



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0091449
(43) 공개일자 2017년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 65/00 (2009.01) *A01N 65/24* (2009.01)

B65D 65/38 (2006.01) *B65D 81/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 65/00 (2013.01)

A01N 65/24 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0012486

(22) 출원일자 2016년02월01일

심사청구일자 2016년02월01일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

류지훈

서울특별시 용산구 이촌로 201, 202동 1502호(이촌동, 한가람아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

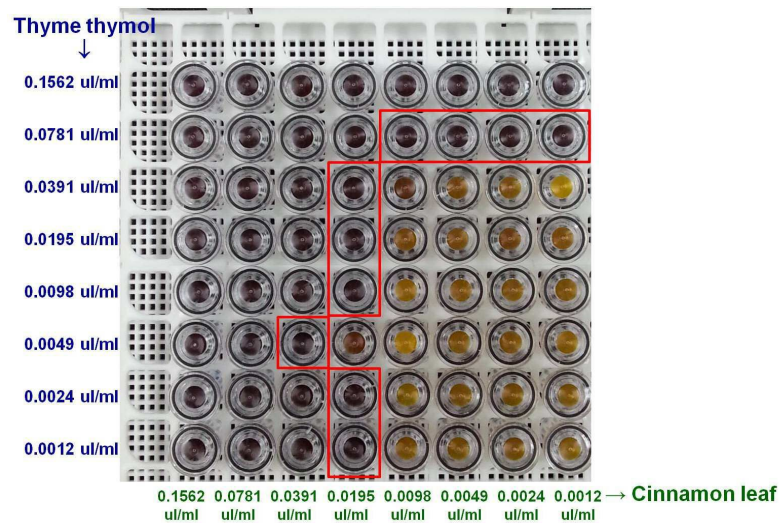
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 천연 항균 정유 조성물

(57) 요약

본 발명은 천연 정유를 포함하는 항균용 정유 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 리스테리아 속의 미생물을 효과적으로 저해시킬 수 있을 뿐만 아니라 개별적으로 사용되는 정유의 양을 최소화함으로써 식품 포장 재제로 사용될 경우 식품의 관능적 특성 변화를 최소화할 수 있으며, 개별적인 정유의 사용량 감소로 인한 비용 절감의 효과도 함께 얻을 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B65D 65/38 (2013.01)

B65D 81/28 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313035-03-3-HD020

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 다양한 효용(항균, 방충 및 항산화)을 가진 식품 포장재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.20 ~ 2016.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

타임 티몰(time thymol), 시나몬 잎(cinnamon leaf), 시나몬 껍질(cinnamon bark), 오레가노(oregano) 및 클로브 버드(clove bud)로 이루어진 군에서 선택된 2종 이상의 정유를 유효성분으로 포함하는 리스테리아(*Listeria*) 속 항균용 정유 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

타임 티몰; 및

시나몬 잎, 시나몬 껍질, 오레가노 및 클로브 버드로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 정유를 유효성분으로 포함하는 항균용 정유 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

타임 티몰의 정유와 시나몬 잎의 정유가 1:0.5 내지 1:20의 함량비로 포함되는 것인 항균용 정유 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

타임 티몰의 정유와 시나몬 껍질의 정유가 1:0.5 내지 1:16의 함량비로 포함되는 것인 항균용 정유 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

타임 티몰의 정유와 오레가노의 정유가 1:0.5 내지 1:4의 함량비로 포함되는 것인 항균용 정유 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서,

타임 티몰의 정유와 클로브 버드의 정유가 1:0.5 내지 1:2의 함량비로 포함되는 것인 항균용 정유 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

오레가노의 정유와 시나몬 껍질의 정유가 1:0.5 내지 1:16의 함량비로 포함되는 것인 항균용 정유 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 리스테리아 속은 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 인 항균용 정유 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 정유 조성물을 포함하는 리스테리아(*Listeria*) 속 항균용 식품 포장재.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 리스테리아 속은 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 인 식품 포장재.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항균용 정유 조성물을 식품 포장재에 도포 또는 코팅하는 단계를 포함하는, 식품에서 리스테리아 속 균의 활성을 억제하기 위한 식품 포장 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

항균용 정유 조성물을 식품 포장재에 도포 또는 코팅하는 단계는 타임 티몰, 시나몬 잎, 시나몬 껍질, 오레가노 및 클로브 버드에서 선택된 2종 이상의 정유를 조합하여 항균용 정유 조성물을 제조하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 식품 포장 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리스테리아 속에 항균 활성을 나타내는 천연 정유 조성물, 이를 포함하는 식품 포장재 및 식품 포장 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 소비자들의 건강지향적 요구가 증가되면서, 항균제제로 화학적 합성물질이 아닌 정유와 같은 천연 항균제제를 선호하는 경향이 있다. 정유는 식물로부터 추출하여 얻어진 휘발성이 강한 액체로, 다양한 미생물에 항균 활성을 가지는 정유들이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 미생물에 대한 항균성을 가진 정유는 액체상태 또는 기체상태로 사용될 수 있다. 정유는 식품의 항균 포장제제로 이용될 수 있으며, 식품 표면이나 식품 접촉 표면의 틈새에 놓여 있는 미생물에 대한 침투성이 높은 장점이 있어, 식품 포장산업에서 천연 정유를 이용한 위해 미생물의 살균기술에 대한 관심이 증가하고 있다. 하지만, 정유는 일반적으로 강한 향미를 가지고 있어 식품 포장재에 사용될 경우 식품의 관능적 특성에 영향을 줄 가능성이 높다. 또한, 한 종류의 정유를 단독으로 사용할 경우 항균 효과를 보이기 위해서는 많은 양이 필요하기 때문에 비용이 많이 든다는 단점이 있다.

[0004] 따라서, 항균 효과를 나타내는 동시에 식품의 관능적 영향을 최소화하고 정유의 사용량을 줄일 수 있는 방법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 리스테리아 속 균에 대한 정유들의 항균 효과는 유지하되, 개별적인 항균 정유의 사용량을 감소시켜 식품의 관능적 특성에 대한 변화와 비용을 최소화할 수 있는 천연 항균 정유 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은 항균 활성을 나타내는 정유 조성물에 대하여 천연물을 대상으로 연구를 진행하던 중 항균 시너지를 일으키는 천연 정유의 조합 및 그 비율을 탐색하여 항균 시너지를 극대화할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명은 천연 정유를 유효성분으로 포함하는 리스테리아(*Listeria*) 속의 미생물에 대한 항균용 정유 조성물, 상기 항균용 정유 조성물을 포함하는 식품 포장재, 상기 항균용 정유 조성물을 식품 포장재에 첨가하는 단계를 포함하는 식품에서 리스테리아 속 미생물의 활성을 억제하기 위한 식품 포장 방법을 제공한다.

[0010] 하기 실시예에서는, 천연 정유를 조합하여 그 비율에 따른 조성물의 리스테리아 속 미생물에 대한 항균활성을 확인하였으며, 천연 정유의 조합에 의한 항균 시너지로부터 개별적으로 사용되는 정유의 양을 최소화할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 일정 비율로 조합된 천연 정유는 리스테리아 속 미생물에 대한 항균용 정유 조성물의 유효성분으로서 사용될 수 있다.

[0012] 이하, 본 발명의 구성을 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명은 타임 티몰(*time thymol*), 시나몬 잎(*cinnamon leaf*), 시나몬 껍질(*cinnamon bark*), 오레가노(*oregano*) 및 클로브 버드(*clove bud*)에서 선택된 2종 이상의 정유를 유효성분으로 포함하는 항균용 정유 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에 있어서, "정유"란 타임 티몰, 시나몬 잎, 시나몬 껍질, 오레가노 또는 클로브 버드로부터 향기 성분을 응축하여 얻은 오일상의 추출물을 말한다. 상기 정유의 제조에는 수증기 증류법, 휘발성 용제(벤젠, 헥산 등)를 이용한 용제 추출법, 침출법(추출 대상에 상처를 내어 침출 수액을 수집하는 방법), 압착법, 초임계 추출법 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 정유는 시판되는 제품을 이용할 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 항균용 정유 조성물은 리스테리아(*Listeria*) 속 미생물에 대한 항균 활성을 나타낸다.

[0016] 한 구체예에서, 상기 리스테리아 속 미생물은 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)일 수 있다.

[0017] 상기 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)는 *Listeria* 속의 미생물 중 유일하게 인간 리스테리아증(*human listeriosis*)을 일으키는 식중독 세균으로, 냉장온도, 높은 산과 염기, 낮은 수분 활성도와 같은 다양한 범위의 환경조건에서 생존 및 성장할 수 있는 특징이 있다. *L. monocytogenes*는 우유, 치즈, 육류, 해산물, 채소 및 각종 가공식품과 같은 다양한 식품에서 식중독을 일으키는 균으로 알려져 있고, 유아, 임산부, 노인, 면역결핍환자와 같은 위험 그룹에서 수막염(*meningitis*), 뇌염(*encephalitis*), 패혈증(*sepsis*), 중추신경감염증, 유산과 같은 심각한 질병을 유발할 수 있으며, 이 균에 감염된 경우의 치사율은 약 30% 정도로 다른 식중독 균들에 비해 매우 높다.

[0018] 따라서, 본 발명에 따른 조성물은 상기 식중독 균의 활성을 억제함으로써 식중독 균에 의한 리스테리아증을 예방할 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 정유는 타임 티몰, 시나몬 잎, 시나몬 껍질, 오레가노 및 클로브 버드에서 선택된 2종 이상의 정유가 특정 비율로 조합되어 포함되는 것이다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 조성물의 정유는 타임 티몰과 시나몬 잎, 시나몬 껍질, 오레가노 및 클로브 버드로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 정유가 조합되는 것을 포함할 수 있다.

- [0021] 한 구체예에서, 상기 정유는 타임 티몰 정유와 시나몬 잎의 정유가 1:0.5 내지 1:20의 함량비, 예를 들어 1:1 내지 1:20, 1:1 내지 1:8, 1:1 내지 1:16, 1:2 내지 1:20, 1:2 내지 1:16, 1:2 내지 1:8, 1:8 내지 1:20, 1:16 내지 1:20의 함량비일 수 있으며, 보다 구체적으로 1:8 내지 1:16의 함량비로 포함되어 조합되는 것일 수 있다.
- [0022] 또한 한 구체예에서, 상기 정유는 타임 티몰 정유와 시나몬 껍질의 정유가 1:0.5 내지 1:16의 함량비, 예를 들어 1:1 내지 1:16, 1:2 내지 1:16, 1:2 내지 1:8, 1:4 내지 1:8, 1:4 내지 1:16의 함량비일 수 있으며, 보다 구체적으로 1:8 내지 1:16의 함량비로 포함되어 조합되는 것일 수 있다.
- [0023] 다른 구체예에서, 상기 정유는 타임 티몰의 정유와 오레가노의 정유가 1:0.5 내지 1:4의 함량비, 예를 들어 1:0.5 내지 1:2, 1:1 내지 1:4, 보다 구체적으로 1:2 내지 1:4로 포함되어 조합되는 것일 수 있다.
- [0024] 또 다른 구체예에서, 상기 정유는 타임 티몰의 정유와 클로브 버드의 정유가 1:0.5 내지 1:2의 함량비, 예를 들어 1:0.5 내지 1:1, 보다 구체적으로 1:1 내지 1:2의 함량비로 포함되어 조합되는 것일 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명에 있어서, 상기 조성물의 정유는 오레가노 정유와 시나몬 껍질 정유가 조합되는 것을 포함할 수 있다. 상기 정유는 오레가노 정유와 시나몬 껍질 정유가 1:0.5 내지 1:16의 함량비, 예를 들어 1:1 내지 1:16, 1:2 내지 1:16, 1:4 내지 1:8, 1:4 내지 1:16, 보다 구체적으로 1:8 내지 1:16의 함량비로 포함되어 조합되는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 조성물의 조성물 총 중량에 대한 함량은 조합되는 정유의 농도, 본 발명의 조성물이 적용되는 대상체에 따라 변할 수 있다.
- [0027] 한편, 본 명세서에서 용어 '유효성분으로 포함하는'이란 정유의 상기와 같은 항균 효능 또는 활성을 달성하는데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 조성물 내에서 조합되는 정유는 예를 들어, 타임 티몰의 정유와 시나몬 잎의 정유가 조합된 경우, 타임 티몰의 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.0012 $\mu\text{L/mL}$ 이상이 포함되고, 시나몬 잎의 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.0195 $\mu\text{L/mL}$ 이상이 포함된다.
- [0028] 본 발명의 다른 구체예에서, 타임 티몰의 정유와 시나몬 껍질의 정유가 조합된 경우, 타임 티몰의 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.0024 $\mu\text{L/mL}$ 이상이 포함되고, 시나몬 껍질의 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 0.0098 $\mu\text{L/mL}$ 이상이 포함된다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 타임 티몰의 정유와 오레가노 정유가 조합된 경우, 타임 티몰의 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.0098 $\mu\text{L/mL}$ 이상 포함되고, 오레가노 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.0098 $\mu\text{L/mL}$ 이상이 포함된다.
- [0030] 본 발명의 다른 구체예에서, 타임 티몰의 정유와 클로브 버드 정유가 조합된 경우, 타임 티몰의 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.0195 $\mu\text{L/mL}$ 이상이고, 클로브 버드 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.0195 $\mu\text{L/mL}$ 이상이 포함된다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 오레가노 정유와 시나몬 껍질의 정유가 조합된 경우, 오레가노 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.0024 $\mu\text{L/mL}$ 이상이고, 시나몬 껍질의 정유는 0.0001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 바람직하게는 0.001 $\mu\text{L/mL}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.0195 $\mu\text{L/mL}$ 이상이 포함된다.
- [0032] 상기 정유는 천연물로서 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물 내에 포함되는 정유의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 항균용 정유 조성물을 포함하는 리스테리아(*Listeria*) 속의 미생물을 저해하기 위한 항균용 식품 포장재를 제공한다. 한 구체예에서, 상기 리스테리아 속의 미생물은 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따르면, 상기 식품 포장재를 사용할 경우 종래에 식품 포장재에 사용되었던 정유의 양보다 사용되는 정유의 양이 최소화되어 식품에 미치는 관능적 영향이 최소화될 뿐만 아니라 비용 절감의 효과도 함께 얻을 수 있다.

- [0037] 또한, 본 발명은 상기 항균용 정유 조성물을 식품 포장재에 도포 또는 코팅하는 단계를 포함하는, 식품에서 리스테리아 속 미생물의 활성을 억제하기 위한 식품 포장 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 항균용 정유 조성물을 식품 포장재에 도포 또는 코팅하는 단계는 타임 티몰, 시나몬 잎, 시나몬 껍질, 오레가노 및 클로브 버드에서 선택된 2종 이상의 정유를 조합하여 항균용 정유 조성물을 제조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 항균용 정유 조성물은 앞서 설명한 내용을 동등하게 적용 또는 준용할 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명의 항균용 정유 조성물은 리스테리아 속 미생물을 효과적으로 저해시킬 수 있을 뿐만 아니라, 정유를 조합함으로써 얻을 수 있는 항균 시너지로 인해 개별적으로 사용되는 정유의 양을 최소화함으로써 식품 포장재제로 사용될 경우 식품의 관능적 특성 변화를 최소화할 수 있으며, 개별적인 정유의 사용량 감소로 인한 비용 절감의 효과도 함께 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 *L. monocytogenes*에 대한 시나몬 잎 정유와 타임 티몰 정유 조합의 checkerboard assay 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 *L. monocytogenes*에 대한 시나몬 껍질 정유와 오레가노 정유 조합의 checkerboard assay 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 *L. monocytogenes*에 대한 시나몬 껍질 정유와 타임 티몰 정유 조합의 checkerboard assay 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 *L. monocytogenes*에 대한 타임 티몰 정유와 오레가노 정유 조합의 checkerboard assay 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

- [0046] [실시예 1] *L. monocytogenes*에 대한 개별적인 천연 정유의 최소저해농도 및 최소치사농도의 결정

- [0047] *L. monocytogenes*에 대한 천연 정유의 최소저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 및 최소치사농도(minimal lethal concentration, MLC)를 결정하기 위해, 기체의 항균력 측정장치 및 기체의 항균력 측정방법(한국 등록특허 제1406387호)을 사용하였다.

- [0048] Nutrient agar에 1%(w/v)의 D-glucose와 0.025%(w/v)의 bromocresol purple이 첨가된 NAGBA를 제조하여 고압에서 멸균하였다. 액상의 상기 배지를 상부 용기에 0.49mL씩 넣고 굳힌 후, *L. monocytogenes* 배양액(ca. $7.0 \log \text{CFU/mL}$) 10 μL 를 분주하여 미생물이 배지에 흡착되도록 laminar flow biosafety hood ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)에서 30분간 유지하였다. 천연 정유는 diethyl ether를 이용하여 1/2배씩 단계별로 희석하여 준비하였다. 상기 희석액을 paper disc(Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)가 들어있는 하부 용기에 10 μL 씩 분주한 후, 상부 용기와 하부 용기를 빠르게 결합하여 밀봉시켜 주었다. 밀봉된 용기들을 30°C 배양기에서 24 내지 48시간 동안 배양한 후, 배지의 색 변화를 육안으로 관찰하여 배지의 색이 변하지 않은 최소 농도를 최소저해농도(MIC)로 설정하였다. 그리고 배지의 색 변화를 보이지 않은 배지 표면들을 NA에 streaking하여 30°C 배양기에서 24시간 동안

배양한 후, 단일 콜로니가 자라지 않은 최소 농도를 최소치사농도(MLC)로 설정하였다. 그 측정 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

Essential oils			MIC (ml/ml)	MLC (ml/ml)
Scientific name	Common name	Plant part		
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamon	Bark	0.0781	0.0781
<i>Cinnamomum ceylanicum</i>	Cinnamon	Leaf	0.0781	0.0781
<i>Syzygium aromaticum</i>	Clove	Flower bud	0.0781	0.0781
<i>Origanum vulgare</i>	Oregano	Flower, leaf, and stem	0.0781	0.0781
<i>Thymus zygis CT thymol</i>	Thyme thymol	Flower, leaf, and stem	0.0781	0.0781
<i>Thymus zygis CT linalool</i>	Thyme linalool	Flower, leaf, and stem	0.1563	0.1563
<i>Styrax tonkinensis</i>	Benzoin	Flower, leaf, and stem	0.6250	0.6250
<i>Daucus carota</i>	Carrot	Seeds	0.6250	0.6250
<i>Ocimum basilicum</i>	Basil	Flowering herb	0.6250	1.25
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cypress	Leaf and branch	1.25	1.25
<i>Abies sibirica</i>	Fir Needle Siberian	Needle and twig	1.25	1.25
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lemongrass	Leaf (blade)	1.25	1.25
<i>Myrtus communis</i>	Myrtle	Leaf and branch	1.25	1.25
<i>Citrus cinensis</i>	Orange sweet	Peel	1.25	1.25
<i>Citrus aurantium amara</i>	Neroli	Blossom	1.25	1.25
<i>Cymbopogon martini var. motia</i>	Palmarosa	Leaf	1.25	1.25
<i>Pogostemon cablin</i>	Patchouli	Leaf	1.25	1.25

표 1에서 보는 바와 같이, 시나몬 껍질, 타임 티몰, 시나몬 잎, 오레가노, 클로브 버드 정유 모두 0.0781 uL/mL의 낮은 최소저해농도(MIC)를 보이는 것을 통해 *L. monocytogenes*에 대한 항균 효과가 우수함을 확인하였다.

[실시예 2] 시나몬 잎의 정유와 타임 티몰의 정유의 조합물의 항균 시너지 확인

현재, 천연 정유를 조합하여 항균 시너지를 확인하기 위한 실험 방법은 표준화되어 있지 않아, 액체 상의 항균 물질을 조합하여 항균 시너지를 확인하는 방법인 checkboard assay를 응용하여 사용하였다.

항균력 측정 용기(vial type)를 8행×8열로 나열하였다. 상부 용기에 0.49mL의 NAGBA 배지(실시예 1 참조)를 넣고 균인 후, *L. monocytogenes* 배양액 (7.0 log CFU/mL) 10 μL를 분주하여 미생물이 배지에 흡착되도록 laminar flow biosafety hood에서 30분 간 유지시켜 주었다. 하부 용기에 반으로 나누어진 8 mm 지름의 paper disc (Advantec Toyo Kaisha. Ltd., Tokyo, Japan)를 넣어주었다. Diethyl ether를 이용하여 천연 항균 정유의 최소저해농도(MIC)의 2배가 되도록 희석액을 제조하였고, 제조한 희석액 각각을 diethyl ether를 이용하여 1/2 배씩 단계별로 희석하여 준비하였다. 1-8행에 MIC의 2배 농도부터 mic의 1/64배 농도가 되도록 희석한 A (시나몬 잎) 정유를 5 μL씩 넣었고, 1-8열에는 MIC의 2배 농도부터 MIC의 1/64배 농도가 되도록 희석한 B(타임 티몰) 정유를 5 μL씩 넣었다. 정유를 분주한 직후, 하부 용기와 상부 용기를 빠르게 결합하여 밀봉시켜 주었다. 밀봉된 용기를 30℃ 배양기에서 24 내지 48시간 동안 배양한 후, 배지의 색 변화를 육안으로 관찰하여 균의 성장이 억제되는 최저 농도의 배양 비율을 판별하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

가장 효율적으로 나타난 배합 농도의 결과를 하기 수학적식에 대입하여 부분 억제 농도(fractional inhibiting concentration, FIC)를 계산하였다. 이때, FIC 지수가 0.5보다 작거나 같으면 상승 효과(synergistic effect), 0.5와 1 사이면 부가 효과(additive effect), 1과 4 사이면 무관함(indifferent), 4 이상이면 상쇄 효과(antagonistic effect)가 있는 것으로 판단하였다. 그 측정 결과를 표 2에 나타내었다.

[0057] [수학식]

$$A \text{ 정유의 FIC} = \frac{\text{조합물에서의 A 정유의 MIC}}{A \text{ 정유를 단독으로 사용하였을 때의 MIC}}$$

[0058]

$$B \text{ 정유의 FIC} = \frac{\text{조합물에서의 B 정유의 MIC}}{B \text{ 정유를 단독으로 사용하였을 때의 MIC}}$$

[0059]

$$\text{FIC index} = A \text{ 정유의 FIC} + B \text{ 정유의 FIC}$$

[0060]

표 2

[0061]

시나몬 (leaf) (A)			타임티몰(B)			FICI	Outcome	Ratio of combination
MIC (mL/mL)		FIC	MIC (mL/mL)		FIC			
Alone	In combination		Alone	In combination				(A:B)
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0012	0.02	0.27	Synergy	16:1
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0024	0.03	0.28	Synergy	8:1
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0098	0.13	0.38	Synergy	2:1
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0195	0.25	0.50	Synergy	1:1

[0063]

도 1 및 표 2에서 보는 바와 같이, 시나몬 잎의 정유와 타임 티몰의 정유를 조합하여 처리하는 경우, 단독으로 정유를 처리하였을 때보다 MIC가 감소하였으며, FIC 지수가 0.27 내지 0.50으로 0.50 보다 작거나 같은 값을 보이는 것으로 보아, 두 정유의 조합이 시너지 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한, 타임 티몰 정유와 시나몬 잎 정유의 조합 비율이 1:16(FIC 지수 0.27), 1:8(FIC 지수 0.28), 1:2(FIC 지수 0.38), 1:1(FIC 지수 0.50)일 때 평균 시너지를 보였으며, 특히 1:16의 비율로 조합하였을 때 FIC 지수가 0.27로 가장 낮아 평균 시너지가 가장 큰 최적의 조합 비율임을 알 수 있었다.

[0065]

[실시예 3] 시나몬 껍질 정유와 오레가노 정유의 조합물의 평균 시너지 확인

[0066]

상기 실시예 2에서 A로 시나몬 껍질을, B로 오레가노를 적용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 시나몬 껍질 정유와 오레가노 정유를 조합하여 *L.monocytogenes*에 대한 평균 시너지를 확인하였다. 도 2에 시나몬 껍질 정유와 오레가노 정유 조합의 checkerboard assay 결과를 나타내었고, 표 3에 시나몬 껍질 정유와 오레가노 정유의 조합 비율을 나타내었다.

표 3

[0067]

시나몬 (bark) (A)			오레가노 (B)			FICI	Outcome	Ratio of combination
MIC (mL/mL)		FIC	MIC (mL/mL)		FIC			
Alone	In combination		Alone	In combination				(A:B)
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0024	0.03	0.28	Synergy	8:1
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0098	0.13	0.38	Synergy	2:1
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0024	0.25	0.50	Synergy	1:1

[0069]

도 2와 표 3에서 보는 바와 같이, 시나몬 껍질 정유와 오레가노 정유를 조합하여 처리하는 경우, 단독으로 정유

를 처리하였을 때보다 MIC 가 감소하였으며, FIC 지수가 0.28 내지 0.50으로 0.5보다 작거나 같은 값을 보이는 것으로 보아 두 정유의 조합이 시너지 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한, 오레가노 정유와 시나몬 껍질 정유의 조합 비율이 1:8(FIC 지수 0.28), 1:2(FIC 지수 0.38), 1:1(FIC 지수 0.50)일 때 항균 시너지를 보였으며, 특히 1:8의 비율로 조합한 경우 FIC 지수가 0.28로 가장 낮아 항균 시너지가 가장 큰 최적의 조합 비율임을 알 수 있었다.

[실시예 4] 시나몬 껍질 정유와 타임 티몰 정유의 조합물의 항균 시너지 확인

상기 실시예 2에서 A로 시나몬 껍질을, B로 타임 티몰을 적용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 시나몬 껍질 정유와 타임 티몰 정유를 조합하여 *L.monocytogenes*에 대한 항균 시너지를 확인하였다. 도 3에 시나몬 껍질 정유와 타임 티몰 정유 조합의 checkerboard assay 결과를 나타내었고, 표 4에 시나몬 껍질 정유와 타임 티몰 정유의 조합 비율을 나타내었다.

표 4

시나몬 (bark) (A)			타임티몰 (B)			FICI	Outcome	Ratio of combination
MIC (mL/mL)		FIC	MIC (mL/mL)		FIC			
Alone	In combination		Alone	In combination				(A:B)
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0024	0.03	0.28	Synergy	8:1
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0049	0.06	0.31	Synergy	4:1
0.0781	0.0098	0.13	0.0781	0.0195	0.25	0.38	Synergy	1:2
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0098	0.13	0.38	Synergy	2:1

도 3 및 표 4에서 보는 바와 같이, 시나몬 껍질 정유와 타임 티몰 정유를 조합하여 처리하는 경우, 단독으로 정유를 처리하였을 때보다 MIC가 감소되었으며, FIC 지수는 0.28 내지 0.38로 0.5보다 작은 값을 보이는 것으로 보아, 두 정유의 조합이 시너지 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한, 타임 티몰 정유와 시나몬 껍질 정유의 조합 비율이 1:8(FIC 지수 0.28), 1:4(FIC 지수 0.31), 1:2(FIC 지수 0.38), 2:1(FIC 지수 0.38)일 때 항균 시너지를 보였으며, 특히 1:8의 비율로 조합한 경우 FIC 지수가 0.28로 가장 낮아 항균 시너지가 가장 큰 최적의 조합 비율임을 알 수 있었다.

[실시예 5] 오레가노 정유와 타임 티몰 정유의 조합물의 항균 시너지 확인

상기 실시예 2에서 A로 오레가노를, B로 타임 티몰을 적용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 오레가노 정유와 타임 티몰 정유를 조합하여 *L.monocytogenes*에 대한 항균 시너지를 확인하였다. 도 4에 오레가노 정유와 타임 티몰 정유 조합의 checkerboard assay 결과를 나타내었고, 표 5에 오레가노 정유와 타임 티몰 정유의 조합 비율을 나타내었다.

표 5

오레가노 (A)			타임티몰 (B)			FICI	Outcome	Ratio of combination
MIC (mL/mL)		FIC	MIC (mL/mL)		FIC			
Alone	In combination		Alone	In combination				(A:B)
0.0781	0.0098	0.13	0.0781	0.0195	0.25	0.38	Synergy	1:2
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0098	0.13	0.38	Synergy	2:1

도 4 및 표 5에서 보는 바와 같이, 오레가노 정유와 타임 티몰 정유를 조합하여 처리하는 경우, 단독으로 정유

를 처리하였을 때보다 MIC가 감소하였으며, FIC 지수는 0.38로 0.5보다 작은 값을 보이는 것으로 보아, 두 정유의 조합이 시너지 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한, 타임 티몰 정유와 오레가노 정유의 조합 비율이 1:2(FIC 지수 0.38), 1:0.5(FIC 지수 0.38)일 때 최적의 조합 조건임을 알 수 있었다.

[실시에 6] 클로브 버드 정유와 타임 티몰 정유의 조합물의 항균 시너지 확인

상기 실시예 2에서 A로 클로브 버드를, B로 타임 티몰을 적용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 클로브 버드 정유와 타임 티몰 정유를 조합하여 *L.monocytogenes*에 대한 항균 시너지를 확인하였다. 표 6에 클로브 버드 정유와 타임 티몰 정유의 조합 비율을 나타내었다.

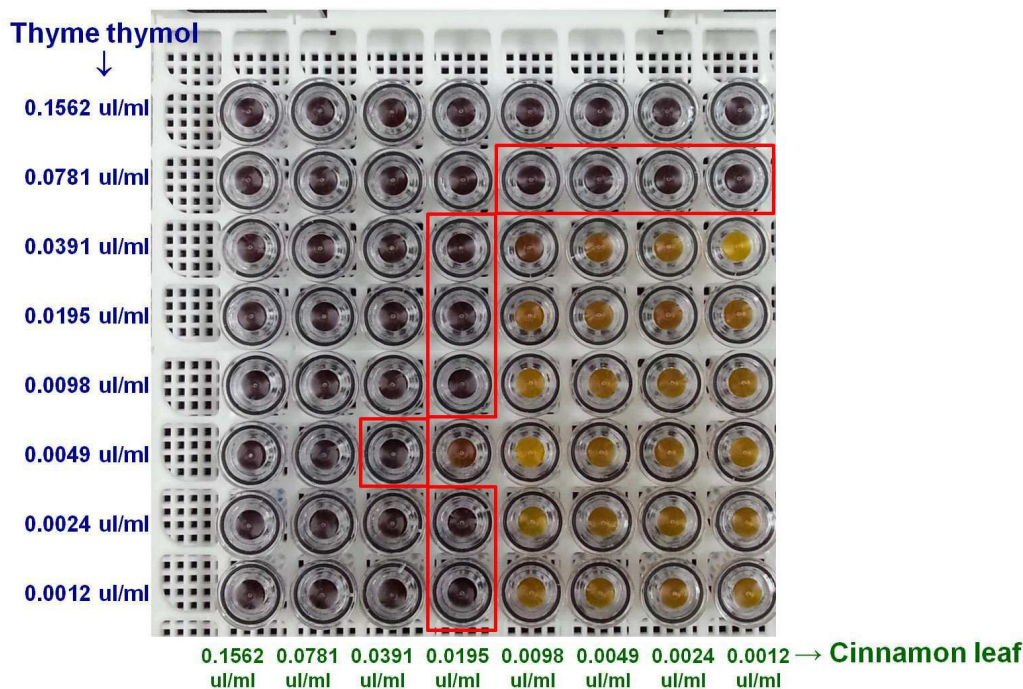
표 6

클로브 버드(A)			타임티몰 (B)			FICI	Outcome	Ratio of combination (A:B)
MIC (mL/mL)		FIC	MIC (mL/mL)		FIC			
Alone	In combination		Alone	In combination				
0.0781	0.0195	0.25	0.0781	0.0195	0.25	0.50	Synergy	1:1

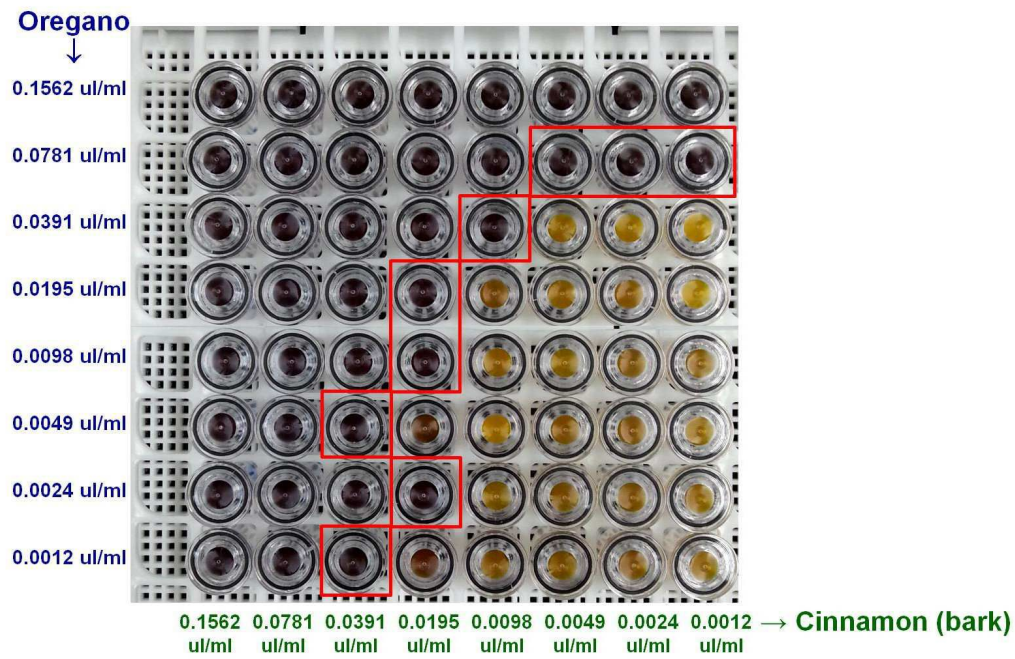
표 6에서 보는 바와 같이, 클로브 버드 정유와 타임 티몰 정유를 조합하여 처리하는 경우, 단독으로 정유를 처리하였을 때보다 MIC가 감소하였으며, FIC 지수가 0.50으로 0.5와 같은 값을 보이는 것으로 보아, 두 정유의 조합이 시너지 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한, 클로브 버드와 타임 티몰 정유를 1:1의 비율로 조합한 경우, FIC 지수가 0.50으로 항균 시너지를 보이는 최적의 조합 조건임을 알 수 있었다.

도면

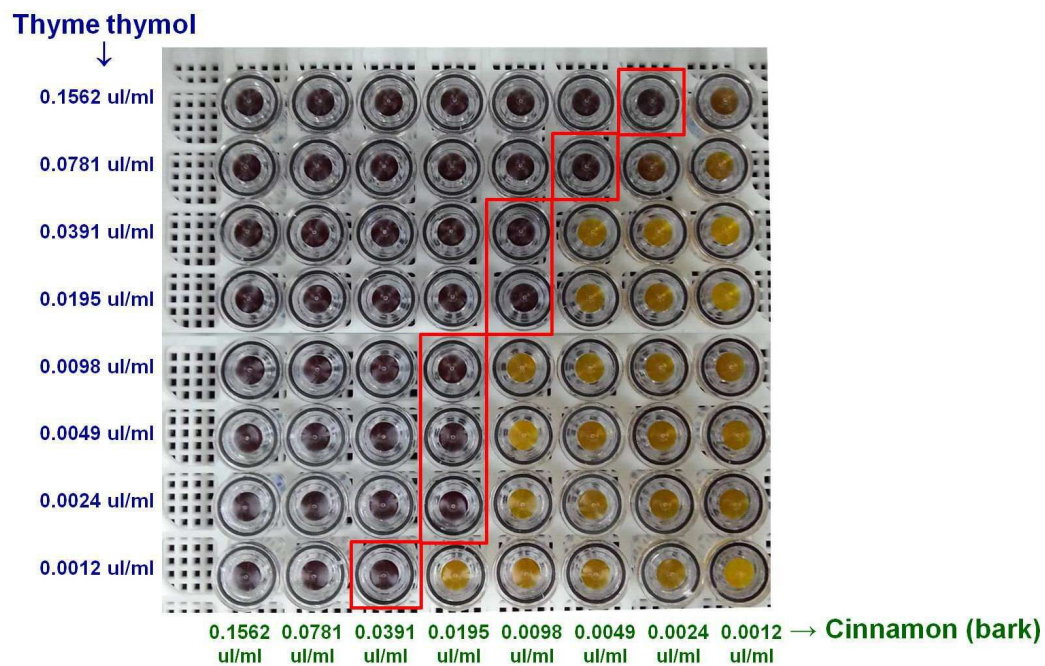
도면1



도면2



도면3



도면4

