

Inhibitory Effects of *Stewartia koreana* Extracts on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation

Sang Gyun Lee, Hye Soo Kim and Soo Jeong Cho*

Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

Received November 6, 2023 / Revised November 21, 2023 / Accepted November 23, 2023

This study was conducted to investigate the potential of *Stewartia koreana* as anti-microbial materials. The branches, stems and leaves of *S. koreana* were extracted into 70% ethanol and their antibacterial activity against *P. aeruginosa* was confirmed. The leaf, branch and stems extracts (1 mg/disc) showed the antibacterial activity against *P. aeruginosa* and leaf extracts showed higher antibacterial activities than those from branch extracts. The MIC against *P. aeruginosa* was 0.8 mg/ml and showed bacteriostatic action. The inhibitory effects of extract on biofilm formation and gene expression related to biofilm formation of *P. aeruginosa* was determined by biofilm biomass staining, SEM and qRT-PCR analysis. The biofilm biomass and cell growth of *P. aeruginosa* in the cultures treated with 0.2~2.0 mg/ml of *S. koreana* leaf extracts were significantly decreased in a concentration-dependent manner. We observed that the extract had an inhibitory effect on the formation of *P. aeruginosa* biofilms at concentrations of 0.8 mg/ml by SEM. qRT-PCR analysis showed that the *lasI* and *rhII* gene expression associated to quorum sensing (QS) in the cultures treated with 0.2~2.0 mg/ml of *S. koreana* leaf extracts were suppressed in a concentration-dependent manner. Based on the above results, it can be concluded that *S. koreana* leaf extracts can be used as anti-microbial material derived from natural materials, as demonstrated by the antibacterial action and inhibition of biofilm formation of *P. aeruginosa* by QS inhibition.

Key words : Antimicrobial activity, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, *Stewartia koreana* Nakai

서 론

*Pseudomonas aeruginosa*의 병원 내 감염은 물론 암 환자, 수술 후 환자, 심한 화상 환자, 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV) 감염 환자 등 면역력이 저하된 사람에게 치명적인 감염을 일으키는 기회감염균이며[6, 8, 34], 카테터, 임플란트, 심장 박동기 및 관절 보철물과 같은 의료 기기의 오염 원인으로 알려져 있다 [7]. *P. aeruginosa*는 생명을 위협하는 가장 위험한 세균 중 하나로 인식되고 있으며 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 2017년에 *P. aeruginosa*를 새로운 항생제 연구 및 개발을 위한 우선 병원체로 지정하였다 [32]. *P. aeruginosa*의 병원성 인자(virulence factors)에는 편

모, 섬모, lipopolysaccharide와 같은 세포 구성 성분, 특정 환경에서 분비되는 독소(exotoxin A, exoenzyme S)와 각종 protease (elastase, LasA protease, alkaline protease, protease IV), 용혈소(hemolysin), 계면활성 성분(rhamnolipid) 등이 있다. 이러한 병원성 인자들은 주변 환경에 영향을 받지 않고 상시 발현되는 경우도 있고, 숙주 세포 내 감염과 같은 주변 환경에 의해 특이적으로 발현되는 경우도 있다 [12]. *P. aeruginosa*는 quorum sensing (QS)을 통해 N-acyl-homoserine lactones (AHLs)이라는 세포 외 신호전달 물질 (autoinducers, AIs)을 분비하여 세포와 세포 사이에서 상호작용(cell to cell communication)을 하고, 그 결과 특정 유전자의 발현에 의해 병원성 인자들이 발현되고 바이오 필름이 형성된다[7].

바이오필름은 표면 부착 미생물과 그들이 표면에 부착한 뒤 응집하여 분비하는 세포 외 고분자물질(extracellular polymeric substances, EPS)로 이루어진 매트릭스를 말하며, 바이오필름의 형성과정은 부착, 응집, 성숙, 분산의 4단계로 이루어져 있다. 부유 상태(planktonic cell)의 *P. aeruginosa*는 섬모를 이용하여 표면에 부착하고, 부착된 상태(attached cell)의 *P. aeruginosa*는 QS을 통해 AHLs을 분비하여 군집을 형성한 다음 다당류, extracellular DNA

*Corresponding author

Tel : +82-55-772-3397, Fax : +82-55-772-3399

E-mail : sjcho@gnu.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.

(eDNA), 단백질 및 지질 등으로 이루어진 3차원 구조의 바이오필름을 형성한다[22, 29]. 바이오필름을 형성한 *P. aeruginosa*는 다양한 항생제에 내성을 나타내며, 환경적 스트레스(화학물질, 온도, 수분 등)에 잘 견디고, 숙주방어에 대한 저항성이 높아 *P. aeruginosa*에 감염되었을 때 바이오필름이 형성되면 상처치유가 지연되고, 급·만성 질환 또는 난치성 질환으로 진행될 수 있다[32]. 따라서 *P. aeruginosa* 감염증 치료에서 중요한 것은 바이오필름 발달 전 초기 단계에서 *P. aeruginosa* 감염증을 진단하는 것이지만, 전 세계적으로 급성 및 지속성 *P. aeruginosa* 감염의 발생률이 증가함에 따라 기존의 항생제 대안으로써 *P. aeruginosa*의 바이오필름 생성을 억제하거나 생성된 바이오필름을 제거할 수 있는 치료제 개발이 필요한 실정이다.

P. aeruginosa 감염증에는 주로 cephalosporin과 penicillin 계열의 항생제가 사용되었으나, 이 계열 항생제에 대한 내성균이 나타나면서 대체제로써 carbapenem 계열 항생제가 사용되고 있다. 그러나, carbapenem 계열 항생제도 사용빈도가 증가함에 따라 내성균 발생 빈도가 증가하고 있다. 최근의 연구결과에 의하면, ceftolozane-tazobactam, ceftazidime-avibactam, cefiderocol 등의 항생제가 *P. aeruginosa*에 대해 항균효과를 나타낼 뿐만 아니라 다제내성 *P. aeruginosa*에 대해서도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[14]. 이처럼 기존 항생제 사용에 따른 내성 문제가 지속적으로 제기됨에 따라 독성이 적고, 효소에 안정적인 천연물 유래 항균물질 개발에 관한 연구가 주목을 받고 있다[4]. *P. aeruginosa*에 대해 항균활성이 있는 천연물 유래 항균소재로는 산사자[31], 상산나무[2], 생강[16], 쇠비름[27], 정향[23], 천문동[13], 표고버섯[9] 등이 보고된 바 있다.

노각나무(*Stewartia* L.)는 중국, 일본, 미국, 한국 등에 분포하고 있는 차나무과(Theaceae), 노각나무속(*Stewartia*)에 속하는 수종으로 우리나라에서는 지리산 권역을 중심으로 1종의 노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)가 자생하고 있다. 노각나무는 6~7월에 동백꽃 모양의 크고 화려한 하얀색 꽃이 피고 가을에는 붉게 단풍이 드는 특징이 있어서 관상수 및 조경수로 사용되고 있고, 목재는 단단한 특징이 있어서 가구재, 장식재 등으로 사용되고 있다. 또한 최근에는 내한성과 내음성도 강하고 공해에도 잘 견디기 때문에 가로수로도 사용되고 있다[10, 21]. 예로부터 서근 활혈의 효능이 있다고 알려진 노각나무 껍질과 뿌리 껍질은 한의학에서 모란이라 불리고 있으며 타박상으로 인한 어혈을 풀어주고 풍습성으로 인한 사지마비와 동통에 효능이 있다고 기록되어 있다. 또한 노각나무 가지는 간염, 간경화증, 지방간 등의 간질환에 효과가 있다고 알려져 있다[11]. 노각나무의 생리활성에 관한 연구에 의하면 노각나무의 가지와 잎에는 dihydrochalcone, flavonoid, phenolic compound, spinasterol glycoside, hyperin 등의 화합물이 함유되어 있고[1, 30], 이 화합물들은 항산화 활성[18],

HIV-protease 억제 및 NO (Nitric oxide) 생성 억제[19], 신생혈관 촉진[25], 항균활성[17] 등의 약리작용이 있다. 이처럼 노각나무에는 다양한 생리활성이 있어서 조경 및 원예적 가치 외에도 식의약품소재로써 이용가능성이 높을 것으로 기대되지만 노각나무의 약리작용에 관한 연구는 아직은 미비한 실정이다.

본 연구에서는 *P. aeruginosa*에 대한 노각나무 추출물의 항균활성과 병원성 인자인 바이오필름 형성에 미치는 영향을 조사하여 천연물 유래 항균소재로써 노각나무 추출물의 이용 가능성을 알아보려고 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 추출물

추출물의 항균활성을 확인하기 위해 사용된 *P. aeruginosa* KACC14021 균주는 국립농업과학원 농업미생물은행(KACC)에서 분양받았으며, 분양받은 균주는 Luria agar (LA; BD, Franklin Lakes, USA) 배지에 계대한 다음 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 사용하였다.

노각나무(*S. koreana* Nakai) 가지, 줄기, 잎은 (주)농업회사법인 모리(경남 거창군)에서 건조된 것을 구매한 다음 분쇄하여 70% 에탄올에 침지하였다. 침지한 노각나무 가지, 줄기, 잎은 80°C에서 2시간 동안 3회 반복 추출하였고, 추출물은 filter paper (5 µm, ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 다음 회전감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축하였다. 농축한 추출물은 동결건조기(PVTFD20R, ilShinBioBase, Dongducheon, Korea)로 5일 동안 동결건조한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA)에 용해하여 4°C에 보관하면서 사용하였다. 노각나무 가지, 줄기, 잎 추출물의 추출 수율은 각각 14%, 19%, 34%였다.

*P. aeruginosa*에 대한 추출물의 항균활성

*P. aeruginosa*에 대한 추출물의 항균활성은 agar diffusion method [3]에 따라 추출물(1 mg/ml)이 함유된 paper disc (8 mm diameter, ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 *P. aeruginosa* (6.0×10^5 CFU/ml)가 도말된 LA 배지에 얹어 배양한 후 paper disc 주위에 나타난 halo zone의 크기를 측정하여 확인하였으며, 음성 대조구로는 용매인 DMSO를 사용하였다.

추출물의 최소성장억제 농도(MIC)와 최소살균농도(MBC) 측정

추출물의 최소성장억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 액체 배지 희석법을 이용하여 확인하였다[24]. LA 배지에서 24시간 동안 배양한 *P. aeruginosa*는 1.2×10^5 CFU/ml의 밀도로 LB 배지에 희석한 다음 96-

well plate에 분주하였고, 희석된 배양액에 추출물을 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리한 다음 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 흡광도(600 nm)를 측정하여 *P. aeruginosa*의 증식이 억제된 최소 농도를 MIC로 정하였다. 추출물의 최소살균 농도(minimum bactericidal concentration, MBC)는 MIC로 확인된 추출물 농도와 그 이상의 농도에 해당되는 MIC 배양액을 추출물이 없는 고체배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 다음 *P. aeruginosa*가 99.9% 사멸된 추출물의 농도로 정하였다.

*P. aeruginosa*의 colony morphology 변화

추출물에 의한 *P. aeruginosa*의 colony morphology 변화는 Ueda 등[33]의 방법을 이용하여 확인하였다. LA배지에서 24시간 동안 배양한 *P. aeruginosa*는 tryptone (BD, Franklin Lakes, USA) 액체배지에 $1.2 \times 10^{5-6}$ CFU/ml의 밀도로 희석하였다. 희석한 *P. aeruginosa* 배양액에 추출물을 0.4-2.0 mg/ml 농도로 처리한 후 0.004% congo red (Samchun, Samchun pure chemical Co., LTD., Pyeongtaek, Korea)와 0.002% coomassie brilliant blue (Sigma Aldrich Co., St. Louise, USA)가 첨가된 tryptone 고체배지에 접종한 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 colony morphology 변화를 관찰하였다.

추출물에 의한 *P. aeruginosa*의 바이오필름 바이오매스 (biofilm biomass) 형성 억제

추출물에 의한 *P. aeruginosa*의 바이오필름 바이오매스 형성 억제효과는 Zhou 등[35]의 방법을 이용하여 확인하였다. 바이오필름 바이오매스 형성을 유도하기 위해 96-well plate에 *P. aeruginosa* ($1.2 \times 10^{5-6}$ CFU/ml)를 분주한 후 추출물을 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리한 다음 37°C에서 배양하였다. 바이오필름 바이오매스가 형성된 96-well plate는 멸균 증류수로 3회 세척한 다음 건조한 후 0.1% safranin (Samchun, Samchun pure chemical Co., LTD., Pyeongtaek, Korea)으로 10분 동안 염색하였다. 염색된 96-well plate는 멸균 증류수로 세척한 다음 건조하였으며, safranin에 염색된 바이오필름 바이오매스는 30% acetic acid (Sigma Aldrich Co., St. Louise, USA)에 용해한 후 spectrophotometer (Softmax M5, Molecular Devices, USA)로 흡광도 (490 nm)를 측정하여 확인하였다.

추출물에 의한 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성 억제

추출물에 의한 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성 억제효과는 Fratesi 등[5]의 방법에 따라 주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM; JEOL LTD., JSM-6701F, Japan)을 이용하여 확인하였다. Coverslip (12 mm, SPL Ltd., Pochen, Korea)이 들어있는 24-well plate에 $1.2 \times 10^{5-6}$ CFU/ml 밀도의 *P. aeruginosa*를 분주한 다음 1.0 mg/ml의

추출물을 처리하였고, 추출물이 처리된 24-well plate는 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 바이오필름 형성을 유도하였다. 바이오필름이 형성된 coverslip은 PBS (Phosphate buffer saline, Bioneer, Daejeon, Korea)로 3회 세척한 다음 2.5% glutaraldehyde (Sigma aldrich Co., St. Louis, USA)를 처리하여 coverslip에서 배양한 *P. aeruginosa*와 바이오필름을 고정하였고, 30, 50, 60, 70, 80, 95 및 99%의 에탄올을 순차적으로 처리하여 *P. aeruginosa*와 바이오필름의 수분을 제거한 후 실온에서 건조하였다. 건조된 시료는 platinum으로 코팅한 후 추출물에 의한 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성 억제능을 확인하기 위해 주사전자현미경으로 관찰하였다.

추출물 처리에 따른 *P. aeruginosa*의 quorum sensing 관련 mRNA 발현

추출물이 *P. aeruginosa*의 QS 관련 mRNA 발현에 미치는 영향은 qRT-PCR로 조사하였다. Total RNA는 *P. aeruginosa* ($1.2 \times 10^{5-6}$ CFU/ml)에 추출물을 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리한 다음 37°C에서 배양한 후 추출물이 처리된 *P. aeruginosa* 배양액을 원심분리하여 얻은 pellet로부터 RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였다. cDNA는 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA)를 이용하여 합성하였고, qRT-PCR은 ssoadvanced™ universal SYBR® green supermix (Bio-Rad, Hercules, California, USA)를 사용하여 CFX96 touch™ qRT-PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, California, USA)으로 수행하였으며, 실험에 사용된 primer는 QS 관련 유전자인 *lasI* (Forward: 5'-GTGTTCAAGGAGCGCAAAGG-3', Reverse: 5'-ATTCGCCAGCAACCGAAAAC-3')와 *rhII* (Forward: 5'-GGTTTTCGGATGGTCTGAACT-3', Reverse: 5'-GCTACCGGCATCAGGTCTTC-3')를 타겟으로 디자인하였다[32]. qRT-PCR은 95°C에서 30초 동안 denaturation 한 다음 95°C에서 denaturation 10초, 60°C에서 annealing 20초의 조건으로 39 cycle을 수행한 후 60°C에서 20초 동안 extension하였다. *lasI*와 *rhII* 유전자의 mRNA 발현량은 *P. aeruginosa*의 housekeeping gene인 16S rRNA (Forward: 5'-CATGCGTACGGAACCGATTG-3', Reverse: 5'-GGTAGACTGGGTGCACTTCG-3')을 endogenous control로 사용하여 확인하였으며, 증폭된 유전자의 정확성은 melt-curve를 분석하여 확인하였다.

통계처리

모든 실험은 5회 이상 반복하여 수행하였으며, 실험 결과의 평균값과 표준오차는 SAS (Statistical analysis system, USA) program으로 구하였고, 통계적 유의성 검정은 Duncan's 다중검정법을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 확인하였다.

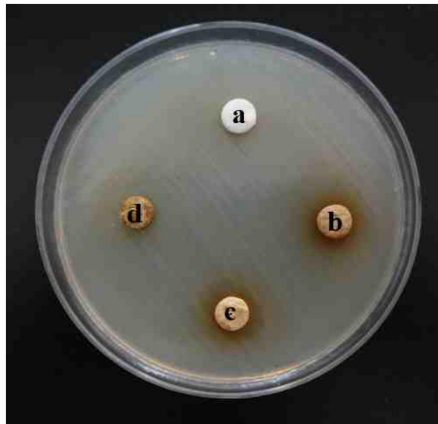


Fig. 1. Antibacterial activity of *S. koreana* extracts against *P. aeruginosa* KACC14021. a: DMSO as a negative control, b: ethanol extracts of *S. koreana* leaves (1 mg/disc), c: ethanol extracts of *S. koreana* branches (1 mg/disc), d: ethanol extracts of *S. koreana* stems (1 mg/disc).

결과 및 고찰

*P. aeruginosa*에 대한 부위별 노각나무 추출물의 항균활성

*P. aeruginosa*에 대한 부위별 노각나무 추출물의 항균활성은 agar diffusion method [3]에 따라 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다. 노각나무 부위별 추출물(1 mg/disc) 중 잎과 줄기 추출물이 *P. aeruginosa*에 대해 항균활성을 나타내었으며, 잎 추출물의 항균활성이 가장 우수하였다.

*P. aeruginosa*에 대해 항균활성을 나타내는 천연물 유래 항균소재로는 산사자 메탄올 추출물[31], 상산나무 잎 메탄올 및 70% 에탄올 추출물[2], 쇠비름 메탄올 추출물[27], 정향 물 추출물[23], 표고버섯 아세톤, 에틸 아세테이트, 에탄올 추출물[9] 등이 보고된 바 있다.

*P. aeruginosa*에 대한 노각나무 잎 추출물의 최소성장억제 농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)

노각나무 추출물 중 잎 추출물이 *P. aeruginosa*에 대해 가장 우수한 항균활성을 나타내었으며, *P. aeruginosa*에 대한 노각나무 잎 추출물의 MIC는 0.8 mg/ml였고, 0.8-2.0 mg/ml의 추출물 처리농도에서 *P. aeruginosa*에 대한 노각나무 잎 추출물의 항균활성은 농도의존적으로 증가하였

다. *P. aeruginosa*에 대한 노각나무 잎 추출물의 MBC를 확인하기 위해 MIC를 확인한 후 MIC인 0.8 mg/ml와 그 이상의 농도인 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml에 해당하는 *P. aeruginosa* 배양액을 추출물 무첨가 고체배지에 배양한 결과, MIC인 0.8 mg/ml 이상의 농도에서 colony가 관찰되었기 때문에 노각나무 잎 추출물은 *P. aeruginosa*에 대해 정균작용을 하는 것으로 판단된다(Table 1).

Lim & Kim [27]의 보고에 의하면 쇠비름(*Portulaca oleracea*) 메탄올 추출물은 300 mg/ml의 농도에서 *P. aeruginosa*에 대해 항균활성을 나타내었고, *P. aeruginosa*에 대한 정향 물 추출물의 항균활성에 관한 Lee 등[23]의 보고에 의하면 정향 물 추출물은 추출물의 농도가 증가함에 따라 항균활성도 증가한다고 보고하였다. 따라서 노각나무 잎 추출물은 낮은 농도에서 *P. aeruginosa*에 대해 정균작용을 나타내기 때문에 천연물 유래 항균 소재로 사용할 경우 경제성이 있을 것으로 판단된다.

노각나무 잎 추출물이 *P. aeruginosa*의 colony morphology에 미치는 영향

노각나무 잎 추출물이 *P. aeruginosa*의 colony morphology에 미치는 영향은 Ueda 등[33]의 방법에 따라 congo red와 coomassie brilliant blue가 첨가된 tryptone 고체배지에서 확인하였다. 노각나무 잎 추출물(1 mg/ml) 첨가배지에서 배양된 *P. aeruginosa*의 colony morphology는 smooth한 형태로 관찰되었지만, 노각나무 잎 추출물 대신 DMSO를 첨가한 대조구의 colony morphology는 rugose한 형태로 관찰되었다(Fig. 2). 이는 식물유래 galactoside인 raffinose가 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성에 미치는 영향에 관한 Kim 등[15]의 보고와도 일치하는 결과이며, Kim 등[15]의 보고에 의하면 raffinose (10 μM) 첨가배지에서 배양한 *P. aeruginosa*의 colony morphology도 smooth한 형태였으며, 바이오필름 형성이 억제되었다. Colony morphology는 EPS의 overexpression과 관련된 것으로 알려져 있으며, smooth한 형태의 colony morphology는 EPS가 감소되었다는 것을 의미한다. EPS는 주로 다당류와 단백질, 지질, eDNA 등으로 구성되어 있는 생체 고분자 혼합물로서 균집을 이루고 있는 그람 음성 세균의 세포 사이에 공간을 만들고 바이오필름 매트릭스 구조를 형성하는데 관여하며, 세균은 자외선, 온도변화, pH, 높은 염도, 고압, 영양분

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of ethanol extract of *S. koreana* leaves against *P. aeruginosa*.

	Concentration (mg/ml)						
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2.0
Minimum inhibitory concentration	+ ^a	+	+	+	+/- ^b	- ^c	-
Minimum bactericidal concentration	+	+	+	+	+	+	+

^a, growth on test medium; ^b, slow growth on test medium; ^c, no growth on test medium.

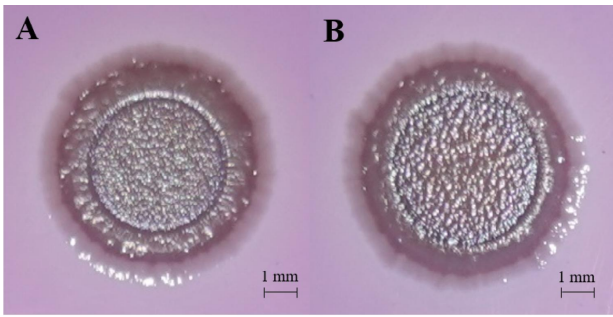


Fig. 2. Comparison of colony morphology on tryptone soy agar plate supplemented congo red and coomassie brilliant blue. colony morphology against *P. aeruginosa* KACC14021 grown without (A) and with (B) ethanol extract of leaves from *S. koreana*.

고갈과 같은 외부환경 변화로와 항생제, 화학물질 등으로 부터 자신을 보호하기 위해 바이오필름을 형성하고 유지 하는 것으로 알려져 있다[27, 28]. 따라서, 노각나무 잎 추출물은 EPS 생성을 억제함으로써 *P. aeruginosa*의 colony morphology와 바이오필름 형성에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

노각나무 잎 추출물이 *P. gingivalis*의 바이오필름 바이오매스 형성에 미치는 영향

노각나무 잎 추출물이 *P. aeruginosa*의 바이오필름 바이오매스 형성에 미치는 영향은 Zhou 등[35]의 방법에 따라 양적 분석법으로 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 노각나무 잎 추출물(0.2-2.0 mg/ml)을 *P. aeruginosa* 현탁액에 처리한 후 24시간 동안 배양했을 때, *P. aeruginosa*의 바이오필름 바이오매스 형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 노각나무 잎 추출물이 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2.0 mg/ml의 농도로 처리된 배양액에서 *P. aeruginosa*의 바이오필름 바이오매스 형성률은 각각 89.46±0.95%, 78.68

±0.99%, 67.29±0.65%, 58.52 ±0.65%, 54.70±0.87, 55.05±0.37%로 추출물의 농도가 높아질수록 바이오필름 바이오매스 형성은 농도의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이 결과는 *P. aeruginosa*에 대한 생강 유래 zingerone의 항균활성 및 바이오필름 형성 억제에 관한 Kumar 등[20]의 보고와 일치하는 결과이며, zingerone도 추출물의 농도가 높아질수록 바이오필름 형성 및 바이오필름 관련 mRNA 발현이 농도의존적으로 억제되었다. 따라서 노각나무 잎 추출물은 *P. aeruginosa*의 생육을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 바이오필름 바이오매스 형성도 억제할 수 있기 때문에 천연물 유래 항균 소재로써 개발 가능성이 있다고 판단된다.

노각나무 잎 추출물이 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성에 미치는 영향

노각나무 잎 추출물이 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성에 미치는 영향은 추출물을 처리하여 배양한 *P. aeruginosa*와 추출물 대신 DMSO를 처리하여 배양한 *P. aeruginosa*(대조구)를 주사전자현미경으로 관찰하여 확인하였다(Fig. 4). 노각나무 잎 추출물 처리구에 비해 대조구에서는 *P. aeruginosa* 주변에 EPS와 바이오필름이 관찰되었지만, 추출물 처리구에서는 *P. aeruginosa* 주변에 EPS와 바이오필름이 관찰되지 않았다. 이와 같은 연구결과는 대조구에 비해 추출물 처리구의 세포 주변에서 EPS와 바이오필름이 관찰되지 않는다는 점에서 이전의 연구들과 일치하였다. Zingerone의 *P. aeruginosa* 바이오필름 형성 저해에 관한 Kumar 등[20] 보고에서도 zingerone을 첨가하지 않은 *P. aeruginosa* PAO1 (대조구)에서는 세포가 균집을 이루고 있고 바이오필름이 관찰되었지만, zingerone을 첨가한 처리구에서는 세포가 흩어져 있고 바이오필름이 관찰되지 않았다.

P. aeruginosa 감염증 치료가 어려운 이유는 *P. aerugi-*

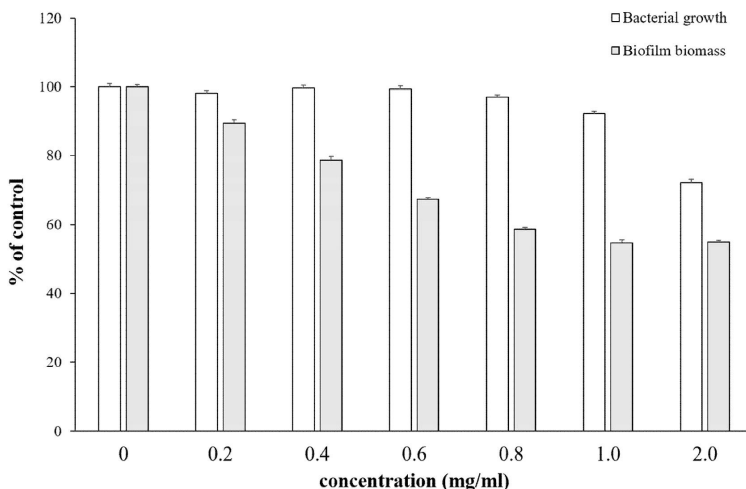


Fig. 3. Bacterial growth and biofilm formation of *P. aeruginosa* KACC14021 in LB treated with ethanol extracts of *S. koreana* leaves (0.2-2.0 mg/ml). Growth and biofilm formation were measured under anaerobic condition. All assays were performed in triplicate, and mean values and standard deviations are shown.

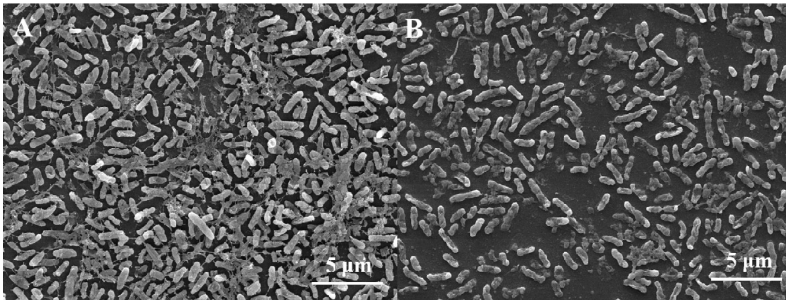


Fig. 4. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs, at 10,000X magnification, of *P. aeruginosa* KACC14021 in the absence (A) and presence (B) of ethanol extracts of *S. koreana* leaves (0.8 mg/ml). Scale bar, 5 µm.

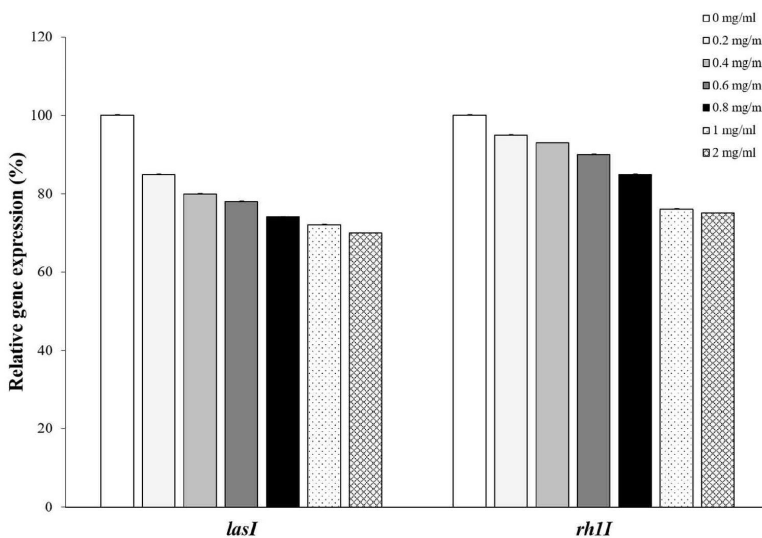


Fig. 5. Effects of ethanol extracts of *S. koreana* leaves on mRNA expression of *lasI* and *rhII* genes in *P. aeruginosa* KACC14021 by qRT-PCR analysis. The mRNA expression was normalized to 16S rRNA gene used as a reference gene. Results are shown as the \pm SD of five replicates. * p <0.05, as compared with the control.

*nosa*가 바이오필름을 형성하기 때문이며 *P. aeruginosa*의 바이오필름 발달과 확산은 QS, EPS 및 c-di-GMP를 수반하는 다단계 프로세스에 의해 조절된다[32]. 따라서 노각나무 잎 추출물은 *P. aeruginosa*의 바이오필름 발달과 확산에 관여하는 인자의 발현을 억제할 수 있는 것으로 판단된다.

노각나무 잎 추출물이 *P. aeruginosa*의 QS관련 mRNA 발현에 미치는 영향

노각나무 잎 추출물이 *P. aeruginosa*의 QS 관련 mRNA 발현에 미치는 영향은 *lasI*와 *rhII* 유전자를 primer로 이용한 qRT-PCR로 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다. 노각나무 잎 추출물을 0.2-2.0 mg/ml의 농도로 처리한 후 *P. aeruginosa*의 QS 관련 유전자인 *lasI*와 *rhII* 발현 변화를 qRT-PCR로 확인한 결과, *P. aeruginosa*의 *lasI*와 *rhII* 유전자 모두 추출물의 농도가 높아질수록 mRNA 발현이 억제되는 경향을 나타내었다.

*P. aeruginosa*에서 독성인자, 운동성, 생물발광 및 바이오필름 형성은 QS에 의해 제어되며, QS은 세포 밀도의 변화와 환경적 스트레스에 반응하여 세포 외 신호전달물질인 AHL을 분비함으로써 시작된다. *P. aeruginosa*의 QS

에는 Las, Rhl, PQS 및 IQS 경로가 있고, 이 중에서도 Las와 Rhl가 세포 외 신호전달물질인 AHL생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며[26], *P. aeruginosa*의 QS을 차단하는 것은 감염증을 치료하는 새로운 방법이 될 것으로 기대되고 있다.

따라서 노각나무 잎 추출물의 처리 농도에 따라 *P. aeruginosa*의 *lasI*와 *rhII* mRNA 발현이 감소하였다는 것은 AHL의 생성이 억제되었다는 것이고 AHL의 생성이 억제되면 QS이 시작되지 않기 때문에, 노각나무 잎 추출물은 QS의 신호전달물질인 AHL의 생성을 억제함으로써 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성을 억제하는 것으로 판단된다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Bae, J. J. and Kwak, J. H. 2015. Phenolic compounds from

- the twigs of *Stewartia pseudocamellia*. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**, 303-308.
2. Choe, S. B. and Kang, S. T. 2014. Investigation of antimicrobial activity and stability of *Orixa japonica* Thunb. leaf extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**, 39-43.
 3. Davidson, P. M. and Parish, M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.* **43**, 148-155.
 4. Eum, J. S. 2012. Activity of nature plants extracts against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *J. Korea Inst. Inf. Commun. Eng.* **16**, 1799-1804.
 5. Fratesi, S. E., Lynch, F. L., Kirkland, B. L. and Brown, L. R. 2004. Effects of SEM preparation techniques on the appearance of bacteria and biofilms in the carter sandstone. *J. Sediment. Res.* **74**, 858-867.
 6. Gale, M. J., Maritato, M. S., Chen, Y. L., Abdulateef, S. S. and Ruiz, J. E. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* causing inflammatory mass of the nasopharynx in an immunocompromised HIV infected patient: a mimic of malignancy. *IDCases* **2**, 40-43.
 7. Ghosh, R., Das, A. and Mallik, S. 2019. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: a review. *Indian J. Pharm. Sci.* **81**, 797-806.
 8. Gomila, A., Carratalà, J., Badia, J. M., Camprubí, D., Piriz, M., Shaw, E., Diaz-Brito, V., Espejo, E., Nicolás, C., Brugués, M., Perez, R., Lèrida, A., Castro, A., Biondo, S., Fraccalvieri, D., Limón, E., Gudiol, F. and Pujol, M. 2018. Preoperative oral antibiotic prophylaxis reduces *Pseudomonas aeruginosa* surgical site infections after elective colorectal surgery: a multicenter prospective cohort study. *BMC Infect. Dis.* **18**, 1-9.
 9. Han, S. R., Kim, M. J. and Oh, T. J. 2015. Antioxidant activities and antimicrobial effects of solvent extracts from *Lentinus edodes*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 1144-1149.
 10. Im, S. B., Kim, J. K., Choi, Y. I., Choi, S. H., Kwon, H. J., Song, H. K. and Lim, Y. P. 2011. Construction of a full-length cDNA library from korean stewartia (*Stewartia koreana* Nakai) and characterization of EST dataset. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* **29**, 116-122.
 11. Jang, J. H. 2011. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of phenolic compounds from stems of *Stewartia koreana* Nakai. M.S. dissertation, Chung-ang University, Seoul, Korea.
 12. Jung, K. J., Choi, Y. S., Ha, C. W., Shin, J. H. and Lee, J. H. 2010. Analysis of quorum sensing-related phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Korean J. Microbiol.* **46**, 240-247.
 13. Jung, M. G., Kim, S. I., Jeong, H. J., Lee, C. Y., Son, H. J., Hwang, D. Y., Lee, H. S. and Kim, D. S. 2015. Antimicrobial activity against respiratory bacteria by *Asparagus cochinchinensis* extracts and its antioxidant capacity. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**, 367-372.
 14. Kang, C. I. 2022. Antibiotics for multidrug-resistant gram-negative bacteria. *J. Korean Med. Assoc.* **65**, 490-497.
 15. Kim, H. S., Cha, E. J., Kim, Y. H., Jeon, Y. H., Olson, B. H., Byun, Y. J. and Park, H. D. 2016. Raffinose, a plant galactoside, inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via binding to LecA and decreasing cellular cyclic diguanylate levels. *Sci. Rep.* **6**, 1-10.
 16. Kim, H. S. and Park, H. D. 2013. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS One.* **8**, 1-16.
 17. Kim, H. S., Park, M. J., Kim, S. J., Kim, B. K., Park, J. H., Kim, D. H. and Cho, S. J. 2021. Antibacterial and antibiofilm activities of leaf extracts of *Stewartia koreana* against *Porphyromonas gingivalis*. *J. Life Sci.* **31**, 330-337.
 18. Kim, M. H., Jang, J. H., Oh, M. H., Heo, J. H. and Lee, M. W. 2014. The comparison of DPPH-scavenging capacity and anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the stems of *Stewartia koreana* Nakai. *Nat. Prod. Res.* **28**, 1409-1412.
 19. Kim, Y., Min, H. Y., Park, H. J., Lee, E. J., Park, E. J., Hwang, H. J., Jin, C., Lee, Y. S. and Lee, S. K. 2004. Suppressive effects of nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by *Calystegia soldanella* methanol extract on lipopolysaccharide-activates RAW 264.7 cells. *Eur. J. Cancer Prev.* **13**, 419-424.
 20. Kumar, L., Chhibber, S. and Harjai, K. 2013. Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Fitoterapia* **90**, 73-78.
 21. Kwon, H. J. and Song, H. K. 2008. Vegetation structures and ecological properties of *Stewartia koreana* community. *J. Korean Soc. For. Sci.* **97**, 296-304.
 22. Lee, J. K. 2012. Bacterial quorum sensing and quorum quenching for the inhibition of biofilm formation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 83-91.
 23. Lee, O. H., Jung, S. H. and Son, J. Y. 2004. Antimicrobial activity of clove extract by extraction solvents. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 494-499.
 24. Lee, S. H. and Baek, D. H. 2013. Antibacterial activity of hydrogen-rich water against oral bacteria. *Int. J. Oral Biol.* **38**, 81-85.
 25. Lee, T. H., Lee, G. W., Kim, C. W., Bang, M. H., Baek, N. I., Kim, S. H., Chung, D. K. and Kim, J. 2010. *Stewartia koreana* extract stimulates proliferation and migration of human endothelial cells and induces neovascularization *in vivo*. *Phytother. Res.* **24**, 20-25.
 26. Li, Q., Mao, S., Wang, H. and Ye, X. 2022. The molecular architecture of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Mar. Drugs* **20**, 1-28.
 27. Lim, M. K. and Kim, M. 2001. Antimicrobial activity of methanol extract from soibirhym (*Portulaca oleracea*) against food spoilage or foodborne disease microorganisms and the composition of the extract. *Korean J. Food Cookery Sci.* **17**, 565-570.
 28. Patil, P. D., Zheng, H., Burns, F. N., Ibanez, A. C. S., Jin, Y. C. and Luk, Y. Y. 2022. Chimeric ligands of pili and lectin a inhibit tolerance, persistence, and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* over a wide range of

- phenotypes. *ACS Infect. Dis.* **8**, 1582-1593.
29. Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P. and Jaziri, M. E. 2015. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Res. Int.* **2015**, 1-17.
 30. Roh, H. J., Noh, H. J., Na, C. S., Kim, C. S., Kim, K. H., Hong, C. Y. and Lee, K. R. 2015. Phenolic compounds from the leaves of *Stewartia pseudocamellia* Maxim. and their whitening activities. *Biomol. Ther (Seoul)*. **23**, 283-289.
 31. Ryu, H. Y., Ahn, S. M., Kim, J. S., Jung, I. C. and Sohn, H. Y. 2010. Antimicrobial activity of fruit of *Crataegus pinnatifida* Bunge against multidrug resistant pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida sp.* *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 77-83.
 32. Thi, M. T. T., Wibowo, D. and Rehm, B. H. A. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1-25.
 33. Ueda, A. and Wood, T. K. 2009. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog.* **5**, 1-15.
 34. Wu, W., Jin, Y., Bai, F. and Jin, S. 2014. *Molecular Medical Microbiology*, pp. 753-767, 2nd ed., Academic Press: Cambridge, MA, USA.
 35. Zhou, L., Ding, Y., Chen, W., Zhang, P., Chen, Y. and Lv, X. 2013. The *in vitro* study of ursolic acid and oleanolic acid inhibiting cariogenic microorganisms as well as biofilm. *Oral Dis.* **19**, 494-500.

초록 : 노각나무 추출물이 *Pseudomonas aeruginosa*의 바이오필름 형성에 미치는 영향

이상균 · 김혜수 · 조수정*

(경상국립대학교 제약공학과)

본 연구에서는 천연물 유래 항균소재로써 노각나무의 이용 가능성을 알아보기 위해 노각나무 가지, 줄기, 잎을 에탄올에 추출한 다음 *P. aeruginosa*에 대한 추출물의 항균활성을 조사하였다. 노각나무 부위별 추출물(1 mg/disc) 중 잎과 줄기 추출물이 *P. aeruginosa*에 대해 항균활성을 나타내었으며, 잎 추출물의 항균활성이 가장 우수하였다. *P. aeruginosa*에 대한 노각나무 잎 추출물의 MIC는 0.8 mg/ml였고 정균작용을 나타내었다. 노각나무 잎 추출물이 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리된 배양액에서 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성은 추출물의 농도가 증가할수록 농도의존적으로 억제되는 경향을 보였다. 또한 주사전자현미경으로 노각나무 잎 추출물(0.8 mg/ml)이 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성에 미치는 영향을 관찰한 결과에 의하면 추출물 대신 DMSO를 처리한 대조구에서는 세포 주변에서 EPS와 바이오필름이 관찰되었지만 추출물을 처리한 처리구의 세포 주변에서는 EPS와 바이오필름이 관찰되지 않았다. qRT-PCR을 이용하여 *P. aeruginosa*의 QS 관련 유전자인 *lasI*와 *rhII* mRNA 발현 변화를 qRT-PCR로 확인한 결과, 노각나무 잎 추출물이 0.2-2.0 mg/ml의 농도로 처리된 배양액에서 *lasI*와 *rhII* mRNA 발현은 추출물의 농도가 높아질수록 농도의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하면 노각나무 잎 추출물은 *P. aeruginosa*에 대한 항균활성과 바이오필름 형성 억제능이 우수하기 때문에 천연물 유래 항균소재로써 이용 가능성이 높을 것으로 판단된다.