



Journal of Korean Society of Dental Hygiene

Original Article **싸리버섯 추출물의 구강세균에 대한 항균활성**

김기화 · 한소라 · 김별이¹ · 정상희² · 오태진¹

선문대학교 일반대학원 생명공학과 · ¹선문대학교 건강보건대학 BT융합제약공학과 · ²강릉영동대학교 치위생과

Antimicrobial activities of *Ramaria botrytis* (Fr.) against oral bacteria

Ki-Hwa Kim · So-Ra Han · Byeol-Lee Kim¹ · Sang-Hee Jung² · Tae-Jin Oh¹

Received: 27 April 2017

Revised: 7 May 2017

Accepted: 30 May 2017

Department of Life Science and Biochemical Engineering, Graduate School, Sunmoon University

¹Department of BT-Convergent Pharmaceutical Engineering, Sunmoon University

²Department of Dental Hygiene, GangneungYeongdong University

Corresponding Author: Tae-Jin Oh, Department of BT-Convergent Pharmaceutical Engineering, Sunmoon University, 70 Sunmoonro 221, Tangeong-myeon, Asan-si, Chungnam 31460, Korea, Tel: +82-41-530-2677, Fax: +82-41-530-2918, E-mail: tjoh3782@sunmoon.ac.kr

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to find out the antimicrobial activities of *Ramaria botrytis* (Fr.) extracts against oral pathogens. **Methods:** The antimicrobial activities of *Ramaria botrytis* (Fr.) extracts were evaluated against oral pathogens by the disc diffusion assay, and the minimum inhibitory concentrations (MICs) of ethyl acetate extracts were determined by broth dilution method. The strains used in this study were *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus criceti*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces viscosus* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Results:** The ethyl acetate extract of *Ramaria botrytis* (Fr.) effectively inhibited the growth of oral bacteria compared with acetone or ethanol extract. The ethyl acetate extract exhibited MIC values ranging from 3.75 to 15.00 mg/ml, and it showed antimicrobial activity against both Gram-positive and negative oral bacteria. **Conclusions:** The ethyl acetate extracts from *Ramaria botrytis* (Fr.) showed the antimicrobial activities against ten oral bacteria. Thus, the extract of *Ramaria botrytis* (Fr.) may be considered as an effective natural antimicrobial agent for the prevention of oral pathogens.

Key Words: Antimicrobial activity, Growth inhibition, Minimum inhibitory concentration, Oral bacteria, *Ramaria botrytis*

색인: 구강세균, 생육저해, 싸리버섯, 최소저해농도, 항균활성

서론

현대사회가 발달함에 따라 삶의 질이 향상되었으며, 제품에 대한 성분을 꼼꼼하게 따지고 인체에 좀 더 안전한 것을 선호하는 소비자들이 증가하고 있다. 최근에는 제품에 대한 소재로 천연소재나 자연친화적 또는 친환경적인 소재 등에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다[1]. 특히, 인체의 일부분인

구강은 외부와 직접 연결되어 있기 때문에 미생물의 침입이 불가피하고, 영양적 또는 환경적으로 세균이 증식하기에 적합하여 약 500여 종 이상의 세균이 치아, 잇몸, 혀 및 구강 점막 등에 존재한다. 그러므로, 질병의 예방과 치료를 위해 식용 가능하고 항균 활성을 지닌 제품이 절실히 필요한 실정이다[2]. 구강 내 질환은 정상 세균총 중 특정 미생물이 증식하면서 발생하는 질환으로 치아우식증, 치은염 및 치주염 등이 구강 내 존재하는 세균에 의한 감염인 것으로 알려져 있다. 구강 내 세균 중 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*는 치아우식증의 대표적인 원인균이며, 특히 *S. mutans*는 치면세균막을 형성하여 치석을 생성시킴으로써 치아의 탈회 유발 및 치아우식 등을 유발시킨다[3,4]. 그리고 치주질환을 일으키는 구강세균으로는 *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 및 *Fusobacterium nucleatum* 등이 알려져 있다[5,6]. 구강질환 예방과 치료를 위하여 지금까지 항생제, 불소함유제 및 클로로헥시딘(chlorohexidine) 등을 이용한 연구가 꾸준히 진행되었지만[7,8], 내성유발과 치아변색 등의 문제점들이 발견됨에 따라 이를 포함한 다양한 부작용으로부터 안전한 천연소재 탐구 관련 분야가 많은 관심을 받고 있다[9,10].

우리나라에서 식용과 약용으로 쓰이는 버섯은 진균류에 속하며, 대부분 담자균류와 자낭균류의 일종이다. 향과 식감이 뛰어나고 각종 영양소, 예를 들어 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등을 함유하고 있어 고영양 재료로 일상에서 꾸준히 이용되어 왔다[11]. 현재까지 표고버섯의 항균 활성, 상항버섯의 항산화 활성, 송이버섯의 혈전 용해 활성, 표고버섯의 면역증강 및 새송이버섯의 항염증 활성 등 다양한 버섯의 생리활성이 보고됨에 따라 각종 구강 관련 기능성 제품에 대한 천연소재의 후보 물질로 대두되고 있다[11-13]. 싸리버섯(*Ramaria botrytis* Fr. Rick)은 싸리버섯과(*Ramariceae*)로서, 주로 동아시아, 유럽, 북미 그리고 우리나라에 널리 분포하며, 장마가 끝난 직후부터 초가을까지 야산에서 대량으로 성장하는 버섯이다[14-16]. 싸리버섯으로부터 알려진 주요 아미노산 성분은 아스파티산, 시스테인 및 히스티딘 등이고, 유기산으로는 숙신산(succinic acid)이 가장 많이 포함되어 있으며, 말산(malic acid)과 구연산(citric acid) 등이 존재한다. 유리당은 주로 포도당(glucose)과 자당(sucrose)이 차지하며, 무기물 검출과 정량 연구 결과, 영양소 중에 칼륨이 가장 많고 칼슘이 일반 식물과 비교하여 매우 적음이 확인되었다[17]. 현재까지 보고된 싸리버섯의 생리활성으로는 메탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물에서 밝혀진 돌연변이 억제 효과와 HT29 결장 암세포 성장 억제 효과[18], 메탄올 추출물에서 증명된 항산화 활성과 항산화계 효소 증가로 인한 간 손상 보호 효과[19] 및 마우스를 통한 간 손상 억제 효과와 간 독성을 해독하기 위한 cytochrome P450 1A1 isozyme 단백질의 감소[16] 등이 알려져 있다. 또한 싸리버섯의 일종인 붉은 싸리버섯(*Ramaria formosa* Fr.)에서는 메탄올 추출을 통해 주요 성분인 4-hexyl-2,5-dihydro-2,5-dioxo-3-furanacetic acid 성분이 알려져 있고 그들의 변비 완화 효과 등이 증명되었다[15].

구강미생물에 대한 항균 활성이 연구된 천연물로는 콩[2], 칩[20], 지의류[21] 및 매실[22] 등이 있으나, 아직까지 국내에서는 다양한 종류의 천연물에 대한 연구가 상당히 미비한 실정이다. 특히, 버섯의 경우에는 표고버섯의 아세톤 추출물과 에틸아세테이트 추출물을 이용하여 구강미생물 5종에 대한 증식 억제 효과를 보고한 일부 자료만이 알려져 있다[13]. 또한, 싸리버섯에 대한 구강미생물의 항균 활성은 현재까지 연구된 바가 전무하기 때문에, 본 연구에서는 아세톤, 에탄올 및 에틸아세테이트

트 등 3가지 용매로 쓰리버섯으로부터 용매추출하여 치아우식증과 치주질환 원인균인 *Streptococcus*, *Actinomyces* 및 *Aggregatibacter* 등 총 10종의 구강세균에 대한 항균 효과를 확인함으로써 항균 관련 구강제품에 적용될 후보 천연소재로서의 가능성을 탐색하고자 한다.

연구방법

1. 쓰리버섯의 용매추출물 제조

쓰리버섯은 강원도 양양군 소재의 산과 바다농장에서 냉동 쓰리버섯을 구입하여 사용하였다. 자연 건조하여 분쇄한 쓰리버섯 50.00 g에 유기용매(아세톤, 에틸아세테이트 및 에탄올) 400 ml를 각각 첨가하여 상온에서 3일 동안 추출하였다. 각각의 추출액을 3번 감압여과(ADVANTEC No. 2 Advantec MFS, Inc., Tokyo, Japan) 한 후, 회전진공증발기(rotary evaporator, EYELA A-1000S, Tokyo Rikakikai Co, Tokyo, Japan)로 농축하여 추출물을 확보하였으며, 추출용매로는 99.50% 아세톤, 99.50% 에탄올 및 99.00% 에틸아세테이트(Daejung Chemicals & Metals, Siheung, Korea) 등을 사용하였다. 각각의 추출물은 200.00 mg/ml의 농도로 DMSO에 용해시켜 4°C에 보관하였으며, 필요에 따라 희석하면서 실험에 사용하였다.

2. 실험 구강균주와 배지

실험에 사용된 구강균주는 총 10종으로 그람양성간균인 *Staphylococcus aureus* 외 8종과 그람음성균인 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 1종 등을 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)로부터 분양 받아 사용하였다. *S. aureus*, *S. anginosus*, *S. criceti*, *S. mutans*, *S. ratti*, *S. sanguinis* 및 *S. sobrinus* 등은 Brain-Heart Infusion (BHI, Difco, Detroit, MI, USA) 배지에, *A. israelii*, *A. viscosus* 및 *A. actinomycetemcomitans* 등은 Trypticase Soy Broth (TSB, BD Co.,

Table 1. List of strains used for antibacterial experiments

Microorganism	KCTC No.	Media
Gram-positive		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1927	BHI
<i>Streptococcus anginosus</i>	3983	BHI
<i>Streptococcus criceti</i>	3640	BHI
<i>Streptococcus mutans</i>	3065	BHI
<i>Streptococcus ratti</i>	3655	BHI
<i>Streptococcus sanguinis</i>	3284	BHI
<i>Streptococcus sobrinus</i>	3308	BHI
<i>Actinomyces israelii</i>	9054	TSB
<i>Actinomyces viscosus</i>	5531	TSB
Gram-negative		
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	3698	TSB

BHI: Brain-Heart Infusion, TSB: Trypticase Soy Broth

USA) 배지에 접종하여 24시간 동안 37°C 혐기성배양기(5% CO₂)에서 배양하였다<Table 1>.

3. 사리버섯 용매추출물의 항균력 측정

사리버섯 추출물의 항균력은 디스크 확산법을 이용하여 측정하였다[23]. 각 시험 구강균주를 각각의 조건에 맞는 액체 배지에 접종 후 37°C에서 24시간 배양하여 활성화시키고 0.5 McFarland 표준탁도(약 1.00×10⁸ CFU/ml)로 맞추어 각각의 평판 배지에 멸균된 면봉을 이용하여 균일하게 도포하였다. 멸균된 filter paper disc (diameter 6 mm, Whatman AA disc, Whatman International, St. Louis, MO, USA)에 추출물을 30 μl (6.00 mg/disc) 농도로 흡수 및 건조시켜 평판 배지 위에 올려놓는다. 그리고 37°C 혐기성배양기(incubator)에서 24시간 동안 배양시키면서, paper disc 주위에 생성된 억제환(inhibition zone)의 크기를 vernier caliper (0~150 mm, color world, China)로 측정하는 방법으로 모든 추출물에 대한 항균력을 비교·분석하였다. 실험을 3번 반복하여 평균값과 표준편차로 나타냈으며, 100.00 μg/ml ampicillin을 양성대조군으로 사용하였다[24].

4. 최소생육저해농도(MIC) 측정

디스크 확산법으로부터 얻은 항균활성 관련 결과를 바탕으로 아세트, 에틸아세테이트 및 에탄올 추출물 중 항균력이 가장 높게 확인된 에틸아세테이트 추출물만을 사용하여 각 구강균주에 대한 최소생육저해농도(MIC) 값을 액체배지희석법(broth dilution method)으로 측정하였다. 96 well plate에 최종농도가 0.12 mg/ml에서 15.00 mg/ml가 되도록 멸균된 증류수를 이용하여 단계별로 추출물을 희석시켰다. 희석된 추출물 60 μl, 각 구강균주 100 μl 및 배지 40 μl를 첨가하였다. 각 구강균주를 활성화시킨 후, 균의 농도를 5.00×10⁵ CFU/ml이 되도록 희석하여 사용하였다. 37°C 혐기성배양기에서 24시간 동안 배양시킨 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육이 나타나지 않는 추출물의 농도를 MIC로 결정하였다.

5. 구강미생물 생육저해곡선

구강세균에 대한 에틸아세테이트 추출물의 농도별 및 시간경과별 생육저해정도를 조사하였으며, 위에서 설명한 최소생육저해농도 측정 방법과 동일하게 진행하였다. 사리버섯 에틸아세테이트 추출물의 MIC 값으로 얻어진 15.00 mg/ml, 7.50 mg/ml, 3.75 mg/ml 및 1.88 mg/ml, 0.12 mg/ml 농도로 추출물을 단계별로 희석하여 첨가하였다. 36시간까지 배양하면서 시간별로(0, 2, 4, 6, 10, 12, 24 및 36 hr) 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 추출물을 포함하지 않은 용액(DMSO 첨가)을 음성대조군으로 사용하였다.

6. 구강미생물의 생육저해율 측정

사리버섯 추출물이 구강세균의 생육에 미치는 생육저해율 측정은 사리버섯 추출물을 3.75 mg/ml 농도로 주입하였으며, 위의 최소생육저해농도 측정방법과 동일하게 측정하였다. 37°C에서 24시간

배양한 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음 식을 사용하여 생육저해율을 조사하였다.

$$\text{Inhibitory rate(\%)} = \{ 1 - (\text{treatment-treatment blank})/(\text{control-control blank}) \} \times 100$$

7. 통계처리

본 연구의 통계처리는 SPSS Statistics 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 분산분석 (ANOVA) 방법으로 비교하였으며, Duncan's multiple range test ($\alpha = 0.05$)에 따라 유의성을 검증하였다. 모든 실험 결과는 3회 반복적으로 수행하여 평균±표준편차로 나타내었다.

연구결과

1. 싸리버섯 용매추출물의 수율

싸리버섯을 건조 분쇄 후, 아세톤, 에탄올 및 에틸아세테이트 등으로 용매추출하여 확보한 고형물의 함량을 각 용매별 수율로 계산하였다<Table 2>. 추출 수율은 에틸아세테이트 추출물이 8.93 %로 다른 용매추출물과 비교하였을 때 가장 높은 수율을 보였으며, 다음으로 아세톤(6.30%)과 에탄올(4.01%) 순으로 나타났다.

Table 2. Extraction yield of various extracts from *Ramaria botrytis*

Solvent	Yield (% , w/w-dry weight)
Acetone	6.30
Ethanol	4.01
Ethyl acetate	8.93

2. 싸리버섯 용매추출물의 항균력

싸리버섯의 용매별 추출물의 항균활성을 디스크 확산법으로 조사하였다<Fig. 1>. 아세톤과 에틸아세테이트 추출물은 10종의 구강균주 모두에 대하여 항균효과를 나타내었고, 에탄올 추출물의 경우는 *S. anginosus*, *S. mutans* 및 *S. sanguinis* 등을 제외한 나머지 구강균주 모두에서 다소 약한 항균활성을 보였다. 아세톤 추출물은 *S. criceti*와 *S. ratti*에서 각각 8.23 mm와 8.59 mm 등으로 다른 구강균주들에 비해 높은 활성을 보였으며, 에틸아세테이트 추출물은 모든 구강균주에서 가장 강한 항균활성을 확인하였다. *S. anginosus*, *S. criceti*, *S. ratti* 및 *A. actinomycetemcomitans* 등에서 각각 8.19 mm, 8.66 mm, 8.98 mm 및 9.05 mm의 억제환을 보이는 것처럼 다른 용매추출물에 비해 유의적으로 월등히 높은 항균활성을 보였다($p < 0.05$). 대부분의 모든 구강균주에서 에틸아세테이트 > 아세톤 > 에탄올 추출물 순으로 항균활성이 나타났으며, 일부 *A. israelii*과 *A. viscosus* 등에서는 에틸아세테이트 > 에탄올 > 아세톤 추출물 순으로 항균활성을 보였으나, 유의적 차이를 나타내지는 않았다($p > 0.05$).

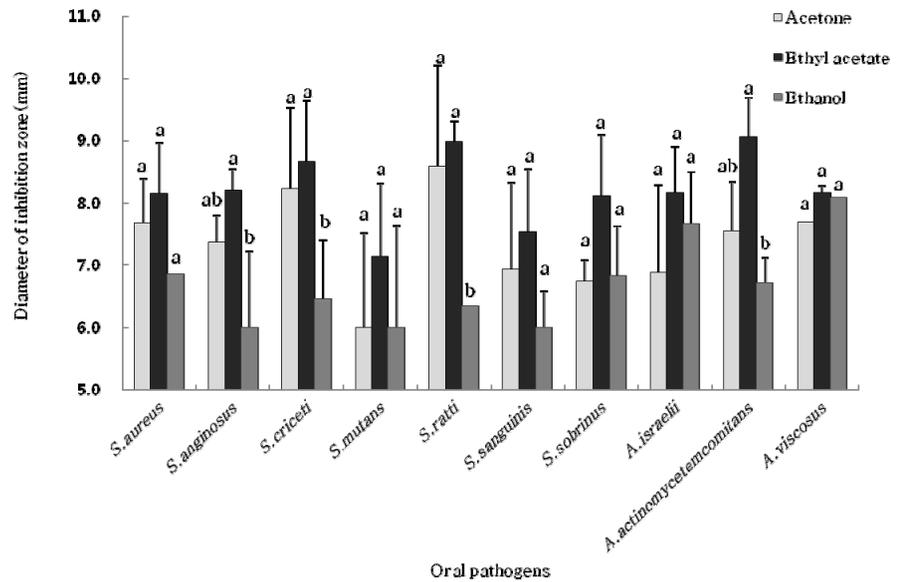


Fig. 1. Antimicrobial activity of extracts from *Ramaria botrytis* by disc diffusion. The results represent the Mean±SD of values obtained from three independent experiments. Mean with different letter (a-b) on the bars in the same bacteria are significantly different by Duncan's multiple comparison ($p < 0.05$)

3. 쓰리버섯 용매추출물의 최소생육저해농도(MIC)

10종의 구강균주에 대해서 다른 용매추출물에 비해 강한 항균활성을 보인 에틸아세테이트 추출물의 최소생육저해농도를 측정하였다<Table 3>. 쓰리버섯 에틸아세테이트 추출물은 *S. aureus*와 *S. mutans*에서 각각 15.00 mg/ml이었으며, *S. anginosus*, *S. criceti*, *S. ratti*, *S. sanguinis* 및 *A. viscosus* 등에서는 각각 7.50 mg/ml의 MIC를 나타내었다. 또한 *S. sobrinus*와 *A. actinomycetemcomitans* 에서는 7.50 mg/ml와 15.00 mg/ml 사이의 MIC 값을 보였으며, 특히 *A. israelii*에서는 3.75 mg/ml로 가장 낮은 MIC를 확인하였다.

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of ethyl acetate extracts from *Ramaria botrytis* against oral pathogens

Microorganism	MIC (mg/ml)	Microorganism	MIC (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	15.00	<i>S. sanguinis</i>	7.50
<i>S. anginosus</i>	7.50	<i>S. sobrinus</i>	7.50<MIC<15.00
<i>S. criceti</i>	7.50	<i>A. israelii</i>	3.75
<i>S. mutans</i>	15.00	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	7.50<MIC<15.00
<i>S. ratti</i>	7.50	<i>A. viscosus</i>	7.50

4. 구강미생물의 생육저해율

10종 구강균주를 대상으로 가장 강한 활성을 나타낸 쓰리버섯 에틸아세테이트 추출물을 3.75

mg/ml 농도로 사용하여 측정한 생육저해율 결과는 다음과 같다(Fig. 2). *S. aureus*와 *S. sobrinus*의 경우 생육저해율이 너무 낮아 그림에서 제외하였다. 24시간 동안 배양한 경우, 싸리버섯 에틸아세테이트 추출물이 첨가된 구강균주는 추출물을 첨가하지 않은 음성대조군에 비하여 *A. israelii*과 *A. viscosus*에 대한 생육저해율이 각각 93.70%와 76.50% 정도 유의적으로 높은 결과를 보였다 ($p < 0.05$). 또한, *A. actinomycetemcomitans*에 대한 생육저해율이 56.80%로 *A. israelii*와 *A. viscosus*를 제외한 나머지 그람 양성균보다 높은 결과를 나타냈으며, *S. mutans*와 *S. sanguinis*에 대한 생육저해율은 각각 18.40%와 26.70%로 상당히 낮게 확인되었다.

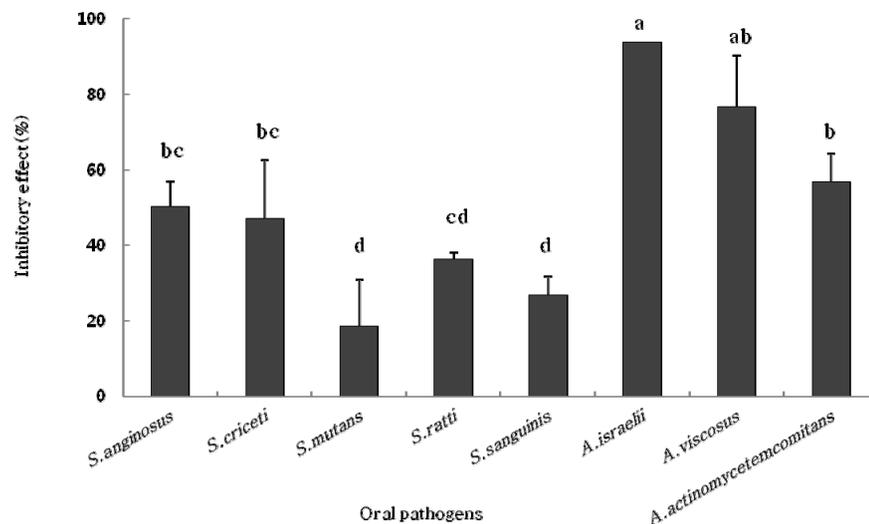


Fig. 2. Inhibitory effect of ethyl acetate extract from *Ramaria botrytis* against oral pathogens for 24 hr at 37°C. The results represent the Mean±SD of values obtained from three independent experiments. Mean with different letter (a-d) on the bars in the same bacteria are significantly different by Duncan's multiple comparison ($p < 0.05$)

5. 구강미생물의 생육저해곡선

싸리버섯의 에틸아세테이트 추출물을 첨가한 후, 10종 구강균주에 대하여 배양시간(0~36 hr)과 추출물 농도에 따라 균의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다(Fig. 3). MIC 측정결과, 싸리버섯의 에틸아세테이트 추출물은 모든 구강균주에서 3.75~15.00 mg/ml의 MIC 값을 보여주었기 때문에, 이를 바탕으로 MIC보다 낮은 농도인 0.12, 1.88, 3.75, 7.50 및 15.00 mg/ml 등의 농도 별로 싸리버섯 에틸아세테이트 추출물을 첨가하면서 10종 구강균주에 대한 생육저해곡선을 측정하였다. 추출물을 첨가하지 않은 음성대조군에서 2시간 이후, 4~6 시간까지 균의 성장이 빠르게 증가하였으나, 싸리버섯 에틸아세테이트 추출물을 0.12 mg/ml로 첨가하였을 경우에는 4시간까지 균의 증식이 억제되다가 12시간까지 균이 완만하게 증식되었으며, 그 이후에는 균의 증식이 활발히 진행되었다. 1.88~7.50 mg/ml의 농도에서는 대부분의 구강균주의 경우, 12시간까지 균의 생육이 억제되었으며, 12시간 이후 음성대조군에 비해 균의 증식이 활발히 진행되었다. 결과적으로, 농도가 커

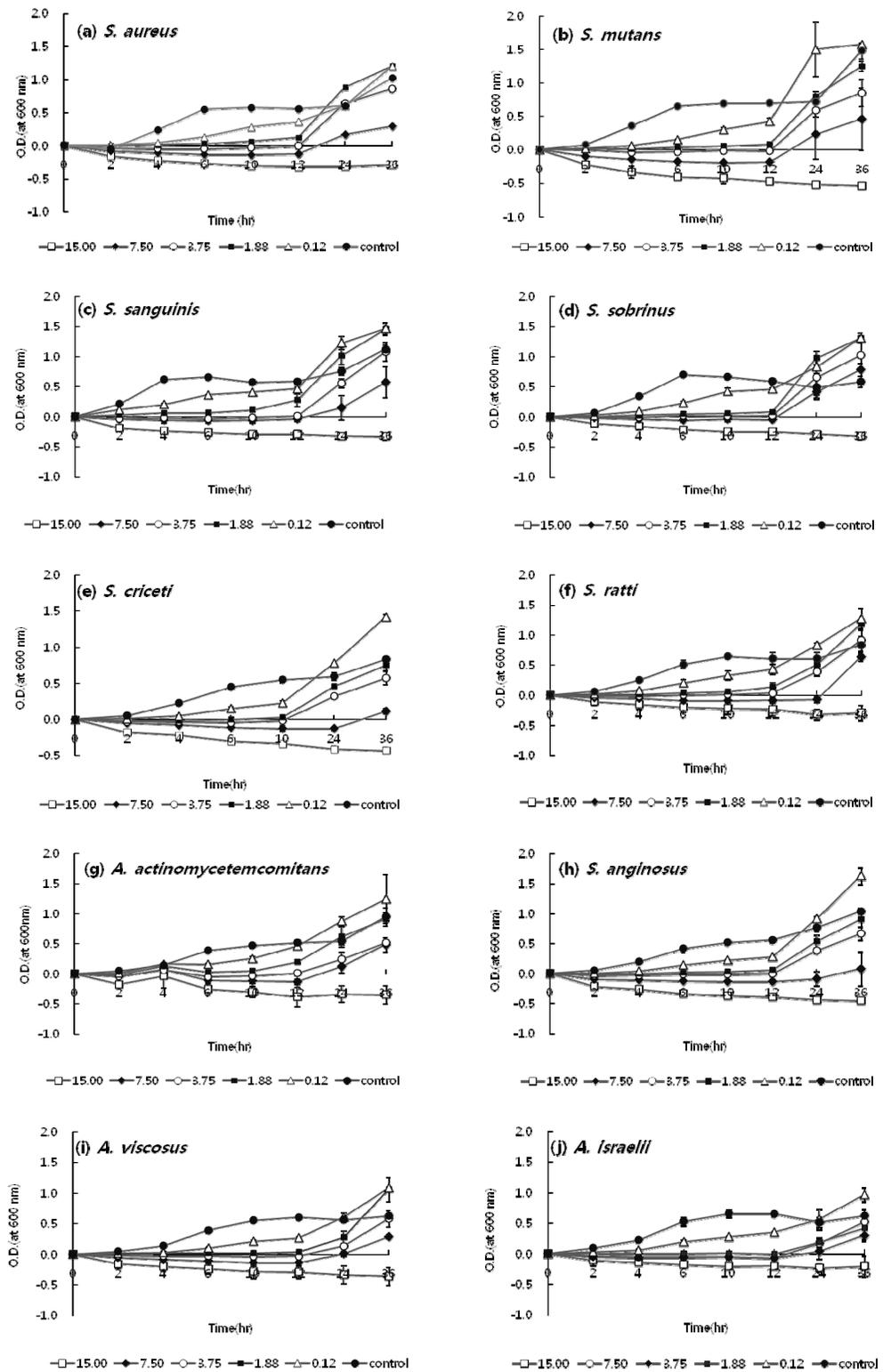


Fig. 3. Growth inhibition curves using ethyl acetate extract from *Ramaria botrytis* against oral pathogens. The results represent the Mean±SD of values obtained from three independent experiments

질수록 균의 증식이 억제되는 시간이 증가하였으며, 균의 증식 속도가 느려지는 것을 확인할 수 있었다. 특히, *S. criceti*, *S. ratti* 및 *S. anginosus* 등은 7.50 mg/ml의 경우에서 24시간까지 균의 증식이 지연되는 결과를 보여주었으며, 또한 농도가 가장 높은 15.00 mg/ml에서는 10종의 모든 구강세균에 대한 36시간 생육기간동안 균의 증식이 완전히 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

총괄 및 고안

현대 사회는 생활수준의 향상으로 구강 건강에 대한 관심이 높아졌으나, 식생활의 변화로 인해 구강질환은 해마다 증가되고 있는 추세이다. 구강질환의 원인으로는 개체, 병원체 및 환경 등 3가지의 발병요인이 복합적으로 작용하여 발생하며, 통증, 섭식 기능 장애 및 구취 혹은 치아 상실을 유발하는 치아우식증과 치주질환 등이 대표적인 구강질환에 해당된다. 구강은 미생물이 서식하는데 적합한 환경으로 다양한 세균이 존재함으로써 구강 내 질환을 유발시킨다. 치아우식증은 치면세균막 내 세균, 음식물 및 타액 등의 상호작용에 의해 발생하는 세균감염성 질환으로 치아 표면의 세균막 내 존재하는 구강세균이 가장 주된 요인으로 알려져 있으며, *Streptococcus*와 *Actinomyces* 속에 해당되는 균들이 원인균에 해당된다. 치주질환은 치주조직의 파괴와 골흡수를 발생시키는 세균감염성 질환으로 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*와 *Porphyromonas gingivalis* 등이 원인균이다. 치아우식증과 치주질환 등 구강질환을 예방하고 구강세균의 성장을 억제하기 위해서 클로로헥시딘과 같은 항생제 등을 사용하지만, 균주 돌연변이에 의한 내성 및 치아의 착색과 같은 부작용이 증가함에 따라 이를 대체하기 위한 천연항균물질에 관심이 많아지고 있다. 폴리페놀과 플라보노이드는 구강균주의 성장을 억제하는 주된 생리활성물질로 알려져 있으며, 특히 (-)-epigallocatechin gallate (EGCg)와 같은 폴리페놀이 균의 성장을 억제한다고 보고되었다[25].

버섯은 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등 풍부한 영양소를 함유하고 있으며, 항산화, 항균 및 항암 등 우수한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 일부 버섯 관련 구강세균에 대한 항균활성도 보고된바 있다. 박 등[26]은 만가닥버섯의 *S. mutans*에 대한 항균활성을 보고하였으며, 한 등[13]은 표고버섯의 에틸아세테이트 추출물이 *S. aureus*, *S. sanguinis*, *A. actinomycetemcomitans* 및 *A. viscosus* 등에 우수한 항균활성이 있다고 보고하였다. Lien 등[27]은 장지버섯의 95% 에탄올, 클로로포름 및 에틸아세테이트 추출물이 *P. gingivalis*와 *S. mutans*의 성장을 억제한다고 보고하였다.

이에 본 연구에서는 치아우식증과 치주질환 원인균에 대한 짜리버섯의 항균활성을 알아보고자 짜리버섯을 아세트, 에탄올 및 에틸아세테이트 등 3종의 용매로 추출하였으며, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus*, *S. sanguinis*, *S. criceti*, *S. ratti*, *S. anginosus*, *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus* 및 *A. israelii* 등 10종의 구강세균에 대한 항균활성능력과 최소억제농도를 측정하였다. 또한, 성장저해곡선을 확인함으로써 짜리버섯 추출물이 10종의 구강세균의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 짜리버섯의 에틸아세테이트 추출물은 10종 구강세균 모두에서 항균활성을 나타내었고, 아세트 추출물은 에틸아세테이트 추출물의 항균활성에 비해 다소 약하지만 *S. mutans*를 제외한 나

머지 모든 구강균주에서 항균효과를 보였다. 에탄올 추출물은 *S. anginosus*, *S. mutans* 및 *S. sobrinus* 등에서 활성을 보이지 않았으나, *A. viscosus*에 대한 활성에서만 다른 모든 구강균주에 비해 다소 높게 확인되었다. 에틸아세테이트를 이용한 표고버섯 추출물이 아세톤 표고버섯 추출물보다 구강세균에 대해 높은 항균활성을 보인 선행연구[13]에서와 동일하게, 본 연구에서도 짜리버섯의 구강세균에 대한 항균효과를 높이는데 에틸아세테이트가 가장 적합한 용매임을 확인할 수 있었다. MIC 측정결과, 짜리버섯의 에틸아세테이트 추출물은 *A. israelii*의 경우, 3.75 mg/ml인 것을 제외하고 나머지 모든 구강균주에 대해서 7.50~15.00 mg/ml의 높은 MIC 값을 나타내었다. 짜리버섯의 에틸아세테이트 추출물을 첨가하였을 경우, 모든 농도에서 12시간까지 균의 생육을 억제하였으며, 또한 10종의 구강균주에 대하여 15.00 mg/ml의 추출물을 첨가한 경우에는 균의 생육 기간 동안 균의 증식이 발생하지 않고 사멸되었다. 결과적으로, 본 연구에서는 짜리버섯 추출물이 *S. aureus*, *S. anginosus*, *S. criceti*, *S. mutans*, *S. ratti*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *A. israelii*, *A. viscosus* 및 *A. actinomycetemcomitans* 등에 항균활성을 보였으며, 특히, *A. viscosus*에 대해 항균활성이 높게 나타났다. 따라서 치아우식증 뿐만 아니라 치주질환을 유발하는 구강균주에 대한 짜리버섯 추출물의 항균효과를 확인할 수 있었으며, 특히 짜리버섯에 대해 에틸아세테이트가 아세톤 및 에탄올 보다 구강세균의 성장을 억제하는데 효과적인 용매로서 더욱 적합하다는 것을 확인할 수 있었다. 버섯은 채취 시기, 건조방법, 추출용매 또는 추출방법의 차이에 따라 추출되는 생리활성물질의 종류와 양이 달라지므로 향후 구강세균에 대해 항균효과를 나타내는 짜리버섯의 성분을 분리하고 그 성분에서 구강세균의 성장억제효과를 확인하는 연구가 필요하며, 또한 독성검사를 통해 안전성을 검증하는 추가적인 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 짜리버섯을 3종의 용매로 추출하여 최적의 구강세균 활성 관련 용매를 탐색하였으며, 치아우식과 치주질환을 유발하는 구강균주 10종에 대한 짜리버섯 추출물의 항균활성을 조사하여 다음과 같은 결과를 확보하였다.

1. 디스크 확산법을 이용하여 아세톤, 에탄올 및 에틸아세테이트 등의 추출용매에 의한 항균활성 조사 결과, 에틸아세테이트로 추출한 짜리버섯 추출물이 10종의 구강균주에 대해서 다른 용매와 비교하였을 때, 상당히 높은 항균활성을 나타낸 반면, 에탄올 추출물은 다소 약한 활성을 보였다. 짜리버섯 에틸아세테이트 추출물의 경우, *S. ratti*와 *A. actinomycetemcomitans* 등에서 가장 강한 활성을 확인하였다.
2. 짜리버섯 에틸아세테이트 추출물의 MIC 조사 결과, *S. aureus*와 *S. mutans*에 대해서 15.00 mg/ml, *S. sobrinus*와 *A. actinomycetemcomitans*에 대해서 7.50~15.00 mg/ml, *S. anginosus*, *S. criceti*, *S. ratti*, *S. sanguinis* 및 *A. viscosus* 등에 대해서 7.50 mg/ml로 확인되었으며, 특히 *A. israelii*에 대해서 가장 낮은 3.75 mg/ml를 나타내었다.
3. 짜리버섯 에틸아세테이트 추출물을 대상으로 농도 및 시간 경과에 따른 생육저해효과를 확인한

결과, 대부분 음성대조군에 비해 균의 생육저해효과를 나타냈으며, 대부분 12 혹은 24 시간 경과 후 균의 생육이 크게 증가하였으나, 농도가 가장 큰 15.00 mg/ml의 경우 배양 초기부터 36시간까지 강하게 균의 생육이 억제되었다.

위와 같이 결과적으로 싸리버섯 추출물은 *S. mutans*, *S. aureus*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. anginosus*, *S. ratti*, *S. criceti*, *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus* 및 *A. israelii* 등 10종의 구강세균에 대하여 항균효과가 있음을 확인함으로써 치아우식증과 치주염 등의 구강질환에 효과적인 천연 항균소재로서 활용될 수 있으리라 생각한다.

References

- [1] Kim HJ, Lee IS. Antimutagenic and cytotoxic effects of korean wild mushrooms extracts. Korean J Food Sci Technol 2004;36:662-8.
- [2] Lee SL, Kim JG. Anti-microbial activity of soybean extract against oral microbes. Korean J Environ Health Sci 2006;32:192-7.
- [3] Kozai K, Miyake Y, Kohds H, Kametaka S, Yamasaki K, Suginaka H, et al. Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and ursolic acid. Caries Res 1987;21:104-8.
- [4] Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. J Dent Res 1989;68:1303-7.
- [5] Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994;5:78-111.
- [6] Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000 1997;14:12-32.
- [7] Jarvine H, Tenovuo J, Huovinen P. In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine, and six other antimicrobial agents. Antimicrob Agent Chemother 1993;37:1158-9.
- [8] Ullsfooss BN, Ogaard B, Arends J, Ruben J, Rolla G, Afseth J. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an in vivo human caries model study. Scand J Dent Res 1994;102:109-12.
- [9] Loe H, Schiott CR, Karring G, Karring T. Two years oral use of chlorhexidine in man. J Periodontal Res 1976;11:135-44.
- [10] Baek DH. Screening of the natural plant extracts for the antimicrobial activity on dental pathogens. Korean J Microbiol 2007;43:227-31.
- [11] Kim HS, Ha HC, Kim TS. Research and prospects in new functional mushrooms - *Tremella fuciformis*, *Grifora frondosa*, and *Hypsizigus marmoreus*. Food Sci Ind 2003;36:42-6.
- [12] Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Kim JK, Lim SS. Physiological activities of extract from edible mushrooms. J Korean Soc Food Sci Nutr 2010;39:1087-96.
- [13] Han SR, Lim KO, Oh TJ. Antimicrobial activities against oral bacteria and growth inhibition against *Actinomyces viscosus* using *Lentinus edodes* various extracts. J Korean Soc Dent Hyg 2015;15:735-41. <https://doi.org/10.13065/jksdh.2015.15.04.735>
- [14] Pyo MY, Ro IH. A study on the amino acid contents of edible mushrooms. Korean J Nutr 1975;8:47-59.
- [15] Hwang BH, Lee TS. Extractive compounds of *Ramaria formosa*(Fr.) Quel. J Kor For En 2003;22:37-42.
- [16] Kim HJ, Lee IS, Bae JT, Kim OM, Park SH, Chang JS, et al. Effect of *Ramaria botrytis* methanol extract on hepatotoxicity in benzo(α)pyrene-treated mice and expression of

- cytochrome P-450 1A1 isozyme. Korean J Mycol 2003;31:34-9.
- [17] Seoh JH, Cho SY, Lee SW. Study on the tasty constituents and minerals in *Clavariaceae botrytis*. J Korean Soc Food Nutr 1974;3:17-21.
- [18] Kim HJ, Lee IS, Lee KR. Antimutagenic and anticancer effects of *Ramaria botrytis*(Fr.) Rick extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 1999;28:1321-5.
- [19] Kim HJ, Lee KR. Effect of *Ramaria botrytis* methanol extract on antioxidant enzyme activities in benzo(α)pyrene-treated Mice. Korean J Food Sci Technol 2003;35:286-90.
- [20] Lee HO, Kim CH, Lim JA, Lee MH, Baek SH. Antimicrobial effect of *Puerariae thunbergiana* extracts against oral microorganism. J Dent Hyg Sci 2004;4:45-8.
- [21] Kim EM, Cho MJ. Antimicrobial activities of oral bacteria by lichen extracts. J Korean Soc Dent Hyg 2012;12:81-91.
- [22] Jang JH, Kim YI, Lee H. Antimicrobial activity of *Prunus mume* extract to oral microbes. J Korean Soc Dent Hyg 2014;14:109-15.
- [23] Piddock LJ. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. J Appl Bacteriol 1990;11:151-7.
- [24] Park SN, Lee DK, Lim YK, Kim HS, Cho EG, Jin DC, et al. Antimicrobial effect of carvacrol against cariogenic and periodontopathic bacteria. Korean J Microbiol 2012;48:52-6. <https://doi.org/10.7845/kjm.2012.48.1.052>
- [25] Katsuhiko F, Tadash I, Yukihiro H. Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria. Agric Bio Chem 1991;55:1895-7. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870886>
- [26] Park EJ, Lee JS, Choi WS. Anti-cariogenic activities of mushroom extracted with various solvent systems. Korean J Food Sci Technol 2011;43:783-6. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2011.43.6.783>
- [27] Lien HM, Tseng CJ, Huang CL, Lin YT, Chen CC, Lai YY. Antimicrobial activity of *Antrodia camphorata* extracts against oral bacteria. PLoS One 2014;9:e105286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105286>