(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0134684
(43) 공개일자 2020년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23K 10/16* (2017.01)
A23L 29/00 (2016.01) *A23L 3/3463* (2017.01)
A23L 3/3571 (2017.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/74 (2015.01) *A61P 31/04* (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23K 10/16 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2019-0060490
(22) 출원일자 2019년05월23일
심사청구일자 2019년05월23일

(71) 출원인
대한민국(환경부 국립생물자원관장)
인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물자원관 (경서동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
방우영
인천광역시 서구 승학로495번길 7, 서해그랑블아파트 103동 1402호
양희선
경기도 군포시 고산로 596-15 주몽마을대림아파트 1031동 403호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안창우

전체 청구항 수 : 총 13 항

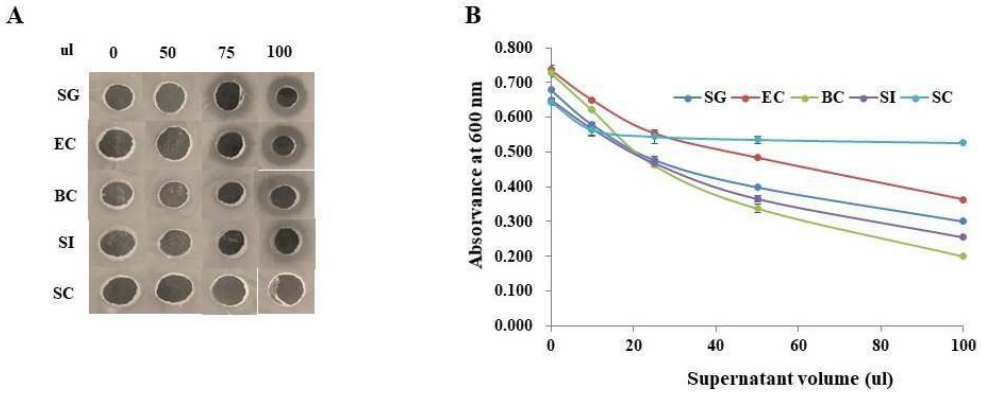
(54) 발명의 명칭 **유해세균에 항균 활성을 갖는 니브리박터 라디오레시스턴스 균주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 항균 및 항진균 활성을 갖는 니브리박터 라디오레시스턴스 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 니브리박터 라디오레시스턴스 균주 또는 그 배양액은 유해 미생물에 직접 영향을 미치는 것을 통해 탁월한 항균 및 항진균 활성을 나타내므로 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물, 식품보존제 조성물, 또는 사료 첨가제 조성물 등의 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 29/065 (2016.08)
A23L 3/34635 (2013.01)
A23L 3/3571 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
A61K 35/74 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
C12R 1/01 (2013.01)

(72) 발명자
강명석
인천광역시 서구 환경로 42 (경서동 종합환경연구단지) 국립생물자원관 미생물자원관
이규필
대전광역시 유성구 노은로 353 송림마을 302동 1202호
김태원
세종특별자치시 다정남로 22 122동 1003호
김삼웅
경상남도 진주시 사들로 61 대방노블랜드 102동 701호
하연조
서울특별시 관악구 신사로 138, 1층

명 세 서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC 18772P로 수탁된 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresist*ens) NIBRBAC000499663 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 니브리박터 라디오레시스턴스*(Nibribacter radioresist*ens) NIBRBAC000499663 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 살모넬라 속 균주는 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)이고, 상기 에스체리치아 속 균주는 에스체리치아 콜라이(E. coli)이며, 상기 스트렙토코커스 속 균주는 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)이고, 상기 바실러스 속 균주는 바실러스 세레우스(B. *cereus*)이며, 상기 사카로마에세스 속 균주는 사카로마에세스 세레비제(S. *cerevisiae*)인 것을 특징으로 하는 니브리박터 라디오레시스턴스*(Nibribacter radioresist*ens) NIBRBAC000499663 균주.

청구항 4

제1항의 니브리박터 라디오레시스턴스*(Nibribacter radioresistens)* NIBRBAC000499663 균주(기탁번호 KCTC 18772P), 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축물 및 상기 배양액의 건조물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 발효용 스타터(starter).

청구항 5

제1항의 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주(기탁번호 KCTC 18772P) 또는 제4항의 발효용 스타터를 이용하여 생산된 발효식품.

청구항 6

제1항의 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주(기탁번호 KCTC 18772P) 또는 제4항의 발효용 스타터를 원재료에 접종하는 단계를 포함하는 발효식품 제조방법.

청구항 7

기탁번호 KCTC 18772P로 수탁되고, 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 나타내며, 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 살모넬라 속 균주는 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)이고, 상기 에스체리치아 속 균주는 에스체리치아 콜라이(E. coli)이며, 상기 스트렙토코커스 속 균주는 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)이고, 상기 바실러스 속 균주는 바실러스 세레우스(B. *cereus*)이며, 상기 사카로마에세스 속 균주는 사카로마에세스 세레비제(S. *cerevisiae*)인 것을 특징으로 하는 병원균에 의한 감염 예방 또는 치료용 약학적 조성

물.

청구항 9

기탁번호 KCTC 18772P로 수탁되고, 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 나타내며, 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 살모넬라 속 균주는 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)이고, 상기 에스체리치아 속 균주는 에스체리치아 콜라이(E. coli)이며, 상기 스트렙토코커스 속 균주는 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)이고, 상기 바실러스 속 균주는 바실러스 세레우스(B. *cereus*)이며, 상기 사카로마에세스 속 균주는 사카로마에세스 세레비제(S. cerevisiae)인 것을 특징으로 하는 항균용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

기탁번호 KCTC 18772P로 수탁되고, 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 나타내며, 니브리박터 라디오레시스턴스(Nibribacter radioresistens) NIBRBAC000499663 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 보존제 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 살모넬라 속 균주는 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)이고, 상기 에스체리치아 속 균주는 에스체리치아 콜라이(E. coli)이며, 상기 스트렙토코커스 속 균주는 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)이고, 상기 바실러스 속 균주는 바실러스 세레우스(B. *cereus*)이며, 상기 사카로마에세스 속 균주는 사카로마에세스 세레비제(S. cerevisiae)인 것을 특징으로 하는 항균용 식품보존제 조성물.

청구항 13

기탁번호 KCTC 18772P로 수탁되고, 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 나타내며, 니브리박터 라디오레시스턴스(Nibribacter radioresistens) NIBRBAC000499663 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유해세균에 대해 항균 활성을 갖는 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 생물체의 항상성(homeostasis)을 유지하기 위한 과정에서 중요한 역할을 담당하고 있는 물질들 중 일부가 각종 생물체 유래의 생리 활성 물질이다. 지금까지 수많은 생리 활성 물질에 관한 많은 연구가 진행되고 있으며, 그 중, 항균 및 항진균 물질에 관한 연구는 생명과학 및 의학 분야에서 매우 중요한 분야이다.

[0004] 모든 생명체는 생존을 위하여 항균 및 항진균 물질을 생산하는 것으로 알려져 있는데, 특히 항균 및 항진균 물질을 생산하는 미생물에 관해서 많은 연구가 이루어지고 있으며, 항균 및 항진균 물질을 생산하는 미생물 또는 이들에게서 분리된 물질을 이용해 항균제를 개발하려는 연구들이 오래전부터 시도되고 있다.

[0005] 대부분 생명체는 자신을 보호하기 위한 물질을 생성하며, 이 보호물질 중에 타 생명체로부터 자신을 보호하기 위해 특수하게 생성되는 물질이 항생물질이거나 펩타이드 기반으로 구성된다. 이 중 펩타이드 기반 항균물질을 AMPs (antimicrobial peptides)라고 하며 대부분의 생물체에서 생성되는 것이 확인되고 있다(Bulet and Stocklin, 2005). 특히 미생물들은 강력한 AMPs, 즉 박테리오신(bacteriocin)을 생성하는 것으로 잘 알려져 있다(Azevedo, et al., 2015; Walsh, et al., 2015). 대부분 AMP 항균물질들은 20 내지 40개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이보다 더 큰 분자량으로 구성되어 항균 기능성을 나타내는 것들도 존재하여 다양성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Dimopouloset al., 1997; Reddy et al., 2004; Wang, 2013). AMP 항균물질들은 리보솜(ribosome)으로부터 합성된 프로단백질의 절단에 의해 생성되는 경우도 있으나, 비리보솜 메카니즘(non-ribosomal mechanism)에 의해 합성되는 경우도 존재한다(Mousa and Raizada, 2015; Tajbakhsh, et al.,2017). 특히, D-형 아미노산(D-amino acid) 또는 환상형태(cyclic form)를 형성하여 프로테아제(protease)의 분해를 저항하는 AMP 물질들도 존재한다(Kajimura and Kaneda, 1997; Schwarzer et al., 2003).

[0006] 또한, 미생물들은 온도, pH, 염 농도, 삼투압, 방사선 등 다양한 극한 환경에서 생존이 가능하다(Raddadi, et al., 2015; Sarmiento et al., 2015; Dopson, et al., 2016). 이들 미생물은 극한 환경에서 생존을 위해 다양한 내성 체계들을 보유하고 있으며, 이들에서 생산된 산물의 산업적 활용 가능성에 관한 연구들이 수행되고 있는 중이다(Cabreera and Blamey, 2018; Chen and Jiang, 2018).

[0007] 한편, 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) 균주는 한국 내의 특수 환경에 서식하는 미생물을 발굴하는 사업을 수행하는 과정에서 발굴된 균주이다(NIBR, 2016). 니브리박터 속 균주는 의간균류(Bacteroidetes) 문에 속하며, 히메노박테륨(Hymenobacteraceae) 과에 속하는 균주로, 그람음성 특성을 나타내며, 짧은 막대 모양의 형태를 특징으로 한다. 동 균주의 콜로니 색은 붉은색이고, 약 1.8 내지 3.6㎛ 사이의 크기를 갖는 것으로 알려져 있다(Kang, et al., 2013; Lin, et al., 2018). 또한, 니브리박터 속 균주들의 성장 최적 온도는 25℃로 알려져 있고, R2A 배지에서 잘 생장하는 것으로 조사된 바 있다(Kang, et al., 2013; Lin, et al., 2018). 니브리박터 속 균주는 2013년 Jahng 등의 그룹에 의하여 최초 보고된 이래 현재까지 본 발명의 균주까지 포함하여 3개 종이 발표된 바 있다(Kang, et al., 2013; Lin, et al., 2018). 니브리박터 코레엔시스(*Nibribacter koreensis*) 균주가 이 속을 대표하는 표준균주(type species) 이며, 니브리박터 속 균주 중에 니브리박터 라디오레시스턴스 균주는 방사선에 내성을 갖는 신종으로 밝혀진바 있다(NIBR, 2016). 그러나, 니브리박터 속 균주 균주가 갖는 항균 및 항진균 활성 등에 대하여 아직 자세한 연구는 진행된 바 없으며, 니브리박터 속 균주들이 갖는 기능성 연구는 미진한 상태이다.

[0008] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 우수한 항균 활성을 갖는 신균주를 발굴하기 위해 예의 노력한 결과, 니브리박터 라디오레시스턴스 균주가 우수한 항균 활성을 갖는 박테리오신을 분비하는 효능이 있어, 항균제, 건강기능식품, 식품보존제, 사료첨가제 등에 유용하게 활용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 항균 활성을 갖는 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*)를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*)를 이용한 항균 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 기탁번호 KCTC 18772P로 수탁된 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주를 제공한다.

[0014] 본 발명의 용어 "니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주"는 국립생물자원관에 의해 새롭게 분리 동정된 니브리박터 라디오레시스턴스 균주로서, "NIBRBAC000499663 균주" 또는 "NIBRBAC000499663"과 혼용하여 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명자들은 신규 항균제의 개발을 위해 미생물들의 항균 효과에 대해 수년간 조사 분석하였고, 그 결과 니브리박터 라디오레시스턴스의 강력한 항균 효과를 검증하고 본 발명을 완성하였다(도 1 내지 도 6 참조).

[0016] 본 발명자들은 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주의 항균 활성을 검증하고, 이를 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2019년 05월 10일자로 기탁하고, 수탁번호 KCTC 18772P를 부여받았다.

[0017] 또한, 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주는 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 상기 살모넬라 속 균주의 예로는 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)이 있고, 상기 에스체리치아 속 균주의 예로는 에스체리치아 콜라이(E. coli)가 있으며, 상기 스트렙토코커스 속 균주의 예로는 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)가 있고, 상기 바실러스 속 균주의 예로는 바실러스 세레우스(B. *cereus*)가 있으며, 상기 사카로마에세스 속 균주의 예로는 사카로마에세스 세레비제(S. cerevisiae)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주(기탁번호 KCTC 18772P), 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축물 및 상기 배양액의 건조물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 발효용 스타터(starter)를 제공한다. 본 발명에서 상기 발효용 스타터란 발효에 관여하는 세균 등을 포함하는 미생물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 포함하는 제제 또는 조성물을 의미하며, 발효용 스타터는 발효식품 등의 생산시 첨가하여 발효식품에서 생장할 수 있는 미생물 또는 우점종으로 생장할 수 있는 미생물을 제공하기 위하여 사용된다. 상기 발효용 스타터를 사용하여 발효식품을 제조하는 경우, 상기 발효용 스타터에 포함된 미생물에 의하여 발효식품의 품질을 일정하게 조절하거나, 발효의 속도 또는 단계를 조절할 수 있으며, 특정한 목적을 달성한 발효식품을 제조할 수 있다. 또한, 상기 발효용 스타터에는 통상적으로 사용되는 첨가제를 더욱 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 상기 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주는 병원성 세균의 생장을 저해하고, 각종 병원성 미생물에 대한 항균 활성이 우수하며, 인체에 해가 없으므로, 안전한 발효식품 제조에 있어서 발효용 스타터로 유용하게 이용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주(기탁번호 KCTC 18772P) 또는 상기 발효용 스타터를 이용하여 생산된 발효식품을 제공한다. 상기 발효식품이란, 유익균이나 효소 등 미생물을 하나 또는 둘 이상 첨가하고 상기 미생물의 발효 작용을 이용하여 만든 식품을 의미하며, 상세하게는 식품 기재에 발효식품용 종균을 첨가하고 숙성시켜 제조하는 식품을 의미한다. 상기 발효식품으로는 주류, 빵류, 김치, 젓갈, 된장, 간장, 치즈, 버터, 요구르트 등 비살균 개방형 발효식품 모두가 포함된다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주(기탁번호 KCTC 18772P) 또는 상기 발효용 스타터를 원재료에 접종하는 단계를 포함하는 발효식품 제조방법을 제공한다. 상기 발효식품 제조방법은 김치, 치즈, 버터, 요구르트 등의 제조방법일 수 있으며, 상기 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 또는 발효용 스타터를 접종하여 발효식품의 제조에 활용할 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 기탁번호 KCTC 18772P로 수탁되고, 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 나타내며, 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명에서, 상기 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 또는 그 배양액은 그 자체로 항균 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명의 상기 감염 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서, 상기 살모넬라 속 균주의 예로는 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)이 있고, 상기 에스체리치아 속 균주의 예로는 에스체리치아 콜라이(E. coli)가 있으며, 상기 스트렙토코커스 속 균주의 예로는 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)가 있고, 상기 바실러스 속 균주의 예로는 바실러스 세레우스(B. *cereus*)가 있으며, 상기 사카로마에세스 속 균주의 예로는 사카로마에세스 세레비제(S. cerevisiae)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 한편, 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 또는 그 배양액의 추출물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 제조될 수 있다. 구체적으로 산을 첨가함으로써 염을 형성할 수 있는데, 예를 들어 무기산(예: 염산, 히드로브롬산, 인산, 질산, 황산 등), 유기 카르복실산(예: 아세트산, 트리플루오로아세트산과 같은 할로 아세트산, 프로피온산, 말레산, 숙신산, 말산, 시트르산, 타르타르산, 살리실산), 산성 당(글루쿠론산, 갈락투론산, 글루콘산, 아스코르브산), 산성 폴리사카리드(예: 히알우론산, 콘드로이틴 술페이트, 아르기닌산), 콘드로이틴 술페이트와 같은 술폰산 당 에스테르를 포함하는 유기 술폰산(예: 메탄, 술폰산, p-톨루엔 술폰산) 등을 첨가하여 염을 형성할 수 있다.

[0026] 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 또는 그 배양액은 임상투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0027] 즉, 본 발명의 신균주 NIBRBAC000499663 또는 그 배양액은 실제로 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 신균주 NIBRBAC000499663 또는 그 배양액은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 신균주 NIBRBAC000499663 또는 그 배양액의 유효용량은 0.01 내지 10㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.1㎎/㎏ 내지 1㎎/㎏ 이며, 하루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물에서 또는 그 배양액은 총 유효량은 볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single does)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple does)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 신균주 NIBRBAC000499663 또는 그 배양액의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

[0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 기탁번호 KCTC 18772P로 수탁되고, 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 나타내며, 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명의 항균용 건강기능식품 조성물에서, 상기 살모넬라 속 균주의 예로는 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)이 있고, 상기 에스체리치아 속 균주의 예로는 에스체리치아 콜라이(E. coli)가 있으며, 상기 스트렙토코커스 속 균주의 예로는 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)가 있고, 상기 바실러스 속 균주의 예로는 바실러스 세레우스(B. *cereus*)가 있으며, 상기 사카로마에세스 속 균주의 예로는 사카로마에세스 세레비제(S. cerevisiae)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0034] 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 당 0.01 ~ 0.04 중량부, 구체적으로는 약 0.02 ~ 0.03 중량부 범위에서 선택할 수 있다.

[0035] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염,

알긴산 및 그의 염, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 기탁번호 KCTC 18772P로 수탁되고, 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 나타내며, 니브리박터 라디오레시스턴스(Nibribacter radioresistens) NIBRBAC000499663 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 보존제 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 용어 "보존"은 미생물의 작용에 의해 식품이 부패하는 것을 막는 것을 의미하며, 항생, 항균을 총칭하는 의미로 사용된다. 또한, 용어 "보존제"는 식품을 보존하기 위한 목적으로 방부하기 위해서 첨가되는 약제를 의미한다. 따라서 인체에 해가 없어야 하며, 또 그 첨가로 인해 식품의 품질을 손상하지 않아야 한다.

[0038] 본 발명의 상기 항균용 식품 보존제 조성물에서, 상기 살모넬라 속 균주의 예로는 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)이 있고, 상기 에스체리치아 속 균주의 예로는 에스체리치아 콜라이(E. coli)가 있으며, 상기 스트렙토코커스 속 균주의 예로는 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)가 있고, 상기 바실러스 속 균주의 예로는 바실러스 세레우스(B. *cereus*)가 있으며, 상기 사카로마에세스 속 균주의 예로는 사카로마에세스 세레비제(S. cerevisiae)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 기탁번호 KCTC 18772P로 수탁되고, 살모넬라 속 균주, 에스체리치아 속 균주, 스트렙토코커스 속 균주, 바실러스 속 균주, 및 사카로마에세스 속 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 병원균에 대해 항균 활성을 나타내며, 니브리박터 라디오레시스턴스(Nibribacter radioresistens) NIBRBAC000499663 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료첨가제 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명의 항균용 사료첨가제 조성물에서, 상기 살모넬라 속 균주의 예로는 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)이 있고, 상기 에스체리치아 속 균주의 예로는 에스체리치아 콜라이(E. coli)가 있으며, 상기 스트렙토코커스 속 균주의 예로는 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)가 있고, 상기 바실러스 속 균주의 예로는 바실러스 세레우스(B. *cereus*)가 있으며, 상기 사카로마에세스 속 균주의 예로는 사카로마에세스 세레비제(S. *cerevisiae*)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 특히, 본 발명의 사료첨가제는 축산 현장에서 직접 채취한 고병원성 살모넬라 균주에 대해 강력한 항균 활성을 가지므로, 가금류, 가축 등에 꾸준히 섭취하게 함으로써 세균성 질환을 예방할 수 있고, 이미 발생한 세균성 질환을 개선할 수 있다. 사료는 영양가, 주성분, 유통, 수분 함량 배합상태 및 가공형태 등에 따라 여러 가지로 분류할 수 있으며, 사료는 조사료, 농후사료, 보충사료, 단백질 사료, 녹말 사료, 지방질 사료 또는 섬유질 사료가 사용가능하다.

[0042] 상기 사료첨가제는 추가적으로 허용되는 담체를 함유할 수 있으며, 예를 들어, 상기 사료첨가제를 그대로 또는 공지의 담체, 안정제 등을 가할 수 있다. 또한, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로서는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다.

[0043] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 기탁번호 KCTC 18772P로 수탁되고, 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주 또는 그 배양액을 함유하는 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 투여하여 병원성 세균을 사멸시키는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 세균성 감염 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명에 따른 상기 치료방법은 비록 인간을 제외한 동물을 치료하는 방법이나, 인간에 있어 이러한 치료방법이 효과가 없음을 의미하는 것은 아니다. 또한, 인간의 경우 있어서 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 세균 또는 진균 감염에 의한 질환을 갖는 것을 고려할 때, 인간의 치료에 있어서도 충분히 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 용어 "인간을 제외한 동물"은 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 세균 또는 진균의 감염에 의해 유발되는 질환을 갖는 인간만을 제외한 말, 소, 양, 돼지, 닭, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물을 의미한다. 본 발명에 따른 치료용 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여함으로써, 세균

및 진균 감염에 의한 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 치료용 조성물의 바람직한 투여량은 치료 대상 동물의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학적 조성물은 0.01mg/kg 내지 10mg/kg이고, 바람직하게는 0.1mg/kg 내지 1mg/kg이며, 하루 1회 내지 3회 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0050] (1) 본 발명은 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 또는 그 배양액을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물을 제공한다.

[0051] (2) 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 또는 그 배양액을 포함하는 조성물은 다양한 균들에 대해 폭넓은 항균 스펙트럼을 나타내고 있으며, 본 발명의 조성물은 유해세균에 의해 발생하는 다양한 세균 감염증에 적용이 가능하다.

[0052] (3) 또한, 본 발명의 조성물은 의약, 건강기능식품, 또는 식품 또는 사료 보존제 등의 다양한 분야에서 항균 목적으로 유용하게 이용가능하다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 살모넬라 겔린아룸(그람음성, *Salmonella gallinarum*), 에스체리치아 콜라이(그람음성, E. coli), 바실러스 세레우스(그람양성, B. *cereus*), 스트렙토코커스 이니에(그람양성, *Streptococcus iniae*), 및 사카로마에세스 세레비제(효모, S. *cerevisiae*) 균주에 대한 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresisten*s) NIBRBAC000499663 균주의 항균 활성을 측정한 그래프이다.

도 2는 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주의 온도 조건에 따른 성장곡선(도 2A) 및 37℃에서 배양된 상등액이 갖는 항균력 분석결과(도 2B)이다(GC; growth curve, SG; Salmonella Gallinarum, BC; Bacillus cereus).

도 3은 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 배양 상등액에 Proteinase K 및 EDTA를 처리한 후 항균활성을 측정한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 배양 상등액의 온도 및 pH 변화에 따른 항균활성을 측정한 그래프이다.

도 5는 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 배양 상등액의 분자량에 따른 분획물 또는 메탄올 분획물이 갖는 항균 활성을 측정한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 배양 상등액을 병원성 세균인 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)에 처리한 후 관찰한 SEM 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0057] **실시예 1. 균주 확보 및 배양 상등액 제조**

[0058] 1-1. 균주 및 배양

[0059] 실험에 사용된 균주는 국립생물자원관(National Institute of Biological Resoures; NIBR)이 국내에서 분리하여 보관 중인 니브리박터 라디오레시스턴스(Nibribacter radioresistens) NIBRBAC000499663 균주를 분양받아 사용하였다. 니브리박터 라디오레시스턴스 균주를 배양하기 위하여 배지는 R2A, TSB, 및 LB (Sigma-aldrich) 배지를 사용하였으며, 필요할 경우 1.5% agar를 첨가하여 고형배지로 사용하였다.

[0060] 병원성 미생물인 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*), E. coli, 및 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*) 균주는 충북대학교(Chonbuk National University, Iksan, Korea) 허진 교수 연구실 및 경북대학교(Gyeongsang National University) 정태성 교수 연구실에서 분양받아 사용하였다. 또한, 바실러스 세레우스(B. *cereus*)(ATCC 1178) 및 사카로마에세스 세레비제(S. *cerevisiae*)(KCTC 27134) 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 사용하였다.

[0061] 살모넬라 겔린아룸, 병원성 대장균, 스트렙토코커스 이니에, 및 바실러스 세레우스는 37℃에서 배양한 반면, 사카로마에세스 세레비제는 30℃에서 배양하였다.

[0063] 1-2. 니브리박터 라디오레시스턴스 배양 상등액 제조

[0064] 싱글 콜로니 유도를 통하여 니브리박터 라디오레시스턴스(Nibribacter radioresistens) NIBRBAC000499663) 균주의 단일 균주를 확보하였다. 확보된 단일 균주를 5mL의 R2A, TSB, 및 LB 액체 배지에 각각 1/100로 접종하였고, 37℃에서 24~48 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 1mL씩 분취하여 13,500RPM에서 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상등액을 채취하여 0.2um 필터(syringe filler)로 여과한 후, -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

[0066] **실시예 2. N. radioresistens 균주 배양 상등액의 MIC 분석**

[0067] 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 항균 활성을 측정하였다.

[0068] R2A, TSB, 및 LB의 액체 배지에서 배양된 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 배양액(cultural broths)을 2,000rpm에서 20분간 원심분리를 수행하여 상등액을 수거하였고, 와트만 No.1 필터 페이퍼(filter paper)로 여과한 후, 0.22um 필터(filteration)로 제균을 실시하였다. 제균된 배양액은 항균력 분석을 위해 직접 사용하거나 적절한 함량으로 분취하여 -80℃에서 보관하면서 사용하였다.

[0069] 아가 플레이트(Agar plate) 상에 분석은 7mm 코크 보러(cork borer)로 각 고형배지에 펀칭(punching)한 후, 0, 20, 40, 60, 80, 및 100ul 용량으로 니브리박터 라디오레시스턴스 배양 상등액을 첨가하였다. 처리된 고형배지는 각각 상응하는 배양 온도에서 24시간 내지 48시간 배양하면서 클리어 존(clear zone)을 관찰하였다.

[0070] 상기 5종의 병원균을 디스크 또는 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate) 방법으로 최소 억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 분석을 수행하였다. 항균 분석을 위해 overnight(O/N)으로 전배양된 균주는 1×10^{6} CFU/ml로 맞추어 실험에 사용되었다. 반응액을 마이크로타이터 플레이트에 첨가하거나 디스크(disc)에 점적한 후, 37℃에서 O/N 배양하면서 반응성상을 관찰하였고, 600nm 흡광도 및 균체 수를 측정하여 항균 활성을 분석하였다.

[0071] 도 1을 참조하면, 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 배양 상등액은 그람양성 균주, 그람음성 균주 및 효모균 모두에 대해 항균 활성을 갖는 것으로 나타났다. 구체적으로 각 균주들의 MIC 값은 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*, 그림음성) 120.2ul/ml, 병원성 E. coli(그람 음성) 145.1ul/ml, 바실러스 세레우스(B. *cereus*, 그림양성)(ATCC 1178) 90.0ul/ml, 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*, 그림양성) 112.9ul/ml 및 사카로마에세스 세레비제(S. cerevisiae)(KCTC 27134) 2,744ul/ml로 측정되었다.

[0072] 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 배양 상등액이 그람음성균이나 효모균에 비교하여 그람양성균에 대해 더 높은 항균 활성을 갖는 경향이 나타났으며, 특히 바실러스 세레우스에 대해 가장 높은 항균 활성을 갖는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 배양 상등액은 광범위 영역에 활성을 가지는 것으로 평가되었지만, 특히 그람양성에 더 높은 활성을 보유하는 것으로 나타났다.

[0074] **실시예 3. 배지 종류 및 온도에 따른 균주 성장 및 항균력 분석**

[0075] R2A, TSB 및 LB 배지에 따른 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 성장력은 25℃에서 48시간 동안 배양하여 측정하였고, 배지 종류에 따른 항균력과 상호 비교하였다. LB 배지에서 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 성장 곡선(growth curve)은 25℃, 30℃, 및 37℃에서 48시간 동안 배양하여 측정하였고, 6시간마다 샘플링(sampling) 하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0076] 또한, 항균력은 각 시간에서 샘플링된 상등액을 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*, 그림음성) 및 바실러스 세레우스(B. *cereus*, 그림양성)에 대하여 상기 실시예 2의 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate) 방법에 의해 분석하였다.

[0077] 일반적으로 니브리박터 라디오레시스턴스 균주는 R2A 배지에 의해 25℃에 48시간 동안 배양되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 본 실시예에서 배지 종류를 달리하여 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 성장을 비교 평가한 결과, R2A 배지와 비교하여 LB 배지에서의 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 성장력이 더욱 우수한 것으로 나타났으며, LB 배지에서 배양할 경우 항균 활성도 우수한 것으로 관찰되었다(미도시). 따라서, 이후의 항균 활성 분석을 위한 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 배양 상등액 샘플은 LB 배지에서 배양한 상등액을 사용하였다.

[0078] LB 배지에서 배양 온도에 따른 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 성장 추세를 분석한 결과, 30℃ 및 37℃ 온도 조건에서 서로 유사한 패턴으로 성장하는 것으로 나타났다(도 2A 참조). 또한, 25℃ 조건에서의 배양은 정지기에 도달하기까지 48시간이 소요된 반면, 30℃ 및 37℃의 온도조건에서의 배양은 정지기에 도달하는데 24시간 미만으로 소요되는 것으로 관찰되었다.

[0079] 또한, 37℃ 조건에서의 배양은 30℃ 조건과 비교하여 대수증식기로 이행되는 시간이 단축되고, 30℃ 조건에 비해 정지기 지속시간이 더 오래 유지되는 것으로 나타났다. 그러나, 각 온도에 따라 배양된 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 배양 상등액이 갖는 항균력은 유사한 것으로 관찰되었다(데이터 미도시).

[0080] 한편, 37℃ 조건의 배양 상등액이 갖는 항균력 분석결과, 대수증식기 말기에서 최대 항균력을 나타내는 것으로 관찰되었고, 이후 이러한 항균 활성이 지속적으로 유지되는 것으로 관찰되었다(도 2B 참조). 따라서, 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 배양 상등액에 포함된 항균물질의 생산 시기는 2차 대사산물의 전형적인 생산 패턴과 유사한 측면이 있으나(Demain, 1998), 2차 대사산물이 생산 후 급격히 감소되는 경향성은 전혀 일치하지 않았다. 다른 한편으로, 바이셀라 콘퓨사(Weisella confusa) 균주에서 생산되는 박테리오신의 경우, 본 발명의 균주가 갖는 성장 및 항균 패턴과 유사하나, 이와는 달리 정지기 후반부에는 감소되는 경향성을 보인다(van der Meij, et al., 2017).

[0081] 추가적으로 병원성 미생물의 농도에 따른 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 배양 상등액이 갖는 항균 활성을 측정해 본 결과, 살모넬라 겔린아룸 및 바실러스 세레우스 균주의 농도 의존적으로 항균 활성을 갖는 것으로 관찰되었다(데이터 미도시). 따라서 니브리박터 라디오레시스턴스 균주의 배양 상등액에 포함된 항균물질들은 항균물질의 농도 및 대상 미생물의 농도 의존적으로 활성을 나타내는 것으로 나타났다.

[0083] **실시예 4. Proteinase K 및 EDTA 처리에 따른 활성 평가**

[0084] 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주의 배양 상등액에 포함된 항균물질이 AMPs 물질인지를 확인하기 위해 proteinase K 및 EDTA를 처리하여 항균 활성을 측정하였다.

[0085] 실험은 그람 음성균인 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)을 이용하여 디스크(disc) 또는 마이크로타이터 플레이트 방법으로 분석을 수행하였다. 상등액은 MIC 값인 120.2ul를 처리하였고, 균주는 1×10^{6} CFU/ml로 사용하였다. Proteinase K(20mg/ml stock)는 100ug/ml 농도로 사용하였으며, 배양 온도는 37℃로 설정하여 평가하였다.

[0086] Proteinase K 처리 결과, 무처리 대조구에 비교하여 81.2%의 균체 수를 유지하는 것으로 관찰되었다. 이러한 실험 결과를 통해 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주의 배양 상등액 갖는 항균 활성은 펩타이드 기반(peptide-based)의 항균 활성으로 분석되었다(도 3A 참조).

[0087] 다른 한편으로, 배양 상등액 속에 포함된 프로테아제(protease)는 항균 활성을 억제하는 요소인 것으로 잘 알려져 있다(Ha, et al., 2017). 본 배양액의 상등액 중에 포함된 항균물질들이 대부분 AMPs에서 유래하는 것으로

추정되기 때문에, 프로테아제 억제제(protease inhibitor) 중의 하나인 EDTA를 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주의 배양 상등액에 첨가하여 항균 활성을 분석하였다.

[0088] 실험은 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)에 EDTA를 각각 0, 5, 10, 15, 20, 25, 및 30mM 농도로 첨가한 후 살모넬라 겔린아룸 1×10^{8} CFU/ml(initial concentration)에 대하여 항균 활성을 분석하였다.

[0089] 그 결과, EDTA가 첨가될 경우 살모넬라 겔린아룸의 균체 수가 감소하여 추가적인 항균활성 증진 효과가 관찰되었고, EDTA의 농도에 비례하여 항균 활성이 증가하는 양상이 관찰되었다. 다만, 20mM 농도의 EDTA를 첨가한 군에서 무첨가구에 비교하여 39.9%의 균체 수가 관찰되었으나, 그 이상의 농도에서는 포화되어 더 이상의 활성 증진 효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과를 통해 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 배양 상등액의 항균물질은 AMPs에 의해 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0091] **실시예 5. 온도 및 pH 안전성 평가**

[0092] 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 배양 상등액의 항균물질이 갖는 온도 안정성을 평가하였다. 실험은 배양 상등액을 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 및 80℃ 온도에서 각 10분간 처리한 후, 마이크로타이터 플레이트 실험을 수행하였다. 또한, pH 안전성은 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 배양 상등액을 pH 2 내지 12 사이로 조정하여 항균력을 측정하였다.

[0093] 통상적으로 미생물이 생산하는 박테리아신은 대부분 60℃ 부근까지 온도 안정성이 유지되며, 대부분의 pH 영역에서 안정성이 확인된다(Garsa, et al., 2014). 그러나, 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 유래 항균물질들의 온도 및 pH 안정성을 분석한 결과, 40℃ 이하에서는 온도 안정성을 보였으나, 50℃ 이상에서는 온도 안정성이 급격히 감소하는 경향성을 보였다. 또한, pH 안전성은 pH 7 부근에서만 안정한 것으로 관찰되었으나, 그 이외의 범위에서는 매우 불안정한 것으로 나타났다(도 4 참조).

[0095] **실시예 6. 분자량 및 메탄올 농도에 따른 항균 활성 평가**

[0096] 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 유래 항균물질의 분자량에 따른 항균력을 평가하기 위해, 배양 상등액(supernatant fluid)을 센트리콘(centricon , Millipore)을 사용하여 3kDa 이하, 3-10kDa, 10-30kDa, 및 30kDa 이상의 4개 구간으로 분리한 후 마이크로타이터 플레이트 실험을 수행하여 항균력을 측정하였다.

[0097] 또한, 항균물질의 화학적 특성을 분석하기 위해 배양 상등액을 30%, 50%, 및 70% 메탄올 농도로 조정한 후, 4℃에서 1시간 반응하고 2,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 수거하였다. 수거된 상등액을 감압 농축하여 완전히 건조시킨 후 상등액 원액에 대해 10배 농축된 용량으로 증류수에 현탁하였다. 처리된 용액은 마이크로타이터 플레이트 실험을 수행하여 항균력을 측정하였다.

[0098] 그 결과, 도 5를 참조하면, 모든 분획에서 항균 활성이 관찰되었으나, 특히, 3kDa 이하 및 30kDa 이상의 분자량을 갖는 분획을 처리한 실험군에서 다른 실험군에 비해 높은 활성을 갖는 것으로 관찰되었다(도 5A). 전술한 proteinase K 처리에 따른 실시예 4의 결과와 마찬가지로, 분자량에 따른 항균 활성 실험 결과는 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 분획에 함유된 물질들은 저분자 및 고분자량의 펩타이드 기반의 항균물질인 것으로 해석된다.

[0099] 또한, 메탄올 분획들의 항균 활성을 분석한 결과, 모든 분획(fractions)에서 활성이 관찰되었으나, 특히, 70% 메탄올 처리 분획에서 가장 높은 활성이 나타났다(도 5B 참조). 상기 결과를 통해 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주의 배양 상등액에 존재하는 대부분의 항균물질은 친수성(hydrophilicity)이 매우 강한 물질이 아니라, 약간 낮은 정도의 친수성을 유지하는 것으로 추정된다. 상기 결과는 대부분의 항균 펩타이드에서 대략 50% 정도의 소수성(hydrophobicity)을 유지할 때 가장 적합한 아미노산 조성인 것과 일치된다(Wang, 2013).

[0101] **실시예 7. 항균활성 성상의 SEM 분석**

[0102] 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주 조정제물의 처리 시간에 따른 용균 현상을 SEM(scanning

Electron Microscope)을 이용하여 관찰하였다.

[0103] 실험은 니브리박터 라디오레시스턴스 NIBRBAC000499663 균주의 배양 상등액을 살모넬라 겔린아룸(*Salmonella gallinarum*)에 처리하고, 배양액을 0, 6, 12, 및 24 시간별로 샘플링 하였다. 샘플링된 배양액에 존재하는 살모넬라 겔린아룸 균주를 2.5% 글루타알데하이드(glutaraldehyde, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI)로 4℃에서 24시간 동안 처리하여 고정시켰다. 고정된 샘플을 멸균 PBS 완충액으로 3회 세척하고 각각의 농도에서 15분 배양하면서 연속적으로 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 및 100%(v/v)의 에탄올로 탈수하였다. 실온에서 샘플을 건조시키고, 금으로 코팅하여 SEM을 이용하여 관찰하였다.

[0104] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 시간이 지남에 따라 세포막에 천공(hole, 화살표에 의해 표시)이 발생되는 세균 수가 증가하는 것이 관찰되었다. 따라서 항균물질은 세포막을 천공하여 세균을 용균시키며, 이에 따라 세균이 사멸되는 것으로 나타났다.

[0105] 종합하면, 니브리박터 라디오레시스턴스(*Nibribacter radioresistens*) NIBRBAC000499663 균주 배양 상등액의 항균 활성은 AMPs 물질에 의해 기인하며, 본 AMPs는 저분자량 또는 고분자량으로 구성되며, 열과 pH에 매우 불안정한 것으로 나타났고, 대상 병원성 균주의 농도에 반비례하는 반면에, 항균물질의 농도에 비례하는 것으로 나타났다. 본 항균 펩타이드(AMPs)는 부분적으로 친수성(partial hydrophilic) 성향을 나타내며, 세포벽에 천공(hole)을 형성하여 용균 현상을 보이는 것으로 나타났다.

[0106] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0108]

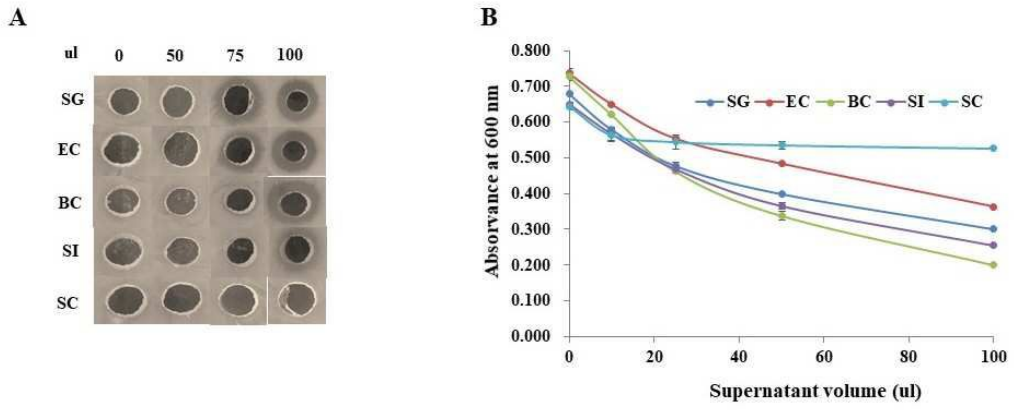
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18772P

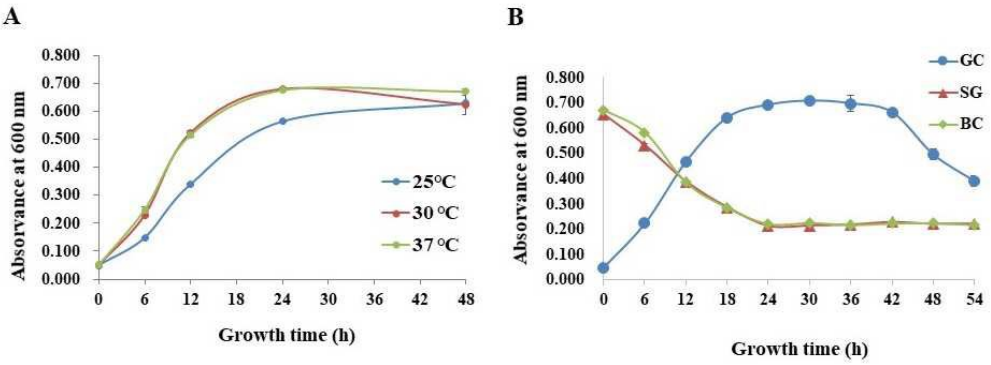
수탁일자 : 20190510

도면

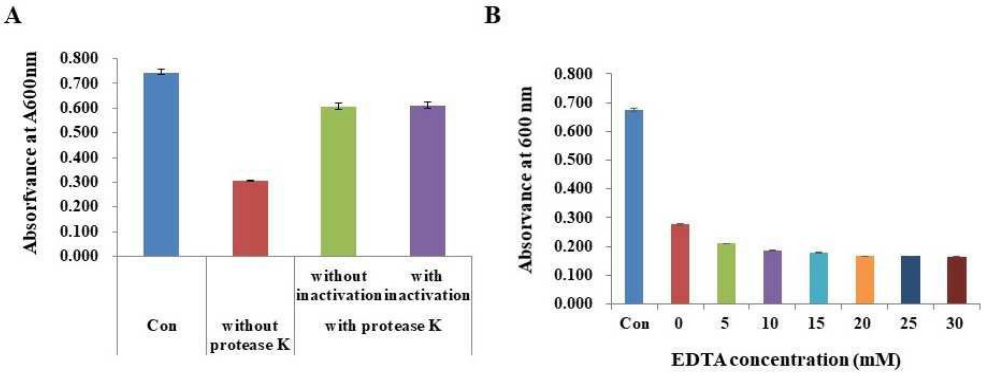
도면1



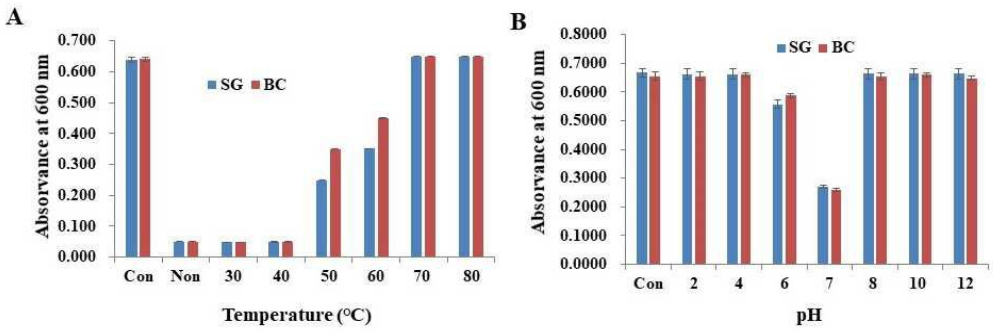
도면2


A
Absorvance at 600 nm
0.800
0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
0 6 12 18 24 30 36 42 48
Growth time (h)
25℃
30 ℃
37 ℃
B
Absorvance at 600 nm
0.800
0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
0 6 12 18 24 30 36 42 48 54
Growth time (h)
GC
SG
BC

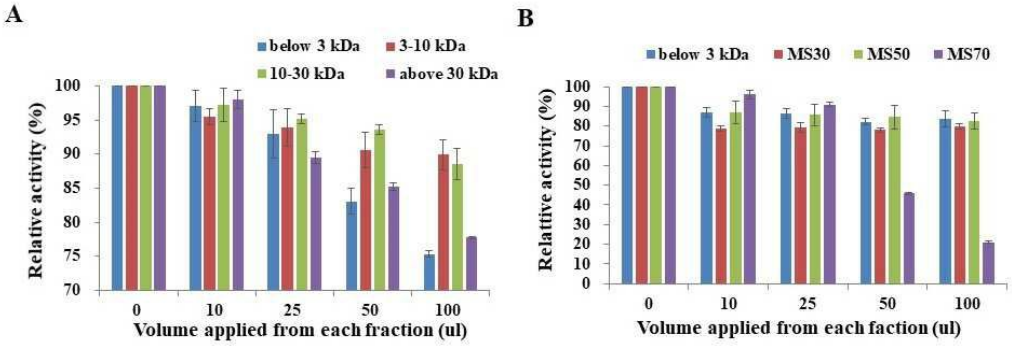
도면3


A
Absorfvance at A600nm
0.800
0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
Con
without protease K
without inactivation
with inactivation
with protease K
B
Absorvance at 600 nm
0.800
0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
Con 0 5 10 15 20 25 30
EDTA concentration (mM)

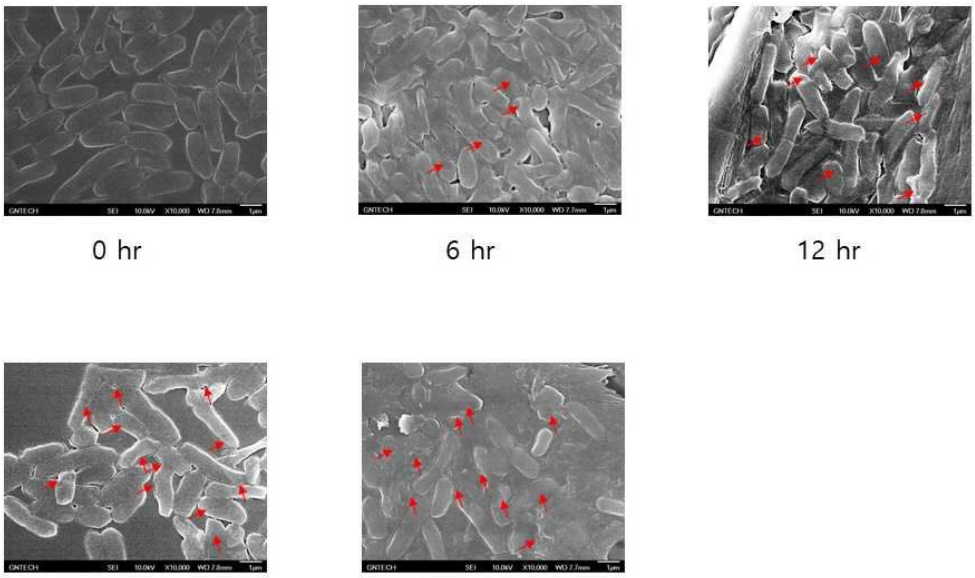
도면4


A
Absorvance at 600 nm
0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
SG BC
Con Non 30 40 50 60 70 80
Temperature (℃)
B
Absorvance at 600 nm
0.8000
0.7000
0.6000
0.5000
0.4000
0.3000
0.2000
0.1000
0.0000
SG BC
Con 2 4 6 7 8 10 12
pH

도면5


A
below 3 kDa
3-10 kDa
10-30 kDa
above 30 kDa
Relative activity (%)
100
95
90
85
80
75
70
0
10
25
50
100
Volume applied from each fraction (ul)
B
below 3 kDa
MS30
MS50
MS70
Relative activity (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
25
50
100
Volume applied from each faction (ul)

도면6


0 hr
6 hr
12 hr
24 hr
36 hr