

식물추출물에 의한 *Streptococcus mutans*의 생육 및 glucosyltransferase저해효과

박원재, 이형재, 전기봉, 서유탉

(태평양기술연구소)

The inhibitory Effects of Plant extracts on *Streptococcus mutans* and Glucosyltransferase

Won-Jae Park, Hyung-Jae Lee, Gi-Bung Jun And Yoo-Taek Seo

(Pacific R & D Center)

Abstract

Dental caries has been reported to be infectious disease by *Streptococcus mutans*(*S. mutans*). The ability of *S. mutans* to produce dental plaque has been shown to be related to glucan synthesis from sucrose by glucosyltransferase (GTase). Glucan is known to play an important role in the initiation of smooth surface caries.

For preventing dental caries by traditional medicines, two hundred kinds of natural products were assayed for inhibiting activity against *S. mutans* and GTase. During the assay course, we chose some active plants against *S. mutans* and GTase and then applied these plant extracts to toothpaste.

I. 서 론

일반적으로 구강내미생물 *S. mutans*가 충치초기단계에서 이균의 균체의효소인 GTase를 분비하고 이것이 sucrose로부터 glucan, 더 나아가서 plaque를 형성함으로써 충치 및 치주의 원인이 되는 것으로 알려져 있다¹⁻⁴⁾.

이러한 충치를 예방하기 위한 목적으로 penicillin, erythromycin, tetracycline, spiramycin과 같은 항생체나 chlorhexidine과 같은 항균제가 사용되고 있지만⁵⁻¹⁰⁾, 구강내에서 여러 부작용들이 있는 것으로 보고되어 있다¹⁰⁾. 또한 plaque형성에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 효소인 GTase를 저해하는 물질들의

연구가 최근 많이 시도되고 있는데, 특히 미생물이 생산하는 Mutastein¹⁰⁻¹⁴⁾과 Ribocitrin¹⁵⁾ 그리고 오배자(Melaphis chinensis(Bell))의 Gallotannin¹⁶⁾이 효과적인 GTase의 저해제로 알려져 있다. 본 연구자는 탁월한 충치예방효과가 있으면서도 부작용이 없는 충치예방물질을 개발하기 위한 목적으로, 200여종 식물의 물 및 methanol추출물들을 대상으로 *S. mutans*와 GTase저해효과에 대해 검색한 결과, 활성이 있는 몇몇 식물추출물들을 선정하였다.

II. 실험방법

1. 실험재료 및 시약

실험에서 사용한 재료는 서울경동시장으로 부터 구입한 상백피등 200여종 생약들이다. Aluminium hydroxide, sorbitol, chlorhexidine • digluconate, berberine 및 sodium lauryl sulfate(SLS), carboxymethyl cellulose(CMC)는 Sigma사에서, brain heart infusion(BHI)은 Difco Lab.(Detroit, Mich)에서 구입하였다. Methanol, ethanol, glycerol 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Mallinckridt사에게 구입하였다.

2. 실험방법

1) 추출방법

Methanol추출물제조 - 건조생약재 분쇄한 것 50 g 에 methanol 500ml를 가하여 실온에서 10일간 침적추출하여 여과한후, 그 여과액을 감압증발하여 methanol추출물을 얻었다.

물추출물제조 - 건조생약재 분쇄한 것 50 g 에 증류수 500ml를 가하여 3시간 환류추출하여 여과한후, 그 여과액을 감압증발하여 물추출물을 얻었다.

2) 항균력실험

(1) 실험균주

본 실험에 사용한 균들은 *S. mutans* ATCC 27351(serotype g)과 당 연구소에서 충치보유자들로부터 직접 분리한 wild type의 균주 및 서울대학교 치과대학 최선진교수로부터 분양받은 ATCC 25175(serotype c)등으로, 각실험균들은 Mitis salivarius(M.S)agar에 계대배양후 4°C에서 보관하며 사용하였고 stock균주는 BHI broth에서 배양한 배양액에 glycerol과 DMSO를 첨가하여 -70°C에서 보관하였다. 각종 항균력실험시 M.S. agar상의 균을 BHI broth에서 15~16시간 배양한 후, 각 실험에 사용하였다.

(2) 식물추출물의 항균력실험

각 시료들이 *S. mutans*에 대한 항균력은 agar dilution법에 의해 측정하

였다. 즉 BHI agar에 각 시료를 가해 적당농도로 희석한 후 petri-dish에 부어 굳힌 다음, BHI broth에서 15~16시간 배양한 *S. mutans*균을 1백금이 취하여 도말하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후, 균의 생육여부를 관찰하여 생육이 관찰되지 않는 가장 낮은 농도를 최소저지농도(minimum inhibitory concentration : MIC)로 하였다.

3) GTase저해활성실험

(1) GTase 분리 및 정제

S. mutans ATCC 25175를 8L의 BHI broth에서 37°C, 18시간 배양한 후 원심분리(7200×g, 20분)하여 균체를 제거하여 그 상등액을 ammonium sulfate로 60-70% 포화시킨 후 4°C에서 18시간 방치하였다. 이렇게하여 생성된 침전물을 원심분리(7200×g, 20분)하여 potassium phosphate buffer(KPB, 0.05M, pH6.5)200ml에 용해한 후 동일 buffer solution으로 24시간 dialysis시켰다. dialysis가 완료된 액을 다시 원심분리하여 불용물을 제거하고 얻은 crude enzyme를 hydroxyapatite로 충전된 column에 주입시킨후, 이온강도가 다른 동일 buffer solution을 단계적으로 용출시켜 정제된 GTase를 얻었다.

(2) 식물추출물의 GTase저해활성 측정

상기 방법에 의해 제조된 GTase 100μg, sucrose 70μg 및 0.02% NaN₃를 함유하는 0.05M KPB(pH6.5) 4ml에 각종 식물추출물액을 0, 10, 50, 100, 200ppm 되게 가하고 37°C에서 15시간동안 반응시킨 후, 생성된 글루칸을 Spectrophotometer에서의 absorbance(660nm)로서 측정하였다. 이 파장에서 absorbance의 감소는 glucan의 생성억제, 즉 GTase저해도에 비례한다.

GTase저해활성도는 다음식에 의해 구하였으며 reference solution의 absorbance(A)는 실험시킨 GTase를 사용한 반응액의 흡광도이다.

$$\text{Inhibition activity of GTase(\%)} = \left(1 - \frac{A \text{ sample solution}}{A \text{ referance solution}}\right) \times 100$$

4) 치약 base에서의 식물추출물의 항균 및 GTase저해활성실험

(1) 추출물제조

건조된 녹차(*Thea sinensis* L.)분쇄한것 95% 에탄올 1000ml를 가하여 실온에서 10일간 침적하여 추출여과한후, 그 여과액을 완전히 감압농축하여 농축물 20.2g을 얻었다. 그 외에 몰약(*Myrrh momol* Eng), 상백피(*Morus alba* L.), 승마(*Cimicifuga heracleifatia* Komarov)를 상기의 기술된 방법에 따라 추출하여 각각 1.2g, 3.4g, 8.4g의 농축물을 얻었다. 그리고 이를 농축물에 95%에탄올을 가하여 50%(W/W)농도의 추출액을 제조하였다.

(2) 조성물

추출물 제조방법에 따라 제조한 식물추출물을 배합한 Table 1과 같은 처방의 치약을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

Table 1. Recipe of toothpaste in the presence of plant extracts

Components	Weight(%)
Aluminium hydroxide	47
Glycerin	10
Sorbitol	20
CMC	0.7
SLS	1.5
Methylbenzoate	0.15
Perfume	1
<i>Myrrh</i> extract	0.03-2.0
<i>Morus</i> extract	0.03-2.0
<i>Cimicifuga</i> extract	0.02-0.4
<i>Thea</i> extract	0.01-0.2
Distilled water	residues
Sum	100.0

(3) 항균력실험

a) 농도별 항균력실험

상기처방에 따라 제조된 치약을 BHI broth로 0.06-0.18% 되게 희석한 후, *S. mutans*을 16시간 배양한 배양액 2방울을 접종하여 37°C incubator에서 24시간 배양한 다음, 치약농도와 생약추출물 농도에 따른 항균력을 측정하였다.

b) 시간별 항균력실험

상기처방에 따라 제조된 치약을 BHI broth로 30%까지 희석한 후, *S. mutans*을 16시간 배양한 배양액을 10⁶cells/ml되게 접종하여 37°C incubator에서 배양하면서 1, 2, 3, 5분의 시간경과에 따른 균의 사멸정도를 측정하였다.

(4) GTase저해활성 측정

상기처방에 따라 제조된 치약을 증류수를 5%까지 희석한 다음, 원심분리(3000rpm, 10min)하여 상등액을 얻는다. 이 액을 다시 KPB로 1.5%가 되도록 희석한액 4ml에 GTase 100µg 및 sucrose 70µg을 가하여 37°C에서 15시간 동안 반응시킨 후, glucan생성저해률을 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 식물추출물들의 항균 및 GTase저해효과

1) 항균효과

충치의 원인균으로 알려진 *S. mutans*에 대한 항균활성을 갖는 성분을 얻기 위하여 각종의 식물들을 대상으로 항균력을 검색한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 상백피, 몰약, 황련, 당후박 및 십약등의 methanol추출물이 강한 항균력을 나타내는 반면에, 나머지생약의 methanol추출물은 MIC가 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 약한 항균력을 나타내었다. 특히 다른식물추출물에 비해 강한 항균력을 보인 상백피 및 몰약은 모든실험균에 대해 50-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 항균력을 보였으나 *S. mutans*에 대해 가장 효과적인 살균제로 알려진 Chlorhexidine-digluconate의 MIC 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 비해서는 낮은 항균력을 나타내었다. 그러나 chlorhexidine에 대한 균주간의 감수성의 차이는 내성균의 발현가능성을 시사해주고 있으며 또한 chlorhexidine의 부작용을 감안한다면 비선택적인 항균력과 생약유래의 안전성을 가진 상백피 및 몰약추출물의 충치 예방제로서의 응용가능성은 더욱 높아진다.

Table 2. Anti-bacterial activities of the methanol extracts of plants against *S. mutans*

Methanol extracts of plants	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	ATCC27351(g)	ATCC25175(c)	wild type
<i>Morus alba</i> L. (柔白皮)	200	200	50
<i>Myrrh momol</i> Eng. (沒藥)	100	200	100
<i>Coptis japonica</i> Makino (黃連)	500	500	500
<i>Magnolia officinalis</i> Rehd. et WILS (唐厚朴)	1000	1000	1000
<i>Houttuynia cordata</i> Thund. (十藥)	1000	1000	1000
Chlorhexidine digluconate	1.0	1.0	10
Berberine hydrochloride	200	100	200

2) GTase저해효과

Plaque생성에 매우 중요한 역할을 하는 *S. mutans*의 균체의효소인 GTase

저해효과를 검색한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 methanol extract에서는 승마, 토당귀, 곽향, 세신, 만형자 및 행인등이, H₂O extract에서는 황련, 형개, 당후박, 지유, 학슬, 승마, 단삼, 소엽, 사철쭉 및 녹차의 식물추출물들이 강한 GTase저해효과를 나타내었으며 Mutastein 및 Tannic acid와 비교실험한 결과, 승마추출물이 이들물질보다 뛰어난 GTase저해효과를 나타내었다.

Table 3. The inhibitory effects of plant extracts on GTase

Plants	Inhibition activity(%)								
	Extracts	MeOH extract(ppm)				H ₂ O extract(ppm)			
	Conc. of extract (μg/ml)	5	10	50	100	10	50	100	200
1. 승마		11	11	39	62	17	17	27	30
2. 토당귀		3	6	13	49	7	7	13	19
3. 황련		4	4	4	—	14	25	31	40
4. 형개		15	16	—	—	15	20	25	49
5. 곽향		10	17	49	—	4	7	14	17
6. 세신		15	17	29	46	9	18	18	24
7. 당후박		0	2	—	—	17	48	—	—
8. 단삼		—	—	—	—	28	28	30	33
9. 소엽		3	5	27	27	15	24	27	34
10. 행인		4	5	36	—	12	12	12	15
11. 만형자		0	13	44	—	9	9	9	22
12. 사철쭉		5	7	—	—	8	14	25	35
13. 녹차		4	—	—	—	13	20	25	30
14. 지유		13	19	—	—	17	26	35	45
15. 학슬		0	6	—	—	0	18	24	45
Standard	Mutastein					2	45	53	63
	Tannic acid					23	50	—	—

(— : not detect)

2. 치약 base에서의 식물추출물의 항균 및 GTase저해활성효과

1) 항균효과

검색한 식물 추출물중 우수한 항균력을 가진 상백피 및 몰약 추출액을 함유하는 치약을 제조한 후 각 치약을 0.06%에서 0.18%까지 희석하여 항균력

시험을 한 결과, Table 4와 같은 결과를 얻었다.

Table 4. Anti-bacterial activities of the methanol extracts of active plants in toothpaste against *S. mutans* ATCC 25175

Conc. of extract(%)		Conc. of toothpaste(%)				
<i>Morus</i>	<i>Myrrh</i>	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14
0.0	0.0	+	+	+	+	+
1.0	0.0	+	+	+	-	-
2.0	0.0	-	-	-	-	-
0.0	1.0	-	-	-	-	-
0.0	2.0	-	-	-	-	-

[+ : growth
- : no growth]

또한 실제로 치약을 사용할 때의 농도 및 시간을 고려하여 30% 치약농도에
서 시간별로 항균력 시험을 했을 때 물약과 상백피의 1종 또는 2종의 추출액
을 함유하는 치약에서 현저한 항균효과가 나타났다(Table 5).

Table 5. Anti-bacterial activities of the methanol extracts of active plants in 30% toothpaste against *S. mutans* ATCC 25175

Conc. of extracts (x10 ⁻² %)		Numbers of viable bacteria (x10 ³ cells)			
<i>Morus</i>	<i>Myrrh</i>	1min	2min	3min	5min
0	0	2160	2200	16	6.4
0	3	13.8	12.9	6.5	6.5
0	9	8.5	8.5	5.3	4.9
3	0	6.1	16.9	8.1	7.5
3	3	3.0	22.0	6.5	4.1
3	9	7.4	5.1	4.7	3.0

2) GTase저해효과

검색한 식물 추출물들중 높은 GTase 저해효과를 가지는 승마 및 녹차 추
출액을 각종농도로 함유하는 치약을 제조한 후, 이들을 1.5% 까지 희석하여
GTasa저해활성시험을 한 결과, Table 6과 같은 결과를 얻었다. 즉 0.05%승마
추출액 및 0.02% 녹차추출액을 혼합함유한 치약 1.5%용액이 GTase활성을

56% 저해하였다.

Table 6. The inhibitory effects of plant extracts in 1.5% toothpaste on GTase

Conc. of extracts(x10 ⁻² %)		Inhibition activity (%)
<i>Cimicifuga</i>	<i>Thea</i>	
0	0	4
2	1	22
8	4	31
20	10	44
40	20	56

Table 4, 5, 6의 결과에서 보는 바와같이 치약 처방상에 몰약, 상백피, 승마, 녹차의 추출물들을 배합할 경우, 식물추출물들을 배합하지 않은 치약에 비해 탁월한 항균효과 및 GTase저해효과를 나타내었다. 따라서 이러한 활성있는 식물추출물을 함유한 치약은 우수한 충치예방 효과가 기대된다.

IV. 결 론

효과적인 충치예방제를 개발하기 위한 시도로 200여종의 생약들이 *S. mutans* 및 GTase저해활동을 검색한 결과, 몰약 및 상백피의 추출물혼합액이 매우 뛰어난 항균력을 갖고 있는 것을 확인했으며 승마 및 녹차 추출물혼합액은 매우 강력한 GTase 저해활성을 나타내었다. 또한 이러한 항균력과 GTase 저해활성을 가지는 추출물들을 치약base에 첨가하여도 이들활성은 그대로 유지되는 것을 확인하였다. 따라서 몰약, 상백피, 녹차 및 승마추출물을 함유하는 치약은 1차적으로는 *S. mutans*에 대한 항균력으로 2차적으로 *S. mutans*가 생성되는 GTase를 억제하므로써 충치예방에 크게 기여할 수 있으리라 생각된다.

References

- 1) Orland, F. J., *Ann. N. Y., Ann. Acad. Sci.*, 78, 285(1059)
- 2) Fitzgerald, R. J. and Keyes, P. H., *J. Am. Dent. Ass.*, 61, 9(1960)
- 3) Keyes, P. H. *Arch. Oral Biol.*, 1, 304(1960)
- 4) Guggenheim, B., Konig, K. G. and Muhlema, H. R., *Helv. Odontol. Acta*, 9,

- 12(1965)
- 5) McClure, F. F. and Hewitt, W. L., *J. Dent Res.*, 25, 441(1946)
 - 6) Stephan, R.M. Fitzgerald, R. J., McClure, F. J., Harris, M. R. and Jordan, H. *J. Dent Res.*, 31., 421(1966)
 - 7) Keyes, P. H. Rowberry, S. A. Englander H. R. and Fitzgerald, R. J., *J. Oral Ther. Pharmacol.*, 3, 157(1966)
 - 8) Handelman, S. L., Mills, J. R. and Hawes, R. R., *J. Oral Therap. Pharmacol.*, 2, 338(1966)
 - 9) Fitzgerald, R. *J. Antimicrobiol. Agents Chemother.*, 1, 296(1972)
 - 10) Fitzgerald, R. J. *J. Am Dent Ass.*, 87, 1006(1973)
 - 11) Akira Endo, Osamu Hayshid and Shigeo, *J. of antibiotics*, 36(3), 203(1983)
 - 12) Shigeo Murakawa, Nobukazu Tanabe, Fumi Yamamoto and Akira Endo, *J. of antibiotics*, XL(3), 394(1937)
 - 13) Yamaji Nakano, Shigeo Murakawa and Akira Endo, *J. of antibiotics*, XL (2),227(1987)
 - 14) Toshihiko Koga, Shigeyuki Hamade, Shigeo Murakawa, and Akira Endo, *Infection Immunit. Des.*, 38(3), 882(1982)
 - 15) *Arch. Oral Biol.*, 46(8), 1987(1982)
 - 16) C. D. Wu Yuan, C. Y. Chen, and R. T. Wu, *J. Dent Res.*, 67(5), 51(1988)