

마와 꿀풀 추출물에 의한 *Streptococcus mutans*의 산 생성 및 Glucosyltransferase 저해효과

정기옥
대구보건대학 치위생과

Glucosyltransferase Inhibition of *Streptococcus mutans* by *Dioscorea batatas* and *Prunella vulgaris* extract

Gi-Ok Jung

Department of Dental Hygiene, Daegu Health College, 702-260, Korea

ABSTRACT *Streptococcus mutans* is the major causative factor in dental caries and has been known to induce dental caries by the process of initial attachment proliferation and acid production. The pH of *Streptococcus mutans*(*S. mutans*) media and glucosyltransferase(GTase) activity were determined to evaluate the anticariogenic activity of *Dioscorea batatas* and *Prunella vulgaris* hexane fraction. In the experiment of hexane fraction of *Dioscorea batatas*, the relative growth ratio(RGR) against *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) was determined as 93% in concentration of 0.125 mg/ml, 100% in 0.25 mg/ml. The hexane fraction of *Prunella vulgaris* revealed relative growth ratio(RGR) against *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) as 86% in concentration of 0.25 mg/ml, 100% in 0.5 mg/ml. The relative growth ratio(RGR) against of hexane fraction were determined as 92% in concentration of 0.25 mg/ml, 100% in 0.5 mg/ml. The acidities were pH 7.2 on *Dioscorea batatas* and 7.0 on *Prunella vulgaris* in 2.0 mg/ml in contrast to pH 5.6 on *Dioscorea batatas* and 5.2 on *Prunella vulgaris* in control. The inhibitory effect to activity revealed 35% on *Dioscorea batatas* and 25% on *Prunella vulgaris* in 2.0 mg/ml. The inhibitory effect of *Dioscorea batatas* was more potent than *Prunella vulgaris*.

Key words *Dioscorea batatas*, *Prunella vulgaris*, *Streptococcus mutans*, Rrelative growth ratio, pH, Glucosyltransferase

서 론

구강은 외계와 직접 통하고 있기 때문에 항상 미생물의 침입을 받고 있으며 구강환경은 영양적·생리적으로 세균이 증식하는데 적합하여 항상 많은 세균이 정착하는 상재 세균총을 이룬다. 보통 사람의 구강에는 30종 이상의 세균이 분리되며 구강세균총은 개인, 연령, 건강상태, 식이상태 또는 위생상태에 따라 그 종류와 비율이 항상 변한다¹⁾. 정상인의 경우는 구강 내에 상주하는 정상균총 상호간에 서로 균형을 이루고 있으나, 어떠한 요인에 의하여 균형을 잃게될 때 특성의 구강질환을 일으킬 가능성이 높아지게 된다²⁾.

치아우식증은 구강질환의 가장 대표적인 질환으로 치아파괴를 동반한 감염성 질환이다. 치아우식증은 치면세균막 내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 질환으로서 치면세균막 내 세균 중에서도 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)가 주된 원인균으로 알려져 있다³⁾. *S. mutans*는 치면에 부착, 증식 및 산 생성 과정을 거쳐 치아 우식을 유발한다⁴⁾. 즉, *S.*

*mutans*는 균체 외 또는 균체 표층에 치아우식의 유발효소인 glucosyltransferase(GTase)라는 효소를 분비하고 이 GTase가 음식물 중 자당(sucrose)을 분해하여 치면에 불용성 glucan을 형성한다. Glucan이 구강내 다른 미생물들과 치면에 부착되어 치면세균막을 생성한다^{5,6)}. 여기에 치아우식 유발균과 혐기성세균이 증식하면서 생성한 산에 의해 치아가 탈회되어 치아우식증을 유발한다^{7,8)}.

천연물질과 구강 관련 선행연구로는 고삼⁹⁾, 소목¹⁰⁾, 오이풀¹¹⁾, 호장근¹²⁾등의 보고들이 있었으나, 마(*Dioscorea batatas*)와 꿀풀(*Prunella vulgaris*)을 이용한 구강세균에 대한 연구는 미흡하여 이에 본 연구는 *S. mutans*의 성장억제, 산 생성억제, GTase의 활성저해 시험을 통해 항균, 항우식 효과의 잠재성을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 재료

이 실험에서 사용한 마와 꿀풀은 대구 약령시 한약재상에서 건조 상태의 것을 구입하여 사용하였다(Table 1).

†Corresponding author

Tel: 016-9511-3479

Fax: 053-428-8844

E-mail: jgo1204@naver.com

Table 1. List of plants used for experiments

Botanical name	Korean name	Parts used
<i>Dioscorea batatas</i>	Ma	Radix
<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	Kkulpul	Whole

2) 기기 및 시약

실험에 사용한 기기로는 rotary vacuum evaporator, 동결건조 장치, CO₂ incubator (Sanyo, MCO-17 AIC, Japan), ELISA reader (Molecular Device, SpecTRA MAX 340, Austria), high speed centrifuge, pH meter 등을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획에 사용된 용매로써 methanol, n-hexane 등은 특급시약을 사용하였으며, potassium tellurite, bacitracin 등은 Sigma사(U.S.A) 제품을 사용하였다.

3) 시료의 추출 및 분획

(1) 매탄올 추출

분쇄한 각 시료에 10 배량 (w/v)의 80% methanol을 가하여 24시간씩 3회 정치하여 추출하고, 추출액은 여과지 (Adventec Toyo 2, Japan)를 사용하여 2회 감압 여과하고 rotary vacuum evaporator로 농축하였다. 이를 동결건조 후 dry keeper에 보관하여 사용하였다.

(2) 매탄올 추출물의 용매분획

마, 꿀풀의 methanol 추출물에 일정량의 증류수를 가하여 현탁 시킨 후 증류수와 동량의 n-hexane을 가하여 진탕하고 방치한 다음 분획 후 농축하여 n-hexane 분획을 얻었다. 위 시료들은 동결건조 후 dry keeper에 보관하여 사용하였다.

2. 항균성 시험

1) 균주

실험에 사용된 균주는 *Streptococcus mutans* KCTC 5316을 한국생명공학연구소로부터 분양받아 사용하였다.

2) 마, 꿀풀 핵산 추출물의 농도에 따른 성장 억제효과

*S. mutans*는 BHI broth에 시료 최고농도 0.5 mg/ml에서 최저농도 0.004 mg/ml까지 단계 희석한 시료를 첨가하였다. 균 배양액을 McFarland No. 0.5 농도가 되게 희석한 후, 다시 100배 희석한 균액을 각 well에 분주하여 박테리아는 37°C 배양기에서 24시간 배양 한 다음 ELISA reader를 사용하여 625 nm에서 흡광도를 측정하여 성장억제능을 관찰하였다.

3. 마, 꿀풀 핵산 추출물의 산 생성 및 GTase 활성저해 효과

1) *S. mutans*의 산 생성 억제

BHI broth에 마, 꿀풀 핵산 추출물을 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ml로 첨가한 후 미리 배양한 *S. mutans*를 1×10⁶ CFU/ml가 되게 접종하였다. 37°C의 CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 BHI broth의 pH를 측정하여 산 생성 억제효과를 관찰하였다. 대조군은 추출물을 넣지 않고 시행하였다.

2) Glucosyltransferase의 분리 및 활성 저해

GTase의 분리는 이 등¹³⁾의 방법을 사용하여 분리하였다. *S. mutans*를 BHI broth에서 37°C, 24시간 배양하여 중균으로

하고, 중균 배양액 20 ml를 BHI broth 1l에 접종(중균 2% v/v)하여 다시 37°C에서 24시간 배양을 하였다. 배양액을 실온에서 6,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상등액을 취하고 4°C이하로 냉각시킨 에탄올 700 ml를 첨가하여 4°C 냉장고에서 overnight 시켰다. 8,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 침전물을 0.06 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 8 ml에 현탁하고 -20°C 냉동고에 보관하며 GTase 효소활성의 검정액으로 사용하였다. 활성 검정은 경질 test tube에 0.06 M potassium phosphate buffer(pH 6.8, 1l 중 sucrose 12.5 g, Na₂SO₄ 0.25 g 함유) 0.8 ml, GTase 0.05 ml, 핵산 추출물(0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml) 0.1 ml을 넣어 37°C에서 17시간 정체 배양 후 상등액은 버리고 증류수 2 ml을 가하여 씻어내었다. 다시 증류수 2 ml을 가하여 30분간 초음파처리를 하여 용기벽에 부착된 glucan을 탈착 및 파쇄하고, spectrophotometer에 의한 흡수파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음 식에 따라 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

4. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 자료의 분석과 통계처리는 SAS 8.01을 사용하여 Levene통계량을 이용하여 등분산에 대한 검정 한 다음, 등분산이 인정되면 각 실험군에 대한 다중 검증을 위해 일원분산분석법(one-way ANOVA)으로 검정하였다. 또한 분산분석결과 군간 유의한 차이가 있을 경우 유의수준은 $\alpha = 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test로 사후검정하였다.

결과 및 고찰

1. 항균성 시험

1) 마 핵산 추출물의 농도에 따른 *S. mutans*의 성장억제효과
*S. mutans*에 대해 마 용매 분획별 항균성을 측정한 결과 핵산추출물이 가장 우수하였다. *S. mutans*의 상대성장률(Relative Growth Ratio, RGR)을 본 결과 0.004와 0.008 mg/ml 농도에서 뚜렷한 억제력을 보이지 않았으나, 0.016 mg/ml 농도에서는 9.27%, 0.031 mg/ml 농도에서 43.5%, 0.063 mg/ml 농도에서는 82%, 0.125 mg/ml 농도에서는 93%, 0.25 mg/ml 농도 이

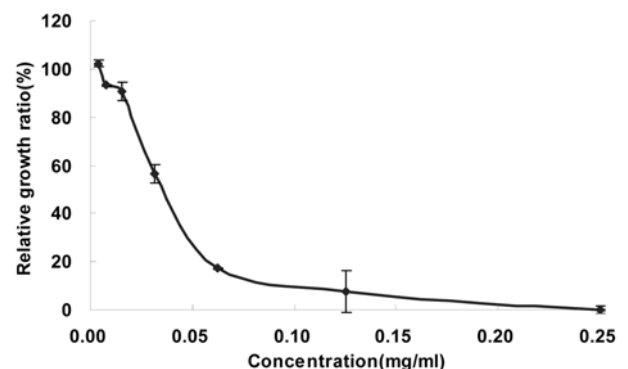


Fig. 1. Relative growth ratio (%) of *S. mutans* cultured at different concentrations of hexane extract of *Dioscorea batatas*.

상에서는 100%까지 억제하여, 추출물의 농도가 증가함에 따라 통계적으로 유의하게 성장이 억제되었다($p < 0.05$)(Fig. 1).

2) 꿀풀 헥산 추출물의 농도에 따른 *S. mutans*의 성장억제 효과

*S. mutans*에 대해 꿀풀 용매 분획별 항균성을 측정한 결과 헥산추출물이 가장 우수하였다. *S. mutans*의 상대성장률(Relative Growth Ratio, RGR)은 0.004와 0.008 mg/ml 농도에서 뚜렷한 억제를 보이지 않았으나, 0.016 mg/ml 농도에서는 33%, 0.031 mg/ml 농도에서 54%, 0.063 mg/ml 농도에서는 67%, 0.125 mg/ml 농도에서 80%, 0.25 mg/ml 농도에서는 86%, 0.5 mg/ml 농도 이상에서는 100%까지 억제하여추출물의 농도가 증가함에 따라 통계적으로 유의하게 성장이 억제되었다($p < 0.05$)(Fig. 2).

2. 함우식 효과

1) *S. mutans*의 산 생성 억제

마 헥산 추출물의 *S. mutans*에 의한 산 생성 억제 효과는 Fig. 3와 같다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 pH는 5.6 ± 0.1 였고, 헥산 추출물을 0.1 mg/ml 첨가하였을 때의 pH는 5.8 ± 0.2 로 대조군과 비교하여 뚜렷한 차이는 없었다. 그러나 0.5 mg/ml를 첨가하였을 때 pH는 6.4 ± 0.1 , 1.0 mg/ml에서는 pH가 6.7 ± 0.2 , 2.0 mg/ml에서는 pH가 7.2 ± 0.1 로 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 산 생성을 억제함을 보였다($p < 0.05$). 그리고 배양 전 추출물을 첨가한 배지와 추출물을 첨가하지 않은 배지 모두 pH는 7.02 ± 0.01 이었는데 24시간 이후 대조군에서는 pH가 5.6 ± 0.1 로 나타났으며 마 헥산 추출물 2.0 mg/ml을 첨가하였을 때 pH는 7.2 ± 0.1 로 나타나

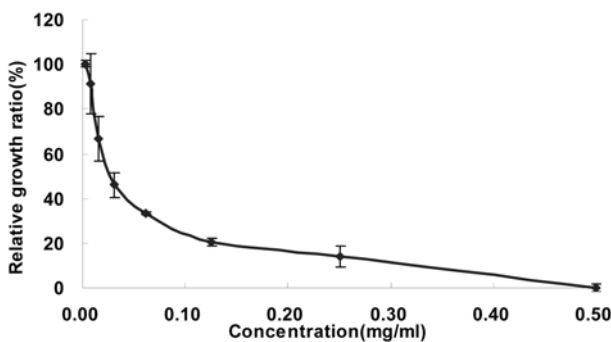


Fig. 2. Relative growth ratio (%) of *S. mutans* cultured at different concentrations of hexane extract of *Prunella vulgaris*.

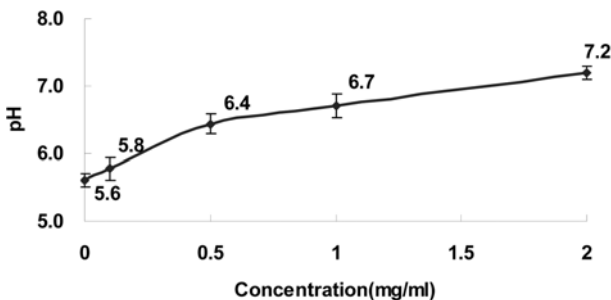


Fig. 3. The change of pH induced by *S. mutans* under varying concentrations of hexane extract of *Dioscorea batatas*.

헥산 추출물이 산 생성을 억제하였음을 알 수 있었다.

꿀풀 헥산 추출물의 *S. mutans*에 의한 산 생성 억제 효과는 Fig. 4와 같다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 pH는 5.2 ± 0.03 였고, 헥산 추출물을 0.1 mg/ml 첨가하였을 때의 pH는 5.5 ± 0.15 로 대조군과 비교시 억제 효과는 없었다. 그러나 0.5 mg/ml를 첨가하였을 때 pH는 6.2 ± 0.32 , 1.0 mg/ml에서는 pH가 6.7 ± 0.11 , 2.0 mg/ml에서는 pH가 7.0 ± 0.06 으로 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 산 생성을 억제함을 보였다($p < 0.05$). 그리고 배양 전 추출물을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지 모두 pH는 7.02 ± 0.01 이었는데 24시간 이후 대조군에서는 pH가 5.2 ± 0.03 로 나타났으며 마 헥산 추출물 2.0 mg/ml을 첨가시 pH는 7.0 ± 0.06 로 나타나 헥산 추출물이 산 생성을 억제함을 보여주고 있다.

마와 꿀풀 두 물질을 비교하였을 때 마 헥산 추출물에서 산 생성 억제력이 높았다.

2) Glucosyltransferase 활성 저해

*S. mutans*에 대한 마 헥산 추출물을 첨가하여 GTase의 활성 저해효과를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 마 헥산 추출물의 첨가량이 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml 일 때, 흡광도는 각각 0.057, 0.052, 0.047, 0.041, 0.037로 나타났고, GTase 활성 저해율은 농도에 따라 각각 0, 9, 18, 28, 35%였으며, 통계적으로 유의하게 활성이 저해되었다($p < 0.05$). 사후검정결과, 모든 군에서 대조군과 비교시 마 헥산 추출물에 대해 농도 의존적으로 유의하게 활성이 저해되었다.

*S. mutans*에 대한 꿀풀의 헥산 추출물을 첨가하여 GTase의 활성 저해효과를 측정한 결과는 Table 3과 같다. 꿀풀 헥산 추출물의 첨가량이 0.0, 0.1, 0.5, 1.0 2.0 mg/ml일 때, 흡광

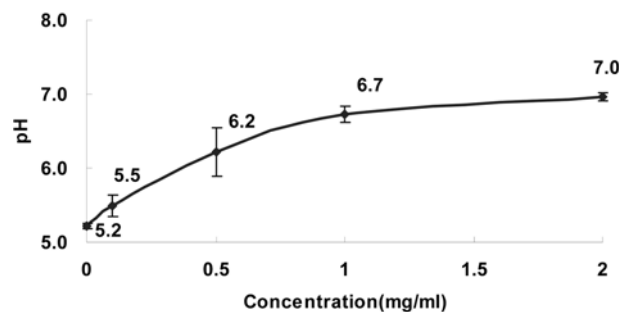


Fig. 4. The change of pH induced by *S. mutans* under varying concentrations of hexane extract of *Prunella vulgaris*.

Table 2. Inhibitory effects of the hexane fraction of *Dioscorea batatas* on glucosyltransferase activity

Concentration (mg/ml)	GTase activity* (O.D. 550 nm)	Inhibition rate (%) [†]
Control	0.057 ± 0.001 ^a	0
0.1	0.052 ± 0.002 ^b	9
0.5	0.047 ± 0.002 ^c	18
1.0	0.041 ± 0.001 ^d	28
2.0	0.037 ± 0.001 ^e	35

*Values are mean ± S.D. (n=3)

Values with different superscripts in the same column are significant different by Duncan's multiple range test($p < 0.05$).

[†]Inhibition rate (%) = [(control O.D. - treated O.D.) / control O.D.] × 100

Table 3. Inhibitory effects of the hexane fraction of *Prunella vulgaris* on glucosyltransferase activity

Concentration (mg/ml)	GTase activity* (O.D. 550 nm)	Inhibition rate (%) [†]
Control	0.047±0.002 ^a	0
0.1	0.044±0.001 ^{ab}	6
0.5	0.041±0.001 ^{bc}	11
1.0	0.039±0.001 ^c	16
2.0	0.035±0.003 ^d	25

*Values are mean ± S.D. (n = 3)

Values with different superscripts in the same column are significant different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

[†]Inhibition rate (%) = [(control O.D. - treated O.D.) / control O.D.] × 100

도는 각각 0.047, 0.044, 0.041, 0.039, 0.035로 농도에 따라 각각 0, 6, 11, 16, 25%로 통계적으로 유의하게 활성이 저해되었다(p < 0.05). 사후검정결과, 대조군과 비교시 0.1 mg/ml를 제외한 0.5 mg/ml이상의 농도에서는 농도 의존적으로 유의하게 활성을 저해시킴을 확인할 수 있었다.

한편 Aloe vera¹⁴⁾에서 분리, 정제한 aloe-emodin과 barbaloin의 100 mg/ml에서 각각 99.8%, 98.4%의 활성저해를 보였으며 콜레스테롤 강화작용과 비만방지 등 효과가 있는 Catechin¹⁵⁾은 100 µg/ml에서 99.8%의 높은 억제율을 보였다. 선행연구와 비교한 결과 마 핵산 추출물의 GTase 활성 저해율이 꿀풀 핵산 추출물에 비해 높게 나타났지만 선행연구자들의 결과에 비해 효과가 낮은 것으로 보아 유효 성분을 분리, 정제하여 실험할 필요성이 대두된다.

요 약

마, 꿀풀 추출물의 용매 분획별 구강병인균에 대한 항균 및 항우식 효과를 알아본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. *S. mutans*에 대한 마, 꿀풀 핵산 추출물의 상대성장률과 산 생성 억제 및 GTase 활성 저해효과를 알아본 결과, 마 핵산 추출물의 0.25 mg/ml 농도에서 100%, 꿀풀 핵산 추출물의 0.5 mg/ml 농도에서 100% 성장을 억제하였다. 따라서 농도가 증가함에 따라 성장이 억제되는 것을 볼 수 있었다. 2.0 mg/ml 농도에서 마가 pH 7.2, 꿀풀이 pH 7.0로 나타나 pH 5.6, pH 5.2인 대조군과 비교하여 볼 때 마, 꿀풀 핵산 추출물을 첨가물이 산 생성을 억제하여 중성으로 보여주고 있으며, GTase

활성 저해효과는 마와 꿀풀의 핵산 추출물의 2.0 mg/ml농도에서 35%, 25%로 각각 활성을 저해하였다.

참고문헌

- 한만덕, 김영권: 구강미생물학. 고문사, pp. 227, 1998.
- 조응휘: 위상차현미경(Phase contrast microscope)을 이용한 구강 미생물검사와 응용법. 치과연구 21(3): 37-44, 1987.
- Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ: Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. Infect Immun 11(6): 1252-1260, 1975.
- Hamada S, Koga T, Ooshima T: Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. J Dent Res 63(3): 407-411, 1984.
- Hanada N, Takehara T: (1-3)-alpha-D-glucan synthase from *Streptococcus mutans* AHT(serotype g) does not synthesise glucan without primer. Carbohydr Res 168(1): 120-124, 1987.
- Hamada S, Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44(2): 331-384, 1980.
- Kozai K, Miyake Y, Kohda H, Kametaka S, Yamasaki K, Suginata H, Nagasaka N: Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and ursolic acid. Caries Res 21(2): 104-108, 1987.
- Gibbons RJ, Houte JV: Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu Rev Microbiol 29: 19-44, 1975.
- 이현옥: 고삼추출물의 항우식효과와 세포독성. 대한구강보건학회지 25(4): 333-343, 2001.
- 유용욱, 유현희, 김윤정, 유미선, 서세정, 이황, 이흥수: 소목(*Caesalpinia sappan*)추출물의 *Streptococcus mutans*에 대한 성장, 산생성, 부착 및 비수용성 글루칸 합성 억제에 미치는 영향. 대한구강보건학회지 27(2): 277-287, 2003.
- 손광진, 이순애, 이기돈, 김영삼, 전재규, 장기완: 오이풀 추출물이 *mutans streptococci*의 성장과 hydroxyapatite beads에의 부착에 미치는 효과. 대한구강보건학회지 28(1): 97-104, 2004.
- 김신규, 김종배, 장기완, 전재규, 송주희: 호장근의 항세균 효과 및 항부착효과. 대한구강보건학회지 29(1): 80-89, 2005.
- 이위영, 안진권, 권영진: 목본식물로부터 *Streptococcus mutans*균 증식억제 및 Glucosyltransferase 활성 억제수종의 탐색. 산림과학논문집 65: 30-46, 2002.
- 박정순, 신용서, 류일환, 이갑상: Aloe vera peel 추출물의 *Streptococcus mutans* JC-2에 대한 항균활성(I). 한국식품영양학회지 13(2): 139-145, 2000.
- 박정순, 신용서, 이갑상, 강인호, 김선호: (+)-Catechin이 *Streptococcus mutans* JC-2의 glucosyltransferase의 활성 및 세포막투과성에 미치는 영향. 대한구강보건학회지 21(2): 245-253, 1997.

(Received January 22, 2007; Accepted March 21, 2007)

