

116094-
03-1-SB
010

보안 과제(O), 일반 과제() / 공개(O), 비공개() 발간등록번호()

발간등록번호
11-1543000-002592-01

꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술 최종보고서

2019. 02. 14.

주관연구기관 / 주식회사 진트론바이오텍
참여기관 / 경희대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부

꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술

최종보고서

2018

농 립 식 품 기 술 평 가 원

농 립 축 산 식 품 부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술”(개발기간 : 2016.09.05 ~ 2018.12.31)
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 14.

주관연구기관명 : 주식회사 한비 (대표자) 박 주 현

참여기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 이 범 석



주관연구책임자 : 주식회사 한비

참여기관책임자 : 경희대학교 산학협력단

국기연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

과제고유번호	116094-03-1 -SB010	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.09.05 ~2018.12.31	단 계 구 분	3차년도/ 3차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명				
	세부 과제명	꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술			
연구책임자	박 주 현	해당단계 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 6 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 700,000 천원 민간: 233,334 천원 계 : 933,334 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 6 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 700,000 천원 민간: 233,334 천원 계 : 933,334 천원
연구기관명 및 소속부서명	주식회사 진트론바이오텍			참여기업명 경희대학교 산학협력단	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

<국문요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 항(진)균제의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 신규 항진균제의 개발 - 신규 항균제의 개발 ○ 항(진)균제의 기전 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 신규 물질의 작용 기전 규명 - 기존 물질의 내성 기전 및 작용 기전 연구 ○ 신규 물질의 생산 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 유효 물질의 순수 추출 (sampling) - 유효 물질을 함유한 순수 물질 추출 전 단계에 대한 연구 ○ 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포 주 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 곰팡이 감염 단백질 분리 및 발현을 통해 감염 기전 연구 - 감염에 관여 하는 단백질의 발현으로 높은 감염 율을 가진 세포 주 제작 - 세포 주를 이용한 신규 감염 억제 또는 성장 억제제 발굴 ○ 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - 면역 관여 기전 연구 - 장내 미생물 연구 - 신규 면역 강화 물질 발굴 ○ 꿀벌에 대한 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 항(진)균 물질 <i>in vitro</i> 테스트 방법 표준화 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 항(진)균제 ○ 꿀벌 감염균 실험을 위한 세포주 개발 ○ 노제마 감염 저해제 ○ 꿀벌 면역 강화 물질 ○ SCI 2편 와 비 SCI급 논문 2편 발표 ○ 교육인력 양성 2 ○ 특허 3개 등록과 기술 이전 1건 ○ 시작품 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 꿀벌 산업에 기여 ○ 신규 항(진)균제 발굴 및 산업화 ○ 사료 등의 원료 개발 및 사업화 적용 기술 확대 ○ 항(진)균제의 기전 확인으로 사업화 및 수출에 대비 할 수 있음 ○ 실험 방법 표준화 ○ 꿀벌 전염성 질병 중 박테리아와 곰팡이에 대한 전문 연구 가능 ○ 꿀벌 연구를 수행 할 수 있는 전문 연구원의 발굴 ○ 꿀벌 질병 방제 기술을 확립한 실험실 구축 가능 ○ 향후 항-바이러스제 등의 연구 기술 확립 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>꿀벌</p>	<p>곰팡이</p>	<p>박테리아</p>	<p>항(진)균</p>	<p>노제마</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Honey Bee</p>	<p>Fungi</p>	<p>Bacteria</p>	<p>anti-microbial agents</p>	<p>Nosema</p>

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구수행 내용 및 결과
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도
4. 연구결과의 활용 계획 등
붙임. 참고 문헌

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

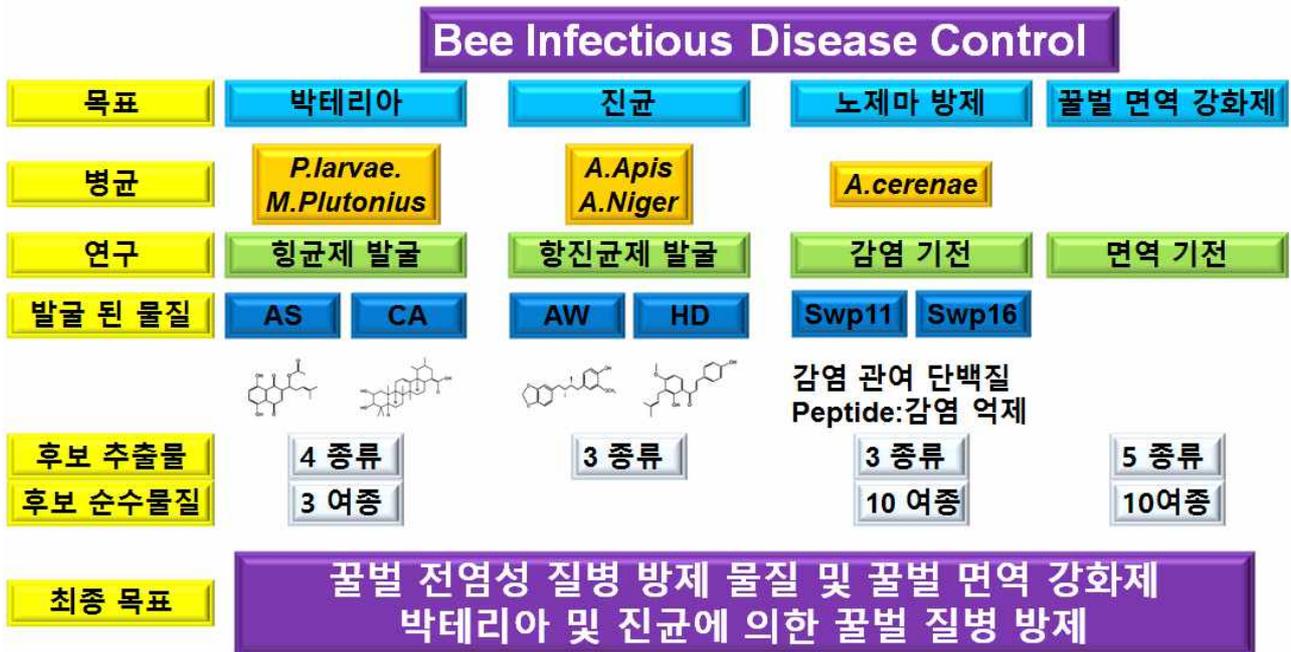
<별첨 3> 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 필요성

○ 연구개발 대상의 기본 개념도

<연구의 기본 개념도>



- 꿀벌 전염성 질병 방제를 위하여 본 과제에서의 목표는 네가지 큰 목표를 가지고 있음.
- 항균제는 이미 기존의 과제에 의해 2가지를 발굴 하였으며, 효과가 더 좋으면서 특허를 보호하기 위해 합성 화합물을 포함하여 더 많은 물질을 대상으로 발굴 예정. 또한 순수 물질의 경우 추출에 비용이 많이 들어가기 때문에 순수 물질이 아닌 crude extract를 가지고 후보 추출물에 대하여 연구 진행 중.
- 항진균제는 이미 2종류를 확보 하였으며, 항균제와 같은 이유로 더 많은 종류를 대상으로 수행 예정. 그리고 crude extract를 가지고 후보 추출물에 대하여 연구 진행 중.
- 노제마의 경우 감염에 대한 연구를 수행할 수 있는 세포주가 없어 실험실 수준의 연구가 매우 힘들기 때문에, 감염에 관여하는 단백질을 발굴하고 있으며 이를 이용하여 감염을 조절할 수 있는 항체를 제작 할 예정. 이를 이용하여 노제마의 감염 또는 성장을 저해하는 물질 발굴 예정.
- 꿀벌 면역 강화제가 몇몇 알려져 있으나, 그에 대한 실험실 수준의 기준들이 알려져 있지 않음. 또한 장내 미생물들에 대한 연구가 전혀 이루어지지 않아 면역에 따른 변화가 알려져 있지 않음. 이는 대부분의 전염성 질병이 장에서 이루어지기 때문에 이를 수행 하여 면역과의 관계뿐만 아니라 이들 면역에 좋은 미생물을 이용한 연구가 가능 하도록 하며 본 과제에서 적용하여 면역 강화제를 발굴 할 예정.

○ 연구개발 대상의 ‘용도’ 및 ‘적용 분야’

- 현재 꿀벌 전염성 박테리아에 대한 항균제는 알려져 있으나, 내성과 꿀벌 제품에 존재 할 가능성에 대한 문제로 새로운 물질에 대한 연구가 진행 되고 있으며, 따라서 신규 항균제로서 사용 가능함.

- 꿀벌 전염성 곰팡이에 대한 항진균제는 없으며, 따라서 본 과제에서 발굴된 항진균제는 사용이 가능한 유일한 항 진균제가 될 것임.

- 노제마에 대한 약으로는 fumagilline이 알려져 있으나, A.cerenae의 성장을 저해하지는 못하는 것으로 알려져 있으며 감염에 대한 연구는 전혀 없음. 따라서 본 과제에서 발굴된 전염에 관여하는 단백질 발굴은 유일한 보고가 될 것이며, 이를 이용한 감염 억제는 유일한 감염 억제 시도가 될 것임. 또한 이 세포주를 이용한 항 노제마 물질은 fumagilline이외에 유일한 노제마 성장 조절 물질이 될 것임. 또한 항 후 비슷한 연구에 대한 기술을 유일하게 보유한 실험실이 될 것임.

- 꿀벌의 면역에 대한 개념은 아직 없으므로 이에 대한 선도 연구가 가능하며, 이를 이용한 실험실 수준의 연구가 없으므로 이를 바탕으로 항 후 꿀벌 면역 연구가 가능 하고 항 후 면역 관련 연구의 유일한 기준이 될 것임. 또한 이를 활용한 면역 강화제 연구는 유일하게 기초 연구 결과를 가진 물질로 기존에 알려져 있는 것 보다 학문적 바탕을 둔 물질이 될 것임. 또한 기존에 알려져 있는 물질에 대한 기초 연구도 가능 하게 될 것임. 또한 지금까지 전혀 알려져 있지 않은 국내 토종벌에 대한 장내 미생물 연구로 항 후 국내 꿀벌 면역과 이를 강화 시킬 수 있는 물질 개발을 할 수 있음.

○ 연구 개발 내용 및 개념

- 꿀벌은 꿀, 프로폴리스 등의 직접적 산물뿐만 아니라 농업, 식물의 다양성 등에 기여하는 정도가 대단히 많은 곤충으로, 사람의 생활에도 밀접히 연관되어 있음.

- 꿀벌의 감소는 전 세계에서 보고되어 지고 있으며, 이에 대응하기 위해 선진국에서는 다양한 정책을 펼치고 있음.

- 본 연구 과제에서는 꿀벌의 전염성 질병 중 박테리아와 곰팡이 균에 대한 항(진)균제의 개발 및 이의 응용을 위한 기전 발굴 및 생산 기술의 확립 방안과 실험실 수준의 연구가 가능 하고 새로운 타겟 발굴을 위해 감염을 일으킬 경우 감염 균에 의해 이용되는 단백질과 이의 결합 단백질을 발굴하여 실험실 수준의 연구가 가능하도록 하는 것과 이의 적용 기술을 표준화 하는 것임

- 이를 위하여 6가지 목표를 가지고 꿀벌에 사용 가능한 신규 꿀벌 전염성 질병 방제 기술을 확보 하는 것임.

1) 꿀벌 전염성 질병을 일으키는 균에 대한 신규 항(진)균제 개발

- 현재 사용 되어지는 꿀벌 전염성 질병을 일으키는 항진균제는 없으며, 항균제의 경우 사용에 제한이 되고 있음.

- 또한 노제마의 성장을 저해하는 물질은 유럽에서 사용 금지 되어 있음. 따라서 사용 가능

1) 꿀벌 전염성 질병을 일으키는 균에 대한 항(진)균제 발굴

2) 항(진)균제의 작용 기전 및 기존 물질의 내성 기전 확인

3) 신규 물질의 생산 기술 확립

4) 감염 연구에 필요한 세포 주 개발 및 신규 타깃 발굴

5) 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴

6) 꿀벌에 대한 적용 기술 표준화 및 실험에 적용

꿀벌에 사용 가능한 항(진)균 물질 개발 및 기전 발굴과 실험 표준화

한 신규 항(진)균제 개발이 필요.

2) 항(진)균제의 기전 확인

- 작용 기전을 확립하여, 사업화시의 규제에 대응하고 수출 시에 보조 자료로 필요.
- 기존 물질의 내성이 일어나는 기전을 확인 하여 이를 신규 타깃으로 할 수 있는지, 또는 신규 물질이 내성 발생 가능성 확인이 필요.

3) 신규 항(진)균제의 생산 기술 개발

- 신규 물질이 천연물 유래이므로, 아직 합성 기술이 부족 함. 따라서 비용이 비싸게 됨으로 사업화시에 경쟁력이 약함. 따라서 대량 추출 기술 또는 유효 성분을 함유한 추출물 수준, 합성 등 방법으로 생산 단가의 절감 연구 필요.

4) 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포 주 확립 및 신규 타깃 발굴

- 실험실 수준의 연구가 가능한 모델 세포 주 개발; 미국과 국내에서 노제마 등의 감염을 위한 세포 주 개발을 시도 하였으나, 현재 사용 가능한 세포 주는 없음. 하지만 이는 반드시 필요하며 따라서 본 과제에서는 꿀벌 전염 균이 전염 시에 관여하는 단백질을 발굴하여 이를 기존에 안정화 되어 있는 곤충 세포에 발현 시켜 전염성을 증가 시키는 방법으로 세포 주를 제작하여 실험실 수준에서 사용 가능한 세포 주를 구축 하는 것이 필요.
- 새로운 타깃 및 작용물질 발굴; 실험실 수준의 연구가 가능한 세포 주를 완성하게 되면, 전염에 관여하는 단백질을 확인 할 수 있으며 이 단백질에 대한 항체를 이용한 감염 을 저하를 유도 할 수 있음. 이를 활용한 신규 물질 제작이 가능함. 이는 동물에 감염을 일으키는 미생물에서는 연구 되어 지고 있으나, 아직 꿀벌에서는 전혀 연구가 되어 지고 있지 않

아 빨리 연구가 필요.

5) 꿀벌 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴

- 현재 몇몇 연구자에 의해 꿀벌 면역 증강제가 개발 연구 되어 있으나, 실험실 수준에서 면역이 강화 되었다는 지표가 없음. 또한 장내 미생물과 면역에 대한 상관관계가 많이 알려져 있음에도 이에 대한 연구가 거의 없음. 이에 대한 연구는 외국에서 몇몇 보고가 있었으나 체계적인 연구는 없음. 따라서 면역 강화제의 기준이 되는 연구가 필요하며 또한 장내 미생물 그리고 봉군에 대한 상존 미생물에 대한 연구가 미리 필요.

6) 꿀벌에 대한 적용 기술 표준화 및 실험에 적용

- 전 세계적으로 꿀벌을 가지고 하는 실험에 대한 표준화가 되어 있지 않아 결과에 대한 신빙성에 많은 문제가 있음. 그 결과 질병 감염 군에 대한 위험도 또한 다양한 의견이 있음. 따라서 실험실 수준의 연구부터 표준화가 필요하고 이를 직접 적용해 보는 것이 필요.

○ 핵심기술

- 항(진)균 실험 : 아직 꿀벌 대상 균주에 대한 실험법이 표준화 되어 있지 않을 뿐만 아니라 공인 된 시험 기관이 없음. 하지만 본 연구실은 기존에 많은 미생물 균주에 대한 연구를 수행 한 경험이 있어 Broth microdilution assay 등의 방법을 통한 연구를 수행 한 경험이 많이 있기 때문에 이를 기반으로 표준화를 수행 할 수 있으며, 더 나아가 공인 된 미생물 연구소를 건립할 수 있는 기반 구축을 할 수 있음.
- 단백질간의 결합을 확인하기 위한 방법으로 Yeast-2-hybrid 뿐만 아니라 IP 기술을 가지고 있으며 또한 효모뿐만 아니라 곤충 세포에도 원하는 단백질을 발현 시킬 수 있는 방법을 가지고 있음.
- 물질 추출능력은 아직 많은 경험이 있지는 않지만, 위탁 연구를 담당하는 경희대학교의 책임 교수는 천연물 소재 표준화 사업을 수행 하고 있으며, 이를 통하여 다양한 물질의 추출에 대한 경험이 있음. 또한 (주)한비의 경우 화분을 이용한 면역 강화제를 판매하며 이를 정제 하여 판매 한 경험이 있어 본 과제를 수행 하는데 필요한 기술은 보유하고 있음.
- 양봉을 직접 수행 하지는 않지만, 국내 양봉 연구를 수행 하고 있는 2개의 큰 실험실과 교류를 하며 꿀벌과 필요한 미생물을 공급 받은 경험이 있음. 또한 제천에 토종벌을 사육하는 양봉업자와 교류를 하며 필요한 벌을 공급 받은 경험이 있어 본 과제를 수행함에 있어 필요한 꿀벌의 공급에는 문제가 없음. 향후 양봉장을 직접 운영하여 필요한 벌들을 직접 공급할 계획을 가지고 있음.

1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술현황

○ 꿀벌 전염성 질병을 일으키는 균에 대한 신규 항(진)균제 개발

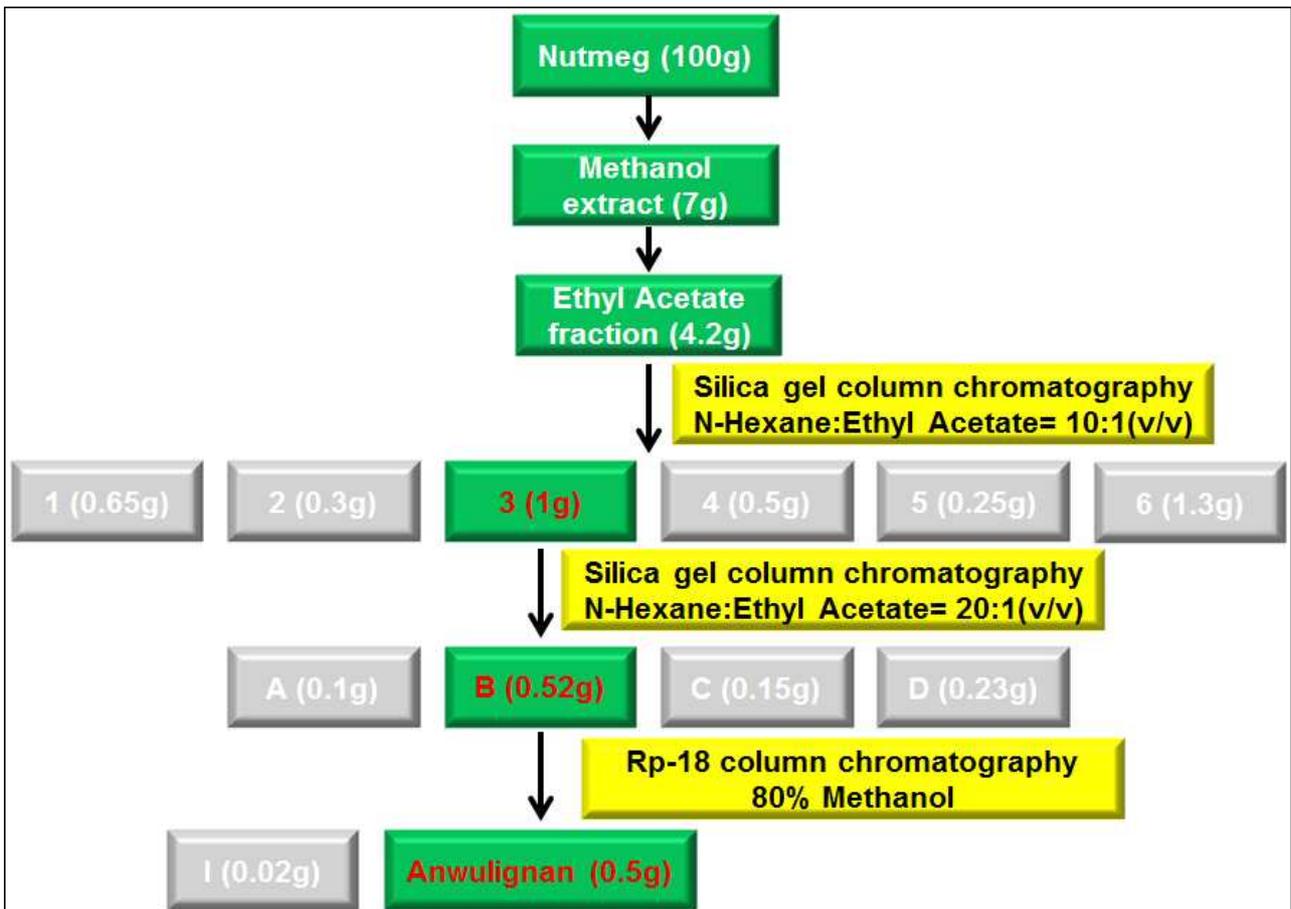
- 기존의 항(진)균제의 개발은 주로 사람에 감염을 일으키는 전염성 균주에 대한 연구에 집중 되어 있음.
- 몇몇 연구실에서 무해한 박테리아에 의해 발현 되는 물질을 대상으로 감염균주 성장 억제제 개발을 하고 있는 것으로 알려져 있으나, 아직 성공 사례는 없음
- 꿀벌 감염 균주 중 유럽 부저병 치료와 백목병에 대한 천연물질을 이용한 연구는 본 연구실에서 개발한 anwulignan 과 corosolic acid가 유일함.
- 꿀벌 면역 증가제가 (주)한비에서 판매 되고 있지만, 이를 항(진)균제와 같이 혼합 사용하려는 시도는 없었음.

○ 항(진)균제의 작용 기전 확립

- 꿀벌 전염성 질병을 일으키는 감염균주에 대한 항(진)균제가 없어 현재 이에 대한 연구는 없음.
- 항진균 타겟으로서 가능한 pathway 발굴을 위해 효모를 이용하여 HOG1 pathway등이 항진균 타겟으로 가능성이 있음에 대한 보고는 있으나, 실질적으로 이를 이용한 저해 물질 발굴 보고는 없음 (경희대학교 보고).

○ 신규 항(진)균제의 대량 생산 기술 개발

- 가격 경쟁력을 높이기 위해 천연물 유래의 신규 물질을 추출하기 위한 노력이 많이 이루어지고 있음.
- 천연물 소재 개발 및 표준화 사업단 등을 비롯하여 식물유래 물질을 추출할 수 있는 곳이 있으며 물질 추출에 대한 표준화가 이루어지고 있으나, 본 과제에서 발굴 한 물질에 대한 연구는 소규모 추출 또는 이를 함유한 추출물에 국한 되어 있음.



[Anwulignan 추출 방법]

- Anwulignan과 corosolic acid의 경우 물질의 생산, 추출 기술은 중소기업청 과제를 통해 본 실험실에서 이미 확보 하고 있으며, 이를 천연물 소재 개발 및 표준화 사업단과 협의하여 비용 대비 생산량을 증가 시키는 방법에 대한 협의 진행 중.

○ 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포주 개발 및 신규 타깃 발굴

- 약 2곳의 실험실에서 별 유래의 안정적인 세포 주를 구축하기 위한 연구가 실행되었으나, 세포가 오랜 기간 안정한 상태에서 유지 되지는 못함. 이는 primary cell을 배양한 것과 비슷하며, 따라서 실험실 수준에서 요구되는 세포주가 필요함.
- 꿀벌에 전염성을 가지는 박테리아 또는 진균에 대한 감염 연구는 없음. 이를 이용한 새로운 타깃 및 작용물질 발굴에 대한 연구 또한 없음.
- 몇몇 연구자에 의해 꿀벌에 직접 노제마를 감염 시키며 노제마에 대한 저해제를 찾고 있으나, 시도한다는 내용은 있으나 아직 중요한 진보를 보이지는 않고 있음.
- 몇몇 실험실에서 꿀벌을 대상으로 감염을 일으키는 경우에 대한 연구가 보고 되었으나, 기전 연구는 전무 함.

○ 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴

- 꿀벌 면역에 대한 연구는 거의 전무 함. 미국 등에서 면역에 대한 연구를 수행 하려는 논문이 발표 되고 있으나, 아직 면역에 관여 하는 단백질 조차 알려져 있지 않음.
- 현재 꿀벌 미생물에 대한 연구는 경희대의 타 연구실에서 1회 발표 되었으나, 그 이후 보고된 것은 없음.
- 미국의 경우 장내 미생물에 대한 보고가 있었으며, 장내 미생물의 종류에 대한 보고가 있음. 하지만, 어느 정도로 분포를 하는지 알려져 있지 않으며, 이에 대한 영향을 본 적은 없음. 또한 국내 토종벌에 대한 연구는 전무 함.

○ 꿀벌에 대한 적용 기술 표준화 및 실험에 적용

- 사용 가능한 세포주가 없기 때문에 연구가 거의 진행 되지 않음. 또한 환경 적인 차이에 의해 field test에 대한 결과는 너무 다양한 결과를 보임. 따라서 우선 실험실 수준의 연구가 가능 하도록 하는 것이 반드시 필요하며 이후 이를 표준화 하는 것이 필요함.
- 현재 경기대와 농진청을 포함한 몇몇 연구소에서 벌을 대상으로 한 연구를 수행하고 있음. 따라서 이들 실험실과 교류를 하여 향후 실험실 수준의 연구와 꿀벌에 대한 연구에서 표준화 등이 필요함

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술현황

○ 꿀벌 전염성 질병을 일으키는 균에 대한 신규 항(진)균제 개발

- oxytetracycline이 현재 미국 부저병 치료에 사용 되고 있으나, 사용 빈도가 높아 내성 균주의 출현이 보고되고 있음.
- 유럽 부저병 치료제로는 oxytetracycline이 사용 되고 있으며 많은 실험실에서 새로운 물질 개발을 하기 위한 시도는 있으나, 보고된 물질은 없음.
- 백묵병 치료제는 현재 보고 되어 있지 않으며, 많은 실험실에서 신규 물질을 찾기 위해 시도 중.
- 현재 유일하게 노제마의 성장 억제제로 사용되고 있는 fumagillin은 *N. cerenae*의 성장 저해에는 잘 작용하지 않을 뿐만 아니라, 유럽에서는 fumagillin의 사용을 금지하였음. 이는 fumagillin이 가치가 없음을 의미하며 따라서 이를 대체할 새로운 물질의 발굴이 절실히 요구되며, IPL-LD-65Y를 이용한 실험에서 노제마 성장 저해물질로 두 가지 화합물(metronidazole and tinidazole)을 발굴하였으나, 기존의 imidazole계통으로 기존의 물질과 같이 합성인데다 세포 독성이 많을 것으로 예상.

○ 항(진)균제의 작용 기전 확립

- fumagillin에 대한 연구는 오래 전에 이루어 졌으며, 독성에 대한 연구 또한 이루어지고 있음.
- ABC transporter등 내성 발생 기전에 대한 연구가 사람에게 감염시키는 균주에서 연구는 되어 있으나, 꿀벌 관련 균주에서는 유전자도 확보 되어 있지 않음.
- 박테리아의 항균 타깃으로서 그리고 내성을 일으키는 주요 기전으로서 Bacterial Two-component signal transduction pathway가 잘 알려져 있음. 이를 대상으로 하는 연구가 활발히 이루어져 있으며, 앞으로도 계속 연구가 되어 질 것으로 예상 됨. *P. larvae* 또는 *M. Plutonius*의 경우에는 이를 구성 하는 유전자도 아직 확보 되어 있지 않으며, 또한 기전 연구도 수행 되지 않음.
- 진균과 박테리아에 대한 연구는 주로 활성이 있는 신규 물질의 발굴에만 국한 되어 있고, 각 물질에 대한 타깃 발굴은 매우 뒤쳐져 있음.

○ 신규 항(진)균제의 대량 생산 기술 개발

- 몇몇 물질 판매 회사들이 있으며, 특히 추출물인 경우 중국의 회사가 강한 면이 있음.
- 다양한 물질 추출을 주로 하기 때문에 필요한 양을 공급할 수 있는지는 확인이 불가 하며, 특히 효능 물질인 경우 공급이 되지 않은 경우가 더 많음.

○ 감염 연구에 필요한 세포주 개발 및 신규 타깃 발굴

- 꿀벌 유래 세포 주는 Michael Goblirsch에 의한 AmE-711 cell line이 보고되었으나, 세포 주를 소실하여 현재 더 이상 존재 하지 않는 것으로 확인(개인적인 연락을 받음). 그 외에 IPL-LD-65Y를 이용한 실험이 있었으나 매미나방 유래의 세포로 노제마에 의한 최대 감염율은 15% 정도 인 것으로 보고 됨. 따라서 실험실 수준에서 요구되는 세포주가 필요함.
- 기존에 세포주를 확립 하였다는 실험실에서 이를 재현 하려고 하고 있으나, 같은 방법으로 하였을 경우 같은 실수가 반복 되지 않을까 생각 됨.
- AmE-711 cell line은 fibroblast cell line이라 질병원이 주로 감염하는 부위가 아니기 때문에, 감염에 의한 노제마의 특성 연구가 불가능. 따라서 아직 꿀벌 전염성 감염 균에 대한 실험실 수준의 연구를 위한 세포 주는 존재 하지 않음.
- *M. Bombyx*에 대한 연구는 되어 지고 있으나, 꿀벌 전염성 미생물 감염 기전에 대한 연구는 없으며 사람에게 감염성이 있는 균에 대한 연구를 바탕으로 봤을 때 향후 많은 연구가 이루어 질 것으로 예상.
- 꿀벌에 전염성을 가지는 박테리아 또는 진균에 대한 감염 연구는 없음. 이를 이용한 새로운 타깃 및 작용물질 발굴에 대한 연구 또한 없음.
- 몇몇 연구자에 의해 꿀벌에 직접 노제마를 감염 시키며 노제마에 대한 저해제를 찾고 있으나, 시도한다는 내용은 있으나 이후 발표는 없으며, 실험에 사용 가능한 세포주가 잘못 되었으므로 결과도 또한 믿을 수 없는 상태가 됨.
- 몇몇 실험실에서 꿀벌을 대상으로 감염을 일으키는 경우에 대한 연구가 보고 되었으나,

기전 연구는 전무 함.

○ 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴

- 꿀벌의 장에서 살고 있는 균에 대한 연구는 어느 정도 이루어지고 있음. 하지만 유효 미생물의 분포와 꿀벌의 건강에 기여 하는 정도에 대한 연구등을 보여 주는 결과는 없으며, 미생물의 분포를 바꾸게 될 경우 어떤 현상이 기대 되는지에 대한 연구는 없음

Taxonomic group	Species	% max identity	BLAST corresponding accession number	GeneBank accession number
Fungi	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	99	DQ437075.1	KC677750
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	JX303663.1	KC677741
Acetic acid bacteria	<i>Asaia astilbes</i>	100	AB485744.1	KC677740
	<i>Gluconobacter sp.</i>	99	AB511061.1	KC677748
Lactic acid bacteria	<i>Fructobacillus fructosus</i>	99	AB680098.1	KC677747
	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	97	JQ009353.1	KC677749
Other bacteria	<i>Acinetobacter boissieri</i>	99	JQ771141.1	KC677738
	<i>Acinetobacter nectaris</i>	99	JQ771134.1	KC677739
	<i>Brenneria quercina</i>	100	NR041975.1	KC677742
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	99	JX437140.1	KC677743
	<i>Chryseobacterium ureilyticum</i>	99	JX100826.1	KC677744
	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	HQ888762.1	KC677745
	<i>Erwinia amylovora</i>	99	DQ059817.1	KC677746
	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	99	NR074869.1	KC677753
	<i>Micrococcus sp.</i>	100	JX437142.1	KC677751
	<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i>	100	EU977670.1	KC677752

[2014년에 보고된 꿀벌의 장내 미생물 종류]

- 꿀벌의 면역에 관여하는 연구는 전혀 없으며, 발표되어지고 있지 않음. 하지만, 면역 강화제에 대한 연구는 몇몇 기업에서 이루어져 판매되고 있음. 또한 면역 강화제에 대한 연구는 더욱 많이 이루어질 것으로 예상되지만 이들이 얼마나 좋은지 확인할 수 있는 실험실 수준의 연구는 없음.

○ 꿀벌에 대한 적용 기술 표준화 및 실험에 적용

- 선진국, 특히 OECD 가입국은 현재 가장 중요한 문제 중 하나를 실험의 표준화와 이를 각 국가에서 밀을 수 있는 방법을 개발하는데 노력하고 있음.
- 향후 이런 표준화가 될 것으로 생각되며, 국내에서도 이러한 표준화 작업이 필요함.

○ 관련기술현황(지식재산권 확보·회피방안 포함)

- 꿀벌 면역 증강제 파워비

꿀벌 면역 증강제에 대한 특허권은 농촌진흥청에서 국유특허로 보유중에 있으며 자사에서 기술이전 받은 상태 (2012~2015, 2015~2018년, 3년씩 재계약)

- 꿀벌에 사용되고 있는 항진균제는 없으며, 단지 항진균제나 항균제에 대한 특허가 있을 뿐임

- 기존에 출원된 유일한 경우로는 본 과제의 참여 학교인 경희대 산학 협력단에 의한 것임.
- 기존에 잘 알려진 물질은 제외하고 실험을 수행 중이기 때문에 선행 특허와의 중복성은 없음.
- 기존에 *A.apis* 또는 *P.larvae*, *M.pluton*에 대한 연구가 거의 되어 있지 않아 이 균주에 대한 특허가 없음. 따라서 기존 특허 회피 가능

<표 1> 국내외 관련지식재산권 현황

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
① 꿀벌 병해충 방제용 조성물	영남대 산학 협력단/박용하,윤병수	한국/10-2012-0001617
② 꿀벌의 전염병 치료용 조성물	경희대 산학 협력단/ 김기영	한국/10-2015-0073588

○ 목표시장의 경쟁현황

- 판로확보 및 마케팅 계획

○ 시장성

- 지속적인 소비가 이루어 질 수 있어 시장성이 넓음.
- 2012년 양봉농가 4만여 농가로 추정

(예, 경북(20.5%)·경남(13.9%)·전남·전북·강원전체 사육군수의 63.3% 차지)

○ 마케팅 전략

- 안전한 먹거리, 꿀, 프로폴리스, 로얄제리 생산을 위한 안전하고 잔류 걱정 없는 친환경 꿀벌치료제 효과 강조
- 유관기관의 친환경 꿀벌치료제 품질인증을 통한 신뢰성 확보 및 홍보
- 판로구축

- 1) 한국양봉농협 계통 판매를 통한 안정된 판매망 구축
- 2) 인터넷 판매 및 전국 양봉원을 통한 판매망 구축
- 3) 전국 농업기술센터 방문/홍보를 통한 자연스런 판매 유도
- 4) 전국 각 지역별 테스트 농가 확보 후 실증 실험 진행
- 5) 사단법인 한국양봉협회 및 사단법인 한국밀원수조림육성협회 통한 홍보 진행

<표 2> 국내·외 시장 규모

(단위 : 억원)

구 분	현재의 시장규모(2015년)	예상 시장규모(2018년)
세계 시장규모	4,000	6,000
국내 시장규모	300	500
산출 근거	(사)한국양봉협회 연간 방역비 산출 근거(2015.12) 및 지자체 방역비, 도소매 예상 산출 근거 포함	

<표 3> 국내·외 주요시장 경쟁사

경쟁사명	제품명	판매가격 (천원)	연 판매액 (천원)
① Weifung (중국)	왕스	60	2,500,000
② 웨이광만푸 (중국)	만푸골드	50	3,000,000
③CEVA(프랑스)	후미달-비	250	2,000,000

1-3. 연구개발의 중요성

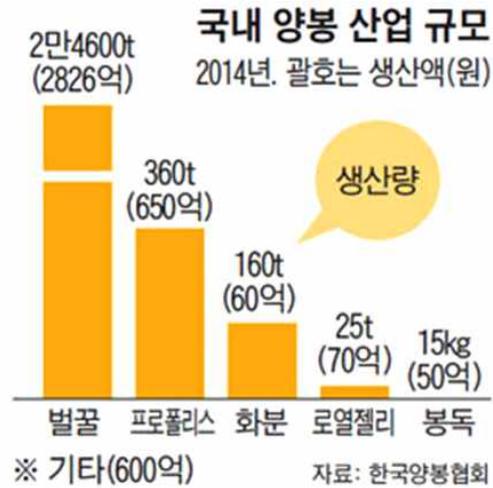
○ 꿀벌의 중요성

- 꿀벌은 지구 생태계의 다양성과 작물의 수분에 지대한 영향을 주며, 지난 수억 년 동안 지구의 생태계를 지켜온 꿀벌이 사라진다는 것은 지구의 생태계에 변화를 야기하여 곧 사람의 생활환경을 바꾸고 식량의 공급에 제한을 줄 수 있음.



- 유엔식량농업기구(FAO)에 의하면 꿀벌은 세계 식량의 90%를 차지하는 100대 주요 작물 중 71종의 수분에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 따라서 이들의 죽음은 지구 생태계뿐만 아니라 사람의 먹을거리에도 많은 영향을 줌.
- 세계적인 환경단체 '어스 워치'는 "대체 불가능한 생물 5종 가운데 꿀벌은 첫 번째 중"이라고 발표.
- 지구에서 꿀벌이 사라지면 인류도 4년 안에 사라질 것이라는 아인슈타인의 말처럼 인간이 재배하는 1,500여 종의 작물 중 약 30%는 꽃가루 매개자에 의한 가루받이가 필요.
- 꿀벌의 경제적 가치는 농진청에 따르면 사과, 배, 복숭아, 고추, 피망, 딸기, 오이, 애호박 등을 포함한 국내 16개 주요 작물의 연간 생산액 12조 5000억 원 중 꿀벌에 의한 수정에 의존하는 생산량은 5조 8000억(약 48%)에 달하는 것으로 보고.
- 2012년 기준 꿀벌 산업 규모는 2014년 '토종벌 증식을 위한 '토종벌 증보전사업' 추진'의 보고에 의하면 벌꿀 2751억과 로얄제리(60억), 프로폴리스(450억), 화분 (24억) 봉독 (9억) 기타 745억원으로 직접적 산업 가치는 약 4039억에 이르고 있음.
- 그린피스는 전 세계적으로 꿀벌의 수분 가치를 2650억 유로(한화 370조) 이상으로 평가

- 하였으며, 국내의 경우 2008년 안동대의 조사에 의하면 약 6조원이상으로 평가.
- 유럽에서 꿀벌의 경제적 지위는 소와 돼지 다음 3번째로 알려져 있음.



○ 꿀벌 개체 수 감소

- 꿀벌수의 감소로 양봉업자들에게 직접적인 피해도 크지만, 2차적인 피해도 어마어마한 규모로 미국 양봉협회 자료에 따르면 꿀벌의 꽃가루수분 기여가치로 1차 양봉생산물이 1억 3000만 달러 규모인 반면 2차 생산효과인 과실수가 33억 달러, 종자와 목초에 미치는 영향이 84억 달러, 낙농 부문에 71억 달러 등 총 190억 달러에 이르러, 1차 생산물의 143배에 달한다고 밝힘.
 - 화분 매개충 중 가장 중요한 역할을 하는 꿀벌의 감소는 전 세계적으로 관찰되며, 특히 프랑스, 벨기에, 스위스, 독일, 영국, 이탈리아, 스페인 등 전 유럽에서 1985년에 비해 25%가 감소하였다고 보고함.
 - 그린피스에 의하면 미국에서 꿀벌의 개체 수는 1980년대 이후 지속적으로 감소하여 왔으며, 2006년에 비해 약 40%가 감소하였고, 특히 2006년~2007년 겨울 기간 동안 약 30%~90%의 벌집 손상이 있었으며 이중 50%가 꿀벌군집붕괴현상(CCD)로 보고.
- *꿀벌군집붕괴현상(Honeybee Colony Collapse Disorder): 벌집에 꿀과 꽃가루가 상대적으로 풍부히 남아 있음에도 불구하고, 어른 일벌이 갑자기 사라져 남아 있는 여왕벌과 봉아(알에서 성충이 되기까지의 새끼 벌)가 벌집을 유지 하지 못하고 붕괴하는 현상(US EPA)

06년 미국; 꿀벌들이 원인 모를 이유로 갑자기 없어지는 증상이 나타나 22개 주에서 꿀벌의 수가 25~40% 감소

유럽과 남미를 비롯 세계 여러 곳에서 '봉군 붕괴증상 (CCD; colony collapse disorder)'이 확산

전 유럽에서 1985년에 비해 25%가 감소

미국 국립연구소와 대학은 벌통의 잦은 이동과 밀집사육, 미생물 감염, 농약 중독, 면역 결핍 등이 원인이라고 발표

오바마, 꿀벌 등 수정 매개체 종물의 보호 국가 전략 발표

[외국의 꿀벌 감소]

- 오바마, 꿀벌 등 수정 매개체 종물의 보호 국가 전략 발표
꿀벌 등의 개체수가 심각한 수준으로 가기 시작하면서 버락 오바마 미국 대통령은 2014년 '꿀벌등 화분매개체 보호를 위한 국가 전략'을 발표하고 테스크 포스를 운영 중에 있다. 이는 관련 정부 14곳뿐만 아니라 민간이 총동원되는 대형 프로젝트로, 10년 내에 꿀벌의 폐사율을 15%미만으로 떨어뜨리려는 계획을 포함하고 있다.
- 중국과 일본 등 아시아에서도 벌집의 급격한 손실이 보고 된 바 있음.

봉군붕괴증상은 없었지만 해마다 농약피해와 환경변화 등으로 지역적인 밀도의 감소 현상이 관찰 됨

백목병은 1984년 포항에서 발생한 이후 현재는 전국 모든 양봉장에서 발생되고 있다

부저병은 1950년 중부지방에서 처음 발생, 현재까지 전국 양봉장에서 지속적으로 발병되고 있다

2010년에 토종벌이 '낭충봉아부패병'이라는 바이러스에 감염되어 전체의 75% 이상의 폐사 발생

꿀벌의 폐사 원인에 대한 과학적 규명 및 대책 마련에 관한 연구가 시급한 실정

[국내의 꿀벌 감소]

○ 국내 꿀벌의 산업의 위기

- 국내 상황은 외국처럼 심각하지는 않지만, 수분 매개 곤충의 감소가 꾸준히 보고됨. 안동대와 농촌진흥청의 조사에 의하면, 우리나라는 양봉 벌의 개체 수는 세계에서 가장 많은 편으로 약 170만-200만통 (1통당 꿀벌 3만-5만 마리 서식)을 가지고 있지만, 재래종 꿀벌의 숫자는 급격히 감소해 멸종 위기에 놓여 있다고 평가.
- 국내에서는 2010년 ‘낭충봉아 부패병’으로 토종벌이 75% 감소하는 피해를 입었으며, 천안 배원예농협은 16년 전부터 배꽃 인공 수분을 지원해 오고 있음. 이는 꿀벌 개체수의 감소로 꿀벌이 할 일을 사람이 대신하게 된 경우로 초봄에 비정상적으로 꿀벌의 군집이 약해지고, 벌들이 죽는 현상이 보고 됨.

○ 꿀벌 개체 수 감소의 원인

- 미국 국립 연구소와 대학은 벌통의 잦은 이동과 밀집 사육, **미생물 감염, 농약 중독, 면역 결핍** 등이 원인이라고 발표.

○ 꿀벌 개체 수 감소의 원인 중 미생물에 의한 원인

	Organism	Treatments
Bacteria	<i>Paenibacillus larvae</i>	Oxytetracycline
	<i>Melissococcus plutonius</i>	Oxytetracycline
Fungi	<i>Ascosphara apis</i>	
	<i>Aspergillus Spe.</i>	
Microsporidia	<i>Nosema ceranae</i>	Fumagillin?
	<i>Nosema apis</i>	Fumagillin

- 현재 잘 알려져 있는 꿀벌 질병 감염 미생물 중 박테리아와 곰팡이 종류는 위와 같음.

○ 신규 항(진)균제의 개발

- 본 과제에서는 박테리아와 곰팡이, Microsporidia에 대한 성장 억제제 또는 감염 저해제 개발에 관한 것임.
- 꿀벌 전염성 질병 중 박테리아에 의한 질병은 부저병으로 알려져 있으며, 유럽 부저병과 미국 부저병이 알려져 있음.
- 세균에 의해 발병하는 꿀벌 질병 중 가장 많이 보고되는 됨
→ 각 나라마다 1.0-10%에 이르는 봉군에서 *P. larvae*의 내생포자가 발견.
- 미국 부저병에 대한 방제 법은 질병 증상이 있는 벌통에서 벌을 이동시키고 유충을 제거하는 방법이 있으나, 재발의 가능성이 높음. oxytetracycline과 같은 항생제가 크게 주목을 끌어왔으나 항생제의 벌꿀 내 잔류성이 의심 되고 내성 균주의 발생이 보고 됨. 이외에 실험실에서 행한 항생제에 대한 시험 결과, 성장 억제효과가 좋은 경우가 있었으나 **부저병을 완전히 치료할 수 있는 약제는 아직 없음.**
- 1950년 중부지방에서 처음 보고 된 후, 현재까지 전국 양봉장에서 지속적으로 발병하고 있으며 미국 부저병은 1877년에 뉴질랜드에서의 발병, 전 세계에서 관찰 됨. 미국 부저병은 최고 수십 년간 감염력을 유지하며, 봉군 밀집도가 상당히 높기 때문에, 상당량의 봉군을 수입하는 국내 양봉의 실정에서는 검역에 의한 외래 병원균의 유입을 가능한 한 차단하고, **국내의 발병을 최대로 억제하는 것만이 최선의 예방책임.**

- 현재 몇몇 연구실에서 연구 되어 지고 있는 항균 물질이 있으나, 보고 된 경우는 없으며 본 연구실에서 개발한 Corosolic acid가 미국 부저병과 유럽 부저병의 성장을 저해 하는 것으로 확인 됨. 하지만 이외에도 몇몇 물질이 부저병 원인균의 성장을 저해 하고 있음을 확인 하였으며, 따라서 본 연구실의 특허권 보호와 더 효과적인 물질의 발굴이 가능 할 것으로 예상.
- 백묵병(Chalkbrood)은 1984년 포항에서 보고된 이후 전국 모든 양봉장에서 발생이 되며, 세계적으로는 1913년 독일에서 최초 보고된 이래 전 세계적으로 널리 분포.

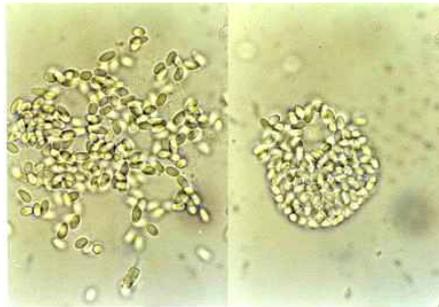


[백묵병에 걸려 폐사된 꿀벌 유충]

- 아직 **정확한 감염 경로와 발생 경위에 대한 연구가 이루어지지 않음**. 보고된 바에 의하면, 꿀벌의 유충에만 감염하여 오염된 화분의 섭취 및 벌의 이동 등에 의하여 감염이 전파 되고 있는 것으로 알려져 있으며 포자는 약 10~15년 동안 유지가 될 수 있어 한번 감염이 되면 장기간 영향을 줄 수 있음.
- 국내에서는 진균적 특성 연구 및 꿀벌의 종류, 밀도, 발육 단계에 따른 감염, 진단등 감염에 대한 연구는 이루어 졌으나, 정확한 전파 경로 및 전파 경로 연구와 효과적인 방제 기술은 극히 미미한 실정.
- 국내에서 가장 피해가 큰 병으로 벌꿀 생산 등에 많은 영향을 주고 있어 이에 대한 연구와 효과적인 방제 기술 개발이 요구 됨.
- 스톤 브루드(Stonebrood)는 *Aspergillus* 종인 *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*등의 감염에 의하여 발병하며, 사람과 새들에게도 감염성 질병을 일으킴. 일반적으로 자주 발견되는 곰팡이 균으로 벌에 감염 되면 larvae는 fungal spores가 발생하며 일벌에 의해 벌통에서 제거 됨. - 상대적 위험성은 적음.
- 사람에게 감염성이 있기 때문에 연구가 많이 수행 되어 지고 있으나, 잘 알려져 있는 방제 기술은 없음.
- 꿀벌의 노제마병(Nosemosis)은 Microsporidia parasites 에 속하는 *Nosema apis* (Zander.1909) 또는 *N. cerenae* 원충의 포자가 성봉의 소화기 및 그 부속기관에 감염되어 기생함으로써 발병하는 내부 기생충성 전염병으로, 이 질병에 걸린 꿀벌의 수명은 약 40% 감소하며 정상적인 활동을 하지 못함.
- 노제마는 *N. apis*에 의한 감염이 많았으나 약 20년 전부터 *N. cerenae*의 감염이 증가하는 것으로 알려져 있음. *N. apis*에 감염 되었더라도 병원성이 많이 있는 지에는 많은 논쟁이

있지만, *N. cerenae*의 감염은 *N. apis* 보다 더 많은 병원성을 보이는 것으로 알려져 있으며, 기후의 변화에 의해 감염성이 증가하는 경향이 있는 것으로 보고 됨.

- 또한 꿀벌 이외에도 bumblebee에서도 *N. cerenae*의 감염이 보고 됨.



[감염된 꿀벌의 위에 있는 노제마 포자]

○ 꿀벌 전염성 질병 유발 미생물 방제 기술

- 전 세계적으로 노제마를 치료 할 수 있는 물질로는 Fumagillin이 알려져 있으며, 부저병 치료제로는 Oxytetracycline이 알려져 있으나, 항진균제는 알려진 바 없음.
- 국내에서 개발 되어진 물질은 없음.
- Fumagillin과 Oxytetracycline은 꾸준한 사용으로 인하여 내성을 가진 균주의 출현이 보고 되어 지고 있음(Damiant N. et al. 2014). 따라서 새로운 방제 기술의 개발이 요구되어 지고 있으며, 세계적으로 몇몇 실험실에서 실험이 수행 되고 있으나, 현재 보고된 주요한 기술은 없음.
- 현재 꿀벌 질병 진균의 방제 기술은 거의 없다 시피 하여 알려져 있는 꿀벌 질병 방제 기술은 훈증제를 이용한 방법 밖에 없으며, 본 연구실에서 확보한 Anwulignan이 방제 가치가 있는 것으로 알려져 있는 유일한 물질임.
- *P. larvae*등 부저병 유발 균주의 경우 Oxytetracycline이 보고되어 있으나, 그 외의 항균 물질은 없음. 하지만 본 연구실에서는 *P. larvae*와 *M.plutonius*의 성장을 저해 하는 Corosolic acid를 발굴 함.
- 하지만 아직 산업성이 있는 적용 방법 연구와 기전 연구의 선행이 필요함.
- 기 보유한 물질 이외에 항(진)균 효능이 있는 물질을 발굴하여 특허권을 보호 하고, 다양한 산업성 생산 기술과 적용성을 확보 할 필요가 있음.
- 다양한 사료 제작에 효모가 사용 되어 지고 있으나, 기능성이 있는 효모는 아직 보고되지 않았음. 일반 효모 보다 항균 기능 또는 면역 강화 등의 기능을 첨가 한 효모 제작이 가능 하면 저 비용으로 기능성 사료등의 제작이 가능.
- 꿀벌 전용 사료의 경우 거의 대부분 효모를 함유 하고 있음. 효모에 항균 효과가 있는 물질을 발현 시켜 병원성 균의 성장을 억제함으로써 밀원이 약해 사료제를 사용해야 할 경우 박테리아성 또는 곰팡이 균의 감염을 억제 할 수 있음.

○ 항(진)균제의 기전 확인

- 기전 타깃 확립 및 기전 타깃에 대한 효능 확인은 현재 항(진)균제 개발의 주요 트렌드 중 하나로 타깃을 확인함으로써 사람 또는 동물에게 독성의 발생뿐만 아니라 이상이 발생 하였을 경우 대처가 빠르게 이루어 질 수 있음.

- 기전 타깃과 항(진)균 효과 상관성을 규명: 항(진)균 효과의 작용 기전 확인은 항 후 물질의 산업화에 있어 중요한 부분으로, 수출 할 경우에도 작용 기전 확인 과 부작용 그리고 사람 또는 벌에 대한 독성 연구에 활용 될 것이며, 또한 타깃의 저해에 의해 항(진)균 효과가 있는지 확인이 필요.
- 조절 유전자 및 신호전달체계의 규명 연구: 타깃으로 확인 된 단백질의 발현 또는 활성화 등 조절에 대한 연구는 후속 연구에도 기여 할 것이며, 신호 전달 체계는 내성의 발생과도 밀접한 연관이 있음. 따라서 이들에 연구는 항 후 신규 물질에 대한 연구에도 필요하며, 특히 약리 기전 연구에서는 필수적이라 할 수 있음.
- 현재 사용 하고 있는 oxytetracycline의 내성 발생이 보고되고 있지만, 내성에 대한 연구가 전무하여 항후 연구의 방향성과 새로운 항균 물질 개발에 있어 내성 기작 연구가 필요함.

○ 신규 물질의 생산 기술 개발

- 질병 치료제의 생산 기술 개발과 이를 통한 가격 경쟁력 확보를 위해 생산 기술 필요.
- 순수한 물질이 아니라 하더라도 효능은 되도록 유지하면서 유효한 물질을 함유한 추출물을 사용하여 생산 단가를 낮추어야 산업화가 가능함. 따라서 생산 단가를 낮추기 위한 방법 개발이 필요.

○ 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포 주 개발 및 신규 타깃 발굴

- 꿀벌 수의 감소의 주요한 원인으로 알려져 있는 꿀벌 면역 감소에 기반하여 많은 연구자들이 면역 강화제를 개발하였음. 하지만, 현재 표준화 되어 있는 방법이 없으며 면역과 장내 미생물과의 관계에 대한 연구는 전혀 없음. 또한 면역 증강제에 대한 유효성 등에 대한 평가가 거의 불가.
- 노제마의 감염 실험과 성장을 저해하는 신규 물질 발굴 등에 대한 연구는 벌 또는 larvae를 이용하고 있으나, 벌을 키울 수 있는 공간의 부족과 표준화의 어려움, 시간과 비용이 많이 드는 등의 문제와 통제가 되지 않을 시에 노제마가 자연계로 나갈 수가 있어 실험이 매우 제한 적임. 따라서 세포주의 배양으로 대체하려는 연구가 진행 되고 있음.
- 보고 된 실험실 수준의 실험에 사용되는 세포 주는 Michael Goblirsch에 의한 AmE-711 cell line의 보고가 있었으며 항후 이용 가치가 뛰어 날 것으로 기대되었지만, 현재는 세포주를 소실하여 더 이상 존재 하지 않는 것으로 확인 하였으며, 그 외에 IPL-LD-65Y를 이용한 실험이 있었으나 매미나방 유래의 세포로 노제마에 의한 최대 감염 율은 15% 정도 인 것으로 보고 됨.
- 국내에서도 세포 주를 만들려고 하였으나, 안정적인 세포주의 개발에 실패함. 따라서 현재 알려져 있는 **노제마 연구를 위한 세포 주는 없음**. 또한 박테리아 또는 바이러스 감염 연구에 대한 세포주도 없음.
- 본 과제에서는 기존에 실패한 방법 대신에 *N. cerenae*의 감염이 어느 정도 보고되어진 세포 주를 변형 하는 방법을 사용 하려고 하며, 구체적으로 이전의 다른 obligated fungi와 박테리아 또는 바이러스의 감염 시에 사용 되어 지는 것으로 알려져 있는 단백질과 같거나 비슷한 단백질을 벌에게서 동정하여 이를 BTI-Tn- 5B1-4에 발현 시켜 노제마의 감염 율을 증가시키고자 함.
- BTI-Tn-5B1-4은 약 10%의 감염율을 보이는 것으로 알려져 있으나 각 실험실에서 수행한

바에 의하면 그 보다 낮은 것으로 생각 되며, 이에 비하여 10% 이상의 감염 율을 증가 시키게 되면, 이는 노제마가 감염 시에 이용하는 단백질을 확인함으로써 감염 기전을 확인함과 동시에 이를 저해함으로써 감염성을 저해 할 수 있는 새로운 펩타이드를 만들어 펩타이드 기반 항-노제마 감염 물질을 만들 수 있는 근거 제공.

- 꿀벌에 질병을 일으키는 병원성 균을 확인 하는 질병 진단에 대한 조사는 활발히 이루어지고 있으나, 꿀벌에 질병을 일으키는 박테리아와 진균이 어떻게 감염을 일으키는지에 대한 연구가 거의 없어, 아직 감염이 일어나는 기전 연구가 없으며 빠른 시일 내에 이에 대한 연구 기반 구축이 필요함.
- 감염균에 의한 감염 기전 연구는 현재 사람 감염 균에서 많이 이루어지고 있으며, 이는 감염 기전을 확인 하여 이를 저해하여 보다 다양한 유효한 타겟을 발굴하기 위함임. 따라서 꿀벌 감염성 질병을 일으키는 균주에 대한 감염 기전 연구는 보다 다양한 저해 기전 연구가 가능하고 이를 활용한 감염 방제 기술 개발에 유용함.

○ 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴

- 많은 사업체와 연구소에서 꿀벌 면역 강화제를 발굴 하고 있음에도 불구하고 세포 수준의 연구는 전무하여 면역 강화제의 좋고 나쁨에 대한 기준이 없음. 따라서 면역 관여 단백질의 발굴이 필요하며 이를 통하여 면역 물질에 대한 실험이 필요.
- 꿀벌 면역 강화제의 연구에 앞서 꿀벌 장내 또는 벌통에 있는 미생물의 연구를 통해 유효한 미생물의 성장을 조절 할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하며, 이러한 기술은 사람의 장내 미생물연구에서 보듯 그 중요성이 충분하다고 사료 됨.
- 특히 국내 꿀벌의 장이나 꿀벌 통에 있는 미생물에 대한 연구는 거의 없으며, 꿀벌의 장내 미생물이나 또는 벌통에 있는 미생물에 대한 연구 등 벌의 면역이나 유효 미생물에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않고 있음.
- 면역 증강제와 항(진)균제 투여는 그 목적이 같음에도 불구하고, 이들의 혼용에 의한 꿀벌 질병 방제 기술은 전혀 연구가 되어 있지 않음.

○ 꿀벌에 대한 적용 기술 표준화 및 실험에 적용

- 최근의 화학위/환경위 합동회의 결과에 대한 OECD 회원국들의 우선순위를 참조하면, 실험실 수준의 실험과 실험의 정확성에 대한 표준화를 요구하고 있음. 하지만, 전 세계적으로 아직 이러한 연구를 집중적으로 실시하는 연구실은 없음.
- 이에 대한 정책적 시사점으로는 사전 예방적인 차원에서 꿀벌 등에 대한 잔류 농약 저감을 위한 회원국들의 동향에 주목함과 동시에 OECD의 신규 시험법 개발에 따른 **시험 인프라 및 전문 인력의 확충** 등 국내 시험 기관의 사전 훈련과 준비가 필요 함.
- 국내의 꿀벌 질병 관리 연구소와 질병 통제 연구소의 경우, 질병이 발생 하였을 경우 이를 확인 하는 작업에 집중하고 있으나, 현재 방제 기술에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았음.

- 어른 꿀벌에 대한 10일 **실험실 독성** 실험
- 꿀벌의 발전 단계에 따른 **실험실 독성** 실험
- 반야외 조건하에서 꿀벌 터널 시험
- 꿀벌과 꽃가루의 잔류 농약 실험
- 꿀벌(성충,유충), 호박벌, 단독벌에 대한 농약에 대한 **위해성 평가 체제** 마련
- 위해성 평가의 불확실성 연구
- 비 Apis종에 대한 실험실 근접 접촉 독성 시험

[최근의 화학위/환경위 합동회의 결과에 대한 회원국들의 우선순위(2014년 주OECD 대표부 정책브리핑 자료)]

- 특히 신규 향(진)균제의 실험실 수준의 연구와 field test에 대한 기준과 방법이 표준화 되어 있지 않음. 특히 실험실 수준에서 사용 가능한 세포주가 존재 하지 않아 실험실 수준의 연구에 많은 제약이 있음.
- 그럼에도 불구하고, field test에 대한 요구는 지속적으로 있을 것으로 예상 되며, 이에 따른 방법을 실험실 수준부터 표준화 하고 본 연구실에서 발굴한 물질에 대하여 효능을 검증 할 필요가 있음.

○ 과제 후 추후 연구 목표



- 신규 향(진)균 물질 발굴을 위해 많은 양의 화합물을 보유하게 되었으며, 이후에도 더 많은 양을 보유 예정. 이를 활용하여 향 후 꿀벌에 질병을 일으키는 바이러스와 마이트의 성장을 제어 할 수 있는 물질 발굴의 재료로 사용 예정
- 다양한 기전 연구는 향 후 발굴 될 수 있는 효능 물질에 대한 기전 연구의 바탕이 되어 이후의 연구에 계속 적용 할 예정이며, 내성 기전 연구로 향 후 더 효과가 있으며, 내성이 적은 물질 발굴에 활용 예정
- 전염성 균이 숙주 세포에 감염 되는 기작을 밝히는 연구는 향 후 바이러스의 감염 연구에

응용하여 감염성을 줄일 수 있는 방법에 대한 연구 수행 예정

- 이를 기반으로 꿀벌 감염성 질병 원인균을 방제 할 수 있는 연구소의 기틀을 다지고, 이후 다양한 방제 기술 개발에 기여 할 예정

○ 정부지원의 필요성

- 과제의 특성상 사업이 주는 효과는 개인적인 사업체에 국한 된 것이 아니라 사회에 미치는 영향이 매우 큰 “벌”에 대한 사업임.
- 현재 대부분의 꿀벌 질병 관련 방제 사업은 정부에 의한 구매로 이루어지고 있음. 따라서 본 과제에 의해 도출 되는 물질은 국내의 많은 농가에 영향을 줄 수 있기 때문에 정부에 의해 통제가 될 것임
- 본 과제에 의해 발굴하고자 하는 것은 방제 시스템으로 기존에 진단 중심의 사업과 연계하여 향 후, 빠른 진단을 한 후 그대로 방제에 들어 갈 수 있는 순수 국내 기술을 확보 할 수 있음.
- 이를 위하여 향 후 방제 기술을 가진 전문 연구 기관을 만들 예정이며, 이 또한 정부의 니즈와 농가의 니즈에 잘 맞는 사업으로 생각 됨.

1-4. 선행연구 내용 및 결과

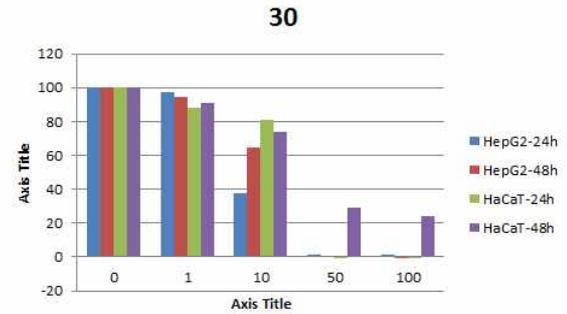
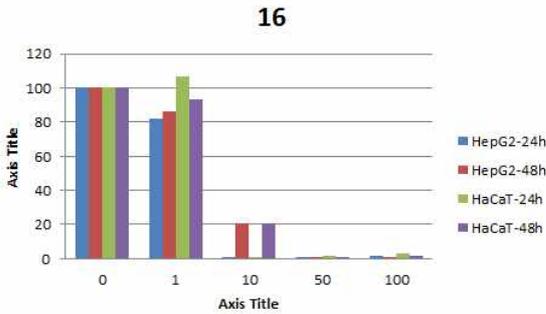
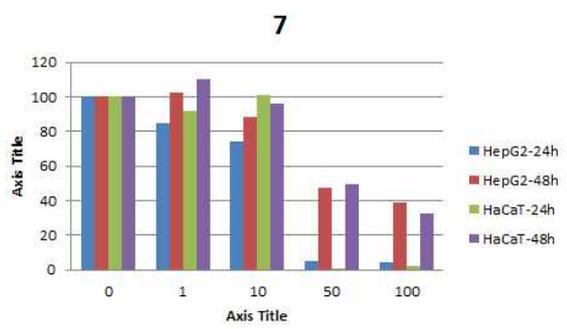
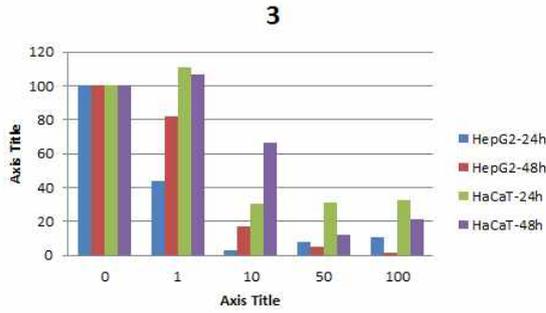
○ 신규 항(진)균제의 개발

- 기존에 본 연구실에서 확보한 항진균제의 특허권 보호와 더 효과적인 물질 발굴을 위해 기 보유한 항(진)균제 외에 또 다른 후보 물질을 발굴 하고 있음.
- 천연물 연구소로부터 약 600여 가지의 물질을 대상으로 *A.apis*와 *P.larvae* 그리고 *M.Plutonius*에 대하여 항(진)균 효과를 가진 화합물을 확인
- 이중 물질 3, 7, 16번이 *A.apis*에 효과가 있는 것을 확인 하였으나, anwulignan 보다 약한 것을 확인 함. 하지만 항 후 lead compound로는 사용 가능 함

	24H	48H		24H	48H
1	>200	>200	19	100	>200
2	100	>200	20	>200	>200
3	6.25	6.25	21	100	>200
4	>200	>200	22	100	>200
5	100	>200	23	>200	>200
6	>200	>200	24	>200	>200
7	3.125	6.25	25	>200	>200
8	>200	>200	26	100	>200
9	>200	>200	27	>200	>200
10	>200	>200	28	100	>200
11	>200	>200	29	50	>200
12	100	>200	30	>200	>200
13	>200	>200	31	>200	>200
14	50	>200	32	>200	>200
15	100	100	Anwulignan	1.56	3.13
16	25	50	Corosolic acid	12.5	12.5
17	25	>200	Miconazole	1.56	1.56
18	12.5	25	Congo Red	>200	>200

[신규 *A.apis* 성장 억제제 발굴]

- 꿀벌에 질병을 일으키는 진균 중 *Aspergillus* spp.에 대한 항 진균 효과 물질 발굴하기 위해 65가지 한약제 추출물을 대상으로 항진균 실험을 수행.
- 65가지 한약제 추출물을 이용하여 *Aspergillus niger*에 대하여 항진균 효과가 있는 추출물을 확인 한 결과 3개의 후보 추출물 확인.



[신규 발굴된 물질에 대한 인체 유래 세포의 성장 억제]

Compounds #	MIC Value (mg/ml)	Compounds #	MIC Value (mg/ml)
1	>20	20	>20
2	10	27	>20
3	>20	28	>20
4	>20	29	20
5	>20	30	>20
6	>20	31	>20
7	>20	40	0.625
8	>20	41	>20
9	>20	43	>20
10	>20	44	10
11	>20	45	>20
12	>20	48	>20
13	20	49	>20
14	>20	50	>20
15	20	51	>20
17	>20	62	>20
18	>20	65	>20
19	>20		

[한약제 추출물에 의한 *Aspergillus niger*의 성장 억제]

- 65가지 한약제 추출물을 이용하여 *A. apis*에 대하여 항진균 효과가 있는 추출물을 확인한 결과 23개의 후보 추출물 확인. 이들 중 *A. apis*에 대하여 성장을 저해 하는 추출물이 있을 것으로 예상. 이들 중 재현성이 있으며 저해성이 좋은 것을 확인한 후, 추출에 대한 비용과 효능에 대하여 확인 예정.

Compounds #	Activity	Compounds #	Activity
1	+	18	-
2	+	19	-
3	-	20	+
4	+	23	+
5	+	26	+
6	-	27	+
7	-	36	+
8	-	40	+
9	-	42	+
10	-	43	+
11	-	44	+
12	-	50	+
13	+	51	+
14	-	52	+
15	+	56	+
16	+	59	+
17	+	65	+

[한약제 추출물에 의한 *A. apis*의 성장 억제]

- 신규 항균 물질 발굴을 위해 본 연구소에서 확보한 물질에 대하여 *P.larvae* 와 *M.Plutonius*에 대하여 항균 실험을 수행.

P.larvae (p618)

	24H	48H	72H		24H	48H	72H		24H	48H	72H
1	X	X	X	13	X	X	X	25	X	X	X
2	X	X	X	14	100	X	X	26	50	50	50
3	3.125	6.25	6.25	15	6.25	12.5	12.5	27	X	X	X
4	X	X	X	16	1.56	1.56	1.56	28	X	X	X
5	X	X	X	17	12.5	12.5	25	29	6.25	12.5	12.5
6	25	25	25	18	X	X	X	30	3.125	3.125	6.25
7	0.78	0.78	1.56	19	X	X	X	31	6.25	12.5	12.5
8	X	X	X	20	100	100	X	32	6.25	12.5	12.5
9	X	X	X	21	12.5	12.5	12.5	control	X	X	X
10	25	25	25	22	25	50	50	Mi	3.125	3.125	3.125
11	X	X	X	23	100	100	X	Tet	0.78	0.78	0.78
12	50	50	50	24	X	X	X	Co	3.125	12.5	25

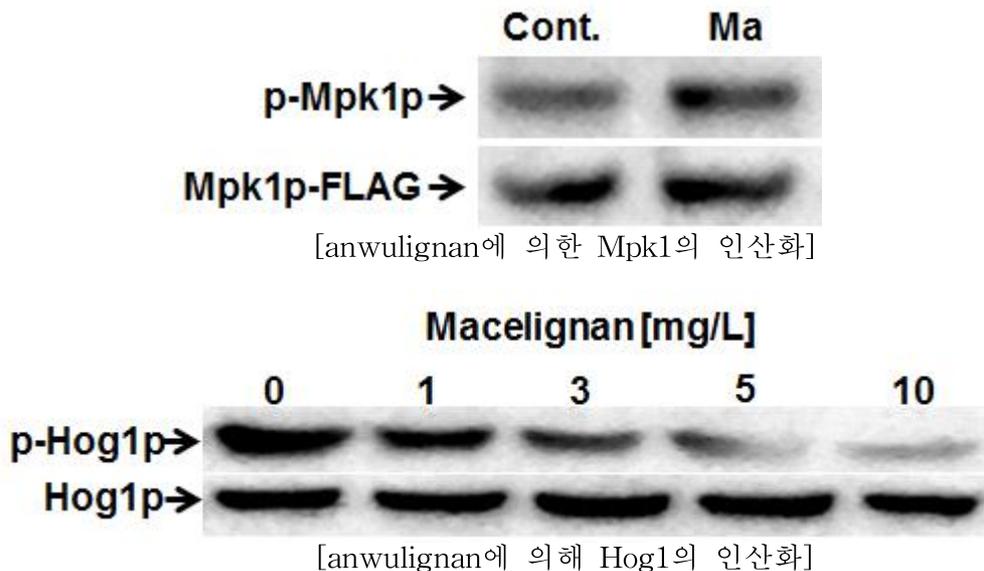
M. plutonius (P630)

	24H	48H	72H		24H	48H	72H		24H	48H	72H
1	X	X	X	13	X	X	X	25	X	X	X
2	X	X	X	14	X	X	X	26	50	50	100
3	6.25	12.5	12.5	15	6.25	6.25	6.25	27	X	X	X
4	X	X	X	16	3.125	3.125	6.25	28	X	X	X
5	X	X	X	17	100	100	X	29	X	X	X
6	12.5	25	25	18	X	X	X	30	12.5	12.5	50
7	3.125	6.25	6.25	19	X	X	X	31	X	X	X
8	X	X	X	20	X	X	X	32	X	X	X
9	X	X	X	21	X	X	X	control	X	X	X
10	100	X	X	22	X	X	X	Mi	6.25	6.25	6.25
11	X	X	X	23	X	X	X	Tet	12.5	12.5	12.5
12	X	X	X	24	X	X	X	Co	X	X	X

- *P.larvae*와 *M. plutonius*에 효과가 있는 물질로 3, 7, 16, 30번을 발굴. 따라서 이들에 대하여 항 후 실험에 사용하기로 하였으며, 특히 3번과 30번이 다른 균주에 대하여 항균 효과가 적게 보이는 장점이 있고, 3번의 경우 국내에서도 많이 자생하는 지치에 함유가 많은 것으로 확인 되어 이를 중심으로 연구를 계획.
- 따라서 기존에 발굴 한 물질 뿐만 아니라 3종 이상의 물질을 꿀벌 질병에 관여 하는 미생물 방제 후보 물질로 발굴 하였으며, 순수 추출물이 아닌 식물 추출물도 3종 이상 발굴 하였음.
- 노제마의 성장 및 항 후 바이러스등에 적용하기 위하여 현재 20여종의 물질을 더 확보 하고 있으며, 이들에 대한 항 박테리아와 항 진균 실험을 수행 한 후 노제마 연구가 가능해지면 이들 물질을 대상으로 연구 수행 예정.

○ 항(진)균제의 기전 확인

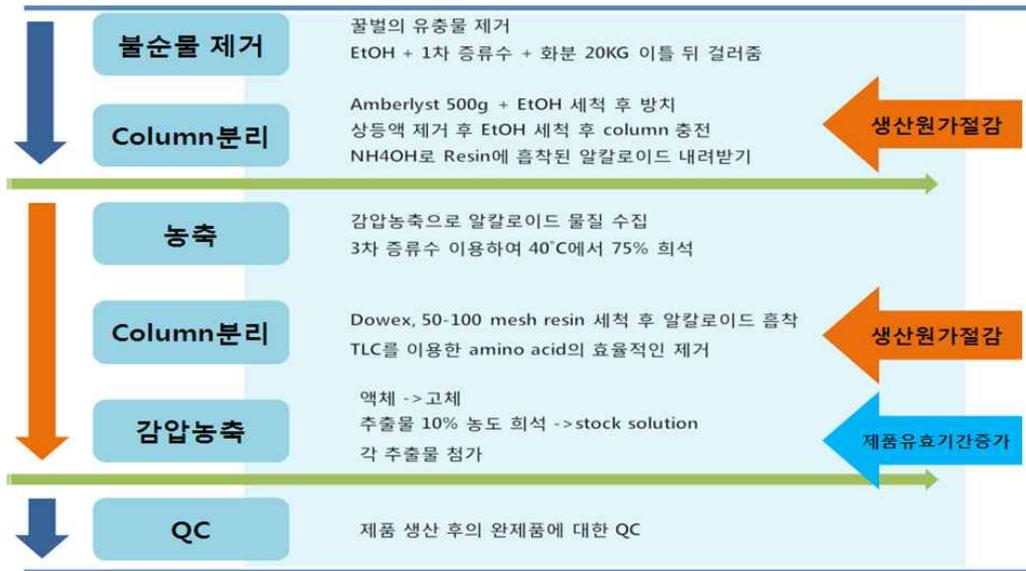
- 본 연구실에서 이전 연구로 발굴한 anwulignan의 기전연구 수행 중, 타겟으로 Hog1 pathway을 확인하였으며, 저해 방법을 확인하기 위해 *A.apis*로부터 gDNA와 mRNA를 추출하여 sequence 확인.
- 실험실에서 확보 한 항진균 효과가 있는 물질 중 anwulignan의 기전을 확인 하기위하여 기존에 잘 알려져 있고 실험실에서 보유하고 있어 바로 확인이 가능한 Hog1과 Mpk1의 활성화를 저해 하고 있는지 확인하기 위해 anwulignan를 2시간 동안 처리한 후 *A.apis*의 단백질을 추출하여 각 각 Hog1(sc-6815 (santa cruz)), p-p38(sc-17852-R (santa cruz)), Mpk1-FLAG (nti-FLAG antibody (M2; sigma)) Phosphorylated Mpk1 (p44/42 MAPK antibody 9102S (Cell Signaling))을 사용 하여 활성의 변화를 확인.



- anwulignan에 의해 Hog1의 인산화가 저해 되는지 확인하기 위해 효모에서 발현을 하여 발현을 확인 하였으며, anwulignan에 의해 저해 되는지 확인 실험 중

○ 항진균제의 추출 방법 확립

- 질병 치료제의 생산 기술 개발과 이를 통한 가격 경쟁력 확보를 위해 유효 물질 추출 방법을 확보하였음.
- anwulignan과 corosolic acid의 경우 물질의 생산, 추출 기술을 중기 과제를 통해 이미 확보 하고 있으며(27페이지 그림 참조), 또한 경희대 산하 천연물 표준화 연구소와의 협업으로 물질의 대량 추출에 대한 기술 협의 중.



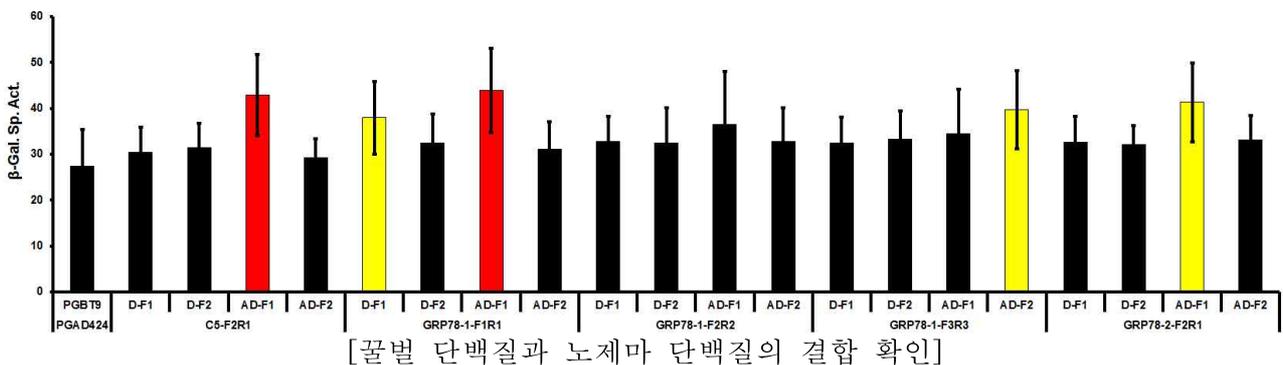
[현 생산 공정(천연물질 분리과정)]

- 위탁 과제 책임자는 “천연물 소재 개발 및 품질 표준화 사업단”에 소속 되어 있으며, 물질 추출에 대한 협력을 유지 하고 있음.
- 실험실 수준의 추출은 가능 하지만 순수한 물질의 분리는 공정상의 문제로 비용이 많이 들어가는 단점이 있음. 따라서 비용이 적게 들어가는 물질을 확인하기 위해 계속적으로 항균제를 발굴하려고 하고 있으며, 많은 양을 분리 하는 방법과 함께 약리 작용이 있는 물질을 함유한 추출물을 대상으로 항(진)균 효과를 확인 중에 있음.
- 더 많은 물질에 대한 연구를 수행하기 위해 KIST의 천연물을 연구하는 실험실과 화합물을 연구하는 경희대 실험실과 협의 중이며, 여기에서 확보 한 물질에 대하여 기존에 본 실험실에서 확보한 방법으로 항(진)균 효능이 있는 물질을 발굴할 예정이며, 이를 향 후 노제마 와 바이러스의 연구에 활용 예정.

○ 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포주 확립 및 신규 타겟 발굴

- 노제마의 감염 연구에 사용 되고 있는 IPL-LD-65Y (Lymantria dispar larvae 매미나방) 세포주가 있으나, 감염율도 15% 정도로 높지 않음. 따라서 이보다 감염율이 높은 균주의 개발은 노제마 실험에 매우 유용하게 사용 될 수 있음.
- 꿀벌 노제마 감염에 관여 하는 단백질에 대한 연구는 없음. 따라서 이에 관한 연구가 선행 되어야 하며, Vertebrate에 감염하는 노제마는 숙주 세포의 GRP78 단백질을 인식 하여 감염을 일으키는 것으로 알려져 있음. 박테리아 종류 중 *Clostridium aceticum*은 숙주 세포에 감염을 일으킬 경우 숙주 세포의 GRP78 단백질을 인식 하여 감염을 일으키는 것으로 알려져 있음.

- 노제마의 spore에는 14가지의 단백질이 있으며 이중 *Nosema bombycis*의 숙주 감염 시에는 SWP11과 SWP16이 관여 하는 것으로 보고되었음. 각 각의 유전자가 결손이 되면 약 20% 정도 감염율이 감소함이 보고되어 있으며, *Nosema*의 감염 시에 인식하는 단백질로 GRP78이 알려져 있음.
- *Clostridium aceticum*의 spore coat 단백질 중 CotH는 숙주 세포의 단백질 GRP78과 결합하여 숙주 인식에 관여 하는 것으로 보고 됨.
- 박테리아와 곰팡이가 공통으로 인식하는 숙주 세포의 단백질 중 하나는 GRP78로 생각되며, 이 단백질의 염기 서열에 따라 숙주가 결정 되어 있을 수 있음을 의미함. 따라서 꿀벌의 GRP78 단백질과 노제마등 전염성 균의 상호 작용이 있는 지 확인이 필요 함.
- 국내에 있는 꿀벌의 상당량을 차지하고 있는 *Apis mellifera*는 6가지의 GRP78 homology 단백질이 있으며, 이 중 막에 존재 하며 충분히 긴 단백질 서열이 세포 밖으로 나와 있을 것으로 예상 되는 것은 **heat shock protein cognate 5** 와 **97 kDa heat shock protein isoform X2**, **hypoxia up-regulated protein 1-like isoform X1** 세 가지 임. 이들 단백질 중 세포 밖으로 노출 되어 있을 것으로 예상 되는 부분을 각 각 Yeast 2-hybrid를 수행하기 위하여 pGAD424에 cloning을 수행.
- 현재 노제마의 spore 단백질에 대한 연구는 많이 이루어져 있지 않음. 하지만 *Nosema bombycis*에 대한 연구가 어느 정도 이루어져 있으며, 이를 바탕으로 Spore Wall Proteins (SWP)을 분석 해 본 결과 16가지의 (SWP)이 있으며 이들 중 SWP11과 SWP16 단백질이 숙주 인식에 관여 하는 것으로 알려져 있음. 이들에 대한 꿀벌에 감염을 일으키는 *Nosema ceranae*의 단백질을 분석 해 본 결과 SWP11과 chaperone protein dnaj, hypothetical protein NCER_101367 단백질이 매우 homology가 높은 것으로 확인. SWP16은 spore wall and anchoring disk complex protein과 유사성이 매우 높았으며, 이 단백질은 *Encephalitozoon cuniculi*의 EnP1과 상동성이 매우 높으며 숙주 세포의 인식에 매우 중요한 단백질로 알려져 있음. 이들에 대하여 숙주 세포의 GRP78과의 결합을 확인하기 위하여 pGBP9에 cloning을 수행.
- 노제마의 단백질 중 SWP11과 SWP16의 상동 단백질과 꿀벌의 GRP78 상동 단백질에 대한 yeast-2-hybrid 결과 결합이 가장 좋은 2가지 조합을 확인 하였으며, 이를 바탕으로 후보 단백질 AD-F1은 효모에, C5-F2R1과 GRP78-1-F1R1은 곤충 세포에 발현시킬 예정.



- BTI-Tn-5B1-4 (*Trichoplusia ni* egg 양배추 은무늬 밤나방)은 이전의 연구에 의하면, *Nosema ceranae* 감염율이 10%를 초과 하지 못하는 것으로 알려져 있으나, 본 실험실에서는 감염이 되지 않는 것을 확인하였음. BTI-Tn-5B1-4에 꿀벌의 GRP78을 발현 시켜 감염

율의 증가를 확인 할 수 있는지 확인하기 위해 pIZT/V5-His(In vitrogen)를 이용하여 결합이 확인 된 단백질을 발현 시킨 후 이를 이용하여 노제마 감염율이 상승하는지 확인 예정.

- 본 연구에서 확립 된 세포주를 이용하여 항(진)균제 발굴에 사용된 화합물과 이미 확보한 20여종의 다른 물질 그리고 식물 추출물 등을 사용하여 항 노제마 물질 발굴 예정.
- 본 연구를 바탕으로 꿀벌에 감염을 일으키는 *P.larvae*, *M. plutonius*, *A.apis*, *N.cerenae* 그리고 virus의 virulence factor 연구에 대한 노하우를 습득하고, 이 후 연구를 수행 하고자 함.

○ 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴

- 주관 기업이 기 확보한 꿀벌 면역 증강제와 같이 사료를 만들 경우 기능이 향상 되는지 확인하기 위해, 꿀벌 면역 증강제와 항(진)균제의 최적 배합 비율을 확인 중.
- 미생물 동정 실험을 확보 하여, 현재 토양 미생물에 대한 연구를 수행 하여 논문 준비 중이며, 제천 소재의 소규모 양봉 농가와 경기대 꿀벌 전염성 연구소와 꿀벌 공급 및 양봉장에서의 미생물 동정에 대하여 협의 중.
- 면역에 관여 하는 후보 단백질에 대한 분석을 진행 중이며, 이에 따라서 defencin, apidaecin, Abaecin등을 확보 함. 하지만, 여기에 이들의 발현을 위해 관여하는 단백질의 연구를 위해 후보 단백질을 확인 중에 있음.
- 위탁 연구 기관은 전사 조절과 신호 전달을 주로 하는 실험실로 이미 전사 조절 연구에 대한 방법과 이들을 조절 하는 단백질을 발굴하는 일을 수행한 경험이 많이 있음. 따라서 이를 바탕으로 위의 면역 물질 발현과 이를 조절 하는 연구를 수행하여 면역 강화제와의 관계를 확인 예정.
- 또한 Lysozyme등 체액성 면역 단백질과 이를 확인 할 수 있는 실험법을 확인 중이며, 이 또한 면역 강화제와의 상호 관계를 확인 할 수 있는 방법을 구상 중.

○ 꿀벌에 대한 적용 기술 표준화 및 실험에 적용

- 기존에 항균제와 항진균제 발굴을 위한 실험을 확보 하고 있으며, 이를 표준화와 기본 실험으로 적용 예정.
- 노제마에 대한 실험은 전혀 없기 때문에, 본 과제에서 발굴한 세포주를 이용한 연구로 표준화 예정.
- 따라서 실험실 수준에서도 실험이 가능한 방법 구축이 가능하며, 이를 바탕으로 field test의 결과와의 부합 성을 보기 위해 농촌진흥청, 양봉협회, 양봉농협과 협의완료 되었음.

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발의 최종목표

구분	내용
최종목표	꿀벌 감염성 질환 중 진균과 박테리아에 대한 방제 기술 개발
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 항(진)균제의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 신규 항(진)균제 5종 발굴 및 1개 시작품 제작 ○ 항(진)균제의 기전 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 신규 약물의 기전 2개 규명 - 기존 물질의 내성 기전 1개 규명 ○ 신규 물질의 생산 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 유효 물질의 순수 추출 방법 1개 이상 - 3개 이상의 유효 물질을 함유한 물질 추출 방법 확립 ○ 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포 주 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 곰팡이 감염 단백질 1개 발굴 및 발현 - 감염율이 높은 1개 신규 세포 주 제작 - 신규 감염 억제 또는 성장 억제제 2종 발굴 및 시작품 제작 ○ 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - 꿀벌 면역 관여 단백질 2종 연구 - 2종 장내 미생물 - 1개 신규 면역 강화 물질

2-2. 연차별 개발목표 및 내용

<p>가. 1차년도</p> <p>① 개발 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> - 주관연구기관(주식회사 한비) : 제형별 시료 제작 및 시험 제형 분석 및 사업화 방안 산업화 수준의 추출 방법 및 공정 최적화 후보 물질 공급 및 분석 - 협동연구기관(경희대학교) : 2종 이상의 신규 항(진)균 물질 개발 유효 물질의 순수 추출 법 2개 확립 면역 관여 단백질 2종 연구 <p>나. 2차년도</p> <p>① 개발 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> - 주관연구기관(주식회사 한비) : 제형별 시료 제작 및 시험

제형 분석 및 사업화 방안

산업화 수준의 추출 방법 및 공정 최적화

후보 물질 공급 및 분석

Field Test 방법 최적화

- 협동연구기관(경희대학교) : 2종 이상의 신규 항(진)균 물질 개발
신규 물질의 기전 2개 규명
3개 이상의 유효 물질을 함유한 물질 추출법 확립
1개 감염 연구에 필요한 세포주 제작
1종의 장내 미생물 연구

다. 3차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관(주식회사 한비) : 제형별 시료 제작 및 시험
제형 분석 및 사업화 방안
산업화 수준의 추출 방법 및 공정 최적화
후보 물질 공급 및 분석
Field Test
- 협동연구기관(경희대학교) : 1종 이상의 신규 항(진)균 물질 개발
기존 물질의 내성 기전 1개 규명
2개의 감염 저해 또는 성장 억제제 발굴 및 시작품 제작
1종의 장내 미생물 연구
1종의 신규 면역 강화 물질 발굴

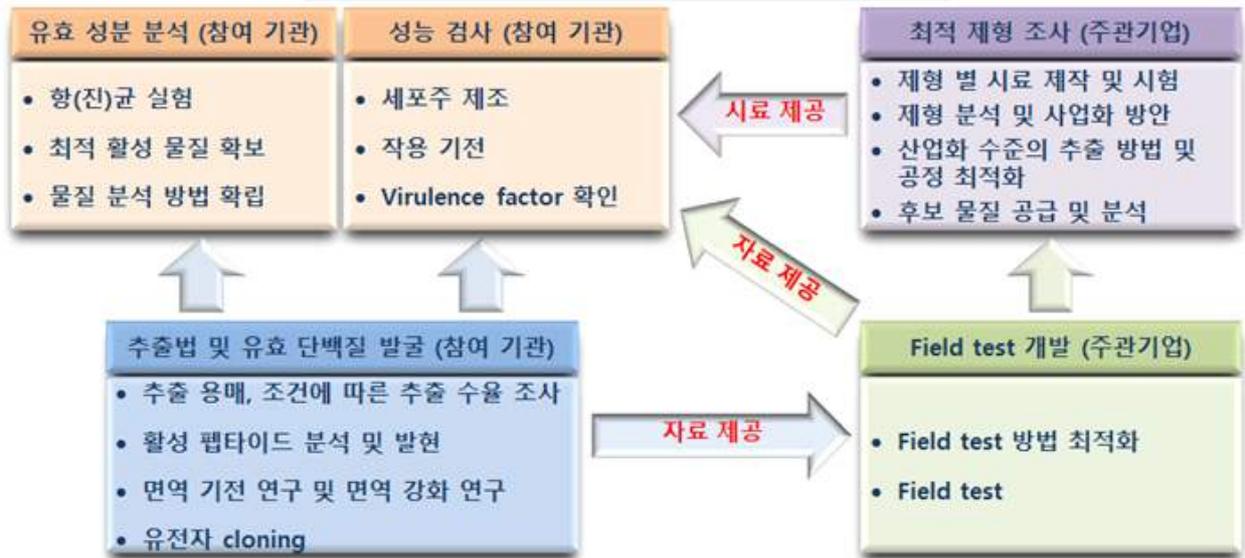
② 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

라. 개발 내용

- 신규 항(진)균제의 개발 항(진)균제 외에 특허 보호와 추출물 가격을 낮추기 위하여 합성 물질과 추출물을 이용한 항균 실험 수행 예정.
 - KIST와 경희대뿐만 아니라 화합물 연구소등을 통해 더 많은 물질 확보 예정.
 - 순수한 물질일 경우 기존의 물질과
 - 기존에 본 연구실에서 발굴한 같이 사용 할 경우 더 효과가 있는 물질이 있는지 확인하기 위해 synergistic assay 진행.
 - 신규 물질이 사람에게 영향을 줄 수 있는지 확인하기 위해 인체 유래 세포를 이용한 MTT assay 수행.

○ 항(진)균제의 기전 확인

꿀벌 전염성 질병 치료용 천연 물질 개발 및 사업화



- 현재 진행 중인 Hog1 pathway의 저해에 대하여 본 연구실이 가지고 있는 물질이 어느 정도 저해 효과가 있는지 확인
- 항 박테리아와 항 진균 효과의 기전 확인을 위해, Molecular cloning 기법을 이용하여 다양한 단백질을 확보 하고자 함. 항진균 타겟의 가능성이 있는 단백질과 신호전달 경로에 관여 하는 단백질 및 항 박테리아의 타겟으로 알려져 있는 two-components 신호 경로를 조절하는 단백질 등을 우선 확보 하고자 함.
- 내성에 연관 되어 있는 것으로 알려져 있는 two-components 신호 경로 및 transporter에 대한 연구가 전혀 이루어지지 않았음. 따라서 이들에 대한 유전자 확보와 내성과의 연관성을 확인하기 위해 곰팡이 단백질은 효모를 이용하여 그리고 박테리아의 단백질은 대장균을 이용하여 발현 시켜 그 효능을 확인 하는 실험 수행

○ 신규 물질의 생산 기술 개발

- 본 연구실에서 이미 확립한 방법을 기반으로 하여, 현재 항진균 효과가 있는 것으로 확인 한 Anwulignan, 및 물질 3, 7, 16, 30번에 대한 실험실 수준의 추출과 이를 기반으로 하여 중간 사이즈의 시작품 제작에 충분한 양의 물질을 추출 할 수 있는 방법 확립
- 순수한 물질과 효능 물질을 함유하고 있는 순수하지 않은 추출물에 대한 연구를 같이 수행하여 효과는 많이 있으면서 비용을 최소화 할 수 있는 방법을 확립

○ 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포주 개발 및 신규 타겟 발굴

- 곰팡이 감염 단백질 분리 및 발현을 통해 감염 기전 연구: 현재 전혀 알려져 있지 않은 노제마 또는 *A.apis*의 감염 경로를 확인 하고 이를 활용한 감염 억제제 개발을 위해 가능성이 있는 후보 단백질을 선정하였음. 이들의 상호 작용을 확인하기 위해 유전자를 확보 하여 Yeast two-hybrid를 수행 하거나 수행 예정.

- 이들의 상호 작용이 확인 되면, 곰팡이 단백질은 효모에서 발현 시키고 숙주 단백질은 BTI-Tn- 5B1-4에 발현 시켜 감염성이 발생 할 수 있는지 확인
- 이들의 감염성이 확인 되면, 감염에 관련 되어 있는 숙주 단백질을 포함하고 있는 BTI-Tn-5B1-4 세포에 직접 노제마를 감염시켜 감염율이 향상 되는지 확인
- 숙주 단백질을 안정적으로 발현 시킬 수 있는 신규 BTI-Tn-5B1-4 유도 세포 제작
- 노제마 이외에 다른 박테리아와 곰팡이의 감염성에 영향을 줄 수 있는 단백질을 발굴 하여 같은 방법으로 꿀벌 전염성 균주의 감염율을 증가 시킬 수 있는 세포주를 확립 하고 이를 감염 억제제 또는 성장 억제제 발굴에 활용

○ 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴

- 꿀벌 장내에 서식하는 미생물과 봉균에 서식하는 미생물 확인: 면역 증가에 의해 꿀벌내의 유해 미생물의 증가를 확인하기 위해 미생물 동정 실험을 통해 꿀벌에 기생 하거나 건강에 영향을 줄 수 있는 미생물 확인이 우선 필요
- 이들 미생물 중 꿀벌의 면역에 연관이 있거나, 꿀벌의 건강에 영향을 주는 미생물의 분포를 확인
- 면역에 관여 하는 단백질 확인 및 발현 또는 연구수행
- (주)한비 등의 회사에서 판매 중인 면역 증강제, 그리고 신규로 발굴 된 항(진)균제에 의하여 미생물 분포에 변화를 줄 수 있는지 확인 하고 항 후 미생물 분포에 변화를 줄 수 있는 물질 발굴에 필요한 기술 습득

○ 꿀벌에 대한 적용 기술 표준화 및 실험에 적용

- 기존에 항균제와 항진균제 발굴을 위한 실험을 확보 하고 있으며, 이를 표준화와 기본 실험으로 적용 예정.
- 노제마에 대한 실험은 전혀 없기 때문에, 본 과제에서 발굴한 세포주를 이용한 연구로 표준화 예정.
- 따라서 실험실 수준에서도 실험이 가능한 방법 구축이 가능하며, 이를 바탕으로 field test의 결과와의 부합 성을 보기 위해 농촌진흥청, 양봉협회, 양봉농협과 협의 완료 되었음.

2-3 연구수행 내용 및 결과

○ 신규 항(진)균제의 개발

- P.larvae에 대하여 신규 항균제 후보 물질 Anwulignan, Corosolic acid, 4-Hydroxyderricin, Acetylshikonin, Pimaric acid, Honokiol, Sophoraplavanon G, 등 7종의 항균 효능 물질 발굴 특허 출원 및 등록

P.larvae 와 *M.plutonius*의 성장 저해제

꿀벌은 농작물을 포함하여 다양한 종류의 식물의 화분매개(bee pollination)에 중요한 역할을

하는 전 세계에서 가장 큰 역할을 하는 화분 매개충이다. 따라서 현재 다양한 원인에 의하여 꿀벌의 개체수가 감소하는 것은 농업 생산 뿐만 아니라 자연 생태계에도 지대한 영향을 미칠 것은 자명하며, 이렇게 꿀벌에 의하여 간접적으로 생태계와 사람에게 기여하는 것은 돈으로 계산하기에는 힘든 일 일 것이다.

꿀벌은 한 공간에 밀집되어 사육되는 대표적인 가축으로 한 곳에 벌통이 수 십통에서부터 수 천 통까지 다양하게 있으며, 또한 수만마리 개체가 좁은 벌통안에 봉군 집단을 형성하여 생활하고 있다. 우리나라의 봉군 수는 2011년 기준으로 약 200만 개의 봉군이 있어 45명당 1개의 봉군 비를 이루어 세계 20위권이지만, 그 밀도는 다른 나라에 비하여 상당히 높다. 이렇게 밀폐된 공간에 수분이 많은 화분과 꿀벌, 유충등이 있기 때문에 전염성 질병에 매우 취약하며, 곰팡이 또는 박테리아와 같은 병원성 미생물에 전염이 되어 봉군을 완전히 잃어버리는 심각한 문제를 일으키기도 한다.

국내 또는 전세계에서 발병이 확인된 꿀벌 전염성 질병 중 박테리아에 의한 질병은 미국부저병(afb)과 유럽부저병(efb)이 있다.

꿀벌의 부저병은 국내에서 꿀벌의 전염병 제 1호로 지정될 정도로 매우 무서운 질병으로, 질병 치료를 위해 수많은 약제의 남용으로 병원균에 대한 저항성이 보고 되어 지고 있으며 꿀벌 산물에 남아서 산물의 질을 떨어트리는 주요 원인이 되고 있다.

부저병은 유충벌에 감염하는 전염성 질병 중 가장 무서운 질병 중 하나이며 *Paenibacillus larvae*에 의한 미국부저병(afb)이 잘 알려져 있다. *P. larvae*는 그람양성균 중 간균(2.5~5.0 $\mu\text{m} \times 0.7\sim 0.8\mu\text{m}$)의 형태로 포자(spore)를 형성 할 수 있기 때문에 살균제에 대한 저항성이 있고, 특정 조건에서는 35년간 감염력을 유지 할 수 도 있는 것으로 알려져 있다. 미국 부저병의 전염은 오염된 꿀의 재사용이나 오염된 기구를 재사용 하여 전염되는 경우도 보고되어 있으며 또한 감염된 벌의 교환 또는 도봉들에 의하여 유충 간 또는 봉군 간에 전염이 확산되기도 한다. 미국 부저병(afb)은 공식적으로는 1877년 뉴질랜드에서 처음 발병된 것으로 알려져 있으며 이후 전 세계로 널리 퍼진 이후 미생물에 의한 꿀벌의 전염성 질병 중 가장 많이 발생되고 또한 피해도 심각한 질병 중 하나이다. 국내에는 1950년 중부지방에서 처음 보고가 된 후 양봉에 매우 심각한 피해를 입힌바 있으며 현재까지 전국에서 지속적으로 발병이 보고되고 있다. 부저병을 일으키는 또 다른 원인균으로는 *Melissococcus plutonius*이 알려져 있으며, 이는 유럽부저병을 일으킨다. *M. plutonius* 또한 유충벌이 감염되어 죽는 과정이나 전염경로는 미국 부저병과 유사하지만 미국 부저병에 비하여 병세가 가볍고 청소벌에 의하여 잘 제거되기도 하는 것으로 알려져 있다.

일반적으로 감염된 봉군의 경우 봉개된 부위가 검붉은 빛을 띄고 꿀벌의 경우 힘이 없고 복부가 비대하며 먹지 못하여 5-6일 후에 소문으로 기어 나와 죽게 된다. 심하게 봉군이 전염이 되었을 경우에는 즉각 소각하는 방법이 제일 좋은 것으로 알려져 있으며 전염이 경미 할 경우에는 테트라사이클린 계통의 항생제를 사용하기도 한다. 하지만, 테트라사이클린 계통의 항생제는 박테리아를 죽이는 약이 아니라 성장을 억제하는 합성 화합물이며, 현재까지 알려진 가장 좋은 부저병의 방제법은 감염된 벌통을 소각하는 방법이지만, 완전히 사용 불가하기 때문에 경제적인 손실이 큰 단점이 있는 방법이다.

항생제는 벌꿀 내 잔류성에 대하여 주의하여야 하며, 완전한 치료가 불가능 한데다가 포자를 제거 할 수 없고 약제를 사용 할 수 있는 기한이 정해져 있어 발병에 대한 치료 보다는 예방적 차원에서 봉군 관리가 절실한 것이 현실 이다. 또한 발병을 확인 하게 되면 주로 소각을 하기 때문에 이에 대한 손실이 많을 수밖에 없다. 또한 테트라사이클린 계통의 항생제는 거의 모든 박테리아를 죽이게 되기 때문에 유익균까지 모두 죽이게 되어 생태계에 좋지 않은 영향을 끼치게 된다. 또한 사용 빈도가 많아, 많은 종류의 박테리아에서 내성균주의 발생이 보고되어 지고 있다. 따라서 이를 대체하려고 하는 약제를 이용한 방제법에 관한 연구가 필요 하다. 꿀벌의 전염병 중 부저병 치료용 물질 발굴을 위해 1차적으로 식물 추출물에서 유래한 단일 화합물을 유효 성분으로 하고 인체에 대한 독성이 낮은 물질 발굴을 추진하였다.

Anwulignan과 Corosolic acid

국내에서 꿀벌 질병 관련 치료약제의 개발이 거의 이루어져 있지 않다. 하지만 향후 꿀벌에 대한 중요성이 부각 되고 있으므로 그 중요성이 증가하고 있으며, 꿀벌 질병을 일으키는 대표 균주인 *P. larvae*의 성장을 저해하는 꿀벌 감염 치료제를 개발하여 꿀벌 질병 치료용 신규 항균 물질을 개발하고자 하였다.

항균 물질 후보는 1차적으로 식물이 함유하고 있는 물질 중 기존에 항(진)균 효과가 보고되지 않고 활성이 있을 것으로 예상 되는 순도가 높은 물질을 실험에 대한 정확도를 위하여 구입하여 실험에 사용하였다.

화합물에 대하여 *P.larvae*에 대한 항균 효과를 확인하고자 the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)에서 제시한 Broth microdilution assay를 사용하였다. 각 화합물은 10mg/ml의 농도로 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 사용하였다. *P.larvae*는 Luria-Bertani(LB) agar (1% (w/v) bacto-tryptone, 0.5% (w/v) bacto-yeast extract, 1% (w/v) NaCl and 4.5% (w/v) nutrient agar)에 키우다가 MYPGP (MYPGP: 1% of Mueller-Hinton broth, 1.5% of yeast extract, 0.2% of glucose, 0.3% of K₂HPO₄ and 0.1% of sodium pyruvate)를 사용하여 실험을 수행 하였다. 각 화합물에 있어 DMSO 농도는 2.5% 보다 높지 않도록 하여 사용하였다.

각 화합물은 2배씩 계속 희석된 후 96-well microtitre plate에 100 μ l 첨가되었으며, 100 μ l의 *P.larvae* 균주 현탁액(OD₆₀₀=0.1)을 각각의 well 에 투입한 후 35°C에서 24시간 또는 48시간 배양하였다. 각 화합물의 농도는 최대 200mg/l 에서 최소 0.2mg/l 이 되게 하였으며, 물질에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 균주가 자라지 않는 최소 농도로 하여 확인되었다. 각 균주에 따라서 *P. larvae*에 대한 감수성 실험은 MYPGP broth를 사용하였다 (Gende *et al.*, 2008, Gende *et al.*, 2010). *S. aureus*와 *S. saprophyticus*에 대한 감수성 실험은 Müller-Hinton broth를 사용하였다. *B. subtilis subsp. Spizizenii* 와 *E. faecalis*는 Mueller Hinton II broth를 사용하여 감수성 실험을 하였다. *M. plutonius*는 KBHI broth를 사용하여 5% CO₂ 조건에서 감수성 실험을 하였다.

Compounds	<i>P. larvae</i>		<i>M. plutonius</i>	
	24h	48h	24h	48h
Loganic acid	>200	>200	>200	>200
Anwulignan	3.13	3.13	3.13	>200

Tracheloside	>200	>200	>200	>200
Fangchinoline	50	>200	>200	>200
Corosolic acid	3.13	200	3.13	3.13
Dehydrocostus lactone	50	50	>200	>200
Emodin-8-O-β -D-glucopyranoside	>200	>200	>200	>200
Miconazole	1.56	3.13	3.13	3.13
Tetracycline	1.56	1.56	0.78	0.78

표 1. 항균 후보 물질에 의한 항균 효과

표 1에서 나타낸 바와 같이 7종의 물질을 대상으로 항(진)균 효과를 확인한 결과 anwulignan은 *P. larvae* (MIC value: 3.13mg/ℓ, 3.13mg/ℓ)에 대하여 놀라운 성장 저해 효과를 보임을 확인 하였다. 또한 corosolic acid (MIC value: 3.13mg/ℓ, 3.13mg/ℓ)가 기존에 잘 알려져 있는 항생제인 tetracycline (MIC value: 0.78mg/ℓ, 0.78mg/ℓ)보다는 약간 약하지만 *M. plutonius*의 성장을 현저히 저해함을 밝혔다. 이들 항균 효과는 기존에 잘 알려져 있는 물질에 비교가 될 정도로 좋은 효과이며, 기존에 알려져 있는 약물이 가지는 내성 균주의 출현과 부작용 때문에 발생하는 문제점 때문에 다양한 항균 효과가 있는 물질을 발굴하려는 취지에 맞는다고 할 수 있다. 또한 이들을 대상으로 유도물질을 만들어 더욱 효과가 좋은 물질을 만드는데 기여할 수 있을 것이다. 이외에 fangchinoline은 *P. larvae*의 성장을(MIC value: 50mg/ℓ, >200mg/ℓ), dehydrocostus lactone은 *P. larvae* (MIC value: 50mg/ℓ, 50mg/ℓ)의 성장을 저해하기는 하였으나, 그 효과가 너무 미미 하였고 loganic acid와 tracheloside, emodin-8-O-β-D-glucopyranoside은 항(진)균 효과가 없는 것으로 확인 하였다.

		MIC for Anwulignan	
		24h	48h
KH A5	<i>A. apis</i>	1.56	3.13
KACC42589	<i>A. niger</i>	>200	>200
KACC40071	<i>A. clavatus</i>	>200	>200
KCTC7965	<i>C. albicans</i>	>200	>200
KCTC7270	<i>C. albicans</i>	>200	>200
KACC45480	<i>C. parapsilosis</i> var. <i>parapsilosis</i>	>200	>200
KCTC7212	<i>C. tropicalis</i>	>200	>200
KCTC17762	<i>C. tropocalis</i> var. <i>tropocalis</i>	>200	>200
KCTC7219	<i>C. glabrata</i>	>200	>200
KCTC17528	<i>F. neoformans</i> var. <i>bacillispora</i>	6.25	6.25
KCTC7211	<i>P. guilliermondii</i>	3.13	200
KACC40256	<i>R. oryzae</i>	>200	>200
BY4742	<i>S. cerevisiae</i>	>200	>200
KACC30068	<i>S. cerevisiae</i>	>200	>200

KCTC3705	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	1.56	50
KACC11304	<i>E. faecalis</i>	>200	>200
ATCC35311	<i>M. plutonius</i>	3.13	>200
ATCC9545	<i>P. larvae</i>	3.13	3.13
ATCC6538	<i>S. aureus</i>	>200	>200
KACC15799	<i>S. saprophyticus</i>	6.25	>200

표 2. Anwulignan에 의한 항(진)균 효과

위의 표 1에서 발굴 된 Anwulignan에 대하여 다양한 종류의 곰팡이균과 박테리아균의 성장에 영향을 주는지 알아보기 위하여 *A. niger*를 포함하여 20개 균주를 대상으로 항(진)균 활성을 확인하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 Anwulignan은 *A. apis* (MIC value: 1.56mg/l, 3.13mg/l)와 *F. neoformans* var. *bacillispora* (MIC value: 6.25mg/l, 6.25mg/l), *P. larvae* (MIC value: 3.13mg/l, 3.13mg/l)에 성장 저해 효과가 있는 것으로 확인 되었으며, *P. guilliermondii*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *M. plutonius*와 *S. saprophyticus*에 24시간 후 성장을 저해 하지만 (MIC value 범위: 1.56mg/l ~3.13mg/l) 48시간 후에는 영향을 주지 못함을 확인 하였다 (MIC value 범위: 200mg/l or >200mg/l). 그 이외의 균주에는 전혀 영향을 주지 않았으며, 이 결과로 Anwulignan은 특정 균주에만 특이적으로 작용하는 물질임을 확인 하였다. 자연계에는 다양한 미생물이 존재하며 이들 중 좋은 균주 또한 많이 있다. 따라서 이 Anwulignan을 사용할 경우 다른 미생물의 성장에는 영향을 미치지 않지만 *A. apis*와 *P. larvae* 같이 벌에 질병을 일으키는 균주에 특이적으로 사용 가능 할 것이다.

		MIC for Miconazole	
		24h	48h
KH A5	<i>A. apis</i>	12.5	12.5
KACC42589	<i>A. niger</i>	>200	>200
KACC40071	<i>A. clavatus</i>	>200	>200
KCTC7965	<i>C. albicans</i>	>200	>200
KCTC7270	<i>C. albicans</i>	>200	>200
KACC45480	<i>C. parapsilosis</i> var. <i>parapsilosis</i>	>200	>200
KCTC7212	<i>C. tropicalis</i>	>200	>200
KCTC17762	<i>C. tropocalis</i> var. <i>tropicalis</i>	>200	>200
KCTC7219	<i>C. glabrata</i>	>200	>200
KCTC17528	<i>F. neoformans</i> var. <i>bacillispora</i>	3.13	>200
KCTC7211	<i>P. guilliermondii</i>	>200	>200
KACC40256	<i>R. oryzae</i>	>200	>200
BY4742	<i>S. cerevisiae</i>	>200	>200

KACC30068	<i>S. cerevisiae</i>	>200	>200
KCTC3705	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	6.25	200
KACC11304	<i>E. faecalis</i>	>200	>200
ATCC35311	<i>M.plutonius</i>	3.13	3.13
ATCC9545	<i>P. larvae</i>	3.13	200
ATCC6538	<i>S. aureus</i>	>200	>200
KACC15799	<i>S. saprophyticus</i>	12.5	50

표 3. Corosolic Acid에 의한 항(진)균 효과

표 3은 Corosolic Acid에 의한 각각의 곰팡이균과 박테리아균에 대한 성장 저해 정도를 나타낸다. 위의 표 1에서 항균 효과가 있는 것으로 발굴 된 Corosolic acid에 대하여 다양한 종류의 곰팡이균과 박테리아균의 성장에 영향을 주는지 알아보기 위하여 *A. niger*를 포함하여 20개 균주를 대상으로 항(진)균 활성을 확인하였다. 표 3에서 보는 바와 같이 Corosolic acid는 *M. plutonius*의 성장을 현저히 억제하며(MIC value: 3.13mg/l, 3.13mg/l) *A. apis*에는 현저하지는 않지만 성장을 저해하는 것으로 확인하였다(MIC value: 12.5mg/l, 12.5mg/l). *F. neoformans* var. *bacillispora* 와 *P. larvae*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*에는 24시간 후까지는 성장을 저해 하지만 (MIC value 범위: 3.13mg/l ~6.25mg/l) 48시간 후에는 영향을 주지 못함을 확인 하였다 (MIC value 범위: 200mg/l or >200mg/l). 그 이외의 균주에는 전혀 영향을 주지 않으며, 따라서 Corosolic acid는 *M. plutonius*와 *A. apis* 등 특정 균주의 성장에만 특이적으로 작용하는 물질임을 확인 하였다. 이는 Anwulignan과 같은 이유로 *M. plutonius*와 *A. apis* 등의 벌에 질병을 일으키는 균주에 특이적으로 사용 가능 할 것이다.

Strain name	MIC for <i>Dehydrocostus lactone</i>	
	24h	48h
KH A5 <i>A. apis</i>	50	50
KACC42589 <i>A. niger</i>	100	100
KACC40071 <i>A. clavatus</i>	50	50
KCTC7965 <i>C. albicans</i>	100	>200
KCTC7270 <i>C. albicans</i>	>200	>200
KACC45480 <i>C. parapsilosis</i> var. <i>parapsilosis</i>	100	>200
KCTC7212 <i>C. tropicalis</i>	50	50
KCTC17762 <i>C. tropicalis</i> var. <i>tropicalis</i>	50	>200
KCTC7219 <i>C. glabrata</i>	100	100
KCTC17528 <i>F. neoformans</i> var. <i>bacillispora</i>	25	100
KCTC7211 <i>P. guilliermondii</i>	50	50
KACC40256 <i>R. oryzae</i>	>200	>200

BY4742	<i>S. cerevisiae</i>	100	100
KACC30068	<i>S. cerevisiae</i>	50	50
KCTC3705	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	50	100
KACC11304	<i>E. faecalis</i>	>200	>200
ATCC35311	<i>M. plutonius</i>	>200	>200
ATCC9545	<i>P. larvae</i>	100	100
ATCC6538	<i>S. aureus</i>	>200	>200
KACC15799	<i>S. saprophyticus</i>	25	50

표 4. Dehydrocostus lactone에 의한 항(진)균 효과

위의 표 1에서 *A. apis* 와 *P. larvae*에 약한 항균 효과가 있는 것으로 확인 된 Dehydrocostus lactone에 대하여 다양한 곰팡이균과 박테리아균의 성장에 영향을 주는지 알아보기 위하여 *A.niger*를 포함하여 20개 균주를 대상으로 항(진)균 활성을 확인하였다. Dehydrocostus lactone은 *A. apis* 와 *A. clavatus*, *C. tropicalis*, *F. neoformans* var. *bacillispora*, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *S. saprophyticus*에 효과를 보이는 것을 확인 하였다(MIC value 범위: 25mg/ℓ ~50mg/ℓ). 그러나 그 효과가 미미하여 더 이상 항(진)균 효과에 대하여 실험하지는 않았다.

기존에 잘 알려진 항생제인 Tetracycline에 의한 항균 효능을 확인 하였다. 이는 본 연구 결과 확인 된 신규 소재와의 혼합사용에 대하여 확인하기 위하여 수행 하였다.

	Strain name	MIC for Tetracycline	
		24h	48h
KCTC3705	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	0.39	0.78
KACC11304	<i>E. faecalis</i>	100	200
ATCC35311	<i>M. plutonius</i>	0.78	0.78
ATCC9545	<i>P. larvae</i>	1.56	3.13
ATCC6538	<i>S. aureus</i>	200	200
KACC15799	<i>S. saprophyticus</i>	3.13	3.13

표 5. Tetracycline에 의한 항균 효과

위의 표 5에서 보듯이 모든 균에 대하여 상당히 높은 항균 효과를 보였다. 이는 박테리아에 의하여 감염이 일어나는 모든 경우에 Tetracycline이 사용 될 수 있으며 이렇게 다양하게 사용이 됨으로 다양한 종류의 내성이 잘 발생 할 수 있음을 의미한다. 또한 이 항균 소재에 대한 내성은 *P.larvae*에 대하여도 보고가 되고 있다 따라서 되도록 꿀벌에 감염성 질환을 일으키는 균에 대한 특이적으로 작용하는 물질 발굴이 필요하게 된다. 또는 이 항생제의 사용량을 줄일 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하게 되었다. 따라서 *P.larvae*에 대한 각 항균 소재에 대한 혼합사

용에 의한 항균 효과를 확인하기 위하여 먼저 하나의 물질을 순차적으로 RPMI 1640 without sodium bicarbonate and with l-glutamine를 0.165 M morpholinopropanesulfonic acid를 사용하여 pH 7.0으로 맞춘 후 2% glucose를 넣은 배지를 (또는 YPD media (1% BactoYeast extract, 2% BactoPeptone, 2% Dextrose)) 사용하여, 2배 희석한 후 90°방향으로 또 다른 항균 소재를 순차적으로 2배 희석하여 96-well microtitre plate에 100 μ l 넣은 다음, 100 μ l의 *P.larvae* 균주 현탁액 ($2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ CFU/ml)을 각각의 well 에 넣은 후 35°C에서 24시간 또는 48시간 배양하였다. Miconazole은 최대 200mg/l에서 최소 0.2mg/l이 되게 하였으며, Anwulignan은 최대 25mg/l에서 최소 0.2mg/l가 되게 하였다. 각 물질에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 다시 확인 하였다. Tetracycline은 최대 100mg/l에서 최소 0.1mg/l이 되게 하였으며, Anwulignan은 최대 25mg/l에서 최소 0.2mg/l가 되게 하였다. 각 물질에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 다시 확인 하였다. *M.plutonius*에 대한 Tetracycline과 Corosolic acid 혼합사용에 의한 항균 실험은 위의 실험을 약간 변형 하여 KBHI broth를 사용하여 5% CO₂ 조건에서 감수성 실험을 하였다. Tetracycline은 최대 100mg/l에서 최소 0.1mg/l이 되게 하였으며, Corosolic acid은 최대 25mg/l에서 최소 0.2mg/l가 되게 하였다. 각 물질에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 다시 확인 하였다.

혼합사용 실험에 사용된 물질간의 상승효과는 $FICI = (Ac/Aa) + (Bc/Ba)$ 공식을 사용하여 Fractional inhibitory concentration indexes (FICIs)으로 표시하였다 (Drogari-Apiranthitou *et al.*, 2012) Ac와 Bc는 혼합 사용하였을 경우의 A 물질과 B 물질 각각의 MIC 값이며, Aa와 Ba는 다른 물질이 없을 경우의 A 물질과 B 물질 각각의 MIC 값으로 한다. FICI값이 0.5이하인 경우 상승효과가 있다고 하며, 0.5 ~ 4일 경우 서로 연관성이 없는 것으로 하였다.

<i>P. larvae</i>	MIC				FICI	
	Anwulignan		Tetracycline		24hour	48hour
	24hour	48hour	24hour	48hour		
Median	3.13	3.13	1.56	3.13	0.83±0.14	0.83±0.14

표 6. Anwulignan과 Tetracycline의 혼합사용에 의한 *P.larvae*균에 대한 성장 저해

표 6의 결과에서 보듯 Anwulignan 과 Tetracycline의 복합사용에 의한 항균 상승효과는 별로 관찰 되지 않았지만 (FICI value=0.83±0.14, 0.83±0.14), Anwulignan 3.13 mg/l을 사용하였을 경우 Tetracycline 0.39 mg/l을 사용 하여도 *P.larvae*의 성장을 저해함을 확인 하였다. 또한 Anwulignan이 1.56 mg/l을 사용하였을 경우 Tetracycline 0.78mg/l을 사용 하여도 *P.larvae*의 성장을 저해함을 확인 하였다. 따라서 Anwulignan 과 Tetracycline의 복합사용으로 Tetracycline의 사용 양을 줄일 수 있음을 확인 하였다.

<i>M. plutonius</i>	MIC				FICI	
	Corosolic acid		Tetracycline		24hour	48hour
	24hour	48hour	24hour	48hour		
Median	3.13	3.13	0.78	0.78	0.29±0.07	0.46±0.07

표 7. Corosolic acid과 Tetracycline의 혼합사용에 의한 *M. plutonius*균에 대한 성장 저해

또한, 표 7의 결과에서 보듯이 Corosolic acid와 Tetracycline의 혼합사용에 의한 항균 상승효과를 확인 하였다 (FICI value=0.29±0.07,0.46±0.07). 이 결과는 Corosolic acid과 Tetracycline의 혼합사용에 의하여 사용되는 물질의 양을 적게 하여도 항균 효과를 줄 수 있음을 의미한다. Corosolic acid 1.56mg/ℓ 을 사용하였을 경우 Tetracycline 0.05 mg/ℓ 을 사용 하여도 24시간 후 *M.plutonius*균의 성장을 완전히 저해함을 확인 하였다. 또한 Corosolic acid 0.39mg/ℓ 을 사용하였을 경우 Tetracycline 0.39mg/ℓ 을 사용 하여도 *M. plutonius*균의 성장을 저해함을 확인 하였다. 따라서 Corosolic acid 과 Tetracycline의 복합사용으로 Tetracycline의 사용 양을 줄이면서도 *M. plutonius*균의 성장을 저해할 수 있음을 확인 하였다.

표 1과 표 2의 결과로 Anwulignan과 corosolic acid은 *A. apis* 와 *P. larvae*균에 특이적으로 항(진)균 효과가 있는 것을 확인 하였다. 이를 사용할 경우 사람에게 해가 될 수 있는지를 확인하기 위하여 HepG2 cell line를 사용하여 사람 세포의 성장에 영향을 주는지 MTT assay를 수행하였다. 2×10^3 cells/0.1ml의 Hep-G2 cell lines을 96-well tissue culture plates (Falcon)의 각 well에 넣은 후 DMSO에 녹여진 각 물질을 표시된 농도로 culture plates에 추가하였다. 대조군 DMSO는 최대 농도가 0.5%가 넘지 않도록 하여 각 plates에 넣어 주었다. 24시간 후 100 μℓ 5mg/ml MTT (sigma Cat. M2128)을 넣어 준 다음 반응물을 추출하여 활성을 ELISA reader(VersaMax, Molecular Devises, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 최소 3회 반복하여 수행하였다.

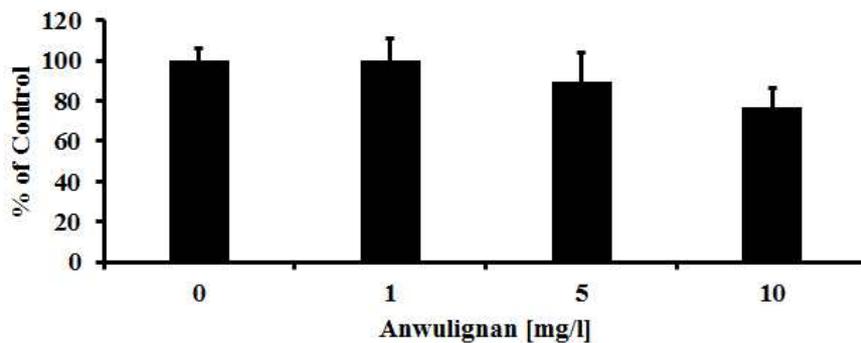


그림 1. Anwulignan에 의한 HepG2 cell line에 대한 성장 저해

그림 1의 결과 (10mg/ℓ 처리한 경우 대조군에 비하여 76.6±10.1% 세포의 성장이 관찰 됨)와 이전에 다른 실험실에서 발표한 결과 (Xu LJ, et al., 2006)에 의하면 Anwulignan은 사람 세포의 성장에 현저한 영향을 주지 않는 것을 확인 하였다. 따라서 이 물질을 항(진)균제로 사용 하더라도 사람에게는 거의 영향을 주지 않는다는 것을 확인 하였다.

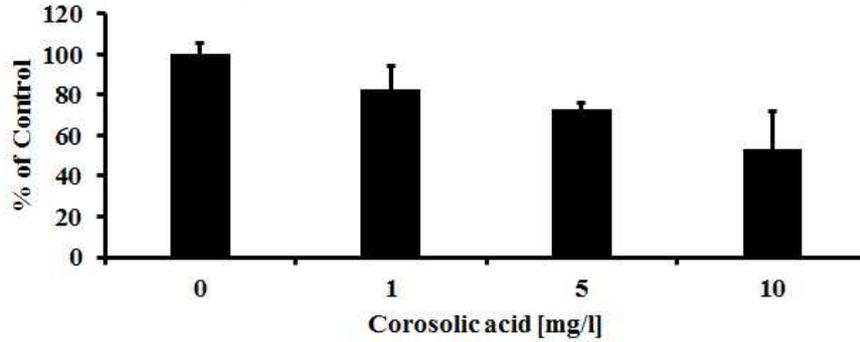


그림 2. Corosolic acid에 의한 HepG2 cell line에 대한 성장 저해

그림 2의 결과에 의하면 Corosolic acid는 10mg/l 처리한 경우 대조군에 비하여 53.6±8.0% 세포의 성장이 관찰 되었다. 이 양은 꿀벌에 질병을 일으키는 균의 성장을 저해하기 위해 사용하는 양에 비하여 매우 높은 양을 사용하여 실험한 결과이고 Corosolic acid는 혈당치 저하제로 사용되고 있기 때문에 사람에게 부작용이 적은 것으로 알려져 있다. 따라서 이 물질을 항(진)균제로 사용 하더라도 사람에게는 현저한 영향을 주지 않는다는 것을 확인 하였다.

항균 소재 물질에 대하여 제품 생산시에 필요한 최소 농도 확인을 위하여 일정한 양의 세포에 항균 소재 물질을 투여 한 후 세포 사멸을 관찰 하였다.

농도 [ug/ml]	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
대조군	4.0X10 ⁵	6.5X10 ⁵	2.9X10 ⁵	8.3X10 ⁵	2.5X10 ⁵	4.5X10 ⁵
감소율(%)	99.91	99.95	99.89	99.96	99.11	97.68

표의 결과에서도 알 수 있듯, 아세틸시코닌은 0.001ug/ml을 처리 하였을 경우에도 세포 사멸이 99.11% 관찰 되어 사용 할 수 있는 최소 농도로 0.001ug/ml임을 확인 하였다.

P.larvae, *M. plutonius* 박테리아균에 의하여 질병이 발생하면 주로 봉군을 태우거나 Tetracycline을 사용하였다. 하지만 제대로 된 치료법은 현재 없기 때문에 전 세계적으로 많은 곳에서 치료제 개발을 추진하고 있다. Anwulignan 은 현재 항(진)균 효과가 전혀 보고되지 않은 신규 물질로서 *A. apis* 곰팡이 균과 *P.larvae*균의 성장을 현저히 저해하는 물질임을 확인 하였다. 나아가 그림 1의 Anwulignan MTT 결과, anwulignan은 HepG2 cell lines에 거의 영향을 주지 않으며, 표 2에서 보듯 다른 균주에도 영향을 거의 주지 않지만, *A. apis*와 *P.larvae* 등 벌에 질병을 일으키는 균주에 특이적으로 작용함으로 Anwulignan은 이들을 관리하는데 있어 매우 중요한 역할을 할 수 있다. 차세대 항균제의 경우 내성문제와 직결되는 돌연변이 유발 빈도의 저감과 다양한 미생물이 존재함을 고려하여 항균 범위를 조절할 수 있는 신개념 항균제(new-paradigm antibacterials)의 발굴에 초점을 맞추고 있다 (조유희, 2015). Anwulignan은 *A. apis* 을 비롯하여 실험에 사용 한 균주 중 매우 특징적인 몇몇 균에만 작용함으로 이러한 개념에 잘 맞는다고 할 수 있을 것이다. 또한 사람 세포의 성장에는 거의 영향을 주지 않고, 기존에 항암제와 당뇨병약으로 사용되어져 왔기 때문에 본 물질을 벌에 질병을 유발하는 곰팡이와 박테리아의 성장을 저해하기 위하여 사용하여도 문제가 없을 것이다.

또한, Corosolic acid는 현재 항균 효과가 전혀 보고되지 않은 신규 물질로서 *M. plutonius* 박테리아균의 성장을 현저히 저해하는 물질임을 확인 하였다. 또한 그림 2의 Corosolic acid MTT 결과, Corosolic acid는 Hep-G2에 거의 영향을 주지 않으며, 표 3에서 보듯 다른 균주에도 영향을 거의 주지 않지만, *M. plutonius* 박테리아균과 같은 벌에 질병을 일으키는 균주에 특이적으로 작용함으로 Corosolic acid는 이들을 관리하는데 있어 매우 중요한 역할을 할 수 있다. 사람 세포의 성장에는 거의 영향을 주지 않고, 기존에 혈압강하제로 사용되어져 왔기 때문에 본 물질을 벌에 질병을 유발하는 박테리아의 성장을 저해하기 위하여 사용하여도 문제가 없을 것이다.

표 8에 나타난 바와 같이, 아세틸시코닌, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 큐라리논의 MIC 값을 측정한 결과 *P.larvae*에 대하여 성장 저해 효과가 있음을 확인 하였다. 기존에 널리 사용되는 테트라사이클린과 비교하여 4-히드록시테리신은 더 좋은 효과를 보였으며, 아세틸시코닌, 소포라플라바논 G 및 큐라리논은 상대적으로 미흡한 항진균 활성을 나타내었으나, *P.larvae*의 성장을 현저히 저해하였다.

구분	P649 (KACC14031)		P618 (KACC11540)	
	24h	48h	24h	48h
Acetylshikonin	3.125	3.125	12.5	12.5
4-Hydroxyderricin	<0.78	<0.78	6.25	12.5
Sophoraflavanone G	1.56	1.56	3.125	12.5
Kurarinone	6.25	6.25	6.25	12.5
Miconazole	1.56	3.125	6.25	12.5
Tetracycline	0.78	0.78	25	50
Alismol	100	100	>200	>200
Alpiniumisoflavone	>200	>200	>200	>200
Bisdemethoxy-curcumin	25	>200	>200	>200
(R)-(+)-Dalbergiphenol	100	100	>200	>200
Dehydrodieugenol	>200	>200	>200	>200
6,8-Diprenylorobol	25	25	50	>200
Eupatilin	>200	>200	>200	>200
Falcarindiol	6.25	6.25	50	100
Gagaminine	>200	>200	>200	>200
Galangin	>200	>200	>200	>200
Guaiacin	50	50	50	50
Matairesinoside	>200	>200	>200	>200
Myristargenol A	>200	>200	>200	>200
Oleiferin F	>200	>200	>200	>200
Sargachromanol G	6.25	6.25	6.25	50
Timosaponin AIII	>200	>200	>200	>200

표 8. 각 물질에 의한 패니바실러스 라베에 대한 항균 효과

각 물질에 의한 멜리소코코스 플루토니우스(*Melissococcus plutonius*)에 대한 항균 활성을 위의 방법과 같은 방법으로 평가하였다.

표 9에 나타난 바와 같이, 아세틸시코닌, 4-히드록시데리신, 소포라플라바논 G 및 큐라리논의 MIC 값을 측정한 결과 *M.plutonius*에 대하여 성장 저해 효과가 있음을 확인 하였다. 아세틸시코닌, 4-히드록시데리신, 소포라플라바논 G 및 큐라리논은 비록 기존에 널리 사용되는 테트라사이클린과 비교하여는 미흡한 활성을 보였으나, 마이코나졸 보다는 같거나 비슷한 활성으로 *M.plutonius*의 성장을 저해하였다.

구분	24h	48h
Acetylshikonin	6.25	6.25
4-Hydroxyderricin	3.125	3.125
Sophoraflavanone G	3.125	3.125
Kurarinone	12.5	12.5
Miconazole	3.125	3.125
Tetracycline	0.78	0.78
Alismol	>200	>200
Alpiniumisoflavone	>200	>200
Bisdemethoxy-curcumin	>200	>200
(R)-(+)-Dalbergiphenol	>200	>200
Dehydrodieugenol	>200	>200
6,8-Diprenylorobol	12.5	25
Eupatilin	>200	>200
Falcarindiol	100	100
Gagaminine	>200	>200
Galangin	>200	>200
Guaiacin	50	50
Matairesinoside	>200	>200
Myristargenol A	>200	>200
Oleiferin F	>200	>200
Sargachromanol G	>200	>200
Timosaponin AIII	>200	>200

표 9. 각 물질에 의한 멜리소코코스 플루토니우스(*Melissococcus plutonius*)에 대한 항균 활성

화합물을 유효 성분으로 포함하는 치료용 조성물은 특정 균주에 대한 특이적인 활성을 보유함으로써 광범위한 사용이 유도되지 않고 내성 발생률이 최소화될 수 있으므로, 각 물질이 패니바실러스 라베(*Paenibacillus larvae*)와 멜리소코코스 플루토니우스(*Melissococcus plutonius*)에 대하여 특이적으로 항균 활성을 보유하는지 아니면 다른 종류의 박테리아균에도 활성을 보이는지 상기한 방법을 사용하여 확인하였다.

	구분	Acetylshikonin	
		24h	48h
꿀벌 감염균	<i>P. larvae</i>	3.125	3.125
	<i>P. larvae</i>	12.5	25

	<i>M. plutonius</i>	6.25	6.25
	<i>A. Baumannii</i>	>200	>200
	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	50	>200
	<i>E. Cloacae</i>	>200	>200
	<i>E. coli</i>	>200	>200
	<i>E. faecalis</i>	12.5	12.5
비교균	<i>E. faecium</i>	12.5	12.5
	<i>L. Monocytogenes</i>	1.56	6.25
	<i>M.luteus</i>	3.125	3.125
	<i>P. aeruginosa</i>	>200	>200
	<i>S. aureus</i>	25	50
	<i>S. saprophyticus</i>	12.5	12.5

표 10. 아세틸시코닌의 각 균주에 대한 성장 저해 효과

표 10에 나타난 바와 같이, 아세틸시코닌은 *P. larvae*와 *M. plutonius*, *M.luteus* 와 *L. Monocytogenes*에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내었으나, 그 외에는 항균 활성이 미약하거나 24h 에 비하여 48h에 활성이 줄어들거나 활성이 전혀 나타나지 않았다.

		구분	4-Hydroxyderricin	
			24h	48h
꿀벌 감염균		<i>P. larvae</i>	<0.78	<0.78
		<i>P. larvae</i>	6.25	12.5
비교균		<i>M. plutonius</i>	3.125	6.25
		<i>A. niger</i>	>200	>200
		<i>A. Baumannii</i>	>200	>200
		<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	3.125	6.25
		<i>E. Cloacae</i>	>200	>200
		<i>E. coli</i>	>200	>200
		<i>E. faecalis</i>	6.25	12.5
		<i>E. faecium</i>	25	25
		<i>L. Monocytogenes</i>	0.78	3.125
		<i>M.luteus</i>	3.125	3.125
		<i>P. aeruginosa</i>	>200	>200
		<i>S. aureus</i>	>200	>200
		<i>S. saprophyticus</i>	6.25	12.5

표 11. 상기 4-히드록시테리신의 각 균주에 대한 성장 저해 효과

표 11에 나타난 바와 같이, 4-히드록시테리신은 *P. larvae*와 *M. plutonius*, *B. subtilis subsp. spizizenii*, *E. faecalis*, *L. Monocytogenes*, *M.luteus*, *S. saprophyticus*에 대하여 항균 활성을 나타낸 반면, 그 이외의 다른 균주에 대한 항균 활성은 나타나지 않았다.

	구분	Sophoraflavanone G	
		24h	48h
꿀벌 감염균	<i>P. larvae</i>	1.56	1.56
	<i>P. larvae</i>	3.125	6.25
	<i>M. plutonius</i>	3.125	3.125
	<i>A. Baumannii</i>	>200	>200
	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	6.25	12.5
	<i>E. Cloacae</i>	>200	>200
	<i>E. coli</i>	>200	>200
비교균	<i>E. faecalis</i>	3.125	6.25
	<i>E. faecium</i>	12.5	12.5
	<i>L. Monocytogenes</i>	0.78	1.56
	<i>M. luteus</i>	1.56	1.56
	<i>P. aeruginosa</i>	>200	>200
	<i>S. aureus</i>	>200	>200
	<i>S. saprophyticus</i>	12.5	12.5

표 12. 상기 소포라플라바논 G의 각 균주에 대한 성장 저해 효과

표 12에 나타난 바와 같이, 소포라플라바논 G는 *P. larvae*와, *M. plutonius*, *E. faecalis*, *L. Monocytogenes*, *M.luteus*에 대하여 항균 활성을 나타낸 반면, 그 이외의 다른 균주에 대한 항균 활성은 약하거나 나타나지 않았다.

	구분	Kurarinone	
		24h	48h
꿀벌 감염균	<i>P. larvae</i>	6.25	6.25
	<i>P. larvae</i>	6.25	12.5
	<i>M. plutonius</i>	12.5	12.5
	<i>A. Baumannii</i>	>200	>200
	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	12.5	25
	<i>E. Cloacae</i>	>200	>200
	<i>E. coli</i>	>200	>200
비교균	<i>E. faecalis</i>	25	25
	<i>E. faecium</i>	25	25
	<i>L. Monocytogenes</i>	6.25	6.25
	<i>M. luteus</i>	6.25	6.25
	<i>P. aeruginosa</i>	>200	>200
	<i>S. aureus</i>	>200	>200
	<i>S. saprophyticus</i>	12.5	25

표 13. 상기 큐라리논에 의한 각 균주에 대한 성장 저해 효과

표 13에 나타난 바와 같이, 큐라리논은 *P. larvae*와, *M. plutonius*, *L. Monocytogenes*, *M.luteus*에 대하여 항균 활성을 나타낸 반면, 그 이외의 다른 균주에 대한 항균 활성은 약하거나 나타나지 않았다.

따라서 아세틸시코닌, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 큐라리논은 일부 미생물종에 대하여 특이적으로 작용하여 성장을 저해 하는 효과를 나타냄으로, 꿀벌의 전염병, 특히, 부저병 치료에 유용하게 활용될 수 있으며, 광범위한 사용의 우려가 적을 것으로 사료 된다.

각 화합물에 대하여 기존 항균제와의 복합 적용에 따른 항균 활성을 평가하고자, 상기한 Broth microdilution assay를 chequerboard fashion으로 사용하였다. 각 화합물의 농도는 최대 200mg/ℓ에서 최소 0.2mg/ℓ이 되도록 계속적으로 2배 희석한 후 96-well microtitre plate에 100μℓ 첨가되었으며, 100μℓ의 각 균주 현탁액(OD₆₀₀=1)을 각각의 well에 투입한 후 35°C에서 24시간 배양하였다. 각 화합물에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 균주가 자라지 않는 최소 농도로 하여 각각의 plate에서 다시 확인되었다.

상기 혼합사용에 따른 상승효과는 FICI=(Ac/Aa)+(Bc/Ba) 공식을 사용하여 Fractional inhibitory concentration indexes (FICIs)으로 표시하였다(Drogari-Apiranthitou *et al.*, 2012). Ac와 Bc는 혼합 사용한 경우 A 물질 및 B 물질 각각의 MIC 값이며, Aa와 Ba는 단독으로 사용한 경우 A 물질 및 B 물질 각각의 MIC 값이다. 상기 FICI값이 0.5이하인 경우 상승효과가 있는 것으로 평가하며, 0.5 내지 4일 경우 상승효과가 없거나 미약한 것으로 평가한다.

구분	FICI
Acetylshikonin + Tetracycline	0.75±0.12
4-Hydroxyderricin + Tetracycline	0.625±0.10
Sophoraflavanone G + Tetracycline	0.83±0.10
Kurarinone + Tetracycline	0.88±0.10

표 14. 아세틸시코닌, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 큐라리논과 테트라사이클린을 동시에 *P. larvae*에 처리한 후의 성장 저해능

상기 표 14에 나타난 바와 같이, 아세틸시코닌과 테트라사이클린의 복합사용에 따른 상승효과가 현저하지 않았지만, 아세틸시코닌과 테트라사이클린의 복합적으로 사용됨으로써 각각의 효과에 약간의 시너지가 있어 사용량이 저감될 수 있었으며, 4-히드록시테리신과 테트라사이클린의 복합 사용은 상승효과가 더 많이 관찰 되었으며 가장 항균 효과가 좋은 4-히드록시테리신은 테트라사이클린의 효과를 증가 시켜 항균 효과에 필요한 양을 현저히 저감시킬 수 있을 것이다.

구분	FICI
Acetylshikonin + Anwulignan	0.83±0.12
4-Hydroxyderricin + Anwulignan	0.88±0.10
Sophoraflavanone G + Anwulignan	0.625±0.12
Kurarinone + Anwulignan	0.75±0.25

표 15. 아세틸시코닌, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 큐라리논을 양우리그난과 동시에 *P. larvae*에 처리한 후의 성장 저해능

상기 표 15에 나타난 바와 같이, 테트라사이클린과 소포라플라바논 G 및 큐라리논의 복합사용에 따른 상승효과가 현저하지 않았지만, 상대적으로 상승효과가 있음을 확인 하였다. 소포라플라바논 G 0.78 mg/ℓ 을 사용하였을 때 양우리그난 0.39 mg/ℓ 만 사용해도 *P. larvae*의 성장을 현저히 저해함을 확인 하였다. 즉, 소포라플라바논 G은 양우리그난과 복합적으로 사용됨으로써 사용량이 저감될 수 있음을 확인 하였다.

아세틸시코닌(Acetylshikonin)은 4-[(2S,3R)-4-(1,3-벤조다이옥솔-5-yl)-2,3-디메틸부틸]-2-메톡시페놀 [1-(5,8-디하이드록시-1,4-디옥소나프탈렌-2-일)-4-메틸펜트-3-에닐]아세테이트 ([1-(5,8-dihydroxy-1,4-dioxonaphthalen-2-yl)-4-methylpent-3-enyl] acetate)로 명명되며, 자초 (*Lithospermum erythrorhizon* S. et Z.)의 뿌리 추출물에서 분리 할 수 있다. 자초는 지치과(*Borraginaceae*)에 속하는 여러 해 살이 풀로 우리나라 각 처의 산과 들에서 자생한다. 자초 뿌리를 핵센을 용매로 하여 추출하며, 이를 유기용매는 탄소수 1 내지 10의 지방족 탄화수소, 탄소수 1 내지 10의 지방족 할로젠화 탄화수소 및 탄소수 2 내지 10의 에스테르를 사용하여 분리하고 이를 추가적으로 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 분리 할 수 있다.

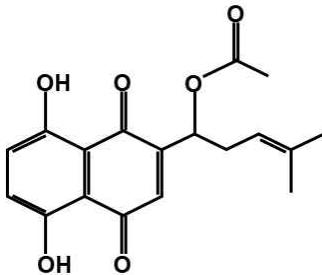


그림 3. 아세틸시코닌(Acetylshikonin)의 구조

4-하이드록시테리신(4-Hydroxyderricin)은 (이)-1-[2-히드록시-4-메톡시-3-(3-메틸부-2-에닐)페닐]-3-(4-히드록시페닐)프로-2-펜-1-원 ((E)-1-[2-hydroxy-4-methoxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one)으로도 명명되며, 신선초 뿌리 (*Angelica keiskei* roots) 추출물에서 분리 할 수 있다. 신선초는 미나리과(*Apiaceae*)에 속하는 다년생 초목으로, 명일엽으로도 알려져 있다. 아열대 지방에서 자생하며 우리나라 전역에서 재배가 가능하여 재배 되어 지고 있다.

4-하이드록시데리신(4-Hydroxyderricin)을 분리하기 위하여 신선초의 식물체 전체, 잎, 과육, 줄기, 뿌리, 꽃을 모두 사용할 수 있으며, 가장 좋은 곳은 뿌리 부위이다. 신선초 뿌리를 갈아 낸 후 메탄올 또는 에탄올과 같은 알코올 용매 또는 이들의 혼합 용매로 열수 추출한 후에 감압 농축한 다음, 여과하여 물 불용성 층 및 물 가용성 층으로 분리하고, 상기 물 가용성 층은 에틸아세테이트를 사용하여 1차 분리 한 다음 비극성 유기용매로 3회 이상 탈지시켜 신선초 뿌리의 소수성 불순물을 제거하여 순도 높은 4-하이드록시데리신층을 확보 할 수 있다. 이를 컬럼 크로마토그래피용 비이온성 수지를 사용하여 또 다시 분리 할 수 있다.

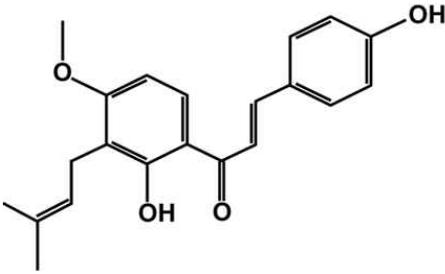


그림 4. 4-하이드록시데리신(4-Hydroxyderricin)의 구조

소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G)는 (2S)-2-(2,4-디하이드록시페닐)-5,7-디하이드록시-8-[(2R)-2-아이소프로페닐-5-메틸-4-헥센-1-일]-2,3-디하이드로-4H-크로멘-4-원 ((2S)-2-(2,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(2R)-2-isopropenyl-5-methyl-4-hexen-1-yl]-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one)로 명명되며, 고삼 (*Sophora flavescens* Ait root.) 추출물에서 분리 할 수 있다. 고삼은 쌍떡잎 식물 장미목 콩과에 속하며, 해발 1000m 이하의 초지에서 흔히 자라는 여러 해 살이 풀로 우리나라 각 처의 산과 들에서 자생한다. 자초를 상온에서 40℃ 미만의 저온의 물 또는 알코올을 용매로 하여 추출하며, 알코올 추출물은 탄소수 1 내지 10의 지방족 탄화수소의 유기용매를 사용하여 분배 추출한다. 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피법을 사용하여 더 순수한 물질로 분리 하기도 한다.

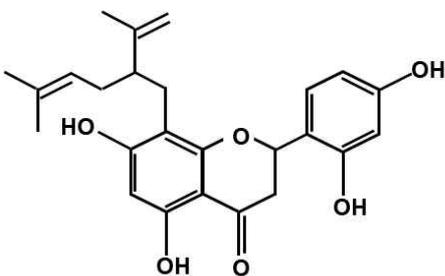


그림 5. 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G)의 구조

큐라리논(kurarinone)은 2-(2,4-디하이드록시페닐)-2,3-디하이드로-7-하이드록시-5-메톡시-8-[5-메틸-2-(1-메틸에틸)-4-헥센-1-일]-4H-1-벤조피란-4-원 (2-(2,4-Dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-7-hydroxy-5-methoxy-8-[5-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-hexenyl]-4H-1-benzopyran-4-one)으로 명명 되기도 하며, 고삼 (*Sophorae Flavescens* Aiton) 추출물에서 분리한다. 고삼은 콩과의 다년생 초본으로, 주로 가을에 뿌리를 채취하여 건조하여 사용하며 한국 일본, 중국등지에서 자생하며 우리나라 전역에서 재배가 가능하다. 큐

라리논(kurarinone)을 효과적으로 추출하기 위하여 상기 고삼 뿌리를 분쇄기로 분쇄하여 80 %의 알코올로 3회 열수 추출한 다음 감압 농축한다. 이를 증류수에 용해시켜 현탁 시킨 후, 물가용성 층을 메틸렌클로라이드를 사용하여 3회 정도 탈지 한다. 이 분리된 물질을 컬럼 크로마토그래피용 비이온성 수지를 사용하여 분리 한다.

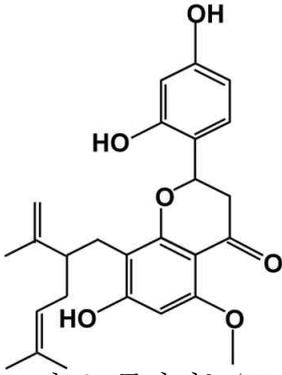


그림 6. 큐라리논(Kurarinone)의 구조

아세틸시코닌(Acetylshikonin), 4-하이드록시테리신(4-Hydroxyderricin), 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G), 큐라리논(Kurarinone)의 인체 유래 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 각 화합물에 의하여 인체 유래 세포의 성장을 저해하는지 측정하였다. 화합물의 성장 저해 효과를 확인하기 위해 각 물질을 농도에 따라 HepG2 cell line 또는 HaCaT cell line에 각각 처리하고 MTT assay를 수행하였다.

각 2×10^3 cells/0.1ml의 세포를 96-well tissue culture plates (Falcon)의 각 well에 넣은 후 DMSO에 용해된 각 물질을 표시된 농도로 culture plates에 추가하였다. DMSO는 최대 농도가 0.2%를 초과하지 않도록 투입하였다. 24시간 또는 48시간 경과 후 $100 \mu\text{l}$ 5mg/ml MTT (sigma Cat. M2128)를 투입한 후, ELISA reader(VersaMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 540nm 흡광도에서 활성을 측정하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

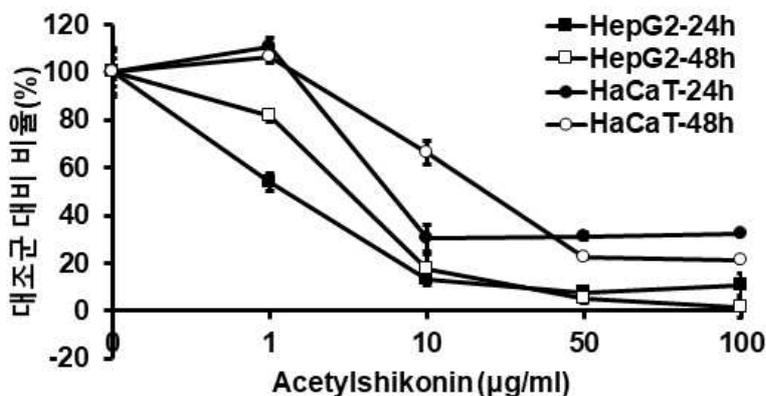


그림 7. 아세틸시코닌(Acetylshikonin)에 의한 세포 독성

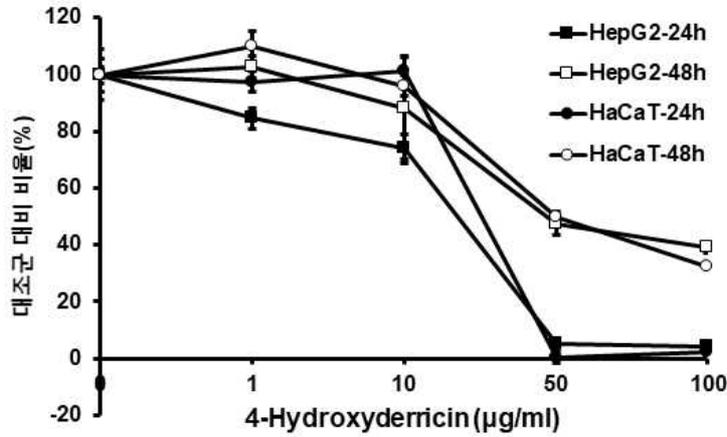


그림 8. 4-하이드록시데리신(4-Hydroxyderricin)에 의한 세포 독성

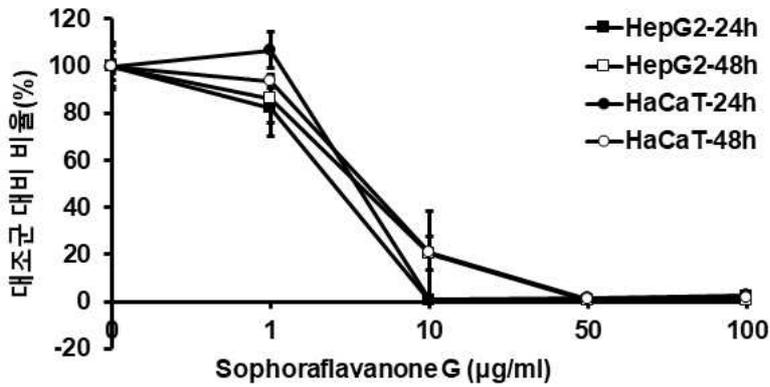


그림 9. 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G)에 의한 세포 독성

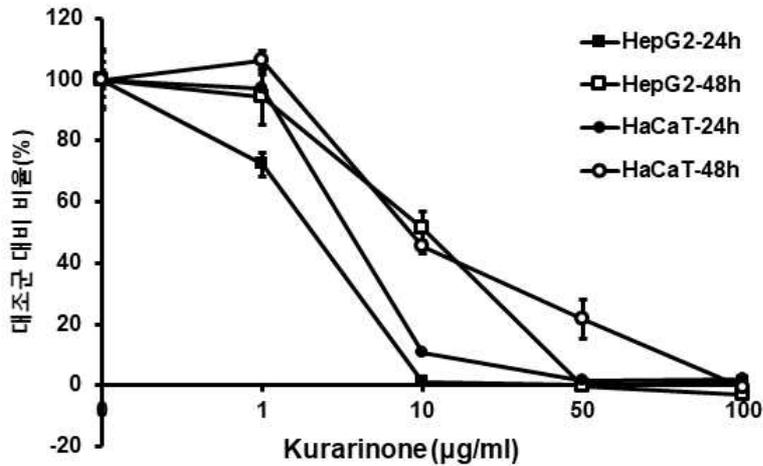


그림 10. 큐라리논(Kurarinone)에 의한 세포 독성

그림 7에 나타난 바와 같이 아세틸시코닌은 고농도(10mg/l)로 처리되었을 경우 Hep-G2 cell lines에서는 아세틸시코닌을 처리하지 않은 경우와 비교하여 18.2±5.4%의 세포 성장이 관찰되었다. HaCaT cell line을 사용한 경우는 고농도(10mg/l)로 처리되었을 경우 65.7±2.6%의 세포 성장이 관찰되었다. Miconazole의 경우 14.3±5.2%의 세포 성장이 보이는 것에 비하여 상기 아

세틸시코닌은 고농도로 처리되었을 때 세포의 성장을 일부 저해하였으나, 항균제로서 통상적인 농도로 사용되는 경우라면 생체에 대한 독성은 극히 미미한 수준일 것으로 분석된다.

그림 8에 나타난 바와 같이 4-히드록시테리신을 고농도(10mg/ℓ)로 처리하였을 경우 Hep-G2 cell lines에서는 4-히드록시테리신을 처리하지 않은 경우와 비교하여 89.0±5.3%의 세포 성장이 관찰되었다. HaCaT cell line을 사용한 경우는 고농도(10mg/ℓ)로 처리되었을 경우 93.1±8.2%의 세포 성장이 관찰되었다. 즉, 4-히드록시테리신은 고농도로 사용되더라도 생체에 대한 독성이 매우 낮으며, 통상적인 사용 농도로서 사용되는 경우라면 생체에 대한 독성이 거의 없을 것으로 분석된다.

그림 9에 나타난 바와 같이 소포라플라바논 G는 고농도(10mg/ℓ)로 처리되었을 경우 Hep-G2 cell lines에서는 아세틸시코닌을 처리하지 않은 경우와 비교하여 20.4±17.9%의 세포 성장이 관찰되었다. HaCaT cell line을 사용한 경우는 고농도(10mg/ℓ)로 처리되었을 경우 20.6±6.9%의 세포 성장이 관찰되었다. 상기 소포라플라바논 G는 고농도로 처리되었을 때 세포의 성장을 일부 저해하였으나, 항균제로서 통상적인 농도로 사용되는 경우라면 생체에 대한 독성은 극히 미미한 수준일 것으로 분석된다.

그림 10에 나타난 바와 같이 큐라리논은 고농도(10mg/ℓ)로 처리되었을 경우 Hep-G2 cell lines에서는 큐라리논을 처리하지 않은 경우와 비교하여 51.6±5.3%의 세포 성장이 관찰되었다. HaCaT cell line을 사용한 경우는 고농도(10mg/ℓ)로 처리되었을 경우 45.3±2.1%의 세포 성장이 관찰되었다. 큐라리논은 고농도로 사용되더라도 생체에 대한 독성이 매우 낮으며, 통상적인 사용 농도로서 사용되는 경우라면 생체에 대한 독성이 거의 없을 것으로 분석된다.

항균 소재 물질에 대하여 제품 생산시에 필요한 최소 농도 확인을 위하여 일정한 양의 세포에 항균 소재 물질을 투여 한 후 세포 사멸을 관찰 하였다.

농도[ug/ml]	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
대조군	4.0X10 ⁵	6.5X10 ⁵	2.9X10 ⁵	8.3X10 ⁵	2.5X10 ⁵	4.5X10 ⁵
감소율(%)	99.92	99.94	99.89	99.96	99.13	97.47

표 16. 아세틸시코닌에 의한 세포 성장 감소율

표 16의 결과에서도 알 수 있듯, 아세틸시코닌은 0.001ug/ml을 처리 하였을 경우에도 세포 사멸이 99.27% 관찰 되어 사용 할 수 있는 최소 농도로 0.001ug/ml임을 확인 하였다.

농도[ug/ml]	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
대조군	4.0X10 ⁵	6.5X10 ⁵	2.9X10 ⁵	8.3X10 ⁵	2.5X10 ⁵	4.5X10 ⁵
감소율(%)	100	100	99.90	99.96	99.01	98.02

표 17. 소포라플라바논 G에 의한 세포 성장 감소율

소포라플라바논 G는 0.0001ug/ml을 처리 하였을 경우에도 세포 사멸이 98.02% 관찰 되어 사용 할 수 있는 최소 농도로 0.0001ug/ml임을 확인 하였다.

농도[ug/ml]	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
대조군	4.0X10 ⁵	6.5X10 ⁵	2.9X10 ⁵	8.3X10 ⁵	2.5X10 ⁵	4.5X10 ⁵
감소율(%)	100	100	99.89	99.95	98.96	98.00

표 18. 큐라리논에 의한 세포 성장 감소율

또한, 큐라리논은 0.0001ug/ml을 처리 하였을 경우에도 세포 사멸이 98.00% 관찰 되어 사용할 수 있는 최소 농도로 0.0001ug/ml임을 확인 하였다.

즉, 아세틸시코닌, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G, 큐라리논은 천연 유래의 화합물로서 항균제의 용도로서 사용되더라도 세포 독성이 낮으므로 인간 또는 꿀벌에 대해 유해성이 낮아 안전하며 친환경적이다.

3. Pimaric acid에 의한 항균 효과

신규 항균 후보 물질 탐색을 위하여, 피마르산의 anti-*Paenibacillus larvae*활성과 함께 후보물질의 항균 활성을 확인 하였다.

화합물	MIC at 24hr	화합물	MIC at 24hr
Pimaric acid	6.25	Ninhydrin	>100
Actinidic acid	50	Paeonol	>100
Folic acid	>100	Sulphosalicylic acid	>100
Gallic acid	>100	L-Tartaric acid	>100
Gentisic acid	>100	Thymol	>100
Gibberellic acid	>100	Vanillin	>100
Glycyrrhizic acid	>100	(-)-Bornyl acetate	>100
Hesperidin	>100	4-Carvomenthenol	>100
soborneol	>100	Citronellol	>100
1-Naphthol	>100	p-Cymene	>100
Tetracycline	50	Oxytetracycline	50

표 19. 신규 항균 물질 탐색

표 19에 나타난 바와 같이, 피마르산의 MIC값을 측정한 결과 *P.larvae*에 대하여 성장 저해 효과를 나타냈다. 기존에 널리 사용되는 테트라사이클린(tetracycline)이나 옥시테트라사이클린(oxytetracycline)과 비교하여 상대적으로 좋은 활성으로 *P.larvae*의 성장을 저해함을 확인 하였다.

물질에 의한 *P.larvae*에 대한 항균 효과를 확인하고자 원반 확산 실험을 사용하였다. 각 화합물은 10mg/ml의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 사용하였다. 각 화합물은 100μg씩 6-mm diameter antibiotic test disks에 첨가한 뒤 *P.larvae* 균주 현탁액(5×10⁴CFU/mL)을 MYPGP agar plate에 뿌려준 뒤 35℃에서 24시간 또는 36시간 동안 배양하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

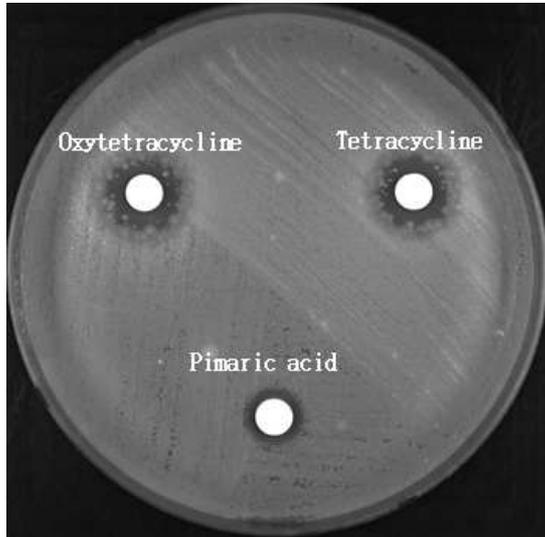


그림 11. 원반 확산 시험을 통한 피마르산, 테트라사이클린, 옥시테트라사이클린에 대한 *P.larvae*의 감수성

Chemical Compound	Diameter (mm)	
	24h	36h
Pimaric acid	10±0.5	9±0.5
Tetracycline	17±1	14±1
Oxytetracycline hydrochloride	19±1.5	16±0.5

표 20. 원반 확산 시험을 통한 *P.larvae*에 대한 피마르산의 항균 효과

표 20에 나타난 바와 같이, 피마르산은 *P.larvae*에 대하여 24시간 이후에는 10±0.5mm의 항균 효과를 나타냈고 36시간 이후에는 9±0.5mm의 항균효과를 나타냈다.

피마르산이 *P.larvae*의 생물막 형성 저해의 정도를 확인하기 위해 *Paenibacillus larvae*를 96 well plate에서 24시간 후보 물질과 함께 키운 후 0.5% crystal violet으로 30℃에서 20분간 염색을 하여, Crystal violet assay를 진행하였다. 이후 crystal violet을 잘 씻고 말려준 다음 30% 아세트산으로 생물막에 붙어있는 crystal violet을 잘 녹여주었다. 그 후 microplate reader (BioTek Instruments, Korea)를 이용하여 450nm의 흡광도에서 녹아 나온 crystal violet의 양을 측정하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

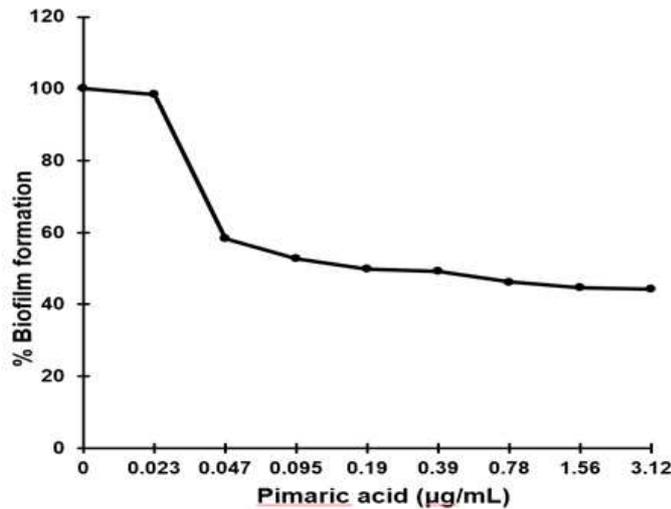


그림 12. 피마르산의 농도에 따른 *P.larvae*의 생물막 형성 저해

그림 12에 나타난 바와 같이, 피마르산의 농도가 증가할수록 *P.larvae*의 생물막 형성이 감소하는 것을 확인하였다.

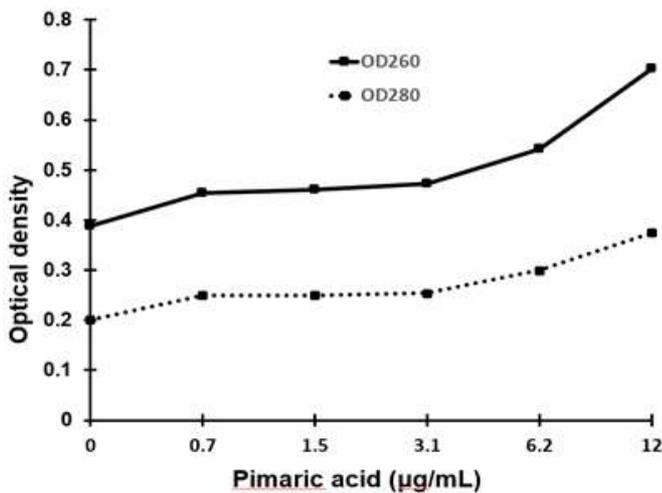


그림 13. 피마르산의 농도별 처리에 따른 260nm와 280nm 흡광도에서 측정 가능한 물질의 양

상기 피마르산의 세포 파열 유도를 확인하기 위해 피마르산을 농도에 따라 *P.larvae*에 처리를 한 후 260nm와 280nm에서 측정을 하여 세포가 파열되었을 때 나오는 물질들의 양으로 파열된 세포의 양을 확인하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

그림 13에 나타난 바와 같이 피마르산의 농도에 따라 파열된 세포에서 나오는 물질들이 많이 측정이 되었다. 이는 피마르산이 단순 성장 억제 물질이 아니라 확실하게 균을 죽일 수 있는 항균제라 할 수 있다.

상기 피마르산의 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 인체 유래 세포의 성장을 저해하는지 측정하기 위하여, 각 10^4 cells/0.1ml의 세포를 96-well tissue culture plates (SPL)의 각 well에 넣은 후 DMSO에 용해된 각 물질을 표시된 농도로 culture plates에 추가하였다. 대조군 DMSO는 최대 농도가 0.2%를 초과하지 않도록 각 plates에 투입하였다. 48시간 경과 후 $10\mu\text{l}$ 5mg/ml MTT (sigma Cat. M2128)를 투입한 후, 3시간 동안 37°C 반응시킨다. 배지를 제거후 0.1ml

의 DMSO를 투입하고 10분 동안 반응 시킨 후 microplate reader (BioTek Instruments, Korea)를 이용하여 540nm 흡광도에서 활성을 측정하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

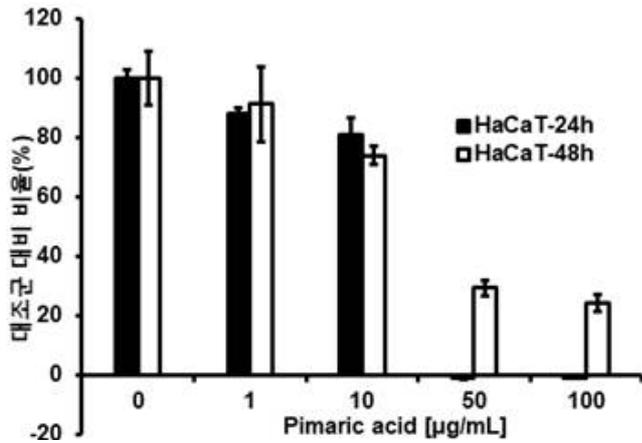


그림 14. 피마르산에 의한 MTT assay

그림 14에 나타난 바와 같이 피마르산을 10ug/ml로 처리하였을 경우 HaCaT cell line 세포에서 저해가 있었으나, *P.larvae*에 대한 피마르산의 MIC값에서는 세포 활성을 거의 저해하지 않았다. 이는 항균제로서 통상적인 농도로 사용되는 경우라면 생체에 대한 독성은 극히 미미한 수준이라 할 수 있다.

피마르산과 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린의 혼합사용에 따른 *P.larvae*에 대한 항균 효과를 확인하고자 상기한 broth microdilution assay를 checkerboard assay를 사용하였다.

Compound	MIC alone	MIC in combination	FIC index value
Pimaric acid	6.25	1.56	0.5
Tetracycline	50	12.5	
Pimaric acid	6.25	3.12	0.625
Oxytetracycline	50	6.25	

표 21. 피마르산과 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린의 혼합사용에 따른 *P.larvae*에 대한 항균 효과

테트라사이클린 또는 옥시테트라사이클린과 피마르산을 복합적으로 투여할 경우의 FICI는 각각 0.5와 0.65를 보였다. 이는 부분 적인 상승효과가 있음을 의미한다. 이는 6.25ug/ml의 피마르산을 투여 할 경우 *P.larvae*를 죽이는데 필요한 항균제의 양이 감소함을 의미하며, 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린의 효과를 증가 시켜 항균 효과에 필요한 양을 저감 시킬 수 있을 것임을 의미한다.

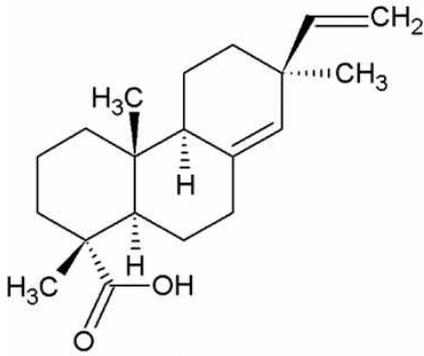


그림 15. 피마르산(Pimaric acid)의 구조

피마르산(Pimaric acid)은 Dextropimaric acid로도 지칭되며, (13a-methyl-13-vinylpodocarp-8(14)-ene-15-oic acid)로 명명될 수 있다.

항균 소재 물질에 대하여 제품 생산시에 필요한 최소 농도 확인을 위하여 일정한 양의 세포에 항균 소재 물질을 투여 한 후 세포 사멸을 관찰 하였다.

농도 [ug/ml]	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
대조군	4.0X10 ⁵	6.5X10 ⁵	2.9X10 ⁵	8.3X10 ⁵	2.5X10 ⁵	4.5X10 ⁵
감소율(%)	99.17	99.4	98.66	99.53	97.22	91.48

표 22. 큐호노키올에 의한 세포 성장 감소율

표 22의 결과에서도 알 수 있듯, 호노키올은 0.0001ug/ml을 처리 하였을 경우에도 세포 사멸이 97.22% 관찰 되어 사용 할 수 있는 최소 농도로 0.01ug/ml임을 확인 하였다.

4. Honokiol에 의한 항균 효과

신규 항균 후보 물질 탐색을 위하여, 호노키올의 anti-*Paenibacillus larvae*활성과 함께 후보물질의 항균 활성을 확인 하였다.

호노키올의 *Paenibacillus larvae*에 대한 항균 활성을 평가하기 위하여 위에서 제시한 broth microdilution assay 를 사용하여 실험을 수행하였다.

화합물	MIC at 24hr	화합물	MIC at 24hr
Honokiol	12.5	Ninhydrin	>100
Actinidic acid	50	Paeonol	>100
Folic acid	>100	Sulphosalicylic acid	>100
Gallic acid	>100	L-Tartaric acid	>100
Gentisic acid	>100	Thymol	>100
Gibberellic acid	>100	Vanillin	>100
Glycyrrhizic acid	>100	(-)-Bornyl acetate	>100
Hesperidin	>100	4-Carvomenthenol	>100
Isoborneol	>100	Citronellol	>100
1-Naphthol	>100	p-Cymene	>100

표 23. 천연물 유래 화합물에 의한 항균 효과

표 23에 나타난 바와 같이, 호노키올의 MIC값을 측정한 결과 *P.larvae*에 대하여 테트라사이클린이나 옥시테트라사이클린과 비교하여 상대적으로 우수한 성장 저해 효과를 나타냈다. 반면, 대조군으로 사용된 화합물들은 상기 미생물에 대한 성장 저해 활성이 없거나 매우 미약하게 나타났다.

화합물	MBC at 48hr
Honokiol	50
Tetracycline	50
Oxytetracycline	50

표 24. 호노키올의 MBC값

호노키올의 MBC값을 측정한 결과 표 24에 나타난 것과 같이 기존에 알려진 항균 물질인 테트라사이클린이나 옥시테트라사이클린과 유사한 활성으로 *P.larvae*에 대하여 살균 효과를 나타냈다.

호노키올에 의한 항균 효과를 확인하기 위하여, 원반 확산 시험을 수행하였다. 그 결과, 표 25에 나타난 바와 같이, 호노키올은 *P.larvae*에 대하여 24시간, 36시간 이후 모두 9±0.5mm의 항균 효과를 나타냈으며, 그림 16과 같이 상기 물질들의 *P.larvae*에 대한 감수성을 각각 육안으로 비교할 수 있었다.

화합물	Diameter(mm)	
	24h	36h
Honokiol	9±0.5	9±0.5
Tetracycline	16±1	15±1
Oxytetracycline	17±1	16±0.5

표 25. 원반 확산 시험을 통한 *P.larvae*에 대한 호노키올의 항균 효과

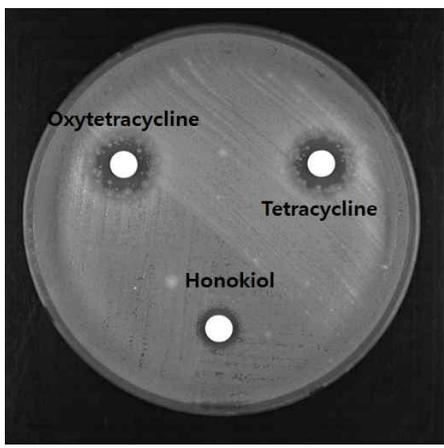


그림 16. 호노키올에 대한 *P.larvae*의 감수성 평가

호노키올의 세포 파열 유도를 확인하기 위해 *P.larvae*에 각각의 화합물 처리 후 260nm 흡광도에서 파쇄된 세포 물질을 확인 하였다. 그림 17에서 보듯이, 호노키올의 농도가 증가됨에 따라 파열된 세포에서 나오는 물질들이 많은 것으로 측정 되었다. 이는 호노키올이 단순 성장 억제 물질이 아니라 *P.larvae*에 대한 파열로 인하여, 완전히 균을 제거할 수 있는 효과를 가지는 물질임을 확인할 수 있었다.

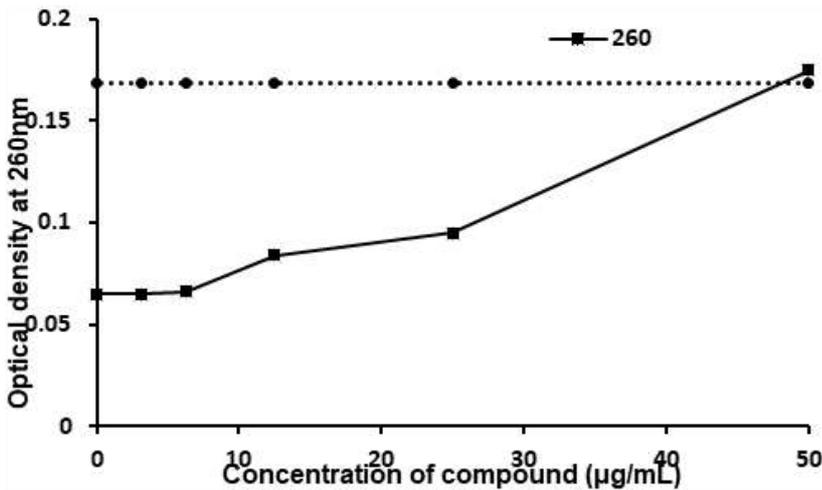


그림 17. 호노키올에 의한 *P.larvae* 세포 파쇄



그림 18. 호노키올을 처리한 후의 *P.larvae* 세포의 투과전자현미경 사진

또한 상기 결과에 대하여, 투과 전자 현미경을 통하여 세포가 완전히 파열되었는지 여부를 육안으로 확인하였다. 상기 호노키올을 6.25ug/ml로 처리한 *P.larvae*에 대하여, 서울대학교 농생명과학공동기기원의 80kV 투과 전자 현미경(JEM1010, JEOL)을 사용하여 관찰하였으며, *P.larvae*은 투과 전자 현미경을 사용하기 전, 그리드에 올렸고 phosphotungstic acid로 염색하였다. 그 결과, 그림 18에서 보듯이, 호노키올을 *P.larvae*에 처리하였을 때 확실히 세포가 터짐을 확인할 수 있었다.

호노키올에 의한 항균 기전 확인을 위해 Biofilm formation억제를 확인 하였다. 그 결과 적은 농도에서는 Biofilm formation억제를 확인 하였으나, 농도가 높다고 하여 Biofilm formation억제를 더 잘 하지는 않는다는 것을 확인 하였다. 즉 적은 농도에서도 약 40% 정도의 Biofilm formation을 억제 하는 것을 확인 하여 호노키올에 의하여 Biofilm formation이 억제됨을 확인 하였다.

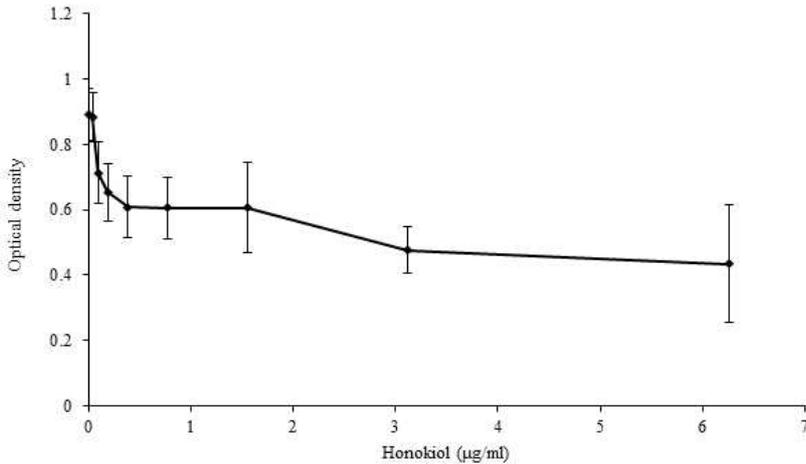


그림 19. 호노키올에 의한 biofilm formation 억제

테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린의 혼합사용에 따른 *P.larvae*에 대한 항균 효과를 확인 하고자 상기한 broth microdilution assay를 checkerboard assay로 사용하였다.

Compound	MIC alone	MIC in combination	FIC index value
Honokiol	12.5	3.12	0.5
Tetracycline	25	6.25	
Honokiol	12.5	3.12	0.5
Oxytetracycline	25	6.25	

표 26. 호노키올과 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린의 혼합사용에 따른 *P.larvae*에 대한 항균 효과

호노키올을 테트라사이클린 또는 옥시테트라사이클린과 복합적으로 투여할 경우의 FICI는 둘 다 모두 0.5를 보였다. 3.12ug/ml의 호노키올을 투여 할 경우 *P.larvae*를 죽이는데 필요한 항생제의 양이 감소함을 의미하며, 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린과 호노키올을 병용 처리하였을 경우, 상기 항생물질들의 효과를 증가 시켜 항균 효과에 필요한 항생제의 양을 감소시킬 수 있다는 것을 보여주는 결과이다.

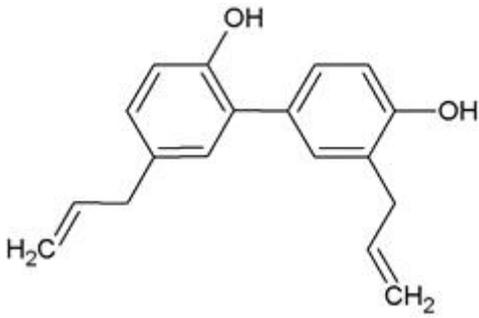


그림 20. 호노키올 구조

호노키올은 (2-(4-hydroxy-3-prop-2-enylphenyl) -4-prop-2-enylphenol)로 명명되기도 하며, 목련과(Magnoliaceae)에 속하는 다년생 초본인 후박(Magnolia cortex)으로부터 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 1,3-부틸렌글리콜 중 하나 이상을 혼합한 추출용매를 이용하여 공지된 추출 방법에 의해 추출 할 수 있다.

항균 소재 물질에 대하여 제품 생산시에 필요한 최소 농도 확인을 위하여 일정한 양의 세포에 항균 소재 물질을 투여 한 후 세포 사멸을 관찰 하였다.

농도[ug/ml]	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
대조군	4.0X10 ⁵	6.5X10 ⁵	2.9X10 ⁵	8.3X10 ⁵	2.5X10 ⁵	4.5X10 ⁵
감소율(%)	99.92	99.94	99.89	99.96	99.13	97.47

표 27. 큐호노키올에 의한 세포 성장 감소율

표 27의 결과에서도 알 수 있듯, 호노키올은 0.0001ug/ml을 처리 하였을 경우에도 세포 사멸이 97.47% 관찰 되어 사용 할 수 있는 최소 농도로 0.001ug/ml임을 확인 하였다.

5. *P.acnes*의 항균 천연물

본 과제에서 확보한 물질에 대하여 다른 효능이 있는지와 작용 기전을 좀 더 확인하기 위하여 *P.acnes*등의 박테리아에 대한 항균 실험을 수행 하였다.

*P.acnes*균은 지방 친화성, 혐기성 균으로 피지 내에서 자기가 살기 좋은 환경을 만들기 위해 모공을 막아 버리게 된다. 이렇게 함으로 피지가 자연스럽게 나아가야 하는데 이를 막게 되어 피지 덩어리가 쌓이게 되고 모공 입구를 완전히 막게 된다. 또한 *P.acnes*균은 피지를 주식으로 하지만, 불포화지방산은 분해를 하지 않는다. 따라서 이 불포화지방산이 쌓이게 되어 피부 트러블을 일으키게 된다. 게다가 이를 제거하기 위하여 백혈구가 작용하게 되고 이에 따라서 염증 반응을 유도하게 된다.

여드름의 치료를 위해서는 이와 같은 다양한 원인을 고려하여 치료를 하여야 하며, 특히 여드름 균이 발생 한 경우에는 여드름 균의 성장을 억제 하거나 죽이는 제품을 사용하여야 한다. 이렇게 함으로서 재발을 방지하는 효과를 보일 수 있다.

화농성 여드름은 피부에 염증과 고름을 동반하며, 제거가 잘 되지 않을 뿐만 아니라 통증을 유

발할 수 있고, 빨리 제거가 되지 않으면 피부에 흉터 자국이 생기게 된다. 따라서 화농성 여드름의 원인을 없애기 위해, 여드름의 발생 초기 또는 이전에 여드름 균을 제거하는 것이 필요하다. 기존에는 이들을 제어하기 위해 다양한 항생제를 사용하였으며, 이에는 Clindamycin 또는 Erythromycin 등이 있으나, 이들은 내성에 대한 문제가 발생하여 장기적인 사용을 할 수는 없다. 또한 많은 경우 피부에 대하여 트러블을 보이기 때문에 독성이 적고 부작용이 적은 새로운 항생 물질 대체 물질에 대한 연구가 요구되고 있다.

본 연구는 인체에 안전성이 우수하고, 내성을 최소화할 수 있는 식물유래 환경 친화적인 여드름 유발균의 성장 억제제 발굴과 기전 연구를 위하여 기 확보한 천연물 유래 물질을 활용하였다. 그 결과 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌 등 3 물질이 효과가 있음을 확인 하였다. 이들은 *P.larvae*에 대하여도 효과가 있음을 이전에 확인 하였으며, 따라서 효능에 대한 연구를 수행 하였다.

하기 표 28은 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 anti-*Propionebacterium acnes* 활성과 함께 기존에 널리 사용되는 항균제와 후보 물질의 항균 최소 농도를 비교한 것으로, 각 화합물의 *P. acnes*에 대한 항균 최소 농도를 확인하고자 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing(EUCAST)에서 제시한 broth microdilution assay를 사용하였다. 각 화합물은 10mg/mL의 농도로 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시킨 후 사용하였다. *P. acnes*는 reinforced clostridial broth(RCB; Becton, Dickinson and Company, USA), Mueller-Hinton agar(MHA; MB cell, USA) 또는 broth(MHB; MB cell, USA)를 사용하여 실험을 수행 하였다. 균주는 해당 배지를 이용하여 anaerobic package(Becton, Dickinson and Company)를 이용하여 anaerobic 상태로 37°C에서 배양 한 후 최소 1회 계대 배양하여 활성이 회복된 균주를 사용하였다. 각 화합물에 있어 DMSO 농도는 2.5% 보다 높지 않도록 하여 사용하였다. 각 화합물은 2배씩 계속 희석된 후 96-well microtitre plate에 100 μ L 첨가하였으며, 100 μ L의 *P. acnes* 균주 현탁액(OD₆₀₀=0.1)을 각각의 well 에 투입한 후 anaerobic 환경에서 37°C에서 24시간 또는 48시간 배양하였다. 각 화합물의 농도는 최대 200mg/L 내지 최소 0.2mg/L로 제어하였으며, 물질에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 균주가 자라지 않는 최소 농도로 하였다.

표 28을 참조하면, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 MIC 값을 측정한 결과 *P. acnes*에 대하여 성장 저해 효과가 확인되었다. 4-히드록시테리신 및 소포라플라바논 G는 기존에 널리 사용되는 항균제인 테트라사이클린과 비교하여 우수한 항균 효과를 보였으며, 아세틸시코닌은 상대적으로 미흡한 항균 활성이 있으며, 기존의 항균제와 비교하여 그 활성이 우수하거나 또는 유사하고 안전성이 우수한 장점이 있다.

구분	P625 (ATCC9008)		P693 (KCTC3314)		P694 (KCTC3320)		P687 (KACC11946)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
	4-Hydroxyderricin	3.125	3.125	3.125	6.25	6.25	6.25	3.125
Sophoraflavanone G	3.125	3.125	1.56	3.125	3.125	3.125	3.125	3.125
Acetylshikonin	12.5	12.5	3.125	3.125	12.5	25	12.5	12.5
Miconazole	12.5	12.5	25	25	25	25	25	25
Tetracycline	6.25	12.5	3.125	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5
6,8-Diprenylorobol	6.25	6.25	6.25	12.5	25	50	6.25	6.25
Kurarinone	12.5	12.5	3.125	6.25	12.5	12.5	6.25	6.25
Alismol	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Actinidic Acid	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Alpiniumisoflavone	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Bisdemethoxy-curcumin	>200	>200	200	200	>200	>200	>200	>200
Dehydrocostus lactone	100	200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
(R)-(+)-Dalbergipheno- l	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Dehydrodieugenol	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Eupatilin	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Falcarindiol	>200	>200	50	100	100	100	>200	>200
Gagaminine	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Galangin	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Guaiacin	100	100	50	100	100	100	>200	>200
Matairesinose	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Myristargenol A	>200	>200	100	100	100	100	6.25	6.25
Oleiferin F	>200	>200	100	100	100	100	3.125	3.125
Sargachromanol G	>200	>200	12.5	50	>200	>200	>200	>200
Sargachromanol I	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Timosaponin AIII	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200

표 28. 여드름균에 대한 항균 효과

4-히드록시테리신과 소포라플라바논 G에 의하여 얼마나 다양한 균에 영향을 주는지 확인하기 위하여 다양한 균에 대하여 항균 실험을 수행 하였다.

구분	4-Hydroxyderricin	
	24h	48h
<i>P. acnes</i> (P625, ATCC 9008)	3.125	3.125
<i>P. acnes</i> (P682, CCARM 9009)	3.125	6.25
<i>P. acnes</i> (P687, KACC 11946)	6.25	6.25
<i>P. acnes</i> (P693, KCTC3314)	3.125	3.125
<i>A. Baumannii</i>	>200	>200
<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	3.125	6.25
<i>E. Cloacae</i>	>200	>200
<i>E. coli</i>	>200	>200
<i>E. faecium</i>	25	25
<i>P. aeruginosa</i>	>200	>200
<i>S. aureus</i>	>200	>200
<i>S. saprophyticus</i>	6.25	12.5

표 29. 4-히드록시테리신의 각 균에 대한 성장 저해 효과

구분	Sophoraflavanone G	
	24h	48h
<i>P. acnes</i> (P625, ATCC 9008)	3.125	3.125
<i>P. acnes</i> (P682, CCARM 9009)	1.56	3.125
<i>P. acnes</i> (P687, KACC 11946)	3.125	3.125
<i>P. acnes</i> (P693, KCTC3314)	3.125	3.125
<i>A. Baumannii</i>	>200	>200
<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	6.25	12.5
<i>E. Cloacae</i>	>200	>200
<i>E. coli</i>	>200	>200
<i>E. faecium</i>	12.5	12.5
<i>P. aeruginosa</i>	>200	>200
<i>S. aureus</i>	>200	>200
<i>S. saprophyticus</i>	12.5	12.5

표 30. 소포라플라바논 G의 각 균에 대한 성장 저해 효과

그 결과 - 히드록시테리신은 *P.acne*를 비롯하여 *B. subtilis* 에 대하여 항균 기능이 있고, 소포라플라바논 G는 *P.acne*에 대하여 항균 기능이 있음을 확인 하였다.

또한 항균 기능을 다시 확인하기 위하여 Log phase 성장 상태의 *P. acnes* 균주 현탁액(OD₆₀₀ = 0.5 McFarland standard 혼탁도 측정; 1.5 X 10⁸ CFU/mL)을 상기 배지에 멸균된 면봉을 이용하여 평면 도말하였으며, 각 화합물은 각 멸균된 8mm 지름의 paper disk에 10mg/mL의 농도로 10 μ L를 첨가하고 건조시킨 상태로 도말된 배지 위에 적용하였다. *P. acnes* 균주 현탁액을 도말하고 혐기조건, 37 $^{\circ}$ C에서 24 시간 배양하였으며 반사광을 이용하여 항균 활성 구역의 지름을 측정하였다. 그 결과 4-히드록시테리신 및 소포라플라바논 G은 테트라사이클린과 미코나졸과 비교하여 상대적으로 미흡하거나 유사한 정도의 감수성을 나타내었으나, *P. acnes*의 성장을 효과적으로 억제하였다.

구분	P682 (CCARM 9009)	P687 (KACC 11946)	P693 (KCTC 3314)
4-Hydroxyderricin	0.9	0.9	1.2
Sophoraflavanone G	1.6	1.6	1.7
Acetylshikonin	-	-	-
Miconazole	1.3	1.7	1.7
Tetracycline	2.4	3.2	3.2
Alpinumisoflavone	-	-	-
6,8-Diprenylorobol 6	-	0.85	-
Kurarinone 15	1.2	1.35	1.4

표 31. 각 물질에 대한 여드름균 감수성 확인

4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌은 여드름 질병을 유발하는 *P. acnes*에 대한 우수한 항균 활성을 나타내었으며, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G는 기존의 항균제와 비교하여 감수성이 유사하거나 또는 약간 미흡하나 안전성이 우수함을 확인 하였다.

6. 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G)에 의한 항균 효능

소포라플라바논 G에 대한 연구를 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*)에 적용하여 항균 작용과 기전 확인 하였다.

먼저, 소포라플라바논 G의 엔테로코커스 패시움에 대한 항균 활성을 EUCAST(the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)에서 제시한 broth microdilution assay를 사용하여 평가하였다. 96 well plate에 OD₆₀₀=0.1의 엔테로코커스 패시움(KACC 11954, CCARM 5506)을 넣어준 후 각 화합물을 최대 100 μ g/mL 로부터 2배씩 희석하여 처리하였다. 각 플레이트는 30 $^{\circ}$ C 에서 24 또는 48시간 배양한 후, 세포의 성장을 억제하는 최소 농도인 MIC (Minimum Inhibitory concentration) 값을 구하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

표 32은 SPF-G와 기존에 널리 사용되는 항균제의 엔테로코커스 패시움에 대한 MIC 값을 비교한 것이다.

화합물	MIC 값 ($\mu\text{g/mL}$)			
	KACC 11954		CCARM 5506	
	24H	48H	24H	48H
Sophoraflavanone G	6.25	12.5	6.13	12.5
Ampicillin	1.5625	6.25	3.125	6.25
Vancomycin	>100	>100	0.78	0.78
Streptomycin	>100	>100	>100	>100
Acetylshikonin	25	50	12.5	12.5
6,8-Diprenylorobol	25	50	25	50
Kurarione	25	50	25	50
Pimaric acid	100	100	100	100
Corosolic acid	12.5	25	12.5	25
Oleanolic acid	>100	>100	>100	>100
Ursolic acid	>100	>100	>100	>100
Berberine chloride form	>100	>100	>100	>100
Sclareol	>100	>100	>100	>100

표 32. 소포라플라바논 G에 의한 항균 효과

소포라플라바논 G를 처리하는 경우, 기존의 항생제(Ampicillin, Vancomycin, Streptomycin)를 처리하는 경우와 비슷한 수준의 엔테로코커스 패시움에 대한 성장 저해 효과를 보였으며, 특히, Corosolic acid와 비교하여 엔테로코커스 패시움의 성장을 현저하게 저해시켰다.

상기 성장을 저해하는 소포라플라바논 G의 농도에서 소포라플라바논 G를 제거한 후 엔테로코커스 패시움의 생존을 확인함으로써, 소포라플라바논 G가 엔테로코커스 패시움의 성장을 억제할 뿐만 아니라 사멸시키는 역할도 하는지 확인하였다. 소포라플라바논 G의 농도에 따라 엔테로코커스 패시움 생존 여부를 확인하기 위해 소포라플라바논 G의 농도를 상기 MIC 값에 따라서 진행하였으며, 그 중 세포 성장이 관찰되지 않는 경우 배지를 바꾸어 준 후 MBC(Minimum Bactericidal Concentration) test를 수행하였다. 37°C 에서 24 시간 배양한 뒤 plate에 접종시키고 나서 24시간 배양하였다. 모든 실험은 3회 실시하였다.

구분	MIC($\mu\text{g/mL}$)		MBC($\mu\text{g/mL}$)	
	SPF-G	Ampicillin	SPF-G	Ampicillin
CCARM 5506	25	50	25	50

표 33. 소포라플라바논 G에 의한 세포 사멸 확인

위의 결과는 엔테로코커스 패시움의 성장을 억제하는 동시에 사멸시키는 Ampicillin과 마찬가지로, 소포라플라바논 G가 엔테로코커스 패시움의 성장을 억제할 뿐만 아니라, 엔테로코커스 패시움을 사멸시킬 수 있음을 의미 한다.

소포라플라바논 G의 엔테로코커스 패시움에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 고체 배지를 활용한 Disc diffusion assay를 수행하였다. 그림 21은 각 화합물의 처리에 의해 엔테로코커스 패시움의 성장이 관찰되지 않는 구역의 크기를 나타낸 것으로, 상기 성장이 관찰되지 않는 구역의 측정값은 표 34에 나타내었다.

구분	Inhibition zone(nm)	
	KACC 11954	CCARM 5506
Ampicillin	19	2.5
Kurarinone	9	1
Sophoraflavanone G	13	1.2
Berberine chloride	-	-
Sclareol	-	-

표 34. 소포라플라바논 G에 의한 Disc diffusion assay 결과

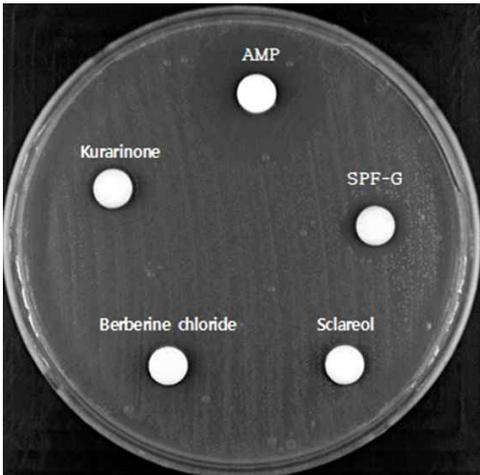


그림 21 및 표 34를 참조하면, Paper disc 8mm기준으로, 소포라플라바논 G의 경우 엔테로코커스 패시움(KACC11954: 1.52cm, CCARM 5506: 1.6cm)의 성장을 저해 하였으며, 상기 엔테로코커스 패시움에 대한 성장 저해 효과는 항생제인 Ampicillin 및 Kurarinone를 처리한 경우와 비교하여 동등하거나 더 높은 수준임을 확인하였다.

그림 21. 각 화합물에 의한 엔테로코커스 패시움의 성장 억제 확인

소포라플라바논 G의 농도를 달리 처리하는 경우 엔테로코커스 패시움의 성장에 미치는 영향을 확인하고자, OD₆₀₀=0.1 엔테로코커스 패시움에 소포라플라바논 G를 각각 MIC 농도(12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 그 반의 양(6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리한 후 37°C에서 기르면서 시간에 따른 성장을 관찰하였다(그림 22).

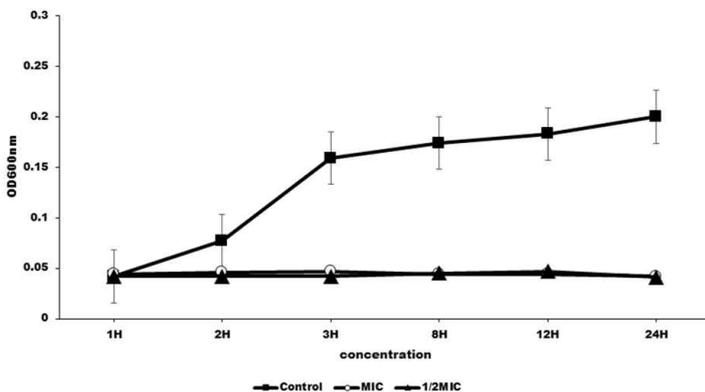


그림 22. 소포라플라바논 G에 의한 엔테로코커스 패시움의 성장 억제

그 결과, 엔테로코커스 패시움(MIC, 1/2MIC)를 처리하였을 때, 엔테로코커스 패시움을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 성장을 현저하게 억제시키는 것을 확인하였다.

*Staphylococcus aureus*에 대한 소포라플라바논 G의 항균 기전 연구에서 소포라플라바논 G가 *Staphylococcus aureus*의 펩티도글리칸과 결합함으로써 항균 효과를 보임이 알려져 있다. 이에, 소포라플라바논 G가 엔테로코커스 패시움의 펩티도글리칸과 결합하여 항균 효과를 보이는지 확인하기 위해 소포라플라바논 G를 처리한 후, 엔테로코커스 패시움의 펩티도글리칸을 농도에 따라 첨가하여 엔테로코커스 패시움의 성장 변화를 관측하였다 (Merkel, G.J. 1978; Kuhner, D., 2014). 구체적으로, 소포라플라바논 G를 각각 6.25(1/2MIC) 및 12.5(MIC) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 96 well plate에 넣은 후 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$ 의 엔테로코커스 패시움에 접종한 뒤 엔테로코커스 패시움에서 직접 추출한 펩티도글리칸(peptidoglycan, PGN)을 농도별(0.29 내지 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 후 24 시간 배양한 뒤 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 에서 엔테로코커스 패시움의 성장을 측정하여 그림 23에 나타내었다.

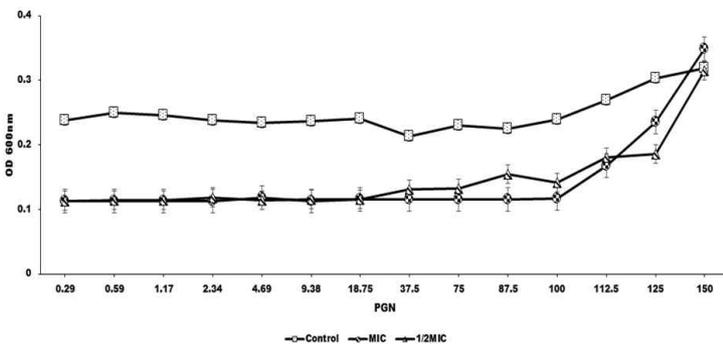


그림 23. 펩티도글리칸의 농도에 따른 엔테로코커스 패시움의 성장 변화

그 결과, 소포라플라바논 G(MIC, 1/2MIC)를 처리한 경우, 펩티도글리칸의 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하에서 엔테로코커스 패시움의 성장이 저해되었다. 펩티도글리칸의 농도를 100 내지 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하는 경우, 엔테로코커스 패시움의 성장이 재개되었으며, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 펩티도글리칸을 처리하는 경우, 소포라플라바논 G를 처리하지 않은 대조군(control)과 동등한 수준으로 세포가 성장하였다. 이는 소포라플라바논 G가 엔테로코커스 패시움 유래 펩티도글리칸과 결합하여 엔테로코커스 패시움의 세포벽 형성을 억제하거나 세포벽을 파괴함으로써 성장을 저해시킴을 시사한다.

소포라플라바논 G에 의해 엔테로코커스 패시움의 세포벽 파괴되어 세포 내의 물질이 밖으로 나오는지 확인하기 위하여 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$ 의 엔테로코커스 패시움에 소포라플라바논 G를 각각 6.25(1/2MIC) 및 12.5(MIC) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 1시간 동안 처리한 후 분광 광도계(spectrophotometer)를 사용하여 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정하였다(그림 24).

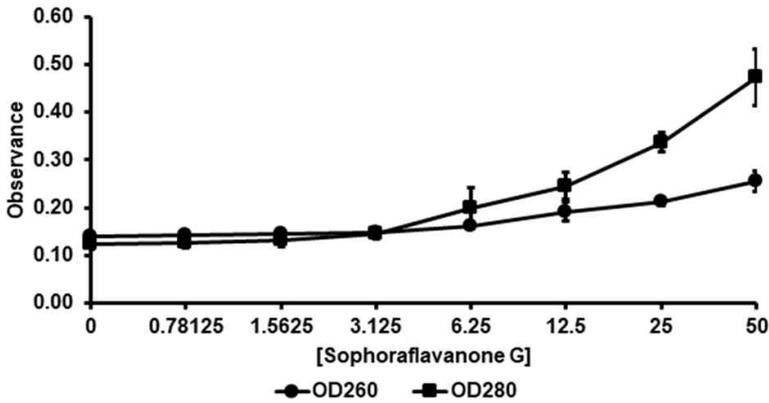


그림 24. 소포라플라바논 G에 의해 260 및 280 nm에서 흡광도 변화 확인

그림 24를 참조하면, 소포라플라바논 G(MIC, 1/2MIC)를 처리한 경우, 260 및 280 nm에서 흡광도가 증가하였으며, 상기 흡광도의 증가는 엔테로코커스 패시움의 세포벽이 파괴되어 세포 내 물질이 외부로 유출되었음을 의미한다.

소포라플라바논 G를 처리하는 경우, 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성에 미치는 영향을 확인하였다. 양성대조군으로는 세포막의 투과성을 증가시키는 화학물질인 Triton X-100을 사용하였다. OD₆₀₀=0.1의 엔테로코커스 패시움에 Triton X-100(Tx-100, 0.0001%), 소포라플라바논 G(3.125 μg/mL)를 각각 또는 함께 처리하여 24시간 배양 후 OD₆₀₀에서의 흡광도를 측정하여 그 결과를 그림 25에 나타내었다.

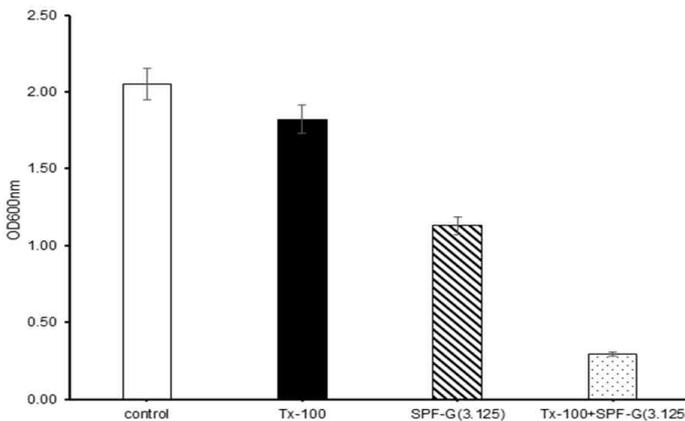


그림 25. 소포라플라바논 G에 의한 세포막 투과성에 미치는 영향 확인

그림 25를 참조하면, Triton X-100 또는 소포라플라바논 G를 단독 처리하는 경우와 비교하여 Triton X-100 및 소포라플라바논 G를 함께 처리하였을 때, 세포 성장이 현저하게 억제되었으며, Triton X-100 및 소포라플라바논 G를 함께 처리하였을 때, 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성이 현저하게 증가함을 의미한다.

소포라플라바논 G는 엔테로코커스 패시움의 세포벽을 파괴하거나, 세포막 투과성을 증가시킴으로써 항생제의 항균 활성을 증진시킬 수 있을 것으로 예측되었으므로, 소포라플라바논 G의 항균 보조 활성을 평가 하였다.

내용	MIC 값 ($\mu\text{g/mL}$)			
	KACC 11954		CCARM 5506	
	24H	48H	24H	48H
SPF-G + Ampicillin	1.25	4.97	0.93	3.96
SPF-G + Vancomycin	3.19	7.34	0.42	0.51
SPF-G + Streptomycin	2.96	9.15	1.84	7.53
SPF-G	6.25	12.5	6.13	12.5
Ampicillin	1.5625	6.25	3.125	6.25
Vancomycin	>100	>100	0.78	0.78
Streptomycin	>100	>100	>100	>100

표 35. 소포라플라바논 G에 의한 항균 보조능 평가

그 결과, 소포라플라바논 G는 타 항생제와 함께 처리되었을 때 더욱 효과적으로 엔테로코커스 패시움의 성장을 저해하였으며, 특히 반코마이신 및 스트렙토마이신을 단독으로 처리하였을 때 매우 낮은 수준으로 측정되었던 항균 활성을 현저히 증가시켰다. 위의 결과는 소포라플라바논 G가 엔테로코커스 패시움의 세포벽을 파괴시킴으로써 항생제에 의한 항균 활성을 현저히 증대시킬 수 있음을 시사한다.

위의 결과는 소포라플라바논 G는 엔테로코커스 패시움의 성장을 억제할 뿐만 아니라, 세포벽의 원료인 펩티도글리칸과 결합함으로써 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성이 증가되면 병용 투여될 수 있는 항균제 또는 항진균제를 박테리아 내로 더욱 효과적으로 침투시킬 수 있어, 그 사용량이 현저히 저감되며, 내성 발생률 또한 최소화시킬 수 있음을 의미한다.

- A.apis에 대하여 신규 항진균 후보 물질 Anwulignan, Magnoflorine, Chinomethionate를 발굴

*Ascosphaera apis*는 꿀벌의 larvae에 감염하여 전염성 질병을 일으키는 곰팡이 중 하나로 백묵병을 일으킨다.

백묵병은 곰팡이 균사가 자라면서 유충의 체액이 말라 백묵과 같이 굳어지는 질병으로 1984년 처음 경상북도 포항 지역에서 알려진 이후로 현재 전국적으로 발생하고 있다. 현재 알려져 있는 백묵병 전문 치료약은 없으며, 철저한 관리를 통해 예방하는 것이 유일한 방법이다. 방제 방법으로는 Propionic acid 훈증성약제가 사용되고 있다. (최승윤, 1992)

또한 기존의 항진균제의 사용은 사람과 동물등 다양한 곳에 사용하게 됨으로 내성 균주의 발생을 야기하게 되어 사용이 자제 되어야 할 것이고, 또한 항진균제가 propolis나 honey bee에 남아 있을 수 있기 때문에 처리 할 수 있는 시기가 매우 제한 적이므로 이를 대체 할 수 있는 항진균제가 절실하다.

기존에 항진균 활성이 알려져 있지 않은 신규 항진균 활성 물질을 발굴하기 위하여 식물 추출물을 이용하여 최초 screening을 수행하였다. 이는 식물 추출물이기 때문에 기존에 알려져 있는 항생제에 대한 부정적 인식과 신규 물질에 대한 농가에서의 저항성이 낮을 것으로 예상된다. 또한 신규 물질을 함유하고 있는 식물을 그대로 사용하여 꿀벌의 집을 청소하는데 사용하게 되면, 질병의 발생을 감소시킬 수 있을 것으로 예상되어 식물 추출물을 사용하였다. 몇몇은 기존에 효과가 이미 알려져 있거나 효과가 미미하여, 효과가 있는 추출물 중 기존에 보고가 되

지 않았고 항진균 효과가 있을 것으로 예상 되는 물질을 대상으로 실험하였다.

순도가 높은 물질을 구매하여 *A.apis*의 성장을 저해 하는지 Broth microdilution assay를 활용하여 확인 한 다음 이들 물질들에 대하여 다른 곰팡이나 박테리아의 성장을 저해하는지 확인 하기 위하여 다양한 종류의 곰팡이와 박테리아를 대상으로 Broth microdilution assay를 하여 성장을 억제하는지 확인 하였다.

Compounds	<i>A. apis</i>	
	24h	48h
Loganic acid	100	>200
Anwulignan	1.56	3.13
Tracheloside	100	>200
Fangchinoline	>200	>200
Corosolic acid	12.5	12.5
Dehydrocostus lactone	50	50
Emodin-8-O-β-D-glucopyranoside	>200	>200
Miconazole	1.56	1.56
Tetracycline	N.D	N.D

표 36. 각 천연물 유래 물질에 대한 항진균 효과

*A.apis*의 경우, EUCAST에서 제시된 broth micodilution assay를 적용하였다. 천연물질은 Dimethyl Sulfoxide를 이용하여 10mg/ml 농도로 만들어 사용하였다. 천연물질은 RPMI 1640 without sodium bicarbonate and with l-glutamine를 0.165 M morpholinopropanesulfonic acid 를 사용하여 pH 7.0으로 맞춘 후 2% glucose를 넣은 배지를 사용하여, 연속적으로 2배 희석하여 (사용된 천연물은 최대 200mg/l 에서 최소 0.2mg/l 이다.) 100μl의 양으로 96 well flat-bottomed microtitration plates에 넣었다. 마지막 well은 균주만 들어가도록 하여 대조군으로 사용하였다. 100μl의 균주 현탁액 (0.5×10⁵~ 2.5×10⁵CFU/ml)을 각각의 well 에 넣은 후 35°C에서 24시간 또는 48시간 배양하였다. MIC 값은 균의 성장을 저해하는 천연물의 최소농도로 하였다 (Cuenca-Estrella M et al, 2002).

표 1에서 나타낸 바와 같이 7종의 물질을 대상으로 항진균 효과를 확인한 결과 anwulignan은 *A. apis* (MIC value: 1.56mg/l , 3.13mg/l 각각 24시간 후와 48시간 후, 이하 동일)에 대하여 놀라운 성장 저해 효과를 보임을 확인 하였다. 또한 잘 알려져 있는 항진균제인 miconazole이 *A. apis* (MIC value: 1.56mg/l , 1.56mg/l)의 성장을 저해함을 최초로 확인하였다. 항진균 효과는 기존에 잘 알려져 있는 물질에 비교가 될 정도로 좋은 효과이며, 기존에 알려져 있는 약물이 가지는 내성 균주의 출현과 부작용 때문에 발생하는 문제점 때문에 다양한 항진균 효과가 있는 물질을 발굴하려는 취지에 맞다고 할 수 있다. 이외에 Corosolic acid는 *A. apis* (MIC value: 12.5mg/l , 12.5mg/l)의 성장을 저해 하였으나, anwulignan 보다는 약하다는 것을 확인 하였다.

위의 표 36에서 발굴 된 Anwulignan에 대하여 다양한 종류의 곰팡이균과 박테리아균의 성장에 영향을 주는지 알아보기 위하여 *A. niger*를 포함하여 20개 균주를 대상으로 항(진)균 활성

을 확인하였다. *Candida* 속과 같이 균락을 형성하는 곰팡이는 NCCLS document M27-A에서 추천하는 broth microdilution assay를 사용하였으며, 10^4 cells/ml의 세포를 96 well round bottom microdilution plates에 넣고 실험 하였다(Cuenca-Estrella M *et al.*, 2002, Park *et al.*, 2001).

표 37에서 보는 바와 같이 Anwulignan은 *A. apis* (MIC value: 1.56mg/ℓ, 3.13mg/ℓ)와 *F. neoformans* var. *bacillispora* (MIC value: 6.25mg/ℓ, 6.25mg/ℓ), *P. larvae* (MIC value: 3.13mg/ℓ, 3.13mg/ℓ)에 성장 저해 효과가 있는 것으로 확인 되었으며, *P. guilliermondii*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *M. plutonius*와 *S. saprophyticus*에 24시간 후 성장을 저해 하지만 (MIC value 범위: 1.56mg/ℓ ~3.13mg/ℓ) 48시간 후에는 영향을 주지 못함을 확인 하였다 (MIC value 범위: 200mg/ℓ or >200mg/ℓ). 그 이외의 균주에는 전혀 영향을 주지 않았으며, 이 결과로 Anwulignan은 특정 균주에만 특이적으로 작용하는 물질임을 확인 하였다. 자연계에는 다양한 미생물이 존재하며 이들 중 좋은 균주 또한 많이 있다. 따라서 이 Anwulignan을 사용할 경우 다른 미생물의 성장에는 영향을 미치지 않지만 *A. apis*와 *P. larvae* 같이 벌에 질병을 일으키는 균주에 특이적으로 사용 가능 할 것이다.

	Strain name	MIC for Anwulignan	
		24h	48h
KH A5	<i>A. apis</i>	1.56	3.13
KACC42589	<i>A. niger</i>	>200	>200
KACC40071	<i>A. clavatus</i>	>200	>200
KCTC7965	<i>C. albicans</i>	>200	>200
KCTC7270	<i>C. albicans</i>	>200	>200
KACC45480	<i>C. parapsilosis</i> var. <i>parapsilosis</i>	>200	>200
KCTC7212	<i>C. tropicalis</i>	>200	>200
KCTC17762	<i>C. tropicalis</i> var. <i>tropicalis</i>	>200	>200
KCTC7219	<i>C. glabrata</i>	>200	>200
KCTC17528	<i>F. neoformans</i> var. <i>bacillispora</i>	6.25	6.25
KCTC7211	<i>P. guilliermondii</i>	3.13	200
KACC40256	<i>R. oryzae</i>	>200	>200
BY4742	<i>S. cerevisiae</i>	>200	>200
KACC30068	<i>S. cerevisiae</i>	>200	>200
KCTC3705	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	1.56	50
KACC11304	<i>E. faecalis</i>	>200	>200
ATCC35311	<i>M. plutonius</i>	3.13	>200
ATCC9545	<i>P. larvae</i>	3.13	3.13
ATCC6538	<i>S. aureus</i>	>200	>200
KACC15799	<i>S. saprophyticus</i>	6.25	>200

표 37. Anwulignan에 의한 각 곰팡이균과 박테리아균에 대한 성장 저해

Miconazole은 잘 알려진 항진균제로 무좀에 관여하는 *Candida*증 등의 치료에 사용되는 항진균제이다. 이 항진균제에 의하여 *A. apis*의 성장이 저해가 될 수 있는지 확인하였다.

	Strain name	MIC for Miconazole	
		24h	48h
KH A5	<i>A. apis</i>	1.56	1.56
KACC42589	<i>A. niger</i>	6.25	12.5
KACC40071	<i>A. clavatus</i>	12.5	12.5

KCTC7965	<i>C. albicans</i>	1.56	12.5
KCTC7270	<i>C. albicans</i>	1.56	12.5
KACC45480	<i>C. parapsilosis</i> var. <i>parapsilosis</i>	12.5	12.5
KCTC7212	<i>C. tropicalis</i>	12.5	12.5
KCTC17762	<i>C. tropicalis</i> var. <i>tropicalis</i>	25	25
KCTC7219	<i>C. glabrata</i>	12.5	12.5
KCTC17528	<i>F. neoformans</i> var. <i>bacillispora</i>	6.25	3.13
KCTC7211	<i>P. guilliermondii</i>	12.5	12.5
KACC40256	<i>R. oryzae</i>	ND	ND
BY4742	<i>S. cerevisiae</i>	12.5	25
KACC30068	<i>S. cerevisiae</i>	12.5	12.5
KCTC3705	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	3.13	3.13
KACC11304	<i>E. faecalis</i>	ND	ND
ATCC35311	<i>M.plutonius</i>	3.13	3.13
ATCC9545	<i>P. larvae</i>	1.56	3.13
ATCC6538	<i>S. aureus</i>	ND	ND
KACC15799	<i>S. saprophyticus</i>	3.13	3.13

표 38. Miconazole에 의한 각 곰팡이균과 박테리아균에 대한 성장 저해

위의 표 36에서 기존에 잘 알려져 있는 항진균제인 Miconazole이 *A. apis*와 *P. larvae*, *M. plutonius*등 벌에 질병을 일으키는 곰팡이와 박테리아에도 효과가 있음을 확인 하였다. 본 실험이 제대로 이루어 졌는지를 확인하고자 *A. niger*를 포함하여 16개 균주를 대상으로 항(진)균 활성을 확인하였다. 표 38에서 보는 바와 같이 Miconazole은 기존에 보고된 저해 농도 범위 안에서 사용한 모든 곰팡이의 성장을 저해함을 확인 하였다 (MIC value 범위: 1.56mg/ℓ ~25mg/ℓ). 따라서 본 실험이 제대로 수행되었음을 확인 하였다. 또한 Miconazole은 *B. subtilis* subsp. *spizizenii*(MIC value:3.13mg/ℓ ,3.13mg/ℓ)와 *P. larvae*(MIC value: 1.56mg/ℓ ,3.13mg/ℓ), *S. saprophyticus*(MIC value: 3.13mg/ℓ ,3.13mg/ℓ)에도 매우 효과적임을 확인 하였다. 이는 Miconazole이 항진균제로서 뿐만 아니라 항균제로서 사용이 가능함을 의미한다. 따라서 위의 결과는 Miconazole을 *A. apis* 또는 *P. larvae*, *M. plutonius*의 감염 치료에 사용 할 수 있음을 알 수 있다.

이 후 anwulignan을 대상으로 기존에 잘 알려져 있는 항진균제인 Miconazole 과 혼합하여 사용할 경우 어떤 효과가 있는지를 Broth microdilution assay를 chakerboard 방법으로 실험을 수행하였다.

Miconazole를 순차적으로 RPMI 1640 without sodium bicarbonate and with l-glutamine를 0.165 M morpholinopropanesulfonic acid를 사용하여 pH 7.0으로 맞추는 후 2% glucose를 넣은 배지를 (또는 YPD media (1% BactoYeast extract,2% BactoPeptone, 2% Dextrose)) 사용하여, 2배 희석한 후 90°방향으로 Anwulignan을 순차적으로 2배 희석하여 96-well microtitre plate에 100μℓ 넣은 다음, 100μℓ의 *A. Apis* 균주 현탁액 ($2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ CFU/ml)을 각각의 well 에 넣은 후 35°C에서 24시간 또는 48시간 배양하였다. Miconazole은 최대 200mg/ℓ에서 최소 0.2mg/ℓ이 되게 하였으며, Anwulignan은 최대 25mg/ℓ에서 최소 0.2mg/ℓ가 되게 하였다. 각 물질에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 다시 확인 하였다. 혼합 사용 실험에 사용된 물질간의 상승효과는 $FICI=(Ac/Aa)+(Bc/Ba)$ 공식을 사용하여 Fractional inhibitory concentration indexes (FICIs)로 표시하였다.

<i>A.apis</i>	MIC				FICI	
	Anwulignan		Miconazole		24hour	48hour
	24hour	48hour	24hour	48hour		
Median	1.56	3.13	1.56	1.56	0.75±0.15	0.78±0.14

표 39. Anwulignan과 Miconazole에 의한 *A.apis*균에 대한 성장 저해 (단위:mg/ℓ)

Anwulignan은 표 36과 표 37의 결과 *A. apis* 별 질병을 일으키는 균주에 특이적으로 작용하며, 항진균 효과가 탁월한 것으로 확인 하였다. Miconazole 또한 이 균주에 대한 성장 저해성이 탁월한 것으로 확인 하였다. 하지만 Azole계 항진균 물질은 내성이 많이 보고되어져 왔으며, 부작용이 많은 것으로 알려져 있다. 따라서 Miconazole을 이 균주의 성장 억제제로 사용할 경우 Miconazole의 사용 양을 줄이는 것이 중요하다. 이를 위하여 Anwulignan 과 Miconazole의 복합사용에 의한 효과를 관찰 하였다.

표 39의 결과에서 보듯 Anwulignan 과 Miconazole의 복합사용에 의한 항진균 상승효과는 별로 보이지 않음을 확인 하였다 (FICI value= 0.75±0.15, 0.78±0.14; 각 24시간 후와 48시간 후; 이후 동일). 하지만, Anwulignan 0.78 mg/ℓ 을 사용하였을 경우 Miconazole 또한 0.78 mg/ℓ 을 사용 하여도 *A. apis* 의 성장을 저해함을 확인 하였다. 따라서 Anwulignan 과 Miconazole의 복합사용으로 Miconazole의 사용 양을 줄일 수 있음을 확인 하였다.

Anwulignan의 기전을 확인하기 위하여 기존에 잘 알려져 있고 실험실에서 보유하고 있어 바로 확인이 가능한 Hog1과 Mpk1의 활성화를 저해 하고 있는지 확인하기 위해 anwulignan을 2 시간 동안 처리한 후 *A.apis*의 단백질을 추출하여 각 각 Hog1(sc-6815 (santa cruz)), p-p38(sc-17852-R (santa cruz)), Mpk1-FLAG (nti-FLAG antibody (M2; sigma)) Phosphorylated Mpk1 (p44/42 MAPK antibody 9102S (Cell Signaling))을 사용 하여 활성의 변화를 확인하였다.

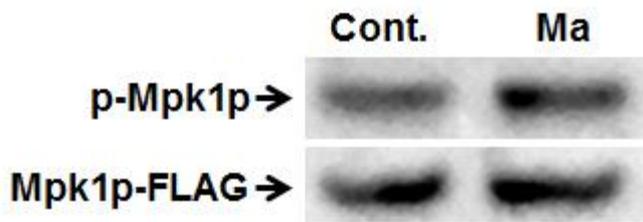


그림. Anwulignan에 의한 Mpk1의 인산화

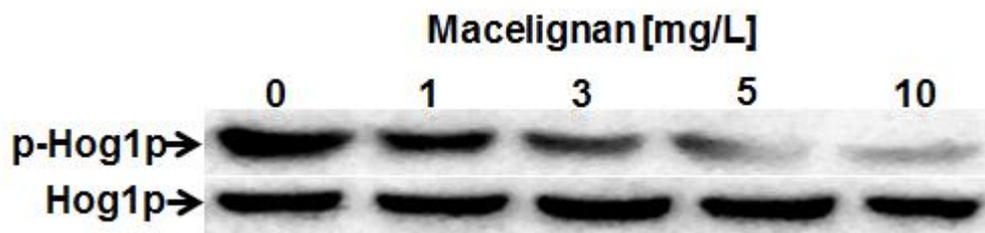


그림 26. Anwulignan에 의해 Hog1의 인산화

그 결과, Anwulignan에 의해 Hog1의 인산화가 저해됨을 확인 하였다. 이를 *A.apis*의 HOG1

homologue 또한 저해가 되는지 확인하기 위하여 *A.apis*의 HOG1 homologue를 효모에서 발현하여 확인한 결과 유전자 발현의 증가가 나타나지 않음을 확인하였다. 따라서 Anwulignan은 *A.apis*의 Hog1의 인산화를 저해하여 항진균 효과를 가짐을 확인하였다.

마지막으로 사람 세포의 성장을 억제하는지 보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. Anwulignan 과 miconazole 세포 독성 실험은 Hep-G2 cell lines을 사용하여 수행하였다. 2×10^3 cells/0.1ml의 Hep-G2 cell lines을 96-well tissue culture plates (Falcon)의 각 well에 넣은 후 DMSO에 녹여진 각 물질을 표시된 농도로 culture plates에 추가하였다. 대조군 DMSO는 최대 농도가 0.5%가 넘지 않도록 하여 각 plates에 넣어 주었다. 24시간 후 $100 \mu\text{l}$ 5mg/ml MTT (sigma Cat. M2128)을 넣어 준 다음 반응물을 추출하여 활성을 ELISA reader(VersaMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 최소 3회 반복하여 수행하였다.

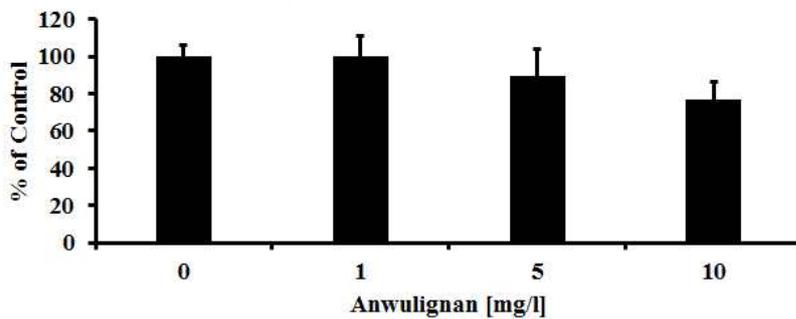


그림 27. Anwulignan에 의한 HepG2 cell line에 대한 성장 저해

그림 27은 Anwulignan에 의한 HepG2 cell line에 대한 성장 저해 정도를 나타낸다. 표 36과 표 37의 결과로 Anwulignan은 *A. apis* 와 *P. larvae*균에 특이적으로 항(진)균 효과가 있는 것을 확인하였다. 이를 사용할 경우 사람에게 해가 될 수 있는지를 확인하기 위하여 HepG2 cell line를 사용하여 사람 세포의 성장에 영향을 주는지 MTT assay를 수행하였다. 그림 27의 결과 (10mg/l 처리한 경우 대조군에 비하여 $76.6 \pm 10.1\%$ 세포의 성장이 관찰 됨)와 이전에 다른 실험실에서 발표한 결과 (Xu LJ, et al., 2006)에 의하면 Anwulignan은 사람 세포의 성장에 현저한 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 따라서 이 물질을 항(진)균제로 사용 하더라도 사람에게는 거의 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다.

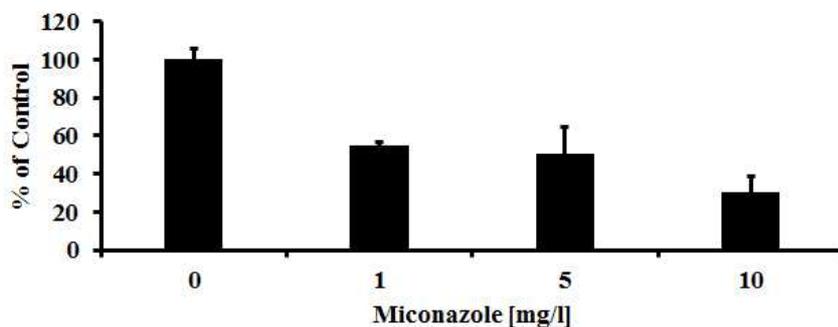


그림 28. Miconazole에 의한 HepG2 cell line에 대한 성장 저해

그림 28은 Miconazole에 의한 HepG2 cell line에 대한 성장 저해 정도를 나타낸다. 표 36과

표 38의 결과로 Miconazole은 *A. apis* 와 *P.larvae*, *M. plutonius*균 뿐만 아니라 실험에 사용된 모든 균주에 대하여 항(진)균 효과가 있는 것을 확인 하였다. Miconazole은 기존에 간 독성 등 많은 부작용이 보고되어 있었으며, 독성이 있을 것으로 예상 되었다. HepG2 cell line를 사용하여 MTT assay를 수행하였다. 예상 과 같이 그림 28의 결과에 의하면 Miconazole은 사람 세포의 성장에 영향을 많이 주는 것을 확인 하였다. 1mg/ℓ 농도의 Miconazole에 의해서도 약 45%의 세포가 성장을 하지 못하며, 10mg/ℓ 농도의 Miconazole에서 약 70%의 세포가 죽는 것을 확인 하였다. 따라서 Miconazole을 자연 생태계에 사용하는 것은 많은 무리가 있을 것으로 예상 되며, 만약 사용 하더라도 Anwulignan 또는 Corosolic acid와 같이 사용함으로, 사용 양을 줄이는 것이 바람직할 것이다. 또한 그렇게 함으로 예상 되는 내성의 발생 빈도를 감소시키고, 사람에게 노출을 최소화할 수 있을 것이다.

- 신규 항 진균 후보 물질로 Magnoflorine 발굴

A. apis 에 대한 신규 천연 항진균제 발굴과 기전 확인을 위하여 잘 알려져 있는 candida에 대한 항진균제 발굴을 수행 하였다.

	KCTC7965	KACC30071	KCTC17762	KACC45480	KCTC7219
Miconazole	3.125	6.25	6.25	0.7813	6.25
Magnoflorine	50	100	>100	100	>100
Berberine chloride	100	100	>100	100	>100
Cinnamaldehyde	100	100	>100	>100	>100

표 40. 각 물질에 대한 항 *candida* 효능 평가

신규 항 candida 물질 발굴을 위해 44종의 물질을 사용하여 확인 한 결과, 천연물질로서 기존에 발굴된 Berberine chloride 과 Cinnamaldehyde 보다 효과가 우수한 천연 항진균 후보 물질로 Magnoflorine을 발굴하였다.

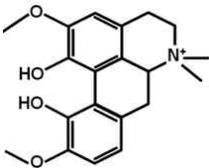


그림 29. magnoflorine의 구조



그림 30. 항 candida 효과 확인

또한 Magnoflorine이 다른 조건에서도 항진균 효과가 있는지 확인 한 결과 agar plate 상에서도 상당히 좋은 저해 능을 가짐을 확인 하였다.

Compounds	MIC value (mg/mL)		
	24 h	48 h	72 h

Miconazole	3.125	3.125	3.125
Magnoflorine	50	50	50
Berberine	100	100	>100
Cinnamaldehyde	50	100	>100

표 40. 시간에 따른 항진균 효과 확인

같은 물질을 3일간 투여한 결과 다른 대조군에 비하여 안정성이 좋음을 확인하였다.

기전을 확인하기 위하여 α -glucosidase activity를 확인 한 결과 Magnoflorine에 의한 저해를 확인

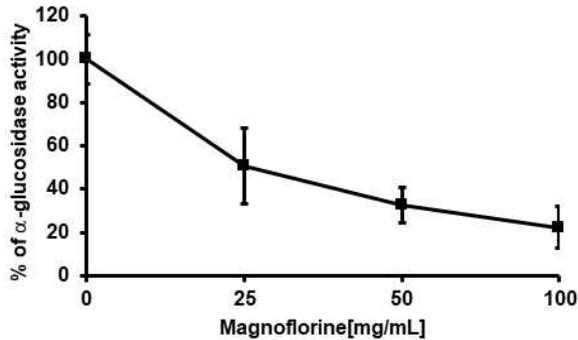


그림 31. Magnoflorine에 의한 α -glucosidase activity 저해

Magnoflorine에 의하여 Dose-dependent 하게 α -glucosidase activity가 저해됨을 확인 하였다. 이는 Magnoflorine에 의한 항진균 기전이 α -glucosidase activity를 저해하여 나타남을 의미한다.

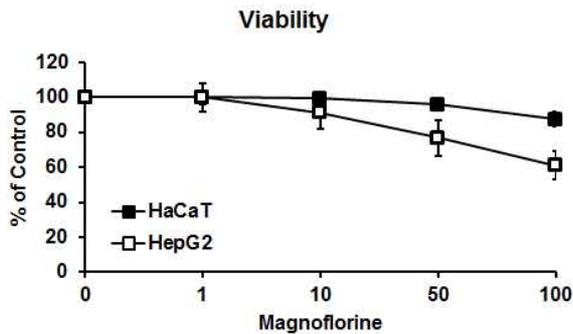


그림 32. 신규 물질에 의한 세포 독성

세포 독성이 상당히 적은 물질로, 신규 항candida 물질 발굴을 위한 선도물질로 활용이 가능함을 확인

그 외에 항진균 효과가 있는 물질로 Acetylshikonin, 4-Hydroxyderricin, Sophoraflavanone G, Falcarindiol, Timosaponin AIII, Otobaphenol, Corosolic acid, (-)-Bornyl acetate, Curcumin, Cinnamaldehyde, 1-Decanol, 등을 발굴 하였다.

Chinomethionate: DNA를 잘라 내거나 DNA에 끼어 들어가 항진균 효능을 보임을 확인

○ 내성 기전 연구

Tetracycline을 세포 밖으로 내 보내는 역할을 하는 유전자에 대한 연구를 수행 하였다. 즉, *P.larvae*를 죽이기 위하여 Tetracycline을 처리하였을 경우, 이를 세포 밖으로 내 보내는 Pump에 의하여 약물이 세포 밖으로 내 보내지게 되면 내성을 가지게 된다. 본 연구진은 이러한 역할을 수행 할 것으로 생각되는 유전자가 있음을 확인 하여 이 유전자에 의한 내성 발생 가능성에 대하여 연구하였다.

1. 유전자 발현

그림 33과 34과 같이 Tetracycline resistance MFS efflux pump (TetMFS)를 확인 하여 이 단백질에 대한 내성이 발생 가능한지 확인 하였다.

```
ATGGCTGTGAACCTGGCGAATCTAAGGGAGGTACCTGTTCTTACATACGGTTTACCTTTGCCTGTGAAAGGAAGGAAACATTGAAA
AAGCCGATATTACTTATCATGATCATGTTGTTTTTCGTCTATGTAGGGTTTGGGATATCATTCCCGTATTGCCGGTTTTGTGCAA
GAAGAAGGAGTTGACCCGGCCGGACTCGGCTGCTGCTTCCATCTATCCATCGTATCCTTCTGGTTGCCCATCTCGGGAGCG
CTGTCCGACCGGAAAGCCAGCGCTCCCATCTCTGCTGACAGCCACGTTTGGTTTTGCATTAAAGCTTCGTGCTTTTGGCTTATCGGAA
CGGCATATTTGGCTGCTCTATCTATCCAGGGTCCTGGGAGGACTATTTTCAGGAGCTTTAAGCGAGTCGCCATGGCATATGTAGGG
GATATTACTTCCCATGAGGAAAGGACGAAATCCATGGGATTCGTGGGATGTCATTTGGCTGGCTTTATCTTTGGTCCGGCTTTG
GGCGTCTTAAAGCAGTTGGAGCTTAACTCTGCCTTTTTGGGTTTCGGCTGGAGCTTGCACTGCAGGTGTTGCGAGTACACTGCTG
GTTTTGCGGAATCTCTGATAAAAGTGTACAGCCTGCAGAACATTCGATTCATCCAGGTGGAAGCTTTCAGCGGTCTGCTGCTG
TATCTGTATATTTTACCTTTGTAGTATCCGCTCTCTCGGCAGGACTGGAATCCACCTTCCAGTACTTTGAAATGGGAGTATTCAG
GTTAOCCTCTTCACAAATCGGGTAATGTTTATGTTTCAGGGTTTTGCTGATGCCCTTGTTCAGGGGATTAATTCGCCGATTGOC
AAACGGAAATGGGAGAAACAGGCTATTTGGTACAGGATTTGTTCTTCTGTGATGGGTTTATCATAAATTTCAAATCCGGCGGTTTC
TGGACAGCTACGGTGGCGCTTACTATATTACGATGGGAAATGCGATGCTCCGCCCTTGTGTCAGCTCTTTATTTGACGCGCAGCTT
ACAGCGGACAGGGAATACACACCGGCTGAATTTCTTATGGACAGCCTCGGACGTATTCAGCGCCCTGCTGGGAAACAGCTTG
TTCCGGTGGAAATCAGGCGCTCTTATCTGGCAGGTATTTGCTTAGCCTTGCCAGCGGATTTGGCTTTGGAAAGTTTCATGAATTTG
GACCAAAAAAGAAAAATGCAGGAGGCGGTAG
```

그림 33. 내성 관련 TetMFS의 유전자 서열

```
MAVNLANLREVPLVITGLPLPKVGRKTLKPIILLIMLFFVYVGFIIIVLQVQEEGVDEPAGLGLLLSIYSIVSFLVAPFWGA
LSDRGRRPILLTATFGFALSFLVLLSERHIWLLYLSRVLGLLFSGALSVMAYVADIT SHEERTKSMGFVMSIGLGFIRGPA
GGLSSWLTLPFWWSAGACTAVFAGTILLVPLESLDKSVQPAEHSRHWKAFSGLLRVLVYILTFVVSVSLAGLESTFQYFEMGVFQ
VTSQQI GLMFMFSGFADALVQGLLRPIAKRWEKQAI GTGLFFSVMGFI IILQSGAFWATVALTIIFSMGNAMVRPCVSSLLTQRT
TGGQGITGLNSMSDLSLGRVAGPLLSTSLFGWKSAPYLAGILLSLAAGYWLKHFELDKKKNAGGV
```

그림 34. 내성 관련 TetMFS의 단백질 서열

2. 유전자를 발현 하였을 경우 내성과의 연관성 연구.

TetMFS의 유전자 서열을 바탕으로 유전자를 증폭하여 *E.coli*에 발현을 하였다. 이를 대상으로 Tetracycline에 대하여 감수성이 바뀔 수 있는지 확인 한 결과 감수성이 감소함을 확인 하였다.

Compound	MIC
<i>E. Coli</i>	25
<i>E. Coli</i> with Pumping protien	100

표 41. TetMFS에 의한 감수성 변화 확인

3. 잘 알려진 항균제에 대한 내성 연구를 진행하기 위하여 내성균을 확보 하고자 하였으나, 아직은 많은 균주가 없는 상황이다. 따라서 기존 항균제 중 glycopeptides에 의한 항균 기전 및 이에 의한 내성 관계를 연구 수행 하였다.

즉, 본 과제에서 확보 한 Sophoraflavanone G의 작용 기전은 세포벽과 결합하여 세포벽을 파괴하여 항균 작용을 보이는데 이는 glycopeptides의 작용 기전과 같다. 또한 세포벽의 peptidoglycan의 조성과의 변화에 의하여 내성이 발생 할 수 있으므로, peptidoglycan의 조성이 어떤 방식으로 변화하게 되면 내성이 발생 할 수 있는지 확인 하였다.

Sophoraflavanone G는 peptidoglycan의 어느 부위와 결합하는지 확인하기 위하여 다양한 종류의 amino acid를 처리 한 후 세포 성장을 관찰 하였다. glycopeptide resistance의 많은 경우

peptidoglycan 합성 경로를 바꾸어 항균제에 내성을 보이는 경우가 많이 있다. 따라서 그러한 항균제가 가지는 항균 효능이 peptidoglycan의 구성, 특히 amino acid의 구성과 연관성이 있는지 확인하기 위하여 다양한 종류의 amino acid를 처리한 후 박테리아의 성장을 확인 하였다.

○ 신규 물질의 생산 기술 개발

- 유효 물질의 순수 추출법 2개 확립

신선초 뿌리로부터 하이드록시테리신 분리법을 확인 하였다.

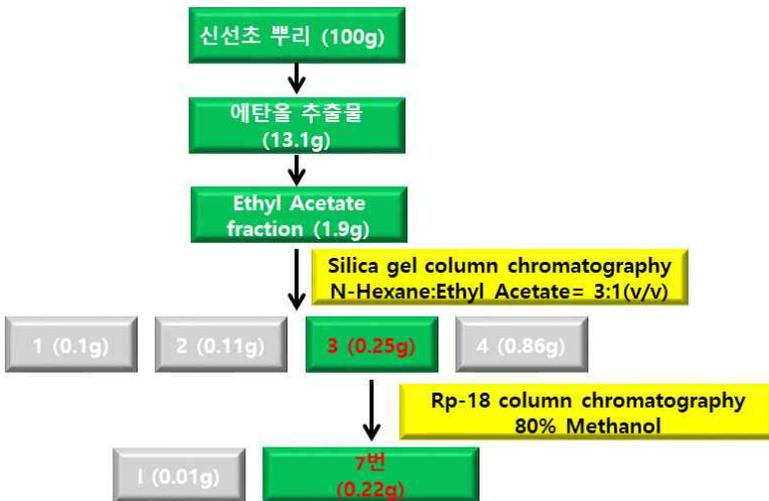


그림 35. 하이드록시테리신 분리 방법

Nutmeg 열매로부터 양우리구난의 분리법을 확인 하였다.

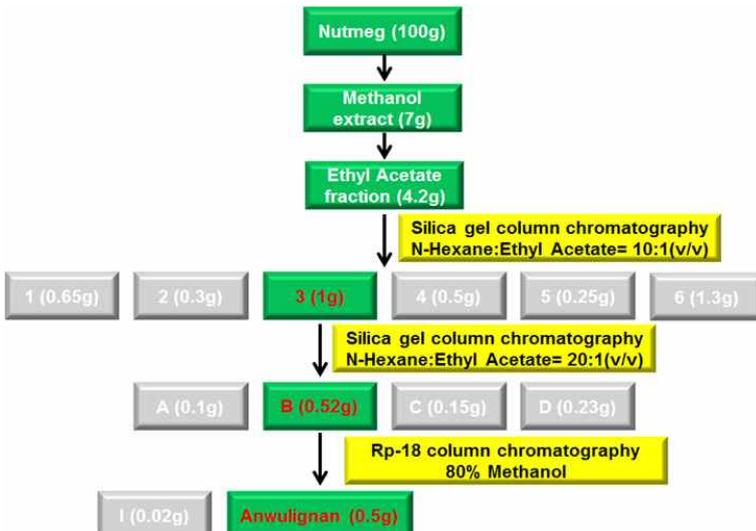


그림 36. 양우리구난의 분리 방법

- 유효 물질을 함유한 순수 물질 추출 전 단계에 대한 연구

순수 추출까지는 비용 문제가 발생할 것으로 생각 되어 분획 중간 단계에 대하여 항균 및 항진균 활성을 연구 중에 있음.

- ① 발굴한 물질에 대하여 순수 추출법 확립을 위해 추출법 개발 중이며, 아세틸시코닌 분리

정제를 위해 헥산을 이용하여 지치에서 1차 분리 후 hexane: EtOAc=10:1에서 분리를 하고 있으나, 아직 고 순도는 아니어서 계속 진행 중

② 신규 물질에 대한 추출법을 확립하기 위하여 고삼을 분쇄 한 후 메탄올을 이용하여 1차 분획을 획득하였음. 이를 클로로포름/메탄올 혼합액으로 분리 중에 있음

○ 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포 주 개발

- 노제마 곰팡이 감염에 관여하는 단백질 1개발굴, 유전자를 확보하여 감염을 상승 확인

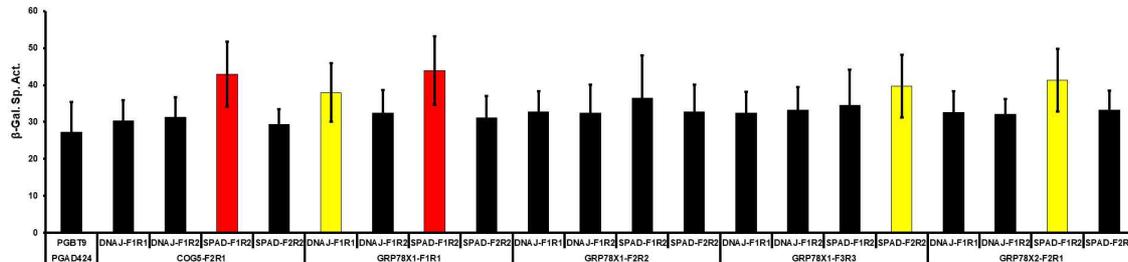


그림 37. 꿀벌의 단백질과 결합하는 노제마 단백질의 결합 확인

감염율이 높은 신규 세포 주 제작하여 노제마 감염을 확인

- 감염 억제에 관여하는 연구를 수행 하여, Nosema의 감염 억제 물질로 2개의 식물 유래 물질, 1개의 추출물을 발굴

1. 비수리 추출물에 의한 노제마병의 예방

꿀벌에서 감염병을 일으키는 병원균에는 대표적으로 노제마병을 일으키는 노제마 아피스 (*Nosema apis*) 등이 있다.

노제마 아피스(*Nosema apis*)는 꿀벌 성충에 감염하는 미포자충목 중 하나로 이로 발생하는 꿀벌의 질병인 노제마병은 노제마 아피스(*Nosema apis*)에 의해 꿀벌 성충의 소화기 및 부속기에 감염되어 기생하고 발병되는 질병 중 하나이다. 노제마 아피스(*Nosema apis*)의 포자는 외부환경에서 수년간 생존 가능하며 꿀벌 체내에서 증식한다. 병원균의 유입은 꿀벌의 먹이 섭취 과정을 통해 이루어지며 장에서 포자가 발아하여 발병된다. 발아한지 4-5일이 지나면 복제된 포자가 세포 밖으로 나와 주변세포에서 다시 발아한다.

노제마병을 방제를 하기 위한 연구자들의 노력은 많았으나, 아스퍼질러스 속 곰팡이에서 생기는 항생물질인 퓨마길린(fumagillin)에 의한 방제와 에틸렌옥사이드(ethylene oxide)의 훈증 소독이 대표적으로 사용되고 있다. 하지만, 퓨마길린(fumagillin)에 의한 방제 기술은 경우에 따라 듣지 않는 것으로 보고 되어 있으며, 또한 국내에서 발견되는 노제마병에는 효과가 좋지 않을 수도 있다는 보고가 있다. 하지만, 현재 노제마병의 방제에 사용 가능한 유일한 물질로 알려져 있다. 따라서 많은 연구자들에 의하여 노제마의 감염을 억제하는 유효 성분을 찾고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있으며, 본 연구진은 이러한 필요성에 따라 식물 추출물을 이용하여 노제마병을 일으키는 노제마 아피스(*Nosema apis*)의 감염을 억제하는 물질 발굴을 수행하여 비수리 추출물에 의하여 효과가 있음을 확인 하였다.

비수리(*Lespedeza cuneata*, Chinese bushclover)는 콩과 식물의 여러해살이풀로서, 식품 또는 사료의 원료로서 흔히 사용된다. 퀘세틴, 캄페롤, 비텍신 등의 플라보노이드류를 다량 함유하고

있으며, 항산화, 혈당 강하, 항염증 등 다양한 효능을 가지는 것으로 알려져 있다. 비수리는 순 우리말로서, 주로 한국, 일본, 대만 등 아시아권 및 오스트레일리아 등에 분포하며, 약 50cm 에서 1m 까지 자라고, 씹쓸한 맛을 가진다. 야관문이라는 명칭으로 더 널리 불린다.

정제된 노제마 아피스를 얻기 위하여 노제마병에 걸린 꿀벌 성충의 장을 뽑아 RIPA buffer를 사용하여 섞어주었다. 충분히 깨질 수 있도록 5분간 볼텍스믹서를 이용하여 섞었다. 이 후 5분간 400rpm으로 원심분리를 하고 상층액을 버려 큰 불순물들을 제거하였다. 얻은 노제마 아피스 세포는 500 μ L의 증류수에 섞어주었다. 같이 섞여있는 박테리아를 제거하기 위해 25%, 50%, 75%, 90%의 불연속으로 쌓인 퍼콜(Sigma)위에 노제마 아피스가 섞인 용액을 올려 15,000g로 30분간 원심분리 하였다. 아래 쪽의 노제마 아피스 층만을 분리하여 이를 사용하였다.

노제마 아피스에 대한 항균 효과를 실험하기 위한 대상으로, 꿀벌 이외에 노제마 아피스에 감염될 수 있는 곤충으로 알려져 있는 *Trichoplusia ni* 세포 또는 상기에서 제작한 감염율이 증가된 세포를 사용하였으며, 세포는 2mL의 glutamine이 들어간 Express Five 배지(Gibco)에서 하루 동안 키운다. 각 세포에 노제마는 10^4 노제마 아피스/mL이 되도록 처리를 하였고 추출물은 50 μ g/mL의 농도로 처리를 하였다. 노제마병의 발병을 확인하기 쉽도록 처리를 한지 5일 후에 관찰을 하였다.

현미경은 먼저 100배로 관찰한 후 결과를 효과적으로 관찰할 수 있는 부분을 400배로 더 확대 관찰하여 사진을 얻었다.

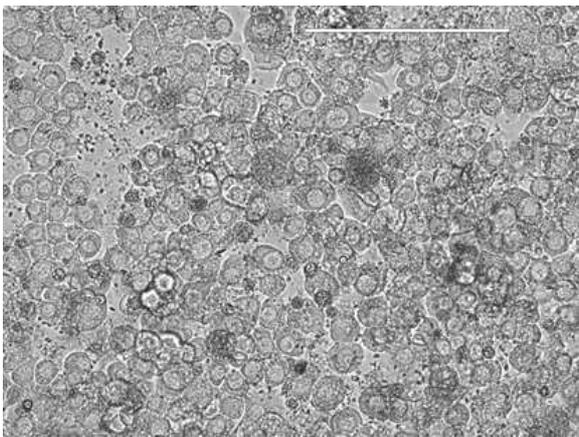


그림 38. 노제마 아피스와 비수리 추출물을 모두 처리하지 않은 세포 사진

그림 38에서 보이는 바와 같이, 노제마 아피스와 비수리 추출물을 모두 처리하지 않은 비교군에서, 세포는 동그란 세포의 모습을 유지하며 분화하는 모습을 보였다.

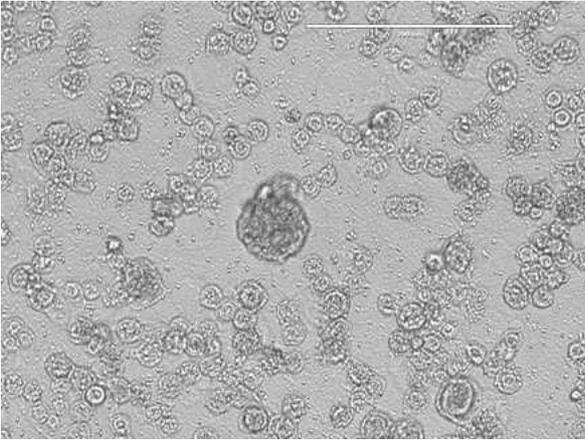


그림 39. 노제마 아피스를 처리한 후의 세포 사진

반면 그림 39와 같이 노제마 아피스를 처리하게 되면 세포의 상태가 나빠지고 내부의 노제마 아피스의 복제과정으로 인해 세포가 비정상적으로 커진 모습을 보였으며, 한 곳에 많이 몰려있는 노제마 아피스 포자를 관찰 할 수 있었다. 또한 세포의 수 또한 상대적으로 적었다.

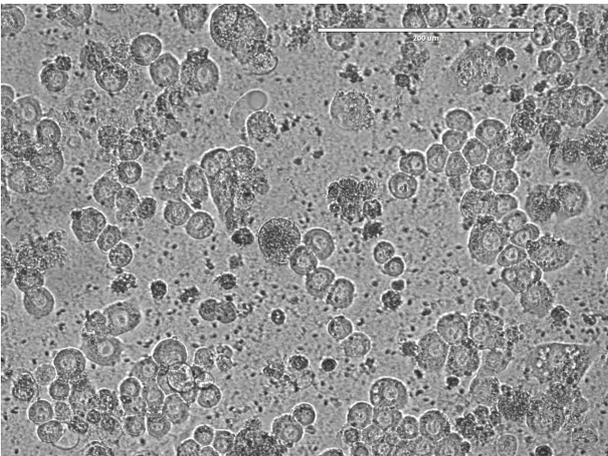


그림 40. 노제마 포자와 곤충 세포에 처리한 결과

이전의 다른 연구진의 연구 결과 월계수의 추출물이 노제마의 감염억제력이 있다고 하여 대조군으로 사용하였으나, 본 연구진의 연구결과 감염 억제력은 있으나 본 연구진이 발굴한 추출물보다 현저히 낮았다

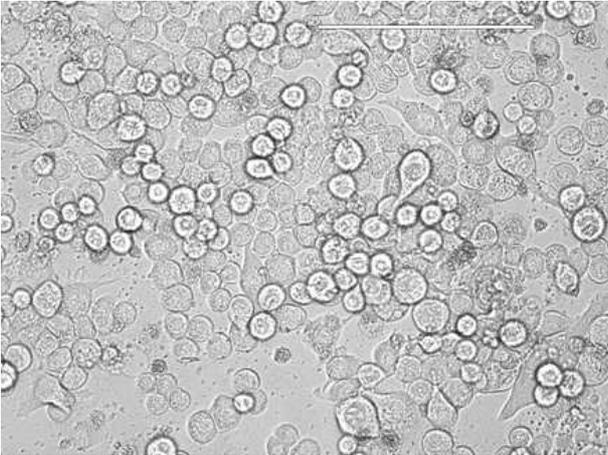


그림 41. 노제마 아피스와 비수리 추출물을 함께 처리한 후의 세포 사진

비수리 추출물의 노제마 아피스의 항균 효과를 확인하기 위하여 노제마 아피스와 비수리 추출물을 함께 처리한 경우, 세포 수와 세포 크기가 정상 대조군과 다른 점이 없었다. 또 노제마 포자가 세포 안쪽 보다는 외부에 많이 위치해 있었다. 즉, 그림 3의 결과로부터 비수리 추출물을 처리하지 않은 군에 비하여 비수리 추출물을 처리한 군에서 노제마 포자(spore)의 수를 확연히 감소시켜 비수리 추출물의 처리가 노제마 치료에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

위에서 얻은 결과를 바탕으로 비수리 추출물이 세포독성을 띄지 않고 노제마 아피스 방제에 효과적인 비수리 추출물의 처리 농도를 찾기 위하여 초기 처리 농도인 50 μ g/mL를 기준으로 두 배씩 농도를 늘려가며 독성 여부를 세포 수 및 세포(포자) 크기를 통하여 관찰하였다. 그 결과, 비수리 추출물의 농도가 200 μ g/mL 이상일 경우, 세포 크기가 작아지는 것을 볼 수 있었고, 세포수도 줄기 시작했다.

노제마 아피스 방제에 효과적인 최소 농도를 찾기 위하여, 유사한 방법으로 50 μ g/mL에서 농도를 1/2로 순차적으로 줄여가며 최소 처리 농도를 확인하였다. 그 결과 3.125 μ g/mL부터 노제마 아피스 포자의 크기 및 수 감소 효과가 떨어지기 시작하였다. 노제마 아피스를 방제하기 위한 비수리 추출물의 적정농도는 6.25 내지 200 μ g/mL임을 확인하였다.

2. 루틴을 이용한 노제마 아피스에 의한 노제마병 예방

노제마병의 발병 원인인 *Nosema apis*의 감염을 막거나 또는 성장을 억제하는 물질 발굴을 위하여 약 200여 종의 식물유래 화합물을 이용하여 감염 억제 물질을 발굴 하고자 하였다. 그 결과 루틴이 감염 억제에 탁월한 효능이 있음을 확인 하였다. 루틴(Rutin)은 rutoside, quercetin-3-O-rutinoside, sophorin 또는 (3-[[6- O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one)로 명명 된다.

그림 41. 루틴의 구조

루틴(Chemfaces, CAS: 153-18-4)은 DMSO에 용해시켰으며 10mg/mL의 농도로 만들었으며 사용된 *Nosema apis* 는 상기와 같은 방법으로 준비하여 실험 하였다.

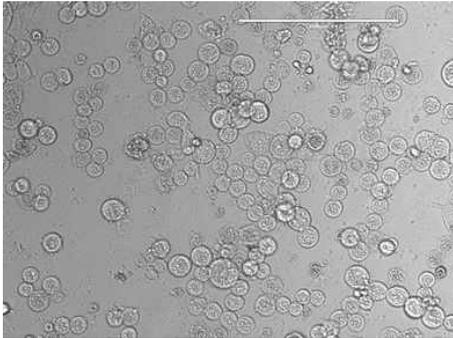
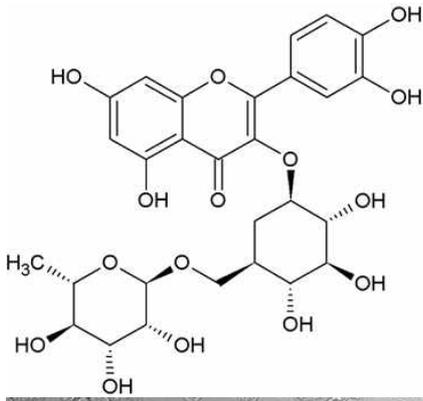


그림 42. 노제마와 루틴을 처리한 세포를 5일간 배양하여 찍은 사진

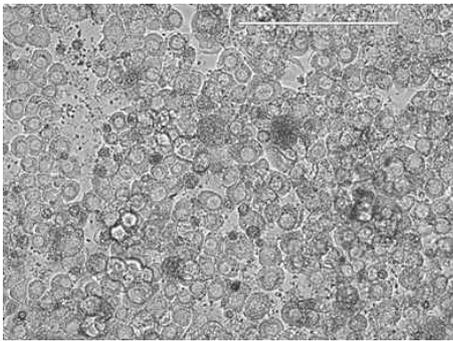


그림 43. 노제마와 루틴을 처리하지 않은 세포를 5일간 배양하여 찍은 사진

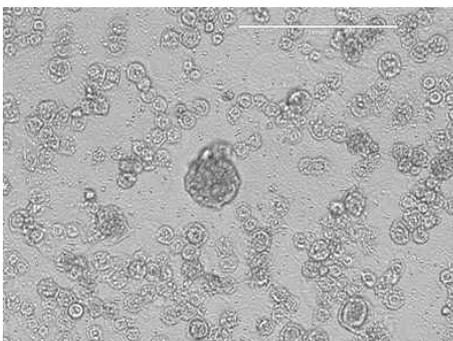


그림 44. 노제마만 처리한 세포를 5일간 배양하여 찍은 사진

위의 실험에서 얻은 결과를 바탕으로 루틴이 세포독성을 띠지 않고 노제마 아피스 방제에 효과적인 때의 농도를 찾았다. 세포 독성을 보이기 시작하는 농도를 찾기 위하여 본래의 농도인 $50\mu\text{g/mL}$ 에서 두 배씩 늘려가며 확인하였다. 그 결과 루틴의 농도가 $100\mu\text{g/mL}$ 가 넘으면 세포가 작아지며 세포수도 줄기 시작했다.

노제마 방제에 효과적인 최소 농도의 경우 50 μ g/mL에서 반씩 줄여가며 확인하였다. 그 결과 3.125 μ g/mL부터 확실히 그 효과가 떨어지기 시작하였다.

노제마를 방제하기 위한 루틴의 적정농도는 3.125-100 μ g/mL이라 할 수 있다.

○ 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴

- 노제마 감염시에 발현에 변화가 있는 mRNA를 조사하여 관련 유전자를 확인 하였으며, 이들 중 꿀벌의 면역과 연관된 단백질 연구 하였다.
- 꿀벌 면역 관여 단백질 중 노제마의 감염에 대하여 발현 변화가 있는 유전자를 확인 하여 Marker로 활용 예정이다.

노제마병을 방제를 하기 위한 연구자들의 노력은 많았으나, 이를 효율적으로 방제하기 위한 방법을 찾기 어려운 실정이며, 따라서 노제마병을 조기에 진단하여 감염된 곤충을 처리하는 방법은 노제마병 방제에 매우 필요한 과정이다. 기존에는 노제마병 진단을 위한 특별한 방법이 없어, 이미 감염된 곤충으로부터 병원균을 분리하거나, 아니면 감염된 곤충이 사멸할 때까지 기다리는 수밖에 없었다. 즉, 노제마병을 조기 진단하여 이에 대처할 수 있는 방안이 양봉 농가에서는 매우 필요한 실정이다.

꿀벌의 면역 관여 단백질을 포함한 노제마의 감염에 대하여 발현 변화가 있는 유전자를 확인 하기 위하여 꿀벌로부터 노제마병에 걸린 꿀벌군을 얻기 위해 50% 설탕물에 *Nosema apis*를 섞고 10일간 섭취하도록 했다. 정상대조군은 50% 설탕물만을 섭취하도록 하였다. 10일 동안 28 $^{\circ}$ C의 암실에서 키웠다. 노제마병에 걸린 일부 벌들에서 *Nosema apis*를 다시 얼음으로써 노제마병에 걸렸음을 확인하였다. 얻은 꿀벌은 사용시까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관되었다.

상기 준비된 감염체로부터, 내장을 분리하기 위하여 막자사발을 이용하여 꿀벌 장세포를 파쇄 하였고, RNA mini kit (Ambion) 를 이용하여 RNA를 추출하였다. RNA를 동량으로 맞추고 Reverse transcriptase (Thermo) 를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA를 주형으로 하여, 노제마병 감염 꿀벌로부터 발현량의 변화를 보기 위해 표 42에서 나타난 바와 같이 서열번호 11 내지 15의 정방향 프라이머와 서열번호 16 내지 20의 역방향 프라이머를 Bionics(Korea)에 의뢰하여 합성하였다.

유전자 마커	프라이머	염기서열	Tm값
유전자 마커1	서열번호 11	TTCAT TACAA GTTGC CTCGG	53.4 $^{\circ}$ C
	서열번호 12	TGTAA ACTGA GTTGG TGAGG	52.5 $^{\circ}$ C
유전자 마커2	서열번호 13	GAAGA TATCA AAGTT GTGGC	49.1 $^{\circ}$ C
	서열번호 14	TAATG CTATG TCGTT CTTCC	49.8 $^{\circ}$ C
유전자 마커3	서열번호 15	CACAA GAAGT ACACG ACCAA	53.0 $^{\circ}$ C
	서열번호 16	CGATT CGTCG AACTC GAATG	54.5 $^{\circ}$ C
유전자 마커4	서열번호 17	CAAAT TTGTG CACCG TATGC	53.6 $^{\circ}$ C
	서열번호 18	AATTC TCCTC GAACG ATACC	52.2 $^{\circ}$ C
유전자 마커5	서열번호 19	TGAAA CTCCG CATAT CCGTC	55.7 $^{\circ}$ C
	서열번호 20	GACAT ATGCT GTTTG CTGTC	52.3 $^{\circ}$ C

표 42. 사용된 프라이머 서열

제작된 cDNA를 주형으로 하고, qPCR master mix (Cellsafe)를 이용하여 95°C 5분 → (95°C 20초, 49 ~ 58°C 20초, 72°C 20초)를 28번 반복 → 72°C 5분 → 4°C의 조건을 CFX Connect (Bio-rad)에서 RT-PCR을 수행하였다. 모든 RT-PCR은 3번 이상 진행되었으며, 그 결과, 그림 45, 46, 47, 48, 49에 나타낸 바와 같은 결과를 얻었다. 또한, 각 유전자의 발현량을 정상 대조군과 비교하기 위하여, 각각의 증폭된 마커 유전자의 Cq 값을 정규화하여 비교하였다. 그 결과 도 11 내지 도 15에서 보듯이, 각 마커 유전자의 Cq 값은 정상 대조군과 비교하여, 현저하게 변화된 것을 관찰할 수 있었다.

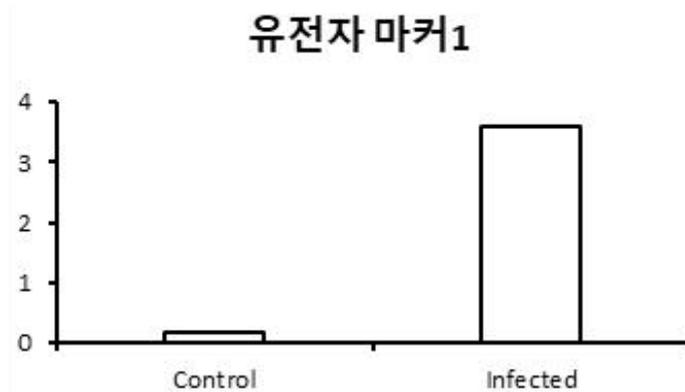


그림 45. 유전자 마커1의 발현 변화

즉, 구체적으로 살펴보면, 유전자 마커 1의 경우, 그림 45에 나타낸 바와 같이 Cq값을 정규화하여 비교한 결과 유전자 마커 1의 정상대조군의 경우 0.177값을 나타내었으나, 노제마에 감염된 꿀벌에서는 3.582로 증가하였다.

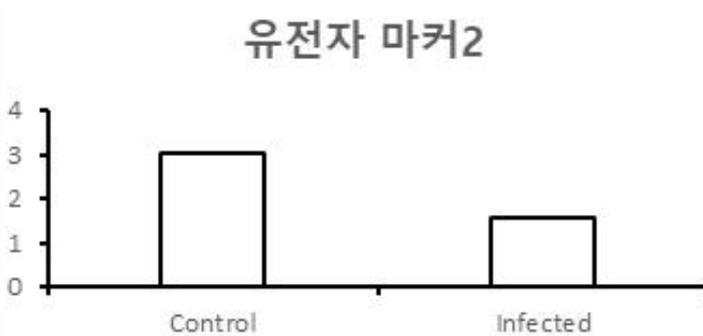
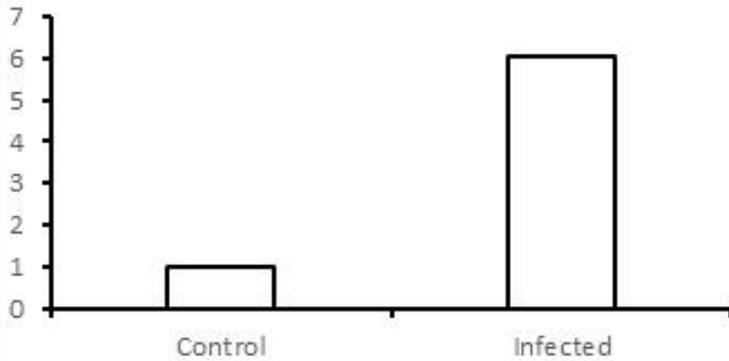


그림 46. 유전자 마커2의 발현 변화

유전자 마커 2는, 그림 46과 같이 정상 대조군의 경우 3.006값을 나타내었으나, 노제마에 감염된 꿀벌에서는 1.585로 감소하였다.

그림 47. 유전자 마커3의 발현 변화

유전자 마커3



유전자 마커 3은, 그림 47과 같이 정상대조군의 경우 0.986값을 나타내었으나, 노제마에 감염된 꿀벌에서는 6.041로 증가하였다.

유전자 마커4

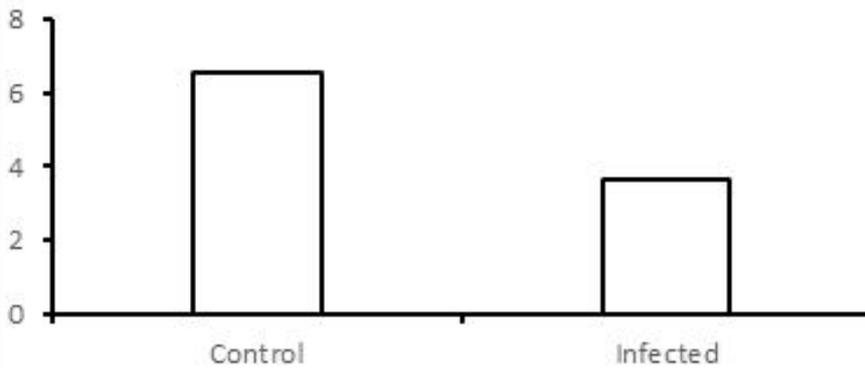


그림 48. 유전자 마커4의 발현 변화

유전자 마커 4는 그림 48에 나타낸 바와 같이 정상대조군의 경우 6.562값을 나타내었으나, 노제마에 감염된 꿀벌에서는 3.662로 감소하였다.

유전자 마커5

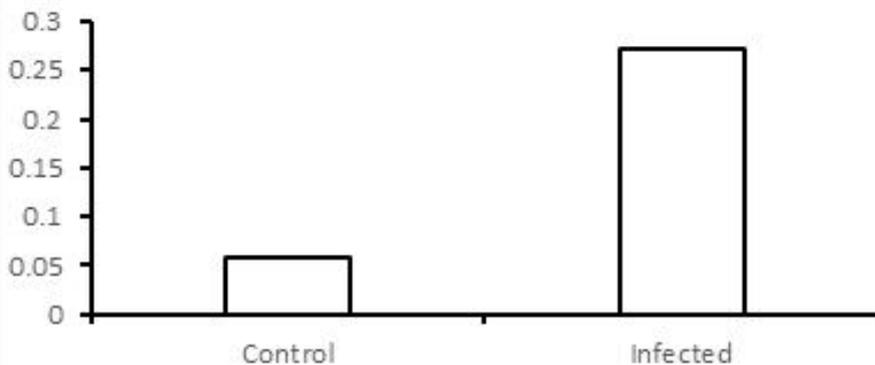


그림 49. 유전자 마커5의 발현 변화

유전자 마커 5는 그림 49에 나타낸 바와 같이 정상대조군의 경우 0.057값을 나타내었으나, 노제마에 감염된 꿀벌에서는 0.273로 증가하였다.

상기와 같은 변화 값으로부터, 정상균과 확연히 비교되는 결과를 노제마 감염균에서 발견할 수 있었으며, 상기 마커의 발현량 변화를 통하여 노제마 아피스의 감염 여부를 진단할 수 있다는 결과를 도출하였다.

- 현재 4종의 신규 꿀벌 장내 미생물에 대한 동정 연구

장내 미생물을 33종 동정하여 분석 중이며, 특히 7종은 신규 미생물로 인정이 되어 16S에 대한 서열을 NCBI 의 Genebank에 등록을 하였으며 특성을 분석 하였다.

동정한 미생물에 대하여 신규성을 확인하기 위하여 16S의 서열을 비교 함. 이의 결과 7종에 신규성이 있어 이들에 대한 미생물 동정 실험을 수행 하였다.

Name	Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity (%)	Top-hit taxonomy
Bam1	Erwiniapersicina	NBRC 102418	99.52	Proteobacteria,Gammaproteobacteria, Enterobacteriales,Enterobacteriaceae, Erwinia
Bam2	Micrococcus yunnanensis	YIM 65004	99.86	Actinobacteria,Micrococcales, Micrococcaceae,Micrococcus
Bam3	Micrococcus aloeverae	AE-6	96.22	Actinobacteria,Micrococcales; Micrococcaceae,Micrococcus
Bam4	Micrococcus aloeverae	AE-6	92.44	Actinobacteria,Micrococcales; Micrococcaceae,Micrococcus
Bam5	Ralstoniapickettii	ATCC 27511	90.68	Proteobacteria,Betaproteobacteria; Burkholderiales,Ralstonia
Bam6	Ralstoniapickettii	ATCC 27511	87.05	Proteobacteria,Betaproteobacteria; Burkholderiales,Ralstonia
Bam7	Bacillus toyonensis	BCT-7112	100	Firmicutes,Bacilli,Bacillales; Bacillaceae,Bacillus

표 43. 동정한 미생물에 대한 16S 서열 비교

신규로 동정한 미생물 7종 중 2종은 이미 거의 동정 연구가 끝났으며 따라서 논문을 준비 중에 있다.

그리고 다시 4종에 대하여 형태학적 연구를 위해 TEM 사진을 찍음

그림 50. Transmission electron microscopy (TEM) analysis

신규 미생물 4종의 특성을 확인 하여 신규성을 확인 하였다.

Characteristic	Bam3	Bam4	Bam5	Bam6
Motility	-	-	-	-
Gram-Reaction	-	-	-	-
Anaerobic growth	obilgate	aerobic	obilgate	obilgate

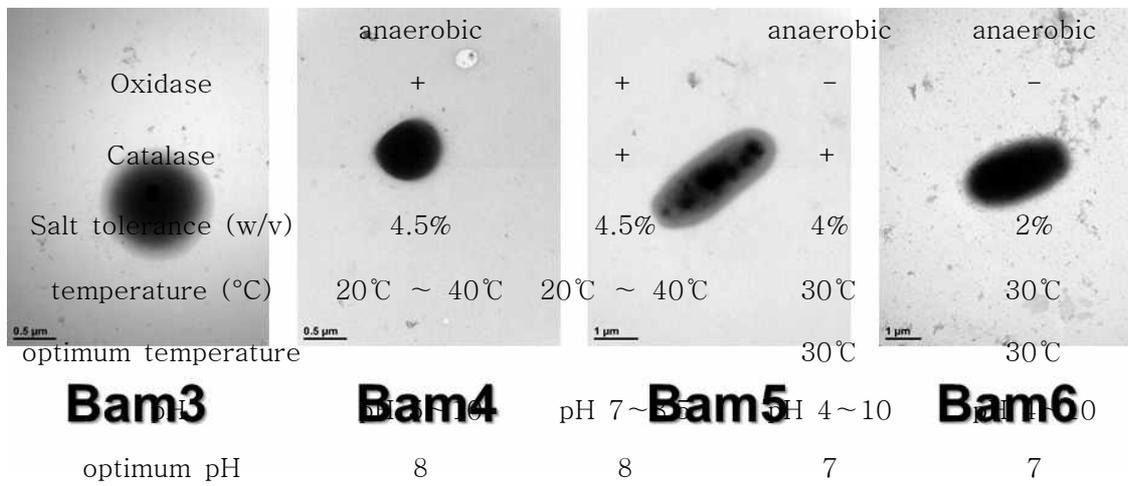


표 44. 신규 미생물의 효소적 특성

신규 미생물 4종의 특성을 확인하기 위하여 Hydrolysis test 수행 하였다.

Hydrolysis of	Bam3	Bam4	Bam5	Bam6
DNase	-	-	-	-
Casein	+	+	-	-
Starch	-	-	-	-
Esculin	-	-	+	+
Tween 20	-	-	-	ND*
Tween 80	-	-	-	+
Lipid	-	-	-	-
L-Tyrosine	+	+	-	-
L-Tyrosine(12days)	+	+	-	-
CMC	-	+	-	-
Chitin	-	-	-	-

표 45. Hydrolysis Test

신규 미생물 4종의 특성을 확인하기 위하여 생물학적 특성 규명 하였다.

API 20NE	Bam3	Bam4	Bam5	Bam6
Glucose Acidification	-	-	-	-
L-arginine dihydrolase	+	+	+	-
Urease	+	+	+	+
β-Glucosidase (esculin hydrolysis)	-	+	-	+
Protease (gelatin hydrolysis)	-	-	-	+
β-Galactosidase (PNPG)	-	+	-	-
D-Glucose	+	+	+	-

L-Arabinose	+	-	+	+
D-Mannose	+	-	+	+
mannitol	+	+	-	+
acetyl-glucosamine	+	+	-	w
D-Maltose	+	w	+	+
gluconate	+	+	+	w
caprate	-	-	+	+
adipate	+	-	-	+
Malate	+	w	+	-
Citrate	+	-	+	++
phenyl-acetate	+	-	+	+

표 46. 신규 미생물의 생물학적 특성

상기한 신규 세포 4종에 대하여 신규 미생물임을 확인 하였다. 이에 대한 벌에 대한 영향이 있는지 향 후 연구 계획 중이다.

- 꿀벌 면역 활성을 조절 하는 물질 발굴을 위해 사람 세포에 대한 면역 강화 역할을 하는 물질에 대한 연구를 미리 수행 하여, 2종의 물질에 의하여 면역 활성이 변화함을 확인 하였다.

이는 미생물 등에 노출이 되었을 경우 꿀벌의 염증 반응에 의하여 꿀벌의 생태에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상하여 항염증 물질을 개발한 다음 이 물질이 꿀벌의 생태에 어떻게 영향을 주는지 확인하기 위하여 수행 하였다.

이를 위하여, 인체 유래 세포에 염증 반응을 유도 한 후, 각 물질을 투여하여 항염증 반응이 일어나는지 확인 하였다.

그 결과 J83이 항염증 반응을 보임을 확인 하였다.

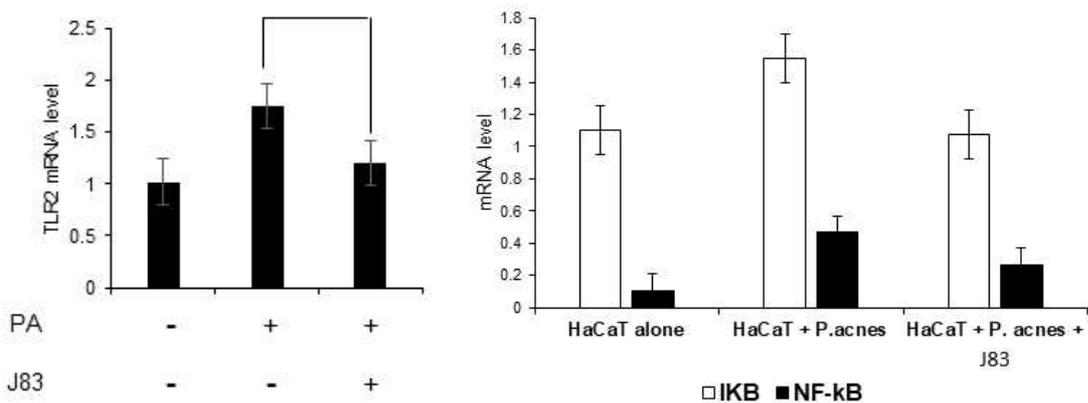
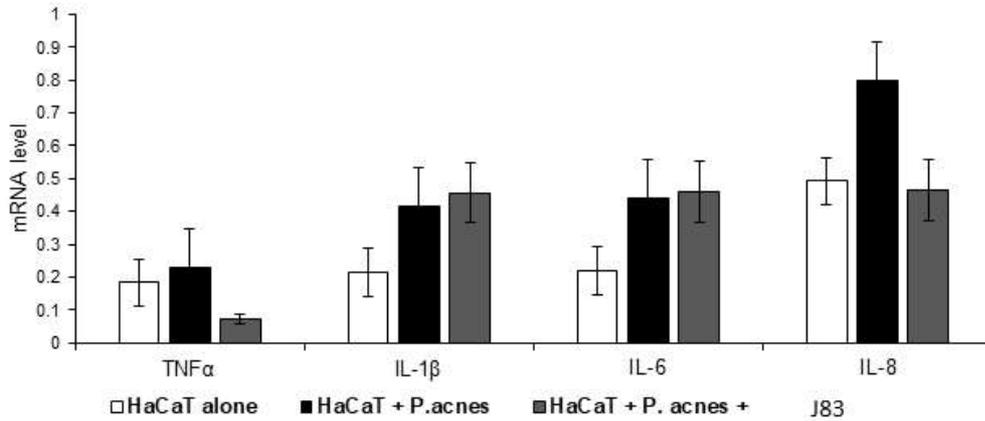


그림 51. J83에 의한 TRL2 와 IKK, NF-kB의 발현 변화

그림 52. J83에 의한 TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8의 발현 변화

상기의 결과 J83에 의한 항염증 반응을 확인 하였으며, 이 물질 외에 이에 의한 좀 더 구체적인 기전 연구와 꿀벌에의 적용을 검토 중에 있다.



면역 활성 물질을 발굴하기 위하여 상기와 같은 실험을 수행 하였다. 그 결과 C89와 C96, J84 등의 물질이 면역 사이토카인의 발현을 증가시킴을 확인 하였다. 사이토카인의 발현이 무조건 증가 한다고 하여 좋을 것은 아니지만 사이토카인의 분비는 박테리아나 곰팡이가 있을 경우 기본적으로 나타나는 면역 반응이다. 따라서 이들의 발현은 꿀벌에게서도 면역의 활성 변화를 예상 할 수 있기 때문에 이 물질들이 어떤 경로로 사이토카인의 발현을 증가 시키는지 확인 한 다음 꿀벌에게서는 어떤 영향이 일어나는지 확인을 할 예정이다.

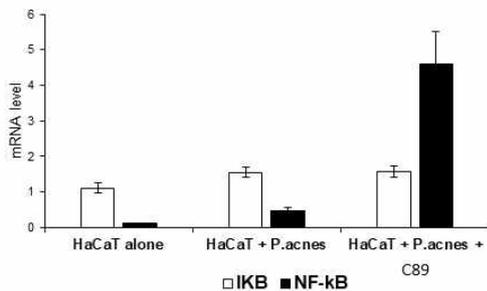


그림 53. C89에 의한 IKB, NF-kB의 발현 변화

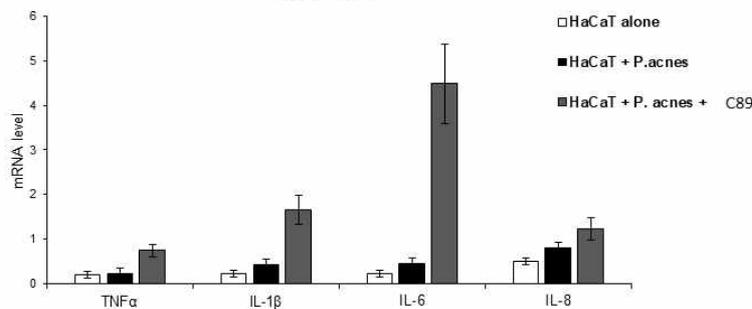


그림 54. C89에 의한 TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8의 발현 변화

위의 결과 C89에 의하여 NF-kB, TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8의 발현이 증가함을 확인 하였다. 이 물질에 의하여 어떻게 면역 관여 사이토카인의 분비가 증가 하는지 좀 더 구체적인 기전 연구와 꿀벌에의 적용을 검토 중에 있다.

그림 55. C96에 의한 IKB, NF-kB의 발현 변화

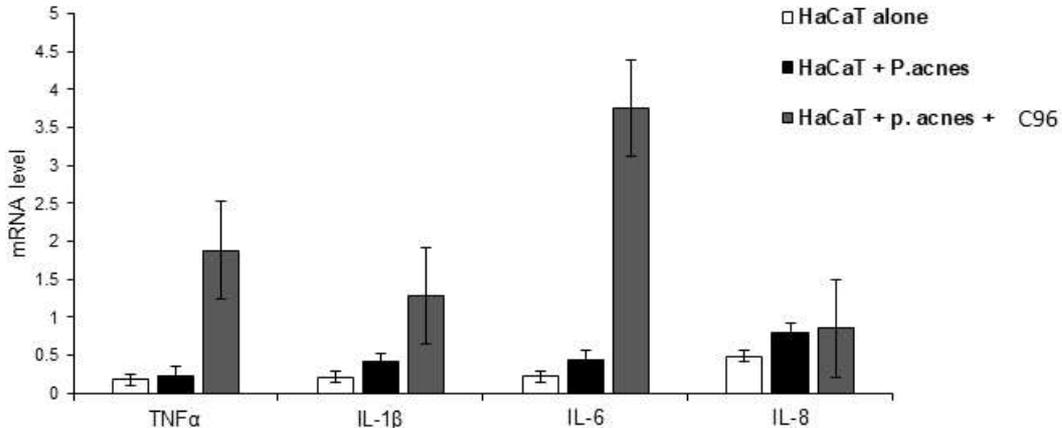
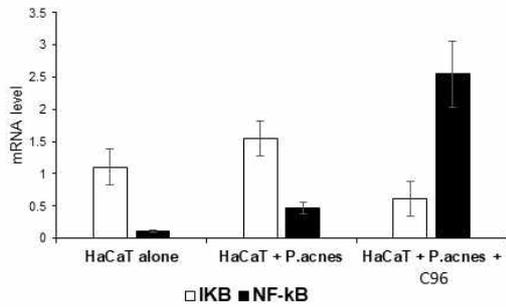


그림 56. C96에 의한 TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8의 발현 변화

위의 결과 C96에 의하여 NF-kB, TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8의 발현이 증가함을 확인 하였다. 이 물질에 의하여 어떻게 면역 관여 사이토카인의 분비가 증가 하는지 좀 더 구체적인 기전 연구와 꿀벌에의 적용을 검토 중에 있다.

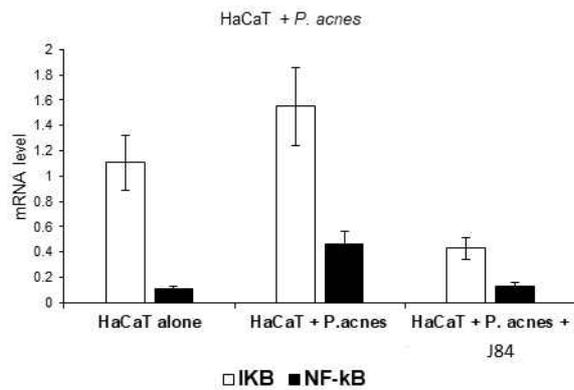
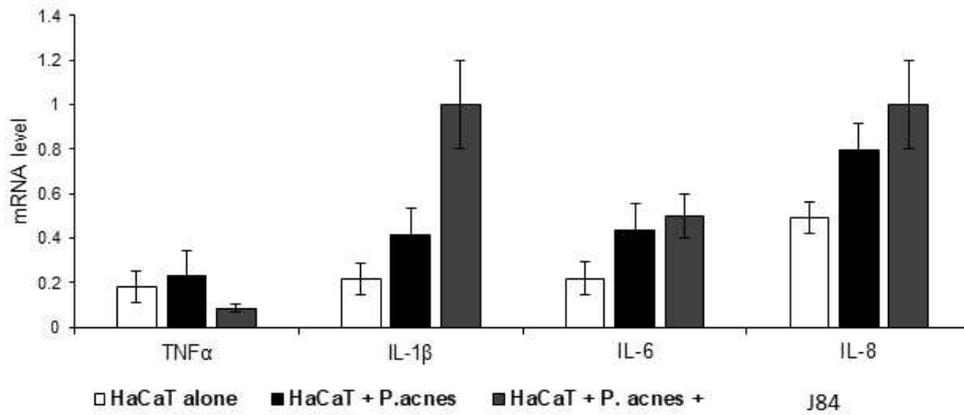


그림 57. J84에 의한 IKB, NF-kB의 발현 변화

그림 58. J84에 의한 TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8의 발현 변화

위의 결과 J84에 의하여 TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8의 발현이 증가함을 확인 하였다. 이 물질에 의하여 어떻게 면역 관여 사이토카인의 분비가 증가 하는지 좀 더 구체적인 기전 연구와 꿀벌에의 적용을 검토 중에 있다. 특히, NF-kB의 발현은 감소하였는데, 이는 TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8의 발현이 NF-kB에 의하여 나타나지 않을 것임을 의미한



다. 즉 전 혀 다른 경로에 의하여 발현이 조절 될 것으로 예상 되어 그 기전 연구와 향 후 꿀 벌에의 적용을 검토 중에 있다.

○ 신규 물질에 대한 홍보 실적

- 한국양봉학회 등이 주관한 제1차 곤충산업 발전을 위한 공동 학술대회 참석
홍보 및 포스터 발표 차 학술대회 참석

				C-06-02	
No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	The 32 nd Conference of the Apicultural Society of Korea	김재구, 박상철, 신유경, 김기영	2017.04.13.-14	인천	한국
2	The 32 nd Conference of the Apicultural Society of Korea	박상철, 김재구, 신유경, 김기영	2017.04.13.-14	인천	한국
3	2017, International conference of the Korea society for Molecular and Cellular Biology.	김재구, 신유경, 김기영	2017.08.13.-14	서울	한국
4	The 33 rd Conference of the Apicultural Society of Korea.	송현찬, 김재구, 신유경, 김기영	2017.10.24.-25	논산	한국
5	The Joint Conference of the Apicultural Society of Korea.	송현찬, 김재구, 김기영	2018.04.12.-13	광주	한국
6	SGRF Conferences.	송현찬, 김기영	2018.09.30.-10.02	Jaipur	인도

www.ksmcb.or.kr

KSMCB

2017
International Conference
Korean Society for
Molecular and Cellular Biology

September / 2017
12 (Tue) ▶ 14 (Thu)
COEX, Seoul, Korea

Seminar : Conference Room (3F-4F)
Exhibition & Poster Presentation : Hall D1 (3F)

Organization
Korean Society for Molecular and Cellular Biology

Sponsors
KOFST, SOKIL METROPOLITAN GOVERNMENT

Poster Session List	
M-16	Control of virus using atmospheric temperature cold plasma Taegeon Kim, and Eunsoo Moon ¹ Biological Science Department, Asia University, Suwon, 447-700, Korea
M-17	Viperin Interaction with Tegument Protein p28 during Human Cytomegalovirus Infection Jae Sang Lee, Heungsik Jeon, and Joo Young Seo ¹ Seoulance Research of Science Institute, Busan Korea 21, P.O. Box 107, For Medical Science, Inje University College of Medicine, Busan 610-752, Korea
M-18	Crosstalk between HDACs and Nco2-based NADPH oxidase mediates H ₂ O ₂ -induced pro-inflammatory responses in astrocytes Gi Sun Yoon, Hyunjung Cho, Donggyu Kim, Soo Young Choi, and Jinsun Park ¹ Department of Biomedical Science and Research Institute for Bioscience & Biotechnology, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea
M-19	Adaptation of Seasonal H3N2 Influenza Virus in DBA/2J and Balb/c Mice Jin-Ho Lee ¹ , Yun-Jung Kim ¹ , Eun-Ji Choi ¹ , So-Rin Lee ¹ , Heuk-Chul ¹ , Joo-Yeon Lee ¹ , Kahye Cho ¹ , Jung-Hoon Choi ¹ , and Moon-Ryul ² ¹ Division of Host Disease Research, Center for Infectious Disease Research, National Institute of Health, Korea Center for Disease Control and Prevention, Incheon, Korea; ² Division of Animal Disease Research, Center for Infectious Disease Research, Division of Emerging Infectious Disease and Zoonosis Research, Center for Zoonotic Disease Research, SNU, Daejeon
M-20	Genetic Alteration of Mouse Adapted H3N2 Seasonal Influenza A Virus Yoon-Jung Kim, Ji-Moo Lee, Eun-Ji Choi, So-Rin Lee, Jung-Hoon Choi, Moon-Ryul, and Myounggi Han ¹ ¹ Division of Host Disease Research, Center for Infectious Disease Research, National Institute of Health, Korea Center for Disease Control and Prevention, Incheon, Korea
M-21	Cooperation of QRDR Mutations, qnrB and aac(5)-Ib-Or Genes in High-level Fluoroquinolone Resistances of Clinically Isolated <i>Escherichia coli</i> Yun-Yi Yang, Won-Ki Baik, Seungil Park, and Min-Ho Suh ¹ Department of Microbiology, Sejong University School of Medicine, Daegu, 43001, Korea
M-22	Roles of Topoisomerase Mutations and PAM2 Genes in Development of Quinolone Resistances in <i>Salmonella pneumoniae</i> Yun-Yi Yang, Won-Ki Baik, Seungil Park, and Min-Ho Suh ¹ Department of Microbiology, Sejong University School of Medicine, Daegu, 43001, Korea
M-23	Low Expression of mmpa and Non-K1/K2 Serotype Predicts Hypertension in Healthy-associated <i>Klebsiella pneumoniae</i> Hyeon Ah Han ¹ , Min-Ho Suh ¹ , Seungil Park ¹ , and Won-Ki Baik ^{1*} ¹ Department of Infectious Disease, Kyungpook University Daegu Hospital Center, Daegu, 41015, Korea; ² Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, 43001, Korea
M-24	Discovery of Novel Hepatitis B Virus Inhibitors Using a Phenotypic Infection Assay Seungil Park ¹ , Jinyoung Han ¹ , Jaewon Yang ¹ , Gwanil Shum ¹ , Hyeon-Ah Han ¹ , Stephen Usher ¹ , and Min-Ho Wook ^{2*} ¹ Seoulance Discovery Platform, Incheon Research Center, Songpaanri 1488, Korea; ² Applied Molecular Biology Laboratory, Incheon Research Center, Songpaanri 1488, Korea; ³ Incheon Research Center, Songpaanri 1488, Korea
M-25	Structure of a Novel Carboxypeptidase from the Extremely Thermophilic Eubacterium <i>Hydrothermococcus plumbum</i> AW-1 reveals its Existence in Open Conformation Inseung Chaung ¹ , Yeung Lee ¹ , Dong-Woo Lee ¹ , and Sang Heung Lee ^{1*} ¹ Department of Cellular and Molecular Medicine, Chonnam National University School of Medicine, Gwangju, 501-757, Korea; ² School of Applied Bioscience, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
M-26	Ethcoline as a noble anti-cancer compound Jae-goo Han ¹ , Yu-Kyong Shin ^{1*} , and Ki-Young Kim ^{1*} ¹ Graduate school of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongsin, Gyeonggi-do, Korea; ² College of Life Science, Kyung Hee University, Yongsin, Gyeonggi-do, Korea
M-27	Structural Characterization of Cysteine desulfurase SufS from Extremely Thermophilic Eubacterium <i>Hydrothermococcus plumbum</i> AW-1 Inseung Chaung ¹ , Yeung Lee ¹ , Dong-Woo Lee ¹ , and Sang Heung Lee ^{1*} ¹ Department of Cellular and Molecular Medicine, Chonnam National University School of Medicine, Gwangju, 501-757, Korea; ² School of Applied Bioscience, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
M-28	Hepatitis B Virus X protein enhances the development of hepatocellular carcinoma by blocking HIF-1 α degradation Inhe Kang, Sang-min Kang, Hanwon Park, Ji An Kim, Ju Hyon Lee, and Jeong Hyeon Ahn ¹ ¹ Department of Microbiology & Molecular Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University
M-29	Hepatitis B Virus X protein elevates the metastasis of HBV-associated HCC by regulating SOCS1 Jin Hyun Lee, Ji Young Park, Hyeon Lee, Jung Sun Min, Inho Kang, and Jeong Hyeon Ahn ¹ ¹ Department of Microbiology & Molecular Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University
M-30	Occurrence of Extracellular Vesicles Produced by Prokaryotic-Containing Marine Bacteria Yong Min Hwang ¹ , Heonil Kwon ¹ , and Sang-Jin Kim ^{1*} ¹ Department of Applied Bioscience, National Institute of Aquaculture of Korea, Busan 48842, Korea; ² Genetics Research Center, Korea Research Ocean Science Institute, Gyeongsang and Cholla National Institute, Daegu University of Education, Gyeongsang, 717-349, Korea; ³ Marine Biotechnology Research Center, Korea Institute of Ocean Science & Technology, P.O. Box 107, Ansan 41302, Korea; ⁴ Department of Marine Biotechnology, Korea University of Science and Technology, Daejeon 30539, Korea; ⁵ National Marine Biotechnology Institute of Korea, Busan 48842, Korea
M-31	A novel compound inhibits hepatitis B virus life cycle through blocking core assembly Jung-Ho Kang, Jeong-Hui Hwang, and Sung-Gyo Park ¹ ¹ School of Life Science, Gyeongsang Institute of Science and Technology, Gyeongsang 61001, Korea
M-32	Development of Monoclonal Antibodies against <i>Leptospira interrogans</i> for Leptospirosis Diagnosis Min Jung Kim ¹ , So-Young Park ¹ , Jee-Rin Han ¹ , Jee-Won Choi ¹ , and Hyeon-Ah Han ¹ ¹ Department of Microbiology, Chonnam National University, Gwangju 501-757, Korea; ² School of Biological Sciences, Chonnam National University, Gwangju 501-757, Korea
M-33	Gentamicin, a broad-spectrum antiviral drug, suppresses enterovirus infection through inhibiting assembly induced by the inhibition of pyrimidine biogenesis Dong-eun Han ¹ , Agnieszka Isak ¹ , Hyeon-Kwon, Kwang-Son Jung, Seung-yeon Kim ¹ , Sang-Bae Han ¹ , Choonsang Kim ¹ , and Sangheon Cho ^{1*} ¹ Antiviral Agent Research Center, Korea Research Institute of Bioc-

- 2017년 분자생물학회에서 포스터 발표 및 홍보

2017년 제32차
한국양봉학회 춘계학술대회
프로그램 및 발표논문 초록

The 32th Conference
of the Apicultural Society of Korea
Program and Abstracts

2017년 한국양봉학회 춘계학술대회

P-09

Acetylshikonin and 4-Hydroxyderricin from natural plant extract can be used as effective growth inhibitors of the Honey Bee infectious fungi *Ascosphaera apis*

Jaegoo Kim^{1,4}, Sangchul Park^{1,4}, Yu-Kyong Shin^{2,4} and Ki-Young Kim^{1,3*}

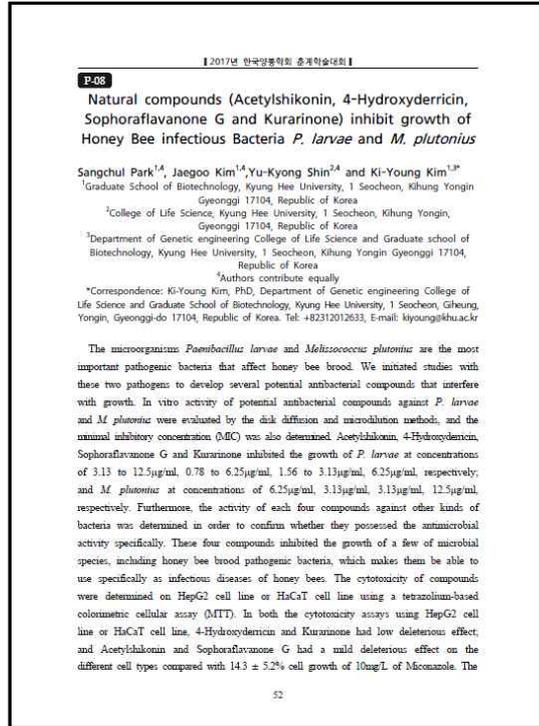
¹Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, 1 Seocheon, Kihung Yongsin Gyeonggi 17104, Republic of Korea
²College of Life Science, Kyung Hee University, 1 Seocheon, Kihung Yongsin, Gyeonggi 17104, Republic of Korea
³Department of Genetic engineering, College of Life Science and Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, 1 Seocheon, Kihung Yongsin Gyeonggi 17104, Republic of Korea
⁴Authors contribute equally

*Correspondence: Ki-Young Kim, PhD, Department of Genetic engineering College of Life Science and Graduate school of Biotechnology, Kyung Hee University, 1 Seocheon, Gheung, Yongsin, Gyeonggi-do 17104, Republic of Korea. Tel: 482312012633; E-mail: kiyoung@khu.ac.kr

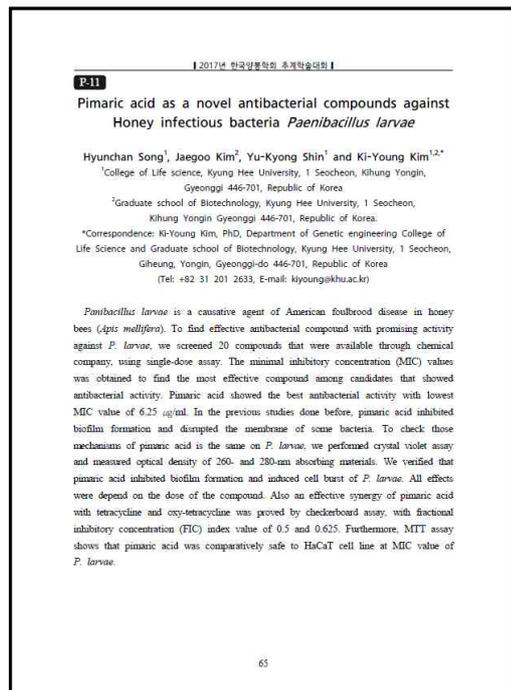
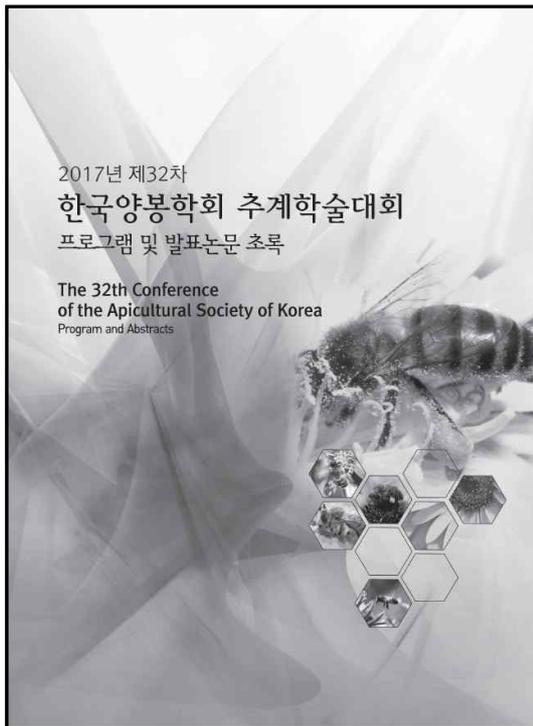
Chalkbrood, the most common fungal bee brood disease, is caused primarily by the fungus *Ascosphaera apis*. Subsequent mycelial growth is lethal to the larvae and results in large economic losses. The aim of the present study was to find a plant-derived compound to inhibit growth of honey bee infectious fungi, *A. apis*. Acetylshikonin and 4-Hydroxyderricin was evaluated the activity of 12.5µg/ml and 3.125 to 6.25µg/ml respectively, using minimal inhibitory concentration (MIC) test with 32 natural plant-derived compounds. We determined that Acetylshikonin and 4-Hydroxyderricin has a specific anti-fungal activity against *A. apis*. In our results, 4-Hydroxyderricin had a more effective anti-fungal activity against *A. apis* and didn't show anti-fungal activity to others. The cytotoxicity of compounds were determined on HepG2 cell line or HeLaT cell line using a tetrazolium-based colorimetric cellular assay (MTT). The cell growth was 17.3±6.3% and 88.2±9.8% treated 10µg/l of Acetylshikonin; 66.2±4.8% and 96.1±18.0% treated 10µg/l of 4-Hydroxyderricin on HepG2 cell line and HeLaT cell line respectively. Compared to the miconazole showing 15.25±3.8% cell growth, toxicity of both compounds to the organism seems to be at an extremely mild level. The synergistic effect of miconazole with two compounds using a fractional inhibitory concentration index (FICI) showed a relative synergistic effect, although the synergistic effect was not significant. It can be reduced the amount of the compounds to treat the disease by the combined use of the two antifungal agents. With these results, Acetylshikonin and 4-Hydroxyderricin with low toxicity in vitro and great anti-fungal activity can be useful to protect infectious disease of honey bees, specially Chalkbrood.

54

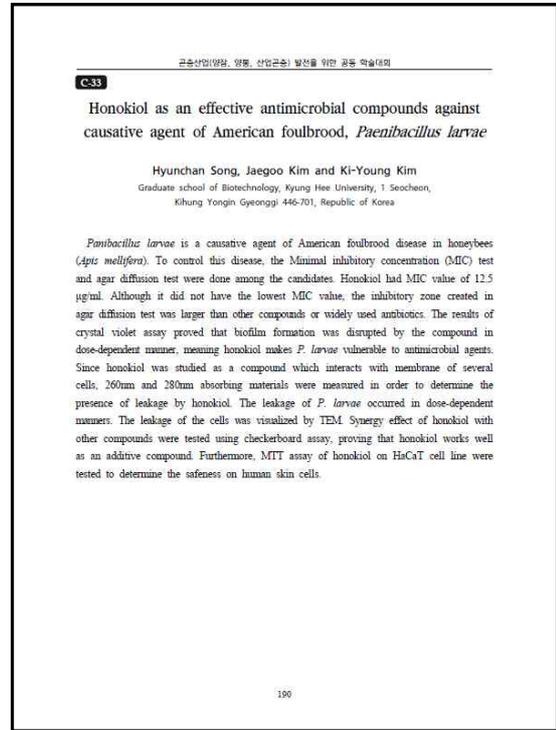
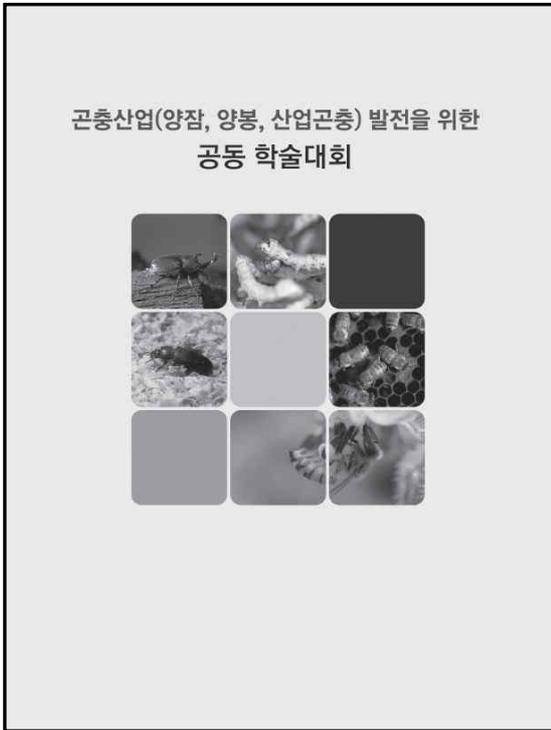
- 2017년 춘계 양봉학회 참석 및 홍보



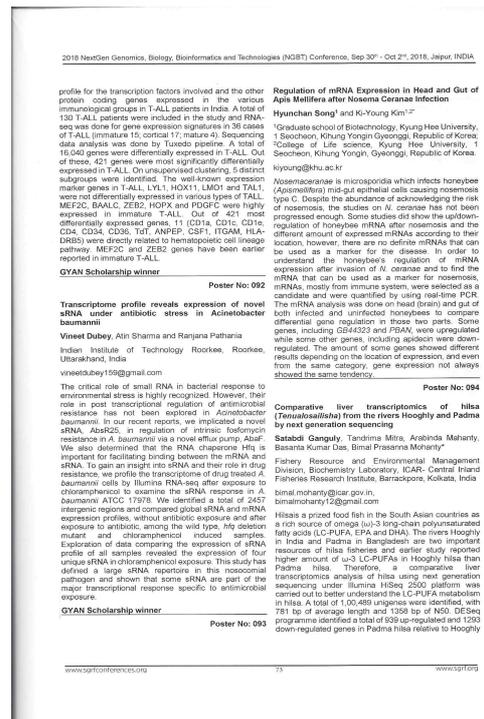
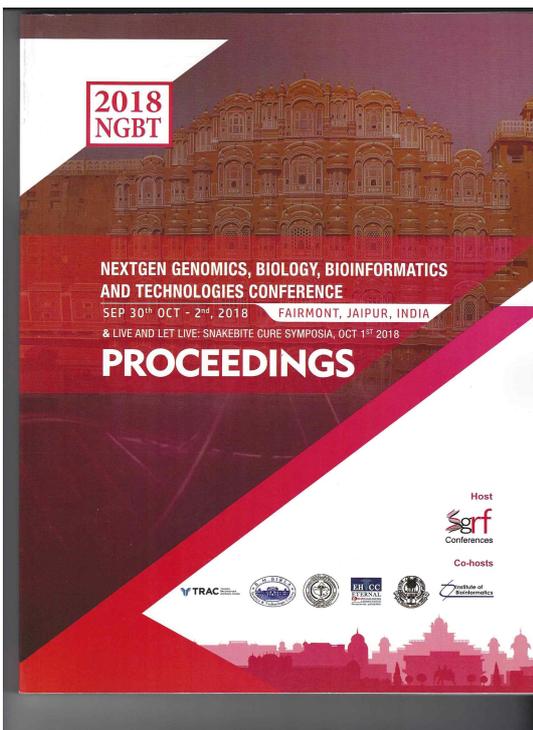
- 2017년 춘계 양봉학회에서 포스터 발표 및 홍보



- 2017년 추계 양봉학회에서 포스터 발표 및 홍보



- 2018년 춘계 양봉학회에서 포스터 발표 및 홍보



- 2018년 NGBT 학회 참석을 하여 포스터 발표 및 홍보

2-4. Field Test 진행

가. 미국 부저병, 유럽부저병 1차 필드테스트 시행

(1) 대상 : 4개의 농가를 대상으로 필드테스트 진행

(2) 기간 : 2016년 8월~10월까지 총 3개월간 진행

(3) 샘플 채취 방법 : 봉균 강세(강, 약), 성장 단계(유충, 성충)에 따라 농가당
4개 시료 채취

4농가/ 4개시료/2반복= 매달 32개 시료 샘플

(4) 분석 방법(Protocol) RT-PCR법 정성 분석법

<p>원리 및 방법</p>	<p>꿀벌의 미국부저병의 발현유무를 확인하여 감염유무를 판단함 1) 시료채취 2) DNA 추출 3) 농도측정 및 DNA회석 4) PCR에 의한 미국부저병과 대조유전자 증폭 5) 감염시 미국부저병이 증폭되어 밴드로 보이며, 비감염시 아무런 증폭이 일어나지 않아 밴드가 안 보임</p>
<p>시약</p>	<p>Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) 미국부저병 Primer Set(10pM) Forward : GCAGCAAATCGTATCAG Reverse : GGTCCTTTGTAACGATTG 유럽부저병 Primer Set(10pM) Forward : GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC Reverse : TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG Actin Primer Set(10pM) Forward : GTGTTTCCTTCGGGAGACG Reverse : TCTCGTTGCCGATGGTGATGA</p>
<p>장비</p>	<p>항온수조(Water Bath) 원심분리기(15,000rpm) Vortex PCR기기 전기영동조(power supply 포함) Incubator Gel image 장치</p>

(5) 실험방법

가. 시료채취

- ① 농가별 3개 봉군 선정(강군, 약군)
- ② 강군과 약군 봉군별 유충/성충 3마리씩 시료 채취

나. DNA 추출

다. 농도측정

- ① Nano-Drop에서 D.W로 Blank를 맞춘 다음 D.W+RNase용액에 들어있는 DNA를 1~2 μ l만 채취하여 농도를 측정한다.
- ② DNA농도를 50ng/ μ l 되도록 희석한다.

라. PCR(유전자 증폭)

- ① 샘플은 control 포함하여 PCR tube를 준비한다.(Actin유전자와 미국부저병)
- ② 라벨 된 PCR tube에 PCR 반응액을 아래와 같이 제조한 다음 살짝 vortexing을 한다.

→ PCR 반응액

Template DNA(100ng)	1~2 μ l
10×PCR Buffer	2 μ l
미국부저병 Primer Set(10pM) or Actin primer set(10pM)	2 μ l
dNTP(10mM)	1 μ l
Taq polymerase(5U)	0.2 μ l
D.W	fill-up
전체 반응액	20 μ l

- ③ 유전자 증폭단계 : PCR기기에 위의 반응액을 장착하고 아래와 같이 프로그램을 입력한다.

→ PCR 프로그램

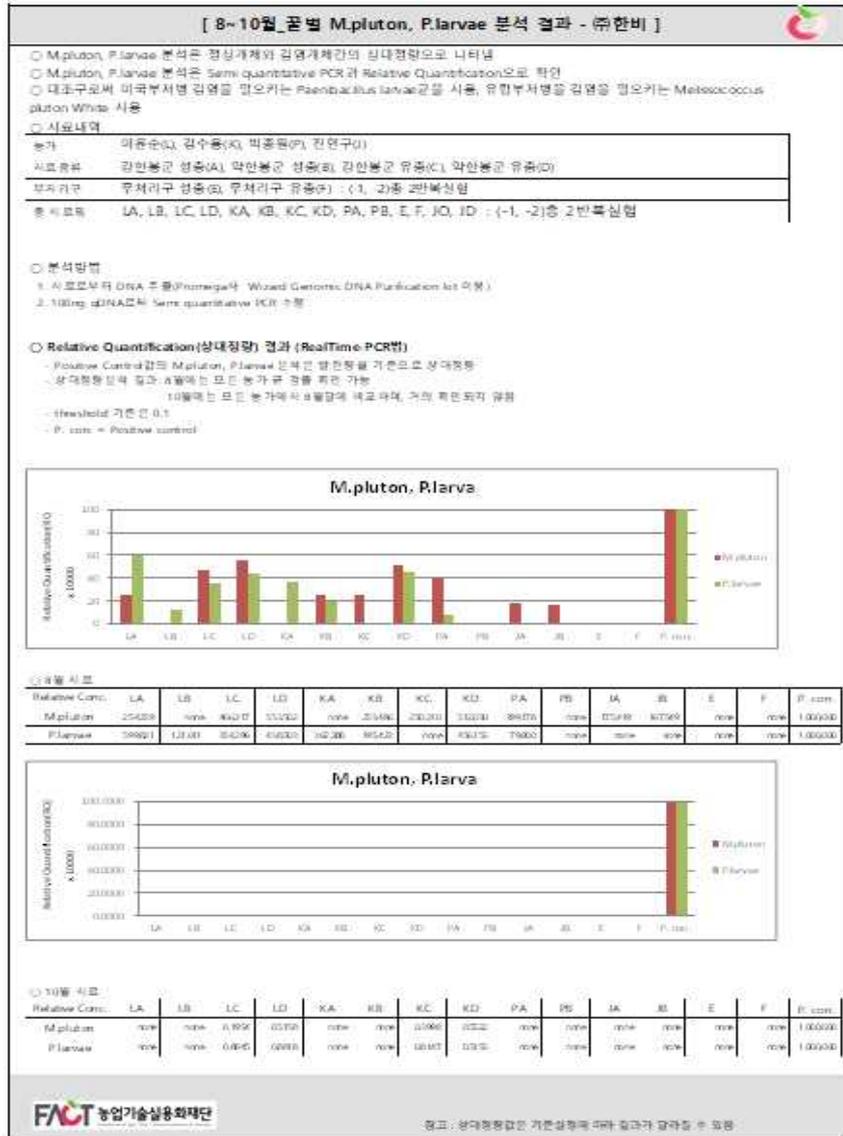
단계		온도	시간
1단계	변 성	94℃	5분
2단계 30cycle	변 성	94℃	30초
	Primer 부착	60℃	30초
	증 폭	72℃	30초
3단계	증 폭	72℃	5분
	보 관	4℃	∞

- ④ 2% agarose gel을 제조한 다음 6 μ l 전기영동 한다.
- ⑤ Gel image 장치로써 PCR산물의 증폭 유무(130bp)를 확인한다.

바. 관정(RT-PCR법)

Actin gene으로 DNA 이상 유무를 확인 후, 미국부저병 발현 유무를 확인하여 감염 여부를 결정한다. (Actin유전자는 꿀벌 전용 대조유전자(Reference gene)로 이용되며 꿀벌에서 항상 증폭되는 유전자임)

(6) 미국부저병, 유럽부저병 분석 결과 자료 (농업기술실용화재단 분석검정본부)



나. 미국 부저병, 유럽부저병 2차 필드테스트 시행

- (1) 대상 : 4개의 농가를 대상으로 필드테스트 진행
- (2) 기간 : 2017년 8월~10월까지 총 3개월간 진행
- (3) 샘플 채취 방법 : 봉군 강세(강, 약), 성장 단계(유충, 성충)에 따라 농가당 4개 시료 채취
4농가/ 4개시료/2반복= 매달 32개 시료 샘플
- (4) 분석 방법(Protocol) RT-PCR법 정성 분석법

원리 및 방법	<p>꿀벌의 미국부저병의 발현유무를 확인하여 감염유무를 판단함</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 시료채취 2) DNA 추출 3) 농도측정 및 DNA희석 4) PCR에 의한 미국부저병과 대조유전자 증폭 5) 감염시 미국부저병이 증폭되어 밴드로 보이며, 비감염시 아무런 증폭이 일어나지 않아 밴드가 안 보임
시약	<p>Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega)</p> <p>미국부저병 Primer Set(10pM) Forward : GCAGCAAATCGTATCAG Reverse : GGTCCTTTGTAACGATTG</p> <p>유럽부저병 Primer Set(10pM) Forward : GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC Reverse : TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG</p> <p>Actin Primer Set(10pM) Forward : GTGTTTCCTTCGGGAGACG Reverse : TCTCGTTGCCGATGGTGATGA</p>
장비	<p>항온수조(Water Bath) 원심분리기(15,000rpm) Vortex PCR기기 전기영동조(power supply 포함) Incubator Gel image 장치</p>

(5) 실험방법

가. 시료채취

- ① 농가별 3개 봉군 선정(강군, 약군)
- ② 강군과 약군 봉군별 유충/성충 3마리씩 시료 채취

나. DNA 추출

다. 농도측정

- ① Nano-Drop에서 D.W로 Blank를 맞춘 다음 D.W+RNase용액에 들어 있는 DNA를 1~2 μ l만 채취하여 농도를 측정한다.
- ② DNA농도를 50ng/ μ l 되도록 희석한다.

라. PCR(유전자 증폭)

- ① 샘플은 control 포함하여 PCR tube를 준비한다.(Actin유전자와 미국부저병)
- ② 라벨 된 PCR tube에 PCR 반응액을 아래와 같이 제조한 다음 살짝 vortexing을 한다.

→ PCR 반응액

Template DNA(100ng)	1~2 μ l
10×PCR Buffer	2 μ l
미국부저병 Primer Set(10pM) or Actin primer set(10pM)	2 μ l
dNTP(10mM)	1 μ l
Taq polymerase(5U)	0.2 μ l
D.W	fill-up
전체 반응액	20 μ l

- ③ 유전자 증폭단계 : PCR기기에 위의 반응액을 장착하고 아래와 같이 프로그램을 입력한다.

→ PCR 프로그램

단계		온도	시간
1단계	변 성	94℃	5분
2단계 30cycle	변 성	94℃	30초
	Primer 부착	60℃	30초
	증 폭	72℃	30초
3단계	증 폭	72℃	5분
	보 관	4℃	∞

- ④ 2% agarose gel을 제조한 다음 6 μ l 전기영동 한다.
- ⑤ Gel image 장치로써 PCR산물의 증폭 유무(130bp)를 확인한다.

바. 판정(RT-PCR법)

Actin gene으로 DNA 이상 유무를 확인 후, 미국부저병 발현 유무를 확인하여 감염 여부를 결정한다. (Actin유전자는 꿀벌 전용 대조유전자(Reference gene)로 이용되며 꿀벌에서 항상 증폭되는 유전자임)

(6) 미국부저병, 유럽부저병 분석 결과 자료 (농업기술실용화재단 분석검정부)

[8~10월_꿀벌 M.pluton, P.larvae 분석 결과 - (후반비)]

○ A.apis, M.pluton, P.larvae 분석은 형상계측 및 강연체간의 상대정량으로 나타냄
 ○ A.apis, M.pluton, P.larvae 분석은 Semi quantitative PCR과 Relative Quantification으로 함
 ○ 대표구로써 미국부저병 감염을 일으키는 Paenibacillus larvae균을 사용, 유럽부저병을 감염을 일으키는 Melissococcus pluton White 사용

○ 시료내역

농기	와산하(4), 김수종(8), 남정우(8), 천연구(8)
시료종류	김천봉고 상종(A), 막한봉고 상종(B), 김천봉고 유종(C), 막한봉고 유종(D)
부저리구	미국부저 상종(1), 미국부저 유종(1), 2종 2반복실험
총시료명	LA, LB, LC, LD, KA, KB, KC, KD, NA, NB, E, F, JQ, JD : (-), ~2종 2반복실험

○ 분석방법

1. 시료로부터 DNA 추출(Promega사 Wizard Genomic DNA Purification kit 이용)
2. 300ng qDNA로써 Semi quantitative PCR 수행

○ Relative Quantification(상대정량) 결과 (RealTime-PCR법)

Positive Control인 A.apis, M.pluton, P.larvae 분석은 빈번함으로 상대정량 상대정량분석 결과 5배에는 모두 농기 간 결과 약간 있음
 10배에는 모두 농기에서 5배정도에 비교하여, 거의 확인되지 않음
 - threshold 기준은 0.1
 - P. con. = Positive control

○ 8월 시료

Relative Conc.	LA	LB	LC	LD	KA	KB	KC	KD	NA	NB	JA	JB	E	F	P. con.
M. pluton	54.73%	100%	101.9%	106.13%	100%	100%	427.11%	53.23%	10222%	100%	21632%	116.54%	100%	100%	1,000,000
P. larvae	79.2%	100%	101.2%	106.4%	100%	100%	323.81%	32.92%	108.6%	1131.6%	100%	100%	100%	100%	1,000,000

○ 9월 시료

Relative Conc.	LA	LB	LC	LD	KA	KB	KC	KD	NA	NB	JA	JB	E	F	P. con.
M. pluton	100%	100%	0.86%	0.12%	100%	100%	0.18%	0.36%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	1,000,000
P. larvae	100%	100%	0.22%	0.32%	100%	100%	0.18%	0.73%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	1,000,000

농고 : 상대정량값은 기본상황에 따라 결과가 달라질 수 있음

(7) 실험 결과 고찰

- ① 실험 결과 6~10월까지 32시료 모두 미국부저병, 유럽부저병 비감염으로 판명.
- ② 이 실험 결과를 볼 때 미국 부저병과 유럽부저병은 동시 다발적으로 발생하지는 않는 것으로 판명됨.

나. 백묵병 필드테스트 시행

- (1) 대상 : 4개의 농가를 대상으로 필드테스트 진행
- (2) 기간 : 2016년 8월~10월까지 총 3개월간 진행
- (3) 샘플 채취 방법 : 봉균 강세(강, 약), 성장 단계(유충, 성충)에 따라 농가당 4개 시료 채취
4농가/ 4개시료/2반복= 매달 32개 시료 샘플
- (4) 분석 방법(Protocol) RT-PCR법 정성 분석법

원리 및 방법	<p>꿀벌의 미국부저병의 발현유무를 확인하여 감염유무를 판단함</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 시료채취 2) DNA 추출 3) 농도측정 및 DNA희석 4) PCR에 의한 미국부저병과 대조유전자 증폭 5) 감염시 미국부저병이 증폭되어 밴드로 보이며, 비감염시 아무런 증폭이 일어나지 않아 밴드가 안 보임
시약	<p>Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega)</p> <p>미국부저병 Primer Set(10pM) Forward : GCAGCAAATCGTATCAG Reverse : GGTCCTTTGTAACGATTG</p> <p>유럽부저병 Primer Set(10pM) Forward : GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC Reverse : TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG</p> <p>Actin Primer Set(10pM) Forward : GTGTTTCCTTCGGGAGACG Reverse : TCTCGTTGCCGATGGTGATGA</p>
장비	<p>항온수조(Water Bath) 원심분리기(15,000rpm) Vortex PCR기기 전기영동조(power supply 포함) Incubator Gel image 장치</p>

(5) 실험방법

가. 시료채취

- ① 농가별 3개 봉균 선정(강균, 약균)
- ② 강균과 약균 봉균별 유충/성충 3마리씩 시료 채취

나. DNA 추출

다. 농도측정

- ① Nano-Drop에서 D.W로 Blank를 맞춘 다음 D.W+RNase용액에 들어 있는 DNA를 1~2 μ l만 채취하여 농도를 측정한다.
- ② DNA농도를 50ng/ μ l 되도록 희석한다.

라. PCR(유전자 증폭)

- ① 샘플은 control 포함하여 PCR tube를 준비한다.(Actin유전자와 미국부저병)
- ② 라벨 된 PCR tube에 PCR 반응액을 아래와 같이 제조한 다음 살짝 vortexing을 한다.

→ PCR 반응액

Template DNA(100ng)	1~2 μ l
10×PCR Buffer	2 μ l
미국부저병 Primer Set(10pM) or Actin primer set(10pM)	2 μ l
dNTP(10mM)	1 μ l
Taq polymerase(5U)	0.2 μ l
D.W	fill-up
전체 반응액	20 μ l

- ③ 유전자 증폭단계 : PCR기기에 위의 반응액을 장착하고 아래와 같이 프로그램을 입력한다.

→ PCR 프로그램

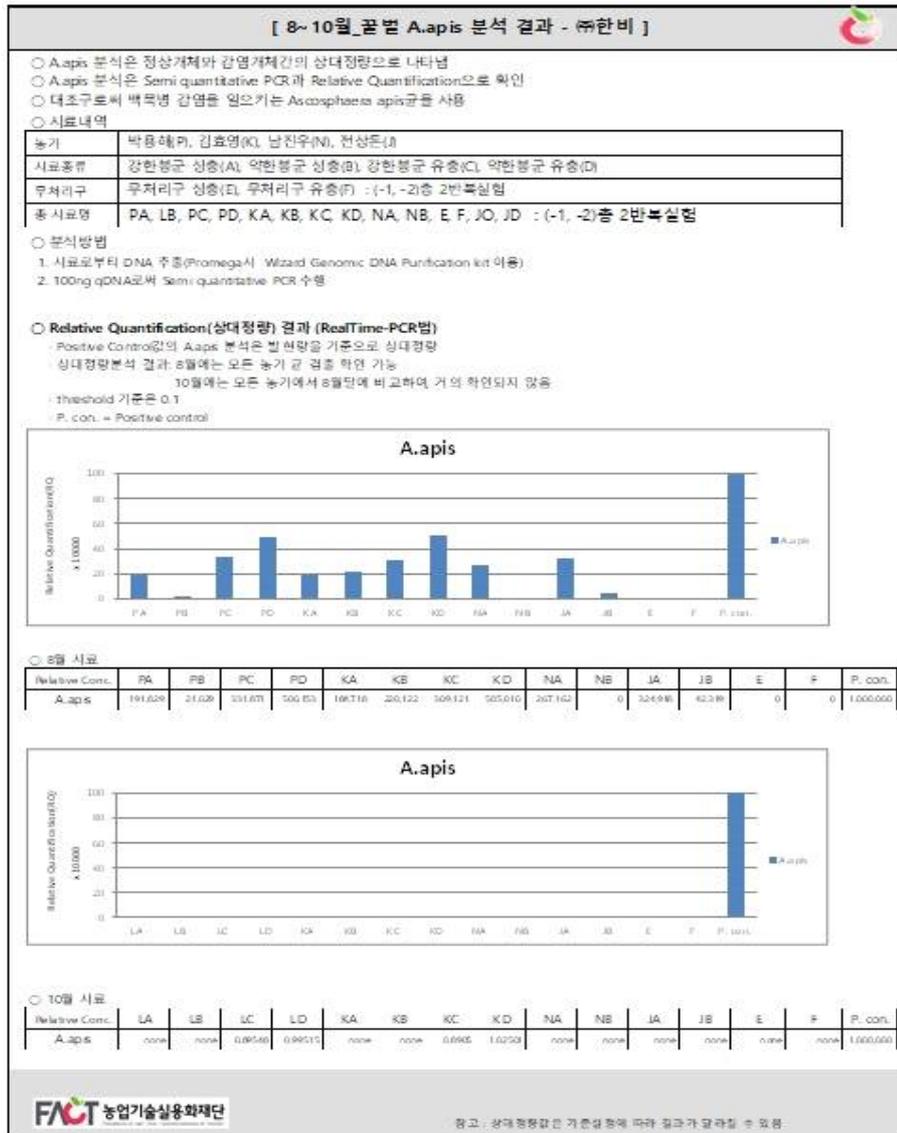
단계		온도	시간
1단계	변 성	94℃	5분
2단계 30cycle	변 성	94℃	30초
	Primer 부착	60℃	30초
	증 폭	72℃	30초
3단계	증 폭	72℃	5분
	보 관	4℃	∞

- ④ 2% agarose gel을 제조한 다음 6 μ l 전기영동 한다.
- ⑤ Gel image 장치로써 PCR산물의 증폭 유무(130bp)를 확인한다.

바. 판정(RT-PCR법)

Actin gene으로 DNA 이상 유무를 확인 후, 미국부저병 발현 유무를 확인하여 감염 여부를 결정한다. (Actin유전자는 꿀벌 전용 대조유전자(Reference gene)로 이용되며 꿀벌에서 항상 증폭되는 유전자임)

(6) 백묵병 분석 결과 자료 (농업기술실용화재단 분석검정본부)



2-5. 인증서 및 성분 분석성적서 자료

가. 보조사료 제조업 등록증

[별지 제2호서식]

(앞 쪽)

2019-0001

(보조) 사 료 제 조 업 등 록 증

대 표 자 : 나지은 생년월일 : 1981년 6월 18일

제 조 업 체 명 : 주식회사 진트론바이오 제조업등록번호:6450000-502-2019-0001
택

소 재 지 : 전라북도 전주시 완산구 홍산북로 15, 401호 (호자동2가)

생산사료 종류 : 보조사료/추출제

생산능력(1일 생산량) 0.050 톤

등 록 조 건 뒤쪽 참조

사료관리법 제8조제1항 및 같은 법 시행규칙 제5조제2항에 따라 위와 같이
(보조) 사료 제조업의 등록을 하였음을 증명합니다.

2019 년 1 월 18 일

전 라 북 도 지 사



210mm×297mm(보존용지(1종) 120g/㎡)

라. 보조사료 파워비 백묵 완료

[별지 제8호서식]

등록번호 제 EEGV60002 호

사료 성분 등록증

대표자 : 나지은

생년월일 : 1981년 6월 18일

업체명 : 주식회사 진트론바이오텍

제조(수입)업등록번호 6450000-502-2019-0001

소재지 : 전라북도 전주시 완산구 흥산북로 15, 401호 (효자동2가)

사료의 종류 : 보조사료/추출제-기타

사료의 명칭 : 프로폴리스추출물

사료의 형태 : 액상

사료의 용도 : 양축농가용, 꿀벌 면역증강용

제조국가 : 국내산

제품명(영문명) : 파워비-백묵(POWER BEE - B)

사료의 성분량

성분명	홍물로보노이드								
성분량	0.7 mg/g 이상								

「사료관리법」 제12조제2항 및 같은 법 시행규칙 제 12조제3항에 따라 위와 같이 사료의 성분등록을 하였음을 증명합니다.

2019년 1월 22일

전라북도지사



210mm×297mm(인쇄용지(1종) 120g/㎡)

마. 충남대 농업과학연구소 성분 분석 검사 성적서(파워비-부저)

사료검정증명서				
34134 대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학기술센터 205호				
담당자(한소영), 책임자(구자룡), TEL : (042)821-8704~5, FAX : (042)821-8706				
문서번호 : 성1812082				
시행일 : 2019. 01. 09				
수신 : ㈜진트론바이오텍				
접수번호	성1812082	접수연월일	2018. 12. 31	
검정번호	성1812082	검정일	2019. 01. 09	
제조(수입)업자	업체명	㈜진트론바이오텍		
	주소	전북 전주시 완산구 홍산북로 15, 201호, 401호 (효자동2가, 세현빌딩)		
제품명	파워비-부저			
사료명칭	보조사료-추출제			
시료상태	개봉			
제조(수입)년월일				
의뢰성분	단위	검정결과	검정방법	비고
총 플라보노이드	mg/kg	963.66	기능성식품공전법	
		이하여백		
「사료관리법」 제20조에 따라 검정을 실시한 결과 위와 같이 검정되었음을 증명합니다.				
2019년 01월 09일				
충남대학교 농업과학연구소장 				
용도	성분등록용			
* 사료명칭 : 성분등록증에 명시된 "사료명칭"을 기재 * 시료상태 : 밀봉(판매·공급용으로 포장된 상태에서 파손하지 않고서는 시료채취를 할 수 없는 경우) 또는 개봉(판매·공급용으로 포장되지 않은 상태, 벌크를 포함)으로 기재 * 제조 또는 수입 연월일 : 제품 포장재에 표시되어 있는 제조 또는 수입 연월일 기재				

바. 충남대 농업과학연구소 성분 분석 검사 성적서(과워비-백묵)

사료검정증명서				
34134 대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학기술센터 205호				
담당자(한소영), 책임자(구자룡), TEL : (042)821-8704~5, FAX : (042)821-8706				
문서번호 : 성1812083				
시행일 : 2019. 01. 09				
수신 : ㈜진트론바이오텍				
접수번호	성1812083	접수연월일	2018. 12. 31	
검정번호	성1812083	검정일	2019. 01. 09	
제조(수입)업자	업체명	㈜진트론바이오텍		
	주소	전북 전주시 완산구 홍산북로 15, 201호, 401호 (효자동2가, 세현빌딩)		
제품명	파워비-백묵			
사료명칭	보조사료-추출제			
시료상태	개봉			
제조(수입)년월일				
의뢰성분	단위	검정결과	검정방법	비고
총 플라보노이드	mg/kg	928.98	기능성식품공전법	
		이하어백		
「사료관리법」 제20조에 따라 검정을 실시한 결과 위와 같이 검정되었음을 증명합니다.				
2019년 01월 09일				
충남대학교 농업과학연구소장 				
용도	성분등록용			
* 사료명칭 : 성분등록증에 명시된 "사료명칭"을 기재 * 시료상태 : 밀봉(판매·공급용으로 포장된 상태로서 파손하지 않고서는 시료채취를 할 수 없는 경우) 또는 개봉(판매·공급용으로 포장되지 않은 상태, 벌크를 포함)으로 기재 * 제조 또는 수입 연월일 : 제품 포장재에 표시되어 있는 제조 또는 수입 연월일 기재				

사. 잔류 독성 테스트



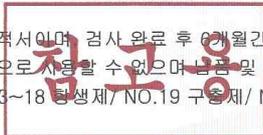
사단 한국양봉협회 양봉산물연구소
 우)137-878 서울시 서초구 서초중앙로 6길 9
 TEL) 02-3486-0882~5 FAX) 02-3486-0886



시험 결과 통지서

·의뢰자 : 나지은	·접수번호 : 18-6279	·접수일 : 2018-12-26
·시험항목 : 전체(참고)	·봉인번호 :	·완료일 : 2019-01-07
·검체표시 : A		·연락처 : 063-222-9131
·주소 : [54966] 전라북도 전주시 완산구 흥산북로 15 (호자동2가)세현빌딩 401호		

·이 통지서는 식품공전에 의거한 검사 성적서이며, 검사 완료 후 9개월간 유효합니다.
 ·이 통지서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용할 수 없으며, 남용 및 참고자료 이외의 사용을 금합니다.
 ·NO.1~12 벌꿀규격 및 일반 성상/ NO.13~18 청생제/ NO.19 구형제/ NO.20~24 농약/ NO.25 독성물질



NO.	항목	기준	결과	NO.	항목	기준	결과
1	성상	적합	적합	13	네오마이신	0.10ppm이하	불검출
2	수분	20.0% 이하	18.4	14	니트로푸란	불검출	불검출
3	물불용물	0.5% 이하	적합	15	스트렙토마이신	0.10ppm이하	불검출
4	산도	40.0meq/kg 이하	적합	16	옥시테트라사이클린	0.30ppm이하	불검출
5	전화당	60.0% 이상	68.7	17	클로람페니콜	불검출	불검출
6	자당	7.0% 이하	3	18	테트라사이클린	0.03ppm이하	불검출
7	당비율	과당/포도당	1.15	19	시미아졸	1.00ppm이하	불검출
8	H.M.F	80.0mg/kg 이하	8.8	20	브로모프로필레이트	0.01ppm이하	불검출
9	타르색소	불검출	불검출	21	아미트라즈	0.20ppm이하	불검출
10	사카린나트륨	불검출	불검출	22	코마포스	0.10ppm이하	불검출
11	이성화당	음성	음성	23	플루에쓰린	0.01ppm이하	불검출
12	탄소동위원소비	-22.5%이하 벌꿀 -22.5%초과 사양꿀	-13.4	24	플루발리네이트	0.05ppm이하	불검출
· 기준 초과 항목				25	그레이아노톡신III	불검출	불검출
· 종합 결과			-				
· 등급 판정							

상기와 같이 시험 결과를 통지 합니다.

2019년 01월 07일

사단 한국양봉협회





사단 한국양봉협회 양봉산물연구소

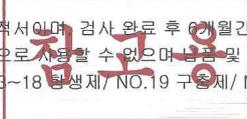
우)137-878 서울시 서초구 서초중앙로 6길 9
TEL) 02-3486-0882~5 FAX) 02-3486-0886



시험 결과 통지서

· 의뢰자 : 나지은	· 접수번호 : 18-6280	· 접수일 : 2018-12-26
· 시험항목 : 전체(참고)	· 봉인번호 :	· 완료일 : 2019-01-07
· 검체표시 : B	· 연락처 : 063-222-9131	
· 주소 : [54966] 전라북도 전주시 완산구 흥산북로 15 (효자동2가)세련빌딩 401호		

- 이 통지서는 식품공전에 의거한 검사 성적서이며, 검사 완료 후 6개월간 유효합니다.
- 이 통지서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용어로 사용할 수 없으며, 남용 및 참고자료 이외의 사용을 금합니다.
- NO.1~12 벌꿀규격 및 일반 성상/ NO.13~18 병생제/ NO.19 구충제/ NO.20~24 농약/ NO.25 독성물질



NO.	항목	기준	결과	NO.	항목	기준	결과
1	성상	적합	적합	13	네오마이신	0.10ppm이하	불검출
2	수분	20.0% 이하	18.1	14	니트로푸란	불검출	불검출
3	물불용물	0.5% 이하	적합	15	스트렙토마이신	0.10ppm이하	불검출
4	산도	40.0meq/kg 이하	적합	16	옥시테트라사이클린	0.30ppm이하	불검출
5	전화당	60.0% 이상	63.5	17	클로람페니콜	불검출	불검출
6	자당	7.0% 이하	5	18	테트라사이클린	0.03ppm이하	불검출
7	당비율	과당/포도당	1.18	19	시미아졸	1.00ppm이하	불검출
8	H.M.F	80.0mg/kg 이하	3.3	20	브로모프로필레이트	0.01ppm이하	불검출
9	타르색소	불검출	불검출	21	아미트라즈	0.20ppm이하	불검출
10	사카린나트륨	불검출	불검출	22	코마포스	0.10ppm이하	불검출
11	이성화당	음성	음성	23	플루메쓰린	0.01ppm이하	불검출
12	탄소동위원소비	-22.5%이하 벌꿀 -22.5%초과 사양꿀	-13	24	플루발리네이트	0.05ppm이하	불검출
· 기준 초과 항목				25	그레이아노톡신III	불검출	불검출
· 종합 결과				-			
· 등급 판정							

상기와 같이 시험 결과를 통지 합니다.

2019년 01월 07일

사단 한국양봉협회



아. 조달청 등록용 시험 성적서(파워비-부저)



**충남대학교
농업과학연구소**

34134 대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학기술센터 205호
담당자(한소영), 책임자(구자룡), TEL : (042)821-8704~5, FAX : (042)821-8706

검 사 성 적 서

발 급 번 호	1901111	접 수 번 호	1901111
시 료 명	파워비-부저		
의뢰인	업체명	㈜진트론바이오텍	
	소재지	전북 전주시 완산구 흥산북로 15, 201호, 401호(효자동2가, 세현빌딩)	
접수년월일	2019. 01 .09	검 사 목 적	조달청 제출용

검사항목 및 결과

검 사 항 목	단 위	검 사 결 과	비 고
총 폴리페놀	mg/kg	7459.97	
총 플라보노이드	mg/kg	972.04	
비 소	ppm	0.01	
납	ppm	0.02	
수 은	ppm	0.01	
카 드 륨	ppm	0.01	
살모넬라		불검출	

위의 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 시험 결과이며, 이 시험 성적서는 용도 이외의 선전, 소송, 기타 법적요건으로 사용할 수 없습니다.

2019년 01월 16일

기관 고유번호	314-83-01013	담당 연구관명	구 자 룡
---------	--------------	---------	-------



충남대학교 농업과학연구소장



자. 조달청 등록용 시험 성적서(과워비-백묵)



**충남대학교
농업과학연구소**

34134 대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학기술센터 205호
담당자(한소영), 책임자(구자룡), TEL : (042)821-8704~5, FAX : (042)821-8706

검 사 성 적 서

발 급 번 호	1901112	접 수 번 호	1901112
시 료 명	파워비-백묵		
의뢰인	업체명	㈜진트론바이오텍	
	소재지	전북 전주시 완산구 흥산북로 15, 201호, 401호(효자동2가, 세현빌딩)	
접수년월일	2019. 01 .09	검 사 목 적	조달청 제출용

검사항목 및 결과

검 사 항 목	단 위	검 사 결 과	비 고
총 폴리페놀	mg/kg	7229.45	
총 플라보노이드	mg/kg	927.78	
비 소	ppm	0.01	
납	ppm	0.02	
수 은	ppm	0.01	
카드뮴	ppm	0.01	
살모넬라		불검출	

위의 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 시험 결과이며, 이 시험 성적서는 용도 이외의 선전, 소송, 기타 법적요건으로 사용할 수 없습니다.

2019년 01월 16일

기관 고유번호	314-83-01013	담당 연구관명	구 자 룡
---------	--------------	---------	-------



충남대학교 농업과학연구소장



차. 파워비-부저 항균활성 테스트 진행

유해균 : *E.coli* 대장균 / *Candida albicans*

유익균 : *Bacillus subtilis*

유해균에는 높은 항균력을 보이며 유익균에는 낮은 항균력을 가지고 있음



충남대학교
농업과학연구소

34134 대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학기술센터 205호
담당자(한소영), 책임자(구자용), TEL : (042)821-8704~5, FAX : (042)821-8706

시험 성적서

발급번호	18121141	접수번호	18121141
시료명	파워비-부저		
의뢰인	업체명	㈜진트론바이오텍	
	소재지	전북 전주시 완산구 흥산북로 15, 201호, 401호(효자동2가, 세현빌딩)	
접수년월일	2018. 12. 28	시험완료일	2019. 01. 11

시험항목 및 결과

1. 시험목적 : 의뢰자가 제공한 시료의 유해균에 대한 항균력을 평가하기 위하여 그 목적이 있다.

2. 시험재료 :

1) 시험용 균주 : *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Candida albicans*

3. 시험방법

각각의 시험편 및 대조편을 0.4g 준비하여 나사식 뚜껑을 가진 약 30ml 정도의 유리 용기 안에 시험편을 넣고, 증균 배양한 시험균주 0.2ml을 취하여, 각 유리용기에 있는 시험편 및 대조편 위에 골고루 살포되도록 주의해서 접종하였다. 접종한 후에 뚜껑을 막고, 37±1℃에서 18시간 배양한 후, 생균수를 계수하고 균 감소율을 계산하였다. 대조구에 대한 시험구의 균 감소율은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{감소율(\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A : 대조구의 균수
B : 시험구의 균수

4. 시험결과

표 1. 유해균 감소율 시험결과

시험균의 종류	단 위	시험 결과		감소율(%)
		대조구	시험구	
<i>Bacillus subtilis</i>	cfu/g	3.0 × 10 ⁵	2.4 × 10 ⁵	20.00
<i>E. coli</i>	cfu/g	7.4 × 10 ⁵	3.0 × 10 ⁵	95.95
<i>Candida albicans</i>	cfu/g	5.4 × 10 ⁵	7.0 × 10 ⁵	87.04

위의 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 시험 결과이며, 이 시험 성적서는 용도 이외의 선전, 소송, 기타 법적요건으로 사용할 수 없습니다.

충남대학교 농업과학연구소장



카. 파워비-백묵 향균활성 테스트 진행

유해균 : *E.coli* 대장균 / *Candida albicans*

유익균 : *Bacillus subtilis*

유해균에는 높은 향균력을 보이며 유익균에는 낮은 향균력을 가지고 있음



충남대학교
농업과학연구소

34134 대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학기술센터 205호
담당자(한소영), 책임자(구자룡), TEL : (042)821-8704~5, FAX : (042)821-8706

시험 성적서

발급번호	18121142	접수번호	18121142
시료명	파워비-백묵		
의뢰인	업체명	㈜진트론바이오텍	
	소재지	전북 전주시 완산구 홍산북로 15, 201호, 401호(효자동2가, 세현빌딩)	
접수년월일	2018. 12. 28	시험완료일	2019. 01. 11

시험항목 및 결과

- 시험목적 : 의뢰자가 제공한 시료의 유해균에 대한 향균력을 평가하기 위하여 그 목적이 있다.
- 시험재료 :
1) 시험용 균주 : *Bacillus subtilis*, *E. coil*, *Candida albicans*
- 시험방법
각각의 시험편 및 대조편을 0.4g 준비하여 나사식 뚜껑을 가진 약 30ml 정도의 유리 용기 안에 시험편을 넣고, 증균 배양한 시험균주 0.2ml를 취하여, 각 유리용기에 있는 시험편 및 대조편 위에 골고루 살포되도록 주의해서 접종하였다. 접종한 후에 뚜껑을 막고, 37±1℃에서 18시간 배양한 후, 생균수를 계수하고 균 감소율을 계산하였다. 대조구에 대한 시험구의 균 감소율은 다음 식으로 계산하였다.
$$\text{감소율(\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A : 대조구의 균수
B : 시험구의 균수
- 시험결과
표 1. 유해균 감소율 시험결과

시험균의 종류	단 위	시험 결과		감소율(%)
		대조구	시험구	
<i>Bacillus subtilis</i>	cfu/g	3.0 × 10 ⁶	3.4 × 10 ⁶	0
<i>E. coil</i>	cfu/g	7.4 × 10 ⁶	3.0 × 10 ⁶	59.46
<i>Candida albicans</i>	cfu/g	5.4 × 10 ⁶	8.9 × 10 ⁵	83.52

위의 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 시험 결과이며, 이 시험 성적서는 용도 이외의 선전, 소송, 기타 법적요건으로 사용할 수 없습니다.

충남대학교 농업과학연구소



타. 파워비-부저 유효기간 테스트 진행

- 1개월 간격으로 6개월간 진행(2018년 11월 ~ 2019년 1월까지)
- 매달 1회 성분 분석하여 부패 및 변질 유무 확인
- 분석 내용: 폴리페놀 함량/ 총 생균수/ 대장균 균



충남대학교
농업과학연구소

34134 대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학기술센터 205호
담당자(한소영), 책임자(구자용), TEL : (042)821-8704~5, FAX : (042)821-8706

시험 성적서

발급번호	1810540	접수번호	1810540
시료명	파워비-부저		
의뢰인	업체명	㈜진트론바이오텍	
	소재지	전북 전주시 완산구 홍산북로 15, 201호, 401호(효자동2가, 세현빌딩)	
접수년월일	2018. 10. 31	시험목적	참고용

시험항목 및 결과

1. 시험목적 : 의뢰자가 제공한 시료의 가속실험을 실시하여 식품으로써 유통기한을 예측하기 위하여 그 목적이 있다.
2. 관련근거 :
식품위생법 시행규칙 제25조 제1항제3호, 「식품의유통기한설정기준(식약청 고시 제2007-66호)」 및 「식품의유통기한설정기준 일부개정고시(식약청고시2008-53호)」
3. 시험방법
의뢰자가 제공한 시료를 30, 35, 40℃의 배양기에 보관하면서 1개월 간격으로 총균수, 대장균군, 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.
4. 시험결과

표 1. 제품의 저장기간별 시험결과

저장기간(개월)	검사항목	단위	저장 온도(℃)			비고
			30	35	40	
0	총 균 수	cfu/g	7.0×10^2	7.0×10^2	7.0×10^2	
	대장균군	cfu/g	불검출	불검출	불검출	
	총 폴리페놀	mg/kg	7512.82	7512.82	7512.82	
1	총 균 수	cfu/g	6.8×10^2	7.2×10^2	6.9×10^2	
	대장균군	cfu/g	불검출	불검출	불검출	
	총 폴리페놀	mg/kg	7449.40	7425.30	7401.20	
2	총 균 수	cfu/g	7.1×10^2	6.8×10^2	7.0×10^2	
	대장균군	cfu/g	불검출	불검출	불검출	
	총 폴리페놀	mg/kg	7433.73	7301.20	7289.16	

위의 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 시험 결과이며, 이 시험 성적서는 용도 이외의 선전, 소송, 기타 법적요건으로 사용할 수 없습니다.

2018년 12월 31일

충남대학교 농업과학연구소



과. 파워비-백묵 유효기간 테스트 진행

- 1개월 간격으로 6개월간 진행(2018년 11월 ~ 2019년 1월까지)
- 매달 1회 성분 분석하여 부패 및 변질 유무 확인
- 분석 내용: 폴리페놀 함량/ 총 생균수/ 대장균 균



충남대학교
농업과학연구소

34134 대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학기술센터 205호
담당자(한소영), 책임자(구자룡), TEL : (042)821-8704~5, FAX : (042)821-8706

시 험 성 적 서

발 급 번 호	1810541	접 수 번 호	1810541
시 료 명	파워비-백묵		
의뢰인	업체명	㈜진트론바이오릭	
	소재지	전북 전주시 완산구 총산북로 15, 201호, 401호(효자동2가, 세현빌딩)	
접수년월일	2018. 10. 31	시 험 목 적	참고용

시험항목 및 결과

1. 시험목적 : 의뢰자가 제공한 시료의 가속실험을 실시하여 식품으로써 유통기한을 예측하기 위하여 그 목적이 있다.
2. 관련근거 :
식품위생법 시행규칙 제25조 제1항제3호, 「식품의유통기한설정기준(식약청 고시 제2007-66호)」 및 「식품의유통기한설정기준 일부개정고시(식약청고시2008-53호)」
3. 시험방법
의뢰자가 제공한 시료를 30, 35, 40℃의 배양기에 보관하면서 1개월 간격으로 총균수, 대장균군, 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.
4. 시험결과

표 1. 제품의 저장기간별 시험결과

저장기간(개월)	검사항목	단 위	저 장 온 도(℃)			비 고
			30	35	40	
0	총 균 수	cfu/g	7.0×10^2	7.0×10^2	7.0×10^2	
	대장균군	cfu/g	불검출	불검출	불검출	
	총 폴리페놀	mg/kg	7603.69	7603.69	7603.69	
1	총 균 수	cfu/g	7.0×10^2	7.0×10^2	7.0×10^2	
	대장균군	cfu/g	불검출	불검출	불검출	
	총 폴리페놀	mg/kg	7473.49	7425.30	7437.35	
2	총 균 수	cfu/g	7.0×10^2	7.0×10^2	7.0×10^2	
	대장균군	cfu/g	불검출	불검출	불검출	
	총 폴리페놀	mg/kg	7457.83	7325.30	7315.25	

위의 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 시험 결과이며, 이 시험 성적서는 용도 이외의 선전, 소송, 기타 법적요건으로 사용할 수 없습니다.

2018년 12월 31일

충남대학교 농업과학연구소장



2-6. 대상 기술의 적용 제품 및 매출 실적

파워비 부저	
	
용도	꿀벌 면역 증강제 (사양액 첨가제)
용량	100ml

파워비 백묵	
	
용도	꿀벌 면역 증강제 (사양액 첨가제)
용량	100ml

나. 2017년도 매출실적

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술						
주관연구기관	주식회사 한비	참여기관	경희대학교 산학협력단				
책임자	박주현	연구기간	2017년 01월 ~ 2017년 12월 (총 12개월)				
정부출연금	300,000	기업부담금	100,000				
기술이전명		기술실시대상기관					
기술료		기술실시일					
구분	기술실시 업체 결산액 (단위: 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적				
실적	자산 총계	352	제품건수	1건			
	자본 총계	182					
	부채 총계	169	기술개발성과비율 매출액	24.2			
	매출액 총계	1,237					
제품별 실적							
구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	파워비-부제		2016. 11.07	6.6	100	대한민국	부
2	파워비-백목		2016. 11.07	6.6	100	대한민국	부
3	파워비-부제 플러스		2017. 09.04	11	100	대한민국	부

2017년 11월 13일
연구책임자 : 박주현 (서명 또는 인)

전자세금계산서				승인번호		20170531-10000000-99460117		
공급자	등록번호	140-81-67031	중사업장번호	등록번호	113-86-56124	중사업장번호		
	상호 (법인명)	주식회사 한비	성명	상호 (법인명)	(주)루젠(에스씨아이)	성명	박성호	
	사업장 주소	충청북도 충주시 청동구 내수읍 영암길 10, 201호(충북농업과학대학교 중앙보육센터 중합3동)		사업장 주소	경기도 부천시 오정구 석현로 397, 301동 1004동(삼정동, 부천테크노파크상층3차)			
	입태	최조업	종목	양봉기구, 보조사육	입태	제조·도매업 상품공개업	종목	시약및과학기자재 외
이메일	koreanbee@koreanbee.co.kr		이메일	lugem@lugensci.com		이메일		
작성일자	공급가액	세액	수량	단가	공급가액	세액	비고	
2017-05-31	12,000,000	1,200,000					해당없음	
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
05	31	파워비-부제	ea	600	10,000	6,000,000	600,000	
05	31	파워비-백목	ea	600	10,000	6,000,000	600,000	
합계금액				현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (총구) 합
13,200,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 일련번호(전자세금계산서)입니다. 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 '조회/발급'>전자세금계산서>제3차 발급사실 조회'를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호		20171027-10000000-11865220		
공급자	등록번호	140-81-67031	중사업장번호	등록번호	113-86-56124	중사업장번호		
	상호 (법인명)	주식회사 한비	성명	상호 (법인명)	(주)루젠(에스씨아이)	성명	박성호	
	사업장 주소	충청북도 충주시 청동구 내수읍 영암길 10, 201호(충북농업과학대학교 중앙보육센터 중합3동)		사업장 주소	경기도 부천시 오정구 석현로 397, 301동 1004동(삼정동, 부천테크노파크상층3차)			
	입태	최조업	종목	양봉기구, 보조사육	입태	제조·도매업 상품공개업	종목	시약및과학기자재 외
이메일	koreanbee@koreanbee.co.kr		이메일	lugem@lugensci.com		이메일		
작성일자	공급가액	세액	수량	단가	공급가액	세액	비고	
2017-10-27	10,000,000	1,000,000					해당없음	
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
10	27	파워비-부제 플러스	ea	1,000	10,000	10,000,000	1,000,000	
합계금액				현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (총구) 합
11,000,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 일련번호(전자세금계산서)입니다. 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 '조회/발급'>전자세금계산서>제3차 발급사실 조회'를 이용하시기 바랍니다.

다. 2018년도 매출실적

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명		꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술						
주관연구기관	주식회사 진드론바이오텍	참여기관	경희대학교 산학협력단					
책임자	박주현		연구기간	2018년 01월 ~ 2018년 12월(총 1년)				
정부출연금	300,000	기업부담금	100,000	총계	400,000			
기술이전명			기술실시대상기관					
기술료			기술실시일					
구분	기술실시 업체 결산액 (단위 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적					
실적	자산 총계	884	제품건수	2건				
	자본 총계	215						
	부채 총계	119	기술개발성과활용 총 매출액 (국내매출액 + 해외수출액)	24.2				
	매출액 총계	385						
제품별 실적								
구분	제품명	제품사진	제품출시일	매출액 (백만원)		해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	과워비-부겨		2016. 11.07	국내	12.1	100	대한 민국	부
				해외				
2	과워비-백목		2016. 11.07	국내	12.1	100	대한 민국	부
				해외				
3				국내				
				해외				

* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)

2019년 1월 14일
연구책임자 : 박주현 (서명 또는 인)

전자세금계산서				승인번호				
140-81-67031				20181003-10000000-75103513				
공통 번호	140-81-67031	회사명	주식회사 진드론 바이오텍	공통 번호	113-86-56124			
상호	주식회사 진드론 바이오텍	성명	박주현	상호	주식회사 진드론 바이오텍			
사업장 주소	경기도 고양시 중원구 용인로 18, 2층 201호(호차종2차, 지하철상)	생년월일	1980.01.12	사업장 주소	경기도 고양시 중원구 용인로 18, 2층 201호(호차종2차, 지하철상)			
연락처	02-950-0000	종목	장물(국, 농산물)	연락처	02-950-0000			
이메일	korabee@korabee.co.kr	이메일	luge7@luge7.co.kr	이메일	luge7@luge7.co.kr			
작성일자	2018-10-02	공급가액	10,000,000	세액	1,000,000			
합계금액	11,000,000	현금	수표	예금	외상대수령			
일	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
10	03	과워비-부겨	sa	600	10,000	6,000,000	600,000	
10	09	과워비-백목	sa	600	10,000	6,000,000	600,000	
합계금액	11,000,000	현금	수표	예금	외상대수령	이 금액을 (총구) 총		

본 인장은 국공영 포털 e-commerce tax.go.kr에서 발급 또는 전용 앱인 전자세금계산서입니다.
HomTax, 발급사실 확인은 상가 홈페이지의 "조회/발급" 전자세금계산서) 메뉴와 발급사실 조회를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호				
140-81-67031				20181214-41000016-71496632				
공통 번호	140-81-67031	회사명	주식회사 진드론 바이오텍	공통 번호	113-86-56124			
상호	주식회사 진드론 바이오텍	성명	박주현	상호	주식회사 진드론 바이오텍			
사업장 주소	경기도 고양시 중원구 용인로 18, 2층 201호(호차종2차, 지하철상)	생년월일	1980.01.12	사업장 주소	경기도 고양시 중원구 용인로 18, 2층 201호(호차종2차, 지하철상)			
연락처	02-950-0000	종목	장물(국, 농산물)	연락처	02-950-0000			
이메일	korabee@korabee.co.kr	이메일	luge7@luge7.co.kr	이메일	luge7@luge7.co.kr			
작성일자	2018-12-14	공급가액	12,000,000	세액	1,200,000			
합계금액	13,200,000	현금	수표	예금	외상대수령			
일	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
12	14	과워비-백목	sa	600	10,000	6,000,000	600,000	
12	14	과워비-부겨	sa	600	10,000	6,000,000	600,000	
합계금액	13,200,000	현금	수표	예금	외상대수령	이 금액을 (총구) 총		

본 인장은 국공영 포털 e-commerce tax.go.kr에서 발급 또는 전용 앱인 전자세금계산서입니다.
HomTax, 발급사실 확인은 상가 홈페이지의 "조회/발급" 전자세금계산서) 메뉴와 발급사실 조회를 이용하시기 바랍니다.

2-7. 마케팅 홍보 실적 및 기대 효과

가. 2017년도 세계양봉대회 참가

- ◆ 일자: 2017년 9월 29일~10월 4일
- ◆ 장소: Istanbul Congress Center (Istanbul, TURKEY)
- ◆ 참여 나라: 세계 136개국 200개의 부스 전시
- ◆ 진행 업무: (사) 한국양봉협회 주관으로 국내 양봉관련 업체 참여
해외 업체에 국내 제품 우수성 홍보



나. 2016년 제 41차 양봉의 날 행사 참여

- ◆ 일자: 11월 08일~11월 09일
- ◆ 장소: 경주 황성공원 실내체육관



다. 2017년 제 42차 양봉의 날 행사 참여

◆ 일자: 10월 25일~10월 26일

◆ 장소: 충남 논산천 둔치



3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 기획연구 목표달성도

연구개발의 목표	연구개발내용	목표달성도(%)
유효 물질 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - 기 확보한 물질과 신규 물질에 대하여 활성을 보이는지 확인하기 위하여 Broth microdilution assay 수행 - 활성이 있는 물질 2종에 대한 분석 완료 	100%
기전 확인	<ul style="list-style-type: none"> - <i>A.apis</i>의 HOG1에 대한 조절 확인 - 기존에 알려져 있는 효소 저해를 바탕으로 각 화합물에 의한 저해방법 확인 	100%
미생물 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 봉균 주변의 발굴한 2개 균주에 대한 동정 완료 - 벌의 장내 미생물 2종에 대한 동정 완료 - 유익균 확보를 위해 꿀벌 내 미생물 동정 실험 중 	100%
세포주 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 곤충 세포에 발현이 시간이 걸려 일정이 약간 지연 되었으나, 발현을 확인 하여 감염 여부 확인 예정 - 기 확보한 물질을 대상으로 감염에 영향을 주는 화합물 발굴 예정 	100%
면역 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 면역에 관여하는 단백질 중 1개 확인 - 병원성 단백질 발굴 완료 - 장내 유익균 확보를 위해 꿀벌 내 미생물 동정 실험 완료 	100%
field test를 통한 꿀벌의 감염유무 확인	<ul style="list-style-type: none"> - <i>M.Plutonius</i>, <i>P.Larvae</i>, <i>A.Apis</i> 의 분석은 Reference gene 과 Positive control 이용하여 Semi quantitative PCR로 발현 유무를 확인 - 농가별로 강균, 약균의 3개 봉균을 선정 하여 봉균별로 유충 및 성충의 시료 채취 후 Filed test 진행 완료 	100%
시제품개발 및 홍보	<ul style="list-style-type: none"> - 면역증강제에 신규 항(진)균 물질 첨가 후 혼합 비율에 따른 field test 진행 - <i>M.Plutonius</i>, <i>P.Larvae</i> 항진균 시제품 개발(제품명:파워비-부저) - <i>A.Apis</i> 항진균 시제품 개발 (제품명:파워비-백묵) - 제41차, 42차 국내 양봉대회, 제45회 세계 양봉대회 총 2건의 전시회 참가 	100%

4. 연구결과와 활용 계획

4-1. 최종 목표 및 계획

구분	내용
최종목표	꿀벌 감염성 질환 중 진균과 박테리아에 대한 방제 기술 개발
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 후보 물질 공급 및 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 천연물 기관을 통해 한방지표물질 및 천연물 표준품 공급받아 분석 ○ 제형별 시료 제작 및 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 향(진)균 물질 개발시 액상, 고형 제형 분석 - 효능 테스트 후 화분떡으로 제품화 가능 ○ 제형 분석 및 사업화 방안 <ul style="list-style-type: none"> - 향(진)균 물질은 사용액 조제방법 및 투여량에 최적화된 비율로 혼합 ○ 산업화 수준의 추출 방법 및 공정 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 향(진)균 물질은 제품 단가를 낮춰 공정 최적화 ○ Field Test 방법 최적화 및 테스트 진행 <ul style="list-style-type: none"> - 지역별로 양봉장을 채택하여 진행 - 지역별 시료로부터 (진)균 분석을 상대정량이 가능하도록 최적화 ○ 신규 향(진)균제의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 신규 향(진)균제 5종 발굴 및 1개 시작품 제작 ○ 향(진)균제의 기전 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 신규 약물의 기전 2개 규명 - 기존 물질의 내성 기전 1개 규명 ○ 신규 물질의 생산 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 유효 물질의 순수 추출 방법 1개 이상 - 3개 이상의 유효 물질을 함유한 물질 추출 방법 확립 ○ 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포 주 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 곰팡이 감염 단백질 1개 발굴 및 발현 - 감염율이 높은 1개 신규 세포 주 제작 - 신규 감염 억제 또는 성장 억제제 2종 발굴 및 시작품 제작 ○ 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - 꿀벌 면역 관여 단백질 2종 연구 - 2종 장내 미생물 - 1개 신규 면역 강화 물질

4-2. 연구결과의 활용 계획

No	구체적인 활용 계획
①	* 꿀벌 산업에 기여
②	* 신규 항(진)균제 발굴 및 산업화
③	* 사료 등의 원료 개발 및 산업화 적용 기술 확대
④	* 항(진)균제의 기전 확인으로 산업화 및 수출에 대비 할 수 있음
⑤	* 꿀벌 전염성 질병 중 박테리아와 곰팡이에 대한 전문 연구 가능
⑥	* 꿀벌 연구를 수행 할 수 있는 전문 연구원의 발굴
⑦	* 꿀벌 질병 방제 기술을 확립한 실험실 구축 가능
⑧	* 향후 항-바이러스제 등의 연구 기술 확립
⑨	* 향후 동물의약품 허가를 받기 위한 구체적인 연구계획 파워비 부저, 백목에 대한 품목허가 신고서 접수 - 효능 및 효과의 명확한 근거를 위해 매해 Field Test 진행 - 포장단위, 저장방법, 유효기간은 기존 데이터의 시험성적서로 대처 - 제조공정도 추가로 준비 예정(추출과정부터 생산 및 포장과정까지 일괄적인 제조공정도 확보 예정) - 최종제품의 시험 타당성 및 반복성을 검증하기 위해 3회 반복실험의 공인성적서 발급

5. 연구성과 자료

5-1. 지식재산권

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출 원			등 록		
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호
1	부저병의 예방 및 치료용 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2017 01.10	10-2017-0 003323	경희대학교 산학협력단	2018 02.06	10- -1828563
2	꿀벌의 전염병 예 방 및 치료용 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2017 01.10	10-2017- 0003720	경희대학교 산학협력단	2018 04.14	10- 1847532
3	천연 화합물을 포 함하는 여드름 개 선용 향균 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2017 07.25	10-2017-0 094113			
4	꿀벌의 전염병 치료용 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2015 05.27	10-2015- 0073588	경희대학교 산학협력단	2016 11.23	10- 1680791
5	파마르산을 유효성 분으로 포함하는 부저병의 예방 및 치료용 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2018 09.14	10-2018- 0110061			

1. 부저병의 예방 및 치료용 조성물

특허증 CERTIFICATE OF PATENT	
특허 Patent Number	제 10-1828563 호
출원번호 Application Number	제 10-2017-0003323 호
출원일 Filing Date	2017년 01월 10일
등록일 Registration Date	2018년 02월 06일
발명의 명칭 Title of the Invention 부저병의 예방 및 치료용 조성물	
특허권자 Patentee 경희대학교 산학협력단(134571-*****) 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)	
발명자 Inventor 등록사항란에 기재	
위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다. This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.	
 특허청 Korean Intellectual Property Office	2018년 02월 06일 특허청장 COMMISSIONER, KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE 성 훈 모

2. 꿀벌의 전염병 예방 및 치료용 조성물

특허증 CERTIFICATE OF PATENT	
특허 Patent Number	제 10-1847532 호
출원번호 Application Number	제 10-2017-0003720 호
출원일 Filing Date	2017년 01월 10일
등록일 Registration Date	2018년 04월 04일
발명의 명칭 Title of the Invention 꿀벌의 전염병 예방 및 치료용 조성물	
특허권자 Patentee 등록사항란에 기재	
발명자 Inventor 등록사항란에 기재	
위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다. This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.	
 특허청 Korean Intellectual Property Office	2018년 04월 04일 특허청장 COMMISSIONER, KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE 성 훈 모

5-2. 기술이전

No	기술이전 유형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	직접 실시	꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술	주식회사 진트론 바이오텍	2018.12.31	7,280,000원	0원

기술료 감면 신청서			
(단위 : 천원)			
연구개발과제 현황	사업명	농생명산업기술개발사업	연구과제번호
	연구과제명	꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술	116094-03-2-SB010
	연구기관명	주식회사 진트론바이오텍	연구책임자
	연구책임자	박주원	참여기관명
	참여기관명	경희대학교	
연구협약일	2016.09.05	연구기간	2016. 09. 05 ~ 2018. 12. 31(28개월)
연구개발비	정부출연금	기업무담금	기타 ()
	700,000	233,334	계
			933,334
기술실시내용	성과활용명	꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술	실시(활용)기간
			2016.09.01. ~ 2018.12.31
	지재권 종류	특허출원	실시권 유형
			직접 실시
	지재권이 출원(등록)된 경우	명 칭	피마프산을 유효성분으로 포함하는 부제병의 예방 및 치료용 조성물
		번호	10-2018-0110061
		일 지	2018.09.14
		기관명	주식회사 진트론바이오텍
		주 소	전라북도 전주시 완산구 흥산북로15 201호 401호
		사업자번호	140-81-67031
기술료 감면	감면근거	농림축산식품부 소관 연구개발사업 운영규정 제35조 제9항에 따라 위와 같이 기술료 감면신청서를 제출합니다.	기술료 납부예정일
			2018-12-21
	감면사유 및 내용	실시기업인 (주) 진트론바이오텍은 중소기업이며, 본 연구과제의 참여기업에 해당하여 징수대상 기술료에서 80% 감면 및 일시납부에 따른 30% 추가감면을 요함	
	감면금액 산출내역	정부출연금 700,000천원 * 10%(중소기업) + 80%(과제참여 중소기업 감면) * 30%(일시납부 감면) = 9,800천원	

농림축산식품부 소관 연구개발사업 운영규정 제35조 제9항에 따라 위와 같이 기술료 감면신청서를 제출합니다.

붙임 1. 연구개발과제 개요 1부.
2. 연구계획서 또는 연구결과보고서 등 1부.
3. 지식재산권을 포함하는 기술실시인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부.

2018년 12월 20일

주관연구기관 주식회사 진트론바이오텍 대표 나지은
농림식품기술기획평가원장 귀하

기술실시보고서			
(단위 : 천원)			
연구개발과제 현황	사업명	농생명산업기술개발사업	연구과제번호
			116094-03
	연구과제명	꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술	
	연구기관명	주식회사 진트론바이오텍	연구책임자
	연구책임자	박주원	참여기관명
참여기관명	경희대학교		
연구협약일	2016.09.05	연구기간	2016.09.05. ~ 2018.12.31.(28개월)
연구개발비	정부출연금	기업무담금	기타 ()
	520,000	233,334	계
			753,334
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술	실시(활용)기간
			2018.10.01. ~ 2018.10.01.~
	계약(활용)일	2018.10.01.	실시(활용)기간
			2018.10.01.~
	지재권 종류	특허출원	실시권 유형
			직접 실시
	* 지재권이 특허(출원,등록)된 경우	명 칭	피마프산을 유효성분으로 포함하는 부제병의 예방 및 치료용 조성물
		번호	10-2018-0110061
		일 지	2018.09.14.
		기관명	주식회사 진트론바이오텍
기술료	주 소	전라북도 전주시 완산구 흥산북로15 201호 401호	대표자
		나지은	
	사업자번호	140-81-67031	전화번호
		063-222-9131	
기술료산정내역	정부출연금	520,000천원 * 10%(중소기업) + 80%(과제참여 중소기업 감면) * 30%(일시납부 감면) = 7,280천원	
기타특기사항	정액기술료	경상기술료	기타 조건
	정수(납부)예정일	정수(납부)납액	정수(납부)예정일
	2018.12.21	7,280천원	정수(납부)시각일
			정산월
	대출에 따른 기술료	정수(납부)종료일	정수월
		-	대출액의 ()회

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.

붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시).
2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시).
3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).

2018년 12월 31일

주관연구기관 주식회사 진트론바이오텍 대표 나지은
농림식품기술기획평가원장 귀하

5-3. 사업화

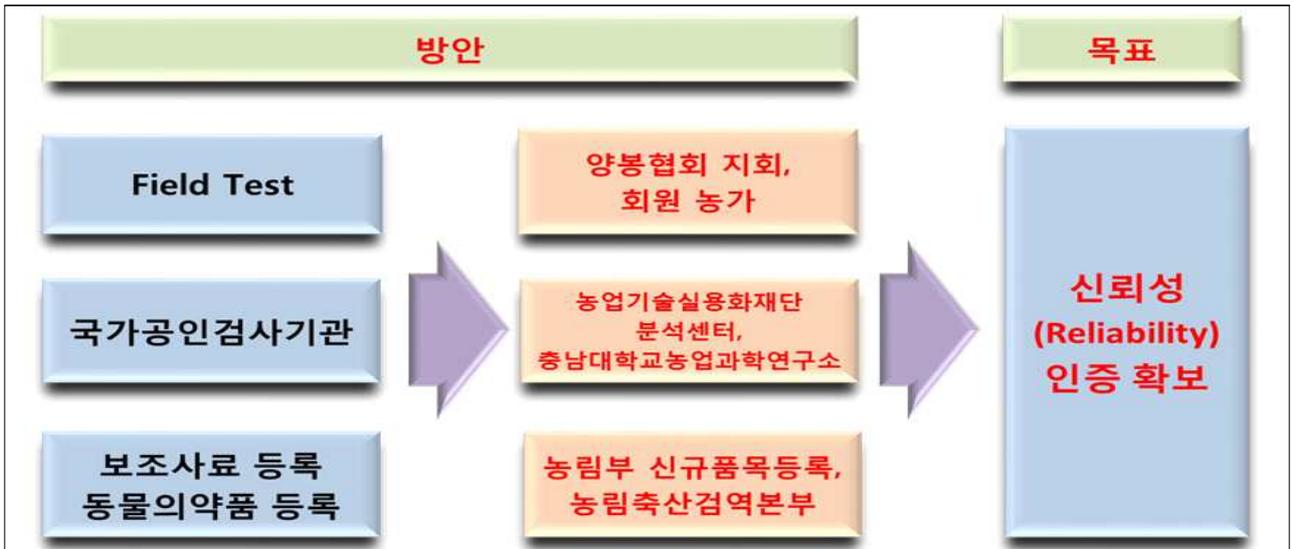
가. 제품홍보, 판로확보, 판매전략 등의 사업화 추진전략

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화 형태 : 관납, 도매, 소매 ○ 수요처 : 전국 기술센터, 양봉협회, 양봉농협, ㈜루젠SCI, 디티씨 ○ 예상 단가 : 10,000원 ○ 개발 투입인력 및 기간 : 4명, 2년
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2012년 농촌진흥청 개발특허 기술 이전 및 상용화 경험 ○ 현재 전국의 농업기술센터 및 양봉협회, 양봉농협 수요처 확보 ○ 4년간 세계양봉대회, 아시아양봉대회 참석으로 인한 해외 수요처 확보
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전국 농업기술센터, 조합과 협회의 시,군,도 지회장을 통한 Field Test ○ 과거 세계양봉대회, 아시아양봉대회 참석으로 인한 수요처 지속적 관리 ○ 국내 양봉대회 참석 및 양봉협회, 양봉농협 지속적 관리

나. 사업화를 위한 비즈니스 모델

가. BM 수립 배경

- 보유 등록특허의 기술이전 및 신규 지식재산권의 활용 필요
 - 본 과제를 통해 개발된 제품은 최초로 양봉산업에 최적화되어 적용되는 면역강화, 항균, 항진균 제제로써 특허의 출원 및 등록을 바탕으로 기술이전 및 사업화를 추진할 것임.
- 신뢰성 인증확보 필요
 - 최종 제품형태로 개발되는 동안 관련기관을 통한 신뢰성 인증확보 진행할 예정임.
- 발굴된 면역증강 소재를 다양한 형태의 면역증강제품 개발 가능
 - 꿀벌뿐만 아니라 다른 벌들에게서도 같이 사용 할 수 있는지 확인 하여 적용 성을 확대 할 예정.
 - 다른 질병 원인균에도 사용 가능한지 확인 하여 적용 성을 확대 할 예정
- 본 과제를 통한 제제는 주관기관이 직접 제조에 필요한 생산 시설을 설치, 확보하여 단가를 낮출 수 있음.
- 제품 생산과 마케팅은 기존 기업이 가진 시스템을 활용하여 시제품의 성능을 확인 한 후 생산비용과 사용 편의성 등을 고려하여 경쟁력 있는 제형을 선정한 다음 제품을 생산이 가능함.
- 추후 연구 및 생산 인력을 지속적인 신규 고용을 통하여 대량 생산과 연구 개발을 위한 발판을 마련할 예정임.



나. 수익 확보 전략 및 진행상황

- 시장성
 - 신규 면역강화, 향균, 항진균 제제로 사용이 가능
 - 지속적인 소비가 이루어 질 수 있어 시장성이 넓음.
 - 2012년 양봉농가 4만여 농가로 추정
(예, 경북(20.5%),경남(13.9%),전남,전북,강원전체 사육군수의 63.3% 차지)
- 마케팅 전략
 - 사단법인 한국양봉협회 주관의 전국양봉대회 출품 및 격년으로 열리는 아시아 양봉대회, 세계 양봉대회 출품으로 제품에 대한 인지도 향상시킴, 안전한 먹거리, 꿀, 프로폴리스, 로얄제리 생산을 위한 안전하고 잔류 걱정 없는 친환경 꿀벌치료제 효과 강조
 - 농업기술실용화재단 분선센터 및 충남대학교 농업과학연구소 등 유관기관의 친환경 꿀벌치료제 품질인증을 통한 신뢰성 확보 및 홍보
- 판로확보

기존 자사가 보유하고 있는 유통 판매망 이용. (주)진트론바이오텍은 전국적으로 한비(Korean Bee)브랜드의 양봉시약과 향균제를 공급하고 있으므로, 이 유통 시스템을 적극 활용하여 제품 홍보 및 판매를 진행하였으며, 양봉 협회나 양봉 학회, 전국의 양봉원 및 전문 네트워크 유통채널 뿐만 아니라 전국 농업기술센터를 방문하여 홍보함으로써 본 과제 종료 시까지 5,000 만원 이상의 신규 매출 발생.

 - ㄱ) 한국양봉농협 계통 판매를 통한 안정된 판매망 적극 활용
 - ㄴ) 인터넷 판매 및 전국 양봉원을 통한 신규 판매망 구축
 - ㄷ) 전국 농업기술센터 방문/홍보
 - ㄹ) 전국 각 지역별 테스트 농가 확보 후 실증 실험 진행
 - ㅁ) 사단법인 한국양봉협회 지회총회 및 양봉대회, 세계 양봉대회 참석 및 홍보

<표 1> 기술개발 후 국내.외 주요 판매처 현황

판매처	국가 명	판매 단가 (천원)	예상 연간 판매량(개)	예상 판매기간(년)	예상 총판매금 (천원)	관련제품
한국양봉농협	대한민국	20	20,000	3	400,000	과워비
한국양봉협회	대한민국	20	20,000	3	400,000	과워비
전국 양봉원	대한민국	20	30,000	3	600,000	과워비
전국 농업기술센터	대한민국	20	20,000	3	400,000	과워비
전국 시,군청 기술보급과	대한민국	20	10,000	3	200,000	과워비

○ 수출을 위한 노력

- 해마다 국내에서 열리는 양봉대회 및 양봉학회에 참석하여 기존제품에 대한 인지도를 쌓아놓은 상태이며, 본 과제를 통해 개발된 제품은 동일한 방법을 통해 홍보 진행.
- 격년으로 열리는 세계양봉대회, 아시아양봉대회 참석을 통해 자사의 브랜드 이미지를 높여놓은 상태이며, 우리나라와 거래량이 가장 많은 아시아 지역의 중국, 베트남 등의 회사들과 거래량을 증가시키기 위한 노력을 하고 있으며, 유럽지역의 영국, 터키 등의 회사들과의 거래 또한 증가 추세에 있음. 본 과제를 통해 개발된 제품은 기존 거래선이 미리 확보 되어있는 장점을 활용하여 수출 진행 예정임.
- 신뢰성 인증 확보절차를 거쳐 제품 품질 향상 및 인허가 진행
- 기존 항생제 위주의 제품에서 세계 최초로 천연물질을 원료로 한 제품이며, 전염성 질병에 고효율 제품이라는 기술적인 파급효과 기대.

○ 기술개발을 통한 고용창출 효과 및 신규인력 채용 계획

- 중장기적으로 주관기관의 생산시설을 확충한 후 지속적인 신규 연구 및 생산 인력 고용 예정이며, 본 과제를 통해 신규인력 2명 창출.

○ 고용유지를 위한 복리후생 등 기업 자체적 방안

- 신규 채용뿐 아니라 지속적인 고용유지를 위해 동종 업계의 평균 이상의 급여 및 복리 후생제도를 도입.

○ 신규인력에 대한 교육 프로그램 등 기술인력 육성계획

- 신규 연구 및 생산 인력에 대한 자체 교육 프로그램 개발 및 본 과제 관련 대학교 학과의 TLO사업 등을 진행중이며, 사업 종료 후 신규인력 추가 채용예정. (2019년 3월1일)

○ 해외 마케팅 전략 및 제품 경쟁력

- 본 과제의 양봉산업에 최적화된 면역강화, 항균, 항진균 제제에 대한 효능 평가 결과에 대한 SCI 논문 2편, 비SCI 논문 2편은 현재 under review전인 상태이며, 곧 발급 예정이다. 특허출원 5건, 특허 등록 2건 확보, 추 후 PCT 출원 등을 통해 국내 판매 뿐 아니라 수출화 전략을 마련.

5-4. 학술 성과

가. 논문

No	논문명	학술 지명	주저자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재 일	등록번호
1	IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MACCELIGNAN AND COROSOLIC ACID AGAINST THE BEE PATHOGENIC BACTERIA PAENIBACILLUS LARVAE AND MELISSOCOSSUS PLUTONIUS.	ACTA VETERINARIA BRNO.	Jaegoo Kim, Sangchul Park, Yu-Kyong Shin, Hee Kang and Ki-Young Kim	87	Czech Republic		SCI	2018	
2	Antifungal activity of Magnoflorine against <i>Candida</i> strains.	World Journal of Microbiology and Biotechnology.	JaeGoo Kim, Thinh Ha Quang Bao, Yu-Kyong Shin and Ki-Young Kim	34	Netherlands		SCI	11, 2018	

ACTA VET. BRNO 2018, 87: 000-000; <https://doi.org/10.2754/avb201887030000>

In vitro antibacterial activity of maclelgan and corosolic acid against the bacterial bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*

Jaegoo Kim^{1,2}, Sangchul Park^{1,2}, Yu-Kyong Shin^{2,3}, Hee Kang², and Ki-Young Kim^{1,4*}

Kyung Hee University, Graduate School of Biotechnology, Kihung, Yongin, Gyeonggi, Republic of Korea, ¹College of Life Science, Kihung, Yongin, Gyeonggi, Republic of Korea, ²Graduate School of Oriental Medicine, Kihung, Yongin, Gyeonggi, Republic of Korea, ³College of Life Science and Graduate School of Biotechnology, Department of Genetic Engineering, Gihung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

*These authors contributed equally as joint first authors

Received August 4, 2017
Accepted

Abstract

Foulbrood disease, which is caused by *Paenibacillus larvae* (American foulbrood) or *Melissococcus plutonius* (European foulbrood disease), is a major threat to honeybees (*Apis mellifera*) worldwide. Tetracycline derivatives have been used to control these bacteria, but resistant strains have evolved, and the antibiotic derivatives can adversely affect bee health. When foulbrood disease is discovered, beekeepers usually burn the bee larvae and equipment. The aim of this study was to investigate the *in vitro* susceptibility of *P. larvae* and *M. plutonius* to new antibacterial agents. Antibacterial activities of seven compounds prepared as serial two-fold dilutions were assayed using 96-well microtiter plates. Minimum inhibitory concentration values were obtained after 24 h or 48 h of incubation. Antibacterial synergistic activity of tetracycline and the test compounds was evaluated using broth micro-dilution assays with two-fold serial dilutions of the compounds. Among the seven compounds tested, maclelgan and corosolic acid showed the strongest anti-bacterial activity. In addition, tetracycline interacted synergistically with corosolic acid to reduce *P. larvae* and *M. plutonius* growth. Even though maclelgan and corosolic acid were worth as solely effective agents to treat *P. larvae* and *M. plutonius*, combinational treatment with tetracycline would be more useful to overcome toxicity, resistance occurrence and costliness. Further validation studies of these compounds and identification of their targets, as well as actual field tests and bee toxicity studies are still needed. However, maclelgan and corosolic acid as natural secondary metabolites would be effective agents for bee foulbrood disease with valuable antibacterial activities.

Honeybee, infectious disease, natural compound, anti-bacterial agent

Approximately one third of the human food supply depends on insect pollination. Honeybees are the most economically important pollinators of agricultural and horticultural plants. Bee populations worldwide have been declining for various reasons (Gensch 2010; Corran et al. 2012; Seitz et al. 2016). No single factor can account for the overall global decline, but a contributing factor is bacteria, including *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* (Miyagi et al. 2000; Alippi et al. 2002; Takamatsu et al. 2014; Takamatsu et al. 2016).

Paenibacillus larvae is a gram-positive endospore-forming bacterium known to cause American foulbrood (AFB) disease, which is one of the most economically devastating bee diseases. *Paenibacillus larvae* infects the brood stages of honeybees (*Apis mellifera* L.), and the infected honeybee brood turns black with a spotted appearance and bitter smell. The brood becomes a hard scale of material that sticks to the walls of the cells. Infected larvae usually die after the cells is sealed, and billions of infective spores form in their remains. *Paenibacillus larvae* spores remain viable for many years and are highly

Address for correspondence:
Ki-Young Kim, PhD
Department of Genetic Engineering
College of Life Science and Graduate School of Biotechnology
Kyung Hee University
1 Yoocheon, Gihung, Yongin, Gyeonggi-do 446-701, Republic of Korea
Phone: +82-31-2011243
E-mail: kiyongkim@khu.ac.kr
http://schver121.cj

World Journal of Microbiology and Biotechnology (2018) 34:167
<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2549-x>

ORIGINAL PAPER

Antifungal activity of magnoflorine against *Candida* strains

Jaegoo Kim¹ · Thinh Ha Quang Bao¹ · Yu-Kyong Shin² · Ki-Young Kim^{1,3}

Received: 10 March 2018 / Accepted: 26 October 2018
© Springer Nature B.V. 2018

Abstract
Candida albicans is a major invasive pathogen, and the development of strains resistant to conventional antifungal agents has been reported in recent years. We evaluated the antifungal activity of 44 compounds against *Candida* strains. Magnoflorine showed the highest growth inhibitory activity of the tested *Candida* strains, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 50 µg/mL, based on microdilution antifungal susceptibility testing. Disk diffusion assay confirmed the antifungal activity of magnoflorine and revealed that this activity was stable over 3 days compared to those of berberine and cinnamaldehyde. Cytotoxicity testing showed that magnoflorine could potentially be used in a clinical setting because it didn't have any toxicity to HaCaT cells even in 200 µg/mL of treatment. Magnoflorine at 50 µg/mL inhibited 55.91 ± 7.17% of alpha-glucosidase activity which is required for normal cell wall composition and virulence of *Candida albicans*. Magnoflorine also reduced the formation of *C. albicans*' biofilm. Combined treatment with magnoflorine and micazazole decreased the amount of micazazole required to kill various *Candida albicans*. Therefore, magnoflorine is a good candidate lead compound for novel antifungal agents.

Keywords Antifungal · *Candida albicans* · Alpha-glucosidase · Magnoflorine · Susceptibility microdilution assay

Introduction

Infection by invasive fungal pathogens is on the rise and poses a major human health risk (Cornely et al. 2017). *Candida albicans* is one of the major invasive fungal pathogens encountered (Shao et al. 2016). Infection by this pathogen causes visceral or superficial mycoses on the mouth, neck, digestive tract, and vagina (Bramono et al. 1995; Sato et al. 2017). Immunocompromised patients in particular are susceptible to infection by this pathogen (Haque et al. 2016). Although various compounds, including azole, are currently used to treat *Candida* infection, the mortality of patients with *Candida* infection is 15–25% (Pal 2017; Chandra et al. 2018). The occurrence of azole-resistant *Candida* strains has also been reported and currently used drugs have limitations because of their toxicity (Zida et al. 2017; Whaley et al. 2016; Haque et al. 2016). There is therefore an urgent need for new drugs to control *Candida* infections. Cinnamaldehyde and berberine are examples of novel antifungal agents that have anti-*Candida* activity (Cornely et al. 2017; Shao et al. 2016; Siddiqua et al. 2015; Zoric et al. 2017).

We evaluated the antifungal activity of 44 natural compounds to find new agents that can be used to treat *Candida albicans* infections. Through the microdilution antifungal susceptibility test and disk diffusion assay, we found one of candidate, magnoflorine (MF) (Chen et al. 2009). MF is classified as an aporphine alkaloid (Supplementary Fig. 1) and has been shown to have antifungal activity against *Penicillium avelanense* and *Penicillium oryzae* (Chen et al. 2009). MF has been found in the following plants: *Acaeculadama*, *Tinospora cordifolia*, *Celestus paniculatus*, *Magnolia*

Jaegoo Kim and Thinh Ha Quang Bao have contributed equally as first authors.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2549-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ki-Young Kim
kiyoung@khu.ac.kr

¹ Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea
² Department of Internal Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 172 Dolsa-ro, Bundang-gu, Gyeonggi-do, Republic of Korea
³ Department of Genetic Engineering College of Life Science and Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, 1732, Deogyong-daero, Gihung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

Published online: 31 October 2018

Springer

나. 학술발표

No	회의명칭	제목	발표자	발표일시	장소	국명
1.	The 32 nd Conference of the Apicultural Society of Korea.	Acetylshikonin and 4-Hydroxyderricin from natural plant extract can be used as effective growth inhibitors of the Honey Bee infectious fungi <i>Ascosphaera apis</i> .	Jaegoo Kim, Sangchul Park, Yu - K y o n g Shin, and Ki-Young Kim	Apr. 13-14. 2017	Inchun	Korea
2.	The 32 nd Conference of the Apicultural Society of Korea.	Natural compounds (Acetylshikonin, 4-Hydroxyderricin, Sophoraflavanone G and Kurarinone) inhibit growth of Honey Bee infectious Bacteria <i>P. larvae</i> and <i>M. plutonius</i> .	Sangchul Park, Jaegoo Kim, Yu - K y o n g Shin, and Ki-Young Kim	Apr. 13-14. 2017	Inchun	Korea
3	I n t e r n a t i o n a l conference of the Korea society for Molecular and Cellular Biology.	Escholine as a noble anti-candida compound.	JaeGoo Kim, Yu-Kyong Shin and Ki-Young Kim	Sep. 12-14. 2017	Seoul	Korea
4	The 33 rd Conference of the Apicultural Society of Korea.	Pimaric acid as a novel antibacterial compounds against Honey infectious bacteria <i>Paenibacillus larvae</i> .	H y u n c h a n Song, Jaegoo K i m , Yu-Kyong Shin and Ki-Young Kim	Oct. 24-25	Nonsan	Korea
5	The Joint Conference of the Apicultural Society of Korea	Honokiol as an effective antimicrobial compounds against causative agent of American foulbrood, <i>Paenibacillus larvae</i>	H y u n c h a n Song, Jaegoo Kim and Ki-Young Kim	Apr. 12-13	Guangju	Korea
6	Nextgen Genomics, B i o l o g y , Bioinformatics and T e c h n o l o g i e s conference.	Regulation of mRNA Expression in Head and Gut of <i>Apis Mellifera</i> after <i>Nosema Ceranae</i> Infection	Hyunchan Song and Ki-Young Kim	Sep.30-Oct. 02.2018	Jaipur	India
7	Nextgen Genomics, B i o l o g y , Bioinformatics and T e c h n o l o g i e s conference.	Tracheloside phosphorylates ERK1/2 upon promotion of Keratinocyte Proliferation.	Minho Kim, Jaegoo Kim, Yu - K y o n g Shin, and Ki-Young Kim	Sep.30-Oct. 02.2018	Jaipur	India

붙임. 참고문헌

1. Jaegoo Kim, Sangchul Park, Yu-Kyong Shin, Hee Kang, Ki-Young Kim (2018) *IN VITRO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MACELIGNAN AND COROSOLIC ACID AGAINST THE BEE PATHOGENIC BACTERIA *PAENIBACILLUS LARVAE* AND *MELISSOCOSSUS PLUTONIUS*. *ACTA VETERINARIA BRNO*. 87: 277-284.
2. JaeGoo Kim, Thinh Ha Quang Bao, Yu-Kyong Shin, Ki-Young Kim (2018) Antifungal activity of Magnoflorine against *Candida* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. November 2018, 34:167.
3. Hyunchan Song and Ki-Young Kim (201?) Honokiol as an effective antimicrobial compound against causative agent of American foulbrood, *Paenibacillus larvae*. *Journal of apiculture*. Under revision.
4. Hyunchan Song, Jaegoo Kim, Yu-Kyong Shin, Ki-Young Kim (201?) Antibacterial activity of pimaric acid against the causative agent of American foulbrood, *Paenibacillus larvae*. *Journal of apicultural research*. Under revision.
5. Sangchul Park, Yu-Kyong Shin, MyoungLae Cho, Hyun Sook Kwon, Yun Ju Kwon, and Ki-Young Kim (201?) *In vitro* antifungal activity of 4-hydroxyderricin and acetylshikonin against *Ascosphaera apis*. *Journal of apiculture*. Under revision.
6. Sangchul Park, JaeGoo Kim, Yu-Kyong Shin, Ki-Young Kim (201?) Antimicrobial activity of 4-hydroxyderricin, Sophoraflavanone G, Acetylshikonin, Kurarinone against bee pathogenic bacteria *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*. *Journal of apicultural research*. Under revision.
7. Hyunchan Song, Hyeakyung Kim and Ki-Young Kim (201?) Regulation of mRNA Expression in Head and Gut of *Apis Mellifera* after *Nosema Ceranae* Infection. Preparation for the *Journal of apicultural research*.
8. Daseul Kim, Yu-Kyong Shin, and Ki-young Kim (201?) The Antimicrobial Activity of Sophoraflavanone G Against *Enterococcus faecium*. In preparation
9. Jae-gu Kim, Min-Ho Kim, Ki-young Kim (201?) *Luteimonas* ___ sp. Nov., isolated from the soil under the Bee hive. In preparation

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술				
	(영문) Control System for the Bee-pathogenic bacteria and fungi				
주 관 연구 기관	주식회사 진트론바이오텍		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 주식회사 진트론바이오텍	
참 여 기 업	경희대학교			(성명) 박 주 현	
총 연구개발비 (933,334 천원)	계	933,334	총 연구 기간	2016. 9. 5 ~ 2018. 12. 31 (2년 4개월)	
	정부출연 연구개발비	700,000	총 참 연 구 원 수	총 인 원	6명
	기업부담금	233,334		내부인원	6명
	연구기관부담금	0		외부인원	0
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> * 신규 항(진)균제 * 꿀벌 감염균 실험을 위한 세포주 개발 * 노제마 감염 저해제 * 꿀벌 면역 강화 물질 * SCI 와 비 SCI급 논문 4 발표 * 교육인력 양성 2 * 특허 3개 등록과 기술 이전 1건 * 시작품 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> * 신규 항(진)균제의 개발 * 항(진)균제의 기전 확인 * 신규 물질의 생산 기술 개발 * 박테리아 또는 진균의 감염 연구에 필요한 세포 주 개발 * 꿀벌의 면역 기전 연구 및 신규 면역 강화 물질 발굴 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> * 꿀벌 산업에 기여 * 신규 항(진)균제 발굴 및 산업화 * 사료 등의 원료 개발 및 사업화 적용 기술 확대 * 항(진)균제의 기전 확인으로 사업화 및 수출에 대비 할 수 있음 * 꿀벌 전염성 질병 중 박테리아와 곰팡이에 대한 전문 연구 가능 * 꿀벌 연구를 수행 할 수 있는 전문 연구원의 발굴 * 꿀벌 질병 방제 기술을 확립한 실험실 구축 가능 * 향후 항-바이러스제 등의 연구 기술 확립 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1.

		과제번호		116094-03-1-SB010	
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	주식회사 진트론바이오텍			연구책임자	박주현
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2016.09.05. ~ 2016.12.31	100,000	33,334	133,334
	2차년도	2017.01.01. ~2017.12.31	300,000	100,000	400,000
	3차년도	2018.01.01. ~2018.12.31.	300,000	100,000	400,000
	4차년도				
	5차년도				
	계	2016.09.05. ~2018.12.31	700,000	233,334	933,334
참여기업	경희대학교 산학협력단				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
주식회사 진트론바이오텍	연구책임자	박주현

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

I. 연구개발실적

다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주우수, 천연 신규 항(진)균제의 후보물질 다량 확보, 기전 확인 및 연구에 필요한 세포주 개발 등 관련 연구에 기반이 될 수 있는 성과물, 기존에 천연물을 활용한 제품이 없는 환경에서, 최초로 등록된 “파워비-백목”, “파워비-부저” 시작품 2종에 대해 공인된 기관의 성적서상 매우 높은 효율을 보이는 제품 개발

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주우수, 사단법인 한국양봉협회의 도움으로 field test를 통한 신뢰도 구축 및 국내, 국외 양봉대회에서 우수성을 인정받았으며, 양봉협회보에 제품등록이 되는등, 실제 제품 다량 생산시 출품작으로 우수성과사례로 등재 될 예정.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주우수, 다량 확보된 천연 신규 항(진)균제가 기존의 항생제나 농약을 대체할 수 있는 동물의약품으로 등록될 수 있으며, 농가 뿐만아니라 꿀에 독성 잔류가 없는 만큼 소비자의 인식 제고 가능.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주우수, 주관기관과 참여기관의 적절한 co-work으로 연구결과 및 실용화에 성공하였다고 판단됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수, 성과지표상 SCI 논문은 현재 2편, 비 SCI 논문은 2편이 발간된 상태이다. 또한 SCI 논문 2편이 Under review에 들어간 상태이고, 1달 이내에 발간된다. 2019년도에도 꾸준히 비 SCI 논문은 3~4편은 진행 할 예정이다.

지적소유권은 특허등록 3건, 특허출원 5건으로 이번 연구에 대한 지적소유권의 성과는 아주 우수하다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
유효 물질 발굴	15	100	- 기 확보한 물질과 신규 물질에 대하여 활성을 보이는지 확인하기 위하여 Broth microdilution assay 수행 - 활성이 있는 물질 2종에 대한 분석 완료
기전 확인	15	100	- <i>A.apis</i> 의 HOG1에 대한 조절 확인 기준에 알려져 있는 효소 저해를 바탕으로 각 화합물에 의한 저해방법 확인
미생물 동정	10	100	- 봉군 주변의 발굴한 2개 균주에 대한 동정 완료 - 벌의 장내 미생물 2종에 대한 동정 완료 - 유익균 확보를 위해 꿀벌 내 미생물 동정 실험 중
세포주 확립	15	100	- 곤충 세포에 발현이 시간이 걸려 일정이 약간 지연 되었으나, 발현을 확인하여 감염 여부 확인 예정 - 기 확보한 물질을 대상으로 감염에 영향을 주는 화합물 발굴 예정
연구	10	100	- 면역에 관여하는 단백질 중 1개 확인 - 병원성 단백질 발굴 완료 - 장내 유익균 확보를 위해 꿀벌 내 미생물 동정 실험 완료
field test를 통한 꿀벌의 감염유무 확인	15	100	- <i>M.Plutonius</i> , <i>P.Larvae</i> , <i>A.Apis</i> 의 분석은 Reference gene 과 Positive control 이용하여 Semi quantitative PCR로 발현 유무를 확인 - 농가별로 강균, 약균의 3개 봉군을 선정 하여 봉군별로 유충 및 성충의 시료 채취 후 Filed test 진행 완료
시제품개발 및 홍보	20	100	- 면역증강제에 신규 항(진)균 물질 첨가 후 혼합 비율에 따른 field test 진행 - <i>M.Plutonius</i> , <i>P.Larvae</i> 항진균 시제품 개발(제품명:과워비-부저) - <i>A.Apis</i> 항진균 시제품 개발 (제품명:과워비-백묵) - 제41차, 42차 국내 양봉대회, 제45회 세계 양봉대회 총 2건의 전시회 참가
합계	100	100	

III. 종합의견

1. 대한 종합의견

천연 신규 항(진)균제의 후보물질 다량 확보, 기전 확인 및 연구에 필요한 세포주 개발 등 관련 연구에 기반이 될 수 있는 성과물들과 기존에 천연물을 활용한 제품이 없는 환경에서, 최초로 등록된 “파워비-백목”, “파워비-부저” 시작품 2종에 대해 공인된 기관의 성적서상 매우 높은 효율을 보이는 제품 개발을 진행. 사단법인 한국양봉협회의 도움으로 field test를 통한 신뢰도 구축 및 국내, 국외 양봉대회에서 우수성을 인정받았으며, 양봉협회보에 제품등록이 되는 등, 실제 제품 다량 생산시 출품작으로 우수성과사례로 등재 될 예정이라는 점에서 성과의 우수성을 강조.

“파워비-부저”보다 필요성분 함유량을 높인 “파워비-부저플러스”의 경우 제품 차별화가 어려워, “파워비-부저”로만 판매 진행하기로 결정.

다량 확보된 천연 신규 항(진)균제가 기존의 항생제나 농약을 대체할 수 있는 동물의약품으로 등록될 수 있으며, 농가 뿐만아니라 꿀에 독성 잔류가 없는 만큼 소비자의 인식 제고 가능.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

성과지표상 SCI 논문 2편, 비 SCI 논문 3편 등재이나, 현재 SCI 논문 2편이 등재 되었으며, 추가로 2편의 논문이 under review 중이다. 비 SCI 논문도 2편이 under review중에 있으며, 한달 이내에 등재될 예정이다. 2019년도에도 비 SCI 논문은 3~4편을 review 예정이다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

보조사료로 등록되어있을 경우 지역 양봉원들과 각 지역의 지자체를 통해서만 제품 공급이 가능한데, 동물의약품으로 허가를 받을 시 신뢰도 구축 및 중앙기관의 방역비 예산을 통한 농가보급이 쉽게 가능하리라고 생각됨. 관련시설 구축을 통한 동물의약품 인허가를 자체적으로 득하거나 또는 기존 동물의약품 생산시설을 갖추고 있는 회사와 OEM생산을 진행 예정.

IV. 보안성 검토

○ 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술			
주관연구기관	주식회사 진트론바이오텍	주관연구책임자	박 주 현	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	700,000	233,334	0	933,334
연구개발기간	2016. 9. 5 ~ 2018. 12. 31 (28개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (자체사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 신규 향(진)균체의 개발	목표로 한 5종 중 Anwulignan, Corosolic acid, Acetylshikonin, 4-Hydroxyderricin, Sophoraflavanone G, Kurarinone, Escholine, Pimaric acid 등 8종을 발굴하였으며, 그 외에 3종에 대한 연구 중
② 향(진)균체의 기전 확인	향(진)균체 발굴과 연계 되며 2종의 화합물에 대한 기전 확인 내성에 관여 하는 단백질의 서열을 확인 하여 관여 여부를 확인
③ 꿀벌의 면역 기전 연구	이전에 발굴 한 HOD1의 조절에 대하여 연구 중 봉군 주변에 살고 있는 미생물 2개 균주 동정 중이며 1개 실험 후 논문 투고 완료 - 벌의 장내 미생물 26종을 확보 하고, 이 중 2종에 대하여 동정을 수행 하고 있으며, 또한 1개 실험 후 논문 투고 완료
④ 시작품 판매	1. 향균 활성도 높은 물질 활용하여 세균성 병원균인 M.Plutonius, P.Larvae 병원균에 의해 발병되는 미국 부저병, 유럽 부저병 치료보조제 개발 및 판매 향진균 활성도 높은 물질 활용하여 진균성 병원균인 A.Apis 병원균에 의해 발병되는 백목병 치료보조제 개발 및 판매

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	3	2		1		2	125 0	50				2	4		4	2		0		
연구기간내 달성실적	4	3		1	7.28	3	53.9	0				2	0		5	2		4		
달성율(%)	100	100		100		100	4.3	0				100	0		100			100		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	항균제 및 항진균제 개발 기술
②	꿀벌 전염성 박테리아 및 곰팡이 제어 물질
③	노제마 감염 확인 및 억제제 발굴 기술
④	노제마 감염 억제제
⑤	면역 활성 조절 및 항 염증제 발굴 기술
⑥	신규 미생물 발굴 기술
⑦	시작품 제작
⑧	항(진)균제의 field test 및 실험 방법 확립
⑨	시작품 홍보 및 판매

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술			v					v		
②의 기술	v					v		v		
③의 기술		v						v		
④의 기술	v					v		v		
⑤의 기술			v			v		v		
⑥의 기술				v				v		
⑦의 기술										
⑧의 기술										
⑨의 기술										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	항균제 및 항진균제 개발 기술을 활용하여 기존의 확보한 물질 외에도 다양한 물질을 확보하여 신규 미생물의 성장 억제 조절 물질 개발에 활용예정이며, 특히 식물 또는 해양 미생물의 성장 억제제 개발에 활용 예정
②의 기술	이전에 발굴한 꿀벌 전염성 박테리아 및 곰팡이 제어 물질은 향 후 식물 또는 해양 미생물 등의 성장 억제 효과를 확인 예정
③의 기술	노제마 감염 확인 및 억제제 발굴 기술은 기존의 기술에 진보가 있는 방법으로, 향 후 사용 가능한 물질 또는 단백질 등의 연구에 활용 예정
④의 기술	노제마 감염 억제제는 신규로 발굴된 물질로 향 후 독성등의 연구를 수행하여 사용 가능 여부를 확인 예정
⑤의 기술	면역 활성화 조절 및 항 염증제 발굴 기술은 꿀벌 대상으로 연구가 원활하지 않아 사람세포를 이용하여 발굴 하였으며, 이를 바탕으로 사람에게 적용 가능한 면역 조절 물질 발굴을 지속적으로 수행 예정이며, 이 들 중 꿀벌에 적용 가능한 물질 발굴 예정
⑥의 기술	신규 미생물 발굴 기술은 향 후 꿀벌내의 또는 벌통 주변의 미생물을 꾸준히 확인 하여 이들에 의한 꿀벌의 생태 또는 건강에 영향을 주는 미생물을 확인 예정
⑦의 기술	M.Plutonium, P.Larvae 항진균 시제품 개발(제품명:파워비-부저) A.Apis 항진균 시제품 개발 (제품명:파워비-백묵)
⑧의 기술	면역증강제에 신규 항(진)균 물질 첨가 후 혼합 비율에 따른 field test 진행
⑨의 기술	45회 터키 세계양봉대회 참석 후 미팅 및 홍보 41,42차 전국양봉인의날 참석 후 미팅 및 주요 판매처인 루젠에스씨아이, 디티씨에 지속적으로 판매 진행

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표																			
연구기간내 달성실적	3	2		1		2	1250	50				2	4	4	2		0		
연구종료후 성과창출 계획	4	3		1	7.28	3	53.9	0				2	0	5	2		4		

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술이전시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.