



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0064373
(43) 공개일자 2012년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01) A23K 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0125571

(22) 출원일자 2010년12월09일

심사청구일자 2010년12월09일

(71) 출원인

주식회사 바이오리더스

대전광역시 유성구 테크노로 13 (용산동)

충북대학교 산학협력단

충청북도 청주시 흥덕구 내수동로 52 (개신동)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

성문희

대전광역시 유성구 유성대로736번길 62, 902호
(장대동, 갤럭시빌2)

김철중

대전광역시 유성구 엑스포로339번길 320, 싸이언스빌 6-102 (원촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이치영

전체 청구항 수 : 총 8 항

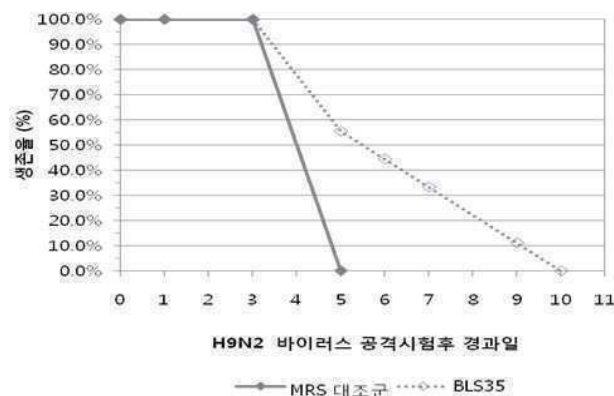
(54) 발명의 명칭 조류 인플루엔자 바이러스 감염억제 효과를 가지는 신규 유산균, 이를 이용한 천연 항바이러스제 및 이를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규 미생물 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 억제 활성을 가지는 김치 유래 신규 미생물 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 및 그 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 또는 그 배양액은 항바이러스능을 가지는 물질을 포함하고 있어, 사료첨가제, 발효제품, 식품, 의약품 등에 유용하게 사용될 수 있으며, 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35는 균주성장능이 뛰어나, 낮은 비용으로 단시간에 많은 양의 균체를 생산할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도2



(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

국민대학교산학협력단

서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자

부하령

대전광역시 유성구 가정로 65, 103동 1405호 (신성동, 대림두레아파트)

최영기

충청북도 청주시 흥덕구 탑골로 6, 현진에버빌 108동 706호 (산남동)

홍승표

대전광역시 유성구 배울2로 3, 테크노밸리 8단지 801동 102호 (관평동)

특허청구의 범위

청구항 1

류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 KCTC18159P.

청구항 2

류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 항바이러스용 조성물.

청구항 3

류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 약제학적 조성물.

청구항 4

류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 건강보조제.

청구항 5

류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 발효식품.

청구항 6

류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 식품첨가용 조성물.

청구항 7

류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 사료첨가제.

청구항 8

류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 KCTC18159P 또는 배양액을 동물에 급여하는 것을 특징으로 하는 인간을 제외한 동물에서 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규 미생물 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 억제 활성을 가지는 김치 유래 신규 미생물 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) BLS35 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고병원성 조류 인플루엔자에 의한 인체감염은 H5N1, H7N7, 그리고 H9N2형의 바이러스로 밝혀지고 있으며, 팬더믹 인플루엔자 발생시 전 세계적으로 200 만명 이상이 사망하는 막대한 인명피해와 사회적인 공황 상태 및 경제마비를 야기할 수 있어 세계보건기구 (WHO)는 국제적인 대책 마련을 촉구하고 있다 (2005년, Global Influenza Preparedness Plan 발표).

[0003] 최근 우리나라에서도 2003년, 2006년 및 2008년 세 차례 조류 인플루엔자의 발생으로 포유동물의 감염가능성의 확인뿐만 아니라 양계산업 및 사회경제에 막대한 경제적 손실을 초래하였으며, 국내에서도 무증상 감염자의 발생으로 팬더믹 인플루엔자 발생에 대한 심각한 사회적 문제점이 야기되고 있는 상황이다.

[0004] 국내 양계산업에 있어서 바이러스성 질병뿐 아니라 세균 감염에 의한 닭 호흡기성 마이코플라스마병, 대장균증, 살모넬라증 등의 세균성 질병도 빈번히 발생하여 세균에 감염되는 경우 면역력의 저하로 다른 질병에도 보다 취약해질 수 있다. 양계농가에서는 조류 질병의 피해를 막기 위해 방역 및 위생관리, 백신이나 항생제를 사용하지만 백신의 접종에 의해 감염을 억제하는 것은 유행하는 바이러스의 형과 백신의 바이러스의 형이 맞지 않으면 효능에 문제점이 있어 백신에 의한 예방에는 한계가 있기 때문에 바이러스에 대한 효과적인 치료법이나 예방책은 아직 미비한 상태이다. 따라서 병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 억제 효과를 가지면서 계군 자체의 면역시스템을 강화시킬 수 있고, 또한 안정성에 문제가 없는 복합적인 치료예방제가 필요한 상황이다.

[0005] 유산균은 혐기 또는 호기의 조건과 상관없이 20 ~ 40℃에서 빠른 속도로 성장할 수 있으며, 배양 과정 중 젖산을 생산하여 산도를 높이고, 과산화수소 등을 생성함으로써 병원성 바이러스 및 미생물의 증식을 억제하여 토양의 병해를 방지한다고 알려져 있다. 또한 각종의 생리활성물질, 항바이러스물질, 항균물질, 항암물질을 생산함으로써 자기방어능력을 향상시키며, 가축의 경우 장내 미생물의 안정화, 사료 효율증가, 내병성의 증가 효과를 나타낸다. 그러나, 유산균을 산업적으로 올바르게 사용하기 위해서는 일반적으로 긍정적인 효과의 나열에 의한 판단보다는 사용용도가 무엇이며 용도에 적합한 특성이 무엇인지를 과학적인 입장에서 명확하게 이해하고 평가하는 절차를 반드시 거쳐야 한다. 이와 같은 절차를 통해서만이 제품의 균일성과 효과의 재현성을 보장할 수 있기 때문이다.

[0006] 항바이러스 활성을 갖는 유산균으로 과일과 야채에서 분리된 류코노스톡 메센테로이드 CLUM 0617 균주가 알려진바 있으나, 생체 내에서 항바이러스 효능을 가질 수 있는지에 대하여 검증되지 않았고, 균주의 성장속도가 느려 생균제제 등으로 산업화하는데 어려움이 있었다(한국등록특허 제0808910호).

[0007] 이에, 본 발명자들은 김치 유래의 유산균 150 종에 대하여 조류 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는데 사용할 수 있는 유산균을 분리하기 위해 예의 노력한 결과, 신규 유산균인 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35를 선별하였고, 상기 균주의 배양액 성분에 의해 조류 인플루엔자 바이러스의 성장이 저해되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 항바이러스능을 가지는 신규 미생물 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 사료용 조성물, 약제학적 조성물, 건강보조제, 발효식품 및 식품첨가물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 그

배양액을 동물에 급여하는 것을 특징으로 하는 동물에서 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 항바이러스용 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 인플루엔자 감염 예방용 건강보조제를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 발효식품을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 식품첨가용 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 사료첨가제를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 배양액을 동물에 급여하는 것을 특징으로 하는 동물에서 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 또는 그 배양액은 항바이러스능을 가지는 물질을 포함하고 있어, 사료첨가제, 발효제품, 식품, 의약품 등에 유용하게 사용될 수 있으며, 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35는 균주성장능이 뛰어나, 낮은 비용으로 단시간에 많은 양의 균체를 생산할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명에 따른 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 균주의 성장패턴과 배양 시간 경과에 따른 배지 pH 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35를 투여한 마우스에 조류인플루엔자를 투여하였을 때의 생존경과일을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 일 관점에서, 본 발명은 신규 미생물 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에 따른 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P는 김치에서 분리한 신규 유산균으로, 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석을 실시한 결과, 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드로 동정되었으며, 신규한 미생물로 확인되었으며, 2009년 5월 26일자로 한국생물공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하였다.
- [0023] 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드는 류코노스톡(*Leuconostoc*)속에 속하는 그람 양성균으로서 일반적으로 무, 배추 및 오이 등을 소금에 절인 것 또는 이 절인 것을 고추, 마늘, 파, 생강, 젓갈 등의

양념을 버무린 후 젖산 생성에 의해 숙성되어 저온에서 발효된 제품인 김치의 발효 과정에서 출현하는 김치 유산균으로, 본 발명의 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35는 신규로 분리 동정된 신규 미생물이다.

- [0024] 본 발명에 따른 유산균은 조류인플루엔자 바이러스에 대해 높은 저해효능을 나타내어 우수한 항바이러스 효능을 가지며, 본 발명의 일 실시예에서는, 조류인플루엔자 바이러스인 H9N2를 항바이러스 효능을 확인하였다.
- [0025] 다른 관점에서, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 그 배양액을 함유하는 항바이러스용 조성물, 인플루엔자 감염 예방용 약제학적 조성물, 인플루엔자 감염 예방용 건강보조제, 발효식품, 식품첨가용 조성물 및 사료첨가제를 제공한다.
- [0026] 본 발명의 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P는 균주성장능이 뛰어나, 낮은 비용으로 단시간에 많은 양의 균체를 생산할 수 있는 균주이며, 한국등록 특허 제0808910호에 기재된 류코노스톡 메센테로이드 CLUM0617 균주와는 16S rDNA 서열이 다르고, 균체성장 속도 및 총 균체수에 있어서, 본 발명의 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 균주가 류코노스톡 메센테로이드 CLUM0617보다 2배 이상 높아, 본원발명의 BLS35 균주는 인용발명의 CLUM 0617균주 보다 균주성장능이 뛰어나, 낮은 비용으로 단시간에 많은 양의 균체를 생산할 수 있어, 산업적으로 이용시 매우 유용하다.
- [0027] 본 명세서의 용어 '배양액'은 항바이러스활성을 갖는 유효성분을 포함하는 균체를 포함한 배양원액, 균체를 제거한 배양 상등액 또는 배양액의 회석액일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 항바이러스조성물을 제조하기 위해서 본 발명의 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35는 통상의 액상 또는 고상의 배양기술을 통하여 대량으로 배양할 수 있다. 상기 균주는 또한 제제화하기 위하여 감압동결건조(Lyophilized), 동결건조, 수화의 상태로 균체를 수거할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35는 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스작용을 나타낸다.
- [0030] 본 발명의 약제학적 조성물은 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35 또는 그 배양액을 함유한 미생물 제제를 의미하며, 약제학적으로 허용되는 담체기질 또는 영양 성분과 함께 경구 투여, 비경구 투여, 또는 피부 또는 점막에 물리적인 접촉을 통해 투여하거나, 직접적으로 튜브나 카테타를 통해 장에 투여할 수도 있다.
- [0031] 상기 약제학적 조성물은 타블렛, 캡슐, 인플란트, 좌약, 분말, 용액, 젤, 액상의 균주 현탁액 등으로 제조될 수 있다.
- [0032] 약제학적 조성물의 투여량은 당해 기술분야에 속하는 전문가에 의해 결정될 수 있고, 제제화 방법, 투여 방식, 투여자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해서도 다양하게 처방될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 발효식품은 냉장, 냉동 또는 장기보관이 가능한 유제품, 예를 들면, 김치, 우유, 분유, 요거트, 케피어(kefir), 아이스크림, 밀크셰이크, 치즈, 크림, 커드, 발효유, 및 우유가 첨가된 발효식품뿐만 아니라 두유, 발효된 곡류제품, 환자식이 및 유아식이 등이 포함될 수 있으며, 동물의 사료로서 동물에게 제공할 수도 있다.
- [0034] 본 발명의 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35를 배양하여 식품으로 제조하거나 식품에 첨가하기 위해서는 우유 또는 곡류와 같이 녹말을 포함한 기질이 균주 배양에 바람직하다.
- [0035] 상기 식품 또는 음료로 제조된 영양조성물은 본 발명의 미생물과 더불어 지방, 단백질, 탄수화물, 식이섬유, 무기질 및 비타민 등으로 구성된 하나 이상의 영양 구성물을 포함할 수 있다. 상기 구성물 중에서 특히 식이섬유는 일반적으로 유산균의 분열을 촉진하는 생물발생이전(Prebiotic)기질로 알려져 있기 때문에 체내에 유입되어 장내에서 콜로니의 형성 및 유지에 중요한 역할을 할 수 있으므로 본 발명의 조성물을 섭취한 후에 또는 동시에 투여될 수 있도록 조성물에 포함시킨다.
- [0036] 본 발명의 약제학적 조성물, 발효식품 또는 식품첨가제는 약제학적으로 필요한 구성물 또는 식품으로 적합한 구성물 외에 인체에 이로운(probiotic) 균주를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 약제학적 담체, 발효식품 또는 식품첨가제에 포함되는 류코노스톡 메센테로이드 씨브스페시스 메센테로이드 BLS35의 양은 약 10^5 cfu/g 내지 약 10^{11} cfu/g일 수 있으며, 바람직하게는 10^6 cfu/g 내지 약 10^{10}

cfu/g, 가장 바람직하게는 10^7 cfu/g 내지 약 10^9 cfu/g이다. 균주를 투여할 경우에는 생균상태로 투여하는 것이 바람직하며, 섭취 전에 사멸시키거나, 감쇄(attenuation)상태로 투여할 수 있다. 또한, 배양 상등액을 사용하여 제조할 경우에는 열처리 과정을 통한 멸균화 과정을 추가적으로 거칠 수 있다. 최소의 효능을 가지는데 필요한 균주량 및 일일 섭취 정도는 섭취자의 신체 또는 건강상태에 따라 달라질 수 있으나 일반적으로 10^6 내지 10^{12} cfu/day가 바람직하며, 가장 바람직하게는 10^7 내지 10^{10} cfu/day 이다. 배양 상등액은 당업계에 통상적으로 사용되는 기술을 사용하여 항균 효능의 정도를 판단할 수 있으며, 이에 따라 투여량이 결정될 수 있다.

[0038] 또 다른 관점에서, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 썬브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P 또는 배양액을 동물에 급여하는 것을 특징으로 하는 동물에서 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명에서, 동물에 급여하는 방법은 사료첨가제 형태이거나, 발효식품, 동결건조제, 균체 배양액의 희석액 등의 형태 등 당해 기술분야에 속하는 전문가에 의해 결정될 수 있고, 급여 방식, 급여동물의 종류, 나이, 체중, 병적 상태, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해서도 다양하게 급여될 수 있다.

[0040] 본 발명에서, 급여되는 동물은 인간을 제외한 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 가축일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 가금류이다.

[0041] 실시예

[0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0043] 하기 실시예에서는 류코노스톡 메센테로이드 썬브스페시스 메센테로이드 BLS35 KCTC18159P의 H9N2에 대한 항바이러스 활성만을 확인하였으나, 조류인플루엔자 바이러스와 비슷한 기작으로 활동하는 바이러스에 대해서도 억제 효능을 가진다는 것은 당업자에게 있어서 자명할 것이다.

[0044] 실시예 1 : 김치 유산균의 분리 및 항바이러스용 배양액의 제조

[0045] 통상적인 김치 제조방법으로 제조된 김치 11종을 선택하고, 상기 김치를 유산균 분리 김치시료로 사용하였다. 상기 김치시료를 0.85% 식염수로 10배 희석하여 1 ml씩 MRS 아가 배지(MRS 아가, 디프코(Difco.); 박토크톤 10 g, 소고기추출물 10 g, 효모추출물 5 g, 글루코스 20 g, 트윈 801 g, 구연산 2 g, 제2 인산칼륨 2 g, 초산나트륨 5 g, 황산마그네슘 0.1 g, 황산마그네슘 0.05 g, 아가 15 g/증류수 1 l)에 접종한 후, 유리막대로 도말하였다. 이후, 플레이트를 30℃의 항온 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 생성된 각각의 콜로니를 MRS 아가 배지에 획선 접종하였고, 30℃에서 48시간 동안 배양하여 총 150개의 유산균 콜로니를 분리하였다. 생장된 집락(colony)의 형태, 색깔 등을 기준으로 우세하다고 여겨지는 10 가지의 집락을 구별하여 MRS 배지에 2차 배양하여 분리하고자 하는 균이 단독균주인지를 확인하였다.

[0046] 상기 2차 배양으로부터 단독균주로 선발된 26종의 김치유래 유산균을 50ml의 MRS broth(Difco)에 접종하고, 30℃에서 24시간 동안 정치배양하였다. 상기 배양된 배양액을 6000rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 pH를 6.5로 중화하고 0.22um 필터로 여과하여 유산균 배양액을 제조하였다.

[0047] 실시예 2 : 조류 인플루엔자 바이러스의 분리

[0048] 충청북도 청주시 옥거리에 위치한 재래시장의 토종닭에서 채취한 분변을 11일령의 유정란에 접종하여 분리한 A/chicken/Korea/LPM77/06 (H9N2)바이러스를 이용하였다.

[0049] 인플루엔자 바이러스의 확인을 위해, Viral RNA 추출은 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Germany)를 사용하였으며, 추출한 RNA를 RT-PCR 방법으로 8개의 segments (HA, NA, M, NS, NP, PA, PB1, PB2) 모두를 증폭하여 유전자분석을 통해 H9N2 바이러스임을 확인하였다.

[0050] 실시예 3 : 선발된 김치 유산균의 조류 인플루엔자 항바이러스능 확인

[0051] 실시예 1에서 선발한 유산균에 대해 다음과 같은 방법으로 항바이러스 효능을 실시하였다. 바이러스는 실시예 2에서 분리한 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 혈청형 바이러스인 A/chicken/Korea/LPM77/06 (H9N2) 를 사용하였다. 바이러스 AIV LPM77주를 9~10일령의 SPF 부화란에 배양하여 역가가 최소 $10^{8.0}$ EID₅₀/ml 이상 되도록 증식하며, 증식된 바이러스는 영하 70℃가 유지되는 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 유산균 배양액은 증류수로 각각 10배 희석하여 4℃로 유지한 후 사용하였다.

[0052] 10배 희석한 바이러스액(요막강액) 1.0ml를 24ml의 증류수와 섞어 추출물과의 반응용 바이러스를 준비하였다. 10배 희석된 유산균 배양액을 2.5ml씩 시험관에 넣고, 준비된 바이러스액 2.5ml를 넣어 혼합한 다음(총 5ml), 4℃에서 정확히 45분간 반응시키며 도중에 10분마다 잘 흔들어 주었다. 바이러스 증식여부의 판정을 위해 반응이 끝나면 반응액을 PBS를 사용하여 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 및 10^{-6} 로 희석하고 희석배수당 4개의 10일란 발육란에 중화된 반응액 0.2ml을 요막강 내로 접종하였다. 접종 후 37℃에서 5일 동안 배양하며, 매일 검란을 실시하고, 접종 24시간 이내에 죽은 발육란은 사고사로 간주하고 시험성적에서 제외하였다. 접종 24시간 후부터 5일 이내에 죽은 접종란은 모두 4℃에 보관하였다. 접종 5일 후까지 살아남은 모든 발육란과 4℃에 보관된 죽은 접종란으로부터 요막강액을 각각 채취하였고, 혈구응집여부 시험을 실시하여 바이러스 유무를 판단하였다.

[0053] 그 결과, 음성 대조군의 바이러스 역가가 $10^{5.5}$ 인데 비하여, 한 균주의 유산균 배양액의 처리 후의 바이러스 역가가 $10^{3.5}$ 가 으로 나타나 매우 높은 항바이러스 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다 (표 1).

표 1

[0054] 유산균 배양액의 항바이러스 효능

	처리후의 바이러스 역가 (EID ₅₀)	대조군 대비 바이러스 감소량 (EID ₅₀)
류코노스톡 메센테로이드 써브스페시스 메센테로이드 BLS35 배양액	$10^{3.5}$	$10^{2.0}$
대조군 바이러스	$10^{5.5}$	

[0055] 실시예 4 : 류코노스톡 메센테로이드 써브스페시스 메센테로이드 BLS35의 균주 동정

[0056] 실시예 3에서 바이러스 저항능을 확인한 유산균의 동정을 위하여, 16S rDNA 염기서열 분석을 수행하기 위해 유전자은행(GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov) 상에 등록되어 있는 유산균의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 16S rRNA 코딩 DNA 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하였다.

[0057] 서열번호 1 : 5'-gac ggg tga gta aca cgt gg-3'

[0058] 서열번호 2 : 5'-acg ggc ggt gtg tac-3'

[0059] 10^9 개의 유산균 균체의 파쇄물을 주형으로 상기 한 쌍의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 1308 bp의 DNA 단편(서열번호 3)을 수득하였으며, 상기 단편을 pGEM-Teasy vector(Promega Co.)에 클로닝 후 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 선발된 유산균은 류코노스톡 메센테로이드 써브스페시스 메센테로이드 (Accession No FJ749873.1), 류코노스톡 메센테로이드 써브스페시스 메센테로이드 (Accession No FJ749759.1) 등과 99% 이상의 상동성을 가지는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스활성을 갖는 유산균주 류코노스톡 메센테로이드 써브스페시스 메센테로이드 BLS35라 명명하고, 2009년 5월 26 일자로 한국생물공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하였다(KCTC18159P).

[0060] **실시예 5: 류코노스톡 메센테로이드 썬브스페시스 메센테로이드 BLS35 균주의 성장패턴 확인**

[0061] 류코노스톡 메센테로이드 썬브스페시스 메센테로이드 BLS35 균주를 고압증기로 멸균된 MRS 액상 배지 (Difco)에 접종하여 배양온도 30℃에서 24시간 정치배양 하였으며, 배양시간대별로 샘플링을 하여 유산균 수와 pH 변화를 확인하였다.

[0062] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 배양 14~18시간이 대수증식기이고, 21시간째에 정지기에 접어들었다.

[0063] 또한, 배양시간에 따른 균체 수를 살펴보면, 정지기에 들어섰을 때 5E+09CFU/ml의 균체수를 가지고 있어, 균체성장 속도 및 총 균체수가 높았다.

[0064] 또한, pH 변화에 있어서도, BLS35의 경우 배지 내 최종 pH는 4.25이었다.

[0065] 상기 결과에서 나타난 바와 같이, BLS35 균주는 균주성장능이 뛰어나, 낮은 비용으로 단시간에 많은 양의 균체를 생산할 수 있는 균주로 판단되었다.

[0066] **실시예 6: 류코노스톡 메센테로이드 썬브스페시스 메센테로이드 BLS35 균주의 *in vivo*에서의 항바이러스능 확인**

[0067] 류코노스톡 메센테로이드 썬브스페시스 메센테로이드 BLS35 배양액이 저병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대해 감염억제 효과를 나타내는지 조사하기 위하여 실험동물 마우스에서의 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 생존율을 확인하였다.

[0068] 대조군은 6주령 Balb/C 마우스 9마리를 사용하고 MRS 액상배지를 14일 동안 매일 0.3 ml씩 경구로 투여하였으며, 실험군은 6주령 Balb/C 마우스 9마리를 사용하고 MRS 액상배지에 배양된 BLS35 균주 배양액을 14일 동안 매일 0.3 ml씩 경구로 투여하였다. 투여기간 14일 경과 후, 대조군 및 실험군의 실험동물에 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 (A/Chicken/Korea/LPM77/06) 30μl를 마우스의 비강을 통해 감염시켰다.

[0069] 조류인플루엔자 바이러스 감염 후, 생존율을 관찰하기 위하여 매일 죽은 마우스 수를 모니터링 한 결과, 대조군 (MRS 배지 투여군)에서는 바이러스를 투여하고 5일이 경과한 후 실험동물 마우스 9마리가 모두 폐사하였고, 실험군(BLS35 투여군)은 5일이 경과한 후 4마리가 폐사하기 시작해서 10일이 지나서야 모두 폐사하였다 (도 2).

[0070] 상기 결과를 통하여, 류코노스톡 메센테로이드 썬브스페시스 메센테로이드 BLS35 배양액이 대조군과 비교하였을때, 동물 체내서도 항바이러스능을 가진다는 것을 알 수 있었다.

[0071] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0072]

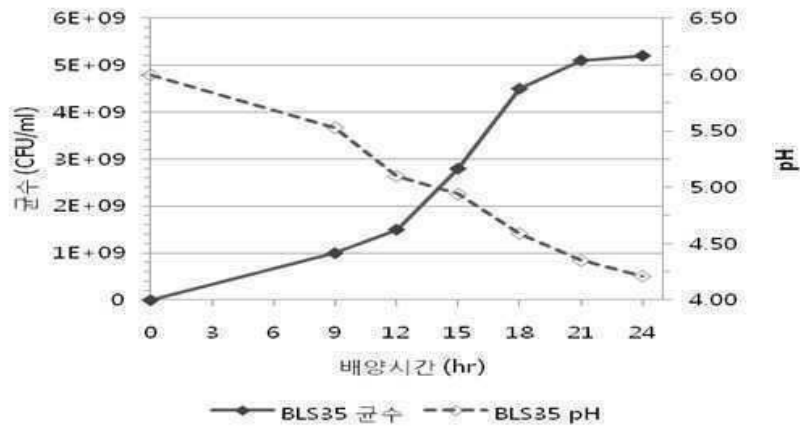
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18159P

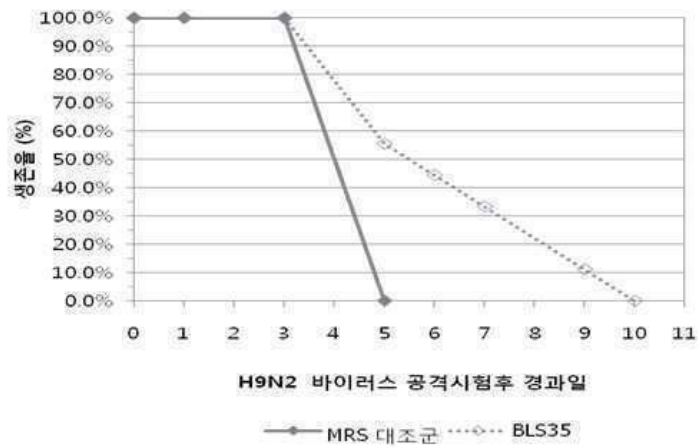
수탁일자 : 20090520

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> BioLeaders corp.
- <120> Novel Lactic Acid Bacteria Preventing Infection of Avian Influenza Virus, Natural Antivirus Using Thereof and Composition Containing Thereof
- <130> P10-B287
- <160> 3
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer

<400>	1	
gacgggtgag taacacgtgg		20
<210>	2	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	2	
acgggcggtg tgtac		15
<210>	3	
<211>	1308	
<212>	DNA	
<213>	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides	
<400>	3	
gacgggtgag taacacgtgg acaacctgcc tcaaggctgg ggataacatt tggaaacaga		60
tgctaatacc gaataaaact tagtgtcgca tgacgaaaag ttaaaaggcg cttcggcgtc		120
acctagagat ggatccgctg tgcattagtt agttgggtggg gtaaaggcct accaagacaa		180
cgatgcatag ccgagttgag agactgatcg gccacattgg gactgagaca cggcccaaac		240
tcctacggga ggctgcagta gggaatcttc cacaatgggc gaaagcctga tggagcaacg		300
ccgcgtgtgt gatgaaggct ttccgggtcgt aaagcactgt tgtatgggaa gaacagctag		360
aataggaaat gattttagtt tgacggtacc ataccagaaa gggacggcta aatacgtgcc		420
agcagccgcg gtaatacgta tgteccgagc gttatccgga tttattgggc gtaaagcgag		480
cgcagacggt ttattaagtc tgatgtgaaa gcccggagct caactccgga atggcattgg		540
aaactggtta acttgagtgc agtagaggta agtggaactc catgtgtagc ggtggaatgc		600
gtagatatat ggaagaacac cagtggcgaa ggcggcttac tggactgcaa ctgacgttga		660
ggctcgaaag tgtgggtagc aaacaggatt agataccctg gtagtcaca ccgtaaacga		720
tgaacactag gtgttaggag gtttccgctt cttagtcccg aagctaacgc attaagtgtt		780
ccgcctgggg agtacgaccg caaggttgaa actcaaagga attgacgggg acccgcaaa		840
gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcaagaa ccttaccagg tcttgacatc		900
ctttgaagct tttagagata gaagtgttct cttcggagac aaagtgacag gtggtgcatg		960
gtcgtcgta gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta		1020

ttgttagttg ccagcattca gatgggcact ctagcgagac tgccggtgac aaaccggagg	1080
aaggcgggga cgacgtcaga tcatcatgcc cttatgacc tgggctacac acgtgctaca	1140
atggcgata caacgagttg ccaacccgcg agggtagct aatctcttaa agtacgtctc	1200
agttcggatt gtagtctgca actcgactac atgaagtcgg aatcgctagt aatcgcggat	1260
cagcacgccg cggagaatac gttcccgggt ctgtacaca ccgccgt	1308