



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

Enterococcus faecalis 에 대한
감태의 항균 및 시너지 효과



2015 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

김 승 용

공학석사 학위논문

Enterococcus faecalis 에 대한
감태의 항균 및 시너지 효과

지도교수 김 영 목

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2015 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

김 승 용

김승용의 공학석사 학위논문을 인준함

2015 년 2 월 27 일

위 원 장 공학박사 김 선 봉



위 원 공학박사 전 병 수



위 원 공학박사 김 영 목



목 차

목 차.....	i
ABSTRACT	iii
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법	7
1. 실험재료	7
1.1 시험물질 선정 및 추출.....	7
1.2 시험에 사용 된 균주 및 배지.....	9
2. 실험방법	10
2.1 Disc diffusion assay	10
2.2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bacterial concentration (MBC).....	10
2.3 항생제 감수성 시험.....	11
2.4 Fractional inhibitory concentration (FIC).....	11
2.5 통계분석.....	13

III 결과 및 고찰	15
3.1 해조류 MeOH 추출물의 항균활성.....	15
3.2 감태 추출물의 MIC 및 MBC 시험결과	19
3.3 <i>Enterococcus faecalis</i> 의 항생제 저항성 시험결과	22
3.4 <i>Enterococcus faecalis</i> 에 대한 감태의 EtOAc 분획 추출물과 항생제와의 synergy 효과	26
IV. 요약.....	30
V. 참고문헌	35



Antibacterial and synergistic of *Ecklonia cava* against

Enterococcus faecalis

Seung Yong Kim

Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Enterococcus faecalis is a nonmotile, gram-positive, spherical bacterium. it can be observed singly, in pairs, or in short chains, and is most often found in the large intestine of humans. *E. faecalis* can cause life-threatening infection in human, especially in the nosocomial environment, where the naturally high levels of antibiotic resistance found in *E. faecalis* contribute to its pathogenicity. *Enterococci* begin with intrinsic resistance to most β -lactam antibiotics because they contain penicillin binding proteins (PBPs), especially low molecular weight PBPs such as PBP 5, which enable them to synthesize cell wall components even in the presence of modest concentrations of most β -lactam antibiotics. They also exhibit low levels of "intrinsic" resistance to aminoglycosides and lincosamides such lincomycin and clindamycin. With these characteristic, antibiotic resistant enterococci has been continuously increased. Thus, it is required to develop new antibiotics or

alternative therapeutic agents. With the continuing demand for new solutions in the development of effective and safe therapies, an investigation was carried out to test the efficacy of an antibacterial agent from marine edible seaweed. The methanolic extract of *Ecklonia cava* among marine edible seaweed evinced potential antibacterial activity against *E. faecalis*. Among five solvent-soluble fractions of *E. cava* methanolic extract, the ethyl acetate soluble extract (EtOAc) exhibited the strongest antibacterial activity with 128 µg/mL of minimum inhibitory concentration and 256 µg/mL of minimum bactericidal concentration against *E. faecalis* strains. Furthermore, the interaction between antibiotic and the EtOAc fraction was assessed by the fractional inhibitory concentration (FIC) indices. The combination of ciprofloxacin and the EtOAc fraction against *E. faecalis* resulted in $\Sigma\text{FIC}_{\min}$ range of 0.188 and $\Sigma\text{FIC}_{\max}$ of 0.508 to 563. The median ΣFIC against *E. faecalis* strains ranged in 0.266 to 0.344. In contrary, the combination of gentamicin and the EtOAc fraction against *E. faecalis* resulted in $\Sigma\text{FIC}_{\min}$ range of 0.064 to 0.188 and $\Sigma\text{FIC}_{\max}$ of 0.078 to 0.563. The median ΣFIC of gentamicin -EtOAc combination ranged in 0.072 to 0.354. Thus, the synergistic ranges of $\text{FIC} < 1$ were observed in all combinations of two antibiotic and the EtOAc fraction against *E. faecalis* strains, suggesting the combination of streptomycin and the EtOAc fraction resulted in marked synergy.

I. 서론

*Enterococcus faecalis*는 주로 인간이나 포유류 등의 장에서 서식하는 통성혐기성 Gram 양성세균의 감염성 세균으로 1899년 프랑스에서 Thiercelin에 의해 최초로 보고되었으며 처음에는 *Streptococcus faecalis*라고 명명되었으나 후에 *Streptococcus* spp.의 특징에 따른 분류체계를 거치는 과정 중에 1937년 Sherman에 의해 *Enterococcus faecalis*로 명명되어 지금까지 쓰이고 있다 (Murray, 1990). *E. faecalis*균에 의한 질병은 periodontitis (치주염), urinary tract infection (요로감염증), wound infection (상처감염), abscesses (농양) 등이 있으며 심할 경우 bacteremia (균혈증), sepsis (패혈증) 까지 일으킬 수 있는 병원성 세균이다 (Kayaoglu and Ørstavik, 2004). 또한 *E. faecalis*는 carbohydrates, glycerol, lactate, malate, citrate, arginine, agmatine 및 keto- acids 등 다양한 에너지를 대사하고 강 알칼리(pH 9.6) 및 고염 등의 조건에서도 생육이 가능하며 최적생육범위는 10℃에서 45℃이나 60℃에서도 30분 정도 생존이 가능하다고 보고 되고 있다 (Giraffa, 2002). 이러한 이유 때문에 염 처리, 훈연 처리, 살균 처리 등의 과정을 거친 제품에서 *E. faecalis*를 포함하고 있는 *Enterococcus* spp.의 검출 비율이 높은 것으로 보고되고 있다. 예를 들어 소시지의 일종인 *Salami*와 *Landjager*에서 *Enterococcus* spp.의 세균이 10^2 에서 10^5 CFU/g로 검출되고, 분리 균들은 온도, pH, 염 및 항생제에 대한 매우 높은 저항성을 나타낸다고 보고되어 있다 (Giraffa, 2002). 또한 *E. faecalis*는 온혈동물뿐만 아니라 토양, 물, 식물 및 채소 등에서 빈번히 검

출되며 발효가 진행되는 우유, 육류 등의 비가열 식품과 살균 처리한 가공식품에서도 잔류할 수 있어 음식을 통한 경구감염에 의해 식중독을 일으키는 식중독 세균이기도 하다. *E. faecalis* 감염에 의한 식중독은 4~5시간의 잠복기를 거친 후 복통, 설사, 구역질, 구토 등의 *Staphylococcus aureus* 감염에 의한 식중독과 유사한 증상을 나타낸다 (Giraffa, 2002).

최근 보건위생에서 심각한 문제로 대두되고 있는 것은 항생제 내성 *Enterococcus* spp. 세균의 증가로 이들은 aminoglycosides, penicillin, tetracycline, chloramphenicol, vancomycin 등의 항생제에 높은 수준의 내성을 나타내며 또한 두 가지 이상의 항생제에 대한 내성을 가지고 있는 다제내성균 (multiple drug resistance bacteria) 도 보고되고 있다 (Johnston and Jaykus, 2004; Hollenbeck and Rice, 2012). 특히, 문제가 되고 있는 것은 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 의 치료를 위해 사용된 vancomycin 에 대한 내성을 획득한 vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) 의 출현으로 이들의 출현은 농업역학적으로 동물의 사료에 avoparcin (성장촉진항생제) 을 사용하는 것과 밀접한 관련을 가진다고 한다. 최종적으로 VRE는 동물을 매개로 하며 출현하지만 식품을 매개로 하여 인류에게까지 출현하는 결과를 나타낸 것이다 (Giraffa, 2002). 또한 내성균의 출현은 *Enterococcus* spp 이 가지는 환경저항성이 강한 특성을 바탕으로 항 미생물제가 사용되는 환경에서도 생육이 가능하게 함으로써 병원과 같이 면역력이 떨어진 사람들이 존재하는 장소에서 치명적으로 작용할 수 있다. 미국 병원에서 VRE 출현빈도는 Fig.1에 나타나 있는 것처럼 vancomycin 이 실제 시판된 1958년

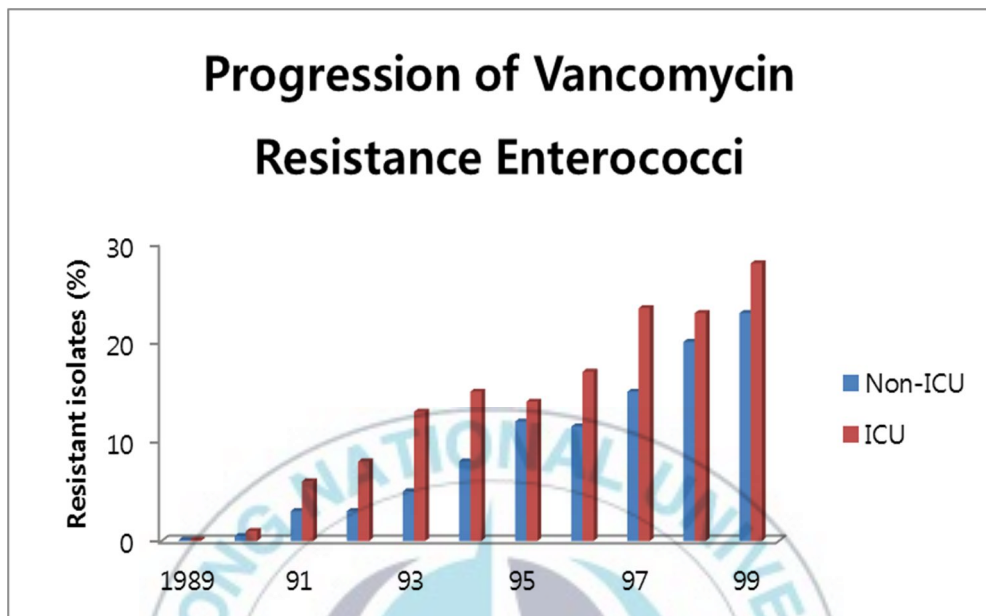


Figure. 1. The progression of vancomycin-resistant *Enterococci* in the United states.

부터 30년이 지난 후 내성균이 나타나기 시작하는 1989~1999년까지의 출현비율에 관해 조사하였고 해가 거듭할수록 VRE 출현비율이 높아짐을 알 수 있다 (Gary et al. 2003). 실제로, 2001년 12월, 호주 서부의 Royal Perth 병원에서 VRE 집단유행이 진행 된 사례가 있다.수 주 동안 172여 건의 VRE 감염사고가 발생 하였으며 원인으로 화장실 청소업체의 감염관리 교육기준 부적합으로 인한 전파자가 된 것으로 판명되었다 (Pearman et al., 2014). 이와 같은 항생제 내성균의 출현을 억제하기 위한 방안으로 새로운 항생제의 개발이나 몇 가지 항생제를 병용하여 사용하는 방법이 있지만 이는 또 다른 내성균의 출현을 야기할 수 있기 때문에 항생제 내성균을 해결하기 위한 새로운 방안으로 천연물을 이용한 항생제 내성균의 제어에 관한 연구가 진행 되어지고 있다 (Eom et al. 2011; 2013a; 2013b; 2014). 지금까지 연구에서는 천연물로부터 생체에 대한 안정성이 높고 부작용이 적은 생리활성 물질 또는 의약품들이 다수 개발되어 왔으나 대부분 육상의 식물체, 곰팡이와 박테리아 등의 미생물 및 소수의 동물을 대상으로 이루어져 왔으며, 그 결과 육상생물에서의 천연물 탐색은 한계에 다다르게 되었다 (Eom et al. 2013a). 또한, 최근에는 MRSA, *Listeria monocytogenes* 등의 주요 감염균에 대한 천연물 유래 화합물과 항생제 조합에 의한 synergistic antibacterial effect에 대한 보고가 있으나 *E. faecalis*의 경우 이에 대한 연구보고가 많지 않다 (Eom et al, 2013a; Nshimiyumukiza et al., 2015). 이에 따른 대안으로 해양생물에 대한 연구가 1970년대 후반부터 진행되어 왔으며, 지금까지 육상생물의 검토에서 알려지지 않았던 새로운 화합물들이 무수히 존재한다는 것이 밝혀졌다. 이는 환

경적인 차이에 기인하는 것으로 여겨지며 아직 밝혀지지 않은 무수한 물질들이 있을 것으로 추정되고 있다. 해양생물자원 유래 기능성식품 소재 연구현황에 관한 내용은 Fig .2에 나타내었다 (Jang, 2004). 다양한 해양자원 중 해조류는 은화 식물의 한 무리를 지칭하는 단어로 물 속에 살면서 엽록소로 동화작용을 하는 조류를 뜻한다. 나타내는 색에 따라 갈조류, 녹조류, 홍조류, 남조류로 구분되며 한국, 일본, 대만 등지에서 가장 많이 섭취하며 서양에서는 바다의 잡초라고 인식 할 만큼 식품으로 여겨지지 않고 있다. 하지만 해조류의 생리활성물질들이 밝혀지면서 전 세계적으로 다양한 연구가 이루어 지고 있다.

본 연구에서는 갈조류, 녹조류, 홍조류를 포함 한 총 15종의 해조류 추출물의 *E. faecalis* 에 대한 항균활성을 검토하고, 과거 연구 결과를 바탕으로 감태의 항균활성을 선행평가 한 뒤 기존에 이용되고 있는 항생제와 병용하여 사용 시 두 물질간의 상승 작용을 검토하고 최종적으로 항생제 사용량의 절감 및 대체할 수 있는 치료제의 개발가능성을 타진하는 것이 연구목적이다.

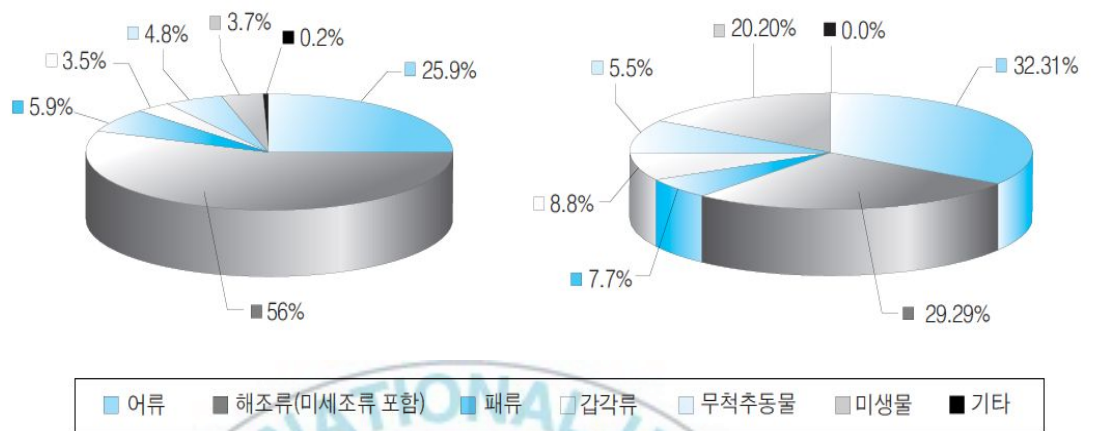


Figure. 2. research in functional food ingredients derived from marine resources (left) and patent (right) (2000).

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1.1 시험물질 선정 및 추출

해조류는 건조된 상태의 제품을 시장에서 구입하여 물로 충분히 세척하여 탈염시킨 후 60°C에서 건조시켰다. 이중 본 연구에 사용된 감태는 2013년 2월 제주 앞바다에서 채취된 감태를 구입하여 -80°C에서 냉동보관 중인 것을 사용하였다. 건조된 해조류는 분쇄기 (HMF-1000A; Hanil Electronics, Seoul, Korea)를 통해 파우더 상태로 분쇄하였다. 각 해조류 분말 (500g)은 70°C에서 3 시간 동안 3회 메탄올 (MeOH; 10 L $\times$ 3)로 추출하였다. 메탄올 추출물은 진공회전농축기 (Eyela Co., Tokyo, Japan) 로 농축시키고, 농축된 메탄올 추출물 (76.3 g) 에 10% MeOH (1.0 L) 를 넣고 차례로 hexane (Hexane; 1.0 L $\times$ 3), dichloromethane (DCM; 1.0 L $\times$ 3), ethyl acetate (EtOAc; 1.0 L $\times$ 3), 그리고 *n*-butanol (BuOH; 1.0 L $\times$ 3) 용액으로 분획하였다 (Fig. 3). 각각의 분획물은 진공상태인 45°C에서 진공회전농축기 (Eyela Co., Tokyo, Japan) 를 이용하여 증발시켰다.

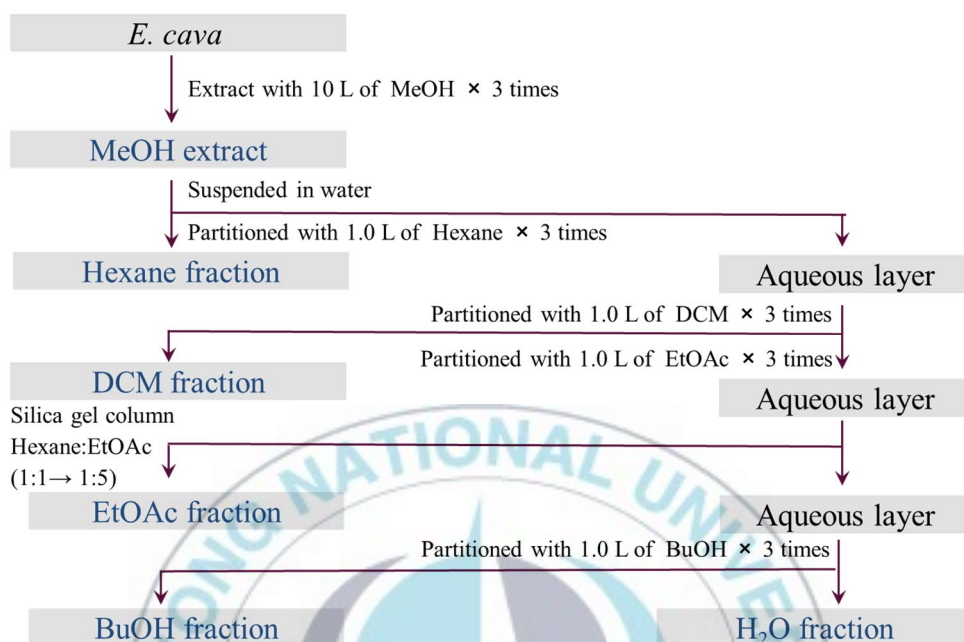


Figure. 3. Scheme of extraction and liquid-liquid partition. n-hexane soluble extract (Hexane ext.); dichloromethane-soluble extract (DCM ext); ethyl acetate-soluble extract (EtOAc ext); n-butanol extract (BuOH ext); water-soluble extract (H₂O ext).

1.2 시험에 사용 된 균주 및 배지

본 연구에서는 KCTC 미생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea)에서 분양 받은 표준균주 *E. faecalis* KCTC 3206와 경상대학병원 (Gyeongsang National University Hospital, Jinju, Gyeongnam, Korea)에서 분양 받은 7종의 분리균주 (*E. faecalis* P107, P130, P227, P 684, P690, P1499 및 P2088)를 사용하였다. 종균 배양을 위해서 tryptic soy broth (TSB; Difco, Detroit, MI)와 nutrient broth (NB; Difco) 를 사용하였으며 disc diffusion assay는 Mueller Hinton broth (MHB; Difco)를 minimum inhibitory concentration (MIC) 측정에는 Mueller Hinton agar (MHA; Difco)를 사용하였다.

2. 실험방법

2.1 Disc diffusion assay

Disc diffusion assay 시험법은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2009) 에 기술 되어 진 항균활성을 정성적으로 평가하기 위한 방법이다. 시험 균주를 TSB 배지에서 배양 (37°C until an OD600 of 0.5) 하여 대략 10^4 CFU/mL의 균을 MHA plate에 1mL 분주하여 도달한 후 각각의 추출물 1mg 및 5mg이 포함 된 paper disc (6mm in diameter) 를 agar 표면에 위치하여 배양 (24hr at 37°C) 한다. 배양시간이 지나면 억제환의 지름을 측정하여 항균활성을 평가한다. 모든 평가는 3회의 시험을 진행하여 평균값을 제시하여야 한다.

2.2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC)

MIC test는 항균제의 최소억제농도를 평가하는 시험으로 20-24hr, 37°C에서 배양 (Grierson and Afolayan, 1999) 후 미생물의 생육억제 정도를 시각적으로 판정한다. 해조류나 상업적인 항생제의 MICs값은 Mueller Hinton broth (MHB; Difco, USA)에서 Two-fold serial dilution method법에 의해 판정된다. 모든 평가는 3회의 시험을

진행하여 평균값을 제시하여야 한다.

MBC test는 99.9%의 균을 제거하기 위해 필요한 항생제의 최소요구량을 평가하는 시험이다. MBC value를 결정하기 위해 MIC test가 끝난 well에서 표본을 취해 빈 plate에 분주한 뒤 Nutrient Agar배지를 붓고 배양한다 (37°C at 24hr). 배양 후 각각 plate의 colony수를 counting하여 MBC value를 확인한다. MIC test와 마찬가지로 모든 평가는 3회 시험을 기본으로 한다

2.3 항생제 감수성 시험

E. faecalis 표준균주 및 분리균주의 항생제 감수성 실험은 BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Discs (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 실시하였으며 총 10종의 항생제가 이용되었다 (Table 1).

2.4 Fractional Inhibitory Concentration (FIC)

*E. faecalis*에 대한 감태와 Gentamicin 및 Ciprofloxacin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)간의 상승작용을 평가하는 시험으로 Fractional Inhibitory Concentration (FIC) (Hsieh et al., 1993; Meletiadis et al., 2010) 를 이용하여 checkerboard method (Norden et al., 1979) 에 의해 평가하였다. FICs (Σ FIC) 의 합은

Table 1. List of antibiotic using this study

abbreviations	antibiotic	company	concentration
VA	Vancomycin	OXOID	30 µg
C	Chloramphenicol	BBL	30 µg
TE	Tetracycline	OXOID	30 µg
LZD	Linezolid	OXOID	30 µg
AMC	Amoxycillin/Clavulanic acid 2:1	OXOID	30 µg
CIP	Ciprofloxacin	OXOID	5 µg
RA	Rifampicin	OXOID	5 µg
AMC	Ampicillin	OXOID	10 µg
GM	Gentamicin	OXOID	10 µg
SYN	Quinupristin/Dalfopristin	OXOID	15 µg

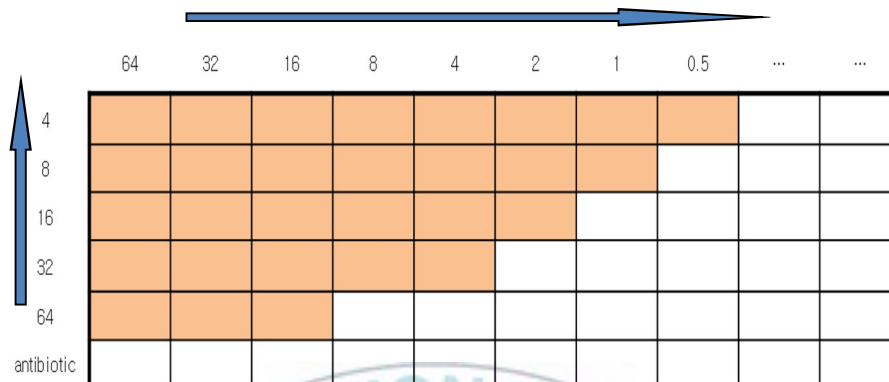
다음 방정식에 의해 계산되었다.

$$\sum FIC = FIC_A + FIC_B = (C_A/MIC_A) + (C_B/MIC_B)$$

MIC_A 와 MIC_B 는 각각 A 와 B의 단독 MIC 값이며, C_A 와 C_B 는 A와 B를 병용하였을 때 대상 균주에 대해 가지게 되는 A와 B의 생육저해 농도를 의미한다. 두 물질간의 항균 시너지 효과는 최소 $\sum FIC$ ($\sum FIC_{min}$)와 최대 $\sum FIC$ ($\sum FIC_{max}$) 값을 고려한 FIC index에 의해 평가한다 (Choi et al. 2010). 두 물질간의 병용효과를 극대화시킬 수 있는 값은 $\sum FIC_{min}$ 로 나타내며, 이 때의 C_A 와 C_B 농도는 병용되었을 때 가장 효과적으로 생육을 억제시키는 농도를 의미한다. $\sum FIC_{max}$ 는 시너지를 나타내는 가장 높은 $\sum FIC$ 값이며, $\sum FIC_{min}$ 와 함께 시너지 효과의 범위를 나타낸다. FIC index <0.5 는 synergistic, 0.5 ~ <1.0 은 weak synergy, >1.0 ~ <2.0 는 indifferent 그리고 >2.0 은 antagonistic으로 평가한다 (Fig. 4).

2.5 통계분석

실험분석 얻어진 값은 SPSS 12.0 (SPSS Inc. Chicago, IL) 을 이용하여 통계분석하였고 $P < 0.05$ 의 유의수준에서 평가하였다.



FIC (Fractional inhibitory concentration)

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

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

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

The FIC index indicated synergy:

The FIC index indicated synergistic effect:

► <0.5 synergy, >0.5 to 1 additive effect, >1.0 to 2.0 indifferent FIC=>4 antagonism

Figure. 4. FIC (Fractional Inhibitory Concentration) index and calculation

Ⅲ. 결과 및 고찰

3.1 해조류 MeOH 추출물의 항균활성

Disc diffusion assay법을 이용하여 *E. faecalis*에 대한 선별된 15종의 해조류로부터 MeOH 추출물의 항균활성을 검토하였다. Table 2에 나타난 것처럼, 갈조류의 추출물이 홍조류나 녹조류 추출물 보다 항균활성이 상대적으로 좋았으며 이는 해조류 추출물의 식중독 세균 및 병원성 세균에 대한 항균활성에 대해 연구한 Eom et al. (2011)과 Nshimiyumukiza et al (2015)의 연구 결과와도 일치하였다. 본 연구에 사용한 15종의 해조류 추출물 중에서 감태 MeOH 추출물이 *E. faecalis* KCTC 3206와 병원성 분리균주에 대해 가장 좋은 항균활성을 나타내었다 (Table 2). 1mg의 감태 추출물이 본 연구에 사용된 8종의 *E. faecalis* 균주에 대해 10.5mm~12.5mm의 clear zone을 형성하는 것으로 나타났으며, 이는 감태 MeOH 추출물이 다른 해조류보다 *E. faecalis*에 대한 항균물질을 보다 많이 함유하고 있다는 것을 의미한다.

*E. faecalis*에 대한 감태 추출물의 항균활성에 대해 후속 연구를 진행하기 위해 유기용매를 이용하여 분획을 하였고 시험결과를 Table 3.에 나타내었다. 여러 분획 추출물 중에서 EtOAc 분획 추출물이 disc diffusion assay에서 *E. faecalis*에 대해 가장 좋은 항균활성을 보였다 (diameter of clear zone around the disc = ranging

from 14mm to 15.5 mm for 1mg/disc). 이 결과는 EtOAc 분획 추출물이 *E. faecalis*에 대한 항균물질을 가장 많이 함유하고 있다는 보고와도 일치한다 (Kim et al., 2014),



Table 2. Disc diffusion assay of seaweed methanolic extracts against *Enterococcus faecalis*

Strain Samples	Zone of inhibition (mm) ^{a)}							
	KCTC 3206	P 107	P 132	P 227	P 684	P 690	P 1499	P 2088
<i>Ecklonia cava</i>	12.5±0.1	11.5±0.2	12.0±0.2	11.0±0.2	10.5±0.1	12.5±0.3	11.5±0.1	11.0±0.2
<i>Eisenia bicyclis</i>	11.0±0.3	10.5±0.2	10.0±0.4	10.0±0.1	10.5±0.3	11.0±0.2	10.0±0.2	10.5±0.4
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	9.0±0.4	8.5±0.1	9.0±0.2	9.0±0.2	8.0±0.3	8.0±0.1	7.0±0.4	8.0±0.3
<i>Undaria pinnatifida</i>	- ^{b)}	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ecklonia stolonifera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hitzikia fucalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Laminaria japonica</i>	-	-	-	-	-	-	6.5±0.3	-
<i>Sargassum fulvellum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ishige okamuræ</i>	9.0±0.2	8.0±0.3	8.0±0.4	8.0±0.1	7.0±0.3	7.0±0.3	7.0±0.2	7.5±0.3
<i>Ulva lactuca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ulva perutsa</i>	9.5±0.1	8.0±0.1	9.5±0.4	9.5±0.3	8.0±0.4	9.5±0.2	8.5±0.1	8.0±0.2
<i>Enteromorpha linza</i>	9.0±0.3	9.0±0.4	7.5±0.2	8.0±0.1	7.0±0.3	7.0±0.3	6.5±0.4	7.0±0.1
<i>Codium fragile</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chondracanthus tenellus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Carpopeltis prolifera</i>	8.5±0.2	7.0±0.2	8.0±0.3	9.0±0.1	6.5±0.4	7.0±0.3	7.0±0.1	7.5±0.2

^{a)} Seaweed methanolic extracts (5 mg/disc) were loaded onto a disc (6 mm in diameter).

^{b)} -, no detected antibacterial activity.

Table 3. Disc diffusion assay of the methanol extract and its solvent-soluble extracts from *Ecklonia cava* against *Enterococcus faecalis*

Strains	Zone of inhibition (mm) ^{a)}					
	MeOH ^{b)}	Hexane	DCM	EtOAc	BuOH	H ₂ O
<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	10.0±0.2	7.0±0.4	- ^{c)}	15.0±0.3	11.0±0.3	-
<i>E. faecalis</i> isolate P107	11.5±0.4	9.5±0.2	-	15.5±0.4	12.5±0.1	-
<i>E. faecalis</i> isolate P130	12.0±0.1	9.0±0.1	-	14.0±0.3	11.0±0.2	-
<i>E. faecalis</i> isolate P227	11.0±0.3	9.0±0.2	-	15.0±0.2	11.0±0.2	-
<i>E. faecalis</i> isolate P684	10.5±0.4	6.5±0.3	-	15.0±0.2	11.0±0.1	-
<i>E. faecalis</i> isolate P690	12.5±0.4	11.5±0.3	9.0±0.3	15.5±0.2	12.5±0.3	-
<i>E. faecalis</i> isolate P1499	11.5±0.2	8.5±0.4	-	15.0±0.4	12.5±0.3	-
<i>E. faecalis</i> isolate P2088	11.0±0.1	9.0±0.2	-	15.5±0.3	12.0±0.2	-

^{a)} The methanolic extract and its solvent-soluble extracts from *E. cava* were loaded onto a disc (6 mm in diameter) at concentrations of 5 mg/disc.

^{b)} MeOH, methanolic extract; Hexane, *n*-hexane-soluble extract; DCM, dichloromethane-soluble extract; EtOAc, ethyl acetate-soluble extract; BuOH, *n*-butanol-soluble extract; H₂O, water soluble extract.

^{c)} –, no detected antibacterial activity

3.2 감태 추출물의 MIC 및 MBC 시험결과

선행시험인 disc diffusion assay 시험을 통해 감태의 정성적인 항균활성을 확인하였다면 이번 연구에서는 MIC 및 MBC test를 통하여 감태의 정량적인 항균활성도를 평가하였다. *E. faecalis*에 대하여 총 6가지 분획 추출물의 항균활성을 평가하였으며 MIC value는 128 $\mu\text{g/mL}$ 에서 1,024 $\mu\text{g/mL}$ 이상까지 (Table 4) 다양하게 나타났다. 분획 추출물 중 EtOAc 분획 추출물은 가장적은 MIC value를 나타냈으며 128 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 표준균주인 *E. faecalis* KCTC 3206과 7종의 분리균주 (P 107, P 132, P 227, P 684, P 690, P 1499, P 2088) 의 성장을 완전히 억제하였다. 이러한 결과는 감태의 EtOAc soluble fraction이 병원성 및 식중독 세균에 대한 항균활성이 가장 뛰어나다는 기존의 연구 결과들과 일치하고 있다 (Choi et al. 2010; Eom et al., 2013b). 또한, 병원성 세균 및 식중독 세균에 대한 갈조류 추출물의 EtOAc 분획 추출물이 가장 강한 항균활성을 나타내고 항균물질을 가장 많이 함유하고 있다는 Eom et al. (2011, 2013a)와 Lee et al. (2014)의 보고와도 일치한다.

감태의 EtOAc 분획 추출물은 세균의 최소살균농도를 평가하는 MBC test에서도 MIC value보다 2배를 초과하지 않는 농도 내에서 세균의 최초 접종균수로부터 99.99% 살균이 가능함을 나타내었다. EtOAc 외 분획 추출물이 256 $\mu\text{g/mL}$ 에서 1,024 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도 범위에서 표준균주 및 분리균주의 살균이 가능했던 반면 EtOAc 분획 추출물은 모든 균에 동일하게 256 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 살균이 진행되었다 (Table 5).

Table 4. Minimum inhibitory concentration of the methanol extract and its soluble fractions
from *Ecklonia cava* against *Enterococcus faecalis* strains

Unit : $\mu\text{g/mL}$

Strains	Fraction					
	MeOH ^{a)}	Hexane	DCM	EtOAc	BuOH	H ₂ O
<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	512	1,024	>1,024	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P107	128	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P130	256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P227	256	256	512	128	128	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P684	256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P690	256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P1499	256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P2088	128	256	512	128	128	>1,024

^{a)} MeOH, methanolic extract; Hexane, *n*-hexane-soluble extract; DCM, dichloromethane-soluble extract; EtOAc, ethyl acetate-soluble extract; BuOH, *n*-butanol-soluble extract; H₂O, water-soluble extract.

Table 5. Minimum bacterial concentration of the methanol extract and its soluble fractions
from *Ecklonia cava* against *Enterococcus faecalis* strains

Unit : $\mu\text{g/mL}$

Strains	Fraction					
	MeOH ^{a)}	Hexane	DCM	EtOAc	BuOH	H ₂ O
<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	512	1,024	>1,024	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P107	128	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P130	256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P227	256	256	512	128	128	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P684	256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P690	256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P1499	256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> isolate P2088	128	256	512	128	128	>1,024

^{a)} MeOH, methanolic extract; Hexane, *n*-hexane-soluble extract; DCM, dichloromethane-soluble extract; EtOAc

3.3 *Enterococcus faecalis*의 항생제 저항성 시험결과

Vancomycin 내성 VRE 및 vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) 감염 치료를 위해 사용되는 항생제인 linezolid와 tigecycline이 현재는 효과적으로 사용되고 있다 (Lee et al, 2013). 하지만, 새로운 항생제의 개발에는 많은 난관이 있으므로 지속적으로 출현할 것으로 예상되는 항생제 내성균의 출현을 억제하기 위해 alternative therapeutic method로서 항균활성을 나타내는 천연물과 항생제 내성균에 대한 효력을 잃어버린 항생제와의 병용을 통해 잃어버린 항생제의 항균활성을 회복하는 연구들이 진행되고 있다 (Eom et al. 2013a, 2014; Lee et al., 2014; Nshimiyumukiza et al., 2015). 이에 본 연구에서도 disc diffusion assay와 MIC assay를 통해 *E. faecalis*에 대한 강한 항균 효과를 가지고 감태의 EtOAC 분획 추출물과 항생제간의 병용에 의한 antibacterial synergy effect에 대한 연구를 진행하였다. 이를 위하여 먼저 *E. faecalis* 표준균주와 7종의 분리균주에 대하여 다양한 antibiotic에 대한 항생제 감수성을 disc diffusion assay를 통해 분석하였다. 표준균주인 *E. faecalis* KCTC 3206와 분리균주인 *E. faecalis* isolated P690 및 P1499을 제외한 나머지 분리균주에서 ciprofloxacin과 gentamicin에 대한 생육 저지환 (clear zone)이 나타나지 않았다 (Table 6). 분리균주인 *E. faecalis* isolated P1499는 ciprofloxacin에서만 clear zone이 나타나지 않았다. 이 결과는 5종의 분리균주의 경우, ciprofloxacin과 gentamicin에 대한 내성을 가지고 있는 다제내성균 (multiple drug resistance bacteria)이라는 것을 의미한다 (Johnston and Jaykus, 2004;

Hollenbeck and Rice, 2012).

E. faecalis 균주들에 대한 두 항생제의 항균력을 MIC assay로 정량 분석하였다. Ciprofloxacin은 표준균주인 KCTC 3206 균주에 적용 시 MIC 값이 0.0625 µg/mL로 다른 분리균주들의 경우는 4 ~ 8 µg/mL로 분석되었다 (Table 5). 다섯 분리균주들 (P107, P227, P 684, P1499 및 P2088)의 ciprofloxacin에 대한 MIC 값은 항생제 내성의 기준값인 MIC breakpoint value 인 2 µg/mL 보다 모두 높은 값을 가지기 때문에 ciprofloxacin에 대한 항생제 내성을 획득했다고 판단된다 (Hällgren et al. 2011). 하지만 gentamicin은 표준균주인 KCTC 3206 균주에 적용 시 MIC 값이 0.125 µg/mL로 다른 분리균주들의 경우는 2 ~ 64 µg/mL로 분석되어 gentamicin의 MIC breakpoint value 인 500~1,024 µg/mL 보다 모두 낮기 때문에 본 연구에서 사용된 분리균주들은 gentamicin 감수성 균주인 것으로 분석되었다 (Hällgren et al., 2011; Table 7).

Table 6. Antibiotic resistance against *Enterococcus faecalis* strains

Antibiotics Strains	VA ^{a)}	C	TE	LZD	AMC	CIP	RA	AM	GM	SYN
<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	15	26	26	26	22	14	12	15	12	8
<i>E. faecalis</i> isolate P107	18	26	10	34	24	AG	10	24	AG	10
<i>E. faecalis</i> isolate P130	18	AG	10	32	30	26	16	28	AG	14
<i>E. faecalis</i> isolate P227	18	24	8	30	30	AG	18	26	AG	12
<i>E. faecalis</i> isolate P684	18	22	10	26	29	AG	18	26	AG	10
<i>E. faecalis</i> isolate P690	10	26	12	30	30	22	18	34	12	18
<i>E. faecalis</i> isolate P1499	20	24	10	30	30	AG	18	22	16	10
<i>E. faecalis</i> isolate P2088	16	20	8	30	30	AG	18	20	AG	10

^{a)}VA, 30 µg of vancomycin; C, 30 µg of chloramphenicol; TE, 30 µg of tetracycline; LZD, 30 µg of linezolid; AMC, 30 µg of amoxicillin/clavulanic; CIP, 5 µg of ciprofloxacin; RA, 5 µg of rifampicin; AM, 10 µg of ampicillin; GM, 10 µg of gentamicin; SYN, 15 µg of quinupristin/dalfopristin.

^{b)}AG, all grow.

Table 7. Minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics against *Enterococcus faecalis* strains

Strains	MIC values (µg/mL)	
	Ciprofloxacin	Gentamicin
<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	0.0625	0.125
<i>E. faecalis</i> isolate P107	4	64
<i>E. faecalis</i> isolate P130	^{a)} -	64
<i>E. faecalis</i> isolate P227	4	32
<i>E. faecalis</i> isolate P684	8	32
<i>E. faecalis</i> isolate P1499	4	2
<i>E. faecalis</i> isolate P2088	8	64

^{a)} -, no determined.

3.4 *Enterococcus faecalis*에 대한 감태의 EtOAc 분획 추출물과 항생제와의 synergy 효과

선행연구 결과에서 새로운 항생제를 개발하는 것 보다 천연물이나 항생제 저항성 세균에 대한 전통적인 치료제로부터 유래 된 항균활성 물질과 병용하여 항생제의 항균활성을 회복하는 것이 더 좋은 방법이라는 것이 보고되어 있었다 (Eom et al. 2014; Lee et al., 2014). 본 연구에서는 *E. faecalis*에 대한 감태의 EtOAc 분획 추출물과 병용에 의한 ciprofloxacin, gentamicin의 *E. faecalis*에 대한 항균활성의 상승효과를 FIC assay로 평가하였다. Ciprofloxacin은 Table 8에 나타난 것과 같이 감태 EtOAc 분획 추출물 (8 $\mu\text{g/mL}$)을 병용 사용하였을 때 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 ciprofloxacin 첨가에 *E. faecalis* 균주들의 증식을 억제할 수 있었다. 결과적으로 ciprofloxacin 을 단독 사용하였을 때 보다 8~32배 낮은 농도로 *E. faecalis*균의 생육을 억제할 수 있는 것으로 분석 되었다 (P107, P227 및 P1499 균주의 경우 8배; P684 균주의 경우 16배; P2088 균주의 경우 32배). 이러한 결과를 바탕으로 FIC value를 계산해 본 결과 $\Sigma\text{FIC}_{\min}$, $\Sigma\text{FIC}_{\max}$ 및 ΣFIC 중간값이 각각 0.188, 0.508 ~ 0.563 및 0.266 ~ 0.344로 나타났다 (Table 8). 결과 $\Sigma\text{FIC}_{\min}$, $\Sigma\text{FIC}_{\max}$ 및 ΣFIC 중간값이 모두 <1.0 이하의 값을 나타내었기 때문에 감태의 EtOAc 분획 추출물과 ciprofloxacin의 병용사용은 *E. faecalis*균에 대해 weak synergy 효과가 나타나는 것으로 나타났다 (Lee et al., 2014).

gentamicin은 Table 9에 나타난 것과 같이 감태 EtOAc 분획 추출물 (8 $\mu\text{g/mL}$)을

병용 사용하였을 때 0.25 ~ 8 µg/mL 의 ciprofloxacin 첨가에 *E. faecalis* 균주들의 증식을 억제할 수 있었다. 결과적으로 gentamicin 을 단독 사용하였을 때 보다 모두 8배 낮은 농도로 *E. faecalis*균의 생육을 억제할 수 있는 것으로 분석 되었다. 이러한 결과를 바탕으로 FIC value를 계산해 본 결과 ΣFIC_{min} , ΣFIC_{max} 및 ΣFIC 중간값이 각각 0.188, 0.258 ~ 0.563 및 0.175 ~ 0.354로 나타났다 (Table 9). 결과 ΣFIC_{min} , ΣFIC_{max} 및 ΣFIC 중간값이 모두 <1.0 이하의 값을 나타내었기 때문에 감태의 EtOAc 분획 추출물과 ciprofloxacin의 병용사용은 *E. faecalis*균에 대해 week synergy 효과가 나타나는 것으로 나타났다 (Lee et al., 2014). 하지만 앞서 기술한 바와 같이 gentamicin의 MIC 값이 MIC breakpoint value 인 500~1,024 µg/mL 보다 모두 낮기 때문에 본 연구에서 사용된 분리균주들은 gentamicin 감수성 균주인 것으로 판단되어 시험결과는 참고자료로 한정되어야 할 것이다.

Table 8. Minimum inhibitory concentrations (MIC) and fractional inhibitory concentration (FIC) indices of the ethyl acetate (EtOAc) fraction of *Ecklonia cava* in combination with ciprofloxacin against *Enterococcus faecalis*

Strains	Test compound	MIC (µg/mL)	Median Σ FIC ^{a)}	Σ FIC _{max} ^{b)}	Σ FIC _{min} ^{c)}	Minimum concentration for observing synergy
<i>E. faecalis</i> isolate P107	EtOAc	128	0.266	0.508	0.188	8
	Ciprofloxacin	4				0.5
<i>E. faecalis</i> isolate P227	EtOAc	128	0.297	0.531	0.188	8
	Ciprofloxacin	4				0.5
<i>E. faecalis</i> isolate P684	EtOAc	128	0.297	0.508	0.188	8
	Ciprofloxacin	8				0.5
<i>E. faecalis</i> isolate P1499	EtOAc	128	0.344	0.563	0.188	8
	Ciprofloxacin	4				0.5
<i>E. faecalis</i> isolate P2088	EtOAc	128	0.297	0.563	0.188	8
	Ciprofloxacin	16				0.5

^{a)} Σ FIC, the sum of FICs; ^{b)} Σ FIC_{min}, the minimum Σ FIC; ^{c)} Σ FIC_{max}, and the maximum Σ FIC.

^{d)} The FIC index indicated synergistic; <0.5, additive; 0.5 to <1.0, indifferent; >1.0 to <2.0, antagonistic; >2.0. Σ FIC was calculated for each well with the equation: Σ FIC = FIC_A + FIC_B = (C_A/MIC_A) + (C_B/MIC_B), where MIC_A and MIC_B are the MICs of drugs A and B alone, respectively, and C_A and C_B are the concentrations of the drugs in combination, respectively.

Table 9. Minimum inhibitory concentrations (MIC) and fractional inhibitory concentration (FIC) indices of the ethyl acetate (EtOAc) fraction of *Ecklonia cava* in combination with gentamicin against *Enterococcus faecalis*

Strains	Test compound	MIC (µg/mL)	Median Σ FIC ^{a)}	Σ FIC _{max} ^{b)}	Σ FIC _{min} ^{c)}	Minimum concentration for observing synergy
<i>E. faecalis</i> isolate P107	EtOAc	128	0.354	0.563	0.188	8
	Ciprofloxacin	64				8
<i>E. faecalis</i> isolate P227	EtOAc	128	0.198	0.281	0.125	8
	Ciprofloxacin	32				4
<i>E. faecalis</i> isolate P684	EtOAc	128	0.175	0.258	0.125	8
	Ciprofloxacin	32				4
<i>E. faecalis</i> isolate P1499	EtOAc	128	0.072	0.0781	0.064	8
	Ciprofloxacin	2				0.25
<i>E. faecalis</i> isolate P2088	EtOAc	128	0.354	0.563	0.188	8
	Ciprofloxacin	64				8

^{a)} Σ FIC, the sum of FICs; ^{b)} Σ FIC_{min}, the minimum Σ FIC; ^{c)} Σ FIC_{max}, and the maximum Σ FIC. ^{d)} The FIC index indicated synergistic; <0.5, additive; 0.5 to <1.0, indifferent; >1.0 to <2.0, antagonistic; >2.0. Σ FIC was calculated for each well with the equation: Σ FIC = FIC_A + FIC_B = (C_A/MIC_A) + (C_B/MIC_B), where MIC_A and MIC_B are the MICs of drugs A and B alone, respectively, and C_A and C_B are the concentrations of the drugs in combination, respectively.

IV. 요약

*Enterococcus faecalis*는 주로 인간이나 포유류 등의 장에서 서식하는 통성혐기성 Gram 양성세균의 감염성 세균으로 질병은 periodontitis (치주염), urinary tract infection (요로감염증), wound infection (상처감염), abscesses (농양) 등이 있으며 심할 경우 bacteremia (균혈증), sepsis (패혈증) 까지 일으킬 수 있는 병원성 세균이다. 또한 *E. faecalis*는 carbohydrates, glycerol, lactate, malate, citrate, arginine, agmatine 및 keto- acids 등 다양한 에너지를 대사하고 강 알칼리(pH 9.6) 및 고염 등의 조건에서도 생육이 가능하며 최적생육범위는 10℃에서 45℃이나 60℃에서도 30 분 정도 생존이 가능하다고 보고 되고 있다. 이러한 특성이 기인하여 최근 보건 위생에서 심각한 문제로 대두되고 있는 것은 항생제 내성 *Enterococcus* spp. 세균의 증가로 이들은 aminoglycosides, penicillin, tetracycline, chloramphenicol, vancomycin 등의 항생제에 높은 수준의 내성을 나타내며 또한 두 가지 이상의 항생제에 대한 내성을 가지고 있는 다제내성균 (multiple drug resistance bacteria)도 보고되고 있다 (Johnston and Jaykus, 2004; Hollenbeck and Rice, 2012). 특히, 문제가 되고 있는 것은 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 의 치료를 위해 사용된 vancomycin 에 대한 내성을 획득한 vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) 의 출현빈도 증가이다. 항생제 내성균의 출현빈도 증가는 *Enterococcus* spp.의 환경적 용력의 영향도 있겠지만 주 원인은 항생제의 남용에서 찾을 수 있다. 따라서 이

번 연구에서는 대체 항생제의 개발이 아닌 천연 추출물의 생리활성물질을 통해 균을 억제할 수 있는 방법에 관한 연구를 진행하기로 하였고, 생체에 대한 안정성이 높고 부작용이 적은 생리활성 물질 또는 의약품으로 많이 검토 되어진 육상생물에서 벗어나 다양한 생리활성물질을 존재한다고 밝혀지고 있는 해양생물 자원 중 해조류 추출물의 항균활성에 대하여 연구하였다. 갈조류, 녹조류, 홍조류를 포함 한 총 15종의 해조류 MeOH 추출물의 항균활성을 표준균주 및 병원체 분리균주를 대상으로 disc diffusion assay를 통해 검토하였으며 이 중 가장 항균활성이 좋았던 감태 추출물을 시험대상으로 선정하였다. 선정 된 감태를 5종의 용매 (Hexane, DCM, EtOAc, BuOH, H₂O) 로 분획 및 추출하여 disc diffusion assay법을 이용하여 항균활성을 평가하였다. 그 결과 EtOAc 분획 추출물이 *E. faecalis* 균주에 대해 10.5mm~12.5mm의 clear zone을 형성하는 것으로 나타났으며, 이는 감태 MeOH 추출물이 다른 해조류보다 *E. faecalis*에 대한 항균물질을 보다 많이 함유하고 있다는 것을 의미하였다. 또한 정량적인 평가인 MIC 및 MBC test를 진행한 결과 128 µg/mL의 농도로 표준균주인 *E. faecalis* KCTC 3206과 7종의 분리균주 (P 107, P 132, P 227, P 684, P 690, P 1499, P 2088) 의 성장을 완전히 억제하는 것을 알 수 있었으며 감태의 EtOAc 추출물은 세균의 최소살균농도를 평가하는 MBC test에서도 MIC value보다 2배를 초과하지 않는 농도 (모든 균 256 µg/mL) 로 세균의 최초 접종 균 수로부터 99.99% 살균이 가능함을 나타내었다. 선행연구 결과를 바탕으로 항생제 내성균의 출현을 억제하기 위한 alternative therapeutic method 로서 항균활성을 나타내는 천연물과 항생제 내성균에 대한 효

력을 잃어버린 항생제와의 병용을 통해 잃어버린 항생제의 항균활성회복에 관해 검토하였다. 본 연구에서는 disc diffusion assay와 MIC assay를 통해 *E. faecalis*에 대한 강한 항균 효과를 가지고 감태의 EtOAC 분획 추출물과 항생제간의 병용에 의한 antibacterial synergy effect에 대한 연구를 진행하였으며 시험에 이용된 항생제는 상업적으로 이용되는 10종의 항생제를 선택하였고 실험은 BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Discs (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 실시하였다. 시험결과 표준균주인 *E. faecalis* KCTC 3206와 분리균주인 *E. faecalis* isolated P690 및 P1499를 제외한 나머지 분리균주에서 ciprofloxacin과 gentamicin에 대한 생육 저지환 (clear zone)이 나타나지 않았다 (Table 6). 분리균주인 *E. faecalis* isolated P1499는 ciprofloxacin에서만 clear zone이 나타나지 않았다. 이 결과는 5종의 분리균주의 경우, ciprofloxacin과 gentamicin에 대한 내성을 가지고 있는 다제내성균 (multiple drug resistance bacteria)이라는 것을 의미하였다. 이를 바탕으로 *E. faecalis* 균주들에 대한 두 항생제의 항균력을 MIC assay로 정량 분석한 결과 Ciprofloxacin은 표준균주인 KCTC 3206 균주에 적용 시 MIC 값이 0.0625 µg/mL로 다른 분리균주들의 경우는 4 ~ 8 µg/mL로 분석되었다 (Table 7). 다섯 분리균주들 (P107, P227, P684, P1499 및 P2088)의 ciprofloxacin에 대한 MIC 값은 항생제 내성의 기준값인 MIC breakpoint value인 2 µg/mL보다 모두 높은 값을 가지기 때문에 ciprofloxacin에 대한 항생제 내성을 획득했다고 판단된다 (Hällgren et al. 2011). 하지만 Gentamicin은 표준균주인 KCTC 3206 균주에 적용 시 MIC 값이 0.125 µg/mL로 다른 분리균주들의 경우는

2 ~ 64 $\mu\text{g/mL}$ 로 분석되어 gentamicin 의 MIC breakpoint value 인 500~1,024 $\mu\text{g/mL}$ 보다 모두 낮기 때문에 본 연구에서 사용된 분리균주들은 gentamicin 감수성 균주인 것으로 분석 되었다 (Hällgren et al., 2011; Table 7). 앞선 결과를 토대로 천연 추출물과 항생제를 병행사용 하였을 때 어떠한 상승작용이 나타나는지 확인하기 위해 FIC test를 진행하였다. ciprofloxacin은 감태 EtOAc 분획 추출물 (8 $\mu\text{g/mL}$)을 병용 사용하였을 때 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 ciprofloxacin 첨가에 *E. faecalis* 균주들의 증식을 억제할 수 있으며 결과적으로 ciprofloxacin 을 단독 사용하였을 때 보다 8~32배 낮은 농도로 *E. faecalis*균의 생육을 억제할 수 있는 것으로 분석 되었다 (P107, P227 및 P1499 균주의 경우 8 배; P684 균주의 경우 16배; P2088 균주의 경우 32배). 이러한 결과를 바탕으로 FIC value를 계산해 본 결과 $\sum\text{FIC}_{\min}$, $\sum\text{FIC}_{\max}$ 및 $\sum\text{FIC}$ 중간값이 각각 0.188, 0.508 ~ 0.563 및 0.266 ~ 0.344로 나타났다 (Table 8). 결과 $\sum\text{FIC}_{\min}$, $\sum\text{FIC}_{\max}$ 및 $\sum\text{FIC}$ 중간값이 모두 <1.0 이하의 값을 나타내었기 때문에 감태의 EtOAc 분획 추출물과 ciprofloxacin의 병용사용은 *E. faecalis*균에 대해 week synergy 효과가 나타나는 것으로 나타났다

gentamicin은 감태 EtOAc 분획 추출물 (8 $\mu\text{g/mL}$)을 병용 사용하였을 때 0.25 ~ 8 $\mu\text{g/mL}$ 의 ciprofloxacin 첨가에 *E. faecalis* 균주들의 증식을 억제할 수 있었다. 결과적으로 gentamicin 을 단독 사용하였을 때 보다 모두 8배 낮은 농도로 *E. faecalis*균의 생육을 억제할 수 있는 것으로 분석 되었다. 이러한 결과를 바탕으로 FIC value를 계산해 본 결과 $\sum\text{FIC}_{\min}$, $\sum\text{FIC}_{\max}$ 및 $\sum\text{FIC}$ 중간값이 각각 0.188,

0.258 ~ 0.563 및 0.175 ~ 0.354로 나타났다 (Table 9). 결과 ΣFIC_{min} , ΣFIC_{max} 및 ΣFIC 중간값이 모두 <1.0 이하의 값을 나타내었기 때문에 감태의 EtOAc 분획 추출물과 ciprofloxacin의 병용사용은 *E. faecalis*균에 대해 week synergy 효과가 나타나는 것으로 나타났다. 하지만 앞서 기술한 바와 같이 gentamicin의 MIC 값이 MIC breakpoint value 인 500~1,024 $\mu\text{g/mL}$ 보다 모두 낮기 때문에 본 연구에서 사용된 분리균주들은 gentamicin 감수성 균주인 것으로 판단되어 시험결과는 참고 자료로 한정되어야 할 것이다.

본 연구 결과는 과거에 많이 검토되었던 육상자원 유래의 생리활성물질에 관한 연구의 한계에서 벗어나 해양생물자원의 생리활성물질에 대한 검토로써 의미가 있으며 항생제가 아닌 천연물을 통해 주요 식중독 세균인 *E. faecalis*의 생육 억제뿐만 아니라 항생제 내성을 가지고 있는 multiple drug resistance *E. faecalis*에 대한 효과적인 제어 방법으로 감태 유래 추출물을 기존의 항생제와 병용 사용함으로써 항생제 남용에 따른 항생제 내성균의 출현 억제뿐만 아니라 잠재적인 치료제로도 이용될 수 있다는 것을 보여주었다. 이러한 결과는 식품 공정에서 *E. faecalis*의 감염의 문제를 해결하는데 기여할 수 있을 것이라 생각되며 추후 정제과정 등을 거쳐 생리활성물질에 대해 더 심도 있는 연구를 진행하여 다양한 의약적 측면에서의 요구에 부응할 수 있을 것이라고 생각된다.

V. 참고문헌

- Choi JG, Kang OH, Brice OO, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Sohn DH, Park H, Choi HG, Kim SG. 2010. Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. Foodborne Pathog Dis 7, 435-441.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard. 3rd ed. CLSI document M27-A3. CLIS, Wayne, PA, US.
- Eom SH, Kang YM, Park JH, Yu DU, Jeong ET, Lee MS and Kim YM. 2011. Enhancement of polyphenol content and antioxidant activity of *Eisenia bicyclis* extract by microbial fermentation. Fish Aquat Sci 14, 192-197.
- Eom SH, Kim DH, Lee SH, Yoon NY, Kim JH, Kim TH, Chung YH, Kim SB, Kim YM, Kim HW, Lee MS, Kim YM. 2013a. *In vitro* antibacterial activity and synergistic antibiotic effects of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Phytother Res 27, 1260-1264.
- Eom SH, Lee DS, Jung YJ, Park JH, Choi JI, Yim MJ, Jeon JM, Kim HW, Son KT, Je JY, Lee MS, Kim YM. 2014. The mechanism of antibacterial activity of phlorofucofuroeckol-A against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Appl

Microbiol Biotechnol 98, 9795-9804.

Eom SH, Lim KS, Kim YM. 2013b. Potential of *Candida utilis* to ferment *Ecklonia cava* by-product for enhanced anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity. J Appl Phycol 25, 1949-1956.

Gray, A, Noskin. Global Antibiotic Resistance in the Hospital Setting: Trends, Impact; Antimicrobial Pressure and the emergency and spread of multi-drug resistant gram-positive pathogens. Medscape CME & Education

Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. FEMS Microbiol Rev. 26, 163-171..

Hällgren A, Abednazari H, Ekdahl C, Hanberger H, Nilsson M, Samuelsson A, Svensson E, Nilsson LE; Swedish ICU Study Group. 2011. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. J Antimicrob Chemother. 48, 53-62.

Hollenbeck BL and Rice LB. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. Virulence 15, 421-433.

- Hsieh MH, Yu CM, Yu VL and Chow JW. 1993. Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 16, 343-349.
- Johnston LM and Jaykus LA. 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Appl Environ Microbiol* 70, 3133-3137.
- Kayaoglu G and Ørstavik D. 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 308-320.
- Lee JH, Eom Sh, Lee EH, Jung YJ, Kim HJ, Jo MR, Son KT, Lee HJ, Kim JH, Lee MS and Kim YM. 2014. *In vitro* antibacterial and synergistic effect of phlorotannins isolated from edible brown seaweed *Eisenia bicyclis* against acne-related bacteria, *Algae* 29, 47-55.
- Lee SC, Wu MS, Shih HJ, Huang SH, Chiou MJ, See LC, Siu LK. 2013. Identification of vancomycin-resistant enterococci clones and inter-hospital spread during an outbreak in Taiwan. *BMC Infect Dis* 13,163.
- Meletiadiis J, Pournaras S, Roilides E and Walsh TJ. 2010. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for

antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 54, 602-609.

Murray DB. 1990. The life and times of the *enterococcus*. Clinical Microbiology Rev. 3, 46-65.

Nshimiyumukiza O, Kang SK, Kim HJ, Eun-Hye Lee EH, Han HN, Kim Y, Kim DH, Kim JH, Eom SH, Kim YM. 2015. Synergistic Antibacterial Activity of *Ecklonia cava* against *Listeria monocytogenes*. Fish Aquat Sci In Press.

Pearman JW, Perry PL, Kosaras FP, Douglas CR, Lee RC, Peterson AM, Orrell CT, Khinsoe CH, Heath CH, Christiansen KJ. 2003. Screening and electronic labelling of ward contacts of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanB carriers during a single-strain hospital outbreak and after discharge from hospital. Commun Dis Intell Q Rep 27, Suppl:S97-102.