

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001483-01

일반과제(0)

과제번호 1100722

포르말린 대체용 항 스키투티카 약육 제제 조성물의 개발
(Formalin alternative anti-scuticociliates formula)

(주)나노스페이스

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “포르말린 대체용 항 스쿠티카 약육 제제 조성물의 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 6 월 30 일

주관연구기관명 : (주)나노스페이스

주관연구책임자 : 한 양 수

연 구 원 : 윤 주 영

연 구 원 : 한 정 화

연 구 원 : 송 은 주

위탁연구기관명 : 제주대학교

위탁연구책임자 : 이 제 희

요 약 문

I. 제 목

: 포르말린 대체용 항 스쿠티카 약육 제제 조성물의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

▪ 최근 양식 어업의 활성화로 인한 연안 수질 환경오염, 사육밀도의 과밀화, 품종 열성화는 양식 생물의 어병 저항력을 저하시켜 각종 질병에 의한 폐사량이 매년 증가하는 경향을 보인다. 특히 스쿠티카증의 경우 치어에서 성어에 이르기까지 발병을 하고, 집단 폐사의 양상을 갖기 때문에 감염시 큰 피해를 유발한다. 세계적으로도 우리나라는 양식 광어 시장의 절반을 차지하고 있으며, 넙치종묘 생산 및 양식기술은 세계 최고 수준이다. 그러나, 넙치양식에서 가장 많이 발생하는 기생충인 스쿠티카충은 넙치의 치어와 성어에 기생시 대량 폐사를 유발하여 넙치의 생산성에 막대한 피해를 초래하기 때문에 이를 해결할 수 있는 기술 및 제품개발이 시급한 실정이다.

▪ 산업적 관점에서 2009년 국내 연간 광어 양식 산업의 규모 (5500 억원)를 기준으로 보았을 때 스쿠티카충에 의한 피해규모는 연간 약 1000 억원에 이르며 이는 생산 원가의 50%를 차지하는 것으로 수익성 악화의 주요 원인이 되고 있다. 따라서, 스쿠티카충에 의한 피해를 방지하는 기술개발은 경제적인 측면에서도 매우 중요하다.

▪ 현재, 국내 양식현장에서는 스쿠티카충에 의한 피해를 예방하기 위하여 유해물질인 포르말린으로 약육을 실시. 그러나 포르말린은 미국에서는 엄격하게 규제하고 있고, 일본에서도 2003년부터 사용을 금지시킨 유해물질이다. 따라서 친환경 양식기술 확립, 안전한 먹거리 제공, 고부가가치 양식제품 개발을 위해서는 유해물질인 포르말린을 대체할 수 있는 스쿠티카충에 대한 약육제제 조성물 및 관련 응용기술의 개발 시급히 요구되고 있다. 국내외의 기술 및 제품개발 현황은 유해물질인 포르말린 대체 제품의 필요성에 공감하여 다양한 방법이 시도되고 있으나 아직 뚜렷한 해법을 찾지 못하고 있는 상황이다

▪ 본 과제에서는 천연유래 물질을 중심으로 항스쿠티카 효능이 있는 물질을 선정하고 이를 점토의 층간에 층간삽입 기술을 이용하여 나노복합소재를 제조, 이를 과립화 하여 천연물의 안정성 개선, 휘발에 의한 손실 개선, 해수용액 중에서의 용해도 개선 및 제어용출 특성을 구현 함으로써 궁극적으로는 스쿠티카충에 대한 살충효과의 극대화를 통한 우수한 약육제제의 개발을 목표로 하고 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구개발과제에서는

- 항 스쿠티카 활성 물질의 선정 및 조성물 설계
- 팽윤성 점토의 층간 삽입 반응을 이용한 유무기 하이브리드형 복합체 개발

- 향 스쿠티카 활성 물질에 따른 복합체 제조 기술 최적화
- 팽윤성 점토 및 향 스쿠티카 활성 물질의 물성에 따른 복합체 특이성 확인
- 반응 첨가물 및 공정 조건에 따른 복합체 특이성 확인
- 유무기 하이브리드형 복합체의 물리화학적 특성 평가 및 *in-vitro* 용출특성 평가
- 제어 용출 특성이 최적화된 향 스쿠티카 약육 제제 조성물 및 제조 조건 최적화
- 스쿠티카층 *in-vitro* 살충 효능 평가
- 향 스쿠티카 약육 제제 조성물의 과립화 공정기술 개발
- 과립형 향 스쿠티카 약육 제제 조성물의 광어 양식 어장 현장 평가
- 제품 및 성능보완, 제품 개발완료
- 특허출원 등 지적재산권 확보를 통한 기술확보 및 이를 이용한 사업화를 위한 연구 개발을 중점적으로 진행하였다.

IV. 연구개발결과

- 알파-피넨, 캄펜, 리모넨과 같은 천연유래 향 스쿠티카 활성물질 선정
- 친환경 소재인 점토의 층간반응성을 이용한 층상형 나노복합체 설계 및 합성기술 확립
- 분리/배양된 스쿠티카층을 이용한 도출된 후보 활성물질의 *in-vitro* 효능평가
: 활성물질 점종에 따른 스쿠티카층의 형태변형 및 사멸효과 평가
- 활성물질(피넨/리모넨/캄펜/카페인/퀴닌)-유기화 점토 나노복합체 제조 및 물리화학적 특성분석
- 나노복합체를 이용한 향스쿠티카 과립조성물 설계 및 최적조성물 도출
- 제한기 및 twin-screw extruder를 이용한 구형 및펠렛형(실린더형) 과립제조 공정 개발 및 공정조건 최적화
- Twin-screw extruder형 과립기 설계 및 제작
- 과립형 나노복합체의 물리화학적 특성 및 용출특성 평가를 통하여 활성물질의 안정화, 용해도 개선, 제어용출(서방성) 특성 확인(*in-vitro* & 현장).
- 과립형 약육제제를 이용한 스쿠티카 살충효능 및 장기간 효능지속효과를 활성물질의 용출에 따른 스쿠티카층의 형태변화 및 사멸효과를 통하여 검증/확인.
- 피네함유 과립제품 (ASP-series), 리모넨 함유 제품 (ASP-LM) 및 리모네-피넨 함유 과립제품 (ASP-LP)를 이용하여 활성물질의 제어 용출특성 및 스쿠티카층 살충효과 확인.
- ASP/ASP-LM을 이용한 광어 양식장 현장 평가를 통하여 현장효능 확인.
: 최고 80% 이상의 폐사율 개선효과 확인.
- 천연물 및 나노복합화 기술을 기반으로 포르말린 대체용 향스쿠티카 약육제제 조성물 및 응용제품 개발 완료

V. 연구개발결과의 활용계획

- 시제품을 이용한 현장마케팅
 - 기개발된 ASP-series, ASP-LM을 중심으로 테스트 마케팅 ((주)창조바이오텍 공동)
 - : 현재까지 총 2,000 kg 정도의 마케팅 제품 공급, 현장평가 진행

- 제품성능 개선 및 제품군 확대 : 폐사율 개선 효과 up-grade
- 활성물질의 종류 및 함량에 따른 다양한 제품군 확보
- 확보된 원천기술을 이용하여 스쿠티카층 이외의 어병제제 개발
- 서,남해안 광어 양식장 확대 적용
- 조피볼락 및 참돔 양식장 확대 적용
- 해외시장 개척 : 중국 및 말레시아 (사바주, UBT)

▪ 연구개발 실적

- 연구개발 결과의 전문학술지 발표 (SCI급/2편)
- 국제/국내 학술회의 논문발표 : 현재까지 8편 발표
- 지적재산권 확보 : 현재 국내 특허 4건 출원 완료 및 1건 출원중
2012년내 국제 PCT 출원 (조성물, 응용 및 과립제조 방법)예정
- 개발제품 (ASP-series)의 관련전시회 참가/제품소개

SUMMARY

The aims of this research are to develop intercalative nanocomposite between natural extracts with anti-scudica activity and layer silicate by a simple solid state intercalation process, and to evaluate the effect of inorganic nanolayers on the sustained releasing property of the target ingredient molecules. Another purpose of this research is to evaluate the efficacy of the intercalative nanocomposite for the treatment of fish parasitic disease, *Scuticociliatosis* in the cultured Oliver Flounder. Intercalative nanocomposite between the target compounds such as alpha-pinene, limonen, camphene, caffeine, and quinine sulfate, and natural layer silicates (clays) are prepared by a simple solid state intercalation process under an ambient atmosphere and low reaction temperature. The hydrophilic nature of layer silicate layer is modified to hydrophobic one by intercalation of surfactant molecules such as quarternary alkylammonium cations, benzalkonium, etc. prior to the intercalation of ingredient molecules. The intercalative compounds are characterized mainly by powder X-ray diffraction (XRD) method along with UV, IR, TG-DSC analyses. Dissolution behaviors of the compounds are also evaluated using the paddle-type dissolution tester. According to the experimental results, the interlayer modification of layer silicate layers from hydrophilic to hydrophobic with surfactant molecules prior to the solid intercalation process is found to be very important to form intercalative nanocomposites successfully by a simple solid intercalation method. Furthermore, pre-loading of some organic molecules is very helpful to control the releasing property of active molecules by preventing from recrystallization/or aggregation of the molecules between the silicate layers. Granular-type nanocomposites were also fabricated by single screw granulator or twin screw extruder type granulator. Such prepared essential oil-containing nanocomposites (ASP-series, ASP-LM, ASP-LP) exhibited excellent sustained releasing property of the active ingredient molecules and also showed good mechanical stability under seawater conditions. According to the field test result using ASP granule samples, the mortality rate of Oliver Flounder infected with *Scuticociliatosis* is greatly improved by the treatment of ASP products. This improvement result can be attributed to the molecular level distribution of active molecules between the silicate layers and slow releasing property. Intercalation of the highly volatile *alpha*-pinene/limoene molecules between silicate layers is very helpful for suppress the volatile loss. The releasing rate of active molecules in seawater condition can be

also controlled finely through the intercalative compounds. In addition the solubility of poorly water soluble molecules (pinene and limonene) in aqueous solution is greatly improved by the molecular level distribution between the silicate layers, resulted in the improvement of insecticidal activity of *alpha*-pinene and limonene molecules.

CONTENTS

Chapter 1. Research background	--- 9
Chapter 2. State-of-the Art	--- 24
Chapter 3. Results and discussion	--- 27
Chapter 4. Research achievements	---129
Chapter 5. Future planning	---133
Chapter 6. References	---134
APPENDIX	---137

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	--- 9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	--- 24
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	--- 27
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	--- 129
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	--- 133
제 6 장	참고문헌	--- 134
별	첨	--- 137

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 개발 기술의 개요

1. 광어 양식어업과 스키테카 감염증 (Scuticocillatosis)

최근 UN 해양법 발효에 따른 배타적 경제 수역 설정과 어업자원 자국화로 인한 해외 어장 상실, 연근해 수산 자원 고갈 등으로 어업 여건이 극도로 악화되어 양식에 의한 수산물 생산량 증대가 불가피한 실정이며, 그 동안 정부는 양식어업 육성 정책을 지속적으로 추진해 왔다. 그 결과 현재 양식어업에 의한 수산물 생산량은 급속히 증가하여 연간 생산 금액이 1 조원에 이르고 있다. 하지만 급격한 양식 어업의 활성화로 인해 연안 수질 환경오염, 양식어장의 노화, 과밀사육, 품종 열성화 등으로 양식 생물의 항병력이 저하되어 각종 질병에 의한 폐사량이 매년 증가하고 수익성 악화의 원인이 되고 있다. 질병에 의한 양식어의 폐사량은 전체 양식 생산량의 20%가 넘는 것으로 알려져 있다.

통계청 자료에 따르면 2009년 기준 국내 연간 천해 양식어업에 의한 총 생산금액은 9821 억원이며, 이중 넙치와 조피볼락, 돔 양식에 의한 생산금액은 9052 억원으로 가장 큰 규모를 차지한다. 2007년 한국어병학회지 “제주도지역 넙치양식장의 스키테카증 발생동향”(제20 권 제2호)에 따르면 어병 발생 건수는 해마다 증가하여 연간 1400건 이상이 발생하고 있으며, 이중 스키테카 증에 의한 스키테카증 발병률은 40% 전후로 높은 비율을 차지하고 있다. 하지만 현재 스키테카증에 대한 효과적인 치료 방법이 없어 그 피해액이 해마다 증가하여 심각한 문제가 되고 있다.

스쿠테카 감염증 (Scuticocillatosis)은 우리나라를 비롯하여 지중해 연안국가, 스페인, 호주, 일본 등지에서 발견되고 있으며 국내 주요 해산양식어인 넙치와 조피볼락을 비롯하여 다양한 해산어종에 감염되어 피해를 유발한다. 섬모충류의 하나인 스키테카충목에 속하는 30 μ m ~ 40 μ m 크기의 섬모충이 원인체로 현재까지 10여종이 알려져 있으며, 일본과 국내에서는 유로네마충에 의한 감염이 대부분인 것으로 알려져 있다. 스키테카 충은 주로 세균류를 먹이원으로 하며, 용존산소농도가 낮은 환경과 유기물이 많은 환경에서 활발하게 번식하기 때문에 양식수조를 이용한 양식 어종에서 감염이 쉽게 이루어진다.

이 기생충은 어체의 아가미, 피부, 지느러미의 상피조직의 하층, 진피와 근육층 까지 침입하여 상피세포의 증식, 비후 및 충혈 심지어 괴사까지 유발하는데 근육에서는 횡근섬유 세포 사이에 기생하여 조직을 붕괴시키고 괴사시킨다. 이 기생충은 또한 뇌에도 침입하여 감염을 유발하는데 뇌로 직접 침입하기도 하고 꼬리류 손상부위에 침입하여 중추신경계를 타고 뇌에 침입하는 경우도 있다. 이 기생충이 뇌에 감염되면 치료가 어려워 감염어는 대부분 폐사하는 것으로 알려져 있다. 이러한 스키테카 증의 발병은 집단 양상을 보여 집단 폐사로 이어지기 때문에 특히 큰 피해가 되고 있다.

2. 스키테카증 (Scuticociliatosis) & 스키테카충 (Scuticociliate)

스쿠테카증은 섬모충의 일종인 스키테카충 (Fig.1)[1]이 어체에 감염되어 발생하는 질병으로 세포 조직의 괴사 및 출혈을 일으키며 종국에는 죽음에 이르게 하는 질병이다. 아가미와 지느러미와 같은 체표로부터 감염된 스키테카충은 혈관을 따라 어체 내부로 깊숙이 침투하는 성질을 가져 체표뿐만 아니라 위장, 신장, 간 등 내장기관에서도 감염증상이 나타나는 질병이다. 어류, 갑각류, 연체류 등 대부분의 해양어류에서 스키테카충의 발병이 확인되었으며, 지역적인 특성 없이 전 세계적으로 발생하는 질병이다. 계절적으로는 기생충이 활발하게 번식할 수 있는 여름철과 같은 고온수기에 발생 빈도가 상대적으로 높고, 스키테카충의 번식 수온 범위는 5 °C ~ 30 °C로 넓기 때문에 연중 지속적으로 발생하는 질병으로 알려져 있다. 특히 기생충이 활발하게 번식할 수 있는 부영양화된 해안이나 양식수조에서 빈번히 발생하는 질병으로 감염 시 효과적인 구제방법이 전무하고 대량 감염, 대량 폐사의 양상을 갖기 때문에 양식 산업에서 가장 큰 피해를 일으키는 질병으로 심각한 문제가 되고 있다.[2-13]

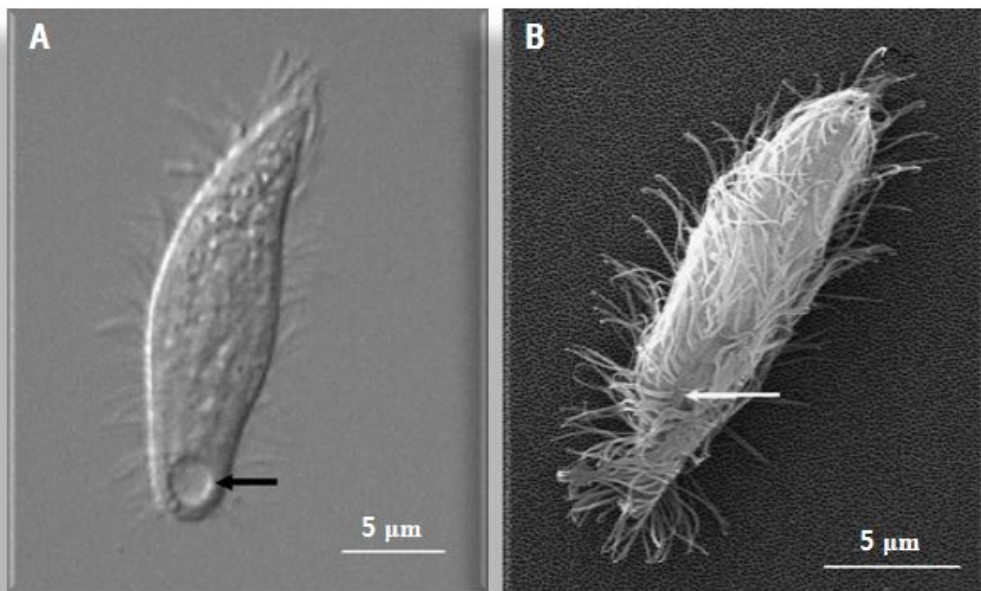


Fig. 1 살아있는 섬모충에 대한 DIC (Differential interference contrast) 사진과 스키테카충의 전자현미경 (SEM) 관찰 모습

어류에서 일차적인 스키테카증 감염 증상은 먹이 섭이 활동의 둔화, 체색의 흑화 현상과 더불어 수면 위에 떠다니는 생활상을 보이며, 표피, 근육조직, 지느러미 및 아가미 조직의 괴사, 출혈 증상 및 출혈로 인한 빈혈 증상, 체중 감소 증상이 나타난다. 체내에 감염시 근육조직, 신경조직, 척추강, 내장, 뇌 조직 까지도 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있으며 감염시 폐사율이 매우 높다. Fig.2에는 스키테카증 감염된 광어의 실물사진과 원인 기생충인 스키테카충에 대한 사진이다. Fig.3에는 어류 아가미의 정상조직과 스키테카충 감염조직의 관찰결과를 비교 하였다.



Fig. 2 스쿠티카충 감염 광어 조직괴사 실물사진

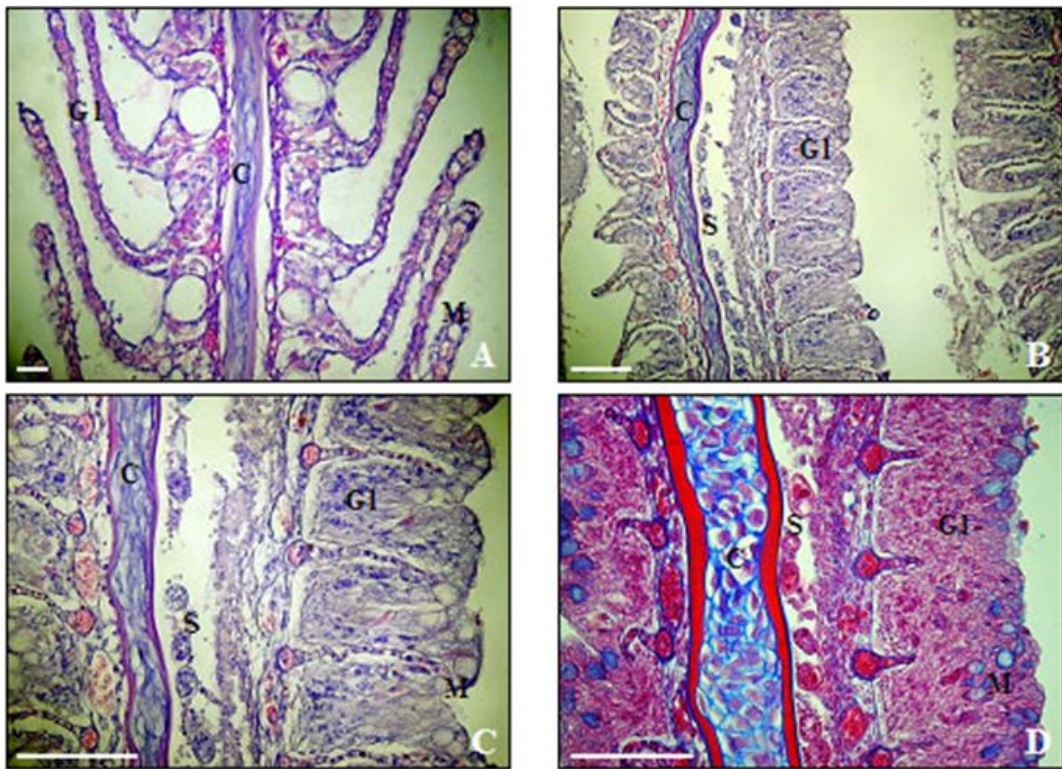


Fig. 3 어류의 정상적인 아가미 조직구조(A)와 스쿠티카충에 감염된 조직사진 (B-D)

스쿠티카충의 원인이 되는 스쿠티카충은 30 ~ 40 μ m 크기의 섬모충으로 1964년 Thompson과 Moewus에 의해 해마류에서 스쿠티카충목의 일종인 *Miamiensis avidus*의 감염이 처음 보고되었으며 이후 광어, 연어, 농어와 같은 양식어종 뿐만 아니라 꽃게, 가제와 같은 갑각류에서도 스쿠티카충의 감염이 보고되었다. 스쿠티카 섬모충에 대한 분류학적 위치는 원생동물문계 (Protozoa), 유모충아문 (Ciliophora), 소막충강 (Oligo-hymenophorea), 막구충아강 (hymenostomatia), 채찍섬모충목 (Scuticociliatida), 필라스테리나충아목 (Philasterina)에 속하나 목 이하는 아직 체계적으로 확립되어 있지 않다.

세계적으로 어류에 발생하는 스쿠티카충은 20 여종이 있으며, 해산어류에 기생하여 대량 폐사를 일으키는 스쿠티카충으로는 수족관에서 사육하는 놀래기류, 자리돔류, 나비고기류 등의 관상용 해산어류에 기생하는 *Uronema marinum*이 있으며 형태는 몸체 앞쪽 부위가 가늘고 뒤쪽 부분은 둥근 형태이며 크기는 $34 \times 16 \mu\text{m}$ 이다. 양식산 bluefin tuna(*T. Maccoyii*)에 기생하는 *Uronema nigricans*는 *Uronema marinum*과 유사하지만 크기가 $26 \times 12 \mu\text{m}$ 로 작은 편이며 (Munday et al., 1997), 해산 농어류에 기생하는 *Philasterides dicentrarchi*의 형태는 달걀 모양으로 크기는 $33 \times 15 \mu\text{m}$ 이며 (Dragesco et al., 1995), 양식산 turbot(*S. maximus*)에 기생하는 *Uronema marinum* 또는 *Miamiensis avidus* 의 형태는 달걀모양으로 앞쪽 부위가 뾰족하고 뒤쪽 부위가 둥근 모양을 하고 있으며 크기는 $32\sim 40 \times 16\sim 20 \mu\text{m}$ 이다.

수산양식어류에 피해를 주는 주된 스쿠티카충으로는 *Philasterides dicentrarchi*, *Miamiensis avidus*, *Uronema marinum*인 것으로 알려져 있으며, 특히 *Philasterides dicentrarchi*는 olive flounder, japanese flounder, turbot과 같은 수산양식어종에서 빈번히 발생 대량 폐사를 일으켜 심각한 문제가 되고 있는 종으로 알려져 있다. 스쿠티카충은 전 세계적으로 발생하는데 일본의 양식 산업에서는 어린 치어에서 섬모충성 질병과 박테리아성 질병이 심각한 영향을 미치고 있으며, 스페인이나 포르투갈에서는 *Uronema spp.*에 의한 양식장에서의 피해가, 노르웨이에서는 *Philasterides dicentrarchi*에 의한 농어 양식의 피해가 보고되었다. 스페인이나 포르투갈, 프랑스 등지의 광어양식에서는 *Philasterides dicentrarchi* 와 *Miamiensis avidus*에 의한 피해가 많은 것으로 보고되고 있다. 우리나라에서는 *Uronema marinum*에 의한 스쿠티카충 발생이 보고되었으며, 최근 농어와 광어 양식에서 *Philasterides dicentrarchi*에 의한 질병 발생으로 대량 폐사를 일으켜 경제적인 손실이 큰 것으로 보고되었다.

3. 광어양식 산업 및 스쿠티카충 피해현황

1990년대 들어 본격적으로 생산이 증가하기 시작한 양식넙치는 2010년에는 4만 1,891톤 (4,728억 원)이 생산되었다. 양식넙치 생산량은 우리나라 전체 양식 생산량의 3.1%에 불과하지만 생산금액으로는 26.4 %를 차지하고 있으며, 양식어류 생산량의 51.7 % (생산금액으로는 55.9 %)를 점하는 중요한 품목으로 자리하고 있다 [14]. Fig.4에는 연도별 양식광어 생산량과 생산금액을 도시하였다 [14]. 넙치 양식 수면적은 233.3 ha이며, 전체 621개 어가가 양식하고 있는데, 전체 양식면적의 77.8 %, 전체 생산업체의 70.0 %가 제주와 완도에 분포하고 있다. 또한 넙치는 우리나라에서 생산되는 횡감용 어류 중 소비자 선호도가 가장 높은 어종이기도 하다. 이러한 넙치 양식산업에 있어서 최근 들어 가장 문제가 되고 있는 것이 바로 어병으로 인한 질병 폐사량 증가이다. 넙치의 폐사는 단기적으로는 생산원가를 가중시킬 뿐 아니라, 장기적으로는 산업의 안정적 발전을 저해하는 요인으로 작용한다. 먼저 넙치 양성에서는 종묘비, 사료비, 전력비, 인건비 등 각종 비용이 투입되게 된다. 그런데 폐사가 발생할 경우 이때까지 투입된 원가는 판매를 통해 회수되지 못하고 전액 비용으로 처리되게 된다. 한편 넙치의 생산원가는 총비용을 생산량으로 분배한 것이기 때문에 결국 폐사어에 투입된 각종 비용 또한 생산되어 출하되는 넙치의 생산비에 반영되어 생산원가를 높게 만드는 요인이 되는 것이다.

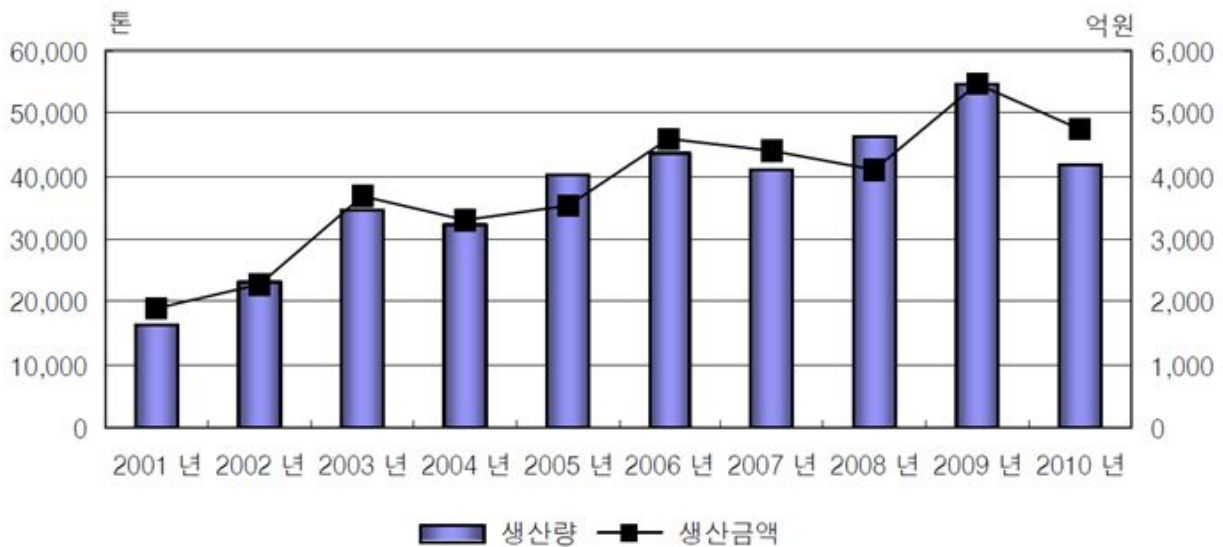


Fig. 4 연도별 양식 광어 생산량 및 생산금액

최근 양식 어업의 활성화로 인한 연안 수질 환경오염, 사육밀도의 과밀화, 품종 열성화는 양식 생물의 어병 저항력을 저하시켜 각종 질병에 의한 폐사량이 매년 증가하는 경향을 보인다. 특히 스쿠티카증의 경우 치어에서 성어에 이르기까지 발병을 하고, 집단 폐사의 양상을 갖기 때문에 감염시 큰 피해를 유발한다. 2007년 한국어병학회지 “제주도지역 넙치양식장의 스쿠티카증 발생동향”(제20권 제2호) [15]에 따르면 제주도내에서만 연간 1300건 이상의 스쿠티카증이 발생하고 있으며, 스쿠티카증에 의한 광어 폐사량은 전체 생산량의 약 20%에 해당하는 것으로 집계되고 있다. 2009년 국내 연간 광어 양식 산업의 규모 (5500 억원, 통계청)를 기준으로 보았을 때 스쿠티카증에 의한 피해규모는 연간 약 1000 억원에 이르며 이는 생산 원가의 50%를 차지하는 것으로 수익성 악화의 주요 원인이 되고 있다. Fig. 5 에는 넙치의 폐사동향에 대한 조사 분석 결과를 표로 나타내었다 [14]. 연도별 폐사량을 보면 2007년 가장 높은 폐사량을 기록한 이후 감소 했다가 다시 증가하는 양상을 보인다. 입식량 대비 폐사량 비율은 2009년 소폭 낮아지기는 했지만 연간 약 40% 수준으로 매우 높은 수준임을 확인 할 수 있다. 최근 2010년에는 폐사율이 다시 증가해 제주지역의 경우 양식넙치의 폐사율이 50%에 이르는 것으로 추정되고 있다. 수산업 관측센터에서 추산한 2010년 전국 폐사량은 전년에 비해 43.0% 증가한 6,840여 톤으로 추정되며 이를 금액으로 환산하면 약 664억 원으로 우리나라 양식넙치 생산금액의 14.0%에 달하는 것으로 예측되고 있다.

구 분	[단위/ 천마리, %]					
	2004년	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년
입식량	112,899	106,707	115,051	122,697	110,541	131,933
폐사량	29,940	40,588	47,621	53,957	44,792	48,767
폐사율	26.5	38.0	41.4	44.0	40.5	37.0

자료: 통계청 어류양식현황조사 각 년도. / 재인용 KMI 수산동향, 2011.

Fig. 5 연도별 양식 광어 폐사량 및 폐사율

한편, Fig.6에는 최근 3년도 월별 양식광어 폐사량을 추정한 그래프이다. 스키테카에 의한 양식광어의 폐사는 특별한 계절적 영향이 없다고 알려져 있으나, 그래도 하절기인 8-9월에 폐사량이 가장 많음을 확인 할 수 있다.

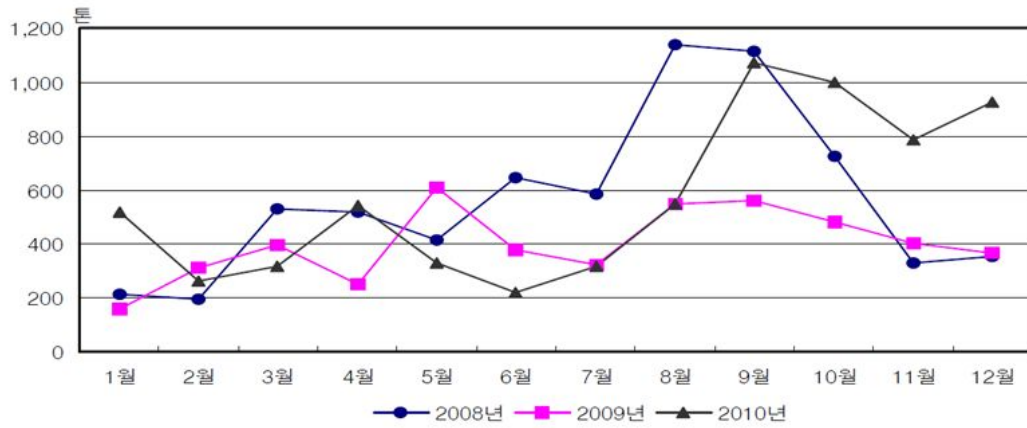
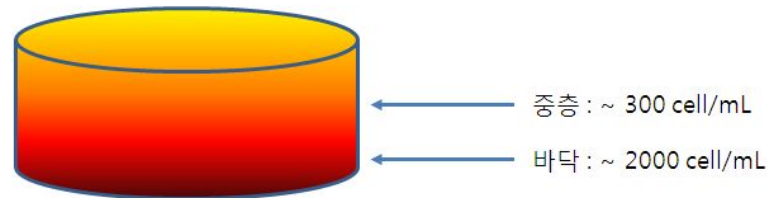


Fig. 6 양식 광어의 최근년도 월별 폐사추이

Fig.7에는 양식수조내 스키테카충 분포도를 나타내었다. 광어의 경우 주로 수조바닥에 붙어 성장함에 따라 스키테카충의 분포도 바닥 부분이나 저수조 침전물에 서식 밀도가 매우 높음을 알 수 있다. Fig.8에는 사육밀도에 따른 폐사율 상관관계를 나타낸 표로 사육밀도가 높을수록 폐사율이 증가함을 확실하게 나타낸다.



구분	장 소	스쿠테카충수 (cell/L)
물	취수구	2.0
	저수수조수	2.0
	사육수조수	110
침전물	저수수조 침전물	1,100

Fig. 7 양식 수조내 스키테카충 서식밀도

수조	사육밀도	누적 폐사율
A	260 마리/m ²	1.0 %
B	400 마리/m ²	2.0 %
C	800 마리/m ²	18.0 %

Fig. 8 사육밀도에 따른 누적폐사율

4. 질병에 의한 광어폐사 원인 및 스쿠티카증 구제현황

양식넙치의 폐사 원인은 자연 도태, 질병, 정전, 시설 파손 등 다양하지만 질병으로 인한 폐사가 가장 많은 부분을 차지하고 있다. 양식넙치에 발생하는 질병은 크게 바이러스, 세균, 기생충 기원의 질병으로 분류되며 이를 정리하면,

- 바이러스성 질병 : 바이러스성 출혈성 폐혈증(VHS ; viral hemorrhagic septicemia), 버나바이러스, 이리도 바이러스로 인한 질병.
- 세균성 질병 : 활주, 비브리오, 에드워드, 연세구균에 의해 발생
- 기생충 : 스쿠티카, 트리코티나, 백점충, 익티오보도 등.

과거 이러한 질병들은 대부분 단독 감염에 의해 발생했으며, 주로 치어에 발생하였다. 그러나 최근에는 세균, 바이러스, 기생충 단독 감염 뿐 아니라 둘 이상의 세균이 복합적으로 발병하기도 하고, 세균과 기생충이 동시에 발병하기도 하는 등 다양한 형태로 발병. 또한 크기별로는 최근에는 500g 크기 이상의 중/대형어의 발병이 증가하는 등 상황이 점점 심각해지고 있다. [16-26]

앞서 설명한 바와 같이 어병발생 증가 원인은 불량종묘의 문제, 수질환경 악화, 사료의 질 저하, 양식장 관리 부족 등이 주요 요인으로 꼽히고 있다. 불량종묘 문제는 치어 열성화, 수정란 부화 후 종묘 생산과정에서 영양관리 미숙, 부화장의 방역관리 소홀 등이 폐사의 원인으로 지목된다. 수질환경 문제는 파도 등으로 인해 발생하는 부유물이 많은 연안수의 유입, 양식장 배출수의 재유입, 연안 수질 자체의 악화 등이 주요 요인으로 작용한다. 또한, 2010년 사료 원료어의 어획량이 급감하면서 전갱이, 청어, 고등어 등 생사료 가격이 상승. 원가를 절감하기 위해 부산물 등 저급 사료를 사용하면서 영양 공급이 불량해지는 등의 문제가 발생하는 것으로도 알려져 있다. 양식장 관리에 있어서도 여러 변화가 있었는데, 산소 발생기 등을 이용하여 양식밀도를 더욱 높여 생산하려는 경영체가 증가하였고, 폐사가 발생할 것을 예상하여 입식량을 더욱 늘리는 경영체도 늘어나 양식밀도가 높아져 어병이 발생 할 경우 대량 폐사로 이어지고 있다. 뿐만 아니라 양식장 시설 노후화, 자연수를 소독하지 않고 그대로 사용하는 현재의 양식 시스템 또한 수질 및 환경 악화의 영향을 그대로 받을 수밖에 없는 상황에 있다.

현재 국내에서 통용되는 대표적인 스쿠티카증 구제방법은 Fig.9 에 요약정리 하였다. 현재 수산양식현장에서는 스쿠티카증을 구제하기 위한 방법으로 350 ± 150 ppm의 포르말린 또는 과산화수소 약욕 방법이 가장 일반적으로 이용되고 있다. 하지만 이러한 유독한 물질의 사용은 수산 양식에서의 먹거리 안전을 위협하고 환경오염을 야기할 수 있기 때문에 문제가 되고 있으며, 이들 약품에 대해서 세계적으로 사용이 금지되고 있는 추세이다. 하지만 아직까지 포르말린 약욕법을 대체할 수 있는 효과적인 스쿠티카증 구제 방법이 전무한 상황으로 관련 연구 개발이 시급한 상황이다. 최근 이들 물질을 대체하면서 항 스쿠티카증 효능을 갖는 새로운 물질의 적용 결과가 많이 보고되고 있으나 실험실 평가에 국한된 내용이며 아직까지 실제 양식 현장에서 그 효과가 검증된 경우는 없다.

대표적인 스키테카증 구제방법

- 포르말린 약욕 : 현재 대부분의 양식장에서 사용
 - 수조에 150 - 400 ppm 농도로 약욕 ⇒ 잔류 시 독성 및 환경 문제
 - 그러나, 아가미부종, 상피세포 박리, 혈전 증상, 체표점액의 과다분비
 - 여체 저항력 약화 문제
- 과산화수소: 수조에 200 - 400 ppm 농도로 약욕 ⇒ 효과가 약함
- 후와산: 과산화수소+은 제품(제품출시 후 소멸)
- 알긴산 추출물: 연구 단계 (고농도에서 효과)
- 키토올리고당 제품: 제품출시 후 소멸
- 아미노레블리닌산 : 특허
- 분말황토를 이용하여 표면스키테카증 응집제거 (1999/국립수산과학원)
- 항진균제 (Ketoconazole) 경구 투여제 (2000/국립수산과학원)
- 항생제 (Terinafine) 투여방식 (2006 /대한뉴팜)
- 고효율백신 활용방법 (2006/부경대학교) 등이 알려져 있음.
- 송절추출물, 부틸알데히드 이용 살충조성물 (2007/창조바이오텍)

Fig. 9 대표적인 스키테카증 구제방법

또 다른 계열로는 항생제나 항생물질 이용방법이 있다. 국내 양식어가에서는 스키테카증을 포함한 기생충성 질병의 구제를 위해 oxytetracycline, gentamycine, tetracycline, amoxicillin, cefazolin 과 같은 항생제 물질을 350 ~ 150 ppm 농도로 처리한다. 하지만 아직까지 양식 현장에서 이들 항생제 물질의 스키테카증 구제 효과에 대해서 과학적으로 검증된 경우는 없다. 지금까지 25가지 이상의 항생제 물질에 대해서 실험실에서의 *in-vitro* 검증 결과로 항 스키테카 효능에 대해서 보고가 되어 있다. Dimetridazole을 *Philasterides dicentrarchi*에 감염된 농어에 약욕의 방법으로 적용한 결과 구제 효과가 있었으며, Dimetridazole을 사료에 첨가하여 경구 투여하는 방법으로 *Ichthyophthirius multifiliis* (백점충, 스키테카충과 더불어 양식 어류에 빈번히 발생하는 기생충성 질병)에 감염된 무지개 송어를 효과적으로 구제할 수 있었다. Nitroimidazole을 사료에 혼합하여 경구 투여하여 *H. salmonis*에 감염된 연어의 효과적인 구제가 가능하다. 말라리아에 효과가 있는 것으로 알려져 있는 Quinine을 약욕의 방법으로 적용하여 *Ichthyophthirius multifiliis*과 *H. salmonis*에 감염된 송어의 구제가 가능하였으며, Quinine을 경구투여 하는 방법도 효과가 있는 것으로 보고되었다. Quinine는 *tetrahymena pyriformis*에서 세포의 분화를 막고 인산화 반응을 막는 작용을 한다. 역시 항 말라리아 물질인 quinacrine를 200ppm 농도로 2시간 약욕 처리 할 경우 *Tetrahymena pyriformis*과 *Ichthyophthirius multifiliis*의 성장을 억제하며 기생충의 50%가 살충되는 것으로 보고되었다. 하지만 quinacrine를 짧은 시간 동안 약욕 처리하는 것은 전혀 효과를 보이지 않아 일정 시간의 약욕 처리가 필요하였다. 일반적인 항 원생동물 물질인 quinacrine은 생체 내에서 산화, 환원 과정에서 중요한 역할을 하는 숙신산(succinic acid)의 산화를 막고 전자의 이동을 방해하는데 기여하며, quinacrine의 항 말라리아 특성은 말라리아의 리보핵산과 ATP의 성분인 아데노신의 발생을 억제하기 때문이다. Salicylanilides, niclosamide과 oxyclozanide을 0.8ppm의 농도로 처리 시 *Philasterides dicentrarchi*에 대해서 우수한 효과가 있는 것으로 보고되었으며, 송어에서 Metronidazole을 1mg/L 약욕 처리하여 *Trichodina*, *Ambiphyra*, *H. salmonis* 에 효과가 있는 것으로 보고되었다. 이외에도 Flubendazole, levamisole, netobimin, niclosamide,

nitroxylnil, oxibendazole, parabendazole, piperazine, praziquantel, tetramisole, thiophanate, trichlorfon, triclabendazole 과 같은 항생제 물질들이 Ichthyophthirius multifiliis에 효과가 있는 것으로 검증되었으며, Ketoconazole, toltrazuril, amprolium, sulphaquinoxaline, quinacrine, N-metylglucamine 과 같은 물질도 Ichthyophthirius multifiliis와 담수 기생충인 Ichthyobodo necator(익티오보도)의 살충 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

하지만 지금까지의 기생충에 대한 항생제의 살충효과는 *in-vitro* 연구 결과로 실제 농어 및 광어 양식어장에서 스쿠티카증 구제를 위해 적용하기 위해서는 몇 가지 고려하여야 할 사항이 있다. 첫째, 스쿠티카증은 체표로부터 혈관을 따라 체내로 침투하여 심장과 같은 내장기관에서 발병한다. 특히 최근 광어 양식에서 큰 피해를 주는 *Philasterides dicentrarchi*는 2분법으로 급격하게 개체 분화 되고 침투성이 강한 매우 위험한 종으로 상기의 항생제 물질을 이용한 약육의 방법이 효과를 발휘 하는 데는 한계가 있다. 약육의 방법을 보완하기 위해 먹이를 이용한 경구투여 방법을 적용하더라도 질병에 걸린 어류는 먹이에 대한 섭이력이 현저히 떨어지기 때문에 사실상 원하는 효과를 얻기 어렵다. 효과적인 항생제가 있다 하더라도 어떻게 효과적으로 질병에 걸린 어류에 적용을 하느냐가 관건일 것이다. 둘째, 상기 같은 항생제 물질은 부수적인 환경오염 및 어체내 잔류할 위험이 있기 때문에 대부분의 물질이 수산양식에서의 적용이 금지되어 있으며, 먹거리 안전을 위해서 상기와 같은 항생제 물질의 사용에 대한 충분한 안전성 확인이 필요하다. 셋째, 일부 항생제 물질의 경우 *in-vitro* 실험실 평가 결과에서는 기생충에 대해서 살충효능을 보였으나 해수 조건에서는 효능이 감소되거나 효능을 보이지 않는 문제가 있어 실제 양식 현장에서의 평가 결과가 요구된다. 마지막으로 사용하는 농도 조건에 대해서 각별한 주의가 필요하다. 기본적으로 상기의 항생제 물질은 독성이 있는 물질로 일정농도를 초과하여 사용하는 경우 어독성 및 어류 폐사의 위험이 있다. 실제 Niclosamide 약육 방법의 경우 매우 유독한데 간혹 Niclosamide 약육 처리를 하였을 경우에 약육 처리를 하지 않은 경우보다 폐사율이 높았다는 경우가 있다.

포르말린은 수산양식에서 기생충성 질병을 구제하기 위해 현재 가장 일반적으로 적용되는 방법이다. 보통 167 ~ 250ppm의 농도로 30~60분간 약육 처리법으로 적용하는데 외부 기생충성 질환과 세균성 질환을 치료하기 위한 목적으로 주로 사용된다. 포르말린이 강력한 살균 및 항균 특성을 갖는 것은 기생충의 지방질을 녹이고 단백질을 결착시키기는 작용을 하기 때문이다. 포르말린은 기생충 뿐만 아니라 동물에게도 매우 유독한 물질이다. 포르말린의 독성과 어종특성을 고려하여 적절히 사용하지 못 할 경우 오히려 어체내 산소를 감소 시켜 죽음이 이르게 할 수 있다. 때문에 포르말린 약육법은 약 60 ~ 70ppm의 저농도로 실시하는 것이 바람직하다. Iglesias R (2002)등에 의하면 포르말린을 60 ~ 250ppm 농도로 30~60분간 약육방법으로 처리하면 *Philasterides dicentrarchi*의 살충에 효과가 있다. 하지만 이러한 포르말린 약육법은 기생충이 어체내로 침투하였을 경우에는 효과가 없는 것으로 알려져 있으며, 사료를 이용한 경구투여 내지 주사를 이용한 주입 방법에 대해서는 아직 검증된바 없다. Trichodiniasis의 경우 포르말린 약육법으로 제어가 가능하나 질병의 전염을 막기에는 불충분한 것으로 알려져 있어 포르말린 약육법 만으로 기생충성 질병을 완벽히 구제하는 데는 한계가 있다. 또한 수산 양식에서 사용이 허가된 일부 포르말린의 경우 고순도로 정제된 제품으로 가격이 비싸다는 문제가 있으며, 포르말린이 어체내 잔류할 경우 수산 양식 먹거리의 안전에 큰 위험이 되며, 환경

오염 문제를 유발할 수 있다는 문제점이 있다. 포르말린과 유사하게 malachite green 수산양식 산업에서 항기생충 물질로 폭넓게 사용되어왔다. 모든 농도에서 malachite green는 섬모충에 대한 저항성을 가지며 일반적인 사용은 67ppm 농도에 1분간 담지, 1~2ppm 농도에 60분간 약욕하는 방법이 있다. 하지만 malachite green의 유해성으로 인하여 수산양식에서 그 사용이 금지되고 있다. FDA는 malachite green의 유해성 때문에 이를 사용한 수산식품의 수입을 일체 금하고 있으며, 1983년부터 미국에서는 수산 양식에서 malachite green의 사용을 엄격히 금지하고 있으며, 중국에서도 malachite green의 사용이 금지되어 있다.

어류의 면역을 증강시켜 기생충성 질병을 구제하기 위한 다양한 면역물질과 백신에 대한 연구가 최근 많이 이루어지고 있다. 이러한 연구 내용도 앞서 항생제 및 살충제 성분의 평가와 마찬가지로 아직까지는 *in-vitro* 평가 결과로 실제 양식 현장에서 적용하기 위해서는 실제 현장 적용 평가 검증이 요구된다. 기생충성 전염병이 어체의 아가미 내지 피부에 국한되지 않고 체내로 침입하는 특성을 갖기 때문에 항생제, 살충제를 이용한 약욕의 방법으로는 좋은 효과를 얻기 어렵고, 항생제, 살충제 성분에 대한 안전성에 대해서 충분히 검증이 되지 않은 문제가 있는 반면 백신을 이용한 방법은 어체고유의 면역을 증진시키는 방법으로 항생제 및 살충제를 대체하는 기생충성 질병의 구제 방법으로 최근 주목받고 있다.

키토산 (Chitosan)은 동물성 플랑크톤, 새우, 게등 갑각류의 외골격이나 균류의 세포벽을 이루는 주요 구성물질인 키틴은 N-acetyl-glucosamine으로부터 유래되는 물질로, 생물체에 무독성이며 생체 적합성과 생분해성이 좋아 다양한 약제에 이용되고 있다. 특히 올리고당 키토산의 경우 항생제로 치료되지 않는 세균과 곰팡이성 질병 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Kim et al.(2001)의 보고에 의하면 키토산 올리고당을 스쿠티카충에 감염된 광어에 투여하였을 때 살충의 효과가 있었으며, 현미경 관찰에 의한 스쿠티카충 사멸과정을 확인한 결과 키토산 올리고당이 투여된 이후 시간이 지남에 따라 섬모의 운동성이 현저하게 감소되고 외형상의 모양이 원형으로 변하고, 사멸 될 때에는 스쿠티카충 세포 자체의 파괴현상이 일어났으며 스쿠티카충의 삼투 조절에 관여하는 수축포의 형태가 증가하였다. 이러한 결과는 키토산 올리고당이 세포막 단백질과 2가 양이온을 흡착함으로써 세포막에서의 이온 평형이 변질되었기 때문으로 결국에서는 스쿠티카충 세포막을 파괴하는 결과를 가져온 것으로 분석되었다.

어류에서 질병을 예방하기 위한 항원은 보통 냉동 또는 포르말린으로 처리한 기생충으로부터 얻어낸다. 항원과 첨가체로 이루어진 백신을 2회 투여한 광어는 5달 후에도 *Philasterides dicentrarchi*에 대한 면역력을 가져 스쿠티카충에 대한 구제 효과가 뛰어났다. 또한 Iglesias는 *Philasterides dicentrarchi* lysate (세포의 용해물)와 보조제 또는 포르말린 고정된 섬모충을 광어에 주사하여 스쿠티카충을 예방할 수 있음을 보였다. Freund's adjuvant 가 주입된 물고기는 높은 혈청 활성능을 보이고 높은 생존률을 보였다. Freund's adjuvant의 주입에 의한 자연적인 면역 반응의 메커니즘이 거의 규명되지 않았지만, 광어에서 adjuvant의 주입에 의해 면역력이 향상될 수 있고 생존률이 향상되는 긍정적인 효과를 보였다.

최근 스쿠티카충에 대해 자연추출물인 허브성분을 구제의 목적으로 이용하는 연구가 다수 보고되고 있다. 하지만 아직까지 스쿠티카충에 대해 효과적인 결과를 얻고 있지 못하며,

어체에 대해서 정확히 어떠한 영향을 주는지 확인되어 있지 않다. 예를 들어 마늘 추출물인 Alliumsatiyumhas는 백점병에 효과가 있으며 monogenean flatworm의 전염을 막고 요각류 기생충의 전염을 치료하는데 효과가 있음이 보고되었다. 최근 몇 년 전 부터 해양 수족관 관리를 위해 마늘 추출물이 이용되고 있으며, 백점병 (Ichthyophthiriasis)에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 마늘 성분 중 satiyum은 trichodinids (외부기생충일종)을 근절하는 효과가 있으며, 15 시간 내에 Ichthyophthirius multifiliis을 살충하는 것으로 알려져 있다. 마늘의 종류와 마늘 추출물의 성분에 따라서 효과가 다른 것으로 알려져 있기 때문에 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다. Caprylic acid 는 코코넛 오일과 버터에서 발견되는 중간체인 지방산이다. Caprylic acid는 어류에서 trophonts (전모충류 Holotriha의 생장기)의 전염을 예방하는데 효과가 있었으며, 유사한 결과로 사료에 사료에 caprylic acid를 첨가하였을 경우 coccidia(척추동물 소화 기관의 기생충)의 수가 감소되는 결과를 보였다.

5. 개발대상 기술 개요

본 연구개발에서는 종래의 유해 화학물질을 대체 할 수 있는 향 스퀴티카 기능의 천연 물질을 선정하고 이를 나노레벨에서 복합시켜 활성성분을 양식수조내로 안정하게 전달할 수 있는 전달시스템을 개발하고 이를 이용하여 향 스퀴티카 성능이 우수한 약욕제제를 개발하는 것이다. Fig.10에는 본 연구범위를 도식적으로 나타낸 것이다. 천연 추출물 가운데 향 스퀴티카 특성이 알려진 천연물을 선정하고, 이를 층간삽입 반응 (intercalation)을 이용하여 나노레벨에서 복합화 시켜 유기-무기 나노복합소재를 합성하고 이를 과립형태의 제형을 만들어 광어양식 수조에 적용할 수 있는 제품을 개발하는 것이다. 천연활성물질에는 피톤치드 (phytocide)의 주 성분인 알파-피넨 (alpha-pinene), 캄펜 (camphene), 카페인 (caffeine), 퀴닌 (quinine) 및 감귤 껍질로부터 주로 얻어지는 리모넨 (d-limonene) 등이 알려져 있다. 이런 천연물질은 공통적으로 일정정도의 향균 및 살충효능을 나타내는 반면 휘발성이 높거나, 물에서의 용해도가 매우 낮거나, 과량으로 적용되는 경우 독성이 나타나는 등의 문제점도 동시에 수반한다. 이런 불안정/불안정한 물질을 무기담체로 점토 (clays)의 층간에 층간삽입 시켜 나노복합화 시켜 나노복합체 (nanocomposite)를 제조하고, 이를 바인더를 이용하여 과립화하여 현장 적용이 가능한 제형을 개발하는 것이다.

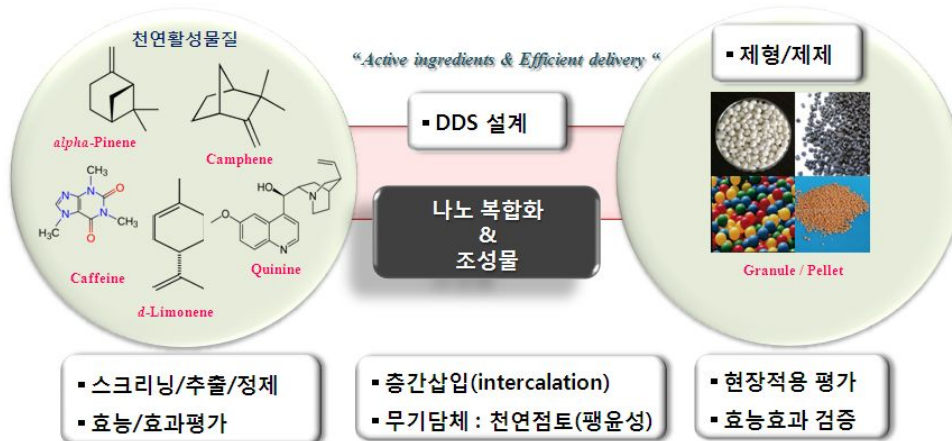


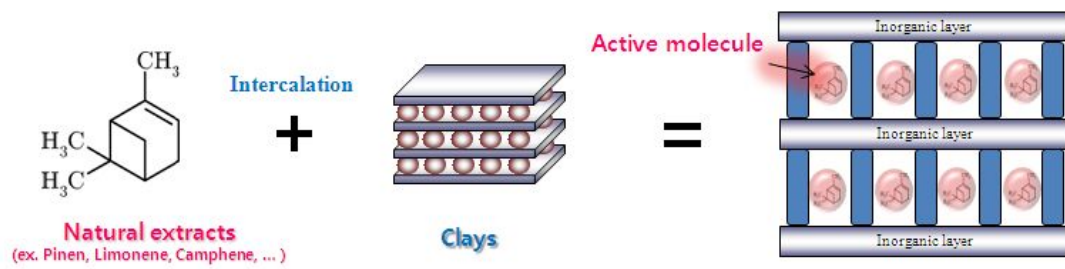
Fig. 10 천연활성물질의 나노복합화를 통한 향 스퀴티카 약욕제제 개발 모식도

Fig.11에는 천연물의 층간삽입에 의해 유도되는 나노복합체 소재 컨셉을 도식적으로 나타낸 것이다. 향 스쿠티카 활성성분의 향균 및 살충과 같은 효과를 최적화하기 위해서는 활성 천연물질의 양식장 수조 내에서의 용출속도 조절이 필수조건이 된다. 즉, 수조내에 유효 약효 농도를 일정하게 유지하기 위해서는 활성성분의 농도가 일정하게 유지되어야 하며 이를 위해서는 활성성분의 용출속도가 조절되는 전달체가 필요하다. 특히, 유효활성성분이 안정성, 휘발성, 용해도 등의 물리적 특성에 의하여 효과적인 전달이 곤란한 경우 이를 극복할 수 있는 전달기술이 요구된다.

본 연구에서 중점적인 연구대상인 알파-피넨이나 리모넨의 경우 난용성 물질로 물에 대한 용해도가 극히 낮아 직접 살포하는 경우 광어가 서식하는 수조 바닥으로 활성성분의 전달이 불가능하다. 또한, 알파-피넨이나 리모넨의 경우 휘발성이 매우 크기 때문에 담체를 통하여 안정화 시키지 않는 경우 일정한 살포나 약효의 기대가 불가능하다. 또, 일시에 과량 수조에 투여하는 경우 오히려 어류의 독성피해를 야기할 수 있다. 이런 경우는 활성물질의 용출을 일정하게 제어 할 수 있게 소재 시스템이 설계되어야 한다.

본 연구에서는 천연물로부터 유래된 향 스쿠티카 활성성분을 천연 미네랄의 일종인 점토 화합물을 이용하여 복합화, 전달담체로 활용 하고자 하였다. 본 나노복합화 관련 기술은 본사는 경제성이 뛰어난 고상층간삽입법 (solid intercalation method)에 대한 원천특허를 보유하고 있다. 바이오 활성물질의 전달담체 (delivery vector)로써 점토화합물의 특징은 일단 층간반응성이 우수하여 층간삽입(intercalation)을 통해 다양한 활성성분을 효과적으로 담지 할 수 있고, 천연으로부터 얻어지는 물질로써 어류, 생태계에 매우 안전한 생태/환경친화형 전달담체이다. 본 연구에서는 층간반응성이 우수하여 활성성분의 안정화 및 용출속도 제어에 효과적으로 적용될 수 있는 팽윤성 점토계열인 스멕타이트 (smectite)계 점토의 대표적인 광물종인 몬트모릴로나이트 (montmorillonite)점토를 주로 사용하였다.

향 스쿠티카 활성성분인 피넨, 캄펜, 리모넨과 같은 친유성 (소수성, hydrophobic) 물질인 경우 친수성이 강한 점토 화합물과의 혼화성이 매우 부족하다. 따라서 이와 같은 친유성 물질은 친수성 점토에 직접적으로 섞어주는 경우 복합체 형성에 따른 안정화 및 약효의 서방화 특성을 구현하기 어렵다. 따라서 친유성 활성물질을 복합화 하기 전에 친수성 점토를 유기물질을 이용하여 친유성으로 표면특성을 개질해 줄 필요가 있다. 이때 사용되는 유기물질로는 대표적으로 4급 암모늄염이 있으며 cetyltrimethyl ammonium chloride, stearyltrimethyl ammonium bromide, distearyldimethyl ammonium chloride, benzalkonium chloride 등이 활용될 수 있다. Fig.11 에는 층상점토 물질의 층간을 유기물질로 1차 표면 개질하고 여기에 친유성 활성물질을 복합화 시켜 천연물-점토 나노복합체 제조 공정을 도식적으로 나타내었다. 그림과 같이 천연 활성 분자를 점토의 나노스페이스 층간에 안정화 시킴에 따라 활성물질의 높은 휘발성을 억제하여 물질의 안정성을 개선할 수 있으며, 난용성 물질인 소수성 물질을 분자 수준으로 분산시킴에 따라 물에서의 용해도 또한 개선할 수 있다. 또한, 층간에 안정화된 피넨 분자가 용출되는 경우 확산 속도를 매트릭스의 조성 및 구조 조절을 통해 제어하여 서방성의 구현이 가능하다.



- 휘발성 (Highly volatile !)
- 용해도 (Poorly water soluble !)
- 독성/안전성 (Toxicity & Safety !)
- 가격 및 경제성 (Cost !)



- 안정성 (Stability !)
- 안전성 (Safety !)
- 용해도 (Solubility !)
- 제어 용출 (Sustained releasing !)

Fig.11 층간삽입 반응에 의한 나노복합체 소재 모식도

제 2 절 기술개발의 중요성/필요성

1. 기술개발의 필요성

현재 국내의 경우 최근 증가하는 스쿠티카증의 피해를 구제하기 위해 2006년 국립수의 과학검역원은 정제 포르말린 5개 제품의 사용을 승인 하고, 해양수산부는 “기생충 구제제 안전 사용 지도지침”을 통해 포르말린을 사용하도록 허가하였다. 현재 스쿠티카증 예방 및 치료를 위해 사용되는 포르말린 양은 국내 광어 양식 규모를 고려 하였을때 연간 54,674,000 L 가 소요되는 것으로 추산되며 정제포르말린의 가격 (6천원/L)을 고려하였을 때 연간 330억에 이를 것으로 추산된다. 한편, 포르말린은 국립환경과학원에서 유독물로 분리하는 발암 물질로 환경부에서는 포르말린 사용에 대한 규제를 강화하고 있으며, 포르말린을 일정 농도를 초과하여 사용시 오히려 어독성을 가지며 어류 패사를 일으키는 문제가 지적되고 있다. 현재 포르말린을 대체하는 스쿠티카증 구제용 제품 내지 방법은 전무한 상황이다. (한겨레 2004년, 환경일보 2006년, 국립수산과학원)

친환경 양식기술 확립, 안전한 먹거리 제공, 고부가가치 양식제품 개발을 위해서는 포르말린을 대체하는 효과적인 스쿠티카증 예방 및 치료제의 개발이 시급히 요구 되고 있으며, 집단패사로 인한 경제적 손실의 개선을 위해서도 꼭 개발이 요구되고 있는 분야이다. 최근 포르말린 약육 방법을 대체하기 위해서 광어에 항생제를 투여하여 면역력을 갖게 하거나 친환경 천연물질로부터 항 스쿠티카증 활성물질을 얻어내는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 국내에서는 천연 물질을 농축하여 새로운 항 스쿠티카 활성 물질을 찾고자 하는 연구가 집중적으로 이루어지고 있는데, 이러한 천연 물질들은 대부분 제조 공정이 복잡하여 원료 단가가 높고 치료 효과를 얻기 위해서는 장기간 약물을 사용해야 하는 문제점이 있다. 또한 기본적으로 천연으로부터 얻어지는 살충성 물질은 일정 농도를 유지하면서 사용하지 못하면 오히려 어독성 및 어류 패사를 발생시키는 문제가 있어 약효가 있더라도 사용상의 문제 때문에 실제 양식 어장에서 사용하는 것은 매우 어려운 실정이다. 따라서 다양한 항산화 및 살충효능이 있는 천연물질로부터 유용성분을 선정하고 이를 이용한 천연살충제의 개발은 종래 환경 및 인체 유해물질의 사용을 배제하고 안전한 먹거리 제공과 관련 수산양식산업의 경쟁력을 높이기 위해 개발이 필요한 분야이다. 특히, 나노레벨에서의 천연 유용성분과 천연 미네랄에 기반 한 무기담체와의 복합화를 통한 신규소재의 개발은 활성성분의 안정화, 제어용출 특성의 구현, 어독성 개선, 살충효과의 극대화 등 다양한 기술적인 진보를 이룰 수 있을 것으로 기대된다.

2. 기술개발의 중요성

천연물 나노복합체를 이용한 친환경 어병방제제의 개발은 다음과 같은 경제적, 산업적 중요성을 갖는다.

- 경제적/산업적 중요성
 - 국내 친환경 양식 산업용 핵심원천 기술 자체확보

- 스쿠티카 감염에 의한 양식광어 폐사율 개선 (매년 500 ~ 600 억원)
- 양식광어 폐사율 개선을 통한 양식어가 소득증대, 생산성 향상
- 천연유용물질 활용 및 서방형 제품 개발을 통한 고부가가치 어병 방제제 개발
- 국내 양식 제품의 해외 수출을 위한 환경장벽 극복 기술 제공
- 국내 200억 이상, 해외 2,000 억원 이상의 항스쿠티카 제제 개발
- 친환경 양식용 신기능성 바이오제품 제공을 통한 양식산업의 고부가가치화 촉진
- 환경/인체 유해물질 사용회피를 통한 안전한 먹거리 제공
- 관련 주변 분야 (천연물 및 전달기술 활용분야)로의 원천기술 전파 및 개발촉진
- 전문연구인력 양성 및 참여기업의 R&D 포텐셜 제고

▪ 학술적/기술적 중요성

- 친환경 양식 산업용 핵심 제품 개발
- 천연물 및 유용물질 전달관련 핵심원천 기술 확보
- 핵심원천 기술의 기업 전파를 통한 응용제품 개발 촉진
- BT-NT 융합형 나노복합화 기술 설계 및 제조 기술 확보
- 참여기업의 요소기술 및 소재 통합을 통한 win-win 사업화 모델 확립

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내·외 관련 기술의 현황

스쿠티카증은 감염 종묘를 비롯하여 환수가 좋지 못한 사육 수조에 상존하는 스쿠티카충이 감염원으로 작용하여 발생한다. 스쿠티카충의 치료는 과산화수소, 포르말린 또는 다른 화합물이나 황토 약욕법으로 이루어지고 있으나, 이는 경감염어에 대해서만 치료 효과를 가지며 안구, 뇌, 근육 속에 스쿠티카충이 잠입한 중감염어의 경우 사실상 구제가 어려운 실정이다. 국립수산물과학원 어병정보센터에 의하면 현재 스쿠티카증에 대한 효과적인 치료 방법이 없는 상태이며, 스쿠티카증에 의한 피해를 최소화하는 방법으로 예방하는 방법을 권장하고 있다. 스쿠티카증의 예방을 위해서는 종묘장의 경우 먹이 생물 배양조 내 스쿠티카충의 밀도를 낮추고, 사육 시설의 철저한 소독과 정기적인 청소를 권장하고 있고 양성어장의 경우 감염 종묘의 입식을 방지하고 사육수가 정체되지 않도록 권장하고 있다. 스쿠티카증 경감염어(체표 또는 아가미에 기생된 상태)는 감염 정도에 따라 항 스쿠티카 물질을 약욕의 방법으로 처리하며, 중감염어의 경우 현재 유효한 치료 방법이 없기 때문에 발견 즉시 수거 및 폐기 할 것을 권장하고 있다.

과거 체표나 아가미에 기생된 경미한 감염의 경우는 포르말린을 100-200 ppm으로 1시간 동안 약욕시키고, 수조를 청소하고 맑은 해수를 공급해 주었는데 최근 포르말린의 강한 독성 때문에 사용이 금지되었으며, 현재 국내 양식업계에서 사용되는 치료 약제로는 설파제, 항생제, 푸란제, 합성 항균제 등과 같은 항균제 및 구충제, 소독제 등이 사용되고 있으나 효과를 거의 보지 못하고 있는 실정이다. 또한 이러한 물질들은 기본적으로 독성이 강한 물질들로 적절한 농도를 초과하여 과량 사용시, 오히려 어류패사 및 어독성이 발생하는 문제점이 있다. 최근 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 독성이 약한 성분들을 이용한 스쿠티카충 살충제에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 한국등록특허공보 제10-0563275호(염산 터피나핀을 유효성분으로 함유하는 양식어류의 스쿠티카병 예방치료제), 한국등록특허공보 제10-0279281호(알긴산염 올리고당 유도체를 유효성분으로 하는 어류 기생충 스쿠티카 살충제), 한국등록특허공보 제10-0379026호(양식 넙치의 스쿠티카충 구제방법), 한국등록특허공보 제10-0820247호(송절추출물을 유효성분으로 포함하는 스쿠티카충 살충용 조성물), 한국등록특허공보 공개특허 10-2007-0063936 (부틸알데하이드를 이용한 스쿠티카충 살충용 조성물)에는 독성이 약한 새로운 항 스쿠티카 물질에 대한 연구 결과를 보고하고 있다. 하지만 상기의 발명에서 보고되는 항 스쿠티카 물질은 대부분 제조 방법이 어려워 고가이며, 스쿠티카증에 대해서 치료 효과를 보기 위해서는 일정한 농도로 장기간 사용해야 하는데 실제 양어장에서 이와 같은 사용은 현실적으로 어렵다. 한국등록특허공보 공개번호 특2003-0075066 (양식어류용 사료첨가제)에서는 양식 어류에 발생하는 어병의 예방과 치료를 위해 어류의 성장 촉진과 면역증강 기능을 갖는 고분자 키토산을 사료에 혼합하여 제공하는 현실적인 방법을 제안하였는데, 항 스쿠티카 물질을 단순히 사료에 첨가하여 사용하는 방법 생각해 볼 수 있으나 이는 실질적으로 약물의 농도를 조절할 수 있는 방법이 아니기 때문에 적절한 약효 효과를 기대하기 어렵다. 스쿠티카 병해에 대해서 일반적으로 약물의 약욕 방법이 제안되며(등록특허

10-0768143), 많은 신규 항 스쿠티카 물질에 대해서 활발히 보고되고 있으나, 아직까지 국내 뿐만 아니라 해외에서도 점토 내지 다공성 담체 물질을 이용하여 약물을 복합화시키고 서방성을 부여하는 연구 결과에 대해서는 보고되고 있지 않다. (주)나노스페이스는 한국등록특허공보 제10-2009-0039969 (화장품용 기능성 활성 물질-무기 점토 복합체의 제조방법)에서 점토의 층간에 기능성 유기 물질을 복합화하여 다양한 기능성을 부여하는 방법에 대해서 보고하였으며 한국등록특허공보 제10-2008-0080973 (제약용 원료-점토 복합체의 제조방법)에서 건식법을 이용한 경제적인 방법으로 제약용 원료를 점토의 층간에 복합화시킬 수 있음을 보고하였다.

우리나라의 광어 양식 산업은 바다어류 양식의 50%를 차지하고 시장규모가 1조원이 넘는 매우 중요한 산업이지만, 그동안 지속적인 생산단가의 상승과 값싼 수입활어의 증가, 시장가격의 변동 등에 따라 점차 경쟁력이 저하되고 있다. 또 잦은 질병의 발생과 이로 인한 집단 폐사, 치료를 위한 항생제의 과다한 사용 등은 비용 부담은 물론 양식어류에 대한 불신으로 이어져 소비자의 외면, 환경오염 등 양식 산업 경쟁력 약화의 주요 원인이 되었다. 양식 어류에서 빈번히 발생하는 스쿠티카증은 스쿠티카충에 의해 발병하며 스쿠티카충의 예방/치료를 위해서는 스쿠티카충의 원인이 되는 스쿠티카충을 살충해야 하며, 스쿠티카충의 살충을 위해 포르말린, 과산화수소와 같은 독성 물질이 이용되거나, 케토코나졸, 염산터비나핀과 같은 항생제 투여방식이 사용되어 왔으나, 현재 효과적인 스쿠티카증 예방/치료의 방법은 아직 없으며 관련 기술 개발이 시급한 실정이다.

최근 양식 어업의 활성화로 인한 연안 수질 환경오염, 과밀사육, 품종 열성화는 양식 생물의 어병 저항력을 저하시켜 각종 질병에 의한 폐사량이 매년 증가하고 있다. 특히 스쿠티카증의 경우 치어에서 성어에 이르기까지 발병을 하고, 집단 폐사의 양상을 갖기 때문에 감염 시 큰 피해를 유발하고 있다. 2007년 한국어병학회지 “제주도지역 넙치양식장의 스쿠티카증 발생동향”(제20권 제2호)에 따르면 제주도내에서만 연간 1300건 이상의 스쿠티카증이 발생하고 있으며, 스쿠티카충에 의한 광어 폐사량은 전체 생산량의 약 20%에 해당한다. 2009년 국내 연간 광어 양식 산업의 규모 (5500억원, 통계청)를 기준으로 보았을 때 스쿠티카충에 의한 피해 규모는 연간 약 1000억원에 이르며 이는 생산 원가의 50%를 차지하는 것으로 수익성 악화의 주요 원인이 된다. 최근 증가하는 스쿠티카충의 피해를 구제하기 위해 2006년 국립수의과학검역원은 정제 포르말린 5개 제품의 사용을 승인 하고, 해양수산부는 “기생충 구제제 안전사용 지도지침”을 통해 포르말린을 사용하도록 허가하고 있다. 한편, 포르말린은 국립환경과학원에서 유독물로 분리하는 발암 물질로 환경부에서는 포르말린 사용에 대한 규제를 강화하고 있으며, 포르말린을 일정 농도를 초과하여 사용시 오히려 어독성을 가지며 어류 폐사를 일으키는 문제가 있다. 현재 포르말린을 대체하는 스쿠티카충 구제용 제품 내지 방법은 전무한 상황이다. 국립수산과학원 육종연구센터는 최근 (2010) 성장이 빠르고 생존율 높아 생산원가 절감 효과가 있는 신품종 광어개발을 보고한 바 있다.

1. 국내 관련기술 현황

- 케토코나졸 (항생제) 40mg ~ 100mg/일의 투여량으로 4 ~ 15일간 경구 투여하는

스쿠티카증 치료방법 (대한민국 특허출원번호 10-2000-0078821, “양식 넙치의 스쿠티카증 구제방법”)

- 염산터비나핀 (항생제)을 양식어류 어체중 kg당 5mg~80mg을 투여하여 스쿠티카병을 예방/치료하는 방법 (대한민국 특허 출원번호 10-2003-0079882, “염산 터비나핀을 유효성분으로 함유하는 양식어류의 스쿠티카병 예방치료제”)

- 부틸알데하이드 (유기화합물) 300ml, 에탄올 200ml 와 물 500ml를 혼합하여 스쿠티카증 살충용 조성물로 사용시 92% 살충효과 확인 (대한민국 특허 출원번호 10-2005-0124329, “부틸알데하이드를 이용한 스쿠티카증 살충용 조성물”)

- 정제 고분자 키토산의 스쿠티카증 살충 효과 확인. (대한민국 특허 출원번호 10-2002-0014168, “양식어류용 사료첨가제”) 등이 대표적으로 알려져 있으나 효능효과에 대한 검증, 가격, 안정성, 적용편리성 등 여러 가지 문제로 인해 시장에서 활발하게 적용이 되지는 않고 있다.

2. 국외 관련기술 현황

- 광어 양식 및 스쿠티카증 구제 관련한 기술은 국내의 기술이 세계를 선도하고 있는 상황이다. 기본적으로 광어양식 산업이 가장 활발한 것이 한국이고 관련한 양식기술 및 기생충 제어 기술 및 관련한 제품시장에서도 선도적인 위치를 갖고 있다. 따라서 해외에서의 기술개발 현황도 국내와 크게 다르지 않은 상황이다. 포르말린 활용법, 키토산 응용법 및 다양한 천연추출물을 활용하는 방법 등이 개발, 소개되고 있다.

- 포르말린 0.2% 함량의 백신을 투여하여 치료. (Aquaculture, 278, 22-26, 2008)

- 키토산을 독성이 강한 물질의 약물 전달체로 사용(Dis Aquat Org, 64,151-158, 2005)

- 천연 추출물 투여의 방법으로 면역력 강화 (Veterinary Parasitology, 2010, "Effect of traditional Korean medicinal (TKM) triherbal extract on the innate immune system and disease resistance in Paralichthys olivaceus against Uronema marinum", web release)

- 지금까지의 관련 특허는 새로운 항 스쿠티카 활성 물질의 개발에 치중되어 있음. 본 연구 과제에서는 항 스쿠티카 활성 물질을 보다 효과적으로 전달하여 사용할 수 있는 과립형 항 스쿠티카 활성 조성물을 제공하는 방법에 대한 특허를 획득할 계획 임.

3. 국내·외 시장 현황

(단위 : 억원)

구 분	현재의 시장규모 (2009년)	예상 시장규모 (2012년)
세계 시장규모	2,000	2,500
국내 시장규모	328	361
산출 근거	- 양식 어장용 어병치료제 세계 시장 규모는 약 2000억원으로 추산됨.(한국어병학회) - 국내 연간 광어 생산량 2009년 기준 54,674톤 - 광어 1톤당 포르말린 사용량 100L 추정 - 정제 포르말린 가격 6,000/L((주)창조바이오) - 최근 광어 양식의 규모는 연간 10%의 성장을 보임.	

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연차별 기술개발 내용

1. 1차년도 주요 연구내용

연구개발내용	세부 연구개발 내용
○ 향스쿠티카 약육제제 조성물 선정 및 유무기 하이브리드 소재 설계	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 피넨, 리모넨, 카페인 등 향 스쿠티카 활성물질 선정/검토 ▪ 팽윤성 점토 중심으로 무기 담체 선정 ▪ 층간 삽입형 유무기 하이브리드 조성 설계 ▪ 기타 결합제, 결합제등 보조제 설계
○ 팽윤성 점토의 층간 삽입 반응을 이용한 향 스쿠티카 나노복합체 합성 및 물리화학적 특성평가	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 향 스쿠티카 활성물질 복합체 조성물 개발 : 3종 이상 <ul style="list-style-type: none"> - 팽윤성 점토 층간 개질 조건 및 제조 조건 최적화 - 단일상 복합체 제조 조건 확립 ▪ 나노복합체의 물리화학적 특성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - XRD, SEM, UV, TG, IR 등 - 나노복합체의 결정구조, 미세구조 및 화학구조 규명
○ 용출 특성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 활성 물질 용출 특성 평가: 2~20ppm/day <ul style="list-style-type: none"> - KS규격 용출기 및 분광분석 이용 ▪ 제어 용출 특성 확인: 10 일 이상 (시료 5g/ 3.5% NaCl 수용액 500mL/ 25℃/ 50rpm) ▪ 소재별 용출 특이성 평가
○ 향스쿠티카 약육제제 조성물의 제어 용출 특성 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 활성물질의 용출량 및 용출속도 제어 파라미터 도출 ▪ 최적화된 조성물의 용출 특성 확인
○ 스쿠티카충 살충 효능평가 (위탁기관/제주대학교)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 스쿠티카충 분리 배양 (Miamiensis avidus, Uronema marinum 2종 배양) ▪ in vitro 스쿠티카충 살충 효능 평가 (운동성 0%, 형태변형 90%)
○ 스쿠티카충 살충 효능 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 살충 효능 평가 결과에 따른 향 스쿠티카 활성물질 나노복합체 제조 조건 및 조성물 최적화 ▪ 개선된 조성물의 살충 효능 특성 확인 (위탁기관) ▪ 최적화된 조성물 선정 3종 이상 <ul style="list-style-type: none"> - 단일상 복합체(XRD, FT-IR) - 활성 물질 함량: 10wt% 이상 - 용출 특성: 2~20ppm/day - 제어 용출 특성: 10일 이상 - 스쿠티카충 살충 효과 검증 : 운동성 0%, 형태변형 90%

2. 2차년도 주요 연구내용

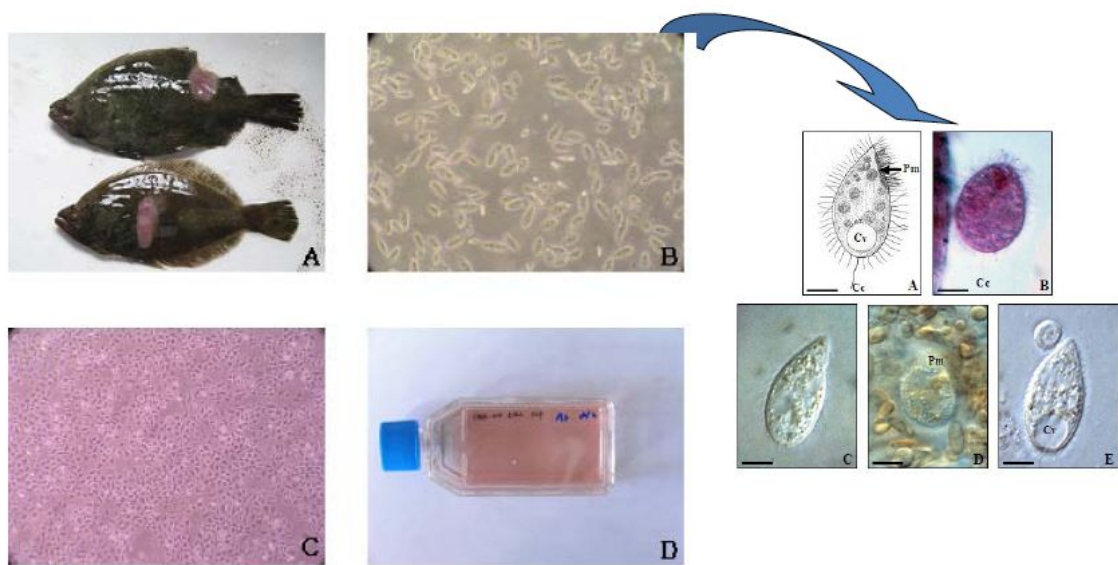
연구개발내용	세부 연구개발 내용
○ 항스쿠티카 약육제제 조성물의 과립화 공정 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 과립화 공정 기술 설계 ▪ 과립화를 위한 조성(바인더) 및 공정 개발 ▪ 과립 제품의 용출 특성 평가 ▪ 과립 제품의 안정성 평가: 30일 이상 과립 형태 유지 (시료 5g/ 3.5% NaCl 수용액 500mL/ 25℃/ 50rpm)
○ 과립 조성물 제품 살충효능 평가 (위탁기관/ 제주대학교)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 과립 제품의 살충 효능 평가 ▪ in vitro 스쿠티카충 살충 효능 평가
○ 항스쿠티카 나노복합체 약육제제 조성물의 과립화 공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 개선된 과립 제품의 용출 특성 평가 ▪ 개선된 과립 제품의 살충 효능 특성 확인 (위탁기관) ▪ 과립화 공정 최적화
○ 과립형 항스쿠티카 약육제제 시제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 시제품 생산용 제조장비 설계 및 제작/시험생산 ▪ 시제품 생산: 3종 이상, 각 10Kg
○ 과립형 항스쿠티카 약육제제 효능 현장 평가 (위탁기관 협력업체, 공동진행)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 현장 평가를 위한 제품 생산 (품목당 100Kg 이상) ▪ 제품의 현장 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 제주도내 광어 양식장, 10일간 추적조사 (물량 50 ton/제품 100Kg (0.2%)) ▪ 현장평가 결과를 바탕으로 제품 성능보완
○ 신제품 개발 완료	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 표준 공정, 제품 품질 기준 확립 ▪ 제품 spec 확립
○ 연구개발 실적 /지적재산권 출원 및 전문학술지 발표 등	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 조성물/과립공정/설비 관련 특허 출원 <ul style="list-style-type: none"> - 항스쿠티카 활성물질 나노복합체 조성물 - 과립화 공정 기술/설비 관련 ▪ 전문학술지 발표 2건 및 학술회의 발표 <ul style="list-style-type: none"> - 나노복합체 조성물/층간삽입 반응 - 과립화 공정 조건에 따른 활성물질 용출 및 살충효능 특이성 관련 ▪ 제품전시회 참가 등

제 2 절. 주요연구 수행 내용 및 결과

1. 항 스키테카 약육제제 조성물 선정 및 유무기 하이브리드 소재 설계

가. 스키테카충에 대한 살충효과 스크리닝

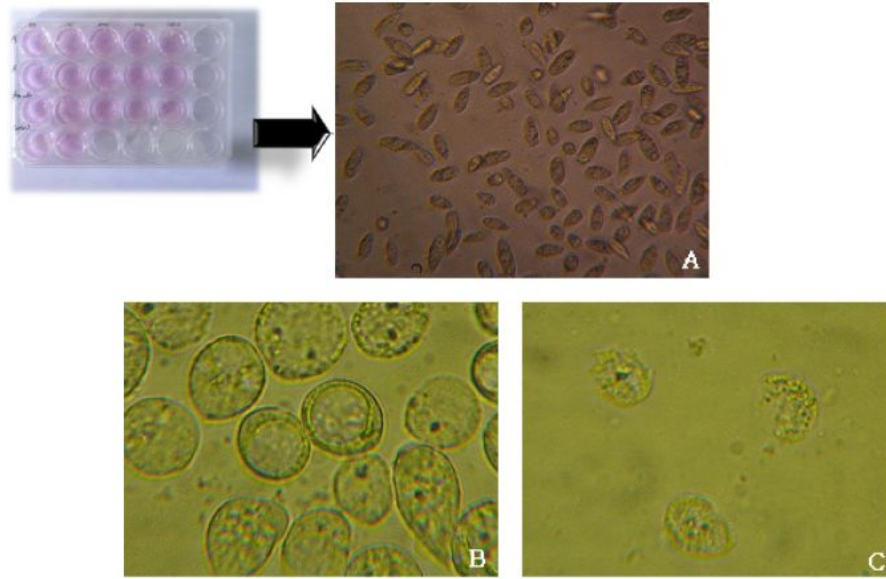
우선, 다양한 후보물질 가운데 스키테카충에 대한 살충효과를 스크리닝 하였다. 스키테카충에 대한 효능효과를 확인하기 위해서는 우선 스키테카충을 분리, 배양하고 후보물질에 대하여 농도별 및 적용시간에 따라 스키테카충의 형태 변형성 및 운동성의 변화를 관찰하여 물질의 항 스키테카 효능/효과를 평가하였다. Fig. 12에는 감염된 광어로부터 스키테카충을 분리하고 배양하여 스키테카충을 얻어 내는 과정과 스키테카충의 현미경 관찰결과이다.



스쿠테카충 분리 및 배양. A, 감염어; B, 스키테카충; C, 주화세포; D, 스키테카충 배양과정

Fig. 12 스키테카충 분리 및 배양 공정도

Fig.13에는 다양한 활성물질의 적용을 통해서 스키테카충의 형태 변형성을 관찰하는 경우 대표적으로 나타나는 모습을 현미경을 이용하여 관찰한 결과이다. 정상적인 스키테카충의 형태(A)와 더불어 공포화 (vacuolation)된 모습 (B), 세포용해 (lysis) 된 모습(C)의 전형적인 모습을 비교할 수 있다. 다양한 후보물질에 대한 스크리닝 결과 일반적인 에센셜 오일류에서 운동성 저하 또는 형태변형의 효과를 나타내었으나 일부의 경우 효과와 함께 어독성 또한 심각하게 나타남을 알 수 있었다. 본 연구에서 중점적인 활성물질로 사용되는 피넨의 경우 표에서 확인 할 수 있는 바와 같이 비교적 낮은 농도에서도 운동성의 저하가 관찰되면 급격한 형태변화를 통한 스키테카 충 사멸효과가 있음을 확인 할 수 있다. 또한, 실험어에서 이상 유영 및 운동성 변화 없고, 2일 경과 후에도 사망개체 발생하지 않았다. 수조에서는 낮은 물에 대한 용해도로 인해 우유빛 형태의 부유물질이 형성됨을 알 수 있었다.



천연물 처리했을 때 스쿠티카충의 변화모습.

A, 배양단계의 스쿠티카충; B, 공포화(vacuolation)된 모습; C, 세포용해(lysis)된 모습

Fig. 13 천연물 처리했을 때 스쿠티카충의 변화 모습. A, 배양단계의 스쿠티카충
B, 공포화 (vacuolation)된 모습 C, 세포용해(lysis)된 모습

표 1에는 다양한 활성물질 후보군에 대한 항스쿠티카 효과 스크리닝 결과를 요약해 놓았다. 문헌이나 물질의 MSDS로부터 보고된 독성에 대한 자료를 같이 제시하였다. 표 1로부터 비교적 효과가 확실한 알파-피넨, 캄펜, 카페인, 리모넨을 후보물질로 선정하였고, 문헌으로부터 항스쿠티카 효과가 알려진 퀴닌을 첨가하여 2차로 운동성 저하 및 형태변형 평가를 실시하였다. 2차 평가시는 농도를 1 및 5 ppm으로 하였으며, 대조군으로 DMSO를 이용하였다. 2차 평가 결과는 표 2에 요약 정리하였다. 표 1과 2로부터 알파피넨, 리모넨, 카페인, 캄펜, 퀴닌의 경우 항스쿠티카 효능이 있을 확일 할 수 있었다. 특히, 알파-피넨의 경우 효과 뿐 아니라 물질의 특이성, 경제성, 원료수급 등의 입장에서 신제품에 개발에 가장 효과적인 물질로 판단하여 중점적인 연구개발을 수행하였다. 또한 제주도내에 용이하게 원료를 확보 할 수 있고 감귤 부산물로 얻을 수 있는 리모넨에 대한 연구도 심도있게 진행 하였다. 본 연구에서 중점적인 활성 물질로 사용되는 피넨의 경우 표에서 확인 할 수 있는 바와 같이 비교적 낮은 농도에서도 운동성의 저하가 관찰되면 급격한 형태변화를 통한 스쿠티카 충 사멸효과가 있음을 확인 할 수 있다. 또한, 실험어에서 이상 유영 및 운동성 변화 없고, 2일 경과 후에도 사망개체 발생하지 않았다.

후보물질을 농도별도 적용하고 시간경과에 따른 스쿠티카충의 형태변형 (morphology) 과 사멸효과(motility)를 관찰하여 효능효과를 스크리닝 하였다. 표로부터 수치가 낮을수록 형태변형 및 운동성 영향이 크게 나타남을 의미한다. 또한, 대조군으로는 용매인 DMSO를 사용하였는데 이것은 5 ppm에서도 스쿠티카충의 형태변형이나 운동성에 영향을 주지 않기 때문에 지용성 핵심성분 (피넨, 캄펜, 퀴닌)의 용매로 사용할 수 있기 때문이다.

표.1 향 스퀴티카 활성물질 스크리닝

순번	활성물질	활성물질 농도 [ppm]				비고	MSDS (LD50)
		100	75	50	10		
	formalin H2O2	운동성저하 운동성저하				발암의심 동물발암	Oral, mouse: 100mg/kg Oral, rat: 500mg/kg
1	butanal	65		-	-	400ppm	Oral, mouse: 6,400mg/kg
2	benzyl aldehyde	10				100%	Oral, rat : 1,300mg/kg
3	cinnamic aldehyde	90	효과확실	효과확실		어독성심각	Oral, mouse:2,200mg/kg
4	eugenol	90	효과확실	운동성감소	-		Oral, mouse:2,680mg/kg
5	salicyl aldehyde	운동성저하					Oral, mouse:480mg/kg
6	acetaldehyde	25%팽윤					Oral, mouse:661mg/kg
7	Dimethylsulfoxide	-					용제
8	Vanillin	운동성저하					Oral, mouse:1,580mg/kg
9	Camphor	-					
10	camphene	100	100	100	-		Oral, rat:>5000mg/kg
11	limonene	100	100	100	100		어독성 심각
12	cinnamyl acetate	운동성저하				mutagen	Oral, mouse=4750mg/kg
13	cineole	-					Oral, rat:=2480mg/kg
14	rotenone	-					Oral, rat:=25mg/kg
15	NaOH	100	32				skin,rabbit:500mg/24H
16	Ivermec	-					
17	Hinokitiol	운동성저하					
18	Alpha-Pinene	100	100	100	100		
19	Nicotinic acid	0				어독성	Oral, rat: 3,720mg/kg
20	Heptaldehyde	98					Oral, rat:3,200mg/kg
21	Pyrethrum-extract	100%모양변					
22	lauric acid	화					
23	propionaldehyde	0					Oral, rat: 1,410mg/kg
24	isobutyraldehyde	60					Oral, rat: 960mg/kg
25	lactic acid	0					
26	Linoleic acid	0					
27	목초액	0					
28	1-Dodecanol	0					어독성
29	Lauric aldehyde	100				어독성	
30	Palmitic acid	100					
31	Oleic acid	30					Oral, rat: 25g/kg
32	Undecylenic acid	60					
33	Stearic acid	0					
34	Geraniol	80					
35	Ammonium Oxalate	운동성저하					
36	Fuchsin	0					
37	myristic acid	0					

38	alpha-bisabolol	100					
39	Didthyl oxalate	0					
40	1-propanol	0					
41	n-butyl alcohol	0					
42	Oleyl alcohol	0					
43	Cetyl alcohol	0					
44	camphor	100	100	100	공포시작		
45	caffeine	100	100	100	공포시작		

Score	Interpretation
Motility	
4	No effect : motility normal
3	Motility slowed in more 50% of ciliates
2	Approximately 50% of ciliates stationary, but cilia still beating
1	Approximately 50% of ciliates stationary, but still beating
0	No sign of motility or cilia movement
Morphology	
4	No change : cells elliptical
3	Less than 50% of cells round or irregular shape
2	Approximately 50% of cells round or irregular shape
1	More than 50% of cells round and lysis evidence
0	Extensive lysis with few cells intact

표. 2 주요 향스쿠티카 후보물질의 살충효과

분류	대상물질	농도	0min		30 min		60 min		90 min		120 min	
		ppm	형태 변형	운동성	형태 변형	운동성	형태 변형	운동성	형태 변형	운동성	형태 변형	운동성
실험구	α-Pinen (DMSO)	1	4	4	4	3	4	3	3	2	3	2
		5	3	3	2	2	1	1	2	2	1	1
	Camphene (DMSO)	1	4	4	4	3	4	3	3	2	3	2
		5	3	3	1	1	2	2	2	2	1	1
	Caffeine (water)	1	4	4	4	3	4	3	3	2	3	3
		5	4	4	3	2	3	2	3	2	3	2
	Quinine sulfate (DMSO)	1	3	3	4	4	4	4	3	2	3	2
		5	2	2	2	2	2	2	3	4	3	3
	d-Limonene (DMSO)	1	4	4	4	3	4	3	3	2	3	2
		5	3	3	2	2	1	1	2	2	1	1
	대조구	DMSO	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4

▪ Score **Motility (운동성)**
 4 (No effect: motility normal), 3 (Motility slowed in more 50%of ciliates),
 2 (Approximately 50% of ciliates stationary, but cilia still beating)
 1 (More than 50% of ciliates stationary, cilia still beating), 0 (No sign of motility or cilia movement)
Morphology (형태변형)
 4 (No change: cells elliptical), 3 (Less than 50% of cells round or irregular shape),
 2 (Approximately 50% of cells round or irregular shape)
 1 (More than 50% of cells round and lysis evidence), 0 (Extensive lysis with few cells intact)

나. 천연 활성 후보 물질의 종류 및 특징

종래의 문헌 정보 분석을 통하여 향 스쿠티카 효능이 있는 천연유래 물질에 대한 탐색 결과 테르펜계 화합물인 알파-피넨(alpha-pinene), 캄펜(camphene)과 카페인 (caffeine), 퀴닌 (quinine) 등이 살충효과가 있음이 보고된 바 있다. 또한, 제주도내 감귤 부산물이 과피로 부터 유도되는 리모넨 (limonene)도 강렬한 살충효과가 알려진바 있다. 알파-피넨 (α -Pinene)은 테르펜계 (terpenoids) 화합물 고유의 향과 함께 항균/살균 특성이 알려져 있다. 알파-피넨 화합물이 스쿠티카충의 운동성을 저하시키고 형태변형을 통한 살충효과가 있음이 알려졌다. Fig. 14 에는 알파-피넨의 분자구조와 간단한 물리화학적 특성에 대하여 정리하였다. 물리화학적으로 알파-피넨 화합물은 휘발성이 매우 강하고 물에 대한 용해도가 극히 낮은 특징을 갖고 있다. 따라서 알파 피넨을 약육을 위하여 양식수조에 직접 투여하는 경우 몇 가지 문제가 발생한다. 우선, 알파 피넨의 난용성 특성으로 인해 투여된 알파 피넨은 물에 섞이지 않고 상분리가 발생된다. 따라서 양식 수조내에 투여하는 경우 실제 물에 용해되어 약효를 발휘하는 알파 피넨은 극히 미량 밖에는 존재하지 않는다. 두 번째는 강한 휘발성으로 인해 실제 수조내에 오래 머물면서 약효를 발휘해야 하나 살포하고는 얼마 지나지 않아 상당량이 공기 중으로 휘발, 손실이 발생한다. 또한, 알파-피넨을 일시에 적용하는 경우 고유의 살충효과에 의해 치어/성어에 독성이 강하여 오히려 폐사율을 높이는 역효과를 나타내기도 한다. 요약하면 알파 피넨의 경우 우수한 살충효율에 의한 향 스쿠티카 성능은 우수하나 물질의 불안정성 및 낮은 용해도를 극복해야 효율적인 향 스쿠티카 약육제제의 개발이 가능해진다.

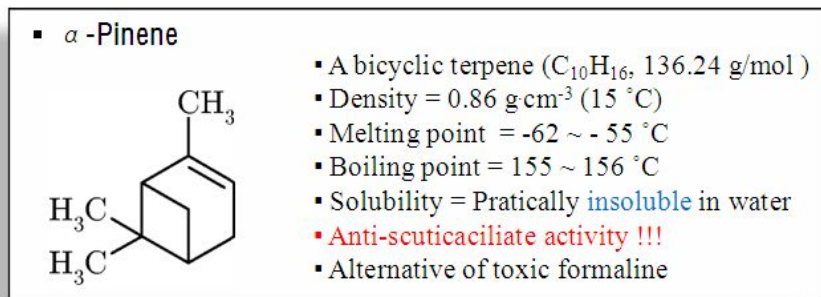


Fig. 14 알파-피넨 (alpha-Pinene) 분자구조 및 특성

동일한 테르펜계 화합물인 캄펜 (Camphene)의 경우도 유사한 항균 및 살충효과가 보고된 바 있으며, 용융점이 50도 내외로 역시 휘발성이 강한 물질이며 공기중에 노출되는 경우 쉽게 승화되는 물질특성이 있다. 다른 테르펜계 물질과 같이 유기용매에는 용해도가 높으나 수용액에서의 용해도는 극히 낮아 실질적으로 난용성의 대표적인 물질이다. Fig.15에는 캄펜의 분자구조와 캄펜의 물리화학적 특성을 요약하였다. 캄펜의 경우 상온에서 무정형이며 비교적 항균성이 우수하고 방충 및 살균효과가 있으나 원료의 수급이 원활하지 않고 원료단가 또한 30,000 원/Kg 이상으로 약육제제용 활성 물질로의 적용에는 코스트 문제를 포함하고 있다.

▪ **Camphene**

- Molecular formula = $C_{10}H_{16}$ (136.24 g/mol)
- Appearance = Rigid solid/crystals
- Melting point = 48-52 °C
- Volatilizes on exposure to air
- Solubility
 - water = practically insoluble in water
 - Freely soluble in common organic solvents (Ethanol, acetone, hexane)
- **Pesticide activity !!!**

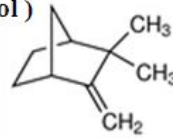
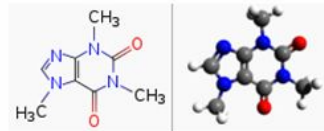


Fig.15 캄펜 (Camphene)의 분자구조 및 특성

카페인의 경우는 오래전부터 살충 및 살균효과가 알려져 있어서 농업용 유충방지제 등으로 활용된 바 있다. 비교적 물질 안정성 우수하며 물에 대한 용해도도 높아 해수 적용하는 경우 용해도에 대한 문제를 보이지는 않는다. 그러나 카페인의 경우도 원료단가가 너무 높고 (120,000 원/Kg), 광범위한 스펙트럼에서 향균 및 살충활성을 보이기는 하나 그 효과가 강하지는 않은 물질이다.

▪ **Caffeine**

- Molecular formula = $C_8H_{10}N_4O_2$ (194.19 g/mol)
- Appearance = Odorless, white needles or powder
- Density = 1.23 g cm⁻³ (solid)
- Melting point = 227 - 228 °C (anhydrous)
- Boiling point = 178 °C (sublimation)
- Solubility
 - water = 2.17g/100mL (25 °C)
 - Ethanol = 1.0g/66mL
 - Acetone = 1.0g/50mL
- **Pesticide activity !!!**



X-ray diffraction pattern of caffeine (anhydrous, JCPDF #29-1594)

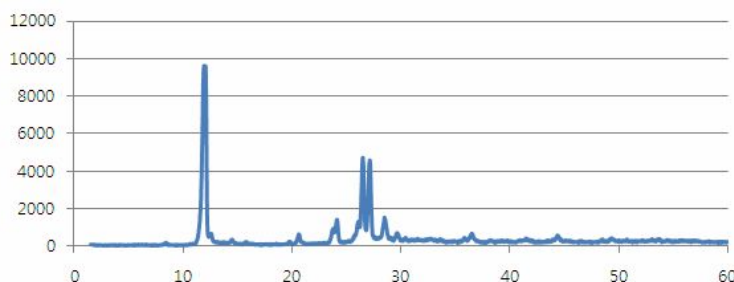


Fig.16 카페인 (Caffeine)의 분자구조 및 특성

말라리아에 효과가 있는 것으로 알려져 있는 Quinine을 약육의 방법으로 적용하여 Ichthyophthirius multifiliis과 H. salmonis에 감염된 송어의 구제가 가능하였으며, Quinine을 경구투여 하는 방법도 효과가 있는 것으로 보고되었다. Quinine는 tetrahymena pyriformis에서 세포의 분화를 막고 인산화 반응을 막는 작용을 한다. 광안정성을 개선하기 위해서는 안정화 및 약물전달기술이 요구되며, 수용해도는 난용성 물질에 해당되는 것으로 판단된다.

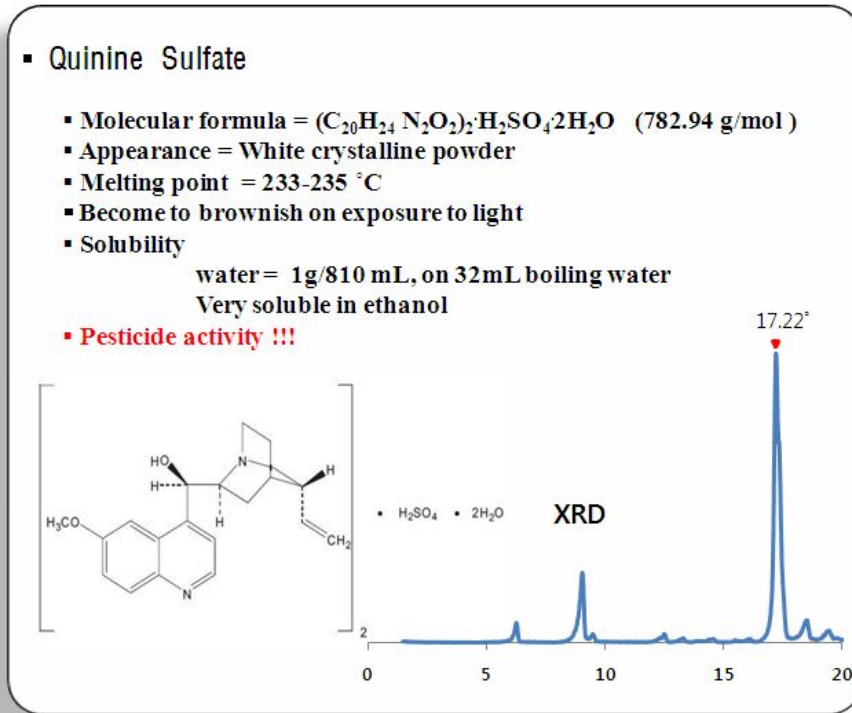


Fig.17 퀴닌 설페이트 (Quinine Sulfate)의 분자구조 및 특성

리모넨 (Limonene)은 오렌지나 감귤 특유의 향을 구성하는 천연 에센셜 오일 (essential oil)이다. 알파-피넨과 마찬가지로 휘발성이 커서 상압 중에서 특유의 확산에 의한 손실이 발생하며 강한 친유성 물질로 물에 대한 용해도가 매우 낮은 물질이다. 리모넨의 경우 강한 향균, 방충 및 살충효과가 있음이 종래 다양한 연구결과를 통하여 알려져 있다. 특히, 화장품, 생활용품에 소량 포함되어 향균과 방부 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 형태 변형성 및 운동성에 대한 평가 결과 매우 낮은 농도에서도 스퀴티카충에 대한 강력할 살충효과를 확인 할 수 있었다. 그러나 종래의 예비실험에서 리모넨 원액을 직접 투여하는 방식의 경우 어독성이 있어 양식용 천연물질로의 활용이 제한 되었다. 따라서 알파-피넨과 마찬가지로 나노복합체형 전달시스템을 이용하는 경우 특유의 휘발성에 의한 원료 손실을 최소화 하고, 수용액에서의 용해도의 개선이 가능하며, 제어용출 시스템에 의한 활성물질의 용출속도를 일정하게 조절함에 따라 부작용인 어독성을 최소화 할 수 있는 제품의 개발이 가능하다. 또한, 감귤이나 오렌지 과피로부터 얻어질 수 있는 물질로 비교적 가격도 저렴 (15,000 ~ 25,000 원/L)하고 원료의 수급이 원활한 장점이 있다. 특히, 제주도내 감귤 가공공장의 부산물로 부터도 원료의 수급이 가능하여 경제성이 우수한 장점을 나타내는 소재이다. 본 연구개발에서도 알파-피넨과 더불어 리모넨을 제품화를 위한 경제성 원료로 선정하여 중점적인 연구개발을 진행 하였다.

d-Limonene

- 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexene [C₁₀H₁₆]
- A cyclic terpene compound
- Colorless liquid with characteristic citrus odor
- MW: 136.23 g/mol
- Melting point : -74.3 ~ -96.9 °C
- Boiling point : 175.5 ~ 176 °C
- Density : 0.8411 g/cm²⁸.
- Solubility: Slightly soluble in water (13.8 mg/mL at 25 ° C)
- Soluble in acetone, dimethyl sulfoxide and ethanol
- High volatile compound (665 Pa at 40.4 ° C)
- Biological description: Limonene is a naturally occurring chemical which is used in many food products, soaps and perfumes for its lemon-like flavor. Limonene also is a registered active ingredient in 15 pesticide products used as **insecticides**, **insect repellents**, and dog and cat repellents.



Fig.18 리모넨 (Limonene)의 분자구조 및 특성

2. 팽윤성 점토의 층간 삽입 반응을 이용한 나노복합체 합성 및 물리화학적 특성평가

가. 층간삽입형 나노복합체 전달 시스템

항 스쿠티카 활성성분의 약효를 극대화하기 위해서는 활성 천연물질의 양식장 수조내에서의 용출속도 조절이 필수조건이 된다. 즉, 수조내에 유효 약효농도를 일정하게 유지하기 위해서는 활성성분의 농도가 일정하게 유지되어야 하며 이를 위해서는 활성성분의 용출속도가 조절되는 전달체가 필요하다. 특히, 유효활성성분이 안정성, 휘발성, 용해도 등의 물리적 특성에 의하여 효과적인 전달이 곤란한 경우 이를 극복할 수 있는 전달기술이 요구된다.

본 연구에서 중점적인 연구대상인 알파-피넨 및 리모넨의 경우 난용성 물질로 물에 대한 용해도가 극히 낮아 직접 살포하는 경우 광어가 서식하는 수조 바닥으로 활성성분의 전달이 불가능하다. 또한, 이들 물질은 휘발성이 매우 크기 때문에 담체를 통하여 안정화 시키지 않는 경우 일정한 살포나 약효의 기대가 불가능하다. 또, 피넨과 리모넨 같이 살충효과가 강한 물질은 일시에 과량 수조에 투여하는 경우 오히려 어류의 독성피해를 야기할 수 있다. 이런 경우는 활성물질의 용출을 일정하게 제어 할 수 있게 소재 시스템이 설계되어야 한다.

본 연구에서는 천연물로부터 유래된 항 스쿠티카 활성성분을 천연 미네랄의 일종인 점토 화합물을 이용하여 복합화, 전달담체로 활용 하고자 하였다. 층간삽입형 나노복합체를 이용한 유용성분의 전달시스템에 대한 원천기술은 본사에 의해 원천특허가 확보되어 있다. 즉, 층간반응성이 우수한 팽윤성 점토의 층간에 활성물질을 층간삽입 시켜 나노복합체를 형성함으로써 활성물질의 안정화, 용해도 개선, 용출특성 제어의 기능을 부여할 수 있다. 바이오 활성물질의 전달담체 (delivery vector)로써 점토화합물의 특징은 일단 층간반응성이 우수하여 층간삽입 (intercalation)을 통해 다양한 활성성분을 효과적으로 담지 할 수 있고, 천연으로부터 얻어지는 물질로써 어류, 생태계에 매우 안전한 생태/환경친화형 전달담체이다. 본 연구에서는 층간반응성이 우수하여 활성성분의 안정화 및 용출속도 제어에 효과적으로 적용될 수 있는 팽윤성 점토계열인 스멕타이트 (smectite)계 점토의 대표적인 광물종인 몬트모릴로나이트 (montmorillonite)점토를 주로 사용하였다. Fig. 19에는 사용한 무기담체인 몬트모릴로나이트의 결정구조를 나타낸 것이다.

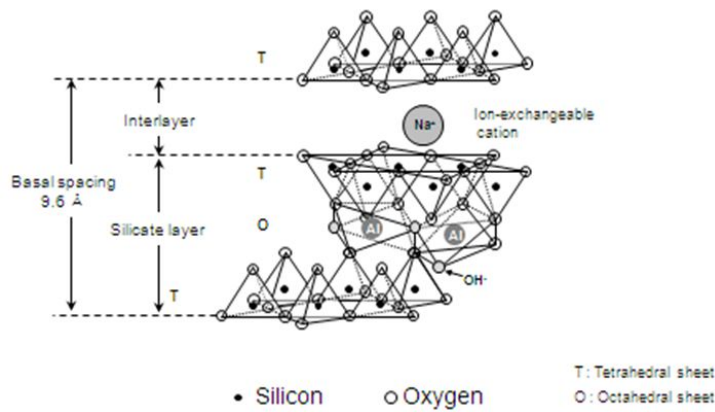


Fig.19 천연점토 (montmorillonite)의 결정구조

항 스쿠티카 활성성분인 피넨, 리모넨, 캄펜, 퀴닌과 같은 친유성 (소수성) 물질인 경우 친수성이 강한 점토 화합물과의 반응성이 매우 부족하다. 따라서 이와 같은 친유성 물질을 점토 물질은 직접적으로 섞어주는 경우 복합체 형성에 따른 안정화 및 약효의 서방화를 구현하기 어렵다. 따라서 활성물질인 피넨을 복합화 하기 전에 친수성 점토를 유기물질을 이용하여 친유성으로 표면특성을 개질해 줄 필요가 있다. 이때 사용되는 유기물질로는 대표적으로 4급 암모늄염이 있으며 cetyltrimethyl ammonium chloride, stearyltrimethyl ammonium bromide, distearyldimethyl ammonium chloride, benzalkonium chloride 등이 활용될 수 있다. Fig. 20에는 층상점토 물질의 층간을 유기물질로 개질하고 여기에 친유성 활성성분을 복합화 시켜 천연물-점토 나노복합체 제조 공정을 도식적으로 나타내었다. 그림과 같이 친유성 활성성분을 점토의 나노스페이스 층간에 안정화 시킴에 따라 높은 휘발성을 억제하여 물질의 안정성을 개선할 수 있으며, 난용성 물질인 피넨/리모넨/캄펜을 분자 수준으로 분산시킴에 따라 물에서의 용해도 또한 개선할 수 있다. 또한, 층간에 안정화된 활성물질 분자가 용출되는 경우 확산 속도를 매트릭스의 조성 및 구조 조절을 통해 제어하여 서방성을 구현이 가능하다.

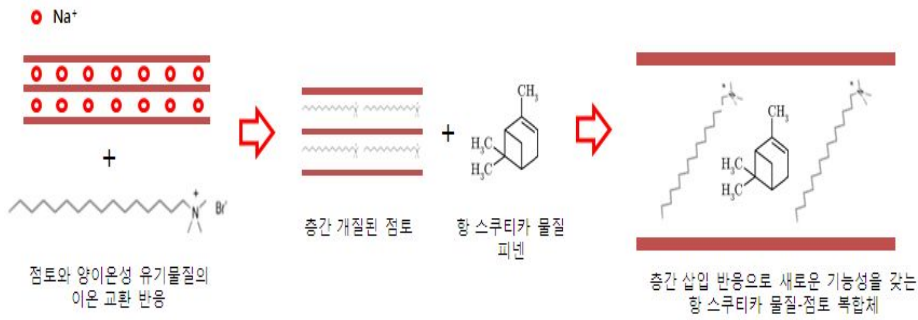


Fig. 20 층간삽입반응에 의한 나노복합체 형성 모식도

나. 활성물질의 층간삽입에 의한 나노복합체의 합성

천연물 유래 항 스퀴티카 활성물질의 층간삽입에 의한 나노복합체 합성을 위하여 우선 층간반응성이 있는 점토의 선택이 중요하다. 가장 대표적으로 알려진 층간삽입 반응성 천연점토는 스멕타이트계 (smectite-type) 점토로 대표적인 것으로 헥토라이트 (hectorite), 몬트모릴로나이트 (montmorillonite), 사포나이트 (saponite), 바이델라이트 (beidellite)가 알려져 있으며 이들의 적층구조 및 조성물 특징은 Fig.21에 나타내었다. 이외에도 팽윤성 합성 마이카 등이 나노복합체형 담체로 활용될 수 있다. [27-31]

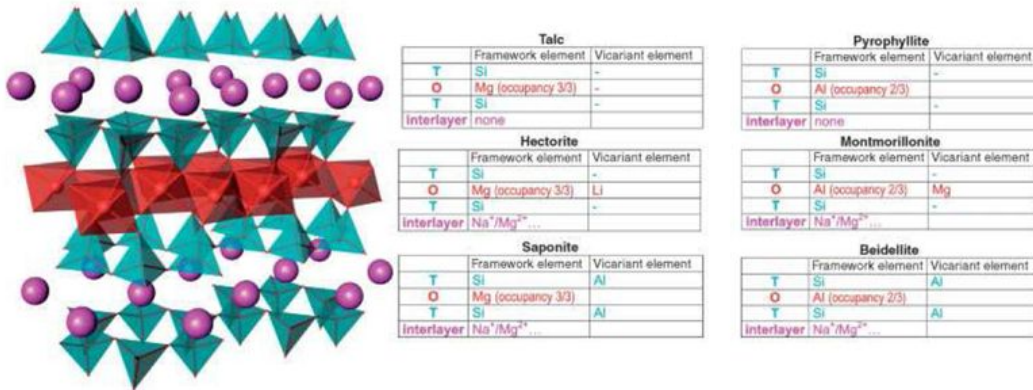


Fig.21 스멕타이트계 점토화합물의 적층구조 및 조성구성

항 스퀴티카층 나노복합체 제조시 이용되는 층상형 무기화합물 담체의 결정구조는 주로 실리카로 구성된 사면체(tetrahedral)층과 마그네슘 또는 알루미늄으로 구성된 육면체(octahedral)구조가 1:1 또는 2:1로 적층된 2차원 층상구조를 갖고 있다. 층상형 무기화합물 격자층 자체가 과잉의 음전하 (negative charge)를 띠게 되어, 이 과잉의 음전하를 전기적으로 안정화시키기 위하여 층간에 과잉의 음전하 양에 해당되는 양이온이 존재하게 된다. 이러한 층상형 무기화합물의 양이온은 다른 형태의 양이온으로 이온교환반응을 통해 대체될 수 있다. 따라서, 층상형 무기화합물 층간에 유기양이온과 같은 다양한 형태의 층간삽입 반응(intercalation

reaction)이 가능하여 유기물질이 층간에 삽입되는 경우 친수특성이 강한 층상형 무기화합물의 특성이 친유성이 강한 물질로 개질될 수 있다. 이러한 층간에 삽입된 물질은 오랜 기간 동안 일정 수준의 농도로 외부로 서서히 용출되게 하는 서방성을 부여할 수 있기 때문에 유기물질 및 약물 등을 일정 농도로 조절하면서 장시간 사용하는데 응용이 가능한 물질이다.

본 연구에서 적용될 수 있는 대표적인 층상형 무기화합물로는 팽윤성이 있는 천연 또는 점토로서 몬트모릴로나이트(montmorillonite), 벤토나이트(bentonite), 헥토라이트(hectorite), 사포나이트(saponite), 바이델라이트(beidellite), 논트로나이트(nontronite), 팽윤성 운모(mica), 버미큘라이트(vermicullite) 등이 포함된다. 상기 층상형 무기화합물의 경우 점토 입자의 모양 및 크기, 양이온 교환능(CEC : cation exchange capacity), 수 팽윤성, 불순물 함유량, 백색도 등에 의해서 다양하게 분류되나 층간삽입에 의한 나노복합체 형성에는 특별한 제한은 없다. 일반적으로 입자의 모양은 판상, 입자의 크기는 50 μm 이하에서 1 μm 이상이 바람직하며, 양이온 교환능은 60~200 meq./100g이 효율적인 반응을 위하여 바람직하게 적용될 수 있다. Fig. 22에는 대표적인 천연 몬트모릴로나이트로 본 연구에서 담체로 주로 사용된 Sud-Chimie사의 Bionit의 물성표를 나타낸 것이다.

Test Items		Unit	Specification	Data
Cation Exchange Capacity		meq/100g	Min.90	91.6
Moisture Contents		wt.%	8-12	9.1
Montmorillonite Contents		wt.%(mg/g)	75-85(330-374)	75(330)
Swelling Volume		ml/2g	Min.30	31.0
Brookfield Viscosity	Immediately	cP	Min.30	147
	After 1H		Min.50	364
pH-Value		-	About 10	10.0
Particle Size(residues on 0.063mm sieve)		wt.%	10-15	14.6

Fig. 22 대표적인 원료점토 (BIONIT)의 물성 (Specification)

또한, 점토화합물은 대표적인 친수성 물질로 대부분 친유성 (소수성, hydrophobic)이 강한 활성물질의 층간삽입을 위해서는 층간을 미리 친유성으로 개질해주는 작업이 필요하다. 친유성 개질을 위해서 일반적으로 사용되는 방법이 양이온성 계면활성제 (cationic surfactant) 물질을 층간삽입 시키는 방법이다. 구체적으로 테트라데실아민(tetradecylamine), 헥사데실아민(hexadecylamine), 옥타데실아민(octadecylamin) 과 같은 아민류 및 그 염류, 디메틸디스테아릴 암모늄 (dimethyldistearylammonium), 트리메틸테트라데실 암모늄(trimethyltetradecyl ammonium), 트리메틸헥사데실 암모늄(trimethylhexadecyl ammonium), 트리메틸옥타데실 암모늄(trimethyloctadecyl ammonium), 벤질트리메틸 암모늄(benzyltrimethyl ammonium), 벤질트리에틸 암모늄(benzyltriethyl ammonium), 페닐트리메틸 암모늄(phenyltrimethyl ammonium),

세틸트리메틸암모늄(Cetyltrimethylammonium) 디메틸디옥타데실암모늄(Dimethyldioctadecyl ammonium), 벤잘코늄(Benzalkonium), 스테랄코늄(Stearalkonium), 데나토늄(Denatonium), 세틸피리디늄(Cetylpyridinium), 테트라-n-부틸암모늄(Tetra-n-butylammonium)과 같은 알킬 및 아로마틱 4급 암모늄, 및 폴리쿼터늄(Polyquaternium)과 같은 양이온성 계면활성제를 사용할 수 있다. 이때 층간에 삽입되는 유기 계면활성제의 종류, 기하학적 모양, 층간삽입 밀도 등에 따라 층간삽입형 나노복합체의 구조 및 특징의 제어가 가능하다. 이때, 원하는 형태의 나노복합체 형성 유무는 X-선 회절분석 (XRD)을 통한 층간거리를 변화를 통하여 용이하고 신속하게 확인 할 수 있다. 즉, 고유의 층간거리를 갖는 점토 격자층 사이에 목적물질의 삽입에 따라 층간거리의 변화가 발생하여 이를 XRD 분석을 통하여 확인 할 수 있다.

다. 피넨-점토 나노복합체의 합성

항 스쿠티카 활성성분인 피넨과 무기 담체인 팽윤성 점토화합물과의 나노복합화 반응은 기본적으로 점토의 팽윤특성과 이온교환특성을 활용한 층간삽입반응 (intercalation reaction)에 의해 진행하였다. Fig.23에는 피넨함유 나노복합체 제조 과정을 도식적으로 나타내었다. 본 연구에서는 무기담체인 팽윤성 점토 물질로 상용품인 Kunipia-G (Kunimine industry Co. Ltd, Japan)를 이용하였다. 즉, 팽윤성 점토의 층간 친수성을 소수성으로 개질하기 위하여 4급 암모늄염인 세틸트리메틸암모늄 브로마이드 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)를 층간에 삽입 시켰다. 이때, 반응의 경제성을 확보하기 위해서 CTAB의 층간삽입 반응은 통상적인 용액 중에서의 이온교환 반응이 아닌 고상반응법 (solid state reaction method)을 이용하였다. 고상반응법에 대한 원천기술은 본사 고유의 기술로 특허를 획득한 상태이다. 고상반응법으로 층간삽입 반응을 하는 경우 용액법에 비해 우선 반응시간이 단축될 뿐만 아니라 용액반응법에서 고형분을 얻어내기 위해서 필요한 공정인 분리, 수세 및 여과 공정이 생략되기 때문에 경제성 면에서 매우 유리한 방법이다. 특히, 4급 암모늄염은 점토와의 화학적 친화성이 매우 뛰어나 고상반응을 통해서도 고순도의 층상화합물을 형성할 수 있다. 보통 고상반응법은 출발물질인 점토와 층간삽입 물질인 유기물을 원하는 비로 칭량, 혼합하고 100도 이하의 낮은 온도에서 30분 정도 열처리를 함에 따라 용이하게 적층화합물이 얻어진다. 일단 유기물이 친수성인 점토의 층간에 삽입되면 친유성 유기 점토 (organo-clays)로 성질이 변하게 된다. 이렇게 친유성으로 개질된 점토는 같은 친유성 물질인 피넨과의 혼화성 및 복합체 형성이 매우 유리하게 된다. 간단하게 중간체인 유기점토에 피넨을 첨가한 후 혼합을 해주면 실온에서도 피넨의 층간삽입이 이루어진다. 이때 반응의 구동력은 피넨과 층간삽입 물질인 계면활성제의 유기파트와의 반데르 발스 (van der Waals) 상호작용이 기본적인 driving force로 작동하게 된다.

Fig.24에는 피넨-점토 나노복합체 합성법을 도시하였다. 출발점토는 팽윤성이 우수한 몬트모릴로나이트계인 Kunipia-G를 이용하였고, 유기층간개질제로는 대표적인 4급 양이온성 계면활성제인 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)를 사용하였다. 피넨의 함량을 10 ~ 30 중량%로 변화시키면서 복합체를 제조 하였으며 롤-밀을 반복적으로 수행하여 층간삽입을 유도하였다.

▪ Intercalative layer nanocomposite of alpha-Pinene

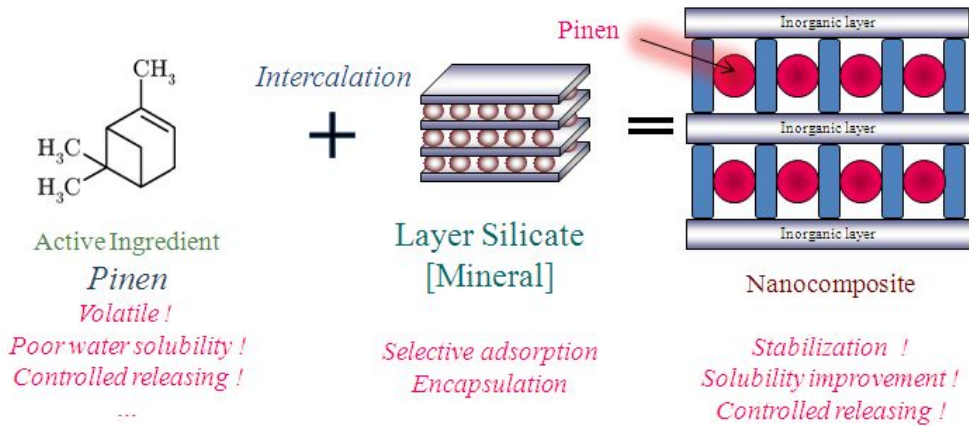


Fig. 23 피넨-점토 층간삽입형 나노복합체 소재 모식도

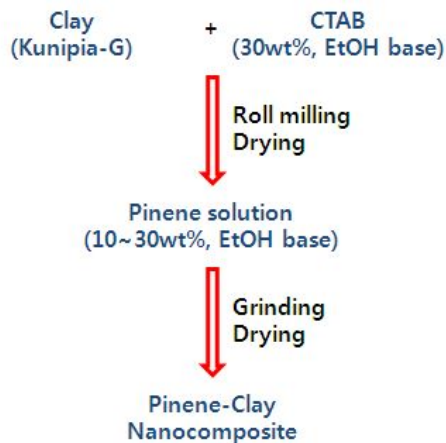


Fig. 24 피넨-점토 나노복합체 제조 공정도

출발물질인 층상점토의 XRD 피크는 주 피크가 9.6 Å에서 관찰된다. 이 거리는 점토의 규산염 층과 층 사이의 거리로 팽윤성 점토에서 층간에 Na⁺ 이온이 존재하는 경우 전형적으로 관찰되는 피크이다. 여기에 유기화제 계면활성제인 알킬암모늄염 (CTAB)을 고상반응에 의하여 층간삽입 시키는 경우 격자와 격자 사이의 거리가 9.6 Å에서 20.2 Å으로 확장됨을 관찰 할 수 있다. 즉, 격자와 격자 사이에 Na⁺ 이온 보다 더 bulky한 분자가 삽입되었음을 의미하는 결과이다. 20.2 Å값은 일반적으로 CTAB 분자가 격자층에 2단으로 평행하게 배열 (double layer)될 때 나타나는 층간거리 값으로 오른쪽에 도식적으로 나타낸 바와 같은 층간배열 구조를 이루고 있음을 예측할 수 있다. 이때 CTAB의 함량, 층간개질제의 종류, 점토의 충전하 밀도 등에 따라 층간 배열구조가 달라질 수 있다. 여기에 마지막으로 피넨을 반응 시키는 경우 앞서 설명한 바와 같이 피넨분자가 층간 흡착이 발생하여 층과 층사이의 거리가 30.4 Å으로 확장된다. 즉, 피넨의 분자가 CTAB 분자와 분자 사이에 van der Waals 상호작용에 의해 흡착 되면서 평행

하게 배열되어 있던 CTAB 분자가 거의 수직 형태의 배열로 전환됨을 의미한다. 이론적인 CTAB의 분자길이는 23.5 Å이다. 따라서 관찰된 30.4 Å의 층간거리는 CTAB의 분자길이와 실리케이트 격자층의 두께 7.6Å의 합과 거의 동일한 값을 보인다. 즉, 격자층과 평행하게 배열되어 있던 CTAB 분자가 피넨 분자의 층간삽입에 따라 수직방향으로 재배열이 발생하고, 이렇게 수직 배열의 형태가 유기물간의 van der Waals 상호작용을 극대화 시킬 수 있는 기하학적 구조를 만들어 내기 때문이 것으로 해석된다. 결국, 점토 층간에 삽입되어 있는 유기물과 피넨의 상호작용을 통한 피넨 분자의 안정화가 달성되며, 이것이 피넨물질의 휘발성 억제, 물에 대한 용해도 증가 및 서방성 구현의 기본 메카니즘이 된다. 한편, 피넨의 함량에 따른 층간거리의 증가는 크게 변화를 보이지 않았다. 이것은 층간거리의 변화가 층간 템플레이트를 사용하는 CTAB분자의 크기에 의해 좌우되기 때문에 나타나는 현상으로 보인다.

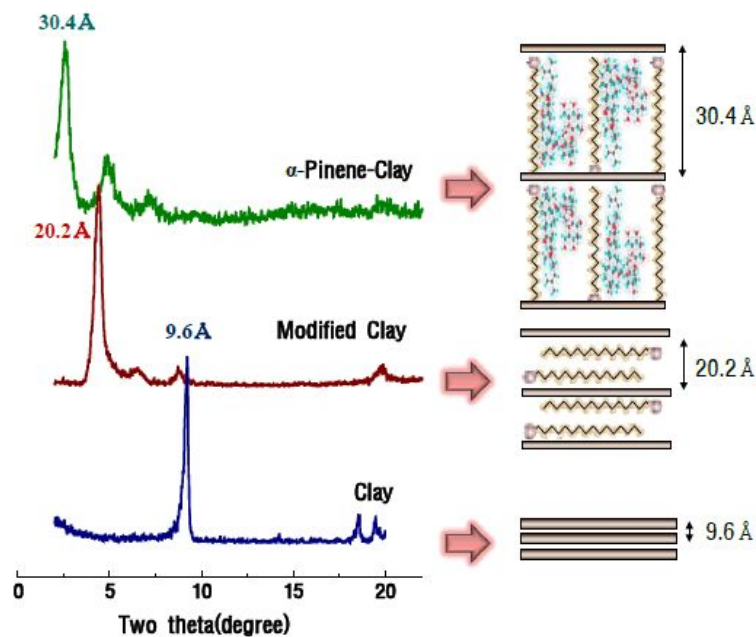


Fig. 25 피넨-무기 복합체 제조과정에서의 X-선 회절패턴의 변화 및 이로 부터 예측되는 나노복합체의 적층구조

복합체의 제조 공정과정에서 얻어지는 물질에 대한 구조 정보를 추가적으로 얻기 위해서 적외선분광분석 (IR)을 측정, 분석하였다. Fig.26에 유기화된 점토 (Kunipia-G-CTAB)와 피넨이 복합화 된 소재에 대한 IR 흡수스펙트럼을 도시하였다. 피넨의 함량은 중량비로 10 ~ 30 % 까지 담지량을 변화시킨 시료에 대한 스펙트럼을 측정하였다. $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 부근에서 관찰되는 강한 흡수피크는 점토의 구성성분인 SiO_4 사면체에 의한 흡수피크이고 $1500 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 에 관찰되는 피크는 CTAB의 암모니아 그룹 ($-\text{NH}_3$)에 의한 흡수밴드이다. 또한 유기물의 $-\text{CH}_2-$ group에 의한 흡수피크는 $2800 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ 에서 관찰된다. 또한, $3300 \sim 3500$ 부근의 broad한 피크는 $-\text{OH}$ 그룹에 의한 피크로 점토에서 유래된 것과 피넨에서 유래된 것이 혼합되어 나타난다. 그런데 IR 분석의 경우 유기물인 (CTAB)와 무기담체인 점토의 피크들이 중첩되어 나타나 정확한 구조 정보를 도출에는 한계가 있었다.

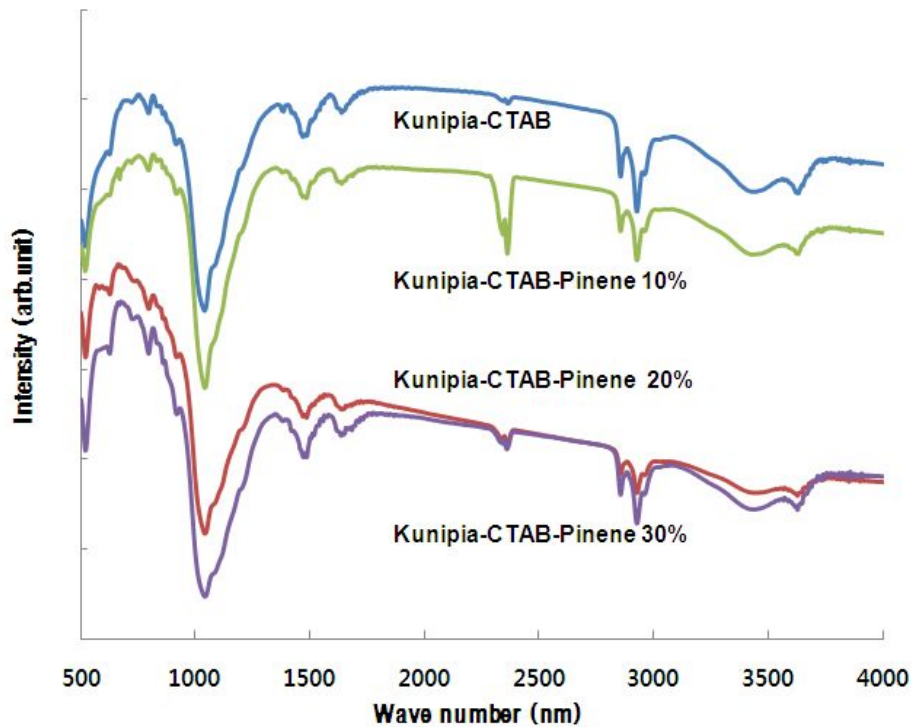
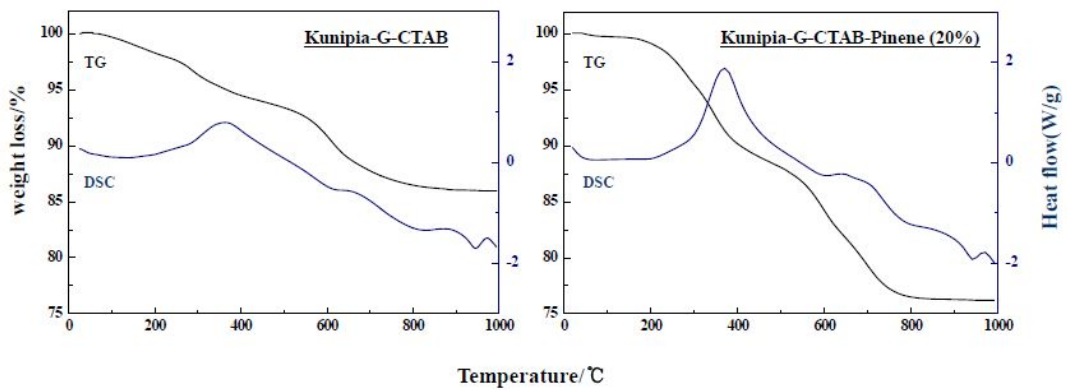


Fig. 26 피넨-유기-무기 복합체의 적외선흡수분광 스펙트럼



Thermal decomposition

- Step 1[RT~150 °C] : Dehydration of adsorbed H₂O (Endothermic)
- Step 2[150~600 °C] : Oxidative decomposition of organics (Exothermic) : CTAB & CTAB + Pinene
- Step 3[600~800 °C] : Dehydroxylation of clay layers+ decomposition of residual carbon (endothermic)
- Step 4[900~1000 °C]: Recrystallization of amorphous aluminosilicates into crystalline ones

Fig. 27 피넨-유기-무기 복합체의 열분석 (TG-DSC) 결과

Fig.27에는 CTAB-Kunipia-G 복합체와 피넨을 첨가한 복합체의 TG (thermogravimetry) 와 DSC (differential scanning calorimetry) 곡선을 각각 도시하였다. 측정은 공기 중에서 실시 하였으며 승온속도는 10°C/min.으로 하였다. TG-DSC 그림으로 부터 150°C이내의 영역에서 관찰되는 중량감소와 넓은 흡열피크(endothermic peak)는 주로 물 및 에탄올과 같은 용매의 휘

발에 의한 것으로 해석되면 150 ~ 600°C 영역에서의 급격한 중량감소와 DSC 곡선상의 발열피크 (exothermic peak)는 존재하는 유기물의 산화분해 반응 때문으로 해석된다. 피넨이 복합화된 시료의 경우 ~300°C 영역에서의 강한 발열피크와 급격한 중량감소로부터 이 영역에서 주로 산화분해 되는 것으로 판단된다. 그러나 이 경우 유기템플레이트도 같이 분해되기 때문에 피넨에 의한 분해손실과 유기 템플레이트에 의한 분해 손실을 뚜렷하게 구분하기는 곤란하다. 600 ~ 800°C 영역에서의 약한 흡열피크와 중량 감소는 점토물질에서 특징으로 관찰되는 것으로 층간에 존재하는 층간수의 탈수에 의한 것으로 해석된다. 900°C 이상에서 중량변화가 수반되지 않은 흡열피크는 무정형 알루미늄노실리케이트의 결정형성에 따른 피크로 해석될 수 있다.

Fig.28에는 출발원료 물질인 피넨 함유 (20 wt%)-점토 복합체의 주사전자현미경 (SEM, A) 관찰결과와 투과전자현미경 (TEM, B) 관찰결과를 나타내었다. SEM 관찰로부터 층상실리케이트 입자가 부분적인 응집체를 형성하고 있음을 확인 할 수 있다. 유기물과의 복합체 형성과정에서 유기물질이 층상실리케이트의 부분적인 응집이 발생한 것으로 해석된다. 또한, TEM 분석으로 부터는 유무기 복합체 형성에 따른 층간거리의 확장이 분명하게 관찰된다. 이것은 XRD 분석을 통해 얻은 결과와 잘 일치함을 알 수 있다.

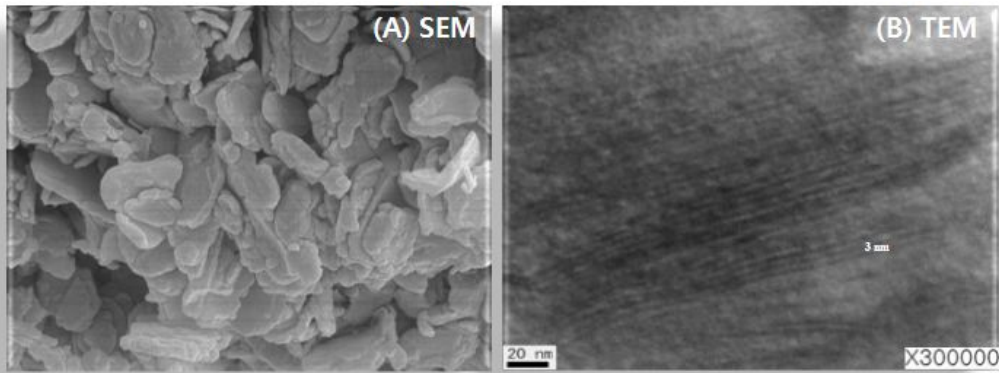


Fig. 28 피넨-유기-무기 복합체의 전자현미경 관찰결과

또한, Fig.29에는 고상반응법을 이용하여 유기 템플레이트인 CTAB와 점토인 Kunipia-G와의 층간삽입 반응 후 CTAB의 함량에 따른 XRD 패턴의 변화 양상을 도시하였다. 그림으로부터 CTAB의 함량이 증가할수록 (001) 면에 의한 회절피크의 위치가 낮은 각도 영역으로 점차적으로 이동함을 확인 할 수 있다. 이것은 층간에 CTAB 분자의 삽입에 따른 층상실리케이트의 층간거리가 증가하는 것을 반영하는 것이다. CTAB의 함량이 30%까지는 단일상의 층간삽입 화합물이 얻어진다. 유기 템플레이트 양이 40%가 되면 층간거리의 증가와 더불어 미반응 CTAB에 의한 회절패턴도 관찰된다. 즉, CTAB의 혼합량이 40% 정도에 이르면 층간에 도입 될 수 있는 CATB의 양이 포화되는 것을 의미하며 층간에 다른 활성물질의 도입을 위해서는 실리케이트 층간에 외부 물질 도입을 위한 공간이 필요하며 이를 위해서는 층간에 도입하는 CTAB의 양은 20~30% 범위가 적절할 것으로 판단 할 수 있다. 이것은 CTAB와 같은 유기화제의 혼합 농도에 의해 층간적층구조의 변화를 제어 할 수 있으며, 이를 통해서 활성성분의 담지함량 및 용출속도 등을 제어 할 수 있음을 의미한다.

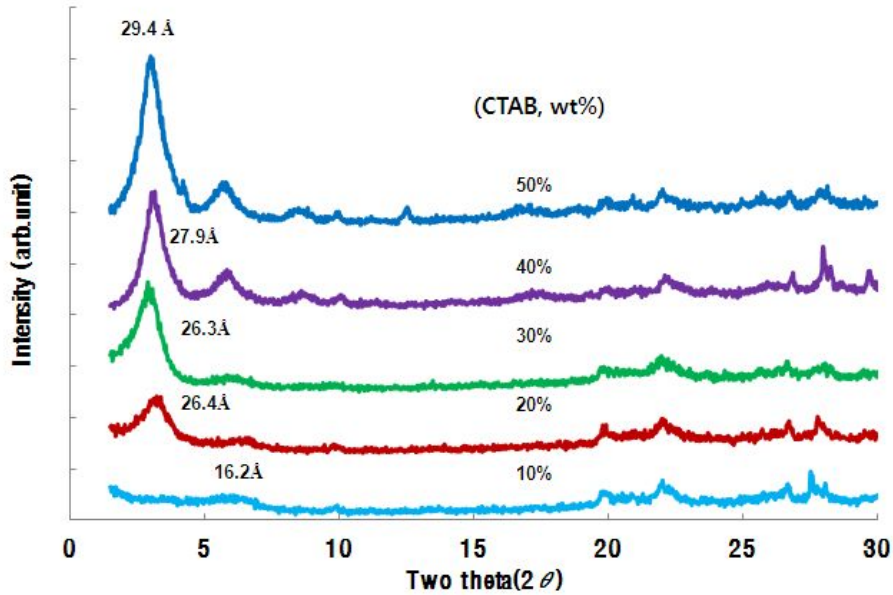


Fig. 29 CTAB의 혼합량에 따른 CTAB-Kunipia-G의 XRD 변화

출발점토의 원료물질로 몬트모릴로나이트 (montmorillonite) 계통 물질인 Kunipia-G 이외에도 상기와 같은 복합체 형성이 가능함을 확인하기 위하여 합성점토인 팽윤성 마이카를 이용하여 동일한 공정을 반복하여 XRD 패턴의 변화를 관찰하였다. Fig.30에는 팽윤성 운모인 S1ME (COOP Chemicals, Japan)를 이용하여 얻어진 X-선 회절 패턴의 변화를 도시하였다. 이때 유기화제인 CTAB의 함량은 30 wt%로 하였고, 피নের 혼합량은 20 wt%로 하였다. Kunipia-G의 경우와는 구체적인 층간거리의 변화는 다르지만 전반적인 양상은 동일하게 진행되는 것을 확인 할 수 있었다. 이때 층간거리의 변화가 상이하게 나타나는 것은 원료인 점토의 충전하 밀도 (layer charge density)가 다르기 때문에 나타나는 현상이다. 즉, 몬트모릴로나이트인 Kunipia-G (dioctahedral smectite)보다 팽윤성 운모 (trioctahedral mica)가 충전하 밀도가 높다. 따라서 동일한 양의 CTAB를 반응 시키는 경우 층간에 CTAB밀도가 높아져 몬트모릴로나이트와 같은 평행(parallel orientation)한 배열구조 보다는 수직형 (perpendicular orientation) 배열이 열역학적으로 안정화 되기 쉽다. 피নের 층간흡착에 따라 약간의 층간거리의 증가는 역시 층간에 유기물의 밀도 증가에 따른 현상으로 해석되며, 약간의 층간거리의 증가와 더불어 적층구조의 질서도가 감소하여 피크의 broadening이 수반되는 것을 관찰 할 수 있다. 합성운모의 경우 천연탈크로부터 Na_2SiF_6 와 고온반응을 통해 얻어지는 물질로 비교적 입자의 크기를 일정하게 제조할 수 있는 장점이 있으며 백색도가 높은 특징이 있다. 그러나 합성을 통해 얻어지는 물질로 비교적 고가의 소재로 양식용 제품의 담체로 사용하기에는 경제성 제약이 따른다. 또한, 충전하 밀도가 천연점토보다 높은 상태이기 때문에 층간에 도입되는 유기템플레이트의 밀도가 높아 피논과 리모넨과 같은 활성물질의 층간 도입을 위해서는 층간에 형성되는 자유공간 (free space)이 부족한 문제가 있어 제품화를 위한 담체로는 한계를 갖는다.

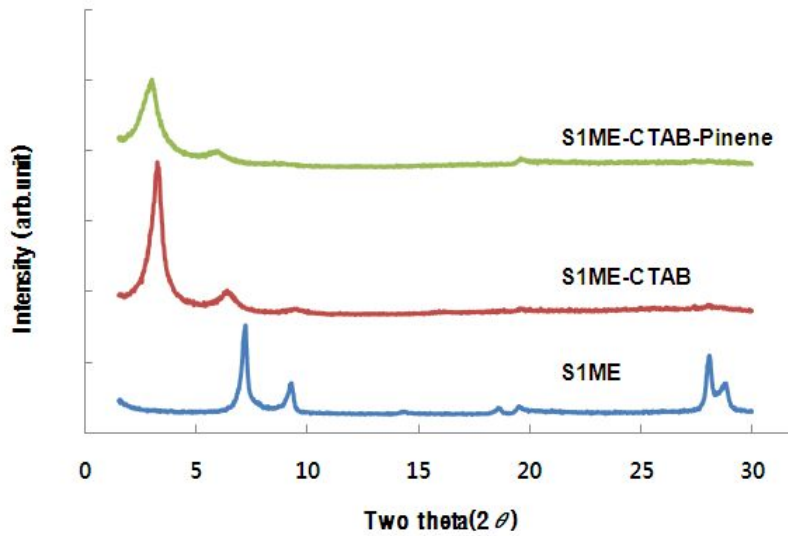


Fig. 30 팽윤성 마이카 (S1ME)를 이용하여 피넨-유기-무기 복합체 제조공정에서의 X-선 회절패턴의 변화

앞서 검토한 바와 같이 향후 양산 및 제품화 하는 경우 원가에 대한 문제를 고려하여 비교적 저가의 원료를 이용하여 동일한 공정을 반복하였다. 시중에 저가의 팽윤성 점토로 알려진 OPAZIL 원료로 사용하였다. OPAZIL은 팽윤성 몬트모릴로나이트와 일부의 불순물로 제올라이트가 혼합되어 있는 천연광물이다. Fig.31에 나타낸 바와 같이 저가의 천연점토의 경우도 위의 2가지 경우와 동일한 메카니즘에 의해 피넨-무기 복합체가 형성됨을 확인 할 수 있었다.

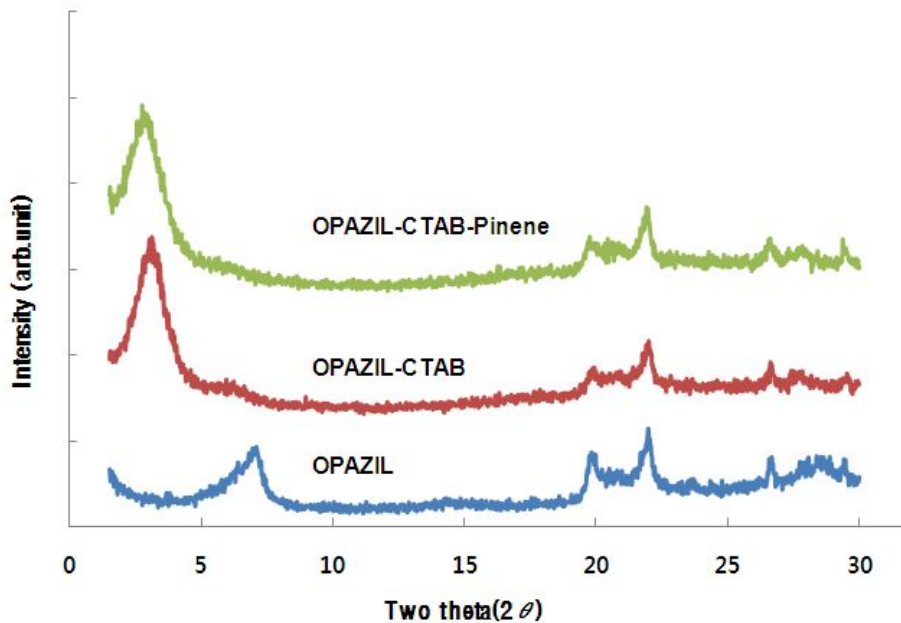


Fig. 31 출발원료로 저가의 몬트모릴로나이트 (OPAZIL)를 이용하여 피넨-유기-무기 복합체 제조공정에서의 X-선 회절패턴의 변화

활성성분인 피넨을 안정화 및 복합화를 하는 경우 물성에 중요한 역할을 하는 것이 유기화제 (계면활성제)의 종류와 기하학적 구조이다. 즉, 계면활성제의 종류 및 분자구조에 따라 점토표면의 표면특성 개질정도에 영향을 주기도 하며, 또한 층간에서의 적층구조 및 free-space를 좌우하게 된다. 또한 층간 흡착물질과의 상호작용 정도를 결정하게 되므로 실제로 불안정한 활성물질의 안정화 정도와 용액 중에서 활성성분의 용출시 용출의 난이도 또는 용출속도를 결정하는 요인으로 작용하게 된다. 본 연구에서는 동일하게 +1의 양전하를 갖는 암모니아계 계면활성제의 종류를 달리하면서 복합체를 제조하였다. 사용한 유기화제 (계면활성제)의 종류 및 분자구조는 Fig.32에 도시하였고, 복합체를 형성했을 때 X-선 회절도는 Fig.33에 비교하였다. Fig.33로부터 유기화제의 종류에 따라 층상복합체의 적층구조가 다양하게 나타남을 확인할 수 있으며 활성성분의 안정성이나 용출특성을 미세조정 하고자 할 때 적절한 유기화제의 선택을 통해 일정정도 제어가 가능함을 예측할 수 있었다.

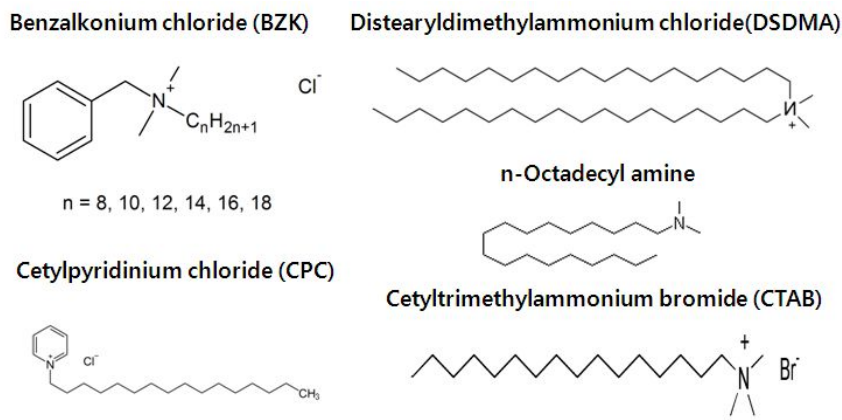


Fig. 32 점토표면 개질용 계면활성제의 종류 및 분자구조

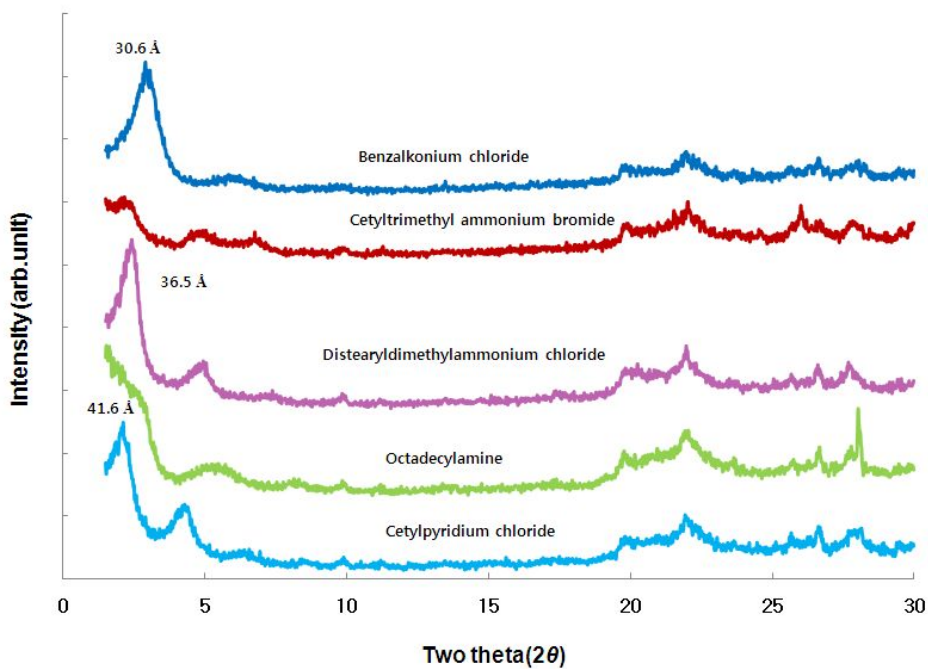


Fig. 33 계면활성제의 종류에 따른 피넨-무기 복합체의 XRD 패턴

출발원료 점토로 천연이면서 저가인 Bionit (Sud-Chimie사)을 사용하고 층간표면 개질용 유기화제로 벤잘코늄 (Benzalkonium)을 이용한 복합담체를 이용하여 피넨의 혼합량에 따른 X-선 회절 패턴의 변화를 관찰 하였다. 벤잘코늄의 혼합량은 중량비로 30%가 되게 하였다. Fig. 34로 부터 피넨의 층간 흡착에 따라 모두 층간거리의 확장이 관찰되었다. 앞서 설명한 바와 같이 층간에 피넨분자의 삽입에 따라 층간적층 구조의 변화가 수반되기 때문으로 이해 할 수 있었다. 그러나 피넨의 함량이 증가한다고 해도 층간거리의 확장은 일정한 한계를 보였다. 이것은 층간거리가 주로 계면활성제의 분자구조에 의해 결정되기 때문으로 해석된다. 층간에 층간 삽입되는 피넨의 함량이 일정 정도의 농도가 되면 피넨의 삽입에 따른 층간거리에 미치는 영향이 제한됨을 알 수 있었다. 즉, 층간에 일정량의 피넨 삽입에 따라 solvation에 의한 배열구조가 변화되고 나면 이후에 피넨 분자가 더 삽입되어도 적층배열 구조에 미치는 영향은 한계가 있음을 의미하는 것이다.

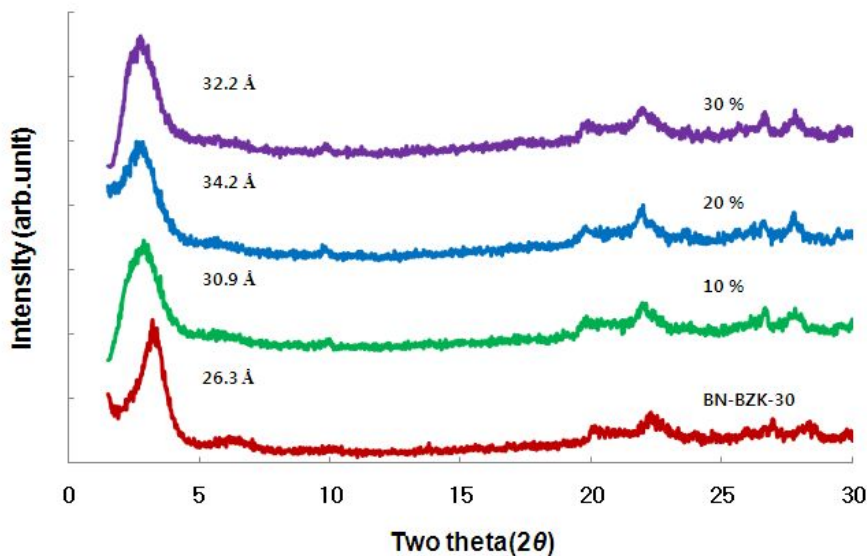


Fig. 34 피넨의 함량에 따른 피넨-점토 (Bionit) 복합체의 XRD 패턴

본 연구에서는 양산시 공정의 경제성을 개선하는 방법의 하나로 유기점토를 제조하는 공정이나 이후 피넨과의 복합화 과정에서 용매를 사용하지 않는 고상반응법 (solid state intercalation method)를 제조방법으로 채택하였다. 이때 고상반응법과 통상적인 용액법으로 제조한 유기화 점토의 차이를 확인 하고자 용액합성법과 고상반응법으로 합성한 샘플에 대한 비교 평가를 수행하였다. Fig.35 에서는 출발원료 점토로 천연이면서 저가인 OPAZIL을 사용하고 층간표면 개질용 유기화제로 CTAB를 사용해서 CTAB-OPAZIL 복합체를 용액법과 고상법으로 각각 합성한 샘플에 대한 XRD 패턴이다. 고상 반응법으로 합성한 샘플의 경우 층간거리가 27.6 Å으로 용액법으로 합성한 샘플의 층간거리 21.0 Å 보다 크게 벌어졌다. 이것은 고상반응법의 경우 CEC (이온교환능) 이상의 유기물이 층간에 van der Waals 인력에 의해 과량 복합화 되기 때문으로 해석된다. 따라서 고상법으로 합성한 샘플을 수세하는 경우 층간거리가 급격하게 감소하여 하여 층간거리는 21.5 Å였다. 이것은 용액법으로 합성한 경우와 유사한 값으로 실제 층간의 적층구조에는 큰 차이가 없음을 나타내었다. 이와 같은 결과는 고상반응법을 이용하여 복합체를 합성하여도 층간삽입형 복합체를 효과적으로 얻어낼 수 있음을 의미하는 결과

이고, 고상반응법을 적용하는 경우 경제적이면서도 효율적인 공정 개발이 가능함을 나타내 주는 결과이다.

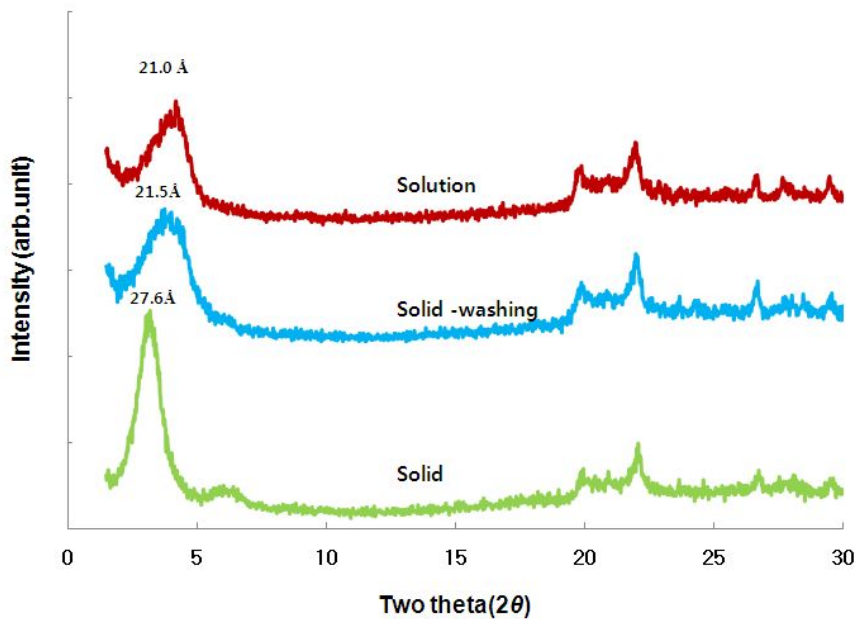


Fig. 35 유기화 점토 제조방법에 따른 XRD 패턴 비교

라. 카페인-점토 나노복합체의 합성

종래 피넨 합성법을 적용하여 카페인-점토 복합체 제조 연구를 진행하였다. 순수 카페인의 경우 하얀색의 결정체로 질소를 함유하고 있으며 염기성 유기화합물의 일종이며 승화(sublimation) 특성이 있다. 다양한 생리화학적 기능과 함께 살충효과가 농업분야에서 알려진 바 있으며, 향 스쿠티카 층에 대한 *in vitro* 실험을 통해 살충효과를 확인 할 수 있었다. 합성방법에 대한 일반적인 흐름도는 Fig. 36에 도시하였다. 우선 출발물질로 몬트모릴로나이트 계열의 Kunipia-G를 사용하고 유기템플레이트로 CTAB 또는 DSDMA (distearyldimethyl ammonium chloride)를 사용하였으며, 유기템플레이트의 혼합량은 30 wt%로 하였다. 먼저, 점토와 유기 템플레이트를 고상반응법에 의한 층간삽입 반응을 통해 유기화 점토를 합성하였다. 일반적으로 고상반응에 의한 나노복합체의 합성은 활성물질의 확산에 의하여 반응이 진행되므로 반응평형이 이루어질 때 까지 반복 반응 필요하며 이 경우 2회 반복반응을 통해 복합체를 합성하였다. 유기화 점토가 얻어지면 여기에 20wt%의 카페인을 첨가하여 롤-밀을 통한 혼합을 반복하여 고상반응법에 의한 카페인의 층간삽입을 유도하였다. 이때 필요한 경우 에탄올/아세톤 등의 보조용매를 소량 첨가하면 반응의 효율을 높이는데 효과적이다. 필요한 경우 혼합이 완료되면 얻어진 복합체를 열처리하여 반응의 완성도를 높일 수 있다. 열처리의 온도는 보통 유기 템플레이트의 용융점 부근이 가장 적절하며 이것은 템플레이트 용융이 이루어지면 층간삽입 반응에서 물질의 층간으로의 확산이 가장 효과적이기 때문이다.

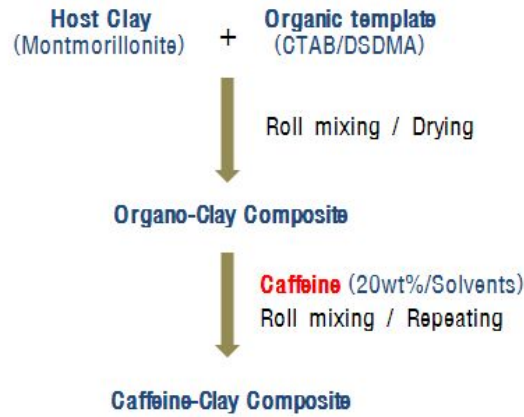


Fig. 36 카페인-점토 나노복합체 제조공정도

Fig. 37의 피넨-점토 복합체 제조 방법과 동일한 방법으로 하여 카페인-점토 나노복합체를 제조하는 경우 XRD 패턴의 변화를 Fig. 37에 도시하였다. 카페인의 경우도 피넨의 경우와 마찬가지로 유기화된 점토에 카페인 분자가 층간삽입 되면 층간거리의 증가가 관찰됨을 확인 할 수 있었다. 그러나 피넨의 경우와는 달리 피크가 매우 broad함을 확인 할 수 있는데 이것은 카페인과 유기점토 중간체와 반응시키는 경우 단일상의 복합체가 얻어지지 않는 때문이다. 미반응의 원인인지를 확인하기 위하여 반복반응 수행하였으나 패턴의 큰 변화는 보이지 않았다. 또한, 12 도 부근의 미반응 카페인에 의한 결정형 피크가 관찰되었다. 결론적으로 카페인의 경우는 피넨의 경우와는 다르게 점토의 유기화 개질이 효과적으로 적용되지 않음을 알 수 있었다.

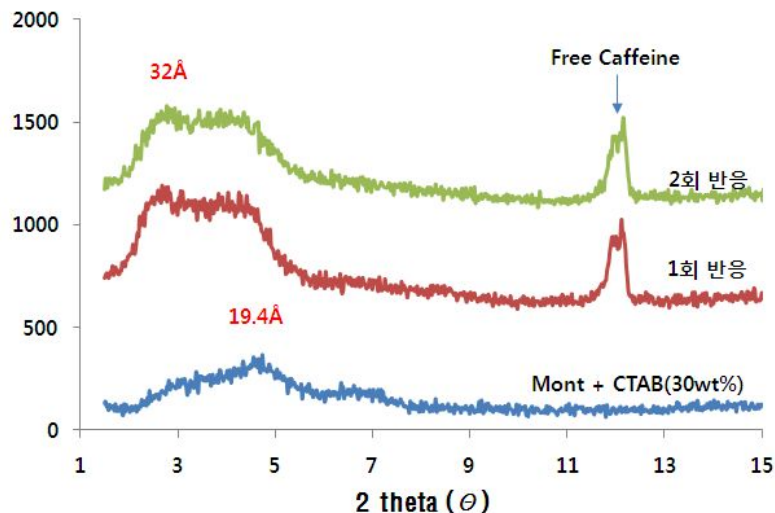


Fig. 37 카페인-점토의 나노복합체에 대한 XRD 분석 결과

Fig. 38에는 유기화 점토의 제조시 유기템플레이트인 CTAB의 혼합량을 변화시키면서 복합체를 제조하고 여기에 카페인을 반응시켜 단일상 카페인-점토 복합체 제조를 시도하였다. 상대적으로 CTAB의 함량이 높을수록 미반응 카페인에 의한 회절피크의 강도가 더 강하게 나

타남을 관찰 할 수 있다. 이것은 점토의 층간에 유기화제인 CTAB의 함량이 증가 할수록 층간에 free-space가 감소하고, 또 친유성이 증가하기 때문으로 해석된다.

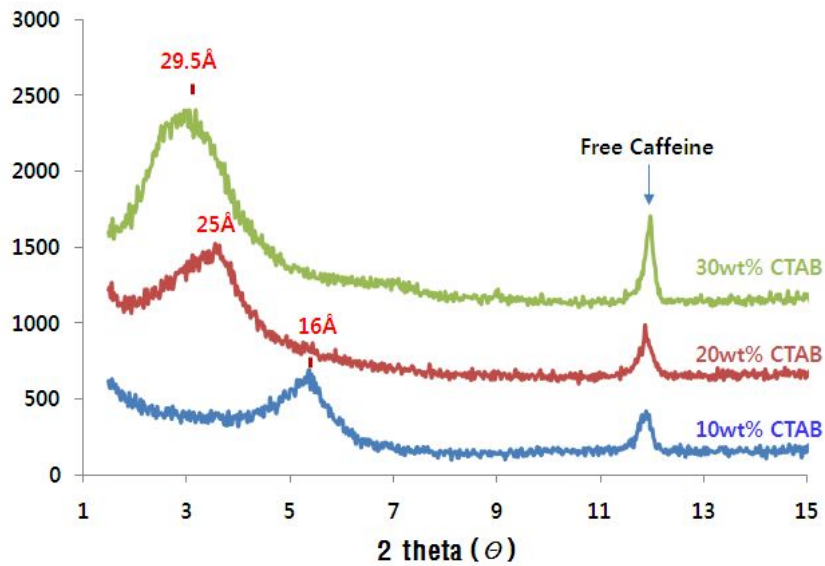


Fig. 38 CTAB 함량별 카페인-점토의 나노복합체에 대한 XRD 분석 결과

Fig. 39에는 점토의 층간개질제로 CTAB 대신 DSDMA (distearyldimethylammonium bromide/ 30wt%)를 이용한 경우의 XRD 패턴의 변화를 나타내었다. DSDMA의 경우 CTAB에 비하여 더 소수성이 강하고 분자의 크기도 큰 특징을 갖는다. 또한, 2개의 long-chain 알킬암모늄 그룹이 있어 층간에 더 많은 free space를 제공할 수 있는 특징이 있는 유기템플레이트 이다. DSDMA의 경우도 카페인이 층간삽입 되면 층간거리가 약간 증가하면서 층간삽입이 일어남을 확인 할 수 있으나 여전히 미반응 카페인이 관찰되었다. 앞서 지적한 바와 같이 카페인의 상대적인 친수성으로 인해 소수성이 강해지더라도 단일상의 나노복합체 제조가 얻어지지 않음을 보인다.

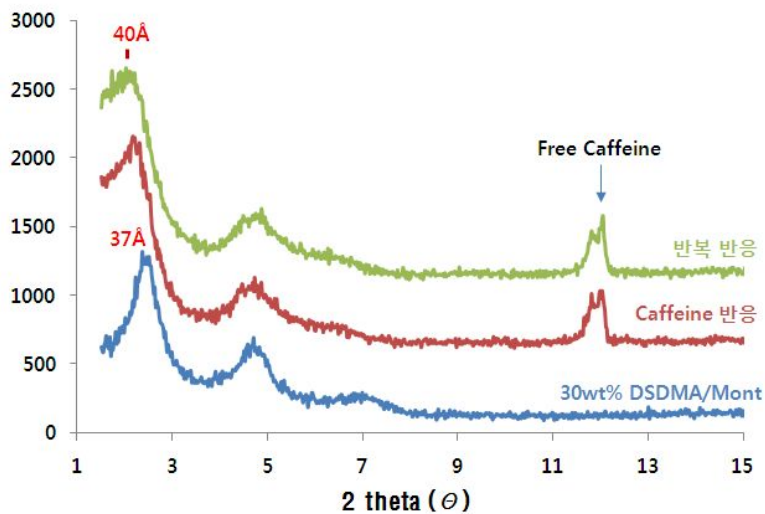


Fig. 39 DSDMA처리 점토를 이용한 카페인-점토의 나노복합체에 대한 XRD 분석 결과

또한, 반응용매로 좀 더 비극성이 강한 이염화메틸 (Dichloromethane, or methylene chloride, CH_2Cl_2 , 84.93 g/mol)을 이용하여 반응을 진행하였으며, 상대적으로 에탄올에 비해 반응에는 효과적임을 확인 할 수 있었다 (Fig. 40). 그러나 잔류 용매에 대한 위험성을 고려하는 경우 이염화메틸을 반응용매로 선택하기에는 한계가 있으며, 미반응 카페인 회절패턴의 관찰로부터 반응의 완성도를 개선하는데 한계가 있음을 알 수 있다. 진공에 의한 용매 제거 작업을 추가로 진행하면 잔류 용매의 문제는 해결할 수 있으나 이 경우는 추가 공정에 의한 제조비의 증가로 인한 경제성에 문제를 일으킨다. 다만, 용매의 선택에 따라 나노복합체의 적층 구조에 대한 영향을 확인 할 수 있으며, 향후 이에 대한 fine-tuning이 필요한 경우 반응용매의 선택을 통해 해결 가능함을 알 수 있었다.

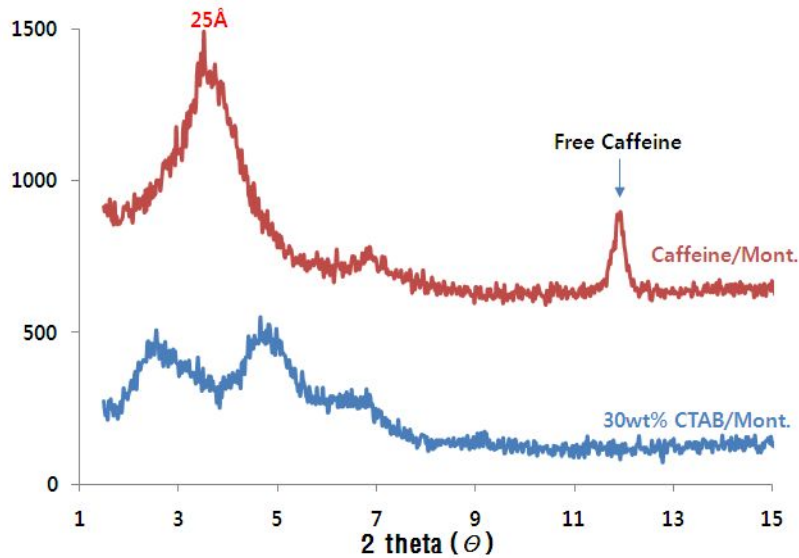


Fig. 40 반응용매로 MC를 사용한 경우 카페인-점토의 나노복합체에 대한 XRD 분석 결과

Fig. 41에는 유기화된 점토에 카페인의 혼합량을 변화시키면서 측정한 XRD 결과이다. 이때 층간 CTAB의 함량은 30 wt%로 고정하였다. CTAB로 처리한 점토에 카페인을 함량별로 혼합하여 고상반응 시키면 카페인의 함량의 변화에 따라 XRD 패턴의 변화가 관찰된다. 이때의 변화는 카페인의 층간에 삽입되면서 수반되는 현상으로 해석될 수 있다. 카페인의 함량이 10 wt%까지는 미반응 카페인만 관찰되지 않는 단일상의 나노복합체가 형성됨을 XRD 분석으로부터 알 수 있었다. 카페인의 혼합량이 15% 부터는 미반응 결정형 카페인이 관찰된다. 즉, 유기화된 점토를 이용하여 카페인을 층간삽입 시키는 경우 혼입함량의 한계는 대략 15wt% 정도임을 확인 할 수 있었다.

지금까지는 점토의 층간개질을 위해서 우선 친수성 점토 층간에 유기화제를 층간삽입시켜 유기점토를 우선 제조한 다음, 이어서 활성물질들을 층간삽입 시키는 단계적 반응법을 사용하였다. 향후 양산 및 사업화를 위해서는 경제성 확보를 위해 공정개선이 필요하며 이 경우 단계적 반응보다는 공정을 일단계로 하여 층간개질과 활성물질의 층간삽입을 유도할 필요가 있다. 유기화제와 활성물질들을 점토에 첨가하여 동시에 혼합/반응을 진행하는 경우 실제 시스템

내에서는 우선 유기화제인 알킬암모늄 분자와 점토입자와 반응이 우선적으로 일어나고, 이어서 중성분자인 활성물질이 층간에 삽입되는 메카니즘을 따를 것으로 예측된다. 즉, 미시적으로 보면 동시에 반응을 시킨다고 해도 단계적으로 반응이 진행될 것으로 예측된다. Fig. 42에는 합성 모식도와 반응결과 얻어지는 XRD 패턴을 나타내었다. Fig. 42에는 점토와 유기화제인 CTAB 및 활성물질인 카페인, 반응용매인 물을 한번에 혼합한 후 유발을 이용하여 30분 정도 균일하게 혼합하였다. 혼합이 완료되면 반응용매를 제거하기 위하여 가열 건조한 다음 측정된 XRD 패턴을 나타내었다. 그림으로부터 단계적인 방법과는 다른 형태의 피크 패턴이 나타났으며 비교적 단일상에 가까운 나노복합체가 얻어짐을 확인 할 수 있었다. 결론적으로 단계적 반응 대신에 한번에 나노복합화 반응이 가능함을 확인 할 수 있으며 사업화시 공정단순화를 위한 중요한 결과임을 알 수 있었다.

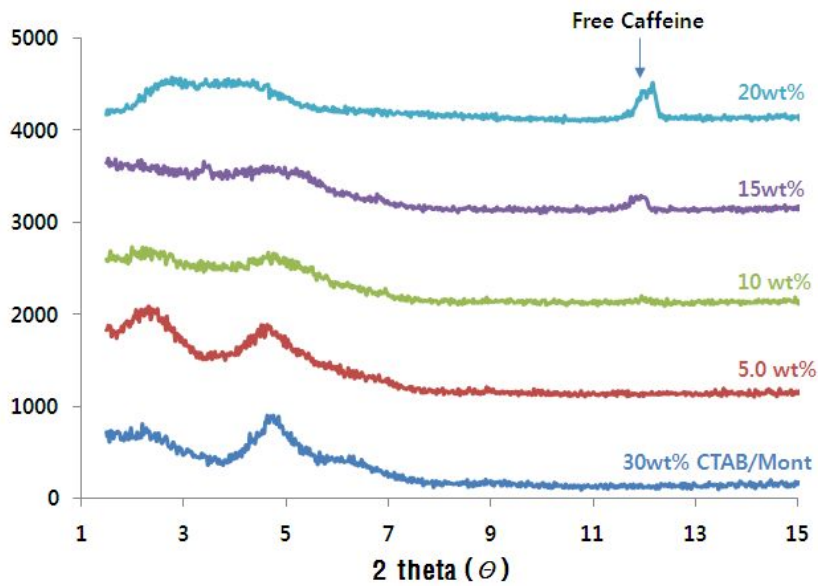


Fig. 41 카페인 혼합량에 따른 카페인-점토의 나노복합체 XRD 분석 결과

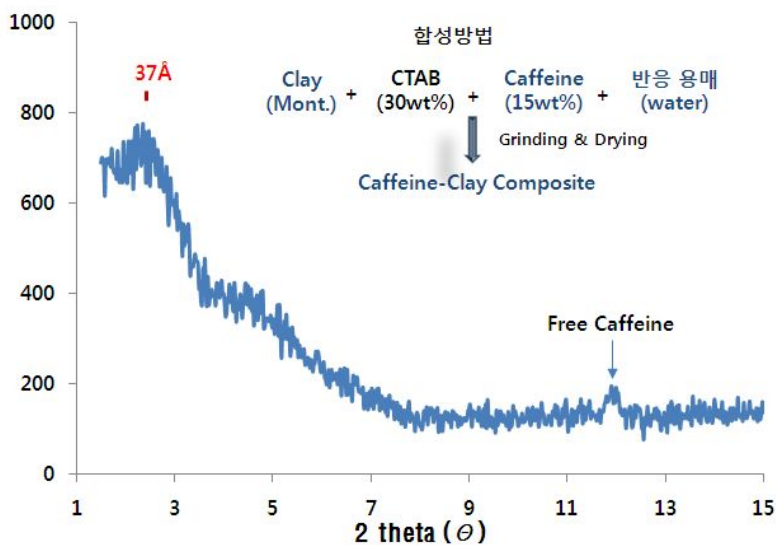


Fig. 42 One-step법에 의한 카페인-점토의 나노복합체 XRD 분석 결과

One-step 방법에 의한 나노복합체 제조에 있어서 층간개질제의 종류에 따른 나노복합체 합성 특이성을 확인 하였다. Fig. 43에는 사용한 유기 템플레이트 3종의 분자구조와 합성모식도를 나타냈으며, Fig.44에는 얻어진 나노복합체에 대한 XRD 패턴을 비교하였다. 우선, 층간개질제의 종류에 관계없이 one-step법에 나노복합체의 합성이 가능함을 확인 할 수 있었으며, CTAB의 경우가 상대적으로 유리하게 작동됨을 알 수 있었다. 이것은 카페인 분자의 친수성에 기인한 것으로 해석된다. 3가지 종류의 유기 템플레이트 가운데 CTAB의 경우가 상대적으로 친수성 특성이 강하기 때문으로 해석된다.

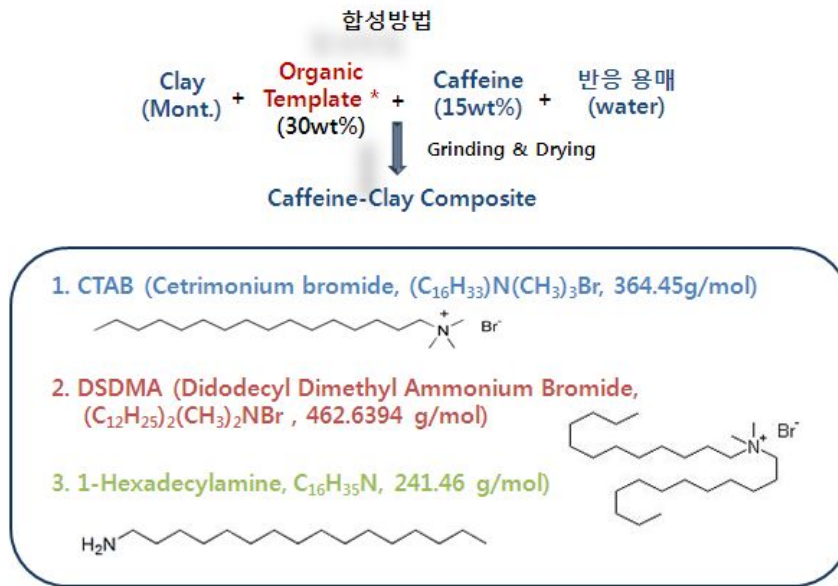


Fig. 43 One-step법에 의한 카페인-점토의 나노복합체 합성

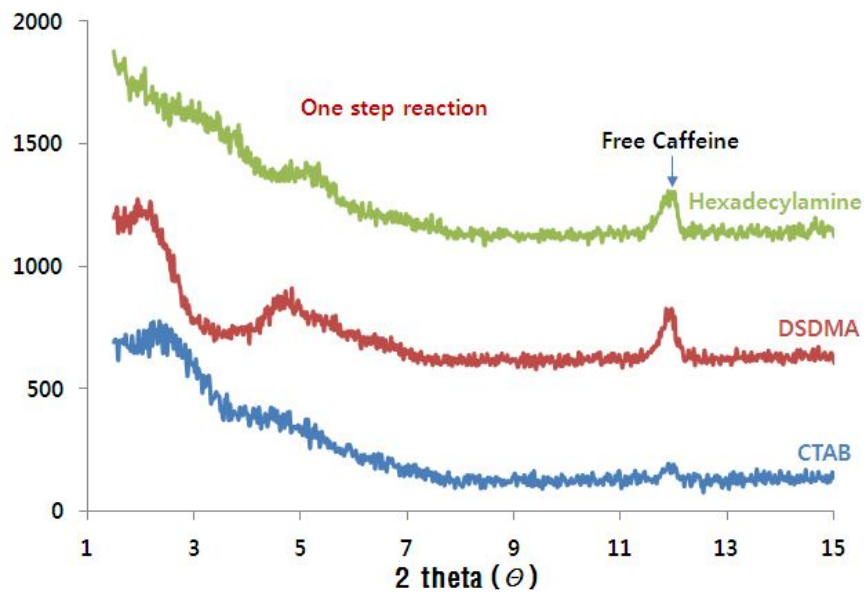


Fig. 44 층간개질제의 종류에 따른 카페인-점토의 나노복합체에 대한 XRD 분석 결과

카페인(caffeine)의 경우 피넨과는 다르게 염기성 물질이면서 물에 대한 용해도도 1 g/46 ml H₂O로 수난용성 물질은 아니다. 따라서 카페인(caffeine)의 경우는 피넨과는 다르게 유기물에 의한 점토의 유기화 처리 없이도 직접 층간삽입이 가능한 물질이다. 따라서 카페인(caffeine)의 경우는 유기 템플레이트에 의한 유기화 처리 없이 직접 점토와 반응시켜 나노복합체 제조를 시도하였다. Fig. 45에는 유기화 처리 없이 직접 점토와 카페인 반응 모식도 이다.

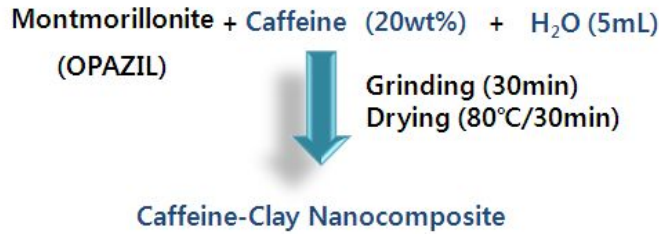


Fig. 45 카페인-점토의 나노복합체에 제조방법 (직접법)

유기 템플레이트 없이 직접 반응시킨 나노복합체의 XRD 측정결과를 Fig. 46에 도시하였다. 미반응 여부를 확인하기 위하여 동일한 고상반응을 3회 반복하였다. 반복을 하여도 XRD 패턴의 특별한 변화가 관찰되지 않는 것으로부터 반응평형은 비교적 빠르게 달성됨을 확인 할 수 있었다. 유기 템플레이트를 이용하지 않는 경우 카페인 분자의 층간삽입에 따른 층간거리는 15.7 Å임을 관찰할 수 있었다. Fig. 47에 도시한 바와 같이 6~7 Å의 분자크기를 갖는 카페인 분자가 층간에 삽입되면 점토 격자층의 두께 ~ 9.6Å와 더해져 ~ 15.7 Å의 층간거리로 확장됨을 알 수 있었다.

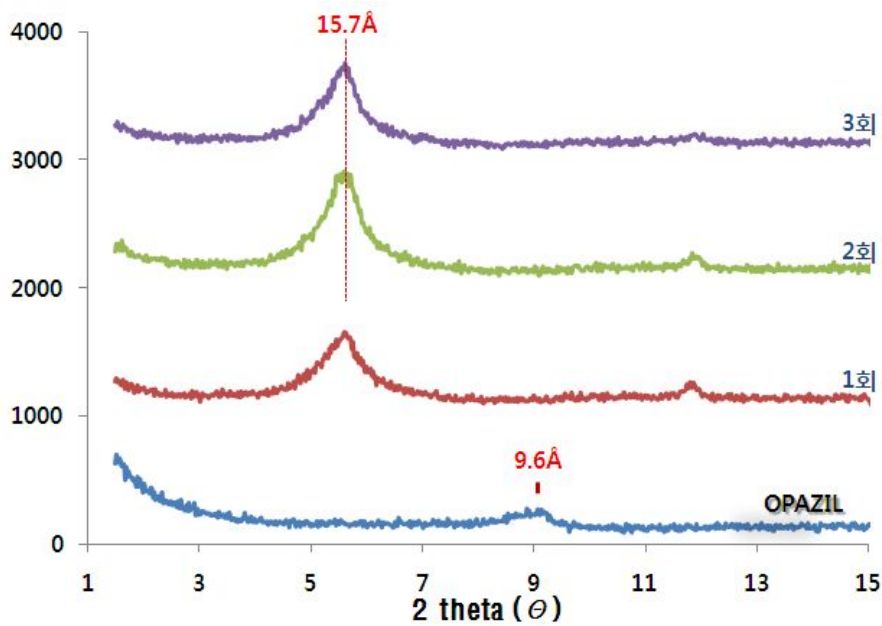


Fig. 46 카페인-점토의 나노복합체에 제조방법 (직접법)

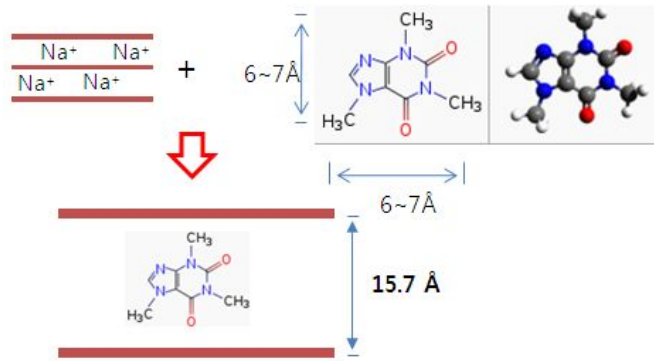


Fig. 47 카페인-점토의 나노복합체에 적층구조 모식도

카페인 복합체 제조에서 출발원료의 종류에 따른 반응 특이성을 평가하였다. 출발원료 점토의 종류에 따른 나노복합체 합성 특이성을 평가하기 위하여 카페인을 활성물질로 하고, CTAB를 층간개질제로 하여 복합체를 합성하고 XRD 분석을 수행하였다. 우선, 평가에 사용한 출발원료 점토는 표 2에 양이온 교환능 (cation exchange capacity, CEC)과 같이 요약 정리하였다. Fig. 48 에는 합성법을 나타내었다. Fig.49에는 XRD 패턴의 변화를 나타냈으며, 기본적으로 점토의 종류에 따라, 즉 원료점토의 양이온 교환능에 따라 상이한 층상화합물이 얻어짐을 확인 할 수 있었다. 그러나 층간거리의 변화는 점토의 CEC에 직접적인 상관관계를 보이지는 않았다. 이것은 고상반응법을 이용하여 CTAB와 같은 유기화제를 층간삽입 시키는 경우 층간 CEC에 정확히 의존하지 않기 때문이다. 따라서 점토의 종류 (양이온교환능)에 따른 층간유기 화제의 층간개질 정도를 좀 더 정확하게 비교하기 위하여 CTAB의 층간삽입 반응은 용액법으로 진행하였다. 용액법의 경우는 고상반응법과는 다르게 층간적층구조가 균일하기 때문에 상대적인 차이를 좀 더 분명하게 확인 할 수 있다. Fig. 50에는 용액법을 이용한 나노복합체 제조 방법을 도시하였고, Fig. 51에는 용액법으로 합성한 유기화 점토 및 카페인 복합체의 XRD 패턴을 비교하였다. Fig. 51 으로부터 점토의 종류, 특히 양이온 교환능 (더 정확하게는 충전하 밀도)에 따라 CTAB의 층간적층구조의 변화가 발생하며, 이에 따라 카페인과 같은 활성물질을 나노복합화 시키는 경우의 층간구조에도 영향을 끼침을 확인 할 수 있었다.

표 2. 출발원료 점토의 종류 및 양이온 교환능

Clay sample	ME-100	Kunipia-G	Wyoming	Laponite	Opazil
Cation Exchange Capacity (mmol/100g)	120	115	71	75	100



Fig. 48 점토의 종류에 따른 카페인-점토의 나노복합체에 합성공정 (고상반응법)

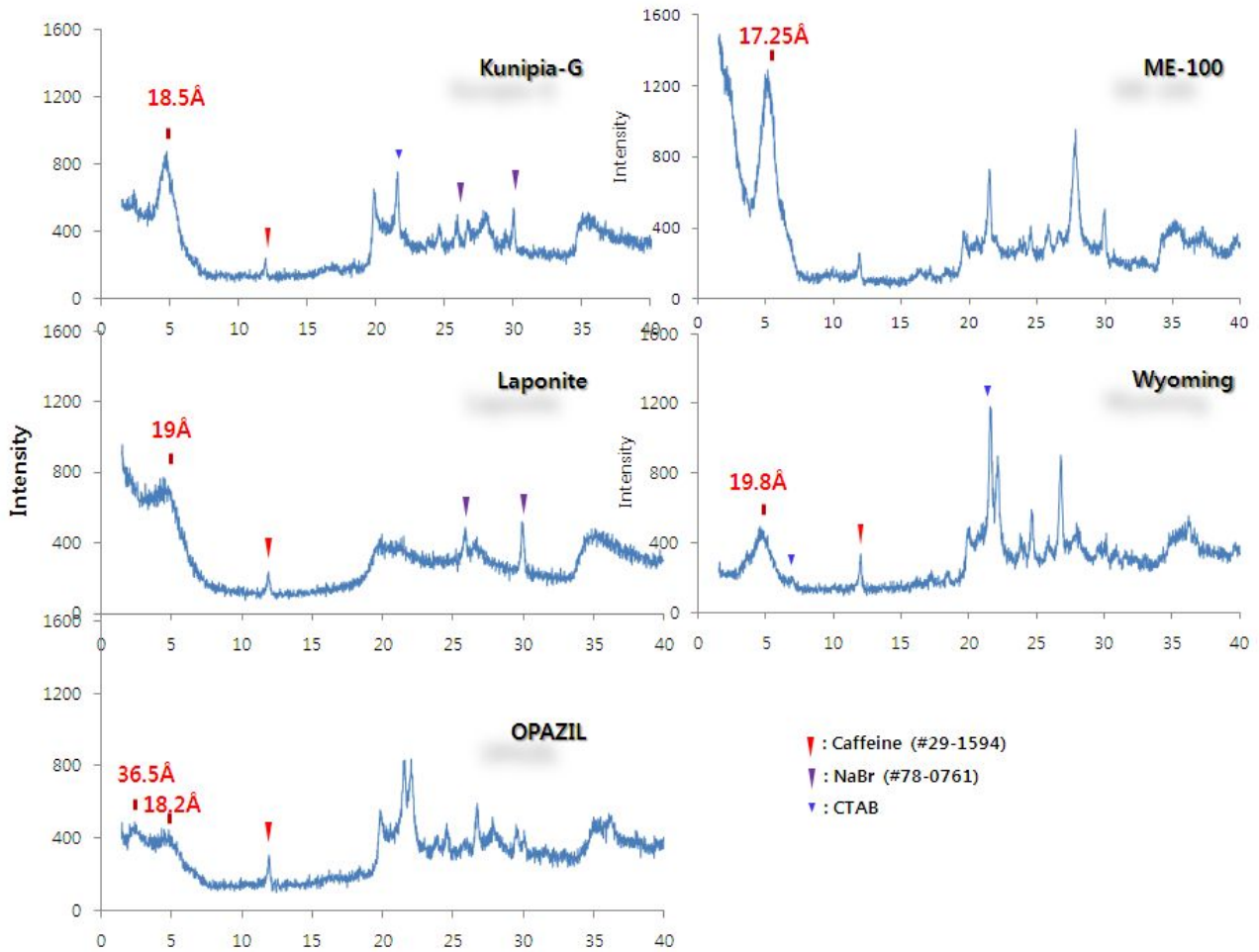


Fig. 49 점토의 종류에 따른 카페인-점토의 나노복합체 XRD 패턴 (고상반응법)

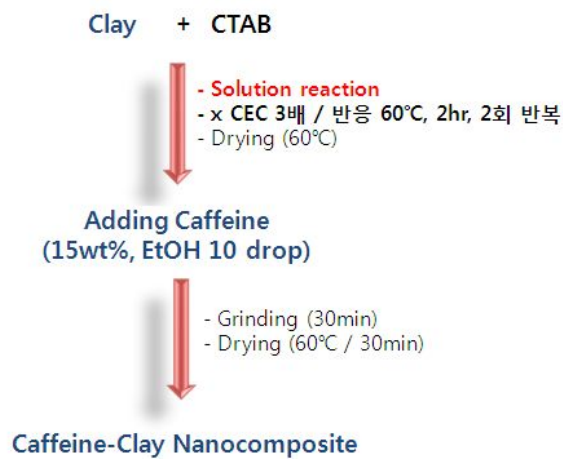


Fig. 50 점토의 종류에 따른 카페인-점토의 나노복합체에 합성공정 (용액법)

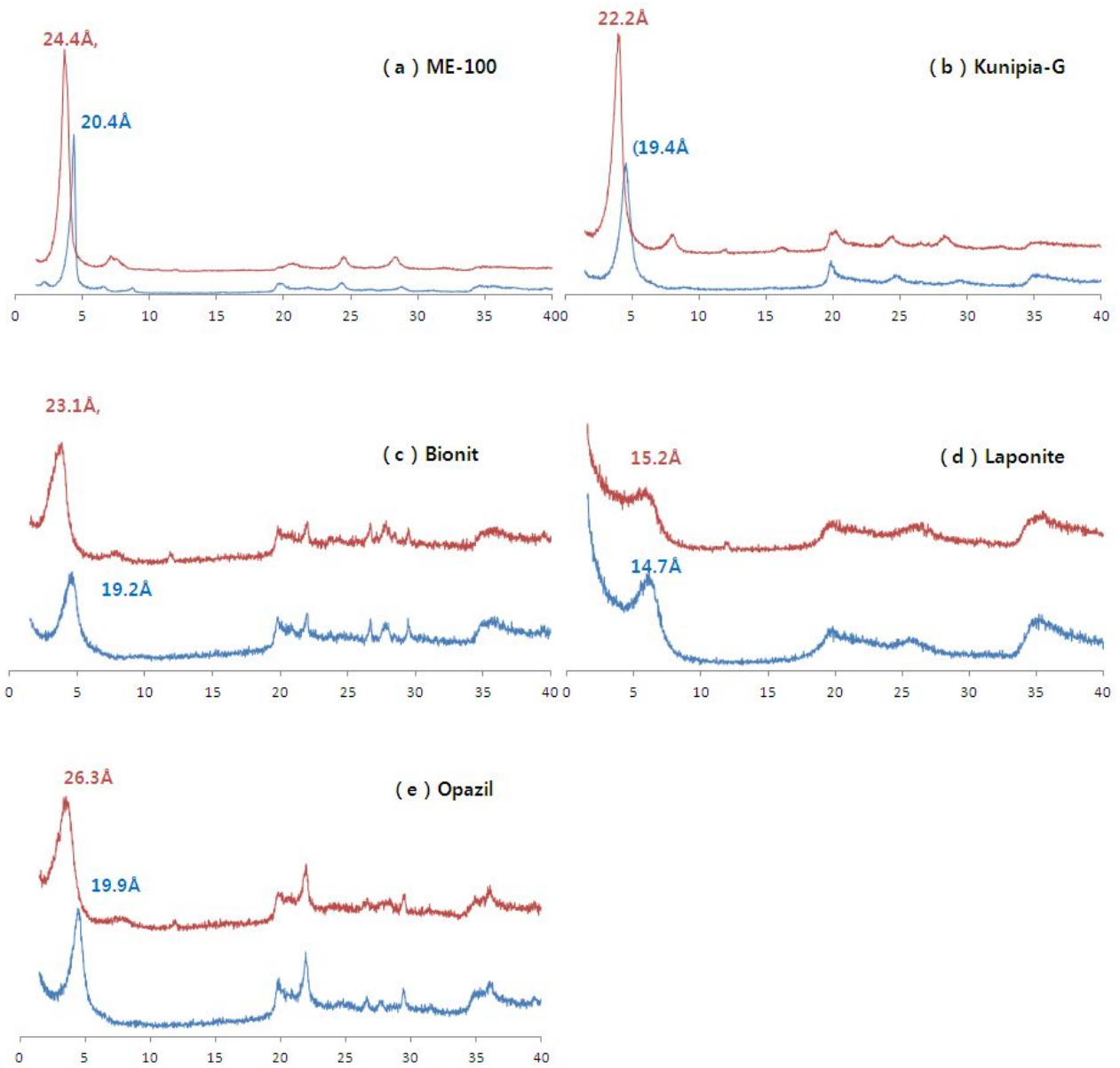


Fig. 51 점토의 종류에 따른 카페인-점토의 나노복합체 XRD 패턴 (용액법)

마. 퀴닌 및 캄펜-점토 나노복합체의 합성

퀴닌과 캄펜에 대한 나노복합체 제조도 피넨과 유사하게 진행하였다. 특히, 캄펜이나 퀴닌의 경우 소수성 물질로 두 경우 다 친수성 점토의 층간을 유기물을 이용한 개질이 필요한 물질이다. Fig. 52 에는 퀴닌 및 캄펜의 나노복합체 제조공정을 도시하였으며, 각각 얻어진 나노복합체에 대한 XRD 분석결과를 Fig. 53에 도시하였다. 이 경우 출발원료 점토로는 역시 몬트모릴로나이트 계열의 천연점토를 이용하였다 (상품명 : OPAZIL). 퀴닌과 캄펜 모두 층간개질된 점토로의 층간삽입 반응을 통해 나노복합체가 형성됨을 확인 할 수 있었다.

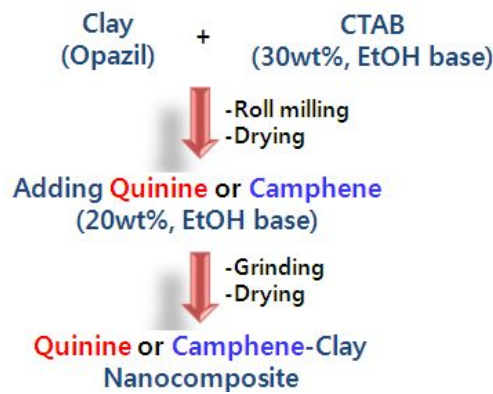


Fig. 52 퀴닌 및 캄펜-점토 나노복합체 제조 공정도

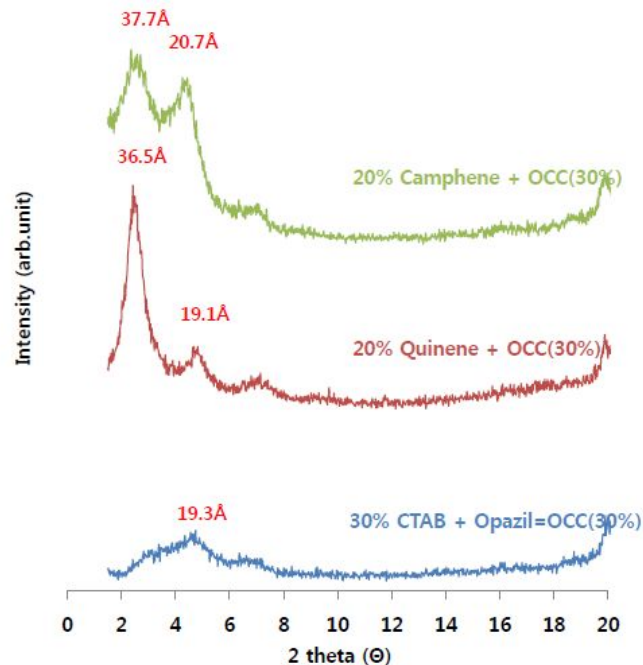


Fig. 53 퀴닌 및 캄펜-점토 나노복합체 XRD 패턴

바. 리모넨-점토 나노복합체의 합성

리모넨 층간삽입 반응 거동은 알파-피넨의 경우와 매우 유사하다. 분자의 기하학적 구조는 물론이고 강한 소수성 및 휘발성이 매우 비슷하다. 리모넨을 이용하여 다양한 층간삽입 반응조건에 대한 합성실험을 진행하였으며 중요한 내용을 다음과 같이 정리하였다.

Fig. 54에는 출발점토 원료로 합성마이카인 ME-100을 이용하고, 유기 템플레이트로 벤잘코늄 (BZK)로하여 리모넨을 복합화 과정을 도시하였다. Fig.55에는 상응하는 공정에서 얻어진 샘플에 대한 XRD 분석결과를 도시하였다. 다른 점토와는 다르게 합성운모의 경우 벤잘코늄을 층간삽입하는 경우 복합상이 얻어지는데 이것은 합성운모의 충전하밀도가 불균일 분포를 하고 있는 것으로 해석할 수 있다. 한편, 리모넨의 경우 유기화된 점토의 층간에 층간삽입하는 경우 회절피크의 broadening은 관찰되나 층간거리는 크게 변화하지 않음을 알 수 있다.

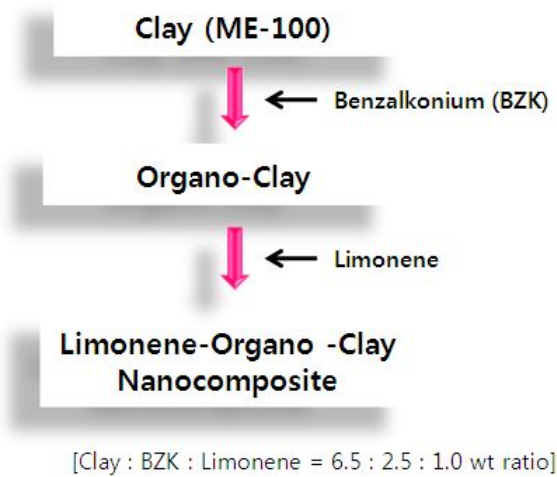


Fig. 54 리모넨-합성운모 나노복합체 합성

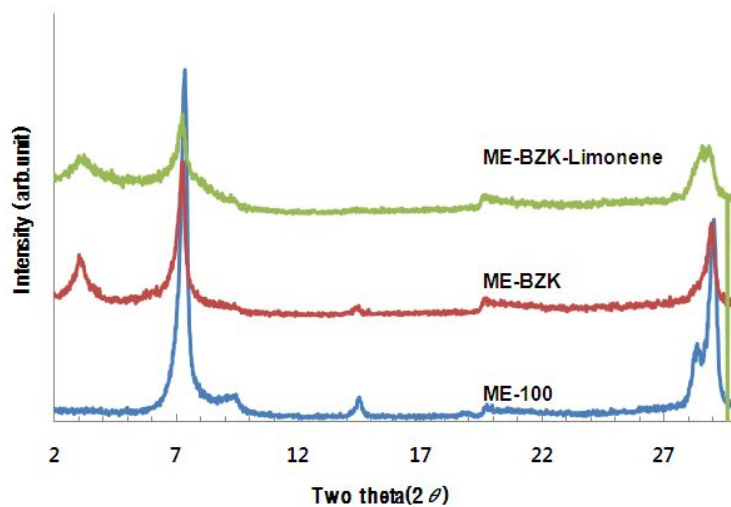


Fig. 55 리모넨-합성운모 나노복합체 XRD 분석결과

Fig. 56에는 Fig.53 합성방법에서 반응용매로 소량의 에탄올을 첨가하고 증간삽입 반응을 반복적으로 진행시키는 경우의 XRD 변화를 도시하였다. 5회 반복반응을 진행하여도 초기 상태와 XRD 패턴의 변화가 크게 관찰되지 않았다. 즉, 고상반응법을 이용하는 경우도 반응평형은 짧은 시간에 이루어짐을 알 수 있다.

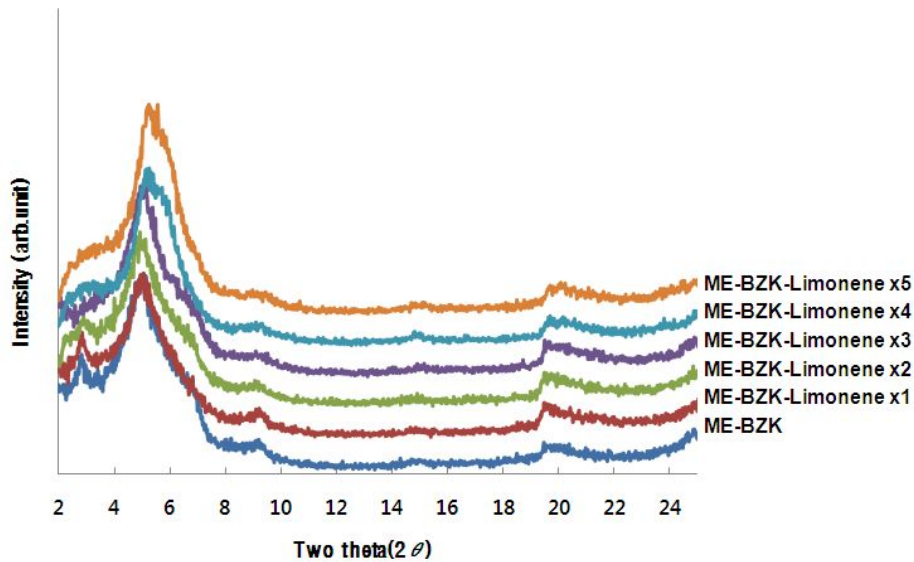


Fig. 56 반복반응에 따른 리모넨-합성운모 나노복합체 XRD 분석결과

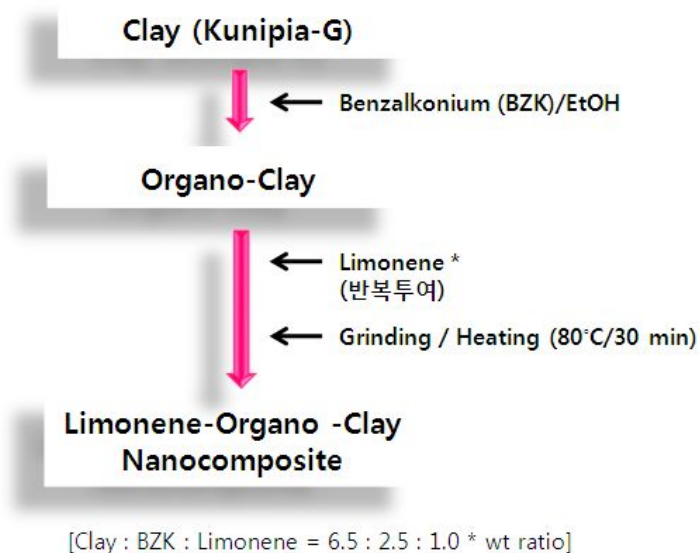


Fig. 57 리모넨-합성운모 나노복합체 합성

Fig. 57에는 출발물질로 Kunipia-G를 사용하고, 리모넨을 소량씩 (0.1g) 증가시키면서 반복 반응시키는 경우의 합성도이고, Fig.58에는 이때 반복과정에서 얻어지는 샘플에 대한 XRD 분석결과를 나타내었다. 6회를 반복해도 초기의 XRD 패턴과 거의 동일한 패턴이 얻어짐을 확인 할 수 있는데, 이 경우도 반응평형이 용이하게 달성되기 때문이라고 해석된다.

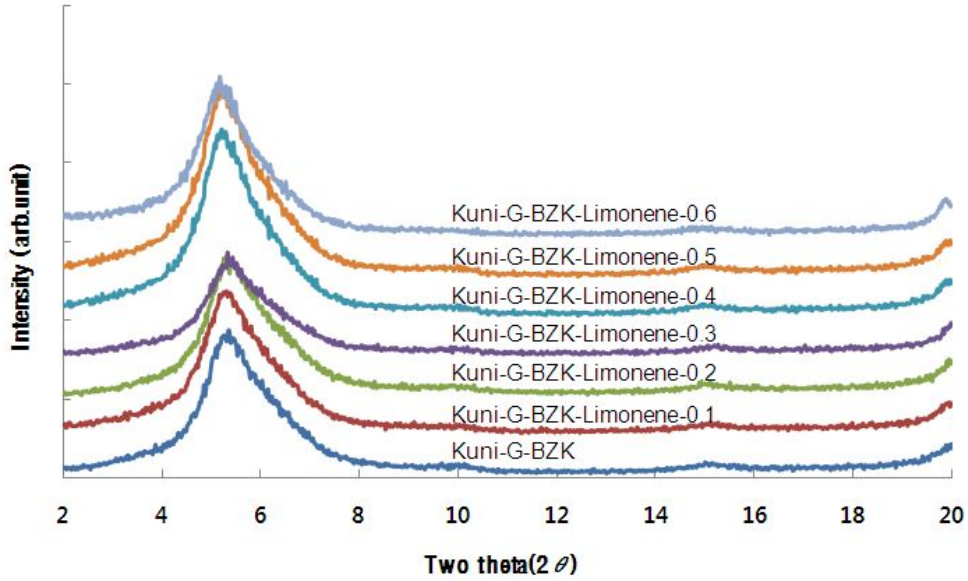


Fig. 58 반복반응에 따른 리모넨-점토 (Kuni-G) 나노복합체 XRD 분석결과

사. 나노복합체의 분석 및 평가

합성된 나노복합체의 분석평가를 위하여 주로 사용된 분석장비는 Fig. 59에 정리한 바와 같다. XRD는 층간삽입 반응에 의한 나노복합체 형성 여부를 판단, 분석하기 위한 장비로 연구개발기간 내내 주로 활용된 장비이며, 자외선 분광분석장비는 함량분석 및 유기물 구조를 분석평가 하기 위하여 활용되었으며, 용출기는 활성물질의 서방성을 평가하기 위한 장비로 식약청 고시 규격품을 사용하였다. 이외에도 광학현미경, GC, 열분석기, IR 분석장비, SEM 등이 나노복합체 또는 나노복합체를 이용한 과립소재의 특성을 분석하기 위하여 활용되었다.

▪ Powder X-ray Diffractometer [분말 X-선 회절 분석기]



- 모델명 : Miniflex
- 제조사 : Rigaku (Japan)
- 제 원 :
X-ray generator(30kV, 15mA)
Vertical type goniometer
X-ray tube, Cu with Ni filter
SC detector

▪ UV-Vis Spectrophotometer [자외선-가시광 분광분석기]



- 모델명 : NEOSYS-2000
- 제조사 : (주)신코
- 제 원 :
Double beam type
Wavelength range : 190 ~1100 nm
Accuracy : ± 0.1 nm

▪ Dissolution tester [용출기]



- 모델명 : KDT-600
- 제조사 : 국제엔지니어링
- 제 원 :
RPM: 0 ~ 200
온도범위: R.T ~ 60°C
전압: 220V, 8A, 1.5kW

Fig. 59 주요 분석 장비의 제원 및 사양

3. 활성후보물질의 스쿠티카충 살충 효과 평가 (위탁기관/제주대학교)

가. 스쿠티카충 분리 배양 (위탁기관/제주대학교)

병원성 스쿠티카충의 동정 : 본 연구기관은 2005년도부터 전남대 및 목포지방해양수산청 진도해양수산사무소 연구팀과 함께 제주도 넙치에서 발병되는 스쿠티카충을 분리 및 배양하여 유전자동정을 통해 여러 스쿠티카충을 순수 분리하였다. 형태적 관찰 및 분자계통학적 동정과정을 거쳐 *Miamiensis avidus* 및 *Uronema marinum*으로 동정된 스쿠티카충을 분양받아 실험에 사용하였다. 분리된 스쿠티카충에서 감염성 및 병원성이 가장 높다고 알려진 *Miamiensis avidus*를 배양하여 실험에 사용하였다. 연구계획 당시 *Miamiensis avidus*와 *Uronema marinum* 2종에 대한 살충효능을 확인하고자 하였으나, 2009년도에 발표된 스쿠티카충 종에 따른 병원성에 관한 논문에 따라 상대적으로 *Miamiensis avidus*보다 병원성이 약한 *Uronema marinum*은 본 연구과제 목표와 부합하여 관련실험은 수행하지 않았다.

나. 동정한 스쿠티카충의 순수배양 및 대량배양

세포주를 이용한 배양 : 어류주화세포 Chinook salmon embryo-214(CHSE-214)는 Minimum Essential Medium(MEM, Gibco, USA)에 10% FBS(Gibco, USA) 및 항생제 penicillin(Gibco, USA) 100 unit과 streptomycin(Gibco, USA) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 각각 첨가한 배양액에서 약 5~7일간 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 분리한 *Miamiensis avidus*를 배양된 CHSE-214 배지에 접종하여 7~9일간 15 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양한 뒤 실험에 사용하였다.

다. *in vitro* 스쿠티카충 살충 효과 평가

in vitro 실험을 통한 항 스쿠티카 약육제제 물질 선정 : 특허 및 문헌 탐색을 통해 항미생물성 또는 항기생충성 활성 물질 총 9가지를 선정하였다. 선별된 물질들은 물질특성에 따라 DMSO와 증류수에 최종농도 5 ppm 로 희석시켜 30분에서 120분간 스쿠티카충의 살충효과를 보이는지 확인하였다 (표 3). 살충효과는 형태변화(morphology)와 사멸(motility) 정도를 확인하였다.

▪ 실험방법

- 24 well-plate에 스쿠티카충 배양액 950 μl 넣은 후 희석된 물질 50 μl 를 섞어 충분히 흔들어 준 후 실온(18~22 $^{\circ}\text{C}$)에 두어 시간별로 관찰하였다.

- 현미경을 통해 스쿠티카충을 확인하였고 농도별, 시간별로 사진 또는 동영상을 촬영하였다.

▪ 실험 결과

- α -pinene, limonen, camphene이 가장 큰 스쿠티카충 살충 효과를 보였다.

표 3. 선별물질에 따른 스쿠티카충의 감수성

	연번	대상물질	용질	감수성	용도
실험구	1	α -pinene	DMSO	+++	
	2	d-limonen	DMSO	+++	
	3	camphene	DMSO	+++	
	4	caffeine	증류수	-	의약품
	5	Quinacrine dihydrochloride	증류수	+	의약품
	6	Quinine sulfate	DMSO	+	의약품
	7	Trimethoprim	DMSO	++	의약품
	8	Oxytetracycline hydrochloride	DMSO	++	의약품
	9	Doxycycline hyclate	DMSO	-	의약품
대조구	1	포르말린	증류수	-	스쿠티카충 약욕제제
	2	DMSO	-	+	용매

* +++: 50% 이상 형태변화 및 사멸; ++, 50% 정도 형태변화 및 사멸; +, 50% 미만 형태변화 및 사멸; -, 변화없음

라. 농도별 및 시간별 살충효과

(1) 1차 실험

α -pinene, limonen, camphene를 최종농도 5, 10, 20, 40, 80, 100 ppm로 처리하여 10분, 30분, 60분, 90분, 120분 동안 각각 스쿠티카충의 살충효능을 확인하였다. 스쿠티카충의 살충정도를 비교하기 위해 대조구로 포르말린(최종농도 50 ppm)을 사용하였고, 소수성인 3가지 선별 물질을 녹이는 용매인 DMSO를 control로 사용하였다. 스쿠티카충의 살충 효과는 이전의 논문을 참고하여 형태변화 (morphology)와 사멸(motility)정도별로 점수를 매겼다 [32] (표 4).

표 4. 스쿠티카충 살충효과별 점수표

	점수	상태
형태변화 (Morphology)	4	변화없음; 타원형의 안정된 세포형태
	3	50% 미만의 세포가 원형 또는 불규칙적인 모양
	2	약 50%의 세포가 원형 또는 불규칙적인 모양
	1	50% 이상의 세포가 원형 또는 불규칙적인 모양
	0	대부분의 세포가 용해
사멸정도 (Motility)	4	사멸없음; 보통수준의 사멸
	3	세포사멸이 50% 정도 진행됨
	2	세포중 약 50% 정도 사멸되고 세포가 비정상적인 운동성을 보임
	1	세포 중 50% 이상이 사멸되고 세포가 비정상적인 운동성을 보임
	0	생존된 세포와 움직이는 세포가 없음

▪ 실험결과 (표 4)

- α -pinene (Fig.60, 61): 농도 40 ppm 이상부터 처리 30분 후 대부분의 스쿠티카충이 사멸하였다. 20 ppm에서는 처리 60분 후 스쿠티카충이 사멸하였다. 5와 10ppm에서는 처리 120분 후 원형의 생존한 스쿠티카충을 관찰할 수 있었으나 대부분 사멸하였다.
- R-limonen(Fig.62, 63): 농도 40 ppm 이상부터 처리 30분 후 대부분의 스쿠티카충이 사멸하였다. 5, 10, 20 ppm에서는 처리후 30분 후부터 형태변화와 사멸정도가 눈에 띄게 관찰되었고 처리 120분 후에도 원형의 생존한 스쿠티카충을 관찰할 수 있었지만 대부분 사멸하였다.
- camphene(Fig.64, 65): 농도 20 ppm 이상부터 처리 30분 후 대부분의 스쿠티카충의 사멸하였다. 10 ppm에서는 처리 10분 후부터 형태변화와 사멸정도가 급격히 눈에 띄었고 처리 30분 후부터 약간의 생존한 원형의 스쿠티카충을 관찰할 수 있었다. 5ppm에서는 처리 120분 후에도 약 50% 정도만이 형태변화와 사멸정도를 보여주었다.
- 포르말린 50ppm을 처리하였을 때 처리 10분 후부터 형태가 원형으로 급격히 변화하였고 운동성이 줄어들었다. 처리 90분 후부터 원형으로 변형된 스쿠티카충이 모두 용해되어 사멸되었다(Fig. 60, G; 그림 Fig 63, F).
- 용매인 DMSO를 스쿠티카충에 처리하였을 때에도 스쿠티카충의 형태변화와 사멸이 있었지만, 선별 물질을 처리한 실험구보다 다소 미미하였다. DMSO 처리 120분 후에는 세포운동성이 감소하였고 형태변화를 보였다 (Fig.60, H; Fig.11, F).
- α -pinene, limonen, camphene의 스쿠티카충 살충 효과는 최고 20~30 ppm에서 가장 빠르고 큰 효과를 보인다고 생각된다.

표 5. 스쿠티카 살충효과 1차 실험 결과

1차 실험	대상 물질	농도 ppm	10분		30분		60분		90분		120분	
			형태	사멸	형태	사멸	형태	사멸	형태	사멸	형태	사멸
실 험 구	피 넨	5	3	4	2	2	2	2	2	2	1	1
		10	2	3	2	2	2	2	1	1	1	1
		20	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0
		40	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	리 모 넨	5	4	4	3	3	3	3	2	2	1	2
		10	3	4	2	3	2	2	1	2	1	1
		20	2	2	1	2	1	1	1	1	0	0
		40	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	감 펜	5	3	4	2	3	2	3	2	3	1	2
		10	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0
		20	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
대 조 구	포르말린	50	3	4	1	4	1	2	1	0	0	0
	DMSO	-	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3

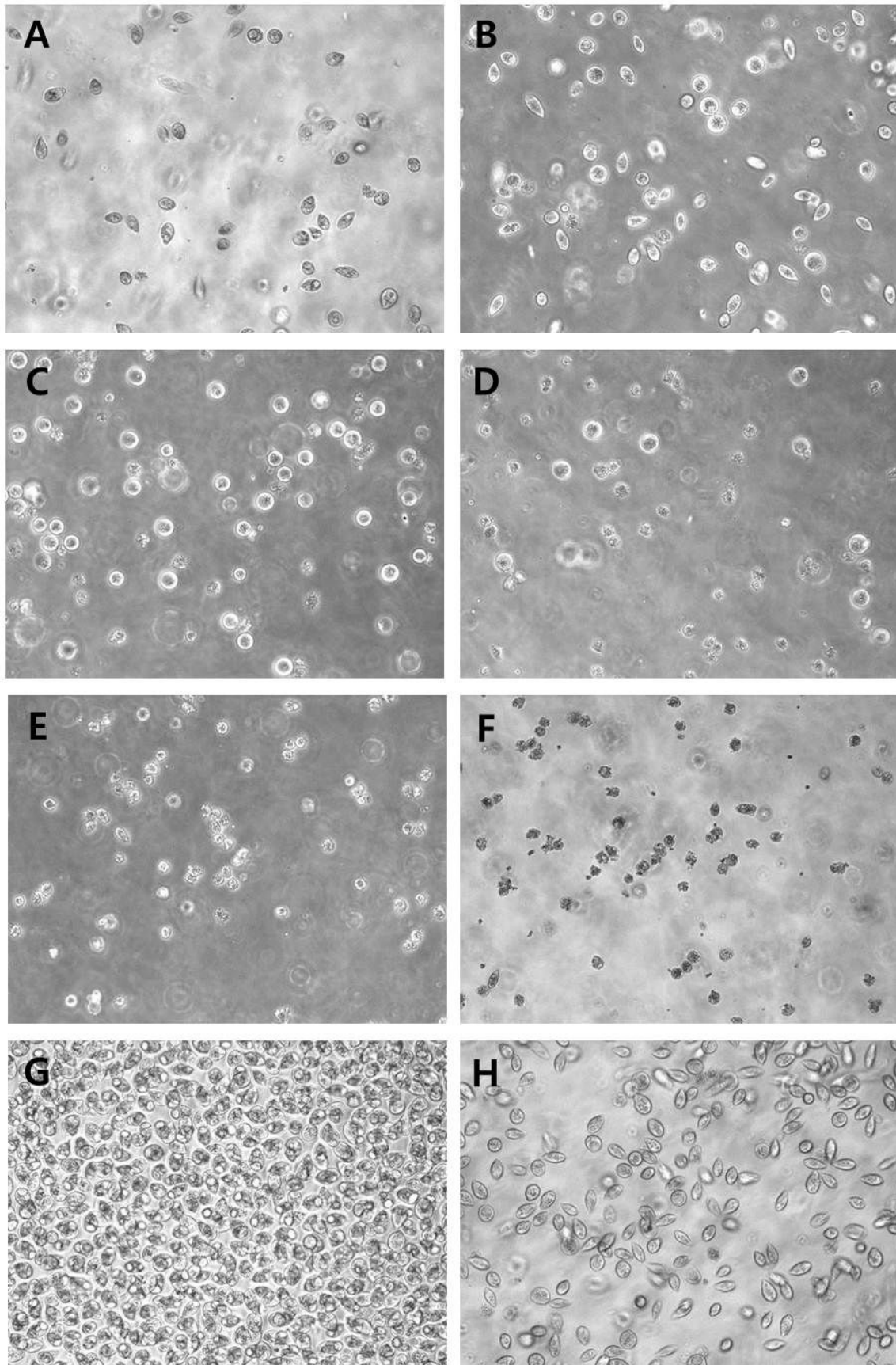


Fig.60. α -pinene 처리 10분 후 농도별 사진. A, 5ppm; B, 10ppm; C, 20ppm; D, 40ppm; E, 80ppm; F, 100ppm; G, 포르말린 50 ppm; H, DMSO; 배율, 200X.

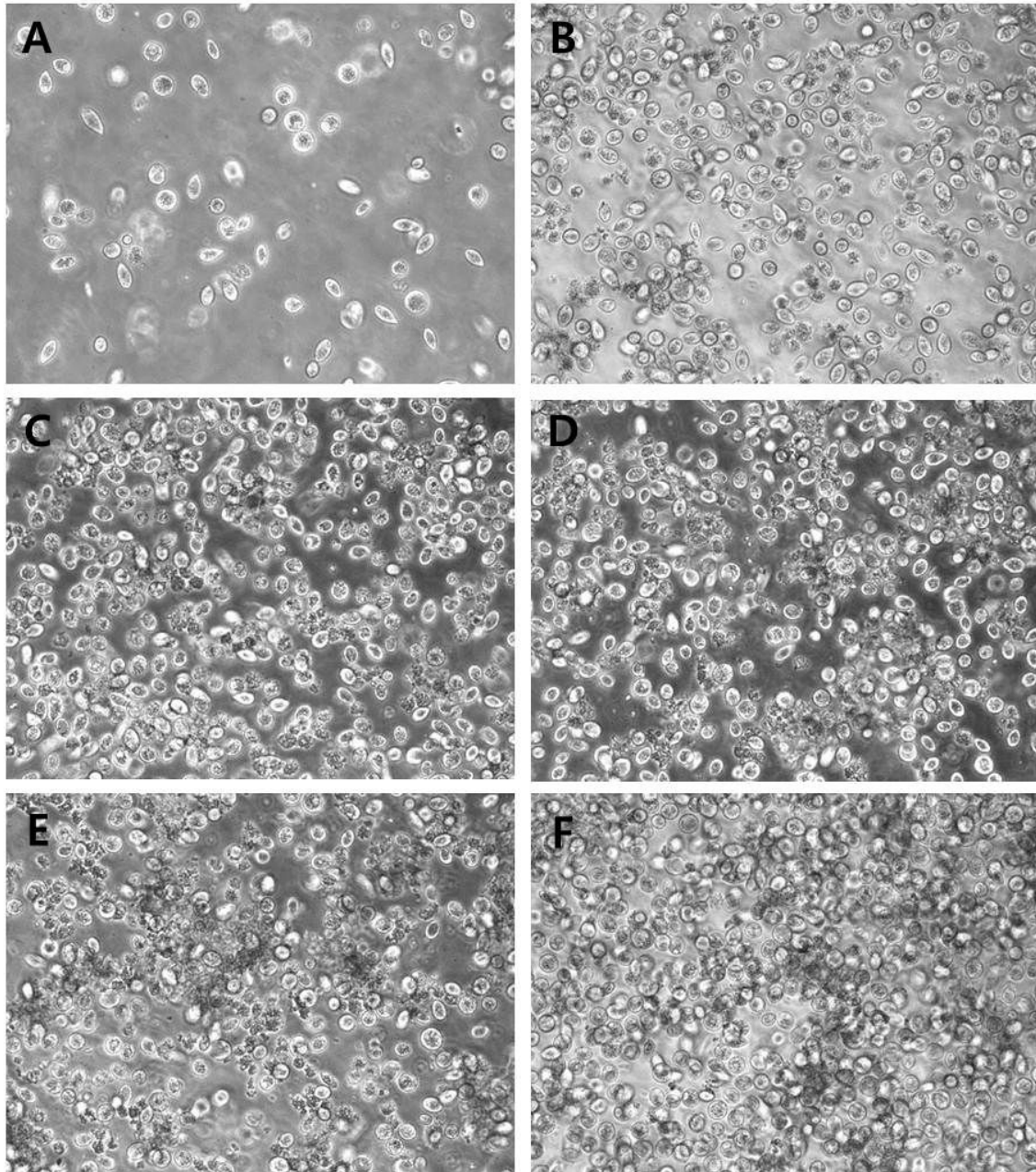


Fig.61. α -pinene 10 ppm 처리 후 시간별 사진. A, 10분; B, 30분; C, 60분; D, 90분; E, 120분; F, DMSO 처리 120분; 배율, 200X.

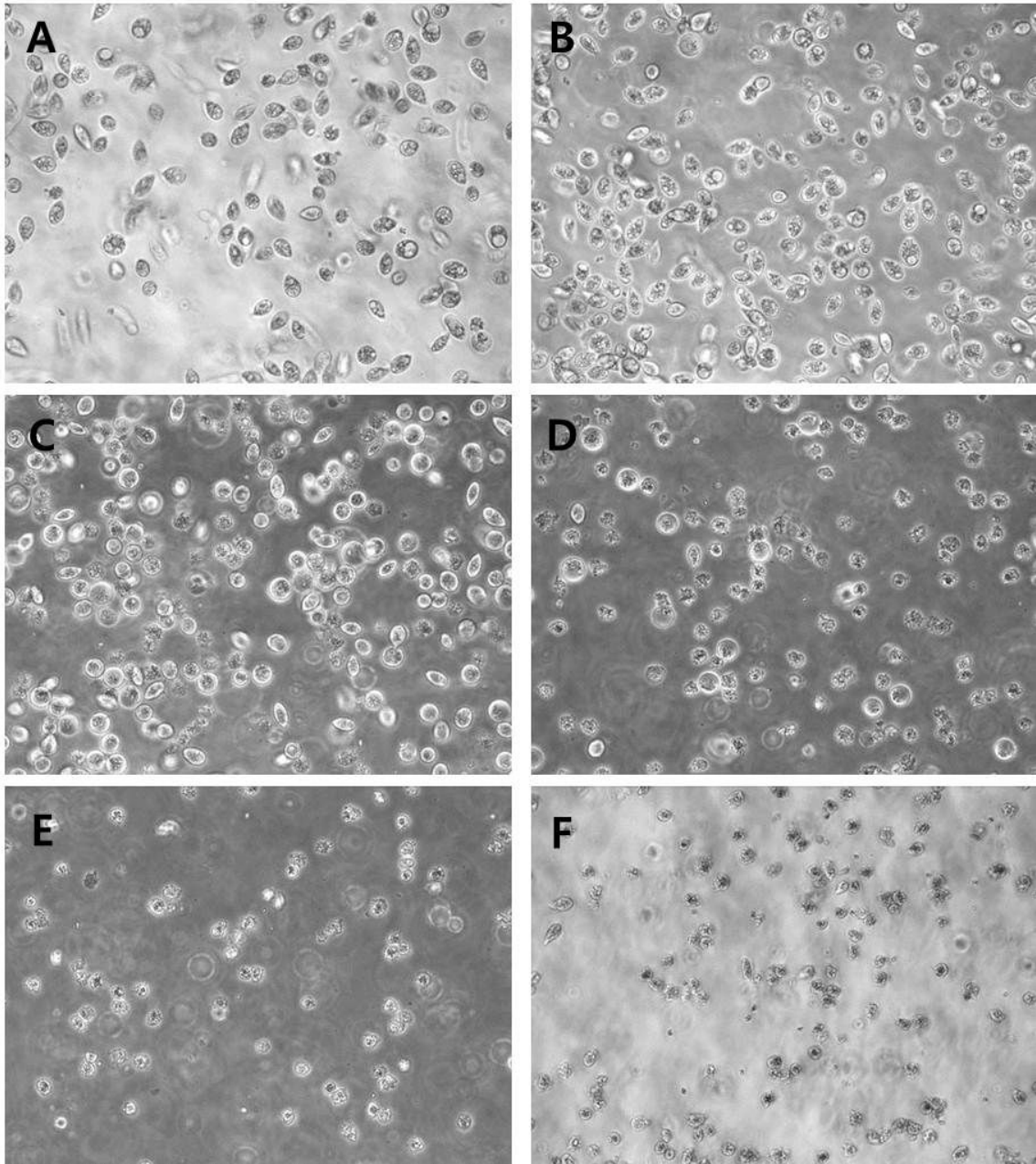


Fig. 62. limonen 처리 10분 후 농도별 사진. A, 5ppm; B, 10ppm; C, 20ppm; D, 40ppm; E, 80ppm; F, 100ppm; 배율, 200X.

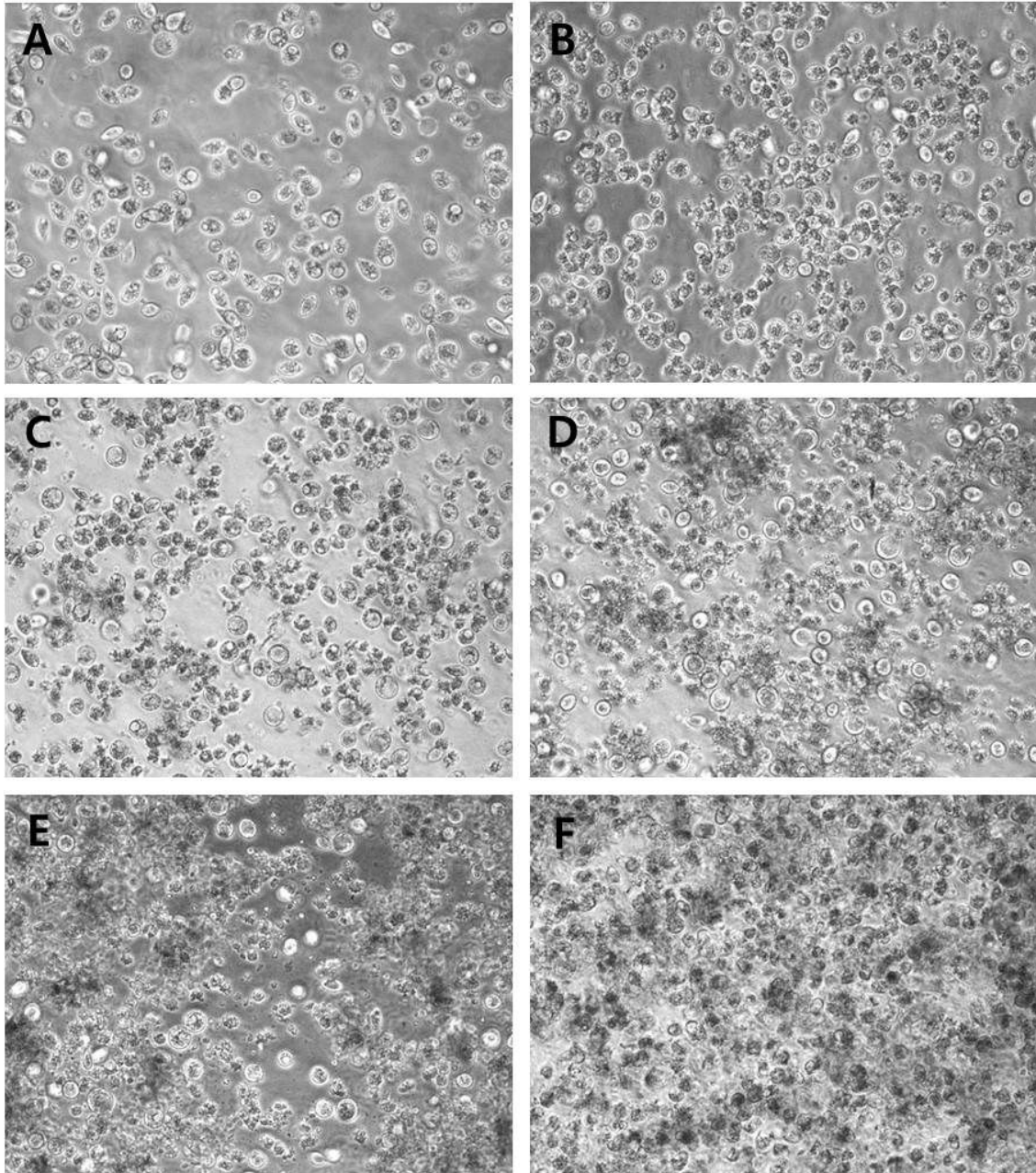


Fig.63. limonen 20 ppm 처리 후 시간별 사진. A, 10분; B, 30분; C, 60분; D, 90분; E, 120분; F, 포르말린 처리 120분; 배율, 200X.

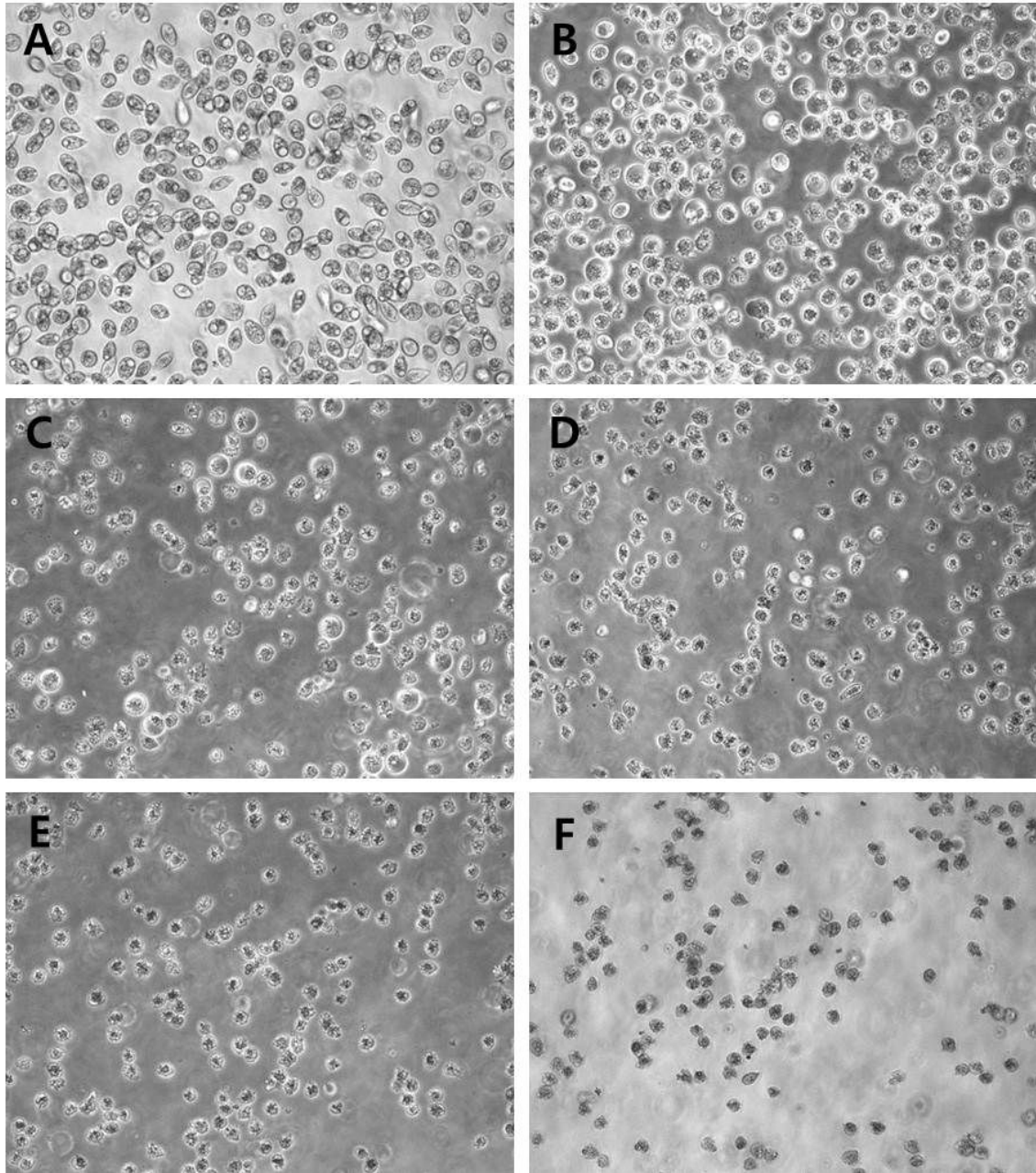


Fig. 64. camphene 처리 10분 후 농도별 사진. A, 5ppm; B, 10ppm; C, 20ppm; D, 40ppm; E, 80ppm; F, 100ppm; 배율, 200X.

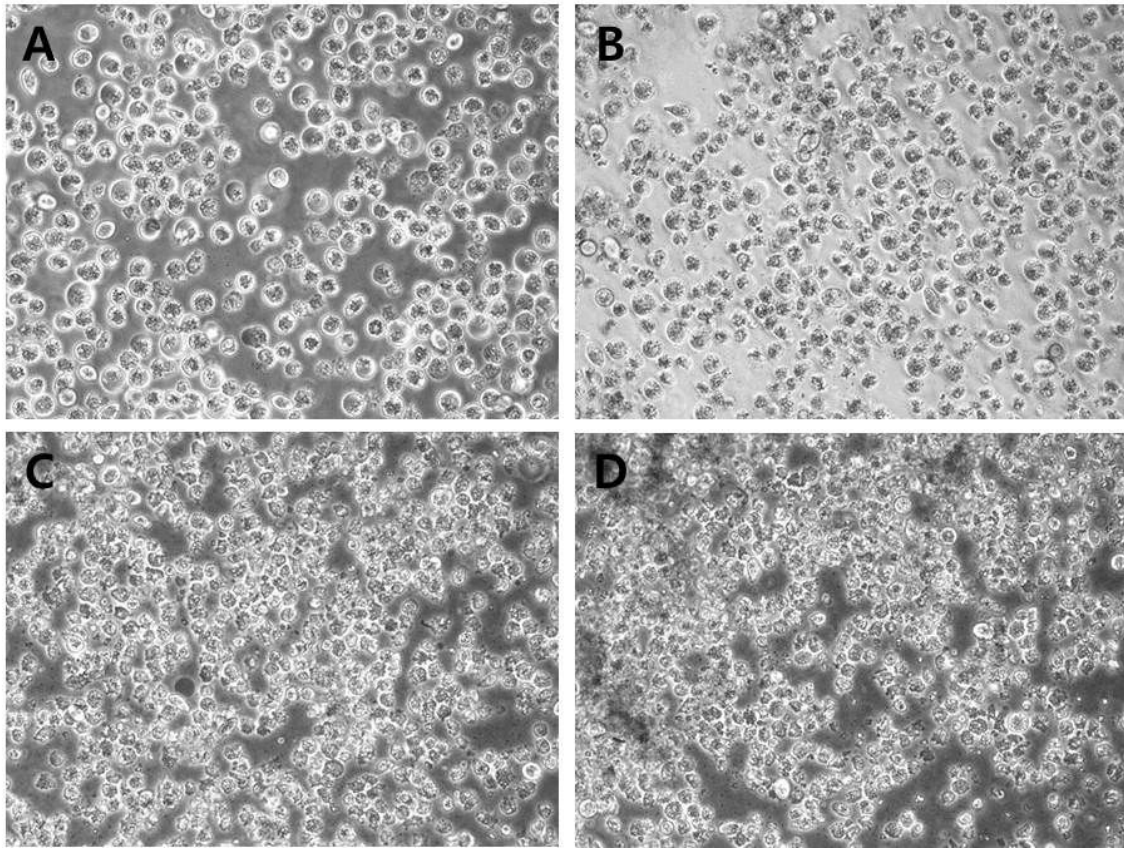


Fig. 65. camphene 10 ppm 처리 후 시간별 사진. A, 10분; B, 30분; C, 60분; D, 90분; 배율, 200X.

(2) 2차 실험

- 1차 실험 결과 α -pinene, limonen, camphene 중에서 가장 효과가 좋은 물질은 camphene이었으나 물질특성상 본 연구과제 목표인 나노화공정이 어려워 2차 실험부터는 제외하였다.

- 1차 실험결과에 따라 α -pinene, limonen의 살충효과 농도 범위를 정한 후 2차 실험을 수행하였다. α -pinene, limonen을 최종농도 1, 5, 10, 15, 20, 30 ppm 농도로 처리한 후 15분, 30분, 60분, 90분, 120분 동안 스쿠티카충 살충효과를 관찰하였다. 스쿠티카충의 살충정도를 비교하기 위해 대조구로 포르말린(최종농도 50 ppm)을 사용하였고, 용매인 DMSO를 control로 사용하였다.

· 실험결과 (표 6)

- α -pinene, limonen 모두 1, 5 ppm 에서는 큰 살충효과를 보이지 않았으나 시간이 지날수록 스쿠티카충의 형태가 원형으로 변하고 운동성이 떨어지는 것을 확인하였다. α -pinene는 10ppm 부터 강한 살충효과를 보였으며 시간이 지날수록 대부분이 스쿠티카충이 사멸하는 것을 관찰하였다. limonen도 15ppm부터 강한 살충효과를 보였다.

- 포르말린를 처리한 스쿠티카충은 1차 실험 결과와 마찬가지로 처리하자마자 운동성이 없

어졌으며 처리 30분 후부터 세포가 용해되는 것을 확인할 수 있었다.

- DMSO를 처리한 스쿠티카충도 시간이 지날수록 형태가 원형으로 변형되었으나 운동성은 다른 물질을 처리한 실험구보다 활발하였다.

- α -pinene, limonen의 스쿠티카충 살충 효과는 최소 5~10 ppm 이상일 때 나타난다고 생각된다.

표 6. 스쿠티카 살충효과 2차 실험 결과

2차 실험	대상 물질	농도 ppm	15분		30분		60분		90분		120분	
			형태	사멸	형태	사멸	형태	사멸	형태	사멸	형태	사멸
실험 구	피넨	1	4	4	3	4	3	3	2	3	1	3
		5	4	4	3	4	2	3	2	3	1	3
		10	2	2	1	1	1	1	1	1	0	1
		15	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	리모넨	1	4	4	3	4	3	4	2	3	2	3
		5	4	4	3	4	2	3	2	3	1	3
		10	2	3	2	2	1	2	1	2	1	2
		15	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
		20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
대조 구	포르말린	50	4	1	4	1	1	1	0	0	0	0
	DM SO	-	4	4	3	4	2	4	2	3	2	3

(3) 3차 실험

▪ α -pinene과 limonen을 혼합하였을 때 살충 시너지효과가 보이는지를 확인하기 위하여 실험을 수행하였다

- α -pinene과 R-limonen를 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ppm 씩 섞어, 혼합 최종농도가 6ppm이 되도록 처리하였다.

▪ 실험결과

- 두 가지 물질을 섞었으나 큰 시너지효과를 보이지 않았다(데이터 보이지 않음). 시너지를 효과를 보기 위해서는 농도를 조절하여 추가적인 실험을 수행해야하나, 두 가지 물질이 같은 계통의 물질인 것을 감안할 때 큰 효과는 없을 것이라 사료된다.

특허와 문헌을 통해 선정된 9가지 물질 중 살충 효과를 크게 보인 α -pinene, limonen, camphene를 선정하여 실험을 수행하였다. 3가지 물질 중 camphene이 효과가 가장 빨랐으나 물질이 실온에서 반고체형태를 띠고 있고 원료단가가 높아 제품화가 어려운 관계로 실험에서 제외하였다. 액체 상태인 α -pinene와 limonen를 DMSO에 녹여 스쿠티카충 배양액과 섞은 후 살충효과를 확인하였다. DMSO 역시 in vitro 실험에서 스쿠티카충에 독성을 보였으나, DMSO에 희석시킨 물질을 처리하였을 때 스쿠티카충이 빠르게 사멸되는 것을 확인하였다. 실험 결과 두 물질 모두 최고 20~30 ppm과 최소 5ppm의 농도에서 효과적인 살충효과를 보였다. 최소농도 5 ppm 또는 10 ppm로 물질을 처리하였을 때 처리 30분 후부터 형태변화가 두드러졌으며 120분 후에는 50% 이상이 사멸하였다. 20~30 ppm으로 처리하였을 때는 처리 10분 후부터 형태변화와 사멸을 확인할 수 있었다. 그러나 두 가지 물질을 혼합하였을 때 유효한 시너지효과는 보이지 않았다.

4. 향스쿠티카 약육제제 조성물의 과립화 공정 기술 개발

가. 과립용 조성물 설계

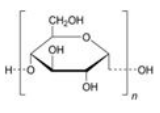
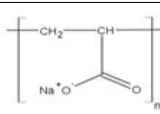
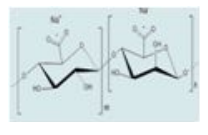
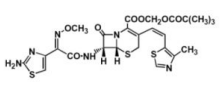
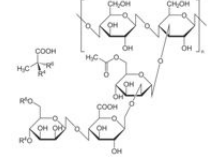
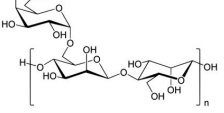
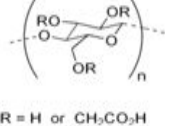
과립제품을 제조하기 위해서는 상기 설명한 바와 같이 제조한 피넨 함유 복합체를 적절한 바인더 및 첨가제와 혼합하여 일정한 크기와 모양으로 성형해야 한다. 향 스쿠티카용 과립제품을 설계함에 있어서 중점적으로 고려해야 할 사항은 우선은 앞서 설명한 바와 같이 복합화 시킨 피넨이 휘발성이 억제될 수 있게 안정화 되어야 하고 해수 중에서 일정한 속도로 용출되는 것이 중요한 요소이다. 그런데 이러한 안정화와 용출속도 제어는 이미 무기 담체와의 복합화를 통해 기본적으로 달성되기 때문이 이러한 특징을 해치지 않는 범위에서 효과적인 과립 공정을 개발하는 것이 관건이 된다. 한편, 향 스쿠티카용 과립의 적용 조건이 바닷물이기 때문에 해수 중에서 기계적인 안정성을 확보하는 것이 과립 조성물 설계에서 매우 중요한 요소이다. 즉, 과립을 제작할 때 소프트 하면 활성성분의 용출에는 효과적이거나 제품의 보관, 이송 및 현장 적용시 깨지거나 바닷물 속에서 봉해되는 문제를 보일 수 있고, 반대로 너무 하드하게 제작하는 경우 과립내 활성성분이 일정한 속도로 용출되기가 용이하지 않다.

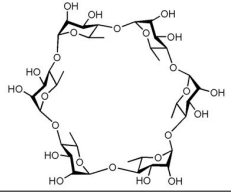
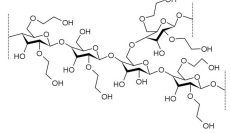
또한 과립을 제조하는 방법에 따라 과립용 조성물의 설계를 좌우하게 된다. 본 연구에서는 제환기나 펠렛 성형기를 이용한 과립화 방법을 우선적으로 고려하였다. 제환기는 구형의 과립 제작이 가능하고 모양이나 크기를 일정하게 만들어 낼 수 있기 때문에 물성을 일정하게 제어하는 데 유리하다고 판단되었다. 제환기를 이용한 과립화 공정에서 과립의 모양, 크기, 강도, 표면의 균일성을 등을 좌우하는 다양한 요소 가운데 가장 중용한 것이 압축시 점성이다. 즉, 과립용 원료를 압축하였을 때 점성이 최적화 되어야 과립의 크기, 모양 및 강도가 일정하게 제어 될 수 있다.

본 연구에서 과립용 조성물을 설계함에 있어서 우선적으로 검토한 다양한 결합제 및 점착제를 표 7에 정리하였다. 하기의 표에 요약되어 있는 결합제 가운데 점토-피넨과의 혼합성 및 점성의 조절이 적합한 것이 알긴산나트륨과 젤라틴이 선정되었다. 그러나 알긴산이나 젤라틴 만으로는 원하는 과립의 강도 및 해수 중에서의 봉해 방지 효과가 한계가 있는 것으로 판

단되어 무기계 바인더인 물유리 (water glass, sodium silicate)를 보조 바인더로 선택하였다. 물유리를 보조 바인더로 하는 경우 바인더간의 혼화성 및 혼합시 점성 등에서 젤라틴 보다는 알긴산을 이용하는 것이 유리하여 알긴산 나트륨과 물유리를 메인 바인더로 하여 과립용 조성물을 설계 하였다. 조성물 가운데 무기 바인더인 물유리의 경우 무기담체인 실리케이트와의 친화성이 우수할 뿐 아니라 시간이 경과함에 따라 자연경화가 진행 되어 과립의 기계적 강도의 향상 및 해수 중에서의 붕해를 방지하는데 효과적인 역할이 기대 되었다. 또한, 과립 제조 시 주요 공정변수로는 바인더의 농도, 종류, 혼합비와 복합체와의 혼합비 등을 주요 검토 및 제어 변수로 선정하였다.

표 7. 대표적인 사료 결합제의 종류 및 특성

성분	화학구조	특성 / 성질	비고
말토덱스트린 (Maltodextrin)		물에 대한 용해성이 우수, 적당한 점도부여, 녹말의 가수분해로 얻어냄. 저 흡습성으로 수분 흡수를 피하는 식품의 부형제로 사용	증점, 저흡수성
폴리아크릴레이트 (Polyacrylate)		흡습 특성이 매우 우수, (Super absorbent polymer). Ca ²⁺ & Mg ²⁺ 과 binding 응고, NaCl 첨가로 binding 용해	증점, 흡습, 용해
알긴산나트륨 (Sodium Alginate)		물에 녹으면 점성이 있으며, 안정제 및 증점제로 그 효과가 우수. 염화칼륨, 황산동, 초산납 등의 2가 이상의 금속염을 가하면 유색염이 생기고 응고. 산성에서 침전되고, 소금이 8% 이상 되는 경우 염석에 의해 점성을 잃음. 모든 유기 용매에는 녹지 않음. 알긴산나트륨 수용액에 산을 가하면 알긴산이 젤리상의 침전으로 석출됨. 이 알긴산은 pH 5.8 이상에서 녹기 시작함.	증점, 흡습
카제인 나트륨 (Sodium Caseinate)		증점력, 결합력, 단백질 특유의 기포성이 있으며 물에 잘 녹고 pH는 중성 수용액에 산을 가하면 카제인이 분리되어 침전 형성 주된 용도 증점제	흡습
잔탄검 (Xanthan Gum)		Polysaccharide, 식품의 증점제, 결합제, 유화제, 발포제로 사용. 냉수에 분산되고 열수에 용해. 용해 온도에 따른 점도의 차이가 거의 없음. 우수한 내열성, pH 2~13 영역에서 점도의 변화가 없음.	
구아검 (Guar Gum)		냉수나 온수에 쉽게 분산되어 균일하고 점성을 가진 교질용액 형성. 1% 수용액은 3000 cps의 점도를 나타냄.	흡습
카복시 메틸셀룰로스 (Carboxymethyl cellulose)	 R = H or CH ₂ CO ₂ H	수용성, 흡습성 증점제, 접착제로 사용 식품첨가물공전 규격, 대한약전 규격, 양어사료용첨가물 규격에 적합.	흡습
젤라틴 (Gelatin)		사료용 결합제, 접착제, 지혈제, 약용 캡슐의 제조에 이용. 온수에 녹아서 졸형성, 냉수에는 천천히	고온 공정

		<p>팽윤하여 젤라틴 무게의 5~10배 가량의 물을 흡수. 5%이하의 농도에서는 겔화가 일어나지 않으며, 5% 이상에서는 gel화. gel의 경도는 젤라틴 농도와 분자량에 의해 결정. pH가 강산성일 경우 gel이 분해. 응고성을 이용하여 음식물에서 모양이나 단단함을 부여하기 위해 사용. 정제된 투명한 제품을 젤라틴이라 하며, 불순물이 많고 조잡한 공정에서 얻어지는 색이 짙고 불투명하며 다소의 불순물을 포함하는 제품을 아교라고함. 사료용 결착제 제품이 있음. 성형 조건이 75도 ~ 80도</p>	
<p>사이클로 덱스트린 (Cyclodextrin)</p>		<p>식품의 점착성 및 점도 증가. 전분과 효소를 이용하여 제조. 물에 잘 녹고 에탄올에 약간 녹음. 친수성과 소수성을 동시에 가짐. 내부는 소수성, 외부는 친수성으로 유화제로 사용.</p>	<p>흡습</p>
<p>전분 (Starch)</p>		<p>포도당이 축합 반응하여 만들어지는 Polysaccharide. 증점특성 보다는 점착 특성 때문에 사용.</p>	<p>흡습</p>

나. 과립공정설계

과립화의 일반적인 공정은 Fig. 66에 도시하였다. 기본 단위공정으로 천연 팽윤성 점토의 유기화제를 이용한 개질 공정, 피넨 등 활성물질의 증간흡착 반응을 이용한 활성물질-점토 복합체 제조 공정, 제환기를 이용한 과립성형 공정 및 최종적으로 포장의 단계로 구성된다. 종래의 방법에서 별도의 결착제 없이 증간유기화제를 액상형 계면활성제를 활용함에 따라 용이하게 과립형성 조건을 만족시킬 수 있었다. 종래의 물유리와 같은 무기 결착제를 사용하는 경우 경시변화에 따른 경화진행으로 인해 초기상태의 과립과 시간 경과후의 과립의 기계적 특성의 차이 뿐 아니라 활성물질의 용출속도의 변화가 발생하여 제품의 품질을 일정하게 유지하는데 한계가 있었다.

친수성 점토의 유기화를 위한 계면활성제를 이용한 개질반응은 앞서 설명한 바와 같이 고상반응법을 기본으로 채택. 용액반응에서 문제가 되는 긴 공정시간, 고-액 분리 및 수세공정을 생략할 수 있는 장점이 있다. 고상반응이란 간단하게 원하는 유기물 (주로 양이온성 계면활성제)와 점토를 원하는 비로 혼합하고 기계적 압력을 가하면서 혼합하여 유기물의 확산에 의한 복합화 반응이 진행되는 것. 특히, 알킬 암모늄계 계면활성제와 양이온성 점토 화합물은 매우 친화성이 우수하여 실온에서도 일정정도의 반응이 진행될 수 있을 만큼 효과적인 반응이 일어난다. 다양한 혼합/압출 방법이 있으나 롤-밀을 사용하는 경우가 매우 효과적임을 평가를 통해 확인 할 수 있었다.

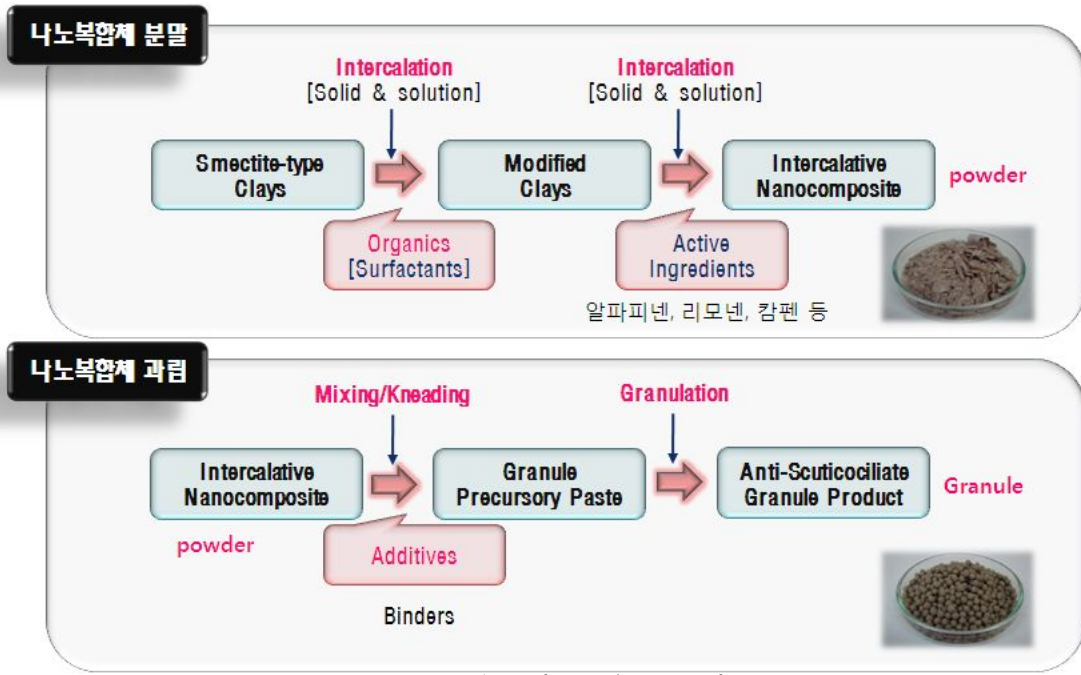


Fig. 66. 과립제조 일반 공정도

Fig.67에는 피넨 함유 과립제조공정도를 나타낸 것이며, Fig.68 에는 피넨 함유 과립 제조 예를 나타낸 것이다. 기본적으로 점토의 층간을 유기화제로 혼합, 건조 및 분쇄하여 분체형의 유무기 복합체를 만들고, 유기화된 점토 복합체에 피넨을 혼합, 물-밀을 이용하여 반복 밀링하여 층간에 피넨 분자가 층간삽입 될 수 있도록 한다. 여기에 바인더 용액인 물유리 및 알긴산 혼합용액을 첨가하여 제환에 적절한 점도를 갖는 반죽을 만든다. 이때도 바인더 용액과 피넨 복합체를 혼합, 물-밀을 반복하여 적절한 점도를 갖는 반죽을 제조한다. 반죽이 지나치게 점도가 낮은 경우는 토출되는 과립의 기계적 강도가 불량하다. 또한, 지나치게 반죽의 점도가 높은 경우는 일반 일정한 크기의 구형과립 형성이 곤란하여 작업성이 떨어지는 단점이 있다. 과립공정에서 실질적으로 작업의 용이성 및 제품 품질의 균일성을 좌우하는 가장 중요한 요소는 전구체 반죽의 점도이다. 제환기를 이용하여 구형의 과립이 얻어지면 필요한 경우 회전팬 건조기를 이용하여 제품의 최종건조를 수행 할 수 있다.



Fig. 67. 피넨 함유 과립제조 공정 흐름도

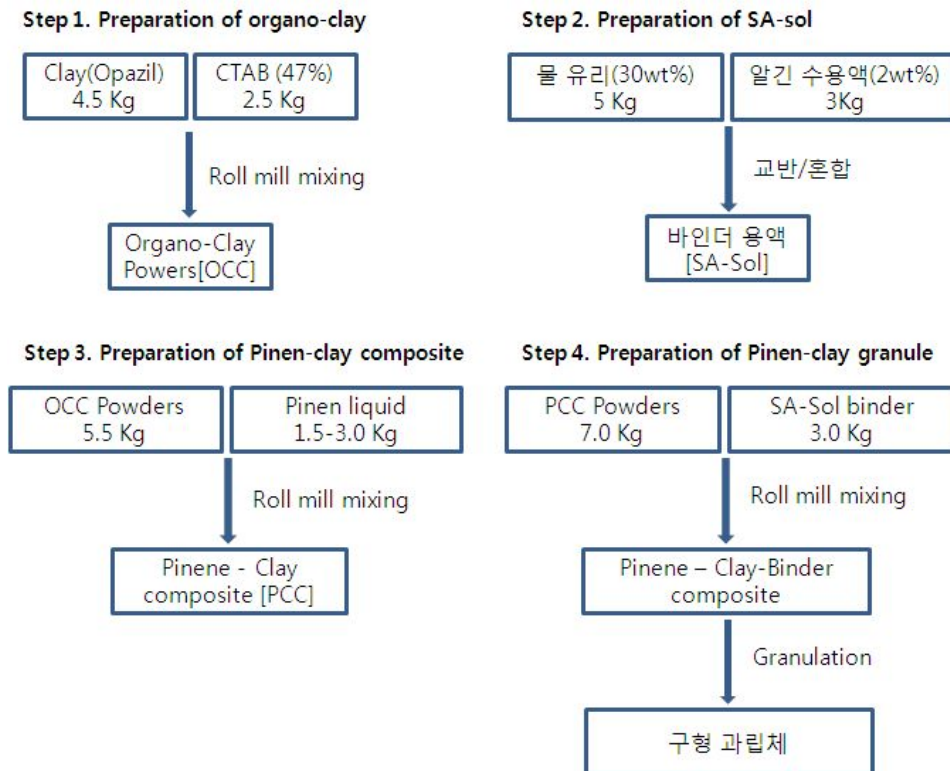


Fig. 68. 피넨 함유 과립 파일럿 (pilot) 제조 예

점토를 선정하고 여기에 유기화제를 층간 삽입하여 친수성 점토를 친유성으로 개질한다. 이때 유기화제의 선택이 별도의 결합제 (또는 바인더) 사용 없이도 효과적인 과립을 제조하는데 매우 중요한 역할을 한다. 특히, 단일상의 CTAB 형태 보다 벤잘코늄과 같이 다양한 체인길이를 갖는 계면활성제가 혼합된 물질의 사용이 과립성형에 적절한 반죽형태를 유도하는데 매우 유리하게 작용하였다. 즉, 벤잘코늄을 유기화제로 도입하는 경우 상기한 공정에서와 같이 무기 바인더인 물유리의 사용이나 점성 조절제 이면서 결합제 역할을 하는 알긴산 용액의 사용을 배제 할 수 있다. 특히, 무기 바인더인 물유리의 사용을 배제하는 경우 공정에서 물유리의 건조 때문에 발생하는 라인 오염 및 작업성 저하의 문제를 해결 할 수 있다. Fig.69에는 별도의 바인더 첨가 없이 유기화제를 과립제형의 결합제로 하여 과립 제조공정을 도사하였다. 또한, 유기화제 처리 후에 연속적으로 활성물질을 도입하는 경우가 과립의 성형에 있어서는 효과적이었다. 좀 더 공정을 단순화하기 위해서는 앞서서도 설명한 바와 같이 단계 반응이 아니라 한번에 층간유기화와 활성물질의 층간삽입을 동시에 유도하는 것이다. 즉, 피넨의 경우 피넨활성물질과 층간유기화제인 벤잘코늄액을 미리 혼합한 다음 원료 점토와 직접 반응시켜 유기화처리와 활성물질의 층간삽입을 동시에 달성할 수 있다. 균일한 혼합을 위해서는 점토-활성물질-유기화제를 동시에 고속믹서에 투입하고 혼합하여 균일한 혼합체를 우선 얻어낸다. 다음으로 혼합물질을 압출기에 투입하여 후방에서 전방으로 혼합물을 강하게 압착, 도출하면서 제환헤드에서 구형으로 성형하게 된다. 이때 압출기에서 강한 압력이 작용하여 유기화제와 활성물질의 층간삽입이 촉진된다.



Fig. 69. 별도의 과립 바인더를 제외하는 과립 제조 공정도

한편, 과립성형에 결정적인 공정변수는 원료물질들의 혼합비, 더 정확하게 표현하면 고상물질과 액상물질의 혼합비이다. 즉, 적절한 과립제조를 위해서는 전구체 역할을 하는 혼합물의 반죽상태가 매우 중요하다. 이때 반죽상태는 용액중의 고형분의 함량에 의해 좌우되는 것으로 액상원료인 피넨이나 리모넨, 유기화제와 고상원료인 점토의 혼합비가 매우 중요한 역할을 하게 된다. 본 연구에서는 이전의 다양한 과립제조 조건에 대한 연구결과를 바탕으로 활성물질 (10~ 30wt%)-유기화제 (5 ~ 20wt%)-점토 (40~ 60wt%)의 작업가능 영역이 있을 도출하였다. 최적의 혼합비는 활성물질 10~20wt%-유기화제 10~20%-점토 60~70% 영역이었다.

제환기를 이용한 과립공정에서 주요 변수는 장환 속도, 즉 내부 스크류의 회전속도에 의한 내용물의 토출속도, 성형롤라의 회전속도, 롤라의 진동속도, 반죽의 점도 등에 의해 성형의 품질이 결정 된다. 즉 공정의 최적화 과정에서 이들의 공정변수를 변화시켜 가면서 과립 성형을 진행하였다. 제환기를 이용한 과립 성형이 완성되면 표면 건조 및 과립의 표면을 매끈하게 다듬기 위하여 회전형 송풍건조기를 이용한 건조공정이 추가될 수 있다. 즉, 건조공정은 필수공정은 아니며 필요한 경우 추가할 수 있는 공정이다. 일반적으로 해수 중에서의 봉해방지와 기계적 강도를 개선하기 위해서는 건조공정을 거치는 것이 바람직하다. 건조공정이 완료되면 최종적으로 포장하여 제조공정을 완성할 수 있다. Fig. 70에는 구형과립의 제조에 사용된 제환기와 열풍형 회전건조기 사진이다. 구형과립의 크기는 토출구 헤드의 구경과 롤라 헤드의 홈 크기의 변화를 통해 자유롭게 조절할 수 있으며 보통 2 ~ 10 mm 범위에서 선택할 수 있다. 본 연구에서는 직경 5 mm의 크기의 과립을 제조할 수 있는 롤라 헤드를 이용하였다. 열풍형 회전건조기는 일차 제조된 과립을 용기내에서 회전 시키면서 열풍을 가해 과립표면의 건조 또는 바인더의 경화를 유도하여 과립의 기계적 강도를 개선시키게 된다. 그러나 본 연구에서는 건조가 장시간 지속되는 경우 휘발성 활성성분의 손실이 크게 일어날 수 있어 짧은 시간만 적용하는 것이 바람직하다.



Fig. 70. 구형과립 제조용 제환기 및 열풍형 회전건조기

다. Twin-Screw Extruder 펠렛 성형기

제환기를 이용하여 활성성분 함유 과립을 제조하는 경우 일정한 크기의 구형과립의 제조에는 매우 효과적으로 적용되었다. 따라서, Lab. 차원에서의 실험과 평가에는 매우 효과적인 과립방식이라고 할 수 있다. 그러나 제환기의 경우 장비자체를 매우 크게 대형화 하지 않고서는 시간당 과립 제조량이 ~ 10 kg 정도이고, 기계가 매우 예민하여 로트별 제품의 편차가 심하게 발생하는 단점이 있었다. 롤러 헤드의 마모 및 공정중 이격거리 형성에 의한 불량발생, 진동에 의한 공정불량 등이 일정한 제품 및 실험샘플 제조에 악영향을 주었다. 따라서, 이를 극복하기 위해 본 연구개발의 목표에 적합한 과립의 제조나 일정한 과립품질의 달성 및 현장 평가에 소요되는 시제품의 원활한 공급을 위해 좀 더 생산성이나 생산안정성이 우수한 과립 방법에 대한 연구를 진행하였으며, 제환기를 변형한 twin-screw extruder 펠렛 성형기를 설계, 제작하였다. Fig. 71에는 twin-screw extruder type 펠렛성형기 (또는 과립기)의 설계도를 나타내었으며 실물사진은 Fig. 72에 도시하였다. Twin-screw extruder 형 과립기는 우선 쌍축 스크류(twin-screw)를 적용하여 전방으로의 토출력을 개선하고 원료 반죽의 역 토출을 최소화 하기 위해서 설계에 반영하였다. 또한, 과립의 형태를 구형이 아니라 실린더 (cylinder type, 원기 등)로 하여 토출구면에 wire-cutting 기를 장착하여 일정한 크기의 과립으로 절단한다. 즉, 후방에서 쌍축 스크류에 의한 원료 반죽을 지름 5 mm 정도의 토출구를 통해 나오면 고속의 wire cutting을 통하여 과립을 제조한다. 본 연구에서 자체 설계 제작한 장비의 경우 실험용 장비임에도 불구하고 시간당 100 kg 이상의 생산속도가 달성되며, 과립의 제조에 특별한 기계적 에러의 발생이 거의 없다. 펠렛형태의 과립에서 직경은 토출구의 구경에 의해 조절이 가능하며 높이는 wire-cutting 스피드나 반죽의 토출속도 제어를 통하여 자유롭게 조절할 수 있는 장점이 있다. 또한, twin-screw에 의한 내부 압력의 발생은 유기화제나 활성물질의 점토 층간으로의 층간삽입을 촉진 시키는 역할을 한다.

한편, 제환방식을 구형제환기에서 실린더형태의 과립으로 전환하는 경우 작업 속도의 결정단계는 원료의 혼합 부분이 된다. 구형 제환 방식의 경우 일반 롤 밀을 반복하여 혼합과 층간삽입 반응을 유도하였는데 이 공정이 분진의 발생이 심할 뿐 아니라 작업시간이 길어지는 문제점이 있다. 따라서 이를 해결하기 위해서 고속스피드 믹서를 설계, 제작 하였다. 고속스피드 믹서의 설계도는 Fig.73에 도시하였으며, 실물사진은 Fig.74에 도시하였다. 고속스피드 믹서를 적용하는 경우 원하는 비로 칭량된 원료를 믹서내 투입하고, 밀폐된 상태에서 고속으로 회전하

는 임펠라에 의해 균일한 혼합체를 단시간에 제조할 수 있는 장점이 있으며, 분진발생을 현저하게 감소시킬 수 있는 특징을 나타내었다.

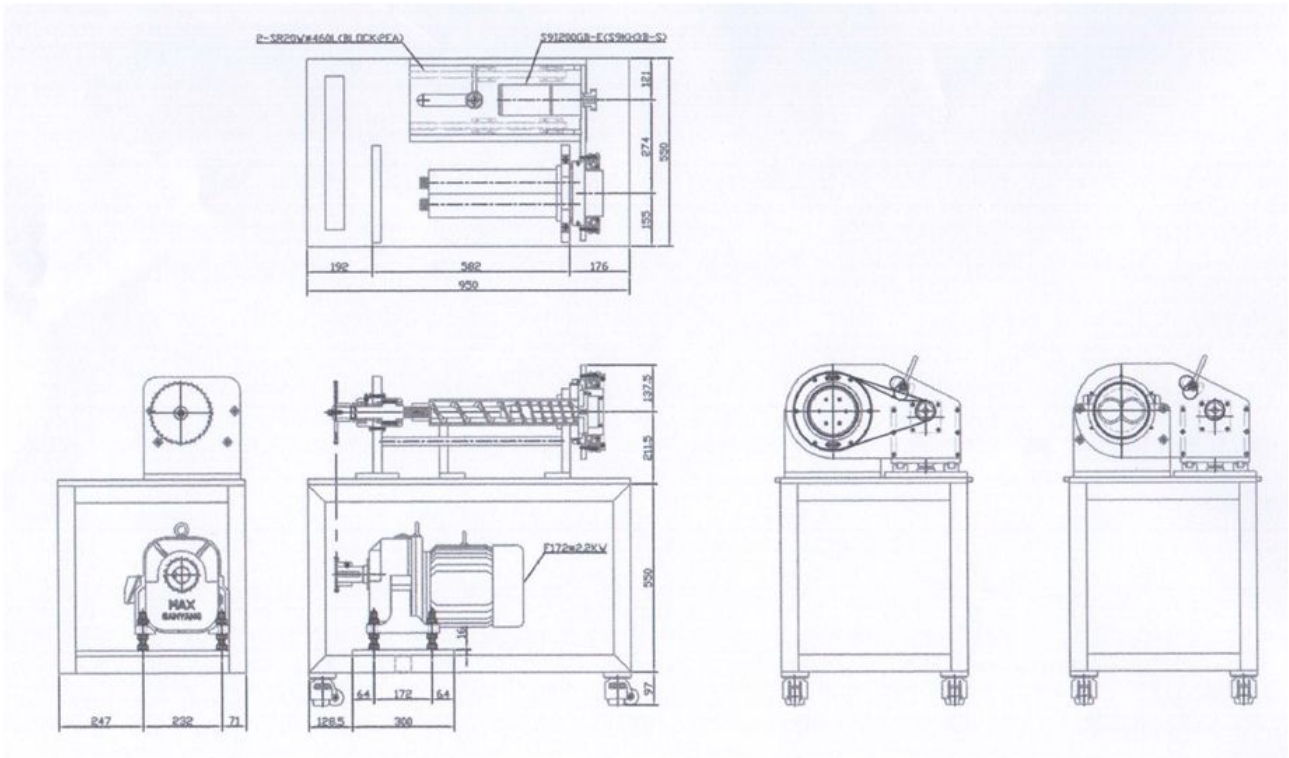


Fig. 71. Twin-screw extruder type 펠릿성형기의 설계도

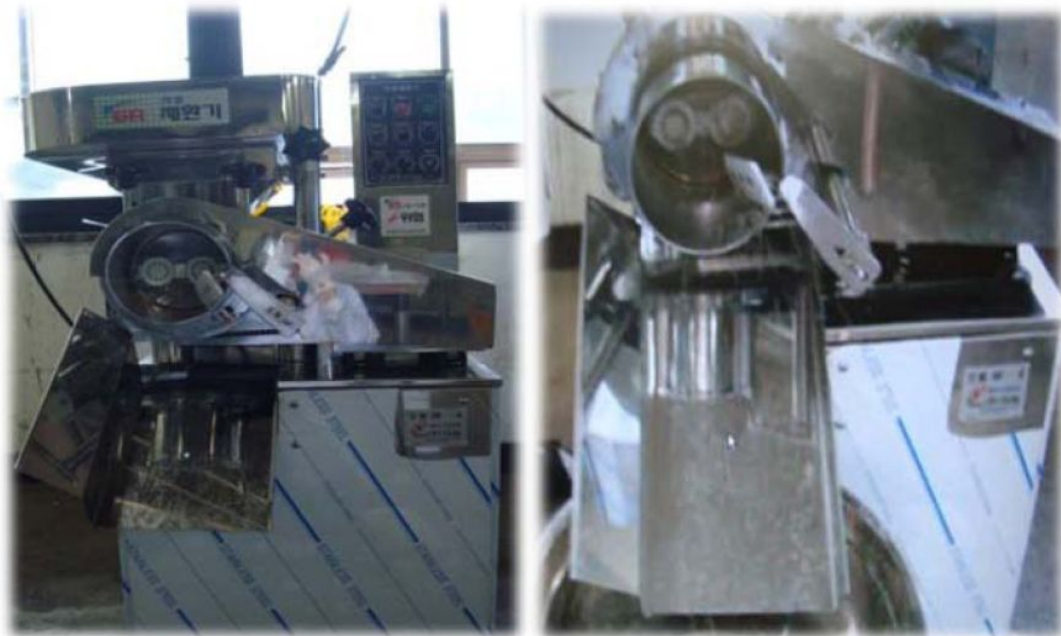


Fig. 72. Twin-screw extruder type 펠릿성형기의 실물사진

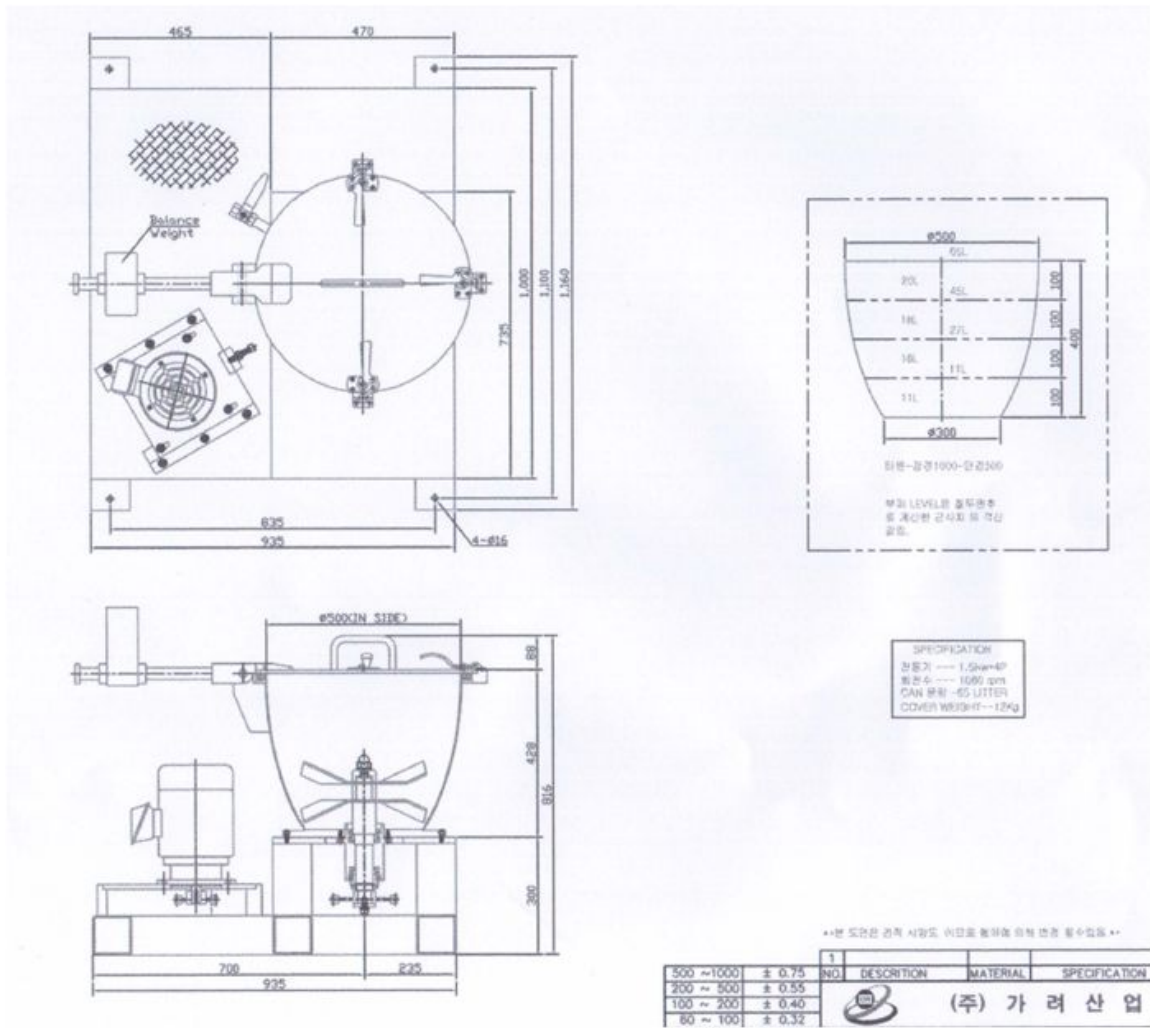


Fig. 73. High-speed mixer 설계도



Fig. 74. High-speed mixer 실물사진 및 작업도

라. 과립샘플의 제조

상기와 같은 과립화 공정을 통하여 구형 또는 실린더 형태의 과립을 제조하였다. 피넨 함유 과립의 경우 활성물질인 피넨의 함량을 변화시키면서 샘플을 제조하였으며, 조성물의 혼합비와 피넨의 함량은 표 8에 요약 정리하였다. 제환기를 이용하여 제조한 피넨 함유 샘플의 실물사진인 Fig. 75에 나타내었다.

표 8. 피넨 함유 구형 과립샘플의 조성비 및 활성성분의 함량

Sample	Pinene 혼합량 (g)	유기화제 (BZK) (g)	점토 (Opazil) (g)	Pinene 함량 (분석치) (%)
ASP-100	100	200	700	8.6
ASP-200	200	150	650	17.1
ASP-300	300	100	600	23.7

* ASP : Anti-Scutica Product



Fig. 75 피넨 함유 과립샘플의 실물사진 (제환기/구형)

Fig. 76에는 twin-screw extruder 과립기를 이용하여 제조한 피넨 함유 실린더 형태의 과립 실물사진을 나타낸 것이다.



Fig. 76 피넨 함유 과립샘플의 실물사진 (펠렛성형기/실린더형)

리모넨 함유 향 스쿠티카 과립의 경우도 알파 피넨 샘플의 경우와 유사한 조성물과 공정을 통해 과립 샘플을 제조 하였다. 리모넨 함유 과립의 경우 twin-screw extruder를 이용한 실린더형 과립을 제조하였다. 리모넨 함유 과립의 제조공정은 Fig. 77 및 Fig.78에 모식적으로 도시하였다. Fig. 79에는 이렇게 제조된 과립체의 XRD 패턴, 과립의 실물 사진을 나타내었다. 리모넨의 경우 이렇게 제조된 샘플을 이용하여 현장평가를 실시하였다.



Fig. 77 펠렛성형기를 이용한 리모넨 함유 과립제조 공정

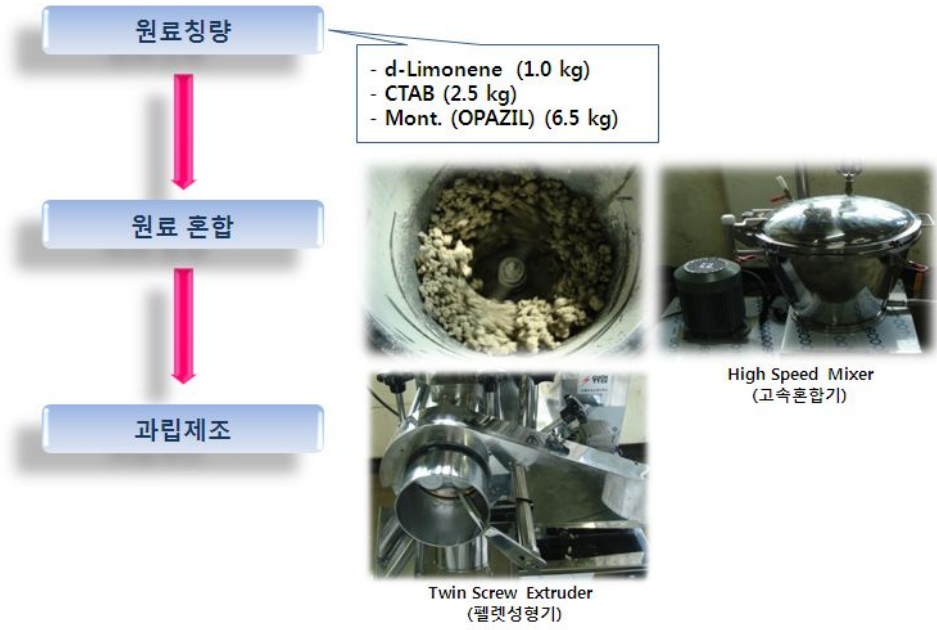


Fig. 78 펠릿성형기를 이용한 리모넨 함유 과립제조 공정

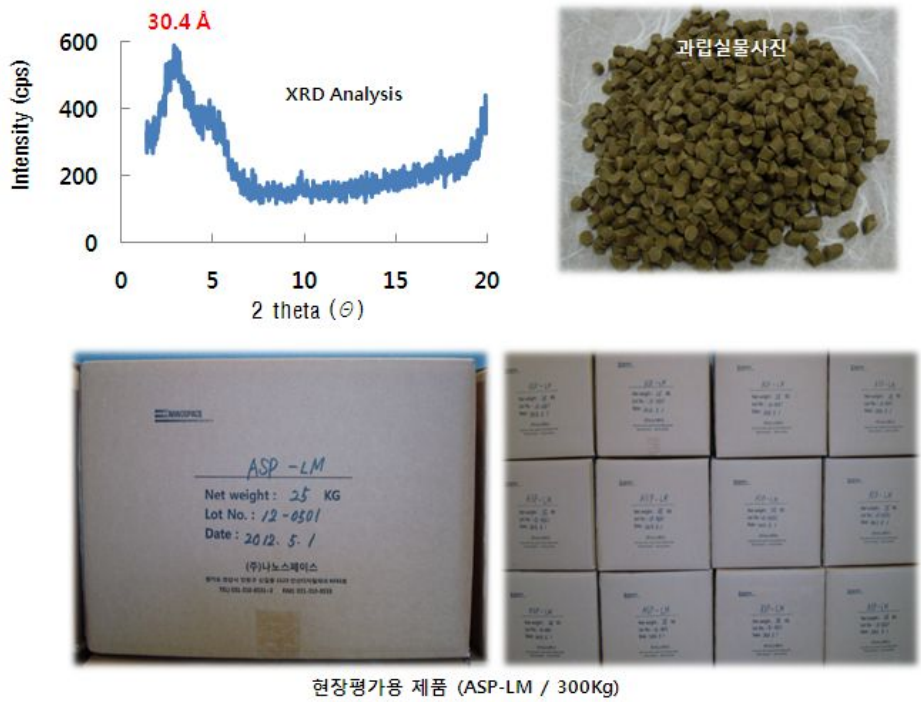


Fig. 79 펠릿성형기를 이용한 리모넨 함유 과립의 XRD 패턴, 과립 및 현장평가용 제품 실물사진

한편, 피넨과 리모넨이 동시에 층간삽입된 과립 샘플을 제조하였으며, 스쿠티카 층에 대한 시너지 효과에 대하여 평가하였다. Fig. 80에는 피넨과 리모넨이 동시에 함유된 과립 샘플의 제조 공정도와 실물샘플 사진을 나타내었다. 이때 리모넨과 피넨의 배합비는 중량비로 1:1로 하였다. 나머지 바인더 및 유기화제의 조건은 리모넨 단독 과립 조성물과 동일하게 하였다. 과립공정에서는 두 개의 활성물질을 동시에 혼합하여 특이한 문제없이 과립을 효과적으로 제조할 수 있었다.



Fig. 80 펠렛성형기를 이용한 리모넨-피넨 함유 과립제조 공정

5. 과립의 물리화학적 특성 및 용출특성 평가

가. 용출기 (dissolution tester)를 이용한 *in-vitro* 용출 평가

과립체내의 활성 성분의 용출특성을 평가하기 위하여 피넨의 함량이 다른 3 가지 샘플에 대한 용출특성을 용출기를 이용하여 평가 하였다. 실험에 사용된 과립샘플은 피넨의 함량이 다른 샘플 3가지를 사용하였으며 피넨의 중량 %은 ASP-100 (10%), ASP-200 (20%), ASP-300 (30%). 용출액의 조건은 3.5% NaCl 수용액 500 mL에 ASP 과립샘플을 각각 5g 씩을 보호망에 넣어 용액중에 투입하고 실온에서 회전속도 50 rpm으로 회전시키면서 피넨을 용출시켰다. 지속적으로 회전시켜 용출시키면서 20 일간 용출을 진행하였으며, 중간 중간 용액을 분취하여 용출된 피넨의 함량을 UV 분광분석을 통하여 측정 하였다. 용출용액은 12시간 마다 250 mL로 물갈이를 해주었다. 이때, 용출된 피넨의 수용액 중에서의 재결정화를 방지하기 위하여 분석용액에는 에탄올을 혼합해 주었으며, 용출액과 에탄올의 혼합비는 부피비로 1 : 1로 하였다. Fig.81에는 회전검체통법에 의한 용출특성 평가 실험용용출기와 용출시 샘플의 장착상태를 각각 보여 준다.



Fig. 81 피넨 용출 분석을 위한 용출기 및 샘플장착 상태

표 9로 부터 과립체 내에서 활성성분인 피넨은 비교적 일정속도로 용출됨을 확인 할 수 있다. 초기 피넨 함량에 따라서 용출량의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 이것은 피넨의 용출량이 초기 함량 보다는 과립체의 조성물, 과립의 기계적 강도 등에 의해 더 강하게 영향을 받고 있음을 의미하는 결과로 해석된다. 즉, 본 실험 범위인 20일 동안 피넨의 용출은 피넨의 농도 보다는 피넨의 과립체 조직 내에서 용출액으로의 확산 용이성에 의해서 결정되는 것으로 판단된다. 시간이 경과됨에 따른 용출량이 증가하는 것은 해수조건 중에서 피넨의 용출과 함께 과립체 조직의 팽윤이 부분적으로 진행됨에 따라 과립체 내부에 존재하는 피넨 분자의 확산 경로가 다양해지고 또 확산 용이성이 증가하기 때문인 것으로 해석된다. 결론적으로 과립체내에서 활성성분인 피넨이 일정한 속도로 용출됨을 알 수 있었으며, 과립의 조성물이나 과립체의 기계적 특성의 조절을 통해 용출량의 제어가 가능함을 알 수 있었다.

표. 9 과립체로부터 시간에 따라 용출되는 피넨량

Period(day)	ASP-100 (ppm)	ASP-200 (ppm)	ASP-300 (ppm)
1	34.6	36.2	37.8
3	36.5	40.3	43.2
5	51.0	51.5	56.0
7	46.1	48.8	48.8
10	58.9	53.6	55.7
15	59.4	63.7	55.0
20	60.8	81.9	60.8

나. GC-Mass를 이용한 피넨 용출특성 평가

과립체로부터 활성성분의 용출특성 좀 더 정확하게 평가하기 위하여 GC-Mass (제주대학교 공동기기원)를 이용하여 용출되는 피넨의 함량을 분석하였다. 10일 동안 12시간씩 용출액을 분취하여 피넨 함량을 분석하였다. ASP-200 (20wt%) 샘플을 정량분석용 시료로 사용하였으며, 해수 용액내에서 농도를 달리하면서 활성성분의 지속적인 서방용출 특성이 구현이 되는지를 확인 하였다. 용출용액은 500 mL 하였으며 12시간마다 1/2씩 물같이 해가면서 용출특성을 확인하였다. 결과는 표 10에 정리하였으며, Fig. 82에 그래프로 나타내었다. 표 10으로 부터 과립체 내에서 활성성분인 피넨은 비교적 일정속도로 용출됨을 확인 할 수 있다. 또한, 초기 함량 (과립농도)에 따라 용액내 피넨의 농도를 조절할 수 있음을 또한 알 수 있었다. 즉, 과립의 투입농도에 따라 용액내에 활성성분의 농도가 비례하여 증가하는 것으로부터 과립의 투입량을 통해 원하는 활성성분의 농도를 조절할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

표. 10 GC-Mass를 이용한 과립으로부터 피넨의 용출량 분석결과

조건	해수:배양액		1:3								start: 2011-05-11
	shaking incubator		160 rpm		20도						
	순환	12시간	1:1 물같이		멸균해수						
	sampling	5ml									
1st	sample	#1		#2		#3		#4		#5	
	해수	control		0.4%(4X)		1.2%(4X)		3.6%(4X)		10.8%(4X)	
	a-pinene	-		2g		6g		18g		54g	
		물같이	sampling	물같이	sampling	물같이	sampling	물같이	sampling	물같이	sampling
Day 1	8:00 PM	0.407	#1-1-1	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 2	8:00 AM	0.025	#1-2-1	3.908	#2-2-1	21.313	#3-2-1	31.578	#4-2-1	144.973	#5-2-1
	8:00 PM	0.360	#1-2-2	3.458	#2-2-2	29.408	#3-2-2	39.762	#4-2-2	134.733	#5-2-2
Day 3	8:00 AM	0.407	#1-3-1	2.030	#2-3-1	9.815	#3-3-1	39.046	#4-3-1	37.723	#5-3-1
	8:00 PM	0.343	#1-3-2	1.670	#2-3-2	3.793	#3-3-2	23.534	#4-3-2	23.123	#5-3-2
Day 4	8:00 AM	0.377	#1-4-1	1.640	#2-4-1	5.226	#3-4-1	9.976	#4-4-1	32.502	#5-4-1
	8:00 PM	0.364	#1-4-2	1.636	#2-4-2	5.548	#3-4-2	10.019	#4-4-2	29.862	#5-4-2
Day 5	8:00 AM	0.068	#1-5-1	1.496	#2-5-1	7.840	#3-5-1	17.546	#4-5-1	39.397	#5-5-1
	8:00 PM	0.025	#1-5-2	1.492	#2-5-2	8.091	#3-5-2	17.554	#4-5-2	39.397	#5-5-2
Day 6	8:00 AM	0.042	#1-6-1	1.492	#2-6-1	3.691	#3-6-1	25.433	#4-6-1	26.467	#5-6-1
	8:00 PM	0.373	#1-6-2	1.458	#2-6-2	4.221	#3-6-2	26.683	#4-6-2	31.277	#5-6-2
Day 7	8:00 AM	0.004	#1-7-1	1.293	#2-7-1	5.344	#3-7-1	18.283	#4-7-1	113.225	#5-7-1
	8:00 PM	0.004	#1-7-2	1.221	#2-7-2	4.497	#3-7-2	18.292	#4-7-2	158.522	#5-7-2
Day 8	8:00 AM	0.068	#1-8-1	1.416	#2-8-1	2.619	#3-8-1	24.089	#4-8-1	50.853	#5-8-1
	8:00 PM	0.420	#1-8-2	1.288	#2-8-2	1.911	#3-8-2	7.226	#4-8-2	39.491	#5-8-2
Day 9	8:00 AM	0.157	#1-9-1	1.310	#2-9-1	1.742	#3-9-1	11.769	#4-9-1	32.523	#5-9-1
	8:00 PM	0.331	#1-9-2	1.170	#2-9-2	1.242	#3-9-2	6.662	#4-9-2	31.086	#5-9-2
Day 10	8:00 AM	0.038	#1-10-1	1.318	#2-10-1	1.627	#3-10-1	2.831	#4-10-1	31.192	#5-10-1
	8:00 PM	0.076	#1-10-2	1.526	#2-10-2	2.259	#3-10-2	2.556	#4-10-2	34.841	#5-10-2
Day 11	8:00 AM	0.314	#1-11-1	1.314	#2-11-1	1.424	#3-11-1	5.221	#4-11-1	54.510	#5-11-1

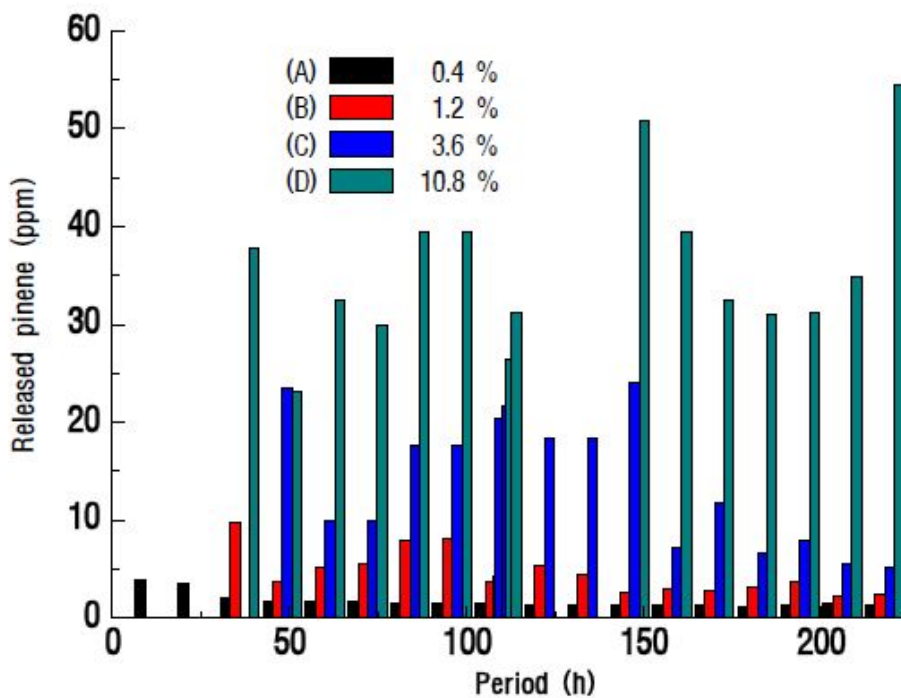


Fig. 82 피넨 함유 과립내 알파-피넨 용출그래프

다. 과립의 해수 봉해 안정성 평가

본 연구에서 개발한 과립체는 해수중에 지속적으로 담지 시켜 놓고 과립내에서 활성성분의 일정속도로의 용출을 유도하는 특징을 갖는 제품이다. 따라서, 해수 중에서 서방성의 구현을 위해서는 우선 과립에 해수 중에서 봉해되는 현상이 나타나지 않아야 한다. 본 연구에서는 용출기를 이용하여 해수 조건에서 일정한 기간 동안 회전시켜 과립 봉해 안정성 여부를 평가 하였다 (Fig.83). 즉, 과립 총 30개를 용출기의 부속품인 싱커망에 장착하고, 3.5% NaCl 수용액 500 mL에서 30 일 동안 처리하였다. 이때 용출기의 온도는 25℃로 하였고, 회전속도는 50 rpm으로 일정하게 기계적 힘을 가해 주었다. ASP-100, 200, 300 에 대한 처리 결과를 Fig. 83의 사진으로부터 확인 할 수 있었다. 사진으로부터 대부분 초기 상태 그대로 특별한 파괴나 부스러짐이 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구에서 개발한 과립 제품의 경우 해수 중에서도 봉해됨이 없는 안정한 과립체를 유지함을 확인 할 수 있었다.

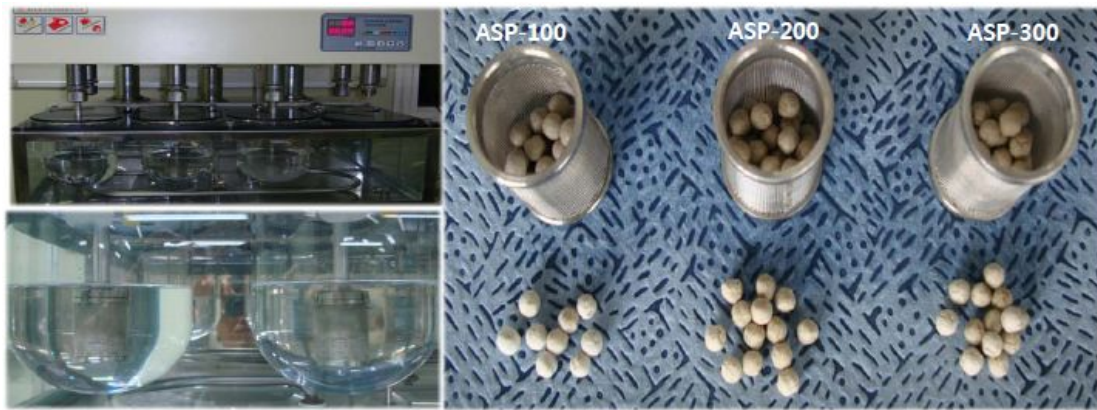


Fig. 83 과립의 해수 봉해 안정성 평가 결과

한편, 양산시 30일 동안 회전시켜서 봉해 안정성을 평가하는 것은 품질관리 면에서 많은 시간의 낭비가 초래되어 좀 더 짧은 시간 내에서 과립의 봉해 안정도를 평가하는 방법으로 초음파 조건에서의 안정성을 평가 하였다. 즉, 그림에서와 같이 유리 바이알에 해수용액을 채우고 과립을 침적 시킨 다음 일정한 온도에서 일정한 시간 동안 초음파를 가하여 좀 더 강한 외부 충격을 가하여 과립의 해체를 촉진 시키는 방법이다. 과립의 기계적 강도가 약한 경우는 초음파 처리함에 따라 바로 붕괴/봉해되는 특성을 보였다. Fig. 84에서는 ASP-series 샘플에 대한 초음파 처리를 통한 봉해 안정도 평가결과를 사진을 나타낸 것이다. 초음파세척기는 화신기계사의 Power Sonic series로 최대진동 주파수는 40 KHz 이고, 처리 시간은 30분, 수조의 온도는 25℃의 조건에서 테스트를 수행하였다. ASP 샘플의 경우 비교 용출기를 통한 봉해 평가에서도 예측할 수 있는 바와 같이 초음파 조건에서도 과립의 기계적 안정성이 우수함을 확인 할 수 있었다. 향후 용출기를 이용한 과립의 봉해 안정성과 초음파 처리의 조건에 따른 안정도에 대한 상관관계를 규명하게 되면 현장에서 비교적 짧은 시간 내에 효과적인 신뢰성 평가를 할 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 판단된다.

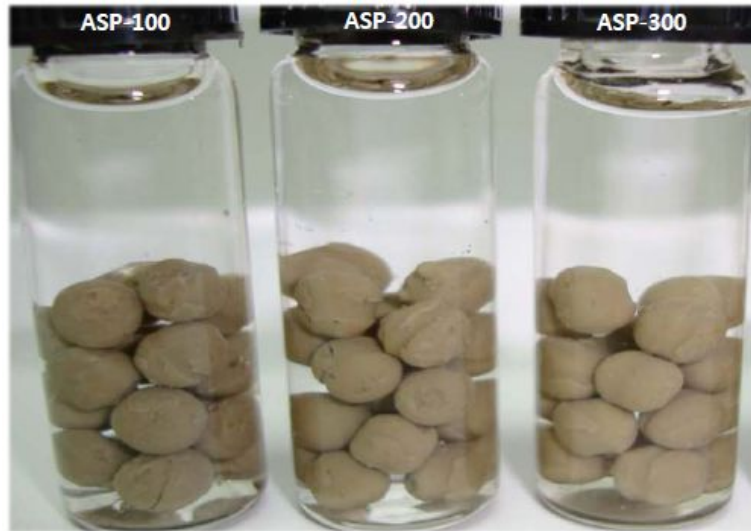


Fig. 84 과립의 해수 봉해 안정도에 대한 초음파 평가

6. 과립의 항스쿠티카 효능 평가 (위탁기관/제주대학교)

가. 스쿠티카충 배양

활성후보물질 평가와 마찬가지로 스쿠티카충에서 감염성과 병원성이 가장 높다고 알려진 *Miamiensis avidus* 를 배양하여 실험에 사용하였다. *M. avidus*는 어류주화세포를 먹이로 공급하여 대량으로 배양하였다. 어류주화세포인 Chinook salmon embryo-214(CHSE-214; ATCC No. CRL-1681)는 FBS(최종농도 10%; Gibco, USA) 및 항생제인 penicillin(최종농도 100 unit/ml; Gibco, USA)과 streptomycin (최종 농도 100 μ g/ml; Gibco, USA)을 첨가한 Minimum Essential Medium(MEM, Gibco, USA)에서 5~7일간 20 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. CHSE-214 세포는 75 cm² 크기의 cell culture flask (SPL Life Sciences, 한국)에 배양액 25 ml를 넣어 배양하였다. CHSE-214가 cell culture flask 바닥을 짝 채울 정도로 배양된 배양액에 *M. avidus*를 접종하여 *M. avidus* 개체수가 최대가 되도록 7~9일간 15 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

나. α -Pinene 나노복합체 (ASP)의 해수 용출 실험

합성된 α -Pinene 나노복합체를 멸균된 해수 500 ml에 각각 0.4, 1.2, 3.6, 10.8%(W/V)가 되도록 첨가하여 20 $^{\circ}$ C, 160 rpm (rotation per minute) 조건의 shaking incubator에서 용출시켰다. 12시간마다 전체 해수의 50%를 멸균된 해수로 물갈이하였다. 물갈이 전에 flask를 잘 흔들어 5 ml 씩 해수를 채수하였다. 채수한 해수 600 μ l에 Hexane 600 μ l를 첨가하여 잘 섞어 준 뒤 상층액 390~400 μ l를 분리하여 HPLC용 vial에 옮기어 해수에 α -Pinene 시료가 얼마나 용출되었는지 분석하였다.

다. α -Pinene 나노복합체가 용출된 해수의 스쿠티카충 살충효과

96 well-plate에 *M. avidus*가 배양된 배양액 ($1\sim 2 \times 10^5$ cells/ml) 150 μ l 씩 분주하였고 α -Pinene 나노복합체의 최종농도가 각각 0.1, 0.3, 0.9, 2.7% (V/V)가 되도록 채수한 해수를 50 μ l씩 처리하여 10~15 초간 pipet으로 혼합하였다. 용출된 해수를 처리한 후 10분, 30분, 60분, 90분간 스쿠티카충의 형태변화 (Morphology)와 사멸정도(Motility)를 현미경으로 관찰하였다.

- 대조군은 나노복합체가 용출된 해수 대신 보통의 해수를 처리하였다. 해수를 금방 처리하였을 때 삼투압에 의해 스쿠티카충의 모양이 다소 변형되나 전체적인 형태와 운동능력은 크게 변하지 않았다. 해수가 스쿠티카충의 형태변화와 사멸, 유영능력에 큰 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다.

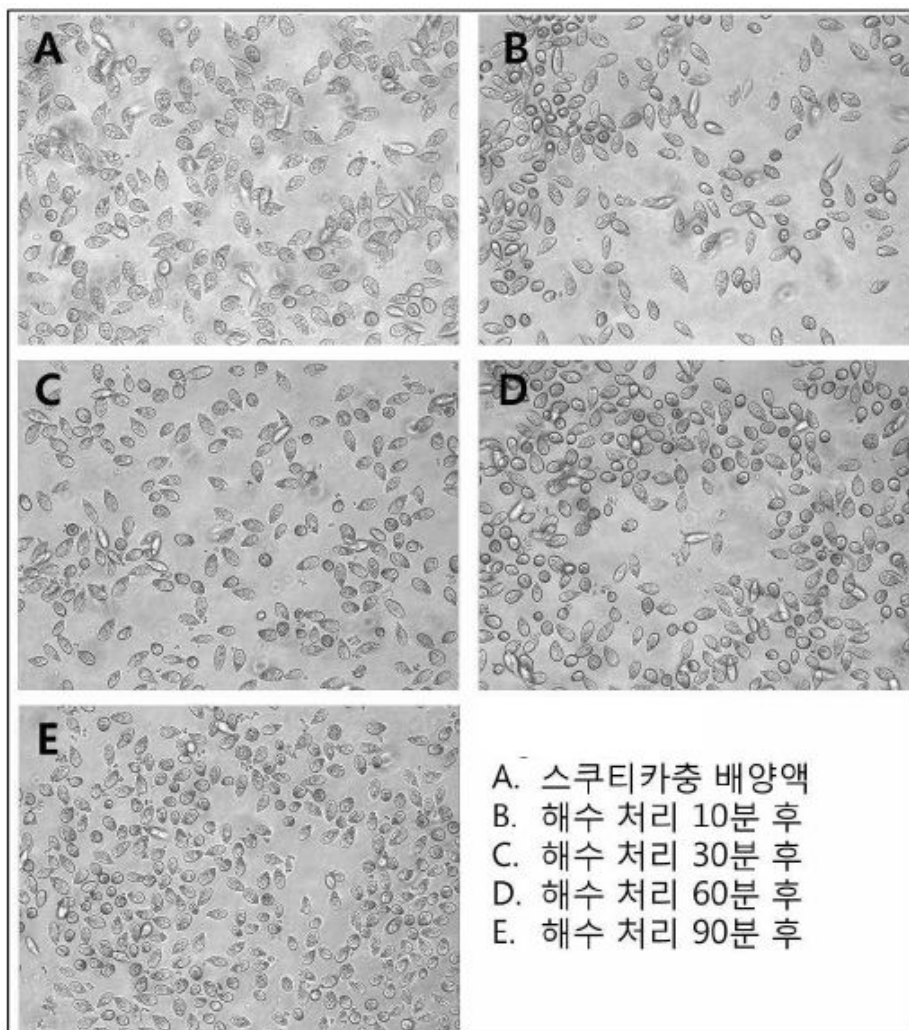


Fig. 85 대조구의 해수처리에 시간에 따른 영향 평가

0.1% 실험구

α -Pinene 나노복합체가 용출된 해수를 처리하면 스쿠티카충의 유영이 갑자기 빨라지다가 시간이 지나면 스쿠티카충이 사멸되는 것을 확인할 수 있었다. 나노복합체를 해수에 용출시킨 12시간과 24시간 샘플을 스쿠티카충에 처리하였을 때 처리 10분후부터 스쿠티카충의 형태가 크게 변화하였고 대부분이 60분 이내에 사멸되었다. 스쿠티카충의 형태적 변화는 용출 120시간까지는 12시간과 유사하였고 144시간 이상의 샘플을 처리하였을 때는 형태적인 변화는 크게 없었으며 전체가 사멸되기까지 걸리는 시간이 60분 이상이었다. 나노복합체를 해수용량의 0.1 % 정도로 처리하였을 때 하루 2회 환수할 경우 최대 7일 정도까지 스쿠티카충을 효과적으로 사멸시키는 효과를 볼 수 있다고 생각된다.

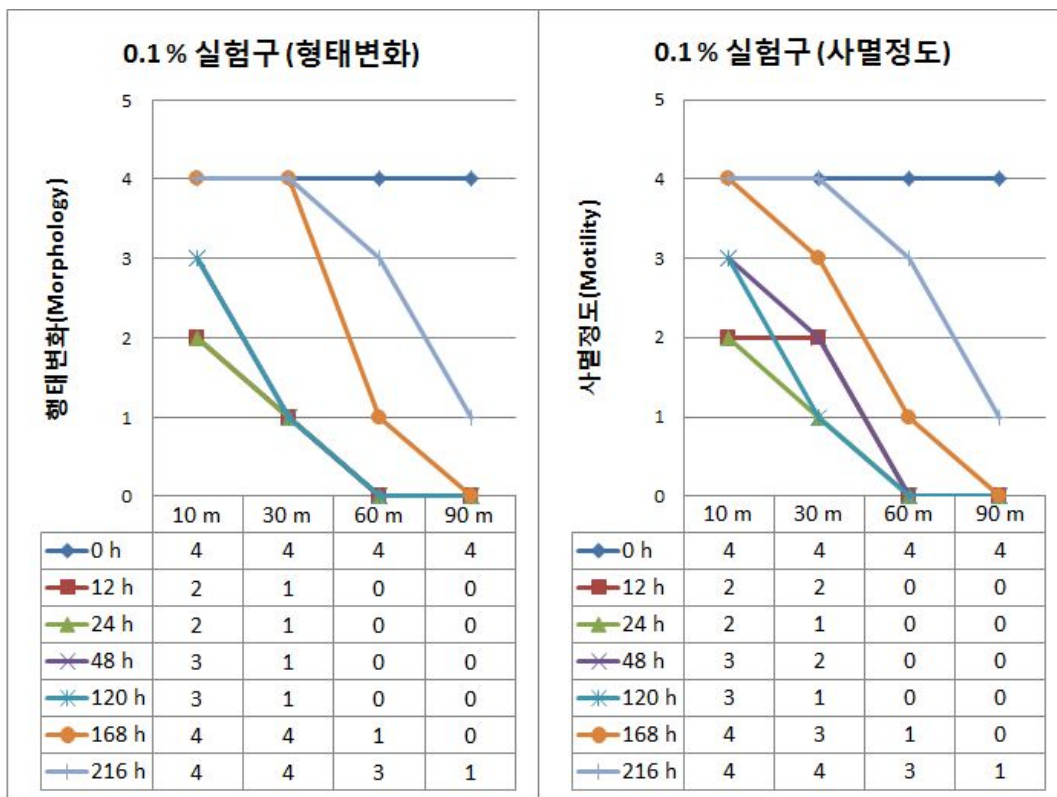


Fig. 86 0.1 % 실험구의 스쿠티카충 형태변화와 사멸정도

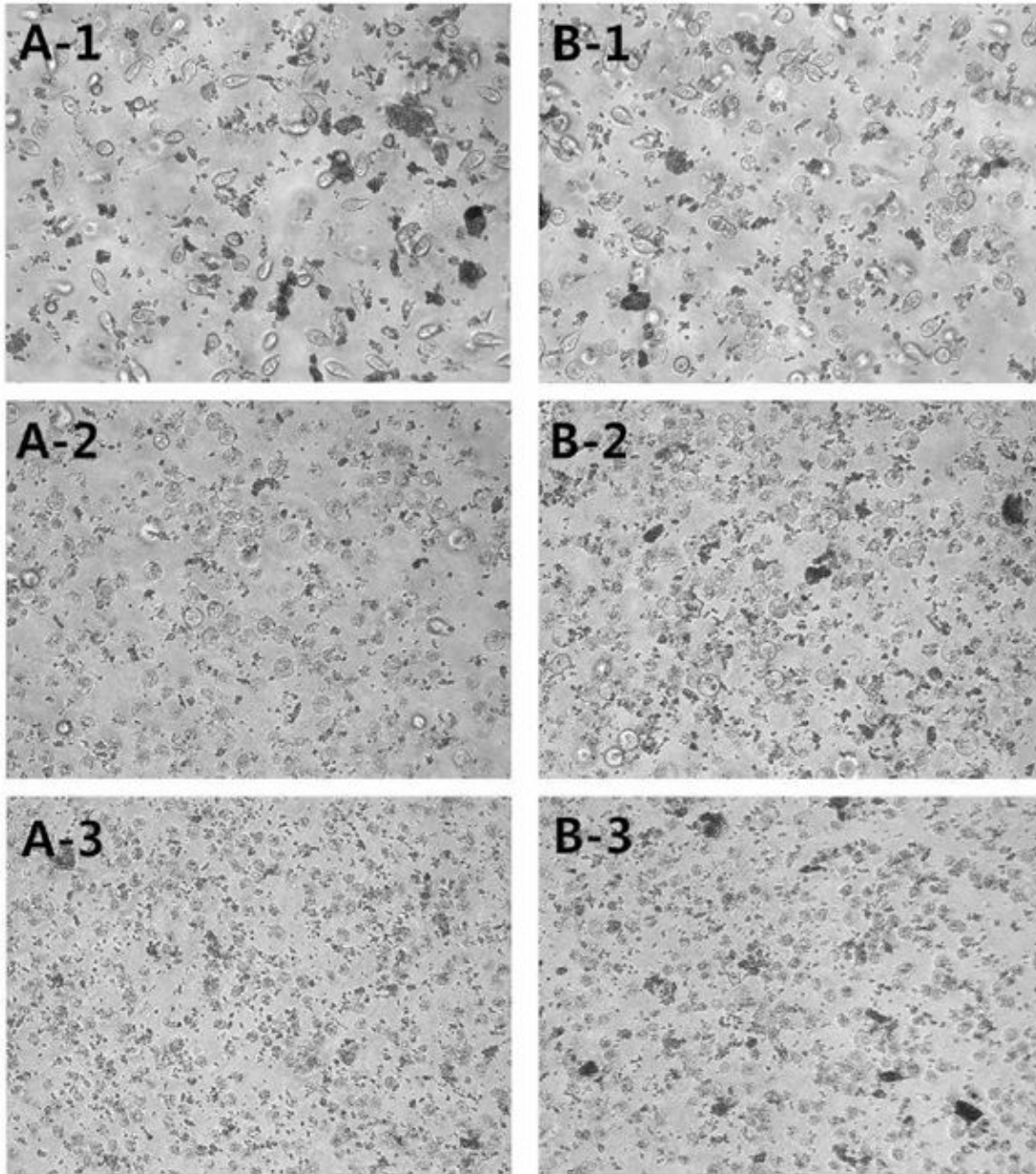


Fig. 87 0.1 % 실험구의 스쿠티카충 형태변화와 사멸정도 관찰결과

A : 12시간 용출, B: 24시간 용출

A-1 : 10분 처리, A-2 : 30분 처리, A-3 : 60분 처리

B-1 : 10분 처리, B-2 : 30분 처리, B-3 : 60분 처리

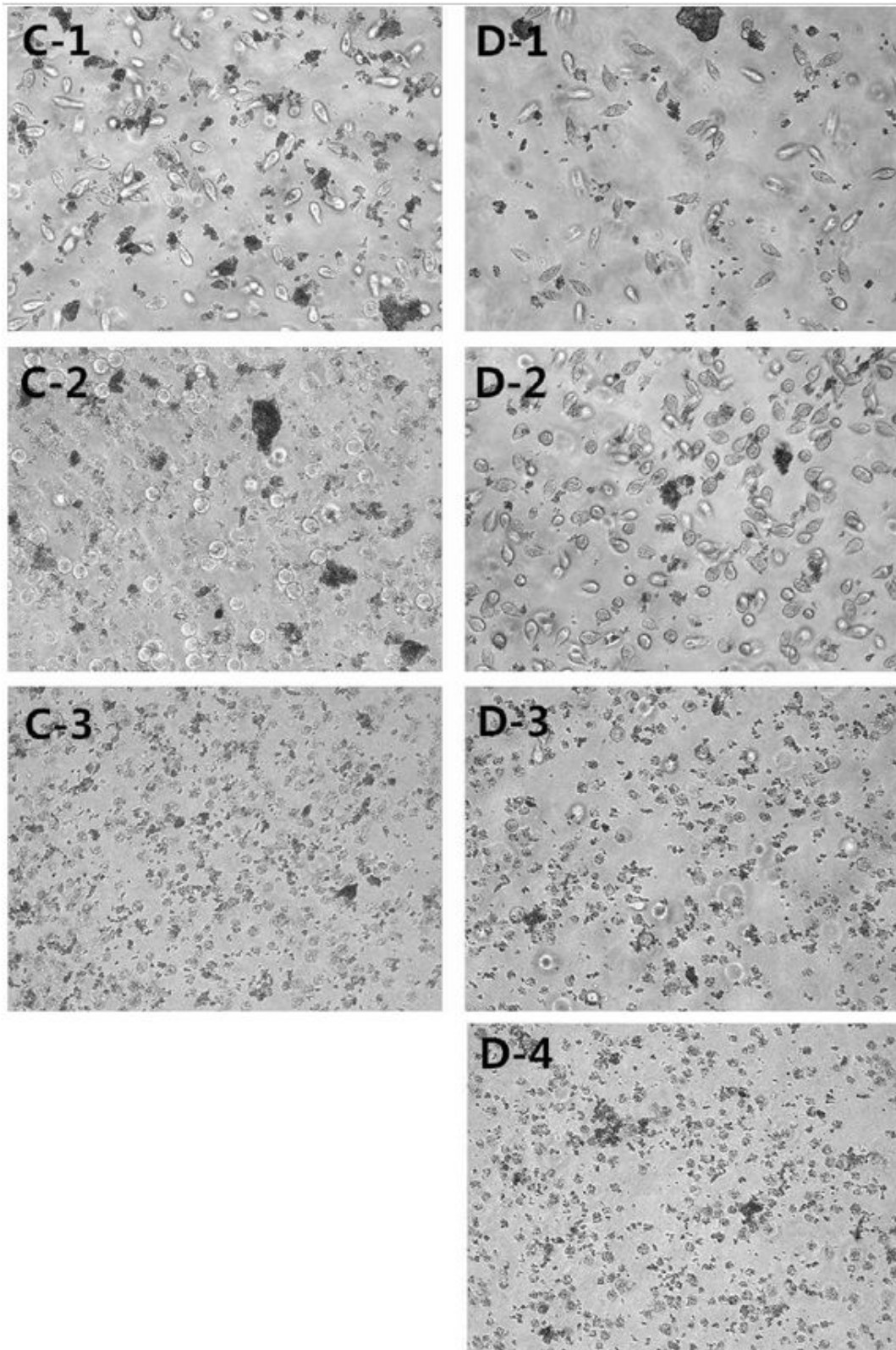


Fig. 87 0.1 % 실험구의 스쿠티카충 형태변화와 사멸정도 관찰결과 (계속)

C : 120 시간 용출, D: 168 시간 용출

C-1 : 10분 처리, C-2 : 30분 처리, C-3 : 60분 처리

D-1 : 10분 처리, D-2 : 30분 처리, D-3 : 60분 처리, D-4 : 90분 처리

0.3 % 실험구

- α -Pinene 나노복합체를 해수에 용출시킨 12시간 샘플을 처리한 10분 내에 모든 스쿠티카충의 형태가 변형되었고 대부분이 사멸되는 것을 확인하였다. 0.3% 해수를 처리하였을 때 216 시간까지 모든 스쿠티카충이 30 분 내에 사멸되었다. 나노복합체를 해수용량의 0.3 % 정도로 처리하였을 때 하루 2회 환수할 경우 최소 9일 정도까지 스쿠티카충을 효과적으로 사멸시키는 효과를 볼 수 있다고 생각된다.

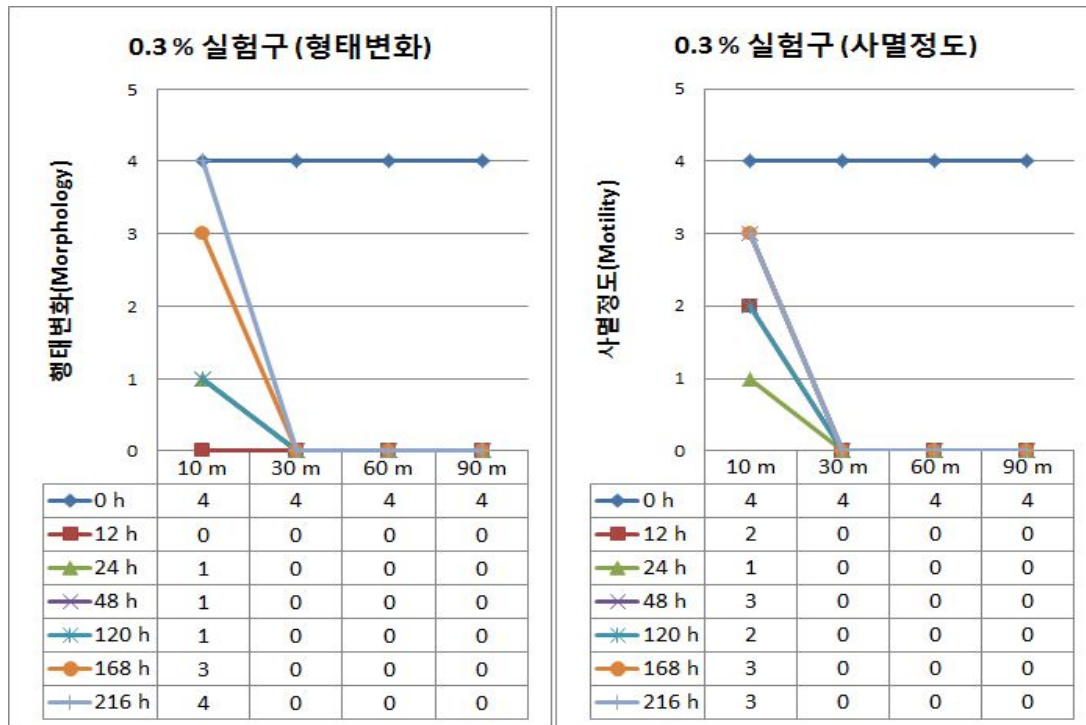
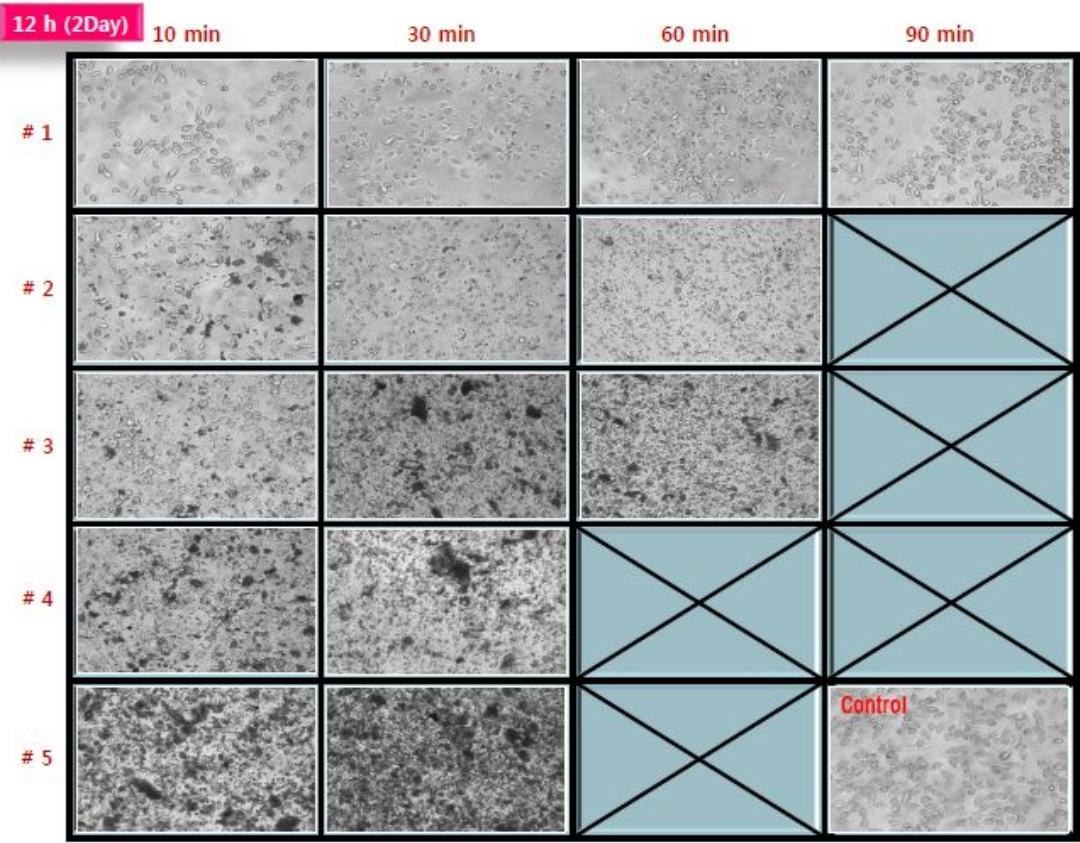
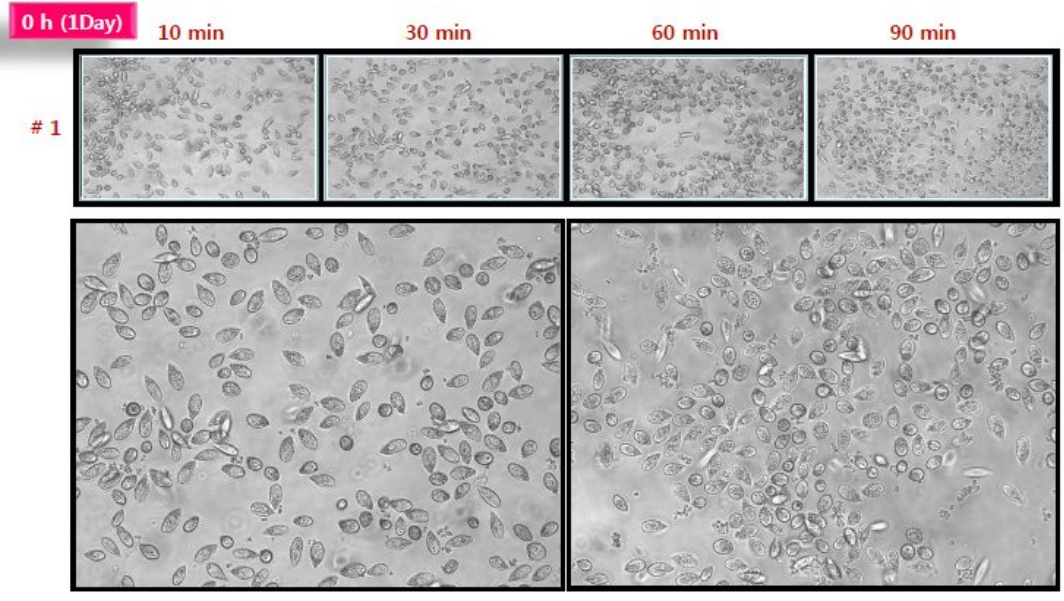


Fig. 88 0.3 % 실험구의 스쿠티카충 형태변화와 사멸정도

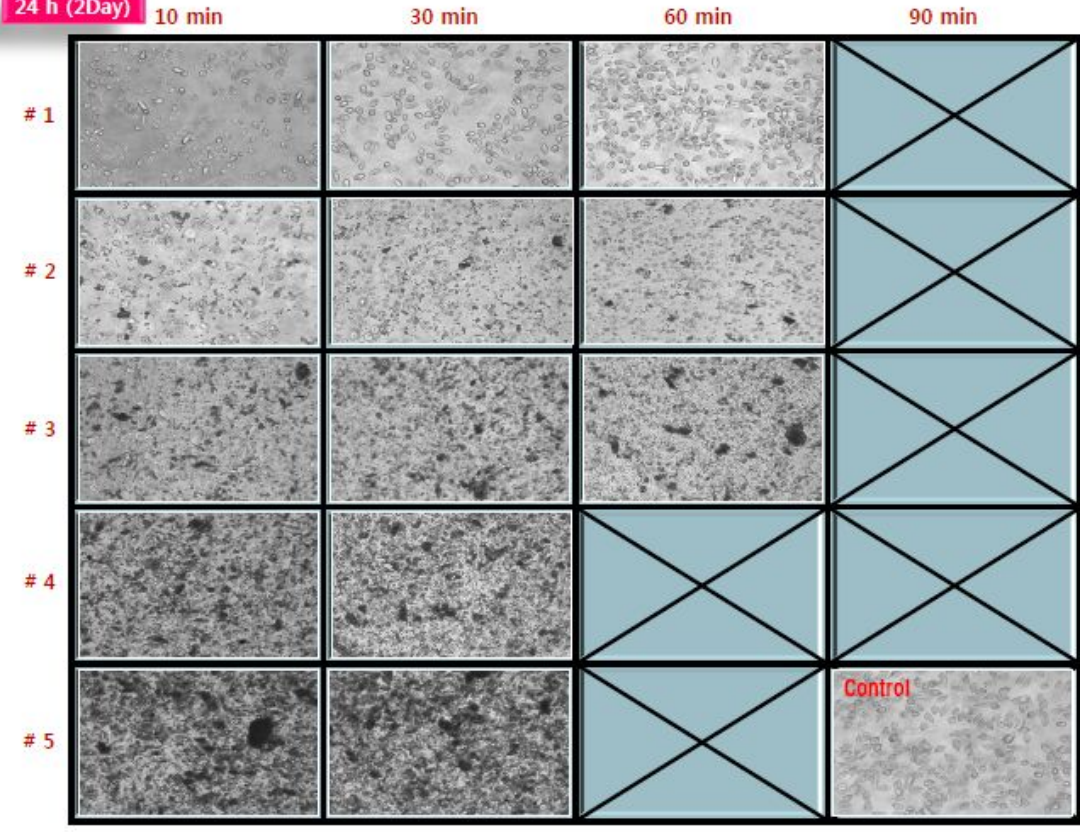
0.9 %, 2.7 % 실험구

- α -Pinene 나노복합체를 해수에 0.9 및 2.7 %로 용출시켜 스쿠티카충에 처리하였을 때 10분 이내에 모두 사멸하는 것을 확인하였다. 이미 0.3%의 농도에서도 효과적으로 스쿠티카충을 사멸시키기 때문에 0.9, 2.7 %의 농도는 사용하기에 다소 높은 농도라고 생각된다.

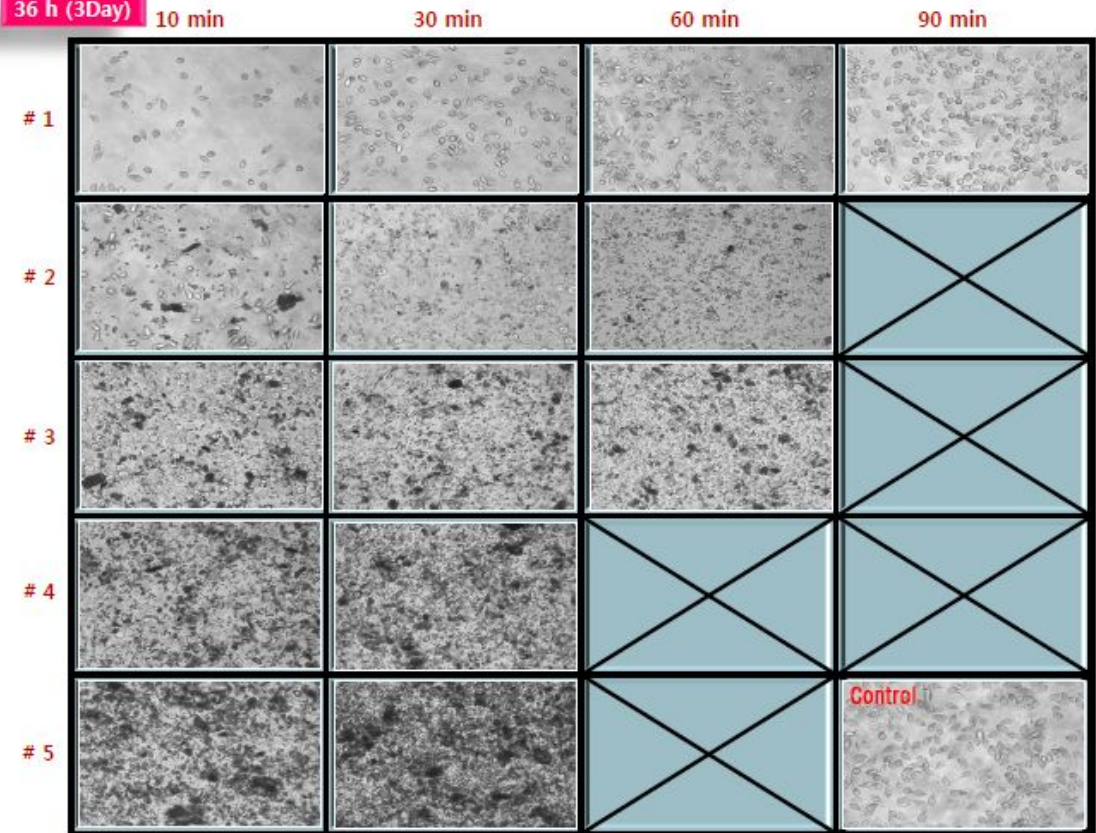
- Fig.89는 상기 피넨함유 과립샘플의 농도별, 용출시간별 및 용출액을 이용한 처리 시간별 스쿠티카충의 사멸정도를 관찰한 결과를 정리한 것이다. 최소 10일 이상의 지속적인 용출성을 보이면서 지속적인 항 스쿠티카 효능이 있음을 확인 할 수 있었다.



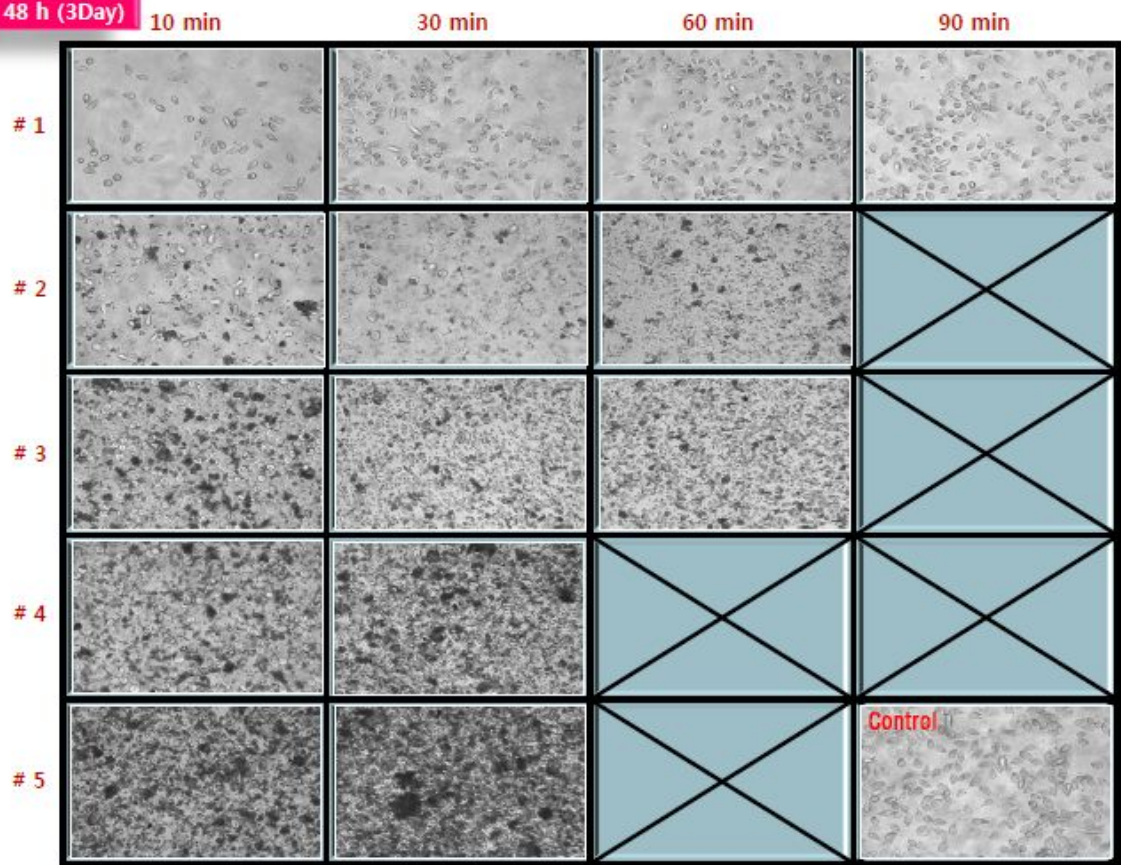
24 h (2Day)



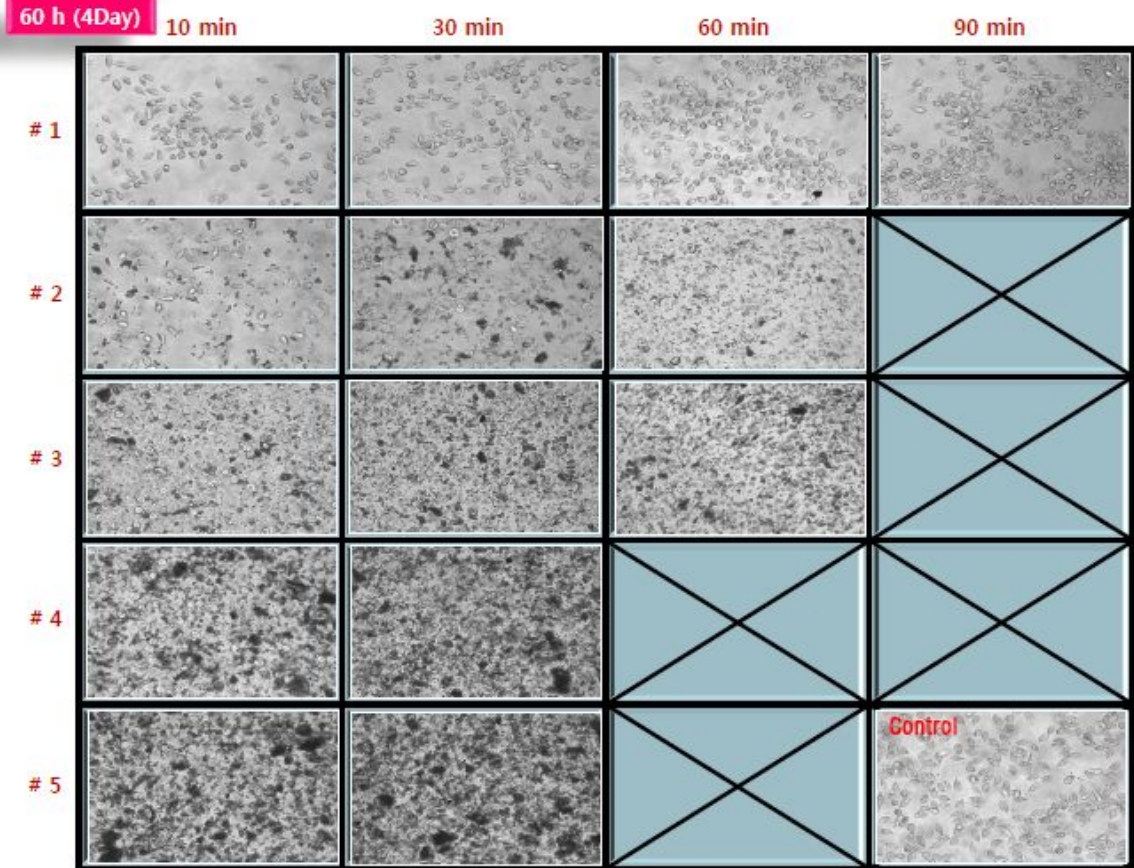
36 h (3Day)



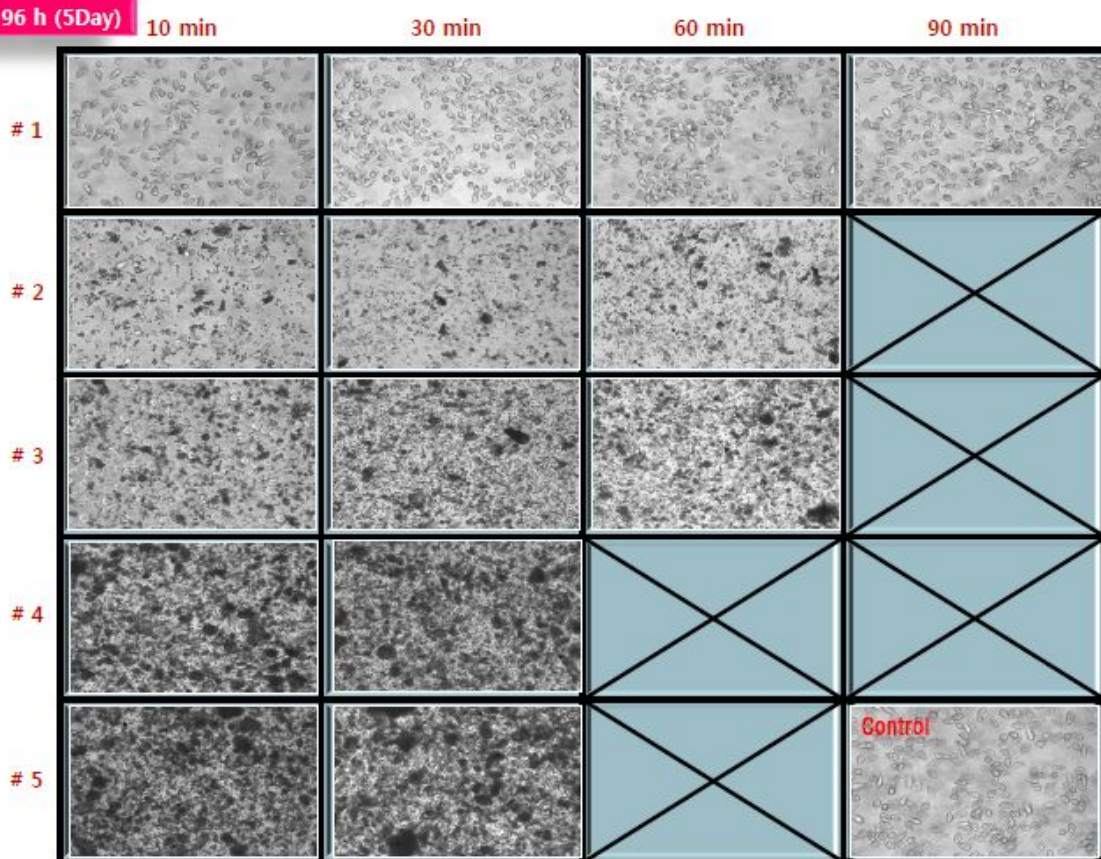
48 h (3Day)



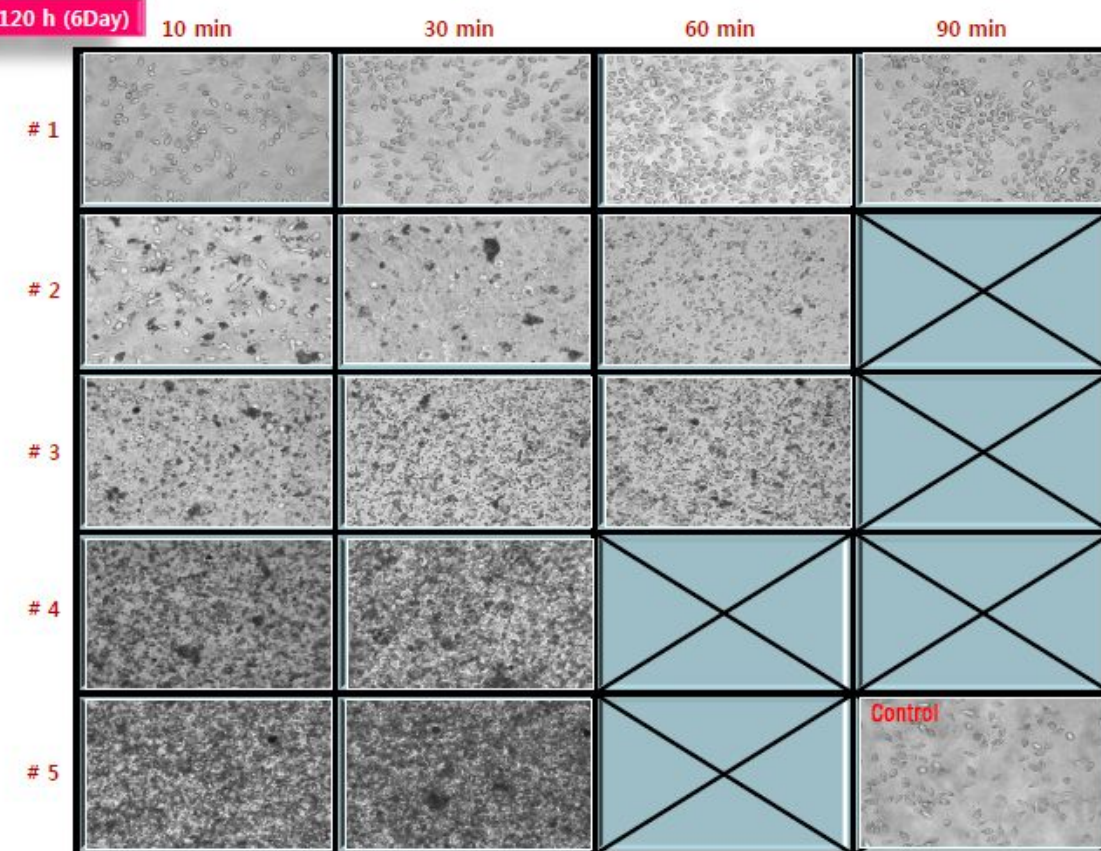
60 h (4Day)



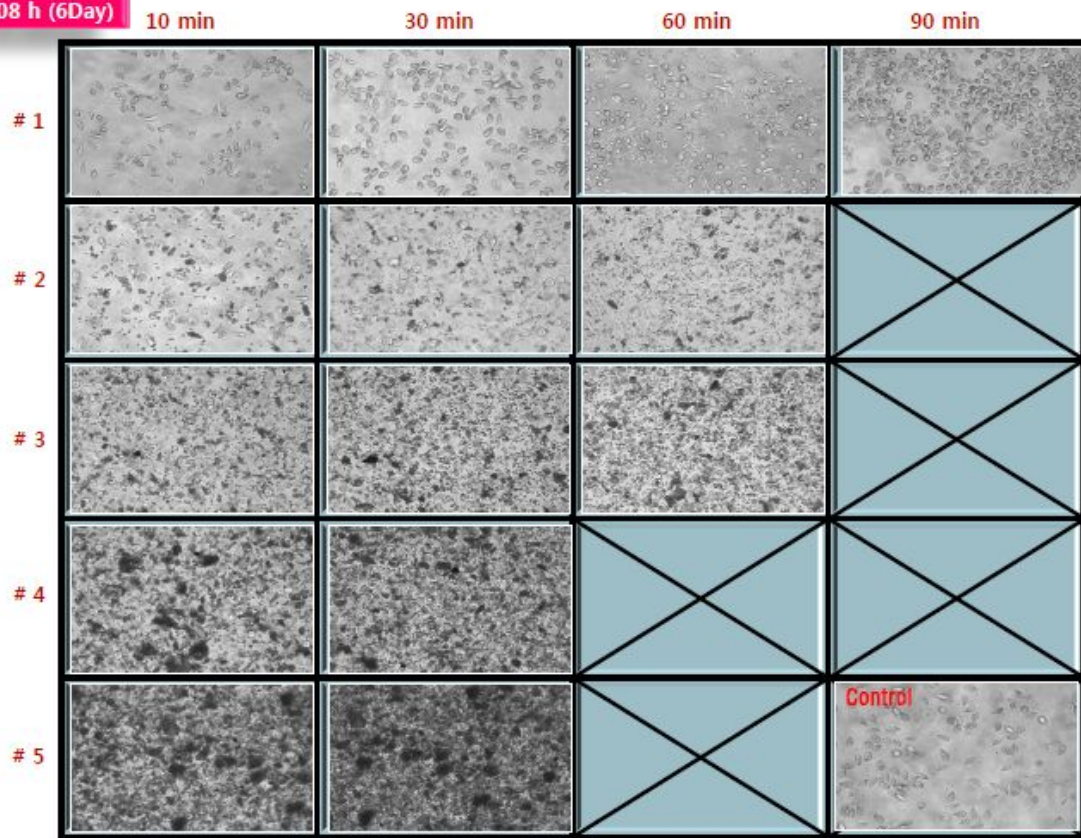
96 h (5Day)



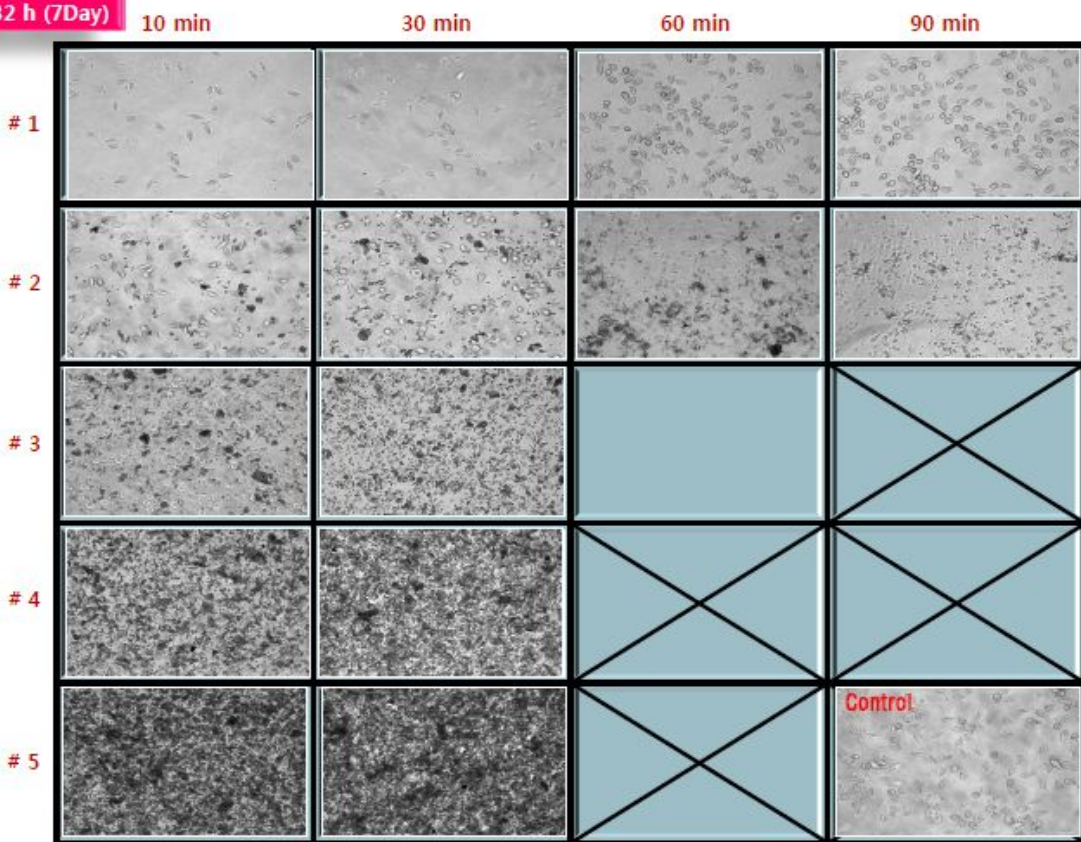
120 h (6Day)

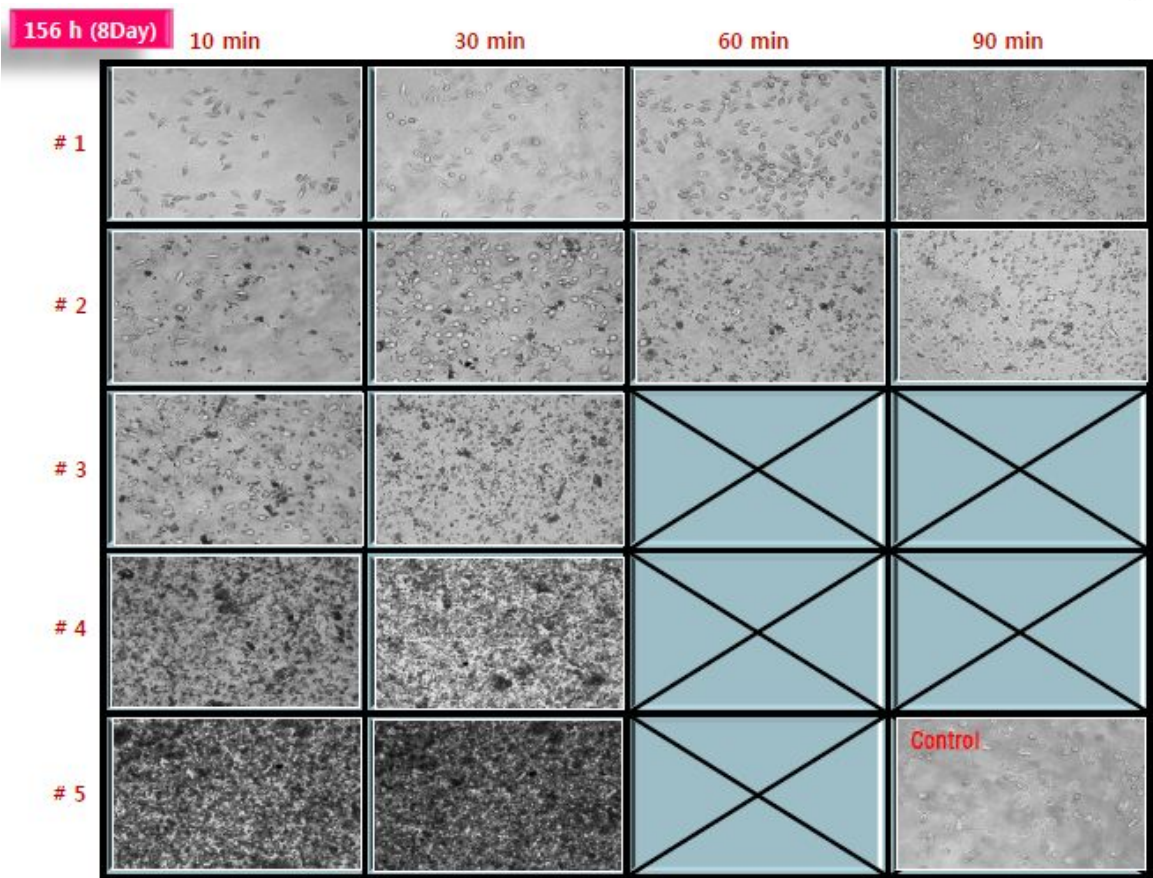
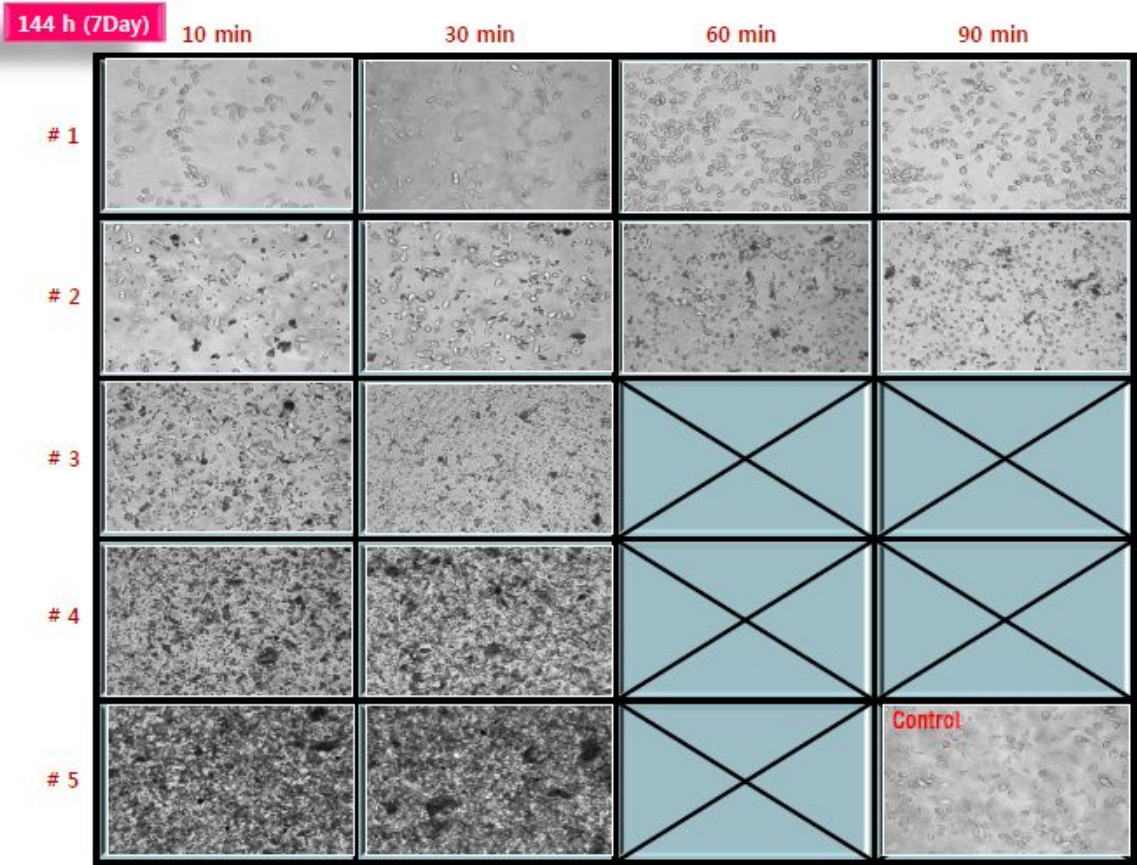


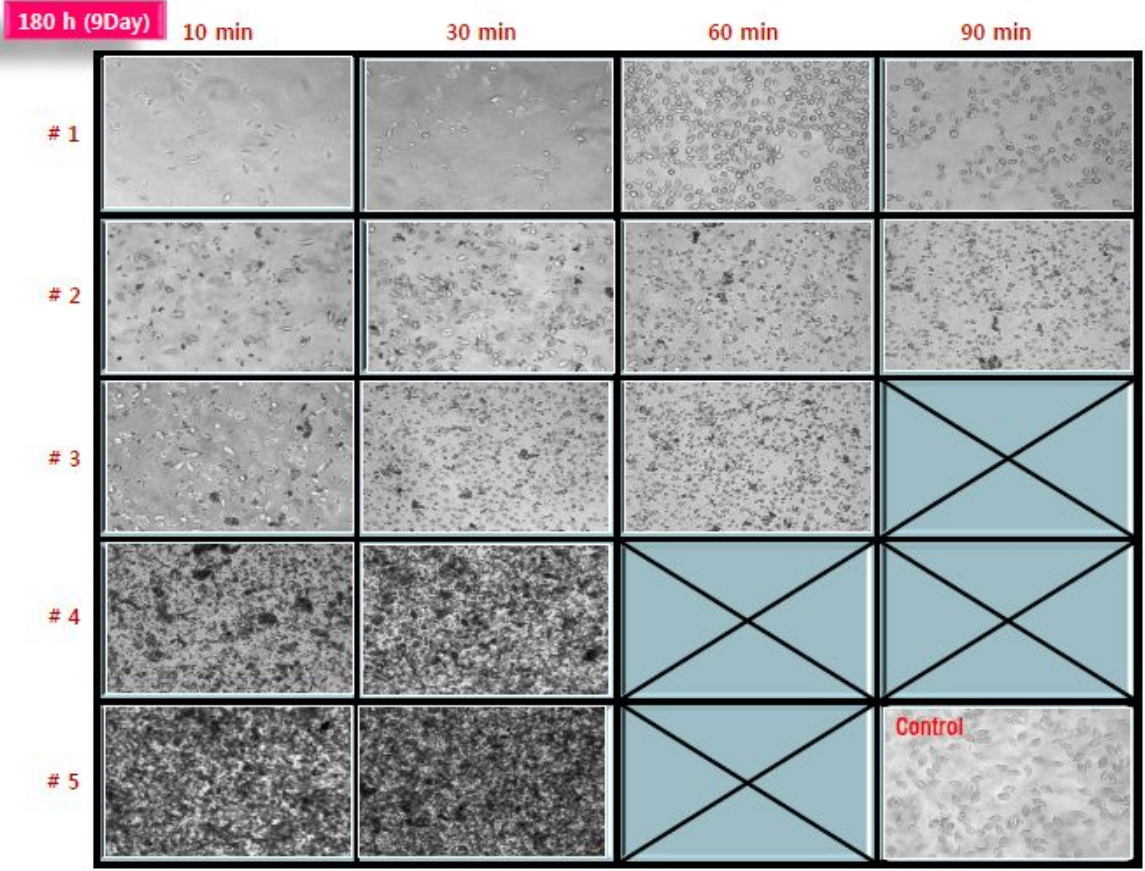
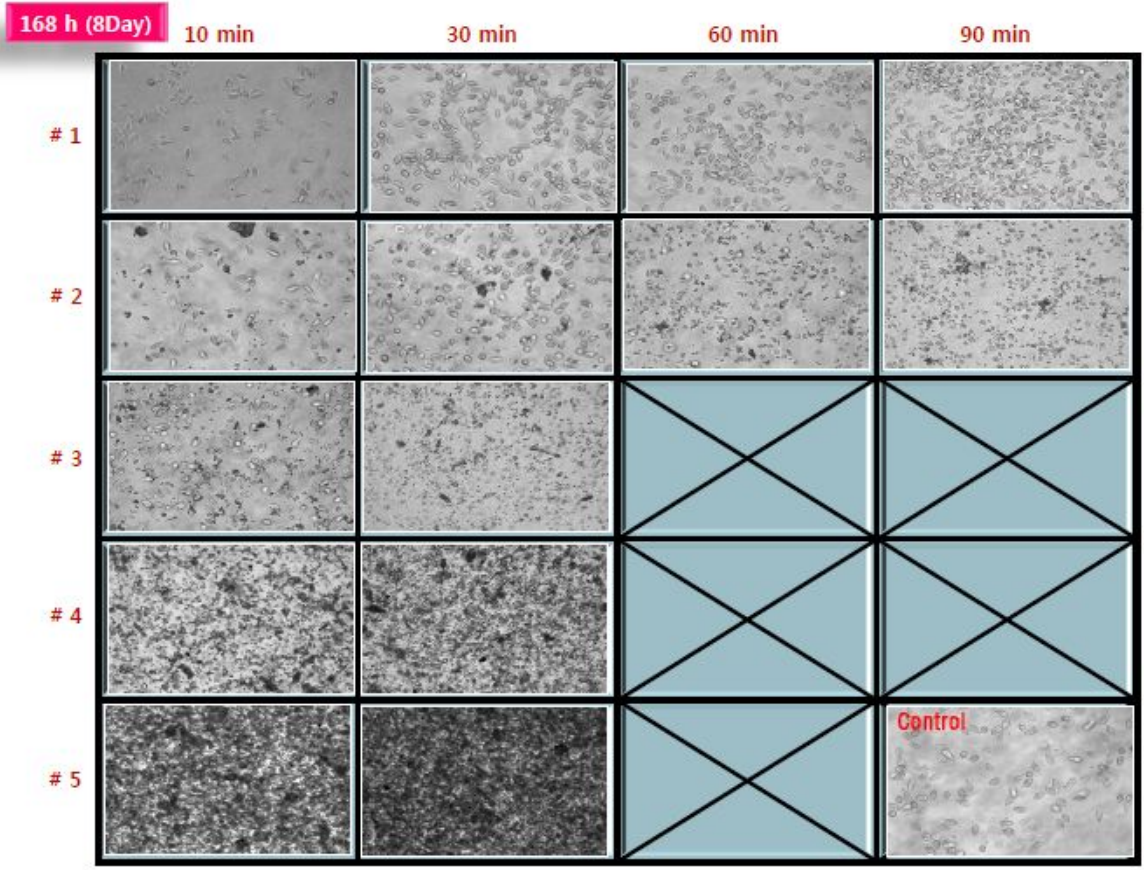
108 h (6Day)

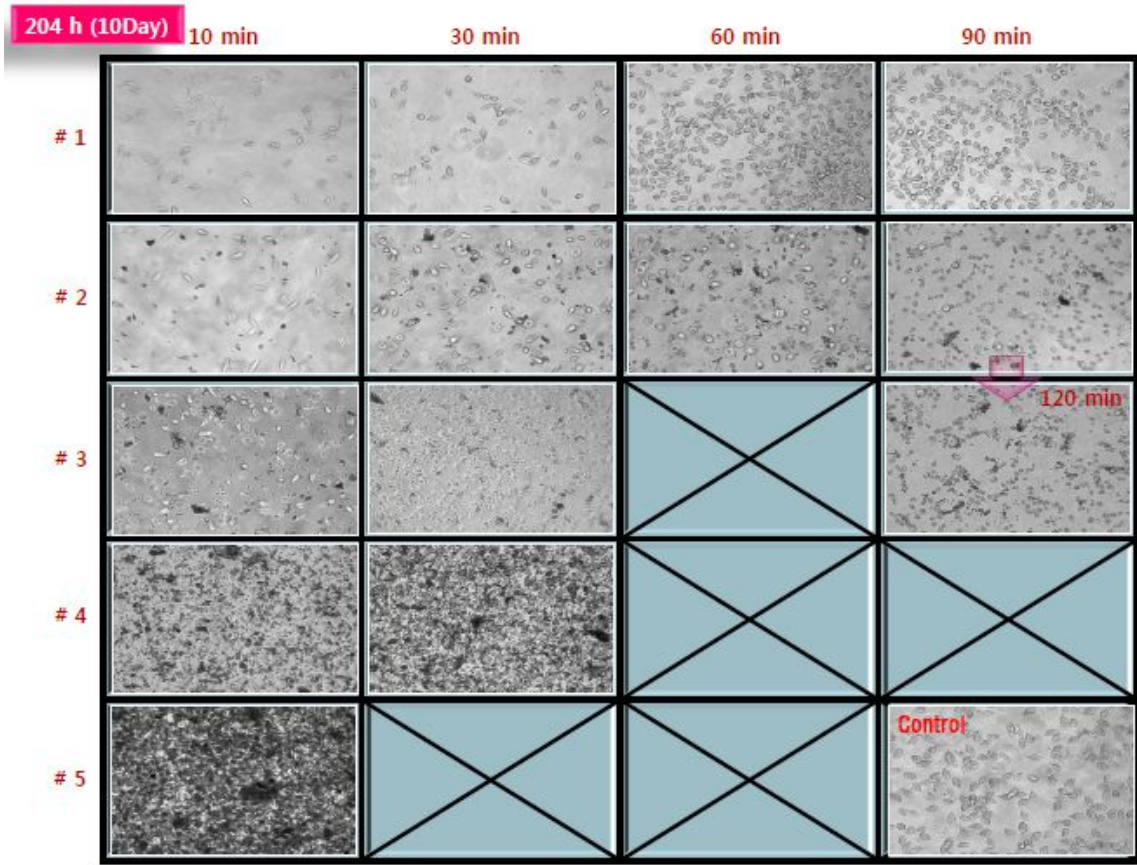
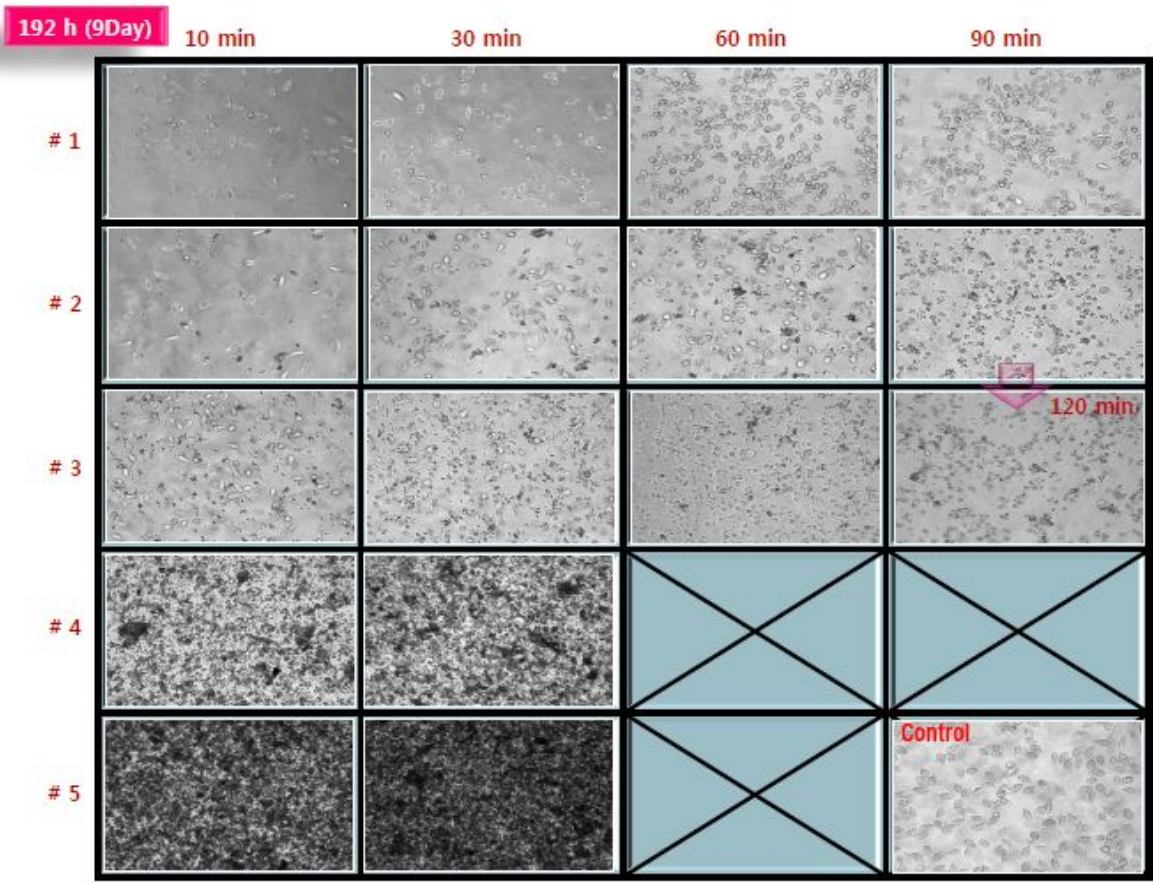


132 h (7Day)









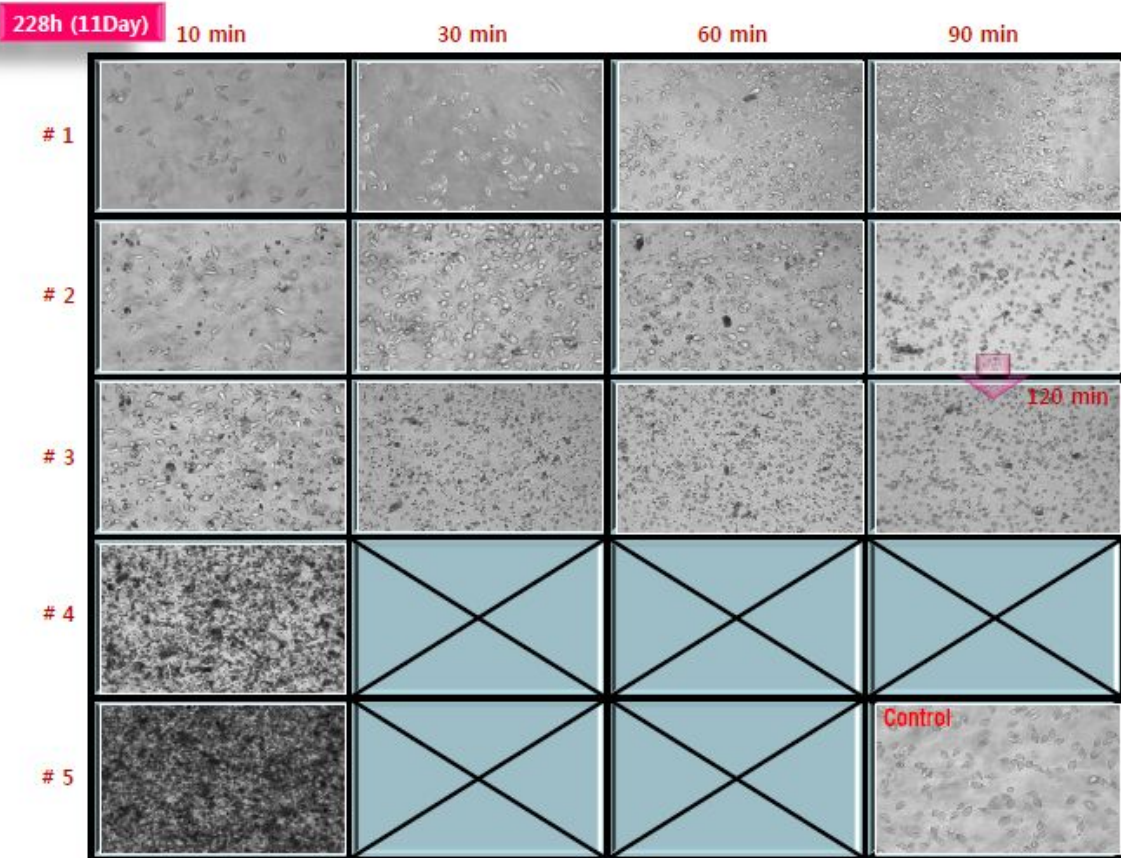
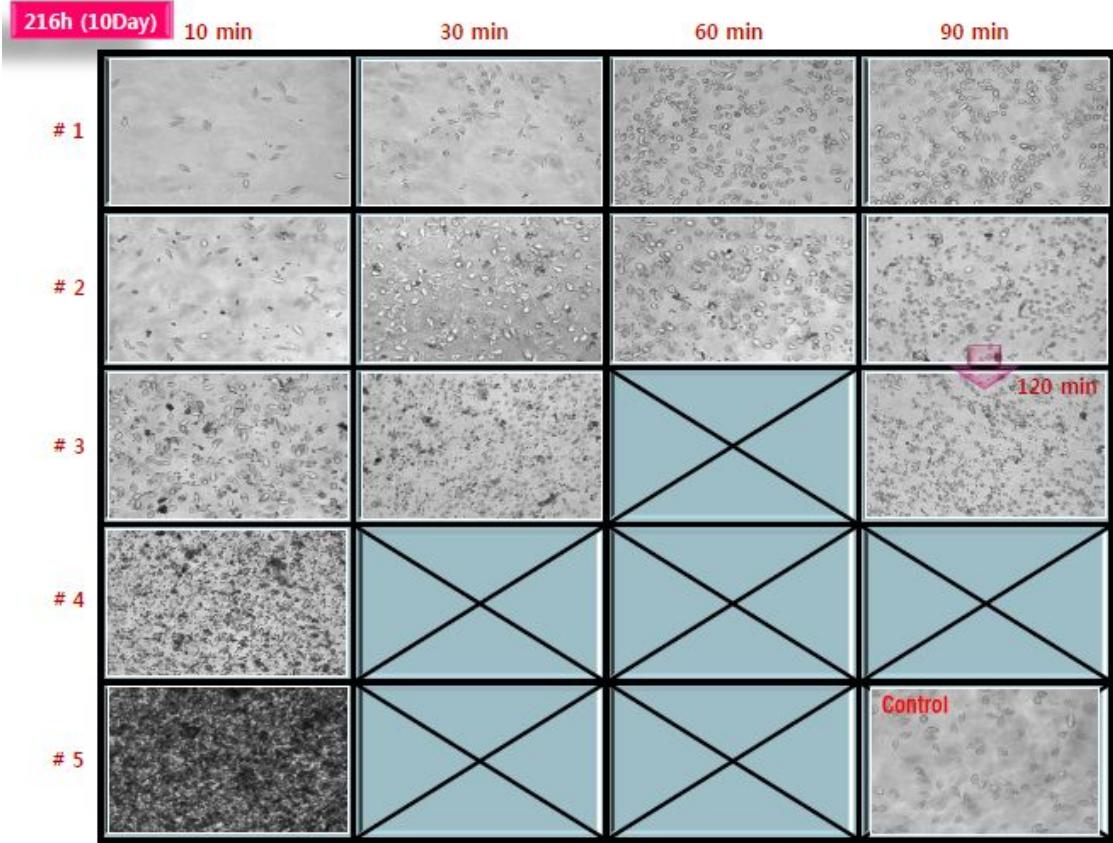


Fig. 89 향 스퀴티카 과립의 *in-vitro* 효능효과 평가결과

라. limonen 나노복합체의 용출 및 스쿠티카 살충효과

limonen이 함유된 나노복합체 (ASP-LM)와 limonen 및 Pinene이 함께 함유된 나노복합체 (ASP-LP)는 멸균된 해수 250 ml에 각각 0.4, 1.2, 3.6, 10.8%(W/V)가 되도록 첨가하여 20 °C, 160 rpm (rotation per minute) 조건의 shaking incubator에서 용출시켰다. 12시간마다 전체 해수의 50%를 멸균된 해수로 물갈이하였다. 물갈이 전에 flask를 잘 흔들어 10 ml 씩 해수를 채수하였다. 채수한 해수 3 ml에 Hexane 3 ml를 첨가하여 잘 섞어준 뒤 상층액 1 ml를 분리하여 HPLC용 vial에 옮기어 해수에 limonen이나 α-Pinene 시료가 얼마나 용출되었는지 분석하였다. 나노복합체를 용출시킨 해수의 스쿠티카충 살충효과는 앞서 설명한 것과 같이 실험하였다. 리모넨 함유 과립 (ASP-LM)의 용출 및 향 스쿠티카 효능평가 실험방법 및 일정표 샘플링은 Fig.90에 요약정리 하였다.

ASP-LM 지속용출실험											
조건	해수:배양액		1:3	0.0%	0.1%	0.3%	0.9%	2.7%	start: 2011-11-08		
	shaking incubator		160 rpm	20도							
	순환	12시간	1:1 물갈이	멸균해수							
	Sampling	10ml									
LM	Sample		#1	#2		#3		#4		#5	
	해수		control	0.4%(4X)		1.2%(4X)		3.6%(4X)		10.8%(4X)	
	ASP-LM		-	1		3		9		27	
		물갈이 sampling		물갈이 sampling		물갈이 sampling		물갈이 sampling		물갈이 sampling	
Day 1	9:30 PM	start	control								
Day 2	9:00 AM	9:30 AM	con-1-1	"	LM-2-1	"	LM-3-1	"	LM-4-1	"	LM-5-1
	9:00 PM	9:10 PM	con-1-2	"	LM-2-2	"	LM-3-2	"	LM-4-2	"	LM-5-2
Day 3	9:00 AM	9:35 AM	con-1-3	"	LM-2-3	"	LM-3-3	"	LM-4-3	"	LM-5-3
	9:00 PM	9:50 PM	con-1-4	"	LM-2-4	"	LM-3-4	"	LM-4-4	"	LM-5-4
Day 4	9:00 AM	9:15 PM	con-1-5	"	LM-2-5	"	LM-3-5	"	LM-4-5	"	LM-5-5
	9:00 PM	9:50 PM	con-1-6	"	LM-2-6	"	LM-3-6	"	LM-4-6	"	LM-5-6
Day 5	9:00 AM	10:30 AM	con-1-7	"	LM-2-7	"	LM-3-7	"	LM-4-7	"	LM-5-7
	9:00 PM	9:50 PM	con-1-8	"	LM-2-8	"	LM-3-8	"	LM-4-8	"	LM-5-8
Day 6	9:00 AM	10:10 AM	con-1-9	"	LM-2-9	"	LM-3-9	"	LM-4-9	"	LM-5-9
	9:00 PM	9:30 PM	con-1-10	"	LM-2-10	"	LM-3-10	"	LM-4-10	"	LM-5-10
Day 7	9:00 AM	10:30 AM	con-1-11	"	LM-2-11	"	LM-3-11	"	LM-4-11	"	LM-5-11
	9:00 PM	10:00 PM	con-1-12	"	LM-2-12	"	LM-3-12	"	LM-4-12	"	LM-5-12
Day 8	9:00 AM	10:15 AM	con-1-13	"	LM-2-13	"	LM-3-13	"	LM-4-13	"	LM-5-13
	9:00 PM	11:00 PM	con-1-14	"	LM-2-14	"	LM-3-14	"	LM-4-14	"	LM-5-14

Fig. 90 리모넨 함유 과립체의 용출 및 향 스쿠티카 효능평가 방법 및 샘플링

- 대조군은 나노복합체가 용출된 해수 대신 보통의 해수를 처리하였다. 해수를 금방 처리하였을 때 삼투압에 의해 스쿠티카충의 모양이 다소 변형되나 전체적인 형태와 운동능력은 크게 변하지 않았다. 해수가 스쿠티카충의 형태변화와 사멸, 유영능력에 큰 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다.

ASP-LM 0.1 % 실험구

Limonen이 함유된 나노복합체를 해수에 용출시키고 그 해수를 스쿠티카충에 처리하였

다. 용출해수를 처리하면 스킨카충의 유영이 급격히 증가하였다가 시간이 지나면 운동성이 떨어지고 형태가 변하면서 사멸한다. Limonen 나노복합체는 α -Pinene 나노복합체와 비교하였을 때 스킨카충에 영향을 주는 속도가 다소 느렸으나 일정 시간이 경과하면 대부분의 충을 사멸시켰다. 용출 시킨지 12시간 쯤 해수를 처리하였을 때 스킨카충이 30분 내에 빠르게 사멸하였고 용출시간이 지날수록 사멸시키는 정도와 시간이 감소되었다. 용출 72시간 쯤 부터는 스킨카충에 2시간동안 반응시켜도 완전히 충을 사멸시키지 못했다. limonen이 함유된 나노복합체를 0.1%의 농도로 해수에 용출시켰을 때 효과적으로 스킨카충을 죽일 수 있는 기간은 최대 3~4일 정도라고 생각된다.

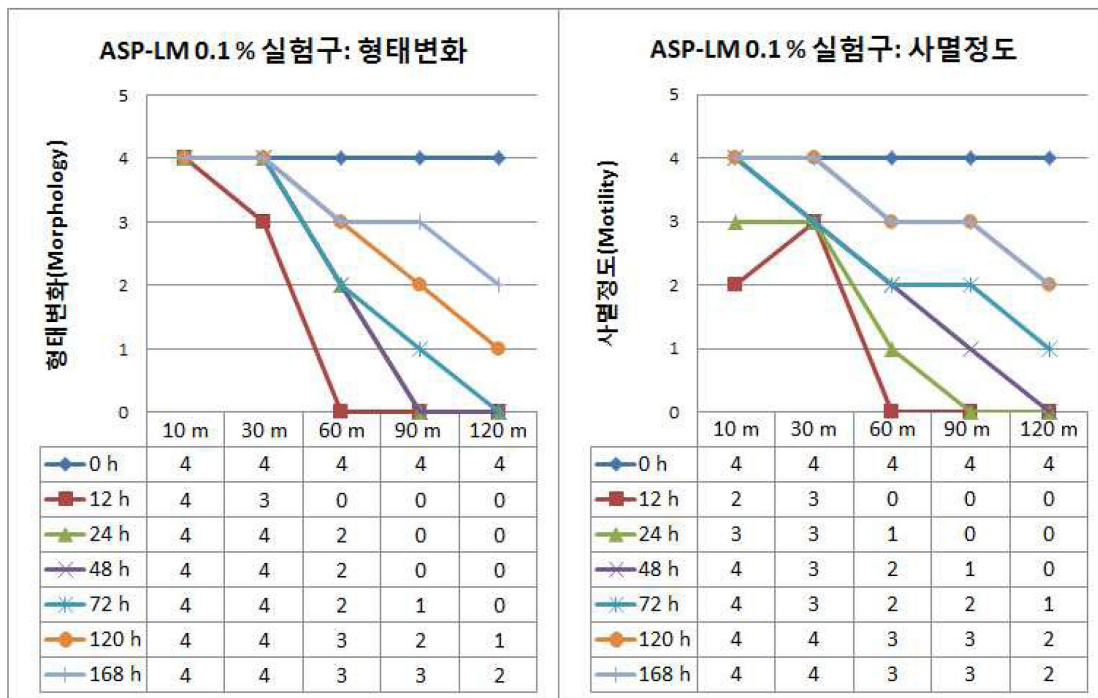


Fig. 91 ASP-LM 0.1 % 실험구의 스킨카충 형태변화와 사멸정도

ASP-LM 0.3 % 실험구

- 0.3 % 해수를 스킨카충에 처리하였을 때 용출 12시간째부터 168시간까지 30분 내에 스킨카충을 사멸시켰다. 스킨카충의 형태변화와 운동능력 변화는 용출시간에 따라 조금씩 차이가 났으나 전체적으로 30분 이내에 스킨카충이 사멸되었다. ASP-LM을 해수에 0.3 %로 처리하였을 때 스킨카충에 충분히 효과적이며 최소 7일 이상 그 효과가 지속된다고 할 수 있다.

ASP-LM 0.9, 2.7 % 실험구

ASP-LM가 0.9 또는 2.7 % 정도 포함된 용출해수를 스킨카충에 처리하였을 때 10분 이내에 모든 스킨카충이 사멸되었다. 강력한 효과를 보였으나 다소 높은 농도라고 생각된다.

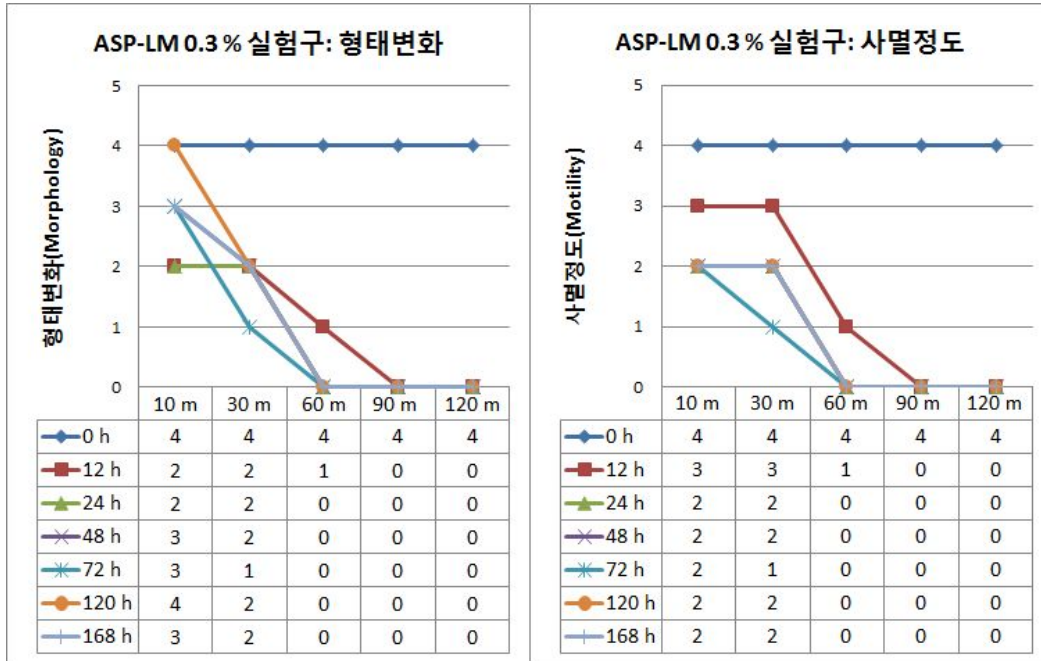


Fig. 92. ASP-LM 0.3 % 실험구의 스쿠티카충 형태변화와 사멸정도

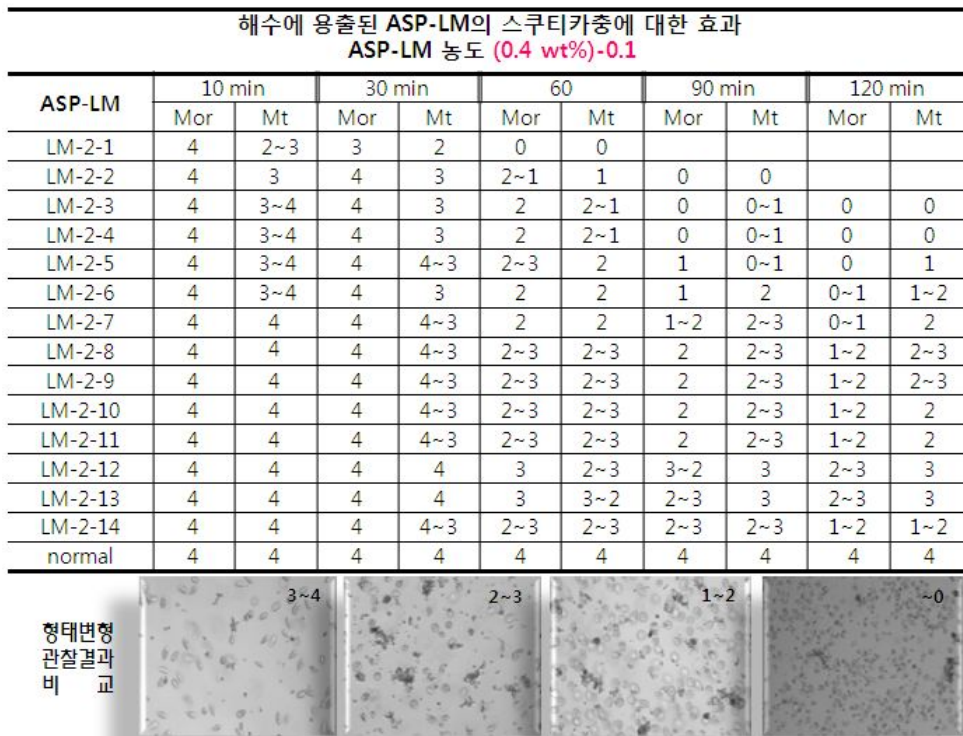


Fig. 93. ASP-LM 농도별 용출 및 처리시간별 항스쿠티카 효과(0.4wt%)

해수에 용출된 ASP-LM의 스퀴티카층에 대한 효과
ASP-LM 농도 (1.2 wt%) - 0.3%

ASP-LM	10 min		30 min		60		90 min		120 min	
	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt
LM-3-1	3~2	3~2	2~3	3	1	1				
LM-3-2	2~3	2~3	2	2~3	0	0				
LM-3-3	2~3	2~3	3	2~3	0	0				
LM-3-4	3	2~3	2	2~3	0	0				
LM-3-5	3	2~3	1	1~2	0	0				
LM-3-6	3~4	2~3	0~1	1	0	0				
LM-3-7	3~4	2~3	0~1	0~1	0	0				
LM-3-8	4~3	2~3	2	2	0	0				
LM-3-9	4	2~3	2	2	0	0				
LM-3-10	4	2~3	1~2	1~2	0	0				
LM-3-11	3~4	2~3	0~1	1	0	0				
LM-3-12	4	2~3	0~1	1	0	0				
LM-3-13	4	2~3	1~2	2	0	0				
LM-3-14	3~4	2~3	2~3	2	0	0				
normal	4	4	4	4	4	4				

Fig. 93. ASP-LM 농도별 용출 및 처리시간별 항 스퀴티카 효과(1.2wt%)

해수에 용출된 ASP-LM의 스퀴티카층에 대한 효과
ASP-LM 농도 (3.6 wt%) - 0.9%

ASP-LM	10 min		30 min		60		90 min		120 min	
	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt
LM-4-1	0~1	1								
LM-4-2	0	0								
LM-4-3	0	0								
LM-4-4	0	0								
LM-4-5	0	0								
LM-4-6	0	0								
LM-4-7	0	0								
LM-4-8	0	0								
LM-4-9	0	0								
LM-4-10	0	0~1								
LM-4-11	0	0								
LM-4-12	0	0								
LM-4-13	0	0								
LM-4-14	0	0								
normal	4	4								

Fig. 93. ASP-LM 농도별 용출 및 처리시간별 항 스퀴티카 효과(3.6wt%)

해수에 용출된 ASP-LM의 스쿠티카층에 대한 효과
ASP-LM 농도 (10.8 wt%)-2.4%

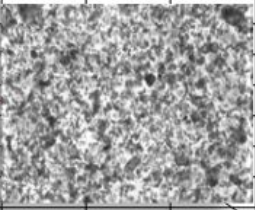
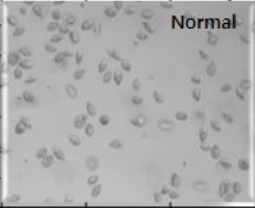
ASP-LM	10 min		30 min		60		90 min		120 min		
	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	
LM-5-1	0	0									
LM-5-2	0	0									
LM-5-3	0	0									
LM-5-4	0	0									
LM-5-5	0	0									
LM-5-6	0	0									
LM-5-7	0	0									
LM-5-8	0	0									
LM-5-9	0	0									
LM-5-10	0	0									
LM-5-11	0	0									
LM-5-12	0	0									
LM-5-13	0	0									
LM-5-14	0	0									
normal	4	4									

Fig. 93. ASP-LM 농도별 용출 및 처리시간별 항 스쿠티카 효과(10.8 wt%)

마. limonen-Pinene 함유 나노복합체 (ASP_LP)의 용출 및 스쿠티카 살충효과

ASP-LP에는 α -Pinene 과 d-Limonen이 같이 함유된 나노복합체이다. 나노복합체를 용출시킨 해수의 스쿠티카층 살충효과는 앞서 설명한 것과 같이 실험하였으며, 시간 경과에 따른 용출 및 항 스쿠티카 효능평가 실험방법 및 일정표 샘플링은 Fig.94에 요약정리 하였다. Fig.96 에는 시간경과별 채취한 용출액 처리 시간에 따른 스쿠티카 사멸효과를 관찰한 결과를 요약 정리한 것이다.

ASP-LP 0.1 % 실험구 (Fig. 95)

0.1 %로 용출된 해수를 스쿠티카층에 처리하였으나 용출된 시간과 상관없이 스쿠티카 층에게 큰 영향을 주지 못했다. 형태적인 변화는 해수처리 90분 이상이 지나야 관찰되었고 운동능력이 감소된 것이 확인되었다. 그러나 모든 시간에서 스쿠티카층을 사멸시키지 못했다. ASP-LP를 해수에 0.1 % 로 첨가하였을 때 스쿠티카층을 효과적으로 사멸시키지 못할 것이라 생각된다.

ASP-LP 0.3 % 실험구 (Fig.96)

0.3 %로 처리된 실험구에서는 용출 12시간째부터 60분 이내에 스쿠티카층의 형태가 급격히 변화되었고 60~90분에 모두 사멸되었다. 168시간 용출시킨 해수를 처리하였을 때에도 60분 이내에 스쿠티카층이 사멸되는 것으로 보아 ASP-LP를 0.3 %로 해수에 처리하였을 때 최

소 7일은 효과적으로 스쿠티카충을 사멸시킬 수 있을 것이라 기대된다.

ASP-LP 지속용출실험

조건	해수:배양액		1:3	0.0%	0.1%	0.3%	0.9%	2.7%	start: 2011-11-08		
	shaking incubator		160 rpm	20도							
	순환	12시간	1:1 물갈이	멸균해수							
	Sampling	10ml									
LP	Sample	#1		#2		#3		#4		#5	
	해수	control		0.4%(4X)		1.2%(4X)		3.6%(4X)		10.8%(4X)	
	ASP-LP	-		1		3		9		27	
		물갈이	sampling	물갈이	sampling	물갈이	sampling	물갈이	sampling	물갈이	sampling
Day 1	9:30 PM	start	control								
Day 2	9:00 AM	9:30 AM	con-1-1	"	LP-2-1	"	LP-3-1	"	LP-4-1	"	LP-5-1
	9:00 PM	9:10 PM	con-1-2	"	LP-2-2	"	LP-3-2	"	LP-4-2	"	LP-5-2
Day 3	9:00 AM	9:35 AM	con-1-3	"	LP-2-3	"	LP-3-3	"	LP-4-3	"	LP-5-3
	9:00 PM	9:50 PM	con-1-4	"	LP-2-4	"	LP-3-4	"	LP-4-4	"	LP-5-4
Day 4	9:00 AM	9:15 PM	con-1-5	"	LP-2-5	"	LP-3-5	"	LP-4-5	"	LP-5-5
	9:00 PM	9:50 PM	con-1-6	"	LP-2-6	"	LP-3-6	"	LP-4-6	"	LP-5-6
Day 5	9:00 AM	10:30 AM	con-1-7	"	LP-2-7	"	LP-3-7	"	LP-4-7	"	LP-5-7
	9:00 PM	9:50 PM	con-1-8	"	LP-2-8	"	LP-3-8	"	LP-4-8	"	LP-5-8
Day 6	9:00 AM	10:10 AM	con-1-9	"	LP-2-9	"	LP-3-9	"	LP-4-9	"	LP-5-9
	9:00 PM	9:30 PM	con-1-10	"	LP-2-10	"	LP-3-10	"	LP-4-10	"	LP-5-10
Day 7	9:00 AM	10:30 AM	con-1-11	"	LP-2-11	"	LP-3-11	"	LP-4-11	"	LP-5-11
	9:00 PM	10:00 PM	con-1-12	"	LP-2-12	"	LP-3-12	"	LP-4-12	"	LP-5-12
Day 8	9:00 AM	10:15 AM	con-1-13	"	LP-2-13	"	LP-3-13	"	LP-4-13	"	LP-5-13
	9:00 PM	11:00 PM	con-1-14	"	LP-2-14	"	LP-3-14	"	LP-4-14	"	LP-5-14

Fig. 94 리모넨-피넨 함유 과립체 (ASP-LP) 용출 및 향 스쿠티카 효능평가 방법 및 샘플링

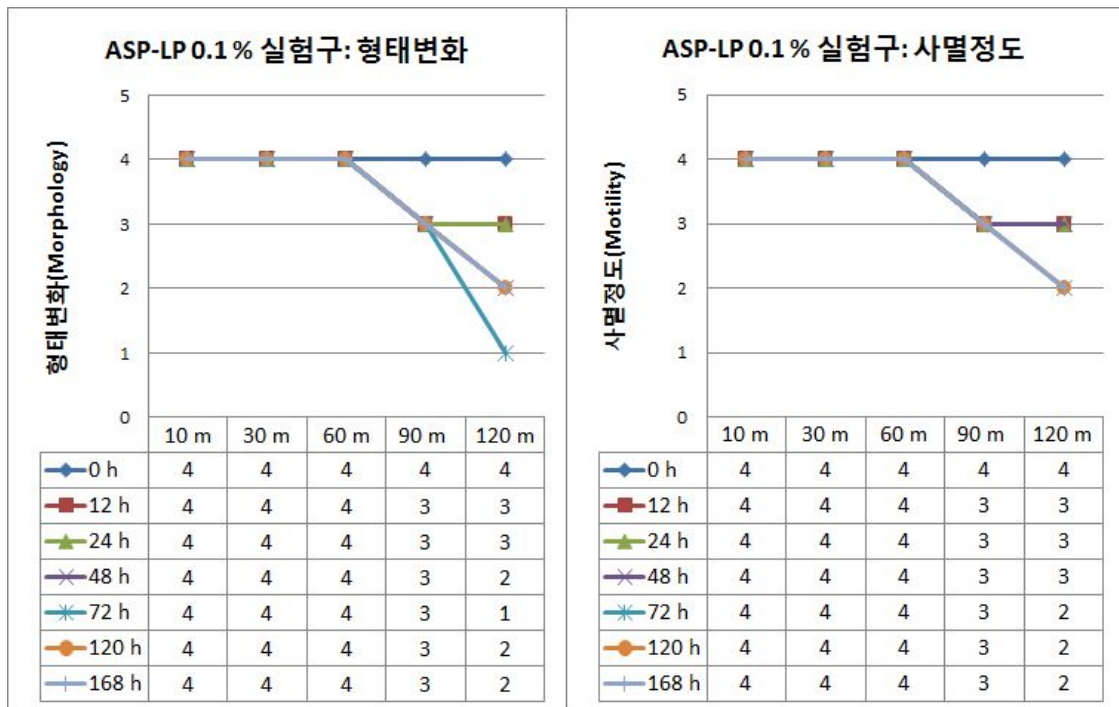


Fig. 95. ASP-LP 0.1 % 실험구의 스쿠티카충 형태변화와 사멸정도

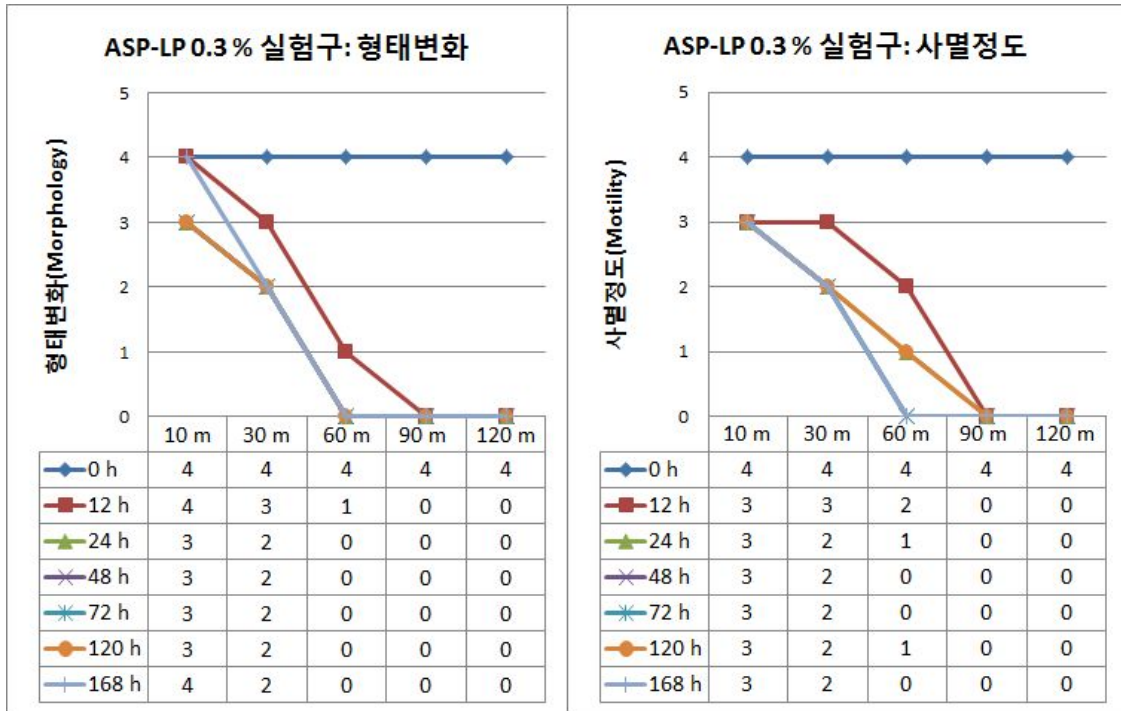


Fig. 96. ASP-LP 0.3 % 실험구의 스쿠티카충 형태변화와 사멸정도

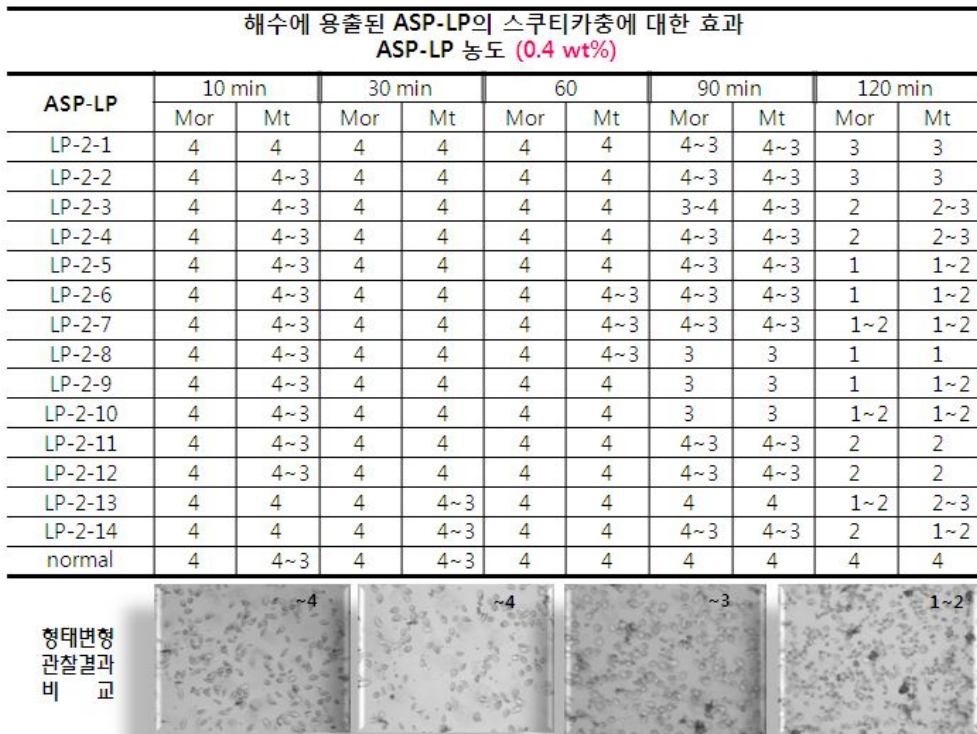


Fig. 97. ASP-LP 농도별 용출 및 처리시간별 향 스쿠티카 효과 (0.4 wt%)

해수에 용출된 ASP-LP의 스쿠티카층에 대한 효과
ASP-LP 농도 (1.2 wt%)

ASP-LP	10 min		30 min		60		90 min		120 min	
	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt
LP-3-1	4	3	4~3	3	1	1~2				
LP-3-2	3	3	2	2~1	0	0~1				
LP-3-3	4~3	3	2	2	0	0~1				
LP-3-4	4~3	3	2	2	0	0~1				
LP-3-5	4~3	3	2	2	0	0~1				
LP-3-6	4~3	3	2	2	0	0				
LP-3-7	3	3	1~2	1~2	0	0				
LP-3-8	3	3	1	1~2	0	0				
LP-3-9	3	3	1	1~2	0	0				
LP-3-10	3	3	1~2	1~2	0	0~1				
LP-3-11	3	3	1	1~2	0	0				
LP-3-12	4~3	3	1	1~2	0	0				
LP-3-13	4	3	1	1~2	0	0~1				
LP-3-14	4	3	1~2	1~2	0	0				
normal	4	4~3	4	4	4	4				

Fig. 97. ASP-LP 농도별 용출 및 처리시간별 항 스쿠티카 효과 (1.2 wt%)

해수에 용출된 ASP-LP의 스쿠티카층에 대한 효과
ASP-LP 농도 (3.6 wt%)

ASP-LP	10 min		30 min		60		90 min		120 min	
	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt
LP-4-1	1~2	2	0	0						
LP-4-2	2	2~3	0	0						
LP-4-3	1~2	2								
LP-4-4	0~1	1~2								
LP-4-5	0	1								
LP-4-6	0	1								
LP-4-7	0	1								
LP-4-8	1~2	1~2								
LP-4-9	1~2	1~2								
LP-4-10	2	2	0~1	0~1						
LP-4-11	1~2	1~2	0~1	0~1						
LP-4-12	1	1	0	0						
LP-4-13	0	0~1	0	0						
LP-4-14	1	1	0	0						
normal	4	4	4	4						

Fig. 97. ASP-LP 농도별 용출 및 처리시간별 항 스쿠티카 효과 (3.6 wt%)

해수에 용출된 ASP-LP의 스쿠티카층에 대한 효과 ASP-LP 농도 (10.8 wt%)										
ASP-LP	10 min		30 min		60		90 min		120 min	
	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt	Mor	Mt
LP-5-1	0	0								
LP-5-2	0	0								
LP-5-3	0	0								
LP-5-4	0	0								
LP-5-5	0	0								
LP-5-6	0	0								
LP-5-7	0	0								
LP-5-8	0	0								
LP-5-9	0	0								
LP-5-10	0	0								
LP-5-11	0	0								
LP-5-12	0	0								
LP-5-13	0	0								
LP-5-14	0	0								
normal	4	4								

Fig. 97. ASP-LP 농도별 용출 및 처리시간별 항 스쿠티카 효과 (10.8 wt%)

바. α -Pinene 나노복합체의 어류독성 여부 확인

실험에는 크기 12 ± 2 cm, 무게 30 ± 10 g 정도의 넙치가 사용되었다. 300 L 수조에 250 L의 해수를 채우고 수조마다 넙치 50마리씩 넣고 1주일간 순치하였다. 첫 번째 실험구에는 α -Pinene 나노복합체를 0.1 % (W/V)가 되도록 250 g을 첨가하였고 두 번째 실험구에는 0.3% (W/V)가 되도록 750 g을 첨가하였다. 12시간 마다 전체 해수 용량의 50%를 물같이 하였고 펌프를 이용해 물을 순환시켰으며 수온은 18°C로 유지하여 약 8일간 실험하였다. 물같이 전에 3마리의 넙치를 해부하여 아가미의 색상을 확인하였고 아가미를 채집하여 Bouin's fluid 고정액에 담아 하루 동안 고정한 뒤 70% 에탄올 용액에 담가 보관하였다.

멤베딩 기계를 이용하여 자동으로 고정된 조직의 탈수와 포매를 진행하였다 : 70 % 에탄올 용액에서 1시간 반응, 80 % 에탄올 용액에서 1시간 반응, 90 % 에탄올 용액에서 1시간 반응, 100 % 에탄올 용액에서 2시간 반응, 에탄올과 xylene이 2:1로 혼합된 용액에서 1시간 반응, 에탄올과 xylene이 1:1로 혼합된 용액에서 1시간 반응, 100 % xylene에서 1시간 반응, xylene과 파라핀이 1:1로 혼합된 용액에서 1시간 반응, 파라핀 용액에서 1시간 반응, 최종적으로 예열된 파라핀을 조직으로부터 조직을 파라핀과 함께 굳힘. 파라핀으로 굳힌 조직을 microtome을 이용하여 7 μ m의 두께로 박절하였다. 얇게 잘려진 조직을 물을 떨어뜨린 슬라이드에 올리고 주름을 펴준 뒤 물기를 제거하였다.

조직슬라이드는 다음과 같은 방법으로 염색 및 탈수 시켰다. 먼저 조직슬라이드를 xylene에 1시간 동안 담가 여분의 파라핀을 제거하고 100 % 에탄올 용액이 담긴 두 개의 용액에 차례로 5분씩 담근다. 95, 90, 80, 70 %의 에탄올 용액에서 순차적으로 5분씩 담근 후 흐르는 물에 15분간 세척하였다. 염색시약인 Hematoxylin에 2분 동안 담가 세포질을 염색시키고 (보란색) 다시 15분간 흐르는 물에 세척하였다. 핵을 빨간색으로 염색시키는 Eosin에 1분 30초간 염색시킨 후 물에 여러 차례 담가준다. 70, 80, 90% 에탄올에 차례로 수 초간 담가 주고 95% 에탄올에서 1분 30초간, 2개의 100% 에탄올 용액에 각각 5분간 반응시킨다. 마지막으로 세 개의 xylene이 있는 용기에 슬라이드를 넣어 차례로 5분간 담가 준 뒤 여분의 시약을 제거하였다. 조직이 마르기 전에 캐나다발삼을 한 방울 정도 떨어뜨리고 커버글라스를 덮은 후 말려서 보관하였다. 완성된 조직 슬라이드는 현미경으로 관찰하여 나노복합체로 인한 조직손상이 있는지 확인하였다.

Fig.98A 및 B는 넙치 아가미조직 사진 관찰을 통한 특이 어독성 여부의 관찰결과이다.

1) α -Pinene 나노복합체를 해수에 처리하였을 때 넙치에게 독성이 있는지 확인하였다. 해수 처리 농도는 스쿠타카충을 효과적으로 사멸시키기에 적당한 농도였던 0.1, 0.3%로 결정하였고 250 L 해수에 나노복합체를 처리하였다. 처리 초반에는 넙치가 바닥에 가라앉은 나노복합체와 거리를 두었으나 실험기간 동안 넙치 행동에는 큰 변화가 없었으며 폐사하는 넙치가 없었다. 12시간마다 해수를 물갈이하기 전에 넙치 3마리를 해부하여 피부와 아가미의 외형적 변화를 살펴보았다. 대조군의 넙치와 비교하였을 때 나노복합체를 처리한 넙치의 피부와 아가미의 색상변화는 없었으며 전체적으로 건강해보였다.

조직적인 변화가 있는지 보기 위하여 채집한 아가미를 조직 슬라이드로 제작하여 관찰하였다. 나노복합체를 처리한 실험구에서 대조군에서 발견되지 않은 이상소견이 다소 보였다. 그러나 0.1%와 0.3%의 차이는 없는 것으로 보아 농도에 의존적인 독성은 아닌 것으로 보이며 개체의 건강도에 따른 미미한 손상으로 생각된다. 이상소견을 보인 아가미는 대조군의 정상적인 아가미와 비교하였을 때 새엽의 형태를 이루는 세포들이 비대해지거나 터져있는 것이 관찰되었다(Fig 98A의 화살표). 그러나 한 개체에서도 전체적인 손상이 아닌 부분적인 손상으로 보인다.

스쿠타카충을 효과적으로 사멸시켰던 0.1, 0.3% 나노복합체 농도에서는 어류에게 조직적으로 큰 손상을 주지 않는 것으로 보이나 작은 손상이 장기적으로 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

Footnote : 넙치를 채집하였을 때 넙치가 활동적이었고 피부, 아가미, 눈, 지느러미 등이 손상이 없거나 색상변화가 없는 것으로 보아 나노복합체로 인한 활동저해 및 손상은 크게 없는 것으로 사료된다. 넙치의 경우 저서생물로 가라앉은 형태의 나노복합체와 계속 접촉하므로 해수에 녹아나오는 α -Pinene에 직접적으로 영향을 받을 것이라 생각된다. 그러나 양식장에서는 물 순환이 빠르므로 α -Pinene 농도는 빠르게 감소할 것이고 넙치에게 장기간동안 나노복합체를 처리하지 않는다면 손상과 같은 영향을 주지 않을 것이라 생각된다.

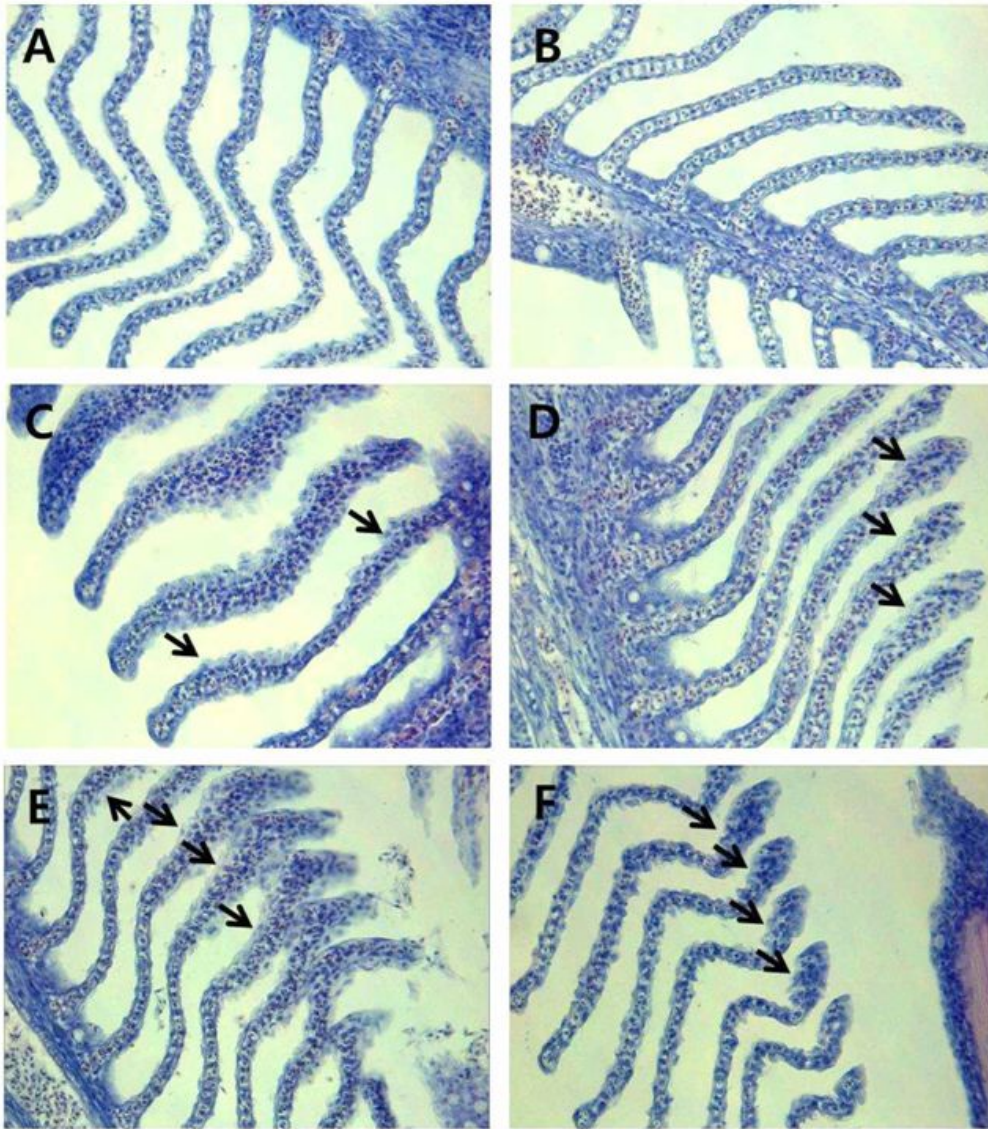


Fig. 98A. 넙치 아가미 조직사진 (400X). A: 대조구 12시간째, 정상소견, B: 대조구 120시간째, 정상소견; C: 0.1% 실험구 3시간째, 이상소견 ; D: 0.1% 실험구 48시간째, 이상소견; E: 0.1% 실험구, 이상소견; F: 0.3% 실험구 12시간째 이상소견

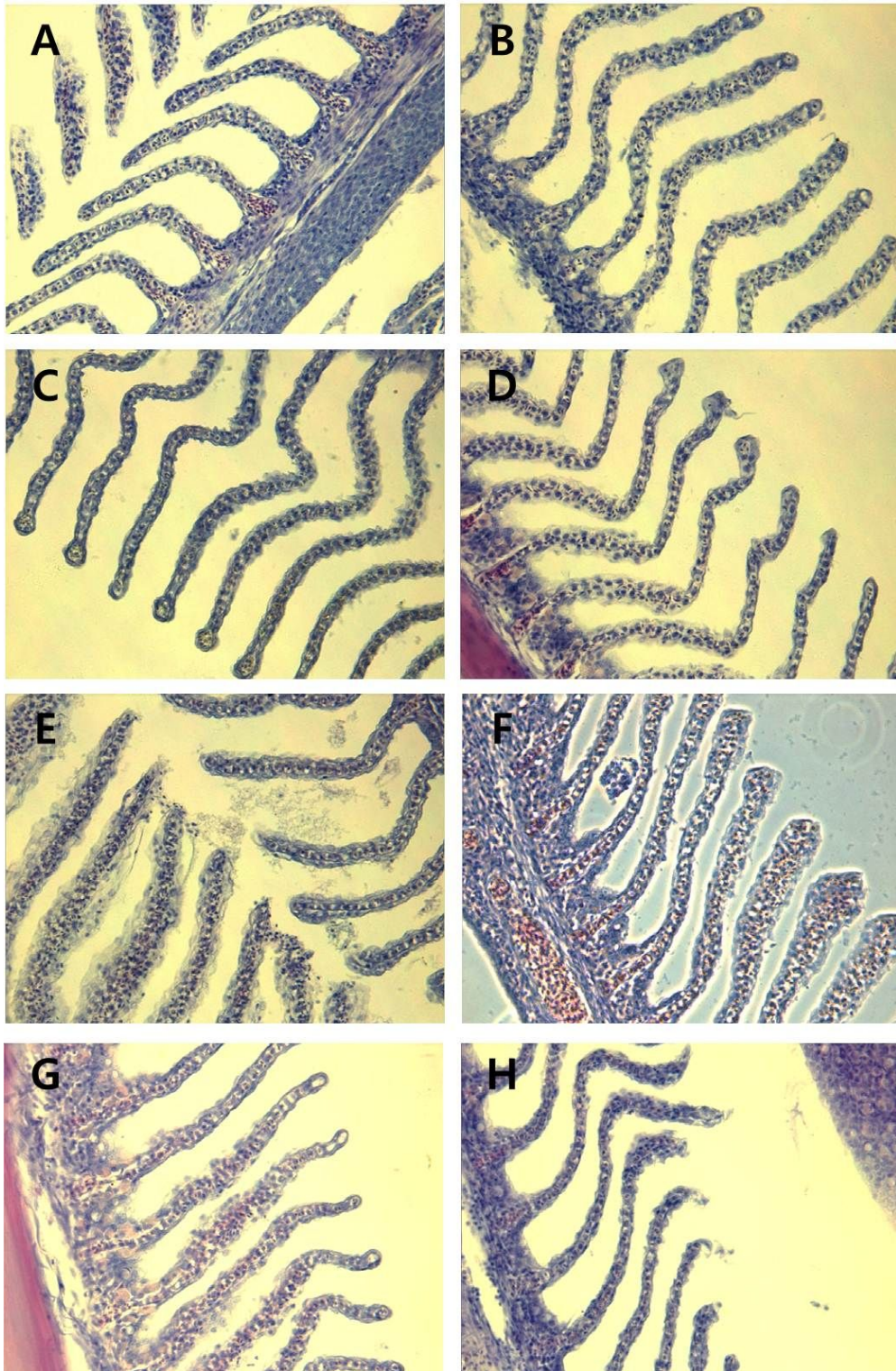


Fig. 98B. 넙치의 아가미 조직 사진(400X). A-E: 대조구 0, 3, 12, 24, 72 시간째; F-H: α -Pinene 나노복합체 0.1% 실험구 3, 48, 72시간째

7. 과립제품의 현장효능 평가

가. 피넨-함유 과립제품 (ASP-series)의 현장평가

- 우선 시작품으로 제작된 과립형 항스쿠티카 나노복합체(ASP-200)을 이용하고 (Fig.99), 제주도내 양식장을 섭외하여 항스쿠티카 효능에 대한 현장평가를 장소 및 일시를 달리 하여 총 5회 실시 하였다. 초기 조건 도출을 위한 간이 평가의 경우는 실험회수에서 제외 하였다. 모든 현장 평가는 스쿠티카 감염에 의한 폐사가 발생하는 현장을 대상으로 섭외하여 폐사율 개선 효과를 평가 하였다. 알파 피넨이 함유되어 있는 과립은 Fig.100에서 보는 바와 같이 미세그물망에 샘플을 원하는 장착하고 수소내에 침적시켜 알파 피넨의 용출을 유도하였다.



Fig. 99 현장평가용 알파-피넨 함유 과립 시작품 (ASP-200)

- 동일한 조건의 수조에서의 폐사율과 알파피넨 처리 수조내의 폐사율을 비교하여 스쿠티카증에 의한 폐사율 개선효과를 평가 하였다. 또한, 현장에서의 알파피넨의 서방성을 확인 하기 위하여 3차 평가에서는 피넨 과립부근과 전체 수조에서의 평균적인 피넨 함량을 GC를

이용하여 분석 하였다. 모든 현장 평가 결과에서 알과 피넨 함유 과립을 적용하는 경우 스쿠티카에 의한 폐사율이 뚜렷하게 개선됨을 확인 할 수 있었다. 앞서 *in-vitro* 평가에서 예측할 수 있었던 바와 같이 알과 피넨은 스쿠티카충에 대한 확실한 살충효과가 있음을 현장에서도 확인 할 수 있었다. 또한, 과립화에 따른 활성성분의 서방성 또한 확인 할 수 있었다. 각각의 표에 정리한 바와 같이 알과 피넨의 함량이 평가기간 (9 일) 동안 일정하게 용출됨을 알 수 있었다. 과립이 적용된 바로 근처에는 농도가 전체 수조에 비해 높게 관찰되었으나 전체적으로 균일하게 용출됨을 알 수 있었다.

- 결론적으로 알과-피넨 함유 과립은 스쿠티카충에 의한 광어의 폐사율 개선에 확실한 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. 향후 적용량에 대한 최적화와 적용기간 등에 대한 최적화를 통해 효율적인 항 스쿠티카 구제 방법의 확립이 가능함을 알 수 있었다.



Fig. 100 알과-피넨 함유 과립을 이용한 항 스쿠티카 효과 현장평가 활동

ASP 과립의 향 스키테카 현장평가 [1차평가]

- 실험 기간 : 2010.07.01 - 07.08
- 실험 장소 : TC수산 1개 수조 (창조바이오 섭외)
- 실험 내용
 - 1) 샘플 : ASP-200 (Lot.10-0610)/구형과립 (피넨 20%)
 - 2) 물량 : 50 ton
 - 3) 시제품 사용량 : 100 kg (0.2 %)
 - 4) 실험 내용 : 알파피넨 (ASP) 처리에 따른 폐사량 확인
- 평가 결과
 - 1) 약 72% 정도의 폐사율 개선효과 확인
 - 2) 어독성과 관련된 특이한 영향은 관찰된 바 없음.

표 11. ASP 과립 적용에 따른 광어 스키테카충 감염 폐사량 개선효과

일 자	ASP처리 수조 폐사량 (마리)	대조구 폐사량 (마리)
0 (2010.06.14.)	32	34
1	10	31
2	9	36
3	11	28
4	10	30
5	11	27
6	8	32
7	10	35
8	9	34

ASP 과립의 항스쿠티카 현장평가 [2차평가]

- 실험 기간 : 2010.07.09.-07.17
- 실험 장소 : SB수산 1개 수조 (창조바이오텍 섭외)
- 실험 내용
 - 1) 샘플 : ASP-200 (Lot.10-0610)/구형과립 (피넨 20%)
 - 2) 물량 : 50 ton
 - 3) 시제품 사용량 : 100 kg (0.2 %)
 - 4) 실험 내용 : 알과피넨 처리에 따른 폐사량 확인
- 평가 결과
 - 1) 약 80% 정도의 폐사율 개선효과 확인
 - 2) 어독성과 관련된 특이한 영향은 관찰된 바 없음.

표 12. 항스쿠티카 과립 적용에 따른 광어 스쿠티카증 감염 폐사량 개선효과

일 자	ASP-처리 수조폐사량 (마리)	대조구 폐사량 (마리)
0 (2010.07.09)	48	46
1	14	50
2	15	46
3	15	48
4	13	51
5	14	46
6	10	45
7	12	48
8	10	49

ASP 과립의 향스쿠티카 현장평가 [3차평가]

- 실험 기간 : 2011.05.16.-2011.05.25
- 실험 장소 : TC수산 (제주도 서귀포시)
- 실험 내용
 - 1) 샘플 : ASP-200 (Lot.11-0422) /구형과립 (피넨 20%)
 - 2) 물량 : 50 ton
 - 3) 시제품 사용량 : 100 kg (0.2 %)
 - 4) 실험 내용 : 알파-피넨 용출 농도/폐사량 확인
- 평가 결과
 - 1) 약 82% 정도의 폐사율 개선효과 확인
 - 2) 어독성과 관련된 특이한 영향은 관찰된 바 없음.
 - 3) 수조내 피넨함량 분석(GC-Mass)을 통하여 용출지속성 확인

표 13. 향스쿠티카 과립적용에 따른 광어 스쿠티카충 감염 폐사량 개선효과 및 알파-피넨의 용출량 분석 결과

일자	alpha-Pinene 농도 [ppm]		폐사량 [마리]
	수조평균	과립부근	
0	0	0	68
1	2.8	5.3	18
2	2.7	5.1	12
3	2.7	5.0	10
4	2.7	5.1	11
5	2.6	4.6	13
6	2.3	4.1	9
7	2.3	4.2	11
8	2.3	4.5	10
9	2.4	4.8	12

ASP 과립의 향스쿠티카 현장평가 [4차평가]

- 실험 기간 : 2011.08.26.-2010.09.06
- 실험 장소 : BB수산 (제주도 서귀포시)
- 실험 내용
 - 1) 샘플 : ASP-200 (Lot.11-0810) / 펠렛 (피넨 20%)
 - 2) 물량 : 50 ton
 - 3) 시제품 사용량 : 100 kg (0.2 %)
 - 4) 실험 내용 : 알파-피넨 용출 농도/폐사량 확인
- 평가 결과
 - 1) 약 80% 정도의 폐사율 개선효과 확인
 - 2) 어독성과 관련된 특이한 영향은 관찰된 바 없음.
 - 3) 수조내 피넨함량 분석(GC-Mass)을 통하여 용출지속성 확인

표 14. 향 스쿠티카 과립적용에 따른 광어 스쿠티카충 감염 폐사량 개선효과 및 알파-피넨의 용출량 분석 결과

일자	alpha-Pinene 농도 [ppm]		폐사량 [마리]
	수조평균	과립부근	
0	0	0	51
1	2.5	4.3	12
2	2.5	4.1	12
3	2.7	5.0	12
4	2.7	5.1	11
5	2.5	4.6	13
6	3.2	6.1	10
7	3.0	4.2	9
8	2.5	4.5	11
9	2.7	4.8	10

나. 리모넨-함유 과립제품 (ASP-LM)의 현장평가

- 피넨 대신 리모넨이 함유된 과립 제품 (ASP-LM)을 이용한 현장평가를 실시하였다. 평가에 사용된 ASP-LM은 리모넨의 함량이 10%이며 실린더 형태의 펠릿형 과립을 이용하여 실시하였다. 현장 평가용 샘플은 Fig.101에 나타내었다.

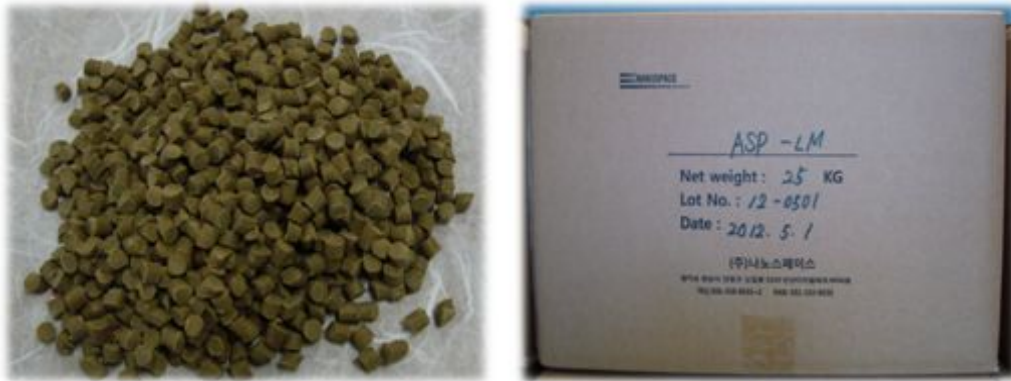


Fig. 101 현장평가용 리모넨 함유 과립 샘플 (ASP-LM)

- 리모넨 함유 제품에 대한 2회의 현장평가 결과 리모넨의 경우 피넨에 비해 효과가 약함을 확인 할 수 있었다. 리모넨 함유 제품을 적용하는 경우 폐사되는 광어의 개체수가 감소하는 효과는 분명하게 나타남에 따라 일정 정도의 항 스킨디카 효능은 있다고 판단도지만 그 개선정도가 20 ~ 40% 내외로 약하게 나타난다. 향후 활성성분인 리모넨의 함량 증가 (현재 10%에서 20%), 수조내 투입량의 변화 (현재 0.2% 수준에서 ~0.5%)를 통하여 적용농도의 최적 조건 도출이 요구된다.

ASP-LM과립의 향스쿠티카 현장평가 [1차평가]

- 실험 기간 : 2012.06.01 - 06.08
- 실험 장소 : YY 수산 1개 수조
- 실험 내용
 - 1) 샘플 : ASP-LM (Lot. 12-0501)
 - 2) 물량 : 50 ton
 - 3) 시제품 사용량 : 100 kg (0.2 %)
 - 4) 실험 내용 : 리모넨 함유 과립 처리에 따른 폐사량 개선 효과 확인
- 평가 결과
 - 1) 약 20~30% 내외 정도의 폐사율 개선효과 확인
 - 2) 어독성과 관련된 특이한 영향은 관찰된 바 없음.
 - 3) 리모넨의 효과 부족/활성성분 함량 증가 필요

표 15. 리모넨 함유 과립 적용에 따른 광어 스쿠티카충 감염 폐사량 개선효과

일 자	ASP-LM 처리 수조 폐사량 (마리)	대조구 폐사량 (마리)
0 (2012.06.01.)	47	49
1	43	44
2	51	54
3	42	41
4	40	47
5	45	59
6	47	62
7	51	67
8	55	71

ASP-LM과립의 향스쿠티카 현장평가 [2차평가]

- 실험 기간 : 2011.06.08 - 2012.06.15.
- 실험 장소 : YB 수산 (제주도 서귀포시)
- 실험 내용
 - 1) 샘플 : ASP-LM (Lot. 12-0501)
 - 2) 물량 : 50 ton
 - 3) 시제품 사용량 : 100 kg (0.2 %)
 - 4) 실험 내용 : 리모넨 함유 과립 처리에 따른 폐사량 개선 효과 확인
- 평가 결과
 - 1) 약 30~40% 내외 정도의 폐사율 개선효과 확인
 - 2) 어독성과 관련된 특이한 영향은 관찰된 바 없음.
 - 3) 리모넨의 효과 부족/활성성분 함량 증가 필요

표 16. 리모넨 함유 과립 적용에 따른 광어 스쿠티카충 감염 폐사량 개선효과

일 자	ASP-LM 처리 수조폐사량 (마리)	대조구 폐사량 (마리)
0 (2012.06.08)	24	27
1	18	31
2	23	34
3	15	16
4	17	23
5	16	22
6	21	36
7	31	48
8	36	52

8. 과립제품의 스펙 및 제품특징

가. 향 스쿠티카용 과립제품의 기준스펙

- 향후 다양한 현장조건에 적용 가능한 현장맞춤형 과립 제품을 확대 개발, 판매 할 예정이다, 현재까지의 연구개발 결과 얻어지는 제품인 ASP-series에 대한 기준 스펙은 다음과 같다.

- 제품의 종류 : ASP-series (피넨/농도별), ASP-LM (리모넨), ASP-LP (리모넨/피넨)
- 활성물질 : 피넨, 리모넨, 캄펜, 카페인, 퀴닌
- 외관 : 직경 5mm의 구형 과립
- 구성성분 : 알루미늄규산염/알킬암모늄염/활성물질/첨가제
- 활성성분의 함량 : 5 ~ 30 중량% (조절가능)
- 과립의 안정성 (형태유지율) : 90% 이상 (해수조건/용출기 평가법)
- 활성성분의 용출량 : 수조 내 (50톤 기준) 3 ± 1.5 ppm
- 활성성분의 서방성 : 10 일 이상 지속
- 스쿠티카 살충률 : > 99% 이상 (형태변형 및 사멸효과)
- 광어폐사율 개선 : > 80 이상
- 과립제품의 실물사진 (ASP-series, Fig.101)



Fig. 102 알과-피넨 함유 향 스쿠티카용 과립 제품사진

나. 항 스쿠티카능 과립제품의 특징

- 본 과제의 수행을 통해 개발된 나노복합체형 과립 제품의 특징은 Fig.103에 요약, 정리하였다.

피넨 함유 항스쿠티카 과립의 특징 ASP-series

- 환경/생태 친화형 조성물 *Eco- & Environmental friendly*
: 천연유래 활성물질 (피넨) 및 전달담체 (천연점토)
- 활성성분 (피넨)의 안정화 *Stabilization*
: 알파-피넨의 휘발성 억제를 통한 안정화
- 제어용출특성 구현 *Slow-releasing & solubility improvement*
: 알파-피넨의 수용해도 개선 및 서방성 구현 / 안전성
- 과립의 해수 봉해 안정성 *Slow-releasing & solubility improvement*
: 알파-피넨의 수용해도 개선 및 서방성 구현
- 적용편리성 및 경제성 *Convenience & Economical benefit*
: 투입 및 회수 편리성, 피넨 서방성 구현 / 효과의 장기 지속성
- 우수한 항스쿠티카 효능 *High performance / efficacy*
: 우수한 항스쿠티카 효능 / 폐사량 개선에 매우 효과적

Fig. 103 나노복합체용 항 스쿠티카용 과립 제품 특징

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 기술적 성과

- 천연물질/무기담체 나노복합화 기술 개발
- 항 스쿠티카 활성물질 함유 과립조성물 및 과립공정 개발
- 경제적인 과립제조를 위한 장비 설계 기술 확보
- 광어양식장용 스쿠티카 감염 예방기술 개발
 - : *In-vitro* 및 현장평가에서 효능 효과 우수성 검증
- 스쿠티카 감염 예방 및 치료용 알파-피넨, 리모넨 함유 과립제조 기술개발
 - : 활성물질 (피넨/리모넨)의 서방성 구현/ 환경 및 생태친화형 제품 / 경제성 및 적용편리성 확립
- 과립공정 및 양산기술 확립 : 500kg/일 규모의 파일럿/양산 기술 확립
- 과립제조용 양산장비 설계 및 제작
- 스쿠티카충의 분리배양 및 살충효과 검증기술 확립 (위탁기관)

2. 지적재산권 및 학술적 성과

- 국내특허출원 : 5 건

- (1) 항 스쿠티카충 복합체 조성물 및 이의 제조방법
10-2011-0063511 (2011.06.29)/(주)나노스페이스/한양수,윤주영,양재훈
- (2) 층상형 무기화합물 담체를 이용한 항 스쿠티카충 복합체 조성물의 제조방법
10-2011-0097994(2011.09.28)/(주)나노스페이스/한양수
- (3) 분말의 과립화 장치
10-2011-0098046(2011.09.28)/(주)나노스페이스/한양수, 윤주영
- (4) 사료첨가제용 조성물 및 그 제조방법
10-2011-0103924(2011.10.12)/(주)나노스페이스/한양수
- (5) 리모넨을 유효성분으로 포함하는 스쿠티카충 구제용 조성물
(2012)/(주)나노스페이스/한양수 (출원중)

- 국내 학술 발표 : 8건

- (1) A simple route to intercalative organo-clay nanocomposites
도보영, 윤주영, 정철연, 이남호, 한양수
대한화학회 춘계학술대회, 2011년 4월28~29 제주국제컨벤션센터
- (2) Intercalative nanocomposite for essential oil delivery support
도보영, 윤주영, 정철연, 이남호, 이제희, 한양수
대한화학회 춘계학술대회, 2011년 4월28~29 제주국제컨벤션센터

- (3) Intercalative nanocomposite between cocamide DEA and swellable clay by solid process 최민아, 이남호, 한양수
대한화학회 춘계학술대회, 2011년 4월28~29 제주국제컨벤션센터
- (4) Preparation of new zinc-pyrrithione clay nanocomposite
강영주, 한양수
대한화학회 춘계학술대회, 2011년 4월28~29 제주국제컨벤션센터
- (5) α -pinene과R-limonen, camphene의 스쿠티카섬모충 *Miamiensis avidus*에 대한 살충효과, 이숙경, 한양수, 정철연, 황일선, 오민영, 이영득, 이제희
2011년도 춘계 한국어병학회 (2011.5.27).
- (6) Essential oil containing nanocompoiste for the treatment of fish parasitic disease
윤주영, 양재훈, 정철연, 이남호, 이제희, 한양수
대한화학회 추계학술대회, 2011년 9월29~30 대전컨벤션센터
- (7) α -Pinene의 어류 기생충인 *Miamiensis avidus*에 대한 살충효과와 스쿠티카충의 항산화 유전자의 발현분석
이숙경, 황일선 이영득 김효원 오민영 이제희
한국수산과학총연합회 공동학술대회 (FSAK 2011) (2011.11.18)
- (8) Essential oil containing nanocompoiste for the treatment of fish parasitic disease
윤주영, 양재훈, 정철연, 이남호, 이제희, 한양수
대한화학회 춘계학술대회, 2012년 4월25, KINTEX

▪ 해외전문 학술지 (SCI) : 2건

- (1) Intercalative Nanocomposite between Cocamide DEA and Swellable Clay by Solid State Process, Yang-Su Han, Joo-Young Yoon, Ji-Ho Lee, Nam-Ho Lee, J.Phys.Chem.Solids (2012).
- (2) alpha-Pinene containing layer nanocomposite for the treatment of fish parasitic disease, Yang-Su Han, Joo-Young Yoon, Nam-Ho Lee, Chol-Yeon Jung, Je-Hee Lee, J.Phys.Chem.Solids (2012)

3. 목표달성도 비교

항 목	계 획	실 적	달성도 (%)
세부 연구 내용 및 달성도	1. 항스쿠티카 약육제제용 하이브리드 소재 설계	- 증간삽입반응 이용 항스쿠티카용 나노복합소재 설계	100
	2. 항스쿠티카용 나노복합체 제조 및 특성평가	- 활성물질/점도의 증간삽입 반응이용 제조기술 확립 - 물리화학적 특성 및 활성성분 용출특성 평가완료	100
	3. 스쿠티카 살충효능 평가	- 스쿠티카충 배양 및 형태안정성/사멸효과 평가 - 원료활성 물질 및 과립형 나노복합체 평가 완료	100
	4. 나노복합체의 제품화(과립화)기술개발	- 제한기 및 twin-screw extruder 이용 과립조성물 및 과립제조 공정 개발 완료	100
	5. 과립형 항스쿠티카 제품의 현장평가	- 제주도내 양식장 대상 총 5회 이상 평가 - 최고 80% 이상 폐사율 개선효과 확인	100
	6. 정량적 연구개발 목표 - 활성 물질 함량 : 10wt% 이상 - 제어 용출 특성 : 2~20ppm/day, >10일 지속 - 살충 효과 : 살충효과 90% 이상 - 과립 형태 및 크기 : 구형 / 2 ~ 5mm - 최종 제품 수 : 활성물질 종류별 3종 이상 - 현장 평가 : 폐사율 80% 이상 감소	- 활성 물질 함량 : 10~30 wt% (조정가능) - 제어 용출 특성 : 2~20ppm/day, >10일 지속 - 살충 효과 : 살충효과 99% 이상 (형태/사멸) - 과립 형태 및 크기 : 구형 및 펠렛형 / 5mm - 최종 제품 수 : ASP (피넛), ASP-LM(리모넨), ASP-LP - 현장 평가 : 폐사율 80% 이상 감소	100
	7. 연구개발 성과목표 - 특허 : 2건 - 전문학술지 : 2편	- 학술회의 발표 8건 - 특허출원 5건 - 해외학술지 (SCI) 논문 : 2건	>100

제5장 연구개발결과의 활용계획

1. 연구개발 결과발표 (2012년 7~12월)

- 연구개발 결과의 전문학술지 발표 (SCI급/2편)
- 국제/국내 학술회의 발표 : 현재까지 8편 발표
- 향후 해외 학술회 참가발표
- 지적재산권 확보 : 현재 국내 특허 4건 출원 완료 및 1건 출원중
2012년내 국제 PCT 출원 (조성물, 응용 및 과립제조 방법)

2. 제품추가 개발 및 현장평가 추가진행 (2012년 7월 ~ 2012년 12월)

- ASP (피넨함유) : 수조내 농도높여서 적용 평가 (현재 0.2% → 0.5%)
- ASP-LM의 경우 활성성분인 리모넨을 현재 10% → 20 % 상향 조정해서
폐사율 개선효과 재평가
- 하이브리드형 제품 추가
: 피넨-리모넨, 피넨-캄펜, 리모넨-캄펜
- 현장평가를 위한 제주도내 양식장과의 지속적인 유대관계 확립
- 피넨 이외의 항 스킨카 활성 물질 확대 적용 제품 개발
- 활성물질 함량 및 용출특성에 따른 제품 사용기간 설정, 제품군 확대 적용

3. 제품홍보 (2012년 6~)

- 관련 분야 전시회 및 학회 참가
- 연구 개발 결과 특허 출원 및 전문학술지 게재
- 대중매체(제주도 지역 신문 및 지역 방송 광고 게재)
- 관련 분야 잡지에 기술 내용 게재
- 양어장 현장 제품 시현회 실시

4. 제품 확대 적용

- 서,남해안 광어 양식장 확대 적용
- 조피볼락 및 참돔 양식장 확대 적용
- 다른 어병에 대한 효능 평가
- 해외 시장 진출 타진 (2012년~)

제 6 장 참고문헌

1. H.J.Small, *Journal of Invertebrate Pathology*, 90 (2005) 108-117.
2. Bassleer, G. (1983). *Uronema marinum*, a new and common parasite on tropical salt-water fishes. *Freshw. Mar. Aquar.*, 6: 14 & 78-79.
3. Cheung, P.J., Nigrelli, R.F. and Ruggieri, G.D. (1980). Studies on the morphology of *Uronema marinum* Dujardin (Ciliatea: Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes. *J. Fish. Dis.*, 3: 295-303.
4. Dragesco, A., Dragesco, J., Coste, F., Gasc, C., Romestand, B., Raymond, J.C. and Bouix, G. (1995).
5. *Philasterides dicentrarchi*, n. sp. (Ciliophora, Scuticociliata), a histophagous opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), a reared marine fish. *Eur. J. Protistol.*, 31: 327-340.
6. Dykova, I. and Figueras, A. (1994). Histopathological changes in turbot *Scophthalmus maximus* due to a histophagous ciliate. *Dis. Aquat. Org.*, 18: 5-9.
7. Iglesias, R., Parama, A., Alvarez, M.F., Leiro, J., Fernandez, J. and Sanmartin, M.L. (2001). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of Scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, 46: 47-55.
8. Iglesias, R., Paramá, A., Alvarez, M.F., Leiro, J., Ubeira, F.M. and Sanmartin, M.L. (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology*, 126: 125-134.
9. Jee, B.-Y., Kim, Y.-C. and Park, M. (2001). Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis. Aquat. Org.*, 47: 49-55.
10. Munday, B.L., O'Donoghue, P.J., Watts, M., Rough, K. and Hawkesford, T. (1997). Fatal encephalitis due to the scuticociliate *Uronema nigricans* in sea-caged, southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. *Dis. Aquat. Org.*, 30: 17-25.
11. Paramá, A., Iglesias, R., Alvarez, M.F., Leiro, J. and Sanmartin, M.L. (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Cilophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 217: 73-80.

12. Sterud, E., Hansen, M.K. and Mo, T.A. (2000). Systemic infection with Uronema-like ciliates in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). J. Fish. Dis., 23: 33-37.
13. Thompson, J.C. and Moewus, L. (1964). Miamiensis avidus n. g., n. sp., a marine facultative parasite in the ciliate order Hymenostomatida. J. Protozool., 11: 378-381.
14. 월간 KMI 수산동향 1-2월호 (2011) p22.
15. “제주도지역 넙치양식장의 스키테카증 발생동향” 2007년 한국어병학회지 (제20권 제2호)
16. "어류 질병 진단 및 치료 대책" 해양수산부 2001년 수산정책국장 강무현
17. “넙치 스키테카증의 발생 상황과 병리조직학적 관찰” 제주대학교 해양연구소 이창훈, 강용진, 하동수, 이영돈 국립수산과학원 (2001년)
18. “남해 양식산 넙치 치어에 기생한 스키테카 섬모충 동태 및 구제에 관하여” J. Fish Pathol., 10(1), 21-29 (1997) 최상덕, 김진만, 김성연, 조용철, 최광규, 양한춘
19. "키토산올리고당을 이용한 넙치 기생성 스키테카 섬모충 구충효과(약육에 의한 구충효과)" 한국키토산학회지 6(2), 47-52 (2001) 김정우, 유광재, 송현철, 김희경
20. Yoshinaga, T. and Nakazoe, J. "Isolation and in vitro cultivation of an unidentified ciliate causing scuticociliatosis in japanese flounder (*paralichthys olivaceus*). Kyobyu, 1993, 28: 131-134
21. Ototake, M. and Matsusato, T. "Notes on scuticociliata infection of cultured juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*." Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, 1978, 9, 65-68
22. Yoshimizu, M., Hyuuga, S., Oh, M. J., Ikoma, M., Kimura, T., Mori, T., Nomura, T. and Ezura, Y. "Scuticociliatida infection of cultured Hirame(*Paralichthys olivaceus*.)-Characteristics, drug sensitivity and pathogenecity of cultured scuticociliata" J. fish pathol., 1993, 6, 205-208.
23. “제주도지역 넙치양식장의 스키테카증 발생동향” J. Fish pathol., 20(1), 93 ~ 98 (2007) 진창남, 강현실, 문영건, 이창훈, 이영돈, 이제희, 송춘복, 허문수
24. “양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 분리된 스키테카 섬모충 *Philasterides dicentrarchi*의 병원성” J. Fish Pathol., 19(2) 87 ~ 97 (2006) 진창남, 강현실, 이창훈, 강선경, 이영돈, 이제희, 허문수
25. "Optimization of an inactivated vaccine against a scuticociliate parasite of turbot: Effect of antigen, formalin and adjuvant concentration on antibody response and protection against the pathogen" Aquaculture 278 (2008) 22 - 26 Jesús Lamas , Manuel L. Sanmartín , Ana I. Paramá , Rosario Castro , Santiago Cabaleiro , María V. Ruiz de Ocenda , Juan L. Barja ,

José Leiro, Spain

26. Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection, *Journal of Fish Diseases* 2008,
- 27, 135 - 140 M L Sanmartín, A Param, R Castro, S Cabaleiro, J Leiro, J Lamas and J L Barja Spain
28. S.M.Auerbach, K.A.Carrado, P.K.Dutta (Eds.), *Handbook of Layered Materials*, 2004.
29. A.Vaccari, *Appl. Clay Sci.* 14(1999)161 - 198.
30. B.K.G.Theng, *The Chemistry of Clay-Organic Reactions*, A Halsted Press Book, John Wiley and Sons, Inc., New York.
31. J.H.Yang, Y.S.Han, J.H.Choy, H.Tateyama, *J. Mater. Chem.* (2001) 1305 - 1312.
32. 진창남 등, *J. Aquaculture* Vol.20(2):106-113, 2007.

별첨1.

(1) 국내특허출원 [출원번호 10-2011-0063511 / 2011년 06.29]

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2011.06.29
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2011-0063511 (접수번호 1-1-2011-0495718-11)
출원인명칭 주식회사 나노스페이스(1-2004-040549-0)
발명자성명 한양수 윤주영 양재훈
발명의명칭 향스쿠티카총 복합체 조성물 및 이의 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
* 미국특허상표청의 출원일을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 출원인이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자격고환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-00000000, 상표등록출원 40-2010-00000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

(2) 층상형 무기화합물 담체를 이용한 항스쿠티카충 복합체 조성물의 제조방법
10-2011-0097994(2011.09.28)/(주)나노스페이스/한양수

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2011.09.28
특 기 사 항 심사청구(무) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2011-0097994 (접수번호 1-1-2011-0756179-01)
출 원 인 명 칭 주식회사 나노스페이스(1-2004-040549-0)
발 명 자 성 명 한양수
발 명 의 명 칭 층상형 무기화합물 담체를 이용한 항스쿠티카충 복합체 조성물의 제조 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교관허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

(3) 분말의 과립화 장치

10-2011-0098046(2011.09.28)/(주)나노스페이스/한양수, 윤주영

관 인 생 략

출원번호통지서

출원일자 2011.09.28
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
 출원번호 10-2011-0098046 (접수번호 1-1-2011-0756591-09)
 출원인명칭 주식회사 나노스페이스(1-2004-040549-0)
 발명자성명 한양수 윤주영
 발명의명칭 분말의 과립화 장치

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
 * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
 * 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

(4) 사료첨가제용 조성물 및 그 제조방법

10-2011-0103924(2011.10.12)/(주)나노스페이스/한양수

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2011.10.12
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
 출원번호 10-2011-0103924 (접수번호 1-1-2011-0795860-34)
 출원인명칭 주식회사 나노스페이스(1-2004-040549-0)
 발명자성명 한양수
 발명의명칭 사료첨가제용 조성물 및 그 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

별첨 2.

대한화학회 춘계학술대회 발표/2011년 4월 28~29 제주국제컨벤션센터 (ICC)

(1) 초록.

·발표자: 도 보 영 직위/직급(연구원) ·발표형식: 구두발표() 포스터발표(●)

A Simple Route to Intercalative Organo-Clay Nanocomposites

Bo-Young Do¹, Joo-Young Yoon¹, Chul Yeon Jung², Nam-Ho Lee³, Yang-Su Han¹

¹Nanomaterials Laboratory, Nanospace Co. Ltd.

²Changjo Biotech Co. Ltd.

³Department of Chemistry, Jeju National University

Intercalative layered nanocomposites of expandable clays (natural montmorillonite and synthetic hectorite) and alkylammonium molecules are prepared. In particular, a simple solid state intercalation route could be applied successfully to the preparation of layer nanocomposite. In the solid state process, alkylammonium molecules have a paraffin-like arrangement between silicate layers with the expansion of basal spacing as large as 40 Å. Additional weak Van Der Waals interaction plays an important role in the formation of paraffin-like stacking structure. Upon washing, some interlayered molecules adsorbed excessively are leached out, resulted in the decrease of basal spacing. The layer stacking structure of organo-clay composites formed by solid state process are discussed in detail according to the kind of clay, organic templates, template loading level, etc.

(2) 초록.

·발표자: 도 보 영 직위/직급(연구원) ·발표형식: 구두발표() 포스터발표(●)

Intercalative Nanocomposite for Essential Oil Delivery Support

Bo-Young Do¹, Chul Yeon Jung², Nam-Ho Lee³, JeHee Lee⁴, Yang-Su Han¹

¹Nanomaterials Laboratory, Nanospace Co. Ltd.

²Changjo Biotech Co. Ltd.

³Department of Chemistry, Jeju National University

⁴School of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University

Layered nanocomposite between alkylammonium surfactants and clay minerals have been applied as delivery support for hydrophobic essential oils such as *alpha*-pinene, camphene, etc. Inclusion of essential oils with high volatility and poor water solubility could be

achieved through the van der Waals interaction between hydrophobic oil molecules and surfactant chain. In particular, solid state intercalative process has been successfully applied in the preparation of intercalative nanocomposite including highly non-polar oil molecules. Hydrophobically modified interlayer clay spaces act as sorption site and stabilize unstable active ingredients.

(3) 초록.

·발표자: 최 민 아 직위/직급(연구원) ·발표형식: 구두발표() 포스터발표(●)

**Intercalative Nanocomposite between Cocamide DEA and Swellable Clay
by Solid State Process**

Min-A Choi¹, Ji-Ho Lee¹, Nam-Ho Lee², Yang-Su Han¹

¹Nanomaterials Laboratory, Nanospace Co. Ltd.

²Department of Chemistry, Jeju National University

Intercalative compound of cocamide DEA and clay minerals have been prepared by solution and solid state intercalation processes. In the solid state intercalation process, the CDEA molecules have paraffin-like double layer arrangement between the silicate layers with the expansion of the basal spacing as large as 44 Å. Weak van der Waals interaction plays an important role in the formation of organic-inorganic nanocomposite. Upon washing, however, the interlayered CDEA molecules are completely leached out when the interlayer cations Na⁺ or Ca²⁺. Even though the basal spacings of the CDEA and protonated clays complexes also decrease largely after washing, they exhibit distinct diffraction profiles at 13.5 Å, which can be assigned to the monolayer CDEA arrangement between the silicate layers. It is sure that the solid state intercalation reaction between protonated clays and CDEA seems to be occurred by an intralayer acid-base complexation between interlayered proton (H⁺) and basic ethanolamine functional groups.

(4) 초록.

·발표자: 강 영 주 직위/직급(연구원) ·발표형식: 구두발표() 포스터발표(●)

Preparation of New Zinc Pyrithione-Clay Nanocomposite

Young-Joo Kang, Yang-Su Han
Nanomaterials Laboratory, Nanospace Co. Ltd.

Zinc pyrithione is known for its use in treating dandruff and seborrheic dermatitis. It is the active ingredient in several anti-dandruff shampoos and preservatives. However, it has very low solubility and poor dispersion property in water and organic solvents. In the present study, a novel zinc pyrithione-clay nanocomposite was prepared by solid state reaction method to improve the solubility in aqueous and organic solvents. At first, micron-sized zinc pyrithione was mixed with alkylamines, and then melted to obtain clear liquid, followed by mixing and grinding with expandable clay, finally resulted in the zinc pyrithione-clay nanocomposite. The zinc pyrithione-clay nanocomposite shows remarkable swelling and dispersion property in organic solvents like benzene.

(6) 초록 : 대한화학회 추계 학술대회, 2011년 9월29~30 대전컨벤션센터

·발표자: 윤주영 직위/직급(책임연구원) ·발표형식: 구두발표() 포스터발표(●)

Essential Oil Containing Nanocomposite for the Treatment of Fish Parasitic Disease

**JooYoung Yoon¹, Jae-Hun Yang¹, Chul Yeon Jung², Nam-Ho Lee³, JeHee Lee⁴,
Yang-Su Han¹**

¹Nanomaterials Laboratory, Nanospace Co. Ltd.

²Changjo Biotech Co. Ltd.

³Department of Chemistry, Jeju National University

⁴School of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University

Layered nanocomposites between organically modified montmorillonite and *alpha*-pinene (C₁₀H₁₆) were prepared by the solid state intercalation method. Quaternary alkylammonium molecules were used as organic templates for interlayer adsorption of hydrophobic pinene molecules. Thus prepared intercalative nanocomposites were successfully applied to the treatment of fish parasitic disease, *Scuticociliatosis* in the cultured Oliver Flounder. Intercalation of the highly volatile *alpha*-pinene molecules between silicate layers is very helpful for suppress the volatile loss. The releasing rate of pinene molecules in seawater condition can be also controlled finely through the intercalative compounds. In addition the solubility of pinene in aqueous solution is greatly improved by the molecular level distribution between the silicate layers, resulted in the improvement of insecticidal activity of *alpha*-pinene.

(8) 초록 :대한화학회 춘계 학술대회, 2012년 4월25, KINTEX

·발표자: 윤주영 직위/직급(책임연구원) ·발표형식: 구두발표() 포스터발표(●)

Essential Oil Containing Nanocomposite for the Treatment of Fish Parasitic Disease

**JooYoung Yoon¹, Chul Yeon Jung², Nam-Ho Lee³, JeHee Lee²,
Yang-Su Han¹**

¹Nanomaterials Laboratory, Nanospace Co. Ltd.

²School of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University

³Department of Chemistry, Jeju National University

Layered nanocomposites between organically modified montmorillonite and *d*-Limonene ($C_{10}H_{16}$) were prepared by novel solid-solid reaction at room temperature. Cetyltrimethylammonium cation was used as interlayer modifier for adsorption of hydrophobic limonene molecules. The hydrophobic interactions between alkylammonium and the aromatic compound are thought to be the driving force for the solid-state intercalation. Thus prepared limonene containing intercalative nanocomposite exhibits a sustained-releasing property, which can be utilized in the treatment of fish parasitic disease, *Scuticocilliosis* in the cultured Oliver Flounder. The intercalative nanocomposite confers the advantages such as reducing volatile loss, improving solubility, reducing toxicity, controlled releasing, and facilitating the formulation of liquids into solid granules or powders, and providing for ease of handling, leading to the improvement of insecticidal activity of *d*-limonene.

- (1) Intercalative Nanocomposite between Cocamide DEA and Swellable Clay by Solid State Process, Yang-Su Han, Joo-Young Yoon, Ji-Ho Lee, Nam-Ho Lee, J.Phys.Chem.Solids (2012).



Intercalative Nanocomposite between Cocamide DEA and Swellable Clay by
Solid State Process

Yang-Su Han^{a,*}, Joo-Young Yoon, Ji-Ho Lee, Nam-Ho Lee^b

^aNanomaterials Laboratory, Nanospace Co. Ltd., Ansan, Gyeonggi 425-839, Korea

^bDepartment of Chemistry, Jeju National University, Ara-1, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

Coconut fatty acid diethanolamine (Cocamide-DEA, CDEA, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$) was intercalated into montmorillonite by solution and solid state reaction methods. In a typical solution process CDEA aqueous solution was mixed with montmorillonite (Kunipia F) aqueous suspension, which resulted in a CDEA-montmorillonite layer complex with a basal spacing of 13.8 Å. A CDEA-montmorillonite complex was also easily prepared by solid-solid reaction method. The mixture of CDEA and Na-montmorillonite was ground under ambient temperature. The basal spacing of the mixture increased up to ~44 Å after grinding for 30 min. Upon washing the basal spacing decreased to ~10 Å close to that of pristine Na-montmorillonite due to the deintercalation of CDEA molecules. While the basal spacing of the CDEA-montmorillonite composite starting from protonated montmorillonite (H⁺-mont.) decreased to 13.5 Å upon washing, indicating the parallel monolayer arrangement of CDEA molecule between silicate layers. This finding strongly suggested that an acid-base intralayer complexation is responsible for the solid state intercalation reaction.

Keywords: A. Cocamide-DEA; B. Montmorillonite; C. Intercalation; D. X-ray diffraction; E. Nanocomposite

1. Introduction

Layered inorganic compounds such as layered aluminosilicates and layered double hydroxides have so much attention to many scientists due to their cationic and anionic exchange properties and bio-compatibility. Due to the diverse intercalation properties, they have been widely applied to catalysts and catalyst adsorbents, and inorganic functional additives, and layered nanoparticles for polymeric nanocomposites. [1-3] In recent, these intercalative layered compounds with functional bio-molecules between the layers are applied for drug or active ingredient delivery systems, and the fields in which the stabilization, solubilization, and slow release function are necessary. [4-8]

On the other hand, so-called solid-solid reactions, which occur between powders in the solid-state, have attracted much attention from the viewpoint of not only reaction kinetics but also their industrial applications. [9-11] In addition, solid-solid

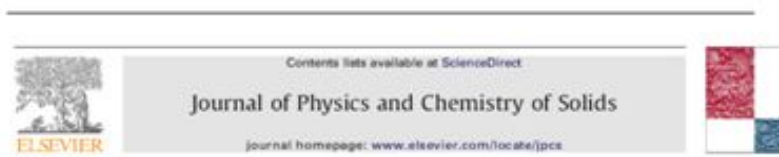
*Corresponding author. Tel.: +82-31-3108532; fax: +82-31-3108533.
E-mail address: yshan@nanospace.com (Y.S.Han).

reactions have possibility to prepare compounds not accessible from solutions [12]. Nevertheless, very little is known about the mechanism and factors controlling the solid-solid reactions. Therefore, further studies on the solid-state ion exchange reactions are of great importance from both theoretical and practical viewpoints. In this study, we report the novel solid-state intercalation reactions between coconut fatty acid diethanolamine (Cocamide-DEA, CDEA), acting as environmentally-friendly biomodifier, and homoionic montmorillonite. Attention has mainly been paid for the comparison of the kind of the interlayer cations on the solid-state intercalation.

2. Experimentals

In order to prepare cocamide-DEA-montmorillonite hybrids, we used the conventional intercalation reaction method and a

- (2) alpha-Pinene containing layer nanocomposite for the treatment of fish parasitic disease, Yang-Su Han, Joo-Young Yoon, Nam-Ho Lee, Chol-Yeon Jung, Je-Hee Lee, J.Phys.Chem.Solids (2012)



alpha-Pinene Containing Layer Nanocomposite for the Treatment of Fish Parasitic Disease

Yang-Su Han^{a,*}, Joo-Young Yoon^a, Nam-Ho Lee^b, Chul-Yeon Jung^c, Je-Hee Lee^c

^aNanomaterials Laboratory, Nanospace Co. Ltd., Ansan, Gyeonggi 425-839, Korea

^bDepartment of Chemistry, Jeju National University, Ara-1, Jeju 690-756, Korea

^cSchool of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Ara-1, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

Layered nanocomposite between organically modified montmorillonite and *alpha*-pinene (C₁₀H₁₆) was prepared by novel solid-solid reaction at room temperature. Cetyltrimethylammonium cation was used as interlayer modifier for adsorption of hydrophobic pinene molecules. The hydrophobic interactions between alkylammonium and the aromatic terpenoid compound are thought to be the driving force for the solid-state intercalation. Thus prepared pinene containing intercalative nanocomposite exhibits a sustained-releasing property, which can be utilized in the treatment of fish parasitic disease, *Scuticocilliatosis* in the cultured Olive Flounder. The intercalative nanocomposite confers the advantages such as reducing volatile loss, improving solubility, reducing toxicity, controlled releasing, and facilitating the formulation of liquids into solid granules or powders, and providing for ease of handling, leading to the improvement of insecticidal activity of *alpha*-pinene.

Keywords: A. Intercalation; B. Montmorillonite; C. *alpha*-Pinene; D. *Scuticocilliatosis*; E. Sustained release

1. Introduction

Among the various materials proposed as pesticide carriers in controlled releasing formulations, recently there has been a renewed interest in the use of natural clays. [1-3] Clays have unique properties, such as their high specific surface areas associated with their small particle size, low cost and ubiquitous occurrence in most soil and sediment environments. In addition, the possibility exists to selectively modify clay mineral surfaces, for instance, through the incorporation of large organic cations in the interlayer, to improve their adsorption capacity for selected pesticides, and to control the desorption rate once added to the environment. [4-8] If clay mineral has metal cations in the cation exchange sites, its surface is hydrophilic and is often not a good adsorbent for

poorly water-soluble organics species which cannot compete with highly polar water for adsorption on the clay mineral surface. However, when the interlayer metal cations are replaced by organoammonium cations, the surfaces of the clays are greatly modified to become strongly organophilic property. Various organoammonium exchanged clays have been synthesized, and the properties and applications have been investigated as so-called "organoclays". These hybrid compounds can be applied for drug or active ingredient delivery systems and the fields where the stabilization, solubilization, and slow release function are necessary. [9-14]

On the other hand, α -pinene (2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-2-ene) (Fig.1) is a monoterpene compound that is contained in pine tree in high concentration.[15] Recently, the

*Corresponding author. Tel.: +82-31-3108532; fax: +82-31-3108533; E-mail address: yshas@nanospace.com (Y.S.Han).