

## 오배자(*Rhus javanica*) 추출물의 어병세균 *Vibrio ichthyenteri*와 *Streptococcus iniae*에 대한 항균활성

김경훈 · 김아라 · 조은지 · 주성제 · 박종훈 · 문지영 · 염종화<sup>1</sup> · 김태훈<sup>2</sup> · 권현주<sup>3</sup>  
· 이현태<sup>3</sup> · 김영만<sup>4</sup> · 이은우<sup>3\*</sup>

동의대학교 생명응용학과, <sup>1</sup>동의대학교 임상병리학과, <sup>2</sup>대구한의대학교 한약재약리학과  
<sup>3</sup>동의대학교 블루바이오 소재개발센터, <sup>4</sup>동의대학교 식품영양학과

### Antibacterial Activity of *Rhus javanica* against the Fish Pathogens *Vibrio ichthyenteri* and *Streptococcus iniae*

Kyoung-Hoon Kim, Ah Ra Kim, Eun-Ji Cho, Seong-Je Joo, Jong-Hoon Park,  
Ji-Young Moon, Jong-Hwa Yum<sup>1</sup>, Tae Hoon Kim<sup>2</sup>, Hyun-Ju Kwon<sup>3</sup>, Hyun-Tai Lee<sup>3</sup>,  
Young-Man Kim<sup>4</sup> and Eun-Woo Lee<sup>3\*</sup>

Department of Life Science and Biotechnology, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

<sup>3</sup>Blue-Bio Industry RIC, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>4</sup>Department of Food Science and Nutrition, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

The antibacterial activities of methanol extracts of 19 commercial herbal medicines were measured against the fish pathogens *Vibrio ichthyenteri* and *Streptococcus iniae*, which cause several fish diseases. *Rhus javanica* showed the strongest antibacterial activity against *V. ichthyenteri* and *S. iniae*. The methanol extract of *R. javanica* was extracted further using several organic solvents with different polarities. The extract from the ethyl acetate fraction showed strong activity against both fish pathogens. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the *R. javanica* extract was 32 µg/mL for *V. ichthyenteri* and 128 µg/mL for *S. iniae*. Further purification and isolation of the active compound (s) responsible for these activities and further study of the synergistic effect using combinations of antibiotics against pathogenic bacteria are needed.

Key words: Antibacterial activity, *Vibrio ichthyenteri*, *Streptococcus iniae*, *Rhus javanica*

### 서론

한약재를 비롯한 천연 생약재는 이미 오래 전부터 질병치료 및 예방, 건강증진 등의 생리활성을 위해 사용되어 왔으며, 특히 항균활성을 가지는 물질에 대한 연구는 현재도 활발히 진행되고 있다. 천연물에 존재하는 항균물질은 그 대부분이 alkaloids, flavonoids, terpenoids, phenolic compounds, quinones 및 volatile oils 등의 이차 대사산물이거나 그 유도체들로 알려져 있다 (Mitscher et al., 1980; Lee and Shin, 1991). 여러 나라에서는 예로부터 이용되어 왔던 여러 한약재의 약리작용, 특히 항균효

과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 국내에서 천연물로부터 항균성물질의 개발에 관한 연구는 주로 의약품과 천연보존제의 용도로 단백질, 유기산, 지방산, 향신료, 생약추출성분 등을 대상으로 주로 이루어져 왔다(Beuchat et al., 1989; Han et al., 2001; Lee, 2003). 이러한 천연물 유래 항균물질은 항생제나 합성 화학요법에 비해 생체 안전성이 높고 내성세균에 대한 출현 우려가 적다는 장점이 있다(Cho et al., 2003). 그러나 이러한 천연항균 물질의 항균효과는 합성된 항생제에 비해 효과가 뛰어나지 않기 때문에 아직까지 실용화되는 경우는 많지 않은 실정이다.

#### Article history;

Received 17 January 2014; Revised 4 February 2014; Accepted 6 February 2014

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 890. 1537 Fax: +82. 51. 890. 1532

E-mail address: ewlee@deu.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 47(1) 018-022, February 2014

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0018>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

Table 1. Growth inhibiting activities of medicinal herb extracts against *V. ichthyenteri* and *S. iniae*<sup>1</sup>

Korean name	Scientific name	Used part	<i>V. ichthyenteri</i>	<i>S. iniae</i>
Gaeyeokkwi	<i>Persicaria blumei</i>	whole plant	- <sup>2</sup>	+
Pitch pine	<i>Pinus densiflora</i>	inner bark	+	-
Garlic	<i>Allium sativum</i>	stem	-	-
Mollyak	<i>Commiphora myrrha</i>	-	+	+
Bujikkaengi	<i>Erysimum aurantiacum</i>	leaves	-	-
Loquat	<i>Eriobotrya japonica</i>	seeds	-	-
Red daedongyeokkwi	<i>Persicaria trigonocarpa</i>	whole plant	-	+
Sokdan	<i>Phlomis umbrosa</i>	roots	-	-
Ssukbujaengi	<i>Aster yomena</i>	leaves	-	-
Yagwanmun	<i>Lespedeza cuneata</i>	whole plant	-	-
Gallnut	<i>Rhus javanica</i>	-	+++	+
Wonhwa	<i>Daphne genkwa</i>	flower bud	-	+
Ongmisu	<i>Zea mays</i>	style	-	-
Cultivated ginseng	<i>Panax ginseng</i>	leaves	-	-
Wild brier	<i>Rosa multiflora</i>	leaves	-	-
Perilla	<i>Perilla frutescens var. acuta</i>	roots	-	-
Aloeswood	<i>Aquilaria agallocha</i>	-	-	-
Grapevine	<i>Vitis vinifera</i>	outer bark	+	+
Figwort	<i>Scrophularia buergeriana</i>	leaves	+	+

<sup>1</sup>Data represent the mean from the results of three experiments.

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

한편, 증가추세에 있는 어류 질병들은 양식산업의 발달과 연안 환경오염 등으로 인해 더욱 가중되고 있으며, 우리나라 양식산업이 직면한 큰 문제중의 하나이다(Kang, 2005). 양식 어류에 발생하는 주요 세균성 질병은 어중에 따라 차이는 있지만 주로 활주세균증, 에드워드병, 비브리오증, 연쇄구균증, 장관백탁증 등이 알려져 있다(Edward, 2000). 이 중 넙치의 자어기에 주로 발병하는 장관백탁증의 원인균인 *Vibrio ichthyenteri*는 부화 후 25-30일령의 자어에 발생하여 단기간에 거의 전멸에 가까운 피해를 주는 질병으로, 장의 점막 상피에 감염하여 점막의 괴사, 박리, 소화관의 백탁, 복부함몰 등의 증상을 나타낸다(Muroga, 2001). 또한 *Streptococcus iniae*는 넙치, 무지개송어 등 다양한 어종에서 베타 용혈성 연쇄구균증을 유발하는 전염성 어병세균으로 병원성이 강하며 이로 인한 경제적 손실이 크다. 이 세균에 감염된 넙치는 체색이상, 안구백탁, 출혈, 복부팽만, 신장비대 및 폐사를 일으킨다(Moon et al., 2009). 이러한 세균성 질병의 치료를 위해서 매년 평균 220톤 이상의 수산용 항생제가 사용되고 있으며 이 중 옥시테트라사이클린, 옥소린산, 에리스로마이신 등이 많이 사용되고 있다(Treves, 2000). 항생제 사용량의 증가와 내성 어병세균의 출현빈도와 내성 경향은 비례하고 있으며, 세균성 질병의 치료와 예방은 더욱 어려워져

가고 있다(Heo et al., 2002).

따라서 본 연구에서는 주요 어병세균인 *V. ichthyenteri*와 *S. iniae*에 대한 시판 한약재 추출물 19종의 항균활성을 검색하고, 이 중에서 활성이 높은 오배자 추출물로부터 활성물질을 분석함으로써 항생제를 대체하거나 그 사용을 감소시킬 수 있는 어류 질병 치료 약제로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 재료

항균활성 대상균주는 *Vibrio ichthyenteri* KCTC 12725와 *Streptococcus iniae* KCTC 3657를 각각 Korean Collection for Type Cultures (KCTC, Korea)에서 구입하여 *V. ichthyenteri*는 Marine broth (Difco Co., USA)를, *S. iniae*는 Brain Heart Infusion broth (Difco Co., USA)에서 각각 배양하며 실험에 사용하였다.

한약재는 시중에서 유통되고 있는 것으로 대한생약제품(주)로부터 구입하여 사용하였다. 사용 한약재의 일반명과 학명, 사용한 부위는 Table 1에 나타내었다. 그 밖의 시약은 분석용 grade 및 Sigma Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 한약재 추출물 시료 조제

시료 추출액의 조제는 각 한약재 별로 약재를 세절하고 잘게 부수어 3배(v/v)의 80% methanol을 첨가하여 혼합하여 24시간 실온에서 침지한 후, Whatman No. 2 (USA) 여과지로 2회 여과하였다. 추출액은 rotary vacuum evaporator로 40℃에서 감압 농축하여 용매를 완전제거였으며, 각각의 농축물을 다시 DMSO에 20 mg/mL의 농도로 용해시켜 각 세균 별 항균활성 측정을 위한 stock solution으로 사용하였다.

### 활성물질의 분획

한약재 80% methanol 추출물을 분획여두에서 극성을 달리 하는 용매를 n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, water의 순서로 순차적으로 분획한 후 분획물을 40℃ 수조의 rotary vacuum evaporator로 농축하여 용매를 완전히 제거하였다. 각 용매 별 농축물을 DMSO에 10 mg/mL의 농도로 용해시켜 -20℃에 보관하면서 대상균주에 대한 항균활성을 측정하였다.

### 추출물의 항균활성 검색

항균활성 검색은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009)의 표준방법에 따라 disk diffusion method를 사용하였다. 즉, 적정배지에서 하룻밤 배양한 대상균주 배양액 200 µL를 한천 배지 상에 멸균된 면봉으로 3회에 걸쳐 고르게 도말하고 지름 8 mm paper disk (Avantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 올린 후, 각 추출물을 30 µL (고형물 600 µg)씩 흡수시켜 37℃의 incubator에서 18시간 배양 후 paper disc 주위의 생육 저해환의 크기를 측정하였다. 추출물의 각 어병세균에 대한 액체배지 상의 증식 억제효과는 배양배지에 추출물을 0, 50 및 100 µg/mL씩을 첨가하고 37℃에서 진탕배양하면서 배양 0시간부터 30시간까지 620 nm에서의 흡광도를 측정하여 관찰하였다.

### 추출물의 열 안정성 측정

추출물의 열 안정성을 알아보기 위해 시료를 membrane filter (0.2 µm, Whatman, USA)로 여과하여 eppendorf tube에 담고, 40℃, 60℃, 80℃의 heating block에서 각각 1시간 동안 열처리 한 후 상온에 방치하여 열을 식힌 후, disc diffusion method를 이용하여 가열 후의 잔류 활성을 측정하였다.

### 최소증식저해농도 측정

추출물의 최소 증식 저해 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)는 96-well plate와 Muller-Hinton 배지(Difco Co., USA)를 이용한 표준 2배 희석 방법으로 측정하였다(Lee et al., 2003). 37℃에서 24시간 배양한 후 대상 세균의 생육이 저해된 최저 농도를 MIC로 결정하였다.

Table 2. Minimal inhibitory concentration of 80% methanol extract from *R. javanica*

Bacteria	MIC (µg/mL) <sup>1</sup>
<i>V. ichthyenteri</i>	32
<i>S. iniae</i>	128

<sup>1</sup>Data represent the mean from the results of three experiments.

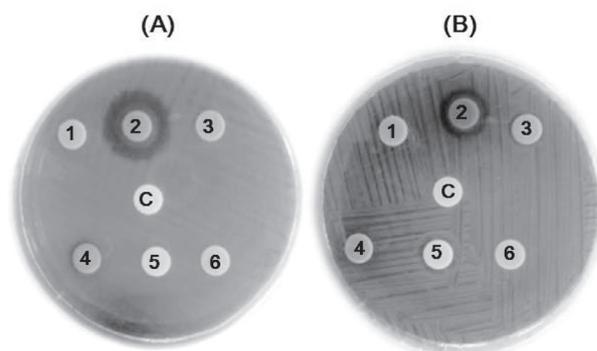


Fig. 1. Antibacterial activity of 80% methanol extracts of several medicinal herbs against *V. ichthyenteri* (A) and *S. iniae* (B). 1. *Aster yomena*, 2. *Rhus javanica*, 3. *Erysimum aurantiacum*, 4. *Rosa multiflora*, 5. *Zea mays*, 6. *Lespedeza cuneata*, C, DMSO as negative control.

## 결과 및 고찰

### 여러 한약재 추출물의 항균활성 탐색

본 연구에 사용한 *V. ichthyenteri* KCTC12725 균주는 원래 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 분리된 어병세균으로 1996년 보고된 표준균주이며, *S. iniae* KCTC3657 균주는 1976년에 보고된 아마존강 담수 돌고래(*Inia geoffrensis*)에서 분리된 beta-hemolysin을 생산하는 병원성 표준균주이다. 어병세균 *V. ichthyenteri*와 *S. iniae*에 대한 19종의 한약재 methanol 추출물의 항균활성을 disc diffusion method로 측정한 결과는 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다. 리기다소나무, 몰약, 포도나무, 현삼 추출물에서 *V. ichthyenteri*에 대한 항균활성이 나타났으며, 개여뀌, 몰약, 붉은대동여뀌, 오배자, 원화, 포도나무, 현삼추출물에서 *S. iniae*에 대해 항균활성을 나타내었다. 이들 중 오배자 추출물에서 *V. ichthyenteri*와 *S. iniae* 모두에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다(Table 1). 이는 오배자 추출물이 *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *S. iniae*에 대해 항균활성을 나타내었다는 보고와 유사한 결과이다(Lee et al., 1997; Choi et al., 2005; Kim et al., 2011).

항균성에서 가장 높은 결과를 보인 오배자 80% methanol 추출물의 각 어병세균에 대한 증식 억제효과를 살펴보기 위해 배양배지에 0, 50 및 100 µg/mL씩을 첨가하여 생육정도를 흡광도를 통해 측정하였다(Fig. 2.). 접종초기부터 배양 30시간까지

Table 3. Antibacterial activities of various fractions from *R. javanica*

Bacteria	Clear zone diameter (mm) <sup>1</sup>				
	80% MeOH <sup>2</sup>	n-Hexane	EtOAc	n-BuOH	H <sub>2</sub> O
<i>V. ichthyenteri</i>	19	13	21	14	10
<i>S. iniae</i>	13	11	16	9	9

<sup>1</sup>Data represent the mean from the results of three experiments.  
<sup>2</sup>MeOH; methanol, EtOAc; ethyl acetate, n-BuOH; n-butanol.

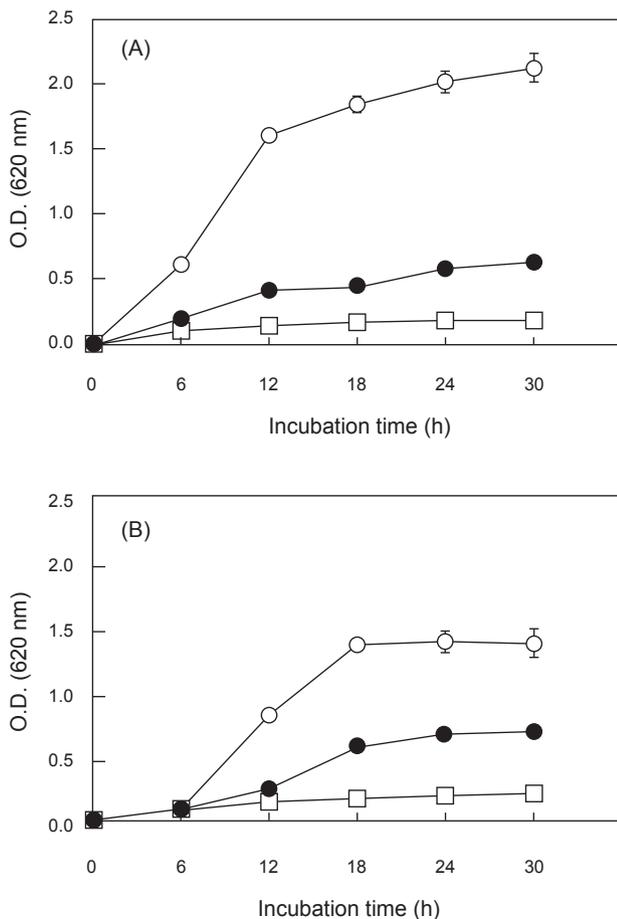


Fig. 2. Effect of methanol extract of *R. javanica* (○; 0 µg/mL, ●; 50 µg/mL, □; 100 µg/mL) on the growth of *V. ichthyenteri* (A) and *S. iniae* (B).

관찰한 결과, *V. ichthyenteri*와 *S. iniae* 모두 100 µg/mL 첨가군에서는 생육이 거의 저지되었다. 50 µg/mL 첨가군에서는 *V. ichthyenteri*의 경우에 약 80% 가량, *S. iniae*의 경우에 약 50% 가량의 생육저지 효과를 나타내어, 오배자 추출물은 *V. ichthyenteri*에 더 효과를 보이는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 배양 30시간까지 지속되었다.

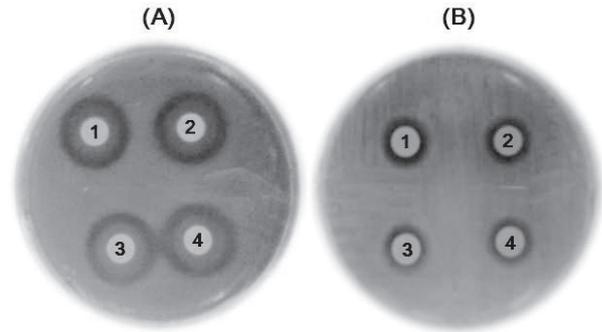


Fig. 3. Effect of heat treatment on antibacterial activities of 80% methanol extract from *R. javanica* against *V. ichthyenteri* (A) and *S. iniae* (B). Each methanol extracts (10 µg/mL) from *R. javanica* was used after no-heat treatment (1), heating at 40°C for 1 h (2), at 60°C for 1 h (3), and at 80°C for 1 h (4).

오배자 80% methanol 추출물의 *V. ichthyenteri*와 *S. iniae*에 대한 최소생육저해농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정된 결과, *V. ichthyenteri*에 대해서는 32 µg/mL, *S. iniae*에 대해서는 128 µg/mL로 나타났다(Table 2). 이 결과는 오배자 추출물을 MIC 농도만큼 사용하였을 경우에 병원성 균주의 성장을 저해시킬 수 있음을 의미하며, *S. iniae*보다는 *V. ichthyenteri*의 경우에 4배 정도 더 효과적으로 활용할 수 있음을 알 수 있다. 이는 Fig. 2의 결과에서 *V. ichthyenteri*가 오배자 추출물에 더 민감하다는 결과와 일치한다. 또한 오배자 methanol 추출물이 *S. aureus*에 대해 60 µg/mL, *Salmonella gallinarum*에 대해 120 µg/mL, 대장균에 대해 80 µg/mL, *E. tarda*에 대해 64 µg/mL이라는 여러 보고들의 MIC 수치들과 유사하거나 약간 강한 활성을 나타내었다(Cho et al., 2003; Choi et al., 2002; Kim et al., 2011). 오배자 methanol 추출물 시료가 정제도가 낮아 활성지표성분이 다른 성분들과 섞여 있는 조추출물임을 감안할 때, 보다 정제되어 단일 물질화 하였을 경우에는 상당히 낮은 농도에서도 *V. ichthyenteri*와 *S. iniae*에 대한 저해능을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

### 오배자 Methanol 추출물의 열 안정성

오배자 80% methanol 추출물의 열 안정성을 조사하기 위해 추출물을 10 mg/mL 농도로 DMSO에 녹이고 heating block에서 40°C, 60°C, 80°C에서 각각 1시간 동안 열처리 한 후 disk diffusion assay를 실시하여 생육 저해환을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 오배자 추출물은 각 처리 온도 별로 추출물의 활성에 변함이 없는 것이 관찰되었으며, 이는 오배자 추출물의 항균활성 성분이 80°C까지의 열에 대해서는 안정함을 의미한다. 열에 안정한 항균활성 성분은 식품, 사료, 첨가물 제조 등 가열 처리가 필수적인 공정한 제품을 제조하는 경우를 포함하여 산업적으로 활용할 경우에 활성성분의 장점으로 적용될 수 있다고 판단된다.

## 오배자 Methanol 추출물의 분획

오배자의 methanol 추출물을 분획여두에서 n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, 그리고 물로 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 각각의 유기용매 가용 분획을 얻었다. 각 분획물의 항균활성을 disk diffusion method에 따라 항균활성을 측정하고 결과 모든 분획에서 어병세균 두 균주에 대해 활성을 나타내었으며, *V. ichthyoenteri*에 대해서는 각 분획물 모두에서 *S. iniae* 보다 높은 활성을 나타내었다. 그 중 ethyl acetate 분획 층에서 두 균주 모두에 대해 가장 높은 활성을 나타내었으며, 같이 비교한 methanol 추출물보다 그 활성이 높게 나타났다(Table 3).

오배자는 진딧물과(Aphidae)에 속하는 곤충에 의해 붉나무와 같은 습나무과(Anacardiaceae)에 형성된 충영으로, 우리나라의 경우 붉나무(*Rhus javanica* L.)에 오배자면충이 기생하여 이루어진 경우가 많다. 전통 한약재로 사용되어 온 오배자는 최근의 일련의 연구에 의해 항산화, 항균, 정장작용, 항암활성 등의 생리활성이 보고되고 있다(Jo et al., 2000). 오배자 추출물은 *S. aureus*와 *Salmonella gallinarum*에 대해 높은 항균활성을 나타내었으며, 열에 대해서도 안정한 결과를 보였다는 보고(Choi et al., 2002)가 있으며, 병원성 녹농균인 *Pseudomonas aeruginosa*와 여드름 원인세균인 *Propionibacterium acnes*에 대해서도 항균활성을 나타내었다는 보고(Cha et al., 2008) 등이 있으나, 구체적인 활성물질을 분리, 동정하고 이를 각 병원성 균주에 대해 항균활성을 측정하고 보고는 드물다. 오배자 추출물을 이용하여 본 실험 결과에서 나타난 *V. ichthyoenteri*와 *S. iniae*에 대한 강한 항균활성은 어병세균을 대상으로 한 점에서 다른 결과와의 차별성을 나타낸다. 오배자의 어병세균에 대한 항균활성 물질을 분리 및 구조동정하고, 어병세균에 대한 항균 활성 메커니즘을 밝히고, 또한 어병세균에 대해 상용되고 있는 항생제와의 병용투여 효과 및 투여 조건 등에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

## 사 사

이 논문은 2012학년도 동의대학교 교내 연구비(과제번호: 2012AA101)에 의하여 수행된 결과로 연구비 지원에 감사 드립니다.

## References

Beuchat IR and Galden DA. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol* 43, 134-139.  
 Cha JY, Ha SE, Sim SM, Park JK, Chung YO, Kim HJ and Park NB. 2008. Antimicrobial effects of ethanol extracts of Korea endemic herb plants. *J Life Sci* 18, 228-233.  
 Choi HS, Kim JS, Jang DS, Yu YB, Kim YC and Lee JS. 2005. Antibacterial activities of *Galla rhois* extracts against fish pathogenic bacteria. *J Fish Pathol* 18, 239-245.  
 Choi I, Chang HS, Yun YM and Um JC. 2002. Antimicrobial activity of medicinal herbs against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella gallinarum*. *Kor J Microbiol Biotechnol* 30,

177-183.  
 Cho JY, Choi I and Hwang EK. 2003. Antimicrobial activity of extracts from medicinal herbs against *Escherichia coli*. *Korea J Vet Res* 43, 625-631.  
 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard-10th ed. CLSI. Wayne, PA, U.S.A., M02-A10.  
 Edward JN. 2000. Fish disease. Diagnosis and treatment. Iowa state university press, Ames, U.S.A., 367.  
 Han JS, Lee JY, Baek NI and Shin DH. 2001. Isolation and antimicrobial action of growth inhibitory substance on food-borne microorganisms from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai. *Korean J Food Sci Technol* 33, 611-618.  
 Heo JH, Jung MH, Cho MH, Kim GH, Lee KC, Kim JH and 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.  
 Jo HC, Han KS and An EY. 2000. Gall formation on different age, habitat, and parasite position in *Rhus javanica* L. *Kor J Med Crop Sci* 8, 304-311.  
 Kang SY. 2005. The antimicrobial compound of *Rhus vernici-flua* barks against fish pathogenic gram-negative bacteria, *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *J Fish Pathol* 18, 27-237.  
 Kim AR, Kim DK, Byun TH, Jo EJ, Lee EW, Kwon HJ, Kim BW, Kim TH, Lee KB and Kim YM. 2011. Antibacterial activity of herbal medicine extracts against *Edwardsiella tarda*. *Korean J Food Preserv* 18, 87-90.  
 Lee BW and Shin DH. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganism. *Kor J Food Sci Technol* 23, 200-204.  
 Lee EW, Chen JC, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T and 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. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.26.266>.  
 Lee MC, Kim GP, Kim SH, Choung NH and Yim MH. 1997. Antimicrobial activity of extract from gall-nut and red-grape husk. *Korean J Food & Nutr* 10, 174-179.  
 Lee SK. 2003. Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* against animal husbandry disease. *Kor J Microbiol Biotechnol* 31, 242-249.  
 Mitscher LA, Park YH and 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.  
 Moon JS, Kim JY, Joh SJ, Kim MJ, Son SW and Jang H. 2009. Influence on efficacy of  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus iniae* vaccine by mixed infections with *Edwardsiella tarda* and *Neoheterobothrium hirame* in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Vet Clin* 26, 226-230.  
 Muroga K. 2001. Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish : A review. *Fish Pathol* 30, 71-85.  
 Treves-Brown KM. 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Academic publishers, Norwell, U.S.A..309.