



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

헛개나무열매 추출물의 항메티실린 내성
황색포도상구균에 대한 항균활성



2009년 2월

부경대학교 산업대학원

식품산업공학과

정영아

공학석사 학위논문

헛개나무열매 추출물의 항메티실린 내성
황색포도상구균에 대한 항균활성

지도교수 : 김 영 목



이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2009년 2월

부경대학교 산업대학원

식품산업공학과

정 영 아

이 논문을 공학석사 학위논문으로
인준함

2009년 2월



주 심 농 학 박사 김 선 봉 (인)

위 원 수 산 학 박사 조 영 제 (인)

위 원 약 학 박사 김 영 목 (인)

**Antibacterial Activity against MRSA(Methicillin Resistant
Staphylococcus aureus) of *Hovenia dulcis* Seed Extracts**

Young-Ah Jung

Department of Food Industrial Engineering,
Graduate School of Industry,
Pukyong National University

Abstract

In an effort to discover an alternative therapeutic agent against methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA), several medicinal plants were evaluated for its antibacterial activity against MRSA. A methanol extract of *Hovenia dulcis* seed exhibited significant antibacterial activity against MRSA. To perform more detailed investigation on antibacterial activity, the methanol extract of *Hovenia dulcis* seed was further fractionated with organic solvents such as *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol. Among them, the ethyl acetate fraction showed the highest antibacterial activity against *S. aureus* and MRSA strains with minimum inhibitory concentration (MIC) from 512 to 1,024 $\mu\text{g/mL}$. The *n*-hexane fractions also exhibited antibacterial activity against MRSA strains, even though the activity was less than that of ethyl acetate fraction. No antibacterial activity against MRSA, however, was observed in butanol and water fraction. The ethyl acetate fraction also exhibited the antibacterial activity against other bacterial strains including gram-negative food pathogenic bacteria. Content of phenolic compounds was the lowest in the ethyl acetate fraction compared that of other fraction,

suggesting that the anti-MRSA activity of *H. dulcis* seed would originated from non-phenolic compounds in the ethyl acetate fraction. However, the anti-MRSA activity in the hexane fraction would mainly resulted from the phenolic compounds since the content was the highest in that fraction.



목 차

Abstract	i
목 차	iii
List of Tables	v
List of Figures	vi
서 론	1
재료 및 방법	3
1. 재료	3
2. 사용 균주	3
3. 시약	3
4. 헛개나무 열매 추출물의 제조 및 분리	4
5. Polyphenol 화합물 정량	5
6. Flavonoid 화합물 정량	5
7. Proanthocyanidin 정량	7
8. 항균활성 측정	10
9. 최소저해농도 측정	10
10. 통계 처리	12
결과 및 고찰	13
1. MRSA 에 대한 헛개나무열매 추출물의 항균활성	13
1.1. 헛개나무열매 추출물의 항균활성	13
1.2. MRSA 에 대한 헛개나무열매 추출물의 MIC 해석	16
1.3. 다른 세균에 대한 헛개나무열매 추출물의 MIC 해석	19
2. 헛개나무열매 용매분획물의 수율 및 그 특징	19
3. 헛개나무열매 추출물의 phytochemical 분석	22

3.1. 총 polyphenol의 함량	22
3.2. Flavonoid의 함량	22
3.2. Proanthocyanidin의 함량	24
요 약	26
감사의 글	27
참고문헌	28



List of Tables

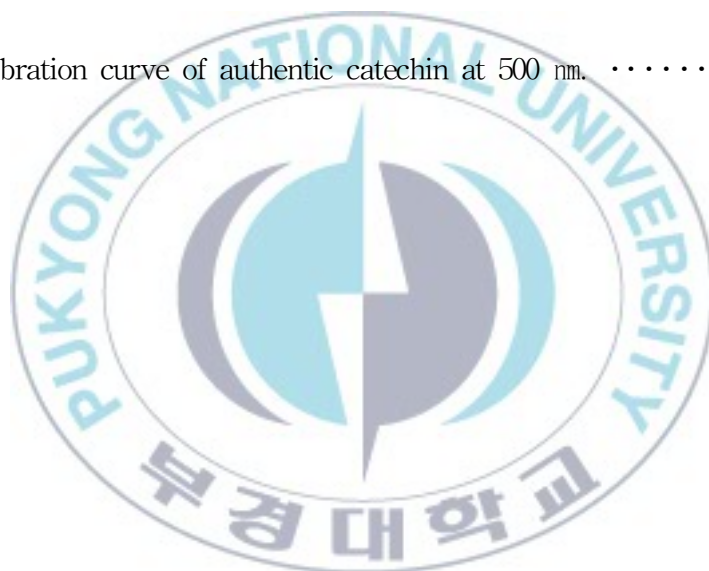
Table 1. Antibacterial activity of methanol extract of various plants against <i>Staphylococcus aureus</i> and methicillin resistant <i>S. aureus</i> (MRSA)	14
Table 2. Antibacterial activity of different solvent fractions of <i>Hovenia dulcis</i> seed methanol extract against <i>Staphylococcus aureus</i> and methicillin resistant <i>S. aureus</i> (MRSA) strains	15
Table 3. Antibacterial activity of different solvent fractions of <i>Hovenia dulcis</i> seed methanol extract against several bacterial strains	17
Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) of solvent fractions of <i>Hovenia dulcis</i> seed methanol extract against <i>Staphylococcus aureus</i> and methicillin resistant <i>S. aureus</i> (MRSA)	18
Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) of hexane fraction and ethyl acetate fraction of <i>Hovenia dulcis</i> seed methanol extract against several bacterial strains	20
Table 6. Yield of serial solvent fraction of <i>Hovenia dulcis</i> seed methanol extract	21

Table 7. Content of total phenolics, flavonoids, and proanthocyanidin
of fractions fractionated of *Hovenia dulcis* seed methanol
extract 23



List of Figures

- Fig. 1. Scheme of extraction and liquid-liquid solvent fraction. 6
- Fig 2. Calibration curve of authentic gallic acid at 765 nm. 8
- Fig 3. Calibration curve of authentic rutin at 415 nm. 9
- Fig 4. Calibration curve of authentic catechin at 500 nm. 11



서 론

한약재는 한국 등 동남아시아에서 수백년동안 민간요법으로서 알레르기, 신진대사장애, 습진, 천식등 건강관리에 이용되어져 왔다. 헛개나무 (*Hovenia dulcis*)는 갈매나무과의 교목으로 높이는 10-17 m정도이며, 열매는 갈색을 띄고 있다. 열매의 모양은 닭의 발톱모양으로서 지름 8 mm정도이다. 헛개나무는 지구자나무 및 괴자라고도 한다. 열매와 줄기는 단맛과 은은한 향을 내어 식용, 과주로 사용되어 맛을 돋우고, 약용으로는 주독을 제거하는데 사용되어 왔다. 술을 썩히는 작용이 있다고 본초강목에 기록되어져 있으며, 생즙은 술독을 풀고 구역질을 멎게 한다고 하였다. 이는 헛개나무 열매의 알코올 분해능과 간 해독 작용이 과음시 부작용으로 나타나는 황달, 지방간, 간경화증, 위장병 및 대장염등의 간기능보호에 효능이 뛰어난 것과 일치한다(Kim, 1996; Hase *et al.*, 1997). 전통적으로 종자는 주정중독, 소변불리, 구통에 좋고 과경은 건위, 자양보혈에 효과가 있다고 전해진다. 최근에는 헛개나무의 열매에서 분리한(+)-dihydromyricetin이 알코올분해 및 간기능회복에 효과가 있다는 보고가 있다(Ko, 2006). 또한 헛개나무열매 열수 추출물에서 분리한 3-methyl-4-hydroxybenzoic acid와 3-methyl-4-hydroxycinnamic acid는 항산화 및 항균작용을 나타낸다고 보고되고 있으며 헛개나무열매 추출물에서 분리한 hovenodulinol은 쥐의 알코올분해에 효과가 있음을 보고하였다(Ma *et al.*, 2006).

전염병은 지난 60년동안 새로운 항생제의 개발로 계속해서 감소해왔다. 그러나, 2차 세계대전 동안 항생제를 사용해 온 이후로 penicillin의 부적절한 사용은 내성균주의 출현을 야기시켰다(Alani, 2005; Levy *et al.*, 2002). Penicillin-binding protein (PBP2a)을 만들어내는 *mecA* gene을

*Staphylococcus aureus*들이 획득하게 되면서 methicillin과 모든 β -lactams (third-generation cephalosporins, cefamycins, and carbapenems)에 내성을 가지게 되는 methicillin resistant *S. aureus*(MRSA)로 진화하게 되었다 (Foster. 2004). MRSA는 vancomycin teicoplanin을 제외한 모든 대부분의 항생제에 내성을 가지는 다중약제내성을 가지고 있기 때문에 임상에서 가장 중요시 여기는 세균이다 (Lowry F. D. 1998). 비록 vancomycin 내성 포도상구균이 여러나라에서 보고되고 있음에도 불구하고 vancomycin은 MRSA에 의해 생기는 질병치료에 사용되어져 왔고, 그결과 최후의 항생제라고 이야기되고 있는 vancomycin에 내성을 가지게 된 vancomycin sensitive *S. aureus*(VSSA) 또는 vancomycin resistant *S. aureus*(VRSA)의 출현이 여러나라에서 보고되고 있다.

따라서, MRSA에 대하여 새로운 대체 치료제가 필요하므로 본 연구에서는 헛개나무열매 추출물의 MRSA에 대한 항균성에 대하여 조사하였고, 세부적으로 헛개나무열매 분획물이 갖는 MRSA에 대한 항균 특성에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 건조된 헛개나무(*Hovenia dulcis*) 열매는 2008년도 수확된 것으로 부산 서면 부전시장에서 구입하였다.

2. 사용균주

항균력 측정에 사용한 균주는 항생제에 내성이 없는 *S. aureus* (KCTC 1927), 두 종의 MRSA (KCCM 40510 and KCCM 40511), 동아대 병원에서 분리한 7종의 MRSA, *Bacillus subtilis* (KCTC 1028), *Escherichia coli* (KCTC 1682), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1637), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1925), *Vibrio parahaemolyticus* (KCTC 2729), 그리고 *Klebsiella pneumoniae* (KCTC 2242)을 사용하였다. 시험에 사용된 표준균주는 각각 KCTC (Korean Collection for Type Cultures; Daejeon, Korea)와 KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms; Seoul, Korea)에서 분양받았으며 임상분리주는 동아대학교 의과대학에서 분양받아 사용하였다. 모든 균주의 성장배지는 Mueller Hinton broth (MHB, Difco, USA)를 사용하여 37°C 배양하였으며 disc diffusion assay에는 Mueller Hinton agar (MHA, Difco, USA)를 사용하였다.

3. 시약

분광분석에 사용된 시약은 Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate, gallic acid, sodium nitrate, aluminum chloride, potassium acetate, quercetin, hydrochloride acid, vanillin, catechin는 Sigma chemical (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였다.

Dimethyl sulfoxide는 Sigma chemical (St. Louis, MO, USA)사의 제품을, paper disc는 Whatman (England)사의 제품을 사용하였다. 이 이외의 기타시약 및 용매류는 국내외의 일급 및 특급을 사용하였다.

4. 헛개나무 열매 추출물의 제조 및 분리

건조된 헛개나무열매를 믹서기 (HMF-1000A, Hanil Electronics, Korea)로 미세하게 분쇄하였다. 헛개나무 열매분말 1 kg에 95% methanol 10 L을 가하여 70°C에서 3시간동안 추출 및 여과를 3회 반복하여 Whatman 여과지 No. 5A로 감압여과하였다. 여과액은 40°C에서 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)로 감압농축하였다.

시료의 항균성 분획을 얻기 위해 용매극성에 따라 순차용매분획을 실시하였다. 감압농축하여 얻은 메탄올 추출물 (446.90 g)에 증류수를 넣어 2 L로 하고, 동량의 *n*-hexane 2 L를 가하여 *n*-hexane과 H₂O 층으로 분리하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 분리된 H₂O 층을 dichloromethane 2 L, ethyl acetate 2 L 와 *n*-butanol 순으로 *n*-hexane으로 동일하게 용매 분획하였다. 충분히 두 용액을 섞은 후에 각 용액층이 분리가 되면 물층을 제거한 후, 다른 2 L의 *n*-hexane을 다시 가하여 흔들 후 안정화시킨 후 다시 물을 제거하였다. 이 과정을 3번 반복하였다. 이렇게 해서 모아진 *n*-hexane 는 rotary evaporator를 이용하여 감압농축하였다 다른 유기 용

매들도 극성에 순서에 따라 분획하였으며, 위에 서술한 것처럼 감압농축하였다. 추출방법과 용매분획은 Fig. 1에 나타내었다. 최종적으로 *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol, 그리고 water 획분을 얻었다. 추출물의 농도는 다음 실험을 위해 dimethyl sulfoxide에 녹여서 200 mg/mL로 맞추어 두었다.

5. Polyphenol 화합물 정량

헛개나무열매 추출물의 용매분획물의 polyphenol 화합물 함량은 gallic acid를 표준용액으로 사용하는 수정된 Folin-Ciocalteu 방법 (Waterman *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2006)으로 정량하였다. 시료는 spectrophotometer의 측정가능한 범위에서 희석해서 사용되었다. 0.1 mL로 미리 소량으로 분주된 시료는 0.5 mL 의 1 N Folin-Ciocalteu 시약과 함께 eppendorf tube에서 혼합되었다. 혼합물은 0.4 mL 의 20% Na₂CO₃을 첨가한 후 3분 동안 정치시켰다. 시료들은 45분 실온 암실에서 반응시킨 후 1600 × g 로 8분간 원심분리시켰다. 상층액의 흡광도는 GENios® microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 765 nm에서 측정하였다.

총 gallic acid 함량은 농도별로 표시된 검량곡선을 작성하여 계산하였고, 분획추출물의 총 phenol 함량의 농도는 검량선의 선형방정식을 사용하여 계산하였다. Y는 흡광도이고 X는 100 g 건식중량에 대한 mg gallic acid (GAE)/g 함량이다. 이 방정식은 $Y = 0.3137X$ 이고, 회귀계수는 0.9884이다.

6. Flavonoid 화합물 정량

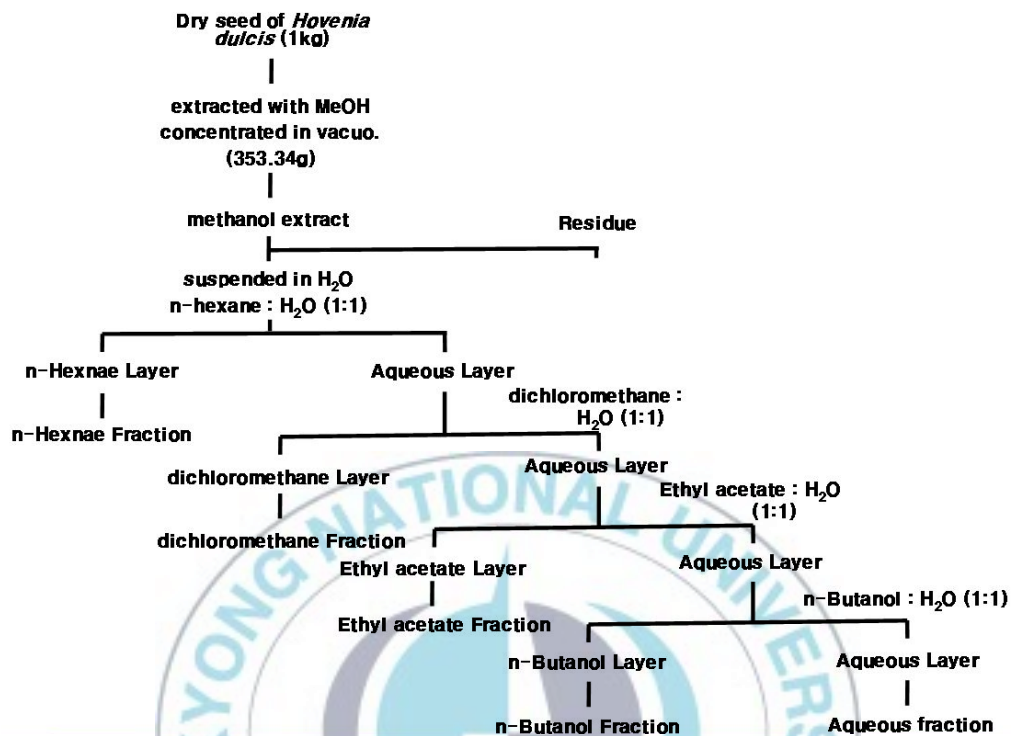


Fig. 1. Scheme of extraction and liquid-liquid solvent fractionation.

The powdered sample (1 kg) was extracted at three times with 1 L of methanol at 70°C for 3 hr and filtered. The combined filtrate was concentrated by rotary evaporation at 40°C. A liquid-liquid solvent fractionation was performed according to relative polarity.

각 분리단계별로 얻어진 용매분획추출물에 대한 총 플라보노이드 화합물의 함량은 수정된 비색방법 (Chang *et al.*, 2002; Woisky *et al.*, 1998; Pham *et al.*, 2008)를 이용하여 측정하였다. 각 분획추출물의 0.1 mL를 95% ethanol로 적절한 농도로 희석시킨 후, 0.02 mL의 10% aluminum chloride, 0.02 mL의 1 M potassium acetate, 그리고 0.56 mL의 증류수를 차례로 혼합하였다. 30분간 실온에서 반응시킨 후 microplate reader (GENios[®], Tecan Austria GmbH, Austria)로 415 nm에서 반응물의 상층액으로 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid 함량은 농도별로 표시된 검량곡선을 작성하여 계산하였다. 분획추출물의 총 flavonoid 함량은 분획추출물의 대신 증류수 0.1 mL를 가한 것의 흡광도를 빼 흡광도 차를 이용하여 검량선을 이용한 선형방정식에 의해 산출되었다. 표준용액은 rutin (Sigma co., USA)을 사용하여 flavonoid 함량을 정량하였으며 100 g 건식중량에 대한 mg rutin (RE)/g로 나타내었다. 이 방정식은 $Y = 0.1628X$ 과 같고 회귀계수는 0.9924 이다.

7. Proanthocyanidin 정량

Proanthocyanidin의 농도측정은 다음과 같은 방법에 따른다. (Sun *et al.*, 1998). 0.1 mL의 추출용액은 0.6 mL의 4% vanillin - methanol 용액과 0.3 mL의 hydrochloric acid를 혼합한다. 반응물은 15분간 반응시킨다. 그리고, 500 nm에서 흡광도를 측정한다. proanthocyanidin의 농도측정은 표시된 검량곡선을 작성하여 계산하였다. 분획추출물의 총 proanthocyanidins 함량은 분획추출물의 대신 증류수 0.1 mL를 가한 것의 흡광도를 빼 흡광도 차를 이용하여 검량선을 이용한 선형방정식에 의해 산출되었다. Y는 흡광도이고 X는 100 g 건식중량에 대한 mg catechin (CE)/g으로 총 proanthocyanidin

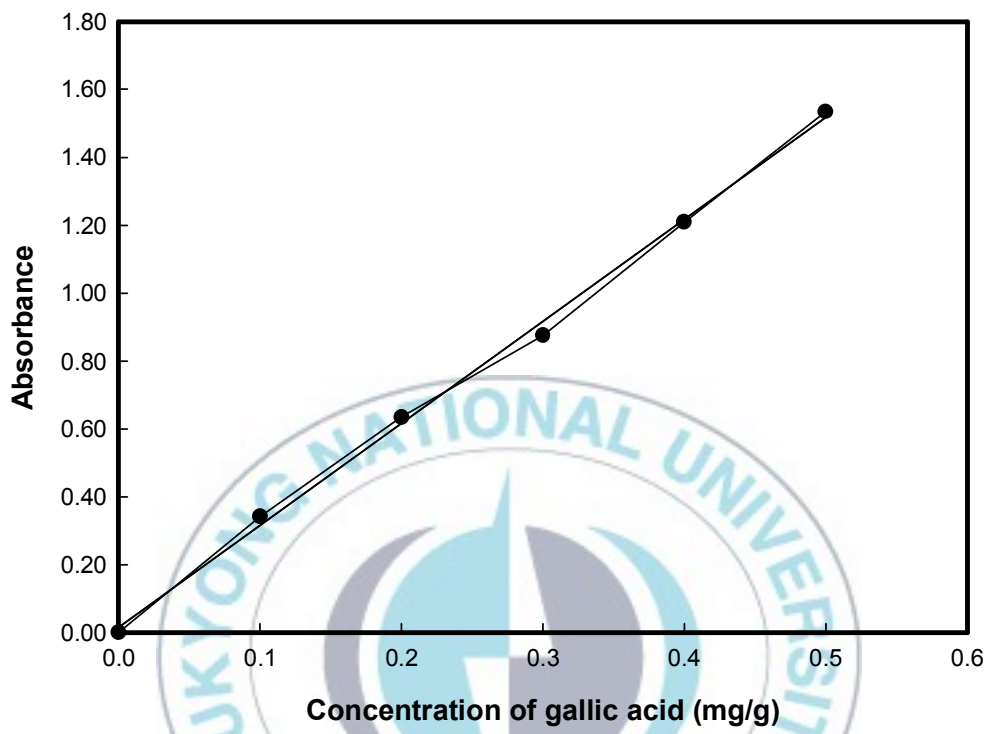


Fig. 2. Calibration curve of authentic gallic acid at 765 nm.

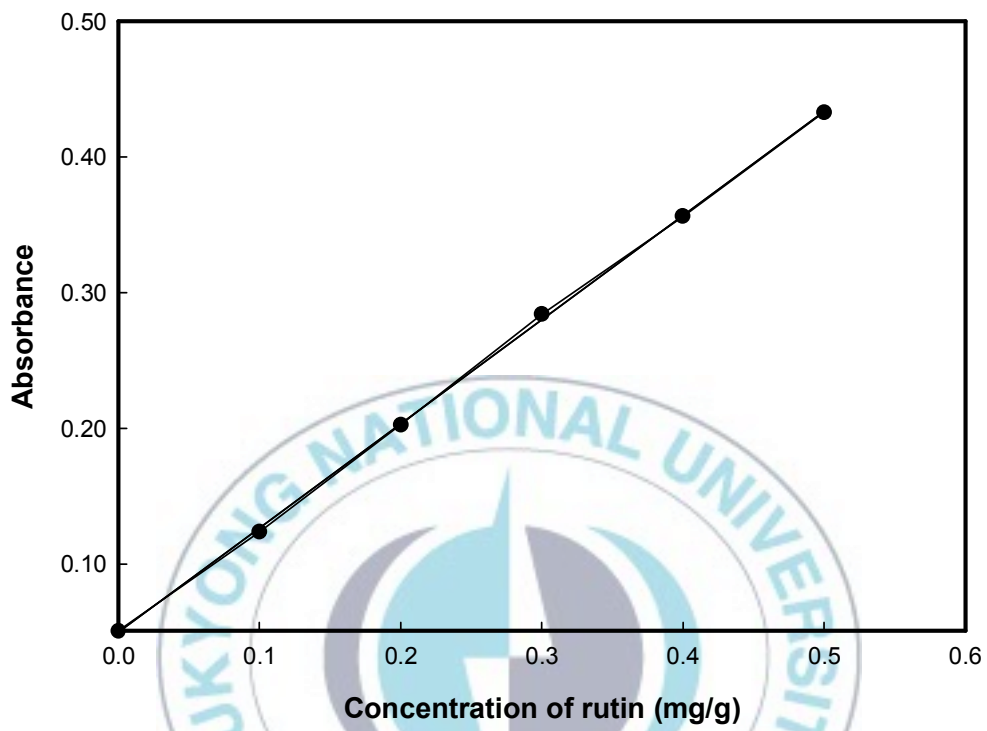


Fig. 3. Calibration curve of authentic rutin at 415 nm.

함량이다. 이 방정식은 $Y = 0.0621X + 0.1203$ 이고 회귀계수는 0.9986이다.

8. 항균활성 측정

항균성실험은 증식 억제 효과로 측정하였다. 실험균주는 미생물농도가 McFarland standard turbidity 0.5에 도달할 때까지 37°C에서 MHB에 배양하였다.

균배양액 1 mL을 희석하여 약 10^{-3} CFU/mL을 포함하고 있는 세균부유액을 MHA 평판위에 분주하고 각각의 농축물을 10 mg의 농도로 paper disc (직경 8 mm)에 분주한다. dry oven에서 충분히 건조시킨 후 plate의 agar 표면에 올려놓는다. 37°C에서 24시간 배양시킨 후, 억제환의 지름을 측정하였다.

9. 최소저해농도 측정

각 추출물과 vancomycin 의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration) 는 각 추출물과 vancomycin을 1,240 μ L/mL에서 1 μ L/mL까지 연속적으로 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002)에서 언급한 2 fold dilution method로 MHB에 첨가하였다. 실험균주를 McFarland 0.5가 되도록 맞추고, 이 균의 부유액 0.1 mL를 접종하여 총 volume이 1 mL가 되도록 하였다. MRSA의 성장 대조군으로 항균물질이 들어있지 않은 동량의 Mueller Hinton broth에 접종하였다. 접종 후, 각각의 배지를 37°C에서 24시간 배양하여, 균의 성장이 억제된 최소 농도를 각각의 균주에 대한 최소억제농도로 결정하였다. 실험은 이 반복으

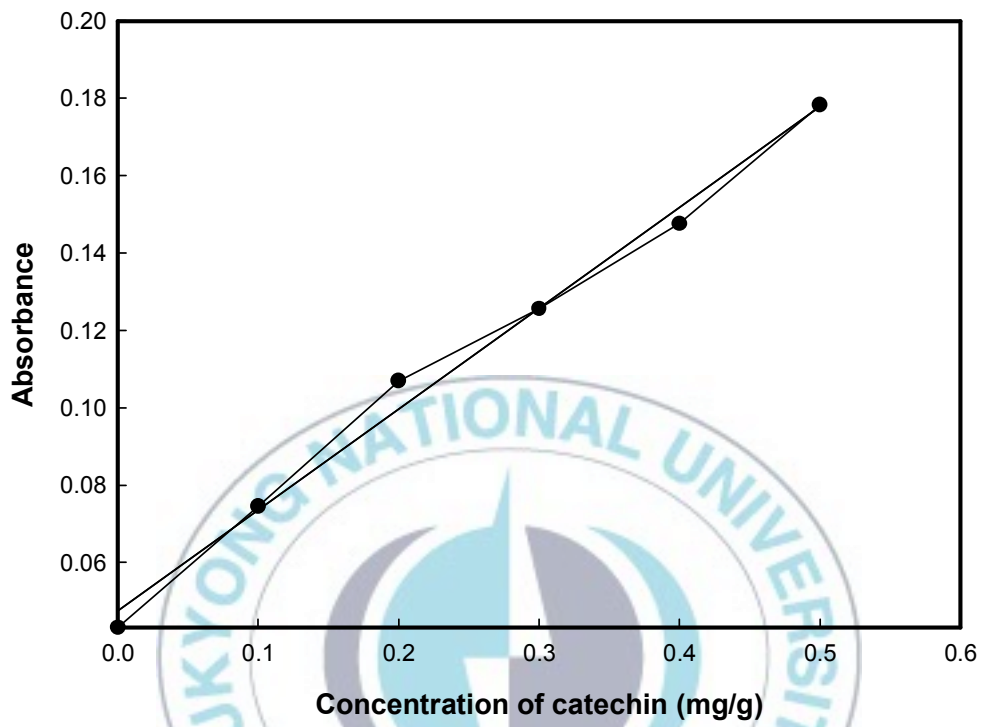


Fig. 4. Calibration curve of authentic catechin at 500 nm.

로 실험하였다.

10. 통계 처리

모든 실험결과는 Statistical Analysis System (SAS)를 이용하여 평균±표준편차로 표시하였다. 각 시료군에 대한 유의차 검정을 분산분석을 한 후 $p = 0.05$ 수준에서 Student's t-test에 따라 분석하였다.



결과 및 고찰

1. MRSA에 대한 헛개나무 열매추출물의 항균 활성

1.1. 헛개나무열매 추출물의 항균활성

한약재를 포함한 다양한 식물자원으로부터 최근 문제시 되고 있는 MRSA의 생육을 저해할 수 있는 후보물질의 검색을 시도하였다. 이러한 노력의 시도로 여러 식물들의 methanol추출물을 이용하여 disk diffusion assay 로 MRSA에 대한 항균활성을 조사하였다.

Table 1에 나타난 것처럼 헛개나무열매의 methanol추출액에서 MRSA에 대한 강한 항균활성이 관찰되었다. 헛개나무열매 추출물의 경우 *S. aureus* 과 MRSA 균들 양쪽에 항균활성이 있는 것을 보여주고 있는 것으로 보아 헛개나무열매가 약재내성인 MRSA에 대해 항균물질을 가지고 있음을 알 수 있다. 또한, 비교대상을 사용된 식중독 세균인 *S. aureus*에 대해서도 비슷한 항균력을 가지고 있음을 보여준다. 이는 원내감염 등으로 인하여 많은 문제가 되고 있는 약제내성균의 피해를 줄일 수 있는 구체적인 방법을 제시해 줄 수 있는 기초 실험결과라 할 수 있다.

이를 바탕으로 좀 더 자세한 항균력을 조사하고자 유기용매의 극성에 따라 용매분획을 실시하였다. 그 결과, Table 2에 나타난 것처럼 나타난 것처럼 ethyl acetate 분획이 가장 높은 항균력을 보여주고 있으며, hexane 분획과 dichloromethane 획분이 그 뒤를 따르고 있다. butanol 획분과 water 획분은 아무런 항균력도 관찰되지 않았다.

Table 2에처럼 가장 높은 항균력을 보여주고 있는 ethyl acetate 획분의

Table 1. Antibacterial activity of methanol extract of various plants against *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)

Medicinal plants and seaweeds tested	Zone of inhibition (mm)									
	<i>S. aureus</i> (KCTC 1927)	MRSA (KCCM 40510)	MRSA (KCCM 40511)	MRSA (DH 70503)	MRSA (DH 70504)	MRSA (DH 70505)	MRSA (DH 70506)	MRSA (DH 70508)	MRSA (DH 70510)	MRSA (DH 70517)
<i>Laminaria japonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Undaria pinnatifida</i>	-	-	-	-	-	-	13.5	-	13.0	-
<i>Angelica gigas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	9.5	-
<i>Citrus nobilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hovenia dulcis</i>	13.5	13.5	13.0	12.5	13.0	13.0	14.0	11.5	14.5	9.0
<i>Cartbamus tinctorius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	12.0	-
<i>Cnidium officinale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10 mg of methanol extract from various samples was loaded onto a disk (8 mm in diameter). Data are the averages of duplicate experiments. -, no detected antibacterial activity.

Table 2. Antibacterial activity of different solvent fractions of *Hovenia dulcis* seed methanol extract against *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains

Profile of solvent extract	Zone of inhibition (mm)									
	<i>S. aureus</i> (KCTC 1927)	MRSA (KCCM 40510)	MRSA (KCCM 40511)	MRSA (DH 70503)	MRSA (DH 70504)	MRSA (DH 70505)	MRSA (DH 70506)	MRSA (DH 70508)	MRSA (DH 70510)	MRSA (DH 70517)
Hexane fraction	15.0	15.0	14.5	13.0	13.0	14.5	14.5	13.0	12.0	12.0
CH ₂ Cl ₂ fraction	11.0	11.0	11.0	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl acetate fraction	17.5	17.0	17.5	15.0	16.0	17.0	16.0	15.5	18.0	14.0
Buthanol fraction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Water fraction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Solvent fractions were obtain as described in materials and Methods. 10 mg of each sample was loaded onto a disk (8 mm in diameter). Data are the averages of duplicate experiments. -, no detected antibacterial activity.

경우 고농도인 10 mg/disk에서 *S. aureus*, MRSA 에 대해 각각 15.0 mm, 18.0 mm로 우수한 항균력을 보였다. 이는 병원에서 사용하는 의료기구 및 의료종사자의 손 등을 소독할 수 있는 소독제의 개발등의 가능성을 시사할 수 있다.

식습관의 변화로 인한 가공식품 섭취의 증가와 급식 및 외식의 증가로 인한 식중독이 증가하고 있는 실정에서 식품을 매개로 하여 발병하는 질병원인균에 대해서도 Table 3와 같이 항균활성을 확인하였다. *S. aureus*, MRSA 에 대한 항균활성보다 약하지만, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa* 에도 각각 10.5 mm, 18.5 mm, 12.0 mm로 효과가 있는 것으로 확인되었다.

1.2. MRSA에 대한 헛개나무열매 추출물의 MIC 해석

위에서 서술한 바와 같이 ethyl acetate 분획이 disk diffusion assay에서 MRSA에 대해 가장 강한 항균력을 보여주었다. 농가진, 피부감염증, 식중독, 폐렴, 결핵, 패혈증, 뇌수막염 등의 광범위한 감염질환의 원인균으로써 관련 있는 MRSA에 대해 항균력이 있는 ethyl acetate 획분과 hexane 획분의 항균력을 양적으로 측정하고자, two-fold serial dilution 방법에 따라 MIC값을 측정하였다. MRSA균들에 대한 ethyl acetate 분획의 MIC값은 512-1,024 μg /mL 로 Table 4에 자세하게 나타내었다.

Penicillin은 세포벽을 약하게 하여 세균으로 하여금 용균시키는 것으로 알려져 있고, 세포벽합성을 저해하는 것으로 알려진 vancomycin이(Barna and Williams, 1984) gram- negative 균들에게는 효과가 없는 것을 알 수 있다. 반면, 헛개나무열매 methanol 추출물과 용매분획들이 MRSA를 포함하는 gram-positive와 gram-negative 균들에 대해 항균력을 보여주는 것을 보여줌으로써 약재내성의 메카니즘이 다르다는 것을 보여준다.

Table 3. Antibacterial activity of different solvent fractions of *Hovenia dulcis* seed methanol extract against several bacterial strains

Profile of solvent extract	Zone of inhibition (mm)					
	<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 1028)	<i>E. coli</i> (KCTC 1682)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KCTC 1637)	<i>Salmonella typhimurium</i> (KCTC 1925)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KCTC 2729)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KCTC 2242)
Hexane fraction	9.5	-	-	-	-	-
CH ₂ Cl ₂ fraction	-	-	12.0	-	13.0	-
Ethyl acetate fraction	14.5	-	-	10.5	18.5	-
Buthanol fraction	-	-	-	-	-	-
Water fraction	-	-	-	-	-	-

Solvent fractions were obtain as described in materials and Methods. 10 mg of each sample was loaded onto a disk (8 mm in diameter). Data are the averages of duplicate experiments. -, no detected antibacterial activity.

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) of solvent fractions of *Hovenia dulcis* seed methanol extract against *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)

Strains	MIC ^a (µg/mL)		
	Hexane fraction	Ethyl acetate fraction	Vancomycin
<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC 1927)	512	512	0.5
MRSA ^b (KCCM40510)	<1,024	512	2.0
MRSA (KCCM40511)	1,024	512	2.0
MRSA (DH 70503)	<1,024	<1,024	2.0
MRSA (DH 70504)	<1,024	1,024	2.0
MRSA (DH 70505)	512	1,024	1.0
MRSA (DH 70506)	<1,024	1,024	2.0
MRSA (DH 70508)	1,024	1,024	2.0
MRSA (DH 70510)	1,024	1,024	1
MRSA (DH 70517)	1,024	1,024	1

^aMIC (Minimum inhibitory concentration) of each solvent extract and vancomycin was determined by the two-fold serial dilution method in Mueller Hinton broth.

^bMRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.

^cNA, not active.

1.3. 다른세균에 대한 헛개나무열매 추출물의 MIC 해석

다른 세균들에 대해서도 MRSA에 항균력이 있는 ethyl acetate 획분과 hexane 획분의 항균력을 양적으로 측정하고자, two-fold serial dilution 방법에 따라 MIC값을 측정하였다. MRSA균들과 다른 식중독균에 대한 ethyl acetate 분획의 MIC값은 512-1,024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 Table 5에 자세하게 나타내었다.

항생제는 gram-positive 세균뿐만 아니라 gram-negative 세균에도 효과적이어야 한다는 사실을 고려해 볼 때, 헛개나무 열매는 그 기원이 천연 물질이다. 즉, 안전성 측면에서 보면, 새로운 개념의 항 MRSA 물질을 평가되거나 최후의 항생제라고 알려진 vancomycin과 다른 항 MRSA 기작을 가지고 있지 않을까 사료된다.

따라서, 헛개나무추출물은 MRSA를 억제하는 성분을 가지고 있으므로 천연 항균제로서 이용할 수 있는 충분한 가치가 있다고 생각된다.

2. 헛개나무열매 용매분획물의 수율 및 그 특징

헛개나무열매의 항균활성을 검토하기 위해 건조된 시료를 마쇄하여 95% methanol로 추출하였다. 건조시킨 후 추출수율로 계산한 결과 추출수율은 44.69%로 측정되었다. 이를 용매별로 분획한 후 95% methanol 추출물에 대한 추출수율을 측정한 결과는 Table 6과 같다. 95% methanol 추출물의 용매별 분획물의 추출수율은 water 분획이 63.39%로 가장 높았으며 butanol, hexane, ethyl acetate, dichloromethane순이었다. 이는 용매별 분획물의 수율이 극성이 높은 추출 용매의 극성도와 일치하는 결과를 보여준다.

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) of hexane fraction and ethyl acetate fraction of *Hovenia dulcis* seed methanol extract against several bacterial strains

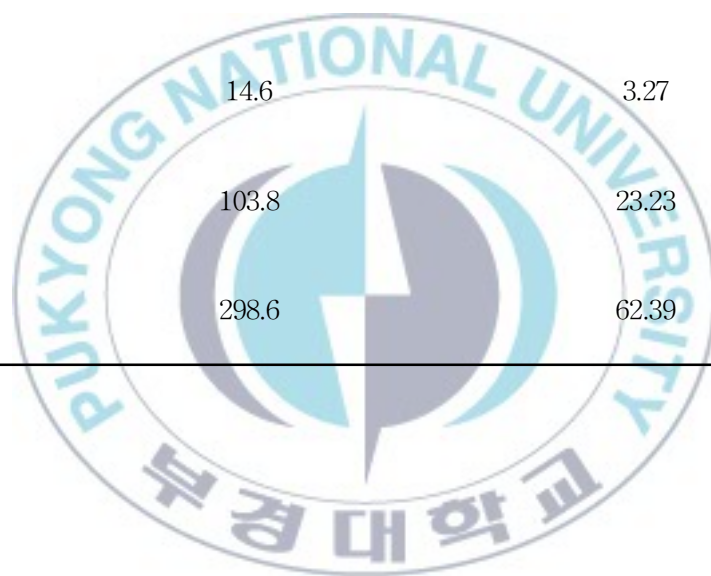
Strains	MIC ^a ($\mu\text{g/mL}$)		
	Hexane fraction	Ethyl acetate fraction	Vancomycin
<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 1028)	1,024	1,024	0.5
<i>Escherichia coli</i> (KCTC 1682)	<1,024	<1,024	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KCTC 1637)	1,024	1,024	NA
<i>Salmonella typhimurium</i> (KCTC 1925)	<1,024	1,024	NA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KCTC 2729)	1,024	512	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KCTC 2242)	<1,024	<1,024	NA

^aMIC (Minimum inhibitory concentration) of each solvent extract and vancomycin was determined by the two-fold serial dilution method in Mueller Hinton broth.

^bNA, not active.

Table 6. Yields of solvent fractions of *Hovenia dulcis* seed methanol extract

Solvent fractions	Amount of extract (g)	Yield (%)
Hexane fraction	21.3	4.77
CH ₂ Cl ₂ fraction	5.7	1.27
Ethyl acetate fraction	14.6	3.27
Butanol fraction	103.8	23.23
Water fraction	298.6	62.39



3. 헛개나무열매 추출물의 phytochemical 분석

3.1. 총 polyphenol 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 물질로 다양한 구조와 분자량을 가지며 페놀성 화합물의 phenolic hydroxyl기가 단백질과 같은 거대분자와의 결합을 통해 항산화, 항암 및 항균 등의 생리기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Choi *et al.*, 2003). 식물에서 분리 동정한 항균물질이 대부분 페놀계 물질들로 나타나 헛개 나무 추출물의 페놀성분과 항균력의 관계를 확인하기 위해 총 페놀 함량을 측정하였다. 시료의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다. 그 결과 Table 7에서 보는바와 같이 헛개나무 열매 95% methanol 추출물의 총 페놀함량은 1.4 mg/g로 각 용매분획은 0.4 mg GAE/g에서 5.5 mg GAE/g으로 나타났다. Hexane 분획물이 5.5 mg GAE/g 로 총 페놀함량이 가장 높았으며 dichloromethan, butanol, water 그리고 ethyl acetate 순이었다.

3.2. Flavonoid의 함량

또한, 플라보노이드 화합물은 비교적 간단한 화학구조를 가지면서 화학작용이 다양한 많은 유도체들이 보고되었고 폴리페놀 화합물은 항암, 항균, 항바이러스, 항염증, 면역 조절, 항혈전 효과 등의 다양한 생물학적 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Shin *et al.*, 2006; Cuvelier *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2004).

Table 7. Content of total phenolics, flavonoids, and proanthocyanidin of fractions fractionated from *Hovenia dulcis* seed methanol extract

Samples	Total phenolics (mg GAE/g, dry basis)	Flavonoids (mg RE/g, dry basis)	Proanthocyanidin (mg CE/g, dry basis)
Methanol extract	1.4 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.0	1.8 ± 0.0
Water extract	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	1.6 ± 0.1
Hexane fraction	5.5 ± 0.4	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0
CH ₂ Cl ₂ fraction	1.2 ± 0.6	0.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0
Ethyl acetate fraction	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0
Butanol fraction	1.1 ± 0.8	0.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0
Water fraction	0.9 ± 0.2	0.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0

Means with different letters within a column were significantly different at $P < 0.05$

^aEach values was presented as the mean ± S.D. ($n = 3$).

Rutin을 이용하여 계산한 각 용매분획추출물의 flavonoid 함량은 Table 7에서 볼 수 있다. 총 페놀함량과 비교해 보았을 때, hexnae 분획물이 1.1 mg RE/g 으로 flavonoid 함량이 제일 높았고, ethyl acetate 분획물이 0.3 mg RE/g 로 가장 낮았다.

3.3. Proanthocyanidin의 함량

Proanthocyanidin이란 축합형 탄닌으로 관능적으로는 떫거나 쓴맛을 나타내며 가공처리 과정에서는 혼탁의 유발이나 단백질 성분과 반응하여 침전을 일으키는 원인 물질로 알려져 있기도 하다. 반면에 생체 내에서는 산소 유리 라디칼 포착기능에 의한 항산화 작용(Tebib *et al.*, 1994), 혈중 콜레스테롤 저하(Tebib *et al.*, 1994), 동맥경화 예방(Monboisse *et al.*, 1983) 뿐만 아니라 항산화 작용에 의해 피부의 노화를 방지하여 유연성, 탄력성의 부여(Kanner *et al.*, 1983)와 같은 바람직한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 식품산업에 있어서도 Proanthocyanidin이 나타내는 항산화 효과가 중요한 의미를 지니는데 이미 포도나 와인 등에 함유된 페놀 화합물의 항산화 작용에 관해서는 잘 알려져 있으며(Frankel *et al.*, 1995; Teissedre *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1991), 그 효과는 비타민 C나 E보다 우수한 것으로 보고되고 있다(Jayaprakasha, 2001).

Proanthocyanin 색소는 pH differential method를 이용 pH변화에 따른 가역적 구조변화를 이용하여 측정하였다. pH differential method는 색깔을 가진 pH 1.0에서 주도되는 oxonium형과 pH 4.5에서 주도되는 무색의 hemiketal형의 차이에 바탕을 두고 있으며, 정확하고 빠른 측정법으로 사용되고 있다(Giusti & Wrolstad, 2001)

각각의 용매분획추출물의 proanthocyanidin 함량은 1.2 mg CE/g에서 1.6

mg CE/g으로 Table 7에 나타나 있고, butanol분획물이 가장 높은 함량을 나타내었다.



요 약

본 연구는 병원 내 감염의 주된 원인균으로 알려진 메치실린계 내성 황색 포도상구균(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA)에 대해 항균활성이 우수한 천연 항균성 물질을 검색하기 위해 예로부터 민간과 한방에서 널리 이용되어 온 약용식물과 해조류를 methanol에 추출하여 항균활성을 조사하였다. MRSA에 대해 항균력 검색을 한 결과 헛개나무열매의 methanol 추출액에서 높은 항균활성을 보여주었다. 고농도인 10 mg/disk에서 *S. aureus*, MRSA에 대해 13.5 mm로 우수한 항균력을 보였다. 이를 통해 methanol 추출물을 용매분획하여 좀 더 자세하게 정성분석하고자 하였다. 5개의 용매분획중 ethyl acetate분획이 높은 항균성을 보여주었으며, ethyl acetate 분획은 MRSA 균주에 대해 512 $\mu\text{g/mL}$ 에서 1,024 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC값을 보여주고 있다.

보통, 식물에서 항염증, 항균성, 항산화성과 항과민증과 같은 생물활성물질은 flavonoids, polyphenols, limonoids, carotenoids, coumarins과 phytosterols에서 유래한다. 그래서, polyphenols, flavonoids, 및 proanthocyanidin을 조사하였다. 헛개의 ethyl acetate 획분이 다른 획분에 비해 높은 항균성을 보여주지만, flavonoids 함량이 다른 획분보다 낮았다. 이를 통해 hexane분획의 항균성은 flavonoids의 성분에서 유래한다고 생각해 볼 수 있고, ethyl acetate분획에서는 비 폴리페놀계 성분이라는 것을 유추할 수 있다.

본 연구는 현재 사용되고 있는 vancomycin의 대체 치료제의 개발뿐만 아니라 vancomycin의 사용량을 줄일 수 있는 연구에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

무엇보다도 이 논문을 검토해주신 조영제 교수님, 김선봉 교수님과 김영목 교수님에게 다시 한번 더 감사드립니다. 그리고, 이 논문이 있기까지 애써주신 엄성환님, 강민승님, 임근식님, 황혜진님, 배향남님, 이윤경님, 송원님 그리고 식품미생물 실험실원 모두에게도 깊은 감사를 드립니다.

조리계에서 만난 이춘복 교수님, 같은 직장에서 먼저 졸업한 최민순님, 김주현님, 영양사 최미옥님, 장세희 선생님, 김은주 선생님, 김선호 과장님 김희선 과장님, 여러모로 감사합니다. 그리고, 학업을 같이한 동기분들에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 항상 도움을 주고 편의를 봐주신 직장내 여러 동료분 들에게도 감사를 드립니다. 그 외에 짧은 만남에 선의의 용기를 제게 주셨던 지금은 고인이 되신 임상병리사 조성희님, 변함없는 사랑으로 항상 기도해주시던 할머니, 이 학교에 등록하고 수술하셔서 몸이 불편하신 어머니님, 한울요리학원에 박필선 회장님, 문원장님, 최원장님, 방통동기, 양산동기, 동주동기, 이정숙님, 한국산업인력공단의 김태성 부장님, 김철수 부장님, 이영재 차장님, 이동석 차장님, 김영철 대리님, 정은호 대리님, 기희향 대리님, 권태희 선생님등 이 논문이 나오기까지 도움을 주신 모든 분들에게 진심으로 감사드립니다.

끝으로 학업에 열중하게 해주시고 늘 격려를 아끼지 않으신 가족에게도 이 자그마한 결실을 함께 하고 싶습니다.

참 고 문 헌

- Alanis, A. J. 2005. Resitance to antibiotics : Are we in the post-antibiotix era? *Arch. Med. Res.* 36: 697-705.
- Barna, J. C. J. and D. H. Williams. 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 339-357.
- Chang, C. C., M. H. Yang, H. M. Wen, and J. C. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug. Anal.* 10: 178-182.
- Choi, Y., M. H. Kim, J. J. Shin, J. M. Park, and J. Lee. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 723-727.
- Cuvelier, M. E., H. Richard, and C. Berset. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 3: 645-652.
- Diaz, M. N., B. Frei, J. A. Vita, and J. F. Keaney. 1997. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 337: 408-416.

- Foster, T. J. 2004. The *Staphylococcus aureus* "superbug". *J. Clin. Invest.* 114: 1693-1696.
- Frankel, E. N., A. L. Waterhouse, and P. L. Tussedre. 1995. Principle phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoprotein. *J. Agri. Food Chem.* 43: 890-894.
- Girenavar, B., S. M. Poulse, G. K. Jayaprakasha, N. G. Bhat, and B. S. Patil. 2006. Furocoumarins from grapefruit juice and their effect on human CYP 3A4 and CYP 1B1 isoenzymes. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 2606-2612.
- Giusti, M. M. and R. E. Wrolstad. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons.
- Hase, K., M. Ohsugi, Q. Xiong, P. Basnet, S. Kadotaa, and T. Namba. 1997. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.* 20: 381-385.
- Hung, P. V. and N. Morita. 2008. Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their

antioxidant capacities. *Food Chem.* 109: 325–331.

Jayaprakasha, G. K., R. P. Singh, and K. K. Sakariah. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem.* 73: 285–290.

Kanner, J., E. N. Frankel, R. Granit, B. German, and J. E. Kinsella. 1994. Natural antioxidant in grapes and wines. *J. Agri Food Chem.* 42: 64–69

Kim, H. P., K. H. Son, H. W. Chang, and S. S. Kang. 2004. Anti-inflammatory flavonoids: Modulators of proinflammatory gene expression. *Nat. Prod. Sci.* 10: 1–10.

Kim, M. J., K. Nobuhiko, and S. Ikunosuke. 1993. Clinical evaluation of PCR for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Clin. Pathol.* 13: 387–393.

Kim, M. M., Q. V. Ta, E. Mendis, N. Rajapakse, W. K. Jung, H. G. Byun, Y. J. Jeon, and S. K. Kim. 2006. Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *J. Jpn. Soc. Food Nutr.* 79: 1436–1443.

Kim, T. J. 1996. Korean Resources Plants. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p 72.

- Ko, B. S., J. S. Jang, S. M. Hong, D. W. Kim, S. R. Sung, H. R. Park, J. E. Lee, W. K. Jeon, and S. Park. 2006. Effect of New Remedies Mainly Comprised of *Hovenia dulcis* Thunb. on Alcohol Degradation and Liver Protection in Sprague Dawley Male Rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 828-834.
- Levy, S. B. 2002. The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys their Curative Powers, Perseus Publishing, Cambridge. MA 1-14.
- Lowry, F. D. 1998. Staphylococcus aureus infections. *N. Engl. J. Med.* 20: 520-532.
- Ma, J. Y. and S. W. Kim. 2006. Effect of *Hovenia dulcis* on liver protection in SD male rats treated with CCl₄. *Korean J. oriental med.* 12: 103-109.
- Mayer, A. S., O. S. Yi, D. A. Person, A. L. Waterhouse, and E. N. Frankel. 1997. Inhibition of human LDL oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agri. Food Chem.* 45: 1638-1643.
- Monboisse, J. C., P. Braquet, A. Randoux, and J. P. Borel. 1983. Non-enzymatic degradation of acid soluble calf skin collagen by superoxide ion; Proactive effect of flavonoids. *Biochem. pharmacol.* 32:

Murakami, K., W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka, and S. Watanabe. 1991. Identification of methicillin resistant strains of *staphylococci* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2240-2244.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard. 2nd ed. Pennsylvania, NCCLS: M31-A2.

Osawa, T. and M. Namiki. 1985. Natural antioxidant isolated from eucalyptus leaf waxes. *J. Agric. Food Chem.* 33: 770-780.

Shin, S. R., J. Y. Hong, H. S. Nam, K. Y. Yoon, and K. S. Kim. 2006. Antioxidative effects of extracts of Korean herbal materials. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 187-191.

Song, M. D., M. Wachi, M. Doi, F. Ishino, and M. Matsubashi. 1987. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Letters.* 221: 167-171.

Sun, B. S., T. Pinto, M. C. Leandro, J. M. Ricardo-Da-Silva, and M. I.

- Spranger. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4267-4274.
- Sun, J. S., Y. H. Tsuang, I. J. Chen, W. C. Huang, Y. S. Hang, and F. J. Lu. 1998. An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury. *Burns.* 24: 225-231.
- Tebib, K., L. Bitri, P. Besancon, and J. Rouanet. 1994. Polymeric grape seed tannins prevent plasma-cholesterol changes in high-cholesterol-fed rats. *Food Chem.* 49: 403-406
- Tebib, K., P. Besancon, and J. Rouanet. 1994. Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue-lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *J. Nutr.* 124: 2451-2457.
- Teissedre, P. L., E. N. Frankel, A. L. Waterhouse, H. Peleg, and J. B. German. 1996. Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric* 70: 55-61
- Walker M. 1991. Antioxidant properties of pycnogenol. *Townsend letters for Doctors* Aug./Sep. 616-619.
- Woisky, R. and A. Salatino. 1998. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.*

37: 99-105.

Vanamala, J., T. Leonardi, B. S. Patil, S. S. Tadde, M. E. Murphy, L. M. Pike, R. S. Chapkin, J. R. Lupton, and N. D. Turner. 2006. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis*. 27: 1257-1265.

