

Anti-microbial Activity Effects of Ozonized Olive Oil Against Bacteria and *Candida albicans*

Kyung Tae Chung^{1*} and Byoung Woo Kim²

¹Department of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

²Blue-Bio Industry RIC, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received December 10, 2018 / Revised December 24, 2018 / Accepted February 7, 2019

Ozone is a gaseous molecule able to kill microorganisms, such as yeast, fungi, bacteria, and protozoa. However, ozone gas is unstable and cannot be used easily. In order to utilize ozone properly and efficiently, plant oil can be employed. Ozone reacts with C-C double bonds of fatty acids, converting to ozonized oil. In this reaction, ozonide is produced within fatty acids and the resulting ozonized oil has various biological functions. In this study, we showed that ozonized oil has antimicrobial activity against fungi and bacteria. To test the antimicrobial activity of ozonized oil, we produced ozonized olive oil. Ozonized olive oil was applied to *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*. Antimicrobial activity was assayed using the disk diffusion method following the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Minimal inhibitory concentrations (MIC) were 0.25 mg for *S. aureus*, 0.5 mg for *S. epidermidis*, 3.0 mg for *P. aeruginosa*, and 1.0 mg for *E. coli*. Gram positive bacteria were more susceptible than Gram negative bacteria. We compared growth inhibition zones against *S. aureus* and MRSA, showing that the ozonized olive oil was more effective on MRSA than *S. aureus*. Furthermore, the ozonized olive oil killed *C. albicans* within an hour. These data suggested that ozonized olive oil could be an alternative drug for MRSA infection and could be utilized as a potent antimicrobial and antifungal substance.

Key words : Antibiotics, antimicrobial activity, MRSA, ozonized olive oil

서 론

오존(O₃)은 산소 원자 3개로 이루어져 있는 기체로 강력한 산화제로 작용한다. 그러나, 오존은 본질적으로 불안정한 분자 구조로 다양한 목적으로 사용하기가 어려우며 주로 상수도의 소독이나 폐수 정화 과정에 사용된다[13, 18, 20]. 의학적인 사용은 19세기에서부터 이루어졌으나 오존이 가지고 있는 독성과 유용성의 양면성으로 인해 제한적으로 사용되어 왔다. 최근에 이르러 치과 치료에 많이 응용이 되고 있으며[30], 그 외 급성 및 만성 질환에도 적용이 되고 있다[26]. 오존 치료는 아직 일반화된 치료방법으로 간주되지는 않으나 오존의 장점과 치료에 적용하기 위한 표준화, 오존에 의한 신호전달 과정과 같은 과학적인 결과가 지속적으로 보고 되고 있다[3, 32].

오존을 더 용이하게 활용하기 위한 방법으로 오존과 식물성 오일을 반응시키는 방법이 시도되었으며, 오존과 반응한 식물

성 오일을 오존화 오일이라고 하며, 오존화 오일에서는 오존에 의해 오일이 산화된 후 산화물끼리의 연속적인 반응에 의해 오조나이드(ozonide) 화합물이 형성된다는 것이 알려졌다[31]. 오조나이드를 함유한 오존화 오일은 다양한 생리적 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 대표적인 기능으로는 피부조직재생 기능과 세균 살균 효과이다[15, 29]. 피부 손상을 일으킨 실험동물에 오존화 오일로 치료를 하였을 경우 피부재생이 보다 빠르게 진행된다고 알려져 있다. 또한, 오존화 오일과 세균을 반응시켰을 경우 세균의 성장이 억제된다고 알려져 있다. 이러한 오존화 오일에 대한 연구는 주로 유럽을 중심으로 이루어졌으나 최근 중동과 아시아 일부 국가에서도 이에 대한 연구가 발표되고 있다[10].

그러나, 국내에서는 오존화 오일에 대한 연구가 극히 제한적으로 이루어졌고, 오존화 오일을 자체 생산하여 사용한 연구결과는 거의 없다. 본 연구에서는 올리브 오일을 오존화하는데 사용하였다. 올리브 오일은 서구에는 피부보호 작용으로 오래 전부터 사용되어 왔으며, 오존의 공격을 받는 이중결합을 가진 지방산이 풍부하게 함유되어 있다. 또한, 오랫동안 사용되어 오일으로써 일반 사람들이 가지는 긍정적 인식의 장점을 갖고 있다.

본 연구 목적은 오존화 올리브 오일의 항균 활성을 측정하기 위한 것이다. 피부와 연조직은 세균감염에 항상 노출되어

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2681, Fax : +82-51-890-2622

E-mail : kchung@deu.ac.kr

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.

있으며, 감염이 발생하면 발적과 부종이 형성되고 염증반응과 함께 감염이 더욱 진행되면 피부 괴사와 같은 심각한 증상이 나타난다. 피부 감염의 가장 대표적인 원인균은 *Staphylococcus aureus*이며, 항생제 내성을 획득한 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)는 피부와 연조직의 복합감염을 유발하는 임상적으로 중요한 균이다[21].

내성의 문제는 항생제가 본격적으로 도입된 1940년도 이래 계속되어 온 문제점으로 1990년대부터 더욱 심화되는 경향을 보이고 있다. 현재 임상에서 사용하는 대부분의 항생제에 대한 내성은 이미 출현했다고 보고되어 있으며, 임상에서 특히 중요하게 여기는 다제내성균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococci*, *Enterobacter* sp.가 대표적이다. 그 중 MRSA는 병원감염의 주원인이며, 1990년대 후반부터는 지역사회에서 자연 발생한 MRSA (community-associated MRSA, CA-MRSA)가 전 세계적으로 출현하고 있다. 특히 미국의 경우 CA-MRSA는 일부 지역사회에서 발생한 피부 연조직 감염 원인균의 70% 이상을 차지한다[27]. 우리나라의 경우 MRSA의 내성률은 71%로 다른 나라들에 비해 월등히 높은 수준이며 경제 협력 개발 기구(OECD) 평균의 약 3배 정도로 높다[7].

세균 외에 진균 또한 피부질환을 유발한다. 피부질환을 유발하는 대표적인 균류는 *Candida albicans*로서, 기저귀를 하는 갓난아기의 피부염과 여성의 질염을 유발한다[9, 14]. 진균의 감염은 세균성 항생제로는 제어되지 않고 항진균제를 사용하여야 한다.

따라서 본 연구는 세균과 항생제 내성균, 진균에 대한 항균 활성 여부를 확인함으로써 오존화 오일의 유용성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

오존화 올리브 오일 제조

올리브 오일을 오존-산소 혼합가스에 통과시켜 올리브 오일을 산화시켜서 제조한 시료를 오존화 올리브 오일(ozoin)로 명명하였다. 오존화 올리브 오일은 부산 소재 C&M 회사에서 제조하였다. 제조한 오존화 올리브 오일의 오존에 의한 산화된 정도는 과산화물가를 측정하여 수치로 나타내었다. 과산화물가가 약 1,200 meq/kg인 오존화 올리브 오일을 항균 효과 분석에 사용하였다.

실험 균주와 배양

오존화 올리브 오일의 항균 활성을 검증하기 위해서 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922)과 항균제 내성 표준실험 균인 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, ATCC 43300)를 포

함하여 총 5 종을 실험 대상 세균종으로 사용하였다.

세균 배양을 위한 액체배지는 trypticase soy broth (TSB)를 사용하였고, disk 확산에 의한 생육억제 검사를 위한 배지는 Muller-Hinton agar를 사용하였다.

항진균 활성을 확인하기 위해서는 피부 칸디다증을 일으키는 *Candida albicans* (ATCC 10231)를 사용하였으며, 배지로는 yeast extract peptone dextrose (YEPD)를 사용하였다.

Disk 확산법에 의한 항균성과 최소생육억제농도 측정

Disk 확산법에 의한 항균성 측정은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에 따라 진행하였다[4]. 각 실험균을 37°C, 18시간 동안 해당 액체 배지로 배양한 후 Mcfarland 탁도 0.5가 되게 각각의 균 현탁액을 제조하여 Mueller-Hinton agar 배지에 균일하게 도말하였다. 오존화 올리브 오일을 적하하기 위해 멸균된 6 mm 지름의 disk를 균이 접종된 배지 표면에 일정한 간격을 두고 부착하고, 오존화 올리브 오일을 시계 방향으로 농도를 감소시키면서 적하하였다. 오존화 올리브 오일의 비중 0.6 g/ml로 측정이 되었고, 사용한 오존화 올리브 오일의 양은 부피에 대해 질량을 산정하여 나타내었다. 음성대조군으로는 오존화되지 않은 올리브 오일 또는 0.9% 생리적 식염수를 사용하였으며, 양성대조군으로는 ampicillin과 tetracycline을 사용하였다. 오존화 올리브 오일과 각 항생제를 disk에 첨가하고 37°C에서 20시간 배양한 후 생육 억제대를 측정하였다. 억제대 지름은 스캔한 후 Image J프로그램(NIH, USA)을 이용하여 측정된 후 엑셀을 이용하여 그래프로 나타내었다. 농도에 따른 억제대의 값은 3회 이상의 실험값을 평균과 표준편차로 나타내었다. 최소생육억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 생육이 나타나는 전 단계의 희석농도로 결정하였다. 양성대조군으로 사용한 ampicillin과 tetracycline은 또한 동일한 방법으로 항균성을 측정하였으며, 농도에 따른 생육억제대의 상관관계 함수를 산출하여 오존화 올리브 오일과의 항균성을 비교하는데 활용하였다.

*Staphylococcus aureus*와 MRSA에 대한 상대적 항균 활성 비교

오존화 올리브 오일의 *Staphylococcus aureus*와 MRSA에 대한 상대적 항균활성을 동시에 비교하기 위해 동일한 Muller-Hinton agar 평판배지에 두 균주를 양분하여 접종한 후 동일 농도의 오존화 올리브 오일을 적하하여 배양한 후 생육억제대를 비교하였다. 항균제 양성대조로 ampicillin을 사용하였고, 음성대조로 올리브 오일을 사용하였다.

Candida albicans 사멸 측정

오존화 올리브 오일에 의한 *Candida albicans*의 사멸률을 *C. albicans*가 사멸되었을 경우 methylene blue로 염색이 되는 방법을 이용하여 측정하였다[5, 23]. *Candida albicans*를 YEPD에

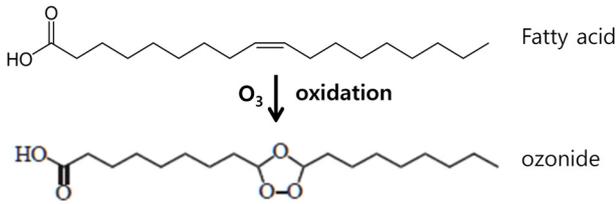


Fig. 1. Production of ozonide. Ozone oxidizes fatty acids at double bond linkage producing a five ring compound, ozonide.

서 18시간 배양 후 3,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 균체만을 회수하였다. 회수한 균체를 1 ml PBS에 현탁하고 원심분리하여 균체를 세 번 세척하였다. 다시 균체를 PBS에 현탁하여 hemocytometer를 이용하여 균수를 측정하여 1×10^8 cells을 취하고 오존화 올리브 오일로 최대 5시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 일정한 시간 간격으로 오존화 올리브 오일과 반응한 균체를 회수하여 methylene blue로 염색한 후 Motic AE31 현미경(Xiamen, China)을 사용하여 400배로 관찰하고, Moticam Pro를 사용하여 사진 촬영을 하였다.

결과 및 고찰

항생제에 의한 감염성 질환의 치료는 인류의 생명을 지켜 온 매우 중요한 치료방법이다. 그러나 최근 항생제 내성균의 출현으로 항생제 치료의 어려움이 발생하고 있다. 비록 새로운 항생 물질의 탐색이 꾸준히 이루어지고 있으나 항생제 개발의 속도는 내성균의 출현 속도에 뒤떨어지고 있다[19]. 오존은 강력한 산화제로 작용하여 음용수의 살균 또는 폐수처리의 살균을 목적으로 많이 사용된다[25]. 본 연구에서 오존과 올리브 오일을 반응시켜 얻은 오존화 올리브 오일의 항균 기능을 조사하였다. 식물성 오일과 오존을 반응시켜 만들어지는 오존화 오일은 오존에 의한 산화적 분해(ozonolysis: oxidative cleavage)와 생성된 분해 산물의 재반응으로 오각형의 고리 화합물을 가지는 지방산이 생산되며, 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Fig. 1) [31]. 오존에 의한 산화적 분해의 정도는 과산화 물가로 나타내며, 분해가 많이 될수록 과산화물가가 증가한다. 본 실험에서 사용한 오존화 올리브 오일은 과산화물가가 약 1,200 meq/kg이었으며, 물성 또한 점도가 증가하여 4°C에서는 고체로 존재하였다.

Pseudomonas aeruginosa에 대한 항균 효과

*Pseudomonas aeruginosa*는 다양한 환경에 존재하며 전 세계

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ozonized olive oil for each organism

MIC (mg)	Gram (+)		Gram (-)	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
	0.25	0.5	3.0	1.0

의 병원 내 감염의 주요 원인균이다. 또한, 다양한 항생제에 대한 내성균주가 광범위하게 존재하며, 내성력을 빠르게 획득하는 능력이 있다[1]. 항생제 내성은 플라스미드와 같은 이동성 유전자를 받아들이거나 자체의 염색체에 존재하는 유전자의 돌연변이를 일으켜 획득하는 것으로 알려져 있다. 이런 이유로 항생제 내성인 *P. aeruginosa*에 감염이 되면 외과적 수술을 해야 하거나, 치료에 필요한 입원 기간이 연장되며, 사망률 등이 높아지는 경향이 있다[11]. Fig. 2와 Fig. 3에서 나타났듯이 항생제에 대해 상당한 저항성을 가지는 *P. aeruginosa*에 오존화 올리브 오일을 3, 6, 12, 18, 24 mg씩 분주하였을 때 6.46, 8.22, 10.18, 11, 86, 12.72 mm의 억제대를 형성하였다. 생육저해를 나타낸 최소농도는 3.0 mg으로 측정되었다(Table 1, Fig. 2). 그람양성균인 *Staphylococcus*와 비교하였을 때 *Staphylococcus*에 미치는 생육억제활성 보다 1/2배 정도로 낮았다. 양성대조균인 항생제와의 비교에서는 10.18 mm의 억제대를 나타내는데 필요한 양은 오존화 올리브 오일이 12 mg, 암피실린은 99.7 µg, 테트라사이클린은 17.08 µg으로 나타났다(Table 2, Fig. 3).

Escherichia coli에 대한 항균 효과

*Escherichia coli*는 온혈동물의 장에 서식하는 장내 세균으로 대부분의 *E. coli*는 질병을 유발하지 않으나 위장염, 요로감염, 신생아 수막염, 출혈성 대장염 등을 유발한다. Uropathogenic *E. coli* (UPEC)는 요로감염 중 중요한 원인균이며[28], enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)는 출혈성대장염의 원인균으로 2011년 독일에서 EHEC에 의해 3,000여명이 심각한 급성 위장염을 앓았으며 그 중 55명이 사망하였다[8]. 따라서, *E. coli*는 장내 상재균으로 위험하지 않은 것이 아니라 더욱 감염관리를 잘 해야 할 균으로 인식되어야 한다.

오존화 올리브 오일에 의한 *E. coli*에 대한 효능은 *P. aeruginosa*와 유사하게 낮게 나타났다. 오존화 올리브 오일 3-24 mg 양에 대하여 7.09-13.34 mm 범위의 억제대를 형성하여 측정대상 그람양성 세균보다 낮게 나타났다(Fig. 2). 그러나 생육저해를 나타낸 최소농도는 1.0 mg으로 측정되어 *P. aeruginosa*의 최소억제농도 보다는 낮았다(Table 1, Fig. 2). 두꺼운 capsular

Table 2. Comparison of Inhibition zones against the tested microorganisms at the amount of 12 mg ozonized olive oil

Inhibition (mm)	Gram (+)		Gram (-)		Fungus
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
	21.63	22.97	10.18	10.15	15.78

polysaccharide가 *E. coli*의 저항성을 제공한다는 보고가 있으나[22], 이것이 오존화 올리브 오일에 대해서도 저항성을 제공할 수 있는지는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. 그러나, 그람음성균인 *P. aeruginosa*와 유사한 패턴의 생육억제 경향을 나타내어 그람음성균의 세포벽 성분구성이 오존화 올리브 오일에 의한 저항성과 연관이 있을 것으로 유추된다. 양성 대조군인 항생제와의 비교에서는 10.15 mm의 억제대를 나타내는데 필요한 양은 오존화 올리브 오일이 12 mg, 암피실린은 28.34 µg, 테트라사이클린은 1.75 µg으로 나타났다(Table 2, Fig. 3).

Staphylococcus aureus에 대한 항균 효과

*S. aureus*는 그람양성 인체 병원균으로 피부의 화농뿐만 아니라 골수염, 심내막염, 균혈증, 폐렴 또는 폐혈증과 같은 심각한 생명을 위협하는 질병의 원인이 된다. 더욱이 *S. aureus*는 현재 사용되는 여러 종류의 항생제로는 치료할 수 없는 다제내성 균주가 존재하며, 특히 병원 내 감염의 40%를 차지하여 매우 위험한 상황을 언제든 유발할 수가 있다고 보고되었다 [2, 6].

*S. aureus*를 배양한 평판배지에 오존화 올리브 오일의 양을 3에서 24 mg으로 증가시키기에 따라 생육 억제대의 지름이 13.46에서 23.83 mm로 농도 의존적으로 증가하였다. 이러한 결과는 그람음성 세균인 *P. aeruginosa*와 *E. coli*와 비교하였을 때 매우 높은 활성을 나타내었으며, 생육저해를 나타낸 최소

농도 역시 0.25 mg으로 측정되어 그람음성 세균에 대한 최소 억제농도 보다 낮게 나타났다(Fig. 2, Table 1). *S. aureus*에 대한 오존화 올리브 오일의 항균효과를 기준 항생제와의 효능을 비교하기 위해 같은 억제대를 나타내었을 때의 항생물질의 양을 측정하였다. 오존화 올리브 오일의 양이 12 mg일 때 나타난 억제대 21.10 mm과 동일한 억제대를 나타내는 항생제의 농도는 각각 암피실린이 2.37 µg, 테트라사이클린이 11.07 µg으로 계산되었다(Table 2, Fig. 3).

Staphylococcus epidermidis에 대한 항균 효과

*S. epidermidis*는 coagulase-negative staphylococci (CoNS)에 속하며, 이점에서 *S. aureus*와 구분된다. *S. epidermidis* 역시 사람의 피부와 점막에 존재하는 정상 상재균으로, 습한 신체 부위에 우선적으로 서식한다. 임상적으로 *S. epidermidis*는 거드랑이, 사타구니, 결막 및 회음부 등에서 분리되는 가장 흔한 CoNS 중에 포함되며, 일반적으로는 정상 상재균으로 무해하지만, 일단 숙주 상피 장벽이 손상되거나 의료 기구를 통해서 감염이 이루어지면 세균성 폐혈증과 같은 심각한 증상을 일으킬 수 있다. 따라서, 피부 상피에 존재하는 세균 중 *S. epidermidis*는 가장 중요한 세균으로 알려져 있다[17].

오존화 올리브 오일을 3에서 24 mg으로 증가하면서 첨가하였을 때 생육 억제대의 지름도 10.06에서 27.80 mm로 농도 의존적으로 증가하였으며, *S. aureus*의 경우 보다 더 큰 생육 억제대를 형성하였다(Fig. 2). MIC값이 0.5 mg으로 나타나 *S.*

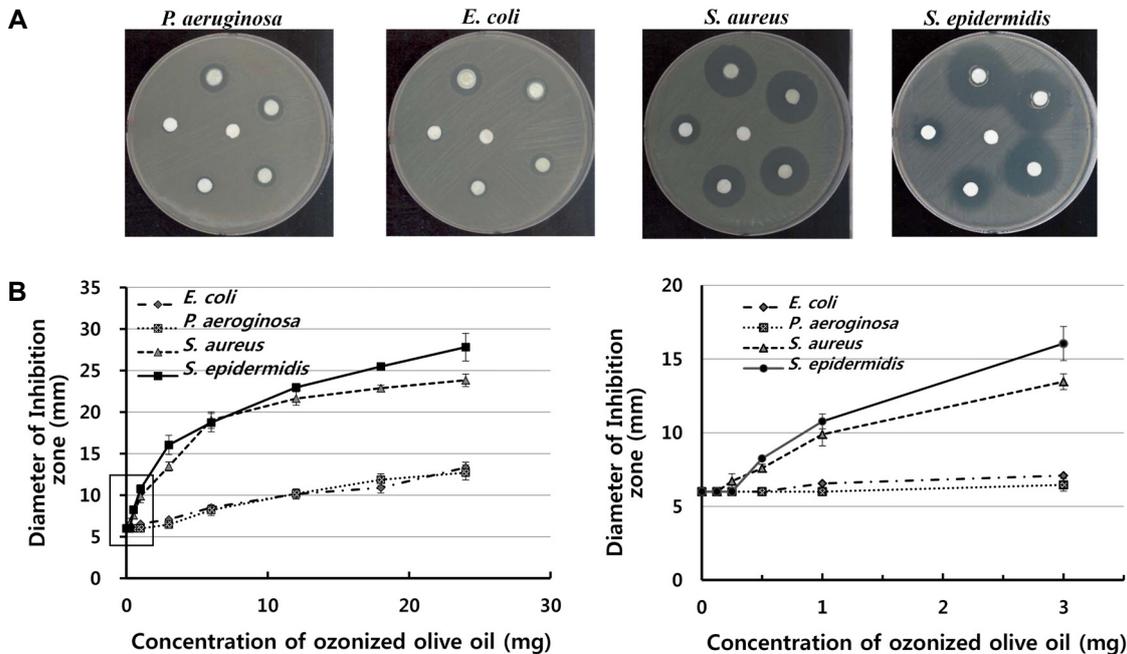


Fig. 2. The antibacterial activity of ozonized olive oil against 4 tested bacteria strains. A. Ozonized olive oil was added at the indicated amounts of ozonide olive oil in a clockwise direction to each bacterial plate. Olive oil (center) was negative control. B. Growth inhibitory graph with various concentrations of ozonized olive oil (Left). The boxed area was re-graphed with small scale (Right). Data were analyzed using MS Excel program.

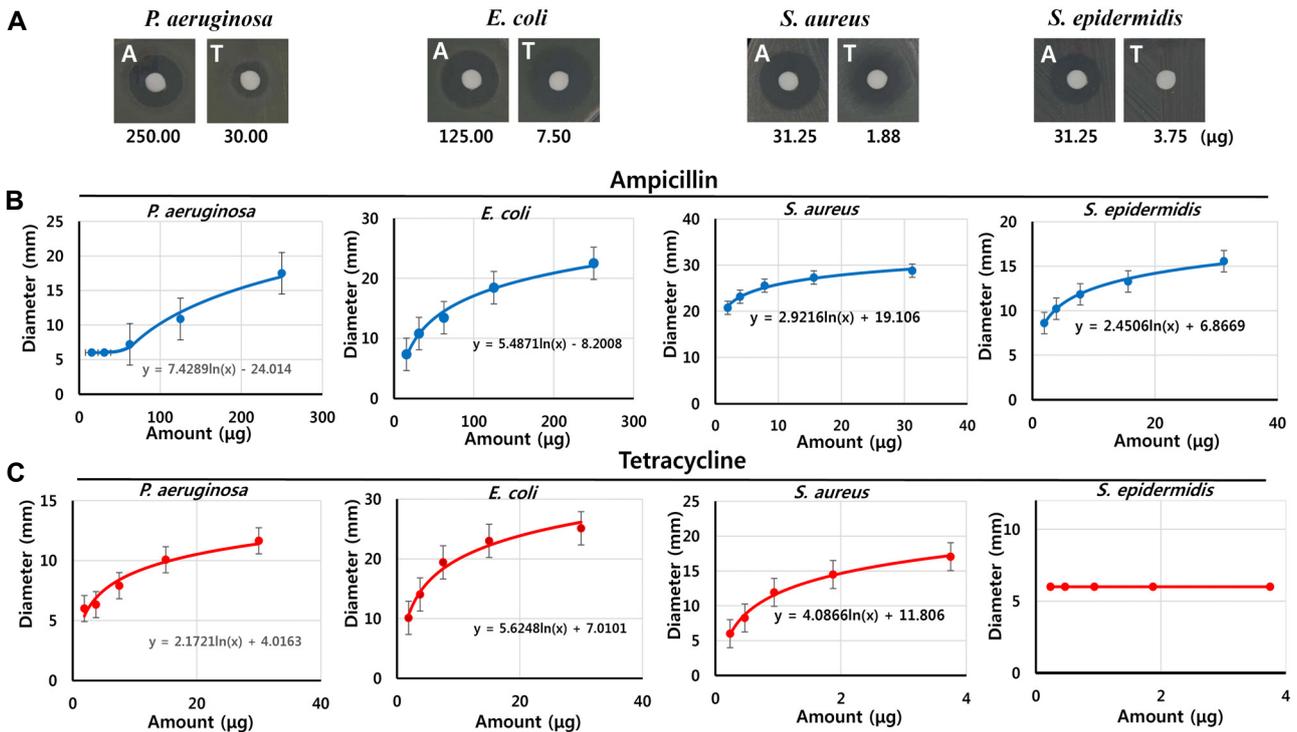


Fig. 3. The antibacterial activity of two positive control antibiotics against 4 tested bacteria strains. A. Representative inhibition zones with amount of each antibiotics. B. Dose-dependent antibacterial activity of ampicillin (B) and tetracycline (C) against 4 tested bacteria strains. Graphs were produced by MS Excel program.

aureus 보다 2 배 높은 반면에 높은 농도의 오존화 올리브 오일에 대해서는 *S. aureus* 보다 민감하게 나타났다. *S. epidermidis* 는 *S. aureus*보다 ampicillin에 대한 저항성이 높게 나타났으며 특히 테트라사이클린에 대해서는 억제대가 생성되지 않았다 (Fig. 3C). 본 연구에 사용된 *S. epidermidis* (ATCC12228)는 테트라사이클린을 세포 밖으로 배출하는 세포막 펌프 단백질을 보유하기 때문에 테트라사이클린 내성을 가진다는 이전 보고 [33]와 일치하게 내성을 나타냈다. 따라서, 이 결과는 테트라사이클린에 내성을 가지는 세균에 대해 오존화 올리브 오일이 사용 가능하다는 증거를 제시하였다. 또한, 오존화 올리브 오일은 *S. aureus*보다 항생제에 대한 내성을 높게 나타내는 *S. epidermidis* 대해서 억제대를 더 크게 형성하여 오존화 올리브 오일의 항균성 효능이 더 높다고 할 수 있다. 항생물질과의 효능 비교에서는 오존화 올리브 오일 12 mg/ml 때 나타난 22.12 mm의 억제대와 동일한 억제대를 나타내는 암피실린의 농도는 504 μg/ml로 나타났다(Fig. 3).

오존화 올리브 오일의 *Staphylococcus aureus*와 MRSA에 대한 항균 효과 비교

페니실린과 같은 β-람탐계 항생제는 가장 많이 사용되는 항생제이며, 이들 항생제에 연속적으로 노출됨에 따라 내성을 획득하게 된다. 그 중에서 MRSA는 공중보건을 위협하는 중요한 내성균으로 지난 수십 년 동안 새로운 MRSA 클론이 발견

되었다. 또한, 내성을 부여하는 기능을 가진 *mecA* 유전자 외에도 staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) 내에 여러 유전자가 지속적으로 발견되고 있다[12]. 오존화 올리브 오일에 의한 MRSA에 대한 MIC값은 *S. aureus*보다도 한 단계 높은 0.5 mg/ml로 나타났으나(Fig. 4A), 오존화 올리브 오일의 농도 증가에 따라서는 *S. aureus*보다 더 민감하게 억제작용을 받는 것으로 나타났다(Fig. 4B, Fig. 4C). MRSA는 penicillin-binding protein (PBP2a)을 생산하여 저항을 나타내는 것으로 알려져 있다. 오존화 올리브 오일이 어떻게 MRSA에 더 잘 작용하는지는 현재로서는 알 수는 없으나 향후 MRSA를 억제할 수 있는 새로운 방법을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

오존화 올리브 오일의 사멸 효과

Disk확산방법에 의한 생육억제 활성을 확인하였지만 오존화 올리브 오일이 직접적으로 세균을 사멸(bactericidal)시키는지 또는 생육만을 억제(bacteriostatic)하는지는 구분을 할 수가 없어[16], 현미경 관찰이 용이한 진균인 *Candida albicans*를 이용하여 사멸과 억제 기능을 구별하였다. Methylene blue로 *C. albicans*를 염색하였을 때 살아 있는 균은 염색이 되지 않고 죽은 균만 염색이 되는 특성을 이용하였다. 효모에 속하는 *C. albicans*는 사람의 정상균총에 속하지만 여성의 75% 이상이 최소한 한 번은 감염이 되는 균이며, 입원 환자의 높은 사망률과도 관계가 있다[14, 19, 24]. 더욱이 *C. albicans*는 진핵

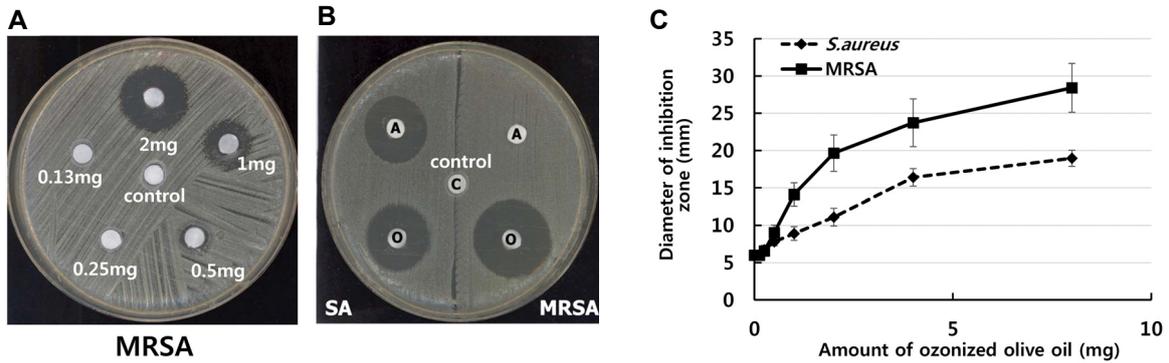


Fig. 4. Comparison of the antibacterial activity of ozonized olive oil against *S. aureus* and MRSA. A. Growth inhibition zones produced by ozonized olive oil against MRSA. B. Comparison of ozonized olive oil sensitivity against *S. aureus* (SA) and MRSA on a single plate. Control was olive oil. C. Growth inhibitory graph with various contractions of ozonized olive oil against *S. aureus* and MRSA. Data were analyzed using MS Excel program.

세포로서 항생제로서는 제어가 되지 않고, 항진균제로 치료하여야 함으로 사멸의 활성뿐만 아니라 항진균 활성을 동시에 확인 할 수 있는 대상균으로 선정하였다. 오존화 올리브 오일과 *C. albicans*를 1시간 반응시킨 후 methylene blue로 염색하여 hemocytometer를 사용하여 사멸 여부를 확인하였다. 오존화 올리브 오일에 의한 1시간 반응으로 *C. albicans*는 methylene blue로 100% 염색되었으며(Fig. 4), 이 결과는 오존화 올리브 오일이 진균인 *C. albicans*를 직접 사멸시킨다는 것을 나타내었다. 또한, 이 사멸 기능은 세균에도 적용된다고 판단된다 [15].

식물성 오일의 한 종류인 올리브 오일을 오존과 반응시켜 만들어진 오존화 올리브 오일의 항미생물 기능을 disk 확산법을 통해서 조사한 결과 그람양성, 그람음성 세균뿐만 아니라 진균 모두에 대해 생육 억제 및 사멸 효과가 있음을 확인하였다. 이 같은 결과는 현재 사용되고 있는 항생제 및 항균제가 세균과 진균에 특이적으로 작용하는 것과는 달리 세균과 진균에 동시에 작용함으로써 차이점을 나타내고 있다. 오존화 올리브 오일의 항미생물 기능은 몇몇 연구가 수행되었지만 아직 사멸에 대한 메카니즘 연구는 거의 보고되지 않았다. 본 연구 결과에서 나타났듯이 세균과 진균에 모두 작용한다는 것은 특이적이지 않다는 것을 의미하며, 이는 보편적 항세균제와 항진균제로서 사용 가능하다는 것을 뜻한다. Fig. 1에서 제시하였듯이 오존과의 반응으로 식물성 지방산은 C=C 이중 결합이 전환되어 과산화물인 산소원자 3 개를 가진 고리 화합물(ozonide 또는 trioxolane)을 가지게 된다[31]. Ozonide는 산소원자로 인해 반응성이 크며, 자신은 환원이 되면서 알데하이드, 케톤, 과산화물을 형성한다. 즉, 식물성 지방산은 오존에 의해 반응성이 높은 ozonide, 알데하이드, 케톤, 과산화물로 전환되며, 이 화합물이 세균과 진균의 세포벽에 손상을 주어 결과적으로 사멸효과를 나타낸 것으로 유추된다.

오존화 올리브 오일의 또 다른 장점으로 제조방법이 기존의 항미생물 제제에 비하여 상대적으로 간단하다는 것이다.

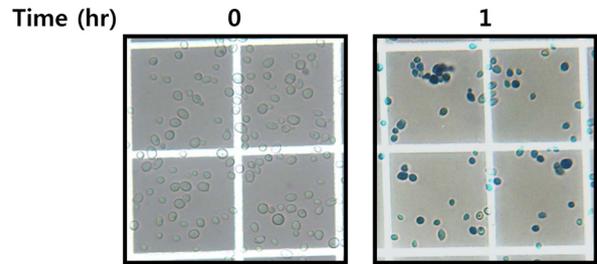


Fig. 5. Mortality by methylene blue assay. *Candida albicans* were stained with methylene blue to identify dead cells after ozonized olive oil treatment at the indicated time. Dark blue color-stained cells were judged as dead cells. Pictures were taken from a hemocytometer slide (400x).

여러 단계의 합성 또는 생산 과정이 필요하지 않고 오존발생장치를 통해 생산한 오존과 식물성 지방을 섞어 주면 오존화 올리브 오일이 생산됨으로 경제적인 항미생물 제제가 될 수 있다. 결론적으로 오존화 올리브 오일은 그람양성과 그람음성 세균의 생육을 억제하여 감염성 피부 질환에 대한 예방 및 치료에 사용될 수 있는 높은 가능성을 나타내었다.

감사의 글

이 연구는 2017년도 지식경제부 부산광역시 지원 지역혁신센터(RIC) 동의대학교 블루바이오 소재 개발 및 실용화 지원센터의 기원을 받아 수행되었음을 감사드립니다. 또한, 결과정리를 도와준 고은주와 정수영에게도 감사드립니다.

References

- Ahmadi, K., Hashemian, A. M., Bolvardi, E. and Hosseini, P. K. 2016. Vancomycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the cases of trauma. *Med. Arch.* 70, 57-60.
- Becher, D., Hempel, K., Sievers, S., Zühlke, D., Pané-Farré,

- J., Otto, A., Fuchs, S., Albrecht, D., Bernhardt, J., Engelmann, S., Völker, U., van Dijk, J. M. and Hecker, M. 2009. A proteomic view of an important human pathogen-towards the quantification of the entire *Staphylococcus aureus* proteome. *PLoS One* **4**, e8176.
3. Bocci, V. A. 2006. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch. Med. Res.* **37**, 425-435.
 4. Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI). 2015. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Twelfth Edition*. CLSI document M02-A12. Clinical and Laboratory Standards Institutes: Wayne, Pennsylvania, USA.
 5. Gibson, J., Sood, A. and Hogan, D. A. 2009. *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: Localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 504-513.
 6. Hecker, M., Mäder, U. and Völker, U. 2018. From the genome sequence via the proteome to cell physiology - Patho-proteomics and pathophysiology of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 545-557.
 7. Kim, H. B. 2007. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Kor. J. Internal Med.* **27**, 120-130.
 8. Köckerling, E., Karrasch, L., Schweitzer, A., Razum, O. and Krause, G. 2017. Public health research resulting from one of the world's largest outbreaks caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Germany 2011: A Review. *Front. Public Health* **5**, 332.
 9. Kühbacher, A., Burger-Kentischer, A. and Rupp, S. 2017. Interaction of *Candida* species with the skin. *Microorganisms* **5**, pii: E32.
 10. Kumar, T., Arora, N., Purim, G., Aravinda, K., Dixit, A. and Jatti, D. 2016. Efficacy of ozonized olive oil in the management of oral lesions and conditions: A clinical trial. *Contemp. Clin. Dent.* **7**, 51-54.
 11. Lister, P. D., Wolter, D. J. and Hanson, N. D. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582-610.
 12. Miragaia, M. 2018. Factors contributing to the evolution of mecA-mediated β -lactam resistance in *Staphylococci*: update and new insights from whole genome sequencing (WGS). *Front. Microbiol.* **9**, 2723.
 13. Martinelli, M., Giovannangeli, F., Rotunno, S., Trombetta, C. M. and Montomoli, E. 2017. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. *J. Prev. Med. Hyg.* **58**, E48-E52.
 14. Mayer, F. L., Duncan, W. and Hube, B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**, 119-128.
 15. Montevicchi, M., Dorigo, A., Cricca, M. and Checchi, L. 2013. Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorhexidine digluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test. *New Microbiol.* **36**, 289-302.
 16. Nemeth, J., Oesch, G. and Kuster, S. P. 2015. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemo.* **70**, 382-395.
 17. Nguyen, T. H., Park, M. D. and Otto, M. 2017. Host response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 90.
 18. Ngwenya, N., Ncube, E. J. and Parsons, J. 2013. Recent advances in drinking water disinfection: successes and challenges. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **222**, 111-170.
 19. Pommerville, J. 2016. *Alcama's Microbes and Society*, pp. 238-249. 4th ed., Jones & Bartlett Learning: Burlington, MA, USA.
 20. Rosenblum, J., Ge, C., Bohrerova, Z., Yousef, A. and Lee, J. 2012. Ozonation as a clean technology for fresh produce industry and environment: sanitizer efficiency and wastewater quality. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 837-845.
 21. Russo, A., Concia, E., Cristini, F., De Rosa, F. G., Esposito, S., Menichetti, F., Petrosillo, N., Tumbarello, M., Venditti, M., Viale, P., Viscoli, C. and Bassetti, M. 2016. Current and future trends in antibiotic therapy of acute bacterial skin and skin-structure infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, S27-36.
 22. Sachdeva, S., Raghuvamsi, V., Palur, K., Sudhakar, U. and Thenmalarchelvi, R. 2017. *E. coli* Group 1 capsular polysaccharide exportation nanomachinery as a plausible antivirulence target in the perspective of emerging antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.* **8**, 70.
 23. Saldi, S. 2014. Image-based cytometric analysis of fluorescent viability and vitality staining methods for ale and lager fermentation yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **72**, 253-260.
 24. Sawant, B. and Khan, T. 2017. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. *Biomed. Pharmacother.* **96**, 1478-1490.
 25. Sechi, L. A., Lezcano, I., Nunez, N., Espim, M., Duprè, I., Pinna, A., Molicotti, P., Fadda, G. and Zanetti, S. 2001. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). *J. Appl. Microbiol.* **90**, 279-284.
 26. Smith, N. L., Wilson, A. L., Gandhi, J., Vatsia, S. and Khan, S. A. 2017. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med. Gas. Res.* **7**, 212-219.
 27. Song, J. H. and Joo, E. J. 2010. The crisis of antimicrobial resistance: Current status and future strategies. *J. Kor. Med. Assoc.* **53**, 999-1005.
 28. Terlizzi, M. E., Gribaudo, G. and Maffei, M. E. 2017. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front. Microbiol.* **8**, 1566.
 29. Travagli, V., Zanardi, I., Valacchi, G. and Bocci, V. 2010. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm.* **2010**, 610418.
 30. Wierichs, R. J. and Meyer-Lueckel, H. 2015. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *J. Dent. Res.* **94**, 261-271.
 31. Zahardis, J. and Petrucci, G. A. 2007. The oleic acid-ozone heterogeneous reaction system: products, kinetics, secondary chemistry, and atmospheric implications of a model system - a review. *Atmos. Chem. Phys.* **7**, 1237-1274.

32. Zeng, J. and Lu, J. 2018. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int. Immunopharmacol.* **56**, 235-241.
33. Zhang, Y. Q., Ren, S. X., Li, H. L., Wang, Y. X., Fu, G., Yang, J., Qin, Z. Q., Miao, Y. G., Wang, W. Y., Chen, R. S., Shen, Y., Chen, Z., Yuan, Z. H., Zhao, G. P., Qu, D., Danchin, A. and Wen, Y. M. 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* **49**, 1577-1593.

초록 : 오존화 올리브 오일의 세균과 *Candida albicans*에 대한 항미생물 활성 효과

정경태^{1*} · 김병우²

(¹동의대학교 임상병리학과, ²동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원 센터)

오존은 박테리아, 원생동물, 효모 및 진균과 같은 미생물을 사멸시킬 수 있는 기체 분자이다. 그러나 오존 가스는 대기 중에서 불안정하기 때문에 쉽게 사용할 수 없다. 최근에 오존을 쉽고 효율적으로 사용할 수 있도록 식물성 오일을 활용하는 방법이 개발되었고, 활용성에 대한 연구가 진행되고 있다. 오존은 지방산의 C-C 이중 결합과 반응하여 오존화된 오일로 전환 될 수 있다. 이 반응에서 오존 처리된 오일의 지방산 내에서 오각형 고리 구조 화합물인 오조나이드가 생성된다. 이 연구에서는 올리브 오일을 사용하여 오존 처리된 오일이 4 종류의 세균과 곰팡이에 대해 중요한 항미생물 활성을 갖는다는 가설을 연구하였다. 오존화 올리브 오일을 4 가지 피부 감염 미생물 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 10231) 및 장내 세균인 *Escherichia coli*에 처리하였다. 항미생물 활성은 미국 국립 임상 실험 표준위원회 방법(National Clinical Laboratory Standards, USA)에 따른 disk 확산 방법을 사용하여 분석하였다. 최소억제농도(MIC)는 *S. aureus*에 대해 0.25 mg, *S. epidermidis*에 대해 0.5 mg, *P. aeruginosa*에 대해 3.0 mg 및 *E. coli*에 대해 1.0 mg로 나타나 오존화 올리브 오일은 그람음성균보다 그람양성균에 더 효과적이었다. 또한, *S. aureus*와 MRSA에 대한 항균활성을 비교하였을 때 MRSA에서 오존화된 올리브 오일이 *S. aureus*보다 더 민감하게 작용하였으며, 진균인 *C. albicans*는 한 시간 이내에 사멸되었다. 따라서 본 연구의 결과는 오존화 올리브 오일이 강력한 항미생물 물질로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.