

복분자 추출물의 *Candida albicans* 성장억제 효과신애리¹, 옥승호^{2,3}, 최충호^{1,3}, 홍석진^{1,3}¹전남대학교 치의학전문대학원 예방치과학교실, ²전남대학교 치의학전문대학원 구강미생물학교실, ³치의학연구소Growth inhibition effect of *Rubus coreanus* Miquel on *Candida albicans*Ae-Ri Shin¹, Seung-Ho Ohk^{2,3}, Choong-Ho Choi^{1,3}, Suk-Jin Hong^{1,3}¹Department of Preventive & Public Health Dentistry, Chonnam National University School of Dentistry, ²Department of Oral Microbiology, Chonnam National University School of Dentistry, ³Dental Science Research Institute, Chonnam National University School of Dentistry, Gwangju, KoreaReceived: April 22, 2015
Revised: August 6, 2015
Accepted: August 17, 2015**Corresponding Author:** Suk-Jin Hong
Department of Preventive & Public
Health Dentistry, Chonnam National
University School of Dentistry, 33
Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju 61186,
Korea
Tel: +82-62-530-5835
Fax: +82-62-225-9618
E-mail: sjhong@chonnam.ac.kr**Objectives:** In this study, the growth inhibition effect of *Rubus coreanus* Miquel on *Candida albicans* (*C. albicans*) was observed.**Methods:** The *Rubus coreanus* Miquel was extracted with 70% methanol and concentrated with a rotary evaporator. Antifungal effect of *Rubus coreanus* Miquel extract on *C. albicans* was determined by paper disc diffusion method and standard plate count method. Seven different concentrations (2, 4, 8, 15, 30, 60, 120 mg/ml) of the extract were tested by paper disc diffusion method. Two kinds of concentration (8, 60 mg/ml) of the extract were tested using standard plate count method on *C. albicans* with different incubating time (for 6, 12, 24 hours immediately after the cultivation). Morphological changes of *C. albicans* cells after exposure to the extract were observed with scanning electron microscopy (SEM) images.**Results:** The *Rubus coreanus* Miquel extract showed an antifungal effect on *C. albicans* in 8, 15, 30, 60, 120 mg/ml of concentrations ($P < 0.05$). The extract with 8 mg/ml of concentration showed about 30% of growth inhibition at 6 h and with 60 mg/ml it showed about 90% of growth inhibition at 24 h. SEM analysis showed damaged surfaces of *C. albicans* cells when treated with *Rubus coreanus* Miquel extract.**Conclusions:** The *Rubus coreanus* Miquel might have the potential as a novel growth inhibitory agent against *C. albicans* that causes oral infection.**Key Words:** *Candida albicans*, Growth inhibition effect, *Rubus coreanus* Miquel

서론

복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 복분자딸기의 열매로 우리나라의 전역에서 재배하고 있고 주로 중부지방의 양지바른 곳에서 자생한다. 5-6월에 연한 붉은색의 꽃이 피고 7-8월에 열매가 적색으로 익으며 나중에는 흑색이 된다. 달고 신 맛과 따뜻한 성질을

가지고 있다.

이러한 복분자는 간과 신장을 보호하고 눈을 밝게 하며 정력 감퇴, 당뇨, 유정, 빈뇨의 치료 등에 한약재로 이용되고 있다^{1,2)}. 또한 메탄올 또는 에탄올을 사용하여 추출한 복분자 추출물은 식중독 관련세균, 여드름 원인균 등에 대한 항균효과가 있음이 보고되었고 항돌연변이 활성, 암세포성장억제 효과 등 다양한 효과가 연

구되고 있다³⁻⁶⁾. 이와 같이 복분자의 효능은 다양한 연구를 통해 구체화 되고 유효성분에 대한 연구가 진행되고 있으나⁷⁾, 구강세균에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.

구강질환 중 구강과 그 주변의 진균감염은 일차적 국소적 병변 또는 전신적 진균증으로 유발된다. 치과에서 많이 진단하고 치료하는 진균감염은 *Candida*종에 의해 발생한다. 구강에 *Candida*종이 존재할 확률은 높지만 그 중 일부에서만 구강칸디다증이 나타나는데, 보균상태에서 감염으로의 전환은 숙주방어력과 병원성 인자의 발현환경에 달려있기 때문이다. *Candida* 보균율은 건강한 사람의 구강에서 약 35%이지만 입원환자나 보철물을 장착한 사람의 구강에서는 약 55%로 증가한다.

많은 *Candida*균들 중 의학적으로 중요한 *Candida*종으로 *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* 등이 있다. 그 중 *Candida albicans*(이하 *C. albicans*)는 칸디다증 환자뿐만 아니라 건강한 사람에게도 검출되고 다른 종에 비해 성장이 쉽다⁸⁾. 또한 *C. albicans*는 보통은 병원성이 아닌 상태로 존재하지만 면역력이 약화된 환자에게 질병을 유발하고 구강상피세포나 의치에 부착하여 기회감염을 일으키기도 한다^{9,10)}. 그리하여 *C. albicans*를 감소시키기 위한 항진균제가 개발되었고 구강칸디다증의 치료에 사용되는 항진균제는 amphotericin B, miconazole, nystatin 등이 있다¹¹⁾.

그러나 항진균제를 사용한 환자에서 약제에 내성을 가진 병원성 *Candida* 균주가 생겨났으며 현재 시판되고 있는 대부분의 항진균제에 대한 내성을 보이는 종도 생겨났다¹²⁾. Echinocandide 항진균제는 비교적 최근에 개발된 약제로 기존 항진균제와는 달리 진균에만 선택적으로 작용하면서 우수한 항진균 활성을 보이지만 내성에 의한 치료 실패와 돌연변이가 관찰되었다^{13,14)}. 구강칸디다증의 치료는 중요하지만 부작용과 내성으로 인해 항진균제의 사용이 제한적이기 때문에 진균감염의 치료에 효과적이면서 부작용과 내성이 적은 천연식물에 대한 연구가 시작되었다. 항진균제의 개발을 위해 세계 각국에서는 항진균 효과가 있는 천연식물 찾고 그 구성물질을 분리하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. Hofling 등¹⁸⁾은 6가지 천연식물로 만든 추출물이 *C. albicans*를 포함한 10가지 종류의 *Candida* 종의 성장을 억제한다고 보고하였고, Sangetha 등¹⁹⁾은 *C. albicans*에 대한 *Cassia Spectabilis* leaf의 항진균 효과를 관찰하였다. Murzyn 등²⁰⁾은 propolis를 에탄올로 추출하여 구강칸디다증에 감염된 환자에게 적용하여 항진균효과를 확인하였다. 또한 이 등²¹⁾은 *C. albicans*를 포함한 4가지 구강세균에 대한 자몽종자추출물과 법제유향수가 함유된 치약 시제품을 제조하여 항균효과를 밝히는 등 천연식물 추출물에 관한 여러 연구가 진행되고 있다.

따라서 본 연구의 목적은 다양한 항균효과가 알려진 복분자 추출물이 구강 내 진균감염을 일으키는 주 원인균인 *C. albicans*의 성장을 억제하는 효과를 확인하고자 하는 것이다. *C. albicans*에 대한 복분자 추출물의 최소저해농도를 측정하고 추출물의 농도에 따른 시간별 생균수를 측정하여 억제율을 계산하며 추출물에 의한 *C. albicans*의 형태학적 변화를 관찰하려 한다. 이를 통해 구강 내

진균감염의 예방제제로 복분자 추출물의 사용 가능성을 제시하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 생약재료 및 추출방법

건조된 국산 복분자열매(600 g)를 전남생약농업협동조합에서 구입하여 사용하였다.

건조된 복분자 100 g을 절구로 분쇄하여 70% 메탄올 500 ml에 80°C에서 1시간 침지 후 여과지(Whatman® filter paper #541, 125 mm)로 여과하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻어진 여과액을 모아 진공농축기(Centrifugl vaccum concentrator, Eco-spin3180C, HANIL, KOREA)를 사용하여 40°C에서 농축하였다. 농축된 추출물은 밀폐하여 -20°C로 냉동 보관하여 실험하였다.

2. 실험균주 및 배양

전남대학교 치의학전문대학원 구강미생물학교실에 동결건조되어 보관중인 *Candida albicans* ATCC 10231를 yeast malt (YM, Difco, USA) 액체배지에 접종하여 37°C의 진탕배양기에 24시간 동안 배양하였다. 세균감염염색법인 그람염색방법(gram staining)을 사용하여 배양된 균을 확인하였다. 여러 번 계대배양 하여 활성화 한 후 실험에 사용하였다.

3. *C. albicans*에 대한 복분자 추출물의 항진균성 검사

*C. albicans*에 대한 복분자 추출물의 항진균성을 측정하기 위하여 한천배지확산법을 실시하였다. *C. albicans*를 YM 액체배지에 10^7 CFU/ml로 희석한 균을 YM 고체배지에 100 µl 떨어뜨리고 살균된 glass spreader를 이용하여 도말하였다. Paper disc (8 mm, Whatman, USA) 위에 대조균인 70% 메탄올과 실험균인 70% 메탄올에 희석한 복분자 추출물을 농도별(2, 4, 8, 15, 30, 60, 120 mg/ml)로 50 µl씩 점적하여 건조한 후 실험균주가 도말된 YM 고체배지 위에 올려놓았다. 37°C의 배양기에 24시간 동안 배양하여 paper disc 주위의 투명한 직경을 측정하였다. 또한 유의한 차이를 나타내며 투명환이 생성된 최소의 농도를 *C. albicans*에 대한 복분자 추출물의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)로 하였다.

4. 복분자 추출물의 농도에 따른 시간별 세균의 성장 억제율

평판정량법(standard plate count method)을 이용하여 복분자 추출물의 농도에 따른 시간별 생균수를 측정하였다. 복분자 추출물을 70% 메탄올에 용해시켜 최소저해농도인 8 mg/ml와 복분자 추출물 원액의 농도인 60 mg/ml가 되도록 하였다. 10 ml의 YM 액체배지에 각 농도별 복분자 추출물을 0.5 ml씩 넣고 10^7 CFU/ml로 희석된 *C. albicans*를 50 µl씩 넣었다. 복분자 추출물과 *C. albicans*를 넣은 각 농도의 YM 액체배지를 37°C의 진탕배양기에 배양하여 배양 직후, 6, 12, 24 시간 간격으로 *C. albicans*의 증식 정도를 평가하였다.

각 농도별 복분자 추출물이 들어간 YM 액체배지를 각 시간 대별로 배양기에서 꺼내어 희석한 후 vortex mixer로 혼합하여 50 μ l를 YM agar plate에 접종하였다. 접종 후 37°C의 배양기에서 24시간 동안 배양하여 각 추출물의 농도에 따른 시간별 집락수(colony forming unit, 이하 CFU)를 측정하였다. 대조군은 YM 액체배지에 균을 접종한 후 70% 메탄올을 0.5 ml 넣어 실험군과 동일한 방법으로 처리하여 배양하였다. 모든 실험은 3번 반복하여 시행하였다. 세균의 성장 억제율은 다음 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{\text{대조군의 세균수} - \text{추출물 함유군의 세균수}}{\text{대조군의 세균수}} \times 100$$

5. 주사전자현미경을 이용한 *C. albicans*의 형태학적 변화의 관찰

대조군으로 YM 액체배지에 추출물을 용해하는데 사용한 용매인 70% 메탄올을 첨가하고 *C. albicans*를 40 μ l를 접종하였다. 실험군으로 YM 액체배지에 *C. albicans*를 대조군과 동일한 양 접종하고 복분자 추출물의 농도를 8 mg/ml로 희석하여 액체배지에 첨가하였다. 실험군과 대조군은 37°C의 진탕배양기에 24시간 동안 배양하였다. 배양된 균을 2% glutaraldehyde와 2% paraformaldehyde가 포함된 buffer에 실온에서 4시간 동안 고정하여 원심 분리 하였고 buffer로 수세하고 1% osmium tetroxide가 포함된 buffer에 1시간 동안 고정하였다. 고정된 *C. albicans*를 ethyl alcohol에 순차적으로 탈수시킨 후 cover glass에 떨어뜨려 건조하였다. 건조된 시료는 동판에 붙여 백금코팅의 전처리과정을 거친 뒤 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM, JSM-7500F, JEOL, Japan)을 사용하여 5 kV의 전압에서 3,000배의 배율로 관찰하였다.

6. 자료분석

복분자 추출물의 농도에 따른 투명한 직경과 복분자 추출물의 농도에 따른 시간별 세균의 성장 억제율은 평균과 표준편차로 나타났다. 복분자 추출물의 농도에 따른 투명한 직경은 비모수적 방법인 Kruskal - Wallis test를 사용하였고, 시간별 세균의 성장 억제율은 Repeated measures ANOVA를 사용하였으며, 군 간의 비교는 Mann-Whitney U test를 사용하였다. 통계분석은 SPSS

(Statistical Packages for Social Science 21.0. SPSS Inc. Chicago, IL, USA) 통계프로그램으로 수행했으며 유의수준은 0.05로 하였다.

연구성적

1. 한천배지확산법을 이용한 *C. albicans*의 성장억제

복분자 추출물의 농도(0, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 120 mg/ml)에 따른 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 한천배지확산법으로 측정한 결과, 8 mg/ml 이상의 농도에서 추출물의 농도에 따른 투명한 지름이 통계적으로 유의한 차이를 보이며 증가했다($P < 0.05$). 따라서 *C. albicans*에 대한 복분자 추출물의 MIC는 8 mg/ml임을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2. 복분자 추출물의 농도에 따른 시간별 생균수

순수한 YM 액체배지에 추출물을 용해하는데 사용한 용매인 70% 메탄올을 첨가하여 균을 접종한 대조군과 비교하여 복분자 추출물의 *C. albicans*에 대한 성장억제율을 측정한 결과, 추출물의 농도 증가에 따라 억제율이 통계적으로 유의하게 증가했다($P < 0.05$). 복분자 추출물의 농도가 8 mg/ml인 경우 6시간 이후부터 *C. albicans*의 성장을 30% 이상 억제했고, 60 mg/ml인 경우 추출물을 첨가한 직후부터 40% 이상 억제했다. 추출물을 첨가한 24

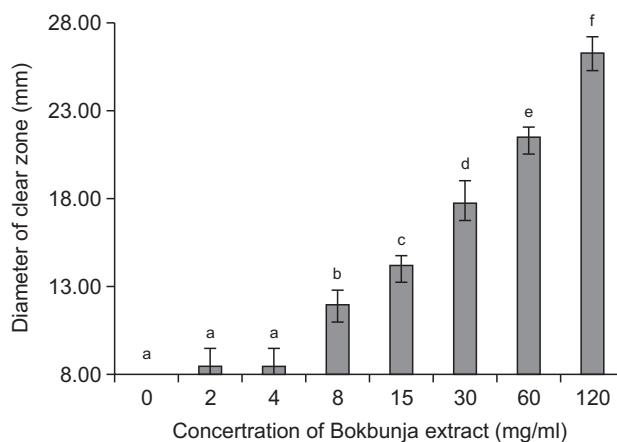


Fig. 1. Clear zone diameter of *C. albicans* in different concentration of *Rubus coreanus* Miquel extract.

Table 1. The inhibition rate of *C. albicans* in different concentration of *Rubus coreanus* Miquel extract according to incubating time Unit : %

Concentration (mg/mL)	Time				P-value
	0 hour	6 hour	12 hour	24 hour	
0 ^a	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.000
8 ^b	13.78±14.13	30.86±12.43	68.45±4.47	73.18±16.27	
60 ^c	42.35±24.98	46.60±23.33	82.44±9.74	91.82±9.83	

Values are mean ± SD.

P-values are determined from Repeated measures ANOVA.

^{a,b,c}The same letter indicates no significant difference by Mann-Whitney U test at $\alpha=0.05$.

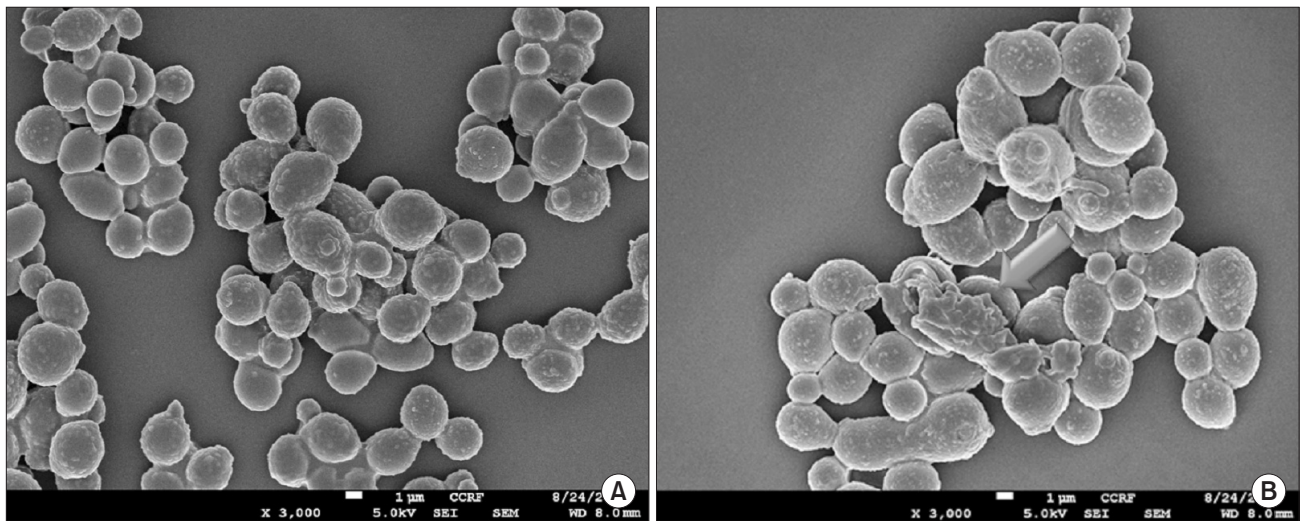


Fig. 2. SEM images of *C. albicans*. (A) Cell treated with 70% methanol; (B) Cell treated with 8 mg/ml *Rubus coreanus* Miquel.

시간 이후에는 추출물의 농도가 8 mg/ml인 경우 70% 이상의 성장억제효과를 보였으며 60 mg/ml인 경우는 90% 이상의 강한 성장억제효과를 나타냈다(Table 1).

3. SEM을 이용한 *C. albicans*의 형태학적 변화

SEM을 통해 *C. albicans*의 형태를 관찰한 결과, *C. albicans*만 배양한 경우는 세포의 형태가 정상적으로 유지되었으나 복분자 추출물을 첨가하여 배양한 *C. albicans*에서는 일부 세포의 세포벽이 일그러지는 양상의 손상이 나타났다(Fig. 2).

고 안

칸디다증은 구강영역에서 대표적인 진균감염증으로 *C. albicans*와 다른 종류의 *Candida*균에 의한 기회감염증이다. *C. albicans*는 단세포형인 효모형과 다세포인 균사형이 모두 존재한다. 인간의 경우 효모형의 진균이 정상 상주균으로 위장 및 질 등에 존재하기도 하고, *Candida*균은 건강한 성인의 30-60%에서 구강 내 상주균으로 존재한다. 구강칸디다증은 연령의 증가, 당뇨나 갑상선기능저하 등과 같은 내분비장애, 영양결핍, 면역장애가 있는 경우에 발병위험이 높고 국소적으로는 의치나 보철물에 의한 외상, 방사선 치료에 의한 점막염, 궤양, 구강건조증 등 조직손상에 의해 발병한다²²⁾.

*C. albicans*는 진균류로 세포의 많은 부분이 사람을 포함한 고등동물과 동일하여 진균에 영향을 주는 화학약제는 숙주의 대사경로에도 역시 영향을 줄 수 있다. 이것이 숙주에는 약제의 독성으로 나타날 가능성이 있기 때문에 많은 항진균 약제들이 국소적인 치료에만 사용되어져 왔다²³⁾.

최근 진균감염의 발생이 증가함에 따라 새로운 항진균제가 개발되고 있지만 항진균제에 대한 내성을 획득한 진균이 출현하거나 내재성 내성을 가진 균종에 의한 감염이 증가되어 항진균제의 내

성은 진균감염의 치료에 중요한 문제가 되고 있다¹²⁻¹⁴⁾. 따라서 진균감염의 치료에 효과적이면서 부작용과 내성이 적은 항진균제의 개발을 위해 여러나라에서 천연식물로부터 항진균효과를 확인하고 그 구성물질을 분리하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾.

이에 본 연구에서는 다양한 효능이 검증되었고 항진균효과가 보고되었으며 안전하고 구하기 쉬운 복분자 열매가 구강 내 진균감염의 원인균인 *C. albicans*의 성장을 억제하는 효과에 관하여 알아보고자 하였다. 복분자 추출물의 *C. albicans* 성장억제효과는 항진균제 감수성검사 중 가장 흔히 사용되는 방법인 한천배지확산법을 시행했고 최소화해농도를 측정하였다.

천연식물의 약리효과는 추출용매에 따라 다르게 나타나는데 이는 추출하는 용매에 따라 추출되는 물질이 달라지기 때문이다¹⁸⁾. 그렇기 때문에 추출용매를 선정하는 것은 추출물의 효과를 증가시키는 데 중요한 요인이다. 박 등⁵⁾의 연구에서는 건조된 복분자를 분말형태로 만들어 70% 메탄올에 혼합하여 80°C에 3시간 동안 2회 반복 추출하여 *Staphylococcus aureus*에 대한 성장억제 효과를 확인한 결과 강한 성장억제 효과가 있음을 보고 했다. 이를 바탕으로 본 연구에서는 70% 메탄올을 추출용매로 사용하였고 동일한 방법으로 추출하여 복분자 추출물을 제조하였다. 제조된 복분자 추출물의 효과를 확인하고자 한천배지확산법을 시행하여 *Staphylococcus aureus*에 대한 성장억제 효과를 관찰한 결과 성장억제 효과가 나타나 추출과정에 이상이 없음을 확인하였다.

복분자 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 나타내는 투명한 직경을 측정하고, 복분자 추출물의 농도가 8, 15, 30, 60, 120 mg/ml 일 때 유의한 차이가 나타났다($P < 0.05$). 그러므로 *C. albicans*에 대한 복분자 추출물의 MIC는 8 mg/ml임을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). 성²⁴⁾은 오배자를 여러 용매로 추출하였으나 메탄올에만 *C. albicans*의 억제효과가 있음을 보고하였고 동일한 추출용매임에도 불구하고 오배자 추출물의 MIC가 50 mg/ml라는 결과를 나타내어 본 실험과 비교했을 때 복분

자 추출물의 MIC가 더 낮은 농도임을 확인 할 수 있었다. 이로써 복분자의 유용성이 더 높아질 것이라 생각한다. Sangetha 등¹⁹⁾은 *C. albicans*에 대한 *Cassia Spectabilis* leaf 추출물의 MIC를 6.25 mg/ml라고 보고하여 복분자 추출물과 비슷한 농도임을 확인 할 수 있었다. 그러나 이²⁵⁾는 감초의 구성물질인 glycyrol에 대한 MIC를 측정한 결과 400 µg/ml로 본 연구의 복분자 추출물과 비교했을 때 현저히 낮은 농도임을 확인 할 수 있었다. 이는 본 실험에 사용된 복분자 추출물이 조추출물(crude extract)이기 때문에 MIC가 더 높은 것으로 생각된다. 그러므로 추후 복분자 추출물의 구성물질 중 *C. albicans*의 성장을 억제하는 구성물질을 분리하여 분석하는 실험이 시행되어야 할 것이다.

이 등⁷⁾은 복분자의 구성물질을 분리하여 분석하였는데 tan-nins인 (-)-epicatechin, (+)-catechin, procyanidin B-4, sanguin H-4가 포함되어 있다고 보고하였고, 김 등²⁶⁾은 그 물질들 중 (-)-epicatechin과 (+)-catechin, procyanidin B-4가 항산화 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 항진균 효과를 나타내는 복분자의 구성물질에 대한 연구는 아직 진행되지 않고 있는 실정이다. 복분자의 구성물질 중 *C. albicans*의 성장을 억제하는 구성물질을 분리하는 과정도 필요하겠지만 이와 같은 선행연구에서 보고된 구성물질을 가지고 항진균 효과를 확인한다면 시간과 비용을 절약할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 복분자 추출물의 농도에 따라 *C. albicans*의 성장이 시간별로 미치는 영향을 알아보기 위해 대조군으로 추출물의 농도가 0 mg/ml인 70% 메탄올을 첨가하였고 실험군으로는 MIC 값인 8 mg/ml의 복분자 추출물과 농축하지 않은 원액의 농도인 60 mg/ml인 복분자 추출물을 첨가하여 억제율을 확인했다. 추출물의 농도가 8 mg/ml인 경우는 첨가한지 6시간 이후부터 30% 이상의 억제율을 나타냈고 60 mg/ml인 경우 추출물을 첨가한 직후부터 *C. albicans*의 성장을 40% 이상 억제했으며, 추출물을 첨가한 24시간 이후에는 추출물의 농도가 8 mg/ml인 경우 70% 이상의 성장억제효과를 나타냈고, 60 mg/ml인 경우는 90% 이상의 강한 성장억제효과를 나타냈다. 박²⁷⁾은 *C. albicans*의 MIC인 2 mg/ml의 작약 추출물을 처리한 후 시간대별 생균수를 측정한 결과 균의 성장을 억제하였으며, 강²⁸⁾의 연구에서 역시 MIC인 0.25%의 편백 피톤치드를 첨가한 경우 *C. albicans*의 성장억제 효과를 보고하였다. 이는 본 연구에서 복분자 추출물의 MIC를 *C. albicans*에 처리한 경우와 비슷한 양상을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

복분자 추출물의 첨가 유무에 따라 세균의 형태 변화를 확인하였다. 복분자 추출물의 농도를 MIC인 8 mg/ml을 넣어 배양한 *C. albicans*와 복분자 추출물을 넣지 않고 배양한 *C. albicans*의 형태를 배양 24시간 후 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과, 복분자 추출물을 넣지 않고 배양한 *C. albicans*는 아무런 변화를 나타내지 않은 반면, 복분자 추출물을 넣고 배양한 *C. albicans*는 일부 세포에서 손상이 발견되었다. *C. albicans*에 대하여 항진균력이 있기 때문에 세포의 손상을 초래하였지만 전체적인 손상을 일으키지는 못하였기 때문에 추출물의 농도 또는 배양시간을 증가함으로써 세포의 전체적인 손상이 나타나는 농도나 시점을 관찰하

는 것도 필요할 것이라 생각된다. 실제로 Sangetha 등¹⁹⁾은 *Cassia Spectabilis* leaf 추출물을 24시간 동안 처리한 후에 세균의 표면이 처리하지 않은 그룹에 비해 약간 거칠었고 추출물을 처리한 36시간 이후에야 기능을 할 수 없을 정도의 손상을 주는 것으로 보고하였다.

본 연구는 다양한 방법으로 복분자 추출물의 *C. albicans* 성장 억제 효과를 확인하였다. 그러나 복분자의 조추출물을 이용한 실험이기 때문에 복분자의 구성 물질 중 어떤 물질이 *C. albicans*의 성장억제 효과를 나타냈는지 구체적으로 확인할 수 없는 제한점이 있다. 그러므로 추후 연구에서는 *C. albicans*의 성장을 억제하는 복분자 추출물의 구성물질을 분리하는 과정이 필요할 것으로 생각된다.

또한 복분자는 독성이 없다고 알려져 있으나²⁹⁾ 고농도의 복분자 추출물에 대한 안전성을 검증받기 위해 세포독성평가에 관한 연구가 진행되어야 하고 독성평가 후 복분자 추출물을 구강캔디 다중 환자에게 직접 적용함으로써 그 효과를 확인하는 실험이 필요할 것이다.

본 연구에서는 구강 내 진균감염을 일으키는 대표적인 균인 *C. albicans*를 억제하는 복분자 추출물의 최소저해농도가 8 mg/ml임을 확인하였고 추출물의 농도와 배양시간이 증가할수록 *C. albicans*의 성장억제효과가 증가하는 것으로 나타났다. 또한 복분자 추출물 원액인 60 mg/ml 농도의 복분자 추출물을 24시간동안 *C. albicans*에 노출시킨 경우 90% 이상의 높은 성장억제 효과를 확인할 수 있었다. 또한 복분자 추출물을 첨가하여 배양한 *C. albicans*는 세포의 손상이 관찰되었다. 이상의 결과 복분자 추출물은 *C. albicans*의 성장을 억제하는 효과를 가졌으며, 8 mg/ml 이상의 복분자 추출물을 치약 또는 구강양치액에 첨가하여 사용한다면 구강 내 진균감염의 예방제제로 사용할 수 있을 것이라 생각된다.

결론

본 연구는 복분자 추출물이 구강 내 진균감염을 일으키는 *C. albicans*의 성장을 억제하는 효과가 있는지에 관하여 알아보고자 시행하였다. 추출물의 세균 성장 억제효과는 한천배지확산법을 이용하여 추출물의 농도(2, 4, 8, 15, 30, 60, 120 mg/ml)에 따른 투명한 직경을 측정함으로써 세균의 성장억제를 확인하였고 이 결과를 바탕으로 *C. albicans*의 성장을 억제하는 복분자 추출물의 MIC를 평가하였다. 또한 평판정량법을 이용하여 추출물의 농도(8, 60 mg/ml)에 따른 시간별(배양 직후, 6, 12, 24 시간) 생균수를 측정하여 성장억제율을 확인하였고, 추출물을 넣어 배양한 *C. albicans*와 추출물을 넣지 않고 배양한 *C. albicans*의 형태를 주사전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 복분자 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 한천배지확산법을 이용하여 투명한 직경을 측정한 결과, 복분자 추출물의 농도가 8, 15, 30, 60, 120 mg/ml 일 때 투명환이 나타났으며 농도가 높아짐에 따라 투명환의 크기가 통계적으로 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 그러므로 *C. albicans*에 대한 복분자

추출물의 MIC는 8 mg/ml임을 확인 할 수 있었다.

2. 복분자 추출물의 농도에 따른 시간별 생균수를 측정한 결과 추출물의 농도가 8 mg/ml인 경우는 첨가한 6시간 이후부터 30% 이상의 성장억제율을 나타냈다. 그러나 추출물의 농도가 60 mg/ml인 경우는 첨가한 경우 직후부터 *C. albicans*의 성장을 40% 이상 억제했고, 24시간 이후에는 90% 이상의 강한 성장억제효과를 나타냈다($P < 0.05$).

3. 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 통해 *C. albicans*의 형태를 관찰 한 결과, 복분자 추출물을 첨가하지 않고 *C. albicans*만 배양한 경우는 세포의 형태가 정상적으로 유지되었으나 복분자 추출물을 첨가하여 배양한 *C. albicans*에서는 일부 세포의 손상이 나타났다.

이상의 결과, 복분자 추출물은 구강 내 진균감염을 일으키는 *C. albicans*의 성장을 억제하는 항진균효과를 가지는 것으로 나타났다. 복분자 추출물은 농도의 증가와 시간의 변화에 따라 *C. albicans*에 강한 성장억제효과를 나타냈다. 또한 복분자 추출물의 첨가는 *C. albicans*의 세포 손상을 일으켰다. 이는 현재까지 알려진 복분자 열매의 효과 이외의 구강 내 진균을 억제시킨다는 새로운 발견이라는 점에 의의가 있으며, 특히 치약이나 구강양치액에 복분자 추출물을 첨가하여 사용함으로써 구강 내 항진균제제로 가용성을 제시하였다.

References

- Herbal resources plant recognized books compilation committee. Herbal resources plants. Seoul:Bumin publishing;2012:189.
- Park JH. Korean medical herbal encyclopedia. Seoul:Shinilbooks; 2012:671.
- Jeon YH, Sun XQ, Kim MR. Antimicrobial Activity of the Ethanol Extract from Rubus coreanum against Microorganisms Related with Foodborne Illness. Korean J Food Cookery Sci 2012;28:9-14.
- Lee KI, Kim SM, Kim SM, Pyo BS. Comparison of Fatty Acids and Antibacterial Activity against Pathogen of Acne in Different Parts of Ripened Black Raspberry (*Rubus coreanus* Miquel). J Korean Soc Food Sci Nutr 2011;40(3):466-469.
- Park CG, Bang KH, Lee SE, Cha MS, Sung JS, Park HW, et al. Antibacterial activity from medicinal plant extracts on the *Staphylococcus aureus*. Korean J Medicinal Crop Sci 2001;9:251-258.
- Jeon YH, Choi SW, Kim MR. Antimutagenic and cytotoxic activity of ethanol and water extracts from *Rubus coreanum*. Korean J Food Cookery Sci 2009;25:379-386.
- Lee MW, Lee YA. Tannins from *Rubus coreanum*. Kor J Pharmacogn 1995;26:27-30.
- Bagg J, Macfarlane TW, Poxstone IR, Miller CH, Smith AJ. Essentials of microbiology for dental students. Seoul:Koonja publishing; 2001:295.
- Jeon HD, An KS, Park CW, Lee HS, Kim SG. Relationship between Adherence of *Candida albicans* to Human Buccal Epithelial Cells in Vitro and Their Virulence. J Hanyang Med Rev 1987;7:855-876.
- Kim MJ, Shin SW, Lee JY. In vitro study on the adherence and penetration of *Candida albicans* into denture soft lining materials. J Korean Acad Prosthodont 2006;44:466-476.
- Lee HO, Jeon JY, Kim KJ, Han DM, Han KY. Susceptibility test of *Candida albicans* isolated from Oral cavity. J Korean Acad Oral Health 1997;21:553-561.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Biology of microorganisms. 12th ed. Seoul:Bio Science;2011:160-161.
- Shin JH. Antifungal Resistance in Yeasts and Filamentous Fungi. Infect Chemother 2009;41:65-71.
- Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin Infect Dis 2008;46:102-128.
- Vengurlekar S, Sharma R, Trivedi P. Efficacy of some natural compounds as antifungal agents. Pharmacogn Rev 2012;6:91-99.
- Bawankar R, Deepti VC, Singh P, Subashkumar R, Vivekanandhan G, Babu S. Evaluation of Bioactive Potential of an Aloe vera Sterol Extract. Phytother Res 2013;27:864-86.
- Mbaveng AT, Kuete V, Ngameni B, Beng VP, Ngadjui BT, Meyer JJ, et al. Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from the twigs of *Dorstenia mannii* (Moraceae). BMC Complement Altern Med 2012;12:83.
- Höfling JF, Anibal PC, Obando-Pereda GA, Peixoto IAT, Furlletti VF, Foglio MA, et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. Braz J Biol 2010;70:1065-1068.
- Sangetha S, Zuraini Z, Sasidharan S, Suryani S. Fungicidal effect and oral acute toxicity of *Cassia spectabilis* leaf extract. Jpn J Med Mycol 2008;49:299-304.
- Santos VR, Pimenta FJ, Aguiar MC, do Carmo MA, Naves MD, Mesquita RA. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. Phytother Res 2005;19:652-654.
- Lee BB, Ha YM, Shin SH, Je KM, Kim SR, Choi JS, et al. Antimicrobial Activity of Test Dentifrice Product Containing Grapefruit Seed Extract and Processed Sulfur Solution against Oral Pathogens. J life science 2009;19:956-962.
- Jo NP. Candidiasis. Journal of Korean Dental Association 2004;42: 290-293.
- Kim YJ. Pathogenic microorganisms & antibiotics. Seoul:Wold science;2010:349-354.
- Seong IW. Antifungal Activity of the Extracts from *Galla rhois* against *Candida albicans*. Korean J Med Mycol 2007;12:175-179.
- Lee JY. Antifungal Effect of Glycyrol against Infections due to *Candida albicans* and Its Mechanism[master's thesis]. Seoul:Dongduk Womens University;2008. [Korean].
- Kim KH, Lee YA, Kim JS, Lee DI, Choi YW, Kim HH, et al. Antioxidative Activity of Tannins from *Rubus coreanum*. Arch Pharm Res 2000;44:354-357.
- Park HS, Min KJ, Cha CK, Song JW, Son JC. Anti-microbial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell by extracts of *paeonia lactiflora*. Kor J Env Hlth 2007;33(1):21-29.
- Kang SK, Lee KS, Chon YH, Hong JP. Effect of *chamaecyparis obtusa* tree phytoncide on *Candida albicans*. J Oral Med Pain 2010; 35(1):19-29.
- Lee MK, Lee HS, Choi GP, Oh DH, Lim JD, Yu CY, et al. Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanus* Miq. Korean J Medicinal Crop Sci 2003;11:5-12.