

## 감초 추출물이 항생제 내성균주의 항균활성에 미치는 영향

이지원 · 지영주 · 유미희 · 임효권 · 황보미향 · 이인선<sup>1,\*</sup>

계명대학교 식품가공학과, <sup>1</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

## Antimicrobial Effect of Extract of *Glycyrrhiza uralensis* on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Ji-Won Lee, Young-Ju Ji, Mi-Hee Yu, Hyo-Gwon Im, Mi-Hyang Hwangbo, and In-Seon Lee<sup>1,\*</sup>

Department of Food Science & Technology, Keimyung University

<sup>1</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources Center

Antimicrobial drug-resistance is natural response to antimicrobial stress based on selection, which weakens chemotherapy effect. Introduction of large numbers of chemotherapeutic agents to clinical practice has generated strains of microorganisms that survive and multiply *in vivo* with high-drug concentrations. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), bacteria found in normal daily life, can be easily ingested through milk, vegetables, and meats, etc. MRSA emerged in many part of the world, increasing complex clinical problems. Therefore, new agents are needed to treat MRSA. *Glycyrrhiza uralensis* was extracted using 80% MeOH to investigate its antimicrobial activity against MRSA stains KCCM 11812, 40510, and 40512 through bacterial measurement, disc diffusion, and O.D. methods, MIC values, MRSA gene expression investigation, and scanning electron microscope observation. Results revealed *MecA*, *MecI*, *MecRI*, and *FemA* were the most highly manifested MRSA genes. Methanolic extract of *G. uralensis* significantly inhibited MRSA and thus could be used in development of antibacteria.

**Key words:** MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*, antibacterial activity, natural products, antibiotic substances

### 서 론

병원내 감염의 주된 원인균으로 알려져 있는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus* *S. aureus*)은 그람 양성 구균 중 임상 검체에서 가장 흔히 분리되는 세균으로 건강한 성인의 비강에서 약 40%가 발견되며 비강이나 피부 등에서 다른 사람에게 전파되며 흔히 수술부위감염, 폐렴 등 병원내 감염을 일으키는 균으로 알려져 있으며, 유아에게 장염을 일으키고 이로 말미암아 이차로 다발성 장 궤양과 천공을 초래한다(1,2). 또한 피부·연조직 감염증, 골관절염, 폐렴, 균혈증 등 다양하면서도 중증 감염증을 일으키는 병원체로서 오래전부터 중요성이 인식되어 왔다. 항균제가 개발되어 세균성 감염증의 치료에 전기가 마련된 이후에도 *S. aureus*는 여러 항균제에 대하여 내성을 획득함으로써 여전히 인류에게 중요한 병원체로 남아있다(3).

한편, 항생제는 1928년 푸른곰팡이에서 처음 분리된 이래 각종 감염증을 치료하고 사망률을 낮추는 등 현대 의학의 최대

업적중 하나로 꼽힌다. 1940년초 페니실린이 발견되어 여러 세균, 특히 포도상구균에 높은 살균력을 보여 세균감염 치료에 지대한 역할을 했으나, 1950년대 들어서면서 페니실린에 대한 내성이 야기되었고, 1950년대 중반 이후에는 포도상구균에 대한 효력이 거의 상실되어 버렸다.

이러한 페니실린 내성 포도상구균에 살균력을 가진 새로운 항생제가 메티실린으로 이 항생제가 도입되면서 포도상구균 감염증의 치료에 크게 기여해왔으나, 메티실린이 사용된지 2년 후인 1961년에는 영국에서 메티실린 내성포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)이 처음 보고되었다. 또한 1970년대 호주에서 MRSA에 의한 원내감염의 집단발생이 보고되면서부터 미국을 비롯한 전세계적인 발생보고가 끊이지 않고 있다(4-6). 우리나라에서도 1980년대 들어서면서 여러 병원에서 MRSA 발생을 보고하고 있으며 1980년대 이전에는 분류율의 추이를 알 수 없었지만 증가 추세에 있으며 대표적인 병원감염 원인균 중의 하나이다. 이러한 황색포도상구균은 병원 입원 환자에게 흔히 노출되어 심한 감염증으로 가기 쉽고, 원내 환경 자체가 병원내 감염의 원인이 될 수 있으므로 항생제를 많이 사용할수록 항생제에 대한 내성 및 내성 균주의 출현 빈도가 증가되어 문제가 되고 있다. 또한 모든 병원 감염의 20%를 차지할 정도로 중요한데 특히 메티실린 내성 황색 포도상구균에 의한 병원내 균혈증은 최근에 규모가 큰 병원에서 많

\*Corresponding author: In-Seon Lee, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea  
Tel: 82-53-580-5538  
Fax: 82-53-580-5538  
E-mail: inseon@kmu.ac.kr

이 발생하여 매우 중요시 되고 있다(7-12).

MRSA가 일반 포도상구균과 다른점은 일반 포도상구균이 메티실린에 감수성(methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*: MSSA)을 보이는 반면, MRSA는 메티실린에 내성을 지닐 뿐 아니라 cephalosporin, ampicillin, nafcillin 등과 같은 베타 락탐( $\beta$ -lactam)계열 항생제를 비롯한 거의 모든 항생제에 내성을 가지고 있기 때문에 한번 감염이 일어나면 현재 사용되는 항생제에는 치료가 되지 않아 환자가 사망하는 경우가 빈번히 일어난다. 따라서 메티실린 및 여러 항생제에 내성을 보이는 황색포도구균 감염을 치유 할 수 있는 새로운 항생제의 개발이 심각하게 요구되고 있다(13).

메티실린의 내성 기전은 매우 복잡하며 완전히 규명하지 못하고 있으나,  $\beta$ -lactamase의 과잉생산(14),  $\beta$ -lactam항생제에 저친화성을 보이는 penicillin-binding protein(PBP) 2'를 생산하는 *meca*A유전자의 발현(15)과 PBP형의 변화(16) 때문으로 생각되어 왔다. Tesch 등(17)은 *meca*A유전자의 발현 외 PBP 2'의 유도 생산을 조절할 수 있는 다른 요소를 *S. aureus* E 67-0에서 확인한 후 *mecR*이라 하였고, 이 *mecR*은 일부의 포도구균에 존재하는 것으로 특별한 유전적 배경에서 PBP 2' 합성을 강하게 억제하고 메티실린 내성 표현에 영향을 미친다고 하였다. 이 *mecR*이 *meca*A유전자의 상류역(upper stream)에 존재하는 2개의 유전자 *mecI*와 *mecRI*으로 밝혀졌다. 이 유전자를 Hiramatsu 등(18)은 cloning, sequencing하였고, 또한 *mecI*는 억제 단백 *mecI*을 코드하고, 한편 *mecRI*는 PBP 2'의 생성 유도에 필요한 유도인자 단백 *mecR*을 코드하고 있으며 유도인자에 해당하는  $\beta$ -lactam 제제가 MRSA와 접촉하면 *mecRI*가 활성화되어 그 신호가 *meca*A의 촉진 부위에 결합하여 전사를 억제하고 있는 *mecI*에 전달되어 억제가 해제되는 것으로 설명하였다. 또, Berger-Bachi 등(19,20)은 *femA*유전자가 중요한 작용을 한다고 하였다. *femA*유전자는 아직까지 작용기전이 확실히 밝혀지지 않은 상태이나, PBP 2'생성에는 영향을 미치지 않으면서, 포도구균의 세포벽 구성 성분의 조성에 관여하며 억제감수성에 영향을 주어 메티실린 내성에 관여하는 것으로 생각되고 있다.

최근 *meca*A유전자의 염기서열이 밝혀짐에 따라 특이적인 DNA 단편을 증폭할 수 있는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)법을 이용하여 PBP 2' 효소의 생산기능을 확인하는 것, 다시 말해서 염색체 상의 PBP 2'의 생산유전자(*mecA* gene)를 PCR법으로 검출하는 것이 유용하다고 보고되고 있다(21-23).

한편, 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 콩과에 속하는 다년생 본초로써 단맛이 성분인 glycyrrhizin을 6-14% 함유하고 있어 맛이 달고 독이 없으며 따뜻한 기운을 가지고 있어 한약의 구성재료로 많이 쓰이며 기관지염이나 결핵 치료에 효능이 있다고 알려져 있다. 이 밖에 감초는 해독 작용과 기침을 멎추게 하는 효능, 비위를 튼튼하게 하고 기를 복돋우는 효능이 있는 것으로 알려져 있다(24).

감초의 주성분은 사포닌 계통의 glycyrrhizin이며 liquiritigenin, liquiritin 등의 flavonoid도 미량 존재한다. Glycyrrhizin은 항알레르기(25), 만성 간염(26) 및 AIDS를 포함한 바이러스성 질환(27)에 뛰어난 효과가 있는 것으로 증명되면서 의약품의 원료로 이용되고 있다. Mori 등(28)은 AIDS환자에게 감초를 다양 투여한 결과 면역 및 간기능을 증가시킨다고 하였고, Shin 등(35)은 감초추출물을 이용하여 *Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 영향을 조사하였으며, Ahn 등(29) 감초 추출물 중 liquiritigenin이 *Listeria monocytogenes*균에 대해 항균 활성을 나

타내는 물질임을 밝혔다. 천연 항균활성 물질은 대부분이 그 항균효과를 검정하는데 그치고 있어 실생활에 적극적으로 응용되어 상품화 된 것은 많지 않은 실정이다. 이는 아직까지 한약재 자체가 식품에 첨가되는 것이 허가되어 있지 않고, 새로운 항균성 물질이 체내에서 안전성이 확보되어야 한다는 문제점을 가지고 있으며, 그 유효성분을 정제하는 과정에서 많은 시간과 노력이 요구되고 있어 사용에 어려움이 있기 때문으로 보여진다. 그러나 오래 전부터 이용되어 온 생약제들은 기본적으로 인체 안전성을 가지고 있고, 굳이 정제하거나 순수 분리하는 과정을 생략한다고 해도 본질적으로 인체에 유용한 생리활성 유효성분과 식품보존성 물질이 함유되어 있어 동시에 이 중의 효과를 줄 수 있을 것으로 기대된다(30). 이런 면에서 한약재 추출물에 관한 연구들이 최근 들어 많이 수행되고 있으며, 이러한 연구들을 기초로 하여 앞으로 천연보존제의 개발도 이루어 질 수 있을 것으로 예상한다. 이에 본 연구에서는 감초 추출물을 이용한 내성균주의 항균 효과를 확인하고 내성 조절유전자의 발현억제 정도를 비교하며 나아가 사람, 동물 등의 질병 치료뿐만 아니라 농·수산물 수확과 생산성 증가에 항생제가 이용되므로 이를 직접 식품에 적용하여 내성 균주에 대한 천연 항균제로서의 이용 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 생장곡선 측정

본 실험에서 사용한 균주 *Staphylococcus aureus*는 표준균주 ATCC 25923, 내성균주 KCCM 11812, 40510, 및 40512를 한국미생물보존센터로부터 분양받아 사용하였고, 각각의 균들은 tryptic soy broth(TSB, Difco, Detroit, USA)에 1백금이 접종하여 3회 계대배양 후 성장 최적 조건에서 사용하였으며, 생균수 측정을 위한 배지는 tryptic soy agar(TSA)를, 세균을 회석하기 위한 회석수로는 멸균 증류수를 사용하였다.

각 균을 TSB 액체 배지 10 mL에 1백금이 취해서 37°C shaking incubator에 키워 3일 계대한 다음, 흡광도 625 nm에서 72시간 동안의 생장을 측정하였다. 이는 균주의 최고 활성을 확인 할 수 있고, 또한 활성이 높은 시기에 계대 배양함으로써 좀 더 높은 활성을 유지함과 동시에 균의 활성이 가장 높은 시기에 항균력 test를 할 수 있게 한다.

### 시료 조제

감초 추출액의 조제는 감초 200 g을 세절하여 시료의 10배 정도의 MeOH를 첨가한 뒤 24시간 3회 추출하였다. 추출액은 Whatman No. 2 여과지로 여과한 후 감압 농축하였으며 최종적으로 각각의 농축물은 멸균한 10% DMSO(dimethylsulfoxide) 용액을 용매로 하여 사용하였다.

### 감초 추출물의 최소 저해 농도 측정(Minimum inhibitory concentration: MIC)

최소생육저해농도는 Kudo 등(31)의 방법을 수정하여 측정하였다. 탁도 0.5를 맞춘 균을 TSB 액체배지에 100  $\mu$ L 접종한 후 syringe filter(0.2  $\mu$ m pore size)로 세균한 시료를 농도별로 처리하여 37°C incubator에서 24시간 배양 후 육안으로 관찰하였을 때 미생물이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

### 감초 메탄올 추출물의 분획

감초 메탄올 추출물을 20배(w/v)의 증류수에 녹인 후 *n*-hexane

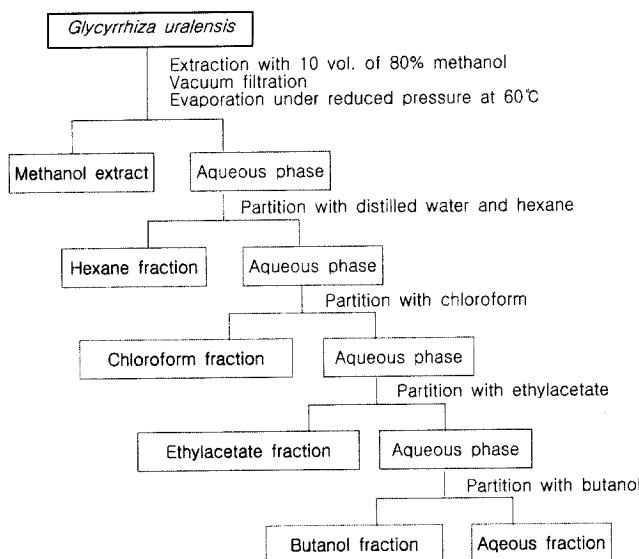


Fig. 1. Procedure for extraction and fractionation of *Glycyrrhiza uralensis* powder by various solvents.

(hexane), chloroform( $\text{CHCl}_3$ ), ethylacetate(EtOAc) 및 butanol ( $\text{BuOH}$ )을 순차적으로 3회 반복 추출하여 Fig. 1과 같이 각 용매별로 계통 분획하였고 남은 수용성 층은 농축하여 water 분획으로 감압농축하여 동결건조로 남은 유기용매를 회발시킨 뒤  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 감초분획물의 내성균주 생육억제 측정

탁도 0.5를 맞춘 균을 TSB 10 mL에 100  $\mu\text{L}$  분주하고 감초분획물을 syringe filter(0.2  $\mu\text{m}$  pore size)로 제균 시킨 다음, 농도 50, 100, 250, 500, 및 1000 mg/mL로 처리하여  $37^{\circ}\text{C}$  shaking incubator에서 키우면서 흡광도 625 nm에서 48시간 동안 생육억제능을 측정하였다.

#### 감초분획물의 생육저지대 비교

추출물의 항균력 검색은 disc diffusion method 법을 실시하였다. 우선 균주는 해당 평판배지에 균주를 streaking하여 배양한 후 배양된 각 균주 1백금이를 취해 10 mL TSB에 접종하고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하여 활성화 시킨 후 3일 계대 배양 후 spectrophotometer(UNIKON 922, Kontron, Italy)를 이용하여 625 nm에서 측정하여 O.D.가 0.5(McFarland nephelometer)가 되게 하여 균수를  $1.5 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$ 로 사용하였다. 항균력 시험용 평판배지 TSA 조제는 TSB에 agar 1.5-2.0%첨가 후 1기압,  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 멸균하고  $60^{\circ}\text{C}$  정도로 냉각한 후 멸균된 petri-dish에 약 15 mL씩 분주하였다. TSA배지에 멸균된 glass load로 균을 도말하였고 균이 도말된 배지의 표면 위에 멸균된 8 mm paper disc(diameter 8 mm, Adantec Co., Japan)를 올려 놓은 다음 syringe filter(0.2  $\mu\text{m}$ )로 제균 시킨 추출물을 50  $\mu\text{L}$ 씩 주입하여 최종농도가 1, 5, 10 mg/disc가 되게 완전히 흡수시킨 후  $37^{\circ}\text{C}$  incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc 주위의 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

#### RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 법에 의한 내성균주 유전자 발현 조사

Total RNA는 내성균주를 18시간 배양하여 분리하였다. TRI reagent(Molecular Research Center, Inc.)를 사용하여 제조사의

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-PCR

Gene	Fragment size (bp)	Oligonucleotides
mecA	554	5'-ATGAGATTAGGCATCGTTC-3' 5'-TGGATGACAGTACCTGAGCC-3'
mecI	268	5'-CTGCAGAACGGAAAGTTATG-3' 5'-ACAAGTGAATTGAAACCGCC-3'
mecRI	235	5'-AAGCACCGTTACTATCTGCACA-3' 5'-GAGTAAATTTGGTCGAATGCC-3'
femA	372	5'-CATGATGGCGAGATTACAGGCC-3' 5'-CGCTAAAGGTACTAACACACAGG-3'

지침에 따라 분리하였다. 배양된 균주에서 배지를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4) 10 mL로 두 번 세척한 후 TRI reagent를 처리하였다. 이것을 1.5 mL tube에 1 mL씩 담고 1-bromo-3-chloropropane을 200  $\mu\text{L}$  첨가하여 30초간 vortex 하여 원심분리(3,000 rpm, 15분,  $4^{\circ}\text{C}$ )하여 상등액을 취해 새로 운 tube에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 이상 방치하고 나서 원심분리(13,000 rpm, 15분,  $4^{\circ}\text{C}$ )한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 75% 에탄올을 첨가하여 제거한 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수를 첨가하여 65°C 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다. 분리된 RNA는 spectrophotometer와 1% formaldehyde agarose gel 전기영동을 이용하여 정량하고 확인하였다.

분리된 total RNA 2  $\mu\text{g}$ , superscript II RT200 U, 0.5  $\mu\text{g}$  Oligo dT, 0.5 mM dNTP를 첨가하여 42°C에서 90분간 반응시킨 후 70°C에서 10분간 반응을 종결시켰다.

Total RNA는 역전사되고 결과물인 cDNA는 Table 1의 primer들을 이용한 PCR 방법으로 증폭되었다. PCR의 반응에는 2.5U Takara Ex. Taq polymerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP를 첨가하여 각각의 primer에 맞는 조건으로 실시하였다.

#### 주사 전자 현미경(Scanning electron microscope:SEM) 관찰

MRSA(KCCM 40510)에 시료를 처리하여 18시간 후의 세포벽의 변화를 주사전자 현미경을 통해 관찰하였다. 각종 배양된 세포균주 배양액을 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 여러 번 세척한 후 2.5% glutaraldehyde로 3-4시간  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 전 고정한 다음 동일 buffer로 10-15분간 세척하였다. 이를 1% OsO<sub>4</sub> (2% OsO<sub>4</sub>: buffer = 1 : 1)로 1시간동안 후고정한 다음 일련의 ethanol 탈수과정과 isoamyl acetate로 치환과정을 거쳐 critical point dryer(Hitachi-HCP-2, Tokyo, Japan)로 건조시키고 순금을 300 mm 두께로 도포한 후 주사전자현미경(Hitachi S-450, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

#### 식품을 이용한 감초추출물의 내성균주 억제 효과

일반적으로 시장에서 판매되고 있는 상추(*Lactuca sativa*)를 사용하여 실제 식품속의 내성균주에 대해 감초 추출물이 갖는 항균활성을 식품공전(32)상의 위생법을 이용하여 실험하였다. 실험은 크게 상추에 균(KCCM 40510)을 처리 한 것과 균을 처리하지 않은 그룹으로 나누어 실험하였으며 먼저, 균을 처리한 그룹을 다시 감초 추출물 농도별로 5군으로 나누어 상추 25 g에 균  $1 \times 10^4 \text{ cfu}/100 \text{ mL}$ 을 처리 한 후 3분 뒤에 0.85% 멸균 생리식염수(225 mL)에 3분간 담근 후 5분간 균질화 시킨 뒤 10단계 희석법으로 희석하여 생균수를 비교측정 하였다. 이때 사용한 배지는 총균수 비교를 위해 standard plate count agar

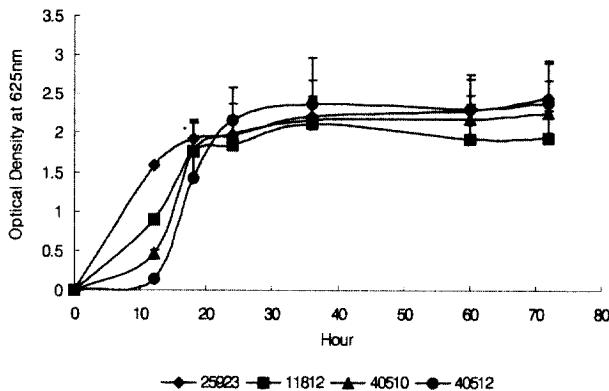


Fig. 2. Growth curve of standard *S. aureus* and MRSA strains in the TSB.

(PCA, Oxoid Ltd, Basingstoke, England)와 황색포도상 구균의 비교를 위해 mannitol salt agar(MSA, Difco, Detroit, USA)배지 사용하였다. 또한 균을 처리 하지 않은 그룹도 위와 같이 5그룹으로 나누어 동일한 방법으로 실험을 하였다.

## 결과 및 고찰

### 표준균주 및 내성균주의 생장곡선

표준균주 ATCC 25923과 내성균주 KCCM 11812, 40510, 40512를 억제하기 위한 항균활성을 검색하기에 앞서 4균주들의 생육도를 조사하였다. 이는 균주의 최고 활성을 확인 할 수 있고, 또한 활성이 높은 시기에 계대 배양함으로써 좀 더 높은 활성을 유지함과 동시에 균의 활성이 가장 높은 시기에 항균력 test를 할 수 있게 한다. 균 접종 후 72시간동안 625 nm에서 측정한 4균주의 생장곡선은 Fig. 2와 같다. 유도기는 0-10시간 까지로 나타났으며 대수기는 15-20시간 사이로 나타났으며 그 이후로는 사멸기가 나타났다. 표준균주인 ATCC 25923은 유도기가 거의 없이 대수기가 10시간 정도로 다른 균들의 15-20시간에 비해 상당히 빠른 것을 볼 수 있었고 대수기 이후에는 균의 활성이 거의 없었다. 또 내성균주인 KCCM 11812, 40510의 경우 0-10시간 정도의 유도기를 거친 후 대수기가 나타나는 것을 볼 수 있었으며, KCCM 40512의 경우에는 다른 균들에 비해 균의 활성이 천천히 일어나 유도기가 짧으며 유도기 이후 대수기 때는 균이 급격하게 활성을 나타냄을 볼 수 있었다.

### 감초 추출물의 최소억제농도 측정

항생제 내성 균주에 대한 감초 추출물의 항균작용을 검색하기 위해 액체 배지 희석법을 이용하여 시료의 최소억제농도 (MIC)를 측정하였다. 그 결과, Table 2와 같이 표준균주인 ATCC 25923의 경우 0.18 mg/mL 범위로 MIC가 측정되었고, 내성균주

Table 2. Minimum inhibition concentration of *G. uralensis* extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Name of medicinal plants	MIC (mg/mL)			
	ATCC 25923	KCCM 11812	KCCM 40510	KCCM 41512
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	0.18	0.20	0.22	0.20

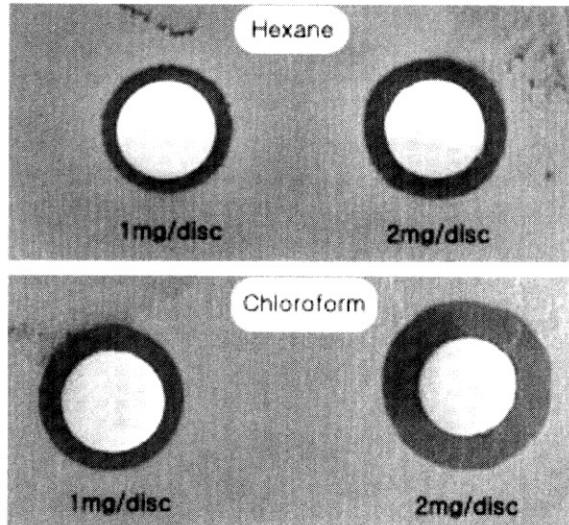


Fig. 3. Antimicrobial effect of *G. uralensis* fractions (hexane,  $\text{CHCl}_3$ ) using disc diffusion method.

들에 대해서 0.20, 0.22 mg/mL로 측정되었다. 특히 내성균주 중 KCCM 40510 균주에서 대체로 높은 MIC값을 보였다.

### 감초 메탄올 추출물의 용매별 순차분획

메탄올로 추출한 감초 파우더를 구성이 다른 용매 hexane 및 chloroform, ethyl acetate, butanol로 분획했을 때 수득량은 다음과 같다. 이들을 메탄올 추출물에 대해 차지하는 비율로 환산하면 butanol 19.15%, chloroform 17.30%, hexane 14.65%, ethylacetate 1.95%, aqueous 10.55% 순으로 높게 나타났다.

### 감초분획물의 항균효과

감초 분획물로 항균효과를 검색한 결과 Table 3에서 보는 것과 같이 EtOAc, BuOH, aqueous 층에서는 inhibition zone<sup>a</sup>이 전혀 나타나지 않아 이를 용매층에서는 항균효과가 확인 되지 않았다. 반면,  $\text{CHCl}_3$  층에서는 표준균주와 내성균주 모두 1 mg/disc 농도에서는 11-14 mm, 2 mg/disc에서는 13-16 mm를 나타냈고, hexane 층도 1 mg/disc 농도에서는 11-13 mm, 2 mg/disc에서

Table 3. Antimicrobial activities of various *Staphylococcus aureus* against *G. uralensis* fractions (mg/disc)

<i>S. aureus</i> strain number	Hexane			$\text{CHCl}_3$			EtOAc			BuOH			Aqueous		
	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5
ATCC 25923	14	13	9	16	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCCM 11812	14	11	9	14	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCCM 40510	13	13	9	15	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCCM 40512	14	12	10	13	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*paper disc (8 mm) was included.

**Table 4. Minimum inhibition concentration of various medicinal herbal extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***

<i>G. uralensis</i> fra.	MIC (mg/mL)			
	ATCC 25923	KCCM 11812	KCCM 40510	KCCM 40512
Hexane	0.10	0.25	0.25	0.25
CHCl <sub>3</sub>	0.10	0.10	0.10	0.10
EtOAc	-	-	-	-
BuOH	-	-	-	-
Aqueous	-	-	-	-
Penicillin	0.10	0.25	0.25	0.25

는 13-14 mm의 inhibition zone을 보였다(Fig. 3). Park 등(33)의 연구에 의하면 *S. aureus*에 대해 복분자 추출물의 경우 10 mg/mL농도에서 inhibition zone이 16.6 mm, 5 mg/mL에서 13.2 mm으로 보고하였고, 한약재의 물 추출물이 대략 1.8-23 mg/mL의 첨가로 항균효과가 있다는 보고와 비교해 볼 때, 본 실험에 사용한 감초 분획물에서는 위의 결과보다 낮은 농도에서 항균효과를 가짐을 알 수 있다.

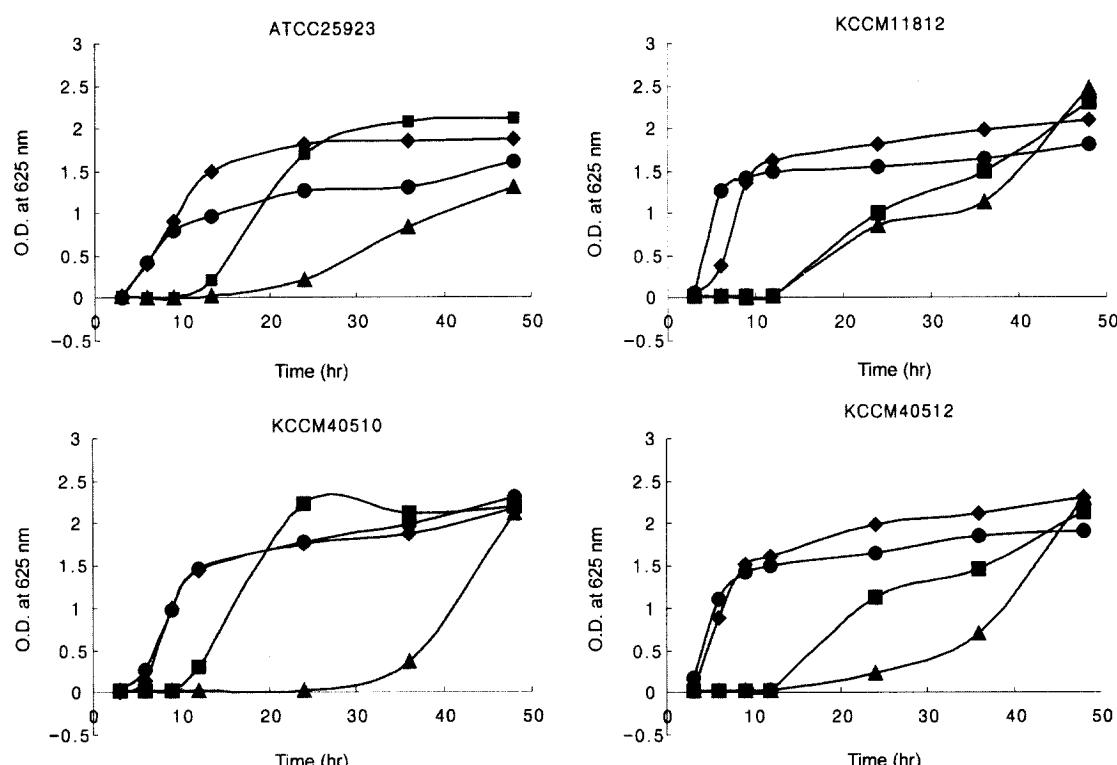
#### 감초 분획물의 최소억제농도 측정

Table 4에서 보는 것과 같이 감초 분획물 중 EtOAc, BuOH, aqueous 층이 1 mg/mL의 높은 농도에서도 항균이 전혀 나타나지 않았다. 표준균주인 ATCC 25923은 hexane, CHCl<sub>3</sub>, penicillin에서 MIC가 0.1 mg/mL로 내성균주에 비해 낮게 나타났으며, 내성균주들은 hexane에서 MIC가 0.25 mg/mL로 동일하게 나타

났고, CHCl<sub>3</sub> 층에서는 hexane 층보다 낮은 0.10-0.12 mg/mL로 나타나 CHCl<sub>3</sub> 층에서 항균효과가 더 좋음을 보였다. 특히 CHCl<sub>3</sub> 층이 penicillin보다 2.5 배정도 높은 항균성을 보였다. *L. monocytogenes*에 대해 감초 CHCl<sub>3</sub> 분획물이 0.05-0.3 mg/mL의 중식억제 효과를 보인 Ahn 등(34)의 연구와 비교해 보면 유사한 중식억제 효과를 보였으며 Shin 등(35)은 위와 동일 균으로 감초 75% 에탄올 추출물이 0.05-0.1 mg/mL 수준에서 항균효과를 나타낸 보고도 있다.

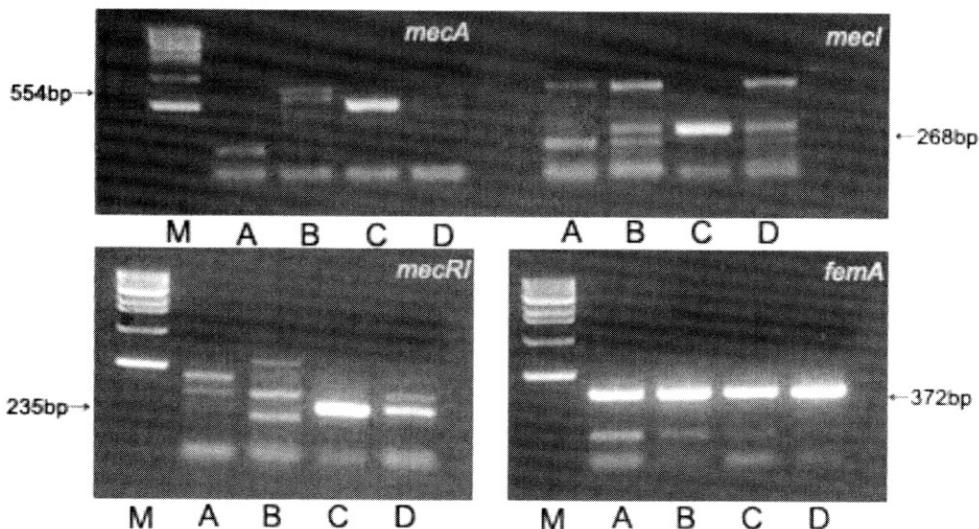
#### 감초분획물에 대한 표준균주 및 내성균주의 생육억제 효과

Fig. 4는 감초 분획물중 항균효과에서 활성을 나타낸 hexane, CHCl<sub>3</sub> 분획물을 가지고 내성균주의 생육억제 정도를 관찰한 결과이다. 48시간동안 100 µg/mL의 동일한 농도의 시료로 저해정도를 비교 관찰한 결과, 4균주 모두에서 hexane, CHCl<sub>3</sub> 분획물이 대수기를 지난 시점까지 고른 저해능을 보였으며, ATCC 25923균주는 24시간이후에 생육증식이 회복되었으며, KCCM 11812는 12시간, KCCM 40510과 40512는 24시간 이후에 증식이 회복되는 경향을 나타냈다. 또한 내성균주가 아닌 ATCC 25923균주는 penicillin에 대해 생육저해능이 확인되는 반면 나머지 내성균주에 대해서는 생육저해능이 확인되지 않았으며, 분획물을 처리 하지 않은 대조군과 유사한 경향을 나타내었다. 특히, KCCM 40510균주의 경우 36시간까지 균의 증식을 저해하였는데 결과에서도 보듯이 동일 농도의 양성대조군 penicillin보다 더 나은 저해능을 보였다. 이것은 NCCLS 기준에 의하면 penicillin 내성을 MIC 0.1 µg/mL 이상으로 정의하고 있는데(36,37) 본 실험은 MIC 기준보다 1,000배 높은 농도의 penicillin에서도 균주의 생육이 가능한 것으로 보아 고도내성균주임을



**Fig. 4. Growth curve of *S. aureus* and methicillin resistant *S. aureus* in the TSB contained fractions (100 µg/mL) on the antimicrobial effect.**

◆: control, ■: hexane, ▲: chloroform, ●: penicillin.



**Fig. 5. RT-PCR analysis of the level of *meca*, *mecl*, *mecRI* and *femA* mRNA in MRSA strains.**

Lane M: 1 kb base pair DNA ladder size marker, lane A: *S. aureus* strain ATCC 25923, lane B: MRSA strain KCCM 11812, lane C: MRSA strain KCCM 40510, lane D: MRSA strain KCCM 40512.

알 수 있고 동일농도에서 천연항균물질인 감초 분획물 보다 저해성이 우수하지 못했다. 즉, 감초 분획물이 항생제보다 낮은 농도로 항균효과를 가짐을 알 수 있다.

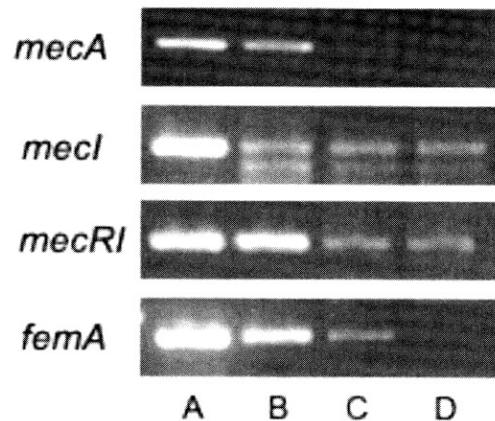
#### 황색포도구균의 내성정도와 내성유전자 검출

RT-PCR(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)를 이용하여 내성발현유무를 살펴본 결과 Fig. 5에서 보는 것과 같이 표준균주 ATCC 25923을 비롯하여 내성균주 KCCM 11812, 40510, 40512에서는 *meca*, *mecl*, *mecRI*, *femA*유전자를 볼 수 없었으나, KCCM 40510에서는 4가지 유전자가 뚜렷하게 나타나는 것을 볼 수 있었다.

이에 4가지 유전자가 모두 발견된 고도내성균인 KCCM 40510을 감초의 분획물 중 가장 효과가 좋았던 CHCl<sub>3</sub> 분획물을 농도별로(50, 100, 250 µg/mL) 처리하여 관찰한 결과 Fig. 6에서 보는 것과 같이, 항생제 내성유전자 *meca*의 경우 감초 분획물의 처리 농도가 높을수록 발현이 억제되는 것을 볼 수 있고, *mecR*유전자를 유도시키는 *mecRI*유전자 또한 농도 의존적으로 발현이 억제 되는 것을 볼 수 있다. 또한 세포벽 조성에 관여하여 메티실린 내성에 연관이 있는 *femA*유전자도 농도 의존적으로 발현이 억제되고 있음을 알 수 있다. 이는 감초 분획물이 *meca*유전자의 발현을 억제시켜 메티실린 내성이 상승하는 것을 억제 시킬 수 있다는 것을 보여줌으로써, 감초가 이러한 고도내성균에 큰 효과가 있다는 것을 알 수 있다. 그러나 *mecl*유전자의 경우 감초 분획물을 농도별로 처리 했을 때 크게 효과가 없는 것으로 보아 고도내성균인 KCCM 40510은 *mecl*보다는 *mecRI*의 pathway에 관련되는 것으로 생각된다.

#### 감초분획물이 내성균주에 미치는 형태학적 변화

PCR결과를 통해 가장 뚜렷한 내성을 보이는 KCCM 40510을 SEM(Scanning electron microscope: 주사전자현미경)을 통하여 30,000배율에서 관찰해 본 결과, Fig. 1에서 보는 것과 같이 균의 형태가 뚜렷한 포도상구균임을 볼 수 있었다. 여기에 감초의 CHCl<sub>3</sub> 분획물의 농도를 250 µg/mL 처리한 후, 이것을 30,000배율에서 관찰한 결과 Fig. 7에서 보는 것과 같이 감초 처리로 인하여 포도상구균의 형태가 세포벽이 파괴되는 등, 세



**Fig. 6. RT-PCR of amplified fragment *meca*, *mecl*, *mecRI* and *femA* mRNA in MRSA KCCM 40510 strains.**

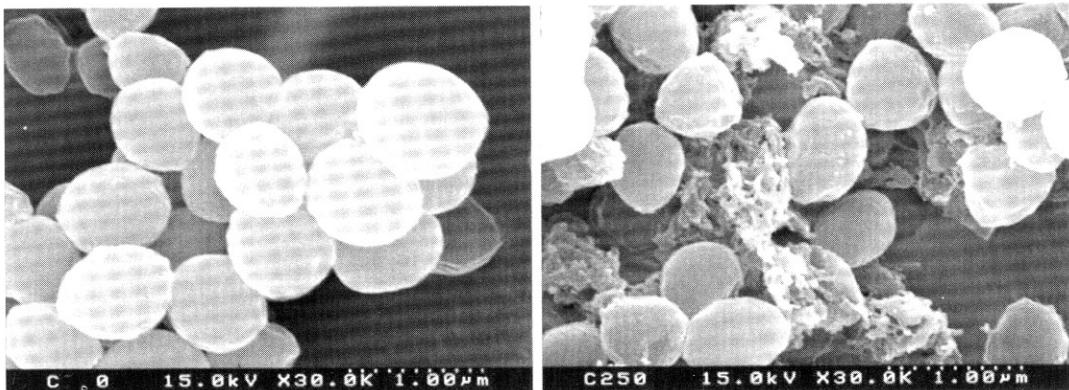
cDNA for PCR amplification was from the different concentration of CHCl<sub>3</sub> fraction described in the legend to Fig. 6. Lane A: control, lane B: 50 µg/mL of CHCl<sub>3</sub> fraction, lane C, 100 µg/mL of CHCl<sub>3</sub> fraction, lane D: 250 µg/mL of CHCl<sub>3</sub> fraction.

포의 모양이 흐트러져 원래 구균의 형태를 유지하지 못하고 있는 것을 볼 수 있었다. 따라서 감초 분획물이 내성균주의 형태를 파괴시켜 메티실린 내성을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 생각되어 진다.

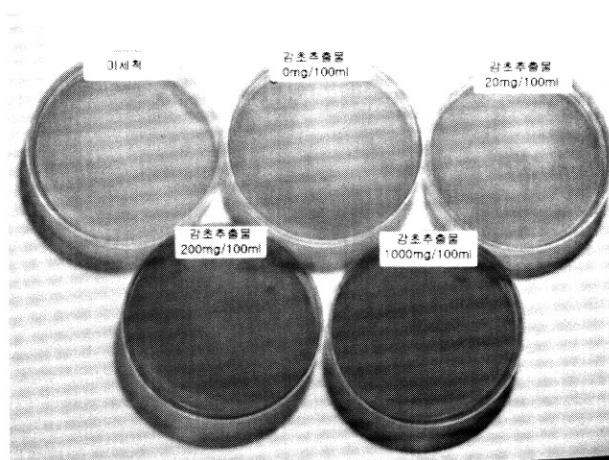
#### 식품을 이용한 감초추출물의 내성균주 억제 효과

내성 균주의 증식억제를 위한 감초 추출물의 최소 농도가 penicillin보다 효과가 좋음을 확인하였다. 그러나 액체배지배양법에서 혼탁도의 측정은 균의 증식양상을 관찰할 수 있으나 정확한 항균정도를 확인 할 수 없었다. 이를 보완하기 위해 일반적으로 시장에서 판매되고 있는 상추(*Lactuca sativa*)를 사용하여 실제 식품속의 내성균주에 대해 감초 추출물이 갖는 항균활성을 식품공전 상의 방법(33)을 이용하여 항균효과를 관찰하였다.

먼저, 균을 처리한 균과 처리하지 않은 균에 대해 실험하였는데, 상추에 따라 다소 균수의 차이가 있을 수 있으나 전체적



**Fig. 7. Antimicrobial effect of *G. uralensis* on methicillin resistant *S. aureus* KCCM 40510 ( $\times 30,000$ ).**  
Left: control, right: treated with CHCl<sub>3</sub>, fraction of 250  $\mu$ g/mL.

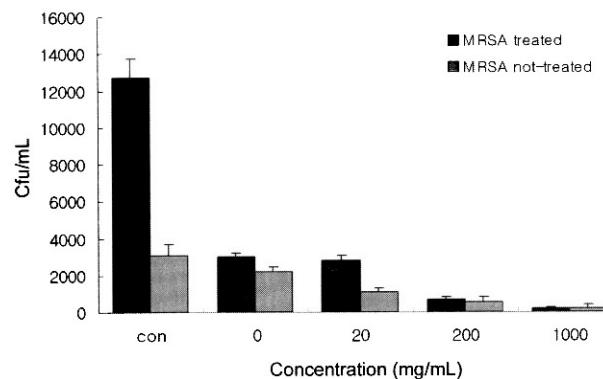


**Fig. 8. Effect of growth inhibition on methicillin resistant *S. aureus* with various concentration of *G. uralensis* extract.**

인 균수를 살펴보면 Fig. 8과 같다. 균수를 측정하는데 사용한 배지는 일반세균을 검출하는 PCA배지와 *S. aureus* 검출 유무를 확인하는 MSA배지를 사용하였다. MSA배지는 *S. aureus*가 검출되면 황색으로 변하는 특징을 가진다.

황색포도상구균 결과(Fig. 9)에서 추출물을 처리하지 않은 배지의 경우에는 균이 많이 증식하여 배지가 전체적으로 황색을 띠는 것을 볼 수 있었고 추출물의 농도를 0-1,000 mg/100 mL로 처리했을 때 균수에서의 차이를 살펴보면, 대조구에 균 처리 후 상추의 균의 수는  $1.54 \times 10^4$  cfu/mL로 증식했고, 추출물을 0 mg/100 mL 처리했을 때 균의 수는  $2.56 \times 10^3$  cfu/mL로 세척만으로도 어느정도의 균수가 줄어드는 것을 알 수 있었다. 또 200 mg/100 mL 처리 했을 때 균의 수는  $7.05 \times 10^2$  cfu/mL, 추출물의 농도가 제일 높은 1,000 mg/100 mL에서는 균의 수가  $2.1 \times 10^2$  cfu/mL로 크게 감소하였다. 따라서 추출물의 농도를 높게 할수록 균수가 감소하는 항균효과를 확인할 수 있었으며 그 외 균처리를 하지 않은 균에서도 균처리를 한 것과 비슷한 효과를 볼 수 있었다.

일반세균 검출의 결과를 보면, 균을 처리한 대조군은  $3.42 \times 10^4$  cfu/mL에서 감초추출물 200 mg/100 mL 처리시  $5.095 \times 10^3$  cfu/mL로 황색 포도상구균에 대한 결과와 유사하게 일반세균의 수도 감소했다. 또한 균을 처리하지 않은 균에서도 위와 비슷한 양상을 보여 내성균주에 대한 감초 추출물의 농도가 200 mg/100 mL 이상에서 항균효과가 있는 것으로 확인되며, 내



**Fig. 9. Change of colony formation on methicillin resistant *S. aureus* with various concentration of *G. uralensis* extract.**

성균주 뿐만이 아니라 일반세균에도 항균효과가 있는 것으로 생각되어 진다(data not shown).

따라서 감초는 항생제 내성균뿐만 아니라 다른 여러 균의 증식도 억제하는 성분을 가지고 있으므로 천연 항균제로서 이용할 수 있는 충분한 가치가 있다고 사려되는 바이다.

## 요 약

본 연구에서는 최근 전세계적으로 문제가 되고 있는 항생제 내성균에 대해 그 항균효과를 천연의 약용식물을 이용하여 분자생물학적 수준에서 비교해보고 천연항균제의 개발에 우선하여 직접 식품에 첨가하여 그 효과를 검색하고자 하였다. 병원 내감염의 주된 원인균으로 알려진 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 여러 항균제에 대하여 내성을 획득함으로써 질병의 치료를 어렵게 한다는 점에서 매우 심각한 문제이다. 이러한 내성균은 다양한 방법으로 동·식물에 빠르게 전파되고 있으므로 소비자가 내성균을 지닌 식품을 섭취해 잠재적인 내성균을 보유하게 되는 결과를 낳게 된다. 이러한 항생제 내성 황색포도상구균(Methicillin Resistant *S. aureus*, MRSA)에 대해 천연 약용 식물 중 우수한 항균력을 가지는 감초를 순차 분획하여 각 분획물을 이용한 MRSA에 대한 항균 활성을 알아본 결과 hexane, chloroform 분획물에서 항균활성을 나타냈으며, 동일농도의 생육저해비교 실험에서 대부분의 내성균주에 대해 대조군과 유사한 효과를 나타낸 penicillin에 비해 감초분획물이 대수기를 넘는 억제효과를 나타내었으며 이 중 chloroform 분획

물이 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 또한 RT-PCR을 통하여 표준균주와 내성균주의 내성 정도와 내성 유전자를 관찰해 본 결과 KCCM 40510은 내성획득유전자는 *mecA*, *mecRI*, *mecI*, *femA*에 발현이 높게 나타나 고도내성균임을 알 수 있었으며, 고도내성을 나타내는 균주를 이용하여 감초의 chloroform 분획물을 농도별로(50, 100, 250 µg/mL) 처리한 결과 농도 의존적으로 유전자 발현이 억제됨을 볼 수 있었다. 특히 고도내성균주인 KCCM 40510은 메티실린 내성을 상승시키는 *mecA* 유전자의 발현을 억제시키는 *mecRI* 유전자의 pathway와 상응하는 것으로 보여지므로 감초가 이러한 고도내성균에 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 SEM을 통한 형태학적 관찰을 통해 분획물 처리 시 세포벽이 파괴되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 이러한 감초추출물을 직접 식품에 첨가하여 내성 균주에 대한 억제 효과도 확인한 결과 추출물 200 mg/100 mL 농도에서 포도상구균에 대해 항균효과를 나타내는 것을 볼 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

## 문 헌

- Francis AW. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In: Mandell Douglas and Bennetts Principles and Infections Diseasea. 4: 1754-1755 Churchill Livingstone (1995)
- Han SJ, Jung PM, Kim HG, Hwang EH, Seong IW. Multiple intestinal ulcerations and perforations secondary to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enteritis in infants. J. Pediatr. Surg. 34: 381-386 (1999)
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother. 40: 135-136 (1997)
- Haley RW, Hightower AW, Khabbaz RF, Thrusberry C, Martone WJ, Allen JR and Hughes JM. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in united states hospitals. Ann. Intern. Med. 97: 297 (1982)
- Locksley RM, Cohen ML, Quinn TC, Tompkins LS, Coyle MB, Kirigara JM, Counts GW. Multiple antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: Introduction Transmission and evolution of nosocomial infection. Ann. Intern. Med. 97: 317 (1982)
- Crowford JJ. New light on the transmissibility of viral hepatitis in dental practice and its control. JADA 91: 829 (1975)
- Codino RC, Marshall WE. Control of infection in the dental operatory. Dent. Surv. 42 (1976)
- Mirrier RL, Burton WE, Spore RW. Aerosols produced by dental instrumentation. Proc. First Intl Symp. Aerosol. p. 97 (1963)
- Codino RC, Marshall WE. Control of infection in the dental operatory. Dent. Surv. 42 (1976)
- Barrett FF, McGehee RF, Finland M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City hospital. N. Engl. J. Med. 279: 441-448 (1968)
- Klimek JJ, Marsik FJ, Bartlett RC, Weir B, Shea P, Quintiliani R. Clinical, epidemiologic and bacteriologic observations of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large community hospital. Am. J. Med. 61: 340-345 (1967)
- Dixon RE. Second international conference on nosocomial. Am. J. Med. 70: 379, 631, 899 (1981)
- Cohen SH, Morita MM, Bradford M. A seven year experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am. J. Med. 91: 233-237 (1991)
- Sabath LD. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. Ann. Int. Med. 97: 339-344 (1982)
- Ubukata, Nonoguchi R, Matsuhashi M, Konno M. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. J. Bacteriol. 171: 2882-2885 (1989)
- Wyke AW, Ward JB, Hayes MV, Curritis NAC. A role in vivo for penicillin-binding protein-4 of *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Biochem. 119: 389-393 (1981)
- Tesch W, Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Berger-Bachi B. Evidence of a novel staphylococcal *mec*-encoded element (*mecR*) controlling expression of penicillin-binding protein 2'. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1703-1706 (1990)
- Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). FEBS Lett. 298: 133-136 (1992)
- Berger-Bachi B, Barberis-Maino L, Strassle A, Kayser FH. FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistant in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. Mol. Gen. Genet. 219: 263-269 (1989)
- Berger-Bachi B, Strassle A, Gustafson JE, Kayser FH. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1367-1373 (1992)
- Bignari GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DCE. Detection of the *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin reactivity. J. Antimicrob. Chemother. 37: 53-63 (1996)
- Mason WJ, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. J. Clin. Microbiol. 39: 3332-3338 (2001)
- Vanuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wautier G, Gala JL. Specific detection of methicillin reactivity *Staphylococcus* species by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 33: 2864-2867 (1995)
- Kee CH. The pharmacology of Chinese herbs. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA. pp. 275-278 (1993)
- Kumagai A, Nanaboshi M, Asanuma Y, Jagur T, Nishino K. Effect of glycyrrhizin on thymolytic and immuno-suppressive action of cortisone. Endocrinol. Jpn. 14: 39-42 (1967)
- Kiso Y, Tohni M, Ino H, Hattori M, Saamoto T, Namba T. Mechanism of antihepatotoxin activity of glycyrrhizin I. Effect on free radical generation and lipid peroxidation. Planta. Medica. 50: 298-302 (1984)
- Pompeii R, Flore O, Marcialis MA, Pani A, Loddo B. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and activates virus particles. Nature 281: 689-690 (1979)
- Mori K, Sakai H, Suzuki S. Effects of glycyrrhizin in hemophilic patients with HIV-1 infection. Tohoku J. Exp. Med. 162: 183-193 (1990)
- Ahn EY, Shin DH, Baek NI, Oh JA. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. Korean J. Food. Sci. Technol. 30: 680-687 (1998)
- Lee YC, Oh SW, Hong HD. Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 700 (2002)
- Kudo T, Saga N. Development of a simple method for antibiotic susceptibility testing in algae using paper disks. Nippon Suisan Gakkaishi 56: 455 (1990)
- Food code. Korea Food Industry Association. Namhyung-Munhwado, Seoul, Korea. pp. 730-743 (1994)
- Park CG, Bang KH, Lee SE, Cha MS, Seong JS, Park SU, Seong NS. Antimicrobial effect of various medicinal herbs on *Staphylococcus aureus*. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 9: 251-258 (2001)
- Ahn EY, Shin DH, Baek NI, Oh JA. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 680-687 (1998)
- Shin DH, Han JS, Kim MS. Antimicrobial effect of ethanol extract of *Sonomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wilts and *Glycyrrhiza glabra* L. var. *Glandulifera Regel* et zucc on *Listeria mono-*

- cytogenes*. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 627-632 (1994)
36. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifth informational supplement, Villanova, PA, USA. M100-S5 (1994)
37. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS Document. Villanova, PA, USA. M7-A2 (1990)

---

(2005년 1월 6일 접수; 2005년 4월 11일 채택)