

편백정유의 항균효과

이현옥* · 백승화¹ · 한동민²

원광보건대학 치위생과, ¹원광대학교 한의학전문대학원
한약자원개발학과, ²자연과학 기술학부

Antimicrobial Effects of *Chamaecyparis obtusa* Essential Oil. Lee, Hyun-Ok, Seung-Hwa Baek¹, and Dong-Min Han². Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College, Iksan, Chonbuk 570-750, Korea, ¹Department of Herbal Resources, Professionalgraduate School of Oriental Medicine and ²Division of Natural Science & Technology, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea – Essential oil of *Chamaecyparis obtusa* showed antimicrobial activity on relatively broad spectrum of bacterial and fungal species. *Staphylococcus epidermidis* was highly sensitive to the essential oil but *Streptococcus aureus* and *Streptococcus mutans* were not. *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* showed sensitivity at the concentration higher than 400 ppm. The growth of a pathogenic yeast *Candida albicans* was inhibited by the essential oil above 200 ppm. The radial growth of several filamentous fungi was also inhibited. The antifungal activity of the essential oil was effective on two plant pathogens *Fusarium oxysporum* and *Alternaria mali*. These results suggest that essential oil of *Chamaecyparis obtusa* has an antimicrobial activity by inhibiting bacterial and fungal species.

Key words: *Chamaecyparis obtusa*, essential oil, antibacterial and antifungal effect

식물이 생활하면서 만들어내는 2차 대사 산물중에 많은 것들은 다른 식물 또는 균류를 포함한 각종 미생물에 스트레스를 준다. 이러한 스트레스는 식물과 미생물 사이의 방해작용으로 나타나고 이러한 현상을 식물의 방어기작이라고 하며[1]. 이러한 식물이 화학물질을 생성하여 주위 환경으로 방산함으로써 다른 식물에게 직접, 간접으로 해를 입히는 영향은 알레로파시(allelopathy)라고 한다[2]. 알레로파시 현상은 식물들 사이에서는 매우 일반적인 현상으로 밝혀졌으며, 식물 상호간에 그리고 식물과 미생물간에 일어나는 일종의 화학전쟁(chemical warfare)이라고 한다[3]. 이들 알레로파시 효과에 관여하는 물질로 알려진 것들은 대개 allelochemicals이라고 불리우는 2차 대사산물들로서 phenolics, terpenoid, alkaloid, phenylpropane, acetogenin, steroid 등으로 나뉘어진다[4].

Allelochemicals는 타식물을 공격하는 것은 물론이고 병원성 곰팡이나 박테리아의 공격에 대한 방어기작(phytoalexins)에 의해 생성된다. Allelochemicals 중 휘발성물질(essential oil, 정유)은 자연상태에서 주위환경내로 퍼져나가서 서식처의 환경변화를 가져오며, 이들 물질이 오늘날 식물 생태에 매우 중요한 역할, 즉 식물생존과 적응에 상당한 역할을 한다[5]. 그 예로 곡물보존을 위한 살충제[6], 항균활성[7,8,9,10,11,12], 미생물질소대사 억제[13], 균류생장억제[14,15],

그리고 농업분야에 이용[16] 등의 활성을 갖는다. 이러한 반응을 나타내는 항균활성물질은 essential oil, flavonoid, tannin을 비롯하여 여러 종류가 알려져있는데 대부분이 terpenoid계와 phenolic 화합물로 알려져 있다[17]. 따라서 이들에 대한 보다 체계적인 연구는 인체에 무해한 항균제나 천연방부제 등으로 응용될 수도 있으며 식물과 미생물간의 상호작용 관계를 밝혀 산업이나 인간의 편의적인 생활에 응용될 수도 있는 연구효과를 기대할 수 있다. 편백(*Chamaecyparis obtusa*)은 현재 일본과 대만 등에서 자생하고 있는 측백나무과 편백나무속의 상록 침엽 교목으로 줄기의 독특한 향기는 잘 알려져 있으며, 건재 등에 사용되고 있다. 그 정유는 향료, 살충제 그리고 방향제 등에 이용되고 있으나 미생물과의 관계에 관한 연구는 미비한 형편이다.

본 연구에서는 편백의 휘발성물질을 추출하여 항균 및 항진균활성에 대하여 조사함으로써 지금까지 널리 연구되어 사용되고 있는 화학적인 항균제나 방부제를 천연물질로 대체하며, 또한 편백 특유의 신선한 향이 첨가됨으로써 이를 이용한 항균제나 방향항균제의 개발에 기여할 수 있는 기초자료로 이용하기위함이다.

재료 및 방법

채집 및 추출

본 실험에서 사용한 편백은 전북 완주군 상관면 죽림리 죽림 온천 근처에서 채집하여 Karlsruker장치[18]를 이용하여, steam-distillation한 후 얻어진 essential oil을 ether로

*Corresponding author
Tel. 063-840-1265, Fax. 063-840-1269
E-mail: holee@wkhc.ac.kr

추출하였다. 추출된 essential oil은 즉시 4°C 냉장고에 보관하였고, 사용직전에 10% dimethyl sulfoxide에 희석하여 실험에 사용하였다.

균주

항세균효과를 측정하기 위하여 사용된 시험미생물은 그람 양성균으로 *Streptococcus mutans* JC-2, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus aureus* ATCC 29213이며, 그람 음성균으로 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471, *Pseudomonas putida* KCTC 8729, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1636을 이용하였고, 항진균효과를 측정하기 위하여 사용된 균주로 효모형 균주는 *Candida albicans* KCTC 1940을 사상형 균주는 *Aspergillus nidulans* FGSC4, *Alternaria mali*와 *Fusarium oxysporum*은 원광대학교 미생물 유전학 실험실에 보관된 균주를 이용하였다.

배지 및 배양조건

항세균효과를 측정하기 위해 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*경우는 Brain heart infusion(BHI, Difco, USA)배지를 사용하였고 *V. parahaemolyticus*는 Brain heart infusion(BHI, Difco, USA)에 NaOCl 3.75 g을 첨가하여 사용하였으며, *P. putida*와 *P. aeruginosa*는 Nutrient broth(NB, Difco, USA)를 사용하였다. 항진균효과에 사용된 배지는 *C. albicans*는 SB(Bacto-peptone 10 g, bacto-dextrose 40 g)를 조제하여 사용하였고 *A. mali*는 Potato dextrose(PD, Difco, USA)를, *A. nidulans*와 *F. oxysporum*은 CM(complete media, Dextrose 10 g, yeast extract 1.5 g, casein acid 1.5 g, vitamine solution 10 ml, adenine solution 4 ml을 증류수에 녹여 1 liter가 되게 한 후 멸균하여

minimal salt stock solution 20 ml을 첨가)을 조제하여 사용하였으며, 각 균주의 배양조건은 Table 1과 같다.

편백정유의 항세균효과

각 균주는 고체배지에서 3번 계대배양한 후 단일 콜로니를 액체배지에 접종하여 37°C의 배양기에서 16시간 진탕 배양한 균주를 일정양 접종하고, 편백정유를 각각 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1,000 ppm과 1,200 ppm 농도를 첨가한 후 18시간동안 배양하였다. 정유가 첨가되어 배양된 균주는 spectrophotometer에 의한 흡수파장 600 nm에서 흡광도(OD, optical density) 값을 측정하였으며, 4회의 반복실험을 실시하였고, 측정된 수치가 낮을수록 항세균효과가 높은 것으로 처리하였다.

편백정유의 항진균효과

효모형 균주의 실험방법은 항세균효과와 같은 방법으로 처리하여 흡광도를 측정하였으며, 4회의 반복실험을 실시하였다. 사상형 진균은 3일간 배양한 포자를 각 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm과 1,000 ppm 농도의 정유를 첨가한 고체배지 위에 점 접종하여, 30°C 배양기에서 5일간 배양한 후 콜로니의 직경을 측정하였으며, 4회의 반복실험을 실시하였다.

통계처리

실험결과와 통계처리는 각 균주들에 대한 시료의 농도별 차이를 규명하기 위하여 일원분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였고, 유의한 차이가 있을 때 Duncan 다중범위 검정으로 사후검정을 하였으며, 유의도 수준은 0.05로 하였고, 통계분석은 SPSS Win을 사용하였다.

결과 및 고찰

그람 양성균에 대한 편백정유의 항세균효과

편백정유의 항세균효과를 파악하기 위하여, 그람 양성균 3종의 각 균주에 대하여 편백정유를 농도별로 처리한 후 나타난 흡광도를 분석한 결과 Table 2와 같이 *S. epidermidis*에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p<0.001). 이들을 농도별로 사후검정한 결과, *S. mutans*와 *S. aureus*의 경우 항세균효과가 나타나지 않았으며, *S. epidermidis*는 200 ppm과 400ppm에서 항세균효과가 나타났고, 600~1,200 ppm에서 항세균효과가 더 높게 나타났다(p<0.05). 편백정유에 대하여 그람 양성균인 *S. mutans*와 *S. aureus*는 항세균 효과가 나타나지 않았으며, *S. epidermidis*는 200 ppm과 400 ppm의 농도에서 항세균효과가 나타났고, 편백정유의 농도가 증가할수록 항세균효과는 높게 나타났다.

Table 1. The culture conditions of each strains tested

Strains	Temperature	Medium
Gram positive bacteria		
<i>S. mutans</i>	37°C	BH
<i>S. epidermidis</i>	37°C	BH
<i>S. aureus</i>	37°C	BH
Gram negative bacteria		
<i>V. parahaemolyticus</i>	37°C	BHIN
<i>P. putida</i>	37°C	NB
<i>P. aeruginosa</i>	37°C	NB
Yeast type fungi		
<i>C. albicans</i>	30°C	SB
Filamentouse fungi		
<i>A. nidulans</i>	30°C	CM
<i>A. mali</i>	30°C	PD
<i>F. oxyporum</i>	30°C	CM

Table 2. Inhibition of growth by gram positive bacteria in various concentrations of *Chamaecyparis obtusa* essential oil¹

Conc.(ppm)	Strains	<i>S. mutans</i>	<i>S. epidermidis h</i>	<i>S. aureus</i>
	Control	0.541 ± 0.098	2.471 ± 0.405	2.278 ± 0.082
	200	0.456 ± 0.070	0.809 ± 0.041 ^a	2.240 ± 0.121
	400	0.447 ± 0.014	0.519 ± 0.041 ^a	2.220 ± 0.132
	600	0.386 ± 0.133	0.389 ± 0.130 ^b	2.327 ± 0.489
	800	0.434 ± 0.076	0.364 ± 0.110 ^b	1.554 ± 0.104
	1000	0.462 ± 0.029	0.279 ± 0.061 ^b	2.300 ± 0.081
	1200	0.405 ± 0.135	0.246 ± 0.048 ^b	2.335 ± 0.092
	F	0.902	65.191	1.255
	p	0.520	0.000	0.338

¹The values(OD 600 nm) represent the mean ± standard deviations for four independent experiments. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by Duncans multiple range test. F : F ratio, p : probability

Table 3. Inhibition of growth by gram negative bacteria in various concentrations of *Chamaecyparis obtusa* essential oil¹

Conc.(ppm)	Strains	<i>V. parahemolyticus</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	Control	2.377 ± 0.050	1.828 ± 0.094	1.750 ± 0.125
	200	1.681 ± 0.220 ^a	1.684 ± 0.169	1.358 ± 0.399 ^a
	400	1.099 ± 0.217 ^b	1.294 ± 0.206 ^a	0.997 ± 0.229 ^b
	600	1.026 ± 0.101 ^b	0.729 ± 0.051 ^b	0.920 ± 0.190 ^b
	800	0.892 ± 0.030 ^b	0.193 ± 0.035 ^c	0.802 ± 0.031 ^b
	1000	0.851 ± 0.058 ^b	0.190 ± 0.046 ^c	0.730 ± 0.097 ^b
	1200	0.432 ± 0.113 ^c	0.175 ± 0.045 ^c	0.717 ± 0.063 ^b
	F	68.842	127.137	11.109
	P	0.000	0.000	0.000

¹The values(OD 600nm) represent the mean ± standard deviations for four independent experiments. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test. F : F ratio, p : probability

그람 음성균에 대한 편백정유의 항세균효과

편백정유의 항세균효과를 파악하기 위하여, 그람 음성균 3종의 각 균주에 대하여 편백정유를 농도별로 처리한 후 나타난 흡광도를 분석한 결과 Table 3에서와 같이 3종 균주에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p<0.001). 이들을 농도별로 사후검정한 결과, *V. parahemolyticus*은 200 ppm에서 항세균효과가 나타났으며, 600~1,000 ppm에서 그리고 1,200 ppm의 농도에서 높은 항세균효과가 나타났다(p<0.05). *P. putida*는 400 ppm에서 항세균효과가 나타났고, 600 ppm과 800~1,200 ppm에서 높은 항세균효과가 효과가 나타났다(p<0.05). *P. aeruginosa*는 200 ppm에서 항세균효과가 나타났으며, 400~1,200 ppm의 농도에서 높은 항세균효과가 나타났다(p<0.05). 편백정유의 그람 음성균에 대하여 항세균효과가 나타난 농도는 *V. parahemolyticus*와 *P. aeruginosa*는 200 ppm의 농도부터, *P. putida*는 400 ppm의 농도부터 항세균효과가 나타났으며, 편백정유의 농도가 증가할수록 항세균효과는 높게 나타났다.

효모형 균주에 대한 편백정유의 항진균효과

편백정유의 효모형 균주에 대한 항진균효과를 파악하기

위하여, *C. albicans* 대하여 편백정유를 농도별로 처리한 후, 나타난 흡광도를 분석한 결과 Table 4에서와 같이 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p<0.001). 이들을 농도별로

Table 4. Inhibition of growth by *Candida albicans* in various concentrations of *Chamaecyparis obtusa* essential oil¹

Conc.(ppm)	Strain	<i>C. albicans</i>
	Control	1.368 ± 0.081
	200	1.154 ± 0.050 ^a
	400	0.869 ± 0.045 ^a
	600	0.750 ± 0.061 ^b
	800	0.687 ± 0.026 ^b
	1000	0.611 ± 0.028 ^c
	1200	0.439 ± 0.414 ^c
	F	121.445
	p	0.000

¹The values(OD 600nm) represent the mean ± standard deviations for four independent experiments. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test. F : F ratio, p : probability

Table 5. Inhibition zone of *Chamaecyparis obtusa* essential oil on various filamentous fungi¹

Conc.(ppm)	Strains	<i>A. mali</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. nidulans</i>
Control		7.975 ± 0.050	6.500 ± 0.817	6.650 ± 0.058
100		7.750 ± 0.129	4.575 ± 0.957 ^a	6.125 ± 0.096
400		7.225 ± 0.957 ^a	4.225 ± 0.171 ^a	5.550 ± 0.129 ^a
600		5.525 ± 0.957 ^b	4.350 ± 1.568 ^b	5.300 ± 0.082 ^b
800		4.200 ± 0.432 ^c	2.975 ± 0.126 ^c	5.140 ± 0.140 ^c
1000		2.975 ± 0.957 ^d	2.175 ± 0.126 ^d	4.600 ± 0.408 ^d
F		433.226	200.015	208.680
p		0.000	0.000	0.000

¹The values (colony diameter, mm) represent the mean standard deviations for four independent experiments. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by Duncans multiple range test. F : F ratio, p : probability

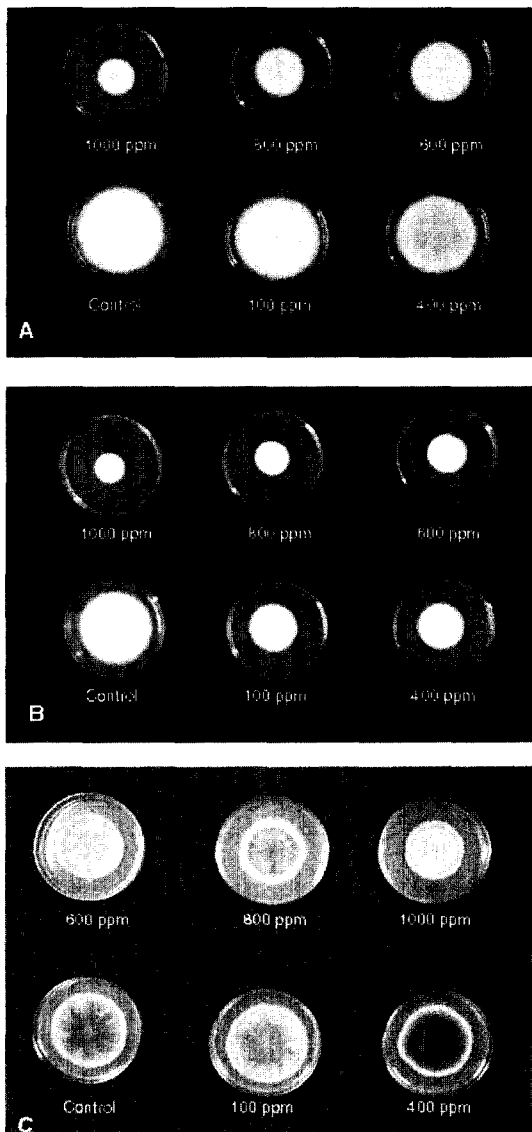


Fig. 1. Inhibition zone of *A. mali* (A), *F. oxysporum* (B) and *A. nidulans* (C) at various concentrations of *Chamaecyparis obtusa* essential oil.

사후검정한 결과, *C. albicans*는 200ppm과 400ppm에서 항진균효과가 나타났으며, 600~1,000ppm과 1,200ppm에서 항진균효과가 나타났다(p<0.05) (Table 4). 편백정유의 *C. albicans*에 대한 항진균효과는 200ppm의 농도부터 항진균효과가 나타났으며, 편백정유의 농도가 증가할수록 항진균효과는 높게 나타났다.

사상형 균주에 대한 편백정유의 항진균효과

편백정유의 사상형 균주에 대한 항진균효과를 파악하기 위하여, 편백정유를 각 농도별로 첨가한 고체배지위에 사상형균주 3종을 점 접종하고, 각 균주의 성장억제대를 측정하여 분석한 결과 Table 5에서와 같이 3종 균주에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p<0.001). 이들을 농도별로 사후검정한 결과, *A. mali*의 경우 400 ppm부터 균주의 성장억제대가 나타나기 시작하였으며, 600 ppm부터는 편백정유의 농도가 증가 될수록 성장억제대가 점진적으로 높게 나타났다(p<0.05). *F. oxysporum*은 100 ppm부터 균주의 성장억제효과가 관찰되었으며, 편백정유의 농도가 증가할수록 각각의 농도별로 균주의 성장억제대가 높게 나타났다(p<0.05). *A. nidulans*는 400ppm부터 균주의 성장억제대가 관찰되었으며, 농가 증가할수록 성장억제대가 각각 증가하였다(p<0.05). 편백정유의 사상형 균주에 대한 항진균효과가 나타난 농도는 *A. mali*와 *A. nidulans*는 400 ppm의 농도부터, *F. oxysporum*은 100 ppm의 농도부터 항진균효과가 나타났으며, 편백정유의 농도가 증가할수록 항진균효과는 높게 나타났다(Fig. 1).

요 약

편백의 정유성분을 추출하여 수종의 병원성세균과 진균을 대상으로 항세균 및 항진균효과를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 편백정유는 그람 양성균인 *S. epidermidis*, 그람 음성균인 *V. parahemolyticus*와 *P. aeruginosa*에 대해서는 200 ppm부터 항세균효과를 나타냈고, *P. putida*에

대해서는 400 ppm부터 항세균효과를 나타냈다. 항세균효과가 나타난 균주들은 편백정유의 농도가 증가할수록 효과가 높게 나타났으며, 통계적으로 유의성이 관찰되었다($p < 0.05$). 또한 편백정유는 효모형 곰팡이인 *C. albicans*에 대하여 200 ppm부터 항진균효과를 나타냈으며, 사상형 곰팡이인 *A. mali*와 *A. nidulans*에 대해서는 400 ppm부터, *F. oxysporum*에 대해서 100ppm부터 항진균효과를 보였고, 편백정유의 농도가 증가할수록 균주의 성장억제대가 증가되었다. 따라서 편백을 항균제나 방부제로 사용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

REFERENCES

1. Lovett, J. V., M. Y. Ryuntyu, and D. L. Liu. 1989. Allelopathy Chemical communication and plant defense. *J. Chem. Ecol.* **15**: 1193-1202.
2. Muller, C. H. 1969. Allelopathy as a factor in ecological process. *Vegetatio.* **18**: 348-357.
3. Patrick, Z. A. 1986. Allelopathy mechanism and their exploitation for biological control. *Canadian J. Plant Pathol.* **8**: 225-228.
4. Whittaker, R. H. and P. P. Feeny. 1971. Allelochemicals, chemical interactions between species. *Science* **171**: 757-770.
5. Wink, M. 1988. Plant breeding, importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Ther. Appl.gen.* **75**: 225-233.
6. 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.
7. Wink, M. and T. Twardowski. 1992. Allelochemicals properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis, In S. J. H. Rizvi and V. Rizvi (ed.), *Allelopathy*, Chapman Hall. pp.129-150.
8. 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.
9. Lee, H. O., K. Y. Han, and D. M. Han. 1999. Antibacterial and antifungal effect by *Artemisia lavandulaefolia* essential Oil. *Korean J. Food & Nutr.* **12**: 559-563.
10. Lee, S. K. 2000. Antimicrobial activity of bamboo (*Phyllostachys bambusoides*) essential oil. *J. Fd Hyg. Safety* **15**: 55-59.
11. Lee, J. J., S. H. Kim, B. S. Chang, J. B. Lee, C. S. Huh, T. J. Kim, and Y. M. Baek. 1999. The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**: 764-770.
12. Ahn, B. Y. 1992. Antimicrobial Activity of the essential oils of *Artemisia princeps* var. orientalis. *Kor. J. Food Hygiene* **7**: 157-160.
13. Grife, U. 1982. Relevance of microbial nitrogen metabolism to production of secondary metabolites, In: overproduction of microbial products Krumphanzl V., B. Sikyta, Z. Vanek (ed.). Academic Press, London. pp. 63-75.
14. 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.
15. Mayer, A. M. 1989. Plant-fungal interactions: A plant physiologists review point. *Phytochemistry.* **25**: 311-317.
16. Song, J. S., S. N. Ryu, K. S. Kim, J. K. Bang, B. H. Lee, and Y. A. Chae. 1999. Analytical technique and agricultural application of essential oil in plant. *Kor. J. Intl. Agri.* **11**: 107-125.
17. Rice, E. L. 1979. Allelopathy-an update. *The Botanical Review.* **45**: 15-109.
18. Stahl, E. 1973. Thin-layer chromatography (2nd ed.). G. Allen and Unwin (ed.), Springer-Verlag. p. 208.

(Received Sep. 5, 2001/Accepted Nov. 20, 2001)