

항생제 내성 *Enterococcus faecalis*에 대한 감태(*Ecklonia cava*) 추출물의 항균 시너지 효과

김승용 · 김영목 · 김은정¹ · 이명숙^{2*}

부경대학교 식품공학과, ¹LG전자, ²부경대학교 미생물학과

Synergistic Antibacterial Activity of *Ecklonia cava* Extract against Anti-biotic Resistant *Enterococcus faecalis*

Seung-Yong Kim, Young-Mog Kim, Eunjung Kim¹ and Myung-Suk Lee^{2*}

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹LG Electronics, Changwon 642-714, Korea

²Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

With continuing demand for the development of new, effective and safe therapies, an investigation was carried out to test the efficacy of an antibacterial agent derived from marine edible seaweed. The methanolic extract of *Ecklonia cava* from marine edible seaweed evinced potential antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*. Among five solvent-soluble fractions of *E. cava* methanolic extract, the ethyl acetate soluble extract (EtOAc) exhibited the strongest antibacterial activity, with a MIC value of 128 μ g/mL against *E. faecalis* strains. Furthermore, a synergistic antibacterial effect between an antibiotic and the EtOAc fraction was assessed using fractional inhibitory concentration (FIC) indices. A combination of ciprofloxacin and the EtOAc fraction resulted in a \sum FIC_{min} range of 0.188 and \sum FIC_{max} of 0.508 to 563, suggesting that the ciprofloxacin-EtOAc fraction of *E. cava* combination resulted in an antibacterial synergy effect against *E. faecalis*.

Key words: Antibacterial activity, *Ecklonia cava*, *Enterococcus faecalis*, Synergistic effect

서 론

*Enterococcus faecalis*는 주로 인간이나 포유류 등의 장에서 서식하는 통성혐기성 Gram 양성세균의 감염성 세균으로 치주염(periodontitis), 요로감염증(urinary tract infection), 상처감염(wound infection), 농양(abscesses) 등을 일으키고 심할 경우 균혈증(bacteremia), 패혈증(sepsis)까지 일으키는 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 가능하고 최적생육범위는 10°C에서 45°C이나 60°C에서도 30분 정도 생존이 가능하다고 보고 되고 있다(Giraffa, 2002). 이러한 이유 때문에 염 처리, 훈연처리, 살균 처리 등의 과정을 거친 제품에서 *E.*

*faecalis*를 포함하고 있는 *Enterococcus* spp.의 검출 비율이 높은 것으로 보고 되고 있다. 예를 들어 소시지의 일종인 *Salami*와 *Landjager*에서 *Enterococcus* spp.의 세균이 10²에서 10⁵ CFU/g로 검출 되고, 분리균들은 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 검출 되며 발효가 진행되는 우유, 육류 등의 비가열 식품과 살균 처리한 가공식품에서도 잔류할 수 있어 식품을 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 이들 세균은 amino-

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0051>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kor J Fish Aquat Sci 48(1) 051-057, February 2015

Received 19 December 2014; Revised 12 January 2015; Accepted 13 January 2015

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5615 Fax: +82. 51. 629. 5619

E-mail address: leems@pknu.ac.kr

glycosides, penicillin, tetracycline, chloramphenicol, vancomycin 등의 항생제에 높은 수준의 내성을 나타내며 또한 두가지 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 vancomycin에 대한 내성을 획득한 vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE)의 출현으로 이들 내성균은 병원 내 감염 등 면역력이 떨어진 사람들에게 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 실제로, 2001년 12월, 호주 서부의 Royal Perth 병원에서 VRE 감염으로 인한 수 주 동안 172여 건의 VRE 감염 사고가 발생하였다(Pearman et al., 2003).

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 진행되고 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 본 연구에서는 갈조류, 녹조류, 홍조류를 포함한 해조류 추출물의 주요 식중독 원인균인 *E. faecalis*에 대한 항균 활성과 항생제에 대한 내성을 가지고 있는 *E. faecalis*균들에 대한 해조류 추출물의 첨가에 의한 기존 항생제의 항균력 회복에 대한 연구를 하였다.

재료 및 방법

시료와 전처리

해조류는 건조된 상태의 제품을 시장에서 구입하여 물로 충분히 세척하여 탈염시킨 후 60°C에서 건조시켰다. 본 연구에 사용된 해조류는 감태(*Ecklonia cava*), 대황(*Eisenia bicyclis*), 고리매(*Scytosiphon lomentaria*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 곶피(*Ecklonia stolonifera*), 툃(*Hitzikia fucalis*), 다시마(*Laminaria japonica*), 모자반(*Sargassum fulvellum*), 패(*Ishige okamurae*), 갈파래(*Ulva lactuca*), 구멍 갈파래(*Ulva perutsa*), 잎파래(*Enteromorpha linza*), 청각(*Codium fragile*), 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) 및 부채 까막살(*Carpopeltis prolifera*) 등 15종이다. 건조된 해조류는 분쇄기(HMF-1000A; Hanil Elec-

tronics, Seoul, Korea)를 통해 파우더 상태로 분쇄하였다. 각 해조류 분말(500 g)은 70°C에서 3 시간 동안 3회 메탄올(MeOH; 10 L×3)로 추출하였다. 메탄올 추출물은 진공회전농축기(Eyela Co., Tokyo, Japan)로 농축시키고, 농축된 메탄올 추출물에 10% MeOH (1.0 L)를 넣고 차례로 hexane (Hexane; 1.0 L×3), dichloromethane (DCM; 1.0 L×3), ethyl acetate (EtOAc; 1.0 L×3), 그리고 *n*-butanol (BuOH; 1.0 L×3) 용액으로 분획하였다. 각각의 분획물은 진공상태인 45°C에서 진공회전농축기(Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 증발시켰다. 본 연구에서 주 재료로 사용된 감태는 2013년 2월 제주 앞바다에서 채취된 감태를 구입하여 -80°C에서 냉동보관 중인 것을 사용하였다.

사용 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 agar (MHA; Difco)를 minimum inhibitory concentration (MIC) 측정에는 Mueller Hinton broth (MHB; Difco)를 사용하였다.

항생제 감수성 테스트

E. faecalis 표준균주 및 분리균주의 항생제 감수성 실험은 BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Discs (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 실시하였다.

항균활성 측정

해조류 추출물 및 항생제의 항균활성은 정성분석법으로 disc diffusion assay에 따라 MHA 배지를 가지고 clear zone의 크기로 측정하였고, 정량분석은 MHB 배지를 가지고 CLSI의 minimum inhibitory concentration (MIC) assay에 따라 측정하였다(CLSI, 2008). *E. faecalis*에 대한 항생제의 MIC assay에 사용된 gentamicin과 ciprofloxacin은 Sigma-Aldrich사(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)에서 구입하였다.

항균 시너지 효과(antibacterial synergy effect) 측정

*E. faecalis*에 대한 해조류 추출물과 항생제간의 항균 시너지 효과는 fractional inhibitory concentration (FIC) assay (Hsieh et al., 1993; Meletiadis et al., 2010)를 이용한 checkerboard 방법으로 다음 방정식에 따라 계산하였다.

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

MIC_A와 MIC_B는 각각 A와 B의 단독 MIC 값이며, C_A와 C_B는 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_A와 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 <0.5는 synergistic, 0.5 - <1.0은 weak synergy, >1.0 - <2.0은 indifferent 그리고 >2.0은 antagonistic으로 평가한다.

통계분석

실험분석에서 얻어진 값은 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하여 통계분석 하였고 P<0.05의 유의수준에서 평가하였다.

결론 및 고찰

해조류 추출물의 *E. faecalis*에 대한 항균활성

Disc diffusion assay를 이용하여 *E. faecalis*에 대한 15종의 해조류 MeOH 추출물의 항균활성을 검토하였다. Table 1에 나타난 것처럼, 갈조류 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 분리균주에 대해 가장 좋은 항균활성을 나타냈다(Table 1). 5 mg의 감태 추출물이 본 연구에 사용된 8종의 *E. faecalis* 균주에 대해 10.5 mm-12.5 mm의 clear zone을 형성하는 것으로 나타났으며, 이는 감태 MeOH추출물이 다른 해조류보다 *E. faecalis*에 대한 항균물질을 보다 많이 함유하고 있다는 것을 의미한다.

*E. faecalis*에 대한 감태 추출물의 항균활성에 대한 후속 연구를 위해 유기용매를 이용하여 분획을 하였고, 여러 분획 추출물 중에서 EtOAc 분획 추출물이 disc diffusion assay에서 *E. faecalis*에 대해 가장 좋은 항균활성을 보였다(5 mg/disc: clear zone 14.0 mm-15.5 mm) (Table 2). 또한 MIC assay를 이용한 감태 추출물 및 분획물의 항균활성에 대한 정량 분석 결과도

Table 1. Disc diffusion assay of seaweed methanolic extracts against *Enterococcus faecalis*

Samples	Strains	Zone of inhibition (mm) ¹							
		KCTC 3206	P107	P130	P227	P684	P690	P1499	P2088
Phaeophyceae									
	<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>	²⁾	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ecklonia stolonifera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Hitzikia fucales</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Laminaria japonica</i>	-	-	-	-	-	-	6.5±0.3	-
	<i>Sargassum fulvellum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ishige okamurae</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
Chlorophyta									
	<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>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
Rhodophyta									
	<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

The type bacterial strain used in this study was obtained from the Korean Collection for Type Cultures (KCTC) and clinical isolates were provided by the Gyeongsang National University Hospital. ¹ Seaweed methanolic extracts (5 mg/disc) were loaded onto a disc (6 mm in diameter). ² -, no detected antibacterial activity.

disc diffusion assay의 결과와 마찬가지로 EtOAc 분획 추출물이 모든 *E. faecalis* 균주에 대해 128 µg/mL로 가장 낮게 나타났다(Table 3). 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.

항생제에 대한 *E. faecalis* 분리균주의 내성

Vancomycin 내성 VRE 및 vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) 감염 치료를 위해 사용되는 항생제인 linezolid와 tige-

cycline이 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 7종

Table 2. Disc diffusion assay of the methanol extract and its solvent-soluble extracts from *Ecklonia cava* against *Enterococcus faecalis*

Strains	Zone of inhibition (mm) ¹					
	MeOH ²	Hexane	DCM	EtOAc	BuOH	H ₂ O
<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	12.5±0.1	7.0±0.4	- ³	15.0±0.3	11.0±0.3	-
<i>E. faecalis</i> P107	11.5±0.2	9.5±0.2	-	15.5±0.4	12.5±0.1	-
<i>E. faecalis</i> P130	12.0±0.2	9.0±0.1	-	14.0±0.3	11.0±0.2	-
<i>E. faecalis</i> P227	11.0±0.2	9.0±0.2	-	15.0±0.2	11.0±0.2	-
<i>E. faecalis</i> P684	10.5±0.1	6.5±0.3	-	15.0±0.2	11.0±0.1	-
<i>E. faecalis</i> P690	12.5±0.3	11.5±0.3	9.0±0.3	15.5±0.2	12.5±0.3	-
<i>E. faecalis</i> P1499	11.5±0.1	8.5±0.4	-	15.0±0.4	12.5±0.3	-
<i>E. faecalis</i> P2088	11.0±0.2	9.0±0.2	-	15.5±0.3	12.0±0.2	-

The type bacterial strain used in this study was obtained from the Korean Collection for Type Cultures (KCTC) and clinical isolates were provided by the Gyeongsang National University Hospital. ¹The 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. ²MeOH, 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. ³-, no detected antibacterial activity.

Table 3. Minimum inhibitory concentration of the methanol extract and its solvent-soluble extracts from *Ecklonia cava* against *Enterococcus faecalis* strains

Unit : µg/mL

Strains	Fraction	Minimum inhibitory concentration (µg/mL)					
		MeOH ¹	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> P107		128	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> P130		256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> P227		256	256	512	128	128	>1,024
<i>E. faecalis</i> P684		256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> P690		256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> P1499		256	256	512	128	256	>1,024
<i>E. faecalis</i> P2088		128	256	512	128	128	>1,024

The type bacterial strain used in this study was obtained from the Korean Collection for Type Cultures (KCTC) and clinical isolates were provided by the Gyeongsang National University Hospital. ¹MeOH, 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.

의 분리균주에 대하여 다양한 항생제에 대한 항생제 감수성을 disc diffusion assay을 통해 분석 하였다. 표준균주인 *E. faecalis* KCTC 3206와 분리균주인 *E. faecalis* P690 및 P1499을 제외한 나머지 분리균주에서 ciprofloxacin과 gentamicin에 대한 생육 저지환(clear zone)이 나타나지 않았다(Table 4). 분리균주인 *E. faecalis* 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. 표준균주인 KCTC 3206 균주는 ciprofloxacin과 gentamicin에 대한 MIC 값이 각각 0.0625 µg/mL과 0.125 µg/mL로 다른 분리균주들의 경우는 두 항생제에 대하여 4-64 µg/mL로 분석되었다(Table 5). 다섯 분리균주들(P107, P227, P 684, 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, *E. faecalis* 균주들에 대한 gentamicin의 MIC 값은 gentamicin의 MIC breakpoint value인 500-1,024 µg/mL보다 모두 낮기 때문에 본 연구에서 사용된 분리균주들은 gentamicine 감수성 균주인 것으로 분석 되었다(Hällgren et al., 2011). 이에 본 연구에서는 ciprofloxacin과 감태 EtOAc 분획 추출물 간의 병용에 의한 항생제 항균활성의 synergy 효과에 대한 연구를 진행 하였다.

*E. faecalis*에 대한 감태의 EtOAc 분획 추출물과 항생제와의 시너지 효과

최근에 항생제 내성 세균 제어를 위한 효과적인 방법중의 하나로 천연물 유래의 항균활성 물질과 병용하여 항생제의 항균활성을 회복하는 것에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Eom et al., 2013a, 2014; Lee et al., 2014; Nshimiyumukiza et al., 2015). 본 연구에서는 감태의 EtOAc 분획 추출물과의 병용에 의한 ciprofloxacin의 *E. faecalis*에 대한 항균활성의 synergy 효과를 FIC assay로 평가하였다. Table 6에 나타난 것과 같이 감태 EtOAc 분획 추출물(8 µg/mL)을 병용 사용하였을 때 0.5 µg/mL의 ciprofloxacin 첨가에 *E. faecalis* 균주들의 증식을 억제할 수 있었다. 결과적으로 ciprofloxacin을 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 결

Table 5. 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> P107	4	64
<i>E. faecalis</i> P130	- ¹	64
<i>E. faecalis</i> P227	4	32
<i>E. faecalis</i> P684	8	32
<i>E. faecalis</i> P1499	4	2
<i>E. faecalis</i> P2088	16	64

The type bacterial strain used in this study was obtained from the Korean Collection for Type Cultures (KCTC) and clinical isolates were provided by the Gyeongsang National University Hospital. ¹ -, no determined.

Table 4. Antibiotic resistance against *Enterococcus faecalis* strains

Strains	Antibiotics	VA ¹	C	TE	LZD	AMC	CIP	RA	AM	GM	SYN
		<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	15±0.4	26±0.6	26±0.3	26±0.5	22±0.5	14±0.2	12±0.1	15±0.1	12±0.4
<i>E. faecalis</i> P107	18±0.2	26±0.7	10±0.5	34±0.3	24±0.3	AG ²	10±0.4	24±0.6	AG	10±0.8	
<i>E. faecalis</i> P130	18±0.3	AG	10±0.3	32±0.2	30±0.1	26±0.3	16±0.2	28±0.4	AG	14±0.3	
<i>E. faecalis</i> P227	18±0.3	24±0.5	8±0.5	30±0.3	30±0.2	AG	18±0.1	26±0.4	AG	12±0.8	
<i>E. faecalis</i> P684	18±0.7	22±0.4	10±0.3	26±0.3	29±0.2	AG	18±0.5	26±0.3	AG	10±0.6	
<i>E. faecalis</i> P690	10±0.6	26±0.5	12±0.1	30±0.8	30±0.6	22±0.4	18±0.3	34±0.7	12±0.2	18±0.5	
<i>E. faecalis</i> P1499	20±0.3	24±0.7	10±0.7	30±0.6	30±0.5	AG	18±0.3	22±0.2	16±0.1	10±0.5	
<i>E. faecalis</i> P2088	16±0.1	20±0.2	8±0.4	30±0.6	30±0.2	AG	18±0.6	20±0.8	AG	10±0.3	

The type bacterial strain used in this study was obtained from the Korean Collection for Type Cultures (KCTC) and clinical isolates were provided by the Gyeongsang National University Hospital.

¹VA, 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. ²AG, all grow.

Table 6. 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 ¹	Σ FIC _{max} ²	Σ FIC _{min} ³	Minimum concentration for observing synergy
<i>E. faecalis</i> P107	EtOAc	128	0.266	0.508	0.188	8
	Ciprofloxacin	4				0.5
<i>E. faecalis</i> P227	EtOAc	128	0.297	0.531	0.188	8
	Ciprofloxacin	4				0.5
<i>E. faecalis</i> P684	EtOAc	128	0.297	0.508	0.188	8
	Ciprofloxacin	8				0.5
<i>E. faecalis</i> P1499	EtOAc	128	0.344	0.563	0.188	8
	Ciprofloxacin	4				0.5
<i>E. faecalis</i> P2088	EtOAc	128	0.297	0.563	0.188	8
	Ciprofloxacin	16				0.5

The type bacterial strain used in this study was obtained from the Korean Collection for Type Cultures KCTC) and clinical isolates were provided by the Gyeongsang National University Hospital. 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. ¹ Σ FIC, the sum of FICs; ² Σ FIC_{max}, the minimum Σ FIC; ³ Σ FIC_{min}, and the maximum Σ FIC.

과를 바탕으로 FIC value를 계산해 본 결과 Σ FIC_{min}, Σ FIC_{max} 및 Σ FIC 중간값이 각각 0.188, 0.508-0.563 및 0.266-0.344로 나타났다(Table 6). Σ FIC_{min}, Σ FIC_{max} 및 Σ FIC 중간값이 모두 <1.0의 값을 나타내었기 때문에 감태의 EtOAc 분획 추출물과 ciprofloxacin의 병용사용은 *E. faecalis*군에 대해 week synergy 효과가 나타나는 것으로 나타났다(Lee et al., 2014). 이러한 결과는 감태 추출물과 ampicillin의 병용 사용이 *S. aureus*와 *Salmonella* 속 미생물에 대한 ampicillin의 항균활성을 회복시킨다는 Choi et al. (2010)의 연구 결과와도 일치한다.

본 연구 결과는 과거에 많이 검토되었던 육상자원 유래의 생리활성물질에 관한 연구의 한계에서 벗어나 해양생물자원의 생리활성물질에 대한 검토로써 의미가 있으며 항생제가 아닌 천연물질을 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.

사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2014년)에 의하여 연구되었음.

References

- Choi JG, Kang OH, Brice OO, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Sohn DH, Park H, Choi HG and Kim SG. 2010. Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. Foodborne Pathog Dis 7, 435-441. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0434>.
- 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, U.S.A.
- 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 and 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. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4851>.
- Eom SH, Lee DS, Jung YJ, Park JH, Choi JI, Yim MJ, Jeon JM, Kim HW, Son KT, Je JY, Lee MS and Kim YM. 2014. The mechanism of antibacterial activity of phlorofucofuroeckol-A against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Appl Microbiol Biotechnol 98, 9795-9804. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6041-8>.
- Eom SH, Lim KS and Kim YM. 2013b. Potential of *Candida utilis* to ferment *Ecklonia cava* by-product for enhanced anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activ-

- ity. *J Appl Phycol* 25, 1949-1956. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-0034-3>.
- 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 and Swedish ICU Study Group. 2001. 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. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.21282>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.5.3133-3137.2004>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-163>.
- Lee SC, Wu MS, Shih HJ, Huang SH, Chiou MJ, See LC and Siu LK. 2013. Identification of vancomycin-resistant enterococci clones and inter-hospital spread during an outbreak in Taiwan. *BMC Infect Dis* 13,163. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-163>.
- Meletiadiis J, Pourmaras 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. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00999-09>.
- Nshimiyumukiza O, Kang SK, Kim HJ, Eun-Hye Lee EH, Han HN, Kim Y, Kim DH, Kim JH, Eom SH and 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 and Christiansen KJ. 2003. Screening and electronic labeling 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.