

지의류 추출물의 구강세균에 대한 항균효과

김은미 · 조민정

광주보건대학교 치위생과

Antimicrobial activities of oral bacteria by lichen extracts

Eun-Mi Kim · Min-Jeong Cho

Department of Dental Hygiene, Gwangju Health College

ABSTRACT

Objectives : By investigating antimicrobial activity of natural extracts, identifying its usefulness as antibiotic material to oral bacteria.

Methods : Antimicrobial activity tests of 25 natural extracts were implemented on 6 type strains alleged to cause dental caries and 10 clinical strains isolated and identified from dental caries.

Results : Among medicinal plants, *Coptis japonica*, *Scutellaria baicalensis*, *Dictamnus dasycarpus* showed antimicrobial activity. Among lichens, 3 methanol extracts and 6 acetone extracts showed antimicrobial activity. Minimum Inhibitory Concentration(MIC) test of *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184, an acetone extract of lichen with the highest antimicrobial activity, on 6 type strains involved in dental caries and 10 strains isolated from dental caries resulted as follows: *Actinomyces oris* 1041 12 μ g/ml, for *Corynebacterium durum* 3151 13 μ g/ml, for *Rothia dentocariosa* KCTC 3204^T 14 μ g/ml, for *R. dentocariosa* 911 15 μ g/ml, for *R. dentocariosa* 1822 12 μ g/ml, for *Lactobacillus casei* KACC 12413^T 12 μ g/ml, for *L. acidophilus* KACC 12419^T 16 μ g/ml, for *L. rhamnosus* 2421 15 μ g/ml, for *Streptococcus mutans* KCTC 3065^T 15 μ g/ml, for *S. mutans* 121 13 μ g/ml, for *Streptococcus oralis* 2221 18 μ g/ml, for *S. salivarius* KCTC 5512 14 μ g/ml, for *S. salivarius* 122 12 μ g/ml, for *S. sanguinis* KCTC 3284^T 14 μ g/ml, for *S. sanguinis* 912 14 μ g/ml, for *Neisseria* sp. KEM232 12 μ g/ml.

Conclusions : Even a small amount of extract from lichen *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184 showed very high level of antimicrobial activation against all 16 bacterial strains involved in dental caries.(J Korean Soc Dent Hygiene 2012;12(1):81-91)

keyword : antimicrobial activity, lichen, natural extract, oral bacteria

색인 : 구강세균, 지의류, 천연물질, 항균성

▶ 본 논문은 2010년 광주보건대학교 교내학술지원비에 의해 연구되었음.

1. 서론

치아우식증은 세균, 식이요인, 숙주요인이 복합적으로 작용하여 발생하는 질환으로¹⁾, 특히 세균의 역할이 필수적이다. 사람의 구강내에는 500종 이상의 세균이 상주하고 있으며, 치면세균막에는 약 10^8 - 10^9 CFUs/mg 정도의 세균이 존재하는 것으로 보고되고 있다²⁾. 치아우식증에 있어 가장 문제가 되는 것은 치면세균막(dental plaque)이다. 치아우식에 관여하는 대표적인 세균으로 *Streptococcus mutans*는 치면세균막을 형성하는 주요 원인균으로 알려져 있다. 또한 *S. mutans*는 평활면 우식증 및 초기 우식증에 관여하고, *Loctobacillus sp.*는 소와열구 우식증 및 진행 우식증에 관여하는 것으로 알려졌다³⁾. 그 외에도 타액에 가장 많이 존재하고 혐기성 상태에서 배양되는 세균 중 총 세균 숫자에서 20%를 차지하고 있는 *Streptococcus salivarius* 등이 있다⁴⁾. 이러한 세균들이 증식하면서 생성시킨 유기산에 의해 치아의 무기질 표면이 파괴된다. 그러므로 치아우식증을 예방하기 위해서는 치면세균막 관리가 필수적이다. 미생물학적 관점에서 본다면 우식 유발성 미생물이 치면에 정착, 증식하는 것을 막고, 또 그 미생물들이 우식작용을 발휘하기 위한 필수기질의 공급을 가능한 억제하는 것이 최우선의 전략이라 할 수 있다. 구체적인 억제 방법은 치면세균막의 기계적인 제거, 식생활 개선을 통한 비우식 유발 감미료의 이용, 항균제, 치면세균막 억제제 이용, 우식 유발 미생물에 대한 예방접종 개발 등을 들 수 있다⁵⁾. 이들 중 특히 Jarvinen 등⁶⁾은 ampicillin, chlorhexidine, erythromycin, penicillin, tetracycline 및 vancomycin과 같은 항생제가 치아우식을 예방하는 데 효과적이라고 보고하였다. 그러나 항생제 내성과 인체에 미치는 부작용이 문제가 될 수 있다. 대표적인 예로 국소적 항세균제로 널리 쓰이고 있는 chlorhexidine 등은 세균 수를 감소시키거나 치면세균막 형성을 억제하는 효과가 있지만, 지속적으로 사용할 경우 치아착색 등의 부작용

을 유발하고 있다. 이러한 이유로 부작용 없이 지속적으로 작용하면서 항생제를 대체할 수 있는 천연 항균물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{7~11)}. 홍 등¹²⁾은 생약추출물인 당귀, 으름덩굴, 황연 등의 항균효과를 이용 치약에 배합하여 인공 우식법랑질에 미치는 영향을 평가하였고, 백 등¹³⁾은 *S. mutans*에 대한 황금 추출물의 항균 및 부착억제 효과를, 이 등¹⁴⁾은 금은화 및 황련의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과를, 조 등¹⁵⁾은 관중을 포함한 생약추출물의 *S. mutans*에 대한 항균효과를, 김과 조¹⁶⁾는 농수산 식품원료를 황금추출물로 처리한 후 *Bacillus subtilis*에 대한 항균효과를 보았다. 이처럼 여러 실험들은 대체로 단일 병원성 세균에 대한 실험들이 주를 이룬다. 반면 백¹⁷⁾은 구강질환을 유발하는 다양한 미생물에 대해 항생작용을 갖는 천연추출물을 검색하였으나 치아우식과 관련이 있는 균주로는 *S. mutans* 단일 세균이고 그 외는 치주질환을 일으키는 세균들이었다. 이에 저자는 생약 추출물들의 항균성을 치아우식과 관련이 있는 것으로 알려진 여러 균주들에 대해 연구하고자 앞에서 언급한 *Streptococcus sp.*, *Loctobacillus sp.*, 외에 *Rothia dentocariosa* 등의 표준균주에 대하여 항균효과를 보고자 한다.

지의류(Lichen)는 곰팡이와 조류(녹조류, 남조류)가 공생관계를 유지하고 있는 생명체로 세계적으로 22,000~23,000종이 분포하고 있으며 오래 전부터 약용, 식용, 장식용 재료로서 여러 나라에서 널리 이용되어지고 있다¹⁸⁾. 과거 지의류의 대부분은 민간 약초로서 사용되었기 때문에 지의류의 항균제로서의 효과를 나타내는 어떠한 활성물질도 보고되지 않았었으나, 1944년을 기점으로 penicillin과 streptomycin이 발견된 후로 지의류로부터 다양한 생리활성물질을 탐색하는 연구가 진행되어져 오고 있다. 그 결과물로 지의류에서 생성되는 1차, 2차 대사산물들은 약리작용이 뛰어난 것으로 알려지고 있고, 대표적으로 usnic acid 성분이 항균작용이 매우 우수한 천연물질로 밝혀져 있다¹⁹⁾. 또한 바라라이²⁰⁾는 남극 지의류 추출물로 항미생물, 항산화 효과를 조사하여 기존에 알려져 있던 usnic acid, usmine A, usmine B 및 usmine C 외에 ramalin을 분리하여 강력한 무독성 항산화 물질로서 제약 산업으로의 응용가능성을 제안하였다. 이외에 최근 지의류는 식품첨가

제, 향수, 항바이러스제, 치매치료제, 제초제 등에 이용되고 있으며, 그 응용범위가 점점 확대되어 미국, 유럽, 일본을 중심으로 활발한 연구가 이루어지고 있다²¹⁾. 이렇듯 지의류는 무독성이면서 항미생물 활성이 높고, 다양한 분야에서 응용 연구되어지고 있는 천연재료이지만 치아우식에 관여하는 세균에 대한 연구는 이루어지지 않고 있다.

이에 본 연구에서는 지의류 추출물 및 생약 등 천연 추출물을 이용하여 치아우식을 유발하는 것으로 알려진 *Streptococcus mutans* 등을 포함한 6종의 표준균주와 구강내 치아우식 부위에서 분리 동정된 임상균주 10종에 대한 항세균 활성능력을 탐색하여, 구강내 세균에 대한 항세균제로서의 이용가치를 확인하고자 한다.

2. 연구대상 및 방법

2.1. 연구대상

실험에 사용한 생약 및 지의류는 각각 18종, 7종이다. 생약 18종은 황련(*Coptis japonica*), 금은화(*Lonicera japonica*), 화피(*Prunus sargentii*), 야국(*Chrysanthemum boreale*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 모과(*Chaenomeles sinensis*), 잔대(*Adenophora triphylla*), 지골피(*Lycium chinense*), 산약(*Dioscorea batatas*), 백두홍(*Pulsatilla koreana*), 진피(*Citrus sunki*), 백화사설초(*Hedyotis diffusa*), 죽엽(*Phyllostachys pubescens*), 두충(*Eucommia ulmoides*), 천화분(*Trichosanthes kirilowii*), 음양곽(*Epimedium koreanum*), 황백(*Phellodendron amurense*) 및 백선피(*Dictamnus dasycarpus*) 등이다. 이 재료들은 한약 재료상에서 건조된 것을 구입하여 사용하였다. 또한 남극에서 분리된 지의류 7종은 *Sterocaulon* sp. KoLRI 004161, *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184, *Usnea antarctica* KoLRI 004167, *Cladonia furcata* KoLRI 004223, *Sphaerophorus* sp. KoLRI 004283, *Umbilicaria antarctica* KoLRI 006693 및 *Cetraria aculeata* KoLRI 004163 등이다. 지의류 균주는 순천대학교 지의류은행에서 분양받아 사용하였다.

2.2. 연구방법

2.2.1. 열수 추출

18종의 생약 즉, 황련, 금은화, 화피, 야국, 황금, 모과, 잔대, 지골피, 산약, 백두홍, 진피, 백화사설초, 죽엽, 두충, 천화분, 음양곽, 황백 및 백선피로부터 시료를 추출하였다. 추출방법은 이 등²²⁾이 사용한 방법에 준하여 이루어졌으며, 간략히 설명하면 시료 12g을 직경 0.5~1.0cm로 세절한 후 탈이온수를 120ml씩 첨가하여 3시간 동안 가압조건에서 가열하여 추출하였다. 얻어진 추출액을 여과한 다음, 여액이 8g이 되도록 감압 농축한 것을 시료로 사용하였다.

2.2.2. 메탄올과 아세톤 추출

지의류 7종, *Sterocaulon* sp. KoLRI 004161, *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184, *Usnea antarctica* KoLRI 004167, *Cladonia furcata* KoLRI 004223, *Sphaerophorus* sp. KoLRI 004283, *Umbilicaria antarctica* KoLRI 006693 및 *Cetraria aculeata* KoLRI 004163은 메탄올과 아세톤으로 추출하였다. 추출방법은 강²³⁾이 사용한 방법에 준하여 이루어졌다. 즉, 각각을 분쇄하여 분말로 된 각 시료에 10배량(w/v)의 80% 메탄올을 가하여 3시간 동안 냉침한 후 초음파 추출기(Sonics-JAC 4020, Jinwoo Co., Korea)를 사용하여 1시간 동안 추출한 후 여과지(No. 5A, Adventec, Japan)를 통과시켰다. 같은 방법으로 3회 반복하여 여과된 추출물을 감압 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 농축액을 얻었다. 같은 방법으로 아세톤을 가하여 농축액을 얻었다. 이들을 동결건조 후 dry keeper에 보관하여 사용하였다.

2.2.3. 항세균 활성 시험

1) 사용균주 및 배양

항세균 활성을 확인하기 위해 사용한 치아우식과 관련이 있는 6종의 표준균주는 *Streptococcus mutans* KCTC 3065^T, *S. sanguinis* KCTC3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512, *Rothia dentocariosa* KCTC 3204^T, *Lactobacillus casei* KACC 12413^T 및 *L. acidophilus* KACC 12419^T이며, 균주들은 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC) 및 한국농업미생물자원센

터(KACC)로부터 분양 받았다. 또한 구강내 우식치아에서 분리한 10개 균주는 김²⁴⁾이 분리한 *Actinomyces oris* 1041, *Corynebacterium durum* 3151, *R. dentocariosa* 911, *R. dentocariosa* 1822, *Loctobacillus rhamnosus* 2421, *S. mutans* 121, *S. oralis* 2221, *S. salivarius* 122, *S. sanguinis* 912 및 *Neisseria* sp. KEM232였다. *L. casei* KACC 12413^T, *L. acidophilus* KACC 12419^T 및 *L. rhamnosus* 2421 균주의 배양 배지는 Loctobacilli MRS agar(MRS, Becton Dickinson)를 사용하였고, 그 외 균주는 Brain heart infusion agar(BHI, Becton Dickinson)를 사용하였다. 배양 온도와 배양 조건은 37°C, 5% CO₂ 배양기를 이용하였다.

2) 항균활성 측정

생약 추출물 18종 및 메탄올과 아세톤 지의류 추출물 각각 7종에 대해 디스크 확산법²⁵⁾을 이용하여 세균 억제 효과를 확인하였다. 생약 추출물은 음성 대조군으로 멸균 증류수를 사용하였다. 지의류 추출물은 음성대조군으로 DMSO(dimethyl sulfoxide)와 양성대조군으로 usinc acid를 사용하였다. 실험 방법은 각각의 생약 추출물 250mg을 멸균 증류수 1ml, 지의류 추출물 25mg을 DMSO 1ml에 완전히 녹인 후 50 μ l씩 filter paper disc에 흡수시킨 후 건조시켰다. 그리고 미리 배지에 접종한 각각의 표준균주 위에 디스크를 올려 놓았다. 그리고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24~72시간 동안 배양한 후 디스크 주변에 생성된 억제환(inhibition zone)의 직경을 vernier caliper(Mitutoyo Co., Japen)로 측정하여 각 추출물의 항세균 활성 정도를 측정하였다. 억제환의 직경 측정은 CLSI²⁶⁾ 기준에 의해 시험하였다.

3) 최소억제농도(Minimum Inhibition Concentration, MIC) 측정

최소억제농도 측정은 디스크 확산법을 통한 1차 항세균활성 검사에서 모든 균주에 대하여 활성을 보인 아세톤 추출에 의한 지의류 *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184에 대하여 디스크 확산법으로 MIC 농도를 측정하였다. 농도는 5mg/ml 원액에 멸균된 2차 증류수로

희석하였다. 희석된 시료는 각각 멸균된 paper disc(9mm)에 50 μ l씩 분주하여 흡수시킨 후 건조하였다. 그리고 표준균주 6종과 분리균주 10종을 미리 배양한 후 그 위에 디스크를 올려 놓았다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24~72시간 동안 배양 한 후 억제환의 크기를 측정하여 최소억제농도를 확인하였다.

3. 연구성적

3.1. 항세균 활성 시험

3.1.1. 생약 추출물의 항세균 활성

18종의 추출물 중 2.5mg/ml 농도에서, 황련은 표준균주 *S. mutans* KCTC 3065^T, *R. dentocariosa* KCTC 3204^T, *L. casei* KACC 12413^T 및 *L. acidophilus* KACC 12419^T에 대하여 각각 12, 15, 15 및 14mm의 균증식 억제력을 보였고, 황금은 *R. dentocariosa* KCTC 3204^T, *L. casei* KACC 12413^T 및 *L. acidophilus* KACC 12419^T 균주에 대하여 각각 11, 11 및 14mm의 균증식 억제력을 보였다(Fig. 1). 백선피는 *L. acidophilus* KACC 12419^T 균주에만 11mm의 균증식 억제력을 보였다. 그러나 금은화, 화피, 야국, 모과, 잔대, 지골피, 산약, 백두홍, 진피, 백화사설초, 죽엽, 두충, 천화분, 음양곽 및 황백 추출물은 어떤 균주에 대해서도 항균효과를 보이지 않았다.

3.1.2. 지의류 추출물의 항세균 활성

7종의 지의류 메탄올 추출물 중 0.25mg/ml 농도에서, *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184 추출물은 표준균주 *S. mutans* KCTC 3065^T, *S. sanguinis* KCTC 3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512, *R. dentocariosa* KCTC 3204^T 및 *L. casei* KACC 12413^T 등 5균주에 대해 각각 15, 20, 15, 15 및 14mm의 균증식 억제력을 보였다. *Usnea antarctica* KoLRI 004167 또한 *S. mutans* KCTC 3065^T, *S. sanguinis* KCTC 3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512, *R. dentocariosa* KCTC 3204^T 및 *L. casei* KACC 12413^T 등 5균주에 대해 각각 15, 21, 16, 16 및 14mm의 균증식 억제력을 보였다. 그리고 *Sphaerophorus* sp. KoLRI 004283

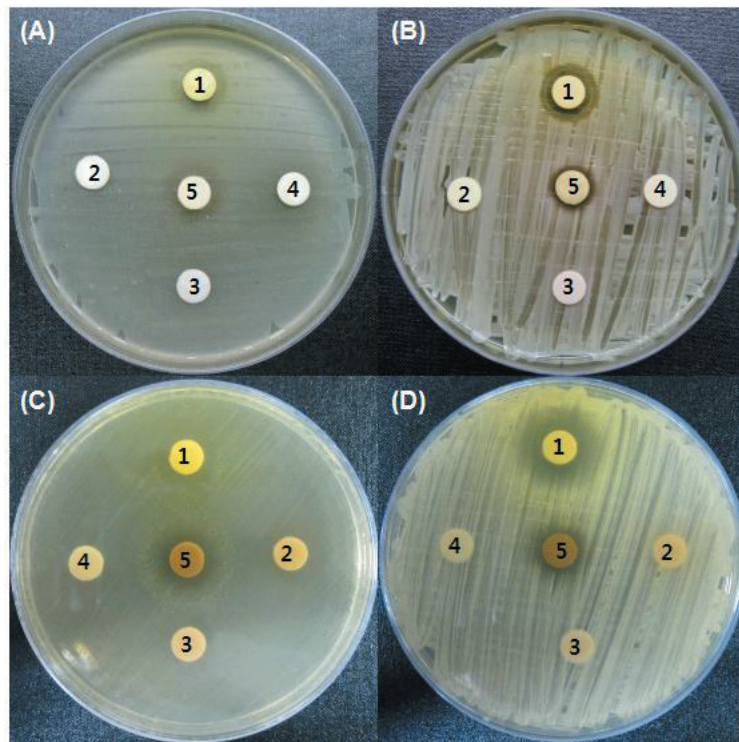


Fig. 1. Antibacterial activity by disc diffusion method of natural extracts.

1, *Coptis japonica*; 2, *Lonicera japonica*; 3, *Prunus sargentii*; 4, *Chrysantemum boreale*; 5, *Scutellaria baicalensis*. (A), *S. mutans*; (B), *S. salivarius*; (C), *S. sanguinis*; (D), *R. dentocariosa*

Table 1. Antimicrobial activities of methanol and acetone extract of lichen against bacterial strains 1, *S. mutans* KCTC 3065^T; 2, *S. sanguinis* KCTC 3284^T; 3, *S. salivarius* KCTC 5512, 4, *R. dentocariosa* KCTC 3204^T; 5, *L. casei* KACC 12413^T; 6, *L. acidophilus* KACC 12419^T; -, no activity

Lichen	1	2	3	4	5	6
DMSO ^a	-	-	-	-	-	-
M ^b <i>Sterocaulon</i> sp. KoLRI 004161	-	-	-	-	-	-
<i>Usnea aurantiacoatra</i> KoLRI 004184	15	20	15	15	14	-
<i>Usnea antarctica</i> KoLRI 004167	15	21	16	16	14	-
<i>Cladonia furcata</i> KoLRI 004223	-	-	-	-	-	-
<i>Sphaerophorus</i> sp. KoLRI 004283	23	23	18	18	-	-
<i>Umbilicaria antarctica</i> KoLRI 006693	-	-	-	-	-	-
<i>Cetraria aculeata</i> KoLRI 004163	-	-	-	-	-	-
A ^c <i>Sterocaulon</i> sp. KoLRI 004161	13	14	13	11	11	-
<i>Usnea aurantiacoatra</i> KoLRI 004184	29	31	22	33	24	19
<i>Usnea antarctica</i> KoLRI 004167	27	26	22	28	21	17
<i>Cladonia furcata</i> KoLRI 004223	-	-	-	-	-	-
<i>Sphaerophorus</i> sp. KoLRI 004283	23	23	20	18	-	-
<i>Umbilicaria antarctica</i> KoLRI 006693	-	12	14	-	-	-
<i>Cetraria aculeata</i> KoLRI 004163	16	18	16	17	-	-

^aNegative control, ^bmethanol extract, ^cacetone extract, unit: mm.

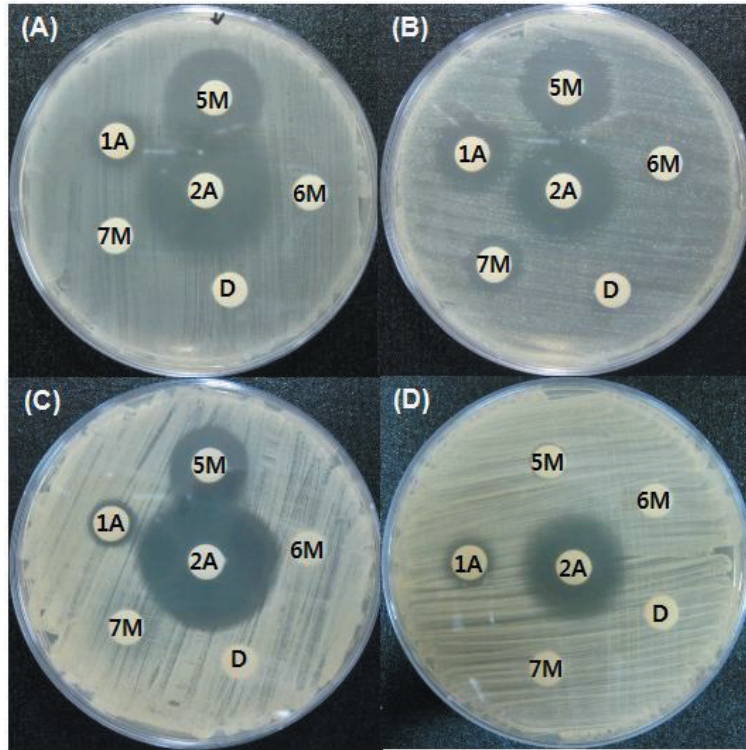


Fig. 2. Antibacterial activities of the methanol and acetone extract from antarctic lichens.

5M, *Sphaerophorus* sp.; 6M, *Umbilicaria antarctica*; 7M, *Cetraria aculeate*; 1A, *Sterocaulon* sp.; 2A, *Usnea aurantiacoatra*; D, negative control(DMSO); (A), *S. mutans* KCTC 3065^T; (B), *S. salivarius* KCTC 5512; (C), *R. dentocariosa* KCTC 3204^T; (D), *L. casei* KACC 12413^T

Table 2. Inhibitory effects of *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184 on the growth of type strains and isolate strains

Strain	Concentration (µg/ml)										
	5,000	2,500	1,000	500	250	100	50	10	5	1	0.5
<i>Actinomyces oris</i> 1041	≥22	≥22	≥22	≥22	≥22	≥22	22	*12	-	-	-
<i>Corynebacterium durum</i> 3151	≥24	≥24	≥24	≥24	≥24	≥24	24	19	*13	-	-
<i>Rothia dentocariosa</i> KCTC 3204 ^T	≥22	≥22	≥22	≥22	≥22	≥22	22	17	*14	-	-
<i>R. dentocariosa</i> 911	≥22	≥22	≥22	≥22	≥22	≥22	22	*15	-	-	-
<i>R. dentocariosa</i> 1822	≥28	≥28	≥28	≥28	≥28	≥28	28	*12	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> KACC 12413 ^T	≥22	≥22	≥22	≥22	22	20	17	*12	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> KACC 12419 ^T	≥23	≥23	≥23	≥23	23	20	*16	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> 2421	≥23	23	21	19	18	16	*15	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> KCTC 3065 ^T	≥23	≥23	≥23	≥23	≥23	23	18	*15	-	-	-
<i>S. mutans</i> 121	≥23	≥23	≥23	≥23	≥23	23	20	*13	-	-	-
<i>Streptococcus oralis</i> 2221	≥22	≥22	≥22	≥22	≥22	22	*18	-	-	-	-
<i>S. salivarius</i> KCTC 5512	≥22	≥22	≥22	≥22	22	20	17	*14	-	-	-
<i>S. salivarius</i> 122	≥20	≥20	≥20	≥20	20	18	15	*12	-	-	-
<i>S. sanguinis</i> KCTC 3284 ^T	≥20	≥20	≥20	≥20	20	17	*14	-	-	-	-
<i>S. sanguinis</i> 912	≥20	≥20	≥20	≥20	20	17	*14	-	-	-	-
<i>Neisseria</i> sp. KEM232	≥20	20	19	18	16	*12	-	-	-	-	-

* Minimum inhibitory concentration (≥12), unit: mm.

은 *S. mutans* KCTC 3065^T, *S. sanguinis* KCTC 3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512 및 *R. dentocariosa* KCTC 3204^T 등 4균주에 대해 각각 23, 23, 18 및 18mm의 균증식 억제력을 보였다<Table 1>.

아세톤 추출물 중 *Sterocaulon* sp. KoLRI 004283 은 *S. mutans* KCTC 3065^T, *S. sanguinis* KCTC 3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512, *R. dentocariosa* KCTC 3204^T 및 *L. casei* KACC 12413^T 등 5균주에 대해 각각 13, 14, 13, 11 및 11mm의 균증식 억제력을 보였다. *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184는 *S. mutans* KCTC 3065^T, *S. sanguinis* KCTC 3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512, *R. dentocariosa* KCTC 3204^T, *L. casei* KACC 12413^T 및 *L. acidophilus* KACC 12419^T 등 6균주 모두에 대해 각각 29, 31, 22, 33, 24 및 19mm의 균증식 억제력을 보였다<Fig. 2>. 또한 *Usnea antarctica* KoLRI 004167도 *S. mutans*

KCTC 3065^T, *S. sanguinis* KCTC3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512, *R. dentocariosa* KCTC 3204^T, *L. casei* KACC 12413^T 및 *L. acidophilus* KACC 12419^T 등 6균주 모두에 대해 각각 27, 26, 22, 28, 21 및 17mm의 균증식 억제력을 보였다. *Sphaerophorus* sp. KoLRI 004283은 *S. mutans* KCTC 3065^T, *S. sanguinis* KCTC 3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512 및 *R. dentocariosa* KCTC 3204^T 등 4균주에 대해 각각 23, 23, 20 및 18mm의 균증식 억제력을 보였다. 그리고 *Umbilicaria antarctica* KoLRI 006693은 *S. sanguinis* KCTC 3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512 에 대해 각각 12, 14mm의 균 증식 억제력을 보였다. *Cetraria aculeata* KoLRI 004163은 *S. mutans* KCTC 3065^T, *S. sanguinis* KCTC 3284^T, *S. salivarius* KCTC 5512 및 *R. dentocariosa* KCTC 3204^T 등 4균주에 대해 각각 16, 18, 16 및 17mm의 균

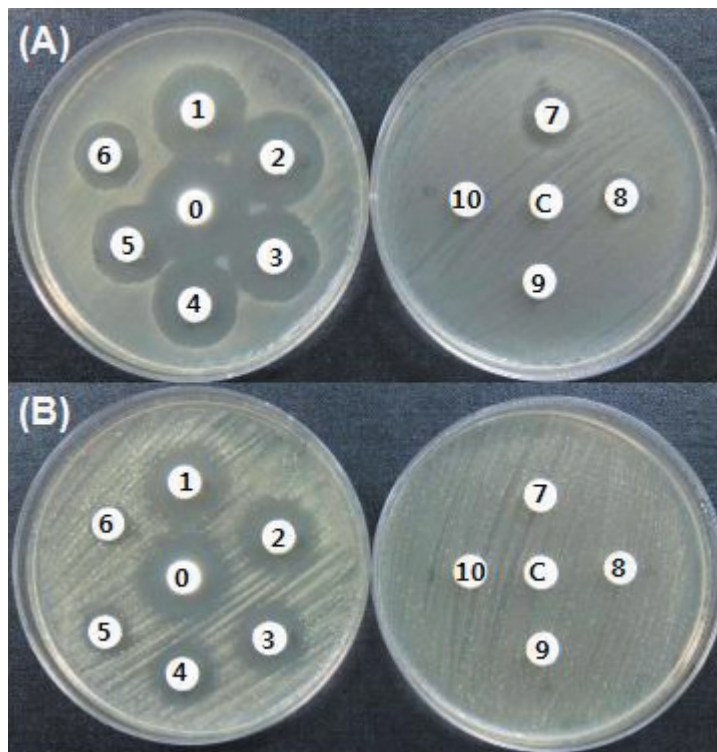


Fig. 3. Minimum inhibitory concentrations of the *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184 extract on the growth of *S. salivarius* KCTC 5512^T(A) and *Neisseria* sp. KEM232(B).

0, 5mg/ml; 1, 2.5mg/ml; 2, 1mg/ml; 3, 0.5mg/ml; 4, 250 μ g/ml; 5, 100 μ g/ml; 6, 50 μ g/ml; 7, 10 μ g/ml; 8, 5 μ g/ml; 9, 1 μ g/ml; 10, 0.5 μ g/ml

증식 억제력을 보였다(Table 1).

3.1.3. 지의류 추출물 최소억제농도(MIC)

1차 항세균활성 검사에서 모든 표준균주에 대하여 가장 높은 활성을 보인 아세톤 추출 지의류 *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184에 대하여 디스크 확산법으로 MIC 농도를 측정하였다. 표준균주 6종과 구강내 우식치아에서 분리한 10개 균주에 대한 *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184의 최소억제농도를 측정한 결과는 Table 2, Fig. 3과 같다. 최소억제농도는 균주에 따라 차이를 보였으며, 범위는 5-100 μ g/ml이었다. 표준균주 *R. dentocariosa* KCTC 3204^T와 구강 분리균주 *C. durum* 3151 균주가 가장 낮은 5 μ g/ml 농도에서 최소억제효과를 보였으며, 그 다음으로 표준균주 *S. mutans* KCTC 3065^T, *S. salvarius* KCTC 5512, *L. casei* KACC 12413^T와 구강분리균주 *S. mutans* NCTC 121, *S. salvarius* 122, *R. dentocariosa* 911, *R. dentocariosa* 1822 모두는 10 μ g/ml 농도에서 최소억제효과를 확인하였다. 표준균주 *L. acidophilus* KACC 12419^T, *S. sanguinis* KCTC 3284^T와 구강분리균주 *A. oris* 1041, *L. rhamnosus* 2421, *S. oralis* 2221, *S. sanguinis* 912 모두는 50 μ g/ml 농도에서 최소억제효과를 보였으며, 그람 음성 세균인 *Neisseria* sp. KEM232가 모든 균주에 비해 가장 높은 100 μ g/ml 농도에서 최소억제효과를 보였다.

4. 총괄 및 고안

생약 추출물을 치아우식의 원인균 및 초기 치아우식에 관여하는 *S. mutans*와 또 다른 우식 원인균으로 알려진 *S. sanguinis* 및 *S. salivarius*에 대한 항균효과를 측정하였다. 또한 소와열구 및 우식 진행 병소에 관여하는 것으로 알려진 *L. casei* 및 *L. acidophilus*, 치면세균막 초기 생성 단계에 나타나는 *R. dentocariosa*에 대한 항균효과를 측정하였다. 그 결과 *S. mutans*에 대한 항균효과를 보인 추출물은 황련이었다. 그리고 우식 진행병소 즉, 심부상아질 우식에 관여하는 것으로 알려진 *L. casei* 및 *L. acidophilus*에 대해 항균효과를 보인 추

출물은 황련과 황금이었다. 결과적으로 황련은 치아우식과 관련이 있는 세균 즉, 그람양성세균에 모두 항균효과를 보이는 것으로 확인되어 배²⁷⁾, 손 등²⁸⁾의 식중독 유발세균 중 그람양성세균에 대해 항균효과를 보인 것과도 일치하였다. 황금의 경우 *L. casei* 및 *L. acidophilus*에만 항균효과를 보인 것은 전 등²⁹⁾의 연구에서 *S. mutans*에 항균효과를 보인 결과와는 차이가 있었다. 그러나 김 등³⁰⁾의 인체 병원성 균주 19종에 대한 항균효과 실험에서는 *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* 등 그람음성세균보다는 그람양성세균에서 항균성분이 유효한 것으로 나타나 본 연구와 같은 결과를 보였다.

남극 지의류 추출물은 메탄올과 아세톤 두 가지 용매로 구분하여 추출하였으며, *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184, *U. antarctica* KoLRI 004167 및 *Sphaerophorus* sp. KoLRI 004283는 메탄올 및 아세톤 추출물에 대해 모두 항균효과를 보였다. 반면에 *Umbilicaria antarctica* KoLRI 006693 및 *Cetraria aculeata* KoLRI 004163는 아세톤 추출물에 대해서만 항균효과를 보였다. 지의류에서 생성되는 대사 산물들은 약리작용이 뛰어난 것으로 알려져 있으며 대표적인 성분이 usnic acid와 같은 탄닌 성분이다. 남극 지의류 추출물을 사용한 바타라이²⁰⁾ 연구에서도 선별된 추출물 분획을 통해 검출된 usnic acid에서 그람양성세균에 대한 항균효과를 확인하였다. 그리고 그의 실험에서 *Cetraria aculeata* 추출물이 그람양성세균에 대해 항균효과를 보인 결과와 본 실험의 *Cetraria aculeata* KoLRI 004163 아세톤 추출물이 *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* 및 *R. dentocariosa* 등의 그람양성세균에 대해 항균효과를 보인 결과와 일치하였다. 그리고 *Umbilicaria antarctica* 추출물이 *S. sanguinis* 및 *S. salivarius* 등의 그람양성세균에 대해 항균효과를 보이는 것과도 일치하였다. 그러나 그의 연구는 지의류 *Cetraria aculeate* 및 *Umbilicaria antarctica*을 메탄올과 물의 혼합액으로 추출하여 그람양성세균인 *Bacillus subtilis*에 대한 항균효과가 높은 것으로 보고하였지만 본 실험에서는 *Cetraria aculeate* KoLRI 004163과 *Umbilicaria antarctica* KoLRI 006693의 메탄올 추출물은 항균효과를 보이지 않았다. 추후 항세균 활성

을 보인 지의류 추출물의 분획 실험을 통해 어떤 성분이 항균효과를 나타내는지에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

1차 항세균 활성 검사에서 표준균주 6종 모두에 대하여 광범위한 억제효과를 보인 남극지의류 *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184를 선택하여 최소억제 농도를 측정하였다. 사용된 균주는 표준균주 6종 이외에 소아의 구강 내 우식 치아에서 직접 분리한 10종의 균주들을 포함하여 측정하였다. 총 16균주 중 그람음성세균인 *Neisseria* sp.를 제외한 그람양성세균에서 비교적 낮은 5-50 μ g/ml 농도 범위에서 억제효과를 보였다. 그람양성세균은 high G+C, low G+C group으로 구분할 수 있다. 본 연구에서 high G+C group인 *A. oris*, *Corynebacterium durm* 및 *R. dentocariosa* 균주들은 5-10 μ g/ml 농도에서 억제효과를 보였으며, low G+C group인 *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius* 및 *S. sanguinis* 균주들은 10-50 μ g/ml로 확인되었다. 또한 그람양성세균보다는 약간 높은 농도이지만 그람음성세균 *Neisseria* sp. 균주도 100 μ g/ml 농도에서 억제 효과를 보였다. 이렇게 그람양성 및 음성세균에 따라 항균 효과가 달라지는 것은 항세균 활성 성분이 세포내로 투과하는 과정 및 세포벽 합성에 대한 저해 때문으로 판단되나 보다 자세한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 표준균주 *R. dentocariosa*, *S. mutans* 및 *S. salivarius*와 구강 분리균주의 항세균 활성 비교에서 *R. dentocariosa* 표준균주는 5 μ g/ml 농도, 분리균주는 10 μ g/ml 농도에서 최소억제농도를 보여 약간의 차이가 있었다. 그러나 *S. mutans*(10 μ g/ml) 및 *S. salivarius*(10 μ g/ml)는 표준 균주와 분리균주 간 최소억제농도 차이는 없었다.

결과적으로, *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184 추출물이 치아우식에 관여하는 세균 16종 모두에 대해 아주 적은 양으로도 항균효과를 보였으며, 그중 그람음성세균(100 μ g/ml)보다 그람양성세균(5-50 μ g/ml)에서 억제효과가 높은 것을 확인하였다.

5. 결론

천연물질의 항세균 활성 능력을 탐색하여, 구강내 세균에 대한 항균제로서의 이용가치를 확인하고자 하였다. 치아우식을 유발하는 것으로 알려진 6종의 표준균주와 구강내 치아우식 부위에서 분리 동정된 임상균주 10종에 대한 천연 추출물 25종에 대하여 항세균 활성 검사를 실시하였다.

그 결과 생약 추출물은 황련, 황금, 백선피에서 항균효과를 보였다. 지의류는 메탄올 추출물 3종, 아세톤 추출물 6종에서 항균효과를 보였다. 그중 가장 높은 항균효과를 보인 *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184 지의류 아세톤 추출물의 치아우식에 관여하는 표준균주 6종 및 우식치아에서 분리한 균주 10종에 대한 최소억제농도(MIC)를 측정한 결과 *Actinomyces oris* 1041 12 μ g/ml, *Corynebacterium durum* 3151 13 μ g/ml, *Rothia dentocariosa* KCTC 3204^T 14 μ g/ml, *R. dentocariosa* 911 15 μ g/ml, *R. dentocariosa* 1822 12 μ g/ml, *Lactobacillus casei* KACC 12413^T 12 μ g/ml, *L. acidophilus* KACC 12419^T 16 μ g/ml, *L. rhamnosus* 2421 15 μ g/ml, *Streptococcus mutans* KCTC 3065^T 15 μ g/ml, *S. mutans* 121 13 μ g/ml, *Streptococcus oralis* 2221 18 μ g/ml, *S. salivarius* KCTC 5512 14 μ g/ml, *S. salivarius* 122 12 μ g/ml, *S. sanguinis* KCTC 3284^T 14 μ g/ml, *S. sanguinis* 912 14 μ g/ml, *Neisseria* sp. KEM232 12 μ g/ml였다.

결과들을 종합해 보면, *Usnea aurantiacoatra* KoLRI 004184 지의류 추출물이 치아우식에 관여하는 세균 16종 모두에 대해 아주 적은 양으로도 큰 항균효과를 보였다.

참고문헌

1. Keyes PH, Jordan HV. Factors influencing the initiation, transmission and inhibition of dental caries: In Mechanisms of hard tissue destruction. New York:Academic Press:1963:261-283.
2. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque forma-

- tion. *Microbes Infect* 2000;2(13):1599-1607.
3. Willett NP, White RR, Rosen S. *Essential dental microbiology*. 1th ed. cunnecticut: Appleton & Lange;1991:341-355.
 4. 박소영, 박은혜, 오종석, 양규호. Fructan 생성 *Streptococcus salivarius*의 인공치태 억제효과. 대한소아치과학회지 2003;30(1):25-32.
 5. 이선영, 김재곤, 백병주 외 4인. 구강 내 세균에 대한 Essential oil의 항균효과에 관한 연구. 대한소아치과학회지 2009;36(1):1-11.
 6. Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(5):1158-1159.
 7. 정기옥. 마 추출물의 구강병 원인균에 대한 항균력. 한국치위생교육학회지 2007;7(1):53-59.
 8. Ooshima T, Minami T, Matsumoto M et al. Comparision of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols in SPF rats. *Caries Res* 1998;32(1):75-80.
 9. Tsuchiya H. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. *Pharmacolgy* 1999;59(1):34-44.
 10. Sarkar S, Sett P, Chowdhury T, Ganguly DK. Effect of black tea on teeth. *J Indian Soc. Pedod Prev Dent* 2000;18(4):139-140.
 11. Yanaida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira Cordeiro JG. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. *J Agric Food Chem* 2000;48(11):5666-5671.
 12. 홍석진, 손재범, 박근형. 생약추출물이 초기우식 법랑질의 재광화에 미치는 효과. 대한구강보건학회지 2003;27(2):237-248.
 13. 백종윤, 김용현, 권현정 외 3인. 황금(*Scutellaria baicalensis*) 추출물에 의한 *Streptococcus mutans*의 항세균 및 부착억제 효과. 치위생과학회지 2008;8(4):367-373.
 14. 이신지, 이명중, 정지은, 김호준, Shambhunath Bose. 발효 금은화 및 황련의 유해균 억제 효과. 한방비만학회지 2011;11(1):35-46.
 15. 조민정, 이항님, 김은미. 생약 추출물의 항균력 및 인공치태형성 억제효과. 한국치위생교육학회지 2005;5(1):123-130.
 16. 김영록, 조성환. 황금추출물처리에 의한 농수산 식품원료의 선도유지효과. 농업생명과학연구 2004;38(1):19-30.
 17. 백동현. 구강 질환 유발 미생물에 대한 항생작용을 갖는 천연물 추출물 검색. 미생물학회지 2007;43(3):227-231.
 18. Crittenden PD, David JC, Hawksworth DL, Campbell FS. Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. *The New phytologist* 1995;130(2):267-297.
 19. Ingoldsdottir K. Usnic acid. *Phytochemistry* 2002;61(7):729-736.
 20. 바비타 파우델-바타라이. 남극지의류 *Ramalina terebrata* 추출물의 항균 항산화 활성[박사학위논문]. 아산:순천향대학교 대학원;2009.
 21. 강형일, 윤병준, 김성현 외 6인. 분자생물학적 기법에 의한 우도해안과 노지암석에 분포하는 지의류의 생태학적 분석. 한국미생물·한국생명공학회지 2004;32(4):334-340.
 22. 이문조, 박진우, 김용주 외 3인. 황금 및 황련 열수추출물의 아질산염 소거작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지 2000;14(2):108-117.
 23. 강현민. 소목(*Caesalpinia sappan* L.의 심재) 메탄올 추출물의 항 Influenza virus 활성성분 연구. 용인대학교논문집 1999;17:179-196
 24. 김은미. 소아의 치아우식 부위별 세균 군집 다양성[박사학위논문]. 순천:순천대학교 대학원;2010.
 25. Marvin T, Robert I, Lindemeyer, Robert G. Petersdorf. Comparison of single-disc and tube-dilution techniques in determining antibiotic sensitivities of gram-negative

- pathogens. *Annals of Internal Medicine* 1962;58(1):56-65.
26. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009: M100-S19.
 27. 배지현. 식중독 유발세균의 증식에 미치는 황련추출물의 효과. *한국식품영양학회지* 2005;18(1):81-87.
 28. 손동화, 이석일, 정영건. 한약재의 식중독균에 대한 항균효과. *한국위생과학회지* 2001;7(2):103-108.
 29. 전은숙, 윤수홍, 한만덕. 한약재 추출물의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균효과. *한국치위생과학회지*. 2002;2(1):31-38.
 30. 김은님, 백종윤, 김용현, 한만덕. 황금(*Scutellaria baicalensis*)의 열수 추출물이 병원성 세균에 미치는 항균활성. *순천향자연과학연구논문집*. 2008;14(1):11-18.