KFAS 한국수산과학회지 Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences
한수지 49(5), 678-682, 2016

Note
Korean J Fish Aquat Sci 49(5),678-682,2016

희렴(*Siegesbeckia pubescens*) 추출물의 어병세균 *Streptococcus iniae*에 대한 항균활성

최보라 · 조은지 · 이명진 · 이승현 · 김채은 · 오세영 · 김경훈[1] · 정창화[1] · 임은서[2] · 김태훈[3] · 이은우*

동의대학교 생명응용학과, [1](주)제이엔에스텍, [2]동명대학교 식품영양학과, [3]대구대학교 식품공학과

Antibacterial Effect of *Siegesbeckia pubescens* Extract against Fish Pathogenic *Streptococcus iniae*

Bo La Choi, Eun-Ji Cho, Myeong Jin Lee, Seong Hyun Lee, Chae Eun Kim, Se Young Oh, Kyoung-Hoon Kim[1], Chang Hwa Jeong[1], Eun Seo Lim[2], Tae Hoon Kim[3] and Eun-Woo Lee*

Department of Life Science and Biotechnology, Dong-eui University, Busan 47340, Korea
[1]JNS Tech Co., Busan 46717, Korea
[2]Department of Food Science and Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520 Korea
[3]Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University, Daegu 42400, Korea

Antibacterial activity of 80% methanol extract from 13 commercial herb medicines was measured against fish pathogens *Streptococcus iniae*, causing several diseases in various kind of fish. *Siegesbeckia pubescens* showed the strongest antibacterial activity against *S. iniae*. Methanol extract of *S. pubescens* was further extracted using several organic solvents having different polarity. Extract from n-hexane and ethyl acetate fraction showed strong activity. Minimal inhibitory concentration, MIC of *S. pubescens* extract was measured and resulted showing 8 μg/mL with n-hexane fraction and 32 μg/mL with ethyl acetate fraction against *S. iniae*. The growth of *S. iniae* was fully inhibited by adding 50 μg/mL (final concentration) of n-hexane or ethyl acetate fraction in the liquid media. It is needed that, from these results, purification and isolation of responsible active compound(s) of these activities and further study on the synergy effect using combination with commercial antibiotics against fish pathogenic bacteria.

Key words: *Siegesbeckia pubescens,* Antibacterial activity, *Streptococcus iniae*

서 론

대량생산화 및 고도화되고 있는 우리나라의 어류양식산업은 연안의 환경오염, 고밀도양식 및 수질관리의 어려움 등으로 인해 다양한 세균성 질병이 빈번하게 발생하고 있다(Kim et al., 2011). 양식 어류에 발생하는 주요 세균성 질병은 어종에 따라 차이는 있지만 주로 활주세균증, 에드와드병, 비브리오증, 연쇄구균증, 장관백탁증 등이 알려져 있다(Edward, 2000). *Edwardsiella tarda*와 함께 우리나라의 대표적 양식어종인 넙치에서 발병이 자주 보고되고 있는 *Streptococcus iniae* 는 넙치, 무지개송어, 틸라피아 등 다양한 어종에서 베타 용혈성 연쇄구균증을 유발하는 전염성 어병세균으로 병원성이 강하며, 이로 인한 경제적 손실 또한 크다. 이 세균에 감염된 넙치는 체색이상, 안구백탁, 출혈, 복부팽만, 신장비대 및 폐사를 일으킨다(Moon et al., 2009). *S. iniae*는 인간의 혈액, 소변과 피부 등에서도 발견되며, 인간에 있어서도 치사에 이를 수 있는 감염증을 매개하는 동물매개 질병의 원인 세균으로도 인식되고 있다(Lahav et al., 2004; Erfanmanesh et al., 2012).

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).

식물성 천연 생약재는 alkaloids, flavonoids, terpenoids, phenolic compounds, quinones 및 volatile oils 등의 이차 대사산

http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0678

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licens (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 49(5) 678-682, October 2016

Received 26 August 2016; **Accepted** 26 September 2016

***Corresponding author:** Tel: +82. 51. 890. 1537 Fax: +82. 505. 182. 6871

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

Copyright © 2016 The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

물이나 그 유도체들이 각종 질병치료에 예로부터 사용되어 왔으며, 이러한 천연물 유래의 생리활성물질이 여러 가지 세균에 대해 항균활성을 나타낸다고 보고되고 있다(Mitscher et al., 1980; Lee and Shin, 1991; Kang et al., 2010). 여러 나라에서는 예로부터 이용되어 왔던 여러 한약재의 약리작용, 특히 항균효과에 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 and Galden, 1989; Han et al., 2001; Lee, 2003). 이러한 천연물 유래 항균물질은 항생제나 합성 화학요법제에 비해 생체 안전성이 높고, 새로운 구조나 기작의 발견 가능성에 의해 내성세균에 대한 출현 우려가 적다는 장점이 알려져 있다(Cho et al., 2003). 그러나 이러한 천연항균 물질의 항균효과는 합성된 항생제에 비해 같은 용량에서 효과가 뛰어나지 않기 때문에 아직까지 실용화되는 경우는 많지 않은 실정이다.

희렴(*Siegesbeckia pubescens*)은 희첨, 시첨, 저고 또는 진득찰이라고도 불리는 국화과 식물 또는 이의 전초를 건조시킨 한약재를 지칭한다. 호랑이나 개에게 물린 상처를 치료할 때 사용된다 하여 호고 또는 구고라고 불리기도 한다. 전통적으로 한방에서는 관절염, 사지동통마비, 종기, 발진, 피부가려움증, 습진 등에 쓰인다(Park et al., 2013). 희렴은 항염증, 상처치료, 항혈전 등의 생리활성이 알려져 있으며, 항세균활성으로는 *Bacillus cereus* (Jun et al., 2013)와 *Staphylococcus aureus* (Choi et al., 2006) 등에 활성이 있는 것으로 보고되어 있다. 그러나 희렴의 항균활성 중에서 어병세균, 특히 *S. iniae*에 대한 연구결과는 아직 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 주요 어병세균인 *S. iniae*에 대해 시판 한약재 추출물 13종의 항균활성을 검색하였고, 이중에서 활성이 높은 희렴 추출물로부터 항균활성을 확인함으로써 양식현장에서의 항생제를 대체하거나 그 사용량을 감소시킬 수 있는 어류 질병 치료 및 예방 약제로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 재료

항균활성 대상균주인 *Streptococcus iniae* KCTC 3657는 Korean Collection for Type Cultures (KCTC, Korea)에서 구입하여 Brain Heart Infusion broth (Difco Co., USA)에서 배양하며 실험에 사용하였다.

한약재는 시중에서 유통되고 있는 것으로 대한생약제품(주)로부터 구입하여 사용하였다. 사용 한약재의 일반명과 학명은 다음과 같으며, 요약한 내용은 Table 1에 나타내었다. 괄루인(*Trichosanthes kirilowii*), 대황(*Rheum officinale*), 백출(*Atractylodes macrocephala*), 연자육(*Nelumbo nucifera*), 인진호(*Artemisia capillaris*), 하고초(*Prunella vulgaris*), 해동피(*Kalopanax septemlobus*), 해조(*Sargassum fusiforme*), 현초(*Geranium thunbergii*), 홍화자(*Carthamus tinctorius*), 화피(*Prunus yedoensis*), 회향(*Foeniculum vulgare*), 희렴(*Siegesbeckia pubescens*)

Table 1. Growth inhibiting activities of medicinal herb extracts against *Streptococcus iniae*[1]

Scientific name	Used part	Activity[2]
Trichosanthes kirilowii	seeds	-
Rheum officinale	roots	-
Atractylodes macrocephala	roots	+
Nelumbo nucifera	seeds	-
Artemisia capillaris	aerial part	++
Prunella vulgaris	stem	+
Kalopanax septemlobus	bark	-
Sargassum fusiforme	whole plant	-
Geranium thunbergii	aerial part	+
Carthamus tinctorius	berry	-
Prunus yedoensis	bark	-
Foeniculum vulgare	berry	+
Siegesbeckia pubescens	aerial part	+++

[1]Data represent the mean from the results of three experiments.
[2]Diameter of inhibition zone (-:8-10 mm, +:10-14 mm, ++:14-18 mm, +++:>18 mm).

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 달리하는 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 측정

항균활성은 Clinical and Laboratory Standards Institute

(CLSI, 2009)의 표준방법에 따라 disk diffusion method를 사용하여 측정하였다. 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 µL씩 흡수시켜 37℃의 incubator에서 18시간 배양 후 paper disc 주위의 생육저해환의 크기를 측정하였다.

추출물의 각 어병세균에 대한 액체배지 상의 증식 억제효과는 배양배지에 추출물을 0, 50 및 100 µg/mL씩을 첨가하고 37℃에서 진탕배양하면서 배양 0시간부터 24시간까지 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 관찰하였다.

최소생육저해농도 측정

추출물의 최소생육저해 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.

결과 및 고찰

여러 한약재 추출물의 항균활성 탐색

본 연구에서는 1976년에 아마존강 담수 돌고래(*Inia geoffrensis*)에서 분리되어 보고된 beta-hemolysin을 생산하는 *S. iniae* KCTC3657 병원성 표준균주를 사용하였다. *S. iniae*는 해수와 담수의 다양한 어류에서 발견되는 그람 양성의 병원성 어병세균으로, 최근에는 사람에서도 기회감염을 일으킬 수 있는 것으로 알려지고 있다(Wang et al., 2016). *S. iniae*에 대한 13종의 한약재 methanol 추출물의 항균활성을 disc diffusion method로 측정하고 생육 저해환의 크기가 10 mm이상인 경우를 활성이 있다고 판단하였으며, 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 백출(*Atractylodes macrocephala*), 인진호(*Artemisia capillaris*), 하고초(*Prunella vulgaris*), 현초(*Geranium thunbergii*), 회향(*Foeniculum vulgare*), 희렴(*Siegesbeckia pubescens*)의 추출물에서 항균활성을 나타내었으며, 이중 희렴 추출물에서 *S. iniae*에 대해 가장 높은 항균활성을 나타내었다(Table 1). 활성을 나타낸 6가지의 한약재 추출물은 모두 *S. iniae*에 대한 항균활성이 아직 보고되어 있지 않았으며, 하고초와 희렴의 methanol 추출물이 *Staphyloccus aureus*에 대해 항균활성을 나타내었다는 보고(Choi et al., 2006)와 *Bacillus cereus*에 희렴 추출물이 항균활성을 보였다는 보고(Jun et al., 2013) 정도가 있었다.

희렴 methanol 추출물의 분획 및 항균활성

희렴의 methanol 추출물을 분획여두에서 n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, 그리고 물로 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 각각의 유기용매 가용 분획을 얻었다(Fig. 1). 각 분획물의 항균활성은 disk diffusion method에 따라 측정한 결과를 Table 2에 사진과 함께 표기하였으며, n-hexane과 ethyl acetate

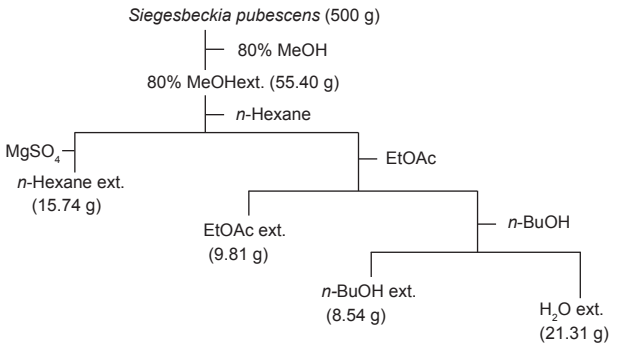
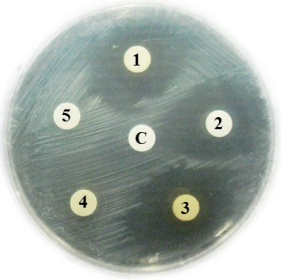


Fig. 1. Isolation scheme for antibacterial substances from *Siegesbeckia pubescens*. MeOH, methanol; EtOAc, ethyl acetate; n-BuOH, n-buthanol; H_2O, water.

Table 2. Antibacterial activities of various fractions from *Siegesbeckia pubescens* against *Streptococcus iniae*

Bacteria	Clear zone diameter (mm)[1]	Disk diffusion assay[2]
80% MeOH	23±2	
n-Hexane	28±2	
EtOAc	28±4	
n-BuOH	8±1	
H_2O	8±1	

[1] Data represent the mean from the results of three experiments. [2]1. 80% MeOH, methyl alcohol; 2. n-Hexane, normal hexane; 3. EtOAc, ethyl acetate; 4. n-BuOH, normal buthanol; 5. H_2O, water; C, DMSO, dimethyl sulfoxide as control

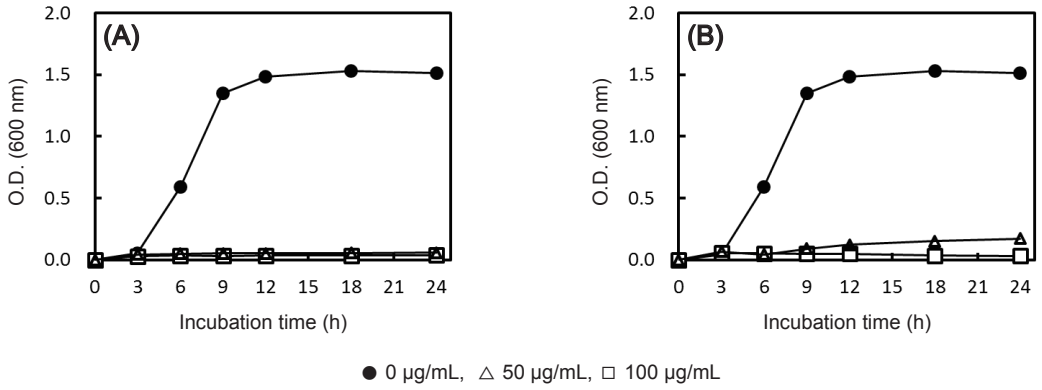


Fig. 2. Growth inhibition effect of n-haxane (A) and ethyl acetate (B) fractions of *Siegesbeckia pubescens* against *S. iniae*. (●; 0 μg/mL, Δ; 50 μg/mL, □; 100 μg/mL)

분획물은 *S. iniae*에 대해 활성을 나타내었으나, n-buthanol과 물 분획물에서는 항균활성을 나타내지 않았다.

희렴 분획물의 최소생육저해농도

희렴 80% methanol 추출물과 n-hexane 분획물, 그리고 ethyl acetate 분획물의 *S. iniae*에 대한 최소생육저해농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정한 결과, 각각 32 μg/mL, 8 μg/mL, 그리고 32 μg/mL로 측정되었다(Table 3). 이 결과는 각 추출물을 MIC 농도로 사용하였을 경우에 병원성 균주의 성장을 저해시킬 수 있음을 의미하며, n-hexane 분획물은 ethyl acetate 분획물이나 methanol 추출물에 비해 4배 정도 더 효과적으로 활용할 수 있음을 알 수 있다.

항균활성에서 가장 높은 결과를 보인 n-hexane과 ethyl acetate 분획물의 *S. iniae*에 대한 증식 억제효과를 살펴보기 위해, 배양배지에 최종농도 0, 50 및 100 μg/mL씩을 첨가하여 생육정도를 흡광도를 통해 측정하였다(Fig. 2). 접종초기부터 배양 24시간까지 관찰한 결과, 두 분획물 모두 100 μg/mL 첨가군에서는 *S. iniae*의 생육이 완전히 저지되었다. Ethyl acetate 분획물 50 μg/mL 첨가군에서는 *S. iniae*의 생육이 24시간 배양 후를 기준으로 할 때 약 88% 정도 저해되었고, n-hexane 분획물 50 μg/mL 첨가군에서는 생육이 완전히 저해되었다. 즉, n-hexane과 ethyl acetate 용매의 분획 극성에서의 차이와 ethyl acetate 분획물에 대해 뚜렷한 차이를 나타낸 n-hexane 분획물의 결과를 바탕으로 고려하면, 두 분획물에는 서로 다른 항균활성 지표물질이 포함되어 있을 것으로 사료된다.

Table 3. Minimal inhibitory concentration of various fractions from *Siegesbeckia pubescens* against *Streptococcus iniae*

Extract	MIC (μg/mL)[1]
80% MeOH[2]	32±0
n-Hexane	8±0
EtOAc	32±0

[1]Data represent the mean from the results of three experiments.
[2]80% MeOH, methyl alcohol; n-Hexane, normal hexane; EtOAc, ethyl acetate.

희렴의 항균활성에 관한 기존 보고 중에서 희렴 methanol 추출물이 *S. aureus*에 대해 MIC 20 mg/mL 정도의 활성을 보였고, *B. cereus*에 대해서는 MIC 62.5 μg/mL의 활성을 나타내었다고 보고되었다(Choi et al., 2005; Jun et al., 2013). 또한 어병세균 *S. iniae*에 대한 천연물의 항균활성에 대한 기존 연구결과는, 계피의 ethanol 추출물이 *S. iniae*에 대해 MIC 75.8 μg/mL를 나타내었고, 짚신나물 추출물은 MIC 1,000 μg/mL, 독활 추출물은 3,000 μg/mL의 활성을 나타내었다고 보고되었다(Mok et al., 2001; Kang et al., 2010). 또한 천연물 유래 단일성분 중에서는 thymol이 MIC 256 μg/mL, carvacrol의 256 μg/mL, quercetin의 128 μg/mL 정도의 보고가 확인되었다(Bak et al., 2015). 본 연구에서 나타난 희렴 n-hexane 분획물의 *S. iniae*에 대한 MIC가 8 μg/mL 임을 고려할 때, 상당히 특이적이고 강한 활성임을 짐작할 수 있다. 또한 본 연구에서 사용된 희렴의 methanol 추출물이나 n-hexane 및 ethyl acetate 분획물 시료가 정제정도가 낮아서 활성지표성분이 다른 성분들과 섞여 있는 조추출물임을 감안할 때, 더욱 정제되어 단일 물질화 하였을 경우에는 상당히 낮은 농도에서도 *S. iniae*에 대한 저해능을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

희렴 추출물을 이용하여 본 실험 결과에서 나타난 *S. iniae*에 대한 강한 항균활성은 어병세균을 대상으로 한 점에서 기존의 다른 결과와 차별성을 나타낸다. 희렴의 어병세균에 대한 항균활성 단일물질을 분리 및 구조동정하고, 어병세균에 대한 항균활성 메커니즘을 밝히고, 또한 어병세균에 대해 상용되고 있는 항생제와의 병용투여 효과 및 투여 조건 등에 대한 연구가 향후 필요하다고 사료된다.

사 사

이 논문은 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 2015년 수산실용화기술개발사업 연구(인위적 염색체 전좌 유도를 통한 불임 무지개송어 산업적 생산)와 2016학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었으며(201600880001), 연구비 지원에 감사 드립니다.

References

Bak SJ, Kang BJ and Park KH. 2015. *In vitro* combination effects of natural substances and antimicrobials against *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae*. J Fish Pathol 28, 17-26.

Beuchat IR and Galden DA. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol 43, 134-139.

Choi I, Cho JY and Lim SC. 2006. Antimicrobial activity of medicinal herbs against *Staphylococcus aureus*. Korean J Plant Res 19, 491-496.

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, IA, U.S.A., 367.

Erfanmanesh A, Soltani M, Pirali E, Mohammadian S and Taherimirghaed A. 2012. Genetic characterization of *Streptococcus iniae* in diseased farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran. The Scientific World Journal 594073, 1-6.

Han JS, Lee JY, Baek NI and Shin DH. 2001. Isolation and antimicrobial action of growth inhibitory substance on foodborne 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.

Jun HJ, Kim JS, Bang JH, Kim HK, Beuchat LR and Ryu JH. 2013. Combined effects of plant extracts in inhibiting the growth of *Bacillus cereus* in reconstituted infant rice cereal. Int J Food Microbiol 160, 260-266.

Kang MA, Kim MB, Kim JH, Ko YH and Lim SB. 2010. Integral antioxidative capacity and antimicrobial activity of pressurized liquid extracts from 40 selected plant species. J Korean Soc Food Sci Nutr 39, 1249-1256.

Kim KW, Kim SS, Jeong JB, Jeon YJ, Kim KD, An CM and Lee KJ. 2011. Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder and fluid on growth performance, immune responses, blood components, and disease resistance against *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae* in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean J Fish Aquat Sci 44, 644-652. http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2011.0644.

Lahav D, Eyngor M, Hurvitz A, Ghittino C, Lublin A and Eldar A. 2004. *Streptococcus iniae* type II infections in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org 62, 177-180.

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 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.

Mok JS, Song KC, Choi NJ and Yang HS. 2001. Antibacterial effect of Cinnamon (*Cinnamomum cassia*) bark extract against fish pathogenic bacteria. J Korean Fish Soc 34, 545-549.

Moon JS, Kim JY, Joh SJ, Kim MJ, Son SW and Jang H. 2009. Influence on efficacy of *β*-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.

Park JA, Jin KS, Lee JY, Kwon HJ and Kim BW. 2013. Antioxidative and anti-obesity activities of *Tetrapanax papyriferus* and *Siegesbeckia pubescens* extracts and their synergistic anti-obesity effects. Korean J Microbiol Biotechnol 41, 341-349.

Treves-Brown KM. 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Academic publishers, Norwell, MA, U.S.A., 309.

Wang E, Wang J, Long B, Wang K, He Y, Yang Q, Chen D, Geng Y, Huang X, Ouyang P and Lai W. 2016. Molecular cloning, expression and the adjuvant effects of interleukin-8 of channel catfish (*Ictalurus Punctatus*) against *Streptococcus iniae*. Sci Rep 6, 29310.