(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 7 월 26 일 (26.07.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/135694 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) *A23K 50/80* (2016.01)
A23K 10/16 (2016.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A23K 20/195 (2016.01) *C12R 1/225* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/001615

(22) 국제출원일: 2017 년 2 월 14 일 (14.02.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0010635 2017 년 1 월 23 일 (23.01.2017) KR

(71) 출원인: 부경대학교 산학협력단 **(PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 48547 부산시 남구 신선로 365, Busan (KR).

(72) 발명자: **김도형 (KIM, Do-Hyung)**; 48432 부산시 남구 수영로 345, #101-1903, Busan (KR). **누엔탄 루안 (NGUYEN, Thanh Luan)**; 48501 부산시 남구 수영로 266번길 98-14, #604, Busan (KR). **김남은 (KIM, Nam-Eun)**; 49318 부산시 사하구 승학로281번길 6-6, Busan (KR).

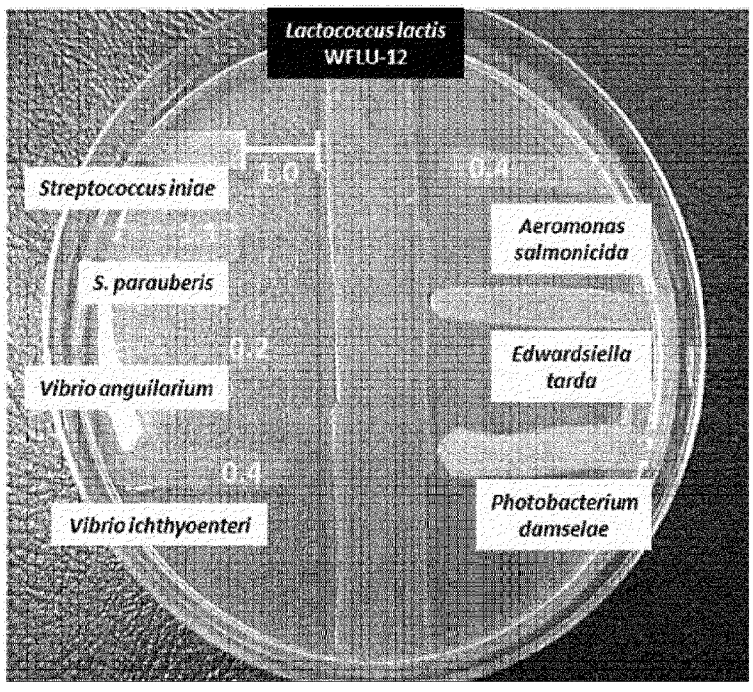
(74) 대리인: 특허법인충정 **(HWANG MOK PARK IP GROUP)**; 06234 서울시 강남구 테헤란로14길 16, 8층 (역삼동,라인빌딩), Seoul (KR).

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) **Title:** NOVEL LACTOCOCCUS LACTIS SUBSPECIES LACTIS ISOLATE WFLU-12 AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 신규한 락토코커스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention provides a Lactococcus lactis subspecies lactis isolate WFLU-12 with the accession number KCTC 13180BP, and a use thereof.

(57) **요약서:** 본 발명은 기탁번호 KCTC13180BP의 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주 및 이의 용도를 제공한다.

[다음 쪽 계속]

WO 2018/135694 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 신규한 락토코커스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 신규한 락토코커스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주 및 이의 용도에 관련된 것이다.

배경기술

[2] 2012년의 세계 식품 어류 양식 생산량은 어류 44.2백만톤(66%), 연체동물 15.2백만톤(23%), 갑각류 6.4백만톤(10%), 그 외 어종 0.9백만톤(1%)으로 기록되었다. 내륙 어류 양식 생산량은 38.6백만톤으로 2012년 세계 수산물 양식 생산량의 58%를 차지하였다. 전세계적으로 총 어류 생산량에서 양식의 비율은 꾸준히 증가하고 있다. 아시아는 2008년 이후부터 일반해면어업(어획)보다 양식어업 생산량이 더 높았으며, 2012년의 경우 총 어류 생산량에서 54%를 차지하였다. 이는 유럽 18%, 다른 국가 15% 미만과 비교하여 굉장히 높은 수치이며, 아시아의 식량 산업에 있어 양식은 매우 높은 비중을 차지하고 있다(FAO yearbook, Fishery and Aquaculture Statistics. 2012). 이러한 어류 양식에서는 양질의 사료가 필요하며 이런 사료는 필요 영양 성분뿐만 아니라 보충 사료첨가제도 포함하는 개념이다. 사료는 어체의 건강유지, 성장발달에 영향을 주며 환경-친화적 양식이 가능해야 한다.

[3] 사료첨가제는 사료에 미량으로 첨가하는 물질로 정의되며 영양과 성장률뿐만 아니라 어체의 건강에 영향을 미친다. 성장촉진에 사용되는 사료첨가제의 대부분은 호르몬, 항생제, 이온층(ionosphere), 몇몇 염(salt)이 포함된다. 프로바이오틱스는 이러한 사료첨가제 중 살아있는 미생물을 사용하는 것으로, 숙주의 장내 미생물 균형을 개선하고 숙주의 성장을 촉진한다. 양식에서 프로바이오틱스는 병원체 억제, 수질 개선, 숙주의 면역 반응 활성, 추가적인 소화 효소 생산을 통한 영양 흡수 증진 등의 측면에서 평가되었다 (Verschuere et al., 2002; Carnevali et al., 2006). 이러한 이유로 전세계적인 어류양식에서 프로바이오틱스의 사용은 각광받고 있다. 일반적으로 사용되는 프로바이오틱스 균주는 *Lactobacillus acidophilus, L. bulgaricus, L.* plantariu, Lactococcus lactis, Saccharomyces cerevisiae이 대표적이다 (FAO, 2004).

[4] 프로바이오틱스를 사료첨가제로 이용하는 경우 가장 큰 의미를 갖는 것은 항생제 대체제로 사용할 수 있다는 점이다. 현재 어류 양식에서는 세균성 질병을 제어 및 예방하기 위하여 항생제와 화학요법제 사용에 의존하고 있다. 그러나, 항생제 및 화학요법제의 사용은 선택압(selective pressure)을 발생시켜 수생 환경 내 항생제 내성 세균의 발생, 어류 병원체에서 항생제 내성의 증가, 이후 세균 및 어류병원체에 존재하는 내성 결정요인이 육상 동물과 인간의 병원체로

전달되는 결과를 초래할 수 있다. 그러므로 어류 양식에서 항생제 및 화학요법제를 대체할 수 있는 물질 개발이 시급하다. 이러한 측면에서 프로바이오틱스는 항생제 내성 세균의 위험을 없앨 수 있는 가장 적합한 대체제이다. 여러 연구들에서 프로바이오틱스의 사용으로 숙주 면역 활성 및 직접적인 병원체 억제로 인한 질병 감염 감소, 폐사율 감소에 효과가 있음이 증명되어 친환경적 양식기술로 의미를 갖는다.

[5] 한국에서 급격한 양식 산업의 확장은 세균성 병원체로 인한 극심한 경제적 타격을 받았으며 특히 넙치에서 연쇄구균증의 주요한 원인체인 *Streptococcus iniae*와 *S.* parauberis에 의한 손실이 큰 비중을 차지한다. 넙치에서 연쇄구균증을 제어하기 위한 항생제의 장기간 사용은 *S.* iniae에서보다 *S.* parauberis에서 항생제 내성의 높은 비율에 기여하였다(Park et al., 2009). 그러므로, *S.* parauberis 내성 전파의 발생을 막기 위해 항생제 사용을 줄이고, 적절한 프로바이오틱스를 사용하는 것이 하나의 대안이 될 수 있다.

[6] 이러한 측면에서, 본 발명의 발명자들은 병원균에 대한 항균 활성 및 감염 예방 효과가 우수할 뿐만 아니라, 어체 성장 촉진 효과 또한 우수한 프로바이오틱스 분리주 및 이를 포함하는 사료첨가제에 대한 연구를 거듭한 결과 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 병원균에 대한 항균 활성이 우수하며, 프로바이오틱스 조성물에 사용되어 어류의 선천면역반응 증진, 어체 성장 촉진 효과를 나타낼 수 있는 분리주를 제공하고자 한다.

[8] 또한, 본 발명은 상기 분리주를 포함하는 프로바이오틱스 조성물, 항균 조성물, 어류 양식용 사료 첨가제 및 사료를 제공하고자 한다.

[9] 또한, 본 발명은 상기 분리주를 이용한 양식 어류의 성장 촉진 방법 및 양식 어류의 병원균에 의한 감염 예방 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[10] 본 발명의 일 구현 예는 기탁번호 KCTC13180BP의 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주를 제공한다.

[11] 상기 분리주는 최소 4℃, 바람직하게는 4-10℃의 온도, 2-10의 pH, 및 담즙산에 저항성을 나타낼 수 있다.

[12] 또한, 상기 분리주는 비브리오 앙구일라룸(Vibrio anguillarum), 비브리오 익티오엔테리(*V.* ichthyoenteri), 에르모나스 살모니시다(Aeromonas salmonicida), 에드와드시엘라 타르다(Edwardsiella tarda), 포토박테리움 담셀레(*Photobacterium damselae*)의 그램 음성 세균 또는 스트렙토코커스 이니애(Strptococcus iniae), 스트렙토코커스 파라우베리스(*S. parauberis*)의 그램 양성 세균으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 대해 항균 활성을 가질 수 있다.

[13] 본 발명의 다른 구현 예는 상기 분리주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 프로바이오틱스 조성물을 제공한다.

[14] 상기 프로바이오틱스 조성물은 어류의 선천면역반응 증진, 체중 증가, 체장 증가, 체내 순환 대사산물 증진, 대사산물의 항상성 유지, 체내 황함유 아미노산 수준의 증가, 장내 타우린의 증가, 체내 시트룰린 수준의 증진 및 장내 비타민 증진으로부터 선택되는 하나 이상의 효과를 나타낼 수 있다.

[15] 본 발명의 다른 구현 예는 상기 분리주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항균 조성물을 제공한다.

[16] 본 발명의 또 다른 구현 예는 상기 프로바이오틱스 조성물 또는 항균조성물을 유효성분으로 포함하는, 어류 양식용 사료 첨가제를 제공한다.

[17] 본 발명의 다른 구현 예는 상기 사료 첨가제를 포함하는 어류 양식용 사료를 제공한다.

[18] 본 발명의 다른 구현 예는 상기 사료를 양식중인 어류에 급이하는 단계를 포함하는 양식 어류의 성장을 촉진하는 방법을 제공한다.

[19] 또한, 본 발명의 다른 구현 예는 상기 항균 조성물을 어류 양식장에 살포하는 단계를 포함하는 양식 어류의 병원균에 의한 감염을 예방하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[20] 본 발명의 신규한 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주는 저장 안정성 및 병원균에 대한 항균활성이 우수하며, 이를 포함하는 프로바이오틱스 조성물은 어류의 선천면역반응 증진, 어체 성장 촉진 효과를 나타낸다. 따라서, 상기 분리주를 포함하는 프로바이오틱스 조성물, 항균 조성물, 어류 양식용 사료 첨가제 및 사료를 사용함으로써 양식산업의 수익을 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[21] 도 1a - 도 1d는 본 발명의 일 구현 예로서, 다른 유래의 분리주와 WFLU-12의 전체 게놈 비교 결과를 도시한다.

[22] 도 2는 본 발명의 일 구현 예로서, 본 발명의 분리주의 사료 내 첨가시 장기간 생존 및 안정성을 도시한다.

[23] 도 3은 본 발명의 일 구현 예로서, Cross-streak 방법을 사용한 *In vitro* 항균활성 시험 결과를 도시한다.

[24] 도 4는 본 발명의 일 구현 예로서, 열처리한 *Lc.* lactis subsp. *lactis* WFLU-12의 *S. iniae*와 *S. parauberis*에 대한 항균 활성 변화 결과를 도시한다.

[25] 도 5는 본 발명의 일 구현 예로서, 넙치에서 프로바이오틱 분리주의 경쟁적 배제 활성을 나타낸다.

[26] 도 6은 본 발명의 일 구현 예로서, 프로바이오틱군과 대조군의 식작용 활성(A)과 호흡폭발활성(B)의 비교 결과를 도시한다.

[27] 도 7은 본 발명의 일 구현 예로서, 전-염증성 싸이토카인 발현의 비교 결과를 도시한다.

[28] 도 8은 본 발명의 일 구현 예로서, 체중 변화(A) 및 체장 변화(B)를 도시한다.

[29] 도 9는 본 발명의 일 구현 예로서, 사료효율(feed efficiency)과 특수생장률(Specific growth rate, SGR)의 비교 결과를 도시한다.

[30] 도 10은 본 발명의 일 구현 예로서, 대사산물의 증진을 도시한다.

[31] 도 11은 본 발명의 일 구현 예로서, 장액(intestinal fluid)과 혈청(serum)에서 검출되는 모든 대사산물의 상대표준편차(RSD%)를 나타낸다.

[32] 도 12는 본 발명의 일 구현 예로서, 어류 체내 황함유 아미노산 수준의 비교 결과를 도시한다.

[33] 도 13은 본 발명의 일 구현 예로서, 어류 장 내 타우린(taurine)과 담즙산(bile acid)의 증가의 비교 결과이다.

[34] 도 14는 본 발명의 일 구현 예로서, 장 내 및 혈청에서 시트룰린(citrulline)의 증가의 비교 결과를 도시한다.

[35] 도 15는 본 발명의 일 구현 예로서, 비타민 B1 (Thiamine), B2 (FAD_divalent), B3 (Nicotinamide), and C (Ascorbic acid) 생합성 비교 그래프를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[36] 본 발명의 일 구현 예는 기탁번호 KCTC13180BP의 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주를 제공한다. 본 발명의 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주는 넙치의 위장관 내에서 분리되었으며 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 99.6%의 상동성을 나타내며 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 타입 변종(strain)으로 동정되었다(RDP SEMATCH program). API CH50 시험 결과에서는 동종과 99.9%의 상동성을 나타냈다.

[37] **다른 유래의 분리주와 WFLU-12의 전체 지놈 비교 분석**

[38] 다른 유래의 분리주와 본 발명의 WFLU-12 분리주의 신테니(synteny)를 분석한 결과 다른 유래의 분리주와 비교하여 구분되는 신테니를 형성함을 나타냈다(도 1 a). 또한, WFLU-12 분리주와 다른 유래 분리주와 게놈 비교 분석 결과 유전자의 재배치(relocation)와 장내 환경에 적응한 다양하고 특이한 특징을 확인하였는데, 예를 들어 부착, 스트레스 저항(cold shock resistance CspB, CspA, CspC, CspF, CspG), 탄수화물 이용(CAZY profile)(도 1b), 박테리오신과 관련된 유전자 클러스터(antibiotic nisin Z 생합성과 colicin V 생산)의 유전자를 인코딩하는 것(encoding) 등의 특징을 확인하였다. 흥미롭게도, 이들 분리주들의 annotation 결과 리소자임 (두 개의 유전자), fimbrial 유전자 클러스터와 관련된 singleton 유전자(특이 유전자)는 WFLU-12에서만 확인되었다. 게다가, 크로모좀의 유지를 돕는 것으로 확인된 Chi site(DNA motif)의 과발현을 포함한 다양한 유전자들이 WFLU-12에서 확인되었다(도 1c). 도 1c에서 WFLU-12와 다른 유래 분리주들 모두에서 Chi site(DNA motifs)의 높은 발현이 나타난다. 또한, 전달 단백질과 시스테인 배제의 수가 WFLU-12 분리주에서 높았다(도 1d).

[39] 또한, 본 발명의 발명자들은 본 발명의 락토코쿠스 락티스 아종 락티스

WFLU-12 분리주가 좋은 기능성 유전자를 가지고 있으면서 다른 분리주와 구분되며, 저온, 다양한 pH 환경 및 담즙산에 대한 저항성 및 저장 안정성이 우수하며, 다양한 어병 세균에 대한 항균 활성 또한 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[40] 구체적으로, 본 발명의 WFLU-12 분리주는 4℃ 내지 상온의 온도, 2-10의 pH 조건에서도 잘 성장하며, 특히 담즙산에 좋은 저항성을 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 분리주는 비브리오 앙구일라룸(Vibrio anguillarum), 비브리오 익티오엔테리(*V.* ichthyoenteri), 에르모나스 살모니시다(Aeromonas salmonicida), 에드와드시엘라 타르다(Edwardsiella tarda), 포토박테리움 담셀레(*Photobacterium damselae*)의 그램 음성 세균 또는 스트렙토코커스 이니애(*Strptococcus* iniae), 스트렙토코커스 파라우베리스(*S. parauberis*)의 그램 양성 세균으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 대해 항균 활성을 가질 수 있다.

[41] 본 발명자들은 본 발명의 WFLU-12 분리주를 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 KCTC(Korean Collection for Type Cultures) 생물자원센터에 2017년 1월 3일자로 기탁하고, 수탁번호 KCTC13180BP를 부여받았다.

[42] 또 다른 구현 예로서, 본 발명은 상기 분리주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 제공한다.

[43] 본 발명의 용어 "배양물"은 본 발명의 WFLU-12 분리주가 시험관 내에서 성장 및 생존할 수 있도록 영양분을 공급할 수 있는 배지에 상기 분리주를 일정기간 배양하여 얻는 배양된 균주, 이의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 전체 배지를 의미하며, 균주 배양 후 균주를 제거한 배양액도 포함한다.

[44] 본 발명의 용어 "프로바이오틱스(probiotics)"는 건강에 도움이 되는 장내 세균총 즉, 숙주의 건강에 이로움을 제공하는 살아있는 미생물 즉 생균류를 의미한다. 일반적으로 프로바이오틱스는 요거트 등의 발효식품의 일부 또는 식이보충제로서 소비된다. 프로바이오틱스로 알려진 미생물에는 락트산 박테리아(lactic acid bacteria; LAB), 비피도박테리아(bifidobacteria), 일부 효모(yeast) 및 바실러스 등이 있다.

[45] 또한, 본 발명의 프로바이오틱스 조성물은 어류의 선천면역반응 증진, 체중 증가, 체장 증가, 체내 순환 대사산물 증진, 대사산물의 항상성 유지, 체내 황함유 아미노산 수준의 증가, 장내 타우린의 증가, 체내 시트룰린 수준의 증진 및 장내 비타민 증진으로부터 선택되는 하나 이상의 효과를 나타낼 수 있다.

[46] 또 다른 구현 예로서, 본 발명은 분리주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항균 조성물을 제공한다. 상기 WFLU-12 분리주는 항균활성, 특히 어류 세균성 병원균에 대한 항균활성을 가지므로, 상기 WFLU-12 분리주 또는 이의 배양물은 항균 조성물로 이용될 수 있다. 바람직하게는 어류 세균성 병원균에 대한 항균 조성물로 이용될 수 있다.

[47] 또 다른 구현 예로서, 본 발명은 상기 항균 조성물 또는 프로바이오틱스 조성물을 유효성분으로 포함하는 어류 양식용 사료 첨가제를 제공한다. 본

발명의 사료 첨가제는 상기 유효성분 이외에 약학적, 식품학적 또는 사료용으로 허용되는 공지의 담체 또는 안정제 등의 첨가제를 추가로 포함할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타 첨가제 등을 포함할 수 있다. 이때, 그 형태는 분체, 과립, 펠렛, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다.

[48] 본 발명의 항균 조성물을 사료 첨가제로 사료에 포함시키는 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 사료성분과 함께 혼합하여 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다, 유효성분의 혼합량은 사용목적에 따라 적합하게 결정될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 균주로부터 유래하여 친환경적이며 안정성 면에서 별다른 문제가 없기 때문에 혼합량에 큰 제한은 없다.

[49] 본 발명의 대상이 되는 어류는 도미, 넙치, 우럭, 참돔, 민어, 숭어, 능성어 등의 해산어류 및 뱀장어, 은어, 산천어, 송어, 쏘가리 등의 육상어류인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게 넙치, 터봇 등 타우린 생산이 억제된 어종일 수 있으나, 특별히 이에 한정되는 것은 아니다.

[50] 본 발명의 사료 첨가제는 상기한 어류에 이용이 제한되는 것이 아니며, 양식 어류에 모두 사용될 수 있으며, 바람직하게는 비브리오 앙구일라룸(*Vibrio* anguillarum), 비브리오 익티오엔테리(*V.* ichthyoenteri), 에르모나스 살모니시다(*Aeromonas* salmonicida), 에드와드시엘라 타르다(*Edwardsiella* tarda), 포토박테리움 담셀레(*Photobacterium damselae*)의 그램 음성 세균 또는 스트렙토코커스 이니애(*Strptococcus* iniae), 스트렙토코커스 파라우베리스(*S. parauberis*)의 그램 양성 세균에 감염가능성이 있는 양식 어류에 사용될 수 있다.

[51] 또한, 본 발명의 사료 첨가제는 고체 배지에서 락토코커스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주를 배양하는 단계; 및 배양된 분리주를 원심분리하여 배양체를 수확하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 바람직하게는, 상기 배양하는 단계는 MRS 액체 배지에서 28℃에서, 최소 24시간, 바람직하게는 46-50시간, 가장 바람직하게는 48시간 동안 수행될 수 있다. 또한, 상기 배양체 수확 단계는 배양된 분리주를 3,000g으로 5-30분 동안, 바람직하게는 15분간 원심분리함으로써 수행될 수 있다. 또한, 상기 사료 첨가제의 제조 방법은 배양체를 생리식염수에 재현탁하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 배양체를 생리식염수에 현탁한 현탁액을 10^9 CFU/g 농도로 사료에 분사하여 골고루 도포한 다음 사료를 자연건조시킴으로써, 사료 첨가제를 포함하는 사료를 제조할 수 있다.

[52] 상기와 같이, 단순한 분리주 배양 및 배양체 수확의 방식으로 사료첨가제를 제작하므로 제작이 매우 간단하고 짧은 시간 내 대량 배양이 가능한 장점이 있다. 또한 사료 내 첨가 후 최소 4℃, 바람직하게는 4-10℃에 저장할 경우 본 분리주의 사료 내 세균수가 일정 기간 유지되어 사료첨가 후 오랜 기간 저장해 두며 사용이 가능하여 실제 양식장에서 사료첨가제로 사용할 경우 매우 용이한

장점이 있다.

[53] 또 다른 구현 예로서, 본 발명은 상기 사료 첨가제를 포함하는 어류 양식용 사료를 제공한다. 본 발명의 사료의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니며, 분말사료, 고형사료, 습윤 펠렛사료, 건조 펠렛사료, EP(extruder pellet) 사료, 날먹이 등 어떠한 사료라도 무방하다.

[54] 또 하나의 구현으로서, 본 발명은 상기 사료를 양식중인 어류에 급이하는 단계를 포함하는 양식 어류의 성장을 촉진하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 사료는 통상의 사료와 동일한 양 및 급이 간격으로 공급되는 것이 바람직하다.

[55] 또 하나의 구현으로서, 본 발명은 상기 항균 조성물을 어류 양식장에 살포하는 단계를 포함하는 양식 어류의 병원균에 의한 감염을 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명의 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주 또는 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물은 어류 세균성 병원균에 대한 항균활성을 나타내므로, 양식장에 살포하여 상기 세균성 병원균의 활성을 억제함으로써, 양식 어류의 상기 병원균에 의한 감염을 예방할 수 있다. 본 발명의 항균 조성물을 양식장에 살포함으로써 감염을 예방할 수 있는 병원균은 바람직하게는 비브리오 앙구일라룸(Vibrio anguillarum), 비브리오 익티오엔테리(*V. ichthyoenteri),* 에르모나스 살모니시다(Aeromonas salmonicida), 에드와드시엘라 타르다(*Edwardsiella* tarda), 포토박테리움 담셀레 (*Photobacterium damselae)*의 그램 음성 세균 또는 스트렙토코커스 이니애(*Strptococcus* iniae), 스트렙토코커스 파라우베리스(*S.* parauberis)의 그램 양성 세균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 실시를 위한 형태

[56] 실시예

[57] **실시예** 1 - 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주의 저항성 및 저장 안정성

[58] 본 발명의 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주 및 동종의 해양 유래가 아닌 다른 분리주의 저온, 다양한 pH 환경 및 담즙산에 대한 저항성을 시험하여 그 결과를 하기 표 1에 나타냈다.

[59] [표 1]

[60]

Species	Growth characteristics [a]		Bile salt characteristics [a]	
	Temp (°C)	pH	0.2%	0.3%
	10 / 45	2 / 4.4 / 9.6	4 / 24h	4 / 24h
Isolates obtained from marine fish gut				
Lc. lactis WFLU-12	+ / –	+ / + / +	+ / +	+ / –
Reference strains				
Lc. lactis KCTC 3899 (Earth worm)	+ / –	– / + / +	+ / +	– / –
Lc. lactis KCTC 3769 (Milk)	+ / –	+ / + / +	+ / +	– / –
Lc. lactis KCTC 3768 (Plant)	– / –	– / – / –	+ / +	– / –
Lc. lactis KCCM 40699 (Milk)	– / –	– / – / +	+ / +	– / –

KCTC: Korean Collection for Type Culture; KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms[a]
+, presence or –, absence of tolerance

[61] 상기와 같이, WFLU-12 분리주는 저온, 다양한 pH 환경에서 잘 성장하며 특히 담즙산에 좋은 저항성을 가진다. 또한, 10℃에서 생존하는데 이는 저온에서 본 분리주를 보존할 수 있는 가능성을 나타낸다.

[62] 또한, 본 분리주 WFLU-12를 첨가한 사료를 4℃에 저장 시 약 8개월까지 생존하였는바, 장기간 생존에 매우 좋은 능력을 보였다(도 2). 따라서, 사료 내 첨가 후 4℃에 저장할 경우 본 분리주의 사료 내 세균수가 일정 기간 유지되어 사료첨가 후 오랜 기간 저장해두며 사용가능하다.

[63] 또한, 본 분리주 WFLU-12를 근육주사 또는 복강주사로 어류에 주사하였을 때 어떠한 임상증상도 보이지 않았다. 또한, 본 종을 매우 높은 농도(~10^9 CFU/g 사료)로 넙치에 8주간 먹였을 때 어떠한 부작용도 나타나지 않았으며 오히려 8주의 기간 동안 어류의 섭이율이 매우 좋았다. 따라서, 본 분리주 WFLU-12는 어체에 악영향을 미치지 않는 매우 안전한 물질임을 확인할 수 있다.

[64] **실시예 2 -항균 활성 시험**

[65] Cross-streak 방법을 이용하여 어병세균에 대한 항균활성을 시험하였고, 그 결과를 표 2 및 도 3에 나타냈다. 도 3에서, *A.*salmonicida(0.4cm), *S.* iniae(1 cm), *S. parauberis*(1.1 cm), *V ichthyoenteri* (0.4 cm)에 항균활성을 확인하였다.

[66] [표 2]

[67]

Species	Source of isolation	Antimicrobial activity[a]							
		Aeromonas salmonicida	*Edwardsiella tarda*	*Photobacterium damselae*	*Streptococcus iniae*	*Streptococcus parauberis*	*Vibrio anguillarum*	*Vibrio ichthyoenteri*
Isolates obtained from fish gut								
Lc. lactis WFLU12	Olive flounder	++	+	–	+++	+++	+	+
Reference strains								
Lc. lactis KCTC 3899	Earthworm intestine	++	+	–	–	–	+	+
Lc. lactis ATCC 19435	Milk	+	–	–	–	–	–	–
Lc. lactis ATCC 29071	Leaf hopper	+	–	–	–	–	–	–
Lc. lactis ATCC 19257	Raw milk	–	–	–	–	–	–	–

KCTC: Korean Collection for Type Culture; ATCC: American Type Culture Collection;
[a] Inhibition zone (mm): ++++ = 16–20 mm; +++ = 11–15 mm; ++ = 6–10 mm; + = 1–5 mm; – = no inhibition
[b] The results were recorded using both cross-streaking method and agar well diffusion assay.

[68] 또한, 상기 표 2에서, 다른 유래의 동종 분리주들은 어류 병원체에 대한 억제 효과가 매우 약하거나 없었으나, 본 분리주 WFLU-12는 그램 음성(*Vibrio* anguillarum, V. ichthyoenteri, Aeromonas salmonicida, Edwardsiella tarda, Photobacterium damselae)과 그램 양성(*Streptococcus* iniae, S. parauberis) 병원성 세균 모두에 광범위하고 강한 항균활성을 보였다.

[69] 또한, 본 분리주의 배양 배지에서 얻은 물질(상청액)을 65℃와 100℃로 열처리하여 그 결과를 하기 표 3 및 도 4에 나타냈다. 열처리 결과 연쇄구균에만 억제 활성을 나타내었다. 이는 WFLU-12가 병원체를 억제하는 항생물질을 생산할 수 있으나 열에 저항성이 있는 bacteriocin은 그램양성세균에만 항생효과를 나타냄을 시사한다.

[70] [표 3]

[71]

Indicator strains	No treatment	Heat treated	
		65°C	100°C
A. samonicida	+	-	-
E. tarda	+	-	-
S. iniae	+	+	+
S. parauberis	+	+	+
V. anguilarium	+	-	-
V. ichthyoenteri	+	-	-
V. harvey	+	-	-

+, positive inhibition; -negative inhibition

[72] 사료의 제조

[73] 다음과 같은 단계를 통해 본 발명에서 사용된 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주 사료첨가제를 포함하는 사료를 제조하였다.

[74] 고체 배지에서 락토코커스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주를 MRS 액체 배지에서 28℃, 48시간 배양하였다. 이후, 3,000g, 15분간 원심분리하여 배양체를 수확하고, 이를 생리식염수에 재현탁한 후, 10^9 CFU/g 사료무게의 농도로 조정하여 현탁액을 사료에 분사, 도포하였다. 이후, 사료를 자연 건조하였다.

[75] **실시예 3 - 병원체 배제 활성**

[76] 일반 배합사료를 먹인 넙치를 대조군(control)으로 설정하고, WFLU-12 프로바이오틱스를 첨가한 사료를 먹인 넙치를 실험군(프로바이오틱, probiotic)으로 하여 하기 실험을 수행하였다.

[77] *Streptococcus* parauberis를 경구감염시킨 후 장과 신장 조직 내 세균 수를 비교하였다(도 5). 장과 신장에서 조직 내 *Streptococcus* parauberis의 평균값은 대조군과 비교시 실험군에서 2주차와 4주차 모두 유의적으로 낮았다. 따라서, 본 분리주 WFLU-12는 연쇄구균 병원체의 침입을 억제하는 기능을 가지고 있음을 확인할 수 있다. 도 5에서, 화살표는 실험군 어류에서 병원체의 colonization과 침입의 유의적인 배제를 보여준다. ((*)와 (**)는 대조군과의 통계적 유의성을 나타내는 것으로 각각 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$를 의미한다. 이는 이하 본 발명의 그래프에서 동일하며, (***)는 $p < 0.001$을 나타낸다.)

[78] 또한, 넙치에서 WFLU-12 분리주의 유익 효과는 세균의 자연 감염율에서 입증된다. 하기 표 4에 나타낸 바와 같이, 중간시험규모(pilot-scale)의 먹이 시험에서, 실험군의 감염율(33%=10/30)은 대조군보다 유의적으로 낮았다(60%=18/30)(Fisher's exact test, $p<0.05$). 혼합감염은 실험군보다 대조군에서 더 빈번히 발생하였다(실험군: 6.7% = 2/30, 대조군: 26.7% = 8/30). 특히 *S. parauberis*에 의한 연쇄구균감염병은 대조군에서 2주차에 60%가 감염되어 있었으나(6/10) 실험군에서는 8주간의 기간 동안 본 세균에 의한 감염은 확인되지 않았다. 이러한 결과는 본 분리주 WFLU-12가 장관 내에서 세균 병원체에 대한 방어를 제공할 수 있음을 나타낸다.

[79] [표 4]

[80]

Treatment	No. of infected fish	Pathogen detection (no. of fish)					
		S. parauberis	*P. damselae*	*V. harveyi*	*V. ichthyoenteri*	*Vibrio* spp.	*Enterococcus* sp.
Week 2							
Probiotic	6/10	–	4	–	3	–	–
Control	**9/10**	6*	4	1	–	–	5
Week 4							
Probiotic	2/10	–	–	–	1	2	–
Control	**5/10**	–	2	–	2	2	–
Week 8							
Probiotic	2/10	–	–	–	–	2	–
Control	**4/10**	–	2	–	–	2	–

–, not detected

[81] **실시예 4 -선천면역반응** 증진

[82] 중간시험규모 먹이 시험에서 두신을 분리하여 식작용 활성 및 호흡폭발활성 측정 결과를 도 6에 나타낸다. 실험군에서 각각 2주차, 4주차에 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 도 6에서, 각 막대는 10마리의 평균값을 나타내며 표준오차를 나타냈다.

[83] 또한, 실험군과 대조군의 전-염증성 싸이토카인 발현을 비교한 결과를 도 7에

나타냈다. 위에서부터 장에서 IL-6와 IL-1β 발현을, 신장에서 IL-6, g-lysozyme, IL-8, IFN-γ 발현을 비교하였는데, 분리주 WFLU-12는 전-염증 싸이토카인의 발현 증가를 유도하며 신장에서 IL-6, IL-8, INF-γ, g-lysozyme과 장에서 IL-6의 증가를 유도함을 확인할 수 있다. 각 막대는 10마리의 평균값을 나타내며 표준오차를 나타낸다.

[84] **실시예 5 - 어류 성장 증진**

[85] **(A) 체장, 체중 증진**

[86] 8주간 대조군과 실험군(10^9CFU/g)의 성장추이, 즉 체중 변화(A) 및 체장 변화(B)를 관찰하고(~80g /fish, n=100) 그 결과를 도 8에 도시하였다. 도 8에서, 그래프의 막대는 표준오차와 함께 평균값을 표시하였다.

[87] 2주째까지 두 그룹 모두에서 체중증가와 체장증가에 유의적인 차이가 없었다. 하지만, 4주째 대조군 147.40 ± 22.47g, 실험군 164.15 ± 24.73 g으로 평균 체중에서 유의적인 차이를 보였으며($p<0.05$), 8주째 대조군 192.91 ± 29.31, 실험군 217.88 ± 33.36 g으로 통계적으로 유의함을 보였다($p<0.01$)(도 8A). 체장변화 또한 대조군에 비하여 실험군의 어류가 더 높은 성장을 나타냈다($p<0.05$). 즉, 4주째 대조군 24.03 ± 0.94, 실험군 24.73 ± 1.18cm로 성장하였으며, 8주째 대조군 26.36 ± 1.24 cm, 실험군 27.28 ± 1.33 cm로 실험군에서 더 높은 성장을 기록했다(도 8B)

[88] **(B) 높은 사료효율과 특수생장률**

[89] 8주간 사료요구율 및 특수생장률을 조사한 결과 대조군과 실험군 사이의 유의적인 차이가 관찰되었다($p<0.01$). 그 결과를 도 9에 나타낸다. 도 9에서, 그래프의 막대는 표준 오차와 함께 평균값을 나타낸다. 사료효율은 4주째 0.85 ± 0.11, 1.04 ± 0.04였으며 8주 째 0.71 ± 0.15, 0.89 ± 0.23이었다(도 9, 위쪽). 특수생장률은 4주째 대조군과 실험군 각각 2.15 ± 0.24와 2.58 ± 0.08였으며 8주째 1.87 ± 0.30, 2.29 ± 0.44를 기록하였다(도 9, 아래쪽). 이러한 결과들은 프로바이오틱 첨가가 어류 성장 증가와 먹이 효율에 긍정적으로 기여함을 나타낸다.

[90] **(C) 어류 장관 내 대사산물(영양)의 확인**

[91] 대조군과 실험군 간의 어류 성장과 관련한 차이는 장 미생물총(gut microbiome)의 다른 패턴이 장내 물질의 유익한 대사산물들, 총 단백질, 효소 활성 촉진 등과 연관이 있을 것으로 가정하였으며 대조군과 실험군 간의 대사산물을 비교하였다.

[92] 도 10A는 계층적 클러스터링으로 나타낸 대사산물(metabolite) 패턴(A)을 도시하며, 빨간색과 초록색은 각각 높은 농도와 낮은 농도의 대사산물을 나타낸다. 도 10B는 실험군 vs 대조군 (IFP vs IFC)의 비율을 검출 값들의 평균을 이용하여 계산된 것이다. 빨간색의 화살표는 실험군에서 대사산물들이 증진됨을 나타낸다.

[93] 도 10A에서 대사산물 분석 결과, 지질대사 관련 물질들과 주요한 탄소대사

중간물질이 실험군에서 더 우세하게 발현됨을 나타냈다. 더불어, 도 10B 산포도 그래프에서 장내 대부분의 대사산물이 대조군에 비하여 실험군에서 더 높게 발현됨을 나타낸다. 이러한 결과는 장내 프로바이오틱 세균과 어류 성장 사이에 특정한 대사산물이 관련됨을 시사한다.

[94] **(D) 어체 내 순환 대사산물의 항상성의 유지**

[95] 어체 내 순환 대사산물의 항상성 유지에 대한 효과를 확인하기 위해 장액(intestinal fluid)과 혈청(serum)에서 검출되는 모든 대사산물의 상대표준편차(RSD%)를 나타낸 상자그림 그래프를 작성하여 도 11에 나타냈다.

[96] 대사산물 상대표준편차(RSD) 값의 차이는 대사산물의 개체 간 차이를 의미하며 혈청 내 대사산물은 장내 세균에 의해 생산되는 대사산물에 의해 영향을 받는다(Matsumoto et al., 2013; Front Syst Neurosci. 2013 Apr 23;7:9.). 장내 물질의 RSD 값은 두 그룹 모두에서 대사산물의 변동성이 유사하였으나($p=0.348$), 혈청 RSD 값은 실험군에서 가장 안정적으로 나타났다($p<0.001$). 즉, 실험군의 혈청에서 대체적으로 좋은 항상성을 나타내는 반면 대조군에서 몇몇 어류가 비교적 불균등함을 나타낸다(숙주 조직에서 합성되는 대사산물). 사료의 프로바이오틱 첨가가 몇 주에 걸쳐서 넙치의 소화능력을 점진적으로 증진시킬 수 있는 것처럼, 이러한 높은 항상성은 어류가 요구하는 적절한 영양 상태에 있는 것으로 볼 수 있다. 본 발명의 분리주 WFLU-12가 전신을 순환하는 대사산물의 견고한 항상성을 돕는 것으로 간주된다.

[97] **실시예 6 - 어류 체내 황함유 아미노산 수준의 증가**

[98] 상기 대조군과 실험군에서 어류 체내 황함유 아미노산 수준의 증가 정도를 측정하고 그 결과를 도 12에 나타낸다. 파란색 막대 그래프(장)와 노란색 막대 그래프(혈청)는 대조군을 나타내며 빨간색 막대 그래프(장)와 초록색 막대 그래프(혈청)는 실험군을 나타낸다.

[99] 다른 아미노산과 마찬가지로, 황함유 아미노산은 단백질 대사에 영향을 끼친다. 이들은 조직 단백질의 구성 요소이며 이들 아미노산이 결핍될 경우 단백질 합성 저하를 일으킨다. 닭의 근육 성장에 메티오닌(methionine) 보충의 효과가 있음이 보고되었으며 메티오닌 결핍 사료(그 외 다른 아미노산은 골고루 첨가된)에 메티오닌을 첨가한 결과 골격근에서 단백질 합성과 부착을 증가시켰다.

[100] 본 발명에서 어류 황함유 아미노산의 전구체인 N-아세틸-메티오닌을 대조군과 실험군에서 비교 시 실험군의 장에서 1.7배 증가하였다. 다른 황함유 아미노산 파생물인 메티오닌 술폭시드($p<0.05$), 시스테인(1.6배 증가), 시스테인 술핀산(3.1배 증가), 시스테산($p<0.05$)은 실험군에서 대조군보다 훨씬 더 높게 발현되었다. 이러한 황함유 아미노산의 증가는 황함유 아미노산 합성에 프로바이오틱이 관여하여 순환하는 대사산물들에서 시스타티오닌(cystathionin)의 유의적인 증가를 유도하며($p<0.05$) 어류 장기에서

단백질 합성의 증가를 유도할 수 있음을 나타낸다.

[101] 본 결과와 부합하는 결과로, 시스틴 첨가 사료를 먹인 어류의 조직(근육)에서 시스타티오닌(cystathionin)이 증가함을 보였으며 또한 대조군과 비교하여 성장 증진을 보였다(Park et al., 2002; Fisheries science Vol. 68 (2002) No. 4 P 824-829). 그러므로, 황함유 아미노산 전구체, 특히 시스타티오닌(cystathionin)은 어류 성장과 관련한 중요한 마커로 작용한다. 그들은 또한 타우린 생합성에 중요한 역할을 하며 특히 시스테산이 타우로콜린산(담즙산)의 분비 증진에 잇달아 타우린을 생성하므로 타우린 형성의 유일한 원천으로 사용될 수 있다.

[102] **실시예 7 - 어류 장 내 타우린의 증가**

[103] 상기 대조군과 실험군에서 어류 장 내 타우린(taurine)과 담즙산(bile acid)의 증가 정도를 측정하고 그 결과를 도 13에 나타냈다. 파란색 막대 그래프(장)는 대조군, 빨간색 막대 그래프(장)는 실험군을 나타낸다.

[104] 타우린(2-amino ethanesulfonic acid)은 황함유 아미노산으로 특히 광범위한 다양한 생리학적 과정들에 참여하는데, 척추동물에서 담즙산 복합체 생성, 삼투압 조절, 칼슘 항상성, 골격근, 신경, 망막 기능에 참여한다. 어류에서 타우린의 체내 합성은 종에 따라 매우 다양하며 특히 넙치와 터봇에서 타우린의 합성이 제한적인 것은 잘 알려져 있다. 타우린은 담즙산과 결합하여 타우로콜린산을 생산하고 넙치에서 전체 담즙산 복합체의 95% 이상을 차지한다. 그러므로 타우린은 넙치 치어의 성장에 영향을 미치는 매우 필수적인 영양소이다.

[105] 황함유 아미노산을 사료에 첨가 시 넙치에서 타우린 생합성을 촉진시키지 못했으나 본 연구의 WFLU-12 분리주를 사료에 첨가 시 넙치 장 내에서 관련 아미노산의 발현을 조절하는 것으로 보인다. 본 분리주가 어류 장내에서 시스테산(CA), 시스테인 술핀산(CSA) 등의 중간매개 아미노산들의 수준을 향상시키는데 기여하여 타우린의 수준을 증가시키는 것이다(도 13). 따라서, 본 분리주를 첨가함으로써 어류의 지방 소화의 효능을 통해 어류 성장을 증진시키고 나아가 타우린 첨가로 인해 발생하는 비용을 절감할 수 있을 것이다.

[106] **실시예 8 - 어류 체내의 시트룰린 수준의 증진**

[107] 상기 대조군과 실험군에서 장 내 및 혈청에서 시트룰린(citrulline)의 증가 정도를 측정하고 그 결과를 도 14에 나타냈다. 파란색 막대 그래프(장)와 노란색 막대 그래프(혈청)는 대조군을 나타내며 빨간색 막대 그래프(장)와 초록색 막대 그래프(혈청)는 실험군을 나타낸다.

[108] 어류는 사료 내 아르기닌(arginine)의 요구량이 높은데 이는 단백질(아미노산에 묶인 peptide로써)과 조직액(포스포아르기닌)으로 존재하며, ATP를 주로 비축함)에 풍부하기 때문이다. 요소형성 진골어류(ureogenic teleost)는 간에서 아르기노숙신산 합성효소와 분해효소(argninosuccinate synthase and lyase)를 통하여 시트룰린을 아르기닌으로 전환할 수 있다(Mommsen et al., 2001). 하지만, 수산동물의 간에서 시트룰린 또는 아르기닌의 네트 합성(net synthesis)이 있는지

알려져 있지 않다.

[109] 본 발명에서 실험군의 장 내 및 순환 혈액(혈청)에서 시트룰린 수준이 증가하였다(도 14). 높아진 순환 시트룰린의 수준은 거의 모든 세포 종류(adipocytes, endothelial cell, enterocyte, macrophage, neurons, myocytes)에서 아르기닌의 내생 합성을 위해 사용될 수 있기 때문에(Wu and Morris, 1998), 영양 이용의 효능에 기여할 수 있고 이후 어류 성장에 기여할 수 있다. 본 분리주에 의한 시트룰린 합성의 유도는 글루타민과 글루타민산염에서의 시트룰린 합성을 억제할 것이며 이는 다른 대사 경로 또는 활성에 글루타민과 글루타민산염의 사용을 할애할 수 있다(예를 들면 글루타민을 글루타민산염으로 전환, 글루타민산염은 성장 호르몬 분비를 직접적으로 증진시킬 수 있음).

[110] **실시예 9 - 어류 장 내 비타민 수준 증진**

[111] 상기 대조군과 실험군에서 비타민 B1 (Thiamine), B2 (FAD_divalent), B3 (Nicotinamide), and C (Ascorbic acid) 생합성 정도를 측정하고 그 결과를 도 15에 나타냈다. 파란색 막대 그래프(장)는 대조군, 빨간색 막대 그래프(장)는 실험군을 나타낸다.

[112] 비타민은 유기화합물로 어류의 성장과 건강에 필요한 필수 영양소이다. 몇몇 비타민은 어류 체내에서 합성되지 않으며 먹이원을 통해 섭취하여야 한다. 본 분리주 WFLU-12를 첨가하여 먹인 어류의 경우 비타민 B와 비타민 C(아스코르빈산)의 증진이 확인되었다(도 15).

[113]

출원인 또는 대리인 부경대학교 산학협력단 파일 참조번호	국제출원번호

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허협력조약 규칙 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 발명의 설명 5 쪽, 13-15 줄에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	
B. 기탁물의 확인 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐	
기탁기관의 명칭 KCTC(Korean Collection for Type Cultures) 생물자원센터	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함) 대한민국, (56212) 전라북도 정읍시 입신길 181, 한국생명공학연구원	
기탁일자 2017. 01. 03	기탁번호 KCTC13180BP
C. 추가적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 계속 ☐	
D. 표시사항이 지정하고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)	
E. 표시사항의 별도 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 사용란	**국제사무국 사용란**
☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음	☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음
담당관	담당관

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

청구범위

[청구항 1] 기탁번호 KCTC13180BP의 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12 분리주.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
최소 4℃ 온도, 2-10의 pH 및 담즙산에 저항성을 나타내는, 분리주.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
비브리오 앙구일라룸(Vibrio anguillarum), 비브리오 익티오엔테리(*V. ichthyoenteri*), 에르모나스 살모니시다(Aeromonas salmonicida), 에드와드시엘라 타르다(*Edwardsiella* tarda), 포토박테리움 담셀레(*Photobacterium damselae*)의 그램 음성 세균 또는 스트렙토코커스 이니애(Strptococcus iniae), 스트렙토코커스 파라우베리스(*S.* parauberis)의 그램 양성 세균으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 대해 항균 활성을 갖는, 분리주.

[청구항 4] 제1항의 분리주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 프로바이오틱스 조성물.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
어류의 선천면역반응 증진, 체중 증가, 체장 증가, 체내 순환 대사산물 증진, 대사산물의 항상성 유지, 체내 황함유 아미노산 수준의 증가, 장내 타우린의 증가, 체내 시트룰린 수준의 증진 및 장내 비타민 증진으로부터 선택되는 하나 이상의 효과를 나타내는, 프로바이오틱스 조성물.

[청구항 6] 제3항의 분리주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항균 조성물.

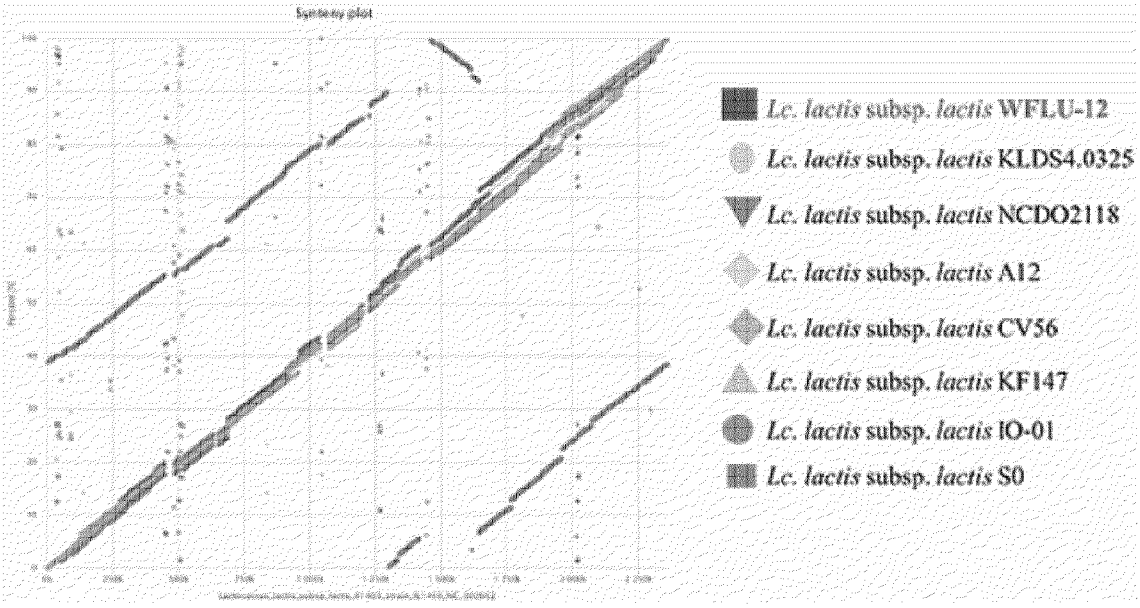
[청구항 7] 제4항의 프로바이오틱스 조성물 또는 제6항의 항균 조성물을 유효성분으로 포함하는, 어류 양식용 사료 첨가제.

[청구항 8] 제7항의 사료 첨가제를 포함하는 어류 양식용 사료.

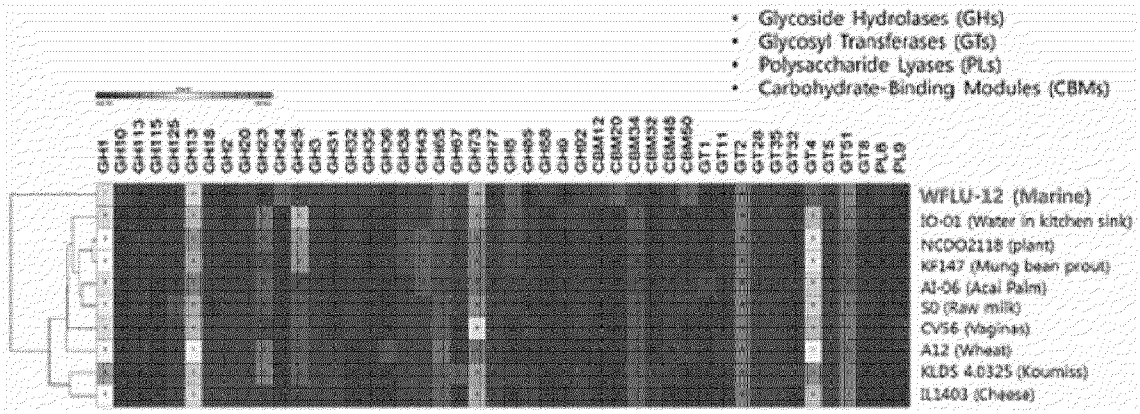
[청구항 9] 제8항의 사료를 양식중인 어류에 급이하는 단계를 포함하는 양식 어류의 성장을 촉진하는 방법.

[청구항 10] 제6항의 항균 조성물을 어류 양식장에 살포하는 단계를 포함하는 양식 어류의 병원균에 의한 감염을 예방하는 방법.

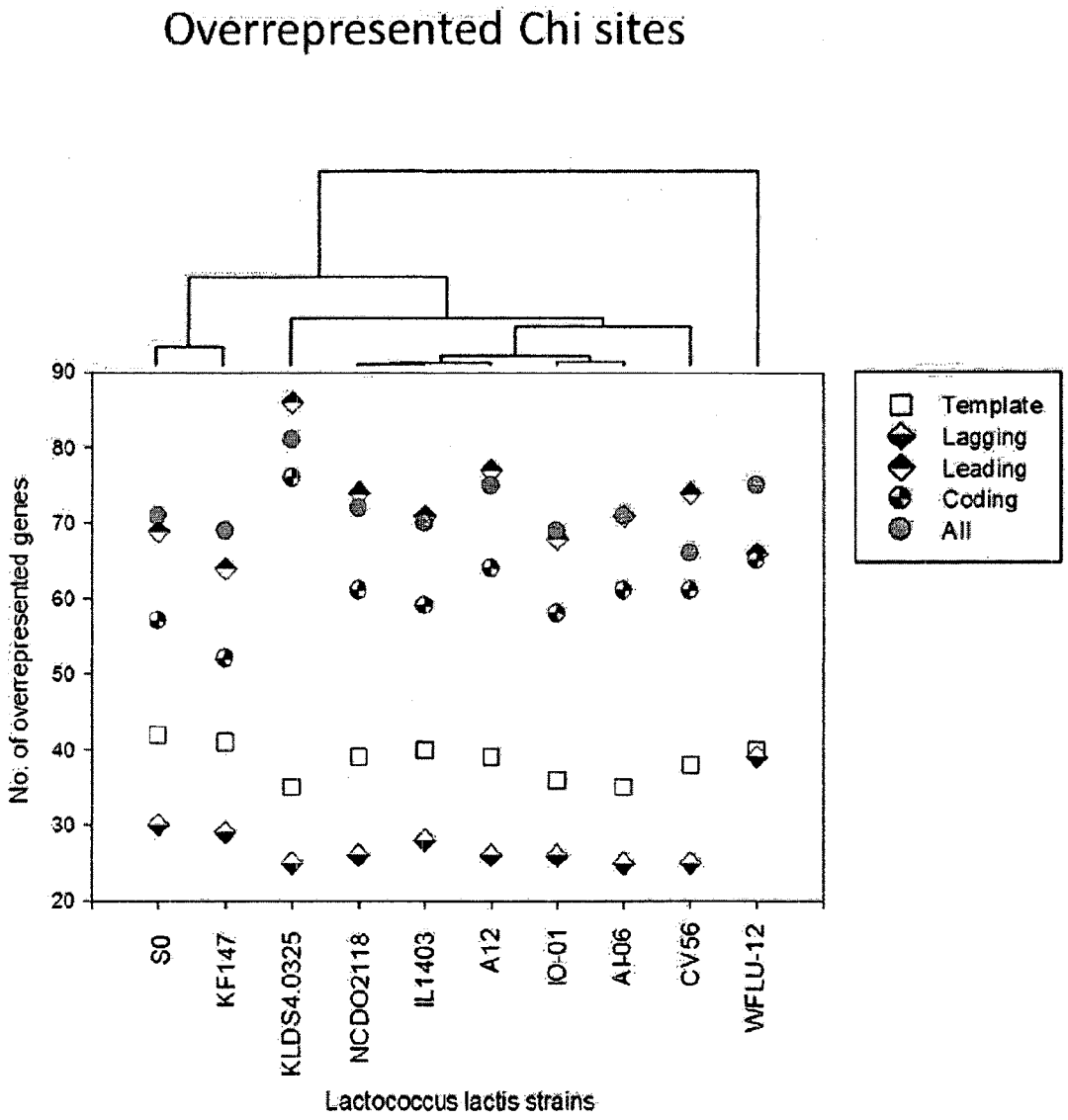
[도1a]


Synteny plot
Lc. lactis subsp. lactis WFLU-12
Lc. lactis subsp. lactis KLDS4.0325
Lc. lactis subsp. lactis NCDO2118
Lc. lactis subsp. lactis A12
Lc. lactis subsp. lactis CV56
Lc. lactis subsp. lactis KF147
Lc. lactis subsp. lactis IO-01
Lc. lactis subsp. lactis S0

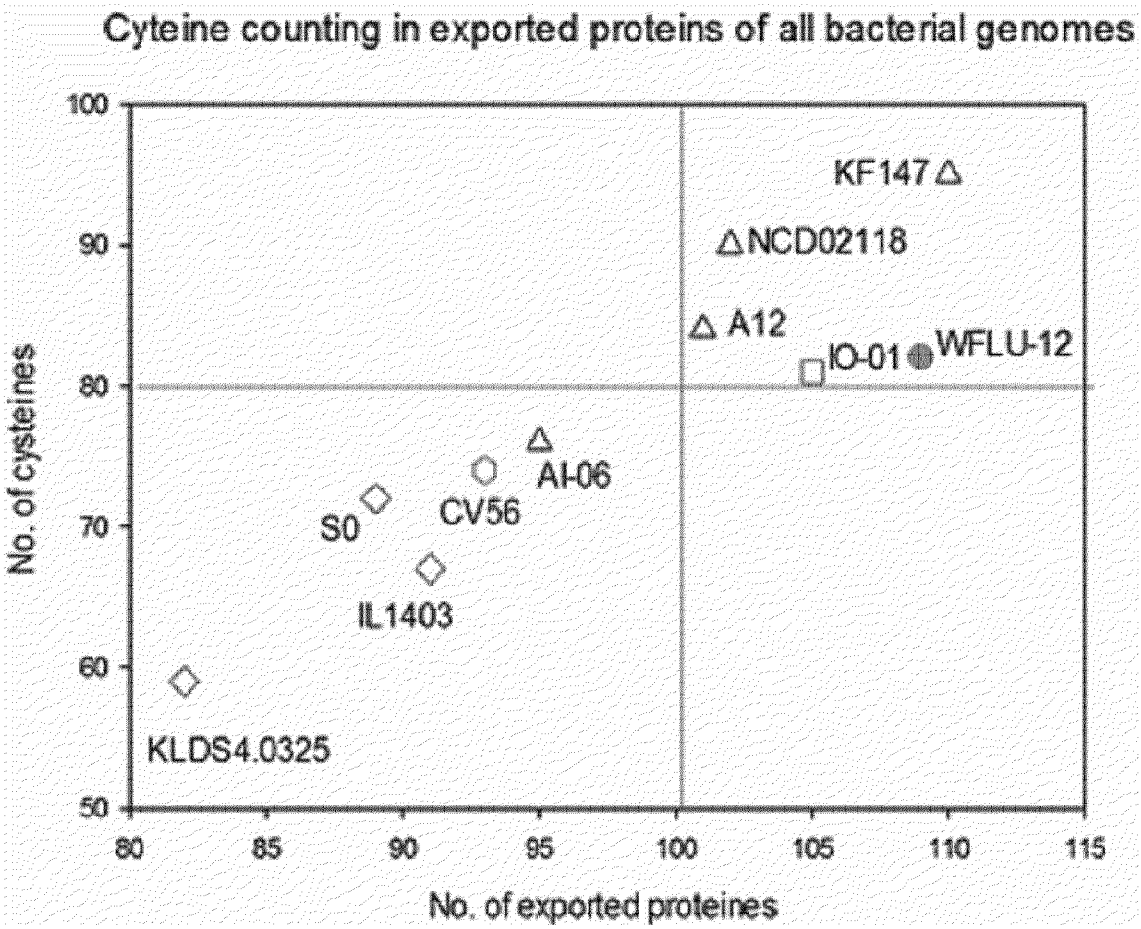
[도1b]


• Glycoside Hydrolases (GHs)
• Glycosyl Transferases (GTs)
• Polysaccharide Lyases (PLs)
• Carbohydrate-Binding Modules (CBMs)
GH1 GH10 GH13 GH115 GH125 GH13 GH18 GH2 GH20 GH23 GH24 GH25 GH3 GH31 GH32 GH33 GH36 GH38 GH43 GH65 GH67 GH73 GH77 GH8 GH88 GH89 GH9 GH92 CBM12 CBM20 CBM34 CBM32 CBM48 CBM50 GT1 GT11 GT2 GT28 GT35 GT32 GT4 GT5 GT51 GT8 PL8 PL9
WFLU-12 (Marine)
IO-01 (Water in kitchen sink)
NCDO2118 (plant)
KF147 (Mung bean prout)
AI-06 (Acai Palm)
S0 (Raw milk)
CV56 (Vaginas)
A12 (Wheat)
KLDS 4.0325 (Koumiss)
IL1403 (Cheese)

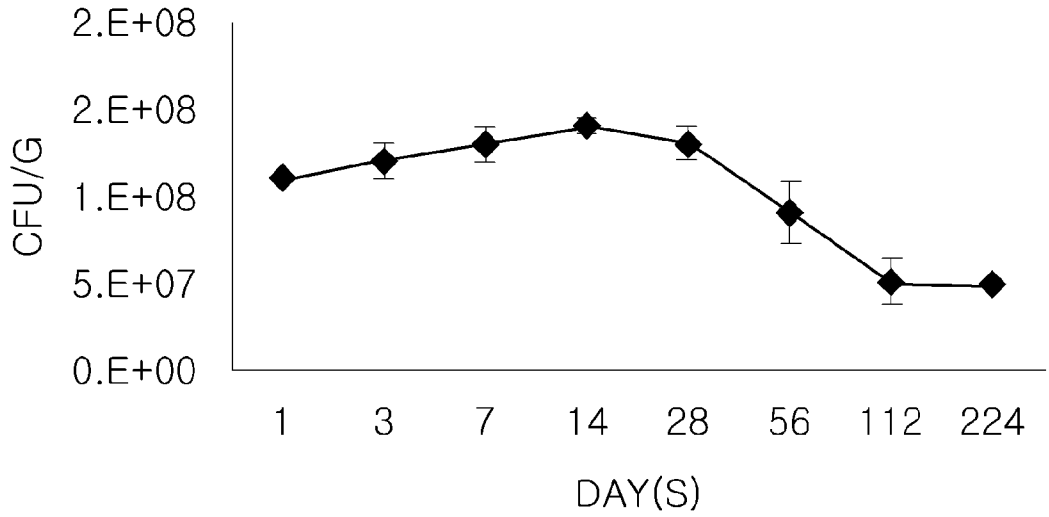
[도 1c]


Overrepresented Chi sites
No. of overrepresented genes
90
80
70
60
50
40
30
20
Template
Lagging
Leading
Coding
All
S0
KF147
KLDS4.0325
NCDO2118
IL1403
A12
IO-01
AH06
CV56
WFLU-12
Lactococcus lactis strains

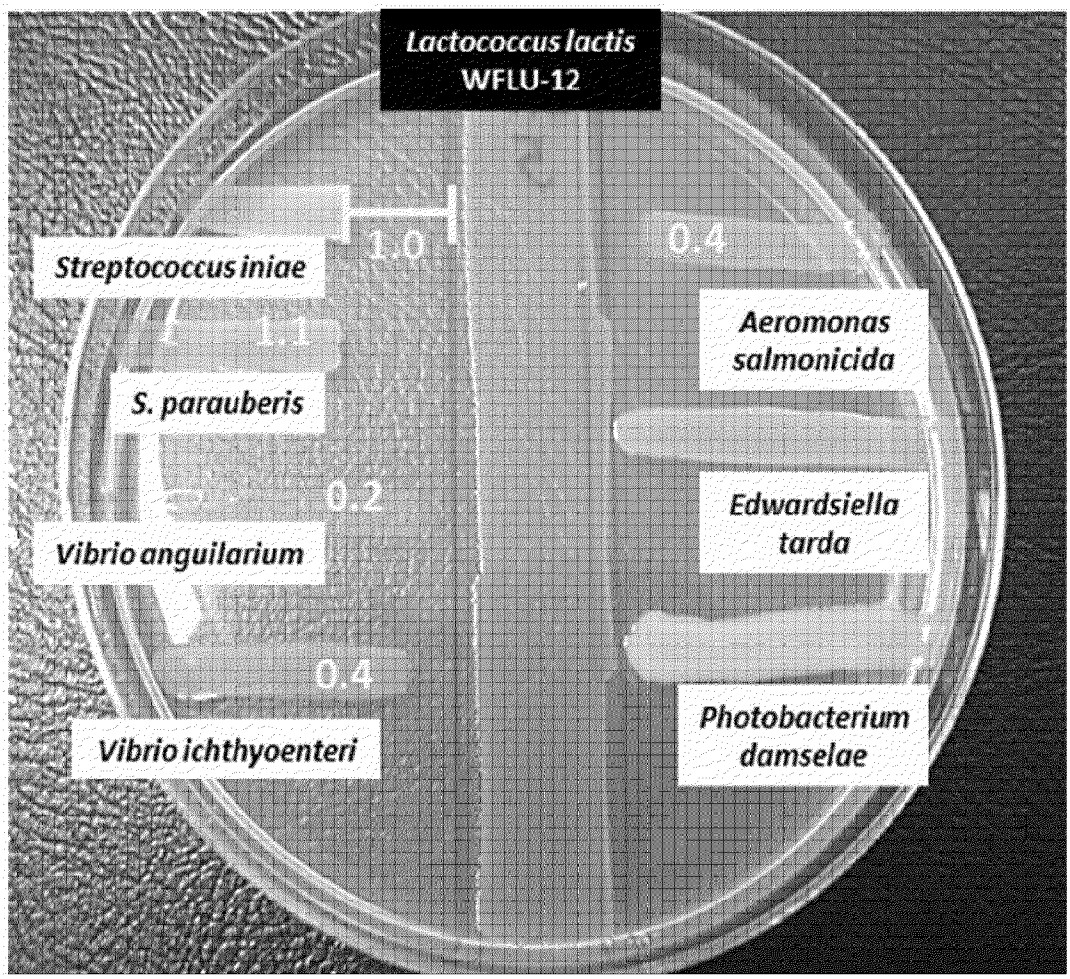
[도1d]


Cyteine counting in exported proteins of all bacterial genomes
No. of cysteines
No. of exported proteines
100
90
80
70
60
50
80
85
90
95
100
105
110
115
KF147
NCD02118
A12
IO-01
WFLU-12
AI-06
CV56
S0
IL1403
KLDS4.0325

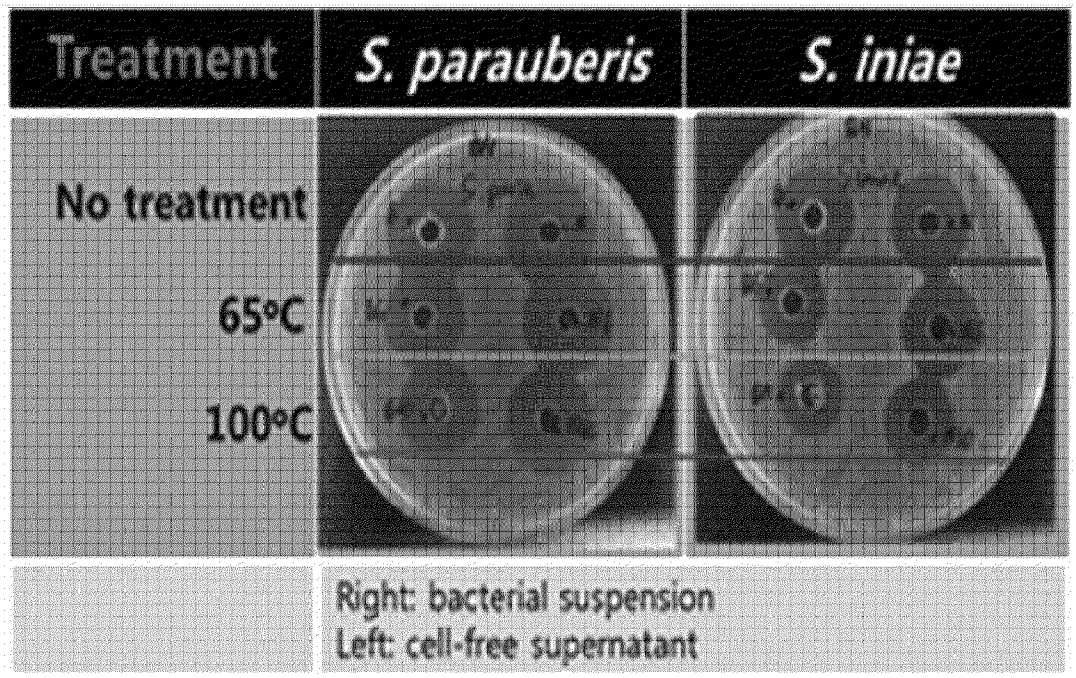
[도2]


CFU/G
2.E+08
2.E+08
1.E+08
5.E+07
0.E+00
1
3
7
14
28
56
112
224
DAY(S)

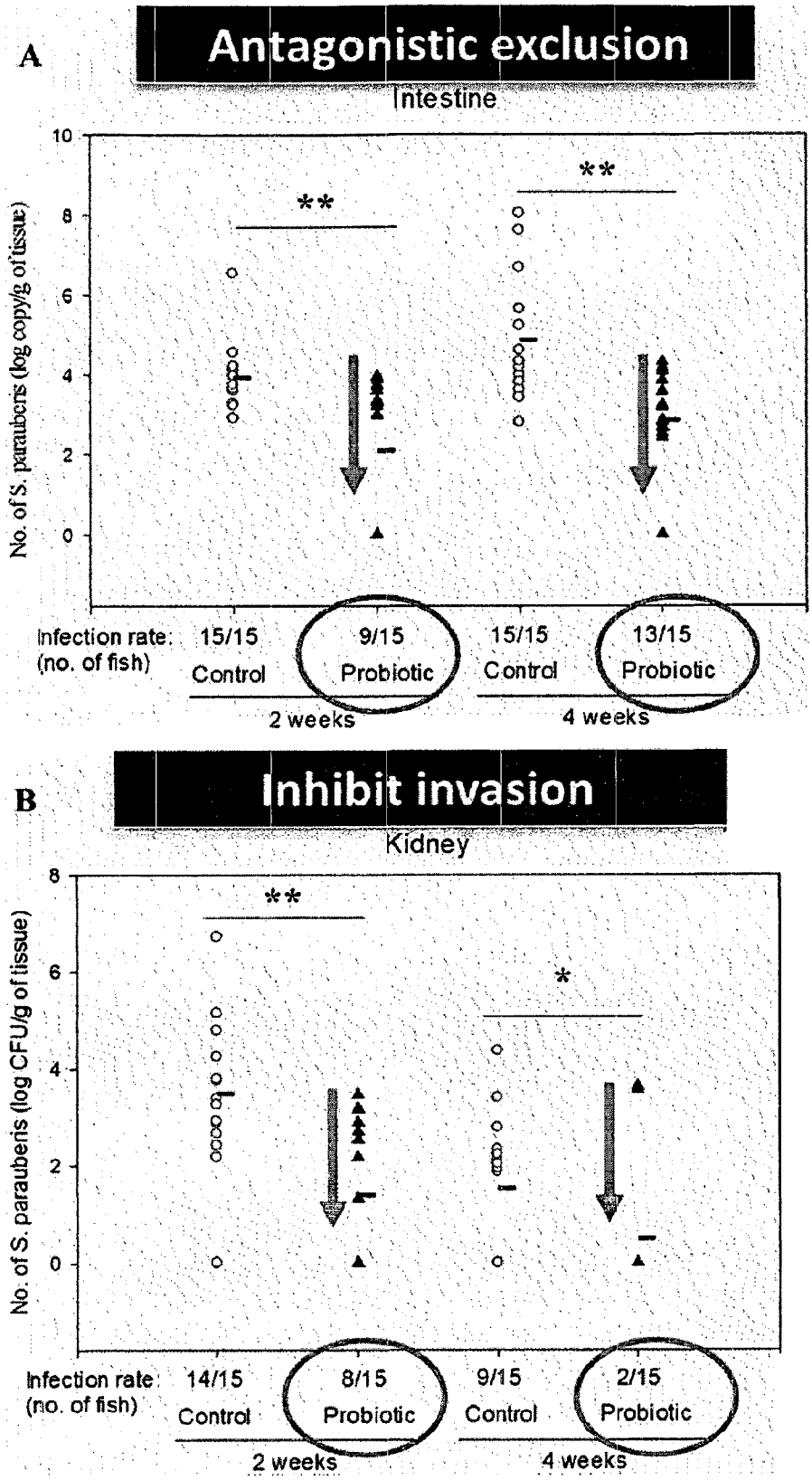
[도3]


Lactococcus lactis
WFLU-12
Streptococcus iniae
1.0
0.4
Aeromonas
salmonicida
1.1
S. parauberis
0.2
Edwardsiella
tarda
Vibrio anguilarium
0.4
Photobacterium
damselae
Vibrio ichthyoenteri

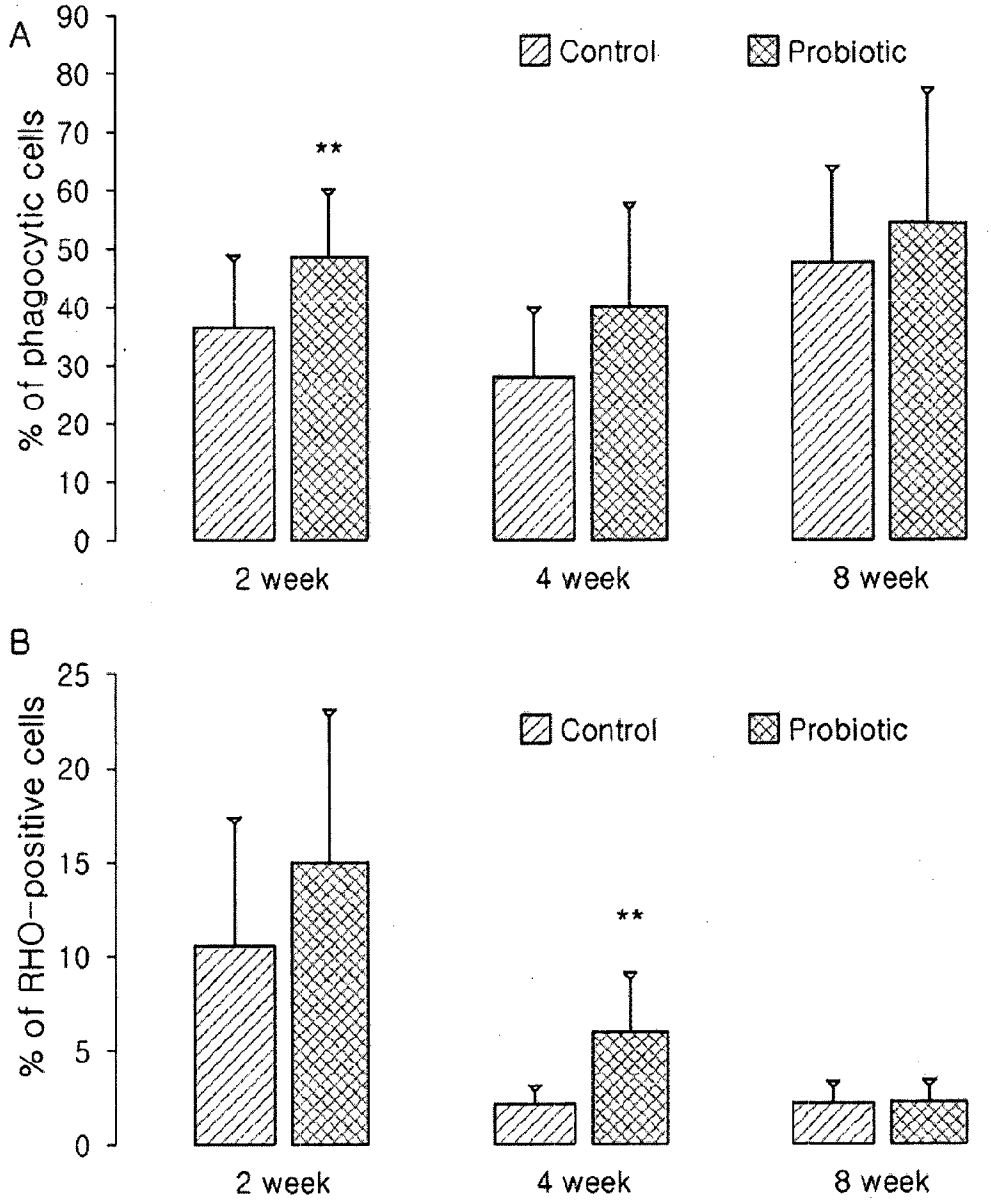
[도4]


Treatment
S. parauberis
S. iniae
No treatment
65°C
100°C
Right: bacterial suspension
Left: cell-free supernatant

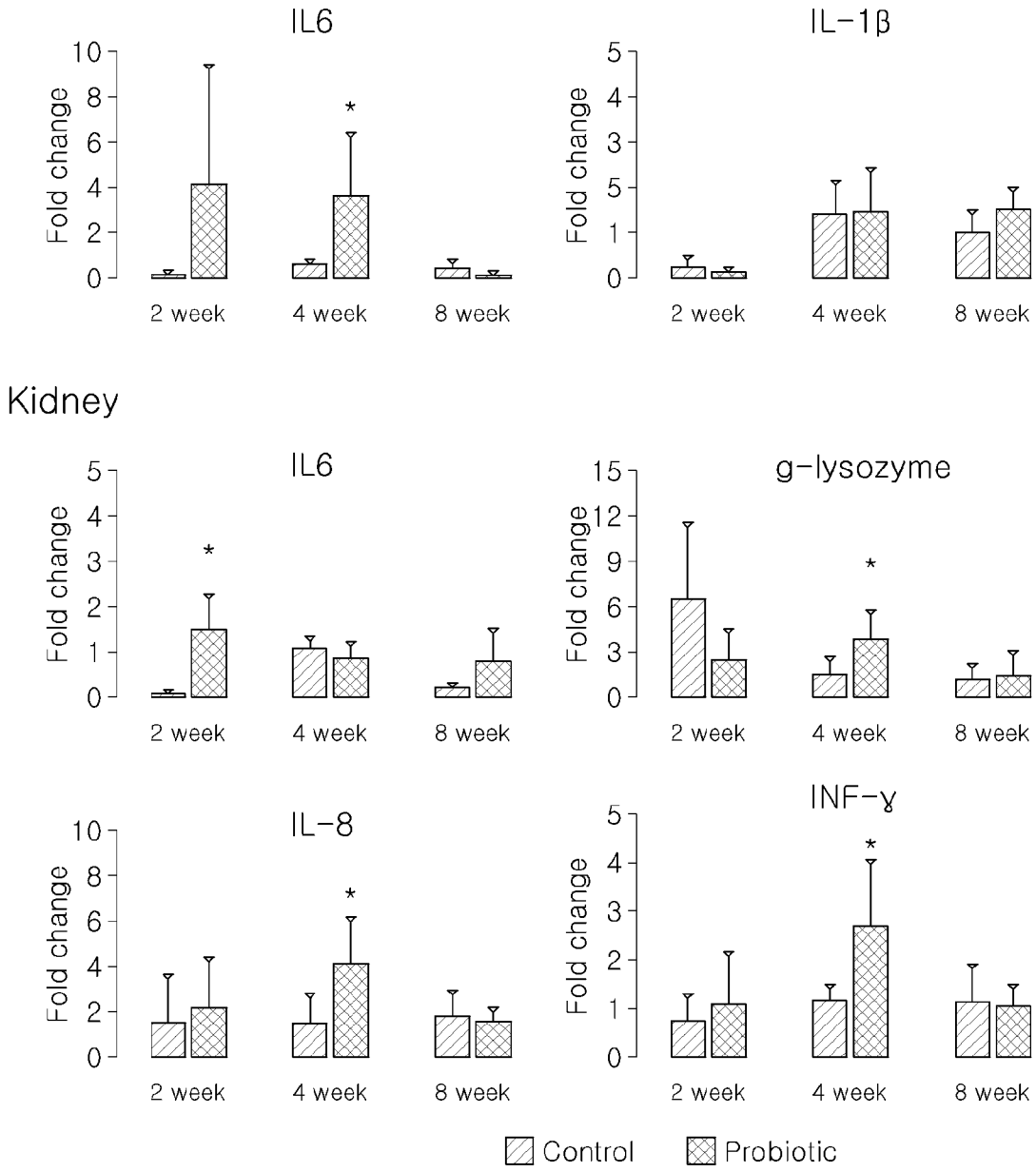
[도 5]


A
Antagonistic exclusion
Intestine
No. of S. parauberis (log copy/g of tissue)
10
8
6
4
2
0
**
**
Infection rate: (no. of fish)
15/15
Control
9/15
Probiotic
15/15
Control
13/15
Probiotic
2 weeks
4 weeks
B
Inhibit invasion
Kidney
No. of S. parauberis (log CFU/g of tissue)
8
6
4
2
0
**
*
Infection rate: (no. of fish)
14/15
Control
8/15
Probiotic
9/15
Control
2/15
Probiotic
2 weeks
4 weeks

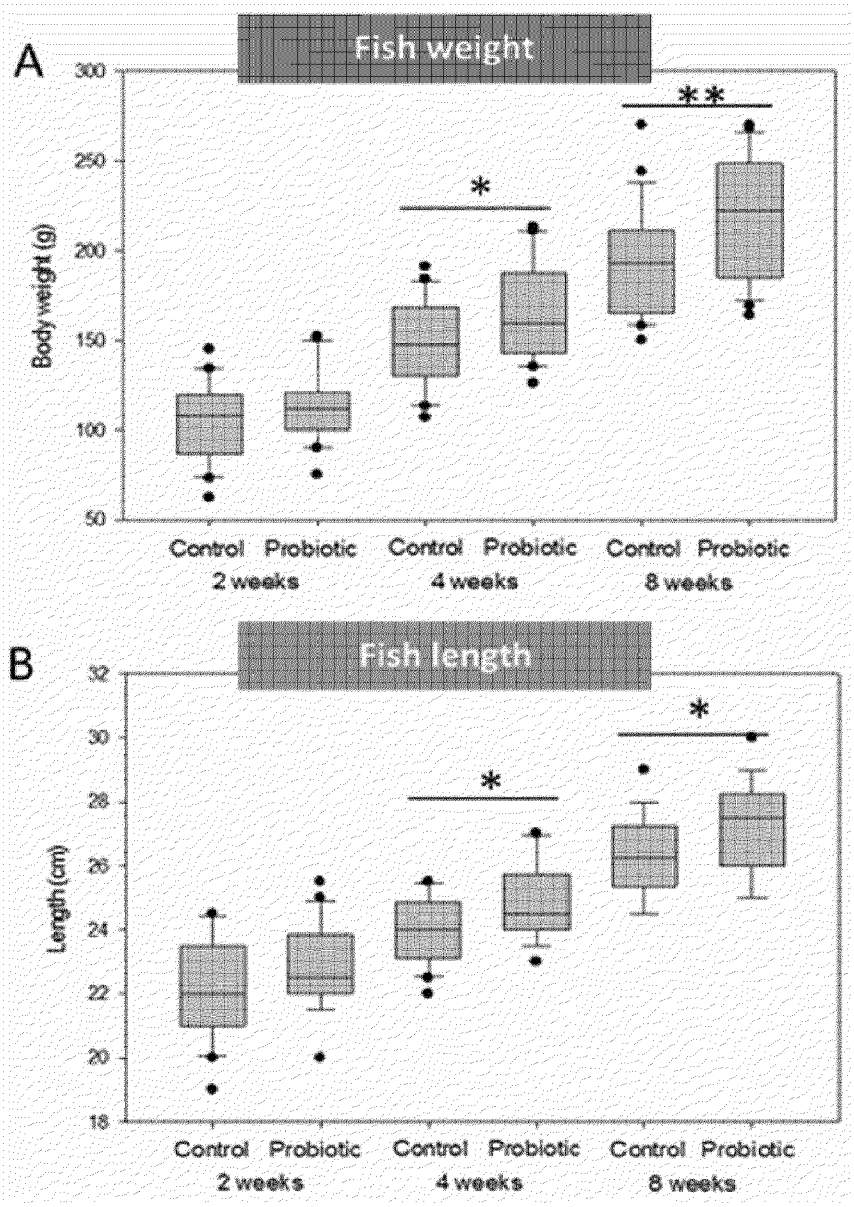
[도 6]


A
% of phagocytic cells
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
Probiotic
**
2 week
4 week
8 week
B
% of RHO-positive cells
25
20
15
10
5
0
Control
Probiotic
**
2 week
4 week
8 week

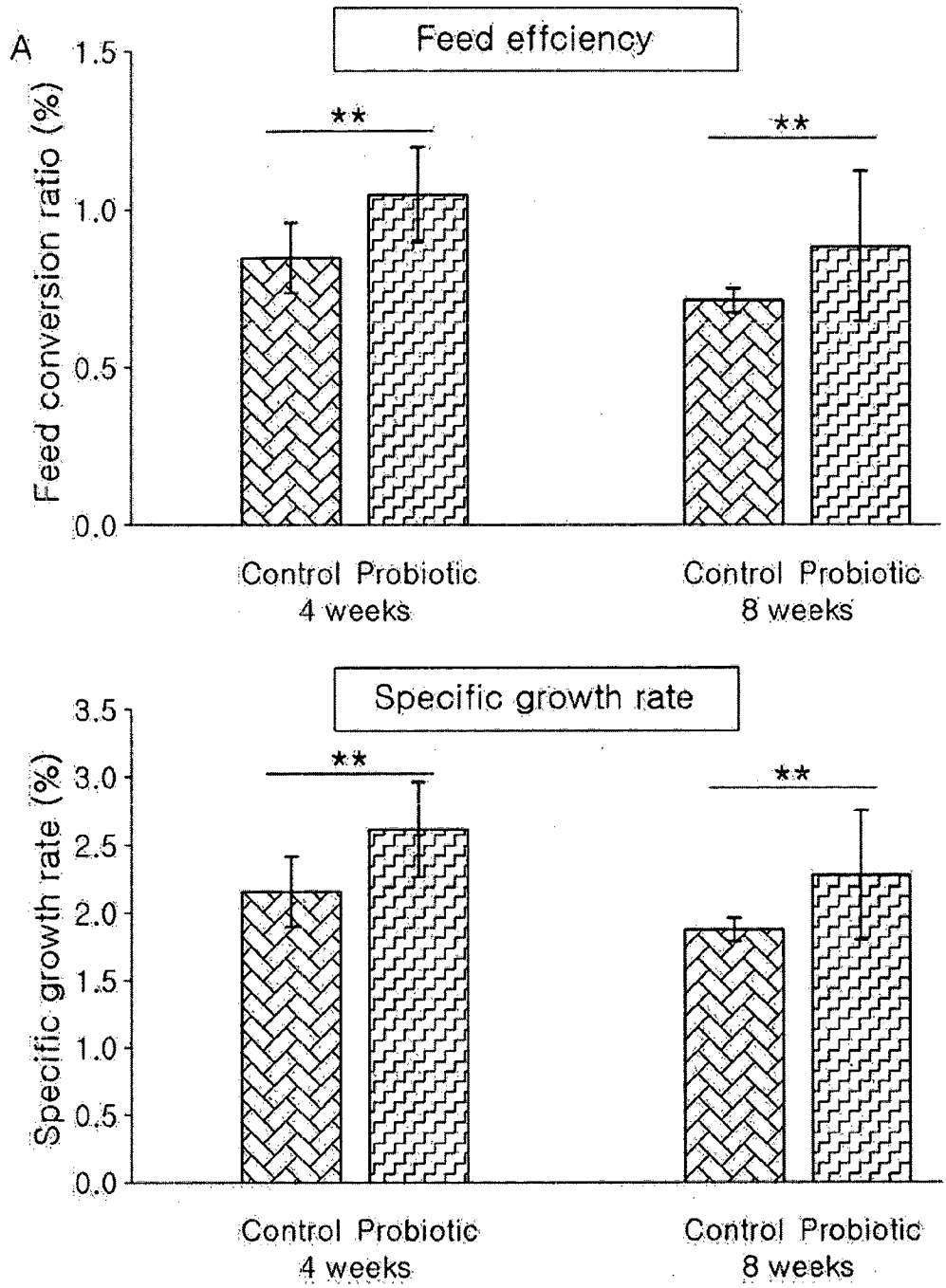
[도7]


Intestine
IL6
IL-1β
Kidney
IL6
g-lysozyme
IL-8
INF-γ
Fold change
2 week
4 week
8 week
Control
Probiotic

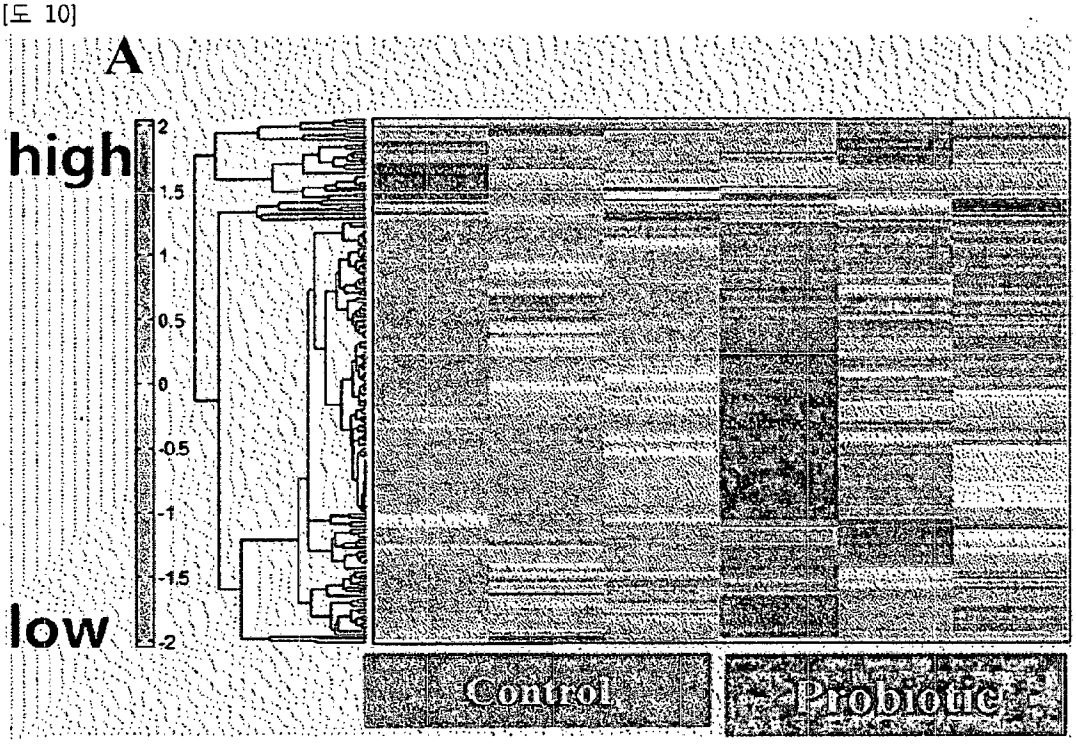
[도8]

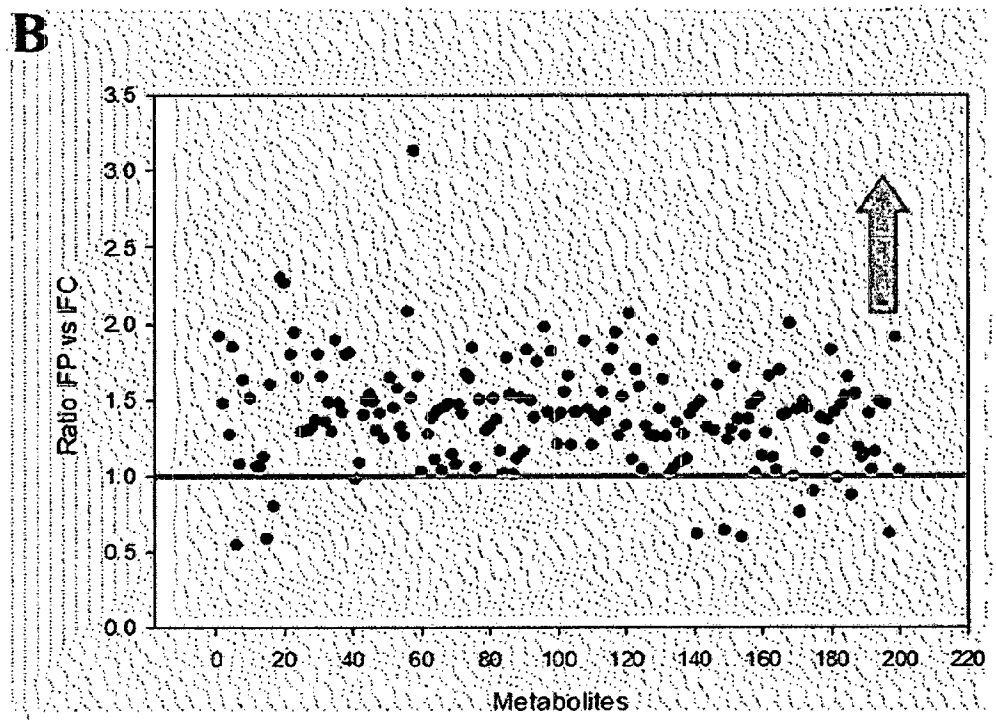

A
Fish weight
Body weight (g)
300
250
200
150
100
50
*
**
Control
Probiotic
2 weeks
4 weeks
8 weeks
B
Fish length
Length (cm)
32
30
28
26
24
22
20
18

[도 9]

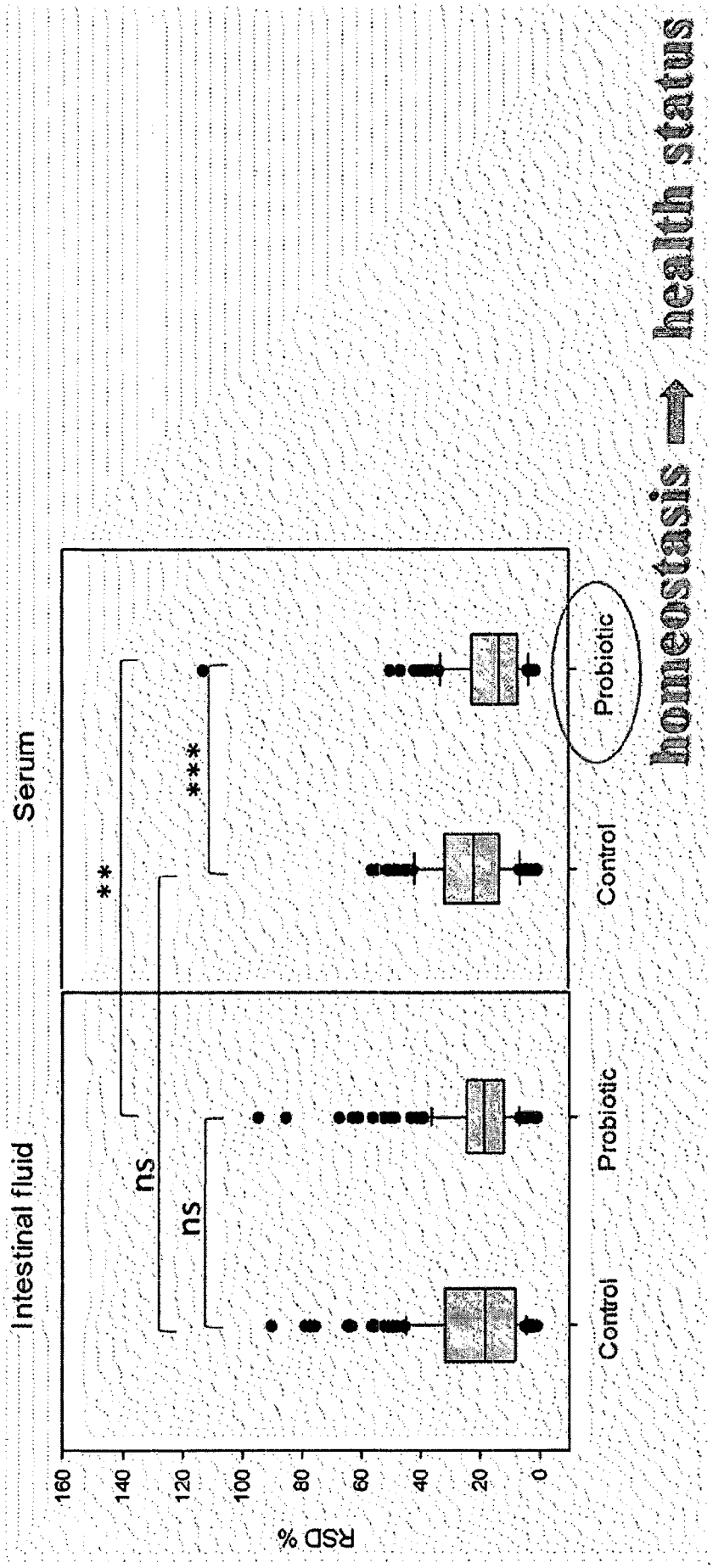

A
Feed effciency
Feed conversion ratio (%)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
Control Probiotic
4 weeks
Control Probiotic
8 weeks
Specific growth rate
Specific growth rate (%)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
Control Probiotic
4 weeks
Control Probiotic
8 weeks

[도 10]

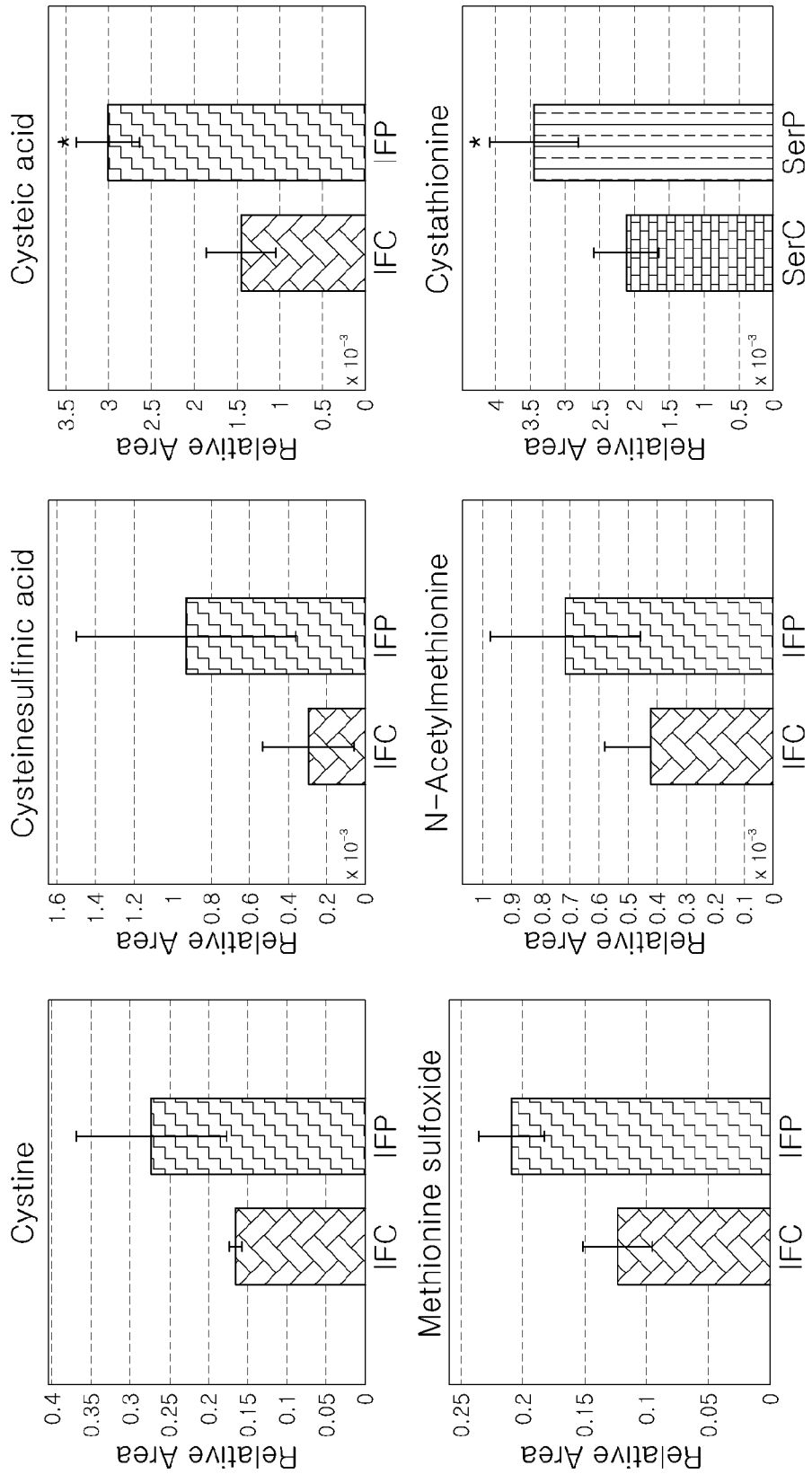

A
high
low
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
Control
Probiotic


B
Ratio FP vs FC
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
Metabolites

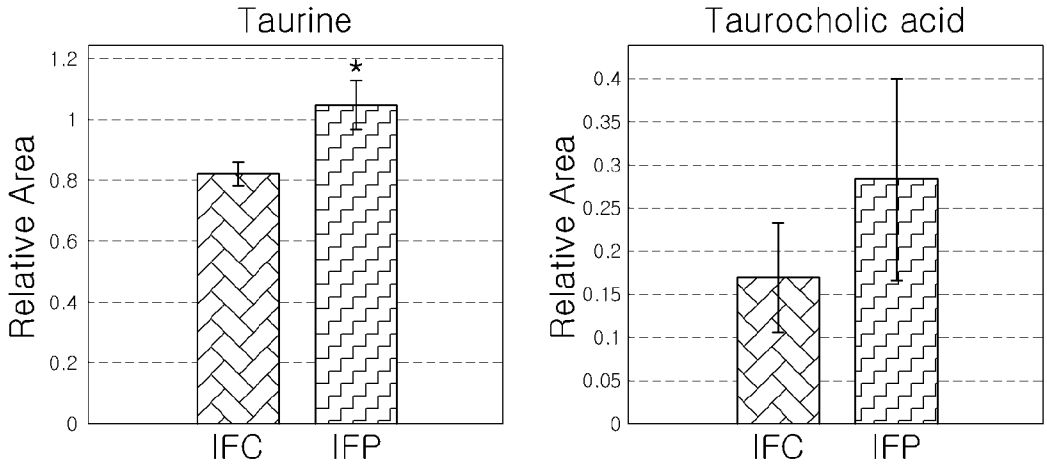
[도 11]


homeostasis → health status
Serum
Intestinal fluid
RSD %
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
Probiotic
Control
Probiotic
ns
ns
**
***

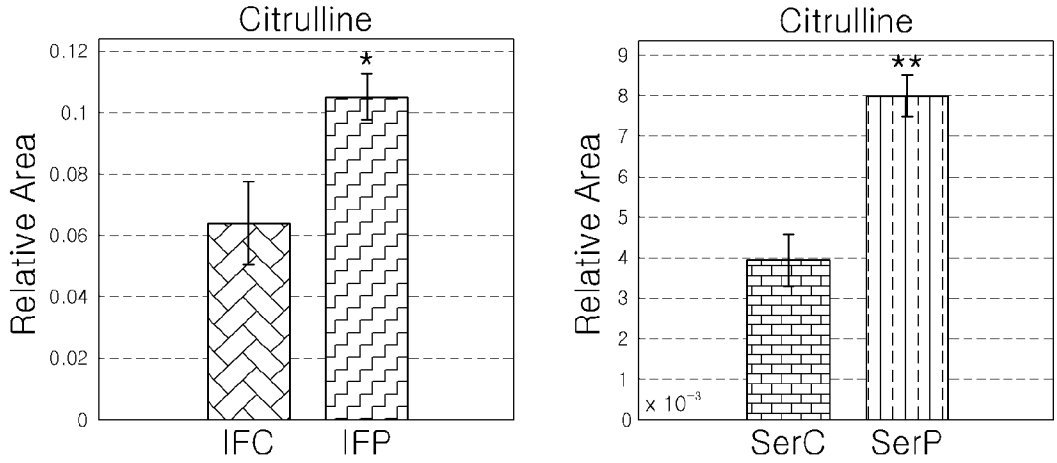
[도12]


Cysteic acid
Cystathionine
Cysteinesulfinic acid
N-Acetylmethionine
Cystine
Methionine sulfoxide
Relative Area
x 10^-3
IFC
IFP
SerC
SerP

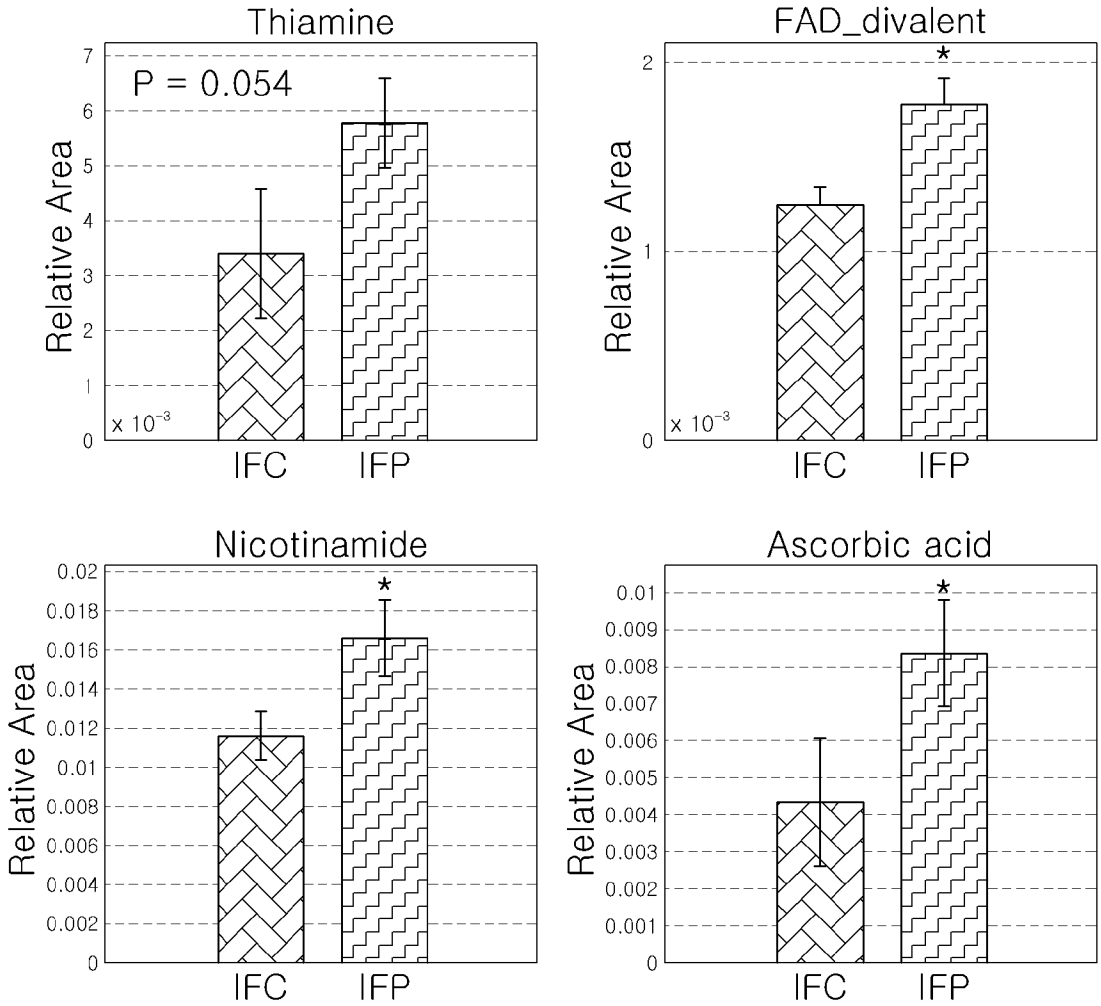
[도13]


Taurine
Relative Area
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
IFC
IFP
Taurocholic acid
Relative Area
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
IFC
IFP

[도14]


Citrulline
Relative Area
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
*
IFC
IFP
Citrulline
Relative Area
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
x 10⁻³
**
SerC
SerP

[도15]


Thiamine
P = 0.054
Relative Area
x 10⁻³
IFC
IFP
FAD_divalent
*
Relative Area
x 10⁻³
IFC
IFP
Nicotinamide
*
Relative Area
IFC
IFP
Ascorbic acid
*
Relative Area
IFC
IFP

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/001615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, A23K 10/16(2016.01)i, A23K 20/195(2016.01)i, A23K 50/80(2016.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, C12R 1/225(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; A23K 20/195; C12N 1/00; A61K 35/74; A61P 31/00; A23K 10/16; A23K 50/80; A23L 33/135; C12R 1/225

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Lactococcus lactis subsp. lactis WFLU-12, KCTC13180BP, probiotics, antibiotic, fish

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NGUYEN, Thanh Luan et al., "Improved Growth Rate and Disease Resistance in Olive Flounder, Paralichthys Olivaceus, by Probiotic Lactococcus Lactis WFLU12 Isolated from Wild Marine Fish", Aquaculture, (Electronic publishing) 09 January 2017, vol. 471, pages 113-120 See abstract; page 114, left column, second paragraph; page 116, left column, second-third paragraphs; page 118, right column, second paragraph; figure 1; tables 2-3; Supplementary table S2.	1-10
A	KR 10-2014-0090854 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 18 July 2014 See claims 1-8.	1-10
A	HEO, Won-Seok et al., "Effects of Dietary Probiotic, Lactococcus Lactis Subsp. Lactis I2, Supplementation on the Growth and Immune Response of Olive Flounder (Paralichthys olivaceus)", Aquaculture, (Electronic publishing) 16 November 2012, vols. 376-379, pages 20-24 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2009-0035960 A (PARK, Hong Je et al.) 13 April 2009 See claims 1-2.	1-10
A	JP 2006-265181 A (UNIVERSITY OF TSUKUBA) 05 October 2006 See claims 1-8.	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 OCTOBER 2017 (24.10.2017)	**24 OCTOBER 2017 (24.10.2017)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/001615

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCBI, BioProject accession no. PRJNA338902 (15 August 2016) See the entire document. ※ The above document is the published document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/001615

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0090854 A	18/07/2014	KR 10-1616530 B1	28/04/2016
KR 10-2009-0035960 A	13/04/2009	KR 10-0901190 B1	04/06/2009
JP 2006-265181 A	05/10/2006	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2017/001615

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/20(2006.01)i, A23K 10/16(2016.01)i, A23K 20/195(2016.01)i, A23K 50/80(2016.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, C12R 1/225(2006.01)n

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 1/20; A23K 20/195; C12N 1/00; A61K 35/74; A61P 31/00; A23K 10/16; A23K 50/80; A23L 33/135; C12R 1/225

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:락토코쿠스 락티스 아종 락티스 WFLU-12, KCTC13180BP, 프로바이오틱스, 항균, 어류

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	NGUYEN, THANH LUAN 등, 'Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, Paralichthys olivaceus, by probiotic Lactococcus lactis WFLU12 isolated from wild marine fish', Aquaculture, (전자공개)2017.01.09, 제471권, 113-120 페이지 초록; 페이지 114, 좌컬럼, 두 번째 단락; 페이지 116, 좌컬럼, 두 번째-세 번째 단락; 페이지 118, 우컬럼, 두 번째 단락; 도면 1; 표 2-3; Supplementary table S2 참조.	1-10
A	KR 10-2014-0090854 A (한국생명공학연구원) 2014.07.18 청구항 1-8 참조.	1-10
A	HEO, WON-SEOK 등, 'Effects of dietary probiotic, Lactococcus lactis subsp. lactis I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (Paralichthys olivaceus)', Aquaculture, (전자공개)2012.11.16, 제376-379권, 20-24 페이지 전체 문헌 참조.	1-10
A	KR 10-2009-0035960 A (박홍제 등) 2009.04.13 청구항 1-2 참조.	1-10
A	JP 2006-265181 A (UNIVERSITY OF TSUKUBA) 2006.10.05 청구항 1-8 참조.	1-10

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2017년 10월 24일 (24.10.2017)	2017년 10월 24일 (24.10.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
김선희
전화번호 +82-42-481-5405

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/001615

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	NCBI, BioProject accession no. PRJNA338902 (2016.08.15) 전체 문헌 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-10

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/001615

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0090854 A	2014/07/18	KR 10-1616530 B1	2016/04/28
KR 10-2009-0035960 A	2009/04/13	KR 10-0901190 B1	2009/06/04
JP 2006-265181 A	2006/10/05	없음	