목재공학 37(6): 585~599, 2009
Mokchae Konghak 37(6): 585~599, 2009

소나무 및 편백나무 수용성 정유를 이용한 *Trichoderma* spp.의 생장억제 활성[*1]

여 희 동[*2] · 정 지 영[*2] · 남 정 빈[*2] · 김 지 운[*2] · 김 희 규[*3] · 최 명 석[*2] · Glen Alm[*4] · Danny Lee Rinker[*4] · 양 재 경[*2†]

Antifungal Activity against *Trichoderma* spp. of Water Soluble Essential Oil extracted from *Pinus densiflora* and *Chamaecyparis obtusa*[*1]

Hee Dong Yeo[*2] · Ji-Young Jung[*2] · Jung Bin Nam[*2] · Ji Woon Kim[*2] · Hee Kyu Kim[*3] · Myung Suk Choi[*2] · Glen Alm[*4] · Danny Lee Rinker[*4] · Jae-Kyung Yang[*2†]

요 약

본 연구는 수목으로부터 분리된 수용성 정유를 이용하여 버섯에 병해를 일으키는 푸른곰팡이병의 원인 미생물인 *Trichoderma*에 대한 항균활성을 확인하고자 시도되었다. 소나무(*Pinus densiflora*)와 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*) 잎으로부터 GAP (Gas assisted process)을 이용하여 수용성 정유를 획득하였다. 버섯의 푸른곰팡이병을 발생시키는 *Trichoderma* spp. 곰팡이 5종은 25℃에서 균사생장이 가장 높았으며, pH 5.0의 배지조건에서 가장 양호한 균사 생장을 나타내었다. 소나무와 편백나무 잎의 수용성 정유는 3.9% 및 3.7%의 수율을 나타내었다. 소나무와 편백나무 잎 정유의 화학적 조성은 동일 화합물이 많았으며, 동일 화합물로는 α-Terpineol acetate, Terpinen-4-ol 및 α-Terpineol이 확인되었다. 소나무 잎의 수용성 정유는 5000 ppm 농도에서 *Trichoderma harzianum*에 대하여 가장 높은 항균활성을 나타냈으며, 편백나무 잎의 수용성 정유 또한 5000 ppm 농도에서 *Trichoderma atroviride*에 대하여 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

[*1] 접수 2009년 5월 21일, 채택 2009년 9월 30일
[*2] 경상대학교 환경산림과학부, 농업생명과학연구원. Division of Environmental Forest Science and Institute of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
[*3] 경상대학교 응용생물환경학전공. Department of Applied Biology & Environmental Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
[*4] Department of Plant Agriculture, University of Guelph, Vineland Station, Ontario, Canada LOR 2EO
† 주저자(corresponding author) : 양재경(e-mail: jkyang@gnu.ac.kr)

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the antifungal activity of the water soluble essential oil against *Trichoderma* spp. Water soluble essential oils from *Pinus densiflora* and *Chamaecyparis obtusa* were obtained from GAP (Gas assisted process) extraction apparatus. When the water soluble essential oil was treated, the growth of the conidial germination was maximum under the cultivation condition at 25℃ and in the culture medium adjusted to pH 5.0. The yield of water soluble essential oil was 3.9% and 3.7% in *P. densiflora* and *C. obtusa*, respectively. 24 and 15 kinds of compounds were identified in water soluble essential oils of *P. densiflora* and *C. obtusa*, respectively. The major components in the essential oil of *P. densiflora* were α-Terpineol acetate and Terpinen-4-ol and those of *C. obtusa* were Terpinen-4-ol and α-Terpineol. Antifungal activity was the best in the 5000 ppm of *P. densiflora* against *Trichoderma harzianum* and in 5000 ppm of *C. obtusa* against *Trichoderma atroviride*.

Keywords: water soluble essential oil, *Trichoderma*, *Pinus densiflora*, *Chamaecyparis obtusa*, antifungal activity

1. 서 론

표고, 느타리, 양송이, 팽이 등 버섯의 종류에 관계없이 발생되고 있는 푸른곰팡이병은 그린몰드(green mold)가 그 원인으로 알려져 있으며 이들의 피해는 심각하다. 푸른 곰팡이병을 일으키는 병원균은 매우 다양하며, 현재까지 밝혀진 병원균은 *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Penicillium* spp., 그리고 *Aspergillus* spp.로 이 중에서 *Trichoderma* spp.는 자낭균류에 속하는 *Hypocrea* spp.의 무성세대로서 발생빈도가 가장 높은 것으로 알려져 있다(Ranque *et al.*, 2008).

버섯의 병해 중에서 방제가 가장 어렵고 버섯의 발생 및 수확에 가장 큰 영향을 미치는 대표적인 병의 하나인 푸른 곰팡이병은 고온다습한 조건에서 많이 발생하며 발생초기에는 버섯균과 비슷한 백색을 띄다가 포자가 형성되면서 황록색 내지 진녹색으로 변하고, 골목의 표면에 부정형의 병반을 형성하면서 버섯균의 생장을 억제하여 결국에는 버섯균을 사멸 시킨다. 현재 버섯 재배농가에서는 버섯균사생장 기간 동안에 푸른 곰팡이병의 발생을 억제하기 위하여 버섯배지 살균 전에 균상표면에 벤레이트, 판마쉬, 스포르곤수화제를 살포하는 것이 최대의 방제법이다(Talma *et al.*, 1989). 하지만 이런 살균제들의 독성에 대한 위험이 일반인의 먹거리에 대한 관심으로 전환되고 있으며, 농약을 사용하지 않거나, 최소한으로 사용한 친환경농산물에 대한 소비자들의 요구가 점차 커지고 있다. 또한 부가적으로 무분별한 농약사용으로 인해 병원균의 약제 저항성 발생하여 약제의 효능이 점차 상실하게 되고, 그 사용에 제한이 따르게 되는 실정에 있다. 버섯산업에서는 이러한 화학적 방제제의 대안으로 천연물로부터 유래된 인체에 무해한 친환경 방제제를 요구하고 있다.

최근 환경보존 및 안전한 먹거리의 필요성 증대에 따라 화학비료 및 농약 사용을 기피하는 대신에 수목으로부터 추출 분리된 항균력을 나타내는 화합물을 활용하려는 연구가 많이 수행되고 있다(Benner, 1993; Pillmoor *et al.*, 1993; Neale, 2000; 이 등, 2003). 수목으로부터 유래된 목초액을 이용하여 고추탄저병 원인균의 생장억제효과도 입증하였으며(안 등, 2003), 또한 수목에서 추출 정제된 휘발성 물질인 정유(essential oil)에 의한 살충성능(Marcus *et al.*, 1979)도 연구되었으며, 식물체 정유에 의한 다양한 항균활성(Wink *et al.*, 1992; Dixshit *et al.*, 1979; Yun *et*

Table 1. Species of *Trichoderma* spp. originated from Canada and Korea

Species	Species number	Origin
Trichoderma aggressivum	UG 1565	University of Guelph, Canada
Trichoderma atroviride	UG 1550	University of Guelph, Canada
Trichoderma harzianum	KCTC 6426	Korean Collection for Type Cultures
Trichoderma koningii	UG 2906	University of Guelph, Canada
Trichoderma viride	UG 2662	University of Guelph, Canada

al., 1993)도 보고되었다.

식물정유는 terpene, alcohol, aldehyde 등과 같은 여러 가지 복합화합물로 식물의 이차 대사산물이며 외부환경에 대한 자체 방어기작으로 합성되는 생리활성물질로 항균, 살균 등 방부효과가 뛰어나고, 향이 후각을 통해 기억, 감정 등을 관장하는 대뇌변연계에 자극을 주기 때문에 스트레스나 긴장을 완화시키고 기억력과 면역력을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Na *et al.*, 1998). 소나무 정유의 주성분에는 60~70%의 monoterpene이 포함되어 있다고 보고되었으며(Price *et al.*, 1995) 편백나무가 속하는 측백나무과의 심재에서는 β-thujaplicin이라는 항균물질이 존재한다고 보고되어 있다(Erdtman and Gripenberg, 1948). 특히 침엽수종인 잣나무, 편백나무, 측백나무 등의 추출물과 citrus 정유에서도 항균활성(Caccioni *et al.*, 1998; Cimanga *et al.*, 2002; Hassanzadeh *et al.*, 2001; 서 등, 2003) 및 살충효과(Baricevic *et al.*, 2001; Chantraine *et al.*, 1998)를 확인하였다는 연구보고도 있다.

정유는 보통 증기법(Maggi *et al.*, 2009), 압착법(Mossi *et al.*, 2004) 등의 방법으로 추출되지만 정유 추출 후 수용성 정유는 대부분 버려지게 된다. 따라서 본 연구는 정유 추출 후 얻어지는 수용성 정유의 획득 및 주요성분을 구명함과 동시에 수용성 정유의 *Trichoderma* 속에 대한 항균력을 밝혀 버섯재배농가에서 버섯 생산양을 감소시키는 주 원인균인 푸른곰팡이류의 방제에 응용하기 위한 기초자료를 마련하고자 시도되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시균주

본 연구에 사용된 그린몰드 균주는 Canada의 University of Guelph, Mushroom Lab.으로부터 4종(*Trichoderma aggressivum* UG 1565, *Trichoderma atroviride* UG 1550, *Trichoderma koningii* UG 2906, *Trichoderma viride* UG 2662), 한국생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(KCTC)로부터 1종(*Trichoderma harzianum* KCTC 6426)을 제공받아 공시균주로 사용하였다(Table 1).

균주는 Malt agar (MA, Difco, France) 배지에 접종하여 25°C 배양기 내에서 지속적으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

Trichoderma 5종 균주는 MA배지에 접종 후 25°C에서 배양하였으며, 일정 배양시간이 경과한 후에 균사 및 포자 모양을 관찰하였다.

2.2. *Trichoderma* 속 그린몰드의 포자 및 균사체 형태 조사

최종적으로 포자가 형성된 *Trichoderma* 5종 균주를 needle을 이용하여 슬라이드글라스에 점착시키고 염색시약(Lactophenyl cotton blue)으로 염색하여 커버글라스를 덮은 후 *Trichoderma* 5종 균주의 형태를 관찰하였다. *Trichoderma* 5종 균주의 관찰 및 사진 촬영은 디지털이미지기록장치(TDI 200, Japan)가 장착된 광학현미경(BX-51, Olympus, Japan)을 사용하여 400배 배율에서 포자 및 균사의 모양을 관찰하였다.

2.3. *Trichoderma*속 그린몰드의 생육특성 조사

Trichoderma 5종 균주의 적정 배양 온도를 탐색하기 위하여 MA (Malt agar, Difco, France) 배지에 균주를 접종 후 배양 온도를 각각 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C로 설정하여 배양하였다. 또한 *Trichoderma* 5종 균주의 최적 생장 pH를 탐색하기 위하여 MA배지 멸균 후 0.1 M의 NaOH 용액과 0.1 M의 HCl 용액을 사용하여 배지를 pH 3.0, pH 5.0, pH 7.0, pH 9.0, pH 11.0로 조절한 후, 최적생장온도에서 배양한 다음, 균총의 직경(mm)을 측정하였다. 이때 대조구로는 MA배지를 사용하였다.

2.4. 소나무 및 편백나무의 수용성 정유의 획득

수목의 잎으로부터 수용성 정유를 획득하기 위하여 사용된 공시수종은 소나무(*Pinus densiflora*)와 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)로 이들 수종의 잎은 경상대학교(경남 진주시 가좌동 소재)에서 채취하였다. 채취된 잎은 5°C에서 밀봉하여 보관한 다음 시료로 사용하였다.

생재상태의 잎을 GAP (Gas assisted process, K-22D-10L, Kashiwabara Engineering Co., Japan)에 투입하여 2시간 동안 추출하여 정유를 획득하였다. 획득된 정유는 증류하여 포집된 정유와 수용성 정유로 분리 수집하였다. 소나무 잎과 편백나무 잎 300 g에 증류수 3 ℓ를 첨가하여 수용성 정유 2 ℓ를 획득하였으며, 이때 잎으로부터 획득된 정유의 총 수율을 식 (1)에 의해 계산하고 수불용성 정유의 수율을 뺀 다음 수용성 정유의 수율을 구했다.

$$\frac{\text{추출 전 잎의 전건 중량} - \text{추출 후 잎의 전건 중량}}{\text{추출 전 잎의 전건 중량}} \times 100(\%) \quad \text{식 (1)}$$

2.5. 수용성 정유의 성분 분석

수용성 정유의 분석을 위하여 ethyl ether로 수용성 정유를 추출하여 GC/MS (Clarus600/Claus600T, Perkin Elmer)로 분석하였다. GC-MS 분석조건은 오븐온도는 80°C에서 2분 유지, 7°C/분 승온, 250°C에서 5°C/분 승온, 280°C에서 12.7분간 유지하였다. Carrier gas는 helium을 사용하였고, ion source temperature는 230°C, injector temperature는 275 °C로 하였다. 소나무 및 편백나무의 수용성 정유의 화합물은 Nist05s와 Wiley7 라이브러리를 비교하여 확인하였다.

2.6. 수용성 정유의 항균력 측정

소나무와 편백나무 잎으로부터 정유추출기에 의해 획득된 수용성 정유는 40°C 이하에서 감압 농축한 후 멸균된 MA배지에 625 ppm, 1250 ppm, 2500 ppm, 5000 ppm의 농도로 첨가하여 배지를 조제하였다. 수용성 정유가 첨가된 배지에 *Trichoderma* 5종 균주를 접종하고 25°C 배양기에서 3일간 배양한 다음 균총의 직경(mm)을 측정하였고, 이때 대조구는 수용성 정유가 첨가되지 않은 MA배지를 사용하였다.

2.7. 통계분석

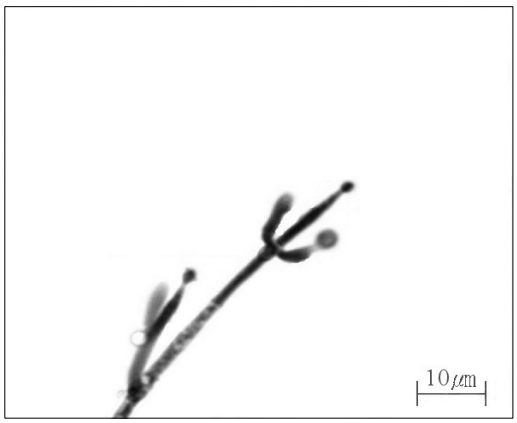
통계분석을 위하여 각 계통의 5반복 값을 Micro office excel을 이용하여 표준편차를 나타내었으며, 각 실험 구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 Duncan의 multiple-range test로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

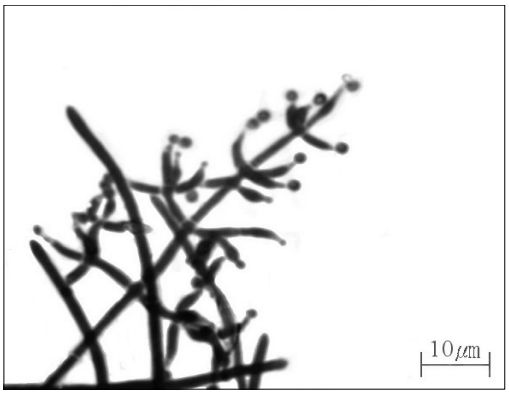
3.1. 공시균주의 현미경 관찰

Fig. 1은 *Trichoderma* 5종의 포자와 균사체를 디지털이미지기록장치가 장착된 광학현미경을 이용하여 400배의 배율에서 사진촬영한 결과이다.

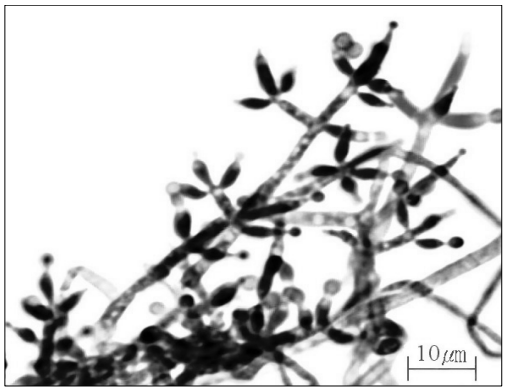
Trichoderma 5종의 형태학적 특징은 Fig. 1과 같이 *T. aggressivum, T. atroviride, T. harzianum, T. koningii* 및 *T. viride*의 형태적 특징을 확인할 수 있



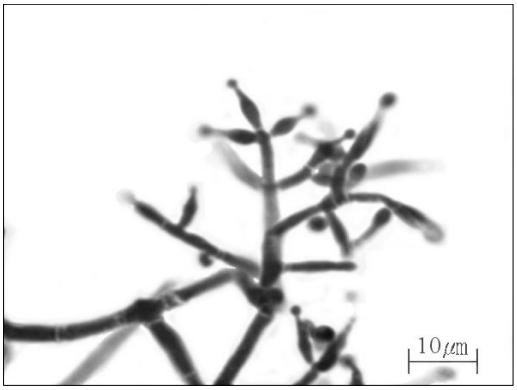
T. aggressivum



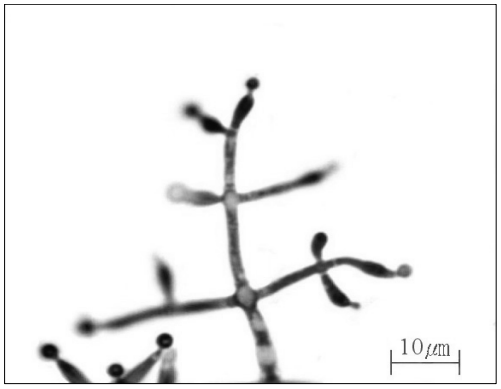
T. atroviride



T. harzianum



T. koningii



T. viride

Fig. 1. Light micrographs of *Trichoderma aggressivum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii* and *T. viride*.

었다. 즉, *T. aggressivum*은 Samuels 등(2002)에 의하여 균학적 특성이 확립된 것으로서 북미지역에 분포하는 종으로 알려져 있다.

이것은 *T. harzianum*과 근연의 종이지만, 분생자병의 분지, 그 위에 Phialide 발달양식이 *T. harzianum*과는 잘 구분되는 solitary 형태가 확인되었다. 특히 이 종은 PDA상, 25°C에서 51시간 내 포자를 형성하는 것이 중요한 특징이었다. *T. harzianum*은 플라스크모양의 Phialide가 한곳에서 3개 또는 이상 규칙적으로 발달하며, 특히 정단부 또는 마디부분에 많이 형성되었다. 그 위에 발달하는 분생포자의 형태는 준구형 내지 짧은 타원형이고, 연한 초록색이었으며, 형태적으로 *T. koningii*와 유사하지만 *T. koningii*의 분생포자의 모양은 원통, 색깔은 초록색이며, 거미줄 같은 기중균사가 균총 위에 발달하는 점이 차이점으로 나타났다. *T. atroviride* 및 *T. viride*의 분생포자의 형태는 준구형 내지 짧은 타원형으로 *T. harzianum*과 유사하나, 성숙한 포자의 색이 진한 초록(dark green)으로 바뀌었다. 분생포자가 구형, 표면에 돌기가 있으면, *T. viride*이지만, 돌기가 없고 편평하면서(smooth), 거꾸로 선 달걀모양(obovoid)으로 기부가 납작(truncate base)하고, 균총에서 강한 코코넛향이 나면 *T. atroviride*로 판단되었다(Kubicek and Harman, 1998).

3.2. *Trichoderma*속 그린몰드의 생육특성

Fig. 2는 *Trichoderma* 5종 균주를 MA 배지에 접종한 다음, 배양온도를 각기 다르게 하여 3일간 배양하였을 때 균사생장 길이를 나타낸 결과이다.

T. aggressivum, T. atroviride, T. harzianum, T. koningii 및 *T. viride*는 25°C에서 최적 균사 생장을 나타내었다. *T. koningii*는 25°C와 30°C에서의 균사생장에서 유의성이 나타나지 않았으며 나머지 4종 균주에서는 생장온도에 따른 균사생장의 유의성이 인정되었다. *T. viride*는 *Trichoderma* 5종 균주 중 가장 낮은 균사생장 속도를 나타냈으며, 다른 4종 균주와 달리 30°C에서 균사생장이 매우 낮게 나타났다.

*Trichoderma*의 온도에 따른 균사생장속도는 종류에 관계없이 거의 비슷한 경향을 나타났으며 15°C부터 25°C까지는 생장속도가 증가하다가 30°C 이후에서는 생장속도가 감소하였으며 35°C에서는 *Trichoderma* 5종 균주 모두 생장하지 못하였다.

결과적으로 *Trichoderma* 5종 균주의 최적 균사생장온도는 25°C이며, 35°C 이후에는 생장이 어렵다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 *Trichoderma* 5종 균주의 생장 가능온도는 15~30°C로 확인되었으며, *Trichoderma* 5종 균주의 최적배양온도는 25°C로 판단되었다.

Fig. 3은 *Trichoderma* 5종의 최적 생장 pH를 탐색하기 위하여, 각각 pH를 달리하는 MA배지에 균주를 접종한 다음 25°C의 온도에서 생장시킨 후 균사생장길이를 측정한 결과이다. 이때 대조구로는 pH를 조절하지 않은 MA배지를 사용하였다.

Trichoderma 5종은 그 종류에 관계없이 pH 5.0에서 가장 높은 균사생장 길이를 나타내었다. pH 9.0과 pH 11.0의 배지에서는 가장 낮은 균사생장 길이를 나타냈으며, 이러한 결과는 향후 그린몰드의 방제를 위해서 pH를 조절하는 방법도 가능할 것으로 판단되었다.

3.3. 수용성 정유의 수율

Table 2에 정유추출기(GAP)에 의해 소나무와 편백나무 잎으로부터 추출된 수용성 정유의 수율을 나타내었다.

소나무와 편백나무 잎으로부터 추출된 수용성 정유의 수율은 약 4% 이하 수준으로 큰 차이가 없었으며, 최종적으로 획득된 정유의 농도는 약 570 mg/ℓ, 540 mg/ℓ였다. 편백나무 잎의(수불용성) 정유 추출수율에 대한 이전 연구에서 Yang 등(2002)에 의하면 heating mantle을 이용하여 정유를 추출하였는데, 봄과 가을에 채취된 편백나무 잎의 수율의 경우 167 g/ℓ의 추출조건에서 각각 4.0%, 4.5%의 수율이 확인되었으며 여름과 겨울에 채취된 편백나무 잎에서는 4.2%와 4.5%의 수율을 나타냈다고 보고하였다. 본 연구 결과와 비교했을 때 편백나무의 수불용성 정유와 수용성 정유는 0.3~0.8% 정도의 수율차이를

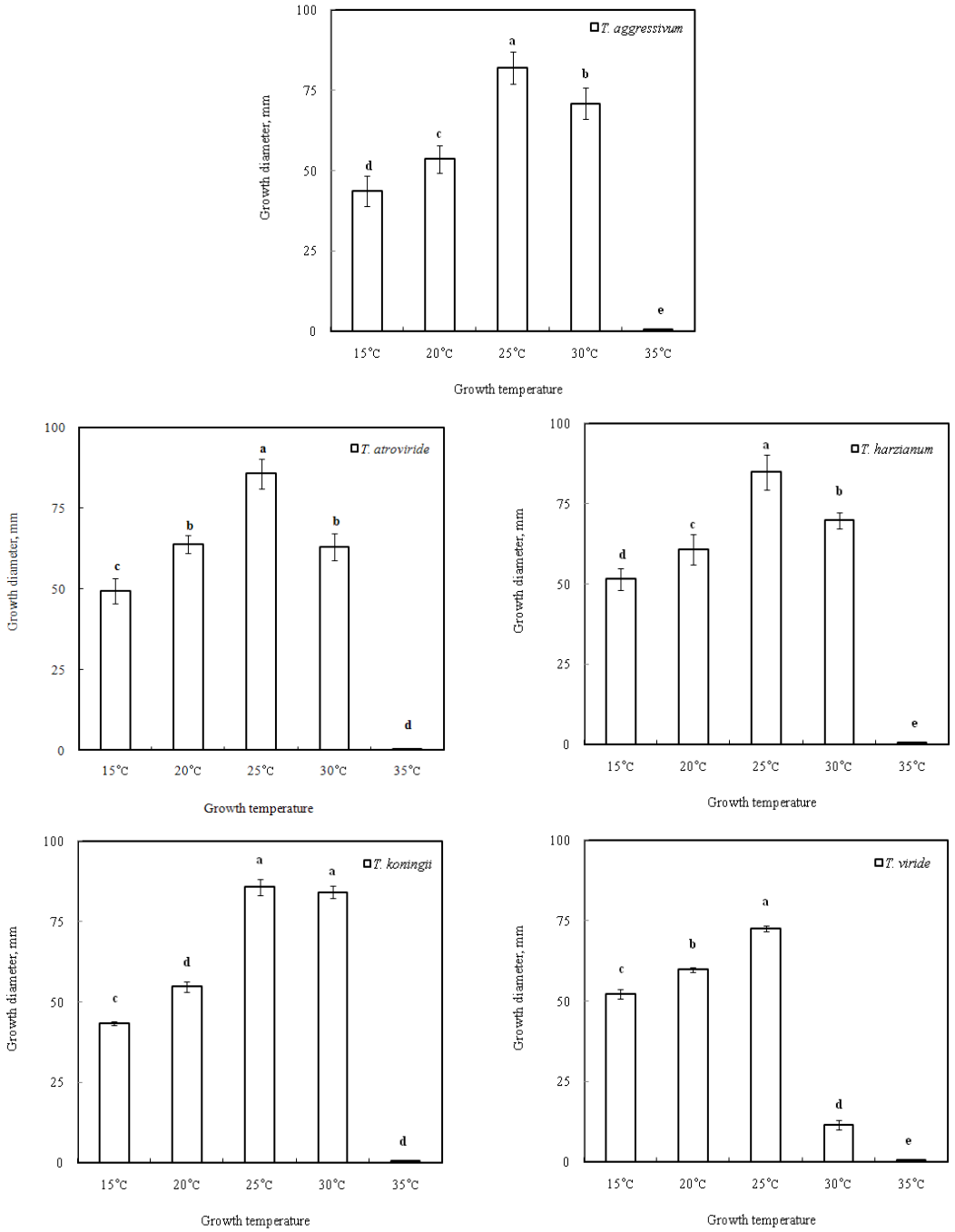


Fig. 2. Effect of growth temperature on mycelial growth of *Trichoderma* spp. for 3 days.

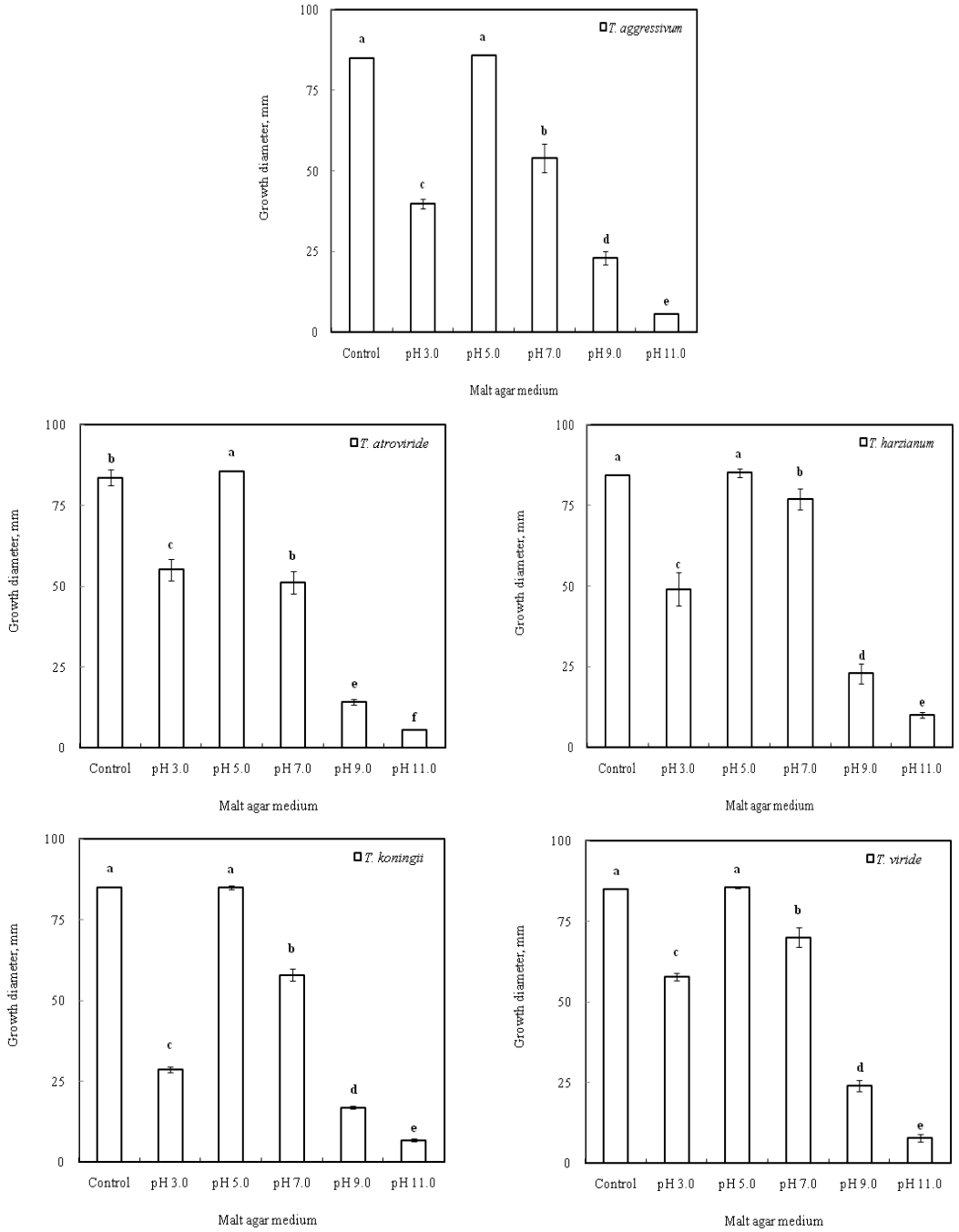


Fig. 3. Effect of pH on mycelial growth of *Trichoderma* spp. for 3 days.

Table 2. Water soluble essential oils from leaves of *P. densiflora* and *C. obtusa* by the gas-assisted process (GAP)

Wood species	Moisture content of leaves, %*	Extraction yield, %*	Weight of extracts, mg/L
P. densiflora	62.3	3.9	570
C. obtusa	62.3	3.7	540

* Based on the oven dry weight

확인할 수 있었다. 결과적으로 GAP 장치로부터 획득할 수 있는 수용성 정유의 total 수율은 heating mantle에서 채취할 수 있는 수불용성 정유와 거의 유사한 수율을 나타내는 것으로 판단되며, 이들의 효율적 추출 및 분리를 위해서는 새로운 산업적 기술도입이 필요하다고 판단된다.

3.4. 수용성 정유의 화합물 조성

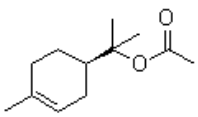
소나무 및 편백나무 잎으로부터 추출된 수용성 정유의 성분들을 Table 3에 나타내었다. 소나무의 경우 24가지 화합물이 검출되었으며 주요 성분들은 momoterpene과 sesquiterpene인 것을 확인할 수 있었다. 소나무 수용성 정유에서 momoterpene은 약 41.7%인 것으로 나타났고 sesquiterpene은 약 45.8%인 것으로 확인되었다. 소나무 수용성 정유의 구성성분으로는 α-Terpineol acetate가 전체 화합물 중 25.4%로 가장 많이 함유되어 있었으며 그 다음으로 Terpinen-4-ol가 약 22.7% 함유되어 있다. (±)-Isoborneol의 함량은 14.5%였으며 Cubenol과 Beyerene은 각각 6.5%로 확인되었다. 그리고 α-Thujene, Myrcene, Limonene, α-Terpinene, Terpinolene, β-Terpineol, (+)-Borneol, α-Terpineol, Caryophyllene, Widdrene, Germacrene D, Cuparene, Calamenene, Cedrol, α-Eudesmol, Longicyclene, Selinenol, Rimuene 및 α-Bulnesene 화합물의 함량은 각각 0.3~3.4% 수준으로 확인되었다.

편백나무 잎으로부터 추출된 수용성 정유에서는 15가지 화합물이 검출되었으며 주요 성분으로는 Terpinen-4-ol 및 α-Terpineol이 각각 73.3% 및 7.23%로 가장 많이 함유되어있다. 편백나무 수용성 정유에서 momoterpene은 약 93.3%인 것으로 나타

Table 3. Retention time and mass spectrometric data for water soluble essential oils from leaves of *P. densiflora* and *C. obtusa* identified by GC-MS

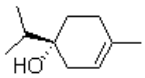
NO.	Compound	tR[a]	*P. densiflora*	*C. obtusa*
1	α-Thujene	4.43	1.0	0.6
2	Myrcene	4.74	0.6	–
3	3-Carene	5.42	–[b]	0.6
4	Limonene	5.49	3.4	–
5	α-Terpinene	6.08	1.1	–
6	Terpinol	6.56	–	1.0
7	Terpinolene	6.74	0.9	–
8	β-Linalool	7.17	–	0.8
9	β-Terpineol	7.41	1.8	4.0
10	Camphor	8.13	–	4.9
11	(+)-Borneol	8.79	1.0	1.5
12	Terpinen-4-ol	8.94	22.7	73.3
13	Thymol	9.15	–	0.9
14	α-Terpineol	9.37	3.2	7.2
15	α-Ocimene	9.46	–	0.7
16	Piperitol	9.83	–	0.8
17	(±)-Isoborneol	11.62	14.5	1.7
18	α-Terpineol acetate	13.14	25.4	1.3
19	Caryophyllene	14.79	0.7	–
20	Widdrene	15.07	3.3	–
21	Germacrene D	15.74	1.7	–
22	Cuparene	16.66	0.6	–
23	Calamenene	17.02	0.7	–
24	Cubenol	17.79	6.5	0.7
25	Cedrol	18.99	1.4	–
26	α-Eudesmol	19.88	1.5	–
27	Longicyclene	21.78	0.3	–
28	Selinenol	24.44	0.4	–
29	Rimuene	26.16	0.4	–
30	Beyerene	26.82	6.5	–
31	α-Bulnesene	28.26	0.4	–

[a] Retention time, [b] Not detected



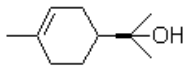
2-((*R*)-4-methylcyclohex-3-enyl)propan-2-yl acetate

α-Terpineol acetate



(*R*)-1-isopropyl-4-methylcyclohex-3-enol

Terpinen-4-ol



2-(*S*)-4-methylcyclohex-3-enyl)propan2-ol

α-Terpineol

Fig. 4. Chemical structure of main compounds in the water soluble essential oils from leaves of *P. densiflora* and *C. obtusa*.

났고 sesquiterpene은 약 6.7%인 것으로 확인되었다. 15종의 화합물중 13 종인 *α*-Thujene, 3-Carene, Terpinol, *β*-Linalool, *β*-Terpineol, Camphor, Thymol, *α*-Ocimene, Piperitol, (±)-Isoborneol, *α*-Terpineol acetate 및 Cubenol 화합물의 함유량은 각각 0.6~4.9% 수준으로 확인되었다.

소나무 및 편백나무 잎의 수용성 정유에서 *α*-Thujene, *β*-Terpineol, (+)-Borneol, Terpinen-4-ol, *α*-Terpineol, (±)-Isoborneol, *α*-Terpineol acetate 및 Cubenol이 공통적으로 검출되었으며 Terpinen-4-ol의 함량이 소나무에서 22.7%, 편백나무에서 73.3%로 모두 높게 나타났다. Kim 등(2005)에 의하면 소나무 잎 정유에서 *α*-pinene, *β*-pinene, camphene, phellandrene, limonene, borneol이 최대 0.8%, 4.8%, 2.8%, 0.4%, 2.7%, 1.4% 함유되어 있으며, 그리고 bornyl acetate가 1.5% 정도 함유되었다고 보고하였으며, Yang 등(2007)에 의하면 편백나무 잎 정유에서 *α*-Thujene이 0.68%, Terpinen-4-ol이 4.11%, *α*-Terpineol acetate이 13.71% 함유되었다고 보고하였다. 기존의 논문에서는 편백나무 잎(수불용성) 정유에서 *α*-Terpineol acetate가 13.71%의 함유량을 나타냈지만, 본 연구 결과에 나타난 수용성 정유에서는 1.3%의 낮은 함량을 나타냈으며, 이와 반대로 Terpinen-4-ol의 함유량은 수용성 정유에서 73.3%로, 편백나무 잎 정유(수불용성 정유, 4.11%)보다 높은 함량을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때, 수용성 정유와 수불용성 정유는 조성 화합물의 종류는 유사하다고 판단되지만, 각각 화합물의 함량(구성) 비율은 크게 다르다는 것으로 확인할 수 있었으며, 이러한 차이는 물에 대한 정유 화합물의 용해도 차이 때문인 것으로 추측된다.

Fig. 4에 소나무와 편백나무 잎에서 가장 많이 검출된 *α*-Terpineol acetate, Terpinen-4-ol 및 *α*-Terpineol의 구조식을 나타냈다.

3.5. *Trichoderma*속 그린몰드에 대한 소나무 수용성 정유의 항균활성

Fig. 5는 소나무 잎으로부터 추출된 수용성 정유가 *Trichoderma* 5종 균주의 균사생장에 미치는 영향을 나타낸 결과로, 이때 대조구로는 수용성 정유를 첨가하지 않은 MA 배지를 사용하였다. *T. aggressivum*에 대한 소나무 수용성 정유의 균사생장 저해 효과는 5000 ppm에서 41.7%를 나타냈으며, 정유 농도의 증가에 따라서 균사생장 저해 효과는 약간 증가되는 경향을 나타냈지만 625 ppm의 농도까지는 생장저해 효과가 나타나지 않았다. 1250 ppm 이상의 농도부터 균사생장에 대한 유의성이 나타났다. *T. atroviride*에 대하여 5000 ppm은 약 44.1%의 균사생장 저해 효과를 나타냈으며, 625 ppm에서는 균사생장 저해효과가 나타나지 않았다. 1250 ppm부터 농도에 따른 균사생장 저해성이 유의성을 나타내었다. *T. harzianum*에 대한 소나무 수용성 정유의 균사생장 저해 효과는 5000 ppm 농도에서 48.5%로 5종 균주 중 가장 높은 균사생장 저해 효과를 나타냈으며, *T. atroviride*와 마찬가지로 1250 ppm부터 농도에 따른 균사생장 저해성에 대한 유의성이 나타났다. 수용성 정유 5000 ppm수준에서 *T. koningi*는 최고 42.0%, *T. viride*는 최고 31.5%의 균사생장 저해 효과를 나타내었다. Oh 등(2006)에 의하면 리기다 소나무 잎의 에탄올 추출물에서도 항균효과가 있다고 보고한 연구결과와 유사한 점이 있었으며, 임 등(2002)은 소

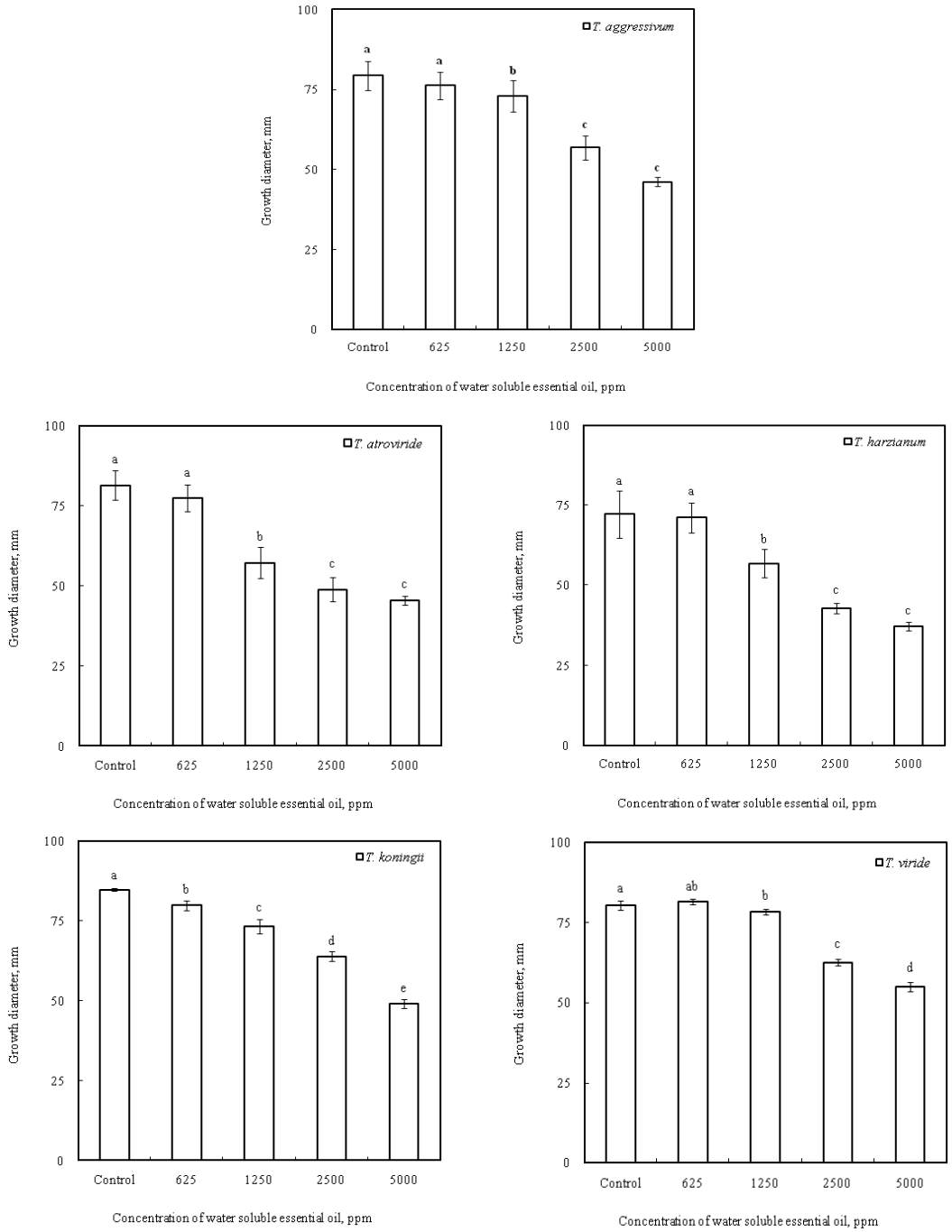


Fig. 5. Effect of *P. densiflora* water soluble essential oils on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

나무의 에탄올 추출물이 식중독 세균인 *Listeria monocytogenes*에 대하여 항균활성을 나타낸다고 보고한 바 있다.

Trichoderma 5종 균주의 종류에 따라서 소나무 수용성 정유의 균사생장 저해효과 차이는 크게 나타나지 않았으며, 결과적으로 소나무 잎으로부터 획득된 수용성 정유는 1250 ppm 이상에서 *Trichoderma* 5종 균주의 균사생장억제 효과가 인정된다고 판단되었다.

3.6. *Trichoderma*속 그린몰드에 대한 편백나무 수용성 정유의 항균활성

Fig. 6은 편백나무 잎으로부터 추출된 수용성 정유에 대한 *Trichoderma* 5종 균주의 생장억제 효과를 나타낸 결과로, *T. koningii*와 *T. viride*에서는 625 ppm 이상의 농도에서 균사생장 저해효과가 5% 수준에서 유의성이 나타났으며, *T. aggressivum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*에서의 균사생장 저해효과는 1250 ppm 이상의 농도에서 유의성이 나타났다.

편백나무 잎 정유에 의한 *Trichoderma* 5종 균주의 균사생장억제 효과는 대조구와 비교했을 때 5000 ppm 농도에서 *T. aggressivum* 52.3%의 균사생장 억제 효과를 나타냈으며, 1250 ppm 이상에서 5% 수준의 유의성이 인정되었다. *T. atroviride*는 1250 ppm 농도에서 37.6%, 2500 ppm 농도에서 48.1%, 5000 ppm 농도에서 69.3%의 높은 균사생장 저해 효과를 나타냈으며 5% 수준에서 유의성이 인정되었다. *T. harzianum*의 경우 2500 ppm 농도에서 34.9%, 5000 ppm 농도에서 54.6%의 균사생장 저해효과를 나타냈으며, 5% 수준에서 유의성이 인정되었다. *T. koningii* 및 *T. viride*는 5000 ppm 농도에서 51% 및 54.5%의 균사생장 저해 효과를 나타냈으며 편백나무 잎 수용성 정유의 전 농도에서 5% 수준에서 유의성이 인정되었다.

Trichoderma 5종 균주 중 *T. atroviride*는 편백나무 잎 수용성 정유 5000 ppm 농도에서 가장 높은 균사생장 저해가 나타났으며 5000 ppm 농도 수준에서 *T. viride*가 가장 낮은 균사생장 저해를 나타냈다. 이와 유사한 연구로는 Yang 등(2007)에 의한 편백나무 잎 정유에서 *Bacillus cereus, Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus mutans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aureobasidium pullulans, Penicillium citrinum, Pityrosporum ovale, Rhizopus oryzae, Trichoderma viride, Candida tropicalis, Saccharomyces cerevisiae*에 대한 항균활성을 나타낸 연구가 있다.

결과적으로 수목의 잎으로부터 GAP 장치에 의해 추출된 수용성 정유는 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 생장 억제 효과는 31.5~69.3% (5000 ppm 기준)로 나타났다. 소나무 수용성 정유와 편백나무 수용성 정유의 *Trichoderma*에 대한 항균효과를 비교해보면, 5000 ppm 농도를 기준으로 할 때, 편백나무 수용성 정유가 소나무 수용성 정유에 비해 *Trichoderma*에 대해 더 높은 항균효과를 나타내었다. 특히 소나무 수용성 정유는 *T. harzianum*에 대한 항균활성이 가장 높았으며, 편백나무 수용성 정유는 *T. atroviride*에 대한 항균활성이 가장 높았다.

본 연구 결과를 기준으로 판단해볼 때, 수목자원으로부터 추출된 수용성 정유를 이용한 *Trichoderma*에 대한 항균제 원료로서의 사용 가능성이 있다고 판단되었다.

4. 결 론

Trichoderma 균주 5종의 포자와 균사체의 모양은 모두 거의 유사하였지만, 포자의 형태가 부분적으로 다르게 나타났다. *Trichoderma*의 생장에 있어서 최적배양은 25°C로 확인되었으며 *Trichoderma*속 균주 5종의 최적생장 pH는 5.0으로 확인되었고, pH 11.0 이상에서는 거의 생장하지 않았다.

소나무(*P. densiflora*)와 편백나무(*C. obtusa*)의 잎으로부터 GAP법(Gas assisted process)에 의해 추출된 수용성 정유의 수율은 약 4% 이하였으며, 획득된 정유의 농도는 약 540~570 mg/L으로 확인되었다.

소나무 잎 수용성 정유의 항균활성은 *T. koningii*에서만 모든 농도에서 유의성이 나타났으며, 5000

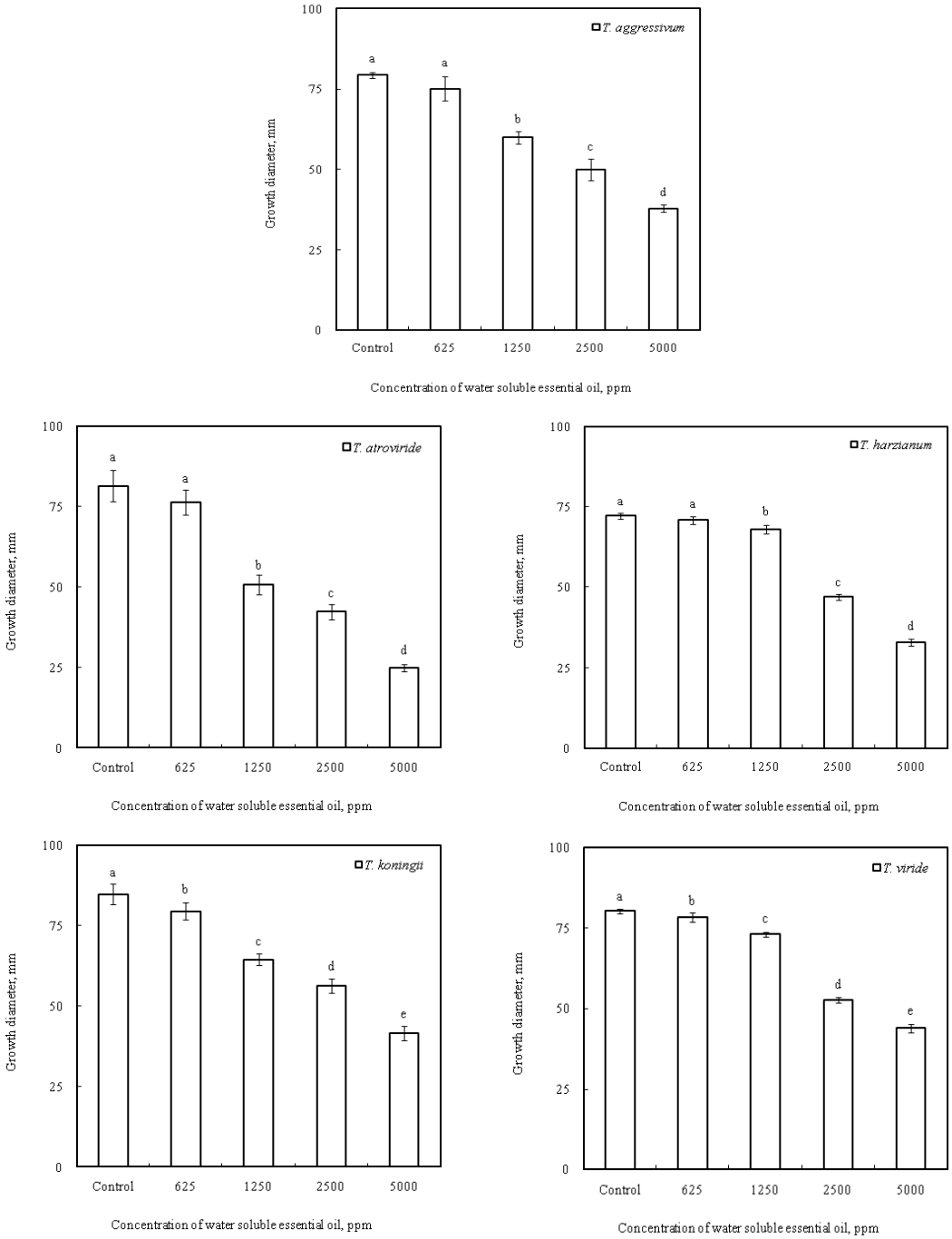


Fig. 6. Effect of *C. obtusa* water soluble essential oil on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

ppm에서 *T. aggressivum* 41.7%, *T. atroviride* 44.1%, *T. harzianum* 48.5%, *T. koningii* 42.0%, *T. viride* 31.5%로 확인되었다.

편백나무 잎 수용성 정유의 항균활성은 *T. aggressivum, T. atroviride* 및 *T. harzianum*을 제외하고 625~5000 ppm의 농도에서 나타났으며, 5000 ppm의 농도에서 *T. aggressivum* 52.3%, *T. atroviride* 69.3%, *T. harzianum* 54.6%, *T. koningii* 51% 및 *T. viride* 54.5%의 항균활성이 확인되었다.

소나무 잎 및 편백나무 잎 수용성 정유는 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 항균제제로서의 원료 사용 가능성이 있다고 판단되었다. 또한 수목 정유를 이용한 연구는 인체에 무해한 천연 항균제 및 방부제로서 응용하여 화학합성 농약을 대체할 수 있는 잠재성이 높다고 판단된다.

참 고 문 헌

1. 서원택, 양재경, 강병국, 박우진, 홍성철, 강영민, 정희영, 김용덕, 강승미, 김선원, 최명석. 2003. 서양측백나무 잎으로부터 식물정유 추출 및 생리활성. 한국약용작물학회. 11(5): 364~370.
2. 안병준, 조성택, 조택수, 이성재, 이윤수. 2003. 탄수화물이 토양미생물 및 고추 생육에 미치는 영향. 임산에너지. 22: 49~56.
3. 양재경, 강병국, 김태홍, 홍성철, 서원택, 최명석. 2002. 침엽수 잎으로부터 효율적인 정유 추출법 탐색 및 정유성분 분석. 한국생물공학회. 17(4): 357~364.
4. 오병태, 최성길, 조성환. 2006. 리기다 소나무 잎 에탄올 추출물의 항균 및 생리활성. 한국식품저장유통학회. 13(5): 629~633.
5. 이향범, 권오성, 김한나, 김미경, 김창진. 2003. 은행나무 추출물의 생물활성 및 천연물 농약으로 이용 가능성. 식물병연구. 9: 99~103.
6. 임용숙, 배만종, 이신호.. 2002. 소나무 에탄올 추출물의 Listeria Monocytogenes에 대한 항균효과. 한국식품영양과학회지. 31(2): 333~337.
7. Baricevic, D., L. Milevoj, and J. Borstnik. 2001. Insecticidal effect of oregano on bean weevil. International journal of Horticultural Science. 7: 84~88.
8. Benner, J. P. 1993. Pesticidal compounds from higher plants. Pesticidal Science. 39: 95~102.
9. Caccioni, D. R. L., Duccio R. L. caccioni, Monica Guizzardi, Daniela M. Biondi, Agatino Renda, and Giuseppe Ruberto. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. International Journal of Food Microbiology. 43: 73~79.
10. Chantraine, J. M., D. Laurent, C. Ballivian, G. Saavedra, R. Ibanez, and L. A. Vilaseca. 1998. Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. Phytotherapy Research. 12: 350~354.
11. Cimanga. K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne, N. Hermans, J. Totté, L. Pieters, and A. J. Vlietinck. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oil of aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology. 79(2): 213~220.
12. Dixshit, A., A. K. Singh, R. D. Triapthi, and S. N. Dixit. 1979. Fungitoxic and phytotoxic studies of some essential oils. Biol. Bull. India. 1: 45~51.
13. Erdtman, H. and J. Gripenberg. 1948. Antibiotic substances from the heart wood of Thuja plicata Don. Naturem. 161: 719.
14. Hassanzadeh. M. K., M. Rahimizadeh, B. S. P. Bazzaz, S. A. Emami, and J. Asilli. 2001. chemical and antimicrobial studies of *Platycladus orientalis* essential oils. Pharmaceut. Biol. 39: 388~390.
15. Kim, Y. S. and D. H. Shin. 2005. Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora*) extracts. Food Microbiology. 22: 37~45.
16. Kubicek, C. P. and G. E. Harman., eds. 1998. *Trichoderma & Gliocladium* vol. 1. p. 278.
17. Maggi, F., M. Bramuccib, C. Cecchinic, M. M. Comanc, A. Crescic, G. Cristallid, G. Lupidib, F. Papad, L. Quassintib, G. Sagratinid, and S. Vittori. 2009. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. Fitoterapia. *in press*.
18. Marcus, C. and P. Lichtenstein. 1979. Biologically active components of arinse: toxicity and interaction with insecticides in insects, J. Agric. Food Chem. 27: 1217~1223.

19. Mossi, A. J., R. L. Cansian, A. Z. Carvalho, C. Dariva, J. V. Oliveira, M. Mazutti, I. N. Filho, and S. Echeverrigaray. 2004. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO_2. Fitoterapia. 75: 168~178.
20. Na, K. J., H. Y. Kang, J. H. Oh, I. G. Choi, Y. W. Yun, and E. B. Jeung. 1998. The sedative effect of stress by essential oils purified from softwoods. Korean J. of Lab. Anim. Sci. 14: 93~96.
21. Neale, M. 2000. The regulation of natural products as crop-protection agent. Pest Management Science. 56: 677~680.
22. Pillmoor, J. B., K. Wright, and A. S. Terry. 1993 Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. Pesticidal Science. 39: 131~140.
23. Price. S., L. Price, and D. Penoel. 1995. Aromatherapy for health professionals. 133~167. 1as ed., Chrchill livingstone, New York.
24. Ranque, S., D. Garcia-Hermoso, A. Michel-Nguyen, and H. Dumon. 2008. Isolation of Trichoderma atroviride from a liver transplant. Journal de Mycologie Médicale. 18: 234~236.
25. Samuels G. J. and S. L. Dod. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus* *Mycologia*. 94(1): 146~170.
26. Talma Katan, Y. Elad, and H. Yunis. 1989. Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of Botrytis cinerea. Plant Pathology. 38(1): 86.
27. Wink, M. and T. Twardowski. 1992. Allelochemicals properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein bio-synthesis, In S. J. H. Rizvi and V. Rizvi(ed). Allelopathy, Chapman Hall. pp. 129~150.
28. Yang, J. K., M. S. Choi, W. T. Seo, D. L. Rinker, S. W. Han, and G. W. Cheong. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtusa* leaf essential oil. Fitoterapia. 78: 149~152.
29. Yun, K. W., B. S. Kil, and D. M. Han. 1993. phytotoxic and antimicrobial activity of volatile constituents of *Artemisia princeps* Var. orientalis. J. Chem. Ecol. 19: 2757~2766.