Journal of Dental Hygiene Science Vol. 4, No. 3, pp. 127~131 (2004)

한국치위생과학회
THE KOREAN SOCIETY OF DENTAL HYGIENE SCIENCE

소목 분획물이 *Streptococcus mutans* KCTC 3065의 생장에 미치는 효과

전은숙† · 한만덕[1]
동부산대학 치위생과
[1]김천대학 치위생과

Effects of *Lignum sappan* Extract on the Growth of *Streptococcus mutans* KCTC 3065

Eun-Sook Jeon† and Man-Deuk Han[1]
Dept. of Dental Hygiene, Dongpusan College, Busan 612-715, Korea
[1]Dept. of Dental Hygiene, Gimcheon College, Gimcheon, Gyeongbuk 740-704, Korea

ABSTRACT This study was to study the antibacterial effect of *Lignum sappan* extract on *S. mutans* growth. The antibacterial activities of *Lignum sappan*'s crude extract was measured 17.3 mm at 20 mg/m*l* concentration. The growth of *S. mutans* in control medium was the highest at 8hr, while the media of *Lignum sappan* extract added-medium (2 mg/m*l*) showed maximum growth at 16hr. The pH values of the control media was 5.08 at 8hr, but the media supplemented with *Lignum sappan* extract was 6.69 at 8hr. The amounts of total carbohydrate of the control media was 0.81 mg/m*l* at 8hr, but the media supplemented with *Lignum sappan* extract was 2.06 mg/m*l* at 8hr. In the protein change of culture medium, the control culture broth and the cultures supplemented with *Lignum sappan* extract was 8.39 mg/m*l* and 12.3 mg/m*l* at 8hr, respectively. The *S. mutans* polysaccharide contents of the control media and the media supplemented with *Lignum sappan* extract was 300 mg/100m*l* and 60 mg/100 m*l* at 8hr, respectively.

Key words *Streptococcus mutans*, antibacterial effect, *Lignum sappan* extract

서 론

치아우식은 치면세균막(plaque)내 세균에 의해 당성분이 분해되어서, 이 때 나오는 산으로 치아표면이 탈회되고 치질 내 유기성분이 용해되는 과정을 말한다. 치아우식 관련세균으로는 Streptococci(*S. mutans*), Lactobacilli(*L. casei*), Actinomyces (*A. biscosus*)로 *S. mutans*는 치아 평활면우식 및 초기우식에 관여하며, *L. casei*는 소와나 열구우식 및 진행우식병소에 *A. viscosus*는 치근우식에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 *S. mutans*는 자당을 대사하여 불용성 세포외 다당류를 생성하는데 이는 치아에 부착하여 많은 양의 치면세균막을 형성하게 된다. 또한 *S. mutans*는 다른 치면세균막 형성 세균보다 자당을 산으로 전환시키는 능력과 다당류를 비축해 두는 능력이 뛰어나다. 이와 같은 이유로 *S. mutans*는 치아우식 원인균 중에서도 가장 중요하게 다뤄지고 있다[1]. 따라서 구강내에서 *L. casei*와 *S. mutans*를 포함한 구강세균의 성장을 미리 억제할 수 있다면 치아우식증을 크게 감소시키거나 더 이상의 진행을 막을 수 있을 것이다.

최근 천연물질에 대한 *S. mutans*의 항균효과에 대한 다양한 연구들이 이루어지고 있다. 전 등[2]은 오미자, 오수유 추출물을 열수추출한 후 *S. mutans*에 대한 항균효과를 검색하였으며, 유윤정 등[3]은 자몽씨, 결명자 및 당귀에 의한 *S. mutans*의 증식 억제효과에 대해 보고한 바 있고, 그 외에도 flavonoid[4], 생약재 및 향신료[5], 관중[6], 황금[7] 등 여러 물질이 보고된 바 있다.

소목(*Lignum sappan*)은 콩과에 속하는 목류 한약재로서 중심부분만 취하여 사용하며[8] 혈전증의 치료, 진통제, 월경 촉진 및 타박상 등에 쓰이고 있다[9]. 함유된 관련 물질로는 brazilin, homoisoflavonoids, dibenz[b,d]oxocins (protosappanins A, B and C, protosappanin E-1 and E-2)[10-12] 등이 알려져 있다.

국내에서는 *S. mutans*에 대한 소목의 연구는 거의 보고되어 있지 않은 실정이며, 소목 추출물의 항산화 효과[13], 소목 추출물이 식품부패 미생물의 성장과 분쇄육 보존에 미치는 영향[14] 등이 보고된 바 있다.

이에 본 연구는 국내에서 유통되는 소목으로부터 열수 추출물을 분리한 후, *S. mutans*에 대한 항균효과를 paper disc method로 검색하고, *S. mutans*의 대사에 미치는 영향을 평가하기 위하여 생장곡선, pH변화, 단백질 변화, 총 탄수화물의

†Corresponding author
Tel: 051-540-3859
Fax: 051-540-3643
E-mail: jes7880@hanmail.net

변화 및 다당류 생성에 미치는 효과 등에 관하여 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

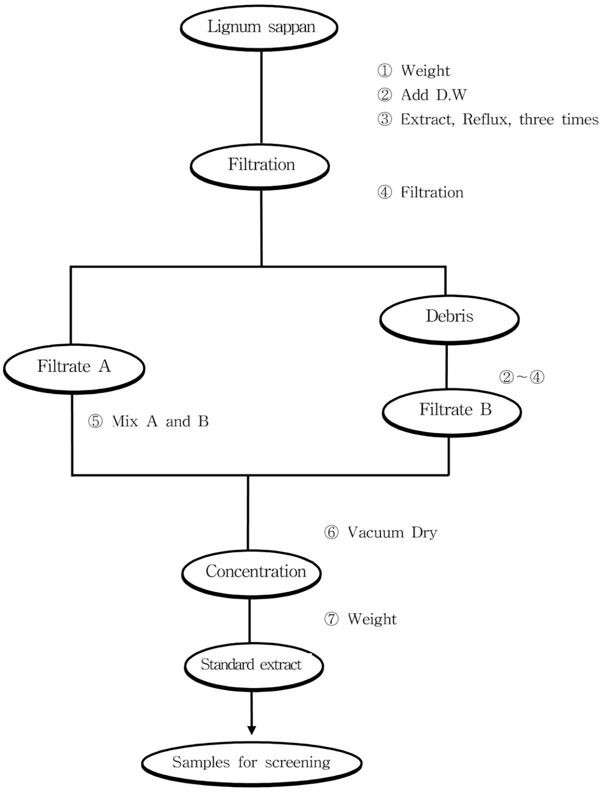
1. 실험재료

본 실험에 사용한 소목은 서울 경동시장에서 건조상태의 것을 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 추출방법

소목을 적절한 크기로 분쇄하여 50 g 씩 평량한 후 삼각플라스크에 넣고 시료가 잠기도록 증류수 1 *l* 를 가한 다음 100°C에서 환류냉각기를 이용하여 수욕상에서 3시간 동안 추출하였다. 이를 여과시켜 여과액을 얻고 잔사는 다시 추출·여과 과정을 거쳐 여액을 얻은 후 여액을 합해 회전농축기를 사용하여 감압 건조시킨 후 시료를 조제하였다(Scheme 1).



Scheme 1. **Standard extract preparation from *Lignum sappan*.**

2) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약으로는 BCA(Piece Co.), BSA(Piece Co.)을 사용했으며, *S. mutans* 배양을 위한 배지는 brain heart infusion(Difco, U.S.A)을 사용하였다. 기기는 pH meter (Istek Co., Korea), UV/Vis spectrophotometer(Shimadzu Co., Japan), centrifuge(Hanil Co., Korea), 혐기자(BBL Co.), incubator(Dongyang Co., Korea), clean bench(Sangwoo Co., Korea), voltex(Dongyang Co., Korea), magnetic stirrer (Corning Co., U.S.A) 등을 사용하였다.

3) 균주 및 배양

실험에 사용된 균주는 한남대학교 미생물학과에서 분양 받은 *S. mutans* KCTC 3065를 사용하였으며, 보관 및 계대배양은 brain heart infusion(BHI) 배지에 37°C에서 24시간 동안 혐기자에서 혐기 배양하였다.

4) 항균활성 측정

소목의 항균활성 검색은 paper disc method에 의하여 측정하였으며[15], *S. mutans* 균주 1 loop를 10 m*l* BHI broth에 접종한 후 37°C에서 18~20시간 혐기자에서 혐기 배양하여 이용하였다.

멸균된 Müller hinton agar 배지를 petri dish에 15 m*l*씩 분주하여 고형화 시킨 후, *S. mutans* 배양액 50 μ*l*를 접종하여 균일하게 도말하였다. 한편 소목 추출물 400 mg을 멸균수 1 m*l*에 완전히 녹여 paper disc(6 mm)에 50 μ*l* 씩 흡수한 후 건조시켰다. 건조된 disc는 시험용 평판배지 표면에 놓아 밀착시킨 다음, 37°C에서 24시간동안 혐기 배양하였다. 추출물에 대한 항균활성은 paper disc 주변의 clear zone 직경(mm)을 측정하여 판단하였다.

5) 최소저해농도 측정

최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 paper disc method에 의하여 측정하였으며[15], *S. mutans* 균주 1 loop를 10 m*l* BHI broth에 접종한 후 37°C에서 18~20시간 혐기적으로 배양하여 이용하였다.

멸균된 Müller hinton agar 배지를 petri dish에 15 m*l* 씩 분주하여 응고시킨 후, *S. mutans* 배양액 50 μ*l*를 접종하여 균일하게 도말하였다. 소목 추출물은 최초 농도를 10 mg/m*l*로 2배 연속 희석한 후 37°C에서 24시간 동안 혐기 배양하여 육안으로 관찰하여 증식된 농도와 억제된 농도로 결정하였다.

6) 생장곡선 측정

생장곡선은 *S. mutans* 균주 1 loop를 10 m*l* BHI broth에 접종한 후 37°C에서 18~20시간 혐기적으로 배양하여 활성화 시킨 액 50 μ*l*와 소목 추출물 50 μ*l*를 BHI broth 10 m*l*에 주입하였다. 37°C에서 혐기 배양하면서 시간별로 채취하여 균의 생육을 spectrophotometer를 이용해서 흡광도(600 nm)를 측정하였다.

7) pH 측정

pH 변화는 *S. mutans* 균주 1 loop를 10 m*l* BHI broth에 접종한 후 37°C에서 18~20시간 혐기 배양하여 활성화 시킨 액 50 μ*l*와 소목 추출물 50 μ*l*를 BHI broth 10 m*l*에 주입한 후 37°C에서 혐기 배양하면서 시간별로 채취하여 pH meter를 이용해서 측정하였다.

8) 탄수화물 정량 측정

배지내 탄수화물 변화는 phenol sulfuric acid 방법을 이용하였다. 표준액의 조제는 검량곡선을 그리기 위하여 표준물질로 D-glucose를 사용하였으며, glucose를 100 μ*l*/m*l*로 stock solution을 만들고 증류수로 희석하여 단계별 표준액을 만들었다. 검량선의 작성은 20 m*l*용 시험관에 단계별 표준액 1 m*l*을 가하여, 여기에 80% phenol 25 μ*l*와 진한 황산 2.5 m*l*을 첨가하고, 대조액에는 표준액 대신 증류수 1 m*l*을 가했다. 또한 sample 1 m*l*와 여기에 80% phenol 25 μ*l*, 진한 황산 2.5 m*l*을 첨가했다. 시험관을 잘 혼합한 후 30°C에서 20분간 반응

시켜 실온으로 냉각한 다음 표준액 및 대조액의 흡광도를 490 nm에서 측정했다.

9) 단백질 정량 측정

배지내 단백질 변화는 BCA kit를 이용하여 측정하였다. 표준액의 조제는 검량곡선을 그리기 위하여 표준물질로 BSA (Bovine Serum albumine)을 이용하였다. BSA를 1 mg/m*l*로 stock solution을 만들고, 증류수로 희석하여 단계별 표준액을 만들었다. 검량선의 작성은 20 m*l*용 시험관에 BCA 혼합액(100:2)을 4 m*l* 가하여, 여기에 단계별 표준액을 각각 0.1 m*l* 씩 첨가하고, 대조액에는 표준액 대신 증류수 0.2 m*l*을 가했다. 또한 sample 1 m*l*에 BCA reagent 혼합액을 가했다. 시험관을 잘 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시켜 실온에서 냉각한 다음, 표준액 및 대조액의 흡광도를 562 nm에서 측정했다.

10) *S. mutans*의 다당류 분리

소목 추출물이 *S. mutans*의 glucan 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양액 내 다당류의 양은 한 등의 방법[16]을 변형하여 실행하였다. 시료 채취를 위하여 BHI 배지에 소목 추출물을 첨가(2 mg/m*l*)하여 각 시간별로 수획한 후 배지를 4°C 냉장고에 보관하였다. 보관된 배지내의 다당류 함량을 측정하기 위하여 채취된 배지에 2.5N의 농도가 되도록 NaOH를 가하고 12시간동안 방치시켰다. 방치된 배양액에 acetic acid를 가하여 중화한 다음 cell debris를 원심분리 하여 제거한 후, 상층액에 3배량(v/v)의 에탄올을 가하여 하루 동안 방치시켰다. 에탄올에 의해 침전된 다당류는 고속원심분리기(Beckman XL-90)로 침전시켜(15,000×g, 10 min) 다당류 성분을 분리하였다. 분리된 다당류는 60°C에서 건조시킨 후 건중량(mg/m*l*)을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. *S. mutans* KCTC 3065에 대한 항균효과

소목 추출물을 20 mg/m*l*의 농도로 paper disc 방법으로 *S. mutans*에 대한 항균효과를 측정한 결과, 17.3 mm의 균증식 억제력을 보였다(Fig. 1). 전원경[17]이 보고한 *Staphylococcus aureus*와 *Salmonella typhimurium*에 대해 증식저해를 보인 결과와는 다소 차이가 있으나 저해환을 생성한다는 보고는 일치하였다. 이것은 소목 추출물이 구강내의 치아우식증을 유발하는 원인균에 대해 효과적으로 적용될 수 있을 것으로 사료되며, 소목의 어떤 성분이 *S. mutans*에 대해 항균작용을 나타내는지 그 기전에 대한 연구가 더 필요할 것으로 본다.

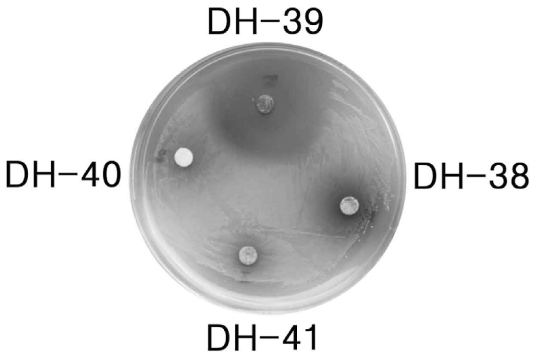


Fig. 1. Antimicrobial activity by paper disc method of the *Lignum sappan* extract(DH-39) on the growth of *S. mutans* KCTC 3065.

2. 최소저해농도

S. mutans KCTC 3065에 대해 소목 추출물의 최소저해농도를 측정한 결과 2.5 mg/m*l* 첨가시 생육이 관찰되지 않았으나, 1.25 mg/m*l*에서는 균의 생장이 일어났다. 따라서 *S. mutans*에 대한 소목 추출물의 최소저해농도는 2.5 mg/m*l*으로 나타났다(Fig. 2).

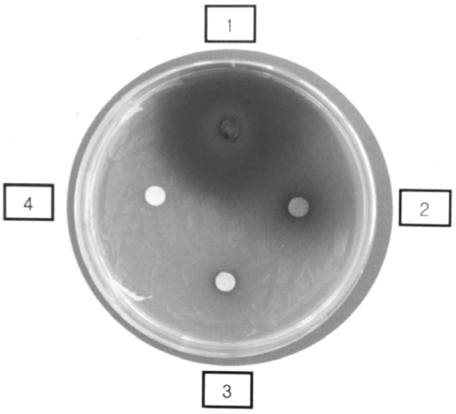


Fig. 2. Minimal inhibitory concentrations of the *Lignum sappan* extract on the growth of *S. mutans* KCTC 3065. (1) 10 mg/m*l* (2) 5 mg/m*l* (3) 2.5 mg/m*l* (4) 1.25 mg/m*l*

3. 소목 추출물 첨가에 따른 *S. mutans* KCTC 3065 생장에 미치는 영향

소목 추출물이 *S. mutans* KCTC 3065의 생육에 미치는 효과를 측정하기 위해 소목 추출물을 2 mg/m*l*의 농도로 배지에 첨가한 후 균의 생육을 Spectrophotometer로 측정한 결과는 Fig. 3-6과 같다.

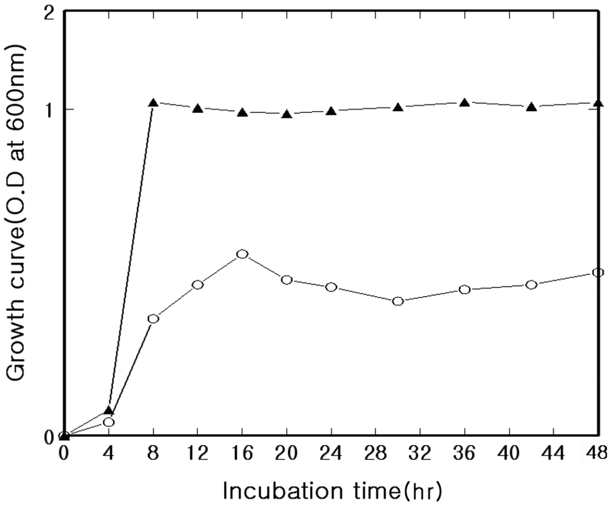


Fig. 3. The growth curve of *S. mutans* KCTC 3065 by addition of *Lignum sappan* extract.
-○- *Lignum sappan*, -▲- Control

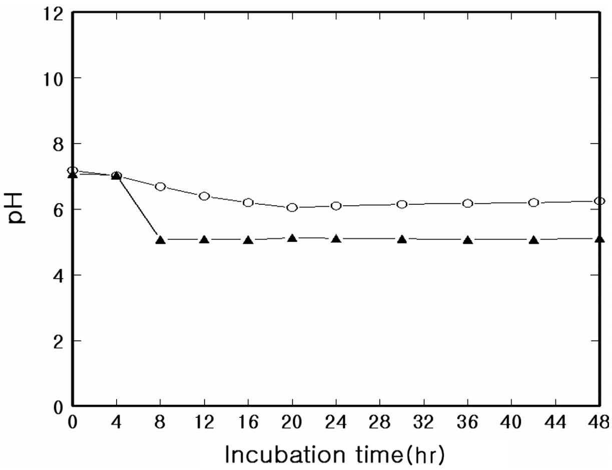


Fig. 4. **The pH changes in *S. mutans* KCTC 3065 culture medium by addition of *Lignum sappan* extract.**
-○- *Lignum sappan*, -▲- Control

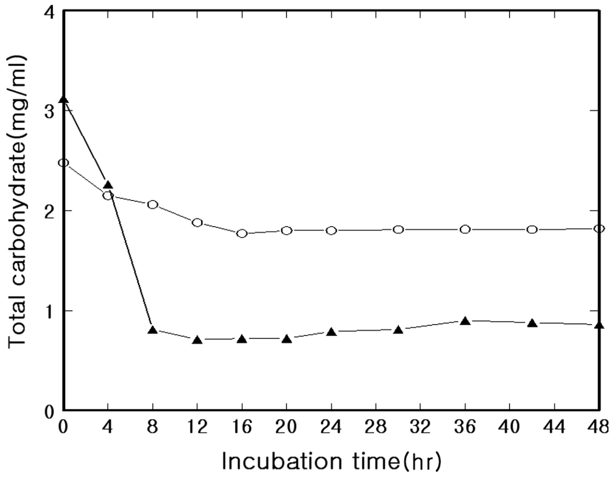


Fig. 5. **The changes of total carbohydrate in *S. mutans* KCTC 3065 culture medium by addition of *Lignum sappan* extract.**
-○- *Lignum sappan*, -▲- Control

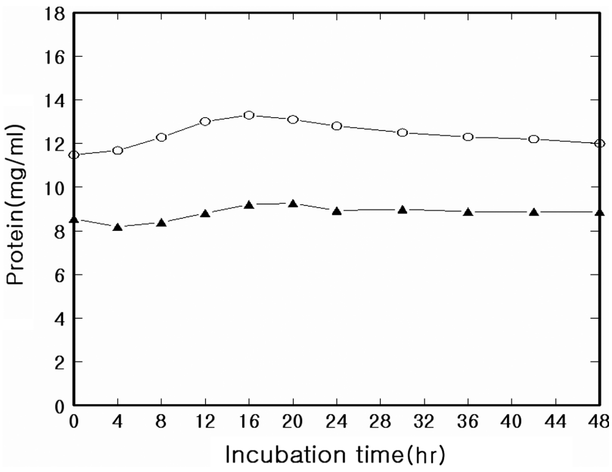


Fig. 6. **The protein changes in *S. mutans* KCTC 3065 culture medium by addition of *Lignum sappan* extract.**
-○- *Lignum sappan*, -▲- Control

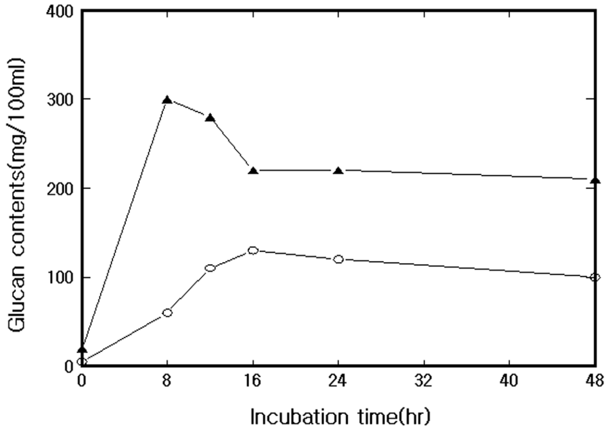


Fig. 7. **The effect of *Lignum sappan* extract on *S. mutans* KCTC 3065 polysaccharide production.**
-○- *Lignum sappan*, -▲- Control

1) 소목 추출물이 생장곡선에 미치는 영향

소목 추출물의 *S. mutans* 생장에 대한 효과는 대조군이 배양 8시간 후에 흡광도 1.05로 최대의 생장을 보였으나, 소목 추출물(2 mg/m*l*)을 투여한 배지에서는 생장이 지연되어 16시간 후에 흡광도 0.36으로 최대의 생장을 나타냈다(Fig. 3). 이같은 결과로 보아 소목 추출물은 우식성 원인균인 *S. mutans*에 대하여 항균 및 생육 지연효과가 있는 것으로 여겨진다.

2) 소목 추출물이 pH 변화에 미치는 영향

소목 추출물을 *S. mutans* KCTC 3065에 첨가하여 8시간 동안 배양한 후 배지내 pH를 측정한 결과 대조군은 pH 5.08로 급격한 변화를 보였지만, 소목 추출물이 투여된 배지는 pH 6.69로 비교적 완만한 변화를 보여 대조군에 비해 pH 변화가 거의 일어나지 않았다(Fig. 4). 구강의 pH는 정상적인 경우는 중성이지만, 당을 많이 섭취하는 경우에는 치면세균막 내 세균에 의한 당분해 과정으로 산이 생성되어 치면세균막내 pH가 떨어지고, 치면세균막 내 pH가 5.5 이하로 떨어지게 되면 치질이 탈회되어 치아우식증을 유발한다[18]. 본 실험의 결과 소목 추출물은 대조군에 비해 pH의 급격한 변화를 세균의 증식 억제와 같은 방법으로 억제하는 것으로 나타났으므로 적절한 방법을 통하여 구강내에 적용되어지면 치아우식감소 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

3) 소목 추출물이 탄수화물 변화에 미치는 영향

소목 추출물을 *S. mutans* KCTC 3065 에 첨가한 후 배지내의 탄수화물 변화를 알아보기 위해 시간별로 측정하였다. 대조군이나 소목 추출물이 첨가된 배지의 초기 총 탄수화물의 양은 m*l* 당 2.5~3 mg의 탄수화물이 정량 되었다. 배양 8시간 후 대조군은 0.81 mg/m*l* 이었으나, 소목 추출물이 투여된 배지는 2.06 mg/m*l*로 탄수화물의 양이 거의 변하지 않았다 (Fig. 5).

4) 소목 추출물이 단백질 변화에 미치는 영향

소목 추출물이 첨가된 BHI 배지에 *S. mutans* KCTC 3065를 배양하고 시간별 변화하는 단백질량을 측정하였다. 배양 0 시간에서는 모든 배지에서 10 mg/m*l*의 단백질이 정량되었다. 균체의 최대 생장량을 보인 8시간에서는 대조군이 8.39 mg/m*l* 이었고, 소목 추출물이 투여된 배지는 12.3 mg/m*l*의 단백질이

정량되었다(Fig. 6). 이 같은 결과는 기본 배지로 사용한 BHI 내 총 단백질이 대조군에서는 세균의 초기 생장에 따라 소실되나, 소목에서는 균의 생장 억제에 따라 단백질의 소모가 크게 감소하지 않은 결과로 여겨진다. 그러나 시간이 경과함에 따라 단백질의 증가는 균의 생장에 따라 균체 외 단백질 등이 증가하여 나타난 결과로 사료된다.

4. 소목 추출물이 *S. mutans* KCTC 3065의 다당류 생성에 미치는 효과

S. mutans KCTC 3065의 다당류는 치아우식증에 관여하는 치면세균막(dental plaque)을 형성하는데 가장 중요한 역할을 하는 다당류이다. 따라서 본 연구에서는 소목 추출물이 *S. mutans*의 다당류 생성을 어느 정도 억제하는지 확인하기 위하여 액체배지에서 시간별 다당류의 양적 변화를 알아보았다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 대조군에서는 배양 8시간만에 300 mg/100 m*l*의 다당류를 얻었으나, 소목 추출물이 첨가된 배지에서는 60 mg/100 m*l*의 다당류를 수획하여 약 1/5정도 낮게 생성하였다(Fig. 7).

이상과 같은 결과로 볼 때 소목 추출물은 치아우식증을 유발하는 *S. mutans*에 대해 항균효과, 생장지연, pH 감소억제 등과 같은 효과를 나타내므로 향후 치아우식을 예방할 목적으로 치약, 구강청정제 등의 성분으로 첨가할 수 있을 것으로 여겨진다.

요 약

본 연구는 소목 추출물의 *S. mutans* KCTC 3065에 대한 항균효과를 paper disc method로 검색하여, 소목의 *S. mutans* KCTC 3065 생장에 관한 영향을 평가하였다.

1. *S. mutans* KCTC 3065에 대한 소목 추출물의 최소생장 억제농도는 2.5 mg/m*l*이었다.
2. 소목 추출물의 *S. mutans* KCTC 3065생장에 대한 효과는 대조군이 8시간에서 1.05로 최대 생장률을 보였으나, 소목 추출물을 2 mg/m*l*을 투여한 배지에서는 16시간 만에 0.36으로 최대생장을 보였다.
3. *S. mutans* KCTC 3065를 8시간 동안 배양한 후 배지 내 pH를 측정한 결과 대조군은 pH 5.08이었으며, 소목 추출물이 투여된 배지는 pH 6.69이었다.
4. *S. mutans* KCTC 3065를 8시간 동안 배양한 후 배지 내 탄수화물 변화량을 측정한 결과 대조군은 0.81 mg/m*l* 이었으며, 소목 추출물이 투여된 배지는 2.06 mg/m*l* 이었다.
5. *S. mutans* KCTC 3065를 8시간 동안 배양한 후 배지 내 단백질 변화량을 측정한 결과 대조군은 8.39 mg/m*l* 이었으며, 소목 추출물이 투여된 배지는 12.3 mg/m*l* 이었다.
6. *S. mutans* KCTC 3065의 다당류 생성에 미치는 효과는 대조군의 경우 배양 8시간에 300 mg/100 m*l*을 생성하였으나, 소목 추출물이 투여된 배지에서는 60 mg/100 m*l*을 생성하였다.

참고문헌

1. Norman PW, Robert RW, Rosen S: Essential Dental Microbiology. Appleton & Lange 341-355, 1991.
2. 전은숙, 한만덕, 김현대: 오미자, 오수유 추출물의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균효과. 치위생과학회지 3(1): 39-44, 2003.
3. 유윤정, 곽월아, 조장기, 장희순, 권호근, 이승일, 박용석, 박재한: 자몽씨, 결명자 및 당귀에 의한 *Streptococcus mutans*의 증식 억제 효과. 대한구강보건학회지 20(1): 107-120, 1996.
4. 정대인, 노재승, 장기완: 수종 Flavonoids의 우식원인균에 대한 항세균 효과. 대한구강보건학회지 20(2): 189-202, 1996.
5. 유영선, 박기문, 김영배: 생약재 및 향신료의 *Streptococcus mutans* 증식 억제 효과. 한국산업미생물학회지 21(2): 187-191, 1993.
6. 도동선, 민병선, 배기환: 관중의 항균성물질 분리 및 충치균에 대한 항균력 평가. 생약학회지 40(4): 478-481, 1996.
7. 문용협, 이유희, 민병선, 배기환: 충치균, *Streptococcus mutans* OMZ 176에 대한 황금의 항균 활성성분. 생약학회지 28(3): 99-103, 1997.
8. 장상문, 김동원: 한약자원식물학. 학문출판사, 1996.
9. 신민교: 도해향약(생약)대사전. 영림사, 1990.
10. Nagai M, Nagumo S, Eguchi I, Lee SM, Suzuki T: Sappanchalcone from *Caesalpinia sappan* L., the proposed biosynthetic precursor of brazilin. Yakugaku zasshi 104: 935, 1984.
11. Namikoshi M, Nakata H, Saitoh T: Homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan*. Phytochemistry 26: 1831, 1987.
12. Nagai M, Nagumo S: Protosappanins E-1 and E-2, stereoisomeric dibenzoxocins combined with brazilin from sappan Lignim. Chem Pharm Bull 38: 1490, 1990.
13. 임대관, 최웅, 신동화: 소목 추출물의 항산화 효과. 한국식품과학회지 28(1): 77-82, 1996.
14. 문원석: 소목(*Caesalpinia sappan L.*) 추출물이 식품부패 미생물의 성장과 분쇄육 보존에 미치는 영향. 대구효성가톨릭대학교 보건환경과학대학원 식품과학과 석사학위논문 1-24, 1999.
15. Marvin T, Robert I, Lindemeyer, Robert G. Petersdorf: Comparison of single-disc and tube-dilution techniques in determining antibiotic sensitivities of gram-negative pathogens. Annals of Internal Medicine 58(1): 56-65, 1962.
16. Han MD, Jeong H, Lee JW, Back SJ, Kim SW, Yoon KH: The composition and bioactivities of ganoderan by mycelial fractionation of *Ganoderma lucidum* IY009. Kor J mycol 23(4): 285-297, 1995.
17. 전원경: 소목 추출물의 항균활성, Topoisomerase I 저해, 세포독성 효과와 마우스를 이용한 급성독성 실험에 관한연구. 건국대학교 대학원 생물학과 석사학위논문 1-43, 1998.
18. Loesche WJ: Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev 50: 353-380, 1990.

(Received November 17, 2004; Accepted December 15, 2004)