



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월02일
(11) 등록번호 10-1465696
(24) 등록일자 2014년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/02 (2006.01) C12P 1/04 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01) A01P 7/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0038412
(22) 출원일자 2014년04월01일
심사청구일자 2014년04월01일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130133560 A

(73) 특허권자
주식회사 유로코스텍
충청남도 홍성군 서부면 와룡로126번길 90
(72) 발명자
이충우
경기도 화성시 동탄중앙로 200, 메타폴리스
D-6402 (반송동)
유병국
경기도 수원시 권선구 정조로 413번길 43 건일빌
라 나동 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김중호

(54) 발명의 명칭 항균 및 방충 조성물

(57) 요약

본 발명은 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 1:1:1:2 비율로 혼합한 혼합물을 유산균을 이용하여 발효시켜 수득되는 발효물을 추출한 발효추출물을 포함하는 항균 및 방충 조성물에 관한 것으로서, 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물에 유산균으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발효 미생물을 접종시키고 3 내지 7일간, 20 내지 37℃의 온도범위 이내에서 pH 4.0 내지 5.0로 유지하며 발효시켜 수득되는 발효물을 추출하여 수득되는 발효추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하며, 세균, 곰팡이, 효모에 대해 매우 우수한 항균 활성을 나타내고 방충기능을 갖는다.

(72) 발명자

김철민

경기도 용인시 기흥구 서천서로 125 서천마을3단지
303동 804호

강영기

경기도 화성시 메타폴리스로 47-25 센트럴에스타운
1032호

이왕연

충남 홍성군 홍성읍 문화로72번길 92, 112동 902호
(주공그린빌)

이민준

충남 홍성군 서부면 홍남서로375번길 354

김미애

충청남도 태안군 태안읍 송암로 30-5

지수진

경기도 화성시 동탄문화센터로 38 서해그랑블 418
동1601호

특허청구의 범위

청구항 1

고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물에 유산균으로서 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*: KCCM35471)를 접종시키고 3 내지 7일간, 20 내지 37℃의 온도범위 이내에서 pH 4.0 내지 5.0로 유지하며 발효시켜 수득되는 발효물을 추출하여 수득되는 발효추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 향균 및 방충 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물이 고삼 0.01 내지 20중량%, 천련자 0.01 내지 20중량%, 고련피 0.01 내지 20중량% 및 정향 0.01 내지 40중량%를 포함하여 이루어짐을 특징으로 하는 향균 및 방충 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 유산균이 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*: KCCM35471)에 더해 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 그라미니스(*Lactobacillus graminis*), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*), 바이셀라 헬레니카(*Weissella hellenica*), 락토코커스 가르비에(*Lactococcus garvieae*), 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 페디오코커스 에시디락티시(*Pediococcus acidilactici*), 비피도박테리움 아니말리스(*Bifidobacterium animalis*), 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*) 및 이들 중 1 이상의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 유산균을 더 포함함을 특징으로 하는 향균 및 방충 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 발효물을 추출하여 수득되는 발효추출물이 상기 발효물을 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 헥산 및 이들 중 2 이상의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 추출용매로 초음파(40kHz) 추출한 것임을 특징으로 하는 향균 및 방충 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 향균 및 방충 조성물이 그람양성균, 그람음성균, 효모 및 진균에 대하여 향균 작용을 가지는 향균 및 방충 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 향균 및 방충 조성물이 집먼지 진드기 및 큰다리 먼지 진드기에 대하여 방충작용을 가지는 천연 방충 조성물.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 향균 및 방충 조성물이 나노캡슐, 마이크로캡슐, 나노솜의 제형으로 제형화되는 향균 및 방충 조성물.

청구항 9

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 향균 및 방충 조성물을 포함하는 화장품.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 향균 및 방충 조성물을 포함하는 식품.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 향균 및 방충 조성물을 포함하는 도료.

청구항 12

(1) 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 유산균으로 접종시키는 접종단계; 및

(2) 유산균으로 접종된 혼합물을 발효시키는 발효단계;를 포함하여 이루어짐을 특징으로 하는 향균, 방충 조성물의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 향균 및 방충 조성물에 관한 것으로 특히, 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 혼합한 혼합물을 유산균을 이용하여 발효시켜 수득되는 발효물을 추출한 발효추출물을 포함하는 향균 및 방충 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재까지, 천연 향균성 물질에 대한 연구로는 향료, 우유 및 어류 등의 식품류, 정유, 한약재로부터 많은 천연 향균성물질이 보고되었고, 알칼로이드(Alkaloid), 플라보노이드(flavonoid), 파이토알렉신(phytoalexin), 향균 펩타이드에 대한 것도 보고되었다.

[0003] 알려진 천연 방부제로는 유기산, 지방산, 저급지방산, 라이소자임, 락토페인, 박테리오신 등의 향균성에 대한 것도 보고되었다.

[0004] 천연 방부제로 실용화된 것으로는 미국의 케미리서치사(Chemi-research)가 개발한 자몽종자 오일(Grandfruit Seed Extract; GFSE)로 제조된 DF-100이 있다. 그러나 천연물질로써의 한계성인 냄새, 색상, 안정성 저하, 좁은 향균스펙트럼, 제형상의 문제점, 많은 사용량 등의 물리적, 경제적 문제로 인하여 대부분이 상용화 되지 못

하고 있어 보다 진보된 천연항균제의 연구가 필요한 실정이다.

- [0005] 또한, 천연물을 이용하여 항균제를 개발하는 연구들이 진행되었고, 현재도 진행 중에 있다.
- [0006] 한국 공개특허공보 제20100003046호에는 천일염 및 꾸지뽕나무 추출물을 포함하는 항균 조성물이 개시되어 있다.
- [0007] 한국 공개특허공보 제20130114055호에는 무화과나무 추출물 또는 이의 분획물에 대한 빛 조사물을 포함하는 항균용 조성물이 개시되어 있다.
- [0008] 또한, 천연물을 이용하여 방충제를 개발하는 연구들이 진행되었고, 또한 현재도 진행 중에 있다.
- [0009] 한국 공개특허공보 제20120021475호에는 참나무 목초액의 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 문화재 보존용 방충 또는 살충용 조성물이 개시되어 있다.
- [0010] 한국 공개특허공보 제20120021507호에는 황벽나무 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 문화재 보존용 방충 및 살충용 조성물이 개시되어 있다.
- [0011] 그러나 천연물, 특히 천연물 유래의 발효추출물을 사용하여 안전하고도 효과적인, 그리고 항균과 방충이라는 2 가지 기능을 함께 수행할 수 있는 새로운 개념의 조성물의 개발에 대한 요구가 존재하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 하나의 목적은 방부제로 기존에 널리 사용되었던 화학방부제의 단점인 자극성을 보완할 수 있는 천연 물질로부터 다기능성 방부제를 개발하기 위하여 고삼추출물, 천련자 추출물, 고련피 추출물 및 정향추출 혼합물의 발효를 통해 매우 우수한 항균 활성을 나타내는 천연 항균 방충 소재 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 하나의 목적은 천연물을 이용하여 이를 발효시킨 후 추출한 발효추출물의 제조방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 항균 방충 조성물을 제공하는 것으로써, 유산균을 활용한 발효 기술을 통하여 안전성을 확보하면서 천연 항균 및 방충 활성을 최대화하고, 발효를 통한 우수한 항균 및 방충 효과를 갖는 천연 발효물 및 이를 포함하는 항균 및 방충 소재를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명에 따른 항균 및 방충 조성물은 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물에 유산균을 접종시키고 3 내지 7일간, 20 내지 37℃의 온도범위 이내에서 pH 4.0 내지 5.0로 유지하며 발효시켜 수득되는 발효물을 추출하여 수득되는 발효추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0015] 상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물은 고삼 0.01 내지 35중량%, 천련자 0.01 내지 35중량%, 고련피 0.01 내지 35중량% 및 정향 0.01 내지 70중량%를 포함하여 배합중량 비율 1:1:1:2 비율로 혼합하여 이루어 질 수 있다.
- [0016] 상기 유산균은 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*: KCCM35471)일 수 있다.
- [0017] 상기 유산균은 상기 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*: KCCM35471)에 더해 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 그라미니스(*Lactobacillus graminis*), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*), 바이셀라 헬레니카(*Weissella hellenica*), 락토코커스 가르비에(*Lactococcus garvieae*), 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 페디오코커스 에시디락티시(*Pediococcus acidilactici*), 비피도박테리움 아니말리스(*Bifidobacterium animalis*), 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*) 및 이들 중 1 이상의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 유산균일 수 있다.

- [0018] 상기 발효물을 추출하여 수득되는 발효추출물은 상기 발효물을 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 헥산 및 이들 중 2 이상의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 추출용매로 초음파(40kHz) 추출한 것일 수 있다.
- [0019] 상기 향균 및 방충 조성물은 그람양성균, 그람음성균, 효모 및 진균에 대하여 향균 작용을 갖는 것일 수 있다.
- [0020] 상기 향균 및 방충 조성물은 집먼지 진드기 및 큰다리 먼지 진드기에 대하여 방충작용을 가지는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 향균 및 방충 조성물은 나노캡슐, 마이크로캡슐, 나노솜의 제형으로 제형화될 수 있다.
- [0022] 상기 향균 및 방충 조성물을 포함하는 도료, 화장품 또는 식품이 또한 제공된다.
- [0023] 또한, 본 발명에 따른 고삼, 천련자, 고련피, 정향 발효추출물의 제조방법은, (1) 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 유산균으로 접종시키는 접종단계; 및 (2) 유산균으로 접종된 혼합물을 발효시키는 발효단계;를 포함하여 이루어진다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따르면 천연 식물을 대상으로 향균 활성뿐만 아니라, 방충 활성까지 연구하던 중 고삼, 천련자, 고련피 및 정향을 적절히 배합하여 발효시킬 경우 세균 및 곰팡이, 효모를 포함한 진균류에 대해 매우 우수한 향균 활성을 나타내며, 방충 효과가 탁월함을 확인하고, 기존의 화학 방부제가 가지는 부작용, 특히 화학 방부제에 비해 인체 자극 가능성이 매우 낮은 다기능 방부 활성을 갖는 천연의 향균 및 방충 조성물을 제공하는 효과가 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예를 참조하여 상세히 설명한다.
- [0026] 본 발명은 유산균을 이용하여 발효공정을 통한 고삼, 천련자, 고련피, 정향 발효물을 만들고, 이 고삼, 천련자, 고련피, 정향 발효물을 이용하여 도료, 식품, 화장품등에서의 다기능성 방부제로써 다기능성 천연 신소재를 제공한다.
- [0027] 본 발명에 따른 고삼, 천련자, 고련피, 정향 발효물은, 혼합물을 유산균으로 발효시켜서 수득되는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명에 따른 향균 및 방충 조성물은 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물에 유산균을 접종시키고 3 내지 7일간, 20 내지 37℃의 온도범위 이내에서 pH 4.0 내지 5.0로 유지하며 발효시켜 수득되는 발효물을 추출하여 수득되는 발효추출물을 유효성분으로 포함함을 특징으로 한다.
- [0029] 상기 발효추출물의 제조에 사용되는 원료들은 천연 유래의 원료, 특히 식물들을 원료로 하는 것이다.
- [0030] 상기 고삼(*Sophora flavescens*)은 콩과(*Leguminosae*)에 속하는 다년생 초본식물로서, 강한 쓴맛이 있고, 인삼과 같은 효과가 있다는 뜻에서 고삼이라 한다. 고삼의 뿌리와 줄기는 오래 전부터 우리나라와 중국, 일본 등지에서 전통 의약으로 사용되었으며, 약리적 특성으로는 해열, 이뇨, 위장염, 장염, 피부의 화농증, 습진 등의 질환 등에 사용되는 생약제이다. 고삼의 유용 성분을 살펴보면 대부분이 (+)-마트린((+)-matrine), (+)-마트린 N-옥사이드((+)-matrine N-oxide), (+)-알로마트린((+)-allomatrine), (+)-이소마트린((+)-isomatrine), (+)-소포라놀((+)-sophoranol), (+)-소포라놀 N-옥사이드((+)-sophoranol N-oxide), (-)-소포라민((-)-sophoramine), (-)-N-메틸시티신((-)-N-methylcytisine), (-)-아나지린((-)-anagryne), (-)-밈티폴린((-)-baptifoline)과 같은 알칼로이드(alkaloid) 화합물과, 식물성에스트로젠(phytoestrogen)으로 알려진 다이드제인(daidzein), 제니스테인(genistein), 포르모노네티ن(formononetin) 등의 이소플라본(isoflavones) 화합물을 포함하고 있다.
- [0031] 상기 천련자는 멸구슬나무(천련: *Melia azedarach* L. var. *japonica* Makino ; 멸구슬나무과(*Meliaceae*))의 늦가을 성숙한 열매를 건조한 것으로, 크고 포만하여 껍질은 황금색이고, 과육은 황백색인 것이 좋다. 성상은 구형 내지 난형으로 지름 10 내지 15mm이며, 바깥 면은 황갈색이며 광택이 있고 주름이 나 있다. 가로 자른 면은 옅은 황색이며, 4 내지 5실로 나뉘었고, 그 안에 씨가 1개씩 들어 있다. 주요 성분으로는 리모노이드(limonoid)인 투센다닌(toosendanin)과 알칼로이드인 아자리딘(azaridine), 기타 성분으로 레진(resin), 탄닌

(tannin), 벤조산(benzoic acid) 등이 함유되어 있다. 주요 약리 작용으로는 구충작용과 항 미생물 작용 등의 목적으로 사용되고 있다.

- [0032] 상기 고련피(*Meliae Cortex*)는 멸구슬나무(*Meliaceae*)의 껍질로써, 원산지는 중국으로 한국에서는 주로 남부지방 야산에 자생하는 아열대성 식물이다. 고련피의 주성분은 아자디라크틴(*Azadirachtin*), 마르고신(*Margosin*), 님빈(*Nimbin*) 등의 알칼로이드 성분이며, 고련피의 알콜 엑기스는 그람 음성균에 대한 항균작용과 장내 기생충에 살충작용이 있는 것으로 알려져 있다. 고련피는 나무의 높이가 15 내지 20m로 우리나라의 북부지방에 자라며, 구부러진 반관상 내지 관상의 근피는 길이 15 내지 20cm, 너비 3 내지 10cm, 두께 3 내지 5mm의 식물이다. 바깥 면은 회갈색이고, 세로로 길게 찢어진 무늬와 가로로 된 피목이 있으며, 코르크층을 벗기면 적갈색을 보인다. 껍은 면은 황백색으로 섬유성이며, 질은 다단하나 꺾이기 쉬운 나무이다. 일반적으로 이 고련피의 맛은 쓰고 특이한 냄새가 있어, 통칭 소테나무라고도 불린다. 고련피의 쓴맛은 주로 알칼로이드 물질로 마르고신(*Margosine*)과 레신(*resin*) 등 수지류를 함유하고 있어 동양의학에서 다양한 용도의 약재로 오래전부터 사용되어 왔다.
- [0033] 상기 정향(*Clove*)은 정향과에 속하는 사철푸른 정향나무의 꽃봉우리를 말린 것을 말한다. 정향나무(*Syringa velutina*)는 정향과(*Myrtaceae*)에 속하는 낙엽 관목이다. 꽃봉우리에 16 내지 19%의 정유가 있다. 정유에는 에우게놀 78 내지 95%, 아세틸에우게놀 3%, 알파 및 베타-카리오필렌 등이 있다. 꽃봉우리는 방향성 건위약, 구풍약으로 가정에서 약 원료로 많이 쓴다. 동의치료에서는 토하거나 설사할 때 곱란, 위와 배 아플 때에 쓴다. 또한 정향은 식약품가공부문에 이용되며 약품으로써는 정유와 에우게놀을 치과용 방부약, 국소마비약으로 쓴다. 종래 정향을 이용한 연구로는 대한민국 특허공개번호 제 1999-0055304에 정향 추출물을 함유하는 5 α -리덕타아제 억제 조성물이 공지된 바 있으며, 대한민국 특허등록번호 제 017394에는 정향나무 추출물을 이용한 방향제에 대하여 공지된 바 있다. 그러나 상기 공지된 방법들은 정향 및 정향나무 추출물을 방향제로서 이용하거나 또는 5 α -리덕타아제 억제 활성 조성물로서 비듬 방지용, 여드름 치료용으로서의 용도에 관한 것으로써 방충, 향균에 관하여는 보고된 바 없으며, 더욱이 위에서 언급한 고삼, 천련자, 고련피 정향 추출물의 발효를 통한 향균 방충 소재 조성물 개발에 관한 내용은 전무한 실정이다.
- [0034] 본 발명에서는 상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물에 유산균을 접종시키고 3 내지 7일간, 20 내지 37℃의 온도범위 이내에서 pH 4.0 내지 5.0로 유지하며 발효시켜 수득되는 발효물을 추출하는 것으로 구성됨을 특징으로 한다.
- [0035] 상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물은 고삼 0.01 내지 35중량%, 천련자 0.01 내지 35중량%, 고련피 0.01 내지 35중량% 및 정향 0.01 내지 70중량%를 포함하여 배합 중량비율 1:1:1:2 비율로 혼합하여 이루어지는 것으로써, 특히 발효를 통해 추출물 간의 상호협력 작용에 따른 우수한 향균, 방충 활성을 나타내 주어 다기능성 천연 방부제로써 효과적으로 이용될 수 있어 바람직하다.
- [0036] 바람직하게는 상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물을 구성하는 각 식물들(달리 "원물"이라고도 함)은 표면 이물질 제거, 세척, 동결건조, 분쇄 등의 처리를 통하여 특히 발효에 적절하게 가공될 수 있으나, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니며, 동결건조를 수행하지 않고도 원물 상태에서의 분쇄 및 물과의 혼합을 통하여 발효에 적절하게 가공될 수도 있음은 당업자에게는 이해될 수 있는 것이다.
- [0037] 상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 포함하는 혼합물은 발효를 수행한 후, 이를 추출하는 과정을 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0038] 본원에서 용어, "발효추출물"은 고삼, 천련자, 고련피, 정향의 혼합물을 발효, 바람직하게는 유산균 발효시켜 수득되는 발효물을 추출한 발효추출물을 의미한다.
- [0039] 상기 발효를 위한 유산균은 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*: KCCM35471)일 수 있으며, 바람직하게는 상기 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*: KCCM35471)에 더해 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 그라미니스(*Lactobacillus graminis*), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*), 바이셀라 헬레니카(*Weissella hellenica*), 락토코커스 가르비에(*Lactococcus garvieae*), 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 페디오코커스 에시디락티시(*Pediococcus acidilactici*), 비피도박테리움 아니말리스

(*Bifidobacterium animalis*), 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*) 및 이들 중 1 이상의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 유산균일 수 있다.

- [0040] 본 발명에서 사용되는 균들은 공지된 균들로서, 한국생명공학연구원의 생물자원센터, Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms (BCCM), 또는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받아 이용할 수 있다.
- [0041] 발효는 미생물이 자신이 가지고 있는 효소를 이용해 유기물을 분해 또는 합성시키는 과정을 의미하며, 대표적인 발효 미생물로는 고초균, 유산균, 누룩균, 효모, 곰팡이, 초산균 등이 있다.
- [0042] 발효물을 추출한 발효추출물은 다른 어떠한 용매를 사용하지 않고, 발효와 숙성과정을 거쳐 천연소재가 함유하고 있는 당성분을 알콜로 변화시키고, 천연소재 속에 들어있는 플라보노이드, 비타민, 알칼로이드, 카테킨 등의 유효성분에 대한 추출효율을 높일 수 있다. 또한, 때론 자극적이거나 독성을 줄 수 있는 천연소재는 발효추출법을 통해 천연소재를 안정화시키거나, 독성을 줄이거나 안정한 유도체로 전환시키는 방법으로 사용될 수 있다. 또한, 유산균 및 효모 등의 발효공정에 의해 흡수가 용이한 저분자 물질로의 전환, 불안정하거나 불활성인 형태에서 활성 형태로 전환되는 과정에서 천연소재의 효능을 극대화 시키고, 향균 및 방충 효과를 극대화 시킬 수 있다.
- [0043] 본 발명에서의 상기 발효는 1종 이상의 발효 미생물을 접종시키고, 3 내지 7일간, 20 내지 37℃의 온도범위 내에서 pH 4.0 내지 5.0로 유지하며 발효시키는 것으로 수행될 수 있으나, 이는 발효를 위한 적당한 발효조건을 의미하는 것으로, 사용되는 유산균에 따라 상기한 시간, 온도 및 pH의 범위를 벗어나는 조건에서도 발효가 가능할 수 있으며, 따라서 본 발명이 상기한 발효조건으로 한정되는 것을 의미하는 것이 아님은 당업자에게는 이해될 수 있는 것이다.
- [0044] 본 발명에 따른 향균 및 방충 조성물은 상기의 추출물 외에 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않고, 주 효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 함유하는 것도 무방하다.
- [0045] 상기 발효물의 추출을 위한 추출 방법은 통상의 추출법을 사용할 수 있으며, 추출 용매에 의한 추출, 초임계 유체 추출, 초음파 추출, 열수 추출 등의 방법을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 즉, 상기 발효물을 추출하여 수득되는 발효추출물은 상기 발효물을 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 헥산 및 이들 중 2 이상의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 추출용매로 초음파(40kHz) 추출한 것일 수 있다.
- [0047] 달리, 본 발명에 따르면 원물을 발효시킨 발효물을 다시 추출하여 발효추출물을 수득하는 것으로 구성되는 선 발효, 후 추출의 공정으로 이루어질 수 있으나, 달리 원물을 선 추출, 후 발효시킬 수도 있다. 즉, 발효단계에서의 수율 향상과 생리활성의 증진을 위하여 원물의 혼합물을 40 내지 100℃의 온도에서 시료의 10 내지 20배량의 용매를 첨가하여 1차로 추출한 다음, 2차로 20 내지 60kHz의 초음파로 처리한 후, 감압여과, 농축 동결 건조하여 추출물을 제조하는 선 추출방법을 사용할 수도 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 상기 발효추출물은 용액 또는 파우더 형태로 제공될 수 있고, 달리 나노캡슐, 마이크로캡슐, 나노졸 등의 제형으로 제형화되어 제공될 수 있으며, 그에 따라 당업자는 상기 농도 범위 내에서 본 발명에 따른 향균, 방충 조성물의 양을 조절하여 사용할 수 있게 된다. 상기한 바와 같이 향균 및 방충 효과가 있는 조성물은 도료, 화장품, 식품등에 제공될 수 있다.
- [0049] 상기 향균 및 방충 조성물은 그람양성균, 그람음성균, 효모 및 진균에 대하여 향균 작용을 갖는다.
- [0050] 상기 향균 및 방충 조성물은 또한 집먼지 진드기 및 큰다리 먼지 진드기에 대하여 방충작용을 갖는다.
- [0051] 상기 향균 및 방충 조성물을 포함하는 화장품 또는 식품이 또한 본 발명에 따라 제공된다.
- [0052] 본 발명의 고삼, 천련자, 고련피, 정향 발효추출물은 천연물로부터 제조된 것임에도 불구하고, 향균력이 높고 내성을 유발하지 않으면서 내성균 및 진균류에도 높은 향균력을 보여 광범위한 향균스펙트럼을 나타내며, 적절한 방충 기능 뿐만 아니라 항산화 활성까지 가지고 있는 천연 소재이다. 따라서, 도료, 식품, 화장품등에서의 다기능성 천연 방부제로써 폭넓은 응용이 가능하다.
- [0053] 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 향균 및 방충 조성물은 고삼, 천련자, 고련피, 정향 추출물을 적절한 비율로 함유하여, 단독 추출물보다 매우 우수한 향균 활성을 나타내며, 향균 스펙트럼이 넓어 다방면의 제품에 대한 방부 능력이 우수하고, 화학 방부제를 첨가하지 않아 피부 자극 유발 가능성이 매우 낮은 생체 친화적

항균 및 방충 조성물이다.

- [0054] 본 발명에 따른 항균, 방충 조성물의 제조방법은 (1) 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 유산균으로 접종시키는 접종단계; 및 (2) 유산균으로 접종된 혼합물을 발효시키는 발효단계;를 포함하여 이루어진다.
- [0055] 상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향은 고삼 0.01 내지 35중량%, 천련자 0.01 내지 35중량%, 고련피 0.01 내지 35중량%, 정향 0.01 내지 70중량%의 범위 이내로 배합 중량비율 1:1:1:2 비율로 혼합될 수 있다.
- [0056] 상기 접종 및 발효단계는 상기 배양액이 들어있는 발효조에 배양된 유산균(전배양액)을 접종하는 것으로, 상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향의 혼합물에 5 내지 15중량%로 유산균을 접종한다.
- [0057] 상기 접종단계에서 접종되는 유산균은 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*: KCCM35471)이며, 바람직하게는 상기 유산균은 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*: KCCM35471)에 더해 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 그라미니스(*Lactobacillus graminis*), 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*), 바이셀라 헬레니카(*Weissella hellenica*), 락토코커스 가르비에(*Lactococcus garvieae*), 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 페디오코커스 에시디락티시(*Pediococcus acidilactici*), 비피도박테리움 아니말리스(*Bifidobacterium animalis*), 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*) 및 이들 중 1 이상의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0058] 발효 공정은 이들의 혼합 균주로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 한다. 유산균은 배양액을 pH 4.0 내지 5.0으로 조정하고, 20 내지 37℃ 온도에서 3일 내지 7일간 배양하였다. 본 발명에 따른 항균 및 방충 조성물은 상기의 추출물 외에 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않고 주 효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 함유하는 것도 무방하다. 상기 혼합 발효추출물은 조성물 전체에 대하여 동결건조 중량 기준 0.001 내지 80 중량%로 조성물에 존재할 수 있다.
- [0059] 상기 숙성 단계는 유산균이 접종된 혼합물을 발효시키는 단계와, 발효물을 획득하는 단계에 의하여 획득된 혼합 발효물(발효소재)을 사용하는 제품화 방법에 따라 추가되는 단계로써, 발효소재를 3 내지 10℃의 저온에서 1 내지 3일간 숙성시킨다.
- [0060] 본 발명에 따른 상기 혼합 발효물은 당해 기술분야에서는 공지된 기술을 사용하여 나노캡슐, 마이크로캡슐, 나노졸 등의 제형으로 용액 또는 파우더 형태로 가공이 가능하며, 당업자는 상기 농도 범위 내에서 본 발명에 따른 조성물 내에 이 용액 또는 파우더의 양을 조절할 수 있을 것이다. 상기한 바와 같이 항균 및 방충 효과가 조성물로 가공된 도료, 화장품, 식품등에 제공된다.
- [0061] 상기 접종단계 이전에 상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 급냉 및 동결건조시키는 전처리단계가 더 수행될 수 있다. 이러한 급냉 및 동결건조는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 용이하게 수행될 수 있는 것으로 이해될 수 있다.
- [0062] 상기 전처리단계와 상기 접종단계 사이에 전처리단계에서 수득되는 건조된 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 분쇄하고, 이를 물과 혼합하여 유산균을 배양시킬 수 있는 배양액을 조성하는 배양액조성단계가 더 수행될 수 있다. 이때 상기 고삼, 천련자, 고련피, 정향 원물을 건조된 분말 중량을 기준으로 10 내지 20배량의 물과 혼합되어 배양액으로 조성될 수 있다.
- [0063] 상기 발효단계 이후에 상기 발효단계에서 수득되는 발효액을 숙성시키는 숙성단계가 더 수행될 수 있다. 상기 숙성단계는 상기 발효액을 공기 또는 산소가 차단되도록 밀봉된 용기 내에서 실온에서 방치시키는 것으로 수행될 수 있으며, 바람직하게는 상기 발효액을 3 내지 10℃에서 1 내지 3일간 저장하는 것에 의해 수행될 수 있다.
- [0064] 상기 발효단계 또는 상기 숙성단계 이후에 수득되는 발효액을 함수율 10%가 되도록 감압농축 및 동결건조시켜서 동결건조된 발효물을 수득하는 후처리단계가 더 수행될 수 있다. 상기한 후처리단계 역시 당업자에게는 용이하게 수행될 수 있는 것으로 이해될 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 항균, 방충 조성물은 총 중량을 기준으로 하여 유효성분으로써 동결건조에 의해 수득되는 동결건조된 발효물 0.001 내지 80중량%의 범위 이내의 양으로 포함한다.

- [0066] 본 발명에 따른 향균, 방충 조성물의 제조방법은 바람직하게는 (1) 고삼, 천련자, 고련피, 정향의 원물을 수세한 뒤 급냉 및 동결건조 단계; (2) 건조된 원물의 분쇄물을 물과 혼합하여 유산균을 배양시킬 수 있는 배양액 조성 단계; (3) 유산균주를 단독 접종하여 발효하는 단계; 및 (4) 발효액을 숙성하는 단계;로부터 얻은 발효액, 또는 그 발효액을 다시 일부 또는 전부 감압농축 및 동결건조하여 제조하여 얻은 농축물, 또는 발효액 및 농축액 중에 함유되고 있는 주 효과를 발휘하는 화학물질 그 자체를 포함한다.
- [0067] 상기 혼합물은 뿌리와 줄기를 분리한 후 수세하였으며, -80℃에서 급속냉동 보관하여 동결건조 후 분쇄하여 미세분말 형태로 제조하였다.
- [0068] 상기 혼합물은 동결건조하여 분쇄한 분말시료를 안정적인 온도에서 물에 혼합하고, 유산균주를 단독으로 접종한 후 발효공정을 통해 발효액을 수득하였으며, 발효 후 발효액을 감압농축 및 동결건조하여 사용하거나, 발효공정 수행 후 저온 숙성 또는 고온 숙성하는 공정을 포함할 수 있다.
- [0069] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시예 및 비교예들이 기술되어질 것이다.
- [0070] 이하의 실시예들은 본 발명을 예증하기 위한 것으로서 본 발명의 범위를 국한시키는 것으로 이해되어져서는 안 될 것이다.
- [0071] 실시예 1: 혼합 발효 추출물의 제조
- [0072] 원물인 고삼, 천련자, 고련피, 정향을 구입하여 외부에 붙어 있는 이물질을 제거한 다음 통째로 세척하였고, 뿌리와 줄기를 분리하여 준비한 후, 한번 더 세척하였다. -80℃에서 급속냉동 보관하여 동결건조 후, 배합 중량 비율은 1:1:1:2 비율로 혼합 후, 분쇄하여 분말 형태로 제조하였다.
- [0073] 뿌리와 줄기 분말의 건조 중량의 10배량의 증류수를 가하여 잘 섞어준 후, 미리 배양된 유산균으로서 류코노스톡 메센테로이테스(*Leuconostoc mesenteroides*: KCCM35471)(전 배양액 ; 유산균을 혼합 추출물에 접종하기 위해 배양에 최적화된 유산균을 준비하는 것으로, 유산균주를 온도 25℃, 진탕속도(ShakingRate) 120RPM에서 3일간 배양하여 나온 수득물을 말함)를 10중량%로 접종하였다. 그 후, 최적조건(온도 26℃)에서 5일 동안 액상발효 시켰다. 발효를 종료하기 위해 80℃에서 10분간 열을 가하여 유산균의 기능상실을 유도하였다. 위의 항에서 수득된 배양액 수분을 증발시킨 후 혼합 발효 추출물의 건조물을 70% 에탄올을 이용하여 추출 하였다. 추출을 마친 혼합 발효 추출물을 초음파 추출처리 장치에 설치하여 추출온도 60℃에서 60분간 초음파(40kHz)추출하였다. 발효물의 숙성을 위해 4℃ 저온에서 2일간 숙성시켰다. 원심분리기를 이용하여 침전물을 제거하고, 상등액을 채취하거나, 여과된 상등액을 60℃ 이하에서 함수율 10% 이하로 감압농축한 후, 동결건조된 것을 사용하였다.
- [0074] 비교예 1: 혼합 일반 추출물의 제조
- [0075] 대조군으로 사용된 혼합 일반 추출물은 발효 공정 없이 동일한 초음파 추출 공정을 통해 수득하였다. 즉, 건조 중량의 10배량의 70% 에탄올을 가하여 잘 섞어준 후, 추출온도 60℃에서 60분간 초음파(40kHz)추출하였다. 각 추출물은 냉침한 후, 8μm 투과사이즈를 갖는 여과지로 여과하였다. 이 여과된 추출액을 60℃ 이하에서 감압농축한 후 감압건조기를 이용해 완전히 건조시켜 혼합 일반 추출물을 수득하였다.
- [0076] 실험예 1: 향균 활성 검증
- [0077] 상기 추출물들의 향균 활성 스펙트럼을 조사하기 위해 원판 확산법(Kirby-Bauer method)를 이용하였다. 사용된 균주로는 그람양성균으로 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*: ATCC 9027), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*: ATCC 6538P), 그람음성균으로 대장균(*Escherichia coli*: ATCC 8739), 효모로는 캔디다 효모(*Candida albicans*: ATCC 10231), 곰팡이로는 검정곰팡이(*Aspergillus niger*: ATCC 22343)를 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양 받아 사용하였다.
- [0078] 세균은 레신 액체 배지(Letheen broth)를 사용하였고 배지에 균을 접종하여 37℃ 진탕 배양기에서 24시간 동안 접종 배양하여 사용하였다. 효모는 와이엠 액체 배지(YM Broth)를 사용하였고, 배지에 균을 접종하여 25℃ 진탕배양기에서 2일간 전 배양하여 사용하였다.
- [0079] 향균시험은 먼저 세균의 경우, 레신 액체 배지 (Letheen broth)에 균을 접종하여 35℃에서 24시간 전 배양하여 준비하고, 효모의 경우, 와이엠 액체 배지(YM broth)에 균을 접종하여 25℃에서 2일간 전배양한 후, 멸균된 식염수에 희석하여 세균은 약 1×10^6 CFU의 균 농도로 각각의 한천평판배지에 도말하고 효모는 약 1×10^5 CFU의 균 농도로 한천평판배지에 도말한다. 그 위에 0, 1, 5, 10% 로 농도를 달리한 추출용액에 침지하여 포화시킨 후, 고체배지 위에 8mm 페이퍼 디스크(paper disc)를 일정한 간격으로 놓는다. 그 다음, 세균은 35℃에서 48시간 동

안 배양하고 효모는 25℃에서 72시간 배양한 후 디스크 주위의 투명대 (clear zone)의 크기(mm)를 측정하여 비교하였다. 각 균주에 대한 실시예 1 및 비교예 1의 항균 활성 능력을 측정한 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	항균스펙트럼(mm)				
	황색포도상구균	대장균	녹농균	칸디다효모	검정곰팡이
비교예1	16	18	15	9	8
실시예1	28	29	18	13	13

실험예 2: 항균력 시험(MIC)

상기 추출물들의 항균력을 평가하기 위하여 농도별로 저해력을 측정하여 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)를 확인하였다. 사용한 균주로는 그람양성균으로 녹농균, 황색포도상구균, 그람음성균으로 대장균, 효모로는 칸디다 효모, 곰팡이로는 검정곰팡이를 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양 받아 사용하였다. 항균활성 검정 시 사용한 균주이고, 균주마다 배양준비과정은 상기 방법과 동일하다.

일반세균은 트립틱 소이 브로스(soy broth)에 각 균주를 접종하여 35℃ 진탕 배양기에서 24시간 배양하고, 광학 밀도(optical density: OD) 600nm 값으로 농도를 측정한 후, 최종농도 1×10^6 cells/ml로 상기 추출물들이 농도별로 함유된 배지에 접종하였다. 그런 다음 35℃, 48시간 배양한 후, 육안으로 미생물의 증식이 확인되지 않은 농도를 결정하여 최소저해농도(Minimum inhibitory concentration: MIC)를 측정하였다. 진균류는 30℃, 72시간 배양하였고, 상기과 같은 방법으로 최소저해농도 시험(MIC test)을 행하였다. 각 균주에 대한 혼합 발효 추출물의 MIC 측정 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

구분	최소 저해 농도(ppm)				
	황색포도상구균	대장균	녹농균	칸디다효모	검정곰팡이
비교예1	25	100	100	300	300
실시예1	25	25	100	150	300

실험예 3: 방충 시험

3-1: 침입저지법 시험(FC-TM-21)

방충용 조성물의 기피율을 측정하기 위해 침입저지법(FC-TM-21)을 수행하였다. 침입저지법의 시험 방법은 하기와 같으며, 사용한 공시충은 큰다리먼지 진드기(*Dermatophagoides farina*)를 사용하였다.

① 플라스틱 원형접시(직경 3.5cm x 높이 1cm)의 바닥에 시험 및 대조시료를 원형접시 크기에 맞게 잘라서 놓고 그 위에 유인물질 0.05g을 넣는다.

② 플라스틱 원형접시 (직경 9cm x 높이1.5cm) 한가운데에 1)의 접시를 놓고 1)과 2)의 원형접시 사이에 공시충 배지를 균일하게 퍼 넣는다.

③ 공시충 배지 밀도는 30,000마리/g 이상의 개체수로 한다.

④ 항온기(25±2℃)에 직사각형 플라스틱 밀폐용기를 넣고 전암(全暗) 상태로 24시간 동안 유지시킨다.

⑤ 24시간 후, 플라스틱 원형접시(직경 3.5cm x 높이 1cm) 안에 침입된 공시충 개체수를 현미경(100 배율)으로 관찰하면서 계측한다.

[수학식 1]

$$\text{기피율(\%)} = \frac{\text{대조시료의 침입개체수} - \text{시험시료의 침입개체수}}{\text{대조시료의 침입개체수}} \times 100$$

혼합 발효 추출물의 큰다리먼지 진드기 기피 실험의 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

구분 N수	실시예 1			비교예 1
	#1	#2	#3	
침입 개체수	1,970	2,230	2,135	4,458
기피율(%)	84.0	81.8	82.6	62.7

3-2: 집먼지진드기 살비효력 검정시험

집먼지진드기 대한 살비효력을 검정하기 위해 직접분무 실험을 수행하였다. 20×20cm의 검정 천에 15마리의 집먼지진드기를 방사하고 약 30cm 떨어진 지점에서 실시예 1을 50배 희석하여 각각 1회, 3회 및 5회 분사 후 살비율(%)을 측정하였다. 분사 조건 하기 표 4와 같다. 또한, 각 분사 횟수별로 분사 후 5분, 15분 및 30분 후에 집먼지진드기의 활동력과 살비율을 측정하여 하기 표 5에 나타내었다.

표 4

구분	결과 시간	1회 처리량 (ml/m ²)	3회 처리량 (ml/m ²)	5회 처리량 (ml/m ²)	총 개체수 (마리)
대조군	5분, 15분 30분 간격	0.6	1.8	3.0	45
실험군	-	-	-	-	15

[수학식 2]

살비율(%) = $\frac{\text{실험군의 치사율} - \text{대조군의 치사율}}{100 - \text{대조군의 치사율}} \times 100$

살비율은 애보트(Abbott)공식(1925)을 이용하여 계산하였다.

표 5

	분사 관찰	1회 처리 시 살비율(%)	3회 처리 시 살비율(%)	5회 처리 시 살비율(%)
	5분 후	79.0	85.0	97.0
비교예 1	15분 후	85.0	97.0	100.0
	30분 후	97.0	100.0	100.0
실시예 1	5분 후	89.0	98.0	100.0
	15분 후	97.0	100.0	100.0
	30분 후	100.0	100.0	100.0

상기한 실시예들을 종합한 결과, 본 발명에 따른 고삼, 천련자, 고련피, 정향의 발효추출물은 발효하지 않은 일 반추출물에 비하여 높은 항균, 방충 효과를 제공함을 확인할 수 있었다.

산업상 이용가능성

본 발명은 천연물을 활용한 발효산업 분야에서 이용될 수 있다. 이상에서 본 발명은 기재된 구체적인 예에 대해 서만 상세히 설명되었지만 본 발명의 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구 범위에 속함은 당연한 것이다.