

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001236-01

생강과(*Zingiberaceae*) 식물로부터 식중독 유발세균의 세포간 신호전달체계를 이용한 독성인자 제어소재 개발

Development of antimicrobial materials from
Zingiberaceae targeting quorum sensing mediated virulence
of pathogenic bacteria

한국식품연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생강과(*Zingiberaceae*) 식물로부터 식중독 유발세균의 세포간 신호전달체계를 이용한 독성인자 제어소재 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 12 월 ○ 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 이 나 리

세부연구책임자 : 장 현 주

연 구 원 : 최 성 욱

연 구 원 : 김 승 민

연 구 원 : 오 수 경

연 구 원 : 김 묘 덕

위탁연구기관명 : 경상대학교

위탁연구책임자 : 김 현 진

참 여 기 업 명 : (주) 다인소재

요 약 문

I. 제 목

생강과(Zingiberaceae) 식물로부터 식중독 유발세균의 세포간 신호전달체계를 이용한 독성인자 제어소재 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
	출원	등록	SCI	비SCI									
최종목표	2	1	2	2		1						3	1
3년간 실적	2		1 (1)	3	5				1			3	1

※ SCI 논문 1편이 현재 revision 중이며 (1), 특허출원을 위해 1편의 논문 투고가 보류 중에 있음
 ※ 특허등록은 현재 2건의 출원에 대한 의견제출통지서를 받아 대응 중임
 ※ 학술발표는 1편의 구두발표 (국내 1), 2편 해외포스터 발표, 2편 국내포스터 발표
 ※ 기술거래는 과제완료시점에서 논의하기로 하여 현재 최종결과물에 대한 특허등록과 단일물질에 대한 동정에 노력을 하고 있음
 ※ 홍보는 2016년도에 단일물질 확인 후 추가 진행 할 예정임
 ※ 본과제 결과를 활용한 후속과제로 “소비자형 모바일 융합 식중독균 검지기술개발” 로 2015년부터 진행 하고 있으며 연구재단의 사회문제해결형 다부처 사업으로 '감염병 조기감시 대응체계 구축' 으로 진행 중

III. 연구개발의 목적 및 필요성

- 과도한 항생제 사용으로 인한 강력한 수퍼박테리아 출현, 사람의 건강에 대한 관심으로 인한 친환경 유기농 식품 소비 증가로 식중독균에 대한 위험성 증가, 위해요소의 실시간 전파로 인한 미생물 변종출현 등으로 새로운 항균물질과 항생제 내성의 문제를 해결할 수 있는 항균제 개발의 새로운 표적이 필요하다.
- 장내유익균의 저하를 최소화하며 미생물의 생장이나 독소생성만 차단할 수 있는 신호전달 기작 교란을 이용한 새로운 패러다임의 항균신소재를 개발한다면 미생물을 죽이지 않고도 선택적으로 제어가 가능하기 때문에 다양한 미생물 관련 산업에서도 효과적으로 사용될 수 있으며 내성이 생길 수 없는 항생제의 존재 가능성에 대한 해답이 될 수 있다.
- 주로 수입에 의존한 제품이 주를 이루고 있는 국내 천연항균소재 시장에서 가습기 살균제 사망사건 등에 의한 항균물질의 안전성에 대한 관심증가로 천연소재에 대한 수요가 증가하고 있으므로 새로운 항균소재 개발이 국내 자생하는 식용식물로부터 개발된다면 농가소득에 의한 경제적 부가가치와 함께 다양한 산업 전반에 중요한 기술기반이 될 것이다
- 본 과제의 목적은 지역 농수축산식품 산업의 성장을 위한 모멘텀을 제공할 수 있도록 국내 자생 국내 자생 생강과 (Zingiberaceae) 식물로부터 식중독균의 증식을 유도하는 세포간 신호전달체계를 이용하여 독성인자를 제어하는 항균신소재를 개발하고 이를 적용한 제품기술

을 개발하는 것이다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 국내 자생 생강과 식물의 표준 추출물 제조

- 생강과 식물의 수집 및 조추출물 제조 및 표준 추출법 결정

2. 신호전달 교란 및 항균활성 후보물질 선발

- 신호전달 교란물질 활성 측정방법 구축 및 신호전달 교란활성 후보물질 선발

3. 추출물의 생리활성평가 기반 유효성분 분리 및 동정

- 선발된 후보추출물에 대한 활성성분 분획, 동정 및 구조 분석

4. 신호전달 교란 활성성분에 대한 생리학적 특성 및 항균소재 후보의 제어기작 규명

- 신호전달 교란 활성성분에 대한 생리학적 특성평가
- 항균소재 후보의 제어기작 연구

5. 항균복합소재 특성연구 및 최종후보 선정

- 단일항균 소재의 비율별 복합제제 제조 및 최적조건 확립
- 신호전달 교란 및 항균활성에 기반한 항균복합소재 후보물질 선정 및 안정성 확인

6. 산업화를 위한 항균 단일/복합소재의 응용기술 개발

- 항균 단일/복합소재의 적용상 연구 및 제품화 연구

7. 신호전달 교란 및 항균활성 복합소재에 의한 미생물 대사체 비교 분석 (위탁과제)

- 선발된 신호전달 교란 물질 및 항균활성을 갖는 복합소재를 처리한 균과 배지의 대사체 분석을 통한 지표물질 발굴

V. 연구개발결과

1. 국내 자생 생강과 식물을 포함한 9종의 조추출물 제조 및 표준추출법 결정

식품첨가물 적용가능성을 고려하여 식품첨가물공전이 정하는 주정과 그 외 활성성분 분리를 위한 MTBE를 추출용매로 국내 자생생강과 식물 중 양하의 메탄올추출물 등 3종과 생강, 강황 메탄올 추출물, 강황 MTBE 추출물, 참여기업이 요청한 석류, 매실, 유자의 메탄올 추출물 등 총 9종의 조추출물을 제조하여 제공하였고 항균활성법과 violacein 억제활성 검증을 통하여 70% 주정추출물에 의한 추출법을 표준으로 확정

2. 신호전달 교란물질 활성법을 구축하여 신호전달 교란활성 후보물질 선발

신호전달 교란활성을 측정하기 위해 *C. violaceum* (1차선별), *C. violaceum* CV026 (2차선별)을 표준균주로 보라색색소 생성 억제환을 측정하는 violacein inhibition assay 방법을 구축하였고 동시에 agar well diffusion법으로 항균활성 (주요 식중독균 5종 대상) 을 측정하여 신호전달 교란물질 활성 후보추출물로 양하, 석류, 유자의 메탄올 추출물을 선발하였고 항균 활성 후보추출물은 양하, 석류, 매실 메탄올 추출물을 선발

3. 선발된 후보추출물에 대한 생리활성평가 기반 유효성분 분리, 동정 및 구조 분석

신호전달 교란 활성성분의 동정과 구조 분석은 바이오필름 억제활성평가 (대상균주: *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*) 를 기반으로 분획하였고 휘발성 양하 분획의 GC/MS 구조분석 결과는 주성분이 geranyl- α -terpinene이고 terpinen-4-ol, geranyl-p-cymene, borneol acetate 등으로 확인되었으며, 항균활성 기반 분획은 비 휘발성분 중 양하 ether:ethyl acetate (50:50) 분획 활성이 높아 GC/MS와 NMR에 의한 항균활성 성분 동정 및 구조분석을 수행, 비교한 결과 isoeugenol, nomilin, β -sitosterol, β -Pinene, α -Terpineol 일 것으로 추정

4. 신호전달 교란 활성성분에 대한 생리학적 특성 및 항균소재 후보의 제어기작 규명

선발된 후보물질에 대하여 violacein 억제활성, 바이오필름 생성 억제능 (대상균주: *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*), Swarming 억제활성, 신호전달 물질 분해능을 확인 (분해대상 물질: C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL) 한 결과 양하II와 석류II 분획이 모든 생리 활성이 높게 나타났으며 121°C 열에도 안정한 것으로 확인되었으며 선발 후보물질들 모두 *Y. enterocolitica* 의 신호전달물질 합성 유전자 *yenI*의 mRNA 발현수준을 낮추고 바이오필름(독소발현) 형성에 관여하는 flagella 조절유전자 *fliA*, *fleB*, *flhDC*의 발현 억제 확인

5. 항균복합소재 제조 최적조건 확립 및 신호교란, 항균활성 기반 최종후보 선정

신호전달 교란활성이 가장 좋은 복합물은 양하 물추출물과 석류 메탄올 추출물의 1:2 인 복합물(활성 30% 증가) 이었으며, 항균활성이 높은 추출물의 비율별 복합제제는 양하 E/A추출물과 황매실 메탄올 추출물의 1:2 비율인 2번 복합물(활성 50% 증가)과 양하 E/A추출물, 황매실 메탄올추출물, 매실 주정추출물이 1:1:1 비율인 7번 복합물(활성 30% 증가)로 3종의 복합물 모두 10°C, 25°C, 45°C에서 30일 동안 보관하면서 외형변화와 활성변화 없이 안정적 발현이 확인되었으며 최종 항균활성복합물로 신호전달 교란활성복합물과 항균활성복합물 2번의 1:1 혼합제제가 선정되었으며 특히 신호전달 교란 활성복합물을 혼합할 때에는 기존 대비 항균물질이 50% 만 첨가되어도 동일한 활성 발현

6. 산업화를 위한 항균 단일/복합소재의 응용기술 개발

항균활성복합물에 대한 제제 유형별 (용액, 분산, 반고형, 분립체 등) 항균활성, 제제 유형별 온도와 저장기간에 대한 안정성과 품질평가 등을 그람음성균과 양성균을 대상으로 수행하였고 제품화를 고려하여 급성경구독성시험과 피부자극시험을 실시하여 얻어진 결과를 기반으로 하여 액상제품으로 손세정제, 고상제품으로 천연비누와 사료첨가제로 제조하여 산업화를 위한 기초실험을 하였으며 추가적으로 치약, 구강청결제의 첨가제로의 자료도 확보

7. 신호전달 교란 및 항균활성 복합소재에 의한 미생물 대사체 비교 분석 (위탁과제)

선발된 신호전달 교란 물질을 처리한 *Y. enterocolitica* 와 항균활성을 갖는 복합소재를 처리한 *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 0157:H17, *Salmonella* sp. 균체와 배지들의 대사체 분석을 LC/MS와 GC/MS를 이용하여 분석하고 다변량통계분석을 통해 관련 지표 물질들을 발굴하였음. 신호전달 교란 물질을 처리한 *Y. enterocolitica*인 경우 균체에서 Asp-Glu-Asn, 5'-deoxy-5-(methylthio)adenosine, C16 sphiganine, oleamide, LysoPE(16:1)가 유의적으로 차이가 나는 것으로 확인되었고 양하 추출물의 경우 biofilm를 형성에 관여하는 valine의 변화가 관찰되었으며 nicotiamide, hypoxanthine, adenosine, guanosine 등 DNA,

RNA 분해 부산물 함량이 균체내에서 증가하였으며 항균물질 처리후 균체 및 배지 대사체 분석 결과 균체에서 지방, 펩타이드, 핵산분해산물들의 함량이 크게 증가함

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

• 연구성과

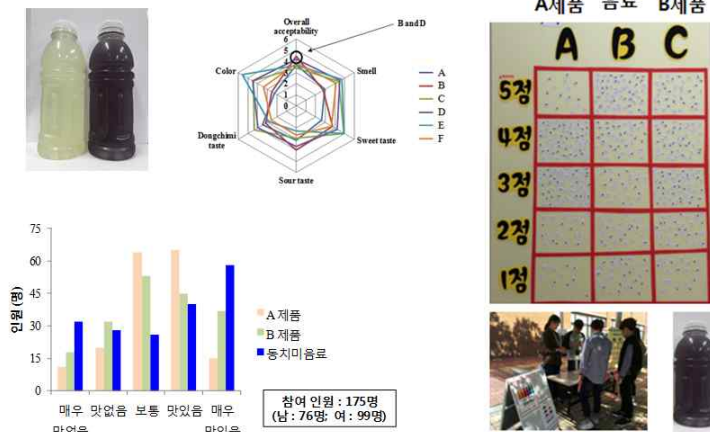
- 특허출원 2건 (현재 의견통지서에 대하여 대응 중), 2016년 2-3월중 1건 출원
- SCI 논문 1건 게재 (1건 revision 중), 특허출원으로 논문 1건 투고 보류 중
- 비SCI 논문 3건 게재
- 학술발표: 구두발표 1건, 해외학회 포스터발표 2건, 국내학회 포스터 발표 2건
- 기술이전 모색: 과제완료시점에 논의하기로 하였으므로 진행예정

• 연구성과 활용계획

- 본 과제에서 개발된 신호전달교란 활성소재와 항균활성소재의 복합제제가 항균소재 사용량을 50% 줄일 수 있으므로 내성없는 신개념 항균소재의 기술이전 및 산업화 가능
- 신호전달 교란활성으로 개발된 항균활성복합물은 식중독 유발세균과 감염형 병원성미생물 뿐 아니라 과일과 채소의 무름병, 어류 폐사의 원인균과 신호전달기작의 일부를 공유하므로 개발된 항균소재와 연구결과는 농축수산물식품 전반에 기초자료로 활용
- 개발된 항균활성복합 소재는 활성에 따라 항생제 대체제, 식품 및 동물사료 첨가제, 의료기구 등의 소독제, 바이오필름 억제제와 생물정화를 위한 첨가제 등의 바이오산업의 전반에 활용
- 국내 농산자원의 가치 재발견을 통한 얻어진 결과이며 아직 농가에 보급된 작물이 아니므로 새로운 고부가가치 작물보급에 농업경제 향상 및 농가소득 증대에 활용
- 본 과제에서 얻어진 과학적 근거자료와 도출된 소재로 “소비자형 모바일 융합 식중독균 검지기술개발”로 2015년부터 진행하고 있으며 연구재단의 사회문제해결형 다부처 사업으로 “감염병 조기감시 대응체계 구축 “으로 신규 후속과제 연계 진행중

동치미 (양하 물추출물) 를 이용한 제품 개발

동치미 음료 (특허출원 예정)



SUMMARY

I. Title

Development of antimicrobial materials from *Zingiberaceae* targeting quorum sensing mediated virulence of pathogenic bacteria

II. Research goals and accomplishments

Type	Patent		Papers		Presentations	Technology Transfer	Education	Commercialization	Technical certification	Human resource	Policy application	Promotion	Etc.
	applied	Registered	SCI	Non-SCI									
Final goals	2	1	2	2		1						3	1
Achievements within 3 years	2		1 (1)	3	5					1		3	1
※ 1 manuscript is currently under revision for an SCI journal, and 1 manuscript is awaiting submission due to a patent application. ※ 2 cases of patent registration are currently at the stage of responding to office actions. ※ Conference presentations consist of 1 oral presentation (domestic), 2 oversea poster presentations and, 2 domestic poster presentations. ※ A decision was made to discuss technology transfer after task completion, and so efforts are currently being made to register patents for the final results and to identify a single substance. ※ We plan to proceed with additional promotion after confirmation of the substance in 2016. ※ As a follow up project, “The Development of consumer-oriented mobile convergence biosensing system for detecting food adulteration caused by food-borne pathogens” is has been going since 2015 and “Establishment of an early surveillance and response system for infectious disease” is planned as a multi-departmental project at the research institute to solve social problems using the scientific evidence and materials derived from this study.													

III. Research and development objectives and needs

- New targets for the development of novel antimicrobial agents are needed to solve the problem of resistance to antibiotics and antimicrobial agents, which is the result of super bacteria emerging due to excessive use of antibiotics, increased risk of bacterial food poisoning due to increased consumption of environmentally friendly organic food for health-related reasons, and the emergence of mutant strains due to real-time transmission of hazards.
- Novel antimicrobial materials can be developed by a new paradigm of inhibiting quorum sensing and preventing toxin production or growth of microorganism while minimizing the degradation of commensal microbes. If successful, this could be a great solution for potential antibiotics that do not result in antibiotic resistance and can be effectively used in various microbial industries, since they would provide selective control without killing

microorganisms.

- In the domestic natural antimicrobial markets, which are mainly dependent on imported products, demand for natural materials is growing due to increased interest in the safety of antimicrobial substances. If novel antimicrobial materials can be developed from domestic edible wild plants, it would be an important technology across a variety of industries with added value for the economy due to farm income.
- The aim of this study is to develop novel antimicrobial materials, which are extracted from domestic wild ginger plants (*Zingiberaceae*) and control virulence mediated by cell-to-cell communications that induces the growth of food poisoning bacteria. These materials will then be used to develop products and technologies.

IV. Research and Development contents and scope

1. Manufacture of standard extracts from domestic wild ginger plants

- Collecting ginger plants, manufacturing crude extracts, and determining standard extraction protocols.

2. Selection of candidates for antimicrobial activity and inhibitors in quorum sensing

- Establishing methods to measure the activity of substances that inhibit quorum sensing, and selecting candidates that show quorum sensing inhibition activity.

3. Isolation and identification of active ingredients based on evaluation of the physiological activity of extracts

- Fractionation, identification and structural analysis of the active ingredients in selected candidate extracts.

4. Investigating physiological characteristics of the active ingredients that inhibit quorum sensing and identifying control mechanisms of antibacterial candidates

- Evaluation of physiological characteristics of the active ingredients that inhibit quorum sensing
- Study of the control mechanisms of antibacterial candidates

5. Characterization of combination antimicrobial materials and selection of final candidates

- Manufacturing combination formulations with different ratios of single antimicrobial material and establishing optimal conditions
- Selection safety testing of candidate antimicrobial combinations based on inhibition of quorum sensing and antimicrobial activity

6. Development of applied technology using single/combination antimicrobial material(s) for commercialization

- Study on the application and commercialization of the antimicrobial single/combination material(s)

7. Metabolomic analysis of cells and their growth media treated with quorum sensing agents and anti-microbial compounds (Researches commissioned)

- Metabolites from the cells and their growth media treated with the selected quorum

sensing agents and anti-microbial compound mixtures, respectively, were analyzed by LC/MS and GC/MS and the related biomarkers were identified.

V. Research and development results

1. Manufacture of crude extracts from 9 species, including domestic wild *Zingiberaceae* plants and determining standard extraction protocols

Crude extracts were manufactured and provided for all 9 species, including methanol extracts of 3 species of in domestic wild *Zingiberaceae* plants such as *Zingiber mioga*, methanol extracts of ginger and turmeric, an MTBE extract of turmeric, and additional methanol extracts of pomegranate, Korean plum, and citron, which were requested by a collaborating company. Ethanol and MTBE, to separate other active compounds, were used as the solvents for extraction, as indicated by the Korean Food Additives Codex, in order to account for future applicability as food additives. The standard extraction protocol was finalized as 70% alcohol extracts, after verifying antimicrobial activity and violacein inhibitory activity.

2. Selection of candidate substances that disrupt signal transduction by establishing the activity of signaling disturbances

To measure the quorum sensing inhibition activity, the violacein inhibition assay was developed, in which the zone of inhibition of purple pigmentation is measured using *C. violaceum* (1stselection) and *C. violaceum* CV026 (2ndselection) as standard strains. At the same time, antimicrobial activity (5 major food poisoning bacteria) was also measured using the agar well diffusion method and candidates that inhibit quorum sensing, such as methanol extracts of ginger, pomegranate, and citron, and candidates that show antimicrobial activity, such as methanol extracts of ginger, pomegranate, and plum.

3. Fractionation, identification and structural analysis of active ingredients based on the evaluation of physiological activity for the selected candidate extracts

Identification and structural analysis of that active ingredients that inhibit quorum sensing was performed as follows: extracts were fractioned based on the biofilm inhibitory activity (Target strains: *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*), and GC/MS structural analysis was performed on the volatile *Zingiber mioga* fraction, confirming that the major ingredients were geranyl- α -terpinene, terpinen-4-ol, geranyl-p-cymene, and borneol acetate. As for fractionation based on antimicrobial activity, among non-volatile compounds, the ether:ethyl acetate (50:50) fraction of *Zingiber mioga* showed high activity, and so identification and structural analysis of the antimicrobial active ingredients was performed using GC/MS and NMR. The major active compounds were found to be isoeugenol, nomilin, β -sitosterol, β -Pinene, and α -Terpineol.

4. Characterization of physiological properties for the active ingredients that inhibit quorum sensing, and Identification of control mechanism of the candidate antimicrobial materials.

We confirmed violacein inhibitory activity, biofilm inhibitory activity (target strains: *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*), swarming inhibitory activity, and the ability to degrade auto-inducer molecules (degradation targets: C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL) for the selected candidates. The ginger II and pomegranate II fractions were shown to have higher physiological activity and be stable at 121° C. Selected candidates reduced expression of *yenI* mRNA, which is a gene that synthesizes quorum sensing inhibition substances in *Y. enterocolitica*, and inhibited the expression of *fliA*, *fleB*, *flhDC*, which are flagella regulating genes involved in biofilm formation (toxin expression).

5. Selection of final candidates based on antimicrobial activity and ability to disrupt signal transduction, and establishment of optimal conditions for the manufacture of combination antimicrobials.

The combination with the best quorum sensing inhibition activity was the 1:2 mixture of *Zingiber mioga* and pomegranate methanol extracts (30% increased activity). Combinations with different ratios of extracts that showed high antimicrobial activity included Combination No. 2, which was 1:2 mixture of *Zingiber mioga* E/A extract and yellow plum methanol extract (50% increased activity), and Combination No. 7, which was a 1:1:1 mixture of *Zingiber mioga* E/A extracts, yellow plum methanol extract, and Korean plum alcohol extract (30% increased activity). When stored for 30 days at 10° C, 25° C, or 45° C, all 3 complexes were confirmed to show stable expression and no change in activity or external appearance. As the final antimicrobial combination, a 1:1 mixture of antimicrobial Combination No. 2 and the quorum sensing inhibitors combination was selected, and in particular, the same activity was observed when adding only half as much antimicrobial agent as conventional formulations.

6. Development of applied technologies using single/combination antimicrobial material(s) for commercialization.

We performed evaluations of antimicrobial activity using various formulation types (solution, dispersion, semi-solid, powder, etc.) and, evaluation of safety and quality for various temperatures and storage durations with gram-negative and gram-positive bacteria. Additionally, we manufactured liquid hand sanitizer products, and natural soap and food additives as solid products, based on the results of acute oral toxicity and skin irritation tests. We also performed primary experiments for commercialization, and secured data for use as an additive in toothpaste and oral cleaners.

7. Metabolomic analysis of cells and their growth media treated with quorum sensing agents and the mixture of anti-microbial compounds (Researches commissioned)

Metabolites from the *Y. enterocolitica* and its medium treated with quorum sensing agents

and five microorganisms (*S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 0157:H17, *Salmonella* sp.) and their growth media treated with the mixture of anti-microbial compounds were analyzed by LC/MS and GC/MS and the related biomarkers were identified. From *Y. enterocolitica*, the levels of Asp-Glu-Asn, 5'-deoxy-5-(methylthio)adenosine, C16 sphinganine, oleamide, and LysoPE(16:1) were significantly changed by the treatment of quorum sensing agents. In addition, nicotinamide, hypoxanthine, adenosine, and quanosine associated with the degradation of nucleotide and valine related with biofilm production were significantly changed by the anti-microbial compounds.

VI. Research accomplishments and planned uses

- Research accomplishments
 - 2 patent applications (currently in the process of responding to office actions), 1 patent application planned for Feb-Mar 2016.
 - Publication of 1 paper in an SCI journal (1 manuscript under revision), submission of 1 manuscript awaiting patent application.
 - Publication of 3 papers in non-SCI journals
 - Conference: 1 oral presentation, 2 poster presentations at international conferences, 2 poster presentations at domestic conferences
 - Technology transfer: to be discussed after task completion
- Future plans for application of the research results
 - There are possibilities for technology transfer and commercialization of the antimicrobial agents, which use a new concept and do not result in resistance, because the combination formulation of quorum sensing inhibitors and antimicrobial agents is able to reduce the use of antimicrobial agents by 50%.
 - The antimicrobial combination drug developed by inhibition of quorum sensing and the research results can be used as underlying materials for all agricultural, meat, and fish-based food products, since the same mechanisms of quorum sensing are shared not only for bacteria causing food poisoning and infectious pathogenic microbes, but also for causative agents of soft rot in fruits and vegetables and fish kill.
 - The antimicrobial combination formulations developed in this study can be used throughout the biotechnology industry, such as substitutes for antimicrobial agents, food and animal feed additives, disinfectants for medical devices, and additives in biofilm inhibitors and bioremediation.
 - Because the result is based on rediscovering the value of domestic agricultural resources, and uses a crop that is not already supplied to farms, they can be used to improve agricultural economy and increase farm income by supplying a new high added value crop.

- As a follow up project, “The Development of consumer-oriented mobile convergence biosensing system for detecting food adulteration caused by food-borne pathogens” is has been going since 2015 and “Establishment of an early surveillance and response system for infectious disease” is planned as a multi-departmental project at the research institute to solve social problems using the scientific evidence and materials derived from this study.

CONTENTS

SUMMARY (Korean)	1
SUMMARY (English)	5
Chapter 1. Summary of Research and Development and Intended Outcomes	15
Section 1. Research and development aims and needs	15
1. Research and development needs	15
2. Research aims	18
Section 2. Research goals and accomplishments	19
Chapter 2. The state of technology development domestically and overseas	20
1. Studies of microbial quorum sensing systems	20
2. The status of technology development overseas	20
3. The status of domestic technology development	22
Chapter 3. Research and Development Contents and Results	23
Section 1. Manufacture of standard extracts of domestic wild <i>Zingiberaceae</i> plants	23
1. Collecting <i>Zingiberaceae</i> plants and manufacturing crude extracts	23
2. Determining standard protocols of extraction	24
Section 2. Selection of candidates showing antimicrobial activity and inhibition of quorum sensing	30
1. Development of methods to measure inhibition of quorum sensing	30
2. Measuring of the activity of active ingredients in <i>Zingiberaceae</i> showing antimicrobial activity	32
3. Measuring inhibition of quorum sensing and selecting active extracts	34
Section 3. Purification and identification of active ingredients based on evaluation of the physiological activity of extracts	39
1. Fractionation of the active ingredients for selected candidate extracts ...	39
2. Identification and structural analysis of the active ingredients	42
Section 4. Characterization of the physiological properties of active ingredients that show inhibition of quorum sensing and elucidation of the control mechanisms of the antimicrobial candidates	44
1. Evaluation of the physiological properties of active ingredients that show inhibition of quorum sensing	44
2. Studying the control mechanisms of the antimicrobial candidates	51
3. Selection of materials based on antimicrobial activity	53

Section 5. Characterization of combination antimicrobials and selection of final candidates	56
1. Establishment of the optimal conditions for manufacturing combination drugs with different ratios of single antimicrobial material	56
2. Selection of the candidate combination antimicrobials	67
3. Confirmation of safety during storage for combination formulations	70
Section 6. Development of the applied technologies using the single/ combination antimicrobial material(s) for commercialization	72
1. Study on the applications of single/composite antimicrobial material(s) ..	72
2. Study of research-based commercialization for the applications	84
Section 7. Metabolomic analysis of cells and their growth media treated with quorum sensing agents and antimicrobial compounds	91
1. Metabolomic analysis of cells and their growth media of <i>Y. enterocolitica</i>	91
2. Metabolomic analysis of <i>Y. enterocolitica</i> treated with quorum sensing agents	93
3. Metabolomic analysis of cells and their growth media treated with antimicrobial compounds	97
Chapter 4. Goal Fulfillment and Contributions to Related Fields	104
Chapter 5. Research and Development Outcomes and Planned Uses	105
1. Plans for commercialization	105
2. Plans for expansion of the technology, such as education, guidance, and promotion	105
3. Plans for securing intellectual property, such as patents, breeds, and academic publications	105
4. Planned uses for additional and other studies	106
Chapter 6. Information on Overseas Science and Technology Obtained during the Research and Development Process	107
Chapter 7. Laboratory Safety Management Adherence	108
Chapter 8. References	111
<Appendix> Patents, Publications and Market Analysis Report	114

목 차

요 약 문	1
영문요약문	5
제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표	15
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	15
1. 연구개발의 필요성	15
2. 연구목적	18
제 2 절 연구성과 목표 대비 실적	19
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
1. 미생물의 quorum sensing 시스템 연구	20
2. 국외 기술개발현황	20
3. 국내 기술개발현황	22
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절 국내 자생 생강과 식물의 표준 추출물 제조	23
1. 생강과 식물의 수집 및 조추출물 제조	23
2. 표준추출물 제조법 결정	24
제 2 절 신호전달 교란 및 항균활성 후보물질 선발	30
1. 신호전달 교란물질 활성 측정방법 구축	30
2. 항균활성이 보고된 생강과 유효성분 활성측정	32
3. 신호전달 교란물질 활성측정 및 활성추출물 선발	34
제 3 절 추출물의 생리활성평가 기반 유효성분 분리 및 동정	39
1. 선별된 후보추출물에 대한 활성성분 분획	39
2. 활성성분 동정 및 구조분석	42
제 4 절 신호전달 교란 활성성분에 대한 생리학적 특성 및 항균소재 후보의 제어기작 규명	44
1. 신호전달 교란 활성성분에 대한 생리학적 특성 평가	44
2. 항균소재 후보의 제어기작 연구	51
3. 항균활성평가 기반 소재 선발	53

제 5 절	항균복합소재 특성연구 및 최종후보 선정	56
1.	단일항균소재의 비율별 복합제제 제조 최적조건 확립	56
2.	항균복합소재 후보물질 선정	67
3.	복합제제의 보관중 안정성 확인	70
제 6 절	산업화를 위한 항균 단일/복합소재의 응용기술 개발	72
1.	항균 단일/복합소재의 적용상 연구	72
2.	적용상 연구기반 산업화 연구	84
제 7 절	신호전달 교란 및 항균활성 복합소재에 의한 미생물 대사체 비교 분석	91
1.	<i>Y. enterocolitica</i> 균체 및 배지 대사체 분석	91
2.	신호전달 교란물질 처리 <i>Y. enterocolitica</i> 의 대사체 분석	93
3.	항균물질 처리 미생물 및 배지 대사체 분석	97
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	104
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	105
1.	실용화·산업화 계획	105
2.	교육·지도·홍보 등 기술확산 계획	105
3.	특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획	105
4.	추가연구, 타연구에 활용 계획 등	106
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	107
제 7 장	연구실 안전관리 이행실적	108
제 8 장	참고문헌	111
<첨부>	특허, 논문 및 시장분석 보고서	114

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 필요성

식중독 유발세균 독성인자 제어

AS-IS

- 제어기술의 내성 발생
- 항균제에 의한 장내 유익균 저하
- 미생물 사멸
- 화학적 합성물질

신호전달
교란 기반
항균신소재
개발

To-be

- 제어기술의 내성 발생 최소화
- 항균제에 의한 유익균 저하 최소화
- 미생물 성장 또는 독소생성 차단
- 식용 가능 안전한 천연물질

유전자 수준에서 병원성 발현을 조절하는
선택적 제어 가능성 확인

미생물의 신호전달 교란을 이용한 새로운 패러다임의 식중독 독소인자 제어기술 개발: 내성을 유발하지 않는 제어소재 필요

가. 기술적 측면

● 항생제 내성을 OECD 국가중 최고수준

최근 국정감사 자료 분석결과, 우리나라 항생제 내성율이 다른 국가에 비해 2.4~10 배 높은 것으로 나타났으며, 내성균 증가는 항생제 소비량 1위라는 항생제 사용관행과 밀접한 관련이 있으며 과도한 항생제의 반복적인 사용이 강력한 슈퍼박테리아를 탄생시키고 있다.

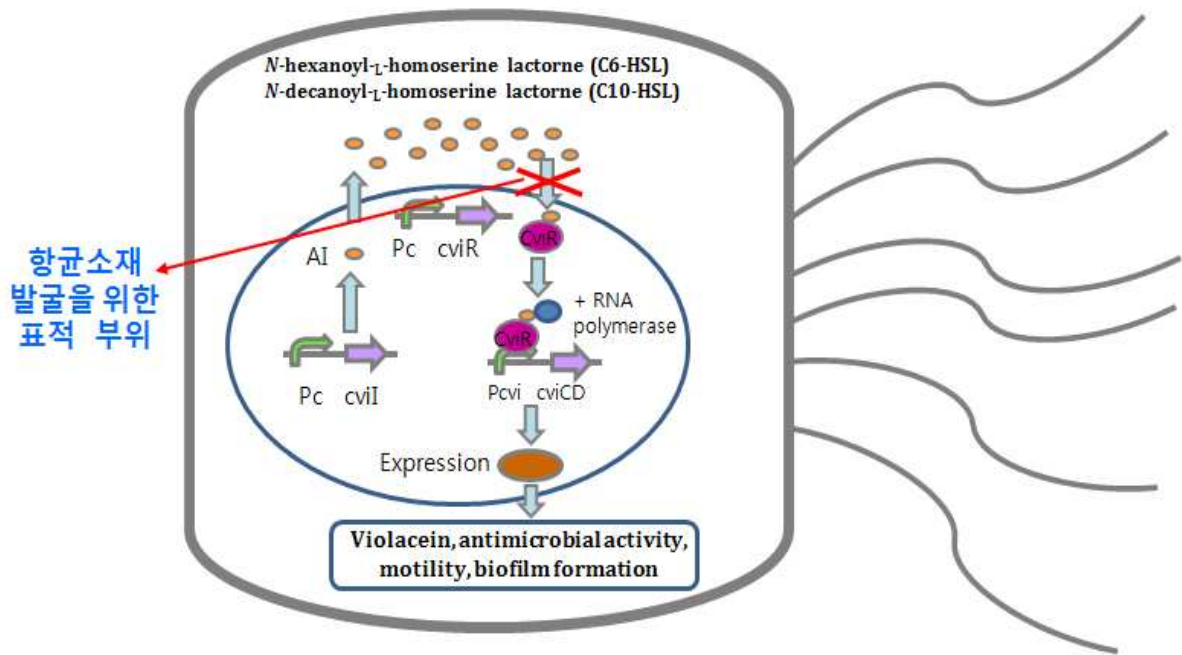
● 새로운 항균물질 개발을 위한 표적

슈퍼박테리아의 출현은 세균감염에 대한 효과적인 신물질을 찾는 노력으로 이어지면서 세균의 생존능력에 필수적인 단백질이나 인자들을 표적으로 하는 신호전달기작 (quorum sensing) 과 특정세균에만 감염되어 그 세균을 파괴시키는 박테리오파지가 항생제 내성을 해결할 수 있는 대체물질 개발의 표적이 되고 있으나 박테리오파지의 돌연변이 발현 가능

성을 배제하기 어렵다는 이유로 치료제로서 개발에 문제점으로 지적되고 있다.

• **신호전달체계로 독성인자 제어소재 개발**

신호전달기작 (quorum sensing) 은 신호전달물질로 세균 개체군의 밀도를 유지하거나 또는 증식을 유도하며 유전자발현을 조절하는 현상으로 독성 인자 생산과 바이오필름 형성, 운동능, 포자생성 등과 같은 발현에 관여하는데, 독성인자 생성 기작도 미생물의 생존이나 성장에 필수요소가 아니므로 독소발현 신호전달만 조절할 수 있는 물질들을 개발한다면 미생물을 죽이지 않고도 선택적으로 제어가 가능하기 때문에, 다양한 미생물 관련 산업과 의약계에서도 내성이 거의 없는 항생제의 존재 가능성에 대한 답을 줄 수 있을 것이다. *Cromobacterium violaceum* CV026은 신호전달물질 *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL)을 합성하지 못하는 돌연변이주로 항균활성을 나타내는 보라색 violacein을 생산하지 못함으로 바이오센서로 활용하여 신호전달 물질의 길항제 (antagonist)에 의한 신호전달 교란을 이용한 독성인자 제어소재 탐색과 개발에 중요한 전략이 될 수 있다 (1, 3, 4, 5).



Cromobacterium violaceum 의 violacein-producing 신호전달 체계

나. 경제·산업적 측면

• **식중독균의 위협성 증가**

사람의 건강에 대한 관심은 친환경 유기농 식품에 대한 소비 증가로 이어져 식중독균에 대한 위협에 더 많이 노출되고 있으며, 농축산식품 생산과 가공 현장에서 사용되는 항생제와 살균소독제에도 내성을 얻어 사람에게 대한 내성 획득의 위협이 커지고 있으며 식중독 발생으로 인한 사회·경제적 손실 비용이 미국은 연 6조 5천억원, 한국은 1조 3천억원으로 추정하고 있다.

• 항생제 시장의 변화

보건복지부의 항생제 사용량 자료를 보면 종합병원, 병원, 의원 모두에서 사용량이 증가하는 것을 확인할 수 있는데 병원급은 3년간 160%의 항생제 사용량 증가를 나타냈으며, 치료 항생제중 프리미엄 항생제시장 규모는 2009년 현재 2900억원에 달하고 있으며 2017까지 11%의 성장할 것으로 예측되며, 항생제가 치료제 시장의 2위를 차지하고 있으므로 산업적 가치로도 중요하다.

• 새로운 항균소재

신호전달 교란을 이용한 독성인자 제어소재의 개발은 세균의 성장에 직접적인 영향을 주지 않기 때문에 내성균의 출현을 막을 수 있고, 극미량 투여시에도 신호전달 교란에 의한 제어 효과가 있으므로 항생제에 대한 비용 증가를 막을 수 있다. 또한 신호전달 기작 연구를 이용하여 바이오필름 또는 독소발현 신호전달만을 조절할 수 있는 천연항균소재들이 개발된다면 식품과 의약계에서 뿐 아니라 환경정화용 제제와 같은 환경 미생물학적 응용, 동물사료용 등, 응용 미생물학 제반 분야에 적용 할 수 있다.

• 항균시장은 천연소재가 대세

천연항균소재 시장은 2014년 현재 세계시장 규모는 3,351억원, 국내 시장 규모는 약668억원 정도가 될것으로 예상되며 항균제품에 대한 수요는 연평균 15%이상 급성장하고 있다. 국내 천연항균소재 시장은 주로 수입에 의존한 제품이 주를 이루고 있으나, 최근 가습기 살균제 사망사건으로 국내 항균물질의 안전성에 대한 관심 증가에 따라 천연소재에 대한 수요가 증가하고 있으므로 신호전달 기작 연구를 이용한 새로운 항균소재를 먹을 수 있는 자생식물로부터 개발 할 수 있다면 농가소득으로 인한 경제적 부가가치는 더욱 클 것으로 생각된다.

다. 사회 문화적 측면

• 항균제 사용의 위험성

2010년 인도를 시작으로 전세계에 전파되어 사망자가 발생했던 수퍼박테리아 NDM-1은 초강력 박테리아로 우리나라 질병관리본부도 2011년부터 이를 포함한 6종의 수퍼박테리아를 법정감염병으로 지정하여 감시하고 있으며 수퍼박테리아가 아니더라도 전 세계적으로 항생제 또는 항균제 내성 발현 문제가 심각하고 특히 항균제 사용의 제한 규정 등이 마련되어 있지 않는 개발도상국에서 광범위한 항균제에 대한 내성이 점차 증가하고 있다.

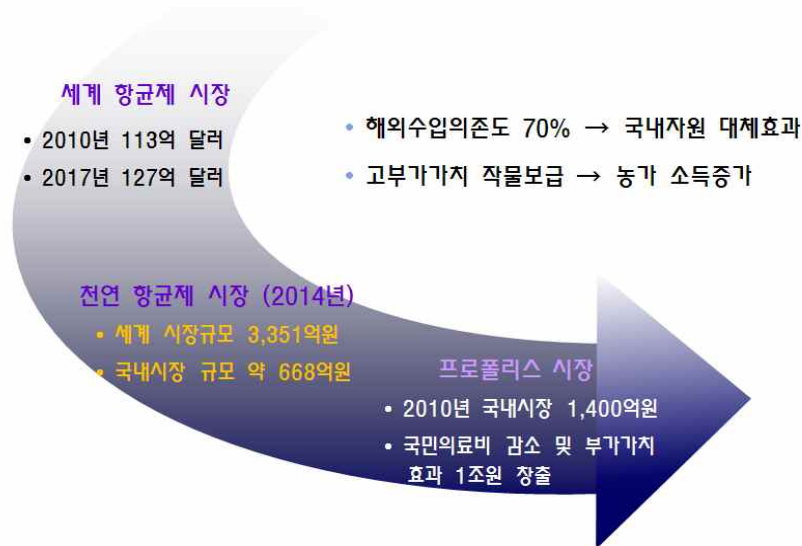
• 위해요소의 실시간 전파

2009년 고위험성 인플루엔자 A, 2002년 중증 급성호흡기 증후군(SARS)의 전세계 확산과 재확산에 대한 우려, 항균제 내성으로 인한 동물바이러스 또는 미생물의 변종출현에 의한 사람의 감염 등에 대한 불안감은 증가하고 있으며 다자간 또는 양자간 협상 등을 통한 수입 식품의 교역량 증대는 안정성에 대한 불신과 소비자 건강에 대한 관심 증가로 연결되어 국내산 농산물에 대한 보다 높은 수준의 품질관리를 요구하고 있다.

• 천연항균소재 활용 증가

식용이 가능하고 생산이력이 관리되어 안전성이 확인된 자생 생강과(Zingiberaceae) 식물에 대한 선행연구결과는 여러 개의 식중독균에 대한 높은 항균활성을 나타냈으며, 또한 바이오센서로 사용되는 미생물의 신호전달기작을 차단하는 활성이 확인되었다. 본 과제에서 연구개발 대상인 생강과 식물중 양하는 제주도 및 남해안 일대에 많이 자생하는 다년생 초본 식물로서 어린 순이나 꽃을 식용으로 섭취하며 뿌리는 약재와 향료로 사용되며 현재 거제도(50 ha), 남원 (20ha), 정읍지역 (30 ha)에서 수출 특용작물로 재배하고 있으며, 최근 여러 가지 생리활성 효과가 연구되면서 고부가가치 작물로 주목받고 있어 농가소득증대에도 기여할 수 있다.

천연항균제 시장분석



2. 연구목적

본 과제의 목적은 지역 농수축산식품 산업의 성장을 위한 모멘텀을 제공할 수 있도록 국내 자생 국내 자생 생강과(Zingiberaceae) 식물로부터 식중독균의 증식을 유도하는 세포간 신호전달체계를 이용하여 독성인자를 제어하는 항균신소재를 개발하고 이를 적용한 제품기술을 개발하는 것이다.

본 과제를 수행하여 자생식물로부터 내성을 유발하지 않는 천연 항균소재가 개발된다면 항생제로서의 가치 뿐 아니라 농축산식품과 가공하는 작업환경에 오염되어 증식하는 식중독균을 제어하는 항균소재로서 식중독 발생을 예방할 수 있으며, 농산물의 부패를 제어하고, 화장품소재, 공기청정제 등 환경 친화적인 항균성 소재 및 동물사료용 첨가제 등으로 확대적용이 가능하다.

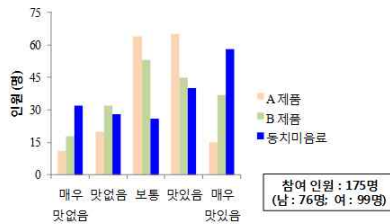
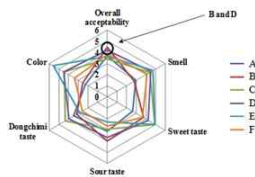
제 2 절 연구성과 목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
	출원	등록	SCI	비SCI									
최종목표	2	1	2	2		1						3	1
3년간 실적	2		1 (1)	3	5					1		3	1

※ SCI 논문 1편이 현재 revision 중이며 (1), 특허출원을 위해 1편의 논문 투고가 보류 중에 있음
 ※ 특허등록은 현재 2건의 출원에 대한 의견제출통지서를 받아 대응 중임
 ※ 학술발표는 1편의 구두발표 (국내 1), 2편 해외포스터 발표, 2편 국내포스터 발표
 ※ 기술거래는 과제완료시점에서 논의하기로 하여 현재 최종결과물에 대한 특허등록과 단일물질에 대한 동정에 노력을 하고 있음
 ※ 홍보는 2016년도에 단일물질 확인 후 추가 진행 할 예정임
 ※ 본과제 결과를 활용한 후속과제로 “소비자형 모바일 융합 식중독균 검지기술개발” 로 2015년부터 진행 하고 있으며 연구재단의 사회문제해결형 다부처 사업으로 '감염병 조기감시 대응체계 구축' 으로 진행 중

동치미 (양하 물추출물) 를 이용한 제품 개발

동치미 음료 (특허출원 예정)



제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 미생물의 quorum sensing 시스템 연구

- quorum sensing 은 다양한 미생물에서 bioluminescence, 동식물의 병원성 관련 요소의 합성, exo-enzyme의 합성, 항생제 및 색소의 생산, exotoxin의 생산 등에 광범위하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다 (1, 3, 4, 5, 15, 16).
- quorum sensing과 관련하여 1995년에 세계적으로 불과 10여 편의 논문이 발표되었고, 2001년도의 경우 약 130여편의 논문이 발표되었으나 최근 새로운 항감염제 개발 및 향후 산업적 응용 가능성이 큰 신생 첨단 연구분야 이기에 관련 논문이 폭발적으로 늘어나고 있다.
- 가장 많은 연구가 이루어진 Autoinducer-1 (AI-1)은 *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Rhizobium* 속 등 약 70 종류 이상의 그람음성균에서 분비되는 것으로 알려져 있다. 본 과제에서 타겟으로 하는 *Y. enterocolitica*도 여기에 해당된다 (2, 6, 8, 16, 29, 32).
- 식중독균의 병발에 관여하는 많은 병독소 요소 가운데 하나인 biofilm의 형성도 quorum sensing에 의해 조절되는데 모든 세균 감염의 65%가 이러한 바이오필름과 관련되어 있다 (26, 29, 31).
- 병원성 미생물에 의한 바이오필름 형성은 면역계의 접근을 저해하여 치료를 어렵게 하여 어떤 항생제가 특정 병원균에 효과적임에도 불구하고 바이오필름을 투과하지 못해 항생제 내성의 문제를 일으키는 주요 원인으로 생각하고 있어 신호물질을 교란함으로써 바이오필름 형성을 제대로 하지 못하게 하여 기존 항생제 투여에 대한 내성을 감소시키고 감염증을 치료하고자 하는 연구들이 진행되고 있다 (5, 11, 21).

2. 국외 기술개발현황

연구수행 기관		연구개발의 내용
과제 계획서 제출시 현황	아이오와 주립대학	• 그린버그 연구팀은 낭포성 섬유증 환자의 호흡기 감염을 일으키는 <i>P. aeruginosa</i> 의 항생물질 개발을 위하여 신호전달물질 합성을 저해하는 길항물질인 HSL 유도체 탐색연구를 수행 및 독소 관련된 바이오필름 생성에 관한 연구 진행되고 있으나 관련 특허등록, 제품 정보는 없다.
	노팅엄 대학	• 애런 스미스 연구팀은 마늘이 <i>Pseudomonas</i> 신호전달을 방해한다는 연구 결과를 발표, 폐질환자의 항생제 분무 흡입치료로 임상실험 진행중이다
	Quorex Pharmaceu- tical	• 미국 Quorex사는 Quorum Science 함께 <i>Pseudomonas</i> 와 같은 질병 유발 세균에서 quorum sensing을 교란시키는 신호물질의 유사체의 탐색을 통해 질병감염을 제어할 위한 물질 합성 연구가 진행중에 있다.
	메릴랜드 대	• William Bentley 등은 미생물의 quorum sensing을 기반으로 나노 크기 공장인 미세유체장치로 항 미생물제제 개발용 고속대량탐색시스템 개발

연구수행 기관		연구개발의 내용
	싱가포르 국립대학, 배재대	<ul style="list-style-type: none"> Dong과 Zhang 교수팀은 세계 최초로 quorum sensing의 신호물질을 분해하는 효소가 신호전달물질을 비활성화 시키는 것을 발견하였고, 식물 병원성 원인균 <i>Erwinia carotovora</i>의 신호전달물질의 생산을 감소시켜, 감자, 배추, 당근, 담배 등에서 병원성을 완화시켰으며 한국에서는 배재대학의 이정기 교수 연구팀이 공동연구로 참여하고 있다.
연구 개발 과정 에서 기술 현황	Dalian polytechnic university	<ul style="list-style-type: none"> Chen 등은 퀴럼센싱에 의한 감염기작을 차단하기 위한 효소를 미생물에서 분리, 동정하여 다양한 미생물에 적용하여 다양한 미생물종과 여러 가지 기질에 작용할 수 있는 효소임을 증명함으로써 현재 독소발현 차단뿐 아니라 사람 등과 같은 제 2차 숙주에서 발현여부를 확인 중에 있다.
	히브루 대학	<ul style="list-style-type: none"> 이스라엘의 Kumar 연구팀은 대장균이 만들어내는 펩타이드 (extracellular death factor) 가 interspecies interaction 뿐 아니라 intraspecies interaction 도 가능하다는 연구결과를 발표하여 미생물을 이용한 새로운 종류의 항생제 개발 가능성을 제시하였다.
	콜로라도 주립대학, 알칸사스 대학	<ul style="list-style-type: none"> 콜로라도 주립대학의 Pittman 연구팀은 Valencia orange 에센셜 오일이 냉장 보관 중 살모넬라와 대장균의 증식을 막아줄 수 있다는 연구결과를 발표했으며, 알칸사스 대학의 Pendleton 연구팀도 냉장 중에 orange 에센셜 오일이 <i>E. coli</i> O157:H7 를 억제한다는 연구결과를 발표하였다.
	델라웨어 대학	<ul style="list-style-type: none"> 식품공학과 Lu 연구팀은 thyme과 carvacrol 과 같은 에센셜 오일 등이 그레이프 토마토와 같은 채소에서 살모넬라 증식을 억제하므로 신선한 과일과 채소 세척에 에센셜 오일을 첨가하여 염소소독을 대체할 수 있음을 제시하였다.
	Danisco Animal Nutrition	<ul style="list-style-type: none"> 영국의 Amerah 연구팀과 그루지아 대학연구팀은 계피 추출물을 식이로 섭취한 가금류에서 살모넬라 감염 전이율을 61-77% 감소시킨다는 연구결과를 발표하였다.
	캘리포니아 대학	<ul style="list-style-type: none"> Jeff Hasty 와 공동연구원들은 약 센티미터 거리에 분포해 있는 대장균 퀴럼센싱 콜로니들을 동기화 하는데 성공하였다. 이러한 대장균 어레이는 LCD 와 유사하게 비소 화합물의 존재유무를 감지할 수 있으며 좀더 개발을 진행하게 되면 바이오픽셀 콜로니는 저가 유전자 바이오센서로 개발되어 중금속 및 병원균의 존재 유무를 확인할 수 있을 것으로 확신하고 있다.
	MIT	<ul style="list-style-type: none"> Ron Weiss 의 연구팀은 <i>P. aeruginosa</i>을 추적하여 중립화 시킬 수 있는 메신저 입자를 찾을 수 있는 대장균을 만들었으면 그 반응으로 항미생물 입자를 전달한다.
	싱가포르 난양기술 대학	<ul style="list-style-type: none"> Mathew chang은 대장균에 추적 및 파괴의 장비를 첨가하여 폐렴과 다른 질병을 일으키는 외부침입 박테리아인 녹농균을 표적으로 만들었고 감염된 실험쥐를 대상으로 죽은 녹농균의 차체를 확인하였다. 또한 피오신이라 불리는 항박테리아 펩타이드를 조합할 수 있는 대장균을 개발하여 화학적 신호를 감지하자마자 자신을 폭발시키도록 만들어 병원체를 추적 파괴하도록 개발

3. 국내 기술개발현황

연구수행 기관		연구개발의 내용
과제 계획서 제출시 현황	서울 대학교	<ul style="list-style-type: none"> 최상호 교수팀은 <i>V. vulnificus</i>를 모델 연구대상으로 quorum sensing에 의한 미생물의 유전자 발현조절 유전자를 찾아 병원성 발현에 대한 관련성 연구를 수행하고 있으며, 세균의사소통연구단 황인규 교수연구팀은 벼알마름병의 원인균인 <i>Burholderia</i>를 모델균으로 신호전달 물질을 분해하는 효소에 의한 항균소재 개발 연구를 수행하고 있다.
	서강 대학교	<ul style="list-style-type: none"> 생명과학과는 미생물의 생존전략을 위해 유전자의 quorum sensing이 이루어진다는 가설로 모델을 만들고 <i>Pseudomonas</i>의 유전체를 대상으로 생존기능 유전자 규명 연구를 지속적으로 수행하며, 이규호 교수 연구팀은 <i>V. vulnificus</i>를 모델로 바이오필름 제어 연구를 한다.
	인 바이오넷	<ul style="list-style-type: none"> 국내 생물·의약분야의 미생물균주 개발 벤처기업 인바이오넷에서 의약품 생산 미생물 대사 제어를 quorum sensing으로 시도하여 생물·의약품 개발을 진행 중에 있으나 아직까지 관련 제품 개발은 없는 상태이다
	동서대	<ul style="list-style-type: none"> 김정선 교수팀은 해양천연물 (해조류)로부터 바이오필름 제어제 개발을 위한 quorum sensing 분석용 시스템을 구축하여 선도물질 찾아내었다.
	한국식품 연구원	<ul style="list-style-type: none"> 본 연구팀은 한국인이 곡류와 채소를 중심의 식생활 특성으로 <i>B. cereus</i>에 의한 식중독 위험에 더 많이 노출되어 있으므로 <i>B. cereus</i>를 선택적으로 제어할 수 있는 제어소재 개발을 위한 기초연구 수행중에 있다.
연구 개발 과정 에서 기술 현황	루미온	<ul style="list-style-type: none"> 자연에서 구한 소재를 조합한 100% 천연 항균제로 개발한 ‘시그마과워’ 출시, 항균력이 빨리 소멸되는 기존의 제품들의 문제를 차별화, 플라스틱에 적용하여 지속성이 좋은 친환경 천연항균제를 이용한 지퍼백 등을 개발 출시예정이다.
	경북 대학교	<ul style="list-style-type: none"> 수련 추출물을 유효성분으로 하는 정족수 인식 억제용 조성물 또는 항균용 조성물에 대한 특허를 출원하였으며 이 조성물은 생물막 형성을 차단할 수 있으며 기존의 항균제와 병용하였을 때 우수한 항균 상승 작용을 가지고 있어 사료첨가용 조성물로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 사료된다.
	울산 대학교와 세종 대학교	<ul style="list-style-type: none"> 정족수 감지 억제 활성 및 항균활성을 갖는 항균용 조성물과 관련된 특허를 공동출원 하였으며 이 물질은 항균용 약제 또는 건강식품 뿐 아니라 중심정맥관이나 인공관절 등에 코팅제로 사용이 가능함으로써 바이오필름 형성을 억제하며 세균을 직접적으로 억제하는 항균활성 물질 조성으로 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 국내 자생 생강과 식물의 표준 추출물 제조

1. 생강과 식물의 수집 및 조추출물 제조

생강과 식물중 *Zingiber mioga*(Thunb.) Roscoe (양하)는 제주 농가에 채취를 요청하여 구입하였고 *Zingiber officinale* Roscoe (생강)는 서산농협, *Curcuma domestica* (강황) 은 전북 장수에서 *Punica granatum* L (석류)과 *Citrus junos* SIEB ex TANAKA (유자)는 전남고흥군, *Prunus mume* Sieb. et Zucc.(매실)은 하동에서 구입하여 조추출물을 제조하였다 (12, 17, 24).

6종의 식물은 항균활성 특성이 있을 것으로 생각되는 열매 또는 뿌리부분을 건조하여 분말로 만든 후 건조중량 15g 당 700 ml 70% 에탄올로 실온에서 150 rpm 속도로 24시간 진탕하여 추출하고 여지로 여과하여 vacuum evaporator로 감압 건조하여 용매를 제거한 다음 추출물을 회수, 농축하여 조추출물을 준비하였다. 또한 양하와 강황에서는 휘발성 성분에 대한 활성연구를 위하여 각 식물의 건조분말 0.5g 당 30ml MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) 를 첨가하여 추출하였다 (Fig. 1).

본 과제에서는 신호전달 교란활성과 항균활성 측정을 위하여 양하의 주정추출물, 주정추출후 MTBE로 재추출한 추출물, MTBE 추출물 3종과 강황의 주정추출물과 MTBE 추출물 2종, 생강, 석류, 유자, 매실의 주정추출물 등 총 6종 식물의 9개 추출물을 제 1 세부과제에 제공하였다.

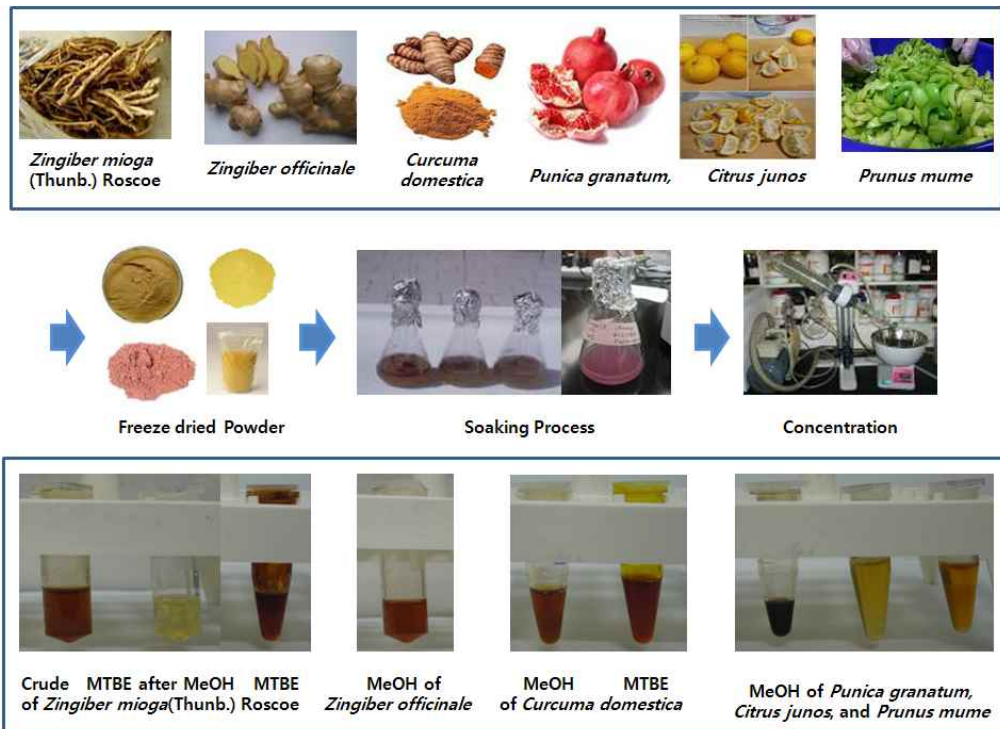


Fig. 1. Schematic diagram of the extraction process in this study

2. 표준추출물 제조법 결정

가. 표준추출법 확인

신호전달 교란활성과 항균활성 소재 개발은 대상 식물의 개발 용이성이 1차 판단기준으로 국내 자생 생강과 식물 중 특히, 양하 (*Zingiber mioga*(Thunb.) Roscoe)를 이용한 활성소재 개발은 국내농산자원의 가치 재발견을 통한 농업 신 성장 동기를 부여함과 동시에 국내농산자원을 이용한 항균신소재 개발이라는 두 조건을 만족시킬 수 있는 식물이다 (17, 24, 30).

양하는 제주도를 비롯한 남해안에 서식하는 생강과 식물로 새순과 초가을에 나는 꽃, 뿌리 등을 먹을 수 있으나 민간에서 진통, 건위 등에 약재로 사용되거나 방부의 목적으로 사용되고 있으나 그 기능에 관련된 연구결과는 거의 없다 (17). 따라서 본 연구에서는 생강과 식물의 특성상 뿌리에 다양한 기능성 성분들이 있을 가능성이 높은 양하 근경을 이미 항균활성이 알려진 생강 근경 추출물과 비교하여 HPLC 및 TLC profiles을 분석한 결과 양하 근경 추출물에 들어있는 성분과 생강 근경 추출물이 전혀 다름을 확인하였다 (Fig. 2). 또한 양하 추출물과 관련된 특허 분석 결과, 신호전달교란 활성과 관련된 특허가 없으므로 항균신소재 개발이 가능할 것으로 추측할 수 있다.

본 연구에서 항균신소재 개발을 위한 주요 연구대상으로 선정한 양하와 나머지 5종의 식물들은 Fig. 3의 “건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(식약청고시 제2007-51호)” 중 안전성 평가를 위한 의사결정도를 만족하였으며, 실험실 단위에서 조추출물 제조시 동물 사료 및 식품첨가물 적용 가능성을 고려하여 식품첨가물공전에서 정하고 있는 주정과 그 외 활성성분 분리를 위한 비극성 용매 MTBE를 이용하여 추출하였다.

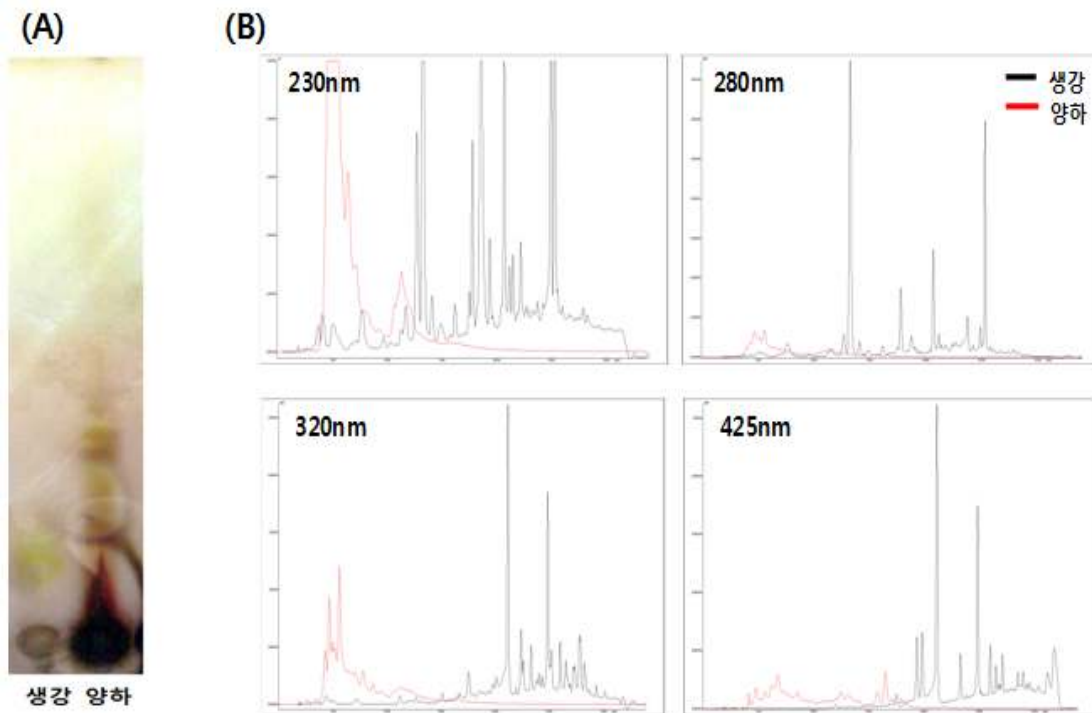


Fig. 2. 생강과 양하의 TLC (A) 와 HPLC (B) profiles 비교

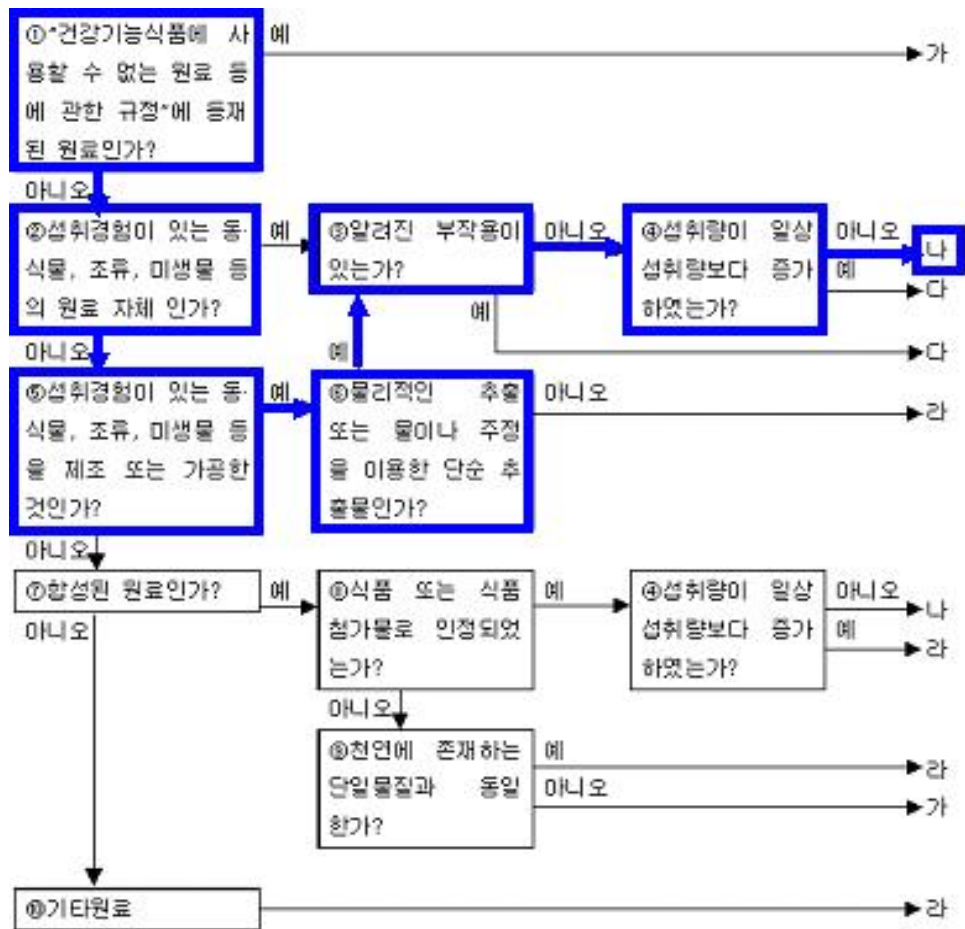


Fig. 3. 건강기능식품 기능성 원료 인정 규정 중 안전성 평가를 위한 의사결정도

주정과 물 비율별 용매 4종 (100% 주정, 70% 주정, 50% 주정, 물)을 이용하여 확립된 활성검증방법을 이용하여 활성테스트를 실시하여 가장 우수한 표준 조추출물 제조방법을 선정하였다. 6종의 식물에 대한 Violacein 억제활성 측정결과 *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe (양하), *Punica granatum* L (석류), *Prunus mume* Sieb. et Zucc.(매실), *Citrus junos* SIEB ex TANAKA (유자) 는 70% 주정추출물에서 가장 높은 활성(18-22mm 억제활성환 형성)을 보여 주었으며 *Zingiber officinale* Roscoe (생강)과 *Curcuma domestica* (강황)은 4가지 용매 모두에서 유사활성 (13-16mm) 을 보여주었다 (Fig. 4). 평균활성 측정결과는 강황, 생강, 유자등에서 4종 용매 모두에서 비슷한 활성을 보여 주었으나, 양하와 석류, 매실의 경우 주정의 비율이 높은 경우, 더 높은 활성이 있음을 확인하였다 (Table 1).

평균활성과 violacein 억제활성 결과를 종합한 결과, 본 연구에서는 70% 주정추출물을 표준추출법으로 확정하여 사용하기로 결정하였다.

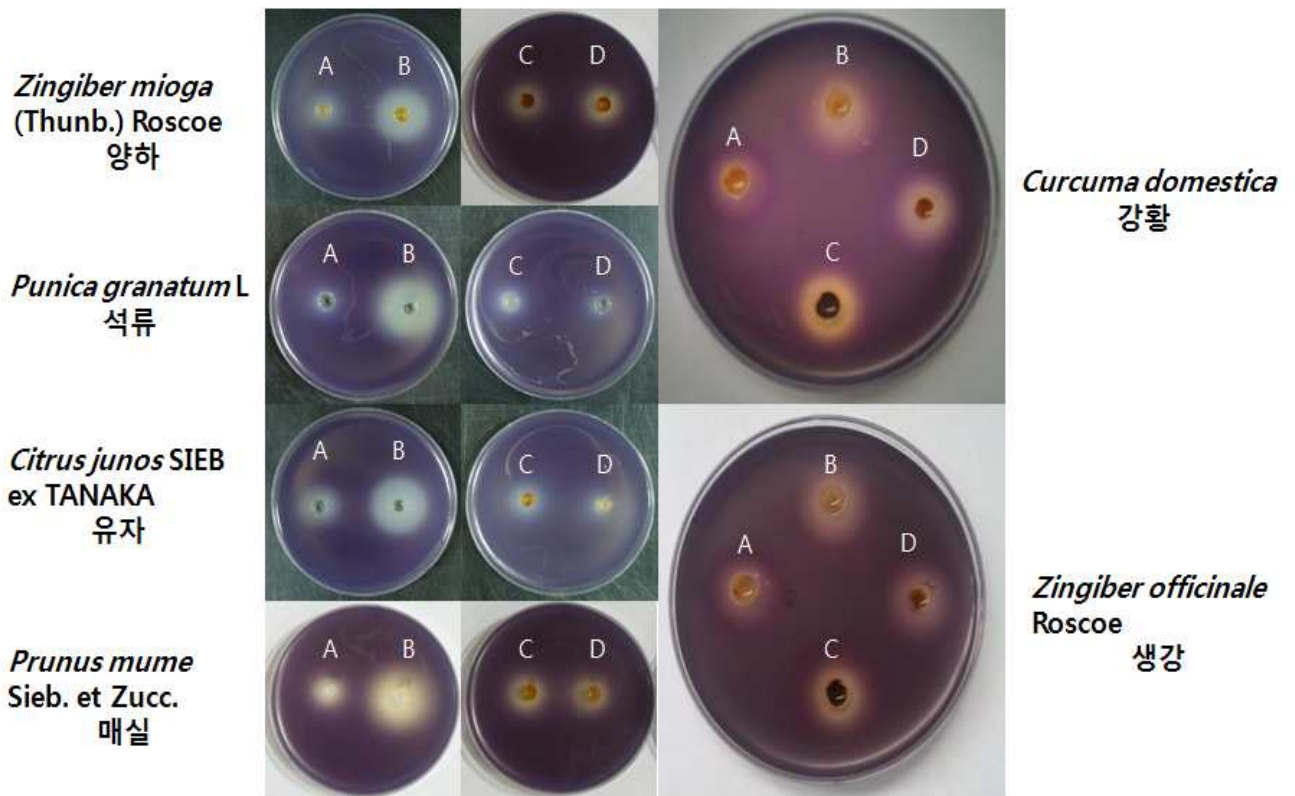


Fig. 4. Violacein inhibition activity of ethanol/water extracts from various plants. A. 100% ethanol, B. 70% ethanol, C. 50% ethanol, D. Water

Table 1. Antibacterial activities of ethanol/water extracts from various plants.

	Concentration (100mg/ml)	Diameter of inhibitory zone (mm)			
		100%ethanol	70%ethanol	50%ethanol	Water
<i>Zingiber mioga</i> (양하)	<i>L. monocytogenes</i>	18	17	14	11
	<i>S. aureus</i>	15	15	13	12
	<i>Salmonella</i> sp.	-	-	-	-
<i>Punica granatum</i> (석류)	<i>L. monocytogenes</i>	14	16	14	15
	<i>S. aureus</i>	13	16	13	14
	<i>Salmonella</i> sp.	17	20	16	15
<i>Citrus junos</i> (유자)	<i>L. monocytogenes</i>	12	13	12	-
	<i>S. aureus</i>	12	14	12	12
	<i>Salmonella</i> sp.	-	-	-	-
<i>Prunus mume</i> (매실)	<i>L. monocytogenes</i>	17	20	16	15
	<i>S. aureus</i>	16	20	14	12
	<i>Salmonella</i> sp.	16	18	14	12
<i>Curcuma domestica</i> (강황)	<i>L. monocytogenes</i>	14	11	11	10
	<i>S. aureus</i>	13	13	13	10
	<i>Salmonella</i> sp.	-	-	-	-
<i>Zingiber officinale</i> (생강)	<i>L. monocytogenes</i>	12	12	12	11
	<i>S. aureus</i>	12	12	12	11
	<i>Salmonella</i> sp.	11	10	-	-

나. 후보추출물에 대한 활성 성분 분획

항균활성과 violacein 억제활성을 근거로 표준추출법으로 확정된 70% 주정추출물은 활성 성분 분리를 위하여 진공가압농축기를 이용하여 농축시킨 후 liquid-liquid extraction 방법을 이용하여 분획하였다(Fig. 5). 농축액을 hexane과 혼합한 후 hexane 층을 분리한 후 남은 여

액은 다시 ether와 물로 추출한다. ether 층은 더 분리하기 위하여 methanol로 분획한다. 모든 분획과정은 2회 반복하였다. 양하 조추출물은 hexane, ether, methanol, 물 분획으로 나누어 항균활성 및 신호교란 실험에 활용되었으며 분획정도를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 각 분획물에 함유되어있는 물질들의 profile을 비교하였다 (Fig. 6).

Silica gel이 도포된 TLC plate위에 일정량의 분획물을 loading 하여 건조한 후 전개용매 toluene: ethyl acetate (93:7)가 들어있는 용기에 넣어 물질들을 전개시킨다. 충분히 분획물들을 전개시킨 후 development solution (10% methanolic sulfuric acid) 용액에 침지 후 110°C dry oven에서 구워낸다. 양하 추출 분획물들을 비교한 결과 분획할 때 사용된 solvent의 polarity에 따라 그 안에 포함되어 있는 물질들도 유사한 polarity를 보이는 것으로 사료되나 현재 분획물에는 많은 물질들이 혼재되어 있으며 다른 분획물에도 유사한 성분들이 많은 부분은 아니지만 서로 섞여 있는 것으로 확인되었다. 강황 분획물 (MTBE와 70% ethanol)인 경우 양하 분획물과는 달리 두 분획물의 TLC profiles이 뚜렷한 차이를 보여주고 있으며 두 분획물이 서로 확연히 다른 물질들이 혼합되어 있는 것으로 사료된다. MTBE 분획물은 강한 소수성 물질과 약한 소수성 물질들이 혼재되어 들어있으나 70% methanol 분획물에는 약한 소수성, 친수성 물질들이 다수 들어있는 것으로 확인되었다 (Fig. 6).

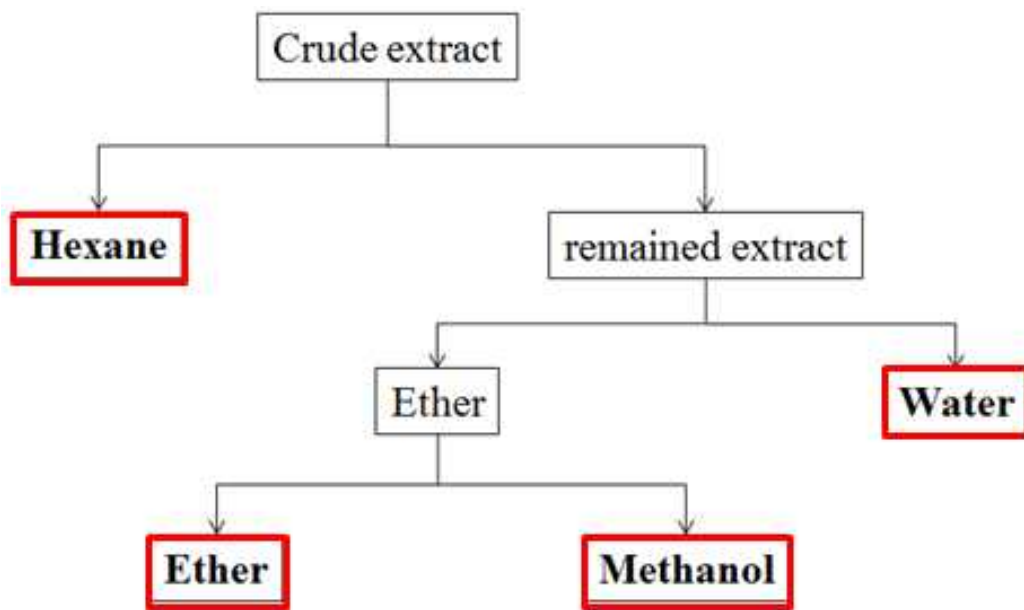


Fig. 5. 70% 주정추출물의 활성 성분 분획 모식도

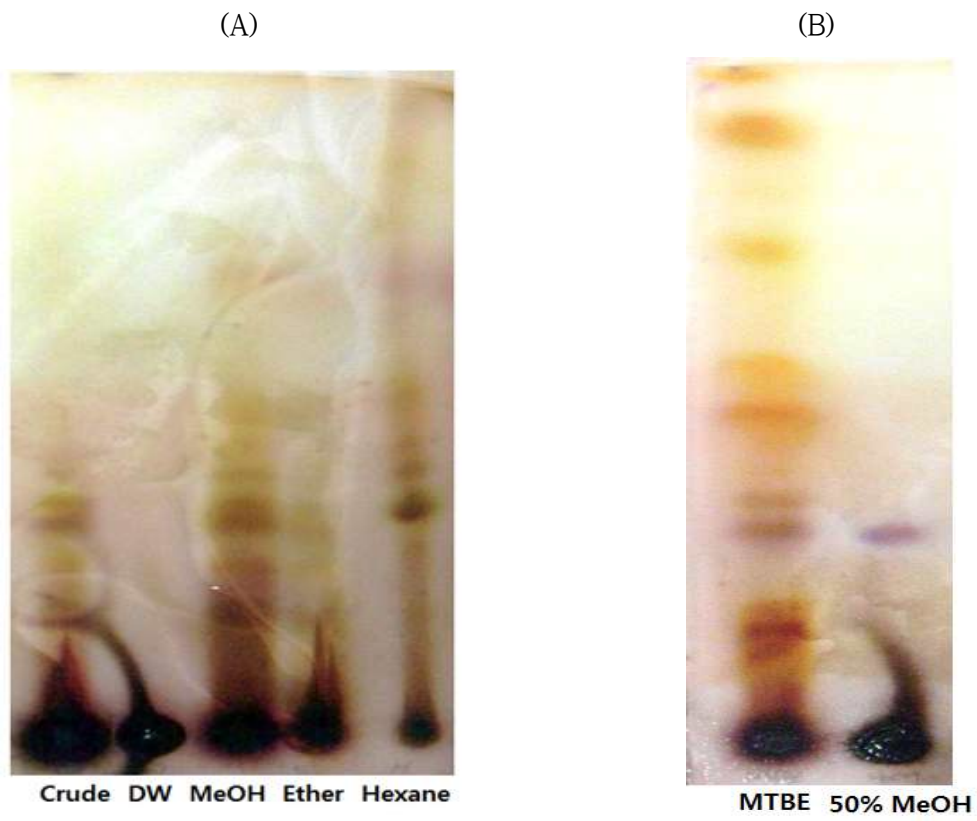


Fig. 6. 양하 추출 분획물(A) 및 생강 추출물 (B)의 TLC profiles

제 2 절 신호전달 교란 및 항균활성 후보물질 선발

1. 신호전달 교란물질 활성 측정방법 구축

가. Violacein inhibition assay 방법 구축

두 개의 reference 균주 *C. violaceum* CV 026 과 *C. violaceum* 을 이용한 측정방법으로 항균독소인 보라색의 violacin 색소의 생성유무를 biosensor로 사용하였다. *Chromobacterium violaceum* CV026은 *C. violaceum* wild-type strain을 mini-Tn5 transposon으로 mutagenesis를 통하여 얻은 것으로 퀴럼센싱 기작에 의한 항균독소를 생성함으로 신호전달 교란물질 뿐 아니라 항균활성 물질 스크리닝에 활용하고 있다 (14, 24).

이 균을 이용한 bioassay 방법은 Luria-Bertani agar (LBA) plate에 borer를 사용하여 표면에 well을 만들고 이 well에 표준물질 또는 추출물을 각각 가하고 표준균주를 0.85% LBA soft agar와 혼합하여 부어서 굳혀서 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, agar well 주위의 보라색 색소 생성 억제환을 mm로 측정하여 violacein 억제능을 계산하였다. 돌연변이주 *C. violaceum* CV 026 은 신호전달물질 N-hexanoyl-L-homoserine lactone을 표준물질 또는 추출물과 함께 첨가하여 보라색 색소 억제능을 측정하였다. 본 과제에서는 음성대조군으로 DMSO, 양성대조군으로 resveratrol을 사용하여 농도별 활성억제효과를 측정하여 향후 신호전달 교란물질 활성에 대한 대조군으로 활용할 수 있도록 최적화하였다 (Fig. 7)

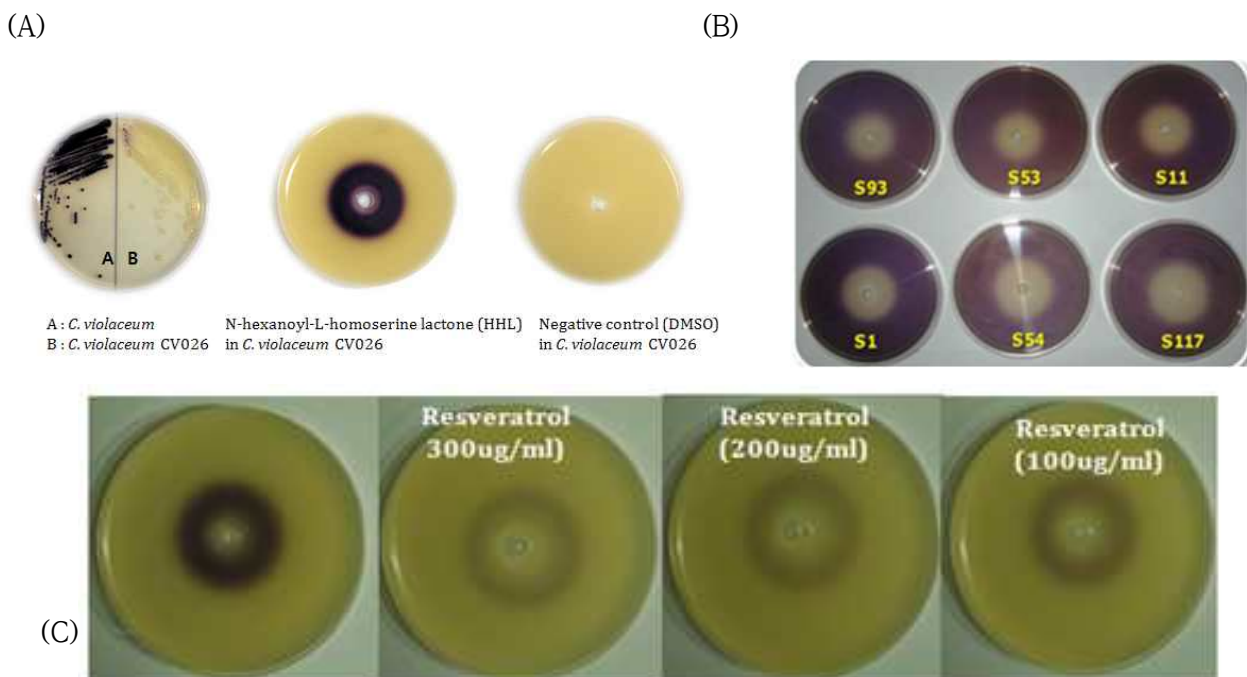


Fig. 7. Violacein inhibition assay. (A) Typical colony of *C. violaceum* and *C. violaceum* CV026 on LB agar plate. (B) Violacein inhibition assay in *C. violaceum*. (C) Effect of Resveratrol in *C. violaceum* CV026 including L-homoserine lactone.

신호전달 교란물질을 선별하기 위한 방법으로는 1차로 *C. violaceum*에서 보라색 색소 생성을 억제하는 추출물을 선별하였고, 1차 선별된 추출물을 대상으로 2차 돌연변이주 *C. violaceum* CV 026에서 신호전달 교란물질을 선별하는 방법으로 결정하였다 (Fig. 8).

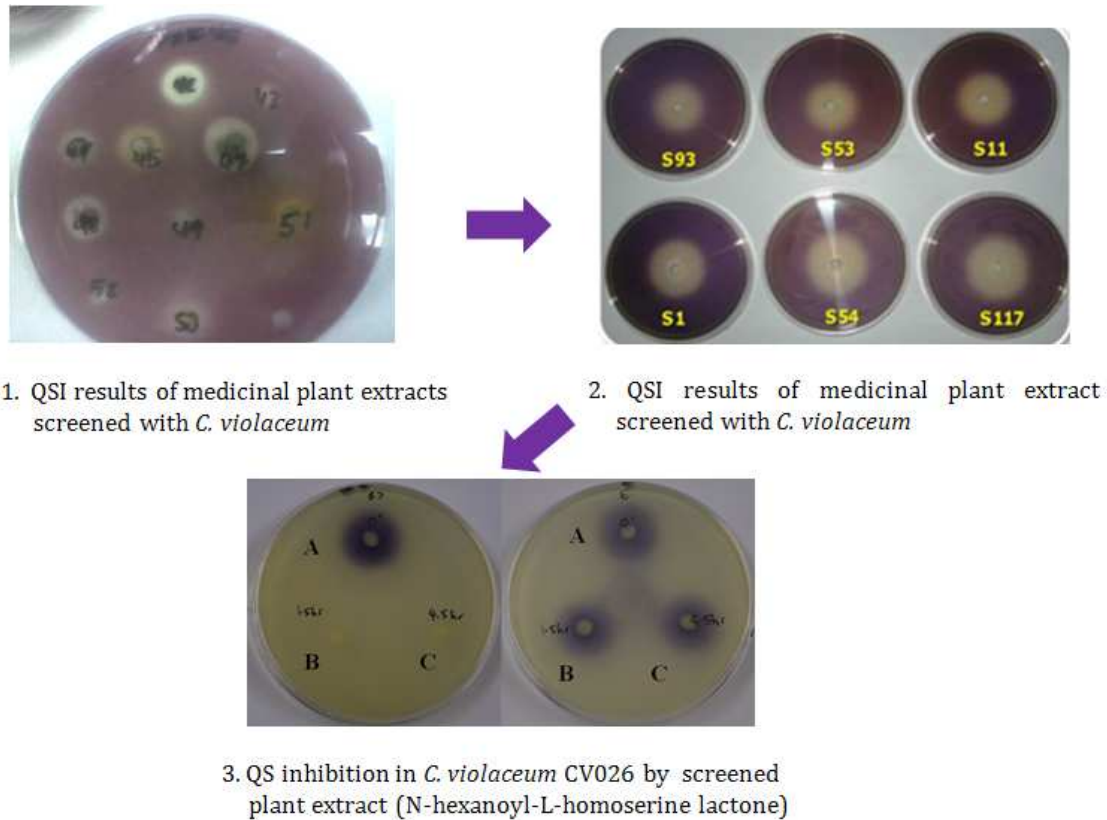


Fig. 8. Schematic strategy to screen materials targeting quorum sensing mediated virulence from *Zingiberaceae* plant extract.

나. Agar well diffusion 법에 의한 항균활성 측정법 구축

일반적으로 항균활성을 측정하는 방법으로 agar well diffusion 법과 Disc diffusion 법이 있다. 그 기본원리는 항균활성을 지니는 물질이 agar 속으로 확산되어 그로인한 항균활성을 억제환의 크기로 결정하는 방법이지만 disc 확산법을 이용하였을 경우는 disc에 투여한 대상 물질이 쉽게 휘발되거나 disc내로 응축되어 agar내로 확산되기 어려워 대상물질의 항균력을 정확하게 측정하기 어려운 단점이 있어 agar well diffusion법을 이용하여 항균활성을 측정하였다 (7, 18). 방법은 Mueller-Hinton agar plate에 borer를 사용하여 표면에 well을 만들고 이 well에 표준물질 또는 추출물을 각각 가하고 표준균주를 0.85% MHA soft agar와 혼합하여 부어서 굳혀서 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, agar well 주위로 미생물의 생장이 저해되는 clear zone 크기를 측정하여 항균력의 크기를 계산하였다. 음성대조군으로 각 시료의 희석에 사용한 DMSO, 양성대조군으로 항생제인 kanamycin을 사용하였으며 *Streptococcus mutans*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 그람양성균 4종과 *E. coli* O157:H7,

Salmonella sp., *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* 등의 그람음성균 4종이 항균활성 검증을 위한 표준균주로 사용하여 조건을 최적화 하였다 (Fig. 9).

당초 8종의 미생물에 대하여 항균활성법을 구축하였으나 1단계의 조추출물 스크리닝 단계에서는 주요 식중독균인 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 그람양성균 3종과 *E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp. 등 그람음성균 2종을 대상균주로 사용하였다.

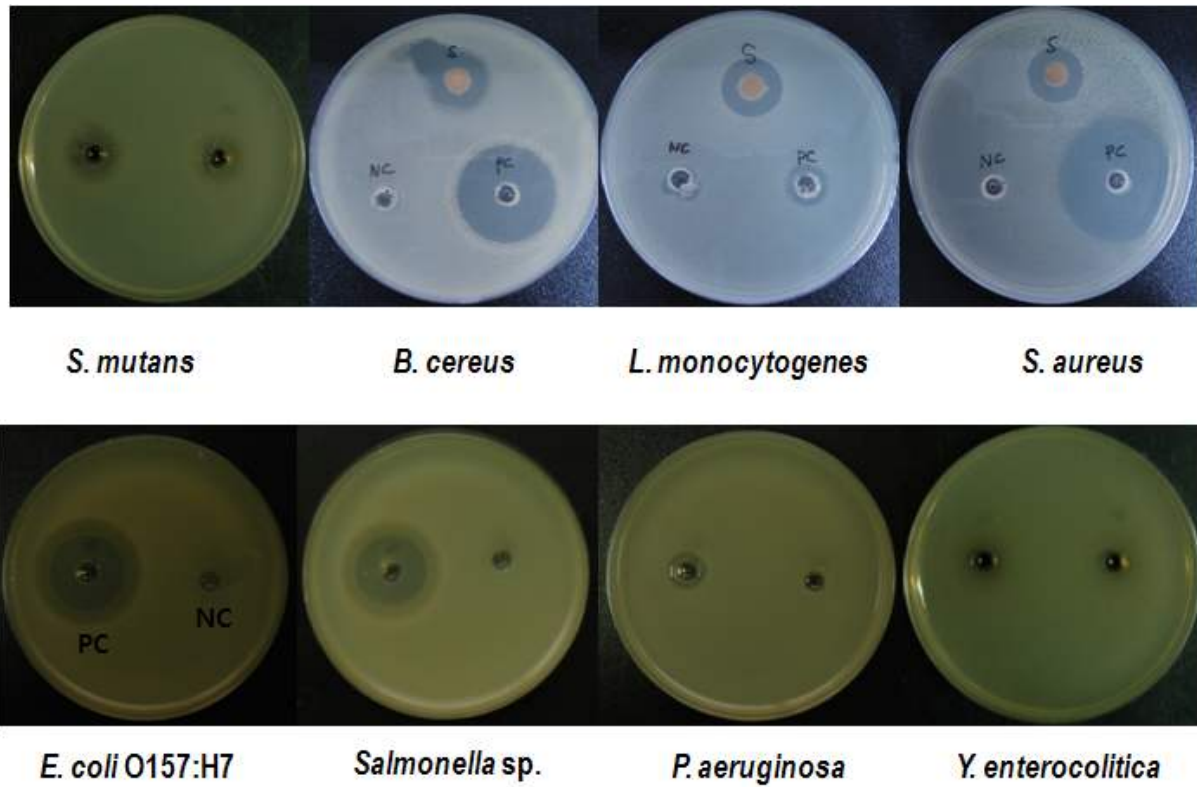


Fig. 9. Antimicrobial activity by Agar well diffusion assay.

2. 항균활성이 보고된 생장과 유효성분 활성측정

이미 항균활성이 있는 것으로 알려진 생장과 식물의 성분 중 항균 유효성분으로 예상되는 화합물 및 향기성분에 대한 violacein 억제활성과 항균활성을 측정하였다. 실제로 galanal, galanolactone 등의 성분은 항균활성이 알려져 있지만 시약으로 판매되고 있지 않아 활성을 측정할 수 없었으며, α -Terpineol, 1,8-Cineole, (-)- α -Pinene, Phytol, Bornyl acetate, 4-Allyl-1,2-dimethoxy benzene, β -Pinene, Borneol, (\pm)-Naringenin, (s)-cis-Verbenol, γ -Terpinene, (-)-trans-caryophyllene, α -Terpinene 등 13종에 대하여 활성측정 실험을 수행하였다 (12, 22).

Violacein 억제활성은 *C. violaceum* CV 026 을 reference 균주로 HHL (10uM) 30ul와 유효성분 (10 mg/ml) 70 ul를 동시에 첨가하여 측정하였는데 그 결과 α -Terpineol, (\pm)-Naringenin과 (-)-trans-caryophyllene에서 활성 가능성을 확인하였고, α -Terpineol과

(-)-trans- caryophyllene 에 대한 *C. violaceum* 에서 농도별 확인 실험결과 violacein 억제활성이 약하게 있으므로 본 과제에서 목표로 하는 *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe 추출물 중 2차년도 유효성분 분리를 위한 우선 대상임을 확인할 수 있었다 (Fig. 10). 또한 항균활성은 이미 활성이 있는 것으로 알려진 유효성분이므로 충분한 농도 (100 ug/well)로 각 성분을 로딩하여 측정한 결과, 그람양성균에 대해서는 대부분 활성을 나타내었으나 그람음성균에 대한 활성은 비교적 낮은 것으로 나타났으며, 4-Allyl-1,2-dimethoxy benzene, phytol 과 Borneol 은 그람음성균에 대한 활성이 없었다 (Table 2).

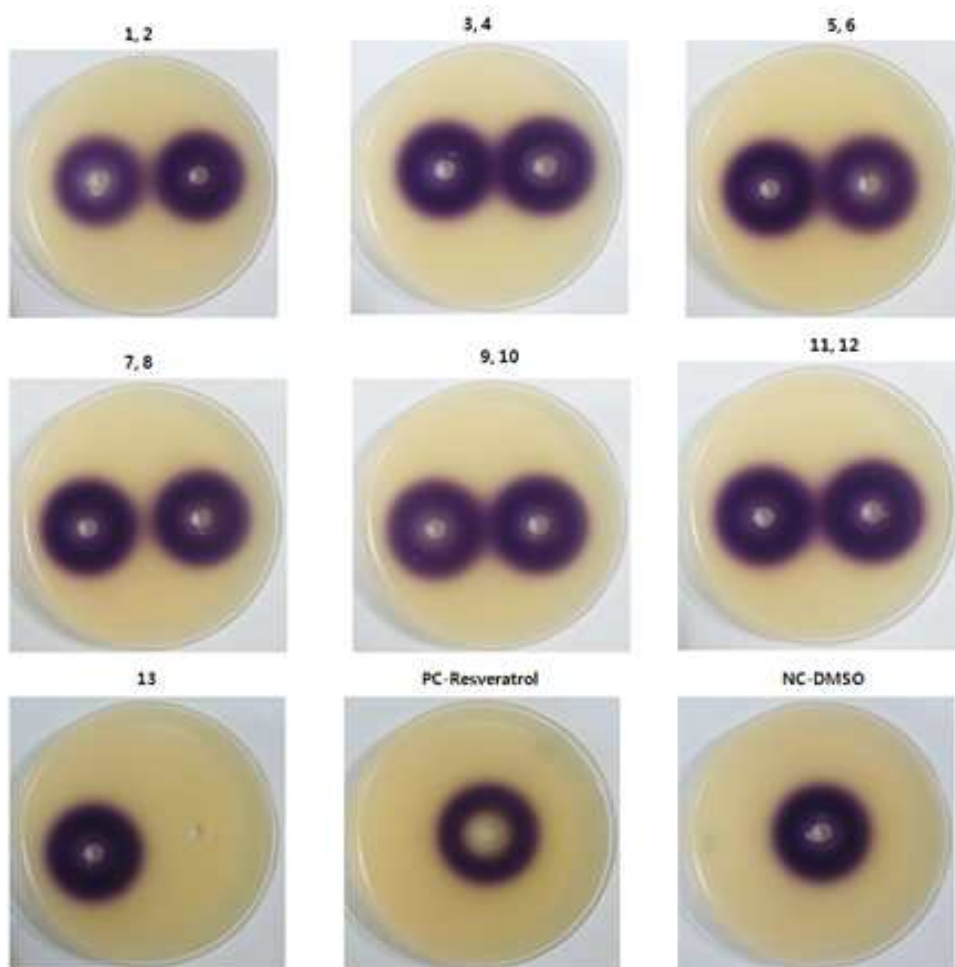


Fig. 10. Violacein inhibition assay in *C. violaceum* CV 026 by various compounds from *Zingiberales*. 1. α -Terpineol, 2. 1,8-Cineole, 3. (-)- α -Pinene, 4. Phytol, 5. Bornyl acetate, 6. 4-Allyl-1,2-dimethoxy benzene, 7. β -Pinene, 8. Borneol, 9. (\pm)-Naringenin, 10. (s)-cis-Verbenol, 11. γ -Terpinene, 12. (-)-trans-caryophyllene, 13. α -Terpinene PC: Resveratrol, NC: DMSO

Table 2. Antibacterial activities of compounds isolated from *Zingiberales*.

Compounds (100ug/well)	Diameter of inhibitory zone (mm)				
	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
α -Terpineol	20	22	20	9	9
1,8-Cineole,	16	20	21	-	10
(-)- α -Pinene	18	20	18	10	11
Phytol	18	20	18	-	-
Bornyl acetate	13	12	12	9	12
1,2-dimethoxy benzene	14	18	16	-	-
β -Pinene	17	18	18	10	9
Borneol	12	14	12	-	-
(\pm)-Naringenin	14	13	13	12	11
(s)-cis-Verbenol	10	12	12	-	12
γ -Terpinene	18	16	14	10	-
caryophyllene	10	16	15	12	12
α -Terpinene	16	16	16	10	9

3. 신호전달 교란물질 활성측정 및 활성추출물 선발

가. Violacein inhibition 활성 추출물 선발

Violacein 억제활성을 이용한 신호전달 교란물질을 선발을 위하여 앞서서 제조된 국내 자생 식물의 조추출물을 이용하여 bioassay 균주인 *C. violaceum*에서 추출물이 로딩되어 있는 agar well 주위의 보라색 색소 생성 억제환을 mm로 측정하여 violacein 억제능을 계산하였다. 당초에는 *C. violaceum* CV 026를 이용하여 violacein 합성 억제율(%)로 활성추출물을 선발할 예정이었으나 신호전달물질 N-hexanoyl-L-homoserine lactone을 첨가로 비용과 시간이 소모되므로 유효성분이 분리된 단계에서 정량을 위한 방법으로 사용하며, 1, 2차 스크리닝 단계에서는 *C. violaceum*를 사용하였다 (2, 12, 14, 24).

국내 자생하는 생강과 식물 중 *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe (양하), *Zingiber officinale* Roscoe (생강), *Curcuma domestica* (강황) 과 참여기업이 요청한 *Punica granatum* L (석류), *Prunus mume* Sieb. et Zucc.(매실), 본 연구팀이 관심을 가지고 있는 *Citrus junos* SIEB ex TANAKA (유자) 등 6개의 식물에 대한 조추출물을 가지고 신호전달 교란물질 활성 측정을 진행하였다. 그 결과 석류, 양하, 유자, 매실의 메탄올 추출물에서 15-25mm 이상의

violacein 억제환을 나타내었으며, 강황의 메탄올과 MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) 추출물, 생강의 메탄올 추출물에서도 violacein 억제활성 (13mm)을 보여주었다 (Fig. 11).

6종 국내 자생식물의 9개의 조추출물에 대한 신호전달 교란물질 활성측정결과 가장 좋은 활성을 나타내었던 *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe (양하)의 70% 에탄올 추출물을 물, 메탄올, 에테르, 헥산 등의 용매로 다시 추출한 분획에 대한 활성을 측정한 결과, violacein inhibition activity 가 물 분획물에서 양성대조군인 resveratrol과 유사하게 나타났다 (Fig. 12). 또한 정확한 violacein 억제 활성농도를 측정하기 위하여 농도별 색소억제환을 측정한 결과 물 분획물의 violacein 합성 최소 억제농도가 10 mg/ml로서 양성대조군과 동일한 높은 활성을 보여주었다 (Table 3). 더 정확한 활성 측정을 위해서 10 mg/ml 과 5 mg/ml 사이에서 활성이 추가로 수행될 예정이며, 추가적으로 *C. violaceum* CV 026을 reference 균주를 이용한 violacein inhibition assay가 수행되어야 한다.

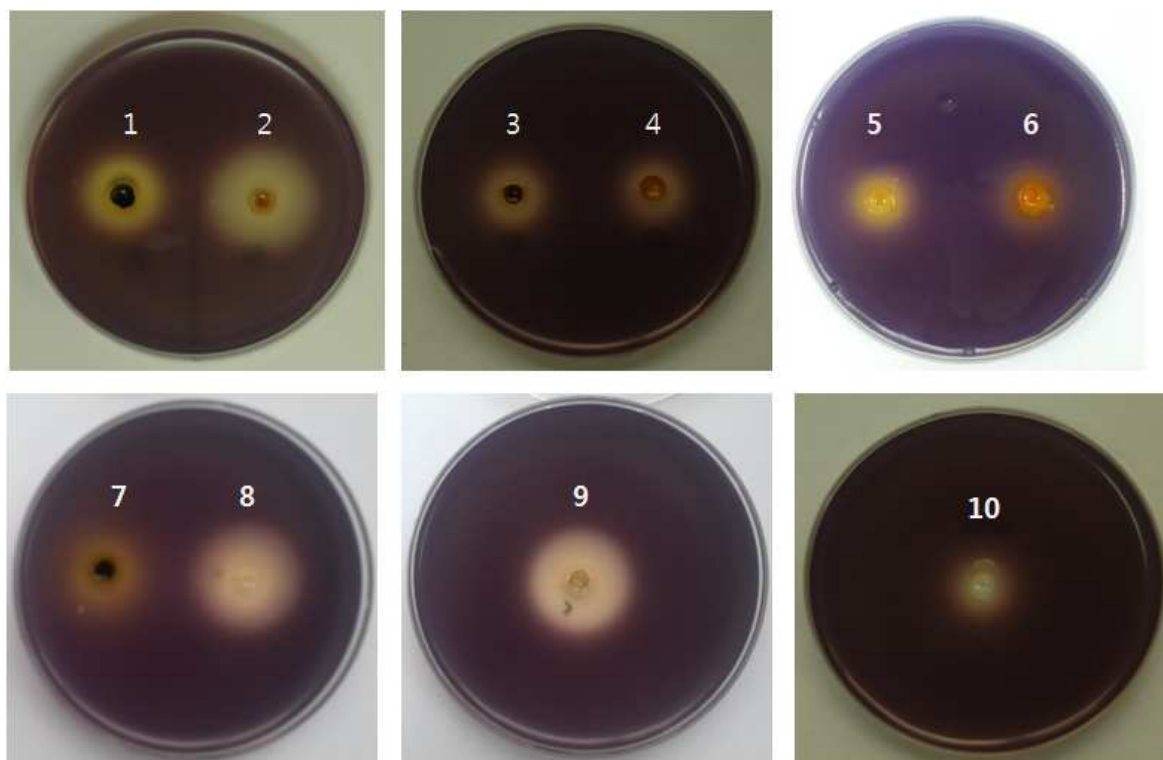
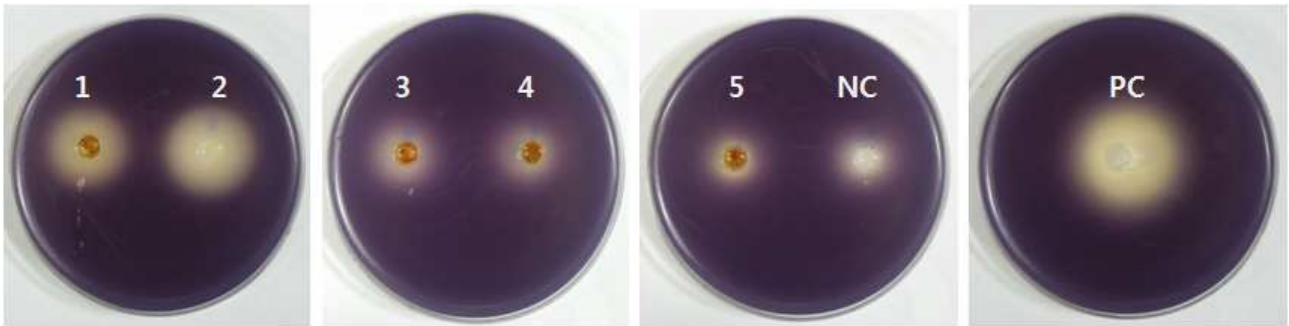


Fig. 11. Violacein inhibition assay in *C. violaceum* by various crude extracts. 1. *Punica granatum* L., 2-4. *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe, 5-6. *Curcuma domestica* 7. *Zingiber officinale* Roscoe, 8. *Citrus junos* SIEB ex TANAKA, 9. *Prunus mume* Sieb. et Zucc., 10. DMSO. 1, 2 and 5-9: MeOH extracts, 3: MTBE extracts after extracts by MeOH, 4 and 6: MTBE extracts



Solvent	Crude (1)	DW (2)	MeOH (3)	Ether (4)	Hexane (5)	NC	PC
Zone of Violacein Inhibition (mm)	25	28	16	15	12	12	28

Fig. 12. Violacein inhibition assay in *C. violaceum* by extracts of *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe. 1. Crude extract, 2. Water fraction, 3. Methanol fraction, 4. Ether fraction, 5. Hexane fraction, NC: negative control (DMSO), PC: positive control (resveratrol)

Table 3. Violacein inhibition activity against *C. violaceum*.

Concentration (mg/ml)	Diameter of inhibitory zone (mm)					
	Crude	Water	Methanol	Ether	NC	PC
100	25	27	12	12	10	27
20	17	19	11	-	-	20
10	14	17	-	-	-	17
5	-	-	-	-	-	-

나. 항균 활성 추출물 선발

Violacein 억제활성에 사용된 6종 국내 자생식물의 동일한 9개의 조추출물에 대한 항균 활성을 측정하였다. 그 결과 대부분의 추출물들이 그람음성균보다 그람양성균에서 활성을 보여주었으며, 가장 높은 violacein 억제활성을 나타내었던 *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe (양하)은 메탄올 추출, MTBE 추출, 메탄올 추출후 MTBE로 추출한 3개의 조추출물 모두에서 항균활성이 유사하게 나타났으며, 역시 violacein 억제활성이 좋았던 *Punica granatum* L (석류) 추출물은 5개의 그람양성과 그람음성 균주 모두에서 높은 활성을 나타내어 violacein 억제활성이 높은 추출물이 항균활성 또한 높음을 확인할 수 있었다. 또한 *Prunus mume* Sieb. et Zucc. (매실) 메탄올 추출물도 그람양성과 음성균 모두에서 높은 활성을 나타내었다 (Table 4).

정확한 항균활성 추출물 선발을 위하여 가장 좋은 항균활성을 나타내었던 *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe (양하) 와 *Punica granatum* L. (석류)의 추출물 4종에 대한 최소성장 억제농도 (MIC)를 측정하였다. 양하의 메탄올과 MTBE 추출물 모두 그람양성균에서 0.4 mg/ml의 최소성장억제농도를 나타내었고 석류의 메탄올 추출물은 특히, 그람음성균에서 8 mg/ml의 최소성장억제농도를 보여주었다 (Table 5).

Table 4. Antibacterial activities of crude extracts from various plants.

Compounds (100mg/well)	Diameter of inhibitory zone (mm)				
	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
<i>Punica granatum</i> (MeOH)	18	16	15	16	19
<i>Zingiber mioga</i> (MeOH)	20	17	9	-	-
<i>Zingiber mioga</i> (MTBE after MeOH)	20	13	13	-	-
<i>Zingiber mioga</i> (MTBE)	22	19	18	-	-
<i>Curcuma domestica</i> (MeOH)	12	-	-	-	-
<i>Curcuma domestica</i> (MTBE)	13	-	12	-	-
<i>Zingiber officinale</i> (MeOH)	12	-	-	-	-
<i>Citrus junos</i> (MeOH)	14	12	13	-	-
<i>Prunus mume</i> (MeOH)	20	20	23	-	11

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) in extracts from *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe and *Punica granatum* L.

Food-borne pathogens	Minimum inhibitory concentration (mg/ml)			
	<i>P. granatum</i> (MeOH)	<i>Z. mioga</i> (MeOH)	<i>Z. mioga</i> (MTBE after MeOH)	<i>Z. mioga</i> (MTBE)
<i>B. cereus</i>	3	0.4	0.8	0.4
<i>L. monocytogenes</i>	30	0.4	12	0.4
<i>S. aureus</i>	15	0.4	12	0.4
<i>E. coli</i>	8	-	-	-
<i>Salmonella</i> sp.	8	-	-	-

Violacein 억제활성 추출물 선발에서 마찬가지로 *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe (양하)의 70% 에탄올 추출물에 대한 4종의 용매추출물에 대한 활성측정 결과, violacein 억제활성은 물 분획에서 가장 높았지만 항균활성은 메탄올과 에테르 추출물 각각에서 *B. cereus*는 0.4와 0.8 mg/ml 이상에서 *L. monocytogenes*와 *S. aureus*는 0.8과 2 mg/ml 농도 이상에서 활성을 나타내어 최소성장 억제농도는 유사했지만 메탄올 분획에서 활성이 더 높은 것을 확인할 수 있었다 (Table 6).

Table 6. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the solvent fractions from the 70% ethanol extracts of *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe.

Concentration (mg/ml)	Minimum inhibitory concentration (mg/ml)			
	Crude	Water	Methanol	Ether
<i>B. cereus</i>	0.8	2	0.4	0.8
<i>L. monocytogenes</i>	2	100	0.8	2
<i>S. aureus</i>	2	20	0.8	2

제 3 절 추출물의 생리활성평가 기반 유효성분 분리 및 동정

1. 선별된 후보추출물에 대한 활성성분 분획

가. 바이오필름 억제활성 기반 분획

앞선 실험에서 신호전달 (quorum sensing) 교란이 확인되어 선별된 양하, 석류, 유자의 신호전달 교란물질 활성성분 존재여부를 확인하여 활성분획을 수행하기 위하여 시료들을 simultaneous distillation extraction (SDE) 방법으로 추출한 후 휘발물질과 비휘발물질로 나누어 *Y. enterocolitica*와 *P. aeruginosa*를 이용하여 6개의 분획에 대한 anti-biofilm 형성을 관찰한 결과 모든 시료에서 효과가 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 13 and 14). 휘발물질은 GC/MS로 분리 정제가 진행되었으며 비휘발물질은 solvent-solvent extraction을 통해 ether, ethyl acetate (EA), dichloromethane (MC), butanol (B), 물 분획(DW)으로 다시 추출하였고 이들을 포함한 각 성분들은 대량으로 추출하여 활성성분 탐색과 생리활성평가를 위하여 사용되었다 (Fig. 13 and 14). 특히 이들 중 가장 효과가 있는 것으로 관찰된 양하로부터 관련물질이 분리 정제되었는데 휘발물질(양하 II)은 GC/MS로 분리 정제하였으며 비휘발물질은 solvent-solvent extraction을 통해 분획 추출하여 활성을 평가하였고 이 중 효과가 좋은 butanol 분획 (양하 I; Fig. 15)을 순상 solid phase extractoin (SPE)를 이용하여 더 분획하여 acetic acid 분획을 얻었다. Acetic acid 분획은 NMR을 이용하여 구조 분석하였다.

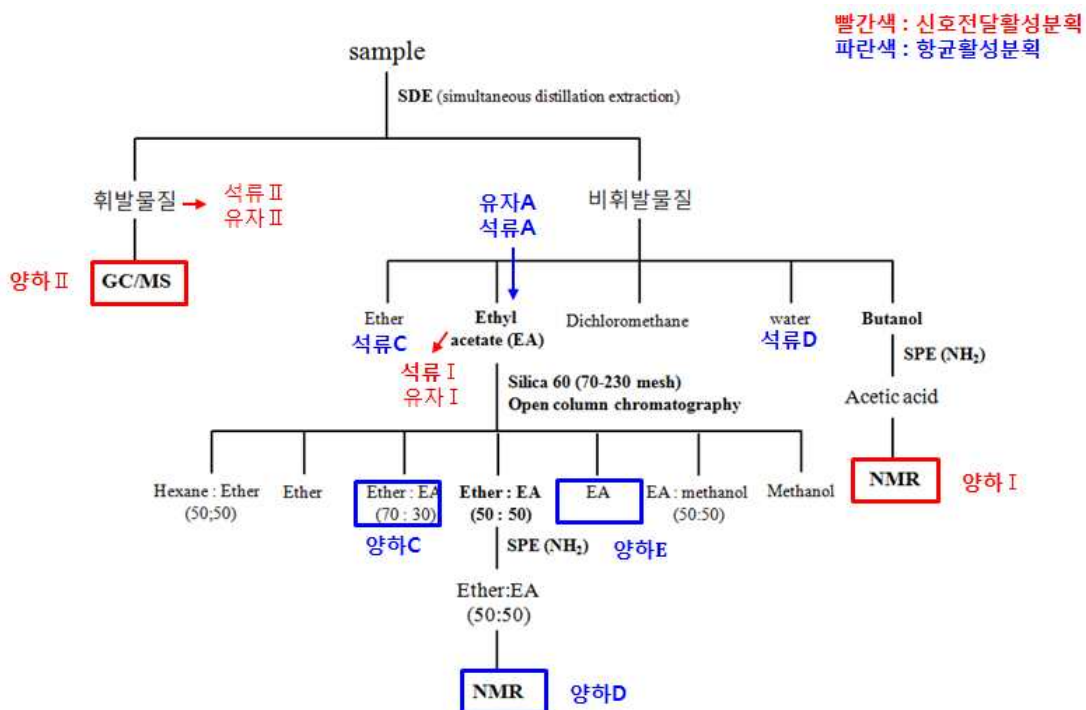


Fig. 13. Schematic diagram of the extraction, isolation, and purification of bioactive compounds having anti-biofilm formation or antimicrobial activity from *Zingiber mioga*, *Punica granatum* L and *Citrus junos*.

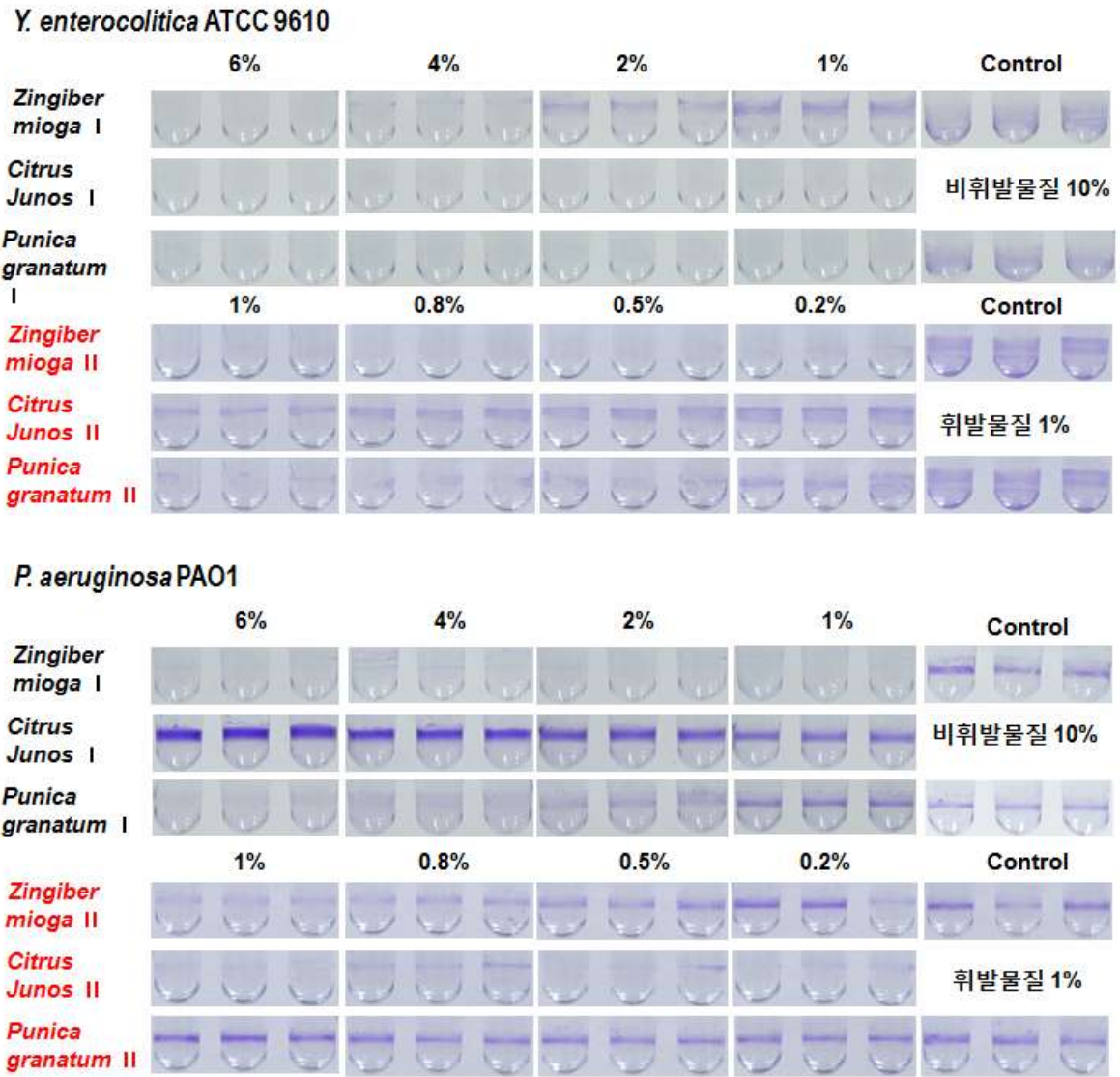


Fig. 14. Effect of the solvent fractions on biofilm formation of *Y. enterocolitica* and *P. aeruginosa*.



Fig. 15. Effect of the solvent-solvent fractions on biofilm formation of *Y. enterocolitica*.

나. 항균활성 기반 분획

양하, 석류, 유자의 항균물질의 존재여부를 확인하기 위해 시료들은 SDE 방법으로 추출한 후 휘발성 분획과 비휘발성 분획으로 나누어 그람음성균 (*E. coli*, *S. enteritidis*)과 그람양성균 (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*)를 이용하여 생육저지환 (clean zone) 형성을 관찰하며 분획이 진행되었다 (Fig. 13). SDE의 휘발성과 비휘발성 분획에 대한 모든 시료 15개가 항균활성측정을 위해 제공되었으며 휘발성 분획에서는 활성이 나타나지 않았으며 비휘발성 분획에서는 양하의 경우 모든 분획에서 활성이 있었으나 특히 ethyl acetate 층에서 모든 균에 대하여 항균활성이 뛰어났으며 유자는 ethyl acetate 층, 석류는 ether, ethyl acetate, 물 층에서 그람양성균에 대한 항균효과를 확인하였다 (Table 7).

이 중 효과가 좋은 ethyl acetate 분획을 silica 60 (70-230 mesh)로 충전한 open column chromatography를 이용하여 다시 7개 성분으로 분획하였으며 항균활성 측정결과 ether : ethyl acetate (50:50) 분획이 가장 활성이 높았다 (Table 8).

Table 7. Antibacterial activities of the solvent-solvent fractions from *Zingiber mioga*, *Citrus junos* and *Punica granatum* L.

Sample	Diameter of inhibitory zone (mm)					
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> sp.	
석류	EA	19	21	21	NT	NT
	MC	-	-	-	NT	NT
	Ether	16.5	22	22	NT	NT
	DW	17	13.5	12	-	-
유자	EA	11	8	8	-	-
	MC	-	-	-	NT	NT
	Ether	10	-	-	-	-
	DW	11	-	-	-	-
양하	EA	16	18	16	11	17.5
	MC	13.5	9.5	9	NT	NT
	Ether	18	19.5	14	NT	NT
	DW	-	-	-	-	-
	기타	8.5	-	8	-	-
PC(Km)	26	28	11.5	26	25	
NC	-	-	-	-	-	

Table 8. Antibacterial activity of fractions purified of *Zingiber mioga* by silica gel column.

Sample	Diameter of inhibitory zone (mm)				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> sp.
Hexane:ether=50:50	15	14	13	-	-
Ether 100	18	17	18	-	-
Ether:Etyl acetate=70:30 (양하 C)	23	30	23	17	20
Ether:Etyl acetate=50:50 (양하 D)	29	35	30	21	30
Ethyl acetate 100 (양하 E)	18	29	18	15	17
Ethyl acetate: Methanol=50:50	14.5	10	13	-	-
Methanol 100	12	NT	NT	-	-
PC	29	33		28	27
NC	-	-	-	-	-

2. 활성성분 동정 및 구조분석

가. 신호전달 교란 활성성분 동정 및 구조분석

GC/MS를 이용하여 신호전달 교란 활성이 가장 높게 나타났던 양하 II 를 분석한 결과 Fig. 16 에서 보는바와 같이 terpinen-4-ol, cryptone, borneol acetate, β -elemene, geranyl-p-cymene, geranyl- α -terpinene을 동정하였다. 이들 중 geranyl- α -terpinene이 양하 II 활성성분의 주요 물질로 확인되었다 (12, 22). 특히 최근의 연구논문들에 의하면 terpinen-4-ol 뿐만 아니라 α -terpinene를 비롯한 많은 terpenes이 biofilm 형성을 저해하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 양하 II 의 신호전달 교란활성 물질은 terpinen-4-ol을 비롯한 다양한 terpenes가 복합적으로 작용했을 가능성이 매우 높다.

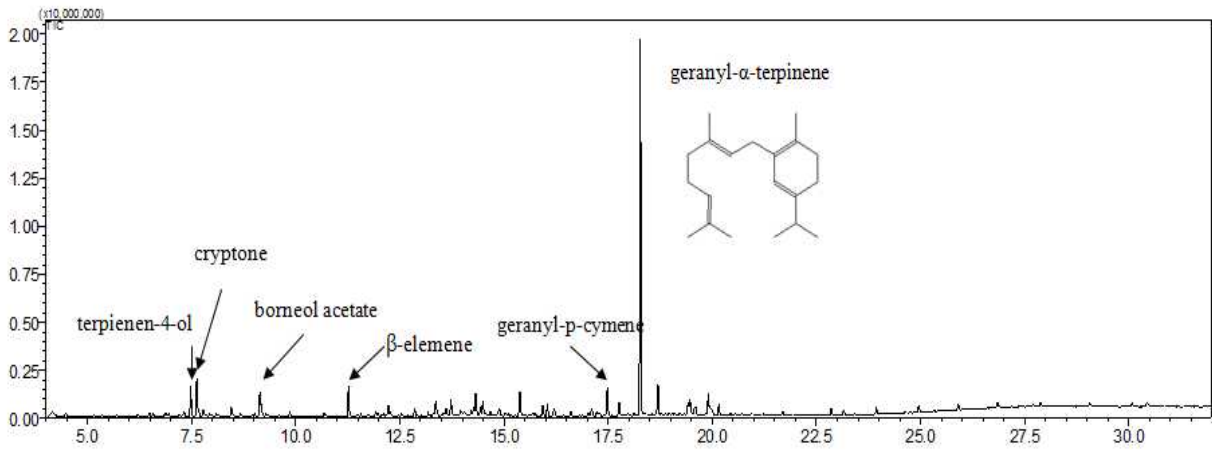


Fig. 16. GC/MS chromatogram of SDE extract (II) from the root of *Zinger mioga*.

나. 항균활성 성분 동정 및 구조분석

양하의 가장 항균활성이 높았던 성분 ether : ethyl acetate (50:50) 분획 (양하 D) 은 다량 확보하여 구조분석을 시도 하였다. NMR 분석을 위해 분획물을 건조 시킨 후 dimethyl sulfoxide-d₆ 또는 methanol-d₄로 녹여내어 NMR 300 MHz로 분석하였다 (Fig. 17; 12, 22). 그러나 분획물의 순수도가 낮아서 해석하는데 많은 한계가 있어서 분획물을 더 분리 정제한 후 재 분석해야만 하나 GC/MS결과와 3개 분획에 대한 비교결과를 예측해 보면 isoeugenol, nomilin, β-sitosterol, β-Pinene, α-Terpineol 등 일 수 있으며 이 결과는 앞서 실시된 양하에 포함될 가능성 있는 단일물질에 대한 실험결과와도 일치한다. 그러나, 추가실험을 통해 확실한 동정이 수행되어야하며 현재 진행중에 있다.

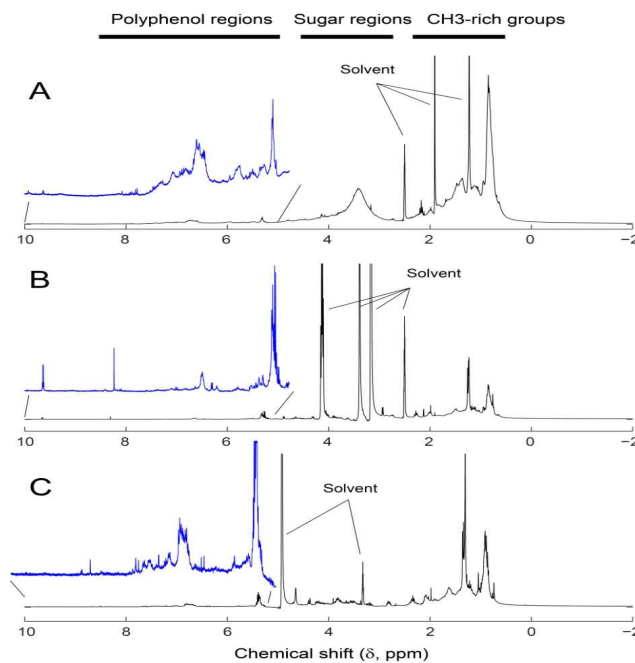


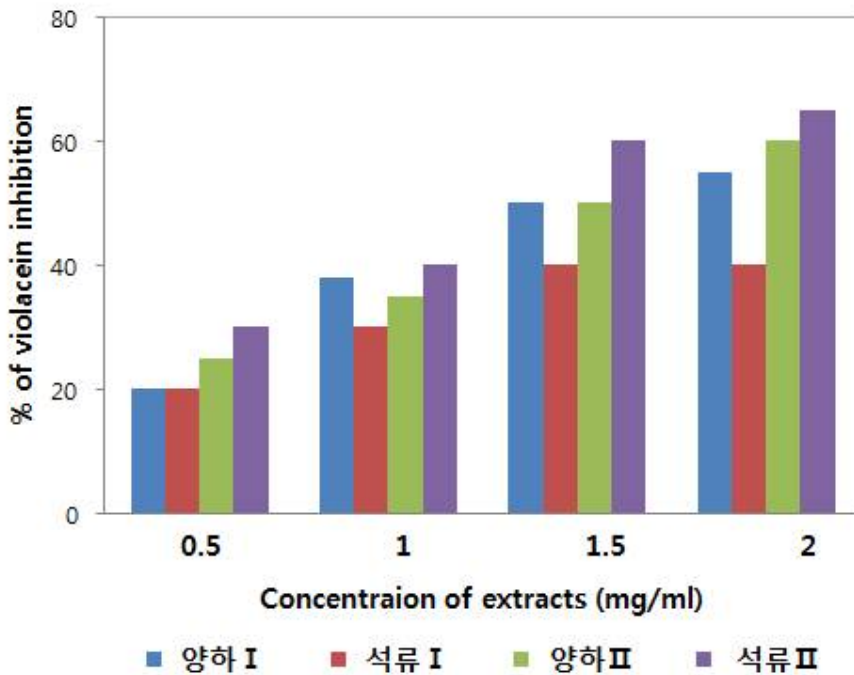
Fig. 17. 300 MHz NMR spectrum of acetic acid fraction (A), ether:ethyl acetate fraction (B), and methanol fraction (C).

제 4 절 신호전달 교란 활성성분에 대한 생리학적 특성 및 항균소재 후보의 제어기작 규명

1. 신호전달 교란 활성성분에 대한 생리학적 특성 평가

가. Violacein 억제활성 측정

신호전달(quorum sensing) 교란 활성성분으로 확인된 활성성분의 활성능을 정량적으로 확인하기 위하여 violacein 억제능을 바이오센서 균주인 *C. violaceum* CV 026을 사용하여 측정하였다. 신호전달물질 *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL) 첨가하지 않은 CV 026을 음성대조군으로 HHL (10uM)을 첨가하여 violacein 생성을 유도 후 신호전달 교란 활성성분을 농도별 (0.5-2 mg/ml)로 첨가하였을 때 violacein 생성량을 585nm에서 측정하여 violacein 억제율 $[(\text{control OD}_{585 \text{ nm}} - \text{test OD}_{585 \text{ nm}}) / \text{control OD}_{585 \text{ nm}}] \times 100$ 을 계산한 결과 활성성분들의 농도가 증가함에 따라 억제능이 증가하였으며 실험된 성분들 중 양하II분획 (60%)과 석류II분획 (65%)에서 억제활성이 가장 높게 관찰되었다 (Fig. 18; 14, 30)



Concentration (mg/ml)	Inhibition %			
	양하 I	석류 I	양하 II	석류 II
0.5	20	20	25	30
1	38	30	35	40
1.5	50	40	50	60
2	55	40	60	65

Fig. 18. Quantitative analysis of the quorum sensing mediated violacein inhibition in *C. violaceum* CV026 by bioactive compounds at 0.5-2 mg/ml.

나. 바이오필름 생성 억제 확인

바이오센서 균주인 *C. violaceum* CV 026에서 violacein 억제활성 측정법으로 신호전달 교란 활성이 있는 것으로 확인된 양하의 분획 2개 (I, II) 활성성분과 석류의 분획 2개 (I, II) 활성성분에 대하여 식중독균인 *Y. enterocolitica*와 병원균이며 식품에 부패를 일으키는 표면 부착 성질이 강한 지표미생물인 *P. aeruginosa*에서 신호전달 교란 활성을 검증하기 위하여 바이오필름 형성에 대한 억제력 평가를 O'Tool과 Kolter의 방법을 (1998) 수정하여 수행하였다 (2, 23).

두 종의 균주를 30°C에서 24시간 전 배양 후 OD₆₀₀에서 0.01 이 되도록 폴리비닐 클로라이드 (Polyvinyl Chloride) 재질의 500 ul U자형 튜브에 200 ul를 접종한 후 30°C에서 50 rpm으로 배양한다. 24시간 후에 배양액을 버리고 PBS (Phosphate-buffered saline)로 씻어낸 다음 0.3% 크리스탈 바이올렛 (Crystal violet)으로 30분 동안 염색한 후 PBS로 2회 세척한다. 95% 에탄올로 남아있는 크리스탈 바이올렛을 녹여내어 595 nm에서 흡광도를 측정한다. Fig. 19과 Table 9에서 확인되는 것과 같이 *Y. enterocolitica*와 *P. aeruginosa* 2종 모두에서 4개의 활성성분의 농도가 증가함에 따라 바이오필름 형성 억제능이 높아졌으며 양하 (0.2% 농도 80% 억제)와 석류 (0.8% 농도 80% 억제) 모두 II 활성성분이 신호전달 교란 활성이 더 좋은 것으로 확인되었다.

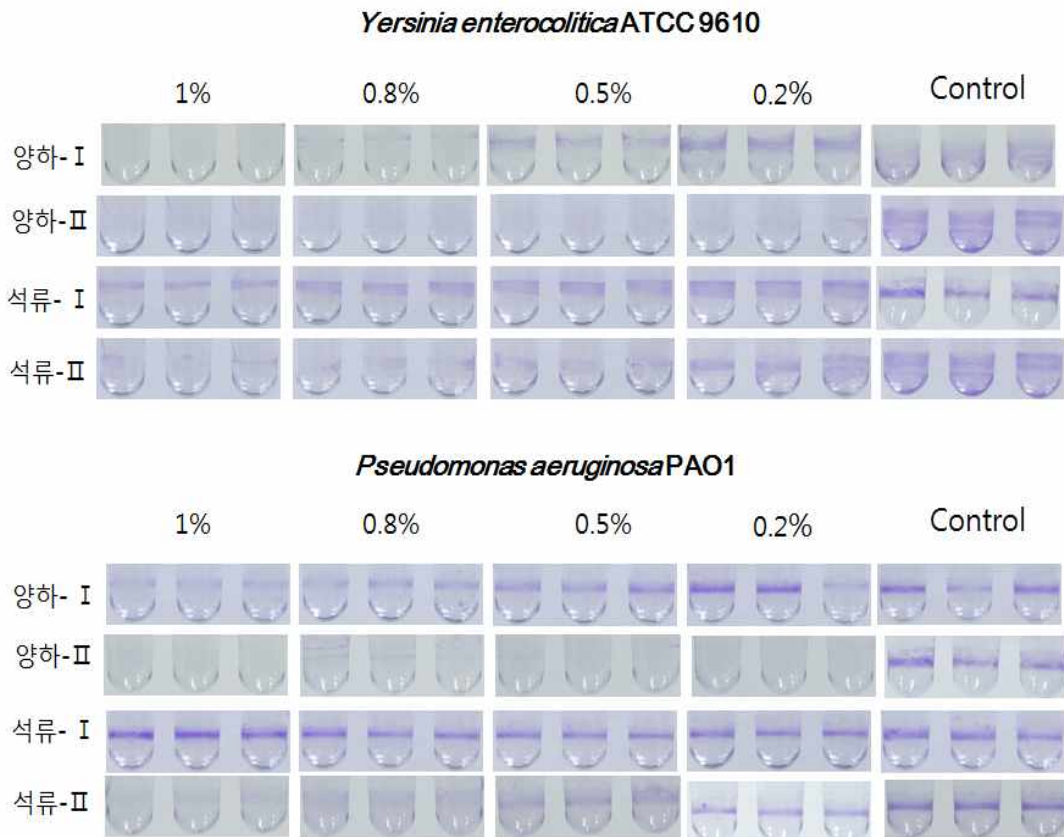


Fig. 19. Effect of the solvent fractions on biofilm formation of *Y. enterocolitica* and *P. aeruginosa*

Table 9. Concentration-dependent antibiofilm activity of bioactive compound against *Y. enterocolitica* and *P. aeruginosa*.

Compound	Concentration (%)	Biofilm formation absorbance (Mean±SD)	
		<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Zingiber mioga</i> I	1	0.092±0.001	0.203±0.026
	0.8	0.196±0.059	0.412±0.072
	0.5	0.522±0.043	0.623±0.045
	0.2	0.854±0.072	0.875±0.033
	DMSO(Control)	0.986±0.044	0.942±0.032
<i>Punica granatum</i> I	1	0.198±0.034	0.965±0.025
	0.8	0.367±0.055	0.944±0.031
	0.5	0.678±0.038	0.934±0.065
	0.2	0.898±0.042	0.937±0.027
	DMSO(Control)	0.966±0.025	0.958±0.048
<i>Zingiber mioga</i> II	1	0.078±0.003	0.082±0.011
	0.8	0.114±0.022	0.145±0.013
	0.5	0.232±0.034	0.245±0.027
	0.2	0.325±0.037	0.295±0.019
	DMSO(Control)	0.914±0.031	0.928±0.054
<i>Punica granatum</i> II	1	0.182±0.023	0.198±0.026
	0.8	0.312±0.045	0.388±0.048
	0.5	0.545±0.043	0.564±0.078
	0.2	0.867±0.063	0.858±0.049
	DMSO(Control)	0.954±0.042	0.983±0.032

다. Swarming 억제활성

신호전달 (quorum sensing)을 통한 communication 에 의해 나타나는 다양한 유전자발현 중 하나가 swarming 현상으로 Swarming assay는 일반적으로 바이오필름 억제물질 탐색에 보편적으로 사용되는 방법이다 (13, 14, 25). 표면부착에 대한 지표미생물인 *P. aeruginosa* 를 대상으로 10 mM 글루코오스와 1% 트립톤을 함유한 LB agar (0.6%)에 다양한 농도 (0-2 mg/ml)의 바이오필름 형성 억제능 실험에 사용된 동일한 활성성분 4종을 첨가한 후 플레이트를 만들어 중앙에 *P. aeruginosa* 의 단일 콜로니를 접종한 후 48시간 동안 30°C 에서 배양하였다. 대조군으로 각 활성성분의 용매를 포함하는 플레이트를 이용하였으며 콜로니가 접종된 중앙을 중심으로 이동거리를 측정하였다.

그 결과 Fig. 20 에서 나타낸 바와 같이 바이오필름 형성 억제능과 마찬가지로 농도 의존적으로 *P. aeruginosa*의 이동이 억제되는 신호전달 교란 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며 양하 I (97→30mm)과 II(98→21mm), 석류 II (97→28mm) 활성성분은 2 mg/ml 농도에서 swarming이 70-80% 까지 억제되는 효과를 보여주었다.

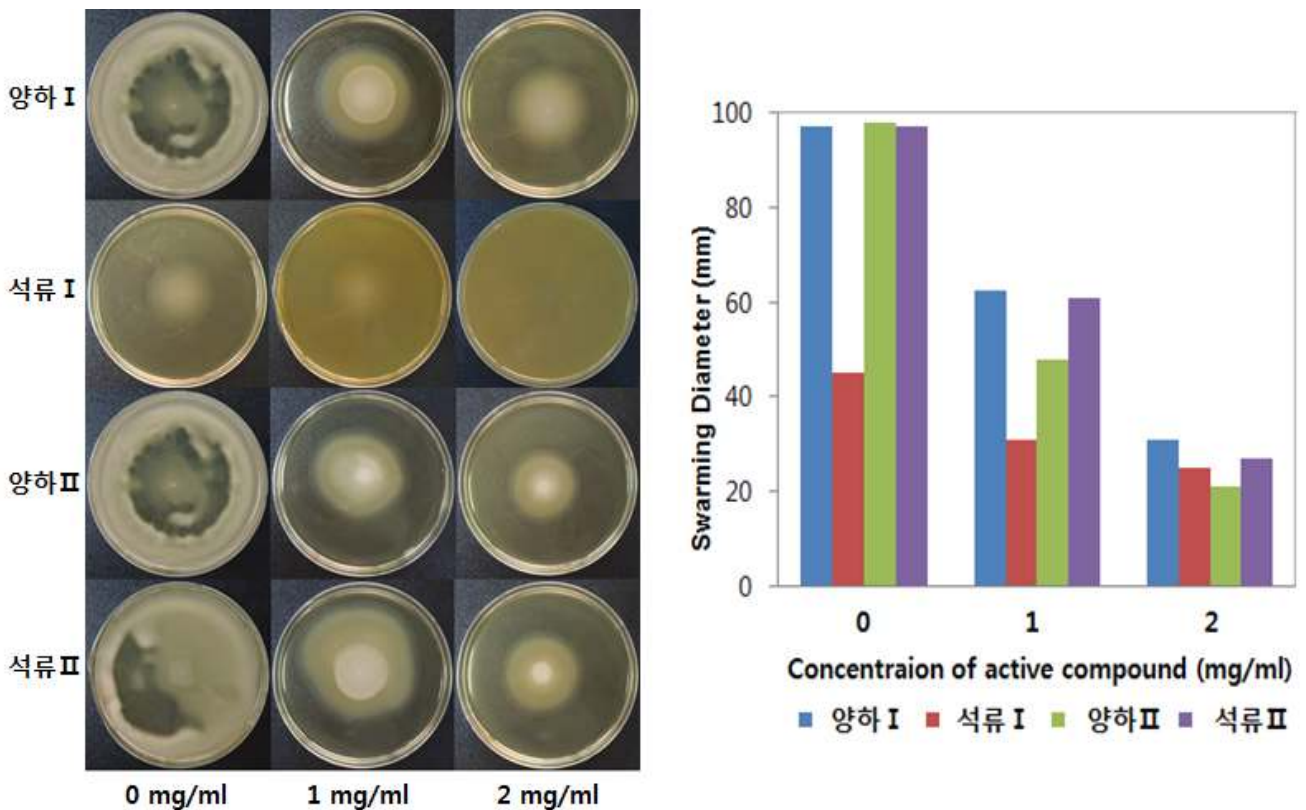


Fig. 20. Effect of bioactive compounds at different concentration on swarming motility of *P. aeruginosa*.

라. 신호전달 물질 분해능 확인

신호전달 교란에 활성이 있는 것으로 확인된 활성성분 4종에 대하여 식중독균인 *Y. enterocolitica* 에 의해 생산되는 것으로 알려진 2개의 신호전달물질 *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) 과 *N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL)에 대한 분해능을 확인하기 위하여 *Y. enterocolitica* 에 활성성분을 첨가하지 않은 것을 대조군으로 4종의 활성성분을 각 2 mg/ml 첨가하여 30°C 에서 48시간 배양한다. 배양된 세균은 원심분리하여 균을 제거한 후 상층액을 여과하여 에틸아세테이트로 2회 추출 후 유기용매 층을 35°C 에서 감압 증발시킨후, 잔여물을 메탄올에 용해시켜 LC-MS/MS 분석을 수행하였다 (10, 12, 14, 20).

크로마토그램의 결과는 *Y. enterocolitica*에 존재하는 2종의 신호전달 물질 peak 모두 48 시간 후에 현저히 감소함으로 신호전달물질이 신호전달 교란 활성성분에 의해 분해되고 있음을 확인하였다 (Fig. 21). 그러나 각 활성성분들에 대한 더 낮은 농도에서 C6-HSL과 3-oxo-C6-HSL의 변화를 확인하기는 어려웠으므로 배양배지 또는 배양조건을 바꾸어 실험을 수행해야 할 것으로 판단된다. 본 결과에서도 양하 II 활성성분이 신호전달 물질 분해능이 가장 높았으며 석류 II, 양하 I, 석류 I 순으로 활성을 가지고 있었다.

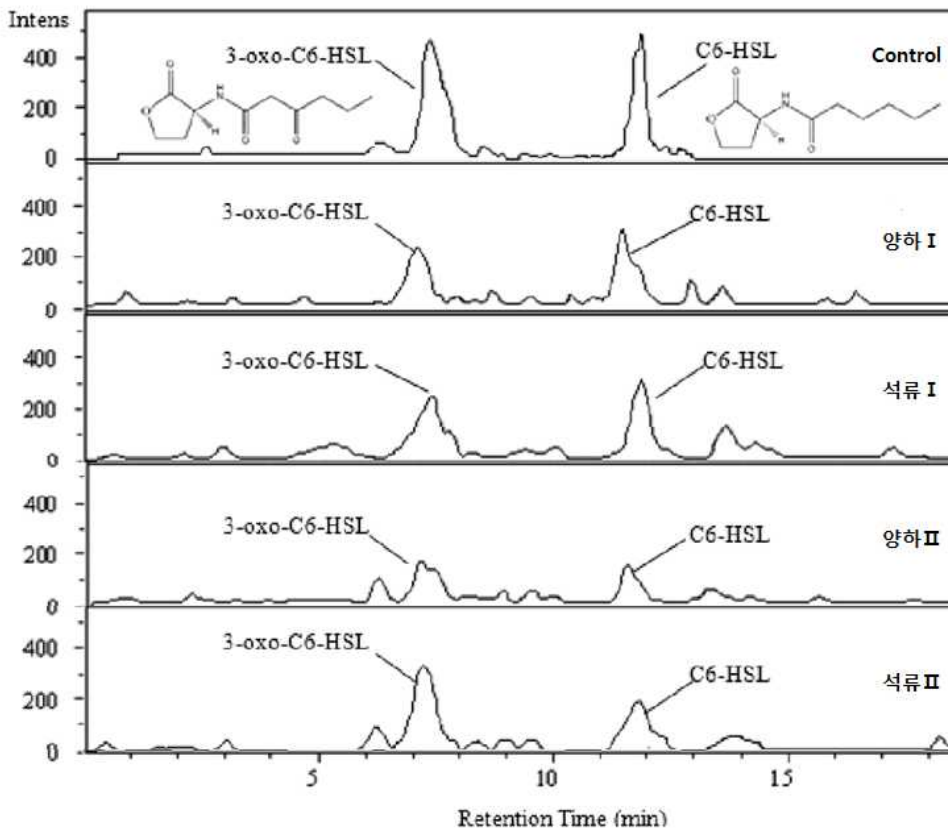


Fig. 21. LC-MS/MS chromatograms of 3-oxo-C6-HSL and C6-HSL present in the supernatant from *Y. enterocolitica* control and from cultures supplemented with bioactive compounds.

마. 세균생장 영향 확인

앞서 수행된 violacein 합성억제, 바이오필름 억제능, 운동력 억제와 신호전달 물질 분해능에 대한 활성 측정 결과 양하의 분획 2개 (I, II) 활성성분과 석류의 분획 2개 (I, II) 활성성분이 신호전달 교란 활성이 있는 것으로 확인되었으므로 식중독균인 *Y. enterocolitica* 와 병원균이며 식품에 부패를 일으키는 표면 부착 성질이 강한 지표미생물인 *P. aeruginosa* 를 대상으로 4종 성분들의 활성이 신호전달기작(quorum sensing)을 교란함으로 나타나는 현상인지 각 성분들의 독성에 의한 단순한 성장 억제인지를 확인하기 위하여 4종의 활성성분을 신호전달 교란활성을 나타낸 최대농도 (2 mg/ml)으로 첨가한 후 24시간 동안 30°C 에서 배양한 후 생균수를 측정하였다.

Table 10 의 결과에서 보는 바와 같이 아무것도 첨가하지 않은 2개의 균주 *Y. enterocolitica* 와 *P. aeruginosa* 의 24시간 후 생균수와 활성성분을 첨가한 각 실험군에서의 생균수는 차이가 없으므로 앞서 측정된 신호전달 교란 활성 성분에 대한 생리학적 평가는 세균의 성장에는 영향이 없음을 확인하였다.

Table 10. Cell counts of *Y. enterocolitica* and *P. aeruginosa* grown in TSB supplemented with different bioactive compounds.

Compounds	Concentration	Cell counts (CFU/ml)	
		<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Control		$6.2 \pm 1.2 \times 10^8$	$4.7 \pm 0.7 \times 10^7$
<i>Zingiber mioga</i> I	2 mg/ml	$5.4 \pm 1.5 \times 10^8$	$3.2 \pm 0.9 \times 10^7$
<i>Punica granatum</i> I	2 mg/ml	$5.9 \pm 1.3 \times 10^8$	$4.9 \pm 0.7 \times 10^7$
<i>Zingiber mioga</i> II	2 mg/ml	$7.2 \pm 1.7 \times 10^8$	$3.9 \pm 1.2 \times 10^7$
<i>Punica granatum</i> II	2 mg/ml	$4.2 \pm 0.6 \times 10^8$	$5.2 \pm 1.1 \times 10^7$



Pseudomonas aeruginosa PAO1



Yersinia enterocolitica ATCC 9610

바. 열안정성 확인

이미 활성이 있는 것으로 확인된 4종의 활성성분중 가장 활성이 약한 석류 I 을 제외한 3개의 성분들에 대한 열안정성 실험을 121°C, 80°C, 60°C 에서 violacein 합성능을 확인하여 각 성분들의 특성을 확인하였다. 3종의 활성성분을 신호전달 교란활성을 나타낸 최대농도 (2 mg/ml)로 각 1ml씩 튜브에 분주한 후, 해당온도에서 15분씩 방치한 후 신호전달 교란 바이오센서 균주인 *C. violaceum* 첨가하여 24시간 동안 30°C 에서 배양한 후 보라색 색소 생성 억제환을 mm로 측정한다. 그 결과 양하II와 석류II 활성성분들은 온도에 상관없이 거의 동일한 활성을 나타내어 본 연구에서 선정된 활성성분은 열에 안정함을 확인하였다 (Fig. 22). 특히 석류II 활성성분은 121°C 에서도 90% 이상 활성을 유지하였다.

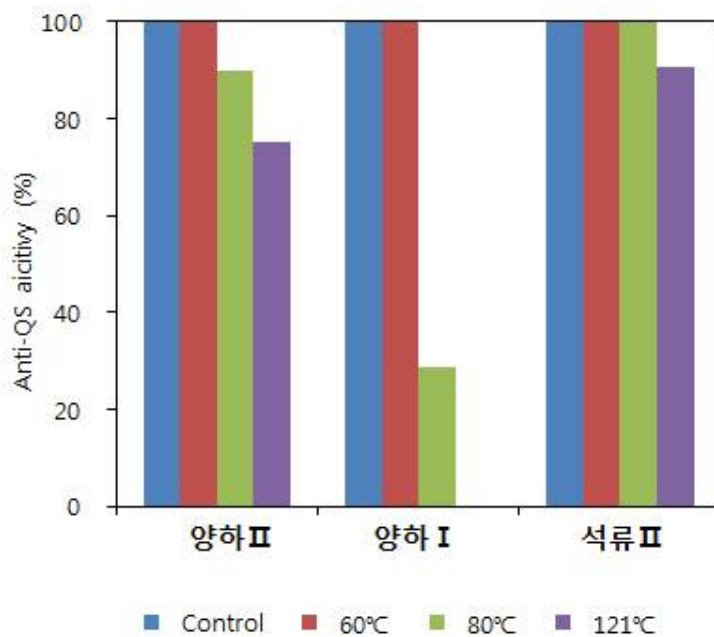
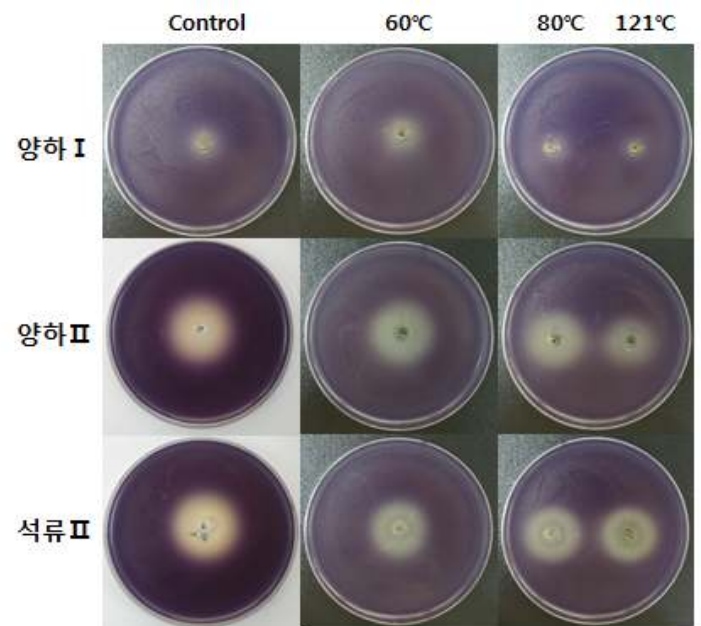


Fig. 22. Heat stability in *Y. enterocolitica* and *P. aeruginosa* of bioactive compounds.

2. 항균소재 후보의 제어기작 연구

가. 신호전달 물질 합성 조절기작 연구

식중독균 *Y. enterocolitica* 가 생산하는 신호전달물질의 합성은 *yenI* 와 *yenR* 에 의해 조절되며 또한 이들에 의해 세균의 운동성 (biofilm formation, swarming)도 조절됨으로 신호전달 교란 활성성분으로 확인된 후보물질에 의해 어떤 분자수준의 변화가 있는지 확인하기 위하여 이들의 mRNA 발현 수준을 비교하였다 (24, 25, 28, 30, 32). mRNA 발현을 확인하기 위하여 신호전달 교란활성을 나타낸 4종의 후보물질을 *Y. enterocolitica*에 1 과 2 mg/ml 농도로 첨가한 후 18시간 동안 30°C 에서 배양하여 mRNA를 추출 후, cDNA를 합성하여 Table 11 의 프라이머를 사용하여 realtime PCR을 수행하였고 CT값을 환산하여 상대적 발현량을 산출하였다.

이때 상대적 정량을 위하여 16S rRNA를 사용하였다. *yenR*은 대조군과 실험군 모두에서 변화가 없었으나 신호전달물질을 합성하는 유전자인 *yenI* 의 경우 양하 I 성분을 1 mg/ml 첨가한 군에서만 발현이 증가되었으며 양하 II, 석류 I 과 II 활성성분에서는 높은 농도가 첨가됨에 따라 발현이 현저히 감소함에 따라 이들 활성성분들이 신호전달 물질 합성 조절에 중요한 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 23)

Table 11. Primers used in the study of gene expression in *Yersinia enterocolitica*.

Gene	Product	Sequence Accession	Primers
<i>yenI</i>	N-acylhomoserine lactone synthase	YP_001005892.1	F-GATGTGAGCCTACCTATTGATGGTT R-CCCACCATATCTCTTGCTAATGCTT
<i>yenR</i>	quorum-sensing transcriptional activator	AM286415.1	F-CCGGTTATATTGACGGCGAAAGATA R-CGGCGGAATCCGTCGAT
<i>fliA</i>	RNA polymerase sigma factor for flagellar operon	AM286415.1	F-AACAACGGCTCGGACGT R-CTGGCGGTACTCAGTCAAATCAATA
<i>fleB</i>	thermoregulated motility protein	L33468.1	F-GGCGGTGCGAAAGATAATGAACAAAT R-AGATTCCAGCCAGAACTTGCA
<i>flhDC</i>	motility master regulatory operon	AF081587.1	F-GCGCGCTTGCAGATGTT R-GCTGCCTCTCAGCTCTTTATAGA

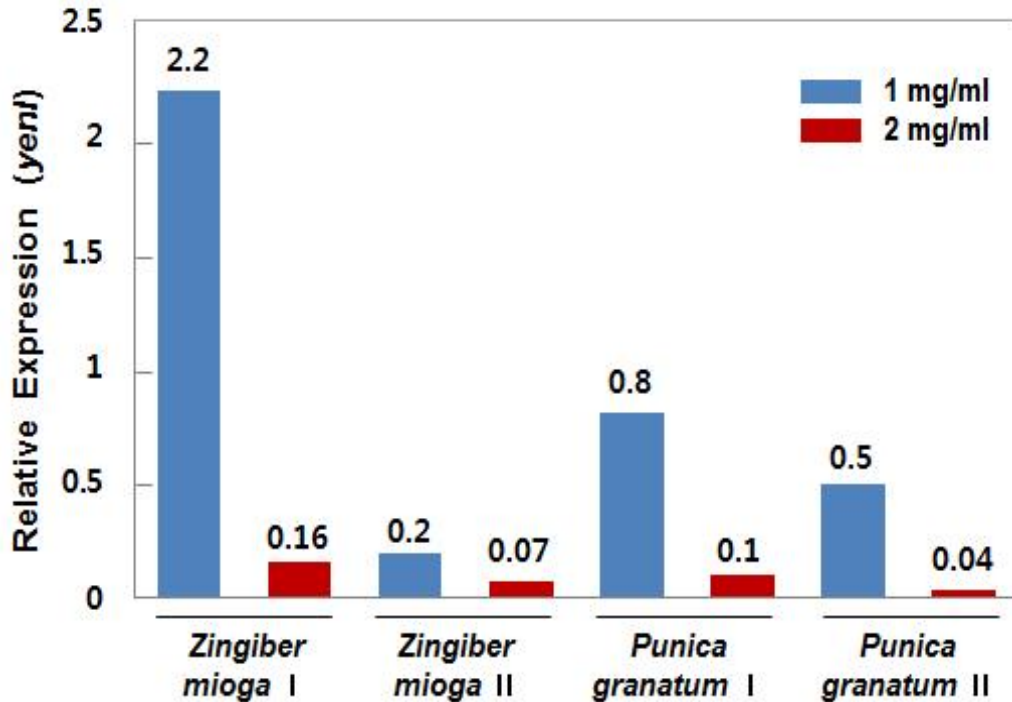


Fig. 23. Relative gene expression levels in *Y. enterocolitica* of *yenI* in the presence of bioactive compounds (1 and 2 mg/ml).

나. 바이오필름(독소발현)형성 조절인자 연구

*Y. enterocolitica*에서 신호전달물질에 의해 바이오필름 형성과 운동력에 변화가 있음을 앞선 연구에서 확인하였고 이들의 발현은 flagella에 의해 이루어지므로 flagella 조절에 관여하는 3개 유전자 (*fliA*, *fleB*, *flhDC*)의 발현으로 이들 표현형에 관여하는 특성을 *yenI* 와 동일한 실험방법으로 확인하였다 (Table 3; 24, 25, 28, 30, 32).

그 결과 4개의 활성성분 모두 2 mg/ml의 농도에서 18시간 배양한 경우 flagella의 운동성을 거의 제거할 수 있는 것으로 확인되었으므로 1 mg/ml의 농도로 24시간 이상 배양한다면 역시 운동성이 제거 될 수 있을 것이다. 그러나 양하 I 성분의 경우 *yenI* 의 결과와 마찬가지로 1 mg/ml 농도에서 *fleB*와 *flhDC* 유전자의 발현이 증가하는 것으로 보아 단순한 활성능이 낮다고 하기 보다는 다른 유전자 조절 기작이 존재한다고 추측할 수 있으며 또한 18시간보다 짧은 시간 배양시의 유전자 변화도 확인해 보아야 할 것이며 본 연구에서 변화를 확인할 수 없었던 *fliA* 와의 상관관계 연구가 추가되어야 할 것으로 생각된다 (Fig. 7).

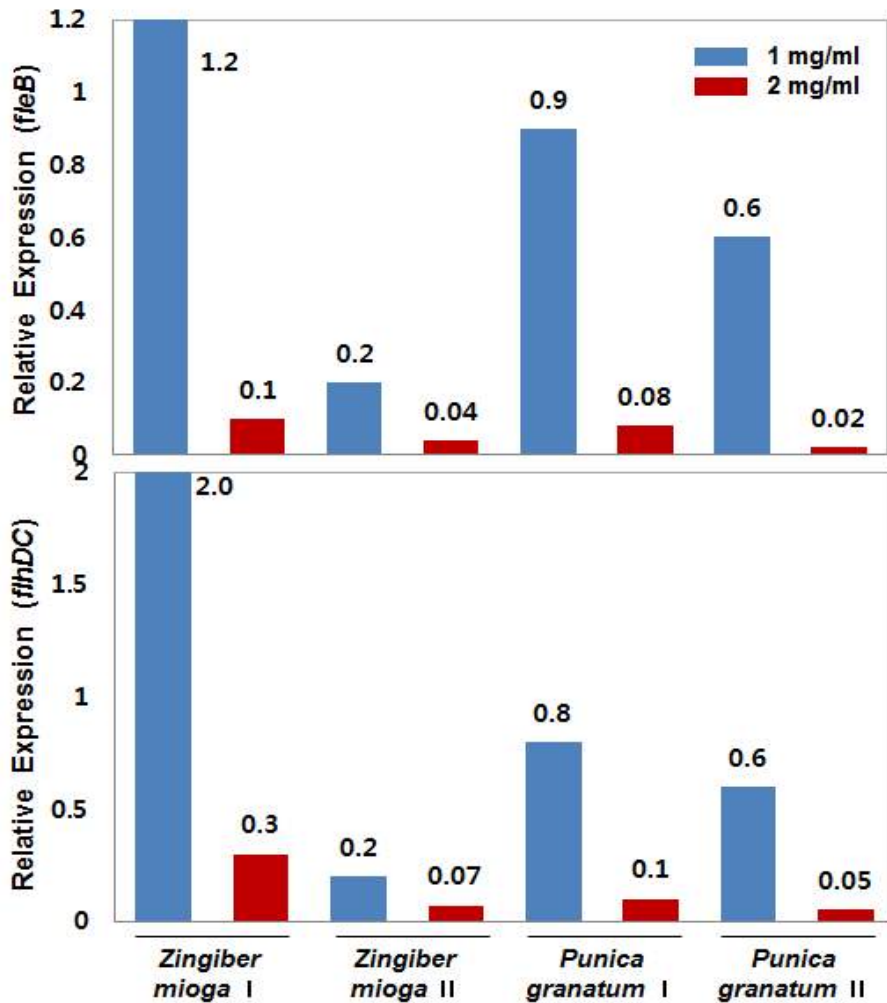


Fig. 24. Differential expression of *fleB* and *flhDC* in *Y. enterocolitica* in the presence of bioactive compounds (1 and 2 mg/ml).

3. 항균활성평가 기반 소재 선발

신호전달 교란 활성측정에 의해 활성성분으로 양하와 석류 활성성분을 포함하여 양하 7개 성분, 석류 5개 성분, 유자 3개 성분에 대한 그람양성균과 음성균에서 항균활성을 측정하고 신호전달 교란 활성을 나타내었던 양하의 A와 G 성분과 석류의 B와 E 성분은 어떤 세균에도 항균활성을 나타내지 않았다 (Table 12). 그러나 양하의 C (17-30 mm), D (21-35 mm), E (15-29 mm) 성분에서 그람양성균과 음성균에서 높은 항균활성을 나타내었으며 석류의 A (19-21 mm), C (16.5-22 mm) 성분은 그람양성균에서만 항균활성을 나타내었다.

특히 양하의 경우, 1차년도에 그람음성균에 대한 항균활성이 거의 나타나지 않은 반면에 성분분리가 진행되면서 그람음성균의 활성이 높게 나타나고 있으며 양하 D 성분의 경우 (35 mm) 그람양성균에서도 양성대조군인 kanamycin (28 mm)보다 더 높은 활성을 나타내었다. 정확한 항균활성 성분 선발을 위하여 가장 좋은 항균활성을 나타내었던 양하의 C, D, E 성분과 석류의 B, E 성분에 대한 최소성장억제농도 (MIC)를 측정하였다. 양하 D 활성성분의 경우 0.025 - 0.1 mg/ml의 최소성장 억제농도를 나타내었고 양하 C와 E 활성성분도 0.05 -

0.125 mg/ml 범위에서 최소성장 억제농도를 보여주었다.

석류의 경우에도 그람음성균에서는 활성이 없었으나 그람양성균의 경우 0.1 - 0.15 mg/ml 의 최소성장억제농도를 보여주었다 (Table 13). 또한, 양하와 석류 모두의 경우 더 낮은 농도에서 MIC 실험이 수행되지 않았으나 각 활성성분들은 더 낮은 농도의 최소성장억제 농도를 갖을 것으로 추정하고 있다.

Table 12. Antibacterial activities of bioactive compounds from *Zingiber mioga*, *Citrus junos* and *Punica granatum* L.

Sample	Diameter of inhibitory zone (mm)					
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> sp.	
<i>Punica granatum</i> L	A	19	21	21	-	-
	B	-	-	-	-	-
	C	16.5	22	22	-	-
	D	17	13.5	12	-	-
	E	-	-	-	-	-
<i>Citrus junos</i>	A	11	8	8	-	-
	B	10	-	-	-	-
	C	11	-	-	-	-
<i>Zingiber mioga</i>	A	-	-	-	-	-
	B	18	17	18	-	-
	C	23	30	23	17	20
	D	29	35	30	21	30
	E	18	29	18	15	17
	F	14.5	10	13	-	-
	G	-	-	-	-	-
PC(Km)	26	28	11.5	26	25	
NC	-	-	-	-	-	

Table 13. Minimum inhibitory concentration (MIC) in bioactive compounds from *Zingiber mioga* and *Punica granatum* L.

Food-borne pathogens	Minimum inhibitory concentration (mg/ml)				
	<i>Punica granatum</i> A	<i>Punica granatum</i> C	<i>Zingiber mioga</i> C	<i>Zingiber mioga</i> D	<i>Zingiber mioga</i> E
<i>B. cereus</i>	0.125	0.15	0.75	0.05	0.1
<i>L. monocytogenes</i>	0.125	0.1	0.75	0.05	0.1
<i>S. aureus</i>	0.125	0.1	0.05	0.025	0.05
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	0.125	0.1	0.15
<i>Salmonella</i> sp.	-	-	0.1	0.05	0.125

제 5 절 항균복합소재 특성연구 및 최종후보 선정

1. 단일항균소재의 비율별 복합제제 제조 최적조건 확립

가. 신호전달 교란소재와 항균활성소재의 혼합처리로 복합제제 제조

(1) 신호전달 교란소재의 복합제제 제조

앞서 신호전달교란 활성이 가장 활성이 높은 것으로 나타났던 양하의 물추출물과 석류 껍질의 MTBE 추출물, 메탄올 추출물의 3개 추출물 소재를 비율별로 조합하여 가장 활성이 좋은 신호전달 교란 소재의 복합제제의 최적비율을 찾아내기 위한 실험을 수행하였다. 신호전달교란 활성은 bio-reporter 균주인 *C. violaceum*에서 violacein 합성을 억제하는 투명환을 측정하여 결정하였다.

모든 활성소재는 100 mg/ml 농도를 기준으로 비율대로 조합하여 실험하였고 그 결과 10개의 복합물 조합중에서 양하 물추출물과 석류 MTBE추출물의 1:2 비율인 3번 복합물, 양하 물추출물과 석류 메탄올 추출물의 1:2 비율인 6번 복합물, 양하 물추출물:석류 MTBE추출물:석류 메탄올 추출물의 1:2:1 비율인 9번 복합물과 양하 물추출물:석류 MTBE추출물:석류 메탄올 추출물의 1:1:2 비율인 10번 복합물의 4개 복합물의 활성이 단일신호전달 교란소재보다 약 30% 더 활성이 높게 나타나는 것으로 나타났으며 그 중 양하 물추출물과 석류 메탄올 추출물의 1:2 비율인 6번 복합물이 활성도 가장 높게 나타났을 뿐 아니라 추출방법도 간편하였기 때문에 신호전달 교란활성 복합물로 결정하였다 (Table 14, Fig. 25).

Table 14. Violacein inhibition assay in *C. violaceum* by various ratio of the three extracts.

Compound No.	Water extract of <i>Zingiber mioga</i>	MTBE extract of <i>Punica granatum</i>	Methanol extract of <i>Punica granatum</i>	Inhibition zone (mm) in <i>C. violaceum</i>
	24			
		25		
			24	
1	1	1		27
2	2	1		24
3	1	2		28
4	1		1	28
5	2		1	25
6	1		2	30
7	1	1	1	27
8	2	1	1	28
9	1	2	1	28
10	1	1	2	28

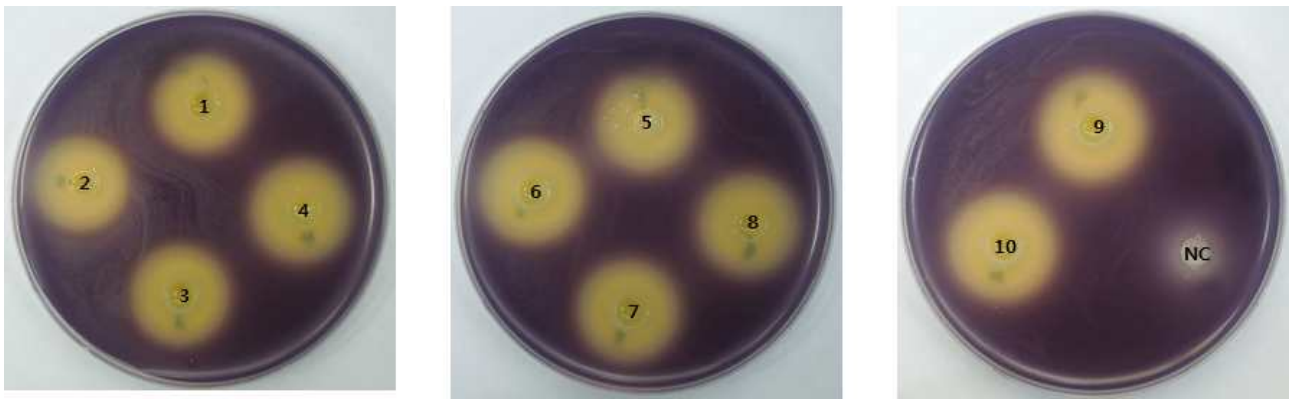


Fig. 25. Violacein inhibition assay in *C. violaceum* by various ratio of the three extracts. NC: DMSO

신호전달 교란활성 복합물로 선정된 4개의 복합물에 대해서는 이 후에 수행될 실험을 위하여 항균활성에서의 MIC 측정법과 동일한 방법을 사용하여 violacein 합성을 억제할 수 있는 최소활성억제 농도를 구하였고 4개의 복합물 모두에서 최소활성 억제농도는 6.25 mg/ml 로 나타났다 (Table 15). 이 농도는 활성 실험과 함께 다음에 수행될 복합물의 안전성 실험 등에서 기본값 설정을 위해 활용하기 위하여 측정되었다.

Table 15. Violacein inhibition activity against *C. violaceum* in various compounds.

Compound No.	Water extract of <i>Zingiber mioga</i>	MTBE extract of <i>Punica granatum</i>	MeOH extract of <i>Punica granatum</i>	Diameter of inhibitory zone (mm)								
				Concentration (mg/ml)								
				100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39
3	1	2		28	24	22	19	16	12	12	12	12
6	1		2	30	25	22	19	17	12	12	12	12
9	1	2	1	29	25	22	18	17	12	12	12	12
10	1	1	2	28	25	22	18	16	12	12	12	12
NC		DMSO		12								

(2) 항균활성소재의 복합제제 제조

신호전달교란 활성과 마찬가지로 항균활성이 활성이 높은 것으로 나타났던 양하의 ethyl acetate (E/A) 추출물과 매실의 주정추출물에 추가로 당해연도에 추가 실험을 통해 활성이 좋은 것으로 확인된 황매실 메탄올 추출물의 3개 추출물 소재를 비율별로 조합하여 가

장 활성이 좋은 항균활성 소재의 복합제제의 최적비율을 찾아내기 위한 실험을 agar diffusion assay 법으로 수행하였다.

모든 활성소재는 50 mg/ml 농도를 기준으로 비율대로 조합하여 실험하였고 그 결과 10 개의 복합물 조합중에서 양하 E/A추출물과 황매실 메탄올 추출물의 1:2 비율인 2번 복합물, 양하 E/A추출물, 황매실 메탄올추출물, 매실 주정추출물이 1:1:1 비율인 7번 복합물, 양하 E/A추출물, 황매실 메탄올추출물, 매실 주정추출물이 1:2:1 비율인 9번 복합물의 3개 복합물의 활성이 단일 항균활성 소재보다 약 30-50% 더 활성이 높게 나타나는 것으로 나타났으며 특히, 그람양성균에 일반적으로 활성이 좋은 반면 그람음성균에 활성이 대부분 없는 식물유래 천연추출물의 단점을 보완하는 것으로 나타났다.

그 중 양하 E/A추출물과 황매실 메탄올 추출물의 1:2 비율인 2번 복합물과 황매실 메탄올추출물, 매실 주정추출물이 1:1:1 비율인 7번 복합물이 단일소재보다 그람 음성균에서 좀 더 활성이 높게 나타났며 또한 9번 복합물도 활성이 높아 신호전달교란 소재와의 복합에 사용하기 위한 항균활성 복합물로 결정하였다 (Table 16).

Table 16. Antibacterial activities of compounds mixed by various ratio with three extracts.

Compounds No.	E/A extract of <i>Zingiber mioga</i>	MeOH extract of <i>Prunus mume</i> (yellow)	EtOH extract of <i>Prunus mume</i> (green)	Diameter of inhibitory zone (mm)				
				<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
	50mg/ml			17	18	16	11	13
		50mg/ml		15	16	15	16	15
			50mg/ml	14	16	16	16	14
1	1	1		19	22	20	13	11.5
2	1	2		21	25	23	17	16
3	2	1		17	19	17	11	10.5
4	1		1	16.5	18.5	15	10	10
5	1		2	18	20	18	11	9
6	2		1	15	15.5	16	-	-
7	1	1	1	20	24	20	16	13
8	2	1	1	18	21	28	13	10.5
9	1	2	1	20	23	20	14	13
10	1	1	2	19	22	20	14	10

항균활성 복합물로 선정된 3개의 복합물에 대해서는 이 후에 수행될 적용상 실험과 안전성 실험을 위하여 각 균주별 MIC 측정법에 의해 최소 활성 억제농도를 구하였으며 그람음성균의 경우 2번 복합물이 40 mg/ml로 가장 낮은 농도였으며, 그람양성균의 경우에는 5-15 mg/ml 의 최소활성 억제농를 확인하였다 (Table 17, Fig. 26). 다른 복합물에 경우에도 그람음성균은 50 mg/ml, 그람양성균은 6.25-20 mg/ml 의 최소활성 억제농도를 나타내었다.

Table 17. Minimum inhibitory concentration (MIC) of various compounds against bacteria.

Compound No.	E/A extract of <i>Zingiber mioga</i>	MeOH extract of <i>Prunus mume</i> (yellow)	EtOH extract of <i>Prunus mume</i> (green)	Concentration (mg/ml)				
				<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
2	1	2		40	40<MIC<50	MIC<5	15	15
7	1	1	1	50	50	7.5	20	20
9	1	2	1	50	50	6.25	15	20

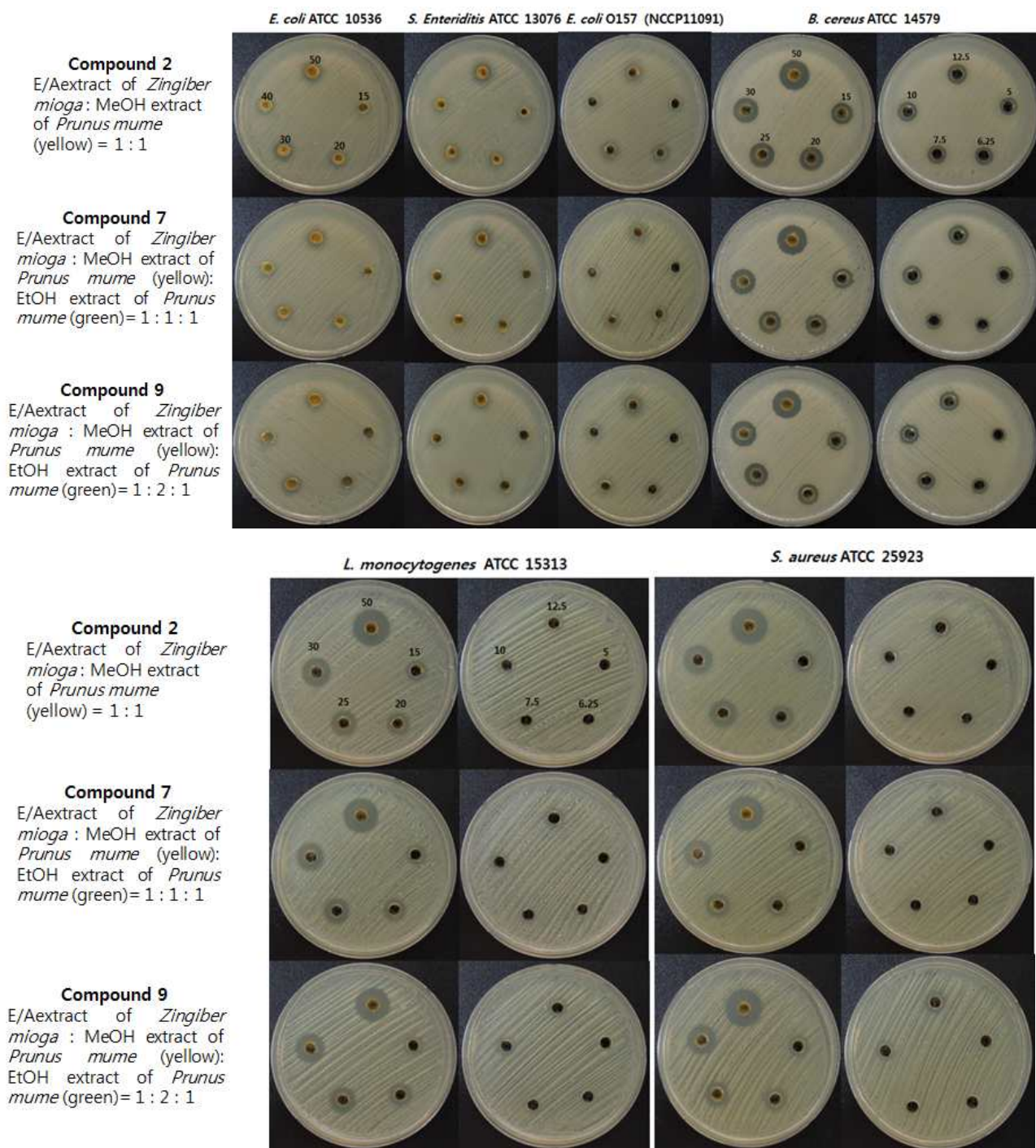


Fig. 26. Antibacterial activity in compounds in various concentration.

나. 혼합처리에 의한 안정성 확인

신호전달 교란소재의 혼합처리로 선정된 복합물 6번과 항균활성소재의 혼합처리로 선정된 복합물 2번과 7번 총 3개의 복합물에 대하여 혼합처리 후에도 외관과 활성 등에 차이가 있는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 각 복합물들은 10°C, 25°C, 45°C에서 30일 동안 보관하면서 2일, 7일, 15일, 23일, 30일 간격으로 복합물은 색깔 변화와 침전여부를 확인하였으며, 또한 pH 변화와 함께 신호전달 교란소재는 violacein 합성 억제능을 항균활성소재는 항균활성능을 측정하였다.

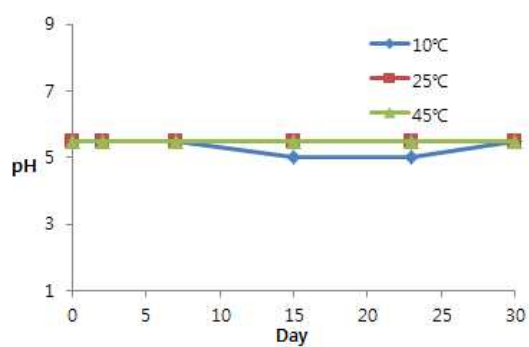
신호전달 교란 복합물 6번의 경우 저장기간 동안 3개 온도 범위에서 pH 변화와 침전 등은 관찰되지 않았으나, 복합물의 색이 저장온도가 높아감에 따라 짙어지는 변화가 2일째에 확인되었지만 그 색깔은 저장기간 30일 후에도 동일한 색으로 안정적으로 유지되었다 (Fig. 27). *C. violaceum*에서 측정된 violace inhibition assay 결과에서도 저장 전과 비교하여 온도와 저장기간에 영향을 받지 않고 일정하게 유지되고 있음을 확인하였다 (Fig. 27, Table 18)

항균활성소재 복합물 2번은 25°C, 45°C에서 저장동안 7일째에 pH가 낮아졌으나 이 후 변화 없이 지속되었으며 색깔변화도 없었으며 침전 등 기타 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 28). 그람음성균으로 *E. coli* ATCC10536, 그람양성균으로 *B. cereus* ATCC14579와 *L. monocytogenes* ATCC15313을 시험균주로 하여 항균활성을 측정한 결과는 Fig. 28와 Table 29에서 나타나는 것과 같이 저장 전과 비교하여 온도에 따른 차이도 없었으며 저장기간이 지속되어도 활성은 최초의 활성값을 유지하고 있었다.

항균활성소재 복합물 7번은 3개 온도범위에서 저장기간 동안 pH의 변화가 차이가 나지 않고 3개 온도 모두에서 유사한 형태로 나타났으며 30일 저장기간 동안 지속되었다. 각 온도별 복합물의 색깔의 변화도 없었으며 침전과 같은 화학적 변화도 관찰되지 않았다 (Fig. 29). 3개 시험균주를 이용한 항균활성을 측정한 결과 저장 전과 비교하여 온도별 활성에 차이가 없었으며 저장기간에 상관없이 일정하게 항균활성을 유지하였다 (Fig. 29, Table 29).

본 과제에서 선택된 신호전달 교란소재 복합물 1종과 항균 복합물 2종은 혼합처리 후에도 복합물의 색의 변화 및 침전 등과 같은 다른 변화들이 관찰되지 않았고 pH 도 일정하게 유지되고 있었으며 가장 중요한 각 복합물의 활성을 잃지 않고 유지함으로써 항균 복합소재로 적용상 연구에 적합한 것으로 확인되었다.

A.



B.

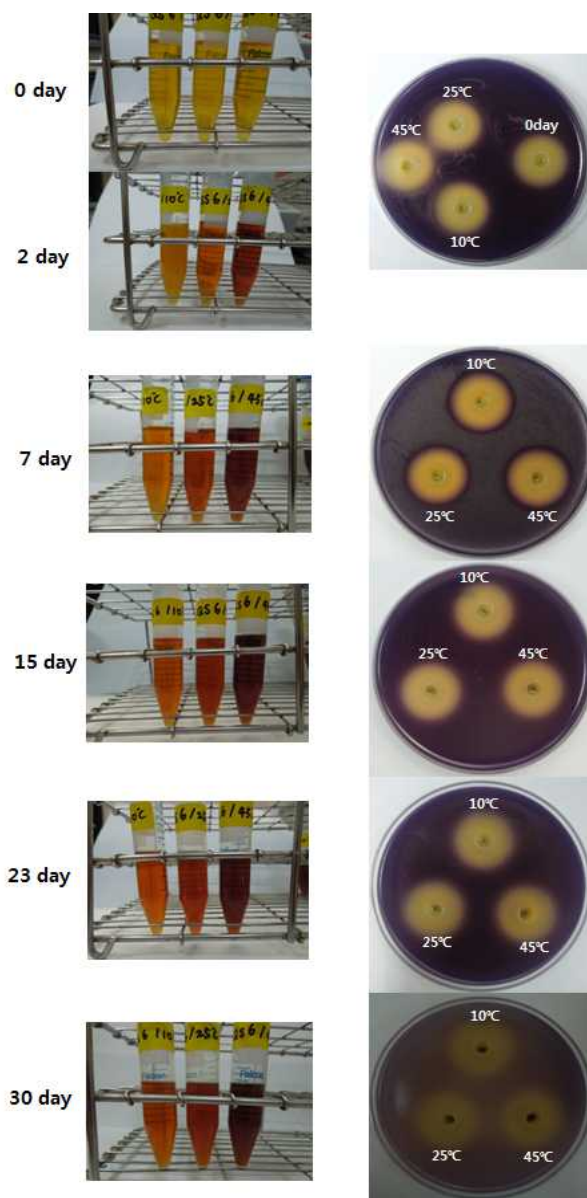
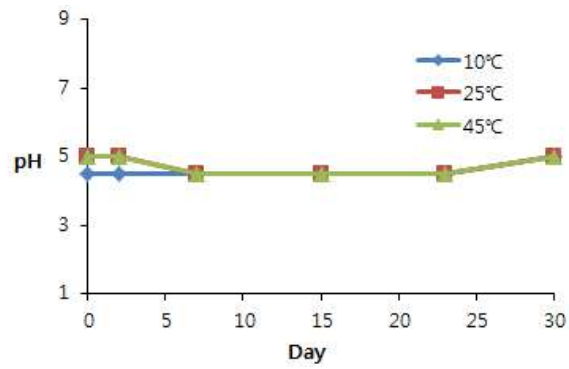


Fig. 27. Change in anti-quorum sensing compound 6 by storage temperature and period. A: pH, B: Color and anti-quorum sensing activity

Table 18. Violacein inhibition activity against *C. violaceum* in anti-quorum sensing compound 6 by storage temperature and period.

Temperature	Day	Inhibition zone (mm)
		<i>C. violaceum</i>
10 °C	0	23
	2	23
	7	23
	15	23
	23	23
	30	24
25 °C	2	23
	7	23
	15	23
	23	23
	30	24
45 °C	2	23
	7	23
	15	23
	23	23
	30	23

A.



B.

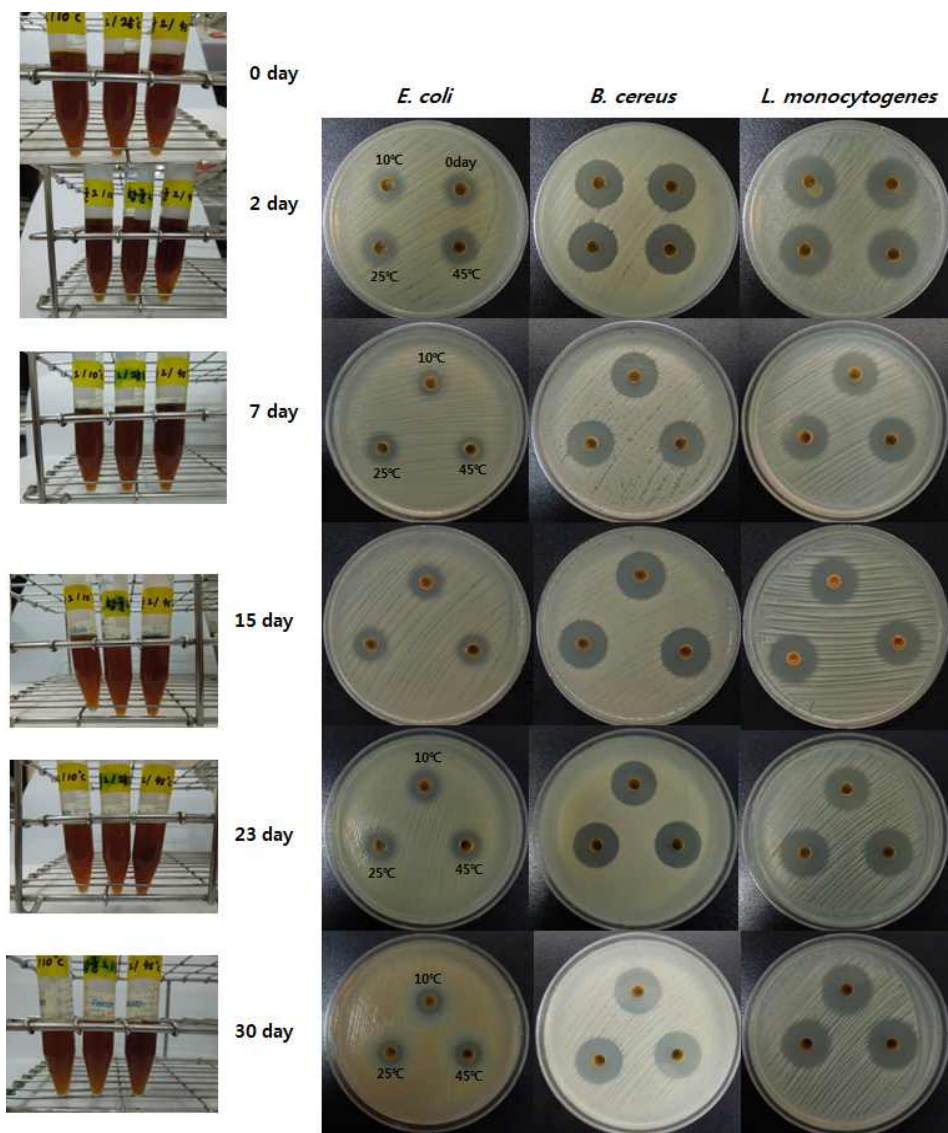
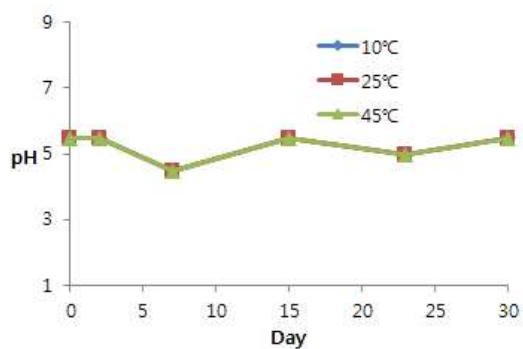


Fig. 28. Change in antibacterial compound 2 by storage temperature and period. A: pH, B: Color and antibacterial activity

A.



B.

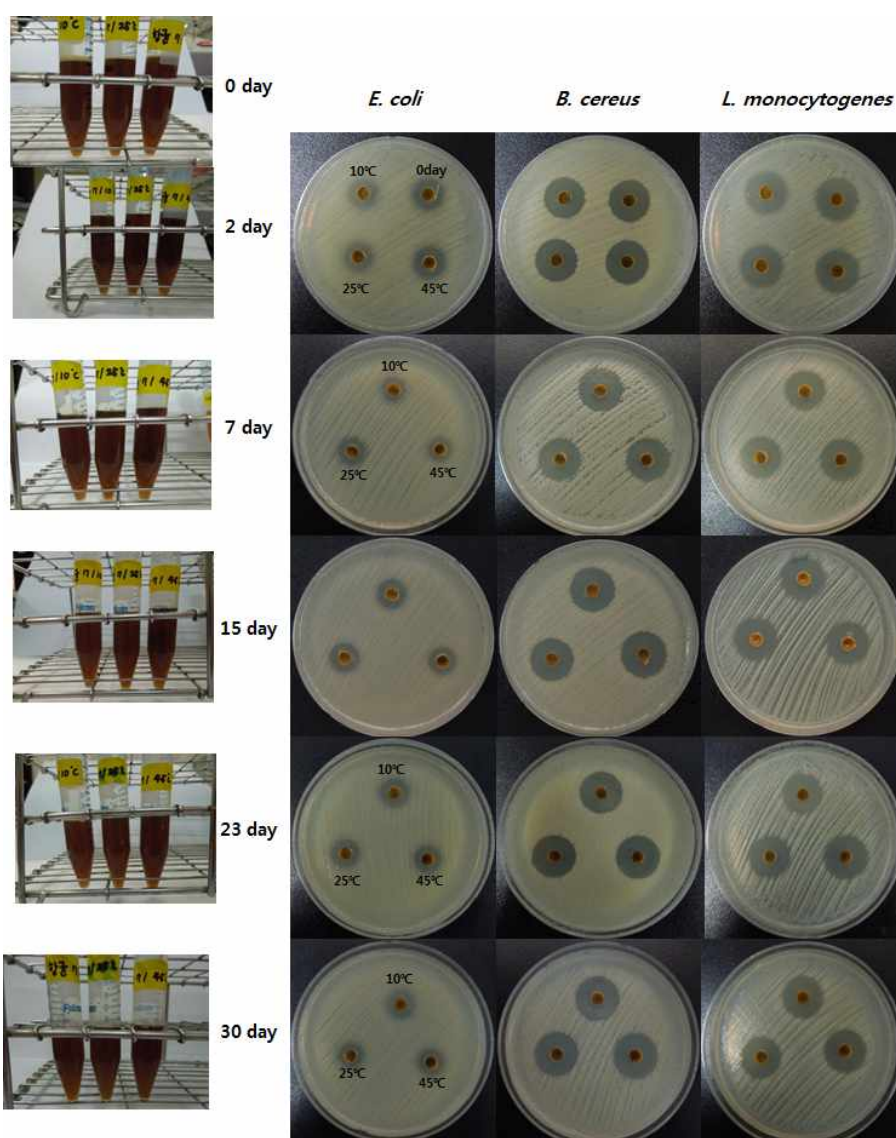


Fig. 29. Change in antibacterial compound 7 by storage temperature and period. A: pH, B: Color and antibacterial activity

Table 19. Effect of antibacterial activities on temperature and storage period of antibacterial compound 2 and 7.

Temperature	Day	Inhibition zone (mm)			
		<i>E. coli</i> ATCC10536	<i>B. cereus</i> ATCC14579	<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	
Compound 2	10 °C	0	14	22	21
		2	14	22	21
		7	14	22	21
		15	15	21	21
		23	15	22	20
		30	14	22	22
	25 °C	2	14	22	20
		7	15	21	20
		15	15	22	21
		23	15	21	21
		30	13	22	21
	45 °C	2	14	22	20
		7	13	21	21
		15	15	22	20
		23	14	22	21
30		14	22	21	
Compound 7	10 °C	0	12	19	19
		2	12	19	19
		7	12	19	19
		15	12.5	19	19
		23	12	19	19
		30	12	19	18
	25 °C	2	12	19	19
		7	12	19	19
		15	12	19	19
		23	12	19	19
		30	12	19	18
	45 °C	2	12	19	19
		7	12	19	19
		15	12.5	20	19
		23	12	20	19
30		12	19	19	

2. 항균복합소재 후보물질 선정

가. 항균복합소재의 신호전달교란 활성; violacein Inhibition 측정

이미 선정된 신호전달 교란 복합물 6번과 항균활성 복합물 2번과 7번 총 3개의 복합물 각각에 대한 혼합처리에 의한 안정성을 확인하였으므로 3종의 복합물을 혼합하여 신호전달 교란 복합물을 혼합함으로써 항균활성 복합물을 최소량 사용할 수 있는 비율을 찾기 위한 실험을 진행하였다.

먼저 항균복합물과 신호전달 교란복합물의 비율을 각각 1:1=50 mg/ml:50 mg/ml, 2:1=50 mg:25 mg/ml, 1:2=25 mg/ml:50 mg/ml로 결정하여 두 개의 항균활성 복합물에 적용하여 violacein inhibition assay를 실시한 결과 Fig. 30 과 Table 21 에서의 결과처럼 (A) 복합물이 (B) 복합물보다 전체 활성이 더 높았다. 이미 신호전달교란 물질의 혼합단계에서 복합물이 단일 활성소재와 비교하여 30% 이상 활성이 더 높아졌다는 것은 확인되었으며 두 개의 다른 성격의 복합물이 혼합되었을 때 (A)의 경우에서처럼 1:1 비율과 1:2 비율의 활성이 유사하게 나타났으므로 실제 적용실험에서는 1:1 비율로 사용하는 것이 더 효율적일 것으로 생각된다.

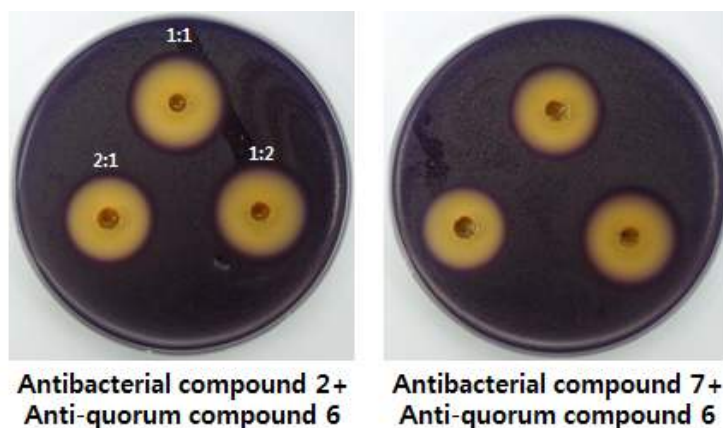


Fig. 30. Violacein inhibition assay in *C. violaceum* by various ratio of anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2 and 7.

Table 20. Anti-quorum sensing activity by various ratio of anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2 and 7.

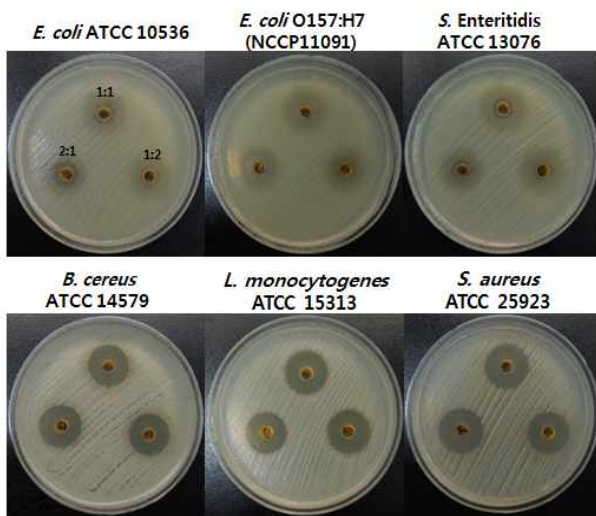
Compound ratio	Antibacterial compound 2 + Anti-quorum compound 6 (A)			Antibacterial compound 7 + Anti-quorum compound 6 (B)		
	1 : 1	2 : 1	1 : 2	1 : 1	2 : 1	1 : 2
Antiquorum sensing activity	1 : 1	2 : 1	1 : 2	1 : 1	2 : 1	1 : 2
Diameter of inhibitory zone (mm)	24	22	24	22	21	22

나. 항균복합소재의 항균활성

신호전달교란 활성과 마찬가지로 같은 복합물을 항균복합물과 신호전달 교란복합물을 각각 1:1=50 mg/ml:50 mg/ml, 2:1=50 mg:25 mg/ml, 1:2=25 mg/ml:50 mg/ml로 비율로 조합하여 항균활성을 측정하였다. 신호전달교란 활성 측정 결과와 유사하게 (A) 복합물이 (B) 복합물보다 전체 활성이 더 높았으며 (B) 복합물의 경우 오히려 그람음성균에서 활성이 나타나지 않고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 31, Table 21). 이는 성격이 다른 두 개의 복합물이 혼합되면 효과의 상승작용 뿐 아니라 감소작용이 일어날 수 있다는 것을 증명하는 것으로 생각된다.

역시 (A) 복합물에 사용된 복합물질은 항균활성 물질의 혼합단계에서 단일활성소재와 비교하여 50% 이상 활성이 더 높아졌다는 것은 확인하였으며 1:1 비율과 1:2 비율의 활성이 유사하게 나타났으나 항균복합물이 1:1 비율에 비해 절반으로 줄어든 1:2 비율에서도 동일한 결과를 얻었으므로 이 복합제제의 조합을 사용한다면 항균물질 사용을 기존의 절반으로 줄일 수 있는 최소량 비율을 찾을 수 있었다 (Table 21). 또한 활성이 더 좋았던 (A) 복합물을 최종 항균복합소재로 결정하여 적용상 연구를 위한 기본 자료 제공을 위한 최소 활성억제 농도를 결정하였다 (Table 22).

A. Antibacterial compound 2+ Anti-quorum compound 6



B. Antibacterial compound 7+ Anti-quorum compound 6

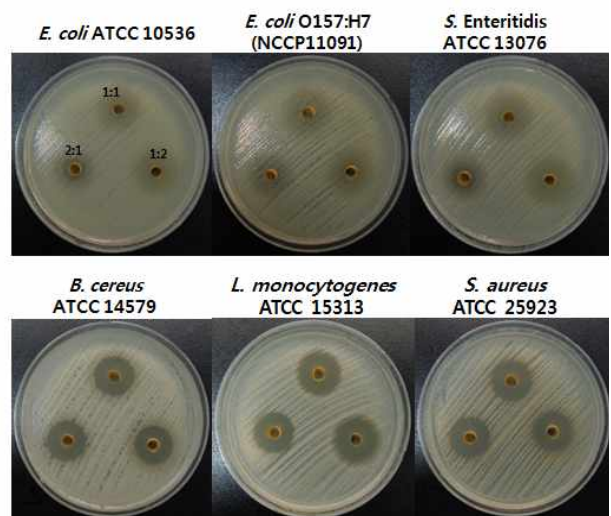


Fig. 31. Antibacterial activities of compounds mixed by various ratio of anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2 and 7.

Table 21. Antibacterial activities of compounds mixed by various ratio of anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2 and 7

Strains	Antibacterial activity		Diameter of inhibitory zone (mm)					
	Compound ratio	Compound ratio	Antibacterial compound 2 + Anti-quorum compound 6			Antibacterial compound 7 + Anti-quorum compound 6		
			1 : 1	2 : 1	1 : 2	1 : 1	2 : 1	1 : 2
<i>E. coli</i> (ATCC10536)			12	11	12	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7 (NCCP11091)			11	10	11	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> (ATCC13076)			14	10	14	-	10	-
<i>B. cereus</i> (ATCC14579)			20	19	20	19	18	18
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC15313)			20	18	20	20	18	20
<i>S. aureus</i> (ATCC25923)			20	21	19	19	20	18

Table 22. Minimum inhibitory concentration (MIC) of final compound (anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2) against bacteria.

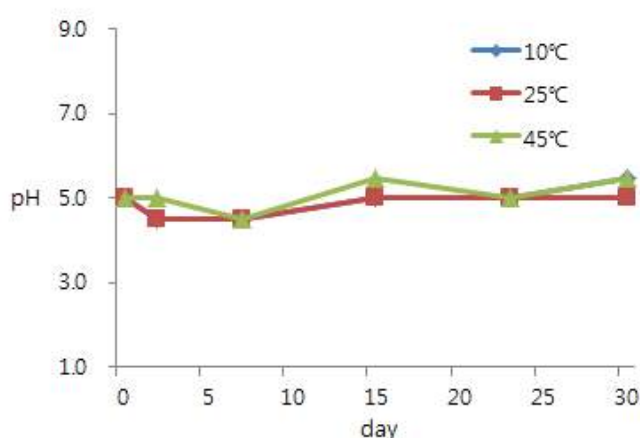
Strain	Concentration (mg/ml)							
	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78
<i>E. coli</i>	12	8	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	19	16	14	11	10	8	8	8
<i>L. monocytogenes</i>	18	12	8	-	-	-	-	-

3. 복합제제의 보관중 안정성 확인

가. 보관온도, 보관기간에 따른 안정성

항균활성 복합물 2번과 신호전달교란 활성 복합물 6번을 1:1 비율로 조합된 최종 복합제제에 대한 안정성 확인을 위하여 앞서 저장실험과 마찬가지로 10°C, 25°C, 45°C의 온도범위에서 2일, 7일, 15일, 23일, 30일 저장동안의 변화를 확인하였다. pH는 2일째에 25°C와 45°C 시험군에서 약 0.3 낮아졌으나 이후에 회복되어 30일째까지 변화 없이 지속되었으며 동일기간 동안 색깔변화 및 침전 등 기타 변화가 관찰되지 않아 각 활성복합물에서와 마찬가지로 외관상의 변화 없이 안정적으로 유지되고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 32).

A.



B.

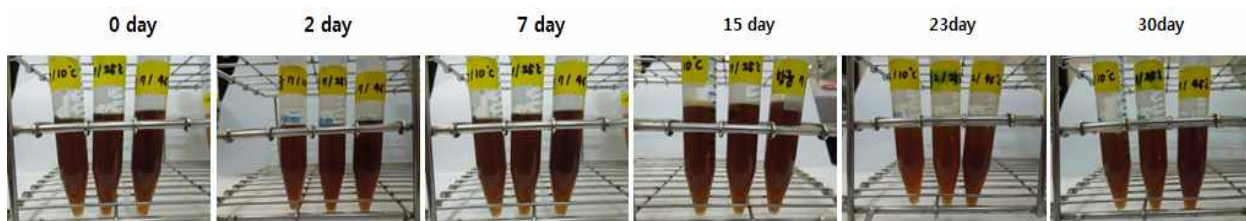


Fig. 32. Change in final compound (anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2) by storage temperature and period. A: pH, B: Color

나. 단일제제의 항균활성 유효농도 지속성 확인

선택된 최종 복합제제의 보관기간동안 항균활성이 안정적으로 유지되는지를 확인하기 위하여 그람음성균 *E. coli* ATCC10536, 그람양성균 *B. cereus* ATCC14579와 *L. monocytogenes* ATCC15313을 대상으로 10°C, 25°C, 45°C의 각 온도별로 2일, 7일, 15일, 23일, 30일 보관기간동안의 항균활성 변화 여부를 확인하였다. Table 23과 Fig. 33에서의 결과에서처럼 저장 전과 비교하여 온도차에 따른 활성의 변화도 없었으며 저장기간이 지속되어도 활성은 최초의 유효농도에서 활성을 유지하고 있었다.

Table. 23. Effect of antibacterial activities of final compound on storage temperature and period

Temperature	Storage period (day)	Inhibition zone (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
10°C	0	15	22	22
	7	15	22	22
	14	15	23	21
	21	15	23	22
	30	15	23	22
25°C	7	16	23	23
	14	16	23	22
	21	15	22	22
45°C	30	15	22	22
	7	15	23	22
	14	15	22	23
	21	14	22	22

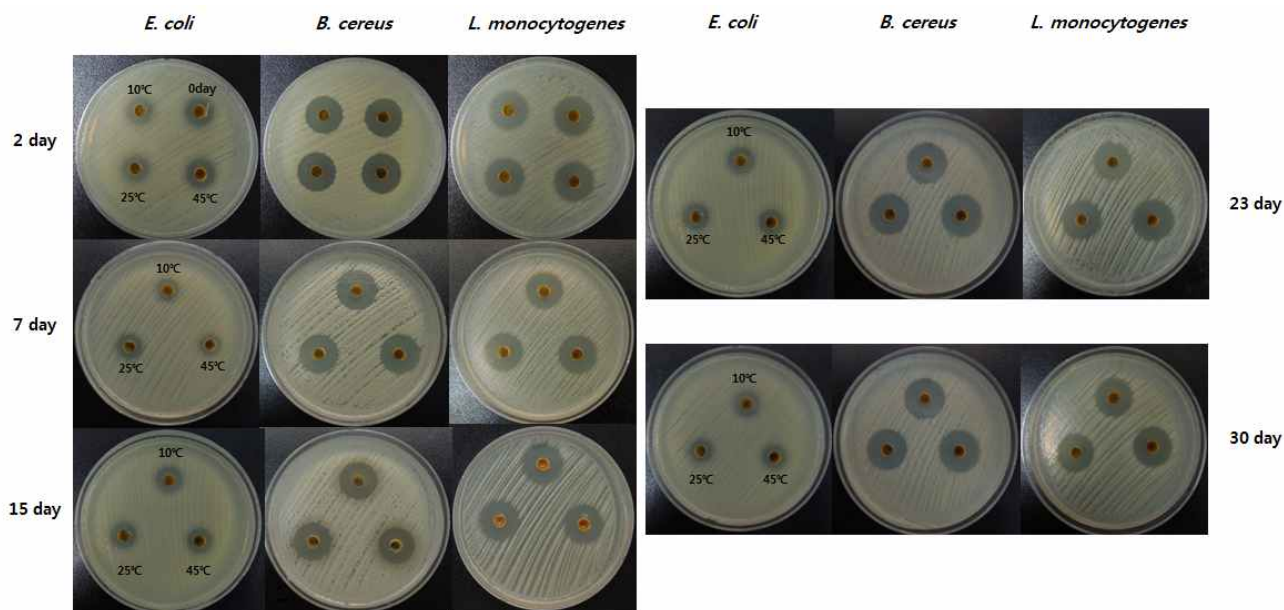


Fig. 33. Antibacterial activities of final compound (anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2) by storage temperature and period.

제 6 절 산업화를 위한 항균 단일/복합소재의 응용기술 개발

1. 항균 단일/복합소재의 적용상 연구

가. 제제 유형별 항균소재활성연구

앞선 실험에서 도출된 신호전달교란 활성소재와 항균활성소재의 복합소재를 대상으로 수행된 연구결과로 개발된 최종항균복합소재의 산업화를 위한 목표달성을 위하여 다양한 제품에 적용을 위한 응용연구를 수행하였다. 용액제제로 만들어 졌을 때 용제의 종류에 따른 활성변화를 그람음성균 중 *E. coli*와 그람양성균 중 가장 활성이 좋았던 *B. cereus*와 *L. monocytogenes* 함께 본 과제에서 개발된 신호전달교란 소재에 대하여 항균활성이 없었던 Bio reporter strain인 *C. violaceum*을 대상으로 항균활성을 확인한 결과 정제수, 60%에탄올, 비누베이스 등에 혼합되었을 때 대조군으로 사용된 항균복합소재만으로 확인된 활성과의 차이가 없었으며, 일반적으로 항균활성이 있는 것으로 알려진 에탄올의 경우 60% 뿐 아니라 70%와 80% 에서도 에탄올 자체항균활성은 확인되지 않아 항균복합소재의 활성이 유지되고 있음을 확인하였다 (Table 24).

Table 24. Antibacterial activity of bioactive compound added in various solutions.

성분	Inhibition zone (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. violaceum</i>
개발된 항균복합소재 (A)	13	20	20	23
정제수+A	13	19	17	22
용액 제제				
60% 에탄올+A	13	18	20	22
비누베이스+A	13	21	23	24

분산제제와 반고형제제 형태를 위한 첨가제 종류에 따른 활성변화를 확인한 결과 계면활성제, 현탁화제, 유화제 등에서 *E. coli* 경우, 대조군과 비교하여 활성이 증가한 것처럼 관찰되나 유의적 차이가 없는 것으로 보이며 *B. cereus*와 *L. monocytogenes*에서도 유사하거나 약간 낮은 것으로 보이나 큰 활성의 차이는 없는 것으로 보인다. 전체적으로 *C. violaceum*에서는 모든 첨가제에 대하여 활성의 변화가 크지 않은 것으로 나타났다. 그 외 첨가제인 점증제, 보존제, 보습제 등에서의 활성도 대조군인 항균복합소재만으로 확인된 활성과의 차이가 없었으며, 또한 첨가제로 같이 사용되는 항균작용이 있는 에센셜오일 (편백, 카렌둘라)과 일반오일 (녹차씨, 피마자, 달맞이꽃 종자씨, 타미누, 호호바, 윗점)에 대한 항균활성에서도 항균복합소재만으로 측정된 활성과 차이가 없어 분산제제와 반고형제제로 제품이 만들어졌을 때 항균활성이 유지될 수 있음을 확인할 수 있었다 (Table 25).

분립제제제를 만들기 위해 첨가되는 부형제, 결합제등의 첨가제의 종류에 따른 활성변화를 확인한 결과 용액제제와 반고형, 분산제제의 첨가물에서와 마찬가지로 *E. coli*, *B. cereus*

와 *L. monocytogenes*, *C. violaceum*에서 그 항균활성이 약간 높거나 낮은 것으로 보이나 모두 유사하여 큰 활성의 차이는 없는 것으로 나타났으며 본 연구결과를 기반으로 만들어지는 어떤 제품에서도 항균력은 유지될 것으로 생각된다 (Table 26).

Table 25. Antibacterial activity of bioactive compound added in dispersant and semi-solid formulation.

성분	Inhibition zone (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. violaceum</i>
개발된 항균복합소재 (A)	13	20	20	23
계면활성제				
코코베타인+A	15	19	19	28
애플계면활성제+A	15	19	19	28
코룸9807+A	15	19	19	28
현탁화제				
구아검+A	15	19	19	28
쟁탄검+A	14	16	16	25
젤라틴+A	13	15	14	24
유화제				
세틸알코올+A	14	16	16	25
솔루빌라이저+A	15	19	19	28
올리브리퀴드+A	13	17	16	23
레시틴프리미엄+A	14	16	16	25
점중제				
페물린+A	13	18	21	22
카보머940+A	12	17	23	21
하이셀+A	13	17	21	20
보습제				
글리세린+A	13	18	20	24
세라마이드+A	13	21	18	21
히아루론산+A	13	21	18	22
알란토인+A	13	21	19	24
트레하+A	13	21	19	24
알로에베라겔+A	13	18	20	21
보존제				
천연비타민 E+A	14	21	18	22
나프리카+A	15	19	19	28

Table 26. Antibacterial activity of bioactive compound added in powdered formulation.

성분	Inhibition zone (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. violaceum</i>
개발된 항균복합소재 (A)	13	20	20	23
네츄럴셀룰로오즈+A	14	18	17	21
부형제 수용성감초추출분말+A	14	18	18	25
솔비톨+A	14	19	19	25
중화제 뉴트럴티+A	11	18	21	24
결합제 폴리쿼터+A	14	19	19	26
전분호액+A	13	19	19	24

나. 제제 유형별 안정성 연구

개발된 항균복합소재의 활용을 위한 제제 유형별 항균소재활성 실험결과 용액, 반고형, 분립체 등의 제형에 차이 없이 무 첨가물 상태의 항균복합소재의 항균활성과 유사한 활성을 가지고 있음을 확인하였으므로 각 제제 유형에 따른 항균활성을 온도변화와 저장기간에도 유지할 수 있는지를 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 앞서 복합소재의 안정성 실험결과에 따라 온도는 10℃, 25℃, 45℃에서 기간은 7, 14, 21, 30일 동안 저장하면서 활성을 확인하였다. 용액제제는 손세정제, 반고형제제는 비누, 분립체는 마우스 사료에 항균복합소재를 첨가하여 재 성형하여 제조하였다. 제조된 각 유형별 제제들은 손세정제는 소독된 투명용기에 비누와 사료는 지퍼백에 넣어 각 온도에 해당하는 인큐베이터에 저장보관하면서 항균활성을 측정하였다.

용액제제, 반고형제제, 분립체제제 3개 적용상에 대한 온도와 저장기간에 따른 항균활성 측정결과 모든 적용상에 대하여 Table 27, 28 와 29에서 보는 바와 같이 활성의 변화 없이 안정적으로 항균활성을 유지하고 있었으며 저장기간 동안 밀봉상태에서 차광이 되지 않는 환경조건에서 보관함에도 활성이 유지되고 있는 것으로 보아 밀폐, 기밀, 차광 상태로 유지되지 않아도 그 활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각되나 추가적으로 밀폐, 기밀 상태로 활성변화 여부에 의한 실험을 수행되어야 할 것이다. 그러나 본 과제에서 개발된 최종항균복합소재는 앞서서 수행된 2종의 복합제제의 안정성 실험에서의 결과와 마찬가지로 온도와 저장기간 등에 영향을 받지 않는 안정된 소재인 것으로 적용상 연구결과로도 확인되었다.

Table 27. Effect of antibacterial activity on temperature and storage period of bioactive compound added in solution.

Temperature	Storage period (day)	Inhibition zone (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
10°C	0	13	20	20
	7	13	19	19
	14	12	21	19
	21	12	20	20
	30	12	20	19
25°C	7	14	20	20
	14	13	20	20
	21	13	19	20
45°C	30	12	19	19
	7	13	19	19
	14	14	20	20
	21	13	20	19

Table 28. Effect of antibacterial activity on temperature and storage period of bioactive compound added in dispersant and semi-solid formulation.

Temperature	Storage period (day)	Inhibition zone (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
10°C	0	13	20	20
	7	13	20	21
	14	13	21	20
	21	12	21	20
	30	12	20	19
25°C	7	14	22	21
	14	14	21	21
	21	13	20	20
45°C	30	13	20	20
	7	13	20	22
	14	13	19	21
	21	13	20	20

Table 29. Effect of antibacterial activity on temperature and storage period of bioactive compound added in powdered formulation.

Temperature	Storage period (day)	Inhibition zone (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
10°C	0	13	20	20
	7	13	20	20
	14	13	21	19
	21	13	21	20
	30	13	21	20
25°C	7	14	21	21
	14	14	21	20
	21	13	20	20
	30	13	20	20
45°C	7	13	21	20
	14	13	20	21
	21	12	20	20
	30	13	20	19

다. 품질평가

용액제제, 반고형제제, 분립체제제 3개의 적용상으로 항균복합소재가 활용되어 제작되어진 손세정제, 천연비누, 동물사료에 대하여 10°C, 25°C, 45°C 온도에서 7, 14, 21, 30일 동안 저장하면서 항균활성 측정과 함께 이 조건에서 저장된 적용상들의 외형상의 변화여부에 대한 관찰이 진행되었다. 30일 동안 3종의 적용상에 대하여 관찰하였을 때 손세정제의 경우 침전물이 다소 생기는 것을 제외하면 색깔 변화 등의 특이 사항은 볼 수 없었으며, 천연비누에서도 다소 건조해진 것 외의 다른 형태적 변화를 찾아볼 수 없었다. 동물사료도 마찬가지로 수행된 온도범위에서 형태의 변화 및 색깔 등의 어떤 물리적 변화도 나타나지 않았다 (Fig. 34).

각 적용상에서 측정된 항균활성 또한 온도와 저장기간에 상관없이 최초의 제작되었을 때의 항균활성을 유지하고 있어 안정되게 발현되고 있음을 확인하였으므로 3개의 적용상 중 어떤 형태로든 안정된 품질을 갖는 제품을 만드는데 지장이 없을 것으로 생각 된다 (Table 30).

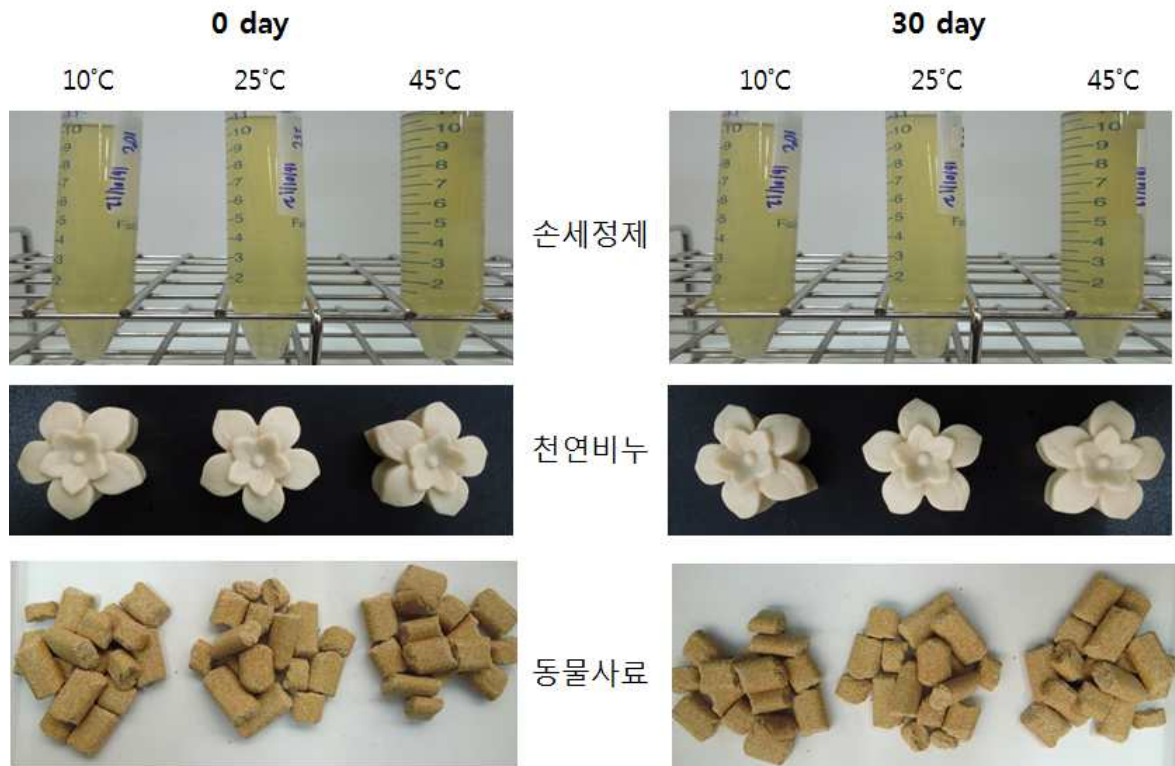


Fig. 34. Effect of solution, semi-solid formulation and powdered formulation on temperature and storage period.

Table 30. Effect of antibacterial activities on temperature and storage period of solution, semi-solid formulation and powdered formulation.

Temperature	Storage period (day)	Inhibition zone (mm)				
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>		
Solution	10°C	0	13	20	20	
		7	13	20	20	
		14	13	21	19	
		21	13	21	20	
		30	13	21	20	
		7	14	21	21	
	25°C	14	14	21	20	
		21	13	20	20	
		30	13	20	20	
		45°C	7	13	21	20
			14	13	20	21
			21	12	20	20
30	13		20	19		
Dispersant and semi-solid formulation	10°C		0	13	20	20
			7	13	20	20
		14	13	21	19	
		21	13	21	20	
		30	13	21	20	
		7	14	21	21	
	25°C	14	14	21	20	
		21	13	20	20	
		30	13	20	20	
		45°C	7	13	21	20
			14	13	20	21
			21	12	20	20
30	13		20	19		
Powdered formulation	10°C		0	13	20	20
			7	13	20	20
		14	13	21	19	
		21	13	21	20	
		30	13	21	20	
		7	14	21	21	
	25°C	14	14	21	20	
		21	13	20	20	
		30	13	20	20	
		45°C	7	13	21	20
			14	13	20	21
			21	12	20	20
30	13		20	19		

라. 안전성 평가

(1) 급성경구독성시험

본 과제에서 개발된 항균 복합소재의 적용을 위한 대상 중 하나인 동물사료 첨가물로써 안전성을 확인하기 위한 첫 번째 단계로서 급성경구독성시험을 진행하였다. 항균복합소재를 0, 5, 50, 500 및 2000 mg/kg · bw 농도로 투여한 후 14일 동안 관찰한 결과, 모든 실험구에서 사망한 쥐는 관찰되지 않아 LD 50은 2000 mg/kg · bw으로 추정하였다 (Table 31). 사망률 뿐만 아니라 항균복합소재 투여 직후부터 6시간 동안 매시간 대조군 및 투여군의 어떠한 이상소견 (보행장애, 행동이상, 웅크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뛰어오름, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등)도 관찰되지 않았으며, 관찰이 진행된 14일 동안 1일 1회씩 동물의 임상증상을 관찰한 결과 특이한 임상적 이상 증상은 관찰되지 않았다.

암수마우스에 항균복합소재를 투여한 후 14일 동안 일정한 간격으로 체중을 측정하여 체중의 변화를 관찰하였다. Table 32에서와 같이 대조군과 투여군에서 모두 정상적인 체중 증가가 관찰되었지만 항균복합소재 투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 체중변화는 없었으며 사료 및 음용수 섭취량도 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

항균복합소재 투여 후 14일 째에 투여군과 대조군의 부검을 실시하였으며 (Fig. 35) 적출한 rks, 비장, 신장, 위 등의 장기를 육안으로 관찰한 결과 무게변화나 육안관찰 상의 이상이 발견되는 장기는 없었다 (Table 33). 부검일 안와정맥을 통해 혈액을 취한 후 혈액생화학 적 검사에 대한 ALP, AST, ALT, cholesterol, triglyceride, creatinine, Blood Urea Nitrogen, globulin, protein, Albumin/Globulin Ratio를 측정하였다. 대조군과 항균복합소재의 평균값과 표준편차로 결과를 비교한 결과 항균복합소재의 투여에 따른 유의성 있는 변화는 발견되지 않고 모든 실험군과 대조군에서 정상범위를 나타내었으며, 실험구 간에 통계학적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다 (Table 34).

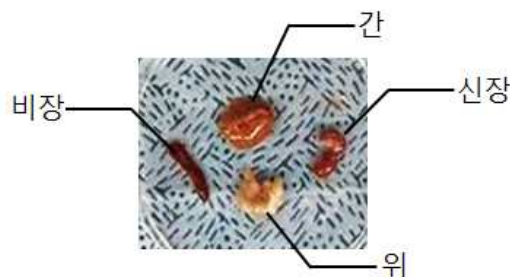


Table 31. Mortality in mouse orally treated with final antibacterial compound.

Sex	Group (mg/kg ·bw)	Day after treatment															LD50 (mg/kg)
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>2000 mg/kg
	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	50	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
Male	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>2000 mg/kg
	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	50	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

Table 32. Body weight in ICR mouse treated with final antibacterial compound.

Sex	Group (mg/kg ·bw)	No of animal	Body Weight (g)						
			0 day	3 day	5 day	7 day	9 day	11 day	14 day
Female	0	5	27.17 ±2.09	28.07 ±2.16	29.58 ±2.36	30.07 ±1.82	30.87 ±2.22	31.06 ±2.00	32.60 ±2.51
	5	5	26.44 ±1.04	26.74 ±1.07	27.91 ±0.72	29.12 ±1.07	29.11 ±1.00	29.83 ±1.34	30.20 ±1.73
	50	5	27.07 ±1.65	28.32 ±1.42	30.22 ±1.62	31.78 ±1.87	31.46 ±2.15	31.14 ±0.91	32.81 ±1.44
	500	5	26.87 ±1.29	27.53 ±1.16	29.18 ±1.38	30.92 ±2.07	31.03 ±1.81	31.32 ±2.24	33.25 ±2.53
	2000	5	26.66 ±1.67	27.07 ±1.62	28.66 ±2.14	30.19 ±2.72	30.36 ±2.48	30.39 ±2.24	31.37 ±2.69
Male	0	5	32.47 ±1.85	33.43 ±2.06	35.49 ±2.72	36.35 ±2.98	37.69 ±3.38	38.20 ±3.79	39.48 ±3.62
	5	5	33.36 ±1.70	34.27 ±2.16	36.03 ±1.48	39.51 ±1.64	39.75 ±1.79	40.43 ±2.17	42.08 ±2.07
	50	5	32.35 ±2.61	33.26 ±2.61	35.31 ±2.95	37.29 ±3.17	37.71 ±3.16	38.44 ±3.06	40.17 ±3.67
	500	5	32.36 ±2.02	33.14 ±2.23	35.02 ±2.38	34.37 ±2.68	37.60 ±2.88	38.04 ±3.09	40.17 ±3.27
	2000	5	31.78 ±2.00	33.88 ±1.94	35.33 ±2.11	38.03 ±2.43	38.53 ±2.73	39.16 ±2.77	40.83 ±3.53

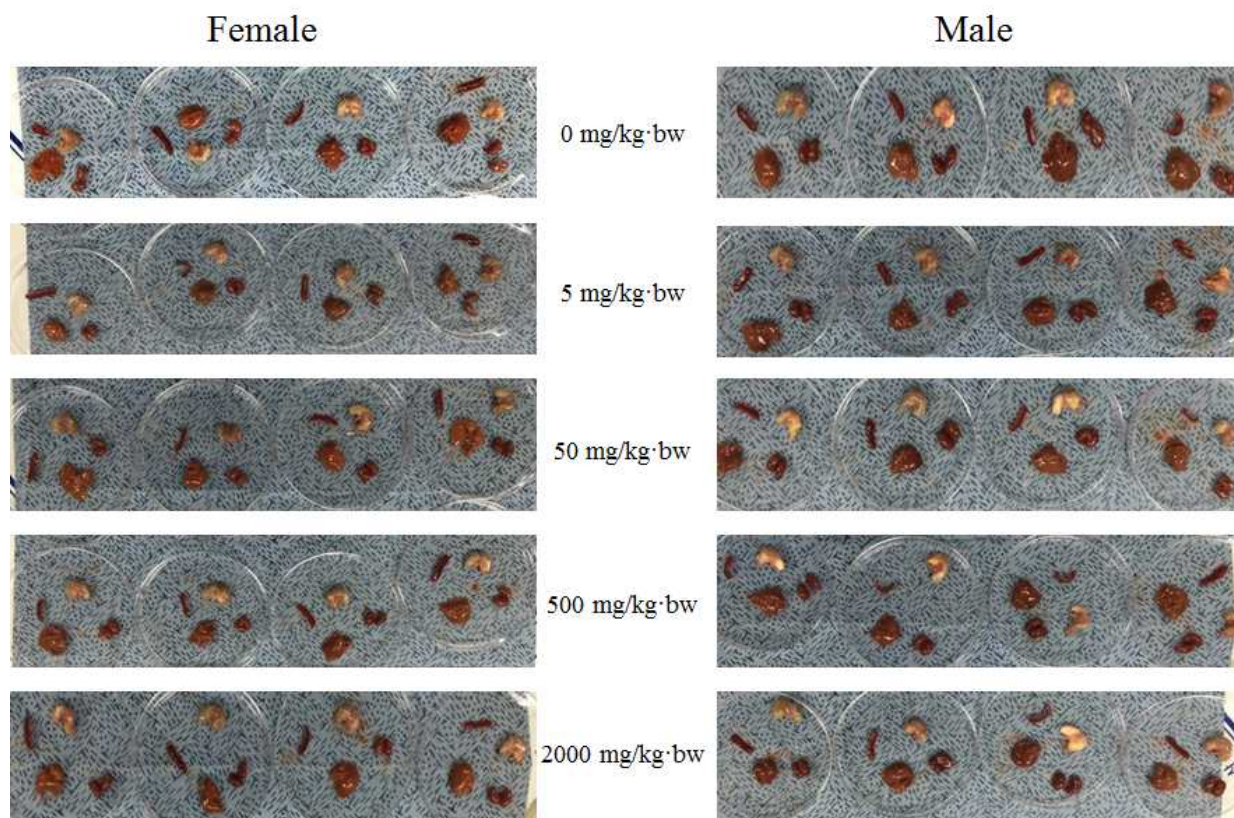


Fig. 35. Dissection in mouse orally treated with final antibacterial compound.

Table 33. Absolute organ weights for mouse orally treated with final antibacterial compound.

Sex	Group (mg/kg·bw)	No of animal	Weight of Organs (g/100g·bw)			
			Liver	Stomach	Kidney	Spleen
Female	0	5	0.36±0.09	0.23±0.04	0.12±0.03	0.04±0.01
	5	5	0.28±0.03	0.21±0.03	0.10±0.01	0.03±0.01
	50	5	0.37±0.06	0.25±0.02	0.12±0.01	0.04±0.01
	500	5	0.36±0.07	0.24±0.04	0.12±0.02	0.04±0.01
	2000	5	0.34±0.06	0.22±0.04	0.11±0.03	0.04±0.01
Male	0	5	0.54±0.12	0.32±0.07	0.22±0.05	0.05±0.01
	5	5	0.6±0.08	0.30±0.03	0.26±0.04	0.05±0.01
	50	5	0.52±0.11	0.31±0.07	0.24±0.07	0.04±0.01
	500	5	0.56±0.10	0.31±0.04	0.23±0.05	0.05±0.02
	2000	5	0.56±0.11	0.33±0.05	0.25±0.04	0.05±0.01

Table 34. Levels of hematological analysis in mouse orally treated with final antibacterial compound.

Sex	Group (mg/kg. bw)	N	Albumin (g/dL)	Bilirubin (mg/dL)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Glucose (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Globulin (g/dL)	Protein (g/dL)	A/G ratio
Female	0	5	4.1±0.2	< 0.1	122.2±19.4	128.8±10.4	46.6±1.8	77.4±8.6	117.0±18.6	193.0±51.9	< 0.20	17.1±3.7	1.5±0.1	5.6±0.3	2.8±0.2
	5	5	4.2±0.0	< 0.1	159±23.7	110.2±24.2	58.4±13.0	73.2±9.8	112.2±2.8	146.8±33.9	< 0.20	21.7±4.3	1.4±0.1	5.6±0.1	2.9±0.2
	50	5	4.1±0.1	< 0.1	149.2±59.7	149.2±20.6	66.4±17.6	64.2±10.0	111.6±22.6	217.4±40.1	< 0.20	18.2±1.7	1.5±0.1	5.6±0.2	2.7±0.1
	500	5	4.3±0.2	< 0.1	121.8±17.6	187.2±55.0	83.4±29.8	83.6±13.0	118.0±12.6	175.6±36.1	< 0.20	20.2±3.8	1.6±0.1	5.9±0.2	2.7±0.2
	2000	5	4.2±0.2	< 0.1	153.4±68.9	145.8±14.5	65.4±13.6	74.0±8.8	121.4±43.9	187.4±51.9	< 0.20	18.6±5.6	1.7±0.1	5.9±0.3	2.6±0.2
Male	0	5	3.8±0.1	0.1±0.0	126.4±14.9	163.2±21.3	132.0±41.9	76.6±9.2	195.8±35.6	172.6±48.9	< 0.20	21.3±3.8	1.9±0.1	5.7±0.1	2.0±0.1
	5	5	3.8±0.2	< 0.1	151.4±39.2	119.0±30.5	75.4±18.4	69.8±7.9	172.6±25.6	239.4±80.5	< 0.20	19.0±0.7	1.9±0.2	5.7±0.4	2.1±0.1
	50	5	3.9±0.2	0.1±0.1	151.6±15.8	113.6±36.5	75.6±25.8	78.4±8.7	202.6±23.7	255.8±56.5	< 0.20	20.4±2.6	1.8±0.1	5.7±0.2	2.2±0.2
	500	5	3.8±0.3	< 0.1	121.6±21.2	111.2±25.3	96.2±26.1	67.2±14.0	177.6±5.9	208.4±45.7	< 0.20	18.5±3.0	1.8±0.1	5.7±0.3	2.1±0.2
	2000	5	3.7±0.1	< 0.1	137.2±50.2	114.0±23.7	153.4±83.8	74.2±8.9	166.0±25.9	234.4±63.8	< 0.20	17.6±2.5	2.0±0.1	5.7±0.1	1.9±0.1

All values are expressed as mean ± SD. ALP, Alkaline phosphatase; AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; BUN, Blood Urea Nitrogen; A/G, Albumin/Globulin Ratio

(2) 피부자극시험

본 과제에서 개발된 항균 복합소재의 적용 대상으로 손세정제와 비누와 같은 피부에 접촉하는 활용연구를 진행하기 위하여 마우스를 이용하여 피부자극시험을 진행하였다. 시험 물질의 적용 24시간 전에 마우스의 등을 상처가 생기지 않도록 면도기를 이용하여 털을 제거하였다. 시험 당일 제모한 마우스의 등에 척추를 중심으로 1.0 cm 간격으로 3개의 1.5 cm 지름의 원을 그려 표시하였고 대조군으로 증류수, 각 적용상의 base 에 해당하는 알코올과 비누 base, 처치부에 base에 항균복합소재를 섞어서 골고루 도포하고 시험부위 전체를 거즈로 덮고 탄력붕대로 감싼 다음 종이테이프로 가장자리를 잘 고정하였다. 실험물질 도포 4시간 후 거즈를 제거하고 피부에 영향을 미치지 않도록 증류수로 씻어내고 24, 48, 72 시간 후에 CTFA 안전성 평가 가이드라인에 따라 “DRAIZE 피부 자극성 점수 시스템” 을 참고하여 평가하여 항균복합소재에 의한 피부 자극성을 피부 1차 자극성 인덱스(PDI)를 산출하여 판정하였다.

항균복합소재의 피부 도포 후 3일간의 관찰기간 동안 도포된 부위에서 시험물질로 인한 특이한 일반증상이 관찰되지 않았으며 홍반-가피현상 및 부종이 없는 피부 1차 자극지수가 “0” 으로 5000 mg/ml 용량에서 비자극성 물질로 평가되어 피부자극에 부작용을 유발하지 않는 것으로 결정되었다 (Fig. 36).



Fig. 36. Skin Irritation studies on final antibacterial compound.

2. 적용상 연구기반 산업화 연구

가. 액상 연구결과를 이용한 제품화 연구

항균 단일/복합소재의 적용상 연구를 통하여 본 과제에서 최종 선발된 항균복합소재 (신호전달교란 활성복합물 6번+항균활성복합물 2번)가 용액제제, 반고형제제, 분립체제제 등 3개의 형태에서도 항균활성을 온도와 저장기간에 상관없이 유지되며 안전성 실험결과 경구투여 및 피부접촉에도 안전하다는 것을 확인하였다.

용액제제 중 손세정제는 위생을 위해서 가장 많이 사용되는 항균제제일 뿐 아니라 항균 티슈로의 활용에도 적용할 수 있음으로 액상 제품화를 위한 대상으로 결정하여 일반적으로 알려진 다양한 레시피 중 4개를 선택하여 제작 후 이에 대한 항균활성을 측정하였으며(Table 35, Table 36) 실제 손소독제를 사용하여 easy checher를 이용한 핸드프린트법에 의한 효과를 측정하였다. 사람마다 손에 붙어있는 균량 및 균주의 종류가 다르기 때문에 실험할 때마다 항상 일정한 결과를 기대할 수는 없지만 일반적인 경향을 이해할 수 있다. 양손을 대상으로 한쪽은 대조군으로 다른 쪽은 손 세정제를 적용하여 씻은 후에 손바닥 모양의 배지에 찍어 배양한 후 비교하였다. 예상대로 사람간의 차가 컸으나 10^2 cells 이 10^0 cells 단위로 바뀌는 정도의 변화를 확인할 수 있어 제작된 손세정의 효능이 있다고 추측할 수 있다 (Table 37).







Table 35. Compositions for manufacture of hand sanitizer.

A		B		C		D	
에탄올	70 ml	에탄올	60 ml	에탄올	70 ml	에탄올	70 ml
증류수	29 ml	증류수	39 ml	증류수	29 ml	증류수	25 ml
올리브리퀴드	1 ml	히아루론산	1 ml	히아루론산	1 ml	글리세린	5 ml
아로마	10방울	아로마	10방울	알로에베라겔	37 g	아로마	25방울
항균활성복합물	1 g	항균활성복합물	1 g	항균활성복합물	1 g	항균활성복합물	1 g
총량	100 ml	총량	100 ml	총량	100 ml	총량	100 ml

Table 36. Effect of antibacterial activity on hand sanitizer.

Recipe	Inhibition zone (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
A	12	20	20
B	13	22	21
C	12	21	20
D	12	20	19

Table 37. Total cell counts before and after hand cleaning by hand sanitizer.

Test	Before	After
A	 5.53×10^2 cells	 1.5×10 cells
B	 3.1×10^2 cells	 3 cells
C	 1.6×10^2 cells	 2 cells

나. 고상 연구결과를 이용한 제품화 연구

반고형제제 중 비누는 흡착, 흡윤, 계면장력 저하, 유화, 가용화, 분산 등의 복잡한 물리·화학적 작용에 의해서 물체표면에 부착된 오염물질을 제거하기 위해 사용되는 혼합물질로 세계적으로 품질 수준의 차이가 거의 없고 수출입 물량이 적은 내수 소비 산업으로 생활 수준 향상과 함께 생활필수품으로 급속히 성장해 왔다.

비누는 천연세제의 일종으로 오랫동안 사용한 역사로 사람이나 가축에게 무해하다는 것이 증명되었으나 건강한 삶과 소비를 우선시 하는 웰빙이라는 트렌드로 인해 향균, 향산화, 미백, 보습 등 다양한 기능성 물질이 함유되어 있는 제품이 각광을 받고 있으며, 일반 세제

에 적용이 가능함으로 고상 제품화를 위한 대상으로 결정하여 일반적으로 알려진 레시피 중 4개를 선택하여 제작 후 이에 대한 항균활성을 측정하였다 (Table 38, Table 39). 손소독제의 경우와 마찬가지로 easy checher를 이용한 핸드프린트법에 의한 효과도 측정하였다. 양손을 대상으로 한쪽은 대조군으로 다른 쪽은 천연비누를 적용하여 씻은 후에 손바닥 모양의 배지에 찍어 배양한 후 비교하였다. 손소독제의 경우와 마찬가지로 사람간의 차가 컸으나 cell count의 변화를 확인할 수 있어 제작된 항균비누가 효과가 있을 것으로 사료된다 (Table 40).

사료첨가제로서 안전성이 일부 확인됨에 따라 사료 첨가제로서의 가능성을 확인하기 위하여 살모넬라, 병원성대장균, 환경에 분포가 많이 되어 있는 바실러스 세레우스에 대하여 억제효과를 확인하였으며, 살모넬라는 12.5 mg/ml, 병원성대장균은 25 mg/ml, 바실러스 세레우스는 6.25 mg/ml의 최소억제 농도를 가지고 있음을 확인할 수 있었으며 (Table 41) 안전성 실험과 동시에 분변시료를 채취하여 총 균수의 변화를 조사하였으나 단회투여로 인한 유의적인 결과는 없었다.

Table 38. Compositions for manufacture of solid soap

A		B		C		D	
비누베이스	97 g	비누베이스	97 g	비누베이스	95 g	비누베이스	95 g
호호바오일	1 g	아로마	20 방울	아로마	23방울	달맞이유	1.5 g
글리세린	1 g	글리세린	1 g	타마누오일	1 g	세라마이드	2 g
토코페롤	0.5 g	녹차씨오일	1 g	알란토인분	0.5 g	비타민 E	1 g
아로마	20 방울			트레하	3 g		
항균활성복합물	1 g	항균활성복합물	1 g	항균활성복합물	1 g	항균활성복합물	1 g
총량	100 g	총량	100 g	총량	100.5 g	총량	100 g

Table 39. Effect of antibacterial activity on solid soaps.

Recipe	Inhibition zone (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
A	13	19	19
B	12	21	19
C	12	20	20
D	12	20	19

Table 40. Total cell counts before and after hand cleaning by natural soap.

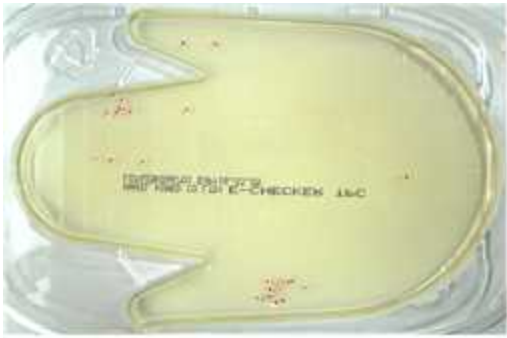

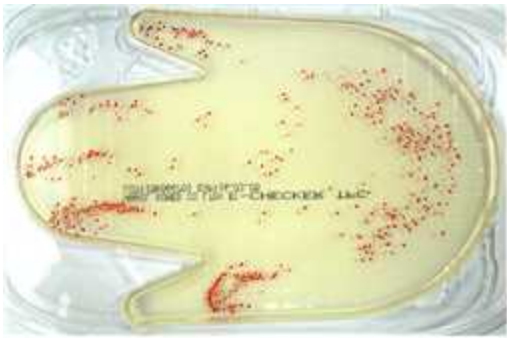



Test	Before	After
A	 4.8×10 cells	 2.5×10 cells
B	 6.86×10^2 cells	 9.1×10 cells
C	 2.1×10 cells	 1 cell

Table 41. Effect of antibacterial activity on animal feed.

Concentrations (mg/g)	Inhibition zone (mm)		
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Samonella</i> sp.	<i>B. cereus</i>
6.25	-	-	11
12.5	-	8	13
25	8	10	16
50	10	13	18
100	13	16	20

다. 제품화를 위한 추가 항균활성 연구

앞서 수행된 액상 및 고상 연구결과를 이용한 제품화 연구 외에 또 다른 제품개발에 적용가능성을 확인하기 위한 추가 연구를 수행하였다.

Y. enterocolitica 는 사람과 동물 모두에서 세균감염을 일으키는 인수공통감염균으로 사람에서는 직접적인 식중독을 일으키며 돼지가 숙주지만 다른 동물의 장에도 존재하면서 배설물이 식수 및 주변환경에 오염됨으로서 식중독의 원인균이 된다. 특히 저온에도 생존하기 때문에 동물사료에 천연항균제로서 첨가하여 이를 제어할 수 있다면 식중독으로 인한 경제적 손실을 줄일 수 있을 것으로 생각된다. *Y. enterocolitica* 대상으로 억제효과를 확인하기 위하여 기존 사료에 항균활성복합물을 첨가하여 재성형 후 억제효과를 확인하였다 (Fig. 37). 항균복합물과 신호전달 교란복합물을 각각 1:1=50 mg/ml:50 mg/ml, 2:1=50 mg:25 mg/ml, 1:2=25 mg/ml:50 mg/ml로 비율로 조합하여 실험한 결과 항균복합물이 50% 만 첨가되어도 *Y. enterocolitica* 억제활성이 1:1 비율과 동일하게 나타나는 것으로 확인되었으며(Table 42) 이들을 사용하는 최소억제농도는 3.125 mg/ml로서 앞서 확인된 *E. coli*, *B. cereus*, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*와 비교하였을 때 가장 효과가 좋았다 (Table 43).

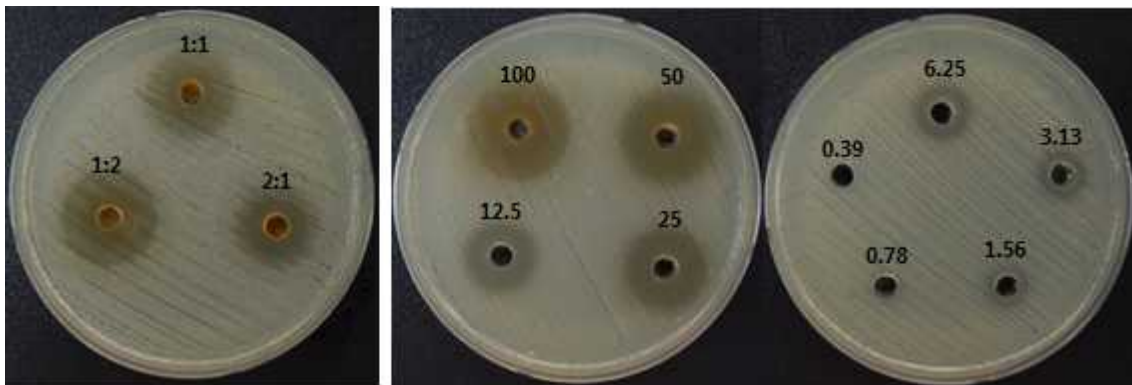


Fig. 37. Antibacterial activities of final compound (anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2) against *Y. enterocolitica*.

Table 42. Antibacterial activities of compounds mixed by various ratio of anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2 and 7 against *Y. enterocolitica*.

	Antibacterial compound 2 + Anti-quorum compound 6		
	1:1	2:1	1:2
Diameter of inhibitory zone (mm)	21	18	22

Table 43. Minimum inhibitory concentration (MIC) of final compound (anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2) against *Y. enterocolitica*.

Strain	Concentrations (mg/ml)								
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
<i>Y. enterocolitica</i>	24	21	19	16	12	10	-	-	-

또 다른 적용연구의 예는 구강관련 편의용품의 첨가제로서 가능성을 확인하였다. 최근 트렌드는 구강의 건강관리를 위해 치약 또는 구강청결제 등 구강용 세정 조성물의 선택이 점점 중요해지고 있다. 이와 더불어 소비자의 다양한 욕구를 충족시키기 위해 확확물보다는 친환경 천연자원을 소재로 한 생약이나 식물 추출물에 대한 인식이 증가되고 있으므로 이미 경구투여 및 피부자극에 대한 안전성이 확보되어 있으므로 구강관련 미생물에 대한 활성만 확인 된다면 근시일내 제품화가 가능하다는 장점이 있다.

5개 중요 식중독균은 이미 앞선 실험에서 억제활성이 확인되었으며 치주질환의 대표적 인 *Streptococcus mutans* 에 대한 억제활성을 확인하였다. *Streptococcus mutans* 는 항균복합물과 신호전달 교란복합물의 비율별 조합에 의한 결과, 신호전달 교란복합물보다 항균복합물이 50% 적은 양으로 첨가되어도 동일한 효과를 나타내었던 다른 미생물과는 달리 항균복합물의 양이 증가할수록 더 높은 활성을 보이는 것을 확인하였다 (Table 44). 또한 이들을 사용하는 최소억제농도는 3.125 mg/ml로서 앞서 확인된 *Y. enterocolitica* 의 활성과 같은 것으로 나타났다 (Table 45).

Table 44. Antibacterial activities of compounds mixed by various ratio of anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2 and 7 against *S. mutans*.

Compound	Antibacterial compound 2 + Anti-quorum compound 6		
	1:1	2:1	1:2
Diameter of inhibitory zone (mm)	24	24	18

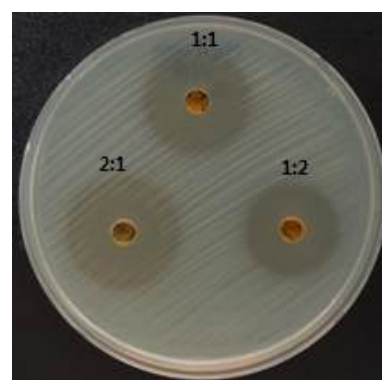
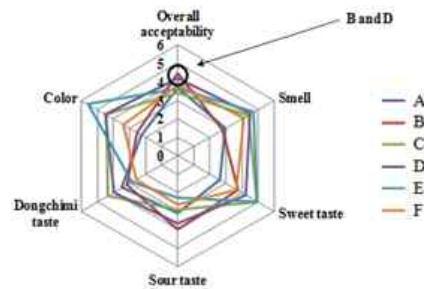


Table 45. Minimum inhibitory concentration (MIC) of final compound (anti-quorum sensing compound 6 and antibacterial compound 2) against against *S. mutans*.

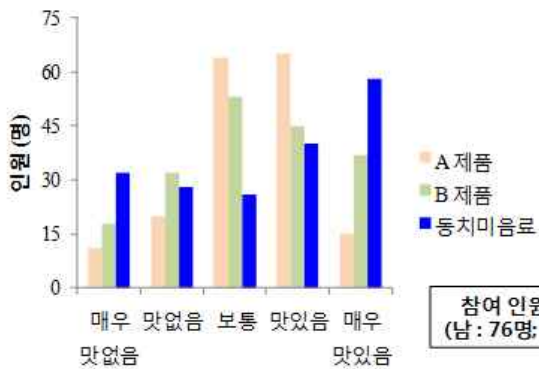
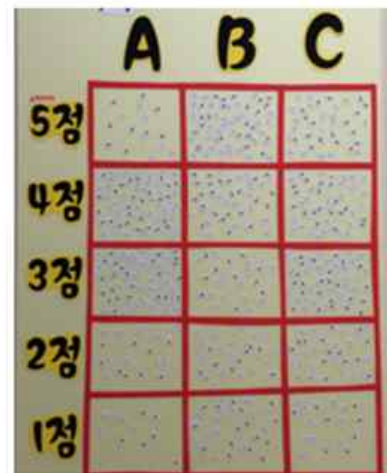
Strain	Concentrations (mg/ml)								
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
<i>S. mutans</i>	25	24	20	17	13	10	-	-	-

동치미 (양하 물추출물) 를 이용한 제품 개발

동치미 음료 (특허출원 예정)



동치미 A제품 음료 B제품



참여 인원 : 175명
(남 : 76명, 여 : 99명)



제 7 절 신호전달 교란 및 항균활성 복합소재에 의한 미생물 대사체 비교 분석 (위탁과제)

1. *Y. enterocolitica* 균체 및 배지 대사체 분석

*Y. enterocolitica*의 생육시기별 균체 및 배지내 대사체 프로파일의 변화를 분석하기 위하여 *Y. enterocolitica*를 6, 12, 24, 48시간동안 배양한 후 균체와 배지를 원심분리를 이용하여 분리한 후 유도체화하여 GC/MS를 이용하여 분석하였다 (Fig. 38). 균체 및 배지의 GC/MS data를 PLS-DA 다변량통계분석 방법을 이용하여 분석한 후 scores plot과 loading plot을 작성하였다. 배지인 경우 PLS-DA scores plot (Fig. 39A) 상에서 생육시기별로 유의적으로 ($p=0.065$) 구별되는 것을 확인하였고 통계적으로 전혀 문제가 없는 것으로 확인되었다 (Fig. 9 C and D). 그러나 균체 대사체 분석결과 PLS-DA scores plot 상에서 생육시기별로 구별되는 것처럼 보이지만 통계적으로 유의하지 않은 것으로 확인되었다 (Fig. 39- II).

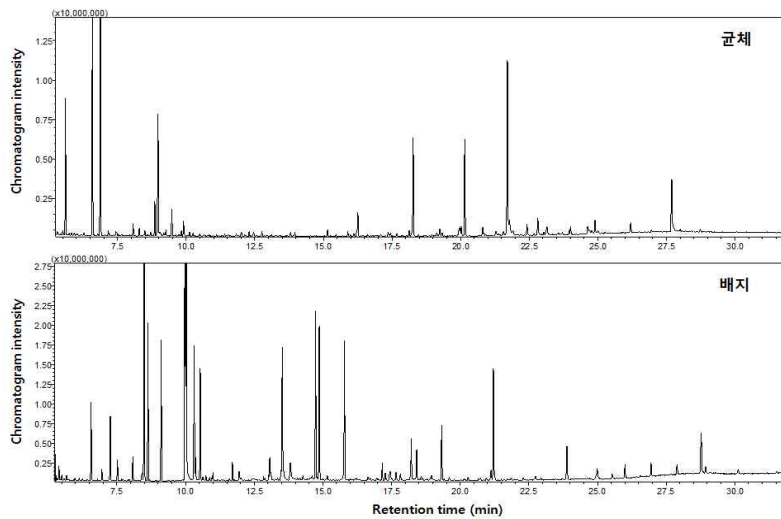


Fig. 38. Representative GC/MS profiles of *Y. enterocolitica* and its growth media.

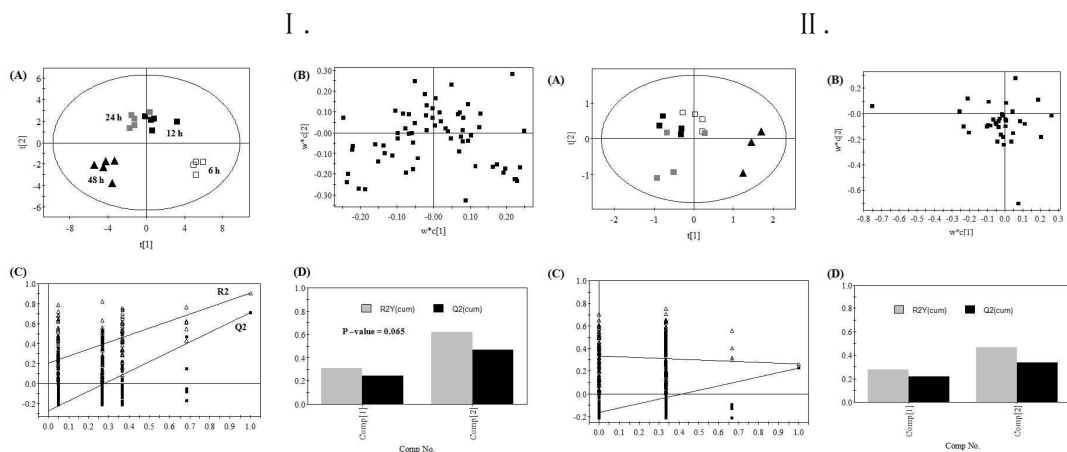


Fig. 39. GC/MS-based metabolomic analysis of the growth media(I) of *Y. enterocolitica* and *Y. enterocolitica* (II) at different growth stage.

생육시기별 *Y. enterocolitica* 균체 및 배지 대사체들 중 유의적으로 차이를 보이는 대사물질을 동정한 결과 배지에서는 glycine, glutamic acid, succinic acid, fumaric acid, citric acid, aminomalonic acid, theronine (Fig. 40), 균체에서는 succinic acid와 tetradecanoic acid가 동정되었다 (Fig. 41). 배지인 경우 대부분의 대사물질들이 6시간 이후 급격히 감소하는 경향을 보이는 반면 citric acid는 생육시기가 증가할수록 함량이 증가하는 것으로 관찰되었다. 감소된 대사물질들인 경우 대부분 배지에서 유래된 것으로 사료된 반면 citric acid인 경우는 균체에서 생성되어 배지로 배출되는 것으로 사료된다. 균체인 경우 succinic acid가 12시간까지 증가하다가 그 이후에 감소하는 경향을 보인 반면 tetradecanoic acid는 생육시간이 증가할수록 다소 증가하다가 48시간에 급격히 증가하였다.

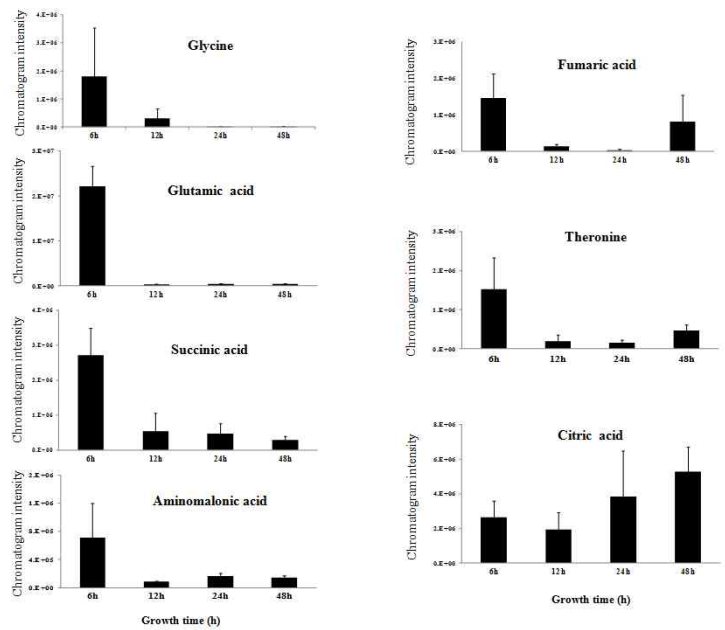


Fig. 40. Quantitative analysis of major media metabolites contributing to the separation between samples on the PLS-DA scores plot.

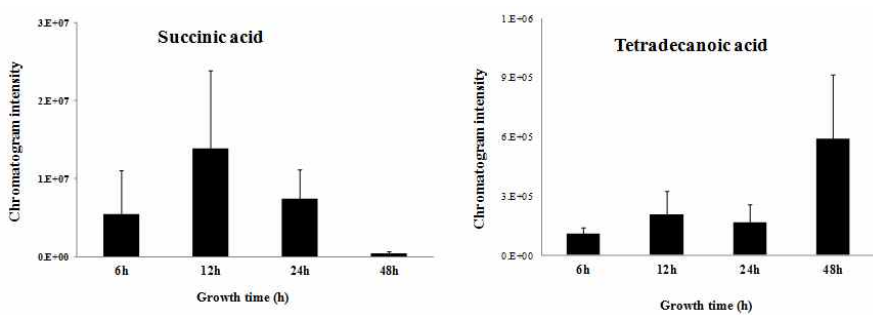


Fig. 41. Quantitative analysis of major cell metabolites contributing to the separation between samples on the PLS-DA scores plot.

2. 신호전달 교란물질 처리 *Y. enterocolitica*의 대사체 분석

가. LC/MS를 이용한 대사체 분석

양하로부터 분리한 신호전달 교란물질을 처리한 후 12시간, 24시간, 48시간 배양한 *Y. enterocolitica*의 균체와 배양에 사용된 배지에 들어있는 대사물질들의 변화를 통해 신호전달 교란물질의 처리가 균에 미치는 영향을 확인하고자 대사체 분석을 진행하였다. 50% methanol 추출물은 LUPLC-Q-TOF MS로 분석 (Fig. 42) 한 후 data processing을 거쳐 다변량 통계분석하였고 사용한 후 유의적으로 차이가 나는 대사물질들을 확인하고 동정하였다.

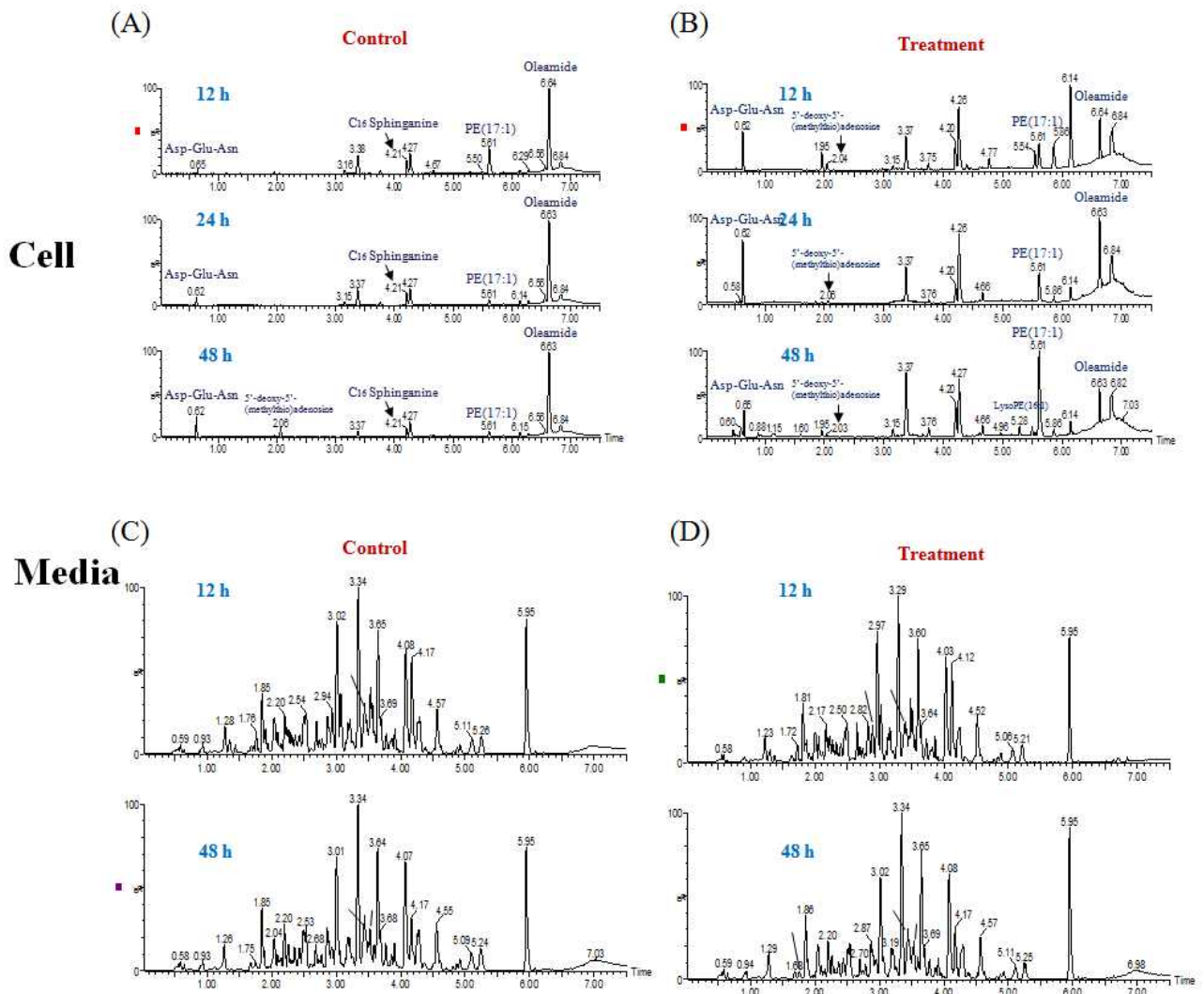


Fig. 42. Representative LC/MS profiles of *Y. enterocolitica* (A and B) and growth media (C and D) treated with the quorum sensing agent.

배양시간에 따른 균체와 배지를 LC/MS로 분석한 대사체를 PLS-DA scores plot으로 분석한 결과 배양시간에 따른 배지의 대사물질들의 변화를 감지되었지만 신호전달 교란물질의

처리에 따른 변화는 유의적으로 차이가 나지 않았다 (Fig. 43). 그러나 균체인 경우 PLS-DA scores plot 상에서 처리구와 비 처리구가 구별되는 것이 확인되었고 이때 사용한 PLS-DA model의 quality를 측정된 결과 모든 parameters (R2X, R2Y, Q2)와 교차검증이 대사체를 분석하는데 문제가 없는 것으로 확인되었다.

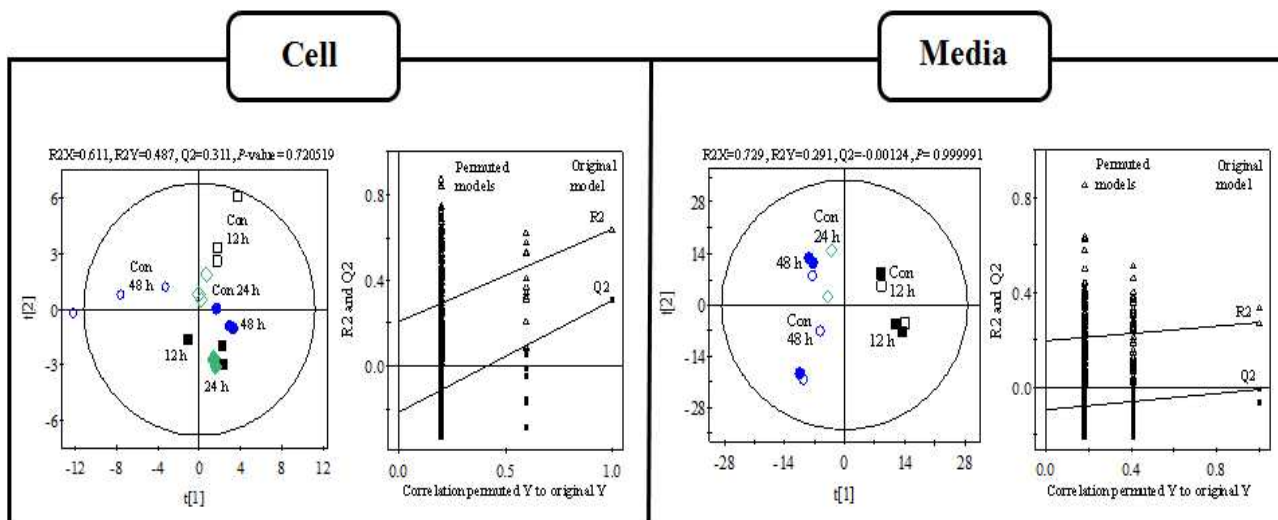


Fig. 43. PLS-DA scores plots of metabolites obtained by LC/MS from *Y. enterocolitica* and growth media treated with the quorum sensing agent. PLS-DA scores plot models querm sensing were evaluated by quality parameters (R2X, R2Y, Q2) and permutation test.

PLS-DA scores plot 상에서 차이를 보이는 균체 대사체들 중 시료들 간의 차이에 관여하는 물질들을 동정한 결과 Asp-Glu-Asn, 5'-deoxy-5-(methylthio)adenosine, C16 sphiganine, oleamide, LysoPE(16:1)가 유의적으로 차이가 나는 것으로 확인되었다 (Table 46).

특히 이들 대사체들 중에서 기존 균체에 없었던 Asp-Glu-Asn가 배양시간이 지나면서 농도가 높아진 반면 처리구에서는 배양 12시간에 존재하였다가 감소하다가 48시간에는 완전히 없어지는 것으로 관찰되었으며 oleamide의 양은 처리구에 의해서 절반이하로 감소하는 경향을 확인할 수 있었다 (Fig. 44). LysoPE (16:1)인 경우 48시간 배양 균체에서만 높게 생성되는 것을 확인하였는데 이는 신호전달 기작의 현상중 하나인 세포막을 통해 신호전달 물질을 세포밖으로 이동시키는 활동이 신호전달 교란물질의 처리로 중단되어 나타나는 현상으로 추정된다. 신호전달 교란물질의 처리로 인해 균체내 지방관련 물질들의 변화가 많이 생기는데 이는 균체의 농도가 증가되었을 때 균체는 신호전달 교란물질들인 지방 또는 펩타이드 관련 물질들을 균체 내 또는 밖으로 내보내서 균체의 농도를 조절하게 됨에 따라 이때 생성되는 지방이나 펩타이드들의 생성에 발골된 지표물질들이 관여하는 것으로 사료된다.

Table 46. Identification of major cell metabolites affected by the treatment of the quorum sensing agent.

Sample	Identity	Exact mass (M+H)	MS Fragments	P-value ^a	VIP ^b
Cell	Asp-Glu-Asn	377.13	245,133,217	0.003	1.16
	5'-deoxy-5-(methylthio)adenosine	298.09	136,75,61	0.020	1.12
	C16 Sphinganine	274.27	256, 229	0.007	1.46
	Oleamide	282.27	265, 247,177,97	0.002	1.34
	LysoPE(16:1)	452.27	311	0.047	1.14
	PE(17:1)	466.29	325	0.68	0.48

^aP-value was analyzed by one-way anova test. ^bVIP is variable importance in the project and its value of above 1.00 showing high relevance for explaining the differences of sample groups.

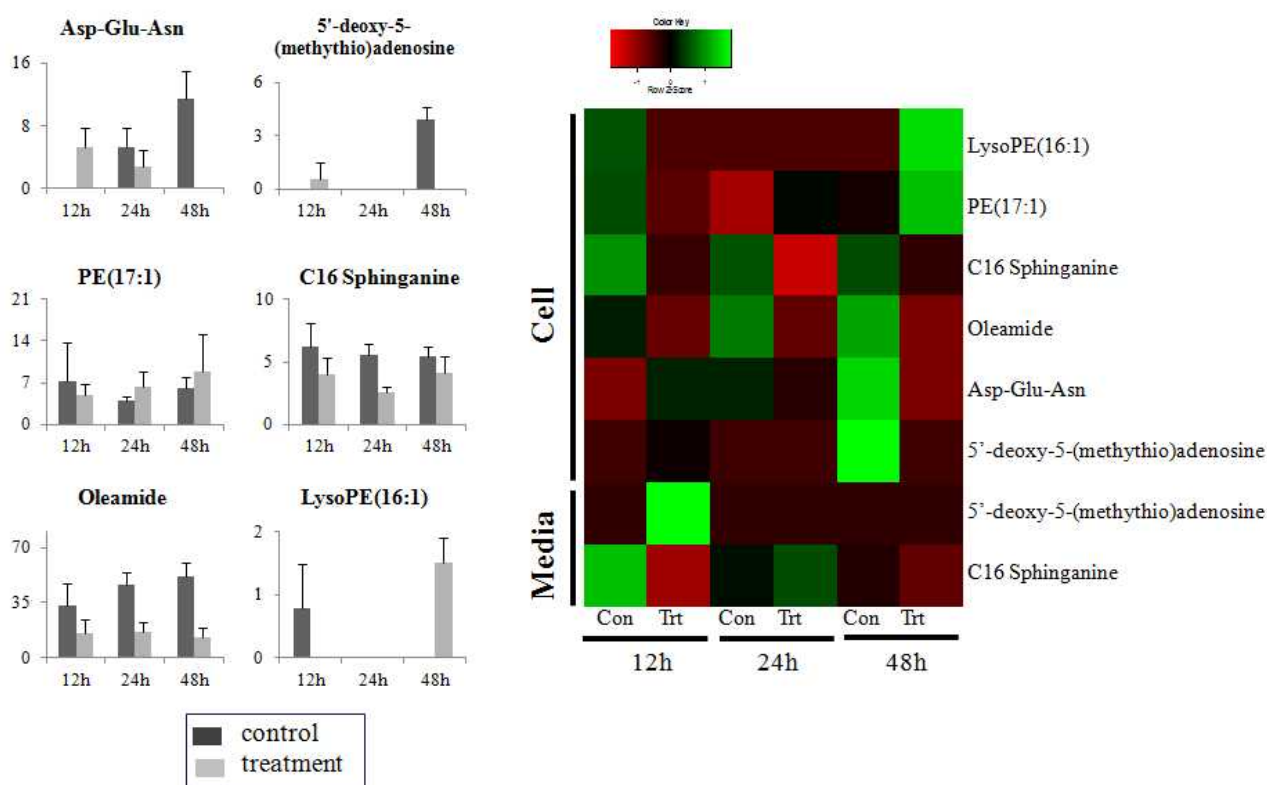


Fig. 44. Relative abundance of identified metabolites and their heat map. The heat maps were drawn by R with ggplot2 and the green-red color represents the z-score transformed raw data of soybean sprout metabolites with significant differences among sample groups. Red and green colors indicate an increase and a decrease of metabolite level, respectively.

나. GC/MS를 이용한 대사체 분석

바이오필름 형성 억제능을 갖고 있는 것으로 확인된 양하 활성성분 I, II 등을 *Y. enterocolitica*를 배양하는 배지에 처리한 후 균체 및 배지에 존재하는 대사물질들의 변화를 GC/MS로 분석하였다 (Fig. 45). 다변량통계분석한 결과 배지인 경우 양하 추출물 처리구들과 무처리구 (control)가 PLS-DA scores plot 상에서 유의적으로 ($p=0.0012$)으로 분리되는 반면 균체인 경우 유의적으로 큰 차이를 나타나지 않았다.

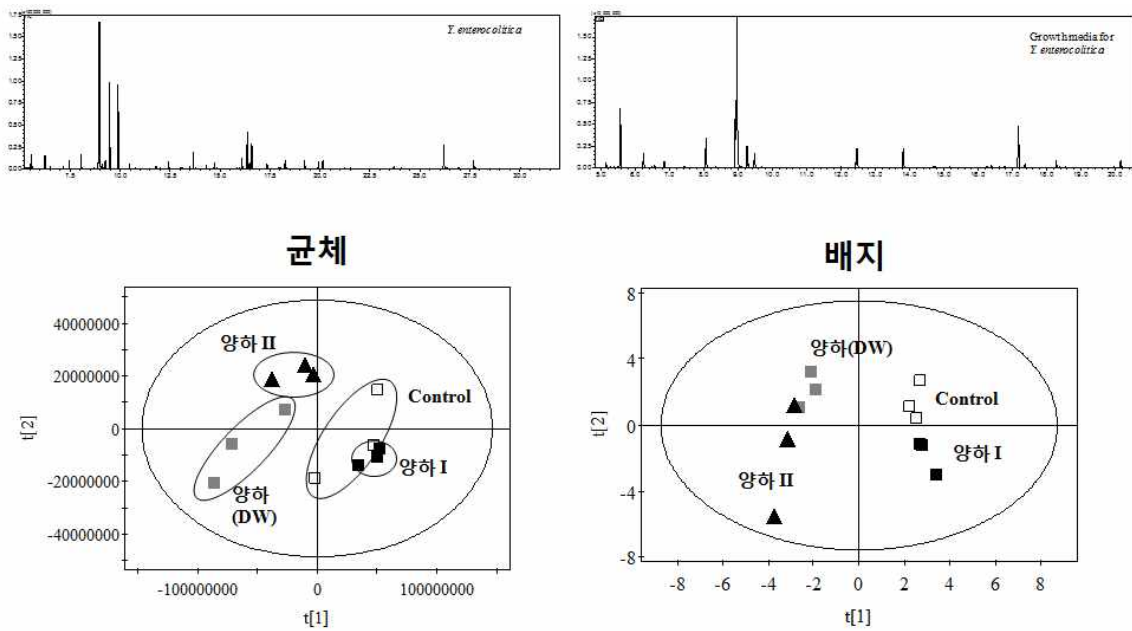


Fig. 45. Representative GC/MS profiles of *Y. enterocolitica* and its media treated with quorum sensing agent and their PLS-DA scores plots.

양하 활성 성분 처리구들과 무처리구 사이에 차이에 관여하는 물질을 동정한 결과 배지에서는 14개의 물질이 유의적으로 차이를 보였으며 비록 PLS-DA scores plot상에서 유의적인 차이를 관찰하지 못하였지만 44개의 균체 대사체 중 28개의 대사물질이 유의적으로 차이가 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 46). 미생물이 biofilm를 형성하는데 관여하는 것으로 알려진 valine인 경우 배지에서는 감소하고 균체에서는 증가하는 것으로 관찰되었으며 nicotiamide, hypoxanthine, adenosine, guanosine 등 DNA, RNA 분해과정의 부산물들의 함량이 신호전달 교란물질들을 처리한 균체 내에서 증가하는 경향을 확인하였다.

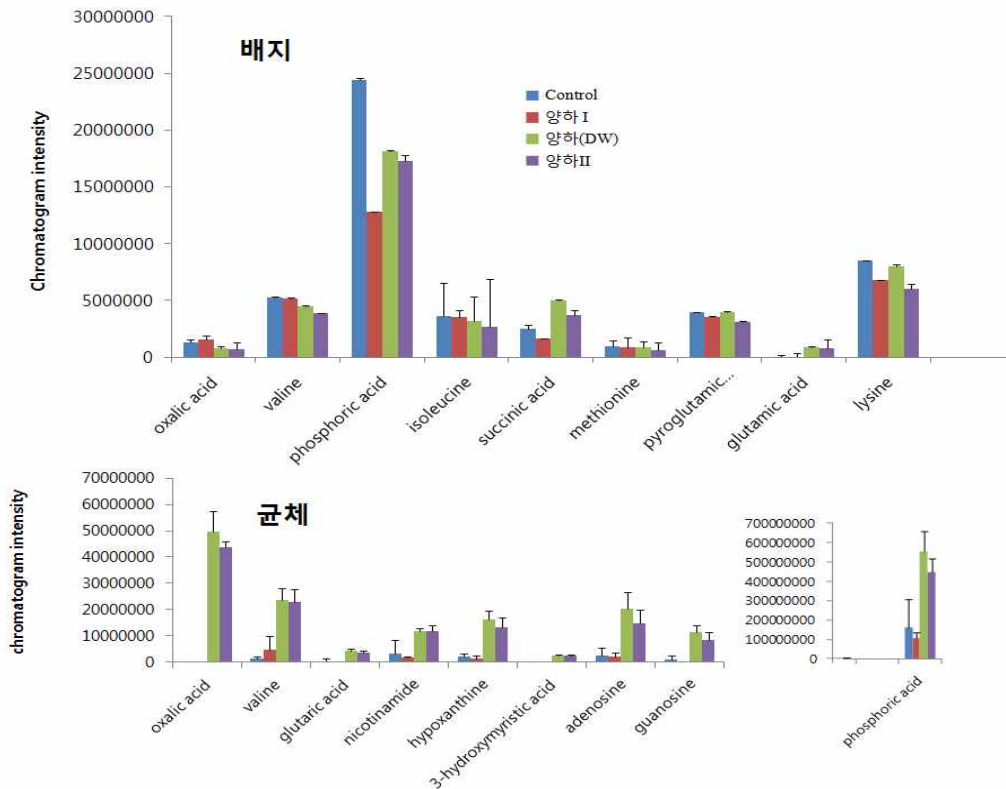


Fig. 46. Relative abundance of major *Y. enterocolitica* and its medium metabolites affected by the treatment of quorum sensing agent.

3. 항균물질 처리시 미생물 및 배지 대사체 분석

가. 항균활성을 갖고 있는 양하추출물을 처리한 배지 대사체 분석

항균능력을 갖고 있는 것으로 확인된 양하 활성성분 (양하D; ether:ethyl acetate 추출물) 을 처리한 *E. coli*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *L. monocitogenes*, *B. cereus*를 16시간동안 배양한 배지의 대사체들을 GC/MS를 이용하여 분석한 후 다변량통계분석 방법으로 분석한 결과 모든 처리구와 control 사이에 유의적인 차이가 관찰되었다 (Fig. 47).

양하 활성성분 처리구들과 무처리구 사이에 차이에 관여하는 물질을 동정한 결과 *E. coli* 배지에서는 alanine과 lysine, *S. enteritidis* 배지에서는 alanine, *Y. enterocolitica* 배지에서는 isoleucine과 3-methylglutaconic acid, *B. cereus* 배지에서는 lactic acid, threonine, glutamic acid가 유의적으로 차이를 보인 반면 *L. monocitogenes* 배지에서는 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. 또한 Alanine, lysine, isoleucine의 함량은 항균물질의 처리에 따라 감소되는 경향을 보인 반면 3-methylglutaconic acid, lactic acid, threonine, glutamic acid는 증가하는 경향을 보여주었다 (Fig. 48). *S. enteritidis* 균체에서는 항균물질 처리로 인해 phosphoric acid 만이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 48).

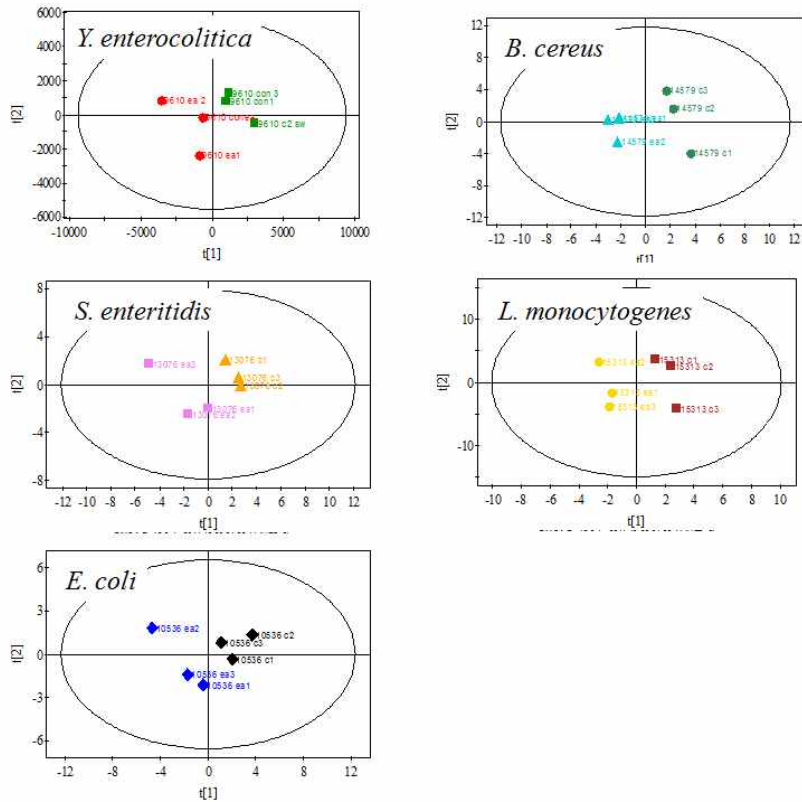


Fig. 47. GC/MS-based metabolomic analysis of the growth media of *E. coli*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, and *B. cereus* treated with *Z. mioga* extracts having antimicrobial activity

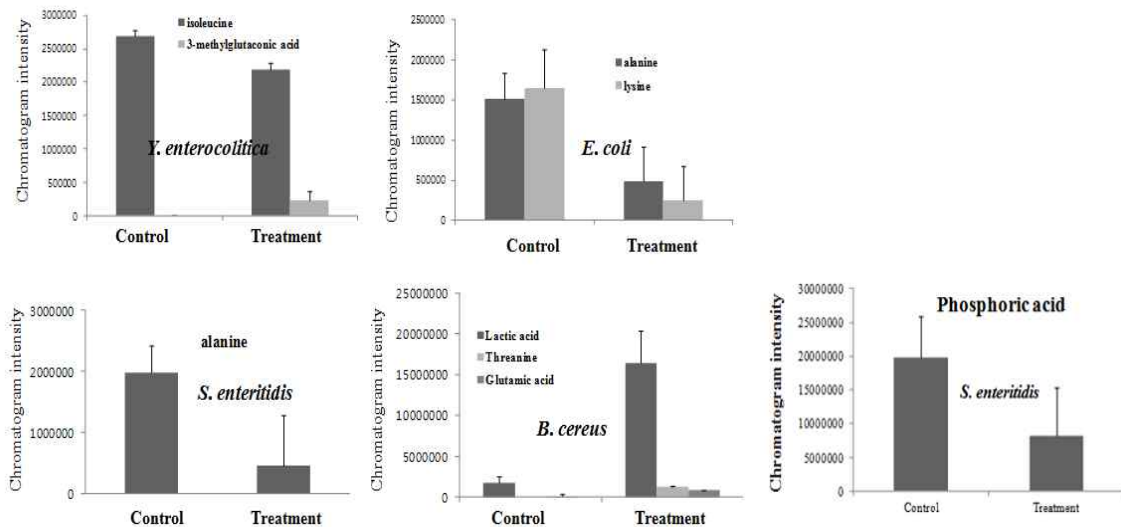


Fig. 48. Relative abundance of the growth media metabolites of *E. coli*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, and *B. cereus* treated with *Z. mioga* extracts having antimicrobial activity

나. 항균활성을 갖고 있는 복합제제를 처리한 배지 대사체 분석

항균활성을 갖고 있는 복합제제를 처리한 5개의 균체 (*E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *L. monocitogenes*, *B. cereus*) 및 이들 배지의 대사체를 UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 분석한 결과 균체의 대사체 프로파일에 큰 차이를 관찰하였다 (Fig. 49). 복합제제를 처리한 균체인 경우 소수성 계열의 물질들이 새롭게 생겨난 반면 친수성 계열의 물질들은 사라지거나 그 함량이 매우 낮은 것으로 관찰되었다. 이들 대사물질들을 다변량 통계분석한 결과 모든 균체들에서 처리구와 비처리구가 뚜렷하게 구별되는 것을 확인하였으며 관련 물질들을 동정하였다.

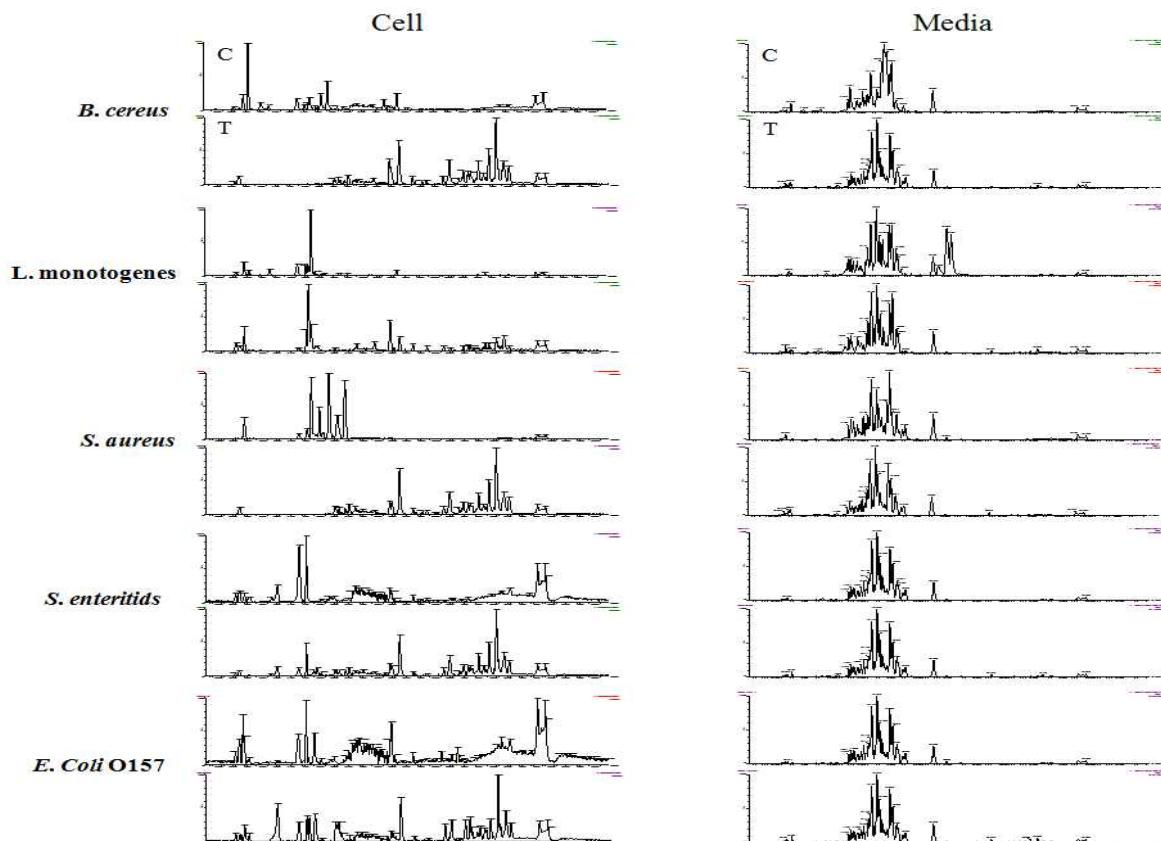


Fig. 49. Representative GC/MS profiles of *Y. enterocolitica* and its media treated with quorum sensing agent.

*E. coli*에서는 glutathione, NAD, LysoPC(C18:2)의 함량이 처리구에 의해 증가하였으나 m/z 796.63와 m/z 782.63를 갖는 물질들의 함량은 감소하였다 (Fig. 50).

*S. enteritidis*에서는 glutathione, NAD, Cys-His-Lys, retinoic acid, 13, 14-dihydro-15-keto PGF 2a isopropyl ester의 함량이 처리구에 의해 증가하였다 (Fig. 51).

*S. aureus*에서는 NAD와 Asp-Met의 함량은 처리구에 의해 감소하지만 Cys-His-Lys, LPC(C18:2)의 함량은 증가하였다 (Fig. 52).

*L. monocitogenes*에서는 Asp-Met의 함량은 처리구에 의해 감소하지만 NAD, Cys-His-Lys,

LPC(C18:2)의 함량은 증가하였다 (Fig. 53).

*B. cereus*에서는 Cys-His-Lys, LPC(C18:2)의 함량은 증가하였으며 배지에서도 Cys-His-Lys의 함량은 증가하는 반면 sucrose의 함량은 감소하였다 (Fig. 54).

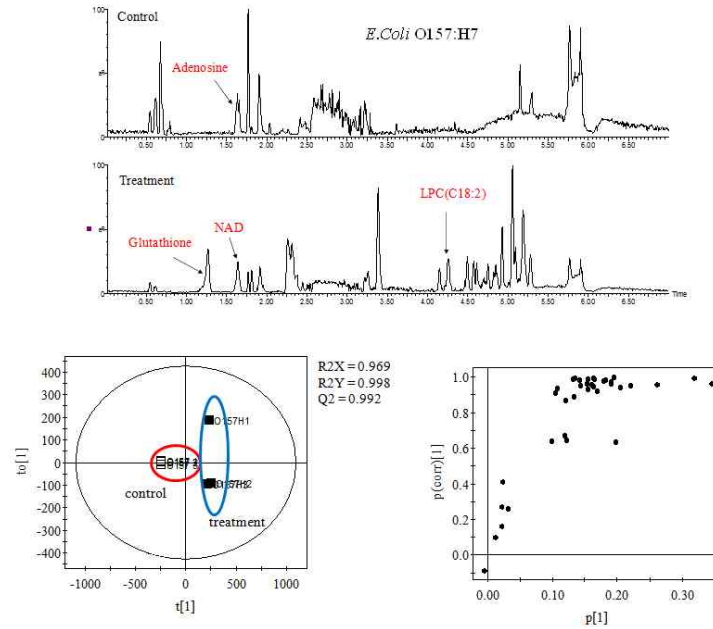


Fig. 50. Representative LC/MS profiles of *E. coli*, treated with the mixture of antimicrobial compounds and PLS-DA scores and S-plots.

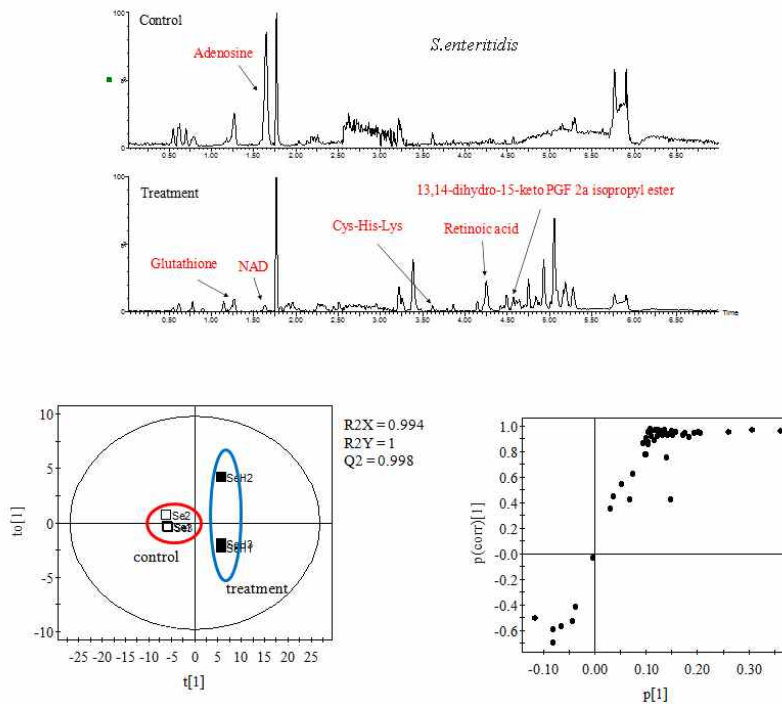


Fig. 51. Representative LC/MS profiles of *S. enteritidis* treated with the mixture of antimicrobial compounds and PLS-DA scores and S-plots.

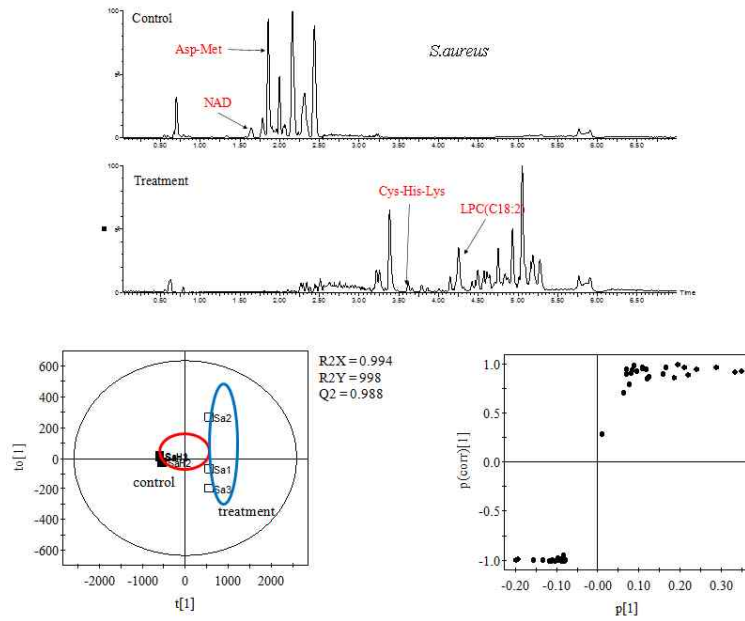


Fig. 52. Representative LC/MS profiles of *S. aureus* treated with the mixture of antimicrobial compounds and PLS-DA scores and S-plots.

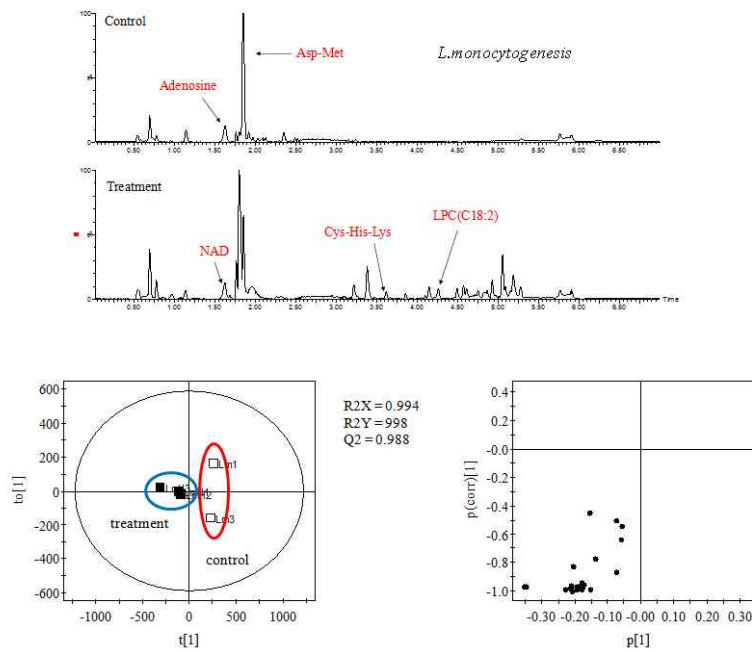


Fig. 53. Representative LC/MS profiles of *L. monocytogenes* treated with the mixture of antimicrobial compounds and PLS-DA scores and S-plots.

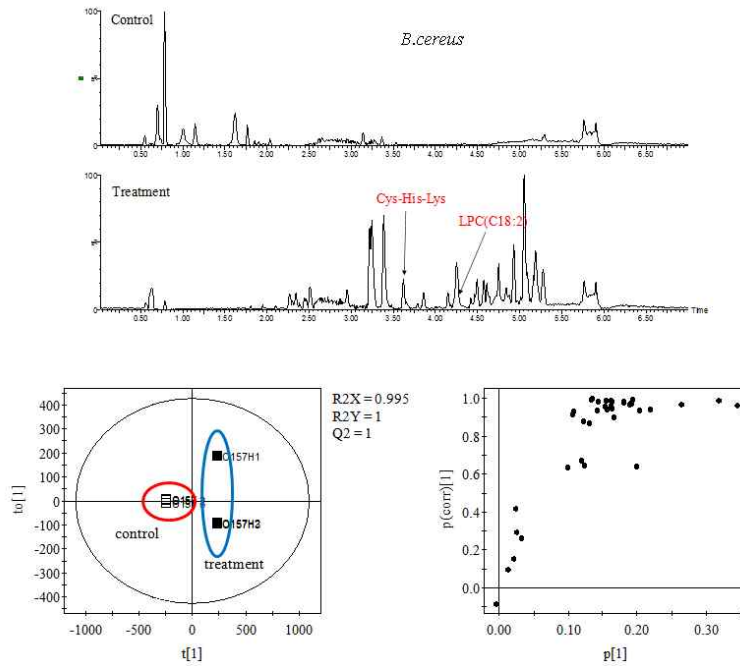


Fig. 54. Representative LC/MS profiles of *B. cereus* treated with the mixture of antimicrobial compounds and PLS-DA scores and S-plots.

동정된 이들 물질들 이외에도 m/z 387.17(fragment 105.06), 414.30(fragment 368.29, 194.05), 457.31(fragment 395.31), 448.28 (fragment 354.27, 180.10), 400.28(fragment 354.27, 180.10)의 물질들도 군체에 관계없이 항미생물 복합제제의 처리에 의해 증가하는 것으로 확인되었다 (Table 47).

Table 47. Identification of metabolites from cells and their growth media

Sample	Bacteria name	Identity	Exact mass (M+H)	MS Fragments	P-value ^a	VIP ^b
Cell	<i>L.monocytogenes</i>	Cys-His-Lys	387.17	105	0.007	1.34
	<i>L.monocytogenes</i>	LPC(C18:2)	520.34	184, 104	0.093	1.14
	<i>S.aureus</i>	Asp-Met	265.08	171, 150, 104, 219	0.003	1.11
	<i>S.aureus</i> , <i>E.coli O157:H7</i>	NAD	664.11	428, 232, 136	0.014	1.09
	<i>E.coli O157:H7</i>	Glutathione	308.09	76, 84, 116, 162	0.016	1.13
	<i>S.enteritidis</i>	Retinoic acid	301.21	91, 105, 119	0.006	1.21
	<i>S.enteritidis</i>	13,14-dihydro-15-keto PGF 2 α isopropyl ester	301.21	205, 189	0.021	1.24
Media	<i>B.cereus</i>	Cys-His-Lys	387.17	105	0.007	1.34
	<i>B.cereus</i>	Sucrose	365.1	203, 185	0.027	1.08

^a P-value was analyzed by one-way anova test. ^b VIP is variable importance in the project and its value of above 1.00 showing high relevance for explaining the differences of sample groups.

항미생물 복합제제의 처리에 의해 세포벽 분해가 촉진되어 세포벽 분해산물들인 펩타이드, 지방관련 물질들, 핵산분해 산물들이 증가하는 경향이 보였으나 Asp-Met의 함량이 감소하였으며 에너지원으로 사용되는 배지내 sucrose 함량은 처리구에 의해 감소하였다. 또한 균체의 대사물질들의 변화가 급격하게 일어난 반면 배지 대사체의 변화는 크지 않은 것으로 확인되었다 (Fig. 55).

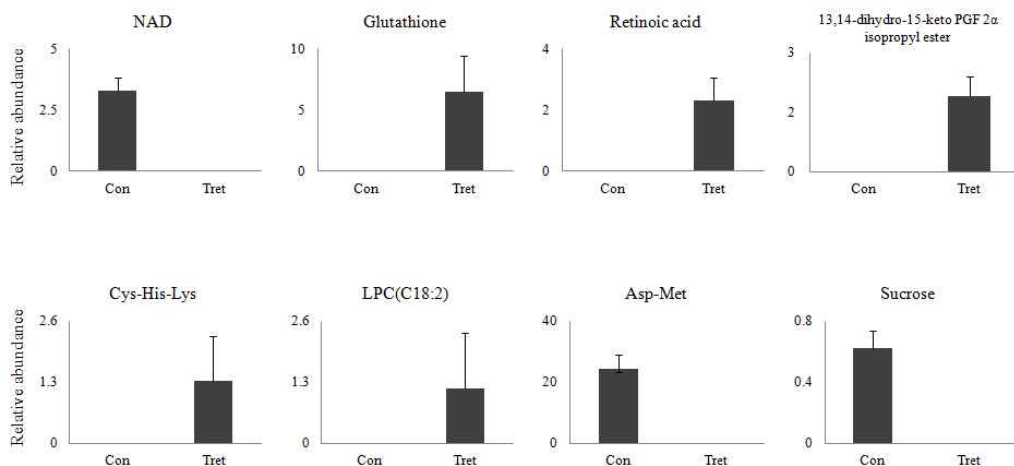


Fig. 55. Relative abundance of metabolites identified from cells and media treated with the mixture of antimicrobial compounds.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구목표	목표달성도	관련분야의 기술발전에 기여도
1차년도	표준추출물 제조	100%	<ul style="list-style-type: none"> 건강기능식품으로 가능성을 열어두고 식약처의 건강기능식품 기능성 원료 인정 규정 중 안전성 평가를 위한 의사 결정도를 만족하는 시료로 확정하여 과학적인 기준 제시
	신호전달 교란 활성 후보물질 선별	100%	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 항균 신소재는 새로운 항균표적을 대상으로 확보된 것으로 본 실험실에서 핵심 기술기반을 확립하여 국제적 경쟁력을 키우는데 기여
2차년도	유효성분 분리 및 동정	100%	<ul style="list-style-type: none"> 국내 자생 식물에 대한 다양한 유효성분 및 기초정보를 확보, 특허출원을 완료하였으므로 관련분야의 기술발전에 기여할 수 있을 것임
	신호전달교란 활성성분의 제어기작 규명	100%	<ul style="list-style-type: none"> 신호전달 교란 활성성분에 대한 제어기작 규명으로 국외저명 학술지에 투고 및 특허출원으로 경쟁력을 가지며 국내 농산자원에 대한 고부가가치 창출에도 기여
3차년도	최종 항균복합소재 선정	100%	<ul style="list-style-type: none"> 단순화된 복합비율이 아닌 활성에 근거한 복합제제 개발로 항균활성을 증진시켰으며 내성이 생길 수 있는 항균제 사용량을 줄일 수 있는 근거자료 제시 (50% 감소된 항균제로 동일한 활성 발현)
	산업화용 응용기술개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 제제유형별 첨가제에 대한 활성 적용 연구로 산업화를 위한 기초자료를 마련하였으며 독성실험법을 적용하여 산업화를 위한 기술 발전에 기여하였음
위탁 과제	신호전달 교란 및 항균활성소재에 의한 미생물 대사체 비교분석	100%	<ul style="list-style-type: none"> 신호전달 교란 물질에 의한 <i>Y. enterocolitica</i> 와 항균활성 복합소재에 의한 5종 식중독균의 균체와 배지 대사체 분석으로 지표물질 발굴 및 유의적으로 차이가 대사체 동정으로 국내 농산자원의 우월성 증명을 위한 근거자료 마련 및 저명 국외학술지에 투고 예정

* 연도별 연구목표에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 기술거래는 과제 완료시점에서 논의하기로 하여 현재 최종결과물에 대한 특허등록과 단일 물질에 대한 동정과 구조분석에 노력을 하고 있음
- 적용상 연구를 통해 실용화를 위한 다양한 분야가 고려되고 있어 소재로 산업화를 할 경우 빠른 시일 안에 실용화가 가능할 수 있으나 제품으로 실용화를 위해서는 복합물에 대한 특허출원이 완료된 시점에서 기술이전에 노력할 예정임 (현재 추가 특허출원 준비 중)

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 교육·지도 등은 관련성이 높지 않음
- 홍보가 2건 실시되었으나 최종결과물의 구조분석 완료 후 추가 홍보 계획

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

가. 특허

- 양하추출물을 유효성분으로 포함하는 정족수 인식 억제용 조성물 (출원번호 10-2014-0139775)
- 유자추출물을 유효성분으로 포함하는 정족수 인식 억제용 조성물 (출원번호 10-2014-0139814)
- 최종복합물에 대한 특허출원 1건 추가예정

나. 논문

- Toxin Profile, Biofilm Formation, and Molecular Characterization of Emetic Toxin-Producing *Bacillus cereus* Group Isolates from Human Stools (SCI, Foodborne pathogens and disease, 2015, 12: 914-920)
- GC/MS을 이용한 *Yersinia enterocolitica* 균체 및 배지의 대사체 분석 (비SCI, Journal of Agriculture & Life science, 2015, 49:199-207)
- Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract inhibits quorum sensing and biofilm formation potential in *Yersinia enterocolitica* (비SCI, Microbiology and Biotechnology Letters, 2015, 43: 357-366)
- Bacterial quorum sensing and food safety (비SCI, 식품과학과 산업, 2013, 46: 48-57)
- SCI 논문 1편이 현재 revision 중
- 특허출원을 위해 논문 투고 1편 보류 준비 중

다. 학술발표

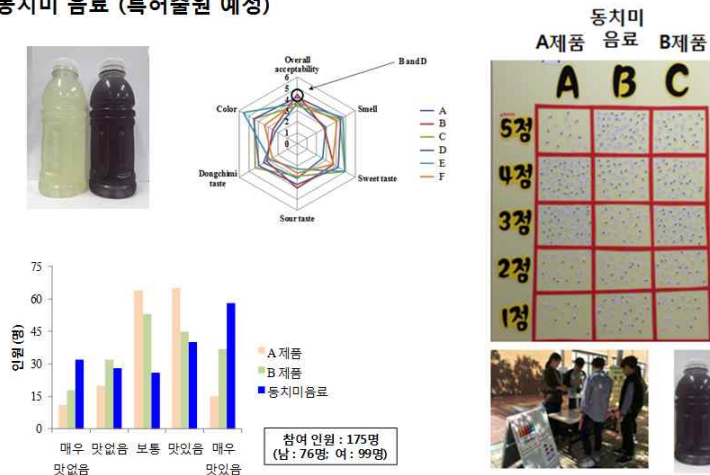
- 식품유래 바실러스 세레우스의 특징 (구두발표, 2015, 한국미생물생명공학회 미니심포지엄)
- Quorum Sensing Inhibitory, Antibacterial, and Anti-Biofilm Activity of Dietary Plants cultivated in Korea (FEMS Congress, 2015, 마스트리히트)
- Anti-Quorum Sensing Potential of Pomegranate Peel in *Yersinia enterocolitica* (한국미생물

생명공학회정기학술대회(KMB2015), 경주화백컨벤션센터)

- Antibacterial and anti-quorum sensing activity of dietary plants cultivated in Korea (European Symposium on Food safety, 2014, 헝가리 부다페스트)
- Microbial interaction of biofilm-forming Bacillus cereus and other foodborne pathogens in autoinducer synthesis (한국미생물생명공학회정기학술대회, 2013, 평창 알펜시아)

동치미 (양하 물추출물) 를 이용한 제품 개발

동치미 음료 (특허출원 예정)



(시음회 개최 2015년 11월 25일)

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 도출된 후보물질의 동정과 대량생산을 위한 연구가 기술이전을 목표로 하여 지속적으로 수행될 예정이며 현재 동정의 최종단계에 있으므로 단일물질이 확보가 되는대로 단일물질의 대량생산을 위한 표준화추출법이 도출될 것임
- 본과제에서 도출된 최종 항균복합물질의 주 원료인 양하와 석류의 안정적인 확보를 위한 방안으로 석류는 최초 구입했던 전남 고흥에서 안정적으로 동일한 품종이 공급될 것이며 양하는 주 사용부위가 뿌리이므로 계절과 상관없이 현재 계약으로 공급하고 있는 제주 농가에서 확보가 가능할 것이며 추루 기술이전 시 계약재배 등과 관련된 추가적인 논의가 필요할 것임
- 본과제 결과를 활용한 후속과제로 “소비자형 모바일 융합 식중독균 검지기술개발” 로 2015년부터 진행하고 있으며 연구재단의 사회문제해결형 다부처 사업으로 “감염병 조기 감시 대응체계 구축” 으로 진행 중

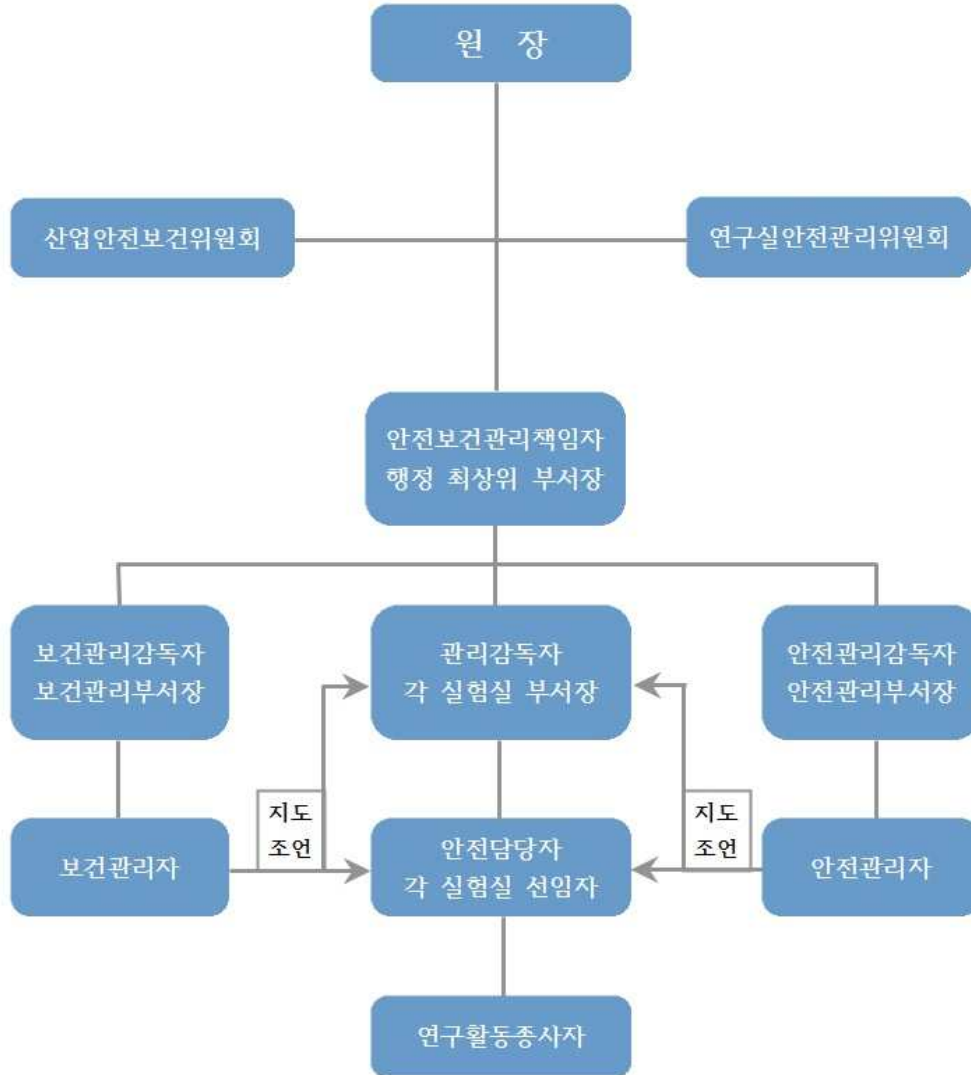
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

연구수행 기관	연구개발의 내용
Dalian polytechnic university	<ul style="list-style-type: none"> Chen 등은 퀴럼센싱에 의한 감염기작을 차단하기 위한 효소를 미생물에서 분리, 동정하여 다양한 미생물에 적용하여 다양한 미생물종과 여러 가지 기질에 작용할 수 있는 효소임을 증명함으로써 현재 독소 발현 차단뿐 아니라 사람 등과 같은 제 2차 숙주에서 발현여부를 확인 중에 있다.
히브루 대학	<ul style="list-style-type: none"> 이스라엘의 Kumar 연구팀은 대장균이 만들어내는 펩타이드 (extracellular death factor) 가 interspecies interaction 뿐 아니라 intraspecies interaction 도 가능하다는 연구결과를 발표하여 미생물을 이용한 새로운 종류의 항생제 개발 가능성을 제시하였다.
콜로라도 주립대학, 알칸사스 대학	<ul style="list-style-type: none"> 콜로라도 주립대학의 Pittman 연구팀은 Valencia orange 에센션 오일이 냉장 보관 중 살모넬라와 대장균의 증식을 막아줄 수 있다는 연구결과를 발표했으며, 알칸사스 대학의 Pendleton 연구팀도 냉장 중에 orange 에센션 오일이 <i>E. coli</i> O157:H7 를 억제한다는 연구결과를 발표하였다.
델라웨어 대학	<ul style="list-style-type: none"> 식품공학과 Lu 연구팀은 thyme과 carvacrol 과 같은 에센셜 오일 등이 그레이프 토마토와 같은 채소에서 살모넬라 증식을 억제하므로 신선한 과일과 채소 세척에 에센셜 오일을 첨가하여 염소소독을 대체할 수 있음을 제시하였다.
Danisco Animal Nutrition	<ul style="list-style-type: none"> 영국의 Amerah 연구팀과 그루지아 대학연구팀은 계피 추출물을 식이로 섭취한 가금류에서 살모넬라 감염 전이율을 61-77% 감소시킨다는 연구결과를 발표하였다.
캘리포니아 대학	<ul style="list-style-type: none"> Jeff Hasty 와 공동연구원들은 약 센티미터 거리에 분포해 있는 대장균 퀴럼센싱 콜로니들을 동기화 하는데 성공하였다. 이러한 대장균 어레이는 LCD 와 유사하게 비소 화합물의 존재유무를 감지할 수 있으며 좀더 개발을 진행하게 되면 바이오픽셀 콜로니는 저가 유전자 바이오센서로 개발되어 중금속 및 병원균의 존재 유무를 확인할 수 있을 것으로 확신하고 있다.
MIT	<ul style="list-style-type: none"> Ron Weiss 의 연구팀은 <i>P. aeruginosa</i>을 추적하여 중립화 시킬 수 있는 메신저 입자를 찾을 수 있는 대장균을 만들었으면 그 반응으로 항미생물 입자를 전달한다.
싱가포르 난양기술대학	<ul style="list-style-type: none"> Mathew chang은 대장균에 추적 및 파괴의 장비를 첨가하여 폐렴과 다른 질병을 일으키는 외부침입 박테리아인 녹농균을 표적으로 만들었고 감염된 실험쥐를 대상으로 죽은 녹농균의 차체를 확인하였다. 또한 피오신이라 불리는 항박테리아 펩타이드를 조합할 수 있는 대장균을 개발하여 화학적 신호를 감지하자마자 자신을 폭발시키도록 만들어 병원체를 추적 파괴하도록 개발

제 7장 연구실 안전관리 이행실적

가. 연구실 안전 담당부서 : 총무실 안전팀

나. 안전보건관리 조직도



다. 안전점검

- 일일점검 실시 : 실험실 안전순찰 2회/일 실시
- 자체안전점검 실시 : 매월 4일 실험실별 자체점검 실시
- 정기안전점검 실시 : 매월 2회 한국안전기술연구원과 합동으로 안전점검 실시
- 특별안전점검 실시 : 동·하절기 및 해빙기 특별안전점검 실시
- 정밀안전진단 실시 : 2년 주기 외부 전문기관 위탁 정밀안전진단 실시

라. 안전교육

- 신규직원 안전교육 : 신규직원 채용시 안전교육실시
- 맞춤형 안전교육 : 실험실 위험지역별 맞춤형 안전교육 년 4회 실시
- 관리감독자 안전교육 : 안전관리감독자 및 안전관리자 외부전문기관 교육 이수
- 특별안전교육 : 특별한 사항 발생시 유형별 특별안전교육 실시

마. 연구활동종사자 건강검진 실시

- 매년 건강검진 실시
- 성인병 건강 검진비 지원

바. 연구활동종사자 보험가입

- 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신처리를 지속적으로 이행함
- 가입회사 : 동부화재(재해보장 책임보험), 산재보험
- 가입대상 : 전직원

사. 안전시설 및 안전장비 설치 : 실험실 7개소 설치



• 실험실 안전시설 및 장비설치

번호	품 명	수량	용 도	번호	품 명	수량	용 도
1	산소호흡기	1Set	질식환자 구호	8	안전장갑	10켢래	내구성 장갑
2	산소구급벨트	1Set	유독가스지역 비상탈출	9	내열장갑	5켢래	내열성 장갑
3	국민방독면	1Set	독가스 살포시	10	화학장갑	5켢래	내화학 장갑
4	세안기	1대	안구 이물질 세척	11	실험복	5벌	내화학 실험복
5	비상약품	1Set	24종 구비	12	흡착포	1Set	흡착제거
6	보안경	10ea	안구보호	13	흡착팬스	1Set	구획설정, 확산방지
7	마스크	10ea	호흡기 보호	14	비상샤워	1대	유독물질 세척

아. 비상대피 시설 구축

- 가스누출 자동감지 경보 및 대피방송시스템 구축
- 주요연구장비보호구역내 자동화재소화설비 구축운영(하론소화설비) 및 법정구역내 소화기 비치
- 비상시 탈출을 위한 피난계단 설치

자. 기타 안전사고 예방 활동 강화

- 연구실안전관리 위원회 개최 년2회
- 안전사고 매뉴얼 제작, 배포 및 숙지
- 연구활동종사자 안전점검 일지 작성
- 화학약품의 올바른 취급을 위한 MSDS(물질안전보건자료) 통합제작 및 배포
- 실험실습실 안전수칙 게시판 제작 부착(9개소)
- 폐용매 분리수거 및 위탁처리(6회/년)

제 8 장 참고문헌

1. Antunes, L. C. M., R. B. R. Ferreira, M. M. C. Buckner, and R. B. Finlay. 2010. Quorum sensing in bacteria virulence. *Microbiology* 156: 2271-2282.
2. Atkinson, S., C. Y. Chang, R. E. Sockett, M. Cámara, and P. Williams. 2006. Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. *J Bacteriol* 188: 1451-1461.
3. Bassler, B. L. 2002. Small Talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109: 421-424.
4. Bjarnsholt, T. and M. Givskov. 2008. Quorum sensing inhibitory drugs as next generation antimicrobials: Worth the effort? *Curr Infect Dis Rep* 10: 22-28.
5. Bodman von, S. B., W. D. Bauer, and D. L. Coplin. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 41: 12.1-12.28.
6. Brackman, G., U. Hillaert, S. Van Calenbergh, H. J. Neils, and T. Coenye. 2009. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. *Res Microbio* 160:144-151.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard, 7th ed. M7-A7. Wayne, PA.
8. Daglia, M., M. Stauder, A. Papetti, C. Signoretto, G. Giusto, P. Canepari, C. Pruzzo, and G. Gazzani. 2010. Isolation of red wine components with anti-adhesion and anti-biofilm activity against *Streptococcus mutans*. *Food Chem.* 119: 1182-1188.
9. Dong, Yi-Hu, and L. H., Zhang. 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* 43: 101-109.
10. Fekete, A., M. Frommberger, M. Rothballer, X. Li, M. Englmann, J. Fekete. 2007. Identification of bacterial N-acylhomoserinelactones (AHLs) with a combination of ultra-performance liquid chromatography (UPLC), ultra-high-resolution mass spectrometry, and in-situ biosensors. *Analytical Bioanalyt Chem* 387: 455-467.
11. Finch, R. G., D. I. Pritchard, B. W. Bycroft, P. Williams, and G. S. A. B. Stewart. 1998. Quorum sensing: a novel target for anti-infective therapy. *J Antimicrob Chemother* 42: 569-571.
12. Fischer, U. A., R. Carle, and D. R. Kammerer. 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *Food Chem* 127: 807-821.
13. Fraser, G. M., and C. Hughes. 1999. Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* 2: 630-635.
14. Giménez-Bastida, J. A., P. Truchado, M. Larrosa, J. C. Espín, F. A. Tomás-Barberán, A. Allende, and M. T. García-Conesa. 2011. Urolithins, ellagitannin metabolites produced by colon microbiota, inhibit quorum sensing in *Yersinia enterocolitica*: phenotypic response and associated molecular change. *Food Chem* 132: 1465-1474.
15. Hardman, A. M., G. S. A. B. Stewart, and P. Williams. 1998. Quorum sensing and cell-cell

- communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Anton Leeuw Int J G* 74: 199-210.
16. Hodgkinson, J. T., M. Welch, and D. R. Spring. 2007. Learning the language of bacteria. *ACS Chem Biol* 2: 715-717.
 17. Jang, K., S. Kim, E. Song, K. Kim, H. Kwon, S. Kang, K. Park, and Y. Jung. 2003. Isolation and structure identification of antibacterial substance from the rhizome of *Zingiber mioga Roscoe*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 246-250.
 18. Jorgensen, J., and Turnidge, J. 2007. Susceptibility test methods: dilution and disc diffusion methods, p. 1152-1172. *In* Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington, D. C.
 19. Kjelleberg, S., and S. Molin. 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* 5: 254-258.
 20. Liu, D., J. Momb, P. W. Thomas, A. Moulin, G. A. Petsko, W. Fast, and D. Ringe. 2008. Mechanism of the quorum-quenching lactase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-Bound Structures. *Biochemistry* 47: 7706-7714.
 21. Martin, C. A., A. D. Hoven, and A. M. Cook. 2008. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 635-642.
 22. Morin, D., B. Grasland, C. C. Valle-Rehel, and D. Haras. 2003. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactone, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J Chromatography A* 1002: 79-92.
 23. O' Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449-461.
 24. Packiavathy, I. A. S. V., A. Palani, K. S. Musthafa, S. K. Pandian, and A. V. Ravi. 2012. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Curcuma cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against gram negative bacterial pathogens. *Food Res Int* 45: 85-92.
 25. Pratt, L. A., and R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, cheotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30: 285-293.
 26. Stoodley, H., L. JW. Costerton, P. Stoodley. 2004. Bacterial biofilms from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108.
 27. Suga, H., and K. M. Smith. 2002. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Microbiol* 7: 586-591.
 28. Throup, J. P., M. Camara, G. S. Briggs, M. K. Winson, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, P. Williams, and G. S. Stewart. 1995. Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* 17: 345-356.
 29. Truchado, P., A. Gil, F. A. Tomás-Barberán, and A. Allende. 2009. Inhibition by chestnut

- honey of *N*-acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*. *J Agric Food Chem* 57: 11186-11193.
30. Vandeputte, O. M., M. Kiendrebeogo, S. Rajaonson, B. Diallo, A. Mol, M. El Jaziri. 2010. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum sensing controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ Microbiol* 76: 243-253.
 31. Vu, B., M. Chen, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova. 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14: 2535-2554.
 32. Zhang, L. H., and Y. H. Dong. 2004. Quorum sensing and signal interference; diverse implications. *Mol Microbiol* 53: 1563-1571.

<첨부>

특허, 논문 및 시장분석 보고서

과 제 명: 생강과(Zingiberaceae) 식물로부터 식중독 유발세균의 세포간 신호전달체계를 이용한 독성인자 제어소재 개발

주관 기관: 한국식품연구원

주관연구책임자: 이 나 리

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
독성인자 제어용 신호전달 교란물질 개발 기술	미국	85%	80%	90%	과제 수행 후 기술 수준향상

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	Thomson innovation DB
검색기간	1991.01.01 ~ 2015.11.20 (최근 25년간)
검색범위	제목 및 초록, Claims (공개 및 등록, PCT공개)

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		독성인자 제어용 신호전달 교란물질 개발 기술	
Keyword		[(biofilm or quorum sensing or quorum quenching or autoinducer or signal molecule) AND (bacteri* or pathogen* or microbi*) AND food*] AND (antimicrob* or anti microb* or antibacter* or anti bacter* or biofilm* or antiquorum sens* or anti quorumsens* or anti quorum sens* or antiquorumsens*)]	
검색건수		790	
유효특허건수		78 (10건: 분자신호이용 유효특허)	
핵심특허 및 관련성	특허명	Compound and methods for regulating bacterial growth and pathogenesis	
	보유국	미국	
	등록년도	2001	
	관련성(%)	80%	
	유사점	미생물의 성장과 독소발현을 조절하는 유사체를 이용한 신호전달 조절연구	
차이점	V. harveyi의 시스템을 이용하여 이중간의 신호전달물질인 AI-2를 대처할 수 있는 유사체를 탐색하여 신호전달을 조절하나 C. violaceum의 신호전달에 관여하는 물질은 Pseudomonas 계열의 LasI/R 시스템이므로 이 방법으로 신호전달이 조절되지 않음		
핵심특허 및 관련성	특허명	Homoserine lactones biofilm regulating compounds and their methods of use	Proteins involved in quorum sensing
	보유국	미국	영국
	등록년도	1998	2004
	관련성(%)	80%	80%
	유사점	바이오필름 제어 등에 활용할 수 있는 미생물의 신호전달기작 시스템 연구	신호전달 발현조절 유전자 연구와 신호전달 기작을 조절할 수 있는 물질 탐색 연구
차이점	그람음성균인 Pseudomonas sp.의 quorum sensing 발현조절유전자인 LasI/LasR 관련연구이며, 본 과제에서는 C. violaceum의 시스템을 이용하여 생산되는 신호전달연구에 집중할 것임	신호전달조절유전자 LuxR과 homologue 들을 타겟으로 신호전달기작 조절을 자가재로 할 수 있도록 LuxR의 항체를 만들고 이를 이용하는 방법 개발함. 본 연구에서는 신호전달 작용 중에 수용체 단백질에 결합할 수 있는 신호전달물질 유사체를 찾아냄으로써 신호전달을 차단할 수 있는 방법 연구	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Thomson innovation DB
검색기간	1991.01.01 ~ 2015.11.20 (최근 25년간)
검색범위	제목, 초록 및 키워드, all text field

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		독성인자 제어용 신호전달 교란물질 개발 기술	
Keyword		(biofilm or quorum sensing or quorum quenching or autoinducer or signal molecule) AND (bacteri* or pathogen* or microbi*) AND food*	
검색건수		1547	
유효논문건수		145	
핵심논문 및 관련성	논문명	Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of Cuminum cymynim and its secondary metabolite methyl eugenol against gram negative bacterial pathogens	Food phytochemicals act as quorum sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of <i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Erwinia carotovora</i>
	학술지명	Food Research International	Food Control
	저자	Ravi A. V. 등	Truchado P. 등
	게재년도	2012년	2006
	관련성(%)	90%	90%
	유사점	식물추출물로부터 <i>C. violaceum</i> CV026 을 이용한 신호전달교란 물질 탐지	식품속의 phytochemical을 이용하여 신호전달 유사체 또는 분해 물질 탐지
차이점	이미 알려진 eugenol 대한 연구로 기작 연구에 대한 내용은 없음. 본 과제는 국내자생 생장과 식물에서 활성성분을 동정하여 복합제제로 항균소재를 개발	<i>Y. enterocolitica</i> 의 바이오필름 억제 신호전달 유사체를 phytochemicals에 국한시켰으나 본과제에서는 국내 자생 생장과 의 용매추출성분 및 향기성분에서 탐색	
핵심논문 및 관련성	논문명	Presence of acylated homoserine lactones (AHLs) and AHL-producing bacteria in meat and potential role of AHL in spoilage of meat	Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives
	학술지명	Applied Environmental Microbiology	Journal of Food Protection
	저자	Bruhn J. B. 등	Lu L. 등
	게재년도	2004년	2004년
	관련성(%)	90%	80%
	유사점	새로운 혹은 기존에 밝혀진 신호전달물질이 종 특이적인지를 확인하기 위한 연구	신호전달 물질 (AI-2)의 신선식품과 가공식품에서 활성여부 확인
차이점	<i>Enterobacteriaceae</i> 의 신호전달물질이 다른 미생물과 함께 실험하여 이 물질이 종 특이적이지 않다는 것을 확인. 본 과제에서는 <i>C. violaceum</i> 의 신호전달물질과 함께 항균활성물질을 복합제제로 적용실험을 함	단순히 몇 개의 식품의 표면미생물과 AI-2와의 신호전달 여부만 확인한 것으로 본 과제에서는 항균활성물질과의 복합소재로 식품부패 또는 식중독균의 독소발현 조절 여부를 식품에서 적용하는 활용기술 개발	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 식중독 미생물들에 대한 신호전달기작 연구는 식품의 부패방지, 바이오필름제어 등으로 인한 식중독 예방의 효과 뿐 아니라 내성을 유발하지 않는 새로운 항 미생물제제로도 개발 할 수 있으므로 충분한 기초연구가 이루어진다면 항생제 시장으로 기술이전도 가능할 것임
- 현재 감염형 병원성 미생물 치료용 프리미엄 항생제 시장 규모는 2009년 2900억원에 달하고 있으며 2017년까지는 11% 이상 성장할 것으로 예측하고 있음 (대한약사회, 2010)
- 또한 식중독 발생으로 인한 의료비를 포함한 사회·경제적 손실 비용을 1조 3천억원으로 추정하였으며, *Salmonella*에 의한 식중독으로 연간 60억 원 정도의 비용의 소모되고 있음 (식품안전관리대책, 2009)

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 미국 메릴랜드대의 William Bentley 등은 미생물의 신호전달기작을 기반으로 나노 크기 공장인 미세유체장치를 개발하여 항 미생물제제 개발을 위한 기초기반을 마련함
- 영국 노팅엄대학 연구팀은 마늘이 *Pseudomonas* 의 신호전달을 방해한다는 연구결과를 발표하였고 폐질환 환자의 항생제 분무 흡입치료에 임상실험을 진행 중에 있음.
- 세계 항생제 시장은 2007년 이후 마이너스 성장이 지속되었으나 2010년 9월 현재 약 20조원이며 미국의 항생제 시장도 415억 달러에 달하며, 식중독 발생으로 인한 사회·경제적 손실 비용이 연 6조 5천억 원인 것으로 알려짐 (미국 시장조사기업, BCC, 2010)

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 독성인자 제어용 신호전달 교란물질 개발기술 연구 결과는 새로운 항생물질 개발, 바이오필름 억제, 비타민 합성, 항산화물질 개발 등에 도입되어 각 산업의 핵심 제품으로 성장할 수 있을 것으로 기대됨
- 국내에도 생물약분야의 미생물균주를 개발하는 벤처기업인 인바이오넷에서 의약품 생산 미생물 대사 제어를 신호전달기작으로 시도하여 생물약품 개발을 하려고 준비 중에 있으나 아직까지 관련 제품 개발은 없는 상태임
- 최근 생물정화를 포함한 바이오환경사업에서도 미생물의 신호전달기작을 이용한 연구가 활발하게 진행되는데 미국 에너지성(US DOE)의 생물환경연구부는 “Genomes to Life” 프로그램을 진행하며 2007년까지 1억 달러 이상을 투자하였는데 이 핵심연구 중에 하나가

생태학적으로 안전하게 오염원을 제거하는 연구임

- 또한 배양이 불가능한 미생물의 유용 유전자만을 선택하여 활용하기 위한 metagenome (수질, 토양, 식품 등)의 자원화 연구에도 미생물의 신호전달기작이 적극 활용되고 있음

2) 산업화를 통한 기대효과

- 현재 연구단계에 있어 산업적으로 가치를 평가하기는 어려우나 식품뿐 아니라 생물의약과 바이오환경사업에서도 많은 관심을 갖고 있으므로 세계항생제 시장의 규모를 근거로 한다면 400억 달러 이상의 가치가 있을 것으로 사료됨.
- Visiogain이 최근 “항생제: 세계시장전망 2012-2022년(Antibacterial Drugs: World Market Prospects 2012-2022)”이란 보고서를 발해했는데 세계 항균제 매출이 2016년 438억 1,000만 달러에 달하고, 2010-2022년 연평균 성장률(CAGR) 2.2%로 성장할 것으로 예측하고 있음.

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	-	200	500	1,500	3,000	5,200
경제적 파급효과	-	500	1,500	3,000	5,000	10,000
부가가치 창출액	-	500	1,000	2,000	3,000	6,500
합 계	0	1,200	3,000	6,500	11,000	21,700

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

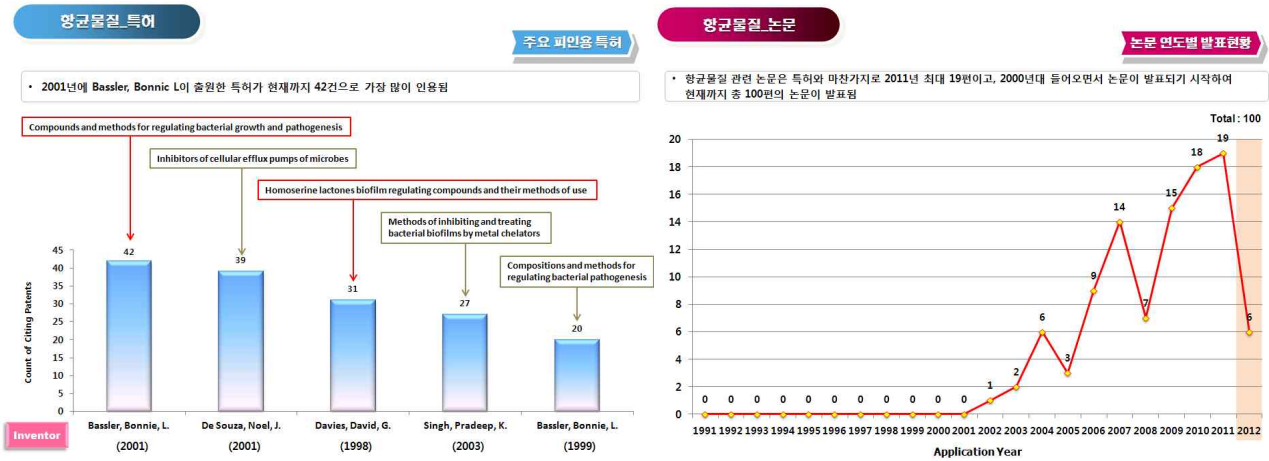
1) 특허분석 측면

- 독성인자 제어용 신호전달 교란물질 개발 기술에 대한 특허는 현재 3건으로 신호전달 연구를 위한 기본연구를 위한 신호전달물질과 관련된 특허이며, 병원성균의 대부분이 포함되는 그람음성균중 *Pseudomonas* 의 신호전달기작 시스템인 LasI/R 시스템에 대한 연구에 집중되어 있음. 본 연구과제에서는 LuxR/I 시스템을 가지고 *C. violaceum*의 특이적인 신호전달물질과 길항작용을 하는 유사체를 탐색하는 연구를 진행하였으며, 국내자생생강과 식물로부터 얻어진 신호전달 교란물질들의 효과를 극대화 되도록 항균 복합소재로 개발하여 국내 특허출원 2건을 하였으며 추가 출원이 진행될 것임.

2) 논문분석 측면

- 신호전달 교란물질의 탐지의 기존 연구가 포도상구균을 제외하고는 대장균, 캄필로박터,

슈도모나스, 살모넬라, 엔테로박터 등의 병원균이 발병할 경우, 사망사고가 일어날 가능성이 있는 그람음성균의 연구에 치중되어 있어 *B. cereus*나 *Y. enterocolitica*처럼 상대적으로 덜 위해한 세균에 대한 연구는 거의 없음. 최근 식물의 무름병과 같은 사람의 생활과 연결된 미생물에 대한 연구가 늘어나면서 인수공통병원균인 *Y. enterocolitica*에 대한 연구 결과도 있으나, 아직 부족한 상태임. 본 연구과제에서는 *C. violaceum* CV026를 이용하여 탐색된 신호전달 교란활성 소재의 제어기작 규명연구와 항균복합소재의 제품화 기술 연구가 추진되었고 결과의 일부는 미생물과 식품안전 관련 학술지에 일부 게재되었음.



3) 제품 및 시장분석 측면

- 본 연구에서 개발되는 독성인자 제어용 신호전달 교란물질 개발 기술은 농산식품에 안전한 적용을 위하여 국내 자생 생강과 식용식물로부터 개발되고 항균소재에 대한 제어기작 규명이 이루어진다면 고부가가치 천연항균소재로 주목을 받을 수 있으며, 특히 항균소재의 복합연구로 얻어진 복합소재를 이용한 제품화 기술이 개발된다면 동물사료와 식품첨가제로서 항균제 시장 뿐 아니라 내성 없는 항생물질 개발, 바이오필름 제어제 (의료, 기계, 식품 등), 비타민 합성, 생물정화 등의 분야에 도입되어 산업화가 가능할 것이며, 이때에 시장 독점권을 갖을 수 있을 것으로 사료됨.