



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0037379

(43) 공개일자

2016년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/20 (2006.01) A61K 31/045 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0129579

(22) 출원일자

2014년09월26일

심사청구일자

2015년09월22일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김현수

서울특별시 노원구 중계4동 131번지

김형업

서울특별시 동작구 알마타길 53, 106동 402호 (대방동, 대방e편한세상아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 6 항

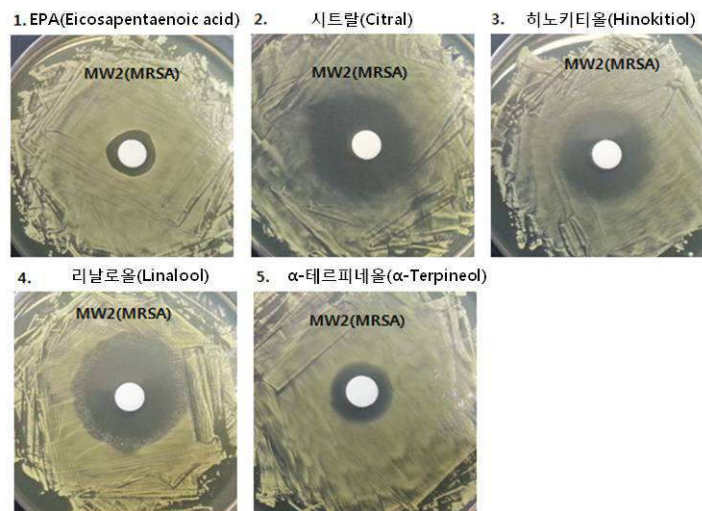
(54) 발명의 명칭 메티실린 저항성 균주에 대한 항균 조성물

(57) 요약

본 발명은 메티실린 저항성 균주에 대한 항균 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 메티실린 저항성 스타피로코커스 아우레우스에 대하여 높은 항균활성, 생육저해 효과 및 살균 효과를 가지는 EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 또는 α -테르피네올(α -Terpineol)을 함유하는 메티실린 저항성 균주 감염의 예방 또는 치료용 의약 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

본 발명에 따른 메티실린 저항성 균주에 대한 항균 조성물의 유효성을 검증하고 이를 포함하는 항균제제를 제공함으로써 의약품 및 건강기능식품의 신소재로서의 용도를 확보하여 메티실린 내성 균주 감염에 대한 예방 또는 치료에 기여할 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김신애

경기도 안양시 만안구 냉천로31번길 13, 가동 101
호 (안양동, 연합연립)

유연승

서울특별시 노원구 노원로22길 34, 109동 905호 (중계동, 롯데우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A2A2A05004796

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 후속연구지원

연구과제명 신규 발굴된 AMPK 활성화인자 및 결합단백질의 혈당 및 암 세포사멸 제어인자로서의 활용가
능성 탐색

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 및 α -테르피네올(α -Terpineol)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 메티실린 내성 균주에 대하여 항균 활성을 갖는 향균 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메티실린 내성 균주는 스타피로코커스 아우레우스(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)인 것을 특징으로 하는 메티실린 내성 균주에 대하여 항균 활성을 갖는 향균 조성물.

청구항 3

EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 및 α -테르피네올(α -Terpineol)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 함유하는 메티실린 내성 균주 감염 질환의 치료용 의약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 메티실린 내성 균주는 스타피로코커스 아우레우스(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)인 것을 특징으로 하는 메티실린 내성 균주 감염 질환의 치료용 의약 조성물.

청구항 5

EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 및 α -테르피네올(α -Terpineol)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 함유하는 메티실린 내성 균주 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 메티실린 내성 균주는 스타피로코커스 아우레우스(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)인 것을 특징으로 하는 메티실린 내성 균주 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메티실린 저항성 균주에 대한 항균 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 메티실린 저항성 스타피로코커스 아우레우스에 대하여 높은 항균활성, 생육저해 효과 및 살균 효과를 가지는 EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 또는 α -테르피네올(α -Terpineol)을 함유하는 메티실린 저항성 균주 감염의 예방 또는 치료용 의약 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 우리 인간은 언제나 외부 환경에 노출이 되어서 살아가고 있다. 그 중 미생물이나 바이러스의 경우 인간에게 치명적인 질병을 일으킬 수 있다. 하지만 과학의 발달로 1900년대에는 플레밍이 페니실린을 발견하고 이를 본격적으로 사용하면서 세균관련 질병으로부터 많은 생명을 구하였다. 이 후 다양한 종류의 항생제가 개발되어 병원균으로부터 인류를 지켜내고 있다.
- [0003] 하지만 최근 항생제에 대해 내성을 갖는 균주들이 생겨나고 있다. 이른바 슈퍼박테리아라고 불리는 내성 균주들이 생겨나고 있는 것이다. 메티실린 저항성 스타피로코커스 아우레우스(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)가 대표적인 예이다. 스타피로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)는 질환을 잘 일으키면서 항생제에 대한 내성이 흔하게 발생한다.
- [0004] 병원성 세균 중 현재 전 세계적으로 가장 문제시되고 있는 스타피로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, 황색포도상구균)는 전체 인구의 약 30%에서 검출되는 그람양성균으로, 병원 내 감염증을 유발하는 병원체로 널리 알려졌다 (Valencia *et al.*, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 50:845-849, 2004). 상기 세균은 일차적으로 피부와 연부조직에 감염을 일으켜 농피증(pyoderma)의 원인이 되고, 골수염, 심내막염, 패혈증과 균혈증 등 생명을 위협하는 중한 전신 감염증을 유발하는 것으로 보고된바 있다(Shinefield *et al.*, *The New England J. of Med.*, 346:491-496, 2002). 페니실린(Penicilin), 메티실린(methicillin) 등 포도상구균 항균제는 그 효과가 우수하여 지난 수십 년간 본 감염증의 주요 치료약제로 사용됐으나, 1961년 영국에서 메티실린에 내성을 보이는 균주인 MRSA가 처음 보고된 이후 전 세계적으로 지속적인 증가 추세를 보이고 있다(Standing Medical Advisory Committee, Department of Health, 1998).
- [0005] MRSA 균주는 메티실린 및 옥사실린에 내성을 가질 뿐 아니라 다른 베타 램탐계 항생제에도 모두 내성을 갖고 있다. 이러한 MRSA 균주는 치료제로 반코마이신 또는 테이코플라닌 등의 글리코펩티드 계열의 항생제를 사용하고 있지만 최근 반코마이신에 내성을 갖는 균주인 VRSA(Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*)균주가 생겨나고 있다(Gould IM, *Int J Antimicrob Agents*, 42, Suppl:S17-21, 2013). 이렇게 되면 현재 존재하는 거의 대부분의 항생제에 내성을 갖게 될 것이다. 이와 같은 이유로 항생제 내성 균주를 해결할 새로운 방법이 연구되고 있지만 낙관하기는 이르다고 할 수 있다.
- [0006] 이에, 본 발명자들은 최근 문제가 되고 있는 *Staphylococcus aureus* MW2 (Methicillin resistant *staphylococcus aureus*, MRSA) 균주에 대한 항균제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 5가지 유형의 항균후보물질인 EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 또는 α -테르피네올(α -Terpineol)이 상기 MRSA 균주의 생장 억제, 살균 효과 및 바이오필름(biofilm) 생성 억제와 같은 탁월한 항균 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 주된 목적은 메티실린 저항성 균주에 대한 항균물질을 유효성분으로 함유하는 항균 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 및 α -테르피네올(α -Terpineol)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 메티실린 내성 균주에 대하여 항균 활성을 갖는 항균 조성물을 제공한다.
- [0009] 본 발명은 또한, EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 및 α -테르피네올(α -Terpineol)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 함유하는 메티실린 내성 균주 감염 질환의 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 및 α -테르피네올(α -Terpineol)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 함유하는 메티실린 내성 균주 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 메티실린 저항성 균주에 대한 항균 조성물의 유효성을 검증하고 이를 포함하는 항균제제를 제공함으로써 의약품 및 건강기능식품의 신소재로서의 용도를 확보하여 메티실린 내성 균주 감염에 대한 예방 또는 치료에 기여할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 항균후보물질인 EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 또는 α -테르피네올(α -Terpineol)이 함유되어 있는 고체배지에서 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)를 배양한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 항균후보물질인 EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 또는 α -테르피네올(α -Terpineol)이 함유된 액체배지에서 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)를 배양한 결과를 살균 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명에서는 최근 문제가 되고 있는 *Staphylococcus aureus* MW2 (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 균주에 대한 항균제를 개발하기 위하여 5가지 유형의 항균후보물질인 EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 또는 α -테르피네올(α -Terpineol)을 사용하여 상기 MRSA 균주의 성장 억제, 살균 효과 및 바이오필름(biofilm) 생성 억제의 유효성을 검증하고자 페이퍼 디스크 시험, MIC 시험, 살균 억제 및 바이오필름 억제를 실시예에 설명한 바와 같이 수행하였다.

[0014] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 이용되는 생활성의 오메가-3, 또는 n3, 지방산(n3-FA)들은 자연적으로 발생하는 해양 오일 트리글리세라이드에 존재하고, 예를 들어, 연질 젤라틴 캡슐, 식품, 장내 영양 제형(Enteral nutrition formulations), 및 비경구적 수중유영양 에멀전의 형태와 같은 영양 보충물로서 상업적 제품에 포함된다. 그뿐만 아니라, 반-합성적으로 유래된 n3-FA는 또한, 고순도 형태, 예컨대, 고중성지방혈증(hypertriglyceridemia)의 치료를 위해 사용되는, 액체 충전(liquid filled) 캡슐 내 오메가-3 산 에틸 에스테르로 존재한다. 해양 오일의 생활성 성분은 세 가지 주요 오메가-3 지방산으로 구성될 수 있다; 즉, 에이코사펜타에노산(Eicosapentaenoic acid; EPA), 도코사헥사에노산(Docosahexaenoic acid; DHA), 및 그보다 적은 양의, 도코사펜타에노산(Docosapentaenoic acid; DPA).

[0015] 또한, 본 발명에서 조성물로 사용되는 시트랄(Citral)은 레몬(*Citrus limonum*), 레몬그라스(*Cymbopogon flexuosus*), 제라늄(*Pelargonium odorantissimum* *Pelargonium graveolens*), 라벤더(*Lavandula x intermedia*), 팔마로사(*Cymbopogon martinii*) 및 오미자(*Schizandra chinensis* RUPRECHT)과실 등의 오일에서 추출되는 대표적인 방향성 정유성분이다. 시트랄의 IUPAC 명은 3,7-디메틸옥타-2,6-디엔(3,7-dimethylocta-2,6-dienal)이고, 두 종류의 이성질체를 가지고 있다. 두 이성질체로 trans품인 geraniol(citral a)과 cis품인 neral(citral b)이 혼합물로 섞여 있다. 시트랄은 일반적으로 레몬이나 오렌지 향을 내는 향재료로 쓰이며 그 밖에 방충효과와 함께 곰팡이나 세균 등 미생물에 대한 항균 활성을 가지고 있는 것으로 알려졌다, 레티놀 합성의 재료로 이용되기도 한다.

[0016] 또한, 본 발명에서 사용되는 히노키티올(hinokitiol)은 베타-쓰야플리신(beta-thujaplicin)이라고도 불리는 트로폴론(troplone) 유도체로 Cupressaceous 패밀리의 나무에서 발견된다. 히노키티올은 철을 킬레이트(iron chelate)하는 화합물로, 케스페이즈-3(caspase-3)의 활성을 통해 세포사멸(apoptosis)을 유도하며, 분화를 유도하는 활성을 지니고, 항염(anti-inflammation), 항균(antibacterial), 항진균(anti-fungal), 항종양(anti-tumor), 항산화(antioxidant) 활성 등 다양한 생물학적 기능을 가지며, 종양세포주의 증식을 강력하게 억제한다. 특히, 히노키티올은 전립선암세포의 성장을 억제하고 안드로젠 수용체 신호화(androgen receptor

signaling)를 방해한다.

- [0017] 또한, 본 발명에서 사용되는 리날로올(Linalool)은 자연계에 존재하는 터펜 알코올(terpene alcohol)로서 200종 이상의 꽃(특히 박하 향기가 나는 Lamiaceae 속 허브종), 향료 작물에 포함된 부드러운 향기를 가진 방향성의 화합물이다. 상업적으로 향장제품, 아로마 용도로 많이 이용되고 있지만 항산화능이 있는 천연 물질이다. 리날로올과 유사한 이소프레노이드(isoprenoid) 구조로 되어 있는 토코트리엔올(tocotrienol)은 콜레스테롤 합성 저해 효과 및 항산화 효능을 나타내는 것으로 보고된 바 있다.
- [0018] 또한, 본 발명에서 사용되는 테르피네올(Terpineol)은 라일락과 같은 향기가 나는 액체로, α -테르피네올· β -테르피네올· γ -테르피네올의 3종이 알려졌으며, 이 가운데 주성분은 α -테르피네올이다. β -테르피네올은 천연으로는 존재하지 않으며, α -테르피네올의 광학이성질체는 식물의 정유 성분으로서 널리 분포한다. 시판되고 있는 테르피네올은 1, 8-테르펜을 묶은 산으로 탈수하여 얻으며, 향료의 원료로 사용된다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에서는, 페이퍼 디스크 시험 결과, 항균후보물질인 EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 또는 α -테르피네올(α -Terpineol)이 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)의 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0020] 본 발명의 다른 실시예에서는, MIC 시험 결과, EPA 또는 히노키티올은 100 μ M 내외의 낮은 농도에서, 시트랄, 리날로올 또는 α -테르피네올은 0.1% 내외의 낮은 농도에서 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)의 성장을 억제하는 효과를 확인할 수 있었다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 살균 어췌이 실험 결과, DMSO(dimethylsulfoxide)로 처리된 대조군에 비해 모든 항균후보물질은 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)에 대한 강한 살균력이 있는 것으로 확인되었다.
- [0022] 본 발명은 또 다른 실시예에서는, 바이오필름 어췌이 실험 결과, 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol) 또는 리날로올(Linalool)로 처리된 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)에서 바이오필름의 생성이 억제되는 효과를 확인할 수 있었다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 및 α -테르피네올(α -Terpineol)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 메티실린 내성 균주에 대하여 항균 활성을 갖는 항균 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서, '항균'이란 어떤 물질이 미생물의 발육을 억제할 수 있는 능력(항균력) 또는 효과(항균효과)를 말하며, 구체적으로는 높은 항균활성, 생육저해, 살균 또는 바이오필름생성저해 등을 의미한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 메티실린 내성 균주는 스타피로코커스 아우레우스(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명은 다른 관점에서, EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 및 α -테르피네올(α -Terpineol)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 함유하는 메티실린 내성 균주 감염 질환의 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 메티실린 내성 균주는 스타피로코커스 아우레우스(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에서 상기 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명에서 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도 한 가지 이상의 부형제 및/또는 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0029] 또한, 본 발명에서 상기 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로

및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 보다 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분 기준으로 1일 약 0.1 내지 100mg/kg으로 할 수 있으며, 예컨대, 1일 기준 1 내지 10mg/kg으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다.

[0030] 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 유효성분의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한, 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명은 또 다른 관점에서, EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 및 α -테르피네올(α -Terpineol)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 함유하는 메티실린 내성 균주 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 메티실린 내성 균주는 스타피로코커스 아우레우스(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에서 건강기능식품은 감염 질환의 개선을 위한 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 건강 기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용될 수 있다. 이때, 건강기능식품 중의 상기 EPA(Eicosapentaenoic acid), 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol), 리날로올(Linalool) 또는 α -테르피네올(α -Terpineol) 및/또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 목적하는 식품의 종류, 기능, 효능 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 식품 중량의 약 0.00001 내지 100 중량%, 바람직하게는 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.001 내지 10 중량%, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 1 중량% 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0035] 실시예 1: 균주 배양

[0036] 실험에 사용한 균주(Bacteria)는 *Staphylococcus aureus* MW2(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)로 고려대학교 의과대학 신욱 교수님 연구실로부터 양도받아 사용하였다. 균주 배양에는 TSB(Trypticase soy broth)(Difco Laboratories, USA) 배지를 사용하였다. 또한, 본 발명의 실시예에서 사용된 시약들은 시그마 케미컬사(Sigma Chemical Co., USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0037] 실시예 2: 항균활성 측정

[0038] 페이퍼 디스크 방법(Paper disc method)으로, 직경 8mm 페이퍼 디스크에 항균후보물질(100mM EPA(Eicosapentaenoic acid), 100mM 히노키티올(Hinokitiol), 100% 리날로올(Linalool) 또는 100% α -테르피네올(α -Terpineol))을 20 μ L 점적하여 항균후보물질-디스크를 준비하였다. 상기 준비된 항균후보물질-디스크를 균주가 도말된 100mm 또는 150mm 펠트리디쉬의 고체배지 중앙에 얹어 6시간 또는 24시간 배양한 다음, 고체 배지 상에서 형성된 생육 저해환(clear zone: 멸균된 원무늬 영역)의 크기를 측정하였다(단위: mm).

[0039] 페이퍼 디스크 시험 결과, 표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이, 전반적으로 모든 항균후보물질이 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)의 생장을 억제하는 것으로 확인되었다. 특히, 시트랄, 히노키티올 및 리날로올에서 높은 생장 저해효과를 나타내었다.

표 1

	항균후보물질	MW2(MRSA)의 생육저해환(mm)	농도
1	EPA(Eicosapentaenoic acid)	14	100mM
2	시트랄(Citral)	30	100%
3	히노키티올(Hinokitiol)	26	100mM
4	리날로올(Linalool)	27	100%

5	α -테르피네올(α -Terpineol)	16	100%
---	---------------------------------------	----	------

[0041] 실시예 3: 최소생육저해농도 시험(MIC(Minimum inhibitory concentration) test)

[0042] MIC 시험은 항균후보물질의 최소생육저해농도(최소억제농도)를 구하는 실험으로, 96웰 플레이트에 항균후보물질을 균주(*Staphylococcus aureus* MW2(MRSA))와 함께 4시간 또는 24시간 배양한 후 OD600에서 배양액의 흡광도를 측정하였다. 각 항균후보물질에 대한 MIC 값은 육안으로 관찰하여 균의 생장이 억제된 최저농도로 정하였으며, 대조군(도시 생략)과 비교하여 그 값이 0.05 이상 차이가 나는 가장 낮은 값으로 정하였다.

[0043] MIC 시험 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, EPA 또는 히노키티올은 100 μ M 내외의 낮은 농도에서, 시트랄, 리날로올 또는 α -테르피네올은 0.1% 내외의 낮은 농도에서 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)의 생장을 억제하는 효과를 나타내었다.

표 2

	항균후보물질	MW2(MRSA)의 MIC		단위
		4 시간	24 시간	
1	EPA(Eicosapentaenoic acid)	0.0625	0.125	mM
2	시트랄(Citral)	0.0625	0.25	%
4	히노키티올(Hinokitiol)	0.125	0.125	mM
4	리날로올(Linalool)	0.5	0.0625	%
4	α -테르피네올(α -Terpineol)	0.25	0.5	%

[0045] 실시예 4: 살균 어썰이(Bactericidal assay)

[0046] 살균 어썰이는 MIC 시험과 달리 이미 자란 균주를 얼마나 살균할 수 있는지를 확인하는 방법이다. 하룻밤(24시간) 배양된 균주(*Staphylococcus aureus* MW2(MRSA)) 배양액을 1:100 비율로 새 TSB로 옮겨서 OD600 값이 약 1이 될 때까지(약 4시간) 배양하였다. 상기 배양된 균주를 셀 다운(cell down) PBS로 세척하고 2mL PBS로 현탁하였다. 상기 현탁된 균주를 96웰 플레이트에 각각 100 μ L씩 옮긴 후 항균후보물질을 농도별로 처리하였다. 1시간 동안 배양 후 일정 비율로 희석하여 TSB 한천(agar)배지 플레이트에 도말하여 하룻밤 배양한 후 콜로니 카운팅(colony counting)을 수행하였다.

[0047] 살균 어썰이 실험 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 대조군인 DMSO(dimethylsulfoxide)에 비해 항균후보물질은 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)에 대한 강한 살균력을 나타내었다.

[0048] 실시예 5: 바이오필름 어썰이(Biofilm assay)

[0049] 바이오필름은 일부 미생물이 생성하는 자연물질로 미생물의 생장이나 표면 부착에 중요할 뿐만 아니라 열악한 외부 환경에 견디도록 하며, 심지어 항생제에 대한 저항성도 생기게 할 수 있다. 본 발명의 항균후보물질이 이러한 바이오필름의 형성을 억제하거나 생성된 것을 제거하는 능력을 가지는지 조사하고자 하였다. 우선, 2% 포도당이 함유된 TSB에 1:100 비율로 균주(*Staphylococcus aureus* MW2(MRSA))를 접종하고 200 μ L씩 96웰 플레이트에 옮긴 후 37°C에서 배양하였다. 일정 시간이 지난 후 배지를 제거하고 200 μ L PBS를 넣고 항균후보물질을 농도별로 처리하여 1~2일간 37°C에서 배양하였다. 1~2일 후 상기 플레이트의 균주가 담긴 웰의 PBS를 제거하고 5분간 건조한 후 0.1% 크리스탈 바이렛(Crystal violet)으로 염색한 다음 OD570에서 흡광도를 측정하였다.

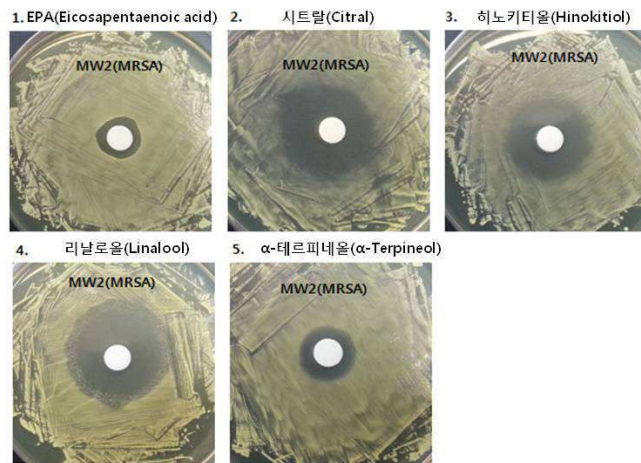
[0050] 바이오필름 어썰이 실험 결과, 시트랄(Citral), 히노키티올(Hinokitiol) 또는 리날로올(Linalool)로 처리된 MRSA(*Staphylococcus aureus* MW2)에서 바이오필름의 형성을 억제하는 효과를 나타내었다(도시 생략).

[0051] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할

것이다.

도면

도면1



도면2

