

구강균 Streptococcus mutans KDJ-50에 대한 정향의 항균효과

대구보건대학 치기공과

곽동주, 남상용, 정석민

=Abstract=

Antibacterial Activity of Caryophylli Flos on the Growth of Dental Caries Bacteria, Streptococcus mutans KDJ-50

Dong-Ju Kwak, Sang-Yong Nam, Suk-Min Chung

Dept. of Dental Laboratory Technology, Taegu Health College

This study was conducted to find antibacterial agent against growth of dental caries bacteria, St. mutans KDJ-50 from various medicinal plants of which safty was indetified. Medicinal plants used in this study was dried and grinded after purchased at Daegu yakryung sijang and Kyungsan jungang sijang. Medicinal plants extracted with 80% ethanol at boiling point for 3 hrs was used as antibacterial agent after freeze dried. This study was conducted to find antibacterial agent against growth of dental caries bacteria, St. mutans KDJ-50 from 32 medicinal plants of which safty was indetified. The result of using paper disc method, Caryophylli Flos, Coptidis Rhizoma, Phellodendri Cortex, Schizamdrae Fructs, Myristicae Semen, Crataegi Fructus and Acori Graminei Rhizoma was selected as antibacterial agent. The result of viable cell counting method, the antibacterial

교신저자 : 정석민(전화 : 053-320-1329) E-mail : smchung@mail.taegu-hc.ac.kr

activity of Caryophylli Flos was highest among tested 7 medicinal plants followed by Phellodendri Cortex and Coptidis Rhizoma. The extinction effect of the *St. mutans* by Caryophylli Flos was shown with the addition of 0.5 (w/v) in the medium. The high antibacterial activity was acquired at high extraction temperature and long extraction temperature. The antibacterial activity of Caryophylli Flos was not effected by the concentration of ethanol.

Key Words: Caryophylli Flos, *Streptococcus mutans* KDJ-50, Antibacterial activity

1. 서 론

최근 현대인들의 식생활 형태가 점차 다양해짐에 따라 기호품 및 당류의 소비는 지속적으로 증가하는 추세에 있는 반면에 스트레스 등의 원인으로 면역기능은 오히려 약화되어 구강내 미생물이 증가 추세에 있다(Houte, 1980).

충치는 구강내 미생물 중 특히 *Streptococcus* sp. 세균이 주요 원인이 되어 치아 중 무기질의 탈회로 인해 상아질이 파괴되어 치아 조직의 결손을 초래하는 세균성 치아 경조직질환이라고 보고되어(Inoue 과 Kora, 1979) 있으며 특히 *Streptococcus mutans* (Viala 등, 1995; Burns, 1995; Kawai, 1994; Mata 등, 1997; Varpuleena, 1996; Yukako 등, 1998) 에 의해 발생된다고 보고되어 있다.

충치에 대한 최근의 견해는 충치균이 생성하는 glucosyltransferase (GTase, EC 2.4.1.5)는 sucrose를 이용(Hamada, 1989, 1991; Furuta 등, 1983; Inoue, 1982; 박원재 등, 1991)하여 glucose 중합체를 생성하는데 이는 90% 이상의 α -1, 3 결합과 α -1, 6 결합으로 이루어진 점착성이고 불용성인 glucan에 충치균 등의 통성 혐기성 및 혐기성 세균이 증식하면서 생성시킨 유기산에 의해 치아의 표면의 에나멜질 또는 세멘트질이 파괴되어 발생한다고 한다 (Degar 등, 1975; Miyoshi 등, 1987; Kozai 등, 1987;

Namba 등, 1982). 그리하여 치아의 유기질이 또다시 세균에 의해 침습되어 심화되어 가는데 이를 치료하지 않을 경우 치아의 손상은 경조직과 치수에 이르고, 나아가서 근관을 거쳐 치조골의 파괴에 이른다.

충치를 예방 및 치료하기 위하여 구강내의 충치균을 제거하기 위한 연구를 요약하면, 첫째로 페니실린, 에로스토마이신, 테트라사이클린, 스파라마이신과 같은 항생제는 생체내 실험이나 생체외 실험에서 효과적이었으나(Mcclure 등, 1946), 장내세균총에 영향을 주는 등 부작용이 크며(Fitzgerald, 1973), 둘째로 클로로헥시딘은 충치형성을 저지하는 효과가 있으나(Loe 등 1970), 구강점막의 궤양이나 박리, 치아에 실리콘을 부착시키는 등의 부작용이 있고 (Sims, 1970), 셋째로 새로운 예방법의 하나로 백신 (Sims, 1972)이나 텍스트라제(Konig 등, 1968) 등 효소의 활용을 시도해봤으나, 효과가 없어 임상에 응용되지 못하고 있는 실정이다.

Namba 등(1982)은 중국산 및 일본산 약용식물 60 종류의 추출물을 이용하여 충치균의 생육 억제 실험 결과 *Magnoliae cortices*의 성분인 magnolol과 hinokiol이 충치균에 대한 MIC가 6.25 μ g/mL로써 강한 항균 효과가 있다고 보고하였다. 국내에서는 배기환 등(1990)이 튜립나무잎의 항균성 성분과 안전성에 대하여 보고하였으며, 배기환 등(1991)도

충치균 Streptococcus mutans에 대한 ρ -Phenphenol 유도체의 항균작용에 대해 보고하였다.

따라서, 본 연구는 충치 예방 및 진행 중단의 방법으로 예로부터 민간에서 이용되어 안전성이 확인된 약용식물 중 항균성이 있다고 알려진 32종을 대상으로 하여 이들 추출물의 구강균에 대한 항균 효과를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 약용식물은 대구 약령시장과 경산 중앙시장에서 구입하였다. 이를 건조된 시료로 미세하게 마쇄한 후 추출용 시료로 사용하였다.

시료의 추출은 수직으로 환류 냉각관을 부착시킨 flask에 시료의 10배의 80% 에탄올 용액을 혼합하여 비등 수용상에서 3시간 동안 가열 추출하여 여과한 후 그 여액을 동결건조시켜 항균성 물질로 사용(Branen, 1975)하였다.

2. 구강분리균

구강균의 분리를 위하여 대구시내 소재 치과 의원에 내원한 환자 15명의 구강에서 시료를 채취하였으며, 채취한 균은 즉시 nutrient broth에 접종하여 37℃에서 48시간 동안 증균배양한 후, 배양액 1 mL를 Brain Heart Infusion agar(Difco; 1999, U.S.A. : 이하 BHI)에 혼합분주하여 37℃에서 48시간 동안 배양하여 분리하였다.

분리된 균주는 Bergey's manual of systemic bacteriology의 방법에 따라 형태학적, 생화학적 특성을 조사하고, Analytical Services, Inc.(U.S.A.)에서 확인·동정하였다.

3. 항균성 약용식물의 선정

1) 1차 선정

구강균에 대한 항균성 약용식물의 1차 선정을 위하여 미리 배양하여 둔 균 배양액 0.1 mL를 BHI agar에 접종한 후 도말삼으로 균일하게 도말하고, 80% 에탄올로 비등수용상에서 3시간동안 추출한 후 동결건조한 약용식물 추출물을 일정량씩 흡수시킨 0.8 mm paper disc를 평판배지 표면에 놓아 밀착시킨 다음 37℃에서 48시간 동안 배양한 후 disc 주위에 생성된 생육저해환의 직경을 비교하였다.

2) 2차 선정

Paper disc법으로 1차 선정된 정향, 황련, 황백, 오미자, 약구슬, 산사 및 석창포 등 7종을 대상으로 BHI broth에 각각의 약용식물을 0.5%(w/v) 농도로 첨가하여 30℃에서 48시간 동안 배양한 후 생균수를 측정하였다.

3) 항균물질의 최적추출조건

추출최적 조건을 조사하기 위하여는 추출온도를 각각 20, 35, 50, 65 및 80℃로, 추출시간을 각각 2, 8, 14, 20 및 26시간으로, 에탄올의 농도를 각각 0, 25, 50, 75 및 100%로 달리하여 추출한 뒤 구강균에 대한 항균력을 조사하여 최적 추출조건을 결정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 구강균의 동정

대구시내에 소재한 치과의원에 내원한 환자 15명의 구강에서 채취하여 선별된 구강균 KDJ-50의 형태학 및 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 이 균주는 아포를 형성하지 않는 gram 양성 구균으로, 2%(w/v) 이상의 염농도에서는 생육이 억제되었으며, 운동성이 없고, 혐기적 조건에서의 성장이 가능하며, mannitol, sorbitol, melibiose 및 raffinose는 분해하였으나, lactose는 분해하지 못하는 등 생리적 특징들이 Bergey's manual of systemic bacteriology 상의 Streptococcus mutans의 특징과 일치하였다. 또한 본 균주를 Analytical services, Inc.에 의뢰한 결과, Streptococcus mutans로 확인되어 Streptococcus mutans KDJ-50으로 명명하였다(data not shown).

2. 구강균에 대한 항균력이 우수한 약용식물의 선별

1) 1차 선별

문헌검색을 통하여 항균력이 있다고 알려진 약용식물 32가지의 80% 에탄올 추출물의 St. mutans KDJ-50에 대한 항균력을 paper disc agar diffusion 법에 따라 약용식물 추출물을 증류수와 1:1(w/v)로 혼합한 후 이를 일정량씩 흡수시킨 paper disc를 배지위에 밀착시켜 생육저해환을 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 즉, 정향, 황련, 황백, 오미자, 약구슬, 산사 및 석창포 등 7종이 시험균주에 대해 특히 강한 항균력을 보였다. 하지만 저해환만으로는 항균활성을 정확히 확인하기 어렵다고 판단되어 이 7종의 약용식물을 대상으로 2차 선별을 위

Table 1. Morphological and cultural and Physiological and biochemical characteristics characteristics of isolate, Streptococcus mutans KDJ-50

Characteristics	Streptococcus mutans KDJ-50
Shape	coccus
Size	0.7 μ m
Motility	-
Gram stain	-
Endospore produced	-
Filaments	-
Anaerobic growth	+
Growth in NaCl	
2%	+
5%	-
7%	-
10%	-
Fermentation of	
Lactose	-
Mannitol	+
Sorbitol	+
Melibiose	+
Raffinose	+
Hydrolysis of	
Arginine	-
Esculin	+
Voges-proskauer	+
H ₂ O ₂ produced	-
Oxidase	+
Catalase	+

한 실험을 수행하였다.

최동환(1999)은 식중독균에 대한 생약재 물추출물의 항균력을 paper disc법으로 측정된 결과 정향, 황련, 오미자가 식중독균에 대해 강한 항균력을 보였으며, 특히 gram 음성균에 대해 강한 증식억제 효과를 보였다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다.

Table 2. Growth inhibition by 80% ethanol extracts of medicinal plants for dental caries bacteria

Samples		Inhibition zone diameter (mm)
		KDJ ^{d)}
Gugija	Lycii Fructus	-
Mokdampi	Moutan cortex	-
MokHang	Helenii Radix	-
Maekmundong	Ophiopogonis Tuber	-
Maeka	Hordei Fructus Germinatus	-
Baekchul	Atractylodis Rhizoma Alba	-
Sain	Arnomi Seman	-
SanSa	Crataegi Fructus	20.4
SanSuYu	Corni Fructus	-
SeokChangpo	Acori Graminei Rhizoma	18.3
Soyeop	Perillae Herba	-
Yeongyo	Forsythiae Fructs	-
OmiZa	Schizandrae Fructs	14.1
Jakyak	Paeoniae Radix	11.8
Jisil	Ponciri Fructs	-
ChangChul	Atractylodis Rhizoma	-
Chunmunolong	Asparagi Radix	-
Hyuncho	Geranium thunbergii Koidz	-
Hwanggi	Astragali	-
Hwangbaek	Phellodendri Cortex	13.8
Hwanglyun	Coptidis Rhizoma	23.1
Baekjilye	Tribuli Fructs	-
Bilrang	Arecae Semen	-
Sagan	Belamcandae Rhizoma	-
SoHyeoHang	Foeniculi Fructs	-
Sungma	Cimicifugae Rhizoma	-
Yukdogu	Myristicae Semen	13.8
EungangKwak	Epimedii Herba	-
Jeonghang	Caryophylli Flos	16.8
Hubak	Magnoliae Cortex	-
Hangin	Armeniaca Semen	-
Yukgae	Cinnamomi Cortex Spissus	-

^{d)} *St. mutans* KDJ-50

^{e)} Antibacterial activity was calculated with Inhibition zone diameter

^{f)} negative

2) 2차 선별

Paper disc agar diffusion법에 따라 1차 선별된 정향, 황련, 황백, 오미자, 약구송, 산사 및 석창포 등의 약용식물을 대상으로 정확한 항균력을 확인하기 위하여 2차선별을 실시하였다. 2차선별을 위해서는 각 약용식물을 0.5%(w/v)농도로 첨가한 BHI broth에 구강균을 각각 1.0×10^6 CFU/mL가 되게 접종하고, 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 생균수를 측정하였다.

그 결과는 Table 3에서와 같이 *St. mutans* KDJ-50에 대해서는 정향이 99.6%의 균성장 저해율을 보여 가장 우수하였으며, 그 외 황백과 황련도 90% 이상의 높은 저해율을 보이는 것으로 나타났다. 따라서, 구강균 *St. mutans* KDJ-50에 대한 항균성 약용식물로 정향을 선정하였다.

Table 3. Growth inhibition ratio by 80%(w/v) ethanol extracts of medicinal plants for dental caries bacteria

Samples	Growth inhibition ratio (%)
	<i>St. mutans</i> KDJ-50
Phellodendri Cortex	95.6
Coptidis Rhizoma	91.5
Caryophylli Flos	99.6
Schizandrae Fructs	80.3
Myristicae Semen	80.2
Crataegi Fructus	65.4
Acori Graminei Rhizoma	66.9

3. 정향의 농도에 따른 항균력

정향의 첨가농도에 따른 배양기간별 *St. mutans* KDJ-50에 대한 증식억제 및 pH의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 1과 2에서와 같이 정향을 0.1%(w/v)

첨가시 대조구와 80% 에탄올 첨가구에 비해 항균 활성을 나타내지 못하였다. 하지만 0.5%(w/v)와 1.0%(w/v) 첨가시는 배양 12시간째에 초기접종량의 106배 이상 감소되어 강한 항균활성을 보임을 알 수 있었다. pH의 변환도 균수의 변화와 유사한 경향을 보였다.

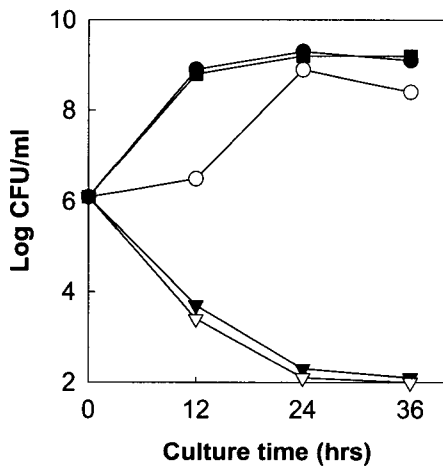


Fig. 1. Changes in the number of *St. mutans* KDJ-50 by percent concentration of *Caryophylli Flos* during cultivation.

●-● : 0% ○-○ : 0.1%
 ▼-▼ : 0.5% ▽-▽ : 1.0%
 ■-■ : Ethanol 1.0%.

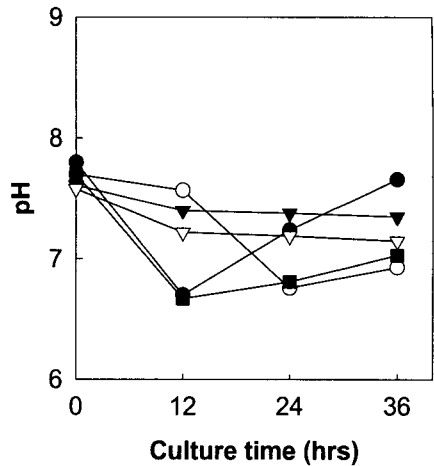


Fig. 2. Changes in pH by percent concentration of *Caryophylli Flos* during *St. mutans* KDJ-50 cultivation.

Symbols denote that ●-● : 0%
 ○-○ : 0.1%(w/v) ▼-▼ : 0.5%
 ▽-▽ : 1.0% and ■-■ : Ethanol 1.0%.

4. 정향의 추출조건에 따른 생육저해효과

정향의 추출조건에 따른 구강균의 생육저해효과를 살펴보기 위하여 추출온도를 각각 20, 35, 50, 65 및 80°C로 달리하여 14시간 동안 80% 에탄올로 추출한 뒤 동결건조하여 시료를 준비하였다. BHI broth에 추출물을 각각 0.5%(w/v)의 농도로 첨가한 뒤 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 생균수를 측정된 결과는 Fig. 3과 같이 추출온도를 높게 할수록 *St. mutans* KDJ-50의 성장이 급격히 억제되는 것으로 조사되었으며, 20°C 추출물에 비해 80°C 추출물에서 1,000배 이상의 항균효과를 확인할 수 있었다.

추출시간에 따른 구강균수의 변화를 조사하기 위하여 추출시간을 각각 2, 8, 14, 20 및 26시간으로 달리하여 80°C에서 추출한 뒤 같은 방법으로

생균수를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 4와 같이 시험된 모든 균주가 추출시간을 오래할수록 균성장이 억제되는 것으로 확인되었다.

추출에 사용된 에탄올의 농도에 따른 구강균수의 변화를 조사하기 위하여 에탄올의 농도를 각각 0, 25, 50, 75 및 100%로 달리하여 정향을 80°C에서 26시간 동안 추출한 뒤 같은 방법으로 생균수를 측정한 결과는 Fig. 5에서와 같다. 에탄올의 농도가 높아짐에 따라 균성장이 다소 억제되는 경향을 보였으나 그 차이는 미비하였으며, 추출용매로 100% 에탄올을 사용했을 경우에는 오히려 생육억제효과가 떨어지는 것으로 나타났다. 에탄올의 농도에 따른 생육억제 패턴도 불규칙한 것으로 나타나 에탄올의 농도는 항균력의 증감에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 추정되었다.

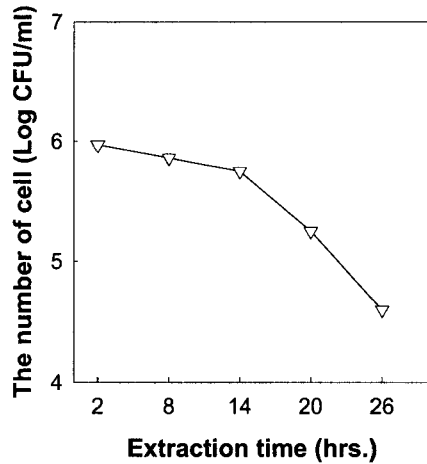


Fig. 4. Effect of extraction time of Caryophylli Flos on the growth of dental caries bacteria. The number of cell was counted after incubation for 24 hrs at 37°C. Symbols denote that ▽-▽ : *St. mutans* KDJ-50.

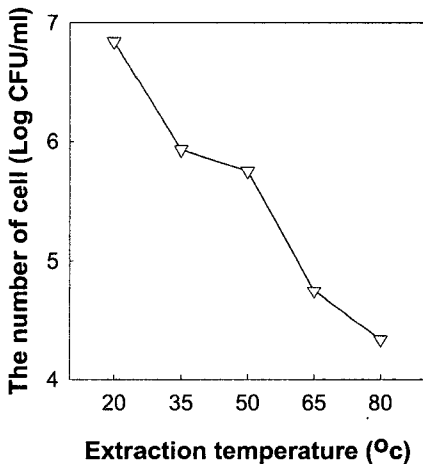


Fig. 3. Effect of extraction temperature of Caryophylli Flos on the growth of dental caries bacteria. The number of cell was counted after incubation for 24 hrs at 37°C. Symbols denote that ▽-▽ : *St. mutans* KDJ-50.

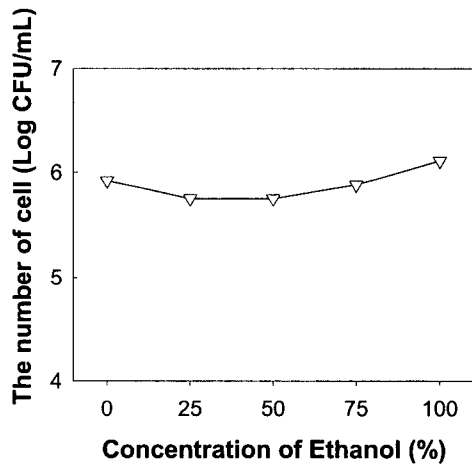


Fig. 5. Effect of the concentration of of Caryophylli Flos ethanol on the growth of dental caries bacteria. The number of cell was counted after incubation for 24 hrs at 37°C. Symbols denote that ▽-▽ : *St. mutans* KDJ-50.

IV. 결 론

본 연구는 충치 예방 및 진행 중단의 방법으로 예로부터 민간에서 이용되어 안전성이 확인된 약용식물 중 항균성이 있다고 알려진 32종을 대상으로 하여 이들 추출물의 본 연구실에서 분리한 *St. mutans* KDJ-50에 대한 성장 억제 효과를 확인하였다.

1. 항균력이 우수한 약용식물을 선별하기 위해 1차적으로 paper disc법으로 생육저해환을 측정하여 정향, 황련, 황백, 오미자, 약구송, 산사 및 석창포 등 7종이 시험균주에 특히 강한 항균력을 보였으나, 저해환만으로 항균활성을 정확히 확인하기 어렵다고 판단되어 이 7종의 약용식물을 대상으로 BHI broth에 각각의 약용식물을 0.5%(w/v) 농도로 첨가하여 30℃에서 48시간 동안 배양한 후 생균수를 측정하여 2차 선별한 결과, 정향이 가장 우수하였으며 황백, 황련 순으로 높은 저해율을 보였다.
2. 정향의 추출농도에 따른 항균력은 0.5%(w/v) 농도로 첨가할 경우 시험균주에 강한 항균력을 보였으며, 추출시간에 따른 항균력은 추출시간을 오래할수록 시험 균주의 성장이 억제되는 것으로 확인하였다.
3. 추출에 사용된 에탄올의 농도에 따른 시험균주의 항균력의 증감에 큰 영향을 미치지 못하였다.
4. 정향의 항균물질을 분리·정제 후 치약, 구강청정제 등에 활용할 경우 높은 상업적 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

박원재, 이형재, 전기봉, 서유탉. 식물추출물에 의한 *Streptococcus mutans*의 생육 및 glucosyltransferase 저해효과. *화장품화학회지*, 17 : 39-47, 1991.

최동환. 생약재의 식중독균에 대한 항균 효과와 생리활성에 관한 연구. 영남대학교 석사논문, 36-38, 1999.

Burns T. Mechanism of killing of streptococcus mutans by light-activated drugs. *Proceeding of Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and Other Modalities ; Barcelona, Spain ; 14-16 Sep. Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering. USA. 26 : 288-297, 1996.*

DeGAR MD, Walker GJ. Metabolism of the polysaccharides of human plaque. *Caries Res.* 9 : 21-27, 1975.

Furuta T, Nisizawa T, Chiba J, Hamada S. Production of monoclonal antibody against a glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* 6715. *Infect Immun*, 41 : 872-875, 1983.

Hamada S. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*, 59 : 4161-4167, 1991.

Hamada S. Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol*, 135 : 335-344, 1989.

- Houte JV. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int Den J*, 30 : 305-308, 1980.
- Inoue M, Koga T, Sato S, Hamada S. Synthesis of adherent insoluble glucan by the concerted action of the two glycosyltransferase components of *Streptococcus mutans*. *FEBS Lett*, 143 : 101-104, 1982.
- Inoue M, Kora T. Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*, 25 : 922-929, 1979.
- Kawai N. Effects of salts and metal oxides on electrochemical and optical properties of *streptococcus mutans*. *Japanese Journal of Applied Physics*, 33 : 1496-1498, 1994.
- Kozai K, Miyake Y, Kohda H, Kamataka S, Yamasaki K, Suginaka H, Nagasaka K. Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic and urosolic acid. *Caries Res*. 21 : 104-108, 1987.
- Mata LG, Drake D, Doyle RJ. Modification of surface properties of oral streptococci by α -1,6 glucans. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Amsterdam, Elsevier, 8 : 295-302, 1997.
- McClure FF, Hewitt WL. *J Dent Res*, 25 : 44, 1946.
- Miyoshi M, Imoto T, Kasagi T. Antieurodontic effect of various fractions extracted from the leaves of *Gymnema sylvestre*. *J Yonago Med Ass*, 38 : 127-137, 1987.
- Namba T, Tsunozuka M, Hattori M, Kadota S, Kikuchi T. Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines-Sc-reening of crude drugs for inhibitory action on plaque formation. *Proc Symp*, 15 : 179-186, 1982.
- Varpuleena K. Longitudinal Analysis of Human Salivary Immunoglobulins, Nonimmune Antimicrobial Agents and Microflora after Tonsillectomy. *Clinical Immunology and Immunopathology* 80 : 110-115, 1996.
- Yukako N, Masatsune M, Kumiko N. Formation of an Inhibitor of Cariogenic Glucan Synthesis in Dark Beer. *Food Science and Technology*, 31 : 503-508, 1998.