

## *Dryobalanops aromatica* 유래 용뇌의 *Malassezia furfur*에 대한 항균 활성

김영주 · 황근배 · 서영배\*  
경북대학교 생명공학부 미생물학과

**Antifungal Activity of Borneolum (Borneo-Camphor) from *Dryobalanops aromatica* against *Malassezia furfur*.** Kim, Young-ju, Guen-bae Hwang, and Young-Bae Seu\*. School of Life science & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea – Ethyl acetate extracts of traditional medicinal herbs were screened for their antifungal activity against *Malassezia furfur* through the liquid growth inhibition method with 96 well plate and the paper disk agar diffusion assay. Among the 91 kinds of herbal solvent extracts, borneolum (borneo-camphor, No. 56) was finally selected as the best antifungal effective medicinal herb. The MIC value of No. 56 against *M. furfur* was 0.3 mg/ml ( $8.2 \times 10^6$  CFU/ml) and it was three times more efficient than midazole which is the known antifungal agent in clinical medicines.

**Key words:** *Dryobalanops aromatica*, borneolum, borneo-camphor, *Malassezia furfur*, borneol, camphor, pityriasis versicolor

Yeast에 속하는 *Malassezia* 속들은 오랫동안 피부에 서식하는 균류로, 특정조건에서 피부 등의 표면 감염을 일으키는 원인이 될 수 있고, 이식 환자 등에서는 기회주의 병원체가 될 수 있다[11]. 1846년 pityriasis versicolor(PV) 환자의 감염조직에서 *Malassezia*와 비슷한 효모가 Eichstedt에 의해 첫 번째로 보고되었다[3]. *Malassezia*라는 이름은 각종 피부병에 환자의 각질층에서 전형적인 원 또는 타원형으로 짝트는 효모를 가장 먼저 보고한 Malassez[8]에 의해 처음 사용되었으며, 그 후 1889년에 Baillon은 PV 피부병에서 관측된 실 형태의 균류를 *Malassezia furfur*(*M. furfur*)로 보고하였다. *M. furfur*는 두껍고, 다층의 세포벽의 특징을 가지는 다형태의 친지방성 미생물로 콜로니는 작고 황갈색이며 선명한 테두리를 가지고 있다. *M. furfur*는 monopolar의 짝트는 효모세포에 의해 재생산되며[12], 가끔 필라멘트를 형성하는 것도 가능하다.

피부에 서식하는 *Malassezia* yeasts가 yeast 형태에서 병원성인 균사형태로 바뀌어 피부의 각질층을 침입할 경우 pityriasis versicolor(PV)라는 피부질환을 일으키며, 이는 통상적으로 어루러기로 잘 알려져 있다. PV는 보통 아동[13]과 신생아[2]에서 보고되었지만, 대부분은 피지선의 활동이 최고조인 청소년들과 젊은이들 그리고 특히 땀을 많이 흘리는 운동선수들에게서 발견되고, 화장품의 부작용으로 나타나기도 한다. 대부분의 환자들은 자각증상이 없고, 몇몇 경우는 가려움을 유발하기도 하며, 자연스럽게 재발하므로 자주 치료할 필요가 있다[4].

*Malassezia* yeasts는 또한 사람 및 동물의 피모 및 피부각질층에 침범하여 피부사상균증도 일으키는데, 피부과 영역에서 가장 빈도가 높은 감염성 질환으로 사람과 동물 상호간 감염원이 되고 있어서 공중보건학적으로 중요시 되고 있다[11]. 우리나라는 최근 개개인의 생활수준이 높아져 고양이, 개와 같은 애완동물을 선호하는 경향과 외국으로부터 동물의 수입이 늘어남에 따라 동물친화성 진균에 의한 감염증 환자도 많아지고 있다. 동물친화성 진균인 *Malassezia*는 동물에 병변을 나타내어 발병하지만 무증상의 보균상태로 존재하면서 생활환경 주위에 균을 오염시키거나 사람에게 감염원으로 작용하므로 공중보건학적으로 중요성이 강조되고 있다.

이러한 피부병의 임상치료를 위하여 많은 antifungal 제제들이 소개되어 왔으며, 일본의 몇몇 재재도 1990년대에 추가되기 시작했다. 이들 중에는 imidazole[7], allylamine[6], benzylamine[1], and morpholine[5]등의 항곰팡이제가 있으며, 이들 모두 넓은 범위의 항곰팡이 효과와 높은 활성을 가진 것으로 밝혀져 있다.

그러나 이들 피부병 임상 치료제 들은 광범위의 항곰팡이 효과만을 보일 뿐, 특이적으로 *M. furfur*에 대하여 항균효과를 보이는 항진균제는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 피부사상균증, PV 등의 주요 원인균인 *M. furfur*의 생육을 저해하는 새로운 기능성 항곰팡이질을 사용빈도가 높은 천연한약재 중에서 찾아내고자 하였으며, 찾아낸 물질의 *M. furfur*에 대한 항균활성의 정도를 기존의 임상에 사용되고 있는 항진균제와 비교한 결과를 보고하고자 한다.

### *M. furfur*에 대한 항균활성을 가지는 한약재의 1차선별

본 실험에 사용된 사용빈도가 높은 91종의 한약재는 시중(대구 남성로 약전골목)에서 구입하였으며, 건조된 형태의 약

\*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5380, Fax: 82-53-955-5522

E-mail: ybseu@knu.ac.kr

재를 분쇄하여 가루형태로 만든 후 사용하였다. 사용된 균주 *Malassezia furfur* (KCTC 7744)는 KCTC(Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 사용하였다. 액체배지는 1%의 olive oil을 포함한 YM broth를 사용하여 배

양하였으며, 고체배지역시 YM agar에 1% olive oil을 첨가하여 사용하였다.

가루상태의 1번부터 91번까지의 각 한약재를(Table 1), 0.2 g 씩 시험관에 넣고, 2 ml의 distilled water(DW)를 첨가 후

**Table 1. Antimicrobial activity and scientific name.**

No	Medical herb	Scientific name	Activity <sup>1</sup>	No	Medical herb	Scientific name	Activity
1	감국(甘菊)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	W	47	소자(蘇子)	<i>Perilla frutescens</i>	N
2	감초(甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	S	48	소회향(小茴香)	<i>Foeniculum vulgare</i>	N
3	강활(羌活)	<i>Ostericum koreanum</i>	N	49	시호(柴胡)	<i>Bupleurum falcatum</i>	M
4	개자(芥子)	<i>Brassica juncea</i>	W	50	신곡(神麴)	<i>Aspergillus oryzae cohn.</i>	W
5	건강(乾薑)	<i>Zingiber officinale</i>	S	51	연교(連翹)	<i>Forsythia koreana</i>	M
6	결명자(決明子)	<i>Cassia tora</i>	S	52	오가피(五加皮)	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	N
7	계지(桂枝)	<i>Cinnamomum cassia</i>	S	53	오두(烏頭)	<i>Aconitum carmichaeli</i>	M
8	계피(桂皮)	<i>Cinnamomum cassia</i>	S	54	오미자(五味子)	<i>Schisandra Chinensis</i>	M
9	고삼(苦參)	<i>Sophora flavescens</i>	M	55	오수유(吳茱萸)	<i>Evodia officinalis</i>	W
10	팔루근(括藜根)	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	W	56	용뇌(龍腦)	<i>Dryobalanops aromatica borneolum (borneo-camphor)</i>	S
11	구기자(枸杞子)	<i>Lysium chinense</i>	N	57	우슬(牛膝)	<i>Paeonia suffruticosa</i>	M
12	길경(桔梗)	<i>Platycodon grandiflorum</i>	N	58	원지(遠志)	<i>Polygala tenuifolia</i>	S
13	내복자(萊子)	<i>Raphanus sativus</i>	N	59	육계(肉桂)	<i>Cinnamomum loureirii</i>	W
14	단삼(丹蔘)	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	W	60	육종용(肉從蓉)	<i>Boschniakia rossica</i>	N
15	당귀(當歸)	<i>Angelica gigas</i>	W	61	익지인(益智仁)	<i>Polygala tenuifolia</i>	N
16	대두황권	<i>Lathyrus japonica</i>	N	62	작약(芍藥)	<i>Paeonia lactiflora</i>	W
17	대황(大黃)	<i>Rheum undulatum</i>	M	63	지각(枳殼)	<i>Poncirus trifoliata</i>	N
18	도인(桃仁)	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	N	64	지모(知母)	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	N
19	독활(獨活)	<i>Aralia contientalis</i>	N	65	지실(枳實)	<i>Poncirus trifoliata</i>	S
20	마황(麻黃)	<i>Ephedra sinica</i>	M	66	지황(地黃)	<i>Rehmannia glutinosa</i>	N
21	망초(莽草)	<i>Erigeron canadensis</i>	N	67	진피(陳皮)	<i>Paeonia lactiflora var. hortensis</i>	N
22	맥문동(麥門冬)	<i>Liriope platyphylla</i>	W	68	질려자(藜子)	<i>Tribulus terrestris</i>	N
23	모과(木瓜)	<i>Aralia contientalis</i>	S	69	창출(蒼朮)	<i>Atractylodes japonica</i>	M
24	모려(牡蠣)	<i>Ephedra sinica</i>	M	70	천궁(川芎)	<i>Cnidium officinale</i>	N
25	목단피(牡丹皮)	<i>Paeonia suffruticosa</i>	S	71	천마(天麻)	<i>Gastrodia elata</i>	N
26	목향(木香)	<i>Inula helenium</i>	W	72	천문동(天門冬)	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	N
27	박하(薄荷)	<i>Mentha arvensis</i>	W	73	청상자(靑箱子)	<i>Celosia argentea Linne</i>	N
28	반하(半夏)	<i>Pinellia ternata</i>	N	74	청피(靑皮)	<i>Citrus nobilis</i>	N
29	방풍(防風)	<i>Ledebouriella seseloides</i>	N	75	초오(草烏)	<i>Aconitum jaluense</i>	N
30	백두구(白豆蔻)	<i>Amomum cardamomum L.</i>	W	76	치자(梔子)	<i>Gardenia jasminoides</i>	M
31	백렴(白斂)	<i>Ampelopsis japonica</i>	M	77	택사(澤瀉)	<i>Alisma canaliculatum</i>	N
32	백삼(白蔘)	<i>Codonopsis lanceolata</i>	N	78	토사자(兔絲子)	<i>Cuscuta japonica Chois.</i>	N
33	백자인(白子)	<i>Thuja orientalis</i>	N	79	패모(貝母)	<i>Fritillaria ussuriensis</i>	N
34	백출(白朮)	<i>Atractylodes japonica KOIDZ</i>	N	80	포부자(附子)	<i>Aconitum carmichaeli</i>	N
35	백편두(白扁豆)	<i>Dolichos lablab L.</i>	N	81	포황(蒲黃)	<i>Typha angustata</i>	N
36	복령(茯苓)	<i>Poria cocos</i>	N	82	하수오(何首烏)	<i>Pleuropterus multflorus</i>	N
37	복신(茯神)	<i>Poria cocos</i>	N	83	행인(杏仁)	<i>Prunus armeniaca</i>	M
38	봉출(蓬朮)	<i>Curcuma zedoaria Roscoe</i>	M	84	향부자(香附子)	<i>Cyperus rotundus</i>	N
39	사인(砂仁)	<i>Amomum villosum</i>	N	85	현삼(玄蔘)	<i>Scrophularia buergeriana</i>	N
40	산사육(山查肉)	<i>Crataegus pinnatifida</i>	M	86	현호색(玄胡索)	<i>Corydalis turtchaninovi</i>	N
41	산수유(山茱萸)	<i>Cornus officinalis</i>	N	87	형개(荊芥)	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	M
42	산약(山藥)	<i>Dosocorea batatas</i>	N	88	황금(黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i>	N
43	산조인(酸棗仁)	<i>Zizyphus vulgaris var.</i>	N	89	황련(黃蓮)	<i>Coptis chinensis</i>	N
44	삼릉(三稜)	<i>Scirpus fluviatilis</i>	M	90	황백(黃柏)	<i>Rutaceae</i>	N
45	석고(石膏)		N	91	황정(黃精)	<i>Polygonatum odoratum</i>	W
46	세신(細辛)	<i>Asarum sieboldii Miq.</i>	M				

<sup>1</sup> Degree of antimicrobial activity for *M. furfur* S (strong), M (medium), W (weak), N (no activity)

잘 섞은 다음 여기에 ethyl acetate(EA)를 2 ml 첨가하여 두 개의 층으로 분리되도록 한 후 교반하여 물층에 있던 유기물들이, EA층으로 추출되도록 한다. 이때, 56번 용뇌는 DW에 전혀 녹지 않으므로 DW에 녹이는 과정을 생략하고, 바로 EA를 첨가하였다. 하룻밤정도 교반한 후 그대로 두어 물층과 EA층이 분리되도록 하고, 잘 분리되지 않을 경우 6000 rpm, 10분 동안 원심분리를 하여 분리를 유도하였다. 분리된 EA층은 감압농축하여 용매를 완전히 제거 후 항균활성 검정을 위한한약재 추출물을 준비하였다.

항균활성 보유 한약재의 1차선별을 위하여 한약재 추출물은 5  $\mu$ l의 DMSO에 녹인 후 45  $\mu$ l의 멸균수를 첨가하여 희석하였으며 *M. furfur* 배양액은 액체배지에 접종 후 37°C에서 48시간 동안 배양 하고, 다시 동일한 배지로 1/10<sup>3</sup>으로 희석한 후 사용하였다. 항균활성은 96 well plate(Falcon co.)를 이용하여 측정하였다. 각 well에 희석한 *M. furfur* 균액을 100  $\mu$ l씩 넣은 후, 희석해놓은 한약재를 20  $\mu$ l씩 떨어뜨리고 37°C에서 배양하면서 580 nm에서 OD 수치를 12시간 마다 주기적으로 읽어 변화를 관찰하였고, 동시에 각 well의 배양액을 10  $\mu$ l씩 고체배지에 도말하여 colony의 생성정도를 확인하였다. 여기서 대조군으로는 같은 조건에서 한약재 추출물을 첨가하지 않은 DMSO 함유 배양액을 사용하였다. 이 결과로부터 *M. furfur*에 항균활성을 강하게 나타내는 2, 5, 6, 7, 8, 9, 23, 25, 56, 58, 65번의 11가지 한약재가 1차로 선별되었고, 각 well의 *M. furfur* 배양액을 각각 고체배지에 도말하여 colony의 생성을 측정한 결과 2, 5, 7, 8, 25, 56, 58, 65번의 8가지의 한약재를 처리한 well에서는 colony가 전혀 나타나지 않아 강한 항균활성이 있음을 확인하였다 (Table 2).

#### Paper disk method에 의한 2차 항균활성 측정

2차선별을 위하여 1차 선별된 11종의 한약재는 다시 1% olive oil을 포함한 YM agar에서 한천 배지 확산법(disk-agar plate diffusion method)으로 투명대의 생성크기로 항균력의 정도를 확인하였다. 한약재 0.2 g의 EA 추출농축액을 EA 50  $\mu$ l로 녹인 후, paper disk(직경 8 mm, D0910606 Toyo Roshi kaisha, Ltd. Japan)에 30 $\mu$ l씩 loading 하여 충분히 건조시켜 용매를 제거하였다. 액체배지에 *M. furfur*를 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 배양 하고, 이것을 고체배지에 면봉을 이용하여 골고루 도말한 후 30 분간 뒤집어 말렸다. 여기에 활성성분 함유 건조 disk와 함께 control로 같은 조건에서 EA 만을 사용한 disk를 얹고 30°C에서 48시간 이상 배양하면서 투명대의 생성정도를 확인하였다.

1차 선별된 11종의 한약재들을 다시 1% olive oil을 포함한 YM agar에서 paper disk를 이용한 한천 배지 확산법으로 투명대의 생성크기 확인함으로써 항균력의 2차선별을 한 결과(Table 2), 56번 용뇌(borneolum, borneo-camphor)가 가장 큰 투명대를 생성하여 가장 항균활성이 높은 것을 확

**Table 2. CFU and inhibition zone of *M. furfur* after antifungal assay.**

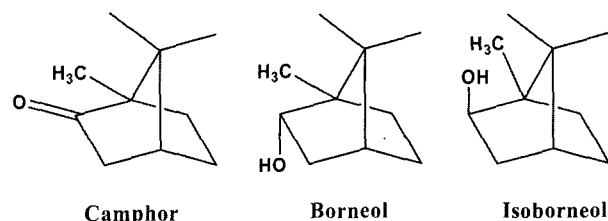
Number of medical herbs	CFU <sup>1</sup>	Relative antifungal activity (%) <sup>2</sup>	Diameter(mm) of inhibition zone
control	568	0	0
2	0	100	12
5	0	100	10
6	2	99.7	11
7	0	100	23
8	0	100	25
9	12	98.8	13
23	29	95.0	9
25	0	100	18
56	0	100	30 <sup>3</sup>
58	0	100	9
65	0	100	11

<sup>1</sup> Colony Forming Unit.

<sup>2</sup> 0% = No growth inhibition, 100% : complete growth inhibition activity.

<sup>3</sup> 1/10 Concentration as compared with others.

인하였고 8번 계피와 7번 계지 또한 강한 활성을 나타내었다. 강한 항균활성을 나타내는 이들 3종 중 항균활성이 가장 강한 56번 용뇌의 경우는 계피와 계지와 같이 항균활성을 가지는 한약재가 아닌 용뇌나무(*Dryobalanops aromatics*)의 나무줄기와 가지를 썰어 수증기로 증류하여 얻은 백색의 결정체로 1차 추출물로 주성분이 borneol, isoborneol, camphor, cineole 등인 화학 혼합물이므로 용뇌를 *M. furfur*에 대한 항균활성을 가지는 최종후보로 선별하였다. 시판 용뇌를 여러 종 수집하여 주성분을 분리 <sup>1</sup>H-NMR로 구조를 확인한 결과 함량비의 차이는 크게 나타났으나 주성분은 borneol과 isoborneol이었으며 소량의 camphor가 검출되었다(Fig. 1). 이들 3종의 방향성 bicyclic monoterpene는 모두 같은 화학적 골격을 가지며 광학활성체로 형성되어 있으므로 모두 9종의 화학 이성질체가 존재하며 이들의 입체구조와 항균활성의 상관관계를 조사하기 위하여 현재 시판되지 않는 화합물들을 합성 중에 있으며 그 결과를 차후 추가적 연구를 거쳐 보고할 예정이다. 이를 바탕으로 *M. furfur*에 대한 항균물질로 기준에 널리 알려져 있는 imidazole과 용뇌의 최소저해농도를 비교 측정하였다.



**Fig. 1. Bicyclic monoterpenes found in borneo-camphor.**

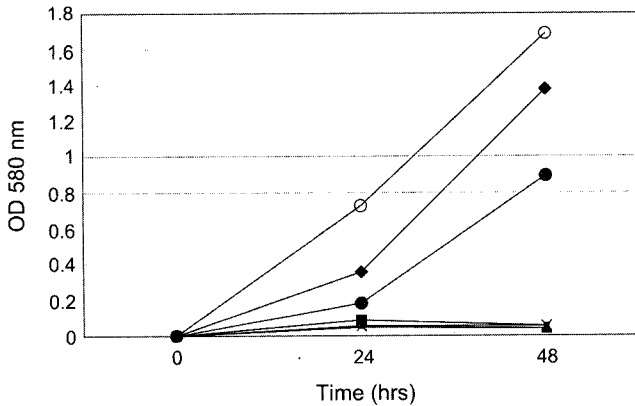


Fig. 2. MIC test of medical herb No. 56 against *M. furfur*. ◆-control (DMSO), ○-0.2 mg/ml, ×-0.3 mg/ml, ▲-0.4 mg/ml, ■-0.5 mg/ml, ●-0.5 mg/ml of imidazole/ml.

#### 용뇌의 *M. furfur*에 대한 최소저해농도 측정

두 차례의 선별과정을 거쳐 *M. furfur*에 대해 가장 강한 항균활성을 나타낸 56번 용뇌의 *M. furfur*균에 대한 최소저해농도를 측정하였다. *M. furfur*는 액체배지에 접종 후 37°C에서 48시간 동안 배양 하고, 다시 동일한 배지로  $1/10^3$ 으로 희석한 후 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣었다. 56번 용뇌의 경우, 물에 전혀 녹지 않으므로 0.01 mg~0.1 mg의 약재를 10  $\mu$ l의 DMSO에 녹인 후 각각 well에 10  $\mu$ l씩 떨어뜨리고 30°C에서 배양하면서 580 nm에서 OD 수치를 12시간마다 주기적으로 읽음으로서 *M. furfur*가 증식하지 못하는 가장 낮은 농도를 찾았다. 대조군으로는 같은 조건에서 한약재 추출물을 첨가하지 않은 DMSO 함유 배양액을 사용하였다. 이때 *M. furfur*에 대한 높은 항균활성을 가지는 것으로 알려져 있는 imidazole을 사용하여 비교하였으며 그 결과(Fig. 2) 용뇌의 최소저해농도는 0.3 mg/ml( $8.2 \times 10^6$  CFU/ml)이며, 이때의 imidazole의 최소저해농도는 1.0 mg/ml ( $8.2 \times 10^6$  CFU/ml)인 것으로 나타남으로써 기존에 알려진 imidazole보다 용뇌의 *M. furfur*에 대한 항균활성이 더 높은 것으로 확인되었다.

#### 감사의 글

본 연구는 경북대학교 학술지원연구비 지원(2000/05)에 의하여 이루어 졌기에 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

1. Arika, T., M. Yokoo, and H. Yamaguchi. 1992. Butenafine, a new benzylamine derivative: In vitro effect on arthrospores of *T. mentagrophytes* and therapeutic efficacy on experimental tinea pedis in guinea pigs. *Jpn. J. Med. Mycol.* **33**: 541-547.
2. Congly, H. 1984. Pityriasis versicolor in a 3-month-old boy. *Can. Med. Assoc. J.* **130**: 844-845.
3. Eichstedt, E. 1846. Piltzbildung in der Pityriasis versicolor. *Froriep Neue Notis Nat. Heilik.* **39**: 270.
4. Faergemann, J. 2000. Management of seborrheic dermatitis and pityriasis versicolor. *Am. J. Clin. Dermatol.* **1**: 75-80.
5. Hiratani, T., Y. Asagi, A. Matsusaka, K. Uchida, and H. Yamaguchi. 1991. In vitro antifungal activity of amorolfine, a new morpholine antimycotic agent. *Jpn. J. Antibiotics.* **44**: 993-1006.
6. Hiratani, T., Y. Asagi, and H. Yamaguchi. 1991. Evaluation of in vitro antimycotic activity of terbinafine, a new allylamine agent. *Jpn. J. Med. Mycol.* **32**: 323-332.
7. Maebashi, K., T. Hiratani, K. Uchida, Y. Asagi, and H. Yamaguchi. 1990. In vitro antifungal activity of SS717, a new imidazole antimycotic. *Jpn. J. Med. Mycol.* **31**: 333-342.
8. Malassez, L. 1874. Note sur le champignon du pityriasis simplex. *Arch. Pysiol. Norm. Pathol.* **1**:451-464.
9. McNeely, W. and C. M. Spencer. 1998. Butenafine. *Drugs.* **55**: 405-412.
10. Skerlev, M., J. Lipozencic, A. Basta-Juzbasic, and A. Pasic. 2000. The significance of *Malassezia furfur* (*Pityrosporum ovale*) in dermatology. *Acta. Dermatovenereol (Croat).* **8**:107-108.
11. Ljubojevi, S., M. Skerlev, and J. Lipozenci. 2002. The Role of *Malassezia furfur* in Dermatology. *Clinics in Dermatology* **20**: 179-182.
12. Takeo, K. and E. Nakai. 1986. Mode of cell growth of *Malassezia* (*Pityrosporum*) as revealed by using plasma membrane configuration as natural markers. *Can. J. Microbiol.* **32**: 389-394.
13. Terragni, L., A. Lasagni, A. Oriani, and C. Gelmetti. 1991. Pityriasis versicolor in the pediatric age. *Pediatr. Dermatol.* **8**: 9-12.

(Received Aug. 10, 2005/Accepted Aug. 25, 2005)