

명세서

발명의 명칭: 신규 리조푸스 올리고스포르스 균주 및 이를 포함하는 항균 조성물

기술분야

- [1] 본 출원은 기탁번호 KCCM12893P로 기탁된 리조푸스 올리고스포르스 CJCC02-20 (*Rhizopus oligosporus* CJCC02-20) 균주; 상기 균주, 균주의 포자, 균주의 배양물, 그의 농축물 및 그의 건조물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 항균 조성물; 상기 항균 조성물을 포함하는 식품 조성물; 사료 조성물; 의약품 조성물; 건강기능식품 조성물; 또는 상기 항균 조성물을 포함하는, 진균, 세균 또는 이들의 조합으로 인한 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 전통 방식으로 제조된 발효식품은 원료 보관, 제조 및 유통 과정에서 항시 진균류와 식중독 균에 취약하다. 진균류 및 식중독 유발 세균은 열처리 후에도 살아남아 식품의 변패 및 부패 혹은 식중독을 유발시키는 것으로 알려져 있다.
- [4] 변패 및 식중독균 증식을 방지하여, 상기 식품의 품질을 오랫동안 유지하기 위해 항균물질에 관한 연구가 많이 진행되어 왔다. 항균물질 중에서 특히 안전성과 경제성이 우수한 천연 보존제에 대한 연구의 필요성이 증대되고 있는 실정이다.
- [5] 대표적인 천연보존제로 박테리오신은 미생물이 생산하는 천연 항균성 단백질 또는 단백질계의 물질을 의미한다. 박테리오신은 단백질이기에 인체에서 분해가 가능하여 안전성이 입증된 물질이다. 이는 기존 항생제의 2차 대사산물로 인체에 부작용을 발생시키는 것과 대조되어 박테리오신에 대한 연구의 필요성이 증대되고 있는 실정이다. 상기 박테리오신과 관련하여, 최근까지 유산균 유래 박테리오신에 관한 연구가 주를 이루고 있다. 유산균 유래 박테리오신은 GRAS 등급으로 안전성이 입증됐다는 장점이 있으나, 항균 활성 범위가 그람 양성균로 특이적이기 때문에 널리 활용되지 못하고 있다.
- [6] 리조푸스 올리고스포르스의 항균성과 관련하여 리조푸스 올리고스포르스 배양액으로부터 생성된 항균 물질 Antibiotic peptide (ABP) 과 Linoleic acid 등은 그람 양성균인 *Straphylococcus* 속 및 *Bacillus* 속을 제어하는 것으로 알려져 있다(Roubos-van den Hil et al., 2010). 그러나 그람 양성인 특정 미생물에 대한 항균 활성만이 보고되고 있을 뿐, 변패 또는 식중독을 유발하는 다양한 균주에 대해 효과에 대해서는 보고된 바가 없다. 나아가, 리조푸스 올리고스포르스는 발효 음식에서 유용한 세균이므로, 상기 박테리오신을 발효식품에 적용할 경우 변패 유발 진균류 및 식중독 세균류에도 특정한 활성을 보인다고 보기 어려워서

발효 식품을 산업화하여 제조 및 유통하기에 어려운 문제가 있다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 이에 본 발명자들은, 인체에 무해하면서 다양한 진균류 및 세균류를 억제하는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 템페(tempe)로부터 신규 분리한 리조푸스 올리고스포르스 CJCC02-20가 진균에 대한 항균 활성을 가질 뿐만 아니라, 식중독 세균 등 식품의 주요 위해 미생물만을 특이적으로 억제하는 항균 활성이 있음을 확인하여 본 출원을 완성하였다.

[9]

과제 해결 수단

- [10] 본 출원은 기탁번호 KCCM12893P로 기탁된 리조푸스 올리고스포르스 CJCC02-20 (*Rhizopus oligosporus* CJCC02-20) 균주; 상기 균주, 균주의 포자, 균주의 배양물, 그의 농축물 및 그의 건조물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 항균 조성물; 상기 항균 조성물을 포함하는 식품 조성물; 사료 조성물; 의약품 조성물; 건강기능식품 조성물 또는 상기 항균 조성물을 포함하는, 진균, 세균 또는 이들의 조합으로 인한 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [11]
- [12] 본 출원의 하나의 목적은 기탁번호 KCCM12893P로 기탁된 리조푸스 올리고스포르스 CJCC02-20 (*Rhizopus oligosporus* CJCC02-20) 균주를 제공하는 것이다.
- [13] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 리조푸스 올리고스포르스 CJCC02-20 균주, 균주의 포자, 균주의 배양물, 그의 농축물 및 그의 건조물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 항균 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 항균 조성물을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 항균 조성물을 포함하는 사료 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 항균 조성물을 포함하는 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [17] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 항균 조성물을 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [18] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 항균 조성물을 포함하는, 진균, 세균 또는 이들의 조합으로 인한 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[19]

발명의 효과

[20]

본 출원에 따른 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20균주를 포함하는 항균 조성물은 진균 및 세균에 대하여 항균 활성을 지니는 특성을 가지므로 식품, 의약품, 의약외품, 건강기능식품 등으로 유용하게 사용할 수 있다.

[21]

도면의 간단한 설명

[22]

도 1은 디스크여지법 (paper disk assay)을 이용하여 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20균주의 아스퍼질러스 오리재, 아스퍼질러스 나이거 및 대장균에 대한 항균 활성을 측정한 결과이다.

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24]

이하에서는, 본 출원을 더욱 상세히 설명한다.

[25]

한편, 본 출원에서 개시되는 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 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[26]

또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다.

[27]

[28]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 출원의 하나의 양태는 기탁번호 KCCM12893P로 기탁된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 (*Rhizopus oligosporus* CJCC02-20) 균주를 제공한다.

[29]

본 발명자들은 발효식품의 품질저하 및 오염을 유발시키는 진균 및 식중독 유발 세균에 뛰어난 항균 활성을 가지는 리조푸스 올리고스포러스에 속하는 신규한 균주를 하기와 같이 규명하였다.

[30]

재래식 템페로부터 다종의 리조푸스 올리고스포러스를 분리하여 곰팡이, 효모 등 진균류 및 식중독 세균류에 대해 검정한 결과 항균 활성이 우수한 균주 리조푸스 올리고스포러스를 선별하고, 선별된 균주를 동정하기 위하여 유전자 염기서열 분석을 수행하였다. 상기 선별된 균주의 18S rRNA 염기서열은 서열번호 1로 기재하였으며, ABP(antibiotic peptide) 유전자 서열은 서열번호 2에 기재하였고, Chitinase(Chi2) 유전자 서열은 서열번호 3에 기재하였다. 상기 유전자 분석을 기초하여 상기 균주를 리조푸스 올리고스포러스 균주로 동정하고, 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20로 명명하였으며, 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 2020년 12월 09일자로 기탁하고 수탁번호 KCCM12893P를 부여 받았다.

- [31]
- [32] 본 출원의 일 구체예에 의하면, 상기 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20는 진균 및 식중독 유발 세균에 대한 항균활성이 우수하여, 다양한 진균류 및 식중독 유발세균에 동시에 작용할 수 있는 항균활성을 나타낸다(실시예 3).
- [33] 상기 진균 및 세균은 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속, 에스케리아(*Escherichia*) 속일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다.
- [34] 본 출원의 일 구체예로서, 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20는 진균인 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 또는 이들의 조합에 대하여 항균활성을 가지는 것일 수 있으나, 상기 진균의 종류에 한정되는 것은 아니다.
- [35] 본 출원의 일 구체예로서, 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 대장균(*Escherichia coli*) 또는 이들의 조합에 대하여 항균활성을 가지는 것일 수 있으나, 상기 세균의 종류에 한정되는 것은 아니다.
- [36] 본 출원의 일 구체예로서, 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20는 아스퍼질러스 오리제, 아스퍼질러스 나이거 또는 대장균에 특이적 항균활성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [37] 상기 아스퍼질러스 오리제, 아스퍼질러스 나이거는 발효식품의 품질 저하 및 오염 유발 균주로 알려져 있으며, 바실러스 세레우스 및 대장균은 식중독의 유발 균으로 알려져 있는 바, 이에 뛰어난 항균활성을 가지는 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20는 다양한 용도로 사용될 수 있다.
- [38] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물, 그의 농축물, 그의 추출물, 및 그의 건조물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상; 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [39] 이때, 상기 담체는 자연적 또는 비자연적으로 발생하는(non-naturally occurring) 담체일 수 있다.
- [40] 본 출원의 일 구체예로, 상기 건조물은 동결건조물일 수 있다.
- [41] 또한 상기 조성물은 동결보호제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 글리세롤, 트레할로스, 말토덱스트린, 탈지분유 및 전분으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 동결보호제를 추가로 포함할 수 있다. 본 출원의 동결보호제는 본 출원의 조성물 총 중량에 대하여 0.01 중량% 내지 20 중량%, 0.01 중량% 내지 10 중량% 포함될 수 있고, 구체적으로 본 출원의 글리세롤은 5 중량% 내지 20 중량%, 본 출원의 트레할로스는 2 중량% 내지 10 중량%, 본 출원의 말토덱스트린은 2 중량% 내지 10 중량%, 본 출원의 탈지분유는 0.5 중량% 내지 2 중량%, 본 출원의 전분은 0.1 중량% 내지 1 중량%로 본 출원의 조성물에 포함될 수 있다.

- [42]
- [43] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물, 그의 농축물, 그의 추출물, 및 그의 건조물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물을 제공한다.
- [44] 이때, 균주의 상태는 액상상태 또는 건조상태일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [45] 상기 항균 조성물은 진균, 세균 또는 이들의 조합에 대한 항균활성을 가지는 것일 수 있으며, 구체적으로, 아스퍼질러스 오리제, 아스퍼질러스 나이거 또는 대장균에 특이적 항균활성을 가지는 것일 수 있으며, 바실러스 세레우스에 증진된 항균활성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [46] 본 출원에서 용어, "포자"는 세균 등의 번식 세포를 말하며, 본 출원의 목적상 상기 포자는 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20의 번식 세포를 의미한다.
- [47] 본 출원에서 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20의 포자는 진균 및 식중독 세균에 대한 항균 활성을 나타내어 항균 활성이 있는 식품, 사료, 의약품, 의약외품, 건강기능식품에 포함되어 사용될 수 있다.
- [48] 본 출원에서 용어, "배양물"은 상기 균주를 배양한 다음 수득한 산물을 의미하며, 균체를 포함한 배양 원액일 수 있으며, 또한 배양 균주, 배양 상등액을 제거하거나 농축한 균체일 수 있다. 상기 배양물의 조성은 통상의 리조푸스 올리고스포러스 배양에 필요한 성분뿐 아니라, 리조푸스 올리고스포러스의 생장에 상승적으로 작용하는 성분을 추가적으로 포함할 수 있으며, 이에 따른 조성은 당업계의 통상의 기술을 가진 자에 의하여 용이하게 선택될 수 있다.
- [49] 본 출원에서 용어, "농축물"은 상기 배양물을 농축한 것을 의미한다.
- [50] 본 출원에서 용어, "추출물"은 상기 배양물 또는 그의 농축물로부터 추출한 것을 의미하며, 본 출원의 진균류 및 세균에 특이적 항균 효과를 나타낼 수 있는 추출물인 한, 이에 제한되지는 않고, 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물, 이를 분획한 분획물을 모두 포함할 수 있다.
- [51] 본 출원에서 용어, "건조물"은 상기 배양물, 그의 농축물, 그의 추출물, 및 그의 분획물을 건조한 것을 의미한다. 건조방법은 통풍건조, 자연건조, 분무건조 및 동결건조가 가능하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [52] 본 출원의 신규 분리한 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20는 통상적인 리조푸스 올리고스포러스 균주의 배양방법을 통해 배양할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 배지로는 천연배지 또는 합성배지를 사용할 수 있다. 배지의 탄소원으로는 예를 들어, 글루코오스, 수크로오스, 덱스트린, 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, 인 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.

- [53] 상기 항균 조성물은 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20를 배양하는 과정에서 생성되는 기타 부산물을 함께 포함할 수 있다.
- [54]
- [55] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 항균조성물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [56] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는 장류, 젓갈류를 포함하는 발효식품, 소스류, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다. 상기 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [57] 구체적으로, 상기 식품 조성물은 발효식품 일 수 있으며, 구체적으로 장류, 젓갈류 일 수 있으며, 보다 구체적으로 템페일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [58] 또한, 상기 식품 조성물은 템페를 포함하는 소스류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [59] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [60] 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [61] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [62] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클라메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제, 분산제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수

있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별하고 적절한 양으로 사용할 수 있다.

[63]

[64] 특히, 본 발명자들은 본 출원의 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20가 장류 발효 곰팡이인 아스퍼질러스 오리제와 식품 오염원인 아스퍼질러스 나이거 및 식중독 세균인 바실러스 세레우스, 장관병원성 세균인 대장균을 동시에 억제할 수 있는 효과가 있음을 확인하였으며(실시예 3, 도 1), 상기 향균 조성물을 발효식품인 템페에 적용한 결과 전통풍미는 구현하면서도 식중독균 방제효과를 유지할 수 있음을 확인하였는 바(실시예 4), 발효식품을 포함한 모든 식품에 직접적으로 사용할 수 있다.

[65]

[66] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 향균 조성물을 포함하는, 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[67] 본 출원에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 출원에 따른 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하여 미생물 감염 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[68] 본 출원에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 출원의 상기 조성물을 미생물 감염 질환 발병 의심 개체에 투여하여 미생물 감염 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[69] 본 출원에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[70] 본 출원에서 사용되는 용어, "개체"란, 미생물 감염 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다.

[71]

[72] 이 때, 미생물 감염 질환은 미생물에 의하여 감염되어 발생하는 질환으로, 바람직하게는 진균 또는 세균에 의해 감염되어 발생하는 질환일 수 있다.

[73] 본 출원의 일 구체예로서, 상기 진균은 아스퍼질러스 오리제, 아스퍼질러스 나이거 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다.

[74] 본 출원의 일 구체예로서, 상기 세균은 바실러스 세레우스, 대장균 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다.

[75] 또한, 본 출원의 일 구체예로서, 상기 미생물 감염 질환은 식중독, 설사, 구토, 장염, 위장관염, 변비, 복통 및 복부팽만으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[76] 본 출원의 일 실시예에서는 식중독을 유발시킬 수 있는 세균인 바실러스 세레우스에 대하여 증진된 향균활성 및 장관병원성 대장균에 관하여 특이적 향균활성을 확인하였으며, 곰팡이균인 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이거에 대한 특이적 항진균 활성을 확인하였는 바, 본 출원의 향균 조성물은 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 효과적으로 사용될 수

있다.

[77]

[78] 본 출원에 따른 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 담체와 함께 제제화되어 식품, 건강기능식품, 의약품, 의약외품, 사료 첨가제 및 음용수 첨가제 등으로 제공될 수 있다.

[79] 본 출원에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다.

[80] 본 출원에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[81] 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.

[82] 본 출원에 따른 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 본 출원의 상기 미생물 감염 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.

[83] 본 출원의 항균물질의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[84]

[85] 또 하나의 양태로서, 본 출원은 상기 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 본 출원에서 사용되는 용어, "개체"란, 미생물 감염 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다.

[86] 본 출원의 상기 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 미생물 감염 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[87] 상기 추출물을 포함하는 조성물의 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단 범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수

있다. 그러나 본 출원의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 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.

- [88] 본 출원의 항균물질은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [89]
- [90] 또 하나의 양태로서, 본 출원은 상기 항균 조성물을 포함하는 미생물 감염 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [91] 이 때, 미생물 감염 질환, 예방, 및 개선의 의미는 상기한 바와 같다.
- [92] 본 출원의 용어, "건강기능식품 (Health functional food 또는 nutraceutical)"은, 특정보건용 식품, 기능성 식품, 건강식품과 동일한 용어로, 양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 미생물 감염 질환의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [93] 상기 건강기능식품은 식품학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 이는 전술한 바와 같다.
- [94] 본 출원의 건강기능식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 출원의 건강기능식품은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 출원의 건강기능식품은 미생물 감염 질환의 예방 또는 개선효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [95] 구체적으로, 상기 식품은 상기 항균조성물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등으로 사용될 수 있다.
- [96] 상기 식품은 공지의 제조방법에 따라 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상의 용액 및 환 등의 제형으로 제조할 수 있으며, 본 출원에 따른 조성물의 함량은 제형에 따라 조절할 수 있다. 본 출원에 의한 항균 조성물을 유효성분으로 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

- [97]
- [98] 또 하나의 양태로서, 본 출원은 상기 항균 조성물을 포함하는 의약외품 조성물을 제공한다.
- [99] 본 출원에서 용어, "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적을 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니하며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염형 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미할 수 있다. 또한 상기 의약외품은 피부외용제 및 개인위생용품을 포함할 수 있다. 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 또는 연고제일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [100] 상기 의약외품 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 이는 전술한 바와 같다.
- [101] 본 발명자들은 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20는 상기 진균 및 세균에 대한 항균효과를 가짐을 확인하였는바, 상기 신규 균주를 이용한 항균 조성물은 의약외품에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [102]
- [103] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 항균조성물을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.
- [104] 본 출원에서 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다.
- [105] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료용 조성물은 사료 첨가제를 포함할 수 있다. 본 출원의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 생균제를 포함할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [106] 이때, 본 출원의 항균조성물을 포함하는 사료 조성물은 부형제, 희석제, 첨가제를 더 포함할 수 있다.
- [107] 본 출원의 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20가 곰팡이 균인 아스퍼질러스 오리제, 아스퍼질러스 나이저 및 식중독 세균인 바실러스

세레우스, 대장균을 동시에 억제할 수 있는 효과가 있음을 확인하였는바, 본 출원은 항균 및 항진균 활성이 있는 사료 조성물을 제공하여, 가축의 식중독을 포함한 미생물 감염 질환을 예방할 수 있다.

[108]

[109] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 항균 조성물의 제조방법을 제공한다.

[110] 본 출원에서, 용어 "배양"은 본 출원의 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및/또는 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[111] 본 출원에서 용어, "배지"는 본 출원의 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 출원의 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[112] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[113] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어

사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [114] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [115] 또한, 본 출원의 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [116] 본 출원의 배양에서 배양온도는 20 내지 45°C구체적으로는 25 내지 40°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [117] 본 출원의 항균조성물의 제조방법은, 본 출원의 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주를 준비하는 단계, 상기 균주를 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.
- [118] 본 출원의 항균조성물의 제조방법은, 상기 배양에 따른 배지(배양이 수행된 배지) 또는 본 출원의 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주로부터 항균물질을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.
- [119] 이때, 상기 항균물질은 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주가 생산하는 항균활성을 가지는 물질이면 제한 없이 모두 포함되며, 일 구체예로 추출액(crude extracts), 화합물 일 수 있으나 이에 제한 되는 것은 아니다.
- [120] 상기 회수는 본 출원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 목적하는 항균물질을 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 또는 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 항균물질을 회수할 수 있다.
- [121] 또한, 본 출원의 항균조성물의 제조방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수

있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 항균조성물 제조방법이 회수 단계와 정제 단계를 모두 포함하는 경우, 상기 회수 단계와 정제 단계는 순서에 상관없이 이시적(또는 연속적)으로 수행되거나, 동시에 또는 하나의 단계로 통합되어 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [122] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주를 배지에서 배양하여 발효하는 단계를 포함하는, 발효물의 제조 방법을 제공한다.
- [123] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 방법에 의해 제조된 발효물을 제공한다.
- [124] 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주는 앞서 설명한 바와 같으며, 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계 역시 앞서 설명한 바와 같다.
- [125] 본 출원에서 용어, "발효물"은, 본 출원의 미생물을 배양하여 수득된 조성물을 의미한다.
- [126] 나아가, 상기 발효물은 상기 미생물을 배양한 후, 적절한 후처리 공정을 거친 후 수득된 액상 또는 분말 형태의 조성물을 포함할 수 있다. 이 때, 적절한 후처리공정은, 예를 들어, 상기 미생물의 배양 공정, 균체 제거 공정, 농축 공정, 여과 공정, 및 담체 혼합 공정을 포함할 수 있으며, 추가적으로 건조 공정을 더 포함할 수도 있다. 경우에 따라서, 상기 후처리 공정은 정제 공정을 포함하지 않을 수 있다.
- [127] 나아가, "상기 발효물"은 본 출원의 미생물을 배양하여 수득된 조성물을 포함하기만 한다면, 비발효 공정으로 수득된 물질 및/또는 비천연 공정으로 수득된 또 다른 물질을 추가로 혼합한 경우를 배제하지 않는다.
- [128] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주 또는 상기 균주를 이용한 발효물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [129] 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 및 식품은 전술된 바와 같다.
- [130] 상기 발효물은 식품의 주원료를 함유하고 있는 배지에 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주를 접종 및 배양하여 수득한 배지 또는 상기 배지와 함께 배양한 미생물을 포함하는 배양물을 의미할 수 있다.
- [131] 또한 상기 발효물은 식품 원료에 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 균주를 접종 및 배양하여 수득한 배양물일 수 있다. 상기 식품 원료는 곡물류일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [132] 본 출원의 일 구체예로 상기 곡물류는 쌀, 보리, 밀, 옥수수 등일 수 있으며, 구체적으로, 밀, 밀브랜, 쌀 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [133] 상기 발효물은 상기 배지 또는 배양물의 여과액, 희석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물, 건조물, 분쇄물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [134]

- [135] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 신규 분리된 균주 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20을 접종하는 단계를 포함하는 식품의 제조방법을 제공한다.
- [136] 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 및 식품은 전술된 바와 같다.
- [137] 본 출원의 일 구체예로, 상기 식품 제조방법은 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20을 곡물에 접종 및 배양하는 단계를 포함하는 발효식품의 제조방법일 수 있다. 상기 균주를 접종 및 배양하여 수득한 발효식품은 구체적으로 장류, 젓갈류 일 수 있으며, 보다 구체적으로 템페 또는 템페를 포함하는 소스류일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [138]
- [139] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 신규 분리된 균주 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.
- [140] 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20 및 사료는 전술된 바와 같다.
- [141]
- [142] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 출원은 상기 신규 분리된 균주 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물, 발효물, 그의 농축물, 그의 추출물, 및 그의 건조물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 조성물의 항균 용도를 제공한다.
- [143]
- 발명의 실시를 위한 형태**
- [144] 이하, 실시예를 통해 본 출원의 구성 및 효과를 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 이들 실시예는 본 출원의 예시적인 기재일 뿐, 본 출원의 범위가 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.
- [145]
- [146] **실시예 1. 항균 물질을 생산하는 균주의 분리 및 동정**
- [147]
- [148] 항균 활성이 있는 균주의 선별을 위하여, 재래식 템페들을 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지에서 30°C 5일 배양한 후 리조푸스 속 형태적 특징을 이용하여 1차 선별하고, 선별된 균주는 5% Kanamycin 1,000ppm을 넣은 PDA 배지에 30°C 5일간 배양하여 분리하였다.
- [149]
- [150] 상기와 같은 공정에 의해 선별된 균주의 18S rRNA, ABP (ABP1) 및 Chitinase (Chi2) 유전자의 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 NCBI의 BLAST를 이용하여 GenBank 데이터베이스와 선별된 균주의 각각의 염기서열(18S rRNA: 서열 번호 1, ABP1: 서열 번호 2, Chi2: 서열 번호 3)을 비교하였다.
- [151] 구체적으로, ABP1 유전자의 염기서열에 근거하여 프라이머 서열번호 4 및 5를

합성하였으며, Chi2 유전자의 염기서열에 근거하여 프라이머 서열번호 6 및 7을 합성하여 PCR을 통해 각각의 염기서열을 확인하였다. 그 결과, 본 균주의 염기서열은 리조푸스 올리고스포러스 18S rRNA에 대해 100%, ABP Gene에 대해 99.9%, Chitinase Gene에 대해 100% 상동성을 보였다.

- [152] 상기의 결과로부터 본 출원에서 취득된 균주는 리조푸스 올리고스포러스 균주로 동정하고 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20로 명명하였으며, 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 2020년 12월 09일자로 기탁하고 수탁번호 KCCM12893P를 부여 받았다.

[153]

[154] 실시예 2. 항균 물질의 분리 및 정제

[155]

- [156] 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20균주가 생산하는 항균물질을 분리하고자, 상기 균주를 10-15 g 밀브랜에 접종한 다음, 30°C 5일, 35°C 1일간 배양하였다. 상기 배양물을 증류수 중량 50배 희석 후 60분간 30°C 150 rpm 조건으로 추출하였다. 추출액(crude extracts)은 규조토를 이용하여 5.0 µm Filter paper로 감압 여과를 행하였다. 여과액은 -20°C 48시간 동결 건조하여 건조물로 정제하였다.

[157]

[158] 실시예 3. 진균류 및 식중독 유발 세균에 대한 항균 활성 시험

[159]

- [160] 신규 분리된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20균주가 진균류 및 식중독 유발 세균에 대하여 억제하는 효과가 있는지 확인하기 위하여 아래와 같은 항균 활성 실험을 진행하였다.

- [161] 장류 발효 곰팡이인 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*)와 식품 오염원 아스퍼질러스 나이거 (*Aspergillus niger*)는 PDA (Potato dextrose agar) 배지에 배양하였다.

- [162] 병원성 효모균 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)와 식품 오염원 자이고사카로마이세스 바일리(*Zygosaccharomyces bailii*) 들은 YPD 배지(Yeast extract peptone dextrose agar)에 배양하였다.

- [163] 또한, 식중독 유발 세균인 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 장관병원성 대장균(*Escherichia coli*), 장류 발효 세균인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 벨레젠시스 (*Bacillus velezensis*) 들은 TSA(Tryptic soy agar) 배지에 배양하였다.

- [164] 상기 실시예 2에서 건조한 항균 물질을 증류수에 녹인 후, 상기 지시 균주가 도말된 평판배지 위에 8 mm 직경의 종이 디스크를 놓고 상기 항균 물질을 30 µl씩 일정하게 가한 후에 30°C에서 24 내지 48시간 동안 배양하여 분리 균주가 생산하는 항균 물질에 의한 생육 저지환 생성 여부를 관찰하였으며, 그 결과를 표 1 및 도 1에 나타내었다. 상기 표 1의 '-'는 생육을 저지하지 못한 경우이고, '+'의

경우 생육 저지환의 직경이 3mm 내지 5 mm이하인 경우이고, '++'의 경우 생육 저지환의 직경이 6mm 내지 10mm인 경우이며, '+++'의 경우 생육 저지환의 직경이 10 mm 이상인 경우이다.

[165] 또한, 상기 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20균주 외에 재래식 템페(인도네시아 및 베트남에서 전통방식으로 제조한 템페)에서 분리한 균주인 리조푸스 올리고스포러스 균주 4종을 비교예 1 내지 4로 항균활성을 비교하였다.

[166]

[167] [표1]

미 생물	항균활성				
	<i>Rhizopus oligosporus</i> CJCC02-20	<i>Rhizopus oligosporus</i> (비교예 1)	<i>Rhizopus oligosporus</i> (비교예 2)	<i>Rhizopus oligosporus</i> (비교예3)	<i>Rhizopus oligosporus</i> (비교예4)
<i>Aspergillus oryzae</i>	+++	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+++	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+++	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	++	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>Bacillus velezensis</i>	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-	-	-	-	-

[168] 상기 표 1 및 도 1에서 확인할 수 있듯이, 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20균주로부터 수득한 정제 물질은 효모에는 항균 활성이 없었으나, 장류 또는 일반 식품에서 저해하기 어려운 아스퍼질러스 오리제와 아스퍼질러스 나이거 곰팡이 균을 선택적으로 제어할 수 있는 우수한 항진균 활성을 보였다.

[169] 또한, 장관병원성 대장균에 선택적 항균 활성을 보였으며, 타 리조푸스 올리고스포러스 균주 대비 식중독균인 바실러스 세레우스에 대한 항균활성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

[170]

[171] 실시예 4: 발효제품 템페에서 식중독균 방제 효과 확인

[172]

[173] 실시예 1에 의해 동정된 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20의 발효제품에서의 식중독균 방제효과를 확인하기 위하여, 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20균주를 15-20 g 밀쌀에 접종한 다음, 30°C 6일, 40°C 1일간 배양하였다. 상기 배양물은 분쇄기를 이용하여 분말로 만들었다.

[174] 해마다 바뀌는 소비 트렌드에 따라 곡물을 다양화한 발효 제품을 개발하기 위해 증자한 대두, 증자한 대두와 쌀, 증자한 대두와 소맥분, 증자한 소맥분에 상기 배양액 분말과 시중 판매되는 리조푸스 올리고스포러스 균주(Ragi Tempe Raprime, Bandung社, Indonesia)를 4% 접종 및 혼합한 다음, 습도를 60%로 조절하여 온도 30°C에서 1-2일간 배양하여 발효 제품인 템페를 만들었다.

[175] 배양한 템페들과 시중 판매되는 재래식 템페를 TSA(Tryptic soy agar)와 Polymyxin B 및 Trimethoprim을 첨가한 *Bacillus cereus* 선택 배지에 30°C 1일간 배양하였다. 실시예 1에서 분리한 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20균주를 접종한 템페들에서는 식중독 유발 세균인 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)와 장관병원성 대장균(*Escherichia coli*)이 검출되지 않은 반면, 시중 판매되는 균주를 접종한 템페와 재래식 템페에서는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)가 검출됨을 확인하였다(표 2 참조).

[176]

[177] [표2]

항목	재래식 템페	시판 균주 활용 템페				분리 균주 활용 템페			
		대두	대두+ 소맥 분	대두+ 쌀	소맥 분	대두	대두+ 소맥 분	대두+ 쌀	소맥 분
Protease activity (unit/g)	300	82	103	83	118	114	134	113	145
<i>Bacillus cereus</i> (CFU /g)	100,000	30,000	10,500	10,200	40,000	ND	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> (CFU/g)	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

[178] * ND: Not Detected

[179] 상기의 결과로서, 리조푸스 올리고스포러스 CJCC02-20균주는 템페 발효

균주로서 전통 풍미를 구현하면서 식중독 균을 제어할 수 있는 효과가 뛰어남을 확인하였다.

[180]

[181] 따라서, 본 출원의 신규 리조푸스 올리고스포리스 CJCC02-20균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물, 그의 농축물 및 그의 건조물 등을 포함하는 항균조성물은 진균 및 식중독균에 대한 항균효과가 뛰어나므로 이를 포함하는 식품, 의약품, 의약품 등에 효과적으로 사용될 수 있다.

[182]

[183] 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.

[184]

[185] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터

[186] 수탁번호 : KCCM12893P

[187] 수탁일자 : 20201209

[188]

[189]

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>Rhizopus oligosporus</i> CICC02-20	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12893P
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 2020년 12월 09일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제대 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2020. 12. 09.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2021년 1월 22일

특허법인 한얼 인



청구범위

- [청구항 1] 기탁번호 KCCM12893P로 기탁된 리조푸스 올리고스포르스 CJCC02-20 (*Rhizopus oligosporus* CJCC02-20) 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 균주는 진균, 세균 또는 이들의 조합에 대한 항균활성을 가지는 것인, 균주.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 진균은 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 또는 이들의 조합인 것인, 균주.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 세균은 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 대장균(*Escherichia coli*) 또는 이들의 조합인 것인, 균주.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 균주는 아스퍼질러스 오리제, 아스퍼질러스 나이거 또는 대장균에 특이적 항균활성을 가지는 것인, 균주.
- [청구항 6] 제1항 내지 5항 중 어느 한 항에 따른 리조푸스 올리고스포르스 CJCC02-20 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물, 그의 농축물 및 그의 건조물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 항균 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 조성물은 진균, 세균 또는 이들의 조합에 대한 항균활성을 가지는 것인, 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 따른 항균 조성물을 포함하는, 식품 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 식품은 템페 또는 템페를 포함하는 소스인 것인, 식품 조성물.
- [청구항 10] 제6항에 따른 항균 조성물을 포함하는, 사료 조성물.
- [청구항 11] 제6항에 따른 항균 조성물을 포함하는, 진균, 세균 또는 이들의 조합으로 인한 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 미생물 감염질환은 식중독, 설사, 구토, 장염, 위장관염, 변비, 복통 및 복부팽만으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 13] 제6항에 따른 항균 조성물을 포함하는, 진균, 세균 또는 이들의 조합으로 인한 미생물 감염 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 14] 제6항에 따른 항균 조성물을 포함하는, 의약품 조성물.