



Effect of structural variation of medium chain fatty acids on antibacterial activities against pathogenic bacteria

Ju-Hyeon Choi · Su-Hyeon Son · Hak-Ryul Kim

중쇄지방산의 구조적 차이에 따른 병원성 세균에 대한 항균활성 변화

최주현 · 손수현 · 김학렬

Received: 3 January 2023 / Accepted: 7 February 2023 / Published Online: 23 February 2023

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Broad range of fatty acids were reported to show antimicrobial activities against broad range of microorganisms. However, possible changes of the antibacterial activity of a fatty acid based on structural variations are largely unknown. This study was focused on determination and comparison of the antimicrobial activities of the medium chain fatty acids, based on the position of carboxyl groups on either terminal end, against the representative food-pathogenic bacteria. Over all, mono-carboxyl medium chain fatty acids (MC-MCFA) presented stronger antimicrobial activities against the food-pathogenic bacteria tested including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) than di-carboxyl medium chain fatty acid (DC-MCFA). In addition, some of MC-MCFA and DC-MCFA showed high possibility to be used as a synergistic adjuvant for both the commercial β -lactam family antibiotics and aminoglycoside family antibiotics against MRSA.

Keywords Antimicrobial activity · Di-carboxyl medium chain fatty acid · Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* · Mono-carboxyl medium chain fatty acid · Synergistic adjuvant

Hak-Ryul Kim (✉)
E-mail: hakrkim@knu.ac.kr

School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

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.

서론

식품이나 인체에 대한 세균성 감염은 심각한 질병을 일으키거나 때로 사망에까지 이르게 하는 심각한 문제를 야기시키고 있다. 이러한 문제를 일으키는 대표적인 병원성 세균들은 *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* 등이 있다. *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *E. coli*는 주로 식인성 질환의 원인으로 알려져 있고 *S. aureus*는 급성 및 만성 감염의 주요 병원체로서 전 세계적으로 대부분의 병원내 감염으로 인한 발병의 원인균으로 알려져 있다[1]. *S. aureus*의 경우 기존 항생제에 대한 내성균이 지속적으로 출현되고 있어 의료계뿐 아니라 축산업계를 포함한 다양한 산업에서 심각한 문제를 야기시키고 있다. 특히 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)는 최근 대부분의 항생제에 저항성을 갖는 multidrug-resistant *S. aureus*으로 발전되어 더욱 심각한 문제가 되고 있다[2].

기존 항생제에 대한 박테리아 및 바이러스의 내성 문제가 증가함에 따라 이들을 효과적으로 제어하기 위한 새로운 항균활성 물질을 찾기 위한 노력으로 잘 알려진 병원성 미생물들에 대해 다양한 천연화합물들의 항균 효과를 확인하는 많은 연구가 진행되고 있다. 산업적으로나 기술적인 측면을 고려할 경우 연구를 통해 개발된 물질이 다양한 균들에 대해 항균 활성을 나타내는 다기능성 항균 소재로 사용될 수 있다면 이는 새로운 항균제 개발 및 질환 치료에 있어서 매우 유리할 것으로 판단된다.

최근 검토되고 있는 단순 항균활성 소재 후보군들 중에서 천연 지방산은 실용적으로 사용 가능한 좋은 선택이 될 수 있다 [3]. 오래전부터 지방산은 박테리아의 성장을 억제하거나 균 자체를 죽일 수 있는 능력이 있다고 알려져 있으며, 병원성 박테리아의 감염에 대처하기 위해 다양한 용도로 사용되고 있다[3-4]. 장쇄불포화지방산(long-chain unsaturated fatty acid)의 경우

피부 및 호흡기 점막에 침투하는 병원균에 대한 숙주의 자연 방어에 중요한 역할을 담당하고 있다고 보고되었으며 모유의 항균 작용에도 관여하는 것으로도 알려져 있다[3-5]. 항균활성 지방산의 항균활성 메커니즘이나 임상적 적용 가능성을 고려할 때 이들은 기존 항생제에 대한 박테리아 및 바이러스의 내성 문제를 해결할 수 있는 잠재적인 대안이 될 수 있음을 말해주고 있다[4-5].

지방산의 항균활성은 탄소 사슬의 길이와 이중 결합의 존재, 수, 위치 등 분자의 구조와 모양에 의해 큰 영향을 받을 수 있다. 특히 탄소 사슬의 길이는 대사 속도와 항균 작용 모드를 결정하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[4]. 탄소수가 6에서 18에 이르는 모든 포화지방산 중에서 decanoic acid (C10:0)와 lauric acid (C12:0)는 대표적으로 박테리아에 대해 높은 항균활성을 갖는 것으로 알려져 있으며 사슬 길이가 길어지거나 짧아짐에 따라 항균활성이 감소하는 경향을 보이고 있다[6-8]. 장쇄지방산(long-chain fatty acid)의 항균활성은 이중결합의 존재에 따라 증가하며 palmitoleic acid (C16:1) 및 linoleic acid (C18:2)가 그람양성균에 대해 높은 항균활성을 나타내어 확인되었다[9-11].

지방산의 경우 유리지방산의 형태로 사용될 때보다 glyceride의 형태 특히 monoacyl glycerol (MAG)의 형태로 전환될 경우 분자의 양친매성 특성이 증가되어 항균활성이 더 높게 나타난다고 알려져 있다[12]. 보고에 의하면 EPA와 DHA는 유리지방산의 형태보다 MAG의 형태로 존재할 때 식품을 통해 더 효과적으로 흡수되고, decanoic acid (C10:0)와 같은 medium-chain fatty acid (MCFA)들의 MAG는 특정 그람양성균에 대해 유리지방산의 형태보다 항균활성이 더 강화되었다고 보고되었다[3]. 이러한 항균활성의 증가는 유리지방산에 비해 MAG의 형태가 바이러스막이나 세포막 파괴에 더 효과적인 구조를 갖기 때문인 것으로 여겨진다[12].

이러한 결과들을 고려해 볼 때 또 다른 형태의 MCFA 유도체들도 지방산의 항균활성을 변화시킬 수 있는 가능성이 있음을 말해주고 있다. 구조적 특징과 항균활성 메커니즘을 고려해 볼 때 MCFA 및 그 유도체들은 항균활성을 나타내는 대상 균주에 대한 특이성이 낮게 나타날 가능성이 높다. 따라서 MCFA의 유도체를 이용한 항균활성 소재가 개발된다면 이들은 넓은 범위의 미생물들에 대해 항균활성을 나타내는 범용성 항균활성 소재로 개발될 가능성이 높음을 말해준다. 일반적 형태의 mono-carboxyl MCFA (MC-MCFA)는 아자유, 팜유 등의 식물성 유자나 동물성 지방 속에 널리 함유되어 있으며 여러 병원균에 대해 광범위한 항균 활성을 갖는 것으로 알려져 있다[13-14]. Di-carboxyl MCFA (DC-MCFA)는 나일론, 알키드 수지, 폴리아미드, 가소제, 윤활제, 유압액, 양초 등의 다양한 화학적 합성 원료로 사용되는 지방산 소재이다. 특히, 탄소수 10개를 가지는 sebacic acid (DC-MCFA C10:0)는 현재 식물유 원료로부터 생물학적으로 대량 생산할 수 있는 기술이 개발되었다.

본 연구에서는 MCFA의 구조에서 하나의 carboxyl 기를 갖는 일반적 MC-MCFA와 양쪽 말단에 하나씩 carboxyl 기를 갖는 DC-MCFA들을 대상으로 병원성세균에 대한 항균활성 차이를 확인하고 carboxyl 기의 숫자와 위치에 따라 항균활성이 어떻게 변화하는지 확인하여 이들을 다양한 용도의 항균활성 소재로 개발하기 위한 기초정보를 얻고자 연구가 수행되었다.

재료 및 방법

실험재료

지방산과 다른 시약은 별도의 언급이 없는 경우 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 연구에 사용된 지방산을 Table 1에 나타냈다. 96-well 세포 배양 플레이트는 SPL Life Sciences (Pocheon, Korea)에서 구입하였다.

미생물과 배양 조건

연구에 사용한 미생물 균주 *S. aureus* ATCC 6538, *B. subtilis* ATCC 6051, *E. coli* ATCC 8739 등은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)으로부터 분양 받았으며 *S. typhimurium* KCTC 2515는 한국미생물 보존센터(Seoul, Korea)로부터 분양 받았다. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 03ST018는 경북대학교 의과대학으로부터 분양 받아 사용하였다. 사용된 균주는 기본적으로 Nutrient broth (NB)를 이용하여 37 °C 조건에서 필요한 시간 동안 배양하여 사용하였다. NB 배지의 조성은 증류수 1 L 당 beef extract 1 g, yeast extract 2 g, peptone 5 g, NaCl 5 g이며 pH는 7.4로 조정하였다. NB agar 배지 제조 시에는 pH 조정 후에 1.5%의 potato agar powder를 첨가하여 제조하였다.

항균 활성 분석

지방산의 항균활성은 디스크 확산법과 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 그리고 Checker board 법을 이용하여 확인하였다. 디스크 확산법과 시료의 최소 억제 농도(MIC)는 임상미생물학 매뉴얼에 기재된 방법을 따라 결정하였다[15]. 연구에 사용된 시료들은 필요에 따라 DMSO와 증류수에 녹여 사용하였으며 항균활성 결정을 위한 음성대조군은 DMSO를 사용하였다. 디스크 확산법은 하룻밤 동안 배양한 세균 배양액(500 µL)을 agar 배지 위에 고르게 퍼 분주한 뒤 6 mm 지름의 페이퍼 디스크(Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 agar 배지 위에 놓고 그 위에 준비된 시료(20 µL)를 가하여 스며들게 하였다. 사용된 균주의 적정 배양 온도에 따라 정치배양기에서 48시간 동안 배양한 뒤 나타난 투명한 크기를 측정하였다.

시료의 MIC 값을 결정하기 위해 먼저 각 시료를 96-well 플레이트에서 Mueller-hinton 배지를 이용하여 1/2 연속 희석법으로 희석하여 희석액을 제조하였다. 610 nm에서 측정된 광학밀도 값을 0.06-0.08로 맞춘 세균 배양액 20 µL를 각 well에 첨가한 뒤 37 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포 현탁액의 광학밀도를 610 nm에서 측정하였다. 음성대조군은 DMSO (5% 최종 농도)를 사용하였으며 MIC₉₀ (µg/mL) 값은 음성대조군과 비교하여 세포 성장이 90% 이상 억제된 농도로 결정하였다.

두 시료의 공동처리에 따른 항균활성 시너지 효과를 확인하기 위해 Checker board 법을 사용하였다[16]. 간략히 설명하면 다음과 같다. 96-well 플레이트의 열과 행에 지방산 시료와 항생제 시료를 Mueller-hinton 배지를 이용하여 1/2배로 연속 희석하여 지방산과 항생제의 조합을 얻는다. 각 조합에 세균 배양액(1-2 × 10⁵ CFU/mL)을 가한 뒤 37 °C에서 12시간 동안 정지 배양하였다. 배양 완료 후 세포 현탁액의 광학밀도를 610

nm에서 측정하였다. 얻어진 광학밀도 값을 이용하여 fractional inhibitory concentration index (FICI) 값을 결정하였다. 최종 FICI 값은 $FICI = FIC_A + FIC_B$ 계산식을 이용하여 결정하였다. 여기에서 FIC_A 는 단독 처리된 시료 A의 MIC에 대한 조합 처리된 시료 A의 MIC 비율이고, FIC_B 는 단독 처리된 시료 B의 MIC에 대한 조합 처리된 시료 B의 MIC 비율을 뜻한다. 계산된 FICI 값에 따라 0.5 미만일 경우 synergy, 0.5-1.0일 경우 additive, 1.0-4.0일 경우 indifference, 4.0 이상의 경우 antagonism으로 판단하였다.

결과 및 고찰

병원성 세균에 대한 MCFA의 항균 활성 확인

병원성 세균에 대한 MC-MCFA와 DC-MCFA의 항균 활성을 결정하기 위해 탄소수 6개에서 16개까지의 지방산(Table 1)을 이용하여 디스크 확산법을 통해 항균활성을 결정하였다. 양성대조군은 필요에 따라 kanamycin과 vancomycin을 사용하였다. MC-MCFA의 경우 MC-C6:0에서 MC-C10:0까지는 투명환이 분명하게 생성되는 것이 확인되었지만 MC-C12:0 이상에서는 투명환이 관찰되지 않았거나 매우 약하게 나타났다(Table 2). 이러한 결과는 MC-C12:0 이상의 지방산이 항균활성을 나타내지 않았다는 것보다 탄소수의 증가에 따라 수용성인 한천 배지에서 용해성이 낮았기 때문으로 판단되었다. DC-MCFA의 경우 carboxyl 그룹이 시슬 양쪽 말단에 존재하기 때문에 분자의 극성이 증가하고 수용성이 높아지면서 결과적으로 DC-C6:0에서부터 DC-C14:0까지 투명환이 생성되었다(Table 3). 그러나 동

일한 탄소수를 가진 지방산의 carboxyl 기 숫자 변화에 따른 항균활성을 비교하는 것이 본 연구의 중요한 목적이므로 MC-MCFA와 DC-MCFA의 탄소수를 동일하게 유지하기 위해 이후 본 연구에서는 C6:0-C10:0의 MCFA를 대상으로 추가적인 항균활성을 평가하였다.

동일한 탄소수를 갖는 MCFA에서 투명환 크기를 비교하였을 경우 탄소수 6개인 C6:0 지방산은 그람양성균 *S. aureus*와 MRSA에서 MC-C6:0이 DC-C6:0에 비해 투명환의 크기가 29% 정도 크게 나타났으며 나머지 균에서는 비슷한 정도의 크기를 나타냈다. C8:0의 경우 사용된 모든 세균에 대해 DC-C8:0보다 MC-C8:0이 33-58% 범위에서 증가된 투명환의 크기를 보여주었다. C10:0의 경우 *B. subtilis*를 제외한 다른 모든 균에서 MC-C10:0이 DC-C10:0 대비 13%의 증가된 투명환을 생성하였음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 볼 때 C6:0-C10:0 범위에서의 MCFA는 동일한 탄소수를 가질 경우 연구에 사용된 모든 균에서 DC-MCFA보다 MC-MCFA가 더 높은 항균활성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 그러나 항균활성 증가는 전반적으로 그람음성균보다 그람양성균에서 더 크게 나타났음을 알 수 있다. 특히 그람양성균 *S. aureus*와 *S. aureus*로부터 유래된 항생제 내성 균주 MRSA에서 DC-MCFA보다 MC-MCFA가 더 뚜렷하게 높은 항균활성을 나타냈다.

탄소수의 차이에 따른 MCFA의 항균활성은 MC-MCFA와 DC-MCFA의 경우 모두 C6:0이나 C10:0에 비해 C8:0이 뚜렷하게 높은 것을 보여주었다. MC-C8:0은 그람음성균 *S. typhimurium*와 *E. coli*에서 MC-C6:0과 MC-C10:0 대비 45-78% 더 큰 투명환이 생성되었고 그람양성균 *S. aureus*와 MRSA에서는 111% 더 큰 투명환이 생성되었다. DC-MCFA에서도 마찬가지로 DC-

Table 1 List of medium chain fatty acid (MCFA) tested

Carbon number	MC ^{a)} -MCFA	DC ^{b)} -MCFA
6	Caproic acid (C6:0)	Adipic acid (C6:0)
8	Caprylic acid (C8:0)	Suberic acid (C8:0)
10	Decanoic acid (C10:0)	Sebacic acid (C10:0)
12	Lauric acid (C12:0)	Dodecanedioic acid (C12:0)
14	Myristic acid (C14:0)	Tetradecanedioic acid (C14:0)
16	Palmitic acid (C16:0)	Hexadecanedioic acid (C16:0)

^{a)}Mono-carboxyl

^{b)}Di-carboxyl

Table 2 Antibacterial activity of MC-MCFA against pathogenic bacteria

MC-MCFA ^{a)}	Size of clear zone (mm) ^{b)}				
	<i>S. typhi</i> ^{c)}	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA ^{d)}
MC-C6:0	2.25±0.25	2.25±0.25	2.75±0.25	2.25±0.25	2.25±0.25
MC-C8:0	3.75±0.25	4	4	4.75±0.25	4.75±0.25
MC-C10:0	2.25±0.25	2.25±0.25	2.75±0.25	2.25±0.25	2.25±0.25
MC-C12:0	-	-	1	-	-
MC-C14:0	-	-	1	-	-
MC-C16:0	-	-	-	-	-

^{a)}Concentration was fixed at 500 µg/DMSO 20 µL

^{b)}Distance from edge of the disk

^{c)}*Salmonella typhimurium*

^{d)}methicillin-resistant *S. aureus*

Table 3 Antibacterial activity of DC-MCFA against pathogenic bacteria

DC-MCFA ^{a)}	Size of clear zone (mm) ^{b)}				
	<i>S. typhi</i> ^{c)}	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA ^{d)}
DC-C6:0	2.25±0.25	2.25±0.25	3	1.75±0.25	1.75±0.25
DC-C8:0	2.75±0.25	2.75±0.25	3	3.25±0.25	3
DC-C10:0	2	2	2.75±0.25	2	2
DC-C12:0	0.8	0.8	1.8	1.8	1.8
DC-C14:0	-	-	1.3	1.8	0.8
DC-C16:0	-	-	-	-	-

^{a)}Concentration was fixed at 500 µg/DMSO 20 µL

^{b)}Distance from edge of the disk

^{c)}*Salmonella typhimurium*

^{d)}methicillin-resistant *S. aureus*

Table 4 Survival rate of pathogenic bacteria with MC-MCFA and DC-MCFA

MCFA ^{a)}	Survival rate (%)				
	<i>S. typhi</i> ^{b)}	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA ^{c)}
MC-C6:0	78	63	44	64	79
MC-C8:0	72	13	24	43	36
MC-C10:0	60	7	28	1	0
DC-C6:0	92	56	95	65	78
DC-C8:0	92	90	69	66	78
DC-C10:0	84	75	87	62	60

^{a)}Concentration was fixed at 500 µg/mL

^{b)}*Salmonella typhimurium*

^{c)}methicillin-resistant *S. aureus*

C8:0가 DC-C6:0와 DC-C10:0보다 더 높은 항균활성을 나타냈다. 그람음성균 *S. typhimurium*와 *E. coli*에서는 DC-C8:0가 DC-C6:0와 DC-C10:0 대비 약 9-38%의 증가된 투명환이 생성되었고 그람양성균 *S. aureus*와 MRSA에서는 약 50-86% 더 큰 투명환이 생성되었다. 따라서 C6:0-C10:0 범위의 MCFA 중에서 탄소수에 따른 항균활성은 MC-MCFA와 DC-MCFA 모두 C8:0이 가장 높은 항균활성을 나타낸다는 사실을 확인하였다. 특히 그람양성균 *S. aureus*와 MRSA에서 탄소수에 따른 항균활성의 차이가 뚜렷하게 높게 나타난다는 사실을 확인하였다.

MCFA 처리에 의한 병원성 세균의 생존율 확인

MC-MCFA와 DC-MCFA의 항균 활성에 대한 정량적 분석을 위해 C6:0-C10:0 범위의 MCFA (500 µg/mL)를 가하여 액체배지에서 15시간 동안 배양 후 각 세균의 생존율을 측정하였다 (Table 4). MC-MCFA의 경우 *E. coli*와 *S. aureus*, MRSA에서 생존율이 매우 낮게 나타났고 탄소 사슬이 짧아질수록 균의 생존율은 점차 증가함을 보였다. *E. coli*의 경우 MC-C10:0을 처리하였을 경우 7%의 균생존율을 보였으며 MC-C8:0을 처리하였을 경우 균생존율이 13%로 증가하였다. *S. aureus*와 MRSA의 경우 MC-C10:0을 처리하였을 때 두 균주 모두 99% 이상의 균이 사멸한 것으로 나타났으며 MC-C8:0을 처리하였을 때 *S. aureus*는 균생존율이 43%로 증가하였고 MRSA의 경우 36%로 증가하였다. 디스크 확산법의 결과에서는 MC-C8:0이 MC-C10:0보다 더 큰 투명환의 크기를 보여주었지만 액체배지

에서의 결과는 MC-C10:0이 MC-C8:0보다 더 높은 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

이러한 결과가 나타난 것은 사용된 지방산의 용해성과 확산성에 의한 영향으로 판단된다. 즉 디스크 확산법에서는 지방산 시료를 처리한 후 자연적인 확산에 의존해 투명환의 생성여부를 관찰하는 반면, 액체배지를 사용하는 생존율 조사 연구에서는 지방산 처리 후 진탕을 통해 지방산 시료와 세균과의 접촉을 최대화시키는 조건에서 연구를 진행함으로써 좀 더 정확하게 항균활성 능력이 분석될 수 있었던 것으로 판단되었다. DC-MCFA의 경우는 전반적으로 MC-MCFA에 비해 균생존율이 높게 나타났으며 탄소수의 차이에 따른 생존율의 차이는 탄소수 증가에 따라 생존율이 다소 감소하는 경향을 보였으나 뚜렷한 경향을 나타내는 것으로 판단하기에는 무리가 있다고 판단되었다.

MRSA에 대한 MCFA의 항균활성 확인

앞에서 실시한 균생존율 조사 연구 결과에 의하면 MC-C10:0가 MRSA와 *S. aureus*에 대해 매우 강력한 항균활성을 나타내는 것이 확인되었다. 두 균주의 균생존율은 비슷한 결과를 보여주었지만 의미하는 바는 큰 차이가 있음을 말해 준다. 왜냐하면 *S. aureus*의 경우 기존 항생제로 쉽게 성장이 억제되지만 MRSA의 경우 *S. aureus*는 달리 기존 항생제에 대해 내성을 가지고 있어 기존 항생제로 제어하기가 어렵다. 그런데 MC-C10:0의 경우 MRSA와 *S. aureus*에 대해 비슷한 항균활성을 나타내고 있으므로 MC-C10:0를 MRSA의 성장 억제를 위한 항생제

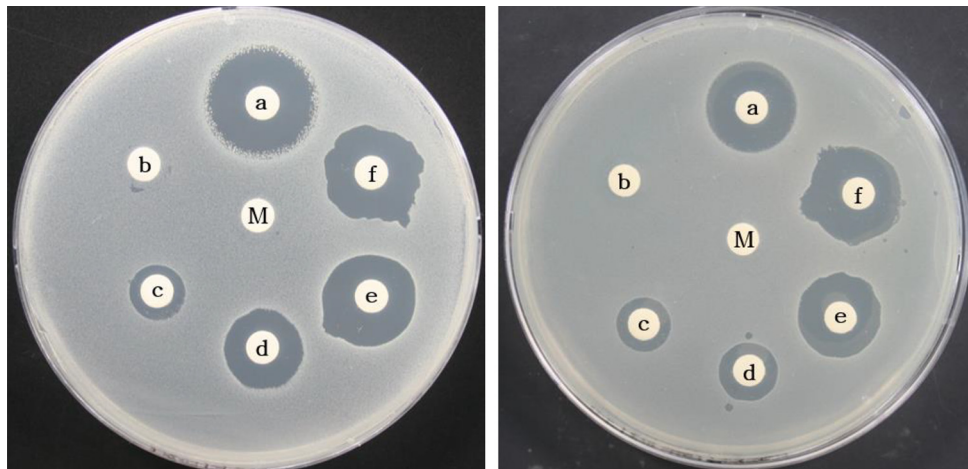


Fig. 1 Antimicrobial activity of MC-C8:0 (Caprylic acid) against *S. aureus* ATCC 6538 (A) and MRSA 03ST018 (B). M; DMSO 20 μ L, a; Vancomycin 5 μ g, b; MC-C8:0 10 μ g, c; MC-C8:0 50 μ g, d; MC-C8:0 100 μ g, e; MC-C8:0 200 μ g, f; MC-C8:0 500 μ g

대체제로 이용할 수 있는 가능성이 높음을 말해주고 있다. 따라서 MRSA에 대한 MC-MCFA의 항균활성 정도를 좀 더 세부적으로 확인하기 위한 연구를 진행하였다. 먼저 MC-MCFA의 처리농도 변화에 따른 MRSA에 대한 항균활성 변화를 확인하기 위해 디스크 확산법을 이용하여 플레이트 상에서 투명환의 크기 변화를 확인하였다(Fig. 1). 플레이트 상에서 항균활성 비교를 위해 투명한 형성이 잘 이루어지는 MC-C8:0을 이용하여 연구를 수행하였다. 그림에서 보여주는 바와 같이 MRSA에 대해 MC-C8:0을 50-500 μ g 범위에서 처리하였을 때 투명환의 크기가 농도의존적으로 증가하는 것을 알 수 있다. *S. aureus*에 대해서도 MC-C8:0을 동일한 조건으로 처리하였을 때 투명환의 크기가 MRSA의 경우와 마찬가지로 농도의존적으로 증가하고 있으며 투명환의 크기도 비슷한 정도로 나타났다.

서로 다른 플레이트에서 MC-C8:0을 처리하였을 때 MRSA와 *S. aureus*에 대해 항균활성 정도가 비슷한 수준을 나타냈지만 두 균에 대한 MC-C8:0의 항균활성 정도를 보다 정확히 비교하기 위해 동일한 플레이트에서 두 균주를 대상으로 추가 실험을 진행하였다(Fig. 2). 그림에서 보여주는 바와 같이 페니실린 1 μ g을 처리하였을 때 *S. aureus*에서는 매우 큰 투명환이 생성되었지만 MRSA에서는 투명환이 전혀 생성되지 않아 대상 균주가 MRSA임을 확인시켜 주고 있다. 그러나 양성대조군으로 사용된 vancomycin (1 μ g)의 경우 MRSA와 *S. aureus* 양쪽 모두에 대해 비슷한 투명환의 크기를 보여주고 있다. MC-C8:0 또한 MRSA와 *S. aureus* 양쪽 모두에 대해 비슷한 투명환의 크기를 보여주고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과를 통해 MC-C8:0을 포함한 MC-MCFA 들이 β -lactam 계열 항생제에 내성이 있는 MRSA를 효과적으로 제어할 수 있는 항균활성소재로 개발될 수 있음을 확인시켜 주고 있다.

MCFA와 기존 항생제의 공동처리에 따른 시너지 효과 확인

본 연구에 사용된 MC-MCFA나 DC-MCFA들이 여러 병원성 미생물에 대해 항균활성을 나타냈지만 일정 수준의 항균활성을 나타내기 위해서는 처리 농도를 비교적 높은 수준으로 사용해야 한다. 그러므로 MC-MCFA나 DC-MCFA들을 항균활성소재

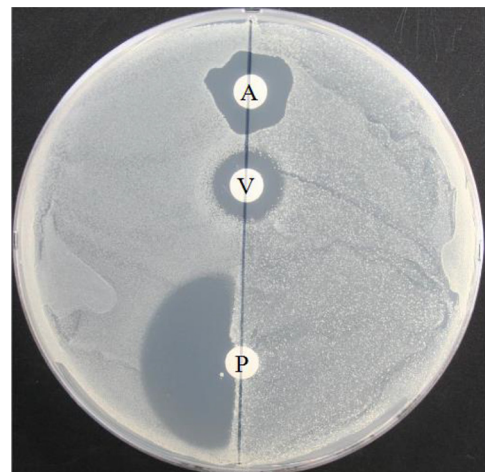


Fig. 2 Comparison of Antibacterial activity of MC-C8:0 (Caprylic acid) against *S. aureus* ATCC 6538 and MRSA 03ST018. Left half; *S. aureus* ATCC 6538, Right half; MRSA 03ST018. A; MC-C8:0 200 μ g, V; Vancomycin 1 μ g, P; Penicillin 1 μ g

제로 직접 사용하는 것보다 기존 항생제의 보조제로 사용하는 것이 더 효과적일 수 있다고 여겨진다. 또한 이미 발표된 다른 보고에 의하면 MCFA 중 일부가 aminoglycoside 계열 항생제와 공동으로 사용되었을 때 항균활성을 크게 증진시킨다는 사실도 확인된 바 있다[17]. 이러한 사실을 근거로 본 연구에 사용된 MC-MCFA나 DC-MCFA들에 대해서도 기존 항생제와 공동처리에 따른 항균활성 증진효과를 알아보기 위한 연구를 진행하였다.

MCFA와 기존 항생제 공동처리에 따른 항균활성 증진효과를 보다 정량적으로 확인하기 위해 Checker board 법을 이용하여 FICI 값을 측정하고 MRSA에 대한 항균활성 시너지 효과를 확인하였다. 공동 처리에 사용한 항생제는 상업적으로 잘 알려진 β -lactam 계열 항생제와 비 β -lactam 계열 항생제 중 aminoglycoside 계열 항생제를 선별하여 사용하였다. MCFA는 탄소

Table 5 Synergy effect of MC-MCFA and DC-MCFA in combination with β -lactam antibiotics against MRSA 03ST018

MCFA	FICI ^{a)}							
	Oxacillin		Ampicillin		Penicillin		Cephalexin	
	A ^{b)}	B ^{c)}	A	B	A	B	A	B
MC-C6:0	2	2	2	1	2	2	2	1
MC-C8:0	2	2	2	1	2	2	2	1
MC-C10:0	2	2	0.5	0.31	1	0.5	1	0.5
DC-C6:0	0.5	0.27	0.5	0.38	2	1	0.5	0.25
DC-C8:0	1.5	0.62	1	0.5	2	2	1	0.5
DC-C10:0	2	2	2	2	2	2	2	2

^{a)}fractional inhibitory concentration index

^{b)}combination at 1/4 MIC

^{c)}combination at 1/2 MIC

Table 6 Synergy effect of MC-MCFA and DC-MCFA in combination with aminoglycoside antibiotics against MRSA 03ST018

MCFA	FICI ^{a)}							
	Gentamycin		Neomycin		Streptomycin		Kanamycin	
	A ^{b)}	B ^{c)}	A	B	A	B	A	B
MC-C6:0	2	2	2	2	2	2	2	2
MC-C8:0	0.38	0.09	1.5	0.75	2	2	2	2
MC-C10:0	0.03	0.02	0.09	0.19	1	0.19	2	2
DC-C6:0	2	2	2	2	2	2	2	2
DC-C8:0	2	2	2	2	2	2	2	2
DC-C10:0	2	2	2	2	2	2	2	2

^{a)}fractional inhibitory concentration index

^{b)}combination at 1/4 MIC

^{c)}combination at 1/2 MIC

수 6-10 범위의 MC-MCFA와 DC-MCFA 모두를 대상으로 MIC 값의 1/4과 1/2에 해당하는 농도에 대해 FICI 값을 결정하여 항균활성 시너지 효과를 비교하였다. Table 5에 보여주는 바와 같이 β -lactam 계열 항생제 중 oxacillin은 사용된 모든 MC-MCFA에 대해 시너지 효과 범위를 넘어서는 FICI 값을 보여주었다. 그러나 DC-MCFA의 경우 DC-C6:0는 시너지 효과 범위 내에 드는 FICI 값(0.27-0.5)을 나타냈다. Ampicillin의 경우 MC-C10:0과 DC-C6:0에서 분명하게 시너지 효과 범위 내에 드는 FICI 값(0.31-0.5)을 나타냈고 DC-C8:0에서는 MIC 1/2의 값에서만 시너지 효과를 나타냈다(FICI=0.5). Penicillin의 경우 MC-C10:0의 1/2의 MIC 값에서만 시너지 효과를 나타냈고(FICI=0.5) 나머지는 모두 시너지 효과 범위를 벗어났다. Cephalexin의 경우 DC-C6:0는 모두 시너지 효과 범위 내에 드는 FICI 값(0.25-0.5)을 나타냈고, MC-C10:0과 DC-C8:0은 1/2의 MIC 값에서만 시너지 효과를 나타냈으며(FICI=0.5) 나머지는 모두 시너지 효과 범위를 벗어났다.

얻어진 연구결과를 통해 알 수 있는 것은 MC-MCFA뿐 아니라 DC-MCFA도 β -lactam 계열 항생제와 공동 처리에 의한 항균활성 시너지 효과를 나타낸다는 것을 보여주고 있다. 그러나 항균활성 시너지 효과는 사용되는 항생제에 따라 그 정도가 다르게 나타나며 MCFA의 처리 농도에 의해서도 영향을 받는 것으로 확인되었다. 전반적으로 볼 때 특이하게도 MC-MCFA의 경우 C6:0-C10:0의 범위 내에서는 탄소사슬의 길이가 길어

질수록 항균활성 시너지 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 반면에 DC-MCFA의 경우에는 C6:0-C10:0의 범위 내에서 탄소사슬의 길이가 짧을수록 항균활성 시너지 효과가 증가하는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 디스크 확산법을 이용하여 확인한 MCFA 자체의 MRSA에 대한 항균활성 결과와 상당히 다른 양상을 보여주고 있다. MRSA에 대한 MCFA의 항균활성은 DC-MCFA보다 MC-MCFA가 더 높게 나타났지만 β -lactam 계열 항생제와 공동 처리에 의한 항균활성 시너지 효과는 오히려 DC-MCFA가 더 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 DC-MCFA와 MC-MCFA의 구조적 차이에 기인되었을 가능성이 높다. 지방산의 carboxyl 기는 물에 가용화되면 이온화되어 친수성을 나타내고 탄소 사슬은 소수성을 나타내어 전체 분자를 양친매성을 갖도록 만든다. 따라서 지방산의 항균 활성을 담당하는 메커니즘은 분자의 양친매성 특성으로 인한 세포막 파괴에 기인할 가능성이 높고[3], 항바이러스 활성을 담당하는 메커니즘은 아마도 박테리아의 신호 전달을 방해하는 내용이 포함될 가능성이 높다[12]. 따라서 carboxyl 기의 숫자와 위치에 따라 지방산의 양친매성 특성에 영향을 줄 가능성이 높으며 이는 지방산의 항균활성 특성에도 영향을 줄 가능성이 매우 높다.

MC-MCFA는 탄소사슬의 한 쪽에만 carboxyl 기를 가지지만 DC-MCFA는 사슬 양쪽 말단에 carboxyl 기를 두 개 가짐으로써 분자 내의 극성의 분포가 달라지게 되고 이러한 차이는 β -

lactam 계열 항생제와 공동 처리에 의한 항균활성 시너지 효과를 나타내는 메커니즘에도 영향을 주었을 것으로 판단된다. 즉 DC-MCFA와 MC-MCFA가 직접 항균활성을 나타내는 작동 메커니즘과 다른 항생제와의 공동 처리에 의한 항균활성 시너지 효과를 나타내는 작동 메커니즘이 다르게 나타났을 가능성이 높음을 말해주고 있다.

비 β -lactam 계열 항생제 중 aminoglycoside 계열 항생제를 사용하여 MCFA와의 공동 처리에 의한 항균활성 증진효과를 확인한 결과를 Table 6에 나타냈다. 결과에서 보여주는 바와 같이 β -lactam 계열 항생제의 경우와 다르게 DC-MCFA는 사용된 모든 항생제에 대해 모두 시너지 효과 범위를 벗어나는 FICI 값을 나타냈다. 반면에 MC-MCFA는 gentamycin, neomycin, streptomycin에서 시너지 효과 범위 내의 FICI 값을 나타냈다. Gentamycin의 경우 MC-C8:0과 MC-C10:0에서 시너지 효과 범위 내의 FICI 값을 보여주었는데 특히 MC-C10:0의 경우 0.02-0.03의 매우 낮은 FICI 값을 나타냄으로 시너지 효과가 매우 강하게 나타남을 보여주었다. 또한 neomycin의 경우에도 MC-C10:0과 공동 처리되었을 때 매우 낮은 FICI 값(0.09-0.19)을 보여주었고 있다. 이러한 결과는 MC-MCFA가 aminoglycoside 계열 항생제에 대해서 공동 처리에 의한 항균활성 시너지 효과를 크게 나타낸다는 것을 보여주고 있으며 그 효과는 β -lactam 계열 항생제에 대해 나타내는 것보다 오히려 더 크게 나타나고 있다는 것을 보여준다. 또한 β -lactam 계열 항생제와 마찬가지로 사용되는 항생제 종류와 지방산의 사슬길이에 따라 항균활성 증진효과가 다르게 나타날 수 있음을 알 수 있다.

Table 5와 Table 6에서 보여준 결과들을 통해 알 수 있는 것은 탄소수 6-10개의 범위 내에서 β -lactam 계열 항생제에 대해서는 MC-MCFA와 DC-MCFA 모두 항균활성 시너지 효과를 나타내는 지방산이 존재하지만 비 β -lactam 계열 항생제 중 aminoglycoside 계열 항생제에 대해서는 MC-MCFA에서만 항균활성 증진효과를 나타내는 지방산이 나타난다는 사실이다. 그러나 고무적인 사실은 본 연구에서 얻어진 결과에 근거해 볼 때 탄소수 6-10개 범위 내의 MCFA 중에는 β -lactam 계열 항생제 뿐만 아니라 비 β -lactam 계열 항생제 중 aminoglycoside 계열 항생제에 대해서도 항균활성 시너지 효과를 동시에 나타내는 범용성 항균활성 증진제를 개발할 수 있는 가능성이 높음을 보여주고 있다. 다만 사용되는 항생제에 따라 항균활성 증진제로 이용될 수 있는 후보 지방산의 종류가 달라질 수 있으므로 각 조합에 따른 후보 지방산의 시너지 효과 작용 메커니즘에 관한 추가적인 연구가 필요해 보인다.

결론적으로 자연에는 다양한 MCFA들이 있지만 본 연구에서는 6-10개의 탄소 원자를 갖는 MC-MCFA와 DC-MCFA를 이용하여 MRSA를 비롯한 병원성 세균에 대해 항균활성을 확인하고 지방산의 구조적 차이에 따른 항균활성 차이를 비교하였다. 또한 MCFA를 단지 항균활성 소재로 이용할 뿐 아니라 기존 항생제들과의 공동 처리를 통한 항균활성 증진제로 개발할 수 있는 가능성을 보여주었다. 본 연구를 통하여 얻어진 결과를 근거로 항생제 저항성 병원균을 효과적으로 대처하기 위한 새로운 패러다임을 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

초 록

일반적으로 여러 다양한 지방산들은 넓은 범위의 미생물들에 대해 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 지방산의 구조에는 다양한 구조적 차이가 있음에도 불구하고 지방산의 구조적 차이에 따른 항균활성의 변화에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 본 연구는 중쇄지방산들을 대상으로 카복실기의 숫자와 위치에 따른 항균활성의 차이를 잘 알려져 있는 식중독균들을 대상으로 조사하였다. 전반적으로 단일카복실기를 갖는 중쇄지방산이 이중카복실기를 갖는 중쇄지방산에 비해 더 강한 항균활성을 나타내었지만 두 종류의 중쇄지방산 모두 일반 항생제들과 함께 사용될 경우 매우 높은 시너지 효과를 나타낸다는 사실이 추가적으로 확인되었다.

Keywords 단일 카르복실 중쇄지방산 · 시너지효과 · 이중 카르복실 중쇄지방산 · 항균활성 · 항생제저항성포도상구균

감사의 글 본 연구는 환경부의 생물소재 전문인력 양성사업과 차세대 시퀀싱 핵심연구지원센터의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339(8): 520–532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806
- Chambers HF, Deleo FR (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol 9: 629–641. doi: 10.1038/nrmicro2200
- Thormar H, Hilmarsen H (2007) The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. Chem Phys Lipids 150(1): 1–11. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.06.220
- Desbois AP, Smith VJ (2010) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. Appl Microbiol Biotechnol 85(6): 1629–1642. doi: 10.1007/s00253-009-2355-3
- Kumar P, Lee JH, Beyenal H, Lee J (2020) Fatty Acids as Antibiofilm and Antivirulence Agents. Trends Microbiol 28(9): 753–768. doi: 10.1016/j.tim.2020.03.014
- Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP (1972) Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother (Bethesda) 2(1): 23–28. doi: 10.1128/AAC.2.1.23
- Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrimsen O, Thormar H (2001) Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. Antimicrob Agents Chemother (Bethesda) 109(10): 670–678. doi: 10.1034/j.1600-0463.2001.d01-131.x
- Sun CQ, O'Connor CJ, Robertson AM (2003) Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. FEMS Immunol Med Microbiol 36(1-2): 9–17. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00008-7
- Wille JJ, Kydonieus A (2003) Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against Gram-positive bacteria. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 16(3): 176–187. doi: 10.1159/000069757
- Kodicek E (1945) The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive microorganisms. Biochem J 39(1): 78–85. doi: 10.1042/bj0390078
- Galbraith H, Miller TB, Paton AM, Thompson JK (1971) Antibacterial

