

물성 분석을 통한 Valine 의 여드름균 바이오필름 내부 세균막 형성 억제 연구

송상훈·황병우·손성길·강내규[†]

LG생활건강 기술연구원

(2021년 4월 7일 접수, 2021년 6월 17일 수정, 2021년 6월 25일 채택)

A Study on Inhibition of Bacterial Membrane Formation in Biofilm formed by Acne Bacteria in Valine through Property Analysis

Sang-Hun Song, Byung Woo Hwang, Seongkil Son, and Nae-Gyu Kang[†]

E10 LG Science Park, LG Household & Health Care, 70 Magog Jungang 10ro, Seoul, Korea, 07795

(Received April 7, 2021; Revised June 17, 2021; Accepted June 25, 2021)

요약: 본 연구는 인체 친화적인 소재로 여드름균을 제거하는 기술을 만들기 위해서 진행하였다. 먼저 여드름균을 운모 디스크에 흡착시켜 생장시킨 후 원자현미경을 통해 바이오필름이 제대로 성장하였는지를 확인하였다. 이미지 상으로 형태가 둥글게 변하였고 사이즈도 평균 17% 정도 길어졌으며 물질을 구분하는 공명주파수의 위상 값이 단일값으로 관찰된 것을 볼 때 세균막이 운모디스크 전체를 덮어서 자란 바이오필름을 확인할 수 있었다. 이렇게 바이오필름을 생성시킨 여드름균에 여러 가지 아미노산 50 mM을 각각 처리하여 관찰한 결과 valine, serine, arginine, leucine을 처리하였을 때 여드름균의 농도가 감소한 것을 발견하였다. 나노인덴터와 AFM 컨택모드로 스캔을 한 결과 valine (Val)을 처리한 여드름균 바이오필름의 강도가 증가해 있는 것을 확인하였다. 이것은 균을 보호하는 외곽의 세균막이 형성 억제됨으로써 세균막보다 더 높은 강도일 수 있는 균을 측정했기 때문일 수 있다. 여드름균과 Val을 처리한 여드름균에 균과 바이오필름 내부의 세균막을 볼 수 있는 형광물질을 각각 태깅하고 형광 이미지를 관찰한 결과 저농도 Val을 처리한 여드름균에서는 세균막이 관찰되었으나 10 mM 이상의 Val을 처리할 때부터 여드름균의 세균막이 형성 억제됨을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 Val 10 mM 이상의 농도에서는 여드름균 전체의 농도도 감소하는 것을 알 수 있었다. 즉, 세균막이 형성 억제됨으로써 약화된 여드름균의 결합력에 의해서 여드름 균의 농도가 감소한 것으로 볼 수 있다. 마침내 Val의 투입은 세균막 생성을 억제함으로써 여드름균을 제거하는 효능이 있음을 확인하였다.

Abstract: This study was conducted to create a technology to remove acne bacteria with human-friendly materials. First, the *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) were adsorbed to the mica disc to grow, and then the biofilm was checked through an atomic microscope to see if the biofilm had grown. Based on the topographic image, the shape changed round, the size was 17% longer on average, and the phase value of the resonance frequency separating materials was observed as a single value, the biofilm grown by covering the extracellular polymeric substrate (EPS). As a result of processing 50 mM of amino acids in the matured biofilm, the concentration of *C. acnes* decreased when valine, serine, arginine and leucine were treated. Scanning with nanoindentation and AFM contact modes confirmed that the hardness of biofilms treated with Valine (Val) increased. This indicates that an AFM tip measured cell which may have more solidity than that of EPS. The experiment of fluorescent tagged to EPS displays an existence of EPS at the condition of 10 mM Val, but

[†] 주 저자 (e-mail: ngkang@lghnh.com)
call: 02-6980-1533

an inhibition of growth of EPS at the 50 mM Val. Number of *C. acnes* was also reduced above 10 mM of Val. Weak adhesion of biofilm generated from an inhibition of EPS formation seems to induce decrease of *C. acnes*. Accordingly, we elucidated that Val has an efficiency which eliminates *C. acnes* by approach of an inhibition of EPS.

Keywords: biofilm, acnes, eps, afm, val

1. 서 론

피지는 두피나 피부 표면에 존재하면서 피부 장벽의 유수분 균형을 이루게 하여 조직 내부의 수분량을 보호하는 역할을 하지만 공급하고 답답한 느낌을 주는 단점이 있다. 더 큰 문제는 두피나 피부에서 발생하는 병리학적인 문제와 연관이 있다는 것이 알려져 있는데 이 현상은 여드름균(*Cutibacterium acnes*, *C. acnes*)과 관련이 있다. 알려진 바로 피부의 여드름균은 피지 분비에 직접적인 관여를 한다[1]. 역으로 피지가 많은 피부에서 여드름균이 많이 발견된다[2,3]. 피지는 두피 모낭 안에 자리 잡으면 탈모를 촉진함도 알려져 있다[4]. 아울러 탈모 증상을 보이는 두피에게서 여드름균이 많이 나오는 연구도 있다[5,6]. 이와 같이 생성량과 병리학적 현상을 볼 때 피지와 여드름균은 어느 한쪽만 유발원이라고 표적하기는 힘들 정도라서 여기서 발생하는 문제를 해결하기 위해 한쪽만 공략하는데는 한계가 있을 수 있다.

전통적으로 피지와 균이 일으키는 불편함과 병리학적인 문제를 해결하기 위해서 피지를 세정제로 제거하거나 균을 항균제로 제거하는 방법이 행해져왔는데 이런 방법은 인체 자극을 불러일으키는 한계를 가진다. 무엇보다도 물리적인 큰 자극을 공급하지 않으면 균을 제거하는 것이 어렵는데, 최근 균이 생성하는 바이오필름을 제거해야 할 필요성이 대두되고 있다[7].

미생물은 그들의 외부 환경으로부터 보호하는 바이오필름을 형성시킨다. 바이오필름은 균과 그 균을 에워싸는 폴리머로 이루어진 세균막(extracellular polymeric substrate, EPS)으로 이루어져 있는데 이 세균막은 외부 이물질의 침투를 막음으로써 세포 밖의 환경 속에서 문제없이 균이 생물학적으로 번성하고 유지될 수 있는 역할을 한다[8]. 바이오필름 세균막은 82.2%의 다당류(polysaccharide)와 12.6%의 단백질과 나머지 5.2%의 DNA로 이루어져 있다[9].

바이오필름은 균으로 하여금 항생물질에 대응해서 1,000 배 더 큰 저항력을 가지게 한다[10]. 세균막은 점착력을 가지고 있으며 표면에 부착되어 있는 상태의 균을 떨어트리려는 물리적인 힘으로부터 계속해서 표면에 부착될 수 있

게 하여 균의 성장을 보호하는 역할을 한다[11]. 바이오필름은 음식과 물과 닿는 산업재 또는 생활 공간과 의료용 기기까지 많은 곳에서 자라난다[12]. 특별히 바이오필름은 인체 건강에 위협을 주는데 여러 가지 감염과, 코균염, 분비성중이염, 담지증 등 많은 문제를 일으킨다[13-15].

바이오필름의 성장단계는 4가지로 이루어져있는데 표면에 흡착해서(adhesion), 콜로니를 형성하고(microcolony), 다음 성장하고(maturation), 흩어지는 분산(dispersion) 단계로 나뉘어 성장한다[16]. 바이오필름을 구성하는 세균막을 제거하는 것은 강한 물리력을 동반하지 않는 한 매우 힘들며 그렇다고 강한 화학 용제를 쓰는 것은 인체와 자연에 유해성을 가지는 한계가 있다. 다만, 바이오필름이 흩어져서 다음 공간으로 확장하는 단계에서 세포 내 valine (Val)의 분비가 증가한다는 것이 밝혀졌다[17]. 본 연구에서는 바이오필름 성장단계 마지막 단계인 분산 단계를 자발적으로 유도하기 위해서 Val을 인위적으로 주입해보았고, 이것이 실제 바이오필름 제거 또는 생성 억제에 영향을 미치는지 바이오필름 물성 추적을 통해서 확인하였다. 아울러 바이오필름 물성 측정을 통해 분산 단계에서 바이오필름에 어떤 현상이 일어나는지 이해해 보았다.

바이오필름을 이해하는 연구는 전통적인 세포 생물학적인 틀로 행해져왔으나 물리화학적 방법이 분석에 도입됨으로써 바이오필름의 물성을 이해하는데 큰 발전이 일어났다. Atomic force microscopy (AFM)을 이용해서 여드름균의 크기 변화를 관찰함으로써 균의 손상 정도를 파악하는 방법이 도입되었다[18]. *Streptococcus mutans* 균에 처리한 공용용매가 일으키는 바이오필름 손상도를 나노인텐터의 점착력 변화로 확인할 수도 있었다[19]. Fast atom bombardment를 통해서 바이오필름의 구조 변화를 확인할 수 있었고[20], 시뮬레이션을 통해서 유체 속도에 따른 바이오필름의 형태 변화 및 거동 패턴을 확인하였다[21].

본 연구에서는 여드름균을 성장시키고 바닥에서 바이오필름을 성장시킨 것을 AFM을 이용해서 경도 변화를 측정하였다. Val이 일으키는 바이오필름의 물성변화를 AFM으로 관찰하고 나노인텐터 모드로 측정하여 실제 여드름균이 자발적으로 분산되는지 확인함으로써 새로운 친환경

바이오필름 제거제를 개발할 수 있는 발판을 마련하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 여드름균과 바이오필름 배양

여드름균(strains RT1, KCTC 3314(=ATCC6919) DPDY, 생물자원센터, Korea)을 OD 1.3까지 배양하고 5 min 간 5,000 g로 원심분리 하였다. 증류수 1.5 mL를 펠레이트에 넣고 vortex 교반한 후 다시 5,000 g로 5 min 간 원심분리 하였다. 증류수로 희석하여 현미경으로 관찰시 세포가 적층되지 않고 날개로 보일 수 있을 때까지 희석하였는데 1,000 배가 가장 적당하였다. 패트리디쉬에 운모 디스크(TedPella Inc., US)를 바닥에 두고 희석액 20 μ L를 붓고 드라이기 냉풍을 이용해 건조하여 세포가 바닥에 부착되지 않고 떠다니는 부유(planktonic) 상태로 만들었다. 이 부유 상태에서 세포는 바이오필름을 만들 수가 없고 세포로 존재하게 된다.

바이오필름이 자랄 수 있게끔 세포를 부착(sessile) 상태로 만들기 위해서 위에서 만든 용액을 운모 디스크가 있는 직경 6 cm 패트리디쉬(에스피엘, Korea)에 붓고 12 h 동안 혐기성(anaerobic state) 팩(BBL GasPak Anaerobic system envelopes, US)에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 그 후 운모 디스크를 증류수에 한번 담궜다가 빼서 행균 후, 휴지로 운모 디스크 위에 있는 물을 흡수시키고 자연건조 시켰다.

아미노산 처리를 할 때는 증류수로 조심해서 세정한 배양 필름에 AFM 측정용 샘플은 1 mL만큼을, 염색의 경우는 100 μ L만큼의 아미노산 용해액을 각각 2 h 동안 처리하였으며, 추가 세정을 2 회 더 실시하였다.

2.2. 원자현미경 측정

AFM은 XE-100 모델로 Parksystems (Korea) 제품을 사용하였다. 모든 이미지는 태핑모드로 진행되었고 scan rate은 1 Hz로 하였다. 나노인텐터를 위한 force-distance 모드는 태핑모드로 이미지를 측정할 후 측정할 타겟 포인트를 발견한 후 수행하였고 4×10^{-5} μ m/ms로 샘플에 주입하였다. 실리콘 프로브는 용수철 평형(spring) 상수가 0.6 N/m로 낮은 NSC36C (MakroMasch, Germany) 것을 사용하였고, 스캔 크기는 3 μ m에서 22 μ m까지 설정해서 찍었다. Drive amplitude는 60 mV로 했고, 바이오필름을 누르는 힘(initial amplitude setpoint)은 1.0 V로 고정해서 측정하였다. 세균막

과 세포간 값을 유지하기 위해서 AFM head와 tip은 수중용 스캔 측정 장치(liquid probehead, Parksystems, Korea)를 부착시켜 찍었다.

2.3. 형광 측정

형광 염료는 바이오필름을 배양하는 액에 배양하기 시작할 때 미리 0.01% 농도로 첨가하여 바이오필름과 태깅 시켰다[22]. 크리스털 바이올렛(crystal violet)은 세포 배양액에 0.01% 농도로 넣고 마이크로 플레이트(Coming, USA)를 사용하여 OD 600까지 배양시킨 후 마이크로 플레이트용 형광 분광측정기(Varioskan LUX, Thermo scientific, USA)로 진행하였다.

바이오필름의 세균막과 균 측정은 전문 형광 분광측정기(Evos FL Auto 2 Imaging System, Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용해서 세균막과 균의 분포를 측정하였다. 기기에 부착된 카메라로 이미지를 저장하였고 Celleste Image Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용해서 이미지들 간의 밝기 상수를 일치화시켜 동등한 조건에서 밝기를 비교하였다.

2.4. 물질

Sodium dichloroisocyanurate (SDIC)는 LG생활건강(Korea)에서 합성한 것이다. 크리스털 바이올렛과 A concanavalin A Alex 633, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)는 Sigma-Aldrich (USA)를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 모든 아미노산 들- Asp, Ser, Ala, His, Arg, Lys, Val, Glu, Orn, Thr, Gln, Met, Asn, Trp, Tyr, Cys, Ile, Phe, Leu은 모두 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다.

3. 결과 및 고찰

Figure 1A 왼쪽에서와 같이 여드름균의 부유 상태를 운석 디스크 위에 붓고 AFM으로 표면을 관찰하였다. 여드름균과 대장균을 AFM으로 관찰하면 바닥 위에 둥그렇게 세로가 긴 형태로 솟아있는 형태를 관찰할 수 있다[18,23]. Figure 1에서의 이미지가 이것들과 비슷한 모양이기 때문에 해당 형태를 여드름균으로 추정할 수 있다. 이것이 바닥과 다른 재질임을 관찰하기 위해 AFM의 위상을 확인한 결과 Figure 1A 오른쪽과 같이 60 $^{\circ}$ 정도로 다른 진동수를 확인하였고 이것은 바닥이 운석이고 중간에 솟아있는 형태가 여드름균임을 예상할 수 있다.

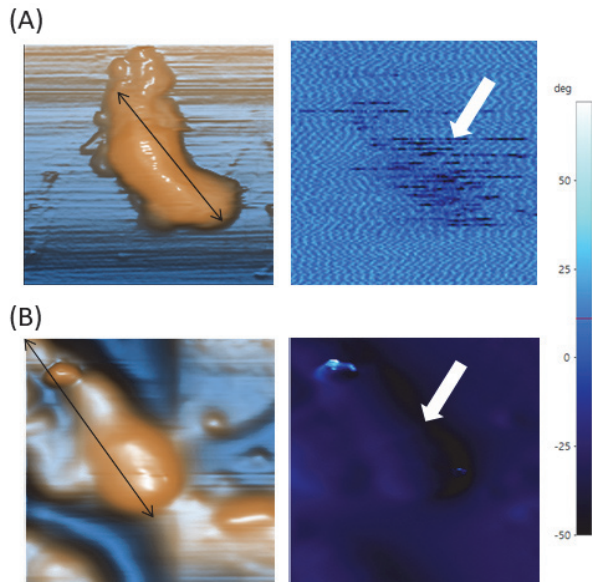


Figure 1. The unique structure of *C. acnes* produced by planktonic (A) and sessile cells (B) of *C. acnes*. (left) topography of *C. acnes* produced by tapping mode ($3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$) (right) phase map upon the image of topography. Arrow indicates the structure corresponds to the image of *C. acnes* cell.

동일한 여드름균을 12 h 동안 운석 디스크 위에 두고 37° 에서 배양한 후 이것을 AFM으로 측정하니 Figure 1B와 같이 바닥과 솟아있는 부분의 경계가 분명하지 않고 매끈한 것을 확인할 수 있었다. 이것의 위상을 평가해보니 오른쪽과 같이 모두 5° 이내의 위상을 보임으로써 전체가 하나의 재질로 평가되었다. 이것은 바이오필름이 성장되어 세균막이 전체 운석 디스크를 덮고 있음을 뜻한다.

구체적으로 이 형태가 전체적인 크기에 변화가 일어났는지 살펴보기 위해서 Figure 2A와 같이 AFM으로 측면에서 찍은 높이에서 제일 바닥 경계의 길이를 기준으로 양단에서 재어서 기록한 결과 Figure 2B와 같은 길이 변화를 확인할 수 있었다. 부유상태에서는 평균 $1.57 \mu\text{m} (\pm 0.1)$ 의 길이를 보인 반면, 부착상태에서는 $1.85 \mu\text{m} (\pm 0.2)$ 의 길이 증가를 보였다. 이 길이 차이는 부착상태에서 세균막이 자라나서 전체 길이가 증가됨을 반증한다.

즉, 부착상태에서 12 h 동안 배양시킨 여드름균은 형태 변화 및 길이 증가와 진동수 측정 결과들을 볼 때 바이오필름 세균막이 제대로 자라났다고 볼 수 있다. 본 실험에서는 이 조건을 통해서 만든 바이오필름을 가지고 바이오필름 제거 실험을 진행하였다.

D-leucine, D-methionine, D-tyrosine, D-tryptophan이 *Bacillus*

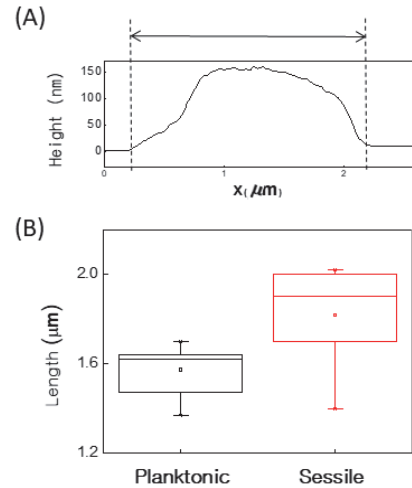


Figure 2. Size of cell without and with biofilm from planktonic and sessile state, respectively. (A) Topographic height of *C. acnes*, (B) Box chart upon the estimated size of *C. acnes* ($N = 13$).

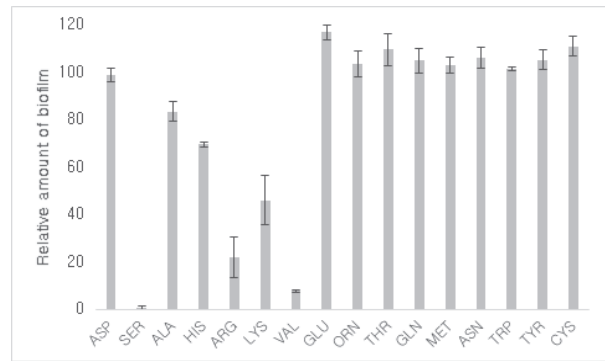


Figure 3. Removal of biofilm by crystal violet. Various amino acids were added to the matured biofilm of *C. acnes* ($N = 3$). Cell was exposed in the solution of 50 mM of amino acids for 2 h.

subtilis 균의 바이오필름에 작용하면 바이오필름과 세포간의 아밀로이드 섬유를 완화시켜 바이오필름의 형성을 억제하는 효능이 있음이 밝혀졌다[24]. 이 효과를 관찰하기 위해서 여드름균에 Figure 3과 같이 여러 가지 아미노산 50 mM을 넣어서 2 h 동안 작용시킨 후 크리스털 바이올렛으로 염색한 후 흡광도를 이용해서 개체수를 확인하였다.

그 결과 serine, argine, valine (Val), leucine에서 팔목할 만한 60% 이상의 여드름균 제거 효율을 관찰할 수 있었다. 위에서 언급하였듯이 바이오필름은 Val의 분비를 촉진시켜 분산작용을 일으키는 신호를 받게 되는데 Val을 받아들인 여드름균의 바이오필름이 자발적으로 탈착을 일으켜서 개체수를 감소시킨 것 같다는 가설을 세우게 되었다. 그런

데 이 과정에서 바이오필름에 어떤 변화가 생겨서 탈착이 일어나는지 알아보기 위해서 AFM을 이용해서 경도를 측정해보았다.

아미노산의 투입이 바이오필름에 어떤 변화를 주는지 관찰하기 위해서 AFM 나노인덴터 모드를 이용해 경도 변화를 관찰하였다. 아미노산에 노출시킨 세포를 배양 2 h 후에 측정하였다. 수직방향으로 팁을 입사시키면서 걸리는 힘을 측정함으로써 바이오필름의 경도를 측정하였다. Figure 4A에서와 같이 먼저 표면을 스캔 한 후 세포의 가장 높은 위치에 해당하는 부분에 팁을 이동시킨 후 수직으로 500 nm 입사하여 걸리는 힘을 Figure 4B와 같이 측정하였다. 화살표 방향으로 팁이 이동할 때 걸리는 힘은 점선 왼쪽 구역에서 기울기, 즉 팁에 걸리는 힘을 이동거리로 나눈 값이다.

표백제(sodium dichloroisocyanurate)를 투입한 경우에 기울기가 가장 낮았는데 구조가 용해되어 녹아서인지 경도가 현격히 약화되었다는 것을 관찰할 수 있었다. Cysteine, serine, methionine 같은 경우는 기울기에 큰 변화가 없었다.

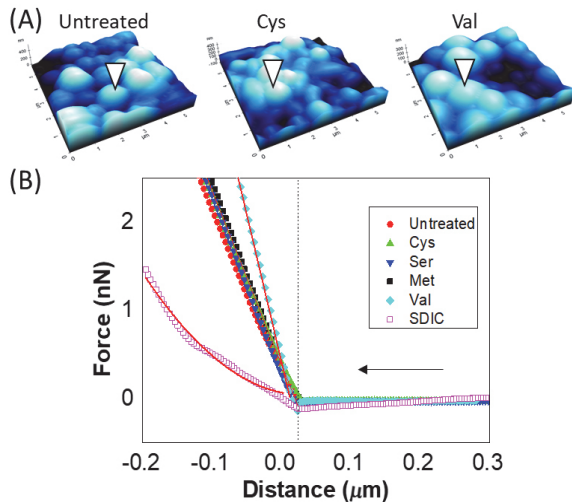


Figure 4. Hardness change of biofilm treated with various amino acids and sodium dichloroisocyanurate (SDIC). (A) Topographic images of biofilm treated with 50 mM of Cys, and 50 mM of Val. Triangle indicates a position performed by nanoindentation. (B) Force-distance curves obtained from the AFM indentation experiments. The force curves at the region up to approximately 2 nN of cell surface indentation was fitted by Hertz model. Arrow indicates a direction of injection. Dash line indicates a location of interface between cell and ambient air. Arrow is a direction of tip injection.

Serine의 경우에는 Figure 3에서 바이오필름 개체수를 감소시킨 것으로 볼 때 바이오필름의 형성을 억제하는 효능이 있는 것으로 평가되었음에도 불구하고 다른 아미노산을 처리한 바이오필름과 비교해 볼 때 경도 변화는 관찰되지 않았다. 이에 비해서 Val의 경우에는 기울기가 가장 높게 관찰되었고 이는 경도가 가장 커졌음을 의미한다.

다른 아미노산에 비해서 경도 변화가 일어난 것은 구조적인 변화가 일어났다고 유추할 수 있다. 여드름균의 세균막 경도는 알려지지 않았기 때문에 경도가 커진 것이 어떤 변화를 뜻하는지 유추하기는 힘들다. 이 부분을 조금 더 관찰해보기 위해서 여드름균을 물리적으로 접촉해보는 추가 실험을 진행하였다.

Val이 여드름균의 바이오필름에 투입되었을 경우 바이오필름에 어떤 물성 변화를 일으키는지 관찰하기 위해서 AFM의 팁이 스캔할 때 일어난 바이오필름의 변화를 관찰해 보았다. 우선 Figure 5에서와 같이 AFM의 캔터리버를 가지고 가로방향으로 스캔할 때 이미지가 어떻게 변했는지 알아보았다. Figure의 왼쪽 이미지들은 태핑모드로 스캔한 것으로 샘플과 거리확보를 통해 캔터리버의 진동을 통한 공명주파수로 측정을 한 것인데 반해서, 오른쪽은 컨택모드로 캔터리버의 팁이 바이오필름 표면에 매우 근접하여 스캔을 진행한 이미지들이다.

스캔 과정에서 마이크론 단위의 단차가 발생되면 팁 부

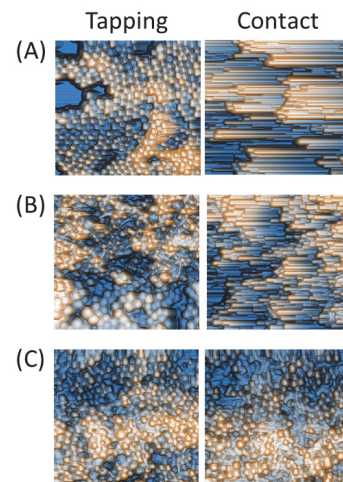


Figure 5. Tapping mode (right) and contact mode (left) images of the same piece of biofilm (22 μm x 22 μm). The z-scale is 0 (blue) to 100 nm (light). Both images were obtained a scan rate of 0.2 Hz with the contact force minimized prior to imaging. Control (A), topography of cell treated with Cys (B) and Val (C).

분이 표면에 접촉을 하게 된다. 이때 표면이 강하지 않고 생체물질처럼 무른 연성을 가진 것은 팁에 닿일때 표면 형체가 손상된다. 팁을 왼쪽에서 오른쪽으로 진행하면 연성이 높은 물질이 컨택 모드에서 옆으로 밀리게 되는 현상은 AFM 측정 과정에서 발생하는 흔한 표면 손상이다.

실험을 한 결과 Figure 5B와 같이 아무 것도 처리하지 않은 여드름균의 바이오필름과 Cystein을 처리한 바이오필름은 컨택모드(오른쪽) 이미지들에서 옆으로 강하게 표면이 붕괴되는 현상이 관찰되었다. 이런 이유로 일반적으로 생체 표면에서는 AFM을 팁의 손상과 샘플 표면의 보호를 위해서 태핑 또는 비접촉 모드로 측정하는 것이 일반적이다.

흥미롭게도 Val을 처리한 바이오필름은 컨택 모드에서 표면에 아무런 손상 없이 측정이 되었다. 이것은 Val이 들어감으로써 바이오필름이 팁에 손상받지 않을 정도로 여드름균의 힘이 증가되어 있음을 뜻한다. 이것은 Val을 처리한 후 여드름균 바이오필름 구조에 어떤 변화가 일어났으로써 경도가 변화하였음을 의미한다. 아미노산과 세균막을 이루는 다당류간 화학반응이 일어나서 결합력 증가에 의해 강도가 증가 되었을 수도 있는데 특별히 Val이 결합력을 올릴 정도의 에너지를 가지고 있지는 않을 것이기 때문에 이 가능성은 희박하다. 바이오필름의 구조 변화에서 강도 증가의 원인을 생각해 볼 수 있는데 세균막의 형성이 억제되면서 강도가 증가한 것이 아닌지 생각해 볼 수 있다. 즉, Val의 첨가가 세균막의 형성을 억제하였고 AFM tip이 세균막이 아닌 균의 강도를 측정함으로써 강도가 증가된 것으로 이해할 수 있다. 그런데 이 가설은 세균막의 강도가 균의 강도보다 더 낮다는 것을 전제로 하기 때문에 이 가설을 확인하기 위해서는 여드름균에 있어서 세균막과 균의 강도를 측정하는 실험 검증이 필요하다.

Val이 여드름균의 바이오필름 세균막의 형성을 억제하였는지 확인하기 위해서 여드름균의 바이오필름을 형광처리 하였다. 형광 염료 concanavalin A 647는 polysaccharide와 결합하기 때문에 외곽의 세균막을 검출할 수 있고 DAPI는 DNA와 결합하기 때문에 균의 분포를 알 수 있다 [22]. 따라서 Figure 6에서 파란색은 DAPI의 분포 즉, 여드름균을 의미하고 빨간색은 concanavalin A 647이 내는 세균막을 의미한다.

Figure 6A에서 Cys 50 mM을 넣었을 때, 중앙에 여드름균이 밝게 빛나는 것을 알 수 있는데 왼쪽과 오른쪽에서 동일 부위에 파란색과 빨간색이 빛나는 것으로 봐서 Cys을 투입하면 균과 세균막이 모두 존재함을 알 수 있다. Val

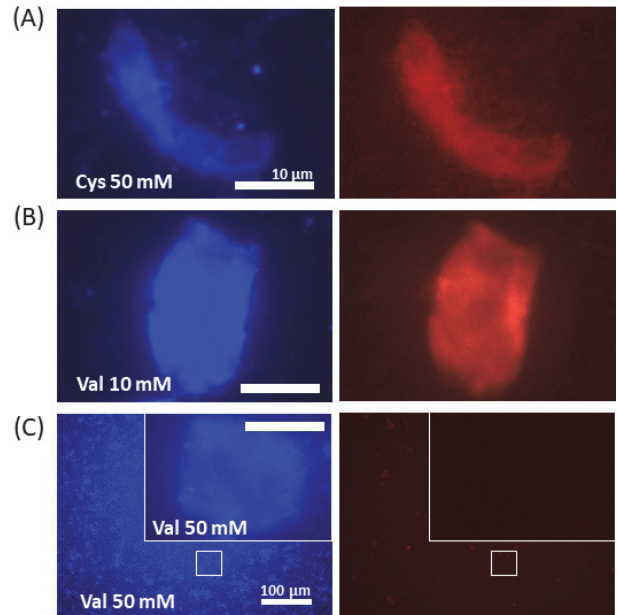


Figure 6. Fluorescence spectral images of biofilm for *C. acnes* treated with amino acids. DAPI tagged *C. acnes* represents cell of *C. acnes* at Ex/Em 357/447 nm and it emits blue color. The fluorescence of EPS was detected in the red emission with concanavalin A 647 (Ex/Em 628/685 nm, right). Scale bars: 10 μm (up), 100 μm (bottom). *C. acnes* were exposed in the solution of 50 mM Cys (A), 10 mM Val (B), and 50 mM Val (C). Inset: enlargement of the area marked by square.

을 10 mM만 넣은 Figure 6B에서도 균과 세균막이 모두 존재하는 것을 볼 수 있다.

놀랍게도 Val의 농도가 높아지는 50 mM을 넣은 환경에서는 균은 존재하지만 세균막이 사라진 것을 알 수 있다. 즉, Val의 양이 많아지면 원래 존재하던 세균막의 형성이 억제된다는 것을 알 수가 있다.

Val의 농도가 증가하면 세균막의 형성 억제 효능이 증가되는 것을 바탕으로 농도 증가가 균의 전체 개체수에 영향을 미치는지 알아보았다. Figure 7에서 다양한 Val의 농도 상태에서 여드름균 개체수 변화를 크리스털 바이올렛을 이용해서 살펴보았다. 실제로 Val의 양이 10 mM까지 증가할때는 여드름균의 개체수에 영향을 주지 않았으나 그보다 더 높은 농도에서는 개체수가 줄어드는 것을 관찰할 수가 있었다.

Figure 6에서 Val이 침투하면 세균막의 형성이 억제됨을 알 수 있었는데 이것이 구조적인 변화를 일으켜서 Figure 7에서와 같이 여드름균의 개체수 감소를 일으킨 것으로 보

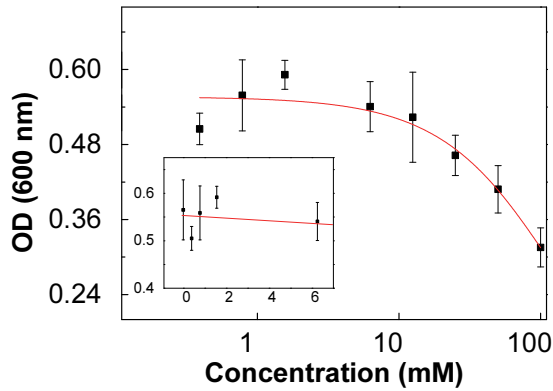


Figure 7. Absorbance for crystal violet stained biofilm of *C. acnes* at the various concentrations of valine. Data represent crystal violet stained adherent biofilm cells at wells of microtiter plates in the presence of valine. Red line curves represent the reduction of biofilm (OD at 600 nm) in the culture media. Inset: alteration of amount of cell at low concentration of valine. Val was penetrated into cell for 2 h.

인다. Val이 저농도에서는 세균막의 형성 억제 효과가 없었는데 이때는 여드름균 개체수에도 전혀 변화가 없었다. 이것은 Val의 세균막의 형성이 억제와 여드름균 제거가 연관 관계가 있음을 말하고 있다.

세균막이 없으면 균은 표면에 흡착되지 못하고 약간의 외부 자극에도 액상의 흐름에 노출되어 떠다니게 되어 번식할 수 없게 된다[11]. 실험 과정에서 크리스털 바이올렛으로 염색하는 과정에서 용액을 교환할 때 세균막이 없어진 여드름균이 바닥에 부착되지 못하고 용액 제거와 함께 제거된 것으로 볼 수 있다. 즉 Val은 여드름균의 세균막의 형성을 억제함으로써 부착 상태에서 부유 상태로 균을 변화시켜 약간의 물리적인 자극에도 균의 제거를 용이하게 하는 작용을 함을 알 수가 있다.

세포 내에서 Val이 일정량보다 더 많이 분비될 때 세포는 신호전달을 통해 분산(dispersion)을 유도하게 된다[17]. 분산 작용은 여드름균이 다른 곳으로 이동하여 확장하는 단계이며, 이 때 원래 있던 부위의 개체수가 줄어들게 된다[16]. Val의 투입은 바이오필름 세균막을 자발적으로 형성 억제함으로써 분산을 쉽게 도와주는 것일 수 있다.

향후 Val이 어떻게 세균막을 형성 억제하는지에 대한 메커니즘이 밝혀진다면 여드름균을 제거하는데 더 효율적인 소재를 발굴하는데 도움이 될 것이다. 아울러 이 과정에서 일어나는 세포 섬유질과의 메커니즘이 세균막과 어떤 연관이 있는지 이해한다면 향후 바이오필름 제거제를

개발하는데 큰 도움이 될 것으로 보인다.

4. 결 론

바이오필름을 성장시킨 여드름균은 세균막을 통해 번식하며 안전한 환경을 조성하여 균을 보호한다. 따라서 균은 바이오필름을 통해 개체수를 증식시킬 수가 있는데 아미노산이 이 관계를 단절시켜 바이오필름의 형성을 저지한다는 연구 결과가 있다. 이를 바탕으로 여드름균을 상대로 아미노산을 투입해본 결과 Val에서 개체수가 감소함을 발견하였다. 특히 10 mM 이상의 Val 농도, 50 mM에서는 개체수뿐만 아니라 세균막이 없어짐을 크리스털 바이올렛과 형광 염료 태깅을 통해 관찰하였다. 이를 통해 Val을 이용하면 여드름균의 치료가 진행될 수 있음을 제시할 수 있다. 더더욱 표백제나 항균제가 아닌 생체 내에 있는 아미노산을 이용한 것이기 때문에 인체와 환경에 자극을 최소화한 치료제 및 예방제로 활용될 수 있는 잇점이 있을 것이다.

References

1. K. Iinuma, T. Sato, N. Akimoto, N. Noguchi, M. Sasatsu, S. Nishijima, I. Kurokawa, and A. Ito, Involvement of *Propionibacterium acnes* in the augmentation of lipogenesis in hamster sebaceous glands *in vivo* and *in vitro*, *J Invest Dermatol*, **129**(9), 2113 (2017).
2. S. Mukherjee, R. Mitra, A. Maitra, S. Gupta, S. Kumaran, A. Chakraborty, and P. P. Majumder, Sebum and hydration levels in specific regions of human face significantly predict the nature and diversity of facial skin microbiome, *Sci. Rep.*, **6**, 36062 (2016).
3. L. Ma, A. Guichard, Y. Cheng, J. Li, O. Qin, X. Wang, W. Liu, and Y. Tan, Sensitive scalp is associated with excessive sebum and perturbed microbiome, *J. Cosmet. Dermatol.*, **18**(3), 922 (2019).
4. B. Siu-Yin. Ho, E. X. P. Ho, C. W. Chu, S. Ramasamy, M. Bigliardi-Qi, P. Florez de Sessions, and P. L. Bigliardi, Microbiome in the hair follicle of androgenetic alopecia patients, *PLoS One*, **14**(5), e0216330 (2019).
5. E. Filaire, A. Dreux, C. Boutot, E. Ranouille, and J. Y. Berthon, Characteristics of healthy and androgenetic alopecia scalp

- microbiome: effect of *Lindera strychnifolia* roots extract as a natural solution for its modulation, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **42**(6), 615 (2020).
6. D. Pinto, E. Sorbellini, B. Marzani, M. Rucco, G. Giuliani, and F. Rinaldi, Scalp bacterial shift in Alopecia areata, *PLoS One*, **14**(4), e0216330 (2019).
 7. J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, **284**(5418), 1318 (1999).
 8. P. S. Stewart and J. William, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet*, **358**(9276), 135 (2001).
 9. M. L. Sun, F. Zhao, M. Shi, X. Y. Zhang, B. C. Zhou, Y. Z. Zhang, and X. L. Chen, Characterization and biotechnological potential analysis of a new exopolysaccharide from the Arctic Marine Bacterium *Polaribacter* sp. SM1127, *Sci. Rep.*, **5**, 18435 (2016).
 10. D. Davies, Understanding biofilm resistance to antibacterial agents, *Nat Rev Drug Discov.*, **2**(2), 114 (2003).
 11. H. C. Flemming and J. Wingender, The biofilm matrix, *Nat Rev Microbiol.*, **8**(9), 623 (2010).
 12. L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat Rev Microbiol.*, **2**(2), 95 (2004).
 13. T. Mattila-Sandholm and G. Wirtanen, Biofilm formation in the industry: a review, *Food Rev. Int.*, **8**(4), 573 (1992).
 14. A. R. Sanderson, J. G. Leid, and D. Hunsaker, Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis, *Laryngoscope*, **116**(7), 1121 (2006).
 15. R. A. Chole and B. T. Faddis, Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, **128**(10), 1129 (2002).
 16. C. Guilhen, C. Forestier, and D. Balestrino, Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties, *Mol. Microbiol.*, **105**(2), 188 (2017).
 17. J. Valle, S. Da Re, S. Schmid, D. Skurnik, R. D'Ari, and J. M. Ghigo, The amino acid valine is secreted in continuous-flow bacterial biofilms, *J. Bacteriol.*, **190**(1), 264 (2008).
 18. Y. Fu, Y. Zu, L. Chen, T. Efferth, H. Liang, Z. Liu, and W. Liu, Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with atomic force microscopy, *Planta Med.*, **73**(12), 1275 (2007).
 19. J. H. Lim, S. H. Song, H. S. Park, J. R. Lee, and S. M. Lee, Spontaneous detachment of *Streptococcus mutans* biofilm by synergistic effect between zwitterion and sugar alcohol, *Sci. Rep.*, **7**, 8107 (2017).
 20. H. Liu, Z. Du, J. Wang, and R. Yang, Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Appl Environ Microbiol.*, **73**(6), 1899 (2007).
 21. A. Sokolov and I. S. Aranson, Physical properties of collective motion in suspensions of bacteria, *Phys. Rev. Lett.*, **109**(24), 248109 (2012).
 22. A. C. Jahns, H. Eilers, and O. A. Alexeyev, Transcriptomic analysis of *Propionibacterium acnes* biofilms *in vitro*, *Anaerobe*, **42**, 111 (2016).
 23. T. Gan, X. Gong, H. Schonherr, and G. Zhang, Microrheology of growing *Escherichia coli* biofilms investigated by using magnetic force modulation atomic force microscopy, *Biointerphases*, **11**(4), 041005 (2016).
 24. I. Kolodkin-Gal, D. Romero, S. Cao, J. Clardy, R. Kolter, and R. Losick, D-amino acids trigger biofilm disassembly, *Science*, **328**(5978), 627 (2010).