



등록특허 10-2639368



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월22일
(11) 등록번호 10-2639368
(24) 등록일자 2024년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23K 10/16 (2017.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61P 31/04 (2006.01) C12R 1/07 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A23K 10/16 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0067535
(22) 출원일자 2023년05월25일
심사청구일자 2023년05월25일
(56) 선행기술조사문헌
Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.
2022, 44:102477.

(73) 특허권자
국립부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
김도형
부산광역시 남구 분포로 145, c동 705호
이주엽
부산광역시 남구 못골로12번길 60, b동 202호
(74) 대리인
위병갑

기술이전 희망 : 기술양도

전체 청구항 수 : 총 12 항

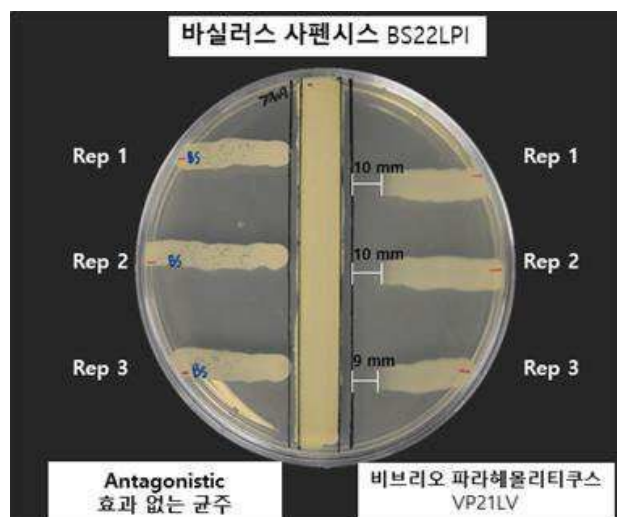
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 신규한 바실러스 사펜시스 균주를 유효성분으로 포함하는 새우 급성간췌장괴사병의 예방 또는 개선용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은, 신규한 바실러스 사펜시스 균주를 유효성분으로 포함하는 새우 급성간췌장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)의 예방 또는 개선용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 본 발명의 신규한 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주는 AHPND 감염의 원인균인 비브리오 파라헤몰리티쿠스 균주에 대하여 항균효과가 있는 것을 확인하였다. 또한 흰다리새우에 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 급여하면, 비브리오 파라헤몰리티쿠스의 감염으로 유도되는 AHPND의 발병을 억제하여, AHPND로 인한 폐사를 억제하고, 새우 간췌장 내 비브리오 균의 생육을 억제하는 것을 확인하였다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)

A61K 35/74 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

C12R 2001/07 (2021.05)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는, 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주(기탁 번호 KCTC15414BP)로써,

상기 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주는 4℃, 10℃ 및 60℃로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나 이상의 온도에서 생장이 가능하며,

비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)에 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 균주.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 균주는 갑각류 유래의 균주인 것인, 균주.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 갑각류는, 참새우(*Penaeus chinensis*), 줄새우(*Palaemon paucidens*), 징거미새우(*Macrobrachium nipponense*), 보리새우(*Penaeus indicus*) 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)로 이루어진 균에서 선택된 갑각류인 것인, 균주.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 갑각류는, 해수, 담수 또는 민물 갑각류인 것인, 균주.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 균주는 급성간췌장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 발병을 억제하는 것인, 균주.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 발병 억제, 갑각류의 폐사를 억제하는 것인, 균주.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 발병 억제는, 갑각류 간체장 내 AHPND 원인균의 생균수를 감소시키는 것인, 균주.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 AHPND 원인균은 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)인 것인, 균주.

청구항 13

제 1항에 따른 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주(기탁번호 KCTC15414BP), 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제 1항에 따른 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주(기탁번호 KCTC15414BP), 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 개선용 식품조성물.

청구항 15

제 1항에 따른 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주(기탁번호 KCTC15414BP), 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 개선용 사료조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 신규한 바실러스 사펜시스 균주를 유효성분으로 포함하는 새우 급성간체장괴사병의 예방 또는 개선용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세계 새우양식장에서 심각한 피해를 주고 있는 ‘급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)’은 ‘조기치사증후군(Early mortality syndrome; EMS)’으로도 불린다. 새우 종자의 입식 후 30일 이내에 발생하며 초기 대량 폐사를 통칭하여 붙여진 명칭이었으며, 이후 질병의 원인체가 밝혀져 AHPND라는 질병명이 공식화되었다.

[0003] AHPND는 흰다리새우, 홍다리얼룩새우 양식에서 100% 폐사를 일으켜 경제적 손실을 발생시키는 매우 심각한 질병이며, AHPND에 감염된 새우는 체색이 얼어지고, 위장관이 비어 있으며, 간체장이 흰색으로 변하거나 비정상적으로 크기가 줄어드는 등의 증상이 관찰된다(Tran et al., 2013; Han et al., 2015a, Lee et al., 2015). 중국(2009)에서 첫 보고 이후 베트남(2011), 말레이시아(2011), 태국(2012), 멕시코(2013), 필리핀(2014), 미국(2017) 등 여러 국가로 급속히 확산되었고(Tran et al., 2013; Joshi et al., 2014; Nunan et al., 2014; Leobert, D et al., 2015; Dhar et al., 2019), 최근에는 국내 새우양식장에서도 보고된 바가 있다(Han et al., 2020a). 세계동물보건기구(OIE)는 2016년부터 AHPND를 관리 대상 질병으로 지정하여 관리하고 있으며, 국내에서도 법정전염병 및 제1종 살처분 대상 질병으로 추가되었다(수산생물질병관리법 시행규칙 2020. 01. 03).

[0004] 일반적으로 AHPND의 원인 병원체는 특정 독소유전자(pirA, pirB)를 포함하고 있으며, 병원성 플라스미드(pVPA3-1)를 가진 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*, VpAHPND)로 알려져 있다(Han et al., 2015a). 비브리오 파라헤몰리티쿠스 세균의 플라스미드 내에는 특이적으로 곤충 독소를 만드는 유전자가 존재한다. 새우와 곤충은 먼 친척관계이므로, 변형된 곤충 독소가 새우에서 간체장을 공격하여 폐사를 일으킨다. 주로 새우의

구강을 통해 감염되어 위에 붙어서 증식하며 독소를 형성하고, 위에서부터 AHPND의 주요 장기인 간체장으로 독소가 이동하여 장기를 망가뜨림으로써 새우의 사료 섭취 및 소화를 저해한다.

[0005] AHPND를 치료하기 위해 많은 종류의 항생제들(flорfenicol, oxytetracycline, enrofloxacin 등)이 사용되었으나 항생제 내성 문제로 현재는 권고되고 있지 않다. 특히 베트남에서는 항생제 치료(tetracycline과 flорfenicol)가 이 질병에 의한 생존율을 향상시키는데 도움이 되지 않았다고 보고하고 있다(Tran et al., 2013). 이와 관련하여 비브리오 파라헤몰리티쿠스는 플라스미드 매개 테트라사이클린계 및 다양한 항생제 내성 유전자들을 보유하고 있다고 알려져 있다(Han et al., 2015; Dong, Xuan et al., 2017). 또한, 최근 소비자의 인식 제고로 인하여 안전한 양식 수산생물을 생산하기 위한 다양한 전략이 개발되고 있다.

[0006] 한편, 프로바이오틱스(probiotics)는 항생물질을 의미하는 항생제 (antibiotics)와는 대립되는 어원적 의미를 가지며, 인간이나 동물 등 숙주의 건강에 유익한 효과를 나타내는 살아있는 미생물 및 그 대사물질을 의미한다. 이는 항균효과뿐만 아니라 숙주의 장내 균총(microbiota)을 조절하여 각종 장 질환을 억제하고 면역력을 증강시키는 등 여러 측면에서 동물에 유익한 효과를 나타낸다. 프로바이오틱스는 사람과 동물에 대한 독성유전자를 보유하지 않으며, 병원성 물질 또한 생산하지 않는다. 이에, 프로바이오틱스 균주의 안정성(stability) 및 안전성(safety)과, 유용 생리활성을 기반으로 입증된 프로바이오틱스를 이용한 양식 사료 첨가제의 개발이 진행되고 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은, 비브리오 파라헤몰리티쿠스에 항균 활성이 있는 신규한 프로바이오틱스 균주를 발굴하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주, 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주, 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주, 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 개선용 사료조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주, 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주, 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주, 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 개선용 사료조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 신규한 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주는 AHPND 감염의 원인균인 비브리오 파라헤몰리티쿠스 균주에

대하여 항균효과가 있는 것을 확인하였다. 또한 흰다리새우에 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 급여하면, 비브리오 파라헤몰리티쿠스의 감염으로 유도되는 AHPND의 발병을 억제하여, AHPND로 인한 폐사를 억제하고, 새우 간체장 내 비브리오 균의 생육을 억제하는 것을 확인하여, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 신규한 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주의 비브리오 파라헤몰리티쿠스에 대한 항균 효과를 확인한 것이다.

도 2는 본 발명의 본 발명의 신규한 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 급여한 흰다리새우의 AHPND 감염 억제 효과를 폐사율로 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 본 발명의 신규한 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 급여한 흰다리새우의 AHPND 감염 억제 효과를 간체장 내 비브리오 생균수로 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

본 발명은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주를 제공한다.

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 균주는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 균주는 기탁번호 KCTC15414BP인 것일 수 있다.

본 발명의 신규한 바실러스 사펜시스(*B. safensis*) BS22LVI는 한국생명공학연구원(KRIBB)에 2023.04.14.일자로 수탁하여, 기탁번호 KCTC 15414BP를 부여받았다.

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 균주는 갑각류 유래의 균주인 것일 수 있고, 상기 갑각류는, 참새우(*Penaeus chinensis*), 줄새우(*Palaemon paucidens*), 징거미새우(*Macrobrachium nipponense*), 보리새우(*Penaeus indicus*) 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)로 이루어진 군에서 선택된 갑각류인 것일 수 있으며, 바람직하게는 흰다리새우인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 갑각류는, 해수, 담수 또는 민물 갑각류인 것일 수 있다.

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 균주는 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)에 항균 활성을 나타내는 것일 수 있다.

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 균주는 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 발병을 억제하는 것일 수 있고, 상기 발병 억제는, 갑각류의 폐사를 억제하는 것일 수 있으며, 상기 발병 억제는, 갑각류 간체장 내 AHPND 원인균의 생균수를 감소시키는 것일 수 있다.

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 AHPND 원인균은 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)인 것일 수 있다.

또한, 본 발명은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주, 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간체장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명에서 사용되는 용어 “배양물”이란 미생물을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 산

물을 의미하며, 미생물이 포함되는 개념이다.

- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0034] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjutant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 효과를 증가시킬 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0037] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주, 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 급성간췌장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명에서 사용되는 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0043] 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 유효성분을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0044] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조

식품류 등이 있다.

[0045] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0046] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 갑각류 감염병인 급성간췌장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 개선 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 먼류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제 제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 신규한 바실러스 사펜시스(*Bacillus safensis*) BS22LVI 균주, 이의 배양액 또는 배양 상등액을 유효성분으로 포함하는 갑각류 급성간췌장괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND)의 예방 또는 개선용 사료조성물을 제공한다.

[0049] 본 발명의 사료 조성물은 종래 사료에 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있다. 이러한 사료에 첨가되는 성분의 일 예로서 곡류분말, 고기분말, 및 두류 등을 포함할 수 있다. 상기에서 곡류분말은 쌀가루, 밀가루, 보리가루, 및 옥수수가루 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다. 상기에서 고기분말은 닭고기, 소고기, 돼지고기, 및 타 조고기 중에서 선택된 어느 하나 이상을 분말화한 고기분말을 사용할 수 있다. 상기에서 두류는 대두, 강낭콩, 완두콩, 및 검정콩 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명의 사료 조성물은 상기에서 언급한 종래 사료에 첨가되는 성분인 곡류분말, 고기분말, 및 두류 이외에도 사료의 영양성을 증대시키기 위해 영양제, 및 무기물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가할 수 있으며, 사료 품질의 저하를 막기 위해 항곰팡이제, 항산화제, 항응고제, 유화제, 및 결합제 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0052] 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.

[0054] <실시예 1> 신규 바실러스 사펜시스 균주의 분리

[0055] 본 발명의 새우 급성간췌장괴사병(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND)의 원인균인 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)에 대한 항균효과를 가지는 신규한 균주를 분리하였다. 구체적으로, 양식 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 장과 위 조직을 수득하고, 이를 마쇄 후 현탁하여 배양하였다. 그 후 연속 희석법으로 희석하여 배양액을 준비한 후 de Man, Rogosa and Sharpe(MRS) 아가(agar) 배지에 평판 도말

하여 배양하였다. 배양 종료 후 콜로니(colony)를 수득하고, 각각의 콜로니를 tryptic soy agar (TSA)배지에 배양한 후 비브리로 파라헤몰리티쿠스 *Vibrio parahaemolyticus* VP21LV 균주를 배양된 plate에 수직 접종하여 공배양한 후, clean zone이 확인된 균주를 선별하였다.

[0057] 그 후 선별된 균주를 하기 표 1의 프라이머를 이용하여, 동정하였다.

표 1

[0058]

Gene	프라이머 정보		
	Primer (F/R)	Oligonucleotide sequence (5' -3')	Product size (bp)
16s rRNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1465
	1492R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> F	AACACGTATGAAGGCGGAAC	686
	<i>gyrB</i> R	TCCGATTCCAGTTCCTAACG	

[0060]

그 결과, *Vibrio parahaemolyticus* VP21LV 균주에 대하여 항균 활성이 있는 신규한 균주는 바실러스 사펜시스 (*Bacillus safensis*)와 상동성이 가장 높은 균주로 확인되었으며 이의 16s rRNA 서열(서열번호 1) 및 *gyrB* 서열(서열번호 2)의 상동성을 확인하여(표 2 및 표 3), 분리된 균주를 *Bacillus safensis* BS22LVI로 명명하였다. 또한, *B. safensis* BS22LVI를 한국생명공학연구원(KRIBB)에 2023.04.14.일자로 수탁하여, 기탁번호 KCTC 15414BP를 부여받았다.

표 2

[0061]

	Type strain of bacteria		Identity (%)
	Species	Strain	
1	<i>Bacillus safensis</i>	ATCC BAA-1126	99.3
2	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	98.72
3	<i>Bacillus australimaris</i>	MCCC 1A05787	98.69
4	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MCCC 1A08372	98.69
5	<i>Bacillus altitudinis</i>	Bi.FFUP1	98.79
서열번호 1 (5'-3')	GCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTGTGTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTCTGCGACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGCTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAGCGTGGGGAGCGAAGAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACA GAACAAAGGGTGCAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGA		

표 3

[0062]

	Type strain of bacteria		Identity (%)
	Species	Strain	
1	<i>Bacillus safensis</i>	ATCC BAA-1126	98.07
2	<i>Bacillus australimaris</i>	MCCC 1A05787	94.09
3	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	91.72

4	<i>Bacillus altitudinis</i>	Bi.FFUP1	90.81
5	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MCCC 1A08372	90.46
서열번호 2 (5'-3')	ACGGAAACCATTGAATTTGATTACGATACACTTGCTAACCGTGTTCGTGAGTTAGCCTTCTTAACAA AAGGTGTAACATCATCATAGAAGACTTGCGTGAAGGCCAAAGAGCGGAGAAAATGAATACTGCTACGA AGGCGGTATTAAGAGCTATGTAGAACATTTAAACCGCTCAAAAGAAGTCGTTTCATGAAGAGCCTGTG TACATCGAAGGTGAGAAAGACGAATCACGGTTGAAGTAGCATTACAATATAACGATTCTATACAA GCAATATCTATTCTTCGCCAACAAATATCAACACGTATGAAGGCGGAACACACGAAGCTGGTTTTAA AACCGGTCTAACCGGTGTCATCAATGACTATGCTCGTAAAAATGGCGTATTCAAAGATGGGGATGCG AATTTAAGTGGTGAAGATGTGCGAGAAGGCTTAACAGCCATTATCTCCATCAACATCCAGACCCTC AATTCGAAGGACAAACGAAGACAAAGCTTGGAAGCTCAGAAGCGAGAACCATCACAGACTCCCTTTT CTCTGAAGCACTTGAGAAATCTTGCTTGAAAATCCTGATTCTGCGAAAAAATGTGGAAGAAAGGA CTGATGGCAGCTCGTGCAAGATGGCTGCCAAAAAAGCTCGTGAGCTGACAAGACGTAAAGTGCAC TGGA		

[0064] <실시예 2> 바실러스 사펜시스 BS22LVI의 배양 조건 확인

[0065] 본 발명의 신규한 분리 균주인 바실러스 사펜시스 BS22LVI의 배양 조건을 확인하였다. 구체적으로 상기 실시예 1에서 선별된 바실러스 사펜시스 BS22LVI를 MRS broth에 1.2×10^7 CFU/ml의 농도로 접종하고, 4, 10, 40 및 65℃의 조건에서 160 rpm으로 진탕 배양하였다. 또한, 염분 농도 및 pH 조건을 확인하기 위하여, 0, 15 및 30 ppt와 pH 6, 8 및 9의 조건으로 28℃에서 160 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 24시간 후, 각 배양액을 640 nm 파장에서 흡광도를 측정하여, 균주 성장을 확인하였다. 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0066]

Species	Growth characteristics		
	Temperature (℃)	NaCl (%)	pH
<i>Bacillus safensis</i>	4 / 10 / 45/ 60	0 / 1.5 / 3	6 / 8 / 9
BS22LVI	+ / + / + / +	+ / + / +	+ / + / +

[0068] 그 결과, 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주는 4 ~ 60℃의 온도 조건에서도 생장이 가능하고, 다양한 염분 및 pH 조건에서도 생장이 가능한 것을 확인하였다.

[0070] <실시예 3> 비브리오 파라헤몰리티쿠스에 대한 신규 균주의 항균 효과 확인

[0071] <3-1> 바실러스 사펜시스 BS22LVI의 항균 효과 확인

[0072] 본 발명의 신규한 분리 균주인 바실러스 사펜시스 BS22LVI가 새우 급성간췌장췌사병(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND)의 원인균인 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)에 항균 효과가 있는지 확인하였다. 구체적으로, 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 Brain heart infusion(BHI) agar +1% NaCl 플레이트(plate)의 중앙에 일직선으로 획선 도말한 후 28℃에서 24시간 배양하였다. 그 후 비브리오 파라헤몰리티쿠스 VP21LV 균주를 바실러스 사펜시스 BS22LVI 배양선과 직각이 되도록 일직선으로 획선 도말한 후, 추가로 28℃에서 24시간 배양하였다.

[0074] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주 배양선으로부터, 비브리오 파라헤몰리티쿠스 VP21LV 균주의 배양선이 10 mm 이격되어 있어, 본 발명의 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주가 AHPND의 원인균인 비브리오 파라헤몰리티쿠스 균주의 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

[0076] <3-2> 바실러스 사펜시스 BS22LVI 배양 상등액의 항균 효과 확인

[0077] 본 발명의 신규한 분리 균주인 바실러스 사펜시스 BS22LVI의 배양액의 상등액에서도, 비브리오 파라헤몰리티쿠스 VP21LV 균주에 대한 항균효과가 나타나는지 확인하였다. 구체적으로, 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 BHI broth에 접종한 후 28℃에서 24시간 배양하였다. 그 후 배양액을 28, 60 및 100℃에 노출시킨 후 8500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 수득된 상등액은 Membrane filter (0.2um)로 여과하고, 멸균하였다. 분리한 상등액을 BHI broth + 1% NaCl 배지와 함께 96 well plate에 각각 100 μ l씩 접종하고, 2 배 희석(2-fold dilution)으로 희석하였다. 그 후 각 well에 5×10^7 , 5×10^6 및 5×10^5 CFU/ml 농도의 비브리오 파라헤몰리티쿠스 VP21LV 균주 배양액을 각각 10 μ l씩 접종하였다. 접종 후 28℃에서 24시간 동안 배양한 후 640 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 비브리오 균만 접종한 양성 대조군, 상등액만 접종한 음성 대조군을

이용하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0078]

Extracellular Bacterial species	Temperature treatment	Extracellular antimicrobial activity	
		<i>V. parahaemolyticus</i> VP21LV	
		Undiluted	2-fold diluted
<i>Bacillus safensis</i> BS22LVI	28 ° C	+	+
	60 ° C	+	+
	100 ° C	-	-

[0080]

그 결과, 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바실러스 사펜시스 BS22LVI의 배양액의 상등액은 28 및 60 °C의 온도 조건에 노출되어도, 비브리오 파라헤몰리티쿠스 VP21LV 균주의 성장을 억제하는 것을 확인하여, 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주가 증식함에 따라, 세포 외로 항균 물질을 분비하는 것을 확인하였다.

[0082]

<실시예 4> 바실러스 사펜시스 BS22LVI를 포함하는 사료 조성물 제조 및 안전성 확인

[0083]

본 발명의 신규한 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 포함하는 양식 새우 사료 조성물을 제조하였다. 구체적으로, 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 MRS broth에서 28°C의 조건으로 48시간 배양하였다. 배양 후 3000g로 15분간 원심분리한 후, 펠렛을 수득하고, 이를 phosphate buffered saline (PBS)에 재현탁 하였다. 그 후 6×10^9 , 5×10^8 및 2×10^7 CFU/ml의 농도로 조정하여, 현탁액을 사료에 도포한 후, 10분간 자연 건조하였다. 그 후 양식 새우인 흰다리새우(*L. vannamei*)를 탱크당 10마리씩 28°C에 입식하였으며, 바실러스 사펜시스 BS22LVI가 도포된 건조 사료를 급여하였다. 대조군은 멸균 PBS를 도포한 사료를 이용하였으며, 2주간 사료를 급여하면 새우의 폐사를 확인하였다.

[0085]

그 결과, 바실러스 사펜시스 BS22LVI가 투여된 탱크에서는 농도와 관계없이, 모든 새우에서 폐사는 확인되지 않았으며, 가장 높은 농도인 6×10^9 CFU/ml의 농도에서도 14일간 폐사가 확인되지 않아, 본 발명의 바실러스 사펜시스 BS22LVI가 안전한 균주인 것을 확인하였다.

[0087]

<실시예 5> 바실러스 사펜시스 BS22LVI의 AHPND 감염 억제 확인

[0088]

본 발명의 신규한 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 포함하는 양식 새우 사료 조성물의 AHPND 감염 억제를 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 4와 동일하게 새우에 각각의 사료를 급여한 탱크에, 비브리오 파라헤몰리티쿠스 VP21LV 균주를 2.1×10^6 CFU/ml의 농도로 1시간 침지 감염시켰다. 그 후 폐사율과 감염 정도를 확인하였으며, 3주간 실험을 진행하였다. 감염 정도는 1, 3, 7, 14일에 새우에서 간체장을 수득하고, 비브리오 파라헤몰리티쿠스의 생균수를 측정하였다.

[0090]

그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 일반 사료를 급여한 군에서는 실험 시작 20일차에 모든 새우 개체가 100% 폐사하였으나, 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 급여한 군에서는 20일 차에 $31 \pm 11.3\%$ 의 폐사율을 나타내어, AHPND 감염으로 인한 폐사가 억제된 것을 확인하였다.

[0091]

또한, 간체장 내부의 비브리오 파라헤몰리티쿠스의 생균수를 확인한 결과, 1일과 3일 차에는 각 군간 유의적인 차이는 없었으나, 7일과 14일 차에, 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 급여한 군에서, 비브리오 파라헤몰리티쿠스의 생균수가 유의적으로 감소되어 있어(도 3), 본 발명의 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주가 비브리오 파라헤몰리티쿠스 감염으로 유도되는 AHPND의 발병을 억제시키는 것을 확인하였다.

[0093]

따라서, 본 발명의 신규한 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주는 AHPND 감염의 원인균인 비브리오 파라헤몰리티쿠스 균주에 대하여 항균효과가 있는 것을 확인하였다. 또한 흰다리새우에 바실러스 사펜시스 BS22LVI 균주를 급여하면, 비브리오 파라헤몰리티쿠스의 감염으로 유도되는 AHPND의 발병을 억제하여, AHPND로 인한 폐사를 억제하고, 새우 간체장 내 비브리오 균의 생육을 억제하는 것을 확인하였다.

수탁번호

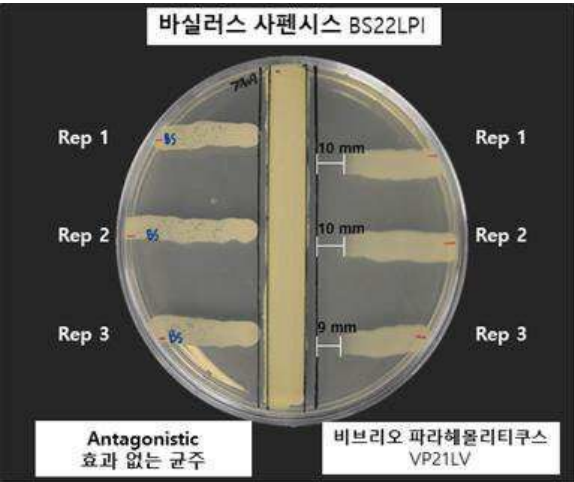
[0095]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

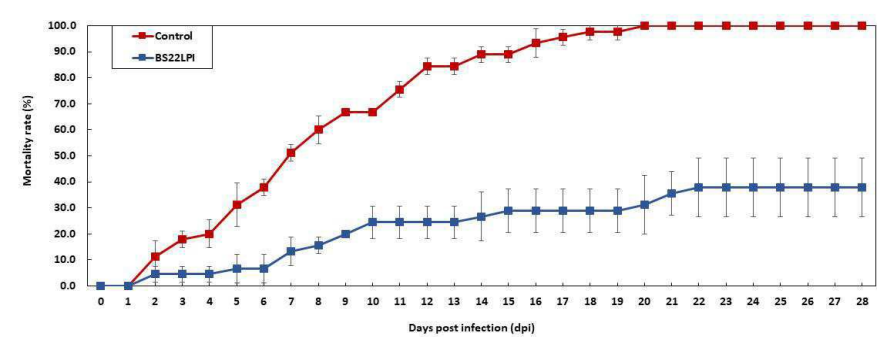
수탁번호 : KCTC15414BP
수탁일자 : 20230414

도면

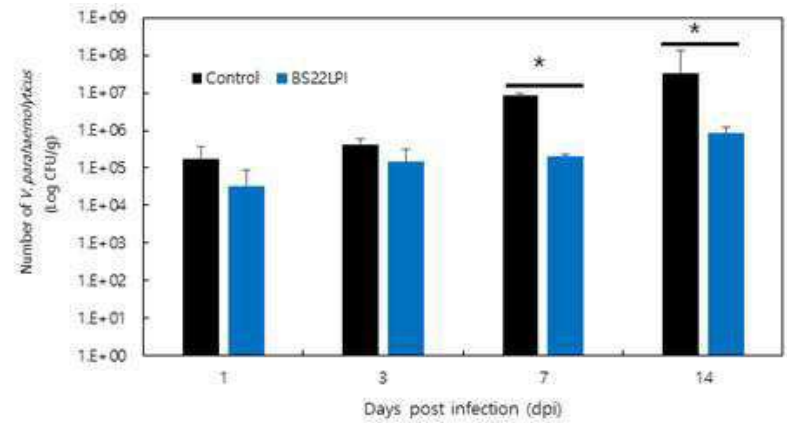
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.