



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월17일  
(11) 등록번호 10-2056650  
(24) 등록일자 2019년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23K 50/80 (2016.01) A23F 3/10 (2017.01)  
A23F 3/12 (2006.01) A23F 3/26 (2006.01)  
A23K 10/30 (2016.01) A23K 20/195 (2016.01)  
(52) CPC특허분류  
A23K 50/80 (2016.05)  
A23F 3/10 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0097919  
(22) 출원일자 2018년08월22일  
심사청구일자 2018년08월22일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR101803069 B1\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
인하대학교 산학협력단  
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)  
인천광역시  
인천광역시 남동구 정각로 29 (구월동)  
(72) 발명자  
양수근  
인천 연수구 컨벤시아대로 42번길 35 송도 더샵그린에비뉴 701-1501  
장진섭  
인천광역시 서구 고산로40번길12(원당동, 원당e편한세상아파트) 105동 1201호  
허명제  
인천광역시 남동구 선수촌로 27 구월아시아드선수촌 6단지 604동 2704호  
(74) 대리인  
김국진

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 수산물 사료 첨가제의 제조 방법과 그에 의해 제조되는 사료 첨가제 및 사료

(57) 요약

항균 활성을 가지는 황칠, 녹차, 솔잎의 천연 추출물의 합성을 통해 어류 병원성 세균에 대한 우수한 항균 활성을 가지며, 기존 항생물질 사용의 최소화로 항생물질 오남용으로 인한 내성 피해를 방지할 수 있는 수산물 사료 첨가제의 제조 방법과 그에 의해 제조되는 사료 첨가제 및 사료에 관한 것으로 식품 첨가제나 차 추출물 등 안전성이 확인된 천연물을 항생제의 대체제로 응용하였으며, 사료 첨가제로서 유기물질 사용시 발생하는 수질 오염 및 회수 문제를 해결하여 수용액상에서 물질 혼합이 가능하고 체내 흡수를 촉진시킬 수 있다.

또한, 본 발명의 수산물 사료 첨가제의 제조 방법과 그에 의해 제조되는 사료 첨가제 및 사료를 통하여, 어류 병원성 세균에 대한 우수한 항균 활성을 가지며, 기존 항생물질 사용의 최소화로 항생물질 오남용으로 인한 내성 피해를 방지하며, 동시에 어류의 성장촉진 및 면역증강을 도모할 수 있는 고기능성 양식어류용 사료첨가제를 제공함에 있다.

(52) CPC특허분류

*A23F 3/12* (2013.01)  
*A23F 3/26* (2013.01)  
*A23K 10/30* (2016.05)  
*A23K 20/195* (2016.05)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110042531 A\*  
KR1020110077202 A\*  
KR1020120138181 A\*  
CN107772146 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (1) 녹차 분말을 제조하는 단계;
- (2) 황칠 추출물을 제조하는 단계;
- (3) 솔잎 추출물을 제조하는 단계;

(4) 바인더에 대하여 상기 (1) 단계에서 얻어지는 녹차분말, 상기 (2) 단계에서 얻어지는 황칠 추출물, 상기 (3) 단계에서 얻어지는 솔잎 추출물을 순차적으로 혼합하는 단계;를 포함하는 것으로,

상기 (1)단계의 녹차분말 제조단계는 녹차잎을 60 내지 80도(℃)에서 열수추출하여 녹차추출액을 얻고, 상기 얻어진 녹차추출액을 감압농축하여 녹차 액상추출물을 제조하고, 상기 제조된 녹차 액상추출물을 동결건조하여 녹차 분말을 얻는 것으로, 상기 녹차잎은 폴리페놀 성분의 추출을 극대화하기 위하여 녹차잎 100중량부에 대하여 펙티나아제 0.01 내지 0.1 중량부를 처리하여 25 내지 35도(℃)에서 1 내지 2일간 전처리 발효하며, 상기 감압농축하여 얻어진 녹차 액상추출물은 녹차추출물을 감압농축기에 투입하며, 상기 감압농축기의 감압조건은 500~600mmHg 압력에서 65 내지 75도(℃)의 온도조건에서 수행하는 것이며,

상기 (2) 단계의 황칠 추출물을 제조하는 단계는 1) 황칠을 1~5 cm 길이로 분쇄 또는 파쇄하는 단계, 2) 분쇄 또는 파쇄된 황칠 100중량부에 대하여 800중량부 내지 1200중량부의 용액에 투입하여 50~65도(℃)의 온도에서 10 내지 48시간 동안 저온 추출하는 단계; 상기 2) 단계에 얻어진 저온 추출물을 감압여과장치로 여과, 농축하는 단계;를 포함하는 것으로, 상기 (2) 단계의 용액은 물과 에탄올이며, 상기 물과 에탄올의 중량비는 1 : 10 내지 10 : 1을 가지며,

상기 (3) 단계의 솔잎 추출물 제조단계는 1) 솔잎을 채취하여 세척한 다음 1~5 cm 길이로 절단 또는 파쇄하는 단계; 2) 상기 절단 또는 파쇄된 솔잎을 가열용기에 담고 솔잎 100중량부에 대하여 800중량부 내지 1200중량부의 용액을 가한 다음, 밀봉상태에서 80~90도(℃)의 온도로 12~48 시간 가열하여 솔잎 열수추출물을 제조하는 단계; 상기 제조된 솔잎 열수추출물을 농축시켜서 솔잎 추출물을 얻는 단계;를 포함하는 것으로, 상기 (3) 단계의 용액은 물과 에탄올이며, 상기 물과 에탄올의 중량비는 1 : 10 내지 10 : 1을 가지며,

상기 바인더는 전호화 시킨 전호화 전분(pregelatinized starch)으로, 옥수수 전분, 감자전분, 고구마 전분, 타피오카 전분, 밀전분, 글루텐, 현미가루, 귀리가루, 대두전분 및 보리전분으로 이루어진 군에서 1종 선택하여, 이를 60 내지 70도(℃)에서 10 내지 60분 동안 호화한 후 80 내지 95℃까지 승온하여 얻어지는 전호화 전분인 것으로,

상기 바인더 100 중량부에 대하여 (1)단계의 녹차 분말 20 내지 400 중량부, (2) 단계의 황칠 추출물 20 내지 200 중량부, (3) 단계의 솔잎 추출물 50 내지 800중량부를 가지는 것을 특징으로 하는 수산물 사료 첨가제의 제조 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

청구항 제1항에 있어서,

상기 전호화 전분에 (1)단계에 얻어진 녹차분말을 3 내지 20도(℃)의 물에 녹인 후, 80 내지 95도(℃)까지 승온하여 적하시키고, 이후 (2) 단계에서 얻어진 황칠추출물을 80 내지 95도(℃)까지 승온하고, 적하시키며, 다시 (3) 단계에서 얻어진 솔잎 추출물을 60 내지 75도(℃)로 하여 적하시키는 것을 특징으로 하는 수산물 사료 첨가제의 제조 방법.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

청구항 제1항, 제12항 중 어느 한항에 기재된 수산물 사료 첨가제의 제조방법에 의해 제조되는 사료 첨가제.

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

청구항 제14항에 기재된 사료 첨가제를 포함하는 양식어류용 사료.

**청구항 18**

삭제

**발명의 설명**

## 기술분야

[0001] 항균 활성을 가지는 황칠, 녹차, 솔잎의 천연 추출물의 합성을 통해 어류 병원성 세균에 대한 우수한 항균 활성을 가지며, 기존 항생물질 사용의 최소화로 항생물질 오남용으로 인한 내성 피해를 방지할 수 있는 수산물 사료 첨가제의 제조 방법과 그에 의해 제조되는 사료 첨가제 및 사료에 관한 것으로 식품 첨가제나 차 추출물 등 안전성이 확인된 천연물을 항생제의 대체재로 응용하였으며, 사료 첨가제로서 유기물질 사용시 발생하는 수질 오염 및 회수 문제를 해결하여 수용액상에서 물질 혼합이 가능하고 체내 흡수를 촉진시킬 수 있다.

## 배경기술

[0002] 수산물인 양식어류에 발생하는 어병은 버나바이러스병(Birna virus), 람도바이러스병(Rhabdo virus), 림포시스티스병(Lymphocystis virus), 표피상피증생증(Herpes virus), 비브리오병(Vibrio sp.), 연쇄구균증(Streptococcus sp.), 에드워드병(Edwardsiella sp.), 활주세균증(Flexibacter sp.), 장관백탁증(Vibriosis), 스쿠티카(Scutica sp.) 등과 같이 다양한 종류가 있다.

[0003] 일반적으로 어병은 병원체 등의 전염원이 많이 존재하고 있어 감염의 기회가 큰 경우, 양식어가 병원체에 대하여 면역력이 낮아지는 경우, 과밀양식에 의한 스트레스나 변질사료 섭취에 따른 소화기관 장애 및 외부상처 같은 양식조건의 악화 등이 주요 원인이 되고 있다.

[0004] 현재 국내 양식산업은 급속한 양적 팽창으로 인한 양식장의 무분별한 난립과 포르말린, 과산화수소수와 같은 각종 살균소독제의 과다한 사용으로 인한 수질오염의 악화에 기인한 환경적인 요인과 넙치, 돔류, 뱀장어류 등과 같은 외국으로부터의 새로운 어종의 도입에 따른 병균의 유입 및 출현(예, 스쿠티카증), 각종 항생제의 남용에 따른 내성균의 출현 등과 같은 생물학적인 요인 등에 의하여 고수온기뿐만 아니라, 연중 돌발적인 폐사가 발생하여 많은 양식장이 도산에 직면하게 되는 심각한 피해가 속출하고 있다.

[0005] 이중 국내 양식산업의 주종을 이루고 있는 넙치양식은 치어(1~20cm) 단계에서 초기 먹이생물의 세균성 질병에 의한 오염으로 20일령에서 발생하는 장관백탁증과 체내외에 기생하는 스쿠티카 등은 대량 폐사를 유발하는 중요한 질병으로 알려져 있다.

[0006] 계절별로 발생하는 어류의 질병중 넙치(Paralichthys Olivaceus)에 관하여 살펴보면, 2월에는 주로 바이러스성 질병인 림포시스티스병이 발생하여 어체 표면이나 입안에 흑이 생겨 외관상 좋지 못하고 입안에 생긴 흑 때문에 넙치가 사료를 섭취하지 못하게 되는데, 이 질병은 연안오염 등으로 매년 증가 추세에 있으며, 넙치가 서로 포개는 습성 때문에 빠르게 확산된다.

[0007] 4월경 넙치 종묘는 성장속도가 매우 빠르기 때문에 적정밀도로 수용을 해도 1개월 이내에 다시 밀식상태로 변하므로 자주 밀도를 점검하여 분산시켜 주어야 한다. 그리고, 6월부터는 수온이 20도(℃) 내외로 상승하여 해면어류에 있어서는 성장이 빠르고 중요한 시기인데, 이 시기 치어의 크기는 15~20cm 정도로 어린 시기이므로 각종 질병에 걸리기 쉬우며, 양식어장 환경이 악화된 곳이나 밀식시설 조류가 빠른 곳에서는 궤양병 및 활주세균증의 발병확률이 높다.

[0008] 또한, 6월에 가장 많이 발생하는 질병은 에드워드증과 연쇄구균증으로 에드워드증의 경우 5~7월에, 연쇄구균증의 경우 7~9월에 발병율이 높는데, 7월과 8월의 여름철 고수온기때의 어병 발생요인은 장기연작에 의한 어장노후화로 저질 및 수질악화, 과다한 밀식시설 및 사육, 산패된 사료 급이, 잦은 스트레스, 상처 등 복합적 요인에 의하여 연쇄구균증, 궤양병, 바이러스 질병 등이 발병하고, 10월부터 12월까지의 동절기에도 7월과 8월의 어병 발생조건과 비슷하다.

[0009] 현재 국내 양식업계에서 사용되고 있는 어류의 질병예방 치료약제로는 설파제, 항생제, 퓨란제, 합성 항균제 등과 같은 항균제 및 구충제, 소독제 등이 사용되고 있으나, 이들 예방 치료약제는 사용상의 몇 가지 단점을 지니고 있다.

[0010] 첫째 치료효과를 발휘하기 위해서는 어체내에서 일정 농도로 유지되어야 하며, 이에 따라 투약 중지 및 경구투여시 효과가 없다는 점이고, 둘째 양식장 수조내의 유용한 다른 미생물의 증식을 억제하거나 살해하는 작용을 하고, 셋째 체내 흡수력이 떨어져 약욕제로 사용되거나 내성균이 발생하기 쉬운 점 등이다.

[0011] 따라서, 어류의 질병예방과 치료를 위한 적절한 예방치료제의 선택은 양식업에 있어서 아주 중요한 사항중의 하나로서, 종래의 양식어류용 사료첨가제로는 키토산 올리고당 유도체를 유효성분으로 하는 양식어류용 성장촉진제가 개시되어 있는데(한국공개특허 제2001-0094457호), 이는 고분자 키토산을 효소로 가수분해시켜 제조한 올

리고당을 액체상태로 제조하여 약육처리 또는 액체형태의 사료첨가제로 이용하는 방법이다.

- [0012] 그러나, 키토산 올리고당은 제조시에 많은 산을 사용하기 때문에 폐액의 배출시 공해문제를 유발하게 되고, 올리고당 키토산도 고분자 불용성 키토산을 출발물질로 사용하여 산처리 또는 효소 처리과정을 거쳐 수용화한 다음, 분무건조 등을 거쳐 분말화하기 때문에 제조원가가 비싸다는 문제점이 있다.
- [0013] 키토산의 분자량을 조절하면서 수용성화시키는 방법은 지금까지 많이 연구되었지만 산업적 규모로 실용화하는 것은 불가능하였고, 또한 처리과정이 복잡하고 고비용의 제조공정으로 인하여 산업적 생산에 있어서 경제성이 맞지 않을 뿐만 아니라, 불용성 키토산은 산처리 또는 효소처리과정을 거치는 동안 분자량이 50% 내지 98%의 범위로 급격히 저하되는 문제점이 있었다.
- [0014] 또한, 키토산, 다시마 및 황토를 주원료로 하는 사료첨가제가 개시되어 있는데(한국공개특허 제2001-0016738호), 이는 어류의 질병예방과 해상의 적조현상 해결이라는 두가지 효과적인 측면에 대하여 강조하고 있으나, 키토산, 다시마 및 황토 각각에 대한 일반적으로 알려져 있는 특성과 장점을 기술하고 이에 대한 효과를 예측하고 있을 뿐, 발명의 구성 및 작용에 대한 구체적인 언급이 되어 있지 않다.
- [0015] 국내 양식업에 있어서 가장 큰 문제는 높은 치사율에 의한 양식업의 채산성 감소와 약품남용에 의한 유해성 제공 및 양식어의 품질저하 등이 대두되고 있으며, 따라서 이러한 문제의 해결을 위한 새로운 형태의 양식어 사료 또는 사료첨가제의 개발에 양식업계의 관심이 집중되고 있다.
- [0016] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 연구를 지속적으로 수행하여 항균 활성을 가지는 황칠, 녹차, 솔잎의 천연 추출물의 합성을 통해 이와 같은 문제점을 개선한 사료첨가제를 제조할 수 있음을 알아내고 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 또한, 본 발명의 수산물 사료 첨가제 및 그 제조 방법을 통하여, 어류 병원성 세균에 대한 우수한 항균 활성을 가지며, 기존 항생물질 사용의 최소화로 항생물질 오남용으로 인한 내성 피해를 방지하며, 동시에 어류의 성장 촉진 및 면역증강을 도모할 수 있는 고기능성 양식어류용 사료첨가제를 제공함에 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0018] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2003-0075066호(2003. 9. 22.)  
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0083865호(2010. 7. 23.)  
(특허문헌 0003) 대한민국 공개특허공보 제10-2006-0099192호(2006. 9. 19.)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0019] 항균 활성을 가지는 황칠, 녹차, 솔잎의 천연 추출물의 합성을 통해 어류 병원성 세균에 대한 우수한 항균 활성을 가지며, 기존 항생물질 사용의 최소화로 항생물질 오남용으로 인한 내성 피해를 방지할 수 있는 수산물 사료 첨가제의 제조 방법과 그에 의해 제조되는 사료 첨가제 및 사료에 관한 것으로 식품 첨가제나 차 추출물 등 안전성이 확인된 천연물을 항생제의 대체제로 응용하였으며, 사료 첨가제로서 유기물질 사용시 발생하는 수질 오염 및 회수 문제를 해결하여 수용액상에서 물질 혼합이 가능하고 체내 흡수를 촉진시킬 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명의 수산물 사료 첨가제의 제조 방법과 그에 의해 제조되는 사료 첨가제 및 사료를 통하여, 어류 병원성 세균에 대한 우수한 항균 활성을 가지며, 기존 항생물질 사용의 최소화로 항생물질 오남용으로 인한 내성 피해를 방지하며, 동시에 어류의 성장촉진 및 면역증강을 도모할 수 있는 고기능성 양식어류용 사료첨가제를 제공함에 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0021] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, (1) 녹차 분말을 제조하는 단계; (2) 황칠 추출물을 제조하는 단계; (3) 솔잎 추출물을 제조하는 단계; (4) 바인더에 대하여 상기 (1) 단계에서 얻어지는 녹차분말, 상기 (2) 단계

에서 얻어지는 황칠 추출물, 상기 (3) 단계에서 얻어지는 솔잎 추출물을 순차적으로 혼합하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0022] 또한, 상기 (1)단계의 녹차분말 제조단계는 녹차잎을 60 ~ 80도(℃)에서 열수추출하여 녹차추출액을 얻고, 상기 얻어진 녹차추출액을 감압농축하여 녹차 액상추출물을 제조하고, 상기 제조된 녹차 액상추출물을 동결건조하여 녹차 분말을 얻는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 그리고, 상기 녹차잎은 폴리페놀 성분의 추출을 극대화하기 위하여 녹차잎 100중량부에 대하여 펙티나아제 0.01 내지 0.1 중량부를 처리하여 25 ~ 35도(℃)에서 1 내지 2일간 전처리 발효하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 또한, 상기 감압농축하여 얻어진 녹차 액상추출물은 녹차추출물을 감압농축기에 투입하며, 상기 감압농축기의 감압조건은 500-600mmHg 압력에서 65 내지 75도(℃)의 온도조건에서 수행하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 그리고, 상기 (3) 단계의 솔잎 추출물 제조단계는 1) 솔잎을 채취하여 세척한 다음 1~5 cm 길이로 절단 또는 파쇄하는 단계; 2) 상기 절단 또는 파쇄된 솔잎을 가열용기에 담고 솔잎 100중량부에 대하여 800중량부 내지 1200 중량부의 용액을 가한 다음, 밀봉상태에서 80~90도(℃)의 온도로 12~48 시간 가열하여 솔잎 열수추출물을 제조하는 단계; 상기 제조된 솔잎 열수추출물을 농축시켜서 솔잎 추출물을 얻는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 여기서, 상기 용액은 물과 에탄올이며, 상기 물과 에탄올의 중량비는 1 : 10 내지 10 : 1을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명의 (2) 단계의 황칠 추출물을 제조하는 단계는 1) 황칠을 1~5 cm 길이로 분쇄 또는 파쇄하는 단계, 2) 분쇄 또는 파쇄된 황칠 100중량부에 대하여 800중량부 내지 1200중량부의 용액에 투입하여 50~65도(℃)의 온도에서 10 내지 48시간 동안 저온 추출하는 단계; 상기 2) 단계에 얻어진 저온 추출물을 감압 여과장치로 여과·농축하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 그리고, 상기 용액은 물과 에탄올이며, 상기 물과 에탄올의 중량비는 1 : 10 내지 10 : 1을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 또한, 본 발명에서 바인더는 옥수수 전분, 감자전분, 고구마 전분, 타피오카 전분, 밀전분, 글루텐, 현미가루, 귀리가루, 대두전분 및 보리전분으로 이루어진 군으로부터 1종 선택하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 여기서, 상기 바인더는 옥수수 전분, 감자전분, 고구마 전분, 타피오카 전분, 밀전분, 글루텐, 현미가루, 귀리가루, 대두전분 및 보리전분을 전호화시킨 전호화 전분(pregelatinized starch)인 것을 특징으로 한다.
- [0031] 한편, 상기 전호화시킨 전호화 전분(pregelatinized starch)은 옥수수 전분, 감자전분, 고구마 전분, 타피오카 전분, 밀전분, 글루텐, 현미가루, 귀리가루, 대두전분 및 보리전분으로 이루어진 군에서 1종 선택하여, 이를 60 내지 70도(℃)에서 10 내지 60분 동안 호화한 후 80 내지 95℃까지 승온하여 얻어지는 전호화 전분인 것을 특징으로 한다.
- [0032] 또한, 본 발명에서 전호화 전분에 (1)단계에 얻어진 녹차분말을 3 내지 20도(℃)의 물에 녹인 후, 80 내지 95도(℃)까지 승온하여 적하시키고, 이후 (2) 단계에서 얻어진 황칠추출물을 80 내지 95도(℃)까지 승온하고, 적하시키며, 다시 (3) 단계에서 얻어진 솔잎 추출물을 60 내지 75도(℃)로 하여 적하시키는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 그리고, 바인더인 전호화 전분 100 중량부에 대하여 (1)단계의 녹차 분말 20 내지 400 중량부, (2) 단계의 황칠 추출물 20 내지 200 중량부, (3) 단계의 솔잎 추출물 50 내지 800중량부를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 그리고, 본 발명의 수산물 사료 첨가제의 제조방법에 의해 제조되는 사료 첨가제인 것을 특징으로 하며, 또한 사료첨가제를 포함하는 사료인 것을 특징으로 한다. 또한 상기 사료는 양식 어료용 사료인 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명에 의한 사료첨가제는 어류 병원성 세균인 *Vibrio ichthyenter* (P 8487), *Vibrio harvey* (P 8370), *Streptococcus iniae* (P 5228), *Streptococcus parauberis* (P 3287), *Lactococcus garviae* (FP 5245), *Photobacterium damsela* (FP 4101), *Edwardsiella tarda* (P 5060) 중 1종 이상에 대하여 항균활성을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0035] 더욱 바람직하게는 본 발명에 의한 사료첨가제는 어류 병원성 세균인 *Vibrio ichthyenter* (P 8487), *Vibrio harvey* (P 8370), *Streptococcus iniae* (P 5228), *Streptococcus parauberis* (P 3287), *Lactococcus garviae* (FP 5245), *Photobacterium damsela* (FP 4101), *Edwardsiella tarda* (P 5060)에 대하여 항균활성을 가지는 것을 특징으로 한다.

## 발명의 효과

- [0036] 본 발명은 수산물 사료 첨가제의 제조 방법과 그에 의해 제조되는 사료 첨가제 및 사료에 관한 것으로 항균 활성을 가지는 황칠, 녹차, 솔잎의 천연 추출물의 합성을 통해 어류 병원성 세균에 대한 우수한 항균 활성을 가지며, 기존 항생물질 사용의 최소화로 항생물질 오남용으로 인한 내성 피해를 방지할 수 있는 수산물 사료 첨가제의 제조 방법과 그에 의해 제조되는 사료 첨가제 및 사료에 관한 것으로 식품 첨가제나 차 추출물 등 안전성이 확인된 천연물을 항생제의 대체제로 응용하였으며, 사료 첨가제로서 유기물질 사용시 발생하는 수질 오염 및 회수 문제를 해결하여 수용액상에서 물질 혼합이 가능하고 체내 흡수를 촉진시킬 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 수산물 사료 첨가제의 제조 방법과 그에 의해 제조되는 사료 첨가제 및 사료를 통하여, 어류 병원성 세균에 대한 우수한 항균 활성을 가지며, 기존 항생물질 사용의 최소화로 항생물질 오남용으로 인한 내성 피해를 방지하며, 동시에 어류의 성장촉진 및 면역증강을 도모할 수 있는 고기능성 양식어류용 사료첨가제를 제공함에 있다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 본 발명의 수산물 사료 첨가제를 제조하기 위하여, (1) 녹차 분말을 제조하는 단계; (2) 황칠 추출물을 제조하는 단계; (3) 솔잎 추출물을 제조하는 단계; (4) 바인더에 대하여 상기 (1) 단계에서 얻어지는 녹차분말, 상기 (2) 단계에서 얻어지는 황칠 추출물, 상기 (3) 단계에서 얻어지는 솔잎 추출물을 순차적으로 혼합하는 단계;를 포함한다.
- [0039] 또한, 본 발명에서 전호화 전분에 (1)단계에 얻어진 녹차분말을 3 내지 20도(℃)의 물에 녹인 후, 80 내지 95도(℃)까지 승온하여 적하시키고, 이후 (2) 단계에서 얻어진 황칠추출물을 80 내지 95도(℃)까지 승온하고, 적하시키며, 다시 (3) 단계에서 얻어진 솔잎 추출물을 60 내지 75℃로 하여 적하시킨다.
- [0040] 또한, 본 발명의 상기 (1)단계의 녹차분말 제조단계는 녹차잎을 60 내지 80도(℃)에서 열수추출하여 녹차추출액을 얻고, 상기 얻어진 녹차추출액을 감압농축하여 녹차 액상추출물을 제조하고, 상기 제조된 녹차 액상추출물을 동결건조하여 녹차 분말을 얻는다. 또한 녹차잎은 폴리페놀 성분의 추출을 극대화하기 위하여 녹차잎 100중량부에 대하여 펙티나아제 0.01 내지 0.1 중량부를 처리하여 25 내지 35도(℃)에서 1 내지 2일간 전처리 발효를 한다. 또한 감압농축하여 얻어진 녹차 액상추출물은 녹차추출물을 감압농축기에 투입하며, 상기 감압농축기의 감압조건은 500-600mmHg 압력에서 65 내지 75도(℃)의 온도조건에서 수행한다.
- [0041] 더욱 자세하게 녹차분말을 제조하기 위한 방법을 설명하기로 한다. 물 100중량부를 기온으로 60~80도(℃)의 상기 물에 녹차잎을 5 내지 10 중량부 첨가하고 10 내지 20분간 추출하여 325 메쉬체를 통과시켜 이것을 5,000~10,000rpm에서 5~10분간 원심분리한다. 또한 본 발명에 사용되는 녹차잎은 바람직하게는 녹차에 함유된 각종 유익한 성분의 손실을 방지하기 위해 드럼배전기로 120~150도(℃)에서 5~30 분 동안, 과장10~100μm에서 원적외선 배전처리한 것을 이용한다. 또한 녹차가 함유한 폴리페놀 성분의 추출을 극대화하기 위해 녹차잎 100중량부를 기준으로 하여 펙티나아제 0.01 내지 0.1 중량부를 처리하여 25 내지 35도(℃)에서 1 내지 2일간 전처리 발효하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 녹차잎을 이용한 열수추출이 끝나면 감압농축을 수행하며, 상기 감압농축시에 감압농축기(500-600mmHg 압력)를 이용하여 수행되어질 수 있다. 또한 감압농축 후에 얻어진 여과된 액상 추출물을 동결 건조기를 이용하여 -80 내지 -40도(℃)의 온도에서 80 내지 90시간 건조하여 분말화한다.
- [0042] 또한, 녹차 내에 존재하는 epicatechin gallate(EGC)는 항암 작용이나 항균작용, 고혈압 및 동맥경화 억제작용 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [0043] 본 발명의 (2) 단계인 황칠 추출물을 제조하는 단계는 1) 황칠을 1~5 cm 길이로 분쇄 또는 파쇄하는 단계, 2) 분쇄 또는 파쇄된 황칠 100중량부에 대하여 800중량부 내지 1200중량부의 용액에 투입하여 50~65도(℃)의 온도에서 10 내지 48시간 동안 저온 추출하는 단계; 상기 2) 단계에 얻어진 저온 추출물을 감압여과장치로 여과·농축하는 단계;를 포함한다. 또한 용액은 물과 에탄올이며, 상기 물과 에탄올의 중량비는 1 : 10 내지 10 : 1을 가진다.
- [0044] 또한, 황칠은 두릅나무과(araliaceae)에 속하는 아열대성 상록활엽교목으로 동남아시아 등에 약 75여종이 분포하고 있으며 우리나라에는 1종이 분포하고 있다. 황칠나무 추출물에서 현재까지 알려진 바로는 항암, 항산화, 항균, 간세포 재생, 당뇨치료 효과 등으로 알려져 있다. 또한, 황칠나무에 함유되어 있는 성분으로는 세스퀴테르펜(Sesquiterpene)에 속하는 β-selinene, capnellane-8-one, β-cubebene 등의 성분이 있으며, 그 중

$\beta$ -cubebene의 경우 항균력이 있다는 알려져 있다.

- [0045] 본 발명의 (3) 단계인 솔잎 추출물 제조단계는 1) 솔잎을 채취하여 세척한 다음 1~5 cm 길이로 절단 또는 파쇄하는 단계; 2) 상기 절단 또는 파쇄된 솔잎을 가열용기에 담고 솔잎 100중량부에 대하여 800중량부 내지 1200중량부의 용액을 가한 다음, 밀봉상태에서 80~90도(℃)의 온도로 12~48 시간 가열하여 솔잎 열수추출물을 제조하는 단계; 상기 제조된 솔잎 열수추출물을 농축시켜서 솔잎 추출물을 얻는 단계;를 가진다. 또한, 솔잎 열수추출물을 얻기 위하여 투입되는 용액은 물과 에탄올이며, 상기 물과 에탄올의 중량비는 1 : 10 내지 10 : 1 을 가진다.
- [0046] 솔잎(Pinus densiflora sieb. et zucc)은 중국이나 일본, 한국을 포함한 아시아 지역, 유럽지역, 아메리카 지역 등의 임야에 널리 자생하고 있는 소나무로부터 저비용으로 손쉽게 얻을 수 있는 장점과 솔잎의 천연향, 항균작용, 항산화 작용, 항암작용, 멜라닌 활성억제 작용 등의 약리적 특성을 가지고 있다. 주요 성분으로는  $\alpha$   $\beta$ -Pinene, Camphene, Limonene, Myrcene, Carene, Terpeneol 등이 있으며 이들 중  $\alpha$   $\beta$ -Pinene은 이소프레노이드 계열로 휘발성이 강한 것이 특징이며 항균력이 있는 것으로 알려져 있다.
- [0047] 본 발명에서는 바인더로 옥수수 전분, 감자전분, 고구마 전분, 타피오카 전분, 밀전분, 글루텐, 현미가루, 귀리가루, 대두전분 및 보리전분으로 이루어진 군으로부터 1종 선택하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 상기 옥수수 전분, 감자전분, 고구마 전분, 타피오카 전분, 밀전분, 글루텐, 현미가루, 귀리가루, 대두전분 및 보리전분 중에서 선택되는 1종을 전호화시킨 전호화 전분(pregelatinized starch)을 선택하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0048] 전분(Starch)은 아밀로스(amylose)와 아밀로펙틴(amylopectin)이란 2가지의 성분으로 구성된다. 둘 다 다당류인데, 포도당이 곧은 사슬 모양 및 나선형으로 결합된 것이 아밀로스이고, 포도당이 나뭇가지 모양으로 결합된 것이 아밀로펙틴이다. 식물의 종류에 따라 다르지만 약 20~25%의 아밀로스와 75~80%의 아밀로펙틴으로 구성된다. 아밀로스(amylose)와 아밀로펙틴(amylopectin) 분자들은 수소결합에 의해 전분 입자 속에서 미셀(micell) 구조를 형성하고 있으며, 전분에 물을 가하여 가열하면 열에너지에 의해서 전분의 규칙적인 미셀 구조가 느슨해져서 물이 침투해 들어가 팽윤하게 된다. 한층 더 가열을 계속하면 미셀 구조는 파괴되고 전분 입자들의 콜로이드 용액이 형성되면서 점도가 상승한다. 이런 현상을 호화(gelatinization)라고 하며, 전호화 전분(Pregelatinized Starch)은 전분이 임의의 정도로 호화된 것을 의미한다. 호화전분은 전분 분해효소 등의 작용을 받기 쉬워 생전분으로 된 식품들보다 소화율 및 흡수율이 좋다.
- [0049] 전호화 전분은 아밀로스와 아밀로펙틴을 포함하는바 아밀로스는 호화가 잘 되는데 반해 아밀로펙틴의 경우 찬물에서는 잘 호화되지 않고 뜨거운 물에서 잘 녹는 성질이 있어서, 예를 들어 70도(℃)에서 아밀로스의 호화 후 90도(℃)로 승온하여 아밀로펙틴의 호화력을 높일 수 있다. 본 발명에서는 전호화 전분을 제조하기 위하여 옥수수 전분 또는 감자전분을 이용할 수 있다. 본 발명에서는 전호화 전분을 얻기 위해, 예를 들어 옥수수 전분 또는 감자전분을 60 내지 70도(℃)에서 10 내지 60분동안 호화한 후 다시 80 내지 95도(℃)까지 승온할 경우에, 전호화 전분을 제조할 수 있다.
- [0050] 본 발명에서는 바인더인 전호화 전분 100 중량부에 대하여 (1)단계의 녹차 분말 20 내지 400 중량부, (2) 단계의 황칠 추출물 20 내지 200 중량부, (3) 단계의 솔잎 추출물 50 내지 800중량부를 가지는 것이 바람직하다.
- [0051] 또한, 본 발명은 수산물 사료 첨가제의 제조방법을 통하여 제조되는 사료 첨가제로서, 상기 사료 첨가제를 양식용 어류 사료와 혼합하여 사료로 이용할 수 있다.
- [0052] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 아래에서 상세히 설명하지만, 이들에 의해 한정된 것은 아니다.
- [0053] (제조예 1: 녹차 분말 제조)
- [0054] 녹차추출액을 얻기 위하여 80도(℃)의 물에 상기 물 100중량부를 기준으로 녹차잎을 5 중량부 첨가하고 20분간 추출하여 325 메쉬체를 통과시켜 이것을 5,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 열수추출 후 여과하여 잔사를 제거한 녹차 추출액을 감압농축기(500~600mmHg 압력, 70 도(℃) 조건)를 사용하여 20 ° Brix 가 되도록 농축하고, 상기 과정에 의해 얻은 농축액은 동결 건조기를 이용하여 -50℃,  $18 \times 10^{-3}$  M bar에서 90시간 건조하여 분말화하여 녹차분말을 제조하였다.
- [0055] (제조예 2: 황칠 추출물의 제조)
- [0056] 황칠 1kg에 대하여 1~5 cm 길이로 분쇄 또는 파쇄하고, 용액인 물 6Kg과 에탄올 2Kg의 혼합용액에 파쇄

된 황칠을 용기에 투입하여 60도(℃)온도에서 24시간동안 저온추출을 수행하고, 이후 저온추출을 통하여 얻어진 저온추출물을 감압여과장치를 이용하여 여과 및 농축하여 황칠 추출물을 수득하였다.

[0057] (제조예 3: 솔잎 추출물의 제조)

[0058] 솔잎 1Kg을 채취하여 세척한 다음 1~5 cm 길이로 절단 또는 파쇄하고, 용액인 물 6Kg과 에탄올 2Kg의 혼합용액에 파쇄된 솔잎을 용기에 투입하여 90도(℃)에서 20시간동안 가열하여 솔잎 열수추출을 실시하고, 이후 열수추출에 의해 얻어진 솔잎 열수추출물을 감압여과장치를 이용하여 여과 및 농축하여 솔잎 추출물을 수득하였다.

[0059] (제조예 4: 전호화 전분의 제조)

[0060] 옥수수 전분 100g을 70 ℃에서 10 분동안 호화한 후 90도(℃)까지 승온하여 전호화하여 전호화 전분을 수득하였다.

[0061] (실시에 1: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0062] 제조예 1을 통하여 얻어진 녹차분말 3g을 10도(℃)의 물 50g에 혼합하여 교반시킨 후, 교반된 녹차분말 수용액을 90도(℃)까지 승온하여 제조예 4에서 얻은 전호화 전분 3g에 적하시켜 제조(1)을 제조하며, 이후 제조예 2를 통하여 얻어진 황칠추출물 3g을 90도(℃)까지 승온하여 제조(1)에 적하시켜 제조(2)를 제조하고, 다시 제조예 3을 통하여 얻어진 솔잎추출물 10g을 70도(℃)까지 승온하여 제조(2)에 적하시켜 수산물 사료 첨가제 (1)를 제조하였다.

[0063] (실시에 2: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0064] 실시예 2는 녹차분말 5g, 전호화 전분 3g, 황칠추출물 3g, 솔잎수출물10g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(2)를 제조하였다.

[0065] (실시에 3: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0066] 실시예 3은 녹차분말 5g, 전호화 전분 3g, 황칠추출물 5g, 솔잎수출물10g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(3)를 제조하였다.

[0067] (실시에 E: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0068] 실시예 E는 녹차분말 5g, 전호화 전분 10g, 황칠추출물 5g, 솔잎수출물10g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(E)를 제조하였다.

[0069] (실시에 4: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0070] 실시예 4는 녹차분말 10g, 전호화 전분 3g, 황칠추출물 3g, 솔잎수출물10g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(4)를 제조하였다.

[0071] (실시에 5: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0072] 실시예 5는 녹차분말 5g, 전호화 전분 3g, 황칠추출물 3g, 솔잎수출물20g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(5)를 제조하였다.

[0073] (실시에 6: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0074] 실시예 6은 녹차분말 5g, 전호화 전분 3g, 황칠추출물 3g, 솔잎수출물 30g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(6)를 제조하였다.

[0075] (실시에 7: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0076] 실시예 7은 녹차분말 5g, 전호화 전분 3g, 황칠추출물 3g, 솔잎수출물 40g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(7)를 제조하였다.

[0077] (비교예 1: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0078] 비교예 1은 녹차분말 5g, 전호화 전분 3g, 황칠추출물 0g, 솔잎수출물 0g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(비교예 1)를 제조하였다.

[0079] (비교예 2: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0080] 비교예 2는 녹차분말 0g, 전호화 전분 3g, 황칠추출물 3g, 솔잎수출물 0g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(비교예 2)를 제조하였다.

[0081] (비교예 3: 수산물 사료 첨가제 제조)

[0082] 비교예 3은 녹차분말 0g, 전호화 전분 3g, 황칠추출물 0g, 솔잎수출물 10g을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법으로 수산물 사료 첨가제(비교예 3)를 제조하였다.

[0083] (실험예)

[0084] 국립수산물학원에서 분양받은 어류병원성 세균 7종에 대한 항균활성 실험을 수행하였다. 어류 병원균 7종은 *Vibrio ichthyoenteri* (P 8487), *Vibrio harveyi* (P 8370), *Streptococcus iniae* (P 5228), *Streptococcus parauberis* (P 3287), *Lactococcus garviae* (FP 5245), *Photobacterium damsela* (FP 4101), *Edwardsiella tarda* (P 5060) 이다.

[0085] 균주배양을 위하여 *Vibrio ichthyoenteri* (P 8487), *Vibrio harveyi* (P 8370), *Edwardsiella tarda* (P 5060)는 Brain Heart Infusion에 1% NaCl을 첨가하여 25℃에서 18시간동안 균주를 배양하였다. 그리고, *Streptococcus iniae* (P 5228), *Streptococcus parauberis* (P 3287), *Lactococcus garviae* (FP 5245), *Photobacterium damsela* (FP 4101)은 Nutrient broth에 1% NaCl을 첨가하여 25℃에서 18시간동안 균주를 배양하였다.

[0086] 병원성 세균에 대한 항균 활성 검사를 위하여 디스크 확산법(Disk diffusion method)으로 MHA(Mueller Hinton Agar)와 THA(Todd Hewitt Agar), TSA(Tryptic Soy Agar) 배지를 이용하였다. 그리고 액체배지에서 배양하여 활성화한 대상 세균 액 200ul를 멸균 면봉으로 평판배지에 고르게 도말 후 10mm paper disc를 사용하여 실시예 1 내지 7 및 E, 비교예 1 내지 3에서 제조된 사료첨가제를 30ul주입하였고, 이후, Incubator에서 37℃의 온도조건에서 24~48시간 배양 후 paper disk의 직경을 포함한 주위의 Inhibition zone을 측정하였다.

표 1

| 어병<br>세균   | 실시예<br>1 | 실시예<br>2 | 실시예<br>3 | 실시예<br>E | 실시예<br>4 | 실시예<br>5 | 실시예<br>6 | 실시예<br>7 | 비교예<br>1 | 비교예<br>2 | 비교예<br>3 |
|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| P<br>8370  | 17.79    | 20.78    | 22.26    | 19.20    | 19.28    | 20.06    | 18.44    | 17.89    | 18.23    | 17.69    | -        |
| P<br>5060  | 18.74    | 20.39    | 20.27    | 19.94    | 19.07    | 18.12    | 18.23    | 17.08    | 18.04    | 19.06    | 19.67    |
| P<br>8487  | 14.00    | 18.32    | 16.43    | 16.78    | 20.91    | 17.55    | 17.25    | 13.85    | -        | -        | -        |
| P<br>3287  | 13.92    | 15.75    | 12.62    | 14.94    | 16.57    | 17.16    | 16.61    | 13.87    | 15.06    | -        | -        |
| FP<br>5245 | 12.34    | 13.45    | 14.65    | 14.64    | 15.04    | 12.82    | 12.90    | 12.90    | -        | -        | -        |
| FP<br>4101 | 16.28    | 19.98    | 20.94    | 13.35    | 20.29    | 18.54    | 18.57    | 16.69    | 17.03    | 18.09    | -        |
| P<br>5228  | 12.90    | 20.60    | 21.49    | 20.65    | 22.98    | 20.44    | 17.27    | 12.85    | -        | -        | -        |

[0088] (Disk clear zone 단위 : mm)

[0089] (표 1)은 실시예 1 내지 7 및 실시예 E, 비교예 1 내지 3의 수산물 사료 첨가제에 대한 어류 병원균 7종(*Vibrio ichthyoenteri* (P 8487), *Vibrio harveyi* (P 8370), *Streptococcus iniae* (P 5228), *Streptococcus parauberis* (P 3287), *Lactococcus garviae* (FP 5245), *Photobacterium damsela* (FP 4101), *Edwardsiella tarda* (P 5060))에 대한 항균 활성 실험결과이다.

[0090] 또한, (표 1)에 따르면, 실시예1 내지 7 및 실시예 E의 경우에는 어류 병원균 7종인 *Vibrio ichthyoenteri* (P 8487), *Vibrio harveyi* (P 8370), *Streptococcus iniae* (P 5228), *Streptococcus parauberis* (P 3287), *Lactococcus garviae* (FP 5245), *Photobacterium damsela* (FP 4101), *Edwardsiella*

*tarda* (P 5060)에 대하여 항균 활성이 모두 나타났음을 확인할 수 있었다.

[0091] 그러나, 비교예 1의 경우에는 P 5060, FP 4101, P 3287, P 8370에 대해서만 항균 활성이 나타났으며, 비교예 2의 경우에는 P 5060, FP 4101, P 8370에 대해서만 항균활성이 나타났음을 확인하였다. 그리고, 비교예 3의 경우에는 P 5060에 대해서만 항균 활성이 나타났음을 확인할 수 있었다.

[0092] 결국 어류 병원균 7종인 *Vibrio ichthyenteri* (P 8487), *Vibrio harveyi* (P 8370), *Streptococcus iniae* (P 5228), *Streptococcus parauberis* (P 3287), *Lactococcus garviae* (FP 5245), *Photobacterium damsela* (FP 4101), *Edwardsiella tarda* (P 5060)에 대하여 항균활성이 나타나기 위해서는 녹차분말, 황칠추출물, 솔잎추출물을 모두 포함하는 수산물 첨가제에 대해 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0093] 따라서, 본 발명에 의한 수산물 사료 첨가제를 이용하여 양식어를 생산할 경우 최근 인간의 건강과 기능성 제공식품에 대한 소비자 욕구를 충족시킬 수 있으며, 새로운 기능성 어류식품을 공급할 수 있을 뿐만 아니라 현행 양식업 기술을 한 차원 높일 수 있는 기술적 및 경제적 가치를 제공하는데 기여할 수 있다고 판단한다.

[0094] 이상 본 발명을 보다 상세하게 설명하였다. 그러나 이는 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 하는 예시적인 것일 뿐이고, 이에 의해 본 발명의 기술적 사상의 본질이 변하거나 범위가 축소되는 것은 아니며, 여기에서 제시되지 않은 여러 가지 실시예 및 적용예들에 가능함은 당업자에게 있어 당연할 것이다.