

피부 병원균에 대한 톱니모자반 추출물의 항균 시너지 효과

김윤희 · 김지훈 · 김덕훈 · 김송희 · 김형락¹ · 김영목*
부경대학교 식품공학과, ¹부경대학교 식품영양학과

Synergistic Antimicrobial Effect of *Sargassum serratifolium* (C. Agardh) C. Agardh Extract against Human Skin Pathogens

Yun Hye Kim, Ji-Hoon Kim, Deok-Hoon Kim, Song-Hee Kim, Hyeung-Rak Kim¹, and Young-Mog Kim*

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University

¹Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University

Abstract The object of this study was to develop an alternative way to treat human skin pathogens using marine algae. During this study, we observed that the ethanolic extract of the edible brown algae [*Sargassum serratifolium* (C. Agardh) C. Agardh] exhibited potential antimicrobial activity against pathogenic commensal bacteria related with acne vulgaris (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*), and *Candida albicans* which causes cutaneous candidiasis. Among the solvent-soluble fractions from the ethanolic extract, a hexane-soluble fraction showed the strongest antimicrobial activity against all tested human skin pathogens with MIC values ranging from 32 to 512 µg/mL. In addition, the hexane fraction exhibited a synergistic antimicrobial activity with commercial antibiotics used in the treatment of acne vulgaris or cutaneous candidiasis. Thus, this study suggests that *S. serratifolium* extract could be a potential source of natural antimicrobial agents or a pharmaceutical component against human skin pathogens.

Keywords: acne vulgaris, antibiotic resistance, cutaneous candidiasis, *Sargassum serratifolium* C. Agardh

서 론

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*와 *Candida albicans*는 사람의 피부에서 발생하는 질병과 밀접한 관련을 가지는 피부 병원균으로, 여드름과 같은 비정상적인 모낭 각화와 피부 염증을 유발한다고 알려져 있다(1,2). 현재 이러한 피부 병원균을 억제하기 위한 치료방법으로 항생제가 빈번히 사용되고 있으나, 항생제를 장기간 사용할 경우 종종 항생제 내성, 장기 손상, 면역 과민 반응 등과 같은 부작용이 나타난다고 보고되고 있다(2,3-6). 최근에는 항생제 사용에 의한 부작용을 최소화 하면서 피부 병원균을 억제할 수 있는 새로운 방법으로 천연물을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 항균, 산화방지, 항염증과 항암 효과 등의 다양한 생리활성을 가지는 해조류에 대해 많은 관심이 집중되고 있다(2,7,8). 하지만, 피부 병원균에 대한 해조류의 항균 활성 연구는 상대적으로 미미한 편이며, 현재 진행된 연구도 대황(*Eisenia bicyclis*), 감태(*Ecklonia cava*), 검등감태(*Ecklonia kurome*), 보라우무(*Symphycloadia latiuscula*) 그리고 넓패(*Ishige sinicola*) 추출물의 *P. acnes*에 대한 항균 활성 연구가 대부분으로 다양한 피부

병원균에 대한 항균 활성 연구는 부족한 실정이다(2,9,10). 특히, 모자반 추출물의 피부 병원균에 대한 항균 활성은 현재까지 보고된 예가 없다.

우리나라 연안에는 약 30여 종의 모자반이 서식한다고 알려져 있으며(11), 이들 모자반류의 산화방지, 항염증 및 항암 효과 등에 대한 연구가 다수 보고되고 있다. Ahn 등(12)과 Bae(13)는 참모자반(*Sargassum fulvellum*) 추출물의 나이트로사민(nitrosoamine) 생성 억제 효과와 항암 효과, Kim 등(14)은 경단구슬모자반(*Sargassum muticum*) 추출물의 DPPH 라디칼(radical) 소거 활성 효과, Joung 등(15)은 지방질다당류(lipopolysaccharide)에 의해 염증 유도된 RAW 264.7 큰포식세포(macrophages)에 대한 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물의 항염증 활성, 그리고 Kang 등(16)은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 노말-헥세인(*n*-hexane) 추출물의 함암효과 등을 보고하였다. 이러한 선행연구로 모자반 추출물이 다양한 생리활성 기능을 가지고 있는 것이 알려졌다. 다양한 피부 병원균에 대한 항균 활성 연구는 없다. 이에 본 연구에서는 선행연구로 다양한 생리활성 기능이 보고된 참모자반, 경단구슬모자반 등을 포함한 총 7종의 모자반을 시험 대상으로 선정, 피부 병원균에 대한 이들 추출물의 항균 활성과 기존에 사용되고 있는 항생제와의 병용에 의한 항균 시너지(synergy) 효과에 대한 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출

실험에 사용된 해조류는 개모자반과 속하는 외톨개모자반과 모자반과 속하는 참모자반, 경단구슬모자반, 톱니모자반, 예모

*Corresponding author: Young-Mog Kim, Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
Tel: 82-51-629-5832
Fax: 82-51-629-5824
E-mail: ymkim@pknu.ac.kr
Received March 25, 2016; revised May 2, 2016;
accepted May 2, 2016

Table 1. List of *Sargassum* sp. used in this study

| Science name | Abbreviations | Family | Order | Collection place |
|--|-------------------------|----------------|---------|------------------|
| <i>Sargassum fulvellum</i> (Turner) C. Agardh | <i>S. fulvellum</i> | | | Tongyeong, Korea |
| <i>Sargassum yezoense</i> (Yamada) Yoshida et Konno | <i>S. yezoense</i> | | | Ulljin, Korea |
| <i>Sargassum muticum</i> (Yendo) Fensholt | <i>S. muticum</i> | Sargassaceae | | |
| <i>Sargassum patens</i> C. Agardh | <i>S. patens</i> | | Fucales | Tongyeong, Korea |
| <i>Sargassum serratifolium</i> (C. Agardh) C. Agardh | <i>S. serratifolium</i> | | | |
| <i>Myagropsis myagroides</i> (Mertens ex Turner) Fensholt | <i>M. myagroides</i> | Cystoseiraceae | | Busan, Korea |
| <i>Sargassum horneri</i> (Turner) C. Agardh | <i>S. horneri</i> | Sargassaceae | | |

자반(*Sargassum yezoense*), 쌍발이모자반(*Sargassum patens*), 그리고 팽생이모자반(*Sargassum horneri*) 총 7종의 모자반으로 2014년 5월에 부산 기장군, 경남 통영시, 경북 울진군 등지에서 구입하여 -80°C 에서 냉동보관 중인 것을 사용하였다(Table 1). 모자반은 탈염 후 물로 세척하였고 이를 60°C 에서 건조시켰다. Kim 등(5)의 방법에 따라 건조된 모자반 속은 분쇄기(HMF-1000A; Hanil Electronics, Seoul, Korea)를 통해 분말 상태로 분쇄하였다. 각 모자반 분말은 70°C 에서 3시간 동안 3회 에탄올(95% ethanol; 10 L \times 3)로 추출하였다. 에탄올 추출물은 진공회전농축기(Eyela Co., Tokyo, Japan)로 농축시키고, 농축된 에탄올 추출물에 10% 에탄올(1.0 L)을 넣고 차례로 노말-헥세인(1.0 L \times 3), 아세트산에틸(ethyl acetate; 1.0 L \times 3), 노말-부탄올(*n*-butanol; 1.0 L \times 3) 용액으로 분획하고 남은 분획층은 수용 분획(water soluble fraction)으로 사용하였다. 이후, 각각의 분획층은 진공상태인 45°C 에서 진공회전농축기(Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 증발시켰다(5).

실험 균주와 배지 조건

본 연구에 사용된 표준균주 *S. aureus* KCTC 1927, *S. epidermidis* KCTC 1370, *P. aeruginosa* KCTC 1637, *C. albicans* KCTC 7122 그리고 *P. acnes* KCTC 3314는 한국미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 각 균주의 종균 배양을 위해서 *S. aureus*, *S. epidermidis*와 *P. aeruginosa*는 tryptic soy broth (TSB; Difco Inc., Detroit, MI, USA)에서 37°C 의 호기적인 조건에서 배양하였으며, *P. acnes*는 brain heart infusion broth (BHI; Difco Inc.)에 1.0%의 포도당(glucose)을 보충하여 10% 이산화탄소(CO_2) 조건에서 배양하였다. *C. albicans*는 yeast malt broth (YMB; Difco Inc.)에서 25°C 의 조건에서 배양하였다.

항균 활성 측정

모자반 추출물의 항균 활성은 National Committee for Clinical Laboratory Standards(17)의 방법에 따라 추출물 또는 분획층이 함유된 직경이 6 mm인 paper discs를 Mueller-Hinton agar 또는 blood agar 표면에 위치시켜 일정시간 배양시킨 후 억제환의 지름을 측정하는 disc diffusion assay로 확인하였다. 또한, 모자반 추출물의 미생물 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 Kim 등(5)의 방법에 따라 96-well-microplate를 이용한 2-fold dilution method로 분석하였다.

항생제 감수성 측정

시험균주의 항생제 감수성은 MIC assay를 통해 확인하였으며 4종의 상업용 항생제인 테트라사이클린(tetracycline), 에리트로마이신(erythromycin), 리코마이신(lico mycin) 그리고 플루코나졸(fluconazole)이 이용되었다.

모자반 추출물과 항생제의 항균 시너지 효과

모자반 추출물과 항생제와의 병용 사용에 의한 항균 시너지 효과는 fractional inhibitory concentration (FIC) 지수를 이용하여 판단하였다(18). FIC 지수는 다음 방정식에 의해 계산되었다.

$$\text{FIC}_A = \text{MIC}_A \text{ in combination} / \text{MIC}_A$$

$$\text{FIC}_B = \text{MIC}_B \text{ in combination} / \text{MIC}_B$$

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$$

FIC 지수 <0.5 는 marked synergy, $0.5 < \text{FIC} < 1.0$ 은 weak synergy, 1.0 은 additive, $>1.0 < \text{FIC} < 2.0$ 은 subaddictive, 2.0 은 indifferent 그리고 >2.0 은 antagonistic으로 판단하였다.

통계분석

통계분석은 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) version 12.0을 사용하여 $p < 0.05$ 유의 수준에서 분석되었다.

결과 및 고찰

피부 병원균에 대한 톱니모자반의 항균 활성

피부 병원균에 대한 7종의 모자반 추출물의 항균 활성은 Table 2에 나타내었다. 이들 중 톱니모자반 추출물의 억제환이 7.0 mm에서 13.0 mm로 가장 높은 항균 활성을 나타내었다. 이 결과는 대표적인 갈조류인 대항 추출물의 피부 병원균에 대한 항균 활성에 관한 Lee 등(2)의 연구와 유사하게 나타났다(7.0-14.0 mm). 하지만, 톱니모자반 추출물은 대항 추출물과 달리 피부 질환과 관련된 병원성 세균에 대한 강력한 항균 활성뿐만 아니라, 캔디다증을 유발하는 진균인 *C. albicans*의 생육 억제에 대해서도 뛰어난 항진균 효과를 나타내었다. 반면에 참모자반, 경단구슬모자반과 팽생이모자반 추출물은 본 연구에 사용된 피부 병원균에 대해 생육 억제환을 형성하지 못하였다. 또한, 왜모자반, 쌍발이모자반 그리고 외톨개모자반 추출물은 일부의 병원균에 대한 약한 생육 억제 효과(7.0-9.0 mm)가 관찰되어 상대적으로 본 연구에 사

Table 2. Antimicrobial activity of *Sargassum* sp. ethanolic extracts against human skin pathogens

| Strains | Extracts | Zone of inhibition (mm) | | | | | | |
|---|-----------|-------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| | | <i>S. fulvellum</i> | <i>S. yezoense</i> | <i>S. muticum</i> | <i>S. patens</i> | <i>S. serratifolium</i> | <i>M. myagroides</i> | <i>S. horneri</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927 | 1 mg/disc | - ^{a)} | 7.0±0.1 ^{b)} | - | 7.0±0.2 | 7.0±0.3 | - | - |
| | 5 mg/disc | - | 9.0±0.2 | - | 9.0±0.3 | 10.0±0.4 | 7.0±0.2 | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ACTC 14990 | 1 mg/disc | - | - | - | - | 10.0±0.2 | - | - |
| | 5 mg/disc | - | - | - | - | 13.0±0.3 | 7.0±0.2 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC1637 | 1 mg/disc | - | - | - | - | - | - | - |
| | 5 mg/disc | - | - | - | - | 7.0±0.3 | - | - |
| <i>Propionibacterium acnes</i> KCTC 3314 | 1 mg/disc | - | 8.0±0.3 | - | - | 9.0±0.3 | - | - |
| | 5 mg/disc | - | 9.0±0.2 | - | - | 10.0±0.2 | - | - |
| <i>Candida albicans</i> KCTC 7122 | 1 mg/disc | - | - | - | - | 10.0±0.2 | - | - |
| | 5 mg/disc | - | 8.0±0.1 | - | - | 11.0±0.2 | - | - |

Ethanol extracts from *Sargassum* sp. were loaded onto discs (6 mm in diameter). The abbreviation of *Sargassum* sp. were listed in Table 1. ^{a)}, No detection of antimicrobial activity. ^{b)}, Data are the averages of triplicate experiments.

Table 3. Antimicrobial activity of *Sargassum serratifolium* (C. Agardh) C. Agardh ethanolic extract and its soluble fractions against human skin pathogens

| Strains | Extract and fractions | Zone of inhibition (mm) | | | | |
|---|-----------------------|-------------------------|----------|----------|-----------------|------------------|
| | | EtOH | Hexane | EtOAc | BuOH | H ₂ O |
| <i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927 | 1 mg/disc | 7.0±0.3 ^{a)} | 10.0±0.1 | 11.0±0.2 | - ^{b)} | - |
| | 5 mg/disc | 10.0±0.4 | 10.0±0.3 | 13.0±0.1 | - | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ACTC 14990 | 1 mg/disc | 10.0±0.2 | 11.0±0.2 | 10.0±0.2 | - | - |
| | 5 mg/disc | 13.0±0.3 | 12.0±0.3 | 14.0±0.1 | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC1637 | 1 mg/disc | - | 8.0±0.1 | 7.0±0.3 | - | - |
| | 5 mg/disc | 7.0±0.3 | 9.0±0.4 | 8.0±0.2 | - | - |
| <i>Propionibacterium acnes</i> KCTC 3314 | 1 mg/disc | 9.0±0.3 | 12.0±0.2 | 13.0±0.2 | - | - |
| | 5 mg/disc | 10.0±0.2 | 14.0±0.3 | 14.0±0.1 | - | - |
| <i>Candida albicans</i> KCTC 7122 | 1 mg/disc | 10.0±0.2 | 10.0±0.1 | 10.0±0.2 | - | - |
| | 5 mg/disc | 11.0±0.2 | 10.0±0.2 | 11.0±0.2 | - | - |

EtOH, ethanolic extract; Hexane, *n*-hexane-soluble fraction; EtOAc, ethyl acetate-soluble fraction; BuOH, *n*-butanol-soluble fraction; H₂O, water-soluble fraction. ^{a)}, Data are the averages of triplicate experiments. ^{b)}, No detection of antimicrobial activity.

용된 피부 병원균에 대한 항균 활성이 미약한 것으로 판단되었다. 이에, 피부 병원균에 대한 강한 항균 활성을 나타내는 톱니모자반 추출물을 유기용매로 분획하고 각 유기용매 분획층의 항균 활성을 측정하였다(Table 3).

톱니모자반 추출물의 유기용매 분획층 중에서 노말-헥세인과 아세트산에틸 분획층이 disc diffusion assay 결과, 억제환이 8.0-14.0 mm로 5종의 분획층 중 가장 높은 항균 활성을 나타내었다. 또한, 톱니모자반 노말-헥세인과 아세트산에틸 분획층은 대항 추출물과는 달리 *C. albicans*에 대해서도 뛰어난 항진균 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다(2). 하지만, 노말-뷰탄올과 수용 분획층은 피부 병원균에 대한 항균 활성이 나타나지 않았다. 이상의 결과를 종합해 보면 톱니모자반 추출물의 경우, 노말-헥세인과 아세트산에틸 분획층에 피부 병원균에 대한 항균 활성 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 판단된다.

피부 병원균에 대한 톱니모자반 추출물의 minimum inhibitory concentration (MIC)

피부 병원균에 대한 톱니모자반 추출물의 항균 활성 후속 연구를 위해 유기용매를 이용하여 분획을 하였고, 분획층 중에서

노말-헥세인과 아세트산에틸 분획층이 disc diffusion assay에서 본 실험에 사용된 5종의 피부 병원균에 대해 가장 좋은 항균 활성을 보였다(Table 3). 톱니모자반 추출물의 항균 효과를 보다 정확하게 평가하기 위해 MIC assay를 이용하여 항균 활성을 정량 분석하였다. 노말-헥세인 분획층의 MIC값(value)이 32 µg/mL에서 512 µg/mL로 에탄올 추출물과 아세트산에틸 분획층에 비해 가장 낮게 나타나 피부 병원균에 대한 성장억제효과가 가장 높은 것으로 나타났다(Table 4). 이 결과는 톱니모자반과 같은 갈조류에 속하는 대항 추출물의 경우, 아세트산에틸 분획층이 피부 병원균에 대해 가장 높은 항균 활성을 나타낸다는 Lee 등(2)의 연구 결과와는 일치하지 않았다. Lee 등(2)은 대항 아세트산에틸 분획층이 피부 병원균에 대한 뛰어난 항균 활성을 나타내는 이유로 아세트산에틸 분획층에 플로로타닌(phlorotannin) 화합물이 다량 함유되어 있기 때문인 것으로 보고하였다. 반면, 본 연구에서는 톱니모자반 추출물의 노말-헥세인 분획층이 피부 병원균에 대해 가장 뛰어난 항균 활성을 나타내었으며, 이는 톱니모자반에는 다른 갈조류에서 발견되는 항균성 물질과는 다른 구조를 가지고 있는 새로운 항균성 물질이 존재하고 있다는 것을 의미하며 향후 이러한 신규 물질을 찾기 위한 심도 있는 연구가 요구된다(19).

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Sargassum serratifolium* (C. Agardh) C. Agardh extracts and antibiotics (tetracycline, erythromycin, lincomycin and fluconazole) against human skin pathogens

| Strains | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | |
|--|--------------------------|--------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| | EtOH | Hexane | EtoAc | Tetracycline | Erythromycin | Lincomycin | Fluconazole |
| <i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927 | 1,024 | 256 | 1,024 | <0.125 | <0.125 | <0.125 | - ^{a)} |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ACTC 14990 | 1,024 | 128 | 1,024 | 0.25 | 0.125 | 8 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC1637 | 512 | 512 | 512 | 4 | 64 | 256 | - |
| <i>Propionibacterium acnes</i> KCTC 3314 | 1,024 | 32 | 1,024 | 32 | 1,024 | 1,024 | - |
| <i>Candida albicans</i> KCTC 7122 | 512 | 512 | 512 | - | - | - | 32 |
| MIC Breakpoint | - | - | - | 4-8 ^{b)} | 1-4 ^{b)} | 2-8 ^{b)} | 8 ^{c)} |

^{a)}, Not determined. ^{b)}, Soussy et al. (1994). ^{c)}, Fothergill et al. (2014). EtOH, ethanolic extract; Hexane, *n*-hexane-soluble fraction; EtoAc, ethyl acetate-soluble fraction

Table 5. Minimum inhibitory concentrations (MIC) and fractional inhibitory concentration (FIC) indices of the hexane fraction of *Sargassum serratifolium* (C. Agardh) C. Agardh in combination with antibiotics against human skin pathogens

| Strains | Test compound | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | FIC _{max} ^{a)} | FIC _{min} ^{b)} | Median FIC ^{c)} | Minimum concentration for observing synergy ($\mu\text{g/mL}$) |
|--|---------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|--|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC1637 | Hexane | 512 | | | | 16 |
| | Erythromycin | 64 | 0.56 | 0.28 | 0.50 | 16 |
| | Hexane | 512 | 1.00 | 0.50 | 0.55 | 128 |
| | Lincomycin | 256 | | | | 64 |
| <i>Propionibacterium acnes</i> KCTC 3314 | Hexane | 32 | 1.00 | 0.09 | 0.26 | 1 |
| | Tetracycline | 32 | | | | 2 |
| | Hexane | 32 | 1.00 | 0.16 | 0.27 | 1 |
| | Erythromycin | 1,024 | | | | 128 |
| | Hexane | 32 | 1.00 | 0.13 | 0.27 | 2 |
| | Lincomycin | 1,024 | | | | 64 |
| <i>Candida albicans</i> KCTC 7122 | Hexane | 512 | 1.13 | 0.31 | 0.52 | 128 |
| | Fluconazole | 32 | | | | 2 |

FIC, the sum of FICs; ^{a)}, FIC_{max}, maximum FICs; ^{b)}, FIC_{min}, minimum FICs; and ^{c)}, Median FIC, media of FICs. The FIC index indicated <0.5, marked synergy; 0.5 to <1.0, weak synergy; 1.0, additive; >1.0 to <2.0, subaddictive; 2.0, indifferent; >2.0, antagonistic.

피부 병원균의 항생제에 대한 내성

테트라사이클린, 에리크로마이신, 리코마이신은 주로 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. acnes*와 같은 피부 병원균 및 여드름 치료에 사용되며, 플루코나졸은 진균 감염에 대한 치료제로 사용된다(6,20,21). 하지만, 상용적으로 사용되고 있는 이들 항생제에 대해 피부 병원균이 항생제 내성을 나타내고 있는 것으로 보고 되고 있다(2,22). 이에, 본 연구에서도 이들 4종의 상업용 항생제에 대한 피부 병원균의 감수성을 평가하였다. 시험은 MIC assay를 통해 이루어졌으며 항생제 내성 profile은 Soussy 등(23)과 Fothergill 등(24)의 MIC breakpoint를 기초로 분석하였다(Table 4).

본 연구에 사용 된 시험균주 중, *S. aureus*와 *S. epidermidis*는 3종의 항균제(테트라사이클린, 에리크로마이신, 리코마이신)에 대해 MIC breakpoint를 충족시킴으로써 항생제에 대해 내성을 가지고 있지 않는 것으로 판단되었다. 하지만, *P. aeruginosa*는 에리크로마이신과 리코마이신에 MIC breakpoint값이 각각 64 $\mu\text{g/mL}$ 과 256 $\mu\text{g/mL}$ 로 강한 항생제 저항성을 나타냈다. 한편, 본 연구에 사용된 *P. acnes*는 3종의 항생제에 대해 MIC breakpoint값이 32-1,024 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 저항성을 나타냈다. 이러한 피부 병원균의 항생제 내성 profile은 Lee 등(2)의 연구와 유사하게 나타났다. 항진균제로 사용되고 있는 플루코나졸에 대해 본 연구에 사용된 *C. albicans*의 MIC값은 32 $\mu\text{g/mL}$ 로, 플루코나졸의 MIC

breakpoint값인 8 $\mu\text{g/mL}$ 를 상회하여 항진균제에 대해 높은 내성을 나타냈다(24). 또한, 환자들에게서 분리된 많은 피부 병원균들이 상용적으로 사용되고 있는 이들 항생제에 대해 내성을 나타내고 있는 것으로 보고되고 있다(25,26). 즉, 이들 상업용 항생제들은 치료제로서의 역할을 상실한 것으로 판단되며 이를 극복할 수 있는 대안으로 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과 이들 항생제와의 병용에 의한 항균 활성의 시너지 효과에 대한 연구를 진행하였다.

피부 병원균에 대한 톱니 모자반 노말-헥세인 분획층과 항생제와의 시너지 효과

최근에 항생제 내성 미생물 제어를 위한 효과적인 방법중의 하나로 천연물 유래의 항균 활성 물질과 병용하여 항생제의 항균 활성을 회복하는 것에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(2,4,5,27,28). 이에 본 연구에서도 톱니모자반 추출 분획층 중에서 피부 병원균들에 대해 가장 우수한 항균 활성을 가지고 있는 것으로 나타난 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과 항생제와의 병용에 의한 항균 활성의 시너지 효과에 대한 연구를 진행하였다. 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과 상업용 항생제 간의 상호작용은 FIC assay를 통한 checkerboard method로 분석하였다(Table 5).

Table 4에 나타난 것처럼, *P. aeruginosa*는 2종의 항생제(에리트로마이신과 리코마이신)에 대한 내성을 나타내고 있다. 하지만,

톱니모자반 노말-헥세인 분획층(16 µg/mL)을 병용 사용하였을 때, *P. aeruginosa*균에 대한 에리트로마이신의 MIC값은 64 µg/mL에서 16 µg/mL로 4배 낮은 농도에서 균의 증식을 억제할 수 있었다. 린코마이신의 경우에도 128 µg/mL의 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과의 병용에 의해 MIC값이 256 µg/mL에서 64 µg/mL로 4배 낮은 농도에서 균의 증식을 억제할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과 에리트로마이신 그리고 린코마이신을 병용하였을 때의 FIC값을 계산해 본 결과 FIC_{max}과 FIC_{min}값이 0.28-1.00의 범위로 나타났고 median FIC값은 모두 0.5-1.0의 값을 나타내었기 때문에 노말-헥세인 분획층과 에리트로마이신 그리고 노말-헥세인 분획층과 린코마이신의 병용 사용은 *P. aeruginosa*균에 대해 weak synergy 효과가 나타나는 것으로 나타났다. 이상의 결과는, 해조류 추출물과의 병용 사용으로 항생제 내성을 획득한 세균들에 대하여 항균 효과를 상실한 기존의 상업용 항생제의 항균 활성 회복에 대해 연구한 이전의 연구 결과들과도 일치한다(2,4,5,27,28).

*P. acnes*는 3종의 항생제(테트라사이클린, 에리트로마이신, 린코마이신)에 대한 내성을 나타내고 있다. 하지만, Table 5에 나타난 것과 같이 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과 병용 사용하였을 때 각 항생제들의 MIC값은 단독으로 사용하였을 때 보다 8-16배 낮은 농도로 *P. acnes*균의 생육을 억제할 수 있는 것으로 분석되었다(테트라사이클린 16배, 에리트로마이신 8배, 린코마이신 16배). 이들 항생제와 톱니모자반 노말-헥세인 분획층의 FIC_{min}와 FIC_{max}값은 0.09-1.00의 범위로 나타났고 median FIC값은 0.26- 0.27로 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과 이들 3종의 항생제와의 병용 사용은 *P. acnes*균에 대해 marked synergy 효과가 나타나는 것으로 나타났다.

항진균제인 플루코나졸의 경우에도 톱니모자반 노말-헥세인 분획층(128 µg/mL)과의 병용에 의해 Table 5에 나타난 것과 같이 *C. albicans*에 대한 MIC값이 32 µg/mL에서 2 µg/mL로 16배 낮은 농도에서 균의 증식을 억제할 수 있었다. 이들 두 물질의 병용 사용에 의한 시너지 효과를 FIC index로 분석한 결과는 FIC_{max}값이 1.13이었지만 FIC_{min}값이 0.52로 weak synergy 효과가 있다는 것으로 분석되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 톱니모자반 추출물은 여드름 등의 피부 질환을 유발하는 피부 병원균들에 대하여 대부분의 천연물 유래의 추출물이 항균 활성을 거의 나타내지 못하는 그람(Gram) 음성의 *P. aeruginosa* 뿐만 아니라 진균류인 *C. albicans*에 대해서도 항균 활성을 나타내는 등 넓은 스펙트럼(broad spectrum)을 가진 항균 활성을 나타내고 있어 상업적 적용에 대한 가능성이 아주 높을 것으로 기대된다. 또한, 피부 감염 질환의 치료제로서 효능을 거의 상실한 상용 항생제와의 병용에 의해 이들 항생제의 항균 활성 회복에 기여 할 수 있어 항생제 내성균의 출현 억제뿐만 아니라 향후 잠재적 치료제로서의 가능성도 높을 것으로 기대된다.

요 약

S. aureus, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. acnes*와 *C. albicans*는 사람의 피부에서 발생하는 질병과 밀접한 관련을 가지는 대표적인 병원성 미생물로 알려져 있다. 본 연구에서는 해조류 중에서도 항균 활성에 대한 연구가 미미한 모자반을 대상으로 피부 병원균에 대한 항균 효과를 조사하였다. 국내의 연해에 자생하는 7종의 모자반 추출물 중에서 disc diffusion assay와 MIC assay를 통해 가장 뛰어난 항균 효과를 나타낸 톱니모자반을 후

속 연구를 위한 후보 물질로 선정하고 연구를 진행하였다. 톱니모자반 추출물의 유기용매 분획층 중에서, 노말-헥세인 분획층이 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. acnes* 및 *C. albicans*에 대한 MIC값이 32-256 µg/mL로 가장 뛰어난 항균 활성을 나타내었다. 이에 피부 병원균들에 대한 치료제로 사용되고 있지만 내성균의 출현으로 효능이 거의 없는 항생제들인 테트라사이클린, 에리트로마이신, 린코마이신과 플루코나졸과 항균 활성이 뛰어난 것으로 나타난 톱니모자반의 노말-헥세인 분획층과의 병용 사용에 의한 항균 시너지 효과를 조사하였다. 그 결과, 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과 이들 항생제와의 병용 사용에 의해 피부 병원균에 대한 항생제와 톱니모자반 노말-헥세인 분획층의 MIC값이 4-32배 감소되었고, 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과 이들 항생제와의 병용 시 median FIC값이 0.26-0.55로 항균 시너지 효과를 나타내었다. 즉, 항생제와 톱니모자반 노말-헥세인 분획층과의 병용 사용은 피부 병원균에 대한 이들 항생제의 감수성을 회복시키는데 크게 기여하는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2016년)에 의하여 연구되었음

References

1. Farrar MD, Ingham E. Acne: Inflammation. Clin. Dermatol. 22: 380-384 (2004).
2. Lee JH, Eom SH, Lee EH, Jung YJ, Kim HJ, Jo MR, Son KT, Lee HJ, Kim JH, Lee MS, Kim YM. *In vitro* antibacterial and synergistic effect of phlorotannins isolated from edible brown seaweed *Eisenia bicyclis* against acne-related bacteria. Algae 29: 47-55 (2014)
3. Yamaguchi N, Satoh-Yamaguchi K, Ono M. *In vitro* evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. Phytomedicine 16: 369-376 (2009)
4. Eom SH, Kang SK, Lee DS, Myeong JI, Lee J, Kim HW, Kim KH, Je JY, Jung WK, Kim YM. Synergistic antibacterial effect and antibacterial action mode of chitosan-ferulic acid conjugate against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Microbiol. Biotechnol. 26: 784-789 (2016)
5. Kim SY, Kim YM, Kim EJ, Lee MS. Synergistic antibacterial activity of *Ecklonia cava* extract against antibiotic resistant *Enterococcus faecalis*. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 48: 51-57 (2015)
6. Ravenscroft J. Evidence based update on the management of acne. Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed. 90: ep98-ep101 (2005)
7. Abad MJ, Bedoya LM, Bermejo P. Natural marine anti-inflammatory products. Mini Rev. Med. Chem. 8: 740-754 (2008)
8. Gupta S, Abu-Ghannam N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends Food Sci. Technol. 22: 315-326 (2011)
9. Choi JS, Bae HJ, Kim SJ, Choi IS. *In vitro* antibacterial and anti-inflammatory properties of seaweed extracts against acne inducing bacteria, *Propionibacterium acnes*. J. Environ. Biol. 32:313-318 (2011)
10. Choi JS, Lee K, Lee BB, Kim YC, Kim YD, Hong YK, Cho KK, Choi IS. Antibacterial activity of the phlorotannins dieckol and phlorofuroeckol-A from *Ecklonia cava* against *Propionibacterium acnes*. Bot. Sci. 92: 425-431 (2014)
11. Oak JH, Lee IK. Taxonomy of the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from Korea II. subgenus *Bactrophycus* section *Halochloa* and *Repentia*. Algae 21: 393-405 (2006)
12. Ahn SM, Hong YK, Kwon GS, Sohn HY. Evaluation of antioxidant and nitrite scavenging activity of seaweed extracts. J. Life Sci. 21: 576-583 (2011)

13. Bae SJ. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fractions on several human cancer cell lines *in vitro*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 480-486 (2004)
14. Kim JY, Lee JA, Kim KN, Yoon WJ, Lee WJ, Park SY. Antioxidative and antimicrobial activities of *Sargassum muticum* extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36: 663-669 (2007)
15. Joung EJ, Lee MS, Choi JW, Kim JS, Shin TS, Jung BM, Yoon NY, Lim CW, Kim JI, Kim HR. Anti-inflammatory effect of ethanolic extract from *Myagropsis myagroides* on murine macrophages and mouse ear edema. BMC Complement. Altern. Med. 12:171 (2012)
16. Kang CW, Park MS, Kim NH, Lee JH, Oh CW, Kim HR, Kim GD. Hexane extract from *Sargassum serratifolium* inhibits the cell proliferation and metastatic ability of human glioblastoma U87MG cells. Oncol. Rep. 34:2602-268 (2015)
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Forth Informational Supplement. CLSI document M100-S24, Wayne, PA, USA. (2014)
18. Hsieh MH, Yu CM, Yu VL, Chow JW. Synergy assessed by checkerboard: A critical analysis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 16: 343-349 (1993)
19. Choi JG, Kang OK, Brice OO, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Sohn DH, Park Y, Choi HG, Kim SG, Shin DW, Kwon DY. Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. Foodborne Path. Dis. 7:435-441(2010)
20. Gollnick H, Cunliffe W, Berson D, Dreno B, Finlay A, Leyden JJ, Shalita AR, Thiboutot D. Management of acne: A report from a global alliance to improve outcomes in acne. J. Am. Acad. Dermatol. 49: S1-S37 (2003)
21. Han SM, Lee KG, Yeo JH, Baek HJ, Park KK. Antibacterial and anti-inflammatory effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom against acne-inducing bacteria. J. Med. Plants Res. 4: 459-464 (2010)
22. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. Clin. Microbiol. Rev. 19: 435-447 (2006)
23. Soussy CJ, Cluzel R, Courvalin P. Definition and determination of *in vitro* antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria in France. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13: 238-246 (1994)
24. Fothergill AW, Sutton DA, McCarthy DI, Wiederhold NP. Impact of new antifungal breakpoints on antifungal resistance in *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 52: 994-997 (2014)
25. Eady EA, Farmery MR, Ross JI, Cove JH, Cunliffe WJ. Effects of benzoyl peroxide and erythromycin alone and in combination against antibiotic-sensitive and -resistant skin bacteria from acne patients. Br. J. Dermatol. 131: 331-336 (1994)
26. Eady EA, Bojar RA, Jones CE, Cove JH, Holland KT, Cunliffe WJ. The effects of acne treatment with a combination of benzoyl peroxide and erythromycin on skin carriage of erythromycin resistant propionibacteria. Br. J. Dermatol. 134: 107-113 (1996)
27. Eom SH, Kim DH, Lee SH, Yoon NY, Kim JH, Kim TH, Chung YH, Kim SB, Kim YM, Kim HW, Lee MS, Kim YM. *In vitro* antibacterial activity and synergistic antibiotic effects of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Phytother. Res. 27: 1260-1264 (2013)
28. Nshimiyumukiza O, Kang SK, Kim HJ, Lee EH, Han HN, Kim YH, Kim DH, Kim JH, Eom SH, Kim YM. Synergistic antibacterial activity of *Ecklonia cava* (Phaeophyceae: Laminariales) against *Listeria monocytogenes* (Bacillales: Listeriaceae). Fish. Aquat. Sci. 18: 1-6 (2015)