

두송실의 치아탈회 및 Glucosyltransferase 활성억제효과

남상해[†] · 장대식* · 양민석*

진주산업대학교 식품가공학과

*경상대학교 농화학과

Inhibition of Teeth Decalcification and Glucosyltransferase Activity by *Juniperus rigida* S. et Z.

Sang-Hae Nam[†], Dae-Sik Jang* and Min-Suk Yang*

Dept. of Food Processing, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea

*Dept. of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract

We investigated the inhibition effects of teeth decalcification and glucosyltransferase(GTase) activity on the *Juniperus rigida* S. et Z. Teeth decalcifications by *Streptococcus mutans* were respectively inhibited to 70.13, 74.93% on methanol and n-hexane fractions. In the inhibition test of GTase activities by solvent fractions of *J. rigida*, they were respectively inhibited to 86.6, 89.5% to a similar degree. And in the result to identify GTase produced by *S. mutans* with SDS-PAGE, the band near 65KD estimated as GTase did not show in the lanes of methanol, n-hexane and chloroform fractions.

Key words: decalcification, glucosyltransferase, *Juniperus rigida*, *Streptococcus mutans*

서 론

탈회는 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 있다(1). 따라서 충치균에 의한 GTase의 활성을 저해시키면 glucan의 생성을 억제하게 되고 결국 치아탈회에 의한 충치의 발생을 막는 길이라고 할

수 있다. 따라서 본 연구에서는 충치균의 생육을 억제하는 천연물질을 찾아내어 충치예방을 위한 식품첨가물을 개발하기 위하여 60여종의 생약을 대상으로 항균 활성을 검색해 본 결과, 특히 충치균에 대한 생육억제 활성을 나타낸 두송실(*Juniperus rigida* S. et Z.)을 발견하여, 이를 대상으로 본 연구를 수행하게 되었다. 두송실은 노간주나무의 과실이며, 상록고목으로서 키가 10여미터까지 자란다. 수피(樹皮)는 암회갈색이며 구형내지 타원형의 열매를 10월경에 채취할 수 있다. 한방에서는 이노, 거풍, 제습 등에 효과가 있다고 알려져 있다(2).

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 두송실은 시중의 한약 재료상에서 5kg을 구입하였으며, 진주산업대학교의 산림자원학과 의 도움을 받아 지리산 일대에서 2kg을 채취하여 음건하여 사용하였다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

총치균의 배양

Streptococcus mutans(KCTC3065)를 한국과학기술원 유전공학연구소 유전자원센터 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였다. 배지는 Brain heart infusion broth(Difco 0037)를 사용하여 3~5일 간격으로 계대배양하였으며, 이 미생물은 혐기적 조건하에서 더욱 잘 증식하므로 CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 배양하였다.

시험액의 조제

두송실 1kg에 대하여 methanol 4L를 가해 가열 추출하여 methanol추출물(DSS-M)을 얻었으며, 이것을 극성이 다른 종류의 용매로서 극성을 차츰 높여 가면서 용매분획을 실시하여 n-hexane(DSS-H), chloroform(DSS-C), ethylacetate(DSS-E), n-butanol(DSS-B)과 water fraction(DSS-W)을 얻었으며, 시험액으로 사용하기 위하여 완전히 농축한 후 10% DMSO(dimethylsulfoxide)로서 10mg/ml(w/v) 용액으로 조제하여 사용하였다. 대조군은 10% DMSO만을 사용하였다(3-6).

탈회시험

Screw cap이 부착되어 있는 시험관(19×200mm)에 Brain heart infusion broth를 각각 9ml씩 분주한 후, 무게를 정확히 달아 등동물의 치아를 넣은 후, 고압멸균하고 각각의 시험관에 1ml씩의 시험액을 가하였다. 그리고 미리 배양해 둔 생육이 왕성한 *S. mutans*를 각각의 시험관에 100μ씩을 접종하였으며, 37°C의 CO₂ incubator에서 5일간 배양하였다. 모든 시험군은 3번 반복하여 실시하였으며, 배지속에 용출된 Ca⁺⁺의 양은 유도결합플라즈마분광법(Ion coupled inductively plasma spectrometry, ICP, Atomscan25, T.J.A., USA)으로 측정하였다.

조glucose 전이효소(GTase)의 분리

*S. mutans*를 배양하여 배양액으로부터 GTase를 조제(1,7,8)하여 불용성 glucan 합성의 저해활성을 측정하였다. 즉 *S. mutans*를 2L의 Brain heart infusion broth로서 37°C, CO₂ incubator에서 18시간 배양한 후, 배양액을 4°C에 하룻밤 넣어두고, 원심분리(4°C, 12,000g, 20min)하여 균체를 제거하고 4°C에서 50% 포화용액의 (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 하룻밤 방치하였다. 30,000g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 침전을 2L의 0.05M

phosphate buffer(pH 6.8)에서 2회 투석하고, 30,000g에서 20분간 다시 원심분리하여 얻어진 상등액을 조GTase용액으로 하여 동결건조하여 -70°C에 보존하면서 사용하였다.

GTase의 저해활성 측정

GTase 저해활성의 측정은 0.05M phosphate buffer (pH 6.8) 0.6ml, 조GTase용액 0.15ml, 2.5% sucrose 0.25ml와 0.1ml의 시험액이 첨가된 반응용액을 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 2.4ml의 methanol을 첨가하여 반응을 중지시킨 후, 4°C에서 4시간 방치하였다. 그 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 침전을 증류수 1ml와 70%의 ethanol로서 순차적으로 가볍게 씻은 후, 얻어진 불용성의 glucan을 phenol-H₂SO₄법(9)으로 정량하였다.

GTase의 SDS-PAGE

두송실의 용매분획과 함께 *S. mutans*를 배양한 배지에서 조GTase를 분리한 후(1,10), Hames와 Rickwood의 방법에 따라 SDS-PAGE를 하였다(11). 즉 7%(w/v) acrylamide 농도의 slab gel(100×100×1mm)을 사용하여 각 lane당 10μ씩의 시료를 loading하여 100~160 V, 4°C에서 2시간 동안 전기영동하였다. 그 후 0.1% coomassie brilliant blue R-250으로 2시간 염색하고, methanol : water : acetic acid(30 : 63 : 7, v/v/v)의 용액에 5시간 동안 담가두어 가볍게 흔들면서 탈색하였다.

결과 및 고찰

치아탈회 억제효과

두송실 methanol추출물과 5종의 용매분획물들, 동물의 치아를 함께 넣은 배지에 *S. mutans*를 접종하여 5일간 배양한 후, 동물의 치아로부터 빠져 나온 Ca⁺⁺의 함량을 이온 유도결합플라즈마분광법으로 측정한 결과는 Table 1과 같았다. 즉 동물의 치아로부터 배지내에 유출된 Ca⁺⁺의 농도는 두송실의 methanol추출물과 n-hexane분획물에서 각각 5.523, 4.635ppm으로서, 각각 70.13, 74.93%의 치아탈회 억제효과를 나타내었다. 그러나 이외의 용매분획물에서는 8~39% 정도로 탈회를 억제하였으나, 그다지 주목할 만한 것은 아니었다. 따라서 두송실의 n-hexane 분획물에는 *S. mutans*의 생육을 억제하는 유효물질이 존재하는 것으로 사료되었다.

Table 1. Calcium contents extruded in medium after culturing animal teeth with, methanol extracts and several solvent fractions isolated from *Juniperus rigida* S. et Z. measured by ICP

Solvent fractions	Calcium contents extruded in medium(ppm)			Inhibition ratio(%) ¹⁾
	Before culture(A)	After culturing for 5 days(B)	Extruded calcium contents(B-A)	
DSS-M	5.023	10.546	5.523	70.13
DSS-H	5.135	9.770	4.635	74.93
DSS-C	5.068	16.240	11.172	39.57
DSS-E	5.013	21.452	16.439	11.09
DSS-B	5.009	20.659	15.650	15.31
DSS-W	4.997	21.965	16.968	8.23
Control	5.115	23.554	18.439	

¹⁾Inhibition ratio(%): $100 \times (\text{extruded calcium content(ECC) of control} - \text{ECC of each samples}) / \text{ECC of control}$

GTase활성의 저해

*S. mutans*의 배양액으로부터 분리한 GTase의 저해 활성을 phenol-H₂SO₄법으로 측정된 결과는 Table 2와 같았다.

GTase에 의하여 합성된 glucan의 양은 탈회실험에서와 유사한 결과를 나타내었다. 즉 두송실의 methanol추출물과 n-hexane분획물에서는 각각 86.6%, 89.5%의 glucan의 합성을 저해하였다. 따라서 탈회실험결과와 함께 미루어 보면, 두송실의 n-hexane분획물에는 *S. mutans*의 생육을 저해하는 물질이 존재하여 생육을 저해함으로써 결국 GTase의 생성을 억제하게 되어 glucan의 합성을 저해하는 것으로 생각되었다.

GTase의 SDS-PAGE pattern

*S. mutans*가 생성하는 GTase의 활성의 정도를 SDS-PAGE로서 알아본 결과는 Fig. 1과 같았다. 탈회시험, GTase 활성저해실험 등에서도 유효한 것으로 나타난 두송실의 methanol추출물과 n-hexane, chloroform분획물에서 GTase로 추정되는 65KD 부근의 band가 나타나지 않았다. 한편 안(7)과 안 등(8)은 충치예방의 일

Table 2. Quantification of glucan produced by GTase isolated from media after culturing of *S. mutans*

Solvent fractions	AIG ¹⁾ (μ g)				Inhibition ratio(%) ²⁾
	Average	Test1	Test2	Test3	
DSS-M	51.0	45	76	32	86.6
DSS-H	40.0	40	38	42	89.5
DSS-C	280.3	276	253	312	26.6
DSS-E	221.3	254	219	191	42.1
DSS-B	207.0	210	227	184	45.8
DSS-W	298.3	312	296	287	21.9
Control	382.0	350	420	376	

¹⁾AIGL: Amounts of insoluble glucan

²⁾Inhibition ratio(%): $100 \times ((\text{AIG of control} - \text{AIG of samples}) / \text{AIG of control})$

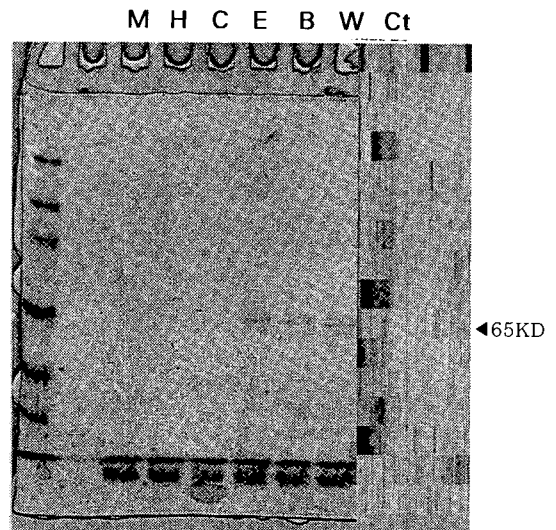


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of glucosyltransferase induced by *S. mutans*.

M: Methanol extracts, H: n-Hexane fr., C: Chloroform fr., E: Ethylacetate fr., B: Butanol fr., W: Water fr., Ct: Control

환으로 *Theobroma cocoa* L.과 Jack fruit로부터 새로운 glucosyltransferase의 저해물질을 분리한 바가 있으나, 두송실로부터는 이러한 연구를 찾아 볼 수 없었다. 이상의 결과로 미루어 볼 때, 두송실에는 충치균에 생육억제 활성을 갖는 물질이 존재함을 알 수 있었다. 따라서 두송실은 다른 생약들과 비교해서 건강한 치아의 충치예방과 탈회억제효과, dental plaque의 생성억제효과가 뛰어난 것으로 짐작되므로 이를 충치예방치약이나 구강청정제, 츄잉껌, 기타 식품의 첨가제로서 개발해 볼 충분한 가능성이 있는 것으로 생각되었다.

요 약

두송실 추출물의 *S. mutans*에 의한 치아탈회 및 gl-

ucosyltransferase의 저해활성을 조사하였다. 두송실 methanol 추출물과 n-hexane분획물에서 각각 70.13, 74.93%의 치아탈회 억제효과를 나타내었다. GTase활성의 저해실험에서도 methanol추출물과 n-hexane분획물에서 각각 86.6, 89.5%의 glucan합성을 저해하였다. 또한 *S. mutans*가 생성하는 GTase를 SDS-PAGE로서 확인해 본 결과에서도 methanol추출물과 n-hexane, chloroform분획물에서 GTase로 추정되는 65KD 부근의 band가 나타나지 않았다.

감사의 글

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

문헌

1. 기능성식품소재연구회 : 식품중의 생체기능조절물질연구법. 송현문화사, p.58(1996)

(1996)
 2. 김재길 : 원색천연약물대사전(下). 남산당, p.362(1992)
 3. Piddok, L. J. V. : Technique used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 307(1990)
 4. 남상해, 양민석 : 산국추출물의 항균력. 한국농화학회지, **38**, 269(1995)
 5. 남상해, 최진상, 최상도 : 두송실 용매분획물에 의한 충치균의 유기산 생성 저해효과. 진주산업대학교 농업기술연구소보, **11**, 173(1998)
 6. 장대식, 박기훈, 최상욱, 남상해, 양민석 : 구절초 꽃의 항균성 물질. 한국농화학회지, **40**, 85(1997)
 7. 안봉전 : Jack fruit 잎으로부터 새로운 glucosyltransferase저해물질분리 및 화학 구조. 한국식품과학회지, **29**, 1304(1997)
 8. 안봉전, 권익부, 최청 : *Theobroma cacao* L. 외피로부터 새로운 flavan-3-ol 화합물의 glucosyltransferase저해효과. 한국식품과학회지, **27**, 92(1995)
 9. 주현규, 조황연, 박충균, 조규성, 채수규, 마상조 : 식품분석법. 학문사, p.302(1995)
 10. Fredrick, J. F. : Glucosyltransferase isozymes forming storage glucan in *Prochloron*, A prokaryotic green alga. *Phytochemistry*, **20**, 2353(1981)
 11. Hames, B. D. and Rickwood D. : *Gel electrophoresis of proteins*. IRL press, Oxford, Washington, D.C., p.36 (1983)

(1998년 8월 5일 접수)