(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0039982
(43) 공개일자 2009년04월23일

(51) Int. Cl.
A61K 31/047 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A01N 65/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0105510
(22) 출원일자 2007년10월19일
심사청구일자 2007년10월19일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(주)에이치케이바이오텍
경상남도 진주시 수곡면 원계리 612-14
(72) 발명자
하영래
경남 진주시 주약동 407-1 금호석류마을아파트 105-1602
김정옥
경남 진주시 주약동 407-1 금호석류마을아파트 105-1602
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

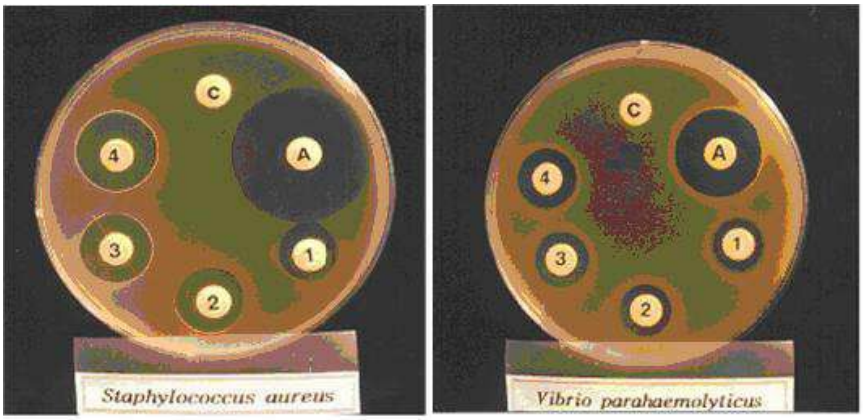
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 식중독균의 생육억제 용도로 식품내 사용되는 암피실린, 페니실린 혹은 스트렙토마이신을 대체가능한 천연 항균제

(57) 요 약

본 발명은 안전성과 강한 활성을 동시에 갖는 식물성 항균제 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 β-카리오필렌(caryophyllene) 광산화물 (PPC)로부터 얻어진 특이성이 있는 식물성 항균제 조성물에 관한 것으로, 세균, 곰팡이, 효모 및 바이러스등 광범위한 병원성 및 부패성 미생물에 특이성이 있는 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5b-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5a-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, 4a-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene, 4b-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-dien을 분리해낼 수 있었으며, 특히 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5a-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 3가지 화합물의 항균력은 서로 비슷하였지만, 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 항균력이 약간 높았다. 결과적으로, 이들 화합물 및 그 혼합물은 다양한 식품에서 항균제로 사용가능한 것이다. 또한, 이들 화합물 및 그 혼합물은 균의 생육억제제로서 식품에 사용시 안전성이 문제되지 않는 장점을 갖는다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

박숙자

대구 남구 이천동 강변타운 102동 806호

김영숙

경남 진주시 상평동 55-70번지

이선민

경남 진주시 평거동 동신아파트 A-303호

특허청구의 범위

청구항 1

1) 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene 단독,

2) 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene 단독,

3) 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene 단독,

4)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물,

5)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물,

6)5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물, 및

7)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, 및

8)5b-hydroxycaryophylla-4(12),8(13)-diene와 4a-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene와 4b-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene의 혼합물,로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상의 물질을 포함하여 균에 대한 강한 활성과 안전성을 동시에 갖는 식물성 항균제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5b-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene, 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, 4a-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene 및 4b-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene 각각은 β-카리오필렌을 광산화시켜 얻은 광산화물로부터 추출된 것을 특징으로 하는 식물성 항균제 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 β-카리오필렌은 인공 화합물 및 그 산화물, 혹은 방향성 식용, 약용 식물로부터 추출한 생화합물 및 그 산화물을 이용하는 것을 특징으로 하는 식물성 항균제 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 광산화 조건은 파장 180-380㎚의 형광램프 하에서 30분 내지 7시간동안 반응시키는 것을 특징으로 하는 식물성 항균제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 4), 5), 6) 물질의 혼합비는 중량 기준으로 각각 40:60 범위내인 것을 특징으로 하는 식물성 항균제 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 7), 8) 물질의 혼합비는 중량 기준으로 45-55:20-30:20-30 범위내인 것을 특징으로 하는 식물성 항균제 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 1종 이상 선택된 물질의 사용가능한 총 함량은 식품 1 Kg 당 1~10 mg 범위내인 것을 특징으로 하는 식물성 항균제 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항중 어느 한 항에 있어서, 상기 균은 세균, 및 곰팡이를 포함하는 광범위한 병원성 미생물, 부패성 미생물 또는 식중독균인 것을 특징으로 하는 식물성 항균제 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식중독균은 *S. aureus* 또는 *V. paraheamolyticus*인 것을 특징으로 하는 식물성 항균제 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 안전성과 강한 활성을 동시에 갖는 식물성 항균제 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 β-카리오필렌(caryophyllene) 광산화물 (PPC)로부터 얻어진 특이성이 있는 식물성 항균제 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> β-카리오필렌 [β-caryophylla-4(5),8(13)-diene]은 약초, 향신료, 호프 및 과일의 오일, 레진 및 추출물에 다량 함유된 중요한 방향성 물질인 시스키테르펜(sesqiterpene)이다 (Leclercq and others 1994; Gramosa and Silveria 2005; Brown others 2006 참조). β-카리오필렌 및 그 신화물은 생물학적인 활성을 갖고 있기 때문에 식품과학자나 영양학자들에게 큰 관심사가 되어 왔다 (Mevy and others 2007 참조).

<3> 구체적으로 β-카리오필렌 및 그 산화물을 함유한 정유는 항균성(Sabμℓal and others 2006; Ana Paμℓa and others 2007; Bajpai and others 2007), 항곤충성(Arey and others 1991; Antonious and Kochhar 2003; Pino and others 2004), 항산화성(Lourens and others 2004; Singh and others 2006), 항염증성 (Agarawl and Rangari 2003; Fernandes and others 2007), 마취성(Ghelardini and others 2001), 항암성(Zheng and others 1992; Kubo and others 1996; Kirana and others 2003; Sylvestre and others 2006), 항위염성(Axelsson and others 2005), 항장염성 (Cho and others 2007) 등의 활성을 갖고 있는 것으로 알려져있다. 이와 같은 정유는 향신료, 향료, 비누, 계면활성제, 크림 및 로숀에 사용되고 있고, 식품이나 beverage에도 사용되고 있다(Sabual and others 2006).

<4> β-카리오필렌의 주요 산화물은 β-카리오필렌 옥사이드인데 이것은 쉽게 가수분해물이나 이성화물로 전환된다 (Tsui and Brown 1996 참조). 예를 들면, 약산용액에서 β-카리오필렌 옥사이드는 두 개의 주요 가수분해물인 clovane diol와 icinal diol로, 케톤, 알데하이드를 갖는 4개의 이성화물, 그리고 두 개의 불포화 환상 알코올 화합물로 전환된다 (Yang and Deinzer 1993a 참조).

<5> 이와 반대로, 광산화 조건하에서 β-카리오필렌은 일차 화합물인 히드록시퍼옥사이드 유도체로 산화되고, 이들이 환원되어 알코올화합물로 전환된다 (Skold and others 2006).

<6> 몇몇 β-카리오필렌 산화물은 호프, 맥주, 및 향신료 (Lam and others 1986; Yang and Deinzer 1993b; Goiris and others 2002), 화장품 (Brunke and Rojans 1988; Srivastava and others 2005; Skold and others 2006), 그리고 향수 (Mussian and others 1980; Verghese 1994) 등에 특징적인 향기성분이다.

<7> 비록 β-카리오필렌 및 그 산화물을 함유하는 정유가 몇몇 미생물의 생육을 억제하는 데 중요한 역할을 수행하는 것이 알려져있지만, 종래 정유에 함유된 β- 카리오필렌 및 그 산화물이 몇몇 그람 양성 및 음성 박테리아에 대하여 갖는 항균성은 그다지 크지 않음을 확인하고 항균 활성이 강한 광산화물로부터 식중독균에 대하여 강한 항균활성을 갖는 물질을 제공하려는 연구를 계속 수행하였다.

<8> 한편, 항균성 물질을 식중독균의 생육 억제제로서 식품에 사용함에 있어, 암피실린과 스트렙토마이신/페니실린과 같은 항생제를 사용할 경우 많은 부작용에 의한 위험 부담이 따른다 (Yang and Deinzer 1993a; Marina-Rose and others 2004; Sabμℓal and others 2006).

<9> 이에 식중독균을 포함한 다수 균의 생육 억제제로서 식품에 사용시 안전성이 문제되지 않는 항균성 물질을 제공할 필요가 존재한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<10> 본 발명의 일 목적은 β-카리오필렌 광산화물로부터 특이적으로 작용하여 강한 항균 활성을 갖는 식물성 항균

제 조성물을 제공하려는데 있다.

<11> 본 발명의 다른 목적은 균의 생육 억제제로서 식품에 사용 시 안전성이 문제되지 않는 식물성 항균제 조성물을 제공하려는데 있다.

과제 해결수단

<12> 본 발명에 의하면,

<13> 1) 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene 단독,

<14> 2) 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene 단독,

<15> 3) 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene 단독,

<16> 4)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물,

<17> 5)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물,

<18> 6)5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물,

<19> 7)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물, 및

<20> 8)5b-hydroxycaryophylla-4(12),8(13)-diene와 4a-hydroxycaryophylla-5(6),8(13)-diene와 4b-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene의 혼합물, 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상의 물질을 포함하여 안전성과 강한 활성을 동시에 갖는 식물성 항균제 조성물을 제공한다.

<21> 이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.

<22> 본 발명에서 안정성과 강한 활성을 동시에 갖는 식물성 항균제 조성물로는 다음 7가지 물질로부터 1종 이상을 선택할 수 있다: 1) 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene 단독, 2) 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene 단독, 3) 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene 단독, 4)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물, 5)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물, 6)5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물, 7)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 혼합물, 및 5b-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 4a-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene와 4b-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene의 혼합물.

<23> 이때 상기 β-카리오필렌의 광산화물로부터 분리된 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5b-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5a-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, 4a-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene, 4b-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-dien을 분리해낼 수 있었으며, 특히 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5a-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 3가지 화합물의 항균력은 서로 비슷하였지만, 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene은 이에 한정하는 것은 아니나, 각각 β-카리오필렌을 광산화시켜 얻은 광산화물로부터 추출된 것이 바람직하며, 또한 상기 β-카리오필렌은 인공 화합물 및 그 산화물, 혹은 방향성 식용, 약용 식물로부터 추출한 생화합물 및 그 산화물을 이용할 수 있다.

<24> 이때 상기 광산화 조건은 파장 180-380㎚의 형광램프 하에서 30분 내지 7시간동안 반응시키면 충분한 것으로, 상기 4), 5), 6) 물질의 혼합비는 중량 기준으로 각각 40:60 범위내인 것이 강한 활성과 안정성 측면에서 바람직하고, 동량 범위로 사용하는 것이 가장 바람직하다.

<25> 나아가 상기 7) 또는 8) 물질의 혼합비는 중량 기준으로 45-55:20-30:20-30 범위 내인 것이 강한 활성과 안정성 측면에서 바람직하고, 특히 50:25:25 범위내로 사용하는 것이 가장 바람직하다.

<26> 상술한 식물성 항균제 조성물은 식품 등에 사용가능한 것으로, 하기 실시예에서 규명한 바와 같이, 암피실린과 스트렙토마이신/페니실린과 같은 항생제가 많은 부작용에 의한 위험 부담을 갖는데 반해, 식품에 사용 시 안전성이 문제되지 않을 항균성 물질을 제공할 수 있다.

<27> 이 같은 1종 이상 선택된 물질의 사용가능한 총 함량은 식품 1 Kg 당 1~10 mg 범위 내이면 충분하며, 항균제의

대상 균으로는 세균, 곰팡이, 효모 및 바이러스 등 광범위한 병원성 및 부패성 미생물, 식중독균 등을 들 수 있으며, 상기 식중독균 또한, 이에 한정하는 것은 아니나 *S. aureus* 또는 *V. paraheamolyticus*등을 들 수 있다.

<28> 본 발명에 의하면, 강한 활성과 함께 안정성을 동시에 갖는 식물성 항균제 조성물을 제공할 수 있다.

효 과

<29> 본 발명에 따르면, β-카리오필렌의 광산화물로부터 *S. aureus*와 *V. paraheamolyticus*에 대하여 특이하게 항균성을 나타내는 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5b-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5a-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, 4a-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene, 4b-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-dien을 분리해낼 수 있었으며, 특히 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5a-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 3가지 화합물의 항균력은 서로 비슷하였지만, 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 항균력이 약간 높았다.

<30> 결과적으로, 이들 화합물 및 그 혼합물은 특정한 식품에서 특히 *S. aureus*나 *V. parahaemolyticus*의 생육을 억제할 수 있는 항균제로 사용가능하다. 또한, 이들 3가지 화합물 및 그 혼합물은 식중독균의 생육 억제제로서 식품에 사용 시 안전성이 문제되지 않는 장점을 갖는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<31> **<재료 및 방법>**

<32> **시약**

<33> 본 실시예에서 사용되는 시약 중 β-카리오필렌, β-카리오필렌 산화물, 로즈 벤갈, 암피실린(amphicilline)(100 ㎍/mL 암피실린) 및 스트렙토마이신/페니실린 (100 ㎍/mL 스트렙토마이신 및 100 U/mL 페니실린)은 Sigma Chemical (St. Louis, Mo., U.S.A.)사로부터 구입하여 사용하였다.

<34> 또한, 아세토니트릴, 헥산, 에틸 아세테이트 및 TLC 플레이트 (Kiesel gel 60 F254)는 Merk (Damstadt, Germany)로부터 구입하였으며, nutrient agar broth는 Difco (Detroit, Mi., U.S.A.)사로부터 구입하여 사용하였다.

<35> 나아가, *S. aureus* (ATCC 13301), *B. subtilis* (ATCC 9372), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. faecalis* (IFO 3971), *B. cereus* (ATCC 15816), *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), *P. aer㎍inosa* (ATCC 11250), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *E. coli* (ATCC 15489)는 Korean Cell Line Bank (Seo㎕, Korea)로부터 구입하였고, 그 외 사용한 모든 시약은 ACS급 이상이었다.

<36> **실험예-광산화반응**

<37> β-카리오필렌 용액 ($5x10^{-3}$ M)은 로즈 벤갈($6.25x10^{-4}$ M)을 함유하는 아세토니트릴로 제조하였다. 상기 용액 10 mL을 screw-capped test tube에 넣고 가끔 흔들어 주면서 형광 램프(10Wx4b㎕bs)하에 24 시간동안 광 반응시켰다.

<38> 얻어진 광산화물을 농축하여 사용할 때까지 냉장고에서 보관하였다.

<39> **실험예-β-caryophyllene 광산화물 (PPC)의 정제**

<40> **1) 박층 크로마토그래피(Thin-layer chromatography):**

<41> 시료는 헥산:에틸아세테이트 (5:1 v/v) 전개용매를 사용하여 코팅 처리된 실리카겔 TLC 플레이트 상에서 분리하였다. 시료의 분리는 5% phosphomolybdic acid (PMA)로 발색하여 확인하였다.

<42> **2) 실리카 칼럼 크로마토그래피(Silica column chromatography):**

<43> 시료 1 g을 실리카겔 (230~400 mesh)이 채워진 유리 컬럼 (3x50 cm)으로 분리하였다. 분리된 시료를 헥산:에틸 아세테이트 용액 (49:1 v/v) 2L로 용출한 다음, 1 L의 헥산:에틸아세테이트 용액 (29:1 v/v)으로 재용출하였다.

<44> 얻어진 용출물은 30 mL 씩 모아 헥산:에틸 아세테이트 (5:1 v/v)를 전개용매로 한 TLC에 의해 확인하였다.

<45> **3) 고성능 액체 크로마토그래피(High-performance liquid chromatography):**

<46> PPC의 분리는 Porasil 실리카 칼럼 (Waters, 125Å, 15-20 mm, 19x300 mm)이 장착된 recycling HPLC system (JAI; Tokyo, Japan)로 분리하였다. 이때 사용한 용매는 헥산:에틸아세테이트 (49:1 v/v)이었고, 용출물 3 mL/min로 용출하고 235 nm에서 측정하였다.

<47> **실험예-β-caryophyllene 광산화물의 동정**

<48> 시료에 대한 IR (KBr) 데이터는 Bruker IFS66 Infrared Spectrophotomer (Karlsruhe, Germany)로 분석하여 얻었고, EI-MS 데이터는 JEOL JMS-700 Mass Spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan)로 분석하였다: ^{1}H-NMR (0-10 ppm), ^{13}C-NMR (0-200 ppm), 2D-NMR (^{13}C-^{13}C NMR, homo cosy, ^{1}H-^{13}C NMR, hetero cosy, Dept).

<49> 스펙트럼 데이터는 시료를 $CDCl_3$에 녹여 테트라메틸실란 (TMS)를 내부표준물질로 사용하여 500 MHz에서 Bruker-AM 500 Spectrophotometer (Karlsruhe, Germany)로 분석하였다.

<50> **실험예-항균효과 실험**

<51> 미생물 균주로는 그람 양성균 인 *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. faecalis*, and *B. cereus*.와 그람 음성균 인 *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, and *E. coli*.를 사용하였다. 이들 균은 nutrient broth (37℃, 18 hrs)에서 배양하였다. 단 *V. parahaemolyticus*는 3% NaCl을 함유하는 배지에서 배양하였다 (Mizunoe and others 2000 참조).

<52> 또한 이들 이외의 박테리아로서 *Brucella abortus, Corynebacterium equi, Klebsiella pneumoniae, Shigella dysentrariae, Streptococcus pyogenes*)와 곰팡이 (*Aspergillus niger, Aureobasidium pullulans, Epidermophyton floccosum, Gliocladium virens, Fusarium moniliforme, Penicillium sp., Trichophyton mentagrophytes*등도 항균성 시험용 균주로 사용되었다.

<53> 항균성 실험은 paper disc diffusion 방법으로 행하였다 (Berghe and Vlietink 1991; Cappuccino and Sherman 1998; Alma and others 2003). 구체적으로는 20 mL의 nutrient agar broth (1.5% agar)로 nutrient agar plate를 만들고, 그 표면에 5 mL의 top agar nutrient (0.8% agar; 45β) [600 nm에서 흡광도가 1인 박테리아 배양물 10% 함유]를 가하였다.

<54> Top agar를 굳힌 다음 paper discs (Toyo Roshi Kaisha 사 제품)를 올려 놓고 이 위에 시료용액 (100 ㎍/30 ㎕ 헥산)을 첨가하고 37℃에서 배양하였다. 18시간 배양 후 생성된 clear zone (mm)을 측정하여 항균성 측정하였다.

<55> 곰팡이는 Top agar 없이 포자를 균일하게 도말한 다음 박테리아의 항균성 시험과 같이 수행하였다.

<56> **<결과 및 고찰>**

<57> **(1) β-카리오필렌의 광산화**

<58> β-카리오필렌을 24시간 동안 광산화하면서 0.5, 1, 3, 6, 12, 24 시간 간격으로 시료를 채취하여 실리카 겔 TLC 플레이트 분석한 결과를 도 1a로서 정리하였다.

<59> 도 1a에서 보듯이, RF 0.61에서 β-카리오필렌의 1차 산화물이 분리되었는데 이 RF 수치는 β-카리오필렌 산화물 수치와 비슷하였다. 상기 일차산화물은 시간이 갈수록 분해되어 PPC I, II, III로 차례로 분해되었다. 광반응 시간이 경과함에 따라 PPC I과 II의 농도는 감소하고, PPC III의 농도는 증가하였다.

<60> β-카리오필렌의 1차 산물 RF치가 β-카리오필렌 산화물의 RF치와 비슷하다 하더라도 β-카리오필렌은 광반응에 의해 β-카리오필렌 산화물이 생성되지 않고 (Skold and others 2006), 도 1b에서 보는 바와 같이 β-카리오필렌 산화물은 광 반응에서 안정하기 때문에 여기에서 광반응에 의해 β-카리오필렌으로부터 생성된 1차 산화물은 β-카리오필렌의 하이드록퍼옥사이드 유도체이다.

<61> 나아가, CPP I, II, III를 분리하기 위하여 24시간 광 반응하여 얻은 PPC를 헥산과 에틸아세테이트 용매 혼합물을 사용하여 실리카 겔 컬럼으로 분리하고 그 결과를 도 2에 정리하였다. 도 2에서 보듯이, PPC로 분리한 분획의 조성비율은 PPC-I이 45%, PPC II가 40%, PPC III이 10%였고, 5%는 다른 산화물이었다.

<62> **(2) β-카리오필렌의 광산화물 (PPC)의 항균성**

<63> 상기에서 얻은 PPC -I, II, III 각각 100 ㎍을 헥산에 녹여 그람 양성균 5종 (*S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. faecalis*, *B. cereus*)과 그람 음성균 4종 (*V. parahaemolyticus*, *P. aer㎍inosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*)에 대한 항균성을 paper disc 법으로 검증하였다 (Cappuccino and Sherman 1998; Berghe and Vlietinck 1991).

<64> 배양 4일째에 나타난 항균효과를 도 1 및 하기표 1에 함께 정리하였다.

표 1

<65> β-카리오필렌(PPC)의 광산화물의 항균 활성

처리 (100 ㎍/30 ㎕ 헥산)		Gram Positive (+)					Gram Negative (-)			
		Staphylococcus aureus	*Staphylococcus faecalis*	*Staphylococcus epidermidis*	*Bacillus subtilis*	*Bacillus cereus*	***Vibrio parahaemolyticus***	*Pseudomonas aerugnosa*	*Samonella typhimurium*	*Escherichia coli*
PPC[1]		10[1]	-	-	-	-	7	-	-	-
PPC-I		-	-	-	-	-	-	-	-	-
PPC-II		13-14					12-13			
PPC-III		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA[2]		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO[3]		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CONTROL[4]		30					23			
화합물[5]	C(1)	16					14			
	C(2)	16					15			
	C(3)	19					17			
C의 혼합물	C(1):(2) (50:50)	15					15			
	C(2):(3) (50:50)	17					16			
	C(1):(3) (50:50)	18					17			
	C(1):(2):(3) (50:25:25)	15					15			

<66> [1] CPP의 처리량은 CPP-II의 함량 (CPP의 40%)을 보정한 250 ㎍/75㎕ 헥산을 의미

<67> [2] β-카리오필렌

<68> [3] β-카리오필렌 옥사이드

<69> [4] antibiotic 처리 (*S. aureus*; Amphicilline, *V. parahaemolyticus*; Streptoomycin/penicillin).

<70> [5] 화합물 (1), (2) 및 (3)은 각각 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene, 5a-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene을 의미

<71> [6] 3반복의 clear zone 평균직경 (mm)

<72> 상기표 1에서 보듯이, PPC-II 가 유일하게 *S. aureus*와 *V. parahaemolyticus* 에 대해 항균효과를 나타내었는데 clear zone은 각각 14mm, 13 mm였다. 반면 PPC-I 과 III 는 검증한 어떠한 균에 대해서도 항균효과를 나타내지 않았다. PPC 및 혼합물에서도 단일 화합물과 유사한 결과를 나타내었다.

<73> **(3) 화합물 분리**

<74> 얻어진 결과로부터, 상기 PPC -II 분핵을 recyclic HPLC로 추가 분리한 결과를 도 4에 정리하였다.

<75> 도 4에서 보듯이, 3개의 피크로 분리된 것을 확인할 수 있는데, 첫 번째 HPLC 실행에 의해 피크 분리가 잘 되지 않았지만 재차 HPLC로 분리한 결과 3개의 피크로 분리되었으며, 용출된 순서에 따라 각각 Compound (1), (2), (3)로 명명하였다.

<76> 도 2에 도시된 바와 같이, PCC II에 함유된 Compound (1), (2), (3)의 조성은 각각 20, 20, 55% 이었다.

<77> **(4) 분리된 화합물에 대한 항균성 검증**

<78> 얻어진 Compounds (1), (2), (3)를 다시 *S. aureus* and *V. parahaemolyticus* 에 대한 항균성 검증을 수행하고 그 결과를 도 5에 도시하였다.

<79> 도 5에서 보듯이, Compound (1), (2), (3)의 100 ㎍에 대한 clear zone은 *S. aureus*에 대하여 각각 15~16 mm, 16 mm, 18~19 mm이었고, *V. parahaemolyticus*에 대하여는 각각 14 mm, 14~15 mm, 15~17 mm였다.

<80> *S. aureus* and *V. parahaemolyticus*에 대한 이들 3 화합물의 항균효과는 대조로 사용한 암피실린의 *S. aureus*에 대한 항균효과 (30 mm clear zone)와 스트렙토마이신/페니실린에 비해 그 효과는 크지 않았다.

<81> 또한, 이들 3가지 (1), (2), (3) 화합물의 항균성은 서로 비슷하였지만, Compound (3)이 다소 항균성 효과가 좋았다.

<82> 항균성 물질을 식중독균의 생육 억제제로서 식품에 사용함에 있어, 암피실린과 스트렙토마이신/페니실린과 같은 항생제를 사용할 경우 많은 부작용에 의한 위험 부담이 따른다 (Yang and Deinzer 1993a; Marina-Rose and others 2004; Sab㎕al and others 2006). 그러나 이들 3가지 화합물은 호프, 맥주, 향신료 등 (Lam and others 1986; Yang and Deinzer 1993b; Goiris and others 2002)에 함유되고 있어 매일 섭취하기 때문에 이들은 식품에 사용할 때 안전성이 전혀 문제되지 않을 것이다. 결론적으로 본 발명에 의한 3가지 화합물은 *S. aureus* and/or *V. paraheamolyticus*에 의해 유발되는 식중독을 방지하기 위해 사용할 수 있다.

<83> **(5) 분리된 화합물의 구조 동정**

<84> Compounds (1), (2), (3)의 구조를 여러 가지 spectroscopic data를 이용하여 동정하였으며, 구체적으로는 도 6을 참조하라.

<85> Compound (1)의 ^{13}C-NMR, DEPT 스펙트럼에 의하여 탄소가 15개 있는데 그 중에서 sp^2 메틸렌을 갖는 탄소가 2개, sp^3 메틸렌을 갖는 탄소가 5개, 메틸 탄소가 2개, 메탄 탄소가 3개 그리고 4급 탄소가 3개로 구성되어 있었다.

<86> ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, m/z 220 (M^+)의 mass fragment로부터 추론해볼 때, Compound (**1**)은 분자식 $C_{15}H_{24}O$이고 4급 불포화도를 갖고 있었다. Compound (**1**)의 IR 스펙트럼에서는 3500 cm^{-1}에서 흡광도가 있어 히드록실기가 있음을 의미하고, ^{13}C-NMR로부터 2개의 exomethylene 이중결합이 있음을 알 수 있어 이 화합물은 불포화 이중결합이 더 존재함을 확인할 수 있었다. 또한, ^{1}H-^{1}H COSY 스펙트럼으로부터 C-5 - C-7, C-3 - C9- C-10의 연속성을 알 수 있었다.

<87> 이같은 결과를 종합하여 볼 때, Compound (1)은 5a-hydroxy caryophylla- 4(12),8(13)-diene으로 동정되었다. 상기 화합물의 스펙트럼 특성은 Collado and others (1996)의 결과와 일치하였다.

<88> Compounds (2) and (3)도 Compound (1)과 동일하게 ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR 스펙트럼으로부터 추론하여 4급 불포화도를 갖는 분자식 $C_{15}H_{24}O$였고, ^{1}H-^{1}H COSY는 Compounds (2) and (3)은 서로 C-5 diastereomer 임을 알 수 있었다. 따라서 Compound (2)는 5a-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene, Compound (3)은 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene로 동정되었다. 이들의 spectral 특성 역시 Collado and others (1996)의 5a-hydroxycryophylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene 결과와 일치하였다.

<89> **실험예-항균력 확인**

<90> 상기 실험에 사용한 미생물 이외의 박테리아와 곰팡이에 대한 다음과 같은 조성물의 항균효과를 측정하였다:

<91> 1) 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene,

<92> 2) 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene,

<93> 3) 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene,

<94> 4)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene의 50:50 혼합물,

<95> 5)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 50:50 혼합물,

<96> 6)5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 50:50 혼합물,

<97> 7)5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 50;25:25 혼합물, 및

<98> 8) 5b-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 4a-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene와 4b-hydroxy caryophylla-5(6),8(13)-diene의 혼합물.

<99> 측정 결과를 하기 표 2에 정리하였다.

표 2

<100> 카리오필렌 광산화물의 여러 미생물에 대한 항균효과

미생물	항균성 조성물 (100 ㎍/30 ㎕ 헥산)[1]							
	PPC	1	2	3	4	5	6	7
박테리아								
Brucella abortus	9[2]	11	12	12	12	13	12	12
Corynebacterium equi	7	10	11	10	12	11	9	10
Klebsiella pneumoniae	7	10	11	11	10	12	11	11
Shigella dysentrariae	9	11	13	13	12	14	12	14
Streptococcus pyogenes	8	10	10	13	11	12	11	9
곰팡이								
Aspergillus niger	11	11	10	9	11	11	10	11
Aureobasidium pullulans	12	15	11	11	13	10	12	15
Epidermophyton floccosum	11	11	15	15	10	16	13	17
Gliocladium virens	15	12	10	16	10	12	15	17
Fusarium moniliforme	15	17	14	17	16	15	19	16
Penicillium sp.	13	11	14	18	11	15	15	13
Trichophyton mentagrophytes	12	19	11	15	10	14	17	15

<101> [1]CPP: CPP-II의 함량 (CPP의 40%)을 보정한 250 ㎍/75㎕ 헥산을 의미

<102> 1): 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene

<103> 2): 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene

<104> 3): 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene

<105> 4): 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene의 50:50 혼합물

<106> 5): 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 50:50 혼합물

<107> 6): 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와 5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 50:50 혼합물

<108> 7): 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene와 5a-hydroxycaryoephylla-3(4),8(13)-diene와

5b-hydroxycaryophylla-3(4),8(13)-diene의 50:25:25 혼합물

<109> [2)]3회 반복의 clear zone 평균 직경 (mm)

도면의 간단한 설명

<110> 도 1은 로즈 벤갈 ($6.25x10^{-4}$ M)을 함유하는 아세토니트릴내에 β-카리오필렌 ($5x10^{-3}$ M) (A 패널) 및 β-카리오필렌 산화물 (B 패널)를 24시간 이상 광산화시켜 생성된 β-카리오필렌 광산화물(PPC) 혼합물의 TLC 패턴을 도시한 도면이다. 상기 TLC 플레이트는 헥산:에틸아세테이트 (5:1 v/v)의 이동상에 의해 전개되었고 5% phosphomolybdic acid (PMA)로 염색하였다. CA와 CO는 각각 β-카리오필렌과 β-카리오필렌 산화물을 나타낸다.

<111> 도 2는 24시간동안 광산화에 의해 생성된 β-카리오필렌의 광산물(PPC)의 각 조성을 도시한 도면이다. CPP 성분 %는 최소 3회 이상 실험값의 평균치이다.

<112> 도 3은 *S. aureus* 및 *V. paraheamolyticus*에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리된 β-카리오필렌의 광산화물 (PPC)의 항균 활성을 도시한 도면이다. 도면 중 C는 대조군(헥산)을; CA는 β-카리오필렌을; CO는 β-카리오필렌 산화물을; 1은 PPC를; 2는 CPP -I을; 3은 CPP -β를; 그리고 4는 CPP -β를 나타낸다. 디스크상에 적용된 샘플의 함량은 100 ㎍이었다.

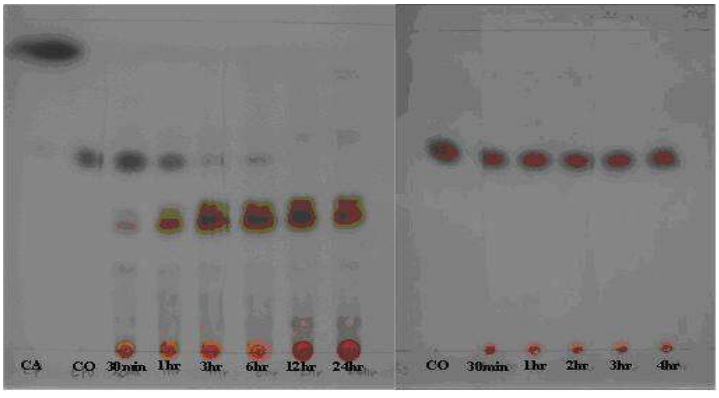
<113> 도 4는 recyclic HPLC 시스템에 의해 분리된 CPP -β 의 HPLC 크로마토그램 이다.

<114> 도 5는 *S. aureus* 및 *V. paraheamolyticus*에 대하여 recyclic HPLC로부터 분리된 β-카리오필렌의 광산화물(PPC)로부터 얻어진 화합물 (1), (2) 및 (3)에 대한 항균 활성을 나타내는 도면이다. 도면 중 C는 대조군(헥산)을; A는 *S. aureus*에 대한 암피실린 및 *V. paraheamolyticus*에 대한 스트렙토마이신/페니실린을; 1은 CPP-II을; 2는 Compound (1)을; 3은 Compound (2)를; 그리고 4는 Compound (3)을 나타낸다. 디스크상에 적용된 샘플의 함량은 100 ㎍이었다.

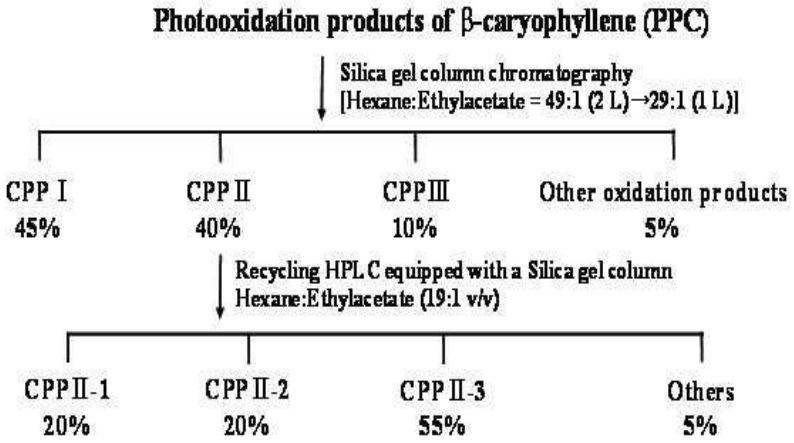
<115> 도 6은 5a-hydroxy caryophylla-4(12),8(13)-diene [화합물 (1)], 5a-hydroxycaryophylla-3,8(13)-diene [화합물 (2)] 및 5b-hydroxycaryophylla-3,8(13)-diene [화합물 (3)]의 화학식을 나타낸 도면이다. 이때 CA와 CO는 각각 β-카리오필렌 및 β-카리오필렌 산화물을 나타낸다.

도면

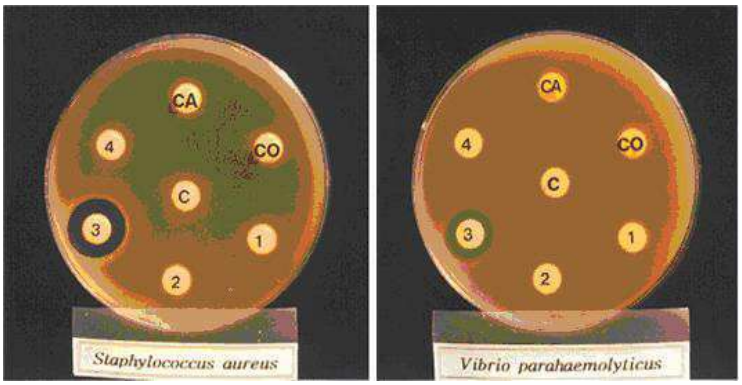
도면1



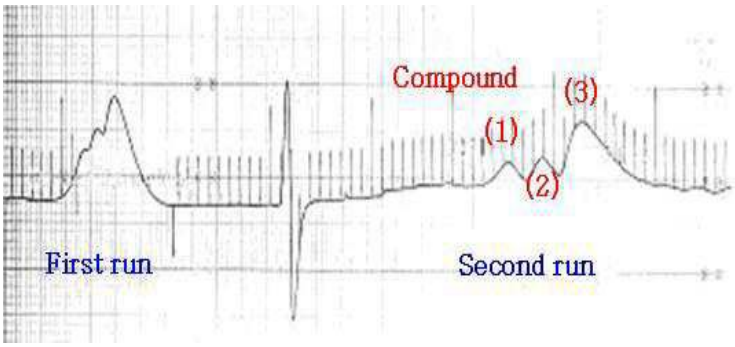
도면2


Photooxidation products of β-caryophyllene (PPC)
Silica gel column chromatography
[Hexane:Ethylacetate = 49:1 (2 L)→29:1 (1 L)]
CPP Ⅰ
45%
CPP Ⅱ
40%
CPPⅢ
10%
Other oxidation products
5%
Recycling HPLC equipped with a Silica gel column
Hexane:Ethylacetate (19:1 v/v)
CPPⅡ-1
20%
CPPⅡ-2
20%
CPPⅡ-3
55%
Others
5%

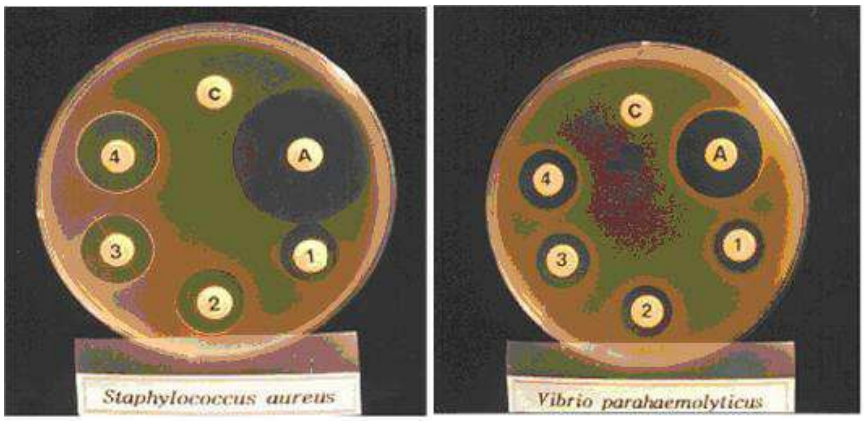
도면3


CA
4
CO
C
3
1
2
Staphylococcus aureus
CA
4
CO
C
3
1
2
Vibrio parahaemolyticus

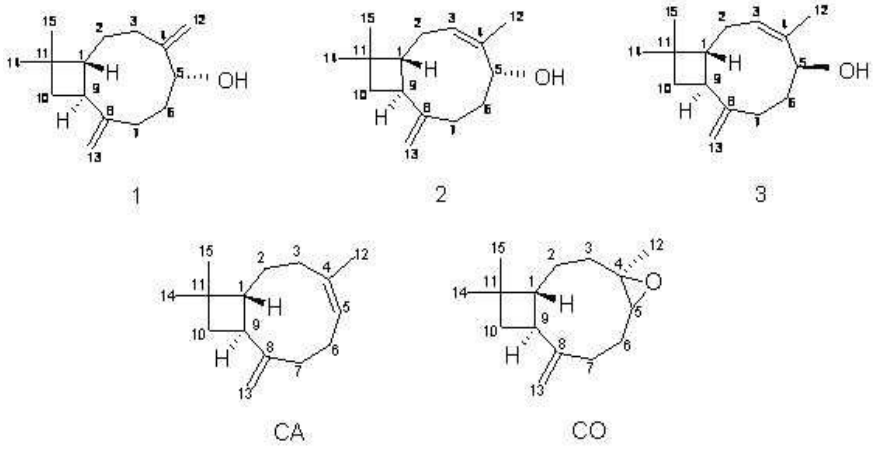
도면4


Compound
(3)
(1)
(2)
First run
Second run

도면5


C
A
4
3
1
2
Staphylococcus aureus
C
A
4
3
1
2
Vibrio parahaemolyticus

도면6


OH
1
OH
2
OH
3
CA
O
CO