

항생제 다제내성 *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Candida* 균주에 대한 산사자의 항균 활성

류희영 · 안선미 · 김종식¹ · 정인창 · 손호용*
안동대학교 식품영양학과, ¹안동대학교 생명과학과

Antimicrobial Activity of Fruit of *Crataegus pinnatifida* Bunge against Multidrug Resistant Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* sp. Ryu, Hee-Young, Seon-Mi Ahn, Jong-Sik Kim¹, In-Chang, Jung, and Ho-Yong Sohn*. Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea, ¹Dept. of Biological Science, School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea - The fructus of *Crataegus pinnatifida* Bunge (CBF) has been used as medicinal and food source in worldwide. In this study, antimicrobial activity of the methanol extract and its sequential organic solvent fractions of CBF against different pathogenic bacteria and fungi, including multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* sp., were investigated. The methanol extract of CBF was active against various gram-positive and gram-negative bacteria, and the ethylacetate and butanol fractions of CBF showed strong antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* and various multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* with minimal inhibitory concentration of 1.0~7.5 mg/mL. Also the fractions showed anti-*Candida* activity against *C. albicans*, *C. krusei* and *C. geochares*. The methanol extract of CBF and its solvent fractions, except n-hexane fraction, did not show any hemolytic activity against human red blood cell up to 500 µg/mL, respectively. The hemolysis in n-hexane fraction at 500 µg/mL was less than 9.9%. Our results suggest that the CBF could be developed as a potent antibacterial agent, especially for multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Key words: Antibacterial, multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, anti-*Candida*, fructus of *Crataegus pinnatifida* Bunge

서 론

산사자는 장미과에 속한 낙엽교목인 산사나무의 성숙한 과실로 이가위, 이가배, 적과자, 산과자, 찔광이, 질구배 등의 다양한 이름으로 불리며, 주로 식용 및 약용으로 이용되고 있다. 우리나라에서는 주로 지리산 이북의 전북, 경북, 강원 등에서 생산되며, 중국, 일본의 각지에서도 많이 생산된다. 산사자는 맛이 좋으며 8%의 조단백질과 5%의 조지질을 함유하여 [15] 떡, 잼, 청량음료 및 전통 발효주의 원료로 이용되고 있으며, 한방에서는 음식을 잘 소화하게 하며 혈압을 낮추는 작용, 혈액순환을 도와 어혈을 없애는 작용 및 지질 용해작용을 한다고 알려져 있다 [4, 24]. 한편 산사자를 이용한 조충 구제 및 세균성이질 치료용 제품들이 개발되어 국내에서도 판매되고 있으며, 최근에는 줄기에 가시가 없는 산사나무 신품종도 개발되어 조경수로 이용되고 있다 [10].

산사자의 활성성분으로는 ursolic acid, corosolic acid, euscaptic acid, oleanolic acid, cratagolic acid, hyperin, vitexin, caffeic acid, procatechuic acid 및 pyrogallol 등의 다양한 페놀성 화합물이 알려져 있으며 [14, 15, 21], 산사나무 잎에서도 유사한 약리성분과 quercetin 배당체, myricetin 배당체, apigenin 배당체와 epicatechin 등이 확인되어 있다 [6, 29, 30]. 한편, 산사자의 생리활성으로는 항세균 활성 [5], 내피세포 의존성 혈관이완 활성 [4], 고지혈증 개선 및 항우울증 효과 [7, 16], 항염증 활성 [12], 알콜성 장해 간보호 효과 [24], 세포사멸 활성 [1, 19], 항산화 활성 [2, 3, 11], angiotensin-converting enzyme 저해효과 [28], chitin synthase II [9], HIV-I protease [18] 및 matrix metalloproteinase-1에 대한 저해활성 [17]이 알려져 있으며, 최근 본 연구팀에서는 산사자의 다양한 용매 추출물 및 분획물들의 트롬빈 저해에 따른 강력한 항혈전 활성을 보고한 바 있다 [23]. 그러나 현재까지 산사자 추출물 및 유기용매 분획물에 대한 광범위한 항균활성 탐색 및 항생제 내성 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 평가한 보고는 없다.

본 연구에서는 산사자의 유용 생리활성 검토를 위한 연구

*Corresponding author

Tel: 82-054-820-5491, Fax: 82-054-820-7804

E-mail: hysohn@andong.ac.kr

의 일환으로, 산사자의 methanol 추출물 및 이의 다양한 분획물을 조제하여 다양한 병원성 및 식중독 미생물에 대한 항균 활성을 평가하였으며, 그 결과 산사자 추출물의 ethylacetate 및 butanol 분획에서 우수한 항미생물성 활성을 확인하였고, 특히 이 분획물들이 항생제 내성 병원성 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해 강력한 항균 활성을 나타냄을 확인하였다. 본 연구결과는 산사자를 이용한 항생제 내성 병원성 *P. aeruginosa* 및 *Candida sp.*의 제어가능성을 제시하고 있다.

재료 및 방법

실험재료 및 시료의 조제

2007년 경북 안동에서 구입한 국내산 산사자(수분함량 18% w/w)를 사용하였다. 산사자 methanol 추출물의 조제는 시료 1 kg에 methanol 10리터를 가하여 24시간 상온 추출하였으며 3회 반복 추출하였다. 추출액은 50에서 감압농축하여 분말로 제조하고 사용 전까지 저온 밀봉 보관하였다. 분획물 제조의 경우 methanol 추출물을 물에 현탁한 후 n-hexane, ethylacetate, butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 물 잔류물을 회수하였으며, filter paper(Whatman No. 2)로 거른 후 감압 건조하여 분말화 하였다. 각각의 시료는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹인 후 적당한 농도로 희석하여 항균 활성 평가에 사용하였다.

사용균주

산사자 methanol 추출물 및 이의 분획물들의 항균 활성 평가에 사용한 세균 및 진균들은 한국미생물자원센터(KCTC), 한국농용미생물보존센터(KACC) 및 일본 Institute for Fermentation, Osaka(IFO)에서 분양 받아 사용하였다(Table 1). *P. aeruginosa* CCARM 2010, 2020, 2030, 2200 및 2210 균주는 한국 항생제내성균주은행(CCARM)에서 분양 받아 사용하였으며 이들은 cefoperazone, gentamicin, nor-gloxacin, piperacillin, amikacin, aztreoman, ceftazidime, cefotaxime 및 imipenem의 항생제 중에서 적어도 2종 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 다제내성균이며, 사람으로부터 분리된 균주이다. 한편 *C. albicans* CCARM 14020 및 14021, *C. kruseis* CCARM 14017, *C. gillermordi* CCARM 14018, *C. tropicalis* CCARM 14019는 한국 항생제내성균주은행(CCARM)에서 분양받아 사용하였으며 이들은 amphotericin B, itaconazole, flucytosine 및 fluconazole에 대해 다제 내성을 나타내는 균주이다(<http://www.ccarm.or.kr>).

항균 활성 측정

항세균 및 항진균 활성 평가는 기존의 보고한 방법[13, 26]과 동일하게 이용하였으며, 각각 Nutrient agar(Difco Co., USA) 및 Sabouraud dextrose(Difco Co. USA) 배지상에서 다양한 시료 5 μ L를 멸균 disc-paper(지름 6.5 mm)에 가한

Table 1. The microorganisms used in this study.

Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC 10186
	<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1926
	<i>Proteus vulgaris</i> KCTC 2433
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC 10186
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC 10187
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC 10258
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC 10259
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC 10260
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 2010
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 2020
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 2030
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 2200	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 2210	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1	
Gram positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916
	<i>Listeria monocytogenes</i> KACC 10550
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917
	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1914
Fungi	<i>Candida albicans</i> KCTC 7270
	<i>Candida albicans</i> KCTC 7965
	<i>Candida albicans</i> KACC 30003
	<i>Candida albicans</i> KACC 30004
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
	<i>Candida albicans</i> CCARM 14020
	<i>Candida albicans</i> CCARM 14021
	<i>Candida kruseis</i> CCARM 14017
	<i>Candida gillermordi</i> CCARM 14018
	<i>Candida tropicalis</i> CCARM 14019
	<i>Candida geochares</i> KACC 30061
<i>Candida saitoana</i> KCTC 41238	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 0233	

후 세균의 경우 24시간, 진균의 경우 48시간 배양 후, 생육 저지환의 크기를 측정하여 평가하였다[26]. 대조구로는 항세균제인 ampicillin 및 streptomycin sulfate와 항진균제인 miconazole 및 amphotericin B(Sigma Co., USA)를 각각 1 μ g/disc 농도로 사용하였으며, 육안으로 생육저지환의 지름을 mm 단위로 측정하였고 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다[13]. 항균 활성이 인정되는 시료는 최소생육억제 농도(MIC: minimal inhibitory concentration)를 측정하였으며, 0.025, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0 및 7.5 mg/mL 농도의 시료들을 처리하여 24-48시간 배양한 후 생육억제제를 육안 판정하여 결정하였다.

인간 적혈구 용혈 활성 평가

산사자 추출물 및 분획물들의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다[27]. PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100 μ L를 96-well microplate에 가하고 시료용액 100 μ L를 가한 다음 37에서 30분간 반응시켰다. 이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상

등액 100 µL를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다. 시료의 용매 대조구로는 DMSO(2%), 실험 대조구로는 triton X-100(0.1%)을 사용하였다. 용혈활성은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

$$(\%) \text{ hemolysis} = \frac{(\text{Abs. S} - \text{Abs. C})}{(\text{Abs. T} - \text{Abs. C})} \times 100.$$

Abs. S: 시료 첨가구의 흡광도, Abs. C: DMSO 첨가구의 흡광도, Abs. T: triton X-100 첨가구의 흡광도

기타 분석

총 flavonoid의 함량 측정은 Davis 방법의 변법[13]에 따라 측정하였으며 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. 총 polyphenol 함량은 Singleton 등의 방법[25]에 따라 측정하였으며, 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. 모든 결과는 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

산사자의 methanol 추출물과 이의 순차적 유기용매 분획물을 조제하였다. 산사자의 methanol 추출효율은 40.4±1.1%이었으며, 추출물에 대한 n-hexane, ethylacetate, butanol 및 물 잔류물의 분획 효율은 각각 1.0, 5.1, 20.9 및 72.2%로 산사자 추출물의 대부분은 butanol 분획 및 물 잔류물로 이행되었다. 산사자 추출물 및 분획물의 총 polyphenol 함량은 methanol 추출물 및 n-hexane, ethylacetate, butanol 및 물 잔류물에서 각각 7.17, 1.33, 22.99, 14.62 및 0.78 mg/g로 나타나 ethylacetate 및 butanol 분획이 대부분의 polyphenol 류들을 포함하고 있었다. 또한 총 flavonoid 함량은 추출물 및 분획물에서 각각 8.02, 15.97, 52.43, 20.61 및 4.03 mg/g를 포함하여 ethylacetate 분획, butanol 분획, n-hexane 분

획 순으로 flavonoid류들을 포함하고 있음을 알 수 있었다.

다양한 식중독 및 병원성 세균들에 대한 항세균 활성을 평가하기 위해 준비된 시료들을 500 µg/disc 농도로 처리하였다. 그 결과, 산사자 methanol 추출물은 *P. aeruginosa*와 *E. coli*를 제외한 모든 균에 대해 전반적으로 우수한 활성을 나타내었다(Table 2). 특히 알려지지 않은 식중독균인 *P. vulgaris*에 대해서는 생육억제환의 크기가 17 mm로 매우 강력한 항균 활성을 나타내었다. 분획물 시료에서는 ethylacetate 분획물이 실험에 이용된 세균 모두에 대해 항균 활성을 나타내었으며, *P. vulgaris*, *S. typhimurium* 및 *L. monocytogenes*에 대해 각각 20.5, 16.0 및 15.0 mm의 매우 큰 생육억제환을 나타내었다. 한편 butanol 분획은 *P. aeruginosa*를 제외한 세균들에서 항균활성이 나타났으며, 전반적으로 ethylacetate 분획물보다는 약한 활성을 나타내었다. n-hexane 분획물과 물 잔류물은 상대적으로 한정된 항균활성을 나타내었으며, 대조구로 사용된 ampicillin(1 µg/disc)은 사용 균주 모두에서 10.5~35.0 mm의 생육저지환을 나타내어 매우 강력한 항세균 활성을 가짐을 보여주었다. 각각의 균주에 대한 ethylacetate 및 butanol 분획에 대한 최소생육저해농도(MIC)를 측정된 결과는 Table 3에 나타내었다. Ethylacetate 분획의 경우 *L. monocytogenes*, *S. epidermidis*, *S. aureus* 및 *P. vulgaris*에 대해서는 1.0~1.5 mg/mL 농도에서 생육이 완전히 억제되었으며, *S. typhimurium*에서는 2.5 mg/mL 농도에서, *P. aeruginosa*, *E. coli*와 *B. subtilis*에 대해서는 5.0 mg/mL 농도에서 생육이 나타나지 않았다. 반면 butanol 분획의 경우 *S. epidermidis*와 *P. vulgaris*는 1.0~1.5 mg/mL, *L. monocytogenes*와 *S. aureus*는 2.5 mg/mL, *S. typhimurium*, *E. coli* 및 *B. subtilis*는 5.0 mg/mL, *P. aeruginosa*에 대해서는 7.5 mg/mL 농도에서 생육이 나타나지 않아 ethylacetate 분획이 butanol 분획보다 전반적으로 낮은 MIC 값을 나타내었다. 한편 산사자의 70% methanol 추출물이 *S.*

Table 2. Antibacterial activity of the methanol extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge and its organic solvent fractions against pathogenic bacteria.

Extract/ fractions	Growth inhibition zone (mm)							
	Gram positive					Gram negative		
	L. m ³	S. e	S. a	B. s	S. t	P. a	P. v	E. c
Ampicillin	25.0	21.5	24.0	13.0	22.0	10.5	35.0	10.5
Methanol ex ¹ .	9.5	8.0	7.5	10.0	8.0	- ⁴	17.0	-
n-Hexane fr ² .	10.0	11.0	8.5	12.0	-	-	9.0	-
Ethylacetate fr.	15.0	11.0	10.0	11.5	16.0	7.5	20.5	7.5
Butanol fr.	15.0	9.5	8.0	9.5	8.0	-	19.5	8.0
Water fr.	8.0	-	-	-	7.5	-	15.0	-

¹ex: extract, ²fr: fraction, ³L. m: *Listeria monocytogenes*, S. e: *Staphylococcus epidermidis*, S. a: *Staphylococcus aureus*, B. s: *Bacillus subtilis*, S. t: *Salmonella typhimurium*, P. a: *Pseudomonas aeruginosa*, P. v: *Proteus vulgaris*, E. c: *Escherichia coli*, ⁴- : No activity
The concentrations of the methanol extract, its organic solvent fractions, and ampicillin used were 500 µg/disc, 500 µg/disc, and 1 µg/disc, respectively. The growth inhibition zone expressed was included a size of disc-paper (6.5 mm of diameter). The data represent a representative result of three independent determinations.

Table 3. The minimal inhibitory concentration (MIC) values of ethylacetate and butanol fractions against different pathogenic bacteria.

Fractions	MIC (mg/mL)							
	Gram positive				Gram negative			
	L. m ²	S. e	S. a	B. s	S. t	P. a	P. v	E. c
Ethylacetate fr ¹ .	1.0	1.5	1.5	5.0	2.5	5.0	1.5	5.0
Butanol fr.	2.5	1.5	2.5	5.0	5.0	7.5	1.0	5.0

¹fr: fraction, ²L. m: *Listeria monocytogenes*, S. e: *Staphylococcus epidermidis*, S. a: *Staphylococcus aureus*, B. s: *Bacillus subtilis* S. t: *Salmonella typhimurium*, P. a: *Pseudomonas aeruginosa* KACC 10186, P. v: *Proteus vulgaris*. E. c: *Escherichia coli*.

*aureus*에 대해 9.1 mg/mL의 MIC를 가진다는 보고[20]와 비교하면, 산사자의 ethylacetate 분획은 70% methanol 추출물보다 우수한 항균력을 가지는 것으로 추측된다. 이러한 결과는 산사자 추출물이 다양한 항균물질을 함유하고 있으며, ethylacetate 및 butanol 분획은 다양한 식중독 및 병원성 세균의 제어에 이용 가능성을 제시하고 있다.

한편 산사자의 ethylacetate 분획은 *P. aeruginosa*에 대해 7.5 mm의 미약한 항균 활성을 나타내었으며(Table 2), 5.0 mg/mL의 MIC를 나타내었다(Table 3). 이는 *P. aeruginosa*에 대해 항균활성을 나타내는 천연물이 거의 없다는 기존 보고[8, 22]로 볼 때 의미있는 결과로 판단되었다. 따라서 산사자 시료들을 대상으로 다양한 *P. aeruginosa* 균주에 대한 항균력을 평가하였다. 먼저 대조구로 사용된 ampicillin의 경우 *P. aeruginosa* KACC 10186에 대해서는 10.5 mm의 생육저지환을 형성하여 양호한 항균활성이 나타났으나 다른 10종의 *P. aeruginosa* 균주에 대해서는 전혀 항균활성이 나타나지 않아(Table 4), 대부분의 *P. aeruginosa* 균주들이 ampicillin에 내성을 가지고 있음을 확인하였다. 또한

streptomycin sulfate 처리시에도 *P. aeruginosa* CCARM 2020, CCARM 2030, CCARM 2200, CCARM 2210 및 *P. aeruginosa* PAO-1는 전혀 생육저해가 나타나지 않아, 상당수의 *P. aeruginosa* 균주들이 streptomycin sulfate 내성 상태였다. 그러나, 산사자 methanol 추출물은 항생제 내성 *P. aeruginosa* CCARM 2010, CCARM 2020, CCARM 2030 및 KACC 10187에 대해 8.0~8.5 mm 정도의 생육억제활성을 나타내었다. 가장 우수한 항균활성은 ethylacetate 및 butanol 분획에서 확인되었으며, 이 분획물들은 항생제 다제 내성 병원성 *P. aeruginosa* 균주 모두에 대해 우수한 항균력을 나타내었다. 각각의 분획물들의 최저생육억제농도 평가 결과, *P. aeruginosa* CCARM 2010을 제외한 항생제 내성균주와 PAO-1 균주는 MIC값이 2.5~5.0 mg/mL 농도로 확인되었으며, 기타의 *P. aeruginosa* 균주들은 MIC값이 5.0~7.5 mg/mL 농도로 나타났(Table 5). 이는 산사자의 ethylacetate 및 butanol 분획물은 기존 내성 항생제와는 다른 기작으로 *P. aeruginosa* 생육을 억제하며, 활성물질의 정제가 이루어진다면 산사자가 *P. aeruginosa* 생육억제제로 개발 가능성을 암시하고 있다.

한편, 산사자 methanol 추출물 및 이의 분획물에 대한 항진균 활성을 평가한 결과는 Table 6에 나타내었다. 대조구로 사용된 miconazole(1 µg/disc)은 *C. albicans* KACC 30003 균주와 항생제 내성균주인 *C. albicans* CCARM 14020, CCARM 14021, *C. krusei* CCARM 14017 및 *C. tropicalis* CCARM 14019에 대해 항균력을 나타내지 못하였으며, amphotericin B(1 µg/disc)경우는 *C. krusei* CCARM 14017을 제외한 균주에 대해서 11.0~28.0 mm의 생육억제환을 나타내었다. 따라서 miconazole에 대한 *Candida sp.*에 대한 내성율은 40%를 상회하며, amphotericin B에 대해서는 10% 이하의 내성율을 나타내는 것으로 추측되었다. 산사자 시료들은 다양한 활성패턴을 나타내었으며, 특히 ethylacetate 및

Table 4. Antibacterial activity of the methanol extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge and its organic solvent fractions against multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Extract/Fractions	Growth inhibition zone (mm)										
	1 ³	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ampicillin	10.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptomycin sulfate	14.0	8.0	7.5	7.5	8.0	9.0	-	-	-	-	-
Methanol ex ¹ .	-	8.5	-	-	-	8.0	8.0	8.0	-	-	-
n-Hexane fr ² .	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethylacetate fr.	7.5	11.0	9.0	8.5	11.0	9.0	9.0	8.5	9.0	10.0	9.0
Butanol fr.	⁴	9.0	9.0	8.0	9.0	9.5	10.0	9.0	8.5	8.0	8.5
Water fr.	-	-	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ex: extract, ²fr: fraction, ³1: *Pseudomonas aeruginosa* KACC 10186, 2: *P. aeruginosa* KACC 10187, 3: *P. aeruginosa* KACC 10258, 4: *P. aeruginosa* KACC 10259, 5: *P. aeruginosa* KACC 10260, 6: *P. aeruginosa* CCARM 2010, 7: *P. aeruginosa* CCARM 2020, 8: *P. aeruginosa* CCARM 2030, 9: *P. aeruginosa* CCARM 2200, 10: *P. aeruginosa* CCARM 2210, 11: *P. aeruginosa* PAO-1, ⁴-: No activity.

The concentrations of the methanol extract, its organic solvent fractions, and ampicillin used were 500 µg/disc, 500 µg/disc, and 1 µg/disc, respectively. The growth inhibition zone expressed was included a size of disc-paper (6.5 mm of diameter). The data represent a representative result of three independent determinations.

Table 5. The minimal inhibitory concentration (MIC) values of ethylacetate and butanol fractions against pathogenic and multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Extract/Fractions	MIC (mg/mL)										
	1 ²	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ethylacetate fr. ¹	5.0	7.5	>7.5	>7.5	7.5	>7.5	5.0	5.0	2.5	2.5	2.5
Butanol fr.	7.5	5.0	5.0	5.0	2.5	7.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0

¹fr: fraction, ²1: *Pseudomonas aeruginosa* KACC 10186, 2: *P. aeruginosa* KACC 10187, 3: *P. aeruginosa* KACC 10258, 4: *P. aeruginosa* KACC 10259, 5: *P. aeruginosa* KACC 10260, 6: *P. aeruginosa* CCARM 2010, 7: *P. aeruginosa* CCARM 2020, 8: *P. aeruginosa* CCARM 2030, 9: *P. aeruginosa* CCARM 2200, 10: *P. aeruginosa* CCARM 2210, 11: *P. aeruginosa* PAO-1.

Table 6. Antifungal activity of the methanol extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge and its organic solvent fractions against pathogenic *Candida sp.*

Extract/fractions	Growth inhibition zone (mm)												S. c ⁵
	<i>Candida albicans</i> (mm)						<i>Candida sp.</i> (mm)						
	1 ⁴	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Miconazole	28.0	⁶ -	20.0	8.0	19.0	-	-	-	11.0	-	30.0	7.0	8.5
Amp B ¹	16.0	14.0	13.0	19.0	15.0	14.0	14.0	-	11.0	11.0	28.0	15.0	13.5
Methanol ex ² .	⁶ -	-	-	7.5	7.0	-	-	7.0	-	8.0	-	-	-
n-Hexane fr ³ .	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.0	8.0	-
Ethylacetate fr.	-	7.5	8.0	8.0	8.0	-	-	-	-	-	10.0	-	-
Butanol fr.	-	7.5	-	7.5	9.5	-	-	8.0	-	-	7.5	7.0	7.5
Water fr.	7.0	-	-	7.5	-	-	-	-	-	7.0	7.5	-	7.0

¹Amp B: Amphotericin B, ²ex: extract, ³fr: fraction, ⁴1: *Candida albicans* KCTC 7270, 2: *C. albicans* KCTC 7965, 3: *C. albicans* KACC 30003, 4: *C. albicans* KACC 30004, 5: *C. albicans* ATCC 10231, 6: *C. albicans* CCARM 14020, 7: *C. albicans* CCARM 14021, 8: *C. krusei* CCARM 14017, 9: *C. gillermordi* CCARM 14018, 10: *C. tropicalis* CCARM 14019, 11: *C. geochares* KACC 30061, 12: *C. saitoana* KCTC 41238, ⁵S. c: *Saccharomyces cerevisiae* IF0 0233, ⁶-: No activity.

The concentrations of the methanol extract, and its organic solvent fractions used were 500 µg/disc, respectively. The concentrations of miconazole and amphotericin B as positive controls used were 1 µg/disc, respectively. The growth inhibition zone expressed was included a size of disc-paper (6.5 mm of diameter). The data represent a representative result of three independent determinations.

butanol 분획물에서 의미있는 항 *Candida sp.* 활성이 나타났다.

그러나 산사자의 methanol 추출물이 5종의 항생제내성 *Candida sp.* 중 *C. krusei* CCARM 14017 및 *C. tropicalis* CCARM 14019 균주에 대해 항균력을 나타낸 것과는 달리 ethylacetate 분획은 항생제내성 *Candida sp.*에 대해 항균력을 나타내지 않았으며, butanol 분획은 *C. krusei* CCARM 14017에 대해서만 항균력을 나타내었다. Ethylacetate 및 butanol 분획을 대상으로 MIC를 평가한 결과 ethylacetate 분획은 5 mg/mL의 MIC를, butanol 분획은 5.0~7.5 mg/mL의 MIC를 나타내어(result not shown), 산사자가 *Candida sp.* 제어에도 이용 가능함을 알 수 있었다.

산사자 methanol 추출물 및 분획물의 독성평가의 일환으로 인간 적혈구 용혈활성을 평가한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 진핵세포의 sterol성분과 결합하여 세포막 파괴를 나타내는 amphotericin B의 경우, 6.25 µg/mL 농도에서 53%, 25 µg/mL 농도에서 90% 이상의 용혈활성을 나타내었으며 (Fig. 1a), triton X-100은 0.1% 농도에서 100% 용혈현상이 나타났다. n-hexane분획물을 제외한 산사자의 추출물 및 분

획물들은 250 µg/mL 농도에서 용혈현상이 나타나지 않았으며, n-hexane 분획물은 약 3.2%의 용혈이 나타났다(Fig. 1b). 이러한 용혈현상은 농도 의존적이었으며, 500 µg/mL 농도에서는 약 9.9%의 용혈을 나타내었다(Fig. 1c). 그러나 n-hexane 분획물을 제외한 시료의 경우, 500 µg/mL 농도에서도 용혈현상이 전혀 나타나지 않으며 산사자 추출물의 n-hexane 분획물의 분획율이 1% 수준이므로 일반적인 사용에 있어서 산사자의 독성은 없을 것으로 판단되었다. 본 연구 결과는 산사자의 ethylacetate 및 butanol 분획물이 항생제 내성균주들을 포함한 다양한 세균 및 *Candida sp.*에 우수한 항균 활성을 가짐을 나타내며, 이들로부터 항생제 내성균주에 대한 항균제 개발가능성을 제시하고 있다. 현재 기존 항생제와 산사자 ethylacetate 분획물의 동시처리에 의한 항생제 내성균주 제어 가능성을 검토 중에 있으며, ethylacetate 및 butanol 분획물로부터 항균 활성물질의 정제가 필요하다.

요 약

산사자는 전 세계적으로 이용되는 있는 식용/약용 생물자

원 중 하나이다. 본 연구에서는 산사자의 유용 생리활성 검토를 위한 연구의 일환으로, 산사자의 methanol 추출물 및 이의 n-hexane, ethylacetate, butanol 분획물 및 물 잔류물을 조제하여 항생제 다제내성 *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Candida sp.*를 포함하는 다양한 병원성 및 식중독 미생물에 대한 항균활성을 평가하였다. 산사자의 methanol 추출물은 그람 양성 및 음성의 다양한 세균에 대해 항균활성을 나타내었고, 이의 분획물 중 ethylacetate 및 butanol 분획물은 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*는 물론 10종의 항생제 내성 병원성 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해서도 우수한 항세균 활성을 나타내었다(최소생육억제농도 1.0-7.5 mg/mL). 또한 ethylacetate 및 butanol 분획물은 일부의 *Candida sp.*에 대해서도 항균활성을 나타내었다. 한편 n-hexane 분획물을 제외한 산사자 methanol 추출물 및 분획물들은 500 µg/mL 농도까지 인간적혈구에 대한 용혈현상을 보이지 않았으며, n-hexane 분획물은 500 µg/mL 농도에서 약 9.9%의 미미한 용혈활성을 나타내었다. 이러한 결과는 산사자가 다양한 세균의 제어는 물론 항생제 내성 *Pseudomonas aeruginosa* 제어를 위한 생물자원으로 개발 가능성을 제시하고 있다.

REFERENCES

- Ahn, K. S., M. S. Hahm, E. J. Park, H. K. Lee, and I. H. Kim. 1998. Corosolic acid isolated from the fruit of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* is a protein kinase C inhibitor as well as a cytotoxic agent. *Planta Med.* **64**: 468-470.
- An, B. J., B. Y. Kang, and J. T. Lee. 2002. Development of cosmetic material from Korean *Crataegi fructus* extract. *Kor. J. Herbology* **17**: 39-50.
- An, B. J. and J. T. Lee. 2002. Studies on biological activity from extract of *Crataegi fructus*. *Kor. J. Herbology* **17**: 29-38.
- Bae, M. H. and H. H. Kim. 2003. Mechanism of *Crataegi fructus* extract induced endothelium-dependent vasorelaxation in rabbit carotid artery. *Kor. J. Herbology* **18**: 169-180.
- Choi, O.-K., Y. Kim, G.-S. Cho, and C.-K. Sung. 2002. Screening for antimicrobial activity from korean plants. *Kor. J. Food. Nutr.* **15**: 300-306.
- El-Mousallamy, A. M. D., 1998. Chemical investigation of the constitutive flavonoid glycosides of the leaves of *Crataegus sinaica*. *Natural Prod. Sci.* **4**: 53-57.
- Hong, S. S., J. S. Hwang, S. A. Lee, X. H. Han, J. S. Ro, and K. S. Lee. 2002. Inhibitors of monoamine oxidase activity from the fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 285-290.
- Hooi, D. S. W., B. W. Bycroft, S. R. Chhabra, P. Williams, and D. I. Pritchard. 2004. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecules. *Infect. Immun.* **72**: 6463-6470.
- Jeong T. S., E. I. Hwang, H. B. Lee, E. S. Lee, Y. K. Kim, B. S. Min, K. H. Bae, S. H. Bok, and S. U. Kim. 1999. Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Med.* **65**: 261-263.
- Kang, H. C., K. K. Shim, Y. M. Ha, and W. H. Lee. 2002. New varieties with thronless branches of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *Kor. J. Hor. Sci. Technol.* **20**: 252-256.
- Kang, I.-H., J.-H. Cha, S.-W. Lee, H.-J. Kim, S.-H. Kwon, I.-H. Ham, B.-S. Hwang, and W.-K. Whang. 2005. Isolation of anti-oxidant from domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge leaves. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**: 121-128.
- Kao, E. S., C. J. Wang, W. L. Lin, Y. F. Yin, C. P. Wang, and T. H. Tseng. 2005. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* in vitro and in vivo. *J. Agric. Food. Chem.* **53**: 430-436.
- Kim J. I., H. S. Jang, J. S. Kim, and H. Y. Sohn. 2009. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**:133-139.
- Kim, J. S., G. D. Lee, J. H. Kwon, and H. S. Yeon. 1993. Antioxidative effectiveness of ether extract in *Crataegus pinnatifida* Bunge and *Terminalia chebula* Rets. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **36**: 203-207.
- Kim, J. S., G. D. Lee, J. H. Kwon, and H. S. Yeon. 1993. Identification of phenolic antioxidative components in *Crataegus pinnatifida* Bunge. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **36**: 154-157.
- Lee, H. J., and M. S. Choi. 1998. Changes of plasma and hepatic lipids, hydroxy-methyl-glutaryl CoA reductase activity and acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by supplementation of hot water extracts from *Rosa rugosa*, *Crataegus pinnatifida* and Polygon. *J. Food. Sci. Nutr.* **3**: 344-350.
- Lee, S. Y., J. H. An, H. Chun, and H. Y. Cho. 2003. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* Bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *J. Kor. Sco. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**: 60-65.
- Min, B. S., H. J. Jung, J. S. Lee, Y. H. Kim, S. H. Bok, C. M. Ma, N. Nakamura, M. Hattori, and K. Bae. 1999. Inhibitory effect of triterpenes from *Crataegus pinatifida* on HIV-I protease. *Planta Med.* **65**: 374-375.
- Min, B. S., Y. H. Kim, S. M. Lee, H. J. Jung, J. S. Lee, M. K. Ma, C. O. Lee, J. P. Lee, and K. Bae. 2000. Cytotoxic triterpenes from *Crataegus pinnatifida*. *Arch. Pharm. Res.* **23**: 155-158.
- Park, C. G., K. H. Bang, S. E. Lee, M. S. Cha, J. S. Sung, H. W. Park, and N. S. Seong. 2001. Antibacterial activity from medicinal plant extracts on the *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **9**: 251-258.
- Park, S. W., C. S. Yook, and H. K. Lee. 1994. Chemical components from the fruits of *Crataegus pinnatifida* var *psilosa*. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**: 328-335.

22. Ryu, H. Y., S. J. Park, B. H. Lee, and H. Y. Sohn. 2007. Control of Yam-putrefactive psychrotrophic bacterium using clove oil and preparation of functional fresh-cut. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 66-72.
23. Ryu, H. Y., Y. K. Kim, I. S. Kwun, C. S. Kwon, I. N. Jin and H. Y. Sohn. 2007. Thrombin inhibition activity of fructus extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *Kor. J. Life Sci.* **17**: 535-539.
24. Seo, B. I. 2005. Preventive effects of water extracts from on *Crataegi* fructus on hyperlipiderma and liver damage induced by alcohol. *Kor. J. Herbology.* **20**: 35-43.
25. Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* **299**: 152-178.
26. Sohn, H. Y., K. H. Son, C. S. Kwon, G. S. Kwon, and S. S. Kang. 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morusalba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine* **11**: 666-672.
27. Woo, S. S., Y. K. Park, C. H. Choi, K. S. Hahm, and D. G. Lee. 2007. Mode of antibacterial action of a signal peptide, Pep²⁷ from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **363**: 806-810.
28. Yun, J. S., B. H. Chung, N. Y. Kim, N. S. Seong, H. Y. Lee, J. H. Lee, and J. D. Kim. 2003. Screening of 94 plant species showing ACE inhibitory activity. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **11**: 246-251.
29. Zhang, P. C. and S. X. Xu. 2001. Flavonoid ketohexose-furanosides from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge var. *major* N. E. Br. *Phytochemistry* **57**: 1249-1253.
30. Zhang, P. C. and S. X. Xu. 2002. Two new C-glucoside flavonoids from leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge var. *major* N. E. Br. *Chinese Chem. Lett.* **13**: 337-340.

(Received Dec. 17, 2009/Accepted March 8, 2010)