

어류 병원성 세균에 대한 월계수(*Laurus nobilis*) 잎 유래 sesquiterpene lactone과 수산용 항생제의 병용효과

임재웅^{***†} · 최지석^{*†} · 투르크 아이만^{**} · 이미경^{**} · 김도형^{****} · 강소영^{*†}

*전남대학교 수산생명의학과, **충북대학교 약학대학
국립수산과학원 병리연구과, *부경대학교 수산생명의학과

Combinational effects of sesquiterpene lactones isolated from bay laurel (*Laurus nobilis*) leaves with antibiotics against fish pathogenic bacteria

Jae-Woong Lim^{***†}, Ji-Seok Choi^{*†}, Ayman Turk^{**}, Mi Kyeong Lee^{**},
Do-Hyung Kim^{****} and So Young Kang^{*†}

*Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu, 59626, Republic of Korea

**College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, 28160, Republic of Korea

***Pathology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan, 46083, Republic of Korea

****Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan, 48513, Republic of Korea

This study is a report on combinational effects between four sesquiterpene lactones (SLs) from bay laurel (*Laurus nobilis*) leaves, and oxytetracycline (OTC) or amoxicillin (AMX) against four fish pathogenic bacteria such as *Vibrio anguillarum*, *V. harveyi*, *Edwardsiella tarda*, and *Streptococcus iniae*. Individually, four SLs exerted little antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. However, when combined with OTC or AMX, they showed synergistic interaction against pathogenic bacteria. Especially, zaluzanin C (**1**) reduced the MIC of OTC (or AMX) eight-fold. Our results showed that combinations of SLs with antibiotics (ABTs) are more effective than ABTs alone to control pathogenic bacteria. The highest synergistic effect was observed when zaluzanin C (**1**) was combined with OTC or AMX against *V. harveyi* or *S. iniae*, displaying significant reductions of MICs up to 8-fold (0.125 to 0.015 µg/mL and 0.0078 to 0.0009 µg/mL). In addition, zaluzanin C (**1**) improved the antibiotic potency of OTC against OTC resistant *V. harveyi* (250 µg/mL to 62.5 µg/mL). Synergism between ABTs and phytochemical such as SLs could be a therapeutically helpful concept to improve the efficacy of ABTs and prevent antibiotic resistance. These results suggest that SLs can be used as an alternative to reduce antibiotic resistance in aquaculture.

Key words: Bay laurel, Sesquiterpene lactone, Antibiotics, Combinational effect, Fish pathogenic bacteria, Antibiotic resistance

†Corresponding author: So Young Kang

Tel: +82-61-659-7176, Fax: +82-61-659-7179

E-mail: sykang1@chonnam.ac.kr

‡These authors contributed equally.

국내 어류 양식산업에서 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 가장 중요한 양식어종 중 하나이며, 전체 천해양식 생산량의 50%로 국내 단일 양식어종 중 가장 높은 비중을 차지하고 있다(Lim et al., 2021). 그러나 vibriosis, streptococcosis 및 edwardsiellosis와 같은 세균성 질병은 넙치양식에서 큰 문제를 야기하고 있으며, 특히 비브리오 감염증은 넙치양식에서 꾸준히 발생하고 있다. 일반적으로 *Vibrio scophthalmi*, *V. gigantis* 및 *V. harveyi* 등에 의한 감염사례가 알려져 있으며(Sohn et al., 2019), 특히 *V. harveyi*는 넙치에 병원성이 있는 것으로 보고되었다(Won & Park, 2008).

항생제는 이러한 세균성 질병을 치료하는 데 있어 가장 중요한 도구 중 하나이지만, 항생제의 지속적인 사용으로 인한 세균의 내성 획득으로 그 효능이 점차 줄어들고 있는 실정이다(Lulijwa et al., 2020). 전세계적으로 지속가능한 양식산업이 추구됨에 따라(Boyd et al., 2020), 항생제 사용을 줄일 수 있는 대안으로 천연소재로부터 항생제 대체제 개발하고자 하는 연구들이 진행되고 있으며, 이러한 천연소재들이 양식 현장에 세균성 질병을 치료할 수 있는 항생제 대체제로서 충분한 가치가 있음을 보여주고 있다(Lim et al., 2019; Lim et al., 2021).

월계수(bay laurel, *Laurus nobilis*)는 방향성을 지닌 상록수로 지중해 지역과 유럽에서 널리 재배되고 있다. 월계수의 건조 잎은 음식의 향신료로 사용되고 있고, 이 외에도 의약품 및 화장품에 사용되는 산업적으로 중요한 천연소재이다(Turk et al., 2019). 월계수 추출물 및 화합물은 상처 치유, 항산화, 항궤양, 항바이러스, 항진균 및 항균활성을 나

타내는 것으로 알려져있으며(Anzano et al., 2022; Dobroslavic et al., 2022), 주요성분으로 flavonoids, flavonol glycosides, essential oils, sesquiterpene lactones 등이 보고되어 있으며(Dobroslavic et al., 2022; Turk et al., 2019), 특히 월계수 잎은 에센셜오일과 monoterpene 및 sesquiterpene 화합물이 주요성분으로 보고되었다(Turk et al., 2019).

월계수를 활용한 연구는 수산양식 분야에서 다양하게 수행되고 있으며, 면역활성 및 사양성능 평가가 주를 이루고 있다(Swamy et al., 2023). 그러나, 현재까지 어병세균에 대한 항균활성에 관한 연구는 월계수 잎에서 분리된 essential oil의 항균활성에 관한 보고에 국한되어 있으며(Snuossi et al., 2016), 다른 화합물들에 대한 연구는 거의 보고되지 않고 있다. 여러 연구에서 천연소재유래 화합물과 항생제의 병용을 통해 항생제의 최소억제농도를 현저하게 감소시킬 수 있으며(Hemaiswarya et al., 2008), 이러한 병용사용은 항생제 내성을 감소시키는데 효과적임을 보고하였다(Chukwujekwu et al., 2018).

따라서 본 연구에서는 수산양식에서 주로 사용되고 있는 항생제인 oxytetracycline에 내성을 갖는 *V. harveyi* 분리균주들을 대상으로 월계수에서 분리된 4종 sesquiterpene lactone의 항균활성과 항생제와의 병용효과를 확인하고자 하였다.

본 연구에 사용된 4종의 sesquiterpene lactones (SLs)는 월계수(*Laurus nobilis*) 잎으로부터 분리 및 동정된 화합물을 사용하였으며(Turk, 2017), 그 구조를 Fig. 1에 나타내었다. 항생물질인 oxytetracycline hydrochloride (OTC) 및 amoxicillin (AMX)과 SLs의 용해를 위해 사용된 cell culture grade di-

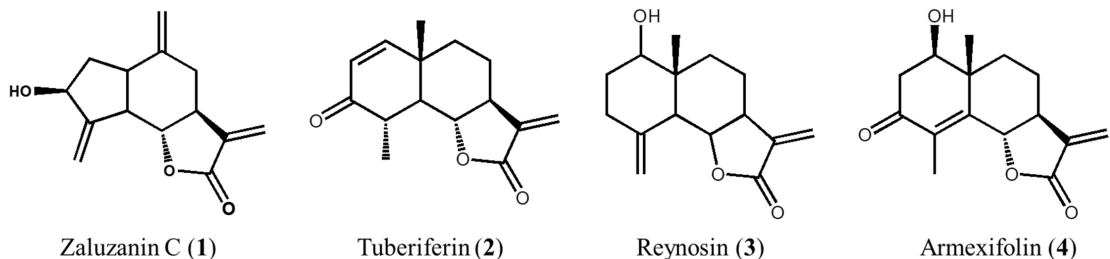


Fig. 1. Chemical structures of four sesquiterpene lactones from bay laurel (*Laurus nobilis*) leaves.

methyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세균 배양 및 병용효과 실험에 사용된 brain heart infusion (BHI)은 Difco (Sparks, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

본 연구에서 사용한 *Edwardsiella tarda* KCTC 12267 및 *V. anguillarum* KCTC2711은 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받았으며, *V. harveyi* KCCM40866는 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양 받아 사용하였다. OTC 내성균인 *V. harveyi* FF10 및 *V. harveyi* Yh21M1 균주에 대한 정보는 Table 1과 같다.

SLs 및 OTC의 최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)를 확인하기 위해 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, approved guideline: M49-A)의 방법을 약간 수정한 broth-microdilution법을 사용하였다(Lim et al., 2019). 4종의 SLs를 DMSO에 용해시킨 후 BHI broth (1% NaCl 첨가)에 2배 단계희석하여 사용하였으며, 시료 희석액에서의 DMSO의 농도는 10% 가 넘지 않도록 조정하였다. 실험세균을 BHI broth에 25°C에서 20시간 동안 120 rpm에서 진탕배양하였다. 배양된 세균액의 세균수를 10⁶ CFU/mL로 조정된 후에 앞서 희석한 SLs 시료와 96-well plate에 동량 혼합한 뒤 25°C에서 20시간 동안 배양하였다. MIC 결정을 위해 0.2 mg/mL의 *p*-iodonitrotetrazolium (*p*-INT) 30 µL를 가하여 암조건에서 2시간 반응 시킨 후, INT formazan의 생성에 따른 붉은색이 보이지 않은 최소농도를 MIC로 결정하였다.

실험세균에 대한 SLs와 OTC의 병용효과는 checkerboard법을 이용하여 결정하였다(Kang et al., 2008). 간단히 서술하면, SLs 유도체와 OTC의 실험농도는 MIC 결정실험에서 얻은 MIC를 기준으로 4, 2,

1, 1/2, 1/4, 1/8 및 1/16배로 조정하고 96-well plate에 각각 세로 및 가로에 배치하여 1:1로 동량을 분주했다. MIC 결정실험과 동일하게 *p*-INT를 사용하여 세균이 자라지 않은 구간을 육안으로 확인하였다. 이후 fractional inhibitory concentration (FIC) 및 fractional inhibitory concentration index (FICI)를 다음과 같이 계산하였다.

$$FICI = FICa + FICb$$

$$FICa = \frac{MICb}{MICa} \text{ (MIC of SLs in the presence of OTC) / MICa (SLs alone)}$$

$$FICb = \frac{MICd}{MICc} \text{ (MIC of OTC in the presence of SLs) / MICc (OTC alone)}$$

FICI에 따라, synergistic effect (상협, FICI ≤ 0.5), additive/indifferent effect (상가/무관, 0.5 < FICI ≤ 4) 및 antagonistic effect (갈항, FICI > 4)로 판정하였다(Aktas & Derbentli, 2017). 본 연구에서는 OTC에 내성을 갖는 *V. harveyi*에 대하여 월계수 잎에서 분리된 4종 SLs와 OTC의 병용효과를 checkerboard법 통해 평가하였다. Checkerboard법은 다양한 항균물질 조합의 상호작용을 신속하게 평가할 수 있는 장점이 있어 본 연구에 이용되었다.

병용효과 시험에서(Table 2), 표준균주인 *V. anguillarum* KCTC2711 및 *V. harveyi* KCCM40866의 OTC 단독처리군(MICc)의 MIC는 각각 0.25 및 0.125 µg/mL로 나타났다. 반면에 OTC내성 *V. harveyi* 균주의 경우 250 µg/mL로 확인되어 표준균주 대비 최대 2000배 높은 MIC를 보여주었다. 항생제와 병용을 위한 SLs의 단독 MIC (MICc)는 250 ~ >500 µg/mL 범위로 확인되었다. 본 연구에서 시험된 화합물들의 어병세균에 대한 항균활성을 검토한 문헌이 없어 직접적인 비교는 어려우나, zaluzanin C (1)의 경우, 그람음성균인 *Shigella sonnei*에서 250 µg/mL를 그람양성균인 *Bacillus cereus*, *B. sub-*

Table 1. Information of two clinical strains of *Vibrio harveyi* and their antibacterial susceptibility results to oxytetracycline

Strains	MIC (µg/mL)	Source
<i>V. harveyi</i> FF10	250	Olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> , Gyeongsang-do, 1999
<i>V. harveyi</i> Vh21M1	250	Mullet, <i>Mugil cephalus</i> , Unknown, 2009

MIC, Minimum inhibitory concentration

Table 2. Combinational effects of sesquiterpene lactones (SLs) with oxytetracycline (OTC) and amoxicillin (AMX) against fish pathogenic bacteria

Strains	Combinations (SLs + ABTs)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				R	FICI	FICI range
		SLs (MICa)	SLs with ABTs (MICb)	ABTs (MICc)	ABTs with SLs (MICd)			
<i>V. anguillarum</i> KCTC2711	1 + OTC	500	125	0.25	0.063	4	0.5 (S)	0.50-1.06
	2 + OTC	>250	3.9	0.25	0.125	2	<0.51 (I)	<0.51-1.00
	3 + OTC	>250	125	0.25	0.063	4	<0.75 (I)	<0.75
	4 + OTC	>250	3.9	0.25	0.125	2	<0.51 (I)	<0.51-1.5
<i>V. harveyi</i> KCCM 40866	1 + OTC	250	125	0.125	0.015	8	0.63 (I)	0.63-1.13
<i>V. harveyi</i> FF10	1 + OTC	250	62.5	250	62.5	4	0.5 (S)	0.50-1.06
<i>V. harveyi</i> Yh21M1	1 + OTC	250	62.5	250	62.5	4	0.5 (S)	0.50-1.13
<i>E. tarda</i> KCTC12267	1 + OTC	>500	7.8	0.25	0.25	-	<1.02 (I)	<1.02-2.02
<i>S. iniae</i> KCTC3657	1 + AMX	>500	250	0.0078	0.0010	8	<0.63 (I)	<0.63-1.03

Note, The FICI results were interpreted as follows: $\text{FICI} \leq 0.5$, synergistic; $0.5 < \text{FICI} \leq 4$, additive/indifferent; and $\text{FICI} > 4$, antagonistic.

SLs, sesquiterpene lactones; ABTs, antibiotics; OTC, oxytetracycline; AMX, amoxicillin; R, maximum reduction fold for MIC of OTC with SLs

tilis 및 *Staphylococcus aureus*에서 각각 125, 250 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 보여 본 연구와 유사하였다 (Sultana et al., 2008). Reynosin (3)도 마찬가지로 *Mycobacterium tuberculosis*에서 64 ~ 128 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 보여(Coronado-Aceves et al., 2016), SLs 자체의 항균활성은 높지 않는 것으로 확인되었다. 본 실험에 사용된 SLs는 배지에서 용해도가 좋지 않아, 병용효과 실험을 위해 *V. anguillarum* 표준균주 외 다른 균주에서는 정확한 FICI 산출을 위해 가장 용해도가 좋은 zaluzanin C (1)를 대상으로 병용 효과 실험을 수행하였다.

천연소재인 SLs와 항생제인 OTC 병용 처리 후, 내성균에 대한 OTC의 MIC가 단독 처리 시 보다 최대 8배 감소하였다. 균주별로 살펴보면, *V. anguillarum* KCTC2711 균주는 zaluzanin C (1)을 병용 시, OTC의 MIC가 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 0.063 $\mu\text{g/mL}$ 로 4배 감소하여 상협작용(S)이 있는 것으로 나타났으며, *V. harveyi* KCCM40866 균주는 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 에서 0.015 $\mu\text{g/mL}$ 로 8배 감소하였고 상가/무관작용(I)이 있음을 확인하였다. OTC 내성균주인 *V. harveyi* FF10 및 *V. harveyi* Yh21M1 균주는 250 $\mu\text{g/mL}$

mL에서 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 4배 감소하여 상협작용(S)을 보여주었다. 양식어류에 질병을 유발하는 그람 음성세균 중 *E. tarda* 균주의 병용효과도 함께 검토하였으나, SLs 병용에 따른 MIC 감소는 나타나지 않았다. 그람음성세균 외에도 그람양성세균에서의 병용효과도 알아보고자 *S. iniae* 균주를 대상으로 AMX과 SLs의 병용효과를 확인하였다. 그 결과, MIC가 0.0078 $\mu\text{g/mL}$ 에서 0.0009 $\mu\text{g/mL}$ 로 8배 감소하였고, zaluzanin C (1)의 단독 MIC를 결정하지 못하였으나, 시험농도 범위에서 상가/무관효과(I)를 나타내었다.

SLs은 구조적으로 친전자성 작용기를 포함하고 있어 세균의 DNA나 효소의 친핵체와 반응할 가능성이 있는 것으로 알려져 있다(Bachelier et al., 2006). 이전 연구에서 SLs는 세균의 세포벽 합성이나 저항성 관련 효소들을 억제할 수 있는 것으로 보고되었으며(Bachelier et al., 2006; Chukwujekwu et al., 2018), 이는 본 연구에서 나타난 내성균주에 대한 상승적 병용효과를 뒷받침해주는 것으로 판단된다. 하지만, 세균에 따라 이러한 작용기전에 차이가 있을 수 있으므로 추가적인 연구가 필요하다

다고 사료된다.

본 연구를 통해 SLs를 OTC와 병용 시 내성균의 항생제 감수성을 높일 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 양식현장에서 내성균 치료에 있어 새로운 접근법을 제시할 수 있을 것으로 보이며, 향후 더 다양한 항생제를 이용한 추가적인 연구를 통해 병용효과의 구체적인 작용기전을 확인할 필요가 있을 것으로 보인다. 또한 본 연구에서 사용된 SLs의 현장에서 활용 가능성을 평가하기 위해서는 추후 OTC와 SLs를 병용한 *in vivo* 실험을 통해 임상 효능을 평가해야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 성과는 정부의 재원으로 한국연구재단(NRF-2019R1F1A1059303) 및 국립수산물품질관리원 수산생물 질병 특성 연구(R2024054)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

Aktas, G., & Derbentli, S.: *In vitro* activity of daptomycin combinations with rifampicin, gentamicin, fosfomycin and fusidic acid against MRSA strains. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 10:223-227, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.022>

Anzano, A., de Falco, B., Grauso, L., Motti, R., & Lanzotti, V.: Laurel, *Laurus nobilis* L.: a review of its botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Phytochem. Rev.*, 1-51, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09791-z>

Bachelier, A., Mayer, R., & Klein, C. D.: Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16:5605-5609, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.08.021>

Boyd, C. E., D'Abramo, L. R., Glencross, B. D., Huyben, D. C., Juarez, L. M., Lockwood, G. S., McNeven, A. A., Tacon, A. G., Teletchea, F., & Tomasso Jr, J. R.: Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. *J. World Aquac. Soc.*, 51:578-633, 2020. <https://doi.org/10.1111/jwas.12714>

Chukwujekwu, J., Van Heerden, F., & Van Staden, J.: Synergistic properties of sesquiterpene lactones iso-

lated from *Centratherum punctatum* Cass. in combination with ampicillin against beta-lactam-resistant Gram-negative bacteria. *S. Afr. J. Bot.*, 117:79-82, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.003>

Coronado-Aceves, E. W., Velazquez, C., Robles-Zepeda, R. E., Jimenez-Estrada, M., Hernandez-Martinez, J., Galvez-Ruiz, J. C., & Garibay-Escobar, A.: Reynosin and santamarine: two sesquiterpene lactones from *Ambrosia confertiflora* with bactericidal activity against clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharm. Biol.*, 54:2623-2628, 2016. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1173067>

Dobroslavic, E., Repajic, M., Dragovic-Uzelac, V., & Elez Garofulic, I.: Isolation of *Laurus nobilis* leaf polyphenols: A review on current techniques and future perspectives. *Foods*, 11:235, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11020235>

Fischer, N. H., Lu, T., Cantrell, C. L., Castaneda-Acosta, J., Quijano, L., & Franzblau, S. G.: Antimycobacterial evaluation of germacranolides in honour of professor GH Neil Towers 75th birthday. *Phytochemistry*, 49:559-564, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00253-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00253-2)

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M.: Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15:639-652, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.008>

Kang, S. Y., Kang, J. Y., Kim, S.-Y., Kim, D.-H., & Oh, M.-J.: Antimicrobial activities of alkyl gallates alone and in combination with antibiotics against the fish pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 41:188-192, 2008. <https://doi.org/10.5657/kfas.2008.41.3.188>

Lim, J.-W., Jo, Y. H., Choi, J.-S., Lee, M. K., Lee, K. Y., & Kang, S. Y.: Antibacterial Activities of Prenylated Isoflavones from *Maclura tricuspidata* against Fish Pathogenic *Streptococcus*: Their Structure-Activity Relationships and Extraction Optimization. *Molecules*, 26:7451, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26247451>

Lim, J.-W., Shin, S.-M., Jung, S.-J., Lee, M. K., & Kang, S. Y.: Optimization of antibacterial extract from lacquer tree (*Rhus verniciflua* Stokes) using response surface methodology and its efficacy in controlling edwardsiellosis of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 502:40-47, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.008>

Lulijwa, R., Rupia, E. J., & Alfaro, A. C.: Antibiotic

- use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Rev. Aquac.*, 12:640-663, 2020. <https://doi.org/10.1111/raq.12344>
- Snuossi, M., Trabelsi, N., Ben Taleb, S., Dehmeni, A., Flamini, G., & De Feo, V.: *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* essential oils: Composition, antioxidant and antibacterial activities against bacteria isolated from fish and shellfish. *Molecules*, 21:1414, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21101414>
- Sohn, H., Kim, J., Jin, C., Lee, J.: Identification of *Vibrio* species isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island, South Korea. *Fish Aquat. Sci.* 22:1-8, 2019. <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0129-0>
- Sultana, N., Afolayan, A., & Bhuiyan, R. A.: Antimicrobial compounds from the shoots of *Arctotis arctoides*. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 43:89-96, 2008. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v43i1.860>
- Swamy, J. M., Patil, A., Biradar, P., Yadav, S. R., Bho-sle, R., & Tipale, J.: Exploring the Therapeutic and Nutritional Significance of Bay Laurel (*Laurus nobilis*) as a Feed Additive in Aquaculture. *Int. J. Environ. Clim.*, 13:192-197, 2023. <https://doi.org/10.9734/ijec/2023/v13i123675>
- Turk, A. Chemical constituents of *Laurus nobilis* and their NF- κ B inhibitory activity. Chungbuk National University, 2017
- Turk, A., Ahn, J. H., Jo, Y. H., Song, J. Y., Khalife, H. K., Gali-Muhtasib, H., Kim, Y., Hwang, B. Y., & Lee, M. K.: NF- κ B inhibitory sesquiterpene lactones from Lebanese *Laurus nobilis*. *Phytochem. Lett.*, 30:120-123, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.02.003>
- Won, K. M., & Park, S. I.: Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture*, 285:8-13, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.013>

Manuscript Received: May 28, 2024

Revised: Jun 04, 2024

Accepted: Jun 11, 2024