

Citronellol 및 Thymol이 *Candida albicans* 세포막 조성에 미치는 영향

임 숙¹ · 신승원*

¹식품의약품안전청, 덕성여자대학교 약학대학

Effects of Citronellol and Thymol on Cell Membrane Composition of *Candida albicans*

Sook Lim¹ and Seungwon Shin*

¹Korea Drug and Food Administration, Seoul 122-704, Korea
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract – Phospholipids are crucially important in a cell membrane function and could thereby influence antibiotic susceptibility. In order to investigate the antifungal mechanism the total lipid was extracted from *C. albicans* treated with citronellol or thymol in concentration of their minimum inhibiting concentration and the changes in phospholipids composition were analyzed using ketoconazole as control. The cell growth and total lipid synthesis in cell walls of *C. albicans* were inhibited by treatment with citronellol. The levels of total lipids were decreased by 35.85% compared to the control. They also showed a significant decrease in the contents of phospholipid, phosphatidylcholine(PC), phosphatidyl ethanolamine(PE) and phosphatidylinositol(PI). As the result of GC assay for total fatty acid methyl esters of PC, PE and PI in *C. albicans* treated with citronellol, it was found that the major fatty acid composed of three phospholipid were palmitic acid, stearic acid and oleic acid. Moreover, the pattern of the fatty acid compositions of PC, PE and PI were changed by the oil. Based on the results, the anti-*Candida* mechanism of citronellol or thymol might be closely associated with disrupting the permeability barriers of the fungal cell wall composition or construction.

Key words – *Candida albicans*, cell membrane, citronellol, thymol, mechanism

식물의 휘발성 정유는 항균력이 강한 성분 군으로서 이미 다수의 성분들이 항균제로 개발된 바 있고, 혼합물 상태인 정유분획도 각종 감염 증의 치료에 사용되고 있다. 정유의 전신성 진균 증에 대한 치료작용에 대해서는 낮은 흡수율로 인한 임상적 약효에 대해 부정적인 견해가 현재로서는 일반적이거나, 이러한 난점을 개선하려는 다양한 연구가 진행되고 있으며, oil의 특성으로 인하여 피부의 침투력 등에 있어서 유리한 점도 있어 진균 증 치료제 개발의 측면에서는 여전히 유망한 천연성분 계열에 속한다.¹⁻⁶⁾ 그러나 정유의 항진균 작용 기전에 대하여는 알려진 바가 적다. 이와 관련하여 Trombetta 등⁷⁾은 정유의 항진균 작용과 진균 세포막의 투과성의 변화 및 세포 내용물의 유출의 연관성에 대해 보고한 바 있다. 또한 구조가 유사한 산화 monoterpene의 경우, ketone 보다는 alcohol이 항균작용이 강하며, 특

히 citronellol 등의 acyclic unsaturated primary alcohol이 강력한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{8,9)}

진균 감염 증에 흔히 사용되는 polyene 및 azole계 화합물의 작용기전으로는 이들 물질이 진균 세포의 원형질막에 작용하여 sterol 분자와 특이적으로 결합하여서 막의 투과성을 변화시켜 칼륨, 무기 인산염, 아미노산, 당 등을 세포 밖으로 방출시키고, 세포벽 합성을 저해하는 것 등이 알려져 있다.¹⁰⁻¹³⁾ 그 밖에 항균제가 지방산 합성을 특이적으로 저해, 세포 소기관들을 손상시키는 경우도 보고되어 있다.^{14,15)} 항진균제의 작용 기전 연구가 행해지면서 이들 약물이 주로 세포막합성 억제 작용을 나타낸다는 결과에 따라 진균 세포를 구성하고 있는 지질의 종류와 인지질 및 지방산에 관한 연구 또한 같이 수행되어 왔다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 또한 진균류에 대하여 생장기간 동안 인지질 구조변화를 분석한 결과 주요 인지질은 phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS)이며, 다소 적은 양이지만 phosphatidylinositol (PI)도 포함되어 있다고 보고되었

*교신저자 (E-mail): swshin@duksung.ac.kr
(Tel): +82-2-901-8384

다.¹⁹⁻²⁰⁾ *Candida* 경우, 주요 인지질은 PC, PE, PI, PS 의 diphosphatidylglycerol 등이 확인되었다.^{21, 22)} 또한 지질을 구성하는 지방산을 비교 연구한 결과 균주 별로 다소 차이는 있으나 주요 지방산은 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid 등인 것으로 보고된 바 있다.²³⁾

*Candida albicans*는 칸다디증의 주 원인균으로 구강, 인두, 호흡기, 생식기 등 신체의 각 부위에 표재성 또는 침습성 감염증을 일으켜, 해당부위의 염증, 통증 및 해당 장기의 병적인 변화 등을 유발한다. 특히 면역억제제 사용이나, 항암치료 중인 사람, 후천성면역결핍증 (AIDS) 환자에서 나타나는 기회감염의 주 원인 균 중의 하나이다.²⁴⁾

본 연구에서는 정유의 항 진균 작용을 기전을 밝혀나가기 위한 과정으로, 우선, 정유 중 항 진균 작용이 강한 성분으로 대표적인 acyclic unsaturated primary monoterpene alcohol인 citronellol 및 역시 강력한 대표적인 정유계 항균제로 phenol성 monoterpene인 thymol을 *C. albicans*에 각각 처리하였을 때 균사형성 억제효과를 살펴보았다. 또한 이들 성분이 *C. albicans*세포막 주성분인 인지질을 구성하는 지방산의 조성에 미치는 영향을 분석하였다.

본 연구는 이러한 과정을 통하여 정유 성분의 항진균 작용기전을 연구하여 정유를 이용한 각종 진균성 질환에 대한 억제제 개발의 기초를 마련하는 것을 목표로 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건 - *C. albicans* KCCM 11282은 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms: 한국 미생물 보존 센터)에서 분양 받았다. 분양받은 균주를 yeast and malt extract agar (YM agar) 배지에 이식하여 24-27°C에서 배양한 후, 각각의 균을 액체 배지에 다시 분주하여 3일간 배양하였다. 각 균주는 배양 후 UV-visible spectrophotometer (spectronic 20)를 이용하여 McFarland 0.5 Standard와 같은 탁도로 조정된 균액을 제조하였다. 균사형성 억제 효과 실험에서는 Gibco-BRL (USA)사의 M199 배지(2.2 g/l Na-bicarbonate 포함)를 사용하였다.

시료 - *Pelargonium graveolens* 정유 (Neumond, Germany) 2 g을 toluene-ethylacetate 용매 (93:7)로 silica gel column chromatography를 실시한 후 TLC pattern에 의해 7개의 분획으로 나누었다 (Fr. 1-7). 이중 Fr. 3 분획을 택하여 같은 용매조건으로(93:7)로 2차 silica gel column chromatography를 실시하여 화합물 1 (76 mg)을 얻었다. 이 물질은 각종 이화학적 성상과 GC-MS, FT-IR, ¹H-NMR의 DATA를 비교 물질과 서로 비교 분석한 결과 각각 citronellol인 것으로 확인되었다.²³⁾ Thymol 및 ketoconazole은 Sigma-Aldrich사 (USA)에서 구입하여 사용하였다.

***C. albicans*에 대한 균사형성 억제 효과** - *C. albicans*

세포는 medium 199에서 균사형성이 유도된다. 12 well plate의 각 well에 37°C의 M199 배지를 3ml씩 분주한 후 앞서 측정된 MIC 결과를 근거로 citronellol, thymol, ketoconazole을 시료액으로 첨가하였다. *C. albicans*를 37°C에서 24시간 배양한 후 배양액에서 1×10⁶/ml의 세포를 취하여 각각의 시료가 첨가된 M199배지에 접종하여, 37°C에서 6시간 배양한 후 현미경으로 *C. albicans* 세포를 관찰하여 균사형성 억제 효과를 확인하였다.

***C. albicans*의 총 지방, 인지질 및 지방산 분석**²¹⁾ - *Candida albicans*를 37°C에서 24시간 배양한 후 배양액에서 1×10⁶/ml의 세포를 취하여 0.08 mg/ml의 시료를 첨가한 sabouraud dextrose broth배지에 접종하여 37°C에서 7일간 배양하였다. 0, 2, 5, 7일째 되는 날 배양액을 원심분리하여 균을 분리한 후, 동결 건조하여 중량을 측정하여 비교하였다.

또한 배양시작 0, 2, 5, 7일째 되는 날 세포를 일정량 취하여 멸균증류수로 3회 세척하고, chloroform-methanol 용액 (1:2)을 첨가한 후 혼합한 다음 증류수를 첨가하여 다시 흔들어 분리된 chloroform층을 whatman No.1 여과지로 여과하여 인지질 추출액을 얻었다. 잔사를 다시 chloroform으로 추출하여 1차 지질 추출물에 합하였다. 이 추출물을 40°C 항온수조에서 증발, 건조 시켜 총 지질 함량을 측정하고, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI)를 분리, 동정하기 위해 TLC를 이용하여 two-dimension으로 전개하였다. 1차 전개는 chloroform-methanol-28% ammonia water 용매 (65:25:5)에서, 2차 전개는 chloroform-acetone-methanol-acetic acid-distilled water 용매 (3:4:1:1:0.5)에서 각각 전개시켰다. 전개 후 TLC plate를 실온 건조시키고, dragendorff 시약으로 PC를, ninhydrin 용액으로 PE를, periodate-schiff 시약으로 이용하여 PI를 확인하였다.

이어서, PC, PE, PI를 구성하는 지방산의 종류 및 양적 동태를 GC로 분석하기 위해 각 인지질을 methylester화 하였다. TLC plate로부터 분리시킨 silica gel에 5% sulfuric acid를 함유한 methanol용액 5 ml와 internal standard인 heptadecanoic acid (Sigma)를 첨가하여 70°C에서 2시간 반응시킨 후 냉각시켜 증류수 5 ml를 첨가했다. n-hexane 2 ml로 3회 반복 추출하여 hexane층을 분리한 다음, 포화된 sodium bicarbonate 용액 5 ml를 첨가하여 hexane추출물을 중성화시켰다. Fatty acid methyl ester를 함유한 hexane층을 분리하여 35°C incubator에서 증발, 건조시켜 각 인지질의 총 fatty acid methyl ester의 함량을 측정하였다.

각 인지질의 fatty acid methyl ester를 분석하기 위해 Hewlett-Packard 6890 GC를 사용하였으며, OMEGAWAXTM 250 (Supelco 24136, 30 m × 250 μm × 0.25 μm) fused silica capillary column을 사용하였다. Injector의 온도는

260°C로 하였고, temperature program은 160°C에서 5분간 유지한 후, 210°C까지 4°C/min 속도로 승온시켜 50분간 유지한 후, 220°C까지 3°C/min의 속도로 승온시켜 5분간 유지했다. Split ratio는 10:1로 하였다. 각 fatty acid methyl ester는 standard mixture와 비교하여 인지질을 구성하는 지방산을 동정하였다.

결과 및 고찰

정유의 C. albicans에 대한 균사 형성 억제효과 - Citronellol 또는 thymol을 각각 MIC에 해당하는 농도로 조제하여 C. albicans에 처리한 후 균사 형성 억제를 관찰한 결과는 Fig. 1에 나타낸 바와 같다. 대조 군에서는 대부분 균사가 생성되었으나, citronellol (1 mg/ml)과 thymol (0.5 mg/ml)을 각각 처리한 실험 군에서는 균사가 형성되지 않았다.

C. albicans 생장 - 상법²⁵⁾에 따라 측정된 citronellol 또는 thymol을 MIC 농도인 1 mg/ml 과 0.5 mg/ml로 각각 처리한 후 C. albicans의 생장에 대한 결과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 처리 군의 세포 생장은 배양기간이 경과할수록 억제 현상이 지속되어 배양 7일에는 citronellol 처리 군은 대조 군에 비하여 39.58%, thymol 처리 군은 48.36%의 감소율이 나타났다. 한편 ketoconazole 처리 군의 세포생장은 배양기간 동안 전반적으로 서서히 증가하는 추세를 보였으

나 배양7일 성장율을 대조 군과 비교한 결과 34.42% 감소되었음을 알 수 있었다.

총 지방의 함량변화 - Citronellol 및 thymol 처리 후 배양에 따른 C. albicans 의 세포내 총 지방의 함량 변화에 대한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 총 지방의 함량은 배양 2일의 대조 군이 배양 0일보다 40.63% 증가한 반면 citronellol, thymol 처리 군에서는 오히려 감소했다가 배양5일에 각각 11.72%, 17.19%로 증가하였으나 대조 군에 비하여 현저히 낮은 함성율을 나타내었다. 배양 7일에 대조 군에서는 총 지방의 함량이 4.17 ± 0.41 mg/g (wet cell)으로 배양 5일보다 87.00% 증가했다. 반면 배양 7일째 citronellol 또는 thymol 처리 군의 총 지방 함량은 각각 대조 군의 32.85%, 41.97%에 해당하는 양으로 현저한 총 지방의 함성 저해 현상이 나타났다. 한편 ketoconazole 처리 군은 배양 7일에서 총 지방함량은 대조 군의 41.97(%)에 해당하는 양으로 총 지방 함성이 억제되었음을 알 수 있었다.

인지질의 함량변화 - Citronellol 또는 thymol을 처리하여 배양 후 추출된 인지질에서 분리된 phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI)의 함량 변화에 대한 결과는 Table I에 나타낸 바와 같다. PC의 함량은 배양기간 동안 대조 군에서는 배양 시작일 (day 0)에 wet cell 기준 0.339 mg/g에서 배양 7일에 1.025 mg/g wet cell로 완만하게 증가된 반면 citronellol 및

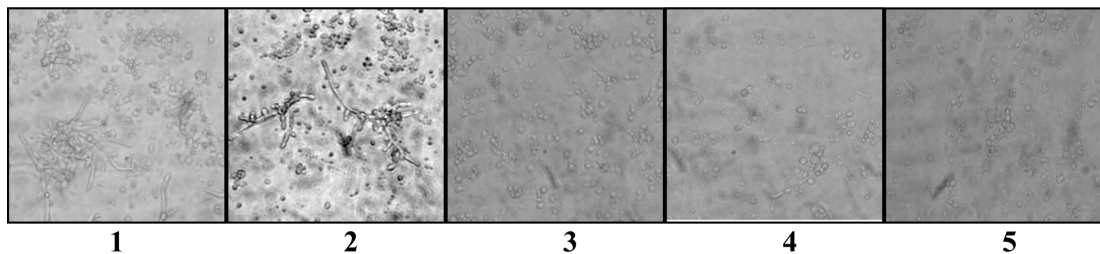


Fig. 1. Hyphal formation of C. albicans treated with ethanol (20 µg/ml, 1), tween 80 (2), citronellol (1 mg/ml, 3), geraniol (0.5 mg/ml, 4) and ketoconazole (16 µg/ml, 5).

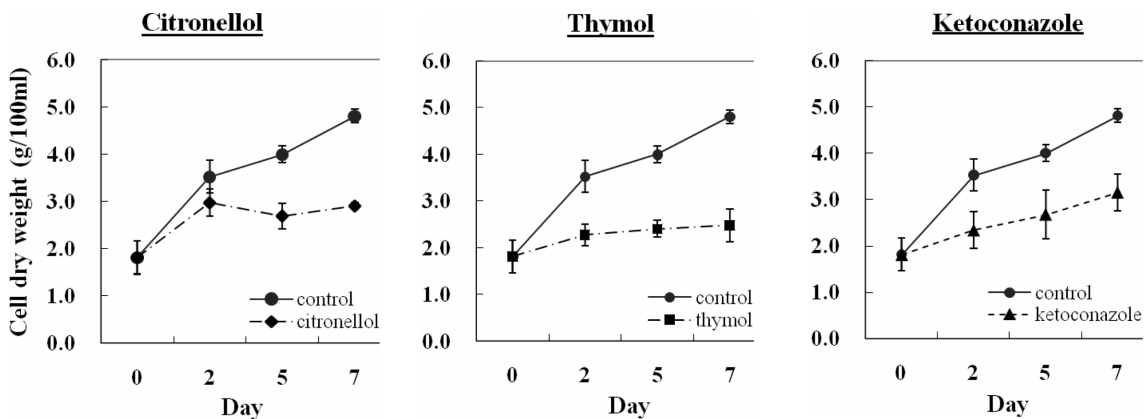


Fig. 2. The effect of citronellol (1 mg/ml), thymol (1 mg/ml) and ketoconazole (16 µg/ml) on growth of C. albicans.

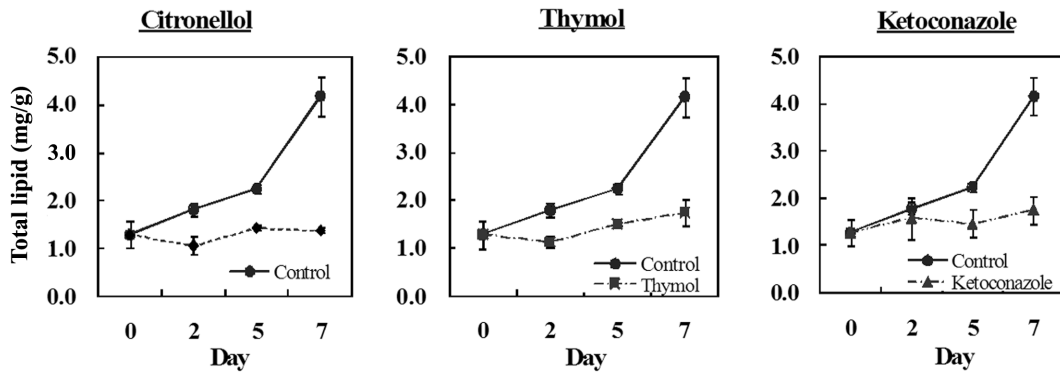


Fig. 3. Changes in the amounts of total lipid (mg/g cell) in *C. albicans* treated with citronellol (1 mg/ml), thymol (1 mg/ml) and ketoconazole (16 µg/ml) during the culture.

Table I. The amounts of each phospholipid (mg/g) in *C. albicans* treated with citronellol (1 mg/ml), thymol (0.5 mg/ml) and ketoconazole (16 µg/ml) during the culture.

Day	Control	Citronellol	Thymol	Ketoconazole
A. Phosphatidylcholine				
0	0.339 ± 0.022	0.339 ± 0.022	0.339 ± 0.022	0.339 ± 0.022
2	0.488 ± 0.019	0.366 ± 0.048	0.366 ± 0.003	0.354 ± 0.110
5	0.776 ± 0.063	0.443 ± 0.000	0.475 ± 0.051	0.341 ± 0.097
7	1.025 ± 0.121	0.449 ± 0.003	0.522 ± 0.105	0.294 ± 0.050
B. Phosphatidylethanolamine				
0	0.276 ± 0.010	0.226 ± 0.010	0.276 ± 0.010	0.277 ± 0.010
2	0.330 ± 0.008	0.252 ± 0.018	0.268 ± 0.026	0.295 ± 0.177
5	0.419 ± 0.012	0.316 ± 0.083	0.331 ± 0.045	0.308 ± 0.076
7	0.708 ± 0.084	0.322 ± 0.045	0.386 ± 0.049	0.257 ± 0.020
C. Phosphatidylinositol				
0	0.107 ± 0.035	0.107 ± 0.035	0.107 ± 0.035	0.107 ± 0.035
2	0.119 ± 0.002	0.094 ± 0.024	0.106 ± 0.016	0.110 ± 0.035
5	0.161 ± 0.017	0.103 ± 0.017	0.117 ± 0.050	0.108 ± 0.039
7	0.196 ± 0.010	0.105 ± 0.009	0.147 ± 0.007	0.103 ± 0.037

The results are given as mean±SD (n=3).

thymol 처리군은 변화가 거의 없다가 배양 7일의 함량이 각각 0.449 mg/g, 0.522 mg/g으로 대조 군에 비해 이들 시료에 의하여 PC합성이 현저히 억제되었음을 알 수 있었다. PE의 함량에서도 변화를 나타내었는데 대조 군은 배양기간 동안 완만하게 증가되었고 citronellol 또는 thymol 처리 군의 함량이 배양 7일에 각각 0.322 mg/g (wet cell), 0.386 mg/g (wet cell)로 대조 군에 비하여 현저한 억제현상이 나타나 PE의 합성에도 이들 시료의 영향이 관찰되었다. 배양기간 동안 PI의 함량은 대조 군과 citronellol 또는 thymol 처리군 모두 배양 초기에 합성된 함량과 별다른 변화가 없었으나 대조 군은 적은 양이나마 완만하게 증가되었으나 citronellol 또는 thymol 처리 군은 거의 변화가 없었으며 배양 7일의

함량이 대조 군에 비하여 현저한 억제현상이 나타나 PI역시 이들 시료에 의하여 합성이 억제됨을 알 수 있었다.

인지질의 지방산 조성 - Citronellol 또는 thymol 처리 군의 PC, PE, PI의 지방산 조성 및 합성 변화를 대조 군과 비교하여 Table II- VI에 각각 나타내었다. *C. albicans* 세포로부터 추출된 인지질의 주요 지방산은 대조 군과 citronellol, thymol 처리군 모두에서 palmitic acid, stearic acid, oleic acid 및 linoleic acid인 것으로 확인되었다. 그러나 각 지방산의 함량과 조성은 배양 기간과 첨가 시료에 따라 다양성을 나타내었다.

Table II에 정리된 바와 같이, PC의 지방산 조성은 대조 군에서는 배양 초기에 palmitic acid 32.41%, oleic acid

Table II. The composition of fatty acids in phosphatidylcholine (PC) of *C. albicans*

Fatty acid	Duration of culture (days)			
	0	2	5	7
A. Control				
Palmitic acid	32.41 ± 0.98	49.50 ± 0.36	32.49 ± 0.15	30.62 ± 0.08
Stearic acid	6.15 ± 1.24	12.84 ± 1.07	22.60 ± 0.18	21.85 ± 0.01
Oleic acid	41.66 ± 0.24	16.66 ± 0.15	34.19 ± 1.82	25.60 ± 0.12
Linoleic acid	12.02 ± 0.76	3.83 ± 0.16	1.29 ± 0.55	2.70 ± 0.11
B. Citronellol				
Palmitic acid	32.41 ± 0.98	41.51 ± 0.89	54.44 ± 0.52	43.70 ± 0.59
Stearic acid	6.15 ± 1.24	25.43 ± 0.37	19.04 ± 0.29	9.55 ± 0.02
Oleic acid	41.66 ± 0.24	29.02 ± 0.47	12.27 ± 0.18	32.43 ± 0.69
Linoleic acid	12.02 ± 0.76	1.07 ± 0.36	1.31 ± 0.22	1.52 ± 0.23
C. Thymol				
Palmitic acid	32.41 ± 0.98	39.21 ± 0.15	47.74 ± 0.05	32.08 ± 0.47
Stearic acid	6.15 ± 1.24	11.84 ± 0.28	22.09 ± 2.15	23.30 ± 0.19
Oleic acid	41.66 ± 0.24	24.19 ± 1.07	17.78 ± 0.23	25.85 ± 0.10
Linoleic acid	12.02 ± 0.76	1.42 ± 0.88	1.18 ± 0.14	1.81 ± 0.41
D. Ketoconazole				
Palmitic acid	32.41 ± 0.98	46.55 ± 0.47	56.96 ± 0.08	41.18 ± 0.39
Stearic acid	6.15 ± 1.24	11.63 ± 0.14	18.31 ± 0.13	5.06 ± 0.19
Oleic acid	41.66 ± 0.24	28.49 ± 0.52	23.21 ± 0.36	21.90 ± 0.49
Linoleic acid	12.02 ± 0.76	1.19 ± 0.08	1.31 ± 0.12	1.35 ± 0.24

Unit: mg/100 mg total fatty acid methyl ester of PC
The results are given as mean±SD (n=3).

Table III. The composition of fatty acid in phosphatidylethanolamine (PE) of *C. albicans*

Fatty acid	Duration of culture (days)			
	0	2	5	7
A. Control				
Palmitic acid	47.47 ± 8.50	42.95 ± 1.17	40.20 ± 10.99	37.54 ± 3.32
Stearic acid	14.42 ± 3.06	25.76 ± 3.51	22.33 ± 1.51	14.14 ± 1.17
Oleic acid	36.72 ± 0.23	12.39 ± 0.81	17.33 ± 3.96	24.00 ± 3.39
Linoleic acid	1.09 ± 0.04	2.07 ± 0.41	2.07 ± 0.18	6.50 ± 0.50
B. Citronellol				
Palmitic acid	47.47 ± 8.50	50.85 ± 3.25	47.19 ± 3.96	51.03 ± 3.98
Stearic acid	14.42 ± 3.06	10.78 ± 2.62	32.91 ± 3.26	6.50 ± 1.70
Oleic acid	36.72 ± 0.23	13.23 ± 4.00	13.85 ± 3.64	23.53 ± 4.67
Linoleic acid	1.09 ± 0.04	2.17 ± 1.32	4.95 ± 1.40	13.84 ± 5.04
C. Thymol				
Palmitic acid	47.47 ± 8.50	64.88 ± 6.47	46.01 ± 3.08	31.99 ± 1.13
Stearic acid	14.42 ± 3.06	24.77 ± 4.53	29.10 ± 0.56	18.28 ± 1.20
Oleic acid	36.72 ± 0.23	6.08 ± 1.30	9.73 ± 2.54	26.53 ± 7.82
Linoleic acid	1.09 ± 0.04	2.01 ± 1.04	1.24 ± 0.15	1.66 ± 0.29
D. Ketoconazole				
Palmitic acid	47.47 ± 8.50	53.23 ± 1.80	59.36 ± 1.83	30.46 ± 9.06
Stearic acid	14.42 ± 3.06	27.20 ± 2.30	15.74 ± 3.77	5.33 ± 3.28
Oleic acid	36.72 ± 0.23	16.33 ± 2.08	21.91 ± 0.67	27.30 ± 1.59
Linoleic acid	1.09 ± 0.04	1.36 ± 0.39	1.09 ± 0.10	7.28 ± 1.74

Unit: mg/100 mg total fatty acid methyl ester of PE.
The results are given as mean±SD (n=3).

Table IV. The composition of fatty acid of phosphatidylinositol (PI) in *C. albicans*

Fatty acid methyl ester	Duration of culture (days)			
	0	2	5	7
A. Control				
Palmitic acid	61.31 ± 36.08	59.22 ± 4.66	59.41 ± 7.13	65.21 ± 5.48
Stearic acid	25.17 ± 14.01	24.16 ± 3.17	19.81 ± 5.73	20.75 ± 1.34
Oleic acid	4.42 ± 0.75	11.00 ± 1.40	13.14 ± 3.37	10.90 ± 0.43
Linoleic acid	1.01 ± 0.07	4.66 ± 1.88	3.31 ± 0.30	2.65 ± 0.46
B. Citronellol				
Palmitic acid	61.31 ± 36.08	61.80 ± 2.97	66.19 ± 4.87	72.34 ± 5.57
Stearic acid	25.17 ± 14.01	22.95 ± 3.60	10.00 ± 1.17	18.96 ± 5.15
Oleic acid	4.42 ± 0.75	12.39 ± 1.71	7.98 ± 2.48	1.85 ± 0.21
Linoleic acid	1.01 ± 0.07	2.08 ± 1.81	1.43 ± 0.28	1.12 ± 0.40
C. Thymol				
Palmitic acid	61.31 ± 36.08	65.27 ± 5.76	59.48 ± 1.20	63.35 ± 47.24
Stearic acid	25.17 ± 14.01	25.51 ± 2.51	28.34 ± 1.26	27.46 ± 2.45
Oleic acid	4.42 ± 0.75	8.26 ± 3.32	10.63 ± 1.89	5.85 ± 0.57
Linoleic acid	1.01 ± 0.07	0.69 ± 0.30	1.01 ± 0.29	1.34 ± 0.54
D. Ketoconazole				
Palmitic acid	61.31 ± 36.08	65.24 ± 15.17	58.16 ± 5.63	60.71 ± 20.50
Stearic acid	25.17 ± 14.01	27.60 ± 7.43	20.54 ± 1.32	24.57 ± 6.80
Oleic acid	4.42 ± 0.75	2.40 ± 0.94	10.80 ± 1.53	10.54 ± 2.63
Linoleic acid	1.01 ± 0.07	1.10 ± 0.20	2.84 ± 0.87	1.70 ± 0.48

Unit: mg/100 mg total fatty acid methyl ester of PI.
The results are given as mean±SD (n=3).

41.66%, linoleic acid 12.02%가 주요 구성 지방산이었으나 배양 2일에는 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 각각 49.50%, 12.84%로 0일보다 증가된 것으로 보아 이들 두 지방산이 인지질 합성에 도입이 되었으며, 배양 5일에는 stearic acid와 oleic acid의 함량이 각각 32.49%, 34.19%로 배양 2일보다 증가된 것으로 보아 이들 이 인지질 구조 합성에 이용되어 배양 시기에 따른 지방산 조성이 다르게 나타났다. Citronellol, thymol 처리 군에서도 역시 배양시기에 따라 다르게 나타났는데 배양 2일의 palmitic acid, stearic acid의 이용율이 높아졌으며 5일에는 palmitic acid의 이용율이 대조 군보다 높은 반면, oleic acid는 대조 군보다 적게 이용되었다. 이와 같이 배양 2일과 5일에는 이용된 주요 지방산이 대조 군과 처리 군에서 각각 다른 조성 비율을 나타냈으며 배양초기와 말기에 조성비율도 다소 차이가 있었다. 배양초기에 이용되었던 linoleic acid 함량은 배양 2일부터 배양기간이 경과할수록 감소함으로써 이용되지 않은 것으로 나타났다.

Table III에 정리된 바와 같이 PE의 지방산 조성은 배양 초기에 palmitic acid 47.47%와 oleic acid 36.72%가 주요

지방산이었는데 배양 2일에는 stearic acid의 이용율이 증가되어 지방산 조성의 변화를 나타냈다. 배양 7일에는 linoleic acid의 이용율이 증가되고 oleic acid 함량도 배양 5일보다 증가함으로써 palmitic acid 37.54%, stearic acid 14.14%, oleic acid 24.00%, linoleic acid 6.50%로 조성이 다양하게 관찰되었다. 한편 citronellol 처리 군에서 배양 2일의 지방산 조성을 살펴보면 대조 군에 비해 palmitic acid는 증가하고, stearic acid의 비율이 낮아져, 인지질 구조합성에 이용된 지방산이 다르게 관찰되었으며, 7일에는 stearic acid가 감소하고, linoleic acid는 증가하여 역시 주요 지방산 조성이 다르게 나타났다. Thymol 처리군에서는 배양 2일 palmitic acid의 비율은 증가하고 oleic acid는 감소하였고, 배양 7일 linoleic acid의 비율은 대조 군에 비해 감소하였다.

Table IV에 정리된 바와 같이, PI의 주 지방산은 palmitic acid와 stearic acid로 확인 되었고, 7일의 전 배양기간에 걸쳐, 특히 palmitic acid는 대조 군에서 59.22-65.21%, 처리 군에서 58.16-72.34%로 다른 지방산에 비해 조성비가 현저하게 높았으며, citronellol 처리에 의하여는 증가하였고, thymol 과 ketoconazole 처리 시에는 감소하였다. Stearic

acid는 처리 군과 대조 군에서 비슷한 조성비를 나타냈다. Oleic acid는 대조 군과 citronellol 처리 군에서 배양 2일에 함량이 크게 증가하였으나 반면 thymol 처리 군에서는 오히려 감소하였다.

이상의 결과를 종합하면, 본 논문에서는 정유성분의 항 *Candida* 작용기전을 규명하기 위하여, 정유성분 중 대표적인 항 진균 성분에 속하는 citronellol과 thymol이 균 세포막에 미치는 영향을 실험한 결과, 이들이 *C. albicans*의 균사 형성과 인지질 합성을 억제하고 지방산 조성을 변화시킴을 확인하였다. 또한 비교물질로 사용한 ketoconazole는 진균 세포막의 ergosterol 생합성 저해가 주 작용기전인 것으로 알려져 있으나, 본 실험 결과, 인지질의 종류에 따라 예외는 있지만, 전반적으로 균 세포막의 지방산 조성에도 현저한 영향을 미침을 알 수 있었다. Citronellol과 thymol은 실험 결과는 인지질과 지방산 종류에 따라 결과가 다른 경우가 있어서, 세포막조성에 미치는 영향이 완전히 같다고 볼 수는 없지만, 구성에 변화를 가져온다는 사실은 확인할 수 있었다.

인용문헌

- Begnami, A. F., Duarte, M. C. T., Furletti, V. and Rehder, V.L.G. (2010) Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species in vitro. *Food Chem.* **118**: 74-77.
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., and Salgueiro, L. (2009) Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* **58**: 1454-1462.
- Rosato, A., Vitali, C., Piarulli, M., Mazzotta, M., Argentieri, M. P. and Mallamaci, R. (2009) In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytotherapy* **16**: 972-975.
- Pannu, J., McCarthy, A., Martin, A., Hamouda, T., Ciotti, S., Fothergill, A. and Sutcliffe, J. (2009) NB-002, a novel nanoemulsion with broad antifungal activity against dermatophytes, other filamentous fungi, and *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3273-3279.
- Sim, Y. and Shin, S. (2008) Combinatorial anti-*Trichophyton* effects of *Ligusticum chuanxiong* essential oil components with antibiotics. *Arch. Pharm. Res.* **31**: 497-502.
- Lim, S. and Shin, S. (2008) Combined effects of the essential oil from *Eucalyptus globules* with ketoconazole against *Candida* and *Trichophyton* species. *Nat. Prod. Sci.* **14**: 27-31.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G. S., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G. and Bisignano G. (2005) Mechanism of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2474-2478.
- Imai, H., Osawa, K., Yasuda, H., Hamashima, H., Arai, T. and Sasatsu, M. (2001) Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. *Microbes* **106**: 31-39.
- Nidiry, E. S. (1998) Structure-fungitoxicity relationships of the monoterpenoids of the essential oils of Peppermint (*Mentha piperita*) and scented geranium (*Pelargonium graveolens*). *J. Essent. Oil Res.* **10**: 628-632.
- Scholar, M. E. and Pratt, W. B. (2000) The antimicrobial drugs. 348, Oxford University Press, New York.
- Fan, X., Biskobing, D. M., Bain, S. and Rubin, J. (1996) Ketoconazole and phorbol myristate acetate regulate osteoclast precursor fusion in primary murine marrow culture. *J. Bone Miner Res.* **11**: 1274-1280.
- Barug, D., Bastiaanse, H. B., van Rossum, J. M. and Kerkenaar, A. (1986) Action of lornazole, and inhibitor of fungal ergosterol biosynthesis, on *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**: 238-244.
- Cao, Y. Y., Cao, Y. B., Xu, Z., Ying, K., Li, Y., Xie, Y., Zhu, Z. Y., Chen, W. S. and Jiang, Y. Y. (2005) cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 584-589.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessiere, J. M. and Viano, J. (2003) Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7115-7121.
- Prabhu, S., Fackett, A., Lloyd, S., McClellan, H. A., Terrell, C. M., Silber, P. M. and Li, A. P. (2002) Identification of glutathione conjugates of troglitazone in human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* **142**: 83-97.
- Ansari, S. and Prasad, R. (1993) Effect of miconazole on the structure and function of plasma membrane of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**: 93-98.
- Arroyo-Flores, B. L., Calvo-Mendez, C., Flores-Carreón, A. and Lopez-Romero, E. (2005) Biosynthesis of glycoproteins in the pathogenic fungus *Candida albicans*: activation of dolichol phosphate mannose synthase by cAMP-mediated protein phosphorylation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **45**: 429-434.
- Leighton, J. K., Dueland, S., Straka, M. S., Trawick, J. and Davis, R. A. (1991) Activation of the silent endogenous cholesterol-7-alpha-hydroxylase gene in rat hepatoma cells: a new complementation group having resistance to 25-hydroxycholesterol. *Mol Cell Biol.* **11**: 2049-2056.
- Heyken, W. T., Wagner, C., Wittmann, J., Albrecht, A., and Schuller, H. J. (2003) Negative regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by a *Candida albicans* orthologue of OPI1. *Yeast* **20**: 1177-1188.
- Klig, L. S., Antonsson, B., Schmid, E. and Friedli, L. (1991) Inositol biosynthesis: *Candida albicans* and *Saccharomyces*

- cerevisiae* genes share common regulation. *Yeast*, **7**: 325-336.
21. Lee, C. and Ju, Y. R. (1992) A study on the biosynthesis of phospholipid and fatty acid composition in the *Candida albicans* treated with antifungal agent, clotrimazole, during the culture. *J. Basic Sci.* **9**: 87-99.
22. Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. and Latge, J. P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyl-transferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**: 14882-14889.
23. Dhillon, N. K., Sharma, S. and Khuller, G. K. (2003) Influence of W-7, a calmodulin antagonist on phospholipid biosynthesis in *Candida albicans*. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**: 382-386.
24. 김영권 외 (2000) 이론과 실제 임상진균학, 39. 고려의학, 서울.
25. Choi, S.H., Lim, S. and Shin, S. (2007) Combined effects of the essential oil from *Pelargonium graveolens* with antibiotics against *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Prod. Sci.* **13**: 342-346.

(2009년 11월 28일 접수)