

## 항생제 내성균에 대한 황금 추출물의 항균효과

†장재선 · 김정희\* · 권문주\*

가천의과대학 식품영양학과, \*인천시 보건환경연구원

### Antibacterial Activity of *Scutellaria baicalensis* Extract against Antibiotic Resistant Bacteria

†Jae Seon Jang, Jung Hee Kim\* and Mun Ju Kwon\*

Dept. of Food & Nutrition, Gachon University of Medicine & Science, Incheon 406-799, Korea

\*Health and Environment Research Institute, Incheon 400-036, Korea

#### Abstract

This study was focused on the determination of antibacterial activity of *Scutellaria baicalensis* extract against antibiotic resistant bacteria (*Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* and enteroaggregative *E. coli*). Extract of *Scutellaria baicalensis* were tested for antibacterial activity by paper disc methods. The *Scutellaria baicalensis* extract in 0.1 g/ml and 0.2 g/ml showed a significant antibacterial activity against antibiotic resistant bacteria. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Scutellaria baicalensis* extract were appeared to 2,048 µg/ml at *S. Enteritidis*, *S. aureus* and enteroaggregative *E. coli*. Finally, the growth incubation curve was determined using *Scutellaria baicalensis* extract against *S. Enteritidis*, *S. aureus* and enteroaggregative *E. coli*. The growth of *S. Enteritidis* was significantly inhibited within 10 hours by the addition of at least 10,000 ppm of *Scutellaria baicalensis* extract. The 10,000 ppm of *Scutellaria baicalensis* extract retarded the growth of *S. aureus* and enteroaggregative *E. coli* more than 10 hours. In conclusion, *Scutellaria baicalensis* extract might be useful to control antibiotic resistant bacteria *in vitro*.

Key words: *Scutellaria baicalensis* extract, antibacterial activity, antibiotic resistant bacteria, minimum inhibitory concentration (MIC)

#### 서 론

최근 주요 병원성 미생물을 억제하기 위한 항생제나 항균 물질의 지속적인 사용으로 항생제 내성균들이 등장하여 사회적으로 큰 이슈가 되고 있는 실정이다(Neu HC 1992; Mah 등 2000). 이에 항균효과와 면역증진효과 등을 얻고자 생약제인 식물(Abo 등 1990; Chattopadhyay 등 2001; Cutter CN 2000; Potera C 2001)이나 생균제인 probiotics(Brassart & Schiffrin 1997; Gurrieri & Schaafsma GJ 1998; Kwon 등 2001; Kwon 등 2001) 등을 이용하여 항생제를 대체할 수 있는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

황금(黃芩, *Scutellaria baicalensis*)은 쌍떡잎식물 통화식물

목 꿀풀과에 속하는 여러해살이풀로 토혈, 고열, 기침, 변비, 태아를 안정시킬 때에 사용되어 오고 있으며(Kim & Park 2006; Choi 등 2007), 뿌리에는 baicalein, baicalin, wohonin, wogonoside, neobaicalein, sitosterol 등이 함유되어 있다고 보고하고 있다(Rhee 등 1997). 황금의 약리작용으로 항균작용(Yang & Kim 1998; Bae 등 2005), 산화 효과(Kim 등 1997; Park 등 1997; Kim 등 2006), 간기능 보호 효과(Yoon 등 1997), 심근허혈재 관류손상 억제 효과(Kim 등 2004), 접촉성과민반응 억제(Choi 등 2001), 항고지혈 효과(Ro 등 1996; Jung 등 2001), 항불안 효과(Jung 등 2004), 항암 작용, 항염증 효과, 항히스타민 효과 등이 알려져 있다(Woo 등 2007). 국내에서 황금의 항균 활성과 관련된 연구로 Cho & Kim(2001)은 황금

† Corresponding author: Jae Seon Jang, Dept. of Food & Nutrition, Gachon University of Medicine & Science, Incheon 406-799, Korea. Tel: +82-32-820-4223, Fax: +82-32-820-4230, E-mail: jsjang@gachon.ac.kr

추출물이 공시균주에 항균력이 있음을 보고하였고, Moon 등 (1997)은 *Streptococcus mutans* OMZ176에 대해 황금 추출물이 항균력이 있다고 보고하였다. 그리고 Lee & Seo(2005)는 황금 추출물이 *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus*에 대해, Choi 등(2002)은 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해 항균력이 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 항생제 내성균인 *S. Enteritidis*, *S. E. coli*에 대한 황금추출물의 항균효과를 검정하고, 세균의 증식에 미치는 영향을 조사하여 천연 항균제로서의 개발 가능성의 기초 자료로 활용하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 황금 추출물 준비

한약재인 황금은 서울 경동시장에서 건조 상태가 좋은 것을 구입하여 깨끗이 손질한 후 추출용 시료로 사용하였다. 시료 추출액의 조제는 황금 200 g을 세절하거나 잘게 부수어 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 round flask에 시료의 5배 정도의 물을 넣어 혼합한 후 heating mantle로 80°C에서 5시간 동안 3회 환류 추출하였다. 추출액은 감압농축기(Rotavapor, Büchi RE-111, Switzerland)를 사용해 80°C 항온수조(Oilbath, Büchi B-485, Switzerland)에서 감압 농축하였으며, 농축된 추출물들은 4°C에 보관하면서 본 연구에 사용하였다.

### 2. 사용균주

2006년 1월부터 12월까지 병원에 내원한 설사환자의 대변에서 분리한 살모넬라(*Salmonella* Enteritidis), 독소(enterotoxin) 생성 황색포도상구균, 장부착성 대장균(EAEC; enteroaggregative

*E. coli*)을 대상으로 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)에 근거한 디스크 확산법을 실시하여 귀놀론계 항생제에 내성을 지닌 균주를 조사하였다. 그 결과, 장부착성 대장균의 경우 ciprofloxacin과 nalidixic acid에 모두 내성을 보이는 35주, oxacillin에 내성을 보이는 황색포도상구균 30주 및 nalidixic acid에 내성을 보이는 *Salmonella* Enteritidis 22주를 선별하여 총 87주를 대상으로 항균성 실험에 사용하였다.

### 3. 황금 추출물의 항균활성측정

황금 추출물을 0.1 g/ml 및 0.2 g/ml 농도로 멸균증류수에 녹인 후 직경 8 mm인 filter paper에 100  $\mu$ l 점종하여 상온에서 자연 건조시켜 준비하였다. TSA(Tryptic Soy Agar, Difco)상의 순수 배양된 균주를 멸균 MHB(Mueller Hinton Broth, Difco)에 McFarland No. 0.5( $2 \times 10^8$  cfu/ml)가 되도록 현탁한 후 면봉으로 균액을 묻혀서 MHA(Mueller Hinton Agar, Difco) 배지 표면에 골고루 바른 다음 준비한 disc를 올려놓았다. 35°C에서 16~18시간 배양한 후 clear zone의 크기를 mm 단위로 측정하여 항균활성을 측정하였다.

### 4. 최소억제농도(MIC; Minimum Inhibitory Concentration) 측정

Table 1에서 언급한 희석방법에 따라 항생제 희석액을 준비한 후, 96 well plate의 각 well에 200  $\mu$ l씩 분주하였다. 시험균주를 MHB 배지에 현탁하고 적당 희석한 후 모든 well에 20  $\mu$ l씩 점종하여 well 내의 최종 균주농도가  $5 \times 10^5$  cfu/ml이 되도록 하였다. 35°C에서 16~20시간 배양한 후 육안으로 균 증식이 완전히 억제된 가장 낮은 농도를 최소저해농도(MIC;

Table 1. Dilute method of antibiotics by concentration

Step	Concentration ( $\mu$ g/ml)	Source	Amount (ml)	MHB (ml)	Final concentration ( $\mu$ g/ml)
1	20,480	Stock	1	9	2,048
2	2,048	1 step	1	1	1,024
3	2,048	1 step	1	3	512
4	2,048	1 step	1	7	256
5	256	4 step	1	1	128
6	256	4 step	1	3	64
7	256	4 step	1	7	32
8	32	7 step	1	1	16
9	32	7 step	1	3	8
10	32	7 step	1	7	4
11	4	10 step	1	1	2
12	4	10 step	1	3	1

minimum inhibitory concentration)로 결정하였으며, 항생제를 녹이기 위한 용매로 ciprofloxacin, oxacillin 및 황금추출물은 물을, nalidixic acid는 NaOH를 한 방울씩 떨어뜨리면서 교반하여 물에 완전히 녹여서 사용하였다.

### 5. 항생제 내성균의 증식억제효과

멸균된 MHB 10 ml에 황금 추출물을 각각 0.1 g, 0.05 g, 0.03 g 녹인 후 균 현탁액 1 ml를 접종하여 최종 접종균의 농도가  $5 \sim 6 \times 10^5$  cfu/ml이 되게 준비하였다. 37°C Incubator에서 24시간 정치배양하면서 일정시간마다 100  $\mu$ l씩 취하여 TSA 배지에 도말, 세균의 증식 정도를 확인하였다.

### 6. 통계처리

본 연구 결과는 통계분석 프로그램인 SPSS(version 19)를 이용하여 평균과 표준편차를 나타내었다. 각 실험군 간의 유의성 검증은 ANOVA로 분석하였으며, 사후 검증으로 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 황금 추출물의 항균활성 활성

황금 추출물이 항생제 내성균에 대한 항균 활성능력을 알아보기 위하여 MHA 배지에 균을 도말하고 paper disc에 추출물을 0.1 g/ml, 0.2 g/ml 농도별로 첨가해 37°C incubator에서 배양하여 생육 억제대를 관찰하였다. Table 2에서 나타내는 바와 같이 황금 추출물 0.1 g/ml에서 항생제 내성균인 *S. Enteritidis*는 13.0±0.3 mm, *S. aureus*는 11.0±1.1 mm, EAEC는 19.7±1.4 mm로 억제대를 형성하였으며, 황금 추출물 0.2 g/ml에서 *S. Enteritidis*는 14.0±0.0 mm, *S. aureus*는 12.8±1.7 mm, EAEC은 21.7±1.5 mm의 억제대를 보였다. 즉, 황금 추출물의 농도가 증가할수록 항균 활성이 크게 나타났다. 황금에는 항균성을 나타내는 것으로 알려져 있는 coumarin이 많이 함유되어 있는데, coumarin류는  $\alpha$ -pyrone환이 benzene과 결합된 C<sub>6</sub>~C<sub>3</sub> 화합물을 기본 골격으로 하는 배당체 형태로 존재하고 있다(Hahn 등 1976). Bae 등(2005)은 황금의 에틸아세테이트 추출물 2,000 ppm 농도에서 *E. coli*는 13 mm, *S. Typhimurium*은 13 mm, 그리고 *S.*

**Table 2. Antibacterial activity of *Scutellaria baicalensis* extract against antibiotic resistant bacteria**

Strains	Clear zone on plate(mm)	
	0.1 g/ml	0.2 g/ml
<i>Salmonella</i> Enteritidis	13.0±0.3	14.0±0.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.0±1.1	12.8±1.7
Enteroaggregative <i>E. coli</i>	19.7±1.4	21.7±1.5

*flexneri*에서 21 mm의 항균력이 있다고 보고한 바 있어 황금 추출물이 항생제 내성균의 항균효과가 있음을 확인하였다.

### 2. 항생제 내성균의 최소저해농도 측정

Table 3은 황금 추출물을 이용하여 최소저해농도(MIC; minimum inhibitory concentration)를 측정한 결과이다. 항생제 내성균인 *S. Enteritidis*, *S. aureus*, EAEC에 대한 MIC의 농도는 모두 2,048  $\mu$ g/ml로 나타났다. Bae 등(2005)은 황금의 에틸아세테이트 추출물의 MIC를 살펴본 결과, *S. aureus* SG511, *S. aureus* 285 균주에서 3.1 mg/ml, *S. aureus* 503 균주에서 6.3 mg/ml로 낮은 농도에서 항균 활성을 확인하였다. Lee & Seo (2005)는 황금 열수 추출물의 최소저해농도는 *S. aureus*에서 20 mg/ml를 보였으며, Yang & Kim(1998)이 연구한 보고에서는 황금 추출물의 최소저해농도가 *S. aureus*에서 0.062 mg/ml라고 보고한 바 있어 황금 추출물이 Gram 양성균과 Gram 음성균에 대하여 폭넓은 항균활성을 가지고 있다고 보고한 것과 유사한 결과를 얻었다.

### 3. 항생제 내성균의 증식억제 효과

황금 추출물을 농도별로 MHB 배지에서 첨가하고, Gram 양성균인 *S. aureus*와 Gram 음성균인 *S. Enteritidis*, EAEC를 각각 접종시켜 24시간 배양하면서 일정시간 간격으로 균주의 성장 정도를 측정해 본 바 Fig. 1, Fig. 2 및 Fig. 3과 같은 증식곡선을 얻었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 *S. Enteritidis*인 경우, 황금 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 배양 후 4시간 이후 급속한 균의 증식을 볼 수 있었고, 5,000 ppm과 3,000 ppm 농도를 첨가한 경우에는 완만한 증가를 나타낸 반면, 10,000 ppm 농도를 첨가하였을 경우 4시간 이후부터 감소하여 10시간 이후 생육하지 못하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 *S. aureus*인 경우, 황금 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 배양 후 4시간 이후 급속한 균의 증식을 볼 수 있었고, 3,000 ppm 농도를 첨가한 경우에는 완만한 증가를

**Table 3. Minimum inhibitory concentration(MIC) of *Scutellaria baicalensis* extract against antibiotic resistant bacteria**

Concentration ( $\mu$ g/ml)	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Staphylococcus aureus</i>	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
128	+	+	+
256	+	+	+
512	+	+	+
1,024	+	+	+
2,048	-	-	-
4,096	-	-	-

나타난 반면, 5,000 ppm과 10,000 ppm 농도를 첨가하였을 경우 10시간 이후부터 감소한 경향을 나타내었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 EAEC인 경우, 황금 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 배양 후 6시간 이후 급속한 균의 증식을 볼 수 있었고, 5,000 ppm과 3,000 ppm 농도를 첨가한 경우에는 완만한 증가를 나타낸 반면, 10,000 ppm 농도를 첨가하였을 경우 8시간 이후부터 감소한 경향을 나타내었다. Chung 등(2009)은 *S. aureus*에 대해 손바닥 선인장 ethanol 추출물이 3.0 mg/ml 이상에서 증식이 지연되었다고 보고한 바 있으며,

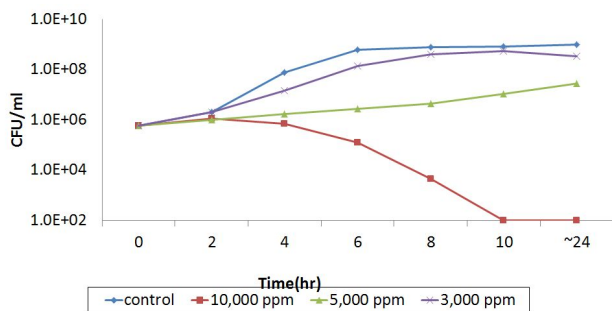


Fig. 1. Effect of *Scutellaria baicalensis* extract on growth inhibiting activity of *Salmonella Enteritidis*.

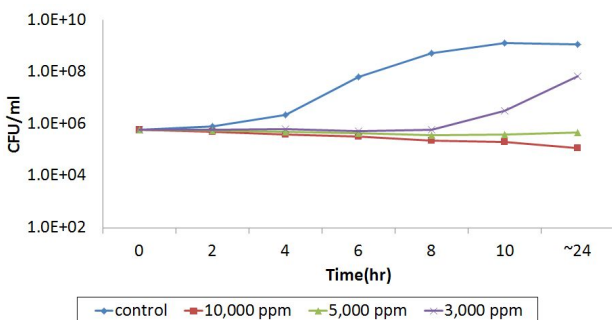


Fig. 2. Effect of *Scutellaria baicalensis* extract on growth inhibiting activity of *Staphylococcus aureus*.

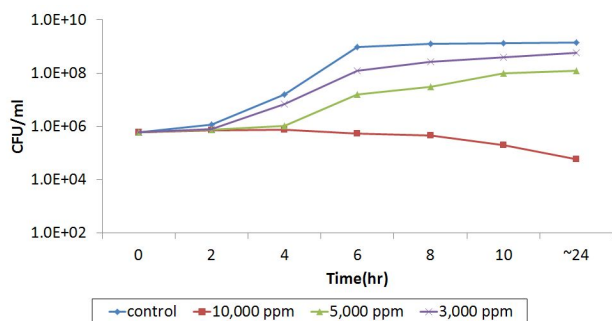


Fig. 3. Effect of *Scutellaria baicalensis* extract on growth inhibiting activity of enteroaggregative *E. coli*.

Jeon 등(2009)은 질경이의 methanol 추출물이 *S. aureus*의 성장을 억제한다고 보고한 바 있다. 또한 Bae 등(2005)은 황금 추출물이 *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*의 성장을 억제한다는 보고한 바 있어 본 실험에서도 황금의 추출물이 항생제 내성 Gram 양성균인 *S. aureus*와 Gram 음성균인 *S. Enteritidis*, EAEC에 대하여 모두 증식 억제효과를 보인 것으로 나타났다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 황금 추출물의 항생제 내성균인 *S. Enteritidis*, *S. aureus*, enteroaggregative *E. coli*에 대한 항균효과를 검증하고, 이들 세균의 증식에 미치는 영향을 조사함으로써 천연 항균제로서의 개발 가능성의 기초 자료로 활용하고자 실시하였다.

1. 황금 추출물 0.1 g/ml에서 항생제 내성균인 *S. Enteritidis*는  $13.0 \pm 0.3$  mm, *S. aureus*는  $11.0 \pm 1.1$  mm, EAEC은  $19.7 \pm 1.4$  mm로, 황금 추출물 0.2 g/ml에서 항생제 내성균인 *S. Enteritidis*는  $14.0 \pm 0.0$  mm, *S. aureus*는  $12.8 \pm 1.7$  mm, EAEC는  $21.7 \pm 1.5$  mm로 억제대를 형성하였다. 즉, 황금 추출물의 농도가 증가할수록 항균 활성이 크게 나타났다.
2. 항생제 내성균에 대한 황금 추출물의 최소저해농도(MIC)를 확인한 결과, 항생제 내성균인 *S. Enteritidis*, *S. aureus*, EAEC에 대한 MIC의 농도는 모두 2,048  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.
3. 황금 추출물을 농도별로 일정시간 간격으로 균주의 성장정도를 측정해 본 결과, *S. Enteritidis*인 경우, 황금 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 배양 후 4시간 이후 급속한 균의 증식을 볼 수 있었고, 5,000 ppm과 3,000 ppm 농도를 첨가한 경우에는 완만한 증가를 나타낸 반면, 10,000 ppm 농도를 첨가하였을 경우 4시간 이후부터 감소를 하여 10시간 이후 생육하지 못하였다. *S. aureus*인 경우, 황금 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 배양 후 4시간 이후 급속한 균의 증식을 볼 수 있었고, 3,000 ppm 농도를 첨가한 경우에는 완만한 증가를 나타낸 반면, 5,000 ppm과 10,000 ppm 농도를 첨가하였을 경우 10시간 이후부터 감소한 경향을 나타내었다. EAEC인 경우, 황금 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 배양 후 6시간 이후 급속한 균의 증식을 볼 수 있었고, 5,000 ppm과 3,000 ppm 농도를 첨가한 경우에는 완만한 증가를 나타낸 반면, 10,000 ppm 농도를 첨가하였을 경우 8시간 이후부터 감소한 경향을 나타내었다.

## 참고문헌

Abo KA, Ogunleye VO, Ashdi JS. 1999. Antimicrobial potential of *Spondias monbin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia*

- crocea*. *Phytother Res* 13:494-497
- Bae JH, Lee MJ, Lee SM. 2005. Antimicrobial effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extracts on food-borne pathogens. *J Kor Microbiol Biotechnol* 33:35-40
- Brassart D, Schiffrin EJ. 1997. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends Food Sci Technol* 8:321-326
- Chattopadhyay D, Maiti K, Kundu AP, Chakraborty MS, Bhadra R, Mandal SC, Mandal AB. Antimicrobial activity of *Alstonia macrephylla*: A folklore of bay islands. *J Ethnopharmacol* 77:49-55
- Cho SH, Kim YR. 2001. Antimicrobial characteristics of *Scutellariae Radix* extract. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 30:964-968
- Choi EM, Lee BK, Koo SJ. 2001. Inhibitory effect on delayed type hypersensitive by the hot water extracts from medicinal herbs. *Kor J Food Sci Technol* 33:146-148
- Choi MR, Lee JS, Lim HS. 2007. Changes in physiological activities of *Scutellariae baicalensis* by heating. *J Life Sci* 17:1381-1386
- Cutter CN. 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *J Food Prot* 63:601-607
- Currier S, Schaafsma GJ. 1998. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 39:237-238
- Jung EA, Kim NJ, Kim YG, Kim DH, Lee SI. 2001. Studies on the development of antihyperlipidemic drugs from oriental herbal medicines(III)-Antihyperlipidemic effects of Gamigwaru-haebaekwhanggum-Tang and its constituent herbal medicines *in vitro*. *Kor J Pharmacogn* 32:22-30
- Jung JW, Ahn NY, Park SH, Oh JG, Oh HR, Lee BG, Om AS, Kim BS, Kim DH, Ryu JH. 2004. The anxiolytic-like effects of *Scutellaria baicalensis* using elevated plus-maze in rats. *Kor J Pharm* 35:22-27
- Kim CH, Jia H, Kim SH, Moon HJ, Lee JS. 2004. The protective effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi on ischemia-reperfusion injuries of rat hearts. *Kor J Lab Ani Sci* 20:357-362
- Kim SC, Ahn KS, Park CK, Jeon BS, Lee JT, Park WJ. 2006. Isolation of antioxidative compound from *Scutellaria baicalensis* G. *J Kor Medicinal Crop Sci* 14:212-216
- Kim YE, Lee YC, Kim HG, Kim CJ. 1997. Antioxidative effect of ethanol fraction for several Korean medicinal plant hot water extracts. *Kor J Food & Nutr* 10:141-144
- Kim YH, Park YS. 2006. Effect of *Scutellaria baicalensis* water extract on antioxidative activity and epidermal thickness in DNCB-induced allergic contact dermatitis animal model. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 35:543-548
- Kwon NH, Kin SH, Bae WK, Kim JY, Lim JY, Noh KM, Kim JM, Ahn JS, Hur J, Park YH. 2001. Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against *Bacillus anthracis* Sterne 34 F2. *Kor J Vet Publ Hlth* 25:277-287
- Kwon NH, Kin SH, Bae WK, Kim JY, Lim JY, Noh KM, Kim JM, Ahn JS, Hur J, Park YH. 2001. Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against major food-borne pathogens. *J Food Hyg Safety* 16:264-273
- Lee CK, Seo JJ. 2005. Antimicrobial activity of Whangkumtang extract and *Scutellariae radix* extract on the food-borne pathogens. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 34:1606-1610
- Mah MW, Menish ZA. 2000. Antibiotic resistance. An impending crisis. *Saudi Med J* 21:1125-1129
- Moon YH, Lee YH, Min BS, Bae KH. 1997. Antibacterial constituents from *Scutellariae radix* against *Streptococcus mutans* OMZ176. *J Kor Pharmacogn* 28:99-103
- Neu HC. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257:1064-1073
- Park SN, Hong JH, Park MG. 1997. Biological protective effect of component from *Scutellaria baicalensis* Georgi against active oxygen induced-tissue damage(V). *Research Bulletin of Seoul-Agriculture University* 45:189-199
- Potera C. 2001. Tree extract curbs food-borne pathogen. *ASM News* 67:605-606
- Rhee JS, Woo ER, Kim NH, Lee EJ, An DK, Lee JH, Park SK, Park HK. 1997. A study on qualitative and quantitative analysis of major ingredients in *Scutellariae radix*. *Anal Sci Technol* 10:91-104
- Ro HS, Ko WG, Kim OJ, Park KK, Cho YW, Park HS. 1996. Antihyperlipidemic activity of *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Coptidis japonica* Makino and *Rhei koreanum* on experimental hyperlipidemic in rats. *J Kor Pharm* 26:215-219
- Woo IT, Park KN, Lee SH. 2007. Antimicrobial activities of *Scutellaria baicalensis* Georgi against various pathogens and spoilage bacteria isolated from Tofu. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 36:470-475
- Yang JH, Kim YI. 1998. Preparation and antibacterial effects of *Scutellariae radix* extract emulsion containing baicalin. *J Kor Pharm Sci* 28:159-164

---

접 수 : 2011년 11월 12일

최종수정 : 2011년 11월 30일

채 택 : 2011년 12월 6일