Korean J. Plant Res. 31(4):330-341(2018)
https://doi.org/10.7732/kjpr.2018.31.4.330

Print ISSN 1226-3591
Online ISSN 2287-8203

Original Research Article

상록성 목본 64종의 추출조건에 따른 무좀원인균의 항균활성 스크리닝

장보국[1], 지래원[1], 조주성[2], 이철희[1]*

[1]충북대학교 축산·원예·식품공학부 생물건강소재산업화사업단, [2]㈜농우바이오 품질관리기술팀

Antimicrobial Activity Screening of Sixty-four Evergreen Woody Species According to Extraction Conditions against *Trichophyton mentagrophytes*

Bo Kook Jang[1], Lai Won Chi[1], Ju Sung Cho[2] and Cheol Hee Lee[1]*

[1]Brain Korea 21 Center for Bio-Resource Development, Division of Animal, Horticultural, and Food Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

[2]Quality Control & Seed Tech Team, Nongwoo Bio CO., LTD., Yeoju 12655, Korea

Abstract - This study was performed to investigate and measure the antimicrobial activity of evergreen woody species extracts on *Trichophyton mentagrophytes*. To do this, leaves and stems were collected from Wando and Jeju islands, and were used for the extraction with different solvents (i.e., distilled water, 80% ethanol, and 100% methanol), and at different ultrasonic extracting times (i.e., 15, 30, and 45 minutes). The experiment was conducted by using the agar diffusion method. The clear zone was measured after incubating the paper disc containing the plant extract in a bacterial culture medium. The controls were synthetic antimicrobials, methylparaben and phenoxyethanol, at concentrations of 0.4, 1, 2, and 4 mg/disc. Altogether, extracts of 56 out of 64 species used in this study had inhibitory activity, which confirmed their antimicrobial activity against Athlete's foot. Among them, the crude ethanolic extract of *Elaeocarpus sylvestris* in 45 min showed a zone of inhibition < 20.2 ㎜, while the clear zone of *Actinodaphne lancifolia* ethanolic extraction for 30 min was 23.5 ㎜. Also, *Quercus acuta*, *Dendropanax morbiferus* and *Daphne odora* showed clear zones of 28.0 ㎜ (45 minutes ethanolic extraction), 20.5 ㎜ (45 minutes crude methanolic extraction) and 19.7 ㎜ (45 minutes methanolic extraction), respectively. Thus, these results confirm that the extracts of evergreen woody species have therapeutic potential against Athlete's foot, and suggest that in order to extract adequate amounts of antimicrobial substance from the plant sources, ideal extraction condition has to be considered.

Key words - Athlete's foot, Methylparaben, Phenoxyethanol, Pruning product, Ultrasonic extraction

서 언

진균(fungi)인 피부사상균은 피부, 머리카락, 손톱 및 발톱의 각질층에 침습하여 피부진균 감염증을 유발하며(Kwon-Chung and Bennett, 1992), *Trichophyton mentagrophytes*는 표재성 진균증의 대표적인 원인균으로써(Summerbell, 2011), 두피, 피부 및 손발톱을 통해 감염되어 무좀을 유발한다(Shin and Lim, 2004). 무좀치료에는 항진균제가 사용되며 스테로이드, 면역억제제, 항생제 및 합성화학물질로 구성되어 치료에 적합하다. 그러나 강한 자극성이나 잔류독성 등 다양한 부작용을 동반하는 것으로 알려져 있으며(Cunha, 2001), 최근 항생제의 오남용으로 내성균의 발생도 증가하고 있어 내성균 치료제의 개발도 대두되고 있다(Shin and Lim, 2004; Lopes *et al.*, 2017).

이러한 문제의 대안으로 식물로부터 유래한 천연물질 소재의 탐색이 시도되어 왔으며, 망고, 월계수 및 양담쟁이 등 다양한 식물군에서 항진균의 효과가 조사되었다(Leven *et al.*,

*교신저자 : E-mail leech@chungbuk.ac.kr
Tel. +82-43-261-2526

ⓒ 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1979). 식물에 함유된 다양한 천연물과 생리활성물질은 합성 화학물질에 비해 부작용이나 잔류독성이 적은 편으로 이를 약용하고자 하는 연구가 현재까지도 활발히 진행되고 있다(Nychas, 1995; Iwu *et al.*, 1999; Chandra *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017).

국내에 자생하는 상록성 목본식물들은 다양한 페놀화합물과 플라보노이드 성분을 함유하고 있으며, 항산화와 항균 작용을 유도하는 것으로 알려져 개발가치가 높다(Kim and Han, 1997; Rim *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2011; Cha *et al.*, 2015). 이와 같은 상록 목본류는 지리적 환경에 적응하여 생장하기 때문에 원산지와 다른 기능성을 나타내며, 채취시기와 환경에 따른 효능도 달라지는 것으로 알려져 있다. 또한 재료 자체의 추출방법(Nostro *et al.*, 2000), 용매의 종류 및 농도에 따라서도 성분의 차이가 발생한다(Sultana *et al.*, 2009).

남부지방 상록수종은 1970년대 후반부터 정원, 공원, 도시녹지, 가로수, 조경 및 방풍림 등에 대규모로 식재하여 관상수 및 원예 · 조경수로 많이 이용해왔다(Lee and Kim, 2017). 그러나 최근 겨울철 전정으로 버려지는 부산물의 규모가 증가하고 있고, 부산물은 대부분 가지와 잎 부위이므로 이를 활용할 수 있는 방안이 요구되고 있다.

본 연구는 연중 수시로 채취가 가능하여 재료수급이 용이하고 일부 우수한 기능성이 보고된 바 있는 상록 목본식물들의 부위별 추출물을 소재로 무좀원인균(*Trichophyton mentagrophytes*) 피부질환치료를 목적으로 하는 천연의약소재를 개발하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

전라남도 완도 및 제주도 일대에 자생하는 64종 상록 목본식물의 잎과 가지를 2013년 1월에 채취하였다(Table 1). 채취한 재료는 동결건조기(Freeze dryer FD8512, Ilshin Bio Base, Korea)를 이용하여 48시간 동안 동결건조 하였다. 건조시료는 분쇄기(Hood mixer FM-681C, Hanil, Korea)로 곱게 분쇄한 후 −70±2℃의 deep freezer (MDF-U73V, Sanyo Electric Co., Ltd., Japan)에 저장하면서 실험에 사용하였다.

추출방법

추출은 ultrasonic cleaner (300×240×145 ㎜, 5510-DTH, Bransonic, USA)를 이용하여 초음파 추출하였다. 건조시료 1 g이 충분히 잠길 정도의 용매를 유리병에 넣어 혼합한 후 아크릴판에 부착하였으며, 초음파 수조 내부에 5 ℓ의 증류수를 넣어 하단으로부터 약 9 ㎝ 높이로 채운 후 30분 동안 추출하였다(20±2℃). 모든 추출은 1회 2반복으로 추출하였다. 추출이 끝난 후 바로 여과지(Advantec No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Japan)를 사용하여 vacuum pump로 감압여과 하였으며, 여과된 추출물은 용매를 보충하여 최종 농도를 50배로 정량하였다. 이후 추출물을 감압농축하여 DMSO로 녹여 농도를 50 ㎎·㎖$^{-1}$로 조절하였다. 추출물은 deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

공시균의 배양

추출물의 항균활성을 측정하기 위해 사용된 공시균은 피부에 무좀을 유발할 수 있는 *Trichophyton mentagrophytes* (KCTC 6316) 균으로 한국유전자 은행에서 분양 받았다. 무좀균 배양에 사용한 배지는 sabouraud agar (M11S2103YJ, MB Cell, Korea)였으며, 균의 활성을 유지하고자 3~5주 간격으로 계대배양 하였으며, 실험 2주 전, 3~5일 간격으로 10 ㎖ agar broth에 무좀균 배양액 100 ㎕를 활성화시켜 사용하였다.

한천 확산법(agar diffusion assay)

Shin and Lee (2010)의 agar diffusion assay을 응용하여 실험을 수행하였다. 실험 전 visible spectrophotometer (Novaspec™ Plus, Biochrom, England)를 이용하여 무좀균 배양액의 O.D. 값을 1.0으로 조정하였으며, 접종을 위해 0.7% agar가 첨가된 soft agar broth 배지를 멸균 후 항온수조에서 60℃로 유지하였다. 준비된 soft agar broth에 무좀균 배양액을 1% v/v 수준으로 첨가 후 교반하였으며, 멸균된 페트리디쉬에 12 ㎖씩 분주 후 무균작업대에서 굳혔다. 그 후 페이퍼디스크(8 ㎜, Advantec Toyo Roshi International Inc., Japan)에 추출물을 2 ㎎/disc (40 ㎕) 농도로 주입하였으며, 추출물 내 용매가 충분히 휘발되도록 건조하였다. 배지 내 추출물의 침투가 용이하도록 4℃ 냉장고에서 1시간 동안 배양한 후, 37℃의 생장상으로 옮겨 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 페이퍼디스크의 직경을 포함한 생육억제환을 측정하였으며, 추출물의 항균활성을 비교하기 위하여 합성항균제로 사용되는 phenoxyethanol (0H2108, Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)과 methylparaben (8K5015, Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)을 0.4, 1, 2, 4 ㎎/disc 농도로 희석하여 무좀원인균의 생육억제정도를 비교하였다.

Table 1. List of plants used in this study and antimicrobial activities of extracts obtained from leaves of 64 species against *Trichophyton mentagrophytes*

Family name	Scientific name		Clear zone (㎜)	Family name	Scientific name	Clear zone (㎜)
Control (mg/disc)[y]	Phenoxyethanol	0.2	-[x]	Gramineae	*Phyllostachys pubescens*	12.67 ± 0.23 f
		0.4	-		*Sasa palmata*	-
		2.0	13.57 ± 0.76 ef[w]	Hamamelidaceae	*Distylium racemosum*	12.60 ± 1.14 g
		4.0	14.17 ± 0.73 e	Illiciaceae	*Ilicium anisatum*	14.50 ± 0.46 e
	Methylparaben	0.2	-	Lardizabalaceae	*Stauntonia hexaphylla*	8.63 ± 4.32 h
		0.4	-	Lauraceae	*Actinodaphne lancifolia*	22.33 ± 0.62 a
		2.0	14.23 ± 0.32 e		*Cinnamomum loureirii*	14.67 ± 1.12 e
		4.0	21.40 ± 1.45 ab		*Cinnamomum yabunikkei*	11.37 ± 0.38 fg
Apocynaceae	*Nerium oleander*		-		*Cinnamomum camphora*	12.13 ± 0.88 f
	Trachelospermum asiaticum var.		-		*Laurus nobilis*	14.63 ± 0.38 e
	Trachelospermum asiaticum		-		*Litsea japonica*	11.70 ± 0.38 f
Aquifoliaceae	*Ilex cornuta*		11.43 ± 0.44 fg		*Machilus japonica*	18.27 ± 0.13 bc
	Ilex ×wandoensis		12.43 ± 0.75 f		*Machilus thunbergii*	11.00 ± 0.25 g
	Ilex crenata		12.03 ± 0.43 f		*Neolitsea aciculata*	13.87 ± 0.28 ef
	Ilex rotunda		-		*Neolitsea sericea*	17.13 ± 0.03 c
Araliaceae	*Dendropanax morbiferus*		22.60 ± 0.57 a	Loganiaceae	*Gardneria insularis*	-
	Fatsia japonica		15.80 ± 1.21 d	Magnoliaceae	*Magnolia grandiflora*	20.10 ± 0.49 b
	Hedera rhombea		12.77 ± 0.61 f	Moraceae	*Ficus oxyphylla*	11.47 ± 0.32 fg
Caprifoliaceae	*Viburnum odoratissimum*		15.37 ± 0.15 d	Myricaceae	*Myrica rubra*	14.10 ± 2.00 e
Cephalotaxaceae	*Cephalotaxus koreana*		-	Myrsinaceae	*Ardisia crenata*	10.00 ± 5.72 h
Cupressaceae	*Chamaecyparis obtusa*		17.73 ± 3.38 c	Oleaceae	*Ligustrum lucidum*	14.40 ± 0.76 e
	Juniperus rigida		15.77 ± 0.37 d		*Osmanthus fragrans*	-
Daphniphyllaceae	*Daphniphyllum macropodum*		10.63 ± 0.79 g		*Osmanthus fragrans* var.	9.50 ± 0.30 h
Elaeagnaceae	*Elaeagnus glabra*		10.10 ± 0.55 h	Pinaceae	*Pinus thunbergii*	13.77 ± 0.74 ef
	Elaeagnus umbellata		9.30 ± 0.26 h	Rosaceae	*Eriobotrya japonica*	13.93 ± 0.47 e
Elaeocarpaceae	*Elaeocarpus sylvestris*		20.20 ± 1.01 b		*Raphiolepis indica*	12.87 ± 0.29 f
Ericaceae	*Rhododendron brachycarpum*		13.47 ± 0.99 ef	Rutaceae	*Citrus junos*	-
	Vaccinium bracteatum		-	Schisandraceae	*Kadsura japonica*	10.33 ± 0.29 g
	Vaccinium oxycoccus		-	Taxaceae	*Torreya nucifera*	13.97 ± 0.24 e
Fagaceae	*Castanopsis sieboldii*		17.83 ± 1.19 c	Taxodiaceae	*Cryptomeria japonica*	16.47 ± 0.87 cd
	Quercus acuta		22.27 ± 0.49 a	Theaceae	*Camellia japonica*	12.27 ± 0.27 f
	Quercus gilva		15.13 ± 2.02 d		*Cleyera japonica*	19.27 ± 1.83 bc
	Quercus glauca		10.50 ± 0.40 g		*Eurya emarginata*	-
	Quercus myrsinifolia		11.33 ± 0.91 g		*Eurya japonica*	-
	Quercus salicina		10.50 ± 0.90 g		*Ternstroemia gymnanthera*	13.80 ± 0.65 ef
Flacourtiaceae	*Xylosma congesta.*		8.93 ± 4.47 h	Thymelaeaceae	*Daphne odora*	22.13 ± 1.05 a

[z]EN; Evergreen Needle-leaved, EB; Evergreen Broad-leaved, EC; Evergreen Climber.
[y]Positive control as a synthetic antiseptic.
[x]Not detected.
[w]Means ± S.E. (n=10) and separation. within columns by Duncan's multiple range test, $p<0.05$.

상록성 목본 64종의 항균활성 스크리닝

상록성 목본 64종의 항균활성 정도를 확인하고자, 상록성 목본 64종의 잎 동결건조 시료 1 g과 100% 메탄올(Merck, Germany)을 용매로 30분 동안 초음파 추출하였다. 64종의 잎 조추출물은 agar diffusion assay를 이용하여 2 ㎎/disc 농도로 항균활성을 조사하였다.

추출조건에 따른 항균활성 측정

잎 조추출물의 스크리닝에서 우수한 항균활성이 확인된 시료 5종을 선발하여 실험에 사용하였다(Table 2-6). 추출부위,

용매 및 시간에 따른 항균활성 정도를 구명하고자, 잎과 가지 부위를 시료, 증류수(Deionized water; nano pure grade), 80% 에탄올(Ethanol, Jin Chemical Parmaceut., Korea), 100% 메탄올을 용매로 각 15, 30 및 45분 동안 초음파 추출하였다. 스크리닝 실험과 동일하게 agar diffusion assay를 이용하여 2 ㎎/disc 농도로 항균활성을 조사하였다.

조사 및 통계분석

Agar diffusion assay를 이용한 스크리닝은 3반복 수행하였으며, 추출물의 농도 및 배양시간에 따른 추가실험은 6반복을 1회로 2회 반복하였다. 모든 결과값은 평균과 표준오차 범위를 구하고 SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., USA)의 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였으며, 추출조건의 요인간 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

항생제는 균을 포함하는 미생물의 생장을 억제하거나, 사멸하는 역할을 하며, 20세기 처음 발견된 이래로 전 인류의 건강과 의학에 혁신을 불러왔다. 그러나 무분별한 항생제의 오남용과 미생물이 항생물질에 적응하기위해 내성을 가지게 되면서 일부 균이나 미생물에는 효과가 나타내지 않아 문제가 발생되고 있다. 이와 같은 문제를 해결하기위한 대안으로 많은 연구자들은 식물의 천연물질에 관심을 가지게 되었으며, 지속적으로 연구가 진행되고 있다. 우리의 연구는 상록 목본식물로부터 유래된 추출물을 이용하여 균의 생장을 억제하거나, 사멸하는 작용을 하는 식물대상을 탐색하고 동일 분야의 기초자료로 제공하고자 한다.

이 연구에 사용된 64종의 잎 추출물 중 황칠나무 등 56종의 처리구에서 생육억제환이 형성되어 공시균으로 사용된 *T. mentagrophytes* (무좀원인균)에 대한 항균효과를 확인 할 수 있었다(Table 1). 그중 황칠나무(22.60 ㎜), 육박나무(22.33 ㎜), 붉가시나무(22.27 ㎜), 서향(22.13 ㎜) 등 4종의 잎 추출물은 대조구로 사용된 methylparaben(21.40 ㎜)보다 우수한 생육억제활성을 보였으며, 담팔수(20.20 ㎜) 등 15종의 잎 추출물의 경우, phenoxyethanol (14.17 ㎜)에 비해 높은 억제활성을 나타냈다. 상록성 목본식물은 종에 따라 무좀원인균의 생육억제정도가 달랐지만, 다수의 종에서 항균활성 여부를 확인 할 수 있었으며, 천연 항균제로써 이용가능성을 제시한 결과라고 생각되었다.

식물체에 존재하는 생리활성물질을 활용하기 위해서는 추출물의 형태로 사용하는 것이 효율적이다. 물, 에탄올, 메탄올은 식물체에서 유효성분을 추출하기위한 용매로 가장 많이 사용되며, 물은 수용성 생리활성물질인 페놀성 화합물을 용출 시킨다(Cha *et al.*, 2009). Cowan (1999)에 따르면, 식물로부터 추출된 물질 중 미생물에 대한 활성이 확인된 물질들은 방향족화합물 또는 유기화합물로 에탄올과 메탄올에 쉽게 용출된다. 또한 추출용매의 비율에 따라 미생물의 억제활성도 다르다고 알려져 있다. 차조기의 경우, 에탄올 비율(0, 30, 50, 70, 95%)에 따라 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* 균주의 억제활성이 달랐으며(Kim *et al.*, 2007), 80% 에탄올을 용매로 복분자, 가자육, 오배자 등 62종의 약용식물을 추출한 결과에서 다양한 미생물의 억제활성을 보고한바 있다(Lee *et al.*, 2002).

선행연구에서 무좀원인균의 억제활성이 우수하였던, 황칠나무(*Dendropanax morbiferus*), 육박나무(*Actinodaphne lancifolia*), 붉가시나무(*Quercus acuta*), 서향(*Daphne odora*), 담팔수(*Elaeocarpus sylvestris*) 5종을 선발하여, 부위(잎, 가지), 추출용매(100% 메탄올, 80% 에탄올, 증류수) 및 초음파 추출시간(15, 30, 45분)을 달리하여 추출조건의 영향을 조사하고자 하였다. 담팔수의 *T. mentagrophytes* 억제는 부위에 따라 항균활성이 달랐으며, 가지보다 잎부위에서 비교적 우수한 결과를 나타냈다(Table 2). 대조구로 사용된 phenoxyethanol (14.90 ㎜)과의 비교에서도 가지보다 잎 부위가 대조구와 유사한 효과를 나타내는 것으로 조사되었다. 그중, 에탄올을 용매로 45분 동안 초음파 추출했을 때, 생육억제환이 20.2 ㎜로 가장 많은 억제율을 나타냈으며, 높은 통계적 유의성을 보인 부위 조건을 제외한 용매, 시간별 조건에서는 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. 담팔수 잎추출물에는 PGG, geraniin, elaeocarpusin, ellagitannin 등의 물질들이 존재하며(Tanaka *et al.*, 1986), 항종양, 항염증, 항균, 항산화활성 및 혈관확장에 강력한 효과를 보인다(Piao *et al.*, 2009; Perera *et al.*, 2015). Lee *et al.* (2004)에 따르면, 담팔수 추출물은 유해 미생물 *Helicobacter pylori*를 억제하는 생육억제환(20.0 ㎜)을 형성하는 것으로 보고되었다. 연구에 사용된 *T. mentagrophytes*도 유사한 억제력을 나타냈으며, 담팔수 잎에 함유된 화합물들에 의한 시너지효과로 추정되었다. 각 물질 별 효과에 대해서는 추가적인 연구가 요구된다.

서향의 추출물도 가지보다 잎 추출물에서 높은 생육억제활성이 조사되었다. 메탄올(19.7 ㎜)과 에탄올(19.2 ㎜)을 45분간 추출한 조건이 가장 효과적이었다(Table 3). 가지 추출물의 경

Table 2. Antimicrobial activities of extracts obtained from leaves and stems of *Elaeocarpus sylvestris* var. ellipticus (Thunb.) H. Hara against *Trichophyton mentagrophytes* according to extraction methods

Part	Solvent	Extraction time (min.)	Clear zone (㎜)
Control (mg/disc)[z]	Methylparaben	0.4	-[y]
		1.0	-
		2.0	14.1 ± 0.24 c-e[x]
		4.0	21.1 ± 0.19 a
	Phenoxyethanol	0.4	-
		1.0	-
		2.0	14.3 ± 0.53 c-e
		4.0	14.9 ± 0.55 c-e
Leaf	MeOH 100%	15	15.9 ± 0.77 b-d
		30	15.4 ± 0.13 c-e
		45	15.6 ± 0.67 b-d
	EtOH 80%	15	18.5 ± 0.50 a-c
		30	17.3 ± 0.40 a-d
		45	20.2 ± 0.10 ab
	Distilled water	15	-
		30	-
		45	-
Stem	MeOH 100%	15	14.2 ± 0.12 c-e
		30	13.0 ± 0.38 de
		45	10.7 ± 2.00 e
	EtOH 80%	15	14.7 ± 0.47 c-e
		30	12.6 ± 0.28 de
		45	13.0 ± 0.65 de
	Distilled water	15	-
		30	-
		45	-
P (Part)			***[w]
S (Solvent)			NS
T (Time)			NS
P × S			NS
P × T			NS
T × S			NS
P × T × S			NS

[z]Positive control as a synthetic antiseptic.
[y]Not detected.
[x]Means ± S.E. (n=10) and separation. within columns by Duncan's multiple range test, $p<0.05$.
[w]NS, *, **, ***; nonsignificant or significant at $p<0.05$, 0.01 or 0.001, respectively.

Table 3. Antimicrobial activities of extracts obtained from leaves and stems of *Daphne odora* Thunb. against *Trichophyton mentagrophytes* according to extraction methods

Part	Solvent	Extraction time (min.)	Clear zone (㎜)
Control (mg/disc)[z]	Methylparaben	0.4	-[y]
		1.0	-
		2.0	14.1 ± 0.24 cd[x]
		4.0	21.1 ± 0.19 a
	Phenoxyethanol	0.4	-
		1.0	-
		2.0	14.3 ± 0.53 cd
		4.0	14.9 ± 0.55 cd
Leaf	MeOH 100%	15	12.5 ± 0.17 d
		30	12.2 ± 0.99 d
		45	19.7 ± 0.75 ab
	EtOH 80%	15	16.7 ± 0.60 bc
		30	15.0 ± 0.58 cd
		45	19.2 ± 0.23 ab
	Distilled water	15	-
		30	-
		45	-
Stem	MeOH 100%	15	13.3 ± 0.95 cd
		30	12.2 ± 0.50 d
		45	16.2 ± 0.45 b-d
	EtOH 80%	15	14.0 ± 0.85 cd
		30	15.0 ± 0.35 cd
		45	14.9 ± 0.55 cd
	Distilled water	15	-
		30	-
		45	-
P (Part)			NS[w]
S (Solvent)			NS
T (Time)			*
P × S			NS
P × T			NS
T × S			NS
P × T × S			NS

[z]Positive control as a synthetic antiseptic.
[y]Not detected.
[x]Means ± S.E. (n=10) and separation. within columns by Duncan's multiple range test, $p<0.05$.
[w]NS, *, **, ***; nonsignificant or significant at $p<0.05$, 0.01 or 0.001, respectively.

Table 4. Antimicrobial activities of extracts obtained from leaves and stems of *Actinodaphne lancifolia* (Sibold & Zucc.) Meisn. against *Trichophyton mentagrophytes* according to extraction methods

Part	Solvent	Extraction time (min.)	Clear zone (㎜)
Control (mg/disc)[z]	Methylparaben	0.4	-[y]
		1.0	-
		2.0	14.1 ± 0.24 cd[x]
		4.0	21.1 ± 0.19 b
	Phenoxyethanol	0.4	-
		1.0	-
		2.0	14.3 ± 0.53 cd
		4.0	14.9 ± 0.55 c
Leaf	MeOH 100%	15	20.0 ± 0.29 b
		30	21.9 ± 0.01 ab
		45	20.8 ± 0.72 b
	EtOH 80%	15	12.2 ± 0.23 d
		30	23.5 ± 1.99 a
		45	22.2 ± 0.72 ab
	Distilled water	15	-
		30	-
		45	-
Stem	MeOH 100%	15	13.3 ± 0.03 cd
		30	14.0 ± 0.06 cd
		45	12.2 ± 0.29 d
	EtOH 80%	15	14.0 ± 0.62 cd
		30	15.0 ± 1.28 c
		45	15.0 ± 0.31 c
	Distilled water	15	-
		30	-
		45	-
P (Part)			***[w]
S (Solvent)			NS
T (Time)			***
P × S			**
P × T			***
T × S			***
P × T × S			**

[z]Positive control as a synthetic antiseptic.
[y]Not detected.
[x]Means ± S.E. (n=10) and separation. within columns by Duncan's multiple range test, $p<0.05$.
[w]NS, *, **, ***; nonsignificant or significant at $p<0.05$, 0.01 or 0.001, respectively.

Table 5. Antimicrobial activities of extracts obtained from leaves and stems of *Quercus acuta* Thunb. against *Trichophyton mentagrophytes* according to extraction methods

Part	Solvent	Extraction time (min.)	Clear zone (㎜)
Control (mg/disc)[z]	Methylparaben	0.4	-[y]
		1.0	-
		2.0	14.1 ± 0.24 fg[x]
		4.0	21.1 ± 0.19 bc
	Phenoxyethanol	0.4	-
		1.0	-
		2.0	14.3 ± 0.53 fg
		4.0	14.9 ± 0.55 fg
Leaf	MeOH 100%	15	18.5 ± 0.32 c-f
		30	23.7 ± 0.27 ab
		45	20.5 ± 0.10 b-d
	EtOH 80%	15	20.5 ± 0.63 b-e
		30	26.2 ± 0.83 a
		45	28.0 ± 0.87 a
	Distilled water	15	17.4 ± 0.90 c-g
		30	26.0 ± 0.27 a
		45	21.4 ± 0.10 bc
Stem	MeOH 100%	15	14.5 ± 0.33 fg
		30	16.2 ± 0.50 d-g
		45	14.0 ± 0.50 fg
	EtOH 80%	15	15.6 ± 0.79 fg
		30	14.9 ± 0.90 fg
		45	15.0 ± 0.40 fg
	Distilled water	15	13.6 ± 0.43 g
		30	17.2 ± 0.38 c-g
		45	15.9 ± 0.32 e-g
P (Part)			***[w]
S (Solvent)			NS
T (Time)			***
P × S			NS
P × T			NS
T × S			NS
P × T × S			NS

[z]Positive control as a synthetic antiseptic.
[y]Not detected.
[x]Means ± S.E. (n=10) and separation. within columns by Duncan's multiple range test, $p<0.05$.
[w]NS, *, **, ***; nonsignificant or significant at $p<0.05$, 0.01 or 0.001, respectively.

Table 6. Antimicrobial activities of extracts obtained from leaves and stems of *Dendropanax morbiferus* H.Lév. against *Trichophyton mentagrophytes* according to extraction methods

Part	Solvent	Extraction time (min.)	Clear zone (㎜)
Control (mg/disc)[z]	Methylparaben	0.4	-[y]
		1.0	-
		2.0	14.1 ± 0.24 f-h[x]
		4.0	21.1 ± 0.19 a
	Phenoxyethanol	0.4	-
		1.0	-
		2.0	14.3 ± 0.53 cd
		4.0	14.9 ± 0.55 c
Leaf	MeOH 100%	15	18.2 ± 0.00 a-f
		30	16.2 ± 0.00 c-h
		45	20.5 ± 0.00 ab
	EtOH 80%	15	15.0 ± 0.00 f-h
		30	14.9 ± 0.00 f-h
		45	19.7 ± 0.00 a-d
	Distilled water	15	15.9 ± 0.00 d-g
		30	17.2 ± 0.00 a-g
		45	19.3 ± 0.00 a-e
Stem	MeOH 100%	15	14.0 ± 0.00 gh
		30	15.6 ± 0.00 e-h
		45	12.5 ± 0.00 h
	EtOH 80%	15	15.0 ± 0.00 f-h
		30	20.2 ± 0.00 a-c
		45	16.7 ± 0.00 b-g
	Distilled water	15	15.9 ± 0.00 d-h
		30	16.4 ± 0.00 c-h
		45	20.1 ± 0.00 a-c
P (Part)			NS[w]
S (Solvent)			NS
T (Time)			**
P × S			**
P × T			*
T × S			NS
P × T × S			NS

[z]Positive control as a synthetic antiseptic.
[y]Not detected.
[x]Means ± S.E. (n=10) and separation. within columns by Duncan's multiple range test, $p<0.05$.
[w]NS, *, **, ***; nonsignificant or significant at $p<0.05$, 0.01 or 0.001, respectively.

우, 메탄올 45분 추출조건(16.2 ㎜)에서 비교적 우수하였다.

육박나무의 무좀원인균 억제활성은 부위와 시간에 따라 항균력이 달랐으며, 특히 부위별 처리조건에서 뚜렷한 차이를 확인할 수 있었다. 잎 시료를 메탄올(21.9 ㎜)과 에탄올(23.5 ㎜)로 30분간 추출하였을 때, 가장 높은 생육억제환이 형성되었다(Table 4). 가지는 잎보다 활성이 저조하였지만, 에탄올을 용매로 30분이상 추출 시 대조구로 사용된 phenoxyethanol과 유사한 억제력을 나타냈다. 한편 담팔수, 서향 및 육박나무는 증류수를 용매로 추출하였을 때, 시간과 부위에 관계없이 생육억제환이 형성되지 않아 항균활성을 확인할 수 없었다. 식물의 추출물은 종별로도 성분의 차이가 크지만, 추출용매 및 방법에 따라 용출되는 성분이 달라지고 용출된 물질도 다양하다고 알려져 있다(Wang and Weller, 2006; Dai and Mumper, 2010). 최근 보고에 따르면, 수용성 용매보다 유기용매(alcoholic, chloroformic acid and hexane)를 포함한 추출물이 더 강력한 피부사상균 억제활성을 나타냈다(Soares *et al.*, 2013; Iqbal *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2017). 이는 무좀원인균에 대한 항균활성을 가진 물질이 담팔수, 서향 및 육박나무 내에서 비극성으로 존재한다고 추정할 수 있었다.

붉가시나무는 부위, 용매 및 추출시간에 관계없이 모든 처리구에서 무좀원인균에 대한 생육억제활성을 확인할 수 있었으며, 대조구인 phenoxyethanol과의 비교에서도 높은 활성을 나타냈다(Table 5). 잎 추출물 중 메탄올 30분(23.70 ㎜), 에탄올 30, 45분(26.2, 28,00 ㎜) 및 증류수 30분(26.00 ㎜) 처리는 다른 대조구인 methylparaben (21.10 ㎜)보다 높은 생육억제환이 조사되었다. 또한 추출시간에 따라 생육억제활성이 상이하였는데, 15분과 30분 추출조건에서의 차이가 가장 컸다. 통계적으로도 부위와 시간별 처리조건이 뚜렷한 영향을 미치는 것으로 조사되었다. 그러나 45분 추출조건에서는 감소하거나 비슷한 수준으로 유지되어 추출효율이 극대화되는 시점이 존재함을 추정할 수 있었다. 참나무과에 속하는 붉가시나무는 강력한 항산화 및 항염증 활성을 보이는 페놀화합물을 가지고 있으며(Oh *et al.*, 2014), *Bacillus brevis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *Escherichia coli* B, *Pseudomonas aeruginosa* 등의 미생물에 대한 억제활성도 조사되었다(Serti *et al.*, 1991). 또한 동일속에 *Quercus acutissima* Carruth., *Q. salicina* Blume, *Q. serrata* Roxb.는 항알러지에 효과를 나타내며(Bak *et al.*, 2011), 붉가시나무의 추출물은 미생물억제에 영향을 미치는 물질이 다수 함유되어 있는 것으로 추정된다.

황칠나무 시료는 부위, 용매 및 시간별 처리조건에 관계없이 모두 무좀원인균에 대한 생육억제환이 형성되어 항균력이 우수한 종으로 조사되었다. 부위 및 용매별 항균력의 차이는 없었지만, 추출시간에 따른 차이는 존재하는 것으로 확인되었다. 잎 시료를 세가지 용매로 45분간 초음파 추출하였을 때, 각각 메탄올(20.50 ㎜), 에탄올(19.70 ㎜), 증류수(19.30 ㎜)로 가장 높은 생육억제환이 조사되었으며, 가지의 경우, 에탄올 30분(20.20 ㎜)과 증류수 45분(20.10 ㎜) 추출조건에서 항균력이 우수하였다(Table 6). 대조구인 phenoxyethanol (14.90 ㎜)보다 높은 항균효과를 나타냈으며, 또 다른 대조구인 methylparaben (21.10 ㎜)과도 유사한 억제력을 보이는 것으로 조사되었다. 황칠나무는 다양한 페놀 및 플라보노이드 화합물들이 함유되어 있으며, 항암, 항산화, 미백, 당뇨 및 간세포재생에 효과를 보인다(Park and Han 2016). Lee *et al.* (2015a)에 따르면, 황칠나무 잎의 에탄올 추출물은 식중독, 비듬, 충치 원인균의 증식을 억제하는 것으로 조사되었으며, n-hexane 분획물에서 분리한 1-tetradecanol과 B-sitosterol은 피부개선 및 탈모방지에 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Lee *et al.*, 2015b). 황칠나무도 무좀원인균에 억제효과를 보이는 다양한 화합물이 존재하는 것으로 생각된다.

이러한 결과로 미루어 볼 때, 상록 목본식물의 잎과 가지를 메탄올, 에탄올 및 증류수로 초음파 추출한 조추출물은 *T. mentagrophytes*에 대한 억제활성을 가지는 것으로 조사되었다. 특히 담팔수, 서향, 육박나무, 붉가시나무 및 황칠나무는 가장 높은 항균활성을 나타내어 피부질환개선 및 치료제로의 개발 가능성을 제시하였다. 차후 실제 치료제 개발을 위해서는 무좀원인균을 억제하는 물질의 분리 및 동정이 필요할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 무좀균(*Trichophyton mentagrophytes*)에 대한 상록성 목본 추출물의 항균활성을 조사하고 측정하기 위해 수행되었다. 이를 위해 완도와 제주도에서 채집한 잎과 줄기를 용매(증류수, 80% 에탄올, 100% 메탄올)와 초음파 처리시간(15, 30, 45분)을 달리하여 추출하여 실험에 사용하였다. 실험은 한천확산법을 사용하여, 박테리아 배지에 식물 추출물이 함유된 종이디스크를 배양한 뒤 클리어존(생육억제환)을 측정하였다. 대조군은 합성항균제인 methylparaben과 phenoxyethanol 0.4, 1, 2, 4 mg/disc에 농도로 사용하였다. 연구에 사용된 64종 중 56종의 추출물에서 클리어존이 보여, 무좀균에 대한 항균작용을

확인할 수 있었다. 그 중 담팔수는 에탄올에 45분간 추출한 처리구에서 20.2 ㎜, 육박나무는 80% 에탄올로 30분간 추출한 처리구에서 23.5 ㎜의 클리어존을 나타냈다. 또한 붉가시나무, 황칠나무 및 서향의 잎 추출물은 각각 28.0 ㎜ (80% 에탄올 45분 추출), 20.5 ㎜ (100% 메탄올 45분 추출) 및 19.7 ㎜ (100% 메탄올 45분 추출)의 클리어존이 조사되었다. 따라서, 이러한 결과는 상록성 목본 추출물의 무좀균에 대한 치료 가능성을 확인할 수 있었으며, 항균물질이 많이 함유한 식물소재를 얻기 위해서는 식물의 적정 추출조건을 고려해야 할 것으로 생각된다.

References

Bak, J.P., J.B. Kim, J.H. Park, Y.J. Yang, I.S. Kim, E.S. Choung and S.C. Kang. 2011. Screening and compound isolation from natural plants for anti-allergic activity. Appl. Biol. Chem. 54:367-375.

Cha, J.D., M.R. Choi, E.S. Ko, S.M. Hwang, J.R. Kang, J.S. Oh, Y.J. Park, Y.H. Jung, A.L. Jeon and K.M. Choi. 2015. Synergistic effects of *Cinnamomum camphora* leaves extract against clinical isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Korean J. Plant Res. 28:9-15 (in Korean).

Cha, W.S., I.S. Ju, D.H. Yun, S.S. Chun, J.H. Kim and Y.J. Cho. 2009. Biological activity of extracts from cherry sage (*Salvia officinalis* L.). Korean J. Life Sci. 19:390-396 (in Korean).

Chandra, H., P. Bishnoi, A. Yadav, B. Patni, A.P. Mishra and A.R. Nautiyal. 2017. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials-A review. Plants 6:16.

Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12:564-582.

Cunha, B.A. 2001. Antibiotic side effects. Medical Clinics 85:149-185.

Dai, J. and R.J. Mumper. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15:7313-7352.

Iqbal, J., R.P. Mishra and A.H. Allie. 2015. Antidermatophytic activity of angiospermic plants: A review. Asian J. Pharm. Clin. Res. 8:75-80.

Iwu, M.W., A.R. Duncan and C.O. Okunji. 1999. New antimicrobials of plant origin: *In* Janick, J (ed.), Perspectives on New Crops and New Uses, ASHS Press, Alexandria, VA (USA). pp. 457-462.

Kim, M.H., N.H. Lee, M.H. Lee, D.J. Kwon and U.K. Choi. 2007. Antimicrobial activity of aqueous ethanol extracts of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf. Korean J. Food Culture. 22:266-273 (in Korean).

Kim, S.I. and Y.S. Han. 1997. Isolation and identification of antimicrobial compound from Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). Korean J. Soc. Food. Sci. 13:56-63 (in Korean).

Kim, S.M., J.H. Park, H.O. Boo, S.G. Song and H.Y. Park. 2017. *In vitro* comparision of biological activities of solvent fraction extracts from *Orostachys japonicus*. Korean J. Plant Res. 30:133-143 (in Korean).

Kwon-Chung, K.J. and J.E. Bennett. 1992. Medical Mycology. Lea and Febiger. Philadelphia, Pennsylvania (USA). pp. 866-866.

Lee, H.K., H.B. Lee, C.S. Kim and Y.J. Ahn. 2004. Anti-Helicobacter pylori activity of methanol extracts from Korean native plant species in Jeju island. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47:91-96.

Lee, K.W. and D.G. Kim. 2017. Freezing injury of evergreen broad-leaved trees in warm-temperature in the southern region in Korea. J. Korean Env. Res. Tech. 20:77-96 (in Korean).

Lee, S.G., S.H. Lee and E.J. Park. 2015a. Antimicrobial and antioxidant activities of ethanol leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev. Korean J. Food Cook. Sci. 31:515-523 (in Korean).

Lee, S.Y., E.J. Choi, D.H. Bae, D.W. Lee and S.O. Kim. 2015b. Effects of 1-tetradecanol and β-sitosterol isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. on skin whitening, moisturizing and preventing hair loss. J. Soc. Cosmet. Sci. Korea 41: 73-83 (in Korean).

Lee, Y.C., S.W. Oh and H.D. Hong. 2002. Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 34:700-709 (in Korean).

Leven, M., D.A.V. Berghe, F. Mertens, A. Vlietinck and E. Lammens. 1979. Screening of higher plants for biological activities I. antimicrobial activity. Planta Medica 36:311-321.

Lopes, G., E. Pinto and L. Salgueiro. 2017. Natural products: an alternative to conventional therapy for dermatophytosis? Mycopathologia 182:143-167.

Nostro, A., M.P. Germanò, V. D´Angelo, A. Marino and M.A. Cannatelli. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett. Appl. Microbiol. 30:379-384.

Nychas, G.J.E. 1995. Natural antimicrobials from plants: *In* Gould, G.W. (ed.), New Methods of Food Preservation, Springer, Boston, MA (USA). pp. 58-89.

Oh, M.H., K.H. Park, M.H. Kim, H.H. Kim, S.R. Kim, K.J. Park, J.H. Heo and M.W. Lee. 2014. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of phenolic compounds from the stems of *Quercus acuta* Thunberg. Asian J. Chem. 26:4582-4586.

Park, Y.M. and J.S. Han. 2016. A study on the utilization of *Dendropanax morbifera* Lev. leaf extract for material of functional cosmetics and hair growth products. Asian J. Beauty Cosmetol. 14:277-288 (in Korean).

Perera, A., S.H. Ton and U.D. Palanisamy. 2015. Perspectives on geraniin, a multifunctional natural bioactive compound. Trends in Food Sci. Technol. 44:243-257.

Piao, M.J., K.A. Kang, R. Zhang, D.O. Ko, Z.H. Wang, K.H. Lee, W.Y. Chang, S.W. Chae, Y.H. Jee, T.K. Shin, J.W. Park, N.H. Lee and J.W. Hyun. 2009. Antioxidant properties of 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl-β-d-glucose from *Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*. Food Chem. 115:412-418.

Rim, Y.S., Y.M. Park, K.Y. Kim, M.J. Kim and Y.H. Choi. 2000. Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants. Korean J. Med. Crop Sci. 8:342-350 (in Korean).

Serit, M., T. Okubo, R.H. Su, N. Hagiwara, M.J. Kim, T. Iwagawa and T. Yamamoto. 1991. Antibacterial compounds from oak, *Quercus acuta* Thunb. Agric. Biol. Chem. 55:19-23.

Shin, S.L. and C.H. Lee. 2010. Antimicrobial activities of methanol extracts obtained from several ferns. Korean J. Plant Res. 23:436-444 (in Korean).

Shin, S. and S. Lim. 2004. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton spp*. J. Appl. Microbiol. 97:1289-1296.

Soares, L.A., J.D.C.O. Sardi, F.P. Gullo, N.D.S. Pitangui, L. Scorzoni, F.S. Leite, M.J.S.M. Giannini and A.M.F. Almeida. 2013. Anti dermatophytic therapy: prospects for the discovery of new drugs from natural products. Braz. J. Microbiol. 44:1035-1041.

Summerbell, R.C. 2011. *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, and agents of superficial mycoses: *In* Versalovic, J., K.C. Carroll, G. Funke, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and D.W. Warnock (10th ed.), Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, Washington, DC (USA). pp. 1919-1942.

Sultana, B., F. Anwar and M. Ashraf. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules 14:2167-2180.

Tanaka, T., G.I. Nonaka and I. Nishioka. 1986. Tannins and related compounds. part 37. isolation and structure elucidation of elaeocarpusin, a novel ellagitannin from *Elaeocarpus sylvestris* var. *Ellipticus*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:369-376.

Wang, L. and C.L. Weller. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Sci. Technol. 17:300-312.

Yang, H.J., M.J. Park and H.S. Lee. 2011. Antioxidative activities and components of *Gardenia jasminoides*. Korean J. Food Sci. Technol. 43:51-57 (in Korean).

(Received 19 March 2018 ; Revised 17 May 2018 ; Accepted 28 May 2018)