

메티실린-내성 포도상구균에 대하여 EDTA 및 Sodium Azide 병용에 의한 우스닌산 약효증대

이영섭^{1#} · 김혜성^{2#} · 이재원¹ · 이대영¹ · 김금숙¹ · 김현욱³ · 노건민⁴ · 이승은¹ · 이순애² · 송옥희² · 권동렬^{2*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작이용팀, ²원광대학교 약학대학 한약학과,
³농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과, ⁴농촌진흥청 국립농업과학원 기능성식품과

Potentiating Activity of (+)-Usnic Acid on EDTA and Sodium Azide Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Young-Seob Lee^{1#}, Hye-Sung Kim^{2#}, Jae Won Lee¹, Dae-Young Lee¹, Geum-Soog Kim¹, Hyoun-Wook Kim³,
Geon-Min Noh⁴, Seung Eun Lee¹, Sun Ae Lee², Ok Hee Song² and Dong-Yeul Kwon^{2*}

¹Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea

²Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute,
Institute of Biotechnology, Wonkwang University, Iksan Jeonbuk, 54538 Korea

³Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science, RDA, Wanju 55365, Korea

⁴Department of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

Abstract – Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) is a multidrug-resistant(MDR) strain. (+)-Usnic acid(UA) is uniquely found in lichens, and is especially abundant in genera such as *Usnea* and *Cladonia*. UA has antimicrobial activity against human and plant pathogens. Therefore, UA may be a good antibacterial drug candidate for clinical development. In search of a natural products capable of inhibiting this multidrug-resistant bacteria, we have investigated the antimicrobial activity of UA against 17 different strains of the bacterium. In this study, the effects of a combination of UA and permeable agents against MRSA were investigated. For the measurement of cell wall permeability, UA with concentration of Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) was used. In the other hand, Sodium azide(NaN_3) was used as inhibitors of ATPase. Against the 17 strains, the minimum inhibitory concentrations(MICs) of UA were in the range of 7.81–31.25 $\mu\text{g/ml}$. EDTA or NaN_3 cooperation against MRSA showed synergistic activity on cell wall. UA and in combination with EDTA and NaN_3 could lead to the development of new combination antibiotics against MRSA infection.

Key words – Usnic acid, Anti-bacterial, Herbal medicine, MRSA

지의류(Lichens)는 세계적으로 22,000에서 23,000종이 분포하고 있는 진핵생물중 하나로 “곰팡이(fungi)와 광합성을 하며 공생관계를 유지하고 있는 연합 생명체이며, 지의체(Thallus)라는 특별한 구조를 가진 안정된 성장체를 형성하는 것”이라 정의된다.¹⁾ 지의류는 지구상 모든 기후대에서 자라며, 중약대사전 등의 한약서에는 장송라(長松蘿) 또는 진송라(眞松蘿, *Usnea Longissima* Ach.), 파화송라(破莖松蘿, *Usnea diffracta* Vaun.), 송석예(松石蕊, *Cladonia fallax*

Abbayes), 작아석예(雀兒石蕊, *Cladonia alpestris*(L.)Rabht.) 등이 있으며, 송석예 및 작아석예는 한약명으로 금쇄과(金刷把), 장송라 및 파화송라는 송라(松蘿)로 기록되어 있다.²⁾ 더욱이 장송라는 식물명으로 소나무겨우살이, 다른 한약명으로는 진송라(眞松蘿)로도 불리며 동의보감(東醫寶鑑)에 파결산(破結散) 및 해조산견환(海藻散堅丸) 등의 재료로 사용되었고, 파결산과 함께 수세보원(壽世保元)의 소영탕(消癭湯)은 영류(癭瘤)를 치료하는 처방으로 현대의학적으로는 갑상선 질환을 치료하는 처방으로 알려져 있다.³⁾ 이처럼 예로부터 약용, 식용, 장식용 재료로서 여러 문화권에서 널리 이용되고 있는 지의류는 대부분 자낭균류(ascmycetes)에 속하며, 곰팡이와 함께 광합성을 통하여 먹이를 생산할 수 있

[#]These two authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): sssimi@wku.ac.kr

(Tel): +82-63-850-6802

는 독립영양체인 단세포 조류(algae, photobionts)가 공생관계를 유지하고 있다.^{1,4,5)} 한반도에 분포하고 있는 지의류는 총 510종으로 지의류에서 생성되는 여러 대사산물 중 우스닌산(usnic acid; UA)과 같은 tannin 성분들은 항균, 항히스타민, 항바이러스 작용이 매우 우수한 천연물질로 이러한 화합물의 대부분은 지의류만이 가지고 있으며, *Thielavia microspora*와 *Cryptosporiopsis diversispora*와 같은 지의류 내생 곰팡이가 주로 합성하는 것으로 알려져 있다.^{4,6-8)} 최근 미국 농무부 농업연구소(ARS)에서는 UA가 carotenoid 합성을 억제함으로써 새로운 천연물기반 산업소재로서 가능성을 제시하였으며, 다양한 생리활성을 지니면서도 신규성과 희귀성이 높은 물질들을 탐색하기 위하여 미국, 일본 등 선진국을 중심으로 활발한 연구가 진행 중이다.^{1,5,9-12)} 따라서 본 연구에서는 UA의 난치성질환치료제로서의 가능성을 평가하고자 슈퍼박테리아로 불리는 다제약제내성균인 메티실린-내성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)에 membrane-permeabilizing agent 및 ATPase inhibitor를 처리하여 항균작용의 작용기전을 확인하였다.

MRSA는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*; *S. aureus*)의 감염에 대하여 methicillin 외에도 cephalosporin, ampicillin, nafcillin 등과 같은 베타락탐(β -lactam)계열의 항생제를 비롯한 거의 모든 항생제에 내성을 가지고 있으므로 현재 거의 모든 항생제에는 치료가 되지 않으며, 감염 후 사망률이 높은 슈퍼박테리아로 진화하였다.^{13,14)} 황색포도상구균은 내성발생이전에도 널리 알려진 식중독균 중의 하나이고 penicillin 발견의 단서가 된 세균으로 건강한 사람이나 가축의 피부와 비강표면에 일반적으로 존재하였으며 오래전부터 감염을 일으키는 병원체로서 중요성이 인식되어 왔다.^{13,15)} 황색포도상구균과 같은 일부 세균은 항생제 등의 화학물질에 노출되면 효소에 의한 항생제 불활성화, 표적물질의 변화, 세포막 항생제 투과성의 변화와 세포 외부로의 항생제 유출 등의 다양하고 복합적인 방어기전으로 화학물질에 의한 내성이 증가되지만 항생제의 적정 사용은 수술 후 감염 발생을 예방하고 감소시킨다고 알려져 있다.^{14,16)} 수술부위감염(surgical site infection; SSI)은 모든 병원감염 환자의 14-16%로 3번째를 차지하고 있으며, 외상 및 수술 환자에서 MRSA 감염은 재수술, 임상경과 악화, 재원일수 연장 및 치료비 증가 등의 중요한 문제를 유발시킨다.^{16,17)} 따라서 효과적인 항생제의 개발과 함께 기존 항생제의 적절한 활용과 내성을 최소화하는 노력이 세계 각국에서 진행되고 있으며, 이와 관련하여 천연물에서 항균활성을 가지거나 증강시키는 새로운 소재의 개발이 시급히 요구되고 있으므로, 본 연구에서는 UA를 이용하여 안전한 식의약소재로 개발하기 위한 기초자료를 확보하고자 하였다.¹⁸⁾

재료 및 방법

시약 및 항생제 - 실험에 사용된 UA, minocycline, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), sodium azide(NaN_3), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서, 균주의 배양에 사용된 Mueller-Hinton (MH) broth 및 MH agar는 Difco Laboratories (Baltimore, MD, USA), phosphate buffered saline(PBS)은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 상업적으로 구입되었다(Fig. 1).

균주 및 배양 - 실험에 사용된 황색포도상구균은 총 17종을 사용하였으며, 표준균주로서 내성을 보유한 MRSA균주인 ATCC 33591 및 내성이 없는 MSSA(Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; MSSA) 균주인 ATCC 25923을 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 나머지 15종은 원광대학교 병원(Iksan, Korea)에서 MRSA 보균자 15명으로부터 각각 분리하여 임상균주로 사용하였다. 모든 세균은 10% DMSO를 이용하여 -70°C 에 보관하였다가, 실험 전 3회 계대배양을 거쳐 사용하였다.

항균효과 측정(Disc Diffusion Method) - 항균효과는 디스크 확산법(Disc diffusion method)에 의하여 억제환(Inhibition zone)으로서 측정하였다.²⁰⁾ 실험 전, 모든 균주는 37°C incubator에서 24시간 배양하였으며 MH agar는 고압 멸균하여 petri dish에 균혀 사용하였다. 항균효과를 측정할 UA는 DMSO(diluted using MH broth; v/v)를 이용하여 희석하여 냉장 보관하여 사용하였고 MRSA 및 MSSA 접종물은 0.5 McFarland standard(approximately 1.5×10^8 colony-forming units(CFU)/ml)로 조정하였으며, 최종적으로 약 1.5×10^6 CFU/spot이 되도록 희석하여 도말하였다. 다음으로 멸균된 paper disc(6 mm)에 UA를 각각 $10 \mu\text{g}$ 및 $100 \mu\text{g}$ 이 되도록 주입하여 완전히 흡수시킨 후 37°C incubator에서 24시간 배양하여 paper disc의 주위에 형성된 inhibition zone의 직경(mm)을 측정하였다.

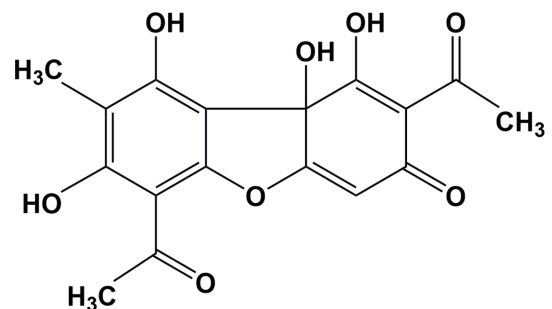


Fig. 1. Chemical structure of (+)-Usnic acid (UA).

최소억제농도(Minimum Inhibition Concentrations, MICs) 측정 – Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines에 기술된 broth microdilution method에 따라 MICs를 측정하였다. MICs를 측정할 UA는 DMSO(diluted using MH broth; v/v)를 이용하여 희석하였고 MH broth에 연속 2배 희석으로 96well-plates에 준비하였다. MRSA 및 MSSA 접종물은 0.5 McFarland standard(approximately 1.5×10^8 colony-forming units(CFU)/ml)로 조정하였으며, 최종적으로 약 1.5×10^6 CFU/spot이 되도록 희석하였다. 또한 37°C incubator에서 24시간 배양한 후, 5 mg/ml의 MTT 시약(diluted using PBS; v/v)을 20 µL 씩 첨가하여 30분간 다시 배양시켰다. 그리고 노란색이 진보라색으로 변화되어 MRSA 및 MSSA의 성장이 억제되지 않는 농도를 확인하였고, 노란색으로 성장이 억제되는 가장 낮은 농도로서 정의하였다.

MRSA에 대한 세포막 투과성 및 ATPase 억제 측정 – UA의 항균활성이 membrane 투과성의 변형과 ATPase 억제에 어느 정도 연관성이 있는지 보기위해 membrane 투과성을 증진시키는 약물인 EDTA과 ATPase inhibitor로 사용되는 NaN_3 를 각각 UA와 병용하여 37°C incubator에서 24시간 이후 박테리아의 억제정도를 관찰하였다. UA, EDTA 및 NaN_3 의 농도는 OD 600 nm를 이용하여 MRSA의 성장을 완전히 억제하지 않는 수준에서 결정하였다.

통계처리 – 모든 실험결과는 유의성 검정은 평균 및 표준편차로 표시하였으며, SPSS(Statistical package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison test)를 활용하여 5% 유의수준에서 비교 및 검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

Disc Diffusion Test – 기존 항생제 등의 항균물질은 세포벽합성 억제 및 파괴, 단백질 합성 억제, 대사억제 등의 기전으로 박테리아의 성장을 억제한다.²⁰⁾ 그러나 이러한 항균물질의 작용에 대하여 MRSA는 항생물질 분해효소 및 세포외 배출 등의 내성기전으로 저항성을 발달시켰으며, 오늘날 세계는 새로운 항생제의 개발을 시급히 요구하고 있다.

전통적으로 지혈 및 상처치료 등에 사용된 약용식물에 대하여 문헌검색을 실시하여 후보자원을 선발하고, Disc diffusion test를 통하여 항균활성을 스크리닝 하였다. 따라서 후보자원 중에서 항균활성이 뛰어난 UA를 선발하여, 표준 균주 2종 및 임상균주 15종에 대하여 UA의 항균효과를 억제환으로서 측정하였다. 평가되었던 균주에 대하여 억제환의 평균치는 12-20 mm로 평가되었으며 UA를 각각 10 µg 및 100 µg이 되도록 주입한 결과, 실험한 모든 균주에서 항균효과가 확인되었다(Table I).

Table I. The disc diffusion test of usnic acid against *S. aureus*

<i>S. aureus</i> strains		Inhibition zone (mm)	
		10 µg	100 µg
MRSA	ATCC 33591	12	16
MSSA	ATCC 25923	13	17
Clinical isolates	KWMrI 1 ¹⁾	17	20
	KWMrI 2	13	15
	KWMrI 3	15	17
	KWMrI 4	13	15
	KWMrI 5	12	13
	KWMrI 6	13	13
	KWMrI 7	13	15
	KWMrI 8	13	15
	KWMrI 9	17	17
	KWMrI 10	13	15
	KWMrI 11	15	17
	KWMrI 12	12	15
	KWMrI 13	13	17
	KWMrI 14	15	17
	KWMrI 15	14	15

¹⁾KWMrI indicates staphylococcal strains from the Department of Plastic. Surgery, Wonkwang University Hospital.

최소억제농도(Minimum Inhibition Concentrations, MICs) – MIC는 항균력을 측정하는 가장 기초적인 지표로 시험관내 세균 감수성 검사(*in vitro* sensitivity test)에서 미생물의 번식을 억제할 수 있는 항생제의 최저농도로 정의된다.²¹⁾ 따라서 최소억제농도는 배양된 세균의 증식을 억제할 수 있는 항균제의 가장 낮은 농도이며, 최소억제농도 측정은 감염 원인균에 대한 치료효과가 높은 항균제를 선택하는 항균제감수성검사 기준이라 할 수 있다.

MICs test를 이용하여 측정된 최소억제농도는 총 15개의 포도상구균에 대하여 UA는 7.81-31.25 µg/ml로 평가되었으며, minocycline 역시 동일하게 7.81-31.25 µg/ml로 평가되었다. Minocycline은 tetracyclines계의 2세대 항생제로서 박테리아의 단백질합성 및 산화물 대사저해, 대사에 필요한 Ca^{2+} 의 킬레이트가 작용기전으로 본 연구에서는 대조군으로 사용되었다.²²⁾ 표준 MSSA 균주에서는 UA 및 minocycline 각각 15.62 µg/ml 및 31.25 µg/ml로 평가되었다(Table II).

Membrane 투과성에 대한 UA와 Membrane-permeabilizing Agent의 병용효과 – Membrane-permeabilizing agent와 UA의 병용을 통하여 membrane 투과성강화 여부를 측정하기 위하여 UA를 MIC 농도의 1/4인 3.9 µg/ml로 처리하고 EDTA 0.09 mM을 병용하였을 때의 membrane에 대한 UA의 효과를 확인하였다. 또한 UA의 항균효과가 membrane

Table II. The MICs of usnic acid (UA) and minocycline against *S. aureus* strains

<i>S. aureus</i> strains		Minimum Inhibitory Concentrations (µg/ml)	
		UA	Minocycline
MRSA	ATCC 33591	15.62	31.25
MSSA	ATCC 25923	15.62	0.97
Clinical isolates	KWMrI 1 ¹⁾	7.81	15.62
	KWMrI 2	31.25	15.62
	KWMrI 3	15.62	31.25
	KWMrI 4	31.25	62.50
	KWMrI 5	31.25	7.81
	KWMrI 6	31.25	7.81
	KWMrI 7	31.25	15.62
	KWMrI 8	31.25	7.81
	KWMrI 9	31.25	15.62
	KWMrI 10	31.25	7.81
	KWMrI 11	31.25	15.62
	KWMrI 12	31.25	15.62
	KWMrI 13	31.25	7.81
	KWMrI 14	15.62	15.62
	KWMrI 15	31.25	15.62

¹⁾KWMrI indicates staphylococcal strains from the Department of Plastic Surgery, Wonkwang University Hospital.

에 작용하는 것을 확인하였다.

EDTA는 매우 제한적이기는 하나 생리식염수보다 우수한 항균효과를 나타내고 킬레이션을 통해 황색포도상구균 등의 biofilm과 membrane을 제거할 수 있다.²³⁾ 특히 대장균과 살모넬라와 같은 Gram-negative균에 대한 항균효과는 외부 membrane의 붕괴에 의한 내부 membrane에 접근을 하지 않는 한 쉽게 억제되지 않는다.²⁴⁾ 따라서 Permeabilizing agents의 병용을 통하여 항균성 약제의 활동을 강화할 수 있으며, 항균성 약제의 사용을 줄이면서 활성을 유지할 수 있으므로, 의학계에서는 근관치료에 탈회를 위한 EDTA의 보조적 사용이 추천되고 있다.^{23,25)} 또한 EDTA는 박테리아의 세포 벽에 위치하는 양이온-결합 위치(cation-binding sites)에서 Ca²⁺과 Mg²⁺ 등의 2가 이온 chelator로 작용하지만 내부로는 투과하지 못하며, 처리된 EDTA는 membrane에 존재하는 Ca²⁺ channel이나 pump에 작용하였거나 어떤 영향을 줌으로써 Ca²⁺ signal transduction을 유도할 수 있다.^{26,27)} 이전의 연구에서도, 분방기에서 분리되는 천연 Ca²⁺ channel blocker인 tetrandrine, EDTA 및 NaN₃ 등의 membrane-permeabilizing agent 및 ATPase inhibitor를 이용하여 세포막 투과성 증가 및 energy 대사저해를 확인하였다²⁸⁾(Fig. 2).

□ Control
 ■ UA 1/4 MIC
 ■ EDTA 0.09 mM
 ■ Combination (+ UA 1/4 MIC)

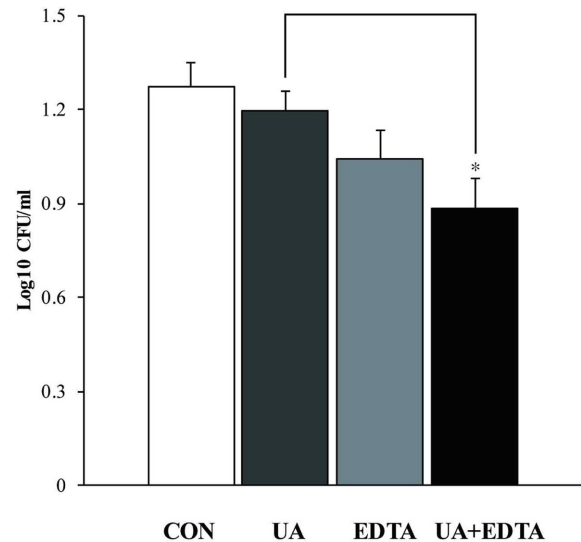


Fig. 2. The effect of membrane-permeabilizing agent (EDTA) on the susceptibility of MRSA (ATCC 33591) to usnic acid (UA). Bacterial viability was determined by the absorbance at 600 nm after incubation for 24 h with UA (3.9 µg/ml, 0.25 MIC value), EDTA 0.09 mM, or their combinations UA+EDTA. The data are presented as the mean±S.D. of three independent experiments. *P<0.05 compared to UA alone. CON, untreated control MRSA.

Energy 대사저해에 대한 UA와 ATPase-inhibitor의 병용효과 - ATPase(EC 3.6.1.3.)는 ADP와 인산이온(Pi)으로부터 ATP를 합성하는 효소(F₀F₁-ATPase)인 ATP synthase와 ATP를 ADP와 Pi로 가수분해하는 효소(F₁-ATPase)의 총칭으로, ATP synthase는 membrane에 내재되어 있는 F₀ group과 Oligomycin Sensitive Conferring Protein(OSCP)에 의하여 F₀ group에 연결되어 있는 F₁ group으로 구성되어 있으며 lipid bilayer인 membrane을 통하여 protein을 전달한다고 보고되어 있다.²⁹⁾ 따라서 생체대사의 Energy원으로 ATP를 합성하는 ATP synthase의 F₁ group과 Pi의 결합을 방해하는 억제제이며 Fe enzyme 억제 및 cytochrome oxidase의 강력한 전자전달 억제제로 잘 알려진 NaN₃와 UA의 병용을 통하여 energy 대사저해 강화여부를 측정하였다.^{30,31)} UA를 MIC 농도의 1/4인 3.9 µg/ml로 처리하고 NaN₃ 0.001%를 병용시의 MRSA 성장 억제를 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 측정하였으며, 그 결과 0.001% NaN₃를 단독으로 처리하였을 때보다 UA와 병용하였을 때 MRSA의 성장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 UA의 항균효과가 membrane 뿐만 아니라 energy 대사저해

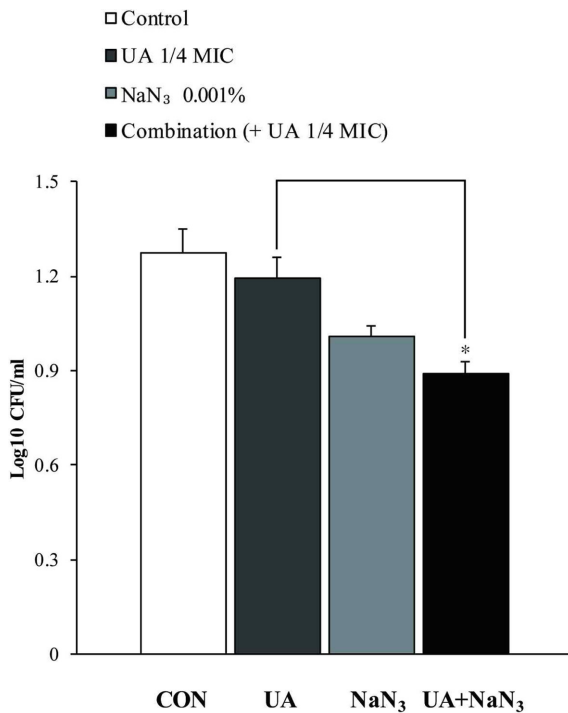


Fig. 3. The effect of ATPase-inhibitor (NaN_3) on the susceptibility of MRSA (ATCC 33591) to usnic acid (UA). Bacterial viability was determined by the absorbance at 600 nm after incubation for 24 h with UA (3.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.25 MIC value), NaN_3 0.001%, or their combinations UA+ NaN_3 . The data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared to UA alone. CON, untreated control MRSA.

에도 작용하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

따라서, MRSA의 치료에 UA가 신약후보물질의 가능성을 확인하고, 기존 항생제에 내성을 가진 MRSA에 대하여 우수한 항균활성을 보유하고 있으며, 항생제의 과잉사용으로 인한 내성 등의 부작용을 해결하는 방법이 될 수 있으리라 판단된다. 앞으로도 전통약용식물에서 분리되는 유효성분 및 대사산물을 이용하여 항균기전을 이해하고 독성여부와 효율적인 투여방법에 대하여 추가연구가 진행된다면 약용식물에서 우수한 신약후보물질을 발견할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

한약서에서 장송라 및 송석에 등으로 알려져 있는 지의류에서 분리되는 우스닌산에 대하여 항균효과를 측정하고, 세포막 투과성과 ATPase 억제를 평가하였다. 사용된 균주는 MRSA를 비롯한 황색포도상구균 17종으로, Disc diffusion test, 최소억제농도, Membrane-permeabilizing agent와 우스닌산의 병용을 통한 membrane 투과성강화를 평가하고,

ATPase-inhibitor 병용으로 에너지 대사저해를 평가하였다. Disc diffusion test에서는 100 μg 의 농도일 때, 13-20 mm의 억제환을 확인할 수 있었고, 최소억제농도는 15.62-31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 우수한 항균효과를 확인하였다. Membrane-permeabilizing agent로 사용된 EDTA와 ATPase-inhibitor로 사용된 NaN_3 의 병용에서도 상승효과가 확인되었으므로 황색포도상구균에 대한 우스닌산의 항균효과는 membrane 및 energy 대사저해를 기반으로 작용한다고 판단된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청에서 주관하는 농축산물유래 프로바이오틱스를 활용한 기능성 제품 개발(과제번호: PJ01191902) 과제의 연구비 지원 및 2015년도 정부[미래창조과학부]의 재원[No. 2008-0062484]으로 한국연구재단의 지원에 의해 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Cheon, D. M., Jang, D. S., Kim, H. Y., Choi, K. S. and Choi, S. K. (2013) Detection of antifungal endolichenic fungi and antifungal compound. *Kor. J. Microbiol.* **49**: 165-171.
- 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 (1997) 중약대사전, 2481. 도서출판 정담, 서울.
- Jeong, J. C., Nam, W. G. and Shin, H. C. (2005) Effects of *Laminariae Thallus* extracts on body weight and lipid metabolism in high fat diet rats. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* **19**: 1296-1302.
- Hwang, H. G., Kim, Y. N., Baik, K. S. and Choi, S. K. (2011) Isolation and characteristics of endolichenic fungi producing antifungal compound. *Kor. J. Microbiol.* **47**: 97-101.
- Kim, E. M. and Cho, M. J. (2012) Antimicrobial activities of oral bacteria by lichen extracts. *J. Korean Soc. Dent. Hyg.* **12**: 81-91.
- Ding, G., Li, Y., Fu, S., Liu, S., Wei, J. and Che, Y. (2009) Ambuic acid and torreyanic acid derivatives from the endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp.. *J. Nat. Prod.* **72**: 1368-1368.
- Jeon, H. S., Koh, Y. J., Lokos, L., Lee, Y. M., Byun, B. K. and Hur, J. S. (2009) Report on the lichen list of North Korea. *Korean J. Mycol.* **37**: 1-10.
- Paranagama, P. A., Wijeratne, E. K., Burns, A. M., Marron, M. T., Gunatilaka, M. K., Arnold, A. E. and Gunatilaka, A. L. (2007) Heptaketides from *Corynespora* sp. inhabiting the cavern beard lichen, *Usnea cavernosa*: first report of metabolites of an endolichenic fungus (1). *J. Nat. Prod.* **70**: 1700-1705.
- Ingolfsson, K. (2002) Usnic acid. *Phytochemistry* **61**: 729-736.
- Ranković, B., Ranković, D. and Marić, D. (2010) Antiox-

- idant and antimicrobial activity of some lichen species. *Mikrobiologiia* **79**: 812-818.
11. Krämer, P., Wincierz, U., Grübler, G., Tschakert, J., Voelter, W. and Mayer, H. (1995) Rational approach to fractionation, isolation, and characterization of polysaccharides from the lichen *Cetraria islandica*. *Arzneimittelforschung* **45**: 726-731.
 12. Roach, J. A., Musser, S. M., Morehouse, K. and Woo, J. Y. (2006) Determination of usnic acid in lichen toxic to elk by liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometry detection. *J. Agric. Food. Chem.* **54**: 2484-2490.
 13. Lee, J. W., Ji, Y. J., Yu, M. H., Im, H. G., Hwangbo, M. H. and Lee, I. S. (2005) Antimicrobial effect of extract of *Glycyrrhiza uralensis* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**: 456-464.
 14. Shin, I. S., Kang, O. H., Joung, D. K., Kang, H. J., Kim, J. E., Hwang, H. C., Kim, I. W. and Kwon, D. Y. (2013) Antibacterial effect of sinhyowoldosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Herbology* **28**: 59-64.
 15. Lee, Y. S., Lee, D. Y., An, T. J., Lee, J. H., Ahn, Y. S., Cha, S. W., Mun, S. H., Kang, O. H., Kwon, D. Y. and Han, S. H. (2014) Synergistic effect of brazilein in combination with hygromycin-b against *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **22**: 504-509.
 16. Kim, K. H., Park, C. S., Chang, J. H., Kim, N. S., Lee, J. S., Choi, B. R., Lee, B. R., Lee, K. D., Kim, S. M. and Yeom, S. A. (2010) Association between prophylactic antibiotic use and surgical site infection based on quality assessment data in Korea. *J. Prev. Med. Public. Health.* **43**: 235-244.
 17. Park, E. J., Chae, S. M., Kim, N. J., Song, J. H., Woo, J. H., Cheong, H. S. and Lee, E. K. (2007) Analysis of economic outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia using retrospective case-control study. *Korean J. Clin. Pharm.* **17**: 59-64.
 18. Im, D. Y. and Lee, K. I. (2011) Antioxidative and antibacterial activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **19**: 238-245.
 19. Kwon, D. Y., Kang, O. H., Choi, J. G., Lee, Y. S., Oh, Y. C., Chae, H. S., Lee, G. H., Park, P. S., Kim, Y. C. and Sohn, D. H. (2007) Antibacterial effect of *Dryopteris crassirhizoma* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* **78**: 430-433.
 20. Kim, I. W., Kang, O. H., Kong, R. and Kwon, D. Y. (2015) Antibacterial activity of Tonghyeonipal-dan against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Herbology* **30**: 15-21.
 21. Lee, D. G. and Shin, H. H. (2008) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics: general concepts and recent advances. *Infect Chemother.* **40**: 140-147.
 22. Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A. and Gálvez, J. (2013) Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol.* **169**: 337-352.
 23. Kim, Y. H., Kang, M. K., Choi, E. K., Yang, S. Y., Yang, I. S., Kang, I. C., Hwang, Y. C., Hwang, I. N. and Oh, W. M. (2009) Comparison of antibacterial effect of Listerine (R) with various root canal irrigants. *Restor Dent Endod.* **34**: 500-507.
 24. Dover, S. E., Aroutcheva, A. A., Faro, S. and Chikindas, M. L. (2008) Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. *Int. J. Probiotics Prebiotics* **3**: 219-230.
 25. Alakomi, H. L., Paananen, A., Suihko, M. L., Helander, I. M., and Saarela, M. (2006) Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 4695-4703.
 26. Knabel, S. J., Walker, H. W., and Hartman, P. A. (1991) Inhibition of aspergillus flavus and selected gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. *J. Food. Prot.* **54**: 360-365.
 27. Yoon, S. Y., Lee, E. M., and Bae, I. H. (2003) The effect of Ni²⁺ on the intracellular Ca²⁺ increase of the mouse early 2-cell embryos. *Korean J. Fertil. Steril.* **30**: 269-280.
 28. Lee, Y. S., Han, S. H., Lee, S. H., Kim, Y. G., Park, C. B., Kang, O. H., Keum, J. H., Kim, S. B., Mun, S. H. and Seo, Y. S. (2012) The mechanism of antibacterial activity of tetrandrine against *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog. Dis.* **9**: 686-691.
 29. Min, T. J. and Lee, K. H. (1991) Study on the characterization of light-induced mitochondrial ATP synthase in *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **19**: 32-40.
 30. Kasahara, M. and Penefsky, H. S. (1978) High affinity binding of monovalent Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **253**: 4180-4187.
 31. Lee, H. Y. and Min, T. J. (1992) Studies on light-induced mitochondrial ATPase in *Pleurotus ostreatus*-effects of organic compounds. *Kor. J. Mycol.* **20**: 51-57.
- (2016. 4. 29 접수; 2016. 6. 10 심사; 2016. 6. 16 게재확정)