

최 종
연구보고서

감귤썩음병 유발 푸른곰팡이에 대한 천연물유래
무독성 친환경 방제제의 개발

Development of Natural antifungal agent
against Fruit disease from *penicillium spp.*

연구기관 제 넨 셀

농림자료실



0012818

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “감귤썩음병 유발 푸른곰팡이에 대한 천연물유래 무독성 친환경 방제제의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 5 월 25 일

주관연구기관명 : 제 넨 셀

총괄연구책임자 : 최 한

연 구 원 : 강 세 찬

연 구 원 : 고 현 자

연 구 원 : 구 현 정

협동연구기관명 : 한국 원자력연구소

협동연구책임자 : 김 인 규

협동연구기관명 : 성균관대 약학대학

협동연구책임자 : 지 옥 표

요 약 문

I. 제 목

감귤썩음병 유발 푸른곰팡이에 대한 천연물유래 무독성 친환경 방제제의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 감귤썩음병을 비롯한 과실썩음병 유발 푸른곰팡이 류 (*Penicillium* spp.)에 대한 천연물(대황; *Rheum coreanum*)유래 저독성 친환경 방제제의 개발에 있다.

감귤썩음병에 대한 푸른곰팡이병은 감귤 수확 후 유통 및 저장중에 가장 문제가 되어 수확된 감귤 중 약 10%이상이 부패되고 있으나, 감귤저장중의 방제에 대한 등록된 약제가 없어(농약공업협회, 2000) 수입이 제한되고 사용이 금지된 이마잘린을 사용하거나 타 곰팡이병 방제제로 이용되고 있는 합성방제제들의 혼용살포에 의존하고 있다. 따라서 감귤썩음병에 대한 방제농약의 개발이 절실한 실정이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 대황 유래 푸른곰팡이 방제제 또는 선도화합물 개발하여 대황으로부터 푸른곰팡이 억제 유효분획 획득, 성분 분리 및 동정 등의 과정을 통하여 물질확보에 대한 노력과 푸른곰팡이 억제 작용메카니즘 규명과정을 통해 특허등록 추진과 시생산 및 농약제제검토연구를 진행하여 허가 및 생산공정확립 과정을 통하여 상품화하고자 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

검색단계에서는 위의 수종의 균주를 사용하여 agar diffusion test법으로 100여 가지의 한약재 중 항균력이 우수한 12가지의 한약재를 선별하여 paper disk를 이용한

radial growth rate test 법으로 대황추출물이 다양한 균주에 대해 항균력이 가장 우수하였다.

대황추출물의 분획분리 실험을 통해 항곰팡이능을 나타내는 주요 유효성분일 것은 Anthraquinone 류 화합물로 판단되었으며 대황 특히 Anthraquinones인 Chrysophanic acid, Aloe-emodin, Emodin 성분을 유효 및 지표성분으로 선정하여 대황추출물을 표준화하고 규격관리를 하였다. 반면 total extract가 개별 유효성분의 동일량보다도 항곰팡이능이 우수하였으므로 Anthraquinone 성분뿐만이 아니라 기타 다른 함유성분이 복합적으로 항곰팡이능에 관여한다고 판단된다.

대황추출물의 표준화를 위하여 직선성, 정확성, 정밀성을 검증한 타성분과 간섭되지 않는 조건의 HPLC 분석조건을 설정하였다. 또한 원물에 대한 표준화를 위하여 총 6종의 국내외 대황을 구입하여 농도에 따라 radial growth rate test를 실시한 결과 이중 중국의 사천성 지역에서 생산되는 *Rheum palmatum* 종인 가장 항곰팡이능이 우수하여 이를 사용하여 공정단계가 용이한 표준공정법을 확립하고 표준추출물인 GNC011을 얻었다. 총 10회의 공정을 반복하여 평균수율 14.5%의 결과를 얻었다. 이는 저렴한 대황원물과 높은 추출수율로 인해 향후 천연물농약으로의 개발가능성이 높다고 사료된다.

GNC011은 radial growth rate test 법으로 농도별로 항곰팡이능을 시험해보았을 때 1mg/mL 이상의 농도에서는 *penicillium* spp. 균사생장을 현저하게 억제하여 1m/mL의 농도가 과실저장병 방제제로서의 최적농도로 판단된다.

GNC011의 농도에 따른 실험 및 포자농도에 따른 실험을 각각 실시하여 결과를 광학현미경을 관찰하였을 때 Fig. 28에서의 곰팡이류의 life cycle에서 spore, sporangium, germ tube, spawn 등의 전반적인 형성을 억제하여 항곰팡이능을 가짐을 알 수 있었다.

감귤표면에 GNC011을 적용농도인 1mg/mL로 도말하여 준 후 곰팡이 배양편을 심어 배양한 결과 비교군에 비하여 곰팡이 생장억제효과가 탁월하였다. Field test 실시결과에서도 화학농약인 iminoctadine triacetate(베푸란)와 벤레이트와 거의 동일한 방제력을 보여 감귤을 비롯한 *penicillium* spp에 의해 야기되는 과실저장병에 대한 방제제로 개발될 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

대황은 과량을 섭취할 경우 사하작용을 일으키게 되고, 소량 복용 시에는 지사작

용을 일으키는 등 양면적 효능을 비롯하여 전통적으로 약제로 사용되어 왔다. 이미 안정성은 확보되었으나 본 연구에서 실시한 독성시험의 결과로도 어독성시험에서 LD50 수치가 333ppm(1 week)로 매우 안전한 것으로 판단되며 Rats를 이용한 급성 독성시험에서도 LD₅₀값은 50mg/kg을 훨씬 상회하여 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 경구투여 급성독성시험에서 안전한 물질인 것으로 판단된다.

본연구의 결과로 GNC011은 독성이 없고 안전한 친환경 과실저장병 방제제로 개발될 가능성이 매우 높으며 향후 Field test에서 과실에 도말이 잘 되지 않는 문제점을 해결하기 위한 제제, 제형연구와 품질관리를 위하여 다양한 지표 및 유효성분에 대한 후속연구가 필요하다고 사료된다.

SUMMARY

Rheum palmatum, medicinal rhubarb is a large, leafy perennial with hollow stalk that may reach ten feet in height. The root/rhizome is the part used medicinally; it is thick and branching, with a brown exterior and a yellow interior. It is native to china and Tibet and is cultivated in Europe, India and Pakistan. The rhizomes contain powerful anthraquinones that act as stimulant laxatives and tannins that acts as astringents.

In this studies, 102 ethanol extracts of natural herbal plant were screened for antimicrobial activity against several bacteria; *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. From investigation of the inhibition zone diameter of microbial growth by paper disk diffusion test for antibacterial activity and radial growth rate test for antifungal activity, the most significant antimicrobial activity against bacterial species was observed from the extract of *Rheum* spp.

Anthraquinones are proved major constituent of *Rheum* spp. for antifungal effect by subfractionation and separation test. Chrysophanic acid, Aloe-emodin, Emodin were rheum specific anthraquinones. Rhubarb extract are standardized as it. HPLC analysis method for anthraquinones is determined. 6 samples from *Rheum* spp. were tested. *Rheum palmatum* is shown most effective antifungal effects. GNC011, standardized Rhubarb extract is developed by standard extraction process with *Rheum*

palmatum. It contains 2.1% of anthraquinones (Chrysophanic acid, Emodin, Aleo-emodin) and the recovery rate is 14.5% by repeated ten process.

When GNC011 is investigated by radial growth rate test, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract against the microorganisms was determined. GNC011 showed strong antimicrobial effects against *penicillium* spp. The MIC on *penicillium* spp was 0.1mg/mL and applied concentration was 1mg/mL.

Antifungal effect of GNC011 is not inhibition single mechanism but shown complex inhibition pattern of spore, sporangium, germ tube, spawn generation in life cycle.

GNC011 was markedly effective to control the postharvest decay by spray at 7 days prior to harvest. When the fruits were sprayed at 7 days prior to harvest and subsequently store for 2 months, the percentage of diseased fruit by *penicillium* spp. was 3.5% in GNC011 at 1mg/mL and 2.6% in iminoctadine triacetate at 0.2mg/mL respectively. On the other hand, the percentage of diseased fruits was relatively high, 47.4% in no-treated group(negative control) at time to 20 days passed..

In toxicity test, there were low toxicity in fish, the LD₅₀ value was 333ppm at 1 week later. There were no deaths at the high dose, 1,000mg/kg in rats. Mortality, organs size, morphological development and average body weight were unaffected in rats At the high dose.

In this studies, GNC011 was developed by nontoxic, safe antifungal agents against postharvest decay of fruits by *penicillium* spp.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	1
Section 1. Research Purpose	1
Section 2. Research Necessity	3
Section 3. Research Scope	7
Chapter 2. Research background and current status	8
Chapter 3. Results and Discussion	12
Section 1. Introduction of Research	12
Section 2. Method	23
Section 3. Results	39
Chapter 4. Achievement and Devotion	85
Section 1. Achievement of Purpose	85
Section 2. Devotion	88
Chapter 5. Application plans of research results	90
Chapter 6. Novel information collected	91
Chapter 7. References	93

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1 절	연구의 목적	1
1.	최종 연구 목표	1
2.	개발 배경	1
3.	개발대상제품 개요	2
4.	년차별 연구개발 내용 및 범위	3
제 2 절	연구개발의 필요성	5
1.	개발기술(제품)의 중요성	5
2.	천연 농약의 신규시장확대 가능성	6
제 3 절	연구개발의 추진체계	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황	8
제 1 절	천연물 농약 기술개발 동향	8
제 2 절	항곰팡이제 개발동향 및 전망	8
1.	기술개발 동향	8
2.	사용제품의 문제점	9
3.	연구개발 분야별 전망	10
제 3 절	시장동향	11
1.	주요국가의 농약시장 규모 및 전망	11
2.	국내외 경쟁(기술)회사 현황	11
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	12
제 1 절	연구개요	12
1.	대황 (<i>Rheum</i> spp.)	12
2.	대황의 약효성분 및 효능	16
3.	대황의 항균활성	19
4.	과실썩음병 방제 천연물 농약	20
제 2 절	연구 방법	23
1.	실험재료, 사용기기 및 사용균주	23

2. 실험 방법	25
제 3 절 결과	39
1. 항공팽이능 천연물농약 후보물질 선정	39
2. 대항 분획 항공팽이능 시험	40
3. 성분 분리 및 항공팽이능 시험에 의한 유효성분 확인	45
4. 표준분석법 개발	48
5. 표준추출공정 개발	50
6. 효능평가	58
7. 독성평가	72
8. 시제품생산	80
9. 제제 검토	83
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	85
제 1 절 연구개발목표의 달성도	85
1. 목표달성도	85
2. 연구개발 실적	86
제 2 절 관련분야 기여도	88
1. 기술적 측면	88
2. 경제적 측면	88
3. 사회적 측면	89
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	90
1. 사업화 계획	90
2. 결과물의 적용 확대	90
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	91
1. 과채류의 저장성 향상을 위한 기술개발	91
2. 딸기 저장병 방제 관련	91
제 7 장 참고문헌	93

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목적

1. 최종 연구 목표

감귤썩음병을 비롯한 과실저장병 유발 푸른곰팡이(*Penicillium* spp.)에 대한 천연물(대황; *Rheum coreanum*)유래 저독성 친환경 방제제의 개발

가. 대황 유래 푸른곰팡이 방제제 또는 선도화합물 개발

- 유기합성농약(개발성공률 1/200,000)에 비해 개발 성공률이 담보된 기술의 개발
- 인체 저독성, 환경 저잔류성 푸른곰팡이 생장억제제(예, 감귤썩음병 방제제)

나. 세부연구 목표

- 대황으로부터 푸른곰팡이 억제 유효분획 획득, 성분 분리 및 동정
- 푸른곰팡이 억제 작용메카니즘 규명 ⇒ 식물유래 항진균 항생제 연구에 활용
- 환경영향 기초 평가

2. 개발 배경

- 감귤의 수확 후 가장 문제가 되는 병으로서, 현재까지 마땅한 등록농약이 없어 방제에 어려움이 있으며, 특히 저장중에 심하게 발생되어 막대한 피해를 주고 있는 감귤부패병의 원인 미생물인 *Penicillium*군들을 방제하기 위한 방법으로 개발 시도
- 국내외에 유통 및 사용되고 있는 백여 종의 한약재로부터 병원미생물에 대한 억제력이 있는 12종의 한약재를 1차적으로 선별(계피, 솔잎, 독활 등)
- 이중 방제효과가 가장 우수한 대황(*Rheum coreanum*, 장군풀)을 대상으로 3종의 푸른곰팡이에 대한 균사 생장억제력을 확인

- 대항 활성분획물은 감귤썩음병의 원인균 뿐만아니라 버섯재배시의 잿빛 곰팡이 병을 포함한 타 곰팡이에도 효력이 있음을 확인
- 현재까지 등록된 농약이 없는 감귤썩음병 방제농약 뿐만 아니라, 과실류, 엽채류, 근채류 등 광범위한 범위의 농산물에 피해를 주고 있는 곰팡이 중, 특히 푸른곰팡이병 방제제 개발이 가능
- 천연식물(한약재)유래의 활성분획으로부터 분리/동정하여 농약을 개발하게 되므로 인체에 대한 안전성이 이미 확보

3. 개발대상제품 개요

대상제품	감귤썩음병 방제제, 과실저장병 방제제
용도	과실썩음병 유발하는 <i>P. digitatum</i> , <i>P..italicum</i> , <i>P..ulaience</i> 등의 푸른곰팡이 방제
기능	푸른곰팡이의 균사생장 억제 - 감귤수확 후 유통 및 저장중의 감귤부패병을 방제
특성	<ul style="list-style-type: none"> - 국내외 유통되고 있는 한약재에서 푸른곰팡이 억제 기능이 있는 한약재를 선별하였으므로 인체 안전성이 확보된 생물농약 - 인체 무독성 메카니즘에 의한 특정 식물병원균에 대한 방제 효과 - 천연 활성물질을 분리, 이용하므로 화학적 합성을 통한 스크리닝 및 합성비용의 원천적 절감 - 이미 푸른곰팡이 균사생장 억제에 대한 기능을 활성분획물을 통하여 확인하였으므로 성공가능성이 매우 높음
기대효과	<ul style="list-style-type: none"> - 등록된 농약이 없는 감귤썩음병 방제제 개발로 신규등록 - 오렌지 썩음방제제로 농약잔류성으로인해 수입 및 사용이 극히 제한적인 이마잘릴(Imazalil, 미국) 대체 - 기타 과실류 및 엽근채류에 대한 푸른곰팡이병 방제제 개발 기대

4. 년차별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위	연 구 개 발 결 과
1차 년도 (2004)	대항분획물의 세부분획 및 분리, 정제	<ul style="list-style-type: none"> - 대항추출물의 세부분획 실시 - 세부분획물의 항곰팡이력 측정 : 포자발아 억제력 - 세부분획물의 감귤썩음병 방제효과 검증 - 물질분리 : TLC, GC-MS를 이용한 물질 분리 및 정제 - 저장환경에서의 항곰팡이력 측정 : 감귤저장고 	<ul style="list-style-type: none"> - 푸른곰팡이 균사성장 억제 기능의 대항추출물 획득(기 완료) - 푸른곰팡이 억제력이 우수한 분획물의 획득 - 상기 분획물로부터 푸른곰팡이 억제력을 갖는 물질의 분리 및 정제 - 상기 물질의 항곰팡이력 측정 및 방제 효과 확인 - 1차년도 성과물의 특허출원 : 추출공정 및 조성물 특허
	대항추출물 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 대항추출물 분석법 개발연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 대항추출물 개발 - 표준물질선정으로 향후 품질관리를 위한 분석법 확립
	대항추출물 표준추출법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 대항분획물의 분석 - 대항추출물 표준추출공정 연구 : 공정단순화, 공정개선, 유효분획함유 	<ul style="list-style-type: none"> - 표준추출법 개발 완료 - 특허출원 : 대항추출물
	푸른곰팡이 특이적 항곰팡이력의 작용메카니즘 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 세부분획물의 항곰팡이력 측정 : 포자 발아억제력 - 세부분획물의 곰팡이 생장 억제 측정 - 세부분획물의 작용메카니즘 규명 : Target molecule의 분자생물학적 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - 대항추출물의 푸른곰팡이에 대한 억제 기능의 분자생물학적 규명 - 항균, 항생제 연구에 활용

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
2차 년도 (2005)	항곰팡이 효능 물질 분리 및 구조 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 대항추출물 단일성분 분리 동정 - 유효성분 구조분석 : IR, NMR 등 기기분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 유효성분의 구조획득 - 성분에 대한 물질특허 - 과제완료 후 합성 및 대량생산 계속연구
	분리물질의 동정 및 환경영향평가	<ul style="list-style-type: none"> - 토양반감기 측정 - 토양미생물에 대한 영향 평가 - 수질잔류량 평가 - 어독성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 환경에 대한 영향평가
	대항추출물의 농약제제 검토	<ul style="list-style-type: none"> - 과실등의 표면에 도달되기 용이한 제형 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 시판용 완제 농약개발
	대항추출물 허가	<ul style="list-style-type: none"> - 최종보고서 작성 및 학술지 발표 - 허가자료 작성 	<ul style="list-style-type: none"> - 생산허가 획득 - 최종보고서 작성
	대항추출물 시생산	<ul style="list-style-type: none"> - 추출공정 scale up - 공장 OEM 계약 	<ul style="list-style-type: none"> - 시생산
	1차년도에서 분리된 물질의 작용기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 분리물질의 작용메카니즘 규명 : Target molecule의 분자생물학적 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - 대항유래 푸른곰팡이 억제물질의 분자 생물학적 역할 규명 - 항균항생제 연구에 활용

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 개발기술(제품)의 중요성

가. 감귤썩음병 : 등록된 농약이 없으며, 방제농약 개발이 절대적으로 필요

감귤썩음병에 대한 푸른곰팡이병은 감귤 수확 후 유통 및 저장중에 가장 문제가 되어 수확된 감귤 중 약 10%이상이 부패되고 있으나, 감귤저장중의 방제에 대한 등록된 약제가 없어(농약공업협회, 2000) 수입이 제한되고 사용이 금지된 이마잘린을 사용하거나 타 곰팡이병 방제제로 이용되고 있는 합성방제제들의 혼용 살포에 의존하고 있다. 따라서 감귤썩음병에 대한 방제농약의 개발이 절실히 요구되는 실정이다.

나. 천연식물 유래 농약의 개발의 중요성

제충국의 꽃에 함유되어 있는 살충성분인 pyrethrin의 개발이래, rotenone제 및 nicotine제 등이 발견되어 왔으나, 전세계적으로는 현재 작물보호제로서는 725종이 농약으로 개발되고 있다. 그러나, 현재 천연물을 이용한 저독성, 친환경농약의 개발 및 필요성이 거의 무시되어 왔다. 천연물의 방대한 자원에 비해 천연물 유래의 농약개발은 매우 극소수이다. 현재, 국내 농가에서 이용되고 있는 농약은 98%가 유기합성농약으로 외국에서 개발되어 도입된 것으로 국내에서 개발된 농약이 없는 실정이다. 천연물 유래 농약은 저독성, 저약량, 저잔류성 등의 환경적 측면 뿐만 아니라 농약시장에서도 매우 큰 부가가치가 기대되는 분야이다. 따라서, 이미 활성분획물의 푸른곰팡이 억제능이 확인되었으므로 농약개발로서의 성공가능성이 매우 높으므로, 반드시 이를 활용한 농약개발이 필요하다. 특히 본 연구에서 개발하고자 하는 대황의 경우는 전통적으로 약재로 사용되어 왔으며 이에따른 인체에 대한 안정성이 확보된 상태이며 곰팡이에 특이적인 방제능을 가져 인체에 무해한 안전한 농약의 개발이 가능하다.

2. 천연 농약의 신규시장확대 가능성

1) 푸른곰팡이 등의 곰팡이류는 자체에서 분비하는 항생물질로 인하여 미생물에 저항성을 갖고 있으므로 미생물등을 이용한 생물농약의 개발 및 이용이 매우 어려운 분야임

2) 화학적 합성농약이 Rio협약 등에 의하여 감소추세이나, 이에 대한 대체농약이 없는 분야이므로 천연물 유래의 저독성 농약의 개발이 필수적임

⇒ 따라서, 천연식물 유래의 저독성 농약의 시장 전망이 매우 크다

3) 천연 농약의 신규시장확대 가능성

- 친환경 농업 필요성 대두

- 화학농약에 비해 생물농약의 개발비 저렴

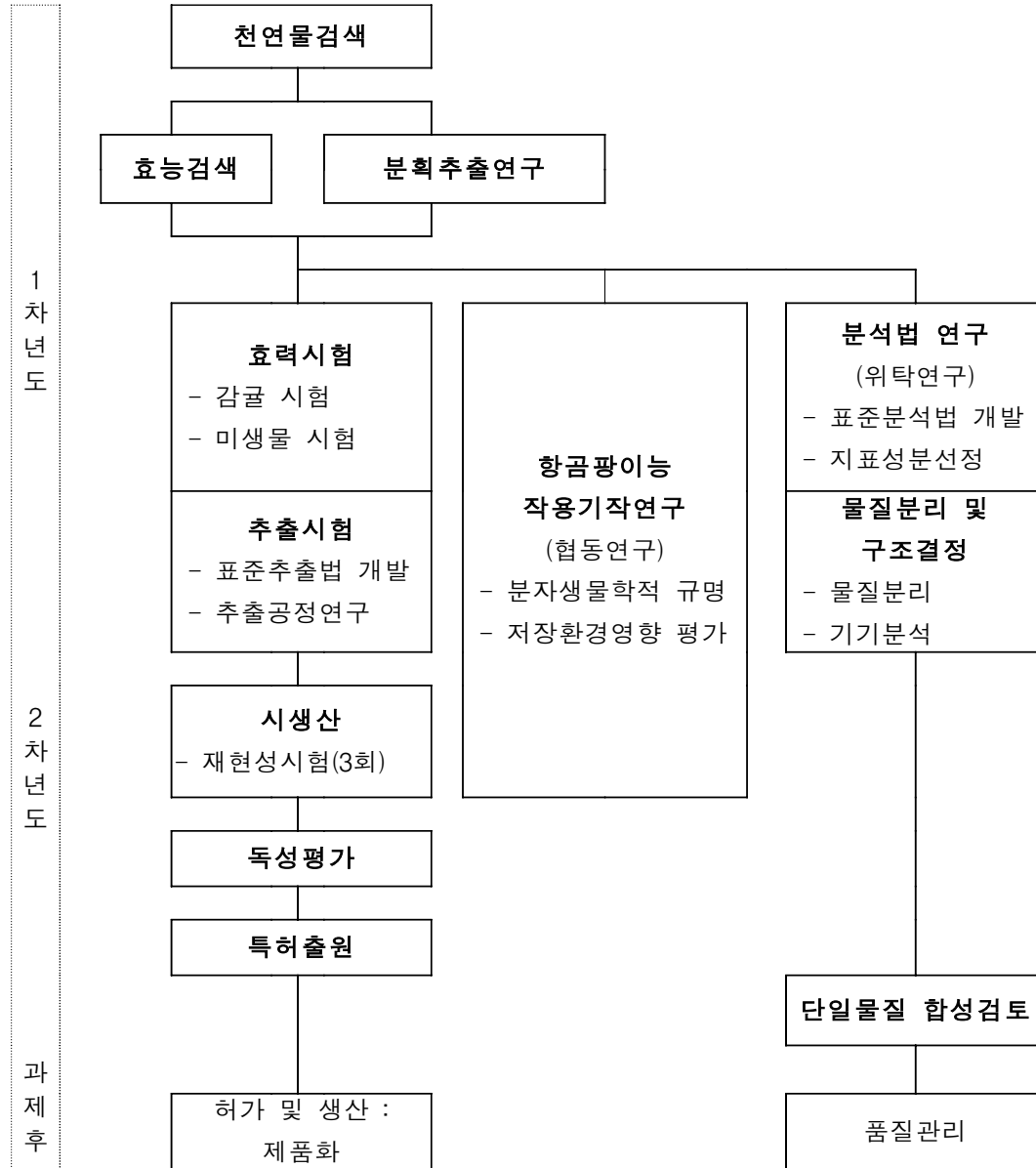
- 미래의 방제전략은 병해충 종합관리(IPM)방식이 필수적이며, 생물적 방제법과 함께 이용되어야 함

⇒ 따라서 저독성, 친환경 천연물 유래 농약의 개발이 필수적

4) 본 개발기술의 전망

푸른곰팡이병 억제관련 문제점	향후 전망
<ul style="list-style-type: none"> · 생물농약 뿐만아니라 합성농약까지 현재 등록된 농약없음 · 미생물제제가 일부 이용되고 있으나 현장살포시 활성저하 문제 · 대체 합성농약의 잔류/독성문제 	<ul style="list-style-type: none"> · 환경친화적 생물농약 이용증대 · 신규 감귤썩음병 억제제 개발 · 인체 저독성 메카니즘에 의한 생물농약, 생화학적 농약, 농약 선도물질 개발

제 3 절 연구개발의 추진체계



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 천연물 농약 기술개발 동향

제충국의 꽃에 함유되어 있는 살충성분인 pyrethrin의 개발이래, rotenone제 및 nicotine제 등이 발견되어 왔으나, 전세계적으로는 현재 작물보호제로서는 725종이 농약으로 개발되고 있다. 유기인계나 carbamate계 등의 유기합성농약에 비해 저독성 및 범용성 근연화합물 농약으로써 개발되었고 그 외의 천연식물에서도 많은 병해 방제 물질을 탐색하고 있으며 평균성분도 확인되었다. 그러나, 현재 천연물을 이용한 저독성, 친환경농약의 개발 및 필요성이 거의 무시되어 왔다. 천연물의 방대한 자원에 비해 천연물 유래의 농약개발은 매우 극소수이다. 현재, **국내 농가에서 이용되고 있는 농약은 98%가 유기합성농약으로 외국에서 개발되어 도입된 것으로** 국내에서 개발된 농약이 없는 실정이다. 천연물 유래 농약은 저독성, 저약량, 저잔류성 등의 환경적 측면 뿐만 아니라 농약시장에서도 매우 큰 부가가치가 기대되는 분야이다.

제 2 절 향곰팡이제 개발동향 및 전망

1. 기술개발 동향

Penicillium spp. 들에 의한 감귤썩음병은 감귤 수확 후 유통 및 저장 중에 가장 문제가 되는 병으로서 특히 저장 중에 심하게 발생되어 막대한 피해를 주고 있다. 감귤을 부패시키는 *Penicillium* 균들에는 감귤에 녹색곰팡이병을 일으키는 *Penicillium digitatum*, 청색곰팡이병을 일으키는 *Penicillium italicum*, 그리고 Whisker mold를 일으키는 *Penicillium ulaiense* 등이 보고되어 있다. 이들의 방제는 여러 기지가 개발되고 있고 미국의 경우 Imazalil를 이용한 약제방제가 보편화 되어 있고, 여러 가지 무기성분들을 이용한 방제도 시도되고 있다. 또한 효모 *Candida*

*oleophila*와 세균 *Pseudomonas syringae*를 이용한 미생물농약이 이미 상품화되어 시판되고 있으며 이외에 여러 미생물을 이용한 방제가 시도 되고 있다.

국내의 경우 감귤저장병 방제를 위한 약제가 활성화 되지 않고 있으며 남 등은 수확 10일전에 thiophanate-methyl 1,000배액을 수상 살포하면 방제에 효과가 있다고 보고하였고 농가에서도 thiophanate-methyl을 비공식적으로 사용하여 왔다. 그러나 이 물질은 저항성 균이 생겨 그 효과가 많이 떨어져 있는 실정이다.

2. 사용제품의 문제점

현 황	내 용	문 제 점
타 방제제 혼용살포	<ul style="list-style-type: none"> · 등록 농약없음 · 버섯 및 기타 과실류의 방제제 혼용살포 · 일본등록 농약의 시험살포 	<ul style="list-style-type: none"> · 사용지침 없음
이마잘릴 살포	<ul style="list-style-type: none"> · 왁스이용 방제방법 개선 · 미국에서 등록 · 잔류량 : 7.9μg/g 	<ul style="list-style-type: none"> · 미국잔류허용치와 타국가 허용치가 상이하여 미국에서만 사용(미국:10μg/g, 타국가:5μg/g) · 열수처리로 신선도 떨어짐
미생물 제제	<ul style="list-style-type: none"> · 생균제 이용 · 미생물을 이용한 스크리닝은 푸른곰팡이 자체가 분비하는 페니실린에 의하여 사멸 하므로 스크리닝 불가, 개발의 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> · 실제포장시 미생물 활성화도 떨어짐(방제효과 불확실)

3. 연구개발 분야별 전망

구 분	푸른곰팡이병 억제관련 문제점	향후 전망
미생물 농약	<ul style="list-style-type: none"> · 포장시 비활성 문제 · 현장사용시 애로 : 미생물 제제 이용시 농민인식 및 활용교육문제 · 사용후 저장의 어려움 · 미생물 배양시설의 농가보급문제 	<ul style="list-style-type: none"> · 미생물 제제의 배지조성기술 발달 : 현장활용의 용이성 및 미생물 활성증대
생물농 약	<ul style="list-style-type: none"> · 현재까지 개발 기술없음 : 미생물 제제외의 생물농약 등록기준이 없음 	<ul style="list-style-type: none"> · 물질특허 허용에 따른 기술개발 증대 예상 · 천연식물을 이용한 생물농약개발의 증대에 따른 등록기준 마련
천연물 유래 저독성 농약	<ul style="list-style-type: none"> · 천연물 스크리닝을 통한 개발노력이 있으나, 푸른곰팡이병 관련 개발 농약 및 선도물질 없음 	<ul style="list-style-type: none"> · 이미 유효성분 분획물을 통하여 활성이 확인되므로, 개발 성공가능성이 매우 높다 · 다양한 천연자원을 이용한 농약 및 선도물질 개발의 중요성이 크게 증가 되고 있음 (환경문제, 인체독성문제, 개발시 경제적 비용절감 문제)

제 3 절 시장동향

1. 주요국가의 농약시장 규모 및 전망

(단위 : 백만달러)

국가	매출액(1995)	매출액(1996)	성장률	2001년	예상성장률
미국	8110	8681	7.0	10000	3
일본	4452	3880	-12.8	3600	-1.5
프랑스	2689	2705	0.5	2990	2.0
독일	1256	1244	-1.0	1275	0.5
한국	825	790	-4.2	790	0

전체 화학적 합성농약의 감소추세로 농약시장의 성장률 둔화, 그러나 미국의 경우 생물농약 등 저독성 신규농약의 지속개발로 매출 1위 및 성장률 1위. 따라서, 국내 시장활성화의 방법은 천연물 유래의 저독성 농약개발, 생물농약 개발 등이 실현되어야 함.

2. 국내외 경쟁(기술)회사 현황

업체(기관) /국가	제품/기술	구분	장점	단점
미국	Imazalil	합성농약	· 미국 애리조나, 캘리포니아에서 널리 이용	· 미국을 제외한 기타 국가의 잔류허용치를 초과
일본	albesilate	합성농약	· 푸른곰팡이 뿐만 아니라 잿빛곰팡이에도 효능	· 인체독성 문제
제주감귤 시험장	혼용살포	합성농약	· 기술개발없이 기존 농약이용	· 사용하지침 없음 · 인체독성 문제
그린바이오텍	그린올P	<i>Bacillus</i> sp. 미생물제제	· 잔류농약없음	· 왁스처리병행 · 자연환경에서 활성저하 · 환경영향평가 문제

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개요

1. 대황 (*Rheum* spp.)

대황은 수천 년동안 사용되어 왔으며 대황 근경은 강한 anthraquinones를 포함하고 있어 하제로 사용되며 tannin은 수렴제(astringents)로 사용된다(1). 또한 위궤양, 만성신부전, 분만촉진제 등으로도 사용된다. 최근에는 항암보조제로도 사용되고 있다(2). 그러나 대황은 다소 설사와 복통을 일으킬 수 있고 하제로 사용할 시 8~10일을 넘지 말아야 한다.

대황은 2천년동안 중국과 티베트에서 전통적으로 약용작물로 사용하여 왔으며 점차적으로 인도, 러시아, 유럽과 북미까지 확산되어 널리 사용된다. 유럽의 생약학자들은 대황을 하제, 이뇨제, 신장결석, 통풍, 황달로 야기되는 췌장질환, 피부질환에도 효능을 밝혔으며 모순되게도 고농도 처방은 하제(laxative)로 사용되며 저 농도 투여는 지사제(dysenteric diarrhea)로 사용되기도 한다(4). 중국인들은 대황을 궤양치료제로서 간, 위, 혈에서 해열을 시켜주는 쓰고 차고 마른 생약으로 사용했으며 기생충제거, 항암, 해열, 항궤양, 두통약으로도 사용했다(5,6). 또한 치통치료제로도 사용했다(7). 유럽에서는 강장제로 사용되었고 Swedish bitters(각 테일의 일종)에 넣기도 하였다(8).

약용 종으로는 *Rheum officinale* 또는 *Rheum palmatum* L.이 있고 다른 종으로는 *Rheum tanguticum* Maxim. ex. Balf., *R. emodi* 와 *R. webbianum*이 있고 *Rheum rhaponticum*은 garden rhubarb라고도 하며 약용보다는 식용으로 이용된다. 유효성분은 종에 따라 다양하다(9,10,11,12)(Table. 1.).

본 연구에서 사용되는 대황은 *Rheum palmatum*이며 금문대황 또는 장엽대황이라고 하며(Fig. 1.) 약용으로 사용할 때는 일반적으로 근경부를 사용한다.



(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 1. *Rhuem palmatum*. a)leaf, b)flower, c)d) root

Table 1. *Rhubarb* Species(continued on next page)

Botanical Name	Common name	Description
<i>Rheum acuminatum</i>	Ornamental Rhubarb	This plant likes to grow in or near water, in summer it has red seedpods. It is disease-free and hardy all across the country (Canada). Low mounds of heavily veined leaves, rich red petioles, and upright, branched and spidery stems or red flowers to 4 feet (1.25 m). Adaptive to full sun or partial shade in rather rich, humusy soil. Cut it hard back after flowering to rejuvenate foliage for the remaining season. Excellent autumn tones of red in full sun.
<i>Rheum alexandrae</i>	Ornamental Rhubarb	An ornamental rhubarb. Spikes of flowers rising to 3-4 feet (1-1.25 m) completely shielded by large, translucent white bracts, and in autumn, spectacular red autumn color.
<i>Rheum alpinum</i>	European Wild Rhubarb	Leaves used for wrapping cheeses, rhizomes used as pig food.
<i>Rheum altaicum</i>		
<i>Rheum australe</i>	Himalayan rhubarb	Seven foot (2 meter) long stems have yellow flowers in late spring-summer. Red stems with large greenish red, heart-shaped leaves.
<i>Rheum compactum</i>		Perennial, typical height 50 cm (19 in) Edible parts are the Leaf stems as a rhubarb substitute.
<i>Rheum coreanum</i>		Perennial, The root is laxative and is also considered good for digestion.
<i>Rheum emodi</i>		<i>Rheum officinale</i> and <i>Rheum Emodi</i> have to some extent been grown also as an ornamental plant, being also quite hardy and readily propagated.
<i>Rheum kialense</i>		A charming, diminutive species. Red-stained crinkled foliage to 15 inches (38 cm) and airy panicles of tiny greenish-red flowers. Stoloniferous (a stolon is a horizontal branch from the base of a plant that produces new plants from buds at its tip or nodes (like a strawberry does), also called a runner), it will form a dense groundcover over time.
<i>Rheum nobile</i>	Sikkim rhubarb	
<i>Rheum officinale</i>	Chinese rhubarb Indian rhubarb	Perennial, typical height 2 m (6.5 ft) E. Asia - Tibet. Hardy to USDA Zone 7. Leaf stem eaten cooked or raw, Rhizome considered medicinal.

Table 1. *Rhubarb* Species

Botanical Name	Common name	Description
<i>Rheum palmatum</i>	Turkey rhubarb Chinese rhubarb East Indian Rhubarb	Some sources say <i>Rheum palmatum</i> is a synonym for <i>Rheum rhaponticum</i> but this is not correct. The leaves of the Turkey Rhubarb are palmate and somewhat rough. The root is thick, of an oval shape, sending off long, tapering branches; externally it is brown, internally a deep yellow color. The stem is erect, round, hollow, jointed, branched towards the top, from 6 to 10 feet (2–3 m) high. This species is distinguished from our familiar garden Rhubarb by its much larger size, the shape of its leaves, with their oblong, sharpish segments, and the graceful looseness of its little panicles of greenish–white flowers. The first buds which appear in spring are yellow, not red. Perennial, typical height 2 m (6.5 ft), Leaf stem eaten raw or cooked. Superior in flavor to the common rhubarb and quite tender, has a long and proven history of herbal/medicinal usage Bold, dramatic dark purple foliage with 6 foot (2 m) long stems that bear rose–red pyramids of flowers in late spring. Several varieties of this are known: 'Atrosanguineum', 'Bowles Crimson', rubrum, tanguticum, and tanguticum 'red selection'.
<i>Rheum rhaponticum</i> <i>Rheum x hybridum</i> <i>Rheum rhabarbarum</i> <i>Rheum x cultorum</i>	Rhubarb Garden Rhubarb Bastard Rhubarb Sweet Round–leaved Dock English Rhubarb Wine Plant	Strong perennial, with thick clustered roots. Similar in medicinal action to Turkey Rhubarb or Chinese Rhubarb, though milder. It is derived from <i>Rheum palmatum</i> , and from <i>Rheum officinale</i> . It has blunt, smooth leaves; large, thick roots, running deep into the ground, reddish–brown outside and yellow within, and stems 2 to 3 feet high, jointed and purplish. The flowers are white.
<i>Rheum ribes</i>		Perennial, typical height 1.5 m. (4.9ft.) Leaf stem – cooked. Eaten raw by the people of Turkey and Iraq.
<i>Rheum spiciforme</i>		Perennial, typical height 30 cm. (11 in.) E. Asia – Himalayas. Leaf stem – raw or cooked. The root is used as a purgative.
<i>Rheum tataricum</i>	Tartarian rhubarb	
<i>Rheum tibeticum</i>		
<i>Rheum undulatum</i>		4–5 feet (1.25–1.5 m) tall, Earlier and smaller than <i>R. rhaponticum</i>

약용대황(*Rheum palmatum* of *R officinale*)은 높이가 3미터정도에 이르는 속이 빈 가지에 크고 잎이 무성한 다년생 식물로 뿌리와 근경을 약용으로 사용한다. 이는 굵고 가지 쳐 있으며 겉은 갈색에 속은 황색을 띤다. Garden 종은 약용과 구분되며 1미터 정도 자라고 적자색의 줄기를 가진다. 유효성분은 유사하나 약용으로는 부족하다. 뿌리는 심은지 4년이 지난후 봄에 수확한다(13).

2. 대황의 약효성분 및 효능

대황에는 Anthraquinones, stilbenes, tannin 등을 비롯한 다양한 효능의 다양한 성분이 존재한다(table. 2, Fig. 2). 대황에서 발견되는 Anthraquinones는 다른 천연 하제로 사용되는 식물체에서도 발견되는데 senna, buckthorn, cascara sagrada와 aloe 등이 있다(14). 이러한 유효성분은 생장에 따라 계절에 따라 추출과정에 따라 매우 다양하게 나타나는데(15,16) 약재로 판매되는 대황에서 유효성분인 Sennoside를 분석해 보면 매우 다양하게 검출되며 물질을 포함하지 않은 경우도 있다(17). 또 다른 Anthraquinone류인 Emodin, Aloe-emodin은 항암과 관련되어 tumor invasion(18)와 Apoptosis(19)의 관하여 항암기작을 가지고 있으며 Anthraquinones 성분의 항돌연변이, 항산화 효능에 대한 연구가 진해되고 있으며(20,21) 일부 연구에서는 Emodin 성분의 미생물에 대한 mutagenic effect를 나타낸다고 했으나 사람에게 대해서는 돌연변이를 유발하지 않음을 확인하였고(22) 임상시험을 통하여 위암발병을 일으키지 않음도 확인하였다(23).

Table 2. Constituents of *Rheum palmatum*.

3,5,4'-Trihydroxystilbene-4'-o-beta-d-glucopyranoside
4-(p-Hydroxyphenyl)-2-butanone-beta-d-glucoside
Aloe-emodin antiherpetic, antileukemic, antiseptic, antitubercular, antitumor, antiviral, bactericide, cathartic, cytotoxic, genotoxic, pesticide, purgative, termitifuge, and viricide
Chrysophanol 690-3,190, antiseptic, bactericide, candidicide, cathartic, hemostat, pesticide, and purgative
Cinnamic acid anesthetic, antiinflammatory, bactericide, cancer-preventive, choleric, fungicide, herbicide, laxative, pesticide, and vermifuge
d-Catechol
Emodin antiaggregant, antifeedant, antiinflammatory, antimutagenic, antiseptic, antitumor (breast), antiulcer, antiviral, cathartic, cytotoxic, gonadotropic, immunosuppressive, pesticide, purgative, spasmolytic, styptic, vasoelaxant, viricide
Gallic acid anticarcinomic, antifibrinolytic, antioxidant, antiseptic, antiviral, astringent, bacteristatic, cancer-preventive, carcinogenic, hemostat, nephrotoxic, pesticide, styptic, and xanthine-oxidase-inhibitor
Hyperin antiinflammatory, antioxidant, antitussive, antiviral, capillarifortificant, capillarigenic, diuretic, hepatoprotective, hypotensive, pesticide, and viricide
Physcion antiseptic, cathartic, pesticide, and purgative
Physcion-8-o-beta-d-gentiobioside
Physcion-diglucoside
Quercitrin aldose-reductase-inhibitor, antiarrhythmic, anticataract, antifeedant, antifu, antihemorrhagic, antiinflammatory, antiviral, CNS depressant, cancer preventive, cardiogenic, choleric, detoxicant, diuretic, dye, hepatogenic, hypotensive, paralytic, pesticide, spasmolytic, vasopressor, and viricide
Rhein anticarcinomic, antiseptic, antitumor, antiviral, bactericide, candidicide, cathartic, cytotoxic, pesticide, proteinase-inhibitor, purgative, and viricide
Rheinoides 12,900
Rheosmin
Sennoside-a 2,000-8,740, purgative
Sennoside-b purgative
Tannins 50,000-100,000, antiarrhythmic, antidysenteric, antimutagenic, antinephritic, antioxidant, antiradical, antiviral, bactericide, cancer-preventive, hepatoprotective, pesticide, psychotropic, and viricide
Tetralin

(ref. 24, 25, 26, 27, 28, 29)

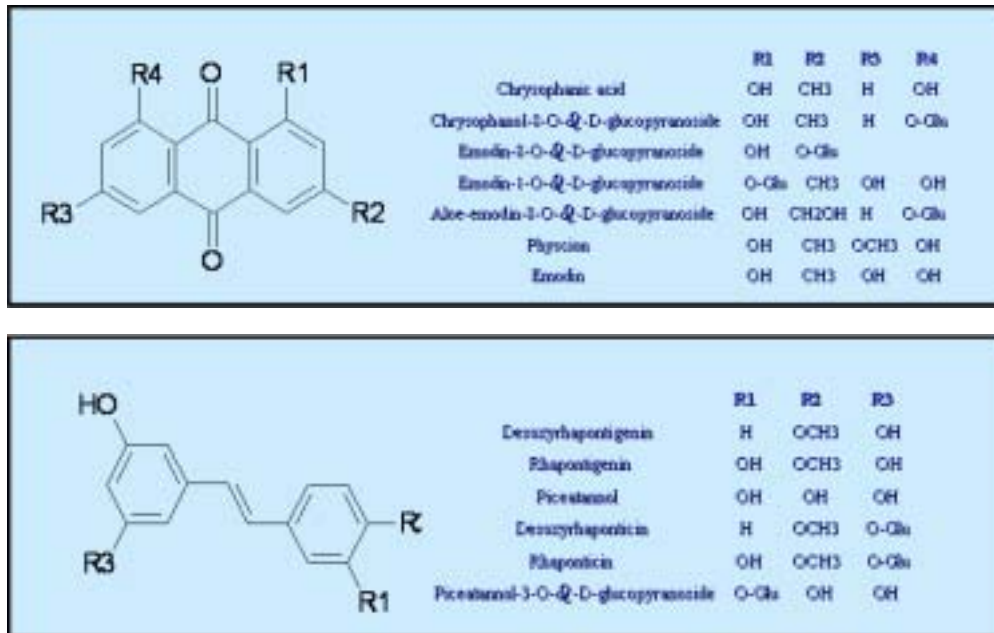


Fig. 2. Structure of anthraquinone and stilbene derivatives from *Rheum* spp.

Oxalic acid는 혈액내의 calcium과 결합하여 불용성 calcium oxalate crystals를 형성하고 이는 신장에 축적되어 신장결석이 된다. 신장결석의 병력이 있던 사람은 oxalate를 함유하고 있는 모든 생약의 복용에 주의해야 한다(30).

대황은 5~10% 정도의 tannins을 함유하고 있다. tannins은 많은 식물체와 일반 식품에서 발견되는 phenolic compounds로 팥이밥류나 녹차등에 존재하며 10%이상 함유하는 식물체는 위장장애, 신장장애를 일으킬 수 있다. 반면 치료효과로는 설사 및 점막염증에 효과가 있고 낮은 dosage에서 anthraquinone의 활성을 저해시켜 변비를 유발한다. 고농도에서는 anthraquinone 활성이 지배적으로 작용하여 고수분의 대변과 배변을 촉진한다(22). 대황에 다량 함유하고 있는 stilbene 유도체 들은 항알러지 효능을 가지고 있다(31).

3. 대황의 항균활성

본 연구와 관련하여 대황의 유효성분 중에는 항균성을 가지는 성분이 존재한다. 대황추출물은 세포배양연구에서 항바이러스제로서 복합적인 결과를 보였는데 anthraquinone 추출물은 HSV1, measles, polio and influenza virus에 항바이러스능을 보이며(32,33,34,35), 반면 HIV1, vacinia viruses에는 효능이 없다(36,32).

Rhein 성분은 *Bacteroid fragalis*에 대해 항균능이 있으며(37) 또 다른 결과는 그람양성균과 acid fast bacteria에 활성이 있다는 결과가 있었다(38). 대황의 항균능은 mitochondria의 전자전달계에 작용하는 enzyme을 방해하는 것으로 예측된다(39). 중국에서 157명의 성인 임질환자를 대상으로 대황을 투여한결과 66% 치료율이 보고되기도 하였다(40).

Babu 등은 *Rheum emodi*에서 항균력을 가지는 새로운 oxanthrone ester 두물질을 분리했으며(41)으며 위의 여러 연구결과로 대황의 항균 및 항곰팡이능은 우수할 것이라 예상되었다. 또한 대황은 5~10%의 Stilbene 유도체를 가지고 있으며 이 물질은 Jayasinghe 등에 의해 항곰팡이능이 있음이 입증되었으며(42) Singh 등은 대황의 유효성분인 Emodin을 17종의 곰팡이에 처리한 결과 포자발아를 억제시킨다고 보고하였다(43, 44). 이외에도 Anthraquinones 및 Napthoquinones의 항균 및 항곰팡이능에 대해서는 많은 보고가 되어있다(45, 46, 47, 48, 49).

4. 과실썩음병 방제 천연물 농약

Penicillium spp. 들에 의한 감귤썩음병은 감귤 수확 후 유통 및 저장 중에 가장 문제가 되는 병으로서 특히 저장 중에 심하게 발생되어 막대한 피해를 주고 있다. 감귤을 부패시키는 *Penicillium* 균들에는 감귤에 녹색곰팡이병을 일으키는 *Penicillium digitatum*, 청색곰팡이병을 일으키는 *Penicillium italicum*, 그리고 Whisker mold를 일으키는 *Penicillium ulaiense* 등이 보고되어 있다(50). 이들의 방제는 여러 기지가 개발되고 있고 미국의 경우 Imazalil를 이용한 약제방제가 보편화 되어 있고(51, 52, 53), 여러 가지 무기성분들을 이용한 방제도 시도되고 있다(54, 55, 56). 또한 효모 *Candida oleophila*와 세균 *Pseudomonas syringae*를 이용한 미생물농약이 이미 상품화되어 시판되고 있으며 이외에 여러 미생물을 이용한 방제가 시도 되고 있다(57, 58, 59, 60, 61).

국내의 경우 감귤저장병 방제를 위한 약제가 활성화 되지 않고 있으며 남 등(62)은 수확 10일전에 thiophanate-methyl 1,000배액을 수상 살포하면 방제에 효과가 있다고 보고하였고 농가에서도 thiophanate-methyl을 비공식적으로 사용하여 왔다. 그러나 이 물질은 저항성 균이 생겨 그 효과가 많이 떨어져 있는 실정이다(63).

Table. 3. Postharvest disease and symptoms of mandarin orange by *penicillium* spp.

병명	병원균	특 징
푸른 곰팡이 병	 <p><i>Penicillium italicum</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - 전염 : 병원균은 감귤원 토양에서 포자를 만들고 여름을 지나 가을에 포자가 바람과 함께 날아다녀 과실에 붙고 저장고에 들여놓으면 발병 - 푸른 곰팡이병 초기병증은 초록곰팡이병과 비슷한데 병 무늬는 차차 확대되어 원형으로 된다. 포자 층은 청색분상으로 주위의 균사대가 좁다. - 푸른곰팡이 병은 저장 후기에 많이 발생
초록 곰팡이 병	 <p><i>Penicillium digitatum</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - 전염경로는 푸른곰팡이와 동일 - 초록곰팡이병은 조생온주밀감 껍질의 상처 난 곳에 나무 위에서 발병한다. 병 무늬는 처음에 담갈색수침 상에서 연화하여 이것이 부정형으로 확대되고 흰색의 균사를 만든다. 계속하여 암녹색의 포자 층을 형성하는데 백색의 균사대가 넓은 폭으로 남는다. - 초록곰팡이병은 저장 초기에 많이 발생
흰빛 썩음 병	 <p><i>geotrichum candidum var. citri-aurantii</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - 전염 : 수확 전 나무에 있는 과실이나 저장, 수송 중인 과실에 발생. - 접촉전염이기 때문에 썩은 것이 점차 확대 - 증상은 수침 상으로 연화하여 물러지면서 즙액이 나온다. 따라서 중심부부터 흰색의 얇은 균사가 병무늬를 덮는다. 특이한 냄새가 있다

이렇듯 공기 전염을 하는 대부분의 병은 농약에 의한 방제가 주로 이루어지고 있으나 농약에 대한 안전성을 고려하여 수확 시까지의 사용 시기, 회수 등을 지켜야 하는 여러 번거로움이 있으며 현재 가장 많이 사용되는 유기합성농약에 의한 화학적 방제법은 지속적인 사용과 남용으로 인해 환경오염 및 인축독성으로 인해 사회적으로 심각한 문제점으로 대두되고 있다. 이러한 사회적 배경에 합성 농약을 극소화하고 인축에 안전하며 병해에 대한 활성이 높은 우수한 천연농약을 개발하고자 하였으며 지금까지의 천연물 농약의 성과로는 제충국, 담배 및 데리스의 주성분인 pyrethrin, nicotine 및 rotenone이 살충제로 개발되었고 유기인계나 carbamate계 등의 유기합성농약에 비해 저독성 및 범용성 근연화합물 농약으로써 개발되었고(64,65,66,67,68) 현재 천연식물에 의한 많은 병해 방제 물질을 탐색하고 있으며(69,70,71,72,73,74,75,76,77) 항균성분도 확인되었다(78).

본 연구에서는 여러 천연물의 검색 중에 대황추출물의 *Penicillium* spp.에 대한 항균력을 확인하고 *Penicillium* spp.에 의하여 발병되는 과실저장병에 적용가능한지를 Field test를 통해 확인하고 환경 및 인축에 대한 영향을 알아보기 위하여 독성시험을 실시하여 과실저장병 특히 감귤저장 썩음병에 유효한 천연농약을 얻고자 하였다.

제 2 절 연구 방법

1. 실험재료, 사용기기 및 사용균주

가. 실험재료

본 연구에 사용한 주 시료인 대황(*Rheum palamtum L.*)은 경동시장 등에서 유통되는 시료이며 동명당에서 구입하여 정확한 감정 후 실험에 사용하였다.

추출 및 분획용 용매는 EP급 용매를 재증류하여 사용하였고, 그 외 시약들은 특급시약을 사용하였다. HPLC 등 분석에 사용되는 용매는 HPLC grade 용매와 3차증류수를 사용하였다. 비교실험 및 분석에 사용되는 표준물질은 Sigma-aldrich에서 구입하여 사용하였다. 각 시료는 Crysophanic acid(98% CAS 481-74-3, Aldrich 229075-50MG), Emodin(>90%, CAS 518-82-1, Aldrich E7881-50MG), Aleo-emodin (95+%, CAS 481-72-1, Sigma A7687-100MG), Gallic acid(CAS 149-91-7, Sigma G7384-100G), trans-Cinnamic acid(99+%, CAS 140-10-3, Aldrich C80857-5G), Oxalic acid(99+%, CAS 144-62-7, Aldrich 241472-50G), piceatanol(Sigma P-0453)를 사용했으며 HPLC 분석에는 Gemini 5u C18(phenomenex, 150x4.6mm)을 사용하였다.

나. 사용기기

실험에 사용한 기기는 다음과 같다.

MP : Gallenmkamp melting point apparatus(uncorrected)

IR : Victor22 (Bruker)

Shaking Incubator : jeitech

Inncubator : Cheil science

Constant Temp. & Humidity Chamber : Cheil science

Vaccum Evaporator : Eyela

HPLC : Knauer
Anaerobic Jar : Difco
Autoclave : Vision Scientific
UV spectrophotometer : Opron 3000
Deep Freezer : Thermo Forma
pH meter : Corning
Electrical Balance : Mettler, Sartorius

다. 사용균주와 배지

제주도 일원에 걸쳐 노지 및 저장고에서 *Penicillium* spp.에 의해 부패된 감귤로부터 접종침을 사용하여 0.05% Triton X-100이 첨가된 멸균수에 포자를 현탁하여 1/2 감자한천배지(PDA, Potato dextrose agar)상에서 평판희석법으로 단포자를 분리하여 사용하였다. 분리된 병원균 들은 PDA배지 에 접종하여 증폭시킨 후 4℃ 또는 -20℃에 보관하였다. 분리된 균주들은 병원성 검정에 의해 나타난 병징에 따라 녹색곰팡이병을 일으키는 *Penicillium digitatum*, 청색곰팡이병을 일으키는 *Penicillium italicum* 이외 새로운 특징의 병징을 유발시키는 *Penicillium* sp. 로 분류하여 본 연구에 사용하였다.

Penicillium spp의 배양을 위한 배지는 감자한천배지(PDA, Potato dextrose agar, Difco 213400)를 사용하였다.

2. 실험 방법

가. 항곰팡이능 천연물 탐색

1) Agar diffusion test(79) : Paper disk diffusion.

일정농도의 각 시료들을 serial concentration으로 Acetone에 희석하여 9 mm 직경의 paper disks (no. 2668/2; Schleicher and Schuell, Dassel, Germany)에 시료를 적신다. acetone이 모두 증발된 후 균이 접종된 agar plates의 중앙에 놓은 후 3일정도 배양시키면서 균사체의 크기를 자로 측정한다.

2) Radial growth rate test(79)

시료의 일정농도를 한천배지에 섞어서 고형배지를 만든다. 균주를 시험농도로 한천배지에 접종하여 수일동안 배양시키면서 균종의 크기를 관찰하고 자로 측정한다. 각 농도별로 3개씩 중복 실험한다.

나. 추출 및 분리 정제

1) 분리 및 성분 효능시험

건조된 대황근경 2.4kg을 Methanol/H₂O(1:1) 냉침으로 3회 추출하여 건조 후 800mL DW로 suspension 시키고 이것을 다시 Hexane 800mL로 3회 반복하여 추출하여 Hexane 추출물 13.51g을 얻었다(F-RE01). 다시 수층을 Methylene Chloride 800mL로 3회 반복 추출하여 MC 추출물 7.45g을 얻었다(F-RE02). 다시 수층을 Ethyl acetate 800mL로 3회 반복 추출하여 Ethyl acetate 추출물 167.56g을 얻었다(F-RE03). 다시 n-Butanol 800mL로 3회 반복 추출하여 Butanol 추출물 46.05g을 얻었다(F-RE04). 나머지 수층을 건조하여 66.05g을 얻었다(F-RE05).(Fig. 3.)

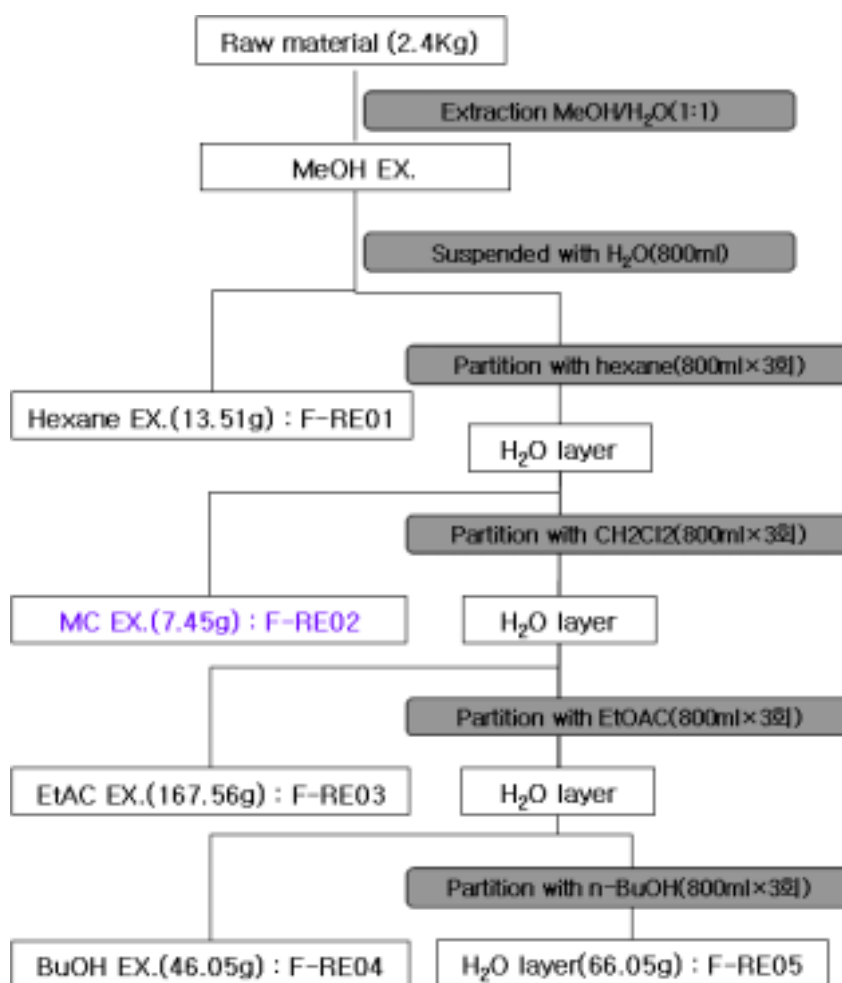


Fig.3. Fractionation of *Rheum palmatum*

2) 활성분획의 분리

3-2-1에서 분획 중에 MC 추출물(F-RE02)를 Column Chromatography 법으로 세부분획으로 분리하였다(Fig. 4).

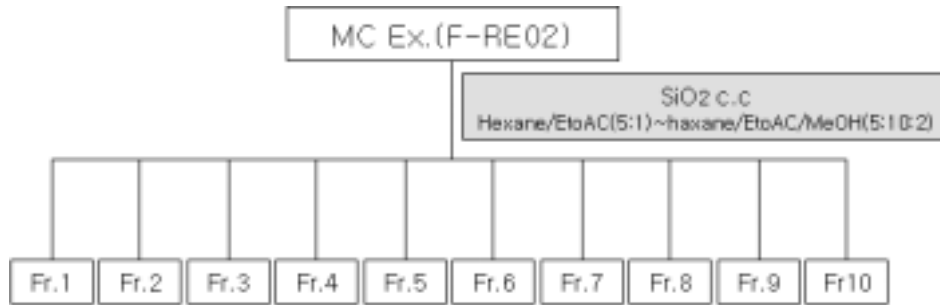


Fig. 4. Subfraction of Methylene Chloride layer(F-RE02)

3) 표준추출공정 확정 : GNC011 추출공정

건조된 대황 원물을 입자의 95%이상의 크기가 4mm 미만이 되도록 분쇄하여 50% Acetone 용매를 1:7(w/v)의 비율로 사용하여 55-65℃ 온도에서 진탕 추출하여 여과 후 여액을 감압 건조하여 수상으로 하고 n-Butanol:Toluene(8:2) 용매로 1:1로 3회 액액분리하여 상층을 완전 건조하여 50% Ethanol 용매로 녹인다. 이것을 다시 완전 건조하여 분쇄한다. 최종 추출물은 분석을 통하여 지표 성분의 함량을 설정하였고 GNC011이라고 하였다(Fig. 5).

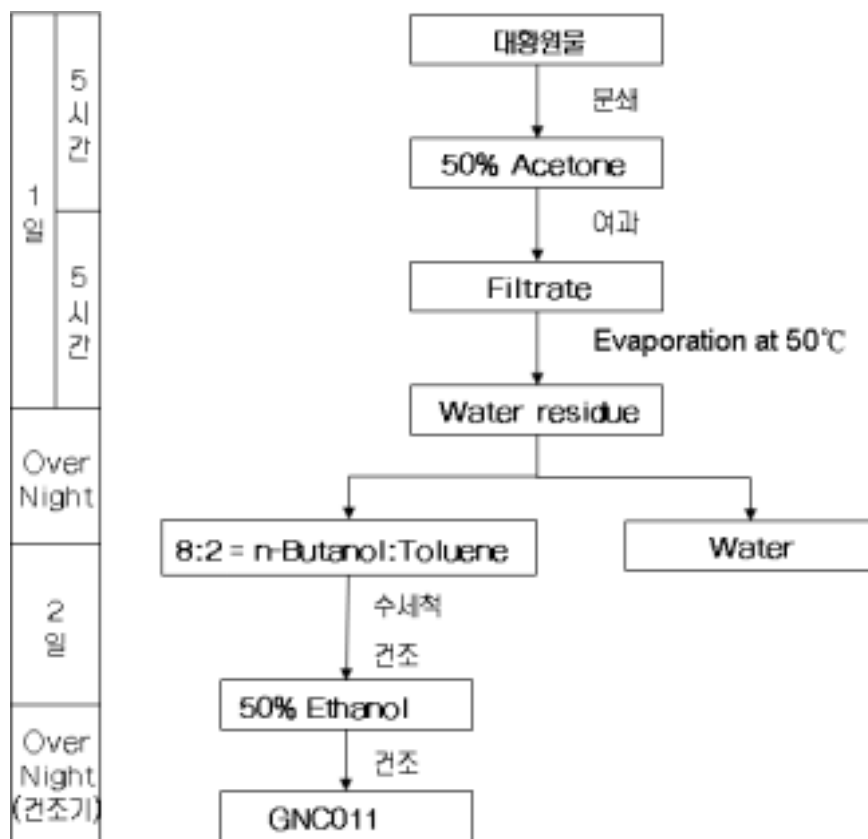


Fig. 5. Standard extraction procedure of GNC011

다. 유효 및 지표 성분분석

본 연구에서는 대황의 Anthraquinone류 성분(Chrysophanic acid, Emodin, Aloe-emodin : Fig. 6.)을 지표성분으로 하여 표준분석법을 설정하였으며 세부 분석법은 아래와 같다.

표준액의 조제 : Chrysophanic acid(98% CAS 481-74-3, Aldrich 229075-50MG), Emodin(>90%, CAS 518-82-1, Aldrich E7881-50MG), Aloe-emodin(95+%, CAS 481-72-1, Sigma A7687-100MG) 표준품 10mg을 정밀히 달아 25mL 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선 후 5mL을 취하여 100mL 용량플라스크에 넣고 이동상으로 표선하여 막여과하 후 여액을 표준액으로 한다.

검액의 조제 : 대황추출물 250mg을 정밀히 달아 50mL 용량플라스크에 넣고 이동상으로 표선하여 막여과한 후 여액을 검액으로 한다.

HPLC 조작 : 표준액 및 검액을 다음조건하에서 대한약전 일반시험법 액체크로마토그래프법으로 분석한다.

- 칼 럼 : 옥타데실실릴화한 실리카겔을 충전한 것
- 이동상 : Methanol:Water 0.5% acetic acid (85:15)
- 유 속 : 1mL/min
- 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 254nm)

< 계산식 >

Emodin의 양(mg)

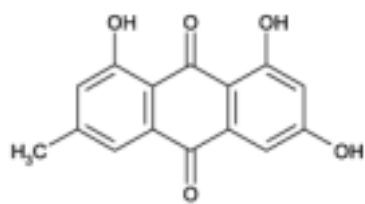
$$= \frac{\text{검액의 피크면적}}{\text{표준액의 피크면적}} \times \text{Emodin 표준품의 양 (mg)}$$

Aloe emodin의 양(mg)

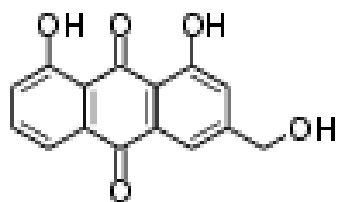
$$= \frac{\text{검액의 피크면적}}{\text{표준액의 피크면적}} \times \text{Aloe emodin 표준품의 양 (ng)}$$

Chrysophanic acid의 양(mg)

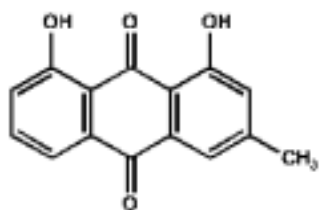
$$= \frac{\text{검액의 피크면적}}{\text{표준액의 피크면적}} \times \text{Chrysophanic acid 표준품의 양 (ng)}$$



Emodin



Aloe-emodin



Chrysophanol

Fig. 6. Standard constituents of GNC011

라. 병원균의 분리 동정 및 검정

제주도 일원에 걸쳐 노지 및 저장고에서 *Penicillium* spp.에 의해 부패된 감귤로부터 접종침을 사용하여 0.05% Triton X-100이 첨가된 멸균수에 포자를 현탁하여 1/2 감자한천배지(PDA, Potato dextrose agar)상에서 평판회석법으로 단포자를 분리하여 사용하였다. 분리된 병원균 들은 PDA배지 에 접종하여 증폭시킨 후 4℃ 또는 -20℃에 보관하였다. 분리된 균주들은 병원성 검정에 의해 나타난 병징에 따라 녹색곰팡이병을 일으키는 *Penicillium digitatum*, 청색곰팡이병을 일으키는 *Penicillium italicum* 이외 새로운 특징의 병징을 유발시키는 *Penicillium* spp. 로 분류하였다. 이들에 대한 병원성을 검증하기 위하여 완전히 착색된 과실을 수확한 후 0.5% sodium hypochlorite 용액에 5분간 침지하여 표면살균한 후 3회 수세척한 후 실내에서 자연 건조시켰다. 과실 표면에 있는 물기가 완전히 제거된 후 0.05% Triton X-100용액에 10^6 포자/mL의 농도(420nm에서 흡광도 0.1)로 현탁된 포자현탁액에 접종침을 담갔다가 과피의 유포(oil grand) 부분을 약 1mm 깊이로 침접종하였다. 접종된 과일은 비닐지퍼백에 10개씩 넣고 15℃에 보관하면서 매일 병발생여부와 병반의 크기를 조사하였다.

마. 항곰팡이능 검정

1) *in vitro* 항곰팡이 효과검정

대황추출물의 *Penicillium* spp.들의 군사생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5일간 PDA 배지에서 배양된 *Penicillium* spp. 균총들의 가장자리에서 직경 4mm의 군사절편을 채취하여 추출물의 serial concentration으로 포함되어있는 감자 한천배지에 접종하고 27℃에서 배양하여 시간 및 일별로 관찰하여 균총의 직경을 측정하였다.

또한 포자발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여 serial concentration으로 대황추출물이 포함되어있는 감자한천배지에 포자를 도말하고 24시간후 발아관의 길이를 광학현미경으로 조사하였다.

2) 수상처리에 의한 효과 검정

대황추출물을 serial concentration으로 수상처리하여 완숙된 궁천조생 각 5개씩 도말처리 후 굴피에 상처를 입힌상태에서 5일간 PDA 배지에서 배양된 *Penicillium* spp. 균총들의 가장자리에서 직경 4mm의 군사절편을 채취하여 상처부위에 접종한다. 항온항습기(27℃, 60%RH)에서 7일간 보관하면서 1일 간격으로 병변을 조사하였다. 이때 무처리 대조구는 동일 조건에서 아무런 약제를 살포하지 않은 상태로 실험하였다.

3) 수상처리에 의한 Field 검정

열매가 완전히 착색된 25년생 궁천조생에 대해 수확 7일전에 약물을 각 처리당 5kg/box로 100box로 하여 온도조절이 안 되는 일반저장고에 60일간 저장하면서 30일까지는 10일 간격으로 다음은 60일 경과 시점에서 *Penicillium* spp.에 의한 부패율을 조사하였다. 이때 무처리 음성대조구는 동일 포장에서 아무런 약제를 살포하지 않은 과실을 수확하여 동일조건으로 저장한 감귤을 사용하였다. 양성대조구는 제주 농가에서 저장병 방제 목적으로 일반적으로 사용되는 화합물 농약인 베푼란(동부한농) 1/2와 벤레이트(산젠타코리아) 의 지시용량을 혼용 살포하여 실험군과 비교하였다.

바. 어독성 시험 : 담수어독성

가로 300mm, 세로 450mm, 높이 250mm의 수조에 금붕어 각각 10마리씩을 넣는다. 3일간 wash out을 하고 10ppm, 100ppm, 1000ppm, 10000ppm의 농도가 되게 GNC011을 섞어준 후 7일간 생육을 관찰한다. 정확한 관찰을 위하여 죽은 고기는 해부하여 원인을 파악하였다. 통계처리하여 LD₅₀값을 구한다.

사. 급성독성

대황추출물(GNC011)에 대한 경구 급성독성의 정보를 얻기 위하여 식품의약품안전청고시 제1999-61호(1999년 12월 22일)의 ‘의약품등의 독성시험기준’을 변형하여 실시하였다.

1) 시험동물

가) 종 및 계통

RAT(SD)

나) 공급원

샘타코 실험동물센터

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1

다) 시험계의 선택이유

SD rats는 독성시험에 적당한 실험동물로서 독성시험에 널리 사용되고 있다. 본 계통의 rats는 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어서, 시험결과의 해석 및 평가 시에 이러한 자료를 이용하는 것이 가능하다.

라) 주령 및 체중범위

- . 주령 : 5주령
- . 동물수 : Female 5 heads, male 6 heads
- . 체중 : 14.4 - 15.7 g

마) 검역 및 순화

동물입수 시에 외관을 육안적으로 검사한 후 10일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키면서 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

2) 사육환경

가) 환경조건

본 시험은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 - 오후 8시), 환기횟수 10 - 20회/hr. 및 조도 150 - 300 Lux로 설정된 성균관대학교 청정동물실험실에서 실시되었다.

나) 사육환경모니터링

시험기간 중 동물실들의 온습도는 항온항습기에 의하여 자동조절 되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었다. 환경측정의 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

다) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

순화, 검역 및 투여 후의 전기간 동안 Rat용 Polycage에 5마리씩 사육상자에 수용하였다. 시험기간 중 사육상자는 시험번호 및 동물번호를 기입한 개체식별카드를 붙여 식별하였다.

라) 사료 및 물

(1) 사료의 급여방법

사료는 실험동물용 고품사료(제일사료 주식회사)를 자유섭취 시켰다. 본 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

(2) 물의 급여방법

물은 상수도수를 자유 섭취시켰으며 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

3) 투여량 및 시험군의 구성

가) 투여량 설정

본 시험물질 대황추출물(GNC011)에 의한 급성독성을 관찰하는 것이 목적이므로, 예비시험 결과 대황추출물(GNC011)은 무독한 것으로 사료되어, 액상

경구투여 가능 최대용량인 50ml/kg/day을 최고 용량군으로 설정하여 실험하였다.

나) 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

군	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (ml/kg)
C ¹⁾	5	1-5	50	0
T ²⁾	5	6-10	50	50

¹⁾ Control group, ²⁾ Treatment group.

다) 군분리 및 동물식별

동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후 2 g 간격으로 구분하여 각각의 평균체중에 가까운 동물들을 10마리 선택하였다. 이렇게 선택된 10마리를 각 군에 5마리씩 균등한 체중으로 분배되도록 순위화한 체중과 난수를 이용한 무작위법으로 분배하였다. 동물의 개체식별은 피모의 색소염색법과 개체식별카드 표시법으로 실시하였다.

4) 시험물질의 투여

가) 투여액의 조제법

GNC011을 100g 칭량하여, 10% Ethanol 수용액 1500ml을 가한 후 완전용해하여 사용하였으며 대조군은 주사용 멸균 증류수를 사용하였다.

나) 투여경로 및 투여방법

동물을 하룻밤 절식시킨 후, 배부피부 고정법으로 고정하고 경구투여용 금속제 존데와 주사관을 이용하여 위내에 강제 경구 투여하였다.

다) 투여경로 선택이유

사람에게 예상되는 경로로서 경구투여를 선택하였다.

라) 투여횟수 및 투여기간

투여당일 오전에 개체별로 1회 투여하였다.

마) 투여액량 계산

투여당일의 측정된 체중을 기준으로 하여 각각의 군별 투여량에 맞게 투여액량을 계산하였다.

5) 관찰 및 검사항목

가) 일반증상 및 사망동물의 관찰

투여당일은 최종 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매 시간마다, 투여 익일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

나) 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시전과 투여 후 1, 3, 7 및 14일에 체중을 측정하였다.

다) 부검소견관찰

투여 후 14 일째에 모든 생존동물을 Ether 마취 하에서 개복한 후에 복대동맥을 절단하여 방혈치사 시킨 후, 육안적으로 내부 장기를 관찰하였다.

라) 혈액성분 분석

서울 독성연구소에 의뢰하여 RBC, Hb, LDH 등 혈중성분을 분석하여 투약후 혈중성분의 변화여부를 관찰하였다.

6) 통계학적 방법

모든 실험군에서 동물측정용 저울을 이용하여 체중을 측정하여 평균과 표준 편차를 구하였다. 용매 대조군과 처치군 사이의 통계학적 유의차는 Student's t-test에 의하여 검정하였고, $p < 0.05$ 를 실험군 간의 유의성 있는 차이로 판정하였다.

제 3 절 결 과

1. 항곰팡이능 천연물농약 후보물질 선정

바실러스균, 세라티아균 외에 대장균, 황색포도상구균, 녹농균, 장구균, 등의 장내 세균과 기회성병원균을 대상으로 대황, 황련, 지모, 비파엽, 건강 등 100여가지의 한약재 중 항균력이 우수한 12가지의 한약재를 선별하여 이들 한약재를 이용하여 천연항균제, 천연방부제 등을 위한 항균/항생 능력이 천연물을 선정하고자 하였으며 본 연구의 검색단계에서는 위의 수종의 균주를 사용하여 agar diffusion test법으로 균이 접종된 agar plate를 만들어 12종의 천연물을 paper disk에 동일량을 도포후 실험해 보았을 때 대황추출물이 다양한 균주에 대해 항균력이 가장 우수하였으며 (Fig.) 이 결과에 따라 대황을 본 연구의 재료로 최종선정 후 향후 분획 및 성분연구와 천연물 농약 연구에 이용하였다.

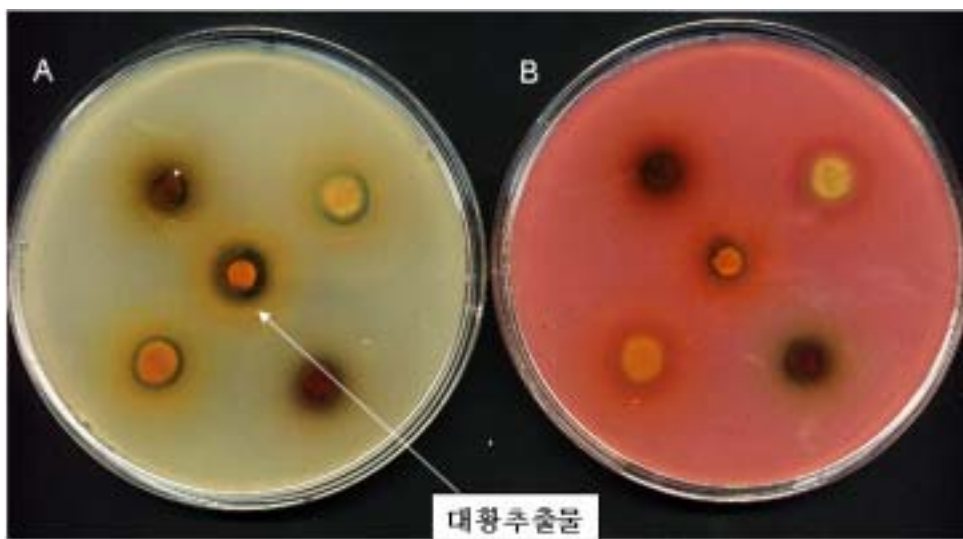


Fig. 7. Screening test of natural antimicrobial materials

2. 대황 분획 항곰팡이능 시험

위의 분획 Scheme에 따라 hexane 13.51g(F-RE01), methylene Chloride 추출물 7.45g(F-RE02), ethyl acetate 추출물 167.56g(F-RE03), n-butanol 추출물 46.05g(F-RE04), 수층 건조물 66.05g(F-RE05) 등 총 5개 분획물을 얻었다. 이것에 대한 *Penicillium* spp.에 대한 항곰팡이능 실험을 실시하였을 때 MC fraction(F-RE02)에서 가장 강하게 항곰팡이능이 관찰되었다(Fig. 8.).

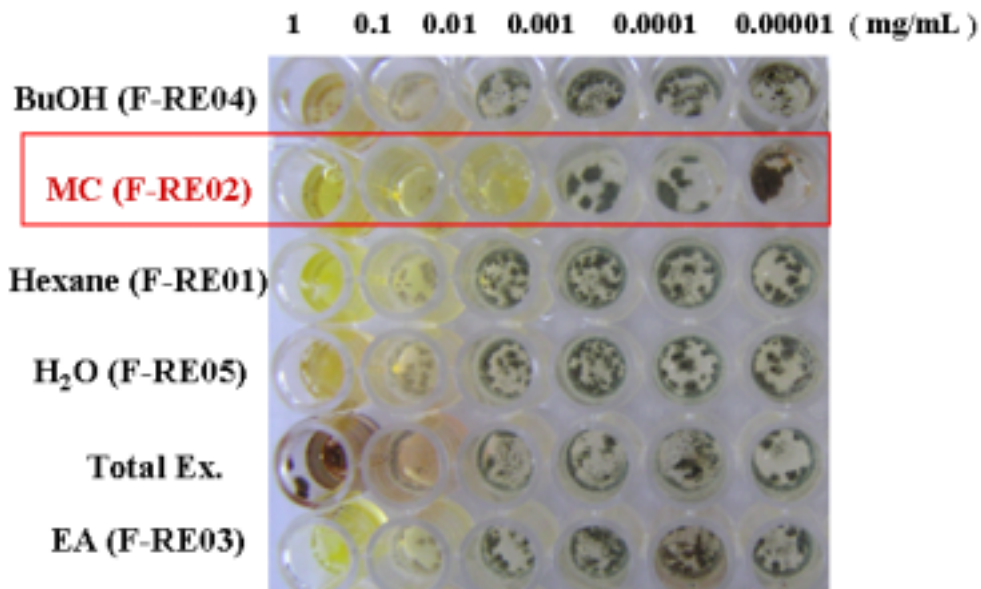


Fig. 8. Antifungal test on serial concentrations of each Rheum fraction

위의 결과로 MC층에 존재하는 성분이 항곰팡이능을 나타내는 주요 유효성분일 것으로 사료되며 total extract의 경우도 항곰팡이능이 우수하였으므로 MC 추출분획의 성분뿐만이 아니라 기타 다른 성분도 항곰팡이능을 가지고 있을 것으로 예상되어진다. 본 연구에서는 대황의 항곰팡이능을 밝히고 total extract 상태에서 천연물 농약을 개발하고자 하는 목적으로 향후 표준화를 위한 유효물질을 선정하여야 하고 이에 적합한 유효물질이 MC fraction에 존재하는 성분으로 하고자 하였다. 따라서 항곰팡이능이 있는 성분을 찾고 유효물질 및 지표성분으로 설정하고자 Subfraction 시험을 진행하였다.

HPLC 분석법으로 분석을 실시하였을 때 Hexane fraction과 MC fraction에서 Chrysophanic acid의 함량이 9%정도로 매우 높게 분석되었으며 MC fraction의 경우 Aloe-emodin, Emodin 성분도 각각 1.9%, 4.5%로 3가지 Anthraquinones 만 16.5%나 함유되는 것을 알 수 있었다. 이러한 분석결과는 가장 항곰팡이능이 우수한 MC fraction의 주성분은 Anthraquinone류 화합물이며 Anthraquinone류 화합물은 항곰팡이능과 매우 밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다(Fig. 9., Fig. 10).

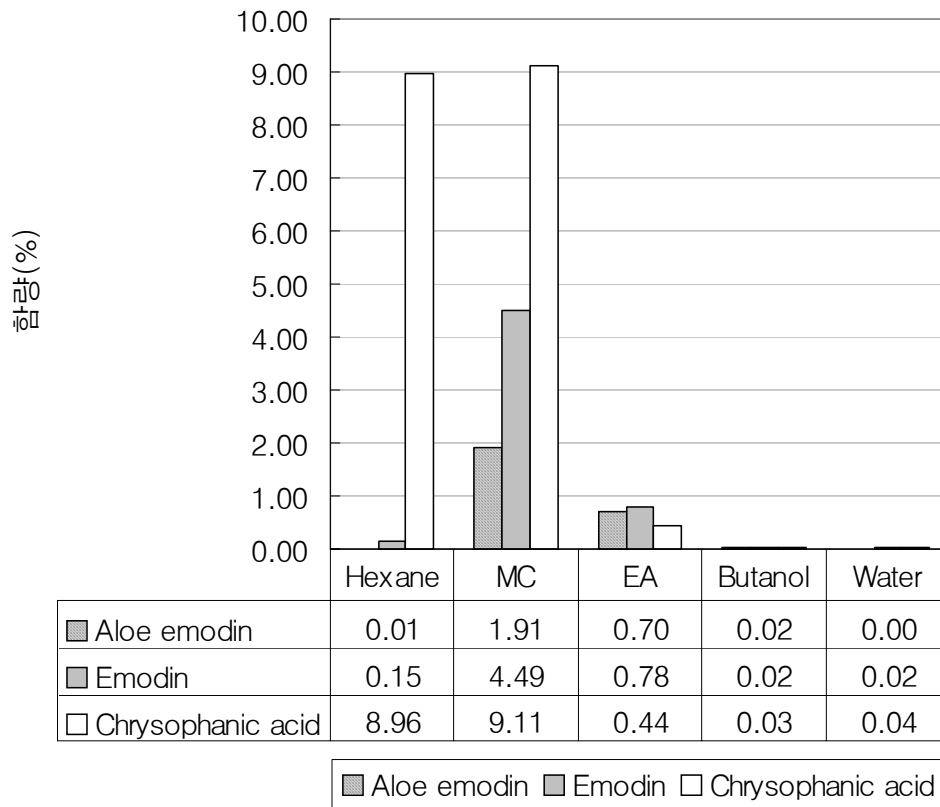
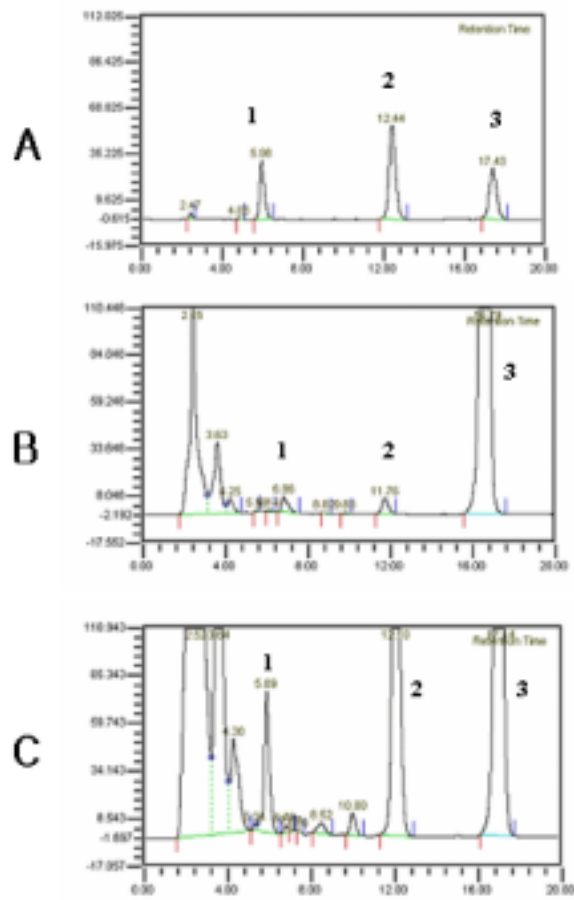
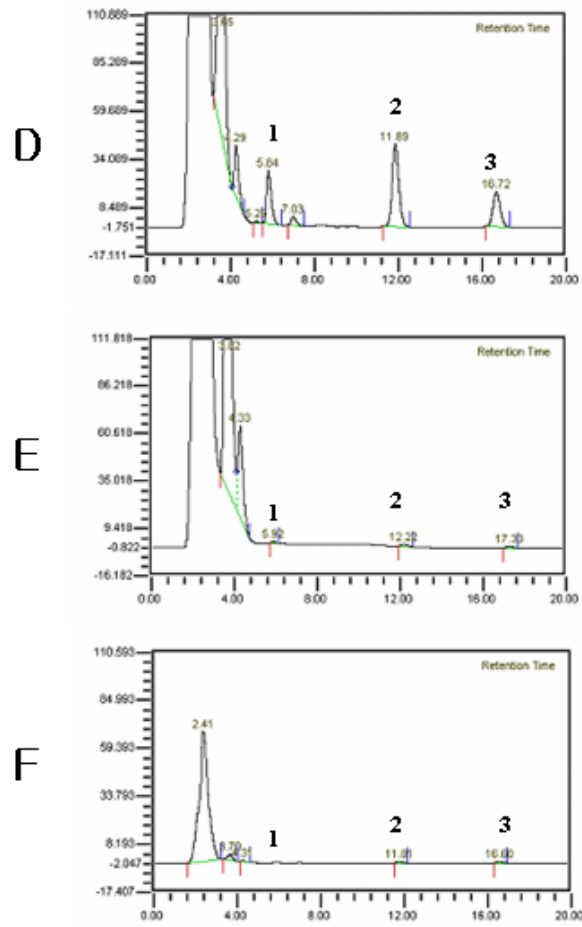


Fig. 9. HPLC analysis of Anthraquinones in each *Rheum* fractions



1. Aloe emodin 2. Emodin 3. Chrysophanic acid

Fig. 10. Continued on next page.



1. Aloe emodin 2. Emodin 3. Chrysophanic acid

Fig. 10. HPLC profile of Rheum fraction A: Standard, B: hexane fraction (F-RE01), C: methylene Chloride fraction (F-RE02), D: ethyl acetate (F-RE03), E: n-butanol fraction (F-RE04), F: Water fraction (F-RE05)

3. 성분 분리 및 항곰팡이능 시험에 의한 유효성분 확인

I 분리 Scheme에 따라 MC fraction(F-RE02)을 10개의 Subfraction으로 분리하였다. 충전제로는 Silica(Merck)를 사용하였으며 hexane:EA(5:1) 용액에서 Hexane:EA: MeOH(5:10:2)를 점차적으로 바꿔주면서 분리를 하였다(Fig. 11.). 분석 컬럼을 이용한 예비시험에서 분리순서를 예상하여 분리를 실시하였고 주로 anthraquinone류 성분이 존재하는 것을 확인하였다. anthraquinone성분은 대황의 항균작용에 주요 효능물질로 많은 연구가 되어있으며 대황의 사하작용에도 관여한다.

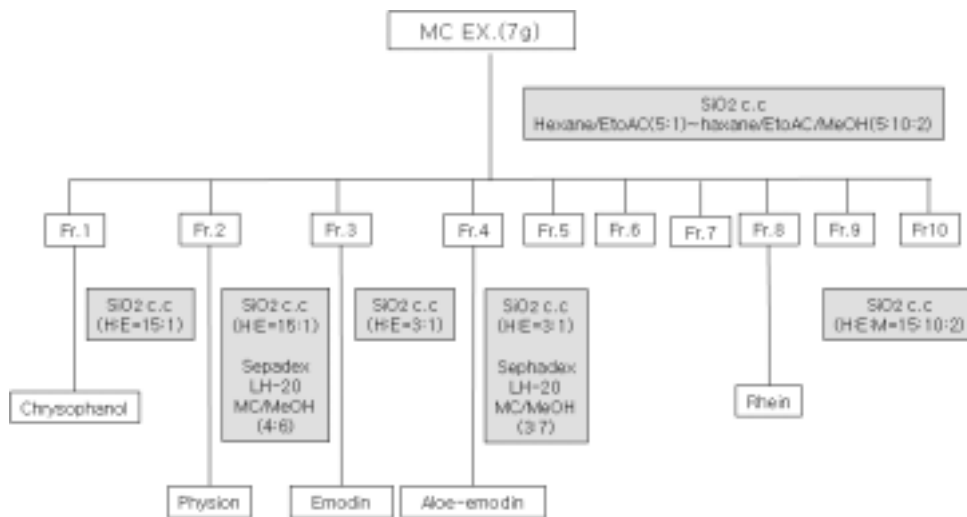
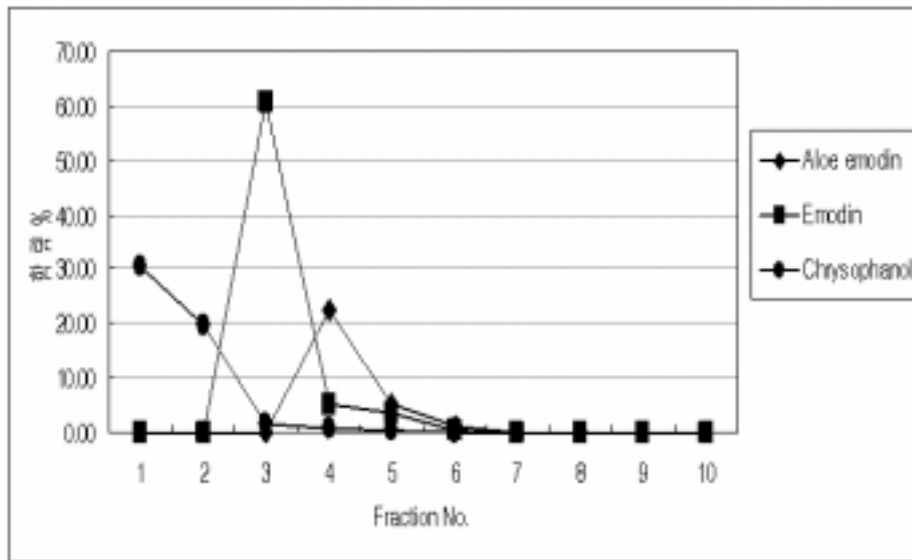


Fig. 11. Subfraction of MC extracts(F-RE02) and each constituent

Fig. 11.의 각 Fraction을 시험방법 3-3의 HPLC 분석법으로 분석을 실시하였을 때 Fraction 1, 2에서는 Chrysophanic acid가 주로 검출되었으며, Fraction 3에서는 Emodin성분이, Fraction 4에서는 Aloe-emodin 성분이 주성분이었다. 각 fraction의 항곰팡이능 시험을 실시한 결과 Anthraquinone 류 성분이 함유된 fraction에서 항곰팡이능이 우수하였다(Fig. 12.). 항곰팡이능이 우수한 Fraction 1, 3, 4, 5, 8은 공통적으로 Aloe-emodin, Emodin, Chrysophanic acid, Rhein, Physcion 등의 Anthraquinones 성분이 다량 함유되어 있으며 Anthraquinones이 대황의 항곰팡이능의 주요 유효물질임을 알 수 있었다.

이에 따라 본 연구에서는 Chrysophanic acid, Emodin, Aloe-emodin의 세가지 성분을 지표성분으로 하여 향후 원료표준화 및 추출공정 표준화 연구시에 이용하였다.

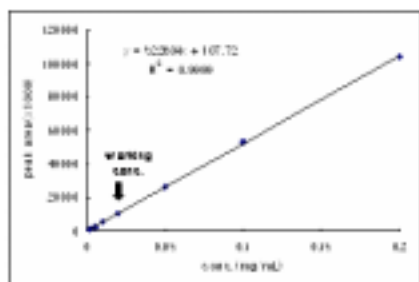


구분	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5	Fr6	Fr7	Fr8	Fr9	Fr10
효능	+	-	+++	++	++	-	-	++	+	+
- : 없음										
+ : 약함										
++ : 중간										
+++ : 강함										

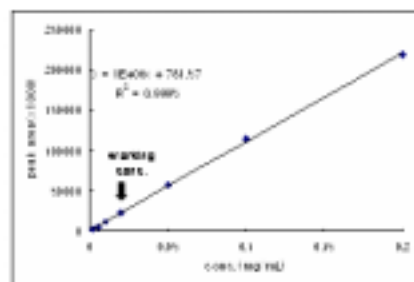
Fig. 12. Analysis and antifungal effect test of Each MC fraction

4. 표준분석법 개발

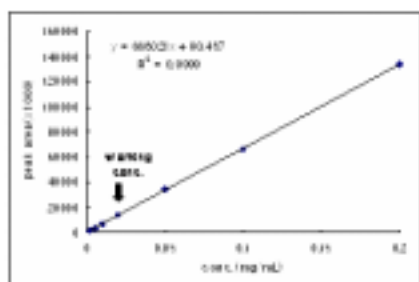
천연 추출물의 표준화 및 표준공정을 설정하기 위해서는 표준추출물을 확인할 수 있는 지표성분을 설정하여 지표성분에 따라 원물질에서 추출공정단계 및 최종 추출물을 제어하여 정량화된 추출물을 설정하는 과정이 필요하다. 앞서 검토한 유효 fraction 및 Subfraction 시험과 분석시험을 통하여 본 연구에서는 Anthraquinone류 화합물인 chrysophanic acid, emodin, aloe-emodin 성분을 지표성분으로 설정하였으며 향후 추출물의 분석에 이용하기 위하여 타성분과 간섭되지 않는 조건의 HPLC 분석조건을 설정하였다. 분석농도 설정의 타당성을 검증하기 위하여 검량선을 작성하여 linearity를 확인하였고(Fig. 13.) n=6으로 하여 Accuracy와 precision을 확인하였다.



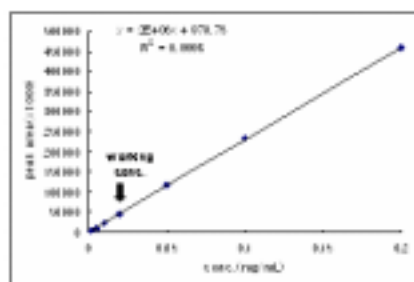
Aloe emodin



Emodin



Chrysopic acid



Total

Fig. 13. Linearity test of Anthraquinones analysis

5. 표준추출공정 개발

가. 원료표준화 연구

천연물 추출물의 표준화를 위해서는 원료표준화, 추출공정표준화, 분석표준화가 이루어져야 한다. 본 연구에서는 원료의 표준화를 위하여 국산 2종(*Rheum uldulatum* Linne, 종대황 ; S-RE01, S-RE03), 중국산 4종(*Rheum palmatum* Linne 금문대황 3종;S-RE04,S-RE05,S-RE06, *Rheum franzenbachii* Munt 화북대황 1종;S-RE02)을 구입하여 항곰팡이능과 천연물방제제의 기능으로서 가장 우수한 원료물질을 찾고자 하였다. 각 종의 형태는 fig. 14.와 같다. 또한 현재 중국에서 생산되고 있는 대황추출물(S-RE07)이 있어 구입하여 사용하였으며 이 추출물의 물성을 시험했을 때 용해도에 문제가 있어 다른 원료추출물과의 물성을 동일하게 하기 위하여 수상용해 물질을 제거하는 재처리 공정을 거친 재처리 추출물(S-RE08)을 함께 검토하였다(table 4.). 원료 표준화에 사용된시료는 총 8종으로 이것을 농도에 따라 radial growth rate test를 실시한 결과 이중 중국의 사천성 지역에서 생산되는 *Rheum palmatum* 종인 S-RE04, S-RE05가 0.1mg/mL와 1mg/mL의 농도에서도 강한 항곰팡이능이 우수하였다. 이에 따라 표준화추출공정연구는 사천성지역에서 재배된 *Rheum palmatum*을 이용하여 진행하였다. 중국산 원료(S-RE07)은 상용원료인데 함량이 구입시 성적서의 양만큼 되지 않았으며 항곰팡이능도 약하였다(Fig. 15. table 5).



Fig. 14. *Rheum* spp. in this study for raw material standardization. A. *Rheum undulatum* Linne, B. *Rheum palmatum* Linne, C. *Rheum Franzenbachii* Munt

Table. 4. *Rheum* spp. used in this study.

No	국가	재배지	구입처	한약명
S-RE01	국산	충북	인동약업사	종대황
S-RE02	중국	화북지방	인동약업사	화북대황
S-RE03	국산	충북	동명당	종대황
S-RE04	중국	사천	동명당	금문대황
S-RE05	중국	사천	다송(주)	금문대황
S-RE06	중국	운남성	대덕약품	금문대황
S-RE07	중국	-	파마라인	금문대황-추출물
S-RE08	중국	-	파마라인	금문대황-재처리

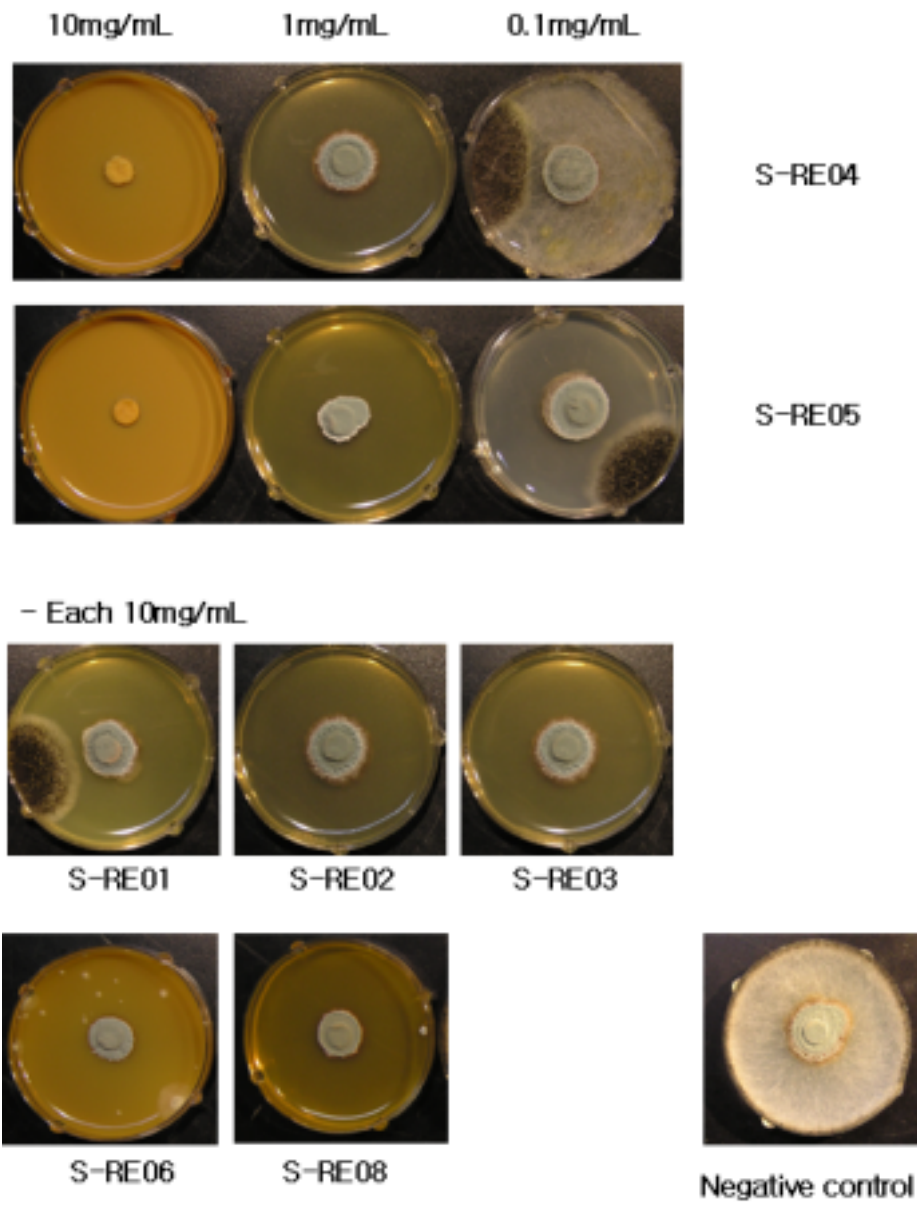


Fig. 15. Radial growth rate test of *Rheum* extracts

Table. 5. Radial growth size of *Rheum* extracts.

(단위 : cm)

No	10 mg/mL	1 mg/mL	0.1 mg/mL
S-RE01	1.3	1.9	2.3
S-RE02	0	1.7	2.3
S-RE03	1.3	1.8	2.2
S-RE04	0	1.0	1.6
S-RE05	0	1.3	2.2
S-RE06	1.3	2.0	2.9
S-RE07	1.5	2.2	2.8
S-RE08	1.7	2.4	2.9

나. 추출공정표준화 연구

본 연구는 천연물 곰팡이 방제제의 개발을 목표로 항곰팡이능의 효능검증과 더불어 추출수율 및 공정용이성을 감안하여 다양한 용매로 추출법을 검토하였다. 초기 추출용매로는 에탄올, 메탄올, 아세톤, 물을 사용하였으며 액액분리에 사용된 용매로는 부탄올, 톨루엔, 디클로로메탄, 헥산, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤, 클로로폼 등의 용매를 사용하였다. 초기추출에서 에탄올 및 메탄올 수용액의 경우는 다음 액액분리시에 유기용매 추출단계에서 제거가 용이하지 않아 완전건조 후 수상과 용매를 가하는 과정을 거치게 되어 공정시간이 길어졌다. 또한 수율도 각각 41%, 45%로 Acetone(58%)에 비하여 낮았으므로 초기 공정은 Acetone수용액으로 결정하기로 하였다. Acetone 수용액은 낮은 끓는점에 의해 공정 중에 냉각기가 필수적으로 필요하다는 단점이 있으나 적정시간으로 감압 농축할 때 Acetone 성분이 제거가 용이하여 다음 액액분리 단계에서 완전건조하지 않아도 잔존하는 수상과 유기용매를 사용하여 공정시간을 단축할 수 있다. 액액분리 공정은 수상의 물질에서 유효물질을 효과적으로 추출할 수 있어야 한다. 앞서 실험한 분리실험에서 디클로로메탄에서 가장 좋은 항곰팡이능과 Anthraquinone 화합물을 함유하는 것으로 밝혀졌으나 수율이 매우 낮았다(0.2%). 따라서 항곰팡이능을 유지하면서 수율을 높일 수 있는 용매가 요구되었다. 문헌 및 용매 검토 결과 에틸아세테이트와 부탄올/톨루엔 혼합물이 가장 용이하였으나 수율 면에서 우수한 부탄올/톨루엔 화합물을 선택하기로 하였다. 최종 건조단계에서는 잔류용매를 없애기 위하여 물을 첨가하여 용매를 제거했으며 완전 건조 후 50% 에탄올수용액에 용해하여 재 건조하여 잔류용매의 가능성을 완전 배제하여 추출물을 완성하고 이 최종추출물을 GNC011의 코드명으로 설정하였다. 최종 수율은 원물 대비 13%정도이며 총 추출공정 시간은 overnight time을 포함하여 30시간 정도가 소요된다. 표준추출공정단계 및 소요시간은 Fig. 16.과 같다.

GNC011은 건조감량 5% 이하의 갈색 및 적갈색의 가루로서 앞서 검토된 표준 분석법으로 분석하였을 때(Fig. 17.) aloe-emodin 0.74%, emodin 0.74%, chrysophanic acid 0.53%로 분석되어졌으며 세성분을 합한 값이 2.01%로 향후 추출물의 표준함량은 추출 후 세성분의 Anthraquinone 성분의 함량이 2.0%±10%의 규격으로 관리하기로 하였다.

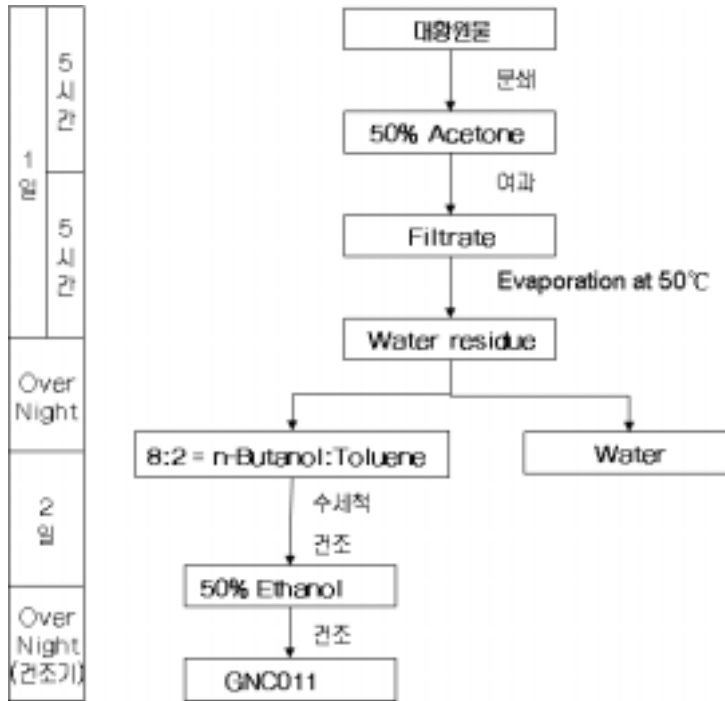
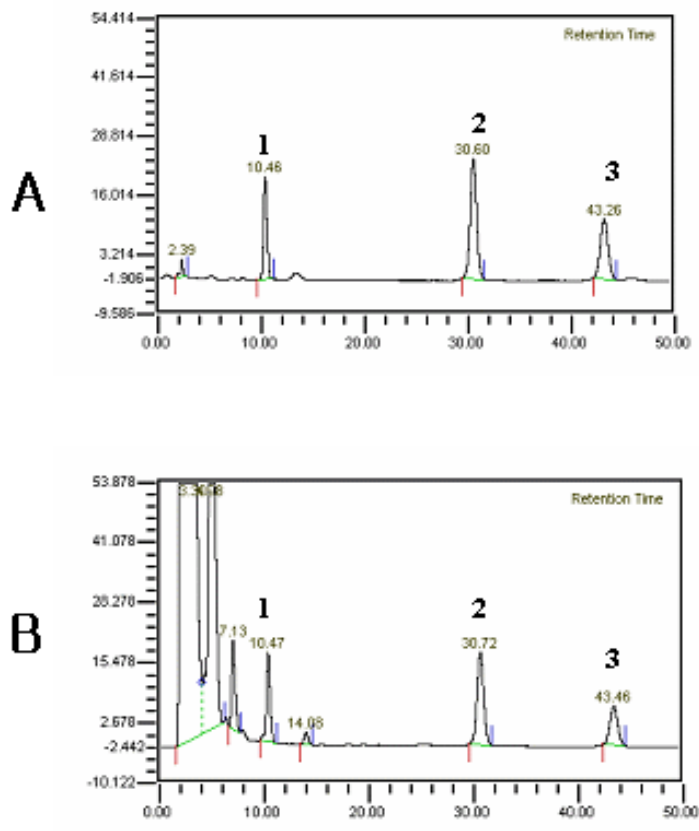


Fig. 16. Final standard extraction process of *Rheum* ext.(GNC011)



1. Aloe emodin 2. Emodin 3. Chrysophanol

Fig. 17. HPLC analysis profile of standard GNC011

6. 효능평가

가. 균사생장억제 효과(radial growth rate test)

이전까지의 실험에서 대황추출물은 Screening 단계에서 항균능이 우수하였으나 종에 따라 그 항곰팡이능은 상이하였다. 가장 항곰팡이능이 우수한 대황을 선정하였고 표준분석법과 표준공정연구를 통하여 표준추출물 GNC011을 얻었다. GNC011은 Antraguinones를 지표성분으로 하여 규격화 하였다. 항곰팡이능을 다시 검증하고 항곰팡이능을 가지는 최소농도 및 향후 농약물질로 개발시에 최적 방제농도를 알기위하여 radial growth rate test 법으로 농도별로 항곰팡이능을 시험해보고자 하였다. Fig. 18.과 같이 GNC011은 항곰팡이능이 우수하였으며 $1\mu\text{g/mL}\sim 0.1\text{mg/mL}$ 의 낮은 농도에서는 시간이 지남에 따라 곰팡이가 어느 정도 성장하는 것을 알 수 있었다. 1mg/mL 이상의 농도에서는 *penicillium* spp. 균사생장이 현저히 증가되어 10mg/mL 의 농도에서는 거의 생장을 멈춘 것으로 관찰되었다.

따라서 GNC011의 향후 적정시험농도는 1mg/mL 로 설정하고 시험을 진행하고자 한다.

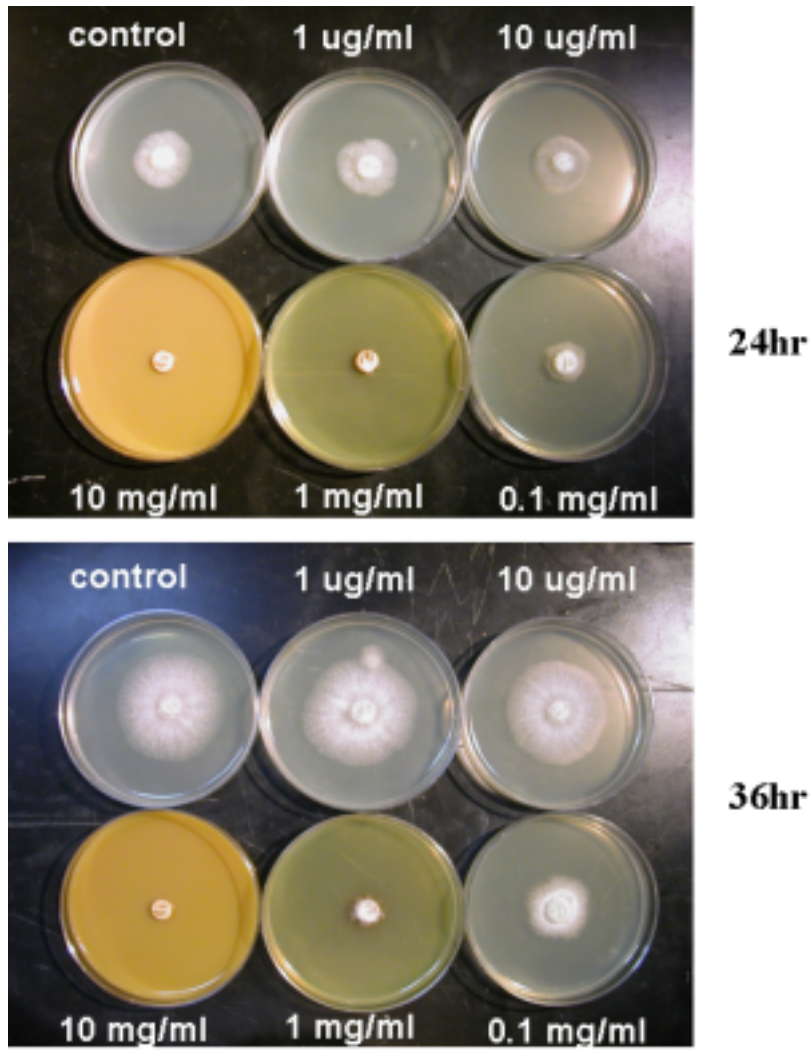


Fig. 18. Antifungal effect of GNC011 dependent on conc. and time.

나. 포자발아억제 검증

GNC011의 포자발아억제를 검증하기 위하여 두 가지 실험을 진행하였다. 자연 상태에서는 실험실내 테스트와 다르게 낮은 population의 *penicillium*이 존재하는 상태이므로 *penicillium* 농도에 따라 동일한 GNC011을 처리해 주었을 때 영향을 살펴보고자 하였다. 동일 농도의 배지에 *penicillium italicum*을 각각 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 을 spreading한 후 72시간동안 항온항습기에서 배양을 해보았을 때 10배수의 균처리 임에도 불구하고 낮은 농도일수록 항곰팡이능이 우수함을 확인하였다 (Fig. 19.). 따라서 GNC011은 강제적으로 많은 균을 처리해주는 실험실조건보다는 자연방제효과는 더욱 뛰어날 것으로 사료된다.

두 번째 방법은 *penicillium italicum*의 농도는 일정하게 하고 배지에 함유된 GNC011의 농도를 달리하여 실험을 해보았다. 0.01mg/mL, 0.025mg/mL, 0.05mg/mL, 0.1mg/mL의 농도로 배지에 GNC011을 첨가하였을 때, 농도구배대로 항곰팡이능을 보였으며 광학현미경으로 포자형성을 관찰하였을 때 현저하게 포자량이 줄어드는 것으로 알 수 있다(Fig. 20.).

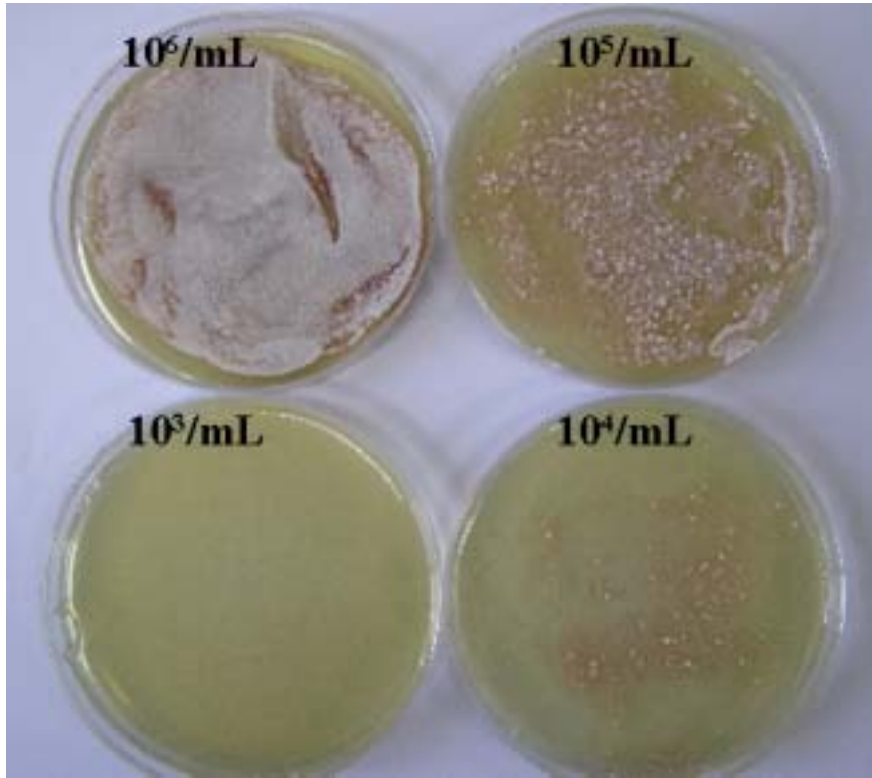


Fig. 19. Antifungal Effect of GNC011 dependent on spore population.

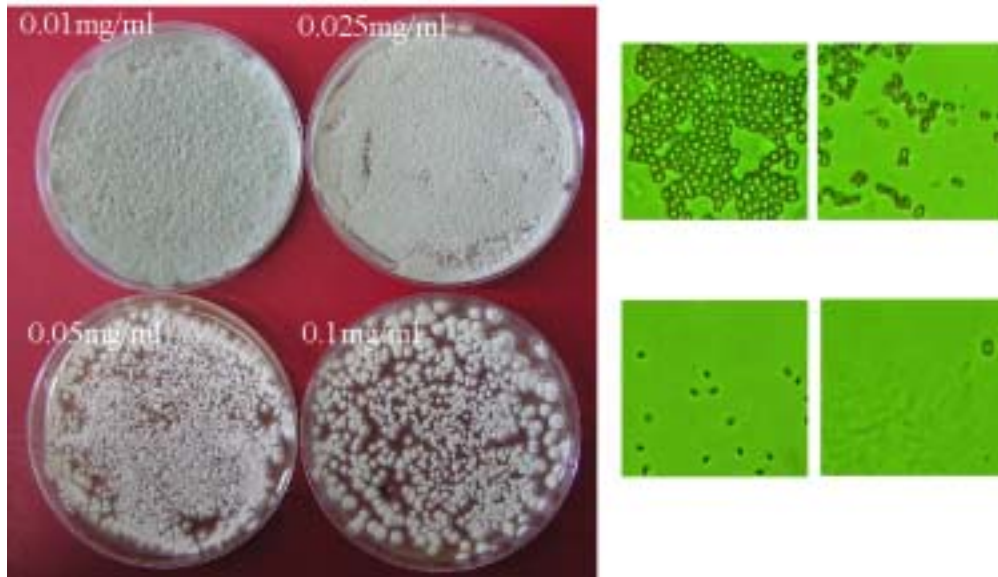


Fig. 20. Suppression of spore germination by serial concentration of GNC011

다. 형태적 관찰 : 광학현미경

GNC011을 농도별로 처리하여 *Penicillium italicum*을 각기 배양시키고 형태적 관찰을 위하여 광학현미경을 사용하여 곰팡이류의 전형적인 기관인 포자낭(Sprangium), 발아관(germ tube), 균사(spawn) 등을 관찰하였다. Fig. 21은 GNC011의 농도별 처리에 따른 포자낭의 형성을 관찰한 현미경사진이다. 무처리 균에서는 정상적으로 포자낭이 형성이 되었고 GNC011의 농도가 높아질수록 포자낭의 형태에 변형이 생기는 현상을 관찰하였고 1mg/mL의 농도에서는 포자낭의 형성이 억제되었다.

또한 농도에 따라 발아관과 균사도 형성이 억제되는 현상이 관찰되었다(Fig. 22.). 곰팡이류의 번식에 결정적인 역할을 하는 발아관의 길이를 측정해 보았을 때도 농도에 따라 억제가 되는 것을 알 수 있다(Fig. 23.).

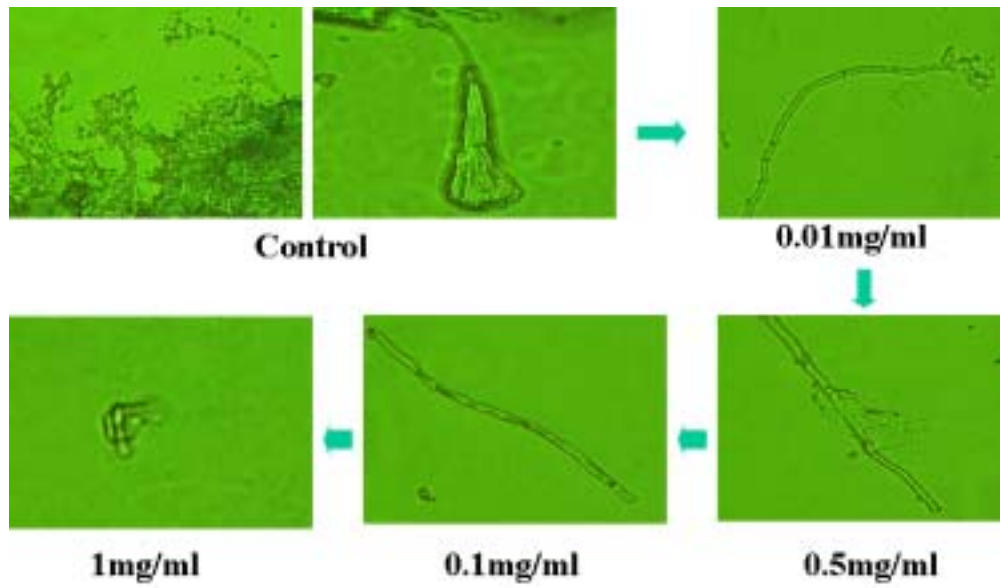


Fig. 21. Suppression of sporangium formation on GNC011 treated.

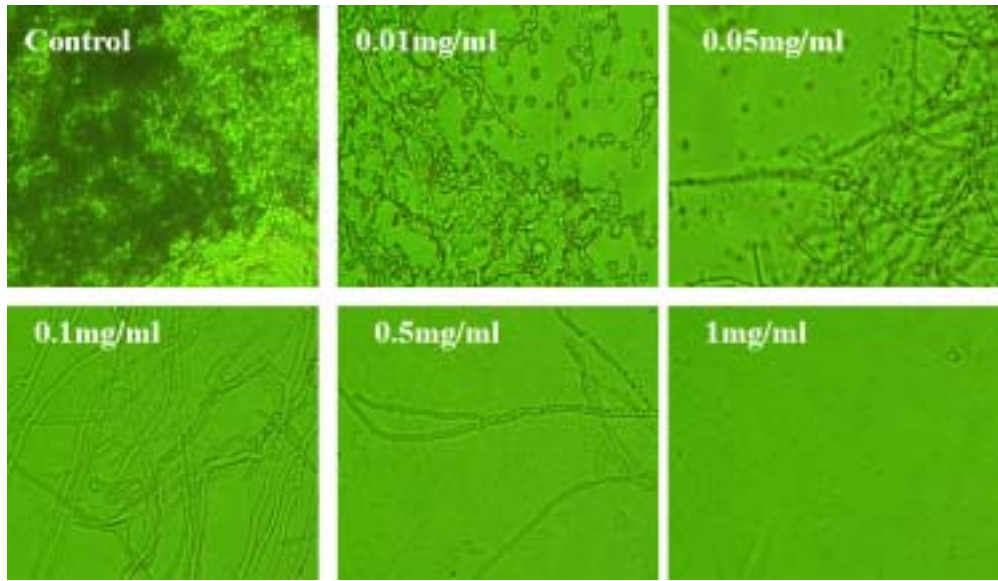


Fig. 22. Suppression of germ tube and spawn generation on GNC011 treated

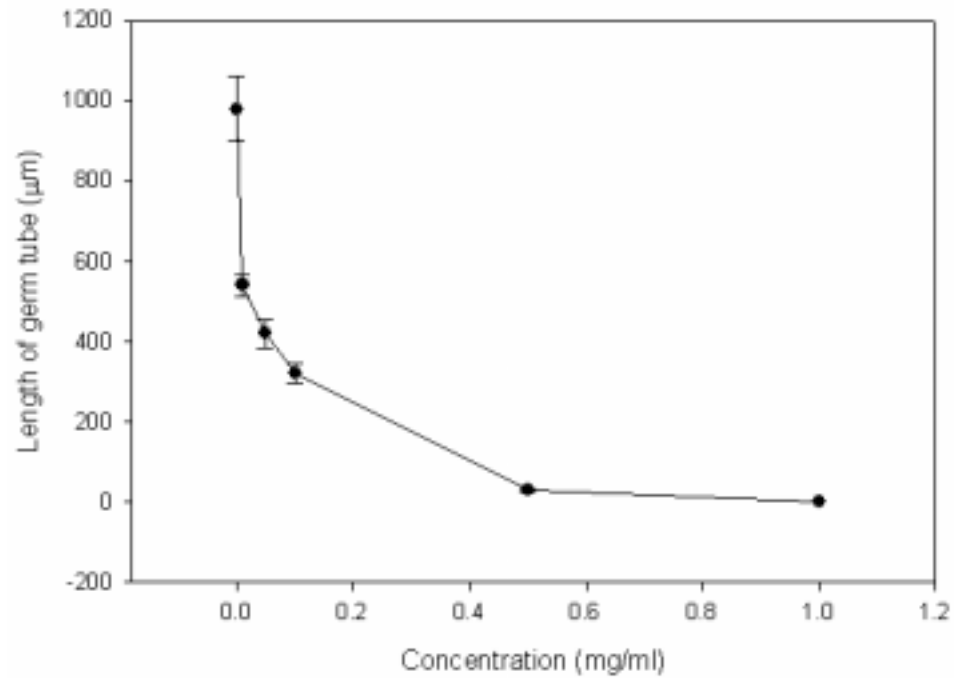


Fig. 23. Suppression effect of germ tube generation on GNC011 treated.

라. 감귤에 대한 효능 검증

1) GNC011의 녹색곰팡이병변 억제 효과

위의 결과로 GNC011의 *penicillium* spp.에 대한 항곰팡이능은 *in vitro* test를 통하여 검증되었으며 표준처리농도는 1mg/mL(0.1% sol.)로 설정하였다. 이 시험농도를 직접 감귤에 적용하여 항곰팡이능을 검증하고자 하였다. 감귤표면에 GNC011을 도말하여 준 후 감귤표면에 부분적으로 상처를 낸 후 곰팡이 배양편을 심어 배양한 결과 무처리군에서는 상처부위의 곰팡이편에서 부터 단기간에 균사가 성장하여 포자를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 GNC011을 1mg/mL, 10mg/mL의 농도로 처리하여준 감귤군에서는 *penicillium* spp.의 생장이 억제됨을 알 수 있었다.

감귤적용시험은 plate test에서 보다는 효과가 약한 것으로 보여지는데 이는 아마도 감귤에 도말시 단순히 10% Ethanol 상태로 적용하여 표면에 적절히 도말되지 못한 데에 기인한 것으로 생각된다. 향후 감귤표면에 잘 도말될 수 있는 제제화연구가 요구된다.

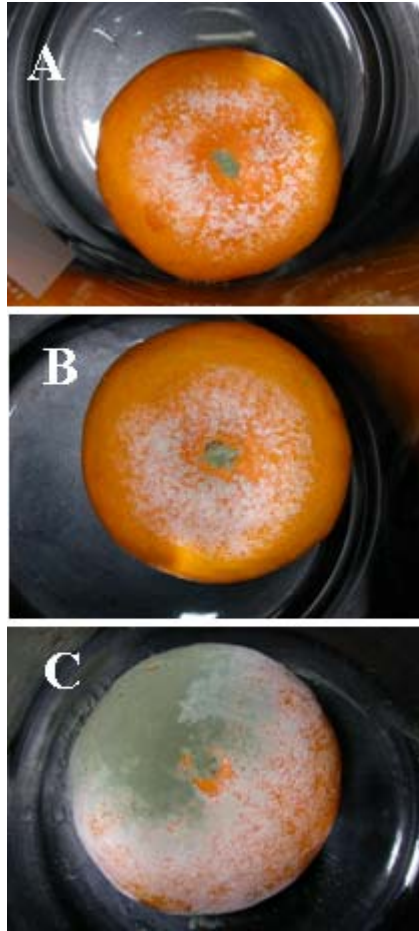


Fig. 24. Antifungal effect of GNC011 treated on mandarin orange.

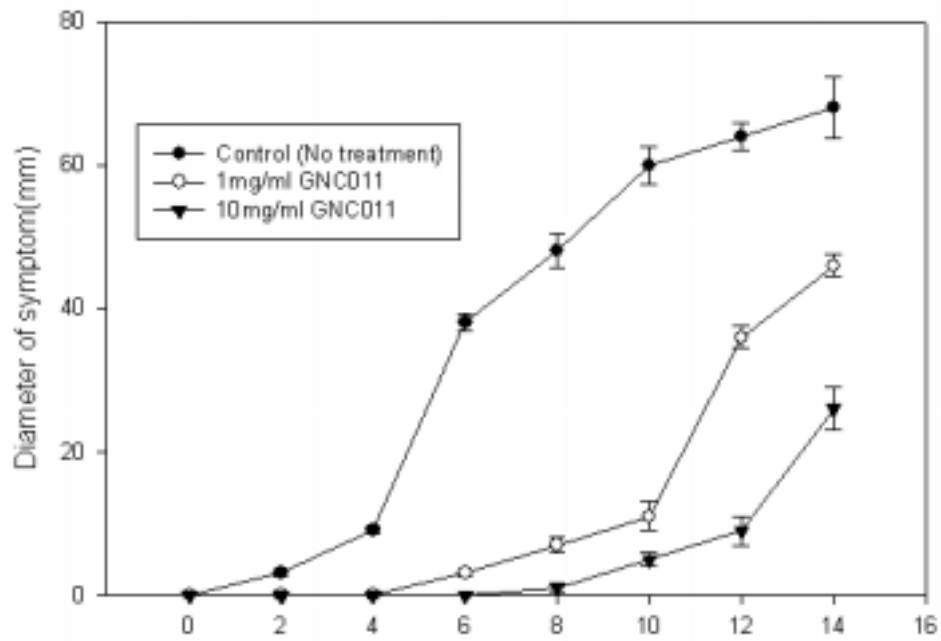


Fig. 25. Mold symptom suppression of GNC011 treated on mandarin oranges

2) GNC011의 Field test

GNC011의 천연물농약의 적용을 위하여 간이포장시험을 실시하였다. 비교 샘플은 제주감귤농가에서 감귤저장을 위하여 수확 1주일 전에 살포하여 사용하고 있는 화학농약인 iminoctadine triacetate(베푸란)와 벤레이트를 사용하였고 살포방법 및 저장조건 등은 아래와 같다.

- ▶ 대 상 : 남제주군 농가
- ▶ 기 간 : 2004. 11. 15 ~ 2005. 1. 22.
- ▶ 저장방법 : 농특저장고
- ▶ 저장기간 : 2개월
- ▶ 살포시기 : 수확 1주일 전
- ▶ 살포방법 : GNC011 (1kg을 1000L에 희석하여 살포)
- ▶ 시 험 군 : 1. 대조군 : 비살포
2. 실험군1 : GNC011 살포
3. 실험군2 : iminoctadine triacetate
벤레이트
4. 실험군3 : 실험군1과 실험군2의 경계지역
- ▶ 통 계 : 각 그룹당 5kg, 100박스
(10box 무작위 선택, 썩음병 발생 감귤수 계산(%))

시험결과 무처리군은 10일경과 후에 13%의 감귤이 초록곰팡이병에 감염되었으며 20일 경과 후에 46%의 감귤이 병변을 일으켰다. 반면 세 개의 실험군 모두 60일 경과 후에도 5%미만의 초록곰팡이에 감염되어 GNC011이 향후 화학농약을 대체할 수 있는 천연물농약의 가능성이 매우 높은 것을 알 수 있다 (Fig. 26.).

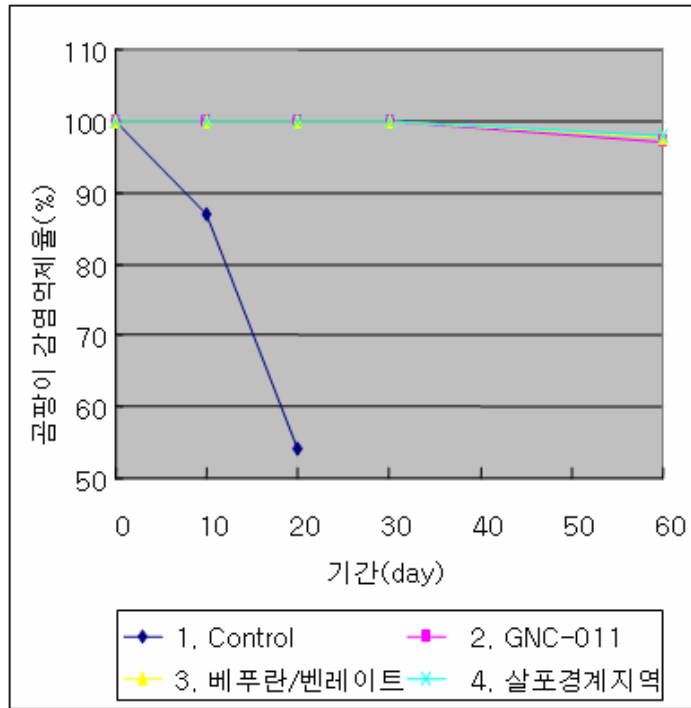


Fig. 26. Field test of GNC011 treated on mandarin orange.

7. 독성평가

가. 어독성시험

가로 300mm, 세로 450mm, 높이 250mm의 수조에 금붕어 각각 10마리씩을 넣고 3일간 wash out을 하고 10ppm, 100ppm, 1000ppm, 10000ppm의 농도가 되게 GNC011을 섞어준 후 7일간 생육하여 독성을 관찰해 보았을 때 100ppm의 농도까지는 사망하는 금붕어가 관찰되지 않았으며 1,000ppm에서 7마리, 10,000ppm에서 10마리가 수일에 죽었다. LD₅₀값을 구하여 보았을 때 2일경과시 500ppm, 일주일 경과 시에 333ppm으로 독성이 거의 없음을 알 수 있었다. 정확한 관찰을 위하여 죽은 고기는 해부하여 원인을 파악하였을 때 약물의 독성보다는 고농도에서 불용화된 GNC011에 의하여 아가미와 피부 등에 흡착되어 물리적으로 사망한 것으로 판단된다. 일반 농약의 경우 LD₅₀값이 어독성 I급은 0.5ppm 미만, 어독성 II급은 0.5~2ppm, 어독성 III급은 2ppm 초과로 나뉘어지는데 본 연구를 통하여 검증된 GNC011의 경우 어독성에 대해 매우 안전한 것으로 판단된다.

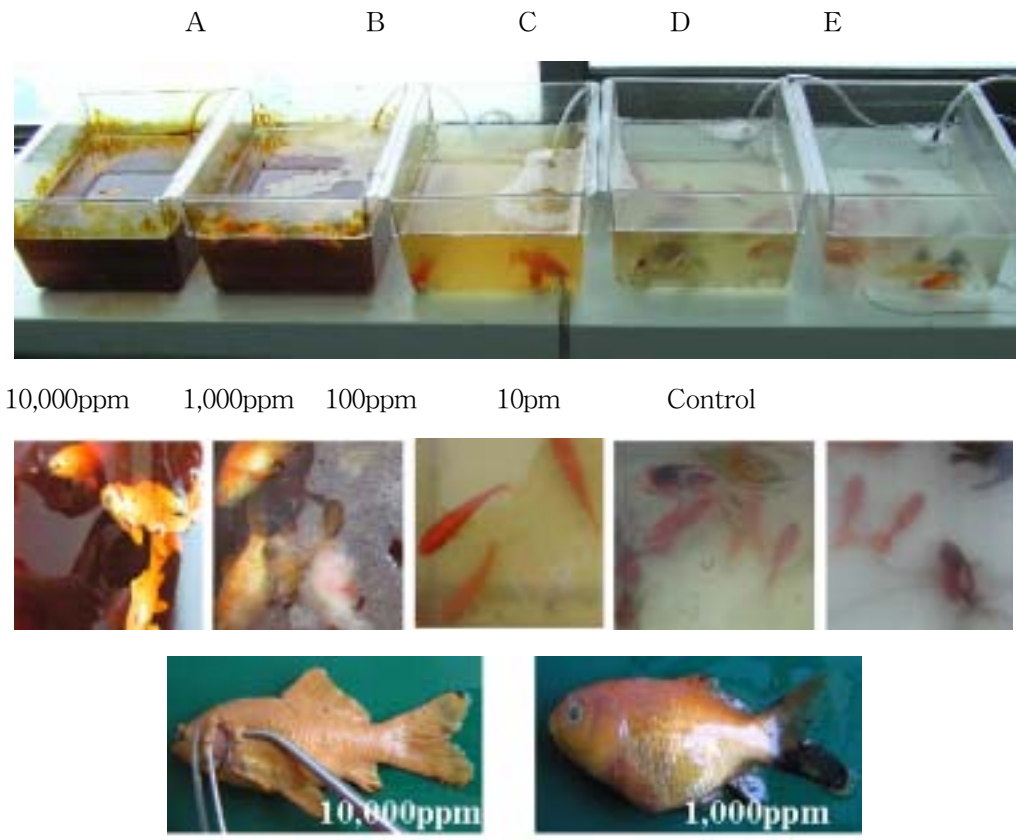


Fig. 27. Fish toxicity test of GNC011

나. 급성독성시험

GNC011의 독성을 조사하기 위하여 SD Rat 수컷 6마리, 암컷 5마리씩 0.1 ~ 1,000mg/kg bw/day로 경구투여하고 7일간의 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 이후 혈액의 성분을 분석하여 본 결과 이와 같이 시험한 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 2) 시험물질의 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 나타나지 않았다 (Table 1).
- 3) 체중변화에서는 모든 투여군에서 시험물질에 기인된 변화는 관찰되지 않았으며, 정상적인 체중 증가가 확인되었다 (Table 5).
- 4) 혈액분석에서는 어떠한 소견도 관찰되지 않았다 (Table 6, 7, 8, 9).

본 시험에서 시험물질 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 LD₅₀값은 50ml/kg을 훨씬 상회할 것으로 사료되었다. 이상의 결과에서 GNC011은 Rat에 의한 1주일간의 경구투여 급성독성시험에서 안전한 물질인 것으로 판단된다.

Table 5. Acute toxicity test of GNC011 : Body weight

Parameter						
	0	0.1	1	10	100	1000
Males						
B.W	217.7±14.2	227.6±4.7	225.2±4.7	225.4±11.1	221.3±7.9	220.3±7.6
Liver(g)	3.378±0.3	3.539±0.2	3.634±0.5	3.416±0.1	3.405±0.3	3.654±0.2
Kidney(g)	0.789±0.0	0.779±0.0	0.770±0.1	0.801±0.0	0.798±0.0	0.879±0.1
Spleen(g)	0.236±0.0	0.206±0.0	0.237±0.0	0.228±0.0	0.235±0.0	0.240±0.0
Lung(g)	0.439±0.344	0.467±0.0	0.479±0.0	0.445±0.0	0.451±0.0	0.483±0.0
Heart(g)	0.344±0.0	0.350±0.0	0.358±0.0	0.406±0.0	0.365±0.0	0.387±0.0
Adrenal glands(g)	0.019±0.0	0.018±0.0	0.018±0.0	0.019±0.0	0.020±0.0	0.020±0.0
Thymus(g)	0.245±0.0	0.248±0.0	0.248±0.0	0.284±0.0	0.287±0.1	0.263±0.0
Females						
B.W	169.2±12.2	164.2±4.3	175.6±6.1	169.3±14.1	173.4±16.1	163.8±5.2
Liver(g)	3.858±0.7	3.554±0.2	3.666±0.2	3.568±0.2	3.203±0.1	3.374±0.1
Kidney(g)	0.799±0.1	0.832±0.0	0.789±0.1	0.779±0.1	0.759±0.0	0.801±0.1
Spleen(g)	0.200±0.0	0.215±0.0	0.282±0.1	0.228±0.0	0.203±0.0	0.245±0.0
Lung(g)	0.521±0.1	0.487±0.0	0.522±0.0	0.546±0.0	0.483±0.0	0.497±0.0
Heart(g)	0.336±0.0	0.363±0.0	0.340±0.1	0.370±0.1	0.334±0.0	0.351±0.0
Adrenal glands(g)	0.029±0.0	0.028±0.0	0.029±0.0	0.027±0.0	0.026±0.0	0.029±0.0
Thymus(g)	0.266±0.0	0.260±0.0	0.281±0.0	0.269±0.0	0.283±0.1	0.272±0.0

Table 6. Acute toxicity test of GNC011 : Blood analysis I

Parameter	0	0.1	1	10	100	1000
Males						
RBC(M ³ /L)	6.19±0.36	5.80±0.14	5.35±0.12	5.62±0.15	6.00±0.3	5.61±0.14
Hb(g/dL)	13.9±0.3	13.6±0.2	12.4±0.05	13.3±0.2	13.6±0.3	12.8±0.1
Hct(%)	60.6±3.3	58.0±0.7	53.4±1.3	55.1±0.8	59.7±1.9	55.0±1.4
MCV(fL)	98.0±1.7	99.8±1.6	99.9±1.2	98.1±1.5	99.3±2.5	98.0±0.8
MCH(pg)	22.5±1.0	23.5±0.6	26.3±4.6	23.7±0.4	22.7±0.8	22.9±0.7
MCHC(g/dL)	23.0±0.8	23.5±0.5	23.5±0.5	24.2±0.1	22.9±0.4	23.4±0.7
RDW(%)	15.5±0.9	14.4±0.3	15.2±0.4	15.5±0.6	15.5±0.7	15.1±0.2
Females						
RBC(M ³ /L)	5.89±0.32	5.79±0.25	5.56±0.25	5.67±0.07	5.74±0.15	5.80±0.27
Hb(g/dL)	14.3±0.5	13.8±0.3	13.2±0.4	13.6±0.1	13.8±0.2	13.5±0.4
Hct(%)	58.0±3.6	58.6±2.3	55.5±2.5	57.3±1.2	57.7±0.9	57.1±2.2
MCV(fL)	98.4±0.9	101.3±0.5	99.8±0.3	100.9±1.7	100.5±1.4	98.5±0.7
MCH(pg)	24.4±0.4	23.9±0.7	23.8±0.3	23.9±0.5	24.0±0.8	23.3±0.4
MCHC(g/dL)	24.8±0.7	23.6±0.5	23.9±0.4	23.6±0.6	23.9±0.5	23.6±0.2
RDW(%)	13.5±0.1	15.2±0.3	14.2±0.2	14.3±0.3	14.4±0.9	14.2±0.3

Table 7. Acute toxicity test of GNC011 : Blood analysis II

Parameter						
	0	0.1	1	10	100	1000
Males						
PLT(K/uL)	1486±111.8	1382±185.2	1612±175.9	1457±6.3	1312±15.1	1652±104.2
PCT(%)	1.64±0.24	1.58±0.22	2.04±0.50	10.04±0.52	10.01±0.46	11.00±0.85
MPV(fL)	11.05±1.44	11.43±0.12	12.47±1.67	1.46±0.07	1.31±0.06	1.82±0.13
PDW(%)	18.3±0.6	18.7±0.6	18.8±0.7	17.7±0.3	17.6±0.6	17.9±0.2
Females						
PLT(K/uL)	990±57.0	1052±98.6	1109±21.5	1243±112.9	1310±13.8	1398±130.7
PCT(%)	14.25±1.65	1.26±0.23	5.44±5.49	1.67±0.18	1.59±0.08	1.52±0.09
MPV(fL)	1.42±0.24	11.90±1.30	9.82±5.94	13.47±1.33	12.13±0.33	10.93±0.40
PDW(%)	17.3±3.7	18.6±0.6	19.7±0.5	19.0±0.6	18.5±0.3	17.9±0.3

Table 8. Acute toxicity test of GNC011 : Blood analysis III

Parameter	0	0.1	1	10	100	1000
Males						
WBC(K/uL)	10.21±1.64	9.63±5.94	6.62±3.98	3.67±3.01	3.76±3.22	8.48±0.17
NE(K/uL)	1.50±0.14	1.34±0.26	0.82±0.16	0.69±0.05	0.82±0.10	1.02±0.14
LY(K/uL)	8.44±1.61	8.06±5.72	5.63±3.79	2.77±3.02	2.79±3.03	7.26±0.27
MO(K/uL)	0.13±0.04	0.11±0.04	0.09±0.06	0.10±0.05	0.04±0.03	0.09±0.01
EO(K/uL)	0.04±0	0.04±0.01	0.04±0	0.04±0.02	0.03±0.01	0.04±0.02
BA(K/uL)	0.12±0.06	0.11±0.03	0.05±0.04	0.08±0.05	0.07±0.05	0.06±0.04
NE(%)	14.8±1.2	23.0±17.3	26.6±24.3	32.3±16.6	38.2±19.4	12.0±1.7
LY(%)	82.2±2.3	72.9±20.2	69.8±25.6	56.6±23.5	57.5±20.5	85.7±1.9
MO(%)	1.3±0.6	1.8±1.3	1.3±0.3	5.2±4.6	1.2±0.6	1.1±0.1
EO(%)	0.4±0.1	0.6±0.4	1.3±1.2	1.5±0.5	1.1±0.5	0.5±0.2
BA(%)	1.3±0.8	1.8±1.2	1.1±0.5	4.3±4.4	2.1±0.4	0.8±0.4
Females						
WBC(K/uL)	10.55±0.35	8.23±0.26	6.73±4.08	1.41±0.06	5.04±2.59	4.75±4.78
NE(K/uL)	1.11±0.25	0.72±0.9	0.95±0.33	0.69±0.11	0.69±0.08	1.02±0.45
LY(K/uL)	9.04±0.11	7.27±0.25	5.64±3.77	0.59±0.12	4.12±2.52	3.58±4.35
MO(K/uL)	0.15±0.04	0.13±0.04	0.08±0.04	0.06±0.04	0.11±0.03	0.05±0.03
EO(K/uL)	0.14±0.01	0.04±0.01	0.07±0.03	0.04±0	0.04±0.01	0.06±0.02
BA(K/uL)	0.10±0.01	0.07±0.03	0.02±0	0.04±0.03	0.09±0.03	0.06±0.03
NE(%)	10.5±2.1	8.8±0.8	23.8±16.1	48.3±6.3	2.2±16.3	39.1±17.9
LY(%)	85.9±1.6	91.4±5.1	69.7±23.0	42.0±10.0	70.7±21.3	51.9±23.1
MO(%)	1.4±0.5	1.6±0.6	2.9±3.0	4.2±2.3	3.1±2.0	2.7±2.1
EO(%)	1.4±0.1	0.5±0.1	3.0±3.5	2.8±0.3	1.2±0.9	4.0±2.9
BA(%)	0.9±0.1	0.8±0.3	0.7±0.6	2.7±1.8	2.8±2.2	2.3±1.1

Table 9. Acute toxicity test of GNC011 : Blood analysis IV

Parameter						
	0	0.1	1	10	100	1000
Males						
TP(g/dL)	6.4±0.5	5.6±0.5	5.6±0.2	6.4±0.4	5.9±0.2	5.7±0.2
Ab(g/dL)	4.2±0.2	3.7±0.2	3.8±0.1	4.1±0.2	3.9±0.1	3.9±0.1
TB(mg/dL)	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0
Alb.Phs(IU/L)	1421±157.9	1128±122.1	1087±9.0	1087±9.0	1081±111.4	998±116.9
AST(IU/L)	171.3±71.8	150.0±71.3	164.7±48.2	164.7±48.2	136.0±62.1	80.3±5.3
ALT(IU/L)	89.7±39.9	96.3±59.2	77.3±25.7	77.3±25.7	62.3±34.5	41.3±6.2
CK(IU/L)	1570±480.2	1345±168.3	824±725.5	824±725.5	943±493.5	411.0±113.0
LDH(IU/L)	1405±480.2	1433±339.4	1284±395.4	1284±395.4	750±521.6	173±59.6
Creatinine(mg.dL)	0.7±0.0	0.7±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0
BUN(mg/dL)	16.0±1.6	16.7±2.5	16.7±0.9	16.7±0.9	14.0±0.8	13.0±0.8
Females						
TP(g/dL)	6.0±0.3	6.1±0.1	5.8±0.1	6.7±0.3	6.3±0.2	7.0±0.3
Ab(g/dL)	4.0±0.2	4.0±0.0	3.8±0.0	4.4±0.1	4.2±0.1	4.4±0.2
TB(mg/dL)	0.3±0.1	0.2±0.0	0.15±0.05	0.3±0.1	0.4±0.2	0.2±0.0
Alb.Phs(IU/L)	845±239.5	838±131.8	573±17.5	698±118.7	730±146.3	712±139.3
AST(IU/L)	149.5±23.5	102.3±43.3	97.0±3.0	129.0±19.3	104.7±28.6	143.0±24.9
ALT(IU/L)	32.0±3.0	27.3±1.2	22.5±9.5	45.7±9.2	39.3±4.5	34.3±3.9
CK(IU/L)	3219±1058.5	1496±987.4	1735±325.5	1844±625.5	1179±450.6	2459±745.7
LDH(IU/L)	2511±363.5	1129±480.6	2030±377	1919±668.2	1377±966	2323±393.4
Creatinine(mg.dL)	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.7±0.0	0.7±0.1	0.8±0.0
BUN(mg/dL)	18.5±0.5	15.3±1.7	15.5±3.5	17.0±0.8	15.3±1.2	16.3±1.2

8. 시제품생산

실험실규모 추출공정의 생산공정 적용과 농약제제로의 개발을 위한 제제검토를 위하여 pilot scale 규모에서 시생산시험을 실시하였다. 생산시설에의 적용을 위해 추출공정에 적합한 제조지시 및 기록서를 작성하였고 정밀한 측량과 수율을 측정하면서 시생산을 실시하였다. 전체적인 공정은 실험실규모를 Scale up하여 진행하였으며 현장 시설에 적합하도록 적용 규모 및 공정을 다소 변경하였다.

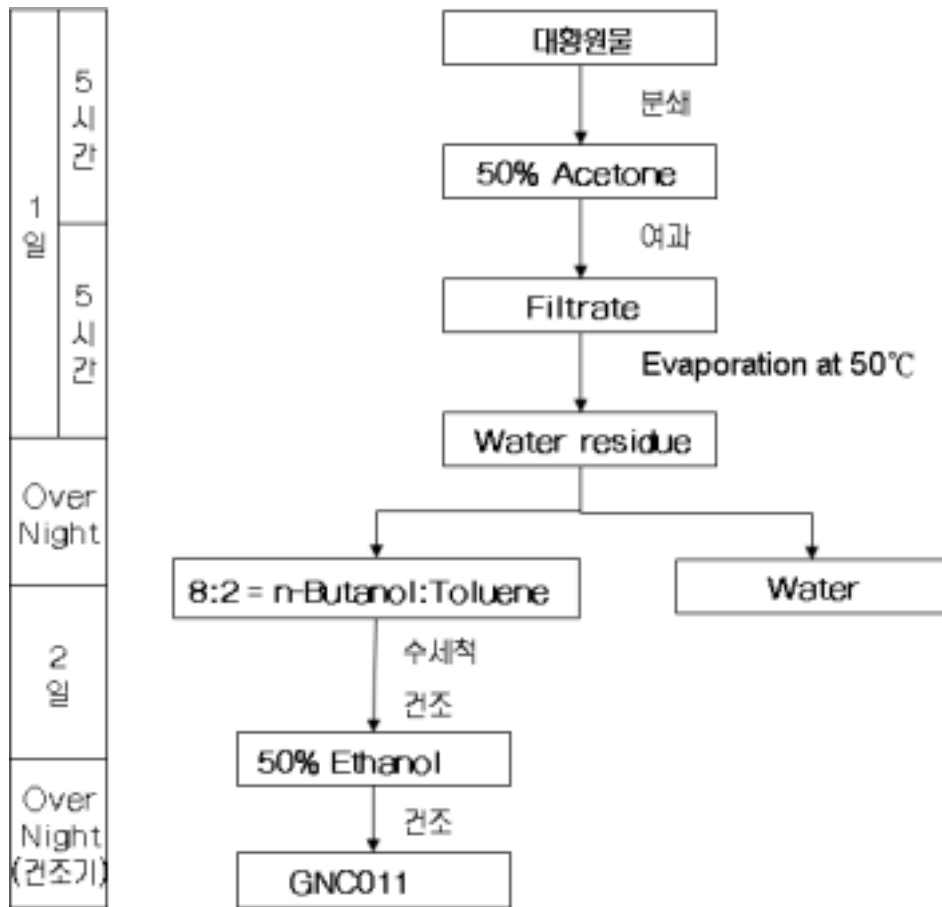


Fig. 28. 시생산 공정도

GENENCELL CO.

Confidential Documents

제정일자 0602 Page 5-1

<u>제조지시 및 기록서</u>									
작성자, 작성일 :					기록서 번호 :				
작업 지시 일 :					제조 관리자 :				
작업 착수 일 : 2006. 02					품질 관리자 :				
작업 완료 일 :									
제 품 명		대황추출물(GNC-011)			제 조 단 위		5 Kg		
제 조 번 호					제 조 년 월 일		2006. 02.		
제 형 및 형 상		황색의 결정성 분말			M.F. No.				
코드 번호	성격 번호	원료명		규격 허가일	기준량	사용량	칭량자	점검자	
		<i>Rheum palmatum</i>			30kg				
		Ethyl Alcohol		JIS K8063	100L				
		Acetone			100L				
		Butanol		KS M1206	80L				
		Toluene		KS M1413	20L				
		T o t a l							
생산부	계	주임	대리.과장	차.부장	품질관리부	계	주임	대리.과장	차.부장

Fig. 29. 시생산공정의 제조지시 및 기록서(계속)

GENENCELL CO.

Confidential Documents

제정일자 0602 Page 5-2

제 품 명	대황추출물(GNC-011)	제조번호		제조단위	5 Kg	
No.	제 조 공 정			작업일시	작업자	점검자
1	* 추출에 사용되는 장치 및 기구류는 깨끗한가 ? * 원료는 정확히 점검 하였는가 ? * 모자, 장갑 등 적합한 복장을 착용하였는가 ?					
2	사용설비 및 기계 - 기구					
	공 정	기계 또는 기구명	성능 또는 규격	제 작 사		
	청 량	전자저울	1kg - 100kg			
	용 해	교반기	4000RPM 70W			
	추 출	추출조 교반기 이송 펌프				
	농 축	Condenser 냉각기 온수탱크 순환펌프 감압펌프 전기히터				
	건 조	건조기 냉각기 전기히터 순환펌프 감압펌프				
3	용해 50% Acetone(100L Acetone : 100L water) Rheum palmatum 30kg을 교반해주며 녹인다. Rheum palmatum 30kg _____ kg EtOH 100L _____ L H ₂ O 100L _____ L 교반시간 60 Min _____ 시 분 - 시 분					

Fig. 29. 시생산공정의 제조지시 및 기록서

9. 제제 검토

GNC-011의 물성을 고려해 감귤을 비롯한 과실류에 도포될 수 있는 제제로의 개발을 위하여 천연물의 용해력을 높이기 위한 Ethanol을 사용하였으며 천연물 농약의 친환경, 무독성을 유지하기 위한 식용 계면활성제를 사용하여 처방을 검토하였다.

처방에 적합한 제제공정검토 과정은 Fig. 30와 같다. 초기 대황추출물을 용해시키기 위하여 4배 볼륨의 Ethanol 25% 수용액으로 용해하였으며 계면활성성분을 성분간 전혼합 후 섞어주고 최종 수용액으로 계면활성제 전혼합용기를 씻어주면서 최종혼합물 10L가 되도록 맞춘다.

Table 10. 대황천연물 농약의 농약제제 처방검토

No.	원료	함량(%)							
		처방1	처방2	처방3	처방4	처방5	처방6	처방7	처방8
1	Ethanol	10	10	10	10	10	10	10	10
2	대황 추출물	10	10	10	10	10	10	10	10
3	Polysorbate 20	5	-	-	-	2	2	2	1
4	Polysorbate 60	-	5	-	-	-	1	-	-
5	polysorbate 80	-	-	5	-	-	-	1	-
6	Hydrgenated Lecithin	-	-	-	5	10	5	5	10
7	정제수	75	75	75	75	68	72	72	69
	pH	6.2	6.5	6.5	6.5	6.5	6.8	6.8	6.8

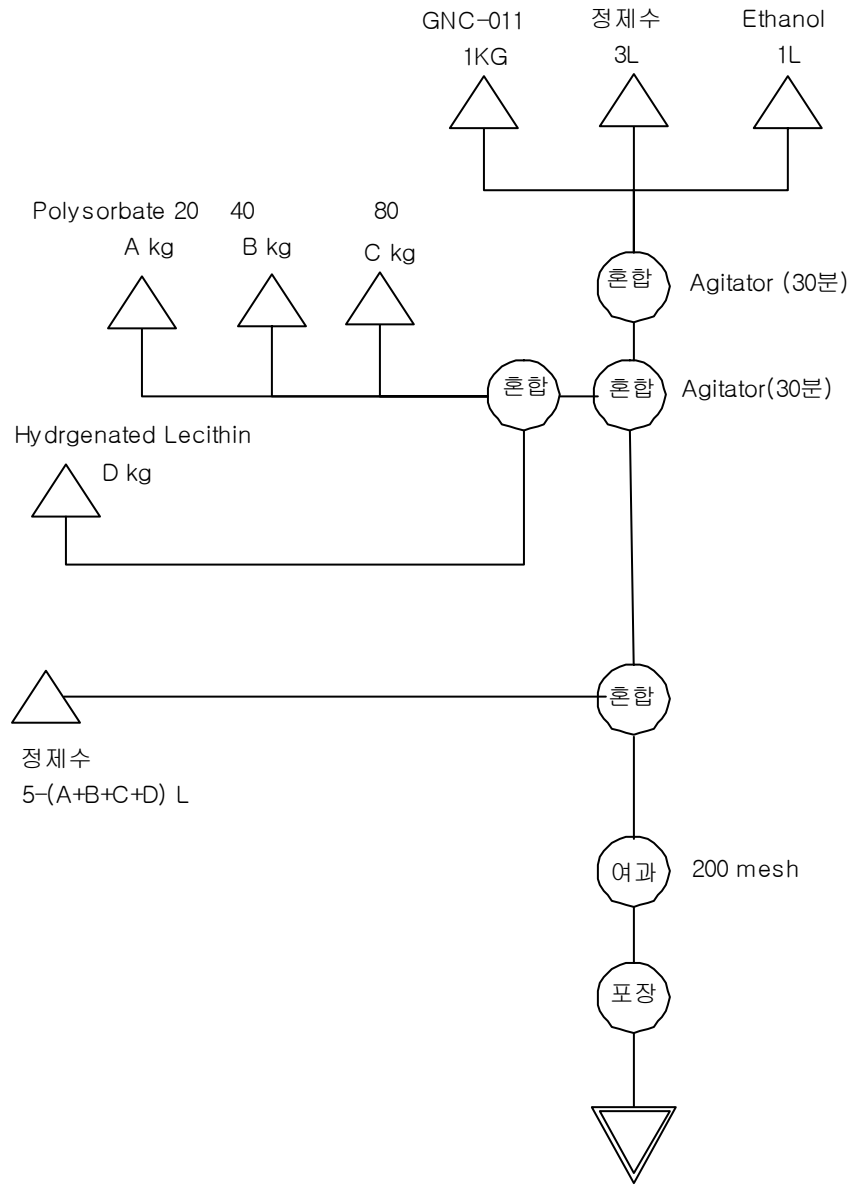


Fig. 30. 체제검토 생산 공정도

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

1. 목표달성도

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발 결과	달성도
대황분획물의 세부분획 및 분리, 정제	<ul style="list-style-type: none"> - 대황추출물의 세부분획 - 세부분획물의 항곰팡이력 측정 - 세부분획물의 감귤썩음병 방제효과 검증 - 물질분리 : TLC, GC-MS를 이용한 물질 분리 및 정제 - 저장환경에서의 항곰팡이력 측정 : 감귤저장고 	<ul style="list-style-type: none"> - 푸른곰팡이 억제력이 우수한 분획물의 획득(MC분획층) - 푸른곰팡이 군사성장 억제 기능의 대황추출물 획득 / 표준화 성공 - 분획물로부터 푸른곰팡이 억제력을 갖는 물질의 분리 및 정제 (3종 분리) - 상기 물질의 항곰팡이력 측정 및 방제 효과 확인 - 추출공정 특허작성 중 	100%
대황추출물 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 대황추출물 분석법 개발연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 대황추출물 분석법개발 	100%
대황추출물 표준추출법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 대황분획물의 분석 - 대황추출물 표준추출공정 연구 : 공정단순화, 공정개선, 유효분획함유 	<ul style="list-style-type: none"> - 표준추출법 개발 완료 	100%
분리물질의 동정 및 환경영향평가	<ul style="list-style-type: none"> - 토양반감기 측정 - 토양미생물에 대한 영향 평가 - 수질잔류량 평가 - 어독성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 환경에 대한 영향평가 	100%
대황추출물 허가	<ul style="list-style-type: none"> - 최종보고서 작성 및 학술지 발표 - 허가자료 작성 	<ul style="list-style-type: none"> - 생산허가 획득 - 최종보고서 작성 	80%
대황추출물 생산	<ul style="list-style-type: none"> - 추출공정 scale up - 공장 OEM 계약 	<ul style="list-style-type: none"> - 생산 	100%

2. 연구개발 실적

1) 특허등록

- 대황추출물 함유 생물농약제제 및 향곰팡이제 (특허 0552997호)

2) 연구 논문발표준비 (국내 1건, 국외 1건)

- 농약과학회지
- Journal of Agricultural and food chemistry

3) 연구홍보활동

- KTV(한국정책방송) 방영 : 녹색한국 선진농업 “농업에 부는 새바람, 바이오 테크놀러지” (2005. 4. 27.)
- 2005 경기과학기술대전 전시 (부스설치)
- 2006 농림기술대전 참가신청



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 0552997 호
(PATENT NUMBER)

출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2004-001053 호
출원일 (FILING DATE(Y/M/D)) 2004년 01월 09일
등록일 (REGISTRATION DATE(Y/M/D)) 2006년 02월 09일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
대황 추출물 함유 생물농약제제 및 항곰팡이제

특허권자 (PATENTEE)
최용표(660515-1*****)
서울특별시 영등포구 양평동6가 100 동얏아파트 102동 907호

발명자 (INVENTOR)
등록사항관에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록
되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2006년 02월 09일



특 허 청
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



제 2 절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

- 1) 천연식물로부터 향곰팡이 등의 농약활성 물질의 분리를 통한 농약개발로 신 물질을 합성하는 합성농약에 비하여 **적은 시설과 인력으로도 신규 농약을 개발**할 수 있으며, 기술적으로도 이미 유효분획물을 통하여 농약활성을 가지므로 **성공 가능성이 매우 높다.**
- 2) 천연식물 유래의 농약활성 물질은 합성농약에 비해 인체 및 동물 등에 대한 독성이 적으므로 **안전한 환경친화적 농약개발**이 가능하다.
- 3) 기초연구를 통하여 효과가 있음을 확인한 후 분리 동정하기 때문에 **분석기술 면에서도 효율성이 높다.**
- 4) 식물유래 향곰팡이 물질의 분리는 농약개발 뿐 만아니라, 식물유래 향균, 향 생제의 **개발기술에 대한 적용성이 크다.**

2. 경제적 측면

- 1) 합성농약의 신규 농약의 개발은 시간 및 비용이 많이 드는 반면, 그 성공가능 성이 매우 희박하다. 또한 현재 국내에서는 외국에서 확인된 원제를 수입하거나, 외국의 특허기간이 만료된 합성원제를 이용하여 농약을 생산하고 있다. 따라서, 합성농약에 비해 국내에 풍부한 천연자원을 이용하여 국내기술로 농약 또는 선도화합물을 개발한다면, **수입대체** 뿐만아니라 **수출**까지 기대할 수 있는 품목이다.
- 2) 현재, 국내 농약기업에서의 농약연구개발비가 거의 없는 실정이다. 1996년 업계 1위의 노바티스사에서 연구개발비로 한해 373백만달러를 사용한 반면에, 국내 동부한농, 동양화학, 경농 등을 통틀어 연구개발비는 전체 매출대비 2-2.5%(약 10백만달러)로 매우 낮은 실정이다.
- 3) 국내외적으로 **합성농약 개발에 비해 시간 및 비용을 크게 절감**할 수 있는 천연물 유래 농약개발에 힘을 쏟고 있으며, 따라서 이와 관련된 **시장은 매우 크게 증가**될 전망이다.

3. 사회적 측면

1) 국내 향후 화학농약 사용의 30% 감소 계획

2) 친환경 농업재배 면적의 확대

3) 잔류농약 문제 : 국내 소비 뿐만 아니라 외국의 수출의 차질

⇒ 친환경 저독성 농약의 개발로 화학농약의 사용을 절감하고, 농약의 잔류성을 해결하여 국민보건 및 국내 생산 농산물의 해외 인지도를 높힐 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 사업화 계획

- 1) 활용분야 : 곰팡이병 방제 농약 또는 선도화합물의 개발
- 2) 주요활용분야 : 감귤썩음병 억제 농약의 개발
- 3) 사업화방향
 - 개발 후 공동개발 : 천연물농약 허가 완료 후 제품발매시점에서 공동개발, 과제에서 획득된 선도화합물 또는 농약의 기술이전 후 선도화합물의 이용한 효력증가, 잔류량 감소, 저독성의 신규물질 공동연구 지속적 실시
 - 기술판매 : 등록특허 실시권 계약, 기술이전후 매출에 대한 로얄티 계약체결

2. 결과물의 적용 확대

- 1) 대항 특이성분에 대한 화장품 원료의 적용
- 2) 대항추출물의 항균력을 이용한 화장품 방부제 원료이용 계약 : 화장품 소재 전문기업 (주)더마랩
- 3) 농약 이외에 기능성을 활용한 다양한 제품에의 확대 적용계획
- 4) 항곰팡이 농약제조방법에 대한 기술이전 및 공동사업화
- 5) 주요성분의 생화학농약의 Lead chemical로 이용
- 6) 타 과실류 및 엽근채류에 대한 적용
- 7) 적용 미생물군 확대 및 병해충에 대한 확대 적용
- 8) 타 천연물예의 기술이용을 통한 신규제품화의 기초자료 이용
- 9) 대항의 표준추출물 획득 및 과정에 대한 작용기전 등의 논문발표

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 과채류의 저장성 향상을 위한 기술개발

식용 및 약용식물로부터 천연항균물질을 추출하여, 이를 제형화하고 최종적으로 포도, 딸기 등의 부패가 잘되는 농산물의 저장 및 유통 중에 이를 분사하여 성공적으로 적용한 사례(대구대학교, 2002)

- ① 강교수는 자체적으로 개발된 천연항균제를 보다 저농도에서 효과적으로 사용할 수 있는 제형화 방법에 대하여 현재 연구 진행중임.
- ② 향나무 잎, 대나무 잎, 소나무 잎 등으로부터 과채류 부패균에 대하여 높은 항균력을 보이는 유효성분을 주성분으로 추출하여 이를 가공하여 적절히 조합 및 제형화함으로써 무공해 천연항균제를 개발.
- ③ 포도(그림 2, 그림 3) 및 딸기(그림 4)에 적용했을 때 이들의 저장성을 2배 이상 연장할 수 있음을 중량감소율, 총균수, 색도, 경도, 관능검사 등을 측정함으로써 확인하였으며, 복숭아, 귤 등 부패가 잘되는 과채류에 대해서 확대적용도 가능할 예정.
- ④ 과채류의 신선도 향상 및 판매시기와 수급량 조절이 가능해짐으로써 농가에 막대한 이익, 수출 상대국의 농약사용 기준을 충족시킬 수 있기 때문에 농산물의 수출에도 기여

2. 딸기 저장병 방제 관련

딸기를 비롯한 블루베리, 포도와 같이 작은 과실에 경제적으로 손실을 가져오는 두가지 곰팡이 병원균의 방제를 위해 천연물에서 추출분리한 물질의 항균제로의 개발되고 있음(미국농업연구청, 2004).

- ① 미국농업연구청(Agricultural Research Service, ARS)에서 고추(Cayenne peppers)유래 항진균 물질 CAY-1에 대한 특허를 획득한바 있으며, 현재 딸기 곰팡이를 대상으로 이물질의 항균능력에 대한 연구를 진행.
- ② ARS Southern Regional Research center의 미생물학자인 Anthony De Lucca는Natural Products Utilization Research Unit의 식물병리학자 David Wedge 및 Small Fruit Research Station의 Barbara Smith와 공동으로 딸기에 질병을 유발시키는 곰팡이에 대한 CAY-1의 효과를 1년에 걸친 실험실 및 식물실험결과를 바탕으로 CAY-1의 시판을 위한 연구를 진행.
- ③ De Lucca는 곰팡이로부터 농작물을 보호할 수 있는 천연 화합물을 탐색하던 중, 5년전 CAY-1 사포닌을 분리.
- ④ 사포닌은 식물체에 널리 발견되는 물질로서 세제의 작용을 가지고 있어 물과 함께 흔들면 거품이 형성됨. 섬유에 침투함으로써 작용을 발휘하는 섬유세제와 같이 고추의 사포닌 역시 세포막에 작은 구멍들을 형성함으로써 곰팡이를 파괴함.
- ⑤ 작은 과실에 경제적으로 손실을 가져오는 Collectotrichum과 Phomopsis에 대해 CAY-1은 낮은 농도에서도 좋은 효과를 나타냄.

제 7 장 참고문헌

1. Huang KC. The pharmacology of Chinses herbs. *Boca Raton*: CRC Press. 1999
2. Locock R. Herbal medicine:Essiac. *Canadian Pharmaceutical Journal* 130;18-19. 1997.
3. Peigen X. Liyi H. Liwei W. Ethnopharmacologic Study of Chineses rhubarb. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984: 10; 275-293
4. Castleman M. The healing Herbs: The Ultimate guide to the curative powers of natural medicine. *Emmaus, PA:Rodale Press*. 305-307. 1991.
5. Peirce A. The American Pharmaceutical Association practical guide to natural medicins. New York; William Morrow and Company. Inc., 1999.
6. Borgia M. Sepe N. Borgia R. Ori-Bellometti M. Pharmacological activity of an herbal extract:controlled clinical study. *Current Therapeutic Research*. 29:525-536. 1981
7. Duke JA. Green Pharmacy. *Emmaus, PA:Rodale Books*. 507. 1997
8. Bissett NG. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. Stuttgart:*Med Pharm CRC Press*. 566. 1994.
9. Seto T. Yasuda I. Hamano T. et al. Determination method of sennoside A, sennosideB, Rhein and Rhein 8-glucoside in Kmpo or crude drug preparations and the comparison of these components ikn processed rhubarb. *Natural*

Medicines. 50:138-144. 1996.

10. Wang X. Lous Z. Mikage M. Namba T. Pharmacognostiical studies on the Chinese crude drug da-huang rhubarb II. Botanical origin of three unofficial da-huang. *Shoyakugaku Zasshi*. 42:302-309. 1988.
11. Lou Z. Wang X. Mikage M. Namba T. Pharmacognostical studies on the chinese crude drug da-huang rhubarb I. Botanical origin of the official da-huang. *Shoyakugaku Zasshi*. 42:291-301. 1988.
12. Zwaving JH. The sennoside content of Rheum palmatum. *Planta Medica*. 21; 254-262. 1972.
13. Bradley PR. British herbal cocmpendium : a handbook of scientific information on widely used plant drugs. published by the British Herbal Medicine Association and produced by its Scientific Committee. *Bournemouth. Dorset: Thee Association*. 1992.
14. Fairbairn JW. The anthraquinone laxatives. Biological assay and its relation to chemical structure[review]. *Pharmacology*. 14:48-61. 1976.
15. Yoneda K. Mayehira Y, Matsumoto Y., Yoshida N., Studies on the resource of crude drugs(XI): The effects of drying and freezing processing on the quality of rhubarb(Rheum palmatum). *Natural Medicines*. 49:6-10. 1995.
16. Murata T., Karasaki S., Shiozuka T., Comparison of the contents of sennosides A, B in fresh and dried rhubarb roots. *Natural Medicine*. 48:82-85. 1994.

17. Harima S., Matsuda H., Kubo M., Study of various rhubarbs regarding the cathartic effect and endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 17;1522-1525. 1994
18. Qing Huang, Han-Ming Shen, Choon-Nam Ong. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kB. *Biochemical Pharmacology*. 68;361-371. 2004.
19. Feng-Tsgh Yeh Chun-Hsiung Wu and Hong, Hong-Zin Lee. Signaling pathway for Aloe-emodin-induced apoptosis in human H460 lung nonsmall carcinoma cell. *Int. J. Cancer*. 106; 26-33. 2003.
20. Rudolf Edenharder, Claudia Speth, Michaela Decker Karl Ludwig Platt. The inhibition by naphthoquinones and anthraquinones of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. *Z Lebensm Forsch A*. 207;464-471. 1998
21. Franklin R. Vargas, Yrene H. Diaz and Karla M. Carbonell. Antioxidant and Scavenging Activity of Emodin, Aloe-emodin, and Rhein on Free-Radical and Reactive Oxygen Species. *Pharmaceutical biology*. 42;342-348. 2004
22. Fridtjof Hallmann. Toxicity of commonly used laxatives. *Med Sci Monit*. 6(3);618-628. 2000.
23. Naoki Mantani, Nobuyasu Sekiya, Shinya Sakai, Toshiaki Kogure, Yataka Shimada, and Katsutoshi Terasawa. Rhubarb Use in Patients Treated with Kampo Medicines - A Risk for Gastric Cancer?. *Yakugasu Zasshi*. 122;403-405. 2002.

24. de Bairacli Levy, Juliette. The Complete Herbal Handbook for Farm and Stable. *Faber and Faber*: Boston. 1988.
25. Beckstrom-Sternberg, Stephen M., James A. Duke, and K.K. Wain. "The Ethnobotany Database." (ACEDB version 4.3 -data version July 1994).
26. Beckstrom-Sternberg, Stephen M., and James A. Duke. "The Phytochemical Database." (ACEDB version 4.3 - data version July 1994).
27. Blackwell, W.H. Poisonous and Medicinal Plants. Prentice Hall: *Englewood Cliffs*, NJ. 1990.
28. Cheeke, P.R. Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants, 2nd ed. *Interstate Pubs. IL*. 1998.
29. De Smet, P.A.G.M., K. Keller, R. Hansel, and R.F. Chandler, eds. Adverse Effects of Herbal Drugs Part 1 and 2. *Springer-Verlag, NY*. 1992.
30. McGuffin M., Hobbs C., Upton R., Goldberg A., American Herbal Products Association's Botanical Safety handbook. *Boca Raton. New York*: CRC press. 231. 1997
31. Hisashi Matsuda, Supinya Tewtrakul, Toshio Morikawa and Masayuki Yoshikawa. Anti-allergic activity of stilbenes from Korean rhubarb(*Rheum undulatum* L.): structure requirements for inhibition of antigen-induced degranulation and their effects on the release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 12;4871-4876. 2004.

32. Sydiskis R. J., Owen D. G., Lohr J. L., Roster K. H., Blomster R. N., Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrobial agent & Chemotherapy*. 35:2463-2466. 1991.
33. May G., Willuhn G., Antiviral activity of aqueous extracts from medicinal plants in tissue cultures. *Arzneim-Forsch*. 28:1-7. 1978.
34. Kurokawa M., Ochiai H., Nagasaka K. Antiviral traditional medicines against Herpes simplex virus(HSV I), poliovirus, and measles viruses in vitro. *Antiviral Res*. 22:175-188. 1993.
35. Wang Z., Wang. G., Xu H., Wang P. Anti-herpes virus action of ethanol-extract from the root and rhizome of rheum officinale Baill. *Chung-Kuo Chung Yao Tsa Chih- China Journal of chinese Materia Medica*. 21:364-366. 1996.
36. Chang R., Yeung H., Inhibition of growth of human immunodeficiency virus in vitro by crude extracts of Chinese medicinale herbs. *Antiviral Res*. 9:163-175. 1988.
37. Cyong J., Matsumoto T., Arakawa K., Kiyohara H., Yamada H., Otsuka Y., Anti-Bacteroids fragilis substance from rhubarb. *Journal of Ethnopharmacology*. 19:279-283. 1987.
38. Lewis W. H., medical botany : plants affecting man's health. New York. Wiley. 1977.
39. Chen C., Chen Q., Biochemical study of Chinese rhubarb XIX. Localization of inhibition of anthraquinone derivatives on the mitochondrial respiratory chain.

- Acta Pharmaceutica Sinica*. 22;12-18. 1987.
40. Chen Q., Han G., Zhuang X., Huang B. Clinical observation on 157 subjects of gonorrhoea treated with rhubarb preparation. *Journal of China Pharmaceutical University*. 22;12-18. 1991.
 41. K. Suresh Babu, P.V. Srinivas, B. Praveen, K. Hara Kishore, U. Suryanarayana Murty, J. Madhusudana Rao. Antimicrobial constituents from rhizomes of *Rheum emodi*. *Phytochemistry*. 62;203-207. 2003
 42. U.L.B. Jayasinghe, S. Puvanendran, N. Hara and Y. Fufimoto. Stibene Derivatives with Antifungal and Radical Scavenging Properties from the Stem Bark of *Arthocarpus nobilis*. *Natural Product Research*. 18;571-574. 2004.
 43. Singh UP, Singh KP, Singh SP, Ram VB. Effect of emodin isolated from *Rhamnus triquetra* on spore germination of some fungi. *Fitopatologia Brasileira*. 17;420-422. 1992.
 44. Ido Izhaki. Emodin - a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New phytologist*. 155;205-217. 2002.
 45. Agarwal, J.S., Rastogi, R.P., Srivastava, O.P., In vitro toxicity of constituents of *Rumex maritimus* Linn. to ring worm fungi. *Current Science*. 45;619-620, 1976.
 46. Fuzellier, M.C., Morter, F., Lectard, P. Antifungal activity of *Cassia alata* L. *Annals of Pharmacology, France*. 40;357-363. 1982.
 47. Inamor, Y., Kato, Y., Kubo, M., Kamiki, T., Takemoto, T., Nomoto, K.

- Studies on metabolites produced by *Aspergillus terreus* var. *aureus*. I. Chemical structures and antimicrobial activities of metabolites isolated from culture broth. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*. 31;4543-4548. 1983.
48. Cyong, J.C., Matsumoto, T., Arakawa, K., Kiyohara, H., Yamada, H., Otsuka, Y. Antibacteriosides Fragilus substance from rhubarb. *Journal of Ethnopharmacology*. 19;279-283. 1987.
49. Harvey, H.E., Morter, F., Lectard, P. Antifungal and other compounds isolated from the roots of New Zealand flax plants(The genus *Phormium*). *Journal of Natural Products*. 50;767-776. 1987.
50. Brown, G.E. and J.W. Eckert. *Penicillium* Decays. In Compendium of Citrus Diseases 2nd. L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and J.H. Graham, eds. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, Mn. pp.41-42. 2000.
51. Eckert, J.W., J.R. Sievert and M. Ratnayake. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packkinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis*. 78;971-974. 1994.
52. Schirra, M., G. D. Hallewin and S. D. Aquino. Effectiveness of Imazalil and Guazatine Fungicides in Postharvest Decay Control of 'Tarocco' Oranges. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. pp1060-1063. 1992.
53. Smilanick, J. L., I. F. Michael, M. F. Mansour, B. E. Mackey, D.A. Margosan, D. Flores and C.F. Weist. Improved control of green mold of citrus with imazalil in warm water compared with its use in wax. *Plant Dis*. 81;1299-1304. 1997.

54. Smilanick, J. L., D. A. Margosan and D. J. Henson. Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. *Plant Dis.* 79:742-747. 1995.
55. Sholberg, P.L. Fumigation of fruit with short-chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay. *Plant Dis.* 82:689-693. 1998.
56. Smilanick, J.L., B.E., Mackey, R. Reese, J. Usall and D.A. Margosan. Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. *Plant Dis.* 81:379-382. 1997.
57. Droby, S., L. Cohen, A. Daus, b. Weiss, B. Horev, E. Chalutz, H. Katz, M. Karen-Tzur and A. Shachnai. Commercial Testing of Aspire: A Yeast Preparation for Biological Control of Postharvest Decay of Citrus. *Biological Control.* 12:97-101. 1998.
58. El-Ghaouth, A. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 19:160-162. 1997.
59. Arras, G. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology.* 8:191-198
60. Huang, Y., B. J. Deverall and S. C. Morris. Postharvest control of green mould on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology.* 5:129-137. 1995.

61. Smilanick, J. L. and R. Denis-Arrue. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Dis.* 76:481-485. 1992.
62. 남기웅, 권혁모, 송남현. 온주밀저장에 관한 연구 : I. Thiophanate-methyl 처리 및 물리적 상처가 저장력에 미치는 영향. *한국원예학회지.* 34:279-284. 1993.
63. 현재욱, 김동환, 권혁모, 김한용. 부패 감귤에서 분리한 *Penicillium* spp. 들의 RARD에 의한 종내, 종간, 유전적 분석과 농약저항성과의 관계. pp196-197. In Proceeding of International Symposium on Recent Teechnology of Chemical Control of Plant Diseases. *The Korean Society of Plant Pathology*, Korea.
64. Briggs, G. G., M. Elliotte and N. F. Janes. Pesticide chemistry Pergamon press. *International Union of Pure and Applied Chemistry.* 157-164. 1983.
65. Elliott, M. Synthetic pyrethroids. *American chemical Society. Washington D.C.* 1-28. 1977.
66. Huff, R.K. The synthesis of 3-(2,2-dichloro vinyl)-1-methyl-cyclopropane-1,2-dicarboxylic acid. *Pestic. Sci.* 11:290-293. 1980.
67. Martin, P., H. Greuter and D. Bellus. A stereoselective versatile synthensis of 3-(2,2-dimethyl)-2,2-dimethylcyclo-propacecarbocylic acids. *Pestic. Sci.* 11:141-147. 1980.
68. Okada, K., F. kiyoks, E. nakanishi, M. Hirano, L. Ohno and N. Matsuo. Synthesis of some novel carboxylic acids and insecticidal activity of their esters. *Agric. Biol. Chem.* 44(11);2595-2599. 1980.
69. Amonker, S.V. and A. banergi. Isolation and characterization of larvicidal

- principle of garlic. *Science*. 174;1343-1344. 1971.
70. Gilliver, K. The effect of plant extracts on the germination of the conidia of *Venturia inaequalis*. *Ann Appl. Biol.* 34;136-143. 1947.
71. Hubbbes, M. 1962. Inhibition of *Hypoxylon pruinaum* by pyrocatochol isolated from bark of aspen. *Science*. 136; 156. 1962.
72. Johnson. D. A. and Clark, L. E. Effect of guar and gauur extraction common root rot of winter wheat and spore germination of *Bipolaris dorokiniata*. *Plant Dis. Rep.* 63(10);811-815.
73. 백수봉, 토양중의 *Phytophthora* spp. 방제를 위한 길항식물의 탐색, *한국균학회지*. 17(1);39-47. 1990.
74. 백수봉. 채소류 잿빛곰팡이병 방제를 위한 길항식물의 탐색과 활용기술개발(I). *농사시협연구논문집(농업산학협동)*. 32;205-210. 1989.
75. 백수봉. 채소류 잿빛곰팡이병 방제를 위한 길항식물의 탐색과 활용기술 개발(II). *농사시협연구논문집(농업산학협동)*. 33;129-134. 1990.
76. 백수봉, 오연선. 토양 병원균 *Phythium ultimum* 방제를 위한 항균성 약용 식물의 탐색. *한국균학회지*. 18(2);102-108.
77. Smale, B.C., R.A. Wilson and H.L. Keil. Asurvey of green plants for antimicrobial substances. *Abstr. Phytopathology*. 54;748. 1964.
78. Lichtenstein, E.P., F.M. Strong and D.G. Morgan. 1962. Identification of 2-phenylenthylisothiocyanate as an insecticide occurring naturally in the

- edible part of turnips. *J. Agric. Food Chem.* 10(1):30-33. 1962.
79. Franz Hadacek and Harald Greger. Testing of Antifungal Natural Products : Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. *Phytochemical analysis.* 11;137-147. 2000
80. Yuan X. Gong, Shao P. Li, Yi T. Wang, Peng Li, Feng A. Yang. Simultaneous determination of anthraquinones in Rhubarb by pressurized liquid extraction and capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 26; 1778-1782, 2005.
81. Mohamed I. A. Ali, Nagwa M. M. Shalaby, Mohamed H. A. Elgamal and Ahmed S. M. Mousa. Antifungal Effects of Different Plant Extracts and their Major components Selected Aloe Species. *Phytotherapy research.* 13; 401-407, 1999.
82. Shang Xiaoyu, Yuan Zhuobin. Active components in Rhubarb by Cyclodextrin-modified Capillary Zone Electrophoresis. *Sensors.* 1; 229-235, 2001.
83. M. Farzami Sepehr, M. Ghorbanli. Effects of nutritional factors on the foramation of Antraquinones in callus cultures of Rheum ribes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 68; 171-175, 2002.
84. Osamu Morinaga, Saiko Nakajima, Hiroyuki Tanaka and Yukihiro Shoyama. Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA. *The Analyst.* 126;

- 1372-1376, 2001.
85. L.R. Salgueiro, E. Pinto, M. J. Gongcalves, C. Pina-Vaz, C. Cavaleiro, A. G. Rodrigues, A. Palmeira, C. Tavares, S. Costa-de-Oliveira, J. Martinez-de-Oliveira. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymbra capitata*, *Letter Planta Med.* 70; 572-575, 2004.
86. Henning J. gensen, Astrid M Keberg, Kristian B. R. Korgh, Lisbeth Olsson. Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monosaccharides. *Journal of biotechnology*, 109; 295-299, 2004.
87. Ann E Hagerman. Tannin Chemistry, 1998~2002.
88. Kathi J. Kemper. Rhubarb root(*Rheum officinale* or *R. palmatum*). *The Longwood Herbal Task Force and The Center for holistic pediatric Educatio and Research Report*, Revised September, 1999.
89. L. E. Sayre. A Briff Study oof the Rhubarbs and a Probable Adulterant. *American Journal of Pharmacy.* 70
90. Mohamed I. A. Ali, Nagawa M. M. Shalaby, Mohamed H. A. Elgamal and Ahmed S. M. Mousa. Antifungal Effects of Different Plant Extracts and their Major Components of Selected Aloe Species. *Phytherapy Res.* 13;401-407. 1999
91. One-Kyun Choi, Yongseong Kim, Gyu-Seong Cho and Chang-Keun Sung. Screening for Antimicrobial Activity from *Korean Plants*. *Korean J. Food & Nutr.* 15(4);300-306. 2002.

92. Yang Zai-Chang, Wang Bo-Chu, Yang Xiao-Sheng, Wang Qiang, Ran Liang. The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*. 41;79-81. 2005.
93. Xia Zhou, Baoan Song, Linhong Jin, Deyu Hu, Chunling Diao, Guangfang Xu, Zihui Zou and Song Yang. Isolation and inhibitory activity against ERK Phosphorylation of hydroxyanthraquinones from rhubarb. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Article in press. 2005.
94. Kyu-Ho Bang, Dong-Won Lee, Hee-Moon Park, and Young-Ha Rhee. Inhibition of Fungal Cell Wall Synthesizing Enzymes by *trans*-Cinnamaldehyde. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 64(5);1061-1063. 2000.
95. Subash C. Verma, Narendra P. Singh, Arun K. Sinha. Determination and locational variations in the rhizomes of *Rheum emodi* using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1097;59-65. 2005.
96. Mingyu Ding, Shuaiwu Ma, and Delin Liu. Simultaneous Determination of Hydroxyanthraquinones in Rhubarb and Experimental Animal Bodies by High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Sciences*. 19;1163-1165. 2003.
97. Ji Song-gang, Chai Yi-feng, Wu Yu-tian, YinSeparation and Determination of Anthraquinone Derivatives in Rhubarb and its Preparations by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Biomedical Chromatography*. 12;335-337. 1998
98. Ming-Ren S. Fuh and Hung-Jian Lin. Analysis of Rhubarb by Liquid

- Chromatography-Electrospray-Mass Spectrometry. *Tamkang Journal of Science and Engineering*. 6(1);31-36. 2003.
99. Gloria D. Jahnke, Catheine J. Price, Melissa C. Marr, Christina B. Myers and Julia D. George. Development Toxicity Evaluation of Emodin in Rats and Mice. *Birth Defects Research (Part B)*. 71:89-101. 2004.
100. Hai-Xia Zhang, Man Cang Liu. Separation procedures for the Pharmacologically active components of rhubarb. *Journal of Chromatography B*. 812:175-181. 2004.
101. Joseph L. Smilanick. New Methods to Control Postharvest Decay of Citrus. *Citrus Research Board*. 2004 Annual Report.
102. Mee-Kyoung Lim, Meera Kim. Antimicrobial Activity of Methanol Extract from *Rheum tanguticum* against Food Hazardous Microorganism and the Composition of Extract. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 19(4);470-476. 2003.
103. 오성준, 백남인, 김해영. 대황(*Rheum undulatum* L.) 뿌리의 항산화 활성물질, Piceatanol. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 44(3);208-210. 2001.
104. Pilar Plaza, Josep Usall, Rosario Torres, Maribel Abadias, Joseph L Smilanick and Immaculada Vinas. The use of sodium carbonate to improve curing treatments against green and blue moulds on citrus fruits. *Pest Management Science*. 60:815-821. 2004.
105. 현재욱, 이성찬, 임양빈, 김동환, 고상욱, 김광식. 저장감귤의 부패에 관여하는 *Penicillium* spp.에 대한 Iminoctadine tris(albesilate) 와 Kresoxym-methyl의 방

- 제효과. *The Korean Journal of Pesticide Science*. 5(2):37-44. 2001.
106. Lluís Palou, Josep Usall, Joseph L Smilanick, Maria-Jose Aguilar and Iammaculada Vinas. Evaluation of food additives and low toxicity compounds as alternative chemicals for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit. *Pest Management Science*. 58:459-466. 2002.
107. Woo Po Park. Change in quality characteristics of Fresh Vegetables treated with Korean Medical Herb Extracts. *Gene and Protein*. 3(1):121-127. 1999.
108. Hong Kyoon No, Shin Ho Lee, Na Young Park, and Samuel P. Meyers. Comparison of Physicochemical, Binding, and Antibacterial Properties of Chitosans Prepared without and with Deproteinization Process. *J. Agric. Food Chem.* 51:7659-7663. 2003.
109. Nicoletta Belletti, Maurice Ndagijimana, Claudio Sisto, Maria E. Guerzoni, Rosalba Lanciotti, and Fausto Gardini. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 52:6932-6938. 2004.
110. Sun-Kyung Chung and Sung-Hwan Cho. Effect of Antimicrobial Packaging System on the Freshness-preserving of Zucchini. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 8(3):274-278. 2001.
111. Sun-Kyung Chung, Suk-Ji Lee, Yun-Jung Chung, Woo-Po Park, Dong-Sun Lee, Sung-Hwan Cho. Antimicrobial Activities of Korean Medicinal Herb Extracts for Preserving Greenhouse Fresh Produce. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 5(1):13-21.

112. Sun-Kyung Chung and Sung-Hwan Cho. Effect of Antimicrobial Packaging System on the Freshness-preserving of Zucchini. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 8(3);274-278. 2001.
113. Su-Bong Paik, Suk-Hun Kyung, Jong-Jin Kim and Yeon-Sun Oh. Effect of a Bioactive Substance Extracted from *Rheum undulatum* on Control of Cucumber Powery Mildew. *Korean J. Plant Pathol.* 12(1);85-90. 1996.
114. Woo-Po Park and Sung-Hwan Cho. Treatment of Korean Medical Herb Extracts Affects the Quality Characteristics of Vegetables. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 6(5);276-280. 1999.