

## MRSA에 대한 울금 추출 및 분획물의 항균활성과 항생제 증강 효과

이경인<sup>1,4\*</sup> · 최철희<sup>2</sup> · 김선민<sup>3</sup> · 표병식<sup>3</sup>

<sup>1</sup>동신대학교 생물자원산업화지원센터, <sup>2</sup>조선대학교 의과대학 내성세포연구센터,  
<sup>3</sup>동신대학교 한약재산업학과, <sup>4</sup>조선대학교 바이오신약개발학과

## Antibacterial Activity and Enhancing Antibiotic Effect of Extract and Fractions from *Curcuma longa* against MRSA Strain

Kyoung-In Lee<sup>1,4\*</sup>, Cheol-Hee Choi<sup>2</sup>, Sun-Min Kim<sup>3</sup> and Byoung-Sik Pyo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Naju, Jeonnam, 520-811, Korea

<sup>2</sup>Research Center for Resistant Cells, Dept. of Pharmacology, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju, Jeonnam, 520-714, Korea

<sup>4</sup>Dept. of Bio New Drug Development, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

**Abstract** – Curcumin content of butanol fraction from *C. longa* was found to be 22.4942% of the highest content. However, in DPPH radical scavenging ability and antibacterial activity against methicillin resistance *Staphylococcus aureus*(MRSA, CCARM3696), ethylacetate fraction contained 2.5791% of curcumin was exhibited highest activity. In comparison of enhancing antibiotic(ampicillin) effect against MRSA, ethanol extract contained 1.7838% of curcumin showed more strong activity. This indicates that the ethanol extract and some fractions from *C. longa* can have antibacterial activity and enhancing antibiotic effect possibly without curcumin. Appropriate use of antimicrobial agent was important point prior to the development of new antibiotics. And in that sence, extract and fractions of *C. longa* were worth using as synergist of antibiotics and natural antimicrobial agent.

**Key words** – *Curcuma longa*, MRSA, antibacterial activity, antibiotic

울금(*Curcumae Radix*) 중에서도 가을울금으로 알려진 *Curcuma longa* L.는 생강과(*Zingiberaceae*)의 울금속(*Curcuma*)에 속하는 다년생 식물로서 열대나 아열대 지역을 중심으로 한 고온 다습한 곳에 주로 분포하고 있으며, 우리나라의 남부지역에서도 일부 재배되고 있다. 담즙분비를 촉진하고 담도결석 개선의 효과가 있어 이담약, 방항성 권위, 통경약 및 지혈약 등으로 쓰이는 생약재이다.<sup>1)</sup> 울금의 뿌리나 줄기에는 curcumin과 그 유사성분과 같은 활성성분을 가지고 있는데, 이로 인해 항암활성, 간보호작용, 항염증 효과, 항돌연변이성 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다.<sup>2-6)</sup>

Penicillin이 개발된 1940년 이후 수많은 감염성 질환의 완치가 가능해졌다. 그러나 항생제가 도입된 지 불과 60여년 만인 2000년대 초부터 항생제 내성 균주에 의한 감염이 전 세계적으로 문제가 되면서 새로운 항생제 개발에 많은 노

력이 이루어져 왔다. 그러나 세균의 내성 발현 속도에 비해 아직까지 신약의 개발 속도는 느린 편이며 또 개발되더라도 사용 후 짧은 시간 안에 약제 내성이 보고되고 있다.<sup>7,8)</sup> 따라서 효과적인 항생제의 개발 못지않게 기존의 항생제의 적절한 활용과 내성을 최소화시키는 노력이 필요한 상황이다.

울금의 추출물이나 curcumin의 상기한 여러 가지 활성에 관한 연구 이외에도 항균활성에 관련된 연구도 이루어진 바가 있었다.<sup>9-11)</sup> 그러나 이 연구들은 내성균주가 아닌 일반적인 세균 및 곰팡이를 대상으로 실시된 것이며, 다만 울금에서 추출한 정유 성분의 내성균주 억제작용에 대한 연구가 있었을 뿐이었다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 울금 추출물 및 분획물의 methicillin resistance *Staphylococcus aureus*(MRSA)에 대한 항균활성과 상용항생제인 ampicillin과 병행처리 시의 항생제 증강효과에 대하여 탐색하였다.

\*교신저자 (E-mail): kilee@bic.re.kr  
(Tel): +82-61-336-3118

## 재료 및 방법

**식물재료** - 울금은 2008년 11월 광주광역시 광산구에서 생산된 것을 4°C 이하로 냉장보관하면서 사용하였다.

**균주 및 배양조건** - 항생제 내성 균주인 MRSA는 한국 내성균주은행(서울여자대학교)에서 분양받은 CCARM 3696을 사용하였으며, 배지는 nutrient agar 및 broth를 사용하여 통기적 조건의 37°C에서 배양하였다.

**시약 및 기기** - 추출 및 분획용 용매는 1급 이상의 시약을, 활성측정 및 성분 분석용은 특급 및 HPLC 등급의 시약을 사용하였다. curcumin 분석에는 사용된 HPLC는 Shimadzu(Japan)의 LC10Avp, DPPH radical 소거능 측정에는 microplate reader인 BIOTEK(USA)의 Powerwave X340을 이용하였으며, 항균활성의 측정에는 Mitutoyo(Japan)의 digimatic caliper를 사용하였다.

**추출 및 분획** - 세척 및 정선된 800 g의 울금을 95% 발효 ethanol을 추출용매로 하여 1시간씩 2회 반복하여 환류 추출하였다. 추출액은 여과와 농축 및 동결건조를 실시하여 분말화하였고 이중 일부를 증류수에 분산시킨 후 n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol을 사용하여 순차적으로 분획을 실시하였다. 추출 및 분획된 모든 시료는 -18°C 이하로 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

**HPLC에 의한 curcumin 함량 분석** - 추출 및 분획된 시료를 methanol에 1 mg/ml 농도로 녹인 후 0.2 µm nylon filter로 여과하여 HPLC 분석용으로 사용하였다. 분석조건은 ODS column(250×4.6 mm), column oven 온도 30°C, 75% methanol을 용리액으로 하여 0.8 ml/min의 유속에서 각 시료액 10 µl를 injection하여 분석을 실시하고, UV-Vis detector에서 424 nm로 검출하였다. 100ppm으로 조제한 curcumin 표준용액의 peak 면적을 기준으로 각 추출 및 농축 시료의 curcumin 함량을 산출하였다.

**DPPH radical 소거능 측정** - 울금 추출물과 분획물의 항산화활성을 비교하기 위해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 사용하는 radical 소거능을 측정하였다.<sup>13)</sup> 각각의 시료를 methanol에 50 µg/ml와 500 µg/ml의 농도로 용해시킨 시료액 10 µl와 300 µM로 용해시킨 DPPH 용액 190 µl를 혼합하여 15분간 암실에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 포함하지 않는 반응액의 흡광도를 기준으로 소거능을 계산하였으며, 대조군으로 ascorbic acid(vitamin C)를 사용하였다.

**Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정** - 울금 추출물과 분획물의 항균활성은 항생제 내성균주(MRSA)인 CCARM 3696을 대상으로 disc diffusion assay로 측정하였다.<sup>14)</sup> 항균시험용 평판배지는 계대 배양된 균주를 멸균 면봉을 이용하여 200 µL씩 도말하여 준비하였고, 시료를 disc 당 0.5-1.0-2.0 mg이 되도록 paper disc(8 mm)에 천천히 흡

수시킨 뒤 무균 조건에서 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 후 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone)의 면적을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

**항생제 증강효과 측정** - 상기의 disc diffusion assay를 이용하여 상용 항생제인 ampicillin이 10 µg/disc 농도로 함유된 paper disc에 추출 및 분획물을 500 µg/disc와 10 µg/disc 농도로 병행 처리하여 항균활성의 변화를 측정하였다.

**통계처리** - 분획수율과 curcumin 함량을 제외한 측정 결과는 평균값±표준편차(mean±SD) 형태로 표시하였다. 실험군 간의 통계학적 분석이 필요한 경우 windows용 SPSS 12.0의 one-way ANOVA를 실행하였으며, 유의성은 신뢰구간  $p < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

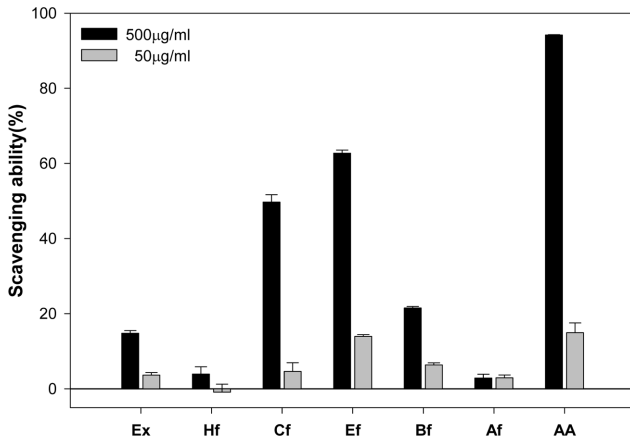
## 결과 및 고찰

**분획수율과 추출물 및 분획물의 curcumin 함량** - 울금 추출물의 분획수율과 울금속 생약재의 대표적인 활성물질로 알려져 있는 curcumin의 함량을 추출물과 분획물별로 측정하여 그 결과를 Table I에 나타냈다. Ethanol 추출물 중에는 1.7838%의 curcumin이 함유되어 있었고, 분획물 중에서는 chloroform 분획의 curcumin 함량이 22.4942%로 다른 분획의 함량인 0.0001~2.5791%에 비하여 월등히 높게 나타나 추출물의 curcumin 대부분이 chloroform 분획으로 분리되어진 것으로 나타났다.

**DPPH radical 소거능** - 일반적으로 높은 항산화활성을 가진 물질은 항균활성 등 다른 여러 가지 활성을 함께 나타내는 경우가 많은데, 울금의 추출 및 분획물에서의 경향을 확인하기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정하였다(Fig. 1). 500 µg/ml, 50 µg/ml 농도에서 ethylacetate 분획물의 소거능이 각각 62.73%와 13.96%로 가장 높게 나타났으며, 특히 50 µg/ml 농도에서는 대조군으로 사용된 ascorbic acid의 활성과 유사한 결과를 보여 비교적 높은 항산화 활성을 가진 것으로 판단할 수 있었다. Ethanol 추출물의 경우 An 등<sup>15)</sup>의 연구에서 울금 추출물이 보여준 소거능보다는 다소 낮게 나타났으나 측정에 사용된 DPPH radical 농도 차이에 따

**Table I.** Fraction yields and curcumin contents of extract and fractions from *C. longa*

	Fraction yields (%)	Curcumin (%)
Ethanol extract	-	1.7838
Hexane fraction	17.52	0.3471
Chloroform fraction	8.43	22.4942
Ethylacetate fraction	2.84	2.5791
Butanol fraction	4.37	0.0025
Aqueous fraction	66.84	0.0001



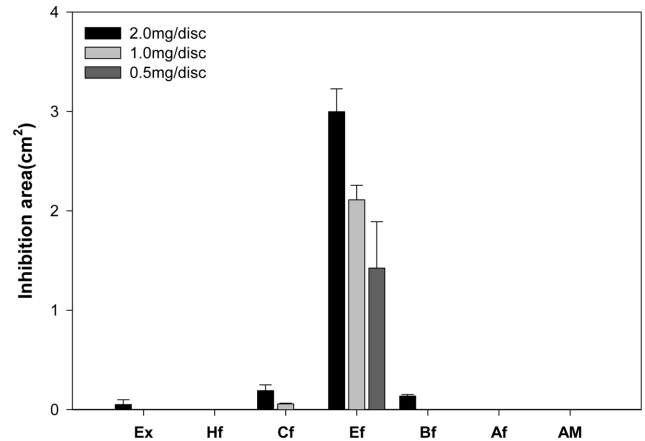
**Fig. 1.** DPPH radical scavenging ability of extract and fractions from *C. longa*. Values are mean±SD(n=4). **Ex** ; ethanol extract, **Hf** ; hexane fraction, **Cf** ; chloroform fraction, **Ef** ; ethylacetate fraction, **Bf** ; butanol fraction, **Af** ; aqueous fraction, **AA** ; ascorbic acid(vitamin C, positive control).

른 것으로 판단된다. 또한 curcumin 함량이 가장 높게 나왔던 chloroform 분획의 활성이 ethylacetate 분획보다 낮게 나오므로써 curcumin 함량과 항산화 활성이 직접적인 연관관계를 가지지 않음을 알 수 있었다.

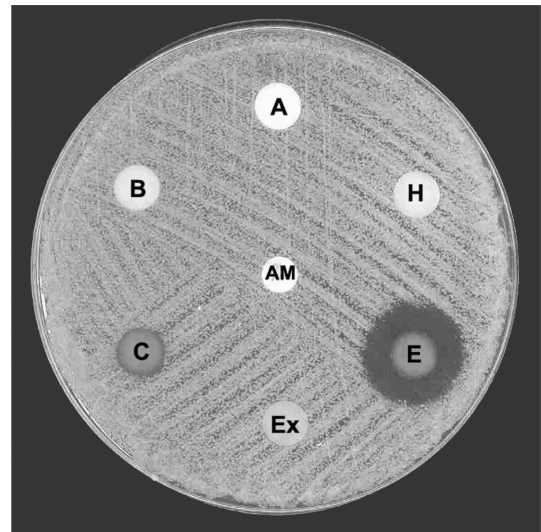
**MRSA에 대한 추출 및 분획물의 항균활성** - 항생제 내성균주인 MRSA(CCARM 3696)에 대한 울금 추출 및 분획물의 항균활성 측정에서 Fig. 2에서 보는 바와 같이 ethylacetate 분획물의 활성이 월등히 높은 것으로 나타났다. 실험에 사용된 CCARM 3696 균주는 oxacillin과 cephalothin, erythromycin, gentamycin, norfloxacin 등의 다양한 항생제에 내성을 가지는 균주이며, Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조균으로 사용된 ampicillin에도 내성을 가지는 것으로 나타난 균주이다. Disc diffusion assay에서 일반적으로 사용되고 있는 저해환 직경측정은 시료간의 항균력이 정밀하게 비교되기 어려운 경우가 발생되기도 한다. 본 연구에서는 좀 더 분명한 비교를 위하여 생성된 저해환의 직경 측정을 상하, 좌우로 실시하고 측정된 직경의 평균치를 기준으로 저해환의 면적을 산출하였다. 이때 항균력이 실제보다 높아 보일 수 있는 요인인 paper disc의 면적은 제외시켰다.

주목할 만 점은 Table I에서 나타난 curcumin 함량과 항균활성의 관계성은 항산화 활성보다도 낮다는 것이 chloroform 분획의 항균활성 결과와 연관시켜 볼 수 있다는 것이다. 가장 낮은 농도인 0.5 mg/disc의 결과를 보면 chloroform 분획은 저해환을 전혀 형성하지 못했지만, ethylacetate 분획의 경우 1.423 cm<sup>2</sup>의 저해환을 형성함으로써 curcumin 함량과 전혀 관계가 없음을 보여주고 있다.

**추출 및 분획물의 항생제 증감 효과** - 울금의 추출 및 분획물과 상용 항생제인 ampicillin의 병행처리 시 항생제 효능의 변화를 비교한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. Fig. 2에서



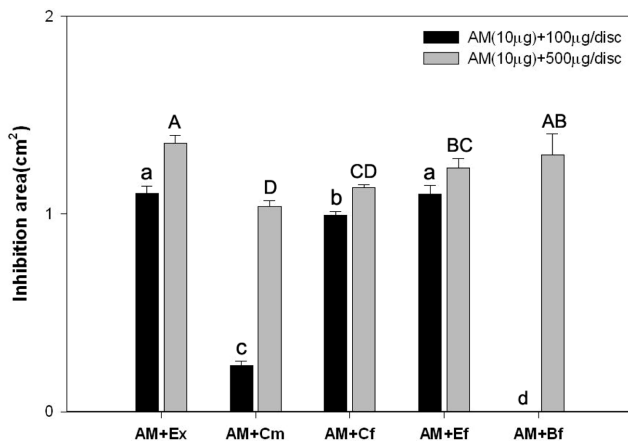
**Fig. 2.** Antibacterial activity of extract and fractions from *C. longa* against MRSA by disc diffusion assay. Values are mean±SD(n=3). **Ex** ; ethanol extract, **Hf** ; hexane fraction, **Cf** ; chloroform fraction, **Ef** ; ethylacetate fraction, **Bf** ; butanol fraction, **Af** ; aqueous fraction, **AM** ; ampicillin(antibiotic, 10 µg/disc).



**Fig. 3.** Antibacterial image of extract and fractions from *C. longa* against MRSA by disc diffusion assay. Concentration of sample is 500 µg/disc without AM. **A** ; aqueous fraction, **B** ; butanol fraction, **C** ; chloroform fraction, **E** ; ethylacetate fraction, **H** ; hexane fraction, **Ex** ; ethanol extract, **AM** ; ampicillin(antibiotic, 10 µg/disc).

의 결과를 바탕으로 ethylacetate 분획물만이 항균효과를 나타낸 농도인 500 µg/disc의 시료를 ampicillin 10 µg과 함께 처리한 paper disc를 사용하여 실험을 실시하였다.

Fig. 3의 결과처럼 ampicillin 10 µg 단독 처리에서는 MRSA(CCARM 3696)에 대해 항균활성을 나타내지 못하였으나 500 µg/disc 농도로 병행처리한 추출 및 분획물의 disc에서는 저해환을 형성하였으며, ethanol 추출물이나 chloroform



**Fig. 4.** Enhancing antibiotic effect of extract and fractions from *C. longa*. Values are mean±SD(n=3). Different superscript letters in the same concentration show significant differences at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA. AM ; ampicillin(antibiotic, 10 µg/disc), Ex ; ethanol extract, Cm ; curcumin, Cf ; chloroform fraction, Ef ; ethylacetate fraction, Bf ; butanol fraction.

및 butanol 분획물의 경우는 단독처리 시에는 보이지 못했던 항균활성을 나타냄으로써 ampicillin과의 상승작용이 있었음을 보여주었다. 또한 동일한 양의 ampicillin과 100 µg/disc 농도의 시료를 병행처리한 경우에서도 일정 수준의 활성을 가지는 것으로 나타나 항생제와 시료를 각각 처리하였을 때와 확연한 차이를 보였다. 다만 butanol 분획물의 경우 농도에 따른 항균활성의 차이가 크게 나타났으며, ethylacetate 분획물의 경우 분획물 단독처리 시와 비교하여 증강효과가 크지는 않은 것으로 나타났다. 또한 500 µg/disc와 100 µg/disc 농도에서 ethanol 추출물 병행처리군의 저해 환이 각각 1.357 cm<sup>2</sup>, 1.106 cm<sup>2</sup>로 가장 넓게 나타나 분획물보다는 추출물의 형태가 상대적으로 더 높은 항생제 증강효과를 가지는 것을 알 수 있었다.

동일한 농도의 curcumin 결과를 보면 추출 및 분획물 단독처리 시의 결과와 마찬가지로 항생제 증강효과 역시 curcumin의 작용만으로는 높지 않음을 보여주었다. 즉 순수한 curcumin에 의한 항균활성과 항생제 증강효과는 제한적이라는 것이다. 이는 울금에서 분리된 curcuminoid를 대상으로 식물체 내 *in vivo* 조건에서 실시된 항곰팡이 활성 연구에서 curcumin보다는 demethoxycurcumin의 활성이 강하게 나타났다는 보고와 동일한 맥락으로 판단할 수 있다.<sup>11)</sup>

## 결론

DPPH radical 소거능과 MRSA에 대한 항균활성에서 울금속 생약재의 대표적 활성 물질로 알려진 curcumin의 함량과 각 활성간의 직접적 관계성이 없거나 낮은 것으로 나

타났다. Curcumin 함량은 chloroform 분획물에서 가장 높은 농도인 22.4942%를 나타냈으나 DPPH radical 소거능과 MRSA에 대한 항균활성에서는 curcumin 함량이 2.5791%로 나타난 ethylacetate 분획물이 월등히 높은 것으로 밝혀졌다. 특히 ethylacetate 분획물의 경우 항생제 내성균주인 MRSA에 대한 우수한 항균력을 가짐으로써 천연물 유래의 새로운 항생물질로 개발이 가능할 것으로 판단된다.

상용 항생제인 ampicillin과 추출 및 분획물을 병행처리하여 실시한 항생제 증강효과에서는 분획물보다는 ethanol 추출물의 증강효과가 높은 것으로 나타났으며, 단독 처리시보다 낮은 농도에서도 항균활성을 보임으로써 기존 항생제의 사용범위를 넓이고 사용량은 줄일 수 있는 항생보조제 또는 증강제로서의 가능성을 확인하였다.

## 인용문헌

1. 신민교 (2002) 임상본초학, 468-469, 영림사, 서울.
2. Ryu, S. R., Han, K. J. and Jang, H. D. (2005) Separation and purification of effectiveness components from Ulgeum(*Curcuma longa*) & the test study of anticancer effects that use its. *Applied Chemistry* **9**: 69-72.
3. Cho, S. I. (2005) *Curcuma longa* L. extract controls cancer cell(Sarcoma 180) growth. *Kor. J. Herbology*. **20**: 27-31.
4. Cheon, H. J., Park, J. G., Kim, Y. S., Kang, S. S., Cai, X. F., Lee, J. J. and Lee S. M. (2007) Hepatoprotective activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**: 1-29.
5. Cho, J. W. and Lee, K. S. (2009) Anti-inflammatory effect of curcumin on UVB-induced inflammatory cytokines in HaCaT cells. *Kor. J. Dermatol.* **47**: 121-126.
6. Lee, S. H. and Yun, Y. G. (2009) Effects of curcumin, the active ingredient of turmeric(*Curcuma longa*), on regulation of glutamate-induced toxicity and activation of the mitogen-activated protein kinase phosphatase-1(MKP-1) on HT22 neuronal cells. *Nat. Prod. Sci.* **15**: 32-36.
7. Lee, M. S. (2009) New antimicrobials on the horizon. *Kor. J. Medicine.* **77**: 35-51.
8. Song, J. H. (2009) Current status and future strategies of antimicrobial resistance. *Kor. J. Medicine* **77**: 143-151.
9. Lee, S. H., Choi, W. J., Lim Y. S. and Kim S. H. (1997) Antimicrobial effect of ethanol extract from *Curcuma aromatica* S. *J. Food Sci. and Technol.* **9**: 161-165.
10. Pachiappan, P., Aruchamy, M. C. and Ramanna, K. (2009) Evaluation of antibacterial efficacy of certain botanicals against bacterial pathogen *Bacillus* sp. of silkworm, *Bombyx mori* L. *Int. J. Indust. Entomol.* **18**: 49-52.
11. Cho, J. Y., Choi, G. J., Lee, S. W., Jang, K. S., Lim, H. K., Lim, C. H., Lee, S. O., Cho, K. Y. and Kim, J. C. (2006) Antifungal activity against *Colletotrichum* spp. of curcuminoids isolated from *Curcuma longa* L. rhizomes. *J. Micro-*

- biol. Biotechnol.* **16**: 280-285.
12. Lee, C. K. and Kim, D. M. (2008) The screening of antibiotics resistance inhibition of herb drugs entered in Korean official formulary(I). *Kor. J. Pharmacogn.* **39**: 369-380.
  13. Ku, K. M., Kim, K. U., Lee, S.C. and Kang, Y. H. (2006) Screening of cancer preventive activities from medicinal plants. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **14**: 590-591.
  14. Collins, C. H., Lyne, P. M. and Grange, J. M. (1995) Collins and Lyne's microbiological methods, 178-205, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford.
  15. An, B. J., Lee, J. Y., Park, T. S., Pyeon, J. R., Bae, H. J., Song, M. A., Baek, E. J., Park, J. M., Son, J. H., Lee, C. E. and Choi, K. I. (2006) Antioxidant activity and whitening effect of extraction conditions in *Curcuma longa* L. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **14**: 168-172.

(2009년 11월 15일 접수)