(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0070975
(43) 공개일자 2009년07월01일

(51) Int. Cl.
*C12N 1/20* (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0139155
(22) 출원일자 2007년12월27일
심사청구일자 2007년12월27일

(71) 출원인
**조선대학교산학협력단**
광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기획팀
(72) 발명자
**장해춘**
광주 남구 진월동 514-22 한국아델리움아파트 101-1002
**양은주**
광주 북구 동림동 푸른마을주공아파트 311동 903호
(74) 대리인
**황주명, 성정현, 위병갑**

전체 청구항 수 : 총 6 항

# (54) 메주로부터 분리된 바실러스 서브틸리스 및 이를 포함하는항균 조성물

## (57) 요 약

본 발명은 메주로부터 분리되고 항균활성 및 항진균활성을 갖는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)에 관한 것으로, 보다 상세하게는 그람 양성균(gram-positive bacillus) 에 대한 항균활성과 칸디다 속(*Candida* sp.) 효모 및 곰팡이균에 대한 항진균활성을 갖는 바실러스 서브틸리스 MJP1(*Bacillus subtilis* MJP1) 및 상기 균주, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 항균조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 균주는 GRAS(generally regarded as safe) 미생물에 속하고, 상기 균주 또는 이의 배양액은 그람 양성균, 칸디다 속 효모 및 곰팡이에 대한 우수한 항균 및 항진균 활성을 가지며, 이러한 항균 및 항진균활성은 넓은 pH 범위에서도 그 활성이 유지되고, 열처리 및 효소처리를 한 경우에도 항진균활성이 유지될 수 있으므로, 항균 조성물, 상기 항균 조성물을 유효성분으로 포함하는 천연식품보존제와 사료보존제 및 상기 항균 조성물을 유효성분으로 포함하는 의약 조성물과 식품 조성물 등 다양한 산업분야에 이용될 수 있다.

*대 표 도* - 도1

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

메주로부터 분리되고 그람양성균에 대한 항균활성 및 진균에 대한 항진균활성을 갖으며, 기탁번호 KFCC 11401P를 갖는 바실러스 서브틸리스 MJP1 균주(*bacillus subtilis* MJP1 KFCC 11401P).

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 그람양성균은 리스테리아 속 균주(*Listeria* sp), 바실러스 속 균주(*Bacillus* sp), 엔테로코커스 균주(*Enterococcus* sp) 및 스테필로코커스 속 균주(*Staphylococcus* sp)로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상이고,

상기 진균은 칸디다 속 균주(*Candida* sp.), 아스페르길루스 속 균주(*Aspergillus* sp.), 페니실륨 속 균주(*Penicillum* sp), 에피코컴 속 균주(*Epicoccum* sp) 및 클라도스포리움 속 균주(*Cladosporium* sp)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상인 갖는 바실러스 서브틸리스 MJP1 균주.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물.

### 청구항 4

제3항의 항균 조성물을 포함하는 식품, 사료, 화장품 및 의약품으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 대한 보존제 조성물.

### 청구항 5

제3항의 항균 조성물을 포함하는 여성 비뇨기 감염 치료 또는 예방용 조성물.

### 청구항 6

제3항의 항균 조성물을 포함하는 조갑 백선 치료 또는 예방용 조성물.

## 명 세 서

## 발명의 상세한 설명

### 기 술 분 야

<1> 본 발명은 항균활성 및 항진균활성을 갖는 미생물 및 상기 미생물을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

<2> 최근 보고에 의하면, 세계 식량생산량의 5 내지 10%가 곰팡이성 변패에 의해 손실된다고 보고되고 있으며, 특히 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.)은 다양한 종류의 식품이나 사료를 저장기간 중 변패시키고 있는 것으로 알려지고 있다. 이와 아울러 이들 변패 곰팡이는 곰팡이 독소를 생성하여 심각한 인체질환의 원인이 되기도 한다.

<3> 상기한 식품의 경우뿐만 아니라, 사료, 의약품이나 화장품의 경우에도 곰팡를 비롯한 미생물에 의한 변패나 부패가 문제되고 있으며, 이러한 변패나 부패를 방지하고 상기 식품 등의 품질을 오랫동안 유지하기 위한 노력이 계속되고 있다. 상기 미생물에 의한 변패나 부패를 방지하기 위하여, 미생물에 의한 부패를 막아주는 보존제 또는 방부제가 널리 사용되고 있다.

<4> 식품의 보존제 또는 방부제, 화장품이나 의약품 등의 보존제 또는 사료의 보존제란 넓은 의미로는 식품, 의약품, 화장품이나 사료의 변질 및 부패나 화학변화를 방지하여 영양가와 신선도를 유지시키기 위하여 사용되는 첨가물을 의미하여, 좁은 의미로는 세균, 곰팡이, 효모등 미생물의 증식을 억제하여 식품 및 의약품을 보존

하는 첨가물로서 부패미생물의 발육을 저지하거나 살균하기 위하여 사용되는 것이다. 이러한 식품의 방부제 및 화장품, 의약품 등의 보존제로써 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.

<5> 기존의 보존제 또는 방부제는 주로 화학적 보존제 또는 방부제가 많이 사용되었으나, 상기 화학적 보존제 또는 방부제 중에서 가장 안전한 것으로 인정되어 범용적으로 사용되는 파라벤류의 방부제들조차 피부알러지와 환경호르몬으로서의 가능성이라는 문제점을 가지고있다. 또한, 식품에 주로 사용되는 보존제 또는 방부제들은 허용된 기준 내에 사용되는 경우에도, 항균력에 대한 불신뿐만 아니라 인체 안전성에 대한 불신이 계속되고 있으며, 지속적인 체내 축적으로 인한 급·만성 독성이나 돌연변이 유발 등의 새로운 문제 가능성이 대두되고 있다.

<6> 상기한 문제점에 대한 언론매체의 보도 등으로 인하여 최근 들어 대부분의 소비자들의 화학적 방부제나 첨가물에 대한 사용 거부감의 동향이 증가함에 따라 미생물이나 그 대사산물로서 변패 미생물의 생육을 저해할 수 있는 천연 보존제 또는 방부제에 대한 관심이 급증하고 있다. 이러한 천연 보존제 또는 방부제에 대한 요구에 수반하여, 안전성과 경제성이 우수한 천연방부제에 대한 연구의 필요성이 증대되고 있는 실정이다.

<7> 상기 천연방부제와 관련하여, 미생물로부터 생산되는 항생물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 상기한 항생물질 중의 일 예로 박테리오신 또는 박테리오신 유사물질(bacteriocin-like substances, BLS)에 대한 관심이 증대되고 있다. 상기 박테리오신 또는 박테리오신 유사물질과 관련하여, 유산균이나 바실러스 속 미생물 등이 연구되고 있다.

<8> 박테리오신 중 nisin이 1998년 미국 FDA로부터 가공치즈 스프레드 식품에 사용되는 것이 승인된 이후로, 박테리오신은 식품산업에서 사용될 수 있는 항균제재로서 인식되고 있으며, 이에 따라 박테리오신, 특히 박테리오신의 항균제재 용도에 대한 수많은 연구들이 진행되고 있다.

<9> 특히 유산균이 생산하는 박테리오신은 유산균이 GRAS(generally regarded as safe) 미생물이고, 인간의 장내 단백분해효소에 의해 분해되므로 안전하다는 인식에 의해, 박테리오신 관련 연구들 중 가장 많은 연구가 유산균 유래의 박테리오신에 대하여 진행되고 있다. 그러나 이와 같은 유산균 유래 박테리오신에 관한 수많은 연구보고가 있음에도 불구하고, 항균 스펙트럼이 좁아 특히 그람 음성균이나 효모, 곰팡이에 대해서는 거의 항균력이 없다는 단점으로 인하여, 유산균 유래 박테리오신은 실제로 식품보존제로 널리 활용되지 못하고 있는 실정이다.

<10> Klaenhammer가 주장한 바와 같이, 천연식품보존제의 경우 식품부패나 식중독 등에 관여하는 세균, 효모 및 곰팡이 등의 미생물에 대해 총체적으로 적용 가능한 넓은 범위의 항균력이 요구되므로, 상기 유산균 또는 유산균이 생산하는 박테리오신을 대체할 수 있는 천연 보존제 또는 방부제에 대한 개발이 요구된다(Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70: 337-349).

<11> 주로 그람 양성균의 생육저해를 할 수 있는 유산균 박테리오신과 달리, 바실러스 속 균주(*Bacillus* sp.)가 생산하는 박테리오신은 그 항균 활성 범위가 매우 넓고 다양한 특성을 지닌다.

<12> 보다 상세하게는, 상기 바실러스 속 균주는 넓은 항균 스펙트럼(antimicrobial spectrum)과 다양한 구조를 지니는 펩타이드 항생물질(peptide antibiotics) 즉, 박테리오신이나 박테리오신 유사물질(bacteriocin-like substances, BLS)을 생산하는 특징을 지니고 있다. 상기 박테리오신이나 박테리오신 유사물질을 생산하는 바실러스 속 균주로는 *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* 및 *B. megaterium* 등인 것으로 보고되어 있다.

<13> 이들이 생산하는 항생물질은 ribosomal antibiotics과 nonribosomal antibiotics로 분류할 수 있으며, 합성되는 기작에 따라 구분된 subtilin, coagulin이 전자에 속하고 antibacterial 활성을 가지며, surfactin, iturin group, fengycin, gramicidins, tyrocidine 및 bacitracin은 후자에 속하고 antibacterial 및 antifungal 활성을 가지는 것으로 보고되고 있다.

<14> 그동안 바실러스 속이 생산하는 박테리오신에 관한 관심은 유산균 유래의 박테리오신 보다 상대적으로 미흡하였다. 그러나 바실러스 속 중 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*)나 바실러스 리케니포르미스(*B. licheniformis*)들은 유산균과 같이 GRAS 미생물이며, 우리나라의 청국장이나 일본의 낫또(natto)를 비롯하여 극동 아시아나 아프리카 지역의 전통음료나 알칼리-발효식품에서 매우 중요한 발효미생물로 작용한다.

<15> 최근 소비자들은 저장기간이 연장되면서도 최소 가공된 식품을 선호하는 추세가 점점 증가하고 있다. 그러므로, 오랜 역사 동안 그 지역의 전통 발효식품과 함께 섭취해온 GRAS 등급의 바실러스 속 미생물, 특히 바실러스 서브틸리스로부터가 생산하는 항균 물질을 이용한 천연식품보존제의 개발은 차세대 식품보존제, 사료보존제 및 사료 항생제 대체제로 활용 가능성이 매우 크다.

<16> 한편, 사춘기 이전의 여성의 질 내는 피부와 유사한 pH 6 내지 8 정도의 중성을 유지하다가 사춘기에 성호르몬의 분비로 인해 글리코겐이 축적된 질 상피세포가 증식되어 세포나 균에서 나오는 효소에 의해서 글리코겐이 젖산으로 분해되어 질 내 산도가 4.5로 유지된다. 질 내에 상주하는 정상 균은 6가지 정도로 그 중 제일 많은 수를 차지하는 세균은 락토바실루스(lactobacillus)로써 이들 균의 생존은 질 내 산도와 당(Glucose)의 이용도에 영향을 받는다. 질 상피세포는 여성호르몬에 의해 글리코겐을 다량 함유하게 되고, 락토바실루스균은 이들을 분해하여 젖산을 생산하게 된다. 만일 질 내 산도가 유지되지 못하거나 대사 장애가 발생하게 되면 정상 균총이 감소되고, 상기 정상 균총의 감소로 인하여 질염을 일으키는 비뇨기 감염원인세균(genitourinary pathogen)들의 감염에 인하여 질병이 발생된다.

<17> 상기 질염을 일으키는 비뇨기 감염원인세균들에는 *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *E coli* 등이 있다. 상기 비뇨기 감염원인세균들에 의한 감염은 요로감염에서부터 시작된다(Reid, G. *et al.*, Potential uses of probiotics in clinical practice. Clinical Microbiology Reviews 16: 658-672 (2003)).

<18> 상기 비뇨기 감염을 치료하기 위한 생균 또는 생균활성제는 상기 병원균에 대한 항균활성이 뛰어나거나 상기 병원균의 성장을 억제하는 능력이 있어야 하며, 여기에 덧붙여 인체 안전성 검사를 통과할 수 있는 GRAS(generally regarded as safe) 미생물이어야 한다.

<19> 또한, 피부진균증(dermatomycosis)은 진균(곰팡이)에 의해 발생되는 피부질환으로서, 특히 피부의 각질, 모발, 손톱, 발톱 등의 각질조직에 침입, 기생하는 피부사상균 또는 칸디다균에 의해 발생되고 피부사상균증(dermatophytosis), 백선(Tinea) 또는 표재성진균증(superficial fungal infection)이라 불리는 발생 빈도가 높은 인체감염증 중 하나이다.

<20> 상기 피부사상균증(dermatophytosis)은 침범부위에 따라 발생부위가 손, 발인 경우 수족부 백선(Tinea manus & Tinea pedis), 안면인 경우 얼굴 백선(Tinea faciale), 두부의 경우에는 두부 백선(Tinea capitis), 서혜부(사타구니)에 발생했을 때에는 완선(Tinea cruris)이라고 하며 손, 발톱의 경우에 조갑 백선(Tinea ungium 또는 Onychomycosis)이라 하고 상기부위를 제외한 부위에 발생한 경우 체부 백선(Tinea)으로 분류된다. 이중 족부 백선 및 조갑 백선은 유병기간이 길고 재발 가능성이 높은 질환이다.

<21> 상기 질환 중, 조갑 백선의 경우 그 부위에 따라 원인균들이 상이한 것으로 보고되어 있다. 조갑 백선 중 발톱 무좀의 경우, 다른 피부사상균증과 유사하게 주로 피부사상균에 속하는 마이크로스포럼(*Microsporum* sp) 및 트리코피톤(*Tricopyton* sp) 속의 진균이 원인균이나, 조갑 백선 중 손톱 무좀의 경우에는 주로 칸디다 균(*Candida* sp) 속의 진균이 원인균이다.

<22> 상기 칸디다균에 의한 손톱 무좀의 경우, 전염성이 강하고 영양원으로 케라틴을 이용한다는 점에서 여러 병원성 진균과 구별되는 특성을 가지며, 원인균과 침투경로가 다양하며, 육안으로 그 원인을 파악하는 것이 불가능한 특성이 있다.

<23> 상기 손톱무좀에 대한 치료에는 기존에 피부사상균에 사용되는 치료제인 그리세오풀빈, 케토카나졸 등의 항진균제가 사용되어 왔으나, 간독성, 위장장애 등 전신적인 부작용이 많았을 뿐만 아니라, 만성 치료시 생기는 내성, 항균 스펙트럼의 한계 및 작용 부위에 대한 약물 전달에 있어서의 문제점 등으로 인해 완치율도 낮아 불신이 많았다. 현재 개발되어 많이 사용되고 있는 트리아졸계의 이트라코나졸 및 알릴아민계의 테르비나핀은 피부사상균증에 대한 치료율이 90%이상이며 부작용 또한 적은 편이나 내성균주 등의 문제가 있다. 또한, 경구용 항진균제는 제한된 균종에만 유효하며, 조갑 백선의 경우 장기간 복용하여야 효능을 알 수 있으며, 장기 복용시에는 간기능 장애 및 내성등의 부작용이 생길 수 있다.

<24> 그러므로 주로 피부사상균증의 치료에는 거부감이 없고 사용이 편리한 연고형 또는 분무형의 개발이 필요한 실정이나 현재 개발되어 약물로 사용되고 있는 항진균제는 많지 않은 실정이다. 따라서, 새로운 항진균제의 요구는 앞으로 더욱 증가될 것으로 전망되며, 독성, 약효의 한계, 내성 등을 개선하기 위하여 기존 항진균제와 달리 천연항균제의 개발이 요구되고 있다.

## *발명의 내용*

### *해결 하고자하는 과제*

<25> 본 발명은 전통 발효 식품으로부터 분리되고 폭넓은 항균 및 항진균활성을 갖는 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<26> 또한, 본 발명은 상기 미생물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 활성성분으로 포함하는 항균 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<27> 또한, 본 발명은 상기 항균 조성물을 포함하는 보존제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<28> 또한, 본 발명은 상기 항균 조성물을 포함하는 여성 비뇨기 감염 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<29> 또한, 본 발명은 상기 항균 조성물을 포함하는 조갑 백선 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

## *과제 해결수단*

<30> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메주로부터 분리되고 항세균활성 및 항진균활성을 갖는 바실러스 서브틸리스(*bacillus subtilis*)를 제공하는 것이다.

<31> 또한 본 발명은 상기 상기 미생물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<32> 또한, 본 발명은 상기 항균 조성물을 포함하는 보존제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<33> 또한, 본 발명은 상기 항균 조성물을 포함하는 여성 비뇨기 감염 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<34> 또한, 본 발명은 상기 항균 조성물을 포함하는 조갑 백선 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<35> 본 발명자들은 메주로부터 분리된 바실러스 서브틸리스 중에서 그람 양성균에 대한 넓은 범위의 항균활성과 칸디다 속(*Candida* sp.) 효모 및 곰팡이에 대한 항진균활성을 갖는 미생물을 검출하여 본 발명을 완성하였다.

<36> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<37> 본 발명에 있어서, 항균 조성물이란 항미생물제를 총칭하는 의미인 항생제와 같은 의미일 수 있고, 항균제, 살균제, 방부제, 보존제 또는 제균제와 같은 의미일 수 있으며, 바람직하게는 그람양성균, 그람음성균, 진균(효모 및 곰팡이)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 발육과 생활 기능을 저지 또는 억제할 수 있는 물질 즉, 항세균 및 항진균 효력이 있는 물질을 의미한다.

<38> 본 발명에 있어서, 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 상기 배양물은 상기 특정 미생물을 포함하거나 포함하지 아니할 수 있다. 상기 배양물은 그 제형이 한정되지 아니하고, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다.

<39> 본 발명에 있어서, 보존제란 식품, 사료, 화장품 및 의약품으로 이루어진 군 중에서 선택된 1 종 이상에 사용될 수 있는 것으로, 세균, 곰팡이 및 효모로 이루어지는 군 중에서 선택된 1 종 이상의 위해 미생물 또는 부패미생물의 증식을 억제하거나 살균하여 식품, 사료 의약품을 보존하는 첨가물로서 부패미생물의 발육을 저지하거나 살균할 수 있는 물질을 의미한다.

<40> 본 발명은 메주로부터 분리되고, 그람 양성균에 대한 항세균활성 및 및 칸디다 속(*Candida* sp.) 효모와 곰팡이에 대한 항진균활성을 갖는 바실러스 서브틸리스 MJP1(*Bacillus subtilis* MJP1)에 관한 것이다.

<41> 상기 메주는 콩, 보리, 밀 및 쌀 등을 익혀 띄워 만드는 장을 담그는 기본 재료로 주로 콩을 삶아 찧어서 덩이를 만들어 발효시켜 제조하는 것이다.

<42> 상기 그람 양성균은 리스테리아 속 균주(*Listeria* sp), 바실러스 속 균주(*Bacillus* sp), 엔테로코커스 균주(*Enterococcus* sp) 및 스테필로코커스 속 균주(*Staphylococcus* sp)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 리스테리아속 균주는 일 예로 리스테리아 모노시아토게네스(*Listeria monocytogenes*)일 수 있고, 상기 바실러스 속 균주는 일 예로 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)일 수 있으며, 엔테로코커스 균주는 일 예로 엔테로코커스 파이칼리스(*Enterococcus faecalis*)일 수 있고, 스테필로코커스 속 균주는 일 예로 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)일 수 있다.

<43> 상기 칸디다 속 균은 일 예로 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있으며, 곰팡이는 아스페르길루스 속(*Aspergillus* sp.), 페니실륨 속(*Penicillum* sp), 에피코컴 속(*Epicoccum* sp) 및 클라도스포리움 속

(*Cladosporium* sp)으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 아스페르길루스 속 균주는 일예로 아스페르길루스 페트라키아이(*Aspergillus petrakii*), 아스페르길루스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*) 및 아스페르길루스 니두란스(*Aspergillus nidulans*)로 이루어진 군 중에서 선택된 1 종 이상일 수 있으며, 상기 페니실룸 속 균주는 일 예로 페니실룸 로퀘포르티(*Penicillum roqueforti*)일 수 있고, 상기 에피코컴 속 균주는 일 예로 에피코컴 니그럼(*Epicoccum* nigrum)일 수 있으며, 상기 클라도스포리움 속 균주는 일예로 클라도스포리움 고시피아이콜라(*Cladosporium gossypiicola*)일 수 있다.

<44> 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1는 서울특별시 서대문구 홍제 1동 361-221번지 유림빌딩에 위치한 한국생명공학연구원에 2007년 11월 7일자로 기탁되어, 수탁번호 KFCC 11401P를 부여받았다.

<45> 본 발명의 바실러스 서브틸리스 MJP1는 메주로부터 분리한 간균으로, 포자를 형성하고, 그람 양성이며 박테리오신 또는 박테리오신 유사 물질로 추정되는 항세균물질 및 항진균물질을 제조할 수 있는 것으로 확인되었고, 당이용성 및 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, 바실러스 서브틸리스로 동정되었다. 보다 구체적으로는 상기 도 2 및 서열번호 3에 기재된 바실러스 서브틸리스 MJP1의 16S rDNA 염기서열은 2007년 7월 12일 Genbank에 등록되어 등록번호 EU024822를 부여 받았으며, 상기 도 3에 나타낸 바와 같이, 16S rDNA 염기서열을 이용하여 계통발생론적으로 분석한 결과 바실러스 서브틸리스 Z99104와 99%의 상동성을 보여 바실러스 서브틸리스로 동정되었다.

<46> 본 발명의 바실러스 서브틸리스 MJP1은 리스테리아 모노시아토게네스에 대하여 현저하게 우수한 항세균활성을 나타내었고, 엔테로코커스 파이칼리스와 황색포도상구균 즉, 스테필로코커스 아우레우스에 대하여 뛰어난 항세균활성을 나타내었으며, 바실러스 서브틸리스에 대해서도 우수한 항세균활성을 나타내었다.

<47> 또한, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 MJP1는 아스페르길루스 페트라키아이, 아스페르길루스 오크라세우스 및 아스페르길루스 니두란스에 대하여 현저하게 우수한 항진균활성을 나타내었고, 에피코컴 니그럼 및 클라도스포리움 고시피아이콜라에 대하여도 매우 우수한 항진균활성을 나타내었으며, 페니실룸 로퀘포르티에 대하여 항진균활성을 나타내었고, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여도 우수한 항진균활성을 갖는 것으로 확인되었다.

<48> 상기 항세균활성 및 항진균활성은 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1를 배양한 배양물에서 상기 균주를 제균한 제균 배양물에서도 동일한 항세균활성 및 항진균활성을 나타내었다.

<49> 또한, 상기 항세균활성 및 항진균활성은 pH 6 내지 10의 범위에서 모두 안정적으로 유지되었고, pH 2 내지 11의 범위에서도 활성이 유지되는 것으로 확인되었고, 상기 항진균활성은 각종 효소에 대한 안정성 실험에서 확인한 결과, 통상의 단백질 가수분해효소에도 영향을 받지 않고 안정적으로 유지될 수 있는 것으로 확인되었다.

<50> 또한, 상기 항진균활성의 경우, 고온의 열처리, 일 예로 100℃ 이상의 열처리, 구체적으로 20 내지 130℃에서도 항진균활성이 안정적으로 유지될 수 있는 것으로 확인되었고, 상기 항세균활성의 경우, 다소 감소하기는 하였으나, 50 내지 130℃에서도 항세균활성을 확인할 수 있었다.

<51> 또한, 상기 항진균활성의 경우, 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1의 대수기, 일 예로 대수기 중반 이후부터 가장 우수한 항진균활성을 나타내었고, 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1의 사멸기에 접어든 후에도 항진균활성이 감소하지 아니하는 것으로 확인되었으며, 상기 항세균활성의 경우, 생육 초기에서부터 항세균활성이 나타났고, 생육정지기 이후에는 항세균활성이 감소하는 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로 상기 항진균활성의 경우, 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1의 배양 8시간부터 나타나기 시작하여, 16시간 이후부터 최대활성을 나타내었으며, 균주의 생육이 사멸기에 접어든 후에도 항진균활성이 계속 유지되었고, 상기 항세균활성의 경우, 일반적인 박테리오신과 달리 생육 초기, 일예로 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1의 배양 4시간부터 확인되었고, 대수기 중반에 이르는 배양 12시간부터 배양 28시간까지 최대 활성을 나타내었으며, 이후로 항세균활성이 감소하는 것으로 확인되었다.

<52> 또한, 본 발명은 바실러스 서브틸리스 MJP1, 이의 배양물, 배양물의 농축물 또는 배양물의 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다.

<53> 본 발명의 항균 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1, 이의 배양물, 배양물의 농축물 또는 배양물의 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 유효성분을 0.001 내지 99.99중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있으며, 상기 항균 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 유효성분의 함량을 적절히 조절할 수 있다.

<54> 상기 항균 조성물은 병원성 미생물, 구체적으로는 그람 양성균에 대한 항균 활성 또는 칸디다 속 효모 및 곰팡이 등에 대한 항균 또는 항진균 활성을 갖는 항균 조성물일 수 있고, 보다 상세하게는 리스테리아 속 균주, 바실러스 속 균주, 엔테로코커스 균주 및 스테필로코커스 속 균주으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 대한 항균 활성 또는 칸디다 속 효모, 아스페르길루스 속 페니실륨 속, 에피코컴 속 및 클라도스포리움 속으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 대한 항진균 활성을 갖는 것일 수 있다.

<55> 상기 리스테리아속 균주는 일 예로 리스테리아 모노시아토게네스(*Listeria monocytogenes*)일 수 있고, 상기 바실러스 속 균주는 일 예로 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)일 수 있으며, 엔테로코커스 균주는 일 예로 엔테로코커스 파이칼리스(*Enterococcus faecalis*)일 수 있고, 스테필로코커스 속 균주는 일 예로 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)일 수 있으며, 상기 칸디다 속 균주는 일 예로 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있고, 상기 아스페르길루스 속 균주는 일 예로 아스페르길루스 페트라키아이(*Aspergillus petrakii*), 아스페르길루스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*) 및 아스페르길루스 니두란스(*Aspergillus nidulans*)로 이루어진 군 중에서 선택된 1 종 이상일 수 있으며, 상기 페니실륨 속 균주는 일 예로 페니실륨 로퀘포르티(*Penicillum roqueforti*)일 수 있고, 상기 에피코컴 속 균주는 일 예로 에피코컴 니그럼(*Epicoccum* nigrum)일 수 있으며, 상기 클라도스포리움 속 균주는 일 예로 클라도스포리움 고시피아이콜라(*Cladosporium gossypiicola*)일 수 있다.

<56> 상기 칸디다 속 균주는 진균류의 한 속으로 사상균과 효모의 중간형태로 사람이나 동물에 기생하여 질병을 일으키는 병원균에 속한다. 상기 칸디다 속 균주는 칸디다증, 질칸디다증, 조갑백선 및 폐칸디다증의 원인인 것으로 보고 되어 있다. 상기 칸디다 속 균주에 의해 발병되는 질병은 90% 이상이 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 의해 유발되는 것으로 보고 되어 있다.

<57> 상기 칸디다증은 칸디다균의 감염으로 발생하는 염증으로, 피부 각층, 각막, 구강 점막 따위에 옮는 표재성과 피부 심지, 기관지, 폐, 소화기 따위의 내장에 옮는 심재성이 있다. 상기 질칸디다증은 여성의 질에 칸디다가 침범하여 일으키는 질의 질환으로, 외음부에 심한 가려움을 느끼며 질구와 그 둘레, 대음순 및 소음순에 흰 막이나 알갱이 꼴의 것이 붙어 있는 증상을 일으키기도 한다.

<58> 상기 조갑백선은 칸디다균이 손톱이나 발톱에 침입하여 손톱이나 발톱을 거칠고 더럽게 만들며 때로 흰색의 점이 생기는 증상을 수반하는 질병으로 손발톱 무좀이라고 한다. 상기 조갑백선 중 발톱 무좀의 경우, 피부사상균이 원인균이나, 조갑백선 중 손톱 무좀의 경우에는 주로 칸디다 균(*Candida* sp) 속의 진균이 원인균이다. 상기 칸디다균에 의한 손톱 무좀의 경우, 전염성이 강하고 영양원으로 케라틴을 이용한다는 점에서 여러 병원성 진균과 구별되는 특성을 가지며, 원인균과 침투경로가 다양하며, 육안으로 그 원인을 파악하는 것이 불가능한 특성이 있다.

<59> 상기 폐칸디다증은 상기 칸디다균, 특히 칸디다 알비칸스에 의한 폐 질환, 기침, 가래, 혈담, 미열, 빈혈 및 체중감소 따위가 나타나며 만성 폐결핵과 비슷한 증상을 보이는 질병이다.

<60> 상기 황색포도상구균은 농양이나 창상감염 등의 피부 감염뿐만 아니라 폐렴, 패혈증 등의 중증 감염의 원인 균으로 보고 되어 있으며, 보다 구체적으로 상기 황색포도상구균에 의한 감염에 의해 폐렴, 폐화농증, 농흉 등의 호흡기감염증, 패혈증, 균혈증, 감염성 심내막염, 장관감염증, 난치성 욕창 또는 창상감염등이 발병되는 것으로 보고 되어 있다

<61> 본 발명의 항균 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용되어 항균 활성을 나타낼 수 있으며, 곡류를 포함한 식품, 화장품 또는 의약에 적용되어 그람 양성균, 효모 또는 곰팡이에 의한 제품의 부패를 억제하거나 예방할 수 있다.

<62> 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하며, 소화나 배성 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하고, 바람직하게는 꿩 또는 닭 등의 가금류를 포함하는 조류 또는 인간, 돼지, 소 염소 등의 포유류일 수 있다.

<63> 본 발명의 항균 조성물은 상기 유효성분 외에 당질, 단백질, 지질, 비타민류 및 미네랄류를 포함할 수 있다.

<64> 상기 당질은 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일예로 벌꿀, 덱스트린, 수크로오스, 팔라티노스, 포도당, 과당, 물엿, 당알콜(sugar alcohol), 소르비톨, 크실리톨, 말티톨일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 단백질은 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일예로, 카제인(casein), 유청 단백질(whey protein) 등의 우유 유래 단백질, 대두 단백질, 이들 단백질의 트립신, 펩신 등의

동물 유래 효소 및 뉴트라아제(neutrase), 알칼라아제(alkilase)에 의한 가수분해물일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 지질은 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일예로, 제1가 포화지방산, 다가 불포화지방산을 포함하는 해바라기유, 채종유(rapeseed oil), 올리브유, 홍화유(safflower oil), 옥수수유, 대두유, 팜유(palm oil), 야자유 등의 각종 식물 유래 유지, 중쇄 지방산(middle-chain fatty acid), EPA, DHA, 대두유래 인지질, 우유 유래 인지질일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 비타민류는 특별한 제한은 없으며, 상기 미네랄류는 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일예로, 인산칼륨, 탄산칼륨, 염화칼륨, 염화나트륨, 유산칼슘, 글루콘산칼슘, 판토텐산칼슘, 카제인칼슘, 염화마그네슘, 황산제1철, 탄산수소나트륨일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

<65> 상기 당질, 단백질, 지질, 비타민류 및 미네랄류 중 어느 것에 대해서도, 조성물의 항균성이 유지되는 한 상기 구체예에 한정되지 않고 다른 성분을 포함할 수 있으며, 각각의 함량은 항균성이 유지되는 한 제한되지 아니하고, 바람직하게는 전체 조성물 대비 0.1 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.5 내지 10 중량%일 수 있다.

<66> 또한, 본 발명은 상기 항균 조성물을 포함하는 보존제 조성물에 관한 것이다.

<67> 상기 보존제 조성물은 세균, 곰팡이 및 효모 등의 위해 미생물 또는 부패 미생물의 증식을 억제하거나 살균하여, 위해 미생물 또는 부패 미생물에 의해 감염되거나 부패될 수 있는 보존대상의 변질, 산패 또는 부패를 방지하고 보존대상의 상태를 유지하기 위하여 사용되는 물질을 의미하며, 바람직하게는 식품, 사료, 화장품 및 의약품으로 이루어진 군중에서 선택된 1종 이상에 사용될 수 있는 것을 의미한다.

<68> 본 발명에 있어서, 상기 식품은 식품가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 건강보조식품, 조미식품, 제빵 및 제과류, 유가공품, 절임식품, 발효식품 또는 음료 등을 포함하며, 상기 사료는 가축 사료를 포함하여 그 용도에 제한되지 아니하고, 고체 또는 액체일 수 있다.

<69> 본 발명의 상기 항균 조성물을 포함하는 보존제 조성물은 상기 항균 조성물을 포함하는 것을 제외하고는 보존제에 포함되는 통상의 물질을 추가로 포함할 수 있다. 상기 보존제 조성물은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 상기 항균 조성물을 0.1 내지 50 중량부 또는 0.5 내지 10 중량부 포함하는 것일 수 있다.

<70> 또한, 본 발명의 상기 보존제 조성물은 본 발명의 효과를 제한하지 않는 범위 내에서, 종래의 합성 보존제 또는 유기산 혼합물을 함께 사용할 수 있다.

<71> 또한, 본 발명은 상기 항균 조성물을 포함하는 여성 비뇨기 감염 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

<72> 또한, 본 발명은 상기 항균 조성물을 포함하는 조갑 백선 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

<73> 상기 여성 비뇨기 감염은 질염을 일으키는 비뇨기 감염원인세균(genitourinary pathogen)들의 감염에 인한 질병으로, 주로 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 황색포도산구균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*E coli*) 등에 의해 여성의 비뇨기가 감염되어 발생되고, 주로 요로감염에서부터 시작되며, 바람직하게는 칸디사성 질염일 수 있다.

<74> 상기 칸디다성 질염은 여성 비뇨기 감염 중 가장 많이 나타나는 질염으로서 대부분의 여성이 일생동안 한번 이상 경험하는 질염이며, 임산부 중 약 1/3이 이 질염에 감염되어 있는 주요 산부인과 질환 중의 하나이다. 대하와 국소소양증이 주된 증상이며 작열감(burning sensation), 성교통, 부종, 외음부통증 등이 있고 임상소견으로는 외음부 및 질의 홍반, 울혈, 표피박리, 소포, 농포 등의 증상이 있다. 상기 칸디다성 질염에 관한 기존 치료제로는 케토코나졸(ketoconazole)과 마이코스타틴(mycostatin)의 병합 치료가 보고된 바 있으며, 근래에 와서는 이미다졸(imidazole) 제제로서 마이코나졸나이트레이트(myconazole nitrate)와 클로트리마졸(clotrimazole)을 사용할 수 있는 것으로 보고 되어 있다.

<75> 본 발명의 항균 조성물 또는 바실러스 서브틸리스 MJP1는 칸디다 속 효모 및 황색포도상구균 등에 대한 항균 활성을 가지고 있으므로, 상기 항균 조성물은 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 및 예방 효과를 갖는다.

<76> 본 발명의 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하며, 소화나 배설 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하고, 바람직하게는 척추동물, 더욱 바람직하게는 포유류일 수 있다. 구체적으로는 상기 포유류는 인간, 돼지, 소 또는 염소 등일 수 있다.

<77> 상기 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물은 상기 항균 조성물을 유효성분으로 단

독으로 포함할 수 있고, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 추가성분 즉, 약제학적으로 허용되거나 영양학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.

<78> 보다 상세하게는 상기 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 또한, 상기 담체, 부형제 또는 희석제는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아키시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀루로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이드, 프로필렌 글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 항균 조성물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

<79> 상기 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 항균 조성물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량%, 더욱 바람직하게는 1중량% 내지 50 중량% 포함될 수 있다. 또한, 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 항균 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위에서 추가할 수 있다.

<80> 또한, 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물은 약제화하는 경우, 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 보존제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있으며, 그 제형으로는 주로 비경구, 예컨데 국부적으로 감염된 부위에 도말하여 적용될 수 있다.

<81> 구체적으로 비경구투여를 위한 형태로는 크림, 연고, 드레싱 용액, 분무제, 기타 도포제 등을 들 수 있다. 상기 국소 투여제의 제형의 일예로는, 유효성분인 항균 조성물 또는 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물을 천연 섬유 또는 합성 섬유로 만든 거즈 등의 담체에 함침시킨 것일 수 있다.

<82> 상기 크림 또는 연고의 경우, 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선의 환부나 그 주위에 직접 도포하는데 적합할 수 있다. 상기 분무제의 경우, 유효성분으로 항균 조성물을 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 분무제 제조방법으로 제조될 수 있고, 압축용기나 기타 분무용기에 충전포장하여 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선 부위에 수시로 분무도포하여 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선을 치료 또는 예방할 수 있다. 상기 드레싱 용액의 경우, 유효성분으로 항균 조성물을 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 드레싱 용액의 제조방법으로 제조될 수 있고, 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선 부위에 드레싱이나 기타 세균 감염부위의 드레싱에 사용하여 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선을 치료 또는 예방할 수 있다.

<83> 또한, 본 발명의 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 더 나아가 본 발명의 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 바람직하게 제형화될 수 있다.

<84> 본 발명에 따른 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물의 투여량은, 제제화 방법, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도, 투여 경로와 반응 감응성 등을 고려하여 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 일예로, 본 발명의 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물은 항균 조성물을 기준으로 할 때, 0.0001 mg/kg 내지 1000 mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해서는 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg으로 투여될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<85> 또한, 본 발명의 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선에 대한 치료 또는 예방용 조성물은 항균조성물 이외에 공지의 여성 비뇨기 감염 또는 조갑백선 치료 또는 예방효과를 갖거나, 칸디다 알비칸스 또는 황색포도상구균의 항균활성 또는 억제활성을 갖는 화합물이나 천연물 또는 천연물의 추출물 등을 더욱 포함할 수 있으며, 상기 더욱 포함되는 성분은 항균조성물 100 중량부에 대하여 각각 5 중량부 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.

<86> 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1는 보편적으로 인체에 안전한 것으로 인정되는 GRAS(generally regarded as safe) 미생물에 해당되고, 상기 균주 자체 및 상기 균주를 배양한 배양물에서 상기 균주를 제균한 배양물에서도

그람 양성균에 대한 폭 넓은 항세균활성 및 및 칸디다 속(*Candida* sp.) 효모와 곰팡이에 대한 폭 넓은 항진균활성이 확인되었므로, 상기 항균 조성물은 천연식품보존제, 사료보존제, 의약 조성물 및 식품 조성물 등 다양한 산업분야에 이용될 수 있다.

## 효 과

<87> 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 MJP1은 그람 양성균에 대한 폭 넓은 항세균활성 및 및 칸디다 속(*Candida* sp.) 효모와 곰팡이에 대한 폭 넓은 항진균활성을 갖고, 폭 넓은 pH 범위에서도 활성이 유지되고, 열처리를 이용하여 측정한 결과, 상기 항진균활성은 온도변하에도 활성이 유지될 뿐만 아니라, 상기 균주는 보편적으로 인체에 안전한 것으로 인정되는 GRAS(generally regarded as safe) 미생물에 해당되므로, 항균 조성물 및 천연식품보존제, 사료보존제, 의약 조성물 및 식품 조성물 등 다양한 산업분야에 이용될 수 있으므로, 그 산업적 이용가치가 매우 크다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<88> 이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<89> **<실시예 1> 항균활성을 가진 균주의 분리 및 동정**

<90> 1-1. 항균활성을 가진 균주의 분리

<91> 전라남도 광주지역의 가정에서 제조된 재래형 메주를 수집하여, 이 중 1g을 취하여 마쇄하였다. 상기 마쇄된 메주 가루를 10 ml의 멸균수에 현탁한 후, 200 μl를 취하여 potato dextrose agar(PDA, Difco Laboratories, U.S.A.) 배지에 도말하였다. 25℃에서 5일 동안 평판배양하면서 집락을 형성하는 균주를 관찰하였다.

<92> 상기 PDA 평판배지에서 5일간 배양한 후, 형성되는 미생물의 집락을 관찰한 결과, 다양한 종류의 세균과 곰팡이들이 동일한 배지 내에서 관찰되었으며, 이 중 곰팡이들에 저해 활성을 나타내는 균주 1종과 이에 감수성을 나타내는 곰팡이 3종을 선별하여 분리하였다.

<93> 1-2. 항균활성을 가진 균주의 동정

<94> 상기 곰팡이에 대해 생육 저해 활성을 나타내는 분리균주의 동정을 위하여, 일차적으로 형태학적, 생화학적 조사를 수행하였고, 최종적인 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다.

<95> 상기 형태학적 조사는 그람 염색 여부와 현미경을 이용하여 균의 형태 및 포자형성 과정을 관찰하였으며, 생화학적 조사는 API 50 CHB system(BioMerieux, Marcy IEtoile, France)을 이용하여 당 발효능을 조사한 후에 균주동정 프로그램(http://apiweb.biomerieux.com)을 이용하여 수행하였다.

<96> 상기 곰팡이에 대해 생육 저해 활성을 나타내는 분리균주의 그람 염색 결과 도 4에 나타낸 바와 같이, 그람 양성의 간균이었고, 위상차 현미경을 이용하여 관찰한 결과 상기 도 5에 나타낸 바와 같이 포자를 형성하였으며, API 50CHB system을 이용하여 당 이용성 조사를 통한 균주 동정 결과 표 1에 나타낸 바와 같이, *Bacillus subtilis*로 판정되었다.

표 1

| Sugar | Metabolism | Sugar | Metabolism |
|---|---|---|---|
| Control | - | Esculine | + |
| Glycerol | - | Salicine | + |
| Erythritol | - | Cellobiose | + |
| D-Arabinose | - | Maltose | + |
| L-Arabinose | + | Lactose | - |
| Ribose | - | Melibiose | + |
| D-Xylose | - | Saccharose | + |
| L-Xylose | - | Trehalose | + |
| Adonitol | - | Inuline | + |
| β-Methyl-xylose | - | 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-annoside | - | D-Arabitol | - |
| α-Methyl-D-glucoside | - | L-Arabitol | - |
| N-Acetyl-glucosamine | - | Gluconate | - |
| Amygdalin | + | 2-ceto-gluconate | - |
| Arbutine | + | 5-ceto-gluconate | - |

<97>

<98> 보다 정확한 동정을 위하여, 상기 분리균주의 16S rDNA 염기서열을 결정하고, 이를 GenBank에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교하여 16S rDNA 염기서열 분석을 수행하였다.

<99> 상기 분리균주의 16S rRNA의 염기서열은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 상기 분리균주의 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, Madison, U.S.A.)를 이용하여 분리한 후에 서열번호 1의 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 서열번호 2의 1492R(5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 상기 PCR 증폭 조건은 94℃에서 5분간 전변성단계(pre-denaturation)를 수행하고 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초의 과정을 30회 반복한 후, 72℃ 10분간 후연장단계(post-elongation)의 방법으로 수행하였다.

<100> 상기 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega, Madison, U.S.A.)을 이용하여 정제하였으며, 상기 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM 3730 DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)를 이용하여 염기서열을 분석하였고 그 결과를 도 2 및 서열번호 3에 나타내었다.

<101> 상기 도 2 및 서열번호 3에 나타낸 16S rRNA 염기서열은 2007년 7월 12일에 GenBank에 EU024822로 등록하였고, 상기 염기서열을 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank에 등록된 염기서열들과 비교하였으며, 상동성은 Clustal X와 Mega 2 program을 이용하여 비교분석하였고, 그 결과 다른 세균과의 계통발생론적 관계를 도 3에 나타내었다.

<102> 상기 분석결과, 상기 분리균주의 16S rRNA는 총 1,451 bp를 가지고 있으며, 그 염기서열은 상기 도 2 및 서열번호 3과 같이 결정되었고, GenBank에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교한 결과, *B. subtilis* Z99104와 99%의 상동성을 보였다. 따라서 항진균 활성을 보이는 본 균주는 최종 바실러스 서브틸리스로 동정되었으며, 바실러스 서브틸리스 MJP1이라 명명하였다.

<103> 또한, 상기 실시예 1-1의 상기 PDA 평판배지에서 확인된 균 중, 바실러스 서브틸리스 MJP1에 감수성을 나타내는 3종의 곰팡이 균주를 분리하여 동정을 수행하였다.

<104> 상기 3종의 곰팡이 균주의 동정은 ITS-5.8S rDNA sequencing으로 수행하였다. 보다 구체적으로, 상기 chromosomal DNA는 균사체를 saline solution(0.8% NaCl, 0.0125% tween 20)에 현탁 후 원심분리를 통하여 균사체를 획득하였고, 상기 균사체에 lysis buffer(0.05 M EDTA, pH 8.0, 0.3% SDS)를 가하여 10분간 방치한 후 멸균된 glass bead를 이용하여 균사체를 파쇄하였으며, 이후 14,000 rpm의 조건으로 3분간 원심분리한 후 상징액을 취하여 동일 부피의 isopropanol을 가하여 genomic DNA를 침전시켰다.

<105> 상기 침전된 genomic DNA를 원심분리를 통하여 수득하였고, 상기 수득한 genomic DNA는 70% ethanol을 이용하여 세척하였다. 상기 세척한 genomic DNA는 미량의 멸균수를 첨가하여 현탁하고, 60℃에서 1시간 처리한 후 PCR에 사용하였다.

<106> 상기 PCR은 universal primer인 서열번호 4의 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 서열번호 5의 ITS4R(5'-CAGACTT(G/A)TA(C/T)ATGGTCCAG-3') 프라이머를 사용하여 수행하였다. 상기 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system을 이용하여 정제한 후, ABI PRISM 3730 DNA analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

<107> 상기 ITS-5.8S rDNA sequencing을 수행하여 염기서열을 비교한 결과, 분리된 곰팡이 균주 중, PF-1과 PF-2라고 지칭한 균주는 아스페르길루스 페트라키아이 AF203793, 아스페르길루스 오크라세우스 AY373854와 99%의 상동성을, PF-3 라고 지칭한 균주는 아스페르길루스 니두란스 AF455499와 98%의 상동성을 나타내었다. 따라서, 상기 3종의 곰팡이는 아스페르길루스 페트라키아이 PF-1, 아스페르길루스 오크라세우스 PF-2 및 아스페르길루스 니두란스 PF-3로 명명하였으며, 항진균 활성 실험을 위한 감수성 균주로 사용하였다.

<108> **<실시예 2> 분리균주의 항균활성**

<109> 2-1. 조항균 물질의 준비

<110> 분리균주의 항균활성을 확인하기 위하여, 조항균 물질을 준비하였다.

<111> 구체적으로, 상기 분리균주 바실러스 서브틸리스 MJP1을 LB 액체 배지(1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 5 ml에 접종하여 37℃에서 24시간 동안 전배양하였다. 100 ml LB 액체 배지에 1%의 상기 전배양액을 접종하고, 다시 37℃에서 24시간 동안 본배양하였다. 상기 본배양액을 4℃ 및 9,500×g의 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상징액을 0.45 μm membrane filter(Advantec MFS, Inc., Japan)를 이용하여 제균하였다. 상기 제균된 상징액을 동결 건조한 후에 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액에 녹여 항균활성 실험에 사용하였으며, 항세균 활성 실험에 사용된 조항균 물질은 상기 배양 상징액의 5배 농축 항균 물질을, 항진균 활성 실험에 사용된 조항균 물질은 농축되지 않은 항균 물질을 사용하였다.

<112> 2-2. 분리균주의 항균활성

<113> 바실러스 서브틸리스 MJP1의 항균 활성에 대한 조사는 10종의 그람 양성균 및 그람 음성균, 8종의 곰팡이 및 3종의 효모에 대하여 paper disk method를 이용하여 수행하였다(Kim, S. I., I. C. Kim, and H. C. Chang. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 526-533(1999)).

<114> 상기 항균 활성 측정을 위해 사용된 배지는 각 지시균주 별로 감수성 세균의 경우 LB 평판배지, 감수성 곰팡이의 경우 MEA(malt extract agar, Difco Laboratories) 또는 PDA 평판배지, 감수성 효모의 경우 YM(Difco Laboratories) 또는 sabouraud dextrose(Difco Laboratories)평판배지를 이용하였으며, 상기 각 배지에 각 미생물을 $1\times10^{6}$ cfu로 도말하였다.

<115> 상기 지시균주가 도말된 평판배지 위에 8 mm 직경의 paper disk(Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 놓고 상기 조항균 물질을 100 μl씩 일정하게 가한 후에 감수성 세균은 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 감수성 효모와 곰팡이는 25℃ 또는 30℃에서 24 내지 48시간 동안 배양하여 분리균주가 생산하는 항균 물질에 의한 생육 저지환 생성 여부를 관찰하였으며, 그 결과를 표 2에 나타내었다. 상기 표 2의 '-'는 생육을 저지하지 못한 경우이고, '+'의 경우 생육 저지환의 직경이 13.5 mm이하인 경우이고, '++'의 경우 생육 저지환의 직경이 13.5 mm 내지 15.5mm인 경우이며, '+++'의 경우 생육 저지환의 직경이 15.5 mm이상인 경우이다.

표 2

| Microorganisms | Indicator species | Antimicrobial activity |
|---|---|---|
| Gram-positive bacteria | *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | +++ |
| | *Micrococcus luteus* ATCC 13513 | - |
| | *Streptococcus mutans* ATCC 25175 | - |
| | *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 | ++ |
| | *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 | ++ |
| | *Listeria monocytogenes* ATCC 19113 | +++ |
| Gram-negative bacteria | *Escherichia coli* ATCC 25922 | - |
| | *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 | - |
| | *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 | - |
| | *Salmonella typhi* ATCC 19430 | - |
| Molds | *Aspergillus flavus* ATCC 22546 | - |
| | *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918 | - |
| | *Aspergillus petrakii* PF-1 | +++ |
| | *Aspergillus ochraceus* PF-2 | +++ |
| | *Aspergillus nidulans* PF-3 | +++* |
| | *Epicoccum nigrum* KF-1 | +++ |
| | *Cladosporium gossypiicola* KF-2 | +++ |
| | *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 | +* |
| Yeasts | *Candida albicans* ATCC 24433 | + |
| | *Candida albicans* ATCC 11006 | + |
| | *Candida albicans* ATCC 18804 | + |

<116>

<117> 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 2-1에서 수득한 조항균 물질은 그람 양성균인 *Listeria monocytogenes* ATCC 19113, *B. subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 29213에 대한 저해 활성을 나타내었으나, 그람 양성균 중 *Micrococcus luteus* ATCC 13513, *Streptococcus mutans* ATCC 25175와 그람 음성균들에 대해서는 항세균 활성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

<118> 또한, 곰팡이와 효모에 대한 실험에서, *A. petrakii* PF-1, *A. ochraceus* PF-2, *A. nidulans* PF-3, *Epicoccum nigrum* KF-1, *Cladosporium gossypiicola* KF-2, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, *Candida albicans* ATCC 24433, *C. albicans* ATCC 11006 및 *C. albicans* ATCC 18804에 대한 생육 저해 활성을 나타내었다.

<119> 상기 조항균 물질의 항균 활성으로부터 확인한 바실러스 서브틸리스 MJP1의 항균 활성은 그람양성균들에 집중되어 있는 것으로 확인되었으며, 이는 세균이 생산하는 항균 물질인 박테리오신이 근연관계의 종에 저해 활성을 나타내는 특성과 유사한 것으로 확인되었고, 특히 *L. monocytogenes* ATCC 19113에 강한 저해 활성을 보이므로, 박테리오신 그룹 중에서 *Listeria*에 강한 항균 활성을 나타내는 특징을 가진 class IIa군의 특성과 유사한 것으로 예상되었다.

<120> 또한, 상기 결과로부터, 저장곡물에서 ochratoxin 등의 곰팡이 독소를 생성하는 것으로 알려진 곰팡이 종에 속하는 *A. petrakii* PF-1, *A. ochraceus* PF-2 및 *A. nidulans* PF-3에 대한 항균 작용뿐 아니라 인체에 피부질환을 일으키는 *E. nigrum* KF-1, 알레르기나 염증성 폐렴에 관여하는 *C. gossypiicola* KF-2 및 여성의 질, 손톱 또는 피부에서 염증을 일으키는 병원성 균인 *C. albicans* stain들에 대해서도 항균 활성을 나타내었다.

<121> 또한, 도 1에 나타낸 바와 같이, 바실러스 서브틸리스 MJP1의 균체를 직접 가하여 실험한 direct method에 의한 항균 실험에서도 상기 균주들에 대해 매우 강력한 항균 활성을 나타내었다.

<122> 상기한 결과로부터, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 MJP1 또는 이의 배양물은 천연식품보존제나 사료보존제로서 뿐만 아니라 새로운 항생제 대체 의약소재로서 응용 가능할 수 있음이 확인되었다.

<123> 2-3. 생육시기에 따른 항균활성

<124> 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1를 37℃에서 0 내지 168시간 동안 진탕배양하면서 $A_{600}$(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 그리고, 이때 생육시기에 따른 항균 활성을 측정하였다.

<125> 보다 구체적으로, 항진균 활성 측정은 감수성 곰팡이인 *Aspergillus petrakii* PF-1의 포자를 PDA 배지 20 ml에 $5\times10^4$ cfu/ml로 첨가하여 petri dish에 부은 후에 굳으면, 항균 물질 10 μl를 배지 위에 spotting하여 30℃에서 48시간 배양한 후 활성을 측정하였다. 항세균 활성은 LB 고체배지에 지시균으로 사용한 *B. subtilis* ATCC 6633을 $1\times10^5$ cfu로 도말한 후에 5배 농축한 항균 물질 10 μl를 spotting한 후, 37℃에서 하룻밤 배양하여 활성을 측정하였다.

<126> 상기 측정된 활성의 역가는 미생물 배양액 ml당 AU(activity unit)로 표시하였다. 즉, 항균 물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 ml에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU/ml로 나타내었으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

<127> 상기 도 6에 나타낸 바와 같이, 생육곡선 측정 결과, 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1 균주는 배양 12시간 후에 대수기 중반을 지나 24시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며, 48시간 이후로 사멸기에 접어듬을 알 수 있었다.

<128> 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1의 항진균 활성은 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1은 배양 8시간부터 나타나기 시작하여 16시간 이후부터 최대 활성(3,200 AU/ml)을 나타내었으며, 균주의 생육이 사멸기에 접어든 후에도 항진균 활성이 계속 유지되었다. 반면 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1의 항세균 활성은 생육 초기부터(배양 4시간) 검출되기 시작하여 대수기 중반에 이르는 12시간부터 생육 28시간까지 최대 항균 활성(1,600 AU/ml)을 나타내었으며, 이후로 조금씩 감소하기 시작하여 72시간 이후에는 활성을 상실하였다.

<129> 상기 결과로부터, 많은 박테리오신들이 영양원이 고갈되는 정지기에 축적되는 것과 달리, 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1이 생산하는 항균 물질은 생육 초기부터 왕성하게 분비되기 시작함을 확인할 수 있었다.

<130> 2-4. 항균활성의 안정성

<131> 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1의 항균 물질의 pH, 온도 및 각종 효소처리에 대한 안정성을 조사하였다.

<132> 보다 구체적으로, pH에 대한 영향의 조사는 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1의 배양상징액을 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH 3.0 내지 12.0으로 조정하여 37℃에서 2시간 동안 처리한 다음, 항균 활성을 측정하는 방법으로 수행하였다. 또한, 온도에 의한 영향의 조사는 상기 배양상징액을 30℃, 50℃ 및 70℃에서 24시간, 100℃에서 30분 및 121℃에서 15분간 열처리한 후에 잔존 항균 활성을 측정하는 방법으로 수행하였다. 각종 효소에 대한 영향의 조사는 분리균주의 배양상징액에 proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma Co., U.S.A.), protease(type I, Sigma), pronase E(protease type XIV, Sigma), trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma), lysozyme(EC 3.2.1.17, Sigma), α-chymotrypsin(EC 3.4.21.1, type I-S, Sigma), pepsin(EC 3.4.23.1, Sigma), carboxypeptidase A(EC 3.4.17.1, Sigma), lipase(EC 3.1.1.3, type VII, Sigma), α-amylase(EC 3.2.1.1, Type VIII, Sigma)는 2 mg/ml, aminopeptidase I(EC 3.4.11.22, Sigma)는 1 unit/ml, carboxypeptidase B(EC 3.4.17.2, Sigma)는 200 unit/ml의 농도로 처리한 후에 잔존하는 항균 활성을 측정하는 방법으로 수행하였다. 잔존 활성 측정은 paper disk method를 사용하였으며, 감수성 곰팡이로는 *A. petrakii* PF-1과 감수성 세균으로는 *B. subtilis* ATCC 6633을 사용하였으며, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

*표 3*

| | Treatment | Antifungal activity | Antibacterial activity |
|---|---|---|---|
| pH | 3.0 | + | + |
| | 4.0 | - | - |
| | 5.0 | + | + |
| | 6.0 | ++ | +++ |
| | 7.0 | +++ | +++ |
| | 8.0 | +++ | +++ |
| | 9.0 | +++ | +++ |
| | 10.0 | +++ | +++ |
| | 11.0 | ++ | + |
| | 12.0 | - | - |
| Heating | 30℃, 24 h | +++ | ++ |
| | 50℃, 24 h | +++ | + |
| | 70℃, 24 h | +++ | + |
| | 100℃, 30 min | +++ | + |
| | 121℃, 15 min | +++ | + |
| Enzyme | Proteinase K | +++ | - |
| | Protease | +++ | - |
| | Pepsin | +++ | - |
| | Trypsin | +++ | - |
| | α-Chymotrypsin | +++ | - |
| | Aminopeptidase I | +++ | - |
| | Carboxypeptidase A, B | +++ | - |
| | Pronase E | +++ | - |
| | Lysozyme | +++ | +++ |
| | α-Amylase | +++ | +++ |
| | Lipase | +++ | +++ |

<133>

<134> 상기 표 3에 나타내 바와 같이, pH 안정성 실험에서 항진균 활성과 항세균 활성 모두 pH 6.0 내지 10.0 구간에서 비교적 안정하게 나타나 두 물질이 중성과 알칼리 pH 영역에서 안정함을 알 수 있었다. 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1의 배양 상징액을 pH 3.0 내지 12.0으로 조정하여 37℃에서 2시간 동안 처리 후, 균체 배양 후의 배양액 pH인 pH 7.8로 회복시켰을 때, pH 처리에 의해 활성이 감소된 pH 3.0 내지 5.0 구간은 항진균 활성과 항세균 활성을 100% 회복하였다. 또한 pH 11.0에서 항진균 활성은 100%, 항세균 활성은 50% 회복되었다. 또한, 온도에 대한 안정성의 경우, 항진균 활성은 열처리에 영향을 받지 않는 것으로 나타난 반면 항세균 활성은 30℃ 이상의 열처리에서는 50% 이상의 활성이 감소되는 결과를 나타내어 열에 불안정한 현상을 보였다. 또한, 각종 효소에 대한 영향을 살펴본 결과 항진균 활성은 단백가수분해효소를 비롯한 어떠한 효소에도 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다. 항세균 활성의 경우, lysozyme, α-amylase, lipase 등의 처리에는 영향을 받지 않았으나, 단백가수분해효소나 peptidase 처리로 불활성화 되어 역가를 상실하였다.

<135> 상기 결과로부터, 상기 바실러스 서브틸리스 MJP1 은 항진균 활성과 항세균 활성이 있는 각각의 물질을 생산하며, 이 두 물질은 서로 다른 특성을 가지고 있음을 추정할 수 있었다. 또한 항진균 물질은 단백가수분해효소에 영향을 받지 않는 물질인 반면, 항세균 물질은 단백질 또는 펩타이드로 이루어진 박테리오신 또는 박테리오신 유사 물질이며, 당이나 지질의 결합이 항균 활성에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

## *도면의 간단한 설명*

<136> 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 MJP1의 항균활성을 나타낸 것으로, 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 아스페르길루스 페트라키아이에 대한 항진균활성을 나타낸 사진이고, 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 칸디다 알비칸스에 대한 항진균활성을 나타낸 사진이며, 도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따른 바

실러스 서브틸리스에 대한 항진균활성을 나타낸 사진이다.

<137> 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 MJP1의 16S rDNA의 염기서열이다.

<138> 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 MJP1의 16S rDNA의 염기서열을 기초로 한 다른 세균(bacteria)과의 계통발생론적 관계를 나타내는 표이다.

<139> 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 MJP1의 그람 염색 결과를 현미경으로 관찰한 사진이다.

<140> 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 MJP1를 위상차 현미경으로 관찰하여 포자 형성 여부를 확인한 사진이다.

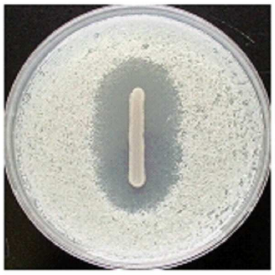
<141> 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 MJP1의 생육시기에 따른 항균활성을 나타낸 그래프이다.

## 도면

### 도면1a



### 도면1b



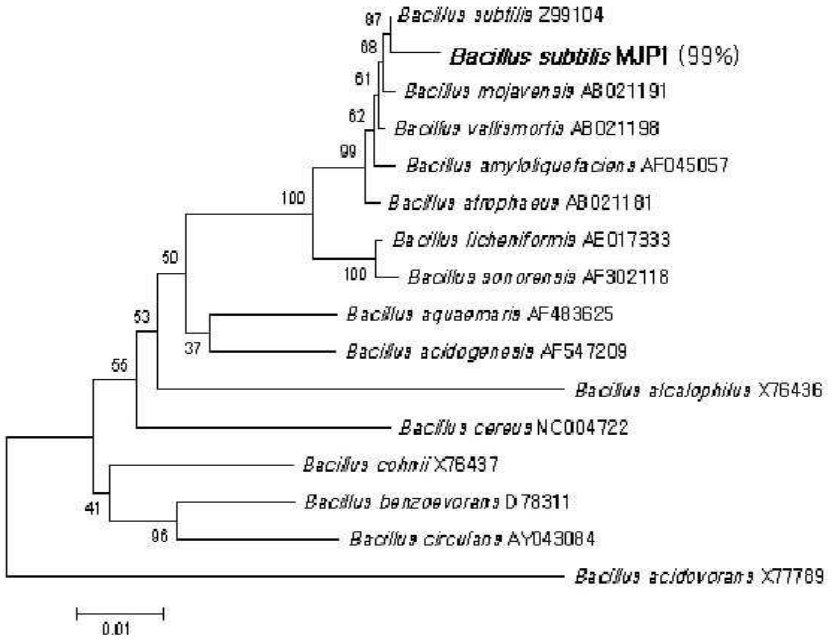
### 도면1c



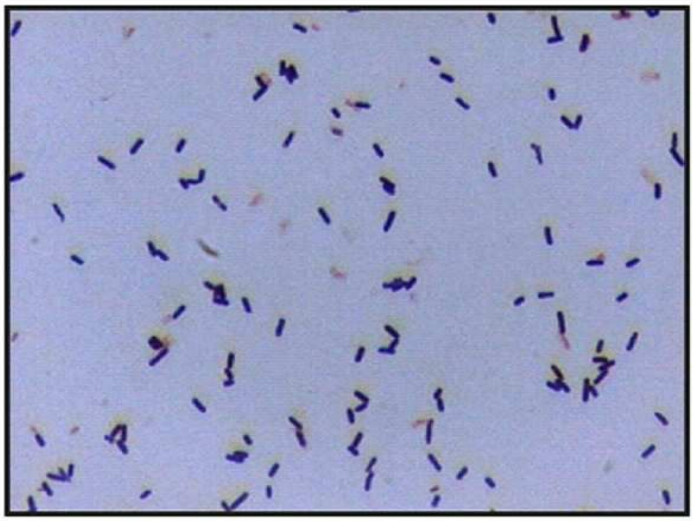
도면2

```
   1 GGCCAGCGCG CTATCTGCAG TCGAGCGGAC AGATGGGAGC TTGCTCCCTG ATGTTAGCGG
  61 CGGACGGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG CCTGTAAGAC TGGGATAACT CCGGGAAACC
 121 GGGGCTAATA CCGGATGGTT GTTTGAACCG CATGGTTCAA ACATAAAAGG TGGCTTCGGC
 181 TACCACTTAC AGATGGACCC GCGGCGCATT AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG
 241 GCAACGATGC GTAGCCGACC TGAGAGGGTG ATCGGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC
 301 AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCGCAAT GGACGAAAGT CTGACGGAGC
 361 AACGCCGCGT GAGTGATGAA GGTTTTCGGA TCGTAAAGCT CTGTTGTTAG GGAAGAACAA
 421 GTACCGTTCG AATAGGGCGG TACCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC
 481 GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTGT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA
 541 GGGCTCGCAG GCGGTTTCTT AAGTCTGATG TGAAAGCCCC CGGCTCAACC GGGGAGGGTC
 601 ATTGGAAACT GGGGAACTTG AGTGCAGAAG AGGAGAGTGG AATTCCACGT GTAGCGGTGA
 661 AATGCGTAGA GATGTGGAGG AACACCAGTG GCGAAGGCGA CTCTCTGGTC TGTAACTGAC
 721 GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA
 781 AACGATGAGT GCTAAGTGTT AGGGGGTTTC CGCCCCTTAG TGCTGCAGCT AACGCATTAA
 841 GCACTCCGCC TGGGGAGTAC GGTCGCAAGA CTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG
 901 CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTCG AAGCAACGCG AAGAACCTTA CCAGGTCTTG
 961 ACATCCTCTG ACAATCCTAG AGATAGGACG TCCCCTTCGG GGGCAGAGTG ACAGGTGGTG
1021 CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC
1081 CTTGATCTTA GTTGCCAGCA TTCAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG
1141 GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
1201 TACAATGGAC AGAACAAAGG GCAGCGAAAC CGCGAGGTTA AGCCAATCCC ACAAATCTGT
1261 TCTCAGTTCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG CTGGAATCGC TAGTAATCGC
1321 GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAC
1381 GAGAGTTTGT AACACCCGAA GTCGGTGAGG TAACCTTTTA GGAGCCAGCC GCCGAAGTGA
1441 CAGAATGCCC C
```

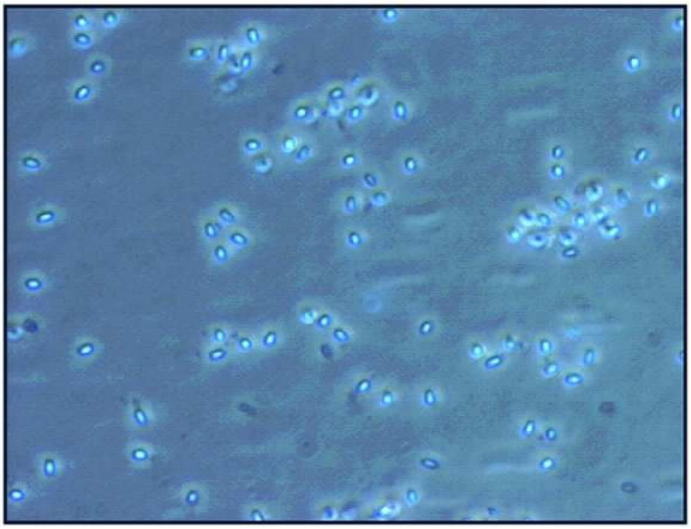
도면3



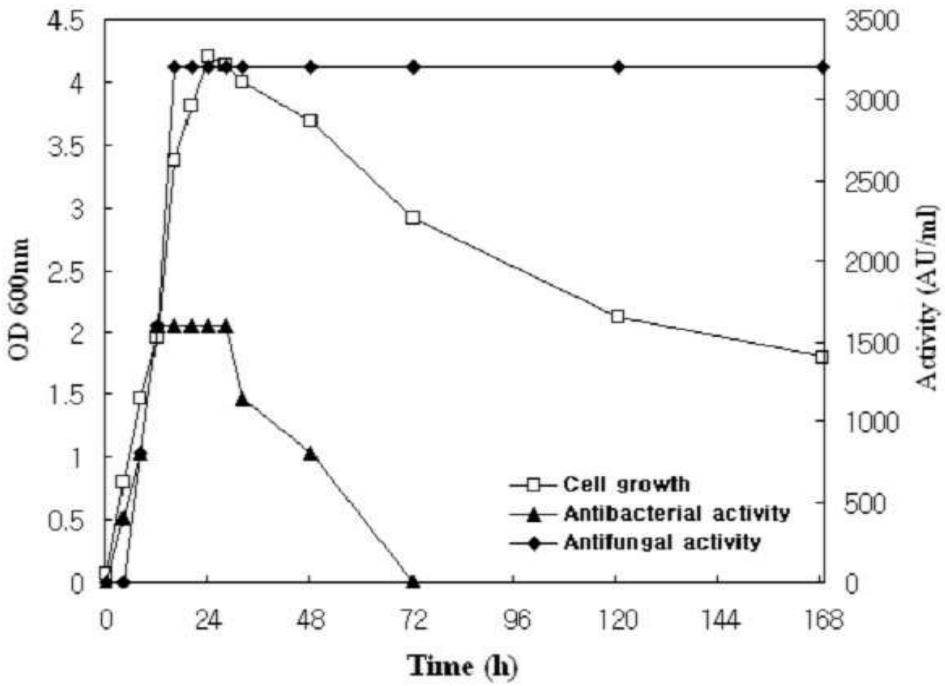
도면4



도면5



도면6




## 서 열 목 록

<110> CHANG, HAE CHOON
<120> BACILLUS SUBTILIS SEPARATED FROM MEJU AND A ANTIMICROBIAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME

<130> DPP20073419KR

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 27F primer

<400> 1
agagtttgat catggctcag 20

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1492R primer

<400> 2
ggataccttg ttacgactt 19

<210> 3
<211> 1451
<212> DNA
<213> bacillus subtilis MJP1 16S rDNA

<400> 3
ggccagcgcg ctatctgcag tcgagcggac agatgggagc ttgctccctg atgttagcgg 60

cggacgggtg agtaacacgt gggtaacctg cctgtaagac tgggataact ccgggaaacc 120

ggggctaata ccggatggtt gtttgaaccg catggttcaa acataaaagg tggcttcggc 180

taccacttac agatggaccc gcggcgcatt agctagttgg tgaggtaacg gctcaccaag 240

gcaacgatgc gtagccgacc tgagagggtg atcggccaca ctgggactga gacacggccc 300

agactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc 360

aacgccgcgt gagtgatgaa ggttttcgga tcgtaaagct ctgttgttag ggaagaacaa 420

gtaccgttcg aatagggcgg taccttgacg gtacctaacc agaaagccac ggctaactac 480

gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttgt ccggaattat tgggcgtaaa 540

gggctcgcag gcggtttctt aagtctgatg tgaaagcccc cggctcaacc ggggagggtc 600

attggaaact ggggaacttg agtgcagaag aggagagtgg aattccacgt gtagcggtga 660

aatgcgtaga gatgtggagg aacaccagtg gcgaaggcga ctctctggtc tgtaactgac 720

gctgaggagc gaaagcgtgg ggagcgaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta 780

aacgatgagt gctaagtgtt aggggtttc cgccccttag tgctgcagct aacgcattaa 840

gcactccgcc tggggagtac ggtcgcaaga ctgaaactca aaggaattga cgggggcccg 900

cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg 960

acatcctctg acaatcctag agataggacg tccccttcgg gggcagagtg acaggtggtg 1020

catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc 1080

cttgatctta gttgccagca ttcagttggg cactctaagg tgactgccgg tgacaaaccg 1140

gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gacctgggct acacacgtgc 1200

tacaatggac agaacaaagg gcagcgaaac cgcgaggtta agccaatccc acaaatctgt 1260

tctcagttcg gatcgcagtc tgcaactcga ctgcgtgaag ctggaatcgc tagtaatcgc 1320

ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcacaccac 1380

gagagtttgt aacacccgaa gtcggtgagg taacctttta ggagccagcc gccgaagtga 1440

cagaatgccc c 1451

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ITS1 primer

<400> 4
tccgtaggtg aacctgcgg 19

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ITS4R primer

<400> 5
cagacttrta yatggtccag 20