

홍조류 가공을 통한 친환경 생물산업소재 개발에 관한 연구

주관연구기관	제주대학교
발행년월	2010-01
주관부처	국토교통부
사업관리기관	한국과학재단
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201000000512
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 17:06:48

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

해양수산연구개발사업 최종연구보고서

R&D /

홍조류 가공을 통한 친환경 생물산업소재 개발에 관한 연구

2010. 1. 20.

주관연구기관 / 제주대학교

국 토 해 양 부
호남 씨 그란트 연구사업

Land Transport and Maritime
R&D Report

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

이 보고서를 "홍조류 가공을 통한 친환경 생물산업소재 개발에 관한 연구"
과제(세분야 "해양생물자원화에 관한 연구")의 보고서로 제출합니다.

2010. 1. 20

주관연구기관명 : 제주대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 신 태 균

연구원 : 안 미 정

" : 김 지 훈

" : 양 원 준

협동연구기관명 :

협동연구책임자 :

보고서 요약서

과제고유번호		해 당 단 계 연구 기 간	2009. 3. 01 ~ 2009. 12. 31	단 계 구 분	총단계 (1년과제)
연구사업명	중사업명	호남 씨그라트 연구사업			
	세부사업명	해양생물자원화			
연구과제명	대과제명	홍조류가공을 통한 친환경 생물산업소재 개발			
	세부과제명				
연구책임자	신태균	해당단계 참여 연구원수	총 : 4 명 내부 : 2 명 외부 : 2 명	해당단계 연구비	정부 : 30,000천원 기업 : 천원 계 : 30,000천원
		총연구기간 참여 연구원수	총 : 4 명 내부 : 2 명 외부 : 2 명	총연구비	정부 : 30,000천원 기업 : 천원 계 : 30,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	제주대학교 산학협력단 제주대학교 수의과대학			참여기업명	
국제공동연구	상대국명	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요 약				보고서 면수	40
<p>홍조류인 벗붉은잎 추출물을 이용하여 돼지의 질병을 일으키는 세균에 대한 항균효과를 시험함 결과 여러 세균에 대해 항균효과가 있었으며, 벗붉은잎을 투여한 돼지의 분변에서는 대장균군의 수가 증가하여, 다른 장내 미생물을 조절할 수 있음을 확인하였음.</p> <p>또한 사염화탄소로 유도된 간손상 모델에서 벗붉은잎을 손상전 3일 동안 투여함으로써 사염화탄소로 인한 간세포의 괴사 및 지방 축적을 완화 시켰고, inducible nitric oxide를 억제하여 간세포를 보호 할 수 있음을 확인하였음.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	해조류, 생리활성능, 해조추출물, 사료첨가제, 조식, 사염화탄소			
	영어	seaweed, bioactive effect, seaweed extracts, feed additive, histology, carbon tetrachloride			

요약문

I. 제 목

1. 벚붉은잎 추출물의 돼지 세균에 대한 항균효과
2. 사염화탄소로 유도된 간손상에서 벚붉은잎에 의한 inducible nitric oxide synthase의 변화

II. 목 적

1. 벚붉은잎 추출물을 이용하여 돼지 세균에 대한 항균 효과를 확인하고, 항생제 대체 물질로서의 역할을 규명하고자 함
2. 사염화탄소로 유도된 간손상에서 벚붉은잎의 효능을 확인하고, 세포의 산화적 손상을 야기할 수 있는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현 양상을 확인하고자 함

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 벚붉은잎의 메탄올 추출물을 이용하여 *Escherichia (E.) coli* (S175), *Enterococcus (E.) faecium* (ATCC 51558), *Salmonella (S.) Typhimurium* and *Staphylococcus (S.) aureus* (ATCC 25923) 균에 대한 항균 검사를 실시하였고, 포유자돈에 1%로 공급하여 장내 미생물의 변화를 확인함
2. 사염화탄소를 이용한 간손상 모델을 이용하여, 간손상전 3일동안 벚붉은잎 (150mg/kg)을 투여하여 간에서의 세포손상 억제 효과를 확인하고, 그 기전을 연구하는 과정에서 iNOS의 발현을 억제한다는 사실을 발견하였고, 웨스턴 블롯 및 조직학적 검사를 이용하여 발현의 정도를 확인함

IV. 연구개발결과

1. 벚붉은잎은 모든 세균에 대해 항균효과를 가짐
 - 가. *E. coli*는 8시간 증균 후 30% 억제 효과를 보이고, *E. faecium*는 8시간 증균 후에 81% 억제되며, *S. Typhimurium*는 배양후 4시간째에 96%의 증균 억제 효과를 나타내며, *S. aureus*는 90% 이상의 억제효과를 보임
 - 나. 벚붉은잎을 투여한 포유자돈의 분변에서 coliform bacteria의 수가 대조군에 비해 4배 증가함
2. 벚붉은잎은 사염화탄소로 유도된 간손상을 억제함
 - 가. 사염화탄소로 손상 받은 중심정맥 주위 세포괴사와 지방축적을 억제함
 - 나. 세포의 산화적 손상을 야기할 수 있는 iNOS의 발현을 감소시킴
 - 다. iNOS의 발현 세포는 손상 받은 부위의 간세포이며, 벚붉은잎 투여 시 양성세포의 강도 및 수가 줄어듦

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 벚붉은잎 추출물은 천연 항생물질로 효과가 있고, 그 기전에 관한 연구 및 돼지 산업에 적용방법이 과제로 남음
2. 벚붉은잎은 사염화탄소와 같은 화학적 물질로 유도된 간손상에서 iNOS의 발현을 억제하여 간세포의 산화적 손상으로부터 보호하는 효과가 있고, 임상 적용에 기초 자료를 제공할 수 있음

SUMMARY

I. Subject

1. Antibacterial activity of *Callophyllis japonica* (*C. japonica*)-methanol extracts against pathogenic bacteria in swine
2. The change of inducible nitric oxide synthase of CCl₄ injury in SD rats treated with *C. japonica*

II. Object

1. To examine whether an methanol extract of *C. japonica* has antibacterial effects against porcine bacteria
2. we assessed the role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury using *C. japonica* (150mg/kg)

III. Materials and methods

1. The *in vitro* antibacterial activities of 80 % methanol crude extracts prepared from the *C. japonica* were tested for inhibitory activity against the *Escherichia* (*E.*) *coli* (S175), *Enterococcus* (*E.*) *faecium* (ATCC 51558), *Salmonella* (*S.*) Typhimurium and *Staphylo-* *coccus* (*S.*) *aureus* (ATCC 25923). Suckling piglets were fed an experimental diet supplement with 1% *C. japonica* for 1 week.
2. The powder of *C. japonica* was administered per oral for 3 days before CCl₄ induced liver injury. we found that *C. japonica* (150mg/kg) was inhibited fatty and necrotic change around centrilobular in liver. The decreased exprssion of iNOS which may clarify the pathogenesis of CCl₄ induced liver injury and thus mechanism of liver injury.

IV. Results

1. The extracts of *C. japonica* were shown to be antibacterial effects on all bacteria tested
 - A. *E. coli* was decreased 30% compared with vehicle controls after 8 hrs incubation. For *E. faecium* was inhibited proliferation rate about 81% at 8 hrs after incubations, respectively. For *S. Typhimurium* was inhibited proliferation rate about 96% at 4h after incubation with extracts of *C. japonica*. For *S. aureus* was inhibited proliferation rate more than 90% each time courses.
 - B. The number of coliform bacteria was increased about 4-fold in the 1% *C. japonica* treated group, as compared to those of controls.

가 .

2. The administration of *C. japonica* protected the liver cells from necrotic and fatty change around the centrilobular lesions.

A. Western blot analysis showed that the level of iNOS was significantly increased in CCl₄-induced group compared with vehicle treated controls (p<0.01). However, pretreatment with *C. japonica* decreased significantly the iNOS expression as compared to the CCl₄ induced hepatic injury (p<0.5).

B. In the liver of the vehicle control rats, iNOS was weakly detected in some of the liver cell around centrilobular lesions. At the normal saline treatment of CCl₄-injury, increased levels of iNOS were strongly detected in the liver cells around portal triad lesions and centrilobular lesions. However, in the pre-treatment with *C. japonica* (150mg/kg), the levels of iNOS immunoreactivity in the liver cells around centrilobular were decreased in the liver.

V. Application plans of this study

1. *C. japonica* extracts be added as an effective natural antibacterial agent. The precise mechanism of antibacterial effects and its application on swine industry remains to be further studied.
2. *C. japonica* may be useful in the treatment of CCl₄ induced liver injury, as well as other protective materials.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the research and development task	
Paragraph 1. Objective of the research and development task -----	9
Paragraph 2. Necessity of the research and development task -----	9
Chapter 2. Present situation of domestic and foreign technology developments	
Paragraph 1. Domestic technology trends -----	12
Paragraph 2. Foreign technology trends -----	12
Paragraph 3. Prospects from now on -----	13
Paragraph 4. Conclusion on the analysis of the technology trends -	13
Chapter 3. Contents and results of the research and development studies	
Paragraph 1. Antibacterial activity of <i>Callophyllis japonica</i> -methanol extracts against pathogenic bacteria in swine -----	14
Paragraph 2. The change of inducible nitric oxide synthase of CCl ₄ injury in SD rats treated with <i>C. japonica</i> -----	21
Chapter 4. Objective accomplishments and contribution in the related fields -----	30
Chapter 5. Application plans of the research and development results -----	31
Chapter 6. Foreign scientific technological informations gathered during the research and development process -----	32
Chapter 7. References -----	35

목 차

제1장	연구개발과제의 개요	
제1절	연구개발의 목적	9
제2절	연구개발의 필요성	9
제2장	국내외 기술개발 현황	
제1절	국내기술 동향	12
제2절	국외기술 동향	12
제3절	향후전망	13
제4절	기술동향 분석 결론	13
제3장	연구개발수행 내용 및 결과	
제1절	벚꽃은잎 추출물의 돼지 세균에 대한 항균 효과	14
제2절	사염화탄소로 유도된 간손상에서 벚꽃은잎에 의한 inducible nitric oxide synthase의 변화	21
제4장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	30
제5장	연구개발결과의 활용계획	31
제6장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	32
제7장	참고문헌	35

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

1. 제주도 연안 자생 홍조류 (벵골은잎) 추출물의 항산화효과 및 항균효과를 확인
2. 해조류 추출물의 급여가 자돈의 성장에 미치는 영향을 평가
3. 제주도 연안 자생 홍조류인 벵골은잎을 이용하여 양돈의 사료첨가제 기술 개발을 통하여 고품질,저비용의 사료첨가제 개발 및 차별화된 돈육 생산 기술 개발
4. 항생제 사용 감소를 통한 청정 돈육 생산
5. 해조류의 생산과 관련된 양식업과 가공제조업을 연계시킴으로써 양식농가 및 어촌의 영어 의욕을 고취시키고 소득을 높이면서 해조류 가격의 안정화 기여

제2절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

가. 기술적 측면

- (1) 제주도 연안 자생 해조류 (벵골은잎 또는 그의 가공품)가 축산(양돈) 산업에 활용 가능성 검사
 - (가) 최근 양돈 산업에서 약제 오·남용에 따른 약제 내성균 출현, 약값의 경제적 부담, 약제의 체내잔류, 분뇨배출에 따른 주변 환경오염등 여러 문제들이 제기됨
 - (나) 최근 양돈분야에서 질병 및 생산성 향상을 위해 인체에 유효한 생약제를 양돈 산업에 이용하려는 노력들이 이루어지고 있는 실정
 - (다) 따라서 여러 생리 활성이 있다고 알려진 식물을 발굴하고 이를 축산(양돈)사료 첨가제 소재로 개발 필요
- (2) 제주도 연안 자생 해조류 (벵골은잎 또는 그의 가공품)를 기본으로 효능성 검토
 - (가) 해조류인 벵골은잎에는 각종 비타민류뿐만 아니라 요소, 칼슘, 망간, 철, 아연, 칼륨 등의 미네랄이 풍부하여 이들 유용성분들을 양돈에 공급 할 경우에 성장 및 면역계에 긍정적인 역할을 할 수 있을 것으로 사료됨
- (3) 제주도 연안 자생 해조류 (벵골은잎 또는 그의 가공품)가 돼지의 병원균 등의 면역기능에 미치는 영향 평가
 - (가) 포유동물의 면역체계는 어류나 양서류에 비해 잘 발달되어 있고 질병에 반응하는 면역계

에 대한 연구가 많음

- (나) 양돈에서도 면역계통이 발달되어 있으나 아직 질병에 반응하는 체계는 연구미진
- (다) 질병에 대항하는 초기 면역계의 확인은 질병의 경보에 도움
- (라) 동물조직의 비교 연구
- (마) 천연 자생식물을 기본으로 한 면역 기능 강화제의 개발 필요성이 증대

나. 경제·산업적 측면

- (1) 현재와 같은 양돈에서는 밀식이 성행됨에 따라 환경이 악화되어 각종 스트레스 요인과 질병이 발생, 양돈장에 적지 않은 부담
- (2) 따라서 효과적인 사료 첨가제를 발굴하여 생산성을 높이고 면역계통의 활성화를 통한 질병방제 기법 개발은 절실히 요구됨
- (3) 벚붉은잎의 가공조건이 확립될 경우 다른 산업에의 응용가능성이 있음
- (4) 일차 생산품인 벚붉은잎의 새로운 판로 개척 및 제주양돈의 고유 브랜드의 개발을 지향
- (5) 최근 홍조류를 이용한 종이개발, 바이오 에너지 생산 등의 기술 개발이 이루어지고 있으나 식품, 우무(Agar), 카라기난 추출 등의 일차식품으로 소비하고 있기 때문에 벚붉은잎의 추출물의 사료첨가제 가치성을 구명하여 고부가가치 상품 개발 가능성
- (6) 우리나라 자생 식물로부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 물질일 가능성이 높고 오랫동안 상식해 온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 유기합성에 의한 신규물질보다 안정성의 확보가 용이
- (7) 국내 해산물 중 가격의 등락이 심했던 해조류의 생산과 관련된 양식업과 가공제조업을 연계시켜 양식농가 및 어촌의 영여의욕을 고취시키고 소득을 높이면서 해조류 가격의 안정화를 기할 수 있기 때문에 전체적인 소비자물가의 안정에 기여도가 클 것으로 예상

다. 사회·문화적 측면

- (1) 우리 민족은 김, 미역, 다시마, 우뚝가사리 등의 해조류를 즐겨 식용으로 즐겨왔기 때문에 예부터 조식민족(藻飾民族)으로 지칭되어 왔고, 현재도 1인당 연간 약 5Kg의 해조류를 생산 소비하고 있는 실정
- (2) 제주도 연근해에서 많은 생산고를 보이는 홍조류와 그 추출물의 생리 기능적 특성을 과학적으로 검토하여 사료 첨가제로 발전시킨다면 벚붉은잎은 일차 생산품이 아닌 고부가가치의 전략 산업으로 특성화할 수 있을 것이며 특히, 세계 생물 산업의

시장의 규모는 1997년 313억 달러, 2000년에 540억 달러, 2003년에 740억 달러, 2008년에 1,250억 달러, 2013년에 2,100억 달러에 이를 것으로 전망되며, 2000~2013년까지 연평균 성장률은 26.9%로 전망되고 있음

- (3) 자돈의 면역계 연구를 통해 양식 환경 변화에 따른 면역계의 적응 연구
- (4) 조기 경보 체계를 추구하여 경제적 손실 방지 및 고품질 양돈 생산
- (5) 최근 생물산업의 발전이 급속히 가시화되고 있으며, 이러한 생물산업분야 발전 가능성 및 업계현황을 감안하여 미국, 일본 등 선진국에서는 생물산업을 국가적인 전략 산업으로 선정하여 육성하고 있으며, 90년대에 들어서는 대만, 싱가포르 등 개발도상국에서도 본격적으로 지원하고 있는 실정으로 앞으로의 성장 가능성과 부가가치는 매우 높을 것으로 전망되며, 해양 생물산업에서의 국제경쟁력을 뒷받침할 수 있는 연구과제 중의 하나가 될 것으로 확신

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내기술 동향

1. 홍조류 (벵골은잎, 우뚝가사리, 참도박, 미역, 다시마 등)는 식용으로 오래전부터 이용, 항산화 작용과 관련하여 매우 많이 연구되었음
2. 갈조류 (감태, 미역)의 경우 특히 제주지역에서 채취되는 감태로부터 Eckol 등의 신규물질 분리, 다양한 생리 활성능이 증명
3. 홍조류와 갈조류 실험결과는 세포 내지 실험동물에서 crude한 추출물을 이용한 항산화 효과, 항염증효과 및 방사선 방호효과에 관한 기초적인 연구들이다.
4. 천연물을 이용한 간기능 증대 효과에 관한 연구들이 많이 이루어지고 있으며, 특히 알콜성 지방간에 대한 예방 및 치료 효과가 요구 된다.
5. 각 분획별 추출물을 이용하여 항산화, 항균효과에 대한 연구는 이루어지지 않았으며 추출물을 가공하여 기능식품이나 사료 첨가제에 관한 연구 보고는 없는 실정이다.
6. 따라서 홍조류의 추출물을 이용하여 자돈 및 육성돈의 사료 첨가제 기술 개발과 가축의 사료 첨가제 이용에 관한 연구를 통해 양돈농가의 생산성 증대시키고 간손상 모델에 적용함으로써 제주도 연안 해조류의 자원이용 방안의 다양화를 이룰 것으로 검토되었다.

제2절 국외기술 동향

1. 중국, 일본을 비롯한 동북아시아 국가에서는 해조류를 생식하는 용도로 사용해왔으며 외국의 경우, 로마시대 이래 지중해 연안지대에서는 해조류를 말사료로 이용해 왔다.
2. 프랑스, 스코틀랜드, 아일랜드 및 노르웨이 해안에서는 해조류를 양, 소 및 돼지의 사료로 이용해 왔으며, 최근 북 노르웨이에서는 해조와 어류 가공 부산물을 섞어 끓인 사료를 개발 중이다.
3. 일본에서는 대표적인 홍조류인 김 추출물이 강력한 암발생 억제효과가 있음이 보고되었다 (Okai 등, 1996).
4. 홍조류의 구성성분인 우무(Agar)를 화장수, 샴푸, 크림 등의 첨가물로 활용하거나 플라스틱이나 직물의 유화안정제, 의약품의 알약의 코팅제나 캡슐제의 원료로 사용하고 있다.

5. 국외의 경우 해조류를 사료와 혼합하여 사용한 예는 있었으나 추출물의 유효성분에 대한 분석은 이루어지지 않았다. 또한 추출물을 이용하여 사료첨가제로의 개발은 아직 시작단계에 있는 국내실정과 비슷하다. 따라서, 새로운 천연물질 소재 개발을 통해 양돈의 생산성을 향상시키는 동시에 질병에 대한 면역력 강화로 양돈용 약제 사용을 감소시킬 수 있다.

제3절 향후전망

1. 양돈의 면역계 연구는 국내외적으로 초보적인 연구단계로 면역세포의 동정 및 환경요인에 따른 변화를 추구하여 질병의 조기 경보 방안으로 활용하려는 연구가 시도되고 있다.
2. 친환경 생물산업소재 개발을 통해 양돈의 생산성 향상
3. 질병에 대한 면역력 강화로 양돈용 약제 사용 감소를 통한 항생제 내성 축산물 생산 방지 가능
4. 항생제의 유해성이 없는 청정 돈육 생산으로 축산물 이미지 제고
5. 가격 등락이 심했던 해조류의 생산과 관련된 양식업과 가공제조업을 연계시켜 양식농가 및 어촌의 소득을 높이면서 해조류 가격의 안정화 기여

제4절 기술동향 분석 결론

1. 갈조류인 칠레산 다시마 (자이언트 켈프)를 이용한 사료화 방안 추진 중이다. 자이언트 켈프는 요오드 성분과 알긴산 성분 그리고 철분, 칼슘, 마그네슘 등 각종 미네랄을 섭취할 수 있는 가장 좋은 식품임이 밝혀져 사람이 먹는 건강 다이어트 식품으로 까지 개발되었다. 일반 채소에서 섭취하기 어려운 비타민 B, 비타민 G, 비타민 H, 비타민 K 등을 함유하고 있다. 이러한 성분을 이용하여 사료 첨가제로써 개발 가능성을 연구하고 있다.
2. 현재 양식을 많이 하고 있는 갈조류에 대한 사료화 방안에 대해서는 연구가 진행되고 있으나 비슷한 생산력을 보유한 홍조류에 대해서는 크게 연구가 이루어지고 있지 않다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 벚붉은잎 추출물의 돼지 세균에 대한 항균효과

1. 연구배경

양돈 산업에서 성장촉진용 항생물질 (antibiotic growth promoters, AGPs)은 돼지의 건강과 생산성을 향상시키기 위해 사용되어 왔다. 항생제의 양돈사료 첨가는 유해미생물 증식을 억제하여 질병을 예방함으로써 면역 및 치료효과와 함께 성장률과 사료효율을 개선시키는 이점이 있는 것으로 알려져 있다 (Hays와 Muir, 1979). 특히 돼지의 경우 생후 2-3주 이내 다양한 원인에 의한 소화기계 질병은 성장을 저해할 수 있고 (Cooper 등, 1997; Salmon 등, 1995), 드물게 대량 폐사를 유발함으로써 지대한 손실을 초래할 수 있다 (Cooper 등, 1997). 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 의심 병원체에 대한 백신이나 항생제가 이용되어 왔다 (Theppangna 등, 2007). 그러나 장기적인 항생제 남용으로 인한 유해성이 문제가 되고 있으며, 그에 따른 항생제 잔류와 내성균이 국제적인 문제로 대두되고 있다 (홍과 김, 2001).

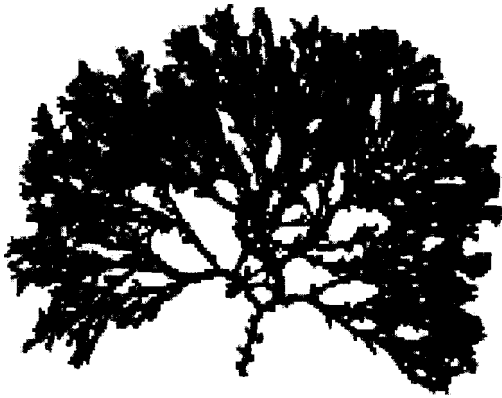
최근 합성 항생물질 사용에 따른 항생제 내성균의 증가 및 그로 인한 합성 항생물질의 사용규제에 따라 생물학적 활성을 갖고 있는 천연소재 추출물에 관한 관심이 증가하고 있다 (Mayer 등, 2009). 특히 천연소재 물질 중 해조류에서는 갈조류 및 홍조류에서 다양한 종류의 생리활성 물질이 알려져 있다 (이 등, 2000). 그 중 일부는 항균작용을 나타냄으로써 항생제 대체물질로 유용하다고 알려져 있다 (임 등, 1999).

벚붉은잎 (*Callophyllis (C.) japonica*)은 홍조류로써 우리나라의 제주도, 부산, 추자도, 거문도, 완도, 방어진에 널리 분포하고 있다. 벚붉은잎은 *in vitro* 실험에서 세포내 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 기를 제거하며, 과산화지질을 억제하는 기능이 알려져 있고 (Kang 등, 2005), 사염화탄소에 의한 간 손상을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Park 등, 2005). 또한 벚붉은잎 추출물은 방사선에 의한 소장 음와세포 사멸을 억제함으로써 방사선 방호효과도 있는 것으로 알려져 있다 (Kim 등, 2008). 그러나 지금까지 벚붉은잎이 돼지에서 문제될 수 있는 세균에 어떤 영향을 미치는지 조사된 바 없다.

이 연구에서는 다양한 생리활성을 가지는 벚붉은잎의 추출물이 돼지에서 질병을 일으키는 세균에 어떤 영향을 미치는지 확인하고, 이를 생후 자돈에 투여한 후 장내 세균총의 변화를 조사함으로써 포유기 자돈에 벚붉은잎 추출물의 적용가능성을 확인하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 벗꽃은잎 (*Callophyllis japonica*)



본 연구에 사용한 벗꽃은잎은 홍조류로서, 제주도 인근 연안에서 채취된 것을 구입하여 사용하였다.

나. 벗꽃은잎 추출물

이 실험에 사용된 시료는 제주도 성산포 연안에 서식하는 벗꽃은잎을 담수를 이용하여 염분을 제거하였다. 염분을 제거한 시료는 건조과정을 거쳐 분말로 제작 한 후, 80% 메탄올(Merck, Darmstadt, Germany)에 교반, 침출 시켜 추출하였다. 추출물은 여과지를 사용해 침전물을 여과한 후 회전감압농축기(Rotavapor; Buchi)를 사용하여 농축하였다.

나. 사용균주 및 시약

이 실험에 사용한 시험균주는 Gram 음성균인 *Escherichia (E.) coli* (S175), *Salmonella (S.) Typhimurium* (국립수의과학검역원)과 Gram 양성균인 *Staphylococcus (S.) aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus (E.) faecium* (ATCC 51558)를 사용하였다. 증균을 위한 broth는 brain heart infusion (BHI) broth (Difco, Livonia, U.S.A.)를 121°C에서 15분간 멸균한 후, 벗꽃은잎 추출물을 1% (w/v)로 부유시켜 혼합하였다. 이 혼합물을 균질화하기 위해서 얼음 상자에 담아 초음파 파쇄기를 이용하여 15초간 초음파 처리, 15초간 정치하기를 8회 반복하였다. 초음파 처리 후 여과멸균기를 통과시켜 사용하였다. 세균수 측정을 위한 고체배지는 BHI agar를 121°C에서 15분간 멸균한 후 사용하였다.

다. 증식억제 효과 측정

증식억제 효과 측정을 위해 균주를 증균배지에 접종 후 0, 4, 8, 12 및 24시간에 세균수를 혼합희석평판배양법 (serial dilution agar plate analysis, pour plate method)을 시행하여 측정하였다. 실험군과 대조군에 18시간 BHI broth에 전배양한 균주를 $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml 수준으로 접종한 후 37°C에서 정치하면서 접종 후 0, 4, 8, 12 및 24시간에 균수를 측정하였다. 균수의 측정은 실험군과 대조군에서 매 측정 시기에 1ml의 배양액을 멸균 생리식염수에 희석한 후 BHI agar 와 혼합하여 접종하였다.

라. 증식억제율의 계산

증식 억제율은 측정된 CFU/ml을 다음과 같은 식을 사용하여 산출하였다 (Negi 등, 1999).

$$\% \text{ Inhibition}^* = (1 - T/C) \times 100$$

* T는 실험군의 수 (CFU/ml) 이고,
C는 대조군의 수 (CFU/ml) 이다.

마. 뱃붉은잎을 투여한 자돈의 분변 중 생균수 변화 관찰

뱃붉은잎 추출물 경구투여 후, 생균수 변화를 확인하기 위해 3일령 돼지를 대용유만을 급여한 대조군과 대용유에 1%농도의 뱃붉은잎 추출물을 첨가하여 급여한 실험군으로 나누어 각 그룹당 2리씩 실험하였다. 1주일간 투여 후 직장으로부터 직접 분변을 채취하였다. 분변 1g을 멸균 생리식염수에 계단희석하여 균수를 측정하였는데, 대장균군 수를 선택적으로 산출하기 위해 violet red bile agar (VRB agar; Merck)를 사용하여 혼합희석평판배양법을 실시하였다.

3. 연구결과

가. Gram 음성균에 대한 증식억제 효과

(1) 추출물의 *E. coli*에 대한 증식억제

뱃붉은잎 추출물을 1% 함유한 BHI broth 에 18시간 전배양한 *E. coli* 균액을 $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml 되게 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였을 때 배양액의 생균수 변화를 나타내었다 (Table 1). 대조군의 경우 접종 후 0시간에 1.0×10^3 CFU/ml, 4시간에 2.7×10^6 CFU/ml, 8시간에 9.0×10^8 CFU/ml, 12시간에 1.1×10^9 CFU/ml, 24시간에 9.5×10^8 CFU/ml의 결과를 나타내

었으며, 실험군의 경우 0시간에 9.1×10^2 CFU/ml, 4시간에 2.4×10^6 CFU/ml, 8시간에 6.3×10^8 CFU/ml, 12시간에 9.7×10^8 CFU/ml, 24시간에 1.1×10^9 CFU/ml의 결과를 나타내었고, 억제율은 0시간에 9%, 4시간에 11%, 8시간에 30%, 12시간에 12%, 24시간에 47% 으로 24시간에 가장 높은 증식억제 효과를 나타내었다 (Figure 1A).

Table 1. Antibacterial effects of the *C. japonica* extracts on Gram-negative bacteria

Micro-organism	Treat-ment	Viable count (CFU/ml, hours)				
		0	4	8	12	24
<i>Escherichia coli</i> (S175)	Control	1.0×10^3	2.7×10^6	9.0×10^8	1.1×10^9	9.5×10^8
	<i>C. japonica</i> extract (1%)	9.1×10^2	2.4×10^6	6.3×10^8	9.7×10^8	1.1×10^9
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Control	1.2×10^4	1.5×10^7	9.9×10^8	1.0×10^9	7.4×10^8
	<i>C. japonica</i> extract (1%)	8.8×10^3	5.6×10^5	9.4×10^7	2.8×10^8	4.9×10^8

(2) 추출물의 *S. Typhimurium*에 대한 증식억제

벚꽃은잎 추출물을 1% 함유한 BHI broth 에 18시간 전배양한 *S. Typhimurium* 균액을 10^2 - 10^3 CFU/ml되게 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였을 때 배양액의 생균수 변화를 나타내었다 (Table 1). 대조군의 경우 접종 후 0시간에 1.2×10^4 CFU/ml, 4시간에 1.5×10^7 CFU/ml, 8시간에 9.9×10^8 CFU/ml, 12시간에 1.0×10^9 CFU/ml, 24시간에 7.4×10^8 CFU/ml 의 결과를 나타내었으며, 실험군의 경우 0시간에 8.8×10^3 CFU/ml, 4시간에 5.6×10^5 CFU/ml, 8시간에 9.4×10^7 CFU/ml, 12시간에 2.8×10^8 CFU/ml, 24시간에 4.9×10^8 CFU/ml의 결과를 나타내었고, 억제율은 0시간에 27%, 4시간에 96%, 8시간에 95%, 12시간에 72%, 24시간에 34% 으로 4시간에 가장 높은 증식억제 효과를 나타내었다 (Figure 1B).

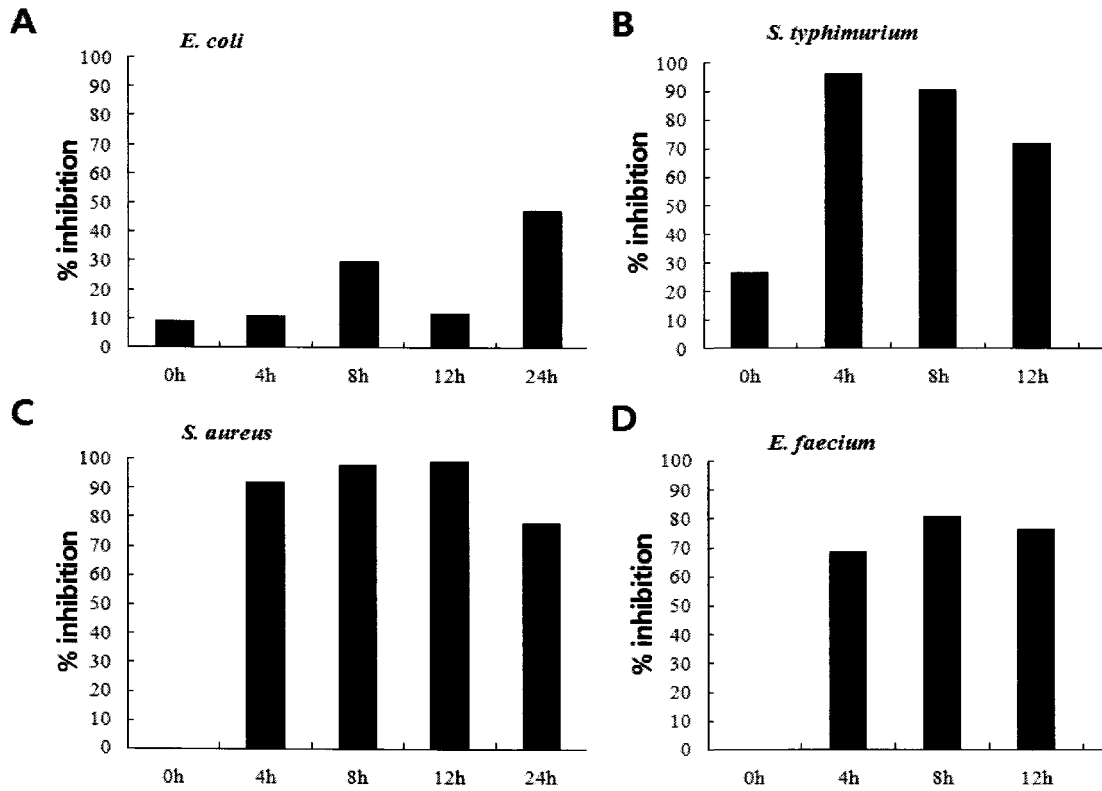


Figure 1. Inhibition of *E. coli* (A), *S. Typhimurium* (B), *S. aureus* (C) and *E. faecium* (D) growth by extracts of *C. japonica*. The results showed that the bacteria growth were inhibited the most for *E. coli* at 24 h, *S. Typhimurium* at 4 h, *S. aureus* at 12 h and *E. faecium* for 8 h by extract of *C. japonica*.

나. Gram 양성균에 대한 증식억제 효과

(1) 추출물의 *S. aureus*에 대한 증식억제

벚꽃은잎 추출물을 1% 함유한 BHI broth 에 18시간 전배양한 *S. aureus* 균액을 10^2 - 10^3 CFU/ml 되게 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였을 때 배양액의 생균수 변화를 나타내었다 (Table 2). 대조군의 경우 접종 후 0시간에 2.2×10^3 CFU/ml, 4시간에 4.4×10^5 CFU/ml, 8시간에 7.9×10^6 CFU/ml, 12시간에 2.8×10^8 CFU/ml, 24시간에 3.5×10^8 CFU/ml의 결과를 나타내었으며, 실험군의 경우 0시간에 2.2×10^3 CFU/ml, 4시간에 3.6×10^4 CFU/ml, 8시간에 1.8×10^5 CFU/ml, 12시간에 2.3×10^6 CFU/ml, 24시간에 7.7×10^7 CFU/ml의 결과를 나타내었고, 억제율은 0시간에 0%, 4시간에 92%, 8시간에 98%, 12시간에 99%, 24시간에 78%으로 12시간에 가장 높은 증식억제 효과를 나타내었다 (Figure 1C).

Table 2. Antibacterial effects of the *C. japonica* extracts on Gram-positive bacteria

Micro-organism	Treatment	Viable count (CFU/ml, hours)				
		0	4	8	12	24
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Control	2.2×10^3	4.4×10^5	7.9×10^6	2.8×10^8	3.5×10^8
	<i>C. japonica</i> extract (1%)	2.2×10^3	3.6×10^4	1.8×10^5	2.3×10^6	7.7×10^7
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 51558)	Control	1.3×10^3	7.3×10^4	1.2×10^7	9.3×10^8	7.4×10^8
	<i>C. japonica</i> extract(1%)	1.3×10^3	2.3×10^4	2.3×10^6	2.2×10^8	4.9×10^8

(2) 추출물의 *Escherichia (E.) faecium* 에 대한 증식억제

벚꽃은잎 추출물을 1% 함유한 BHI broth 에 18시간 전배양한 *E. faecium* 균액을 10^2 - 10^3 CFU/ml 되게 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였을 때 배양액의 생균수 변화를 나타내었다 (Table 2). 대조군의 경우 접종 후 0시간에 1.3×10^3 CFU/ml, 4시간에 7.3×10^4 CFU/ml, 8시간에 1.2×10^7 CFU/ml, 12시간에 9.3×10^8 CFU/ml, 24시간에 7.4×10^8 CFU/ml의 결과를 나타내었으며, 실험군의 경우 0시간에 1.3×10^3 CFU/ml, 4시간에 2.3×10^4 CFU/ml, 8시간에 2.3×10^6 CFU/ml, 12시간에 2.2×10^8 CFU/ml, 24시간에 4.9×10^8 CFU/ml의 결과를 나타내었고, 억제율은 0시간에 0%, 4시간에 68%, 8시간에 81%, 12시간에 76%, 24시간에 34% 으로 8시간에 가장 높은 증식억제 효과를 나타내었다 (Figure 1D).

각 균의 배양을 통한 억제율을 비교했을 경우 증균 후 4시간에 *S. Typhimurium*에 대한 항균활성이 가장 높았으며, 증균 후 8, 12, 24시간에는 *S. aureus*에 대한 증식억제 효과가 가장 높은 것을 확인 하였다 (Figure 1).

다. 벚꽃은잎 급여 후 대장균군 수의 변화

3일령 자돈에 1% 벚꽃은잎을 1주일 동안 대용유와 함께 급여한 후, 분변 1g중 대장균군수를 측정하였다. 그 결과 대조군에서는 $2.8 \times 10^9 \pm 22$ CFU/g의 결과를 나타내었고, 실험군에서는 $1.0 \times 10^{10} \pm 5.5$ CFU/g의 결과로 1% 벚꽃은잎을 급여한 그룹에서 대장균군 수가 약 4배 증가하였다 (Figure 2).

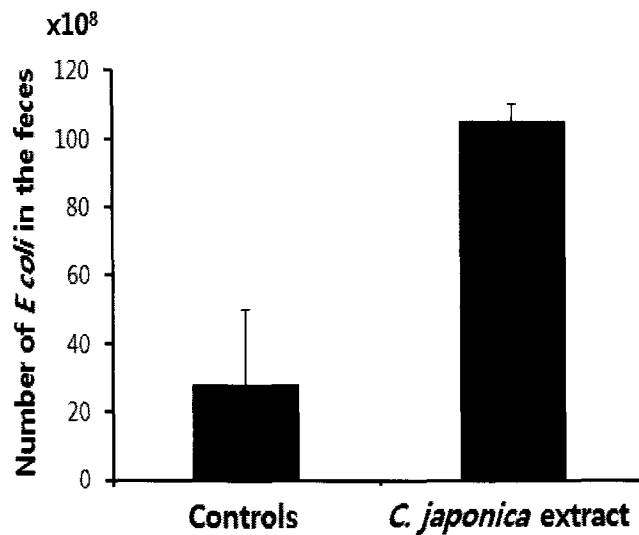


Figure 2. Effect of *C. japonica* extract on bacterial counts for *E. coli* in the feces of nursery swine. Treatment with the *C. japonica* extracts increased the number of *E. coli* as compared with non-treatment controls. *C. japonica* extract was administrated with milk for 1 week. The data is expressed as the mean ± SE.

제2절 사염화탄소로 유도된 간손상에서 벚꽃은잎에 의한 inducible nitric oxide synthase의 변화

1. 연구배경

사염화탄소(Carbon tetrachloride, CCl₄)는 간섬유화를 동반하는 간손상을 일으키기 위하여 널리 이용되고 있다 (Lee 등, 2000; Gilani and Janbazz, 1995). 그 작용기전은 아직 알려져 있지 않으나 CCl₄의 산화제로서의 역할이 중요시 되고 있다. 즉 CCl₄가 간내의 microsomal cytochrome P-450에서 산화기를 형성하게 되는데, 이 산화기가 직, 간접적으로 세포막의 지질 또는 다른 분자들에 손상을 유발하게 된다 (Castillo 등, 1992). 이러한 손상 기전에 의해 간에서는 중심소엽의 괴사와 지방이 축적되게 된다 (Castillo 등, 1992).

벚꽃은잎 (*Callophyllis (C.) japonica*)은 홍조류로써 우리나라의 제주도, 부산, 추자도, 거문도, 완도, 방어진에 널리 분포하고 있다. 벚꽃은잎은 in vitro 실험에서 세포내 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 기를 제거하며, 과산화지질을 억제하는 기능이 알려져 있고 (Kang 등, 2005), 방사선에 의한 소장 음과 세포 사멸을 억제함으로써 방사선 방호효과도 있는 것으로 알려져 있다 (Kim 등, 2008). 또한 본 연구진이 보고한 결과에 의하면, 사염화탄소에 의해 유도된 간 손상 모델에서 벚꽃은잎이 간손상 시 증가되는 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)의 감소시켰고, 중심소엽의 괴사 및 지방 축적을 억제시켜 간손상이 억제됨을 확인하였다 (Park 등, 2005).

Nitric oxide (NO)는 L-arginine으로부터 분비되는 Nitric oxide synthase (NOS)에 의해 합성 된다 (Xie 등, 1994). 이러한 NOS는 어떠한 자극에 의해 산화적 손상을 유도하게 되는데, 간에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 간경변성 간염에서 강하게 발현하였고 (Patrino 등, 2007), CCl₄에 의한 급성 간손상 시 iNOS가 증가된다고 보고되었다 (Tipoe 등, 2006).

본 연구에서는 사염화탄소에 의해 유도된 간손상 모델에서 벚꽃은잎에 의한 세포 보호 효과를 확인하고, iNOS의 발현 양상을 확인하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 벚붉은잎의 준비

이 실험에 사용된 시료는 제주도 성산포 연안에 서식하는 벚붉은잎을 담수를 이용하여 염분을 제거하였다. 염분을 제거한 시료는 건조과정을 거쳐 분말로 제작 하였고, 생리식염수에 분말을 섞어 경구 투여하였다.

나. CCl₄를 이용한 간손상 유도

150-200g의 7-8주령 수컷 Sprague-Dawley 랫트를 이용하여, CCl₄ (Oriental Chemicals, Seoul, South Korea)를 20% (v/v) 용액을 올리브 오일에 희석하여 1.25ml/kg로 복강투여 하였다 (Slater, 1996; Raju 등, 2003).

벚붉은잎의 예방효과를 확인하기 위하여 실험그룹은 1) 올리브 오일만을 투여한 대조군, 2) CCl₄ 간손상 유도 saline 그룹 3) CCl₄ 간손상 유도 벚붉은잎 치료 그룹으로 하여 세 그룹으로 나누어 각 그룹 당 10마리씩 실험하였다. 첫 번째 그룹은 3일 동안 생리식염수 (10ml/kg)를 경구투여하고 희생 전 6시간에 올리브 오일만을 복강주사 하였고, 두 번째 그룹은 3일 동안 생리식염수 (10ml/kg)을 경구투여 한 후, CCl₄ (1.25ml/kg)로 복강 주사하였고, 세 번째 그룹은 벚붉은잎 (150mg/kg/day)을 3일 동안 경구투여 한 후, CCl₄ (1.25ml/kg)로 복강주사 하여 화학적 간염을 유도하였고, 세 그룹 모두 6시간 후에 희생시켰다.

다. 조직표본 준비와 조직 검사

실험동물은 CO₂로 마취하여 방혈하였고, 세 그룹 모두 CCl₄ 유도 후 6시간째에 희생시켜 간 조직을 조직 검사와 Western blotting을 위해 샘플링 하였다. 현미경 관찰을 위한 조직은 10% 포르말린 고정하고 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포맷한 후 5 μ m의 두께로 조직절편을 만들어 H-E 염색을 실시하였다.

라. Western blotting

간 조직을 leupeptin (0.5 ug/ml), PMSF (1 mM), aprotinin (5 ug/ml)등의 protein inhibitor가 포함된 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40 (polyoxyethylene [9] p-t-octyl phenol)의 buffer에서 녹인 후, 갈아서 완전히 파쇄한 후, 14,000 g로 30분간 원심분리하여 상층액을 회수한다. 이들을 단백질 정량하여 변성시킨

후 동량 (20 ug/20 ul)으로 sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel에서 전기영동하고, gel 상의 단백질 밴드를 다시 nitrocellulos membrane에 100V에서 2시간 동안 이동시켰다. 옮겨진 membrane을 5% skim milk로 blocking한 후, 1차 항체로 mouse monoclonal anti-iNOS (Transduction Laboratories, Lexington, KY)(1:1000)을 실온에서 1시간 반응시킨 후 2차 항체로는 horseradish peroxidase-conjugated horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 60분간 반응시킨다. 면역반응이 끝난 membrane은 Amersham ECL reagents (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK)로 반응시켜, X-ray 필름에 노출시키고, 그 결과를 densitometer (M GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)로 측정하였다.

마. 면역조직화학

슬라이드 준비된 조직의 파라핀을 제거하고 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H₂O₂가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰다. 비특이적 반응을 방지하기 위해 10% normal horse serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체로 mouse monoclonal anti-iNOS (Transduction Laboratory, Lexington, KY)(1:200)을 실온에서 1시간 반응시킨 후 biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA)(1:200)로 45분간 반응시켰다. 이어 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 45분간 반응시켰다. 각 단계가 끝나고 PBS (pH 7.4)로 5분간 3회 충분히 세척했으며, 면역반응이 끝난 조직절편은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 발색했다. 그리고 hematoxylin용액으로 대조염색을 한 후, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

바. 자료 통계

모든 실험에서 얻어진 자료는 one-way ANOVA (the post-hoc Student-Newman-Keuls)의 방법으로 유의성 검사하였고, 그들의 수치는 평균 표준편차 mean \pm SE의 값으로 나타내었으며, *p*값이 0.05보다 작을 때 그 값을 유의성이 있는 값으로 정하였다.

3. 결과

가. 벚붉은잎 투여 후 CCl₄에 의한 간손상 완화

조직학적 검사 결과, 생리식염수를 경구투여하고 올리브 오일만을 복강주사 한 대조군에서는 건강한 간세포와 중심정맥 주변에 동모양 모세혈관이 확인되었다 (Figure 1A). 그러나 CCl₄만을 주사하여 간손상을 준 그룹에서는 손상된 세포와 괴사부위가 광범위하였고, 중심정맥의 수축과 간소엽의 확장, 그리고 손상 받은 세포는 지방의 축적되고, 분명하게 가장자리만 남아있는 것을 확인하였다 (Figure 1B). 그러나 CCl₄로 손상을 주기 전 3일 동안 벚붉은잎 (150mg/kg/day)을 경구 투여한 그룹에서는 괴사소견이 거의 나타나지 않았고, 지방 축적이 아주 약해졌음을 확인할 수 있었다 (Figure 1C).

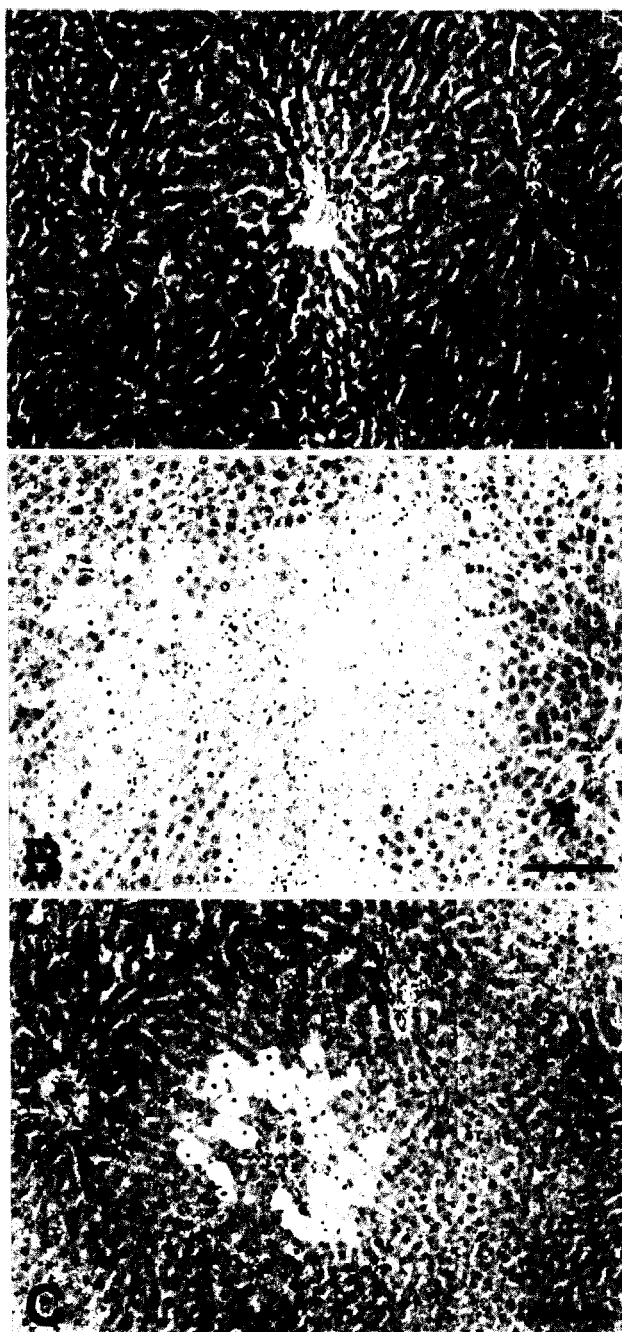


Figure 1. Histological findings of livers with vehicle (olive oil) control rat (A), normal saline control rat (B) and pre-treatment with *C. japonica* (150mg/kg) (C) for 3 days in CCl₄-injected rat. (A) Shows the normal appearance of liver. (B) Shows centrilobular fatty change and necrosis of liver cell in the liver. (C) Shows a decrease in the necrotic and fatty change in liver. Hematoxylin-eosin staining. Scale bar = 100 μ m

나. iNOS의 발현에 대한 Western blotting 결과

Western blotting을 통해 iNOS의 양적인 변화를 확인한 결과, iNOS의 발현은 올리브 오일만을 주사한 대조군에 비해 CCl₄에 의해 손상 받은 그룹에서 약 7배가 증가하여 유의성 있는 결과를 나타내었고 ($p < 0.01$), CCl₄ 손상 전 3일 동안 벚붉은잎을 투여한 그룹에서는 생리식염수만을 투여한 그룹에 비해 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.5$)(Figure 2). 이러한 결과는 CCl₄에 의한 간손상 전에 벚붉은잎의 투여로 인해 iNOS의 발현이 감소로 인해 간세포가 보호되었을 것으로 사료된다.

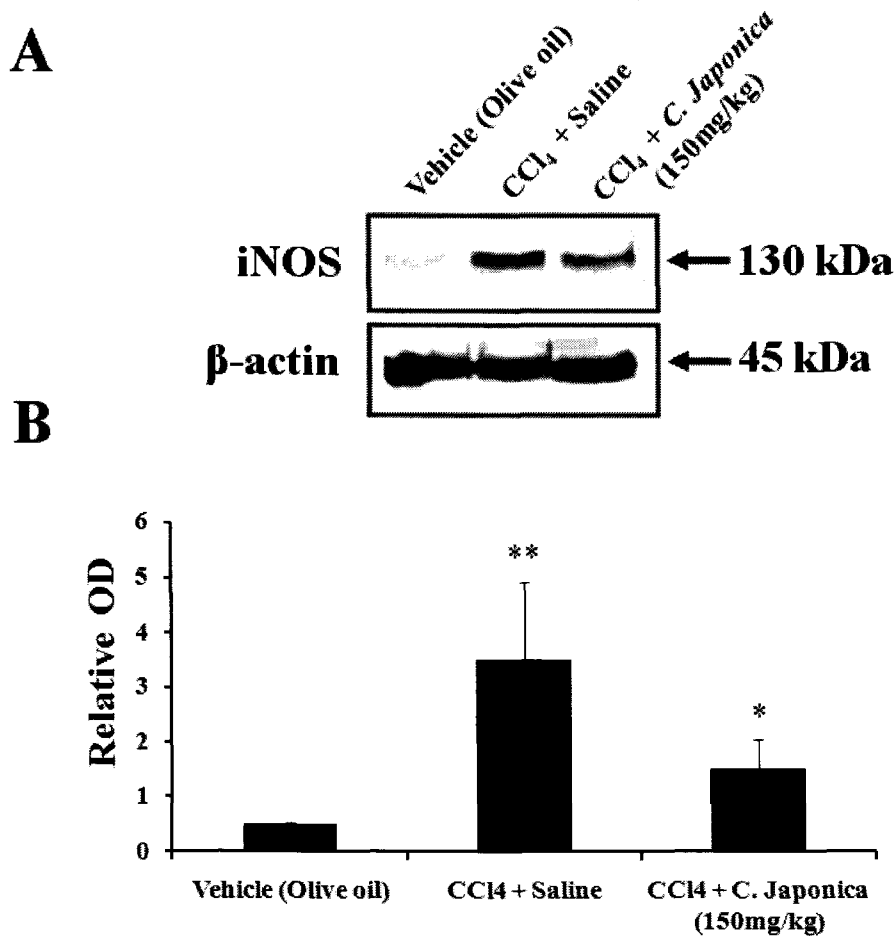


Figure 2. Western blotting analysis of iNOS in the liver of vehicle control rats (Olive oil) and rats with normal saline and *C. japonica* (150mg/kg) for 3 days before CCl₄-injected. (A) Representative photographs of Western blots for the detection of iNOS (130 kDa) and β -actin (45 kDa). (B) Results of densitometric data analysis (mean \pm S.E., n = 3 rats/group). The data are presented as mean (\pm S.E.) ** $P < 0.01$ vs. vehicle controls, * $P < 0.05$ vs. normal saline controls.

다. iNOS의 발현에 대한 면역조직화학적 결과

간조직에서 iNOS의 발현양상을 면역조직화학적 기법을 이용하여 확인한 결과, 올리브 오일만을 투여한 대조군에서는 iNOS의 발현은 중심정맥 주위 간세포에서 아주 약하게 나타났다 (Fig. 3A). 그러나 CCl₄를 이용하여 간손상을 유도하기 전에 생리식염수만을 주사한 그룹에서는 손상받지 않은 간삼조 부위 간세포에서도 강하게 발현하였으며 (Fig. 3B), 손상을 심하게 받은 중심정맥 주위 간세포에서 iNOS의 발현이 강하게 나타났다 (Fig. 3C, 3E). 반면에 CCl₄ 손상 전 3일 동안 벚꽃은잎을 투여한 그룹에서의 iNOS의 발현은 생리식염수만을 투여한 그룹에 비해 양성세포의 수와 발현 강도가 약하게 나타났다 (Fig. 3D, 3F). 이러한 결과는 iNOS의 발현 양을 비교한 Western blotting 결과와도 일치하는 소견이었다.

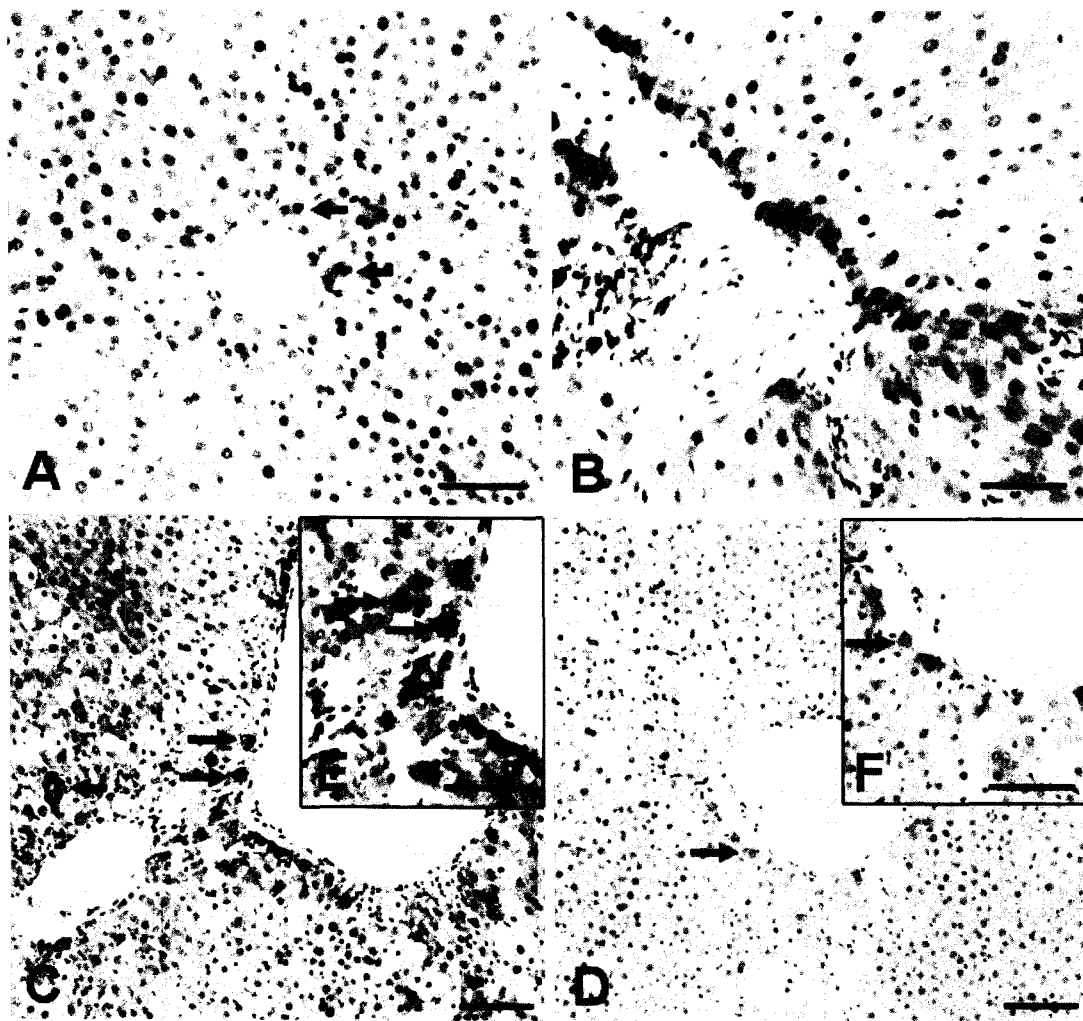


Figure 3. Immunohistochemical staining of iNOS in the liver of vehicle control rats (A) and rats with normal saline (B, C and E) and *C. japonica* (150mg/kg) (D and F) for 3 days before CCl₄ injury. In the liver of the vehicle control rats, iNOS was weakly detected in some of the liver cell around centrilobular lesions (A arrows). At the normal saline treatment of CCl₄-injury, increased levels of iNOS were strongly detected in the liver cells around portal triad lesions (B) and centrilobular lesions (C and E, arrows). However, In the liver of the pre-treatment with *C. japonica* (150mg/kg), the levels of iNOS immunoreactivity in the liver cells around centrilobular were decreased (D, and F, arrows). E and F were high magnification of C and D, respectively. The specimens were counterstained with hematoxylin. Scale bars: 50 μ m.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 벚붉은잎 추출물의 항산화효과 및 항균효과를 확인한 결과 돼지 질병을 야기하는 세균에 대한 항균효과를 확인
2. 벚붉은잎 추출물의 급여가 자돈의 성장에 미치는 영향을 평가하기 위하여 돼지의 사료 첨가제로서의 효능을 평가한 결과, 출생 초기 위축을 야기할 수 있는 세균감염을 억제하여 성장에 도움이 될 것으로 사료됨
3. 제주도 연안 자생 홍조류인 벚붉은잎을 이용하여 양돈의 사료첨가제 기술 개발을 통하여 고품질, 저비용의 사료첨가제 개발에 영향을 줄 수 있음
4. 돼지의 세균성 질병을 일으키는 세균에 대한 항균효과를 평가하였고, 항생제 사용 감소를 통한 청정 돈육 생산의 가능성을 확인
5. 벚붉은잎을 사염화탄소로 유도한 간손상 모델에 적용시킴으로써, 화학적 매개 인자로 인한 간손상의 치료 및 예방 효과를 확인하여 임상적용에 기초자료를 제공함
6. 사염화탄소 유도 전 벚붉은잎의 투여는 세포의 산화적 손상을 줄 수 있는 iNOS의 발현을 억제 하였고, 이로 인해 간세포를 보호하는 효과를 나타냄
7. 제주도 연안 자생 해조류인 벚붉은잎을 이용하여 양돈의 사료첨가제 기술 개발을 통하여 고품질, 저비용의 사료첨가제 개발에 기여 하고, 간손상 모델에서 벚붉은잎의 효능을 확인함으로써 간세포의 괴사 및 지방 축적을 야기하는 질병에 대한 효과에 기여함
8. 제주도 지역에서 자생한 벚붉은잎을 활용함으로써, 제주도 해녀 및 어촌의 영어 의욕을 고취시켰으며, 소득증대로 인한 해조류의 가격의 안정화에 기여

제5장 연구개발결과의 활용계획

제주도 인근 바다에 자생하는 해조류 중 벗꽃은잎 메탄을 추출물을 이용하여 Gram 음성균 및 Gram 양성균의 증식에 미치는 영향을 조사하고 이를 경구투여한 후 자돈의 장내 세균총에 미치는 영향을 확인 한 결과, 돼지의 질병을 일으키는 세균에 대한 항균효과가 있음을 확인하였고, 앞으로 사료첨자제로서 개발하여 양돈농가의 항생제 남용을 억제하여 청정 돈육을 생산하길 기대하고, 어민들의 소득을 증대 시킬 수 있는 기회를 제공할 계획이다.

또한 우리 연구진의 벗꽃은잎을 활용한 연구에 의하면 (Park 등, 2005), 벗꽃은잎은 사염화탄소에 의해 유도된 급성 간손상에서 간세포를 보호하는 것으로 확인되었고, 간세포 보호효과를 용량별로 확인 한 경우, 150mg/kg/day가 가장 효과적인 용량이었다. 이 용량을 사염화탄소 손상 전에 투여한 경우, 혈청학적 검사를 통해 ALT와 AST의 수치가 유의성 있게 감소됨을 확인하였고, 손상이 완화된 기전을 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 사염화탄소에 의해 간손상을 유도하기 전에 벗꽃은잎을 투여한 경우, 중심정맥 주위 피사와 지방의 축적을 감소시켰으며, 이러한 간세포 손상이 완화될 수 있는 것은 iNOS의 발현 감소에 의한 것이고, 벗꽃은잎은 급성 간손상 시, 산화적 손상으로부터 방어할 수 있는 iNOS의 억제제 역할을 할 수 있다고 사료된다.

또한 사염화탄소와 같은 화학적 물질에 의해 손상 받을 수 있는 간에서 벗꽃은잎이 산화적 손상으로부터 세포를 보호 할 수 있다는 결과를 확인함으로써 인해, 간손상을 예방할 수 있는 물질로 개발하여, 현대인들의 간보호 물질로 개발할 수 있는 기초 자료를 제공할 계획이다.

벗꽃은잎의 항균효과 작용기전에 대한 연구와 생체내 생균수 조절에 관한 연구 및 양돈 산업의 적용 방법, 벗꽃은잎의 섭취 및 해조류 활용 가능성에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

또한 벗꽃은잎은 강력한 항산화 및 항균, 항염증 작용이 있는 것으로 확인되었고, 사람의 다발성 경화증의 염증성 동물 모델인 자기면역성 뇌척수염에서 벗꽃은잎의 치료 및 예방 효과를 확인하여 볼 계획이다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

문헌에 따르면 중국에서 기원전 1,000년경부터 해조류를 식용한 것으로 알려져 있고, 기원전 고대 페키니아인이 적물의 염색을 위해서 자줏빛 염료를 해조류로부터 구했다는 기록이 남아 있다. 또한 기원후 AD 532년에 이스탄불에서 규조류를 벽돌 제작에 사용했다는 기록이 남아 있으며, 프랑스에서는 17세기경 갈조류에서 소다회 (soda ash)를 19세기 중엽에는 요오드를 추출하기도 했다. 전 세계적으로 조류를 직접 음식 재료로 사용하는 나라는 주로 한국, 일본, 중국 등의 동북아시아와 아일랜드 그리고 세계 곳곳의 해안 지역과 도서지역으로 제한되어 있다. 음식물로 섭취되는 조류는 나라마다 고유한데 주로 대형 해조류(marine macroalgae)이며 김, 미역, 다시마 등이 대표적이다. 조류의 생산량은 연간 700만톤(wet weight)인데 그중 가장 많은 양을 차지하는 것이 다시마, 미역, 그리고 김이다. 1995년 한해 중국에서만 다시마(*Laminaria japonica*)가 400만톤이나 생산되었고 같은 해 일본에서도 30만톤이 생산되어 전 세계적으로 다시마 단일 품종이 약 500만톤이나 생산되었다. 미역(*Undaria pinnatifida*)은 우리나라, 일본, 중국에서 주로 양식되는데 1995년 약 75만톤이 생산되었다. 전체 조류 산업은 1995년 약 10조\$ 정도이며 가장 생산량이 많은 김, 미역, 다시마 이외에도 총 115속 395종의 조류가 식용 43%, 공업용 42.8%, 의약품 7.7%, 그리고 사료용 6.5%으로 이용되고 있다. 조류를 양식하는 나라는 중국, 일본, 한국이며 필리핀, 인도네시아, 말레이시아, 칠레, 프랑스, 영국, 미국, 캐나다 등 24개국에서도 생산되고 있다.

조류를 이용한 산업원료로는 갈조류에서 추출한 알긴산, 홍조류에서 추출한 아가(한천)와 카라기난이 널리 이용되고 있다. 알긴산은 *Macrocystis pyrifera* (미국), *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria cloustoni* (영국), *L. digitata* (영국, 노르웨이, 중국) 그 밖에 감태와 같은 대형 갈조류에서 추출되고 있다. 현재 조류 추출물에서 가장 용도가 다양한 알긴산은 전체 35,000톤의 생산량 중에서 섬유산업에서 50%, 식품 30%, 제지산업 6%, 그리고 의약품에 5% 정도가 사용되고 있다. 알긴산은 흡수성이 커서 현탁제, 안정제, 유화제, 농후제, 겔화제 등으로 다양하게 이용되고 있다. 특히 수분을 보존하고 질감을 균일하게 해 주어 플라스틱이나 직물에서 유화안정제도 이용되고 있고, 제지코팅, 섬유도색, 화장품, 의약품 등에서 알약의 코팅제나 캡슐제 등의 원료로 사용되고 있으며, 치과용 impression gel material의 원료로도 활용되고 있다. 아가는 다양한 홍조류에서 추출되는데 가장 많이 활용되는 조류는 우뚝가사리이다. 아가는 연구분야 뿐만 아니라 샴푸, 크림, 화장수 등에도 첨가물로 사용되고 있으며 제지산업에도 이용되고 있다. 카라

기난은 비교적 최근에 이용되고 있는데 1983년 아일랜드에서 생산되기 시작했다. 이들은 분산과 유화안정제, 팽윤제, Fat replacer, 증점제, 결착제, 식이섬유, 결정방지제, 방향제 나 소취제 그리고 겔화제로 사용되어 다양한 산업분야에서 응용되고 있으며 앞으로 활용 범위가 확대될 전망이다. 이밖에도 규조류에서 유래한 규조토가 정수기용 필터, 음향기기 스피커, 베타락톤 살충제, 방부제, 에나멜 광택제, nitroglycerine의 안정제, 여송연(담배)의 불 붙는 정도를 조절하는 첨가제, 페인트광택 억제제등으로 이용되고 있다. 최근에는 녹조류 청각의 일종인 *Codium tomentosum*에서 추출한 glucuronic acid(marine betahydroxyacid)와 hydroxyproline이 BAH라는 이름으로 화장품의 세포재생성분으로 이용되고 있다.

조류는 기본적으로 의약제조에 있어 캡슐의 원료로 이용되고 흡착제와 유화제 및 suspending agent로 이용되고 있다. 해조류를 의약품으로 사용한 역사는 식용으로 사용한 역사만큼이나 오래되었다. 중국에서는 고대로부터 모자반과 다시마등의 여러 가지 해조류가 갑상선 종양 및 그 밖의 내분비성 질환의 치료에 사용되어 왔으며, 우뚝가사리속도 일찍부터 위장병과 열병의 치료에 쓰여 왔다. 영국에서는 김을 괴혈병 방지용으로, 홍조류인 진두발 (*Chondrus*)은 속병 치료용으로 사용하기도 하였다. 이밖에도 홍조류에서 추출되는 kainic acid는 구충제로 사용되었으며, 다시마가 생산하는 만니톨이 의약품 원료로 광범위하게 사용되고 있다. 또한 일본에서는 최근 대표적인 홍조류인 김 추출물이 강력한 암발생 억제효과가 있음이 보고되었다 (Okai 등, 1996).

외국의 경우, 로마시대 이래 지중해 연안지대에서는 해조류를 말사료로 이용해 왔으며 또한 프랑스, 스코틀랜드, 아일랜드 및 노르웨이 해안에서는 해조류를 양, 소 및 돼지의 사료로 이용해 왔는데 현재 해조류를 이용한 사료 공장이 세워져 해조 분말을 만드는 기술을 발달시켰다 (Orpin CG 등, 1985). 또한 최근 북 노르웨이에서는 해조와 어류 가공 부산물을 섞어 끓인 사료를 개발 중에 있다. 태평양 해안이나 아프리카 남동해안에서는 대형 갈조 분말을 가축의 천연사료로 이용하고 있다. 또한 다양한 미세 조류가 가축 및 새우 양식, 어류 양식과 같은 수산 양식의 사료로 활용되고 있다. 유럽, 미국, 아시아 등지에서는 일찍부터 해조류를 비료로 사용해 왔는데, 해조류를 직접 경작지에 뿌려 주거나 해조 속에 포함된 비료 성분만을 따로 추출하여 이용하고 있다. 유럽, 북아메리카, 남아프리카 등지에서는 모자반류, *Ascophyllum*류의 대형 갈조를 비료로 이용하고 있다. 해조비료는 토양성층을 향상시키고, 부식도를 증가시키며 토양수분 함유율을 증가시켜 종자의 발아를 촉진함 감염에 대한 저항성을 증가시킨다 (Blunden G 등, 1968). 석회성 조류(Calcareous algae)들과 남조인 *Anabaena* sp., 대형갈조, 녹조 *Chlamydomonas*와 *Chlorella*를 비롯한 토양성 조류도 천연 비료로 이용되고 있다.

조류는 현재 미래 자원으로 각광받고 있는 추세이다. 조류는 바이오 에너지 생성과

오염 물질 정화능력을 보유하고 있어 이의 산업적 이용도 시도되고 있다. 기존의 바이오 에너지산업은 식량대체작물인 옥수수과 사탕수수를 이용하여 산업용 에탄올을 만들어왔다. 하지만 이는 식량작물을 이용한다는 비난을 피하기 어려웠고 또한 곡물수요의 불안정을 초래하여 문제점이 많이 드러났다. 하지만 해조류의 경우 식량작물을 재배하기 힘든 환경조건에서도 생장이 가능하며, 또한 생장율이 높아 단위 면적당 얻을 수 있는 생산량이 많아 약 1 헥타르당 연간 2만리터의 바이오에탄올을 생산할 수 있다. 그리고 발육시 대기중의 이산화탄소를 포집하는 능력이 있어 지구 온난화 방지 목적으로도 사용될 수 있다.

이렇듯 해조류는 다양한 분야에서 사용되고 있다. 특히 국외의 경우 해조류를 사료와 혼합하여 사용한 예는 있었으나 추출물의 유효성분에 대한 분석은 이루어지지 않았고 또한 추출물을 이용하여 사료첨가제로의 개발은 아직 시작단계에 있는 국내실정과 비슷하다. 따라서, 새로운 천연물질 소재 개발을 통해 양돈의 생산성을 향상시키는 동시에 질병에 대한 면역력 강화로 양돈용 약제 사용을 감소시킬 수 있다. 또한 현대인들에게 쉽게 노출되어 있는 알콜성 간손상을 비롯하여 화학적 간손상을 예방할 수 있는 기초자료로 제공 될 수 있다.

제7장 참고문헌

- 김진아, 이종미. 2004. 건조방법에 따른 해조류(툇)의 생리활성 성분 및 항산화 활성의 변화. 한국식생활문화학회지 19(2): 200-208.
- 이학성, 서정호, 서근학. 2000. 해조류 추출물로부터 항균제의 제조 및 항균효과. 한국수산학회지 33(1): 32-37.
- 임치원, 이종수, 송광태, 박정흠, 조영제. 1999. 참보라색우무 추출물의 항균특성. 국립수산물과학원연구보고 57: 211-220.
- 임치원, 이종수, 조영제. 2000. 참보라색우무에서 추출한 항균물질의 구조 및 특성. 한국수산학회지 33(4): 280-287.
- 홍의철, 김인호. 2001. 환경친화형 양돈사료를 위한 항생제 대체 기능성 물질. 한국유기농업학회지 9(4): 136-149.
- Aarestrup FM, Hasman H. 2004. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet Microbiol* 100(1-2): 83-89.
- Ahn M, Kang J, Lee Y, Riu K, Kim Y, Jee Y, Matsumoto Y, Shin T. 2001. Pertussis toxin-induced hyperacute autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is correlated with increased expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha. *Neurosci Lett* 308: 41-44.
- Bentley R, Meganathan R. 1982. Biosynthesis of Vitamin K (menaquinone) in Bacteria. *Microbiol Rev* 46(3): 241-280.
- Blunden G, Challen SB, Woods DL. 1968. Seaside extracts as fertilisers. *J Sci Food Agric* 19(6): 289-293

- Brenner DA, Veloz L, Jaenisch R, Alcorn JM. 1993. Stimulation of the collagen alpha 1 (I) endogenous gene and transgene in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Hepatology*. 17(2):287-292.
- Castillo T, Koop DR, Kamimura S. 1992. Triadafilopoulos G, T sukamoto H. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron- dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* 16:992-996.
- Cooper DM, Swanson DL, Gebhart CJ. 1997. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. *Vet Microbiol* 54: 47-62.
- Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich GE, Berman AE, Bilan MI, Usov AI, Ustyuzhanina NE, Grachev AA, Sanderson CJ, Kelly M, Rabinovich GA, Iacobelli S, Nifantiev NE; Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Bio-Oncologia Italy. 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17: 541-552.
- Del Bigio MR, Yan HJ, Campbell TM, Peeling J. 1999. Effect of fucoidan treatment on collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *NeurolRes* 21:415 - 419.
- Gilani AU, Janbaz KH. 1995. Studies on protective effect of *Cyperus scariosus* extract on acetaminophen and CCl₄-induced hepatotoxicity. *Gen Pharmacol*. 26(3):627-631.
- Granert C, Raud J, Lindquist L. 1998. The polysaccharide fucoidin inhibits the antibiotic-induced inflammatory cascade in experimental pneumococcal meningitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 322 - 324.

- Hays VW, Muir WM. 1979. Efficiency and safety of feed additive use of antibacterial drugs in animal production. *Can J Anim Sci* 59: 447-456.
- Hudault S, Guignot J, Servin AL. 2001. *Escherichia coli* strains colonizing the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* 49(1): 47-55.
- Jhamandas JH, Wie MB, Harris K, MacTavish D, Kar S. 2005. Fucoidan inhibits cellular and neurotoxic effects of beta-amyloid (A beta) in rat cholinergic basal forebrain neurons. *Eur J Neurosci* 21: 2649 - 2659.
- Kang KA, Bu HD, Park DS, Go GM, Jee Y, Shin T, Hyun JW. 2005. Antioxidant activity of ethanol extract of *Callophyllis japonica*. *Phytother Res* 19: 506-510.
- Kim J, Moon C, Kim H, Jeong J, Lee J, Kim J, Hyun JW, Park JW, Moon MY, Lee NH, Kim SH, Jee Y, Shin T. 2008. The radioprotective effects of the hexane and ethyl acetate extracts of *Callophyllis japonica* in mice that undergo whole body irradiation. *J Vet Sci* 9(3): 281-284.
- Lee JI, Lee KS, Chung JP, Park YN, Lee SJ, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM, Kim HS. 2000. The change of Transforming Growth Factor- β 1 expressing and the effect of vitamin E in the acute rat liver injury with carbon tetrachloride. *Korean J Hepatol*, 6: 147-155.
- Lim SB, Kim SH, Ko YH, Oh MC, Oh CG, Ko YG, Park JS. 1995. Extraction yields of *Hizikia fusiformis* and *Aloe vera* linne by supercritical carbon dioxide and antimicrobial activity of their extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27(1): 68-73.
- Mayer AM, Rodriguez AD, Berlinck RG, Hamann MT. 2009. Marine pharmacology in 2005-6: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities : effecting the cardiovascular, immune and nervous systems,

- and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1790: 283-308.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43(2): 109-142.
- Moon C, Ahn M, Jee Y, Heo S, Kim S, Kim H, Sim KB, Koh CS, Shin YG, Shin T. 2004. Sodium salicylate-induced amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is associated with the suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenases. *Neurosci Lett* 356: 123 - 126.
- Moon C, Ahn M, Wie MB, Kim HM, Koh CS, Hong SC, Kim MD, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T. 2005. Phenidone, a dual inhibitor of cyclooxygenases and lipoxygenases, ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes. *Brain Res* 1035: 206 - 210.
- Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. 2002. Bactericidal activity phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J Antimicrob Chemother* 50: 889-893.
- Negi PS, Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. 1999. Antibacterial Activity of Tumeric Oil: A Byproduct from Curcumin Manufacture. *J Agric Food Chem* 47: 4297-4300.
- Okai Y, Higashi-Okai K, Yano Y, Otani S. 1996. Suppressive effects of chlorophyllin on mutagen-induced umu C gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK 1002) and tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction in BALB/c 3T3 fibroblast cells. *Mutat Res* 370(1); 11-17.
- Orpin CG, Greenwood Y, Hall FJ, Paterson IW. 1985. The rumen microbiology of seaweed digestion in Orkney Sheep. *J Appl Bacteriol* 58(6); 585-596.

- Park DS, Lee KH, Kim HC, Ahn MJ, Moon C, Ko MS, Lee KK, Go GM, Shin T. 2005. Effects of *Callophyllis japonica* powder on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Orient Pharm Exp Med* 5: 231-235.
- Patruno A, Speranza L, Tetè S, Mastrangelo F, De Lutiis MA, Pesce M, Franceschelli S, Vinciguerra I, Felaco M, Grilli A. 2007. iNOS activity in the aged rat liver tissue. *J Biol Regul Homeost Agents*. 21(3-4): 89-95.
- Raju K, Anbuganapathi G, Gokulakrishnan V, Rajkapoor B, Jayakar B, Manian S. 2003. Effect of dried fruits of *Solanum nigrum* LINN against CCl₄-induced hepatic damage in rats. *Biol Pharm Bull*. 26(11): 1618-1619.
- Reid G, Howard J, Gan BS. 2001. Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol* 9(9): 424-428.
- Salmon SA, Watts JL, Case CA, Horrman LJ, Wegener HC, Yancey RJ Jr. 1995. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the united states, canada, and denmark. *J Clin Microbiol* 33(9): 2435-2444.
- Schönrock LM, Kuhlmann T, Adler S, Bitsch A, Brück W. 1998. Identification of glial cell proliferation in early multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 320 - 330.
- Shin T, Kojima T, Tanuma N, Ishihara Y, Matsumoto Y. 1995. The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 56: 171 - 178.
- Slater TF. 1966. Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: a speculative mechanism based on activation. *Nature*. 209(5018): 36-40.
- Stanislaus R, Gilg AG, Singh AK, Singh I. 2005. N-acetyl-L-cysteine ameliorates the

- inflammatory disease process in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J Autoimmun Dis* 2: 4.
- Theppangna W, Murase T, Tokumaru N, Chikumi K, Shimizu E, Otsuki K. 2007. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. *J Vet Med Sci* 69(12): 1235-1239.
- Tipoe GL, Leung TM, Liong E, So H, Leung KM, Lau TY, Tom WM, Fung ML, Fan ST, Nanji AA. 2006. Inhibitors of inducible nitric oxide (NO) synthase are more effective than an NO donor in reducing carbon-tetrachloride induced acute liver injury. *Histol Histopathol.* 21(11): 1157-1165.
- Uhm CS, Kim KB, Lim JH, Pee DH, Kim YH, Kim H, Eun BL, Tockgo YC. 2003. Effective treatment with fucoidin for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Neurosci Lett* 353: 21 - 24.
- Vallinayagam K, Arumugam R, Kannan RR, Thirumaran G, Anatharaman. 2009. Antibacterial activity of some selected seaweeds from pudumadam. *Global J Pharmacol* 3(1): 50-52.
- Wells JE, Oliver WT, Yen JT. 2009. The effect of dietary additives on faecal levels of *Lactobacillus* spp., coliforms, and *Escherishia coli*, and faecal prevalence of *Salmonella* spp. and *Camphylobacter* spp. in US production nursery swine. *J Appl Microbiol* 107: 1-9.
- Xie, Q. W. and Nathan, C. 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leuk. Biol.* 56: 576-582.

주 의

1. 이 보고서는 국토해양부에서 시행한 호남 씨그라트 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 국토해양부에서 시행한 호남 씨그라트 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

2. 재료 및 방법

가. 벗꽃은잎 (*Callophyllis japonica*)



본 연구에 사용한 벗꽃은잎은 홍조류로서, 제주도 인근 연안에서 채취된 것을 구입하여 사용하였다.

나. 벗꽃은잎 추출물

이 실험에 사용된 시료는 제주도 성산포 연안에 서식하는 벗꽃은잎을 담수를 이용하여 염분을 제거하였다. 염분을 제거한 시료는 건조과정을 거쳐 분말로 제작 한 후, 80^o 메탄올 (Merck, Darmstadt, Germany) 에 교반, 침출 시켜 추출하였다. 추출물은 여과지를 사용해 침전물을 여과한 후 회전감압농축기 (Rotavapor; Buchi)를 사용하여 농축하였다.

나. 사용균주 및 시약

이 실험에 사용한 시험균주는 Gram 음성균인 *Escherichia (E.) coli* (S175), *Salmonella (S.) Typhimurium* (국립수의과학검역원)과 Gram 양성균인 *Staphylococcus (S.) aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus (E.) faecium* (ATCC 51558)를 사용하였다. 증균을 위한 broth 는 brain heart infusion (BHI) broth (Difco, Livonia, U.S.A.)를 121^oC에서 15분간 멸균한 후, 벗꽃은잎 추출물을 1% (w/v)로 부유시켜 혼합하였다. 이 혼합물을 균질화하기 위해서 얼음 상자에 담아 초음파 파쇄기를 이용하여 15초간 초음파 처리, 15초간 정치하기를 8회 반복하였다. 초음파 처리 후 여과멸균기를 통과시켜 사용하였다. 세균수 측정을 위한 고체배지는 BHI agar 를 121^oC에서 15분간 멸균한 후 사용하였다.

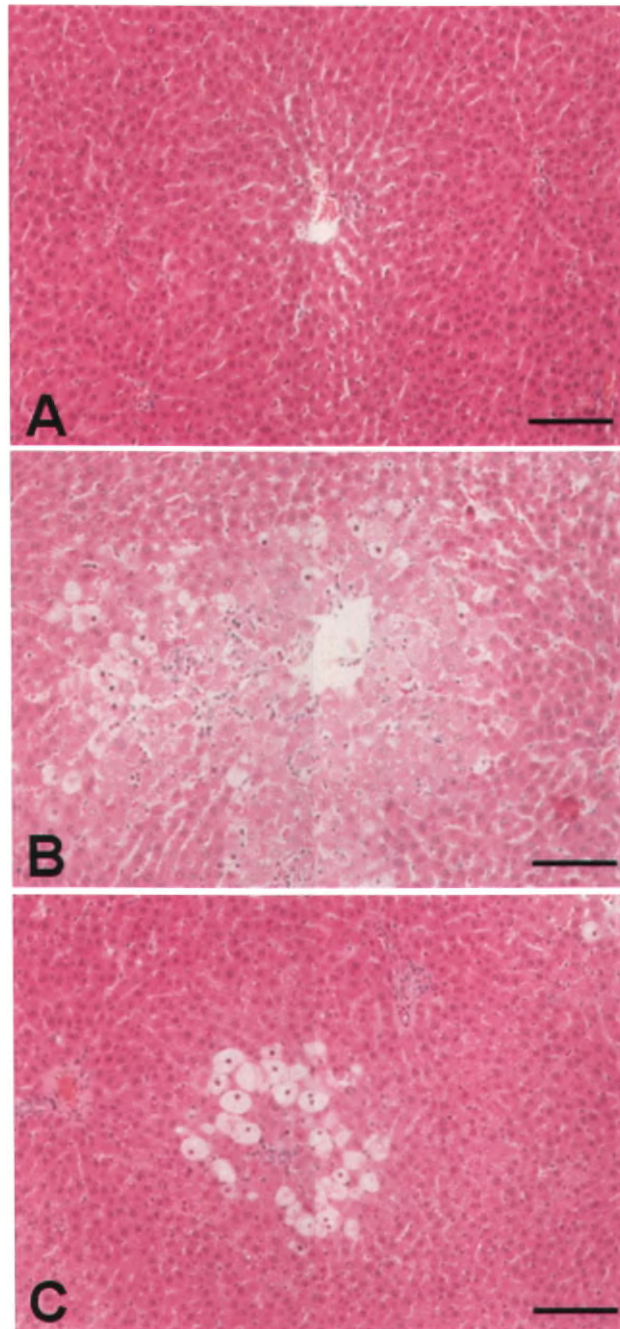


Figure 1. Histological findings of livers with vehicle (olive oil) control rat (A), normal saline control rat (B) and pre-treatment with *C. japonica* (150mg/kg) (C) for 3 days in CCl₄-injected rat. (A) Shows the normal appearance of liver. (B) Shows centrilobular fatty change and necrosis of liver cell in the liver. (C) Shows a decrease in the necrotic and fatty change in liver. Hematoxylin-eosin staining. Scale bar = 100 μ m

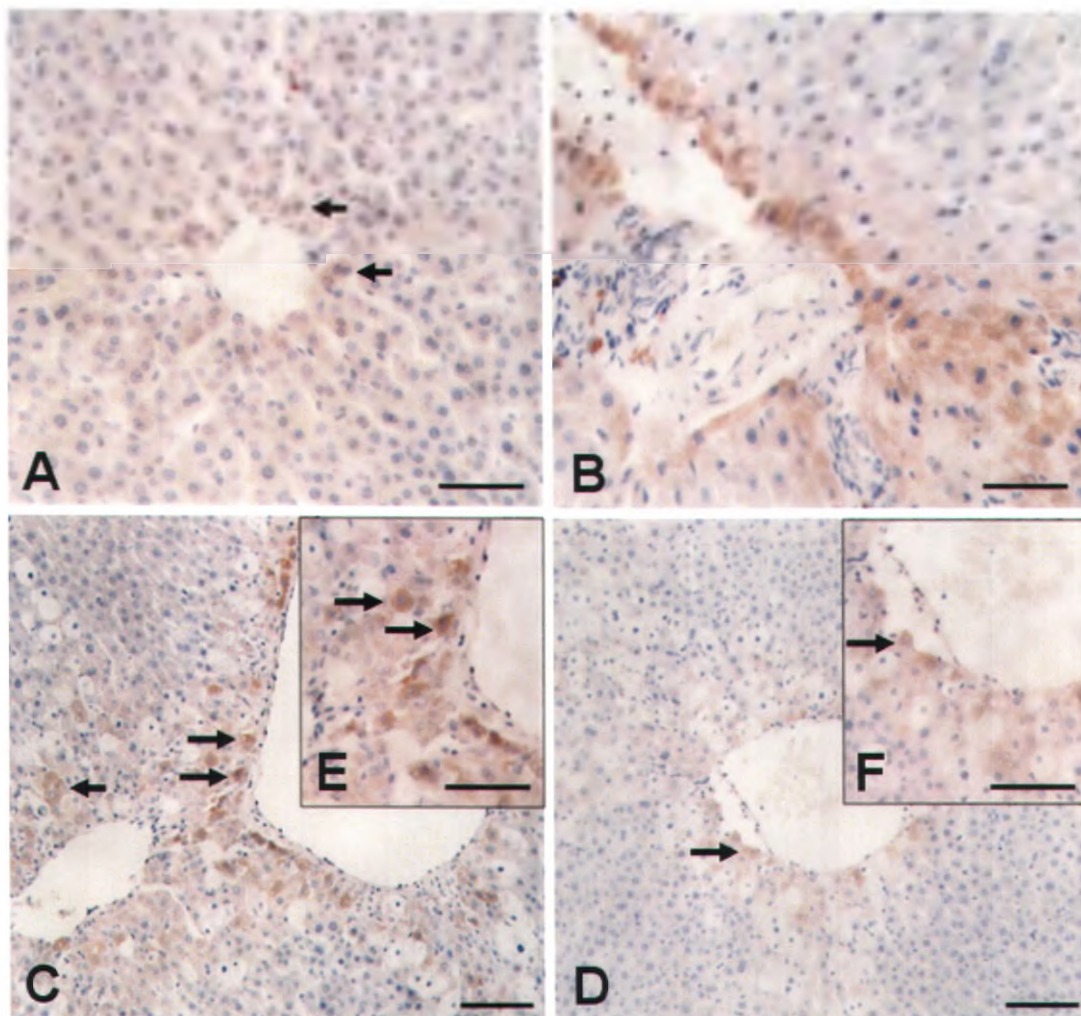


Figure 3. Immunohistochemical staining of iNOS in the liver of vehicle control rats (A) and rats with normal saline (B, C and E) and *C. japonica* (150mg/kg) (D and F) for 3 days before CCl_4 injury. In the liver of the vehicle control rats, iNOS was weakly detected in some of the liver cell around centrilobular lesions (A arrows). At the normal saline treatment of CCl_4 -injury, increased levels of iNOS were strongly detected in the liver cells around portal triad lesions (B) and centrilobular lesions (C and E, arrows). However, In the liver of the pre-treatment with *C. japonica* (150mg/kg), the levels of iNOS immunoreactivity in the liver cells around centrilobular were decreased (D, and F, arrows). E and F were high magnification of C and D, respectively. The specimens were counterstained with hematoxylin. Scale bars: 50 μm .