



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년03월03일
(11) 등록번호 10-0808910
(24) 등록일자 2008년02월25일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0101881

(22) 출원일자 2006년10월19일

심사청구일자 2006년10월19일

(56) 선행기술조사문헌

KR100552462 B1

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

주식회사 씨티씨바이오

서울 송파구 오금동 93

(72) 발명자

오화균

경기 성남시 분당구 이매동 296 이매포스파크 101동 204호

김세영

경기 부천시 원미구 중1동 보람마을 1113동 1502호

김꽃님

경기 화성시 팔탄면 가재리화성진우아파트 104동 502호

(74) 대리인

특허법인필앤온지

전체 청구항 수 : 총 11 항

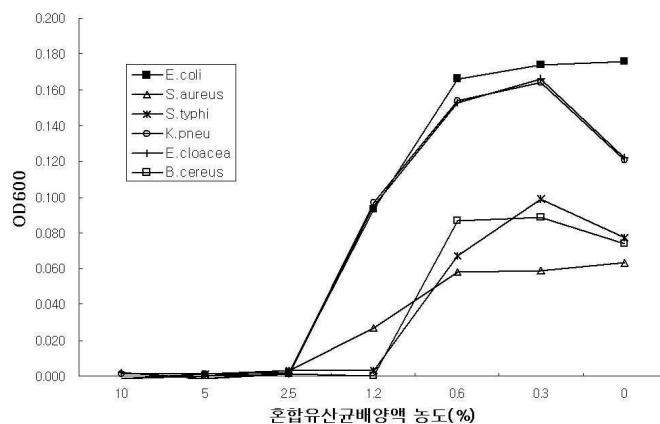
심사관 : 김준경

(54) 항균 및 항바이러스 효과를 가진 신규한 유산균 및 이를포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 항균 및 항바이러스 효과를 가진 신규한 유산균에 관한 것으로서, 본 발명은 유해 미생물의 생육 억제 활성 및 조류독감 바이러스에 대한 억제 활성을 가지는 신규한 미생물인 류코노스톡 메첸테로이드 CLUM0617, 류코노스톡 시트레움 CLUC0620, 락토바실러스 플란타룸 CLP0611 및 락토바실러스 파라카제이 CLPC0603와 이러한 유산균 또는 유산균 배양물을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 신규한 유산균 또는 이 유산균의 배양물은 정장용, 생균용, 항균용, 항바이러스용 등의 용도로 사료, 발효제품, 식품, 의약품 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(56) 선행기술조사문헌
KR100583836 B1
US 5124359 A
KR 20030070591 A
KR 20040036997 A
KR 100426279 A
KR 20040043511 A

특허청구의 범위

청구항 1

항균 및 항바이러스 효과를 갖는 류코노스톡 메젠테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P).

청구항 2

류코노스톡 메젠테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P) 및 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유산균 또는 유산균 배양물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항균용 조성물.

청구항 3

류코노스톡 메젠테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P) 및 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유산균 또는 유산균 배양물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 바이러스는 조류독감 바이러스인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 5

류코노스톡 메젠테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P) 및 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유산균 또는 유산균 배양물을 포함하는 것을 특징으로 하는 저장용 조성물.

청구항 6

류코노스톡 메젠테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P) 및 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유산균 또는 유산균 배양물을 포함하는 것을 특징으로 하는 생균제 조성물.

청구항 7

류코노스톡 메젠테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P) 및 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유산균 또는 유산균 배양물을 포함하는 것을 특징으로 하는 사료첨가용 조성물.

청구항 8

류코노스톡 메젠테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P) 및 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유산균 또는 유산균 배양물을 포함하는 것을 특징

으로 하는 발효제품.

청구항 9

항균 및 항바이러스 효과를 갖는 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P).

청구항 10

항균 및 항바이러스 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P).

청구항 11

항균 및 항바이러스 효과를 갖는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P).

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <6> 본 발명은 유해 미생물에 대한 항균력 및 조류독감과 같은 바이러스에 대한 항바이러스력을 가진 신규한 유산균, 그 배양액 및 그러한 유산균 또는 유산균의 배양액을 조성물에 관한 것이다.
- <7> 1983년 벨기에, 프랑스 등 유럽에서 발생하기 시작한 이래 2004년 현재까지 세계 각국에서 문제가 되고 있는 조류독감은 조류에 감염되는 급성 바이러스성 전염병으로 주로 닭, 칠면조 등의 가금류에 많은 해를 입힌다. 병원성(病原性)에 따라 고(高)병원성, 약(弱)병원성 및 비(非)병원성 3종류로 구분되며, 이 가운데 고병원성은 인간에게도 감염되어 1997년 홍콩에서 6명이 사망하였고, 2004년 베트남에서는 16명이 사망하기도 하였다.
- <8> 감염은 조류의 분비물을 직접 접촉할 때 주로 일어나며, 비말(飛沫), 물, 사람의 발, 사료차, 기구, 장비, 알 껍질면에 묻은 분변 등에 의해서도 전파된다. 증상은 감염된 바이러스의 병원성에 따라 다양하지만 대체로 호흡기 증상과 설사, 급격한 산란율의 감소가 나타난다. 경우에 따라 벗 등 머리 부위에 청색증이 나타나고, 안면에 부종이 생기거나 깃털이 한 곳으로 모이는 현상이 나타나기도 한다. 폐사율도 병원성에 따라 0~100%로 다양하다.
- <9> 조류독감이 발생하면 전 세계 대부분의 국가에서는 전량 도살 처분하며, 발생국가에서는 양계산물을 수출할 수 없게 된다. 한국에서도 1996년에 이어 2003년에 조류독감이 발생해 전국적으로 확산하였다. 비록 약병원성으로 인체에는 전염되지 않는 것으로 확인되었으나, 우리나라도 조류독감의 피해로부터 결코 안전하다 할 수는 없을 것이다.
- <10> 또한 양계산업에 있어서 바이러스성 질병뿐 아니라 세균 감염에 의한 닭 호흡기성 마이코플라스마병(CRD), 대장균증, 살모넬라증(가금디프스, 추백리) 등의 세균성 질병도 빈번히 발생하는데, 닭이 세균에 감염되었을 경우 저항력이 떨어져 다른 질병에도 보다 취약해질 수 있다. 이러한 조류질병으로부터의 피해를 막기 위해 양계 농가에서는 1차적으로는 방역 및 위생관리, 2차적으로는 백신이나 항생제를 사용한다. 하지만 실제 백신의 사용에는 많은 어려움이 따르고, 무절제한 항생제의 사용 또한 바람직하지 않다. 따라서 병원성 세균이나 바이러스에 대한 억제 효과를 가지면서 닭의 면역시스템을 강화시킬 수 있는 복합적인 치료예방제가 필요하다.
- <11> 유산균은 자연계에 널리 존재하며 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 유산을 생산한다. 유산균이 발견되는 자연환경은 다양한데, 사람이나 동물의 장내에 존재할 뿐 아니라, 다양한 채소와 과일에서도 발견되며 요구르트, 우리나라의 김치나 독일의 사우어크라우트(sauerkraut)와 같은 발효식품에서 그 발효과정에 중요한 역할을 담당한다. 이러한 유산균으로는 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 페디오코커스 속(*Pediococcus* sp.), 류코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.), 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 스포로락토바실러스 속(*Sporolactobacillus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 등이 있다.
- <12> 이들 유산균은 장내로 유입된 후 장내 상피세포에 착생하게 되어 유해 미생물의 장 정착을 방지하고 항균 물질

을 분비함으로써 유해 미생물의 생육을 억제하고 설사와 변비를 개선할 뿐만 아니라, 면역활성 증진, 항암 작용 등의 효능을 가지고 있다. 특히 동물에게 먹이는 경우, 사료의 소화식이를 돕고, 면역력을 강화시켜 생균제로서 많이 사용되고 있다.

- <13> 또한, 항바이러스 효능이 있는 유산균도 많이 보고되어 있는데, 이러한 유산균들은 체내에서 면역활성의 증진과 함께 직접적으로 바이러스의 감염을 억제함으로써 바이러스 감염에 대한 효과적인 예방효과를 기대할 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <14> 따라서 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 유해 세균 및 바이러스에 대한 억제효능이 뛰어난 신규한 유산균, 및 이러한 유산균 또는 유산균 배양물을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <15> 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 항균 및 항바이러스 효과를 갖는 신규한 유산균인 류코노스톡 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P) 또는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P)을 제공한다.

- <16> 본 발명은 또한 상기 유산균(들) 또는 유산균(들)의 배양물을 포함하는 항균용, 항바이러스용, 정장용, 생균제용 또는 사료첨가용 조성물과 발효제품을 제공한다.

- <17> 본 발명자들은 채소와 과일로부터 천연적으로 존재하는 유산균들 중 항균력 및 항바이러스 능력이 우수한 유산균들을 새롭게 분리, 동정하였다. 본 발명자들이 새롭게 분리 및 동정한 유산균들은 유해 세균에 대한 항균력이 우수하며, 조류독감 바이러스 등 바이러스에 대한 억제 효능이 우수하여 유해 미생물의 생육 억제 및 조류독감에 대한 예방효과를 기대할 수 있다.

- <18> 이하, 본 발명의 항균 및 항바이러스 효과를 가진 신규한 유산균 및 이를 포함하는 조성물에 대해 보다 상세히 설명한다.

- <19> 본 발명은 항균 및 항바이러스 효과가 뛰어나 생균제용, 항균용, 항바이러스용, 사료용 등의 조성물에 사용되기에 유용한 신규한 유산균인 류코노스톡 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P) 또는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P)를 제공한다.

- <20> 본 발명에 따른 유산균들은 다음과 같은 방법에 의해 분리 및 동정되었다. 본 발명자들은 먼저, 과일 및 채소로부터 유산균 선별 배지를 이용하여 유산균만을 분리하고 이 중에서 항균력이 우수한 균주를 분리하였다(하기 표 3 참조). 그 다음 상기 분리된 균주의 조류독감 바이러스에 대한 항바이러스 효능이 우수한 균주를 4종 분리하였다(하기 표 4 참조).

- <21> 최종 선별된 유산균 4종은 각각 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석을 실시하였다. 그 결과, 본 발명에서 분리한 균주 CLUM0617은 류코노스톡 메센테로이드로, CLUC0620은 류코노스톡 시트레움으로, CLP0611은 락토바실러스 플란타룸으로, CLPC0603은 락토바실러스 파라카제이로 각각 동정되었다. 본 발명자들은 본 발명에서 분리된 균주를 각각 류코노스톡 메센테로이드 CLUM0617, 류코노스톡 시트레움 CLUC0620, 락토바실러스 플란타룸 CLP0611, 및 락토바실러스 파라카제이 CLPC0603이라 명명하고 2006년 9월 18일자로 부다페스트 조약하의 국제기탁기관인 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 361-221 유립빌딩에 소재하는 한국미생물보존센터(KCCM)에 수탁번호 KCCM10771P, KCCM10772P, KCCM10773P 및 KCCM10774P로 각각 기탁하였다.

- <22> 본 발명에서 처음으로 분리 및 동정된 유산균 CLUM0617, CLUC0620, CLP0611, 및 CLPC0603은 다음과 같은 특성을 지닌다.

- <23> 첫째, 본 발명에 따른 유산균들은 유해 미생물을 억제하는 효능을 가지며(하기 표 3 참조), 10% 농도로 처리했을 경우 조류독감 바이러스를 억제하는 효과를 나타낸다(하기 표 4 참조).

- <24> 둘째, 본 발명에 따른 유산균들은 혼합배양이 가능하며, 그 혼합배양액은 2.5% 이상의 희석농도에서 유해미생물들의 성장을 억제하는 효능을 가진다(하기 도 3 참조). 본 발명에 따른 신규 유산균으로 성장이 억제될 수 있는

유해 미생물로는 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*E. coli*), 클레브시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 엔테로박터 크로아세(*Enterobacter cloacae*) 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다(하기 표 8 참조).

- <25> 셋째, 본 발명에 따른 유산균의 혼합배양액은 조류독감바이러스에 대해 높은 저해효능을 나타내어 우수한 항바이러스 효능을 가진다(하기 표 9 참조). 본 발명의 실시예에서는 조류독감 바이러스인 H9N2를 대상으로만 항바이러스 효능을 확인하였지만, 조류독감 바이러스와 비슷한 기작으로 활동하는 바이러스에 대해서도 억제 효능을 가짐을 유추해 볼 수 있다.
- <26> 상기 본 발명에 따른 유산균 CLUM0617, CLUC0620, CLP0611 및 CLPC0603은 통상적인 락토바실러스 속 미생물의 배양법에 의해 대량으로 배양할 수 있다. 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, MRS 액체 배지 및 우유가 첨가된 액체 배지를 사용할 수 있다. 배양은 통상의 유산균 배양 조건으로 수행할 수 있으며, 예를 들어 약 15-45℃에서 약 10-72시간 동안 배양할 수 있다. 배양액 중의 배양배지를 제거하고 농축된 균체만을 회수하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자의 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동하거나 냉동건조하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.
- <27> 또한, 본 발명에 따른 미생물은 당업계에 공지된 통상적인 물리화학적 돌연변이 방법 등에 의해 이와 동등한 활성을 가지거나 또는 이보다 우수한 활성을 가지도록 개선 또는 개량될 수 있다.
- <28> 한편, 본 발명의 CLUM0617, CLUC0620, CLP0611 및 CLPC0603은 유해 세균에 대한 저해효능이 우수하고, 항바이러스 효능이 있어서 동물의 건강증진을 위한 정장용 조성물, 생균제, 항균용 조성물 및 항바이러스용 조성물의 형태로 제공될 수 있다.
- <29> 상기 '정장용'이란 동물의 장내 세균총의 이상 발효에 의하여 야기되는 제반증상을 치료 및 개선하는 용도를 말한다. 상기 증상으로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 유해 미생물에 의한 감염성 설사, 위장염, 염증성 장질환, 신경성 장염 증후군, 소장 미생물 과성장증, 장 급이성 설사 등이 포함된다.
- <30> 상기 '생균제'는 살아 있는 균 즉, 동물이 섭취했을 때 위장관에 머물러 생존할 수 있는 미생물로서 특정 병리상태를 예방하거나 치료할 수 있는 효과가 있는 미생물 제제를 말한다. 일반적으로 생균제는 장내 세균총의 이상 발효에 의하여 야기되는 제반 증상을 치료하고 개선하는 효과가 있으며 체내에 투여되면 장내의 소화관 벽에 밀집, 정착하여 유해 미생물이 정착하지 못하게 하는 작용을 하고 유산을 생성하여 장내 pH를 낮추어서 유해 미생물의 증식을 억제한다. 또한, 투여된 생균제는 영양분의 흡수를 담당하는 장용모의 활동을 도와주는 역할을 수행한다.
- <31> 상기 '항균용' 또는 '항바이러스용'이란 유해 세균 또는 유해 바이러스의 생육을 저해 또는 억제하는 활성을 말한다. 바람직하게는 상기 유해 미생물로는 생체 내 소화기관에 존재하면서 소화기관과 관련된 여러 질환을 유발하는 미생물일 수 있다.
- <32> 상술한 조성물들은 본 발명에 따른 유산균의 파쇄된 세포벽 분획, 생균, 사균, 건조균 또는 이의 배양물을 유효 성분으로 함유할 수 있으며, 적합한 부형제 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 배양물은 본 발명에 따른 유산균을 적합한 액체 배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 균주를 제거한 여액(여과액 또는 원심분리한 상등액), 상기 배양액을 초음파 처리하거나 상기 배양액에 용해효소(lysozyme)를 처리하여 수득한 세포 파쇄액 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- <33> 또한, 상기 조성물은 당업계에 공지된 방법에 따라 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 유산균 또는 이의 배양물은 약제학적 분야에서 통상적으로 사용되는 담체와 혼합하여 정제(tablet), 트로키(troche), 캡슐(capsule), 엘릭시르(elixir), 시럽(syrup), 산제(powder), 현탁제(suspension), 과립제(granule) 등의 형태로 제조되어 투여될 수 있다. 상기 담체로는 예를 들어, 이에 한정되지는 않으나 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료가 포함된다.
- <34> 예를 들어, 산제는 본 발명의 유산균과 유당, 전분, 미결정셀룰로오스 등 약제학적으로 허용되는 적당한 부형제를 단순 혼합함으로써 제조될 수 있다. 과립제는 본 발명의 유산균; 약제학적으로 허용되는 적당한 부형제; 및 폴리비닐피롤리돈, 히드록시프로필셀룰로오스 등의 약제학적으로 허용되는 적당한 결합제를 혼합한 후, 물, 에탄올, 이소프로판올 등의 용매를 이용한 습식과립법 또는 압축력을 이용한 건식과립법을 이용하여 제조될 수 있다.

다. 또한 정제는 상기 과립제를 마그네슘스테아레이트 등의 약제학적으로 허용되는 적당한 활택제와 혼합한 후, 타정기를 이용하여 타정함으로써 제조될 수 있다.

- <35> 상기 조성물의 투여방법으로는 경구투여 방법 또는 정맥내, 근육내, 피하, 국소, 설하, 비강내, 복강내, 직장내 등을 포함하는 다양한 비경구적 방법에 의해 투여될 수 있다.
- <36> 또한, 투여 용량은 체내에서의 활성성분의 흡수도, 불활성율, 배설속도, 피투여자의 연령, 성별, 상태, 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택할 수 있다. 생균제용 조성물의 경우에는 조성물 내 생균수가 1×10^5 내지 1×10^{11} cells/g, 바람직하게는 1×10^6 cells/g 이상이 되도록 투여할 수 있다.
- <37> 또한, 본 발명에 따른 CLUM0617, CLUC0620, CLP0611, CLPC0603 또는 이의 개별 혹은 혼합배양물은 사료 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 상기 사료 조성물은 기존 항생제의 대체용으로 사용되어 장내 유해균의 생육을 억제하며 장내 균총을 안정되게 유지하여 가축의 건강상태를 양호하게 하여 가축의 증체량과 육질을 개선시키고 산유량 및 면역력을 증가시킬 수 있다. 본 발명의 사료 조성물은 이에 한정되지는 않으나 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태, 사일리지(silage) 등의 형태로 제조될 수 있다. 상기 발효사료는 본 발명의 유산균과 여러 가지 미생물 또는 효소를 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 상기 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 유산균을 혼합하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 펠렛 형태의 사료는 상기 발효사료 또는 배합사료를 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일리지는 청예사료를 본 발명의 유산균으로 발효시킴으로써 제조할 수 있다.
- <38> 또한, 상기 본 발명에 따른 조성물들은 본 발명의 유산균과 함께 동물이 섭취하기에 적합하고 섭취시 유해 미생물의 생육을 억제하며 장내 균총의 균형을 개선시키는 활성을 가지는 다른 종류의 공지된 미생물을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 미생물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 락토바실러스 사케(*Lactobacillus sake*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 락토바실러스 아리멘타리우스(*Lactobacillus alimentarius*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 등을 들 수 있다.
- <39> 기타, 본 발명의 유산균 또는 이의 배양물은 유해 세균 또는 바이러스의 성장을 억제하기 위하여 식품, 화장품, 의약품 등에 첨가제로 사용될 수 있다.
- <40> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위하여 하기 실시예 등을 들어 설명한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며 본 발명의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석해서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 본 발명의 구체적 이해를 돕기 위해 예시적으로 제공되는 것이다.
- <41> <실시예 1> 유산균의 분리 및 항균력 확인
- <42> 항균력 및 항바이러스능이 있는 유산균을 분리하기 위해 야채 및 과일로부터 다양한 종의 유산균을 분리하였다. 분리한 유산균들을 멸균한 하기 표 1의 MRS 액체 배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 이후 배양액을 6000rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 0.22um 필터로 여과하여 배양액을 제조하였다.
- <43> 항균력이 우수한 유산균주를 선별을 위해 제조한 유산균배양액으로 다음과 같은 방법으로 항균력 측정을 하였다.
- <44> 하기 표 2의 항균활성 측정용 지시균들을 각각 Tryptic soy 액체 배지에 접종하여 37℃에서 하룻밤동안 배양하였다. 멸균하여 45℃로 식힌 소프트 아가 배지(0.8% 아가)에 각 지시균 배양액을 1% 접종하였다. 지시균이 접종된 소프트 아가 배지를 일회용 배지접시에 부어 식혀 평판배지를 제조하였다. 제조된 평판 배지 위에 종이 디스크를 올려놓고 종이 디스크에 제조한 유산균 배양액을 100ul씩 점적한 후, 각 지시균의 최적성장온도에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 지시균에 대한 생육억제환(Clear zone)의 지름을 측정함으로써 각 유산균들의 항균활성을 측정하였다.
- <45> 생육억제환의 지름을 비교함으로써 각 균종별로 항균력이 높은 균주를 2종씩 선발하였다. 선발된 균주의 항균활성을 나타내는 저지환의 지름을 표 3에 나타내었다.

표 1

<46>

MRS 액체 배지 성분	함량(g/L)
프로테오스 펩톤	10
비프 추출물	10
효모 추출물	5
포도당	20
트윈 80	1
암모늄 시트레이트	2
소듐 아세테이트	5
황산마그네슘($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1
황산망간($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05
인산칼륨(dibasic)	2

표 2

<47>

균주명	KCTC 번호
<i>Salmonella typhimurium</i>	2514
<i>Staphylococcus aureus</i>	1621
<i>Escherichia coli</i>	2441
<i>Enterobacter cloacae</i>	2361

표 3

<48>

지시균/ 지름(mm)	CLUM0616	CLUM0617	CLUC0620	CLUC0621	CLP0611	CLP0612	CLPC0603	CLPC0604
<i>E. coli</i>	16	14	17	18	17	17	18	16
<i>S. aureus</i>	18	12	11	14	24	25	19	16
<i>S. typhi</i>	15	19	19	20	22	26	24	23
<i>E. cloacea</i>	13	15	13	13	20	19	21	20

<49>

<실시예 2> 선발한 유산균의 항 조류독감 바이러스 효능

<50>

실시예 1에서 선발한 유산균 8종에 대해 다음과 같은 방법으로 항바이러스 효능을 실시하였다.

<51>

공시 바이러스로는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 혈청형 바이러스인 A/chicken/Korea/MS96/1996 (H9N2)를 사용하였다. 바이러스 AIV MS96주를 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.

<52>

10배 희석한 바이러스액(요막강액) 1.0ml를 24ml의 증류수와 섞어 추출물과의 반응용 바이러스를 준비하였다. 10배 희석된 유산균배양액을 2.5ml씩 시험관에 넣고, 준비된 바이러스액 2.5ml를 넣어 혼합한 다음(총 5ml), 4℃에서 정확히 45분간 반응시키며 도중에 10분마다 잘 흔들어 주었다.

<53>

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 판단하고 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

<54> 종별로 항바이러스 효능을 비교하여 최종적으로 CLUM0617, CLUC0620, CLP0611 및 CLPC0603 4가지 균주를 선발하였다.

표 4

<55>

유산균 배양액	처리후의 바이러스 역가 (EID ₅₀)	대조군 대비 바이러스 감소량 (EID ₅₀)
CLUM0616	10 ^{5.0}	10 ^{0.5}
CLUM0617	10 ^{3.5}	10 ^{2.0}
CLUC0620	10 ^{3.5}	10 ^{2.0}
CLUC0621	10 ^{4.0}	10 ^{1.5}
CLP0611	10 ^{2.7}	10 ^{2.8}
CLP0612	10 ^{4.0}	10 ^{1.5}
CLPC0603	10 ^{3.0}	10 ^{2.5}
CLPC0604	10 ^{3.3}	10 ^{2.2}
대조군바이러스	10 ^{5.5}	

<56>

<실시예 3> 선발된 유산균의 동정

<57>

<3-1> 형태학적 분석 및 생화학적 특성

<58>

본 발명의 선발된 유산균들을 MRS 평판 배지에서 배양하고 콜로니의 형태를 현미경으로 관찰하였다. 선발한 유산균의 콜로니 형태는 하기 표 5에 나타내었으며, 생화학적인 특징은 하기 표 6에 나타내었다.

표 5

<59>

	CLUM0617	CLUC0620	CLP0611	CLPC0603
형태	원형	원형	원형	원형
크기	1-1.5mm	0.5-1mm	1-2.5mm	1.5-2.5mm
색	흰색	흰색	흰색	흰색
불투명도	불투명	불투명	불투명	불투명
융기	평평함	평평함	돌출	돌출
표면	매끄러움	매끄러움	매끄러움	매끄러움

표 6

<60>

	CLUM0617	CLUC0620	CLP0611	CLPC0603
그람 염색	양성	양성	양성	양성
세포 형태	구균	구균	간균	간균
호기적 생장	양성	양성	양성	양성
혐기적 생장	양성	양성	양성	양성
카탈라아제	음성	음성	음성	음성
포자 형성	음성	음성	음성	음성
운동성	음성	음성	음성	음성

<61>

<3-2> 당 발효 특성 분석

<62>

본 발명에 따른 유산균의 당 발효 특성을 조사하였다. 당 발효 특성은 API 50 CHL 키트(Bio Merieux사)를 이용하여 공급회사의 실험방법에 따라 조사하였으며, 그 결과는 하기 표 7에 나타내었다. 당 발효 특성 분석 결과, CLUM0617은 류코노스톡 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides/dextranicum*)와 젠티오바

이오스 이용성에서 차이를 보이며 99.5%의 동정확률을 나타내었다. CLUC0620은 류코노스톡 시트레움 (*Leuconostoc citreum*)과 D-자일로스, D-만노오스, 2 케토-글루코네이트 및 5 케토-글루코네이트 이용성에서 차이를 보였으며, 72.0%의 동정확률을 나타내었다. CLP0611은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)과 99.9%의 동정확률을 나타내었으며, CLPC0603은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*)와 락토오스 이용성에서 차이를 보이고, 92.1%의 동정확률을 나타내었다.

표 7

<63>

당	CLUM0617	CLUC0620	CLP0611	CLPC0603
글리세롤	-	-	-	-
에리스리톨	-	-	-	-
D-아라비노스	-	-	-	-
L-아라비노스	+	+	+	-
리보스	+	-	+	+
D-자일로스	+	+	-	-
L-자일로스	-	-	-	-
아도니톨	-	-	-	-
메틸-자일로사이드	-	-	-	-
갈락토오스	+	-	+	+
D-글루코오스	+	+	+	+
D-프럭토오스	+	+	+	+
D-만노오스	+	+	+	+
L-소르보스	-	-	-	+
람노스	-	-	-	-
둘시톨	-	-	-	-
이노시톨	-	-	-	-
만니톨	-	+	+	+
솔비톨	-	-	+	+
메틸-D-만노사이드	-	-	+	-
메틸-D-글루코사이드	+	+	-	+
N-아세틸 글루코사민	+	+	+	+
아미그달린	+	+	+	+
알부틴	+	+	+	+
에스쿨린	+	+	+	+
살리신	+	+	+	+
셀로바이오스	+	+	+	+
말토오스	+	+	+	+
락토오스	-	-	+	-
멜리바이오스	+	-	+	-
수크로오스	+	+	+	+
트레할로스	+	+	+	+
이눌린	-	-	-	+
멜레지토스	-	-	+	+
D-라피노오스	+	-	+	-
스타치	-	-	-	-
글리코겐	-	-	-	-
자일리톨	-	-	-	-
젠티오바이오스	+	+	+	+
D-투라노오스	+	+	+	+
D-라이소스	-	-	-	-
D-타가토스	-	-	-	+
D-푸코스	-	-	-	-
L-푸코스	-	-	-	-

D-아라비톨	-	-	-	-
L-아라비톨	-	-	-	+
글루코네이트	+	+	+	+
2 케토-글루코네이트	-	+	-	-
5 케토-글루코네이트	±	+	-	-

<64> 상기 표 7에서, +는 발효함을 의미하고, -는 발효하지 않음을 의미한다.

<65> <3-3> 16S rDNA 분석

<66> 선발된 4종의 유산균을 동정하기 위해 16S rDNA 염기서열분석을 실시하였으며 그 결과는 각각 서열번호 1 내지 4에 나타내었다. 본 발명의 유산균 CLUM0617은 류코노스톡 메센테로이드와 99.4%의 16S rDNA 상동성을 보였으며, CLUC0620은 류코노스톡 시트레움과 99.7%의 상동성을, CLP0611은 락토바실러스 플란타룸과 99.7%의 상동성을, CLPC0603은 락토바실러스 파라카제이와 99.8%의 상동성을 보였다. 본 발명자들은 이상의 실험 결과를 기초하여 본 발명에서 분리된 균주 CLUM0617은 류코노스톡 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*), CLUC0620은 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*), CLP0611은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), CLP0603은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*)임을 확인하였다. 따라서, 본 발명자들은 본 발명에서 분리된 균주들을 2006년 9월 18일자로 부다페스트 조약하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터에 수탁번호 KCCM10771P, KCCM10772P, KCCM10773P 및 KCCM10774P로 기탁하였다.

<67> <3-4> 선발된 유산균주의 배양특성

<68> 최종 선발된 유산균 4종을 각각 멸균된 MRS broth에 접종하여 30℃에서 정치배양 하면서 균수와 pH의 변화를 확인하였다. 각 균주의 성장곡선은 각각 도 1 내지 4에 나타내었다.

<69> <실시예 4>

<70> <4-1> 혼합유산균 배양액의 제조

<71> 상기 실시예 2에서 최종 선발된 유산균 4종에 대해 혼합배양을 실시하였다. 선발된 4종의 유산균을 각각 멸균된 MRS broth에 접종하여 30℃에서 16시간 동안 종균배양을 한 후, 이 종균배양액을 각각 1%씩 멸균된 MRS broth에 혼합접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양액을 6000rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 0.22um 필터로 여과하여 배양액을 제조하였다.

<72> <4-2> 혼합유산균배양액의 항균 활성

<73> 실시예 4-1에서 제조한 배양액의 항균활성을 측정하기 위해 다음과 같은 방법으로 MIC 시험을 하였다. 하기 표 8의 지시균을 각각 영양 액체 배지에 접종하여 37℃에서 16시간 전배양 후, 전배양액을 새로운 영양 액체 배지에 1%씩 접종하였다. 지시균이 접종된 배지 80ul와 증류수에 희석한 혼합유산균배양액 20ul를 섞어 96웰 플레이트의 각 웰에 분주하였다. 이 플레이트를 37℃에서 배양한 후 600nm에서 OD값을 측정하여 혼합유산균배양액의 지시균 성장억제 농도를 확인하였다(도 5 참조). 그 결과 2.5% 이상의 희석농도에서 모든 지시균에 대한 성장억제 효과를 확인할 수 있었다.

표 8

<74>

지시균의 균주명	KCTC 번호
<i>Salmonella typhimurium</i>	2514
<i>Staphylococcus aureus</i>	1621
<i>Escherichia coli</i>	2441
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2208
<i>Bacillus cereus</i>	3624
<i>Enterobacter cloacae</i>	2361

<75> <4-3> 혼합유산균배양액의 항 조류독감바이러스 효능

<76> 실시예 4-1에서 제조한 혼합유산균배양액에 대한 항바이러스 효능을 평가하였다. 평가방법은 상기 실시예 2와

같은 방법을 사용하였으며 그 결과는 하기 표 9에 나타내었다. 혼합유산균배양액의 처리결과 처리 후의 바이러스 역가가 $10^{0.0}$ 이 됨으로써 매우 높은 항바이러스 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

표 9

혼합유산균배양액의 항바이러스 효능

시료	처리후의 바이러스 역가 (EID ₅₀)	대조군 대비 바이러스 감소량 (EID ₅₀)
혼합유산균배양액	$10^{0.0}$	$10^{5.5}$
대조군바이러스	$10^{5.5}$	

발명의 효과

본 발명은 항균 및 항바이러스 효과를 가진 신규 유산균, 및 이러한 유산균 및/또는 유산균 배양물을 함유하는 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 유산균, 유산균 배양물 또는 조성물은 항균 및 항바이러스 효과가 있어 사료, 식품, 화장품, 의약품 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 류코노스톡 메젠테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) CLUM0617 (수탁번호: KCCM10771P)의 성장곡선을 나타내는 그래프이다.

도 2는 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) CLUC0620 (수탁번호: KCCM10772P)의 성장곡선을 나타내는 그래프이다.

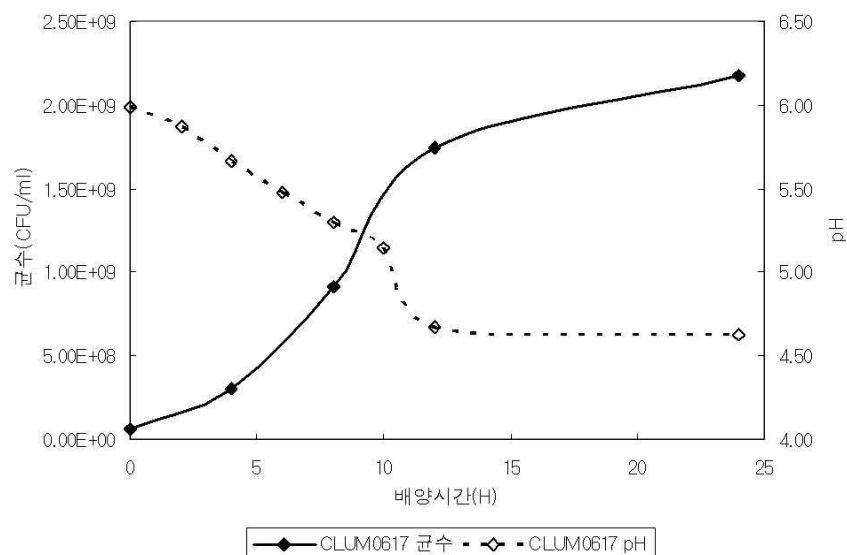
도 3은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CLP0611 (수탁번호: KCCM10773P)의 성장곡선을 나타내는 그래프이다.

도 4는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) CLPC0603 (수탁번호: KCCM10774P)의 성장곡선을 나타내는 그래프이다.

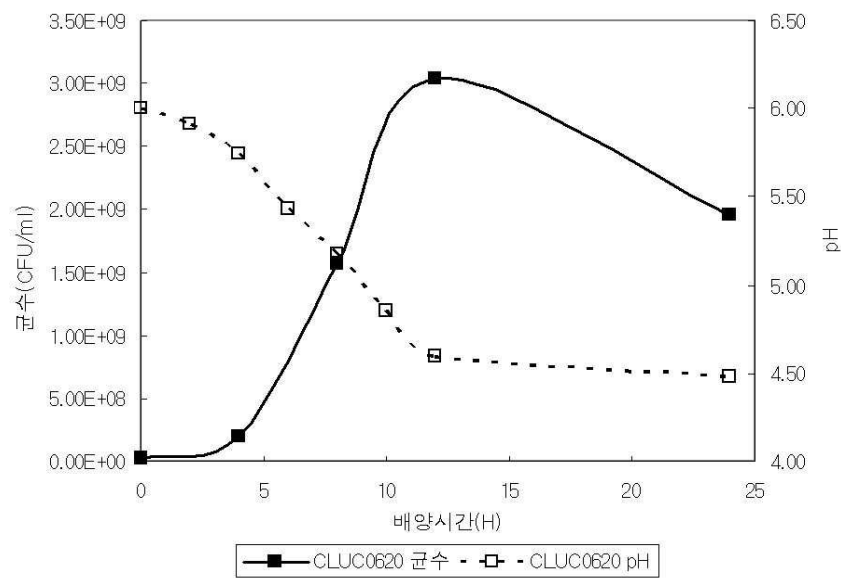
도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 혼합유산균배양액의 항균 활성을 나타내는 그래프이다.

도면

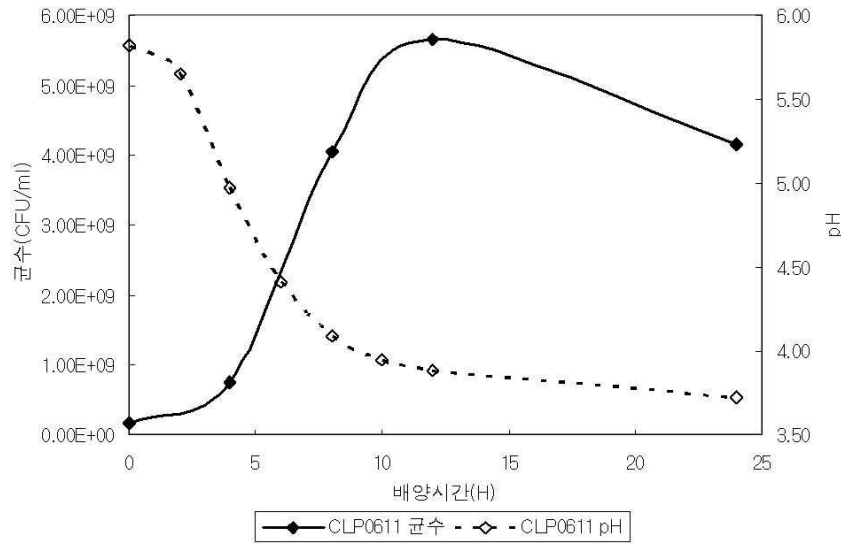
도면1



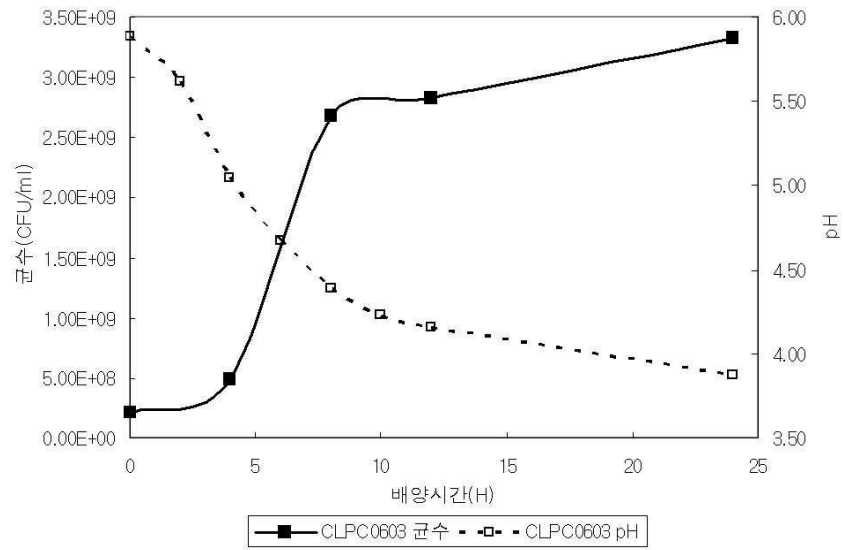
도면2



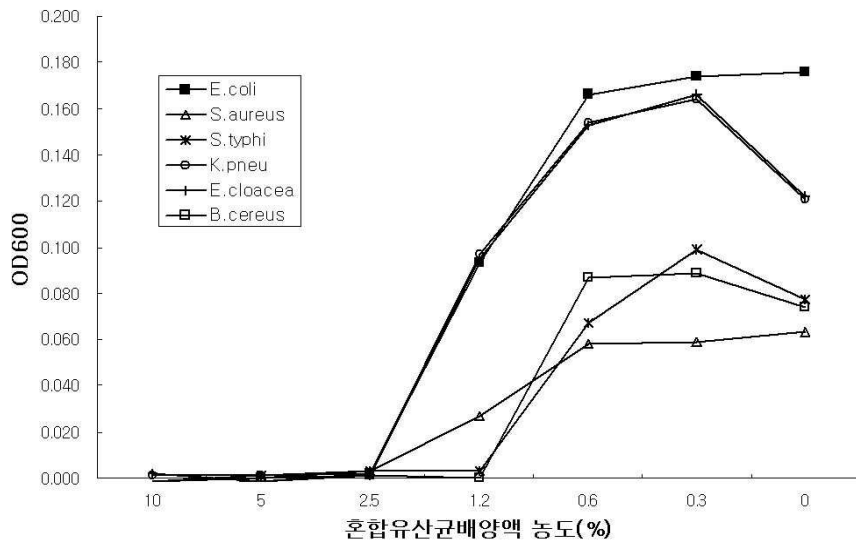
도면3



도면4



도면5



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)