유칼립투스 정유와 Eucapytol의 *Candida albicans*에 대한 항 진균 효과

고려대학교 의과대학 미생물학교실

성 인 화

=Abstract=

Antifungal Activity of the Essential oil from Eucalyptus and Eucapytol against *Candida albicans*

Inwha Seong

Department of Microbiology, College of Medicine, Korea University

Background: *Candida albicans* is a member of the normal flora of the skin, mucous membranes and gastrointestinal tract. Vaginal candidiasis remains a significant problem in women of childbearing age, majority of the cases are caused by *C. albicans* and recurrence is common in spite of topical treatment.

Objective: The purpose of this study was to develop the antifungal agent from the medicinal herbs traditionally used in Korea.

Method: In this study, the essential oil of eucalyptus, cedar wood, clary sage, orange sweet and eucapytol were examined for antifungal activities against *C. albicans*.

Results:

1. Eucalyptus essential oil and eucapytol showed antifungal activity against *C. albicans*.
2. Minimal inhibitory concentration (MIC) of Eucapytol against eight strains and standard strains was 12.5 µl/ml and 6.25 µl/ml against two strains.
3. MIC of eucapytol was 25 µl/ml against eight strains and 50 µl/ml against two.

Conclusion: Eucalyptus essential oil and eucalytol could be a candidate for a new antifungal agent for candidiasis and other fungal diseases. **[Kor J Med Mycol 2009; 14(3): 127-132]**

Key Words: Eucalyptus oil, Eucapytol, Antifungal activity, *Candida albicans*

서 론

항생제는 1940년대 초기부터 널리 사용되기 시작되었지만 첫 항진균제로 1949년에 등장한 nystatin은 *Streptomyces noursei*에서 분리되었고 독성이 상당히 강하여 경구적으로 전신 진균증의 치료에 사용되지 못하고 피부 점막에 발생하는 진균증에 사용되었다. 그 이후 polyene계 항진균제로 amphotericin, flavadin, trichomycin, candicidin, tolnaftate 등의 항진균제들이 개발되었고 경구투여가 가능한 griseofulvin이 개발되었다. 근래에 와서는 새로운 항 진균제로 독성이 비교적 적고 항진균력이 우수한 azole계 항진균제들로 clotrimazole, miconazole, ketoconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole 등이 있다[1,2]. Terbinafine은 독성이 비교적 적은 항진균제로 알려져 현재까지 여러 가지 진균 질환 치료에 사용되고 있다[3~8].

†별책 요청 저자: 성인화, 136-701 서울시 성북구 안암동 5가 1번지, 고려대학교 의과대학 미생물학교실
전화: (02) 920-6167, Fax: (02) 923-3645
e-mail: inwha@korea.ac.kr

국외에서는 식물에서 항균, 항바이러스 및 항 진균 활성을 나타내는 물질을 분리해내고자 하는 연구들이 활발하게 진행되어 왔으나 국내에서는 이에 대한 연구가 활발하지 못한 실정이다.

본 연구는 식물에서 추출한 정유들의 항 진균 활성 보유 여부를 밝혀내기 위한 연구의 일환으로 외국에서는 물론 우리나라에서 현재까지 사용되어 온 정유 중 eucalyptus, cedar wood, clary sage와 orange sweet의 정유가 항 진균 활성을 보유하고 있는지 특히 가임기의 여성들에게 흔하게 올 수 있는 진균 질환인 재발성 질 캔디다증 환자에서 분리한 *Candida albicans*에 대하여 항 진균 활성이 있는지 여부를 규명하기 위하여 시행되었다.

재료 및 방법

1. 실험재료

정유들은 서울에 있는 숍 플러스 회사에서 구입하였는데 eucalyptus 정유는 중국산이었고, clary sage는 불가리아 산이고 cedar wood와 orange sweet는 미국 산이었다. Eucalyptus 정유의 주성분으로 알려진 eucaputol은 Sigms에서 구입하였다.

2. 항 진균 활성 검사

1) 배지

Sabouraud's dextrose agar와 broth를 사용하였다.

2) 균주

재발성 질 캔디다증 환자들에서 분리된 *C. albicans* 중 10주와 *C. albicans* 표준균주 (ATCC 10231)를 사용하였다.

3) 항 진균 활성검사와 Minimum inhibitory concentration (MIC) 결정

디스크 확산법을 사용하였는데 그 이유는 정유의 희석에 사용한 용매인 n-hexane, 그 자체 항균성이 있어 일반적인 방법인 tube dilution 방법이나 agar dilution 방법으로 할 수 없기 때문이었다.

정유들과 eucapytol을 n-hexane으로 2배 계단 희석한 용액 20 μl를 직경 6 mm의 여과지 (Advantec N0. 26) 디스크에 가하고 음압에서 건조시켜 용매를 제거한 디스크들을 사용하였다. 균들은 Sabouraud broth에 부유하여 37℃ 배양기에 24시간 배양한 후 Saborauud's dextrose agar에 다시 배양한 다음 각 균의 집락을 하나씩 broth에 넣어 배양하고 농도를 McFarland standard

Table 1. Antifungal Activities of essential oils against *C. albicans*

Microorganism	Growth Inhibition / Essential oil			
	Eucalyptus	Cedar Wood	Clary Sage	Orange Sweet
C. albicans-1	+	−	−	−
C. albicans-2	+	−	−	−
C. albicans-3	+	−	−	−
C. albicans-4	+	−	−	−
C. albicans-5	+	−	−	−
C. albicans-6	+	−	−	−
C. albicans-7	+	−	−	−
C. albicans-8	+	−	−	−
C. albicans-9	+	−	−	−
C. albicans-10	+	−	−	−
*C. albicans**	+	−	−	−

*: Standard strain

Table 2. Minimal inhibitory concentration of eucalyptus essebtial oil against *C. albicans*

Microorganism	Growth Inhibition / μl / ml				
	100	50	25	12.5	6.25
C. albicans-1	+	+	+	+	−
C. albicans-2	+	+	+	+	−
C. albicans-3	+	+	+	−	−
C. albicans-4	+	+	+	+	−
C. albicans-5	+	+	+	−	−
C. albicans-6	+	+	+	+	−
C. albicans-7	+	+	+	+	−
C. albicans-8	+	+	+	+	−
C. albicans-9	+	+	+	+	−
C. albicans-10	+	+	+	+	−
*C. albicans**	+	+	+	+	−

*: Standard strain

Table 3. Antifungal activity of eucalyptol against *Candida albicans*

Microorganism	Growth inhibition / μl / ml				
	100	50	25	12.5	6.25
C. albicans-1	+	+	+	−	−
C. albicans-2	+	+	+	−	−
C. albicans-3	+	+	−	−	−
C. albicans-4	+	+	+	−	−
C. albicans-5	+	+	−	−	−
C. albicans-6	+	+	−	−	−
C. albicans-7	+	+	+	−	−
C. albicans-8	+	+	+	−	−
C. albicans-9	+	+	−	−	−
C. albicans-10	+	+	+	−	−
*C. albicans**	+	+	+	−	−

*: Standard strain

0.5에 맞춘 균부유액 0.1 ml를 agar 표면에 도말한 다음 디스크들을 올려놓고 37도에서 48시간 방치한 후 형성된 성장억지대의 직경을 측정하였다.

결 과

1. 각 정유들의 항 진균 활성

Eucalyptus, cedar wood, clary sage와 orange sweet 정유의 항균효과을 검사한 결과 eucalyptus 정유만이 *C. albicans* 10주와 표준균주에 대하여 항진균 효과을 나타내었고 cedar wood, clary sage와 orange sweet 정유는 원액에서도 항 진균 효과가 없었다 (Table 1).

2. Eucalyptus 정유의 MIC

Eucalyptus 정유의 MIC를 측정한 결과 8주와 표준균주의 MIC는 12.5 μl/ml이었고 2주의 MIC는 25 μl/ml이었다 (Table 2).

고 찰

세균 감염 질환을 치료하는데 사용되어온 항생제들은 다양하고 종류들이 많지만 진균들은 세균들과 많은 차이가 있어 세균처럼 진균에게만 선택 독성을 나타내는 항진균제들이 많지 않고 현재까지 개발되어 사용되고 있는 항진균제들도 대부분 한 가지 이상의 한계성을 가지고 있는데 심한 부작용, 좁은 항 진균 스펙트럼, 일부 조직에의 낮은 침투성, 내성 등이며 상당한 수준의 독성을 나타내므로 간 기능 검사 등 여러 가지 검사를 하면서 조심스럽게 사용되고 있다. 진균들은 사람 세포와 같이 진정 핵 세포로 되어있어 세포 수준과 분자 수준에서의 수많은 상동성이 있기 때문에 진균에 대해서만 선택 독성을 가진 항진균제의 개발이 쉽지 않다. 항진균제는 1970년대 azole 계의 ketoconazole이 개발되면서 획기적인 발전을 이루었고 계속해서 clotromazole, econazole, miconazole 등 imidazole계의 항진균제의 개발에 이어 triazole계의 fluconazole, itraconazole, terconazole, voriconazole 등의 약들이 개발되

었다[1,2]. 최근에는 allylamine계에 속하는 terbinafine이 등장하여 독성이 거의 없다고 알려져 여러 가지 진균 질환의 치료에 널리 사용되고 있으나 오심, 설사, 복통, 미후각 장애, 현훈, 간 기능 장애, 백혈구 수 감소, 피부에 색소침착, 전신성 발진, 급성 간염 등 여러 가지 부작용이 보고되었다[3~7].

세계보건기구는 개발도상국에 살고 있는 사람의 80%가 전통의학에 의지하고 있다고 추산하였으며 그 대부분이 오래 전부터 효과가 있다고 알려진 식물들을 사용하는 것이라고 하였다[8].

식물에서 항균 활성이 있는 물질을 추출해 내고자 하는 연구는 전 세계적으로 오래 전부터 진행되어 왔으며 수많은 식물들이 특히 항균, 항진균 활성이 있는 물질을 생산하고 있음을 규명하였고 지금 그러한 연구는 활발하게 진행되고 있으나 국내에서는 이에 대한 연구가 활발하지 못하다[9~21].

유카립투스는 특히 호주에 자생하고 있는 나무로 가까운 주위 뉴기니와 인도네시아와 멀리는 필리핀에 극히 소수만이 자라고 있고 몇 종류들은 미국 영국, 아프리카, 지중해 유역, 중앙아시아, 중국 및 인도 아대륙에서 재배되고 있다.

나뭇잎에서 추출한 정유는 강력한 항균 작용이 있는 성분들이 있고 대량에서는 독작용이 있다고 알려졌으나 코알라 같은 유대동물들은 내성을 가지고 있다.

유칼립투스 정유는 잎을 증류하여 얻는데 세척, 악취 제거에 사용되었고 소량이 음식물 첨가제 특히 과자, 기침약과 충혈제거에 사용되었으며 모기 같은 해충퇴치제의 성분으로 사용되었다. 대장균과 슈도모나스에 대한 항균 활성이 있음이 보고되었고[22], Fusarium에 대한 항균 효과가 있고[23,24], 피부의 표재성 진균 감염의 원인진균인 *Epidermophyton*, *Microsporum*과 *Trichophyton*에 대해 항 진균 효과가 있음이 보고되었으나[25], 캔디다에 대한 연구는 찾아 볼 수 없었다.

본 연구에서 유칼립투스 정유는 *C. albicans*에 데하여 상당한 항 진균 효과를 가지고 있음을 알 수 있었고 정유의 주된 성분인 eucapytol이 정유보다 MIC가 높았는데 그 이유는 알 수 없었다. 유칼립투스내의 정유의 함량은 유칼립투스의 종류에 따라 다르나 70~80% 정도로 알려졌으며[26] eucapytol은 cineol, cineole, 1,8-cineole, limonene oxide caieputo, 1,8-epoxy-menthane, 1,8-epoxy-p-menthane 등 많은 별칭을 가지고 있고[27] 항 진균 효과 뿐만 아니라 머리에 기생하는 이를 죽일 수 있는 효과가 있으며[28] 급성 비화농성 비부비동염의 치료에 사용되었다[29].

결 론

Eucalyptus, cedar wood, clary sage, orange sweet의 정유와 eucapytol의 *C. albicans*에 대한 항 진균 활성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Eucapytus 정유와 eucapytol만이 *C. albicans*에 대한 항 진균 효과가 있었다 (Table 1).
2. Eucapytus 정유의 MIC는 *C. albicans* 8주와 표준균주가 12.5 μl/ml이었고, 2주는 2 μl/ml이었다 (Table 2).
3. Eucapytol의 MIC는 *C. albicans* 6주와 표준균주가 25 μl/ml, 4주는 50 μl/ml이었다 (Table 3).
4. Eucapytus 정유와 eucalytol은 candidiasis를 비롯한 진균 질환의 치료제로 개발이 가능할 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. Smith EB. History of antifungals. J Am Acad Dermatol 1990; 23: 776-778
2. Herbrecht R, Nivoix Y, Fohrer C, Natarajan-Ame. Management of systemic fungal infections: alternatives to itraconazole. J Antimicrobial Chemotherapy 2005; 56(Suppl. S1): i139-i148.
3. Gupta AK, Sibbald RG, Knowels SR, et al. Terbinafine therapy may be associated with the development of psoriasis de novo or its exacerbation; four case reports and a review of drug-induced

psoriais. J Am Acad Deramtol 1997; 36: 858-862
4. Wach F, Stolz W, Hein R, et al. Severe erythema anulare centrifugum-like psoriatic drug eruption induced by terbinafine. Arch Dermatol 1995; 131: 960-961
5. Gupta AK, Kopstein JB, Shear NH. Hypersensitivity reaction to terbinafine. J Am Acad Dermatol 1997; 36: 1018-1019
6. Duoin N, Gorin L, Djien V, et al. Acute generalized erythematous pustulosis induced by terbinafine. Arch Dermatol 1996; 132: 123-1254
7. Bennet ML, Jorizzo JL, White WL. General pustular eruptions associated with oral terbinafine Int J Dermatol 1999; 38: 596-600
8. Vivas S, Rodriguez M, Palacid MA, et al. Acute hepatitis associated with terbinafine. Gastroenterol Hepatol 1997; 20: 456-458
9. Cox PA. The ethnobotanical approach to drug discovery: Strengths and limitations, pp25-41 *In*: G.T. Prance. Ethnobotany and the search for new drugs. Wiley; Chichester (Ciba Foundation Symposium 185), 1994: 25-41
10. Grayer RJ, Harborne JB. Review article No. 92. A survey of antifungal compounds from higher plants. Phytochem 1994; 37: 19-42
11. Ozcan MM, Chalchat JC, Arslan D, Ates A, Unver A. Comparative essential composition and antifungal effect of bitter fennel (Foenieum vulgare ssp. piperitum) fruit oils obtained during different vegetation. J Med Food 2006; 9(4): 552-561
12. Mimica-Dukic N, Kujundzic S, Sokovic M, Couladis M. Essential oil composition antifungal activity of Foeniculum vulgare mill obtained by different conditions. Phytother Res 2003; 17(4): 368-371
13. Ken-ichi Fujita, Tomoko Fujita, Isao Kubo. Anethole, a potent antimicrobial synergist, converts a fungistatic dodecanol to a fungicidal agent. Phytother Res 2007; 1: 47-50
14. Adetumbi MA, Lau BH. Allium sativum (garlic)--a natural antibiotic. Med Hypothesis 1983; 12(3): 227 -237
15. Shahi SK, Shukla AC, Bajal AK, Banerjee U, Rimek D, Midgely G, Dikshit A. Broad spectrum herbal therapy against superficial fungal infections, Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2000; 13(1): 60-64
16. Rai MK, Qureshi S, Pandey AK. In vitro susceptibility of opportunistic Fusarium spp. to essential oils. Mycoses 1999; 42(1-2): 97-101
17. Pattnaik S, Subramanyam VR, Kole C. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. Microbios 1996; 86: 237-246
18. Ramezani H. Fungicidal activity of volatile oil from eucalyptus Citriodora Hook. against Alternaria triticina. Commun Agric Appl Biol Sci 2006; 71(3): 909-914
19. Kim SJ, Park KY. Antimicrobial substances in Leek (Alliumtuberosum) Kor J Food Sci Technol 1996; 28(3): 604-608
20. Kumar M, Berwal JS. Sensitivity of food pathogens to garlic (Allium sativum) J Appl Microbiol 1998; 84(2): 213-215
21. Lee HY, Kim CK, Sung TK, Mun TK, Lim CJ. Antimicrobial activity of Ulmus pumila L. extract. Kor J Appl Microbiol Biotechnol 1996; 20(1): 1-5
22. Pattnaik S, Subramanyam VR, Rath CC. Effect of essential oils on the viability and morphology of Escheriachia coli (SP-11). Microbios 1998; 84(340): 195-199
23. Rai MK, Qureshi S, Pandey AK. Invitro susceptibility of opportunistic Fusarium spp. to esential oils. Mycoses 1999; 42(1-2): 97-101
24. Shahi SK, Shukia AC, Bajai AK, Banerjee U, Rimek D, Midgely G, Dikshit A. Broad spectrum herbal therapy against superficial fungal infections. Skin Pharmacol Physiol 2000; 13(1): 6064
25. Lopes-Lutz D, Alvino DS, Alvino CS, Kolodziejczyk PP. Screeing of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. Phytochemistry 2008; 69(8): 1732-1738
26. Maetha Windholz, Susa Budavari, Rosemary F. Blumetti, Elizabeth S. Otterbein The MerckIndex An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals.

3rd ed. Rahway. Merck & CO., Inc. 1983: 974

27. Boland DL, Brophy LL, APN House. *Eucalyptus Leafoils*. ISBN 09006-5-69-6. 1991: 6
28. Yang YC, Choi HY, Choi WS, Clark JM, Ahn YJ. Ovicidal and adulticidal activity of Eucalyptus globulus leaf oil terpenoids against Pediculus humanus capitis (Anoplura: Pediculidae). J Agric Food Chem 2004; 52(9): 2507-2511
29. Kehrl W, Sonnemann U, Dethlefsen U. Therapy for acute nonprulent rhinosinusitis with cineol; results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trials. Lsryngoscope 2004; 114: 738-742