

솔잎 및 소나무 가지 추출물의 항충치 활성 및 glucosyltransferase 억제 효과

최희돈* · 고윤정 · 최인욱 · 김윤숙 · 박용곤

한국식품연구원

Anticariogenic Activity and Glucosyltransferase Inhibitory Effects of Extracts from Pine Needle and Twig

Hee-Don Choi, Yoon-Jeoung Koh, In-Wook Choi, Yun-Sook Kim and Yong-Kon Park

Korea Food Research Institute

Abstract To investigate anticariogenic effects of extracts from pine needles and twigs, we measured the extracts' antimicrobial activities against *Streptococcus mutans*, their glucosyltransferase (GTase) inhibitory effects and their stabilities under various conditions of heat and pH. The 70% ethanol extracts of pine needles and twigs showed greater antimicrobial activities against *S. mutans* than the hot water extracts, and the pine twig extracts showed greater antimicrobial activity than the pine needle extracts. More specifically, the *n*-hexane fractions of the pine needles and twigs had the greatest effects against *S. mutans*, and their minimal inhibition concentration (MIC) was 0.6 mg/mL. The results of the extracts' GTase inhibitory effects indicated that the 70% ethanol extracts had greater effects than hot water extracts, and the pine twig extracts showed greater effects than the pine needle extracts. The antimicrobial activity against *S. mutans* for the pine needle *n*-hexane fraction was greatly reduced as temperature increased, and was also largely affected by changes in pH. These results suggest that extracts from pine needles and twigs have anticariogenic effects and could be used as anticariogenic food additives.

Key words: anticariogenic effect, pine needle, pine twig, antimicrobial activity, *Streptococcus mutans*, glucosyltransferase

서 론

충치(dental caries, 치아우식증)는 치아의 파괴를 동반한 감염성 질환으로 치석(plaque) 내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의해 유발되는 다인성 질환이다. 치석내 세균 중에서도 *Streptococcus mutans*가 주요 원인균이며(1,2), 이 균은 치면의 피막에 부착한 후 자신이 생산하는 glucosyltransferase(GTase)에 의하여 음식물 중의 sucrose로부터 불용성 glucan을 합성한다. 합성된 glucan은 치면에서 증식하는 세균 간의 결합을 증가시키며, 치면에 부착한 *S. mutans*는 당질 대사과정에서 lactic acid 등 유기산을 생성하여 치아의 enamel질을 탈회(decalcification)시켜 충치를 유발한다(2-4).

최근 충치를 효과적으로 예방하기 위하여 *S. mutans*의 증식을 억제하는 기능, 그리고 sucrose로부터 glucan 합성에 관여하는 GTase 활성 저해 기능을 갖는 항충치 물질의 검색이 활발히 이루어지고 있으며, 특히 천연물을 이용한 탐색이 많이 시도되고 있다. You 등(5)은 20여종의 생약재와 향신료로부터 정유와 에탄올 추출물을 제조하여 이들의 *S. mutans*에 대한 항균력과 GTase 활성 저해 효과를 측정하여 oregano의 정유가 탁월한 효과가 있

음을 보고하였고, Choi 등(6)도 여러 가지 생약재의 항충치 효과를 측정하여 감초박 추출물의 항충치 효과가 가장 우수하였고 이때 chloroform 분획이 강력한 효과를 나타냄을 보고한 바 있다. Park 등(7)은 40여종의 생약재의 항충치 효과를 탐색한 결과 팔각향과 공사인의 효과가 가장 우수하다고 보고하였으며, 이외에도 후박피(8), 황련(9), 감국(10), 애사과(11), *Curcuma xanthorrhiza*(12), 감잎, cacao bean 등 많은 천연물의 항충치 효과가 보고되어 있다. 특히 Endo 등(13)은 *Aspergillus terreus* M 3328 배양액으로부터 불용성 glucan 생성을 억제하는 glycoprotein 성분을 분리하여 Mutastein이라 명하고 이를 산염화하였고, 또 녹차 폴리페놀의 항충치 효과(14)를 이용한 제품인 녹차 추출물이 치약 등의 제품에 이용되는 등 항충치 효능을 갖는 소재 및 제품들이 상품화되고 있다.

소나무(*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.)는 한국, 일본, 만주 등의 극동지방에 자생하는 상록성 침엽수로서 예로부터 잎, 솔방울, 꽃가루, 송진, 껍질 등 모든 부위가 구황식물로 이용되었으며, 솔잎은 한방 또는 민간요법으로 솔잎차, 솔잎술, 솔잎즙이나 솔잎주스 그리고 솔잎송편을 만들어 신경통, 당뇨병, 고혈압, 피부질환 등의 성인병 치료에 사용되는 등 약용 및 건강식품으로 이용되어 왔다. 솔잎의 생리활성 관련 연구도 많이 이루어져 항산화(15, 16), 면역활성 증진(17), 항비만(18), 지질대사에 미치는 영향(19), 뇌조직의 acetylcholine esterase의 활성화에 미치는 영향(20) 등에 관한 연구가 보고되어 있다. 특히 솔잎의 병원성 및 식중독 미생물에 대한 항균효과에 관한 연구(21-24)가 상당히 많이 이루어져 있으며, Kuk 등(25)은 솔잎 내에 다량 함유되어 있는 benzoic acid

*Corresponding author: Hee-Don Choi, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Kyonggi-do 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9068
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: chdon@kfri.re.kr
Received January 29, 2007; accepted April 26, 2007

가 강력한 항균활성을 나타낸다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 주변에서 손쉽게 얻을 수 있으면서 강력한 항균활성을 나타내는 솔잎을 이용한 항충치 효능 소재의 개발을 위한 기초자료를 제공하기 위하여 솔잎의 항충치 효과를 탐색하였고 이때 솔잎 채취시 함께 채취되는 소나무 가지의 항충치 효과를 함께 검토하였으며, 이를 상품화된 제품인 녹차 추출물과 비교하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 솔잎과 소나무 가지는 경북 봉화군의 야산에서 자생하고 있는 춘향목의 가지 부위를 채취하여 솔잎과 가지로 부위를 구분하여 사용하였으며, -20°C의 냉동고에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 항충치 효능 분석을 위한 대조물질로서 polyphenol 함량이 95%인 녹차추출물 [(주)청우화학, 서울]을 구입하여 사용하였다.

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 충치관련 균주로 *Streptococcus mutans* (KFRI 1171, 1175)를 한국식품연구원으로부터 분양받아 brain heart infusion(BHI) broth에 접종하여 37°C shaking incubator에서 3회 계대배양하여 사용하였다. BHI 배지는 Difco Co. (Detroit MI, USA) 제품을 사용하였다.

추출물 제조 및 추출물의 분획

채취한 솔잎과 가지를 깨끗이 세척한 후 3~4 cm 크기로 절단하여 추출물 제조에 사용하였으며, 환류 냉각관이 부착된 flask 내에 시료를 넣고 열수 추출물과 70% EtOH 추출물을 제조하였다. 열수추출물은 시료 200 g에 증류수 2 L를 가하여 90°C에서 1 시간 추출하고 여과하여 여액을 진공농축기로 감압농축한 후 동결건조하여 얻었으며, 70% EtOH 추출물은 시료 200 g에 70% EtOH 2 L를 가하여 50°C에서 1 시간 추출하고 여과하여 여액을 진공농축기로 감압농축한 후 동결건조하여 얻었다.

항충치 효과가 뛰어난 70% EtOH 추출물을 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol로 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 각 추출물을 얻었다.

충치균에 대한 항균력 측정

70% EtOH 추출물 및 각 용매별로 분획한 분획물의 항균력은 액체배지 희석법(broth dilution method)(26)으로 측정하였다. BHI broth 9 mL에 *S. mutans* 배양액 50 μ L를 접종하고 각 농도별 시료를 1 mL 첨가 후, 37°C incubator에서 24시간 배양하고 550 nm에서 흡광도를 측정하여 균에 대한 저해율을 계산하였다. 이때 균의 증식이 관찰되지 않는 최소 농도를 최소저해농도(minimum inhibition concentration, MIC)로 하였다.

Inhibition ratio (%) =

$$\frac{[(\text{Control-control blank}) - (\text{Sample-sample blank})] \times 100}{\text{Control-control blank}}$$

또한 용매별로 분획한 분획물의 *S. mutans*에 대한 항균력을 측정하기 위하여 디스크 확산법(27)을 실시하였다. 멸균한 BHI agar 20 mL에 *S. mutans* 배양액 10 μ L를 접종하여 petri dish에서 균현 후, 멸균된 paper disc(직경 8 mm)를 plate에 놓고 일정 농도의 분획물을 2.5 mg/disc의 농도로 disc에 20 μ L씩 흡수시키고 37°C

incubator에서 24시간 배양시켰다. 배양 후 disc 주변에 생성된 clear zone의 크기를 비교하였다.

GTase 활성 억제효과

각 시료의 GTase에 의한 glucan의 합성을 저해하는 정도를 비교하기 위하여 Miyoshi 등의 방법(28)을 사용하였다. *S. mutans* 배양액을 4°C에서 8,000 rpm, 5분간 원심분리시킨 후 그 상침액을 취하여 여과지(Whatman paper No. 2)로 여과하고, 그 여액을 1 N NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하고 다음 sodium azide를 0.02% 첨가하여 GTase 조효소액을 제조하였다. 조효소액 0.5 mL에 2% sucrose 1 mL와 농도별 시료 0.05 mL를 첨가하고 37°C, 24시간 반응시킨 후 vortex하여 생성된 glucan을 분산시키고 660 nm에서 탁도를 측정하여 sucrose 무첨가군과 비교한 상대치로 glucan 생성 억제 정도를 측정하였다.

솔잎의 *n*-hexane 분획의 열, pH 안정성

충치균에 대해 높은 항균력을 나타낸 솔잎의 *n*-hexane 분획의 열과 pH에 대한 안정성을 확인하기 위하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 열 안정성 확인을 위해서 우선 *n*-hexane 분획을 소량의 70% EtOH로 용해한 후 증류수를 첨가하여 현탁시킨 시료를 각각 30, 50, 70, 90°C에서 2시간 동안 열처리한 후, 동결건조하여 항균력을 측정하였다. pH 안정성은 분획을 70% EtOH로 용해한 후 증류수를 첨가하여 현탁시킨 시료를 0.05 N NaOH와 HCl을 이용하여 각각 pH 3, 5, 7, 9, 11로 조정하고 30°C에서 2 시간 반응시키고 다시 pH 7로 중화한 후에 동결건조하여 항균력을 측정하였다. 이때 어떠한 처리도 하지 않은 *n*-hexane 분획을 대조군으로 하였다. 이렇게 해서 얻어진 시료의 항균력은 액체배지 희석법으로 측정하였으며, 모든 시료의 농도는 0.8 mg/mL로 실험하였다.

통계처리

3회 반복실험을 하였고 SAS (Statistical Analysis System)를 사용하여 각 처리구의 평균과 표준편차를 산출하고 분산분석을 행한 후 Duncan's multiple range test로 각 처리구 간의 유의성을 검증하였다(29).

결과 및 고찰

솔잎 및 가지 추출물의 충치균에 대한 생육저해 효과

*S. mutans*에 대한 솔잎 및 가지 추출물의 항균효과를 검증하기 위하여 채취한 솔잎과 가지를 사용하여 열수추출물과 70% EtOH 추출물을 제조하였으며, 이때의 추출 수율 결과는 Table 1과 같다. 열수추출물, 70% EtOH 추출물 모두 가지의 4.3±0.2, 5.7±0.3%에 비해 솔잎에서 9.5±0.8, 10.8±1.0%로 솔잎에서의 추출 수율이 크게 높았으며, 열수추출물 보다는 70% EtOH 추출물의 추출 수율이 약간 높은 것으로 나타났다. 솔잎과 가지의 열수추출물과 70% EtOH 추출물의 충치균에 대한 생육저해효과를 액체배지 희석법으로 조사한 결과는 Table 2와 같다. 솔잎의 경우 열수추출물은 5, 10, 20 mg/mL의 처리농도에서 2종의 충치균 (*S. mutans* KFRI 1171, 1175)에 대해 각각 0.0±0.0~12.1±4.2%와 4.5±3.0~35.2±4.3%의 저해율을, 70% EtOH 추출물은 각각 5.0±3.4~99.1±2.9%와 1.4±1.9~96.3±6.4%의 저해율을 나타내어 열수추출물보다는 70% EtOH 추출물이 충치균에 대해 높은 생육저해효과를 나타내었다. 가지의 경우에도 솔잎과 마찬가지로 70% EtOH 추출물의 생육저해효과가 높았다. 특히 70% EtOH 추출물

Table 1. Yields of extracts from pine needle and twig

Extracts		Yield (%)
Needle	Hot water	9.5 ± 0.8 ^a
	70% EtOH	10.8 ± 1.0 ^a
Twig	Hot water	4.3 ± 0.2 ^b
	70% EtOH	5.7 ± 0.3 ^b

¹⁾Each value represents mean ± S.D.

²⁾Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

의 경우 5, 10, 20 mg/mL의 처리농도에서 *S. mutans* KFRI 1171에 대해 각각 42.2 ± 6.3, 95.2 ± 5.4, 98.3 ± 2.7%의 저해율을, *S. mutans* KFRI 1175에 대해서는 각각 20.7 ± 5.8, 95.4 ± 5.0, 101.5 ± 2.3%의 저해율을 나타내어 가장 우수한 생육저해효과를 나타내었으며, 상품화된 녹차추출물 보다도 더 높은 저해 효과를 나타내었다. 또한 *S. mutans* KFRI 1175에 대해서 솔잎 및 가지 추출물의 최소저해농도를 측정된 결과는 Table 3과 같다. 솔잎과 가지의 열수추출물의 경우 30 mg/mL 이상의 MIC를 나타낸 반면 70% EtOH 추출물은 각각 20 mg/mL와 10 mg/mL로서 Table 2의 결과와 마찬가지로 열수추출물에 비해 70% EtOH 추출물의 증치균에 대한 생육저해효과가 크게 높았으며, 또한 솔잎 보다는 가지의 70% EtOH 추출물의 생육저해효과가 더 높은 것으로 나타났다. 한편 녹차 추출물은 25 mg/mL의 MIC를 나타내어 솔잎과 가지의 열수추출물 보다는 높지만 70% EtOH 추출물 보다는 낮은 생육저해 효과를 나타내었다.

솔잎 및 가지 추출물의 GTase 활성저해 효과

솔잎과 가지의 열수추출물과 70% EtOH 추출물이 *S. mutans*가 생성하는 GTase 활성에 미치는 영향에 대하여 조사하였으며, 그 결과는 Table 4와 같다. 솔잎의 경우 열수추출물은 2, 10 mg/mL의 처리농도에서 2종의 증치균(*S. mutans* KFRI 1171, 1175)의 조효소액에 대해 각각 21.9 ± 4.9, 63.4 ± 9.4%와 66.1 ± 10.7, 80.5 ± 7.7%의 GTase 활성 저해율을, 70% EtOH 추출물은 각각 86.8 ± 8.2, 98.7 ± 4.4%와 76.8 ± 9.6, 91.3 ± 4.9%의 저해율을 나타내어 열수추출물보다는 70% EtOH 추출물이 높은 GTase 활성 억제 효과를 나타내었다. 가지의 경우에도 솔잎과 마찬가지로 70% EtOH 추출물이 각각 65.1 ± 5.9, 94.0 ± 4.0%와 77.3 ± 10.2, 93.8 ± 7.7%의 저해율을 나타내어 열수추출물의 39.0 ± 7.3, 48.8 ± 8.3%와 66.8 ± 3.7, 91.5 ± 4.3%에 비해 다소 높은 GTase 활성 억제 효과를 나타내었다. 한편 녹차 추출물은 2종의 증치균의 조효소액에 대해 각각 74.0 ± 6.7, 91.3 ± 3.8%와 94.0 ± 4.3, 96.9 ± 3.0%의 GTase 활성 저해율을 나타내어 솔잎 및 가지의 열수 및 70% EtOH 추출물

Table 3. Minimal inhibition concentration (MIC) of extracts from pine needle and twig against *Streptococcus mutans* KFRI 1175

Extracts		MIC (mg/mL)
Needle	Hot water	30 <
	70% EtOH	20
Twig	Hot water	30
	70% EtOH	10
Green tea		25

에 비해 GTase 활성 억제 효과가 다소 높았지만 솔잎 추출물도 상당히 높은 수준의 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. Hattori 등(14)은 녹차 잎에서 분리된 축합형 탄닌이 GTase 활성 억제에 우수한 효과가 있음을 보고하였고, Nakahara 등(30)도 녹차를 발효한 우롱차에 축합형 탄닌이 많이 생성되고 이들의 GTase 활성 억제 효과에 대해 보고하였다. 또한 Matsumoto 등(31)은 우롱차의 축합형 탄닌이 *S. mutans*의 C-말단의 glucan 결합 부위에 대해 비경쟁적 저해를 함으로써 GTase 활성을 억제한다고 보고하였다. Jerez 등(32)과 Rohr 등(33)은 소나무(*Pinus pinaster*와 *Pinus radiata*) 껍질의 주요 폴리페놀이 catechin과 epicatechin 그리고 이들의 에스터화된 유도체로 구성된 축합형 탄닌이라고 보고한 결과로 볼 때 본 연구에 사용한 솔잎과 가지의 주요 폴리페놀도 축합형 탄닌일 것으로 추정되며, 이들 성분이 GTase 활성 억제에 우수한 효과를 나타낸 것으로 판단된다.

솔잎 및 가지의 용매 분획의 항증치 효과

우수한 증치균 생육저해 효과를 나타낸 솔잎과 가지의 70% EtOH 추출물을 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 등의 용매로 극성 차이에 따라 순차 분획하고 각 분획물의 *S. mutans*에 대한 생육 억제 효과를 액체배지 회석법과 디스크 확산법으로 측정하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 솔잎과 가지의 각종 용매 분획과 녹차 추출물의 *S. mutans*에 대한 생육 억제 효과를 비교한 결과 솔잎과 가지 모두 *n*-hexane 분획이 5, 10 mg/mL의 처리농도에서 각각 98.9 ± 2.2, 97.9 ± 3.5%와 97.8 ± 1.8, 98.1 ± 3.3%의 저해율을 기타 분획 및 녹차 추출물에 비해 유의적으로 높은 저해효과를 나타내었고, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol 분획의 순으로 저해효과를 나타내어 솔잎 및 가지의 EtOH 추출물의 증치균 생육 억제 효과는 극성보다 비극성 물질에 의한 것으로 판단된다. 솔잎과 가지의 *n*-hexane 분획의 *S. mutans*에 대한 최소저해농도를 측정된 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 0.6 mg/mL의 최소저해농도를 나타내었다. 또한 솔잎과 가지의 *n*-hexane 분획과 chloroform 분획의 *S. mutans*에 대한 항균성을 디스크 확산

Table 2. Inhibitory effects of extracts from pine needle and twig against *Streptococcus mutans*

(Inhibition rate : %)

Extracts	<i>S. mutans</i> KFRI 1171 (mg/mL)			<i>S. mutans</i> KFRI 1175 (mg/mL)			
	5	10	20	5	10	20	
Needle	Hot water	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	12.1 ± 4.2 ^d	4.5 ± 3.0 ^c	12.5 ± 4.4 ^d	35.2 ± 4.3 ^c
	70% EtOH	5.0 ± 3.4 ^b	74.3 ± 4.8 ^a	99.1 ± 2.9 ^a	1.4 ± 1.9 ^c	57.7 ± 8.4 ^{bc}	96.3 ± 6.4 ^a
Twig	Hot water	9.5 ± 4.4 ^b	36.8 ± 5.5 ^d	41.6 ± 3.9 ^c	13.0 ± 6.0 ^{bc}	46.6 ± 7.1 ^c	57.0 ± 8.0 ^b
	70% EtOH	42.2 ± 6.3 ^a	95.2 ± 5.4 ^a	98.3 ± 2.7 ^a	20.7 ± 5.8 ^b	95.4 ± 5.0 ^a	101.5 ± 2.3 ^a
Green tea		42.2 ± 8.1 ^a	53.5 ± 8.4 ^c	85.7 ± 4.5 ^b	38.7 ± 5.3 ^a	62.6 ± 6.2 ^b	92.1 ± 8.8 ^a

¹⁾Each value represents mean ± S.D.

²⁾Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Inhibitory effects of extracts from pine needle and twig against the activity of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* (Inhibition rate: %)

Extracts		<i>S. mutans</i> KFRI 1171 (mg/mL)		<i>S. mutans</i> KFRI 1175 (mg/mL)	
		2	10	2	10
Needle	Hot water	21.9 ± 4.9 ^d	63.4 ± 9.4 ^b	66.1 ± 10.7 ^b	80.5 ± 7.7 ^b
	70% EtOH	86.8 ± 8.2 ^a	98.7 ± 4.4 ^a	76.8 ± 9.6 ^{ab}	91.3 ± 4.9 ^{ab}
Twig	Hot water	39.0 ± 7.3 ^c	48.8 ± 8.3 ^b	66.8 ± 3.7 ^b	91.5 ± 4.3 ^{ab}
	70% EtOH	65.1 ± 5.9 ^b	94.0 ± 4.0 ^a	77.3 ± 10.2 ^{ab}	93.8 ± 7.7 ^{ab}
Green tea		74.0 ± 6.7 ^{ab}	91.3 ± 3.8 ^a	94.0 ± 4.3 ^a	96.9 ± 3.0 ^a

¹⁾Each value represents mean ± S.D.

²⁾Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

Table 5. Inhibitory effects of solvent fractions from 70% EtOH extract of pine needle and twig against *Streptococcus mutans* KFRI 1175

Extraction solvents	Inhibition rate (%)		
	5 mg/mL	10 mg/mL	
Needle	<i>n</i> -Hexane	98.9 ± 2.2 ^a	97.9 ± 3.5 ^a
	Chloroform	47.3 ± 5.1 ^b	46.4 ± 4.3 ^{cd}
	Ethyl acetate	26.7 ± 5.8 ^c	55.8 ± 4.7 ^{bc}
	<i>n</i> -Butanol	16.7 ± 7.6 ^{cd}	54.5 ± 5.7 ^{bc}
Twig	<i>n</i> -Hexane	97.8 ± 1.8 ^a	98.1 ± 3.3 ^a
	Chloroform	50.1 ± 5.5 ^b	66.7 ± 5.6 ^b
	Ethyl acetate	17.1 ± 3.5 ^{cd}	29.4 ± 10.8 ^e
	<i>n</i> -Butanol	9.2 ± 4.5 ^d	33.6 ± 9.0 ^d
Green tea		38.7 ± 5.3 ^b	62.6 ± 6.2 ^b

¹⁾Each value represents mean ± S.D.

²⁾Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

Table 6. Minimum inhibition concentration (MIC) of *n*-hexane fraction from pine needle and twig against *Streptococcus mutans* KFRI 1175

	Parts	MIC (mg/mL)
<i>n</i> -Hexane fraction	Needle	0.6
	Twig	0.6

법으로 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 솔잎과 가지의 chloroform 분획은 clear zone을 형성하지 않은 반면 *n*-hexane 분획은 약 20~25 mm의 clear zone을 형성하여 액체배지 희석법과 유사한 경향을 나타내었다. Cho 등(34)은 EtOH, *n*-hexane, diethyl ether 등의 용매로 솔잎, 가지, 순을 추출하여 향기성분을 분석한 결과 *n*-hexane에서 휘발성 성분이 가장 많이 검출되었고 β -pinene, limonene, α -pinene 등이 주요 성분이라고 하였으며, Kim과 Shin(35)은 솔잎의 향기성분을 수증기 증류법으로 추출하여 병원성 미생물에 대한 항균성을 조사하여 솔잎 정유성분의 높은 항균성을 보고하였다. 이와 같이 식물의 정유성분은 지용성이면서 휘발성의 terpenes으로서 미생물에 대해 높은 생육억제 효과를 나타내기(36,37) 때문에 본 연구에서의 *n*-hexane 분획의 *S. mutans*에 대한 높은 생육억제 효과도 *n*-hexane에 의해 추출된 솔잎과 소나무 가지의 정유성분이 그 효과를 나타낸 것으로 판단된다. 한편 Table 7은 솔잎 및 가지의 *n*-hexane 분획이 *S. mutans*가 생성하는 GTase 활성에 대한 저해효과를 조사한 결과로서 1, 2, 10 mg/mL의 농도에서 솔잎 *n*-hexane 분획은 각각 52.6 ± 4.1, 95.8 ±

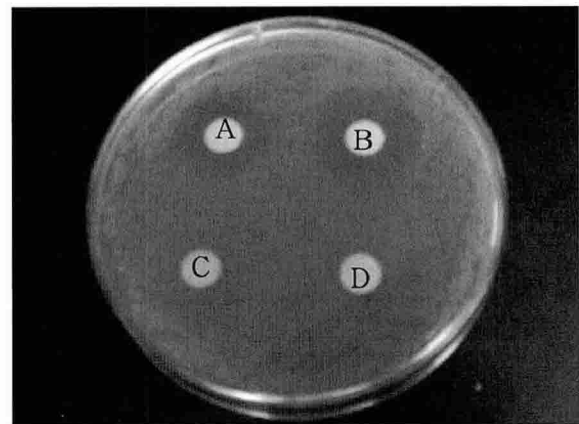


Fig. 1. Comparison of inhibitory zone formation of *n*-hexane and chloroform fraction from pine needle and twig against *Streptococcus mutans* KFRI 1175. A: *n*-hexane fraction of pine twig, B: *n*-hexane fraction of pine needle, C: chloroform fraction of pine twig, D: chloroform fraction of pine needle.

Table 7. Inhibitory effects of *n*-hexane fraction from pine needle and twig against the activity of GTase from *Streptococcus mutans* KFRI 1175 (Inhibition rate: %)

Parts	Concentration (mg/mL)			
	1	2	10	
<i>n</i> -Hexane fraction	Needle	52.6 ± 4.1 ^a	95.8 ± 2.3 ^a	97.3 ± 3.6 ^a
	Twig	60.1 ± 7.5 ^a	92.7 ± 5.7 ^a	96.5 ± 6.2 ^a
Green tea		-	94.0 ± 4.4 ^a	96.9 ± 3.0 ^a

¹⁾Each value represents mean ± S.D.

²⁾Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

2.3, 97.3 ± 3.6%, 가지 *n*-hexane 분획은 각각 60.1 ± 7.5, 92.7 ± 5.7, 96.5 ± 6.2%의 저해율을 나타내어 거의 유사한 효과를 나타내었고 또한 녹차 추출물과 거의 유사한 GTase 저해효과를 나타냄을 알 수 있었다.

이상의 실험을 통하여 솔잎 및 가지 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균작용과 GTase의 활성에 대한 억제효과 등의 항충치 효과를 조사한 결과 70% EtOH 추출물의 효과가 우수하였고 *S. mutans*에 대한 항균작용의 경우 상업화된 소재인 녹차 추출물 보다도 우수한 활성을 나타내어 항충치 소재로서의 활용 가능성이 크다고 생각된다. 70% EtOH 추출물을 여러 가지 용매로 순차분획 하였을 때 특히 *n*-hexane 분획이 *S. mutans*에 대한 항균작용

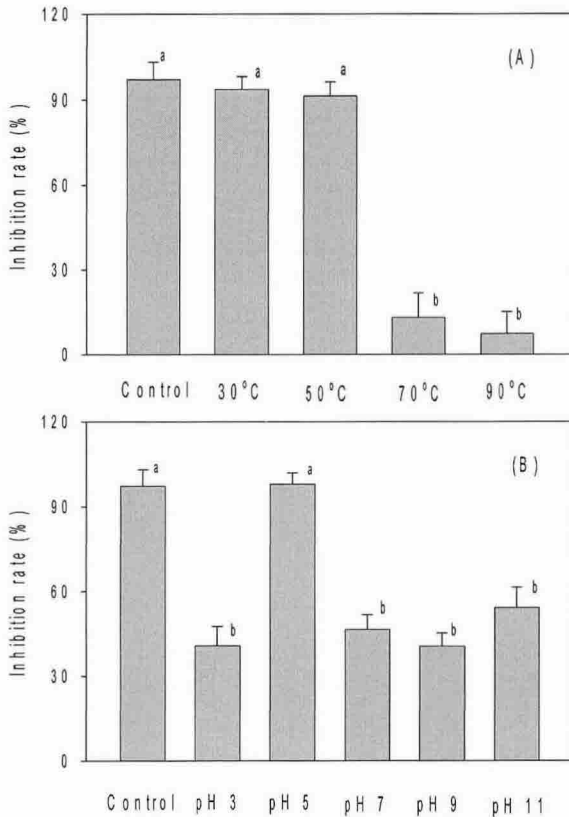


Fig. 2. Effect of heat (A) and pH (B) treatment on inhibitory activity of *n*-hexane fraction from pine needle against *Streptococcus mutans* KFR1 1175. Different letters mean significant difference ($p < 0.05$).

이 매우 높았으며, GTase에 대한 저해 활성도 높은 것으로 나타나 *n*-hexane 분획의 정유성분이 솔잎 및 가지의 항충치 효과의 주요한 원인물질인 것으로 판단된다. 이외에 솔잎 및 가지에 함유된 축합형 탄닌 성분도 GTase 활성 억제에 크게 기여하는 등 정유성분과 축합형 탄닌 등의 성분들의 복합적인 작용에 의해 솔잎 및 가지의 항충치 효과가 나타나는 것으로 생각된다.

솔잎의 *n*-hexane 분획의 열, pH 안정성

*S. mutans*에 대해 높은 생육억제 효과를 나타낸 *n*-hexane 분획의 열과 pH에 대한 안정성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 30°C와 50°C로 처리한 *n*-hexane 분획의 *S. mutans*에 대한 항균력은 각각 93.9±4.0%, 91.4±5.1%로 무처리한 *n*-hexane 분획의 97.3±5.8%와 거의 유사한 값을 나타내었으나, 70°C와 90°C에서는 각각 13.0±8.7%, 7.3±7.8%로 항균력이 현저히 감소하여 열처리 온도가 증가함에 따라 *n*-hexane 분획의 열안정성이 크게 감소함을 알 수 있었다. 한편 *n*-hexane 분획을 여러 범위의 pH로 처리하였을 때 pH 5에서 97.9±4.1%의 항균력을 나타내어 안정하였지만 나머지 pH에서는 항균력이 50% 전후로 상당히 감소하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 솔잎의 *n*-hexane 분획의 항균력이 열처리 온도와 pH에 크게 영향 받음을 알 수 있었다.

요 약

솔잎과 소나무 가지의 항충치 효과와 기능성 소재로서의 활용 가능성을 조사하기 위하여 추출물과 용매 분획의 *S. mutans*에 대

한 항균효과, GTase 활성 억제효과 그리고 열과 pH에 대한 안정성을 측정하였다. 열수추출물 보다는 70% EtOH 추출물이, 솔잎 보다는 가지 추출물이 *S. mutans*에 대한 생육저해 효과가 큰 것으로 나타났으며, 특히 *n*-hexane 분획의 MIC는 0.6 mg/mL로서 *S. mutans*에 대해 가장 높은 항균효과를 나타내었다. 그리고 솔잎과 가지 추출물의 GTase 활성 억제 효과는 *S. mutans*에 대한 생육 억제 효과 결과와 마찬가지로 열수추출물 보다는 70% EtOH 추출물이, 솔잎 보다는 가지 추출물이 GTase 활성 억제 효과가 큰 것으로 나타났다. 한편 솔잎의 *n*-hexane은 열처리 온도가 증가함에 따라 *S. mutans*에 대한 항균력이 크게 감소하였고 pH의 변화에도 크게 영향받는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 봉화군청의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Hamada S, Ooshima T, Torii M, Imanishi H, Masuda N, Mizuno J, Sobue S, Kotani S. Dental caries induction in experimental animals by clinical strains of *Streptococcus mutans* isolated from Japanese children. *Microbiol. Immunol.* 22: 301-314 (1978)
- Mosci F, Perito S, Bassa S, Capuano A. The role of *Streptococcus mutans* in human caries. *Minerva Stomatol.* 39: 413-429 (1990)
- Gibbons RJ, Van Houte J. On the formation dental plaque. *J. Periodontol.* 44: 347-360 (1973)
- McGhee JR, Michalek SM. Immunology of dental caries: microbial aspects and local immunity. *Ann. Rev. Microbiol.* 135: 595-638 (1981)
- You YS, Park KM, Kim YB. Antimicrobial activity of some medical herbs and species against *Streptococcus mutans*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 187-191 (1993)
- Choi IW, Jung CH, Park YK. Anticariogenic activities of various plant extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 1221-1225 (2003)
- Park YM, Kim SJ, Jo KH, Yang EJ, Jung ST. Anticariogenic and antioxidant activities from medical herbs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 284-293 (2006)
- Lee YS, Park HJ, You JS, Park HH, Kwon IB, Lee HY. Isolation of an anticariogenic compound from Magnoliae bark. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 230-236 (1998)
- Jang GH, Ahn BY, Oh SH, Choi DS, Kwon YJ. Anticariogenic effects of *Coptis chinensis* Franch extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1396-1402 (2000)
- Kim SJ, Park YM, Jung ST. Anticariogenic effects and inhibition of glucosyltransferase activity of *Chrysanthemum indicum* L. extracts. *Korean J. Food Culture* 20: 341-345 (2005)
- Yoon SY, Kim SH, Chung HL, Lee JJ, Huh CS, Baek YJ. Anticariogenic effects of unripe apple extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 168-173 (2000)
- Hwang JK, Shim JS, Baek NI, Pyun YR. Xanthorrhizol: a potential antibacterial agent from *Curcuma xanthorrhiza* against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* 66: 196-197 (2000)
- Endo A, Hayashida O, Murakawa S. Mutastain: A new inhibitor of adhesive-insoluble glucan synthesis by glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *J. Antibiot.* 36: 203-207 (1983)
- Hattori M, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 717-720 (1990)
- Boo YC, Jeon CO, Oh JY. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone from pine needles as an antioxidative. *Agric. Chem. Biotechnol.* 37: 310-314 (1994)
- Kim SM, Cho YS, Sung SK, Lee IG, Lee SH, Kim DG. Antioxidative and nitrite scavenging activity of pine needle and green tea

- extracts. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 22: 13-19 (2002)
17. Choi HS, Hang D, Kang SC, Sohn ES, Lee SP, Pyo SK, Son EW. Immunomodulatory activity of pine needle (*Pinus densiflora*) extracts in macrophages. J. Food Sci. Nutr. 11: 105-109 (2006)
 18. Jeon JR, Kim JY, Lee KM, Cho DH. Anti-obese effects of mixture contained pine needle, black tea, and green tea extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 48: 375-381 (2005)
 19. Kim JD, Yoon TH, Choi M, Im KJ, Ju JS, Lee SY. Effect of dietary supplementation with pine leaf on lipid parameters in rat. Korean J. Gerontol. 1: 47-50 (1990)
 20. Choi JH, Kim DI, Park SH, Back SJ, Kim NJ, Cho WK, Kim KJ, Kim HS. Effects of pine needle ethyl acetate fraction on acetylcholine (ACh) and its related enzymes in brain of rats. Korean J. Nutr. 37: 95-99 (2004)
 21. Choi MY, Choi EJ, Lee E, Rhim TJ, Cha BC, Park HJ. Antimicrobial activities of pine needle (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.) extract. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 293-297 (1997)
 22. Kim YS, Shin DH. Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora* S. et Z.) extracts. Food Microbiol. 22: 37-45 (2005)
 23. Park CS. Antibacterial activity of ethanol extract of pine needle against pathogenic bacteria. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 5: 380-385 (1998)
 24. Park KN, Lee SH. Antimicrobial activity of pine needle extract and horseradish on the growth of *Vibrio*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 185-190 (2003)
 25. Kuk JH, Ma SJ, Park KH. Isolation and characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 204-210 (1997)
 26. Lim CM, Kyung KH, Yoo YI. Antimicrobial effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). Korean J. Food Sci. Technol. 19: 54-60 (1987)
 27. Conner DE, Beuchat LR. Effect of essential oil from plants on growth of food spoilage yeasts. J. Food Sci. 49: 429-434 (1984)
 28. 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)
 29. SAS Institute, Inc. SAS User's guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1993)
 30. Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K, Tanaka T, Ooshima T, Hamada S. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans Streptococci. Appl. Environ. Microb. 59: 968-973 (1993)
 31. Matsumoto M, Hamada S, Ooshima T. Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. FEMS Microbiol. Lett. 228: 73-80 (2003)
 32. Jerez M, Pinelo M, Sineiro J, Nunez MJ. Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. Food Chem. 94: 406-414 (2006)
 33. Rohr GE, Meier B, Sticher O. Analysis of procyanidins. Stud. Nat. Prod. Chem. 21: 497-570 (2000)
 34. Cho JE, Lee MJ, Lee YB, Yoon JR. Comparisons of volatile compounds of *Pinus densiflora* on kinds of extraction solvent and parts of pinus. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 973-979 (1999)
 35. Kim YS, Shin DH. Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora* S. et Z.) extracts. Food Microbiol. 22: 37-45 (2005)
 36. Burt S. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in food-a review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223-253 (2004)
 37. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control 18: 414-420 (2007)