

어젠다코드	4 - 16 - 57		수행시기	전반기 (계속)	
기술분야코드	V2	기술유형코드	P01	작목구분코드	LP-04-4150
과제종류	농업공동연구		세세부사업	가축질병 사전예방 기술개발	
연구과제 및 세부과제			수행기간	과제책임자 및 세부책임자	
항생제 대체제를 이용한 육계의 장염 발생 및 치료 기술 개발			'11~'13	전북대학교	장형관
3) 육계 장염 발생 예방을 위한 항생제대체제 선발 및 대량생산체계 구축			'11~'13	인삼약초연구소	이광재
책임용어	육계, 장염, 콕시듐, 항생제대체제				

ABSTRACT

Clostridium perfringens is a gram-positive, spore-forming and anaerobic bacterium which is widely found in the food and intestinal tract of human and animal. *C. perfringens* can cause diarrhea and abdominal pain in human and necrotic enteritis, enterotoxemia and hemorrhagic gastroenteritis in animal due to several exotoxins of *C. perfringens*. e.g. A type α -toxin, B type α , β , ϵ and C type α , β . This study was carried out to search antibiotic alternative against *C. perfringens* from plant resources and evaluate efficacy of antibiotic alternative according to the experiment method. 15 kinds of plant extracts had antimicrobial activity against *C. perfringens* and MIC of *Castanea crenata*, *Ailanthus altissima*, *Fraxinus rhynchophylla*, *Aster pilosus*, *Agastache rugosa*, *Patrinia scabiosaeifolia*, *Ampelopsis brevipedunculata* and *Geranium koreanum* were 1.02mg, 1.02mg, 0.10mg, 0.99mg, 1.06mg, 0.93mg and 0.10mg, respectively. Ethanol extract of *F. rhynchophylla* and *G. koreanum* suppressed growth of *C. perfringens* in a dose-dependent manner as well as salinomycin. Although 0.01mg/mL of *F. rhynchophylla* and *G. koreanum* extract did not affect growth of *C. perfringens*, absorbances of broth treated with 0.1 and 1mg/mL of *F. rhynchophylla* and *G. koreanum* extract were decreased compared to non-treated group. At a concentration of 0.1mg/mL, ethanolic extract of *F. rhynchophylla* inhibited growth of *C. perfringens* about 81.8% compared with control while 1.0mg/mL of *G. koreanum* extract inhibited the growth of *C. perfringens* about 68.8%. Moreover, ethanol extract of *F. rhynchophylla* and *G. koreanum* stimulated the growth of *B. bifidum* about 5~20% compared with control after treated with the extract for 24~72 hours. Antimicrobial activity of *F. rhynchophylla* and *G. koreanum* extract were not altered after heated at 100°C for 60 minutes and sustained in wide range of pH. These results suggested that *F. rhynchophylla* and *G. koreanum* extract could be used as natural source for the development of antibiotics alternative.

1. 연구목표

국내 육계농장에서 발생하는 장염은 콕시듐과의 복합적인 감염이 대부분을 차지하고 있으며 장염으로 인한 주된 피해는 증체율 감소 및 폐사율 증가로 나타나고 있으며, 육계산업에서 심각한 피해를 발생시키는 이러한 장염을 극복하기 위한 대안으로 적절한 항생제대체제의 선발과 적용이 하나의 방안으로 제시되고 있다(Songer, 1996, Petit et al., 1999, Yim et al., 2011). 이에 따라 항생제를 대체할 수 있는 천연물 소재 대체제들의 수요가 늘고 있으며 국내에서도 수입 또는 자체 개발된 미네랄제제, 생균제, 유기산제, 식물추출물 및 면역증강제 등이 보급되고 있으나, 이에 대한 활용방법이나 기술이 확립되지 않아 일반 농가에서 크게 환영받지 못하고 있는 실정이다. 따라서, 이들 항생제 대체제에 대한 정확한 효능 규명 및 작용기전과 이들에 대한 활용방법을 확립하여 일반 농가가 안심하고 항생제 대체제를 사용할 수 있도록 관련 연구가 필요하며, 이를 통해 관련 산업의 새로운 아이템 개발과 시장점유율 향상 및 농가소득 증대에 크게 기여하게 될 것이다.

2. 재료 및 방법

가. 항생제대체제 후보물질 종류에 따른 스크리닝법 구축

항생제대체제 선발 및 항균시험법 구축을 위해 밤나무 등 30종의 후보자원을 선발하여 추출물을 제조하였다(표 1). 추출물은 각 식물의 건조시료 100g을 에탄올 2L가 담겨있는 5L의 삼각플라스크에 넣고 100rpm의 속도로 24시간 동안 교반하여 2회 반복 추출한 다음, 여과지가 깔려있는 깔때기를 통과시켜 잔재물을 제거하고 rotary vacuum evaporator를 이용하여 완전 농축한 후, 농축물을 동결건조기를 이용하여 건조시켜 -20℃에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다(Lee & Shin, 1991). 육계장염 원인균인 *C. perfringens*에 대한 항균활성을 가지는 식물추출물을 선발하기 위하여 전북대학교에서 분양받은 *C. perfringens*(type C)균주를 대상으로 항균활성 정도를 측정하였다.

표 1. 후보물질(식물추출물) 종류

일련번호	일반명	학명
P1	밤나무	<i>Castanea crenata</i> Siebold & Zucc.
P2	땅두릅	<i>Aralia cordata</i> Thunb.
P3	기린초	<i>Sedum kamtschaticum</i> Fisch. & Mey.
P4	가래나무	<i>Castanea crenata</i> Siebold & Zucc.
P5	방풍	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schisikin
P6	물엉겅퀴	<i>Cirsium nipponicum</i> (Maxim.) Makino
P7	기린초	<i>Sedum kamtschaticum</i> Fisch. & Mey.
P8	가죽나무	<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle
P9	물푸레	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hance
P10	땅두릅	<i>Aralia cordata</i> Thunb.
P11	미국쑥부쟁이	<i>Aster pilosus</i> Willd.
P12	마타리	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.
P13	느릅나무	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> (Rehder) Nakai

일련번호	일반명	학명
P14	개나래나무	<i>Actinidia polygama</i> (Siebold & Zucc.) Planch
P15	배초향	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. & Mey.) Kuntze
P16	미나리	<i>Oenanthe javanica</i> (Blume) DC.
P17	마타리	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.
P18	다래나무	<i>Actinidia arguta</i> (Siebold & Zucc.) Planch
P19	개머루	<i>Ampelopsis brevipedunculata</i> (Maxim.) Trautv.
P20	마타리	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.
P21	돌단풍	<i>Aceriphyllum rossii</i> (Oliv.) Engl.
P22	땀무	<i>Geum japonicum</i> Thunb.
P23	비타민나무	<i>Hippophae rhamnoides</i> L.
P24	만병초	<i>Rhododendron brachycarpum</i> D.Don ex G.Don
P25	둥근이질풀	<i>Geranium koreanum</i> Kom.
P26	고사리	<i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>latiusculum</i> (Desv.)
P27	병꽃나무	<i>Weigela subsessilis</i> L.H.Bailey
P28	만병초	<i>Rhododendron brachycarpum</i> D.Don ex G.Don
P29	고추냉이	<i>Wasabia japonica</i> (Miq.) Matsum.
P30	붉나무	<i>Rhus javanica</i> L.

(1) 육계 장염 원인 병원체 (*C. perfringens*와 *Eimeria*)의 항균력 평가

항생제대체제 효능평가기법 중 항균시험법 구축을 위해서 액체배지희석법(broth dilution method)으로 항균활성을 측정하여 디스크확산법으로 측정한 항균활성 결과와 비교하였으며, 식물추출물의 장내유익균 비피도박테리움군에 대한 생육억제정도를 조사하였다(Choi et al., 2007, Kim & Shin, 2002).

(2) 후보물질 면역증강 효능평가

식물추출물의 면역증진 효능평가기법 구축을 위해 30종의 식물추출물을 대상으로 NO(nitric oxide) 생성능을 측정하였다. NO 생성량 측정을 위해 RAW264.7 세포주를 96 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음 각각의 추출물을 최종 100µg/mL의 농도가 되도록 처리하여 24시간 배양 후 NO 생성량을 확인하였다(Wang et al., 2007).

세포 증식능 시험은 면역세포 (B, T cell)를 이용하여 증식능을 측정하였다. 면역세포에 각각의 식물추출물을 처리하여 24시간 동안 배양 후, 증식 정도를 MTT assay를 통해 분석하였다(Carimichael et al., 1987, Lee et al., 2003).

(3) 항염증 효능평가

항생제 대체제의 염증예방 및 치료효능 평가기법 확립을 위해 식물추출물을 이용하여 NO, IL-1β 생성억제능을 측정하였으며, 동물시험을 수행하여 식물추출물의 효능을 평가하였다.

(4) 후보물질의 생리활성(간기능, 장기능, 신장기능 등) 효능평가

항생제대체제의 간보호 효능 평가기법 확립을 위해 간독성 동물모델을 제작한 후 시험물질의 효능을 분석하여 시험방법별 효능을 비교하였다. 간독성은 acetaminophen과 D-galactosamin

을 이용하여 유발하였으며 대조물질로는 실리마린을 투여하였고, 시험물질은 잔대추출물을 사용하였다(Park et al., 2008, Lee et al., 2010). 대조물질과 시험물질을 투여그룹에 따라 25~1,000mg/kg 용량으로 1주일 동안 투여한 후 300~400mg/kg 용량의 아세트아미노펜 및 갈락토사민을 복강 투여하여 간독성을 유발시킨 후 시험물질의 효능을 평가하였다.

(5) 마우스모델에서의 항생제 대체제 효능 평가

식물추출물, MCFA 등 항생제 대체제 종류별 효능평가를 위해 가래나무 추출물 등 5종 시료의 면역증진효능을 평가하였다(표 2). Balb/c 마우스를 이용하여 각각의 시료를 4주 간 급이한 후 체중변화, 장기중량 및 비장세포 표면항원을 분석하여 효능을 비교, 평가하였다.

표 2. 항생제대체제 종류별 면역증진 효능평가

구분	N	T1	T2	T3	T4	T5
시험군	정상군	β -glucan	caproic acid	lauric acid	가래나무 추출물	가죽나무 추출물
처리농도	-	0.01%			0.1%	

* Balb/c, 4주 급이

나. 물푸레나무, 등근이질풀 추출물 항균활성 및 prebiotic 효능 검증

항생제대체제 후보자원으로 선발된 물푸레나무 및 등근이질풀 추출물의 시간별, 농도별 항균활성 및 prebiotic 효능을 검증하였다.

다. 항생제대체제 유망소재 효능평가 및 후보물질 공급

(1) 항생제대체제 유망소재 안정성 검증

(가) 산도 및 열 안정성 검증

항생제 대체제 후보자원으로 선발한 물푸레나무 추출물과 등근이질풀 추출물의 가공적성을 알아보기 위하여 각각의 추출물을 강산, 강염기 또는 고온조건에 노출시킨 후 산도 및 열안정성을 조사하였다.

(나) 효능 평가 및 활성 우수 대체제 선발

등근이질풀 추출물의 효능평가를 위해 등근이질풀 추출물을 0.5%~1.0% 수준으로 사료에 첨가하여 4주 동안 급이하였다.

라. 항생제대체제 대량생산체제 구축

선발한 항생제 대체제의 목적동물(육계)에서의 효능평가를 위해 물푸레나무 및 등근이질풀을 수집하여 에탄올 추출물을 제조하였으며 항생제대체제 효능시험을 위한 후보물질로 공급하였다. 물푸레나무는 전국에 걸쳐 분포하는 목본식물로 껍질은 진피라 불리며 민간의약 또는 한약재로 유통되고 있어 손쉽게 대량 확보가 가능한 재료이며, 등근이질풀은 초본식물로 전국의 산야에 자생하며, 종자 번식 또는 포기나누기를 통해 재배가 가능하다.

3. 결과 및 고찰

가. 항생제 대체체 후보 물질 종류에 따른 스크리닝법 구축

디스크 확산법(paper disc diffusion method)으로 항균활성을 측정한 결과, 밤나무 추출물을 포함한 15종의 추출물이 *C. perfringens*(type C)의 생육을 억제하는 활성을 가지고 있음을 확인하였다 (표 3).

표 3. *C. perfringens* (type C)에 대한 항균 활성

NO.	Antimicrobial activity	NO.	Antimicrobial activity
P1	+	P16	ND
P2	ND*	P17	+
P3	ND	P18	ND
P4	+	P19	++
P5	ND	P20	+
P6	+	P21	+
P7	+	P22	ND
P8	+	P23	ND
P9	+++	P24	++
P10	+	P25	+++
P11	ND	P26	ND
P12	ND	P27	ND
P13	+	P28	ND
P14	ND	P29	ND
P15	ND	P30	ND

* ND : not detected

** Concentration : 10mg/mL, +<3.0mm, 3.0mm<+<5.0mm, 5.0mm<+++

(1) 육계 장염 원인 병원체(*C. perfringens*와 *Eimeria*)의 항균력 평가

액체배지 희석법으로 식물추출물의 항균활성을 측정한 결과, 8종의 식물추출물이 장내유익균인 비피도박테리움균의 성장에는 영향을 미치지 않으면서 클로스트리디움 병원균의 성장을 억제하는 활성을 가지고 있음을 확인하였다 (표 4).

장내유익균인 비피도박테리움균의 성장에는 영향을 미치지 않으면서 클로스트리디움 병원균의 성장은 억제하는 활성을 가지고 있는 식물추출물 8종의 최소억제농도(minimal inhibitory concentrations, MICs)를 측정한 결과, 물푸레나무 추출물과 둥근이질풀 추출물의 MIC 값이 0.10mg으로 가장 우수하였으며, 그 외의 추출물은 0.93~1.06mg으로 조사되었다(표 5).

표 4. *C. perfringens*(type A, C) 항균활성 및 장내유익균(*Bifidobacterium bifidum*) 억제 활성 탐색 (Broth dilution method)

Sample NO.	<i>B. bifidum</i> 억제율(%)	<i>C. perfringens</i> type C 억제율(%)	<i>C. perfringens</i> type A 억제율(%)
P1	8.9±1.8	96.5±0.1	98.4±1.3
P2	10.4±1.5	27.9±2.6	97.0±0.1
P3	ND	ND	128.0±2.0
P4	100.0±0.5	99.6±3.5	92.6±1.9
P5	ND	9.8±0.5	97.2±1.0
P6	ND	4.4±3.32	46.8±2.1
P7	37.5±4.7	99.5±1.8	92.5±4.3
P8	ND	98.4±0.9	98.7±2.1
P9	ND	109.7±1.9	88.9±1.8
P10	48.2±0.3	101.7±1.6	92.6±5.9
P11	ND	100.3±0.4	98.9±1.4
P12	13.5±8.5	0.2±2.3	100.1±3.9
P13	ND	ND	93.8±3.9
P14	ND	ND	105.6±4.5
P15	ND	98.7±0.0	101.5±0.7
P16	12.1±0.9	4.3±0.7	0.2±3.7
P17	10.6±1.9	96.0±12.0	94.6±3.0
P18	20.6±2.2	98.0±1.0	93.3±1.3
P19	ND	99.4±0.9	106.9±0.0
P20	66.6±1.6	99.5±0.8	98.4±1.3
P21	100.0±1.0	100.0±0.0	92.6±1.8
P22	33.8±2.6	93.7±2.9	98.2±1.1
P23	43.4±1.0	97.8±2.4	90.8±2.0
P24	57.1±2.2	100.0±0.5	100.6±0.3
P25	ND	102.8±1.2	103.9±1.5
P26	ND	ND	1.0±0.1
P27	ND	45.2±0.5	94.3±0.5
P28	4.1±2.6	56.7±3.8	100.1±1.8
P29	ND	ND	ND
P30	ND	ND	90.0±9.8

* Concentration : 1mg/mL

** ND : not detected

표 5. 8종 식물 추출물의 MIC

NO.	p1	p8	p9	p11	p15	p17	p19	p25
MIC (mg)	1.02	1.02	0.10	1.01	0.99	1.06	0.93	0.10

* *C. perfringens* type A

** Broth dilution method

디스크확산법을 이용한 *C. perfringens* type C 항균활성 검정결과, 30종 추출물 중 15종의 추출물의 항균활성을 확인할 수 있었으며, 액체배지 희석법(broth dilution method)을 이용하여 *C. perfringens* type C 병원균에 대한 항균활성 측정결과, 30종 추출물 중 17종의 추출물의 항균활성을 확인하였다. *C. perfringens* type A 병원균에는 30종 추출물 중 3종을 제외하고 항균활성이 우수한 것으로 조사되었다.

두 종류의 시험법에 따른 항균활성 시험결과, 전체적인 항균 활성값은 유사하였으나, P6, P13 추출물은 디스크확산법을 이용한 실험에서만 활성을 보였고, P11, P18, P22, P23 추출물은 액체배지 희석법을 이용한 시험에서만 활성이 나타나는 등 특정 식물추출물에서는 시험 방법에 따라 항균활성에 차이가 있음을 확인하였다. 액체배지 희석법을 이용한 시험에서는 항균활성을 나타낸 대부분의 시료가 처리농도 1mg에서 90% 이상의 병원균 생육억제 활성을 보여 디스크확산법보다 감도가 우수한 것으로 나타났으며, 또한 항균소재 선발 시 병원균에 대한 항균활성 뿐 아니라 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*와 같은 유익균에 대한 영향까지 조사해야 할 것으로 판단된다.

(2) 후보물질 면역증강 효능 평가

식물자원의 면역활성 평가를 위해 식물추출물 30종의 nitric oxide 생성능 측정 결과, 9종의 식물추출물이 대조구인 LPS 처리구보다 NO생성량이 많은 것으로 분석되었으나 (그림 1A), 추출물 고유 색깔에 의한 간섭효과에 의한 오차 값이 큰 것으로 추정되며 데이터 신뢰도가 낮아 NO 생성량 단독 값으로는 식물 추출물의 면역활성 검정 시 적용이 곤란할 것으로 판단된다. 이러한 점을 보완하기 위해 각 식물추출물의 TNF- α 생성량을 측정하였다. TNF- α 는 일련의 면역반응에 관여하는 인자로 TNF- α 생성량 측정은 ELISA법을 이용하였으며 본 시험에서 사용된 NO 측정법과는 달리 추출물 고유의 색깔에 영향을 받지 않아 좀 더 신뢰도가 높은 실험법으로 사료된다. TNF- α 생성량 측정결과, P1, P5, P7 및 P8 추출물이 TNF- α 생성을 증가시키는 활성을 가지고 있었다 (그림 1B).

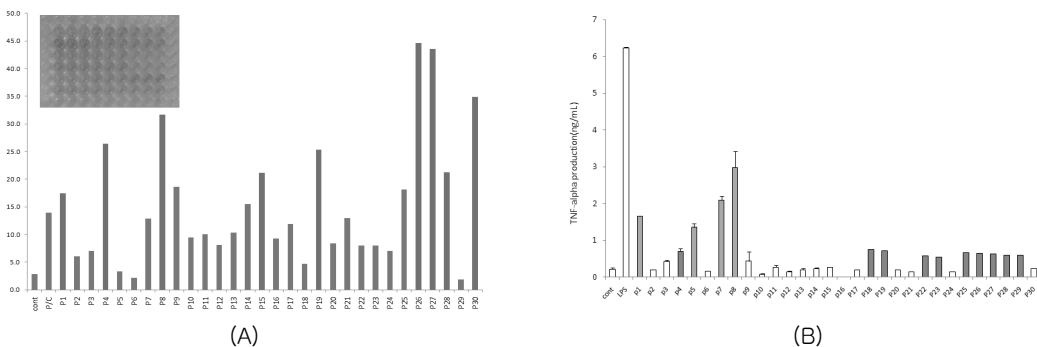


그림 1. 식물추출물의 NO 생성능(A) 및 TNF- α 생성능(B)

면역세포 (B, T cell)를 이용하여 증식능을 측정하고, 증식 정도를 MTT assay를 통해 분석한 결과, P4, P7, P21 및 P30 등 4종류의 식물추출물은 B cell과 T cell의 생육을 동시에 촉진시키는 활성을 가지고 있었으며, P23과 P29 추출물은 B cell 생육만을 촉진시키는 활성을 가지고 있었고(그림 2A) P8, P22, P25 및 P28 등 4종의 추출물은 T cell의 생육만을 촉진시켰다 (그림 2B).

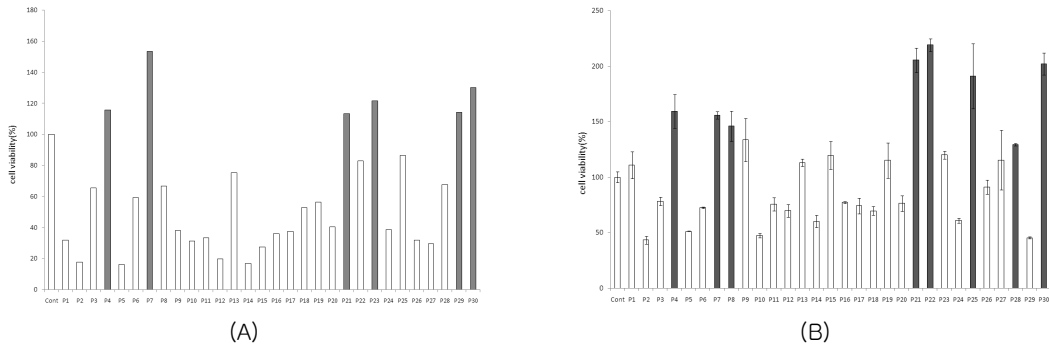


그림 2. 식물추출물의 B cell (A) 및 T cell 증식능 (B)

(3) 항염증 효능평가

항생제 대체제의 염증예방 및 치료효능 평가기법 확립을 위해 식물추출물을 이용하여 NO, IL-1 β 생성억제능을 측정한 결과, NO는 염증반응과 밀접한 관련이 있는 물질로 해당화 및 달맞이꽃 추출물은 0.1~1.0mg/mL의 농도에서 LPS에 의한 NO의 생성을 억제하는 활성을 가지고 있었다 (그림 3A). 면역증진 효능평가기법 확립을 위한 NO 생성능 시험결과와 같이 추출물 고유색깔에 의한 간섭현상을 고려하여, ELISA 방법에 의한 IL-1 β 생성억제능 시험을 추가로 실시하였으며 시험결과, 추출물에 의한 간섭현상이 NO 측정 시 나타났음을 확인하였다 (그림 3-B). 이와 같은 결과는 염증예방 및 치료효능평가를 위한 기내시험 (*in vitro*) 시 2가지 이상의 실험을 실시하여 결과를 비교 분석한 후 효능을 평가해야 한다는 것을 시사한다.

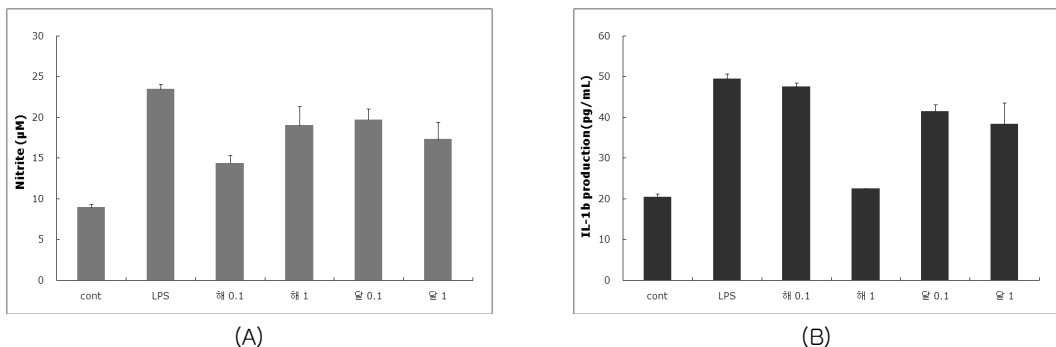


그림 3. 해당화, 달맞이꽃 추출물의 NO (A) 및 IL-1 β (B) 생성억제능

또한, 동물시험을 수행하여 식물추출물의 효능을 평가한 결과, TPA는 염증을 유발하는 물질로 마우스 귀에 TPA 도포 시 귀의 두께가 $453.3 \pm 77.6\mu\text{m}$ 로 정상군 대비 2.5배 증가하였다 (표 6). 그러나, 달맞이꽃 추출물 또는 해당화 추출물을 TPA와 동시에 도포 시 TPA에 의한 귀 부종은 달맞이꽃추출물이 33.8~37.0% 경감효과를 나타냈으며, 해당화추출물은 양성대조군 대비 18.8~34.9%의 경감효과를 나타냈다(그림 4). 대조물질로 사용한 인도메타신의 경감율이 37.9%임을 감안하면 달맞이꽃 추출물과 해당화 추출물이 우수한 항염활성을 가지고 있는 것으로 추정된다. 또한 항생제 대체제의 항염 효능평가 시 *in vitro* 및 *in vivo* 시험을 통해 항생제대체제의 효능을 교차 확인한 후 우수대체제를 선발하는 것이 필요할 것이라 판단된다.

표 6. 해당화, 달맞이꽃 추출물의 염증경감 효능 검정 (*in vivo*)

실험군	농도	Thickness (μm)
Normal	-	200.0 ± 7.8
Control	-	453.3 ± 77.6
달맞이꽃(T1)	100mg/mL	285.7 ± 21.8
달맞이꽃(T2)	500mg/mL	300.3 ± 39.4
해당화(T3)	100mg/mL	368.3 ± 5.8
해당화(T4)	500mg/mL	295.0 ± 18.0
Indomethacin	25mg/mL	281.7 ± 2.9

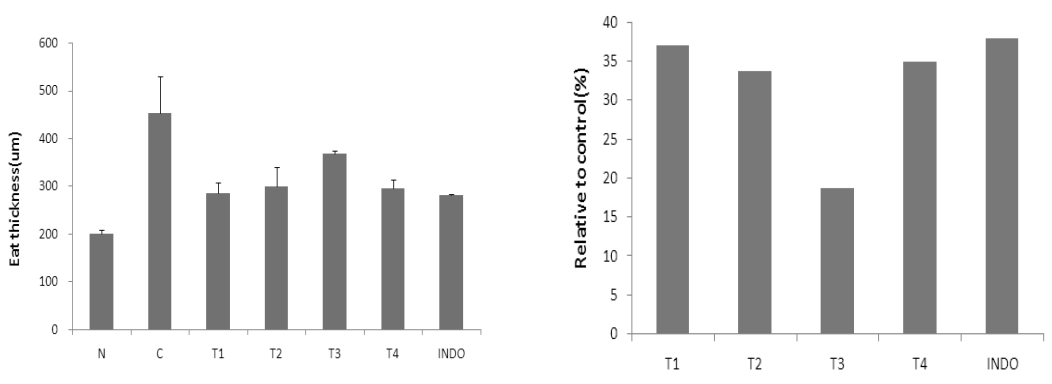


그림 4. TPA에 의해 유도된 마우스 귀 부종 경감 효과

(4) 후보물질의 생리 활성(간기능, 장기능, 신장기능 등) 효능 평가

항생제대체제의 간 보호효능 평가기법 확립을 위해 간독성 동물모델을 제작한 후 시험물질의 효능을 분석하여 시험방법별 효능을 비교한 결과, 양성대조군의 GOT, GPT수치가 정상군보다 2배 이상 상승하여 약물에 의해 간독성이 정상적으로 유발되었음을 확인하였으며, 간독성 유발 시 신장에는 영향을 미치지 아니 하였고 간 조직의 무게도 큰 차이가 나타나지

않았다 (그림 5, 6). 대조물질로 사용한 실리마린은 GOT, GPT가 정상군 수준으로 나타나 간 보호효능이 우수한 것을 다시 한 번 알 수 있었다(그림 5). 잔대추출물은 간 보호효능이 우수한 것으로 이미 알려져 있는 실리마린에 비해 효능은 조금 못 미치나 농도 의존적으로 GOT 및 GPT 상승을 억제하였으며 추출물임을 고려할 때 간 보호물질로의 개발 가능성이 있는 것으로 판단된다.

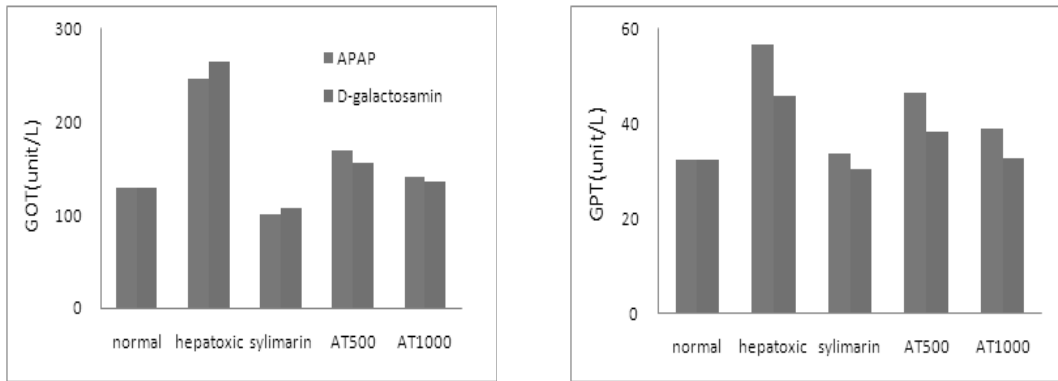


그림 5. 시험방법별 GOT, GPT 변화

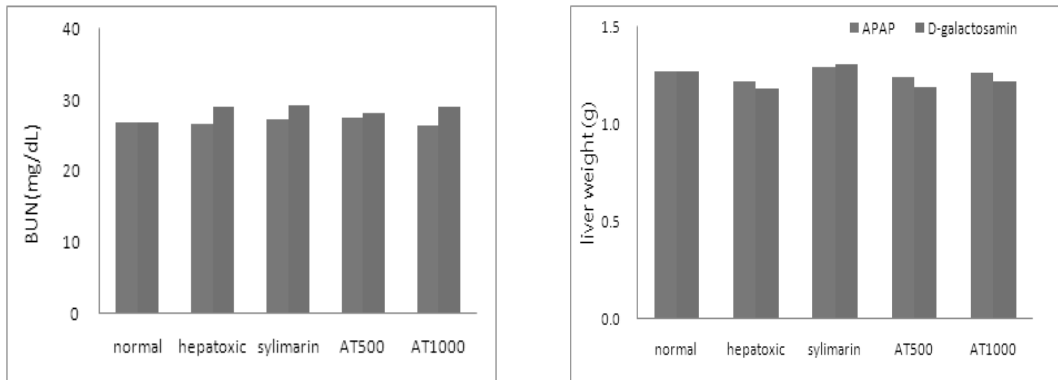


그림 6. 시험방법별 BUN, 장기중량(간무게) 변화

(5) 마우스모델에서의 항생제 대체제 효능 평가

(가) 시험군별 체중변화 및 장기중량

4주 동안의 시험시료 급여기간 중 체중은 각 시험군 간에 큰차이를 나타내지 않았다 (그림 7A). 시험 종료 후 부검을 실시하여 장기중량을 조사한 결과, 신장, 비장 중량은 모든 시험군에서 큰 차이를 나타내지 않았으며 간 중량은 lauric acid 투여군, 가래나무 추출물 투여군 및 가죽나무 추출물 투여군에서 정상군에 비해 다소 낮았으나 차이는 미미하였다 (그림 7B).

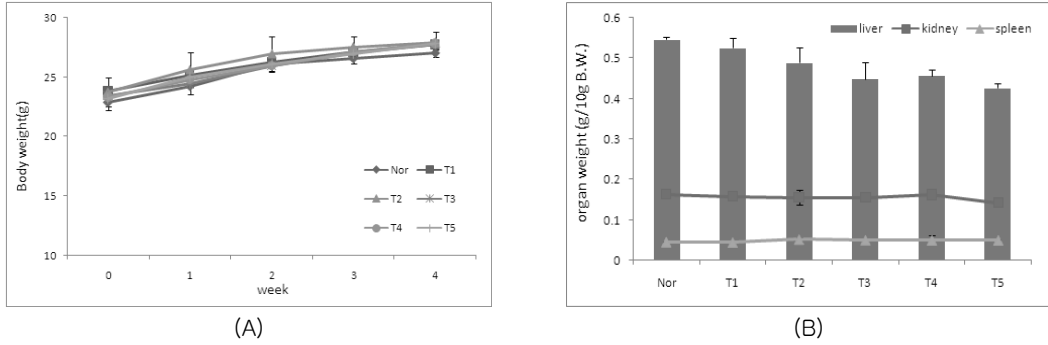
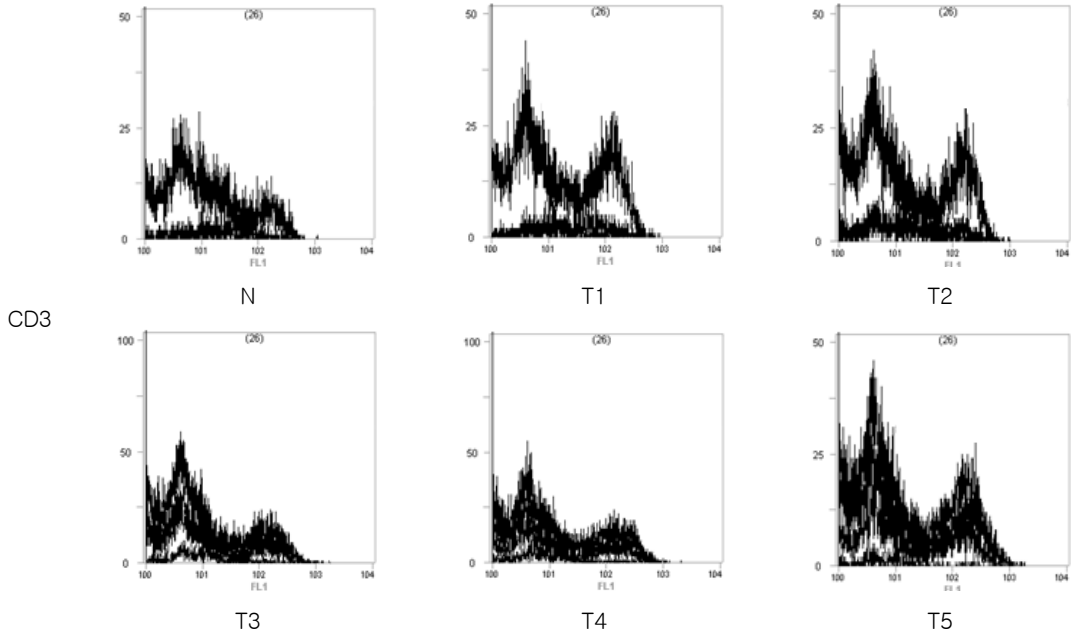


그림 7. 시험군별 체중변화 및 장기중량

(나) 비장세포 표면항원 분석

각 시료의 면역증진효능 평가를 위해 비장을 적출하여 비장세포 표면항원을 flow cytometer를 이용하여 분석하였다(Sharon et al., 2004). 효능평가는 T cell과 B cell 표면의 특이적 항원인 CD3, CD19를 비장 내 T cell, B cell population을 측정하는 면역증진효능의 지표로 이용하였으며 측정결과, 정상군과 비교 시 모든 시험군에서 T cell population 증가한 것으로 나타나 시험에 이용된 모든 시료가 세포성 면역반응을 증진시키는 효능을 가지고 있는 것으로 추정된다. CD19항원 측정을 통한 B cell population 측정결과, B cell population은 T1~T4 시험군에서는 증가하였으나 T5 시험군은 정상군과 유사한 것으로 분석되었으며, 이는 가죽나무 추출물을 제외한 4종의 시료가 체액성 면역반응을 증진시키는 효능도 가지고 있음을 시사한다 (그림 8).



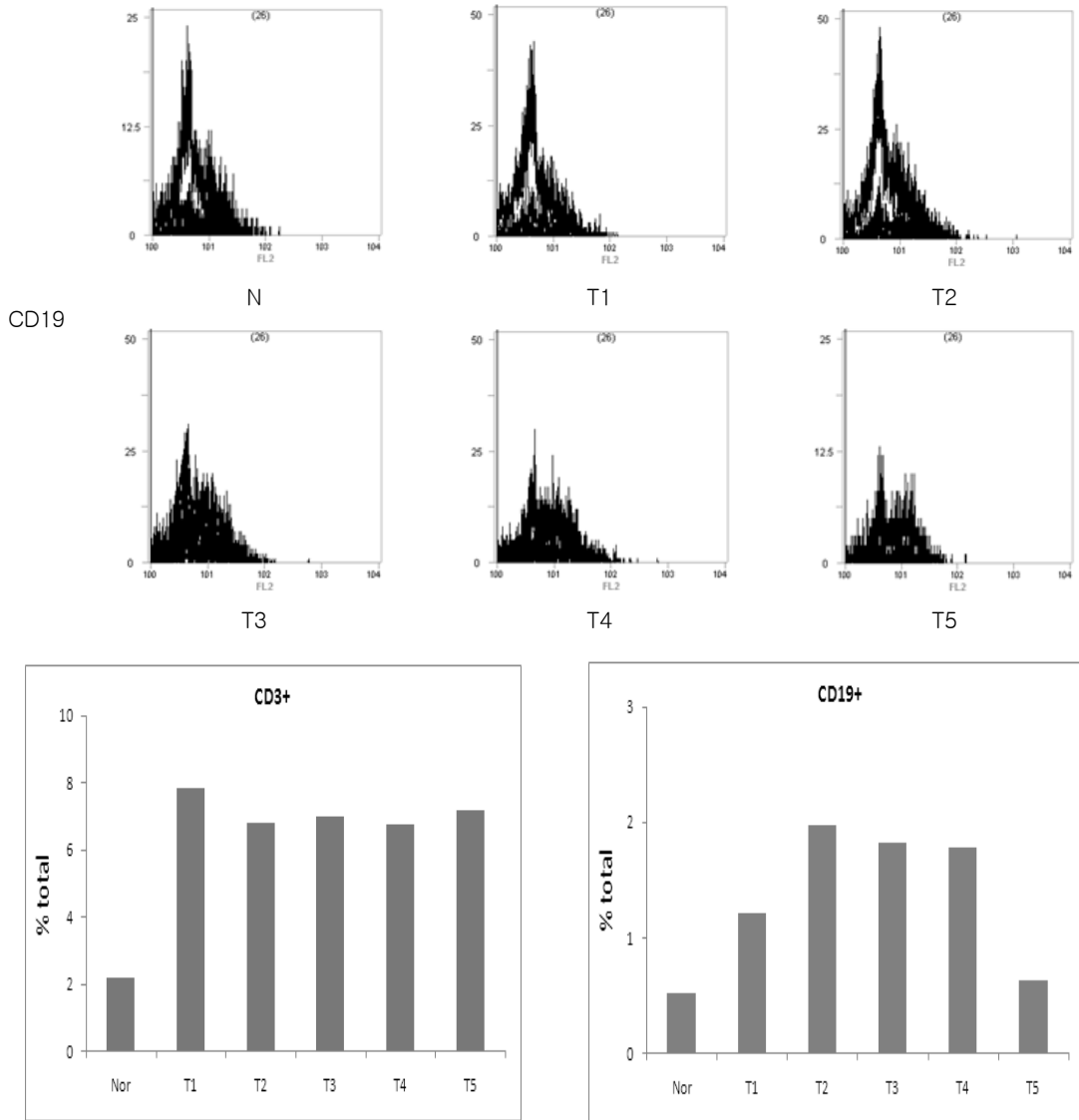


그림 8. β -glucan, MCFA, 식물추출물의 비장내 T cell과 B cell population에 미치는 영향

나. 물푸레나무, 등근이질풀 추출물 항균활성 및 prebiotic 효능 검증

항생제대체제 후보자원으로 선발된 물푸레나무 및 등근이질풀 추출물의 시간별, 농도별 항균활성 및 prebiotic 효능을 검증하였다. 대조물질로 사용한 살리노마이신은 예상대로 농도의존적으로 클로스트리디움 병원균의 성장을 억제하였으며 특히, 0.01mg/mL의 농도로 처리 시 72시간까지 병원균의 성장을 0%수준으로 유지하였다 (그림 9).

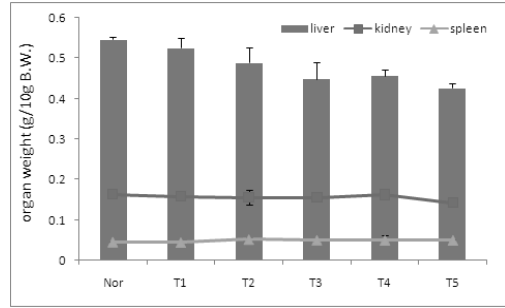
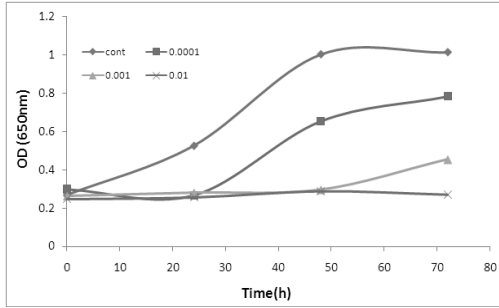


그림 9. Salinomycin 항균 활성 (*C. perfringens*)

물푸레나무 추출물의 시간별, 농도별 항균활성 검정결과, 물푸레나무 추출물은 0.1mg/mL 농도로 처리 시 처리 9시간째에 클로스트리움 병원균의 성장을 81.8% 억제하였으며, 그 후 배양시간이 길어지면서 활성이 급격히 감소하였다 (그림 3-10). 장내유익균인 비피도박테리움균에 대한 활성 검정결과, 물푸레나무 추출물을 0.1mg/mL 농도로 72h 처리 시 비피도박테리움균의 성장을 16.0% 촉진하였으며 prebiotic 효능은 처리농도 및 처리시간 비례하였다 (그림 3-11).

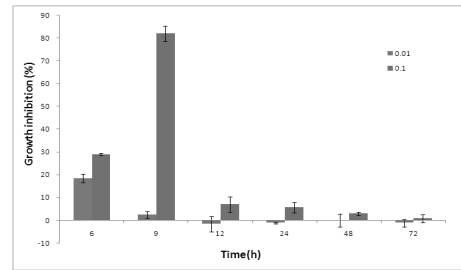
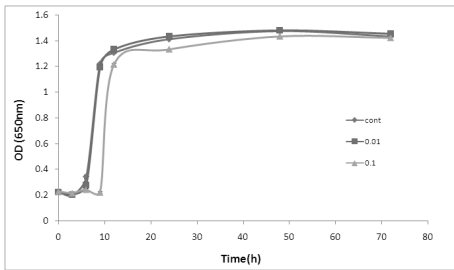


그림 10. 물푸레 추출물 항균활성 (*C. perfringens*)

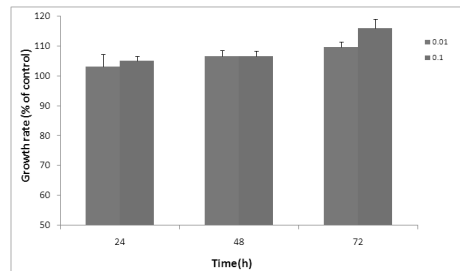
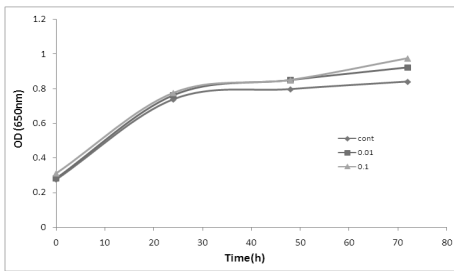


그림 11. 물푸레 추출물 prebiotic 효능 (*B. bifidum*)

등근이질풀 추출물은 1mg/mL 농도로 액체배지에 처리하여 병원균과 함께 배양 시 24시간 후 클로스트리움 병원균의 성장을 68.8% 억제하였으며 다소 감소하기는 하나 72시간 까지 항균활성을 유지하여(그림 12), 물푸레나무 추출물과 비교 시 더 우수한 항균활성을 가지고 있는 것으로 사료된다. 또한, 1mg/mL 농도에서 72시간 동안 처리 시 비피도박테리움균의 성장을 20% 촉진하는 것으로 나타나 등근이질풀 추출물 역시 prebiotic 효능을 가지고 있음을 확인하였다(그림 13).

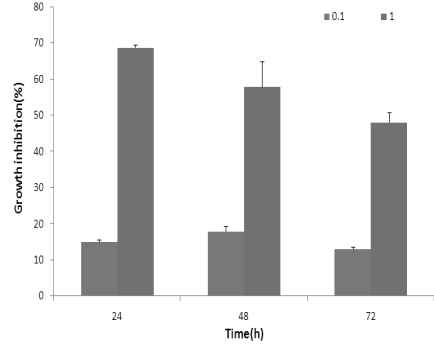
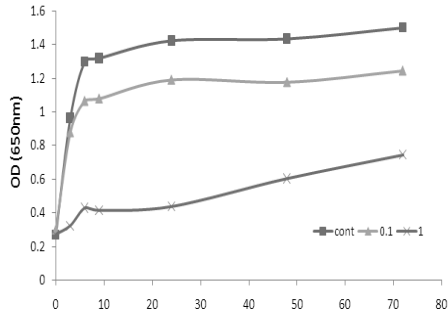


그림 12. 등근이질풀 추출물 항균 활성(*C. perfringens*)

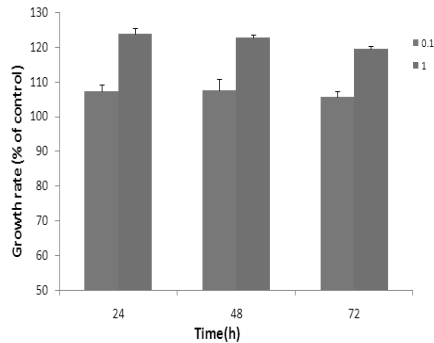
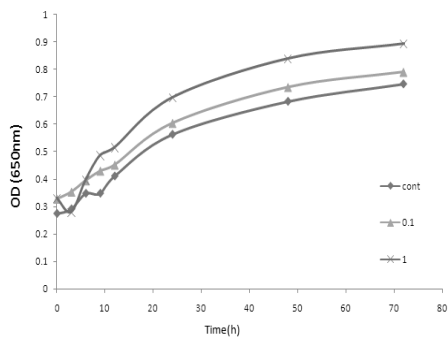


그림 13. 등근이질풀 추출물 prebiotic 효능 (*B. bifidum*)

다. 항생제대체제 유망소재 효능평가 및 후보물질 공급

(1) 항생제대체제 유망소재 안정성 검정

(가) 산도 및 열 안정성 검정

항생제대체제 후보자원으로 선발한 물푸레나무 추출물과 등근이질풀 추출물의 가공적성을 알아보기 위하여 각각의 추출물을 강산, 강염기 또는 고온조건에 노출시킨 후 산도 및 열안정성을 조사하였다. 물푸레나무 추출물을 이용한 시험결과, 추출물을 100℃로 60분 동안 가열하여도 항균활성변화가 없어 추출물이 열에 안정적인 것으로 조사되었으며 (그림 14), 산도변화에 대한 안정성 시험결과, pH 9에서 pH 11 사이의 산도에서 활성이 다소 높아지는 경향이 있으나 유의적이지 않았고 전체적으로 산도에 관계없이 동일한 활성을 나타내었다 (그림 15). 등근이질풀 추출물 또한 열이나 산도 변화에 따른 항균활성 변화가 나타나지 않아 (그림 16, 17), 두 종류의 추출물 모두 가공과정에서 열이나 산도변화에 크게 영향을 받지 않을 것으로 추정된다.

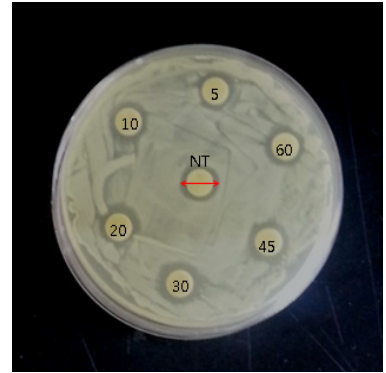
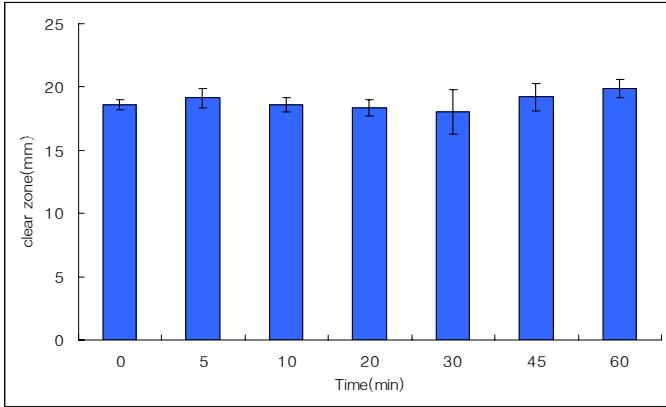


그림 14. 물푸레나무 추출물의 열안정성

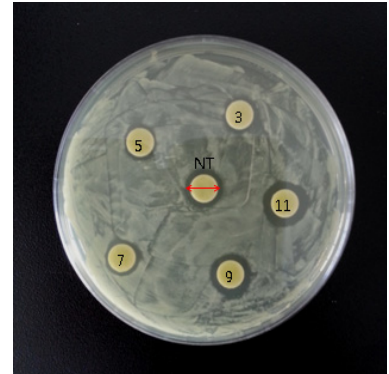
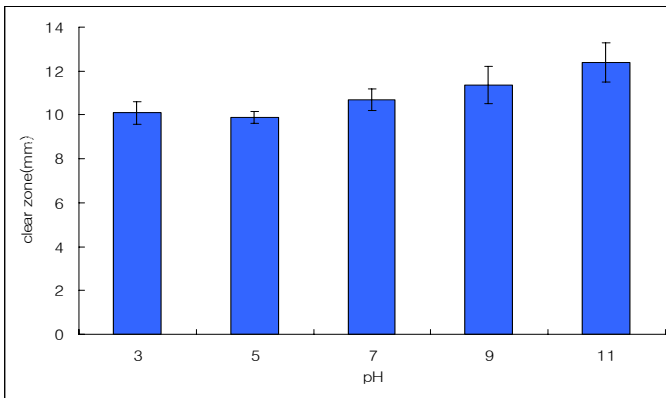


그림 15. 물푸레나무 추출물의 pH 안정성

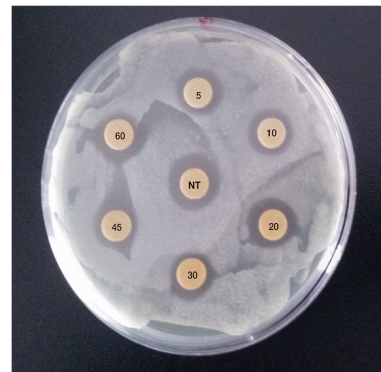
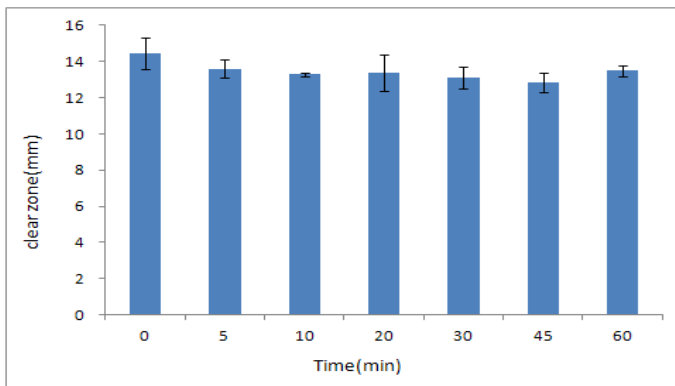


그림 16. 둥근이질풀 추출물의 열 안정성

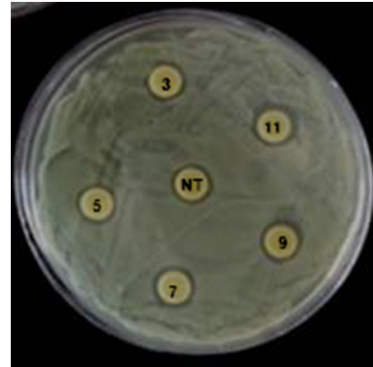
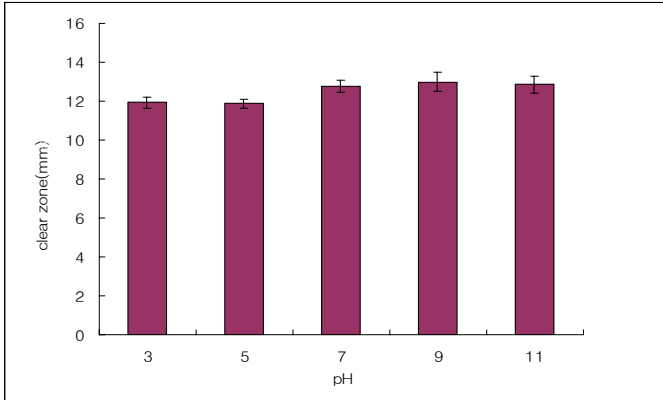


그림 17. 동근이질풀 추출물의 pH 안정성

(나) 효능 평가 및 활성 우수 대체제 선발

동근이질풀 추출물의 효능평가를 위해 동근이질풀 추출물을 0.5%~1.0% 수준으로 사료에 첨가하여 4주 동안 급여하였다. 4주 급여기간 중 시험군별 체중은 거의 동일하였으며, 사료섭취량은 1~2주 동안은 추출물을 1.0% 첨가한 사료 급여 군에서 다소 높은 경향이 있었으나 3~4주가 되면서 안정되었다 (그림 18). 추출물을 농도별로 급여한 시험군의 혈청 내 GOT, BUN 수치는 정상군과 유사하여 간이나 신장에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되며 (그림 19) 분변 내 클로스트리디움 병원균 수는 정상군에 비해 0.5% 급여군은 18%, 1.0% 급여군은 22% 감소하여 동근이질풀 추출물의 항생제대체제로의 이용가능성을 확인하였다(그림 20).

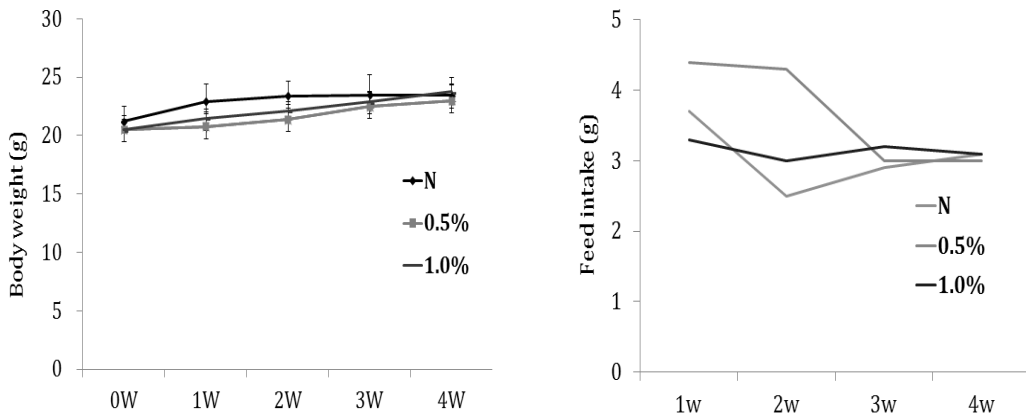


그림 18. 체중변화 및 사료섭취량

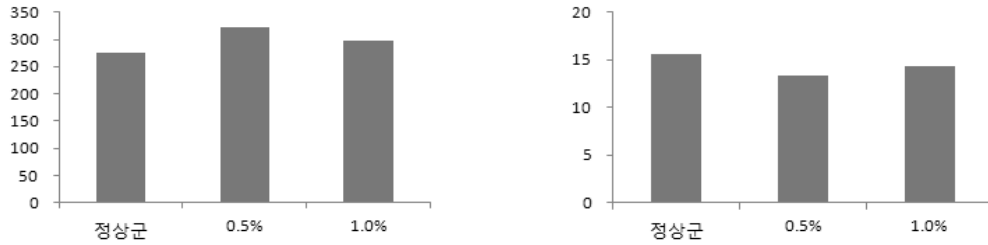


그림 19. 혈청 내 GOT, BUN

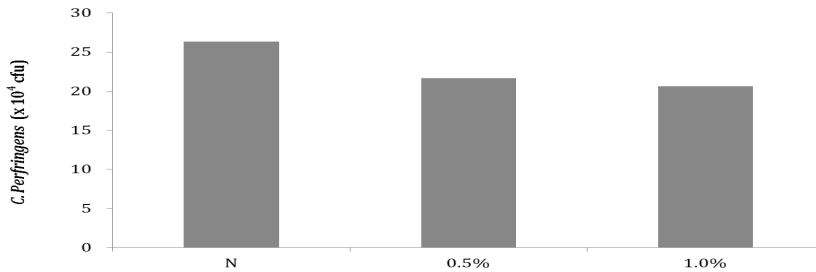


그림 20. 분변내 클로스트리디움 균수변화

라. 항생제대체제 대량 생산체계 구축

선발한 항생제대체제의 목적동물(육계)에서의 효능평가를 위해 물푸레나무 및 등근이질풀을 수집하여 에탄올추출물 제조하였으며 항생제대체제 효능시험을 위한 후보물질로 공급하였다(그림 21). 물푸레나무는 전국에 걸쳐 분포하는 목본식물로 껍질은 진피라 불리며 민간의약 또는 한약재로 유통되고 있어 손쉽게 대량확보가 가능한 재료이며, 등근이질풀은 초본식물로 전국의 산야에 자생, 종자 번식 또는 포기나누기를 통해 재배가 가능하여 항생제대체제 소재로 개발 시 큰 어려움 없이 대량생산할 수 있을 것으로 사료된다.



그림 21. 효능평가를 위한 식물추출물 제조 및 공급

4. 적 요

- 디스크확산법과 액체배지 희석법에 따른 항균활성 시험결과, 전체적인 항균 활성값은 유사하였으나, P6, P13 추출물은 디스크확산법을 이용한 실험에서만 활성을 보였고, P11, P18, P22, P23 추출물은 액체배지 희석법을 이용한 시험에서만 활성이 나타나는

등 특정 식물추출물에서는 시험방법에 따라 항균활성에 차이가 있음.

- 액체배지 희석법이 디스크확산법보다 감도가 우수한 것으로 나타났으며, 또한 항균소재 선발 시 병원균에 대한 항균활성 뿐 아니라 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*와 같은 유익균에 대한 영향까지 조사해야 할 것으로 판단됨.
- 식물자원의 면역활성 평가를 위해 식물추출물 30종의 nitric oxide 생성능 측정 결과, 9종의 식물추출물이 대조구인 LPS 처리구보다 NO생성량이 많았으나, 추출물 고유 색깔에 의한 간섭효과로 데이터 신뢰도가 낮아 NO 생성량 단독 값으로는 식물 추출물의 면역활성 검정 시 적용 곤란.
- P4, P7, P21 및 P30 등 4종류의 식물추출물은 B cell과 T cell의 생육을 동시에 촉진시키는 활성을 가지고 있었으며, P23과 P29 추출물은 B cell 생육만을 촉진시키는 활성을 가지고 있었고 P8, P22, P25 및 P28 등 4종의 추출물은 T cell의 생육만을 촉진.
- 달맞이꽃 추출물 또는 해당화 추출물을 TPA와 동시에 도포 시 TPA에 의한 귀 부종은 달맞이꽃추출물이 33.8~37.0% 경감효과를 나타냈으며, 해당화추출물은 양성대조군 대비 18.8~34.9%의 경감효과를 나타냄.
- 항생제대체제의 간 보호효능 평가기법 확립을 위해 간독성 동물모델을 제작한 후 시험물질의 효능을 분석하여 시험방법별 효능을 비교한 결과, 양성대조군의 GOT, GPT수치가 정상군보다 2배 이상 상승하여 약물에 의해 간독성이 정상적으로 유발되었음을 확인하였으며, 간독성 유발 시 신장에는 영향을 미치지 아니 하였고 간 조직의 무게도 큰 차이가 나타나지 않음.
- 모든 시료가 세포성 면역반응을 증진시키는 효능을 가지고 있었으며, 가축나무 추출물을 제외한 4종의 시료가 체액성 면역반응을 증진시키는 효능도 나타내었음.
- 물푸레나무 추출물의 시간별, 농도별 항균활성 검정결과, 물푸레나무 추출물은 0.1mg/mL 농도로 처리 시 처리 9시간째에 클로스트리움 병원균의 생장을 81.8% 억제하였으며, 그 후 배양시간이 길어지면서 활성이 급격히 감소.
- 장내유익균인 비피도박테리움균에 대한 활성 검정결과, 물푸레나무 추출물을 0.1mg/mL 농도로 72h 처리 시 비피도박테리움균의 생장을 16.0% 촉진하였으며 prebiotic 효능은 처리농도 및 처리시간에 비례하였음.
- 등근이질풀 추출물은 1mg/mL농도로 액체배지에 처리하여 병원균과 함께 배양 시 24시간 후 클로스트리움 병원균의 생장을 68.8% 억제하였으며 72시간 까지 항균활성을 유지.
- 1mg/mL 농도에서 72시간 동안 처리 시 비피도박테리움균의 생장을 20%촉진하는 것으로 나타나 등근이질풀 추출물 역시 prebiotic 효능을 가지고 있음을 확인
- 물푸레나무 추출물을 100℃로 60분 동안 가열하여도 항균활성변화가 없어 추출물이 열에 안정적인 것으로 조사되었으며, pH 9에서 pH 11 사이의 산도에서 활성이 다소 높아지는 경향이 있으나 전체적으로 산도에 관계없이 동일한 활성을 나타냄.
- 등근이질풀 추출물 또한 열이나 산도 변화에 따른 항균활성 변화가 나타나지 않아 두 종류의 추출물 모두 가공과정에서 열이나 산도변화에 크게 영향을 받지 않을 것으로 추정됨.
- 등근이질풀 추출물의 효능평가를 위해 등근이질풀 추출물을 0.5%~1.0% 수준으로 사료에 첨가하여 4주 동안 급이한 결과, 혈청 내 GOT, BUN 수치는 정상군과 유사하였으며, 분변 내 클로스트리디움 병원균 수는 정상군에 비해 0.5% 급이군은 18%, 1.0% 급이군은 22% 감소하여 등근이질풀 추출물의 항생제대체제로의 이용가능성을 확인.

5. 인용문헌

- Carimichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B., 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47:936-942.
- Choi, J. H., Yim, G. Y., Jang, S. Y., Jeong, Y. J., 2007. Inhibition effect of the harmful food-born microorganisms on germination condition of acorn pollen. *Korean J. Food Preserv.* 14:87-93.
- Kim, J. D., Shin T. S., 2002. The Growth Promoting Effect of Bifidobacterium bifidum by Combination of Natural Products Bearing Antioxidative Capacity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 30:388-394.
- Lee, B. W., Shin, D. H., 1991. Antimicrobial effect of plant extracts and their fractionates for food spoilage microorganisms. *Korea J. Food Sci. Technol.*, 23:205-211.
- Lee, H. H., Yoon, J. S., Song, S. Y., 2010. Protective effect of Lithospermum erythrorhizon on galactosamine induced liver injury. *Kor. J. Microscopy* 40:29-35.
- Lee, M. K., Lee, S. H., Choi, G. P., Yu, C. Y., Lee J. H., Lee, H. Y., 2003. Screening of immune enhancement activities of the extracts from Rosa rugosae radix. *Korean J. Med. Crop Sci.* 11:13-18.
- Park, J. C., Kim, J. Y., Lee, Y. J., Lee, J. S., Kim, B. G., Lee, S. H., Nam, D. H., 2008. Protective effect of Oenanthe javanica extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Yakhak Hoeji* 52:316-321.
- Petit, L., Gibert, M., Popoff, M. R., 1999. Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 7:104 - 110.
- Sharon L. M., Stephen, E. K., Frances A. H., Dennis, R. T., Robert, M. B., Steven, H. H., 2004. Activation of RAW264.7 Macrophages by bacterial DNA and lipopolysaccharide increases cell surface DNA binding and internalization. *J. Biol. Chem.*, 279(1):7217 - 7223.
- Songer, J. G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 216-234.
- Wang, S., Chen, Y., He, D., He, L., Yang, Y., Chen, J., Wang, X., 2007. Inhibition of vascular smooth muscle cell roliferation by serum from rats treated orally with gastrodia and uncaria decoction. *J. Ethnopharmacol.* 114:458-462.
- Yim, D., Kang, S. S., Kim D. W., Kim, S. H., Lillehoj, S., Min W., 2011. Protective effects of Aloe vera-based diets in Eimeria maxima -infected broiler chickens. *Exp. Parasitol.* 127: 322 - 325.

6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제 목
2011(1년)	논 문	Effects of Dietary Fiber Isolated from <i>Synurus deltooides</i> on Constipation in Loperamide-Induced Rats
2012(2년)	논 문	달맞이꽃 추출물이 <i>Eimeria</i> 감염 브로일러의 생존율에 미치는 영향
	영농활용	등근이질풀의 클로스트리디움 항균효과
2013(3년)	논 문	TPA로 유도된 마우스 귀 부종 동물모델에서 소목추출물의 항염증 효과
	영농활용	육계 콕시듐증 피해저감을 위한 사료 내 닥나무 첨가 급이

7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도		
					'11	'12	'13
협동과제 책임자	인삼약초연구소	농업연구사	이광재	협동과제 총괄	○	○	○
공동연구자	"	농업연구관	안문섭	연구수행 자문	-	-	○
"	농식품연구소	"	허남기	"	○	○	-
"	옥수수연구소	"	김경희	연구방향 제시	○	-	-
"	인삼약초연구소	농업연구사	조윤상	활성검정	-	-	○
"	"	"	모영문	시료수집	-	-	○
"	"	"	정햇님	시료추출	-	-	○
"	농식품연구소	"	김희연	추출물 제조	○	○	○
"	"	기계운영서기보	이상규	시료수집	-	-	○
"	"	운전서기보	윤석원	"	-	-	○
"	농식품연구소	기계운영	최병철	시료수집 및 건조	○	○	○
"	"	공무직	정은경	활성검정	○	○	○
"	"	"	정혜정	동물시험	○	○	○

