

생약재 및 향신료의 *Streptococcus mutans* 증식 억제 효과

유영선^{2*} · 박기문¹ · 김영배

고려대학교 식품공학과, ¹오뚜기 중앙연구소, ²산업기술정보원

Antimicrobial Activity of Some Medical Herbs and Spices against *Streptococcus mutans*

You, Young-Sun^{2*}, Ki-Moon Park¹ and Young-Bae Kim

Department of Food Technology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

¹Ottogi Research Center, Ottogi Foods Co., Anyang 430-070, Korea

²Korea Institute of Industry & Technology Information, Seoul 130-742, Korea

Abstract — In order to find out an anticariogenic substance, antibacterial activities of some medical herbs and spices against *Streptococcus mutans* were investigated. The essential oils of oregano, thyme, sage, fennel, nutmeg, rosemary, calamus and cassia cortex were shown antibacterial effect against *S. mutans*. The essential oil of oregano among other tested medical herbs and spices showed the most active antimicrobial activity. The essential oil of oregano inhibited the activity of glucosyltransferase from *S. mutans*. The minimal inhibition concentration of oregano essential oil was determined as 0.05 μ /ml. The activity of glucosyltransferase from *S. mutans* was inhibited in the presence of oregano essential oil.

충치는 구강내 미생물중 특히 *Streptococcus mutans*가 주요 원인이 되어 치아중 무기질이 탈회되고 상아질이 파괴되어 치아 조직의 결손을 초래하는 세균성 치아 경조직 질환이라고 보고되어 있다(1). 최근 현대인들의 식생활 형태가 점차 다양하여 짐에 따라 당류의 소비는 증가 일로에 있고, 반면에 stress 등의 원인으로 면역 기능은 오히려 약화되어 구강내 미생물이 증가 추세에 있다(2). 충치에 대한 근래의 견해는 충치균이 생성하는 glucosyltransferase(GTase)에 의해 sucrose로부터 점착성이고 불용성인 glucan이 합성되어 치아 표면에 부착되고, 부착된 glucan에 충치균 등의 혐기성 세균이 증식하면서 생성시킨 유기산에 의해 치아의 표면이 파괴되어 발생한다고 한다(3-6). 최근 생약재나 향신료의 추출물에서 충치균의 성장을 억제하는 물질의 검색이 관심을 모으고 있다(4-10).

Miyoshi 등(4)은 *Gymnema sylvestre*의 잎에서 gy-

nmemic acid(GA)를 추출하여 실험한 결과 GA 1 mg/ml 처리시 충치균의 증식이 억제되었고 GA 0.5 mg/ml 처리시 glucan 생성이 억제되었다고 보고하였다. 또한 Namba 등(6)은 중국산 및 일본산 생약재 60종류의 추출물을 이용하여 충치균의 생육 억제 실험 결과 *Magnoliae cortices*의 성분인 magnolol과 hino-kiol의 충치균에 대한 MIC가 6.25 μ g/ml로써 강한 항균 효과가 있다고 보고하였다. 또한 green tea extract(7), cardinol(8) 등의 살균성 물질(bactericidal agents) 또는 정균성 물질(bacteriostatic agents)을 이용하여 충치균을 살균하거나 증식을 억제하여 충치의 예방 및 진행 중단의 목적에 사용 할 수 있다.

따라서 본 연구는 충치 예방 및 진행 중단의 방법으로 예로부터 민간에서 이용되어 안전성이 확인된 생약재 및 향신료 추출물 등의 충치균 성장 억제 효과를 조사하기 위하여 시행하였다. 이를 위하여 생약재, 향신료 등과 같이 식품이나 한약재로 사용되는 천연물의 정유 및 에탄올 추출물의 충치균에 대한 항균 활성을 검색하였으며, 검색된 정유 및 에탄올 추출물의 충치균에 대한 최저 성장 억제 농도(minimal

Key words: *Streptococcus mutans*, oregano essential oil, anticariogenic

*Corresponding author

inhibitor concentration ; MIC)를 측정하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 항균성 실험 대상 물질은 기존 문헌에서 일반적인 항균력이 있다고 보고되어 있는 생약재와 향신료(11, 12)를 1차 실험하여 선별한 것으로 이들 시료를 건조하거나, 생것을 그대로 마쇄한 후 실험 재료로 사용하였다.

재료의 수증기 증류

실험 재료의 정유 추출은 尾形浩一 등(13)과 Farag 등(14)의 방법에 따라 수증기 증류하였다. 즉 시료 10 g과 증류수 100 ml를 둥근 플라스크에 수직으로 환류 냉각관과 유·수 분리부가 설치되어 있는 유리관을 부착시킨 추출기(Nickerson Liken 장치의 변형)에 넣고 혼합한 후 90~100°C dml 전기로 상에서, 5~48 시간 동안 수증기 증류한 후 유·수 분리부에서 정유 성분만을 분리하여 항균 실험에 사용하였다.

재료의 75% 에탄올 추출

실험재료의 75% 에탄올 추출은 Miyoshi 등(4)과 신동화 등(15)의 방법에 따라 행하였다. 즉 시료 10 g과 75% 에탄올 100 ml를 둥근 플라스크에 수직으로 환류 냉각관을 부착시킨 추출기에 넣고 혼합한 후, 90~100°C 의 전기로 상에서, 5~48시간 동안 가열 추출하였다. 추출액이 더운 용액 상태일 때 여과하고, 10,000 rpm, 4°C 에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 취하였다. 각 시료의 원심분리 상등액을 rotary vacuum evaporater를 이용하여 감압 농축, 용매를 증발시키고 각 시료를 10 ml까지 농축하여 항균 실험에 사용하였다.

사용균주 및 배지

충치균으로 사용된 균주는 오뚜기식품 주식회사 중앙연구소에 보존중인 *Streptococcus mutans* ATCC 25175를 사용하였고, 증식 배지는 brain heart infusion medium(DIFCO, BHI medium)을 사용하였다.

충치균에 대한 항균력 조사

실험 재료의 항균력 조사는 배지 5.0 ml를 screw cap tube에 취하고 시료의 정유 또는 에탄올 추출액을 에탄올에 녹여서 배지에 첨가한 후, 배지 1 ml당 약

10⁵ 정도의 *S. mutans*를 접종하여 37°C 에서 24시간 배양시킨 후 660 nm에서 탁도를 측정하였다.

충치균에 대한 MIC 결정

실험재료의 충치균에 대한 MIC 결정은 50% 에탄올로 각 시료를 농도별로 희석시킨 시료액 0.05 ml씩을 BHI broth 5 ml에 첨가한 후, 배지 1 ml당 약 10⁵ 정도의 *S. mutans*를 접종하여 37°C 에서 24시간 배양한 후, 균의 생육 여부를 육안으로 관찰하여 충치균의 생육을 억제한 최저 농도 희석액을 기준으로 MIC를 구하였다.

Oregano 정유의 GTase 활성 억제 효과

충치균이 생성하는 GTase가 sucrose로 부터 점착성이고 불용성인 glucan을 합성하므로 oregano 정유의 glucan 합성 저해능을 비교하기 위하여 Miyoshi 등(4)의 방법에 따라 충치균 배양액을 4°C 에서 8000 rpm, 5분간 원심분리시킨 후 그 상등액을 취하여 toyo filter paper No. 101로 여과하고, 그 여액을 1N-NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하여 다음 mercuric chloride를 0.02% 첨가하여 제조한 조효소액에 1% sucrose와 oregano 정유를 농도별로 첨가하고 37°C, 24 시간 반응시킨 후 660 nm에서 탁도를 측정하여 oregano 무처리구와 비교한 상대치로 glucan 생성 억제 정도를 측정하여 GTase 활성 억제 효과를 비교하였다.

결과 및 고찰

생약재 및 향신료의 75% 에탄올 추출액의 항균력

실험 재료의 75% 에탄올 추출액을 멸균된 BHI broth에 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 µl/ml 농도로 처리한 후 배지 1 ml당 10⁵ 정도의 *S. mutans*를 접종하고, 37°C 에서 24시간 배양시킨 후 660 nm에서 탁도를 측정하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 이들 중 황백(phellodendron), 오배자(nutgall) 추출물은 2.0 µl/ml 첨가시 살비아(sage), 오레가노(oregano), 백리향(thyme) 추출물은 4.0 µl/ml 첨가시 충치균의 생육을 억제하였다.

생약재 및 향신료 정유의 항균력

실험 재료의 정유를 각각 BHI broth에 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 µl/ml 농도로 처리한 후 배지 1 ml당 10⁵ 정도의 *S. mutans*를 접종하고 37°C 에서 24시간

Table 1. Antibacterial effect of 75% ethanol extract of medical herbs and spices on growth of *S. mutans* at 37°C for 24 hrs

English name	Scientific name	Inhibition activity
Dolichi semen	<i>Dolichos lablab</i> L.	-
Sandal wood	<i>Santalum album</i> L.	-
Licorice	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	-
Curcumae rhizoma	<i>Curcuma longa</i> L.	-
Lonicerae flos	<i>Lonicera japonica</i> Thunberg	-
Peony	<i>Paeonia suffruticosa</i>	-
Orange peel	<i>Citrus unshiu</i> Marc	-
Phelloteri radix	<i>Phelloterus littoralis</i> Bentham	-
Cassia semen	<i>Cassia tora</i> L.	-
Brunellae herba	<i>Brunella vulgaris</i> L.	++
Phellodendron	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprech	++++
Cnidii rhizoma	<i>Cnidium officinale</i> (Makino)	-
Schizandrae fructus	<i>Schizandra chinensis</i> Ruprecht	-
Chexidonii herba	<i>Chelidonium majus</i> L.	+
Plantain	<i>Plantago asiatica</i>	-
Puerariae radix	<i>Pueraria thunbergiana</i> Bentham	-
Nepetae herba	<i>Nepata japonica</i> Maxim	-
Raphani semen	<i>Raphanus sativus</i> L.	-
Aconite root	<i>Aconitum koreanum</i> R. Raymond	-
Artemisiae radix	<i>Artemisia iwayomogis</i> Kitamura	+
Scutellariae radix	<i>Scutellaria baicalensis</i> George	+++
White hellebore	<i>Beratrum grandiflorum</i> Loesnerfil	-
Ailanthi cortex	<i>Ailanthus altissima</i> Swingle	-
Nutgall	<i>Melaphis chinensis</i> J.Bell	++++
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	++++
Thyme	<i>Thymus Bulgaris</i> L.	++++
Sage	<i>Salvia officinalis</i>	++++

The antibacterial effect against *S. mutans* is represented as follows; +++++: The growth of *S. mutans* was inhibited by adding at least 2.0 µl/ml 75% ethanol extract to BHI broth; ++++: ditto, at least 4.0 µl/ml; +++: ditto, at least 6.0 µl/ml; ++: ditto, at least 8.0 µl/ml; +: ditto, at least 10.0 µl/ml; -: No inhibition by adding 10.0 µl/ml.

배양시킨 후, 660 nm에서 탁도를 측정하여 Table 2와 같은 결과를 얻었다. 이들 중 육두구(nutmeg), 오레가노(oregano), 백리향(thyme)의 정유는 0.1 µl/ml 농도에서 충치균의 생육을 억제하였고 계피(cassia cortex), 창포(calamus), 회향(fennel), 로즈메리(rosemary) 정유는 0.2 µl/ml에서 살비아(sage), 커민(cumin), 정향(clove), 산자소(mosla)는 0.5 µl/ml 농도에서 충치균의 생육을 억제하였다. 여기서 살비아, 오레가노, 백리향의 항균력을 비교하면 정유는 에탄올 추출액에 비해 충치균에 대한 항균력이 현저히 높았다. 효모, 곰팡이 및 일반세균에 대한 강한 항균력을

지닌 eugenol이 주성분인 clove 정유는 효모, 곰팡이 및 일반세균에 대해서는 생육 억제 효과가 높다고 보고되었으나(12, 14), 충치균에 대한 항균 활성은 낮았다. Thymol이 정유 성분의 50%를 차지하는 oregano 정유의 경우 항균 활성이 높았다. 본 실험의 결과는 尾形浩一(13) 등이 계피油, cumin油 및 rosemary油가 충치균의 생육 억제 활성이 강하다고 보고한 것과 유사하였다.

생약재 및 향신료의 충치균에 대한 MIC 측정
항균력 실험결과에서 충치균에 대한 항균력이 강한

Table 2. Antibacterial effect of essential oil of medical herbs and spices on growth of *S. mutans* at 37°C for 24 hrs

English name	Scientific name	Inhibition activity
Calamus	<i>Acorus calamus</i> L.	+++
Cassia cortex	<i>Cinnamomum cassia</i>	+++
Mosla	<i>Perilla folium</i>	+
Artemisiae herba	<i>Artemisia iwayomogis Kitamura</i>	++
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	++++
Thyme	<i>Thymus Bulgaris</i> L.	++++
Sage	<i>Salvia officinalis</i>	+++
Fennel	<i>Foeniculum vulgare</i> Miller	+++
Nutmeg	<i>Myristica fragrans</i>	+++
Cumin	<i>Cuminum cyminum</i>	++
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	+++
Dill	<i>Anethum graveolens</i> L.	+
Clove	<i>Eugenia caryophyllus</i>	++

The antibacterial effect against *S. mutans* is represented as follows; +++++: The growth of *S. mutans* was inhibited by adding at least 0.1 $\mu\text{l/ml}$ essential oil to BHI broth; +++: ditto, at least 0.2 $\mu\text{l/ml}$; ++: ditto, at least 0.5 $\mu\text{l/ml}$; +: ditto, at least 1.0 $\mu\text{l/ml}$.

Table 3. MIC of medical herbs and spices against *S. mutans*

Plant	MIC ($\mu\text{l/ml}$)		
Nutmeg	0.10	Essential oil	
Fennel	0.17		
Sage	0.17		
Rosemary	0.20		
Thyme	0.06		
Oregano	0.05		
Calamus	0.20		
Artemisiae herba	0.40		
Cassia cortex	0.17		
Cumin	0.30		
Clove	0.30		
Phellodendron	0.20		75% Ethanol extract
Nutgall	1.50		
Sage	3.00		
Oregano	3.00		
Thyme	2.00		

정유 11종과 에탄올 추출액 5종을 BHI broth에 농도별로 처리한 후 배지 1 ml당 10^5 정도의 *S. mutans*를 접종하여 37°C의 incubator에서 24시간 동안 배양하여 얻은 MIC의 측정 결과는 Table 3과 같다. 이들 중 oregano, thyme 및 nutmeg의 항균 작용이

특히 현저하여 MIC는 각각 0.05, 0.06, 0.10 $\mu\text{l/ml}$ 로 항균력은 oregano의 항균력이 가장 강하였다. Namba 등(6)에 의하면 각종 생약재 중의 MIC는 황련(*coptidis rhizoma*) 추출물 분말 200 $\mu\text{g/ml}$, 화후박(*magnoliae obovatae cortex*) 추출물 분말 100 $\mu\text{g/ml}$, 당후박(*magnoliae officinalis cortex*) 추출물 분말 25 $\mu\text{g/ml}$ 이라고 하였다. 이와 비교할 때 oregano 정유의 항균력이 더 우수한 것으로 나타났다. 또한 Miyoshi 등(4)이 밝힌 gymnemic acid의 충치균에 대한 MIC 0.5 mg/ml로 보고된 것과 비교할 때도 oregano 정유의 충치균에 대한 증식 억제 효과가 더 우수하였다.

Oregano 정유의 GTase 활성 억제 효과

충치 발생 요인중의 하나인 Glucan은 충치균이 균체외로 분비하는 GTase의 작용으로 sucrose에서부터 생성된다. Oregano 정유의 GTase 활성에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 4와 같다. Glucan 생성 억제 작용은 oregano 정유 농도가 0.01 $\mu\text{l/ml}$ 부터 glucan의 생성량이 급격히 감소되고 이후 정유 처리농도가 증가됨에 따라 glucan의 생성량이 완만히 감소하다가 정유농도 0.10 $\mu\text{l/ml}$ 에서는 glucan이 전혀 생성되지 않았다. 따라서 oregano 정유는 충치균의 성장을 억제할 뿐 아니라, 충치균이 생산하는 GTase의 활성 또한 억제하므로 효과적인 충치예방 물질로서 이용 가능할 것으로 생각된다. Oregano 정유의 GTase

Table 4. Effect of Oregano essential oil on glucan formation from sucrose by GTase

Oregano concentration ($\mu\text{l}/\text{ml}$)	O.D. (660 nm)
0.00	1.00
0.02	0.28
0.04	0.24
0.06	0.17
0.08	0.10
0.10	0.00

활성 억제 작용 기작에 대하여서는 더욱 연구가 요망된다.

요 약

충치 예방 효과가 있는 천연물을 탐색하기 위해서 생약재 및 향신료 정유 27종과 생약재 및 향신료의 에탄올 추출액 13종을 각각 BHI broth에 일정량 첨가하고 충치의 원인균인 *Streptococcus mutans*의 증식 억제 실험을 실시하였다. 실험대상 생약재와 향신료중 오레가노(oregano), 백리향(thyme), 살비아(sage), 회향(fennel), 육두구(nutmeg), 로즈매리(rosemary), 창포(calamus), 계피(cassia cortex)를 수증기 증류하여 얻은 정유가 충치균의 생육을 효과적으로 억제하였고 그 중 오레가노 정유가 MIC 0.05 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 로서 생육억제 효과가 가장 좋았다. 오레가노, 백리향, 살비아의 경우 에탄올 추출액보다 정유의 충치균에 대한 생육 억제 효과가 더 높았다. 또한 오레가노 정유는 당류에 작용하여 glucan의 형성을 억제하였다.

참고문헌

- Inoue, M. and T. Koga. 1979. Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. *Infect. Immunity* **25**: 922-929.
- Houte, J. Van. 1980. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int. Den. J.* **30**: 305-308.
- Degar, M.D. and G. J. Walker. 1975. Metabolism of the polysaccharides of human plaque. *Caries Res.* **9**(1): 21-27.
- Miyoshi, M., T. Imoto and T. Kasagi. 1987. Antieurodontic effect of various fractions extracted from the leaves of *Gymnema sylvestre*. *J. Yonago Med. Ass.* **38**: 127-137.
- Kozai, K., Y. Miyake, H. Kohda, S. Kamataka, K. Yamasaki, H. Suginaka and K. Nagasaka. 1987. Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and urosonic acid. *Caries Res.* **21**(2): 104-108.
- Namba, T., M. Tsunozuka, M. Hattori, S. Kadota and T. Kikuchi. 1982. Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines-Screening of crude drugs for inhibitory action on plaque formation. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **15**: 179-186.
- Sakanaka, S., M. Kim, M. Taniguchi and T. Yamamoto. 1989. Antibacterial Substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, A cariogenic bacterium. *Agr. biol. chem.* **53**(9): 2307-2311.
- Takasago perfumery KK. 1990. Inhibitor of cariogenic bacteria, Japan Patent 25890.
- 배기환, 김봉희, 명평근, 변재화. 1990. 충치균에 대한 생리활성 생약 성분의 분리 및 약효 평가(1). *약학회지* **34**(2): 106-111.
- Shelef, L.A., O.A. Naglik and D.W. Bogen. 1980. Sensitivity of some common food borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. *J. Food Sci.* **45**(4): 1042-1044.
- 이선우, 이용주. 1985. 생약학, 고문사.
- Conner, D.E. and L.R. Beuchat. 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.* **49**(2): 429-434.
- 尾形浩一, 丸山直子, 福田正佳. 1984. 香料の抗う蝕性とその薬者への應用. *食品工業* **27**(2): 57-62.
- Farag, R.S., Z.Y. Daw, F.M. Hewedi and S.A. El-Baroty. 1991. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oil. *J. Food Prot.* **52**(9): 665-667.
- 이병완, 신동화. 1991. 식품 미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성 물질의 검색. *한국식품과학회지* **23**(2): 200-204.

(Received March 8, 1993)