(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0004533
(43) 공개일자 2018년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/00* (2017.01)
A23K 10/16 (2017.01) *A61K 35/74* (2015.01)
C12R 1/38 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0084201
(22) 출원일자 2016년07월04일
심사청구일자 2016년07월04일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
류지훈
서울특별시 용산구 이촌로 201, 202동 1502호(이촌동, 한가람아파트)
손혜리
경기도 부천시 원미구 조마루로 134 (중동 보람마을아주아파트) 1114동 303호
(74) 대리인
특허법인다나

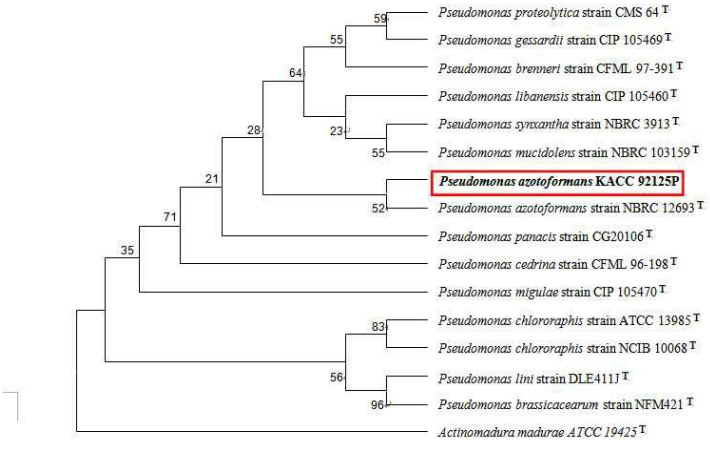
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P 및 이를 포함하는 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P는 식품위해미생물인 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 항균 활성을 나타내고, 건조한 환경에서도 환경 표면에 바이오필름을 형성할 수 있으므로, 상기 균주를 포함하는 조성물은 생물학적 제제로써 사용되어 식품, 농업, 환경 산업 등에 넓게 적용시킬 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A23K 10/16 (2016.05)
A61K 35/74 (2013.01)
C12R 1/38 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 316011-05-1-HD060
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 농림기술기획평가원
연구사업명 수출전략기술개발사업
연구과제명 [협동]건전종자생산을 위한 종자살균기술개발
기 여 율 1/1
주관기관 국립종자원
연구기간 2016.05.19 ~ 2016.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KACC 92125P의 슈도모나스 아조토포만스{*Pseudomonas azotoformans*} 균주.

청구항 2

슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 유효성분으로 포함하는, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대한 항균용 조성물.

청구항 3

슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는 사료 또는 사료 첨가제 조성물.

청구항 4

슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대한 생물학적 방제제.

청구항 5

제4항의 방제제를 가축, 축사 또는 그 부근에 처리하는 단계를 포함하는, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)의 활성 억제 방법.

청구항 6

슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는, 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 의한 이삭 마름병 방제제.

청구항 7

제6항의 방제제를 식물에 처리하는 단계를 포함하는, 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)의 활성 억제 방법.

청구항 8

슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는, 가축에게서 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 의한 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 감염 질환은 식중독, 장염, 유선염, 부종성 피부염, 관절염, 폐렴, 당뇨병, 골수염, 심장내막염, 균혈증, 패혈증, 경구개 궤양 및 간암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 약제학적 조성물.

청구항 10

슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 표면에 처리하는 단계를 포함하는 표면의 항균처리 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

표면에 처리하는 단계는 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 표면에 분사하여 배양하는 단계를 추가로 포함하는 표면의 항균처리 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

분사 후 20℃ 내지 30℃에서 6 내지 120시간동안 배양하는 단계를 포함하는 표면의 항균처리 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

표면은 스테인리스 스틸, 유리, 나무, 비닐, 플라스틱, 고무 및 타일류로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 표면의 항균처리 방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 항균처리 방법은 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대한 항균처리 방법인, 표면의 항균처리 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 항균 활성을 나타내는 신규 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이를 포함하는 조성물 및 이를 이용한 병원성 미생물의 활성 억제 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)는 그람 양성의 통성혐기성 세균으로 건강한 사람이나 가축의 피부와 비강 표면에 존재하여 사람이나 동물의 피부, 호흡기, 부비강 등에 염증을 유발할 수 있다. 상기 균에 의해 식품이 오염되면, 균이 식품 중에서 증식하면서 장내독소(enterotoxin)를 생산하게 되어 이를 함유한 식품을 섭취할 경우 식중독을 일으킬 수 있다. 또한, 이 균은 식세포를 죽이는 독소(류코시딘), 용혈소, 응고효소 등을 분비하여 감염 숙주세포의 저항성에서 벗어나 화농성 감염증을 일으킨다. 뿐만 아니라, 소금 농도가 높은 곳에서도 증식하며, 특히 건조 상태에서 저항성이 강하여 식품이나 가검물 등에서 장기간(수개월) 생존하여 식중독을 유발한다.

[0003] 포도상구균 식중독(Staphylococcal food poisoning)은 전 세계적으로 가장 흔하게 보고 되고 있는 식중독 중 하나이며, 주로 스타필로코커스 아우레우스에 의해 생성된 포도상구균의 장내독소(staphylococcal enterotoxin)이 포함된 식품을 섭취했을 때 발생한다(비특허문헌 1). 식품의약품안전처의 통계 정보에 따르면, 우리나라에서는 최근 5년간 스타필로코커스 아우레우스에 인해 총 46건의 집단식중독 사고가 발생하였으며, 총 환자 수는 807명에 이른다고 보고하였다. 스타필로코커스 아우레우스에 의해 발생하는 식중독으로 인한 주요 증상으로는 메스꺼움, 구토, 경련성 복통 등이 나타난다.

[0004] 한편, 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)는 곰팡이 독소이며, 발암물질로 알려진 아플라톡신(aflatoxin)을 생성하여 식품을 오염시킬 수 있다. 아스퍼질러스 플라버스가 생성하는 아플라톡신은 인간 및 동물에게 노출될 경우 면역기능이 억제됨으로써 감염에 대한 저항성이 낮아지는 것으로 나타났고, 성장장해와 폐사, 사료 효율 감소, 질병별 감염율 증가를 야기하는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 2). 동물은 종에 따라 독성에 대한 감수성이 달라지며, 같은 종 안에서도 연령, 성별, 몸무게, 식이, 감염 물질에의 노출, 기타 곰팡이

독소 또는 약물 등의 존재에 따라 상당한 차이가 있다. 특히, 곰팡이독소는 가축을 키우는 농가에 심각한 피해를 주는 요인이 되고 있다.

[0005] 또한, 건조 환경과 같은 스트레스에 대해 저항성이 강한 스타필로코커스 아우레우스는 식품 제조 설비와 환경 표면에서 흔히 발견되며, 이는 식품으로의 오염 또는 재오염의 원인이 되며, 다양한 종류의 식품으로 교차오염을 유발할 수 있다. 따라서, 이와 같이 위해미생물이 다양한 환경으로 교차 오염되는 것을 예방하기 위해서는 효과적인 살균처리 방법이 개발되어야 한다.

[0006] 현재 환경표면에 오염된 위해미생물을 억제하기 위하여 하이포아염소산염(hypochlorite), 이산화염소(chlorine dioxide), 에탄올(ethanol), 과산화수소(hydrogen peroxide)와 같은 화학적 살균제가 개발되어 있고, 이 살균제들의 살균력 역시 검증되어 있지만, 이러한 화학적 살균제는 작업자에게 피부염증, 독성물질의 축적과 같은 부작용을 유발할 수 있다. 따라서, 식품접촉표면에서 화학적 합성물보다 천연물 제제를 이용하여 을 억제할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

[0007] 한편, 바이오필름은 생물학적 또는 비생물학적 표면에 부착된 미생물과 미생물이 분비하는 다당류(EPS; extracellular polymetric substances)의 결합층이다. 미생물들이 식품접촉표면에 바이오필름을 형성하게 되면 건조와 같은 환경스트레스에 저항성이 상당히 증가하게 된다. 만약 스타필로코커스 아우레우스에 대한 항균특성을 가진 길항미생물들을 이용하여 다양한 환경표면에 바이오필름을 형성시킨다면, 이 표면은 스타필로코커스 아우레우스에 대한 지속적인 항균활성을 나타낼 수 있을 것이다.

[0008] 현재까지 환경표면에 오염된 식중독세균을 억제할 수 있는 신규 미생물을 발굴한 사례는 거의 없고, 특히 바이오필름 형성을 유도하여 길항미생물들의 환경스트레스에 대한 저항성을 향상시킨 연구도 거의 없었다. 따라서, 다양한 환경 표면에서 위해미생물을 억제할 수 있는 신규 미생물의 발굴은 계속적으로 이루어져야 하며, 발굴된 신규의 유용 미생물을 적용하기 위한 방법들 역시 개발되어야 한다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Seo, S., Bohac, G. A., 2013. Staphylococcus aureus. In: Doyle, M. P., Buchanan, R. L. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington D.C., pp. 547-573.

(비특허문헌 0002) Nam, K, H., Korean Journal of Poultry Science (1994) 21(2), 113-117

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 항균 활성을 나타내는 신규 균주인 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이를 포함하는 조성물 및 이를 이용한 병원성 미생물의 활성 억제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이에, 본 발명자들은 토양, 식품, 식품접촉표면으로부터 약 2,100개의 미생물을 분리하였고, 이 미생물 중 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 우수한 항균 활성을 나타내는 균주를 찾고자 노력한 결과, 신규한 슈도모나스 속 균주인 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P를 분리, 동정하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 본 발명에 따른 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P(*Pseudomonas azotoformans* strain KACC 92125P)는 식품 유래의 슈도모나스 아조토포만스 신규 균주이다. 비록 본 발명에서의 슈도모나스 아조토포만스 균주는 식품으로부터 분리, 동정하기는 했으나, 입수 경로가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에의 실시예를 통해 분리된 스타필로코커스 아우레우스 및 아스퍼질러스 플라버스에 대해 우수한 항균효과를 나타내는 미생물의 동정 및 분류를 위한 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 도 3의 핵산서열을 갖는 것으로 나타났다. 또한, 분석 결과, 상기 균주는 도 4의 트리에서 볼 수 있는 바와 같이, *Pseudomonas azotoformans*

strain NBRC 12693와 가장 높은 분자계통학적 유연 관계를 보였다.

[0014] 따라서, 도 3의 16S rRNA 염기서열을 갖는 본 발명의 미생물을 슈도모나스 아조토포만스 렉투스(*Pseudomonas azotoformans* lettuce)로 명명하고, 국립농업과학원에 2016년 03월 30일자로 기탁하였다(수탁번호 KACC 92125P). 본 발명에 있어서, 상기 슈도모나스 아조토포만스 렉투스(*Pseudomonas azotoformans* lettuce)는 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P(*Pseudomonas azotoformans* strain KACC 92125P)와 상호 교환적으로 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)와 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 동시에 항균 활성을 나타냄으로써, 본 발명의 균주를 포함하는 조성물은 생물학적 제제로써 사용되어 식품, 농업, 환경 산업 등에 넓게 적용시킬 수 있다.

[0016] 하기 실시예에서는, 본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P가 스타필로코커스 아우레우스와 아스퍼질러스 플라버스에 대해 동시에 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 상기 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 현탁액을 스테인리스 스틸에 분사 건조하여 배양한 표면에서 상기 균주의 개체수를 측정하여 바이오필름 형성 능력이 우수함을 확인하였다.

[0017] 그러므로, 본 발명에 따른 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P는 스타필로코커스 아우레우스 및 아스퍼질러스 플라버스에 대한 항균성 물질로서 가축, 축사 등에서 상기 병원성 미생물의 활성 억제 용도로 다양하게 활용될 수 있다.

[0018] 이에, 본 발명의 한 구체예에서는, 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P는 생균체 또는 사균체로서 존재할 수 있으며, 또한 건조 또는 동결건조된 형태로 존재할 수도 있다. 다양한 조성물 내에 포함시키기 적합한 균주의 형태 및 제제화 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 추출물, 배양물, 농축물, 현탁물 등의 형태로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 한 구체예에서는 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에 따른 항균용 조성물은 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 항균 활성을 나타낸다.

[0022] 스타필로코커스 아우레우스는 젖소와 염소류에게 유선염을 유발할 수 있으며, 닭에게 부종성 피부염과 관절염을 유발할 수 있고, 폐렴, 당뇨병, 골수염, 심장내막염, 균혈증 패혈증 등의 감염 질환을 유발할 수 있다. 또한, 아스퍼질러스 플라버스는 옥수수에서 이삭 마름병을 유발할 수 있고, 특히, 아스퍼질러스 플라버스는 곡류에 아플라톡신(aflatoxin)이라는 곰팡이 독소를 형성할 수 있는데, 이 곰팡이 독소가 형성된 곡류를 동물이 섭취했을 경우 부종, 소화불량, 간질환, 암, 낙태, 기형 발생, 경구개 궤양, 안면신경마비 등의 증상 또는 질환을 유발할 수 있다. 또한, 상기 스타필로코커스 아우레우스와 아스퍼질러스 플라버스는 대표적인 식중독 균으로 알려져 있어, 가축에게서 식중독, 장염 등을 유발할 수 있다.

[0023] 따라서, 상기 조성물은 동물 또는 식물의 병원성 미생물의 감염에 의한 질환의 예방, 치료, 개선에 이용될 수 있으며, 바람직하게는 상기 동물은 소, 말, 돼지와 같은 가축과 식물은 밀, 보리, 귀리, 호밀, 쌀 등의 곡류를 포함한다.

[0025] 또한, 본 발명은 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는 사료 또는 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[0026] 사료로서 이용될 경우, 상기 조성물은 동물의 식이욕구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기곡분을 포함할 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로 옥수수, 콩곡분, 또는 옥수수/콩곡분믹스로 주로 구성되어 있다.

[0027] 사료 첨가제로서 이용될 경우, 상기 조성물은 20 내지 90% 고농축액이거나 분말 또는 과립 형태로 제조될 수 있다. 상기 사료 첨가제는 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산, 사과산등의 유기산이나 인산 나트륨, 인산 칼륨, 산성 피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물,

비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 사료로서 이용될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화 될 수 있으며, 통상의 사료성분을 함께 포함할 수 있다.

[0028] 상기 사료 첨가제 및 사료는 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩, 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제 등을 더 포함할 수 있다.

[0029] 상기 사료 첨가제는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑드레싱으로서 또는 이들을 동물사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료 첨가제를 동물사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 약제학적으로 허용가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수전분, 락토오스, 수크로오스, 콩플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탑 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀젼제, 또는 용액제의 제형일 수 있다.

[0030] 또한, 상기 사료 및 사료 첨가제는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액촉진제 등을 함유할 수 있다. 상기 사료 첨가제는 침주, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 사료 또는 사료 첨가제는 포유류 및 가금류를 포함하는 다수의 동물식이에 적용할 수 있다.

[0032] 상기 포유류로서 돼지, 소, 양, 염소, 실험용 설치동물 및 실험용 설치동물뿐만 아니라, 애완동물(예: 개, 고양이) 등에게 사용할 수 있으며, 상기 가금류로서 닭, 칠면조, 오리, 거위, 꿩, 및 메추라기 등에도 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 또한, 본 발명은 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는 생물학적 방제제를 제공한다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 방제제에 사용되는 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P는 임의의 다른 성분을 전혀 첨가하지 않고 그대로 사용할 수 있다. 필요에 따라, 고체 담체 또는 액체 담체 등의 임의의 각종 담체와 합하여 제조된 조성물, 또는 첨가제 등의 제제용 보조제를 첨가하여, 균주 또는 물질을 수화제, 용액제, 현탁제, 과립제, 분제, 마이크로캡슐제 등으로 제제화하여 수득된 제형물을 사용할 수 있다. 상기 제제는 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P를 약 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니나 제제 1g 당 약 10^3 내지 10^{10} CFU의 상기 균주를 포함할 수 있다.

[0036] 제제화에 사용되는 고체 담체로는 예를 들어, 미네랄 분말(예, 카올린클레이, 벤토나이트, 규조토, 합성 함수산화규소, 탈크, 석영, 버미큘라이트, 펄라이트 등), 무기염(예, 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 우레아 및 염화암모늄 등), 유기분말(소맥분, 대두분, 밀기울, 키틴, 쌀겨, 탈지분유 및 전지분유 등), 활성탄 및 탄산칼슘 등을 들 수 있다. 액체 담체로는, 예를 들어 물, 글리세롤, 식물유(예, 대두유 및 유채씨유), 액체 동물유(예, 어유), 에틸렌글리콜, 폴리(에틸렌글리콜), 프로필렌글리콜 및 폴리(프로필렌글리콜) 등을 들 수 있다.

[0037] 제제용 보조제로는, 예를 들어 카제인, 젤라틴, 다당류(예, 전분가루, 아라비아고무, 셀룰로오스 유도체 및 알긴산), 리그닌 유도체, 벤토나이트, 당류, 식물유, 광물유, 합성 수용성 고분자(예, 폴리(비닐알콜), 폴리(아크릴산) 등), 프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜 등의 동결 방지제; 실리콘계 화합물 등의 소포제; 천연 다당류(예, 잔탄검 등), 무기물(예, 알루미늄 및 벤토나이트 등), 합성 수용성 고분자(예, 폴리(아크릴산) 등) 등의 증점제 등을 들 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 방제제는 항균제, 축사 소독제, 음수 첨가제 등으로 적용할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명에 따른 방제제는 살충제, 살선충제, 살진드기제, 살진균제, 살균제, 제초제, 식물 생장 조절제, 전착제, 비료, 미생물 재료, 토양 개량제 등과 혼합하여 사용하거나, 또는 혼합하지 않고 동시에 사용할 수도 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 생물학적 방제제를 가축, 축사 또는 그 부근에 처리하는 단계를 포함하는, 병원성 미생물의 활성 억제 방법을 제공한다.

[0042] 본 발명에 따른 병원성 미생물의 활성 억제 방법은 가축, 축사 또는 그 부근에 직접 처리하거나 바이오 필름을 형성시켜 처리하는 단계를 모두 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 생물학적 방제제를 사료에 첨가하여 가축에게 급여하거나, 축사 또는 그 부근에 살포함으로써 가축에 감염을 일으킬 수 있는 병원성 미생물의 활성을 억제시키는 방법과 축사 및 그 부근환경에 상기 생물학적 방제제를 부착하거나 바이오 필름 형성을 유도하여 병원균에 대해 항균성을 부여하는 방법 등을 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 병원성 미생물은 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)일 수 있다.

[0044] 앞서 설명한 바와 같이, 상기 병원성 미생물의 활성을 억제시킴으로써, 가금류, 가축 등의 동물에게 스타필로코커스 아우레우스로부터 유발되는 식중독, 장염, 유선염, 부종성 피부염, 관절염, 폐렴, 당뇨병, 골수염, 심장내막염, 균혈증, 패혈증 등과 아스퍼질러스 플라버스로부터 유발되는 경구개 궤양, 간암 등의 병원성 미생물에 의한 감염 질환을 예방할 수 있다.

[0046] 본 발명은 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는, 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 의한 이삭마름병 방제제를 제공한다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 방제제를 식물에 처리하는 단계를 포함하는 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)의 활성 억제 방법을 제공한다.

[0048] 본 발명에 따른 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)의 활성 억제 방법은 상기 방제제를 식물에 살포함으로써 식물에 감염을 일으킬 수 있는 아스퍼질러스 플라버스의 활성을 억제시킬 수 있다.

[0049] 앞서 설명한 바와 같이, 아스퍼질러스 플라버스의 활성을 억제시킴으로써 밀, 보리, 귀리, 호밀, 쌀 등의 곡류에서 이삭마름병을 예방할 수 있다. 또한 아스퍼질러스 플라버스에 의해 형성되는 아플라톡신(aflatoxin)의 곰팡이 독소 역시 예방할 수 있다. 상기 아플라톡신은 안면신경마비, 경구개 궤양, 간암 등을 유발할 수 있다.

[0050] 본 발명은 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 포함하는 병원성 미생물에 의한 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 병원성 미생물은 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)를 포함한다.

[0052] 본 발명에 따른 조성물은 가금류, 가축 등의 동물에게 스타필로코커스 아우레우스로부터 유발되는 식중독, 장염, 유선염, 부종성 피부염, 관절염, 폐렴, 당뇨병, 골수염, 심장내막염, 균혈증, 패혈증 등의 감염 질환과 아스퍼질러스 플라버스로부터 유발되는 경구개 궤양, 간암 등의 병원성 미생물 또는 곰팡이독소에 의한 감염 또는 독소형 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0053] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 활용될 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0054] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0055] 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연당, 옥수수감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐아세테이트, 소듐 클로라이드등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액,

정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0056] 나아가 해당 분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명은 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P, 이의 배양물, 이의 추출물 또는 이의 현탁물을 표면에 처리하는 단계를 포함하는 표면의 항균처리 방법을 제공한다.

[0059] 본 발명에 있어서, 표면에 처리하는 단계는 상기 균주, 균주의 배양물, 균주의 추출물 또는 균주의 현탁물을 표면에 분사하여 건조하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 분사 건조한 후, 20℃ 내지 30℃의 온도범위에서 3시간 내지 120시간 동안, 바람직하게는 3시간 내지 72시간 동안, 더 바람직하게는 6시간 내지 48시간 동안 배양기에서 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명에 있어서, 상기 표면은 스테인리스 스틸, 유리, 나무, 비닐, 플라스틱, 고무 또는 타일류일 수 있으나, 표면의 종류가 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 하기 실시예에서, 상기 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 현탁액을 스테인리스 스틸 쿠폰에 분사하여 건조한 후, 25℃의 온도에서 120시간 동안 배양한 결과, 배양 24시간 만에 상기 균주의 개체수가 약 100배 이상 증가하여 그 후에는 개체수가 유지되는 것을 확인함으로써, 상기 균주가 스테인리스 스틸 쿠폰에 바이오필름을 형성하여 항균 활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0062] 따라서, 본 발명에 따른 균주는 표면에 비선택적으로 바이오필름을 형성하여 스테인리스 스틸, 유리, 나무, 비닐, 플라스틱, 고무, 타일류 등의 표면에 바이오필름을 형성함으로써 항균 활성을 나타낼 수 있으므로, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 우수한 항균활성을 나타낼 수 있다.

발명의 효과

[0063] 본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P는 식품위해미생물인 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 항균 활성을 나타내고, 건조한 환경에서도 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P는 잘 생존하므로, 상기 균주를 포함하는 조성물은 생물학적 제제로써 사용되어 식품, 농업, 환경 산업 등에 넓게 적용시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 본 발명에 따른 균주의 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성을 저해환의 형성을 통해 나타낸 결과이다.

도 2는 본 발명에 따른 균주의 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대한 항균 활성을 저해환의 형성을 통해 나타낸 결과이다.

도 3은 본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 SEQ ID NO: 1에 기재된 염기서열을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 분자계통학적 유연 관계를 보여주는 트리이다.

도 5는 본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 바이오필름 성장 곡선을 그래프로 나타낸 결과이다.

도 6은 본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P가 형성한 바이오필름의 형태를 SEM을 통해 관찰한 결과이다.

도 7은 본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P로부터 형성된 바이오필름의 건조 환경 스트레스에 대한 저항성을 확인한 결과이다.

도 8은 본 발명의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P로부터 형성된 바이오필름의 스타필로코커스 아우

레우스에 대한 항균활성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0067] **[실시예 1] 토양, 식품, 식품접촉표면으로부터 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대해 항균력을 보이는 길항 미생물의 발굴**

[0068] 토양 샘플은 대한민국의 여러 산, 호수, 댐 등에 존재하는 흙을 채집하여 확보하였다. 흙은 10cm정도 깊이로 땅을 파서 내부에 있는 흙을 채취하였다. 이 흙 1g을 10ml의 멸균된 물에 현탁 시키고 1 내지 3시간 정도 25℃에서 200rpm으로 진탕배양하였다. 배양 후, 배양액에서 흙이 가라앉으면 상등액 0.1ml를 취해 humic acid vitamin agar에 도말하여 28℃에서 3일 내지 14일간 배양한 후 자란 미생물 콜로니를 백금이(inoculation loop)로 취하여 20% 글리세롤에 넣고 -80℃에서 냉동보관하였다.

[0069] 보관해둔 토양 유래 미생물의 단일 콜로니를 백금이를 이용하여 Bennet's agar에 획선 도말하고 25℃ 배양기에서 총 6일 동안 배양하였다. 이때, 3일 배양 후, 균주가 잘 자랐는지 확인하여 잘 자라지 못한 균주는 멸균 면봉을 이용하여 2차 획선 도말한 후 배양하였다.

[0070] 6일 후 콜로니가 자라면 약 1 내지 5개의 콜로니를 작은 사이즈의 구슬이 포함된 10ml의 TSB에 접종하여 약 200rpm으로 25℃에서 3일 동안 진탕 배양하였다.

[0071] 3일 배양 후, 이 토양미생물들을 TSA에 10㎕씩 점접종하고 15분 내지 30분 동안 층류 생물안전 캐비닛 후드(laminar flow biosafety cabinet hood)에서 건조 한 후, 25℃ 배양기에서 24시간 동안 정치 배양하였다.

[0073] 식품으로부터 미생물을 분리하기 위하여 서울에 소재한 재래시장에 있는 상점들 중 무작위로 8곳을 선정하여 신선 채소(상추, 얼음 양상추, 양배추, 적양배추, 배추, 깻잎, 어린 양배추, 치커리 그리고 겨자잎)와 수산물(어류[고등어, 참조기], 갑각류[새우] 그리고 패류[홍합, 피조개])을 구입하였다.

[0074] 10g의 신선 채소 또는 수산물을 100ml의 멸균된 0.1% 펩톤수(peptone water, PW)와 함께 400ml의 폴리올레핀 용기에 넣고 균질기를 이용하여 2분간 균질화하였다. 균질화된 샘플들은 각각 0.1% PW로 희석하고, 0.1%(w/v) 피루빈산나트륨(sodium pyruvate)이 첨가된 TSA(tryptic soy agar) 배지에 평판 도말한 후, 25℃에서 48시간 동안 배양하였다. 배양한 후, 모양과 색깔이 서로 다른 콜로니들을 선별하여 백금이로 TSA 배지에 획선도말한 후 25℃에서 24시간 동안 배양하여 4℃에서 냉장보관하였다.

[0075] 식품과 식품접촉표면에서 분리한 미생물의 경우, 단일 콜로니를 10 ml의 TSB에 접종하여 25℃ 배양기에서 24시간 간격으로 세 번 계대배양하였다.

[0076] 10ml의 TSB에서 배양한 식품 유래 미생물을 TSA에 각각 10㎕씩 점접종하고 층류 생물안전 캐비닛 후드(laminar flow biosafety cabinet hood)에서 15분 내지 30분 동안 건조한 후, 25℃ 배양기에서 24시간 동안 정치 배양하였다.

[0078] 토양에서 분리한 미생물의 경우 점접종 3일 배양 후, 식품에서 분리한 미생물의 경우는 점접종 24 시간 배양 후, 45℃로 유지한 TSA 99 ml와 1ml의 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 10^7 CFU/ml와 혼합하여 10^5 CFU/ml의 균을 포함하는 100ml의 agar를 준비하였다. 스타필로코커스 아우레우스가 혼합된 agar를 균주가 자란 TSA에 10ml씩 분주하였다.

[0079] 이 agar plate를 층류 생물안전 캐비닛 후드(laminar flow biosafety cabinet hood)에서 30분 동안 건조한 후, 37℃에서 24시간 배양하여 저해환의 크기를 확인하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0081] 도 1에서 보는 바와 같이, agar plate에 형성된 저해환의 직경을 측정한 결과, 식품으로부터 분리한 길항미생물(상추-9)에 의한 저해환의 직경이 3.9cm로 가장 크게 나타나는 것을 확인하였다.

[0083] **[실시예 2] 토양, 식품, 식품접촉표면으로부터 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 항균력을 보이는 길항 미생물의 발굴**

[0084] 항균 대상으로 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 저해환의 크기를 확인하였다. 도 2를 통해 저해환의 크기를 확인하였다.

[0086] 도 2에서 보는 바와 같이, agar plate에 형성된 저해환의 직경을 측정한 결과, 식품으로부터 분리한 길항미생물(상추-9)에 의해 직경이 1.1cm인 저해환을 형성하는 것을 확인하였다.

[0088] **[실시예 3] 길항 미생물의 동정**

[0089] 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)에 대해 항균력을 보인 길항 미생물을 TSA 배지에 획선 도말하여 25℃에서 2일 동안 정치 배양한 뒤, 16S rRNA 유전자 서열 분석을 의뢰한 결과, 도 3의 핵산서열을 갖는 것으로 나타났다. 16S rRNA 유전자 서열정보를 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)의 blast 분석을 통해 균을 동정하였다. 동정 결과 이 미생물은 슈도모나스 속(*Pseudomonas* spp.)일 가능성이 99%인 것으로 확인되었다. SEQ ID NO: 1의 핵산서열을 도 3에 나타내었다.

[0090] 이 슈도모나스 속(*Pseudomonas* spp.)의 종명을 확인하기 위하여, 먼저 계통도(phylogenetic tree)를 그려 분석하였다. 계통도는 분석된 16S rRNA 유전자 서열정보를 Mega software(version 5.05)의 neighbor-joining 방법으로 도시한 도 4의 트리에서 볼 수 있는 바와 같이, *Pseudomonas azotoformans* strain NBRC 12693의 유전자 서열정보와 유사한 것으로 확인되어 슈도모나스 아조토포만스와 가장 높은 분자계통학적 유연 관계를 보였다. 따라서, 실시예 1 및 2에서 분리한 상기 길항미생물(상추-9)을 슈도모나스 아조토포만스 렉투스(*Pseudomonas azotoformans* lettuce)로 명명하고, 국립농업과학원에 2016년 03월 30일자로 기탁하여 수탁번호 KACC 92125P를 부여받았다.

[0092] **[실시예 4] 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 바이오필름 형성 능력 확인**

[0093] 상기 실시예를 통해 식품에서 분리한 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 단일 콜로니를 10ml의 TSB 배지에 접종하여 25℃ 배양기에서 48시간 간격으로 세 번 계대배양하였다.

[0094] 10ml TSB에서 48시간 동안 배양한 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 배양액을 2,002rcf로 원심분리한 후, 1ml의 현탁액을 99ml의 PBS(phosphate buffer saline)를 이용하여 100배로 희석하고, 동일한 방법으로 한번 더 희석하여 최종적으로 5 log CFU/ml의 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 현탁액을 준비하였다.

[0095] 이렇게 준비한 현탁액을 스테인리스 스틸 쿠폰에 멸균된 스프레이를 이용하여 분사한 후, 1시간 동안 laminar flow biosafety hood에서 건조시킴으로써 쿠폰 표면에 단순 부착시켰다.

[0096] 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 cells이 부착된 쿠폰에 4ml의 TSB를 공급하고 25℃ 배양기에서 최대 120시간 동안 저장하였고, 저장 24시간 마다 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 개체수를 확인하여 바이오필름 형성 능력을 확인하였다. 이때, 스테인리스 스틸 표면에서 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 개체수가 유의적으로 증가한 경우에 바이오필름이 형성되었다고 판단하였다. 도 5에 바이오필름이 형성되는 성장 곡선을 나타내었다.

[0097] 25℃에서 120시간 저장 후, 스테인리스 스틸에서 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P이 형성한 바이오필름을 확인하기 위하여 주사현미경(SEM)을 찍어 이 균의 특성을 파악하였다. SEM을 통해 바이오필름을 형성한 모습을 도 6에 나타내었다.

[0098] 도 5에서 보는 것과 같이, 스테인리스 스틸에 부착된 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 초기 개체수는 3.3log CFU/coupon이었고, 저장 24시간 만에 유의적으로 증가하였고, 저장 48시간 이후에는 8.5 log CFU/coupon까지 증가하였으나, 그 이후에는 개체수가 유지되었다. 이러한 결과는 TSB를 공급해준 후 25℃에 저장하는 동안에 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P가 스테인리스 스틸 표면에 바이오필름을 형성할 수 있다는 것을 의미한다.

[0099] 또한, 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P가 스테인리스 스틸 표면에 바이오필름을 형성한 모습을 SEM을 이용하여 모습을 관찰한 결과(도 6), 스테인레스 스틸 표면에 전반적으로 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P가 많은 군집을 형성하고 있고, 스테인리스 스틸 표면과 균 또는 서로 다른 균 사이를 연결하는 섬유질과 같은 끈들이 발견된 것을 확인하였다.

[0101] **[실시예 5] 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 건조 환경 스트레스에 대한 저항성 확인**

[0102] 스테인리스 스틸 표면에 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P를 부착시키기 위해, TSB 배지 10 ml에서 48시간 동안 25℃의 온도조건에서 배양된 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P 9 log CFU/ml를 멸균된 스프레이를 이용하여 분사하고, 1시간 동안 건조시키면서 부착시켰다.

[0103] 스테인리스 스틸 표면에 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 바이오필름을 형성시키기 위해, TSB 배지 10 ml에서 48시간 동안 25℃의 온도조건에서 배양된 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P 5 log CFU/ml를 멸균된 스프레이로 분사하고 1시간 동안 건조시킨 후, TSB 배지 4 ml를 공급하여 25℃에서 5일 동안 저장하였다.

[0104] 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P가 부착된 또는 바이오필름이 형성된 스테인리스 스틸 쿠폰은 25℃, 43%의 상대습도 조건에서 5일 동안 저장하였고, 저장 24시간 마다 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 개체수를 확인하였다. 그 결과를 도 7에 그래프로 나타내었다.

[0105] 그 결과, 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P이 단순 부착된 경우에는 저장 24시간 이후 3.4 log CFU/coupon 이상의 개체수 감소를 보였지만, 바이오필름을 형성한 경우에는 단지 0.8 log CFU/coupon의 개체수 감소를 보였다. 이러한 결과들은 테스트된 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P이 스테인리스 스틸 표면에 바이오필름을 형성할 경우, 건조 환경에 대한 저항성이 증가한다는 것을 의미한다.

[0107] **[실시예 6] 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 저감화 효과 확인**

[0108] 실시예 5와 동일한 방법으로 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 바이오필름이 형성된 스테인리스 스틸 쿠폰을 준비한 후, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 현탁액을 0.1ml(약 4 log CFU/coupon) 취하여 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 바이오필름을 포함한 또는 포함하지 않은 스테인리스 스틸 쿠폰 위에 18±2 drops 정도로 점접종(spot-inoculation)하였다. 그 후, 43%의 상대습도와 25℃의 온도조건에서 48시간 동안 저장하였고, 저장 0, 3, 6, 12, 24 그리고 48시간 마다 스타필로코커스 아우레우스의 개체수를 확인하였다. 그 결과를 도 8에 그래프로 나타내었다.

[0109] 실험 결과, 접종된 스타필로코커스 아우레우스의 초기 개체수는 4.2 log CFU/coupon이었다. 바이오필름을 형성하지 않은 스테인리스 스틸 쿠폰의 표면에 존재하는 스타필로코커스 아우레우스의 개체수는 저장 48시간 후에 3.0 log CFU/coupon이 남아있었다. 반면, 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P가 형성한 바이오필름을 포함하고 있는 스테인리스 스틸 쿠폰에 접종된 스타필로코커스 아우레우스가 더 빠르게 사멸하는 것을 확인하였다. 즉, 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P가 형성한 바이오필름에 노출된 스타필로코커스 아우레우스의 개체수는 저장시간 동안 유의적으로 감소하여, 저장 48시간 후에는 1.9 log CFU/coupon으로 감소되었다. 이를 통해 슈도모나스 아조토포만스 균주 KACC 92125P의 스타필로코커스 아우레우스에 대한 강한 살균력을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0110]

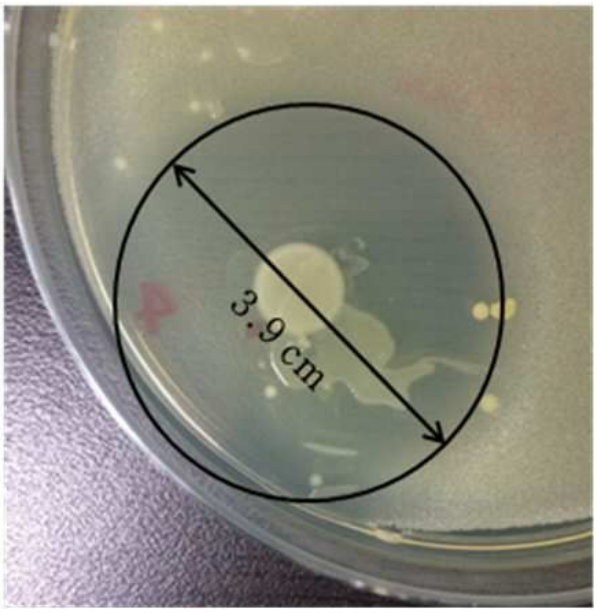
기탁기관명 : 국립농업과학원(국내)

수탁번호 : KACC92125P

수탁일자 : 20160330

도면

도면1



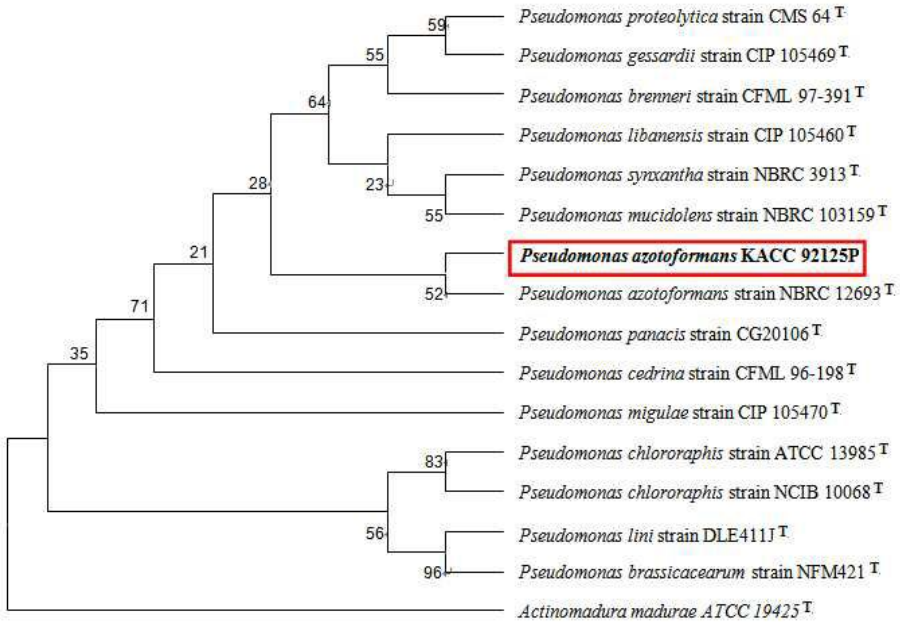
도면2



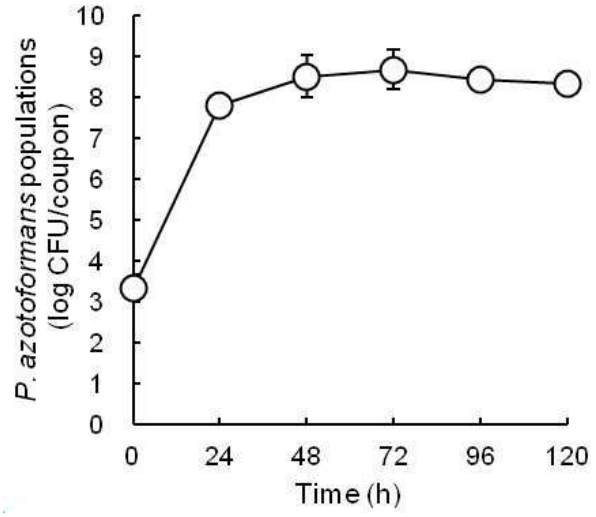
도면3

TCAGATTAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGA
AGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCC
TGGTAGTGGGGGATAACGTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTAC
GGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCG
GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGT
CTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA
GGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG
CTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAG
GGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAA
CTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGAC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACA
TTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGG
GCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTA
CAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT
CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
GAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGAC
GGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTACAGGGGAACCC

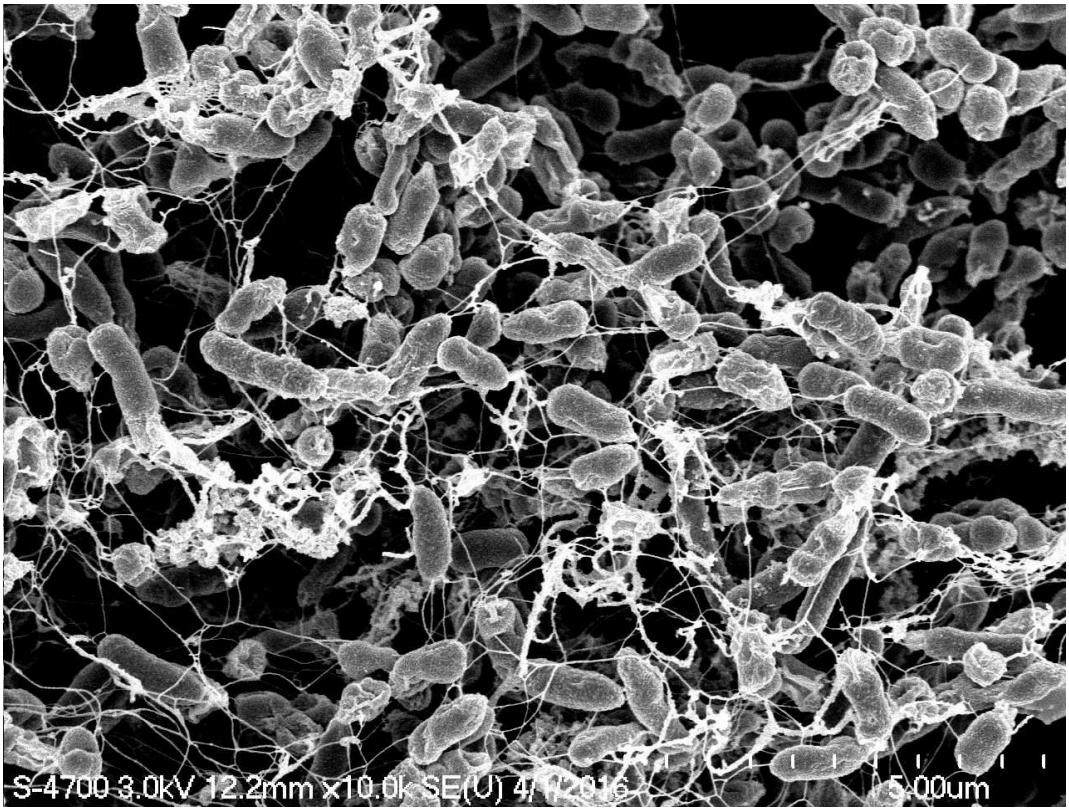
도면4



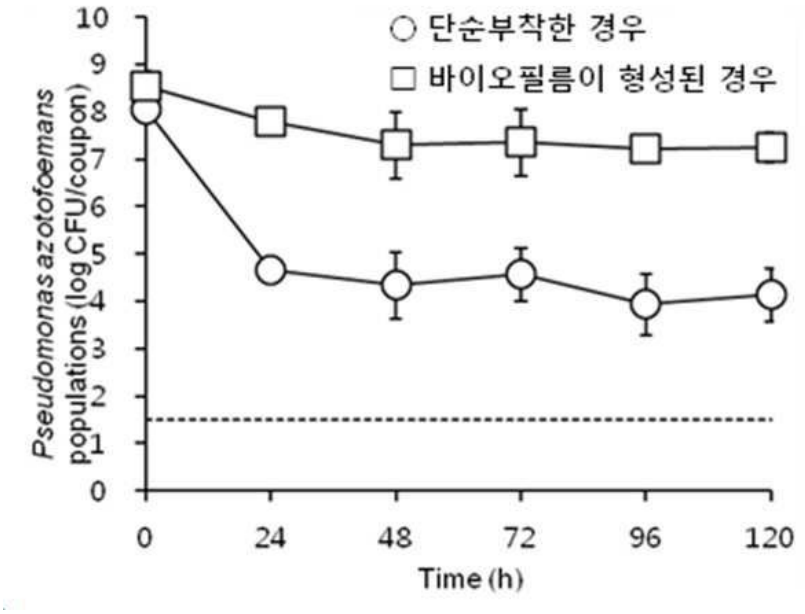
도면5


P. azotoformans populations
(log CFU/coupon)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
24
48
72
96
120
Time (h)

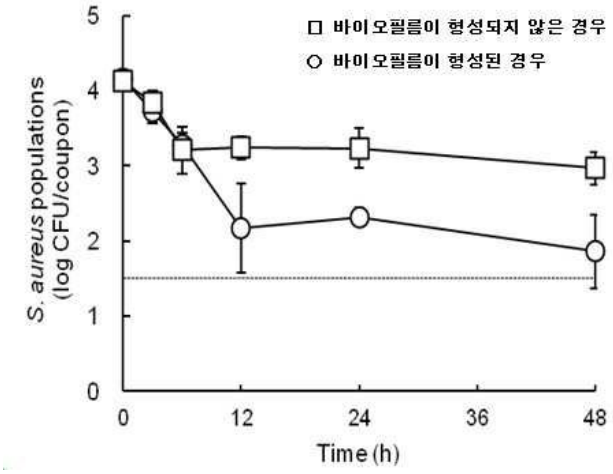
도면6


S-4700 3.0kV 12.2mm x10.0k SE(U) 4/
5.00um

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Pseudomonas azotoformans strain KACC 92125P and composition for comprising the same

<130> P16U13C0801

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1481

<212> RNA

<213> Pseudomonas azotoformans strain KACC 92125P

<400> 1

tcagattaac gctggcggca ggcctaacac atgcaagtcg agcggtagag agaagcttgc 60

ttctcttgag agcggcggac gggtgagtaa tgcctaggaa tctgcctggt agtgggggat 120

aacgttcgga aacggacgct aataccgcat acgtcctacg ggagaaagca ggggaccttc 180

gggccttgcg ctatcagatg agcctaggtc ggattagcta gttggtgggg taatggctca 240

ccaaggcgac gatccgtaac tggtctgaga ggatgatcag tcacactgga actgagacac 300

ggtccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgg acaatgggcg aaagcctgat 360

ccagccatgc cgcgtgtgtg aagaaggtct tcggattgta aagcacttta agttgggagg 420

aagggttgta gattaatact ctgcaatttt gacgttaccg acagaataag caccggctaa 480

ctctgtgcca gcagccgcgg taatacagag ggtgcaagcg ttaatcggaa ttactgggcg 540

taaagcgcgc gtaggtggtt tgttaagttg gatgtgaaat ccccgggctc aacctgggaa 600

ctgcattcaa aactgactga ctagagtatg gtagagggtg gtggaatttc ctgtgtagcg 660

gtgaaatgcg tagatatagg aaggaacacc agtggcgaag gcgaccacct ggactaatac 720

tgacactgag gtgcgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc 780

cgtaaacgat gtcaactagc cgttggaagc cttgagcttt tagtggcgca gctaacgcat 840

taagttgacc gcctggggag tacggccgca aggttaaaac tcaaatgaat tgacgggggc 900

ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggcc 960

ttgacatcca atgaactttc cagagatgga ttggtgcctt cgggaacatt gagacaggtg 1020

ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgt aacgagcgca 1080

acccttgtcc ttagttacca gcacgtcatg gtgggcactc taaggagact gccggtgaca 1140

aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt catcatggcc cttacggcct gggctacaca 1200

cgtgctacaa tggtcggtac agagggttgc caagccgcga ggtggagcta atcccataaa 1260

accgatcgta gtccggatcg cagtctgcaa ctcgactgcg tgaagtcgga atcgctagta 1320

atcgcgaatc agaatgtcgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac 1380

accatgggag tgggttgcac cagaagtagc tagtctaacc ttcgggagga cggttaccac 1440

ggtgtgattc atgactgggg tgaagtcgta caggggaacc c 1481