Korean Journal of Microbiology (2019) Vol. 55, No. 1, pp. 46-51
DOI https://doi.org/10.7845/kjm.2019.9014

pISSN 0440-2413
eISSN 2383-9902

유칼립투스, 유카와 차나무의 추출분획 혼합물의 여러 인간 피부 상재균에 대한 항균활성

이다솔[1] · 홍인기[2] · 송홍규[1*]
[1]강원대학교 생명과학과, [2](주)래디안

Antimicrobial activity of fraction mixture of ethanol extracts from *Eucalyptus globulus*, *Yucca recurvifolia*, and *Melaleuca alternifolia* against several human skin microbes

Da-Sol Lee[1], In Kee Hong[2], and Hong-Gyu Song[1*]
[1]*Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea*
[2]*R&D Center, Radiant Ltd., Chuncheon 24398, Republic of Korea*

(Received January 25, 2019; Revised February 19, 2019; Accepted February 20, 2019)

This study was carried out to evaluate antimicrobial effects of a mixture of resin fractionated ethanol extract of *Eucalyptus globulus*, *Yucca recurvifolia*, and tea tree (*Melaleuca alternifolia*). The plant fraction mixture showed low minimum inhibitory concentration (0.24~3.32 mg/ml) against several bacteria and yeast that usually used as the target skin microbes in a cosmetic industry, and it was more effective than antibiotics, triclosan and ampicillin. In a time-kill assay the plant fraction mixture reduced more than 92% of microbial populations during 4 h, and significantly increased leakage of nucleotides from all microorganisms tested. Antimicrobial effect of the plant fraction mixture was not affected by divalent cation (Mg^{2+} and Ca^{2+}). These results suggest that the fraction mixture of ethanol extracts of *E. globulus*, *Y. recurvifolia*, and *M. alternifolia* may be utilized as an efficient preservative in cosmetics to prevent contamination by human skin microbes.

Keywords: *Eucalyptus*, *Yucca*, antimicrobial activity, human skin microbes, tea tree

***For correspondence.** E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-259-5665

화장품의 경우 미생물이 이용할 수 있는 유·무기물을 다량 함유하고 있어 미생물 오염 가능성이 상존하며(Ku *et al*., 2013), 인간에 질병을 유발하는 등 큰 문제를 초래할 수 있다(Behravan *et al*., 2005). 실제 2005년에서 2008년 사이에 유럽지역에서 화장품 173 종류가 회수되었는데 그 중 대부분이 *Pseudomonas aeruginosa*에 오염되었고, 일부에서 *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*와 *Klebsiellea* sp.이 검출되었다(Lundov and Zachariae, 2008). 또한 국내에서도 테스터 화장품에서 비병원성 *Bacillus subtilis*뿐만 아니라 인간에 병원성을 나타낼 수 있는 *Staphylococcus* sp., *Candida* sp., *Micrococcus* sp. 등의 미생물이 다수 검출되었다는 보고가 있다(Lee, 2017). 위와 같은 병원균 또는 기회적 병원균들은 패혈증, 전신감염, 만성기도 감염증, 각막염 등을 일으킬 수 있을 정도로 심각한 영향을 미칠 수 있다(Behravan *et al*., 2005).

현재 이러한 위험성을 지닌 미생물을 제어하기 위해서 화장품의 경우 항균활성 범위가 크고, 넓은 pH와 온도 범위에서 안정한 paraben과 phenoxyethanol 화합물을 이용하고 있지만 피부 부작용 유발(앨러지, 염증 등), 방부제 성분이 피부에 잔류하는 등의 문제를 나타내고 있다(White and Groot, 2006; Kokura *et al*., 2010). 이러한 문제를 해결하기 위해 독성이 없

고, 사람에게 해를 끼치지 않는 천연항균물질을 이용한 미생물 제어에 대한 관심이 최근 증가하고 있으며 주로 약용식물의 항균활성에 대해 연구가 이루어져 왔다(Sánchez *et al*., 2005; Aiyegoro *et al.*, 2009; Lahmar *et al*., 2017). 다양한 약용식물 중 *Pseudomonas aeruginosa*에 항균활성을 나타낸 유칼립투스(*Eucalyptus globulus*) (Pereira *et al*., 2014), *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus* 같은 세균뿐만 아니라 *Aspergillus* spp. 등의 진균에도 활성을 보이는 유카(*Yucca recurvifolia*) (Zubair *et al*., 2013) 및 세균과 진균 등 넓은 항균활성 범위를 갖는 차나무(tea tree, *Melaleuca alternifolia*) (Carson *et al*., 2006) 등이 그 대표적인 예이다. 그러나 이제까지 약용식물의 항균활성은 대부분 한 종류 용매의 추출물이나 essential oil에 대해 조사하였는데 보다 효율적인 항균효과를 위해 본 연구에서는 유칼립투스, 유카 및 차나무의 에탄올 추출물을 수지로 분획한 후 그 혼합물에 대해 화장품업계에서 주된 미생물 균주로 이용하는 5종류의 피부 상재균에 대해 항균활성을 평가하고 항균기작을 조사하였다.

재료 및 방법

식물 추출분획 혼합물

식물 추출분획 혼합물은 춘천시 소재 ㈜래디안에서 제조한 것을 제공받아 이용하였고 그 제조 과정은 다음과 같다. 건조한 유카, 유칼립투스와 차나무 잎을 분쇄하여 각각의 분말 500 g에 95% ethanol을 10 L 첨가한 후 교반하여(300 rpm, 3시간) 함유 성분을 추출하였다. 추출용액을 공극 0.22 μm의 친수성 PVDF 여과막(RephiLe Bioscience Ltd.)으로 1차 여과한 후 소수성 수지인 Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Co.)을 이용하여 분획 후 분획물의 항균활성을 측정하였다. 항균능이 있는 분획물은 감압 농축하여 분말 형태로 제조 후 dimethyl sulfoxide (Daejung)에 용해시켜 이용하였다. 각 식물 추출분획물의 비율을 달리하여 항균 효능을 조사한 결과 0.93:1.69:7.38의 조합이 가장 큰 활성을 나타내어 이후 이 조합으로 실험을 수행하였다.

항균활성 및 항균기작

미생물 균주 : 화장품업계에서 오염방지 표적 미생물로 흔히 이용하는 피부 상재균 5종(*Candida albicans* ATCC10231, *B. subtilis* ATCC19659, *S. aureus* ATCC6538, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC2513, *E. coli* ATCC8739)을 ㈜래디안으로부터 분양받아 이들에 대한 항균활성을 조사하였는데 이들은 tryptic soy broth (TSB, Difco Lab.)에 접종하고 배양하여(30°C, 150 rpm) 이용하였다.

최소저해농도 : 최소저해농도(minimum inhibitory concentration; MIC)는 항균물질이 항균활성에 의해 미생물의 생장을 완전히 저해할 수 있는 최소농도를 의미하므로 이것이 낮을수록 우수한 항균효과를 나타낼 수 있다. 유카, 유칼립투스와 차나무의 추출분획 혼합물의 최소저해농도는 Al-Ani 등(2015)의 방법을 이용하여 수행하였다. 각 미생물 균주를 TSB에 배양하여(30°C, 150 rpm) 개체수를 10^7 cell/ml로 조정한 복식 시료를 준비하였다. 여기에 다양한 농도(400~0.000078 mg/ml)의 식물 추출분획 혼합물을 처리한 뒤 추가적으로 배양하면서 미생물 생장이 나타나지 않은 항균물질 처리구의 농도를 MIC로 결정하였다. 이 실험에서의 양성 대조군으로는 triclosan과 ampicillin (Sigma Aldrich)을 이용하였다.

Time kill assay : MIC 농도의 추출분획 혼합물 처리 시 미생물 균주가 사멸하는 양상은 time kill assay (Jayaraman *et al*., 2010; Al-Ani *et al*., 2015)로 조사하였다. 미생물 균주를 TSB 배지에 배양하고(30°C, 24시간) TSB 배지를 이용하여 개체수를 10^5~10^6 cell/ml로 보정하였다. 배양액에 최종 1 MIC로 항균 물질을 처리하고 배양하였다(30°C, 160 rpm). 0, 0.5, 1, 2, 3과 4시간 간격으로 시료를 수집한 뒤 10배씩 시료를 희석하여 TSA 배지에 100 μl 도말하고 배양(30°C, 24시간) 후 생균수를 계수하였다. 이 실험에서의 양성 대조군으로는 triclosan과 ampicillin을 이용하였다.

뉴클레오티드 유출 : 식물 추출분획 혼합물에 의해 미생물 균주의 세포가 파괴되어 뉴클레오티드가 유출되는 양상은 인산완충용액으로 각 미생물 균주를 세척하고 개체수를 2~5 × 10^7 CFU/ml로 조정한 후 1 MIC로 추출분획 혼합물을 첨가하여 평가하였다. 혼합물 첨가 후 0, 30, 60, 120, 240과 480분 간격으로 시료를 채취하여 공극 0.22 μm의 친수성 PVDF 여과막으로 여과하고 분광광도계(Shimadzu model UV1700)로 260 nm에서 흡광값을 측정하여, 0시간 대비 뉴클레오티드 유출 양상을 비교하였다(Lou *et al*., 2011).

이가 양이온의 영향 : 항균활성의 안정성에 영향을 미칠 수 있는 이가 양이온의 영향을 조사하기 위해 미생물 균주의 개체수를 10^7 CFU/ml로 보정하고 추출분획 혼합물은 0.5, 1, 2와 4 MIC로 각각 100 mM의 Mg^{2+}($MgCl_2$)와 Ca^{2+}($CaCl_2$)에 용해시켜 준비하였다. 96 well에 TSB 배지 160 μl, 추출분획 혼합물

20 μl와 미생물 균주 20 μl를 첨가한 후 배양하였으며(30°C), 18~24시간 뒤 600 nm에서 흡광도를 측정하여 미생물 생장을 판단하고 MIC 값의 변화를 비교하였다(Alhanout *et al*., 2010).

결과 및 고찰

식물 추출분획 혼합물의 최소저해농도

5종의 인간 피부상재균에 대한 식물 추출분획 혼합물과 양성 대조군의 효과를 비교하였다. 양성대조군인 항생물질 처리 시 *C. albicans*에 대한 triclosan의 MIC는 10 mg/ml, 그리고 ampicillin의 MIC는 *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 및 *E. coli*에 대해 각각 0.312, 0.0002, 5.0과 0.156 mg/ml를 나타내었다(Table 1). 식물 추출분획 혼합물의 경우 5종의 피부 상재균에 0.24~3.32 mg/ml의 MIC를 나타내었는데, *S. aureus*에 대한 결과 만을 제외하고 모든 경우에서 항생제와 비교하여 높은 항균 효과를 나타내었다(Table 1). 이 결과는 *Euphorbia hirta* 잎 추출물이 *C. albicans*에 대하여 25 mg/ml의 MIC를 나타낸 것(Jackson *et al*., 2009)보다 우수하며, *Aegopodium podagraria* 잎의 ethanol 추출물이 *B. subtilis*와 *S. aureus*에 대해서 각각 2.5 그리고 5.0 mg/ml의 MIC를 나타낸 결과(Stefanovic *et al*., 2009)보다 효과적이었다. 또한 *Bacillus amyloliquefaciens* An6가 생산하는 항균물질인 bacteriocin이 *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC25923에 대해 MIC가 각각 1.25와 5.00 mg/ml, 그리고 *P. aeruginosa* ATCC27853에 활성을 나타내지 못한 결과(Ayed *et al*., 2015)와 비교하여 비록 대상 종의 균주가 다르지만 식물 추출분획 혼합물이 Table 1에서 보듯이 더 다양한 미생물 균주에 대부분 더 낮은 MIC값을 보임으로서 더 효과적인 항균활성을 나타내었다.

Pereira 등(2014)은 유칼립투스가 quercetin과 luteolin 같은 페놀 화합물에 의해 항균활성을 나타낼 수 있으며, 이러한 성분들은 항산화, 질병 감소, 항암 등의 효과로 건강상에 도움을 줄 수 있다고 보고하였다. 유카의 경우 페놀 화합물과 flavonoids, saponins 등을 다량 포함하여 항산화와 항균활성을 나타낼 수 있으며(Zubair *et al*., 2013), 차나무는 terpinen과 1,8-cineole 성분을 생산하여 다양한 그람 양성과 음성 세균에 항균효과를 나타낼 수 있다고 보고되었다(Carson *et al*., 2006).

Time kill assay

미생물 균주 배양액(10^5~10^6 cell/ml)에 1 MIC 농도로 식물 추출분획 혼합물을 처리하였을 때 배양 3시간과 4시간째에 *C. albicans*는 각각 63%와 92%가 사멸하였으며, *B. subtilis*는 각각 83%와 99%의 사멸률을 나타내었다(Fig. 1). *S. aureus*의 경우 배양 2시간과 3시간째에 각각 98%와 99%, *P. aeruginosa*는 배양 1시간째에 99%의 사멸률, 3시간째부터는 완전한 사멸을 보였으며, *E. coli*의 경우 배양 3시간과 4시간째에 각각 88%와 99%의 사멸률을 나타내어 5종의 피부 상재균 모두에 식물 추출분획 혼합물이 높은 항균 효과를 나타내었다. 1 MIC 농도의 항생제 또한 높은 사멸 효과를 나타내었지만 *B. subtilis*와 *P. aeruginosa*에 대해서는 식물 추출분획 혼합물보다 효과가 낮았으며 *S. aureus*와 *E. coli*에 대해서는 항생제와 식물 추출분획 혼합물이 유사한 사멸 효과를 나타내었다(Fig. 1). 전체적으로 미생물 균주에 대한 MIC가 항생제에 비해 식물 추출분획 혼합물이 낮기 때문에 항생제보다 적은 농도로도 우수한 효과를 나타낸다고 할 수 있다. 이러한 결과는 Zou 등(2012)이 보고한 lactic acid bacteria가 생산한 bacteriocin인 nisin과 약용식물의 항균활성 성분인 allyl isothiocyanate를 각각 단독으로 *S. aureus*에 처리하였을 때 각각 배양 4시간 째 생균수가 다시 증가하는 양상을 보인 것과 비교하여 더 우수하였다. 또한 다양한 항생제와 생리활성물질인 sulfamethoxazole, protocatechuic acid와 ellagic acid 등이 배양 4시간 후에도 10^6 cell/ml의 *P. aeruginosa* 균주를 상당수 감소시키지 못한 결과보다 효과적인 항균효과라 할 수 있다(Jayaraman *et al*., 2010).

뉴클레오티드 유출

5종의 피부 상재균에 식물 추출분획 혼합물을 처리하였을 때 나타난 뉴클레오티드 유출 변화는 배양 8시간 후 OD_{260}이

Table 1. Minimum inhibitory concentration of antibiotics and plant fraction mixture against several human skin microbes

Target organisim	Antibiotics (MIC, mg/ml)	Plant fractioon mixture (MIC, mg/ml)
C. albican ATCC10231	Triclosan (10.0000)	3.3200
B. subtilis ATCC19659	Ampicillin (0.3120)	0.2700
S. aureus ATCC6538	Ampicillin (0.0002)	0.2400
P. aeruginosa KCTC2513	Ampicillin (5)	3.1600
E. coli ATCC8739	Ampicillin (0.1560)	2.1500

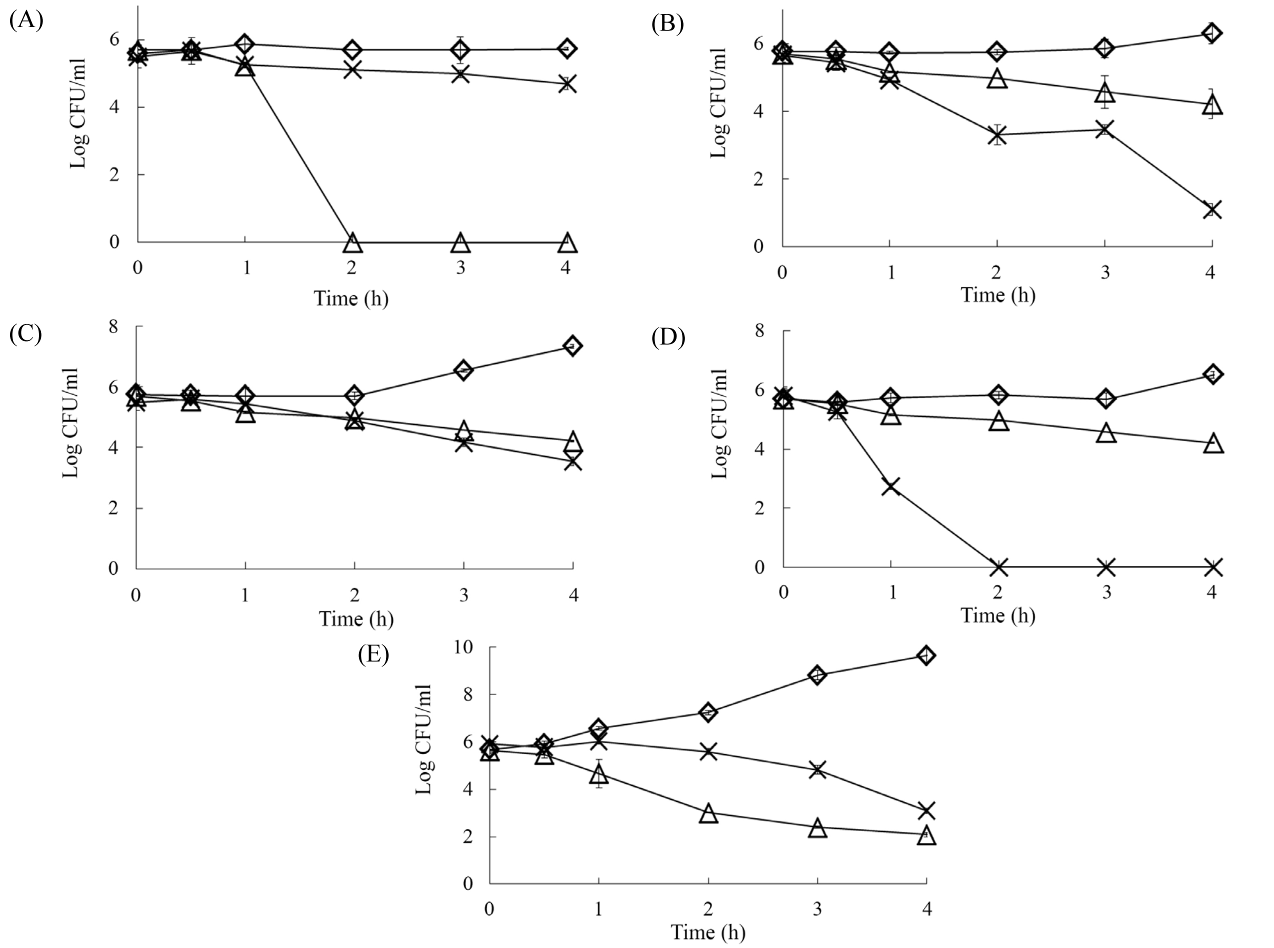

Fig. 1. **Growth of *C. albicans* ATCC10231 (A) *B. subtilis* ATCC19659 (B) *S. aureus* ATCC6538 (C) *P. aeruginosa* KCTC2513 (D) and *E. coli* ATCC8739 (E) in the presence of plant fraction mixture (*Yucca*, *Eucalyptus*, tea tree) and antibiotics (◇, control; X, plant fraction mixture; △, triclosan or ampicillin).**

*C. albicans*는 0.003, *B. subtilis*는 0.0006, *S. aureus*는 0.001, *P. aeruginosa*는 0.003, *E. coli*는 0.001을 나타내었으며, 모든 미생물의 뉴클레오티드 유출량이 time kill assay에서와 같이 시간이 지남에 따라 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 2). 이 결과는 *Gallesia integrifolia* 추출물(200 μg/ml)을 *S. aureus*에 처리했을 때 시간 경과에 따라 뉴클레오티드 유출량이 증가한 결과(Arunachalam *et al*., 2010) 및 다양한 미생물에 chlorogenic acid를 처리하였을 때 생균수와 뉴클레오티드 유출량이 반비례적인 양상을 나타낸 보고(Lou *et al*., 2011)와 일치하였으며, 따라서 본 식물 추출분획 혼합물이 대상 피부 상재균을 효과적으로 제어하고 있음을 나타낸다.

이가 양이온의 영향

세균의 세포벽은 Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^{+} 및 K^{+}를 비롯한 많은 종류의 양이온을 가지고 있는데 이들은 효소 작용, 대사 조절 및 세포의 안정성 유지 등에 기여한다(Saharan *et al*., 2013). 이런 양이온이 과량으로 존재하면 항균활성이 현저히 감소하고 MIC가 감소될 수 있다(Hanckock *et al*., 1991). 피부 상재균을 억제하는 식물 추출분획 혼합물의 MIC값에 대한 divalent salt의 영향을 조사하였을 때 *B. subtilis*에 대한 MIC가 Ca^{2+}에 의해서 증가한 것을 제외하고는 다른 처리구에서는 영향을 받지 않았다(Table 2). Alhanout 등(2010)의 연구에서 squalamine와 colistin은 *P. aeruginosa*, *E. coli*와 *S. aureus*에 대하여 각각 2~8 그리고 0.5~128 mg/L의 MIC를 나타내었다. 그러나 10 mM의 Mg^{2+}와 Ca^{2+} 존재 하에 MIC가 최대 32배 증가하여 이가 양이온에 의한 항균활성의 저해가 나타났다. 반면 본 연구의 식물 추출분획 혼합물은 이가 양이온의 존재하에서도 거의 대부분의 경우 MIC가 유지되었고, MIC가 증가한 경우에도 Alhanout 등(2010)의 결과보다 증가폭이 크지 않기 때문에 항균활성의 안정성이 우수하다고 할 수 있다.

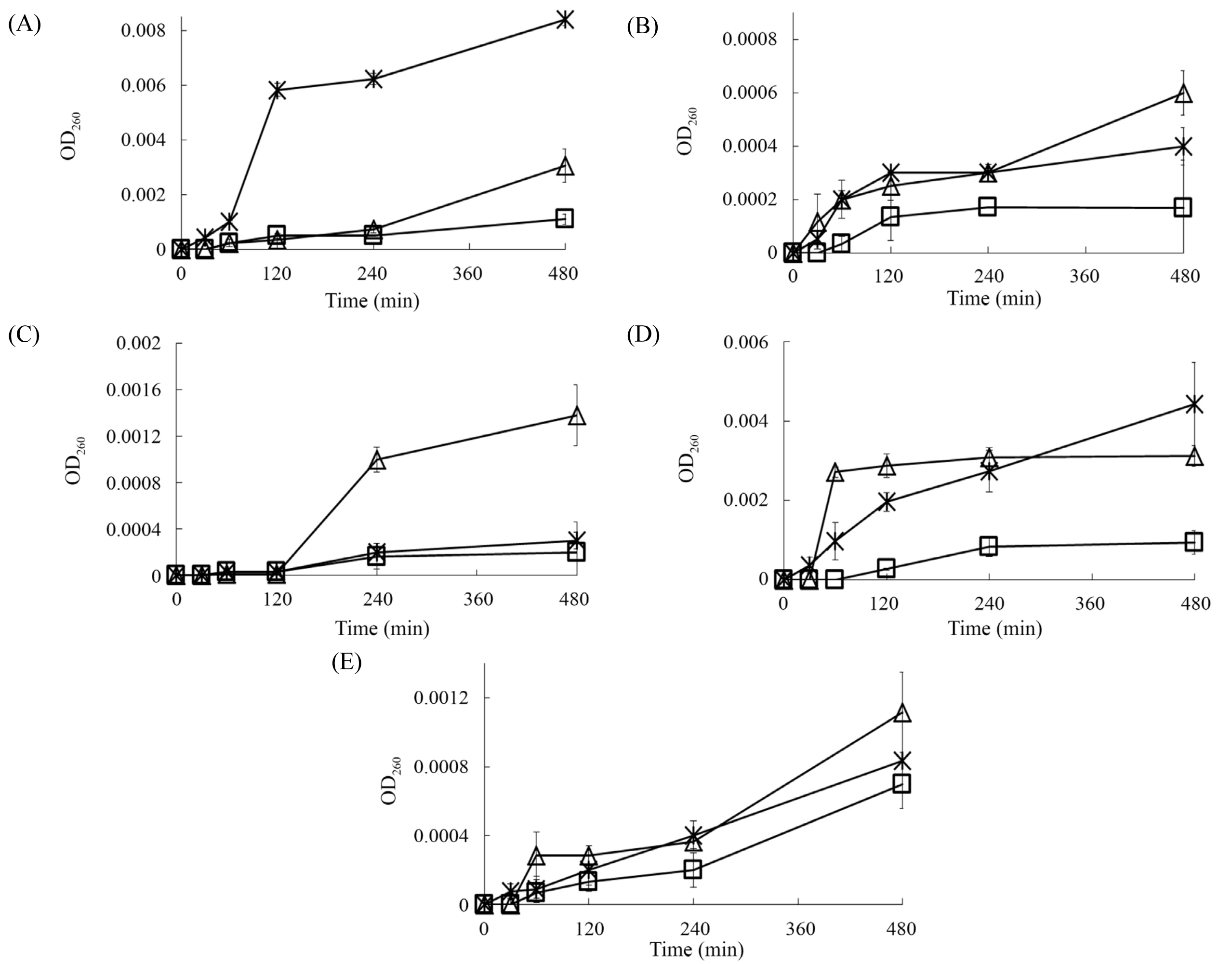

Fig. 2. **Nucleotide leakage of *C. albicans* ATCC10231 (A) *B. subtilis* ATCC19659 (B) *S. aureus* ATCC6538 (C) *P. aeruginosa* KCTC2513 (D) and *E. coli* ATCC8739 (E) in the presence of plant fraction mixture (*Yucca*, *Eucalyptus*, tea tree) and antibiotics (◇, control; △, plant fraction; X, triclosan or ampicillin).**

Table 2. **Effect of divalent cation on the antimicrobial activity of plant fraction mixture**

Target organism	Control MIC (mg/ml)	MIC with cation (mg/ml)	
		Ca^{2+}	Mg^{2+}
C. albican ATCC10231	3.32	3.32	3.32
B. subtilis ATCC19659	0.27	0.54	0.27
S. aureus ATCC6538	0.24	0.24	0.24
P. aeruginosa KCTC2513	3.16	3.16	3.16
E. coli ATCC8739	2.15	2.15	2.15

적 요

이 연구에서는 유칼립투스, 유카와 차나무의 ethanol 추출물의 수지를 이용한 분획 혼합물에 대한 항균활성을 평가하였는데 여러 인간 피부 상재균에 낮은 최소저해농도(0.24~3.32 mg/ml)를 나타내었고 항생제 triclosan과 ampicillin보다 우수한 활성을 나타내었다. Time kill assay에서 식물 추출분획 혼합물은 4시간 이내에 미생물 균주의 개체수를 92% 이상 감소시켰고, 모든 미생물 균주의 뉴클레오티드를 상당량 유출시켰으며, 항균 효과는 이가 양이온(Mg^{2+}과 Ca^{2+})에 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 *Eucalyptus* sp., *Yucca* sp., 및 tea tree의 ethanol 추출물의 수지분획 혼합물이 중요한 인간 피부 상재

균을 억제하는 효율적인 화장품 방부제로 이용될 수 있음을 시사한다.

감사의 말

2017년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였음(관리번호-520170486).

References

Aiyegoro OA, Afolayan AJ, and Okoh AI. 2009. Synergistic interaction of *Helichrysum pedunculatum* leaf extracts with antibiotics against wound infection associated bacteria. *Biol. Res.* **42**, 327–338.

Al-Ani I, Zimmermann S, Reichlinga J, and Wink M. 2015. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine* **22**, 245–255.

Alhanout K, Malesinki S, Vidal N, Peyrot V, Rolain JM, and Brunel JM. 2010. New insights into the antibacterial mechanism of action of squalamine. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1688–1693.

Arunachalam K, Ascêncio SD, Soares IM, Aguiar RWS, da Silva LI, de Oliveira RG, Balogun SO, and de Oliveira Martins DT. 2016. *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities and mode of action. *J. Ethnopharmacol.* **184**, 128–137.

Ayed HB, Maalej H, Hmidet N, and Nasri M. 2015. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *J. Global Antimicrob. Resist.* **3**, 255–261.

Behravan J, Bazzaz BSF, and Malaekeh P. 2005. Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran. *Int. J. Dermatol.* **44**, 482–485.

Carson CF, Hammer KA, and Riley TV. 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 50–62.

Hanckock RE, Farmer SW, Li ZS, and Poole K. 1991. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1309–1311.

Jackson C, Agboke A, and Nwoke V. 2009. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. *J. Med. Plant. Res.* **3**, 666–669.

Jayaraman P, Sakharkar MK, Lim CS, Tang T, and Sakharkar KR. 2010. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. *Int. J. Biol. Sci.* **6**, 556–568.

Kokura S, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, and Yoshikawa T. 2010. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine* **6**, 570–574.

Ku JE, Han HS, and Song JH. 2013. The recent trend of the natural preservative used in cosmetics. *Korean J. Aesthet. Cosmetol*. **11**, 835–844.

Lahmar A, Bedoui A, Mokdad-Bzeouich I, Dhaoui Z, Kalboussi Z, Cheraif I, Ghedira K, and Chekir-Ghedira L. 2017. Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. *Microb. Pathog.* **106**, 50–59.

Lee JH. 2017. Master thesis. A study of microbiological contamination after use of lip makeup tester. Sookmyung Women's University, Seoul, Korea.

Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, and Wang Z. 2011. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J. Food Sci*. **76**, 398–403.

Lundov MD and Zachariae C. 2008. Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008. *Int. J. Cosmet. Sci.* **30**, 471–474.

Pereira V, Dias C, Vasconcelos MC, Rosa E, and Saavedra MJ. 2014. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts)and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Ind. Crops Prod.* **52**, 1–7.

Sánchez E, Heredia N, and García S. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. *Int. J. Food Microbiol*. **98**, 271–279.

Sahalan AZ, Aziz AHA, Lian HH, and Ghani MKA. 2013. Divalent cations (Mg^{2+}, Ca^{2+}) protect bacterial outer membrane damage by polymyxin B. *Sains Malays.* **42**, 301–306.

Stefanovic O, Comic L, Stanojevic D, and Solujic-Sukdolak S. 2009. antibacterial activity of *Aegopodium podagraria* L. extracts and interaction between extracts and antibiotics. *Turk. J. Biol*. **33**, 145–150.

White IR and Groot AC. 2006. Cosmetics and skin care products, pp. 493–506. *In* Frosch PJ, Menn T, and Lepoittevin JP. (eds.), Contact Dermatitis, 4th ed. Springer, Berlin, Germany.

Zou YY, Jung LS, Lee SH, Kim SK, Cho YJ, and Ahn JH. 2012. Enhanced antimicrobial activity of nisin in combination with allyl isothiocyanate against *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella* Typhimurium and *Shigella boydii*. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**, 324–333.

Zubair M, Rasool N, Mansha A, Anjum F, Iqbal M, Mushtaq M, and Shahid M. 2013. Antioxidant, antibacterial, antifungal activities and phytochemical analysis of dagger (*Yucca aloifolia*) leaves extracts. *J. Med. Plant Res.* **7**, 243–249.