



등록특허 10-2753454



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월10일

(11) 등록번호 10-2753454

(24) 등록일자 2025년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/22 (2020.01)

A01P 1/00 (2006.01) A23K 10/16 (2017.01)

A23L 33/135 (2016.01) C12R 1/07 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/205 (2021.05)

A01N 63/22 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2024-0014715

(22) 출원일자 2024년01월31일

심사청구일자 2024년01월31일

(56) 선행기술조사문헌

KR101589026 B1

KR102065581 B1

KR1020170130341 A

KR101839375 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

김영목

부산광역시 남구 분포로 111, 109동 1103호(용호동, 엘지메트로시티)

조경진

부산광역시 남구 황령대로492번길 18, 303호(대연동, 영 스퀘어)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주는 발효 스타터, 내열성을 가지는 효소생산 및 식품 원료로부터 영양분 추출을 위한 미생물 제제 등 다양한 바이오 관련 산업에 유용하게 활용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A01P 1/00 (2021.08)
A23K 10/16 (2016.05)
A23L 33/135 (2016.08)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/3204 (2013.01)
C12R 2001/07 (2021.05)

정금재

부산광역시 남구 용소로34번길 14, 204호(대연동, 가람하우스)

(72) 발명자

김민웅

울산광역시 남구 도산로77번길 4, 102동 1201호(달동, 어울림아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	미부여
과제번호	RS-2024-00404977
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	대체해조육 및 수산배양육 기술개발사업
연구과제명	미세조류 기반 대체해조육 상용화 기술개발
과제수행기관명	부경대학교 산학협력단
연구기간	2024.01.01 ~ 2028.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

단백질 및 세포벽 분해 효소 활성이 우수하고, 내열성, 내염기성, 항생제 감수성 및 병원성 미생물에 대한 항균 활성이 우수하며, 바이오제닉아민을 생성하지 않고 용혈을 일으키지 않는 바실러스 아밀로리퀴페시언스 (*Bacillus amyloliquefaeciens*) MU2 균주 (KCTC15499BP).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 1의 16S rRNA 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 바이오제닉 아민은 히스타민 (histamine), 티라민 (tyramine), 푸트레신 (putrescine) 또는 카다베린 (cadaverine)인 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 5

제1항의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 발효용 스타터 (starter).

청구항 6

제1항의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 하는, 병원성 미생물 성장 저해용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 병원성 미생물은 대장균 (*Escherichia coli*), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 또는 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria Monocytogenes*)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 병원성 미생물은 항생제 내성 병원성 미생물인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 항생제는 겐타마이신 (Gentamicin), 카나마이신 (Kanamycin), 스트렙토마이신 (Streptomycin), 테트라사이클린 (Tetracycline), 에리스로마이신 (Erythromycin), 클로람페니콜 (Chloramphenicol), 또는 반코마이신 (Vancomycin)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 10

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 프로바이오틱스 제제.

청구항 11

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 건강식품.

청구항 12

제1항의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 하는, 사료 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0002] * 본 발명은 (재)부산테크노파크의 수산 가공식품 혁신성장 현장밀착형 기술개발사업, 블루푸드테크 기반의 미래 고부가 수산식품 개발(과제번호 202303370001, 연구기간 2023.04.01~2024.03.31) 및 한국연구재단의 중점연구소지원사업, 해양바이오닉스융합기술센터(과제번호 2021R1A6A1A03039211, 연구기간: 2023.03.01~2024.02.29)의 지원을 받은 발명이다.

배경 기술

[0004] 전통발효식품은 영양적, 건강 기능적으로 우수성이 높이 평가되고 있으며 유산균과 바실러스 균종을 대표로 하는 다양한 미생물을 포함하는 유전자원 pool로써도 고려될 수 있다. 이러한 전통발효식품에서 유래한 미생물은 항암, 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 혈전저해, 설사 방지 등의 프로바이오틱스 효과가 있는 건강기능성 유용 미생물로 보고되고 있다. 따라서 건강 기능성이 우수한 전통발효식품으로부터 안정적인 품질과 기능성의 향상을 기대할 수 있는 종균의 발굴 및 활용이 필요하다.

[0005] 바실러스 아밀로리퀴페시언스 이용한 발효 기술은 농업, 식품, 생명과학 등의 다양한 분야에서 활용되고 있다. 바실러스 아밀로리퀴페시언스는 대사활동을 통하여 원료의 특성을 개선하거나 원하는 물질을 추출 및 생산하며, 이를 통한 제품의 품질 향상에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 또한, 발효 기술은 여타 식품 가공 기술과는 달리 자연에 미치는 영향이 적은 친환경적인 생산방법으로 인식되고 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 안전한 전통식품인 것갈에서 분리한 신규한 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 (KCTC15499BP)가 내염기성, 내열성, 세포외 효소 분비능, 항생제 감수성 및 유해 미생물에 대한 항균 활성이 우수하고 바이오제닉 아민을 생성하지 않고 용혈성을 가지지 않는 것으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) KR 10-1860836 B1
(특허문헌 0002) KR 10-1839371 B1
(특허문헌 0003) KR 10-1839371 B1

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Korean Journal of Microbiology (2012) Vol.48, No.3, pp. 220-224

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 신규한 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주를 제공하는 것이다.
[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 발효용 스타터, 병원성 미생물 생장 저해용 조성물, 프로바이오틱스 제제, 건강식품, 사료 첨가제를 제공하는 것이다.
[0012]

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 단백질 및 세포벽 분해 효소 활성이 우수한 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 (KCTC15499BP)를 제공한다.
[0014] 또한 본 발명은 상기 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 발효용 스타터, 병원성 미생물 생장 저해용 조성물, 프로바이오틱스 제제, 건강식품, 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주는 발효 스타터, 내열성을 가지는 효소생산 및 식품 원료로부터 영양분 추출을 위한 미생물 제제 등 다양한 바이오 관련 산업에 유용하게 활용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
[0020] 본 발명은 단백질 및 세포벽 분해 효소 활성이 우수한 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 (KCTC15499BP)를 제공한다.
[0021] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주는 전통 전갈에서 분리한 신규한 균주이며, 내염기성, 내열성, 세포외 효소 분비능, 항생제 감수성 및 유해 미생물에 대한 항균 활성이 탁월하고, 용혈소 (hemolysin)와 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 균학적 특징을 가지고 있음을 확인하였고, 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2023년 07월 11일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC15499BP를 부여받았다.
[0022] 본 발명의 일 구현예에 따른 균주에서, 상기 균주는 바이오제닉 아민 (biogenic amine)을 생산하지 않는 것을 특징으로 한다.

- [0023] 상기 바이오제닉 아민은 미생물의 아미노산 디카복실라제 작용에 의해 아미노산으로부터 형성되며, 인체의 분해 한도를 넘어서는 바이오제닉 아민을 식품에서 섭취하는 경우에는 발진, 국소적 피부염증, 알레르기, 구토, 오심, 설사 등의 증상을 유발한다.
- [0024] 상기 바이오제닉 아민은 히스타민 (histamine), 티라민 (tyramine), 푸트레스신 (putrescine) 또는 카다베린 (cadaverine)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주는 서열번호 1의 16S rRNA 염기서열을 갖는다.
- [0027] 또한 본 발명은 상기 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 발효용 스타터를 제공한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 발효용 스타터 (starter)란 발효에 관여하는 미생물을 포함하는 제제 또는 조성물을 의미한다. 발효용 스타터를 발효식품의 생산 시 첨가하여 발효식품을 제조하는 경우, 상기 발효용 스타터에 포함된 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액에 의하여 발효식품의 품질을 일정하게 조절할 수 있고, 상기 스타터의 첨가량 또는 초기 균수에 의하여 발효의 속도를 조절할 수 있다.
- [0029] 상기 발효용 스타터에는 통상적으로 사용되는 첨가제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 균주를 배양하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법에 따라 배양할 수 있으며, 특별한 방법에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에 이용되는 배양액은 본 발명의 균주를 배양한 배양물 자체 뿐만 아니라, 원심분리 등으로 본 발명의 균주 (세포)가 어느 정도 제거되고 본 발명의 균주가 배양시 생산한 유기산을 포함하고 있는 상등액을 물리적 방법으로 여과한 배양여액인 것도 포함할 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효성분으로 포함하는"이란, 본 발명의 균주 또는 이의 배양액이 그 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양으로 포함되는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 유효성분들은, 짓갈로부터 분리한 균주 또는 이의 배양액인 바, 과량 투여하여도 대상에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.
- [0034] 또한 본 발명은 상기 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 병원성 미생물 성장 저해용 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 병원성 미생물로는 대장균 (*Escherichia coli*), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*), 황색포도상구균 (*aphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토게네스 (*steria Monocytogenes*), 장염비브리오 (*brio parahaemolyticus*)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 병원성 미생물은 항생제 내성 병원성 미생물일 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 항생제는 겐타마이신 (Gentamicin), 카나마이신 (Kanamycin), 스트렙토마이신 (Streptomycin), 테트라사이클린 (Tetracycline), 에리스로마이신 (Erythromycin), 클로람페니콜 (Chloramphenicol), 반코마이신 (Vancomycin)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 실제 임상투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주, 이의 배양액에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 젤라틴 등을 섞어 제조된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0039] 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액이 약 0.001 ~ 100

mg/kg이고, 바람직하게는 5 ~ 50 mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

- [0040] 본 발명의 조성물은 상술한 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액을 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0042] 또한 본 발명은 상기 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제를 제공한다.
- [0043] 상기 프로바이오틱스 제제는 당업계에서 공지된 방법에 따라 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액은 약제학적 분야에서 통상적으로 사용되는 담체와 혼합하여 산제 (powder), 액제 (liquids and solutions), 정제 (tablet), 캡슐 (capsule), 시럽 (syrup), 현탁제 (suspension) 또는 과립제 (granule) 등의 형태로 제조되어 투여될 수 있다. 상기 담체로는 예를 들어, 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 투여 용량은 체내에서의 활성 성분의 흡수도, 불활성물, 배설속도, 피투여자의 연령, 성별, 축종, 상태 및 질병의 중증 정도 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 프로바이오틱스 제제는 상술한 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액을 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0046] 또한 본 발명은 상기 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 병원성 미생물 생장 저해용 건강식품을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액을 함유하는 건강식품으로는 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 하는 차, 젤리, 즙, 액기스, 음료 등의 병원성 미생물 생장 억제제를 목적으로 하는 민간요법제를 들 수 있다. 이와 같이 다양한 형태로 가공된 본 발명의 항생제 내성 병원성 미생물 또는 장내 유해 미생물의 생장 억제용 건강식품은 인체에 부작용이 없으면서 병원성 미생물의 생장 억제에 우수할 뿐 아니라 복용이 용이하고 장기간 보관이 가능하다.
- [0048] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액은 병원성 미생물의 생장 억제제를 목적으로 건강식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 각각을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액이 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없으므로 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 건강식품은 상술한 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액을 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0051] 또한 본 발명은 상기 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 병원성 미생물 생장 저해용 사료 첨가제를 제공한다.
- [0052] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 및 이의 배양액은 가축을 비롯한 동물을 대상으로 사용될 수 있으며 동물 사료에 첨가할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 상기 사료 첨가제는 상술한 본 발명의 균주 또는 이의 배양액을 원형 그대로 사용하거나 또는 추가적으로 사료 첨가제에 허용되는 곡류 및 그 부산물 등의 공지된 담체, 안정제 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성 피로인산염, 폴리인산염 (중합인산염) 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있으며, 상기 사료 첨가제를 공급하

는 경우는 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다.

[0054] 본 발명의 사료 첨가제는 상술한 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주 또는 이의 배양액을 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0056] 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0057] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] <실시예 1> 균주의 분리 및 배양

[0060] 재래식으로 제조된 3 종의 젓갈 (가자미 식해, 멸치 젓갈, 오징어 젓갈) 샘플을 제주도 전통시장에서 수집하였으며, 이를 이용하여 균주를 분리하고자 하였다.

[0061] 구체적으로, 각 샘플 25 g을 취하고 225 mL의 멸균된 phosphate buffered saline (PBS)과 혼합하여 Bagmixer를 이용하여 균질화하였다. 다음으로, 균질화한 샘플을 9 mL의 PBS를 이용하여 단계별로 희석한 뒤, all culture agar (AC agar)에 spread method로 접종하여 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양이 끝난 AC agar plate에서 균의 형태학적 특징을 확인하여 균주를 분리 및 배양하였다. 그 후 배양이 끝난 AC agar plate에서 균의 형태학적 특징을 확인하여 균주를 분리 및 배양하였다.

[0063] <실시예 2> 단백질 및 세포벽 분해 효소 활성 확인 및 균주의 선정

[0064] 상기 실시예 1에서 확인된 균주의 단백질 및 세포벽 분해 효소 활성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0065] 구체적으로, skim milk agar와 carboxymethyl-cellulose agar (CMC agar)를 이용하여 확인하였다. 순수 분리된 균주를 AC broth에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후, 각각의 plate에 멸균된 목면봉을 이용하여 spot inoculation method로 접종하고, 37℃에서 24시간 동안 배양 후 clear zone의 크기를 확인하였다. 단백질 분해 효소 활성 및 세포벽 분해 효소 활성은 배양이 끝난 plate에서 clear zone과 각 균주 colony 크기의 비로 나타내었다.

[0066] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, F1-2-1 균주가 단백질 분해 효소 활성이 3.0, 세포벽 분해 효소 활성이 4.0으로 가장 높은 것으로 나타나 F1-2-1 균주를 선별하여 이후 실험에 사용하였다.

표 1

[0067]

균주명	세포벽 분해 효소 활성	단백질 분해 효소 활성
F1-2-1	4.0	3.0
F1-4	2.8	1.8
F1-9	2.8	1.8
F1-11	2.3	1.1
F2-1	3.0	-
F2-2	3.0	2.2
F2-4	-	1.8
F2-5	2.0	1.0
F2-6	2.8	-
F2-8	2.0	1.3
F2-9	1.8	1.6
F2-10-1	1.9	-
F2-10-2	2.0	-
F2-11	-	2.1
F2-13-2	1.8	-
F2-13-3	2.0	-
F2-14-2A	1.2	-
F2-14-2B	-	-
A1-1	1.8	1.0
A1-6	1.3	1.6

A2-4	-	1.1
A2-5	-	1.0
S1-3	2.1	1.4
S1-4-1	2.2	2.8
S2-1-1A	2.8	2.0
S2-1-2B	3.0	1.9
S2-1-2	1.3	1.3
S2-2	1.0	1.8
S2-3	-	1.1
S2-4	1.1	-
S2-5	3.0	1.9
S2-6	-	2.1
S2-8	1.1	1.9
S2-9	-	2.1
S2-10	-	2.0

[0069] 선정된 균주는 DNA extraction kit를 이용하여 DNA를 추출 및 정제하였으며, 16s rRNA PCR kit를 이용하여 DNA를 증폭 후 시퀀싱을 진행하고 NCBI의 Blast 프로그램을 이용하여 균주를 동정하였다.

[0070] 상기 균주의 16S rRNA를 코딩하는 DNA 염기서열 (16S rDNA; 서열번호 1)을 Basic local alignment search tool (Blast, NCBI)을 통해 진뱅크 (GeneBank) 데이터베이스에 등록된 균주들의 16S rRNA 염기서열과 상동성을 조사하여 계통학적 유연 관계를 분석한 결과, 본 발명의 선별된 분리 균주가바실러스 아밀로리퀴페시언스 (*Bacillus amyloliquefaeciens*)와 99%의 상동성을 갖는 것으로 확인되어, 바실러스 아밀로리퀴페시언스에 속하는 균주임을 확인하였다.

[0071] 이에, 본 발명자들은 상기 분리한 바실러스 아밀로리퀴페시언스 (*Bacillus amyloliquefaeciens*) MU2로 명명하고 한국생명공학연구원 생물자 원센터(KCTC)에 2023년 7월 11일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC15499BP를 부여받았다.

[0072] 따라서, 본 발명의 균주인 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주는 공시 균주와 비교하였을 때 염기서열 상 차이가 존재하는 것으로 밝혀진 신규 균주이며, 상기 균주는 단백질 및 세포벽 분해 효소 활성이 우수한 균학적 특징이 발휘되므로, 균주 자체뿐만 아니라 이의 배양 대사물로서 효과를 달성할 수 있다.

[0074] <실시예 3> 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주의 내열성 확인

[0075] 선정된 균주 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2의 내열성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0076] 구체적으로, 멸균된 AC broth에 균주를 접종하여 각각 30, 37, 40, 50, 60℃의 온도에서 24시간 동안 배양하였고 배양된 균주를 9 mL의 PBS를 이용하여 단계별로 희석한 뒤, all culture agar(AC agar)에 spread method로 분주하고 다시 37℃에서 24h 배양하여 생균수를 측정하였다.

[0077] 그 결과, 본 발명의 균주는 표 2에 나타난 바와 같이 30℃의 배양온도에서 7.74 ± 0.06 Log CFU/mL로 가장 높은 생장도를 나타내었으며, 50℃에서도 6.98 ± 0.03 Log CFU/mL 로 높은 생장도를 나타내었다.

표 2

배양온도(℃)	생장 정도(Log CFU/mL)
30	7.74 ± 0.06
37	7.72 ± 0.01
40	7.09 ± 0.02
50	6.98 ± 0.03
60	3.26 ± 0.01

[0079] 일반적인 발효는 20-40℃의 중온대에서 이루어지며, 이는 대부분의 식중독균과 같은 유해 미생물의 증식 온도와

맞물려있어 제품의 품질이나 안전성을 저하할 수 있는 반면 본 발명의 균주는 50℃ 이상에서도 발효가 가능함을 확인하였다.

[0081] <실시예 4> 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주의 바이오제닉 아민 생성 확인

[0082] 선정된 균주 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2가 인체에 유해한 바이오제닉 아민을 생성하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0083] 구체적으로, 1% arginine, 2% lysine, 1% ornithine이 각각 첨가된 decarboxylase broth를 제조하였다. 다음으로 제조된 배지에 균주와 *Escherichia Coli* KCTC 2571 (*E. coli*)을 positive control로서 접종하고 배지 위에 멸균된 mineral oil를 도포 및 밀봉하여 37℃에서 24시간마다 확인하여 배지의 색이 보라색에서 노란색, 그 후 다시 보라색이 될 경우를 양성, positive control의 배지가 다시 보라색이 되었을 때까지 노란색일 경우 음성으로 판정하였다.

[0084] 그 결과, 본 발명의 균주는 표 3에 나타난 바와 같이, 카다버린과 푸트리신 2종에 대한 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 것으로 확인되었다.

표 3

균주	카다버린	푸트리신
<i>B. amyloliquefaeciens</i> MU2	ND	ND
<i>E. coli</i> KCTC 2571	+	+

[0086] 바이오제닉아민은 발효식품에서 문제가 되는 대표적인 물질로 카다버린과 푸트리신은 식품에 첨가된 nitrite와 반응해 carcinogenic nitrosamine이라는 발암성을 가지는 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 균주는 이러한 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 것으로 확인되어 안전성에 긍정적인 영향을 줄 수 있음을 확인하였다.

[0088] <실시예 5> 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주의 내염기성 확인

[0089] 선정된 균주 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2의 내염성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0090] 구체적으로, AC broth의 pH를 각각 7, 8, 9, 10으로 맞추어 멸균하고 각각의 배지에 균주를 접종하여 37℃에서 24시간 동안 배양하였고 배양된 균주를 9 mL의 PBS를 이용하여 단계별로 희석한 뒤, all culture agar (AC agar)에 spread method로 접종하고 다시 37℃에서 24시간 동안 배양하여 생균수를 측정하였다.

[0091] 그 결과, 본 발명의 균주는 표 4에 나타난 바와 같이 pH 7에서 7.79 ± 0.01 Log CFU/mL 로 생균수가 가장 높았으며, pH 10에서 3.30 ± 0.19 Log CFU/mL 로 생균수가 가장 낮게 나타났다.

표 4

pH	Viable cell count (Log CFU/mL)
7	7.79 ± 0.01
8	6.90 ± 0.06
9	7.06 ± 0.04
10	3.30 ± 0.19

[0093] 일반적으로 대부분의 세균은 pH 6.5~7.5에서 최적 생장을 나타낸다. 이는 대부분의 환경에서 흔히 볼 수 있는 pH로 인체에 유해한 병원균이 생육할 수 있는 조건이기도 하다. 본 발명의 균주는 pH 9에서도 잘 생육하는 내염기성을 가지고 있기 때문에 병원균이 잘 자라지 못하는 환경에서도 발효가 가능함을 확인하였다.

[0095] <실시예 6> 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주의 항생제 감수성 확인

[0096] 선정된 균주 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2의 항생제에 대한 감수성을 확인하기 위해 MIC (Minimum

Inhibitory Concentration, 최저 억제 농도)를 분석하였다.

[0097] 구체적으로, MIC는 CLSI M07-A9의 dilution method를 이용하여 진행하였으며 EU에서 지정한 cut-off value 값을 통해 항생제 감수성을 확인하였다. Bacillus 속의 항생제 감수성을 확인하는데 사용하는 7종의 항생제 (Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline, Erythromycin, Chloramphenicol, Vancomycin)를 선정 하여 cut-off value에 맞게 희석하여 준비하였다.

표 5

[0098]

분주량(μL)											
균액	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
균액	180	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
항생제	20	이후 100 μL씩 double folding									
균액	180	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
항생제	20	이후 100 μL씩 double folding									
균액	180	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
항생제	20	이후 100 μL씩 double folding									

[0099] 그 결과, 본 발명의 균주는 표 6에 나타난 바와 같이 7종의 항생제에 대하여 cut-off value를 초과하지 않아 항생제 내성이 없는 것으로 나타났다.

표 6

[0100]

항생제	MIC	cut-off value
Gentamicin(GEN)	≤0.25	4
Kanamycin(KAN)	0.5	8
Streptomycin(STR)	8	8
Tetracycline(TET)	4	8
Erythromycin(ERY)	0.25	4
Chloramphenicol(CHL)	≤0.06	8
Vancomycin(VAN)	0.25	4

[0101] 항생제 내성 균주는 수평적 유전자 이동으로 인해 항생제 내성균이 퍼지는 위험성을 가지고 있다. 본 발명의 균주는 항생제 내성을 나타내지 않는 것으로 확인되어 발효 시 위와 같은 위협에서 안전함을 확인하였다.

[0103] <실시예 7> 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주의 용혈성 확인

[0104] 선정된 균주 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2가 용혈성을 가지는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0105] 구체적으로, sheep blood agar를 이용하였고, 순수 분리된 균주와 Bacillus cereus ATCC 10876을 AC broth에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후, sheep blood agar에 멸균된 목면봉을 이용하여 spot inoculation method로 접종하고 37℃에서 24 시간 동안 배양 후 clear zone의 크기를 확인하였다.

[0106] 그 결과, 본 발명의 균주는 표 7에 나타난 바와 같이 clear zone이 확인되지 않아 γ-hemolysis인 것으로 확인되었다.

표 7

[0107]

균주명	용혈성
<i>B. amyloliquefaeciens</i> MU 2	γ-hemolysis
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	β-hemolysis

[0108] 용혈성은 혈액내의 적혈구가 모종의 원인으로 파괴되는 현상으로, 크게 α-hemolysis와 β-hemolysis 및 γ-hemolysis로 구분된다. α-hemolysis는 불완전용혈로 헤모글로빈을 부분적으로 용해하여 접종된 배지를 녹회색

으로 변화시키며, β -hemolysis는 완전용혈로 헤모글로빈을 완전히 용해시켜 접종된 배지에서 투명한 clear zone을 확인할 수 있다. γ -hemolysis는 무용혈로 용혈을 일으키지 않아 배지에 변화가 없는 것을 확인할 수 있다. 용혈현상은 인체의 적혈구를 파괴하여 장기 및 순환기 계통에 악영향을 끼쳐 빈혈, 황달, 장기비대 등의 질병을 유발할 수 있기에 균주의 용혈성은 안전성 확인에 있어 중요한 요인으로 작용한다. 본 발명의 균주는 γ -hemolysis로 용혈성을 나타내지 않는 것으로 확인되어 위와 같은 위협에서 안전함을 확인하였다.

[0110] <실시예 8> 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주의 병원성 미생물에 대한 항균활성 확인

[0111] 선정된 균주 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2가 병원성 미생물에 대하여 항균활성을 가지는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0112] 구체적으로, 병원성 미생물 4종(*Escherichia coli* KCTC 2571, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria Monocytogenes* KCTC 3569)을 선정하여 disk diffusion method를 실시하였다. 각 병원성 미생물 및 선정된 균주를 tryptic soy broth에 접종하고 37℃에서 24h 배양한 뒤 멸균된 mueller hinton agar에 병원성 미생물을 9 mL의 PBS를 이용하여 10^5 log CFU/mL까지 희석하고 spread method를 이용하여 균을 접종하였다. 그 후 멸균된 paper disk를 병원성 미생물이 접종된 plate 위에 올리고, 선정된 균주를 10^7 log CFU/mL까지 9 mL의 PBS로 희석하여 paper disk 위에 20 μ L 분주한 뒤 37℃에서 24h 배양하였다. 배양이 끝난 후 paper disk의 중심을 기준으로 하여 clear zone의 크기를 측정하여 항균활성을 확인하였다.

[0113] 그 결과, 본 발명의 균주는 표 8에 나타난 바와 같이, *E. coli* KCTC 2571에 대하여 17 mm, *S. aureus* ATCC 6538에 대하여 15 mm, *L. monocytogenes* KCTC 3569에 대하여 23 mm의 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, *B. cereus* ATCC 10876에 대한 항균활성은 나타나지 않았다.

표 8

병원성 균주명	clear zone diameter(mm)
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2571	17
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	15
<i>Listeria Monocytogenes</i> KCTC 3569	23

[0116] 종합적으로, 본 발명에서는 바실러스 아밀로리퀴페시언스 MU2 균주는 단백질 및 세포벽 분해 효소 활성, 내염기성, 내열성, 항생제 감수성 및 유해 미생물에 대한 항균 활성이 우수하고, 바이오제닉아민 생성 및 용혈을 일으키지 않아, 발효 스타터, 내열성을 가지는 효소 생산 및 식품 원료로부터 영양분 추출을 위한 미생물 제제 등 바이오 관련 산업에 다양하게 활용할 수 있을 것으로 예상된다.

[0118] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

수탁번호

[0120] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15499BP

수탁일자 : 20230711

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.