

명세서

발명의 명칭: 항바이러스 및 면역조절 효능을 가지는 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 및 이를 포함하는 조성물

기술분야

- [1] 본 출원은 내산성, 내담즙성 및 면역 증강 활성을 갖는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) CJLP17 균주에 관한 것으로, 구체적으로 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 조성물, 사료 첨가제 및 기능성 식품 등에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 현재 축산업계에서는 전염성이 높은 바이러스성 질환으로 인해 가축들이 폐사하고, 이로 인한 농가의 경제적 피해가 발생하는 경우가 많다. 특히 양돈 산업에서 4대 만성 소모성 질환인 돼지호흡기복합증후군(porcine respiratory disease complex), 이유후 전신소모성 증후군(Postweaning multisystemic wasting syndrome), 돼지 생식기 호흡기 증후군(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome), 및 돼지 유행성 설사병(Porcine epidemic diarrhea)과 같이, 바이러스와 세균에 의한 감염성 질환들에 의해 막대한 경제적 손실이 초래되고 있는 상황이다.
- [4] 이 중 돼지 유행성 설사병은 코로나바이러스과(corona virus family)에 속하는 돼지유행성설사바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)의 감염에 의해 발생하는 돼지 소화기성 질병이다. 상기 바이러스는 소장과 대장의 용모세포에서 증식하며 모든 일령의 돼지, 특히 자돈에서 급성 장염, 구토, 수양성 설사를 유발한다. 특히 11월부터 4월까지, 주로 동절기에 피해가 심각한데, 생후 1주일 이내의 포유자돈 폐사율은 약 50% 수준으로 나타나며, 심할 경우에는 극심한 탈수로 인해 폐사율이 거의 100%까지 나타나는 것으로 알려져 있다.
- [5] PED 바이러스는 1971년 유럽에서 처음 관찰되었으며(Oldham J., Letter to the editor. Pig Farming, 1972, 10:72-73), 1976년 벨기에에서 G1a type PEDV CV777이 추가적으로 검출 및 분리되었고 (Pensaert MB et al., A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch Virol., 1978, 58:243-247), 80년대 유럽에서 유행 하다가 90년대 중국, 한국, 일본, 대만 등 동아시아 지역에서 발생 하였다. 또한, 상기 G1a type보다 병원성이 높은 G2b type PEDV가 2010년 중국을 시작으로 발생하였다. 상기 신종 type의 PEDV는 북미지역(미국, 캐나다)뿐만 아니라 동남아시아, 유럽까지 발병하여 큰 피해를 입히고 있다 (Song D. et al., Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines, Virus Genes, 2012, 44:167-175). 2013년 기준으로 미국

양돈산업에서 생산성 손실로 인해 한화 약 2조 2,000억원의 피해가 발생하였으며, 우리나라에서는 현재 연간 20~40%의 농가에서 매년 발생되어, 이로 인해 전체 자돈의 6%가 폐사되는 것으로 보고 되고 있다. 또한, 도축장 출입 차량의 감염율이 약 60%에 달하는 것으로 보고되고 있다 (한국농촌경제연구원, 한국양돈수의사협회).

[6]

[7] 현재까지 G2b type PED 바이러스에 대한 근본적인 예방은, 철저하게 소독하는 방법이 유일하다. 많은 농장에서 바이러스 질환에 따른 피해를 예방하기 위해 인공감염법을 이용하거나 기존 G1a type PEDV 백신을 접종하고 있으나, G2b type PEDV 감염을 예방하는 데에 한계를 가지고 있다. 이러한 문제를 보완하기 위해 PED 바이러스 예방(백신 등) 및 치료(IgY, 정유(Essential oil), 유기산, 프로바이오틱스 등)용 제제의 개발이 활발하게 이루어지고 있으며, 근래에는 특히 항바이러스 효과를 가지면서 생체 내 면역계를 자극하는 기능성 소재를 이용하여 면역을 증진시키는 방법이 연구되고 있다.

[8]

[9] 면역은 일반적으로 선천성면역(Innate immunity)과 후천성면역(Adaptive immunity)으로 나눌 수 있다. 선천성면역은 병원체 감염을 제 1선에서 즉각적으로 방어하는 체계로, 직접적인 침입 인자(항원)에 작용하거나 후천성 면역을 유도한다. 후천성 면역은 보다 더 복잡하고 정밀한 체계로 침입인자를 인지하여 제거하거나, 해당 침입 인자에 대한 기억 등의 작용을 하여 선천성면역에 비해 더욱 영구적인 면역 작용을 한다. 선천성면역과 관련된 항원제시세포(Antigen-presenting cells)인 수지상세포 (Dendritic cells, DCs), 대식세포(Macrophages), 자연살해세포(natural killer cells) 등이 직접적인 선천 면역 작용을 하고, 여러 종류의 T세포 활성을 돕는 수용체를 가지고 있으며, 이를 통해 사이토카인(cytokines)을 분비한다. 후천성면역은 체내에 침입한 항원에 대한 2차 방어체제로, B림프구, T림프구에 의해 나타나는 특이적 면역반응이다. 항원에 의해 활성화된 T세포의 면역반응은 세포독성 T세포 반응(Cytotoxic T cell), 도움 T세포(Helper T cell, Th) 반응 등이 있다. 이러한 T세포의 전구체 역할을 하는 Naive CD4 T 세포는 IL-12(interleukin-12)을 분비하며, 세포 내 침입물질(intracellular pathogen)을 퇴치하는 CTL(Cytotoxic T lymphocyte) 반응을 유도하거나, IL-4(interleukin-4)를 분비하여 세포 밖 침입물질을 특이적으로 퇴치하는(B 세포의 항체 분비) 반응을 유도한다. 또한, 염증반응 같은 과도한 면역반응을 억제하기 위해 TGF-beta(Beta transforming growth factor)를 분비하거나, TGF-beta와 IL-6(interleukin-6) 등의 분비로 B 세포를 플라즈마 세포로 변형시켜 항체 생성을 촉진하거나, 잘못된 자가면역과 세포 밖 침입물질들을 퇴치하는 면역 반응(Th17)을 유도하는 등, 정교하고 복잡한 과정을 거쳐 체내로 침입한 인자들에 대해 적절한 방식으로 대응한다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 상기와 같은 바이러스에 억제 활성을 나타내면서도 면역계를 활성화 할 수 있는 신규한 미생물을 분리 및 동정하여 이의 활성을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 출원의 하나의 목적은, 내산성, 내담즙성 및 면역 증강 활성을 갖는, 기탁번호 KCCM12249P로 기탁된 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) CJLP17 균주를 제공하는 것이다.
- [14] 본 출원의 다른 하나의 목적은, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 사료 첨가제를 제공하는 것이다.
- [16] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 기능성 식품을 제공하는 것이다.

[17]

발명의 효과

- [18] 본 출원의 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 내산성, 내담즙성이 우수하여 프로바이오틱스로 제공 가능하며, 생체 내 면역 세포를 활성화하여 면역 기능을 조절 가능하고, 특히 돼지유행성설사바이러스에 대해서도 우수한 감염 억제 활성을 나타낸다. 또한, 본 출원의 락토바실러스 플란타럼 CJLP17을 가축에 경구 투여할 경우 면역 조절 효과를 통해 설사 발생율을 현저히 낮출 뿐만 아니라, 일당 증체량이 개선되는 효과를 나타내었다. 따라서, 본 출원은 PEDV에 대한 항바이러스 활성, 면역 증진 활성, 증체량 개선 효과 및 가축의 설사 발생을 감소 효과를 갖는 신규한 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주를 제공할 수 있으며, 상기 균주는 약학 조성물, 식품 조성물, 또는 사료 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

[19]

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은, CJLP17의 전자현미경 사진을 나타낸 것이다.
- [21] 도 2는, 균주의 용혈성 여부를 확인한 혈액한천평판배지 사진을 나타낸 것이다.
- [22] 도 3은, CJLP17의 세포 독성 여부를 확인한 그래프이다.
- [23] 도 4는, 돼지 비장세포(그래프에서 Spln으로 표기)와 말초혈액 단핵구(그래프에서 PBMC로 표기)를 배양한 후, IL-12의 분비를 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.
- [24] 도 5는, 돼지 비장세포(그래프에서 Spln으로 표기)와 말초혈액

단핵구(그래프에서 PBMC로 표기)를 배양한 후 IL-10의 분비를 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

[25] 도 6은, 장간막(그래프에서 mLM 으로 표기)과 폐이어판 세포(그래프에서 PP로 표기)를 배양한 후 TGF-beta의 분비를 측정하여 음성 대조군 대비 증가량 (pg/ml)을 나타낸 그래프이다.

[26] 도 7은, 락토바실러스 플란타럼 CJLP17에 의해 PED 바이러스 감염 억제 효과를 나타낸 현미경사진이다.

[27] 도 8은, CJLP17의 경구투여가 이유자돈의 평균 일당증체량(mean value of ADG)에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[28] 도 9는, CJLP17의 경구투여가 이유자돈의 설사율에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[29]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[30] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[31]

[32] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는 내산성, 내담즙성 및 면역 증강 활성을 갖는, 기탁번호 KCCM12249P로 기탁된 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) CJLP17 균주를 제공한다.

[33] 본 출원에서 용어 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 자연계에 널리 분포하는 호기성, 또는 통성 혐기성의 그람 양성 간균 속 미생물이다. 락토바실러스 속에 속하는 미생물에는 락토바실러스 플란타럼 등이 있다. 본 발명자들은 락토바실러스 플란타럼에 속하는 신규한 균주를 기탁번호 KCCM12249P 로 기탁하여 제공한다. 이는 프로바이오틱스 균주에 해당하며, 인체에 무해하며, 부작용 없이 사용될 수 있다.

[34] 본 출원에서 용어 '프로바이오틱스'는 체내에 들어가서 건강에 좋은 효과를 주는 살아있는 균을 말한다. 현재까지 알려진 대부분의 프로바이오틱스는 락토바실러스 등의 유산균을 이용하여 만들어진 발효유 제품으로 섭취되어 왔으나 최근에는 락토바실러스 이외에 비피도박테리움, 엔테로코커스와 같은 일부 균주 등을 포함한 발효유, 과립, 분말 등의 형태로 판매되고 있다.

[35] 본 출원에서 용어 '내산성' 높은 산도에 견디는 성질을 말한다. 프로바이오틱스가 내산성을 가질 경우, 경구를 통해 섭취되어 위장 내 강한 산성 조건에 노출되더라도 분해되거나 손상되는 경우를 방지할 수 있다.

[36] 본 출원에서 용어 '내담즙성'은 담즙 내 소화 효소에 대한 저항성을 말한다. 담즙은 간에서 만들어져서 쓸개에 저장되었다가 작은창자 내부의 샘창자에서

지방의 소화작용을 돕는 약 알칼리성의 녹색색 액체로, 지방질을 유화하여 소화, 흡수를 돕는 다양한 효소들을 포함하고 있다. 이러한 담즙은 경구를 통해 섭취된 프로바이오틱스에 대해서도 작용함에 따라 프로바이오틱스 투여 효과를 감소시키는 주요 원인 중 하나에 해당한다.

[37]

[38] 구체적으로 본 출원의 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 돼지 유행성 설사 바이러스가 발생한 국내 농장의 모돈, 자돈의 분변 및 초유로부터 분리하여 얻은 것이다. 본 출원의 균주의 형태학적 특징은 그람 양성 간균이며, 서열번호 1의 16s rDNA 염기서열을 가진다. 상기 염기서열을 분석한 결과 락토바실러스 플란타럼과 99% 상동성을 가지고 있었다. 이에 본 발명자들은 신규 분리한 락토바실러스 플란타럼 CJLP17을 2018년 4월 13일 한국 미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 기탁번호 KCCM12249P으로 기탁하였다.

[39] 본 출원의 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 장기간 안정적으로 보존하기 위하여, 물에 글리세롤 성분을 일정량 혼합하여 만든 보관용액에 균체를 풀어 -70°C에서 보관하거나 멸균된 10% 탈지유에 현탁하여 동결건조할 수 있다.

[40]

[41] 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 갖는 것일 수 있다.

[42] 본 출원에서 용어 "항균"은 병원성 미생물을 포함하는 균의 생육 또는 증식을 억제하여 균의 감염을 예방 또는 치료하는 활성을 의미한다.

[43] 본 출원에서 '병원성 미생물(pathogenic microorganism)'이란 인체에 기생함으로써 질환을 일으키는 미생물을 의미한다. "병원성"은 병원체가 기주에 감염되어 질병을 일으키는 능력을 의미하며, 세균 또는 효모의 침투성, 증식성 및 독소생산성 등을 총칭할 수 있다. 상기 병원성 미생물의 예시로서, 대장균(*E. coli*), 장독성대장균(*Enterotoxigenic E. coli*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 및 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 병원성 미생물을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[44] 본 출원의 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 가지나, 일반적인 모든 락토바실러스 속 미생물이 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 가지는 것은 아니다.

[45]

[46] 본 출원의 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 적혈구에 대한 용혈성을 나타내지 않는 것일 수 있다. 용혈이란 적혈구가 파괴되어 헤모글로빈이 외부로 유출하는 것을 말하며 생체내 유해균으로부터 생산된 효소에 의해 적혈구가 용혈되는 작용이다. 따라서, 상기 CJLP17이 생체 내 투여되더라도, 혈관 내에서 용혈 현상을 유발하지 않는 안정한 미생물에 해당한다.

[47] 또한 본 출원의 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 항생제에 대한 내성이

약하거나 없는 것일 수 있다. 상기 항생제는 구체적으로 암피실린, 클린다마이신, 겐타마이신, 카나마이신, 에리트로마이신, 암피실린/설박탐, 클로람페니콜, 또는 스트렙토마이신일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 따라서, 상기 CJLP17을 의약품, 건강기능식품, 사료 첨가제 등으로 사용하더라도, 항생제에 대한 내성이 없으므로, 그에 따른 약리 효과나 환경적 문제가 발생할 가능성이 낮다.

- [48]
- [49] 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 면역 세포의 활성화를 촉진하여 사이토카인의 분비량을 증가시키거나, 생체 내에 투여되어 면역 기능을 촉진하는 것일 수 있다.
- [50] 상기 '면역 세포'란 생체 내 면역 기능에 관여하는 모든 세포를 의미하며, 크게 T 세포와 B 세포로 나눌 수 있다. 상기 면역세포에는 Th1 또는 Th2 세포가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 출원의 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 면역 세포를 자극하여 IL-12, IL-10 및/또는 TGF-beta와 같은 사이토카인의 분비량을 증가시키는 활성을 가질 수 있다.
- [51] 일반적으로 높은 폐사율을 보이는 바이러스성 질병에서는, 바이러스에 의한 세포나 조직 자체의 괴사로 인하여, 다른 균주의 2차 감염 및 패혈증, 과도하게 활성화된 면역 반응으로 야기된 염증 질환, 또는 식욕저감 및 탈수증이 발생하고 있다. 따라서 바이러스 감염을 억제하는 항바이러스 효능(Th1, Th2 관련)과, 2차 감염과 과도한 염증 반응을 조절해 주는 면역 반응(Th2, Antiinflammation)이 동시에 증강될 경우, 효과적인 바이러스성 질병의 예방 및 치료 효과를 이끌어낼 수 있다. 이처럼 프로바이오틱스를 통한 면역 증강 효능에 있어서 Th1과 Th2를 동시에 증강시키는 균주는 공지되어 있지 않으며, 본 발명자에 의해 새롭게 규명되었다.
- [52] 상기 사이토카인은 신체 방어체계를 제어하고 자극하는 신호 물질로 사용되는 당단백질을 의미하며, 예시적으로 IL-12, IL-10 또는 TGF-beta일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [53]
- [54] 상기 균주는 가축에 대한 경구 투여시 가축 성장을 촉진하거나, 설사 발생율을 감소시키는 것일 수 있다.
- [55] 상기 균주는 돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV)에 대한 항바이러스 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [56] 상기 돼지 유행성 설사 바이러스는 돼지의 소장 세포를 감염시키는 코로나 바이러스로서 심한 설사 및 탈수증이 유발되는 돼지 유행성 설사병을 유발한다. 본 출원의 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 처리할 경우, 상기 돼지 유행성 설사 바이러스의 활성 및 감염이 현저하게 억제될 수 있으므로, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 조성물은 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물,

또는 돼지 유행성 설사병의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 예방 또는 개선용 건강기능식품, 의약외품, 또는 사료 조성물로 활용될 수 있다.

- [57]
- [58] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 균주의 배양물, 그의 농축액, 또는 그의 건조물을 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 균주에 관한 보다 상세한 사항은 전술된 내용을 참조할 수 있다.
- [59] 본 출원의 신규 분리한 균주는 통상적인 락토바실러스 균주의 배양방법을 통해 배양할 수 있다. 배지로는 천연배지 또는 합성배지를 사용할 수 있다. 배지의 탄소원으로는 예를 들어, 글루코오스, 수크로오스, 텍스트린, 글리세롤, 녹말 등이 사용될 수 있고, 질소원으로는 펩톤, 육류 추출물, 효모 추출물, 건조된 효모, 대두, 암모늄염, 나이트레이트 및 기타 유기 또는 무기 질소 함유 화합물이 사용될 수 있으나, 이러한 성분에 한정되는 것은 아니다. 배지에 포함되는 무기염으로는 마그네슘, 망간, 칼슘, 철, 칼륨 등이 사용될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 상기 탄소원, 질소원 및 무기염의 성분 이외에 아미노산, 비타민, 핵산 및 그와 관련된 화합물들이 배지에 첨가될 수 있다. 본 출원의 신규 분리한 균주의 배양온도 조건은 20~40°C의 온도 범위에서 12시간에서 4일간 배양할 수 있다.
- [60] 구체적으로 신규 분리한 균주의 배양액은 균체를 포함한 배양 원액일 수 있으며, 또한 배양 상등액을 제거하거나 농축한 균체일 수 있다. 상기 배양액의 조성은 통상의 락토바실러스 배양에 필요한 성분뿐 아니라, 락토바실러스의 성장에 상승적으로 작용하는 성분을 추가적으로 포함할 수 있으며, 이에 따른 조성은 당업계의 통상의 기술을 가진 자에 의하여 용이하게 선택될 수 있다.
- [61] 또한 균주의 상태는 액상상태 또는 건조상태일 수 있으며, 건조방법은 통풍건조, 자연건조, 분무건조 및 동결건조가 가능하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [62] 상기 조성물에서, 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주의 농도는 이에 제한되지는 않으나, 10^3 CFU/ml 내지 10^8 CFU/ml, 10^4 CFU/ml 내지 10^8 CFU/ml, 10^5 CFU/ml 내지 10^8 CFU/ml, 10^6 CFU/ml 내지 10^8 CFU/ml, 10^3 CFU/ml 내지 10^7 CFU/ml, 10^4 CFU/ml 내지 10^7 CFU/ml, 10^5 CFU/ml 내지 10^7 CFU/ml, 10^6 CFU/ml 내지 10^7 CFU/ml 일 수 있다.
- [63] 상기 조성물은, 동결보호제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 조성물은, 글리세롤, 트레할로스, 말토덱스트린, 탈지분유 및 전분으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 동결보호제; 및/또는 포도당, 텍스트린 및 탈지우유로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 부형제;를 추가로 포함할 수 있다. 본 출원의 동결보호제는 상기 조성물 총 중량에 대하여 0.01 중량% 내지 20 중량%, 0.01 중량% 내지 10 중량% 포함될 수 있고, 구체적으로 상기 글리세롤은 5 중량% 내지 20 중량%, 상기 트레할로스는 2 중량% 내지 10 중량%, 상기 말토덱스트린은 2 중량% 내지 10 중량%, 상기

탈지분유는 0.5 중량% 내지 2 중량%, 상기 전분은 0.1 중량% 내지 1 중량%로 상기 조성물에 포함될 수 있다. 또한, 상기 부형제는 상기 조성물 총 중량에 대하여 75 중량% 내지 95 중량% 또는 85 중량% 내지 95 중량%로 포함할 수 있다.

- [64] 또한, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 균주의 배양물, 그의 농축액, 또는 그의 건조물을 포함하는 조성물을 제조하는 방법은, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 균주의 배양물, 그의 농축액, 또는 그의 건조물과, 첨가제를 혼합하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 첨가제는 전술한 동결보호제 또는 부형제일 수 있다.
- [65]
- [66] 다른 양태로서 본 출원의 신규 분리한 균주 또는 배양물을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제를 제공한다.
- [67] 프로바이오틱스는 장내의 소화관 벽에 정착하여 유해균이 정착하지 못하게 하며, 바이러스의 증식을 억제한다. 또한 프로바이오틱스가 생산하는 유익한 소화효소는 영양소의 흡수와 이용을 용이하게 하여 성장을 촉진시킨다.
- [68]
- [69] 상기 조성물은 식품, 기능성 식품, 사료, 사료 첨가제, 화장료 조성물, 약학적 조성물 및 의약품으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [70] 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 조성물은 병원성 미생물에 대한 항균용인 것일 수 있다. 상기 균주, 병원성 미생물, 항균에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [71] 구체적으로, 상기 병원성 미생물은 대장균(*E.coli*), 장독성대장균(*Enterotoxigenic E. coli*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 및 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [72] 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 조성물은 면역 증강용인 것일 수 있다.
- [73]
- [74] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 사료 첨가제, 또는 사료 조성물을 제공한다.
- [75] 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 구체적으로, 본 출원의 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주를 항균, 성장 촉진, 설사율 감소, 바이러스 활성 억제를 목적으로 사료 첨가제 또는 상기 사료 첨가제를 포함하는 사료 조성물에 첨가할 수 있다.
- [76] 본 출원에서 용어, "사료 첨가제"는 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내섭유소의 소화 이용성 증진, 유질 개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함한다. 본 출원의 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당하며,

탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 페티오닌, 리이산 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

- [77] 출원에서 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분으로, 본 출원에 따른 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계의 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 구체적으로는 농후사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있다.
- [78] 사육 대상은 출원의 사료를 섭취할 수 있는 생명체라면 제한 없이 포함될 수 있으며, 본 출원의 목적상 돼지를 포함할 수 있다.
- [79] 본 출원에 따른 사료 조성물 내 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주의 함량은 적용 가축의 종류 및 연령, 적용 형태, 목적하는 효과 등에 따라서 적절하게 조절 가능하며, 예컨대 0.01 내지 20 중량%로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [80] 본 출원의 사료 조성물은 투여를 위해서 추가로 구연산, 푸마르산, 아디프산, 젖산 등의 유기산; 인산칼륨, 인산나트륨, 중합 인산염 등의 인산염; 폴리페놀, 카테킨, 토코페롤, 비타민 C, 녹차 추출물, 키토산, 탄닌산 등의 천연 항산화제 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항인플루엔자제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 또는 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [81] 또한, 본 출원의 사료 조성물은 보조성분으로 아미노산, 무기염류, 비타민, 항산화제, 항진균제, 항균제 등과 같은 각종 보조제 및 분쇄 또는 파쇄된 밀, 보리, 옥수수 등의 식물성 단백질 사료, 혈분, 육분, 생선분 등의 동물성 단백질 사료, 동물성 지방 및 식물성 지방 같은 주성분 이외에도 영양 보충제, 성장 촉진제, 소화 흡수 촉진제, 질병 예방제와 함께 사용될 수 있다.
- [82] 본 출원의 사료 조성물을 사료 첨가물로 사용할 경우, 상기 사료 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 사료 조성물의 투여 형태는 비독성 제약상 허용 가능한 담체와 조합하여 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 프로필렌 글리콜일 수 있다. 고체형 담체의 경우에는 정제, 산제, 토로키제 등의 투여 형태일 수 있으며 액체형 담체의 경우에는 시럽제, 액체 현탁액제, 에멀전제, 용액제 등의 투여 형태일 수 있다. 또한, 투여제는 보존제, 윤화제, 용액 촉진제, 안정화제를 함유할 수 있으며 다른 염증 질환 개선제 및 바이러스 예방상 유용한 물질을 함유할

수도 있다.

- [83] 본 출원에 따른 사료 조성물은 가축사료에 건조 중량 기준으로 1 kg 당 약 10 내지 500 g, 구체적으로는 10 내지 100 g의 양으로 혼합될 수 있고, 완전히 혼합한 후 매쉬로 공급하거나, 추가 가공 공정을 통하여 펠렛화, 팽창화, 압출 공정을 거칠 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [84]
- [85] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 식품 조성물 또는 기능성 식품을 제공한다.
- [86] 구체적으로, 본 출원의 조성물은 항균 용도, 성장 촉진, 면역 촉진, 설사율 감소, 바이러스 활성화 억제를 목적으로 식품 조성물에 첨가될 수 있다. 락토바실러스 플란타럼 CJLP17에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [87] 본 출원의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강 식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives)등의 모든 형태를 포함하여, 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [88] 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주를 식품 첨가물로 사용할 경우, 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주를 포함하는 원료 조성물 중 0.0001~1 중량%, 구체적으로는 0.001~0.1 중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.
- [89] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [90] 본 출원의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 추가 성분의 비율은 본 출원의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.04 중량부, 구체적으로는 0.02~0.03 중량부일 수 있다.

- [91] 상기 외에 본 출원의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 출원의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 그밖에 본 출원의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 과육의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 출원의 조성물 100 중량부 당 0.01~10 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 이들 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [92]
- [93] 본 출원에서 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주 또는 균주의 배양물, 그의 농축액, 또는 그의 건조물을 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 투여에 의해 본 출원의 대상체에 대하여 조성물의 효능, 즉 병원성 미생물에 대한 항균 활성, 면역 증강 활성 등을 나타낼 수 있다.
- [94] 상기 대상체는 인간을 제외한 또는 인간을 포함한 동물을 포함할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 상기 효능의 발휘가 필요한 모든 동물을 포함할 수 있으며, 구체적으로 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있고, 다른 예시로 애완동물일 수 있다.
- [95] 상기 투여를 위한 투여량은 이에 제한되지는 않으나, 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 기준으로 10^6 CFU/일 이상, 10^7 CFU/일 이상, 10^8 CFU/일 이상, 10^9 CFU/일 이상, 또는 10^{10} CFU/일 이상 투여하는 것일 수 있다.

[96]

발명의 실시를 위한 형태

- [97] 이하, 실시예를 통하여 본 출원의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 출원을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[98]

[99] 실시예 1: 균주 분리 및 선발

[100]

[101] 1-1. 시료 확보 및 균주 분리

[102]

- [103] PEDV가 만성적으로 발생한 국내 농장의 모돈, 자돈의 분변 샘플 및 초유 샘플을 확보하였다. 확보된 시료를 단계적으로 희석하여, MRS 및 BHI 고체배지에 도말한 후 37°C 에서 48시간 동안 배양하였다. 각 시료에서 분리된 균주들은 새로운 배지에 옮겨 배양하는 방법으로 순수 분리 하였으며, 20% 글리세롤이 첨가된 영양배지에 순수 분리되어 배양된 균을 담아 영하 70°C 이하에서 보존하였다. 그 결과 총 1,552종의 균주를 확보하였으며, 이하의

실시예를 통하여 우수한 항바이러스 활성 등을 갖는 균주를 선발하였다.

[104]

[105] 1-2. 균주의 내산성 및 내담즙성 평가

[106]

[107] 프로바이오틱스로 활용 가능한 균주를 선별하기 위해, 상기 확보된 균주들에 대해서 내산성 및 내담즙성에 대한 활성 평가를 실시하였다.

[108]

[109] 내산성 평가를 위하여 인공위액 배지를 제조하였다. 보다 구체적으로, 상기 인공위액 배지는, MRS 액체배지에 펩신을 첨가하여 pH2.5가 되도록 조정한 후 멸균하여 준비되었다.

[110]

상기 실시예 1-1의 균주들을 2차 계대배양 후, MRS 액체배지에서 37°C 온도, 18시간 동안 정치배양하였다. 상기 인공위액 배지에 전배양한 균주를 1% 접종하여 37°C에서 정치배양하였으며, 0시간 및 3시간이 되는 시점에 배양액을 샘플링하였다. 샘플링한 배양액을 MRS 고체배지에 단계적으로 희석하여 도말한 후, 37°C에서 48시간 동안 배양하여 생균수를 측정하였다.

[111]

[112] 내담즙성 평가를 위하여 인공담즙액 배지를 제조하였다. 보다 구체적으로, 상기 인공담즙액 배지는 0.5% oxgall(황소의 담즙)을 첨가한 MRS 액체배지를 멸균하여 준비되었다.

[113]

상기 실시예 1-1의 균주들을 2차 계대배양 후, MRS 액체배지에서 37°C 온도, 18시간 동안 정치배양하였다. 상기 인공담즙액 배지에 전배양한 균주를 1% 접종하여, 37°C에서 정치배양하면서 0시간, 24시간의 경과 시점에 배양액을 샘플링하였다. 샘플링한 배양액을 MRS 고체배지에 단계적으로 희석하여 도말한 후, 37°C, 48시간 배양하여 생균수를 측정하였다.

[114]

[115] 상기 평가를 통하여, 내산성 및 내담즙성이 가장 우수한 균주인 CJLP17을 선별하였다. 선별된 균주는 이하의 실시예를 통하여 확인한 바와 같이, 락토바실러스 플란타럼으로 동정되었다. 상기 CJLP17 균주의 내산성 및 내담즙성을 종래 공지된 균주와 비교하기 위하여, 상기 방법과 동일한 방법으로 한국미생물보존센터에서 분양 받은 락토바실러스 플란타럼 표준균주(KCCM12116)의 내산성 및 내담즙성을 평가하였다.

[116]

[117] [표1]

내산성 평가 (단위: CFU/ml)

	0시간	3시간
Lactobacillus plantarum CJLP17	1.1×10^6	4.0×10^6
Lactobacillus plantarum(KCCM12116)	2.3×10^7	1.3×10^7

[118]

[119] [표2]

내담즙성 평가 (단위: CFU/ml)

	0시간	24시간
Lactobacillus plantarum CJLP17	1.3×10^6	1.1×10^7
Lactobacillus plantarum(KCCM12116)	2.1×10^7	1.6×10^6

[120]

[121] 상기 표 1 및 표 2에 따르면, 락토바실러스 플란타럼 표준균주(KCCM12116)는 인공위액 배지 및 인공담즙 배지에서 균주 수가 감소하였다. 이를 통해, 일반적으로 알려진 모든 락토바실러스 플란타럼이 내산성 및 내담즙성을 갖는 것은 아님을 알 수 있다.

[122] 반면, 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 두 배지에서 균주 수가 오히려 증가하였으므로, 내산성 및 내담즙성이 뛰어난 균주임을 알 수 있다.

[123]

[124] 1-3. 균주의 형태학적, 생화학적 특성 조사

[125]

[126] 상기 CJLP17 균주의 동정을 위하여, 일차적으로 형태학적, 생화학적 조사를 수행하였다. 형태학적인 특징으로, 그람염색 결과 그람 양성이었으며, 전자현미경 촬영 결과 간균임을 확인하였다 (도 1). 생화학적 특성을 분석하기 위하여 API 50CHL system(biomerieux Vitek, Inc., 프랑스)으로 균주의 당 발효 패턴을 분석하였다(표 3).

[127]

[128] [표3]

분리 균주의 당 발효패턴 분석

균주명	CJLP17	균주명	CJLP17
control	-	Esculine	-
Glycerol	-	Salicine	+
Ertlythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
β Methyl-xyloside	-	Melezitose	+
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	β Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	--	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α Methyl-D-mannoside	+	D-Arabitol	-
α Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N Acetyl gllucosamine	+	Gluconate	+
Amygdaline	+	2 ceto-gluconate	-
Arbutine	+	5 ceto-gluconate	-

[129] + 양성, - 음성

[130]

[131] 1-4. 균주 동정

[132]

[133] 균주를 보다 정확히 동정하기 위하여, DNA 염기서열에 의한 분자계통분류학적 방법을 실시하였다. 염기서열분석은 PCR premix(바이오니아, 대한민국)와 유니버설 프라이머 27F(5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'), 1492R(5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3')을 사용하여 16s rDNA의 유전자를 증폭시켰다. 유전자 증폭 시 총 반응액은 20 μ l로 맞추고, 94°C 1분, 56°C 1분, 72°C 1분을 총 30회 반복하여, 증폭된 DNA 염기서열을 분석하였다. 분리 균주의 분석된 16s rDNA의 염기서열은 서열번호 1과 같다.

[134] 상기 분석 결과, CJLP17은 락토바실러스 플란타럼과 99% 상동성을 가지는 미생물로 동정되었다. 이에 상기 분리된 균주를 '락토바실러스 플란타럼 CJLP17'로 명명하였다. 이와 같이 동정된 신규 미생물을 한국미생물보존센터에 2018년 4월 13일자로 락토바실러스 플란타럼 CJLP17로 기탁하였다 (기탁번호 KCCM12249P).

[135]

[136] 실시예 2: CJLP17의 항균활성 특성 분석

[137]

[138] 병원성 미생물로 대장균(*E.coli*), 장독성대장균(*Enterotoxigenic E. coli*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 및 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)를 준비한 후, 이들 병원성 미생물에 대한 CJLP17의 항균활성 평가를 진행하였다.

[139]

[140] CJLP17을 MRS 액체배지에 접종하여, 37°C에서 24시간 정치배양하였다. 상기 병원성 미생물 중에서 대장균, 장독성대장균, 살모넬라 티피뮤리움 및 황색포도상구균은 BHI 액체배지에 접종하여, 37°C에서 18시간 동안 200rpm으로 배양하였으며, 비브리오 파라헤모라이티쿠스는 3% NaCl이 첨가된 LB 액체배지에 접종하여, 30°C에서 18시간 동안 200rpm으로 배양하였다.

[141] MRS 고체배지에 CJLP17의 배양액 10 μ l를 점적하여 말린 후, 37°C에서 18시간 동안 전배양을 하였다. 상기 병원성 미생물의 배양액을 BHI 고체배지 10ml에 각각 1% 접종한 후, 이를 상기 CJLP17이 전배양된 MRS 고체배지 위에 부어 완전히 굳혔다. 이후 37°C에서 24시간 배양하여 형성되는 환의 크기를 측정하였다. 환의 크기가 클수록 항균활성이 높은 것을 의미한다. 항균 활성 비교를 위하여, 락토바실러스 플란타럼 표준균주 (KCCM12116)의 항균활성을 상기 방법과 동일하게 평가하였다.

[142]

[143] [표4]

균주명	대장균	장독성대장균	황색포도상구균	살모넬라 티피뮤리움	비브리오 파라헤모라 이티쿠스
CJLP17	5	8	8	7.5	6
L. plantarum(K CCM12116)	3	5	4.5	3	4

[144] (단위 mm)

[145]

[146] 상기 방법으로 환의 크기를 측정한 결과 표 4와 같이, CJLP17은 모든 병원성 미생물에 대해, 락토바실러스 플란타럼 표준균주에 비해 우수한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[147]

[148] 실시예 3: 균주의 안정성 평가

[149]

[150] 3-1. 균주의 용혈성 확인

[151]

[152] β-용혈이란 적혈구에 의해서 공급되는 인지질이 유해균으로부터 생산된 인지질 효소에 의해 가수분해되어, 결과적으로 적혈구가 용혈되는 작용이다. CJLP17의 용혈성을 알아보기 위하여 혈액천평판배지(sheep blood 5% agar, (주)한일코메드, 대한민국)를 이용하였다. 준비된 혈액천평판배지에 선형 접종(streaking)한 후, 37°C에서 24시간 배양하여 용혈 여부를 확인하였다.

[153] 그 결과, 도 2에서 알 수 있듯이 락토바실러스 플란타럼 CJLP17 균주는 용혈성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

[154]

[155] 3-2. 항생제 감수성 평가

[156]

[157] CJLP17을 MRS 액체배지에 접종하여, 37°C에서 24시간 정치배양 하였다. 배양된 균을 멸균된 면봉에 적셔 Mueller Hinton II 고체배지(Difco)에 도말한 후, 상기 배지 위에 항생제 디스크를 올려 37°C에서 24시간 배양하였다. 항생제 검사를 위한 항생제 디스크로는, Ampicillin, clindamycin, Gentamicin, kanamycin, Erythromycin, Ampicillin/sulbactam, Chloramphenicol, 및 Streptomycin 디스크(Oxoid, 영국)를 준비하여 사용하였다.

[158] CJLP17의 항생제 감수성 검사 결과, CJLP17는 상기 항생제들에 대한 내성을 갖지 않는 것으로 확인되었다(표 5). 따라서, CJLP17을 의약품, 건강기능식품,

사료 첨가제 등으로 사용하더라도, 항생제에 대한 내성이 없는 점에서 그에 따른 내성 문제나 환경적 문제는 발생할 가능성이 낮음을 알 수 있다.

[159]

[160] [표5]

항생제에 따른 균주 성장저해도

항생제(Antibiotics)	항생제를 중심으로 한 성장저해영역 반지름(mm)
	CJLP17
Amp10 (Ampicillin)	7.5
C30 (Clindamycin)	7
CN120 (Gentamicin)	5
K30 (Kanamycin)	1.5
E15 (Erythromycin)	12
SAM20 (Ampicillin/Sulbactam)	7
S10 (Chloramphenicol)	3.5
DA2 (Streptomycin)	4.5

[161]

[162] 실시예 4: 세포독성평가

[163]

[164] 상기 균주가 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해, MTS 분석방법 (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, promega, USA)을 이용하여 IPEC-J2(돼지 장 상피 세포, intestinal pig epithelium cells) 세포 상에서 세포독성 수준을 평가하였다. 각 세포를 96 웰 세포 배양 플레이트에 배양한 후 CJLP17를 농도별($10^3 \sim 10^8$ CFU/well)로 처리하여 배양하였다. 24시간 후 세포 배양액에 MTS 용액을 첨가하고 2시간 동안 배양하였고 마이크로플레이트 리더기로 파장 490nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)를 계산하였다.

[165] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이 6가지 농도로 처리하였을 때 10^7 CFU/ml 이하의 농도에서는 세포 사멸이 거의 일어나지 않은 것으로 나타났고 10^8 CFU/ml 에서 약 80%의 세포 생존율을 보임을 확인하였다. 따라서, CJLP17은 실질적으로 10^7 CFU/ml 이하의 농도에서 세포 독성을 거의 나타내지 않음을 알 수 있다.

[166]

[167] 실시예 5: 면역 증진 활성 평가

[168]

[169] CJLP17 균주의 면역 증진 효과를 확인하기 위하여, Dulbecco's Modified Eagle

Medium: Nutrient Mixture F-12(DMEM/F-12) 배지에서 IPEC-J2 세포를 배양하였다. 또한, 21일령 이유자돈으로부터 장간막 림프절 세포(lymphocytes in mesenteric lymph nodes), 말초혈액 단핵세포(PBMC, peripheral blood mononuclear cell), 페이어판 세포(PP, Cells in peyer's patch)과 비장세포(Splenocytes)를 채취하였고, 각 조직 및 혈액으로부터 하기와 같은 방법을 사용하여 면역세포들을 수득하였다.

[170]

[171] 비장 및 장간막 림프절 조직으로부터 면역세포를 수득하기 위하여, 세절(chopping)된 조직을 주사기의 플런저(plunger)와 70 마이크로미터 셀 스테이너(Cell strainer)(BD Falcon)를 이용하여 분쇄시킨 후, Roswell Park Memorial Institute-1640(RPMI-1640, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지를 이용하여 세포를 세척하였다. 마지막 세척 전 단계에서 RBC lysis 버퍼(eBioscience, USA)를 이용하여 잔존하는 RBC(적혈구)를 제거하였다. 마지막 세척 후 수집된 면역세포를 트리판 블루(Trypan blue)로 염색하고, 혈구계산판(hemocytometer)로 카운팅하여 사용 하였다.

[172] 페이어판 세포를 수득하기 위하여, 소장에서 해당 조직을 분리하고 수술용 가위를 이용하여 세절 및 분쇄한 후, Dnase I(Roche, Germany), Dispase II(Sigma aldrich, USA), antibiotics, FBS, 15mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES)가 포함된 RPMI-1640 배지(pH 7.2)에서 1시간 동안 반응시켜 단일세포를 얻었다. 이 후 상기 서술된 방법과 동일한 방법으로 면역세포를 수득하였다.

[173] 채취한 혈액은 PBS와 1:1로 섞어 Ficoll-Paque Plus(GE healthcare Life Sciences, NJ, USA)상에 얹혀서 원심분리를 하였고 WBC(백혈구) 응집층을 분리하였다. 분리된 층으로부터, 상기 서술된 방법과 동일한 방법으로 말초혈액 단핵세포를 수득하였다.

[174]

[175] 면역 증진 효과를 평가하기 위하여, 해당 균주(CJLP17)와 상기 방법으로 수득한 각각의 면역세포를 10:1로 혼합한 후, 5% CO₂를 함유한 37°C 세포 배양기에서 20시간 동안 배양하였다. 배양 완료 시 원심분리한 후, 싸이토카인 ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)를 이용하여 배양 상층액의 면역 활성 효과 평가를 진행하였다. 보다 구체적으로는, 외부 침입 인자(Pathogen)에 대한 방어 기능을 하는 Th1(T helper 1) 관련 면역 기작을 활성화 시키는 IL-12(interleukin-12)에 대한 ELISA(R&D Systems, USA)를 진행하였다. 전신면역에서의 Th1, Th2 면역 반응을 평가하기 위해 IL-12와 IL-10의 경우 비장세포와 말초혈액단핵구를 사용하였고, 장내에서의 항염 반응을 보다 정확하게 측정하기 위해 페이어판 세포와 장간막 림프구를 이용하여 TGF-beta ELISA 시험을 진행하였다.

[176]

- [177] IL-12, IL-10 및 TGF-beta를 측정된 결과를 나타낸 그래프를 각각 도 4 내지 도 6에 나타내었다. 각 그래프에서 대조군은 군주 처리가 없는 음성 대조군을 사용하였다.
- [178] 그 결과 도 4 내지 도 6에서 알 수 있듯이, CJLP17 군주는 면역 세포를 자극하여 IL-12, IL-10 및 TGF-beta의 분비량을 증가시키는 활성을 가짐을 확인하였다. 따라서, CJLP17가 Th1 면역기작 뿐만 아니라 Th2 면역기작을 동시에 증진시키는 효과를 나타냄을 알 수 있다.
- [179]
- [180] **실시예 6: 바이러스 감염 억제 효과**
- [181]
- [182] CJLP17 군주의 바이러스 감염 억제 효과를 측정하기 위하여, 돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV, SM98 또는 KPEDV9 군주)를 준비하였다. 구체적으로는, 상기 바이러스를 Vero(CCL-81, 버빗원숭이 기원 신장 상피 세포) 세포에서 증식 배양하였으며, 상기 Vero 세포를 배양하기 위한 배지로 Eagle's Minimum Essential Medium(MEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 열처리된 불활화된 10% fetal bovine serum(FBS, v/v), 1%(v/v) penicillin/streptomycin을 사용하였다. 상기 Vero 세포를 단층이 되도록 배양한 후 두 차례에 걸쳐 배지로 세척하고 모든 용액을 제거하였다. 5 µg/ml TPCK(N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)가 처리된 트립신을 포함하는 FBS 무첨가 MEM에 0.1 MOI(Multiplicity of infection) 수준의 바이러스를 섞고, 이를 준비된 배양 세포에 최소 볼륨으로 처리한 뒤 5% CO₂를 함유한 37°C 세포 배양기에서 2~3일간 배양하였다.
- [183]
- [184] 바이러스의 감염 여부는 바이러스 신시티움(virus syncytium) 형성 여부로 판단하였다. 신시티움이 형성되면 3~6시간 내에 바이러스 배양액을 수거하고, 원심분리를 이용하여 세포를 제거한 후, -80°C에 보관 하였다. 바이러스의 감염 역가 계산의 경우, 96-well 플레이트에 Vero 세포를 2X10⁴ cells/0.1ml 수준으로 배양하고 세포를 PBS로 세척한 후, 바이러스를 2배수 연속 희석한 배양액을 넣고 24~48시간 배양 시켜 바이러스의 감염 유무를 확인한 뒤, Reed & Muench 방법에 의해 바이러스의 감염 역가를 계산하였다.
- [185]
- [186] CJLP17 군주의 바이러스 감염 억제 효과를 측정하기 위하여, CJLP17 군주와 상기 실시예 5에서 추출된 면역 세포 4종간의 20~24시간 반응 후 배양액을 수득하였다. 상기 배양액을 IPEC-J2가 배양된 96-웰 세포 배양 플레이트에 각각 처리하고 2~4시간 5% CO₂를 함유한 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 각각의 플레이트에 100 TCID₅₀/ml (50% of tissue cell infectious dose)의 PED 바이러스(SM98 또는 KPEDV9)를 점적한 후 48시간 배양하였다. 바이러스 감염 여부를 확인하기 위하여, 배양이 완료된 후 세포배양 플레이트를 메탄올로 고정시키고 크리스탈 바이올렛으로 염색을 한 후, 세포 변성된 웰을 현미경으로

확인하여, 바이러스 감염 여부를 판단 하였다.

[187]

[188] [표6]

락토바실러스 플란타럼 CJLP17로 인해 활성화된 면역세포에 따른 PED 바이러스(SM98/KPEDV9 strain) 억제 효과

	mLN		Peyer's patches		PBMC		Spln	
	SM98	KPED V9	SM98	KPED V9	SM98	KPED V9	SM98	KPED V9
음의 대조군	-	-	-	-	-	-	-	-
CJLP17	++	++	+	++	++	++	+	++

[189] ++ : complete inhibition, + : partial inhibition, - : infected

[190]

[191] 그 결과 표 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, 돼지 면역세포와 락토바실러스 플란타럼 CJLP17을 처리했을 때 군주에 의해 면역 세포가 활성화 되어 바이러스 감염이 확연하게 억제되는 효과를 확인할 수 있었다. 따라서, 면역세포와 CJLP17을 함께 처리할 경우 PED 바이러스에 대한 우수한 항바이러스 활성을 가짐을 알 수 있다.

[192]

[193] 실시예 7: 가축의 성장 및 설사에 미치는 효과 확인

[194]

[195] 락토바실러스 플란타럼 CJLP17을 경구투여 시 성장 성적 및 설사율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

[196] 21일령 이유자돈 32두를 구매하여 31±1℃, 습도 50%가 유지되는 인큐베이터 사육장에서 14일간 사육하였다. 사료는 항생제가 첨가되지 않은 일반적인 크럼블 사료를 공급하였고, 물은 무제한 급이 하였다. 락토바실러스 플란타럼 CJLP17은 동결 건조 분말 형태로 생산하여 냉장 보관 후, 경구 투여를 위하여 하루에 마리당 10¹⁰ CFU/일씩 섭취할 수 있도록 크럼블 사료에 고르게 혼합하였다. 이와 같은 총 14일 간의 이유자돈 사양 시험을 통해, 상기 군주가 자돈 생산성 및 설사/연변 발생율에 미치는 영향을 도 8, 도 9에 나타내었다.

[197]

[198] 그 결과, CJLP17이 포함된 사료를 급이한 처리구 이유자돈의 평균 일당증체량(mean value of ADG)이 대조군보다 더욱 우수한 것으로 확인되었다 (도 8). 또한, CJLP17이 포함된 사료를 급이한 처리구에서 대조군에 비해 48%의 설사율 개선효과가 나타남을 확인하였다 (도 9).

[199] 따라서, CJLP17이 가축의 성장, 즉 생산성을 증가시킬 뿐만 아니라, 설사

발생율을 현저히 낮추는 효과가 있음을 알 수 있다.

[200]

[201] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[202]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP17	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12249P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 4월 13일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 120-861	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 4. 13.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 5월 3일

변리사 손민

