

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(43) 국제공개일  
2009년 8월 20일 (20.08.2009)

PCT

(10) 국제공개번호  
WO 2009/102143 A2

- (51) 국제특허분류: C12N 1/20 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/000636
- (22) 국제출원일: 2009년 2월 11일 (11.02.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2008-0012264 2008년 2월 11일 (11.02.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): (주) 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 여은동 52, 305-333 Daejeon (KR). 충남대학교 산학협력단 (THE INDUSTRY AND ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 궁동 220, 305-764 Daejeon (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 성문희 (SUNG, Moon-Hee) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 장대동 283-4 번지

갤러리빌 2 차 902 호, 305-308 Daejeon (KR). 김철중 (KIM, Chul Joong) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 신성동 삼성환울아파트 103 동 801 호, 305-707 Daejeon (KR). 성문석 (SUNG, Moon Seok) [KR/KR]; 제주특별시 서귀포시 강정동 177 번지 대림한숲빌라 112-203, 697-801 Jeju-do (KR). 부하령 (POO, Haryoung) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 신성동 대림두레아파트 103 동 1405 호, 305-720 Daejeon (KR). 강윤환 (KANG, Yun Hwan) [KR/KR]; 경상남도 진주시 상봉서동 1068-7, 660-809 Gyeongsangnam-do (KR).

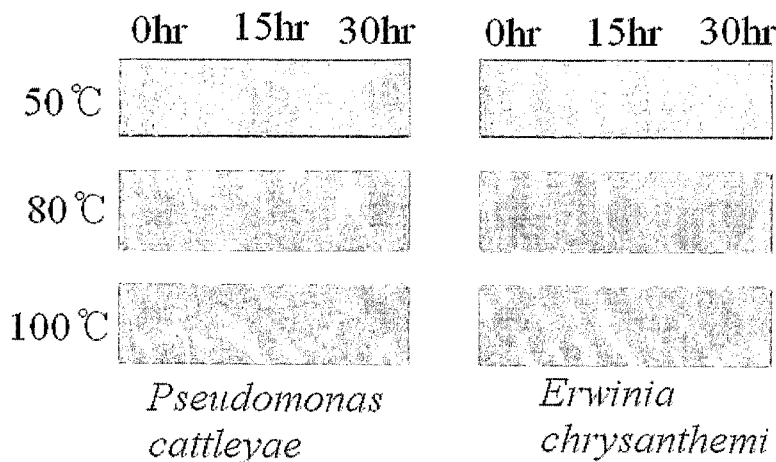
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11 층, Seoul 135-080 (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: KIMCHI-BASED LACTOBACILLUS PLANTARUM BLS41 AND USE THEREOF

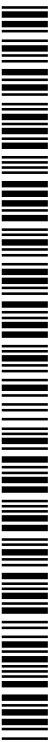
(54) 발명의 명칭: 김치유래 락토바실러스 플란타룸 BLS41 및 그 용도

FIG. 1



(57) Abstract: The present invention relates to Kimchi-based novel *Lactobacillus plantarum* BLS41, and more particularly, to *Lactobacillus plantarum* BLS41 having antifungal and antibacterial activities and to the use thereof. The *Lactobacillus plantarum* BLS41 of the present invention or pathogen growth inhibiting substances produced from the lactic acid bacteria are suitable for use in an environmentally friendly microbial agent and antibiotic free feed.

(57) 요약서: 본 발명은 김치유래 신규 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) BLS41 에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 항진균 및 항균 활성을 가지는 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) BLS41 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸 BLS41 또는 상기 유산균이 생산하는 병원성 균의 성장 억제 물질은 친환경 미생물 제제 및 무항생제 사료의 성분으로 유용하다.



WO 2009/102143 A2



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, 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))

## 명세서

### 김치유래 락토바실러스 플란타룸 BLS41 및 그 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 김치로부터 동정된 신규 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) BLS41에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 항진균 및 항균 활성을 가지는 김치유래 신규 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) BLS41 및 그 용도에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 사상균인 푸자리움 속 (*Fusarium* sp.)의 다수의 분화형은 다양한 숙주작물 (채소, 화훼, 밭작물 등)에 기생하면서 도관병이나 뿌리썩음병을 일으키며, 일부는 도관병과 함께 뿌리, 줄기, 괴경 등의 부패를 동반하기도 한다. 푸자리움의 전염은 내구생존기관인 후막포자를 형성하여 작물 및 관리기구, 토양을 통해 다른 작물이나 밭으로 오염이 된다. 공기전염성 지상부 병해의 경우에는 숙주 작물체의 표면에 병원균을 저해하는 화학물질을 살포함으로써 병원균을 사멸시키거나 감염을 방해하여 방제할 수 있다. 그러나 감염된 후에는 감염부위가 뿌리이며 또한 감염원이 모두 토양 속에 존재하기 때문에, 토피에 살균제를 살포하더라도 토양 심층부에 도달하기 어려워 뿌리 감염을 저지하기가 어렵다.
- [4] 푸자리움의 피해를 막기 위해 여러 가지 제배방법의 변화와 윤작 및 물리적 방제법이 있으며, 생물학적 방제법으로는 대표적으로 작물의 뿌리와 친화성이 높은 미생물 중에서 푸자리움에 대하여 길항성이 높은 균주를 선별하여 증식시킨 후, 종자나 어린 모에 접종시켜 숙주작물의 뿌리에 정착시키거나, 또는 병원성을 가지고 있지 않은 푸자리움과 동일한 근연종 미생물을 일종의 백신으로서 숙주작물의 자른 부위나 뿌리에 접종시켜, 작물 체 내에서 저항성 물질을 생성하도록 하여 푸자리움의 감염을 억제하는 것이다.
- [5] 호접난과 같은 관상용 식물에서 이러한 병증이 발생하게 되면 관상학적 가치가 떨어지게 되므로 관상용 식물 재배업계에서 이러한 식물체 병증은 치명적인 해로 작용한다. 식물에 병증이 일단 발생하게 되면 관리가 잘 되지 않을 경우 잎에 병흔이 남기 때문에 낙엽이 될 때까지 관상학적 가치를 떨어뜨리게 되는 요인으로 작용하므로 식물병은 치료도 중요하지만 병의 예방 또한 중요한 가치가 있다.
- [6] 식물 질병의 발생을 막기 위해서는 동물에 적용되는 주사 또는 복용과 같은 약제의 투여방법과는 다르게 넓은 공간에 농약을 살포해야 하기 때문에 독성이 강할 경우 살포자 뿐만 아니라 살포환경에 노출되는 사람과 동식물에 악영향을 끼칠 수 있다. 이를 예방하기 위해서는 동식물에 무해하면서 식물병의

예방효과가 있는 친환경적이면 생물학적 제제의 개발이 요구되고 있다.

- [7] 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 미생물의 증식을 억제하여 토양의 병해를 방지한다고 알려져 있다. 또한 각종의 생리활성물질, 항균물질, 항암물질을 생산함으로써 식물체의 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.

- [8] 이에, 본 발명자들은 김치 유래의 유산균 150 종에 대하여 관상용 식물 병의 치료 및 예방하는데 사용할 수 있는 유산균을 분리하기 위해 예의 노력한 결과, 유산균인 락토바실러스 플란타룸 BLS41를 선별하고, 상기 균주 및 상기 균주의 배양액에 의해 푸자리움을 함유하는 식물병 유발 진균 및 살모넬라 (*Salmonella*) 등을 함유하는 병원성 균의 성장이 저해됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[9]

[10] 발명의 요약

- [11] 결국, 본 발명의 목적은 항진균 및 항병원성 균 활성을 가지는 김치유래 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)을 제공하는데 있다.

- [12] 본 발명의 다른 목적은 락토바실러스 플란타룸 또는 그 배양물을 포함하는 항진균 제제를 제공하는데 있다.

- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 플란타룸 또는 그 배양물을 포함하는 병원성 균의 감염 억제용 조성물을 제공하는데 있다.

- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 플란타룸 또는 그 배양액을 포함하는 병원성 균의 감염 억제 효능을 가지는 식품을 제공하는데 있다.

- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 플란타룸 또는 그 배양액을 포함하는 병원성 균의 감염 억제 효능을 가지는 사료 첨가제를 제공하는데 있다.

- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 플란타룸을 이용한 진균 또는 병원성 균 감염의 치료 또는 예방 방법을 제공하는데 있다.

- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 진균 또는 병원성 균의 감염을 억제하기 위한 락토바실러스 플란타룸의 용도를 제공하는데 있다.

- [18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항진균 및 항병원성 균의 활성을 가지는 김치유래 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) BLS41 KCTC 11056BP를 제공한다.

- [19] 본 발명은 또한, 락토바실러스 플란타룸 BLS41 KCTC 11056BP 또는 그 배양물을 포함하는 항진균 제제를 제공한다.

- [20] 본 발명은 또한, 락토바실러스 플란타룸 BLS41 KCTC11056BP 또는 그 배양물을 포함하는 병원성 균의 감염 억제용 조성물을 제공한다.
- [21] 본 발명은 또한, 락토바실러스 플란타룸 BLS41 KCTC11056BP 또는 그 배양액을 포함하는 병원성 균의 감염 억제 효능을 가지는 식품을 제공한다.
- [22] 본 발명은 또한, 락토바실러스 플란타룸 BLS41 KCTC11056BP 또는 그 배양액을 포함하는 병원성 균의 감염 억제 효능을 가지는 사료 첨가제를 제공한다.
- [23] 본 발명은 또한, 김치유래 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) BLS41 KCTC 11056BP을 이용한 진균 또는 병원성 균 감염의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, 진균 또는 병원성 균의 감염을 억제하기 위한 김치유래 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) BLS41 KCTC 11056BP의 용도를 제공한다.
- [25] 본 발명의 다른 특징 및 구현에는 다음의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위로부터 더욱 명백해 질 것이다.

[26]

### 도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 배양 상등액의 온도 및 열처리 시간에 따른 항균활성의 변화를 나타낸 것이다.
- [28] 도 2는 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 배양원액, 배양 상등액 및 열처리한 배양액을 병증이 관찰되는 호접난에 분사한 후 얻어지는 식물병에 대한 항균효과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 3은 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) BLS41 및 그의 배양물의 푸자리움 (*Fusarium*)에 대한 항균활성을 나타낸 것이다.
- [30] 도 4는 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) BLS41의 푸자리움 (*Fusarium*)에 대한 항균활성을 그래프로 나타낸 것이다.
- [31] 도 5는 호접란 병원성균 외에 다른 병원성균 (*Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*)에 대한 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 항균효과를 나타낸 것이다.

[32]

### 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현에

- [33] 본 발명은 일 관점에서, 항진균 및 항병원성균 활성을 가지는 김치유래 락토바실러스 플란타룸 BLS41 (KCTC 11056BP)에 관한 것이다.
- [34] 락토바실러스 플란타룸은 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 속에 속하는 그람 양성균으로서 일반적으로 김치(kimchi or sauerkraut), 피클, 올리브절임 및 식물 발효 식품이나 일부 치즈에서 발견되는 유산균으로, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 BLS41은 신규로 분리 동정된 신규 미생물이다.
- [35] 본 발명의 미생물은 김치로부터 분리 동정된 유산균으로서 통상적으로

[36]

병원성이 없는 균으로 알려져 있기 때문에, 생균으로 섭취하더라도 인체에 무해하다는 사실은 당업자에게 자명하다.

- [37] 본 발명의 미생물은 병원성 균 및 진균에 대한 항균, 항진균효과와 아울러 이들 균의 성장저해 활성을 가진다. 상기 항균 및 항진균 활성은 고열에서 안정적인 것을 특징으로 하고, 호접란에서 갈반병과 연부병을 일으키는 원인균인 에위니아 (*Erwinia*) 및 슈도모나스 (*Pseudomonas*)의 성장을 저해하고, 또한, 도관병이나 뿌리썩음병을 일으키는 원인균인 푸자리움 (*Fusarium*)에 대해서도 성장억제 작용을 나타낸다. 특히, 상기 작용은 치료효과보다는 예방효과가 더 우수한 것으로 확인되었다.
- [38] 본 발명은 다른 관점에서, 락토바실러스 플란타룸 BLS41 (KCTC 11056BP) 또는 그 배양물을 함유하는 병원성 균 또는 진균의 성장억제 또는 사멸 효능을 가지는 항진균 제제에 관한 것이다.
- [39] 본 발명의 항진균 제제는 도관병이나 뿌리썩음병을 일으키는 원인균인 푸자리움 (*Fusarium*) 속, 호접란에서 갈반병과 연부병을 일으키는 에위니아 (*Erwinia*) 속 및 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 속 대한 항진균 작용을 나타낸다.
- [40] 본 명세서의 용어 ‘항진균 제제’란 미생물 제제로서 토양 또는 식물체에 사용하였을 때, 제제에 함유되어 있는 특정 유용미생물의 활성에 의한 효과로 인하여 식물재배에 도움이 되는 효능을 가지는 제제를 말한다. 본 발명의 항진균 제제는 생균을 포함하고 있으며, 경우에 따라 균체를 흡착한 담체, 균체의 활성화를 위한 유기영양원, 그 외의 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 항진균 제제의 효능은 유기물 분해촉진, 연작장해 억제, 토양의 이화학성 개선, 토양 미생물성 개선, 작물의 생산성 향상, 작물의 품질향상, 오염물질의 정화, 병충해 예방 등이 있다. 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 BLS41를 이용한 미생물 제제는 식물의 성장강화 및 병충해 예방을 효과를 나타낸다.
- [41] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 BLS41 배양물을 함유하는 항진균 제제는 액상 현탁액, 안정화된 액상 현탁액, 유화된 농축 제제, 캡슐, 수용제 또는 수화제 분말, 액상수화제(aqueous flowables), 입상수화제(dry flowables), 수화제 그레놀 및 수화제 분산 그레놀 등의 상태로 제조될 수 있으며, 상기 미생물 제제의 상태는 당업계에 통상의 지식을 가진 자에 의해 잘 알려져 있다. 또한 본 발명의 균주 또는 배양액은 비료, 영양토 또는 옆면 살포제와 함께 사용될 수 있으며, 이외의 제제 상태는 당업계의 통상의 기술을 가진 자에게는 자명한 것이다.
- [42] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 BLS41을 함유하는 항진균 제제는 벼, 채소류, 과수류, 화훼류, 잔디, 동서양란 등을 재배하는 경우 항균효과를 얻기 위해 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 동서양란 재배 시 항균효과를 얻기 위해 사용할 수 있다.
- [43] 본 발명의 항진균 제제는 토양, 종자, 종묘 또는 식물체에 처리할 수 있으며, 수동적 수단이나, 분사기 또는 경작 시스템을 이용한 기계적인 수단을 살포할 수 있다. 재배 시에 발생할 수 있는 병충해는 발생 시기를 예상하기가 어렵기

때문에 목적하는 재배 상태가 유지되도록 본 발명의 균주를 함유하는 미생물 제제를 사용하기 위해서는 재배 시기 및 재배 환경에 따라 수차례 반복 살포함이 바람직하다. 통상적으로 식물의 성장강화 및 병충해 예방을 위한 유산균의 살포 시기는 5-20일이며, 보다 바람직한 살포 시기는 7-15일이다. 가능하면 병충해에 노출되기 전에 살포하는 것이 매우 중요하다. 항진균 제제의 효과를 얻기 위해 식물체에 사용하는 방법은 당업계의 통상의 기술을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있다.

- [44] 본 발명의 항진균 및 항병원성 균활성은 락토바실러스 플란타룸 BLS41 및 상기 균주로부터 유래한 배양물에서도 동일한 효능을 가진다.
- [45] 본 명세서의 용어 ‘배양물’ 균체를 포함한 배양원액일 수 있으며, 또한 균체를 제거한 배양 상등액 또는 배양물의 희석액일 수 있다. 상기 배양물의 조성은 통상의 유산균 배양에 필요한 성분뿐만 아니라, 유산균 생장에 상승적으로 작용을 하는 성분을 추가적으로 포함할 수 있으며, 이에 따른 조성은 당업계의 통상의 기술을 가진 자에 의하여 용이하게 선택될 수 있다.
- [46] 상기 균주 및 배양물은 농업용 항진균 제제, 병원성 균의 감염 억제용 조성물, 식품 및 동물 사료 첨가제를 함유하는 병원성 균 및 진균의 성장 억제 효능을 가지는 항균 조성물로 제조될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [47] 또한, 본 발명의 항진균 제제, 병원성 균의 감염 억제용 조성물, 식품 및 동물 사료 첨가제는 미생물이 제거된 배양물만을 포함할 수도 있으며, 균체가 혼합되거나, 균체만을 함유하도록 제조할 수 있다.
- [48] 본 발명의 항균조성물을 제조하기 위해서 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 BLS41은 통상의 액상 또는 고상의 배양기술을 통하여 대량으로 배양할 수 있다. 본 발명의 항진균 제제 및 조성물은 상기 균주의 영양세포 또는 포자, 또는 영양세포와 포자의 혼합 상태로 구성될 수 있고, 제제화하기 위하여 감압동결건조(lyophilization), 동결건조, 수화의 상태로 균체를 수거할 수 있다.
- [49] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 BLS41은 식물 병원성 균에 대한 항균작용 외에 또한, 식중독을 유발하는 살모넬라 (*Salmonella*) 속 및 바실러스 (*Bacillus*) 속의 장내 병원성 균에 대해 항균작용을 나타낸다.
- [50] 따라서 본 발명은 또 다른 관점에서, 락토바실러스 플란타룸 BLS41 (KCTC 11056BP) 또는 그 배양물을 함유하는 병원성 균의 감염 억제용 조성물에 관한 것이다.
- [51] 상기 미생물을 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.
- [52] 상기 조성물은 타블렛, 캡슐, 인플란트, 좌약, 분말, 용액, 젤, 액상의 균주 현탁액 등으로 제조될 수 있다. 상기 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.

- [53] 본 발명은 또 다른 관점에서, 락토바실러스 플란타룸 BLS41 (KCTC 11056BP) 또는 그 배양물을 함유하는 병원성 균의 감염 억제 효능을 가지는 식품(또는 건강기능식품)에 관한 것이다.
- [54] 락토바실러스와 같은 유산균은 젖산 발효를 함으로써 식품의 부패를 방지하고, 항균 물질을 분비하여 식중독 균을 억제하는 등 인체에 유익한 균으로 활동한다. 유산균 발효를 이용하여 제조되는 식품으로는 치즈, 버터밀크, 요구르트, 유청(whey) 등이 있으며, 최근에는 유산균 발효에 의한 기능성 요구르트도 널리 시판되고 있다. 또한, 유산균 발효 식품들은 정장제로서의 정제, 과립제제 등으로 제조되어 식품 조성물, 의약품 등으로 시판되고 있다.
- [55] 따라서, 상기 식품에는 냉장, 냉동 또는 장기보관이 가능한 유제품, 예를 들면, 우유, 분유, 요거트, 케피어(kefir), 아이스크림, 밀크셰이크, 치즈, 크림, 커드, 발효유, 및 우유가 첨가된 발효식품뿐만 아니라 두유, 발효된 곡류 제품, 환자식이 및 유아식이 등이 포함될 수 있으며, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 BLS41를 배양하여 식품으로 제조하거나 식품에 첨가하기 위해서는 우유 또는 곡류와 같이 녹말을 포함한 기질이 균주 배양에 바람직하다.
- [56] 본 발명에서, 상기 식품은 본 발명의 미생물과 더불어 지방, 단백질, 탄수화물, 식이섬유, 무기질 및 비타민 등으로 구성된 하나 이상의 건강기능용 조성물 또는 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 포함시킬 수 있다.
- [57] 본 발명은, 또 다른 관점에서 락토바실러스 플란타룸 BLS41 (KCTC 11056BP) 또는 그 배양물을 함유하는 병원성 균의 감염 억제 효능을 가지는 사료 첨가제에 관한 것이다.
- [58] 본 발명의 사료 첨가제는 기존 항생제를 대체하고 유해한 미생물을 억제하여 동물체의 건강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과가 있다. 본 발명의 사료 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 등의 형태로 제조될 수 있다. 상기 사료에 첨가되는 락토락토바실러스 플란타룸 BLS41의 유효량은  $10^6$  개/g 이상이며, 바람직하게는  $10^8$  개/g 이상이다. 발효사료는 여러 가지 미생물군 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 미생물을 혼합하여 제조할 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일리지는 청예사료를 본 발명에 따른 미생물로 발효시킴으로써 제조할 수 있다. 습식발효사료는 음식물 쓰레기 등과 같은 유기물을 수집 및 운반하여 살균과정과 수분조절을 위한 부형제를 일정비율로 혼합한 후, 발효에 적당한

온도에서 24시간 이상 발효하여, 수분함량이 약 70% 포함되도록 조절하여 제조할 수 있다. 발효건조사료는 습식발효사료를 건조과정을 추가로 거쳐 수분함량이 30% 내지 40% 정도 함유되도록 조절하여 제조할 수 있다.

- [59] 본 발명의 항진균 제제, 병원성 균의 감염 억제용 조성물, 식품 및 사료 첨가제는 약제학적으로 필요한 구성물 또는 식품으로 적합한 구성물 외에 인체에 이로운(probiotic) 균주를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [60] 상기 약제학적 담체 또는 식품에 포함되는 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 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, 배양물을 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.

[61]

[62] 실시예

- [63] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[64]

[65] 실시예 1: 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 균주 선별

[66]

- [67] 식물병인 호접난에 병증을 일으키는 병원성 균을 한국농용미생물 보존센터로부터 분양받아 배양한 후 LB 플레이트에 도말봉으로 고루 도말하여 준비하고, 상기 플레이트에 김치로부터 분리한 150여종의 유산균의 배양 상등액을 점적하여 배양하였다. 배양 후 LB 플레이트 상에 클리어존의 생성 여부를 근거로 갈반병과 연부병 균에 대해 항균활성을 가지는 유산균을 1 주를 선별하였다.

- [68] 선별된 유산균의 동정을 위한 16S rDNA 염기서열 분석을 수행하기 위해 유전자은행(GenBank, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 상에 등록되어 있는 유산균의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 16S rRNA 코딩 DNA 부위를 증폭할 수 있는 프라이머(서열번호 1 및 서열번호 2)를 제작하였다.

[69] 서열번호 1: 5'-cag tga cga ctc tgg tat tga-3'

[70] 서열번호 2: 5'-cct aat cat ctg tcc cac ctt-3'

[71] 10<sup>9</sup> 개의 유산균 균체의 파쇄물을 주형으로 상기 한 쌍의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 1439 bp의 DNA 단편을 수득하였으며, 상기 단편을 pGEM-Teasy vector(Promega)에 클로닝 후 염기서열을 분석하였다(서열번호 3). 그 결과, 선별된 유산균은 락토바실러스 플란타룸(Accession No DQ239696.1), 락토바실러스 플란타룸(Accession No AL935261.1) 등과 99% 이상의 상동성을 가지는 것으로 확인되었다.

[72] 이상의 결과로 호접란 병원성 균에 대한 항균활성을 갖는 유산균주 락토바실러스 플란타룸 BLS41라 명명하고, 2006년 12월 26 일자로 KCTC에 기탁하였다(KCTC 11056BP).

[73]

[74] 실시예 2: 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 항균활성

[75]

[76] 실시예 1에서 선별된 락토바실러스 플란타룸 BLS41 (KCTC 11056BP)이 가지는 항균활성의 열안정성을 확인하기 위하여 배양 상등액을 온도별 시간별로 열처리하여 항균활성 변화를 관찰하였다. 식물 병원성 균인 슈도모나스 카틀레아(*Pseudomonascattleyae*)를 도말한 고체배지에 50°C, 80°C, 100°C에서 15분, 30분 열처리 한 락토바실러스 플란타룸 BLS41 배양 상등액을 처리한 결과, 대조균으로 사용한 MRS 배지(1% casein hydrolysate, 1.5% yeast extract, 2% destrose, 0.2% ammonium citrate, 0.5% sodium acetate, 0.01% magnesium sulfate, 0.05% manganese sulfate 및 0.2% dipotassium phosphate)를 점적한 부위에서는 항균활성이 관찰되지 않았으나, 락토바실러스 플란타룸 BLS41 배양액을 dotting한 부위에서는 모두 항균활성이 관찰되었다 (FIG. 1).

[77] 동일한 조건의 실험을 어위니아 크리산테미(*Erwinia chrysanthemii*)를 대상으로 수행했을 경우에도 락토바실러스 플란타룸 BLS41 배양 상등액에 의해 병원성 균의 성장이 저해함을 확인하였다 (FIG. 1). 상기 결과를 근거로 락토바실러스 플란타룸 BLS41 배양액에는 호접란의 두 병원성 균의 성장을 저해하는 열에 안정한 분비성분이 존재하는 것을 확인하였다.

[78]

[79] 실시예 3: 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 식물병 증상의 억제효과

[80]

[81] 락토바실러스 플란타룸 BLS41 배양 원액과 배양 후 균체를 제거한 배양 상등액 및 열처리한 배양 상등액을 병증을 나타내는 호접난에 분무 처리한 후 밀봉하여 그 변화를 관찰하였다.

[82] 그 결과, 배양액을 처리하지 않은 실험대조군은 잎이 마르고 낙엽이 되었지만, 락토바실러스 플란타룸 BLS41 배양 원액과 배양 상등액 및 열처리한 배양 상등액을 처리한 군에서는 병증이 나타난 잎들은 낙엽이 되었지만 더 이상 낙엽이 진전되지 않고 병증이 완화되는 것을 확인할 수 있었다 (FIG. 2).

[83]

[84] 실시예 4: 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 푸자리움(*Fusarium oxysporum*)에 대한 항진균 활성

[85]

[86] 한국 농업 미생물자원 센터로부터 식물병원성 푸자리움(KACC 41090)을 분양받아 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 항진균 활성을 관찰하였다. 96-웰 플레이트에  $2 \times 10^3$ 의 푸자리움을 포함한 PDB 배지 (20% 포테이토 인퓨전 프럼, 2% 박토 텍스트로즈) 50  $\mu$ l씩을 분주하고 락토바실러스 플란타룸 BLS41 배양액을 순차적으로 1/2배씩 희석하여 진균과 혼합하고 37°C에서 16시간을 배양한 후, 배양액을 PDB 고체배지에 도말하여 30°C에서 추가 배양하였다.

[87] 그 결과 MRS 유산균 배양배지를 첨가한 고체배지에서는 푸자리움 콜로니가 발생하였으나, 락토바실러스 플란타룸 BLS41을 첨가한 고체배지에서는 푸자리움 콜로니가 생성되지 않은 것으로 확인됨으로써 락토바실러스 플란타룸 BLS41은 항진균 활성을 가진 것으로 나타났다 (FIG. 3 및 4).

[88]

[89] 실시예 5: 락토바실러스 플란타룸 BLS41의 동물 병원성 균에 대한 항균활성

[90]

[91] 실시예 3의 방법과 동일하게 락토바실러스 플란타룸 BLS41 배양 상등액을 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium* KCTC 1925)과 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus* KCTC 3624)가 도말된 고체배지에 점적하여 상기 병원성 균에 대해 성장저해 효과를 나타내는 지를 관찰하였다. 그 결과, 성장저해효과가 있음을 확인하였다 (FIG. 5).

[92]

### 산업상 이용가능성

[93] 이상 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 김치 유래 항진균 및 항병원성균 활성을 가지는 신규 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) BLS41 (KCTC 11056BP)는 김치로부터 분리된 것이기 때문에 생균을 섭취하더라도 안정성이 보장되며, 미생물에 의한 식물 및 동물의 병원균의 성장을 저해하는 효과가 있어, 친환경적 미생물 제제로서 병원균에 의한 질병 예방 및 치료에 매우 유용하다.

[94]

[95] 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.

[96]

### 서열목록

- [97] 전자파일 첨부하였음.  
[98]

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약  
국제 규격  
7.1조에 따른 국제 규격의  
원기탁 증명서

대한민국 대전광역시 유성구 용산동 559  
바이오리더스

I. 미생물의 동정	
기탁자로부터 받은 학명 정보: <b><i>Lactobacillus plantarum</i> BLS41</b>	국제 기탁기관에 수여된 기탁번호: <b>KCTC 11056BP</b>
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치 상기 I 항에 표시된 미생물은 하기의 서류와 같이 제출되었음: [ x ] 과학적 성질 [ ] 분류학상 위치 (적절한 위치에 x표 하시오)	
III. 접수 및 수리 본 국제 수탁기관은 상기 I항목에 표시된 미생물을 2006년 12월 26일자로 접수하였음.	
IV. 전환 청구의 접수 상기 I항에 표시된 미생물은 본 국제수탁기관에 의해 접수되었으며, 원기탁을 부다페스트 조약에 근거한 기탁으로 전환하는 청구를 접수하였음.	
V. 국제 수탁 기관	
명칭: 한국생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture) 주소: 대한민국 대전시 유성구 과학로 111 한국 생명공학연구원(KRIBB)	국제 수탁기관의 대표자 서명 오 희 목 2008년 11월 12일

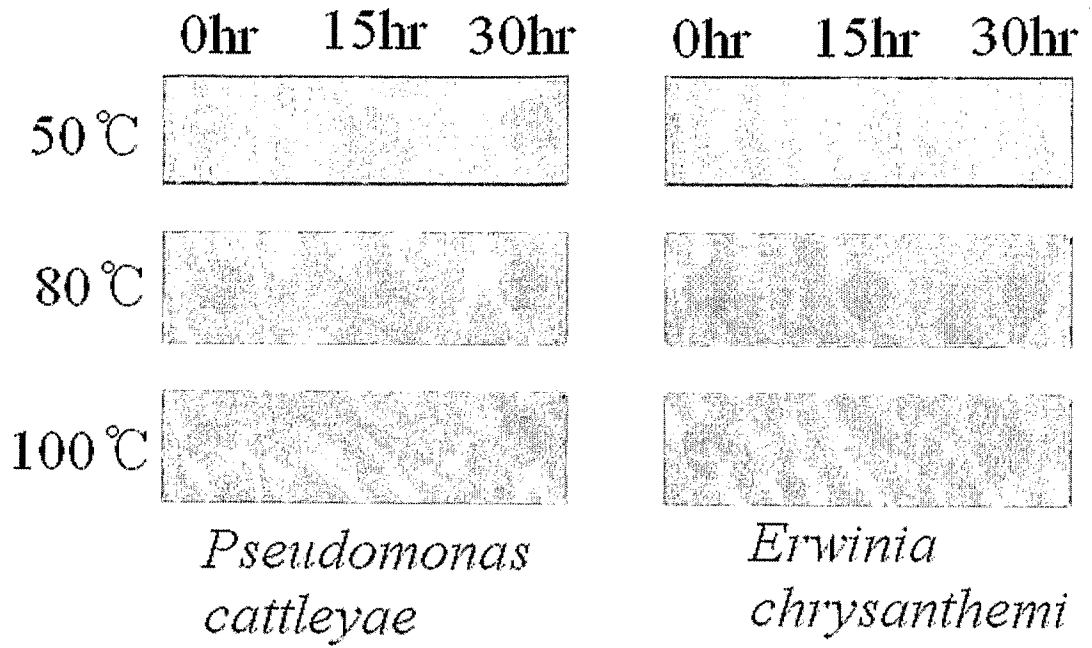
\* 상기번역문은 원본과 동일함을 증명합니다. 변리사 이 처 영

## 청구범위

- [1] 향진균 또는 항병원성균 활성을 가지는 김치유래 락토바실러스 플란타륨 (*Lactobacillus plantarum*) BLS41 (KCTC 11056BP).
- [2] 락토바실러스 플란타륨 BLS41 (KCTC 11056BP) 또는 그 배양물을 함유하는 향진균 제제.
- [3] 제2항에 있어서, 상기 진균은 식물병을 유발하는 에위니아 (*Erwinia*) 속, 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 속 및 푸자리움 (*Fusarium*) 속으로 구성된 균에서 선택된 것을 특징으로 하는 향진균 제제.
- [4] 락토바실러스 플란타륨 BLS41 (KCTC 11056BP) 또는 그 배양물을 함유하는 병원성 균의 감염 억제용 조성물.
- [5] 제4항에 있어서, 상기 병원성 균은 식중독을 유발하는 살모넬라 (*Salmonella*) 속 또는 바실러스 (*Bacillus*) 속인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [6] 락토바실러스 플란타륨 BLS41 (KCTC 11056BP) 또는 그 배양물을 함유하는 병원성 균의 감염 억제 효능을 가지는 식품.
- [7] 제6항에 있어서, 상기 병원성 균은 식중독을 유발하는 살모넬라 (*Salmonella*) 속 또는 바실러스 (*Bacillus*) 속인 것을 특징으로 하는 식품.
- [8] 락토바실러스 플란타륨 BLS41 (KCTC 11056BP) 또는 그 배양물을 함유하는 병원성 균의 감염 억제 효능을 가지는 사료 첨가제.
- [9] 제8항에 있어서, 병원성 균은 식중독을 유발하는 살모넬라 (*Salmonella*) 속 또는 바실러스 (*Bacillus*) 속인 것을 특징으로 하는 사료 첨가제.

1/3

FIG. 1



2/3

FIG. 2



FIG. 3

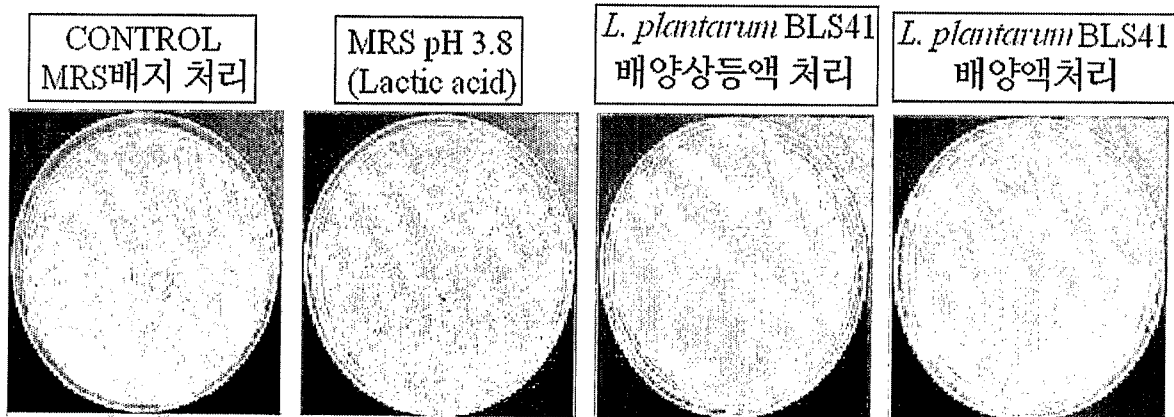


FIG. 4

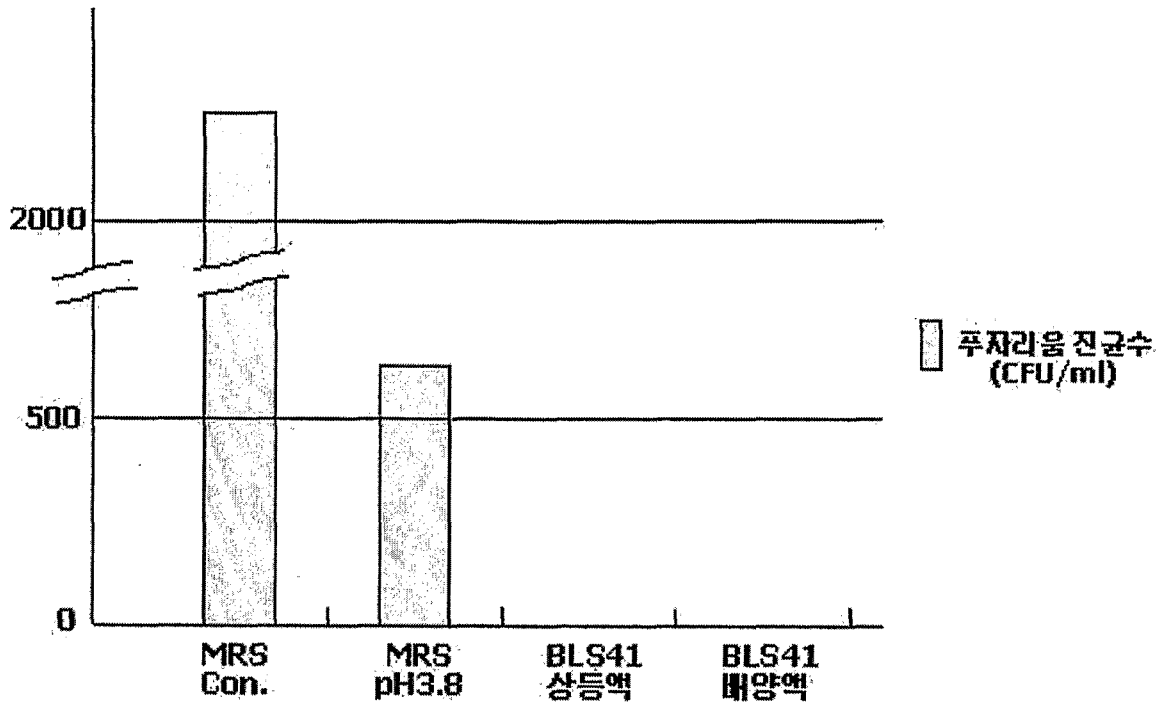


FIG. 5

*Lactobacillus plantarum* BLS41  
배양 상등액

