

소나무屬 수목의 부위별 추출물의 항균활성

김종진 · 송흥근* · 한창훈

건국대학교 산림환경과학과

(2001년 10월 18일 접수, 2001년 11월 19일 수리)

소나무속의 3수종, 소나무, 리기다소나무 및 잣나무의 부위별 추출물을 병원진균인 *Colletotrichum gloeosporioides* 를 대상으로 항균활성을 조사하였다. 위 균주에 대하여 가장 우수한 항균활성은 잣나무 수피 및 근피 EtOAc 분획분에서 나타났는데 5.0 mg/l 농도에서 각각 98.8%와 100%로 조사되었다. 한편 두 분획분의 위 균주에 대한 ED₅₀(median effective dose)는 각각 469 µg/ml 및 588 µg/ml로 조사되어 수피 추출물이 보다 낮은 값을 나타내었다. 잣나무 수피 EtOAc 분획분의 다른 병원진균 *Alternaria brassicicola* 및 *Fusarium oxysporum*에 대한 ED₅₀는 각각 533 µg/ml 및 2,277 µg/ml로 나타나 이 분획분의 항균활성은 *F. oxysporum*보다 *C. gloeosporioides* 나 *A. brassicicola*이 더 우수한 것으로 조사되었다. 한편 잎 추출물의 경우를 보면, 소나무 잎 EtOAc 분획분은 *C. gloeosporioides*에 대하여 5.0 mg/l 농도에서 39.6%의 활성을 보였으나 다른 두 수종의 잎 추출물에서는 추출 용액에 상관없이 거의 활성이 나타나지 않았다. 현재 주요 항균활성 화합물들은 분리, 동정 중에 있다.

Key words: 소나무속, 항균활성, EtOAc 분획, median effective dose

서 론

식물조직 내에 함유되어 있는 항균활성물질을 분리하여 이용하려는 노력은 오래 전부터 여러 분야에서 시도되어져 오고 있다. 근래에 들어 화학합성농약의 사용이 제한 또는 규제되면서 인체와 환경에 피해가 없거나 적은 천연물을 이용한 생물농약 개발에 대한 관심이 높아지면서 이러한 식물조직 내의 항균활성물질(preformed or induced antimicrobial compounds)을 분리·이용하려는 연구가 국내·외적으로 많이 수행되고 있다.^{1,4)} 현재 식물유래 항균활성물질은 수백 내지 수천 정도로 많은 물질들이 보고⁵⁾되고 있으나 아직까지 산업적으로 대체농약으로 사용되고 있는 경우는 흔치 않다.

한편 biomass 생산이 큰 수목으로부터 이러한 물질들을 분리·동정 및 이용하려는 연구도 최근 들어 여러 나라에서 수행되고 있으며 탐구대상 수종도 목적 및 각 나라 또는 각 지역의 특수상황에 따라 더욱 다양해지고 있는 추세이다.⁶⁾ 우리나라 산림 중 침엽수 천연림은 소나무가 우점종으로 자리잡고 있으며 인공림의 경우는 잣나무와 리기다소나무가 넓은 면적을 차지하고 있다. 위와 같은 수종의 함유성분 규명에 대한 연구는 많이 수행되었는데 Son과 Hwang⁷⁾은 우리나라 주요 침엽수(소나무, 잣나무, 리기다소나무, 곰솔) 정유의 terpenoid 성분대에 대하여, Song과 Kim⁸⁾은 소나무와 잣나무 잎과 수지의 정유 성분에 대하여 보고하였으며, Song 등⁹⁾은 잣나무 수피로부터 stilbene 유도체를 분리하였다. 그러나 항균활성에 대한 연구는 많지 않은 실정이며¹⁰⁾ 같은 성분이라도 공시 병원균의 종류에 따라서도 그 활성이 달라지므로 정확한 활성검정이 요구된다.

따라서 본 연구에서는 같은 소나무속에 속하면서 우리나라의

넓은 지역에 분포하고 있는 위 세 가지 수종의 부위별 추출물을 대상으로 하여 항균활성을 검정하고 효과적인 추출분리방법 탐구 및 새로운 천연 농약제로서의 대체 가능성을 탐색하여, 앞으로 이들 수종의 확대·이용에 대한 기초자료로 제공하고 자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 추출. 본 실험에 사용된 소나무속의 수목은 소나무(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.), 리기다소나무(*P. rigida* Mill.) 및 잣나무(*P. koraiensis* Sieb. et Zucc.)로서 경기도 광주시 소재 건국대학교 연습림에서 생육하고 있는 수령 약 25년 생들이다. 추출에 사용한 시료는 벌채 후 잎, 줄기, 뿌리 등 부위별로 나누었고, 수피 및 근피는 가장 바깥 껍질(손으로 제거되는) 부위는 제외하고 목질부 전까지 박피한 후 음건하여 얻었다. 건조된 시료들을 Wiley mill을 이용하여 분쇄하고 30 mesh 이하의 것을 추출용 시료로 사용하였다. 추출은 acetone 과 물 7:3의 비율(v/v)로 분쇄된 시료가 충분히 침지할 만큼 넣은 후 암실에서 3일 동안 추출한 후 여과하여 감압농축기에서 40°C로 농축한 후 동결 건조하였다.

동결 건조된 조추출물 5g을 H₂O 100 ml에 현탁한 후 CHCl₃ 100 ml씩 다섯 차례에 걸쳐 CHCl₃ 분획을 얻었고, 수용액층에 다시 ethylacetate (EtOAc) 100 ml씩 다섯 차례로 가하여 EtOAc 분획과 H₂O 분획을 얻었다.

공시균주 및 항균활성 검정. 본 검정에 사용된 공시균주는 작물 및 수목병원균으로 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc., *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire 및 *Fusarium oxysporum* Schl. 등 세 가지 종으로서 건국대학교 수목병리연구실에서 계대배양 보관균주이다. 항균활성 시험은 한천배지 희석법으로 실시하였는데 CHCl₃과 EtOAc 분획분

*연락처

Phone: 82-2-450-3734; Fax: 82-2-456-7183

E-mail: hksong@konkuk.ac.kr

의 경우에는 에탄올에 용해하였으며 모든 시험구에 최종적으로 0.5%의 에탄올이 공히 함유되도록 하였다. 균주의 접종은 PDA (potato dextrose agar, Difco, Grayson, GA) 배지에 계대배양하여 7일째 되는 균주의 균사선단부 disc(직경 8 mm)를 떼어내어 추출물이 혼합된 시험배지의 중앙에 놓은 후 25°C에서 7~9일간 배양한 뒤 대조구의 생육 균사직경과 비교하여 항균활성을 조사하였으며, 항균활성이 우수한 분획은 serial dilution assay¹¹⁾를 통하여 ED₅₀(median effective dose)를 산출하였다.

본 실험에 사용된 균주 중 *C. gloeosporioides*에 대한 positive control로서 옥사디실 타로닐 수화제(동부한농화학, 한국)를 사용하였으며, *C. gloeosporioides*에 대한 옥사디실 타로닐 수화제의 ED₅₀는 18.9 µg/ml로 조사되었다.

결과 및 고찰

수종별 항균활성. 소나무속에 속하는 공시 세 수종의 항균활성은 수종 사이에 차이를 보였으며 추출 부위에 따라서도 현저한 차이를 보였다(Table 1). 잎 추출물의 경우, 리기다소나무와 잣나무는 CHCl₃ 분획분, 수용분 및 EtOAc 분획분에 관계없이 거의 활성을 보이지 못한 반면, 소나무는 EtOAc 분획분

5.0 mg/l 농도에서 39.6±6.7%, 2.5 mg/l에서 25.6±4.8%의 활성을 보였다.

본 시험에서 가장 우수한 항균활성은 잣나무의 수피 및 근피의 EtOAc 분획분에서 나타났는데 근피의 경우는 5.0 mg/l 농도에서 100%, 2.5 mg/l에서 93.0±2.8%, 수피는 5.0 mg/l 농도에서 98.8±1.1%, 2.5 mg/l에서 82.6±2.5%로 조사되었다. 또한 잣나무 수피 및 근피의 CHCl₃ 분획에서도 EtOAc 분획보다는 낮은 수준이지만 5.0 mg/l 농도에서 각각 68.2±2.4%, 65.2±2.8%의 항균활성이 조사되었다.

한편 리기다소나무의 수피 및 근피의 CHCl₃와 EtOAc 분획분에서도 항균활성을 보였는데, EtOAc 분획의 경우 5.0 mg/l 수준에서 각각 49.7±2.1%, 36.6±2.4%로 나타나 잣나무에서 보다는 낮은 활성을 보였다.

잣나무 수피 및 근피 EtOAc 분획분의 ED₅₀. 위 시험에서 가장 우수한 항균활성을 보인 잣나무의 수피 및 근피 EtOAc 분획분의 *C. gloeosporioides*에 대한 ED₅₀를 보면, 수피의 경우는 469 µg/ml로 근피는 588 µg/ml로 조사되었고 농도가 낮아질수록 항균활성이 비례적으로 낮아지는 것으로 나타났다(Fig. 1). 두 분획분의 항균활성은 Table 1에서 보는 바와 같이 5.0 mg/l 및 2.5 mg/l과 같은 고농도에서는 근피의 활성이 다소 우수한

Table 1. Antifungal activities of extracts from the various parts of three *Pinus* species against *Colletotrichum gloeosporioides*

Species	Part	Fraction	Antifungal activity ¹⁾ (%)	
			5.0 mg/l	2.5 mg/l
<i>P. densiflora</i>	Leaves	CHCl ₃	19.8±3.2	10.2±3.5
		H ₂ O	4.3±2.0	-5.9±1.7
		EtOAc	39.6±6.7	25.6±4.8
	Stem-bark	CHCl ₃	13.8±3.1	8.1±2.5
		H ₂ O	9.0±3.9	2.9±2.6
		EtOAc	16.6±4.6	6.2±4.1
	Root-bark	CHCl ₃	16.2±3.1	9.1±2.5
		H ₂ O	20.3±2.4	7.9±2.7
		EtOAc	24.7±5.4	15.8±4.4
<i>P. rigida</i>	Leaves	CHCl ₃	4.5±2.5	1.8±1.1
		H ₂ O	2.8±1.2	-3.8±2.1
		EtOAc	4.9±2.8	1.6±1.4
	Stem-bark	CHCl ₃	32.3±2.5	20.8±2.8
		H ₂ O	-0.9±1.4	0.5±2.5
		EtOAc	49.7±2.1	27.2±1.5
	Root-bark	CHCl ₃	32.5±2.5	20.4±2.1
		H ₂ O	1.0±1.9	-0.1±1.8
		EtOAc	36.6±2.4	28.8±1.8
<i>P. koraiensis</i>	Leaves	CHCl ₃	5.2±1.8	1.4±1.4
		H ₂ O	2.3±2.0	-2.6±1.8
		EtOAc	8.3±2.1	1.1±1.6
	Stem-bark	CHCl ₃	68.2±2.4	47.8±2.6
		H ₂ O	6.7±2.3	0.5±2.1
		EtOAc	98.8±1.1	82.6±2.5
	Root-bark	CHCl ₃	65.2±2.8	40.4±3.1
		H ₂ O	12.5±3.2	2.8±1.2
		EtOAc	100±0.0	93.0±2.8

¹⁾Means ± SE obtained from triplicate bioassay.

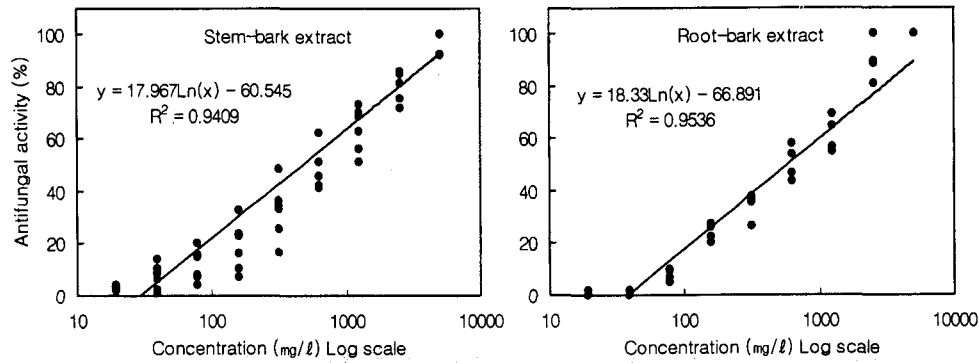


Fig. 1. Antifungal activities of EtOAc extracts from the bark of *Pinus koraiensis* stem and root against *Colletotrichum gloeosporioides*.

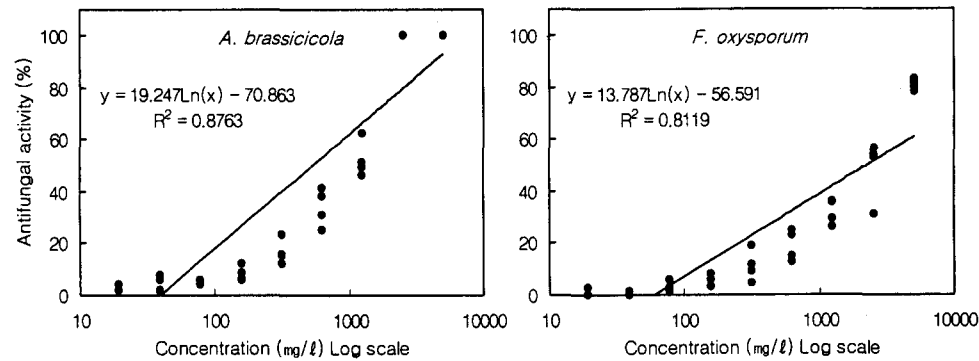


Fig. 2. Antifungal activities of EtOAc extracts from the bark of *P. koraiensis* stem against *Alternaria brassicicola* and *Fusarium oxysporum*.

것으로 나타났으나 ED₅₀는 수피 EtOAc 분획분이 보다 낮은 결과를 보였다.

잣나무 수피 EtOAc 분획분의 *A. brassicicola* 및 *F. oxysporum*에 대한 항균활성. *C. gloeosporioides*에 대하여 가장 높은 항균활성을 보인 잣나무 수피 EtOAc 분획분을 다른 병원진균 *A. brassicicola* 및 *F. oxysporum*을 대상으로 항균활성 ED₅₀를 조사한 결과 균주에 따라 다른 반응이 나타났다. *A. brassicicola*에 대한 ED₅₀는 533 µg/ml로 나타나 *C. gloeosporioides*에 대한 활성과 비슷하였으나 *F. oxysporum*에 대한 ED₅₀는 2,277 µg/ml로 위 두 균주보다 높은 값을 보였다. 이와 같이 어느 특정 화학물질에 대한 특이적인 내성 또는 감수성 등으로 나타나는 생명반응 차이는 그 미생물 고유의 유전적 특성으로 사료되어 항미생물 물질의 검색에는 보다 정밀한 시험이 요구된다.

위의 결과에서 보듯이 공시 수종 중 잣나무의 수피 추출물의 항균활성이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 현재 이들 활성성분에 대한 분리 및 구조분석 작업이 진행 중에 있다. 한편 소나무를 비롯한 여러 침엽수(낙엽송, 삼나무, 편백 등)의 수피 추출물을 대상으로 항균활성을 검정한 Shibutani 등¹⁰⁾의 결과에서는, 본 실험에서 EtOAc 분획분에서 가장 우수한 항균활성이 나타난 결과와는 달리 EtOAc 분획분보다 *n*-hexane 분획에서 높은 항균활성을 보였다 한다. 이와 같은 결과는 두 실험에서 사용된 공시 병원균이 다른 점을 고려하더라도, 같은 과(family), 속(genus)의 수목 중에서도 함유성분 및 함유량의 차이에 따른 항균활성 정도가 상이하게 나타난다는 것을 보여주고 있다.

참고문헌

1. Grayer, R. J. and Harbone, J. B. (1994) A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem.* **37**(1), 19-42.
2. Harborne, J. B. (1987) In *Natural fungitoxins*, Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur., vol. 27, Hostettmann, K. and Lea, P.J. (eds.), Clarendon Press, Oxford, pp. 195-211.
3. Jain, S. R. and Jain, M. R. (1973) Effect of some common essential oils on pathogenic fungi. *Planta Med.* **24**, 127-132.
4. Lee, S. S., Lee, H. J. and Choi, D. H. (2001) Studies on biological activity of woody extractives(VII) -Antimicrobial and antioxidation activities of extractives from heartwood of *Prunus sargentii*. *J. Kor. Wood Sci. Tec.* **29**(2), 140-145.
5. Mansfield, J. W. (1983) In *Antimicrobial compounds*, Biochem. Plant Pathol., Callow, J.A. (ed.), John Wiley and Sons, NY, pp. 237-265.
6. Kim, Y. G. (1999) Studies on the antimicrobial activities of the extractives from *Magnolia*(*Magnolia kobus* DC. var. *borealis* Sarg.). *J. Kor. Wood Sci. Tec.* **27**(1), 105-114.
7. Son, J. O. and Hwang, B. H. (1990) Terpenoid analysis of the main softwoods essential oil-comparison of terpenoid components in softwood. *J. Kor. For. En.* **10**(2), 97-106.
8. Song, H. K. and Kim, J. K. (1994) Essential oil components of leaves and resins from *Pinus densiflora* and *P. Koraiensis*. *J. Kor. Wood Sci. Tec.* **22**(3), 59-67.
9. Song, H. K., Moon, S. C., Yong, Y. J. and Lim, Y. H. (1998) Separation of stilbene derivatives from the barks of Korean pine (*Pinus koraiensis*). *J. Agri. Resources Development*

- Konkuk Univ.* **20**, 23-29.
10. Shibutani, S., Samejima, M. and Saburi, Y. (1998) Antimicrobial activities of extractives from the barks of Japanese coniferous trees. *Bull. Tokyo Univ. Forests* **99**, 219-233.
11. Frobisher, M. (1962) In *Fundamentals of Microbiology*, (7th ed.), W. B. Saunders Co., Philadelphia, p. 299.

Antifungal Activities of Extracts from the Various Parts of the Genus *Pinus* Trees

Jong Jin Kim, Hong Keun Song* and Chang Hoon Han (*Department of Forest and Environmental Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea*)

Abstract: This study was carried out to investigate the antifungal activities of the extracts from various parts of three *Pinus* species, *P. densiflora*, *P. rigida* and *P. koraiensis* to pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. The EtOAc fraction from the bark of *P. koraiensis* stem and root showed 98.8 and 100% of activity, respectively to the fungus. Median effective doses (ED₅₀) of above two fractions were 469 and 588 µg/ml, respectively in the bioassay with the fungus. ED₅₀ of the EtOAc fraction from the bark of *P. koraiensis* stem against *Alternaria brassicicola* and *Fusarium oxysporum* was 533 and 2,277 µg/ml, respectively. This means that the fraction was more sensitive to the *C. gloeosporioides* and *A. brassicicola* than the fungus *F. oxysporum*. The EtOAc fraction from the leaves of *P. densiflora* showed 39.6% of activity to *C. gloeosporioides*, but all the fractions from the leaves of two species showed no activity. The active compounds in the bark of *P. koraiensis* stem and root are being identified.

Key words: genus *Pinus*, antifungal activity, EtOAc fraction, median effective dose

*Corresponding author