



Antimicrobial activity of 7,10-epoxy-octadeca-7,9-dienoic acid crude extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Su-Hyeon Son · Ye-Ji Park · Su-Hyeon Lee · Ju-Hyeon Choi · Hak-Ryul Kim

메티실린 저항성 황색포도상구균에 대한 7,10-epoxy-octadeca-7,9-dienoic acid 조추출물의 항균 활성 연구

손수현 · 박예지 · 이수현 · 최주현 · 김학렬

Received: 30 December 2022 / Accepted: 20 February 2023 / Published Online: 8 March 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Effective and alternative strategies to control methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are consistently needed. Previous study presented that 7,10-epoxy-octadeca-7,9-dienoic acid (EODA) was produced from 7,10-dihydroxy-8(*E*)-octadecenoic acid through one-step heat treatment. Further studies confirmed that EODA was highly active against broad range of pathogenic bacteria including MRSA, promising development of a novel antibacterial agent to control MRSA. However, there are some practical huddles for industrialization of EODA, especially high cost for fine purification. To address this problem, this study was focused on determination of any changes in the antibacterial activities of EODA when used as a crude extract. As a result, any significant changes in the antibacterial activities of EODA was not detected and additional synergistic effect for commercial antibiotics on antibacterial activity was sustained as it was.

Keywords 7,10-epoxy-octadeca-7,9-dienoic acid · Crude extract · Furan fatty acid · Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

서론

수산화지방산(Hydroxy fatty acid, HFA)은 일반 지방산 사슬에 수산기를 가지는 형태를 말하며 자연에서는 식물, 곤충, 미생물 등의 지방산에서 발견되고 있다. HFA는 사슬 내에 수산기를 가짐으로써 일반 지방산과 달리 높은 점성이나 반응성을 가지게 되어 산업적으로 다양하게 이용될 수 있다[1]. HFA는 연결된 수산기에 따라 mono-, di-, tri-hydroxy fatty acid로 분류되며 수산기 이외에 별도의 구조를 포함하는 epoxyhydroxy fatty acid 등도 포함된다.

최근의 보고에 의하면 미생물을 이용한 생물전환을 통해 식물성 오일로부터 다양한 HFA가 생산되기도 하였다[2]. 또한 미생물 생물전환을 통해 생성된 HFA 중 일부는 식물 병원성 곰팡이나 인체 병원성 세균에 대해 성장 억제 능력을 가지고 있다는 것이 확인되었으며 항균, 항염증, 항산화 등의 활성을 가지고 있는 것들도 확인되었다[3-6]. 특히 미생물 생물전환을 통해 생성된 HFA 중 7,10-dihydroxy-8(*E*)-octadecenoic acid (DOD)는 *Pseudomonas aeruginosa* PR3를 이용하여 oleic acid를 포함하는 식물성 오일로부터 생산할 수 있는 기술이 확인되었고 대량 생산할 수 있는 기술까지 개발되었다[2].

한편, DOD의 유도체 합성을 통한 새로운 기능성 지방산 생산 연구과정에서 DOD의 단순한 열처리 과정을 통해 푸란 지방산의 일종인 7,10-epoxy-octadeca-7,9-dienoic acid (EODA)가 생성된다는 사실이 확인되었다[7,8]. 또한 추가적인 연구를 통해 EODA가 다양한 병원성 세균에 대해 높은 항균활성을 나타낸다는 사실이 확인되었으며, 특히 메티실린 저항성 포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)에 대해 매우 높은 항균활성을 나타낸다는 것이 확인되었다[9].

MRSA는 초기에는 페니실린에 대한 내성을 나타내는 것으로

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

School of Food Science & 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.

확인되었으나 점차 내성을 나타내는 항생제의 범위가 확대되면서 현재는 대부분의 항생제에 대해 내성을 나타내는 슈퍼박테리아로 발전되었다[10,11]. 따라서 MRSA는 공중보건을 비롯하여 축산업, 식품산업 등에도 심각한 문제를 야기시키고 있어 MRSA를 효과적으로 제어하기 위한 대책이 절실히 요구되고 있다[12]. 일반적으로 항생제 내성 균주에 대응하기 위한 전략으로 식물추출물이나 에센셜오일 등 천연물질을 항생제 보조제로 기존 항생제와 함께 사용하는 방법이 시도되기도 하였으나 그 효과는 미미한 것으로 평가되고 있다[13,14].

EODA의 경우 MRSA에 대해 항균활성을 나타내지만 특이하게도 베타실린에 저항성을 갖지 않은 일반 포도상구균보다 MRSA에 대한 항균활성 정도가 오히려 더 높게 나타난다고 보고되었다[9]. 또한 EODA는 EODA 자체로 MRSA에 대해 높은 항균활성을 나타내지만 현재 상업적으로 사용되고 있는 β -lactam계 항생제들과 함께 사용될 경우 MRSA에 대한 항균활성을 크게 증가시킨다는 사실이 확인되었다[15]. 보고에 의하면 EODA에 의해 증가된 항균활성 정도는 MRSA의 β -lactam계 항생제들에 대한 항생제 내성을 90% 이상 감소시키는 정도로 나타나는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 EODA가 MRSA를 효과적으로 제어하기 위한 강력한 항균활성 증진제로 사용될 수 있음을 보여주고 있으며, 특히 MRSA로 인해 야기되는 문제에 효과적으로 대처하기 위한 새로운 항생제를 개발하지 않고 기존 항생제를 재사용하여 MRSA를 효과적으로 제어할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

그러나 EODA를 MRSA의 효과적 제어를 위한 항균활성 증진제로 실용화하기 위해서는 넘어야 할 산이 남아 있다. 특히 EODA 생산 후 순수 정제에 필요한 많은 시간과 높은 비용이 실용화를 어렵게 만들고 있다. 따라서 본 연구는 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로 EODA 생산 후 얻어진 조추출물을 정제과정 없이 직접 사용할 수 있는 가능성을 확인하기 위해 수행되었다. EODA 생산 후 조추출물의 상태로 사용하였을 때 정제된 EODA에 비해 항균활성에 차이가 있는지 혹은 기존 항생제와의 공동치리에 따른 항균활성 시너지 효과에 어떠한 영향을 나타내는지 등에 대해 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료

DOD는 이전 논문에 언급된 방법에 따라 생산하고 정제하여 사용하였다[16]. *N*-trimethyl silyl imidazole (TMSI)는 Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)에서, Pyridine은 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 분석용 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC) 플레이트(Kiesel gel 60 F₂₅₄)는 EM Science (Cherry Hill, NJ, USA)에서 구입하였다. 96-well 세포 배양 플레이트는 SPL Life Sciences (Pocheon, Korea)에서 구입하였다. EODA 생산을 위한 열처리 반응에 필요한 Hexane은 HPLC grade를 사용하였고 나머지 시약은 일반 grade를 사용하였다. 그 외의 시약들은 별도의 언급이 없는 경우 Sigma에서 구입하였다.

미생물과 배양 조건

MRSA 균주는 경북대학교 의과대학으로부터 제공받아 사용하였으며 균주의 보관 및 처리는 이전 논문에 언급된 방법을 따라 수행하였다(9). *S. aureus* ATCC 6538은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)으로부터 분양 받았다. 사용된 균주는 기본적으로 Nutrient broth (NB)를 이용하여 37 °C 조건에서 필요한 시간 동안 배양하여 준비하였다. NB의 조성은 증류수 1L 당 beef extract 1g, yeast extract 2g, peptone 5g, NaCl 5g이며 pH는 7.4로 조정하였다. NB agar 배지 제조 시에는 pH 조정 후에 1.5%의 potato agar powder를 NB 배지에 첨가하여 제조하였다.

EODA 생산 및 정제

EODA는 이전 논문에 언급된 방법에 따라 생산하여 얻었다[7]. 간략히 정리하면, 4 mL 유리병에 DOD 10 mg을 넣은 후 hexane 500 μ L를 가하여 95 °C에서 72시간 동안 가열하였다. 반응 종료 후 상부 hexane을 증발시켜 제거하고 나머지 생성물을 chloroform에 녹여 조추출물을 얻었다. 조추출물로부터 EODA를 정제하기 위해 생성물을 TLC 플레이트에 전개시킨 뒤 EODA에 해당하는 spot을 회수하여 회수물로부터 실리카겔을 제거하는 약식방법을 사용하였다. 정제된 EODA는 chloroform과 methanol의 혼합용매(2:1 v/v)에 녹여 -20 °C에서 보관하였다.

EODA 생성물 분석

DOD 열처리 후 생성물의 분석은 TLC와 가스 크로마토그래피(gas chromatography, GC)를 이용하여 분석하였다. TLC 분석을 위해 toluene:dioxane:acetic acid (79:14:7 v/v/v) 혼합 용액을 전개용매로 사용하였다. 시료를 TLC 플레이트에 전개시킨 후 50% 황산을 도포하여 95 °C 오븐에서 10분 가열한 뒤 spot을 확인하였다. EODA 생성 및 함량은 GC 분석을 통해 확인하였다. GC 분석을 위해 먼저 시료 10 mg을 diazomethane을 이용하여 methylation 시켰다. Methylation 된 시료에 TMSI:pyridine 혼합용액 (1:4 v/v) 500 μ L를 가하고 실온에서 50분 정치하여 TMSI-유도체를 제조한 뒤 최종 분석시료로 사용하였다. GC 분석은 SPB-1 capillary column (15 m \times 0.32 mm i.d., 0.25 mm thickness, Supelco Inc.)과 불꽃 이온화 검출기(Flame Ionization Detector, FID)가 연결된 ACME 6100 (Young Lin Instrument Co., Seoul, Korea) GC를 이용하였다. GC 운영조건은 오븐 온도 100 °C에서 200 °C까지는 분당 10 °C씩 증가, 200 °C에서 210 °C까지는 분당 0.5 °C씩 증가, 210 °C에서 300 °C까지 분당 10 °C씩 증가 후 300 °C에서 10분간 정치 후 분석 완료하도록 설정하였다. 시료 주입구의 온도는 230 °C, 검출기 온도는 250 °C, 이동상 기체로는 질소를 사용하였다.

항균활성 분석

연구에 사용된 시료들의 항균활성은 디스크 확산법과 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 결정 그리고 Checker board 법을 이용하여 확인하였다. 실험에 필요한 시료들은 필요에 따라 DMSO와 증류수에 녹여 사용하였다. EODA 생산 조추출물과 정제된 EODA는 DMSO를 용매로 이용하였고

대조군 항생제 vancomycin, oxacillin, penicillin은 증류수를 이용하였다. 음성대조군은 DMSO를 사용하였다. 디스크 확산법은 하룻밤 동안 배양한 세균 배양액(500 µL)을 고체배지 위에 고르게 펴 분주한 뒤 6 mm 지름의 페이퍼 디스크(Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 고체배지 위에 놓고 그 위에 준비된 시료(20 µL)를 가하여 스며들게 하였다. 사용된 균주의 적정 배양온도에 따라 정치배양기에서 48시간 동안 배양한 뒤 나타난 투명환의 크기를 측정하였다.

시료의 MIC 값은 CLSI 가이드라인에 따라 결정하였다[17]. 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 광학 밀도를 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[18]. 96-well 플레이트의 열과 행에 EODA 조추출물 시료와 항생제 시료를 Mueller-hinton 배지를 이용하여 1/2 배율로 연속 희석하여 EODA 조추출물과 항생제의 조합을 얻는다. 각 조합에 세균 배양액(1-2×10⁵ CFU/mL)을 가한 뒤 37 °C에서 12시간 동안 정치 배양하였다. 배양 완료 후 세포 현탁액의 광학 밀도를 610 nm에서 측정하였다. 얻어진 광학 밀도 값을 이용하여 Fractional inhibitory concentration index (FICI) 값을 결정하였다. 최종 FICI 값은 $FICI = FIC_A + FIC_B$ 계산식을 이용하여 결정하였다. 여기에서 FIC_A는 단독 처리된 시료 A의 MIC에 대한 조합 처리된 시료 A의 MIC 비율이고, FIC_B는 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

EODA 생산 및 정제

DOD로부터 EODA를 생산하기 위하여 DOD를 95 °C에서 72시간 동안 반응시켜 생성물을 얻었다. 얻어진 조추출물을 TLC로 분석한 결과 Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 상단에 DOD 이외의 새로운 spot이 생성되었음을 확인하였다. 조추출물로부터 정제하여 얻어진 EODA와 비교하여 보았을 때 상부의 spot이 EODA임을 확인하였다. 이는 선행 연구에서 보고한 결과와 일치하였으므로 본 연구에서 얻어진 DOD의 열처리반응 생성물 내에 EODA가 포함되어 있음을 확인하였다[7]. EODA 조추출물과 정제 후 EODA를 가스 크로마토그래피로 분석한 결과 9.6 분대에서 큰 피크가 확인되었는데 이는 이미 선행연구에서 확인된 EODA의 피크와 일치하였다(Fig. 2A). 피크의 면적 비율을 통해 얻어진 EODA의 함량은 27%로 확인되었고 DOD는 36%의 비율로 구성되어 있는 것을 확인하였다. 정제된 EODA의 경우 EODA 함량이 80%에 해당하는 것으로 확인되었다

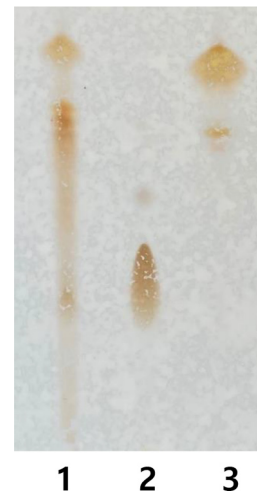


Fig. 1 Thin Layer Chromatography analysis of products obtained from heat treatment of DOD. Lane 1; crude extract, lane 2; standard DOD, lane 3; purified EODA

(Fig. 2B). 이후 진행되는 연구에서는 생산된 EODA 조추출물과 부분 정제된 EODA를 시료로 사용하였다.

EODA 조추출물과 정제 EODA의 항균활성 비교

항균활성소재로서 EODA 조추출물의 활용 가능성을 확인하기 위해 먼저 EODA 조추출물의 항균활성과 정제된 EODA의 항균활성을 디스크 확산법을 통해 비교하였다(Fig. 3) 사용된 대상 균주는 MRSA 02ST001과 *S. aureus* ATCC 6538을 사용하였고 대조군으로 항생제 내성여부를 판단하기 위해 oxacillin을 사용하였다. 두 균주 모두에 대해 항균활성을 나타내는 양성대조군으로 vancomycin을 사용하였다. 음성대조군으로는 DMSO를 사용하였다. 처리된 EODA 조추출물 중에 포함된 EODA와 DOD의 양에 해당하는 동일한 양의 EODA와 DOD를 동일 plate에서 처리하여 비교한 결과 Fig 3A에서 보여주는 것처럼 EODA 조추출물과 정제 EODA의 투명환의 크기가 MRSA 02ST001에 대해 거의 동일한 크기를 보여주고 있음을 알 수 있다. DOD의 경우에도 투명환을 나타냈으나 EODA에 비해 기여하는 바가 매우 작음을 알 수 있다. 이를 통해 EODA 조추출물 상태로도 MRSA 02ST001에 대해 EODA가 나타내는 항균활성을 충분히 발휘하고 있음을 알 수 있다. 항생제의 경우 oxacillin은 투명환을 나타내지 않아 사용된 대상 균주 MRSA 02ST001가 β-lactam계 항생제에 대해 내성을 가지고 있음을 확인하여 주었다. 한편 β-lactam계 항생제에 대해 내성을 가지고 있지 않은 *S. aureus* ATCC 6538을 대상으로 동일한 실험을 실시한 결과 그림 Fig 3B에서 보여주는 것과 같이 MRSA 02ST001의 경우와 마찬가지로 EODA 조추출물과 정제 EODA의 투명환의 크기가 *S. aureus* ATCC 6538에 대해 거의 동일한 크기를 나타냈다. DOD의 경우에도 투명환을 나타냈으나 EODA에 비해 기여하는 바가 매우 작음을 알 수 있다. 그런데 사용한 각 균주에 대한 EODA 조추출물과 정제 EODA의 항균활성을 비교하여 보았을 때 동일한 농도에서도 EODA 조추출물과 정제 EODA 모두 *S. aureus* ATCC 6538보다

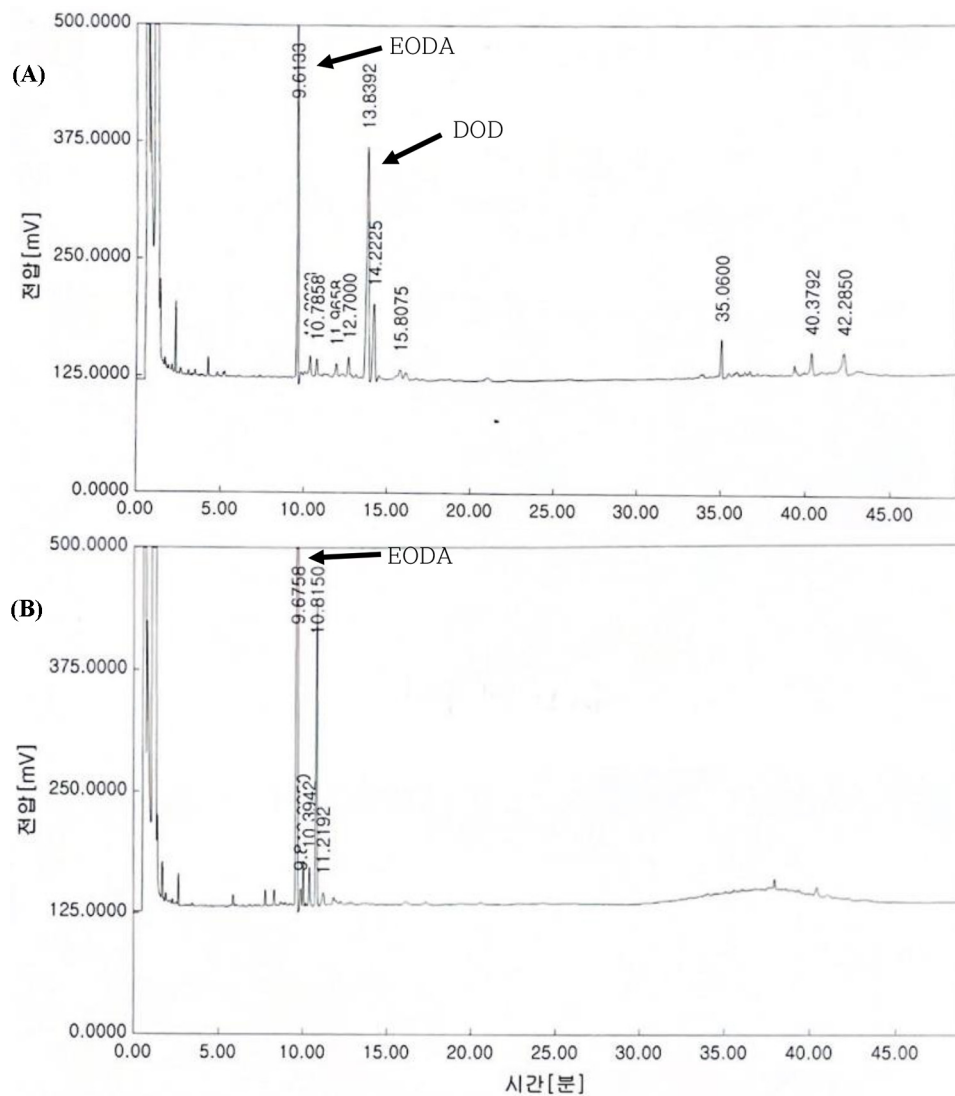


Fig. 2 Gas chromatography analysis of the EODA crude extract (A) and partially purified EODA (B)

MRSA 02ST001에 대해 더 큰 투명환을 나타내고 있음을 확인하였다. 이는 EODA가 일반 포도상구균보다 항생제 내성 포도상구균에 대해 더 높은 항균활성을 나타내고 있다는 것을 보여주고 있다.

S. aureus ATCC 6538와 MRSA 02ST001에 대한 EODA 조추출물의 항균활성 차이를 좀 더 명확하게 비교하기 위해 동일한 plate 상에서 항균활성 비교 실험을 실시하였다. Fig. 4에서 보여주는 바와 같이 plate의 반을 경계로 나누고 왼쪽에는 *S. aureus* ATCC 6538 오른쪽에는 MRSA 02ST001을 배양시킨 후 경계선 상에 oxacillin, vancomycin, EODA 조추출물을 처리하여 나타나는 투명환의 크기를 살펴보았다. 그 결과 Fig. 3에서 보여준 것과 동일하게 EODA 조추출물의 투명환 크기가 *S. aureus* ATCC 6538에 비해 MRSA 02ST001에서 더 크게 나타났다. 이러한 연구결과를 통해 EODA의 경우 EODA 생산 후 정제 과정을 거치지 않고 조추출물의 상태로 사용하여도 *S. aureus* ATCC 6538와 MRSA 02ST001 모두에 대해 충분한

항균활성을 나타냄을 확인하였고, 특히 *S. aureus* ATCC 6538에 비해 MRSA 02ST001에 대해 더 강한 항균활성을 나타내고 있음을 확인하였다. 따라서 MRSA를 효과적으로 제어하기 위한 항생제 후보물질로서 EODA를 실용화하는 데 있어 경제성을 크게 높일 수 있을 것으로 판단되었다.

EODA 조추출물의 농도별 항균활성 확인

MRSA 02ST001에 대한 EODA 조추출물의 항균활성이 확인됨에 따라 처리 농도 변화에 따른 항균활성 변화를 확인하기 위해 동일한 plate 상에서 EODA 조추출물의 농도를 50-500 μg 까지 변화시키며 투명환의 크기 변화를 관찰하였다. Fig 5에서 보여주는 바와 같이 EODA 조추출물의 농도가 높아짐에 따라 투명환의 크기가 점차 비례적으로 커지고 있는 것을 확인할 수 있다. 이로써 MRSA 02ST001에 대한 EODA 조추출물의 항균활성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

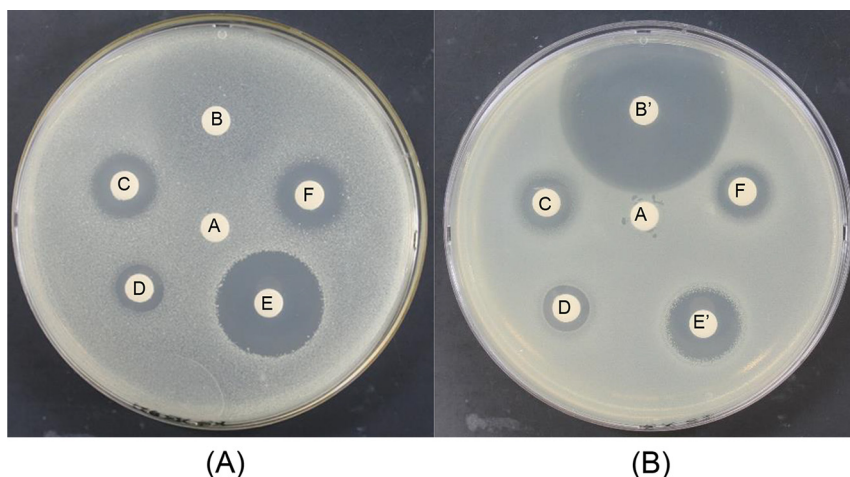


Fig. 3 Antibacterial activity of EODA crude extract and purified EODA against MRSA 02ST001 (a) and *S. aureus* ATCC 6538 (b). A; DMSO (20 μ L), B; oxacillin (10 μ g), B'; oxacillin (5 μ g), C; purified EODA (133 μ g), D; DOD (135 μ g), E; vancomycin (10 μ g), E'; vancomycin (5 μ g), F; EODA crude extract (370 μ g)

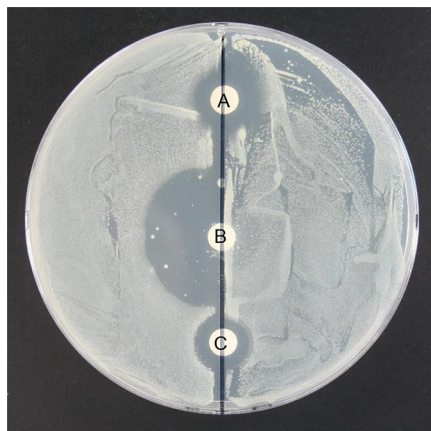


Fig. 4 Comparison of antibacterial activity of EODA crude extract against MRSA 02ST001 (right side) and *S. aureus* ATCC 6538 (left side). A; EODA crude extract (370 μ g), B; oxacillin (1 μ g), C; vancomycin (1 μ g)

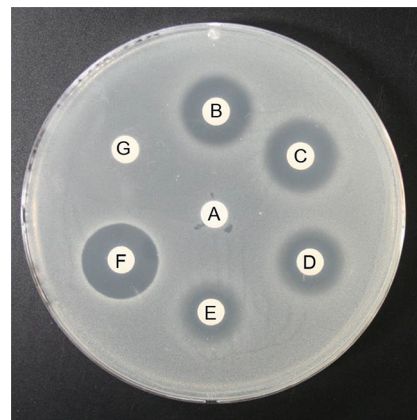


Fig. 5 Dose-dependent antibacterial activity of EODA crude extract against MRSA 02ST001. A; DMSO (20 μ L), B; EODA crude extract (500 μ g), C; EODA crude extract (200 μ g), D; EODA crude extract (100 μ g), E; EODA crude extract (50 μ g), F; vancomycin (5 μ g), G; oxacillin (10 μ g)

EODA 조추출물과 β -lactam계 항생제의 공동처리 효과

보고에 의하면 EODA가 β -lactam계 일반 항생제들과 공동으로 사용되었을 때 항균활성을 크게 증가시킨다는 것이 확인되었으므로[15], EODA 조추출물의 경우에도 동일한 기능을 유지하고 있는지 확인하기 위해 EODA 조추출물과 β -lactam계 항생제를 MRSA 02ST001에 공동 처리하고 나타나는 항균활성의 변화를 확인하였다(Fig. 6). 양성대조군으로는 vancomycin을 사용하였다. 시료 중 EODA 실 함유량이 10-50 μ g이 되도록 조정된 EODA 조추출물을 penicillin 10 μ g 및 oxacillin 10 μ g과 함께 처리하고 투명환의 크기변화를 관찰한 결과, 항생제와 EODA 조추출물을 각각 단독으로 처리하였을 때보다 공동 처리하였을 때 투명환의 크기가 누적된 크기에 비해 더 증가하거나 불분명했던 투명환의 바깥쪽 경계가 분명해지는 것을 확인하였다. 그리고 이러한 효과는 처리 농도가 높을수록 더욱 분명하게 나타났다. 특히 이러한 항균활성 증가효과는 oxacillin의 경우보다

penicillin의 경우 더 분명하게 나타나고 있음을 알 수 있다.

이러한 결과는 선행 연구에서 EODA와 penicillin의 공동처리 실험 결과와 같은 추세를 보여주고 있다[15]. 따라서 EODA 조추출물의 경우에도 정제된 EODA와 마찬가지로 β -lactam계 항생제와 같이 사용될 경우 MRSA를 효과적으로 제어할 수 있는 항생제 보조제로 사용될 가능성이 있음을 확인하였다.

EODA 조추출물과 항생제 공동처리에 따른 시너지 효과 확인

EODA 조추출물과 penicillin 공동처리에 따른 항균활성 증진 효과를 보다 정량적으로 확인하기 위해 Checker board 법을 이용하여 FICI 값을 측정하고 비교하였다. 앞의 연구결과에서 항균활성 증진 효과가 크게 나타난 penicillin을 이용하여 EODA 조추출물과 함께 MRSA 02ST001에 처리한 Checker board 분석 결과가 Fig. 7에 나타나 있다. 그림에 나타난 EODA의 농도는

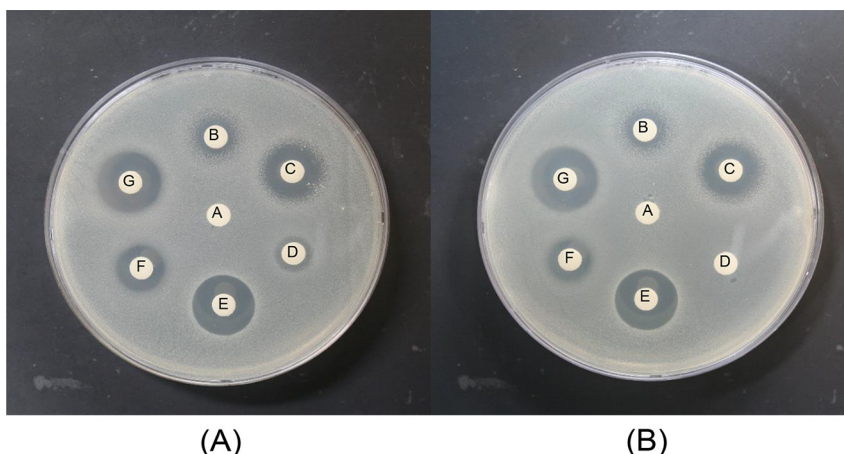


Fig. 6 Antibacterial activity of EODA crude extract in combination with penicillin (a) and oxacillin (b). A; DMSO (20 μ L), B; EODA crude extract (37 μ g), C; EODA crude extract (185 μ g), D; antibiotics (10 μ g), E; vancomycin (5 μ g), F; antibiotics (10 μ g) + EODA crude extract (37 μ g), G; antibiotics (10 μ g) + EODA crude extract (185 μ g)

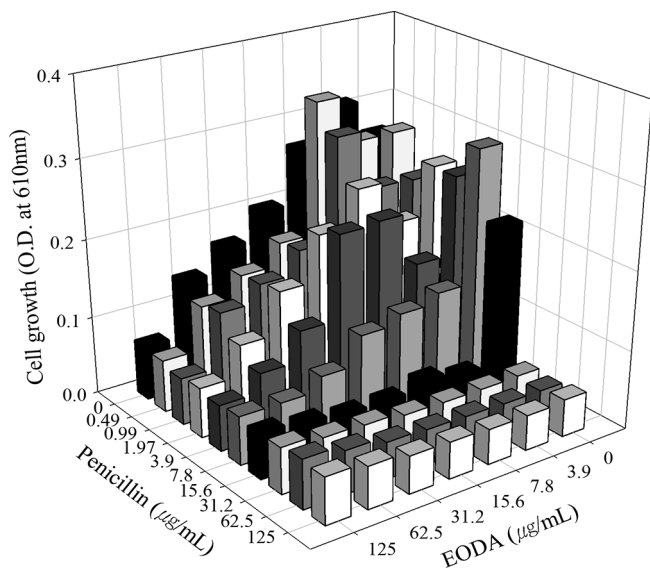


Fig. 7 Checker board analysis of co-treatment of EODA crude extract and penicillin

EODA 조추출물에 포함된 EODA의 실 농도를 나타낸다. 결과에 따르면 EODA의 경우 MIC 값이 125 μ g/mL로 나타났고 penicillin의 경우 MIC 값이 31.2 μ g/mL임을 알 수 있다. EODA 조추출물과 penicillin의 MIC 값과 각 농도별 조합에 따른 균 성장 정도를 이용하여 FICI 값을 계산하고 그 결과를 다른 β -lactam계 항생제들과 함께 Table 1에 나타냈다. FICI 값은

EODA 조추출물과 penicillin을 이미 확인된 각 시료의 MIC 값의 1/2, 1/4에 해당하는 농도의 두 시료를 조합한 경우에 대해 계산식을 이용하여 값을 구하여 나타냈다. Penicillin 외에 다른 β -lactam계 항생제 두 종에 대해서도 동일한 방법으로 FICI 값을 구하여 시너지효과를 확인하였다. 결과에서 보여주는 것과 같이 penicillin의 경우 MIC의 1/4 농도로 EODA 조추출물과 함께 처리하였을 경우 FICI 값이 1.0으로 나타났으며 이는 시너지 효과가 없다는 것을 보여준다. 반면에 MIC의 1/2 농도로 사용하였을 경우 FICI 값이 0.28로 확인되어 두 시료의 조합이 시너지 효과를 나타내고 있음을 보여주고 있다. β -lactam계 항생제인 Ampicillin의 경우 MIC 값은 62.5 μ g/mL로 나타났으며 MIC의 1/4 농도로 EODA 조추출물과 함께 처리하였을 경우 FICI 값이 0.37을 보임으로서 시너지 효과가 있음을 보여주고 있다. MIC의 1/2 농도로 사용하였을 경우 FICI 값이 0.16으로 확인되어 시너지 효과가 농도의존적으로 크게 증가함을 보여주고 있다. 이러한 결과는 EODA 조추출물의 항균활성 증진효과가 Penicillin에 비해 Ampicillin과 함께 사용될 경우 더 크게 발휘될 수 있음을 말해주고 있다. 정제된 EODA를 사용한 결과와 비교해 볼 때 사용된 MRSA 균주의 번호는 다르지만 시너지 효과 정도는 비슷한 경향을 나타냈다[15]. 또 다른 β -lactam계 항생제 Cephalexin의 경우 MIC 값은 250 μ g/mL로 나타났으며 MIC의 1/4 농도로 EODA 조추출물과 함께 처리하였을 경우 FICI 값이 0.5를 보임으로서 시너지 효과가 있음을 보여주고 있다. MIC의 1/2 농도로 사용하였을 경우 FICI 값이 0.28로 확인되어 시너지 효과가 농도의존적으로 크게 증가함을 보여주고 있다. 이러한 결과는 Ampicillin의 경우와 매우 비슷한 값을 보여주고 있는데 이로서 Cephalexin 또한 EODA 조추

Table 1 Synergistic effect of EODA crude extract for β -lactam family antibiotics against MRSA 02ST001

Penicillin			Ampicillin			Cephalexin		
MIC	FICI-A ^a	FICI-B ^b	MIC	FICI-A	FICI-B	MIC	FICI-A	FICI-B
31.2	1	0.28	62.5	0.37	0.16	250	0.5	0.28

^aCombination of 1/4 MIC antibiotics and 1/4 MIC EODA crude extract

^bCombination of 1/2 MIC antibiotics and 1/2 MIC EODA crude extract

출물과 함께 사용될 때 항균활성 시너지 효과가 Penicillin에 비해 더 크게 발휘될 수 있음을 말해주고 있다. 반면 β -lactam계 항생제가 아닌 다른 항생제들에 대해서도 EODA 조추출물의 항균활성 시너지 효과를 별도로 확인해 본 결과 본 논문에 결과값이 제시되지는 않았지만 특별한 효과를 나타내지 않음을 확인하였다.

이러한 결과들로 미루어 볼 때 EODA 생산 후 정제과정을 거치지 않은 조추출물의 상태에서도 MRSA를 대상으로 한 항균활성과 항균활성 시너지 효과를 충분히 발휘하고 있음을 확인하였다. 따라서 EODA 생산 조추출물이 MRSA를 대상으로 한 항균활성소재로서 뿐 아니라 β -lactam계 항생제의 활성보조제로서 개발될 충분한 가능성을 유지하고 있음을 확인하였다. 또한 활성보조제로서의 역할은 실험에 사용된 β -lactam계 항생제들 중 Penicillin에 비해 Ampicillin이나 Cephalexin과 함께 사용될 때 효과가 더 크게 나타난다는 사실도 확인하였다.

초 록

메티실린 저항성 황색포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)을 제어하기 위한 효과적이고 대안적인 전략이 계속해서 요구되고 있다. 이전 연구에서는 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid로부터 1단계 열처리를 통해 7,10-epoxy-octadeca-7,9-dienoic acid (EODA)이 생성되었음을 제시하였다. 추가적인 연구에서는 EODA가 MRSA를 포함한 광범위한 병원성 박테리아에 대해 높은 활성을 보인다는 것을 확인시켜 MRSA를 제어할 수 있는 새로운 항균제의 개발 가능성을 보여 주었다. 그러나 EODA를 산업적으로 사용하기 위해서는 극복해야 할 중요한 문제점이 있는데 그 중에서도 순수한 활성성분을 얻기 위한 정제에 많은 비용과 시간이 소요된다는 것이다. 이러한 문제를 해결하기 위해 본 연구는 열처리에 의한 EODA 생산 반응 후 얻어진 반응물을 추가적인 정제 과정 없이 조추출물의 상태로 사용할 때 항균 활성에 어떠한 변화가 나타나는지 확인하는 데 초점을 맞추었다. 얻어진 결과로부터 조추출물의 상태로 사용하더라도 EODA 자체가 나타내는 항균 활성에 유의한 변화가 감지되지 않았으며 상업용 항생제와 병용처리 시 나타나는 추가적인 시너지 효과 또한 그대로 유지됨을 확인하였다.

Keywords 메티실린-저항성 황색포도상구균 · 조추출물 · 푸란지방산 · 7,10-epoxy-octadeca-7,9-dienoic acid

감사의 글 이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2021R1F1A1047177).

References

1. Bagby MO, Calson KD (1989) Fats for the future. Ellis Horwood Limited and Press, Chichester
2. Suh MJ, Baek KY, Kim BS, Hou CT, Kim HR (2011) Production of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from olive oil by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1721–1727. doi: 10.1007/s00253-010-3040-2
3. Bajpai VK, Shin SY, Kim MJ, Kim HR, Kang SC (2004) Anti-fungal activity of bioconverted oil extract of linoleic acid and fractionated dilutions against phytopathogens *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea*. *J Appl Biol Chem* 47: 199–204
4. Hou CT, Forman RJ (2000) Growth inhibition of plant pathogenic fungi by hydroxy fatty acids. *Ind Microbiol Biotechnol* 24: 275–276. doi: 10.1038/sj.jim.2900816
5. Kato T, Tamaguchi Y, Abe N, Uyehara T, Nakai T, Yamanaka S, Harada N (1984) Unsaturated hydroxy fatty acids, the self defensive substances in rice plant against rice blast disease. *Chem Lett* 25: 409–412
6. Shin SY, Kim HR, Kang SC (2004) Antibacterial activity of various hydroxy fatty acids bioconverted by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *J Appl Biol Chem* 47: 205–208
7. Ellamar JB, Song KS, Kim HR (2011) One-step production of a biologically active novel furan fatty acid from 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid. *J Agric Food Chem* 59: 8175–8179. doi: 10.1021/jf2015683
8. Ellamar JB, Kim IH, Hou CT, Kim HR (2020) Optimal production of 7,10-epoxy-octadeca-7,9-dienoic acid from 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid by heat treatment. *Biocatal Agric Biotechnol* 24: 101545. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101545
9. Dasagrandhi C, Ellamar JB, Kim YS, Kim HR (2016) Antimicrobial activity of a novel furan fatty acid, 7,10-epoxyoctadeca-7,9-dienoic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Food Sci Biotechnol* 25: 1671–1675. doi: 10.1007/s10068-016-0257-6
10. Gould IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Lina G, Mazzei T, Peters G (2012) New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 39: 96–104. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.028
11. David MZ, Daum RS (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 23: 616–687. doi: 10.1128/CMR.00081-09
12. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E (2006) Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368: 874–885. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68853-3
13. Brown D (2015) Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void?. *Nat Rev Drug Discov* 14: 821–832. doi: 10.1038/nrd4675
14. Friedman M (2015) Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. *J Agric Food Chem* 63: 3805–3822. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00778
15. Dasagrandhi C, Kim YS, Kim IH, Hou CT, Kim HR (2017) 7,10-Epoxyoctadeca-7,9-dienoic acid: A small molecule adjuvant that potentiates β -lactam antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian J Microbiol* 57: 461–469. doi: 10.1007/s12088-017-0680-2
16. Chang AI, Kim IH, Kang SC, Hou CT, Kim HR (2007) Production of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from triolein via lipase induction by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 301–306. doi: 10.1007/s00253-006-0662-5
17. Murra PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, Morgan DR (1995) Manual of Clinical Microbiology (6th edn). *Trends Microbiol* 3: 449–449
18. Soprala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T, Balada-Llasat J, Pancholi P (2010) Synergy testing by E-test, microdilution checker board, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemo* 54: 4678–4683. doi: 10.1128/AAC.00497-10