

# 피부사상균 균사의 형태학적 변화를 통한 일본잎갈나무 정유의 항진균 활성 효과 구명\*1

김 선 홍\*2 · 이 수 연\*2 · 홍 창 영\*2 · 장 수 경\*2 · 이 성 숙\*4 · 박 미 진\*4 · 최 인 규\*2,3†

## Evaluation on Anti-Dermatophyte Effect of *Larix (kaempferi)* Essential Oil on the Morphological Changes of Eermatophyte Fungal Hyphae\*1

Seon-Hong Kim\*2 · Su-Yeon Lee\*2 · Chang-Young Hong\*2 ·  
Soo-Kyeong Jang\*2 · Sung Suk Lee\*4 · Mi-Jin Park\*4 · In-Gyu Choi\*2,3†

### 요 약

본 연구는 피부사상균 *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*에 대한 일본잎갈나무 정유의 항진균 활성을 평가하고, 항진균 유효성분을 구명하고자 하였다. 또한 일본잎갈나무 정유에 노출된 피부사상균의 균사를 전자현미경으로 관찰하여 일본잎갈나무 정유의 항진균 효과를 균사의 형태학적 변화를 통하여 밝히고자 하였다. 일본잎갈나무 정유의 주성분은 (-)-bornyl acetate였으며, MIC는 모든 균에 대해 125 ppm을 나타냈다. 한천희석법을 통한 항진균 활성 평가에서는 모든 균에 대해 500 ppm 이상에서 100%의 활성, 100 ppm의 낮은 농도에서도 50% 이상의 활성을 나타냈다. SEM과 TEM을 통해 균사를 관찰한 결과, 일본잎갈나무 정유에 노출된 *E. floccosum*은 정상세포와 다른 균사 형태가 관찰되었다. 광이실 모양의 격막을 갖고 있는 곧고 매끈한 표면의 정상세포와는 달리, 처리구에서는 균사 표면에 주름이 있었으며 균사가 터지거나 접히고 부풀어 오른 것, 세포소기관과 세포벽이 붕괴된 것도 관찰되었다. 분획을 통해 일본잎갈나무 정유의 항진균 유효성분을 확인한 결과, (-)- $\tau$ -muurolol, (+)-terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -cadinol 등의 ter-pene alcohol 화합물이었다.

\*1 접수 2013년 2월 4일, 채택 2013년 5월 22일

\*2 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부. Department of Forest Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

\*3 서울대학교 농업생명과학연구원. Research Institute for Agriculture & Life Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

\*4 국립산림과학원 임산공학부 화학미생물과. Division of Wood Chemistry & Microbiology, Department of Forest Resources Utilization, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

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

## ABSTRACT

This study was to investigate the antifungal activity of *Larix kaempferi* essential oil against dermatophytes, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. The active components of *L. kaempferi* against dermatophytes were determined (characterized by GC-MS), and the morphological changes of the dermatophytes exposed to the *L. kaempferi* essential oil were observed by electron microscope. Main component of *L. kaempferi* essential oil was (-)-bornyl acetate. In antifungal activity tests, MIC of *L. kaempferi* crude oil was 125 ppm on every fungi and 100% (agar dilution method) at more than 500 ppm. By using SEM and TEM, the fungal morphology of *E. floccosum* exposed to the *L. kaempferi* essential oil was different from that of normal hyphal morphology. Hyphae exposed to the *L. kaempferi* essential oil was damaged with distorted and collapsed surfaces. In addition, there were destruction and disorganization of organelles in cytoplasm and collapse of cell membrane. Active antifungal components from *L. kaempferi* essential oil were identified as terpene alcohol compounds like (-)- $\tau$ -muurolol, (+)-terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, and  $\alpha$ -cadinol.

**Keywords:** *Larix kaempferi*, essential oil, antifungal activity, change of hyphal morphology, terpene alcohol

## 1. 서 론

지난 몇 년 동안, 면역력이 약해져 있는 환자들에게서 진균에 의한 감염율이 증가하고 있다(Pfaller *et al.*, 2006). 불완전 균류에 속하는 진균은 각종 동물의 피부진균증(dermatomycosis)의 원인으로서는 황백선, 운선 등 무좀의 원인균이며 면역력이 약해진 아토피피부염 환자의 2차 피부 감염의 원인이 된다. 진균 감염은 균주에 의해 생산되는 대사물질, 감염 균주의 독성, 감염 부위, 환경 요소에 의해 숙주 반응이 지속적으로 발생하여 일어난다. 인간의 진균 감염이 증가함에 따라 치료법에 대한 관심 또한 증가하고 있다. 그러나 현재 사용되고 있는 대다수의 항진균제의 경우 진균에 대한 저항성, 부작용, 독성, 오남용 등이 문제되고 있기 때문에, 부작용이 적고 질병 치료에 효과적인 자연 치료법을 강구하려는 노력이 높아지고 있다(Zuzarte *et al.*, 2011). 이러한 노력으로 천연 성분의 항진균 효과에 대한 관심이 높아지고 있으며, 그 중 생리활성이 뛰어난 수목 정유에 초점이 맞춰지고 있다.

정유는 식물 표피나 엽육 조직에서 분화된 세포 외

특정 공간에 저장되어 있는 저비점의 기름성 물질로 공기 중에 쉽게 휘산되며, 식물의 생명유지에 있어서 필수적인 2차 대사산물이다(Bakkali *et al.*, 2008). 정유는 식물생장과 발아를 효과적으로 억제하여 다른 식물의 생장을 방해함으로써 자신의 생장을 이롭게 하며, 곤충의 공격에 대한 식물의 저항성과도 밀접하게 연관되어 있다(Wallace, 2004). 이러한 정유의 역할이 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있으며, 특히 항박테리아, 항진균, 항충 효과가 뛰어나다고 보고되었다(Hammer *et al.*, 2001). 하지만 천연물 연구 중 수목 정유를 이용한 항진균 효과에 대한 연구는 많이 이뤄지지 않았으며, 특히 수목 정유의 특정 성분에 의한 효과의 검증과 형태학적 관찰을 통한 항진균 효과의 과학적 근거 제시에 대한 연구는 많이 부족한 실정이다.

본 연구에 사용된 일본잎갈나무(*Larix kaempferi*)는 소나무과의 낙엽침엽 교목으로 낙엽송이라고도 불리며, 일본 원산수종으로 1904년에 도입되어 중부 이남에 대량으로 식재되어 있는 주요 조림수종이다. 목재는 건축, 갯목, 침목, 펄프, 선박, 토공용재 등으로 쓰이고, 일본잎갈나무 정유는 발모, 치통, 통경 등 약

용으로 사용된다(사 등, 2005). 일본잎갈나무 추출물에 대한 국내 연구로는 주로 화학적 특성과 항산화 활성 평가가 주를 이루고 있다. 사 등(2005)에 따르면, 일본잎갈나무 낙엽의 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획과 수용성 분획에서 단리된 (+)-catechin과 (-)-epicatechin이 대표적인 항산화 성분인 BHT (butyl hydroxyl toluene)과  $\alpha$ -tocopherol 보다 높은 항산화 활성을 나타냈다고 보고하였다. 또한 윤 등(2000)에 따르면, 일본잎갈나무 심재부의 플라보노이드 성분이 BHT와  $\alpha$ -tocopherol 보다 높은 DPPH radical 소거능을 나타내어 항산화 활성이 우수하다고 보고하였다. 하지만 국내 연구 중 일본잎갈나무 정유의 생리활성에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 피부사상균 3종에 대한 일본잎갈나무 정유의 항진균 활성을 검정하고, 진균증 치료를 위한 일본잎갈나무 정유의 적용 가능성을 구명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료

공시재료로 사용된 일본잎갈나무 잎은 서울대학교 농업생명과학대학 태화산 학슬림에서 채취하였으며, 채취한 잎은 생체 상태로 -39℃에서 냉동 보관한 후 정유를 추출하여 진균 억제 평가를 실시하였다. 공시균주로는 국내 임상 논문을 중심으로, 진균증 발생 빈도가 높고 질환 유발에 영향력이 큰 3가지 균주를 선택하였다. 선택된 진균은 표재성 진균인 *Trichophyton* 속 2종(*Trichophyton mentagrophytes* (interdigitale) 11950 (*T. mentagrophytes*), *Trichophyton rubrum* 60443 (*T. rubrum*)과 표피균속 *Epidermophyton floccosum* 11667 (*E. floccosum*)으로 한국 미생물 보존센터(KCCM)에서 구입하였으며, 구입한 균은 28℃에서 Becton, Dickinson and Company로부터 구입한 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 배지에 10일간 배양하였다.

### 2.2. 정유의 추출

실험실 규모의 수증기 증류 장치에 500 g의 일본잎

갈나무 잎과 4 l의 증류수를 첨가하여 정유를 추출하였다. 온도를 점차 증가시켜 100℃에서 24시간 동안 휘발성분들을 응축액 형태로 포집하였다. 정유 층과 물 층으로 나누어져 있는 응축액에서 정유 층만 스포이드로 분리하여 4℃의 온도에서 냉장 보관하였다. 일본잎갈나무 정유의 수율은 0.28%였다.

### 2.3. 항진균 활성

#### 2.3.1. MIC (minimum inhibitory concentration) 측정

균의 생장을 저해시키는 최소 기질의 농도를 확인하기 위하여 단계희석법(serial dilution method)을 통해 MIC를 측정하였다. Microdilution plate (96 well) 각각의 well에 Sabouraud Dextrose Broth (SDB) 배지 100  $\mu$ l을 넣고 일본잎갈나무 정유 100  $\mu$ l (2000 ppm)를 넣은 후, 단계적으로 0.5배 희석되도록 이전 well에서 배지와 정유 혼합액 100  $\mu$ l씩 떠내어 다음 well에 넣었다. 초기 농도는 2,000 ppm이었다. 그 후 3종의 균주를 표준 탁도관(MacFarland 0.5, absorbance: 0.132)에 따른  $1 \times 10^6$  CFU/ml의 포자현탁액(24시간 이상 선배양된 균주)으로 만들어 각각의 well에 10  $\mu$ l를 넣었다. 준비된 microdilution plates (SPL life sciences, Tissue culture testplate)를 28℃에서 배양하였고 대조구의 포자 형성이 완료되면 육안 상으로 혼탁도를 관찰하여 MIC를 측정하였다.

#### 2.3.2. 한천희석법

한천희석법을 이용하여 in vitro 상에서의 균사 성장량을 측정하여 진균에 대한 일본잎갈나무 정유의 항진균활성 평가를 실시하였다. 기질을 멸균된 SDA 고체 배지에 100, 500, 1,000 ppm (0.1, 0.5, 1 mg/ml)으로 직접 첨가하여 50 mm petri-dish에 옮겼다. 이후 4 mm의 균사의 plug를 접종시킨 후 처리구와 무처리구인 대조구로 구분하여 포자 형성이 이루어질 때까지 28℃에서 배양하였다. 항진균활성은 대조구의 균사 생장이 50 mm petri-dish에서 완료된 후 다음의 식을 이용하여 성장환을 측정하여 계산하였다.

항균활성 평가(%)

$$= [(대조구의 균사 생장환 직경(mm) - 처리구의 균사 생장환 직경(mm)) / 대조구의 균사 생장환 직경(mm)] \times 100$$

### 2.3.3. 항진균 효과의 형태학적 검증

일본잎갈나무 정유의 항진균 효과를 형태학적으로 검증하기 위해 SEM (Scanning Electron Microscope) 과 TEM (Transmission Electron Microscope) 분석을 실시하였다.

한천희석법을 통해 일본잎갈나무정유에 노출시킨 균사를 준비하고 Karnovsky's 고정액으로 4℃에서 2 시간 동안 1차 고정을 한 후 0.05 M sodium cacodylate buffer으로 4℃에서 10분간 3회 반복 세척하였고, 다시 1% osmium tetroxide와 0.05 M sodium cacodylate buffer를 이용하여 4℃에서 2시간 동안 2차 고정 후 다시 증류수로 3회 세척하였다. 그 후 SEM 분석을 위해서는 30, 50, 70, 80, 90, 100%의 에탄올을 이용하여 탈수를 시키고 Critical Point Dryer를 이용하여 건조하고 백금 코팅 후 SEM 관찰을 실시하였다. TEM 분석을 위해서는 0.5% uranyl acetate를 이용하여 4℃에서 30분간 반응시켜 염색을 하고, 30, 50, 70, 80, 90, 100%의 ethanol을 이용하여 10분씩 탈수시킨 후 propylene oxide와 Spurr's resin을 이용하여 전이, 침투, 중합을 실시하여 박편 및 염색을 한 후 TEM 관찰을 실시하였다.

### 2.3.4. 분획물의 항진균 활성

수증기 증류법을 통해 얻은 일본잎갈나무 잎 정유의 활성물질을 탐색하고자 TLC를 통해 화합물들의 분리 양상을 확인한 후, 분획을 위해 open column chromatography를 실시하였다. 정유 성분들은 비교적 비극성이기 때문에 silica gel 60 (40~100 μm)을 고정상으로 하여 normal phase로 진행하였다. 지름이 8 cm 인 column을 사용하였으며 silica gel 450 g을 hexane에 섞어 column에 충전시킨 후 용매의 조건을 고려하여 24시간 동안 packing시켜 두었다. 5시간이 지난 후 packing된 silica의 약 3%에 해당하는 sample 15 g을 loading하였다. Eluent solvents는 hexane과 ethyl

acetate의 비율을 49:1, 30:1, 18:1, 9:1, 4:1, 1:1로 하여 총 12 l를 사용하였으며, 용매의 속도는 20 ml/min으로 하여 50 ml씩 분획하였다. 나누어진 분획물은 TLC 양상에 따라 1~8로 총8분획으로 나누었으며, 그 후 분획물의 항진균 활성을 확인하고자 한천희석법으로 실험을 실시하였다. 그 후 활성 성분을 확인하기 위해 GC/MS 분석을 실시하였다.

## 2.4. GC/MS (Gas chromatography/Mass spectrometry) 분석

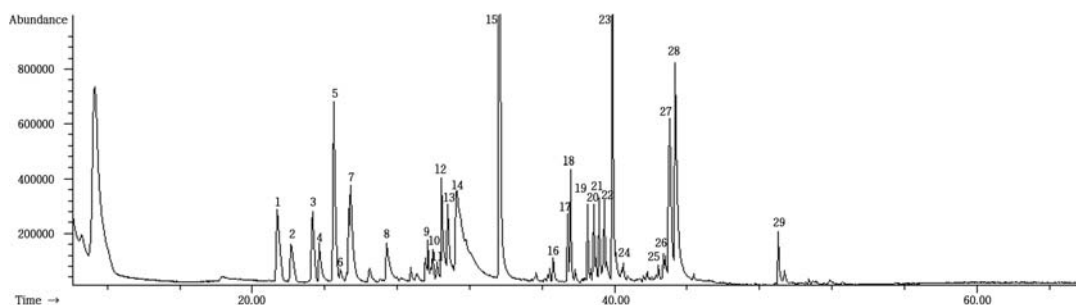
GC (model-Agilent 6890)분석을 위해 column은 HP5 (25 m × 0.32 mm × 0.52 μm)를 사용하였다. Carrier gas는 헬륨을 사용하였고, 온도 조건은 injector 260℃, detector 280℃, oven 온도는 초기온도 120℃에서 5분간 유지시킨 후 4℃/min씩 상승시켜 최종온도 280℃까지 올린 후 10분간 유지시켜서 분석하였다. MS는 model Agilent 5973을 사용하였고 EI mode로 분석하였다. 얻어진 시료 피크의 mass data와 표준 library data (Willy 7th ed)와 비교하여 피크의 화합물 구조를 동정하였다. 분석 시료는 crude oil과 분획물로 나누어 각각 ethyl acetate에 희석하여 분석하였으며 그 농도는 500 ppm이었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 일본잎갈나무 정유의 성분 분석

수증기 증류법을 통해 추출한 일본잎갈나무 정유의 성분은 Fig. 1과 같다. 일본잎갈나무 정유는 15종의 monoterpene과 13종의 sesquiterpene, 1종의 diterpene으로 이뤄져 있으며, 대표적인 주성분은 (-)-bornyl acetate로 밝혀졌다. 대부분의 소나무과 정유의 주성분은 α-pinene, β-pinene 등으로 알려져 있는데 반해 (Krauze-Baranowska *et al.*, 2002), 소나무과인 일본잎갈나무 정유의 주성분은 (-)-bornyl acetate으로 분석되었다. 특이한 점은 소나무과 정유의 주성분인 α-pinene과 β-pinene 성분이 일본잎갈나무 정유에서는 다른 소나무과 수종에 비해 함량이 적었고, 오히려

피부사상균 균사의 형태학적 변화를 통한 일본잎갈나무 정유의 항진균 활성 효과 구명



Number	Compound	Retention time	Relative proportion (%)
1	(-)- $\alpha$ -Pinene	21.381	2.72
2	(-)-Camphene	22.147	1.37
3	(-)- $\beta$ -Pinene	23.317	2.08
4	$\beta$ -Myrcene	23.686	1.12
5	(+)-3-Carene	24.495	4.27
6	(+)-D-Limonene	25.312	1.12
7	$\beta$ -Phellandrene	25.416	3.24
8	(+)-4-Carene	27.411	1.72
9	(-)-trans-Pinocarveol	29.544	0.42
10	(-)-Camphor	29.708	0.51
11	$\alpha$ -Pinocarvone	30.215	0.31
12	(-)-Borneol	30.465	2.00
13	(+)-terpinen-4-ol	30.783	2.18
14	(-)- $\alpha$ -Terpineol	31.316	9.04
15	(-)-Bornyl acetate	33.639	27.54
16	(-)- $\beta$ -Elemene	36.615	0.39
17	(+)-Longifolene	37.398	0.59
18	(-)- $\beta$ -Caryophyllene	37.561	1.38
19	$\alpha$ -Humulene	38.508	0.91
20	$\alpha$ -Cadinene	38.860	1.00
21	(+)-Germacrene D	39.144	1.14
22	$\alpha$ -Muurolene	39.437	1.31
23	$\delta$ -Cadinene	39.884	4.80
24	$\gamma$ -Muurolene	40.469	0.43
25	Cadina-1(2),4-diene	42.430	0.48
26	(+)-Viridiflorol	42.791	0.44
27	(-)- $\tau$ -Muurolol	43.050	4.97
28	$\alpha$ -Cadinol	43.342	6.85
29	(+)-Cembrene	49.037	0.74

Fig. 1. GC/MS spectrum of *L. kaempferi* essential oil and its chemical compositions.

$\delta$ -cadinene,  $\tau$ -muurolol,  $\alpha$ -cadinol의 함량이 높았다. 일본잎갈나무의 주성분인 (-)-bornyl acetate는 많은 수목 정유의 구성 성분으로 알려져 있으며(편백, 삼나무), 항미생물 활성을 가지고 있다는 연구가 보고되고 있다. Park 등 (2003)에 따르면 bornyl acetate는 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)에 대하여 높은 항충활성을 나타낸다고 보고된 바 있다.

### 3.2. 일본잎갈나무 정유의 항진균 활성

#### 3.2.1. 항진균 활성 평가

일본잎갈나무 정유의 MIC (minimum inhibitory concentration)는 *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*에 대해 모두 0.125 mg/ml (125 ppm)를 나타냈다. 삼나무 정유의 MIC는 *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*에 대해 각각 0.5, 0.0156, 0.0625 mg/ml이다(김 등, 2012). MIC 결과를 가지고 비교해보면, 일본잎갈나무 정유가 삼나무 정유보다 *E. floccosum*에 대해서는 더 낮은 농도에서, *Trichophyton* 속에 대해서는 더 높은 농도에서 항진균 활성을 가질 것으로 판단된다.

일본잎갈나무 정유의 한천희석법에 의한 항진균 활성 결과는 Fig. 2와 같다. 500 ppm과 1,000 ppm의 농도일 때 100%의 항진균 활성을 나타냈다. 이와 같은 결과는 앞서 시행된 MIC 농도의 결과와 유사하게 나타났다. 일본잎갈나무 정유의 MIC는 125 ppm으로서 두 결과를 종합한 결과 일본잎갈나무 정유는 125 ppm 이상의 농도에서 항진균 효과를 나타낼 것으로 판단되었다.

#### 3.2.2. 균사의 형태 변화

전자 현미경으로 관찰한 세 균주의 균사 형태는 거의 유사하기 때문에 세 균주 중 *E. floccosum*에 대해 균사 형태 변화를 관찰하였다. 일본잎갈나무 정유에 노출시킨 *E. floccosum*의 처리구와 무처리구의 SEM (Scanning Electron Microscope), TEM (Transmission Electron Microscope) 결과는 Figs. 3, 4와 같다. SEM 관찰 결과, *E. floccosum*의 무처리구 균사는 표면이 매끈하고 팽이실 모양을 띠고 있으며 격막이 있

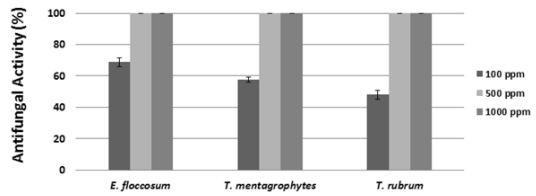


Fig. 2. Antifungal activity (%) of crude essential oil from *L. kaempferi* by agar dilution method against *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*.

는 온전한 세포 형태를 이루고 있었다. 하지만 처리구에서는 정상세포와는 달리 균사의 표면이 매끄럽지 못하며 주름이 확인되었고, 수축·팽윤된 모습이 관찰되었다. 또한 균사의 생장이 고르지 못하고 불규칙하여 균사들끼리 엉켜있거나 접혀있는 모습을 보였다. TEM 결과, 무처리구에서는 균사가 온전한 세포 형태를 이루고 있으며, 완전한 세포막과 격막이 관찰되었다. 또한 세포질 내에 다양한 소기관들이 존재하는 것이 관찰되었다. 하지만 처리구에서는 세포벽 외막이 존재하지 않고, 세포벽 내막이 불완전하고 밀도가 낮은 형태로 존재하는 것이 관찰되었다. 또한 세포 내의 액포에는 무처리구에서 보이지 않았던 물질들로 가득 차 있는 모습이었으며, 동시에 세포 내 소기관과 세포질을 관찰할 수 없었다. 액포에 들어있는 물질은 일본잎갈나무 정유라 사료된다. 동물 세포의 액포는 일반적으로 무기 이온과 다양한 유기화합물을 저장하는 기관으로 세포 내 소화를 돕고 세포 내 독성을 분해하는 역할을 한다(Matile, 1978). 따라서 *T. rubrum* 균사가 유기화합물인 일본잎갈나무 정유를 독성 물질이라 판단하여 저장하고 소화시키고자 흡수한 것으로 판단된다. 하지만 액포가 정유를 소화시키지 못해 독성을 가진 정유의 존재로 인하여 세포 소기관들이 기능을 잃고 파괴되거나 분해되어 정상 모습으로 관찰될 수 없었던 것으로 판단된다. 따라서 TEM 결과를 통해 일본잎갈나무 정유가 세포벽을 통해 배지와 함께 영양분으로 흡수되어 세포벽과 소기관을 분해 혹은 파괴시킴과 동시에 세포벽과 소기관의 형성을 저해시켜 균사의 성장을 방해하는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 이와 같은 SEM과 TEM 결과를 통해

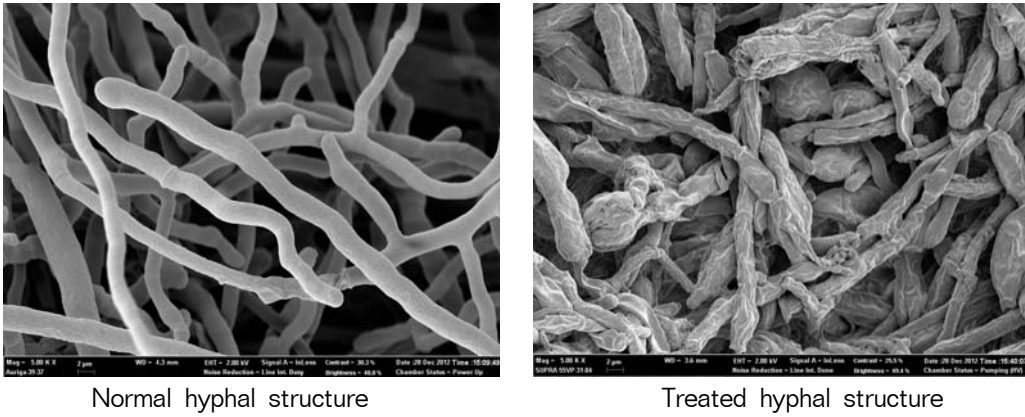


Fig. 3. Scanning electron micrographs of *E. floccosum* treated with *L. kaempferi* essential oil (500 ppm).

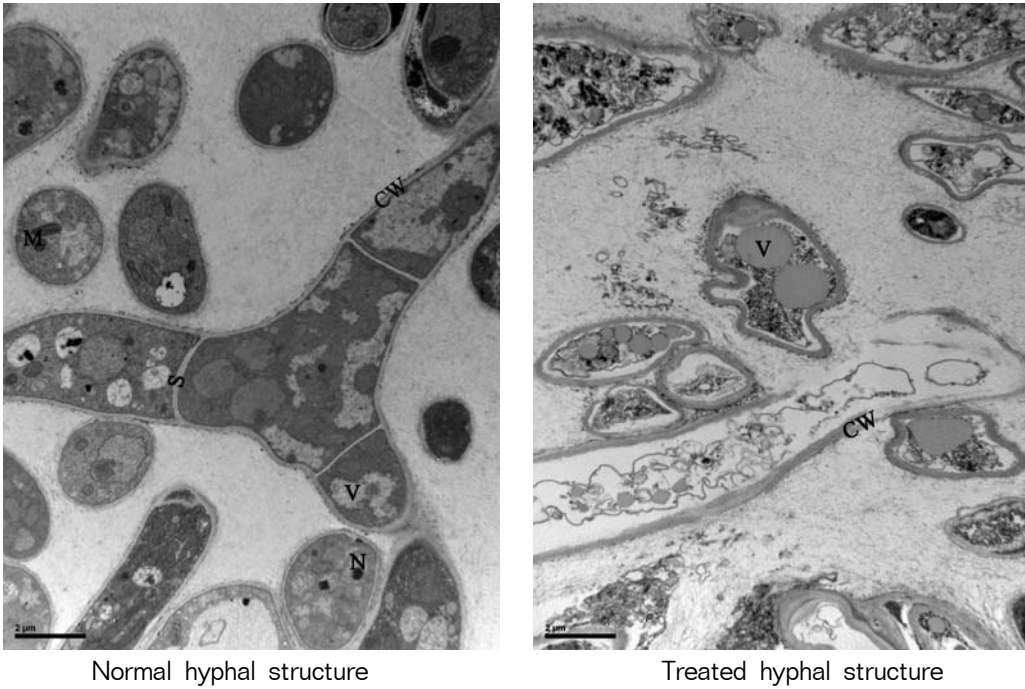


Fig. 4. Transmission electron micrographs of *E. floccosum* treated with *L. kaempferi* essential oil (500 ppm). CW: Cell Wall, N: Nucleus, S: Septum, M: Mitochondria, V: Vacuole.

일본잎갈나무의 높은 항진균 활성을 나타내는 이유는, 일본잎갈나무 정유가 균사에 손상을 입히고 세포 성장을 방해하기 때문이라 사료된다.

Park 등(2009)의 연구에서 citral, eugenol, nerolidol,  $\alpha$ -terpineol에 노출된 *Trichophyton menta-*

*rophytes*의 균사 변화를 SEM으로 관찰한 결과, 무치리구 균사에서는 균사 직경이 2  $\mu$ m인 매끈한 균사의 형태가 관찰됐으며 격막이 존재하고 branching을 하여 균사가 성장하는 것을 확인할 수 있었지만, citral, eugenol, nerolidol,  $\alpha$ -terpineol에 노출된 균사는

Table 1. The relative proportion and the retention time of major compounds from *L. kaempferi* fractions by GC/MS analysis

Fraction	Compound	Retention Time	Relative proportion (%)
1	(-)- $\alpha$ -Pinene	21.38	30.4
	(-)- $\beta$ -Pinene	23.32	19.4
	(+)-3-Carene	24.50	5.7
	(-)-Camphene	22.15	5.1
2	(+)-D-Limonene	25.31	12.5
	$\alpha$ -Muurolene	39.44	11.5
	$\beta$ -Phellandrene	25.39	5.8
3	(-)-Bornyl acetate	33.64	68.2
4	Cadina-1(2), 4-diene	42.70	55.01
5	(+)-Terpinen-4-ol	30.78	32.16
6	$\delta$ -Cadinene	39.88	64.80
7	(-)- $\tau$ -Muurolol	43.05	71.29
8	$\alpha$ -Cadinol	41.65	45.31
	(-)- $\alpha$ -Terpineol	31.32	27.08

균사가 control과 다르게 엉켜있고 세포벽에 주름이 생겼으며 정상적이지 않은 형태를 띠고 있었다. 또한 TEM 결과에서도 citral, eugenol, nerolidol,  $\alpha$ -terpineol에 노출된 균사는 세포벽이 붕괴되고 세포질 안의 세포 소기관이 파괴되고 해체되어 분열된 것이 확인되었으며 소기관 형성이 이루어지지 않거나 파괴된 것으로 사료된다고 보고한 바 있다. Terpene 화합물이 진균에 대해 균사 손상을 입히고 생장을 방해한다는 선행 연구 결과들을 바탕으로 terpene 화합물로 이루어진 수목 정유 또한 이와 같은 결과를 나타냈을 것이라 사료된다. 이러한 결과들을 바탕으로 일본잎갈나무 정유가 진균의 세포막 2중 구조의 지방족 부분에 들어가서 membrane을 파괴하고 양성자 동력을 소멸시켜 membrane 확장을 어렵게 하고, membrane 기능을 변화시켜(Sikkema *et al.*, 1994, 1995) 균사 생장을 억제하는 것으로 판단된다.

### 3.3. 항진균 활성 성분 탐색

#### 3.3.1. 분획 및 성분 분석

일본잎갈나무 정유의 항진균 유효성분을 확인하고

자 분획 및 성분분석을 실시하였다. TLC (Thin Layer Chromatography) 양상에 따라 1~8번 분획으로 나누었으며 분획물의 주성분은 구조 특성에 따라 분리 양상을 나타냈다(Table 1). 주성분으로는 분획 1과 2는 일본잎갈나무 정유의 monoterpene (hydrocarbon)류가 검출되었고, 분획 3은 일본잎갈나무 정유에 가장 많이 함유되어 있는 (-)-bornyl acetate가 주성분이었다. 분획 4와 6은 cadinene의 이성질체들이 주성분으로 각각 cadina-1(2),4-diene,  $\delta$ -cadinene으로 검정되었다. 분획 5, 7, 8의 주성분은 주로 alcohol류가 검출되었으며 각각 (+)-terpinen-4-ol, (-)- $\tau$ -muurolol,  $\alpha$ -cadinol과 (-)- $\alpha$ -terpineol으로 밝혀졌다.

#### 3.3.2. 항진균 활성 평가

일본잎갈나무 정유 분획의 항진균 활성을 한천희석법을 통해 평가한 결과는 Fig. 5와 같다. 그 결과, *T. rubrum*을 제외한 모든 균에 대해 6, 7, 8 분획물이 높은 항진균 활성을 나타냈다. 또한 분획 6, 7, 8의 MIC를 측정할 결과, *E. floccosum*에 대해 각각 31.25, 15.63, 7.86 ppm을 나타냈고, *T. mentagrophytes*에 대해 모두 15.63 ppm, *T. rubrum*에 대해 각각 31.25, 15.63,



피부사상균 균사의 형태학적 변화를 통한 일본잎갈나무 정유의 항진균 활성 효과 구명

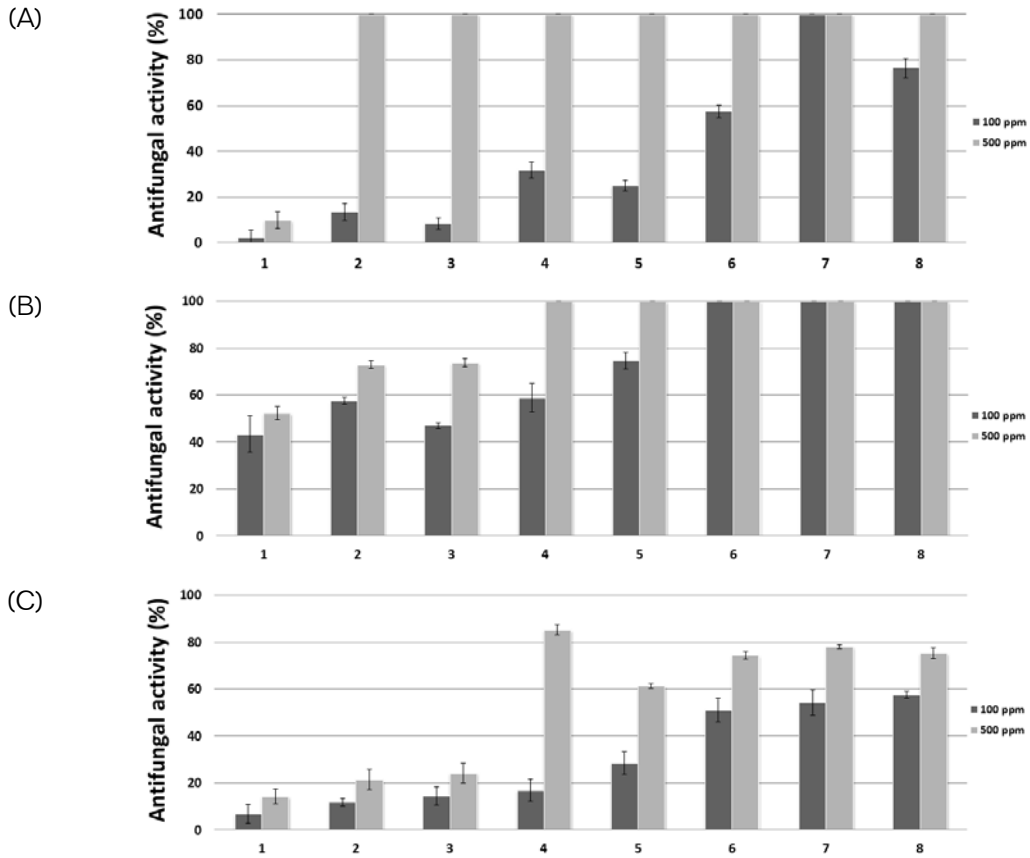


Fig. 5. Antifungal activity (%) of 8 fractions from *L. kaempferi* essential oil against *E. floccosum* (A), *T. mentagrophytes* (B) and *T. rubrum* (C) by agar dilution method.

Table 2. MIC (ppm) of fractions (6 to 8) from *L. kaempferi* essential oil against *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*

	<i>E. floccosum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
Fraction 6	31.25	15.63	31.25
Fraction 7	15.63	15.63	15.63
Fraction 8	7.86	15.63	15.63

15.63 ppm을 나타냈다(Table 2). 이는 일본잎갈나무 정유 원액보다 낮은 MIC로, 정유 원액보다 분획물이 높은 항진균 효과를 나타내었다. 종합적으로 볼 때, 한천희석법에서도 *T. rubrum*을 제외한 나머지 균에 대해 100 ppm의 농도에서도 100%의 항진균 활성을 나타낸 분획 7이 가장 항진균 활성이 높은 분획물이라

판단된다. 분획 7의 주성분은 (-)- $\tau$ -muurolool이기 때문에 일본잎갈나무 정유 성분 중 (-)- $\tau$ -muurolool이 진균에 대해 항진균 효과를 나타내는 유효성분이라 판단되었으며, 항진균 활성이 비교적 높았던 분획 8의 주성분인 (+)-terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -cadinol 또한 항진균 유효성분이라 판단된다. 본 연구에서 활성을

나타낸 성분들은 (-)- $\tau$ -muurolol, (+)-terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -cadinol 등으로 모두 terpene alcohol 화합물이다. Inoue 등(2004)에 따르면 terpene alcohol은 주로 aliphatic chain으로 이루어진 세포 membrane에 손상을 입혀 항균효과를 나타낸다고 보고된 바 있다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 일본잎갈나무 정유의 항진균 활성은 terpene alcohol 성분들이 세포막에 손상을 입혀 나타나는 것이라 판단된다. 하지만 일본잎갈나무 정유의 주성분인 (-)-bornyl acetate가 주성분으로 함유된 분획 3은 다른 분획물들에 비해 효과가 미미하여, 일본잎갈나무 정유 원액에 비해서도 낮은 활성을 나타냈다. 따라서 일본잎갈나무 정유의 높은 항진균 활성은 주성분인 (-)-bornyl acetate에 의한 효과가 아닌 함유 성분 중 terpene alcohol 화합물들의 항진균 효과에 따른 것이라 사료된다.

#### 4. 결 론

일본잎갈나무 정유는 피부진균증을 야기시키는 진균들, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*에 대해 높은 항진균 활성을 나타냈다. SEM과 TEM을 통해 균사의 형태 변화를 관찰한 결과, 일본잎갈나무 정유가 세포벽과 세포소기관에 손상을 입혀 생장을 저해시키는 것으로 나타났다. 또한, 일본잎갈나무 정유 분획물의 항진균 활성 평가와 항진균 유효성분을 확인한 결과, 일본잎갈나무 정유의 주성분인 (-)-bornyl acetate의 효과보다는 (-)- $\tau$ -muurolol, (+)-terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -cadinol 등의 terpene alcohol 화합물들이 항진균 효과를 나타낸 것으로 판단되었다.

결론적으로 본 연구에 사용된 일본잎갈나무 정유는 항진균제 관련 연구에 주요한 기초자료로 이용될 수 있다. 특히 정유 성분 중 terpene alcohol 화합물들의 항진균 효과가 뛰어난 것으로 밝혀졌으므로, 차후 terpene alcohol 화합물을 함유하는 항진균제의 개발 가능성이 있음을 제시하였다.

#### 사 사

본 연구는 산림과학원 산림정책연구부 산림복지연구과 '산림치유 기반구축을 위한 통합의학적 응용기

술 개발(과제번호: 0525-20120016)'의 위탁연구과제 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

#### 참 고 문 헌

1. 김선홍, 이수연, 홍창영, 정한섭, 박미진, 최인규. 2012. 삼나무 정유의 표재성 진균에 대한 항진균 활성. 목재공학 40(4): 276~286.
2. 사전령, 권동주, 김진규, 황병호, 배영수. 2005. 일본잎갈나무 낙엽의 추출성분 및 항산화활성. 산림과학연구 21: 24~33.
3. 윤순영, 이학주, 이성숙, 최돈하, 백기현. 2000. 수목추출물의 생리활성에 관한 연구 (5)-일본잎갈나무 심재부의 플라보노이드 성분 분리 및 항산화활성. 목재공학 28(3): 78~84.
4. Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idomar. 2008. Biological effects of essential oils - a review. Food and Chemical Toxicology 46(2): 446~475.
5. Hammer, K. A., CF Carson, and TV Riley. 2001.\*<sup>1</sup> Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86(6): 985~990.
6. Inoue, Y., A. Shiraiishi, T. Hada, K. Hirose, H. Hamashima, and J. Shimada. 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. FEMS Microbiology Letters 237(2): 325~331.
7. Krauze-Baranowska, M., M. Mardarowicz, M. Wiwart, L. Poblocka, and M. Dynowska. 2002. Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of Biosciences 57(5-6): 478~482.
8. Matile, Philippe. 1978. Biochemistry and function of vacuoles. Annual Review of Plant Physiology 29: 193~213.
9. Park, I. K., S. G. Lee, D. H. Choi, J. D. Park, and Y. J. Ahn. 2003. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* and *Sitophilus oryzae*. Journal of Stored Products Research 39(4): 375~384.
10. Park, M. J., K. S. Gwak, I. Yang, K. W. Kim, E. B. Jeung, J. W. Chang, and I. G. Choi. 2009. Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*.

- phytes. *Fitoterapia* 80(5): 290~296.
11. Pfaller, M. A., P. G. Pappas, and J. R. Wingard. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clinical Infectious Diseases* 43: S3~S14.
  12. Sikkema, J., JA De Bont, and B. Poolman. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8022~8028.
  13. Sikkema, J., JA De Bont, and B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews* 59: 201~222.
  14. Wallace, R. J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society* 63(4): 621~629.
  15. Zuzarte, M., M. J. Gonçalves, C. Cavaleiro, J. Canhoto, L. Vale-Silva, M. J. Silva, E. Pinto, and L. Salgueiro. 2011. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *Journal of medical microbiology* 60(5): 612~618.