



등록특허 10-2126991



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월25일

(11) 등록번호 10-2126991

(24) 등록일자 2020년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/05 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/05 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0173925

(22) 출원일자 2018년12월31일

심사청구일자 2018년12월31일

(56) 선행기술조사문헌

Ho et al., PHYTOTHERAPY RESEARCH, 2001, 15, pp.139-141 (2001.03.16.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김기영

경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호(죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)

송현찬

서울특별시 동작구 동작대로7길 64, 에이동 202호(사당동, 경운빌라)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 6 항

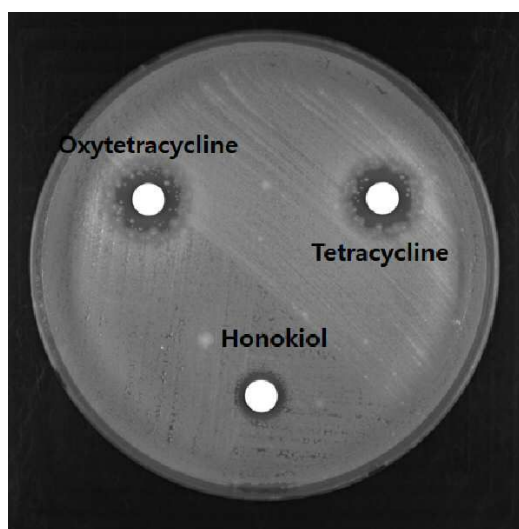
심사관 : 정혜진

(54) 발명의 명칭 호노키올을 유효성분으로 포함하는 꿀벌감염병의 예방 또는 치료용 조성물.

(57) 요약

본 발명은 호노키올(Honokiol)을 포함하는 꿀벌 감염병의 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 감염병의 원인균에 대한 항균 활성을 가지는 조성물에 대한 것으로서, 대표적인 꿀벌 감염병인 미국 부저병 및 이의 원인균인 패니 바실러스 라베(Paenibacillus larvae)에 대한 항균용 조성물 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 상기 원인균에 대한 항균 효과가 우수하여 미국부저병과 같이 박멸이 어려운 꿀벌 감염병의 예방 또는 치료제로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/04 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 IPET11545016545

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업: 농업생명자원 생산, 관리기술

연구과제명 꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술

기 여 율 1/1

주관기관 주식회사 한비

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

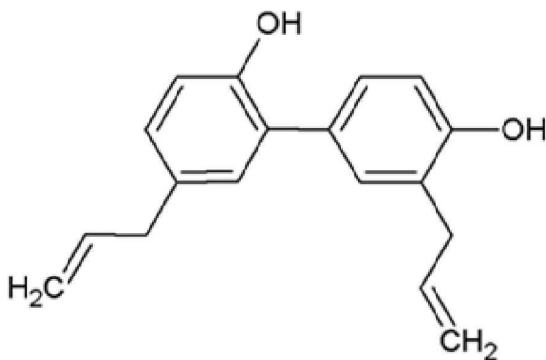
청구항 1

호노키올(Honokiol)을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 감염병 예방 또는 치료용 조성물로서,
상기 꿀벌 감염병은 미국부저병인 것을 특징으로 하는, 꿀벌감염병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 호노키올은 하기 화학식 1의 화합물인 것을 특징으로 하는 꿀벌 감염병 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 미국부저병의 원인균에 대한 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 꿀벌감염병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 원인균은 패니바실러스 라베(*Paenibacillus larvae*)인 것을 특징으로 하는 꿀벌감염병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물에 하나 이상의 항균제 또는 항진균제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 꿀벌감염병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 항균제 또는 항진균제는 테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 아미카신, 젠타마이신, 토브라마이신, 스트렙토마이신, 네틸마이신, 카나마이신, 시프로플록사신, 노르플록사신, 오픈록사신, 트로바플록사신, 로메플록사

신, 레보플록사신, 에녹사신, 나프티리딘, 술폰아미드, 폴리믹신, 클로르암페니콜, 네오마이신, 파라모모마이신, 콜리스티메테이트, 박시트라신, 반코마이신, 리팜핀, 시클로세린, 베타-락탐, 세팔로스포린, 암포테리신, 플루코나졸, 플루시토신, 나타마이신, 미코나졸, 케토코나졸, 코르티코스테로이드, 디클로페낙, 플루르비프로펜, 케토롤락, 수프로펜, 코몰린, 로독사미드, 레보카바스틴, 나파졸링, 안타졸린 및 페니라미만으로 구성된 군으로부터 1 이상의 물질인 것을 특징으로 하는, 꿀벌감염병 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 꿀벌의 유충에 대한 전염병인 미국 부저병을 일으키는 병원균으로 알려져 있는 패니바실러스 라베(*Paenibacillus larvae*)에 대하여 항균 효과를 가지는, 호노키올(Honokiol)을 포함하는 꿀벌 감염병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생태계에서 꿀벌은 필수 불가결한 존재이다. 특히 꿀벌은 식물의 수분 과정에서 큰 역할을 하고 있다. 하지만 꿀벌의 병원체에 의하여 꿀벌의 개체수가 꾸준히 줄어 들고 있으며, 이로 인하여 많은 문제점이 야기되고 있다.

[0003] 꿀벌의 병원체에는 대표적으로 미국부저병을 일으키는 패니바실러스 라베(*Paenibacillus larvae*) 나 노제마병을 일으키는 노제마 아피스(*Nosema apis*), 백목병을 일으키는 아스코스페라 아피스(*Ascosphaera apis*)등이 있다.

[0004] *Paenibacillus larvae*는 꿀벌 유충에 감염하는 세균 중 하나로 그람양성균 중 간균($2.5 \sim 5.0 \mu\text{m} \times 0.7 \sim 0.8 \mu\text{m}$)의 형태로 포자(spore)를 형성 할 수 있기 때문에 살균제에 대한 저항성이 있고 따라서 특정 조건에서는 35 년간 감염력을 유지 할 수도 있다. 미국 부저병의 전염은 오염된 꿀의 재사용이나 오염된 기구를 재 사용 하여 전염되는 경우도 보고 되어 있으며 또한 감염된 벌의 교환 또는 도봉들에 의하여 유충간 또는 봉군간에 전염이 확산되기도 한다. 일반적으로 부화 한지 2일 이내의 유충에 감염이 심각하며, 유충에 전염된 *Paenibacillus larvae* 내생포자는 경구를 통하여 중장관(midgut)에 도착한 후 1일 이내에 영양세포로 성장을 하며 이후 급속히 증식한다. 증식된 *Paenibacillus larvae* 세포들은 유충이 죽으면 영양분이 줄어들어 다시 1개의 유충 당 약 500 내지 1,000만개의 내생포자를 형성하여 다른 유충을 감염시킨다. 변태하기 전 유충의 상태로 죽기 때문에 *Paenibacillus larvae*의 개체수를 조절하기 위한 연구가 계속 요구되어져 왔다.

[0005] 현재까지 *Paenibacillus larvae*의 개체수를 줄이기 위하여 많은 연구가 진행이 되어 왔으며, 주로 화학물질의 처리 방법이나 열처리 방법을 사용해왔다. 하지만 *Paenibacillus larvae*은 열이나 여러 가지 화학물에 저항성을 갖고 있고, 열처리하여 소각하는 방법은 경제적으로 손실이 큰 문제점 등 많은 어려움이 있었다. 몇몇 *Paenibacillus larvae*의 경우 벌집 내에서 35년이 지난 후에도 죽지 않음이 밝혀졌기 때문에 개체수를 줄이는 방법을 찾기 힘든 실정이다.

[0006] 따라서 *Paenibacillus larvae*을 확실하게 죽일 수 있거나 또는 내성균주의 발생을 저해 할 수 있도록 선택적으로 *Paenibacillus larvae*의 성장을 저해하는 신규 항균물질의 개발이 시급한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 전술한바와 같이, 꿀벌에 미국부저병(American Foulbrood)을 유발하는 원인균인 *Paenibacillus larvae*의 감염 및 확산 문제를 해결하고자 효과적으로 *Paenibacillus larvae*의 성장을 억제하고, 박멸할 수 있는 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

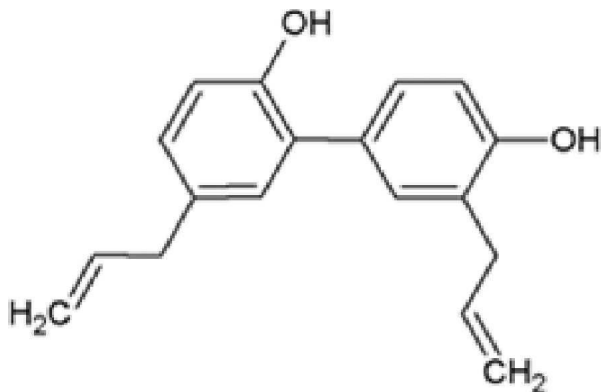
[0008] 즉, 본 발명의 목적은 호노키올을 유효성분으로 포함하는 꿀벌감염병 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 호노키올(Honokiol)을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 감염병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 상기 호노키올은 하기 화학식 1로 표시되는

물질이다.

화학식 1



[0010]

[0011]

상기 화학식 1의 호노키올은 (2-(4-hydroxy-3-prop-2-enylphenyl)-4-prop-2-enylphenol)로 명명될 수 있으며, 목련과(Magnoliaceae)에 속하는 다년생 초본인 후박(Magnolia cortex)으로부터 추출되는 대표적인 유효성분 중 하나이다. 항암, 결핵치료제, 지방간질환에 대한 치료제, 발모제 등의 효과가 알려져 있으며, 일부 문헌을 통하여 항균 활성을 가지고 있음이 보고되어 있다.

[0012]

상기 호노키올은 후박으로부터 추출용매를 이용하여 공지된 추출 방법에 의해 추출될 수 있으며, 추출용매는 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 1,3-부틸렌글리콜 중 1 또는 2 이상을 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013]

또한 상기 조성물은, 꿀벌 감염병 중 미국부저병(ABF)을 유발하는 원인균인 패니바실러스 라베(*Paenibacillus larvae*)에 대한 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0014]

본 발명의 조성물은, 미국 부저병을 유발하는 패니바실러스 라베(*Paenibacillus larvae*)에 대하여 특이적인 항균 활성을 보유하고 있으므로, 광범위한 사용이 유도되지 않고, 내성 발생률이 최소화될 수 있으며, 생체 안정성이 우수한 특징을 가진다.

[0015]

이에 제한되는 것은 아니나, 상기 항균 활성을 가지는 조성물은, 하나 이상의 항균제 또는 항진균제를 추가로 포함하여 패니바실러스 라베(*Paenibacillus larvae*)에 대한 항균 활성을 더욱 극대화할 수 있으며, 상기 항균제 또는 항진균제는 테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 아미카신, 젠타마이신, 토브라마이신, 스트렙토마이신, 네틸마이신, 카나마이신, 시프로플록사신, 노르플록사신, 오픈록사신, 트로바플록사신, 로메플록사신, 레보플록사신, 에녹사신, 나프티리딘, 술폰아미드, 폴리믹신, 클로르암페니콜, 네오마이신, 파라모모마이신, 콜리스티메테이트, 박시트라신, 반코마이신, 리팜핀, 시클로세린, 베타-락탐, 세팔로스포린, 암포테리신, 플루코나졸, 플루시토신, 나타마이신, 미코나졸, 케토코나졸, 코르티코스테로이드, 디클로페낙, 플루르비프로펜, 케토롤락, 수프로펜, 코몰린, 로독사미드, 레보카바스틴, 나파졸링, 안타졸린 및 페니라미만을 포함하는 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0016]

본 발명은 호노키올(Honokiol)을 포함하는 미국 부저병 예방 및 치료용 조성물 및 상기 전염병의 원인균인 패니바실러스 라베(*Paenibacillus larvae*)에 대한 항균 활성을 가지는 조성물에 대한 것으로서, 상기 원인균에 대한 항균 효과가 우수하여 감염병의 치료제로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017]

도 1은 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 호노키올에 대한 *Paenibacillus larvae*의 감수성을 평가한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 호노키올이 *Paenibacillus larvae*의 세포를 파열시키는 결과를 보여주 것이다.

도 3는 본 발명의 일 실시예에 따른 호노키올을 *Paenibacillus larvae*에 처리하였을 때의 투과전자현미경 사진으로, 세포 파열 여부를 육안으로 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0019] <실시예 1> 시료 준비 및 균주 배양
- [0020] 다양한 후보 물질 (표 1) 및, 호노키올 (CAS: 35354-74-6, Chemfaces), 그리고 공지된 항균 물질인 옥시테트라사이클린 (CAS:2058-46-0, Tokyo Chemical Industry) 및 테트라사이클린 (CAS:60-54-8, Sigma-Aldrich)은 구입처로부터 구매하여 각각 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 10mg/ml로 녹여 준비하였다.
- [0021] *Paenibacillus larvae* (ATCC 9545)는 MYPGP 배지 (Mueller-Hinton broth, yeast extract, potassium phosphate, glucose, sodium pyruvate)에서 키웠다. 전날 MYPGP에 접종을 하고 37℃에서 다음날 오전까지 배양하였다. 모든 실험에 앞서 키운 박테리아들은 3000rpm에서 10분간 원심 분리를 하여 사용한 배지를 모두 제거해주었고 새로운 MYPGP배지에서 2시간 더 키워 실험에 사용하였다.
- [0023] <실험예 1> 최소성장저지농도를 통한 활성 농도 확인(*In vitro* antibacterial activity)
- [0024] 본 발명의 호노키올의 *Paenibacillus larvae*에 대한 항균 활성을 평가하기 위하여 the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)에서 제시한 broth microdilution assay 를 사용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다..
- [0025] 물질들의 MIC값과 MBC값을 찾기 위해 two-fold dilution방법을 사용하였고 각 화합물은 계속적으로 2배 희석된 후 96-well microtitre plate에 100 μ l첨가되었으며, 100 μ l의 *Paenibacillus larvae* 균주 현탁액(5×10^4 CFU/ml)을 각각의 well에 투입한 후 30℃에서 48시간 배양하였다. 각 화합물의 농도는 최대 100ug/ml에서 최소 1.5625ug/ml가 되게 하였다. 각 물질에 대한 MIC값은 각각의 plate에서 균주가 자라지 않는 최소농도로 하여 확인되었다.
- [0026] 하기 표 1은 호노키올의 anti-*Paenibacillus larvae*활성과 함께 후보 물질의 항균 활성을 비교한 것이다. 표 1에 나타난 바와 같이, 호노키올의 MIC값을 측정한 결과 *Paenibacillus larvae*에 대하여 공지된 항균제인 테트라사이클린(tetracycline)이나 옥시테트라사이클린(oxytetracycline)과 비교하여 상대적으로 우수한 성장 저해 효과를 나타냈다.
- [0027] 반면, 대조군으로 사용된 비교예 화합물들은 상기 미생물에 대한 성장 저해 활성이 없거나 매우 미약하게 나타났다. 즉, 본 발명에 따른 호노키올에 의한 *Paenibacillus larvae*에 대한 항균 활성이 확인 되었다.
- [0029] <실시예 1> 시료 준비 및 균주 배양
- [0030] 다양한 후보 물질 (표 1) 및, 호노키올 (CAS: 35354-74-6, Chemfaces), 그리고 공지된 항균 물질인 옥시테트라사이클린 (CAS:2058-46-0, Tokyo Chemical Industry) 및 테트라사이클린 (CAS:60-54-8, Sigma-Aldrich)은 구입처로부터 구매하여 각각 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 10mg/ml로 녹여 준비하였다.
- [0031] *Paenibacillus larvae* (ATCC 9545)는 MYPGP 배지 (Mueller-Hinton broth, yeast extract, potassium phosphate, glucose, sodium pyruvate)에서 키웠다. 전날 MYPGP에 접종을 하고 37℃에서 다음날 오전까지 배양하였다. 모든 실험에 앞서 키운 박테리아들은 3000rpm에서 10분간 원심 분리를 하여 사용한 배지를 모두 제거해주었고 새로운 MYPGP배지에서 2시간 더 키워 실험에 사용하였다.
- [0033] <실험예 1> 최소성장저지농도를 통한 활성 농도 확인(*In vitro* antibacterial activity)
- [0034] 본 발명의 호노키올의 *Paenibacillus larvae*에 대한 항균 활성을 평가하기 위하여 the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)에서 제시한 broth microdilution assay 를 사용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다..
- [0035] 물질들의 MIC값과 MBC값을 찾기 위해 two-fold dilution방법을 사용하였고 각 화합물은 계속적으로 2배 희석된 후 96-well microtitre plate에 100 μ l첨가되었으며, 100 μ l의 *Paenibacillus larvae* 균주 현탁액(5×10^4 CFU/ml

L)을 각각의 well에 투입한 후 30℃에서 48시간 배양하였다. 각 화합물의 농도는 최대 100ug/ml에서 최소 1.5625ug/ml가 되게 하였다. 각 물질에 대한 MIC값은 각각의 plate에서 균주가 자라지 않는 최소농도로 하여 확인되었다.

[0036] 하기 표 1은 호노키올의 anti-*Paenibacillus larvae*활성과 함께 후보 물질의 항균 활성을 비교한 것이다. 표 1에 나타난 바와 같이, 호노키올의 MIC값을 측정한 결과 *Paenibacillus larvae*에 대하여 공지된 항균제인 테트라사이클린(tetracycline)이나 옥시테트라사이클린(oxytetracycline)과 비교하여 상대적으로 우수한 성장 저해 효과를 나타냈다.

[0037] 반면, 대조군으로 사용된 비교예 화합물들은 상기 미생물에 대한 성장 저해 활성이 없거나 매우 미약하게 나타났다. 즉, 본 발명에 따른 호노키올에 의한 *Paenibacillus larvae*에 대한 항균 활성이 확인 되었다.

표 1

화합물	MIC at 24hr	화합물	MIC at 24hr
실시예 (Honokiol)	12.5	비교예11 (Ninhydrin)	>100
비교예1 (Actinidic acid)	50	비교예12 (Paeonol)	>100
비교예2 (Folic acid)	>100	비교예13 (Sulphosalicylic acid)	>100
비교예3 (Gallic acid)	>100	비교예14 (L-Tartaric acid)	>100
비교예4 (Gentisic acid)	>100	비교예15 (Thymol)	>100
비교예5 (Gibberellic acid)	>100	비교예16 (Vanillin)	>100
비교예6 (Glycyrrhizic acid)	>100	비교예17 ((-)-Bornyl acetate)	>100
비교예7 (Hesperidin)	>100	비교예18 (4-Carvomenthenol)	>100
비교예8 (Isoborneol)	>100	비교예19 (Citronellol)	>100
비교예9 (1-Naphthol)	>100	비교예20 (p-Cymene)	>100
비교예10 (Tetracycline)	25	비교예21 (Oxytetracycline)	25

[0039] <실험예 2> 최소 살균 농도를 통한 활성 농도 확인 (Minimum Bactericidal Concentration test)

[0040] 상기 실험예 1과 같이, 호노키올(Honokiol), 테트라사이클린(tetracycline) 및 옥시테트라사이클린(oxytetracycline)을 각각 10mg/ml의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 사용하였다. 각 화합물은 계속적으로 2배 희석된 후 96-well microtitre plate에 100 μ l 첨가하였으며, 100 μ l의 *Paenibacillus larvae* 균주 현탁액(5×10^4 CFU/mL)을 각각의 well에 투입한 후 30℃에서 48시간 배양하였다. 각 화합물의 농도는 최대 100ug/ml에서 최소 1.5625ug/ml가 되게 하였다. 이후 균주가 자라지 않는 화합물의 농도들에 대해 MYPGP agar plate에서 다시 48시간 키웠으며 agar plate에서도 자라지 않는 경우 각 물질에 대한 MBC값으로 정하였다.

[0041] 그 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 호노키올의 MBC값을 측정한 결과 *Paenibacillus larvae*에 대하여 살균 효과를 나타냈다. 기존에 알려진 항균 물질인 테트라사이클린(tetracycline)이나 옥시테트라사이클린(oxytetracycline)과 유사한 활성으로 *Paenibacillus larvae*의 성장을 저해하였다.

표 2

화합물	MBC at 48hr
실시예 (Honokiol)	50
비교예1 (tetracycline)	50
비교예2 (Oxytetracycline)	50

[0043] <실험예 3> 원반 확산 시험을 통한 항균 효과 확인(Agar disk diffusion testing)

[0044] *Paenibacillus larvae*에 대하여 호노키올에 의한 항균 효과를 확인하기 위하여, 원반 확산 시험을 수행하였다. 실시예 1의 각 화합물은 10mg/ml의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 사용하였다. 각 화합물은 100 μ g씩 6-mm diameter antibiotic test disks에 첨가한 뒤 *Paenibacillus larvae* 균주 현탁액(5×10^4 CFU/mL)을 MYPGP agar plate에 뿌려준 뒤 35℃에서 24시간 그리고 36시간 동안 배양하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

[0045] 상기 배양 결과, 원반 확산 시험을 통해 얻은 *Paenibacillus larvae*에 대한 호노키올의 항균 효과를 클리어존의

평균 지름(mm)을 이용하여 수치화하였다. 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 호노키올은 *Paenibacillus larvae*에 대하여 24시간, 36시간 이후 모두 9 ± 0.5 mm의 항균 효과를 나타냈으며, 도 1과 같이 상기 물질들의 *Paenibacillus larvae*에 대한 감수성을 각각 육안으로 비교할 수 있었다.

표 3

화합물	Diameter(mm)	
	24h	36h
호노키올	9 ± 0.5	9 ± 0.5
테트라사이클린	16 ± 1	15 ± 1
옥시테트라사이클린	17 ± 1	16 ± 0.5

<실험예 4> 호노키올의 세포 파열 효과 확인

호노키올의 세포 파열 유도를 확인하기 위해 *Paenibacillus larvae*에 각각의 화합물 처리 후 260nm 흡광도에서 파쇄된 세포 물질을 확인하였다. 즉, 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여 사용한 배지를 제거한 후, PBS를 이용하여 같은 방법을 반복하여 배지가 남지 않도록 하였다. 2시간동안 PBS에서 배양한 후 $3.12 \mu\text{g/ml}$ 내지 $50 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 화합물을 처리하여 1시간동안 추가로 배양하였다. 세포를 초음파 파쇄법을 이용하여 파쇄한 후, 같은 세포에 대하여 Lysozyme을 처리한 군과 화합물만 처리한 값을 대조군으로 설정하였다. 얻은 상층액을 260nm의 파장에서 측정하였고 각 흡광도는 화합물만 처리 하였을 때의 값을 빼어 순수 260nm에서 측정가능한 물질들만을 측정하였다.

그 결과, 도 2에서 보듯이, 호노키올의 농도가 증가됨에 따라 파열된 세포에서 나오는 물질들이 많은 것으로 측정 되었다. 이는 호노키올이 단순 성장 억제 물질이 아니라 *Paenibacillus larvae*에 대한 파열로 인하여, 완전히 균을 제거할 수 있는 효과를 가지는 물질임을 확인할 수 있었다.

또한 상기 결과에 대하여, 투과 전자 현미경을 통하여 세포가 완전히 파열되었는지 여부를 육안으로 확인하였다. 상기 호노키올을 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 로 처리한 *Paenibacillus larvae*에 대하여, 서울대학교 농생명과학공동기기원의 80kV 투과 전자 현미경(JEM1010, JEOL)을 사용하여 관찰하였으며, *Paenibacillus larvae*은 투과 전자 현미경을 사용하기 전, 그리드에 올렸고 phosphotungstic acid로 염색하였다.

그 결과, 도 3에서 보듯이, 호노키올을 *Paenibacillus larvae*에 처리하였을 때 확실히 세포가 터짐을 확인할 수 있었다.

<실험예 5> 복합 적용에 따른 항균 효과 (Antifungal synergy testing)

테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린의 혼합 사용에 따른 *Paenibacillus larvae*에 대한 항균 효과를 확인하고자 상기한 broth microdilution assay를 checkerboard assay로 사용하였다. 각 화합물의 농도는 최대 $100 \mu\text{g/ml}$ 에서 최소 $1.564 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 계속적으로 2배 희석한 후 96-well microtitre plate에 $100 \mu\text{l}$ 첨가되었으며, $100 \mu\text{l}$ 의 각 균주 현탁액($1 \times 10^4 \text{ CFU/ml}$)을 각각의 well에 투입한 후 35°C 에서 24시간 또는 48시간 배양하였다. 각 화합물에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 균주가 자라지 않는 최소 농도로 하여 각각의 plate에서 다시 확인되었다.

상기 혼합 사용에 따른 상승효과는 $\text{FICI} = (\text{Ac}/\text{Aa}) + (\text{Bc}/\text{Ba})$ 공식을 사용하여 Fractional inhibitory concentration indexes (FICIs)으로 표시하였다. Ac와 Bc는 혼합 사용한 경우 A 물질 및 B 물질 각각의 MIC 값이며, Aa와 Ba는 단독으로 사용한 경우 A 물질 및 B 물질 각각의 MIC 값이다. 상기 FICI값이 0.5 이하인 경우 강력한 상승 효과, 0.5 ~ 0.75의 경우 부분적인 상승 효과, 0.75 ~ 1.0의 경우 상가 효과, 1.0 ~ 4.0 범위에서는 두 물질간 관계 없는 것으로 평가하며, 4.0 이상일 때 반감 효과를 보이는 것으로 평가한다.

표 4

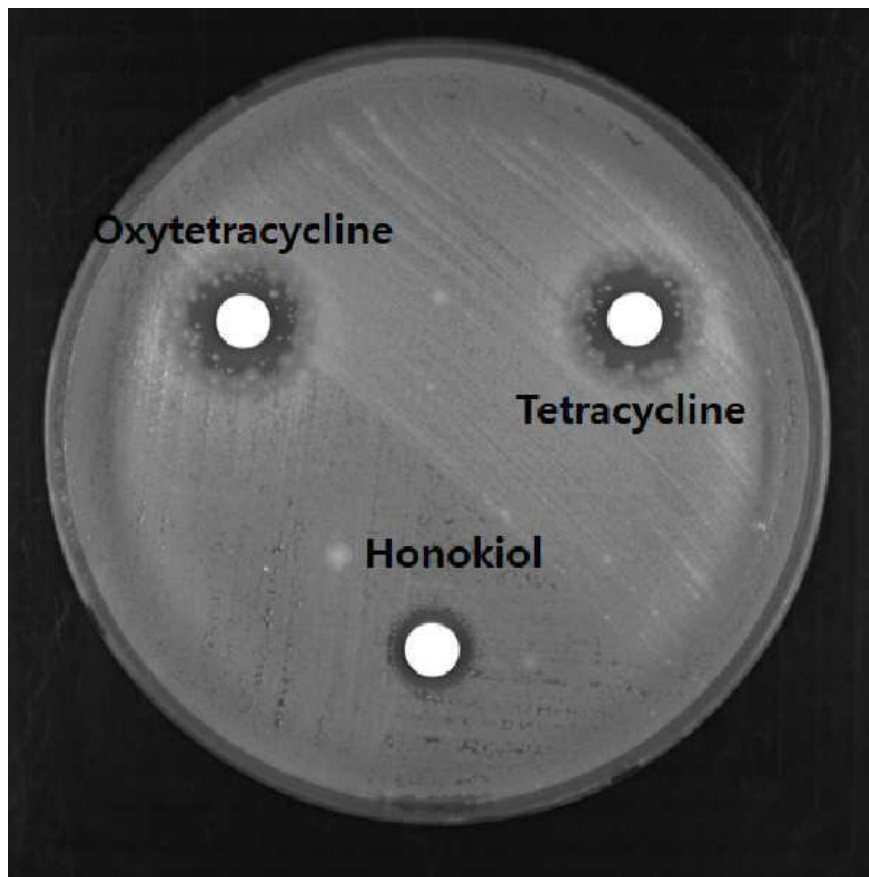
Compound	MIC alone	MIC in combination	FIC index value
Honokiol	12.5	3.12	0.5
tetracycline	25	6.25	
Honokiol	12.5	3.12	0.5
oxytetracycline	25	6.25	

[0057] 테트라사이클린과 옥시테트라사이클린을 복합적으로 투여할 경우의 FICI는 둘 다 모두 0.5를 보였다. 이는 부분적인 상승 효과가 있음을 의미한다. 즉, 각각 따로 처리를 했을 때 MIC값은 순서대로 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 25 µg/ml이었으나, 함께 처리한 경우 호노키올은 3.12 µg/ml 두 항생제는 6.25 µg/ml로 감소하였다. 이는 3.12ug/ml의 호노키올을 투여 할 경우 *Paenibacillus larvae*를 죽이는데 필요한 항생제의 양이 감소함을 의미하며, 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린과 호노키올을 병용 처리하였을 경우, 상기 항생물질들의 효과를 증가 시켜 항균 효과에 필요한 항생제의 양을 감소시킬 수 있다는 것을 보여주는 결과이다.

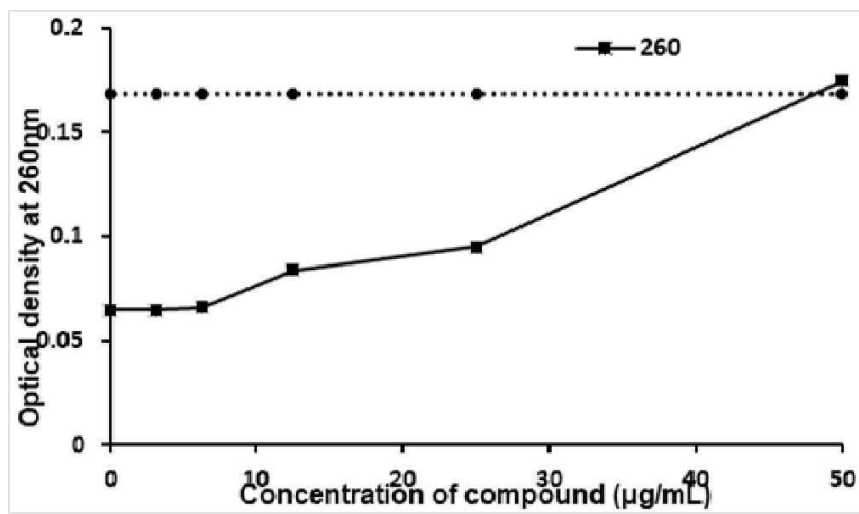
[0059] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

