

Schima wallichii subsp. *liukuensis*의 *Candida*종에 대한 항균효과 및 항균물질의 분리정제

†최명석·¹신금·양재경·¹안진권·¹권오웅·¹이위영
경상대학교 산림과학부, ¹임업연구원 임목육종부 생물공학과
(접수 : 2001. 4. 20., 게재승인 : 2001. 6. 14.)

Purification of Antimicrobial Compounds and Antimicrobial Effects of *Schima wallichii* subsp. *liukuensis* against *Candida* sp.

Mynug Suk Choi[†], Kuem Shin¹, Jae Kyung Yang, Jin Kwon Ahan¹, Oh Woong Kwon¹, and Yi Young Lee¹
Division of Forestry, Gyeongsang National University, Jinju, Korea,
¹Division of Biotechnology, Forest Research Institute, Suwon, Korea
(Received : 2001. 4. 20., Accepted : 2001. 6. 14.)

To develop natural antimicrobial substances from Theaceae, *Schima wallichii* subsp. *liukuensis* was selected from 218 woody plants, and antimicrobial compounds against bacteria, fungi, and yeast were isolated. The antimicrobial activity of ethanol extracts proved higher than those of other organic solvents. The antimicrobial activity of *S. liukuensis* extract showed no differences in seasonal variation, but, that of plant part was high in bark at autumn. An antimicrobial substance was isolated from the extract of *Schima* using column chromatography packed with silica gel and sephadex LH-20, and then a purified antimicrobial substance (Compound I) was obtained using HPLC analysis. The Compound I in the analysis of UV, IR, and GC-MS presumed a triterpene or steroidal saponin, α -sitosterol as aglycon combined three sugars. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the Compound I against a bacteria, fungi, and yeast were 1.25 g/L, 5.0 g/L, and 0.040 g/L, respectively. This is much lower than the MIC of hinokitiol, a natural antimicrobial compound used commercially, which suggests that Compound I could be developed as a natural preservative and pharmaceuticals.

Key Words : *Schima wallichii* subsp. *liukuensis*, antimicrobial compound, *Candida* sp, natural preservatives

서론

식물에 존재하는 항균물질은 alkaloids, flavonoids, terpenoids, phenolic compounds, quinones 및 volatile oil 등의 이차대사산물 또는 그 유도체들로 알려져 있다(1,2). 현재까지 개발된 식물유래 항균물질은 마늘에서 allicin(3), 해당화에서 sesquiterpene 화합물, 녹차에서 gallocatechine류(4) 등 다수의 수종에서 보고되어 있으며, 용도 또한 매우 다양하다. 최근 인공합성항균제의 안전성에 관한 논란과, 경제발달에 따른 소비자들의 합성항균제 기피현상 등 사회적 구조가 변함으로 말미암아 인공합성방부제를 생산하는 식품가공업계 및 연구기관에서부터 천연 항균성물질의 개발에 심혈을 기울이고 있다.

천연 항균성물질의 개발을 위한 전제조건으로는 세균과 진균류의 생육을 동시에 저해시킬 수 있는 광범위한 항균 spectrum을 갖고, 장기간 소량씩 투여해도 부작용이 없이 안전하며, 또한 무미, 무취함은 물론 개발에 필요한 시간과 비용이 절감되는 것이 중요한 요소이다(5).

의약품, 식품보존제 및 생물농약 등 다용도로 사용되고 있는 식물 유래 천연항균제는 항세균제과 항진균제로 크게 나눌 수 있다(6). 이중 항진균제는 곰팡이와 효모에 동시에 적용되고 있으나, 효모만을 위한 항균제 개발은 미비한 실정이다. 그나마 이들 대부분은 합성물질이거나, 미생물 유래 항생물질로서 이들이 체내에 축적될 경우 생기는 여러 가지 문제점으로 인해 사용이 기피되고 있다. 특히 효모형 진균인 *Candida*종의 발병은 표재성 감염, 질 칸디다증, 심부점막감염(식도염, 질염, prony chia 및 장칸디다증 등) 등을 유발하며, 면역억제제, 스테로이드 호르몬, 항암제 등의 약물을 장기 복용하여 면역이 저하된 사람, AIDS 등으로 면역결핍된 환자에게 감염이 증가하고 있어 그 대책이 시급히 요구되고 있다

†Corresponding Author : Division of Forestry, Gyeongsang National University, Jinju, Korea
Tel : +82-55-751-5493, Fax : +82-55-753-6015
E-mail : mschoi@nongae.gsnu.ac.kr

(7,8). 또한 효모는 육가공품, 가축사료, 식물체 등에 존재하여 식품의 변패 또는 질병을 유발함으로써 심각한 문제를 일으키기도 한다. 최 등(9)은 효모와 세균에 의해 발생하는 문제점을 해결하고, 인체에 무해한 천연 항균소재를 개발하기 위하여 218종의 목본식물을 대상으로 항균수종을 탐색한 결과 *Schima wallichii* subsp. *liukuensis* 추출물이 *E. coli*, *Streptococcus* 및 *Candida*종에 매우 강한 항균활성이 있음을 보고한 바 있다.

차나무과에 속하는 *Schima wallichii* subsp. *liukuensis*는 대만, 중국의 사천성, 네팔, 인도네시아, 일본 오사카 등지에서 자생하는 상록활엽교목으로 잎이 얇고, 털이 없으며, 양면 모두 큐틴질이 풍부하다. 이 종은 주로 건축재로 이용되며, 현재까지의 조사에 의하면 생리활성에 관한 보고는 없는 실정이다. 본 연구에서는 효모 등에 탁월한 항균효과를 보인 *Schima wallichii* subsp. *liukuensis*로부터 항균물질의 추출조건을 구명하고, 항균물질을 분리·정제하기 위해 행하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 실험에 사용한 *Schima wallichii* subsp. *liukuensis*는 천리포수목원에서 96년 5월과 8월에 채집하고, 식물학적 동정을 거친 후 수피, 잎, 가지 등으로 분리하였다. 이를 1-3 cm 정도 크기로 절단한 후 7일간 음건하고, 다시 40℃의 건조기에서 최종 건조하였다. 건조된 시료는 Wiley miller를 이용하여 잘게 파쇄하여 플라스틱 통에 실리카겔과 함께 넣고 밀봉한 후 사용할 때까지 4℃에 보관하였다.

항균활성 측정

Schima wallichii subsp. *liukuensis*의 항균활성 측정을 위해 사용된 균주는 세균(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* SL KTC 1102, *Staphylococcus aureus* IFO 12732)와 곰팡이(*Aspergillus niger* KCTC 6910), *Botrytis cinerea* KCTC 6973), 효모(*Candida tropicalis* KCTC 7901), *C. albicans*(KCTC 7121), *C. guilliermondii* KCTC 7144)를 생명공학연구원 유전자원센터로부터 분양받아 사용하였다.

사용된 배지는 세균의 경우 Luria-Bertani(LB) 배지를, 효모의 경우 yeast peptone dextrose(YPD) 배지를, 그리고 곰팡이의 경우 malt extract agar(MEA) 배지를 사용하였으며, 사용한 모든 시약은 특급을 사용하였다.

먼저 보관된 미생물(4℃)의 전배양액을 제조하고 현미경으로 배양액의 균수를 측정하였다. 항균성 물질의 검색시 항균력은 Zaika의 방법(10)을 응용한 한천배지 확산법(disc-agar plate diffusion method)으로 측정하였다. 배지 1 mL당 1×10^8 개의 균이 포함되도록 하여 45℃로 조절된 멸균평판배지 10 mL에 전배양액 0.1 mL를 무균상에서 잘 혼합시킨 후 굳혔다. 항균활성 검정을 위해 50 μ L의 추출액을 loading하여 건조된 paper disc(ϕ 8 mm, Adventec)를 시험미생물이 접종된 고체배지 위에 올려 놓고 37℃에서 24시간 배양하여 paper disc 주위에 형성된 생육저해환 (inhibition zone)을 autocaliper (CD-15B, Mitutoyo, Japan)로 측정하였고, 대조구로서는 시판중인 천연항균제인 hinokitiol을 사용하였다.

최소억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 Koneman 등의 방법(11)을 약간 변형하여 측정하였다. YPD액 체배지에 *Schima* 추출물을 1000, 500, 250, 125, 63, 32, 16, 8, 4, 2, 1 μ g/mL이 되도록 serial dilution한 후 45℃ 항온수조에서 보관하면서 96-well plate에 추출물과 YPD 혼합액 190 μ L 그리고 균현탁액 10 μ L를 강하게 vortex시켜 30℃에서 24시간 배양하고, ELISA Reader(Microplate, Bio-Tek Instrument)로 620 nm에서 생육정도를 측정하였다. 이때 생장이 관찰되지 않은 최소농도를 MIC 값으로 결정하였으며, MIC의 단위는 mg/mL로 하였다. 모든 실험은 3반복 이상 행하였고, 얻어진 결과는 평균하여 나타내었다.

조추출물의 항균활성

항균활성 조사를 위해 *Schima*를 잎, 줄기, 뿌리 등으로 구분하고, 봄, 여름, 가을 등 계절별로 시료를 채집하여 위와 같은 방법으로 시료를 조제하였고, 항균활성을 조사하였다. 이온강도의 차이와 추출방법에 다양성을 주기 위해서 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-buthanol 등의 용매를 사용하여 추출한 후 항균활성을 조사하였다.

항균성 물질의 분리 및 정제

시료 1.3 kg을 ethanol/water(7:3, v/v) 혼합용액에서 1시간 동안 sonication 후 24시간씩 4회 추출하여 여과하고, 여액을 감압농축하여 에탄올 추출물(129.8 g)을 얻었다. 에탄올 추출물을 증류수 1,000 mL에 현탁시킨 후 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-buthanol의 순으로 분획하였다. 이들 각각의 용매분획물을 한천배지확산법에 의해 *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*에 대하여 항균력을 측정하고, 유의성있는 항균효과를 보이는 buthanol분획물을 silica gel 60 (particle size 0.040~0.063 nm)이 packing된 column(3.6×40 cm)에 buthanol:glacial acetic acid:water(5:1:4)의 혼합용매로 용출하여 항균 활성획분을 얻었다.

Silica chromatography에 의해 얻어진 주요 활성획분은 methanol:water(8:2, v/v)로 평형화된 sephadex LH-20(Pharmacia, sweden)이 충전된 column(1.2×50 cm)을 사용하여 gel filtration을 행하였다. 얻어진 분획물은 silica plate(20×20 cm, thickness 0.1 mm, silica gel 60 F254, Merck)에 점정하여 buthanol:glacial acetic acid:water를 5:1:4 (v/v/v)의 비율로 만든 용매로 분리하고, 장파장(360 nm)과 단파장(254 nm)의 UV와 dragendroff, ninhydrin, vallinin - phosphoric acid 등 발색시약에 의하여 물질을 확인하였다. HPLC 분석 (TSP, Series P4000 pump)은 Lichrospher RP-C₁₈(3.2×250 mm, 5 μ m, Merck) column, eluent는 methanol 20%에서 80%의 gradient 조건으로 30분간, 그 이후는 100% methanol로 용출하였고, 유속은 분당 0.8 mL로 하였다. 분석시료는 HPLC급 methanol로 녹여 불용물질을 원심분리로 제거하고, 0.45 μ m prefilter로 여과한 후 분석시 마다 10-20 μ L씩 주입하였다.

항균물질의 동정

총당 함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 phenol-sulfuric의 방법(11), 단백질의 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 사용하여 Lowry법(12)으로 정량하였다. 구성당

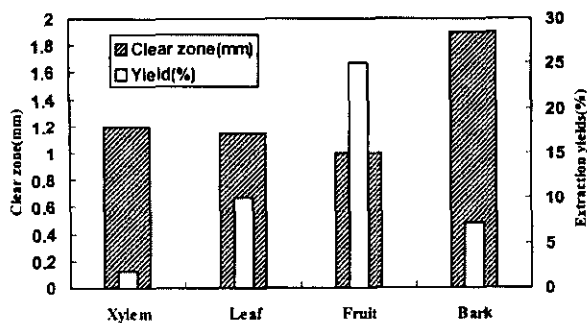


Figure 1. Antimicrobial activities against *C. albicans* and extraction yields from the plant parts of *Schima wallichii* subsp. *liukuensis*. Plant tissues collected on 15, September 2000, and extracted with 70% EtOH and measured antimicrobial activities using paper disk method.

분석은 Jones 등의 방법(13)에 따라 2 M trifluoroacetic acid로 121°C에서 90분간 가수분해한 후 NaBH_4 를 사용하여 중성당을 alditol로 환원시킨 후 acetic aldehyde를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시켜 GC로 구성당을 분석하였다. 이때 GC 분석조건은 Yonglin GC system, Flame ionizing detector, SP-2380(0.25 x 30 mm), column의 온도는 230°C(10 min), 2.5°C/min 250°C, injector 온도는 250°C, detector 온도는 250°C, carrier gas로 N_2 를 1.0 mL/min로, make up gas로 N_2 를 30 mL/min로 해 주었다. 구성당의 molar ratio는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로 계산하였다.

또한 산가수분해를 통하여 aglycone의 구조동정을 행하였다. Compound I 15 mg에 3 ml의 Ag_2CO_3 를 가하여 중화시킨 후 여과하여 TMS 유도체화시켜 GC-MS분석(JMS-AX505 WA)을 행하였다. 기타 항균활성물질 분석은 UV (Shimadzu UV-260 spectrophotometer)분석, FAB MS분석(VG70-VSEQ), FT-IR(FTS-60, Bio-Rad)분석은 KBr법으로 행하였다.

결과 및 고찰

*Schima*의 항균활성

Schima wallichii subsp. *liukuensis*의 목부, 잎, 열매 및 수피 등 부위별 항균활성을 조사하였다(Figure 1). *Candida tropicalis*, *C. albicans*, 및 *C. guilliermondii* 등 3종에 대한 각 부위별 추출물의 항균활성은 수피추출물에서 가장 높았으며, 잎이나 열매의 경우도 비교적 높은 항균활성이 관찰되었다. *Candida* 3종간의 항균활성은 큰 차이를 나타내지는 않았으며, 가장 높은 항균활성을 보인 종은 *C. albicans*로 모든 부위에서 항균활성이 높았다. 목본식물의 조직 중 수피는 각종 생리활성물질을 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 주목나무의 항암제 taxol은 잎과 뿌리 등에 비해 수피조직에 가장 많이 함유되어 있음이 그 좋은 예이다(14). 항균물질의 대량추출을 위해서는 수피를 사용하는 것이 바람직하나 공시목의 수피가 얇아 적합하지 못하나 잔가지가 많아 비교적 활성은 낮지만 잎이나 어린가지를 이용하는 것도 좋을 것으로 판단된다. 그러나 목부조직에서도 항균활성이 비교적 높게 나타난 것은 특이할만한 사실로 추후 이에 관한 연구가 요망된다.

Figure 2는 *Schima wallichii* subsp. *liukuensis* 추출물의 계

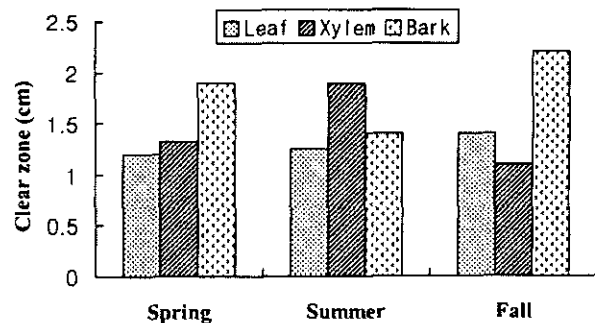


Figure 2. Antimicrobial activities against *C. albicans* based on the seasons of *Schima wallichii* subsp. *liukuensis* extract. Plant tissues were extracted with 70% EtOH and extracts of 1000 ppm loaded on paper disk and then measured size of clear zone.

절별 항균활성과 수율을 나타낸 것이다. 잎은 계절별 항균활성에서 큰 차이를 나타내지 않았으나, 목부조직에서는 여름에, 수피의 경우는 가을에 채취한 시료가 가장 좋았다.

최적의 추출용매를 선택하기 위하여 유기용매 추출물, 알칼리 추출물, 열수 추출물을 제조하여 항균활성을 측정한 결과 ethanol추출물은 가장 높은 항균활성을 나타내었다(결과 미제시). 또한 에탄올과 물의 혼합농도에 따른 항균활성을 조사한 결과 70% ethanol에서 가장 높게 나타나 항균물질은 극성이 매우 높은 물질로 추정되었다(결과 미제시). 이 결과는 박 등(15)이 20종의 한약재를 열수 및 에탄올로 추출하여 항균성을 검색한 연구에서 에탄올 추출물이 열수추출물 보다 약 2-100배나 항균력이 높았다는 보고와 일치하며, 55종의 생약재 잎을 70% 에탄올 등의 용매로 추출하였을 때 4종의 세균에 대하여 항균효과가 뛰어났다는 보고와도 일치된다(16).

항균성 물질의 분리 및 정제

시료 1.3 kg으로부터 얻어진 70% ethanol 추출물(130 g)을 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol 등으로 순차적으로 정제하여 최종적으로 39.2 g의 조추출물을 얻었다. 항균활성 최종 분획인 *n*-butanol 가용부는 silica gel을 충전한 column을 통하여 다시 분획한 결과 4개의 분획을 얻을 수 있었으며, 항균활성은 4번째 분획에서 나타났고, 연황색 결정상이었다. 이어서 활성분획을 sephadex LH-20을 충전한 column에서 80% methanol로 다시 용출하여 3개의 분획으로 분리하여 흰색 결정의 항균 물질을 얻을 수 있었다.

이 물질은 silica plate에 점정하고 TLC 한 결과 가장 강력한 활성분획의 Rf 값은 0.25-0.30이었다. 활성물질은 dragendroff 시약과 ninhydrin에도 각각 발색이 되지 않아 alkaloid 물질과 amino acid계열이 아닌 것으로 추정되었으며, vanillin-phosphoric acid(VPA)에서는 진홍색으로 발색이 되어 saponin계 물질임을 추정할 수 있었다. 한편, 항균물질 분획의 화학적 구성물은 총당이 50.26%, 단백질이 18.36%로 나타났다(Table 1).

항균물질의 순수단리를 위해 활성분획을 ODS column이 장착된 HPLC를 이용하여 분리한 결과 isocratic 조건으로는 분리되지 않았고, gradient 조건으로 행하였을 때 양호하게 분리되었다. 이 물질의 최대 흡광도는 210 nm이었으며, 410 nm 부근에서 두 번째 흡광을 나타내었다(결과 미제시).

IR spectrum의 경우에는 3437 cm^{-1} 에서 수산기의 흡수가 보

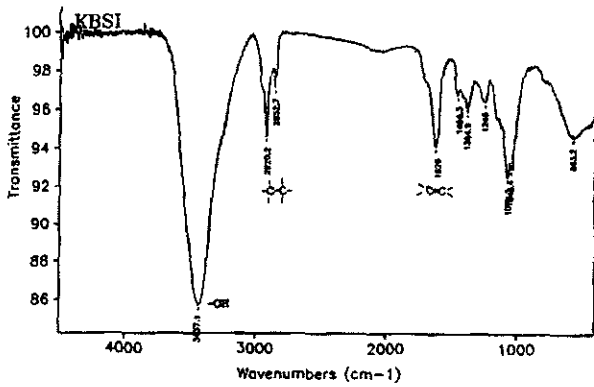


Figure 3. IR spectrum of antimicrobial compound I.

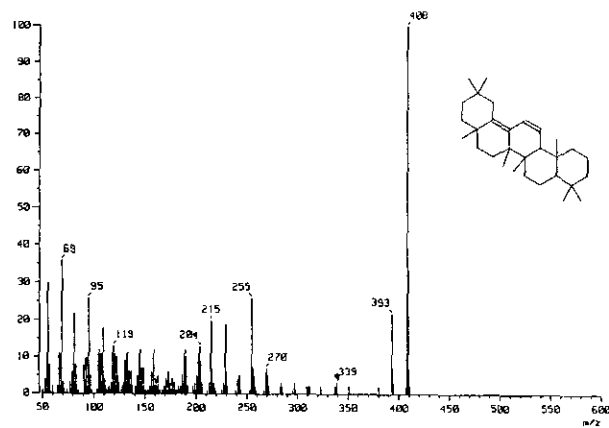


Figure 4. GC-MS spectrum of antimicrobial compound I.

Table 1. Chemical properties of active fraction of *Schima wallichii* subsp. *liukuensis*

| Chemical component | Ratio |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Total sugar (as Glu) | 50.26% |
| Protein (as BSA) | 18.36% |
| Component sugars(molar ratio) | rhamnose : galactose : glucose |
| | 1 : 1 : 1 |

이며, 2853과 2920 cm^{-1} 에서 methylene 또는 methyl기 peak의 흡수가 나타나며, 1626 cm^{-1} 에서 탄소 이중결합 peak가 보이고 있다(Figure 3).

활성물질의 FAB Mass분석 결과 triterpene 또는 sterol saponin 및 배당체로 추정되어졌다(데이터 미제시). 따라서 이를 2 N HCl을 이용하여 가수분해 후 GC-MS분석 결과 aglycone의 분자 ion peak는 M^+408 로 나타나고, 주요 ion intensity는 m/z 55(13%), 69(35%), 95(27%), 105(22%), 119(13%), 131(12%), 204(13%), 255(25%), 393(21%) 등으로 나타났다(Figure 4). 이 물질을 GC-MS library 및 문헌으로 소상히 검토한 결과 aglycon은 α -sitosterol로 추정되었다(Figure 4).

Compound I의 당쇄부분을 구명하기 위해 GC 분석한 결과 rhamnose, galactose, glucose의 비가 1:1:1로 나타났다(Table 1). *Schima* 항균물질은 α -sitosterol의 aglycone에 3종의 당이 결합된 steroid saponin으로 추정된다. 따라서 HMQC, COSY 등 자세한 구조동정에 관한 연구를 수행중이다.

Table 2. Minimal inhibition concentration(MIC) of antimicrobial compound I.

| Microorganisms | MIC(g/L) | |
|---|------------|------------|
| | Compound I | Hinokitiol |
| Bacteria | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 1.25 | 0.75 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102 | 1.25 | 0.75 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732 | 1.25 | 0.75 |
| Yeast | | |
| <i>Candida tropicalis</i> KCTC 7901 | 0.04 | 0.50 |
| <i>Candida albicans</i> KCTC 7121 | 0.04 | 0.50 |
| <i>Candida guilliermondii</i> KCTC 7144 | 0.05 | 0.50 |
| Fungi | | |
| <i>Aspergillus niger</i> KCTC 6910 | 5.00 | 5.00 |
| <i>Botrytis cinerea</i> KCTC 6973 | 5.00 | 5.00 |

정제물질 Compound I의 항균활성

정제과정 중 buthanol획분의 *Candida tropicalis*에 대한 MIC는 1 g/L였으며, 여러단계의 정제를 거쳐 얻어진 Compound I의 MIC는 0.04 g/L였다. 이 물질의 항균활성을 *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*에 대해 검증한 결과 정제 전의 MIC에 비해 25배 항균력이 높았다. Table 2는 여러미생물에 대한 Compound I의 항균력을 나타낸 것이다. Compound I의 bacteria에 대한 MIC는 *E. coli*에 1.25 g/L, *Staphylococcus*에서 1.25 g/L였고, 곰팡이인 *Botrytis cinerea*는 5.0 g/L, *Aspergillus niger*는 5.0 g/L로 항균력이 낮았다. 한편 Compound I의 효모에 대한 항균활성은 매우 높게 나타나 *C. tropicalis*, *C. albicans*는 각각 0.04 g/L, *C. guilliermondii*에 대한 MIC는 0.05 g/L로 매우 낮았다. 이것은 시판중인 항균제인 Hinokitiol의 *C. tropicalis*에 대한 MIC인 0.4 g/L보다 항균력이 더 강하게 나타나 다양한 용도의 항균제로 개발이 기대된다. *Candida*증의 치료제인 nystatin은 *C. albicans*와 *C. glabra*에 대해 0.004 g에서 0.001 g/L 농도에서 치료효과(17), 다른 *Candida* 종에 대해 0.01-0.02 g/L에서 항진균 치료제로 보고(18)를 검토 해볼 때 항균활성은 다소 낮지만 천연 항진균 치료제로 개발 가능성을 지니고 것으로 사료된다. 향후의 연구는 Compound I의 분자구조 동정, 미생물에 대한 항균기작, 나아가 이 물질의 이용성 및 이 수종에 대한 육종법도 강구하여야 할 것으로 보인다.

사 사

시료의 채집과 동정을 위해 협조를 해 준 천리포수목원 관계자에게 감사한다.

요 약

218종의 목본식물 자원으로부터 높은 항균력을 보인 *Schima wallichii* subsp. *liukuensis*로부터 항균활성물질을 추출, 정제하였다. *Schima*의 항균물질 추출에 가장 적합한 용매는 70% 에탄올이었으며, 계절에 따른 항균활성은 차이를 보이지 않았고, 부위별로는 가을에 채취한 수피가 가장 좋았다.

조추출물을 유기용매로 정제하여 최종적으로 buthanol 분획을 얻었고, 이를 silica gel과 sephadex LH-20 및 HPLC분석을 통하여 흰색결정의 항균물질 Compound I을 얻었다. 항균물질은 UV, IR, MS분석 결과 aglycone으로 α -sitosterol에 rhamnose, galactose, glucose가 1:1:1로 결합된 물질로 추정되었다. Compound I의 미생물에 대한 MIC는 3종의 bacteria에 1.25 g/L, 2종의 fungi에 5.0 g/L로 나타났으며, 효모에 대한 MIC는 0.04 g/L로 매우 높게 나타났다. Compound I은 천연 보존제, 의약품 등으로의 향후 개발이 기대된다.

REFERENCES

1. Grayer, R. J. and J. B. Harbone (1994), A survey of antifungal compounds from higher plants, *Phytochemistry* **37**, 19-24.
2. Clark, A. M., F. S. El-Feraly, and W. S. Li (1981), Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L., *J. Pharmaceutical Sciences* **70**, 951-952.
3. Robert, A. F. and G. S. Bulmer (1987), *In vitro* effect of aqueous extract of Galic on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*, *Mycologia*, **70**, 397-405.
4. Demizu, S., K. Kajiyama, K. Takahashi, Y. Hiraga, S. Yamamoto, and T. Kinoshita (1988), Antioxidant and antimicrobial constituents of Licorice, *Chem. Pharm. Bull.* **36(9)**, 3474-3479.
5. Min, B. S., K. H. Bang, J. S. Lee, and K. H. Bae (1996), Screening of antifungal activity from natural products against *Candida albicans* and *Penicillium avellaneum*, *Yahak Hoeji* **40(5)**, 582-590.
6. Lemke, T. L. (1997), Antiseptics and disinfectants, Principles of Medicinal Chemistry, 4th edition, (Williams, O. F., L.L. Tomas, and A.W. David, eds), pp. 812-821, Lea and Febiger, London.
7. Park, Y. M., H. J. Kim, D. H. Kim, I. K. Lee, D. H. Kim, and C. K. Ryu (1996), The evaluation of *in vivo* antifungal activity of 6-[(N-4-fluorophenyl) amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione, *Yahak Hoeji* **40**, 90.
8. Erguang, L., A. M. Clark, and C. D. Hufford (1995), Antifungal evaluation of pseudolaric acid B a major constituent of *Pseudolarix kamepferi*, *J. Nat. Prod.* **58**, 57.
9. Choi, M. S., K. Shin, O. W. Kwon, S. R. Yoon, M. Y. Jung, K. H. Song, J. K. Ahn, W. Y. Lee, and S. H. Son (1999), The screening of antimicrobial species from woody plants. *FRI. J. of Forest Science.* **62**, 141-154.
10. Zaika, L. L. (1988), Spices and herbs; Their antimicrobial activity and it's determination, *J. Food Safety.* **9**, 97.
11. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350.
12. Lowry, D. H., N. J. Rosebrough, L. Farr, and R. J. Rindall (1951), Protein measurement with the foin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
13. Jones, T.M. and P. Abersherim (1972), A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol.*, **49**, 926-931.
14. Borman S. (1991), Scientists mobilize to increase supply of anticancer drug taxol, pp. 11-18, C&E, Washington.
15. Park, U. Y., D. S. Chang, and H. R. Cho (1992), Screening of Antimicrobial Activity for Medicinal Herb Extracts, *J. Kor. Soc. Food Nutri.* **21(1)**, 91-96.
16. Tomas-Lorente, F., E. Iniesta-Sanmaritin, F.A. Tomas-Barberan, W. Trowitzsch-Kienast, and V. Wray (1989), Antifungal phloroglucinol derivatives and lipophilic flavonoids from *Helichrysum decumbens*, *Phytochemistry* **28**, 1613-1615.
17. Hurley, D. L. (1987), Biology and activities of yeasts, Yeast (Skinner, F. A., D. Passmore, and R. R. Davenport, pp. 231-248, Academic Press, London.
18. Mamduh, S., A. Haridy, and A. Moustafa (1993), Yeast flora of the human vagina and effects of antifungal agents on its growth *in vitro*, *Kor. J of Mycol.* **21(2)**, 140-145.