

두송실에 의한 충치균의 유기산 생성 억제효과

남상해* · 서원택 · 최상도 · 장대식¹ · 양민석¹

진주산업대학교 식품가공학과, ¹경상대학교 농화학과

초 록 : 생약에서 충치균에 대한 항균성 물질을 개발하기 위하여 수종의 야생생약을 수집하여 항균활성을 측정해 보았다. 그 중에서 충치균에 강한 항균활성을 나타낸 두송실(*Juniperus rigida* S. et Z.)을 methanol로서 추출하고 극성이 다른 수종의 용매로서 분획하여, 충치균에 대한 항균활성과 유기산의 생성억제효과를 측정해 본 결과, n-hexane, chloroform 분획에서 활성이 나타났다. 충치균에 의하여 생성된 유기산은 주로 lactic acid와 citric acid로 전체의 80~90%를 차지하였는데 두송실의 methanol추출물과 n-hexane분획물을 1 mg/ml 처리한 시험균에서 각각 89.3, 90.8%의 유기산 생성 억제효과를 나타내었다.(1998년 8월 7일 접수, 1998년 8월 25일 수리)

서 론

의료기술의 발달로 인류의 평균수명이 상당히 연장되었으므로, 이에 따라 치아도 더욱 오래동안 건강한 상태로 사용할 수 있도록 관리되어야 함은 당연하다. 그러나 오늘날 맛벌이와 핵가족화에 따른 식생활문화에도 많은 변화를 가져오게 되어 전통식품의 수요가 줄어들고 즉석 가공식품의 수요가 급증하고 있는 추세이며, 식품의 양보다는 기호에 맞는 맛의 질을 선호하는 현상이 두드러지게 나타나 필요 이상의 유기산을 함유한 가공식품들이 많이 이용되고 있는 실정이다. 이로 인한 치아의 탈회(脫灰)는 더욱 가속될 것으로 전망되며, 실제로 최근의 통계자료에 의하면 초등학교 6학년의 충치수는 평균 5~6개 정도로 70년대의 3~4개보다 50% 이상이 많아진 것을 보아도 그 심각성은 짐작할 수 있다. 인간은 본능적으로 생명연장의 수단으로서 음식을 섭취하게 되고 음식물의 섭취는 특수한 경우를 제외하고는 구강을 통하여 이루어지므로 치아의 탈회는 필연적이다. 칼회는 치아에서 칼슘이 빠져 나오는 현상으로서 그 원인은 충치균인 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*가 식품중의 탄수화물을 생육에 이용하고 유산(乳酸)을 주로 하는 유기산을 분비함으로써 치아의 에나멜질의 화학성분인 hydroxyapatite[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]를 분해하는 것이다.¹⁾ 또한 충치균은 sucrose를 기질로 해서 glucan과 fructan을 생성하는데, 이들을 합성하는 효소는 충치균이 분비하는 glucosyltransferase(GTase)와 fructosyltransferase(FTase)이다. 이 효소들의 반응에 의해서 물에 불용성인 glucan이 대표적으로 치아의 표면에 부착되며, 이렇게 형성된 부착집단을 dental plaque라 한다. Dental plaque를 계속 방치할 경우에는 양치질을 해도 쉽게 제거되지 않으므로 충치균의 생육온상의 역할을 할 뿐만 아니라, 충치균에 의해 생성되는 유기산의 확산을 방해하여 충치를 가속시킨다고 할 수 있

다.¹⁾ 안 등^{2,3)}은 충치예방의 일환으로 *Theobroma cocoa* L.과 Jack fruit로부터 새로운 glucosyltransferase 저해물질을 분리한 바가 있다. 본 연구에서는 충치균의 생육을 억제하는 천연물질을 찾기 위하여 100여종의 생약을 대상으로 screening하던 중, 특히 충치균에 항균효과를 나타낸 두송실(*Juniperus rigida* S. et Z.)을 발견하여 이를 대상으로 충치균으로 인한 치아에 손상에 영향을 미치는 유기산 생성의 저해효과를 알아보고자 하였다. 두송실은 노간주나무의 과실이며, 상록교목으로서 키가 10여미터까지 자란다. 수피(樹皮)는 암회갈색이며 구형내지 타원형의 열매를 10월경에 채취할 수 있다. 한방에서는 이뇨, 거풍, 제습등에 효과가 있다고 알려져 있다.⁴⁾

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 두송실은 충남 금산의 「천궁약초」에서 구입한 5 kg과 지리산 일대에서 1997년 10월초에 2 kg을 채취하여 본교 산림자원학과의 조현서 박사에게 동정 후 실온에서 1개월 정도 음건하여 사용하였다.

충치균의 배양

Streptococcus mutans(KCTC 3065)은 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행으로부터 분양 받았으며, 배지는 Brain heart infusion broth(Difco 0037)를 사용하였고 혐기적 조건하의 37°C에서 3~5일 간격으로 계대배양하면서 사용하였다.¹⁾

시험액의 조제

두송실 1 kg에 대하여 methanol 4 l를 가해 가열추출하여 methanol추출물(DSS-M) 188.6 g을 얻었으며, 이것을 극성

찾는말 : 생약, 유기산, 충치균, 두송실
*연락처자

이 다른 수종의 용매로서 극성을 차츰 높여 가면서 용매분획을 실시하여 n-hexane(DSS-H) 11.5 g, chloroform(DSS-C) 32.4 g, ethyl acetate (DSS-E) 18.5 g, n-butanol (DSS-B) 8.9 g과 water fraction(DSS-W) 45.2 g을 얻었으며, 농축한 후 10% DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹여 10 mg/ml(w/v) 용액으로 조제하여 사용하였다. Control은 10% DMSO만을 사용하였다.^{5,7)}

총치균에 대한 항균효과실험

두송실 methanol추출물과 용매분획물의 항균력시험에 사용할 총치균은 사면에 배양된 총치균을 백금이로 취해서 10 ml의 배지에 접종하고, 37°C, CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 사용하였다. 항균력 시험용 평판배지의 멸균된 기층용배지(1.5% agar)를 petri dish에 15 ml씩 분주하여 응고시키고, 중층용배지(0.75% agar)를 각각 2.5 ml씩을 시험관에 분주하여 멸균한 후, 45°C의 수욕상에 보관하면서 각각의 시험균액 0.1 ml를 첨가하여 잘 혼합한 후, 기층용 배지 위에 고르게 퍼지도록 도포한 뒤 응고시켜 2중의 균점종 평판 배지를 만들어 사용하였다. 시료의 항균력 검사는 한천배지확산법으로 측정하였다.^{8,9)} 또한 10 mg/ml로 조제된 시험액을 멸균된 배지와 혼합하여 1 mg/ml의 농도가 되도록 조제하였으며, 이를 사용전에 0.45 µm membrane filter (Millipore社, USA)로 여과하여 제균하고, 멸균된 paper disc(Toyo, 8 mm, Japan)에 100 µl씩을 흡수시킨 후, 용매를 완전히 휘산시키고 항균시험용 평판배지위에 놓아 밀착시켰다. 이것을 4°C에서 1시간 방치한 후, 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음, paper disc 주변에 생긴 항균대의 직경을 측정하였다.

유기산 생성 억제효과 실험

Screw cap이 부착되어 있는 test tube(19×200 mm)에 Brain heart infusion broth를 각각 10 ml씩 분주한 후 고압 멸균하고 각각의 test tube에 100, 200, 500, 1000 µl씩의 시험액을 가하였다. 그리고 미리 배양해 둔 생육이 왕성한 *S. mutans*를 각각의 test tube에 100 µl씩을 접종하였으며, 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 모든 시험군은 3반복으로 실시하였으며, 배지속에 분비된 유기산의 종류와 양을 HPLC로서 측정하였다.¹⁰⁾ 이 때의 control은 각각의 test tube에 시험액이 포함되지 않은 10% DMSO만을 사용하였다.

유기산 분석

유기산의 분석은 *S. mutans*의 생육배지에 분비되어 나온 유기산의 종류와 각 성분의 함량을 HPLC로서 다음과 같은 조건으로 분석하였다.

유기산의 분석을 위한 시료의 조제는 배양이 끝난 생육 배지 1 ml씩을 취하여 C₁₈ Sep-pak으로 통과시킨 후, 0.2 µm membrane filter로서 여과하여 각각 10 µl씩을 injection 하였다. 또한 유기산 성분함량의 결정은 표준용액의 peak와 retention time을 비교하여 시료의 성분을 결정하고, 해당

Table 1. Analytical conditions of HPLC for organic acid analysis

| | |
|-------------------------|----------------------|
| Instrument | Shimadzu LC10-A |
| Analytical column | Supelcogel 610H |
| Column oven Temperature | 30°C |
| Mobile phase | 0.1%-phosphoric acid |
| Flow rate | 0.5 ml/min |
| Detector | UV detector, 210 nm |

peak의 면적을 비례식으로 계산하였다.¹⁰⁾

결과 및 고찰

총치균에 대한 항균효과

두송실의 methanol추출물과 그 용매분획물의 한천배지확산법으로 측정해 본 총치균에 대한 항균력은 Table 2와 같았다.

두송실 methanol추출물과 용매분획물들의 총치균에 대한 항균활성을 한천배지 확산법으로 측정해 본 결과, water 분획물을 제외한 모든 분획에서 항균력을 나타내었으며 methanol, n-hexane, chloroform분획에서 항균대의 직경이 21, 27, 18 mm로서 비교적 큰 활성을 보였다. 따라서 총치균에 대한 활성물질은 주로 n-hexane분획물에 포함되어 있을 것으로 생각되었다.

유기산 생성 억제효과

총치균으로부터 각각의 배양액에 분비된 유기산의 종류와 양을 측정하기 위하여 HPLC로서 분석하였다. 분석결과는 Table 3과 같다. 배양중 총치균에 의한 유기산의 생성은 주로 oxalic acid, citric acid, lactic acid, acetic acid, fumaric acid였으며, 이 중에서 lactic acid와 citric acid가 전체의 80~90%를 차지하였으며, 피 시험시료에 의한 유기산의 생성억제는 한천배지확산법에 의한 결과와 마찬가지로 methanol추출물과 n-hexane분획물에서 비교적 강하게 억제되었다. 즉 lactic acid의 경우에는 methanol추출물과 n-hexane분획물 1000 µl 처리구에서 각각 1.15, 0.90 µg/ml이 생성되어 대조군에 비하여 각각 7.3, 5.7%정도 밖에 생성되지 않았다. 또한 전체 유기산은 모든 시험군에서 대조군에 비하여 0.6~90.8% 정도 생성이 억제되었으며, 특히 methanol추출물을 1000 µl 처리한 시험군에서는 89.3%, n-hexane분획물

Table 2. Antibacterial activities of MeOH extracts and solvent fractions in *Juniperus rigida* S. et Z. against *S. mutans*

| Solvent fractions | Diameters of clear zone (mm) | Remarks |
|-------------------|------------------------------|---------|
| DSS-M | 21 | +++* |
| DSS-H | 27 | +++ |
| DSS-C | 18 | ++ |
| DSS-E | 12 | + |
| DSS-B | 10 | + |
| DSS-W | - | - |
| Control | - | - |

+, +++, strong, ++, common, +, weak

Table 3. Organic acid contents produced by *S. mutans* analyzed with HPLC

| Solvent fractions | Treated conc. (ppm) | Organic acid contents (µg/ml) | | | | | Total | Inhibition ratio* (%) |
|------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------|-----------------------|
| | | Oxalic acid | Citric acid | Lactic acid | Acetic acid | Fumaric acid | | |
| MeOH extracts | 100 | 0.27 | 2.54 | 5.05 | 0.12 | 0.09 | 8.07 | 64.6 |
| | 200 | 0.29 | 2.36 | 5.10 | 0.09 | - | 7.84 | 63.9 |
| | 500 | 0.16 | 1.98 | 3.18 | - | - | 5.32 | 78.9 |
| | 1000 | 0.15 | 1.32 | 1.15 | - | - | 2.62 | 89.3 |
| n-Hexane fractions | 100 | 0.24 | 1.88 | 4.87 | 0.06 | 0.10 | 7.15 | 68.7 |
| | 200 | 0.27 | 1.85 | 4.66 | - | - | 6.78 | 68.8 |
| | 500 | 0.11 | 1.65 | 2.17 | - | - | 3.93 | 84.4 |
| | 1000 | 0.15 | 1.21 | 0.90 | - | - | 2.25 | 90.8 |
| Chloroform fractions | 100 | 0.75 | 1.97 | 7.54 | 0.25 | 0.13 | 10.64 | 53.4 |
| | 200 | 0.67 | 1.86 | 8.07 | 0.08 | 0.06 | 10.74 | 50.6 |
| | 500 | 0.43 | 1.78 | 6.55 | - | - | 8.76 | 65.3 |
| | 1000 | 0.59 | 1.90 | 4.48 | - | - | 6.97 | 71.6 |
| Ethylacetate fractions | 100 | 1.34 | 2.54 | 10.58 | 0.33 | 0.15 | 14.94 | 34.5 |
| | 200 | 1.66 | 2.65 | 10.44 | 0.30 | 0.15 | 15.20 | 30.1 |
| | 500 | 1.03 | 3.01 | 8.18 | 0.24 | 0.14 | 2.60 | 50.1 |
| | 1000 | 0.98 | 2.21 | 7.54 | 0.21 | 0.16 | 11.10 | 54.8 |
| n-Butanol fractions | 100 | 1.45 | 3.54 | 12.12 | 0.15 | 0.16 | 17.42 | 23.6 |
| | 200 | 1.56 | 3.44 | 13.15 | 0.16 | 0.13 | 18.43 | 15.3 |
| | 500 | 1.63 | 3.21 | 11.79 | - | 0.05 | 16.68 | 33.9 |
| | 1000 | 1.89 | 3.00 | 10.66 | - | - | 15.55 | 36.7 |
| Water fractions | 100 | 2.03 | 4.98 | 13.12 | 0.79 | 0.20 | 21.12 | 7.4 |
| | 200 | 2.34 | 4.64 | 13.89 | 0.54 | 0.21 | 21.62 | 0.6 |
| | 500 | 2.13 | 5.68 | 15.66 | 0.65 | 0.15 | 24.26 | 3.9 |
| | 1000 | 1.99 | 4.66 | 14.18 | 0.46 | 0.16 | 21.45 | 12.7 |
| Control | 100 | 1.88 | 5.06 | 15.03 | 0.66 | 0.18 | 22.81 | |
| | 200 | 1.57 | 5.39 | 14.09 | 0.50 | 0.20 | 21.75 | |
| | 500 | 1.86 | 5.80 | 16.75 | 0.57 | 0.26 | 25.24 | |
| | 1000 | 2.01 | 5.90 | 15.69 | 0.78 | 0.18 | 24.56 | |

*Inhibition ratio(%)=[1-(total organic acid content in tested sample group/total organic acid content in control group)]×100

을 500, 1000 µl 처리한 시험군에서는 각각 84.4, 90.8%의 유기산 생성 억제효과를 나타내었다. 따라서 두송실의 methanol추출물과 n-hexane분획물이 충치균의 생육억제 및 유기산 생성을 강하게 억제하는 것으로 나타나 두송실의 추출물이 충치균의 생육을 억제함으로써 충치유발의 직접적인 원인이 되는 유기산의 생성도 억제되는 것으로 짐작되므로, 충치예방치약이나 구강청정제, 츄잉껌, 기타 식품의 첨가제로서 개발해 볼 충분한 가능성이 있는 것으로 생각되었다.

감사의 글

이 논문은 1997년 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 수행된 연구결과의 일부로서 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 川岸舜朗 (1996) 生體機能調節物質研究法, 송현문화사, p.58-66.
 2. An, B. J. (1997) Chemical structure and isolation of novel glucosyltransferase inhibitor from *Artocarpus heterophyllus*

folium, *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**(6), 1304-1308.
 3. An, B. J., I. B. Kwon and C. Choi (1995) Inhibitory effect of novel flavan-3-ol isolated *Theobroma cacao* L. husk on glucosyltransferase, *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**(1), 92-96.
 4. Kim, J. G. (1992) Illustrated natural drugs encyclopedia (color edition) Vol. 2, 南山堂, p.362.
 5. Nam, S. H. and M. S. Yang (1995) Antibacterial activities of extracts from *Chrysanthemum boreale* M., *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **38**(3), 269-272.
 6. Nam, S. H. and S. D. Choi (1998) Inhibition effect of teeth decalcification by extracts of *Juniperus rigida* S. et Z., *J. Agric. Tech. Res. Inst (Chinju Nat. Univ.)* **11**, 155-159.
 7. Jang, D. S., K. H. Park, S. U. Choi, S. H. Nam and M. S. Yang (1997) Antibacterial substances of the flower of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura, *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **40**(1), 85-88.
 8. Fredrick J. F.(1981) Glucosyltransferase isozymes forming storage glucan in *Prochloron*, A prokaryotic green alga, *Phytochemistry*, **20**(10), 2353-2354.
 9. Piddok, L.J.V. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 307-318.
 10. 朱鉉圭, 趙晃衍, 朴忠均, 曹圭成, 蔡洙圭, 馬相朝 (1995) 食品分析法, 學文社, p448-468.

Inhibition Effect by *Juniperus rigida* S. et Z. on Organic Acids Production from *Streptococcus mutans*

Nam Sang Hae*, Weon Taek Seo, Sang Do Choi, Dae Sik Jang¹ and Min Suk Yang¹(Dept. of Food Processing, Chinju National University, Chinju, Gyeongnam, 660-758, Korea and ¹Dept. of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju, Gyeongnam, 660-701, Korea)

Abstract : To develop the natural antibacterial agents which don't have any toxicity against man, collected several species of medicinal plants were tested for their antibacterial activity and inhibition effect on organic acids production from *Streptococcus mutans*. Among the tested medicinal plants, methanol extracts and n-hexane fraction of *Juniperus rigida* S. et Z. had the comparatively strong activities. For example, strong antibacterial effect against *S. mutans* were showed in methanol extracts, n-hexane and chloroform fractions. Organic acids production were reduced to 89.3 and 90.8% of control in methanol extracts and n-hexane fraction treated concentration of 1 mg/ml, respectively.

Key words : medicinal plants, organic acid, *Streptococcus mutans*, *Juniperus rigida* S.et Z.

*Corresponding author