



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년11월09일
(11) 등록번호 10-1080995
(24) 등록일자 2011년11월01일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0004578

(22) 출원일자 2009년01월20일

심사청구일자 2009년01월20일

(65) 공개번호 10-2010-0085352

(43) 공개일자 2010년07월29일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080083840 A

EP00360290 A3

KR100716133 B1

KR100860785 B1

(73) 특허권자

선 바이오 (주)

충남 아산시 영인면 신봉리 302-3

대한민국 농촌진흥청

경기 수원시 권선구 서둔동 250번지

(72) 발명자

함준상

경기도 화성시 병점동 주공아파트 205동 704호

정석근

경기도 안산시 성포동 주공아파트 4차 405동 1007호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 6 항

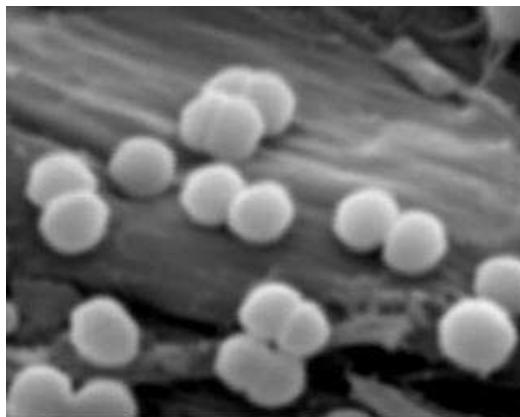
심사관 : 김민정

(54) 발효 마늘액을 포함하는 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 항생제 저항성 유해균의 생장 억제능을 가지는 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5), 상기 미생물의 배양액으로 발효시킨 발효 마늘액 및 상기 발효 마늘액을 포함하는 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 발효 마늘액은 항생제 저항성 유해균에 대해 매우 우수한 항균 효과를 나타내어 항생제 대체물질로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

한기성

경기도 수원시 권선구 오목천동 청구1차 아파트
104동 1102호

유영모

경기도 수원시 권선구 금곡동 530번지 엘지빌리지
아파트 207동 1402호

채현석

경기도 수원시 권선구 구운동 839 성원아파트 104
동 1006호

안종남

경기도 수원시 영통구 영통동 청명마을 건영아파트
424-1002

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

이 콜라이(*E. coli*) F4, 이 콜라이(*E. coli*) F5, 또는 이 콜라이(*E. coli*) K99로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 항생제 저항성 유해균의 생장 억제능을 가지는 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)(KACC 91419P)의 배양액으로 발효시킨 발효 마늘액.

청구항 3

신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)(KACC 91419P)의 배양액으로 마늘즙을 발효시켜 얻은 발효 마늘액, 이의 농축액, 이의 건조물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 이 콜라이(*E. coli*) F4, 이 콜라이(*E. coli*) F5, 또는 이 콜라이(*E. coli*) K99 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 발효 마늘액은 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)의 배양액 30 내지 50 중량부와 마늘즙 30 내지 50 중량부를 혼합한 후 발효시켜 얻는 것을 특징으로 하는 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)의 배양액은 $OD_{600} = 0.8$ 내지 1.0인 것을 특징으로 하는 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 발효 마늘액은 세포 포함 발효액 또는 무세포(cell-free) 발효액인 것을 특징으로 하는 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제3항에 있어서,

상기 조성물은 음료, 사료, 식품, 의약품 및 화장품으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 형태인 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 항생제 저항성 유해균의 생장 억제능을 가지는 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5), 상기 미생물의 배양액으로 발효시킨 발효 마늘액 및 상기 발효 마늘액을 포함하는 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 2차 세계대전 때 부상당한 환자의 감염을 막기 위해 개발된 페니실린은 기적의 물질로 취급되었으나, 항생제의 이용이 늘어나면서 항생제에 저항하는 세균이 나타나게 되었다.
- [0003] 가장 먼저 보고된 항생제 저항성 세균은 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)으로, 공기, 토양 등에 널리 분포하며, 특히 단백질, 탄수화물이 많은 식품에 오염될 가능성이 매우 높고 식품으로의 오염 경로도 매우 다양하여 식중독의 원인이 되는 균이다. 따라서, 식품위생상 중요하게 다뤄지고 있으며, 최근에는 포도상구균의 임상분리주 가운데 미국은 34%, 일본, 싱가포르, 대만은 60%, 이탈리아와 포르투갈은 50% 이상이 항생제 저항성으로 알려지고 있어 항생제 저항성 균주에 대한 경각심이 높아지고 있다.
- [0004] 사료 첨가용 항생제는 1950년대부터 가축의 생장촉진제로 널리 사용되어 왔으나 육제품에 항생제의 잔류로 인한 잠재적 위해성이 제기되면서 전세계적으로 사용이 규제되고 있는 실정이다. 항생제는 가축의 질병치료에만 사용하고 항생제를 대체할 수 있는 생육촉진제의 개발이 필요하게 되었다.
- [0005] 생균제는 이러한 목적에서 개발되었으며, 1989년 Fuller에 의해 장내 미생물의 균총을 개선함으로써 숙주동물에게 유익한 작용을 유도할 수 있는 생균제제로 그 개념이 확정되었다. 생균제를 가축의 사료에 혼합 사용할 경우 생육촉진제로서의 효과가 입증되었는데, Pollmann(1981) 등은 돼지에서 체중 증가의 결과를 얻었다고 보고하였다. 또한, 국내에서도 장 등(2000)이 돼지에 유산균을 첨가한 사료를 급여하였을 때 증체율이 증가되는 것을 확인하였다. 생균제로의 이용을 위한 균주의 선발 기준은 안전, 기능적 및 기술적 측면(Saarela 등 2000)으로 요약될 수 있고, 기능적 측면은 위산 및 담즙 독성에 대한 저항성(Dunne 등 1999), 항산화 활성(Kullisaar 등 2002), 항미생물질의 생산, 면역반응 조절 및 장 조직 접착능력(Saarela 등 2000) 등을 포함한다. 그 중 항미생물질의 생산 측면에서 유산균(*Lactobacilli*)은 유기산, 과산화수소, 이산화탄소, 디아세틸, 아세트알데히드 및 박테리옌 같은 여러 종류의 항미생물질의 생산으로 인해 생균제로서의 강점을 가지며 널리 이용되고 있다(Ouwehand, 1998).
- [0006] 한편, 마늘은 세균, 곰팡이, 그리고 효모의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있으나 항균력과 함께 독성을 함께 가지고 있다. 또한, 마늘은 김치에 첨가되어 사용되기도 하는데, 지금까지 김치의 유용한 효과들은 보고되어 왔으나 마늘의 독성에 따른 부작용은 밝혀진바 없다. 더욱이 마늘을 첨가하지 않은 김치는 마늘을 첨가한 김치에 비해 발효 초기에 호기성 세균의 증식을 촉진하여 김치의 나쁜 냄새에 영향을 준다고 알려져 있다. 이러한 보고들을 통해 김치의 유용한 효과, 특히 항균, 항암효과는 마늘을 포함한 기타 김치 부재료들이 유산균에 의해 발효되어 이로 인한 2차 대사산물에서 기인된 것으로 보인다.
- [0007] 따라서, 항생제 저항성 저감화 대책의 일환으로서 마늘 발효에 관련된 미생물을 이용하여 마늘의 우수한 항균효과를 더욱 증가시키고, 특히 항생제 저항성 유해균에 대해 우수한 항균활성을 갖는 천연 조성물의 개발이 시급하다.

발명의 내용

해결하고자하는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 알리신 또는 마늘즙에서 생장이 촉진되는 유산균을 선발하고, 이를 이용한 항생제 저항성 유해균에 대한 생장 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 알리신 또는 마늘즙에서 생장이 촉진되는 유산균과 마늘즙을 이용한 발효 마늘액과 그 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항생제 저항성 유해균의 생장 억제능을 가지는 신규 미생물 페디오코

커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)(KACC 91419P)을 제공한다.

- [0011] 본 발명은 또한 이 콜라이(*E. coli*) F4, 이 콜라이(*E. coli*) F5 및 이 콜라이(*E. coli*) K99로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 항생제 저항성 유해균의 생장 억제능을 가지는 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)의 배양액으로 발효시킨 발효 마늘액을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)의 배양액으로 마늘즙을 발효시켜 얻은 발효 마늘액, 이의 농축액, 이의 건조물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한
- [0014] i) 알리신 함유 배지에서 생장이 촉진되는 유산균을 선발하는 단계;
- [0015] ii) 상기에서 선발된 유산균 배양액과 마늘즙을 혼합 배양하여 pH가 감소된 유산균을 선발하는 단계; 및
- [0016] iii) 상기 ii) 단계에서 선발된 유산균 배양액으로 마늘즙을 발효시켜 발효 마늘액을 제조하는 단계를 포함하는 발효 마늘액의 제조방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 본 발명의 발효 마늘액의 제조방법에 따라 제조된 발효 마늘액을 제공한다.

효 과

- [0018] 본 발명의 발효 마늘액은 항생제 저항성 유해균에 대해 매우 우수한 항균 효과를 나타내어 항생제 대체물질로 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0020] 본 발명은 항생제 저항성 유해균의 생장 억제능을 가지는 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5) (KACC 91419P)을 제공한다. 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)는 마늘의 주요 항균물질인 알리신을 함유한 배양배지에서 생장능이 우수한 유산균을 1차 선발하고, 선발된 유산균과 마늘즙을 혼합 배양하여 배지 내 pH가 감소된 유산균을 최종 선발하고, 최종 선발된 유산균의 배양액과 마늘즙을 혼합하여 발효시켜 항생제 저항성 유해균에 대해 통상의 항생제보다 우수한 생장 억제 효과를 나타내는 유산균을 선별하는 과정을 통해 발견되었으며, 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁하고 수탁번호 KACC 91419P를 부여받았다. 본 발명은 또한 항생제 저항성 유해균의 생장 억제능을 가지는 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)(KACC 91419P)의 배양액으로 발효시킨 발효 마늘액을 제공한다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)의 배양액으로 발효시킨 발효 마늘액은 우수한 항생제 저항성 유해균의 생장을 억제한다.
- [0021] 본 발명은 또한 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)(KACC 91419P)의 배양액으로 마늘즙을 발효시켜 얻은 발효 마늘액, 이의 농축액, 이의 건조물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 발효 마늘액의 농축액 및 건조물은 상기 발효 마늘액을 당업자가 이해할만한 수준의 통상의 방법으로 농축 또는 건조하여 얻은 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 발효 마늘액은 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)의 배양액 30 내지 50 중량부와 마늘즙 30 내지 50 중량부를 혼합한 후 발효시켜 얻을 수 있다. 상기 함량 범위 내에서 알리신의 변형체로 생각되는 항균물질(후술)의 생산이 최대화될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 한 측면에서, 상기 신규 미생물 페디오코커스 펜토사세우스 L5 (*Pediococcus pentosaceus* L5)의 배양액은 OD₆₀₀= 0.8 내지 1.0일 수 있다. 예를 들어, 페디오코커스 펜토사세우스 L5 를 통상의 MRS 배지에서 1일간 배양하여 OD₆₀₀= 0.8 내지 1.0인 것을 사용함으로써 적절한 항균물질을 생산한다.

- [0025] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 발효 마늘액은 세포 포함 발효액 또는 무세포(cell-free) 발효액일 수 있다.
- [0026] 상기 항생제 저항성 유해균은 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 클로람페니콜, 가나마이신, 밴코마이신 및 에리스로마이신로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 항생제에 대해 저항성을 가지는 균이라면 특별히 제한하지는 않으나, 스태필로코커스 아리우스(*Staphylococcus aureus*) 40510, 살모넬라 풀로럼(*Salmonella pullorum*) 13036, 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*) 49223, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) BBA 185, 이 콜라이(*E. coli*) F4, 이 콜라이(*E. coli*) F5, 또는 이 콜라이(*E. coli*) K99 등일 수 있다. 특히, 이 콜라이(*E. coli*) F4, 이 콜라이(*E. coli*) F5, 또는 이 콜라이(*E. coli*) K99 일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 항생제 저항성 유해균의 생장 억제용 조성물은 적용 대상 및 형태에 따라 음료, 사료, 식품, 의약품, 또는 화장품 등 어느 하나의 형태의 것일 수 있다. 상기 조성물에 함유된 발효 마늘액, 이의 농축액 및 건조물, 또는 이들의 혼합물의 함량은 적용 형태에 따라 적절히 조절 가능하여 특별히 제한하지는 않는다.
- [0028] 또한, 본 발명의 조성물은 적용 형태에 따라 통상적으로 포함되는 부형제, 보존제, 안정화제 등의 첨가제를 통상적인 함량으로 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명은 또한
- [0030] i) 알리신 함유 배지에서 생장이 촉진되는 유산균을 선발하는 단계;
- [0031] ii) 상기에서 선발된 유산균 배양액과 마늘즙을 혼합 배양하여 pH가 감소된 유산균을 선발하는 단계; 및
- [0032] iii) 상기 ii) 단계에서 선발된 유산균 배양액으로 마늘즙을 발효시켜 발효 마늘액을 제조하는 단계를 포함하는 발효 마늘액의 제조방법에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명의 발효 마늘액의 제조방법을 단계별로 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0034] 단계 i)는 알리신이 첨가된 유산균 배양 배지에서 유산균을 배양하여 생장이 90% 이상 촉진되는 유산균을 선발하는 단계이다.
- [0035] 상기 알리신의 함량은 유산균 배양 배지 100 중량부에 대하여 0.5내지 1중량부로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 함량 범위 내에서 알리신의 유산균 억제여부의 결정이 가능하다.
- [0036] 상기 유산균 배양 배지는 특별히 제한하지는 않으나 MRS 배지인 것이 바람직하다.
- [0037] 단계 ii)는 상기 단계 i)에서 선발된 유산균 배양액을 마늘즙과 혼합하여 30 내지 40℃에서 1일 내지 2일 배양하여 pH가 감소된 균주를 선발하는 단계이다. 마늘즙을 첨가하고 일정시간 경과후 pH 감소는 마늘즙 첨가조건에서도 유산균이 생장할수 있음을 의미한다.
- [0038] 단계 iii)는 상기 단계 i)과 ii)를 거쳐 최종 선발된 유산균 배양액으로 마늘즙을 발효시켜 발효 마늘액을 제조하는 단계이다.
- [0039] 상기 유산균은 페디오코커스속(*Pediococcus*) 미생물인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*) L5 인 것이 좋다.
- [0040] 이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] <실시예 1> 항생제 저항성 유해균의 선발
- [0042] 실험에 사용한 유해균 후보 균주로는 논문을 통해 항생제 저항성 유해균으로 알려져 있는, 스태필로코커스 아리

우스(*Staphylococcus aureus*) 12256, 스탕필로코커스 아리우스(*Staphylococcus aureus*) 40510, 살모넬라 풀로럼(*Salmonella pullorum*) 13036, 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*) 49223, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) BBA 185, 이 콜라이(*E. coli*) F4, 이 콜라이(*E. coli*) F5, 및 이 콜라이(*E. coli*) K99을 사용하였다.

[0043] 항생제로는 테트라사이클린 30 μ g, 페닐실린 10IU/IE/UI, 스트렙토마이신 10 μ g, 클로람페니콜 30 μ g, 가나마이신 30 μ g, 벤코마이신 30 μ g, 에리스로마이신 15 μ g을 사용하였다.

[0044] 항생제 저항성은 시험 테스트 디스크(백톤 비비엘 센스 디스크 감수성)를 사용하여 측정하고, 도 1에 그 결과를 나타내었다.

[0045] 도 1에 나타난 바와 같이, 스탕필로코커스 아리우스(*Staphylococcus aureus*) 12256(g)은 각각 사용된 농도에서 항생제 저항성을 나타내지 않았고, 스탕필로코커스 아리우스(*Staphylococcus aureus*) 40510(h)은 에리스로마이신, 페니실린, 스트렙토마이신, 클로람페니콜, 가나마이신에 항생제 저항성을 나타내었고, 살모넬라 풀로럼(*Salmonella pullorum*) 13036(c) 및 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*) 49223(a)은 벤코마이신과 페니실린, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) BBA 185(b)는 벤코마이신, 페니실린, 스트렙토마이신, 클로람페니콜, 이 콜라이(*E. coli*) F4(d)는 벤코마이신, 가나마이신, 페니실린, 테트라사이클린, 이 콜라이(*E. coli*) F5(f)는 페니실린, 가나마이신, 클로람페니콜, 이 콜라이(*E. coli*) K99(e)는 테트라사이클린, 벤코마이신, 페니실린, 스트렙토마이신에 저항성을 나타내었다.

[0046] <실시예 2> 항생제 저항성 유해균의 성장을 억제하는 유산균의 선발

[0047] 마늘의 주요 항균물질인 알리신에 의해 성장이 억제되지 않는 유산균을 선발하기 위해, 축산과학원에 보유 중이거나 종균보관기관에서 분양받은 45종의 유산균을 알리신(5mg/mL)이 첨가된 MRS 배지에서 배양하여 유산균의 성장을 비교하였다.

[0048] 표 1에 나타난 바와 같이, 7개의 균주에서 알리신의 첨가에 의해 100% 이상 생장이 촉진되었다.

표 1

[0049] 알리신 첨가에 따른 유산균의 성장

성장율(%)	< 80	80-90	90-100	100 <
균주 수	12	10	16	7

[0050] 다음으로, 알리신 첨가 후에도 90% 이상의 성장을 나타내는 23개의 균주를 대상으로 배양액과 마늘즙을 동량으로 혼합하고 하룻밤 배양하여 pH 변화를 측정하여 pH가 감소된 5개 균주를 선발하였다(표 2). 이때 동량의 배지와 마늘즙을 혼합한 것을 대조군으로 사용하였다.

표 2

[0051] 마늘즙과 유산균 배양액을 동량 혼합하여 배양한 후 pH 변화

명명	pH-before	pH-after
대조군	6.65	6.71
<i>L. plantarum</i> CSII 13-1	4.64	4.45
<i>L. casei</i> KCTC 3109	5.23	4.85
<i>L. reuteri</i> SW	4.92	4.79
<i>L. paracasei</i> KCTC 3169	4.70	4.56
<i>Pediococcus pentosaceus</i> L5	4.93	4.70

- [0052] 페디오코커스 펜토사세우스 L5(*Pediococcus pentosaceus* L5)는 사일리지에서 분리된 균주로 사일리지를 Sodium azide가 첨가된 MRS에 배양하고 공지의 유산균 분리 방법에 의해 분리하였다. 균주의 동정을 위해 전자현미경으로 형태를 관찰하였으며, 16s rRNA 염기서열 분석을 통해 균종을 결정하였다. 도 2는 페디오코커스 펜토사세우스 L5의 형태적 특성을 보여주며, 하기 염기서열은 페디오코커스 펜토사세우스 L5의 16s rRNA 염기서열을 나타낸다(서열 중 N 표시는 염기서열분석기가 A,G,C,T를 각각 다른 형광색으로 표지한후 분석하는데 명확하지 않을 때 N으로 표시한 것이다). 상기 페디오코커스 펜토사세우스 L5를 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁하고 수탁번호 KACC 91419P를 부여받았다.
- [0053] < 페디오코커스 펜토사세우스 L5의 16s rRNA 염기서열>
- [0054] NNNNNCGGCGGTGCTATACATGCAAGTCGAACGAACCTCCGTTAATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCAGAAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAAGTAAGTGTATACCCAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCAATGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAA GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAA
- [0055] <실시예 3> 발효 마늘액의 제조
- [0056] 마늘을 믹서(Alozen, Multi-function food processor)로 갈아 즙을 제조하고, 상기 실시예 2에서 선발된 5개 균주 각각의 배양액(OD₆₀₀=0.8-1.0)을 동량 첨가하여 37℃에서 하룻밤 배양하여 발효 마늘액을 제조하였다.
- [0057] <실험예 1> 발효 마늘액의 항균 효과 조사
- [0058] 상기 실시예 3에서 제조한 발효 마늘액의 항균효과는 agar-well diffusion method로 측정하였다. 각 웰에는 발효 마늘액 50 μ l를 첨가하였고, 항생제 저항성 유해균으로는 실시예 1에서 선발된 7종류의 균주를 사용하였다. 대조군으로는 마늘즙과 배양 배지를 동량 혼합한 것을 사용하였다.
- [0059] 도 3에서, a)는 스태필로코커스 아리우스(*Staphylococcus aureus*) 40510, b)는 살모넬라 폴로럼(*Salmonella pullorum*) 13036, c)는 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*) 49223, d)는 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) BBA 185, e)는 이 콜라이(*E. coli*) F4, f)는 이 콜라이(*E. coli*) F5, g)는 이 콜라이(*E. coli*) K99에 대한 항균 실험 결과를 나타낸 것이다.
- [0060] 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군에서는 항생제 저항성 유해균에 대해 억제효과가 나타나지 않거나 매우 약하게 나타났다. 반면, 발효 마늘액을 처리한 실험군에서는 유산균종 마다 차이는 있었으나 항생제 저항성 유해균에 대한 우수한 항균 효과를 확인할 수 있었다.
- [0061] 특히, 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*) L5는 모든 항생제 저항성 유해균에 대해 높은 항균 효과를 나타내었다.
- [0062] 상기 결과로부터 마늘 자체는 항생제 저항성 유해균에 대해 항균 효과가 없거나 미비하지만, 유산균을 첨가하여 발효시킨 마늘은 항생제 저항성 유해균에 대해 매우 우수한 항균 효과를 나타내어 발효로 인한 유용한 2차 대사산물이 생성되고, 이 산물이 항균 효과와 관련됨을 예측할 수 있었다. 이 항균물질은 항균력이 우수하여 ultrafiltration, C18 컬럼을 이용하여 분획할 수 있었으며 LC MS/MS를 통해 분자량을 확인할 수 있었다. 도 4는 스태필로코커스 아리우스(*Staphylococcus aureus*) 40510 항생제 저항성 유해균에 대한 Ultrafiltration 여과물의 항균 활성을 보여주며, 도 5는 C18 컬럼으로 분획한 분획물의 항균 활성을 보여준다. 도 6 내지 8은 C18 컬럼분획물의 LC MS 크로마토그램을 보여준다[도 6: A8, 도 7: A9, 도 8: A10]. C18 컬럼분획물의 A8, A9(항균활성존재), A10의 LC-MS 결과를 비교한 결과 A9 분획물에만 존재하는 것은 157.9383의 물질이며 이에 대한 MS-MS 결과(도 9)는 이것이 알리신의 대사산물을 보여준다.

도면의 간단한 설명

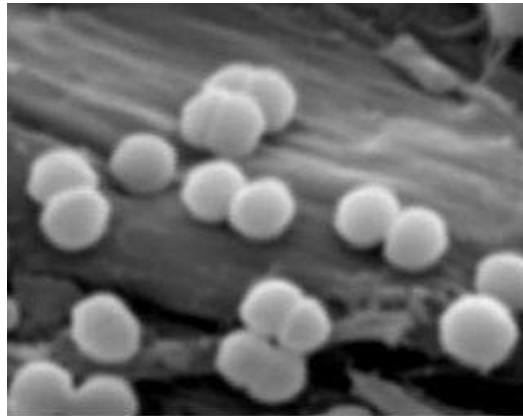
- [0063] 도 1은 항생제 저항성 유해균을 선별하기 위한 균주의 항생제 저항성 실험 결과를 나타낸 것이다.
- [0064] 도 2는 *Pediococcus pentosaceus* L5의 형태적 특성을 보여준다.
- [0065] 도 3은 본 발명의 발효 마늘액의 항생제 저항성 유해균에 대한 항균 효과를 나타낸 것이다.
- [0066] 도 4는 스타필로코커스 아리우스(*Staphylococcus aureus*) 40510 항생제 저항성 유해균에 대한 Ultrafiltration 여과물의 항균 활성을 보여준다.
- [0067] 도 5는 C18 컬럼으로 분획한 분획물의 항균 활성을 보여준다.
- [0068] 도 6 내지 8은 C18 컬럼분획물의 LC MS 크로마토그램을 보여준다[도 6: A8, 도 7: A9, 도 8: A10)].
- [0069] 도 9은 A9 분획물에 존재하는 157.9383의 물질에 대한 MS-MS 결과를 보여준다.

도면

도면1



도면2



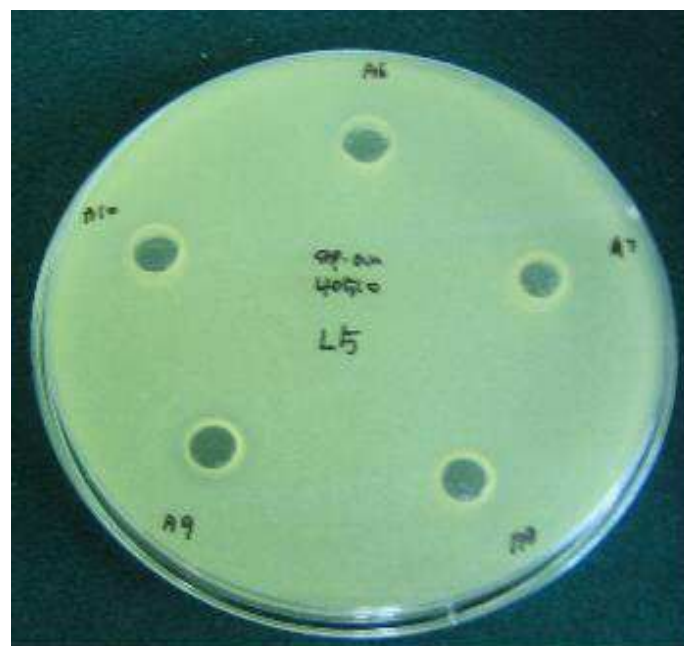
도면3



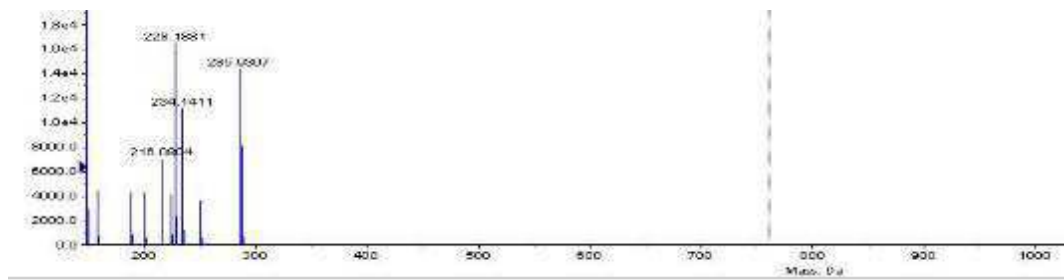
도면4



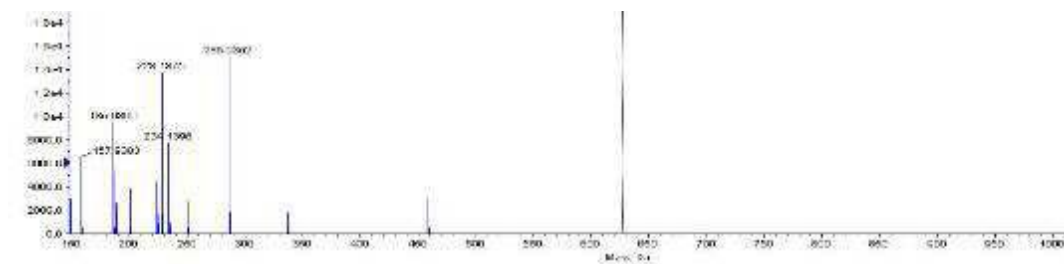
도면5



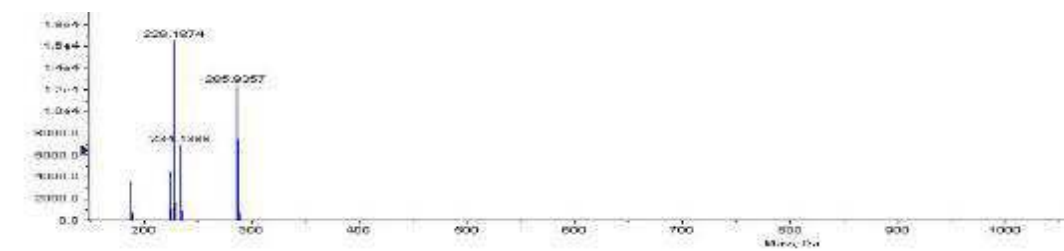
도면6



도면7



도면8



도면9

