

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000779-01

**생물전환기술을 이용한 어병예방용 천연 항염,
면역증강 활성을 가지는 황금 바이칼린 유도체 개발**

(Development of new scutellaria baicalin complex by the
bioconversion technology which has anti-inflammation
and immune modulation activities against fish pathology)

(주)비에스티 기술연구소

농림수산식품자료실



0004010

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생물전환기술을 이용한 어병예방용 천연 항염, 면역증강 활성을 가지는 황금 바이칼린 유도체 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 1월 10일

주관연구기관명 : (주)비에스티

주관연구책임자 : 이 호

세부연구책임자 :

연 구 원 : 김 철

연 구 원 : 현 광 옥

연 구 원 : 김 도 경

연 구 원 : 김 종 태

협동연구기관명 : 한국해양대학교

산학협력단

협동연구책임자 : 조 성 환

요 약 문

I. 제 목

생물전환기술을 이용한 어병예방용 천연 항염, 면역증강 활성을 가지는 황금 바이칼린 유도체 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

수산양식용 어병 예방 및 치료용 항생제 또는 포르말린 등의 화합물을 대체할 수 있는 천연추출물로 제품을 개발함으로써, 경쟁력 있는 천연물의 제품화 기술을 관련업계에 전파하고, 수산물 품질향상을 통하여 수산물 수출증대로 수산업 관련 어민들의 소득증대 뿐만 아니라 관련시장의 수입대체효과 및 항생제내성을 감소시킴으로써 국민들의 건강증진에 기여하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 주관기관
 - 천연 생약자원으로 부터 어병 예방 및 치료용 항생제 분리추출공정 최적화
 - 제형 최적화 및 pilot 생산 공정 최적화 통한 천연항균제 시제품 개발
- 협동기관
 - 천연 생약자원 추출물의 사료 내 첨가에 따른 넙치 및 메기의 성장, 체조성과 혈액성상 및 질병의 면역성에 미치는 영향 평가 조사

IV. 연구개발결과

- 천연 생약자원으로 부터 어병 예방 및 치료용 항생제 분리추출
- 제형 최적화 및 pilot 생산 공정 최적화 통한 천연항균제 시제품 개발
- 사료내 천연 생약자원 추출물의 농도별 첨가에 따른 넙치의 성장, 체조성과 혈액성상 및 내병성에 미치는 영향을 성공적으로 수행

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 수산양식용 항생제 대체용 천연항균제 시판
- 헛집 등의 수조에 대한 천연 위생항균처리제 시판
- 관상용 수조에 대한 천연 위생항균처리제 및 이끼방지제 시판

SUMMARY

I. Subject

Development of new scutellaria baicalin complex by the bioconversion technology which has anti-inflammation and immune modulation activities against fish pathology

II. Objective and necessity of research and development

We develop the product with the preventative effect to disease of the cultivation fish and it will be able to substitute the treatment of antibiotics and synthetic antiseptics (formalin etc.). Also it propagates the natural product manufacture technique which is competitive power to the relation industry. Quality increase of the cultivated marine products leads the export increase and the import-replace effect on the market. Also it will decrease an antibiotic resistance of the pathogens and contribute to the health improvement of the citizens.

III. Research and development contents and scope

- Subjective agency

- From natural herb medicine resources fish disease preventive and antibiotics extraction process optimization
- From formulation optimizations and pilot production process optimizations production of prototype

- Coordinated agency

- Investigation of the growth rate, body ingredient, blood ingredient and immunity power of the flatfish and the catfish which it feeds with the natural antibiotics

IV. Research and development result

- From natural herb medicine resources fish disease prevention and

therapeutic antibiotics extraction

- From formulation optimizations and pilot production process optimizations natural antibiotic prototype development
- In cultivation of flatfish and catfish the natural antibiotics showed an affirmative effect on immunity power

V. Research result and result application plan

- launching of natural and/or substitutional antibiotics for cultivation of fish
- launching of natural hygienic antibiotics for the tanks in sliced raw fish eatery
- Launching of the natural hygienic antibiotics and moss inhibitor for the ornamental water tank

CONTENTS

Chapter 1	Synopsis of research and development subject	7
Chapter 2	Domestic and foreign technical development present condition	9
Chapter 3	Research and development accomplishment contents and result ...	12
Chapter 4	Coherence in attainment of objective and relation field	57
Chapter 5	Research and development result and result application plan	60
Chapter 6	The overseas scientific and technical information which it collects from research and development process	61
Chapter 7	References	62

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황	9
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	12
제 1 절	정제공정 최적화	12
제 2 절	생물전환	22
제 3 절	항균활성 분석	29
제 4 절	시제품 생산	37
제 5 절	양식어류에 대한 효능 분석	40
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	57
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	60
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	61
제 7 장	참고문헌	62

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

현대사회는 국민의 소득수준 향상에 따라 식생활이 육류에서 수산물로 중심축이 변하여 국가마다 수산물의 소비량은 점차 증가하고 있으나, 어업생산량은 환경오염과 수산자원의 남획으로 인해 현재의 어업생산량 6천만 톤 이상의 증가는 기대하기 어려운 실정이다. 따라서 부족한 생산량은 양식어업을 통해 기대되고 있다. 농축산업의 생산성이 한정된 토지에 영향을 받고 있는 것처럼, 양식산업도 연안 수괴의 한정적인 이용에 제한을 받으면서, 이용효율을 극대화하기 위하여 고밀도 양식이 널리 확산되고 있다. 특히 한국의 경우 산업화에 의한 수질오염, 연안개발에 따른 매립 및 수자원 보호의 환경정책 등으로 인해 양식을 위한 수면적이 줄어들면서 고밀도 양식은 필요불가결한 요소가 되었다. 고밀도 양식이 양식의 효율을 높일 수는 있으나, 인위적인 고밀도 양식 시스템에서의 어류는 다양한 형태의 스트레스(고밀도 사육, 물리적 장애, 수질 악화, 항생제 및 화학약품의 남용, 선별 등등)에 노출되어 있다(Donaldson, 1981; Wendelaar Bonga, 1997). 이러한 양식조건은 사육 중인 어류의 최적 성장을 방해하며(Wedemeyer, 1976; Wardle, 1981), 주변 환경에 의해 체내대사와 생리적 상태가 부정적 변화를 가져오게 한다(Clark et al., 1981). 이러한 예로서, 종묘생산 및 양성과정에 있어서 에너지 대사와 성장률 저하(Barton and Iwama, 1991) 및 사망 후 육질의 변성(Lowe et al., 1993) 등을 유발하여 궁극적으로는 양식 생산량의 감소를 가져온다. 또한, 어류의 면역기능을 억압함으로써 질병에 대한 감수성을 증가시키며 낮은 성장률을 유발하는데 직접적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Pickering, 1992). 그리고 비특이적 면역조절 능력을 저하시키고 병원균으로부터 감염을 일으킨다. 척추동물에 있어 비특이적 방어는 병원균의 감염시 첫 번째 방어선으로 알려져 있으며, 선천적인 면역시스템의 활성화에 의해 병원균으로부터 저항할 수 있는 능력이 강화될 수 있음을 보고되고 있다(Anderson and Siwicki, 1994).

이러한 문제로 인한 어류의 생산성 감소와 함께 가장 큰 문제점은 양식 시설 및 부화장내에 서식하고 있는 상재세균의 영향이 큰 것으로 보고되고 있다(Vadstein, 1997). 병원성 세균 보다는 감염의 기회가 많이 주어진 이러한 세균에 의한 피해가 해마다 증가하고 있음을 보고하고 있다(Munro et al., 1995). 세균성 질병으로 인한 문제점을 해결하기 위해 사육수를 소독하거나 혹은 항생제를 사용하기도 하는데, 이러한 방법들은 세균 개체군간의 균형을 불안정하게 만들며,

궁극적으로는 단시간적인 해결책에 지나지 않는다. 또한 최근 항생제 사용의 증가로 인해 항생제에 대한 내성균주의 발생이 계속적으로 보고하고 있으며(Aoki, 1992), 장기간에 걸친 항생제의 사용은 어류에게 많은 스트레스를 줄 뿐만 아니라 환경오염 및 인체에 안 좋은 영향을 미칠 수 있는 문제점들을 안고 있다. 이를 해결하기 위해 많은 양식 사양가들은 화학약품 및 항생제 사용제를 무분별하게 투여하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구과제를 통해 양식어류의 고밀도 사육을 통해 발생하는 문제점을 해결하기 위한 방법 중 하나인 무분별한 항생제 사용을 통한 양식어류의 안전성과 환경에 발생할 수 있는 문제점을 해결하기 위해서 천연항생제 개발을 통해 양식어류의 면역성을 증가시킴은 물론 환경에 발생할 수 있는 문제점을 차단하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 및 국외 관련기술 동향

1. 국내기술동향

현재까지 항생제 대체물질로는 생균제와 천연식물제제, 광물질 등이 있는데, 이들 대체물질 가운데 생균제와 천연식물제제에 대한 연구 및 신제품이 속 속 선보이면서 효과면에서도 큰 성과를 보이는 것으로 나타나고 있다. 특히 항생제 사용에 대한 농수축산농가의 절감노력과 사용규제로 항생제 대체물질 시장은 어려움을 겪고 있는 동물약품업계의 숨통을 틔어줄 효자로 등장할 전망이다. 이를 반영하듯 중견 동물약품 생산업체와 생명공학 벤처기업을 중심으로 항생제 대체물질 개발에 적극 나서고 있다. 유한양행, 코미팜, 다원케미칼, 중앙바이오텍, 고려비엔피, 한동, 진바이오텍 등은 이미 제품을 선보이거나 개발 중에 있는 것으로 알려졌다. 특히 유한양행은 천연식물성 에센셜 오일을 주성분으로 하는 성장촉진제 “프레스타 에프 콘”을 시판하여 업계의 관심을 끌고 있다.

이 제품은 100% 천연식물추출물로 약용성 기능을 가진 허브와 에센셜 오일, 플라보노이드, 뮤실리지를 추출해 만든 사료첨가제이다. 또한 생명공학 벤처기업인 진바이오텍이 개발한 천연 과일발효 생균제인 “락토케어”는 병원성 대장균 및 살모넬라와 같은 유해균에 대한 억제효과가 탁월해 필리핀에 수출되고 있는 실정이다. 이상과 같이 국내 동물약품업체들의 항생제 대체물질 개발은 빠르게 진척되고 있지만 완전하게 항생제를 대체할 수 있는 천연물질에 대한 기술적 장담은 아무도 하지 못하고 있는 실정이다. 이는 효능과 안정성에 대하여 제품으로서의 품질평가가 제대로 이루어지지 않고 있을 뿐만 아니라 이러한 개발제품에 대하여 기술적으로 인증해줄 수 있는 국가적인 공인검정 시스템이 없다는 커다란 문제점을 가지고 있기 때문이다.

2. 국외기술동향

1968년에 발간된 영국의 Swann report에서는 항생제 내성의 위험성과 이로 인한 인류와 동물 건강에 대한 우려가 대두되면서 현재에는 양식사료 내 항생제의 첨가에 대한 재평가 및 사용 규제에 이르게 되었다. 항생제를 양식동물에 투여할 경우 항생제에 대한 내성이 생기고 축산물 내

잔류에 의한 인체에서의 감수반응의 문제점이 제기되면서(Solomons, 1978), EU를 중심으로 항생제 사용의 규제 및 금지가 확산되고 있다. 2004년 7월 스위스 제네바에서 개최된 CODEX 총회에서도 비임상용 항생제 사용과 관련된 내성 특별반 구성이 논의되는 등 각국에서 축·수산물 항생제에 의한 내성을 증가가 중요한 사안으로 부각되었다.

동물산업 분야에서 현재까지 연구된 항생제 대체제로는 생균제(probiotics), 효모제(yeast culture), 효소제(enzymes), 호르몬제(hormones), 고효율 광물질 제제(high available minerals) 및 허브를 포함한 천연생리활성물질(natural bioactive materials) 등이 있다(Wenk, 2000). 이외에도 논란의 여지가 있으나 올리고당, 유기산과 같은 산 조절제, 향신료 역시 항생제 대체제로서 거론되고 있다. 항생제 대체제가 갖추어야 할 조건으로 성장개선 효과와 질병예방 효과를 들 수 있는데, 두 가지를 만족시킬 수 있는 대체물질의 개발은 여전히 쉽지 않은 문제로 생각된다. 효모제, 효소제, 호르몬제와 고효율 광물질 제제의 이용 시 성장개선 효과는 인정되지만, 생리활성 부여 및 질병예방 효과에 대해서는 명확한 결과를 얻기 어려운 것으로 판단된다.

이미 오래 전부터 생균물질의 항생제 대체 효과에 대해서는 많은 연구가 이루어졌으며, 국내외적으로 항생제 대체제로서 가장 많은 제품이 소개되었다. 근래에 약용식물과 향료에서 추출한 에센셜 오일이나 허브 polysaccharide 물질들이 소화 흡수를 돕는 효과가 있으며, 강력한 살균작용을 발휘한다는 점에 착안하여 단일제제 또는 여러 물질을 혼합한 제제들이 일부 소개된 바 있다. 이 중 oregano extract, clove oil 및 cinnamon 추출물의 향미생물 효과가 잘 알려지면서 다양한 제품이 수입되어 국내에서 소개되었다. 최근에는 국내의 산야초에서 추출한 성분에도 대해서도 다양한 연구가 진행되어 일부 식물 추출물에서 유효한 효과가 있음이 밝혀지기도 하였으나 제품간의 비교 검토와 명확한 검증 자료는 충분하지 않은 실정이다.

3. 기술동향 분석과 향후 전망

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
진바이오텍	천연과일발효 생균제 개발	락토케어 probiotics 제품화
운석식품	천연유산균, 효모, 유기산, 탄수화물 복합미생물 제제개발	유산균 probiotics 제품화
나람바이오텍	양돈양계 무항생제 사료개발	무항생제 전용사료공장 준공
유한양행	천연식물성 에센셜오일 개발	항생제 대체 천연오일제품개발

현재 국내외 연구동향은 probiotics 개발이 주류를 이루고 있으며 천연식물성 에센셜오일과 무기물질에 대한 기술개발이 소규모로 진행되고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 제품들은 기술적 유효성과 관능, 내성 그리고 제품으로서의 효능 등에서 문제점을 가지고 있어서, 아직까지 완전히 항생제를 대체할 수 있는 개발제품은 없는 것으로 평가되고 있다. 최근 동물용 항생제를 대체할 수 있는 물질로서 천연 추출물에 대한 관심이 효능과 독성적인 측면뿐만 아니라 관능적인 측면에서 기술적인 필요성이 점차 증가하고 있는 실정으로, 양식현장에서 천연항균제로 적용할 수 있는 현실성 있는 새로운 천연소재의 제품개발이 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 정제공정 최적화

1. 천연물 library

생리활성 물질 검색 또는 신규 구조의 생리활성전환 산물을 검색하기 위한 천연물 소스를 아래의 표 1 과 같이 1,000 여점을 확보하였다. 구축한 천연물 library는 random selection에 의한 무작위 검색이 아닌 효능검색기술을 기반으로 하는 specific selection 방법으로 효율성이 높다.

이러한 library 구축은 향산화, 항노화 생리활성 물질 검색뿐만 아니라 미백, 항균, 항염 등의 다양한 생리활성 물질을 검색하는 원천기술자원으로서 활용도가 매우 높을 것으로 판단된다.

2. 토양 미생물 및 배양액 분리

가. 균주 및 시약

국내에서 채취한 토양시료로부터 다양한 종류의 미생물을 분리하고 항균활성이 증가된 키토올리고당으로의 전환에 관여하는 biocatalytes를 생산하는 특정균주를 검색하였다. 항균활성 검정을 위한 screening에는 본 실험실에 보관중인 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 균주를 이용하였다. 그 외의 실험에 사용한 모든 시약은 EP (extra pure) grade의 시약을 사용하였다.

나. 배지 및 배양방법

토양 미생물의 보전 및 균주의 sporulation을 위하여 ISP #4 배지에서 oatmeal이 10% 첨가된 한천 배지가 사용되었다. 기초발효조건 검토를 위한 토양 미생물의 액체 배양은 ISP #4 배지 조성에서 agar가 첨가되지 않은 배지를 기본으로 하여 250ml flask (broth volume 50ml, triplicate)에서 30°C, 180 rpm의 조건으로 수행하였다. 균주의 배양과 보존을 위하여 사용된 여러 배지의 조성은 다음과 같다.

▶ ISP #1 배지 : Tryptone - yeast extract broth

Bacto-Tryptone (Difco)	5.0g
Bacto-Yeast Extract (Difco)	3.0g
Distilled water (DW)	1.00 ℓ
살균전 pH를 7.0으로 조정	

▶ ISP #2 배지 : Yeast extract-malt (YM) agar

Bacto-Yeast Extract (Difco)	4.0g
Bacto-Malt Extract	10.0g
Bacto-Dextrose	4.0g
Distilled water	1.00 ℓ
pH를 7.3으로 조정후 Bacto agar 20.0g을 첨가하고 멸균한다.	

▶ ISP #3 배지 : Oatmeal agar

Oatmeal	20.0g
Oatmeal 20.0g를 증류수에 1 ℓ에 넣고 20분간 침지 후, 거르로 여과를 하고 다시 증류수를 가하여 1 ℓ로 조정하였다.	
Add trace salts solution	1.0ml
NaOH로 pH를 7.2로 조정 후 Agar 18.0g을 첨가하고 멸균한다.	

▶ ISP #4 배지 : Inorganic salts- starch agar

- Solution I : starch suspension

Difco soluble starch 10.0g에 찬물을 소량 가하여 paste 상태로 혼합, 현탁한 후 최종 부피가 50ml가 되도록 증류수를 가하였다.

- Solution II: Inorganic salts solution

K ₂ HPO ₄	1.0g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0g
Nacl	1.0g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0g
CaCO ₃	2.0g
Distilled water	500.0 ml

Trace salts solution (1) 1.0 ml

pH는 7.0~7.4로 조정한다.

solution I 과 II를 혼합한 후 agar 20.0 g을 첨가하고 멸균한다.

▶ ISP #5 배지 : Glycerol - asparagine agar

L- asparagine 1.0g

Glycerol 10.0g

K₂ HPO₄ 1.0g

Distilled water 1.0 ℓ

Trace salts solution 1.0ml

pH를 7.0~7.4로 조정 후 agar 20.0g을 첨가하고 멸균한다.

▶ ISP #6 배지 : Peptone - yeast extract iron agar

Bacto-Peptone 15.0g

Proteose peptone 5.0g

Bacto -Yeast Extract (Difco) 1.0g

Ferric ammonium citrate 0.5g

K₂ HPO₄ 1.0g

Sodium thiosulfate 0.08g

Bacto- Agar 15.0g

Distilled water 1.0 ℓ

멸균전 pH를 7.0~7.2로 조정

표 1 천연물 library

BST No.	Broth	항균활성	항진균활성	비고
BST-PLT0001	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0002	MeOH	G+	ND	
BST-PLT0003	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0004	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0005	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0006	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0007	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0008	MeOH	G+	ND	
BST-PLT0009	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0010	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0011	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0012	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0013	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0014	MeOH	G+	ND	
BST-PLT0015	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0016	MeOH	G+	ND	
BST-PLT0017	MeOH	G+/G-	ND	broad spectrum
BST-PLT0018	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0019	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0020	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0021	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0022	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0023	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0024	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0025	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0026	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0027	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0028	MeOH	G+	ND	
BST-PLT0029	MeOH	G+	ND	
BST-PLT0030	MeOH	G+	ND	
BST-PLT0031	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0032	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0033	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0034	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0035	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0036	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0037	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0038	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0039	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0040	MeOH	G+	ND	potent G+
BST-PLT0041	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0042	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0043	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0044	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0045	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0046	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0047	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0048	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0049	MeOH	ND	ND	
BST-PLT0050	MeOH	G+	ND	

표 2. 추출활성분획 library

BST No.	추출분획	항산화 활성	항균활성	비고
BST-PLT0001	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0002	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0003	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0004	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0005	EtOH	+	++	
BST-PLT0006	EtOH	+	+++	
BST-PLT0007	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0008	EtOH	+	+	
BST-PLT0009	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0010	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0011	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0012	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0013	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0014	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0015	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0016	EtOH	ND	ND	생물전환효소 생성
BST-PLT0017	EtOH	+	++	
BST-PLT0018	EtOH	+	++	
BST-PLT0019	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0020	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0021	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0022	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0023	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0024	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0025	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0026	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0027	EtOH	+	ND	
BST-PLT0028	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0029	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0030	EtOH	ND	ND	생물전환효소 생성
BST-PLT0031	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0032	EtOH	+	++	
BST-PLT0033	EtOH	+	+	
BST-PLT0034	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0035	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0036	EtOH	+	+	
BST-PLT0037	EtOH	+	+	
BST-PLT0038	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0039	EtOH	ND	ND	
BST-PLT0040	EtOH	ND	ND	

3. 추출방법과 분획조합에 따른 항균력 평가

가. 용매추출 및 제형 최적화

황금추출물은 국내산 황금(*Scutellaria baicalensis*) 건고물(한국생약협회공판장, 충북 청주)을 사용하여 황금 건고물에 에탄올과 정제수의 혼합용액을 분쇄물의 10배(중량비) 가량 가하여 냉각콘덴서가 부착된 추출기에서 약 80℃의 온도로 24시간동안 가열하여 추출물을 얻고 여과하여 감압·농축시킨 후 농축추출액을 얻었다. 얻어진 농축추출액의 2배(중량비)에 해당하는 정제수를 가한 다음 에틸아세테이트, 메칠렌클로라이드 등의 비극성용매를 4배(중량비) 가량 첨가하고, 강하게 진탕한 후 상층인 비극성 용매층을 분리하여 감압 농축하여 황금추출물을 얻었다. 추출단계별로 관능과 물성이 개선되었고 polyol 용매 최적화 처방을 확립함으로써 제품으로 사용할 수 있는 최적의 제형을 확립하였다.



1단계 2단계 3단계
3차 추출후 polyol 1차 처방 polyol 2차 처방

나. 분리 및 구조분석

(1) 추출물의 분리, 정제

Sephadex LH-20 column chromatography 실시한 결과를 보면 MeOH 농도가 증가하는 분획 후반부에 미백활성 분획이 검출되는 것으로 보아 극성용매 분획이 증가할수록 활성분획 분리가 증가되는 것으로 판단되었다. Sephadex LH-20 column chromatography 분획 16에서 19를 회수하고, HPLC(high performance liquid chromatography)를 실시하여 활성성분을 분리·동정한 결과 황금으로부터 향산화, 미백활성의 주요 활성성분으로 분리된 물질은 baicalin인 것으로 확인되었다.

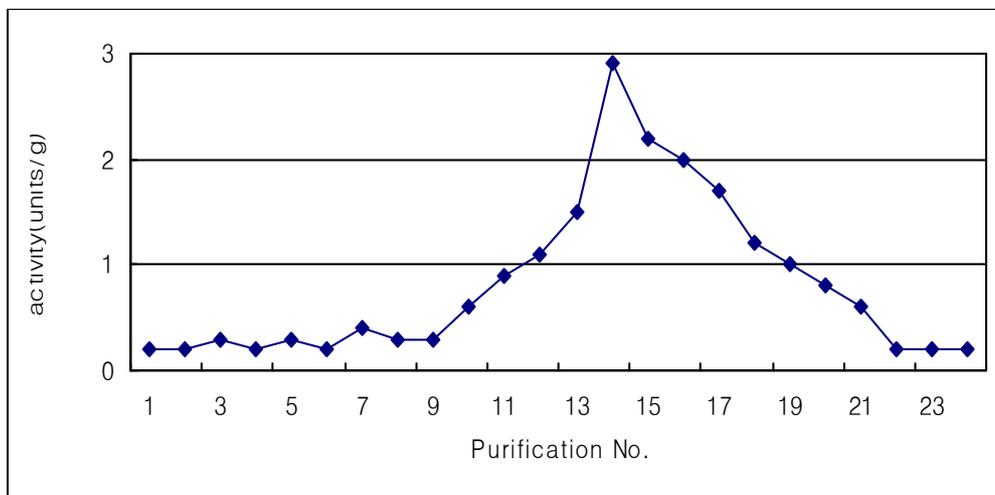


Fig. 1. Silica gel chromatography spectrum for *Scutellaria baicalensis* extracts. The sample solution was applied to the column (2.0×100cm) equilibrated with 20.0 mM phosphate buffer (pH7.0) The flow rate was 10.0 ml/hr.

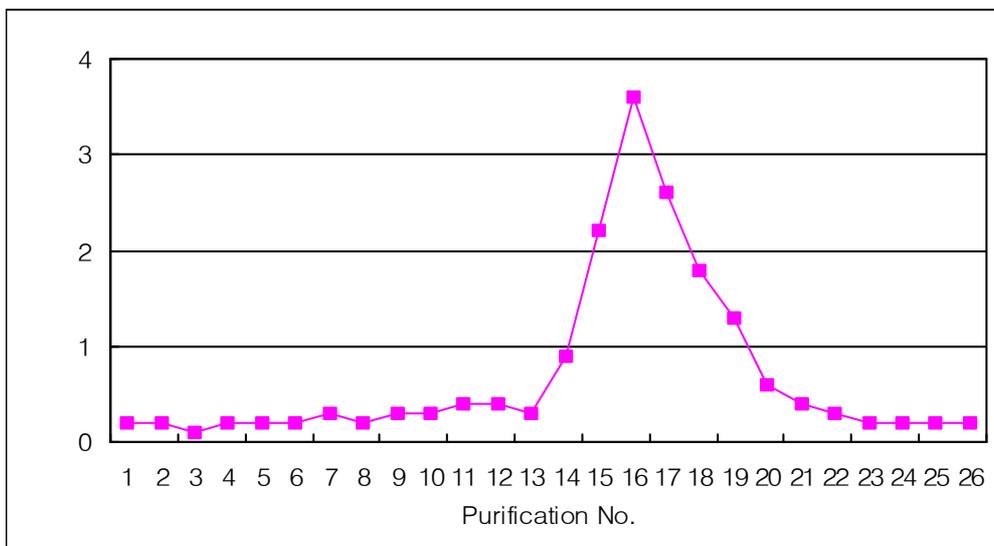


Fig. 2. Sephadex LH20 chromatography spectrum for *Scutellaria baicalensis* extracts. The sample solution was applied to the column (3.0×30cm) equilibrated with 10.0 mM phosphate buffer (pH 6.5) and then eluted with 0.01–0.2 M NaCl–10 mM phosphate buffer. The flow rate was 15 ml/hr.

(2) 분리정제 구조분석

Sephadex LH20 chromatography를 실시하여 얻은 활성분획을 모아서 HPLC 분석을 실시하였고, Proton nuclear magnetic resonance spectrophotometer($^1\text{H-NMR}$) spectrum은 Bruker AM-300(300MHz)와 Varian Unity 500(500MHz) spectrophotometer를 사용하여 측정된 결과는 다음과 같다(Fig. 3). 이상의 결과를 바탕으로 황금추출물의 주 활성분획에서 분리한 미백활성물질은 baicalin 계열의 플라보노이드 물질인 것으로 판단되었다(Fig. 4).

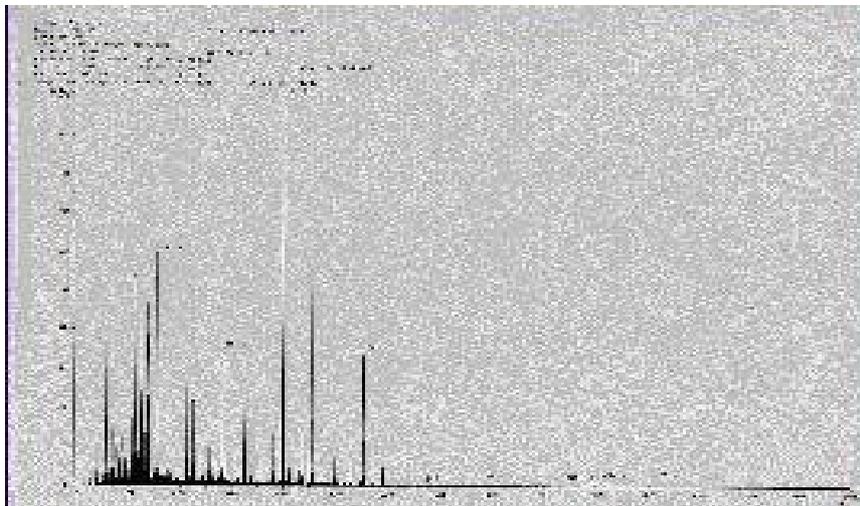


Fig. 3. NMR Profile of *Scutellaria baicalensis* activity ingredient (baicalin).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 4.55 (dd, 5.6, 11.0, H-6); 2.66 (dd, 11.0, 13.2, H-7B); 0.78 (t, 7.3, H-16); 1.09 (d, 6.4, H-17); 3.01 (dd, 7.6, 14.5, H-18A); 3.16 (dd, 6.8, 14.5, H-18B); 5.07 (m, H-19), 1.64 (br s, H-21); 1.70 (br s, H-22); 1.22 (s, H-24); 1.39 (s, H-25); 4.92 (br t, ca 6.5, H-27); 1.70 (br s, H-29); 1.57 (br s, H-30); 1.05 (s, H-31); 5.07 (m, H-34); 1.60 (br s, H-36); 1.64 (br s, H-37).

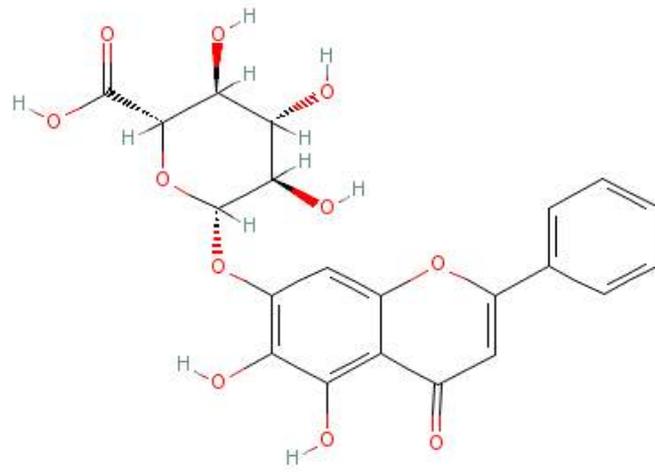


Fig. 4. Flavonoid structure of *Scutellaria baicalensis* extracts (baicalin).

제 2 절 생물전환

천연물 library를 사용하여 생물전환 효소활성을 검색 한 결과 Table 3, 4와 같이 전체 library의 약 1-2% 정도가 활성을 보였다. 이는 다른 연구자들의 검색기술 방법과 유사한 검색빈도이고, 이러한 방법으로 검색한 후보물질의 제품화 성공가능성이 높을 것으로 사료된다. 결과를 종합하면, 방선균기원, 식물기원 library 공통으로 항산화활성을 가지는 추출물들은 98% 이상이 항균활성을 가지는 것으로 나타나 항산화 기전과 항균작용과는 연관성을 가지는 것을 알 수 있다. 그러나 생물전환 효소생성은 항산화활성 또는 항균활성과 연관성은 없는 것으로 나타났다.

1. 생물전환 후 활성검색

상기 검색법으로 황금추출물을 발효 전환시키는 천연물로서 BST22, BST48, BST127을 검색하였는데, 이 중에서 특히 BST127의 전환활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 그리하여 BST127에 대하여 배양을 실시하고 효소정제실험을 진행하였다. BST22, BST48, BST127의 생물전환 활성은 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Bioconversion activity of BST22, BST48 and BST127

library	MIC (ug/ml)		activity (times)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
BST22	2,000/1,000*	1,000/250	2	4
BST48	2,000/500	1,000/500	4	2
BST127	2,000/250	1,000/63	8	16
Control	2,000/2,000	1,000/1,000	-	-

* : MIC values of before conversion /after conversion

Broth dilution method assay was carried out to determine the antimicrobial activity of bioconverted ferment extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

The results showed that BST127 was higher in antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, than BST 22 and BST 48. These data suggest the potential advantage of bioconversion process to improve the antimicrobial efficacy.

2. 생물전환 효소정제

BST127의 배양액으로부터 여과를 거쳐 조효소액을 조제하고 황산암모늄 침전을 30%에서 80%까지 실시한 다음 이온크로마토그래피와 젤 여과를 실시하여 정제를 실시하였다. 최종 회수율은 11%이고 정제도는 110배 증가하였다(Table 4).

최종단계까지의 정제공정은 제품화과정에서 차지하는 비용이 높고 정제효소량이 미량이기 때문에 생산 공정에 적용하기에는 어려운 것으로 판단된다. 그리하여 정제 2단계 황산암모늄 침전 후의 투석 조효소액을 황금발효추출물 생산에 사용하였다.

Table 4. The process of enzyme purifications

Step	Activity (Unit)	Protein (mg)	Specific activity (Unit/mg protein)	Yield (%)	Purity (fold)
Crude broth	225.0	264.7	0.9	100	1
Ammonium sulfate precipitation (30→80%)	92.2	25.3	3.7	41	4.1
DEAE-Sephadex A-50 Ion Chromatography	31.1	0.9	34.6	14	39
Sephadex G-75 Gel Chromatography	23.8	0.24	99.1	11	110

One unit of activity was defined as a change of 0.1 absorbance unit at 280nm. The specific activity was expressed as the number of units activity per milligram of proteins.

3. 생물전환 플라보노이드 분석

생물전환 플라보노이드의 HPLC 분리 조건을 확립하여 분리정제 및 공정 Solvent 는 Acetonitrile : 0.5% Phosphoric acid(27:73, v/v)를 사용하였고, u-Bondapak C18 silica column(3.9×30 cm)을 사용하였고 용매조건은 15 ul injection, 280 nm detection, 1.0 ml/min을 사용하였다. 상기 분석조건으로 HPLC 분석한 결과 7분대에 검출되는 단일 피크로서 baicalin 계열의 푸라보노이드로 추정되었다(Fig.5).

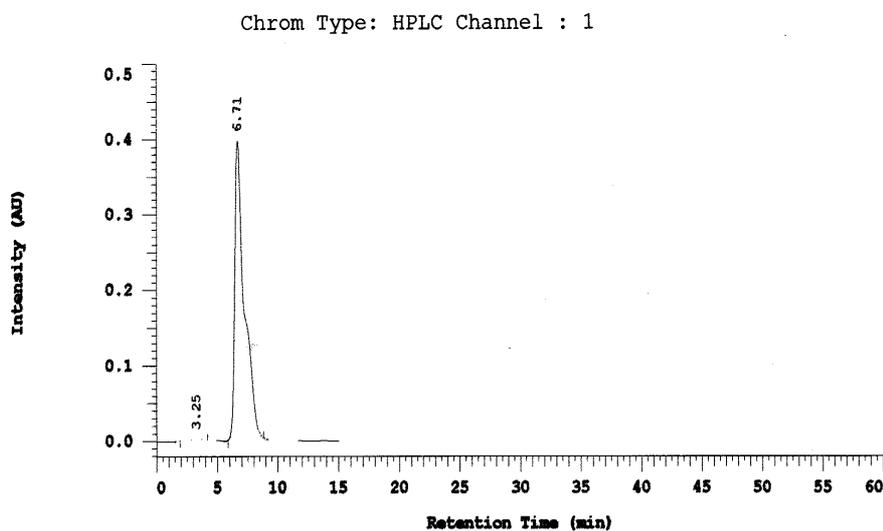


Fig. 5. HPLC analysis of *Scutellaria baicalensis* extracts. This figure showed that HPLC profile before the bioconversion process. Solvent system of MeOH-acetonitrile-water (85:5:10) of the conventional method was used.

4. 생물전환 황금추출물의 항균활성 및 항산화 활성

생물전환된 푸라보노이드의 물질변환과 항균활성 변화를 측정하기 위하여 상기 HPLC 분석과 bioassay를 통한 항균활성을 측정하였다. HPLC 결과에서 생물전환 후 활성성분의 피크가 변경되는 것을 확인하였으며(Fig.5, 6), 이렇게 생물전환된 활성분획의 항균활성이 증가되는 것을 확인하였고(Fig. 7), DPPH assay를 통한 in vitro 항산화 활성을 측정한 결과, 항균활성의 경우와 같이 발효전환 추출물의 항산화 활성도 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 8).

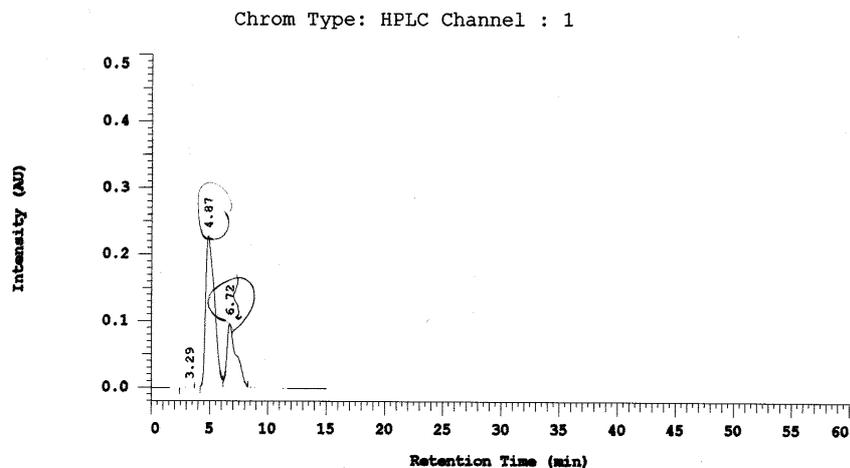


Fig. 6. HPLC profile of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts. This figure showed that HPLC profile after the bioconversion process was transfer the peak profile and improved the antimicrobial efficacy. Solvent system of MeOH-acetonitrile-water (85:5:10) of the conventional method was used.

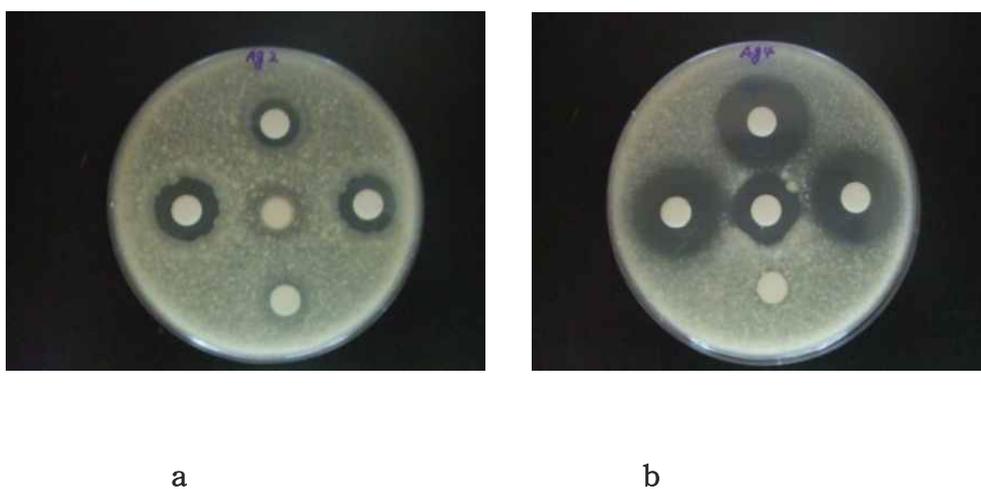


Fig. 7. Antibacterial activity of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts (BMB) in the bioassay. It showed higher activity than in the before fermentation. a. before fermentation, b. after fermentation

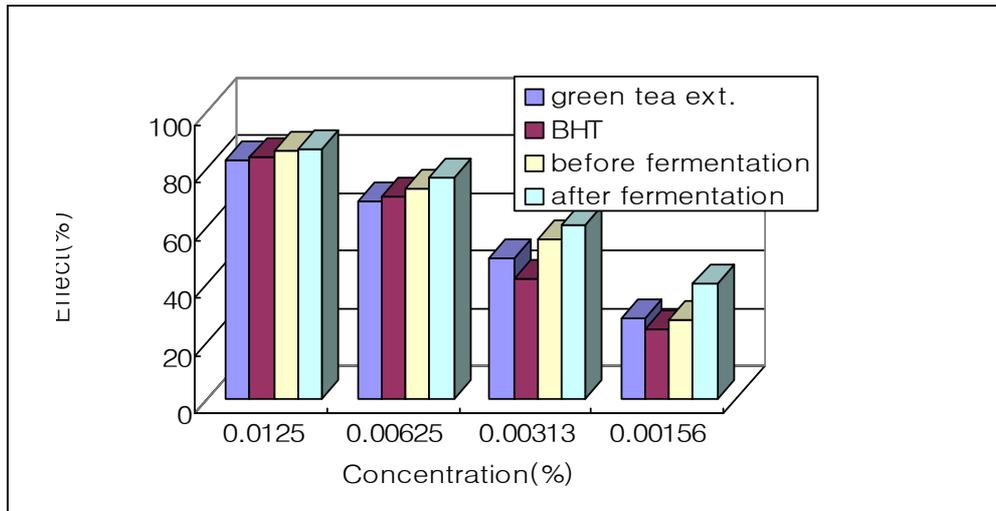


Fig. 8. Antioxidation activity of fermented *Scutellaria baicalensis* extract (BMB). DPPH radical scavenging activity of BHT, green tea extract, before fermented extracts and after fermented extracts. The radical scavenging ability of varying concentrations (0.00156–0.0125 %) of test reagents was analysed by measuring their inhibitory effects on the absorbance of the DPPH radicals. Absorbance of the reaction was measured at 517 nm. The results were expressed as mean \pm SD of % inhibition of the absorbance of the DPPH radicals. DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; BHT, butylated hydroxy toluene; BMB, bioconversion multifunctional biocide.

5. 생물전환 황금추출물의 물성개선

가. Decolorization & Deodorization

추출분리과정의 정제공정을 통하여 관능적 측면에서의 색상과 원료의 이취를 개선할 수 있었다(Fig. 9). 특히 2차 정제공정인 silica gel chromatography 공정과 최종 정제공정인 Sephadex LH20 chromatography 공정에서 관능적 물성이 상당히 개선되었다.

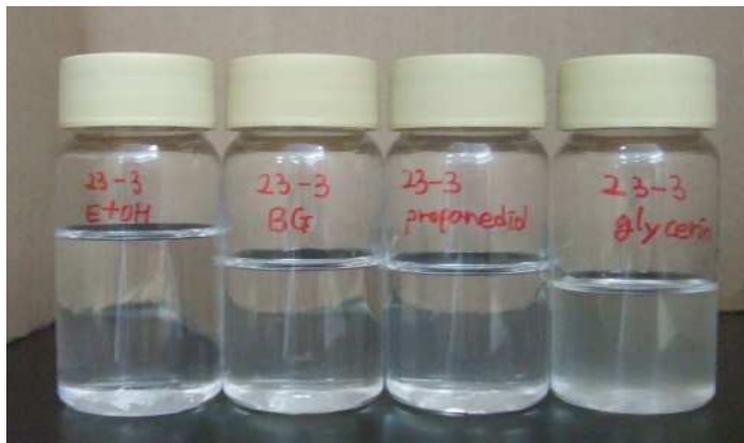


Final extraction <--- 2nd extraction <--- 1st extraction

Fig 9. Advanced effect of sensory and properties on process. This figure showed that decolorization of BMB after process (step 1 to 3) was achieved. Step 1: hot water extraction and concentration process, Step 2: fermented bioconversion process, Step 3: UF purification process.

나. 발효 황금추출물의 수용성

발효 황금추출물을 에탄올과 1,3 butyleneglycol, 1,3 propanediol 그리고 글리세린에 1% 용해시킨 결과 각종 용매에 대하여 용해도가 우수한 것으로 나타났다(Fig. 10). 이러한 결과를 바탕으로 발효전환 황금추출물의 다양한 제품제형에 대한 적용성이 확대될 수 있음을 예시해주는 결과이다.



EtOH 1.3-BG 1.3-propanediol Glycerin

Fig. 10. Solubility of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts. This figure showed what solvent is suitable for BMB.

6. 발효 황금추출물의 항균 기전

발효 황금추출물의 항균활성 작용기전은 세포막의 손상저해를 통한 비가역적 항균활성을 나타내는 것으로 판단된다(Fig. 11). 이러한 작용기전은 EDTA 등과 같은 세포벽손상저해 기전을 가지는 물질과 병용하였을 경우 항균활성 병용시너지 효과가 뚜렷하다는 실험결과로 설명할 수 있으며, 이러한 결과는 주사전자현미경사진으로 세포벽이 비가역적으로 뒤틀린 것을 확인하였다.

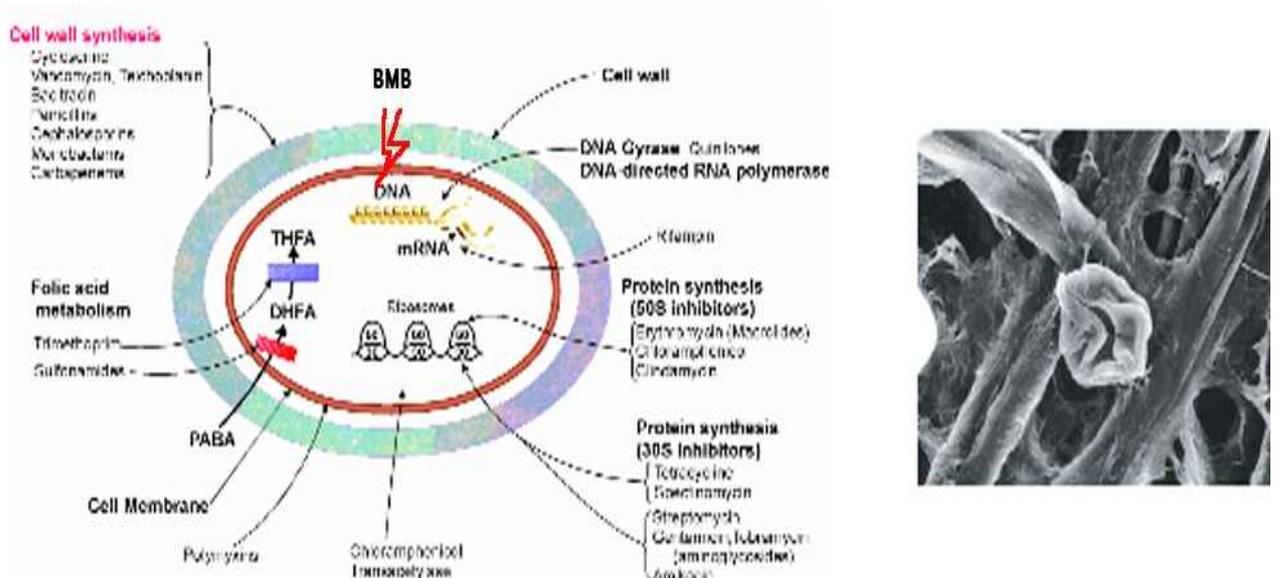


Fig. 11. Antibacterial activity mechanism of fermented *S. baicalensis* extracts (BMB).

제 3 절 항균활성 분석

1. 최소 발육저해 농도시험(MIC)

MIC 항균력 평가 결과, 발효전환 황금추출물은 그람양성과 그람음성균뿐만 아니라 효모와 곰팡이에 대해서도 강력한 항균력을 가지는 광범위한 항균스펙트럼을 가지는 것으로 확인되었다(Table 5). 이러한 항균활성은 benzoate, paraben 등의 합성 방부제와 그리고 현재 시장에 널리 사용되고 있는 자몽종자추출물과 유사한 항균활성 강도와 스펙트럼을 가지는 것으로 판단되어, 실제 제품에 적용할 수 있는 천연추출물 제품으로서 주목받을 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

Table 5. MIC results of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts

Microorganism	BMB	Benzoate	M-paraben	GSE
<i>B. subtilis</i> ATCC21770	0.078	0.039	0.039	0.078
<i>S. aureus</i> ATCC29213	0.156	0.078	0.078	0.156
<i>E. coli</i> ATCC25922	0.156	0.156	0.078	0.156
<i>Sal. Typhimurium</i> ATCC14028	0.039	0.039	0.078	0.039
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0.156	0.078	0.039	0.156
<i>S. cerevisiae</i> ATCC24858	0.200	0.200	0.200	0.200
<i>C. albicans</i> ATCC32354	0.039	0.039	0.200	0.039
<i>A. fumigatus</i> ATCC90906	0.039	0.039	0.200	0.039

The antimicrobial activity was higher than other synthetic preservatives and much the same with GSE (grape seed extract).

발효 황금추출물의 항균활성이 pH와 온도에 대한 영향을 받는지에 대한 실험 결과이다(Table 6, 7). pH는 5.0에서 8.0까지 범위에서 미치는 영향을 관찰하였고 온도는 120°C에서 20분까지 관찰한 결과, 발효 황금추출물은 산성 및 알칼리 pH 변화와 120°C 고온에서도 항균활성에 영향을 미치지 않는 안정성이 매우 우수한 천연 항균 추출물이라는 것을 확인할 수 있었다.

Table 6. Effect of pH on antibacterial activity of fermented *S. baicalensis* extracts

Microorganism	MIC (%)			
	pH			
	5	6	7	8
<i>B. subtilis</i> (ATCC21770)	0.078	0.156	0.156	0.156
<i>S. aureus</i> (ATCC29213)	0.078	0.156	0.156	0.156
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	0.156	0.156	0.156	0.156
<i>Sal. Typhimurium</i> (ATCC14028)	0.039	0.078	0.078	0.078
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853)	0.156	0.313	0.313	0.313
<i>S. serevisiae</i> (ATCC24858)	0.020	0.039	0.039	0.039
<i>C. albicans</i> (ATCC32354)	0.039	0.078	0.078	0.078
<i>A. fumigatus</i> (ATCC90906)	0.078	0.078	0.078	0.078

MIC method was carried out to determine the change of a antimicrobial activity against various microorganisms on different pH. The results showed that the activity was not different according to pH.

Table 7. Effect of heating on antibacterial activity of fermented *S. baicalensis* extracts

Microorganism	MIC (%)			
	Heating condition			
	control	80°C/60 min	100°C/30 min	120°C/20 min
<i>B. subtilis</i> (ATCC21770)	0.156	0.156	0.156	0.156
<i>S. aureus</i> (ATCC29213)	0.156	0.156	0.156	0.156
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	0.156	0.156	0.156	0.156
<i>Sal. Typhimurium</i> (ATCC14028)	0.078	0.078	0.078	0.078
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853)	0.313	0.313	0.313	0.313
<i>S. serevisiae</i> (ATCC24858)	0.039	0.039	0.039	0.039
<i>C. albicans</i> (ATCC32354)	0.078	0.078	0.078	0.078
<i>A. fumigatus</i> (ATCC90906)	0.078	0.078	0.078	0.078

MIC method was carried out to determine the change of a antimicrobial activity against various microorganisms on different temperature. The results showed that the activity was not different according to temperature.

세균과 효모 그리고 곰팡이의 다양한 균종에 대하여 발효 황금추출물이 항균활성을 가진다는 것을 보여주고 있다(Table 8, 9, 10). 특히 다양한 종류의 장내 병원성 세균에 대하여 강력한 항균활성을 나타내고 있으며, 무좀균과 같은 억제하기 까다로운 곰팡이에도 항균활성을 가지고 있음을 확인하였다.

Table 8. MIC results of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts for various bacteria

	Strain	MIC (%)		
		Potassium sorbate	Sodium benzoate	BMB
Gram (-)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> S21	0.500	0.500	0.063
	<i>Citrobacter diversus</i> 2046E	0.250	1.000	0.250
	<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	0.500	0.250	0.250
	<i>Enterobacter aerogenes</i> 37	1.000	1.000	0.250
	<i>Enterobacter cloacae</i> P 99	0.500	0.500	0.250
	<i>Escherichia coli</i> 078	1.000	0.500	0.125
	<i>Escherichia coli</i> O 157:H7	0.500	0.500	0.125
	<i>Klebsiella oxytoca</i> 1082 E	1.000	1.000	0.063
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> F11035	1.000	0.500	0.250
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	0.500	0.500	0.031
	<i>Proteus vulgaris</i> 867	0.500	0.250	0.250
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	>1	>1	0.500
	<i>Salmonella typhi</i>	0.250	0.125	0.031
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.500	0.500	0.125
	<i>Serratia marcescens</i> 1	0.500	0.500	0.250
	<i>Shigella flexneri</i>	0.250	0.500	0.031
	<i>Shigella flexneri</i> 83DH40	0.500	0.500	0.063
	<i>Shigella sonnei</i> H011	1.000	1.000	0.063
	<i>Shigella sonnei</i> H710	0.250	0.500	0.063
<i>Vibrio cholerae</i> 569B	0.250	0.250	0.063	
<i>Vibrio cholerae</i> C6709	0.500	>1	0.125	
<i>Vibrio vulnificus</i> MO6	0.500	0.500	0.125	
<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	0.250	0.250	0.063	
Gram (+)	<i>Bacillus cereus</i> ATCC9634	0.500	0.500	0.031
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.500	0.500	0.016
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1.000	0.500	0.031
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	1.000	1.000	0.016
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285	1.000	1.000	0.008
	<i>Staphylococcus aureus</i> 3553	>1	>1	0.031
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM	>1	>1	0.031
	<i>Staphylococcus aureus</i> MS15009/1258	0.500	0.500	0.016
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC15041 D	>1	>1	0.016	
<i>Streptococcus faecium</i> D	>1	>1	0.031	

Broth dilution method assay was carried out to determine the antimicrobial activity against pathogenic microorganisms, including a total of 19 Gram-negative and 7 Gram-positive bacterial species. Potassium sorbate and sodium benzoate were compared as controls of chemical preservatives. The results showed that BMB was higher in antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria strains tested than chemical preservatives. These data suggest the potential advantage of using BMB as preservative for food and cosmetics.

Table 9. MIC results of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts for various yeast

Strain	MIC (%)		
	Potassium sorbate	Sodium benzoate	BHC
<i>Candida albicans</i> A9	>1	>1	0.063
<i>Candida albicans</i> CA-1	>1	>1	0.063
Yeast <i>Malassezia furfur</i>	0.004	>1	1>
<i>Malassezia pachydermatis</i>			0.004
<i>Pityrosporum ovale</i>	>1	0.031	0.031

Broth dilution method assay was carried out to determine the antimicrobial activity against pathogenic microorganisms against 4 yeast species. It inhibited at low concentrations the growth of 3 yeast species which are resistant to the chemical preservatives. These data suggest the potential advantage of using BMB as preservative for food and cosmetics.

Table 10. MIC results of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts for various fungi

Strain	MIC (%)		
	Potassium sorbate	Sodium benzoate	BHC
<i>Microsporum canis</i>	0.016	0.031	0.063
Fungi <i>Trichophyton rubrum</i>	0.125	0.016	0.125
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	0.125	0.125	0.125

Broth dilution method assay was carried out to determine the antimicrobial activity against pathogenic microorganisms against 3 fungi species. Potassium sorbate and sodium benzoate were compared as controls of chemical preservatives. It was comparable with the chemical preservatives in antifungal activity.

2. 한천평판법 평가

MIC 항균활성 평가법과 함께 천연추출물의 항균활성 평가에 가장 많이 사용되고 있는 한천평판법으로 발효 황금추출물의 항균활성을 Fig. 12와 Fig. 13에 나타내었다. 실험결과 MIC에서 관찰하였던 다양한 항균스펙트럼과 강력한 항균활성을 확인할 수 있었는데, 특히 대부분의 천연추출물들이 항곰팡이 활성이 없거나 약한 항곰팡이 활성을 가지는 반면에 발효 황금추출물은 강력한 항곰팡이활성을 가지는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서 도출한 발효 황금추출물의 화장품, 식품, 생활용품 등 곰팡이가 문제되고 있는 다양한 제품에 대한 천연 항균추출물로서의 기술 독립성과 개발 가능성이 높다고 사료되는 바이다.

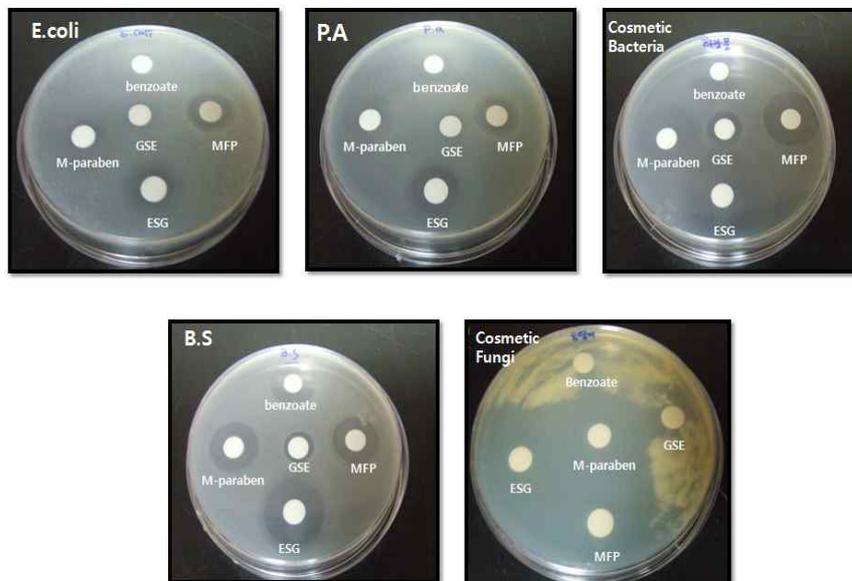
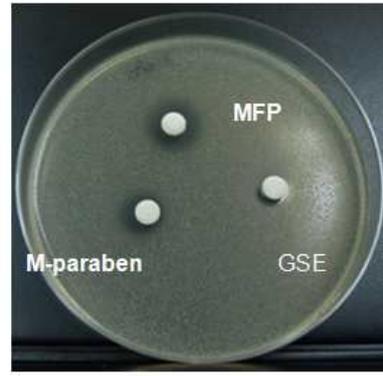


Fig. 12. Antibacterial activity of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts by agar plate method. Agar plate bioassay was carried out to determine the antimicrobial activity against *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and house isolated bacteria and fungi from cosmetic formula or manufacturing process. Test solution was loaded on paper disk of agar plate with 20ul volume then incubated on the 35°C incubator for 48hrs. The results showed that BMB was higher in antimicrobial activity against *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and house isolated bacteria and fungi from cosmetic formula or manufacturing process. than chemical preservatives as sodium benzoate and methyl paraben.



Pityrosporum spp.



Propionibacter acnes

• Bioassay agt. Pityrosporum & Propionibacterium (10%, 20ul loading, paper disk method)

Fig. 13. Antibacterial activity of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts for *Pityrosporum ovale* and *Propionibacterium acnes*. Agar plate bioassay method was carried out to determine the antimicrobial activity against *Propionibacter acnes* and *Pytyrosporum spp.* Test solution was loaded on paper disk of agar plate with 20ul volume then incubated on the 35°C anaerobic jar for 48 hrs. The results showed that BMB was higher in antimicrobial activity against *Propionibacter acnes* and *Pytyrosporum spp.* than methyl paraben and reference preservatives such as Citros, GSE. These data suggest the BMB have a potential as a natural antimicrobial ingredients of acne and dandruff formulas.

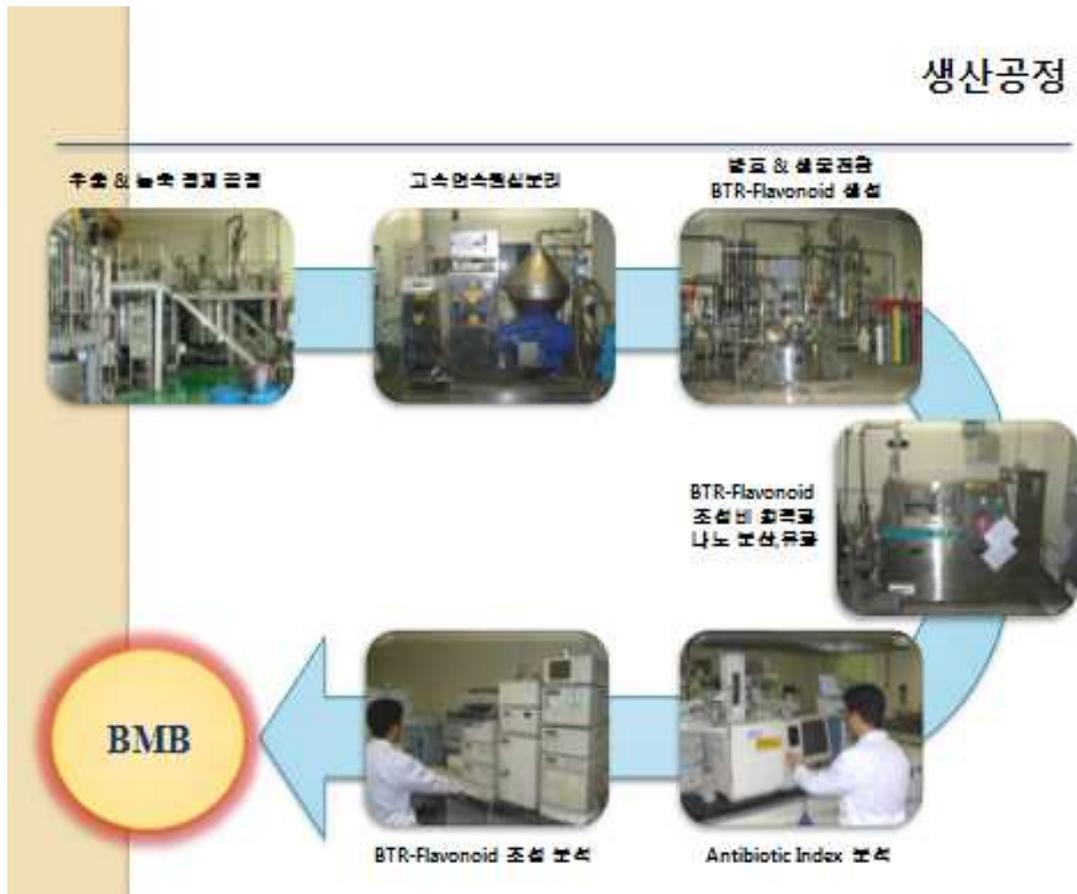
Fig. 14는 임상에서 분리한 다양한 항생제 내성균주에 대하여 발효 황금추출물의 항균활성을 bioassay로 실험한 결과이다. 결과에서 보듯이 다양한 균종의 항생제 내성균들에 대하여 기존 천연항균제보다 투명환이 상대적으로 월등히 큰 것을 알 수 있다. 이러한 결과에 바탕하여 발효전환 황금추출물은 임상에서 문제되고 있는 MRSA 또는 VRE 등 다양한 항생제 내성 균주에 대하여 효과적으로 대응할 수 있는 천연 항균 추출물로서의 가치를 가지는 것으로 사료되는 바이다. 그러므로 발효전환 황금추출물을 향후 좀 더 구체적으로 구조와 기능을 밝혀서 의약품과 병용할 수 있는 고부가가치의 천연추출 화합물을 개발 할 수 있을 것으로 기대된다.



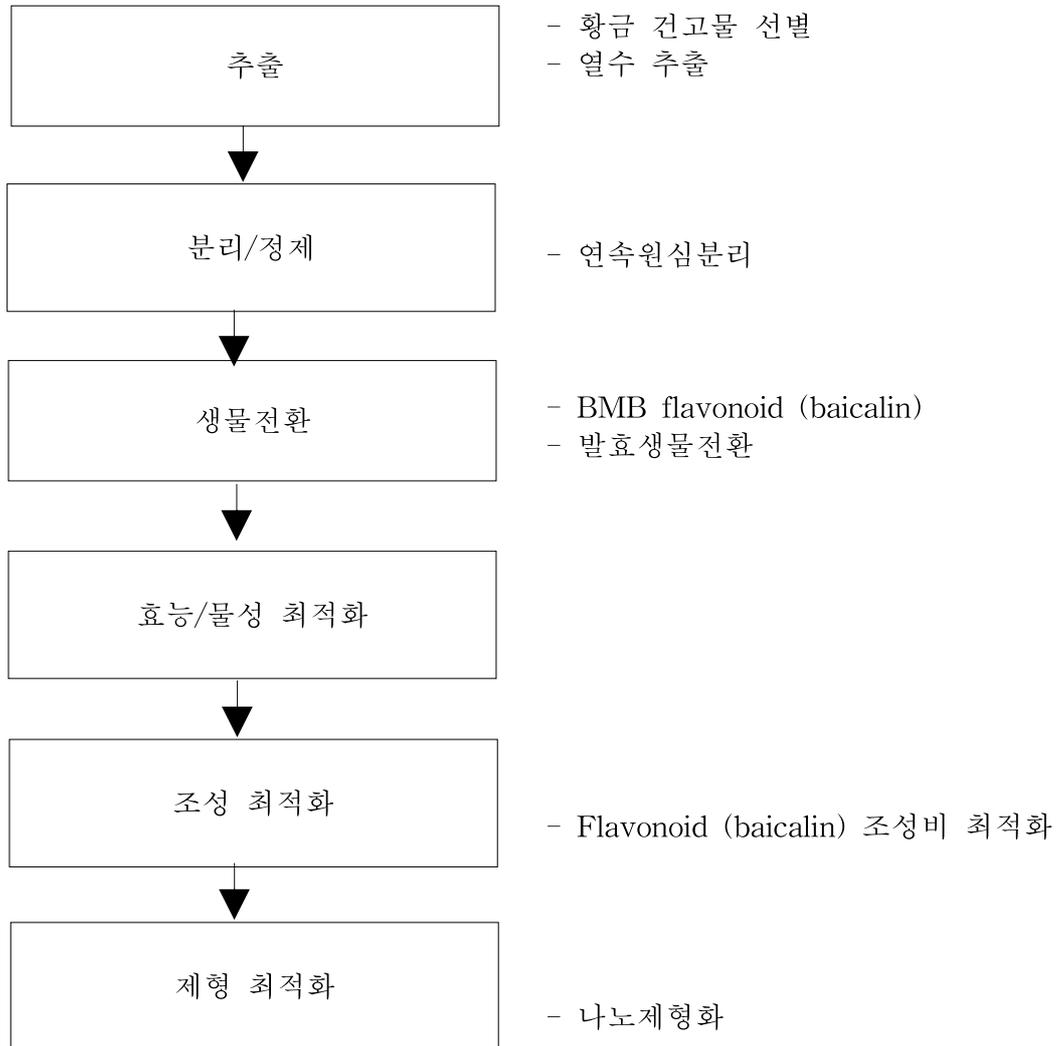
Fig. 14. Antibacterial activity of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts for antibiotics resistant bacteria. Agar plate bioassay method was carried out to determine the antimicrobial activity against drug resistant pathogenic microorganisms, isolated from clinicals. Test solution was loaded on paper disk of agar plate with 20ul volume then incubated on the 35°C incubator for 48hrs. The results showed that BMB was higher in antimicrobial activity against drug resistant pathogenic microorganism than Citros (chemical preservatives). These data suggest the BMB have a potential as a natural antibiotics for clinical fine chemicals.

제 4 절 시제품 생산(pilot scale 생산)

최적화된 처방 조성으로 사양실험과 제품생산을 위한 시제품 생산용 공정을 그림과 같이 확립하였다.



1. 생산을 위한 최적화 공정



2. 시제품 안정화 연구

가. 이화학 안정도 연구

(1) 온도 및 습도 안정성 시험

생물전환 황금 바이칼린 시제품을 일정한 온도 조건에 방치하여 시간 경과에 따른 시료의 상태변화에 대하여 관찰 및 측정한다. TEMPERATURE & HUMIDITY CHAMBERS를 사용하여 보존기간을 1일~1개월, 2개월, 6개월 등으로 하여 외관의 변화 및 냄새 변화, pH의 변화 등을 측정하였다.

(2) 광 안정성 시험

유통 중 혹은 사용 중 빛에 의한 변성이 유발될 가능성이 있으므로 광안정성 시험이 필요하다. 측정항목으로는 일광 노출 시험 및 실내 인공광 노출시험을 통해 관능적, 물리적 변화 등을 측정하였다.

3. 이화학 안정도 연구 결과

하기 표에서 확인 할 수 있듯이 시제품은 4℃, 상온, 37℃, 45℃에서 6개월간 제형적 상태 및 관능적 상태 모두 안정한 것으로 확인되었다.

(1) 안정성(Stability) 실험 방법

① 실험방법 : 경시 변화 안정성에 대하여 기준 및 시험방법에 따라 상온에서 1일 숙성 후, 각 온도 조건과 자외선 조건에서의 경시 변화 안정도를 관찰함.

② 실험기간 : 6개월

③ 보존기간 : 기밀 용기에 보관

④ 평가제품 : 생물전환 황금 바이칼린 및 시제품

(2) 안정성(Stability) 평가 결과

제 품	항 목	4℃	R/T	37℃	45℃	자외선
생물전환 황금	변 색	적합	적합	적합	적합	적합
	변 취	적합	적합	적합	적합	적합
바이칼린	물성변화	안정	안정	안정	안정	안정
시제품	변 색	적합	적합	적합	적합	적합
	변 취	적합	적합	적합	적합	적합
	유화안정도	안정	안정	안정	안정	안정
	물성변화	안정	안정	안정	안정	안정

제 5 절 양식어류에 대한 효능 분석

1. 넙치에 대한 효능 분석

천연 생약자원 추출물의 농도별 (0%-대조구, 0.5%, 1%, 2%, 3%와 5%) 사료내 첨가에 따른 넙치의 성장, 체조성과 혈액성상 및 질병의 면역성에 미치는 영향을 조사하였다. 8주간의 사육실험 종료시 생존한 개체를 대상으로 하여 *E. tarda* challenging test를 실시하여 96시간 동안의 폐사율 변화를 직접 monitoring하는 실험을 수행하였다.

8주간의 사육실험 종료시 넙치의 일간성장율은 사료내 추출물을 2%, 0.5%, 1%, 대조구(무첨가구), 3% 및 5% 첨가의 순으로 우수한 것으로 나타났다. 8주간의 사육실험 종료시 넙치의 혈액성상학적 또는 면역학적으로 뚜렷한 차이는 없었다. 8주간의 사육실험 종료시 생존한 넙치를 대상으로 challenging test를 수행한 결과 *E. tarda* 감염 후 60시간부터 폐사가 관찰되기 시작하였으며, 감염 후 96시간에는 무첨가구인 대조구에서 전량 폐사하였으나 추출물을 첨가한 모든 실험구에서 대조구에 비하여 낮은 폐사율 경향을 보였다.

가. 성장에 대한 영향

(1) 실험 방법

실험어로 이용된 넙치는 일정한 크기의 개체를 충남 태안의 개인양어장에서 구입하여 운반하였으며 사육실험을 시작하기 전 1주 동안 사육 환경에 적응 순화시켰다. 적응기간 동안 상업용 부상사료(수협사료 : 조단백지 함량 54%, 조지질 함량 11%)을 1일 2회 공급하였으며 30마리(시작 시 무게 5.0g)를 18개의 180L 유수식 탱크(수량 :150L)에 수용하였으며 이때 환수량은 탱크 당 6.8L/min 으로 하였다. 사육 수는 자연해수를 탱크에 가두어 사용하였으며, 각 수조에는 aeration을 공급하여 주었고 시험기간 동안 사육수온은 18.4~24.4°C범위로서 평균수온은 21.5±1.71°C 으로 유지하였다.

본 실험에는 총 5종류(대조구, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%)의 실험사료구가 준비되었으며, 각 실험구는 3 반복구를 두었음. 어분, 탈피대두박 및 콘글루텐분을 주요 단백질원으로 이용하였으며, 실험사료 원료는 혼합기에 잘 혼합하여 발효배양 플라보논이드 추출물과 3:1의 비율로 섞어 펠렛 제조기를 이용하여 실험 사료를 제조 하였고, 제조한 실험사료는 실온에서 건조시킨후 -20°C 냉동고에 보관하면서 필요시마다 소량씩 사용 하였다. 모든 실험어는 손으로 만복시 까지 1일2회(오전7:00과 오후 3:00)에 사료를 공급하여 주었으며 총 실험기간은 8주간 실시하였다.

(2) 결과

실험결과 아래 표 1과 같이 비에스티의 발효 플라보논이드 추출물 2% 첨가구에서 증체 및 사료요구율이 개선되는 결과가 얻어졌다.

표 1. 넙치 사료내 천연 생약자원 추출물의 수준별 첨가에 의한 성장 효과

사료종류	수조번호	작리시마수	작리시계	마리무게(시작시)	종료시마리수	폐사무게	종료시무게	마리당 어체중량(종료시)	어체중량	마리당어체중량	%증체율	생존율	사료섭취량(중기준)
대조구	37	30	151	5.0	30		985	32.8	834	27.8	552.3	100.0	712.0
	49	30	151	5.0	30		1034	34.5	883	29.4	584.8	100.0	805.0
	61	30	150	5.0	30		1028	34.3	878	29.3	585.3	100.0	816.0
평균			150.7	5.0			1015.7	33.9	865.0	28.8	574.1	100.0	777.7
편차			0.58	0.02			26.73	0.89	26.96	0.90	18.90	0.00	57.13
오차			0.33	0.01			15.43	0.51	15.57	0.52	10.91	0.00	32.99
BMB0.5%	38	30	150	5.0	30		992	33.1	842	28.1	561.3	100.0	721
	50	30	149	5.0	29	8.3	986	34.0	845.3	29.0	584.6	96.7	738
	62	30	148	4.9	30		1029	34.3	881	29.4	595.3	100.0	742
평균			149.0	5.0			1002.3	33.8	856.1	28.8	580.4	98.9	733.7
편차			1.00	0.03			23.29	0.64	21.63	0.68	17.35	1.92	11.15
오차			0.58	0.02			13.45	0.37	12.49	0.39	10.02	1.11	6.44
BMB 1%	39	30	150	5.0	30		948	31.6	798	26.6	532.0	100.0	727.0
	51	30	150	5.0	30		1057	35.2	907	30.2	604.7	100.0	793.0
	63	30	150	5.0	30		959	32.0	809	27.0	539.3	100.0	750.0
평균			150.0	5.0			988.0	32.9	838.0	27.9	558.7	100.0	756.7

편차			0.00	0.00			60.01	2.00	60.01	2.00	40.01	0.00	33.50
오차			0.00	0.00			34.65	1.15	34.65	1.15	23.10	0.00	19.34
BMB 2%	40	30	148	4.9	30		1071	35.7	923	30.8	623.6	100.0	836.0
	52	30	148	4.9	30		1096	36.5	948	31.6	640.5	100.0	881.0
	64	30	149	5.0	30		1112	37.1	963	32.1	646.3	100.0	904.0
평균			148.3	4.9			1093.0	36.4	944.7	31.5	636.8	100.0	873.7
편차			0.58	0.02			20.66	0.69	20.21	0.67	11.78	0.00	34.59
오차			0.33	0.01			11.93	0.40	11.67	0.39	6.80	0.00	19.97
BMB 3%	41	30	150	5.0	29	5.1	895	30.9	750.1	25.9	517.2	96.7	730.0
	53	30	150	5.0	29	6.3	1054	36.3	910.3	31.3	626.9	96.7	797.0
	65	30	150	5.0	30		934	31.1	784	26.1	522.7	100.0	728.0
평균			150.0	5.0			961.0	32.8	814.8	27.8	555.6	97.8	751.7
편차			0.00	0.00			82.87	3.09	84.42	3.09	61.80	1.92	39.27
오차			0.00	0.00			47.84	1.78	48.74	1.78	35.68	1.11	22.67
BMB 5%	42	30	151	5.0	30		931	31.0	780	26.0	516.6	100.0	659.0
	54	30	150	5.0	29	4.8	1003	34.6	857.8	29.6	591.7	96.7	754.0
	66	30	148	4.9	30		928	30.9	780	26.0	527.0	100.0	702.0
평균			149.7	5.0			954.0	32.2	805.9	27.2	545.1	98.9	705.0
편차			1.53	0.05			42.46	2.08	44.92	2.07	40.71	1.92	47.57
오차			0.88	0.03			24.52	1.20	25.93	1.20	23.51	1.11	27.47

나. 혈액학적 분석

(1) 실험 방법

실험사료 공급 8주 후 각 실험구에서 넙치를 무작위로 5마리씩 샘플링하여 미부정맥에서 채혈하여 혈청을 분리 하였으며 분리된 혈청을 이용하여 분석에 사용 하였다.

(2) 결과

실험결과 아래 표2. 와 같이 혈액 성상에서는 실험군 간에 큰 차이가 없는 것으로

나타났으며, GOT 및 GPT 수준에서 변화가 없는 것으로 볼 때 발효전환 플라보노이드 추출물자생허브 추출물이 생리적으로 부정적인 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

혈액 분석에 사용된 방법의 원리는 다음과 같다.

ALT
(GTP)

원 리 L-alanine + α-ketoglutaric acid --- ALT --> pyruvic acid + glutamic acid
 Pyruvic acid + NADH --- LD --> lactic acid + NAD
 NADH 의 흡광도 감소율을 측정하여 ALT의 활성치를 정량 한다.
 ♣ LD : Lactate dehydrogenase

시 약 Pureauto S ALT (DAICHI, JAPAN)
 장 비 HITACHI 7600-210 & HITACHI 7180 (HITACHI, JAPAN)

AST
(GOT)

원 리 L-aspartic acid + α-ketoglutaric acid --- AST --> oxaloacetic acid + glutamic acid
 Oxaloacetic acid + NADH --- MD --> malic acid + NAD
 NADH 의 흡광도 감소율을 측정하여 AST의 활성치를 정량 한다.
 ♣ MD : Malate dehydrogenase

시 약 Pureauto S AST (DAICHI, JAPAN)
 장 비 HITACHI 7600-210 & HITACHI 7180 (HITACHI, JAPAN)

Triglyceride

원 리 <Reaction 1>
 Glycerol+ATP---GK--àGlycerol-3-phosphate+ADP
 Glycerol-3-phosphate---Glycerol-3-phosphateoxidase--à
 H₂O₂+Dihydroxiacetonephosphate
 H₂O₂---Catalase--àH₂O+O₂
 <Reaction 2>
 Triglyceride---Lipoproteinlipase--àGlycerol+fattyacid
 Glycerol+ATP---GK--àGlycerol-3-phosphate+ADP
 Glycerol-3-phosphate---Glycerol-3-phosphateoxidase--à
 H₂O₂+Dihydroxiacetonephosphate
 H₂O₂+ESBmT+4-amminoantipyrine---POD--àreddish-purplecompound
 ♣ GK : Glycerol kinase
 POD : Peroxidase
 ESBmT : N-ethyl-N-sulfobutyl-m-toluidine
 생성된 Reddish-purple compound의 흡광도를 측정하여 Triglyceride의 농도를 정량한다.

시 약 Pureauto S TG-N (DAICHI, JAPAN)
 장 비 HITACHI 7600-210 & HITACHI 7180 (HITACHI, JAPAN)

Cholesterol, total

원 리 Choleaterolester---CHE--àFreecholesterol+fattyacid
 Freecholesterol+O---CHO--àCholest-4-en-3-one+H₂O₂
 H₂O₂+ESBmT+4-amminoantipyrine---POD--àReddish-purplecompound
 ♣CHE : Cholesterol esterase

CHO : Cholesterol oxidase

POD : Peroxidase

ESBmT : N-ethyl-N-sulfobutyl-m-toluidine

생성된 Reddish-purple compound의 흡광도를 측정하여 Cholesterol 농도를 정량 한다.

시 약 Pureauto S CHO-N (DAICHI, JAPAN)

장 비 HITACHI 7600-210 & HITACHI 7180 (HITACHI, JAPAN)

Protein, total

원 리 Protein --- biuret reagent --> colored product (reddish-purple)

Alkaline 용액 중에서 단백질 4개의 peptide 결합이 Cu^{2+} 와 chelate 결합하여 자색으로 발색한다.

발색된 흡광도를 측정 하여 protein의 농도를 정량 한다.

시 약 Clinimate TP (DAICHI, JAPAN)

장 비 HITACHI 7180 (HITACHI, JAPAN)

표 2. 혈액학적 정상 분석.

시료명	수신 자명	Protein, total	Glucose (FBS)	AST (SGOT)	ALT (SGPT)	Cholesterol	Triglyceride
		g/dL	mg/dL	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL
대조구	37	2.9	61	22	8	161	263
	49	3.1	86	28	15	195	568
	61	3.3	75	36	18	215	547
	avg	3.1	74.0	28.7	13.7	190.3	459.3
	std	0.16	10.23	5.73	4.19	22.29	139.09
	se	0.09	5.91	3.31	2.42	12.87	80.31
BMB 0.5%	38	2.8	33	42	22	177	512
	50	2.7	66	31	15	176	319
	62	검체부족					
	avg	2.8	49.5	36.5	18.5	176.5	415.5
	std	0.05	16.50	5.50	3.50	0.50	96.50
	se	0.03	9.53	3.18	2.02	0.29	55.71
BMB 1%	39	2.7	63	37	15	145	327
	51	검체부족					
	63	2.0	33	21	3	124	195
	avg	2.4	48.0	29.0	9.0	134.5	261.0
	std	0.35	15.00	8.00	6.00	10.50	66.00
	se	0.20	8.66	4.62	3.46	6.06	38.11
BMB 2%	40	2.5	55	17	5	157	292
	52	3.2	75	58	20	210	359
	64	2.8	47	33	13	186	485
	avg	2.8	59.0	36.0	12.7	184.3	378.7
	std	0.29	11.78	16.87	6.13	21.67	80.01
	se	0.17	6.80	9.74	3.54	12.51	46.19
BMB 3%	41	2.8	48	26	7	166	253
	53	2.7	61	76	43	176	385
	65	3.0	40	68	33	171	381
	avg	2.8	49.7	56.7	27.7	171.0	339.7
	std	0.12	8.65	21.93	15.17	4.08	61.30
	se	0.07	5.00	12.66	8.76	2.36	35.39

BMB 5%	42	2.8	64	31	7	166	241
	54	검체부족					
	66	2.9	57	39	19	165	229
	avg	2.9	60.5	35.0	13.0	165.5	235.0
	std	0.05	3.50	4.00	6.00	0.50	6.00
	se	0.03	2.02	2.31	3.46	0.29	3.46

다. *V. harvey*, *E. tarda* 감염 공격성시험

(1) 실험 방법

상기 1)의 성장성적 관찰 실험 8주 진행후 5종류(대조구, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%)의 실험완료 사료구에서 각각 10리씩 무작위 선별하여 복강내 *V. harvey*와 *E. tarda* 균액을 3×10^9 cfu/ml 수준으로 주사하여 감염시켰으며 각 실험구는 3 반복으로 실시하였다. 었으며 총 실험기간은 8주간 실시하였다. 경시적으로 감염후 60시간까지 치사정도를 관찰하였다.

(2) 결과

표 3 및 4와 같이 *V. harvey*, *E. tarda* 복강내 감염후 발효전환 플라보노이드 추출물 3% 이상 함유 시험구에서 대조구 대비하여 치사지연효과가 확연하게 관찰되었다.

표 3. 발효전환 플라보노이드 추출물 급여에 대한 *V. harvey* 복강내 공격성 시험

		600nm _y 1.0014 3X10 ⁹ cfu/ml																
<i>V. harvey</i>		시작	1h	2h	3h	4h	6h	9h	12h	15h	18h	21h	24h	30h	36h	48h	60h	합계
대조구	37	13:0 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	10	10	10
	49	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	9	10	10
	61	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	9	10	10
BMB 0.5%	38	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	9	10	10	10
	50	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	9	10	10	10
	62	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	10	10	10
BMB 1%	39	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	10	0	10	10
	51	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	0	10	10
	63	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	9	10	10
BMB 2%	40	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	10	10	10
	52	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	9	10	10
	64	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	9	10	10
BMB 3%	41	14:0 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	9	10	10
	53	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	7	9	10	10
	65	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	9	10	10
BMB 5%	42	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	10	10	10
	54	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	10	10	10
	66	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8	10	10	10

표4. 발효전환 플라보노이드 추출물 급여 시험군에 대한 *E. tarda* 복강내 공격성 시험

		600nm, 1.0014 3X10 ⁹																			
<i>E. tarda</i>		시작	1h	2h	3h	4h	6h	9h	12h	15h	18h	21h	24h	30h	36h	48h	60h	72h	84h	96h	합계
대조구	37	13:07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7	9	10	10
	49	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7	10	10
	61	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	7	10	10
BMB 0.5%	38	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5	8	8
	50	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	6	9	9
	62	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6	7	7
BMB 1%	39	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	7	8	8
	51	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	8	10	10
	63	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	7	7
BMB 2%	40	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	8	10	10
	52	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	6	9	9
	64	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	5	7	7
BMB 3%	41	14:04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	7	8	8
	53	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	7	9	9
	65	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	8	8	8
BMB 5%	42	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	6	7	8	8
	54	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5	7	7
	66	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	6	8	8

2. 메기에 대한 효능 분석

(1) 실험 방법

실험어로 이용된 메기는 일정한 크기의 메기 치어를 충남 논산의 개인양어장에서 구입하여 운반하였으며, 수송후 사육실험을 시작하기 전에 1주일 동안 사육환경에 적응시킨 후에 실험어로 이용하였다. 적응기간 동안에는 상업용부상사료(수협사료: 조단백질 함량 44%, 조지질 함량 7%)를 1일 2회 공급해 주었다. 35마리의 메기 치어(시작시 무게: 0.96 g)를 24개의 180 L 사각형 순환여과식수조(수량: 150 L)에 무작위로 각각 분산 수용하였으며, 이때 수조당 환수량은 2.2 L/min으로 하였다. 충분한 산소공급을 위하여 각각의 수조에 aeration을 공급해 주었으며, 실험기간 동안 사육수온은 20.8~25.5°C범위(평균수온: 24.0±1.16°C)이었다.

실험에 이용된 실험사료는 총 8종류의 사료[대조구(Con)-첨가제 무첨가구, 생약자원 추출물 0.25% 첨가 사료(SB-0.25), 생약자원 추출물 0.5% 첨가 사료(SB-0.5), 생약자원 추출물 1% 첨가 사료(SB-1), 생약자원 추출물 2% 첨가 사료(SB-2), 생약자원 추출물 3% 첨가 사료(SB-3)와 생약자원 추출물 5% 첨가 사료(SB-5)]를 준비하였으며, 각 실험구는 3 반복구를 두었다. 첨가제로 이용된 액체성 추출물로서 비에스티(Beautiful Science & Technology Co. Ltd)에서 제공받았다. 그리고 생약자원 추출물 첨가제의 효능을 평가하기 위하여 상업용으로 널리 이용되고 있는 시판용 면역증강 첨가제를 권장양에 근거하여 0.1% 첨가한 사료(CP)를 준비하였다.

실험사료의 주요 영양성분은 Table 1과 같으며, 어분, 탈피대두박 및 dextrin을 주요 단백질원으로 이용하였으며, 소맥분과 오징어간유 및 대두유를 주요 탄수화물원 및 지질원으로 각각 이용하였다. 실험사료 원료는 3:1의 비율로 물과 혼합하여 혼합기에서 잘 혼합하여 사용하였으며, 실험에 이용된 첨가제들은 물 대신에 동일한 양을 대신하여 혼합하였으며, 펠렛 제조기를 이용하여 실험사료를 제조하였다. 제조한 실험사료는 실온에서 건조시킨 후 -20 °C 냉동고에 보관하면서 필요시마다 소량씩 사용하였다. 모든 실험어는 손으로 만복 시까지 1주일에 7일간 1일 2회(07:00, 17:00) 매일 사료를 공급하여 주었으며, 사육실험 기간은 8주간이었다.

Table 1. Ingredient and chemical composition (% DM basis) of the experimental diets

	Experimental diets							
	Con	SB-0.2 5	SB-0.5	SB-1	SB-2	SB-3	SB-5	CP
<i>Ingredient (%)</i>								
Fishmeal	45	45	45	45	45	45	45	45
Dehulled soybean meal	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
Dextrin	5	5	5	5	5	5	5	5
Wheat flour	30	30	30	30	30	30	30	30
Squid liver oil	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Soybean oil	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Choline	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin premix ¹	2	2	2	2	2	2	2	2
Mineral premix ²	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Scutellaria aicalensis</i> ³	0	0.25	0.5	1	2	3	5	
Commercial product								0.1
<i>Nutrients (% DM)</i>								
Dry matter	90.4	90.3	89.2	89.3	89.3	90.4	89.6	89.3
Crude protein	45.1	45.6	46.8	46.1	45.4	42.0	44.1	45.0
Crude lipid	11.4	11.5	11.8	11.4	12.1	11.6	12.1	11.6
Ash	8.2	9.0	8.8	8.6	8.2	8.4	8.3	8.5

¹Vitamin premix contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg premix): L-ascorbic acid, 121.2; DL- α -tocopheryl acetate 18.9; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin(5%), 0.27; folic acid, 0.68; P-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003.

²Mineral premix contained the following ingredients (g/kg premix): NaCl, 43.3; MgSO₄·7H₂O, 136.5; NaH₂PO₄·2H₂O, 86.9; KH₂PO₄, 239.0; CaH₄(PO₄)·2H₂O, 135.3; ferric citrate, 29.6; ZnSO₄·7H₂O, 21.9; Ca-lactate, 304.0; CuCl, 0.2; AlCl₃·6H₂O, 0.15; KI, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄·H₂O, 2.0; CoCl₂·6H₂O, 1.0.

³*Scutellaria baicalensis* (SB) was supplied by Beautiful Science & Technology Co. Ltd (Gyeonggi-do, Korea).

가. 성장효과 분석

8주간의 사육실험 종료시 메기의 생존율은 93% 이상으로 나타났으나 실험구간에 유의적인 차이는 없었다(Table 2). 그리고 생약자원 추출물 첨가에 따른 메기의 어체중 증가와 일일성장율(SGR)도 실험구간에 유의적인 차이는 없었으나, 생약자원 추출물을 첨가한 실험구에서 다소 증가하는 경향을 보였다.

Table 2. Survival (%), weight gain (%) and specific growth rate (SGR) of Korean catfish (*Silurus asotus*) fed the experimental diets containing the various concentrations of *S. baicalensis* extract for 8 weeks

Experimental diets	Initial weight (g/fish)	Final weight (g/fish)	Survival (%)	Weight gain (g/fish) ¹	SGR ²
Con	0.96 ± 0.01	43.5 ± 1.17	98.1 ± 0.95 ^a	42.6 ± 1.17 ^a	6.81 ± 0.06 ^a
CP	0.95 ± 0.00	44.0 ± 1.40	99.1 ± 0.95 ^a	43.1 ± 1.40 ^a	6.85 ± 0.05 ^a
SB-0.25	0.95 ± 0.00	44.7 ± 1.42	98.1 ± 0.95 ^a	43.8 ± 1.42 ^a	6.87 ± 0.06 ^a
SB-0.5	0.96 ± 0.00	44.8 ± 4.06	98.1 ± 0.95 ^a	43.8 ± 4.05 ^a	6.85 ± 0.16 ^a
SB-1	0.96 ± 0.00	46.4 ± 3.40	96.2 ± 1.90 ^a	45.4 ± 3.40 ^a	6.92 ± 0.12 ^a
SB-2	0.96 ± 0.00	45.4 ± 1.73	93.3 ± 5.30 ^a	44.5 ± 1.73 ^a	6.88 ± 0.07 ^a
SB-3	0.95 ± 0.00	44.1 ± 1.43	95.2 ± 2.52 ^a	43.2 ± 1.43 ^a	6.85 ± 0.07 ^a
SB-5	0.95 ± 0.01	45.9 ± 2.60	95.2 ± 0.95 ^a	45.0 ± 2.61 ^a	6.92 ± 0.11 ^a

Values (means of triplicates ± SE) in the same column sharing the same superscript letter are not significantly different (P>0.05)

¹Weight gain (g) = Final weight of fish - Initial weight of fish

²SGR = (Ln final weight of fish - Ln initial weight of fish)×100/days of feeding trial.

나. 사료 이용성 분석

메기의 마리당 사료 섭취량, 사료전환효율(FER) 및 단백질축적율(PR)은 실험구간에 유의적인 차이가 없었다(Table 3). 그러나 단백질전환효율(PER)은 SB-3사료 공급구에서

가장 높게 나타났으며 이것은 SB-3사료내 단백질 함량이 다른 실험사료에 비해서 낮은 것에 기인한 것으로 생각된다.

Table 3. Feed consumption (g/fish), feed efficiency ratio (FER), protein efficiency ratio (PER) and protein retention (PR) of Korean catfish (*Silurus asotus*) fed the experimental diets containing the various concentrations of *S. baicalensis* for 8 weeks

Experimental diets	Feed consumption	FER ¹	PER ²	PR ³
Con	46.7 ± 1.20 ^a	0.91 ± 0.00 ^a	2.02 ± 0.01 ^{bcd}	30.26 ± 0.40 ^a
CP	45.6 ± 1.73 ^a	0.95 ± 0.01 ^a	2.10 ± 0.01 ^{abc}	31.07 ± 0.22 ^a
SB-0.25	47.0 ± 1.64 ^a	0.93 ± 0.01 ^a	2.04 ± 0.01 ^{abcd}	30.27 ± 0.72 ^a
SB-0.5	46.7 ± 5.03 ^a	0.94 ± 0.02 ^a	2.01 ± 0.03 ^{bcd}	29.41 ± 1.44 ^a
SB-1	49.7 ± 3.63 ^a	0.91 ± 0.02 ^a	1.98 ± 0.04 ^{cd}	29.82 ± 1.11 ^a
SB-2	50.2 ± 3.14 ^a	0.89 ± 0.03 ^a	1.96 ± 0.08 ^d	28.43 ± 0.40 ^a
SB-3	47.4 ± 1.98 ^a	0.91 ± 0.02 ^a	2.17 ± 0.06 ^a	32.03 ± 0.45 ^a
SB-5	48.1 ± 1.98 ^a	0.93 ± 0.01 ^a	2.12 ± 0.03 ^{ab}	32.43 ± 1.04 ^a

Values (means of triplicates ± SE) in the same column sharing the same superscript letter are not significantly different (P>0.05)

¹Feed efficiency ratio (FER) = Weight gain of fish/feed consumed

²Protein efficiency ratio (PER) = Weight gain of fish/protein consumed

³Protein retention (PR) = Protein gain×100/protein consumed.

다. 일반성분 분석

(1) 실험 방법

8주간의 사육실험 종료후 각각의 수조에서 생존한 메기 5마리씩을 무작위로 선택하여 간을 분리한 후, 메기의 간 및 간을 제외한 전어체에 대한 일반성분을 AOAC (1990) 표준방법에 따라 분석하였다. 조단백질(N × 6.25)은 Kjeldahl method, 조지방은 ether 추출법, 조회분은 550℃의 회화로 에서 4시간 동안 태운 후 정량하였으며, 수분은 105℃의 dry oven에서 건조하여 측정하였다.

(2) 실험 결과

메기 간을 제외한 전어체의 수분, 조단백질과 조회분 및 간의 수분, 조단백질 및 조지방의 함량은 실험구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 4). 그러나 대조구(Con)와 SB-3사료를 공급한 실험구에서 간을 제외한 메기의 조지방 함량은 CP, SB-0.5, SB-2와 SB-5사료를 공급한 실험구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다.

Table 4. Chemical composition (% , wet weight basis) of the whole body excluding liver and liver of Korean catfish (*Silurus asotus*) at the end of the 8-week feeding trial

Experimental diets	Whole body excluding liver			
	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Ash
Con	75.0 ± 0.19 ^a	14.9 ± 0.16 ^a	6.8 ± 0.23 ^a	2.3 ± 0.02 ^a
CP	76.6 ± 1.18 ^a	14.7 ± 0.02 ^a	4.7 ± 0.14 ^d	2.1 ± 0.10 ^a
SB-0.25	75.0 ± 0.13 ^a	14.7 ± 0.27 ^a	6.3 ± 0.15 ^{ab}	2.5 ± 0.06 ^a
SB-0.5	75.7 ± 0.41 ^a	14.5 ± 0.84 ^a	5.6 ± 0.40 ^c	2.3 ± 0.12 ^a
SB-1	74.5 ± 0.52 ^a	14.9 ± 0.48 ^a	6.3 ± 0.20 ^{ab}	2.4 ± 0.09 ^a
SB-2	77.4 ± 0.69 ^a	14.4 ± 0.39 ^a	5.6 ± 0.11 ^c	2.4 ± 0.15 ^a
SB-3	76.0 ± 0.43 ^a	14.7 ± 0.18 ^a	6.4 ± 0.11 ^a	2.4 ± 0.19 ^a
SB-5	75.4 ± 0.59 ^a	15.2 ± 0.31 ^a	5.7 ± 0.12 ^{bc}	2.4 ± 0.10 ^a
	Liver			
	Moisture	Crude protein	Crude lipid	
Con	65.9 ± 0.97 ^a	12.1 ± 0.27 ^a	1.5 ± 0.09 ^a	
CP	65.5 ± 1.48 ^a	12.5 ± 0.38 ^a	1.3 ± 0.09 ^a	
SB-0.25	66.5 ± 1.04 ^a	12.4 ± 0.20 ^a	1.6 ± 0.24 ^a	
SB-0.5	64.8 ± 0.50 ^a	12.3 ± 0.51 ^a	1.5 ± 0.16 ^a	
SB-1	64.3 ± 1.18 ^a	12.5 ± 0.12 ^a	1.4 ± 0.10 ^a	
SB-2	64.8 ± 1.27 ^a	12.4 ± 0.22 ^a	1.4 ± 0.05 ^a	
SB-3	66.4 ± 0.05 ^a	12.6 ± 0.07 ^a	1.3 ± 0.15 ^a	
SB-5	63.3 ± 0.03 ^a	11.8 ± 0.31 ^a	1.4 ± 0.30 ^a	

¹Values (means of triplicates ± SE) in the same column sharing the same superscript letter are not significantly different (P>0.05)

나. 혈액성상 분석

(1) 실험 방법

8주간의 사육실험 종료시 생존한 메기의 혈액성상학적 분석 결과, total protein, glucose와 triglyceride의 함량은 실험구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 5). 그러나 SB-2사료를 공급한 실험구에서 메기의 GOT 함량은 SB-1사료를 공급한 실험구를 제외한 모든 다른 실험구에 비하여 유의적으로 높은 값을 보였다. SB-2사료를 공급한 실험구에서 메기의 GPT 함량은 다른 모든 실험구에 비하여 유의적으로 높은 값을 보였다. 특히 SB-0.25사료를 공급한 실험구에서 메기의 GOT와 GPT 값은 동일하게 가장 낮은 값을 보였다.

(2) 결과

8주간의 사육실험 종료후 1일의 절식이후 각각의 수조에서 생존한 메기 5마리씩을 무작위로 선택하여 미부정맥에서 혈액을 채혈하여 혈장을 분리하였으며 분리된 혈장을 이용하여 혈액성상학적 분석을 실시하였다. 혈장의 total protein, glucose, glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT)와 triglyceride 함량을 automatic chemistry system (Vitros DT60 II, Vitros DTE II, DTSC II Chemistry System, Johnson and Johnson Clinical Diagnostics Inc., New York, USA)을 이용하여 분석하였다 .

Table 5. Serum chemical composition and lysozyme activity of Korean catfish (*Silurus asotus*) at the end of the 8-weeks feeding trial

Experimental diets	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	Cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)
Con	2.3 ± 0.15 ^a	195.3 ± 13.98 ^a	133.3 ± 12.03 ^{bc}	12.3 ± 0.88 ^b	102.7 ± 7.69 ^a	365.7 ± 45.29 ^a
CP	2.7 ± 0.17 ^a	172.0 ± 58.64 ^a	84.7 ± 22.26 ^{bc}	13.0 ± 2.65 ^b	98.0 ± 1.53 ^a	336.0 ± 32.51 ^a
SB-0.25	2.5 ± 0.10 ^a	114.7 ± 8.76 ^a	46.3 ± 9.02 ^c	10.0 ± 1.15 ^b	117.0 ± 17.21 ^a	512.3 ± 184.18 ^a
SB-0.5	2.5 ± 0.07 ^a	153.7 ± 22.41 ^a	134.7 ± 26.77 ^{bc}	14.0 ± 2.08 ^b	128.7 ± 14.44 ^a	646.0 ± 144.78 ^a
SB-1	2.3 ± 0.24 ^a	244.7 ± 52.41 ^a	171.0 ± 6.66 ^{ab}	16.0 ± 3.79 ^b	95.7 ± 14.52 ^a	361.0 ± 80.06 ^a
SB-2	2.2 ± 0.18 ^a	130.7 ± 36.17 ^a	261.7 ± 53.29 ^a	35.5 ± 0.50 ^a	148.3 ± 32.12 ^a	452.0 ± 164.12 ^a
SB-3	2.5 ± 0.09 ^a	151.7 ± 26.44 ^a	124.7 ± 52.30 ^{bc}	13.7 ± 1.45 ^b	110.3 ± 9.60 ^a	375.7 ± 66.09 ^a
SB-5	2.2 ± 0.03 ^a	198.3 ± 12.45 ^a	97.0 ± 20.01 ^{bc}	16.0 ± 1.53 ^b	93.0 ± 6.35 ^a	326.7 ± 62.73 ^a

Values (means of triplicates ± SE) in the same column sharing the same superscript letter are not significantly different (P>0.05)

다. 세균 공격성(Challenge test) 실험

(1) 실험 방법

8주간의 사육실험 종료후 생존한 메기를 대상으로 하여 각 수조당 10마리씩을 무작위로 추출하여 복강내 그람양성균인 *Vibrio anguillarum* (3×10⁷cfu/ml)과 그람음성균인 *Streptococcus inlae* (3×10⁷cfu/ml)을 인위적으로 주사하여 감염시켰으며, *V. anguillarum*는 감염이후 20일까지의 누적폐사율과 *S. inlae*는 감염이후 30일까지의 누적폐사율을 각각 측정하였다.

(2) 실험 결과

8주간의 사육실험 종료시 생존한 메기를 대상으로 하여 *V. anguillarum*와 *S. inlae*의 인위적인 감염이후 이들의 폐사율 변화를 각각 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. *V.*

*anguillarum*은 감염이후 3일째부터 폐사가 관찰되기 시작하였으며, 세균감염이후 10일 이후부터 대조구(Con)에 비하여 모든 실험구에서의 누적폐사율이 유의적으로 낮게 나타났다. *V. anguillarum* 감염이후 20일째에는 대조구에서 전량 폐사하였으며, SB-0.25 56.7%, SB-0.5 56.7%, SB-1 46.7%, SB-2 46.7%, SB-3 43.3%, CP 40% 및 SB-5 36.7%의 순으로 누적폐사율을 보였다.

그리고 *S. inlae*도 감염이후 2일째부터 폐사가 관찰되기 시작하였으며, 세균감염이후 20일째부터 무첨가구인 대조구(Con)에 비하여 모든 실험구에서의 누적폐사율이 유의적으로 낮게 나타났다. *S. inlae* 감염이후 30일째 대조구에서의 누적폐사율은 53.3%이었으며, CP 33.3%, SB-3 33.3%, SB-0.5 33.3%, SB-1 30%, SB-5 26.7%, SB-0.25 26.7% 및 SB-2 23.3%의 순으로 누적폐사율을 보였다.

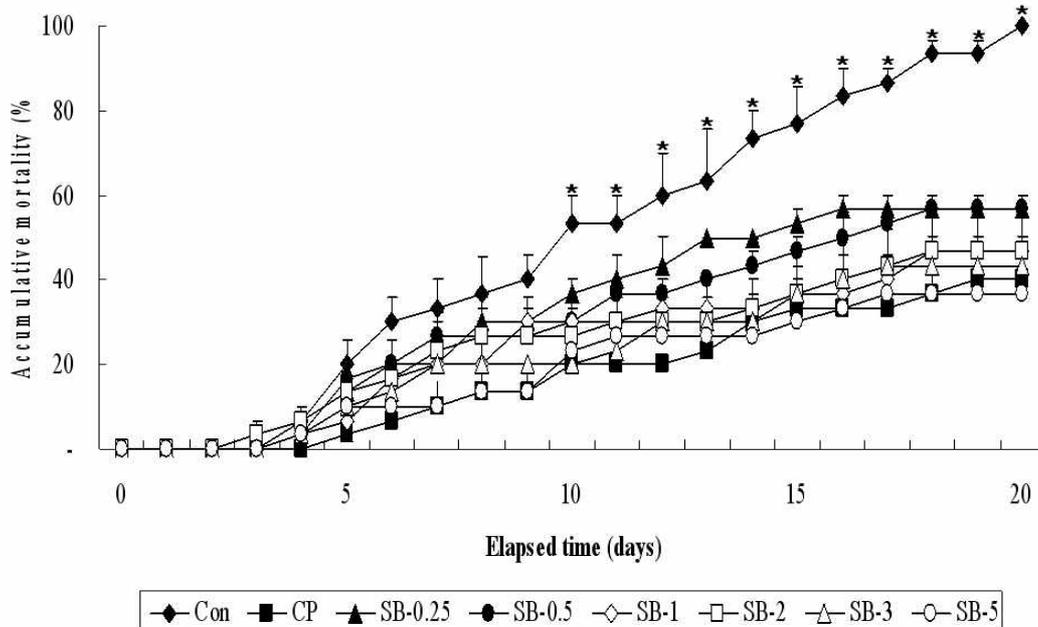


Fig. 1. Accumulative mortality (%) of Korean catfish (*Silurus asotus*) fed the experimental diets containing various concentrations of *S. baicalensis* (SB) for the following 20 days after *V. anguillarum* infection (means of triplicates \pm SE). * indicates that the accumulative mortality of fish fed the CP, SB-0.25, SB-0.5, SB-1, SB-2, SB-3 and SB-5 diets was significantly ($P < 0.05$) lower than that of fish fed the Con diet.

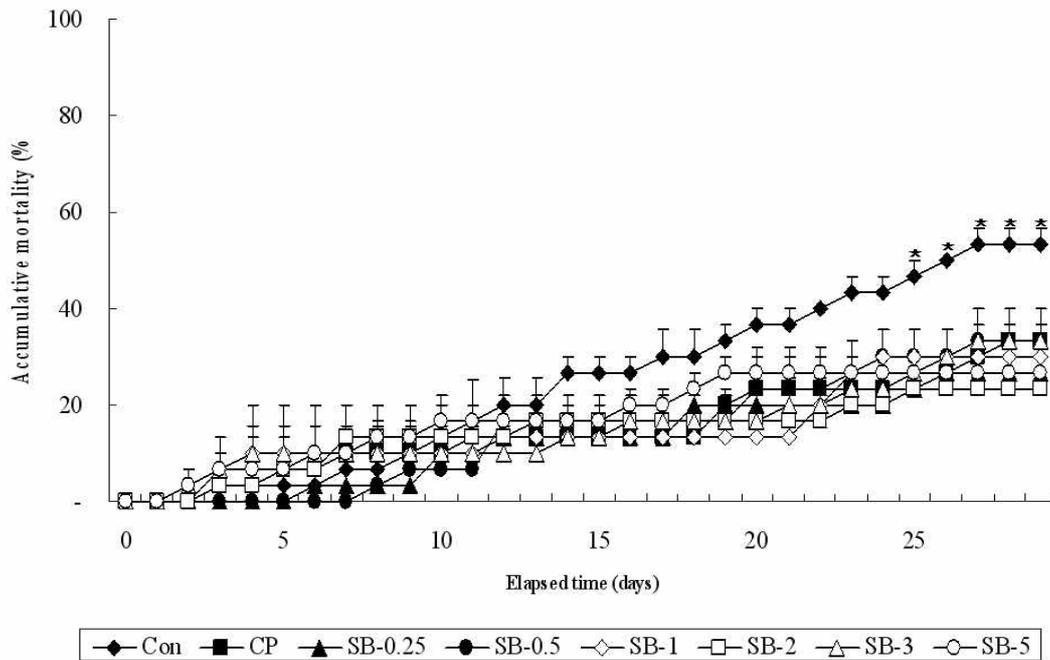


Fig. 2. Accumulative mortality (%) of Korean catfish (*Silurus asotus*) fed the experimental diets containing various concentrations of *S. baicalensis* (SB) for the following 30 days after *S. inlae* infection (means of triplicates \pm SE). * indicates that the accumulative mortality of fish fed the CP, SB-0.25, SB-0.5, SB-1, SB-2, SB-3 and SB-5 diets was significantly ($P < 0.05$) lower than that of fish fed the Con diet.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 목표달성도

1. 1차년도 연구개발 목표

천연 생약자원으로 부터 분리추출공정을 최적화하고 생물전환 후 제형최적화를 통한 천연항균제 시제품 개발한다. 협동기관인 한국해양대학교 산학협력단에서는 천연 생약자원 추출물이 첨가된 사료를 이용한 넙치의 양식에서 성장 및 항질병성 등의 효능을 분석한다.

2. 1차년도 연구개발 달성도

연구개발 목표	목표대비 결과	달성도 (%)	비고
1. 정제과정 최적화 yield 10% 이상 MIC 1% 이하	yield 20%이상 MIC 0.3 목표초과 달성%	100	주관
2. 제형최적화물에 대한 용해성 확보, 45C에서 3개월 동안 항균력 안정한 제형 개발	수용해성 확보및 45C에서 6개월 동안 항균력 안정한 제형 개발완료	100	주관
3. 사양실험 시제품 생산 사양실험에 사용가능한 시제품생산	사양실험 가능한 시제품생산 완료, 협동기관 제공	100	주관
4. 넙치 사료내 천연 생약자원 추출물의 수준별 첨가에 의한 성장 효과 평가	생약자원 추출물의 수준별 첨가에 의한 성장 효과 평가	100	협동
5. 넙치 사료내 천연 생약자원 추출물의 수준별 첨가에 의한 체조성 및 혈액학적 변화에 관한 효과 평가	생약자원 추출물의 수준별 첨가에 의한 체조성 및 혈액학적 변화에 관한 효과 평가	100	협동
6. 넙치 사료내 천연 생약자원 추출물의 수준별 첨가에 의한 비특이적 면역 반응 효과	생약자원 추출물의 수준별 첨가에 의한 비특이적 면역 반응 효과	100	협동

3. 2차년도 연구개발 목표

1차년도 연구개발 결과를 바탕으로 시제품에 대한 품질개선(경도, 관능), 안정성 시험, 현장에서의 적용성(섭취, 보관성)에 관한 연구 개발 및 pilot scale 생산 최적화 연구와 생산성을 검토하여 제품 생산에 반영하고, 관련학회에 협동기관과 공동으로 참가하여 연구결과 발표 및 제품을 홍보한다.

4. 2차년도 연구개발 달성도

연구개발 목표	목표대비 결과	달성도 (%)	비고
1. Pilot scale up 생산공정 연구 및 수율공정 개선 (제품력 향상)	Pilot scale 생산 공정 확립	100	주관
2. 품질개선 연구 - 관능 및 경도 개선 - 품질 안정성 test - 섭취, 보관 등 현장적용성연구	품질 개선 완료 안정성 및 현장 적용성 확보	100	주관
3. 메기 사료내 천연 생약자원 추출물의 농도별 첨가에 의한 성장 효과 조사	메기 사료내 천연 생약자원 추출물의 농도별 첨가에 의한 성장 효과 조사 완료	100	협동
4. 메기 사료내 천연 생약자원 추출물의 농도별 첨가에 의한 체조성 및 혈액성상학적 변화에 관한 효과	메기 사료내 천연 생약자원 추출물의 농도별 첨가에 의한 체조성 및 혈액성상학적 변화에 관한 효과 분석 완료	100	협동
5. 메기 사료내 천연 생약자원 추출물의 농도별 첨가에 의한 비특이적 면역 반응 효과	생약자원 추출물의 수준별 첨가에 의한 비특이적 면역 반응 효과 분석 완료	100	협동
6. 학회발표 및 제품 홍보	2011년도 한국어류학회, 한국양식학회 등 관련학회 발표 및 참가예정	50	주관

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 기술분야

천연물 library로부터 목적하는 효능성분을 신속하고 효율적으로 검색하는 파생기술의 관련분야 활용이 기대된다. 관능, 물성 개선기술을 활용하여 기타 천연물의 제품화 단계에 적용할 수 있으며, 애완동물에 대한 다양한 제품개발 단계에 기술 응용이 가능하다. 낚치 및 메기뿐만 아니라 각종 양식어류의 양식과정에서 빈번히 발생하는 질병으로 인한 생산성 감소를 해결할 수 있는 우수한 사료첨가제로 다양한 양식 어류의 양식에 적용 가능할 것을 사료된다.

2. 경제·산업분야

현재 사용중인 probiotics, 에센셜 오일, peptide 등의 수입의존적인 항생제 대체용 천연항균제 시장에서의 수입대체효과를 기대할 수 있고, 축산용 천연항균제로서 수출 효과, 국내 생약재배농가의 소득증가 효과, 항생제 내성감소, 알러지 감소 등의 효과에 의한 국민건강증진효과가 기대된다. 천연소재의 생약 추출물 첨가에 따른 낚치 및 메기 등 양식어류의 성장 개선과 질병에 대한 면역력 향상으로 양식어류의 생산성 향상이 기대된다.

3. 사회·문화적 측면

항생제 내성균 발현을 억제함으로써 국민 보건 및 건강 증진효과, 수산양식 산업에 대한 국민인식 변화와 수출 경쟁력 확보 등을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 천연소재의 사료첨가제를 낚치 및 메기 양식에 적용시킴으로서 기존의 항생제나 기타 약품 등에 대한 소비자들의 양식 어류에 대한 식품으로서의 안전성에 대한 불신과 거부감을 해소 할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발성과

수산양식용 어병 예방 및 치료용 항생제를 개발할 목적으로 국내 자생 생약자원으로부터 천연 항염, 면역증강 활성을 가지는 바이칼린 유도체를 추출하였다. 또한 이 추출물에 바이오 고분자를 적용한 생물전환기술을 활용하여 포르말린 등의 화합물을 대체할 수 있고, 항균, 항염 및 면역력 증강효과가 증대된 수산양식용 어병 예방 및 치료용 천연항생제 제품을 개발하였다.

메기를 대상으로 실시한 8주간의 사육실험에서 생존한 메기를 대상으로 하여 병원균 *V. anguillarum*와 *S. inlae*를 인위적으로 감염 시킨 후 이들의 폐사율 변화를 분석한 결과에서 *V. anguillarum* 감염에서는 감염이후 3일째부터 폐사가 관찰되기 시작하였으며, 10일 이후부터 대조구(Control)에 비하여 모든 실험구에서의 누적폐사율이 유의적으로 낮게 나타났다. *V. anguillarum* 감염이후 20일째에는 대조구에서 전량 폐사하였으며, SB-0.25 56.7%, SB-0.5 56.7%, SB-1 46.7%, SB-2 46.7%, SB-3 43.3%, CP 40% 및 SB-5 36.7%의 순으로 누적폐사율을 보였다.

또한, *S. inlae* 감염의 경우에서도 감염이후 2일째부터 폐사가 관찰되기 시작하였으며, 20일째부터 무침가구인 대조구(Control)에 비하여 모든 실험구에서의 누적폐사율이 유의적으로 낮게 나타났다. *S. inlae* 감염이후 30일째 대조구에서의 누적폐사율은 53.3%이었으며, CP 33.3%, SB-3 33.3%, SB-0.5 33.3%, SB-1 30%, SB-5 26.7%, SB-0.25 26.7% 및 SB-2 23.3%의 순으로 누적폐사율을 보였다.

이러한 결과는 본 사업에서 개발한 수산양식용 어병 예방 및 치료용 천연 항생제가 실제 수산양식 현장에서 물고기에 대한 면역증강 활성을 보였다고 할 수 있으며, 수산양식 어민과 관계기관의 의지에 따라 현장에 바로 적용할 수 있으며, 이는 어민들의 소득증대와 고품질의 양식어류를 섭취할 수 있는 기회도 제공 받을 수 있을 것으로 사료된다.

제 2 절 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획

- 제품 생산 및 시판예정(2011년 7월)
- 주관기업 자체 소재영업망을 이용한 국내영업 및 사료회사 등을 통한 전략적 제휴
- 중기청 수출기업화 사업을 통한 해외시장 개척
- 일본 판매회사(계약체결) 및 중국법인을 통한 해외시장 개척

국내 양식 어업가구수는 2009년 현재 29,540가구로 2000년 이후 큰 폭의 변화는 없으며(Fig. 3), 양식사업에 종사하는 업체 수는 2009년 현재 전국에 200여 개로 조사 되고 있다.

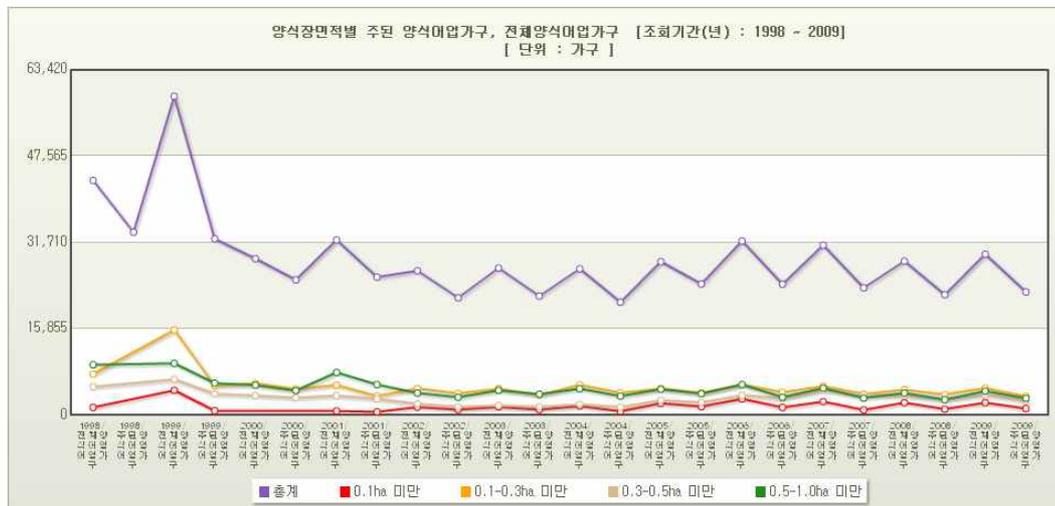


Fig. 3. 국내 연도별 어업가구수 변화(자료, 통계청)



Fig. 4. 국내 연도별 양식사업체수 변화(자료, 통계청)

부산, 인천 및 전국의 양식업체를 조사하고 현장방문하여 본 사업으로 개발된 사료 첨가제를 홍보하고 실제 양식사업에 적용할 수 있도록 국내 영업망을 활용할 계획이다.

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

- 양식관련 전시회 및 관련학회 참가하여 발표 및 제품, 기술 홍보예정(2011년 4월~6월)

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

- 수산 항생제 대체용 천연항균제 특허출원으로 지적재산권 확보예정(2011년 10월)

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 가금류, 소, 돼지 등 타 동물 사료용 천연 항생제 개발연구 예정(2011년 4월)
- 중기청, 지경부, 농림수산식품부 등 사업을 통해 항균작용 및 면역증강작용의 기전에 대한 추가연구 수행
- 현장 적용시 잉여먹이에 대한 오염문제와 수생태계 위해성에 대한 추가 연구 수행예정

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

어류에 효과적으로 작용하는 면역증강물질은 성장호르몬, 박테리아 구성소, 다당류(glucan), 동물·식물 추출물과 영양소 요인(amino acids, nucleotide, vitamin) 등이 있으며, 이러한 면역증강물질은 어류의 면역력 증가뿐만 아니라 성장률을 증가시킴으로써 어류의 생산성을 높일 수 있다. 그 중 식물 추출물 중 하나인 목초액은 양어용 사료첨가제로 유효성이 있는 것으로 보고되어져 있다.

일본에서 여러 연구들이 이루어진 것으로 알려져 있다. 목초액은 참나무류의 목재를 탄화시킬 때 발생하는 연기를 포집하여 생성되는 조목초액을 다시 정치 및 여과시켜 만든다. 이는 축산업, 원예, 버섯재배, 의약품, 건강음료, 탈취제 등으로 활발히 사용되고 있으며 또한 가축사료 첨가제로 활용되고 있다. 목초액의 효과는 동식물에 있어 살균작용, 해독작용, 세포의 활성화 및 정상화를 돕는 작용, 교감신경계의 억제작용을 등을 하는 것으로 알려져 있으며 일본에서 양어용 사료첨가제에 사용하고 있는 것으로 알려져 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Bull Environ Contam Toxicol. 1981 Dec;27(6):877-84. Stress response of juvenile sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) to the butoxyethanol ester of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.
McBride JR, Dye HM, Donaldson EM.
2. Physiol Rev. 1997 Jul;77(3):591-625. The stress response in fish. Wendelaar Bonga SE.
3. J Pediatr. 1976 Feb;88(2):289-91. Hypothalamic-pituitary dysfunction following group B beta hemolytic streptococcal meningitis in a neonate. Pai KG, Rubin HM, Wedemeyer PP, Linarelli LG.
4. Br J Clin Psychol. 1981 Jun;20(Pt 2):97-109. Binge eating: a theoretical review.
Wardle J, Beinart H.
5. Neurosci Biobehav Rev. 1981 Spring;5(1):137-75. Neurophysiology and neuropharmacology of cardiovascular regulation and stress. Galosy RA, Clarke LK, Vasko MR, Crawford IL.
6. Orthopedics. 1991 Nov;14(11):1263-7. Post-polio fatigue: a 31P magnetic resonance spectroscopy investigation. Thompson RT, Barton PM, Marsh GD, Cameron MG, Gravelle DG, Hsieh JT, Hayes KC, Driedger AA.
7. J Biol Chem. 1993 Dec 25;268(36):27012-9. Kinetics of interaction between normal and proline 12 Ras and the GTPase-activating proteins, p120-GAP and neurofibromin. The significance of the intrinsic GTPase rate in determining the transforming ability of ras.
Eccleston JF, Moore KJ, Morgan L, Skinner RH, Lowe PN.

8. *Gen Comp Endocrinol.* 1992 Dec;88(3):454-60. The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. Pottinger TG, Prunet P, Pickering AD.
9. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994 Jun;41(3-4):323-39. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. Rumsey GL, Siwicki AK, Anderson DP, Bowser PR.
10. *J Appl Microbiol.* 1998 Feb;84(2):227-33. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. Ringø E, Vadstein O.
11. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Dec;61(12):4425-8. Comparison of the Growth and Survival of Larval Turbot in the Absence of Culturable Bacteria with Those in the Presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a Marine *Aeromonas* sp. Munro PD, Barbour A, Birkbeck TH.
12. *Kansenshogaku Zasshi.* 1992 Feb;66(2):177-88. [Clinical efficacy of levofloxacin (LVFX) single-dose therapy in female acute uncomplicated cystitis]. Hirose T, Kumamoto Y, Nishimura M, Aoki M, Tsukamoto T, Miyake M, Yanase M, Miyao N, Akagashi K, Yokoo A, et al.
13. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 May;44(5):1352-5. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in human skin blister fluid. Trampuz A, Wenk M, Rajacic Z, Zimmerli W.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.