(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년09월29일
(11) 등록번호 10-1661117
(24) 등록일자 2016년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/22 (2006.01) *A23K 1/14* (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01) *A61K 36/54* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/22 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2015-0080658
(22) 출원일자 2015년06월08일
심사청구일자 2015년06월08일
(56) 선행기술조사문헌
JP02599158 B2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상대학교 산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이후장
경상남도 진주시 석갑로 45 (평거동, 들말흥한아파트) 110동 801호
(74) 대리인
한윤호

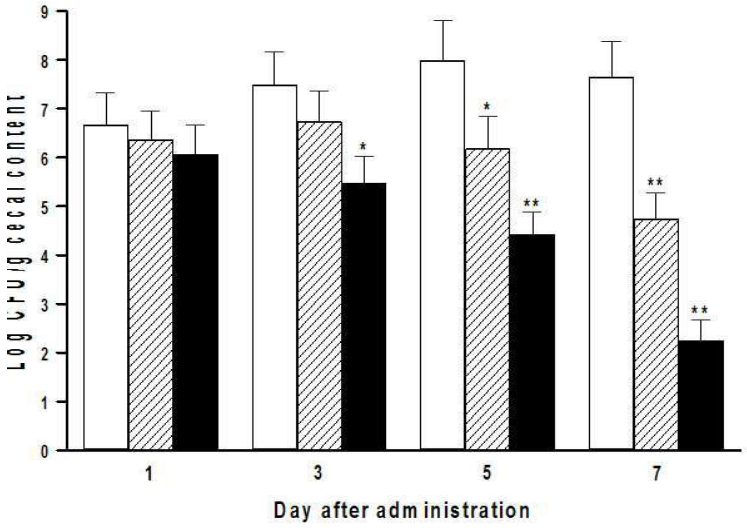
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 **한방 추출복합물을 유효성분으로 포함하는 가축 캠필로박터증 방제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 오배자(*Galla rhois*) 추출물 및 계피(*Cinnamonmum verum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 가축 캠필로박터증 방제용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23K 20/00 (2016.05)
A61K 36/54 (2013.01)
A61K 2236/33 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2010-0021247
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업/ 기본연구지원사업(유형II)
연구과제명 인수공통전염병 유발 세포내 기생세균의 에너지 대사와 증식 저해물질의 탐색 및 이의 적용
기 여 율 1/1
주관기관 경상대학교 산학협력단
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

오배자(*Galla rhois*) 추출물 및 계피(*Cinnamonmum verum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 가축 캠필로박터증 방제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알콜, 주정 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조하는 것을 특징으로 하는, 가축 캠필로박터증 방제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 캠필로박터증은 *C. jejuni* 또는 *C. coli*에 의해 유발되는, 가축 캠필로박터증 방제용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 오배자 추출물 및 상기 계피 추출물이 2:1 내지 1:2의 중량비로 혼합되는, 가축 캠필로박터증 방제용 조성물.

청구항 5

오배자(*Galla rhois*) 추출물 및 계피(*Cinnamonmum verum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 가축 캠필로박터증 방제용 사료첨가제.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알콜, 주정 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조하는 것을 특징으로 하는, 가축 캠필로박터증 방제용 사료첨가제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 가축 캠필로박터증 방제용 조성물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 한방 추출복합물을 유효성분으로 포함하는 가축 캠필로박터증 방제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근, *Campylobacter jejuni*(*C. jejuni*)는 *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 등과 더불어 공중보건학적으로 중요한 식중독 원인균으로 인식되고 있다 (Kim *et al.*, *Korean J Vet Serv*, 36: 57-60, 2013). *C. jejuni*는 일반적으로 동물의 분변에 상재하는 그람 음성의 아포(spore)를 형성하지 않는 미호기성(microaerophile) 세균으로 알려져 있다(Silva J *et al.*, *A review. Front Microbiol*, 2: 200, 2011). 미국식품의약품안전청과 유럽연합의 보고에 따르면, 사람의 캠필로박터증(campylobacteriosis)은 일반적으로 위장염을 주증으로 하는 질병이며 그 발생률은 매년 증가추세에 있는 것으로 보고되고 있고 (European Centre for Disease Preventive and Control, *Stockholm: ECDC*. 59-62. 2010) 식품의약품안전처 식

중독통계시스템에 따르면, 2010년부터 2014년까지 캠필로박터증 환자가 2,069명 발생하였다고 보고하였다. 캠필로박터증의 약 90%는 *C. jejuni*에 의해 발생하는 것으로 알려져 있고 *C. jejuni*는 사람 이외에 소, 면양, 산양, 개, 고양이 및 원숭이 등 포유동물의 장관 내에서 증식하며, 이들 동물에서 장염 및 식중독을 일으킨다. 특히, 가금의 30~100%가 *C. jejuni*를 보균하고 있으며, 매우 소량으로도 사람에서 감염증을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Duffy G *et al.*, *Meat Sci*, 78: 34-42, 2008). 과거에는 캠필로박터(*Campylobacter*) 감염증의 방제를 위해, 사료에 항생제를 첨가하여 가금에 급여하였고, 이로 인해 항생제 내성균의 출현 등 공중보건학적으로 많은 문제점을 야기하였고 국내·외적으로 성장촉진을 목적으로 한 사료첨가용 항생제의 사용 전면 금지됨에 따라, 양계산업에 있어서도 *C. jejuni*의 방제를 위한 새로운 전략이 시급한 실정이다.

[0003] 대한민국 등록특허 제1309583호는 천연약용식물의 추출물의 유효성분을 포함하는 닭 전염성질병 예방용 조성물을 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 그러나 상기 선행기술의 경우, 많은 약용식물의 추출공정으로 인해 제조가 복잡하고 항균 활성이 낮아 산업이용성의 한계가 존재한다.

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 한방 추출복합물을 이용하여 가축의 *C. jejuni* 감염증 방제효과를 나타내는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, 오배자(*Galla rhois*) 추출물 및 계피(*Cinnamonmum verum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 가축 캠필로박터증 방제용 조성물이 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 오배자(*Galla rhois*) 추출물 및 계피(*Cinnamonmum verum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 가축 캠필로박터증 방제용 사료첨가제가 제공된다.

발명의 효과

[0008] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 한방 추출복합물을 이용하여 효과적으로 가축 캠필로박터증을 방제하는 효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 한방 추출복합물인 GCE를 실험군에 농도별 음수투여 후 맹장 내용물 중 경시별 *C. jejuni* 균수의 변화를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] **용어의 정의:**

[0011] 본 문서에서 사용되는 용어 "캠필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*)"는 동물의 분변에 상재하는 그람 음성의 아포를 형성하지 않는 미호기성 세균으로 가축 또는 가금(家禽)의 장관에서 널리 보균(保菌)되고 있고 사람의 경우는 세균성 식중독 또는 위장염의 주요한 병원체로 인식되고 있다.

[0012] 본 문서에서 사용되는 용어 "오배자(*Galla rhois*)"는 옻나무과에 속하는 붉나무의 잎에 오배자 진딧물의 자상에 의하여 생긴 벌레집으로, 오랜 기간 동안 한방에서는 수렴·지사, 지혈, 해독 및 항균 등에 효력이 있어, 설사, 탈항, 위·십이지장궤양, 혈변, 혈뇨 및 구내염 등의 치료에 사용되어져 왔다.

[0013] 본 문서에서 사용되는 용어 "계피(*Cinnamonmum verum*)"는 계피나무의 외피를 건조시킨 것으로 한방에서는 두통, 발열, 신경성심계항진, 진통 및 감기 등의 치료에 많이 사용되는 중요한 생약으로 계피의 주요성분은 방향족 화합물인 cimmamon aldehyde로 음료와 화장품의 향성분 및 구취제거제로 이용되고 있다.

[0014] 본 문서에서 사용되는 용어 "GCE"는 오배자(*Gall rhois*) 추출물 및 계피(*Cinnamonmun verum*) 추출물의 혼합물

인 추출복합물을 의미한다.

[0015] **발명의 상세한 설명:**

[0016] 본 발명의 일 관점에 따르면, 오배자(*Galla rhois*) 추출물 및 계피(*Cinnamonmum verum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 가축 캠필로박터증 방제용 조성물이 제공된다.

[0017] 상기 조성물에 있어서, 상기 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알콜, 주정 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조될 수 있다.

[0018] 상기 오배자 추출물 및 상기 계피 추출물이 2:1 내지 1:2의 중량비로 혼합될 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 오배자(*Galla rhois*) 추출물 및 계피(*Cinnamonmum verum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 가축 캠필로박터증 방제용 사료첨가제가 제공된다.

[0020] 상기 사료첨가제에 있어서, 상기 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알콜, 주정 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조될 수 있다.

[0021] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0022] **실시예 1: 한방약제 추출**

[0023] 본 발명의 일 실시예에 따라 한방약제의 추출액을 캠필로박터증 방제효과를 나타내는 유효물질을 추출하고 동결건조하여 분말로 제조하였다.

[0024] 구체적으로, 본 연구에서 사용된 오배자와 계피는 동물생리활성물질자원은행(ABRB, 진주)으로부터 구입하였다. 상기 약제를 물로 세정하여 불순물을 제거한 다음, 암실에서 건조시킨 후, 분쇄하여 각각 분말로 제조하였다. 상기 각각의 분말 100 g에 400 ml의 70% 메탄올을 가한 후, 실온의 mantle-reflux 위에 24시간 동안 방치하였다. 이후에, 상층액을 회전농축기(rotary evaporator, N-1000S, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 감압·농축시켜 메탄올을 제거하였다. 그 후 상기 농축액을 Whatman No. 1 filter paper((주) 일신랩, 서울)로 여과한 추출액을 동결건조기(Labconco Co., Kansas, MO)를 이용하여 분말로 제조하여 실험에 사용하였다.

[0025] **실시예 2: 공시균주 및 배양**

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따라 항균시험에 사용한 균주는 국립보건환경연구원에서 분양 받은 *C. jejuni*(ATCC 3356)를 사용하여 종래의 방법(Hermans D *et al.*, *Vet Res*, 45: 27, 2014)에 따라 Modified Prestoon Campylobacter-selective supplement(MPC, Oxoid, Hampshire, UK)와 Campylobacter-specific growth supplement(CGS, Oxoid, Hampshire, UK)가 첨가된 영양배지 No. 2(NB 2, Oxoid, Hampshire, UK)에서 미호기성 상태(5% O_2, 5% CO_2, 5% H_2 및 85% N_2)로 42℃에서 24시간 동안 배양하였다.

[0027] **실시예 3: 한방약제 추출물의 항균실험**

[0028] 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 한방약제 추출물을 이용하여 *C. jejuni*에 대한 항균실험을 수행하였다.

[0029] 구체적으로, 오배자와 계피 추출물의 *C. jejuni*에 대한 최소억제농도(MIC, minimun inhibitory concentration)와 최소살균농도(MBC, minimun bactericidal ceoncentration)는 종래의 액체배지미량희석법에 따라 측정하였고(Sirirak T and Voravuthikunchai SP, *Poult Sci*, 90: 791-796, 2011) 항균실험은 하기의 방법과 같이 수행하였다. 먼저, 오배자와 계피의 동결건조 분말을 증류수로 용해시켜 10 mg/mL의 용액을 만들 다음, 이를 단계희석(serial dilution)하여 0.25-5.0 mg/mL의 범위의 농도로 만들었다. 상기 각각의 희석액 20 ㎕를 96-웰 플레이트의 웰에 넣고, 여기에 80 ㎕의 Muller-Hinton broth(MHB, Difco, Franklin Lakes, USA)를 첨가하였다. 이어서 *C. jejuni* 균주 희석액(10^6 colony forming unit (CFU)/mL) 100 ㎕을 각 웰에 넣고, 미호기성 상태로 42℃에서 48시간 동안 배양한 후, 최초로 *C. jejuni*의 발육이 억제된 농도를 MIC로 나타내었고 MIC 전·후 농도의 웰들에서 혼합액 50 ㎕를 채취하여 5% 면양 혈액을 함유한 Muller-Hinton agar에 도포하고, 미호기성 상태로 42℃에서 48시간 동안 배양한 후, 최초로 *C. jejuni*가 완전히 사멸된 농도를 MBC로 나타내었다. 오배자 추출물과 계피 추출물의 MBC를 각각 구한 후, MBC의 역비로 오배자와 계피를 혼합하여, 이를 GCE로 명명하고, GCE의 MIC와 MBC를 상술한 방법에 따라 측정하였다.

[0030] 그 결과, *C. jejuni*에 대한 MIC는 오배자 추출물, GCE 및 계피 추출물 순으로 낮게 나타났으며, MBC는 GCE, 오배자 추출물 및 계피 추출물 순으로 낮게 나타났다. GCE의 MBC가 오배자 추출물과 계피 추출물의 MBC 보다 낮게 나타난 것은, 오배자 추출물과 계피 추출물의 상승작용에 의해 *C. jejuni*에 대한 살균효과가 증가한 것으로 사료된다. 상기 *C. jejuni*에 대한 오배자 추출물, 계피추출물 그리고 GCE의 MIC와 MBC를 분석한 결과를 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

[0031]

추출물	MIC(mg/mL)	MBC(mg/mL)
오배자	0.5	4.0
계피	2.0	4.0
*GCE	1.5	2.5

[0032] *오배자 추출물과 계피 추출물을 1:1로 혼합시킨 혼합물

[0033] **실시예 4: 실험동물**

[0034] 본 발명에 사용된 실험동물은 2주령의 Ross종 육계(평균체중, 421±35 g) 60수를 경남 진주에 위치한 양계장으로부터 구입하여 사용하였다. 상기 실험계는 분변을 이용한 *C. jejuni* 분리실험을 통해 음성인 개체를 선발하여, 5수씩 임의 배치하여 케이지에 사육하면서 1주일 동안 환경에 적응 시킨 다음 실험에 사용하였다. 사육온도는 24±1℃로 유지하여 사육하였고, 전 시험시간 동안 24시간 점등을 실시하였으며. 사육기간 중 사료와 음수는 자유로이 섭취하도록 하였다.

[0035] 본 연구에 사용된 모든 동물실험은 경상대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (승인번호, GNU-150117-M0004)을 얻어'실험동물의 사용과 윤리에 관한 규정'에 따라 수행하였다.

[0036] **실시예 5: 실험군 설정 및 감염**

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따라 실험군은 1주일 동안 환경에 적응시킨 육계를 대상으로 각각 20수씩으로 구성하였고 *C. jejuni*는 미호기성 상태로 42℃에서 24시간 동안 MPC와 CGS가 첨가된 영양배지 No. 2(Oxoid, Hampshire, UK)에서 배양한 후, 배양 균액을 2,000 rpm에서 15분간 원심분리하였고 상층액을 버리고 남은 침전물을 PBS(pH 7.2)로 희석하여 균수를 3.0ㅅ10^5 CFU/mL로 조정한 다음, 존데(sonde)가 부착된 3 mL 시린지를 이용하여 실험계 한 마리 당 0.5 mL씩을 경구에 주입하여 감염시켰다. 상기 실시예 3에서 측정된 GCE의 MBC를 기초로 하여, 실험군 I은 투여 농도를 2.5 g/L로 설정하였고, 실험군 II는 5.0 g/L로 설정하여 투여하였다.

[0038] **실시예 6: 약제투여 방법**

[0039] 본 발명의 실험군 I과 실험군 II에 대하여 *C. jejuni* 접종 후 2일부터 음수에 혼합하여 7일 동안 연속 투여하였고 대조군은 약제를 투여하지 않은 음용수를 공급하였다. 상기 실험을 실시하는 동안 물과 사료((주) 우성사료, 대전)는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0040] **실시예 7: 균수 측정**

[0041] 본 발명의 일 실시예에 따라 GCE의 농도별 음수투여에 따른 맹장 내용물 중 경시별 *C. jejuni* 균수의 변화를 측정하였다.

[0042] 우선, GCE 투여 후, 1, 3, 5 및 7일에 각 실험군의 실험계 5마리씩 경추탈골로 안락사 시킨 후, 부검을 통해 맹장 내용물을 멸균적으로 채취하였다. 상기 채취한 맹장 내용물 0.2 g에 MPC와 CGS가 첨가된 NB 2를 1.8 mL 첨가하여 균질화시킨 다음 Hank's Balanced Salt Soution(HBSS, Gibco-BRL, Carlsbad, USA)을 10배수로 단계희석하였고 상기 각각의 희석액 100 ㎕를 charcoal cefoperazone deoxycholate agar selective supplement(Oxoid, Hampshire, UK)와 CGS가 첨가된 Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar(mCCDA, Oxoid, Hampshire, UK)에 도포하여 미호기성 상태로 42℃에서 24시간 동안 배양한 다음, *C. jejuni*의 집락수를 측정하여 Log_{10}CFU/g으로 나타내었다.

[0043] 그 결과, 투약 1일째에 대조군과 비교하여 실험군 I과 실험군 II의 *C. jejuni* 균수는 유의성 있게 감소하지 않았으나 투약 3일째에는 실험군 II의 *C. jejuni* 균수가 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소하였다($P<0.05$). 또한 GCE 투여 5일째에는 실험군 I($P<0.05$)과 실험군 II($P<0.001$) 모두 대조군과 비교하여 *C. jejuni* 균수가 통

계적으로 유의성 있게 감소하는 결과를 나타냈으며 GCE 투여 7일째에도 대조군과 비교하여 실험군 Ⅰ과 실험군 Ⅱ(7.65, 4.75 및 2.25 Log_{10}CFU/g) 모두 유의성 있게 감소한 것을 확인하였다(P<0.001)(도 1).

[0044] **실시예 8: 혈액학적 · 혈액생화학적 검사**

[0045] 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 실험군에 GCE의 음수투여 후 혈액을 채취하여 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 수행하였다.

[0046] 구체적으로, GCE의 안전성을 확인하기 위해, GCE 투여 종료 후, 심장천공법으로 혈액을 채혈하여 EDTA tube(BD vaccutainer, Franklin Lakes, NJ)에 넣어 혈액학적 검사에 사용하였고, 일부 채혈한 혈액은 원심분리를 통해 혈청을 분리하여 혈액생화학적 검사에 사용하였다. 상기 혈액학적 검사는 자동혈구계산기(Advia 120 hematology analyzer, Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY)를 이용하여 적혈구수 (RBC, red blood cell), 총 백혈구수 (WBC, white blood cell), 적혈구용적율 (HCT, hematocrit) 및 혈색소 (Hb, hemoglobin) 등을 측정하였고 상기 혈액생화학적 검사를 위해 분리한 혈청을 이용하여 자동생화학분석기(Hitachi 911 chemistry analyzer, Hitachi, Japan)를 이용하여 간세포와 근육 손상의 지표인 AST (aspartate amino-transferase), 간세포 손상의 지표인 ALT(alanine transaminase), 신장 기능 지표인 BUN(blood urea nitrogen) 및 Cr(creatinine)을 측정하였다.

[0047] 그 결과, GCE를 투여한 실험군 Ⅰ과 실험군 Ⅱ의 모든 지표값이 정상범위 내에 존재하였으며, 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았고 GCE를 투여한 실험군 Ⅰ과 실험군 Ⅱ 사이에서 용량 상관성은 관찰되지 않았다. 상기 혈액학적 · 혈액생화학적 검사 결과를 하기 표 2에 표시하였다.

표 2

[0048]

매개변수	정상 범위	*실험군		
		대조군	실험군 Ⅰ	실험군 Ⅱ
RBC(M/㎟)	5.00-8.00	6.29±0.24	6.43±0.29	6.32±0.34
WBC(M/㎟)	12.00-30.00	16.27±1.53	16.31±1.44	16.26±1.48
HCT(%)	22.0-35.0	26.9±2.17	26.2±1.87	26.4±2.23
Hb(g/dl)	7.0-13.0	9.2±0.65	9.5±1.15	9.1±0.76
AST(IU/L)	150-400	290±17.4	294±15.7	289±18.1
ALT(IU/L)	0-668	35±3.75	37±4.21	36±3.75
BUN(mg/dl)	0-124	32±3.63	30±4.28	28±3.65
Creatinine(mg/dl)	0.1-0.4	0.3±0.08	0.3±0.06	0.3±0.11

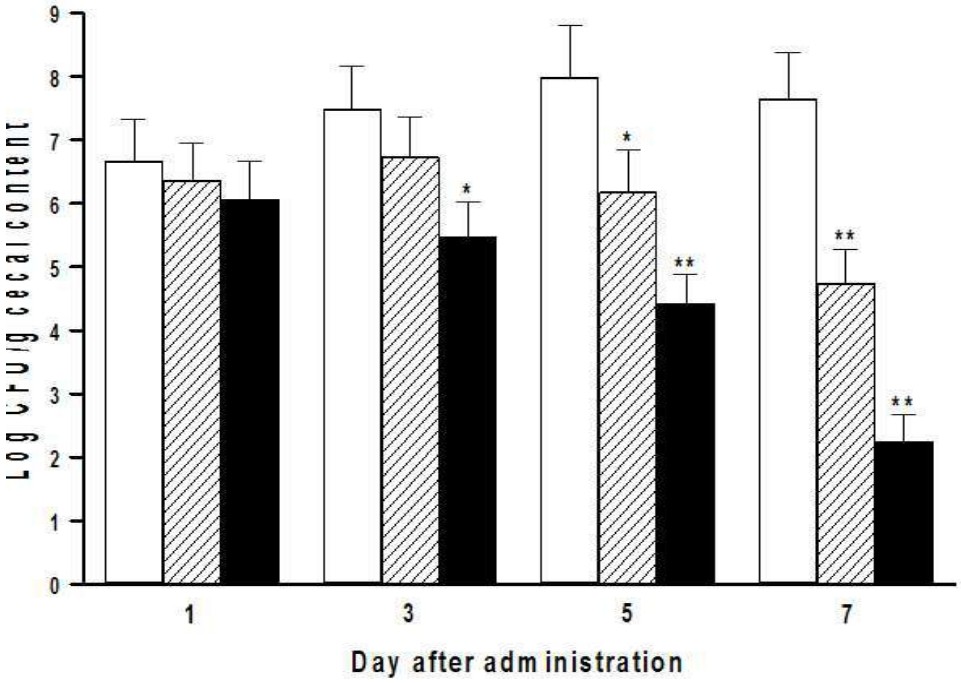
[0049] *대조군은 무처리, 실험군 Ⅰ은 2.5 g/L 음수 투여, 실험군 Ⅱ는 5.0 g/L 음수 투여.

[0050] 결론적으로 본 발명은 *C. jejuni*에 대해 항균효과를 갖는 오배자와 계피의 한방복합 추출물의 합제인 GCE를 *C. jejuni*를 감염시킨 육계를 대상으로 투여한 결과 *C. jejuni*에 대한 높은 방제효과를 확인하였으므로 이를 가축의 세균성 질병 특히 캠필로박터증 방제를 위한 사료 첨가제로 활용할 수 있다.

[0051] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

도면1


Log cfu/g cecal content
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
*
**
**
**
1
3
5
7
Day after administration