



Original Article / 원저

병원성 미생물에 대한 다빈도 51종 한약처방의 항균 활성 연구

이나리¹, 신현규¹, 하혜경^{1*}, 최순용^{2**}

¹한국한의학연구원 한약연구부

²한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템학과

Antimicrobial Activities of 51 Herbal Formulae on Pathogenic Microorganisms

Nari Lee¹, Hyeun-Kyoo Shin¹, Hyeakyung Ha^{1*}, Soon Yong Choi^{2**}

¹Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine,

²Department of Biological Sciences and Biotechnology, Hannam University

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study was to establish experimental evidence for the antimicrobial effects of 51 herbal formulae commonly used in traditional Korean medical institutions.

Methods: The antimicrobial activities of herbal formulae were screened using the disc diffusion method against 10 pathogenic microorganisms (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* DH5 α , *E. coli* O157, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, and *Helicobacter pylori*). Of the 51 herbal formulae, 13 herbal formulae with antimicrobial activity were selected and their dose-dependency were confirmed.

Results: Nine herbal formulae, including *Gyeji-tang*, *Dangguisu-san*, *Saengmaek-san*, *Samul-tang*, *Ssanghwa-tang*, *Socheongryong-tang*, *Yukmijihwang-tang*, *Jakyakgamcho-tang*, and *Paljung-san*, presented antibacterial activity against *B. cereus*. The effects of *Saengmaek-san* and *Paljung-san* was sustained for 48 hr. On *L. monocytogenes*, *Dangguisu-san* and *Hyangsapyeongwi-san* showed antimicrobial activity, but only *Hyangsapyeongwi-san* maintained the activity for 48 hr. Thirteen herbal formulae such as *Galgeun-tang*, *Gyeji-tang*, *Dangguisu-san*, *Mahwang-tang*, *Banhasasim-tang*, *Saengmaek-san*, *Socheongryong-tang*, *Yukmijihwang-tang*, *Jakyakgamcho-tang*,

© 2019 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cheonwangbosim-dan, *Palmijhwang-tang*, *Paljung-san*, and *Hwanglyeonhaedok-tang* showed antimicrobial activity against *V. parahaemolyticus*, and the activity was maintained for 48 hr. The 51 herbal formulae did not show any antimicrobial activity against seven strains such as *E. coli* DH5 α , *E. coli* O157, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *S. flexneri*, and *H. pylori*.

Conclusions: Nine, two, and thirteen herbal formulae showed antimicrobial activities against *B. cereus*, *L. monocytogenes*, and *V. parahaemolyticus* in a dose-dependent manner, respectively. The results of antimicrobial activity of 51 herbal formulae against 10 microorganisms might be used as the basis for new application of herbal formulae.

Key words : Herbal formula, Pathogenic microorganisms, Antimicrobial activity, Disc diffusion method.

I. 서론

병원성 미생물에 의한 식품 오염 및 다양한 감염성 질환의 발병은 심각한 공중보건 문제이며 전세계적으로 엄청난 경제적 손실의 원인이 되고 있다. 세균의 증식을 억제하는 합성 항균제, 보존제, 방부제 등은 세균의 증식을 억제하여 감염성 질환의 확산을 막거나 가공식품, 생활 물품들의 유통 및 보존 기간을 증가시켜주지만 항생제 내성 구균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)과 같은 내성 균주의 발현으로 병원 내 감염의 문제가 되기도 하고¹⁾, 환경호르몬으로 작용하여 내분비계 교란을 유발하는 등^{2,3)}의 부작용이 있다.

항생제가 개발되기 이전에는 전통적으로 한약을 비롯한 천연물을 이용하여 감염성 질환을 치료해 왔으나 합성 항생제 개발 이후로는 천연물을 이용한 감염병 치료는 미미하였다. 합성 항생제의 장기간 및 고농도 사용 시 항생제에 대한 내성균이 생기거나 독성이 증가하는 등의 문제점이 발생하고 있으며, 이에 따라 한약을 비롯한 천연물을 이용한 항균 활성 제품 개발에 대한 관심도 2000년 이후 꾸준히 증가하고 있다^{4,5)}. 본 연구팀에서는 한약처방의 병원성 미생물에 대한 억제 효능에 대한 실험적 근거를 제시하고자 한방의료기관에서 다빈도로 사용되는 한약처방^{6,7)}을 중심으로 51종 한약처방을 활용하여 병원성 미생물

10종에 대한 항균 활성을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 사용 균주

실험에 사용한 균주 중 *Escherichia coli* O157, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* 등 9종의 균주는 한국미생물 보존센터 (KCCM)에서 구입하였으며, *E. coli* DH5 α 는 (주)엔지노믹스에서 구입하여 사용하였다.

2) 한약처방 추출물 제조

본 실험에 사용된 처방의 구성은 동의보감, 방약합편을 기준으로 다빈도 및 기본 처방 51종을 선정하였으며, 처방의 구성 약재들은 (주)광명당제약 (Ulsan, Korea)에서 의약품 수준의 규격품을 구입 후, 각각의 처방에 따라 약재를 배합한 후 이의 10배에 해당하는 증류수와 함께 100°C에서 2시간 동안 초고속진공저온추출기 (COSMOS 660, Incheon, Korea)를 이용하여 추출하였다. 이후 동결건조기를 이용해 완전히 건조된 분말 형태의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 각 한약처방의 추출수율은 Table 1에 나타내었다⁸⁾.

*Corresponding author : Hyekyung Ha. Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon, 34054, Republic of Korea.

Tel : +82-42-868-9513, Fax : +82-42-864-2120, E-mail : hkha@kiom.re.kr

**Corresponding author : Soon Yong Choi. Department of Biological Sciences and Biotechnology, Hannam University, 1646 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon, 34430, Republic of Korea.

Tel : +82-42-629-8774, Fax : +82-42-629-8751, E-mail : sychoi@hnu.kr

•Received : September 16, 2019 / Revised : November 11, 2019 / Accepted : November 19, 2019

2. 실험 방법

1) 미생물 균주 배양 배지 및 배양 조건

각 미생물을 배양하기 위한 배지와 배양 조건은 Table 2와 같다.

2) 항균 활성 측정 (디스크 확산법)

각 미생물을 해당 배지에 접종하여 30°C 또는 37°C의 조건에서 16시간 배양한 후 새로운 배지에 10 배로 희석하였으며, 희석된 배양균주 100 µL를 각 균주별 해당 평판배지에 도말하였다. 해당 균주를 균일하게 도말한 평판배지에 직경 10 mm 크기의 멸균된 filter paper disc를 올려놓고 각 한약처방 추출물 희석액 100 µL를 disc에 흡착시켜 각 미생물별 배양 조건 (Table 2)에 맞는 배양기에서 24 시간 및 48 시간 배양하였다. 각 한약처방 추출물은 5 mg/disc의 농도로 처리되었으며, 배양 후 미생물의 생장이 억제되어 형성된 억제환의 유무와 disc를 포함한 억제환의 크기, 즉 균 성장 억제 영역의 직경인 clear zone의 크기 (mm)를 측정하여 항균 활성 여부를 판단하였다.

각 미생물에 대해 48시간까지 항균 활성이 유지되는 유효 한약처방을 선별하여 한약처방 추출물의 농도별 항균 활성을 확인하였다. 위와 같은 방법으로 미생물을 도말하고 직경 10 mm 크기의 멸균된 filter paper disc에 유효 한약처방 추출물 희석액을 각 5, 10, 15 및 20 mg/disc의 농도로 흡착시켰다. 각 24 시간 및 48 시간 배양하여 clear zone의 크기 (mm)를 측정하였다.

III. 결과

1. 51개 한약 처방의 항균 효과

10종 병원성 미생물 균주에 대해 51개의 한약처방 추출물을 5 mg/disc로 동일하게 처리하여 clear zone 형성 여부를 확인한 결과 (Table 3), *B. cereus*에 대해서 생맥산과 팔정산의 clear zone이 24시간에 각각 17, 16 mm로 나타났으며 48시간까지 지속되었다. 계지탕 (14 mm), 당귀수산 (13 mm), 사물탕 (14 mm), 소청룡탕 (15 mm), 쌍화탕 (13 mm), 육미지황탕 (13 mm) 및 작약감초탕 (12 mm)도 배양 24시간까지는 clear zone이 나타났으나 이후 48시간에 모두 항균 활성이 소실되었다. *L. monocytogenes*

에 대해서 당귀수산의 clear zone의 크기는 24시간 및 48시간에 13 mm로 나타났고, 향사평위산은 24시간에 12 mm로 항균활성을 나타냈으나 이후 48시간에 소실되었다. *V. parahaemolyticus*에 대해서 작약감초탕 14 mm, 당귀수산과 천왕보심단 13 mm, 생맥산과 팔미지황탕은 12 mm의 크기로 clear zone을 형성하여 항균 활성이 있는 것으로 나타났으며 모두 48시간까지 지속되었다. 갈근탕, 육미지황탕, 소청룡탕, 황련해독탕, 반하사심탕, 계지탕, 마황탕 및 팔정산은 모두 clear zone이 관찰되었으나 크기가 11 mm 미만이었으며, 모두 48시간까지 지속되어 약한 항균 활성을 나타냈다. 위 언급된 16개 한약처방 이외의 35개 한약처방은 *B. cereus*, *L. monocytogenes* 및 *V. parahaemolyticus*의 3종 균주에 대해서 항균 활성을 나타내지 않았다. 사용된 균주 중 *E. coli* DH5α, *E. coli* O157, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *S. flexneri*, 및 *H. pylori* 등 7종에 대해서는 51개의 한약처방이 모두 항균 활성을 나타내지 않았다.

2. 유효 한약처방의 처리 농도별 항균효과

B. cereus, *L. monocytogenes* 또는 *V. parahaemolyticus*에 대하여 48시간까지 항균 활성을 나타내는 13개 유효 한약처방을 선별하여 농도별 (5, 10, 15 및 20 mg/disc)로 처리한 후 48시간 동안 항균 활성을 평가한 결과를 Table 4에 나타냈다. *B. cereus*와 *V. parahaemolyticus*에 대해서 생맥산과 팔정산의 농도별 항균 활성을 평가한 결과, *B. cereus*에서는 생맥산의 농도가 증가할수록 clear zone의 직경이 24시간 처리 시 14 mm에서 16 mm까지 증가하였고 48시간에는 11 mm 미만에서 15 mm 까지 clear zone을 형성하였지만 24시간과 비교하여 항균 활성이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 1A). *V. parahaemolyticus*에서도 생맥산 처리 시 clear zone의 직경이 12 mm에서 17 mm까지 농도의존적으로 증가하였고 48시간까지 유지되었다 (Fig. 2A). 팔정산은 *B. cereus*에 대해 clear zone의 직경이 14 mm에서 17 mm (Fig. 1B), *V. parahaemolyticus*에서는 11 mm 미만에서 14 mm로 농도의존적으로 항균 활성이 증가되는 것으로 나타났으며 이러한 활성이 48시간까지 지속되었다.

*L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*에 대해서 당귀수산의 농도별 항균활성을 평가한 결과, *L.*

*monocytogenes*에 대해 13 mm에서 22 mm의 clear zone을 형성하여 농도의존적 항균활성을 나타냈을 뿐만 아니라 48시간까지 그 효과가 지속되었고 (Fig. 3), *V. parahaemolyticus*에 대해서는 11 mm 미만에서 13 mm까지 농도의존적 항균 활성을 나타냈으며 이는 48시간까지 지속되었다. *V. parahaemolyticus*에 대해서 계지탕과 작약감초탕은 농도의존적으로 항균 활성이 증가했으며, 최고 농도 (20 mg/disc)에서 clear zone의 직경이 각각 18 mm와 20 mm로 다른 한약처방들과 비교하여 *V. parahaemolyticus*에 강한 항균력을 나타냈다 (Fig. 2B 및 2C). 반하사심탕, 마황탕, 소청룡탕, 육미지황탕, 천왕보심단, 팔미지황탕 및 팔정산도 *V. parahaemolyticus*에 대해 농도의존적으로 항균 활성이 증가하는 것으로 나타났으나 최고농도인 20 mg/disc에서 clear zone의 직경이 12 mm에서 14 mm 정도로 약한 항균활성을 나타냈다. 갈근탕과 황련해독탕은 20 mg/disc까지 농도를 증가시켜도 *V. parahaemolyticus*에 대한 clear zone의 직경이 11 mm 이하로 매우 약한 항균 활성을 나타냈다. 이들 한약처방의 항균 활성은 모두 48시간까지 지속되었다.

IV. 고찰

전통의학정보포털 OASIS (<https://oasis.kiom.re.kr>) 사이트의 논문 검색 시스템에서 현재까지 발표된 한약의 항균 활성과 관련된 한의계 논문을 확인한 결과⁸⁾, 황금 등 단일 약재 (56편), 기존 처방이 아닌 한약 복합 추출물 (5편), 한약처방의 가감방 (5편), 약침 및 한약 성분 등의 기타 논문 (15편), 한약 처방에 대한 논문 (57편) 등 총 138편이 검색되었다. 한약처방의 항균 활성 평가에 사용된 균주는 *Staphylococcus* 속 (*S. aureus*, *S. epidermidis* 및 methicillin-resistant *S. aureus*: MRSA 등)이 가장 사용 빈도가 높았고, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *V. parahaemolyticus*의 순이었다. 본 연구에서 사용된 51개 한약 처방에 대한 국내·외 연구 결과를 정리해보면, 광항정기산과 보중익기탕은 알레르기성 비염 환자에서 분리한 *Klebsiella pneumoniae*에 대해 항균활성을 나타냈으며¹⁰⁾, 보중익기탕은 *S. aureus*, *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *H. pylori* 등의 세균 감염 동물 모델에 투여 시 생존율을 증가시키거나 위내 세

균수를 효과적으로 감소시키는 것으로 보고되었고¹¹⁻¹⁵⁾, 내소산 (환혼산)은 *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* 및 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해 항균 활성을 나타내는 것으로 보고되었으나¹⁶⁾, 본 연구에서는 사용한 10종 균주 모두에 대해 항균 활성을 나타내지 않았다. 반하사심탕은 *H. pylori* 감염으로 유발된 위염 감염균의 사멸뿐만 아니라 손상된 위 조직을 회복시키는 것으로 알려져 있으나¹⁷⁾, 본 연구에서는 *H. pylori*에 대한 항균 활성은 관찰되지 않았으며, *V. parahaemolyticus*에 대해서 농도의존적인 항균 활성을 확인할 수 있었다. 십전대보탕은 *E. coli*나 *Bacteroides fragilis*에 대해서는 직접적인 항균 작용은 없으나 이들에 의한 감염으로 유발된 자궁농종 동물모델에서는 자궁 내 세균수를 감소시키는 등의 개선효과¹⁸⁾ 및 *Porphyromonas gingivalis*에 대한 항균 작용과 이에 의해 유발되는 치조골 소실도 억제하는 것으로 알려져 있는데¹⁹⁾, 본 연구에서도 *E. coli*에 대한 항균 활성은 관찰되지 않았으며, 나머지 9개 균주에 대해서도 항균 활성이 나타나지 않았다. 팔정산은 비뇨기 및 요로감염과 관련이 있는 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae* 등 화농성 Gram 양성 구균과 Gram 음성 쌍구균²⁰⁾, *Diplococcus gonorrhoeae*에 대한 항균 작용이 알려져 있는데²¹⁾, 본 연구에서는 *S. aureus*에 대한 항균 활성은 나타나지 않은 반면 *B. cereus*와 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 농도의존적 항균 활성이 관찰되었다.

황련해독탕은 *S. aureus*, *S. epidermidis*에 대해 항균 활성이 전혀 나타나지 않았다는 보고와²²⁾ 고농도에서 *S. aureus*에 대해 항균 활성을 나타냈다는 상반된 보고가 있는데²³⁾, 본 연구에서는 *S. aureus*에 대해 항균 활성이 없는 것으로 나타났다. 또한, *V. parahaemolyticus*에 대해서는 항균 활성이 있으나 *S. flexneri*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. pneumoniae*, *S. typhi*에 대해서는 항균효과가 없다고 보고되었다²⁴⁾. 본 연구에서도 황련해독탕의 *E. coli*에 대한 항균 활성은 관찰되지 않았으며 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 약한 항균 활성을 나타내었다. 마지막으로 *V. parahaemolyticus* 균주에서 소청룡탕이 가장 높은 항균 활성을, 갈근탕, 광항정기산, 삼령백출산, 이진탕 및 평위산이 약한 항균 활성을 나타냈으며, 보중익기탕 오령산, 이중탕, 사군자탕, 육군자탕, 오적

산은 효과가 없는 것으로 발표되었는데^{25,26)}, 본 연구에서도 보중익기탕 등은 항균 효과가 나타나지 않았으며, 유효하다고 보고되었던 처방 중 소청룡탕과 같은 근탕만 농도의존적인 항균 활성이 나타났다. 이처럼 이전의 보고와 본 연구 결과에서 일치하거나 일치하지 않는 결과들이 나타난 것에 대해서는 각 연구별로 한약 처방을 구성하는 약재, 추출법, 처리 농도 또는 사용하는 균주의 strain 차이에 의한 것으로 판단된다. 본 연구에서는 각 한약처방의 구성, 추출방법, 이화학적 성분 함량에 대한 정보가 제공되고 있는 한약처방⁸⁾ 51종에 대해 일괄적으로 10종 미생물 균주에 대한 항균 활성 평가 결과를 제시함으로써 추후 유효한 한약처방들의 구체적 활용에 대한 실험적 근거로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결론

한방의료기관에서 다빈도로 사용되거나 방제학 이론상 기본 처방에 속하는 51종 한약처방을 소재로 10종 미생물 균주에 대한 항균 활성을 연구한 결론은 다음과 같다.

1. 식중독 또는 심내막염, 폐혈증과 같은 화농성 질환을 유발할 수 있는 *B. cereus*에 대해서 계지탕, 당귀수산, 사물탕, 생맥산, 쌍화탕, 소청룡탕, 육미지황탕, 작약감초탕, 팔정산 등 9종의 한약처방이 유효했으나 팔정산과 생맥산 2종 처방만 48시간까지 항균 활성이 지속되었고, 최고 유효한 한약처방은 팔정산이었다.
2. 뇌수막염, 폐혈증, 결막염 등을 유발할 수 있는 *L. monocytogenes*에 대해서는 당귀수산과 향사평위산이 유효했으나 당귀수산만 48시간까지 항균 활성을 유지하였으며, 최고 유효 처방은 당귀수산이었다.
3. 어패류에 의한 식중독의 원인균인 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 갈근탕, 황련해독탕, 반하사심탕, 소청룡탕, 천왕보심단, 당귀수산, 마황탕, 팔미지황탕, 육미지황탕, 팔정산, 생맥산, 계지탕, 작약감초탕의 순서로 높은 항균 활성을 나타냈으며, 이들 13종 한약처방의 항균 활성은 48시간까지 유지되었다.
4. *E. coli* DH5a, *E. coli* O157, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *Y. enteocolitica*, *S. flexneri*, 및 *H.*

pylori 등 7종 균주에 대해서는 51종 한약처방 모두 항균 활성을 나타내지 않았다.

감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원의 ‘한약처방의 과학적 근거기반 구축사업 (K16251)’과 ‘한방의료기관 한약처방 안전성·유효성 구축사업 (K18241)’ 지원으로 수행되었습니다.

References

1. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109(7):309–18.
2. Huang H, Du G, Zhang W, Hu J, Wu D, Song L, Xia Y, Wang X. The in vitro estrogenic activities of triclosan and triclocarban. *J Appl Toxicol*. 2014;34(9):1060–7.
3. Kassotis CD, Klemp KC, Vu DC, Lin CH, Meng CX, Besch-Williford CL, et al. Endocrine-disrupting activity of hydraulic fracturing chemicals and adverse health outcomes after prenatal exposure in male mice. *Endocrinology*. 2015;156(12):4458–73.
4. Kim E, Choi CH, Kim IH, Lee HI, Song YS. Antibacterial effect of Huanggeumjakyak-tang against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Korean Med Rehabi*. 2013;23(3):15–26.
5. Kim JH, Do EJ, Lee G. Investigation of anti-microbial activity of herbal medicines used as natural preservatives based on the analysis of papers and patents. *J Physiol & Pathol Korean Med*. 2015;29(1):101–13.
6. 한약진흥재단. 2017년 한방의료이용 및 한약소비 실태조사 종합편. 2018. 서울. p. 204–21. (available from: http://koms.or.kr/board/researchReport/view.do?post_no=46&menu_no=21 (accessed 01 April 2019))
7. Lee JT. Research on intake of Chinese Medicine by Korean. Korea Food & Drug Administration. 2006. p. 80–94 - (available from: <http://www>

- ndsl.kr/ ndsl/commons/util/ ndslOriginalView.do?dbt=TRKO&cn=TRKO200700007645&rn=&url=&pageCode=PG18 (accessed 01 April 2019))
- Shin HK, Ha H, Seo CS, Lee MY, Kim JH, Lee JK, et al. Standard herbal medicine formulary. Daejeon:Korea Institute of Oriental Medicine. 2018:915.
 - Available from: https://oasis.kiom.re.kr/oasis/search/search_total.jsp?srch_menu_nix=JI3a9m1H&collection=article&query=항균 (accessed 01 April 2019).
 - Suh JY, Seo EH, Park SJ, Goo DM. The antimicrobial activity of Bojungikgi-tang, Gwakyangjeonggi-san, and Gunggwihyangso-san to *Klebsiella pneumoniae* 289 extracted from allergic rhinitis patients. J Sasang Constitut Med. 2004;16(3):85-95.
 - Matsui K, Uechi Y, Horiguchi A, Yang G, Kitada Y, Ono Y, et al. Antibacterial effect of the Kampo herbal medicine, Hochu-ekki-to on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive mice. Kampo Med. 1997;48(3):357-67.
 - Shimizu S, Furuno H, Horiguchi A, Wang X, Ogata Y, Uechi Y, et al. Establishment of mouse model for *Salmonella* infection and trial of immunomodulating therapy using Hochu-ekki-to. Kampo Med. 1997;48(3):369-76.
 - Yamaoka Y, Kawakita T, Kishihara K, Nomoto K. Effect of a traditional chinese medicine, Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on the protection against an oral infection with *Listeria monocytogenes*. Immunopharm. 1998; 39:215-23.
 - Shimizu S, Komatsu Y, Wang X, Liu BX, Takeda M, Matsui K, et al. Immunomodulating activity of Hochu-ekki-to against mouse model for enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Kampo Med. 1998;49(3):429-39.
 - Yan X, Kita M, Minami M, Yamamoto T, Kuriyama H, Ohno T, et al. Antibacterial effect of Kampo herbal formulation, Hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang) on *Helicobacter pylori* infection in mice. Microbiol Immunol. 2002;46(7):475-82.
 - Kim JH, Hwang CY, Lim KS. A study on the anti-inflammatory, analgesic and anti-bacterial activity of Hwanhonsan (HHS) water extract and 20% ethanol extract. J Wonkwang Oriental Med. 1994;4(1):361-78.
 - Yang GZ, Zheng YJ, Jiang X, Sun JX, Wang LX, Wang Y. Effect of Banxiaxixin decoction on *H. pylori* gastritis by regulating the secretion of HSP70. Chin J Integr Trad West Med Dig. 2016;24(1):001.
 - Mikamo H, Kawazoe K, Izumi K, Sato Y, Tamaya T. Therapeutic effects of herbal medicines (Juzen-taiho-to and Ryutan-shakan-to) in a rat intrauterine infection (pyometra) model. Curr Therap Res. 1997;58(7):454-8.
 - Takeda O, Toyama T, Watanabe K, Sato T, Sasaguri K, Akimoto S, Sato S, Kawata T, Hamada N. Ameliorating effects of Juzentaihoto on restraint stress and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss. Arch Oral Biol. 2014;59(11):1130-8.
 - Lee AG, Yoo DG, Lee UJ. Experimental study on the effect of Paljeongsan water extract on analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial activity in experimental animals. Herb Formula Sci. 1990;1(1):209-26.
 - Lu H, Li Y, Chen Y. In vitro effects of ancient prescription Bazhengsan against *Diplococcus gonorrhoeae*. J Chin Med Mater. 1998;21(3):147-8.
 - Seo HS. The experimental study on anti-bacterial potency of Hwangryunhaedoktang herbal-acupuncture & extract on *Staphylococcus aureus* & *Staphylococcus epidermidis*. J Korean pharmacopunct Inst. 2006;9(2):99-103.
 - Kim IS, Oh HS, Shin MK, Lee YS. Antimicrobial activity of *Hwangryunheadok-tang*, and *Scutellariae Radix* extract, *Phellodendri Cortex* extract, *Coptis Rhizoma* extract, *Gardenia Jasminoides* extract against *Staphylococcus*



- aureus*. J Int Korean Med. 2014;35(4):455-71.
24. Zeng X, Zhou G, Yang X, Liao J. Studies on antibacterial activities of Huanglian Jiedu decoction. Chin Med Herald. 2012;9(19):161-2.
25. Ma JY, Kim JS, Jung KY, Park KJ. Antimicrobial Activity of Korean Traditional Prescription(Kumkue-Yoryak) and Herb Simplexes Extracts to *Vibrio Parahemolyticus*. Korean J Orient Med. 2000;6(1):107-16.
26. Ma JY, Kim JS, Shin SS, Jung KY, Park KJ. Antimicrobial Activity of Korea Traditional Prescription(Bangyak-Happyon) and Herb Simplexes Extracts to *Vibrio parahemolyticus*. Korean J Orient Med. 2000;5(1):59-72.

Table 1. The Lists of Herbal Formulae and their Extraction Yields

No.	Herbal formula	Yield (%)	No.	Herbal formula	Yield (%)
1	Bangpungdongseong-san	17.7	27	Naeso-san	11.9
2	Banhabakchulcheonma-tang	17.6	28	Ojeok-san	21.0
3	Banhasasim-tang	14.9	29	Onkyung-tang	30.6
4	Bojungikgi-tang	25.4	30	Oryeong-san	22.7
5	Buhnsingieum	14.5	31	Oyaksungi-san	24.4
6	Bulwhangeumjeonggi-san	12.4	32	Paljung-san	9.34
7	Chengsimyeunjaeum	13.0	33	Palmijihwang-tang	24.7
8	Cheonwangbosim-dan	21.3	34	Palmul-tang	25.9
9	Daeyoung-jeon	27.5	35	Pyeongwi-san	23.4
10	Danguisu-san	16.9	36	Saengmaek-san	26.5
11	Galgeun-tang	12.6	37	Sagunja-tang	22.3
12	Gamisoyo-san*	19.4	38	Samchulgeonbi-tang	24.5
13	Guibi-tang	24.3	39	Samryeongbaekchul-san	14.1
14	Gumiganghwal-tang	22.8	40	Samsoeum	18.6
15	Gwakhyangjeonggi-san	12.8	41	Samul-tang	33.3
16	Gyejibokryeong-hwan	11.8	42	Sipjeondaebo-tang	22.9
17	Gyeji-tang	9.75	43	Socheongryong-tang	21.7
18	Hwanglyeonhaedok-tang	17.1	44	Sosiho-tang	22.9
19	Hyangsapyeongwi-san	18.7	45	Ssanghwa-tang	25.5
20	Hyangsayukgunja-tang	12.9	46	Wiryeong-tang	12.5
21	Hyangso-san	13.4	47	Yeongyechulgam-tang	12.7
22	Insampaedok-san	24.3	48	Yijin-tang	18.5
23	Jaeumganghwa-tang	20.8	49	Yijung-tang	24.8
24	Jakyakgamcho-tang	19.3	50	Yongdamsagan-tang	18.5
25	Maekmundong-tang	9.2	51	Yukmijihwang-tang	27.0
26	Mahwang-tang	4.5			

*The composition of herbs based on Dong-uibogam

Table 2. Culture Conditions of Microorganisms

Strain	Culture media	Culture condition
<i>B. cereus</i>	Nutrient Broth	Aerobic, 30°C
<i>S. aureus</i>	Tryptic Soy Broth	Aerobic, 37°C
<i>L. monocytogenes</i>	Brain Heart Infusion Broth	Aerobic, 37°C
<i>V. parahaemolyticus</i>	Nutrient Broth with 3% NaCl	Aerobic, 37°C
<i>E. coli</i> DH5α	Luria Bertani Broth	Aerobic, 37°C
<i>E. coli</i> O157	Luria Bertani Broth	Aerobic, 37°C
<i>S. enteritidis</i>	Luria Bertani Broth	Aerobic, 37°C
<i>Y. enteocolitica</i>	Tryptose Broth	Aerobic, 37°C
<i>S. flexneri</i>	Luria Bertani Broth	Aerobic, 37°C
<i>H. pylori</i>	Luria Bertani Broth	Anaerobic, 37°C



Table 3. Antimicrobial Activities (the Size of Clear Zone, mm) of Herbal Formulae on the Microbes by using the Disc Diffusion Method.

Herbal formula	Strain					
	<i>B. cereus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>	
	Incubation time (hr)					
	24	48	24	48	24	48
Banhasasim-tang	-	-	-	-	*	*
Cheonwangbosim-dan	-	-	-	-	13	13
Danguisu-san	13	- [†]	13	13	13	13
Galgeun-tang	-	-	-	-	*	*
Gyeji-tang	14	- [†]	-	-	*	*
Hwanglyeonhaedok-tang	-	-	-	-	*	*
Hyangsapyeongwi-san	-	-	12	- [†]	-	-
Jakyakgamcho-tang	12	- [†]	-	-	14	14
Mahwang-tang	-	-	-	-	*	*
Paljung-san	16	16	-	-	*	*
Palmijihwang-tang	-	-	-	-	12	12
Saengmaek-san	17	17	-	-	12	12
Samul-tang	14	- [†]	-	-	-	-
Socheongryong-tang	15	- [†]	-	-	*	*
Ssanghwa-tang	13	- [†]	-	-	-	-
Yukmijihwang-tang	13	- [†]	-	-	*	*

-; No clear zone (the size of disc: 10 mm)

*; The size of clear zone \leq 11 mm

[†]; Reduction of clear zone at 48 hr compared with that at 24 hr

Table 4. Antimicrobial Activity of 13 Herbal Formulae for 24 and 48 hr on the Microbes by using the Disc Diffusion Method.

Strain	Herbal formula	Concentration of extract (mg/disc)							
		5		10		15		20	
		Incubation time (hr)							
		24	48	24	48	24	48	24	48
<i>B. cereus</i>	Paljung-san	14	14	15	15	16	16	17	17
	Saengmaek-san	14	- [†]	14	12 [†]	15	14 [†]	16	15 [†]
<i>L. monocytogenes</i>	Dangguisu-san	13	13	16	16	18	18	22	22
<i>V. parahaemolyticus</i>	Banhasasim-tang	*	*	*	*	12	12	12	12
	Cheonwangbosim-dan	-	-	*	*	12	12	13	13
	Dangguisu-san	-	-	*	*	12	12	13	13
	Galgeun-tang	*	*	*	*	*	*	*	*
	Gyeji-tang	14	14	16	16	17	17	18	18
	Hwanglyeonhaedok-tang	-	-	*	*	*	*	*	*
	Jakyakgamcho-tang	15	15	17	17	18	18	20	20
	Mahwang-tang	-	-	*	*	12	12	13	13
	Paljung-san	*	*	12	12	13	13	14	14
	Palmijihwang-tang	*	*	12	12	12	12	13	12
	Saengmaek-san	12	12	13	15	15	15	17	17
	Socheongryong-tang	*	*	*	*	*	*	13	13
	Yukmijihwang-tang	*	*	*	*	12	12	14	14

-; No clear zone (the size of disc: 10 mm)

*; The size of clear zone ≤ 11 mm

[†]; Reduction of clear zone at 48 hr compared to that at 24 hr

Figure legends

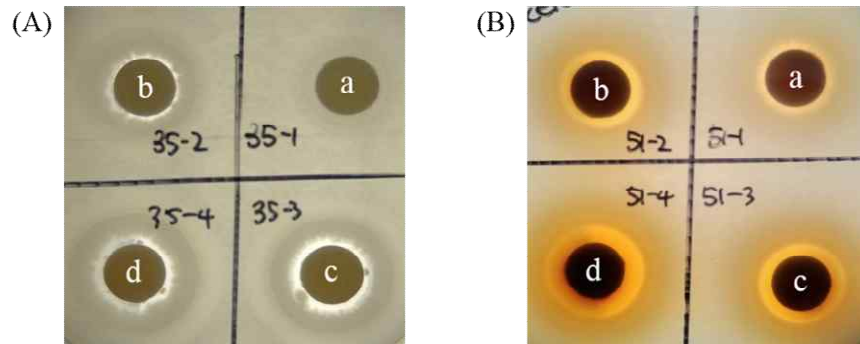


Figure 1. Antimicrobial activity of (A) *Saengmaek-san* and (B) *Paljung-san*. Each herbal formula was treated with (a) 5 mg/disc, (b) 10 mg/disc, (c) 15 mg/disc, and (d) 20 mg/disc for 48 hr against *Bacillus cereus*.

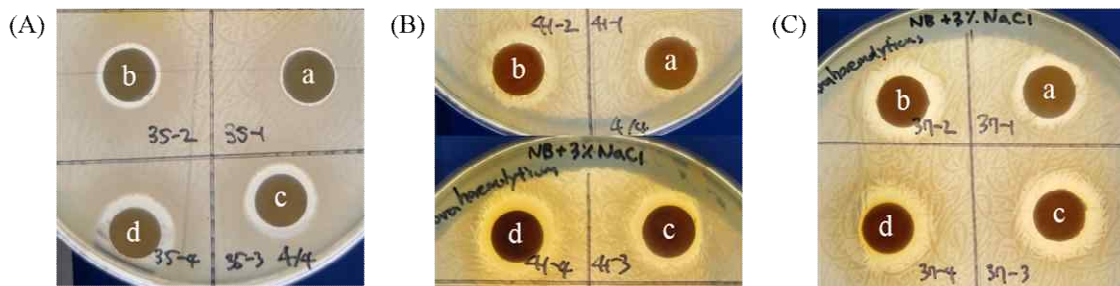


Figure 2. Antimicrobial activity of (A) *Saengmaek-san*, (B) *Gyeji-tang*, and (C) *Jakyakgamcho-tang*. Each herbal formula was treated with (a) 5 mg/disc, (b) 10 mg/disc, (c) 15 mg/disc, and (d) 20 mg/disc for 48 hr against *Vibrio parahaemolyticus*.

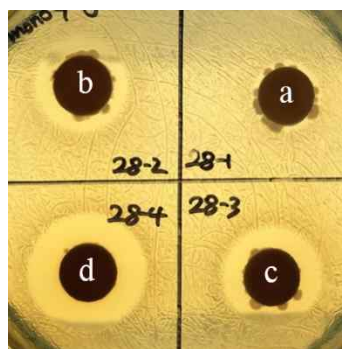


Figure 3. Antimicrobial activity of *Dangguisu-san*. *Dangguisu-san* was treated with (a) 5 mg/disc, (b) 10 mg/disc, (c) 15 mg/disc, and (d) 20 mg/disc for 48 hr against *Listeria monocytogenes*.