

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 12월 23일 (23.12.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/147397 A2

(51) 국제특허분류:

C12N 1/20 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003895

(22) 국제출원일: 2010년 6월 17일 (17.06.2010)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2009-0053845 2009년 6월 17일 (17.06.2009) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 바이오리더스 (BIOLEADERS CORPORATION) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 용산동 559, 305-500 Daejeon (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52, 305-333 Daejeon (KR). 충북대학교산학협력단 (CHUNGBUK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION) [KR/KR]; 충청북도 청주시 흥덕구 개신동 12, 361-763 Chungcheongbuk-do (KR). 국민대학교산학협력단 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 서울특별시 성북구 정릉동 861-1 국민대학교, 136-702 Seoul (KR). 충남대학교산학협력단 (THE INDUSTRY AND ACADEMIC COOPERATION IN CHUNG-NAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 궁동 220번지, 305-764 Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 노종복 (RHO, Jong-Bok) [KR/KR]; 서울특별시 마포구 합정동 399-2 백합연립 102호, 121-886 Seoul (KR). 부하명 (POO, Haryoung) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 지족동 열매마을 아파트 408동 501호, 305-770 Daejeon (KR). 최영기 (CHOI, Young-Ki) [KR/KR]; 충청북도 청주시 흥덕구 산남동 현진에버빌 108동 706호, 361-160 Chungcheongbuk-do (KR). 김철중 (KIM, Chul Joong)

[KR/KR]; 대전광역시 유성구 원촌동 257-18 싸이언스빌 6-102, 305-370 Daejeon (KR). 성문희 (SUNG, Moon-Hee) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 장대동 283-4번지 갤러리빌 2차 902호, 305-308 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11층 5T 국제특허법률사무소, 135-080 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서와 별도로 규칙 13의 2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NEW LACTIC ACID BACTERIA HAVING INHIBITORY EFFECT ON AVIAN INFLUENZA VIRUS INFECTIONS AND COMPOSITION CONTAINING SAME

(54) 발명의 명칭: 조류 인플루엔자 바이러스 감염억제 효과를 가지는 신규 유산균 및 이를 포함하는 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a new microorganism *Weissella cibaria* BLS13, and more specifically, to a Kimchi-derived new microorganism *Weissella cibaria* BLS13 which activates an inhibitory effect on avian influenza viruses, and to uses thereof. According to the present invention, the *Weissella cibaria* BLS13 or a culture medium thereof contains a substance having an anti-viral function, and thus can be used advantageously in feed additives, fermentation products, food and medicine.

(57) 요약서: 본 발명은 신규 미생물 바이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*)BLS13에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 억제 활성을 가지는 김치 유래 신규 미생물 바이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*)BLS13 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바이셀라 시바리아 BLS13 또는 그 배양액은 항바이러스능을 가지는 물질을 포함하고 있어, 사료첨가제, 발효제품, 식품, 의약품 등에 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2010/147397 A2

명세서

발명의 명칭: 조류 인플루엔자 바이러스 감염억제 효과를 가지는 신규 유산균 및 이를 포함하는 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 신규 미생물 바이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*)BLS13에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 억제 활성을 가지는 김치 유래 신규 미생물 바이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*)BLS13 및 그 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 고병원성 조류 인플루엔자에 의한 인체감염은 H5N1, H7N7, 그리고 H9N2형의 바이러스로 밝혀지고 있으며, 팬더믹 인플루엔자 발생시 전 세계적으로 200만명 이상이 사망하는 막대한 인명피해와 사회적인 공황 상태 및 경제마비를 야기할 수 있어 세계보건기구 (WHO)는 국제적인 대책 마련을 촉구하고 있다 (2005년, Global Influenza Preparedness Plan 발표).
- [4] 최근 우리나라에서도 2003년, 2006년 및 2008년 세 차례 조류 인플루엔자의 발생으로 포유동물의 감염가능성의 확인뿐만 아니라 양계산업 및 사회경제에 막대한 경제적 손실을 초래하였으며, 국내에서도 무증상 감염자의 발생으로 팬더믹 인플루엔자 발생에 대한 심각한 사회적 문제점이 야기되고 있는 상황이다.
- [5] 국내 양계산업에 있어서 바이러스성 질병뿐 아니라 세균 감염에 의한 닭 호흡기성 마이코플라스마병, 대장균증, 살모넬라증 등의 세균성 질병도 빈번히 발생하여 세균에 감염되는 경우 면역력의 저하로 다른 질병에도 보다 취약해질 수 있다. 양계농가에서는 조류 질병의 피해를 막기 위해 방역 및 위생관리, 백신이나 항생제를 사용하지만 백신의 접종에 의해 감염을 억제하는 것은 유행하는 바이러스의 형과 백신의 바이러스의 형이 맞지 않으면 효능에 문제점이 있어 백신에 의한 예방에는 한계가 있기 때문에 바이러스에 대한 효과적인 치료법이나 예방책은 아직 미비한 상태이다. 따라서 병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 억제 효과를 가지면서 계군 자체의 면역시스템을 강화시킬 수 있고, 또한 안정성에 문제가 없는 복합적인 치료예방제가 필요한 상황이다.
- [6] 유산균은 혐기 또는 호기의 조건과 상관없이 20 ~ 40°C에서 빠른 속도로 성장할 수 있으며, 배양 과정 중 젖산을 생산하여 산도를 높이고, 과산화수소 등을 생성함으로써 병원성 바이러스 및 미생물의 증식을 억제하여 토양의 병해를 방지한다고 알려져 있다. 또한 각종의 생리활성물질, 항바이러스물질, 항균물질, 항암물질을 생산함으로써 자기방어능력을 향상시키며, 가축의 경우 장내

미생물의 안정화, 사료 효율증가, 내병성의 증가 효과를 나타낸다. 그러나, 유산균을 산업적으로 올바르게 사용하기 위해서는 일반적으로 긍정적인 효과의 나열에 의한 판단보다는 사용용도가 무엇이며 용도에 적합한 특성이 무엇인지를 과학적인 입장에서 명확하게 이해하고 평가하는 절차를 반드시 거쳐야 한다. 이와 같은 절차를 통해서만이 제품의 균일성과 효과의 재현성을 보장할 수 있기 때문이다.

- [7] 이에, 본 발명자들은 김치 유래의 유산균 150 종에 대하여 조류 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는데 사용할 수 있는 유산균을 분리하기 위해 예의 노력한 결과, 신규 유산균인 바이셀라 시바리아 BLS13을 선별하였고, 상기 균주의 배양액 성분에 의해 조류 인플루엔자 바이러스의 성장이 저해되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[8]

[9] 발명의 요약

- [10] 본 발명의 목적은 항바이러스능을 가지는 신규 미생물 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP를 제공하는데 있다.

- [11] 본 발명의 다른 목적은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 사료용 조성물, 약제학적 조성물, 건강보조제, 발효식품 및 식품첨가물을 제공하는데 있다.

- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 동물에 급여하는 것을 특징으로 하는 동물에서 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공하는데 있다.

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바이셀라 시바리아 (*Weissella cibaria*) BLS13 KCTC11516BP를 제공한다.

- [14] 또한, 본 발명은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 항바이러스용 조성물을 제공한다.

- [15] 또한, 본 발명은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

- [16] 또한, 본 발명은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 건강보조제를 제공한다.

- [17] 또한, 본 발명은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 발효식품을 제공한다.

- [18] 또한, 본 발명은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 식품첨가용 조성물을 제공한다.

- [19] 또한, 본 발명은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 사료첨가제를 제공한다.

- [20] 또한, 본 발명은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 배양액을 동물에 급여하는 것을 특징으로 하는 동물에서 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공한다.

- [21] 본 발명의 다른 특징 및 구현에는 다음의 상세한 설명 및 첨부한 특허청구범위로부터 더욱 명백해 질 것이다.
- [22]
- [23] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현에
- [24] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [25] 일 관점에서, 본 발명은 신규 미생물 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP에 관한 것이다.
- [26] 본 발명에 따른 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP은 김치에서 분리한 신규 유산균으로, 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석을 실시한 결과, 바이셀라 시바리아로 동정되었으며, 신규한 미생물로 확인되었으며, 2009년 5월 26일자로 한국생물공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하였다.
- [27] 바이셀라 시바리아는 바이셀라(*Weissella*)속에 속하는 그람 양성균으로서 일반적으로 무, 배추 및 오이 등을 소금에 절인 것 또는 이 절인 것을 고추, 마늘, 파, 생강, 젓갈 등의 양념을 버무린 후 젓산 생성에 의해 숙성되어 저온에서 발효된 제품인 김치의 발효 과정에서 출현하는 김치 유산균으로, 본 발명의 바이셀라 시바리아 BLS13은 신규로 분리 동정된 신규 미생물이다.
- [28] 본 발명에 따른 유산균은 조류인플루엔자 바이러스에 대해 높은 저해효능을 나타내어 우수한 항바이러스 효능을 가지며, 본 발명의 일 실시예에서는, 조류인플루엔자 바이러스인 H9N2를 항바이러스 효능을 확인하였다.
- [29] 다른 관점에서, 본 발명은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 항바이러스용 조성물, 인플루엔자 감염 예방용 약제학적 조성물, 인플루엔자 감염 예방용 건강보조제, 발효식품, 식품첨가용 조성물 및 사료첨가제를 제공한다.
- [30] 본 명세서의 용어 '배양액'은 항바이러스활성을 갖는 유효성분을 포함하는 균체를 포함한 배양원액, 균체를 제거한 배양 상등액 또는 배양액의 회석액일 수 있다.
- [31] 본 발명의 항바이러스조성물을 제조하기 위해서 본 발명의 바이셀라 시바리아 BLS13은 통상의 액상 또는 고상의 배양기술을 통하여 대량으로 배양할 수 있다. 상기 균주는 또한 제제화 하기 위하여 감압동결건조(Lyophilized), 동결건조, 수화의 상태로 균체를 수거할 수 있다.
- [32] 본 발명의 바이셀라 시바리아 BLS13은 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스작용을 나타낸다.
- [33] 본 발명의 약제학적 조성물은 바이셀라 시바리아 BLS13 또는 그 배양액을

함유한 미생물 제제를 의미하며, 약제학적으로 허용되는 담체기질 또는 영양 성분과 함께 경구 투여, 비경구 투여, 또는 피부 또는 점막에 물리적인 접촉을 통해 투여하거나, 직접적으로 튜브나 카테타를 통해 장에 투여할 수도 있다.

[34] 상기 약제학적 조성물은 타블렛, 캡슐, 인플란트, 좌약, 분말, 용액, 젤, 액상의 균주 현탁액 등으로 제조될 수 있다.

[35] 약제학적 조성물의 투여량은 당해 기술분야에 속하는 전문가에 의해 결정될 수 있고, 제제화 방법, 투여 방식, 투여자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해서도 다양하게 처방될 수 있다.

[36] 본 발명의 발효식품은 냉장, 냉동 또는 장기보관이 가능한 유제품, 예를 들면, 김치, 우유, 분유, 요거트, 케피어(kefir), 아이스크림, 밀크셰이크, 치즈, 크림, 커드, 발효유, 및 우유가 첨가된 발효식품뿐만 아니라 두유, 발효된 곡류제품, 환자식이 및 유아식이 등이 포함될 수 있으며, 동물의 사료로서 동물에게 제공할 수도 있다.

[37] 본 발명의 바이셀라 시바리아 BLS13을 배양하여 식품으로 제조하거나 식품에 첨가하기 위해서는 우유 또는 곡류와 같이 녹말을 포함한 기질이 균주 배양에 바람직하다.

[38] 상기 식품 또는 음료로 제조된 영양조성물은 본 발명의 미생물과 더불어 지방, 단백질, 탄수화물, 식이섬유, 무기질 및 비타민 등으로 구성된 하나 이상의 영양 구성물을 포함할 수 있다. 상기 구성물 중에서 특히 식이섬유는 일반적으로 유산균의 분열을 촉진하는 생물발생이전(Prebiotic)기질로 알려져 있기 때문에 체내에 유입되어 장내에서 콜로니의 형성 및 유지에 중요한 역할을 할 수 있으므로 본 발명의 조성물을 섭취한 후에 또는 동시에 투여될 수 있도록 조성물에 포함시킨다.

[39] 본 발명의 약제학적 조성물, 발효식품 또는 식품첨가제는 약제학적으로 필요한 구성물 또는 식품으로 적합한 구성물 외에 인체에 이로운(probiotic) 균주를 추가적으로 포함할 수 있다.

[40] 상기 약제학적 담체, 발효식품 또는 식품첨가제에 포함되는 바이셀라 시바리아 BLS13의 양은 약 10^5 cfu/g 내지 약 10^{11} cfu/g일 수 있으며, 바람직하게는 10^6 cfu/g 내지 약 10^{10} cfu/g, 가장 바람직하게는 10^7 cfu/g 내지 약 10^9 cfu/g이다. 균주를 투여할 경우에는 생균상태로 투여하는 것이 바람직하며, 섭취 전에 사멸시키거나, 감쇄(attenuation)상태로 투여할 수 있다. 또한, 배양 상등액을 사용하여 제조할 경우에는 열처리 과정을 통한 멸균화 과정을 추가적으로 거칠 수 있다. 최소의 효능을 가지는데 필요한 균주량 및 일일 섭취 정도는 섭취자의 신체 또는 건강상태에 따라 달라질 수 있으나 일반적으로 10^6 내지 10^{12} cfu/day가 바람직하며, 가장 바람직하게는 10^7 내지 10^{10} cfu/day 이다. 배양 상등액은 당업계에서 통상적으로 사용되는 기술을 사용하여 항균 효능의 정도를 판단할 수 있으며, 이에 따라 투여량이 결정될 수 있다.

- [41] 또 다른 관점에서, 본 발명은 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 배양액을 동물에 급여하는 것을 특징으로 하는 동물에서 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [42] 본 발명에서, 동물에 급여하는 방법은 사료첨가제 형태이거나, 발효식품, 동결건조제제, 균체 배양액의 회석액 등의 형태 등 당해 기술분야에 속하는 전문가에 의해 결정될 수 있고, 급여 방식, 급여동물의 종류, 나이, 체중, 병적 상태, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해서도 다양하게 급여될 수 있다.
- [43] 본 발명에서, 급여되는 동물은 인간을 제외한 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 가축일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 가금류이다.
- [44]
- [45] 실시예
- [46] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [47] 하기 실시예에서는 바이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP의 H9N2에 대한 항바이러스 활성만을 확인하였으나, 조류인플루엔자 바이러스와 비슷한 기작으로 활동하는 바이러스에 대해서도 억제 효능을 가진다는 것은 당업자에게 있어서 자명할 것이다.
- [48]
- [49] 실시예 1: 김치 유산균의 분리 및 항바이러스용 배양액의 제조
- [50]
- [51] 통상적인 김치 제조방법으로 제조된 김치 11종을 선택하고, 상기 김치를 유산균 분리 김치시료로 사용하였다. 상기 김치시료를 0.85% 식염수로 10배 희석하여 1 ml씩 MRS 아가 배지(MRS 아가, 디프코(Difco); 박토펙톤 10 g, 소고기추출물 10 g, 효모추출물 5 g, 글루코스 20 g, 트윈 801 g, 구연산 2 g, 제2 인산칼륨 2 g, 초산나트륨 5 g, 황산망간 0.1 g, 황산마그네슘 0.05 g, 아가 15 g/중류수 1 l)에 접종한 후, 유리막대로 도말하였다. 이후, 플레이트를 30°C의 항온 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 생성된 각각의 콜로니를 MRS 아가 배지에 획선 접종하였고, 30°C에서 48시간 동안 배양하여 총 150개의 유산균 콜로니를 분리하였다. 생장된 집락(colony)의 형태, 색깔 등을 기준으로 우세하다고 여겨지는 10 가지의 집락을 구별하여 MRS 배지에 2차 배양하여 분리하고자 하는 균이 단독균주인지를 확인하였다.
- [52] 상기 2차 배양으로부터 단독균주로 선발된 26종의 김치유래 유산균을 50ml의 MRS broth(Difco)에 접종하고, 30°C에서 24시간 동안 정치배양하였다. 상기 배양된 배양액을 6000rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 pH를 6.5로 중화하고 0.22um 필터로 여과하여 유산균 배양액을 제조하였다.

[53]

[54] 실시예 2 : 조류 인플루엔자 바이러스의 분리

[55]

[56] 충청북도 청주시 육거리에 위치한 재래시장의 토종닭에서 채취한 분변을 11일령의 유정란에 접종하여 분리한 A/chicken/Korea/LPM77/06 (H9N2)바이러스를 이용하였다.

[57] 인플루엔자 바이러스의 확인을 위해, Viral RNA 추출은 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Germany)를 사용하였으며, 추출한 RNA를 RT-PCR 방법으로 8개의 segments (HA, NA, M, NS, NP, PA, PB1, PB2) 모두를 증폭하여 유전자분석을 통해 H9N2 바이러스임을 확인하였다.

[58]

[59] 실시예 3 : 선발된 김치 유산균의 조류 인플루엔자 항바이러스능 확인

[60]

[61] 실시예 1에서 선발한 유산균에 대해 다음과 같은 방법으로 항바이러스 효능을 실시하였다. 바이러스는 실시예 2에서 분리한 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 혈청형 바이러스인 A/chicken/Korea/LPM77/06 (H9N2)를 사용하였다. 바이러스 AIV LPM77주를 9~10일령의 SPF 부화란에 배양하여 역가가 최소 $10^{8.0}$ EID₅₀/ml 이상 되도록 증식하며, 증식된 바이러스는 영하 70°C가 유지되는 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 유산균 배양액은 증류수로 각각 10배 희석하여 4°C로 유지한 후 사용하였다.

[62] 10배 희석한 바이러스액(요막강액) 1.0ml를 24ml의 증류수와 섞어 추출물과의 반응용 바이러스를 준비하였다. 10배 희석된 유산균 배양액을 2.5ml씩 시험관에 넣고, 준비된 바이러스액 2.5ml를 넣어 혼합한 다음(총 5ml), 4°C에서 정확히 45분간 반응시키며 도중에 10분마다 잘 흔들어 주었다. 바이러스 증식여부의 판정을 위해 반응이 끝나면 반응액을 PBS를 사용하여 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 및 10^{-6} 로 희석하고 희석배수당 4개의 10일란 발육란에 중화된 반응액 0.2ml를 요막강 내로 접종하였다. 접종 후 37°C에서 5일 동안 배양하며, 매일 검란을 실시하고, 접종 24시간 이내에 죽은 발육란은 사고사로 간주하고 시험성적에서 제외하였다. 접종 24시간 후부터 5일 이내에 죽은 접종란은 모두 4°C에 보관하였다. 접종 5일 후까지 살아남은 모든 발육란과 4°C에 보관된 죽은 접종란으로부터 요막강액을 각각 채취하였고, 혈구응집여부 시험을 실시하여 바이러스 유무를 판단하였다.

[63] 그 결과, 음성 대조군의 바이러스 역가가 $10^{5.0}$ 인데 비하여, 한 균주의 유산균 배양액의 처리 후의 바이러스 역가가 $10^{3.5}$ 가 으로나타나 매우 높은 항바이러스 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다 (표 1).

[64]

[65] 표 1

유산균 배양액의 항바이러스 효능

	처리후의 바이러스 역가 (EID ₅₀)	대조군 대비 바이러스 감소량 (EID ₅₀)
바이셀라 시바리아 BLS13 유산균 배양액	10 ^{3.5}	10 ^{2.0}
대조군 바이러스	10 ^{5.5}	

[66]

[67] 실시예 4 : 바이셀라 시바리아 BLS13의 균주 동정

[68]

[69] 실시예 3에서 바이러스 저항능을 확인한 유산균의 동정을 위하여, 16S rDNA 염기서열 분석을 수행하기 위해 유전자은행(GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov) 상에 등록되어 있는 유산균의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 16S rRNA 코딩 DNA 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하였다.

[70]

[71] 서열번호 1 : 5'-gac ggg tga gta aca cgt gg-3'

[72] 서열번호 2 : 5'-acg ggc ggt gtg tac-3'

[73]

[74] 10⁹ 개의 유산균 균체의 파쇄물을 주형으로 상기 한 쌍의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 1308 bp의 DNA 단편(서열번호 3)을 수득하였으며, 상기 단편을 pGEM-Teasy vector(Promega Co.)에 클로닝 후 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 선별된 유산균은 바이셀라 시바리아(Accession No FJ429987.1), 바이셀라 시바리아(Accession No FJ429985.1) 등과 99% 이상의 상동성을 가지는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스활성을 갖는 유산균주 바이셀라 시바리아 BLS13라 명명하고, 2009년 5월 26 일자로 한국생물공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하였다(KCTC11516BP).

[75]

산업상 이용가능성

[76] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 바이셀라 시바리아 BLS13 또는 그 배양액은 항바이러스능을 가지는 물질을 포함하고 있어, 사료첨가제, 발효제품, 식품, 의약품 등에 유용하게 사용될 수 있다.

[77]

[78] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[79]

서열목록 Free Text

[80] 전자파일 첨부하였음.

[81]

[82]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL REGULATION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : SUNG, Moon-Hee
 559 Yongsan-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-500
 Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Wetzelia cibaria</i> BLS13	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 11516BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on May 20, 2009 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____.	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  LEE, Jung-Suk, Director Date: May 20, 2009

청구범위

- [청구항 1] 마이셀라 시바리아 (*Weissella cibaria*)BLS13 KCTC11516BP.
- [청구항 2] 마이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 항바이러스용 조성물.
- [청구항 3] 마이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 약제학적 조성물.
- [청구항 4] 마이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 건강보조제.
- [청구항 5] 마이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 발효식품.
- [청구항 6] 마이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 식품첨가용 조성물.
- [청구항 7] 마이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 사료첨가제.
- [청구항 8] 마이셀라 시바리아 BLS13 KCTC11516BP 또는 배양액을 동물에 급여하는 것을 특징으로 하는 동물에서 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는 방법.