



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0090544
(43) 공개일자 2020년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01) A01N 43/16 (2006.01)
A23K 20/121 (2016.01) A23K 50/90 (2016.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)
A01N 43/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0007683

(22) 출원일자 2019년01월21일

심사청구일자 2019년01월21일

(71) 출원인

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

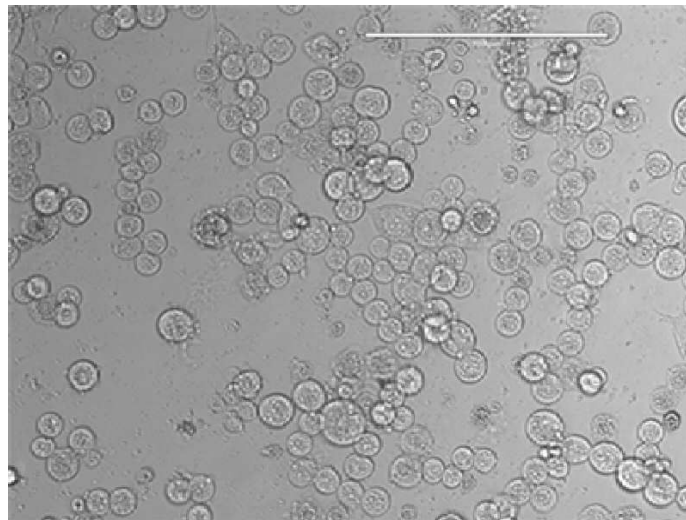
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 루틴을 유효성분으로 포함하는 노제마병의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 루틴을 유효성분으로 포함하는 노제마병 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 전염병의 원인균인 노제마 세라네(*Nosema ceranae*)에 대한 항균 활성을 가지는 조성물에 대한 것으로서, 본 발명의 상기 조성물은 노제마병의 원인균인 노제마 세라네에 대한 항균 효과가 우수하여 곤충의 감염병의 치료제 또는 기능성 사료 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23K 20/121 (2016.05)

A23K 50/90 (2016.05)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A61P 31/10 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545016545

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발(R&D)

연구과제명 꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술

기 여 율 1/1

주관기관 농림식품기술기획평가원

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

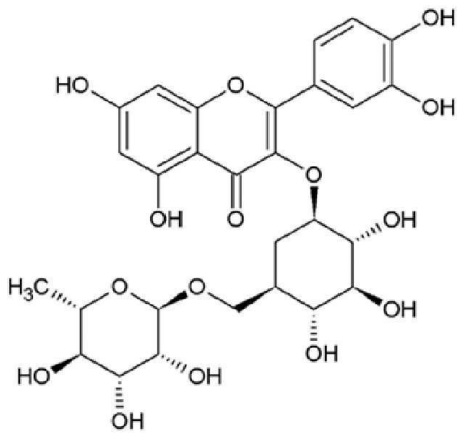
루틴을 유효성분으로 포함하는 노제마병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 루틴은 하기 화학식 1로 표시되는 물질임을 특징으로 하는 노제마병 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 노제마병의 원인균인 노제마 세라네(*Nosema ceranae*)에 대한 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 노제마병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 루틴을 1.0 내지 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 노제마병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

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

청구항 6

제5항에 있어서,

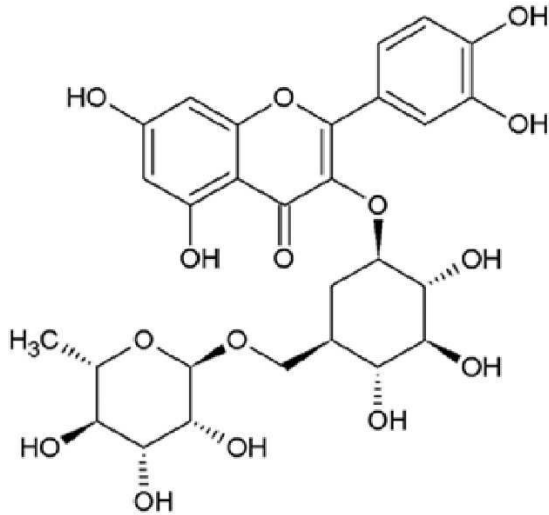
상기 항균제 또는 항진균제는 테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 아미카신, 젠타마이신, 토브라마이신, 스트렙토마이신, 네틸마이신, 카나마이신, 시프로플록사신, 노르플록사신, 오픈록사신, 트로바플록사신, 로메플록사신, 레보플록사신, 에녹사신, 나프티리딘, 술폰아미드, 폴리믹신, 클로르암페니콜, 네오마이신, 파라모모마이신, 콜리스티메테이트, 박시트라신, 반코마이신, 리팜핀, 시클로세린, 베타-락탐, 세팔로스포린,

암포테리신, 플루코나졸, 플루시토신, 나타마이신, 미코나졸, 케토코나졸, 코르티코스테로이드, 디클로페낙, 플루르비프로펜, 케토롤락, 수프로펜, 코몰린, 로독사미드, 레보카바스틴, 나파졸링, 안타졸린 및 페니라미만으로 구성된 군으로부터 1 이상의 물질인 것을 특징으로 하는, 노제마병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1의 루틴(rutin)을 유효성분으로 포함하는 곤충 사료 조성물.

[화학식 1]



청구항 8

제7항에 있어서,

상기 곤충 사료는 노제마병 방제 활성을 포함하는 것을 특징으로 하는, 곤충 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 꿀벌 등에 대한 전염병인 노제마병을 일으키는 병원균으로 알려져 있는 노제마 세라네(*Nosema ceranae*)에 대한 감염 억제 효과를 가지는 물질인, 루틴을 포함하는 노제마병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 꿀벌에서 감염병을 일으키는 병원균에는 대표적으로 노제마병을 일으키는 노제마 세라네(*Nosema ceranae*), 노제마 아피스(*Nosema apis*)나, 미국부저병을 일으키는 패니바실러스 라베(*Paenibacillus larvae*), 백목병을 일으키는 아스코스페라 아피스(*Ascosphaera apis*)등이 있다.

[0003] 노제마 세라네(*Nosema ceranae*)는 꿀벌 성충에 감염하는 미포자충목 중 하나로 이로 발생하는 꿀벌의 질병인 노제마병은 노제마에 의해 꿀벌 성충의 소화기 및 부속기에 감염되어 기생하고 발병되는 질병 중 하나이다. 노제마의 포자는 외부환경에서 수년간 생존 가능하며 꿀벌 체내에서 증식한다. 병원균의 유입은 꿀벌의 먹이 섭취 과정을 통해 이루어지며 장에서 포자가 발아하여 발병된다. 발아한지 4-5일이 지나면 복제된 포자가 세포 밖으로 나와 주변세포에서 다시 발아한다.

[0004] 노제마병을 방제를 하기 위한 연구자들의 노력은 많았으나, 아스퍼질러스 속 곰팡이에서 생기는 항생물질인 퓨마길린(fumagillin)에 의한 방제와 에틸렌옥사이드(ethylene oxide)의 훈증 소독이 대표적으로 사용되고 있다. 하지만, 퓨마길린(fumagillin)에 의한 방제 기술은 경우에 따라 듣지 않는 것으로 보고 되어 있으며, 또한 국내에서 발견되는 노제마병에는 효과가 좋지 않을 수도 있다는 보고가 있다. 하지만, 현재 노제마병의 방제에 사용 가능한 유일한 물질로 알려져 있다. 따라서 많은 연구자들에 의하여 노제마의 감염을 억제하는 유효 성분을 찾

고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 전술한바와 같이, 꿀벌에 노제마병을 유발하는 원인균인 노제마 세라네(*Nosema ceranae*)의 감염 및 확산 문제를 해결하고자 효과적으로 노제마의 감염을 억제하고, 방제할 수 있는 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 즉, 본 발명의 목적은 루틴(rutin)을 유효성분으로 포함하는 노제마병 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

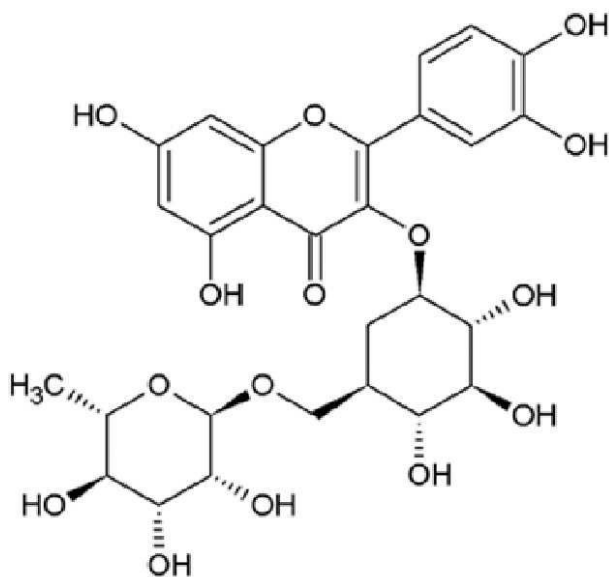
[0007] 또한 본 발명의 다른 목적은, 루틴(rutin)을 유효성분으로 포함하는 노제마병 저해 활성을 포함하는 사료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 루틴(rutin)을 유효성분으로 포함하는 노제마병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 상기 루틴(rutin)은 노제마병을 감염시키는 병원균인 노제마 세라네(*Nosema ceranae*)에 대한 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 상기 루틴은 하기 화학식 1로 표시되는 물질이다.

화학식 1



[0010]

[0011] 또한 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 루틴(rutin)을 유효성분으로 포함하는 노제마병 저해 활성을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.

[0013] 이하 본원 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0015] 본 발명의 루틴(rutin)은 rutoside, quercetin-3-O-rutinoside, sophorin 또는 (3-[[6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one)로 명명되는 물질로서, 상기 화학식 1과 같이 표시될 수 있다.

[0016] 루틴(rutin)은 과일 및 채소에서 발견되는 식물성 플라보노이드로서, 약학적 용도로서 널리 사용되는 물질이다.

루틴은 주로 메밀, 유칼립투스, 라임트리, 산사나무, 사과 등으로부터 추출될 수 있으며, 혈관 강화 효과를 가진다고 알려져 있어, 정맥류, 내출혈, 뇌졸중 등의 질환을 예방 및 치료하는 용도로 사용되어 왔다. 또한, 루틴은 암 치료의 부작용으로 나타나는 점막성 궤양 등의 효과를 완화시킬 수 있다고 알려져 있고, 항산화 및 항염증 효과를 가질 수 있으므로, 이와 관련된 다양한 용도로 사용될 수 있음이 공지되어 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 루틴(rutin)이 가지고 있는 노제마병의 방제 효과를 확인하였으며, 이에 루틴을 포함하는 노제마병 치료 또는 예방용 조성물을 제조하였다.

[0018] 또한, 본 발명의 노제마병 예방 또는 치료용 조성물은 노제마병에 대한 원인균인 노제마 세라네에 대한 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하며, 특히 상기 균주에 대한 특이적인 항균 활성을 보유하고 있어, 광범위한 사용이 유도되지 않고, 내성 발생률이 최소화될 수 있으며, 생체 안정성이 우수한 특징을 가진다.

[0019] 본 발명의 루틴(rutin)을 포함하는 노제마병 예방 또는 치료용 조성물은, 단독으로 사용될 수 있으며, 기존에 알려진 항균 활성 물질 또는 조성물과 혼합하여 사용될 수도 있다.

[0020] 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 항균 활성을 가지는 조성물은, 하나 이상의 항균제 또는 항진균제를 추가로 포함하여 노제마 세라네에 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, 예녹사신, 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

[0021] 본 발명은 루틴(rutin)을 유효성분으로 포함하는 노제마병 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 전염병의 원인균인 노제마 세라네(*Nosema ceranae*)에 대한 항균 활성을 가지는 조성물에 대한 것으로서, 본 발명의 상기 조성물은 노제마병의 원인균에 대한 항균 효과가 우수하여 곤충의 감염병의 치료제 또는 기능성 사료 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1는 노제마 세라네와 루틴을 처리한 *Trichoplusia ni* 세포를 5일간 배양하여 찍은 400배 현미경 사진이다.

도 2을 노제마 세라네만 처리한 *Trichoplusia ni* 세포를 5일간 배양하여 찍은 400배 현미경 사진이다.

도 3은 노제마 세라네 및 루틴을 처리하지 않은 *Trichoplusia ni* 세포를 5일간 배양하여 찍은 400배 현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 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.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0025] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다. 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

[0027] <실시예 1> 시료의 준비

[0028] 본 발명의 루틴은 상업적으로 시판되고 있는 것을 구매하여 사용하였으며(Chemfaces, CAS: 153-18-4) 이를 DMSO에 용해하여 10mg/mL의 농도로 희석하여 사용하였다. 제조 후, 사용 전까지 이를 -20℃에서 보관하였다.

[0030] <실시예 2> 노제마 세라네(*Nosema ceranae*)준비

[0031] 본 실험예에서 사용된 노제마 세라네(*Nosema ceranae*)는 농촌진흥청으로부터 노제마병에 걸린지 14일 된 꿀벌 성충을 받아 사용하였다.

[0032] 정제된 노제마 세라네를 얻기 위하여 노제마병에 걸린 꿀벌 성충의 장을 뽑아 RIPA buffer를 사용하여 섞어주었다. 충분히 깨질 수 있도록 5분간 볼텍스믹서를 이용하여 섞었다. 이 후 5분간 400rpm으로 원심분리를 하고 상층액을 버려 큰 불순물들을 제거하였다. 얻은 노제마는 500 μ L의 증류수에 섞어주었다. 같이 섞여있는 박테리아를 제거하기 위해 25%, 50%, 75%, 90%의 불연속으로 쌓인 퍼콜(Sigma)위에 노제마가 섞인 용액을 올려 15,000g로 30분간 원심분리 하였다. 아래 쪽의 노제마 세라네가 포함된 층만을 분리하여 이를 사용하였다.

[0034] <실시예 3> 노제마 감염 세포(*Trichoplusia ni*) 준비

[0035] 노제마 세라네에 대한 항균 효과를 실험하기 위한 대상으로, 꿀벌 이외에 노제마에 감염될 수 있는 곤충으로 알려져 있는 *Trichoplusia ni* 세포를 사용하였으며, 이의 High five cell을 사용하였다. *Trichoplusia ni* 세포는 2mL의 glutamine이 들어간 Express Five 배지(Gibco)에서 키웠으며, 키운 플레이트는 6-well plate을 사용하였다. 하루 키운 *Trichoplusia ni* 세포에 노제마는 10^4 노제마/mL이 되도록 처리를 하였고 추출물은 50 μ g/mL의 농도로 처리를 하였다. 노제마병의 발병을 확인하기 쉽도록 처리를 한지 5일 후에 관찰을 하였다.

[0037] <실험예 1> 노제마 포자의 현미경 관찰

[0038] 상기와 같이 노제마 세라네 및 루틴을 *Trichoplusia ni* 세포에 처리한 후 5일 경과된 날, 노제마 포자가 형성된 부분을 먼저 현미경을 이용하여 100배로 확대 관찰한 후 결과를 효과적으로 관찰할 수 있는 부분을 400배로 추가 확대 관찰하여 사진을 얻었다. *Trichoplusia ni* 세포에 노제마 세라네와 루틴을 처리한 대조군(도 1), 루틴을 처리하지 않은 대조군(도 2)과 루틴, 노제마 세라네를 모두 처리하지 않은 대조군(도 3)을 확인하였다.

[0039] 그 결과, 도 3과 같이 노제마 세라네와 루틴을 처리하지 않은 *Trichoplusia ni* 세포는 동그란 세포의 모습을 유지하며 분화하는 모습을 보였다. 또한, 도 1과 같이 노제마 세라네와 루틴을 처리한 경우, 세포의 수와 세포 크기가 정상 대조군과 다른 점이 없었다. 또 노제마 포자는 세포 내부보다는 외부에 많이 위치해 있었다. 반면 도 2에서 보이는 바와 같이 노제마 세라네만 처리하게 되면 세포의 상태가 나빠지고 내부의 노제마의 복제과정으로 인해 비정상적으로 커진 모습을 보였다. 또한, 노제마 포자가 한쪽에 몰려 있는 현상을 관찰 할 수 있었다. 노제마 세라네에 감염되었으나, 루틴을 처리하지 않은 경우, 세포의 수도 현격하게 줄어들었음을 확인할 수 있었다.

[0042] <실험예 2> 세포 독성 실험

[0043] 상기 실험예에서 얻은 결과를 바탕으로 루틴이 세포독성을 띄지 않고 노제마 방제에 효과적인 루틴의 처리 농도를 찾기 위하여 아래와 같이 실험하였다. 초기 처리 농도인 50 μ g/mL를 기준으로 두 배씩 농도를 늘려가며 독성 여부를 세포 수 및 세포(포자) 크기를 통하여 관찰하였다.

[0044] 그 결과, 루틴 농도가 100 μ g/mL 이상일 경우, *Trichoplusia ni* 세포 크기가 작아지는 것을 볼 수 있었고, 세포 수도 줄기 시작했다.

[0045] 노제마 세라네의 방제에 효과적인 최소 농도를 찾기 위하여, 유사한 방법으로 50 μ g/mL에서 농도를 1/2로 순차

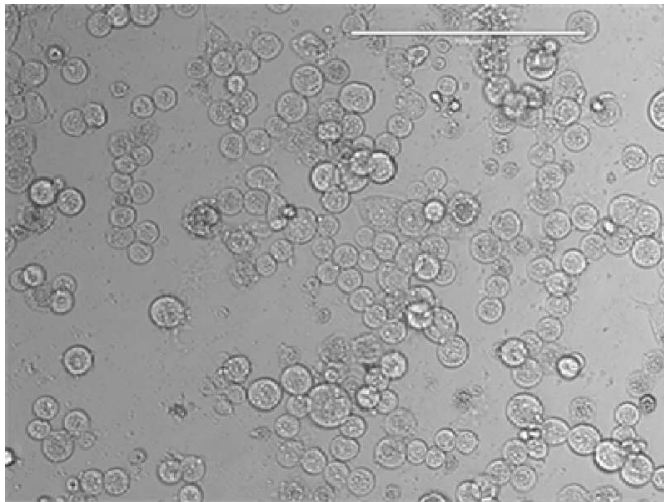
적으로 줄여가며 최소 처리 농도를 확인하였다. 그 결과 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 부터 노제마 포자의 크기 및 수 감소 효과가 떨어지기 시작하였다.

[0046] 상기 결과를 통하여, 노제마를 방제하기 위한 루틴의 적정농도는 3.125 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ 임을 확인하였다.

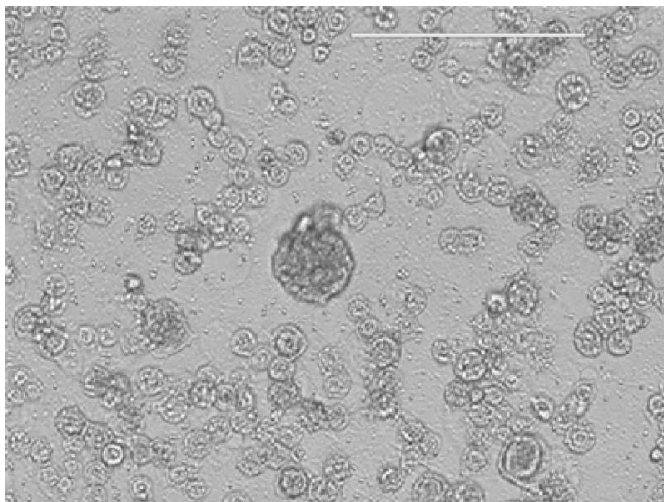
[0048] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

