



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0043584
(43) 공개일자 2012년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 63/02 (2006.01) A01P 1/00 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0104943

(22) 출원일자 2010년10월26일

심사청구일자 2010년10월26일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

류지훈

서울특별시 성북구 안암동5가 고려대

International Faculty House E-114

이현석

서울특별시 송파구 가락2동 프라자아파트 12동
806호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 8 항

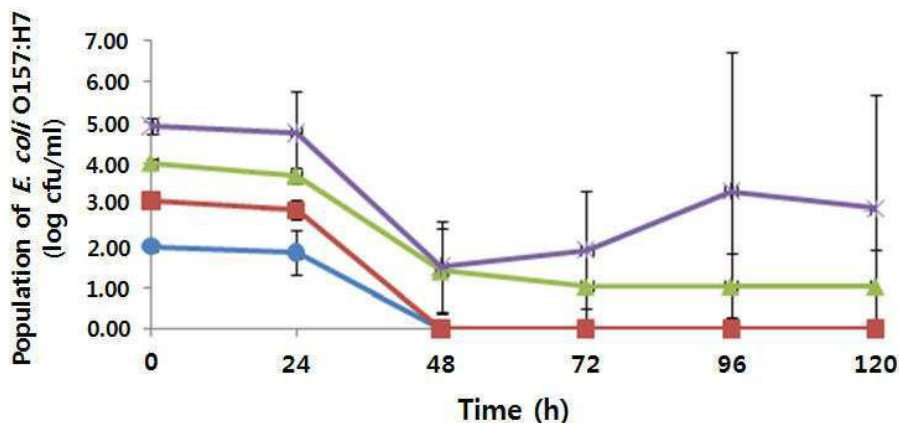
(54) 발명의 명칭 식중독균에 항균력을 갖는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 미생물을 함유하는 항균 조성물

(57) 요약

본 발명은 식중독균에 항균력을 갖는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 미생물을 함유하는 항균 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 새싹채소로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사 strain KACC 91583P를 유효성분으로 함유하는 식중독균에 대한 항균 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 새싹채소로부터 분리 및 동정한 균을 이용하여 식중독 균에 대해 항균효과를 갖는 조성물을 제조할 수 있다. 구체적으로 본 발명에 따르면 새싹채소로부터 분리된 미생물 중 *E. coli* O157:H7 및 살모넬라(*Salmonella*)에 항균효과가 있는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)를 동정하였으며, 상기 패니바실러스 폴리믹사를 *E. coli* O157:H7이 오염된 무순종자에 적용함으로써 새싹으로 자란 무순에서 *E. coli* O157:H7을 저감화함을 확인하였다. 따라서 새싹채소로부터 분리한 본 발명의 패니바실러스 폴리믹사를 이용하면 식중독 예방이 가능할 것이며, 식품의 안전성 확보에도 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

대표도 - 도3b



(72) 발명자

방지현

울산광역시 남구 신정로68번길 40 (달동)

김희경

서울특별시 성북구 오패산로 90, 삼성래미안아파트
121동 1402호 (하월곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313-2007-2-F00112

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 경쟁적 배제제의 바이오필름 형성을 이용한 새싹채소의 친환경적 식중독균 제어기술 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2007.12.01 ~ 2008.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ0073872010

부처명 농림수산식품부

연구사업명 15대 어젠다사업

연구과제명 신선농식품의 식중독균 유래 바이오필름 제어를 위한 화학적/미생물학적 제어기술의 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

새싹채소에서 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 미생물을 유효성분으로 함유하는 식중독균에 대한 항균 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)는 새싹채소 또는 새싹씨앗을 멸균된 생리식염수에 넣고 균질화하고, 고체 영양배지(Plate count agar)에 도말하고 배양하여 각각의 콜로니를 분리하고, 분리된 콜로니를 접종한 아래층의 배지와 식중독균을 접종한 위층의 배지로 구성된 Double-layer assay를 이용하여 항균성이 확인된 패니바실러스 폴리믹사가 분리된 것을 특징으로 하는 식중독균에 대한 항균 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)는 표 1의 생화학적 특성을 가지고, 서열번호 1의 16S rRNA 유전자 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 식중독균에 대한 항균 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 미생물은 국립농업과학원에 기탁된 패니바실러스 폴리믹사 strain KACC 91583P인 것을 특징으로 하는 식중독균에 대한 항균 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 식중독균은 *E. coli* 0157:H7 또는 살모넬라(*Salmonella*)인 것을 특징으로 하는 식중독균에 대한 항균 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)는 *E. coli* 0157:H7에 대해 저해환의 크기가 0.50 ~ 5.00 mm의 항균활성 및 살모넬라(*Salmonella*)에 대해 저해환의 크기가 0.50 ~ 4.00 mm의 항균활성을 갖는 것을 특징으로 하는 식중독균에 대한 항균 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 조성물을 새싹채소에 처리시 식중독균이 저감화되는 것을 특징으로 하는 식중독균에 대한 항균 조성물.

청구항 8

식중독균에 대한 항균활성을 갖는 국립농업과학원에 기탁된 패니바실러스 폴리믹사 strain KACC 91583P.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 식중독균에 항균력을 갖는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 미생물을 함유하는 항균 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 새싹채소로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사 strain KACC 91583P를 유효성분으로 함유하는 식중독균에 대한 항균 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)는 통성혐기성, 내생포자를 형성하는 그람양성간균이다. 주로 식물의 뿌리 주변환경인 근권(根圈)에서 발견되는 토양미생물로, 질소고정, 토양 인산용해 및 토양의 다공성(porosity)을 촉진하는 능력이 있다. 또한 식물생장 호르몬인 옥신(auxin), 사이토카인(cytokine)을 생성하는 능력을 가지고 있어 식물의 생장을 촉진하는 미생물로 널리 사용되었다. 패니바실러스 폴리믹사의 세균, 곰팡이, 선충(nematodes), 방선균(actinomycetes)에 항균력을 나타내었다는 다양한 연구결과가 보고되었으며, 따라서 각종 미생물과 식물병원균으로부터 식물을 보호하기 위한 생물학적 제제로 이용되었다.

[0003] 한편, 최근 10년 동안 새싹채소의 소비가 증가되었다. 새싹채소는 비타민, 미네랄, 엽산 및 식이섬유가 풍부한 고영양 식품으로 항 콜레스테롤 및 항암작용에 관한 연구가 보고되었다. 뿐만 아니라 저 칼로리로 다이어트 식품으로도 알려져 있다. 하지만 가열처리 하지 않고 간단한 조리과정 이후 섭취하는 특성 때문에 식중독에 감염될 위험성도 있다. 새싹채소 섭취로 인한 집단식중독 사건이 1976년부터 2006년 동안 40 건 이상 발생되었고, 이들 사건을 유발시킨 식중독 원인균은 주로 *E. coli* O157:H7과 살모넬라(*Salmonella*)였다. 따라서 새싹채소의 소비와 생산이 증가하는 요즘, 새싹채소의 물성을 변화시키지 않으면서 식중독 원인균을 효과적으로 저감화시키는 기술이 요구된다.

[0004] 이러한 이유로 새싹채소나 새싹종자로부터 식중독균을 저감화시킨 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 연구가 보고되었다. 새싹채소는 대부분 토양으로부터 수확된 새싹종자로부터 오염되기 때문에 대부분의 연구가 새싹종자에 존재하는 식중독균을 저감화하는 방법에 초점이 맞추어져 있다. 물리적 멸균방법은 뜨거운 물, 건열처리, 방사선 조사, 초음파를 이용해서 새싹종자에 존재하는 식중독 원인균을 저감화하는 방법이다. 하지만 이 방법은 식중독균의 저감화에 효과적이지만 발아율이 낮아지거나, 새싹채소로 성장 후에 길이가 짧아지는 것과 같은 새싹의 물리적 성질 변화가 관찰되었다. 화학적 멸균방법에는 전해수(EO), 오존(O₃), 과산화수소(H₂O₂), 차아염소산 나트륨(NaOClO₃), 이산화염소(ClO₂), 아염소산칼슘(Ca(OC1)₂)을 사용해서 씨앗에 존재하는 식중독균을 저감화하는 방법이다. NACMCF(National advisory committee on microbiological criteria for foods)는 20,000 ppm의 아염소산칼슘을 추천하고 있지만 이것과 같은 염소계 화합물은 살균과정에서 발생하는 증기(vapor)에 의해 처리자의 피부와 호흡기 질환을 발생시킬 수 있으며, 처리 이후 씨앗에 잔존하는 유기염소화합물이 역시 문제되고 있다.

[0005] 생물학적 저감화 방법은 하나 이상의 미생물을 이용하여 특정미생물의 개체 수를 조절하는 방법이다. 미생물을 경쟁적 배제제(competitive exclusion)인 다른 미생물을 이용해서 제어하는 정확한 작용기작은 밝혀지지 않았지만 미생물 사이의 영양분 및 부착위치의 경쟁, 주위 환경 변화의 유도, 또는 이 모든 요소들의 복합적 작용으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다. 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)와 같은 젖산 생성균을 이용해서 새싹채소에 존재하는 식중독균을 저감화하기 위한 연구가 수행된 적이 있지만, 패니바실러스 폴리믹사를 경쟁적 배제제로 사용해서 무순 새싹에 존재하는 *E. coli* O157:H7을 저감화하기 위해 시도한 사례는 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 새싹채소에 존재하는 미생물의 종류를 조사하여 *E. coli* O157:H7에 대해 항균능력이 있는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)를 동정하였으며, *E. coli* O157:H7이 오염된 무순 종자에 패니바실러스 폴리믹사를 적용하는 경우, 효과적으로 *E. coli* O157:H7을 저감화 할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 주된 목적은 식중독을 일으키는 주요 원인균인 *E. coli* O157:H7 및 살모넬라(*Salmonella*)에

대해 항균성을 갖는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 미생물이 함유하는 식중독균에 대한 항균 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 새싹채소에서 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 미생물을 유효성분으로 함유하는 식중독균에 대한 항균 조성물을 제공한다.
- [0009] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)는 새싹채소 또는 새싹씨앗을 멸균된 생리식염수에 넣고 균질화한 후, 고체 영양배지(Plate count agar)에 도말하고 배양하여 각각의 콜로니를 분리한다. 이후 분리된 콜로니를 접종한 아래층의 배지와 식중독균을 접종한 위층의 배지로 구성된 Double-layer assay를 이용하여 항균성이 확인된 패니바실러스 폴리믹사가 분리된 것을 특징으로 한다.
- [0010] 상기 항균성이 확인된 미생물은 *E. coli* 0157:H7과 살모넬라(*Salmonella*)에 동시에 항균성을 가지며, 16S rRNA 유전자 서열의 비교결과 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)일 가능성이 99% 이상이다.
- [0011] 본 발명의 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)는 표 1(실시예 1에 나타냄)의 생화학적 특성을 가지고 서열번호 1의 16S rRNA 유전자 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0012] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 미생물은 국립농업과학원에 기탁된 패니바실러스 폴리믹사 strain KACC 91583P인 것을 특징으로 한다.
- [0013] 미생물의 종(species)은 유전적으로 70 % 이상 같은 미생물 그룹을 나타내며, 그에 반하여 strain은 미생물의 유전자 조합이 조금이라도 다르면 다른 strain이 된다. 즉, 같은 종류의 종에는 수많은 strain이 존재하게 된다. 그 각각의 strain은 개별적인 특성이 다르게 나타난다.
- [0014] 본 발명의 식중독균에 대한 항균 조성물에 있어서, 상기 식중독균은 *E. coli* 0157:H7 또는 살모넬라(*Salmonella*)인 것을 특징으로 하며, 상기 균들은 식중독을 유발시키는 주요 원인균으로 분류된다.
- [0015] 본 발명에 따른 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)는 *E. coli* 0157:H7에 대해 저해환의 크기가 0.50 ~ 5.00 mm의 항균활성 및 살모넬라(*Salmonella*)에 대해 저해환의 크기가 0.50 ~ 4.00 mm의 항균활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 상기 패니바실러스 폴리믹사의 항균활성은 패니바실러스 폴리믹사의 배양시간 및 배양 온도에 따라 다르게 나타나며, 식중독균의 초기 개체 수가 적을수록 더 높은 활성을 보인다.
- [0016] 본 발명의 조성물은 새싹채소에 처리시 식중독균이 저감화되는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 구체적인 실시예에 따르면, *E. coli* 0157:H7에 감염된 무순 씨앗에 본 발명의 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)를 접종하는 경우, 접종된 패니바실러스 폴리믹사의 개체 수에 따라 차이를 보이지만 *E. coli* 0157:H7을 저감화시킨다.
- [0018] 미생물을 식품에 적용하는 경우, 그 미생물의 기원(source)이 어디인가가 매우 중요하다. 본 발명의 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)는 새싹채소에서 분리한 균주이기 때문에 새싹채소가 가지고 있는 고유한 균주인 것이므로, 이 균주를 새싹채소에 적용하는 것이 가능하다. 또한 확대시켜서 신선과채류에 모두 적용 가능한 균주이다.
- [0019] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 식중독균에 대한 항균활성을 갖는 국립농업과학원에 기탁된 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) strain KACC 91583P를 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 새싹채소로부터 분리 및 동정한 균을 이용하여 식중독 균에 대해 항균효과를 갖는 조성물을 제조할 수 있다.
- [0021] 구체적으로 본 발명에 따르면 새싹채소로부터 분리된 미생물 중 *E. coli* 0157:H7 및 살모넬라(*Salmonella*)에 항균효과가 있는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)를 동정하였으며, 상기 패니바실러스 폴리믹사를

E. coli 0157:H7이 오염된 무순종자에 적용함으로써 새싹으로 자란 무순에서 *E. coli* 0157:H7을 저감화함을 확인하였다. 따라서 새싹채소로부터 분리한 본 발명의 패니바실러스 폴리믹사를 이용하면 식중독 예방이 가능할 것이며, 식품의 안전성 확보에도 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 새싹채소로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 *E. coli* 0157:H7 및 살모넬라(*Salmonella*)에 대한 억제 효과를 나타낸 결과이다.
- 도 2는 패니바실러스 폴리믹사의 배양온도에 따른 생장곡선을 나타낸 것이다.
- 도 3a는 패니바실러스 폴리믹사와 *E. coli* 0157:H7을 TSB 배양액에 함께 접종한 후 배양시간에 따른 패니바실러스 폴리믹사 개체 수 변화를 나타낸 결과이다.
- 도 3b는 패니바실러스 폴리믹사와 *E. coli* 0157:H7을 TSB 배양액에 함께 접종한 후 배양시간에 따른 *E. coli* 0157:H7의 개체 수 변화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0024] 실시예 1. 새싹채소 및 새싹씨앗으로부터 균의 분리 및 항균성, 생리적 특성 확인

[0025] 1-1. 새싹채소 및 새싹씨앗으로부터 균의 분리

- [0026] 36 개의 무순(radish, *Raphanus sativus*) 씨앗 시료, 36 개의 알팔파(alfalfa, *Medicago sativa*) 씨앗 시료, 27 개의 순무(turnip, *Brassica rapa* var. *rapa*) 씨앗 시료를 준비하였다. 각각의 씨앗 시료들은 9개의 온라인 판매 사이트를 통해 구입하였다. 포장된 무순 새싹채소 시료 45 개와 새싹채소들이 혼합되어 들어있는 시료 45 개를 준비하였다. 모든 시료들은 각각 5 곳의 백화점, 5 곳의 대형 마트, 5 곳의 재래시장에서 구입하였다. 새싹채소들이 혼합되어 들어있는 시료들에는 토끼풀(clover, *Trifolium* sp.), 알팔파(*M. sativa*), 방울다다기 양배추(Brussele sprouts, *Brassica oleracea* Gemmifera Group), 브로콜리(broccoli, *Brassica oleracea*), 콜라비(kohlrabi, *Brassica oleracea* Gongylodes Group), 붉은 토끼풀(red clover, *Trifolium pratense*), 배추(Chinese cabbage, *Brassica rapa* subsp.) 중 최소 3 가지가 혼합되었다.

- [0027] 상기 준비한 새싹채소 또는 새싹씨앗 10 g을 400 ml의 폴리올레핀 백(Polyolefin bag; Interscience, St Nom La Breteche, France)에 넣고 멸균된 생리식염수 100 ml를 첨가하였다. 상기 폴리올레핀 백을 균질기(bag-mixer; Interscience, France)를 이용하여 1분 동안 균질화하였다. 균질화된 새싹채소 또는 새싹씨앗과 생리식염수를 0.1% 펩톤수(peptone water)를 이용하여 희석시킨 후, Plate Count Agar(PCA; BBL/Difco, Spark, MD, USA)에 평판 도말하여 콜로니들을 추출하였다. 상기 PCA는 37℃의 배양기에서 48 시간 동안 배양한 후, 콜로니들을 확인하였다. 각각의 시료 별로 평판 도말된 PCA에서 육안으로 판단하여 다른 형태를 지니는 콜로니를 백금 이(loop, 90010; SPL Life Science Co. Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 채취한 후, Tryptic Soy Agar(TSA, pH 7.0; BBL/Difco)에 희석 도말하고 30 ℃ 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면 다시 콜로니의 형태를 관찰하고 재취하여 희석 도말하는 과정을 반복하여 각각의 콜로니를 분리하였다. 콜로니 분리 결과, 새싹씨앗으로부터 총 113개 콜로니, 새싹채소로부터는 총 62 개의 콜로니들을 분리하여 총 175 개의 콜로니들을 분리하였다.

- [0028] 새싹채소는 각각 백화점에서 구입한 새싹채소에서는 24 개, 시장에서 구입한 새싹채소에서는 20 개, 마트에서 구입한 새싹채소에서는 18 개의 콜로니들을 분리하였다. 백화점에서 구입한 새싹채소로부터 분리한 24 개의 콜로니들 중, 9 개는 무순 새싹채소, 13 개는 혼합되어 포장된 새싹채소에서 분리한 것이며, 나머지 2 개는 백화점에서 구입한 일반 새싹채소에서 분리된 것이다. 시장에서 구입한 새싹채소에서 분리한 20 개의 콜로니들 중, 8 개는 무순 새싹채소로부터 유래한 것이며, 12 개는 혼합 포장된 새싹채소들에서 유래한 것이다. 그리고 마트에서 구입한 새싹채소로부터 분리한 18 개의 콜로니들 중, 각각 9 개씩 무순 새싹채소와 혼합된 새싹채소에서 분리된 것이다.

[0029] 1-2. 분리된 미생물의 항균성 측정

[0030] 상기 실시예 1에서 새싹채소 및 새싹씨앗으로부터 분리한 균들의 *E. coli* 0157:H7 strain ATCC 43895 및 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo(*Salmonella* Montevideo)에 대한 항균성을 측정하였다. 측정 방법은 Zhao et al. (2004년)의 논문에 인용된 double-layer assay를 이용하여 측정하였다 [Zhao, T., Doyle, M.P., Zhao, P., 2004. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3996-4003].

[0031] 먼저, 분리한 균들을 Tryptic Soy Broth(TSB, pH 7.01 BBL/Difco)를 이용하여 25℃에서 배양시킨 배양액을 Tryptic Soy Agar(TSA, pH 7.0; BBL/Difco)에 점 접종(spot inoculation)하였다. 점 접종 후, 다시 25 ℃ 배양기에서 24 시간 동안 배양하여 균들을 배양한 뒤, *E. coli* 0157:H7 또는 *S. Montevideo*가 접종된 액체 상태의 TSA 10 ml을 이미 분리된 균이 성장한 TSA에 부어 상온에서 굳혔다. 이때 액체 상태의 TSA에 접종된 *E. coli* 0157:H7 또는 *S. Montevideo*의 개체 수는 5, 6, 7, 8 log cfu/10ml이 되도록 접종하였다. 상기 균이 배양된 TSA에 부어진 *E. coli* 0157:H7 또는 *S. Montevideo*가 접종된 TSA가 완전히 굳으면 다시 25 ℃ 배양기에 넣고 24 시간 동안 배양한 후, 저해환(inhibition zone)의 생성 유무를 확인하였다.

[0032] 상기와 같이 새싹채소 및 새싹씨앗으로부터 분리된 균이 자라있는 아래층의 배지와 *E. coli* 0157:H7 또는 *S. Montevideo*이 접종된 위층의 배지, 두 개의 층을 이용함으로써 double-layer assay라고 지칭한다.

[0033] Double-layer assay를 이용하여 항균성을 측정한 결과, 분리된 미생물이 *E. coli* 0157:H7 및 *S. Montevideo*에 동시에 항균성을 가짐을 확인하였으며, 도 1은 분리된 균들 중 가장 항균 효과가 뛰어난 균의 *E. coli* 0157:H7 및 살모넬라(*Salmonella*)에 대한 억제 효과를 측정한 결과이다.

[0034] 1-3. 항균성을 지닌 균들의 동정 및 생화학적 특성 분석

[0035] 항균성이 확인된 균들을 TSA에 도말하여 25℃에서 24 시간 동안 배양한 뒤, 16S rRNA 유전자 서열 분석을 의뢰하였다(MacroGen, Seoul, Korea). 이후 16S rRNA 유전자 서열 분석 결과를 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 서열 분석(megablast)을 통해 균을 동정하였다. 그 결과, 분리된 균들 중 가장 항균성이 뛰어났던 균은, 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)일 가능성이 99%인 것으로 확인되었다. 상기 패니바실러스 폴리믹사의 16S rRNA 유전자 서열은 서열번호 1로 나타내었다.

[0036] 항균성이 가장 강력하였던 균이 패니바실러스 폴리믹사인 것으로 확인된 후, 이 균의 생화학적 특성을 확인하기 위하여 3 종의 API test(apiListeria(829946901), apiStaph(806573302), api20E(814567001))를 수행지침에 따라 수행하였다. 이를 위해, 상기 확신 도말을 통해 얻은 패니바실러스 폴리믹사의 콜로니 하나를 지정된 용매에 넣고, 희석한 뒤 각각의 반응 위치에 적정량을 주입하고 37 ℃ 배양기에서 24 시간 배양한 뒤, 추가 시약이 첨가되어야 하는 것을 첨가하여 반응시켜 관찰하여 생화학적 특성을 파악하였다. 이는 하기 표 1에 나타내었다.

[0037] [표 1. 새싹채소 및 새싹씨앗으로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 생화학적 특성]

General Characteristics	Result	Carbohydrate utilization	Result
β -galactosidase	-	D-Glucose	+
Arginine dihydrolase	-	D-Fructose	+
Lysine decarboxylase	-	D-Mannose	+
Ornithine decarboxylase	-	Maltose	+
Urease	-	Lactose	+
Gelatinase	+	D-Trehalose	+
Alkaline phosphatase	+	D-Mannitol	+
Hydrolysis	+	Xylitol	-
α -mannosidase	-	D-Melibiose	+
Tryptophane deaminase	-	Raffinose	+
Sucrose	+	Xylose	+
Indole production	-	α -methyl-D-Glucoside	+
H ₂ S production	-	N-acetyl-Glucosamine	-
Acetoin production	+	D-Arabitol	-
acetyl-methyl-carbinol production	+	Rhamnose	-
Citrate utilization	-	Methyl- α -D-Glucopyranoside	+
Reduction of nitrate to nitrite	+	Ribose	+
Glucose-6-Phosphate	-	Tagatose	-

[0038]

[0039] 1-4. 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 생장곡선 작성

[0040]

상기 실시예 2에서 25 ℃에서 24 시간동안 배양시킨 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 TSB 배양액을 TSB를 이용하여 1/1000로 희석하였다. 이 희석된 패니바실러스 폴리믹사 배양액을 미리 준비한 100 ml의 TSB에 10 μ l 루프(loop, 90010; SPL Life Science Co. Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 접종하였다. 이후 패니바실러스 폴리믹사가 접종된 TSB 100 ml을 각각 15, 25, 37 ℃에서 배양하면서, 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 168, 192 시간에 샘플을 채취하여 TSA에 평판 도말을 함으로써 개체 수를 측정하여 생장곡선을 작성하였다. 이때 샘플을 채취하여 평판 도말한 TSA는 37℃에서 24 시간 배양한 후에 개체 수를 측정하였으며, 모든 실험은 3번 반복하였다. 생장곡선 결과는 도 2에 나타내었다.

[0041]

도 2에 나타난 바와 같이, 15 ℃에서 배양시킨 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)는 약 24 시간 부근까지 유도기(lag phase)를 거치는 것을 확인할 수 있으며, 24 시간 이후부터는 96 시간을 전후로 지수 증식기(log phase)를 거친 뒤 96 시간 이후 마지막으로 채취한 192 시간까지 정상기(stationary phase)를 유지한다. 정상기에서의 세포 개체 수는 8 log cfu/ml 이었다. 25 ℃에서 배양시킨 경우 0 ~ 8 시간 사이에는 유도기를 거친 후, 8 시간 이후부터 36 시간 사이에 지수 증식기 과정을 거친다. 그리고 36 ~ 48 시간 사이에 개체 수가 더 증가하여 8 log cfu/ml을 넘게 되지만, 12 시간이 더 지난 이후 0.5 log cfu/ml의 개체 수 감소를 나타내었다. 이후 144 시간까지 24 시간 간격으로 0.3 log cfu/ml 수준의 감소가 계속 일어나고, 마지막 샘플 채취 및 개체 수 측정을 수행한 144 시간까지 7 log cfu/ml 이상의 개체 수를 유지하였다. 37 ℃에서 배양시키는 경우, 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 접종 직후부터 4 시간 사이가 유도기이며, 4 ~ 16 시간 사이의 시점을 지수 증식기로 판단할 수 있다. 이후 48 시간까지 약간의 개체 수 증가 현상을 나타내다가, 48 시간 이후 72 시간 사이에 개체 수의 감소가 일어난 뒤 일정 개체 수를 유지함을 볼 수 있다. 120 시간 까지 생장곡선을 작성하는 전체 시간에 걸쳐 개체 수는 8 log cfu/ml을 넘지 않았다.

[0042]

패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 생장곡선을 비교해 보았을 때, 상대적으로 정상기에 도달하는 시간이 가장 빠른 것은 37 ℃에서 배양하였을 때이다. 그러나 생장곡선 과정 전체에 걸쳐 37 ℃에서 배양한 경우에만 8 log cfu/ml 이상의 개체 수에 도달하지 못하였다. 또한 패니바실러스 폴리믹사의 생장곡선에서 각각

시기에서의 개체 수도 37 °C에서 배양한 경우가 상대적으로 낮았다.

[0043] **실시예 2. 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 항균 특성 분석**

[0044] 상기 실시예 1에서 새싹채소 및 새싹씨앗으로부터 분리한 총 175 개의 균들 중 가장 우수한 항균성을 보인 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)에 대해서 여러 생리학적 특성들을 파악하는 연구를 수행하였다. 상기 패니바실러스 폴리믹사의 경쟁적 배제제로의 활용 가능성을 확인하기 위해 패니바실러스 폴리믹사를 이용하여 제어하고자 하는 대상인 *E. coli* 0157:H7에 대한 항균 특성을 분석하였다.

[0045] **2-1. 고체 배지에서 식중독균 개체 수, 온도 및 배양 시간에 따른 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 항균 효과 분석**

[0046] 상기 실시예 1의 생장곡선을 작성하는 방법과 동일한 방법으로 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)를 배양하여 배양시간에 따른 항균 효과를 well-diffusion test를 이용하여 측정하였다. Well diffusion test는 Oke et al. (2009년)의 논문에서 인용된 방법을 이용하여 측정하였다 [Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., Altundag, S., 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chem. 112, 874-879]. 패니바실러스 폴리믹사의 배양 온도 조건은 25 및 37 °C, 항균 효과 측정 시간은 36 ~ 120 시간까지 12 시간 간격으로 측정하여 배양 온도 및 배양 시간에 따른 패니바실러스 폴리믹사의 항균 효과를 분석하였다.

[0047] Well-diffusion test는 각 측정 시간별로 채취한 5 ml의 샘플의 CFCS(Cell Free Culture Suspension)를 이용하여 측정하였다. CFCS는 채취한 5 ml 샘플을 15 ml 코니칼 튜브(conical tube, 17×120 mm; SPL Life Science Co, Ltd)에 넣고, 상온에서 2600 g-force로 15 분간 원심분리(MF80; Hanil Science Industrial., Seoul, Korea)한 후, 상등액을 10 ml 주사기(Kovax-Syringe, Korea vaccine Co., LTS., Seoul, Korea)와 0.20 μM 마이크로 필터(DICMIC-13 CP, ADVANTEC, Toyo Rochi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 용액이며, 상기 용액을 4 °C에서 보관하였다. TSA에 *E. coli* 0157:H7 및 *S. Montevideo*를 각각 5, 6, 7, 8 log cfu가 되도록 평판 도말한 뒤, 200 μl 팁(tip)을 이용하여 지름 8 mm well을 생성한다. 이후 4 °C에 보관중인 CFCS를 100 μl씩 웰(well)에 넣고, 상온에서 30 분 정도 보관하여 CFCS가 배지에 흡수되도록 한다. 이후 25 °C 배양기에 넣고 24 시간 배양한 후, 저해환의 크기를 측정하였다. 같은 방법으로 37 °C 배양기에서도 배양시킨 후 저해환의 크기를 측정하였다. 모든 실험은 3번 반복하였다. 측정한 저해환의 크기 변화 결과는 하기 표 2 내지 4에 나타내었다.

[0048] 측정 결과, 먼저 표 2에 나타난 것과 같이 25 °C에서 배양한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 배양 시간에 따른 *E. coli* 0157:H7에 대한 항균 효과의 차이를 보면, 배양 시간 36 시간부터 120 시간까지 모든 경우에 *E. coli* 0157:H7에 대한 패니바실러스 폴리믹사의 항균 효과가 나타남을 볼 수 있다. 일반적으로 평판 도말된 *E. coli* 0157:H7의 개체 수가 감소할수록 저해환의 크기는 증가하는 추세가 실험 전체에 걸쳐 관찰되었다. 이번 실험에서도 역시 96 시간 배양시킨 경우의 결과가 상대적으로 가장 좋은 저해 효과를 나타내었다. 배양 시간 증가에 따른 저해환의 크기의 증가는 36 시간과 120 시간 배양 후에는 증가하였으나, 전체에 걸쳐서는 증가와 감소를 반복하여 나타내었다. 표 3에 나타난 것과 같이 *S. Montevideo*에 대한 항균 효과는 배양 시간 36 시간에는 나타나지 않지만, 48 시간 이후 120 시간까지는 계속 항균 효과가 나타났으며, 배양 시간에 따른 저해환의 크기의 증가는 96 시간을 정점으로 이후 감소하였다. 그러나 120 시간 동안 배양한 경우 저해환의 크기는 36 시간 배양시킨 경우의 저해환의 크기보다 크다. 72 시간과 120 시간 동안 배양하였을 때를 제외하고는 모든 경우에서 도말된 *S. Montevideo*의 개체 수가 감소할수록 저해환의 크기는 증가하며, 72 시간과 120 시간에서도 그 추세는 표준 편차 이내에서 증가하는 경향을 보였다.

[0049] 그리고 37 °C에서 배양한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 배양 시간에 따른 *E. coli* 0157:H7에 대한 항균 효과를 관찰한 결과, 표 4에 나타난 것과 같이 *E. coli* 0157:H7를 10⁸ cfu로 도말한 경우에 대해서는 실험 전체에 걸쳐 효과를 보이지 못했으나, 10⁷ cfu로 도말한 경우 및 그 이하의 개체 수에 대해서는 60 시간 동안 배양한 후부터 항균 효과를 나타내었다. 또한 같은 시간동안 배양하였을 때 도말된 *E. coli* 0157:H7의 개체 수가 감소함에 따라 저해환의 크기가 증가하는 경향을 보이지만, 배양 시간의 증가와 저해환의 크기는 항상 비례하지 않았다. *E. coli* 0157:H7를 10⁷ cfu로 도말한 경우 60 시간 배양하였을 때, 0.75 mm로 가장 큰 저해환의 크기를 보였으며, 이후 감소와 증가를 반복하여 나타냈다. 전체 배양 시간을 비교하였을 때는

96 시간 배양하였을 경우 저해환의 크기가 가장 크게 나타났다. 또한 패니바실러스 폴리믹사를 37 ℃에서 배양하여 배양 시간에 따른 *S. Montevideo*에 대한 항균 효과를 측정하였으나, 120 시간의 실험 전체에 걸쳐 *S. Montevideo*에 대한 패니바실러스 폴리믹사의 항균 효과를 관찰할 수 없었다.

[표 2. 25 ℃에서 배양한 패니바실러스 폴리믹사의 배양 시간에 따른 *E. coli* O157:H7에 대한 항균 효과]

<i>E. coli</i> O157:H7 개체 수	Radius of inhibition zone (mm)							
	36h	48h	60h	72h	84h	96h	108h	120h
10 ⁸ cfu	0.50±0.00	1.92±0.77	1.83±0.66	1.83±0.31	1.83±0.31	2.50±0.54	2.17±0.42	2.33±1.05
10 ⁷ cfu	1.00±0.50	2.75±0.35	3.00±0.35	3.08±0.31	3.17±0.31	3.83±0.31	3.58±0.31	3.33±0.66
10 ⁶ cfu	1.25±0.25	3.17±0.42	3.75±0.20	3.83±0.47	3.67±0.51	4.83±0.12	4.42±0.12	4.50±1.41
10 ⁵ cfu	2.25±0.00	3.33±0.12	3.50±0.20	4.17±0.24	4.50±0.54	4.33±0.31	4.83±0.47	4.08±0.47

[표 3. 25 ℃에서 배양한 패니바실러스 폴리믹사의 배양 시간에 따른 *S. Montevideo*에 대한 항균 효과]

살모넬라 개체 수	Radius of inhibition zone (mm)							
	36h	48h	60h	72h	84h	96h	108h	120h
10 ⁸ cfu	ND [†]	0.92±0.42	1.25±0.00	1.42±0.12	1.83±0.12	2.33±0.31	1.83±0.31	2.08±1.01
10 ⁷ cfu	ND [†]	2.08±0.24	2.25±0.61	2.83±0.42	2.58±0.31	2.83±0.12	3.08±0.42	2.92±0.62
10 ⁶ cfu	ND [†]	2.25±0.41	2.58±0.42	2.58±0.24	2.75±0.00	3.58±0.31	3.25±0.54	2.83±0.12
10 ⁵ cfu	ND [†]	2.83±0.12	2.67±0.31	2.50±0.41	2.92±0.24	3.58±0.47	3.42±0.77	3.00±0.20
[†] Not detected								

[표 4. 37 ℃에서 배양한 패니바실러스 폴리믹사의 배양 시간에 따른 *E. coli* O157:H7에 대한 항균 효과]

<i>E. coli</i> O157:H7 개체 수	Radius of inhibition zone (mm)							
	36h	48h	60h	72h	84h	96h	108h	120h
10 ⁸ cfu	ND [†]	ND [†]	ND [†]	ND [†]	ND [†]	ND [†]	ND [†]	ND [†]
10 ⁷ cfu	ND [†]	ND [†]	0.75±0.25	0.50±0.00	0.58±0.12	0.67±0.12	0.63±0.13	0.50±0.00
10 ⁶ cfu	ND [†]	ND [†]	0.83±0.24	0.75±0.00	0.88±0.12	0.92±0.12	0.92±0.12	0.58±0.12
10 ⁵ cfu	ND [†]	ND [†]	0.88±0.38	1.00±0.20	1.00±0.00	1.00±0.00	0.92±0.12	4.08±0.12
[†] Not detected								

2-2. 액체 배지에서 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)와 *E. coli* O157:H7의 공동 배양을 통한 항균성 확인

패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 배양액에 포함된 항균 물질들의 항균 효과로 인한 *E. coli* O157:H7에 대한 저해 현상을 피하기 위해서, 25 ℃에서 24 시간 동안 배양한 패니바실러스 폴리믹사의 배양액 10 ml을 15 ml 코니칼 튜브(conical tube, 50015; SPL Life Science Co, Ltd)에 넣고 25 ℃, 2600 g-force로 10 분간 원심분리(MF80; Hanil Science Industry)하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 코니칼 튜브 아래 남아 있는 세포들을 PBS(Phosphate buffer solution, pH 7.2) 10 ml을 넣고 현탁액을 제조하였다. 이후 다시 10 분간 원심분리를 수행한 후, 상등액을 버리고 다시 PBS 10 ml을 넣고 현탁액을 만든 뒤, 마지막으로 원심분리하여 세포를 세척하였다. 세척 완료 후 TSB 10 ml을 넣었으며, 제조된 패니바실러스 폴리믹사 현탁액을 실험에 사용하였다. 패니바실러스 폴리믹사가 포함된 현탁액을 TSB로 희석하여 100 ml TSB에 각각 5, 6 log cfu/ml이 되도록 접종하였다. 이후 바로 샘플을 채취하여 TSA에 평판 도말하여 패니바실러스 폴리믹사의 개체 수를 확인하였다.

- [0058] 그리고 37 °C에서 24 시간 배양한 *E. coli* 0157:H7 배양액을 TSB를 이용하여 희석한 후, 패니바실러스 폴리믹사가 6 log cfu/ml로 접종된 TSB 100 ml에 *E. coli* 0157:H7의 개체 수가 2, 3, 4, 5 log cfu/ml이 되도록 *E. coli* 0157:H7 희석액을 접종하였다. *E. coli* 0157:H7 접종 후 다시 샘플을 채취하여 MSA(MacConkey Sorbitol Agar, pH 7.1; BBL/Difco)에 평판 도말하여 개체 수를 확인하였다.
- [0059] 이후 패니바실러스 폴리믹사와 *E. coli* 0157:H7이 함께 접종되어 있는 TSB 배양액을 25 °C 배양기에 넣고 120 시간까지 함께 배양하며, 24 시간 간격으로 샘플을 채취하여 TSA와 SMA에 평판 도말하여 각각의 개체 수를 확인하였다. 평판 도말한 TSA와 SMA는 37 °C에서 24 시간 배양한 뒤, 콜로니 수를 확인하여 패니바실러스 폴리믹사와 *E. coli* 0157:H7 각각의 개체 수를 확인하였다. 측정 결과는 도 3a 및 3b에 나타내었다.
- [0060] 먼저 도 3a에서 보이는 바와 같이, 패니바실러스 폴리믹사를 6 log cfu/ml로 접종한 후 배양 24 시간 만에 개체 수가 8 log cfu/ml을 초과하였다. 그러나 120 시간까지 배양하는 경우 0.2 log cfu/ml 정도씩 일정한 감소 추세를 나타내었다.
- [0061] 그리고 도 3b에 나타난 바와 같이, *E. coli* 0157:H7의 개체 수는 초기 접종 균수에 상관없이 공동배양한지 24 시간 후까지는 적은양의 개체 수를 보이다가, 48 시간 이후부터는 급격한 개체 수 감소를 나타내었다. *E. coli* 0157:H7를 2 log cfu/ml로 접종한 경우에는 배양 시간이 48 이상부터 검출되지 않았으며, 3 log cfu/ml로 접종한 경우 3반복 실험 중 1번만 48 시간 배양 후 콜로니가 1개만 발견되었고, 나머지 2번의 실험에서는 48 시간 이후부터 120 시간까지 콜로니가 발견되지 않았다. 또한 *E. coli* 0157:H7를 4 log cfu/ml로 접종하였을 때에는 48 시간 배양 후에는 1.4 log cfu/ml, 72 시간 후에는 1 log cfu/ml로 감소한 후, 120 시간까지 1 log cfu/ml을 유지하였다. 그러나 *E. coli* 0157:H7를 5 log cfu/ml로 접종하는 경우, 배양 48 시간 후에 1.5 log cfu/ml로 감소하였다가 96 시간 배양 후까지는 개체 수가 증가하고, 이후 120 시간에는 다시 개체 수가 감소하였다.
- [0062] **2-3. 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 *E. coli* 0157:H7에 대한 M.I.C.(Minimum Inhibitory Concentration) 측정**
- [0063] 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 *E. coli* 0157:H7에 대한 M.I.C.의 측정은 TSB를 이용하여 배양한 패니바실러스 폴리믹사와 M9 medium broth를 이용하여 배양한 패니바실러스 폴리믹사를 이용하여 각각 측정하였다.
- [0064] 먼저, 패니바실러스 폴리믹사의 배양액을 TSB를 이용하여 희석한 후, 100 ml TSB에 1 log cfu/ml이 되도록 접종하였다. 이후 25 °C 배양기에서 96 시간 동안 배양한 후, CFCS를 만들어 10 ml TSB에 0 ~ 256 μ l로 2 배씩 농도를 증가시켜 첨가하고, 추가로 0, 1, 2, 3, 4%(v/v) 농도로 첨가하여 실험하였다. CFCS가 첨가된 TSB에 *E. coli* 0157:H7를 5 log cfu/ml로 접종한 뒤, 25 °C에서 24 시간 배양하였다. 배양한 뒤 큐벳(cuvette, 2712120; ratiolab GmbH, Dreieich, Germany)에 1 ml을 채취하여 넣고, 분광광도계(Spectrophotometer, SPECTRONIC GENESYS 20; Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA)를 사용하여 630 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. M.I.C.의 설정은 24 시간 배양한 TSB가 육안으로 관찰하기에 멸균된 TSB와 차이가 없고, 흡광도가 0.005 미만인 CFCS 농도로 설정하였다. 모든 실험은 3번 반복실험 하였다.
- [0065] 그리고 패니바실러스 폴리믹사의 배양액을 M9 medium broth(M3001; Biosesang Inc., GyeongGi-Do, Korea)를 이용하여 희석한 후, 100 ml M9 medium broth에 접종하여 수행하였다. M9 medium broth에는 패니바실러스 폴리믹사의 농도를 5 log cfu/ml로 접종하여 실험을 수행하였다. 패니바실러스 폴리믹사가 접종된 M9 medium broth 배양액을 25 °C에서 96 시간 배양한 뒤, CFCS를 만들어 10 ml의 TSB에 0 ~ 10%(v/v) 농도로 첨가한 뒤, 5 log cfu/ml로 *E. coli* 0157:H7를 접종하여 다시 25 °C에서 24 시간 배양하고, 큐벳에 1 ml을 넣고 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. M.I.C.의 설정은 24 시간 배양한 TSB가 육안으로 관찰하기에 멸균된 TSB와 차이가 없고, 흡광도가 0.005 미만인 CFCS 농도로 설정하였다. 모든 실험은 3번 반복실험 하였다.
- [0066] TSB에서 배양한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)의 CFCS를 0 ~ 4%(v/v)로 각각 첨가하여 *E. coli* 0157:H7에 대해 실험한 결과, 표 5에 나타난 바와 같이 3%(300 μ l)에서 평균 OD₆₃₀ 측정값이 M.I.C.의 기준이 되는 0.005 미만의 값을 나타내기 때문에 M.I.C를 3%(v/v)로 설정할 수 있었다.
- [0067] M9 medium broth에 초기 접종 균의 수가 1 log cfu/ml이 되도록 패니바실러스 폴리믹사를 접종하여 96 시간 배양한 경우, 패니바실러스 폴리믹사의 개체 수는 평균 2.83 log cfu/ml에 도달하였다. 그러나 *E. coli* 0157:H7에

대한 항균 효과는 0 ~ 10 %(v/v)의 모든 경우에 있어서 측정되지 않았다. OD₆₃₀ 측정값을 비교하여도 패니바실러스 폴리믹사 CFCS를 0% 주입한 대조군과 거의 차이가 나지 않았다. 표 6에 나타낸 바와 같이, 초기 접종 균수를 5 log cfu/ml이 되도록 M9 medium broth에 패니바실러스 폴리믹사를 접종하여 96 시간 배양한 경우의 평균 개체 수는 6.32 log cfu/ml이었으며, 육안 관찰시 패니바실러스 폴리믹사 CFCS를 2%(v/v) 주입한 시점부터 투명하게 보였다. OD₆₃₀ 측정값에서도 R2를 제외하고는 2%의 측정값이 M.I.C. 설정 기준인 0.005 미만으로 나타났다. 또한 R3의 3%(v/v)에서는 측정값이 0.005로 M.I.C. 설정 기준을 초과하지만, 평균은 0.005 미만이므로 M.I.C.는 3%(v/v, 300 µl)로 설정하였다.

[0068] TSB에서 배양한 패니바실러스 폴리믹사와 M9 medium에서 배양한 패니바실러스 폴리믹사의 항균 효과를 비교하는 경우, M9 medium broth를 이용한 경우의 항균 효과가 더 우수하게 나타났다. 개체 수를 비교해 보아도, TSB에서 96 시간 배양한 경우에는 7.80 log cfu/ml, M9 medium broth에서는 6.32 log cfu/ml이었다. M9 medium broth에서 배양하는 경우 개체 수가 더 적음에도 더 뛰어난 항균 효과를 나타내었다.

[0069] [표 5. TSB에서 25 °C, 96 시간 동안 배양한 패니바실러스 폴리믹사의 항균 효과]

	OD ₆₃₀ value				
	0%	1%	2%	3%	4%
R1	1.052	0.971	0.054	0.008	0.002
R2	1.085	0.957	0.056	0.005	0.002
R3	1.100	0.830	0.039	0.001	0.001
Mean	1.079	0.919	0.050	0.005	0.002
STDEV	0.020	0.063	0.008	0.003	0.000
1%(v/v) = 100 µl					

[0070]

[0071] [표 6. M9 medium both에서 25 °C, 96 시간 동안 배양한 패니바실러스 폴리믹사의 항균 효과]

	OD ₆₃₀ value										
	0%	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
R1	1.052	0.927	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	-0.001	-0.002	0.000	0.004
R2	1.063	0.979	0.036	0.002	0.001	0.000	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	0.000
R3	1.103	0.917	0.002	0.005	-0.001	0.002	0.001	-0.001	0.002	0.002	0.000
Mean	1.073	0.941	0.013	0.003	0.000	0.001	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.001
STDEV	0.022	0.027	0.017	0.002	0.001	0.001	0.000	0.000	0.002	0.001	0.002
1%(v/v) = 100 µl											

[0072]

[0073] **실시예 3. 패니바실러스 폴리믹사(Paenibacillus polymyxa)를 이용한 무균 씨앗의 E. coli O157:H7에 대한 항균 활성**

[0074] **3-1. 무균 씨앗에 E. coli O157:H7 접종**

[0075] 날리딕스산(nalidixic acid, N8878-25G; Sigma-Aldrich, Inc.)에 적응된 5 개의 E. coli O157:H7 strain(ATCC 43895, E0018, F4546, H1730, 932)을 TSBN(날리딕스산의 농도가 50 µg/ml가 되도록 첨가된 TSB)을 이용하여 37 °C에서 24 시간 동안 배양하였다. 각각의 E. coli O157:H7 배양액을 각각 6 ml씩 취하여 50 ml 코니칼 튜브(conical tube)에 담아 30 ml의 혼합된 E. coli O157:H7 배양액을 제조하였다. 상기 혼합된 E. coli O157:H7 배양액을 2600 g-force로 15 분간 원심분리(25 °C, MF801; Hanil Science Industry)한 뒤, 상등액을 버리고, 멸균 증류수 30 ml를 첨가하여 E. coli O157:H7 현탁액을 제조하였다. 이후 다시 멸균 증류수를 이용하여 E. coli O157:H7의 농도가 2 log cfu/ml이 되도록 희석하였다. 희석된 E. coli O157:H7 현탁액 450 ml를 수침시킨 무균 씨앗 150 g에 5 분간 접종시켰다. 이후 멸균된 채(testing sieve, DH.SI10035; CHUNG GYE SANG GONG SA,

Seoul, Korea)에 펼쳐 놓았다. 접종 완료 후, 무순 씨앗 150 g 중 10 g을 폴리올레핀 백(Polyolefin bag, 400 ml; Interscience)에 넣고, 90 ml TSB와 함께 균질화시킨 후, 균질화된 용액을 이용하여 TSA와 SMAN에 평판 도말하여 총 균수와 *E. coli* 0157:H7의 개체 수를 확인하였다. 또한 균질화된 무순 씨앗과 TSB를 37 °C에서 24 시간 동안 인리치먼트(enrichment)하였다. 인리치먼트 과정은 모든 균질화된 무순 씨앗과 TSB 시료에 동일하게 적용하였다. 이후 무순 씨앗이 보관되어 있는 채를 클린 벤치 내부에서 상온에 보관하며 24 시간 건조하였다. 건조 후, 건조된 무순 씨앗 10 g과 90 ml TSB를 함께 균질화하여 건조한 후, 총 균 수(TSA)와 *E. coli* 0157:H7 개체 수(SMAN)를 평판 도말을 통해 측정하였다.

[0076] 3-2. 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)를 이용한 무순 씨앗의 *E. coli* 0157:H7 억제 효과

[0077] 25 °C, TSBN에서 24 시간 배양시킨 날리덕산에 적응된 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) 배양액 10 ml를 멸균 증류수로 희석하여, 준비된 다른 멸균 증류수 90 ml에 패니바실러스 폴리믹사의 개체 수가 각각 0(control), 1, 2, 3 log cfu/ml이 되도록 희석하였다. 각각의 패니바실러스 폴리믹사 현탁액에 *E. coli* 0157:H7 접종한 후, 24 시간 건조시킨 무순 씨앗 30 g을 넣고 2 시간 동안 상온에서 수침을 통해 패니바실러스 폴리믹사를 접종하였다. 2 시간 동안 수침 후, 씨앗 20 g을 멸균된 물과 함께 재배틀에 넣고 25 °C에서 5 일간 재배하였다. 나머지 10 g은 폴리올레핀 백(Polyolefin bag, 400 ml; Interscience)에 담아 90 ml TSB와 균질화하였다. 균질화 용액을 TSA, SMAN 및 TSAN에 평판 도말한 후, 37 °C에서 24 시간 동안 배양한 후, 각각의 배지들을 통해 총 균 수, *E. coli* 0157:H7 개체 수 및 접종된 패니바실러스 폴리믹사의 개체 수를 확인하였다. 그리고 5일 뒤, 무순 새싹 10 g을 90 ml TSB와 함께 균질화한 뒤, TSA, SMAN 및 TSAN에 평판 도말하고 37 °C 배양기에서 24 시간 배양한 후 총 균 수, *E. coli* 0157:H7 및 패니바실러스 폴리믹사의 개체 수를 확인하여 저해가 일어났는지 관찰하였다. 24 시간 배양 후, *E. coli* 0157:H7의 콜로니가 발견되지 않을 경우엔 폴리올레핀 백(Polyolefin bag, 400 ml)에 담겨 있는 인리치먼트(enrichment) 용액을 백금이(10 µl; SPL Life Science Co. Ltd)를 이용하여 SMAN에 희석 도말하여 37 °C 배양기에서 24 시간 배양한 뒤, 콜로니의 형태와 색깔 및 응집반응 키트(*E. coli* 0157:H7 latex, J521410; Oxoid Ltd., Hants, UK)를 통해 *E. coli* 0157:H7의 유무를 판단하였다.

[0078] 하기 표 7에 나타난 것과 같이, 무순 씨앗에 *E. coli* 0157:H7를 접종하고, 건조시킨 후, 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)를 수침을 통해 접종하는 전반적인 과정에 있어서, 무순 씨앗에 존재하는 총 균의 수는 큰 변화를 보이지 않았다. 총 균수는 전반적으로 4 log cfu/g 수준을 유지하였으며, 무순 씨앗이 새싹채소로 완전히 자란 후에는 9 log cfu/g 수준에 도달하며, 건조 및 멸균 증류수를 이용한 수침과정의 영향을 받지 않았다. 패니바실러스 폴리믹사는 각각 1, 2, 3 log cfu/g으로 무순 씨앗에 접종되었지만, 새싹채소로 완전히 자란 후에는 초기 접종 농도에 비례하여 약간의 차이는 있으나 7 log cfu/g 수준으로 성장하였다.

[0079] 무순 씨앗에 *E. coli* 0157:H7은 1.20 log cfu/g으로 접종되었으며, 24 시간 건조시킨 후에는 평판 도말한 SMAN에서 콜로니가 발견되지 않았다. 하지만 표본으로 사용한 무순 씨앗을 인리치먼트(enrichment)를 한 후, SMAN에 희석 도말한 결과, 콜로니가 형성되었으며, *E. coli* 0157:H7 응집반응 키트를 이용하여 *E. coli* 0157:H7이 존재함을 확인하였다. 이후 패니바실러스 폴리믹사를 각각 1, 2, 3 log cfu/g으로 2 시간 동안 수침하며 접종한 경우, 패니바실러스 폴리믹사를 수침한 후에도 SMAN에 콜로니는 형성되지 않았지만, 인리치먼트(enrichment) 희석 도말 및 응집반응을 통해 *E. coli* 0157:H7이 존재함을 확인할 수 있었다. 이후 5일간 재배한 무순 새싹채소에서 는 접종된 패니바실러스 폴리믹사 개체 수에 따라 *E. coli* 0157:H7의 개체 수도 약간의 차이를 나타내었다. 패니바실러스 폴리믹사가 2 log cfu/g으로 접종된 때에는 약 2.14 log cfu/g의 *E. coli* 0157:H7이 검출되었다. 패니바실러스 폴리믹사 3 log cfu/g으로 접종된 경우에는 무순 새싹채소에서 약 1.33 log cfu/g의 *E. coli* 0157:H7이 발견되었다. 접종되는 패니바실러스 폴리믹사의 초기 농도가 증가함에 따라 *E. coli* 0157:H7의 개체 수에서 차이를 보이지만, *E. coli* 0157:H7을 효과적으로 제어함을 확인할 수 있다.

[0080] [표 7. 무슨 씨앗의 *E. coli* O157:H7에 대한 패니바실러스 폴리믹사의 항균 효과]

시료 종류		Population (log cfu/g)			
		<i>E. coli</i> 접종 (or D.W. 처리)	24시간 건조 후	<i>P. polymyxa</i> 현탁액 수침 후 (or D.W.에 수침 후)	Sprout
Control 1 (no inoculation)	TAB	4.24±0.10	4.08±0.46	4.31±0.12	8.65±0.02
Control 2 (<i>E. coli</i> O157:H7 inoculated)	TAB	4.40±0.06	4.36±0.62	4.43±0.61	9.04±0.04
	<i>E. coli</i> O157:H7	1.20±0.14	+	+	2.81±0.52
Exp1 (1 log <i>P. polymyxa</i>)	TAB	4.40±0.06	4.36±0.62	4.32±0.42	8.97±0.17
	<i>P. polymyxa</i>	-	-	1.59±0.21	6.42±0.51
	<i>E. coli</i> O157:H7	1.20±0.14	+	+	3.80±0.94
Exp2 (2 log <i>P. polymyxa</i>)	TAB	4.40±0.06	4.36±0.62	4.51±0.47	8.95±0.05
	<i>P. polymyxa</i>	-	-	2.53±0.03	6.89±0.67
	<i>E. coli</i> O157:H7	1.20±0.14	+	1.10±0.14	2.14±0.27
Exp3 (2 log <i>P. polymyxa</i>)	TAB	4.40±0.06	4.36±0.62	4.89±0.58	9.21±0.06
	<i>P. polymyxa</i>	-	-	3.38±0.09	7.25±0.55
	<i>E. coli</i> O157:H7	1.20±0.14	+	+	1.66±0.50

[0081]

수탁번호

[0082]

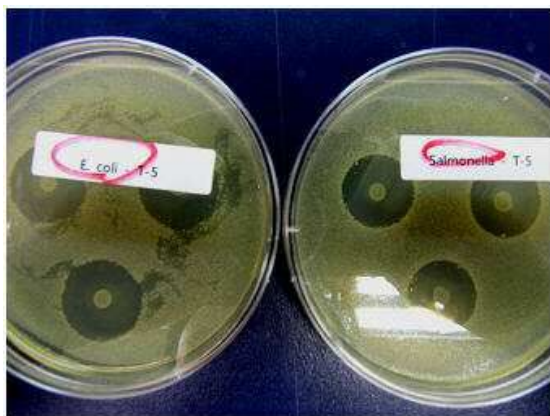
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91583P

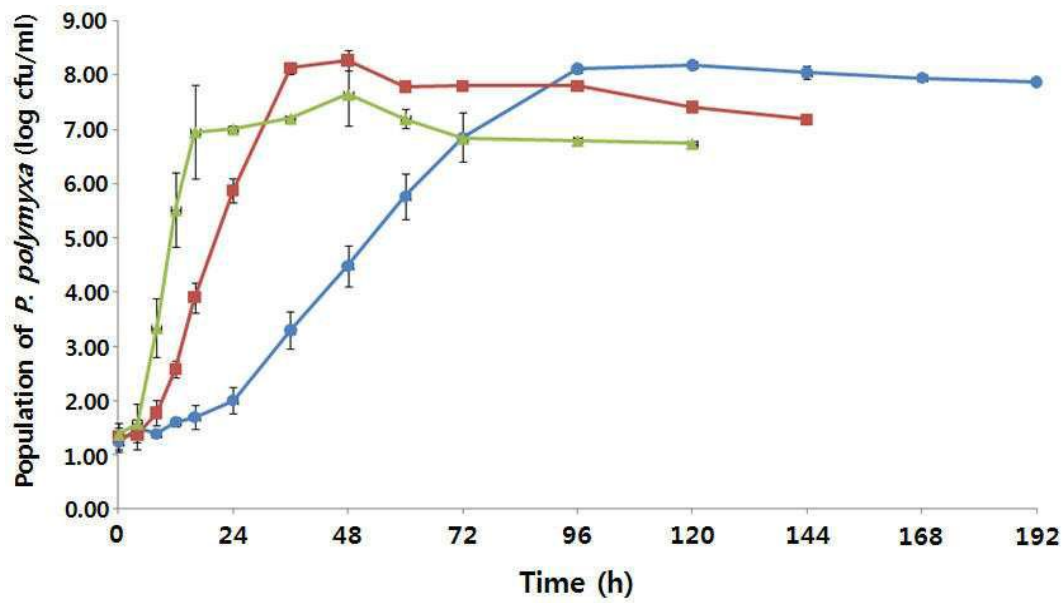
수탁일자 : 20101005

도면

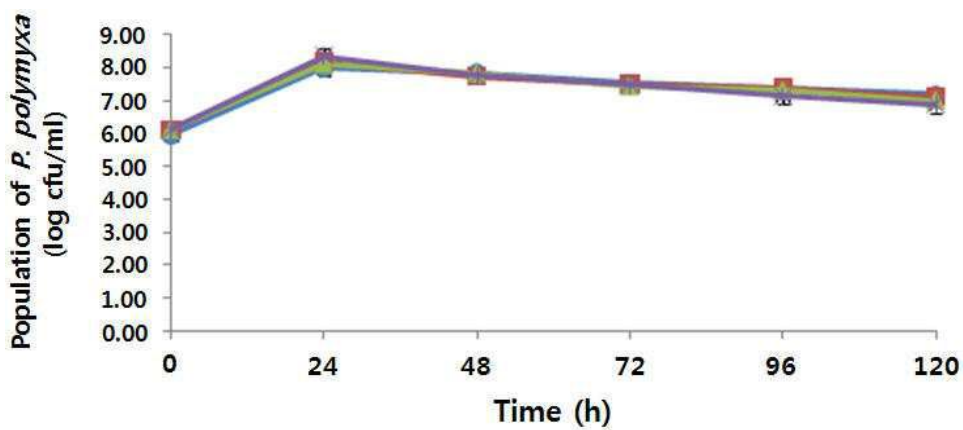
도면1



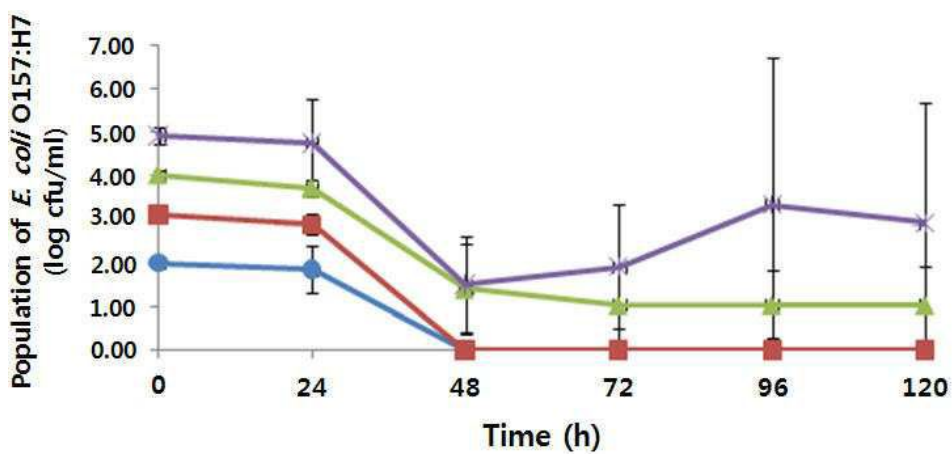
도면2



도면3a



도면3b



서열목록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
 <120> Antimicrobial composition comprising the Paenibacillus polymyxa
 against foodborne pathogens
 <160> 1
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 950
 <212> DNA
 <213> Paenibacillus polymyxa
 <400> 1

gnnnggaann tnnccgatta ttgggcgtaa gcgcgcgcag gcggctcttt aagtctggtg	60
tttaatcccg aggcctcaact tcgggtcgca ctggaaactg gggagcttga gtgcagaaga	120
ggagagtgga attccacgtg tagcggtgaa atgcgtagat atgtggagga acaccagtgg	180
cgaaggcgac ttcttgggct gtaactgacg ctgaggcgcg aaagcgtggg gagcaaacag	240
gattagatac cctggtagtc caccgcgtaa acgatgaatg ctaggtgtta ggggtttcga	300
tacccttggt gccgaagtta acacattaag cattccgcct ggggagtacg gtcgcaagac	360
tgaaactcaa aggaattgac ggggacccgc acaagcagtg gagtatgtgg tttaattcga	420
agcaacgcga agaaccttac caggcttga catccctctg accggtctag agatagacct	480
ttccttcggg acagaggaga cagggtgtgc atggttgctg tcagctcgtg tcgtgagatg	540
ttgggttaag tcccgaacg agcgcaaccc ttatgcttag ttgccagcag gtcaagctgg	600
gcactctaag cagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc	660
atgcccctta tgacctgggc tacacacgta ctacaatggc cggtaacaac ggaagcgaaa	720
tcgcgaggtg gagccaatcc tagaaaagcc ggtctcagtt cggattgtag gctgcaactc	780
gcctacatga agtcggaatt gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc	840
ccgggtcttg tacacacgc cgcgtcacacc acgagagttt acaacaccgc aagtcggtgg	900
ggtaaccgcg aaggagccag ccgccgaagt ggggtagatg atgggtgagt	950