

## 피부사상균 *Microsporum canis* 및 *Trichophyton mentagrophytes*에 대한 편백정유의 항진균활성물질 탐색\*1

박 미 진\*2 · 이 수 민\*2 · 곽 기 섭\*2 · 정 의 배\*3 · 장 제 원\*4 · 최 인 규\*2†

### Investigation of Active Antifungal Compounds of Essential Oil from *Chamaecyparis obtusa* Against Dermatophytes, *Microsporum canis* and *Trichophyton Mentagrophytes*\*1

Mi-Jin Park\*2 · Soo-Min Lee\*2 · Ki-Seob Gwak\*2 · Eui-Bae Jeung\*3 ·  
Je-Won Chang\*4 · In-Gyu Choi\*2†

#### 요 약

본 연구는 국내산 편백의 활용도를 높이고 편백정유의 식물성 의약품으로서 이용 가능성을 조사하고자 피부사상균인 *Microsporum canis* (KCTC6591), *Trichophyton mentagrophytes* (KCTC6077)에 대한 국내산 편백정유의 항진균활성을 평가하고, 활성분획의 주성분을 GC/MS로 확인하였다.

편백정유는 *M. canis*보다 *T. mentagrophytes*에 대한 항진균효과가 더 높게 나타났으며, 한천 회석법에서 5,000 ppm 이상의 농도로 처리시 *M. canis*와 *T. mentagrophytes* 모두 균사 생장을 못하였다. TLC를 이용한 편백정유 분획에서는 B와 C부분에서 활성이 나타났으며 B와 C의 하부분획에서는 C-2가 강한 항진균 활성을 보였다. 항진균활성을 보이는 C-1의 주성분은  $\alpha$ -terpineol이고, C-2의 주성분은 elemol, cedrol, eudesmol임을 GC/MS 분석에 의해 확인하였다.

\* 1 접수 2004년 11월 23일, 채택 2005년 1월 17일

\* 2 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, Dept. of Forest Science, College of Agriculture & Life Science, Seoul national university, Seoul 151-921, Korea

\* 3 충북대학교 수의과대학 수의학과, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

\* 4 엔바이타(주), Enbita Co. LTD, Namsong Bldg. 260-199 Itewon Yongsan, Seoul 140-856, Korea

† 주저자(corresponding author) : 최인규(e-mail: cingyu@snu.ac.kr)

## ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the application of *Chamaecyparis obtusa* and to investigate potential utilization of essential oil from *C. obtusa* as plant-based medicine. The antifungal activity of essential oil from leaves and twigs of *C. obtusa* (Sieb. Et Zucc) was determined and the major components of active fractions against *Microsporum canis* (KCTC6591) and *Trichophyton mentagrophytes* (KCTC6077) were identified by GC/MS analysis.

In treatment of essential oil from *C. obtusa*, the strain *M. canis* was more resistant than the other, *T. mentagrophytes*. In the agar diffusion assay, essential oil from *C. obtusa* inhibited hyphal growth of *M. canis* and *T. mentagrophytes* at the concentration of more than 5,000 ppm. The zones named B and C in the TLC assay of essential oil from *C. obtusa* showed antifungal activities. Among four sub-fractions of *n*-hexane extract from B and C zones, named as B-1, B-2, C-1 and C-2, the C-2 showed the highest antifungal activity. Instrumental GC/MS analysis for sub-fractions showed that a major component of C-1 was  $\alpha$ -terpineol as terpene alcohol, while C-2 contained sesquiterpenes such as elemol, cedrol and eudesmol.

**Keywords:** *Chamaecyparis obtusa*, essential oil, antifungal activity, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*

## 1. 서 론

식물에서 얻어지는 정유는 동서양을 막론하고 아주 오래전부터 종교의식용, 의학용 이외에도 미용을 목적으로 이용되어 왔으며, 근래에 식품첨가제, 방향제 (Mishra & Dubey, 1994), 방향요법 등 다양한 용도로 사용되고 있다. 이러한 점에서 정유에 대한 연구는 식물에 미치는 생태학적 역할 뿐만 아니라 천연자원의 경제적인 이용면에서도 중요하다.

측백나무과(*Cupressaceae*)에 속하는 편백(*Chamaecyparis obtusa*)은 원래 일본이 원산지로서 우리나라에는 20세기 초에 들어와 주로 중부이남에서 자생하고 있다. 편백정유에 관해서는 일본산 및 대만산 편백을 중심으로 많은 연구가 진행되고 있으며 국내 산 편백정유의 주요 구성성분은 monoterpene류와 sesquiterpene류로 알려졌다(홍 등, 2001).

편백정유는 소나무, 잣나무, 편백, 화백의 잎 정유 중에서 항진균활성이 우수하였으며(이 등, 2002), *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*에 대해 항균효과가 있음이 밝혀졌다(이 등, 2001).

또한 *Aeromonas hydrophila* CF-2, *Aeromonas salmonicida* ATCC14174, *Edwardsiella tarda* ECK-1, *Streptococcus* sp.의 증식은 편백정유의 처리 농도가 증가할수록 비례하여 억제효과도 증가한다(이 등, 1999). 편백의 목재에서 분리 정제된  $\beta$ -thujaplicin (hinokitiol)은 *Staphylococcus aureus*의 성장을 억제하는 효과를 보였으며(Yaeno Aroma et al., 2003), Yoshixol은 *Escherichia coli*, *Mycobacterium chelonae*, *P. aeruginosa* 그리고 *C. albicans*에 강한 항생 효과(antibiotic effect)를 보인다(Shozo Koyama et al., 1997). 이외에 편백정유는 살충효과(Park 등, 2003), 타감효과(allelopathic effects)(Kil, 2000), 마우스를 진정시키는 효과(나 등, 1999), 스트레스를 완화시키는 효과(나 등, 1998) 등 다양한 생리활성을 지니고 있음이 밝혀져 있다.

정유에 관한 연구의 대부분이 정유의 성분분석, 수종간의 구성 성분의 차이(송, 1994), 정유 자체의 항미생물 활성을 조사하였으나 정유의 구성 성분 중 어느 성분에 의해 항미생물 활성이 발현되는지에 관한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 1970년대 이후 범국가적 차원에서

실시된 산림녹화 사업에 기인하여 식재면적이 증가하는 편백의 활용방안과 편백정유를 이용한 기능성 천연제품 개발을 위한 기초자료제공을 위해, 국내산 편백의 지역으로부터 추출된 정유의 피부사상균에 대한 항진균활성 여부를 살펴보고, 항진균효과를 나타내는 주요 성분을 규명하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료 및 편백정유의 항진균활성

본 실험에 사용된 편백정유는 엔바이타(주)에서 공급되었고 *Microsporum canis* (KCTC6591), *Trichophyton mentagrophytes* (KCTC6077)를 한국생명공학연구원에서 분양받아 공시균주로 사용하였다. Sabouraud Dextrose Agar (Difco, USA) 배지를 사용하여 28°C에서 시험균주를 배양하였다. 편백정유의 항진균활성에 대한 평가는 한천 희석법, 디스크 확산법, TLC 활성법을 사용하여 측정하였다.

### 2.2. 항진균활성 분획 단계

항진균활성성분의 검출에는 TLC 활성법을 이용하였는데, TLC plate에 편백정유를 hexane: ethylacetate=8:2의 전개용매를 이용하여 전개 영역을 6부분(A, B, C, D, E, F)으로 분리한 뒤 2.1항의 균주들도 도달한 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 평판 배지에 올려놓고 배양하여 생육 저지환의 유무와 크기로 항진균활성을 평가하였다. 항진균활성을 보이는 B부분과 C부분을 TLC를 이용하여 각각 2개로 재분획하여 B-1 (Rf값: 0.67), B-2 (Rf값: 0.63), C-1 (Rf값: 0.58), C-2 (Rf값: 0.55)로 구분하고, 각각의 실리카겔층을 분리하여 *n*-hexane 2 ml에 슬러리화한 후 원심분리하여 상등액을 1 ml로 농축하였다. 농축한 시료를 8 mm paper disc에 60 µl씩 흡수시키고 용매를 건조하는 과정을 2회 반복하여 항진균 시험 디스크를 제조하였다. *M. canis*, *T. mentagrophytes*를 도달한 SDA 배지위에 시험 디스크를 올려놓고 28°C에서 7일 동안 배양하면서 1일 단위로 항진균활성을 관찰하였다. 활

성을 보인 하부 분획물은 GC/MS분석에 사용되었다.

### 2.3. GC/MS분석

2.2항의 항진균 활성을 보이는 분획의 주성분을 알아보고자 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 GC/MS분석을 하였으며 그 조건은 다음과 같다.

GC (model-Agilent 6890)분석을 위해 column은 HP1을 사용하였다. Carrier gas는 헬륨을 사용하였고 온도 조건은 injector 250°C, detector 280°C, oven 온도는 초기온도 60°C에서 10분간 유지시킨 후 5°C/min씩 승온하여 최종온도 280°C까지 올린 후 10분간 유지시켜서 분석하였다. MS는 model Agilent 5973을 사용하였고 EI mode로 분석하였다. 얻어진 시료 피크의 mass data와 표준 library data와의 비교를 통하여 피크의 화합물 구조를 동정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 편백정유의 항진균활성

한천희석법을 이용하여 500, 1,000, 5,000, 10,000 ppm의 편백정유 농도별로 *M. canis*, *T. mentagrophytes*에 대한 항진균효과를 평가하였다. 편백정유는 *M. canis*보다는 *T. mentagrophytes*에 대해 활성이 높았다. 대조구에 대한 균사생장억제로 항진균력을 계산한 결과, *M. canis*에 대한 편백정유의 항진균력은 농도가 500 ppm일 때 16.69%, 1,000 ppm일 때 30.17%의 항진균 효과를 보였다. *T. mentagrophytes*에 대해서는 편백정유 농도가 500 ppm일 때 41.38%, 1,000 ppm일 때 59.09%의 항진균효과를 보였다. 5,000 ppm, 10,000 ppm 농도에서는 두 시험균주 모두 균사생장이 이루어지지 않았다. 1,000 ppm 농도에서는 두 균 모두 일정기간 균사생장이 보이지 않았으며 일정기간이 지난 후 균사생장이 일어남을 볼 수 있었다(Fig. 1, 2). 이러한 현상이 편백정유의 휘발에 의한 농도변화에 따른 것인지 혹은 저항성 발현의 결과인지에 대해서는 좀 더 연구가 필요하리라 사료된다.

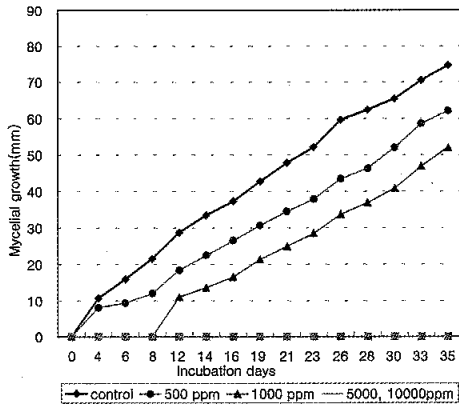


Fig. 1. The relationships between mycelial growth and incubation days of *M. canis* in various concentrations of *C. obtusa* essential oil.

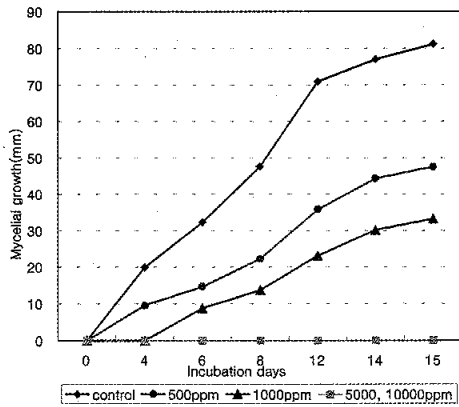


Fig. 2. The relationships between mycelial growth and incubation days of *T. mentagrophytes* in various concentrations of *C. obtusa* essential oil.

### 3.2. 항진균활성분획 단리

편백정유의 항진균활성을 나타내는 주요 성분을 밝혀내고자 TLC를 이용하여 정유를 Fig. 3과 같이 A, B, C, D, E, F의 6부분으로 나누었다. 6부분으로 분리한 TLC plate를 *M. canis*, *T. mentagrophytes*에 대해 항진균효과를 시험한 결과는 Fig. 4와 같았으며, 분획의 항진균효과 발현은 clear zone의 육안적 넓이 차이를 제외하고는 시험된 두 균주간에 유사한 경향

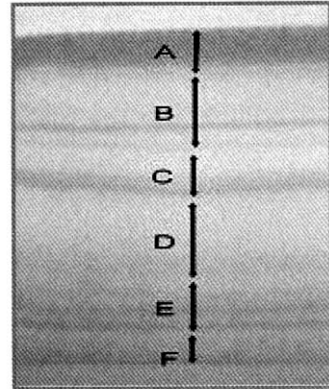


Fig. 3. TLC plate fractions of *C. obtusa* essential oil used in antifungal activity assay.

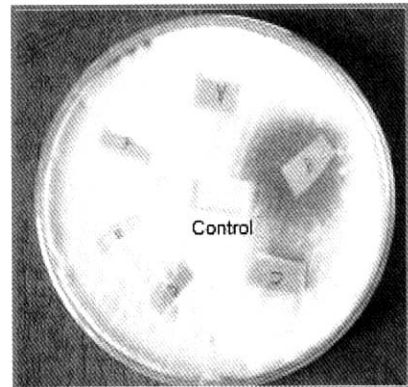


Fig. 4. Antifungal activity of six TLC fractions of *C. obtusa* essential oil against *T. mentagrophytes*.

을 나타내었다.

항진균활성을 보이는 B부분과 C부분을 TLC를 이용하여 각각 2개로 재분획하여 B-1, B-2, C-1, C-2로 구분하여 항진균활성을 관찰하였다.

Fig. 5와 Fig. 6과 같이, B-1과 B-2는 분획후 B분획과 달리 항진균효과를 보이지 못했다. B에 비해 항진균 효과가 낮았던 C에서 분획한 C-1과 C-2 모두 *M. canis*, *T. mentagrophytes* 두 균에 대해 항진균효과를 보였으며 특히 C-2의 경우 강한 항진균효과를 보였다.

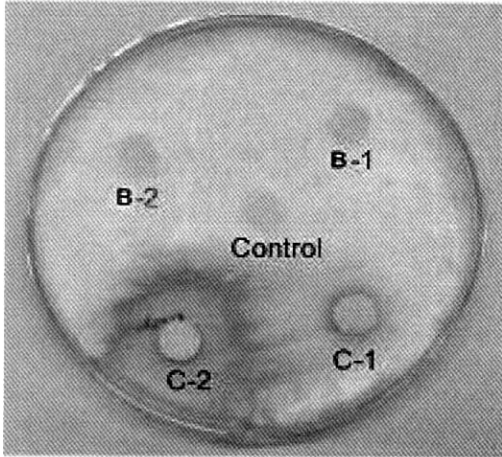


Fig. 5. Antifungal activities of sub-fractions of *C. obtusa* essential oil against *T. mentagrophytes*.

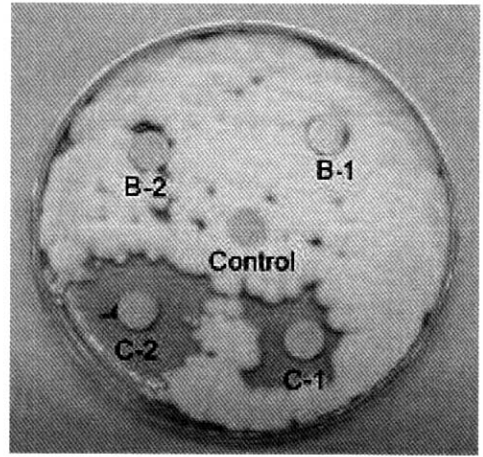


Fig. 6. Antifungal activities of sub-fractions of *C. obtusa* essential oil against *M. canis*.

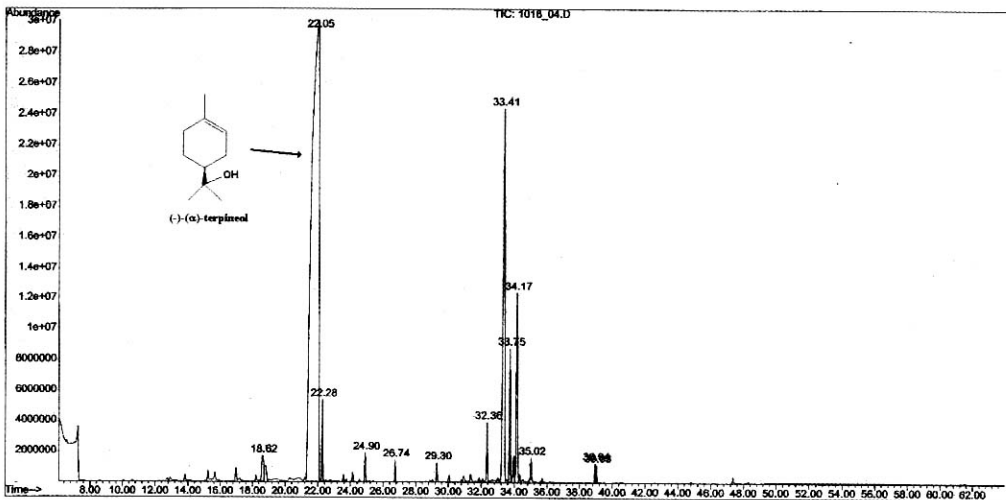


Fig. 7. Total ion chromatogram of sub-fraction C-1 of *C. obtusa* essential oil determined by GC/MS.

### 3.3. 항진균활성물질 탐색

3.2항에서 활성을 보인 하부분획 C-1과 C-2에 대해 GC/MS를 이용하여 주요성분 분석을 실시하였다. Fig. 7과 Table 1에서 보는 것과 같이 하부분획 C-1의 성분은  $\alpha$ -terpineol이 주요한 성분으로 나타났으며 그 밖에 nerolidol, cadinol 등이 검출되었다. C-1

보다 높은 활성을 보인 C-2의 주요성분으로는 elemol, cedrol, eudesmol이 검출되었으며 그 밖에 linalool L, exo-methyl-campheniol, borneol, 그리고 4-terpineol 등이 확인되었다(Fig. 8, Table 1). C-2의 주요성분 중 elemol 다음으로 함유량이 높은 RT 31.80분의 피크는 MS로 동정할 수 없으므로 이에 대한 단리 동정이 필요할 것으로 판단된다.

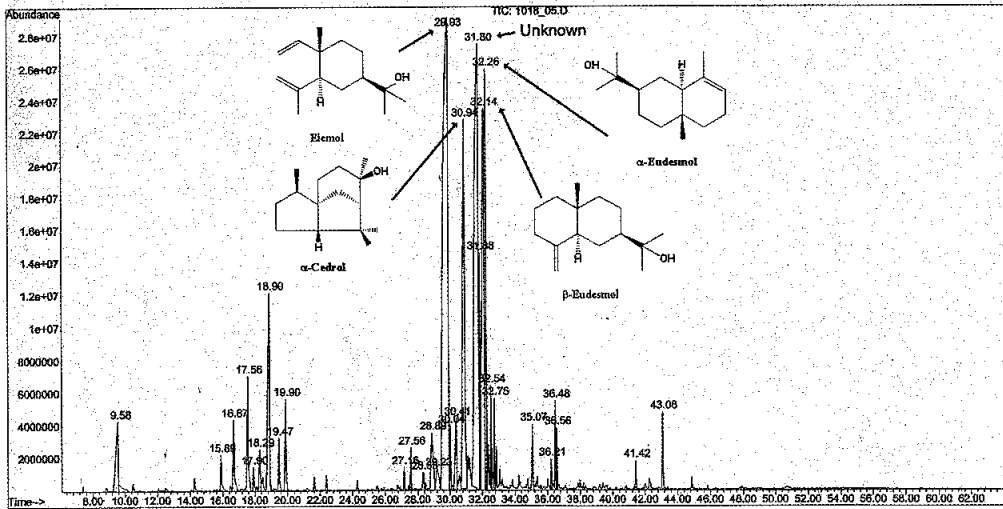


Fig. 8. Total ion chromatogram of sub-fraction C-2 of *C. obtusa* essential oil determined by GC/MS.

Table 1. Major compounds of C-1 and C-2 fractions of *C. obtusa* essential oil identified by GC/MS

Fraction	Retention Time (min)	Peak Area (%) <sup>*1</sup>	compound	Mass peaks <sup>*2</sup>
C-1	22.05	69.1	$\alpha$ -terpineol	59, 93, 121, 136, 81 (BP <sup>*3</sup> : 59, MP <sup>*4</sup> : 154)
	33.41	13.1	unknown	150, 95, 135, 81, 107
	Sum	82.2		
C-2	29.93	27.1	Elemol	59, 93, 161, 107, 67 (BP: 93, MP: 222)
	30.94	8.5	$\alpha$ -cedrol	150, 95, 43, 81, 107 (BP: 150, MP: 222)
	31.80	18.9	Unknown	189, 161, 204, 133, 91
	31.88	2.3	Unknown	161, 204, 95, 121, 105
	32.14	8.8	$\beta$ -Eudesmol	59, 149, 164, 108, 123 (BP: 59, MP: 222)
	32.26	6.5	$\alpha$ -Eudesmol	59, 149, 161, 189, 204 (BP: 59, MP: 222)
Sum	72.1			

<sup>\*1</sup>Percentage of peak area is the ratio of each peak area to total peak area on the basis of TIC values of GC/MS

<sup>\*2</sup>Major mass peaks of the corresponding compound

<sup>\*3</sup>BP; base peak

<sup>\*4</sup>MP; molecular ion peak

## 4. 결 론

편백정유는 *Microsporum canis*보다 *Trichophyton mentagrophytes*에 대한 항진균효과가 더 높게 나타났으며, 또한 한천 희석법에서 5,000 ppm 이상의 농도로 시험시 *M. canis*, *T. mentagrophytes* 모두 균

사 생장을 저해하였다. TLC를 이용한 편백정유 분획부에서는 B와 C부분에서 활성이 나타났으며 B와 C의 하부분획에서는 C-2가 항진균효과를 보였다. 항진균활성을 보이는 C-1의 주성분은  $\alpha$ -terpineol이고, C-2의 주성분은 elemol, cedrol, eudesmol 등이다.

## 사 사

이 연구의 일부분은 BK21(임산공학 연구인력 양성 사업팀), 농림기술관리센터의 연구비 지원에 의해서 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. 나기정, 강하영, 유신근, 정의배. 1999. 침엽수 정유의 생물학적 효능. Korean J. of the Lab. Anim. Sci. 15(1): 79~81.
2. 나기정, 강하영, 오종환, 최인규, 윤영원, 정의배. 1998. 침엽수종으로부터 분리된 정유의 스트레스 완화효과. Korean J. of Lab. Anim. Sci. 14(1): 93~96.
3. 송홍근. 1994. 소나무와 잣나무잎 정유성분의 생체학적 차이. 목재공학 23(1): 49~53.
4. 이근광. 1999. 측백나무(*Thuja orientalis*)와 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*) 정유(Essential oil)의 항균력 검색. 한국미용학회지 5(2): 567~577.
5. 이성숙, 강하영, 최인규. 2002. 수목정유의 생리활성에 관한 연구(I). 목재공학 30(1): 48~55.
6. 이현욱, 백승화. 한동민. 2001. 편백정유의 항균효과. Kor. J. Appl. Microbiol. biotechnol. 29(4): 253~257.
7. 홍철운, 김철생, 김남균, 김영희. 2001. 편백과 화백의 잎과 열매에서 분리한 정유성분의 조성. J. Korea Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 44(2): 116~121.
8. Kil B.-S. 2000. Allelopathic effects of volatile substances from *Chamaecyparis obtusa*. Korea J. Ecol. 23(4): 323~329.
9. Park, I.-K., S.-G. Lee, D.-H. Chol, J.-D. Pakr, and Y.-J. Ahn. 2003. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis*(L.) and *Sitophilus oryzae*(L.). J. stored products research. 39(4): 375~384.
10. Mishra A. K. and N. K. Dubey. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. Appl. Environ. Microbiol. 60(4): 1101~1105.
11. Shozo Koyama, Satoshi Tanaka, Yoshihiro Yamaguchi, and Jiro Motoyoshya. 1997. Apoptosis like cell death induced by Yoshixol and wood oil of *Chamaecyparis obtusa* on HeLa cell. Gen. pharmac. 28(5): 805~811.
12. Yaeno Aroma, Yoriko Nakai, Ritsuko Hayakawa, and Takeshi Nishino. 2003. Antibacterial effect of  $\beta$ -thujaplicin on staphylococci isolated from atopic dermatitis. Journal of antimicrobial chemotherapy. 51: 113~122.