

< Original Article >

## 어류의 병원성 세균에 대한 curcumin의 항균효과

허강준<sup>1</sup> · 강진휘<sup>1</sup> · 신기욱<sup>2\*</sup>

충북대학교 수의과대학<sup>1</sup>, 전북대학교 수의과대학 생체안전연구소<sup>2</sup>

### Antimicrobial effects of curcumin against pathogenic bacteria in fish

Gang-Joon Heo<sup>1</sup>, Jin-Hui Kang<sup>1</sup>, Gee-Wook Shin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

<sup>2</sup>Bio-Safety Research Institute and College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received 26 November 2013; revised 13 December 2013; accepted 20 December 2013)

#### Abstract

The present study was to investigate anti-microbial effects of curcumin on major bacterial pathogens for farmed fish, such as *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* using disk diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests. In disc diffusion test, curcumin exhibited concentration-dependent antimicrobial activities to all bacteria pathogens used in the study. Antimicrobial effects of curcumin was found differently depending on bacterial species when determined by MIC or MBC tests. For examples, *E. tarda* and *A. hydrophila* was respectively the most sensitive bacterium for bacteriostatic and bacteriocidal effect of curcumin. Collectively, curcumin could be a potential natural drug for controlling pathogenic bacteria in the aquaculture industry.

**Key words :** Curcumin, Antimicrobial activity, Fish pathogenic bacteria

## 서 론

최근 산업화의 급속한 발달과 인구 증가는 양식생물에 피해를 줄 뿐만 아니라 인간의 건강에까지 악영향을 미치고 있다. 양식은 수질 악화와 어류질병을 야기하여 경제적 손실을 가져온다(Kang 등, 2005). 양식생물에 대한 질병을 제어하기 위하여 각종 항생제를 남용하고 있으며, 그 결과 약제에 대한 내성균까지 출현하였다(Aoki 등, 1973; Blackburn 등, 2010). 따라서 많은 국가에서 항생제 사용을 금지하고 그 사용량과 식품에서의 잔류 허용량을 더욱 엄격히 제한하고 있으며 최대잔류허용기준(MRL, maximum residue level)을 설정하여 규제하고 있다(Kim 등, 2009). 현재 어류의 질병치료에는 페니실린계(Penicillins), 테트라사이클린계(Tetracyclines) 및 퀴놀론계(Quinolones) 등

여러 가지 항균제가 많이 사용되고 있으나, 이들 항균제가 어류나 최종 소비자인 사람의 체내에 장기간 축적될 경우, 약제 내성은 물론 균교대증이나 allergy 유발 등의 안전성 문제가 발생할 수 있다(National Fisheries Research & Development Agency, 2000). 이러한 문제점들을 해결하기 위해 천연에서 추출한 물질 중에서 항생물질을 대체하거나 항생제와 병용 시에 그 효과를 상승시켜 항생제 사용을 감소할 수 있는 항생제 대체물질의 개발 연구가 시급히 요구되고 있다.

천연물에 존재하는 항균성 물질의 개발에 관하여 달걀이나 우유, 감자 및 어류 등의 식품소재로부터 분리한 항균성 물질(Hughey 등, 1987; Beuchat 등, 1989), 마늘, 양파, 고추냉이 및 정향 등과 같은 각종 향신료로부터 추출한 성분들의 항균력(Shelef 등, 1980), 목단피, 회령, 오미자, 소목, 오배자, 가자 등의

\*Corresponding author: Gee-Wook Shin, Tel. +82-63-270-3903,  
Fax. +82-63-270-3778, E-mail. shingw@chonbuk.ac.kr

한약재를 이용한 천연 항균제 개발 등 다양한 연구가 수행되어 왔다(Park 등, 1992; Kim 등, 1998; Song 등, 1998; Oh 등, 1998).

특히 항균성을 지닌 천연물질들 중 울금은 걸금, 옥금, 심황이라 불리는 생강과에 속하는 다년생 초목으로 한약재, 향신료 및 식용으로 어혈을 푸는 한방 약재와 식품의 향미성분 및 착색성분으로 열대지방의 남아시아와 동남아시아에서 오랜 기간 동안 사용되고 있다(Moon 등, 2003). 울금의 종류로는 크게 30~70 여종이 알려져 있으며, 대부분 외관상 형태는 비슷하나 재배되는 지역적 기후와 토질에 따라 그 향과 성분이 다소 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Purseglove 등, 1981; Moon 등, 2003). 우리나라에서 울금은 전남, 경기, 충북, 전북 등지에서 약 8.4 ha가 재배되고 있으며 1990년대 중반 일본 오키나와현을 거쳐 도입된 것으로 알려져 있다(Han 등, 2010).

울금의 지하부에 착생하는 근경은 카레의 주원료로 이용되고 있으며, 근경에 함유되어 있는 curcumin의 연구 보고로는 항산화(Selvam 등, 1995; Kang 등, 1998), 항염증(Ammon 등, 1991; Gupta 등, 1999), 항균(Chatterjee 등, 2001), 항바이러스(Mazumder 등, 1995), 항암(Khar 등, 1995; Ryu 등, 2005), 콜레스테롤의 생합성에 관여하는 squalene synthase 억제 작용 및 간에 축적된 cholesterol 수치를 저하시켜 간 및 신경계에 효능을 나타내는 cefotaxime과의 상승작용 등이 보고되어 있다(Lee 등, 1990).

그러나 울금의 항산화효과와 항균효과가 우수함에도 불구하고 생울금 추출에 대한 연구 보고만이 대부분이며 양식산업에는 실질적으로 응용된 경우가 매우 드물다. 이에 본 연구에서는 천연식품 보존제 개발의 일환으로 천연물질인 울금의 주성분인 curcumin을 이용하여 양식어류에게 매년 피해를 주는 병원성 미생물(*Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*)에 대해서도 항균 활성을 갖는지 알아보고 어류질병의 효과적인 예방 대책에 대한 기초 자료를 마련하고자 한다(Lee 등, 1991; Kang 등, 2005).

## 재료 및 방법

### 공시균주

공시균주로는 *A. hydrophila* (ATCC 7966), *V. vulnifi-*

*cus* (ATCC 33148), *V. parahaemolyticus* (ATCC 33844), *A. salmonicida* subsp. *masoucida* (ATCC 27013), *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (ATCC 33658), 그리고 *E. tarda* (pirarucu, Korea, 2009)의 그람음성균 6균주로 서울대학교 수의과대학 수생동물질병학 연구실로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

### 디스크 확산법에 의한 항균력 판정

Tryptic soy agar (Difco, USA) 평판배지에서 20°C로 24시간 배양된 신선한 colony를 0.85% 멸균생리식염수에 농도가 MacFarland No. 0.5로 현탁시켜, 약 1~5×10<sup>6</sup> CFU/mL의 균 현탁액을 만들었다. 이 시험균 현탁액 100 μL를 Muller-Hinton agar (Difco, USA) 배지에 분주하고, 멸균된 면봉으로 잘 도말하여 수분을 건조시켜 준비하였다. 멸균된 paper disk (φ10 mm, Advantec Toyo, Japan)에 curcumin (Sigma Chem co, USA)을 10, 20, 30 mg씩 흡습시켜 충분히 건조시킨 후에, 각각의 disk를 시험균 현탁액이 도말된 Muller-Hinton agar 배지에 밀착시켜 올려놓은 후, 20°C에서 48시간 배양한 후에 disk 주변에 생긴 저지대의 직경을 측정하여 항균력 유무를 판정하였다.

또한 시판되고 있는 항생제 disk를 사용하여 공시 약제와의 항균력을 비교하였다. 항생제는 계열별로 한가지씩 선택하여 사용하였는데 β-lactam계로는 amoxicillin (30 μg/disc), tetracycline계로는 tetracycline (30 μg/disc), macrolide계로는 erythromycin (15 μg/disc), sulfa계로는 trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25~23.75 μg/disc), ansamycin계로는 lincomycin (15 μg/disc), quinolone계로는 nalidixic acid (30 μg/disc), 그리고 phenicol계로는 chloramphenicol (30 μg/disc)의 총 7종류를 사용하여 propolis와 동일한 방법으로 어병 세균에 대한 항균력을 측정하였다. 항생제 disk 가운데 trimethoprim-sulfamethoxazole은 Biolab (Hungary)에서 구입하였으며 나머지는 모두 Liofilcam (Italy)에서 구입하였다.

### 최소억제농도와 최소살균농도에 의한 Curcumin의 항균력 측정

각 실험 균주에 대한 curcumin의 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration)는 broth micro-dilution 방법을 사용하여 측정하였다(Lee 등, 1991; Kang 등, 2005). 모든 균주는 tryptic soy agar 배지에 20°C에서 24시간 배양한 후, MacFarland No. 0.5 (1~

**Table 1.** The result of antimicrobial sensitivity test by antibiotics and curcumin

Strains	Diameter of inhibition zone (mm)							Curcumin (mg)		
	AML <sup>1)</sup>	TE <sup>2)</sup>	E <sup>3)</sup>	SXT <sup>4)</sup>	MY <sup>5)</sup>	NA <sup>6)</sup>	C <sup>7)</sup>	10	20	30
<i>A. hydrophila</i>	NA*	35	16	39	NA	38	45	12	16	22
<i>A. salmonicida subsp. masoucida</i>	10	40	31	38	13	41	50	12	18	24
<i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i>	8	38	25	41	NA	40	46	11	14	19
<i>V. vulnificus</i>	NA	35	29	42	NA	40	52	7	11	14
<i>V. paraheamolyticus</i>	30	35	25	39	16	38	52	9	15	21
<i>E. tarda</i>	7	35	15	37	10	39	45	15	24	32

\*No antibacterial activity. <sup>1)</sup>AML: amoxicillin, <sup>2)</sup>TE: tetracycline, <sup>3)</sup>E: erythromycin, <sup>4)</sup>SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, <sup>5)</sup>MY: lincomycin, <sup>6)</sup>NA: nalidixic acid, <sup>7)</sup>C: chloramphenicol.

5×10<sup>6</sup> CFU/mL)로 농도를 조절하여 균현탁액을 준비하였다. Curcumin을 Muller-Hinton broth에 16~8192 µg/mL까지 단계별로 희석한 후, 균 현탁액을 각각 접종하고 48시간 배양한 후 최소억제농도를 측정하였다.

최소살균농도(minimum bactericidal concentration)는 균이 증식하지 않은 최소억제농도 이상의 배양액을 한천배지에 도말하여 균주를 접종한 후 배양하여 측정하였다. 최소살균농도는 최초의 접종균수의 99.9%를 사멸하는 최대희석배수의 농도로 정하였다.

## 결 과

### 디스크 확산 시험법

Curcumin을 멸균된 농도별 paper disk에 흡습시켜 균 현탁액이 도말된 Muller-Hinton agar 배지에 올려 놓은 후, 20°C에서 48시간 배양하여 disk 주변에 생긴 억제대의 직경을 측정한 결과, curcumin은 모든 시험균주에 대해 저용량(10 mg)에서 고용량(30 mg)으로 갈수록, 즉 용량에 비례하여 발육억제대가 증가하였다(Table 1). *E. tarda*는 다른 공시균에 비해 curcumin에 대해 가장 감수성이 높은 균주였으며 그 다음으로는 *A. salmonicida subsp. masoucida* 그리고 *A. hydrophila*이다. *Vibrio* spp.의 경우 다른 시험균에 비해 10 mg/mL의 curcumin 농도에서 가장 낮은 발육억제대를 보였으며 특히, *V. vulnificus*는 curcumin의 항균효과에 대해 *V. paraheamolyticus*보다 더 저항하는 것을 알 수 있었다.

**Table 2.** The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of curcumin against microorganisms

Strains	Curcumin (ppm)	
	MIC	MBC
<i>A. hydrophila</i>	2,048	2,048
<i>A. salmonicida subsp. masoucida</i>	2,048	4,096
<i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i>	2,048	4,096
<i>V. vulnificus</i>	4,096	8,192
<i>V. paraheamolyticus</i>	4,096	4,096
<i>E. tarda</i>	1,024	4,096

### 최소억제농도와 최소살균농도 시험법

공시균에 대한 curcumin의 정균 및 살균효과를 규명하기 위하여 broth dilution법에 의해 최소억제농도와 최소살균농도를 조사하였다(Table 2). 그 결과, *E. tarda*에서 1,024 ppm으로 가장 낮은 최소억제농도를 보였지만 살균효과는 4,096 ppm으로 최소억제농도의 4배인 4,096 ppm이었다. *Aeromonas* spp.의 최소억제농도는 2,048 ppm이었으나 최소살균농도는 *A. hydrophila* 그리고 *A. salmonicida*에서 각각 2,048 ppm 그리고 4,096 ppm인 것으로 관찰되었다. 한편, *Vibrio* spp.의 최소억제농도 그리고 최소살균농도는 다른 공시균에 비해 더 높은 것으로 관찰되었고 특히, *V. vulnificus*는 8,192 ppm의 가장 높은 최소살균농도를 보여 curcumin에 대한 가장 높은 저항성을 보였다.

## 고 찰

수산물 생산량의 약 20%를 차지하는 한국의 양식은 1980년대 중반부터 남해안을 중심으로 해상가두리 양식, 육상 수조식 양식 기술이 개발됨으로서 다

양한 어류양식 산업이 급진적으로 발전되어 왔다 (Kang 등, 2005). 양식 산업의 발달과 연안의 환경오염으로 인한 양식생물의 질병 증가는 현재 우리나라의 양식 산업이 직면한 큰 문제 중 하나이다. 항생제의 남용에 따른 약제 내성 발현균주의 증가로 인해, 기존에 임상에서 사용되어 그 안전성과 효과가 증명된 약용식물과 같은 천연물 유래의 항균 활성 물질의 중요성이 더욱 높아지고 있다(Cowan 등, 1999).

여러 가지 식물 추출물들은 각종 세균 및 균류에 대해 항균력, 항진균력과 면역력 향상 효과가 있는 것으로 알려져 있어 우리 조상들은 오래 전부터 식용 및 약용으로 사용하였다. 환경 친화적인 식물 추출물의 사용으로 각종 병원균을 제어할 수 있고 내병력을 향상시킬 수 있다면 환경보호는 물론 나아가 인류 건강을 보호해 줄 수 있는 수단이 된다(Cho 등, 1990; Choi 등, 1990; Lee 등, 1991).

이와 같은 취지로 최근 각광 받고 있는 천연물질 중 하나가 울금의 뿌리성분인 curcumin이다. curcumin은 페놀과 플라보노이드계 성분을 지니고 있어 항산화력 또한 우수하고 최근에는 curcumin 발효시 항산화, 항균 효과가 더 우수하다는 보고가 있다(Selvam 등, 1995; Kang 등, 1998).

디스크 확산법에서 curcumin을 10 mg, 20 mg, 30 mg의 용량으로 흡습시킨 결과, 모든 시험균주에 대해 농도에 비례하여 발육억제대가 나타났고, 30 mg에서는 대조군으로 사용한 항생제와 유사한 수준의 항균력을 나타내었고, amoxicillin과 lincomycin보다는 넓은 항균 범위를 보였다. 최소억제농도 검사에서는 *Edwardsiella tarda*가 다른 균주에 비해 대체적으로 높은 감수성을 나타냈고, 역으로 *Vibrio*속 균은 높은 내성을 보였다. 디스크 확산법으로 시행한 공시균들에 대한 curcumin의 감수성은 최소억제농도 그리고 최소살균농도 측정을 위한 broth dilution법에서도 유사한 결과를 보였다. 최소살균농도는 모든균에서 최소억제농도의 1~2배의 결과를 나타내었는데 그 중 *A. hydrophila*가 2048 ppm으로 가장 높은 감수성을 보였고 *V. vulnificus*는 8192 ppm으로 가장 강한 내성을 보였다.

이상의 결과를 요약하면, 울금 추출물의 주성분인 curcumin은 고용량(30 mg)에서 *A. hydrophila* 외 5종의 어류 질병 세균에 대해 시판되는 항생제가 지닌 정도와 유사한 항균력을 나타냄을 알 수 있었고, 최소억제농도, 최소살균농도 측정 시험을 통해 세균마다 실험 항균물질인 curcumin에 대한 감수성 정도는

조금씩 상이하지만 유의할 만한 항균효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과는 울금 추출물의 주성분인 curcumin의 수산용 의약품으로서의 응용 전망을 예측하게 하고, 합성항균제가 인체에 미치는 유해성 논란의 해결책이 될 것이라 생각한다. 나아가 curcumin의 항균효과에 대한 안전성과 안정성 그리고 경제성을 갖춘 천연항균제에 대한 개발과 연구가 더 시행되어야 할 것으로 보인다.

## 결 론

본 실험에서 디스크확산법과 최소억제농도 및 최소살균농도 측정시험을 통해 *A. hydrophila* 외 5종의 모든 어류 병원성 시험 균주에 대한 울금의 curcumin 성분의 항균 효과를 알아보았다. 그 결과, 디스크 확산법에서 curcumin은 모든 시험균주에 대해 농도에 비례하여 발육억제대가 나타났고, 30 mg 이상에서 대조군으로 사용한 항생제와 비슷한 수준의, 유의성 있는 항균성을 나타내었다. 또한 최소억제농도 및 최소살균농도 검사에서도 균마다 약간의 차이는 있지만 유의성 있는 억제 수준을 나타내었다. 최소억제농도는 1,024~4,096 ppm, 최소살균농도는 2,048~8,192 ppm 사이에서 관찰되었고 curcumin을 4,096 ppm 이상의 농도로 투하하였을 때 모든 균에서 완전한 억제 효과를 나타내었으며 8,192 ppm 이상의 농도에서는 모든 균에서 살균 효과를 보였다. 따라서 curcumin이 모든 균주에서 유의성 있는 항균 활성이 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2012년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었다.

## 참 고 문 헌

- Ammon HPT, Wahl MA. 1991. Pharmacology of *Curcumin longa*. *Planta Medica* 57: 1-7.
- Aoki T, Egusa S, Watanabe T. 1973. Detection of R<sup>+</sup> bacteria in cultured marine fish, yellow tails. *J Microbiol Immunol* 21: 77-83.

- Beuchat LR, Golden DA. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol* 43: 134-142.
- Blackburn KJ, Mitchell AM, Blackburn HM, Curtis A, Thompson AB. 2010. Evidence of antibiotic resistance in free swimming, top-level marine predatory fishes. *J Zoo and Wildlife Med* 41: 7-16.
- Chatterjee S, Padwal Desai SR, Thomas P. 1993. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the antioxidant activity of tumeric (*Curcuma longa* L.) extracts. *Food Research International* 32: 487-490.
- Cho SW. 1990. Inhibitory effects grapefruit seed extract (DF-100) on growth and toxin production of *Penicillium islandicum*. *J Korean Agric Chem Soc* 33: 169-173.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agent. *Clin Microbial Rev* 12: 564-582.
- Gupta B, Ghash B. 1999. Curcuma longa inhibits TNF- $\alpha$  induced expression of adhesion molecules human umbilical vein endothelial cells. *International J of Immunopharmacology* 21: 745-757.
- Han HS, Woo S, Kim DK, Heo BG, Lee, KD. 2010. Effects of composts in the growth, yield and effective components of tumeric (*Curcuma Longa* L.) *Korean J Environ Agric* 32: 171-178.
- Hughey VL, Johnson EA. 1987. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl Environ Microbiol* 53: 2165-2170.
- Kang SY, Oh MJ, Shin JA. 2005. Antimicrobial activities of Korean marine algae against fish pathogenic bacteria. *Korean J Fish Soc* 18: 147-156.
- Kang WS, Kim JH, Park EJ, Yoon KR. 1998. Antioxidative Property of Turmeric (*Curcuma Rhizoma*) Ethanol Extract. *Korea J Food Sci Technol* 30: 266-271.
- Khar A, Mubarak A, Pardhasaradhi BVV, Begum Z, Anjun R. 1995. Antitumor activity of curcumin is mediated through the induction of apoptosis in AK-5 tumor cell. *FEBS Letters* 445: 165-168.
- Kim KH, Chun HJ, Han YS. 1998. Screening of antimicrobial activity of the dandelion (*Taraxacum platycarpum*) extract. *Korean J Soc Food Sci* 14: 114.
- Kim SS, Jang JW, Song JW, Lim SJ, Jeong JB, Lee SM, Kim KW, Son MH, Lee KJ. 2009. Effects of Dietary Supplementation of Alga Mixtures (*Hizikia fusiformis* and *Ecklonia cava*) on Innate Immunity and Disease Resistance Against *Edwardsiella tarda* in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Korean J Fish Aquat Sci* 42: 614-620.
- Lee BW, Shin DH. 1991. Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractionates for good spoilage microorganisms. *Korean Food Sci Technol* 23: 205-211.
- Lee SG, Cho KH, Lee WC, Kim YS, Bai HS, Koo BH. 1990. Effects of cefotaxime on the hepatic and renal function of *Curcuma Rhizoma* in Rabbits. *Kyung Hee Univ. Med Cont* 6: 188-201.
- Mazumder A, Raghavan K, Weinstein J, Kohn KW, Pommier Y. 1995. Inhibition of human immunodeficiency virus TYPE-1 integrase by curcumin. *Biochemumder Pharmacology* 49: 1165-1170.
- Moon JS, Hong YG. 2003. Life properties and contents of curcumin as to harvest condition. pp. 102-105.
- National Fisheries Research & Development Agency. 2000. p. 204.
- Oh DH, Ham SS, Park BK, Ahn C, Yu JY. 1998. Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or food borne disease microorganisms. *Korean J Food Sci Technol* 30: 957-953.
- Park UY, Chang DS, Cho HR. 1992. Antimicrobial effect of *Lithospermum erythrorhizon* extract. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 97-100.
- Purseglove JW, Brown EG, Green CL, Robbins SRJ. 1981. Spices. pp. 100-286. Lonman Inc., New York, NY, USA.
- Ryu SR, Han KJ, Jang HD. 2005. Separation and Purification of Effectiveness Components from UIGem (*Curcuma longa*) & The Test Study of Anticancer Effects that Use Its. *Applied Chemistry* 9: 69-72.
- Selvam R., Subramanian L, Gayathri R, Angayarkanni N. 1995. The antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). *J. of Ethnopharmacology* 47: 59-67.
- Shelef LA, Naglic OA, Bogen DW. 1980. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. *J Food Sci* 45: 1042-1044.
- Song JH, Kwon HD, Lee WK, Park IH. 1998. Antimicrobial activity and composition of extract from *Smilax china* root. *J Soc Food Sci Nutr* 27: 574-584.