

자생 및 약용 식물의 *Streptococcus mutans* 항균 활성의 검색

김건우 · 백정규 · 장영욱 · 금은주¹ · 권윤숙¹ · 김홍주¹ · 손호용^{1*}

안동대학교 생약자원학과, ¹안동대학교 식품영양학과

Received June 15, 2005 / Accepted September 2, 2005

Screening of Antibacterial Agent Against *Streptococcus mutans* from Natural and Medicinal Plants. Kun-Woo Kim, Jueng-Kuy Baek, Young-Wook Jang, Eun-Joo Kum¹, Yun-Suk Kwon¹, Hong-Ju Kim¹ and Ho-Yong Sohn^{1*}. *The School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea, ¹Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea* – Oral streptococci are major constituents of dental plaques, and their prevalence is closely linked with various pathologic symptoms, such as dental caries. To develop natural anticaries agent, we prepared 309 kinds of plant extracts from 215 species of edible or medical plants, and antibacterial activity of the extracts against *Streptococcus mutans* JC-2 were evaluated based on 96 well microtiter plate assay and disk paper method, subsequently. Among the tested plant extracts, *Ailanthus altissima*, *Paeonia lactiflora*, *Rubus phoenicolasius*, *Aralia continentalis*, *Quercus acutissima*, *Persicaria hydropiper* and *Agrimonia pilosa* extracts showed strong antimicrobial activity. Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of the selected seven plant extracts showed that *Ailanthus altissima*, *Persicaria hydropiper* and *Quercus acutissima* extracts (MIC=25~30 µg/ml) has potential as a source of natural anticaries agents.

Key words – Antibacterial activity, Anticaries agents, Edible or medical plants, *Streptococcus mutans*

치아우식증(충치)은 구강연쇄구균인 streptococci에 의해 발생하는 구강 질환 중의 하나로, 최근의 감미료 사용 증대로 인해 우리나라는 물론 전 세계적으로도 발병률이 증가되고 있는 실정이다[7,8,11,20]. 치아우식증의 주요 원인균은 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*로 알려져 있으며[6], 특히 *S. mutans*는 glucosyltransferase 및 fructosyltransferase와 같은 당전이 효소를 생산하여 설탕과 같은 당류로부터 불용성 글루칸을 생산하며, 생성된 불용성 글루칸은 미생물 집단이 치아에 쉽게 부착, 증식하도록 하고 유기산을 생산하여 최종적으로 충치를 유발한다[9,13,24]. 따라서, 치아우식증의 예방과 치료에 대한 연구는 (1) 충치원인균 *S. mutans*에 대한 항균물질 개발[2,3,9,10,12,16,23-25], (2) 당전이 효소 glucosyltransferase 및 fructosyltransferase 저해제 개발[1,10,27,29], (3) 생성 글루칸의 분해 또는 불용성 글루칸이 생성되지 못하는 설탕의 대체 감미료 및 발효이온음료 개발[11], (4) 치아 살균, sealant 및 항균 cement 개발[21,22] 등으로 대별할 수 있다. 이 중에서도 현재 충치 원인균에 대한 균주 성장 억제제가 가장 원천적이며 쉽게 접근 가능하므로, *S. mutans*에 대한 항균물질 개발에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

현재 주로 사용되고 있는 항균물질은, chlorohexidine, penicillin, erythromycin, tetracycline 등이 있으나, 치아 착색, 구강 점막상피 탈락, 궤양, 미각장애, 치아 석회 침착물 부착, 소화기 장애, 과민반응 및 내성균의 발현 등의 다양한 부작용

용이 알려져 있다[5,15,28]. 그러므로 기존 항균제, 항생제의 부작용을 극복할 수 있는 안전성이 확보된 천연물로부터 항균제를 개발하고자 하는 연구가 많이 이루어지고 있으며, 그 예로 두송실의 메탄올 추출물[23], 고삼의 (+)-kurarinone, (2S)-2'-methoxy kurarinone[16], 황련 추출물의 berberine과 palmatine[10], 호장근의 emodin[3], 계피의 trans-cinnamaldehyde [2], 개암풀 종자의 bakuchiol[12], 열대약용식물인 temu kunci의 Isopanduratin A[8], 뽕나무의 Kuwanon G[24] 등이 지속적으로 보고되어 왔다. 최근에는 광범위한 천연물 추출물을 대상으로 다양한 병원균, 식품 위해균에 대한 항균물질의 선별[26]이 시도된 바 있으며, 항우식 활성의 경우에도 55종의 천연물에 대해 활성평가[4]가 시도된 바 있다. 이러한 광범위한 천연물의 활성평가는 보다 효율적으로 신규의 안전성이 확보된 천연항균제를 개발하는데 도움이 될 것이다.

본 연구는 안전성이 우수한 천연물 충치예방 및 치료제 개발을 목표로, 국내 자생되는 215 종의 약용 및 식용 식물의 다양한 부위로부터 조제한 309종의 추출물을 대상으로 *S. mutans* JC-2에 대한 생육 저해능을 평가하여, 여뀌, 상수리나무, 독활, 작약, 쑥신나물, 곰딸기, 가죽나무 추출물을 선정하였으며, 7종의 선정물질에 대한 MIC (Minimal Inhibitory Concentration)를 측정하여 최종적으로 가죽나무(가지), 여뀌(전초), 상수리나무(잎)에서 강력한 항균력을 확인하였다. 이러한 결과는 약용 및 야생 식물 자원으로부터 *S. mutans*에 대한 항균력을 나타내는 새로운 항우식증 예방 및 치료제 개발이 가능함을 제시하며, 또한 활성성분의 규명에 따른 식품 첨가물 및 구강세척제 개발로 이어질 수 있음을 암시한다.

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5491, Fax : +82-54-823-1625

E-mail : hysohn@andong.ac.kr

실험 방법

실험 재료 및 시료 조제

경북 및 강원도 일대에서 1995년에서 2004년 사이에 채집한 식용 및 약용 식물 309 종을 대한식물도감[19]에서 검증하여, 그들에서 일주일 간 건조 한 후 잘게 썰어 메탄올로 추출하였으며, 추출액은 감압 농축하여 분말로 제조하여 사용 전까지 저온 밀봉 보관하였다. 사용시에는 10 mg/ml의 농도로 DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹인 후 항균 활성을 평가하였다. 사용한 식물 재료 및 추출 부위는 Table 1에 나타내었다.

사용 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 원광대학교 치과대학 구강미생물 실험실에 보관중인 *S. mutans* JC-2를 분양 받아 4주마다 NA

(Nutrient agar, Difco Co., USA)배지에 계대하여 사용하였다. 항균 활성 측정에 사용된 배지로는 HIB (Heart Infusion Broth, Difco Co., USA)를 사용하였다. 시료의 활성 평가를 위한 대조군으로는 ampicillin, erythromycin, streptomycin sulfate (Sigma Co., USA)를 DMSO에 적당한 농도로 녹여 사용하였다.

항균활성의 평가

항균활성을 나타내는 천연물은 96 well microtiter plate assay, Disk paper method, MIC 측정의 3단계를 통해 최종 선정하였다.

96 well microtiter plate assay에 의한 항균 활성의 측정: 96 well plate를 사용하여 각 well에 180 µl HIB 배지, 10 µl의 시료와 10 µl의 *S. mutans* 균액을 혼합하여 최종 부피가 200

Table 1. Evaluation of antibacterial activity of 309 plant extracts against *Streptococcus mutans* JC-2 using 96 well microtiter plate assay.

Korean name	Family	Scientific name	Part	Growth inhibition (%)
가는괴불주머니	Fumariaceae	<i>Corydalis ochotensis</i>	whole	23.63
가는잎할미꽃	Ranunculaceae	<i>Pulsatilla cernua</i>	whole	45.55
가죽나무	Simaroubaceae	<i>Ailanthus altissima</i>	leaf	84.12
			branch	95.17
갈퀴나물	Leguminosae	<i>Vicia amoena</i>	leaf	0.00
갈퀴덩굴	Rubiaceae	<i>Galium spurium</i>	whole	5.48
갈퀴현호색	Fumariaceae	<i>Corydalis grandicalyx</i>	whole	2.05
개감수	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia sieboldiana</i>	whole	39.04
개구리발톱	Ranunculaceae	<i>Semiaquilegia adoxoides</i>	whole	34.26
개맥문동	Liliaceae	<i>Liriope spicata</i>	whole	11.03
개밭나물	Umbelliferae	<i>Sium suave</i>	whole	29.79
개버무리	Ranunculaceae	<i>Clematis serratifolia</i>	whole	36.30
개상사화	Amarylidaceae	<i>Lycoris aurea</i>	rhizoma	30.48
개승마	Ranunculaceae	<i>Cimicifuga acerina</i>	whole	0.00
갯질경	Plumbaginaceae	<i>Limonium tetragonum</i>	whole	18.84
검종덩굴	Ranunculaceae	<i>Clematis fusca</i>	whole	28.08
고추냉이	Cruciferae	<i>Wasabia japonica</i>	radix	33.86
			whole	26.69
곰딸기	Rosaceae	<i>Rubus phoenicolasius</i>	fructus	82.19
			stem	75.68
구기자	Solanaceae	<i>Lycium chinense</i>	leaf	21.96
구름마나리아재비	Ranunculaceae	<i>Ranunculus borealis</i>	aerial	16.78
			radix	41.78
국수나무	Rosaceae	<i>Stephanandra incisa</i>	branch	58.11
			leaf	45.86
굴거리	Euphorbiaceae	<i>Daphniphyllum macropodum</i>	twig	49.80
			fructus	27.74
굴피나무	Juglandaceae	<i>Platycarya strobilacea</i>	leaf	74.66
			branch	77.36
궁궁이	Umbelliferae	<i>Angelica polymorpha</i>	rhizoma	0.00
			leaf	14.14
금평의다리	Ranunculaceae	<i>Thalictrum rochebrunianum</i>	aerial	43.15
금새우난	Orchidaceae	<i>Calanthe striata</i>	radix	36.21
기름나물	Umbelliferae	<i>Peucedanum terebinthaceum</i>	whole	41.10
기린초	Crassulaceae	<i>Sedum kamtschaticum</i>	aerial	11.80

Table 1. continued

Korean name	Family	Scientific name	Part	Growth inhibition (%)
까마중	Solanaceae	<i>Solanum nigrum</i>	aerial	20.27
			fructus	27.70
까치고들빼기	Compositae	<i>Youngia chelidoniifolia</i>	radix	15.20
			leaf	0.00
꼭두서니	Rubiaceae	<i>Rubia akane</i>	whole	17.57
꽃창포	Iridaceae	<i>Iris ensata</i>	whole	3.38
나도바람꽃	Ranunculaceae	<i>Isopyrum raddeanum</i>	whole	22.30
나도하수오	Polygonaceae	<i>Pleuropterus cilinervis</i>	whole	41.78
노랑매발톱	Ranunculaceae	<i>Aquilegia buergeriana</i>	whole	39.73
노랑물봉선	Balsaminaceae	<i>Impatiens noli-tangere</i>	whole	25.34
노루발	Pyrolaceae	<i>Pyrola japonica</i>	whole	96.21
노루삼	Ranunculaceae	<i>Actaea asiatica</i>	whole	45.55
노린재나무	Symplocaceae	<i>Symplocos chinensis</i>	leaf	35.14
			flower	28.04
늦것가락나물	Ranunculaceae	<i>Aconitum ciliare</i>	whole	35.62
누른종덩굴	Ranunculaceae	<i>Clematis chiisanensis</i>	aerial	43.84
누린내풀	Verbenaceae	<i>Caryopteris divaricata</i>	radix	32.07
			aerial	31.47
눈피불주머니	Fumariaceae	<i>Corydalis ochotensis</i>	aerial	8.76
눈빛승마	Ranunculaceae	<i>Cimicifuga davurica</i>	herba,stem	26.71
느릅나무	Ulmaceae	<i>Ulmus davidiana</i>	leaf	0.00
			branch	5.14
다래	Actinidiaceae	<i>Actinidia arguta</i>	leaf	0.00
닥나무	Moraceae	<i>Broussonetia kazinoki</i>	aerial	0.00
단풍마	Dioscoreaceae	<i>Dioscorea quinqueloba</i>	radix	12.41
달맞이꽃	Onagraceae	<i>Oenothera odorata</i>	radix	63.24
			aerial	62.57
			seed	70.00
			pod	66.85
			stem	0.00
담쟁이덩굴	Vitaceae	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	leaf	61.49
			radix	52.76
			whole	42.63
			whole	23.31
			whole	35.86
당개지치	Borraginaceae	<i>Brachybotrys paridiformis</i>	whole	23.31
당귀	Umbelliferae	<i>Ligusticum acutilobum</i>	whole	35.86
대극	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia pekinensis</i>	whole	53.42
대사초	Cyperaceae	<i>Carex siderosticta</i>	whole	57.24
도깨비고비	Aspidiaceae	<i>Cyrtomium falcatum</i>	whole	32.53
독활	Araliaceae	<i>Aralia continentalis</i>	leaf	100.00
동의나물	Ranunculaceae	<i>Caltha palustris</i>	leaf, stem	0.00
			radix	31.51
두릅	Araliaceae	<i>Aralia elata</i>	aerial part	0.00
등굴레	Liliaceae	<i>Polygonatum odoratum</i>	leaf	30.07
			radix	4.48
등근잎평의비름	Crassulaceae	<i>Sedum rotundifolium</i>	aerial	24.83
			flower	85.26
등나무	Leguminosae	<i>Wistaria floribunda</i>	branch	21.28
			fructus	51.35
등대풀	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia helioscopia</i>	whole	30.28
매죽나무	Styracaceae	<i>Styrax japonica</i>	leaf	22.97
			branch	21.72

Table 1. continued

Korean name	Family	Scientific name	Part	Growth inhibition (%)
뚝갈	Valerianaceae	<i>Patrinia villosa</i>	rhizoma	52.07
맑은대쑥	Compositae	<i>Artemisia keiskeana</i>	whole	35.74
매발톱꽃	Ranunculaceae	<i>Aquilegia buergeriana</i>	flower	6.55
매발톱나무	Berberidaceae	<i>Berberis amurensis</i>	leaf, branch	46.23
멀구슬나무	Meliaceae	<i>Melia azedarach</i>	leaf, flower	25.10
			branch	11.16
			heartwood	0.00
멍석딸기	Rosaceae	<i>Rubus parvifolius</i>	leaf, stem	82.53
머느리밀씻개	Polygonaceae	<i>Persicaria senticosa</i>	whole	23.29
명아주	Chenopodiaceae	<i>Chenopodium album</i>	whole	34.93
모데미풀	Ranunculaceae	<i>Megaleranthis saniculifolia</i>	whole	45.82
물레나물	Hypericaceae	<i>Hypericum ascyron</i>	whole	58.22
미국가막사리	Compositae	<i>Bidens frondosa</i>	radix	40.54
			aerial	40.64
미국자리공	Phytolaccaceae	<i>Phytolacca americana</i>	rhizoma	33.10
			aerial	0.00
미나리아재비	Ranunculaceae	<i>Ranunculus japonicus</i>	whole	6.16
미역줄나무	Celastraceae	<i>Tripterygium regelii</i>	branch	62.16
미치광이풀	Solanaceae	<i>Scopolia japonica</i>	leaf	6.76
			radix	11.82
			stem	6.08
밀나물	Liliaceae	<i>Smilax riparia</i>	seed	29.73
바늘꽃	Onagraceae	<i>Epilobium pyrricholophum</i>	whole	78.77
바디나물	Umbelliferae	<i>Angelica decursiva</i>	whole	0.00
바위취	Saxifragaceae	<i>Saxifraga stolonifera</i>	whole	17.13
박주가리	Asclepiadaceae	<i>Metaplexis japonica</i>	aerial	38.85
			fructus	37.24
방기	Menispermaceae	<i>Sinomenium acutum</i>	stem,radix	0.00
방아풀	Labiatae	<i>Isodon japonicus</i>	aerial	32.09
			radix	47.64
배초향	Labiatae	<i>Agastache rugosa</i>	aerial	46.55
배풍등	Solanaceae	<i>Solanum lyratum</i>	whole	46.23
백당나무	Caprifoliaceae	<i>Viburnum sargentii</i>	fructus	52.36
백선	Rutaceae	<i>Dictamnus dasycarpus</i>	radix	0.00
			leaf	5.86
			rhizoma	23.97
백양꽃	Amarylidaceae	<i>Lycoris koreana</i>	rhizoma	36.30
백출	Compositae	<i>Atractylodes japonica</i>	rhizoma	20.50
뱀딸기	Rosaceae	<i>Duchesnea chrysantha</i>	whole	36.21
별개미취	Compositae	<i>Aster koraiensis</i>	aerial	0.00
범꼬리	Polygonaceae	<i>Bistrora manshuriensis</i>	leaf	55.17
			radix	74.14
벗풀	Alismataceae	<i>Sagittaria trifolia</i>	whole	35.27
복수초	Ranunculaceae	<i>Adonis amurensis</i>	whole	20.32
부처손	Selaginaceae	<i>Selaginella tamariscina</i>	aerial	39.19
			radix	68.58
붓꽃	Iridaceae	<i>Iris nertschinskia</i>	whole	26.90
붓순나무	Illiciaceae	<i>Illicium religiosum</i>	leaf	33.47
			branch	39.04
비자나무	Taxaceae	<i>Torreya nucifera</i>	leaf	0.00
			branch	40.24

Table 1. continued

Korean name	Family	Scientific name	Part	Growth inhibition (%)
백쑥채	Compositae	<i>Viburnum sargentii</i>	radix	0.00
			leaf	20.00
사상자	Umbelliferae	<i>Torilis japonica</i>	rhizoma	33.45
			aerial	9.96
사스레나무	Theaceae	<i>Eurga japonica</i>	branch	25.00
			fructus,leaf	11.10
사위질빵	Ranunculaceae	<i>Clematis apiifolia</i>	aerial	0.00
산피불주머니	Fumariaceae	<i>Corydalis speciosa</i>	aerial	13.01
산구절초	Compositae	<i>Chrysanthemum zawadskii</i>	whole	0.00
산팽의다리	Ranunculaceae	<i>Thalictrum filamentosum</i>	whole	6.51
산비장이	Compositae	<i>Serratula coronata</i>	whole	20.72
			aerial	0.00
삼주	Compositae	<i>Atractylodes japonica</i>	rhizoma	18.28
			radix	23.65
삿갓나물	Liliaceae	<i>Paris verticillata</i>	leaf	48.21
상사화	Amarylidaceae	<i>Lycoris radiata</i>	rhizoma	47.81
			leaf,branch	35.96
상산	Rutaceae	<i>Orixa japonica</i>	leaf	84.46
상수리나무	Fagaceae	<i>Quercus acutissima</i>	branch	85.96
			whole	23.90
새끼노루귀	Ranunculaceae	<i>Hepatica insularis</i>	leaf	31.72
새모래덩굴	Menispermaceae	<i>Menispermum daouricum</i>	whole	23.31
서양톱풀	Compositae	<i>Achillea millefolium</i>	leaf	51.00
석산	Amarylidaceae	<i>Lycoris radiata</i>	rhizoma	39.04
			whole	0.00
섬기린초	Crassulaceae	<i>Sedum takesimense</i>	leaf	47.41
섬노루귀	Ranunculaceae	<i>Hepatica maxima</i>	aerial	30.68
			whole	49.66
섬바디	Umbelliferae	<i>Dystaenia takeshimana</i>	aerial	15.14
			radix	0.00
섬백리향	Labiatae	<i>Thymus quinquecostatus</i>	whole	45.82
섬천남성	Araceae	<i>Arisaema negishii</i>	fructus	14.86
			aerial	3.19
섬황벽	Rutaceae	<i>Phellodendron insulare</i>	rhizoma	0.00
			leaf	26.69
세뿔투구꽃	Ranunculaceae	<i>Aconitum austro-koreense</i>	heartwood	14.74
			bark	0.00
소귀나무	Myricaceae	<i>Myrica rubra</i>	fructus	27.89
			aerial	0.00
솔나물	Rubiaceae	<i>Galium verum</i>	heartwood	78.09
			bark	64.94
솔장다리	Chenopodiaceae	<i>Salsola collina</i>	whole	0.00
			whole	0.00
송악	Araliaceae	<i>Hedera rhombea</i>	fructus	19.12
			whole	28.69
쇠고비	Aspidiaceae	<i>Cyrtomium fortunei</i>	whole	52.40
쇠무릅	Amaranthaceae	<i>Achyranthes japonica</i>	radix	40.54
쇠물푸레나무	Oleaceae	<i>Fraxinus sieboldiana</i>	branch	27.74
수송나물	Chenopodiaceae	<i>Salsola komarovii</i>	leaf	15.52
쉬나무	Rutaceae	<i>Evodia daniellii</i>	branch	20.89
			leaf	52.40

Table 1. continued

Korean name	Family	Scientific name	Part	Growth inhibition (%)
승마	Ranunculaceae	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	leaf	8.97
시호	Umbelliferae	<i>Bupleurum falcatum</i>	root	22.76
실거리나무	Leguminosae	<i>Caesalpinia japonica</i>	leaf.branch	0.00
쑥	Compositae	<i>Artemisia princeps</i>	rhizoma	26.69
			whole	29.88
쑤바귀	Compositae	<i>Ixeris dentata</i>	whole	0.00
아카시아	Leguminosae	<i>Robinia pseudo-acacia</i>	radix	42.57
			leaf	56.76
			branch	0.00
			flower	29.73
암대극	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia jolkini</i>	leaf	65.34
			radix	69.72
애기괭이눈	Saxifragaceae	<i>Chrysosplenium flagelliferum</i>	whole	0.00
애기똥풀	Papaveraceae	<i>Chelidonium majus</i>	whole	24.26
			leaf	0.00
애기얇은부채	Araceae	<i>Symplocarpus nipponicus</i>	whole	5.58
약오밀	Saururaceae	<i>Houttuynia cordata</i>	aerial	28.97
양지꽃	Rosaceae	<i>Potentilla fragarioides</i>	whole	52.76
어수리	Umbelliferae	<i>Heracleum moellendorffii</i>	leaf	41.83
			rhizoma	33.90
얼레지	Liliaceae	<i>Erythronium japonicum</i>	fructus	4.73
			radix	46.62
영경귀	Compositae	<i>Cirsium japonicum</i>	leaf	0.00
			radix	15.54
여뀌	Polygonaceae	<i>Persicaria hydropiper</i>	whole	84.59
여로	Liliaceae	<i>Veratrum maackii</i>	aerial	12.50
			radix	26.69
여로	Liliaceae	<i>Veratrum maackii</i>	fructus	0.00
연령초	Liliaceae	<i>Trillium kamtschaticum</i>	whole	18.73
왕고들빼기	Compositae	<i>Lactuca indica</i>	whole	8.78
왕호장근	Polygonaceae	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	leaf	8.28
왜현호색	Fumariaceae	<i>Corydalis ambigua</i>	aerial	0.00
			radix	31.42
용담	Gentianaceae	<i>Gentiana scabra</i>	whole	57.93
울릉쑥부쟁이	Compositae	<i>Aster glehni</i>	whole	11.55
으아리	Ranunculaceae	<i>Clematis mandshurica</i>	whole	47.01
인동	Caprifoliaceae	<i>Lonicera japonica</i>	whole	0.00
일천궁	Umbelliferae	<i>Cnidium officinale</i>	whole	45.86
자주괴불주머니	Fumariaceae	<i>Corydalis incisa</i>	whole	41.43
자주평의다리	Ranunculaceae	<i>Thalictrum uchiyamai</i>	whole	0.00
작약	Ranunculaceae	<i>Paeonia latiflora</i>	seed	100.00
			petal	74.32
정영영경귀	Compositae	<i>Cirsium chanroenicum</i>	aerial	12.41
제비꽃	Violaceae	<i>Viola mandshurica</i>	whole	0.00
조릿대	Gramineae	<i>Sasa borealis</i>	stem	0.00
			rhizoma	22.30
			leaf	3.98
조팝나무	Rosaceae	<i>Spiraea prunifolia</i>	leaf	0.00
			branch	0.00
			flower	3.59
조협	Leguminosae	<i>Gleditsia japonica</i>	whole	9.50
조희풀	Ranunculaceae	<i>Clematis heracleifolia</i>	leaf	0.00

Table 1. continued

Korean name	Family	Scientific name	Part	Growth inhibition (%)
족도리	Aristolochiaceae	<i>Asarum sieboldii</i>	whole	45.82
죽제비싸리	Leguminosae	<i>Amorpha fruticosa</i>	whole	55.17
주목	Taxaceae	<i>Taxus cuspidata</i>	fructus	34.83
			leaf	16.33
			branch	0.00
주엽나무	Leguminosae	<i>Gleditsia japonica</i>	leaf	51.03
			heartwood	18.84
			bark	6.51
쥐방울덩굴	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia contorta</i>	leaf	0.00
지느러미영경귀	Compositae	<i>Carduus crispus</i>	whole	17.91
지령कु나무	Caprifoliaceae	<i>Sambucus sieboldiana</i>	branch	29.73
지령कु나무	Caprifoliaceae	<i>Sambucus sieboldiana</i>	leaf	0.00
지치	Borraginaceae	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	radix	47.24
			aerial	31.87
질경이	Plantaginaceae	<i>Plantago asiatica</i>	whole	8.03
죄신나물	Rosaceae	<i>Agrimonia pilosa</i>	radix	100.00
			aerial	28.04
쪽동백나무	Styracaceae	<i>Styrax obassia</i>	branch	30.68
			leaf	22.71
			bark	0.00
			heartwood	45.55
참빗살나무	Celastraceae	<i>Euonymus sieboldiana</i>	fructus	42.76
			leaf,branch	13.79
참취	Compositae	<i>Aster scaber</i>	leaf	4.39
처녀치마	Liliaceae	<i>Heloniopsis orientalis</i>	whole	29.88
천남성	Araceae	<i>Arisaema amurense</i>	rhizoma	15.88
천문동	Liliaceae	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	aerial	7.09
철쭉	Ericaceae	<i>Rhododendron schlippenbachii</i>	aerial	0.00
청미래덩굴	Liliaceae	<i>Smilax china</i>	leaf	48.62
			radix	44.22
초피나무	Rutaceae	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	leaf	63.01
			branch	44.18
쫄대승마	Ranunculaceae	<i>Cimicifuga simplex</i> Wormsk	whole	43.15
쑥	Leguminosae	<i>Pueraria thunbergiana</i>	leaf,branch	0.00
큰제비고깔	Ranunculaceae	<i>Delphinium maackianum</i>	whole	38.36
큰피막이	Umbelliferae	<i>Hydrocotyle ramiflora</i>	whole	0.00
탱자나무	Rutaceae	<i>Poncirus trifoliata</i>	leaf	3.42
			fructus	0.00
터리풀	Rosaceae	<i>Filipendula glaberrima</i>	whole	79.28
털개구리미나리	Ranunculaceae	<i>Ranunculus cantoniensis</i>	whole	42.12
토끼풀	Leguminosae	<i>Trifolium repens</i>	whole	0.00
톱풀	Compositae	<i>Achillea sibirica</i>	whole	54.85
투구꽃	Ranunculaceae	<i>Aconitum jaluense</i>	flower	29.73
			rhizoma	31.42
			aerial	5.18
파리풀	Phrymaceae	<i>Phryma leptostachya</i>	whole	35.27
피마자	Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i>	aerial	0.00
			seed	13.94
하늘말나리	Liliaceae	<i>Lilium tsingtauense</i>	radix	39.53
해국	Compositae	<i>Aster spathulifolius</i>	leaf	25.34
향유	Labiatae	<i>Elsholtzia ciliata</i>	aerial	47.30
			rhizoma	57.93

Table 1. continued

Korean name	Family	Scientific name	Part	Growth inhibition (%)
헛개나무	Rhamnaceae	<i>Hovenia dulcis</i>	fructus	47.59
현삼	Scrophulariaceae	<i>Scrophularia buergeriana</i>	aerial	36.15
호랑가시나무	Aquifoliaceae	<i>Ilex cornuta</i>	leaf	51.79
			heartwood	51.39
			bark	47.01
호박	Cucurbitaceae	<i>Cucurbita moschata</i>	flower	65.88
홀아비꽃대	Chloranthaceae	<i>Chloranthus japonicus</i>	radix	24.66
홀아비바람꽃	Ranunculaceae	<i>Anemone koraiensis</i>	whole	0.00
환삼덩굴	Cannabaceae	<i>Humulus japonicus</i>	aerial	20.61
황기	Leguminosae	<i>Astragalus membranaceus</i>	root	16.39
황칠나무	Araliaceae	<i>Dendropanax moribifera</i>	leaf	39.38
			branch	17.12
회리바람꽃	Ranunculaceae	<i>Anemone reflexa</i>	whole	6.51
흰바디나물	Umbelliferae	<i>Angelica distans</i>	whole	0.00
흰진범	Ranunculaceae	<i>Aconitum longecassidatum</i>	radix	48.65
			aerial	34.83
			whole	0.00

μl 되도록 조정하였으며, 최종 시료농도는 100 μg/ml, 접종 농도는 10⁶ CFU/ml로 되도록 첨가하였다. 이후, 37°C에서 24시간 배양하고, UV-Visible spectrophotometer (Hitachi Co., JAPAN)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 *S. mutans*에 대한 성장률을 측정하여 항균력을 평가하였다. 시료 처리시 용매 대조구는 DMSO를 5% (v/v)를 사용하였으며, 이 농도까지는 *S. mutans*의 성장저해는 나타나지 않았다. 성장 저해율은 아래와 같이 계산하였다[14].

$$\text{Growth inhibition (\%)} = \{1 - (S - C_2) / (C_1 - M)\} \times 100$$

이때 S는 (배지 + *S. mutans* + 시료) 흡광도, C1은 (배지 + *S. mutans*) 흡광도, C2는 (배지+시료) 흡광도, M은 배지 흡광도를 각각 나타낸다.

Disk paper method를 이용한 항균 활성의 측정: 96 well microtiter plate method에 의해 1차 선별된 시료의 항균 활성은 HIB 고체 배지에서 disk paper (지름 6.5 mm, Whatman No. 2)를 이용한 생육저지환의 크기를 측정하여 재평가 하였다[25]. 이때 시료의 농도는 disk당 100 μg을 사용하였으며, *S. mutans* 세포 농도는 1~2×10⁸ CFU 되도록 도달한 후 37°C에서 24 시간 배양 한 후 생육저지환의 크기(mm)를 측정하여 2차 선별하였다. 대조군으로는 ampicillin, erythromycin, streptomycin sulfate의 시판 항생균제를 1 μg/ml 농도로 처리하였으며, 항생균 활성은 생육저지환의 크기로 나타내었다.

MIC의 측정: 2차 선별된 7종의 천연물 시료의 항균 활성은 microbroth dilution 법을 변형시켜 평가하였다[26]. HIB 액체 배지 980 μl에 시료 10 μl (각각의 최종농도 0, 10, 15, 25, 30, 50, 75, 100, 150, 200 μg/ml)와 균액 10 μl (10⁶ CFU/ml)를 첨가하여, 37°C에서 24시간 배양한 후 생육이 나타나지 않는 최저농도를 MIC로 결정하였다. 이때 실험의 대조군으로

는 ampicillin, erythromycin, streptomycin sulfate를 각각 최종농도1, 2, 3, 4 μg/ml 되도록 처리하여 MIC를 결정하였다.

결과 및 고찰

조제된 309종의 천연물 추출물은 기존의 대량검색[4]에 사용된 55종 시료와 비교할 때, 백선피, 백출, 비자, 시효, 천남성, 천문동, 황기의 7종이 중복되었다. 309 종의 약용 및 식용 식물 메탄올 추출물을 이용하여 *S. mutans*에 대한 항균력을 microtiter plate assay로 측정할 결과는 Table 1과 같다. 균주 생육이 80% 이상 저해되는 천연물 시료는 가죽나무(잎, 가지), 곰딸기(열매), 노루발(전초), 독활(잎), 둥근잎평의비름(잎), 명석딸기(잎, 줄기 혼합 추출물), 상수리나무(잎, 가지), 여뀌(전초), 작약(종자), 짚신나물(뿌리)로 10 종이 확인되었다. 이중 백작약의 경우 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*에 대한 미약한 항균 활성 (MIC = 2 mg/ml)이 알려져 있고[9], 짚신나물의 경우 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*에 대한 약한 항균 활성 (MIC = 0.75~5 mg/ml)이 보고[17,18]되어 있으나, 곰딸기, 노루발, 독활, 둥근잎평의비름, 명석딸기, 상수리나무, 여뀌의 경우는 현재까지 항균 활성이 알려져 있지 않다.

선별된 10종 천연물의 농도를 100 μg/disk로 조정하여 항균활성을 disk paper method로 검정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 가죽나무(가지), 곰딸기(열매), 독활(잎), 상수리나무(잎), 여뀌(전초), 작약(종자), 짚신나물(뿌리) 7종의 시료에서 생육저지환의 크기가 7 mm 이상으로 우수한 활성이 나타났으며, 대조군으로 사용된 ampicillin, erythromycin, streptomycin sulfate의 경우, 1 μg/disk 농도에서 생육저지환의 크기가 각각 17 mm, 11 mm, 15 mm로 나타나 강한 활성을 확

Table 2. Evaluation of antibacterial activity of first selected 10 plant extracts against *S. mutans* JC-2 based on disk paper method.

Plant extracts and Reference compounds	Part	Clear zone (mm)
Ampicillin	-	17
Erythromycin	-	11
Streptomycin sulfate	-	15
<i>Agrimonia pilosa</i>	radix	9.5
<i>Ailanthus altissima</i>	branch	10.0
	leaf	¹ NA
<i>Aralia continentalis</i>	leaf	9.0
<i>Paeonia lactiflora</i>	seed	14.0
<i>Persicaria hydropiper</i>	whole	7.0
<i>Pyrola japonica</i>	whole	¹ NA
<i>Quercus acutissima</i>	leaf	8.0
	branch	¹ NA
<i>Rubus parvifolius</i>	leaf & stem	¹ NA
<i>Rubus phoenicolasius</i>	fructus	7.0
<i>Sedum rotundifolium</i>	flower	¹ NA

The concentrations of reference compounds (ampicillin, erythromycin, and streptomycin sulfate) and plant extracts were 1 µg/disk and 100 µg/disk, respectively. ¹NA: No Activity.

인하였다. Table 2에 나타난 것 과 같이 1차 선별된 가죽나무 (잎 추출물), 명석딸기 (잎, 줄기 혼합 추출물), 둥근잎평의비름 (꽃 추출물)의 경우에는 생육저지환이 나타나지 않았는데, 이는 액체배지를 사용한 직접 접촉시험과 고체배지의 확산 시험에서 차이가 나타난다는 최근의 보고[21,22]와도 부분적으로 일치된다. 즉, 활성성분이 세포와 직접 접촉하는 액체배지와 달리, 고체배지를 이용한 Disk paper method의 경우 활성성분의 확산도가 생육저지환 생성에 따른 활성평가에 영향을 미칠 수 있음을 확인 하였다. 한편 가죽나무, 상수리나무 추출물에서 보는 바와 같이 동일한 식물체임에도 불구하고 부위별 항균활성이 다르게 나타났으며, 이는 천연물에서 활성 물질의 생성 시기, 생성 조직의 다양성, 활성물질의 화학적 다양성에 기인하는 것으로 추측되었다. 이러한 결과는, 보다 다양한 식물체 부위별 활성을 조사할 필요성을 제기하며, 새로운 부위별 추출물에서 신규의 생리활성 물질 개발이 가능함을 의미한다.

항균활성의 정량적 비교를 위해, 2차 선별된 7종 시료의 MIC를 측정하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 쑥신나물(뿌리), 독활(잎) 추출물의 MIC는 각각 100 µg/ml, 여뀌(전초), 작약(종자) 추출물의 MIC는 50 µg/ml이며, 가죽나무(잎) 추출물이 30 µg/ml, 곰딸기(열매) 및 상수리나무(잎) 추출물은 각각 25 µg/ml로 7종 모두 100 µg/ml 이하의 MIC를 나타내었다. 여뀌, 상수리, 곰딸기 추출물의 경우 microtiter plate assay에서는 82~85%의 생육저해를 나타내어 쑥신나물, 독활 추출물의 100% 생육저해에 비해 활성이 다소 약한 것으로 추측되었으나(Table 1), MIC 결정을 위한 시험관 규모

Table 3. Minimum inhibitory concentration of selected seven plant extracts against *Streptococcus mutans*.

Plant extracts and Reference compounds	Part	MIC (µg/ml)
Ampicillin	-	1
Erythromycin	-	1
Streptomycin sulfate	-	1
<i>Agrimonia pilosa</i>	radix	100
<i>Ailanthus altissima</i>	branch	30
<i>Aralia continentalis</i>	leaf	100
<i>Paeonia lactiflora</i>	seed	50
<i>Persicaria hydropiper</i>	whole	25
<i>Quercus acutissima</i>	leaf	25
<i>Rubus phoenicolasius</i>	fructus	50

MIC was determined by microbroth dilution method and the results were expressed as the mean value from triplicated experiments.

에서 활성 평가한 경우 25~50 µg/ml의 MIC를 나타내어 쑥신나물 및 독활 추출물보다 강력한 활성을 나타내었다(Table 3). 이는 microtiter plate assay의 200 µl 배양조건, 600 nm에서의 흡광도 측정에 의한 생육도 판정(Table 1)과 MIC 측정시의 1,000 µl 배양조건 및 생육저지농도의 육안판정의 차이에서 기인하는 것으로 판단된다. 그러므로 microtiter plate assay를 이용한 항균활성의 평가의 경우, 초기 추출물 선정에 효율적이며, 100% 생육저해보다는 80% 이상의 생육저해를 나타내는 추출물을 선정하는 것이 적당하리라 판단된다. 한편, 상기의 7종 천연물 추출물이 정제되지 않은 추출물 상태인 점과, *S. mutans*에 대한 항원 메탄올 추출물[10], 다시마 80% 에탄올 추출물[13] 및 두송실 추출물[23]의 MIC가 각각 130 µg/ml, 190 µg/ml, 100 µg/ml인 점을 감안하면, 선정 추출물의 낮은 MIC는 7종 시료의 추출물이 매우 강력한 항균 활성물질을 포함하고 있음을 의미한다. 특히 *S. mutans*에 대한 MIC가 50 µg/ml 이하인 가죽나무, 곰딸기 및 상수리나무 추출물의 경우, 항우식 활성 및 활성물질이 알려져 있지 않으나, 활성물질의 정제를 통해 안전성이 우수한 물질이 확보된다면 새로운 충치예방 및 치료제 개발이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

식용 및 약용 식물 215 종의 천연물로부터 추출부위를 달리한 메탄올 추출물 309 종을 조제하였으며, 안전성이 우수한 천연물 충치예방 및 치료제 개발을 목표로 309종의 추출물의 *S. mutans* JC-2에 대한 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성은 96 well microtiter method에 의한 생육저해능 측정 및 disk paper method에 의한 생육저지환 크기를 측정하여 평가하였으며, 그 결과 가죽나무(가지), 곰딸기(열매), 독활(잎), 상수리나무(잎), 여뀌(전초), 작약(종자), 쑥신나물(뿌리)

추출물에서 강한 활성을 확인하였다. 상기 7종 천연물의 최소 생육저지농도(MIC)를 측정하여 항균 활성을 비교한 결과, 여뀌, 상수리나무, 가죽나무 추출물이 25~30 µg/ml의 농도에서 생육을 완전히 억제하였다. 이러한 결과는 항균력이 우수한 천연물로부터 새로운 충치 예방 및 치료제 개발이 가능함을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역기술혁신센터사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- An, B. J., M. J. Bae and C. Choi. 1998. Chemical structure and isolation of glucosyltransferase inhibitor from the leaves of Korean persimmon. *Food Sci. Biotechnol.* **7**, 23-27.
- Bae, K. H., J. M. Ji, and K. L. Park. 1992. The anticariogenic component from Cinnamon cortex against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Arch. Pharm. Res.* **15**, 239-241.
- Bae, K. H., B. H. Kim, P. K. Myung, K. S. Chung, and J. H. Baek. 1990. The isolation and evaluation of bioactive components from crude drugs against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176(2). *Yakhak Hoeji* **34**, 277-281.
- Do, D. S., S. M. Lee, M. K. Na, and K. H. Bae. 2002. Antimicrobial activity of medicinal extracts against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ176. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**, 319-323.
- Gjeramo, P. 1989. Chlorhexidine and related compound. *J. Dent. Res.* **68**, 1602.
- Hamada, S., and H. D. Slade. 1980. Immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* **44**, 331-384.
- Hamada, S., T. Ooshima, M. Torii, H. Imanishi, N. Masuda, J. Mixuno, S. Sobue and S. Kotani. 1978. Dental caries induction in experimental animals by clinical strains of *Streptococcus mutans* isolated from Japanese children. *Microbiol. Immunol.* **22**, 301-314.
- Hang, J. K., J. Y. Chung, N. I. Baek, J. H. Park. 2004. Isopanduratin A from *Kaempferia pandurata* as an active antibacterial agent against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **23**, 377-381.
- Hwang, J. S., H. J. Chun and Y. S. Han. 2000. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Jakyak* (*Paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI). *Korean J. Soc. Food Sci.* **16**, 67-74.
- Jang, G. H., B. Y. Ahn, S. H. Oh, D. S. Choi and Y. J. Kwon. 2000. Anticariogenic effects of *Coptis chinensis* Franch extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 1396-1402.
- Jung, D. S., and Y. K. Lee. 2002. Development of fermented isotonic beverage with anticariogenic activity using bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 399-404.
- Katsura, H., R.-I. Tsukiyama, A. Suzuki, and M. Kobayashi. 2001. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. *Antimicrob. Agents Ch.* **45**, 3009-3013.
- Kim, J. H., D. S. Lee, C. W. Lim, H. Y. Park and J. H. Park. 2002. Antibacterial activity of Sea-mustard, *Laminaria japonica* extracts on the cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*. *J. Korean Fish. Soc.* **35**, 191-195.
- Kloucek, P., Z. Polesny, B. Svobodova, E. Vlkova, and L. Kokoska. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *J. Ethnopharmacol.* **99**, 309-312.
- Lander, P. E., G. M. Newcomb, G. J. Seymour and R. N. Powell. 1986. The antimicrobial and clinical effects of a single subgingival irrigation of chlorhexidine in advanced periodontal lesion. *J. Clin. Periodont.* **13**, 74-80.
- Lee, H. O., D. M. Han, S. H. Baek. 2002. Isolation and identification of anticariotic compound from *Sophora flavescens* Ait. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 420-424.
- Lee, E. S. and B. I. Seo. 2003. Growth inhibition of *E. coli* KCTC 2441 by *Agrimonia pilosa* Ledeb. extract. *Kor. J. Herbology.* **18**, 15-20.
- Lee, E. S. and B. I. Seo. 2003. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Agrimonia pilosa* Ledeb. extract. *The J. Applied Oriental Medicine.* **3**, 37-42.
- Lee, T. B. 1993. Illustrated flora of Korea, Hwang Moon Sa, Seoul.
- Lee, Y. S., H. J. Park, J. S. You, H. H. Park, I. B. Kwon and H. Y. Lee. 1998. Isolation of an anticariogenic compound from *Magnoliae* Bark. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 230-236.
- Lewinstein, I., S. Matalon, S. Slutzkey, and E. I. Weiss. 2005. Antibacterial properties of aged dental cements evaluated by direct-contact and agar diffusion test. *J. Prosthet. Dent.* **93**, 364-371.
- Matalon, S., H. Slutzky, and E. I. Weiss. 2005. Antibacterial properties of 4 orthodontic cements. *Am. J. Orthod. Dentofac.* **127**, 56-63.
- Nam, S. H., T. S. Weon, S. D. Choi, D. S. Jang and M. S. Yang. 1998. Inhibition effect by *Juniperus rigida* S. et Z. on organic acids production from *Streptococcus mutans*. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 395-398.
- Park, K. M., J. S. You, H. Y. Lee, N. I. Baek, and J. K. Hwang. 2003. Kuwanon G: antibacterial agents from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *J. Ethnopharmacol.* **84**, 181-185.
- Sakanaka, S., M. Kim, M. Taniguchi and T. Yamamoto. 1989. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2307-2311.
- Sohn, H. Y., E. J. Kum, Y. S. Kwon, G. S. Kwon, I. Jin, H. Y. Kwon, C. S. Kwon, K. H. Son. 2003. Screening of anti-candidosis agent from medicinal and wild plants. *Kor. J. Life Sci.* **13**, 604-617.
- Song, Y. H., D. S. Kim, S. R. Jung, Y. S. Seo, K. W. Chang.

2001. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus mutans*. *J. Kor. Acad. Dent. Health* **25**, 299-306
28. Terranova, V. P., L. C. Franzetu, C. Hic. 1986. A biochemical approach to periodontal regeneration; Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J. Periodont Res.* **21**, 330-337.
29. Yoon, S. Y., S. H. Kim, H. L. Chung, J. J. Lee, C. S. Huh, and Y. J. Baek. 2000. Anticariogenic effects of unripe apple extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 168-173.