

*Brachyspira hyodysenteriae*에 대한 항균물질 탐색

김진규 · 오세택 · 양시용 · 김선여¹ · 강현미² · 문진산² · 송민동*
건국대학교 생명공학과, ¹경희대학교 동서의학대학원, ²국립수의과학검역원

Screening of Antimicrobial Substances against *Brachyspira hyodysenteriae*. Kim, Jin-Kyu, Se-Teak Oh, Si-Yong Yang, Sun-yeou Kim¹, Hyun-Mi Kang², Jin-San Moon², and Min-Dong Song*. Department of Biotechnology, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea, ¹Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea, ²National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea – The extracts from 70 different plant natural products were used to investigate the antimicrobial activities against *Brachyspira hyodysenteriae*, the causative agent of swine dysentery. Among them, the extracts from *Terminalia chebula* exhibited the highest antimicrobial activities against *B. hyodysenteriae*. It showed the antimicrobial activity against *B. hyodysenteriae* mostly in parts of its shell. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the water extracts of *T. chebula* was 12.5 mg/ml. After organic solvent extractions, the ethylacetate extracts exhibited higher antimicrobial activities against *B. hyodysenteriae*, and their antimicrobial activities were similar to that of the tannin. In conclusion, these findings suggest that the extracts from *T. chebula* may be used as animal feed additives for their antimicrobial activities against *B. hyodysenteriae*.

Key words: *Brachyspira hyodysenteriae*, *Terminalia chebula*, antimicrobial activity

돈적리(Swine dysentery)는 혐기성 장내 스피로헤타인 *Brachyspira hyodysenteriae*에 의해 돼지에서 발생하는 점막 출혈 대장염으로[4], 양돈농가에 치사, 성장률 저해, 사료 낭비, 치료제 비용문제 등 경제적으로 손실이 큰 질병 중 하나이다[5]. 돈적리는 1921년 미국에서 최초 발생 보고된 이래 호주, 유럽, 일본 등 돼지를 생산하고 있는 세계 각 지역에서 넓게 만연되어 있는 실정이다. 국내에서 1975년에 발생 조사를 실시한 바 경기, 충북 및 전북지역 양돈장에서 약 17%의 발생률을 보였고, 1993~1994년 전국의 50개 양돈장의 설사하는 비육돈 약 400두를 대상으로 조사한 결과 약 20%의 농장이 돈적리균에 감염되어 있었고, 설사하는 비육돈 중에서는 약 40%가 돈적리인 것으로 확인된 바 있다[9]. 현재 치료용으로 여러 항생제들이 많이 사용되나 내성균주 및 항생제 잔류문제가 야기되고 있어 이에 대한 대안이 요구되고 있다[8]. 본 연구는 천연물 중 *B. hyodysenteriae*에 대해 항균력을 나타내는 물질을 선별함으로써, 돈적리를 억제하는 항생제 대체 물질 개발을 목적으로 수행하였다.

문헌적으로 항균효과가 인정되는 천연물들을 Table 1과 같이 선별하였고, 천연물들을 건조 및 파쇄 후 200 g을 1 l 물에 열수 추출한 다음, Whatman No. 4 여과지로 여과하여 rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축한 농축물을 시료로 항균활성 탐색에 사용하였다. 시험균주는

Stanton 등[18]의 방법에 따라 5%(v/v) FBS(Fetal Bovine Serum)가 첨가된 Tryptic Soy Agar(TSA)에 도말하여 37°C, 10% CO₂ 조건에서 48시간 배양 후, β-hemolysis를 나타내는 colony를 10%(v/v) FBS와 0.2%(w/v) glucose가 첨가된 BHI(Brain Heart Infusion) agar에 도말하여 37°C, 10% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다.

항균력 검색은 Piddok[14]의 paper disc법으로 측정하였으며, 배지는 10%(v/v) FBS와 0.2%(w/v) glucose가 첨가된 BHI agar를 이용하였다. 항균력 검색 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 *Crataegus pinnatifida*, *Eugenia caryophyllata*, *Terminalia chebula* 등에서 항균활성이 나타났으며, 특히 *Terminalia chebula*(가자)가 가장 높은 항균활성을 나타내었다(Table 1). 가자의 부위별 항균활성을 측정하기 위해 전체(whole), 속(seed), 껍질(shell)로 구분하여 측정된 결과 껍질 부위가 가장 높은 항균활성을 나타내었고(Fig. 1), MIC value 또한 전체에서 25 mg/ml, 속에서 50 mg/ml, 껍질에서 12.5 mg/ml로 껍질 부위가 가장 좋은 항균활성을 나타내었다(Table 2).

가자 껍질의 분획 별 항균활성 측정을 위해 파쇄한 가자 껍질을 85% methanol에 24시간 냉침 후 Whatman No. 4로 여과하여 감압 농축하였고, 이 추출물을 증류수로 현탁시켜 ethyl acetate와 H₂O(1:1)로 separatory funnel로 분획한 다음 각각 감압 농축하여 항균활성을 측정하였다. 냉침 추출물 및 분획 농축물들을 농도별로 항균활성을 측정된 결과 2.5 mg/ml의 농도에서 ethyl acetate 분획물이 가장 우수한 항균활성을 나타내었다(Table 3).

*Corresponding author

Tel: 82-43-840-3612, Fax: 82-43-852-9377

E-mail: minds@kku.ac.kr

Table 1. List of the medicinal herbs used for the antimicrobial activity test and their growth inhibition against *B. hyodysenteriae*

Scientific name	Inhibition ^a	Scientific name	Inhibition ^a
<i>Paeonia suffruticosa</i> Andr	-	<i>Morus bombycis</i>	-
<i>Taraxacum platycarpum</i>	-	<i>Angelica gigas</i> Nakai	-
<i>Pulsatilla koreana</i>	-	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	-	<i>Paeonia lactiflora</i>	-
<i>Crataegus pinnatifida</i>	+	<i>Polygonatum odoratum</i>	-
<i>Caesalpiniae Lignum</i>	+	<i>Portulaca oleracea</i>	-
<i>Sinomenium acutum</i>	-	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	-
<i>Granati Pericarpium</i>	-	<i>Rheum undulatum</i>	-
<i>Prunus mume</i>	-	<i>Pleuropterus multflorus</i>	-
<i>Artemisiae asiaticae</i>	-	<i>Angelica dahurica</i>	-
<i>Dianthus superbus</i>	-	<i>Belamcanda chinensis</i>	-
<i>Schizandra chinensis</i>	-	<i>Zingiber officinale</i>	-
<i>Ginkgo biloba</i>	-	<i>Asplenium sarelii</i>	-
<i>Acorus calamus</i> var. <i>angustatus</i>	-	<i>Allium sativum</i> for. <i>Pekinense</i>	-
<i>Zanthoxylum coreanum</i>	-	<i>Akebia quinata</i> Decaisne	-
<i>Epimedium koreanum</i>	-	<i>Allium cepa</i>	-
<i>Reynoutria elliptica</i>	-	<i>Rumex crispus</i>	-
<i>Thuja orientalis</i>	-	<i>Stemona japonica</i> Miquel	-
<i>Punica granatum</i>	-	<i>Aster tataricus</i>	-
<i>Ampelopsis brevipedunculata</i>	-	<i>Lilium concolor</i> var. <i>partheneion</i>	-
<i>Juniperus rigida</i>	-	<i>Machilus thunbergii</i>	-
<i>Agrimonia pilosa</i>	-	<i>Liriope platyphylla</i>	-
<i>Inula helenium</i>	+	<i>Evodia officinalis</i>	+
<i>Terminalia chebula</i>	+++	<i>Cornus officinalis</i>	+
<i>Sanguisorba officinalis</i>	-	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	-
<i>Houttuynia cordata</i>	-	<i>Foeniculum vulgare</i> Gaertner	-
<i>Eugenia caryophyllata</i>	+	<i>Piper longum</i>	-
<i>Commelina communis</i>	-	<i>Allii Fistulosi Bulbus</i>	-
<i>Viscum alvum</i> L. var. <i>coloratum</i>	-	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	-
<i>Paeoniae Radix alba</i>	-	<i>Nelumbo nucifera</i>	-
<i>Asparagus cochinchinensis</i>	-	<i>Imperata cylindrical</i>	-
<i>Forsythia Koreana</i> Nakai	+	<i>Lythrum anceps</i>	-
<i>Prunella vulgaris</i>	-	<i>Patrinia villosa</i>	-
<i>Ledebouriella seseloides</i>	-	<i>Impatiens balsamina</i>	-
<i>Lonicera japonica</i> Thunberg	+	<i>Cortex Mori radices</i>	-

Agar diffusion method employed.

^a+, moderately sensitive; +++, highly sensitive; -, resistant.

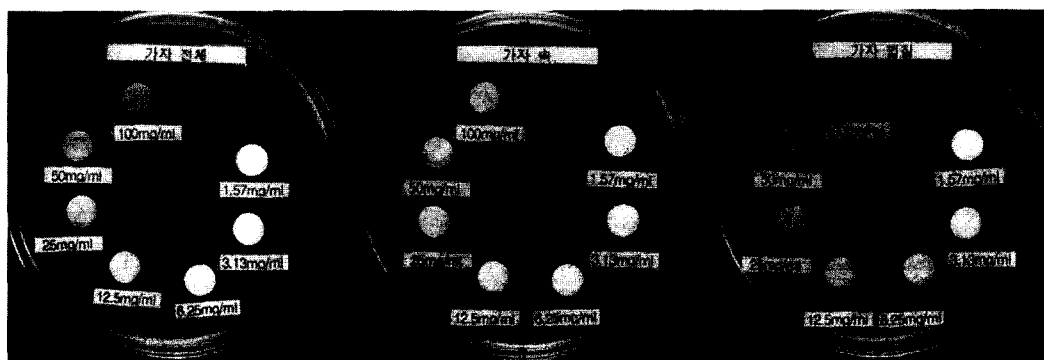


Fig. 1. Antimicrobial activities of each part of *Terminalia chebula* RETZ (left: whole, middle: seed, right: shell).

Table 2. MIC value of each part of *Terminalia chebula* RETZ.

Part	MIC (mg/ml)
Whole	25
Shell	12.5
Seed	50

Table 3. Antimicrobial activities of each fraction of *Terminalia chebula* RETZ

Fraction	Concentration (mg/ml)		Clear zone diameter (mm)				
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.157
Methanol	16	13	12	ND	ND	ND	ND
Water	10	10	ND	ND	ND	ND	ND
Ethyl acetate	19	16	14	ND	ND	ND	ND

ND; Not detected

본 연구결과 *B. hyodysenteriae*에 대한 항균활성이 높은 것으로 나타난 가지는 국내에서 예로부터 수렴, 지사의 효능으로 이용되어지는 한약재로서, 이는 사군자과(Combretaceae)에 속하는 가자 나무의 성숙과실을 건조한 것이다. 주요 성분은 chebulic acid, chebulin 및 tannin이 주성분으로 특히 tannin이 20~40% 정도로 많은 양이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며[2,11], 항암작용[15], 정장작용[19], 면역조절작용[13], 항산화효과[7] 등의 생리활성이 알려져 있다. 특히, 항균작용에 대한 연구로 *Streptococcus mutans*에 대해 항충치작용[6], *Entamoeba histolytica*에 대한 항아메바활성[17], *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성[12], 다중약제내성 병원균에 대한 항균활성[1], 메치실린 내성 *Staphylococcus aureus*(MRSA)에 대한 항균활성[16], HIV에 대한 항바이러스 효과[3] 등이 알려져 있다.

가축 질병 원인균에 대한 항균활성으로 *Eubacterium limosum*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*에 대해 가자가 우수한 항균활성을 갖는다고 보고된 바 있으나[10], *B. hyodysenteriae*에 대한 천연물에서의 항균활성 물질 검색에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

이상의 결과를 종합해 보면 돈적리의 원인균인 *B. hyodysenteriae*에 대한 항균활성 물질을 탐색한 결과 *Crataegus pinnatifida*, *Eugenia caryophyllata*, *Terminalia chebula* 등에서 항균활성을 나타내었으며, 특히, *T. chebula*가 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 가자의 부위별 항균활성에서는 가자의 껍질부분에서 가장 우수한 항균활성을 보여 항균활성 물질이 가자의 껍질부분에 주로 분포함을 보였고, 가자의 열수추출물과 85% 메탄올 냉침 후 유기용매 분획 추출물간의 항균활성 비교에서 에틸아세테이트 추출물에서 가장 높은 항균활성을 보였지만 열수추출물과의 항균활성이 비슷한 수준으로 항균활성은 단일물질에만 국한되지 않고 여러 물질들로 추정되어진다. 가자는 tannin 함유량이

높고, 전통적으로 지사, 수렴 목적으로 널리 사용되어 온 한약재로서 본 연구결과를 토대로 돈적리균에 대한 항균활성 및 지사 효과를 동시에 얻을 수 있는 돈적리 예방 및 치료를 위한 사료첨가제로서의 가능성이 높은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 (주)TM세미의 지원 및 2003년도 과학기술부 지정 지역협력연구센터사업(건국대학교 바이오 식·의약 연구센터, R12-2003-003-00017-0)의 지원에 의해 얻은 결과임으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahmad, I. and A. Z. Beg. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.* **74**: 113-123.
- Cha, J. H. 1990. *Practical oriental medicine*. pp. 353. Ilwolsongak, Seoul, Korea. 353.
- El-Mekkawy, S., M. R. Meselhy, I. T. Kusumoto, and S. Kadota. 1995. Inhibitory effects of Egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase. *Chem. & Pharm. Bull.* **43**: 641-648.
- Harris, D. L., D. J. Hampson, and R. Glock. 1999. *Disease of swine*, pp. 579-600. 8th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Harris, D. L., and R. J. Lyons. 1992. *Swine dysentery*. pp. 599-616. 7th. ed. Iowa State Univ. Press. Ames, Iowa, USA.
- Jagtap, A. G. and S. G. Karkera. 1999. Potential of the aqueous extract of *Terminalia chebula* as an anticaries agent. *J. Ethnopharmacol.* **68**: 299-306.
- Jang, S. J., G. D. Lee, J. S. Kim, and H. S. Yoon. 1992. Antioxidative effectiveness of *Terminalia chebula* Retz. Extracts. *Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.* **10**: 11-17
- Karlsson, M., S. L. Oxberry, and D. J. Hampson. 2002. Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. *Vet. Microbiol.* **84**: 123-133.
- Lee, H. S. 2004. Pathogenesis and prevention of swine dysentery. *National Veterinary Research & Quarantine Service*.
- Lee, K. S., S. H. Kim, K. C. Sim, C. S. Park, and Y. S. Shin. 1997. Antimicrobial activity of *Terminalia chebula* Retz. Extract of against intestinal pathogens. *Korean J. Food & Nutr.* **10**: 559-563.
- Lee, S. I. 1990. *Clinical Application of Oriental Medicine*. pp. 392. Seongbosa, Seoul, Korea.
- Malekzadeh, F., H. Ehsanifar, M. Shahamat, M. Levin, and R. R. Colwell. 2001. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18**: 85-88.
- Moeslinger, T., R. Friedl, I. Volf, M. Brunner, E. Koller, and

- P. G. Spieckermann, 2000. Inhibition of inducible nitric oxide synthesis by the herbal preparation Padma 28 in macrophage cell line. *Canadian J. Physiol. and Pharmacol.* **78**: 861-866.
14. Piddok, L. J. V. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 307-318.
15. Saleem, A., M. Husheem, P. Harkonen, and K. Pihlaja. 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *J. Ethnopharmacol.* **81**: 327-336.
16. Sato, Y., H. Oketani, K. Singyouchi, T. Ohtsubo, M. Kihara, H. Shibata, and T. Higuti. 1997. Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* Retz. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. & Pharm. Bull.* **20**: 401-404.
17. Sohni, Y. R., P. Kaimal, and R. M. Bhatt. 1995. The anti-amoebic effect of a crude drug formulation of herbal extracts against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. *J. Ethnopharmacol.* **45**: 43-52.
18. Stanton, T. B, E. G. Matson, and S. B. Humphrey. 2001. *Brachyspira hyodysenteriae* gyrB mutants and interstrain transfer of coumermycin A. resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2037-2043.
19. Tamhane, M. D., S. P. Thorat, N. N. Rege, and S. A. Dahanukar. 1997. Effect of oral administration of *Terminalia Chebula* on gastric emptying: an experimental study. *J. Postgrad. Med.* **43**: 12-13.

(Received Oct. 4, 2004/Accepted Nov. 23, 2004)