

Antibacterial Activity of Herbal Medicine Extracts against *Edwardsiella tarda*

Ah Ra Kim^{1,2}, Do Kyun Kim^{1,2}, Tea Hwan Byun¹, Eun Jee Jo¹, Eun-woo Lee^{1,2}, Hyun-Ju Kwon^{1,2}, Byung-Woo Kim^{1,2}, Tae Hoon Kim³, Kyung-Bon Lee⁴ and Young-Man Kim^{5*}

¹Department of Life Science and Biotechnology, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

²Blue-Bio Industry RIC, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

³Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

⁴Departments of Animal Science and Physiology, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824, USA

⁵Department of Food Science and Nutrition, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

어병세균 *Edwardsiella tarda*에 대한 한약재 추출물의 항균활성

김아라^{1,2} · 김도균^{1,2} · 변태환¹ · 조은지¹ · 이은우^{1,2} · 권현주^{1,2} · 김병우^{1,2} · 김태훈³ · 이경본⁴ · 김영민^{5*}

¹동의대학교 생명응용학과, ²동의대학교 블루바이오소재개발센터, ³대구한의대학교 한약재약리학과,

⁴미시간주립대학교 동물과학 · 생리학, ⁵동의대학교 식품영양학과

Abstract

The methanol extracts of 19 commercial herb medicines was analyzed to antibacterial activities against *Edwardsiella tarda*, causing several fish diseases. *Rhus javanica* showed most strong antibacterial activity against *E. tarda* and *Escherichia coli*. Methanol extract of *R. javanica* was further extracted using several organic solvents having different polarity. Extract from ethyl acetate fraction showed strong activity against *E. tarda* as well as *E. coli*. Minimal inhibitory concentration, MIC of *R. javanica* extract was measured and resulted showing 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *E. tarda* and 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *E. coli*. It is needed that, from these results, further purification and isolation of reposable compound of these activities and further study on the synergy effect using combination with antibiotics against pathogenic bacteria.

Key words : antibacterial activity, herb medicines, *Edwardsiella tarda*, *Rhus javanica*

서 론

천연물 특히 오랜 기간 널리 사용되어 온 한약재에 존재하는 항균활성 물질에 대한 연구는 오래 전부터 수행되어 왔으며, 현재도 활발히 진행되고 있다. 식물에 존재하는 항균물질은 그 대부분이 alkaloid류, flavonoid류, terpenoid류, phenolic compound류, quinone류 및 volatile oil 등의 이차 대사산물이거나 그 유도체들로 알려져 있다(1,2). 이러한 천연물 유래 항균물질은 항생제와 합성 화학요법에 비해 안전성이 높고 내성세균의 출현에 대한 우려가 적다는 장점이 있다(3). 그러나 이러한 천연항균 물질의 항균효과

가 합성된 항생제에 비해 효과가 뛰어나지 않기 때문에 아직까지 실용화되는 경우는 많지 않은 실정이다. 국내에서 천연물로부터 항균성물질의 개발에 관한 연구는 주로 의약품과 천연보존제의 용도로서 단백질, 유기산, 지방산, 향신료, 생약추출성분 등을 대상으로 주로 이루어져 왔다. 우리나라 뿐 아니라 동양의 여러 나라에서 이용되는 여러 한약재의 약리작용, 특히 항균효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(4-6). 이러한 한약재 중 오배자(*Galla Rhois*)는 붉나무(*Rhus javanica*)의 잎에 오배자 진딧물(*Melaphis chinensis*)이 산란함으로써 인해 생긴 벌레집이다. 한방에서는 오배자의 수렴, 지혈, 해독, 항균, 항바이러스 및 항진균 등의 효력이 알려져 있으며 예로부터 설사, 탈항, 위궤양, 십이지장궤양, 도한, 유정, 혈변, 혈뇨, 구내염 등의

*Corresponding author. E-mail : ymkim@deu.ac.kr,
Phone : 82-51-890-1591, Fax : 82-51-890-1588

치료제로 사용되어 오고 있다(7).

양식 어류에 발생하는 주요 세균성 질병은 에드워드병, 비브리오증, 연쇄구균증 등이 있으며 (8), 이 중 에드워드병은 초여름부터 늦가을까지 주로 고수온기에 다발하지만 최근에는 년중 발생하는 경향을 보이고 있다. 양식넙치의 경우 이 질병에 특히 민감한 것으로 알려져 있으며, 장기간에 걸쳐 폐사되어 누적폐사율이 증가하는 것으로 알려져 있다(9). 이러한 세균성 질병의 치료를 위해서 항생제가 사용되고 있다(10). 매년 평균 220톤 이상의 수산용 항생제가 사용되고 있으며 이 중 옥시테트라사이클린, 옥소린산, 에리스로마이신 등이 많이 사용되고 있다(11). 이에 따라 항생제 내성 어병세균이 빈번히 출현하고 있으며 그 내성 경향은 증가되고 있다(12).

따라서 본 연구에서는 주요 어병세균으로 알려진 *Edwardsiella tarda*에 대한 시판 한약재 추출물 19종의 *in vitro* 항균활성을 검색하고, 이 중에서 활성이 높은 한약재로부터 활성물질을 분리 및 병용함으로써 항생제를 대체하거나 그 사용을 감소할 수 있는 어류 질병 치료 약제로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

한약재는 시중에서 유통되고 있는 것으로 대한생약제품(주)로부터 구입하여 사용하였다. 사용 한약재의 일반명과 학명 등은 Table 1과 같다. 그 밖의 시약은 분석용 grade 및 Sigma Co (USA)에서 구입하여 사용하였다.

사용균주

항균활성 대상균주는 어병세균인 *Edwardsiella tarda* KCTC 12267와 활성검정 대상균주로 표준균주인 *Escherichia coli* KCTC 1682를 각각 Korean Collection For Type Cultures (KCTC, Korea)에서 구입하여 nutrient broth (Difco Co)에서 배양하며 실험에 사용하였다.

한약재 추출물 조제

시료추출액의 조제는 각 한약재별로 약재를 세절하거나 잘게 부수어 3배(v/v)의 methanol을 첨가하여 혼합하여 24시간 실온에서 침지한 후, Whatman No.2 여과지로 2회 여과하였다. 추출액은 rotary vacuum evaporator로 40°C에서 감압 농축하여 용매를 완전제거하였으며, 각각의 농축물을 다시 ethanol에 20 mg/mL의 농도로 용해시켜 각 세균별 항균활성 측정을 위한 stock solution으로 사용하였다.

활성물질의 분획

한약재 80% methanol 추출물의 추가적인 유기용매를 사

용한 극성에 따른 분획은, 물에 현탁된 추출시료를 저극성 용매인 n-hexane으로 먼저 추출한 후 물층을 다시 ethyl acetate (EtOAc), n-butyl alcohol (n-BuOH)을 이용하여 각각 순차적으로 3회 분획 추출한 후 분획물을 40°C 수조의 rotary vacuum evaporator로 농축하여 용매를 완전히 제거하였다. 각 용매추출 분획을 감압 농축하여 건조 시킨 후 n-Hexane 가용분획(2.6 g), EtOAc 가용분획(63.5 g), n-BuOH 가용분획(6.7 g), H₂O 가용분획(4.1 g)을 각각 얻었다. 각 용매별 농축물은 농도를 일정하게 조절하여 대상균주에 대한 항균활성을 측정하였다(Fig. 1).

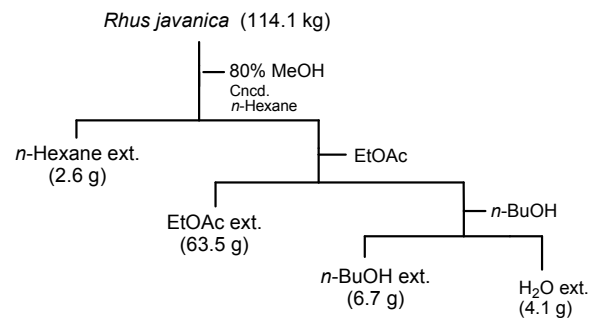


Fig. 1. Isolation scheme for antibacterial substances from *Rhus javanica*.

항균활성 측정

각 시료 추출물의 항균활성은 disc diffusion method로 측정하였다. 액체배지에서 18시간 배양하여 활성화시킨 대상 세균 배양액 200 μ L를 멸균 면봉으로 nutrient agar 평판 배지에 3회에 걸쳐 골고루 도말한 후, 직경 8 mm의 멸균 paper disc (Whatman No.2)를 올려놓은 다음 각 추출물을 30 μ L (고형물 600 μ g)씩 흡수시켜 37°C의 incubator에서 18시간 배양 후 paper disc 주위의 생육 저해환의 크기를 측정하였다. 대조균으로 추출물 시료의 용매로 사용된 ethanol을 동량 사용하였으며, 모든 실험은 최소 3회 반복 실시하였다.

최소생육저해농도 측정

추출물의 최소생육저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)는 96-well plate와 Muller-Hinton 배지를 이용한 표준 2배 희석 방법으로 측정하였다(12). 37°C에서 24시간 배양한 후 대상 세균의 생육이 저해된 최저 농도를 MIC로 결정하였다. 모든 실험은 최소 3회 반복 실시하였다.

결과 및 고찰

어병세균 *Edwardsiella tarda*에 대한 19종의 한약재 methanol 추출물의 항균활성을 disc diffusion method로 측정한 한약재 추출물의 결과 중 일부를 Fig. 2에 나타내었다.

몰약, 부지깽이, 쑥부쟁이, 오배자, 장뇌삼, 쫄레에서 *E. tarda*에 대한 항균활성이 나타났으며, 붉은대동여뀌, 원화, 포도나무, 현삼은 *E. coli*에도 항균활성을 나타내었다. 이들 중 오배자 추출물에서 *E. tarda*와 *E. coli* 모두에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다(Table 1). 이는 오배자 추출물이 *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus iniae*에 대해 항균활성을 나타내었다는 보고와 유사하다(7,14).

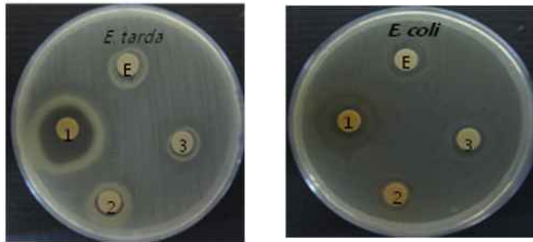


Fig. 2. Antibacterial activity of 80% methanol extracts of several medicinal herbs against *E. tarda* and *E. coli*.

1. *Rhus javanica*, 2. *Daphne genkwa*, 3. *Zea mays*, E, 30 μ L of ethanol as positive control.

Table 1. Growth inhibiting activities of medicinal herb extracts against *Edwardsiella tarda* and *Escherichia coli*¹⁾

Common name	Scientific name	used part	<i>E. tarda</i>	<i>E. coli</i>
개여뀌	<i>Persicaria blumei</i>	whole plant	- ²⁾	-
니기다 소나무	<i>Pinus densiflora</i>	inner bark	-	-
마늘	<i>Allium sativum</i>	stem	-	-
몰약	<i>Commiphora myrrha</i>	-	+	+
부지깽이	<i>Erysimum aurantiacum</i>	leaves	+	+
비파	<i>Eriobotrya japonica</i>	seeds	-	-
붉은대동여뀌	<i>Persicaria trigonocarpa</i>	whole plant	-	+
속단	<i>Phlomis umbrosa</i>	roots	-	-
쑥부쟁이	<i>Aster yomena</i>	leaves	+	+
야관문	<i>Lespedeza cuneata</i>	whole plant	-	-
오배자	<i>Rhus javanica</i>	-	+++	++
원화	<i>Daphne genkwa</i>	flower bud	-	±
옥미수	<i>Zea mays</i>	style	-	-
장뇌삼	<i>Panax ginseng</i>	leaves	+	+
쫄레	<i>Rosa multiflora</i>	leaves	+	+
차조기	<i>Perilla frutescens var. acuta</i>	roots	-	-
침향	<i>Aquilaria agallocha</i>	-	-	-
포도나무	<i>Vitis vinifera</i>	outer bark	-	+
현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>	leaves	-	+

¹⁾Data represent the mean from the results of three experiments.

²⁾Diameter of inhibition zone (-:8-10 mm, +:10-14 mm, ++:14-18 mm, +++:>18 mm)

탐색한 한약재들 중 항균력이 가장 뛰어난 오배자의 methanol 추출물의 *E. tarda*와 *E. coli*에 대한 최소생육저해

농도(MIC)를 측정된 결과, *E. tarda*에 대해서는 64 μ g/mL, *E. coli*에 대해서는 256 μ g/mL로 나타났다(Table 2). 이 결과는 오배자 추출물이 *E. coli*보다는 *E. tarda*에 대해 4배 낮은 농도로 생육을 저해할 수 있음을 나타낸다. 이는 또한 오배자 methanol 추출물이 *S. aureus*에 대해 60 μ g/mL, *Salmonella gallinarum*에 대해 120 μ g/mL, 대장균에 대해 80 μ g/mL이라는 여러 보고들의 농도들(3,15)과 유사하거나 강한 활성을 나타내었다. 사용한 시료가 정제도가 낮은 조 추출물임을 감안할 때, 보다 정제되어 단일 물질 또는 2-3가지 기능성 물질의 복합물질화 하였을 경우에는 상당히 낮은 농도에서도 *E. tarda*에 대한 저해능을 기대할 수 있을 것이다.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of 80% methanol extract from *Rhus Javanica*

Bacteria	MIC (μ g/mL) ¹⁾
<i>E. tarda</i>	64
<i>E. coli</i>	256

¹⁾Data represent the mean from the results of three experiments.

오배자의 methanol 추출물을 분획여두에서 n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, 그리고 물로 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 각각의 유기용매 가용 분획을 얻었다. 각 분획물의 항균활성을 disk diffusion method에 따라 항균활성을 측정된 결과 *E. tarda*에 대해서는 각 분획물 모두에서 *E. coli*보다 높은 활성을 나타내었다. 그 중 ethyl acetate 분획 층에서 두 균주 모두에 대해 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 3). 최일 등(16)의 결과에서는 hexane과 물 층에서는 *S. aureus*에 대해 활성이 나타나지 않았으며, chloroform과 ethyl acetate, 그리고 butanol층에서 골고루 활성이 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서 몰약, 부지깽이, 쑥부쟁이, 장뇌삼, 쫄레, 포도나무, 현삼 등 항균활성을 나타낸 다른 한약재들은 현재 분리정제 단계에 있으며, *E. tarda*와 *E. coli* 이외에 *S. aureus*, *Vibrios*, *Salmonella* sp. 등 다른 병원성 및 식품 미생물에 대해 활성을 검증하고 있다. 아직 오배자로부터 *E. tarda*에 대한 항균활성을 나타내는 물질에 대한 구체적인 동정이나 구조결정 등의 보고는 없다. 본 실험 결과에서 나타난 *E. coli*와 *E. tarda*에 대한 강한 항균활성물질을 분리 동정하고, 상용되고 있는 항생제와의 병용투여 효과 및 조건 등에 대한 지속적인 연구가 필요하다.

Table 3. Antibacterial activities of extract from *Rhus Javanica*

Bacteria	Clear zone diameter (mm) ¹⁾				
	80% MeOH	n-Hexane	EtOAc	n-BuOH	H2O
<i>E. tarda</i>	18	16	19	16	12
<i>E. coli</i>	16	13	16	12	12

¹⁾Data represent the mean from the results of three experiments.

요 약

시판 19종 한약재 methanol 추출물의 어병세균 *Edwardsiella tarda*에 대한 항균활성을 측정된 결과, 오배자 추출물에서 가장 강한 활성이 나타났다. 오배자 methanol 추출물은 용매 극성에 따라 분획하였으며, 각 분획물의 항균활성 측정 결과 ethyl acetate 층에서 가장 강한 항균 활성이 나타났다. 이는 *E. coli*와 *E. tarda* 모두에 대해 유사한 결과를 보였다. 오배자 추출물의 최소생육저해농도(MIC)를 측정된 결과 64 µg/mL에서 *E. tarda*의 생육을, 256 µg/mL에서 *E. coli*의 생육을 저해할 수 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 활성물질이 정제되어 단일 물질화 하였을 경우에는 상당히 낮은 농도에서도 *E. tarda*에 대한 저해능을 기대할 수 있을 것이다. 본 실험 결과에서 나타난 *E. coli*와 *E. tarda*에 대해 강한 효능을 나타내는 항균활성물질을 분리 동정 중에 있으며, 상용되고 있는 항생제와의 병용투여 효과 및 조건 등에 대한 연구가 지속적으로 진행되어야 한다.

감사의 글

이 논문은 2008학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(과제번호 2008AA133).

참고문헌

1. Mitscher LA, Park Y H, Clark D (1980) Antimicrobial agents from higher plants, antimicrobial isoflavonoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var *Typica*. J Nat Prod, 43, 259-269
2. Lee BW, Shin DH (1991) Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganism. Kor J Food Sci Technol, 23, 200-204
3. Cho JY, Choi I, Hwang EK (2003) Antimicrobial activity of extracts from medicinal herbs against *Escherichia coli*. Kor J Vet Res, 43, 625-631
4. Beuchat IR, Galden DA (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol, 43, 134-139
5. Han JS, Lee JY, Baek NI, Shin DH (2001) Isolation and antimicrobial action of growth inhibitory substance

- on food-borne microorganisms from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai. Kor J Food Sci Technol, 33, 611-618
6. Lee SK (2003) Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* against animal husbandry disease. Kor J Microbiol Biotechnol, 31, 242-249
 7. Choi HS, Kim JS, Jang DS, Yu YB, Kim YC, Lee JS (2005) Antibacterial activities of *Galla rhois* extracts against fish pathogenic bacteria. J Fish Pathol, 18, 239-245
 8. Edward JN (2000) Fish disease Diagnosis and treatment. Iowa state university press, p 367
 9. Kim JS, Rho S, Heo MS (2001) Spatial and temporal occurrence of *Edwardsiella tarda* at flounder farms in Jeju. Kor J Environ Biol, 19, 173-181
 10. Treves-Brown KM (2000) Applied fish pharmacology. Kluwer Academic publishers, p 309
 11. Jung SC, Lim SK, Lee HS, Jung BR, Lee JY, Yang CB, Shin HC (2008) Current report on the antibiotic using in animals and the antibiotic resistant bacteria. Infection and Chemotherapy, 40, 144-149
 12. Heo JH, Jung MH, Cho MH, Kim GH, Lee KC, Kim JH, Jung TS (2002) The study on fish diseases with reference to bacterial susceptibility to antibiotics in the southern area of Kyeognam. J Vet Clin, 19, 19-22
 13. Lee EW, Chen JC, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T (2003) Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of *EmeA*, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. Biol Pharm Bull, 26, 266-270
 14. Lee MC, Kim GP, Kim SH, Choung NH, Yim MH (1997) Antimicrobial activity of extract from gall-nut and red-grape husk. Kor J Food and Nutr, 10, 174-179
 15. Choi I, Chang HS, Yun YM, Um JC (2002) Antimicrobial activity of medicinal herbs against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella gallinarum*. Kor J Microbiol Biotechnol, 30, 177-183
 16. Choi I, Cho JY, Lim SC (2006) Antimicrobial activity of medicinal herbs against *Staphylococcus aureus*. Kor J Plant Res, 19, 491-496

(접수 2010년 8월 30일, 수정 2011년 1월 19일 채택 2011년 1월 21일)