

Antimicrobial Effects of Linalool and α -Terpineol against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Korean

Saeng-Gon Kim^{1†}, Mi-Hwa Choi^{2†}, Soon-Nang Park², and Joong-Ki Kook^{2*}

¹Department of Human Biology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

²Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(received March 25, 2013; revised April 26, 2013; accepted April 29, 2013)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the important causative microbes for nosocomial infection and has been isolated from the dental environment. The purpose of this study was to investigate the antimicrobial activity of linalool and α -terpineol against MRSA isolates from a Korean population. In the experiments, we determined the minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of these two compounds against 18 strains of MRSA. The data revealed that the MIC₉₀/MBC₉₀ values of linalool and α -terpineol against MRSA were >12.8 mg/ml and 6.4 mg/ml, respectively. These results indicate that α -terpineol has more potent antimicrobial activity against MRSA than linalool and may have utility as an anti-MRSA cleansing agent for dental instruments and dental unit chairs.

Key words: α -terpineol, Antimicrobial effect, Linalool, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

[†]These authors contributed equally to this work

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosukdong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea. Tel.: +82-62-230-6877, Fax: +82-62-224-3706, E-mail: jkkook@chosun.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.

서론

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)가 1961년 처음 보고[1]된 이후, MRSA 뿐만 아니라 여러 항생제에 대한 저항성을 갖는 다제내성 *S. aureus*의 출현이 증가하고 있다[2,3]. 이러한 MRSA 균주들은 일반 *S. aureus* 처럼 세균 감염 증상을 보이지 않는 사람의 비강이나 피부에 존재하며, 공기를 따라 전파될 수 있어 원내 감염을 일으킬 수 있다[4]. 실제로 우리나라 3차 병원과 1, 2차 병원 각각에서 분리되는 *S. aureus*의 70% 및 40% 이상이 MRSA라고 보고 되었다[5,6]. 이러한 보고에 의하면 치과 병원의 환경이나 치과 의료인에 MRSA가 오염될 경우 치과 진료를 받은 환자들이 원내 감염에 의해 세균성 심내막염, 패혈증 및 골수염에 이환될 수도 있을 것으로 생각된다. 그러므로 치과 진료 환경이 MRSA에 오염되지 않도록 이에 대한 소독제 개발이 필요할 것으로 생각된다.

일반적으로 항균제로 널리 사용되는 항생제는 내성을 유발하는 단점이 있기 때문에 천연물을 이용한 항균제 개발에 대한 연구가 많이 진행되고 있다[7-9]. 이러한 천연물들 중에서 에센셜 오일(essential oils)은 많은 식물의 잎이나 줄기의 이차 대사산물로 생산되는 향기를 갖는 기화성 물질로 항균능을 갖는 것으로 알려져 있다[10,11]. 특히, oxygenated monoterpenes 계통인 linalool과 monoterpene hydrocarbons 계통인 α -terpineol은 치주질환 원인 균인 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 등과 우식 원인 균인 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* 등

에 대해 항균능이 있음이 보고 되었다[10-13]. 일반적으로 천연물의 항균능을 조사할 때 표적 세균 중의 표준균주나 소수의 균주만을 사용하는 경우가 대부분이다. 하지만, 본 연구자의 선행연구 결과에 의하면, 균주에 따라 항균의 차이가 존재하는 것을 알 수 있었다[14,15]. 그러므로 본 연구는 치과 병원에서 치과 진료 의자(dental unit chair)나 핸드피스 등의 환자 몸과 접촉되지 않은 치과 진료기구 소독에 사용할 항 MRSA 소독제 개발에 linalool과 α -terpineol을 사용할 수 있는지, 적정 농도는 얼마인지를 알아보기 위하여 시행하였다.

재료 및 방법

세균 및 배양조건

본 연구에 사용된 MRSA 균주(KCOM 1588, KCOM 1589, KCOM 1590, KCOM 1591, KCOM 1592, KCOM 1593, KCOM 1594, KCOM 1595, KCOM 1597, KCOM 1598, KCOM 1599, KCOM 1600, KCOM 1601, KCOM 1602, KCOM 1603, KCOM 1604, KCOM 1605 및 KCOM 1606) 들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, KCOM)에서 분양 받아 사용하였다. 이들 세균들은 brain heart infusion (BHI, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 액체배지 및 한천 배지를 이용하여, 37°C 세균배양기에서 1일간 배양한 후 다음 실험에 사용하였다.

Minimum inhibitory concentration (MIC) 및 minimum bactericidal concentration (MBC) 측정

본 연구에서는 oxacillin과 ampicillin의 항생제를 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 linalool과 α -terpineol의 에센셜 오일을 ACROS (NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. MRSA 균주들의 oxacillin에 의한 항생제감수성 여부 및 linalool과 α -terpineol의 항균능을 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [16]에서 제시한 미세희석(micro-dilution) 법을 이용하여 MIC와 MBC 값을 측정하여 알아보았다. 각각의 MRSA 균주들을 BHI 액체배지를 이용하여 37°C 세균배양기에서 24시간 배양한 후, 파장 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 1×10^6 CFU/ml 농도의 세균용액을 96-well plate에 100 μ l씩 분주하였다. 여기에 반응 물질인 oxacillin (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 and 32 μ g/ml), linalool (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 and 12.8 mg/ml)과 α -terpineol (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 and 6.4 mg/ml)은 각각 2배의 농도로 BHI에 희석한 후, 앞에서 준비한 96-well plate에 100 μ l씩 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 세균이 자라지 않는 well의 oxacillin, linalool

과 α -terpineol 농도를 MIC 값으로 판정하였다. 이때 oxacillin은 물에 녹여 0.2 μ m 기공의 필터로 여과하여 사용하였고, linalool과 α -terpineol은 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma)에 희석하여 사용하였다. 음성대조군은 멸균된 물(oxacillin 실험)또는 DMSO (linalool과 α -terpineol 실험)를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였고, 양성대조군은 ampicillin (100 mg/ml)를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하여 세균배양 하였다. MIC 값을 구하기 위해 배양하였던 각 well의 세균배양액을 10 μ l를 취한 후, BHI 한천배지에 도달하고 37°C 세균배양기에서 24 h 배양하여 세균이 자라지 않는 well의 농도를 MBC 값으로 정하였다. 모든 실험은 3번 반복하여 값을 구하였다.

결 과

MRSA 균주들의 linalool과 α -terpineol의 항균능 실험결과 linalool은 한국인 유래 18개 MRSA 균주에 대하여 MIC/MBC 값이 각각 1.6 mg/ml-12.8 mg/ml로 넓은 범위의 값을 보였다. α -terpineol의 경우는 MIC/MBC 값이 0.8 mg/ml-6.4 mg/ml의 범위를 가졌다(Table 1). Linalool과 α -terpineol의 18개 MRSA 균주에 대하여 MBC₉₀ 값이 각각 >12.8 mg/ml 및 6.4 mg/ml의 값을 보여 α -terpineol이 linalool에 비하여 MRSA 균주에 대한 항균효능이 더 강한 것으로 조사되었다(Table 2).

고 찰

본 연구에서 사용한 MRSA 균주들은 MRSA 선택배지 [17]에서 분리하여 VITEX II 장비로 생화학적 방법을 이용하여 동정된 것들이다(data not shown). 또한 methicillin 저항 유전자인 *mecA*를 PCR 법으로 검출하여 그 존재를 확인하였다[18]. 본 연구에서는 이들 MRSA 균주들의 methicillin 저항성을 확인하기 위하여 oxacillin을 이용하여 MIC 및 MBC 값을 구하였다. CLSI에서는 oxacillin 4 μ g/ml 이상의 농도에서 MIC 값을 가질 경우 methicillin에 저항성을 갖는 포도구균(MRSA)으로 정의하였다. 연구 결과 본 연구에서 사용한 모든 균주들이 모두 32 μ g/ml 농도가 초과된 MIC 값을 가져 모두 MRSA인 것으로 판정되었다. 다만, 선행연구[18]에서 MRSA라고 생각되었던 *S. aureus* KCOM 1596 균주는 oxacillin 2 μ g/ml 농도에서 MIC 값을 보여 MRSA가 아닌 것으로 판단된다(data not shown). 이러한 이유는 현재로써는 명확하지 않지만, 이 균주의 *mecA* 유전자(penicillin에 대한 결합력이 떨어지는 penicillin-binding protein)에 돌연변이가 생겨 penicillin에 대

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of oxacillin, linalool, and α -terpineol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Species and strains	Oxacillin	Linalool	α -terpineol
	MIC (μ g/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)
<i>S. aureus</i> KCOM 1588	>32	3.2/6.4	1.6/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1589	>32	3.2/3.2	0.8/0.8
<i>S. aureus</i> KCOM 1590	>32	3.2/3.2	1.6/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1591	>32	3.2/3.2	0.8/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1592	>32	>12.8/>12.8	1.6/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1593	>32	1.6/1.6	1.6/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1594	>32	3.2/6.4	1.6/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1595	>32	3.2/3.2	1.6/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1597	>32	>12.8/>12.8	3.2/3.2
<i>S. aureus</i> KCOM 1598	>32	6.4/6.4	1.6/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1599	>32	>12.8/>12.8	3.2/3.2
<i>S. aureus</i> KCOM 1600	>32	6.4/6.4	1.6/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1601	>32	3.2/3.2	1.6/3.2
<i>S. aureus</i> KCOM 1602	>32	6.4/12.8	3.2/3.2
<i>S. aureus</i> KCOM 1603	>32	6.4/6.4	3.2/3.2
<i>S. aureus</i> KCOM 1604	>32	6.4/6.4	1.6/1.6
<i>S. aureus</i> KCOM 1605	>32	>12.8/>12.8	6.4/6.4
<i>S. aureus</i> KCOM 1606	>32	6.4/6.4	6.4/6.4

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology

Table 2. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from Koreans

	Linalool (mg/ml)		α -terpineol (mg/ml)	
	MIC ₅₀ / MBC ₅₀	MIC ₉₀ / MBC ₉₀	MIC ₅₀ / MBC ₅₀	MIC ₉₀ / MBC ₉₀
MRSA (n=19)	6.4	>12.8	1.6	6.4

MIC₅₀ and MIC₉₀: the minimum inhibitory concentration needed to inhibit the growth of 50% and 90% of MRSA strains, respectively.

MBC₅₀ and MBC₉₀: the minimum bactericidal concentration needed to kill 50% and 90% of MRSA strains, respectively.

한 결합력이 회복되었기 때문일 것으로 생각된다. 하지만 이에 대한 기전은 추후 연구에서 밝혀야 할 것으로 생각된다.

에센셜 오일은 세균의 세포벽을 파괴, 세균 효소의 활성을 억제하거나, 특정 유전자 조절유전자의 단백질 발현을 억제하여 항세균 작용을 갖는 것으로 알려져 있다[19-21]. 그러므로, linalool과 α -terpineol들도 MRSA에 대해 이와 비슷한 기전으로 항세균 효능을 갖는 것으로 생각된다. 선행 연구에서 사람유래 KB 세포주에 대한 세포독성실험 결과 linalool과 α -terpineol은 0.8 mg/ml 이상의 농도에서 99.8%

세포가 사멸하는 것으로 보고되었다[13]. 그러므로 이들을 인체에 직접 사용하기는 어려울 것으로 생각된다. MRSA가 일반병원 및 치과병원 내 오염된 공기나 진료 장비를 통하여 환자들에게 감염될 수 있다[22]는 점을 고려한다면, 스프레이 형태의 소독제 개발에 이용될 수 있을 것이다. 즉, 치과 진료 의자(dental unit chair)나 핸드피스 등의 환자 몸과 접촉되지 않은 치과 진료기구 소독에 α -terpineol이 들어 있는 소독제를 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 연구결과를 종합하면, MRSA에 대한 linalool과 α -terpineol의 MIC₉₀/MBC₉₀ 값은 각각 >12.8 mg/ml과 6.4 mg/ml로 α -terpineol이 linalool보다 MRSA에 대한 항균 효과가 더 뛰어난 것을 알 수 있었다. 그러므로, α -terpineol은 6.4 mg/ml 이상의 농도에서 치과 도구 및 치과진료의자 등의 소독을 위한 항 MRSA 소독제 개발에 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

참고문헌

- Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol.* 1961;14:385-393.
- Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 2010;15:19688.
- Kreisel KM, Johnson JK, Stine OC, Shardell MD, Perencevich EN, Lesse AJ, Gordin FM, Climo MW, Roghmann MC. Illicit drug use and risk for USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections with bacteremia. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1419-1427.
- Kundsinn RB. Documentation of airborne infection during surgery. *Ann N Y Acad Sci.* 1980;353: 255-261.
- Chong Y, Lee K. Present situation of antimicrobial resistance in Korea. *J Infect Chemother.* 2000;6:189-195.
- Kim HB, Sa CM, Yoo J, Kim BS, Yun OJ, Yoon HR, Lee YS. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from the patients admitted to non-tertiary hospitals. *Korean J Infect Dis.* 2000;32:259-263.
- Kim MJ, Kim CS, Park JY, Lim YK, Park SN, Ahn SJ, Jin DC, Kim TH, Kook JK. Antimicrobial Effects of Ursolic Acid against Mutans Streptococci Isolated from Koreans. *Int J Oral Biol.* 2011;36(1):7-11.
- Ahn SJ, Cho EJ, Kim HJ, Park SN, Lim YK, Kook JK. The antimicrobial effects of deglycyrrhizinated licorice root extract on *Streptococcus mutans* UA159 in both planktonic and biofilm cultures. *Anaerobe.* 2012;18:590-596.
- Kim CS, Park SN, Ahn SJ, Seo YW, Lee YJ, Lim YK, Freire MO, Cho E, Kook JK. Antimicrobial effect of sophoraflavanone G isolated from *Sophora flavescens* against mutans streptococci. *Anaerobe.* 2013;19:17-21.
- Cha JD, Jung EK, Kil BS, Lee KY. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Artemisia feddei*. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17:2061-2065.
- Baik JS, Kim SS, Lee JA, Oh TH, Kim JY, Lee NH, Hyun CG. Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic citrus species. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18:74-79.
- Gopanraj G, Dan M, Shiburaj S, Sethuraman MG, George V. Chemical composition and antibacterial activity of the rhizome oil of *Hedychium larsenii*. *Acta Pharm.* 2005;55: 315-320.
- Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe.* 2012; 18:369-372.
- Lee ES, Ahn TY, Yoon JJ, Kook JK, Lee BR, Kim DK. Restraint effect on leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Casia tora* against periodontopathogens. *J Korean Acad Dent Health.* 2003;27:569-579.
- Lim SH, Seo JS, Yoon YJ, Kim KW, Yoo SY, Kim HS, Kook JK, Lee BR, Cha JH, Park JY. Effect of leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *casia tora* on viability of mutans Streptococci isolated from the interface between orthodontic brackets and tooth surfaces. *Korean J Orthod.* 2003;33:381-389.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. CLSI document M7-A6. Wayne Pennsylvania USA. 2005.
- Winstanley TG, Eggington R, Spencer RC. Selective medium for MRSA. *J Clin Pathol.* 1993;46:1140.
- Kim SC, Kim MJ, Jin D, Park SN, Cho E, Freire MO, Jang SJ, Park YJ, Kook JK. Antimicrobial effects of ursolic acid and oleanolic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J Microbiol.* 2012;48:212-215.
- Kubert D, Rubin M, Barnett ML, Vincent JW. Antiseptic mouthrinse-induced microbial cell surface alterations. *Am J Dent.* 1993;6:277-279.
- Fine DH. Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent.* 1998;1:259-263.
- Qiu J, Zhang X, Luo M, Li H, Dong J, Wang J, Leng B, Wang X, Feng H, Ren W, Deng X. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2011;6:e16160.
- Han SH, Song IS, Lee MJ, Jeong SI, Kim SM, Kim KJ. Pattern of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dental and Medical Environments. *Int J Oral Biol.* 2010; 35:185-190.