(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월13일
(11) 등록번호 10-1638859
(24) 등록일자 2016년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/00* (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01) *A23K 1/16* (2006.01)
A61K 35/741 (2014.01) *C12R 1/465* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0028930
(22) 출원일자 2016년03월10일
심사청구일자 2016년03월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080014242 A
KR1020020014561 A
KR101467990 B1
US04713331 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
류지훈
서울특별시 용산구 이촌로 201 202동 1502호 (이촌동,한가람아파트)
김범석
서울특별시 용산구 회나무로42길 39-17 SOD 10차 303호 (이태원동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

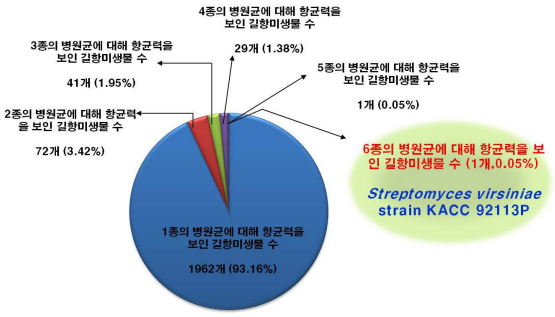
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P) 및 이를 포함하는 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 스트렙토마이세스 속의 신규 균주에 관한 것으로, 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P) 및 이를 포함하는 조성물은 다양한 병원성 미생물의 활성을 동시에 억제함으로써 생물학적 제제로 사용될 경우 식품, 농업, 환경 산업 등에 넓게 적용시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23K 10/16 (2016.05)
A23K 20/00 (2016.05)
A61K 35/741 (2013.01)
C12R 1/465 (2013.01)
(72) 발명자
방지현
서울특별시 성동구 행당로 79 121동 703호 (행당동,대림아파트)
권려려
서울특별시 성북구 안암동5가 고려대학교안암캠퍼스(자연계) 생명과학관(동관) 417호
이예리
서울특별시 양천구 목동서로 130 413동 206호 (목동,목동4단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A2A2A01068475
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 (재)한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 식중독균 제어를 위한 길항미생물 기반 향균표면의 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 스타필로코커스 아레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*) 및 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*)의 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 갖는 수탁번호 KACC 92113P의 스트렙토마이세스 버지나에{*Streptomyces virginiae*} 균주.

청구항 2

제1항의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P), 이의 배양물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 스타필로코커스 아레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*) 및 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 병원성 미생물에 대한 항균용 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P), 이의 배양물 또는 이의 추출물을 포함하는 사료 또는 사료 첨가제 조성물.

청구항 5

제1항의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P), 이의 배양물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 스타필로코커스 아레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*) 및 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 병원성 미생물에 대한 생물학적 방제제.

청구항 6

제5항의 방제제를 가축, 수생 생물, 축사, 양어장 또는 그 부근에 처리하는 단계를 포함하고,

대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 스타필로코커스 아레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*) 및 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 병원성 미생물에 대한 병원성 미생물의 활성 억제 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P), 이의 배양물 또는 이의 추출물을 포함하고,

아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*) 및 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*)으로 이루어진

군에서 선택된 하나 이상의 병원성 미생물에 의한 이삭 마름병 방제제.

청구항 9

제8항의 방제제를 식물에 처리하는 단계를 포함하고,

아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*) 및 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 병원성 미생물에 대한 병원성 미생물의 활성 억제 방법.

청구항 10

제1항의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 포함하고,

식중독, 장염, 유선염, 부종성 피부염, 관절염, 뇌염, 패혈증, 수생동물의 꼬리지느러미 썩음병 및 변색증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의, 가축의 병원성 미생물에 의한 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다양한 병원성 미생물에 대해 항균 활성을 나타내는 신규 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P), 이를 포함하는 조성물 및 이를 이용한 병원성 미생물의 활성 억제 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* spp.) 균주는 그람 양성균으로 주로 토양에 서식하고 있는 방선균의 한 속이다. 상기 균주는 필라멘트형 균사를 형성하고 그 끝에 포자를 만들어 증식하는 것으로, 형태학적으로 진균류와 매우 비슷하다. 또한, 스트렙토마이세스 속 균주는 토양의 셀룰로오스(비특허문헌 1 내지 3)나 리그닌(비특허문헌 4)의 분해에 관여하고, 항균 물질을 생성하여 병원성 곰팡이, 세균, 바이러스의 생육을 억제하는 작용을 한다고 알려져 있다(비특허문헌 5).

[0003] 방선균이 생산하는 10,000 종류가 넘는 항균물질 중 70% 이상이 스트렙토마이세스 속이 생산하는 항균물질이며, 스트렙토마이세스 속 균주는 다양한 산업분야에서 매우 중요한 역할을 한다. 주로 의약분야에서 상업적으로 활용되고 있는 항생물질 중 75%, 농업분야에서 활용되고 있는 항생물질 중 60% 정도가 이 균에 의해 생산되고 있다. 이 외에도 폐기물 분해처리와 같은 환경산업, 식품의 보존제 및 첨가제로서 식품산업 등에서도 활용될 수 있는 잠재력이 매우 큰 균이다.

[0004] 현재까지 스트렙토마이세스 속이 분비하는 수많은 항균물질이 발굴되어 다양한 산업분야에 활용되고 있지만, 대부분의 연구결과에서 스트렙토마이세스 속이 분비하는 항균물질은 한 두 종류의 특정 병원균에 대해서만 항균효과를 보였다. 또한 식중독 균과 식물 병원균에 대해 동시에 항균 활성인 보인 스트렙토마이세스 속을 발굴한 예는 거의 없었다.

[0005] 따라서 식품, 농업, 환경산업 등에 넓게 적용 가능한 다양한 병원균에 대해 항균효과를 가지는 신규 미생물을 발굴하고 항균 조성물을 획득하는 작업은 계속적으로 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Enger, M.D. and Sleeper, B.P., 1965. Multiple cellulase system from Streptomyces antibioticus. Journal of Bacteriology 89: 23-27.

(비특허문헌 0002) Kluepfel, D., Shareck, F., Mondou, F., Morosoli, R., 1986. Characterization of

cellulase and xylase activities of Streptomyces lividans. Applied Microbiology and Biotechnology 2: 230-234.

(비특허문헌 0003) Spear, L., Gaallagher, J., McHale, L., McHale, A.P., 1993. Production of cellulase and P-glucosidase activities following growth of Streptomyces hygroscopicus on cellulose containing media. Biotechnology Letters 15: 1265-1268.

(비특허문헌 0004) Pometto, A.L. and Crawford, D.L., 1986. Effects of pH on lignin and cellulose degradation by Streptomyces viridosporus. Applied and Environmental Microbiology 52: 246-250.

(비특허문헌 0005) Rifaat H.M. and Kansoh, A.L., 2005. Streptomyces virginiae: Taxonomy, identification and biological activities. Arab Journal of Biotechnology 8: 29-34.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 다양한 병원성 미생물에 대해 항균 활성을 나타내는 신규 균주인 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P), 이를 포함하는 조성물 및 이를 이용한 병원성 미생물의 활성 억제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 이에, 본 발명자들은 토양, 식품, 식품접촉표면으로부터 2,106개의 미생물을 분리하였고 이 미생물 중 다양한 병원성 미생물에 대한 우수한 항균 활성을 나타내는 균주를 찾고자 노력한 결과, 신규한 스트렙토마이세스 속 균주인 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 분리, 동정하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 버지나에(*Streptomyces virginiae*) 균주(KACC 92113P)는 토양 유래의 스트렙토마이세스 버지나에 신규 균주이다. 비록 본 발명에서의 스트렙토마이세스 버지나에 균주는 토양으로부터 분리, 동정하기는 했으나, 입수 경로가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0010] 본 발명에의 실시예를 통해 분리된 다양한 병원성 미생물에 대해 우수한 항균 효과를 나타내는 미생물의 동정 및 분류를 위한 16S rRNA 염기서열 분석 결과, SEQ ID NO: 1의 핵산서열을 갖는 것으로 나타났다. 또한, 분석 결과, 상기 균주는 도 3의 트리에서 볼 수 있는 바와 같이, 스트렙토마이세스 버지나에와 가장 높은 분자계통학적 유연 관계를 보였다.

[0011] 따라서, SEQ ID NO: 1의 16S rRNA 염기서열을 갖는 본 발명의 미생물을 스트렙토마이세스 버지나에(*Streptomyces virginiae*) 균주로 명명하였으며, 미생물보존센터에 2015년 12월 28일자로 기탁하였다(수탁번호 KACC 92113P).

[0012] 본 발명의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)는 식중독 균과 식물 병원균에 대해 동시에 항균 활성을 나타냄으로써, 상기 균주를 포함하는 조성물은 생물학적 제제로써 사용되어 식품, 농업, 환경 산업 등에 넓게 적용시킬 수 있다.

[0013] 하기 실시예에서는, 본 발명의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)가 6종의 병원성 미생물에 대해 동시에 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 일반적인 스트렙토마이세스 속 균주가 분비하는 항균 물질이 1~2종류의 특정 병원균에 대해서만 활성을 보이는 것과 비교하여, 동시에 6종류의 병원성 미생물에 대해 항균 활성을 나타내는 것은 본 발명의 균주가 뛰어난 항균 활성을 나타내는 것임을 알 수 있었다.

[0014] 그러므로, 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)는 다양한 병원성 미생물에 대한 항균성 물질로서 가축, 수생동물, 축사, 양어장 등에서 병원성 미생물의 활성 억제의 용도를 위해 다양하게 활용될 수 있다.

[0015] 이에 본 발명의 한 구체예에서는, 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)는 생균체 또는 사균체로서 존재할 수 있으며, 또한 건조 또는 동결건조된 형태로 존재할 수도 있다. 다양한 조성물 내에 포함시키기 적합한 균주의 형태 및 제제화 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 추출물, 배양물, 농축물 등의 형태로 포

함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 한 구체예에서는 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에 따른 항균용 조성물은 식중독 균 및 식물 병원균을 포함하는 병원성 미생물에 대해 항균 활성을 나타낸다. 상기 식중독 균은 대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 스타필로코커스 아레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 및 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)을 포함할 수 있고, 상기 식물 병원균은 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*) 및 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*)을 포함할 수 있다.

[0019] 상기 대장균 O157:H7은 가축, 특히 송아지에게 장염을 유발할 수 있고, 스타필로코커스 아레우스는 젖소와 염소류에게 유선염을 유발할 수 있으며, 닭에게 부종성 피부염과 관절염을 유발할 수 있다. 리스테리아 모노사이토제네스는 감염될 경우 반추동물에게 뇌염, 유산, 패혈증을 유발할 수 있고, 비브리오 파라헤몰리티쿠스는 어류(*Aphanius iberus*)에게 꼬리 썩음병과 새우, 전복 등의 수생동물에게 변색증을 유발할 수 있다. 또한, 아스퍼질러스 플라버스는 옥수수에서 이삭 마름병을 유발할 수 있고, 푸사리움 그라미네아룸은 밀, 보리와 같은 작은 크기의 곡류에서 이삭 마름병을 유발할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히, 아스퍼질러스 플라버스와 푸사리움 그라미네아룸은 곡류에 각각 아플라톡신(aflatoxin)과 트리코테센(Trichothecenes)이라는 곰팡이 독소를 형성할 수 있는데, 이 곰팡이 독소가 형성된 곡류를 동물이 섭취했을 경우 부종, 소화불량, 간질환, 암, 낙태, 기형 발생 등의 증상을 유발할 수 있다.

[0020] 따라서, 상기 조성물은 동물 또는 식물의 병원성 미생물의 감염에 의한 질환의 예방, 치료, 개선에 이용될 수 있으며, 바람직하게는 상기 동물은 소, 말, 돼지와 같은 가축과 어류, 새우, 전복과 같은 수생동물을 포함하며, 식물은 밀, 보리, 귀리, 호밀, 쌀 등의 곡류를 포함한다.

[0022] 또한, 본 발명은 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 포함하는 사료 또는 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[0023] 사료로서 이용될 경우, 상기 조성물은 동물의 식이욕구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기곡분을 포함할 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로 옥수수, 콩곡분, 또는 옥수수/콩곡분믹스로 주로 구성되어 있다.

[0024] 사료 첨가제로서 이용될 경우, 상기 조성물은 20 내지 90% 고농축액이거나 분말 또는 과립 형태로 제조될 수 있다. 상기 사료 첨가제는 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산, 사과산등의 유기산이나 인산 나트륨, 인산 칼륨, 산성 피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 사료로서 이용될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화 될 수 있으며, 통상의 사료성분을 함께 포함할 수 있다.

[0025] 상기 사료 첨가제 및 사료는 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩, 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제 등을 더 포함할 수 있다.

[0026] 상기 사료 첨가제는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑드레싱으로서 또는 이들을 동물사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료 첨가제를 동물사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 약제학적으로 허용가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수전분, 락토오스, 수크로오스, 콩플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탑 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀젼제, 또는 용액제의 제형일 수 있다.

[0027] 또한, 상기 사료 및 사료 첨가제는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액촉진제 등을 함유할 수 있다. 상기 사료 첨가제는 침주, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 사료 또는 사료 첨가제는 포유류, 가금류 및 수생동물을 포함하는 다수의 동물식이에 적용할 수

있다.

[0029] 상기 포유류로서 돼지, 소, 양, 염소, 실험용 설치동물 및 실험용 설치동물뿐만 아니라, 애완동물(예: 개, 고양이) 등에게 사용할 수 있으며, 상기 가금류로서 닭, 칠면조, 오리, 거위, 꿩, 및 메추라기 등에도 사용할 수 있고, 수생동물로서 이베리안 투스캅(종명: *Aphanius iberus*) 등의 어류, 새우, 전복 등에도 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 또한, 본 발명은 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 포함하는 생물학적 방제제를 제공한다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 방제제에 사용되는 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)는 임의의 다른 성분을 전혀 첨가하지 않고 그대로 사용할 수 있다. 필요에 따라, 고체 담체 또는 액체 담체 등의 임의의 각종 담체와 합하여 제조된 조성물, 또는 첨가제 등의 제제용 보조제를 첨가하여, 균주 또는 물질을 수화제, 용액제, 현탁제, 과립제, 분제, 마이크로캡슐제 등으로 제제화하여 수득된 제형물을 사용할 수 있다. 상기 제제는 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 약 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니나 제제 1g 당 약 10^3 내지 10^{10} CFU의 상기 균주를 포함할 수 있다.

[0033] 제제화에 사용되는 고체 담체로는 예를 들어, 미네랄 분말(예, 카올린클레이, 벤토나이트, 규조토, 합성 함수산화규소, 탈크, 석영, 버미큘라이트, 펄라이트 등), 무기염(예, 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 우레아 및 염화암모늄 등), 유기분말(소맥분, 대두분, 밀기울, 키틴, 쌀겨, 탈지분유 및 전지분유 등), 활성탄 및 탄산칼슘 등을 들 수 있다. 액체 담체로는, 예를 들어 물, 글리세롤, 식물유(예, 대두유 및 유채씨유), 액체 동물유(예, 어유), 에틸렌글리콜, 폴리(에틸렌글리콜), 프로필렌글리콜 및 폴리(프로필렌글리콜) 등을 들 수 있다.

[0034] 제제용 보조제로는, 예를 들어 카제인, 젤라틴, 다당류(예, 전분가루, 아라비아고무, 셀룰로오스 유도체 및 알긴산), 리그닌 유도체, 벤토나이트, 당류, 식물유, 광물유, 합성 수용성 고분자(예, 폴리(비닐알콜), 폴리(아크릴산) 등), 프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜 등의 동결 방지제; 실리콘계 화합물 등의 소포제; 천연 다당류(예, 잔탄검 등), 무기물(예, 알루미늄 및 벤토나이트 등), 합성 수용성 고분자(예, 폴리(아크릴산) 등) 등의 증점제 등을 들 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 방제제는 살충제, 살선충제, 살진드기제, 살진균제, 살균제, 제초제, 식물 생장 조절제, 전착제, 비료, 미생물 재료, 토양 개량제 등과 혼합하여 사용하거나, 또는 혼합하지 않고 동시에 사용할 수도 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 생물학적 방제제를 가축, 수생동물, 축사 또는 그 부근에 처리하는 단계를 포함하는, 병원성 미생물의 활성 억제 방법을 제공한다.

[0037] 본 발명에 따른 병원성 미생물의 활성 억제 방법은 가축, 수생동물, 축사 또는 그 부근에 직접 처리하거나 바이오 필름을 형성시켜 처리하는 단계를 모두 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 생물학적 방제제를 사료에 첨가하여 가축 또는 수생동물에게 급여하거나, 축사, 양어장 또는 그 부근에 살포함으로써 가축 또는 수생동물에 감염을 일으킬 수 있는 병원성 미생물의 활성을 억제시키는 방법과 축사, 양어장 및 그 부근환경에 상기 생물학적 방제제를 부착하거나 바이오 필름 형성을 유도하여 병원균에 대해 항균성을 부여하는 방법 등을 포함할 수 있다. 상기 양어장의 경우, 양어장 내의 물에 본 발명에 따른 생물학적 방제제를 직접 섞는 방법을 통해 병원성 미생물의 활성을 억제시킬 수 있다.

[0038] 상기 병원성 미생물은 대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 스타필로코커스 아레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 및 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0039] 앞서 설명한 바와 같이, 상기 병원성 미생물의 활성을 억제시킴으로써, 가금류, 가축 등의 동물에게 유발되는 장염(*E. coli* O157:H7), 유선염(*S. aureus*), 부종성 피부염(*S. aureus*), 관절염(*S. aureus*), 뇌염(*L. monocytogenes*), 패혈증(*L. monocytogenes*), 수생동물에게 유발되는 꼬리 썩음병(*V. parahaemolyticus*), 변색증(*V. parahaemolyticus*) 등의 병원성 미생물에 의한 감염 질환을 예방할 수 있다.

[0041] 본 발명은 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 포함하는 식물용 방제제를 제공한다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 식물용 방제제를 식물에 처리하는 단계를 포함하는 병원성 미생물의 활성 억제 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명에 따른 병원성 미생물의 활성 억제 방법은 상기 식물용 방제제를 식물에 살포함으로써 식물에 감염을

일으킬 수 있는 병원성 미생물의 활성을 억제시킬 수 있다.

[0044] 상기 병원성 미생물은 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*) 및 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0045] 앞서 설명한 바와 같이, 상기 병원성 미생물의 활성을 억제시킴으로써 밀, 보리, 귀리, 호밀, 쌀 등의 곡류에서 이삭마름병을 예방할 수 있다. 또한 상기 병원성 미생물의 활성을 억제시킴으로써 아스퍼질러스 플라버스 또는 푸사리움 그라미네아룸에 의해 형성되는 아플라톡신(aflatoxin) 또는 트리코테센(Trichothecenes)의 곰팡이 독소 역시 예방할 수 있다.

[0046] 본 발명은 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 포함하는 병원성 미생물에 의한 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0047] 본 발명에 따른 조성물은 가금류, 가축 등의 동물에게 장염(*E. coli* 0157:H7), 유선염(*S. aureus*), 부종성 피부염(*S. aureus*), 관절염(*S. aureus*), 뇌염(*L. monocytogenes*), 패혈증(*L. monocytogenes*)과, 수생동물의 꼬리 썩음병(*V. parahaemolyticus*), 변색증(*V. parahaemolyticus*) 등의 병원성 미생물에 의한 감염 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0048] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 활용될 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0049] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0050] 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연당, 옥수수감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐아세테이트, 소듐 클로라이드등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0051] 나아가 해당 분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)는 다양한 병원성 미생물에 대해 동시에 항균 활성을 나타내므로 상기 균주를 포함하는 조성물은 생물학적 제제로써 사용되어 식품, 농업, 환경 산업 등에 넓게 적용시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 토양, 식품, 식품접촉표면에서 분리한 2,106개 미생물들 중 6개의 병원균에 대하여 동시에 항균력을 보인 미생물들의 현황을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 균주가 병원성 미생물 6종에 대해 항균 활성을 나타냄을 저해환의 형성을 통해 나타낸 결과이다.

도 3은 본 발명의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)의 분자계통학적 유연 관계를 보여주는 트리이다.

도 4는 본 발명의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)를 ISP 배지에서 14일 동안 배양한 결과이다.

도 5는 본 발명의 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P)의 형태를 SEM을 통해 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0056] **[실시예 1] 토양, 식품, 식품접촉표면에서 분리한 미생물의 항균 활성 확인**

[0057] 2,106개의 다른 형태의 콜로니를 가지는 미생물들을 토양 샘플(1,691개), 식품 샘플(310개), 식품접촉표면(105개)에서 확보하였다. 토양에서 분리한 미생물의 단일 콜로니를 백금이를 이용하여 Bennett's agar에 획선 도말하고 25° C 배양기에서 총 6일 동안 배양하였다. 3일 동안 배양한 후, 균주가 잘 자랐는지 확인하고 잘 자라지 못한 균주는 멸균면봉을 이용하여 2차 획선 도말한 후 배양하였다. 배양 6일 후 콜로니가 자라면 약 1~5개의 단일 콜로니를 작은 사이즈의 구슬이 포함된 10ml의 TSB에 접종하여 약 200rpm으로 25° C에서 3일 동안 진탕 배양하였다. 3일 동안 진탕 배양한 후, 이 토양 미생물들을 TSA에 점접종(10㎕)하고 15분-30분 동안 층류 생물안전 캐비닛 후드(laminar flow biosafety cabinet hood)에서 건조 한 후 25° C 배양기에서 24시간 동안 정치 배양하였다.

[0058] 식품과 식품접촉표면에서 분리한 미생물의 단일 콜로니를 10ml의 TSB에 접종하여 25° C 배양기에서 24시간 간격으로 세번 계대배양 하였다. 10ml의 TSB에서 배양한 미생물을 TSA에 각각 10㎕씩 점접종하고 층류 생물안전 캐비닛 후드(laminar flow biosafety cabinet hood)에서 15분-30분 동안 건조한 후, 25° C 배양기에서 24시간 정치 배양하였다.

[0059] 토양에서 분리한 미생물의 경우 점접종 3일 배양 후, 식품에서 분리한 미생물의 경우는 점접종 24시간 배양 후, 45° C로 유지한 TSA(*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*를 위해), MA(*V. parahaemolyticus*를 위해), PDA(*A. flavus*, *F. graminearum*를 위해) 99ml이 1ml의 각각의 병원성 미생물(10^7 CFU/ml)과 혼합하여 10^5 CFU/ml의 균을 포함하는 100ml의 agar를 준비하였다. 각각의 병원성 미생물이 혼합된 agar를 균주가 자란 TSA에 10ml씩 분주하였다. 이 agar plate를 층류 생물안전 캐비닛 후드(laminar flow biosafety cabinet hood)에서 30분 동안 건조하고, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*는 37° C에서 24시간, *V. parahaemolyticus*, *F. graminearum*은 25° C에서 48시간, *A. flavus*는 30° C에서 48시간 동안 배양한 후, 토양, 식품, 식품접촉표면에서 분리한 2,106개의 미생물 중 여러 병원성 미생물들에 대해 동시에 항균 효과를 나타내는 미생물의 개수를 세어 도 1에서 확인하였고, 저해환의 크기를 확인하여 그 결과를 도 2에서 분석하였다.

[0061] 도 1에서 보는 바와 같이 토양, 식품, 식품접촉표면에서 분리한 2,106개의 미생물 중 6종류의 병원균에 대해 항균력을 보인 균주는 1개(0.05%)뿐이었다. 대부분의 분리 미생물(1,962개, 93.16%)은 1종의 병원균에 대해서만 항균력을 보였고, 72개(3.42%)의 분리 미생물이 2종의 병원균, 41개(1.95%)의 분리 미생물이 3종의 병원균, 29개(1.38%)의 분리 미생물이 4종의 병원균에 대해 항균력을 나타냈었다. 5종류의 병원균에 대해 항균력을 보인 분리 미생물도 역시 1개(0.05%) 있었다.

[0062] 또한, 도 2에서 보는 바와 같이, 6종의 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 저해환의 형성 유무로 판단했을 때, 본 발명에 따른 균주는 6종의 병원성 미생물에 대해 모두 항균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0064] **[실시예 2] 스트렙토마이세스 버지나에 균주 KACC 92113P의 동정**

[0065] 6종류의 병원성 미생물에 대해 항균력을 보인 길항 미생물을 Bennett's agar에 획선 도말하여 25℃에서 3일 동안 정치 배양한 뒤, 16S rRNA 유전자 서열 분석을 의뢰한 결과, SEQ ID NO: 1의 핵산서열을 갖는 것으로 나타났다. 16S rRNA 유전자 서열정보를 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)의 blast 분석을 통해 균을 동정하였다. 동정 결과 이 미생물은 *Streptomyces* spp.일 가능성이 99%인 것으로 확인되었다.

[0067] 이 *Streptomyces* spp.의 종명을 확인하기 위하여, 먼저 계통도(phylogenetic tree)를 그려 분석하였다. 계통도는 분석된 16S rRNA 유전자 서열정보를 Mega software(version 5.05)의 neighbor-joining 방법으로 도시한 도 3의 트리에서 볼 수 있는 바와 같이, *S. virginiae* strain NBRC 3729의 유전자 서열정보와 유사한 것으로 확인

되어 스트렙토마이세스 버지나에와 가장 높은 분자계통학적 유연 관계를 보였다.

[0069] **[실시예 3] 스트렙토마이세스 버지나에 균주(KACC 92113P) 특성 확인**

[0070] 이 *Streptomyces* spp.의 배양상 특성이 *S. virginiae*에 가까운지를 확인하기 위하여 International Streptomyces project medium(ISP; medium 1-6)을 이용하여 확인한 배양 특성을 표 1과 도 4에 나타내었다. SEM을 이용하여 그 형태를 도 5에서 확인하였다.

표 1

[0071]

배지	배양상 특성			
	기균사 (Aerial mycelium)	기저균사체(Substrate mycelium)	가용성 색소(Soluble pigment)	생장 여부(Growth)
ISP1 (Trypton-yeast extract agar)	흰색(White)	노란빛갈색(Yellowish brown)	없음(None)	잘 자람(Good)
ISP2 (Yeast-malt extract agar)	회색(Gray)	노란색(Yellow)	없음(None)	잘 자람(Good)
ISP3 (Oatmeal agar)	회색(Gray)	노란색(Yellow)	없음(None)	잘 자람(Good)
ISP4 (Inorganic salts starch agar)	회색(Gray)	노란색(Yellow)	없음(None)	잘 자람(Good)
ISP5 (Glycerol asparagines agar)	회색(Gray)	노란색(Yellow)	없음(None)	잘 자람(Good)
ISP6 (Peptone-yeast extract agar)	없음(None)	자줏빛흑색(Purplish-Black)	자줏빛흑색(Purplish-Black)	잘 자람(Good)
Bennett’s agar	회색빛흰색(Grayish white)	노란빛갈색(Yellowish brown)	없음(None)	잘 자람(Good)

[0073] 배양 특성 결과, ISP(medium 2,3,4,5)에서 콜로니의 색이 회색이며, 콜로니 뒷면의 색이 노란색(몇몇 콜로니 뒷면의 색은 회색을 띰)이고 색소를 형성하지 않는 특징이 문헌 1(Whitman, W. et al., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology:Vol.5(2012), second ed., Springer New York, Dordrecht Heidelberg, London)와 문헌 2(Boeck et al., The Journal of Antibiotics 38, 1-8(1984))에 기록되어 있는 *S. virginiae*의 배양상 특성과 유사하여 스트렙토마이세스 버지나에(*S. virginiae*)로 명명하였다.

수탁번호

[0074]

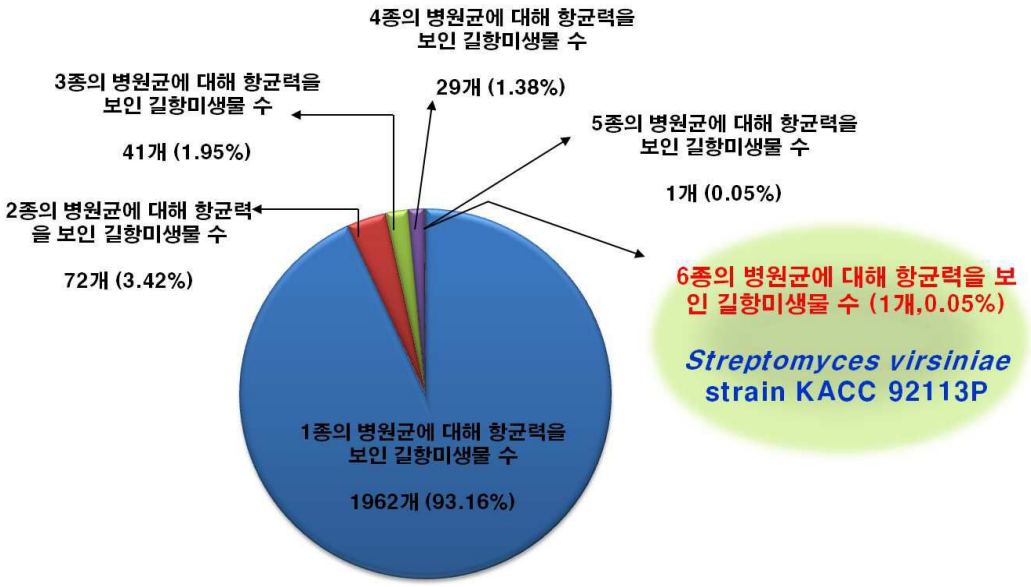
기탁기관명 : 국립농업과학원(국내)

수탁번호 : KACC92113P

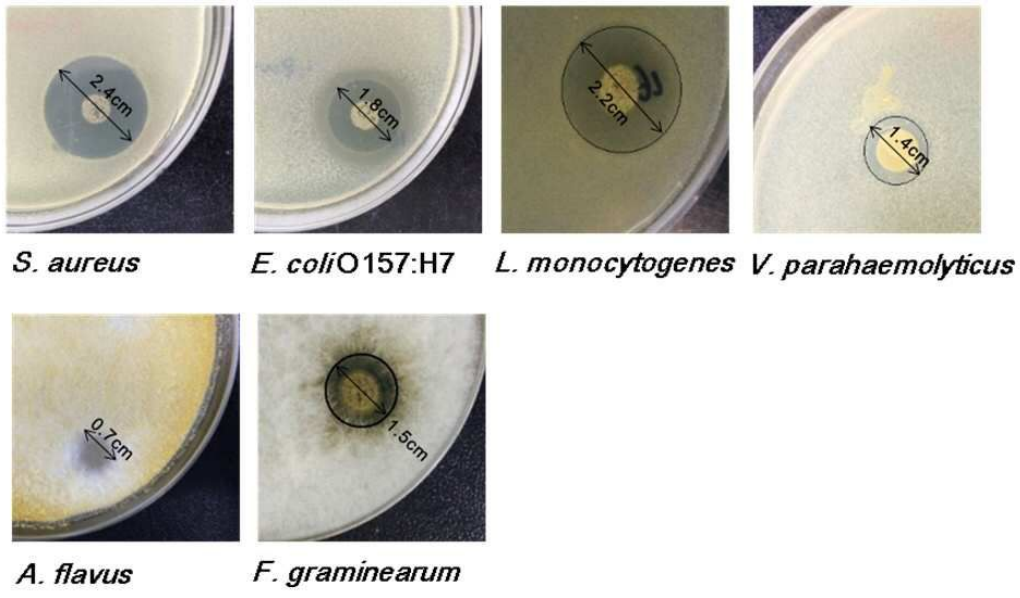
수탁일자 : 20151203

도면

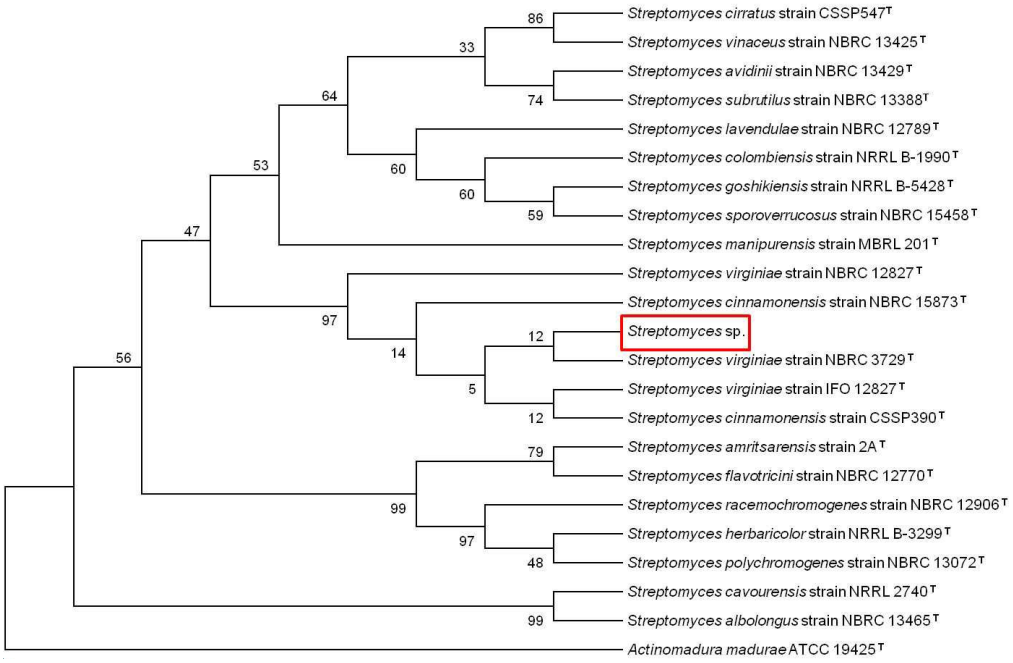
도면1


4종의 병원균에 대해 항균력을 보인 길항미생물 수
29개 (1.38%)
3종의 병원균에 대해 항균력을 보인 길항미생물 수
41개 (1.95%)
5종의 병원균에 대해 항균력을 보인 길항미생물 수
1개 (0.05%)
2종의 병원균에 대해 항균력을 보인 길항미생물 수
72개 (3.42%)
6종의 병원균에 대해 항균력을 보인 길항미생물 수 (1개,0.05%)
Streptomyces virsiniae strain KACC 92113P
1종의 병원균에 대해 항균력을 보인 길항미생물 수
1962개 (93.16%)

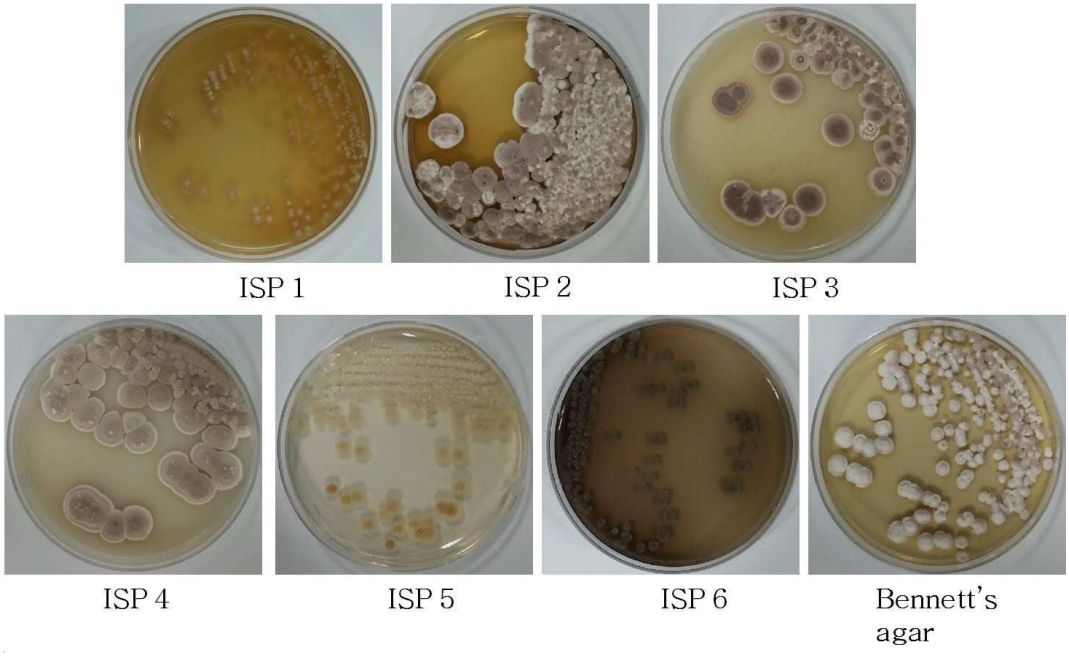
도면2


2.4cm
1.8cm
2.2cm
1.4cm
S. aureus
E. coliO157:H7
L. monocytogenes
V. parahaemolyticus
0.7cm
1.5cm
A. flavus
F. graminearum

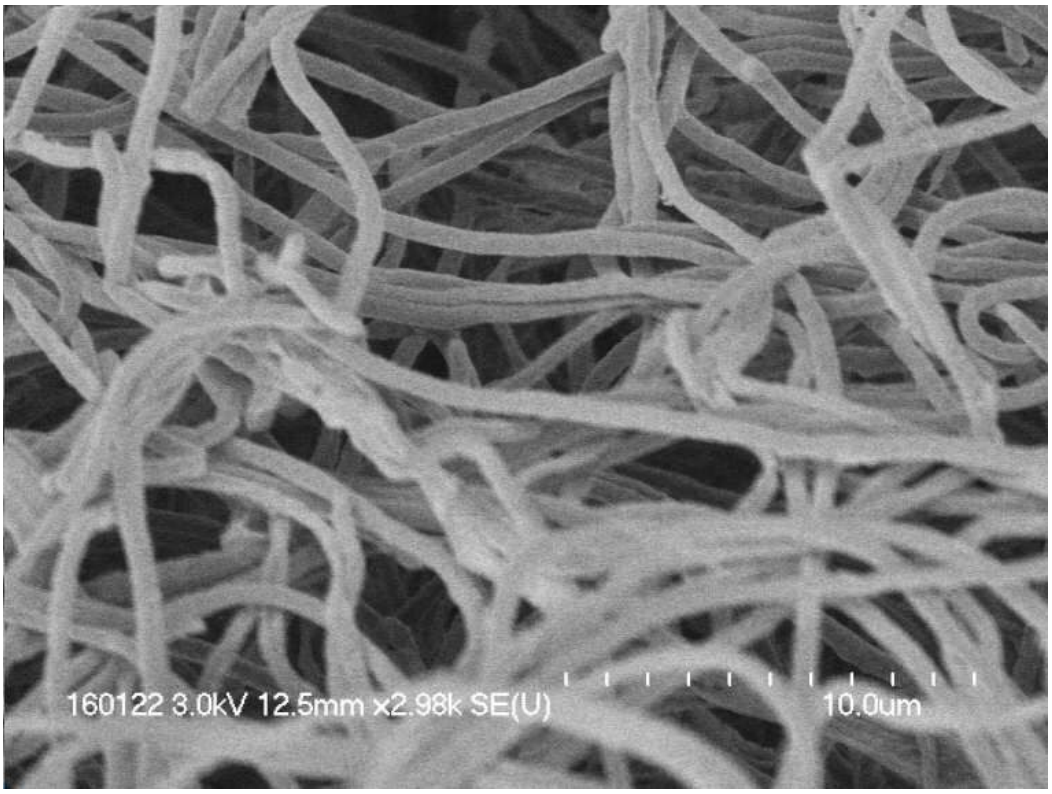
도면3


Streptomyces cirratus strain CSSP547T
Streptomyces vinaceus strain NBRC 13425T
Streptomyces avidinii strain NBRC 13429T
Streptomyces subrutilus strain NBRC 13388T
Streptomyces lavendulae strain NBRC 12789T
Streptomyces colombiensis strain NRRL B-1990T
Streptomyces goshikiensis strain NRRL B-5428T
Streptomyces sporoverrucosus strain NBRC 15458T
Streptomyces manipurensis strain MBRL 201T
Streptomyces virginiae strain NBRC 12827T
Streptomyces cinnamonensis strain NBRC 15873T
Streptomyces sp.
Streptomyces virginiae strain NBRC 3729T
Streptomyces virginiae strain IFO 12827T
Streptomyces cinnamonensis strain CSSP390T
Streptomyces amritsarensis strain 2AT
Streptomyces flavotricini strain NBRC 12770T
Streptomyces racemochromogenes strain NBRC 12906T
Streptomyces herbaricolor strain NRRL B-3299T
Streptomyces polychromogenes strain NBRC 13072T
Streptomyces cavourensis strain NRRL 2740T
Streptomyces albolongus strain NBRC 13465T
Actinomadura madurae ATCC 19425T
86
33
74
64
60
60
59
53
47
97
14
12
5
12
56
79
99
97
48
99

도면4


ISP 1
ISP 2
ISP 3
ISP 4
ISP 5
ISP 6
Bennett's agar

도면5



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Streptomyces virginiae strain(KACC 92113P) and composition for comprising the same

<130> P16U13C0091

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1469

<212> RNA

<213> Streptomyces virginiae

<400> 1

ccatgctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gatgaagccc 60

ttcggggtgg attagtggcg aacgggtgag taacacgtgg gcaatctgcc cttcactctg 120

ggacaagccc tggaaacggg gtctaatacc ggataccact cctgcctgca tgggcggggg 180

ttgaaagctc cggcggtgaa ggatgagccc gcggcctatc agcttgttgg tggggtaatg 240

gcctaccaag gcgacgacgg gtagccggcc tgagagggcg accggccaca ctgggactga 300

gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgaaagc 360

ctgatgcagc gacgccgcgt gagggatgac ggccttcggg ttgtaaacct ctttcagcag 420

ggaagaagcg aaagtgacgg tacctgcaga agaagcgccg gctaactacg tgccagcagc 480

cgcggtaata cgtagggcgc aagcgttgtc cggaattatt gggcgtaaag agctcgtagg 540

cggcttgtca cgtcggatgt gaaagcccga ggcttaacct cgggtctgca ttcgatacgg 600

gctagctaga gtgtggtagg ggagatcgga attcctggtg tagcggtgaa atgcgcagat 660

atcaggagga acaccggtgg cgaaggcgga tctctgggcc attactgacg ctgaggagcg 720

aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgttgggaa 780

ctaggtgttg gcgacattcc acgtcgtcgg tgccgcagct aacgcattaa gttccccgcc 840

tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccg cacaagcggc 900

ggagcatgtg gcttaattcg acgcaacgcg aagaacctta ccaaggcttg acatataccg 960

gaaagcatta gagatagtgc ccccccttgtg gtcggtatac aggtggtgca tggctgtcgt 1020

cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tgtcctgtgt 1080

tgccagcatg cccttcgggg tgatggggac tcacaggaga ccgccggggt caactcggag 1140

gaaggtgggg acgacgtcaa gtcatcatgc cccttatgtc ttgggctgca cacgtgctac 1200

aatggccggt acaatgagct gcgataccgt gaggtggagc gaatctcaaa aagccggtct 1260

cagttcggat tggggtctgc aactcgaccc catgaagtcg gagtcgctag taatcgcaga 1320

tcagcattgc tgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacgtcacga 1380

aagtcggtaa cacccgaagc cggtggccca acccttgtgg agggagctgt cgaaggtggg 1440

actggcgatt gggacgaagt cgtaacagg 1469