

## 용매 변화에 따른 버섯추출물의 항충치활성

박은진 · 이준수 · 최원석<sup>1,\*</sup>

충북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>충주대학교 식품공학과

### Anti-cariogenic Activities of Mushroom Extracted with Various Solvent Systems

Eun-Jin Park, Junsoo Lee, and Won-Seok Choi<sup>1,\*</sup>

Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chungju National University

**Abstract** Various mushroom extracts were examined for their anti-*Streptococcus mutans* and anti-glucosyltransferase (GTase) activities. Mushrooms were extracted with chloroform, methanol, acetone, ethyl acetate, and distilled water. The chloroform, methanol, and ethyl acetate extracts showed higher antimicrobial activity than that of the others. The inhibitory effects of the chloroform, methanol, and ethyl acetate extracts of *Lyopyllum ulmarium*, which have high anti-microbial and GTase activities, on the growth of *S. mutans* were examined and the optimal ratio of solvents was also evaluated to investigate the influence of solvents using a simplex centroid design. The anti-cariogenic effects of the *L. ulmarium* extract on *S. mutans* was influenced by the solvent, and the optimum anti-cariogenic activity of the extract was obtained with the ratio of chloroform:methanol:ethyl acetate=1:1:1 (v/v/v). These results suggest that solvent selection is an important factor to extract anti-cariogenic materials effectively from mushrooms.

**Keywords:** anti-cariogenic materials, selection of solvent, mushrooms, *Lyopyllum ulmarium*

## 서 론

버섯은 담자균류에 속하는 음식생물로서, 풍미가 뛰어나고 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등의 각종 영양소를 함유하고 있을 뿐만 아니라 다양한 생리활성 물질들을 생산함으로써로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 온 자연건강식품이다(1,2).

버섯은 1945년 낙엽버섯(*Marasmius conigenus*)에서 항생물질로 marasimic acid가 함유된 것을 보고한 것을 비롯하여, 균사 및 자실체에서 혈당강하물질, 콜레스테롤 감소 물질, 항혈전물질(혈소판 응집 저해물질), 항염증물질 및 렉틴 등 지금까지 약 180개 이상의 생리활성물질을 함유한 것으로 보고되어, 다양한 생체기능 조절물질들을 포함하고 있는 것으로 알려져 있다(3). 특히 식용 및 약용 버섯류로부터 생산되는 기능성 생리활성 물질들은 부작용이 적고 독성 면에서 비교적 안전할 뿐만 아니라 인체 면역계의 기능을 증강시켜, 항암효과 검증 및 다양한 임상연구가 미국, 일본, 중국 및 한국이 중심이 되어 활발히 진행되고 있다(4,5).

충치는 *Streptococcus mutans* 에 의한 치아표면의 colony 형성에 의해 발생하며, 선진국은 물론 우리나라의 경우에도 발병율이

매년 증가하고 있는 추세이다(6-8). *S. mutans* 로부터의 glucosyltransferase(Gtase)에 의해 합성되는 불용성 glucan 또한 치석을 형성하여 산을 축적시킴으로서 치아 에나멜층의 국소적 탈미네랄화를 야기 시킨다(9). 따라서 이론적으로 충치형성 중에 이들 단계를 억제한다면 충치를 예방할 수 있을 것이다.

버섯은 또한 잠재적인 항충치활성을 지니고 있다. 전 세계적으로 널리 알려져 있으며 식용버섯으로 다량 재배되고 있는 Shiitake(*Lentinus edodes*) 버섯이 치석형성을 조절하고 구강세균의 성장을 억제하는 것으로 보고되었다. 또한 다양한 버섯들이 치아표면에 치석을 야기하는 glucan의 성장을 억제하고 glucosyltransferase를 저해하는 데 효과가 있는 여러 페놀화합물들을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(10,11). 그럼에도 불구하고 이러한 버섯들의 항충치활성에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다.

본 연구에서는 1) 항충치물질인 polyphenolic 화합물과 flavonoids가 다량 함유되어 있는 것으로 알려진 8종의 국내자생 천연버섯 추출물에 대해 항충치활성을 조사하였으며, 2) 이들 결과로부터 항충치활성이 높은 버섯을 선정하여, 보다 높은 항충치활성을 지닌 추출물을 얻고자 적절한 추출용매를 조사하였으며, 심플렉스 중심합성계획법을 이용한 추출용매조성별 추출물의 항충치활성을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 버섯 및 버섯추출물 제조

실험에 사용된 버섯은 국내 자생 버섯으로 양송이(*Agaricus bisporus*), 팽이(*Flamm velutipes*), 영지(*Ganoderma lucidum*), 노루궁데이(*Hericium erinaceum*), 만가닥(*Lyopyllum ulmarium*), 검은비

\*Corresponding author: Won-Seok Choi, Department of Food Science and Technology, Chungju National University, Jeungpyeong, Chungbuk 368-701, Korea  
Tel: 82-43-820-5249  
Fax: 82-43-820-5240  
E-mail: choiws@cjnu.ac.kr  
Received July 18, 2011; revised August 22, 2011;  
accepted August 23, 2011

늘(*Pholiota adiposa*), 큰 느타리(*Pleurotus eryngii*) 및 표고(*Shiitake edodes*) 8종으로, 가급적 수확일자가 유사한 것으로 대형마트(Chungju, Korea)에서 구입하거나 충청북도 농업기술원에서 제공 받아 사용하였다.

이들 8종의 버섯으로부터 각각 chloroform(DC Chemical, Seoul, Korea), methanol(Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA), acetone(Daejung Chemical, Shinheung, Korea), ethyl acetate(DSP Inc., Ansan, Korea) 및 증류수를 용매로 사용하여 추출물을 제조하였다.

마쇄한 시료 50 g에 각 용매 100 mL를 가해 혼합한 후, 24시간 동안 상온에서 환류시켰다. 추출 후 고형물은 filter paper(Toyo, No. 2, Tokyo, Japan)를 이용하여 제거하였으며, 분리된 상정액은 rotary evaporator(N-1000S, EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C 이하에서 감압 농축하여 용매를 완전히 휘발시켰다. 농축된 추출물은 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 10 mL로 정용한 후 실험에 사용하였으며, DMSO 용액을 별도의 대조구로 사용하였다(12).

## 균주

항충치 실험에 사용된 균주는 *Streptococcus mutans*(KCTC 3065, *S. mutans*)로 brain heart infusion broth(BHI, Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C shaking incubator(JSSI-100T, JS Reasarch Inc., Gongju, Korea)에서 3회 계대배양함으로써 활성을 회복시키고, 활성이 회복된 균주를 BHI agar에 분주하여 37°C에서 24시간 혐기배양하여 사용하였다.

## 항충치 효과 측정

(1) *S. mutans* 균에 대한 항균활성 측정

### ① Disk diffusion assay

전배양된 *S. mutans* 를  $2 \times 10^5$  CFU/mL로 희석한 후, 미리 제조한 BHI agar plate에 도말하였다. 멸균된 paper disc(직경 8 mm)에 각각의 추출물을 흡수시킨 다음, plate에 올려놓은 후 37°C incubator에서 24시간 배양하는 동안 clear zone의 지름을 측정하였다. 항충치활성의 비교를 위해 항균제 원료로 널리 사용되고 있는 chlorhexidine(Sigma Chemical Co.)을 구입하여 대조구로 사용하였다.

### ② Minimum inhibitory concentration(MIC) 측정

*S. mutans* 에 대한 버섯추출물의 MIC를 측정하기 위하여 액체배지 희석법을 이용하였으며, 각 추출물의 농도를 1-1000 µg/mL까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. *S. mutans* 는 전배양을 통해 균주의 활성을 높인 후  $2 \times 10^5$  CFU/mL로 희석하여 접종하였다. *S. mutans* 가 접종된 BHI broth에 각 추출물을 농도별로 첨가하여 37°C incubator에서 24시간 배양한 후 spectrophotometer(DU 650, Beckman, Indianapolis, IN, USA)로 655 nm에서 배양액의 흡광도를 조사하였다. *S. mutans* 에 대한 버섯추출물의 MIC는 배양액이 0.05 이하의 흡광도 값을 얻었을 때로 정의하였다(8,13).

### (2) Glucosyltransferase(GTase) 분리 및 저해활성 측정

Crude-GTase 분리 및 저해활성 측정은 Hamada와 Torii(14) 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 전배양된 *S. mutans* 를 멸균된 BHI broth에 1%(v/v) 접종하여 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 *S. mutans* 를 4°C, 8000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상정액을 취하였다. 이 상정액을 50% ammonium sulfate(Shinyopure chemicals, Osaka, Japan)로

Table 1. Three-variable simplex centroid design

Formula number	Composition of solvent (%)		
	X1	X2	X3
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33.3	33.3	33.3

포화시켜 4°C에서 하룻밤을 방치한 후, 다시 4°C, 8000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 침전물을 10 mM phosphate buffer(pH 6.8)에 완전히 용해시킨 뒤, 동일 완충용액으로 2회 투석하여 ammonium sulfate를 제거한 후 또 한번 4°C, 8000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소로 사용하였다. GTase 저해활성 측정의 경우, 1 L의 10 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 sucrose(Shinyopure chemicals) 12.5 g, sodium azide(Across organics, Pittsburgh, PA, USA) 0.25 g을 용해시켜 멸균한 기질 용액 0.8 mL를 시험관에 넣고 여기에 GTase 0.04 mL 및 각 추출물을 0.1 mL 첨가한 다음, 멸균된 증류수로 최종용량이 1 mL가 되도록 하였다. 이 시험관을 약 30°C 각도로 누여 경사를 만든 후, 37°C incubator에서 24시간 배양시켰다. 배양 후 표면에 부착된 glucan을 sonicator(Branson 2510, Fisher Scientific, Atlanta, GA, USA)를 이용하여 분산시킨 후, 550 nm에서 흡광도를 측정함으로써 GTase 활성억제 정도를 대조구와 비교하여 측정하였다.

GTase 활성 저해율(%)=

$$[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료무첨가구의 흡광도})] \times 100$$

## 실험 계획

버섯으로부터 *S. mutans* 에 대한 항균성분추출을 위한 최적의 용매선택을 위해 심플렉스 중심합성 계획법(simplex centroid design)을 이용하여 실험계획을 수립하였다. 실험 수는  $2^n - 1$ 로, 이때 n는 변수의 갯수를 나타낸다(15). 본 실험에서는 3개의 용매를 변수로 사용하여 총 7번의 실험 수를 갖게 디자인 하였다(Table 1). 각 용매의 혼합 비율은 0-100%까지로 하였으며, 모든 실험은 3회 반복 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 다양한 버섯 추출물의 항충치 활성

#### 1) *S. mutans* 균에 대한 항균활성

국내 자생 8종의 버섯중 대표적인 충치 원인균인 *S. mutans* 에 대한 항균 효과가 우수한 버섯을 선정하고자 chloroform, methanol, acetone, ethyl acetate 및 증류수를 사용하여 추출한 버섯추출물을 disk diffusion assay 방법을 이용 충치균에 대한 저해효과를 조사하였다(Table 2). *S. mutans* 에 대한 항균 효과가 이미 보고된 표고(*Shiitake edodes*)버섯(10,11)과 생리적 효능이 뛰어난 것으로 알려진 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)(16)의 증류수를 제외한 대부분의 용매 추출물에서 항균 효과가 나타났으며, 특히 만가닥 버섯(*Lyophyllum ulmarium*) 추출물에서 비교적 높은 항균 효과가 나타났다. 추출용매에 의한 항균효과를 살펴보면, 전반적으로 chloroform, methanol, ethyl acetate로 추출한 버섯 추출물에서 상대적

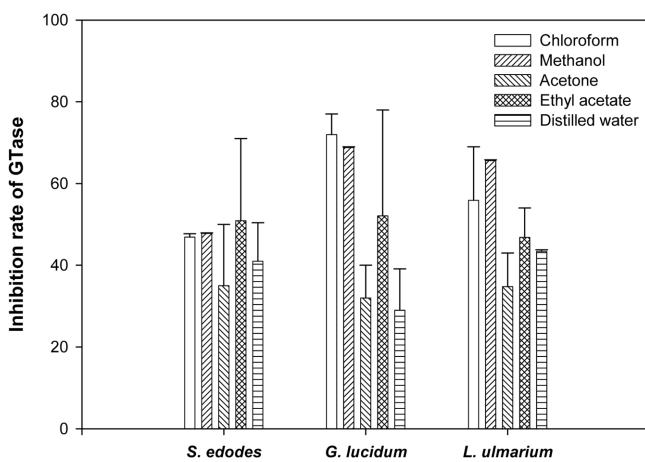
**Table 2. Antimicrobial activities of mushroom extracts against *S. mutans* by various solvents**

	Chloroform	Methanol	Acetone	Ethyl acetate	Distilled water
<i>Agaricus bisporus</i>	+ <sup>1)</sup>	+	- <sup>2)</sup>	-	-
<i>Flamm velutipes</i>	+	-	-	-	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	++	++	+	+	-
<i>Hericium erinaceum</i>	++	-	-	++	-
<i>Lyopyllum ulmarium</i>	++	+++	+	++	-
<i>Pholiota adiposa</i>	-	++	-	+	-
<i>Pleuotus eryngii</i>	-	-	-	-	-
<i>Shiitake edodes</i>	++	++	+	-	-

Chlorhexidine: +++++, DMSO: not detected

<sup>1)</sup>+, clear zone (φ) ≥1.0 mm; ++, clear zone ≥1.5 mm; +++, clear zone ≥2.0 mm; +++++, clear zone ≥2.5 mm

<sup>2)</sup>not detected



**Fig. 1. Inhibition effects of mushroom extracts on GTase activity by various solvents.**

으로 높은 항균효과가 나타났다. 한편 버섯추출물과 항균효과 비교를 위해 사용되었던 chlorhexidine 의 경우 예상했던 대로 매우 높은 항균효과를 보여주었으며, 시료정용을 위해 사용되었던 DMSO 용매의 항균효과는 관찰되지 않았다.

2) Glucosyltransferase(GTase)의 활성저해

*S. mutans* 균이 생성하는 GTase가 sucrose를 이용하여 집착성을 지니며 불용성인 glucan을 합성, dental plaque를 형성하므로, 앞선 실험결과 *S. mutans* 균에 대해 항균활성이 높은 것으로 나타난 표고버섯, 영지버섯 및 만가닥버섯만을 대상으로 이들 추출물의 GTase 활성 저해 효과를 조사해 보았다(Fig. 1). 3종류의 버

섯추출물 모두 어느 정도 GTase 활성을 저해하는 것으로 나타났으며(29-72%), 특히 chloroform, methanol 및 ethyl acetate용매 추출물에서 높은 GTase 활성 저해효과를 보여주었다.

*S. mutans* 에 대한 항균활성 및 GTase 활성저해 측정결과로부터, 항균 효과와 GTase 저해 활성이 뛰어나지만 상대적으로 그 기능이 밝혀지지 않은 만가닥버섯을 선정하여, 이 버섯을 chloroform, methanol 및 ethyl acetate 용매로 추출한 후, 항충치효과를 지닌 소재로서의 이용 가능성을 조사해 보았다.

추출용매의 조성변화와 만가닥버섯 추출물의 항충치활성

높은 항충치활성을 지닌 만가닥버섯 추출물을 얻고자 최적의 추출용매 조성을 심플렉스 중심합성계획법(simplex centroid design)을 이용하여 조사하였다. 추출 공정의 독립변수(Xi)는 추출 용매인 chloroform(X1), methanol(X2) 및 ethylacetate(X3)로 정하였으며, 실험범위는 각각 0-100% 까지로 하여 X1+X2+X3=100%가 되도록 설계하였다. 위의 실험계획법에 의한 각각의 추출 조건에서 만가닥 버섯의 항충치 활성은 *S. mutans* 균에 대한 disc diffusion assay와 MIC 실험을 통한 항균활성측정 및 GTase 저해활성측정을 통하여 조사하였으며, 각각 3회 반복 실험한 후 그 결과의 평균값을 Table 3에 나타내었다.

Disc diffusion assay를 통한 항균 효과 측정결과, 3가지 용매 중에서는 ethyl acetate 로 추출한 추출물이 *S. mutans* 에 대해 항균 효과가 상대적으로 높은 것으로 나타났으나, 전체적으로는 3가지 용매를 모두 혼합하여 추출한 추출물에서 가장 높은 항균효과를 보여주었다. MIC 측정 및 GTase 저해 활성 측정결과에서는 3가지 용매 중 chloroform 추출물에서 상대적으로 낮은 최소저해농도(MIC) 값을 나타내었고, GTase 활성 저해능력이 상대적으로 컸으나, 전체적으로는 역시 3가지 용매를 모두 혼합하여 추출한 추

**Table 3. Anti-cariogenic effects of *L. ulmarium* extract on *S. mutans* by various solvent systems**

Formula number	Composition of solvent(%)			Clear zone (φ, mm)	MIC (μg/mL)	Inhibition rate of GTase activity (%)
	Chloroform	Methanol	Ethyl acetate			
1	100	0	0	9.7	250.0	37.08
2	0	100	0	9.7	568.8	28.15
3	0	0	100	10.0	437.5	17.24
4	50	50	0	9.8	200.4	35.89
5	50	0	50	9.8	232.5	30.73
6	0	50	50	9.9	216.7	17.64
7	33.3	33.3	33.3	10.4	92.5	39.46

DMSO: Inhibition rate of GTase activity, 3.79%

출물에서 가장 낮은 MIC값과 가장 높은 GTase 저해 활성을 나타내었다. 즉, *S. mutans*에 대해 항균효과와 GTase 저해 활성은 이들 3가지 용매를 균등하게 혼합한 용매로 추출한 추출물에서 가장 높았음을 보여 주었다. 결론적으로 만가닥버섯 추출물은 뛰어난 항충치 소재로서 추후 산업적 응용면에서 매우 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다. 더불어 버섯추출물의 항충치 효과는 추출용매에 의해 영향을 받으므로 버섯에서 항충치활성 물질을 얻고자 할 때에는 추출용매선택이 매우 중요할 것으로 사료된다.

## 요 약

버섯류는 기호식품으로서의 성격과 기능성식품으로서의 성격을 동시에 갖는 매우 독특한 식품소재로서 본 연구에서는 국내에서 자생하는 8종류의 버섯에서 항충치 활성성분을 조사해 보았으며, 더불어 높은 항충치활성을 가진 추출물을 얻고자 다양한 용매를 이용, 최적의 용매조성을 탐색해 보았다. Chloroform, methanol, acetone, ethyl acetate 및 증류수를 용매로 사용하였으며, 이들 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균 효과와 glucosyltransferase (GTase) 활성 억제효과를 살펴보았다. 표고버섯, 영지버섯 및 만가닥버섯 추출물이 상대적으로 높은 항충치활성을 나타내었으며, 추출용매에 의한 항균효과를 조사해본 결과, chloroform, methanol, ethyl acetate로 추출한 버섯 추출물에서 상대적으로 높은 항균효과를 보여주었다. 8종의 버섯 중 항균효과가 뛰어나고 GTase 활성 억제효과가 높은 만가닥(*Lyopyllum ulmarium*) 버섯으로부터 chloroform, methanol 및 ethyl acetate 추출물을 얻어 항충치활성을 조사하였다. *S. mutans*에 대한 만가닥 버섯의 최대 항균효과를 얻기 위해 심플렉스 중심 합성 계획법(simplex centroid design)을 이용하여 최적의 추출용매조성을 살펴본 결과, chloroform, methanol 및 ethyl acetate 3가지 용매를 모두 동일한 비율(1:1:1)로 혼합하여 추출한 추출물에서 가장 높은 항균효과가 나타났다. 만가닥버섯추출물은 항충치 소재로서 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대되며, 버섯추출물의 항충치 효과는 추출용매에 의해 영향을 받으므로 버섯에서 항충치활성물질을 얻고자 할 때에는 추출용매선택이 매우 중요할 것으로 사료된다.

## 문 헌

1. Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Nutritional value of mush-

- rooms widely consumed in Italy. Food Chem. 73: 321-325 (2001)
2. Mattila P, Knkk, Euroala M, Pihlava JM, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V. Contents of vitamins, mineral elements, and some polyphenolic compounds in cultivated mushrooms. J. Agr. Food Chem. 49: 2343-2348 (2001)
3. Mau JL, Lin HC, Chen CC. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. J. Agr. Food Chem. 50: 6072-6077 (2002)
4. Mizuno T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). Int. J. Med. Mushrooms 1: 9-29 (1999)
5. Ikekawa T, Saitoh H, Feng W, Zhang H, Li L, Matusuzawa T. Antitumor activity of extracts and polysaccharides. Chem. Pharm. Bull. 40: 1954-1957 (1992)
6. Rho JH, Han CK, Kim YB, Lee NH. Effect of diet supplements on the production of anti-dental caries hen's eggs by immunization of *Streptococcus mutans*. Koran J. Food Sci. An. 25: 333-339 (2005)
7. Jang GH, Ahn BY, Oh SH, Choi DS, Kwon SH. Anticariogenic effects of *Coptis chinensis* french extract. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 1396-1402 (2000)
8. Kim KM, Hwang KT, You SG, Lee US, Jung KH, Moon SK, Choi WS. Antimicrobial effect of edible pullulan film containing natural antimicrobial material on cariogenic bacteria. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 1466-1470 (2009)
9. Ooshima T, Minami T, Aono W, Tamura Y, Hamada S. Reduction of dental plaque formation in humans by Oolong tea extracts. Caries Res. 28: 146-149 (1994)
10. Hirasawa M, Shuji N, Neta T, Fukushima K, Takada, K. Tree kinds of antibacterial substance from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (*shiitake*, an edible mushroom). Int. J. Antimicrob. Ag. 11: 151-157 (1999)
11. Shouji N, Takada K, Fukushima K, Hirasawa M. Anticaries effect of a component from *shiitake* (an edible mushroom). Caries Res. 34: 94-98 (2000)
12. Yu HH, Lee JS, Lee KH, Kim KY, You YO. *Saussurea lappa* inhibits the growth, acid production, adhesion, and water-insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. J. Ethnopharmacol. 111: 413-417 (2007)
13. Li XC, Cai L, Wu CD. Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens. Phytochemistry 46: 97-102 (1997)
14. Hamada S, Torii M. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. Infect. Immun. 20: 592-599 (1978)
15. Conell JA. Experiments with mixtures; A review. Technometrics 15: 437-455 (1973)
16. Oh SI, Lee MS. Antioxidative and antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* krast extracts. Korean J. Food Nutr. 18: 54-62 (2005)