J Korean Soc Food Sci Nutr
38(5), 541~547(2009)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2009.38.5.541

로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.) 추출물의 항생제 내성균주 (MRSA)에 대한 항균활성 및 내성 유전자 조절 효과

최준혁 · 유미희 · 황은영 · 이인선†

계명대학교 식품가공학 전공, 계명대학교 전통미생물 자원 개발 및 산업화 연구 센터

Effect of *Rosmarinus officinalis* L. Fractions on Antimicrobial Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Resistant Genes Regulation

Jun-Hyeok Choi, Mi Hee Yu, Eun Young Hwang, and In-Seon Lee†

Dept. of Food Science and Technology, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

This study was performed to evaluate antimicrobial activity of methanol extract from *Rosmarinus officinalis* L. and their fractions on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and resistant gene regulation. The methanol extract of *Rosmarinus officinalis* L. and their hexane fractions showed the strongest antimicrobial activity against *S. aureus* and MRSA. To observe the morphological change of MRSA according to the hexane fraction 80 μg/mL treatment, scanning electron microscope (SEM) of MRSA were measured. The results from SEM showed decreased number of bacteria, lysis and damaged cell wall. Expressions of MecA and penicillinase were substantially decreased in a dose-dependent manner on MRSA that had been treated with methanol extract of *Rosmarinus officinalis* L. and their hexane fractions.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Rosmarinus officinalis* L., antimicrobial activity

서 론

국가경제의 급속한 성장에 따른 경제·사회 환경의 변화와 생활 방식의 변화로 소비자들의 식품소비에 있어서도 생존수단이라는 양적인 측면뿐만 아니라 고급화·안전성이라는 질적인 측면을 강조하게 되었다. 이러한 관점에서 '안전한 식품'에 대한 인식의 점진적 변화와 더불어 그에 따른 다양한 정책적, 관리적 사항이 필연적인 것으로 간주되고 있다. 또한 국내·외적으로 발생하고 있는 식품오염 및 식품위해에 관련된 사례들로 인하여 식품소비의 안전성이라는 측면에서 소비자들의 관심이 증대되고 있다. 특히, 최근 주로 임상에서만 검출되었던 항생제 내성균주(MRSA: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)가 식품에서 분리되었다(1). 질병 억제 및 예방, 사료효율을 높이기 위해 식용동물의 치료 및 사료 첨가제 등으로 항생제가 널리 사용됨(2,3)으로 인해서 식용동물 체내에 항생제가 축적되고 이것으로부터 생산된 식용제품을 사람이 섭취함으로써 사람 체내에도 항생제가 축적된다(4). 이처럼 무분별한 항생제 사용으로 식용동물과 식품 내에 서식하는 세균 중 일부에 항생제 저항 유전자가 유도되거나 획득되어 항생제 내성균이 출현하기 시작하였다. 이러한 현상은 식품취급자 및 소비자에게 MRSA에 대한 감염발생 위험을 높일 것으로 예상되며, 어떤 항생제에도 저해되지 않는 내성균주(VRSA: vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*)의 출현으로 그 심각성이 더 커져가고 있는 실정이다.

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)의 처방을 위해 만들어진 penicillin, methicillin 등의 항생제는 항균력이 우수하여 지난 수십 년간 본 감염증의 주요 치료약제로 사용되어 왔으나, 1940년대에 일부 *S. aureus*가 penicillin에 대하여 내성을 나타내기 시작하였으며, 1950년대에 들어와서는 tetracycline, chlororamphenicol 및 erythromycin에 내성인 *S. aureus*가 나타났으며, penicillin 내성 포도상구균에 효과적으로 작용하는 항생제인 methicillin이 등장한지 일 년 후인 1961년에 methicillin에 내성을 나타내는 황색포도상구균(MRSA)이 보고되었다(5). 그 이후 MRSA의 분리비율은 계속 증가하여 1988년에는 vancomycin에 고도의 내성을 보이는 장구균이 나타났고 1997년에는 MRSA에 의한 감염증의 치료제로 사용하여 온 vancomycin에 내성을 나타내는 *S. aureus*가 일본에서 보고되어 페니실린 결합 단백질(penicillin-binding protein,

†Corresponding author. E-mail: inseon@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5538, Fax: 82-53-580-5538

PBP) 획득 등에 의하여 이들 항생제에 내성이 생긴 MRSA 균주가 많아졌다(6-11). 우리나라에서의 *S. aureus*의 항생제 내성은 특히 문제가 심각하여 methicillin 내성률은 50% 내외로 매우 높으며, 대한병원 감염관리학회가 최근 조사한 결과에 의하면 대부분의 대학병원과 종합병원에서 분리되는 내성균주 중 *S. aureus*가 차지하는 비율이 70~80%에 이르는 실정이다(12).

MRSA는 β-lactams, aminoglycoside, macrolides 항생제에 대해 다재 내성일 뿐만 아니라 methicillin 내성발현은 배지의 온도, pH, 식염농도와 같은 여러 가지의 성장 조건에 영향을 받는 매우 복잡한 유전적 배경을 가지므로 보통의 항생제 감수성 검사로 검출해내기가 어려운 것으로 알려져 있다. MRSA의 내성 기전은 매우 복잡하여 완전히 규명되지 못하고 있으나, β-lactam 항생제의 활성을 방해하는 효소(β-lactamase)의 과잉생산(13), β-lactam 항생제에 저 친화성을 보이는 단백질 PBP2a (penicillin binding protein 2a)를 생산하는 Mec(methicillin resistant determinant) A 유전자의 발현(14)과 단백질 PBP형의 변화(15) 등을 들 수 있다.

최근 들어 항생제 내성 균주의 발생에 관한 우려가 없으면서 항생제를 대체할 수 있는 식물 또는 동물 유래 성분, 즉 천연물질을 이용한 항균활성물질의 개발이 활발히 연구되고 있다. 국내에서 천연 항생제의 개발을 위한 연구로서 단삼(16), 가자(17), 갓(18), 솔잎(19), 자초(20) 등에서 항균력이 있음이 보고되었다.

한편, 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 로즈마리(*Rosemarinus officinalis* L.)는 라틴어인 로스 마리누스(ROS marinus, 바다의 이슬)가 어원이며 주요 성분으로는 α-pinene, apigenin, β-carotene, β-sitosterol, betulinic acid, borneol, caffeic acid, camphor, carnosol, carvacrol, carvone, caryophyllene, chlorogenic acid, diosmin, geraniol, hesperidin, limonene, linalool, oleanolic acid, 1,8-cineol, phytosterol, rosemanol, rosmarinic acid, salicylic acid, squalene, tannin, thymol, ursolic acid, 칼슘, 철, 마그네슘, 망간, 인, 칼륨, 아연, 비타민 B1, B3, C 등이 있다(21). 로즈마리차, 로즈마리와인은 옛날부터 만들어졌는데 차는 두통, 감기를 고칠 뿐 아니라 항균 작용, 혈액순환 촉진 등에 도움이 된다. 침출액은 두통에 약효가 있어 흡입법으로 이용하면 뛰어난 효과를 볼 수 있다. 에센셜 오일은 피부의 노화를 방지하는 효과가 있어 미용, 화장수로서 인기가 높고 목욕제로 사용하면 피로 회복에 좋다. 예부터 로즈마리 헤어토닉(hair tonic)은 유명한데 샴푸나 린스로 이용하면 비듬을 억제하여 준다. 꽃수는 눈의 세정에 사용하고 잎은 향수의 원료로도 쓰인다. 자유라디칼, 염증, 세균, 진균을 막고 위를 편하게 해주고 혈액순환, 소화를 촉진한다(21). 특히 뇌의 혈액순환을 돕는다. 또한 고혈압, 저혈압, 생리통에 좋다. 하지만 독성이 있어 과용은 금물이며 임신 중의 복용은 절대 피해야 한다(22).

본 연구에서는 최근 다방면으로 이용되고 있는 로즈마리를 이용하여 *S. aureus* 및 MRSA에 대한 항균활성과 내성 유전자 조절효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

천연약용식물의 항균활성 검색

시료준비: 본 실험에 사용한 천연물 42종은 Table 1과 같으며, 이들 재료는 대구시의 약령시장에서 건조 상태의 것을 구입하여 불순물 제거를 위해 수세 후 건조하여 사용하였고, 무게의 10배량(w/v)의 80% 메탄올이나 증류수(w/v)를 가하여 24시간 동안 정치하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 3, England)로 여과한 다음 rotary evaporator로 55°C에서 농축한 후 동결 건조하여 메탄올 추출물로 사용하였다.

균주 및 배지: 본 실험에서 사용한 균주 *S. aureus*는 표준균주 KCCM 40511를 한국미생물보존센터로부터, 내성균주인 MRSA는 ATCC 25923을 미국균주보존센터로부터 분양받아 각각의 균들은 tryptic soy broth(TSB, Difco, Detroit, USA)에 1백금이 접종하여 3회 계대배양 후 MRSA 확인 및 성장 최적조건에서 사용하였으며, 생균수 측정을 위한 배지는 tryptic soy agar(TSA)를, 세균을 희석하기 위한 희석수로는 멸균 증류수를 사용하였다.

생육저해능 비교: 추출물의 항균력 검색은 disc diffusion method 법을 실시하였다. 우선 균주는 해당 평판배지에 균주를 streaking하여 배양한 후 배양된 각 균주 1 백금이를 취해 10 mL TSB에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하여 활성화시킨 후 3일 계대 배양 후 spectrophotometer(UNIKON922, Kontron, Italy)를 이용하여 625 nm에서 측정하여 흡광도가 0.08~0.1(McFarland nephelometer)이 되게 하여 균수를 1.5×10^8 cfu/mL로 사용하였다. 항균력 시험용 평판배지 TSA 조제는 TSB에 agar 1.5~2.0% 첨가 후 121°C에서 15분간 멸균하고 60 °C정도로 냉각한 후 멸균된 petri-dish에 약 15 mL씩 분주하였다. TSA배지에 멸균된 glass spreader로 균을 고르게 spread 한 후, paper disc(8 mm)를 올려놓은 다음 syringe filter(0.2 μm)로 제균 시킨 추출물을 최종농도가 1, 2.5, 5 mg/disc가 되도록 10% DMSO에 용해시킨 후 50 μL를 주입하여 완전히 흡수시킨 후 37°C incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc 주위의 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

로즈마리 추출물의 *S. aureus* KCCM 40511및 MRSA ATCC 25923에 대한 항균활성

로즈마리 메탄올 추출물의 분획: 로즈마리 메탄올 추출물을 20배(w/v)의 증류수에 녹인 후 n-hexane, chloroform ($CHCl_3$), ethylacetate(EtOAc) 및 butanol(BuOH)을 순차적으로 3회 반복 추출하여 Fig. 1과 같이 각각의 용매별로 계통분획하였고 남은 수용성층은 농축하여 water 분획으로 감압농축하여 동결건조로 남은 유기용매를 휘발시킨 후, -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

로즈마리 분획물의 MRSA 생육억제 측정: 로즈마리 분획물의 항균력 검색은 disc diffusion method 법을 실시하였다. TSA배지에 멸균된 glass spreader로 균을 spread한 후 8 mm paper disc를 올려놓은 다음 syringe filter(0.2 μm)로 제균 시킨 추출물을 최종농도가 0.625, 1.25, 2.5 mg/disc가 되도록

Table 1. List of scientific name of 42 medicinal plants

No.	Name of medicinal herbs	Scientific name	No.	Name of medicinal herbs	Scientific name	No.	Name of medicinal herbs	Scientific name
1	현초	*Geranium nepalense subsp. thunbergii*	15	당유자	*Citrus junos*	29	삼백초잎	*Saururus chinensis Baill*
2	유자	*Citrus junos*	16	백지	*Angelicae Dahuricae Radix*	30	쇠무릎뿌리	*Achyranthes japonica Nakai.*
3	권백	*Selaginellae Herba*	17	홍화씨	*Carthamus tinctorius Linne*	31	더덕	*Codonopsis lanceolata Trautv.*
4	골쇄보	*Drynaria fortunei (Kunze) J. Sm.*	18	쌀	*Oryza sativa L.N*	32	로즈마리	*Rosemarinus official* L.
5	미나리	*Oenanthe javanica (BLUME.) Dc.*	19	음나물	*Kalopanax pictus*	33	양배추	*Brassica oleracea var. capitata*
6	쑥	*Artemisia princeps*	20	케일	*Brassia oleracea L. var. acephala D*	34	레몬	*Citrus limon BURN*
7	냉이	*Capsella bursa-pastoris*	21	홍국쌀	*Oryza sativa L.N* (red yeast rice)	35	파프리카	*Capsicum frutescens L.,*
8	야콘	*Polymnia sonchifolia*	22	청겨자	*Brassica juncea*	36	두릅피	*Aralia elata (Miq.) Seem.*
9	솔잎	*Pinus densiflora Sieb. and Zucc.*	23	파슬리	*Petroselium sativum HOFFM*	37	신령	*Agaricus blazei Murrill*
10	마늘쫑	*Allium sativum, Allium sativa*	24	콩나물	*Glycine Semen Germinatum*	38	싸리버섯	*Romaria formosa (Fr.) quel*
11	방울토마토	*Lycopersicon esculentum Mill*	25	쌀기울	*Oryza sativa L.N* (aleurone layer)	39	호두	*Juglans regia L. var. orientis kitaqmura*
12	신선초	*Angelica keiskei*	26	쌀겨	*Oryza sativa L.N* (husk)	40	콩나물	*Glycine Semen Germinatum*
13	삼백초	*Saururus chinensis Baill*	27	뽕잎	*Tilia taquetii Schneider*	41	참다래	*Actinidia chinensis YANGGAO.*
14	세신	*Asiasarum heterotropoides var. mandshuricum*	28	생지황	*Rehmannia glutinosa Libschitz var. purpurea Makino*	42	빙편	*Dryobalanops aromatica Gaertner*

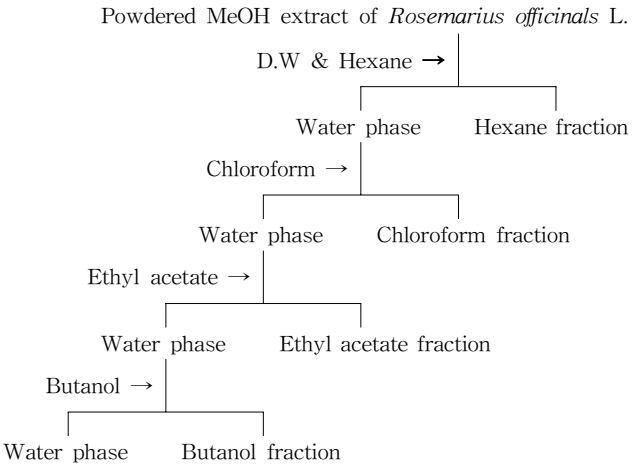

Fig. 1. Procedure for extraction and fraction and fractionation of *Rosemarinus officinalis* L. powder by various solvents.

10% DMSO에 용해시킨 후 50 μL 주입하여 완전히 흡수시킨 후 37℃ incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc 주위의 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

로즈마리 분획물의 MIC(Minimum inhibitory concentration) 측정: 최소생육저해농도는 Kudo와 Saga(23)의 방법을 수정하여 측정하였다. 탁도 0.8을 맞춘 균을 TSB 액체배지 10 mL에 150 μL 접종한 후 시료를 농도별로 처리하여 37℃ incubator에서 24시간 배양 후 육안으로 관찰하였을 때 미생물이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

주사전자현미경(Scanning electron microscope: SEM) 관찰: MRSA KCCM 40511에 시료를 처리하여 18시간 후의 세포벽의 변화를 주사전자현미경을 통해 관찰하였다. 각종 배양된 세포균주 배양액을 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 여러 번 세척한 후 2.5% glutaraldehyde로 전 고정한 다음 동일 buffer로 세척하였다. 이를 1% OsO_4로 후 고정한 다음 tannic acid로 전도염색을 하였다. 이를 ethanol로 탈수한 후 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.

로즈마리 추출물의 내성유전자 억제

Western blot에 의한 내성단백질 발현 변화 조사: 로즈마리 추출물이 MRSA 세포벽의 PBP2a와 PBP2a 전사와 관련된 단백질인 MecA의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MRSA KCCM 40511 균주를 사용하여 western blot을 실시하였다. MRSA KCCM 40511을 15 mL cornical tube에 1.5×10^8 cfu/mL로 접종하여 로즈마리 MeOH 추출물과 hexane 분획물을 처리한 후, 24시간 배양한 뒤 3,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 그 침전물에 용해 buffer(50 mM tris, 150 mM NaCL, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 100 mM

Table 2. Antimicrobial effect of methanol extract (1 mg/disc) from medicinal herbs against *S. aureus* ATCC 25923

No.	Name of medicinal herbs	Activity[1]	No.	Name of medicinal herbs	Activity	No	Name of medicinal herbs	Activity
1	*Geranium nepalense subsp. thunbergii*	+	15	*Citrus junos*	−	29	*Saururus chinensis Baill*	+
2	*Citrus junos*	−[2]	16	*Angelicae Dahuricae Radix*	−	30	*Achyranthes japonica Nakai.*	−
3	*Selaginellae Herba*	−	17	*Carthamus tinctorius Linne*	−	31	*Codonopsis lanceolata Trautv.*	−
4	*Drynaria fortunei (Kunze) J. Sm.*	+	18	*Oryza sativa L.N*	−	32	*Rosemarinus official* L.	+
5	*Oenanthe javanica(BLUME.) Dc.*	−	19	*Kalopanax pictus*	−	33	*Brassica oleracea var. capitata*	−
6	*Artemisia princeps*	−	20	*Brassia oleracea L. var. acephala D*	−	34	*Citrus limon BURN*	−
7	*Capsella bursa-pastoris*	−	21	*Oryza sativa L.N* (red yeast rice)	−	35	*Capsicum frutescens L.*	−
8	*Polymnia sonchifolia*	−	22	*Brassica juncea*	−	36	*Aralia elata (Miq.) Seem.*	−
9	*Pinus densiflora Sieb. and Zucc.*	−	23	*Petroselium sativum HOFFM*	−	37	*Agaricus blazei Murrill*	−
10	*Allium sativum, Allium sativa*	−	24	*Glycine Semen Germinatum*	−	38	*Romaria formosa (Fr.) quel*	−
11	*Lycopersicon esculentum Mill*	−	25	*Oryza sativa L.N* (aleurone layer)	−	39	*Juglans regia L. var. orientis kitaqmura*	+
12	*Angelica keiskei*	−	26	*Oryza sativa L.N* (husk)	+	40	*Glycine Semen Germinatum*	−
13	*Saururus chinensis Baill*	−	27	*Tilia taquetii Schneider*	−	41	*Actinidia chinensis YANGGAO.*	−
14	*Asiasarum heterotropoides var. mandshuricum*	+	28	*Rehmannia glutinosa Libschitz var. purpurea Makino*	−	42	*Dryobalanops aromatica Gaertner*	−

[1]The concentration of all test samples was 1 mg/disc.
[2]+>10 mm, −<10 mm, and disc diameter (8 mm) was included.

PMSF, 1 μg/mL leupeptin, 1 μg/mL aprotinin 1 M DTT) 300 μL를 첨가하여 빙냉 하에서 1분간 sonication 하여 세균을 용해시켰다. 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 상등액을 얻은 다음 BCA kit를 이용하여 단백질을 정량한 후 10% running gel과 4.5% stacking gel을 이용하여 125 V에서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다.

전기영동을 하여 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane(Milipore, Billerica, MA)과 transfer buffer(20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 350 mA에서 120분간 transfer 시켰다. 단백질이 이동된 membrane은 fast green solution으로 transfer의 유무를 확인한 후, 5% non-fat skim milk solution으로 blocking하였다. 4°C에서 일차 항체인 MecA와 24시간 반응시킨 후 TST(100 mM Tris-Cl, 0.5% tween-20)를 이용하여 10분 간격으로 3회 세척하였다. 계속하여 이차항체인 Anti-Mouse IgG와 2시간 반응시키고 다시 TST로 3회 세척하였다. 항체와 반응한 membrane에 ECL 진단 kit의 발색시약 Ⅰ과 Ⅱ를 40:1로 섞은 혼합액을 도포하고, X-ray film에 노출하여 현상한 후 film상의 band 농도를 관찰하였다.

결과 및 고찰

천연약용식물의 항균활성 검색

약용식물 추출물의 *S. aureus* ATCC 25923 및 MRSA KCCM 40511에 대한 항균력 검색 42종의 천연약용 식물추출물의 *S. aureus* ATCC 25923 균주에 대한 항균 활성을 관찰한 결과, 세신, 호두(열수), 골쇄보, 뽕잎, 로즈마리 추출물에서 항균력을 나타냈으며, 이중 로즈마리가 5 mg/disc의 농도에서 17.5 mm의 Inhibition zone을 나타내 가장 높은 항균력을 보였다. 같은 농도에서 세신은 15.5 mm, 호두, 골쇄보, 뽕잎(열수추출물)의 경우 각각 13.5 mm, 12 mm, 12 mm의 항균력을 나타냈다(Table 2, 3).

로즈마리는 항균작용 및 진정작용이 우수한 것으로 알려져 있으나 MRSA와 같은 내성균에 대한 보고는 미비한 실정이다. 그래서 이러한 결과는 천연물을 이용한 천연 약재로써의 활용가치가 클 것으로 예상된다.

Table 3. Antimicrobial activities of methanol extracts from various extracts against MRSA KCCM 40511

MeOH extraction	Inhibition zone diameter (mm)[1]	
	2.5 mg/disc	5 mg/disc
Asiasarum heterotropoides var. mandshuricum	11.5	15.5
Juglans regia L. var. orientis kitaqmura	10	13.5
Drynaria fortunei (Kunze) J. Sm.	8	12
Oryza sativa L.N	8	10
Tilia taquetii Schneider	8	12
Rosemarinus official L.	14	17.5

[1]Disc diameter (8 mm) was included.

로즈마리 메탄올 추출물 및 분획물의 MRSA 항균활성

로즈마리 메탄올 추출물의 용매별 순차분획: 메탄올로 추출한 로즈마리 powder를 극성이 다른 용매 hexane 및 chloroform, ethyl acetate, butanol로 분획했을 때 수득량은 Table 4와 같으며, 이들을 메탄올 추출물에 대해 차지하는 비율로 환산하면 water fraction 33.5%, butanol fraction 17.1%, ethylacetate fraction 10.26% 순으로 높게 나타났다.

로즈마리 분획물의 항균효과: 로즈마리 분획물을 이용하여 *S. aureus* ATCC 25923 및 MRSA KCCM 40511에 대한 항균효과를 검색한 결과 Table 5에서 보는 것과 같이 EtOAc, BuOH, water 분획물에서는 inhibition zone이 전혀 나타나지 않아 이들 용매 층에서는 항균효과가 확인되지 않았다. 반면, $CHCl_3$에서는 2.5 mg/disc의 농도에서 표준균주에 대해 12 mm, 내성균주에 대해 11.5 mm, 1.25 mg/disc의 경우 표준균주는 9.5 mm, 내성균주의 경우 9 mm의 inhibition zone을 보였다. 또한 hexane 분획물의 경우에서는 2.5 mg/disc의 농도에서 표준균주는 15 mm, 내성균주는 11.5 mm의 inhibition zone을 나타냈으며, 1.25 mg/disc의 경우 표준균주는 13 mm, 내성균주는 11 mm을 나타내어 로즈마리의 $CHCl_3$, hexane 분획물층 모두에서 표준균주와 내성균주에 대해서 높은 항균력을 가지는 것으로 나타났다.

로즈마리 분획물의 최소억제농도 측정: 로즈마리 분획물의 KCCM 40511균주에 대한 최소억제 농도를 측정한 결과, Table 6에서는 보는 것과 같이 로즈마리 분획물 중 EtOAc, BuOH, water에서는 560 μg/mL의 농도에서도 항균효과가 전혀 나타나지 않았다. 하지만 로즈마리 메탄올 추출물 및 hexane 분획물에서는 각각 165, 130 μg/mL의 농도에서 MIC를 나타냈다. 이러한 결과들로 볼 때, 로즈마리에서 MRSA 균주에 항균력을 나타내는 성분이 hexane 분획물에 다량 함유되어 있다고 판단되며, 앞서 연구된 단삼(24)의 결과와 비교해 볼 때 로즈마리가 우수한 항균물질을 다량 함유하고 있는 것으로 판단된다.

주사전자현미경관찰(SEM): KCCM 40511을 SEM을 통하여 15,000배율에서 관찰해본 결과, Fig. 2에서 보는 것과 같이 로즈마리 hexane 분획물의 처리로 인하여 내성균주의 세포벽이 파괴되고 세포의 모양이 흐트러져 원래 구균의 형태를 유지하지 못하고 있는 것을 볼 수 있었다.

따라서 로즈마리 hexane 분획물이 MRSA의 세포벽을 파괴

Table 4. Yields of hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, and water fraction of *Rosemarinus officinalis* L. methanol extract

Fractions	%
Hexane	2.5
Chloroform ($CHCl_3$)	0.9
Ethylacetate (EtOAc)	10.26
Butanol (BuOH)	17.1
Water	33.5
Total	64.26

Table 5. Antimicrobial activities of *Rosemarinus officinalis* L. fractions against *S. aureus* ATCC 25923 and MRSA KCCM 40511

Fractions		Inhibition zone diameter (mm)	
	Concentration (mg/disc)	ATCC 25923	KCCM 40511
Hexane	0.625	12.5	10.5
	1.25	13	11
	2.5	15	11.5
$CHCl_3$	0.625	8.5	8
	1.25	9.5	9
	2.5	12	11.5
EtOAc	0.625	8	8
	1.25	8	8
	2.5	8	8
BuOH	0.625	8	8
	1.25	8	8
	2.5	8	8
Water	0.625	8	8
	1.25	8	8
	2.5	8	8

Paper disc (8 mm) was included.

Table 6. Minimum inhibition concentration of *Rosemarinus officinalis* L. fractions against MRSA KCCM 40511

Rosemerinus officinalis L.	MIC (μg/mL)
MeOH	165
Hexane	130
$CHCl_3$	520
EtOAc	MIC>560
BuOH	MIC>560
Water	MIC>560

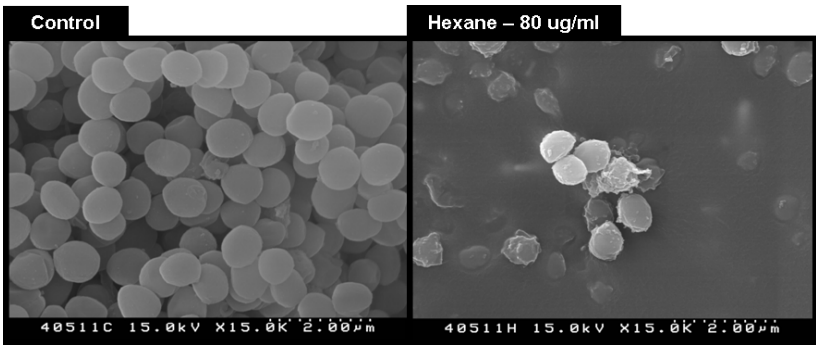

Fig. 2. Antimicrobial effect of *Rosemarinus officinalis* L. hexane fraction on MRSA KCCM 40511, ×15,000). Left: control, Right: treated with hexane fraction of 80 μg/mL.

시켜 methicillin 내성을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 생각된다. 이는 세포벽의 이상 발현에 관여하는 MecA유전자와 세포벽 조성의 변화를 유도하는 femA 유전자의 발현감소와도 상관관계가 있음을 추측할 수 있다.

로즈마리 추출물의 내성 유전자 억제

Western blot법에 의한 내성단백질 발현 변화 조사: 로즈마리 추출물이 MRSA 세포벽의 생산 효소인 penicillinase와 PBP2a 전사와 관련된 단백질인 MecA의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MRSA KCCM 40511 균주를 사용하여 Western blot을 실시한 결과는 Fig. 3, 4와 같다. 내성균주에 로즈마리 메탄올 추출물과 Hexane 분획물을 각각 농도별로 처리했을 때, MecA의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. MRSA의 내인성 내성은 methicillin과 다른 β-lactam계 항생제에 대한 민감성이 감소된 형태로 나타나고 이 감소 현상을 MecA 유전자에 의해 외인성 PBP2a의 생산을 통하여 일어나게 된다. MecA 유전자는 유전요소인 SCCmec에 암호화 되고 SCCmec는 외인성 요인으로부터 획득하게 된다(25).

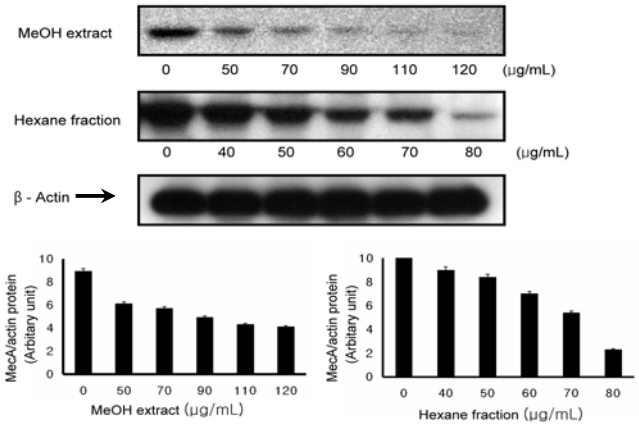

Fig. 3. Effect of *Rosemarinus officinalis* L. extracts on MecA (51 kDa) expression in MRSA KCCM 40511.

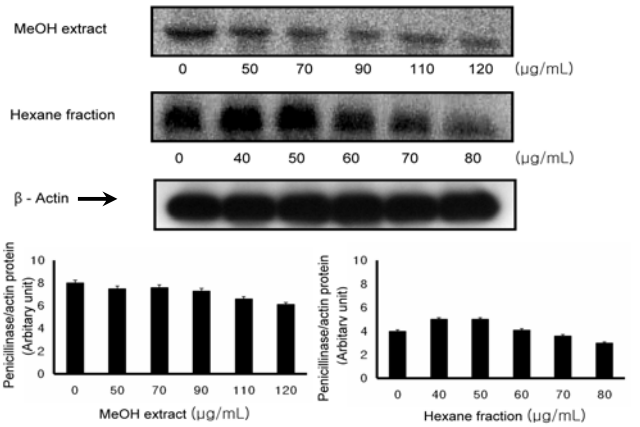

Fig. 4. Effect of *Rosemarinus officinalis* L. extracts on penicillinase (34 kDa) expression in MRSA KCCM 40511.

MecA에 의해 합성되는 penicillinase는 penicillin, ampicillin, cefalosporin 등의 화학 구조 중 β-lactam ring 구조를 파괴시켜 이들의 약제 효능을 상실케 한다. 이에 β-lactamase라 불린다. MRSA KCCM 40511 균주에서의 penicillinase 발현 역시 로즈마리 메탄올 추출물 및 hexane 분획물 처리 시에 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 penicillinase가 MecA에 의해 합성되어지기 때문에 MecA의 발현이 억제됨에 따라 penicillinase의 발현 또한 억제되는 것으로 생각된다. Yuki 등(26)은 각기 다른 항생제에 내성을 보이는 MRSA KCCM 40511균주에 대해 MecA, penicillinase 단백질이 발현되었다고 보고한 바 있다.

그러므로 로즈마리 메탄올 추출물 및 hexane 분획물은 MRSA KCCM 40511의 내성 단백질인 MecA와 MecA에 의해 합성되는 세포벽 단백질인 penicillinase의 발현을 억제시킴으로써 고도 내성균의 내성을 억제시키는데 큰 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

요 약

42가지의 천연물 시료 중 세신, 호두(열수), 골쇄보, 뽕잎, 로즈마리에서 *S. aureus* ATCC 25923 및 MRSA KCCM 40511에 대해 우수한 항균활성을 나타냈다. 이들 시료 중 가장 우수한 항균활성을 가지는 로즈마리를 순차 분획하여 각 분획물을 이용한 MRSA에 대한 항균활성을 알아본 결과 hexane, chloroform 분획물에서 항균활성을 나타냈으며, 각 분획물 중 hexane 분획물이 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 또한 SEM을 통한 형태학적 관찰을 통해 분획물 처리 시 MRSA의 세포벽이 파괴되는 것을 확인할 수 있었다. 로즈마리 메탄올 추출물 및 hexane 분획물은 MRSA KCCM 40511의 내성 단백질인 MecA와 MecA에 의해 합성되는 세포벽 단백질 penicillinase의 발현을 억제시킴으로써 고도 내성균의 내성을 억제시키는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 계명대학교 전통 미생물 자원개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W. 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 8: 82-84.
2. Bower CK, Daeschel MA. 1999. Resistance responses of microoganism in food environments. *Int F Food Microbiol* 50: 33-44.
3. Bazile-Pham-Khac S, Truong QC, Lafont FP, Gutmann L, Zhou XY, Osman M, Moreau N. 1996. Resistant to flur-oquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry.

Antimicrob Agents Chemother 40: 1504-1507.
4. Piddock LJ. 1996. Dose the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J Antimicrob Chemother* 38: 1-3.
5. Choi OK, Noh YC, Hwang SY. 2000. Antimicrobial activity of grapefruit seed extracts and polylysine mixture against food-borne pathogens. *Korean J Dietary Culture* 15: 9-15.
6. Cho TH, Kim MJ, Cho YH. 1999. Comparison between dot blot hybridization and southern blot hybridization in detecting methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J Life Science* 9: 358-367.
7. Baker CN, Huang MB, Tenover FC. 1994. Optimizing testing of methicillin-resistant *Staphylococcus* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 19: 167-170.
8. Beck WD, Berger-Bachi B, Katser FH. 1986. Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of mec-specific DNA. *J Bacteriol* 165: 373-378.
9. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptivility. *J Antimicrob Chemother* 40: 135-136.
10. Mainardi JL, Shlaes DM, Goering RV, Acar JF, Goldstein FW. 1995. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Chemother* 1: 40-49.
11. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 340: 493-501.
12. Kim SM, Lee H, Peck KR, Song JH, Yang JW, Jin JH, Pai HJ, Oh MD, Choe KW. 1997. Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from 3 different hospitals in Korea. *Korean J Infect Dis* 29: 453-462.
13. Sabath LD. 1982. Mechanisms of resistant to beta-lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 97: 339-344.
14. Bachi B, Strassle A, Gustafson J, Kayser F. 1992. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1367-1373.
15. Wyke A, Ward J, Hayes M, Curtis N. 1981. A role in vivo for penicillin-binding protein 4 of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem* 119: 389-393.
16. Ji YJ. 2006. Antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and resistant genes regulation. *MS Thesis*. Keimyung University, Daegu, Korea.
17. Kang HM, Moon JS, Jang GC, Kim JM, Song MD, Yang SY. 2005. Antibacterial effects of *Terminaliae chebula* extract against major pathogens and methicillin-resistant *Staphyococcus aureus* (MRSA) from bovine mastitis milk. *Korean J Vet Res* 45: 113-119.
18. Kang SK, Kim D, Park SK. 1995. Effect of antimicrobial of leaf mustard (*Brassica juncea*) extract on compositions and leakage of cellular materials in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 280-285.
19. Choi MY, Choi EJ, Lee E, Rhim TJ, Cha BC, Park HJ. 1997. Antimicrobial activities of pine needle (*Pinus densiflora* Seib et Zucc.) extract. *Korean J Appl Microbial Biotechnol* 25: 293-297.
20. Park UY, Chang DS, Cho HR. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 91-96.
21. Duke JA. 1997. *The green pharmacy*. Rodale Press, New York. p 6-23.
22. Yoon KS. 2005. Analysis of essential oil of *Rosemarinus officinalis* L. *MS Thesis*. Sun Moon University, Asan, Korea.
23. Kudo T, Saga N. 1990. Development of a simple method for antibiotic susceptibility testing in algae using paper disks. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 455-459.
24. Cai H, Choi SI, Lee YM, Heo TR. 2002. Antimicrobial effects of herbal medicine extracts *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Korean J Biotechnol Bioeng* 17: 537-542.
25. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9: 486-493.
26. Yuki K, Zhang HZ, Hong D, Henry FC. 2003. Jumping the barrier to β-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 185: 5465-5472.

(2009년 3월 20일 접수; 2009년 4월 28일 채택)