



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0031004
(43) 공개일자 2013년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0094648
(22) 출원일자 2011년09월20일
심사청구일자 2013년01월08일

(71) 출원인
씨제이제일제당 (주)
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
(72) 발명자
양시용
인천시 남동구 논현동 동산마을주공아파트 803동
1403호
김재원
서울시 노원구 상계동 주공아파트 124동 305호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

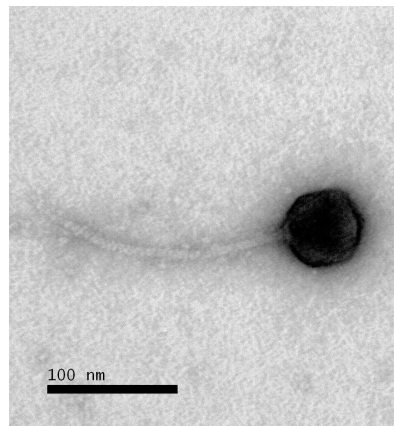
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신규 박테리오파지 및 이를 포함하는 항균 조성물

(57) 요약

본 발명은 살모넬라 특이적 사멸능을 갖는 신규 박테리오파지(bacteriophage), 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 감염성 질병의 예방 또는 치료용 조성물, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항생제, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 가축용 사료 또는 음용수 및 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제에 관한 것이다. 본 발명의 신규 박테리오파지는 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스 또는 살모넬라 뉴포트에 특이적 사멸능을 가지는 반면, 익균은 사멸시키지 않고, 내산성, 내열성 및 내건성이 우수하므로, 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스 또는 살모넬라 뉴포트 감염성 질병인 살모넬라증 또는 살모넬라 식중독의 예방 또는 치료에 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 가축용 사료, 가축 음용수, 소독제 및 세척제 등에도 광범위하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

조영욱

서울특별시 용산구 이촌로 347, 10동 609호 (서빙
고동, 신동아아파트)

김영사

서울특별시 성북구 오패산로 90, 래미안아파트 11
9동 1704호 (하월곡동)

신은미

인천광역시 연수구 먼우금로252번길 29, 4층 (연수
동)

특허청구의 범위

청구항 1

- (i) 살모넬라 콜레라수이스(*Salmonella choleraesuis*)에 특이적 사멸능을 갖고;
- (ii) 형태학상 정이십면체의 머리(isometric capsid) 및 수축성이 없는 꼬리(long non-contractile tail)로 구성된 형태형(morphotype) B1 시포비리데(Siphoviridae)에 속하며;
- (iii) 전체 게놈 크기가 약 140kbp이고; 및
- (iv) 31-35kDa, 53-57kDa 및 68-72kDa 크기의 단백질을 주요 구조단백질로 포함하는 박테리오파지.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 박테리오파지는 형태학적으로 도 1에 도시된 형태를 갖는 것인 박테리오파지.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 박테리오파지는 서열번호 1 내지 4 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 핵산 분자를 전체 게놈의 일부로서 포함하는 것인 박테리오파지.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 박테리오파지는 서열번호 5와 6, 서열번호 7과 8, 서열번호 9와 10, 서열번호 11과 12 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 프라이머 세트로 PCR을 진행하였을 경우, 각각 1 내지 2kbp의 PCR 산물을 수득할 수 있는 것인 박테리오파지.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 박테리오파지는 pH 3 내지 pH 11의 범위에서 내산성을 가지고, 37°C 내지 60°C 범위에서 내열성을 가지며, 60°C 건조 조건에서 내건성을 갖는 것인 박테리오파지.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 박테리오파지는 기탁번호 KCCM11208P인 박테리오파지.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는, 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스, 살모넬라 뉴포트 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택

되는 살모넬라균에 의하여 유발되는 감염성 질병의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 살모넬라 콜레라수이스 또는 살모넬라 티피뮤리움에 의하여 유발되는 감염성 질병은 살모넬라증 또는 살모넬라 식중독이고, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스 및 살모넬라 뉴포르에 의하여 유발되는 감염성 질병은 세균성 감염형 살모넬라 식중독인 것인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항생제.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 가축용 사료 또는 음용수.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규 박테리오파지 및 이를 포함하는 항균 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 살모넬라 특이적 사멸능을 갖는 신규 박테리오파지(bacteriophage), 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 감염성 질병의 예방 또는 치료용 조성물, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항생제, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 가축용 사료 또는 음용수 및 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 살모넬라균은 장내균과의 그람 음성의 보통 혐기성 세균 1속(조건 무산소균임)으로 아포를 형성하지 않는 간균으로, 보통 주모성 편모에 의한 운동성을 갖는다. 살모넬라균의 유전자 염기 구성 성분을 보면 GC 포함 정도가 50-52%로 대장균(Escherichia coli)과 쉬겔라(Shigella)와 유사하다. 살모넬라균 속은 사람에게뿐만 아니라 여러 가축에 감염하여 다양한 질병을 일으키는 병원성 미생물이다. 살모넬라균 종인 살모넬라 엔테리카(Salmonella enterica)는 혈청학적 구별에 의한 구분을 통해 살모넬라 갈리나룸(Salmonella gallinarum), 살모넬라 플로럼(Salmonella pullorum), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium, ST), 살모넬라 엔테리티디스(Salmonella enteritidis, SE), 살모넬라 티피(Salmonella typhi), 살모넬라 콜레라수이스(Salmonella choleraesuis, SC), 살모넬라 더비(Salmonella derby, SD)등을 포함한 많은 혈청종(serovar)를 가진다. 이들 중 돼지에 특이한 콜레라수이스와 더비 등이 질병을 일으켜 농가와 소비자에 막대한 피해를 주기도 하며, 가금에 특이한 갈리나룸과 플로럼, 대상 동물이 다양한 인수공통 혈청종인 티피뮤리움과 엔테리티디스, 사람에게 특이한 티피 등이 피해를 주고 있다(Zoobises Report; Unitted Kingdom 2003).

[0003] 돼지의 질병으로 사람에게 전염될 수 있는 질병으로는 돼지 단독, 일본뇌염, 렙토스피라병, 돼지 부루셀라병, 연쇄상구균증, 포도상 구균증, 돼지 낭충증, 외부기생충, 클로스트리디움증, 리스테리아증, 캄필로박터성 설사증, 예시니아증, 톡소프라즈마병, 그리고 살모넬라병이다. 그러나 이러한 대부분의 질병들은 직접 사람에게 전염되어

치명적인 질환이 발생하는 일이 거의 없다. 최근 돼지에 직접적인 피해를 주며, 식육위생에서 중요한 살모넬라균은 사육 중 돼지의 소화기관내에 존재하고 있었던 살모넬라균이 도축과정에 돼지고기에 오염될 가능성이 높기 때문에 2003년 7월 1일부터 우리나라 전 도축장에 HACCP(식품 위해 요소 중점관리 제도)를 도입하였다(예재길, 돼지살모넬라균 감염증의 특징과 대책, 월간양돈, 2004).

[0004] 살모넬라 감염에 의한 돼지의 급성 또는 만성 소화기전염병으로 일명 돼지 파라타이포이드(paratyphoid)라 불리며 위장염 및 패혈증을 특징으로 하고 주로 비육기에 많이 발생한다. 특히 이 질병의 일부 원인균은 식육을 통하여 사람의 식중독을 유발할 수 있기 때문에 공중보건학적으로도 중요한 질병이다. 많은 종류의 살모넬라가 원인균이 될 수 있으며 그 중에서도 돼지 콜레라균으로 잘 알려져 있는 균으로 살모넬라 콜레라수이스(Salmonella choleraesuis) 및 살모넬라 타이피수이스(Salmonella typhisuis)는 살모넬라에 의한 급성패혈증의 주된 원인균이다. 급성패혈증은 2-4개월령의 어린 돼지에서 흔히 발생하며, 주된 증상은 체온 상승(41-42℃), 원기소실과 식욕감퇴, 귀주위와 다리부위에 청색증(cyanosis)이 생기며, 발병 2-4일 이내에 대부분 폐사된다. 급성 장염형은 비육기 가축에 주로 발생되며 식욕이 일정하지 않고 심한 수양성 설사와 고열, 원기쇠약, 폐염 및 신경증상을 동반하여 중증의 경우 피부변색이 나타난다. 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 엔테리티디스 및 살모넬라 더비 등은 주로 만성장염을 일으키는 원인균이다. 만성 장염의 경우는 점차적으로 젤라틴 양의 점액성 설사로 변하고 설사변은 장점막상피세포의 괴사편을 함유하고 있으며 간혹 혈액이 섞여 있는 경우도 있다. 일반적으로 살모넬라 티피뮤리움에 의한 장염형은 전염 속도가 느리고 폐사율이 낮은 편이다. 반면에 살모넬라 콜레라수이스에 의한 패혈증형은 전염 속도는 비슷하나 전신 증상으로 급사하며 폐사율이 높다. 패혈증에 의한 전신성 감염을 일으키는 살모넬라 콜레라수이스 감염시 특히 돈콜레라와 임상 증상이 유사하고 동아시아 국가 중 대만의 경우 살모넬라 콜레라수이스에 의한 폐렴과 패혈증이 크게 문제가 되고 있는 것으로 보고되었다(이희수, 돼지 살모넬라병 방제대책, 국립수의과학검역원, 2003).

[0005] 살모넬라 감염증은 주로 여름철에 다발하는 것으로 알려져 있는데 이는 여름철에 살모넬라 원인체가 증식하기 수월한 점도 있지만 더위 스트레스에 의해서 돼지들의 항병력이 저하되는 현실에 기인한 것이다. 그러나 실제 국내 돼지에서 실제로 확인된 살모넬라 감염증의 연도별, 월별 발생 상황을 살펴 보면 계절에 상관없이 거의 매달 산발적으로 발생하고 있는 것을 확인할 수 있으며 2003년까지는 비육돈에서의 발생 빈도가 가장 많았지만, 2004년에 확인된 7건은 모두 이유자돈 구간에서 발생했다는 보고가 있다. 그리고 육성돈이나 비육돈에서의 발생 사례도 지속적으로 이야기 되고 있으며, 이유자돈에서의 발생 증가는 최근까지도 지속되고 있는 특징 중에 하나이다(이희주, 살모넬라감염증, 대한임상미생물학회지, 2001).

[0006] 살모넬라 감염증은 기본적으로 살모넬라균에 오염된 사료, 물 등에 의해서 경구감염 되기 때문에 이러한 전과경로에 대한 대비책이 필수적으로 요구된다. 오염된 원료사료나 물 또는 별 증상 없이 균을 보균하고 있는 성돈이 중요한 전염원이 될 수 있다. 즉 보균축이 여러 가지 스트레스 등이 원인이 되어 발병하게 되고 발병축의 분변을 통하여 Fecal-Oral route를 통하여 경구 감염된다. 균의 배설은 질병에서 회복된 후에도 약 3개월 동안 일어난다. 그러나 소수의 돼지는 영구적으로 균을 보균하며, 배설한다. 균은 거름 속에서 오래 생존하며, 분변 중에서는 20주까지 생존함이 보고 되었다. 그래서 축사의 오염은 이러한 혈청형에 의해서 유발되는 질병의 역학에 있어서 중요하다. 급성 감염기에 있는 돼지는 분변 g당 10^6 살모넬라 콜레라수이스 또는 10^7 살모넬라 티피뮤리움을 배출한다. 그러나 인공적 감염을 시도한 여러 실험에 의하여 성공적인 감염은 10^8 내지 10^{11} 의 살모넬라를 사용해야 가능했다. 10^3 살모넬라를 돼지에 접종한 실험에서 접종된 돼지는 병증을 보이지 않았지만 같이 사육되던 다른 돼지들은 살모넬라 특이적인 임상증상을 보였다. 이런 결과는 농장에서 자연 감염된 돼지에서 살모넬라 특이적인 임상증상을 보였다. 이런 결과는 농장에서 자연 감염된 돼지에서 살모넬라가 엄청난 양으로 불어나 다른 돼지들을 감염시킬 수 있음을 시사한다(이중복, 최근 빈발하는 돼지 살모넬라 및 증식성 회장염 대책, 대한양돈협회, 2009).

[0007] 양돈농가의 관심이 PMWS(Postweaning Multisystem Wasting syndrome: 이유후 전신성소모성증후군)에 집중되면서 폐사돈 부검시 폐렴 병변이 확인되면 일단 PMWS라고 짐작하고 실험실 진단을 의뢰하는 경우가 있는데 많은 경우에 PMWS가 아닌 다른 원인에 의한 병변으로 확인되고 그 중에 살모넬라 감염증도 포함된다. 현재 국내 양돈은 돼지 생식기 호흡기 증후군(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome:PRRS) PRRS나 돼지 썩코바이러스(Porcine circovirus: PCV2) 같은 심각한 바이러스 질병에 의하여 많은 경제적 피해를 보고 있어 이 질병들을 중심으로 질병관리가 되고 있다. 이로 인해 증식성 회장염이나 살모넬라증의 경우 지속적인 혈청학적 모니터링이나 원인체에 대한 연구들이 미진한 실정이다. 하지만 이런 세균성 질환은 사료첨가 항생제의 사용금지가 시작되면 바이러스 질병 못지 않게 피해를 가져올 수 있기 때문에 미연에 질병의 발생 현황 파악이나 질병관리가 시

작되어야 할 것이다(이중복, 최근빈발하는 돼지 살모넬라 및 증식성 회장염 대책, 건국대수의과대학전염병 실험실, 축산식품안전. 2010)(Robert W. Wills, Veterinary Microbiology, 1999).

[0008] 한편, 박테리오파지는 특정 세균에만 감염하여 세균의 성장을 통제하는 세균특이적 바이러스로 보통 파지라고 줄여서 부르기도 하며, 세균 숙주 없이는 자가 증식이 불가능하다. 박테리오파지는 단일 혹은 이중 사슬의 DNA 또는 RNA가 유전물질로써 핵산을 구성하고 있으며, 이 핵산을 단백질 외피가 싸고 있는 단순한 구조로 20면체의 머리에 꼬리가 있는 형태, 20면체 머리에 꼬리가 없는 형태, 그리고 필라멘트형의 3가지 기본형 구조로 나뉘고, 가장 흔한 형태인 20면체의 머리에 꼬리가 있는 형태의 박테리오파지는 꼬리 특성에 따라 수축성 꼬리를 가지는 마이오비리데(Myoviridae), 길고 수축성이 없는 꼬리의 시포비리데(Siphoviridae) 그리고 짧은 꼬리의 포도비리데(Podoviridae)로 세분화 될 수 있다. 20면체의 머리에 꼬리가 없는 박테리오파지는 머리의 형태, 머리의 구성 성분 및 외피의 유무에 따라 세분화된다. 마지막으로 필라멘트형태의 박테리오파지는 크기, 모양, 외피 및 필라멘트 구성 성분에 따라 분류된다(H.W.Ackermann., Arch. Virol., 146:843-857, 2001; Elizabeth Kutter et al. Bacteriophages biology and application; CRC press).

[0009] 세균을 감염시킬 때 박테리오파지는 세균의 표면에 달라붙어 자신의 유전물질을 세포 내로 주입한 후 용균성 (lytic) 또는 용원성(lysogenic)을 띠게 된다. 용균성인 경우 박테리오파지가 세포 기구들을 이용하여 자신의 구조물들을 만든 후 새로운 박테리오파지 입자들을 방출시킴으로써 세포를 파괴하거나 용해한다. 용원성인 경우 자신의 핵산을 세균 숙주세포의 염색체에 편입시켜 세균을 파괴하지 않고 세포와 함께 복제되지만 일정 조건이 되면 용균성으로 전환된다.

[0010] 박테리오파지의 발견 이후 이를 감염질환 치료제로 이용하기 위한 연구가 진행되었지만 광범위한 숙주범위 (broad target spectrum)를 갖는 항생제의 특성에 비해 숙주특이성(specific target spectrum)을 갖는 박테리오파지가 경쟁에서 밀려나 관심을 받지 못했다. 항생제 혹은 항균제는 세균 감염에 의한 감염성 질환의 치료에 널리 사용되고 있지만 항생제의 오남용으로 항생제 내성균의 문제가 심각해 지고, 식품내의 항생제 잔류에 의한 인체에 미칠 영향에 대한 우려가 더해지고 있다. 특히 동물의 성장촉진을 위해 사료에 첨가하는 항생제 (antimicrobial growth promoter, AGP)가 항생제 내성유발의 주요원인이 밝혀짐에 따라 AGP의 사용을 금지하는 정책들이 입안되어 유럽연합은 2006년부터 모든 AGP의 사용이 금지되었고 한국은 일부 AGP의 사용금지가 시행되고 있으며 2011년 7월 1일부터 축종에 관계없이 성장 촉진용 항생제를 사료에 첨가하는 것이 전면 금지되고 있다. 이러한 사료첨가 항생제의 금지는 공중보건 상으로 꼭 실시해야 하는 중요한 의미를 갖고 있으나 양돈 산업에 미칠 영향도 만만치 않다. 예를 들어, 양돈선진국 중 하나라 할 수 있는 덴마크의 경우 1990년대에 들어서면서 사료첨가 항생제를 비육돈, 이유자돈, 육성돈 순으로 점점 줄여나가 2000년도에 모든 첨가제제를 금지했다. 그 결과 1994년도에 200톤 이상 소비되던 항생제가 2004년에 80톤 수준으로 사용량이 현저하게 감소하였다. 그러나 사료첨가 제제의 금지 이후에 많은 세균성 질병이 심한 임상증상을 야기했다. 사료첨가 항생제의 사용금지 전에는 2~30% 수준의 소화기계 질병이 덴마크 양돈농장에서 관찰되었으며 돼지 회장염의 경우 역학 조사에서 거의 100% 감염률을 보였으나 뚜렷한 임상증상을 보이지 않아 심각한 질병으로 고려되지 않았었다. 하지만 사료첨가제제의 사용이 금지된 후 회장염에 의한 설사가 빈번하게 발생하였으며 이로 인한 일당증체량의 감소가 50g에 달했다. 2002년과 2003년의 덴마크 조사에 의하면 전체 치료용 항생제의 사용량 중 육성돈에서 82%, 비육돈에서 65%가 장관계 질병의 치료에 사용되는 것으로 발표되었다. 국내에서도 회장염의 경우 거의 모든 농장에서 양성의 항체를 관찰할 수 있으나 뚜렷한 증상이 나타나지 않는 경우가 흔하다. 하지만 현재 사용되고 있는 사료첨가 항생제를 제거할 경우 실험이나 실제 과거 다른 나라에서 발생했던 것과 같이 항생제에 의해 억제되던 살모넬라를 비롯한 세균성 질병의 발생 증가가 예상되므로, 구체적이고 실천 가능한 살모넬라 관리 가이드 라인의 확립이 절실하다(이중복, 최근빈발하는 돼지 살모넬라 및 증식성 회장염 대책, 건국대수의과대학전염병 실험실, 축산식품안전. 2010).

[0011] 이러한 흐름을 바탕으로 박테리오파지의 연구가 다시 관심을 모으고 있다. 박테리오파지를 이용하여 E.coli O157:H7 균을 통제하기 위한 박테리오파지 7개가 2002년도에 미국 특허등록(미국 등록특허 제6,485,902호) 되었으며, Nymox 사에서는 다양한 종의 미생물을 통제하는 박테리오파지 2종에 대하여 2005년도에 미국 특허등록(미국 등록특허 제6,942,858호)를 받았다. 박테리오파지에 관한 연구가 활발히 진행됨에 따라 산업계에서 또한 박테리오파지를 이용한 다양한 상품을 개발하고 있다. 유럽의 EBI food system 사는 박테리오파지를 이용하여 리스테리아균에 의한 식중독을 방지하는 식품첨가제 제품인 Listerix-P100을 개발하여 최초로 미국 FDA의 승인을 받았고 동일한 개념의 리스테리아균 통제 식품첨가형 박테리오파지 제품 LMP-102를 개발하여 GRAS(Generally regarded as safe)의 인증을 받았다. 또한 2007년에는 OmniLytics 사에서 도축과정 중에 E.coli O157이 소고기 제품으로 오염되는 것을 막기 위한 세척액으로 박테리오파지를 이용한 제품이 개발되어 USDA's Food Safety and

Inspection Service(FSIS)로부터 승인되었다. Clostridium sporogenes phage NCIMB 30008과 Clostridium tyrobutyricum phage NCIMB 30008는 각각 2003년과 2005년에 유럽에서 사료보존제로써 등록되어 사료 내 오염된 클로스트리디움(Clostridium)균의 통제를 목적으로 하는 제품으로 개발되었다. 이러한 연구는 박테리오파지는 항생제 치료가 어려운 세균의 통제나 축산물 등에 오염된 인수공통 전염균 등을 식품단계에서 통제할 수 있는 연구가 지속적으로 이루어지고 있음을 보여준다.

[0012] 하지만 대부분의 박테리오파지 연구가 대장균, 리스테리아균, 클로스트리디움균 통제하는데 주력하고 있다. 살모넬라균 또한 인수공통 전염균으로 이에 대한 피해가 줄어들지 않고 있으며, 앞서 언급하였듯이 살모넬라는 여러 약제에 대하여 내성을 갖기 쉽기 때문에 현재 한국에서는 전염병예방법 시행령(대통령령 16961호), 전염병 예방법 시행규칙(보건복지부령 제179호), 및 국립보건원 직제(대통령령 제17164호)에 의해 내성감시를 실시하고 있다. 따라서 살모넬라균을 통제할 수 있는 박테리오파지 개발이 필요하다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 항생제의 오남용으로 인한 항생제 내성균의 문제점 및 식품 내의 항생제의 잔류 문제 및 과거 항생제와 같이 광범위한 숙주범위의 문제점을 해결하기 위해, 가축의 주요질병을 일으키는 살모넬라균을 선택적으로 사멸시킬 수 있는 신규 박테리오파지를 자연계에서 분리하였다. 그리고, 이들의 형태적, 생화학적 및 유전적 특성을 확인한 결과, 상기 박테리오파지가 이들의 유익균에는 영향을 주지 않고 살모넬라 콜레라수이스(Salmonella choleraesuis, SC), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium, ST), 살모넬라 더비(Salmonella derby, SD), 살모넬라 인퍼티스(Salmonella infantis, SI) 및 살모넬라 뉴포트(Salmonella newport, SN) 모두를 사멸시킬 수 있을 뿐만 아니라, 내산성 및 내열성이 뛰어난 것을 확인하였다. 또한 상기 박테리오파지는 살모넬라 티피뮤리움에 의해 유발되는 가축 살모넬라증 및 가축 유래 살모넬라 식중독 예방 또는 치료 목적으로 이용할 수 있는 조성물 및, 살모넬라균의 증식을 효과적으로 예방할 수 있고 통제할 수 있는 다양한 제품 즉, 동물 사료 첨가제, 동물 음용수, 축사 소독제 및 육가공 세척제에도 적용이 가능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 하나의 목적은 살모넬라 콜레라수이스에 대하여 사멸능을 갖는 신규 박테리오파지를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인퍼티스 또는 살모넬라 뉴포트 감염성 질병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 가축용 사료 또는 음용수를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항생제를 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인퍼티스 또는 살모넬라 뉴포트에 특이적 사멸능을 갖는 신규 박테리오파지를 제공한다.

[0020] 본 발명자들은 양돈장의 분변과 하수로부터 시료를 채취하여 시료에서 숙주세포인 SC를 용균하는 박테리오파지를 분리하고, 이들이 ST, SD, SI 및 SN를 용균시킬 수 있음을 확인하였으며(도 2 및 표 1), 이들 박테리오파지(ΦCJ11)를 전자현미경을 통해 형태학적으로 관찰한 결과, 형태형(morphotype) B1, 시포비리데(Siphoviridae)에 속함을 확인하였다(도 1). 또한, ΦCJ11의 단백질 패턴을 분석한 결과, 박테리오파지의 주요 구조단백질로서 약

69.5kDa, 55kDa 및 33kDa의 단백질을 포함함을 알 수 있었고(도 3), Φ CJ11의 전체 게놈 크기를 분석한 결과, 약 97-145.5kbp의 크기를 나타냄을 확인하였다(도 4). 아울러, 이들의 유전적 특성을 분석한 결과, 서열번호 1 내지 4의 핵산 분자를 전체게놈의 일부로서 포함하는 것을 확인하였고(실시예 6), 상기 서열번호 1 내지 4를 바탕으로 타종간 유사성을 비교한 결과, 현재까지 알려진 박테리오파지와 다소 차이를 보여, 신규 박테리오파지임을 확인하였다(표 2). 상기 유전적 특성을 좀 더 구체적으로 분석한 결과, Φ CJ11에 특이적인 프라이머 세트(primer set), 구체적으로, 서열번호 5와 6, 서열번호 7과 8, 서열번호 9와 10 및 서열번호 11과 12의 프라이머 세트로 PCR을 진행하였을 때, 특정 크기의 PCR 산물인 각각 1.4kbp, 1.2kbp, 1.25kbp 및 1.5 산출물이 얻어지는 것을 확인하였다(도 5).

[0021] 한편, 상기 Φ CJ11을 SC, ST, SD, SI 및 SN에 감염시켰을 때, 용균반(phage plaque로 soft agar에서 하나의 박테리오파지에 의해 숙주세포가 용균되어 형성되는 clear zone)의 형성을 확인하였고(도 2), Φ CJ11을 다양한 pH 범위 및 온도에서 안정성을 조사한 결과, pH 3.5 내지 11.0(도 6) 및 37°C 내지 70°C 범위의 넓은 범위에서 안정하게 생존(도 7)할 뿐만 아니라, 건조 시에도 안정성을 유지할 수 있는 특성을 나타냄을 확인하였으며(도 8), 야생 분리주 SC, ST, SD, SI 및 SN 에도 감염이 되는 것을 확인할 수 있었다(표 3).

[0022] 끝으로, 상기 Φ CJ11을 New Zealand White계 특정병원균부재(SPF) 토끼에 피부자극성과 안점막 자극 시험을 실시한 결과 피부자극지수(P.I. I.)는 0.33으로 비자극성을 나타내었고, 안반응 관찰 결과, 급성 안점막 지수인 I.A.O.I.는 전 관찰기간 동안 세안균 및 미세안균 모두 0으로 비자극성으로 평가되었으며, Φ CJ11을 경구투여한 결과 에서 증체 변화가 없고(도 9), 사망 개체수, 일반 증상(표 4), 및 장기 이상(표 5)이 관찰되지 않아 독성이 없다는 것을 확인할 수 있었다.

[0023] 이에, 본 발명자는 양돈장의 분변과 하수로부터 시료를 채취하여, SC, ST, SD, SI 및 SN에 대한 특이적 사멸능을 갖고 상기와 같은 특징을 갖는 상기 박테리오파지를 "Bacteriophage Φ CJ11"로 명명하고, 2011년 9월 9일 한국미생물 보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, 서울시 서대문구 홍제1동 361-221)에 기탁번호 제KCCM11208P호로 기탁하였다.

[0024] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스 및 살모넬라 뉴포르트로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 살모넬라균으로 유발된 감염성 질병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 박테리오파지는 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스 및 살모넬라 뉴포르트를 특이적으로 사멸시킬 수 있는 항균 활성을 가지므로, 이들 균들에 의해 유발되는 질병을 예방하거나 치료하기 위한 목적으로 이용될 수 있다. 바람직하게, 살모넬라 콜레라수이스 또는 살모넬라 티피뮤리움에 의한 질병으로는 돼지에서의 살모넬라증 또는 살모넬라균 식중독, 및 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스, 살모넬라 뉴포르트에 의한 질병의 예는 돼지에게 급성 또는 만성 장염을 들 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 용어 "살모넬라증"은 살모넬라균 감염에 의해 발열두통, 설사, 구토 등을 수반하는 증상을 총칭한다. 즉, 살모넬라균 속의 세균에 의해 일어나는 질병을 총칭하며 살모넬라증은 장티푸스와 같은 증세를 나타내는 패혈증형과 식중독인 급성위장염형으로 대별되며, 장염, 식중독, 급성 균혈증 등이 포함된다.

[0027] 본 발명의 용어 "예방"이란 조성물의 투여로 질병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0028] 본 발명의 용어 "치료"란 조성물의 투여로 상기 질병의 증세가 호전되거나 상기 질병의 억제 또는 경감 및 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0029] 본 발명의 상기 조성물은 1×10^2 내지 1×10^{12} PFU/ml 의 Φ CJ11을 포함하며, 바람직하게는 1×10^6 내지 1×10^{10} PFU/ml 의 Φ CJ11을 포함한다.

[0030] 한편, 본 발명의 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학

적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 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.

[0032] 본 발명의 예방 또는 치료용 조성물은 질환 부위에의 도포 또는 분무하는 방법으로 이용할 수 있으며, 그 밖에 경구 투여 또는 비경구 투여를 통해 투여할 수도 있으며, 비경구 투여의 경우 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수도 있다.

[0033] 본 발명의 상기 조성물의 적합한 도포, 분무 및 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 대상이 되는 동물 및 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사나 수의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐 제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[0036] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항생제를 제공한다.

[0037] 본 발명의 용어 "항생제"는 약제 형태로 동물에게 제공되어 균을 사멸시킬 수 있는 제제를 의미하며, 방부제, 살균제 및 항균제를 총칭하는 것이다. 상기 동물은 인간을 포함한 포유동물이다. 본 발명의 박테리오파지는 기존 항생제에 비하여 살모넬라균에 대한 특이성이 매우 높으므로, 익균은 죽이지 않고, 특정 병원균만 사멸시킬 수 있고, 약물 내성 내지 저항성을 유도하지 않아, 기존의 항생물질에 비하여 제품수명(life cycling)이 긴 신규 항생제로서 이용될 수 있다.

[0038] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효 성분으로 포함하는 가축용 사료 또는 음용수를 제공한다.

[0039] 축산, 수산업에서 사용되는 사료 첨가용 항생제는 예방 목적으로 사용되고 있는데, 예방 목적의 항생제 투여는 내성균 발생 가능성을 높이고 가축에 잔류하는 항생제가 사람에게 전달될 수 있어서 문제이다. 항생제가 육류를 통해 인체에 흡수되면 항생제 내성을 유발해 질병의 확산을 부를 수도 있다. 또한, 사료에 섞여 먹이는 항생제의 종류가 많고 이는 다제 내성균 발생 확률이 높아지는 문제점이 있기 때문에 좀더 자연 친화적이면서도 기존의 항생제의 사용에서 발생한 문제를 해결할 새로운 사료첨가제용 항생물질로서 본 발명의 상기 박테리오파지를 이용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 가축용 사료는 박테리오파지를 사료첨가제 형태로 따로 제조하여 사료에 혼합시키거나, 사료 제조 시

직접 첨가시켜 제조할 수 있다. 본 발명의 사료 내 박테리오파지는 액상 또는 건조상태일 수 있으며, 바람직하게는 건조된 분말형태이다. 건조방법은 통풍건조, 자연건조, 분무건조 및 동결건조가 가능하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 박테리오파지는 분말형태로 사료 중량의 0.05 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 2중량%의 성분비로 혼합될 수 있다. 또한, 상기 가축용 사료는 본 발명의 박테리오파지 외에 사료의 보존성을 높일 수 있는 통상의 첨가제들을 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 사료첨가제에는 비병원성의 다른 미생물이 추가로 첨가될 수 있다. 첨가될 수 있는 미생물로는 단백질 분해 효소, 지질 분해효소 및 당 전환 효소를 생산할 수 있는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 고초균, 소의 위와 같은 혐기적 조건에서 생리적 활성 및 유기물 분해능이 있는 락토바실러스 균주 (*Lactobacillus sp.*), 가축의 체중을 증가시키며 우유의 산유량을 늘리고 사료의 소화 흡수율을 높이는 효과를 보여주는 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)와 같은 사상균(*J AnimalSci* 43: 910-926, 1976) 및 사카로미세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모(*J Anim Sci* 56:735-739, 1983)로 구성된 균으로부터 선택될 수 있다.

[0042] 본 발명에서의 Φ CJ11을 포함하는 사료에는 식물성으로는 곡물류, 근과류, 식품가공 부산물류, 조류, 섬유질유, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류, 곡물부산물류 등이 있으며, 동물성으로는 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질, 동물성플랑크톤류, 남은 음식물 등이 있으며 이에 한정된 것은 아니다.

[0043] 본 발명에서의 Φ CJ11을 포함하는 사료 첨가제에는 품질 저하를 방지하기 위하여 첨가하는 결착제, 유화제, 보존제 등이 있고, 효용 증대를 위하여 사료에 첨가하는 아미노산제, 비타민제, 효소제, 생균제, 향미제, 비단백태질소화합물, 규산염제, 완충제, 착색제, 추출제, 올리고당 등이 있으며, 그 외에도 사료 혼합제 등을 추가로 포함할 수 있으며 이에 한정된 것은 아니다.

[0044] 또한 음용수에 혼합하여 공급함으로써 지속적으로 장내 살모넬라균의 숫자를 감소시킬 수 있으며, 살모넬라 청정 가축 생산을 모색할 수 있다.

[0045] 상기 목적을 달성하기위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효 성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제를 제공한다.

[0046] 상기 목적을 달성하기위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 박테리오파지 또는 상기 조성물을 이용하여 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스 또는 살모넬라 뉴포트에 의한 감염성 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0047] 구체적으로, 상기 본 발명의 치료방법은 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스 또는 살모넬라 뉴포트에 의한 감염성 질환이 발병된 개체에 상기 박테리오파지 또는 상기 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0048] 본 발명의 상기 박테리오파지 또는 조성물은 약학적 제제의 형태로 동물에게 투여되거나, 가축의 사료 또는 음용수에 혼합하여 이를 섭취시키는 방법을 통해 투여될 수 있으며, 바람직하게는 사료첨가제의 형태로 사료에 혼합되어 투여될 수 있다.

[0049] 본 발명의 상기 박테리오파지 또는 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입 등을 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.

[0050] 상기 치료방법에 투여되는 본 발명의 상기 박테리오파지 또는 조성물의 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0051] 본 발명의 신규 박테리오파지는 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스 또는 살모넬라 뉴포트에 특이적 사멸능을 가지는 반면, 익균은 사멸시키지 않고, 내산성, 내열성 및 내건성이 우수하므로, 살모넬라 콜레라수이스, 살모넬라 티피뮤리움, 살모넬라 더비, 살모넬라 인펜티스 또는 살모넬라 뉴포트 감염성 질병인 살모넬라증 또는 살모넬라 식중독의 예방 또는 치료에 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 가축용 사료, 가축 음용수, 소독제 및 세척제 등에도 광범위하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 Φ CJ11의 전자 현미경 사진이다. 형태학상 정이십면체의 머리(isometric capsid)와 수축성이 없는 꼬리(long non-contractile tail)로 구성된 형태형(morphotype) B1 시포비리데(Siphoviridae)에 속한다.

도 2는 Φ CJ11의 살모넬라균에 대한 용균반 형성유무 사진이다. A,B;SC, C;SG, D;ST, E;SI, F,G;SD, H;SN. SC, ST, SI, SD 및 SN 에서는 용균반을 형성하지만, SG 에서는 용균반을 형성하지 않는 것을 확인하였다.

도 3은 분리된 박테리오파지 Φ CJ11의 SDS-PAGE 결과이다. 박테리오파지의 단백질 패턴을 나타낸 것으로 33kDa, 55kDa 및 69.5kDa의 주 단백질로 관찰되었다. 바이로라드(BIO-RAD)사의 Precision plus protein standards를 마커로 사용하였다.

도 4는 분리된 박테리오파지 Φ CJ11의 PFGE 결과이다. Φ CJ11의 전체 게놈의 크기는 약 140kbp 정도이다. 바이오라드(Bio-rad)사의 CHEF DNA size standard-Lambda ladder를 크기 마커로 사용하였다.

도 5는 Φ CJ11의 게놈 DNA의 각 프라이머 세트를 이용한 PCR 결과를 나타낸 것이다. A; 서열번호 5와 6 프라이머 세트, B; 서열번호 7과 8 프라이머 세트, C; 서열번호 9와 10 프라이머 세트, D; 서열번호 11과 12. A, B, C 및 D 라인 모두 1kbp 이상 2kbp 이하 정도의 PCR 산물을 가진다.

도 6은 박테리오파지 Φ CJ11의 내산성 실험 결과로서, pH 2.1, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.5, 6.4, 6.9, 7.4, 8.0, 9.0, 9.8 및 11.0에서의 생존 박테리오파지 수를 나타내었다. Control과 비교하여 pH 5.5 까지는 박테리오파지 Φ CJ11의 활성을 잃지 않았으나 pH 4와 pH 3.5에서 활성이 감소되어 pH 3.0 이하에서는 활성을 완전히 잃었다.

도 7은 박테리오파지 Φ CJ11의 내열성 실험 결과로서, 37, 45, 53, 60 및 70°C에서 0, 10, 30, 60 및 120 분마다 시간 별로 정지해 두었을 때 생존 박테리오파지 수를 나타낸다. 60°C에서 2시간까지 노출이 되어도 활성을 유지하는 것을 확인하였다.

도 8은 박테리오파지 Φ CJ11의 내건성 실험결과이다. SpeedVac concentrator를 이용하여 건조 처리한 결과로서, 건조 후 원래 타이터와 상대적인 안정성을 비교하였을 때 활성이 60°C에서 1시간까지 유지되는 것을 알 수 있었다.

도 9는 Sprague-Dawley 계통의 랫드를 대상으로 Φ CJ11을 단회 경구투여 하였을 때 나타나는 독성시험의 체중변화 결과이다. Φ CJ11의 투여 전, 투여 후 1, 3, 7, 10 및 14일의 체중을 관찰한 결과, 대조군에 비교하여 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(■;대조군 수컷, □; Φ CJ11 수컷, ●;대조군 암컷, ○; Φ CJ8 암컷).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1: 살모넬라균에 감염하는 박테리오파지의 분리

[0055] 실시예 1-1: 박테리오파지 스크리닝 및 단일 박테리오파지 분리

[0056] 돼지농장 및 근처 하수 종말 처리장 시료 50ml를 원심분리관으로 옮겨 4000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등

액을 0.45 μ m 필터를 이용하여 여과하였다. Salmonella choleraesuis("SC") 진탕 배양액(OD600=2) 150 μ l와 10X Luria-Bertani 배지(tryptone 10g/L, yeast extract 5g/L 및 NaCl 10g/L: LB 배지) 2ml에 시료 여과액 18ml을 섞어주었다. 이를 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양한 후, 배양액을 4000rpm에서 10분간 원심분리하고, 그 상등액을 0.2 μ m 필터를 이용하여 여과하였다. LB plate에 0.7% 한천(agar)(w/v) 3ml, SC 진탕 배양액(OD600=2) 150 μ l("top-agar")를 섞어 부어 굳힌 후, 그 위에 시료 배양 여과액 10 μ l를 떨어뜨려 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양하고, 배양된 탐아가에서 성장한 숙주세포가 박테리오파아지에 의하여 용균되는 현상을 관찰하는 소프트 아가 오버레이(soft agar overlay) 방법을 수행하였다.

[0057] 용균이 일어난 시료 배양 여과액을 적당히 희석하여 SC 진탕 배양액(OD600=2) 150 μ l를 섞은 후 소프트 아가 오버레이를 진행하여 단일 용균반을 획득하였다. 하나의 용균반은 하나의 박테리오파지로 구성된다고 보기 때문에, 단일 박테리오파지를 순수분리 하기 위해 하나의 용균반을 취해서 400 μ l SM 용액(NaCl, 5.8g/L, MgSO₄·7H₂O, 2g/L, 1M Tris-Cl(pH7.5) 50ml/L)에 넣고 4시간 동안 실온에 정치하여 단일 박테리오파지를 순수분리하였다. 분리된 박테리오파지를 대량확보하기 위해 단일 박테리오파지 용액의 상등액 100 μ l를 취한 후, 0.7% 한천 12ml, SC 진탕 배양액 500 μ l와 혼합하여, 150mm 지름의 LB 배지에서 소프트 아가 오버레이를 실시하였다. 완전히 용균이 일어난 플레이트에 15ml SM 용액을 분주한 후, 4시간 동안 실온에서 서서히 진탕시켜서 탐-아가 속의 박테리오파지를 유출시켰다. 박테리오파지가 유출된 SM 용액을 회수한 뒤 최종부피의 1%가 되도록 클로로포름(chloroform)을 첨가해서 10분간 잘 섞어준 후, 4000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 여기서 얻어진 상등액을 0.45 μ m 필터로 여과하여 냉장 보관하였다.

[0058] **실시예 1-2: 박테리오파지의 대량배양**

[0059] 선별된 박테리오파지를 SC를 이용하여 대량배양을 실시하였다. SC를 진탕 배양하여 1.5 X 10¹⁰ cfu(colony forming unit)가 되도록 분주하여 4000rpm에서 10분간 원심분리한 후 이를 4ml SM 용액에 재부유시켰다. 여기에 박테리오파지를 9.0 X 10⁸ PFU(plaque forming unit)로 접종하여 M.O.I.(multiplicity of infection)=0.001로 만든 후 37 $^{\circ}$ C에서 20 분간 정치하였다. 이를 150ml LB 배지가 들어있는 플라스크에 접종한 후 5시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 최종 부피의 1%가 되도록 클로로포름을 첨가하고 20 분간 흔들어 주었다. DNase I과 RNase A를 각각 최종농도 1 μ g/ml 되도록 첨가하고 30 분간 37 $^{\circ}$ C에 정치시켰다. 최종 농도가 각각 1M과 10%(w/v)이 되도록 NaCl과 PEG(polyethylene glycol)를 넣어 준 뒤 4 $^{\circ}$ C에서 3시간 추가 정치시켰다. 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm에서 20 분간 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 5ml SM용액으로 침전물을 재부유시킨 후 20 분간 실온에 정치시켰다. 여기에 4ml 클로로포름(Chloroform)을 첨가한 후 잘 섞어주고 4 $^{\circ}$ C, 4000rpm에서 20 분간 원심분리하였다. 상등액을 0.2 μ m 필터로 여과하여 글리세롤 밀도 구배법(밀도: 40%, 5% 글리세롤)을 이용한 초원심분리(35,000rpm, 1시간, 4 $^{\circ}$ C)를 통하여 박테리오파지를 정제하였고, 이를 "Bacteriophage Φ CJ11"로 명명하였다. 정제한 Bacteriophage Φ CJ11은 300 μ l의 SM 용액으로 재부유 한 후 타이터를 측정하였다. 상기 Φ CJ11은 2011년 9월 9일 한국미생물 보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, 서울시 서대문구 홍제1동 361-221)에 기탁 번호 제KCCM11208P호로 기탁하였다.

[0060] **실시예 2: Φ CJ11의 살모넬라균 감염 여부 조사**

[0061] 선별된 박테리오파지가 SC 외에 다른 종의 살모넬라균에 대하여 용균 활성을 갖는지 확인하기 위해 다른 종의 살모넬라균에 교차감염을 시도하였다. 그 결과 Φ CJ11는 SC(Salmonella choleraesuis), ST(Salmonella typhimurium), SD(Salmonella derby), SN(Salmonella Newport), SI(Salmonella infantis), SA(Salmonella arizonae) 및 SB(Salmonella bongori)에는 감염하고 SE(Salmonella enteritidis), SG(Salmonella gallinarum), 및 SP(Salmonella pullorum)에 감염시키지 않았다(표 1 및 도 2).

[0062]

ΦCJ11의 살모넬라균 감염여부

혈청형	균주명	용균반형성유무	혈청형	균주명	용균반형성유무
SC	ATCC 10708	0	SA	ATCC 12398	0
SN	SL 317	0	SB	ATCC 12397	0
SD	ATCC 2468	0	ST	13	0
SE	SGSC 2282	X	SI	SARB 26	0
SG	SGSC 2293	X	SP	SGSC 2295	X

[0063]

* ATCC : American Type Culture Collection

[0064]

* SGSC : Salmonella Genetic Stock Center

[0065]

아울러, 도 2는 ΦCJ11의 살모넬라균에 대한 용균반 형성유무 사진이다. 상기 도 2에서 보듯이, A,B;SC, C;SG, D;ST, E;SI, F,G;SD, H;SN. SC, ST, SI, SD 및 SN 에서는 용균반을 형성하지만, SG 에서는 용균반을 형성하지 않음을 알 수 있었다.

[0066]

실시예 3: ΦCJ11의 형태관찰

[0067]

정제된 ΦCJ11를 SM버퍼 용액에 희석한 후, 이를 copper grid에 끼워 2% 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)에서 3 내지 5 초간 염색하고 건조한 후, 투과전자현미경(LIBRA 120, Carl Zeiss transmission electron Microscope, 80kV, 배율 X 120,000 ~ X 200,000)으로 검경하였다(도 1). 도 1은 ΦCJ11의 전자 현미경 사진이다. 도 1에서 보듯이, 분리된 ΦCJ11의 형태는 형태학상 정이십면체의 머리(isometric capsid)와 수축성이 없는 꼬리(long non-contractile tail)로 구성된 형태형(morphotype) B1 시포비리데(Siphoviridae)에 속함을 알 수 있었다.

[0068]

실시예 4: ΦCJ11의 단백질 패턴 분석

[0069]

10¹¹ PFU/ml 타이터(titer)의 정제된 ΦCJ11 용액 15μl와 5X SDS 시료 용액 3μl를 섞은 후 5분간 가열하고, 12% SDS-PAGE를 수행한 다음, 쿠마시블루(coomassie blue) 염색 용액을 이용하여 젤을 1시간 동안 상온에서 염색하였다(도 3). 도 3은 분리된 박테리오파지 ΦCJ11의 SDS-PAGE 결과이고, 이때, 마커로는 바이로라드(BIO-RAD)사의 Precision plus protein standards를 사용하였다. 도 3에서 보듯이, 상기 박테리오파지의 단백질 패턴은 33kDa, 55kDa 및 69.5kDa의 주 단백질이 존재함을 확인할 수 있었다.

[0070]

실시예 5: ΦCJ11의 전체 게놈 DNA 크기 분석

[0071]

초원심분리를 통해 정제된 ΦCJ11의 게놈 DNA를 추출하였다. 구체적으로 정제된 ΦCJ11 배양액에 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid(pH8.0)), 프로테아제 케이(proteinase K), 및 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 각각 최종 농도가 20mM, 50μg/ml, 및 0.5%(w/v) 되도록 첨가한 후 50℃에서 1시간 동안 정치하였다. 동일 양의 페놀(phenol(pH8.0))을 첨가한 후 잘 섞어준 다음, 실온에서 12000rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상등액을 수득해서 동일 양의 PC(phenol:chloroform=1:1)를 첨가하고 잘 섞어준 후 실온에서 12000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 그 후, 상등액을 수득해서 동량의 클로로포름을 잘 섞어준 후 실온에서 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 수득한 후 3M 초산나트륨(sodium acetate)을 전체 부피의 1/10로 섞고 2배 양의 차가운 95% 에탄올(ethanol)을 첨가한 후 -20℃에서 1시간 정치시켰다. 그 후, 0℃에서 10분간 12,000rpm으로 원심분리 후 상등액을 완전히 제거한 후 바닥의 DNA를 50μl TE(Tris-EDTA, pH 8.0) 용액에 녹였

다. 추출한 DNA를 10배 희석하여 OD260에서 흡광도를 측정해 농도를 측정하였다. 1 μ g 전체 게놈 DNA를 1% PFGE(pulse-field gel electrophoresis) 아가로즈 젤에 로딩한 후 BIORAD CHEF DR II PFGE system에서 switch time ramp 50-90 seconds, 6 V/cm(200V) 조건을 이용하여 14 $^{\circ}$ C에서 22시간 동안 전개하였다. 크기를 확인하기 위한 마커로는 CHEF DNA Size standard로 BIO-RAD사의 Lambda ladder를 사용하였다(도 4). 도 4는 분리된 박테리오파지 Φ CJ11의 PFGE 결과이다. 도 4에서 보듯이, 48.5 내지 1,000kbp 사이에 존재하는 약 140kbp의 DNA를 확인할 수 있었다.

[0072]

[0073] **실시예 6: Φ CJ11의 유전적 특성 분석**

[0074]

분리한 Φ CJ11의 유전자적 특성을 알아보기 위해서 Φ CJ11의 게놈 DNA 5 μ g을 Pst I, Xba I과 BamH I, EcoR I과 Sal I 제한효소로 동시에 처리하였다. 벡터로는 pCL1920(Promega 사)를 Pst I, Xba I과 BamH I, EcoR I과 Sal I 제한효소로 자른 후 CIP(calf intestinal alkaline phosphatase) 처리한 것을 사용하였다. 절편된 게놈 DNA와 벡터의 양이 3:1이 되도록 반응조건을 맞추어 섞은 후, 16 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 라이게이션(ligation)을 진행하였다. 이를 대장균의 한 종인 DH5 α 세포에 도입시켰다. 이렇게 형질전환 된 전환체를 각각 스펙티노마이신(spectinomycin)이 처리된 LB 플레이트 배지에 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)을 깔아 청백 콜로니 선별법으로 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니를 각각의 항생제가 포함된 배양배지에서 16시간 동안 진탕 배양하였다. 여기서 플라스미드 정제키트(Promega 사)를 이용하여 플라스미드를 추출하였다.

[0075]

상기 플라스미드들을 FTR135와 FTR136(서열번호 13과 14) 프라이머 세트를 이용하여 PCR로 클로닝 여부를 확인하였으며, 삽입조각 크기가 1kbp 이상 되는 것을 골라 상기 프라이머 세트를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 이렇게 수득한 유전자 염기서열을 서열번호 1 내지 4에 나타내었고, 각각은 1 내지 2kbp 이하의 크기였다. 이를 NCBI blastx와 blastn 프로그램을 이용하여 해독염기서열의 유사성을 분석한 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0076]

Φ CJ11의 염기서열과 다른 박테리오파지의 해독염기 서열 상동성 비교

	Organism	Protein	Blastx			
			Query	Subject	Identity	e-value
1	Enterobacteria phage T5	hypothetical protein	436-627	1-64	63/64 (98%)	7e-32
	Enterobacteria phage SPC35	hypothetical protein	10-423	1-139	127/139 (91%)	3e-31
	Enterobacteria phage SPC35	hypothetical protein	3-863	30-315	264/291 (91%)	2e-116
	Enterobacteria phage T5	hypothetical protein	3-863	30-315	255/291 (88%)	1e-113
	Enterobacteria phage EPS7	hypothetical protein	3-761	29-281	235/253 (93%)	7e-107
	Klebsiella phage KP15	hypothetical protein	9-761	22-276	217/255 (85%)	4e-100
	Enterobacteria phage RB43	putative SPFH domain-containing protein	9-839	18-257	223/281 (79%)	7e-99
	Enterobacteria phage RB16	hypothetical protein	9-761	18-272	219/255 (86%)	2e-98

2	Enterobacteria phage EPS7	hypothetical protein	412-77 1	1-120	109/120 (91%)	7e-57
	Enterobacteria phage T5	hypothetical protein	490-77 1	1-94	94/94 (100%)	3e-46
	Enterobacteria phage T5	D11 protein	532-2	1-177	175/177 (99%)	5e-96
	Enterobacteria phage SPC35	D11 protein	532-2	1-177	174/177 (98%)	2e-95
	Enterobacteria phage EPS7	D11 protein	532-8	1-175	163/175 (93%)	4e-90
	Enterobacteria phage EPS7	hypothetical protein	872-52 8	5-120	96/116 (83%)	2e-46
3	Enterobacteria phage SPC35	tail protein Pb4	777-4	1-258	221/258(8 6%)	4e-128
	Enterobacteria phage T5	tail protein Pb4	777-4	1-258	197/258(7 6%)	6e-115
	Enterobacteria phage SPC35	tail protein Pb3	1322-7 80	769-949	178/181(9 8%)	2e-96
	Enterobacteria phage EPS7	tail protein Pb3	1322-7 80	769-949	160/181(8 8%)	9e-88
	Enterobacteria phage T5	structural tail protein Pb3	1322-7 80	769-949	156/181(8 6%)	8e-84
	Enterobacteria phage EPS7	tail protein Pb4	423-4	1-140	112/140(8 0%)	2e-62
4	Enterobacteria phage SPC35	flap endonuclease	980-56 4	153-291	138/139(9 9%)	1e-73
	Enterobacteria phage T5	flap endonuclease	980-56 4	153-291	138/139(9 9%)	1e-73
	Enterobacteria phage EPS7	flap endonuclease	980-56 4	153-291	135/139(9 7%)	4e-72
	Enterobacteria phage SPC35	putative deoxyUTP pyrophosphatase	564-15 7	1-136	130/136 (96%)	3e-70
	Enterobacteria phage T5	putative deoxyUTP pyrophosphatase	564-16 0	1-135	130/135(9 6%)	2e-69
	Enterobacteria phage EPS7	putative deoxyUTP pyrophosphatase	564-15 7	1-136	128/136(9 4%)	2e-67

[0077] **실시예 7: Φ CJ11 특이적 프라이머 염기서열 제작**

[0078] Φ CJ11을 동정하기 위하여 Φ CJ11 특이적인 프라이머를 서열번호 1 내지 4를 바탕으로 제작하였다. 서열번호 5와 6, 서열번호 7과 8, 서열번호 9과 10 및 서열번호 11와 12를 각각 프라이머 세트로 하여 PCR을 진행하였다. 0.1 μ g의 박테리오파지 전체 게놈 DNA와 0.5 pmole이 되도록 프라이머를 pre-mix(Bioneer 사)에 첨가하고 최종부피가 20 μ l이 되도록 맞추었다. 이를 denaturation; 94 $^{\circ}$ C 30 초, annealing; 55 $^{\circ}$ C 30 초, polymerization; 72 $^{\circ}$ C 1 분 30 초의 조건으로 30 cycles PCR을 진행하였다(도 5). 도 5는 Φ CJ11의 게놈 DNA의 각 프라이머 세트를 이용한 PCR 결과를 나타낸 것이다. A; 서열번호 5와 6번 프라이머 세트, B; 서열번호 7과 8번 프라이머 세트, C; 서열번호 9와 10 프라이머 세트, D; 서열번호 11과 12. A, B, C 및 D 레인 모두 1 내지 2kbp 정도의 PCR 산물을 가진다. 도 5에서 보듯이, 서열번호 5와 6, 서열번호 7과 8, 서열번호 9과 10 및 서열번호 11과 12 프라이머 세트에 이용했을 경우 전부 약 1kbp 이상 2kbp 이하 정도의 PCR 산물을 획득하였다.

[0079] **실시예 8: 박테리오파지의 pH에 따른 안정성 조사**

[0080] Φ CJ11이 폐지 위장 내 낮은 pH에서 안정성을 보유할 수 있는지 확인하기 위하여 다양한 pH 범위(pH 2.1, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.5, 6.4, 6.9, 7.4, 8.2, 9.0, 9.8 및 11.0)에서 안정성 조사 실험을 하였다. 다양한 pH 용액

(소듐아세테이트 용액(Sodium acetate buffer(pH 2.1, pH 4.0, pH 5.5, 및 pH 6.4)), 소듐시트레이트 용액(Sodium citrate buffer(pH 2.5, pH 3.0 및 pH 3.5)), 소듐포스페이트 용액(Sodium phosphate buffer(pH 6.9 및 pH 7.4)), 트리스 용액(Tris-HCl(pH 8.2, pH 9.0, pH 9.8 및 pH 11.0))을 각각 0.2M로 제작하였다. pH 용액 180 μ l와 1.0 X 10¹¹ PFU/ml 타이터의 박테리오파지 용액 20 μ l를 섞어 각 pH 용액의 농도가 1M이 되게 한 후, 2시간 동안 상온에서 정치하였다. 이들을 단계 희석하고, 소프트 아가 오버레이(soft agar overlay) 방법을 이용하여 각 단계의 희석액을 10 μ l씩 떨어뜨린 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양하여 용균 여부를 통해 타이터를 측정하였다(도 6). 도 6은 박테리오파지 Φ CJ11의 내산성 실험 결과로서, pH 2.1, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.5, 6.4, 6.9, 7.4, 8.0, 9.0, 9.8 및 11.0에서의 생존 박테리오파지 수를 나타내었다. Control과 비교하여 pH 5.5까지는 박테리오파지 Φ CJ11의 활성을 잃지 않았으나 pH 4와 pH 3.5에서 활성이 감소되어 pH 3.0 이하에서는 활성을 완전히 잃었다. 도 6에서 보듯이, pH 5.5까지는 활성을 잃지 않고 매우 안정적인 반면, pH 3.0 이하의 pH에서는 활성이 소실됨을 확인할 수 있었다.

[0081] **실시예 9: 박테리오파지의 온도에 따른 안정성 조사**

[0082] 박테리오파지의 제품 제형 중 사료 첨가제로 이용할 경우 박테리오파지의 제형 과정에서 발생하는 열에 대한 안정성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 1.0 X 10¹¹ PFU/ml 농도의 Φ CJ11의 용액 200 μ l를 37 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 53 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C 및 70 $^{\circ}$ C의 온도 조건 하에서 각각 0 분, 10분, 30 분, 60 분 및 120 분 동안 정치시켰다. 처리한 실험 배양액을 단계 희석하여, 소프트 아가 오버레이 방법으로 각 단계의 희석액 10 μ l씩 떨어뜨린 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양하여 용균 여부를 통해 타이터를 측정하였다(도 7). 도 7은 박테리오파지 Φ CJ11의 내열성 실험 결과로서, 37, 45, 53, 60 및 70 $^{\circ}$ C에서 0, 10, 30, 60 및 120 분마다시간 별로 정치해 두었을 때 생존 박테리오파지 수를 나타낸다. 도 7에서 보듯이, 60 $^{\circ}$ C에서 2시간까지 노출이 되어도 활성을 유지하는 것을 확인하였다.

[0083] **실시예 10: 박테리오파지의 건조에 대한 안정성 조사**

[0084] 박테리오파지의 제품 제형 중 사료 첨가제로 이용할 경우 박테리오파지의 제형 과정에서 발생하는 건조 조건에 대한 Φ CJ11의 안정성을 확인하였다. 내열성 확인 실험을 통해 도출한 결과를 바탕으로, SpeedVac concentrator를 이용하여 건조 실험을 진행하였다. 1.0 X 10¹¹ PFU/ml 타이터의 Φ CJ11의 용액 200 μ l를 2시간 동안 60 $^{\circ}$ C에서 진공으로 건조하여 펠릿(pellet)을 SM 용액 200 μ l를 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 완전히 재부유시킨 후 타이터를 측정하였다(도 8). 도 8은 박테리오파지 Φ CJ11의 내건성 실험결과이다. SpeedVac concentrator를 이용하여 건조 처리한 결과이다. 도 8에서 보듯이, 건조 후 원래 타이터와 상대적인 안정성을 비교하였을 때 활성이 60 $^{\circ}$ C에서 1시간까지 유지됨을 알 수 있었다.

[0085] **실시예 11: 박테리오파지의 감염범위 조사**

[0086] Φ CJ11이 실험에 사용된 SC(ATCC SC10708) 이외에 서울대학교 수의과대학 조류질병학실 야생분리주 2주, Salmonella choleraesuis 5주, Salmonella Typhimurium 17주, Salmonella infantis 4주, Salmonella Newport 6주, Salmonella Derby 2주 및 Salmonella Dublin 3주 에 대하여 용균 활성이 있는지 여부를 확인하였다. 각 균주의 진탕 배양액(OD600=2) 150 μ l를 섞어 소프트 아가 오버레이 방법을 진행하여 10¹⁰ PFU/ml 타이터의 Φ CJ11의 용액 10 μ l씩 떨어뜨린 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양하여 용균반 형성 유무를 관찰하였다(표 3). SC 8주에 대하여 용균반 형성을 확인할 수 있었다.

[0087]

ΦCJ11이 감염하는 야생분리주 SC, ST, SD, SI, SN

혈청형	균주명		용균반형성	혈청형	균주명		용균반형성	
SC	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2929	○	SI	<i>S. infantis</i>	SARB 26	○	
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2930	○		<i>S. infantis</i>	SARB 27	○	
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2932	○		<i>S. infantis</i>	S1326/28	○	
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2933	○		<i>S. infantis</i>	B09-106	○	
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2425	○	SN	<i>S. newport</i>	SARB 36	○	
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 10708	○		<i>S. newport</i>	SARB 37	○	
	<i>S. choleraesuis</i>	SNU#1	○		<i>S. newport</i>	SARB 38	○	
	<i>S. choleraesuis</i>	SNU#2	○		<i>S. newport</i>	7257	○	
ST	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST1	○	SD	<i>S. newport</i>	SL 317	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST2	○		<i>S. newport</i>	SL 254	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST4	○		SD	<i>S. derby</i>	ATCC 2466	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST7	○			<i>S. derby</i>	ATCC 2468	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST8	○	SD	<i>S. dublin</i>	SA 4405	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST11	○		<i>S. dublin</i>	RKS 4699	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST12	○	SA	<i>S. dublin</i>	88/6	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST13	○		<i>S. arizonae</i>	ATCC 12398	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST14	○	SB	<i>S. bongori</i>	ATCC 12397	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST17	○		SH	<i>S. heidelberg</i>	SARA 33	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST18	○	<i>S. heidelberg</i>		SARA 23	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST19	○	SM	<i>S. maimi</i>	SARB 28	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST20	○		<i>S. maimi</i>	SARB 29	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST26	○	SP	<i>S. panama</i>	SARB 39	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST38	○		<i>S. panama</i>	SARB 40	○	
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST41	○		<i>S. panama</i>	SARB 41	○	
<i>S. typhimurium</i>	SNU ST42	○	<i>S. panama</i>		7261	○		

[0088]

* SGSC : Salmonella genetic stock center

[0089]

* ATCC : American Type Culture Collection

[0090]

* SNU : 서울대학교 수의과대학 조류질병학실

[0091]

실시예 12: 박테리오파지의 독성 평가

[0092]

살모넬라증 및 살모넬라 식중독 예방용 박테리오파아지로서 ΦCJ11에 대한 독성시험에 많이 사용되고 있으며 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어서 실험결과의 해석이 용이한 New Zealand White계 특정병원균부재(SPF) 토끼에서의 피부자극시험과 안점막 시험을 진행하였다. 토끼의 배부 피부에 정상피부(비찰과피부) 및 찰과피부에 시험물질을 2.5 cm x 2.5 cm의 시험물질을 적용한 거어즈를 덮어 피부와 접촉시키고, 0.5ml/site씩 적용하였고, 일반증상에서 이상변화가 관찰되지 않았으며, 시험물질 적용 후 1일째 경미한 체중 감소가 있었으나 시험물질 폐쇄적용에 따른 스트레스로 판단되었다. 피부반응 평가에서 피부자극지수(P.I.I.)는 0.33으로 비자극성에 해당되었다. 안점막 자극성을 조사하기 위해 토끼의 왼쪽 안구에 적용한 후 시험물질을 적용하지 않은 오른쪽 안구와 비교 평가하였다. 시험결과 전 시험기간 동안 시험물질 적용과 관련한 일반증상 및 체중의 이상변화는 관찰되지 않았으며, 시험물질 적용 후 안반응 관찰 결과, 급성안자극지수 I.A.O.I(The Index of Acute Ocular Irritation)는 "0"으로 비자극성으로 평가되었다. 따라서 신규 분리된 박테리오파아지 ΦCJ11는 독성이 없음을 확인할 수 있었다.

[0093]

또한, ΦCJ11을 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위

하여 시험을 수행하였다. ΦCJ11을 1 x 10¹¹PFU/kg으로 투여하는 시험물질투여군과 부형제인 Vehicle[20mM Tris-HCl(pH 7.0) + 2mM MgCl₂]만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였고, 각 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 경구투여한 후, 2 주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하여 서로 비교하였다. 투여 당일에는 투여 후 30분에 관찰을 시작하여 1시간까지 지속적으로, 이후 6시간까지는 매 시간마다 관찰하며, 14일 간은 1일 1회 일반증상을 관찰하여 기록하였다(표 4 및 표 5).

표 4

[0094]

ΦCJ11의 경구투여독성 시험에 따른 사망 개체수 및 일반 증상 관찰 결과

성별	Dose (pfu)	처리이후 경과일														사망개체수
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
남성	대조군	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ¹¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
여성	대조군	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ¹¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

표 5

[0095]

ΦCJ11의 경구투여독성 시험 후 부검하여 장기 이상 관찰 결과

성별	Dose (PFU)	gross finding	Frequency ^A
남성	대조군	No gross finding	5/5
	10 ¹¹	No gross finding	5/5
여성	대조군	No gross finding	5/5
	10 ¹¹	No gross finding	5/5

[0096]

^A Number of animals with the sign/Number of animals examined.

[0097]

상기 표 4 및 표 5에서 보듯이, 사망개체는 발생하지 않았고, ΦCJ11에 의한 독성 증상과 특이할 만한 임상증상도 나타나지 않았으며, 그 결과는 표 4와 표 5에 나타내었다. 체중은 투여 전, 투여 후 1, 3, 7, 10 및 14일에 체중을 측정하여 기록하였고 그 결과 대조군에 비교하여 유의성 있는 체중 변화의 차이는 관찰되지 않았다.

[0098]

한편, 체중 변화 관찰 결과 ΦCJ11가 식욕을 감소시키거나 체중을 변화시키는 독성반응을 유발하지 않은 것을 알 수 있었고 이는 도 9에 나타내었다. 도 9는 Sprague-Dawley 계통의 랫드를 대상으로 ΦCJ11을 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성시험의 체중변화 결과이다. 도 9에서 보듯이, ΦCJ11의 투여 전, 투여 후 1, 3, 7, 10 및 14일의 체중을 관찰한 결과, 대조군에 비교하여 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(■;대조군 수컷, □;ΦCJ11 수컷, ●;대조군 암컷, ○; ΦCJ8 암컷).

[0099]

따라서 신규 분리된 박테리오파지 ΦCJ11의 개략의 치사량(ADL)은 암수 모두 1 X 10¹¹PFU/kg을 상회하는 것으로 판단하고 독성이 없음을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0100]

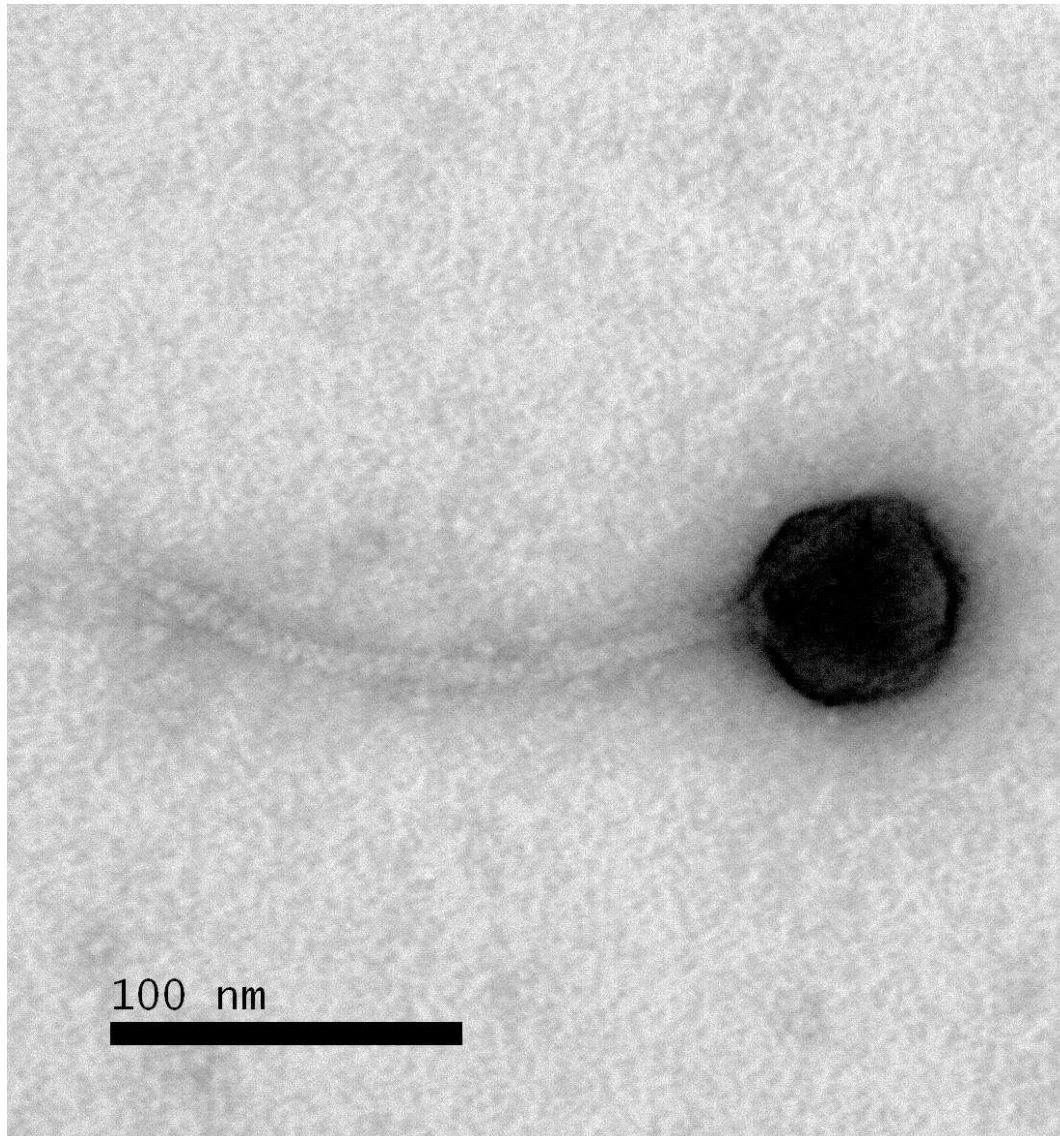
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11208P

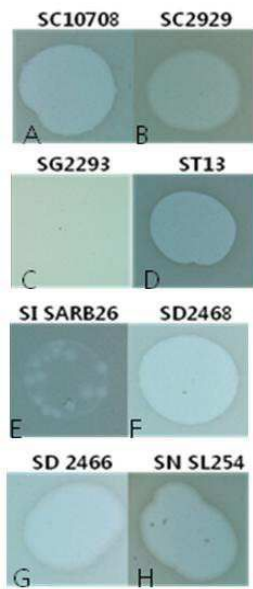
수탁일자 : 20110909

도면

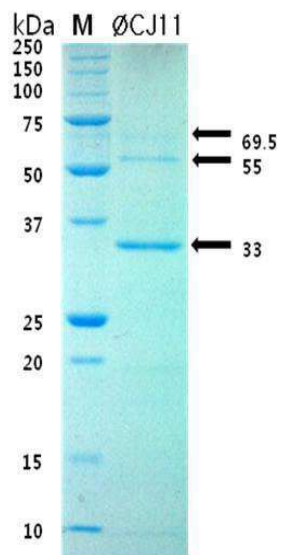
도면1



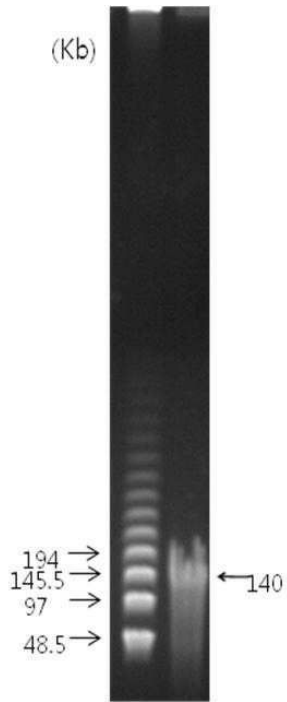
도면2



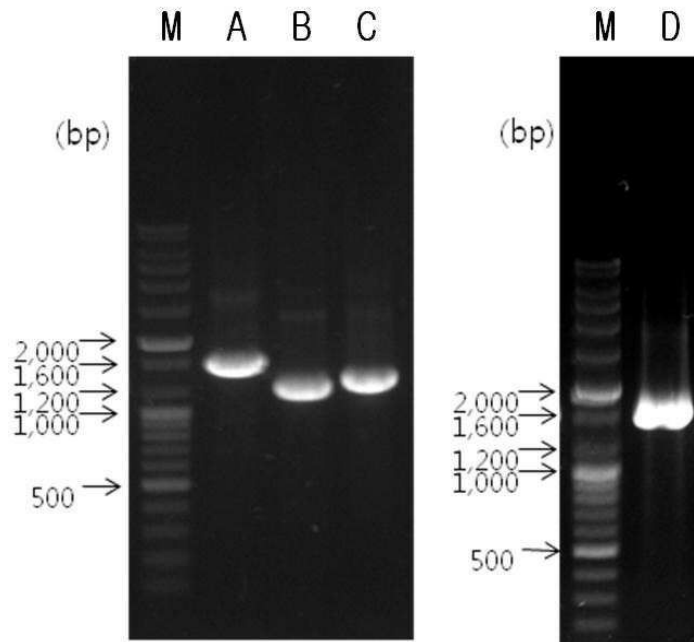
도면3



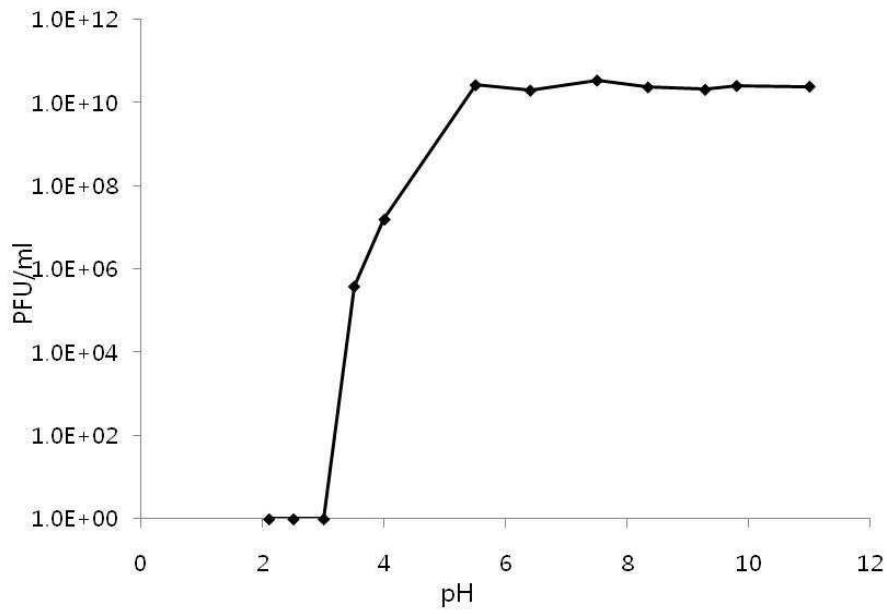
도면4



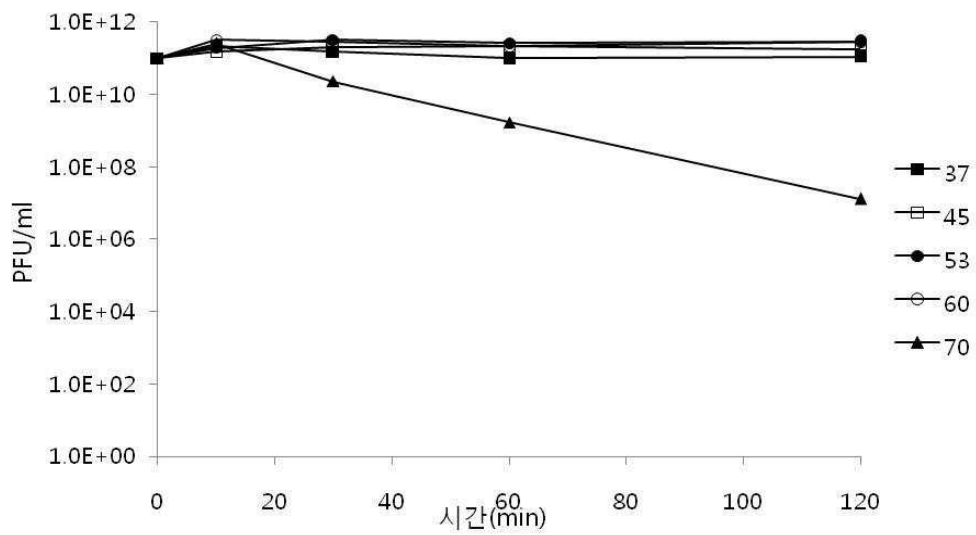
도면5



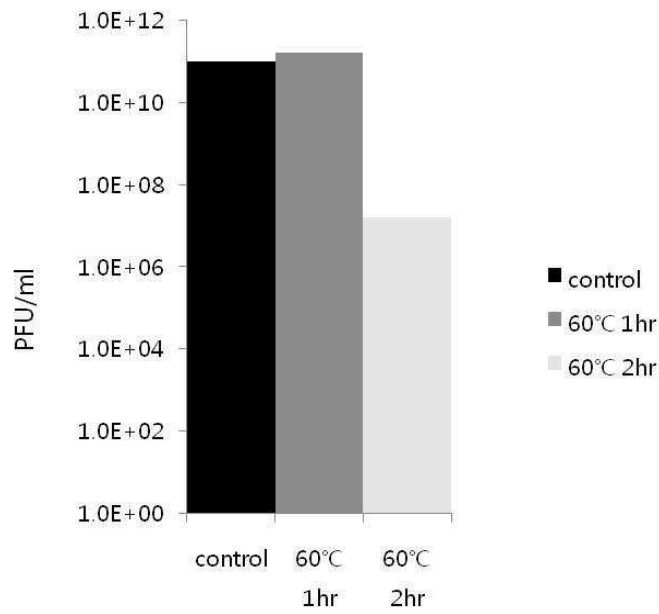
도면6



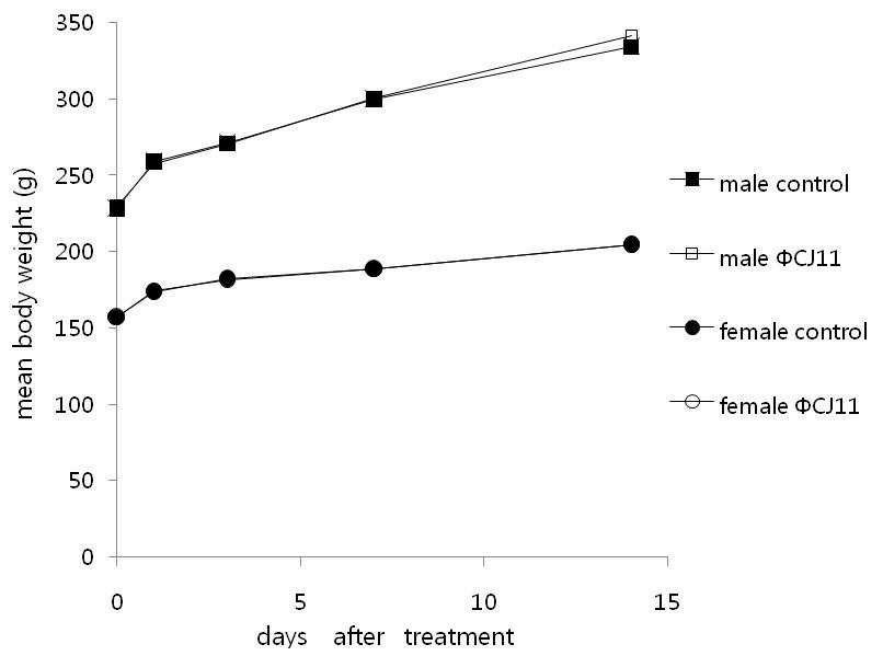
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> CJ CheilJedang Corporation
- <120> Novel bacteriophage and antibacterial composition comprising the same
- <130> PA110691/KR
- <160> 14
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 1643

<212> DNA

<213> bacteriophage CJ11

<400> 1

taaactgccg gcttaaatatt aaggggagga gccattatg agtaaatatg gttttgtaaa	60
taacggactt aatcaaagta tgggctccca gcagcccatg cgggtctgg ataacccta	120
cttacaacag ttgcaacagc gtttagcaga agcgcaacag atgcagcaac aactccagca	180
aaatcctgga agtgtagtc ctatgcaaat gatgcagcaa atgaatgggc agtcgcaaat	240
gccccaaaca atgcagcaac agatgccgca gcagcaagtt cagcaacaaa cccaacaacc	300
gcaggtttct gcggaaggac aggcagtact agcccttttc gaagacttcg caaagacaga	360
ggatgggaag cagcttgat cacttatggg taagttaaat agcttctgcc aaagccaagt	420
tgcaaaagct caaatggtg gtaataactc ctaaggagga attatgtgtt gcagaaaatc	480
tgtttctgtc tgcccaatgc ctgtagcacg ttgttctctc tcagcaatgt ttacacaaat	540
accggcgttc aatccgtttg cctttaagcc tactcttate ctgcccccta gagtagattt	600
tcagtcaagg ttggcctccc gtatgggtgg ttgctgtaat aagagtatat gtttctaaag	660
aaccaaaca taaagccctt agtcgaaaga cttaggggct tttcttttat cttaataca	720
gaaaagccct gcgctctcca gggaacgcag ggcttacttc agatgttacg tgcggatatt	780
atattatagc catatccatg atcatttggc catcatagcc agtgccaacc acagtctgcg	840
gtacaccacc tttggtatit ctgagcacga atcatttcaa ctttccagtt gettccagcg	900
aatcatctca ggagtaatgg tacgttgcaa tgcggcgtaa gcttcagctt ctttcttagc	960
tgcgtacagt ttggcatctg cgteacgttc gttagcaata gcttggttat tacgagcttc	1020
gcgatctgct tctgcttgtt taaccttctg ctgtgcttct tgttcaacac gagccagttc	1080
agctttcgca gcattaacct gttcttcacg aactttgta ttctgtacct gttccatgat	1140
taccggtggc aaagtaatat cctgaagaaa tacctgctta actgtgtaac catatgggcg	1200
tgcatactct tcaacttctt gttgaattgc agtttgcaat tgagcctgaa ttttagcatc	1260
aaacaaatct tgtcttttag gtacagactt accaaactca cgaatagtag acagtaattt	1320
ttcagttaca tatttgtcta acgcttgatc ctgagtacct gcattaatac ggttaatcgg	1380
tgcccttaga ccatcaaaact gcaacataac agtcaggtca acagtggtatt taaacttate	1440
ctgactagga acctgaagtt tatctaattt tagagcaata tctttagtag taaaagtatc	1500
gaaagaagca aaaggattta caatatgaaa gccgggtaat actgggctag ggtcaacttt	1560
accaggaaa gtctgggttt taacagtacc gtcttgaaca acagtatagg agttaagggc	1620

cagaactaaa cctaccaaac caa 1643

<210> 2

<211> 1464

<212> DNA

<213> bacteriophage CJ11

<400> 2

taggtataca ctgggatact aactcttctia aatggaaggt agaaataact aactgtatag 60

gigttaaaat atatggtggg ttattccctt atgaagaatt agagttagct ataaataaag 120

ctaacgaact tagagcacag catctaggta tggattccag gcaagaacta ttcaaaggat 180

atatttgccg acgtgaggac ttagataagt aaaattgcat ttggcaatag ctcataaatg 240

atgtataata tatacataaa tttagagagag aaagtctcgg attgataaga aagtccgaag 300

cagaaaaata aaaatcttag ttgctaaatt ctctcgaat ctagtataat atatacataa 360

attcgaggag aaaacaaaa ttaaattctt cgattatgaa aagctatact tactagctag 420

aggaaattcc gacctaatta ttaagttatt caaaagaatg cttacagagc ctgatgctca 480

ccaattattg gtcggttctt cattcatttt gaatgaatca acaatagttg ataatccaaa 540

taaattgtct aatagacaac tggcagaata tctaggaatt ttaagtctac gaaattatgc 600

cgaatacaag ttacaaaacg atcctagttt ggacatacaa tatgttccag tatggatacc 660

acgtttagta atcgacacta acccactaat cgcaattaac aaatcgaaat taatctttaa 720

agaggaaata aaatatggct aagtcttggg gcgaaactac tggcgttctt aacgataaaa 780

tcgaattcct gaagttcaac aacggtatca ctctgttctg tatcgtttctt ggtgttcttc 840

cacgttatgt ctattggctg actaataaag agggtagcgt agctcctttc gaatgtctcc 900

gttttaaccg tgacaaaagag agctttgttc gtggtaaagc tgatccggtt catgagatgg 960

gcttcttcca gaaagaactg gataaagatg gtaatcgtgt tccgctgaaa ccgaagaaaa 1020

actatatcgc ttttgttacc gaccgttctg ataacaaact gaaagtaatg gaagtcaagg 1080

ctactattct gaaaggcatc cagtctatca tgaagcagtt gagtctggca actccgtttg 1140

atattgatat ttctatcgag aaaaaaggta aaggtttcga tactgagtat gatgtacagc 1200

agattgtgc tatgcagttc cagattaagc tgcaagatcc taacagtgca gagtctaagc 1260

aatatgctgc aggcattgcaa gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 1320

ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 1380

gggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca 1440

gtcgggaaac ctgtcgtgcc agct 1464

<210> 3

<211> 1324

<212> DNA

<213> bacteriophage CJ11

<400> 3

tactgaatct atataagaaa caacaaattc gcgaacgtta ggc ccagctc ctctatccca 60

ttcccattgt acacggagat catabctttc ttaccatca gcaatccttg cagctttgaa 120

agtaatgttg ttaggagcag taggaggtac aaagttatac tctacagtaa gaactttgga 180

aaattcaaag tatccagaag agtctacagt tacacatct ggcatggtaa ctgcccaga 240

tatgcgtact ttgtaatccc caacaggaac accaccaaat ctaatagtgg gagatagtgg 300

acctataata tactttacc acgggctatt tgaaggtga gtacttttta actcaatagt 360

acaataacta gcttctctg tagtctctat aactactata ggggcaccta cacccacatc 420

tactggatca gcctctgac tagcggcagt aatagtaggt tttctcttag tactaaaggt 480

agttttattg gataagttta tgccaatttt agectctaat agctcagagt ctataataga 540

gtcatagaaa gcccttgaa cctcataaga agttgaaggg gttagattat taatcattac 600

aaagaaagta tctataccgg tatagtcacg tctatcaata ctttctcta actttaacca 660

aaaggatcta ccaataacgt cataatcagt atatatagag tgctggacat atgccattgt 720

atatccagtc attatactat ttaagacat ttggctggt gcattattcg aatcattaa 780

atggatgcc actccacaga ctgttccca tcatctcctt ctgctctaat acgaaaatat 840

agttttctat tgatccctag agcatcactg ttatggagag caaaatctgc cttattatac 900

attaataaat agtcataagt atactgattt tcaatacgt cacttcttag cattctattc 960

tggaatcat agatctccag agtatagaat atactttcta ttatatcttc ttctggtatc 1020

ctatccaag ctagttttac gtctgggccg aaaaactcag ttacatctcc agaagccgta 1080

ttagttacce taaaattaga tactacgctt aggttttttag cagagttaag ttctatagat 1140

aatgttactg gagaacttct tctaccgttt ataccacag cccttatttc aatattgct 1200

aaacctgcag gttctccaac tatctcttgg atcatgcgtt cattgggatt tgtttctagt 1260

tgctgcacaa tatacggctc agcatggcct gaatgtacga tagaatagta aactacgtta 1320

ttag 1324

<210> 4

<211> 1666

<212> DNA

<213> bacteriophage CJ11

<400> 4

cagaaaataa cattaccttc tttatctggt tttagtacaa ccgtttctgg tttagtagtt 60

ttaatctgat aagttgatgt actagtatca atacctacca tattaggatc ggtaaaatta 120

tttgcttctt gaacttccaa atccgccttc cccacgatct gtctccccta gttcgtcaac 180

gatttcaaaa ttatgagttg agtagtgg tactactact agctgacaaa gtctttcaaa 240

atittccaga gtttgaattt cagaaccata gttataaagg ttcacttaa tagttccacg 300

atagtctgag tcaatcactc ctgcggtgtt tgcaatcadc agatgacgct tacctaagga 360

gctacgagga actaccaaac cgaaccaacc tcgcggaatt tctaccgca caccggtgtc 420

aatcattaag gatttgctg gtgcaatagc acgtaaatct gcagcagggt tagtaccaaa 480

gaacgctcgc agatccatac ctgcggcadc ttcggaacca atcttaggcg tacaatctgg 540

atgagttaat ttaattttaa tcaattgtct gcaatctcca aaatatcttt tgtaaattta 600

tctaatacat cttagctac agcagcaata gcatccacac agtaggtagg taaatcaacc 660

agaattaggt ttcgataaag caattcttc gaagcattta aattctgtat atatttctgt 720

tttccaggca gtggaagctg atcaataata tccagaacgt taccaaatc acgaataata 780

ttataccac gctttgccc aataacctca acacctgga tattatcccc taaatcacc 840

ataattgctt tcaggagat aaactgctct acatcgtcaa cattatgatg ctcatacata 900

tcacgaagat gatattcacg acgtgttgig aaagagaagc gagatacttt atcagttaat 960

aaagtatccc agtcaccadc ggtagaaatt agccaaacat gatcatatag atgccaatc 1020

agcttaacaa tataagetgc catatcatct gcttctacce cacgaatagt gaaagtggg 1080

aatgtagttt cacataatc gaaagcatct ttcaagtact cgaagaattg ttcactaat 1140

gctttctctt ctccgtacg ctgcgagtat ttctcatctc gattcccttt atactcaggg 1200

agatgctcta ggcggaatgc agacttccct ttatctecta aaactattgt agttctagca 1260

gagtaagatt ttgcaagaga ctgaatagt gaaacataac ttgaggcaaa tggtttttta 1320

ctattgttat gcttgaagcg aaagcctaag ttagttccat cgacaatcat taggttacga 1380

cggaagcca tttcgcttc ctcttctca ataaatttc cccaggattt actcattatt 1440

taattaagtc ctcaacagat gcatgatgta gccacggctc aaataacca attacgatt 1500

ccatgctttt cttattaac accatatggg tacgactcat taagtgtca accatcgggt 1560

ctgagctatc caagctatt aacctgtc ctctgtcttt tttgaatatt aatgcagggt 1620

tggagtcat ctgctcacct tcacgtgagc actgctgcca ccactt 1666

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

cccattatga tgaatatagg 20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ctatactggt gttcaagac 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gataactaact cttctaaatg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cttagactct gaactgtag 20

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

ctgaatctat ataagaaaca ac 22

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 cgaagtttac tattctatcg 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 gtttttagta caaccgtttc 20

<210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 cagatgaact ccaaacctg 19

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 cgggcctctt cgctattacg 20

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400> 14

aggcttaccg gtcttactgt cg

22