

생약재 5종 열수추출물의 어류 병원체에 대한 *in-vitro* 약효와 선택된 한 종(황금)의 넙치에서의 항균효능과 독성시험

이남실 · 정승희 · 지보영^{*†}

국립수산과학원 병리연구과, *국립수산과학원 수산생물방역과

Anti-fish pathogenic efficacy of hot water extracts obtained from 5 herbs *in-vitro*, and efficacy and toxicity in flounder of the one selected herb, skullcap

Nam-Sil Lee, Sung Hee Jeong and Bo-Young Jee^{*†}

Division of Pathology, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea
^{*}Aquatic Life Disease Control Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

Hot water extracts of 5 herbs were tested *in-vitro* for anti-bacterial, anti-fungal, anti-parasitidal effects for possible use against fish diseases. Skullcap, *Scutellaria baicalensis*, was the most effective herb in these 5. The effects of skullcap in cultured flounder were examined for various physiological responses and bacterial disease-prevention follow as feeding skullcap absorbed diet for 4, 8, 12 weeks. There were not any significant effects in physiological responses, except beneficial action of growth promotion. No definitive preventive activity was observed with experimental feeding of the extract against infected flounder. As we could not confirm *in-vivo* antibacterial effects of skullcap in flounder despite its *in-vitro* efficacy, further studies are needed to define the *in-vivo* efficacy.

Key words: Herbs, Skullcap, *Scutellaria baicalensis*, Hot water extract, Flounder, Preventive effects

천연 생약재는 이미 오래전부터 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등 아시아에서 질병치료 및 예방을 위해 사용해 왔으며, 과학적으로도 그 효능이 입증되고 있다. 이러한 천연 생약재가 식품의 안전성과 관련하여 수산양식에서의 친환경적인 사료첨가제, 소독제, 치료제로써 활용면에서 그 연구가 활성화 되고 있다. Kim 등(1994)은 천연생약재의 항균활성을 어병세균에 적용시켜 검토하였으며, 이후, Jung 등(2001)은 삼지구엽초, 약쑥, 지유에서 추출한 물질을 대상으로 어병세균에 대한 항균력 및 어체면역에 대한 연구를, 또한 오배자, 칠피, 홍삼 등의 생약재추출물의 항균효능, 어체면역반응에 대한 보고도 이어지

고 있다(Jo *et al.*, 2002; Kang, 2005; Choi *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005a; Choi *et al.*, 2005b). 최근 손바닥선인장줄기 성분도 이러한 배경에서 치료제, 소독제로써의 활용 가능성을 검토하기도 하였다(Jee *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008). 이러한 연구는 천연생약재의 수산양식상에서의 활용, 연구에 더욱 활기를 불어넣고 있다.

본 내용에서는 5종의 천연 생약재(황금;*Scutellaria baicalensis*, 귤피;*Citrus unshin* Markovich, 고삼;*Sophorae flavescens* Radix, 자소엽;*Perilla frutesens*, 금은화;*Lonicera japonica*) 열수추출물에 대하여 *in-vitro*에서 항균, 항기생충, 항곰팡이 효능을 분석하였으며, 그 중 효능이 드러나는

[†]Corresponding Author : Bo-Young Jee, Tel : 051-720-3031
Fax : 051-720-3039, E-mail : protjee@nfrdi.go.kr

1종을 선택하여 시판 EP 사료에 농도별(0.05, 0.1, 0.2%)로 흡습시켜 급여하고 기간별(4, 8, 12주)로 어체의 면역활성변화와 생리활성변화, 그리고 세균성질병(Edwardsiellosis, Streptococosis)에 대한 예방효과를 검토하였다.

재료 및 방법

천연생약재 5종 및 항균, 항기생충, 항곰팡이 효능시험

천연생약재로는 황금;*S. baicalensis*, 굴피;*C. unshin* Markovich, 고삼;*S. flavescens* Radix, 자소엽;*P. frutescens* 그리고 금은화;*L. japonica*를 사용하였으며 이들 각각 100 g을 물 1000 ml에 넣어 3시간 동안 끓인 것을 열수 추출 원액으로 실험에 사용하였다.

항균활성시험에는 국립수산과학원 병리연구과에서 보관 중이던 *Edwardsiella tarda*(G3)와 *Streptococcus iniae*(2-24)의 두 균주를 사용하였으며, Kang(2005)의 방법에 따라 96 well plate에서 최소발육저지농도(MIC)를 측정하였다. 비교항생물질로는 norfloxacin을 사용하였다. 항기생충 활성시험은 같은 시기 자연 감염된 넙치로부터 분리한 scuticocilliatida를 배양하여 사용하였으며, Minimum Essential Medium(MEM)배지(WelGENE Inc.)에서 Epithelial Papilloma of carp(EPC) cell을 공급하고 각 생약재추출물의 함유량을 1.25, 2.5, 5, 10, 20%의 농도로 구분하여 기생충을 배양하면서 10분 간격으로 충의 활성변화 및 변성을 관찰하였다. 항곰팡이활성 시험은 국립수산과학원 병리연구과에서 분리(미동정) 보관 중이던 물곰팡이(*Saprolegnia* sp.)를 사용하였다. 시험방법은 15 ml 용량의 test tube에 GY(glucose yeast) broth에 생약재 함량을 배지의 5%로 하여 각각 동량으로 준비하고 GY agar 평판배지에 미리 배양한 균사를 취하여(지름 8 mm) 각 생약재 별로 동량을 tube 바닥에 심었다. 4일 동안 매일 균사가 위쪽방향으로 자라나온 길이를 자로 재었다.

실험어의 사료투여

경북 사설 양어장에서 구입한 넙치(체중 약 40 g)를 국립수산과학원에 순치하였다가 질병이 없고 외관상 깨끗한 어체를 선별하여 실험구와 대조구로 분리하여 수용하였다가, 실험구당 100마리, 대조구 100마리로 준비하였다. 실험구에는 상기추출액 중 황금의 원액을 사용하여 일반 EP 사료(수협사료)에 사료무게의 0.05, 0.1, 0.2%로 흡습시켜 건조한 실험용 사료를, 대조구는 일반 EP 사료를 냉장보관하면서 매일 1회 일정한 시간에 반복 급여하였다.

실험어의 생체, 생리변화측정

사료 급여후 4, 8, 12주째 실험구와 대조구에서 각 10마리씩 무작위로 선택하여 어체중 및 간중지수(Hepatosomatic index; HSI; 간중량/체중×100)를 측정하여 10마리의 평균값을 구하였다. 실험구별 어체의 생체, 생리활성을 조사하기 위하여 부검 시 개체마다 미부정맥에서 채혈하여 microhematocrit법으로 Hematocrit(Ht)치를 측정하였고, 혈액을 원심(3000rpm, 15분)하여 얻어낸 혈장을 냉동보관(-80°C)하였다가 3일 이내에 혈액화학분석기(FUJI DRY CHEM3500i)를 사용하여 혈액생화학적변화를 측정하였다. 측정항목은 GOT (AST-PⅢ), GPT(ALT-PⅢ), 포도당(Glucose: GLU), 총단백질(Total protein: TP), 총콜레스테롤(Total cholesterol: Tchol), NH₃(Ammonia), Ca(Calcium) 총 7항목으로 하였다.

Lysozyme 활성 측정 및 조직학적 검사

어체의 비특이적 면역활성변화를 조사하기 위하여 미리 분리해둔 혈장으로 Lang *et al.*(2001)의 방법에 따라 lysozyme 활성변화를 측정하였다. 황금의 독성효과 여부를 확인하기 위하여 각 기간별로 간 조직을 채취하여 10%중성완충 포르말린에 고정하고 상법에 따라 조직절편을 만들고 Hematoxyline and Eosin(H&E) 염색하여 조직학적 관찰을 실시하였다.

단, 0.05% 실험구의 경우 최종 실험어의 잔존량이 부족하여 12주째 생리, 생체변화 분석은 실시하지 못하였으며, 공격실험만 수행하였다.

항병력조사

세균성 질병 예방효과 조사를 위해서는 각 실험구에 대하여 매 기간별(4, 8, 12주)로 어병세균 2종 *E. tarda*(6-24)와 *S. iniae*(2-24)를 각각 어체당 $0.99\sim 2.8 \times 10^6$ CFU와 $1.15\sim 12.7 \times 10^6$ CFU 주사하여 2주 후의 생존율을 조사하여 대조구에 대한 상대생존율로 평가하였다.

결과 및 고찰

항균효과가 있는 것으로 알려진 황금, 굴피, 고삼, 자소엽, 그리고 금은화의 5종의 생약재를 대상으로 어류질병과 관련하여 항균, 항기생충, 항

곰팡이 효능에 관한 실험을 실시한 결과, 항균활성의 경우 황금이 10%에서 Minimum inhibitory concentration(MIC)를 나타내어 나머지 4종이 30~40%인데 비하여 좋은 항균활성을 나타내었다(Table 1). 항기생충활성을 관찰하기 위한 스쿠티카충에 대한 생약재의 효능은 고삼 40%, 자소엽 50%, 굴피 25%의 고농도에서 한 시간 동안 80%이상의 충체 폐사를 나타내었으며, 황금은 5%에서 한 시간 동안 반수이상의 충체가 사멸하였으며, 10%와 20%에서 폐사율 90%이상의 상등한 효능을 나타낸 것으로 나타났다(Fig. 1). 항곰팡이 활성의 경우도 배양 4일째 결과를 분석한 결과, 나머지 4종에 비하여 황금이 가장 뚜렷한 항곰팡이 활성을 나타내었다(Fig. 2).

5종의 생약재 가운데 가장 효능이 좋은 것으로 나타난 황금을 흡습시킨 사료를 넙치에 먹이고, 4주, 8주 12주 후에 어체 내 효능을 조사한

Table 1. Minimum inhibitory concentration(MIC) assay aginst *E.tarda* and *S.iniae* using of 5 herbs and a comparative antibiotic(norfloxacin)

Strain	Minimum inhibitory concentration(MIC)					
	Norfloxacin (mg/ml)	<i>L. japonica</i> (%)	<i>S. flavescens</i> (%)	<i>P. frutescens</i> (%)	<i>S. baicalensis</i> (%)	<i>C. unshin</i> (%)
<i>E. tarda</i> (G3)	0.125	40	30	30	10	30
<i>S. iniae</i> (2-24)	0.125	40	30	30	10	30

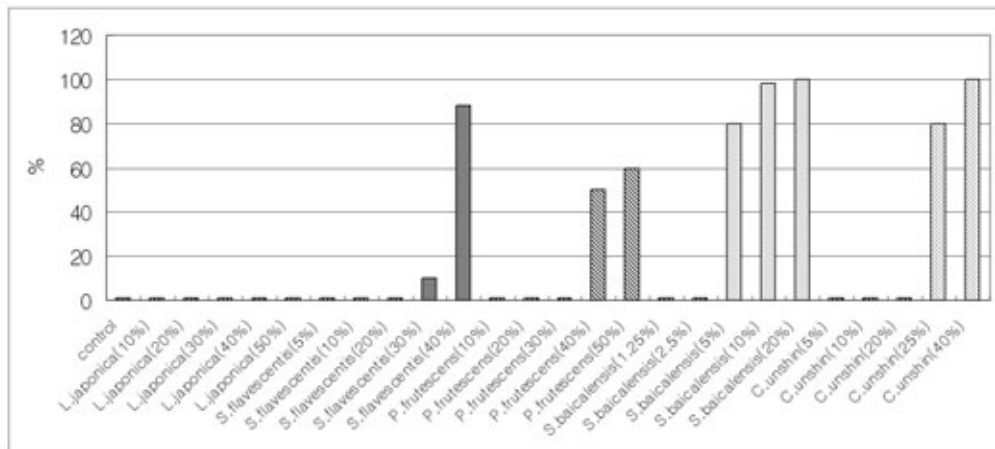


Fig. 1. Mortality assay of *Scuticocillia* sp. in cell culture flask containing 5 different concentrations of 5 herbs

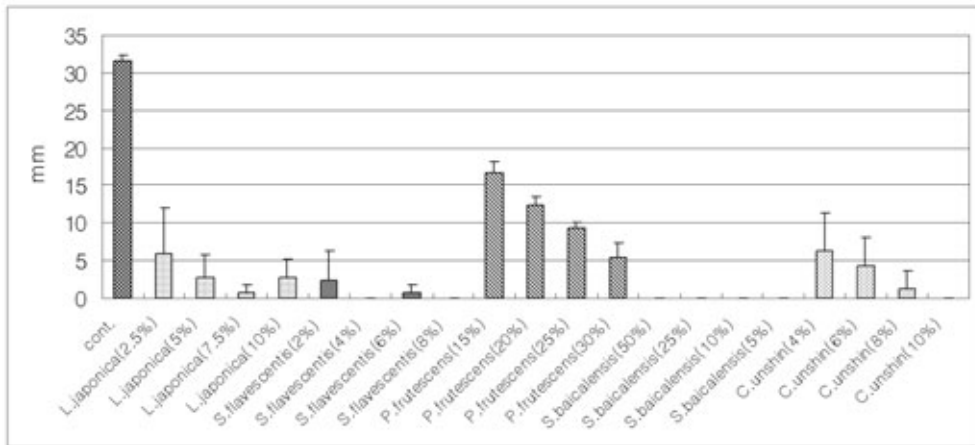


Fig. 2. Growth of *Saprolegnia* sp. for 4 days in test tubes containing 4 different concentrations of 5 herbs

결과, 실험어의 라이소자임활성(Table 3)과 혈액 생화학적성상에 뚜렷한 변화는 없었으며(Table 2), 간의 조직학적 변화에도 영향이 없는 것으로 나타났다(결과생략). 상기의 결과는 황금흡습사료를 먹임으로써 어체의 생리활성에는 큰 영향을 나타내지 않으며, 간세포에 대한 독성작용도 없는 것으로 해석할 수 있다(단, 12주째 0.05% 투여구의 경우 실험어의 부족으로 시료채취를 하지 못하였음). 체중의 경우 대조구보다 투여구에서 증가비율이 크게 나타나 성장에는 영향을 준 것으로 생각된다(Table 2). 세균성질병에 대한 예방효과에 대해서는 12주째 0.05%와 0.1% 첨가구의 *E. tarda* 주사구와 *S. iniae* 주사구에서 상대 생존율이 각각 43%와 40%로 다른 구에 비하여 높게 나타났으나(Table 4), 다른 4주, 8주에서의 결과가 좋지 않아 세균성질병에 대한 예방효과를 증명하지는 못했다.

본 연구에 선택 사용된 황금은 속썩은 풀(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 벗긴 뿌리를 말린 것으로서, 한국, 중국, 일본 등지에서 주로 사용하는 생약재로 그 주성분은 baicalin, wogonin, baicalin 등으로 알려져 있으며, 소염, 진통, 항알러지, 항균 그리고 항암작용 등의 효능을 가지고 있어 이들 물질의 다양한 효능에 대한 연구가 이루어지고 있다(Chou *et al.*, 2003; Taira *et*

al., 2004). 그러나 모든 생약재에서 그렇듯이 일부 간독성에 대한 영향이 제기되기도 하였으나 우리나라에서 사용하는 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 뿌리와는 상관이 없으며 오히려 황금과 관련하여 간에 대한 이로운 평가들을 국내의 논문에서 찾아볼 수 있는데, Jang *et al.*(2003)은 황금에서 추출된 baicalin이란 주성분이 acetaminophen(AP)-induced hepatotoxicity로부터 보호한다고 보고하였으며, 황금이 흰쥐에서 간섬유화(liver fibrosis)를 억제한다는 발표도 있다(Shimizu *et al.*, 1999). 이러한 내용은 간활성에 악영향을 미치지 않고 성장에만 영향을 나타낸 본 연구의 결과와도 관련이 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 *in-vitro*에서는 다른 생약재에 비해 탁월한 항균, 항기생충, 항곰팡이의 효능을 나타내었으나, 생약재 흡습사료를 통한 *in-vivo* 실험(세균성질병에 대한 항병성)에서는 명확한 효능을 확인하지는 못하였다. 이 후, 황금을 좀 더 어체에 효과적으로 흡수시키는 방법을 고안하고, 농도별, 기간별 효능을 재검토해야 할 것으로 보이며 어류질병의 다양한 원인체를 대상으로 시험, 조사해야 할 것이다. 본 연구를 통하여 황금의 어류질병치료제 또는 사료첨가제로써의 개발 가능성을 시사하였으며, 이 후 추가적인 조사가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Table 2. Physiological and Hematological changes in flounders fed commercial EP(Control) and skullcap absorbed EP(0.05%, 0.1%, 0.2%) for 12 weeks

	Body weight (g)	HSI*	Ht (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)	GLU (mg/dl)	TP (g/dl)	Tchol (mg/dl)	NH ₃ (μ g/dl)	Ca (mg/dl)
4wks	Cont.	0.83±0.15	48.19±4.46	12.75±2.22	67.20±21.09	92.80±26.72	4.06±0.26	255.40±79.97	107000±359.44	21.50±1.90
	0.05%	0.98±0.13	40.25±3.43	12.00±1.00	40.00±13.29	46.60±31.85	4.34±0.17	302.60±20.82	752.00±167.84	18.38±1.55
	0.10%	1.11±0.12	41.50±3.70	21.50±2.12	57.00±17.00	58.40±29.19	4.28±0.30	273.00±78.89	886.00±141.70	18.18±2.03
	0.20%	1.11±0.14	45.72±3.28	18.40±5.98	81.20±32.80	64.20±24.81	4.68±0.24	296.40±60.76	956.00±142.76	17.80±1.54
8wks	Cont.	1.04±0.34	31.20±4.97	16.80±8.61	85.40±73.02	38.60±18.82	4.22±0.51	273.80±54.65	572.00±85.85	16.62±1.49
	0.05%	1.25±0.23	28.00±7.32	17.60±5.03	80.40±26.20	48.00±12.75	4.14±0.43	282.80±54.98	664.00±197.81	17.28±0.72
	0.10%	1.05±0.09	29.20±8.38	27.40±7.99	124.00±84.58	81.20±17.71	4.82±0.41	279.33±118.68	1202.50±305.44	17.33±1.16
	0.20%	1.12±0.27	31.00±6.82	17.20±5.89	62.60±21.22	66.60±38.58	4.04±0.40	353.00±63.82	544.00±90.17	16.56±1.00
12wks	Cont.	0.94±0.54	34.25±3.5	24.20±16.27	108.25±57.08	53.40±22.81	3.20±0.41	277.80±50.48	358.00±56.30	16.56±1.03
	0.05%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.10%	1.21±0.29	44.00±4.06	26.60±6.84	70.80±32.87	51.40±11.08	4.10±0.31	355.50±46.95	692.00±179.36	18.30±0.76
	0.20%	1.01±0.14	40.60±3.50	23.60±20.62	193.60±115.65	79.80±20.07	3.52±0.16	293.80±80.47	628.00±178.52	17.64±1.17

*HSI(Hepatosomatic Index) = (whole liver wight/whole body weight) × 100

Table 3. Lysozyme activity(mean \pm SD unit/ml) in olive flounder fed commercial EP and skullcap adsorbed EP for 12weeks

	Control	0.05%	0.1%	0.2%
4 wks	15 \pm 5	18.1 \pm 4.95	20.8 \pm 1.98	16.1 \pm 2.12
8 wks	13.6 \pm 7.26	12.6 \pm 2.36	13.92 \pm 4.73	13.33 \pm 4.78
12 wks	8.6 \pm 5.84	-	7.07 \pm 2.08	10.1 \pm 3.89

Table 4. Relative percent survival(RPS)¹ of experimentally infected flounders with *E. tarda*² and *S. iniae*³, that fed skullcap adsorbed EP for 12 weeks

RPS		4weeks			8weeks			12weeks		
		0.05 %	0.10 %	0.20 %	0.05 %	0.10 %	0.20 %	0.05 %	0.10 %	0.20 %
	<i>E.tarda</i>	25	25	0	<0	0	<0	43	43	29
	<i>S.iniae</i>	0	30	40	0	<0	<0	40	40	10

¹ 1-(mortality of test group(%)/mortality of control group(%)) \times 100

² *E. tarda* ($0.99 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^6$ CFU/fish, 0.1ml/fish)

³ *S. iniae* ($1.15 \times 10^6 \sim 12.7 \times 10^6$ CFU/fish, 0.1ml/fish)

요 약

5가지 생약재로부터 얻어낸 열수추출물을 대상으로 시험관(*in-vitro*) 실험을 통하여 어류병원체에 대한 항세균, 항곰팡이, 항기생충 효과를 검토하였다. 황금의 효과가 가장 두드러졌으며, 황금의 열수추출물을 사료에 흡수시켜 넙치에 급여하고 4, 8, 12주 후에 다양한 생리학적 반응과 세균성질병(Edwardsiellosis, Streptococosis)에 대한 예방효과를 조사한 결과, 성장효과에 대한 변화 이외의 뚜렷한 생리학적변화는 나타나지 않았으며, 두 가지 세균성 질병에 대한 예방효과도 확인되지 않았다. 따라서 이 후 추가적인 조사·연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

감사의글

이 연구는 국립수산물과학원(양식생물질병 방제 연구, RP-2010-AQ-006)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참 고 문 헌

- Choi H.S., Kim J.W., Jang D.S., Yu Y.B., Kim Y.C. and Lee J.S.: Antibacterial activities of Gallarhois extracts against fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.*, 18:239-246, 2005a.
- Choi H.S., Kim Y.C., Lee J.S., Jo M.R., Seo C.H. and Park S.L.: Antibacterial activities of hot-water and ethyl alcohol extracts of medicinal herbs on fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.*, 17:39-55, 2004.
- Choi M.S., Park S.W. and Park K.H.: Effect of Red ginseng extract on immune function of Israeli carp. *Cyprinus carpio*. *J. Fish Pathol.*, 18:277-286, 2005b.
- Chou T.C., Chang L.P. Li C.Y., Wong C.S. and Yang S.P.: The antiinflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Anesthesia and Analgesia*, 97:1724-1729, 2003.

- Jang S.I., Kim H.J., Hwang K.M., Jekal S.J., Pae H.O., Choi B.M., Yun Y.G., Kwon T.O., Chung H.T. and Kim Y.C.: Hepatoprotective effect of baicalin, a major flavone from *Scutellaria radix*, on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 25:585-594, 2003.
- Jee B.Y., Lee N.-S., Kim J.W. Park M.S. and Jeong S.H.: The preventive effects of hydrolysis compound of cactus opuntia genus, *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino against bacterial disease on cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 20:179-187, 2007.
- Jo, M.R., Kim J.W. and Kim D.S.: Antimicrobial effects of natural plant and mushroom, *Dicyphora indusiata* extracts on fish pathogenic bacteria. *J. Kor. Fish Soc.*, 35:578-582, 2002.
- Jung S.H., Lee N.-S., Jee B.Y. and Park M.S.: Antimicrobial activity of hydrolysis compound of cactus stem(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino) against fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.*, 21:29-34, 2008.
- Jung, S.H., Shon Y.C. and Kim Y.C.: In vitro effect of water extract of medicinal herbs on antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and superoxide production of kidney phagocytes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 14:3-10, 2001.
- Kang S.Y.: The antimicrobial compound of *Thus verniciflua* barks against fish pathogenic gram-negative bacteria *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *J. Fish Pathol.*, 18:227-238, 2005.
- Kim Y.G., Rho B.J. and Lee K.K.: Antimicrobial activity of *Artemisia princeps* var. *orientalis* essential oil against fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.*, 7:105-112, 1994.
- Lang S., Gudmundsdottir B.K. and Magnadottir, B.: Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 11:523-535, 2001.
- Shimizu L, Ma Y.R., Mizobchi Y., Liu F, Miura T., Makai Y., Yasuda M., Shiba M., Horie T., Amagaya S., Kawada N., Hori H. and Ito S.: Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology*, 29:149-160, 1999.
- Taira Z., Yabe K., Hamaguchi Y., Hirayama K., Kishimoto M., Ishida S. and Ueda Y.: Effects of Sho-saiko-to extract and its components, Baicalin, baicalein, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, on pharmacokinetic behavior of salicylamide in carbon tetrachloride intoxicated rats. *Food Chem. Toxicol.*, 42:803-807, 2004.

Manuscript Received : February 28, 2010

Revised : March 31, 2010

Accepted : April 7, 2010