

< Original Article >

사상자 추출물의 자돈 병원성 대장균 억제 효과

홍선화¹ · 김옥진^{1,2*}

원광대학교 동물자원개발연구센터¹, 원광대학교 식품산업연구원²

The effects of *Torilis fructus* extracts against enteropathogenic *Escherichia coli* in Piglets

Sunhwa Hong¹, Okjin Kim^{1,2*}

¹Center for Animal Resource Development, ²Digestive Disease Research Institute, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

(Received 19 August 2013; revised 2 October 2013; accepted 8 November 2013)

Abstract

The antibiotic chemotherapy produces sometimes side effects and fails to eliminate bacterial infection. The occurrence of strains resistant to antibiotics would be expected to increase, and it is nowadays important to search for non-antibiotic substances. We are aimed to evaluate the effects of *Torilis fructus* extracts against enteropathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) in Piglets. The piglets were divided with three groups; Negative control group, *E. coli*-infected positive control group, and the *Torilis fructus* extracts treated group with *E. coli* infection. During the study period, we compared clinical signs, weight increase rate, fecal scores, gross findings between the treated group and non treated group. After necropsy, necropsy findings and histopathological findings were conducted with the comparison between the groups. As the results of this study, the *Torilis fructus* extracts additive showed the effects on the suppression of *E. coli*-induced lesions. On the basis of this study results, our data suggest that the *Torilis fructus* extracts additive have the antimicrobial effects. The *Torilis fructus* extracts additive could be used as the alternative material for antimicrobial feed additives.

Key words : Antibiotic, Antibacterial, Antimicrobial, *E. coli*, *Torilis fructus*

서론

항생제의 사용은 자주 부작용과 항생제 내성 균주의 출현 문제를 야기하고 있다(Buenz 등, 2007). 항생제의 과다 사용에 의한 내성균의 출현은 증가 추세에 있으며 이로 인하여 새로운 항생제의 개발에 대한 필요성이 크게 대두되고 있다(Liu 등, 2007). 또한 축산업이 집단사육 형태로 대규모화 되어감에 따라 병원체의 감염에 의한 집단 발병의 위험성은 더욱더 높아지게 되었으며 이에 따라 질병을 예방 치료하기 위한 치료약제의 집중적인 사용이 증가하고 있다(Anadon

과 Martinez-Larranaga, 1999). 새로운 항생제의 개발 분야에서 크게 각광을 받고 있는 것으로 기존 화합물에 기초한 항생제와 연관 관계가 먼 천연물 유래의 안전한 항생 물질이 있으며 천연물은 화합물 보다 다양성이 크고 안전하여 천연물 유래 항생 물질의 사용은 높은 안전성과 항생제 내성 문제의 해결 측면에서 큰 장점을 가지고 있다(Koehn과 Carter, 2005).

양돈 산업에서 항생제의 사용은 질병의 예방 및 치료 목적으로 통상적으로 사용되고 있으며 식육 잔류에 의한 인체 항생제 섭취로 인한 항생제 내성 문제가 공중보건학적 측면에서 매우 중요한 문제로 대두되고 있는 실정이다(Deen 등, 2001). 항생제 첨가에 의한 돼지 질병의 예방 및 증체에 대한 기대 효과 때

*Corresponding author: Okjin Kim, Tel. +82-63-850-6668, Fax. +82-63-850-7308, E-mail. kimoj@wku.ac.kr

문에 그 동안 축산 농가의 항생제 사용을 줄이기 힘들었지만 현재 전 세계적으로 항생제의 식육 잔류에 의한 인체 섭취로 인한 항생제 내성 균주의 출현 증가 등의 공중보건학적인 문제로 인하여 양돈 산업에서 항생제 사용에 대한 규제가 이루어지고 있다 (Smith, 1999). 이처럼 가축에 항생제의 사용에 대한 우려는 식육에 잔류하는 항생제의 의한 항생제 내성균 출현 문제이며, 이러한 이유 때문에 항생제 대체 물질에 대한 관심이 고조되고 있는 현실이다 (Van Loo 등, 2007). 사상자(*Torilis fructus*)는 미나리과의 두해살이 풀인 사상 (*Torilis japonica*)의 열매로, 맵고 쓰며 따뜻한 성질이 있고 독이 없다고 알려져 있다. 한의학에서는 열매를 말려 만든 생약을 사상자라 부르며, 한국, 일본, 중국, 대만, 인도, 미얀마 등지에서 분포하고, 약리효과로는 항원충작용, 성호르몬 유사 작용과 항알레르기 작용 등이 있고, 수렴성 소염약으로 가려움증 등에 효과가 있으며, 사상자의 주요성분은 토릴린(torilin), 토릴로론(torilolone) 등의 세스퀴테르펜(sesquiterpene)계 화합물이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있으나 (Lee 등, 2006), 양돈에서 병원성 대장균 억제 효과에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

본 연구는 국내 양돈 산업에 막대한 경제적 손실을 끼치는 병원성 대장균에 대한 사상자 추출물의 억제 효과를 알아보려고 수행되었다.

재료 및 방법

시험물질 제조

본 연구에서 사용된 사상자 추출물은 전북 익산시 대학한약국에서 구입한 사상자를 자연 건조시킨 후 잘게 세절하여, 건조된 사상자 1 kg에 증류수 10 L를 가하여 100°C에서 3시간 동안 가열하는 것을 3회 반복한 후, 진공 여과하여 여액을 얻고, 여과액을 감압 농축(EYELA사, N-1000, 일본)하여 사상자 추출물 126 g을 수득하여 사용하였다. 본 연구의 시험재료로 사용된 사상자 추출물은 열수 추출방법에 의해 제조되었으며 12.6%의 수득율(yield)을 보였다.

공시동물 및 시료

1주령의 랜드레이스 잡종 돼지를 전라축산(전북 익산시)에서 20두 구입하여 시험에 사용하였다. 공시

동물을 구입한 농장은 구입 전까지 바이러스 설사증이 발생하지 않은 것으로 확인되었다. 공시동물은 원광대학교 동물자원개발연구센터에 도입하여 동물사육시설에서 2일간 순화 사육하여 질병이 없고 외관상 건강한 돼지를 선별하여 군 구성을 하였고, 군 구성 시 체중 평균은 3.35 kg으로 군 간 차이 없이 유사하게 분류하였다. 공시동물의 먹이는 전라축산에서 제공한 항생제가 첨가되지 않은 신생자돈용 전용 분유를 급여하였다. Group I은 병원성 *E. coli* 감염 없이 사상자 추출물 급여도 없는 음성대조군이고, Group II는 사상자 추출물 급여 없이 병원성 *E. coli* 감염만 있는 양성대조군, Group III은 병원성 *E. coli* 감염 후 사상자 추출물을 사료에 0.5% 급여한 고용량군으로 각 군에 5두씩으로 분류하여 실험을 수행하였다. 실험은 원광대학교 동물자원개발연구센터 동물사육사에서 사육하며 시험을 수행하였으며 실험 기간 동안 실내온도 24±4°C의 온도와 동일한 환경이 적용될 수 있도록 하였다. 실험은 원광대학교 동물실험윤리위원회의 실험계획 평가 후 승인 과정을 거쳤으며 실험 과정 및 종료까지 원광대학교 동물실험윤리 지침을 준수하며 수행되었다.

병원성 *E. coli* 배양액 및 시험물질

시험에 사용된 병원성 *E. coli* F44 strain은 서울대학교 수의과대학에서 설사 자돈으로부터 분리한 야외 분리주를 분양 받아 brain heart infusion broth에 37°C로 배양하여 사용하였다. 시험개시 일에 *E. coli* F44 배양액을 1×10⁹ CFU/mL의 역가로 20 mL씩을 Group II, III 군의 동물들에 Lee 등(2008)의 방법을 이용하여 각각 카테타를 사용하여 위내 접종하였다. Group I의 동물들에는 대조를 위하여 brain heart infusion broth 배지를 20 mL씩 카테타를 이용하여 위내 접종하였다. 시험물질 사상자 추출물은 *E. coli* F44 접종 후 Group III 군의 동물들에게 시험기간 동안 사료에 0.5%로 배합하여 급여하였다.

임상증상 및 분변상태 평가

사상자 추출물의 효능은 *E. coli* F44 strain 배양액 투여 후 14일 동안 공시동물의 폐사, 체중, 임상증상 그리고 분변의 이상 유무를 관찰하여 평가 기록지에 특히 사항을 기록하였다. 또한 시험기간 동안 매일 육안 상태 및 분변의 상태를 관찰하여 점수화하여 육

안점수 및 분변점수를 주고 시험 종료 후 구간 차이를 비교하였다. 육안점수는 시험 진행 과정 동안에 매일 육안 상태를 관찰하고 각 개체의 육안점수를 기록하고 각 군의 평균 및 표준편차를 구하였으며 육안 점수는 “0; 건강, 1; 운동 상태 감소 및 피부상태 거침, 2; 침울 및 수척, 3; 폐사”로 하였다. 분변점수는 시험 진행 과정 동안에 매일 분변 상태를 관찰하고 각 개체의 분변점수를 기록하고 각 군의 평균 및 표준편차를 구하였다. 분변 점수는 “0; 정상, 1; 연변, 2; 설사, 3; 폐사”로 하였다(Lee 등, 2008).

혈액검사 및 병리조직학적 검사

시험 종료 시 혈액을 heparin tube에 채혈하여 혈구 수 검사를 수행하였다. 이 후 공시동물을 xylazin (바 이엘동물약품, 한국)으로 마취 후 전기충격으로 안락 사하고 부검을 실시하여 소장의 육안 병변을 관찰하였다. 또한 병리조직학적 검사를 위하여 적출된 소장은 생리식염수로 세척한 후 10% 중성 포르말린에서 24시간 이상 고정하였다. 소장은 개체당 각각의 장기에서 3개 부위를 선정하였고, 이 때 선별된 부위들은 다른 개체들 간에 서로 동일한 부위가 되도록 주의하여 선정하였다. 선정된 부위들의 조직들은 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀 포매한 후, 4 µm 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 후 병리조직학적인 검사를 수행하였다. 병리조직검사는 샘플 위치에 따른 변수를 줄이고자 한 개체 당 9개 소장 부위를 각각 제작하여 검사하였다. 병리조직검사는 각 병변의 상태에 따라 점수화 하여 9개 조직의 점수의 합으로 개체 점수를 매긴 후 각 군의 평균 및 표준편차를 구하였다. 병리조직 점수는 “0 정상, 1 장상피층에 염증세포 침윤, 2 소장용모상피 괴사 및 궤양, 3 폐사”로 하였다(Lee 등, 2008).

통계학적 분석

얻어진 모든 실험결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성 검정은 SPSS v. 12 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 ANOVA (one-way analysis of variance test)로 분석하였으며, Duncan 사후검정을 실시하여 P<0.05 이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 판단되었다.

결 과

폐사율 및 체중증감

시험 기간 동안 공시동물의 폐사는 발생하지 않았다. 공격시험 동안에 각 군의 평균 체중 및 표준편차는 Table 1과 같았다. 도입 시 구간 체중의 평균은 유사 하였으나, E. coli 접종 후 체중변화는 14일 동안의 관찰기간동안의 체중 증감에 있어 모두 구간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

육안점수

시험 진행 과정 동안에 매일 육안 상태를 관찰하고 각 개체의 육안점수를 기록하고 각 군의 평균 및 표준편차를 구하였다(Table 2). E. coli 접종 후 II군의 개체들은 심한 설사와 운동감소, 침울 및 쇠약 등의 육안 소견이 관찰되었으며, I 군 및 III 군의 동물들보다 육안점수가 높은 것을 알 수 있었다. 시험 종료 일에 부검 후 육안병변을 관찰한 결과, 병원성 대장균에 감염된 양성 대조군 II군의 돼지들은 소장혈관이 확장되고 충혈된 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A). 반면 대장균 감염을 시킨 후 사상자 추출물을 적용한 III군의 돼지들은 소장에 유의한 소견이 관찰되지 않았으며 정상 소견을 보였다(Fig. 1B).

Table 1. Body weight changes of pathogenic *E.coli* therapeutic efficacy test with *Torilidis fructus* extracts in piglets (gram)

Group	<i>E. coli</i>	Treatment	D0	D2	D4	D6	D8	D10	D12	D14
I	No	No	3,320±469.84	3,680±539.21	3,840±559.46	4,160±551.59	3,940±549.32	4,420±490.66	4,730±661.06	4,680±672.31
II	Yes	No	3,430±402.49	3,620±500.75	3,690±476.18	4,030±430.9	3,870±397.81	4,237.5±325.00	4,575±457.35	4,475±478.71
III	Yes	Yes	3,350±659.55	3,620±718.16	3,820±696.96	4,090±674.91	3,930±617.05	4,230±783.90	4,460±766.81	4,440±792.46

Group I: Normal control, Group II: *E. coli*, Group III: *E. coli* + *Torilidis fructus*.

Table 2. Gross score changes of pathogenic *E. coli* therapeutic efficacy test with *Torilidis fructus* extracts in piglets

Group	Inoculation		Gross score							
	<i>E. coli</i>	Treatment	D0	D2	D4	D6	D8	D10	D12	D14
I	No	No	0	0	0.2±0.45	0.2±0.45	0	0	0	0
II	Yes	No	0	0	0	0	0	0.4±0.89	0.6±1.34	0.6±1.34
III	Yes	Yes	0	0	0	0	0	0.2±0.45	0.2±0.55	0.4±0.55

*Group I: Normal control, Group II: *E. coli*, Group III: *E. coli* + *Torilidis fructus*.

Table 3. Stool scores of studied animals

Group ^a	D0	D2	D4	D6	D8	D10	D12	D14
I	0	0*	0*	0*	0*	0.2±0.45*	0*	0*
II	0	2.8±0.45	2.6±0.55	2.6±0.55	2.8±0.45	2.2±0.45	1.8±0.45	1.6±0.84
III	0	0.8±0.84*	1.0±0.71*	0.8±0.45*	0.8±0.45*	0.6±0.55*	0.6±0.55*	0.6±0.55*

Stool scores: 0; normal, 1; soft stool, 2; diarrhea, 3; death.

^aGroup I: Normal control, Group II: *E. coli*, Group III: *E. coli* + *Torilidis fructus*.

*Significant difference at $P < 0.01$ level compared with positive control group (Group II).

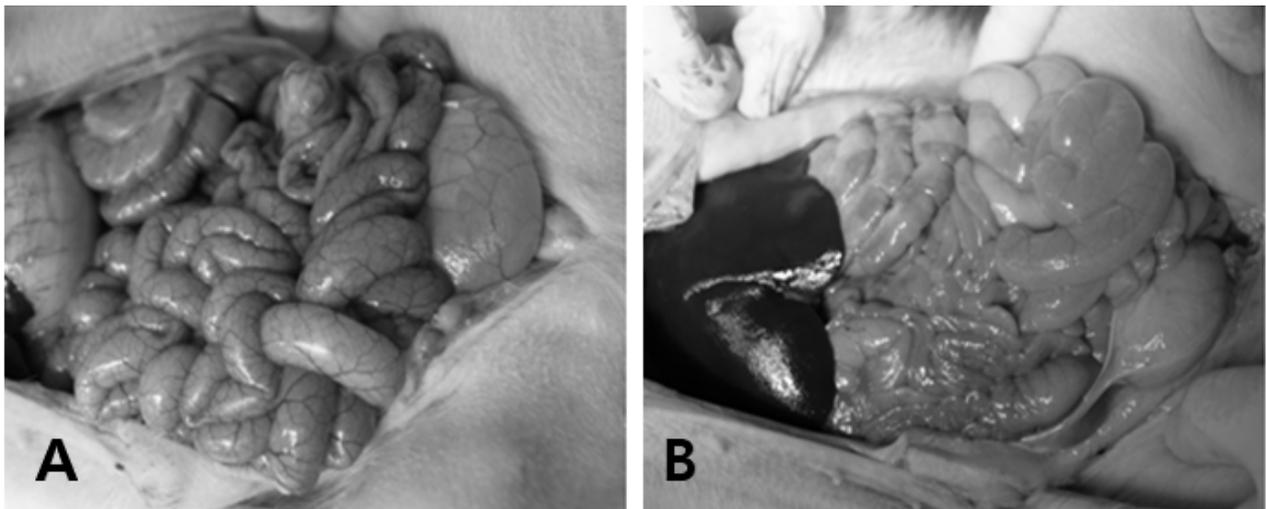


Fig. 1. Gross findings of the intestines of studied animals. (A) Group II: pathogenic *E. coli* infected pig, (B) Group III: pathogenic *E. coli* + *Torilidis fructus*.

분변점수

시험 진행 과정 동안에 매일 분변 상태를 관찰하고 각 개체의 분변점수를 기록하고 각 군의 평균 및 표준편차를 구하였다. 시험기간 동안 평가된 각 군의 분변점수의 평균 및 표준편차는 Table 3과 같았다. *E. coli* 접종 후 II군의 개체들은 심한 설사를 보여 분변 점수가 높은 반면, *E. coli* 감염 후 사상자 추출물을 사료에 0.5% 급여한 III군의 개체들에서는 분변 점수가 II군과 비교하여 유의하게 낮은 것을 알 수 있었다.

혈액검사 결과

E. coli 접종 후 14일되는 시점에서 각 군의 개체들을 xylazin (바이엘동물약품, 한국)으로 마취한 후 혈액을 채혈하여 혈구수를 측정하고 각 군의 평균 및 표준편차를 구한 결과는 Table 4와 같았다. 검사 결과 혈구수의 유의한 변화는 시험 군간 공시동물에서 찾아볼 수 없었다.

Table 4. Results of blood analysis of pathogenic *E. coli* therapeutic efficacy test with *Torilitis fructus* extracts in piglets

Group	RBC	Hb (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT	WBC	WBC Differential Counting (%)				
				MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)			Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils	Basophils
I	5.02±1.54	10.32±3.09	22.68±6.85	45.36±2.08	20.66±0.67	45.25±1.08	373.80±198.93	7.64±1.89	3.80±2.27	2.52±1.08	0.49±0.43	0.80±0.74	0.03±0.01
II	4.74±0.88	9.63±1.64	21.53±3.54	45.68±2.42	20.38±0.51	44.70±1.98	394.25±267.42	10.61±4.55	6.26±2.48	2.54±0.97	0.57±0.53	1.22±1.39	0.03±0.02
III	5.45±0.96	10.68±1.49	24.64±4.56	45.10±2.10	19.84±2.72	43.90±5.36	678.00±403.41	20.86±4.24	11.47±5.17	4.38±1.59	0.62±0.26	4.31±3.46	0.09±0.05

*Group I: Normal control, Group II: *E. coli*, Group III: *E. coli* + *Torilitis fructus*.

병리조직검사 결과

소장의 병리조직학적 검사결과, 각 군의 병리조직학적 점수는 Table 5와 같았다. *E. coli*를 단독 투여한 II군 개체들에서는 소장 장상피세포의 심한 위축병변과 점막에 염증세포 침윤이 관찰되어 병리조직학적 점수가 높았다(Fig. 2A). *E. coli* 감염 후 사상자 추출물을 사료에 0.5% 급여한 III군의 개체들의 소장은 정상에 가까운 소견을 보여 병리조직학적 점수가 II군과 비교하여 유의하게 낮은 것을 알 수 있었다(Fig. 2B).

고 찰

최근 축산업이 집단 사육 형태로 대규모화 되어감에 따라 운영과 관리면에서는 효율성을 높일 수 있게 되었으나 질병 원인체에 노출될 가능성과 질병전파의 위험성은 더욱 높아지게 되었으며 이에 따라 질병을 예방 치료하기 위한 치료약제의 집중적인 사용이 증가하고 있다(Blendinger, 1997). 동물에 사용되는 항생제는 가축의 경우에 사료 첨가제의 형태로 일상적으로 다량 사용되고 있어 항생제의 식육 잔류 문제와 인체 섭취에 의한 항생제 내성 세균의 증가 문제를 야기하여 공중보건학적 문제에 대한 우려가 증가하고 있는 현실이다(Cromwell, 2001; Deen 등, 2001). 항생제 사용에 의한 질병 예방 효과와 체중 증체에 대한 이점은 축산 농가에서 수익과 직결되기 때문에 항생제 규제에 의한 축산 농가의 경제적 손실과 질병 발생의 증가 부분에 대한 문제는 해결되어야 할 문제이다(Elliott, 2001). 이러한 이유로 항생제 대체 물질의 개발 필요성이 대두되고 있으며 향후 항생제 규제 법안과 소비자의 무항생제 축산물에 대한 선호도 때문에 양돈산업에서도 항생제 사료첨가제를 대체할 수 있는 물질의 개발 필요성이 늘어나고 있다(Van Loo, 2007). 이러한 질병감염의 위험성을 배제하기 위하여 주요 가축질병의 예방을 위한 백신개발 및 백신 프로그램작성, 항균제의 사료첨가제에 의한 사전 감염차단은 물론, 초기 감염 시 감수성 높은 항균제 선발에 의한 적절한 치료 대책 수립 등 다양한 방법이 나오고 있으며, 항균제 내성균이 사람에게 전파되지 않는 안전축산물을 생산하기 위해서 항생제 사용에 대한 적절한 기준 설정이 필요하다(Blendinger, 1997). 그러나, 이러한 질병예방과 치료를 위한 방법 중에서

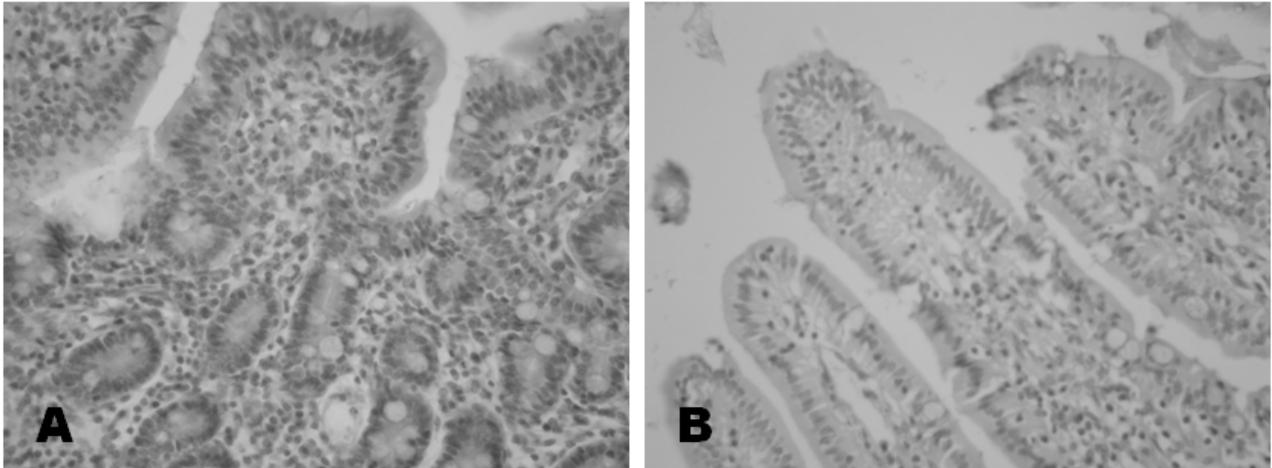


Fig. 2. Histopathological findings of small intestine. H&E stain, $\times 100$, (A) Group II: pathogenic *E. coli* infected pig, (B) Group III: pathogenic *E. coli* + *Torilidis fructus*.

Table 5. Histopathological scores of the small intestines of studied animals

Group	Treatment	Histopathological scores
I	Negative control	1.2 \pm 0.84*
II	<i>E. coli</i>	15.6 \pm 0.89
III	<i>E. coli</i> + <i>Torilidis fructus</i>	5.8 \pm 1.64*

*Significant difference at $P < 0.01$ level compared with positive control group (Group II).

백신의 이용은 포괄적인 질병방어 보다는 제한된 특정질병 원인체에 대해서만 소기 성과를 기대할 수 있을 뿐만 아니라 병원성이 높은 미생물의 감염 시에는 그나마 기대에도 미치지 못하는 결과를 가져오게 된다(Bonneau과 Laarveld, 1999). 항균성 약제에 의한 질병 예방 및 치료는 일시적인 효과는 있으나 근본적이고 종합적인 질병방제를 이루기에는 매우 미흡하며, 무분별한 약제의 남용은 추후 더욱 강력한 항균제를 필요로 하게 되고 결과적으로는 내성균의 만연으로 인하여 질병의 확산 및 난치성 질병을 유발할 수 있다는 점에서 신중을 기하여야 할 방법이다(Anadon과 Martines-Larrananga, 1999). 현재 항생제 내성 및 다제 내성 세균의 증가로 치료가 어려운 경우가 많아졌으며, 앞으로 세균감염 치료가 더욱 어려워질 것으로 세계적인 전문가들이 예측하고 있다(Kunin, 1993). 이에 따라 다제내성균에 대하여 항균효과를 가지는 새로운 항생물질의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 학

계와 산업계에서는 새로운 항생물질인 천연항생제 개발에 많은 노력을 기울이고 있다(Lim 등, 2002). 돼지는 축산 산업에서 가장 큰 분야를 차지하고 있는 주요 축종으로, 각종 병원체 감염에 의해 막대한 경제 손실을 입는 것으로 보고되고 병원성 대장균은 양돈 산업에 막대한 손실을 끼치는 대표적인 병원체로 알려져 있다.

결론

사상자는 산형과에 속하는 사상(*Torilis japonica*)의 과실로써 식품공전 상에 식품부원료로 분류되어 있으며, 습창, 완선, 음중, 옴 등의 피부 질환에 유효하다고 알려져 있다(Lee 등, 2006). 본 연구 결과 천연물질인 사상자 추출물은 병원성 대장균에 감염된 자돈의 병변을 효과적으로 경감시키는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 부터 천연물질인 사상자 추출물이 양돈용 사료첨가제로 개발될 수 있을 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 2013 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Anadon A, Martinez-Larranaga MR. 1999. Residues of antimicrobial drug and feed additives in animal products. Regulatory aspects. *Livest Prod Sci* 59: 183-198.
- Blendinger K. 1997. Hormonal state and effects of the use of an antiprogestin in bitches with pyometra. *J Reprod Fertil Suppl* 51: 317-325.
- Bonneau M, L.aarveld B. 1999. Biotechnology in animal nutrition, physiology and health. *Livest Prod Sci* 59: 223-241.
- Buenz EJ, Bauer BA, Schnepfle DJ, Wahner-Roedler DL, Vandell AG, Howe CL. 2007. A randomized Phase I study of *Atuna racemosa*: a potential new anti-MRSA natural product extract. *J Ethnopharmacol* 114: 371-376.
- Cromwell GL. 2001. Antimicrobial and promicrobial agents. p. 401. In: Lewis A, Southern L(ed.). *Swine Nutrition*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Deen J, Dee S, Morrison, RB, Radostits M. 2001. Health and production management in swine herds. pp. 635-764. In: Radostits OM(ed.). *Herd Health: Food animal Production Medicine* 3th ed. Saunders Co., W.B., Philadelphia.
- Koehn FE, Carter GT. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4: 206-220.
- Kunin CM. 1993. Resistance to antimicrobial drugs-a worldwide calamity. *Ann Intern Med* 118: 557-561.
- Lee GH, Kang SS, An WG, Lee YS, Kwon YK, Shin SW. 2006. Comparison of immune promotion effects of water-extracted *angelicae gigantis*, *Rehamanniae radix*, *Paeoniae japonica* and *Polygoni multiflori radix*. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 20: 1507-1515.
- Lee HA, Hong SH, Bok NH, Kim BK, Kim MS, Park H, Kim YC, Kim OJ. 2008. Antiviral Effect of Natural Herb Extract WK01 and WK02 against Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *J Life Sci Nat Res* 30: 61-71.
- Lim TH, Lee JM, Chang, Cha BJ. 2002. Antifungal activity and identification of an Actinomycetes strain isolated from mummified peaches. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 28: 161-166.
- Liu CS, Cham TM, Yang CH, Chang HW, Chen CH, Chuang LY. 2007. Antibacterial properties of Chinese herbal medicines against nosocomial antibiotic resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan. *Am J Chin Med* 35: 1047-1060.
- Seo SY, Pang JY, Li RH, Kwon J, Ahn MS, Eun JS. 2009. Effects of the combined extracts of *Glycine max* Merr. and *Glycyrrhiza uralensis* on the activity of murine splenocytes and macrophages. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 23: 1385-1391.
- Sim JG, Lee JH, Shin TY, Shin HY, Jeong SH, Kim MH, Ku HJ, Park JS. 2010. Anti-inflammatory effects of vegetable soup in murine macrophage RQW 264.7 cells. *J Korea Soc Food Sci Nutr* 39: 1097-1101.
- Van LI, Huijdsens X, Tiemersma E, De NA, Van de SN, Beaujean D, Voss A, Kluytmans J. 2007. Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Animal Origin in Humans. *Emerg Infect Dis* 13: 1834-1839.