

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Inhibiting the Proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*

Mi-Sun Kang, Hyun-Ju Oh, Hyun-Chul Lee and Jong-Suk Oh*

Department of Microbiology, School of Medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Propionibacterium acnes is the most common causative agent of acne. *Staphylococcus epidermidis* is another major bacterial strain to be found in acne lesions. Two strains of lactic acid bacteria (LAB) were isolated from normal inhabitants of humans, which inhibited the proliferation of *P. acnes* and *S. epidermidis*. The growth of *P. acnes* and *S. epidermidis* was decreased by 4-log scales after incubation for 24 h with LAB isolates, whereas the growth rate of selected LAB isolates were not affected by these pathogenic bacteria. This antibacterial activity of LAB isolates was related to lactic acids, hydrogen peroxide and bacteriocin-like compound production. Two LAB isolates efficiently adhered to human keratinocytes HaCaT and were identified by API 50 CHL medium kit and 16S rDNA partial sequencing analysis. The similarity of 16S rDNA sequences between one isolate and *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* was 100%, which suggests that they were *L. salivarius* subsp. *salicinius*. On the other hand, 16S rDNA sequence similarity between the other isolate and *Lactobacillus fermentum* was 99.04%, which indicates that it was *L. fermentum*. In conclusion, these results demonstrate that the two LAB strains isolated from human body were identified as *L. salivarius* subsp. *salicinius* and *L. fermentum*, which inhibit the proliferation of *P. acnes* and *S. epidermidis*.

Key Words: Isolation, Identification, *Lactobacillus*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*

서 론

여드름은 모낭-피지선에서 발생하는 피부질환이다. 여드름은 피지선에서 피지 분비가 증가하거나 피지선의 모공이 좁아지든지 막혀서 피지가 배출되지 못함에 따라 세균이 증식하여 염증이 생기는 것이다. 여드름은 주로 사춘기 나이의 사람에게서 많이 발생하는데 이는 사춘기 나이에 분비되기 시작하는 안드로젠이라는 남성호르몬 때문이다. 안드로젠은 피지 분비를 촉진시키고, 표피의 과각화를 일으킨다. 피지의 분비 증가와 표피 과각화로 모낭-피지선에서 피지가 정체되어 모낭이 막힘에 따라 모낭내부가 *Propionibacterium acnes*를 비롯한 혐

기성 세균이 잘 자랄 수 있는 환경이 된다 (1, 2). 동시에 *Staphylococcus epidermidis*와 같은 다른 세균들이 모낭주위에서 여드름과 여드름 합병증을 일으키는데 역할을 한다 (3). 여드름 발생의 병리 조직학적인 기전은 *P. acnes*의 효소, 사이토카인 및 보체와 중성구, 손상된 각질형성 세포에서 분비된 cytokine 등이 염증을 일으키는데 관여하는 것으로 알려져 있으나 (4), 아직 정확한 기전에 대해서는 알려진 바 없다.

*P. acnes*와 *S. epidermidis* 등의 균들이 염증 반응을 유발하는데 주된 역할을 하게 되므로 염증성 여드름의 치료에 항생제가 사용되고 있다 (5). Triclosan, benzoyl peroxide, azelaic acid (6), retinoid, tetracycline, erythromycin, macrolide, clindamycin 등의 항생제가 사용되고 있으나, 부작용이 알려져 있다. Benzoyl peroxide와 retinoid는 피부건조증이나 과민증을 유발하고 (7), tetracycline, erythromycin, macrolide, clindamycin은 항생제에 대한 내성 발생으로 인하여 지속적인 사용이 어렵고 간독성이 심하며, 칸디다증과 같은 기회감염증이 나타날 수 있다 (8, 9). 또한, triclosan의 경

Received: February 13, 2009/ Revised: March 6, 2009

Accepted: March 11, 2009

*Corresponding author: Jong-Suk Oh, M.D., Ph.D. Department of Microbiology, School of Medicine, Chonnam National University, 5 Hak-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-746, Republic of Korea.
Phone: +82-62-220-4134, Fax: +82-62-228-7294,
e-mail: joh@chonnam.ac.kr

우 빛에 노출되었을 때 환경호르몬으로 바뀌어 심각한 환경오염을 일으킬 수 있다. 따라서, 많은 연구자들이 항균효과가 있으면서 부작용이 없는 여드름 치료제를 개발하려고 노력 중이다 (10, 11).

유산균은 탄수화물을 발효하여 최종 대사산물로 유산을 생산하는 세균을 말한다. 유산균은 인간과 동물의 장 및 질에 존재하며 (12, 13), 통상적으로 김치 또는 요구르트 등 발효식품의 제조과정에 활용되고 있다. 식품에 활용되는 유산균으로는 *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* 등이 있다 (14, 15). 이와 같이 이로운 방향으로 작용하는 정상 세균 중 유산막대균인 *Lactobacillus*는 대표적인 유산균으로 유해균 발육을 억제하는 효과가 강하여 발효식품과 유산균 제제, 의약품 등으로 사용되고 있으며, 병원성 세균을 억제하는 *Lactobacillus*의 분리 및 동정이 연구되고 있다 (16~19).

본 연구의 목적은 세균을 이용한 여드름 치료제를 연구하기 위한 첫 과정으로, *P. acnes*와 *S. epidermidis*의 증식을 억제하며 각질세포에 대한 부착능이 있는 유산균을 선발하여 생화학적 성질 및 16S rDNA partial sequencing analysis에 의한 동정을 실시하고자 하였다.

재료 및 방법

공시세균 및 배양

공시세균으로는 *P. acnes* ATCC11828와 *S. epidermidis* ATCC 12228 (Rockville, MD, USA)를 이용하였다. *P. acnes*는 Actinomyces broth (BBL, Sparks, MD, USA)에 접종하여 37°C 혐기조건 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂)에서 1일간 배양하였으며, *S. epidermidis*는 Brain Heart Infusion broth (BHI, Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C 호기조건에서 16시간 배양하였다. 각각의 균은 실험에 이용하기 전에 본 배지에서 2회 계대배양한 후 실험에 이용하였다.

시료채취 및 유산균의 분리

인체 구강, 장, 질로부터 시료를 채취하여 0.9% NaCl로 계단 희석하여 유산막대균 분리용 배지인 Rogosa 우무배지 (Difco)에 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후 집락을 취하였다. 이것을 다시 De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) 우무배지 (Difco)에 접종, 배양하여 약 3000주의 유산균

을 분리하였다. Actinomyces 우무배지와 MRS 우무배지가 동량 섞어진 배지 표면 전체에 *P. acnes*를 도말 접종한 다음, 분리균주를 점점이 떨어뜨려 37°C 배양기에서 24시간 배양하여 투명환 (clear zone)을 나타내는 균주를 1차 선발하였다. 선발된 균주들은 다시 *P. acnes*와 *S. epidermidis*와의 상호작용을 통하여 최종적으로 유산막대균 2주를 선발하여 lactic acid bacteria (LAB) 1, LAB 2로 명명하였다. 분리균주 2주는 MRS 액체배지에 배양한 후 글리세롤의 최종농도가 20% (w/v) 되도록 첨가하여 -80°C에 냉동 보관하면서 필요에 따라 접종, 배양하여 실험에 사용하였다.

분리 유산균의 과산화수소 생성능 측정

분리균주의 과산화수소의 생성능력을 보기 위하여 0.25 mg/ml TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine, Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.01 mg/ml peroxidase (Sigma)가 첨가된 MRS 우무배지에 각 분리균주를 3 µl씩 접종하여 37°C에서 혐기배양한 후 꺼내어 호기상태에서 집락의 색깔을 관찰하여 집락의 색깔이 청색을 띠면 과산화수소 생성 양성 (positive)으로 판단하였고 색깔에 따라 감청색은 strongly positive, 청색은 positive, 약청색은 weakly positive, 색깔의 변화가 없으면 음성 (negative)으로 정하였다 (20).

분리 유산균의 *P. acnes*와 *S. epidermidis*에 대한 항균 작용

분리 유산균의 *P. acnes*에 대한 항균력을 알아보기 위하여 MRS broth와 Actinomyces broth가 동량 섞어진 배지에 접종량이 각각 1.0×10^6 CFU가 되도록 *P. acnes*와 분리 유산균을 단독 또는 병합으로 접종하였다. 37°C에서 8시간 및 24시간 혐기배양 후 배양액을 희석하여 MRS 우무배지와 Actinomyces 우무배지상에 접종하여 48시간 배양한 다음, 분리 유산균과 *P. acnes*의 생균수를 산정하였다. 또한, *S. epidermidis*에 대한 항균력을 알아보기 위하여 MRS broth와 BHI broth가 동량 섞어진 배지에 접종량이 각각 1.0×10^6 CFU가 되도록 *S. epidermidis*와 분리 유산균을 단독 또는 혼합으로 접종하였다. 37°C에서 8시간 및 24시간 호기배양 후 배양액을 희석하여 MRS 우무배지와 BHI 우무배지상에 접종하여 48시간 배양한 다음, 분리 유산균과 *S. epidermidis*의 생균수를 산정하였다.

분리 유산균 배양 상청액의 *P. acnes*와 *S. epidermidis*에 대한 항균작용

분리 유산균 배양 상청액의 분비물질 중에서 어떤 성분에 의한 항균효과인지를 알아보기 위하여 분리 유산균을 MRS broth에서 24시간 배양한 다음 원심분리 (4,000 rpm, 20 min, 4℃)한 것을 여과하여 균을 완전히 제거하였다. 유산에 의한 항균력인지 알아보기 위하여 상청액에 proteinase K (0.1 mg/ml)와 catalase (0.5 mg/ml)를 처리하였으며, 과산화수소에 의한 항균력인지 알아보기 위하여 상청액을 pH 6.3으로 중화시키고 proteinase K를 처리하였다. 또한, 상청액을 pH 6.3으로 중화시키고 catalase를 처리하여 박테리옌 유사물질 (bacteriocin-like compound)에 의한 항균력인지 알아보려고 하였다. *P. acnes*와 *S. epidermidis* 배양액을 각각 흡광도 600 nm에서 0.05가 되도록 희석하여 96 well plate에 100 µl 접종하고 배양 상청액을 100 µl 첨가하였으며, 대조군으로는 MRS broth를 100 µl 첨가하였다. 37℃에서 24시간 혐기 및 호기배양 후 microplate reader를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

분리 유산균의 human keratinocytes HaCaT에 대한 부착능

분리 유산균의 human keratinocytes에 대한 부착능을 알아보기 위해 실험에 이용한 세포주는 각질형성세포주인 HaCaT (epithelial cell line from adult human skin)으로서, 10% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin (10 U/ml)/streptomycin (10 µg/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GibcoBRL, Braunschweig, Germany) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 분리 유산균의 부착실험은 Scaletsky 등 (21)의 방법에 따라 수행하였다. 4-well Lab-Tek II chamber slide system (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA)에 well당 10⁵ 세포를 18시간 배양한 후, PBS로 세포를 2회 세척하고 multiplicity of infection (MOI)이 250이 되도록 분리 유산균 (10⁹ bacteria/ml)을 25 µl 가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였다. PBS로 세포를 3회 세척한 후 methanol로 고정하고 30분간 Giemsa 염색한 후, PBS로 다시 세척하여 공기 중에 건조시켜서 각각의 세포에 대한 부착력을 광학현미경 (BX51, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, 100개의 세포에 부착한 세균의 평균 개수를

Table 1. Hydrogen peroxide-producing LAB isolates from normal inhabitants of humans

Isolates	Source	H ₂ O ₂ -productivity
LAB 1	Saliva	Positive
LAB 2	Saliva	Strongly positive

측정하였다.

분리 유산균의 동정

분리 유산균의 1차 동정법으로는 API 50 CHL kit (BioMérieux, Marcy, l'Etoile, France)를 사용하여 동정 프로그램인 API LAB plus로 검사 결과를 분석하여 생리적 특성을 검토하였으며, 2차 동정법으로는 16S rDNA 염기서열을 분석하여 결정하였다. 16S rDNA 염기서열 분석을 하기 위하여 Rochelle 등 (22)의 방법으로 단일 콜로니에서 DNA를 분리하였으며, 27F (5'-AGAGTTTGATCMTG-GCTCAG-3')와 1522R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3') primer를 사용하여 16S rDNA를 PCR 증폭하였다 (23). PCR 산물은 Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 정제하였으며, 염기서열 분석은 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열 결과는 NCBI의 GenBank 프로그램을 사용하여 상동성을 조사하였다.

통계처리

통계적 처리는 SPSS 통계분석 프로그램 (SPSS version 12.0)을 사용하였으며, Mann-Whitney test로 분석하였다.

결 과

분리 유산균의 과산화수소 생성능력

혐기성 세균은 과산화수소에 예민하므로 분리 유산균의 과산화수소 생성능력을 측정한 결과, LAB 1과 LAB 2는 과산화수소를 생성하여 감청색의 집락을 형성하였다 (Table 1).

*P. acnes*에 대한 분리 유산균의 항균력

*P. acnes*에 대한 분리 유산균의 항균력을 보기 위하여

*P. acnes*와 분리 유산균의 혼합배양 후 생균수 검사 결과, 24시간 배양 후 두 분리 유산균 모두 *P. acnes* 생육을 유의하게 감소시켰다 ($p < 0.05$). 8시간 혼합배양 후 *P. acnes*에 대한 분리 유산균의 항균력은 거의 없었으나, 24시간 배양 후 단독배양한 *P. acnes* 생균수는 $3.6 \times 10^9 \pm 8.0 \times 10^8$ CFU/ml이었으며, LAB 1과 병합으로 배양시에는 *P. acnes* 생균수는 $4.0 \times 10^6 \pm 7.0 \times 10^4$ CFU/ml으로 감소하였다. 또한, LAB 2와 병합시 $2.0 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^3$ CFU/ml으로 크게 감소하였다. 따라서, 두 분리 유산균 중 *P. acnes*에 대한 항균력은 LAB 2가 더 좋았다. 반면, 두 분

리 유산균을 혼합배양하였을 때 생균수에 대한 변화가 거의 없었다 (Fig. 1).

*S. epidermidis*에 대한 분리 유산균의 항균력

*S. epidermidis*와 분리 유산균의 혼합배양 후 생균수 검사 결과, 두 분리 유산균 모두 8시간부터 *S. epidermidis* 생육을 유의하게 감소시키기 시작하였으며, 24시간 후에는 *S. epidermidis* 생육을 10^4 CFU/ml까지 감소시켰다 ($p < 0.05$). 24시간 배양 후 *S. epidermidis* 생균수는 1.7×10^8

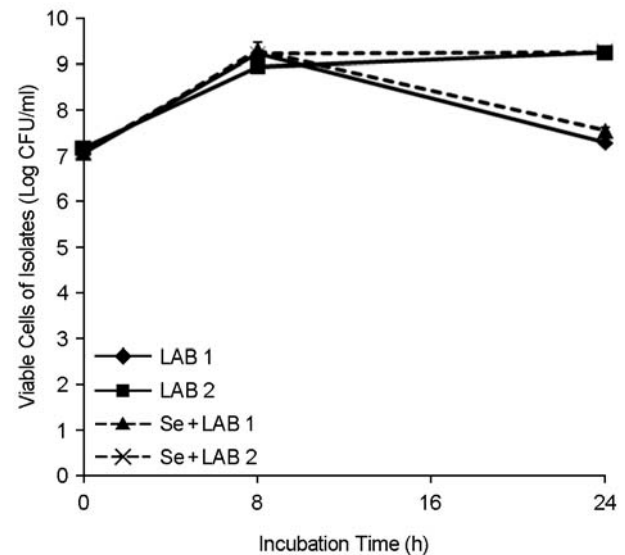
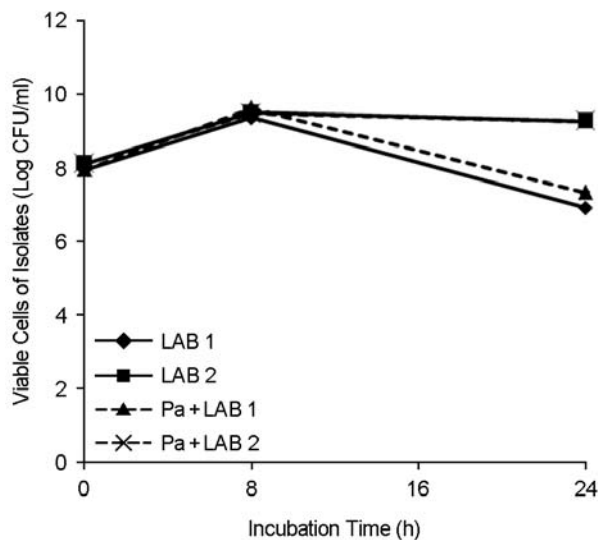
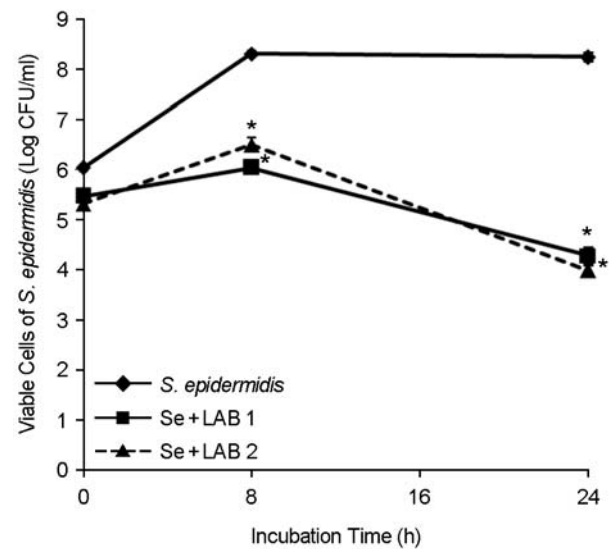
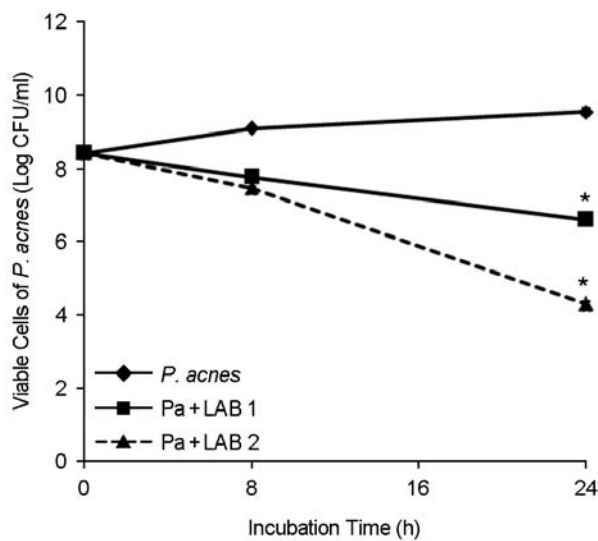


Figure 1. Viable cells of *P. acnes* and the LAB isolates in the mixed cultures over time. Pa, *P. acnes*. * $p < 0.05$ for coculture versus monoculture. Values are means \pm standard deviations of three independent experiments.

Figure 2. Viable cells of *S. epidermidis* and the LAB isolates in the mixed cultures over time. Se, *S. epidermidis*. * $p < 0.05$ for coculture versus monoculture. Values are means \pm standard deviations of three independent experiments.

Table 2. Antibacterial activity of lactic acid, hydrogen peroxide (H₂O₂) and bacteriocin-like compound (BLC) in cultured supernatants of two LAB isolates against *P. acnes* and *S. epidermidis*

Isolates	Inhibition (%) ^a by					
	Lactic acid ^a		H ₂ O ₂ ^b		BLC ^c	
	<i>P. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>
LAB 1	99.42±0.18	99.13±0.02	19.75±0.23	5.638±3.06	17.75±3.18	10.42±2.08
LAB 2	94.74±5.61	99.01±0.54	17.63±0.47	12.82±8.24	32.15±3.57	15.80±5.56

* Values are means ± standard deviations of three independent experiments.

^a Inhibition of growth by lactic acid was measured following treatment of the sterilized supernatants with proteinase K (0.1 mg/ml) and catalase (0.5 mg/ml).

^b H₂O₂-dependent activity was evaluated using the neutralized and proteinase K-treated supernatants.

^c Inhibition of growth by BLC-dependent activity was evaluated using catalase-treated and neutralized supernatants

± 3.0 × 10⁷ CFU/ml이었으며, LAB 1과 병합으로 배양시에는 *S. epidermidis* 생균수는 2.0 × 10⁴ ± 7.0 × 10³ CFU/ml로 감소하였고, LAB 2와의 병합시 1.0 × 10⁴ ± 2.0 × 10³ CFU/ml로 감소되었다. 따라서, 두 분리 유산균 중 *S. epidermidis*에 대한 항균력도 LAB 2가 더 좋았다. 반면, 두 분리 유산균 모두 혼합배양하였을 때 생균수에 대한 변화가 거의 없었다 (Fig. 2).

P. acnes 및 *S. epidermidis*에 대한 분리 유산균 배양 상청액의 항균력

P. acnes 및 *S. epidermidis*에 대한 분리 유산균 배양 상청액의 항균력을 조사한 결과, 분리 유산균 2주 모두 유산에 의하여 약 95% 이상 항균효과를 나타내었으며, 과산화수소 및 박테리옌 유사물질에 의해서도 *P. acnes*의 생육을 각각 18~19%와 18~32% 억제하였다 (Table 2).

Human keratinocytes HaCaT에 대한 유산균의 부착력

각질형성세포에 대한 분리 유산균의 부착능을 알아 본 결과, 분리 유산균 모두 각질형성세포주인 HaCaT 세포에 부착이 잘 되었으며, 1개의 HaCaT 세포당 부착된 LAB 1과 LAB 2 평균 개수는 각각 91.0 ± 9.65, 40.0 ± 2.0 개로서, LAB 1이 부착력이 더 우수하였다 (Fig. 3).

유산균의 동정

탄소원의 이용성 차이로 동정하는 생화학적 방법인 API 50 CHL kit로 1차 동정을 한 결과, LAB 1은 *L. salivarius* (가능성 99.9%), LAB 2는 *Lactobacillus cellobiosus* (가능성 92.9%), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (가능성 3.1%)로 동정되었다.

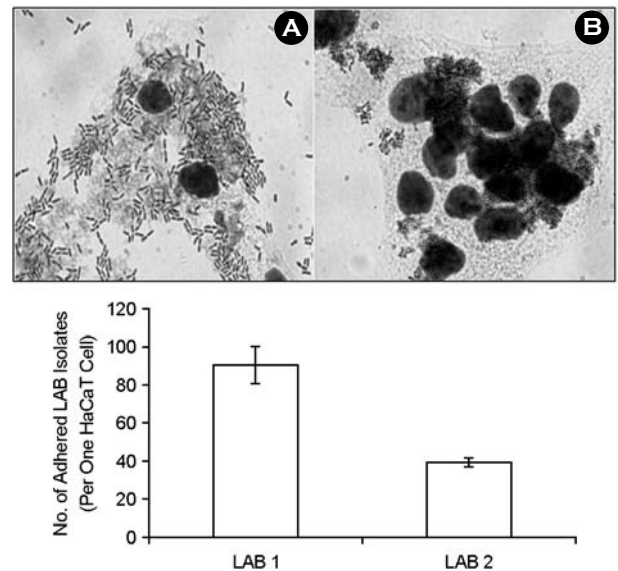


Figure 3. Microscopic observations and numbers of adhered of LAB isolates to HaCaT cells. **A**, LAB 1 vs. HaCaT cells; **B**, LAB 2 vs. HaCaT cells. Magnification, × 1000. Values are means ± standard deviations of three independent experiments.

한편 LAB 1는 16S rDNA 991 bp를 직접 염기서열 분석하여 (Fig. 4), NCBI의 GenBank 프로그램을 사용하여 상동성을 조사하여 본 결과, 비교한 991개의 염기 중 *L. salivarius* subsp. *salicinius* JCM 1230 (accession no. AB289295)과 100% 상동성을 보여 *L. salivarius* subsp. *salicinius*로 동정되었다 (Table 3). LAB 2는 *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931 (accession no. AB017345)과 유사치가 99.04%로 가장 높아 *L. fermentum*으로 동정되었다 (Table 4).

```

1   TGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTACCGTAAG   50
51  AAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTAAAAGA   100
101 AGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATC   150
151 GCATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCC   200
201 GCGGCGTATTAAGTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATAC   250
251 GTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC   300
301 AAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGT   350
351 CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACT   400
401 CTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTCAATTCGATGACGG   450
451 TATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATA   500
501 CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGGAACGCAGG   550
551 CGGTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCA   600
601 TTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAATCCATGTG   650
651 TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGC   700
701 TCTCTGGTCTGTAAGTGACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAG   750
751 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTG   800
801 GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCT   850
851 GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGC   900
901 ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTAC   950
951 CAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTT   991

```

Figure 4. Nucleotide sequence of the partially amplified 16S rDNA gene from LAB 1 by PCR.

Table 3. 16S rDNA similarity of LAB 1 to other bacteria

Strains	Similarity (%)	Nucleotide differences
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>Salicinius</i> JCM 1230	100.00	0/991
<i>L. salivarius</i> T	99.90	1/985
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>Salivarius</i> ATCC 11741	99.80	2/990
<i>L. aviarius</i> T	94.95	49/970
<i>L. agilis</i> T	92.27	75/970
<i>L. acidipiscis</i> FS60-1	91.68	82/985
<i>L. animalis</i> T	91.58	81/962

Table 4. 16S rDNA similarity of LAB 2 to other bacteria

Strains	Similarity (%)	Nucleotide differences
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	99.04	6/622
<i>L. thermotolerans</i> DSM 14792	93.45	41/626
<i>L. ingluviei</i> LMG 20380	93.45	41/626
<i>L. mucosae</i> DSM 13345	88.42	72/622
<i>L. vaginalis</i> NCTC 12197	87.90	68/562
<i>L. plantarum</i> JCM 1149	86.91	80/611
<i>L. panis</i> DSM 6035	86.85	81/616
<i>L. reuteri</i> DSM 20016	86.80	82/621
<i>L. pentosus</i> JCM 1588	86.76	81/612
<i>L. aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i> ATCC 43234	86.43	81/597
<i>L. oralis</i> DSM 4864	86.34	84/615

고 찰

여드름은 가장 흔한 피부질환 중 하나로, 모낭-피지선 단위의 자기 국한성 만성 염증성 질환으로 면포, 홍반성 구진, 농포 등을 형성하는 것을 특징으로 하며, 드물게 결절 혹은 가성낭종이 발생하고 활동성 병변의 후유증으로 소와성 혹은 비후성 반흔을 남기기도 한다. 여드름의 임상 양상은 비염증성인 면포와 염증성인 표재성 병변과 심재성 병변으로 나타나는데, 심재성 병변인 결절은 주로 남자에서 나타나며 결절사이에 진피를 통한 루 (sinus)

가 형성되어 농양 및 낭종으로 커지게 되고 치유된 후에는 흔히 영구적으로 위축성 혹은 켈로이드성 반흔을 남긴다. 여드름의 원인 세균 중에서 가장 대표적이라 할 수 있는 *P. acnes*는 통성 혐기성 그람 양성 간균으로 호지성인 특성이 있어서 피지 분비가 많은 부위인 얼굴, 목, 등, 가슴에 호발한다. *P. acnes*는 여드름 환자의 혈액 단핵구로부터 IL-8의 분비를 유도하거나 균으로부터 lipase가

분비되어 호중구가 피부 병변에 유입된다 (24, 25). 그리고 *P. acnes*와 분비되는 coproporphyrin III에 의해 각질형성세포가 자극되어 IL-1, TNF- α 와 GM-CSF와 같은 cytokine이 분비되어 여드름의 염증에 관여하는 것으로 알려져 있다 (26, 27).

여드름 치료에서 항생제는 효과적이지만, 항생제의 장기간 사용으로 여드름 발생에 관여하는 균주나 피부 상재균의 항생제 내성이 보고되고 있다 (8). 이런 항생제 내성 문제를 극복하기 위하여 대체 치료법으로 약용 식물들이 광범위하게 연구되어 왔다. 최근에는 전통 약초들을 이용한 스킨케어 화장품을 만들어 여드름 치료를 위한 새로운 기능 성분을 찾기 위한 노력이 계속되고 있다 (10, 28). 또한, 목련 줄기 껍질에서 분리된 마그놀롤 (magnolol)과 호노키올 (honokiol)은 피부질환 치료제로서 이용되어 오고 있는데, 항염증 및 항균효과가 있다고 보고되었다 (29, 30).

병원성 세균을 억제하는 유산균에 대한 연구는 많이 되어 왔으나, *P. acnes*에 대한 항균효과를 가진 유산균에 대한 연구는 미비한 편이다 (31). Smith 등 (32)은 거의 모든 유산막대균이 박테리옌을 생성하고, 여성의 질 내에 상재하는 유산막대균은 과산화수소를 분비하여 항균력을 가지고 있으며, 병원체와 결합력이 높은 것으로 보고하였다 (33). 혐기성 세균은 과산화수소에 매우 예민하므로 과산화수소에 의하여 억제된다 (34, 35). 이러한 항균물질을 생성하는 세균의 작용은 항생제의 부작용과는 달리 피부 환경의 균형을 파괴시키지 않으면서 효과를 지속적으로 발휘할 수 있어 피부건강의 유지에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 본 연구에서 분리한 유산막대균 중에서 *L. salivarius* subsp. *salicinius*로 동정된 LAB 1과 *L. fermentum*으로 동정된 LAB 2가 과산화수소를 생성하는 능력이 있었으며, LAB 2가 과산화수소를 더 많이 생성하였다. *P. acnes*를 단독으로 24시간 배양했을 때에 비해 분리 유산균과 병합시 생균수가 $10^3 \sim 10^5$ CFU/ml의 감소를 보였으며, LAB 2가 항균력이 더 우수하였다. 또한, *S. epidermidis*에 대해서도 분리 유산균과 병합시 약 10^4 CFU/ml의 감소를 보였으며, *P. acnes*에 대해서와 마찬가지로 LAB 2가 항균력이 더 좋았다. 그리고, 분리 유산균의 배양 상청액 또한 *P. acnes*와 *S. epidermidis*의 생육을 거의 억제하였으며, 대부분이 유산에 의해 항균작용을 보였으며, 과산화수소 및 박테리옌 유사물질에 의해서도 어느 정도 항균력을 나타내었다.

각질형성세포에 부착이 잘 일어나는 세균은 피부의 여드름 병변에 접종하였을 때, 피부에서 군락화가 되기 쉬워 세포에 부착이 잘 안되는 세균에 비하여 치료효과가 더 좋을 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구에서 각질형성세포주인 HaCaT 세포에 대한 분리 유산균의 부착 정도를 본 결과, 분리 유산균 모두 부착이 잘 일어났다.

종래 미생물을 동정하기 위하여 이용하던 배양이나 혈청학적 방법에 비교하여 미생물에 존재하는 고유한 유전자를 이용하여 동정하는 방법은 민감도와 정확성에 있어서 월등하기 때문에 최근에 세균으로부터 추출한 DNA에 rRNA 유전자 probe를 hybridization시킨 후, 제한효소로 처리한 결과로 세균을 분류하기 시작하였다 (36). 분리균주의 16S rDNA 염기서열을 비교하면 세균이 진화과정상 가까울수록 염기서열은 비슷하고 진화과정상 멀수록 염기서열의 유사성은 감소하게 된다. 본 연구에서도 분리 유산균 2주를 탄수화물 발효로 검사하는 API 50 CHL medium kit로 동정시험한 결과와 16S rDNA 유전자와 비교한 결과가 약간의 차이가 있었는데, 분리 유산균 1주는 *L. salivarius* subsp. *salicinius*의 유전자와 유사치가 100%를 보여 *L. salivarius* subsp. *salicinius*로 동정되었으나, 다른 한 주는 *L. fermentum*의 유전자와 유사치가 99.04%로서, API 50 CHL medium kit를 이용한 동정 결과인 *L. cellobiosus* (92.9%)와는 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 따라서 최종적인 세균의 동정은 유전자 분석에 의해 이루어져야 될 것으로 사료된다.

본 연구에서는 *L. salivarius* subsp. *salicinius*와 *L. fermentum*으로 동정된 분리 유산균들이 *P. acnes*와 *S. epidermidis*를 억제하는 효과가 있었고, 각질형성세포인 HaCaT 세포에 대한 부착력이 좋았으며, 과산화수소 생성 능력이 우수한 *L. fermentum*이 *P. acnes*와 *S. epidermidis*에 대해서도 가장 억제력이 우수하였다. 향후 이 연구의 결과가 사람의 여드름 병변에서도 임상적으로 검증된다면 분리 유산균의 여드름 예방과 치료를 위한 프로바이오틱으로 개발하여 건강의 증진에 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, *P. acnes*와 *S. epidermidis*에 대한 분리 유산균의 억제기전에 대한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Harper JC. An update on the pathogenesis and management of

- acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:S36-8.
- 2) Thiboutot DM. Acne. An overview of clinical research findings. *Dermatol Clin* 1997;15:97-109.
 - 3) Nishijima S, Kurokawa I, Katoh N, Watanabe K. The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. *J Dermatol* 2000;27:318-23.
 - 4) Jeremy AH, Holland DB, Roberts SG, Thomson KF, Cunliffe WJ. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J Invest Dermatol* 2003;121:20-7.
 - 5) Hughes BR, Murphy CE, Barnett J, Cunliffe WJ. Strategy of acne therapy with long-term antibiotics. *Br J Dermatol* 1989; 121:623-8.
 - 6) Breathnach AS, Nazzaro-Porro M, Passi S. Azelaic acid. *Br J Dermatol* 1984;111:115-20.
 - 7) Akhavan A, Bershad S. Topical acne drugs: review of clinical properties, systemic exposure, and safety. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:473-92.
 - 8) Eady EA, Cove JH, Holland KT, Cunliffe WJ. Erythromycin resistant propionibacteria in antibiotic treated acne patients: association with therapeutic failure. *Br J Dermatol* 1989;121: 51-7.
 - 9) Wawruch M, Bozekova L, Krcmery S, Kriska M. Risks of antibiotic treatment. *Bratisl Lek Listy* 2002;103:270-5.
 - 10) Nam C, Kim S, Sim Y, Chang I. Anti-acne effects of oriental herb extracts: a novel screening method to select anti-acne agents. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003;16:84-90.
 - 11) Tan HH. Antibacterial therapy for acne: a guide to selection and use of systemic agents. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:307-14.
 - 12) Ahm   S, Nobaek S, Jeppsson B, Adlerberth I, Wold AE, Molin G. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J Appl Microbiol* 1998;85:88-94.
 - 13) Redondo-López V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* 1990;12:856-72.
 - 14) Choi HJ, Cheigh CI, Kim SB, Lee JC, Lee DW, Choi SW, Park JM, Pyun YR. *Weissella kimchi* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52:507-11.
 - 15) Martini MC, Lerebours EC, Lin WJ, Harlander SK, Berrada NM, Antoine JM, Savaiano DA. Strains and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on *in vivo* lactose digestion. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1041-6.
 - 16) Elmer GW. Probiotics: "living drugs". *Am J Health Syst Pharm* 2001;58:1101-9.
 - 17) Gorbach SL. Lactic acid bacteria and human health. *Ann Med* 1990;22:37-41.
 - 18) Kaewsrirachan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;48:75-83.
 - 19) Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, Conte U, Matteuzzi D. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *J Appl Microbiol* 2002;93:884-93.
 - 20) Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, Holmes KK. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1989;27:251-6.
 - 21) Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 1984;45:534-6.
 - 22) Rochelle PA, Fry JC, Parkes RJ, Weightman AJ. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 79:59-65.
 - 23) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991;173:697-703.
 - 24) Chen Q, Koga T, Uchi H, Hara H, Terao H, Moroi Y, Urabe K, Furue M. *Propionibacterium acnes*-induced IL-8 production may be mediated by NF-kappaB activation in human monocytes. *J Dermatol Sci* 2002;29:97-103.
 - 25) Lee WL, Shalita AR, Suntharalingam K, Fikrig SM. Neutrophil chemotaxis by *Propionibacterium acnes* lipase and its inhibition. *Infect Immun* 1982;35:71-8.
 - 26) Graham GM, Farrar MD, Cruse-sawyer JE, Holland KT, Ingham E. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* GroEL. *Br J Dermatol* 2004;150:421-8.
 - 27) Schaller M, Loewenstein M, Borelli C, Jacob K, Vogeser M, Burgdorf WH, Plewig G. Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with *Propionibacterium acnes* and coproporphyrin III. *Br J Dermatol* 2005;153:66-71.
 - 28) Kim SS, Kim JY, Lee NH, Hyun CG. Antibacterial and anti-

- inflammatory effects of Jeju medicinal plants against acne-inducing bacteria. J Gen Appl Microbiol 2008;54:101-6.
- 29) Wang JP, Ho TF, Chang LC, Chen CC. Anti-inflammatory effect of magnolol, isolated from *Magnolia officinalis*, on A23187-induced pleurisy in mice. J Pharm Pharmacol 1995; 47:857-60.
- 30) Ho KY, Tsai CC, Chen CP, Huang JS, Lin CC. Antimicrobial activity of honokiol and magnolol isolated from *Magnolia officinalis*. Phytother Res 2001;15:139-41.
- 31) Arihara K, Ogihara S, Mukai T, Itoh M, Kondo Y. Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* T140 active against pathogenic bacteria. Lett Appl Microbiol 1996;22:420-4.
- 32) Smith SI, Aweh AJ, Coker AO, Savage KO, Abosede DA, Oyedele KS. Lactobacilli in human dental caries and saliva. Microbios 2001;105:77-85.
- 33) Ocaña VS, Pesce de Ruiz Holgado AA, Nader- Macías ME. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. Curr Microbiol 1999;38:279-84.
- 34) Leke N, Grenier D, Goldner M, Mayrand D. Effects of hydrogen peroxide on growth and selected properties of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 1999;174:347-53.
- 35) Ohwada T, Shirakawa Y, Kusumoto M, Masuda H, Sato T. Susceptibility to hydrogen peroxide and catalase activity of root nodule bacteria. Biosci Biotechnol Biochem 1999;63: 457-62.
- 36) Grimont F, Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann Inst Pasteur Microbiol 1986;137B:165-75.
-