

한약재 추출물의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균효과

전은숙[†] · 윤수홍¹ · 한만덕²

포항1대학 치위생과

¹대구가톨릭대학 약학과

²김천대학 치위생과

Antimicrobial Activity of *Streptococcus mutans* by Herbal Medicine Extracts

Eun-Sook Jeun[†], Su-Hong Yoon and Man-Deuk Han

Dept. of Dental Hygiene, Pohang College, Pohang city 791-711, Korea

¹Dept. of Pharmacy, Catholic University of Taegue, Taegue city 712-702, Korea

²Dept. of Dental Hygiene, Kimcheon College, Gimcheon, Gyeongbuk 740-704, Korea

ABSTRACT This study was to investigate the antibacterial effect of 63 species herbal medicine extracts on *S. mutans* growth by paper disc method and then examined the effects of *S. mutans* growth by some selected herbal medicines. Antibacterial effect of 63 species medicinal herb extracts on *S. mutans* was superior to *Lycopi herba*, *Scutellariae radix* in regular order and antibacterial activity(20 mg/ml concentration) through paper disc method were measured 6.3 mm and 3.5 mm, respectively. The growth of *S. mutans* in control medium was the highest at 8hrs, while that of medicinal herbs extract added-medium(2 mg/ml) was at 16 hrs. The pH values of the control media and media supplemented with *Lycopi herba* and *Scutellariae radix* extract were 5.08, 5.80, and 5.74 at 8 hrs, respectively. In the change of total carbohydrate of the control media and supplemented with *Lycopi herba* and *Scutellariae radix* extract were 0.81 mg/ml, 1.70 mg/ml and 1.84 mg/ml at 8 hrs, respectively. In the change of proteins of the control media and supplemented with *Lycopi herba* and *Scutellariae radix* extract were 8.39 mg/ml, 9.52 mg/ml and 9.28 mg/ml at 8 hrs, respectively. The polysaccharide contents of the control media and supplemented with *Lycopi herba* and *Scutellariae radix* extract were 300 mg/100 ml, 200 mg/100 ml and 220 mg/100 ml at 8hrs, respectively.

Key words *Streptococcus mutans*, Herbal medicine extracts, Antimicrobial activity

서 론

치아우식증은 구강질환의 가장 대표적인 질환으로 치아괴파를 동반한 감염성 질환(progressively infectious disease)이다. 치아우식증은 치면세균막 내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 다인성 질환으로써 치면세균막 내 세균 중에서도 *Streptococcus mutans*가 주 원인균이며, *S. mutans*는 치면에 부착, 증식 및 산 생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발한다¹⁾. 즉, *S. mutans*는 세포의 다당류를 생성하는 glucosyltransferase (GTF) 효소를 분비함으로써 자당(sucrose)을 분해하여 수용성 또는 비수용성 glucan을 생성하며, 이중 비수용성 glucan이 치아표면에 부착하여 치면세균막을 형성하게 된다. 치면에 부착

한 *S. mutans*는 치면에 정착하여 당의 대사과정을 통해 유기산을 생성함으로써 법랑질을 탈회시켜 치아우식증을 유발한다^{2,3)}. 따라서 치아우식증 예방을 위해서는 세균의 성장을 억제하거나, 획득피막에 세균이 부착되는 것을 억제할 수 있는 항미생물제제가 요구된다.

최근, 치아우식증을 예방하기 위한 기초 연구의 일환으로 항미생물질을 통해 치아우식 발생 억제에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있으며, 그 중에서도 천연물을 이용한 미생물 억제에 대해 관심이 높아지면서 이에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 천연물질로부터 구강에 대한 항우식 효과에 관해서는 magnolol과 hinokiol⁴⁾, gymnemic acid⁵⁾, polyphenol⁶⁻⁸⁾, 일본산 녹차추출물⁹⁾과 cardinol¹⁰⁾ 등이 보고되고 있다.

국내에서도 치아우식증 예방 및 진행의 중단을 목적으로 여러 가지 생약의 추출물^{11,12)}에 관하여 연구되고 있고, 자몽 종자추출물(Grapefruit seed extract)은 ascorbic acid에 의해 *S. mutans*에 대한 항균작용을 나타낸다고 보고되고 있다¹³⁾.

최근 부작용 없이 치아우식증을 예방할 수 있는 새로운 방

[†]Corresponding author

Tel: 054-245-1222

Fax:

E-mail: jess@pohang.ac.kr

법에 관심이 집중되면서 천연물에서 항우식물질을 분리하고자 하는 노력이 시도되고 있는 시점에, 이들 추출물에서 천연 항균물질은 음료수, 치약, 식품첨가제 및 구강양치액 등으로 활용되어 국민의 구강건강을 증진시킬 수 있다면 그 의의는 매우 크다고 하겠다.

이에 본 연구에서는 국내에서 유통되는 63종의 한약재로부터 열수추출물을 분리한 후, *S. mutans*에 대한 항균효과를 paper disc method로 검색하고, 항균효과가 나타나는 한약재를 이용하여 *S. mutans*의 대사에 미치는 영향을 알기 위하여 생장곡선, pH 변화, 단백질 변화, 총 탄수화물의 변화 및 다당류 생성에 미치는 효과 등에 관하여 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 한약재(지부자 외 62종)는 서울 경동시장에서 건조상태의 것을 구입하여 사용하였으며, 이들은 Table 1에서 보는 바와 같다.

2. 실험방법

(1) 추출방법

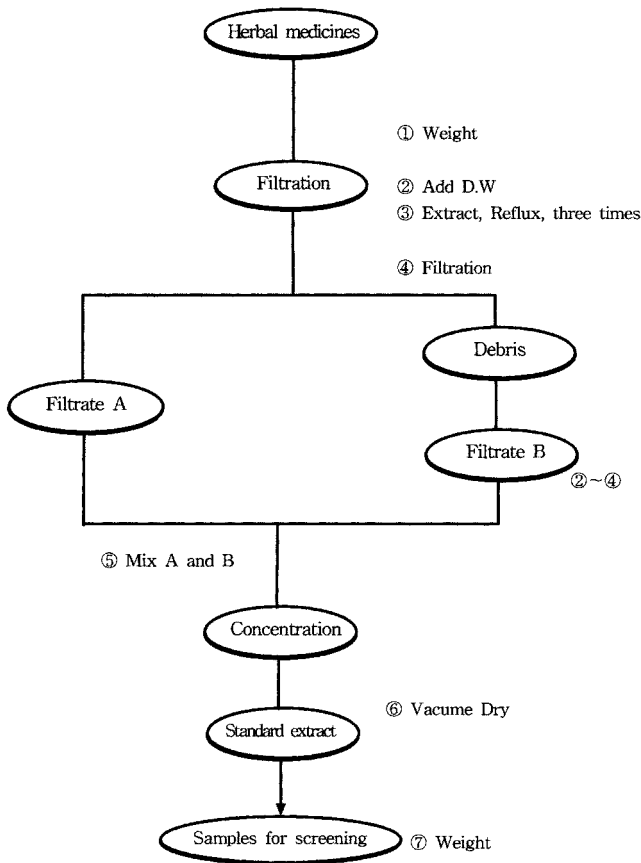
각각의 한약재를 적절한 크기로 분쇄하여 50 g 씩 평량 한 후 삼각프라스크에 넣고 시료가 잠기도록 증류수 1 l를 가한 다음 100°C에서 환류냉각기를 이용하여 수욕상에서 3시간 동안 추출하였다. 이를 여과시켜 여과액을 얻고 잔사는 다시 추출·여과 과정을 거쳐 여액을 얻은 후 여액을 합해 회전농축기를 사용하여 감압 건조시킨 후 시료를 조제하였다. 추출은 한약재로 사용되는 부위에 따라 시료별로 껍질, 열매, 뿌리, 잎 등을 대상으로 하였다(Scheme 1).

(2) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약으로는 BCA protein assay kit(Pierce Co., U.S.A), BSA(Pierce Co., USA)을 사용했으며, *S. mutans* 배양을 위한 배지는 brain heart infusion(Difco, USA)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

Table 1. List of tested samples

Serial No.	Korean name	Name of herbal medicines	Serial No.	Korean name	Name of herbal medicines
DH-01	Goihwa	<i>Sophorae flos</i>	DH-33	Guchuk	<i>Cibotii rhizoma</i>
DH-02	Gilkyung	<i>Platycodi radix</i>	DH-34	Sansaja	<i>Crataegi fructus</i>
DH-03	Duchung	<i>Eucommiae cortex</i>	DH-35	Sanyak	<i>Dioscoreae rhizoma</i>
DH-04	Soksae	<i>Equiseti herba</i>	DH-36	Sandugun	<i>Sophorae subprostratae radix</i>
DH-05	Ogapi	<i>Acanthopanax cortex</i>	DH-37	Sukchangpo	<i>Acori graminei rhizoma</i>
DH-06	Usul	<i>Achyranthis radix</i>	DH-38	Choyongdam	<i>Labiatae flos</i>
DH-07	Doin	<i>Persicae semen</i>	DH-39	Sokdan	<i>Phlomidis radix</i>
DH-08	Haedongpi	<i>Kalopanax cortex</i>	DH-40	Sungma	<i>Cimicifugae rhizoma</i>
DH-09	Cheonma	<i>Gastrodiae rhizoma</i>	DH-41	Siho	<i>Bupleuri radix</i>
DH-10	Pogongyung	<i>Toraxaci herba</i>	DH-42	Sini	<i>Magnoliae flos</i>
DH-11	Mokdanpi	<i>Moutan cortex radix</i>	DH-43	Gongsain	<i>amomi xanthioidis fructus</i>
DH-12	Goldamcho	<i>Caraganae radix</i>	DH-44	Yonkyo	<i>Forsythiae fructus</i>
DH-13	Ganghwal	<i>Angelicae koreanae radix</i>	DH-45	Aeyop	<i>Artemisiae asiaticae herba</i>
DH-14	Mogun	<i>Imperata rhizoma</i>	DH-46	Chodugu	<i>Katsumadai alpiniae semen</i>
DH-15	Hwanggum	<i>Scutellariae radix</i>	DH-47	Pohwang	<i>Typhae pollen</i>
DH-16	Dansam	<i>Salviae radix</i>	DH-48	Indong	<i>Lonicerae flos</i>
DH-17	Baekdugu	<i>Amomi cardamomi fructus</i>	DH-49	Jeonho	<i>Anthrisci radix</i>
DH-18	Bokbunja	<i>Rubi fructus</i>	DH-50	Gungang	<i>Zingiberis rhizoma</i>
DH-19	Gamguk	<i>Chrysanthemi flos</i>	DH-51	Eumyangguk	<i>Epimedii herba</i>
DH-20	Golyonpi	<i>Meliae cortex</i>	DH-52	Jogudong	<i>Ramulus uncaria cum uncis</i>
DH-21	Bija	<i>Torreyae semen</i>	DH-53	Jinbum	<i>Aconitum flos</i>
DH-22	Jibuja	<i>Lycopi herba</i>	DH-54	Magamok	<i>Sorbus cortex</i>
DH-23	Baekdanhang	<i>Santali album lignum</i>	DH-55	Mahwang	<i>Ephedrae herba</i>
DH-24	Daepungja	<i>Hydnocarpus semen</i>	DH-56	Jinpi	<i>Citrus unshin peel</i>
DH-25	Gumaengja	<i>Rosae laevigatae fructus</i>	DH-57	Daehwang	<i>Rhei Rhizoma</i>
DH-26	Binlangja	<i>Arecae semen</i>	DH-58	Chuncho	<i>Zanthoxyli pericarpium</i>
DH-27	Ganghwang	<i>Curcuma longae rhizoma</i>	DH-59	Chunlunja	<i>Meliae fructus</i>
DH-28	Tosaja	<i>Cuscutae semen</i>	DH-60	Chungsangja	<i>Caricae fici fructus</i>
DH-29	Baeklyom	<i>Ampelopsis radix</i>	DH-61	Chukbaeyop	<i>Meliae flos</i>
DH-30	Baeksunpi	<i>Dictamni radices cortex</i>	DH-62	Donggoaja	<i>Benincasae semen</i>
DH-31	Baekgulchae	<i>Chelidonii herba</i>	DH-63	Danggui	<i>Angelicae gigantis radix</i>
DH-32	Gosam	<i>Sophorae radix</i>			



Scheme 1. Standard extract preparation from herbal medicines.

stirrer(Coming Co., USA) 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 혐기 상태에서 혐기 배양하였다.

(4) 항균활성 측정

각종 한약재 추출물의 항균활성 검색은 paper disc method에 의하여 측정하였으며¹⁴⁾, *S. mutans* 균주 1 loop를 10 ml BHI broth에 접종한 후 37°C에서 18~20시간 혐기 상태에서 혐기 배양하여 이용하였다.

멸균된 Muller hinton agar 배지를 petri dish에 15 ml씩 분주하여 고형화 시킨 후, *S. mutans* 배양액 50 µl를 접종하여 균일하게 도말하였다. 한편 63종의 한약재 추출물을 400 mg씩 멸균수 1 ml에 완전히 녹여 paper disc(6 mm)에 각각 50 µl씩 흡수한 후 건조시켰다. 건조된 disc는 시험용 평판배지 표면에 놓아 밀착시킨 다음, 37°C에서 24시간 동안 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 측정하였으며¹⁴⁾, *S. mutans* 균주 1 loop를 10 ml BHI broth에 접종한 후 37°C에서 18~20시간 혐기적으로 배양하여 이용하였다.

멸균된 Muller hinton agar 배지를 petri dish에 15 ml씩 분주하여 응고시킨 후, *S. mutans* 배양액 50 µl를 접종하여 균일하게 도말하였다. 한약재 추출물은 최초 농도를 10 mg/ml로 2배 연속 희석한 후 37°C에서 24시간 동안 혐기 배양하여 육안으로 관찰하여 증식된 농도와 억제된 농도로 결정하였다.

(6) 성장곡선 측정

성장곡선은 *S. mutans* 균주 1 loop를 10 ml BHI broth에 접종한 후 30°C에서 18~20시간 혐기적으로 배양하여 활성화시킨 액 50 µl와 한약재 추출물 50 µl를 BHI broth 10 ml에 주입하였다. 37°C에서 혐기 배양하면서 시간별로 채취하여 균의 생육을 spectrophotometer를 이용해서 흡광도(600 nm)를 측정하였다.

(7) pH 측정

pH 변화는 다음과 같이 측정하였다. *S. mutans* 균주 1 loop를 10 ml BHI broth에 접종한 후 37°C에서 18~20시간 혐기 배양하여 활성화 시킨 액 50 µl와 한약재 추출물 50 µl를 BHI broth 10 ml에 주입하였다. 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 µl/ml로 stock solution을 만들고, 증류수로 희석하여 단계별 표준액을 만들었다. 검량선의 작성은 20 ml용 시험관에 단계별 표준액 1 ml을 가하여, 여기에 80% phenol 25 µl와 진한 황산 2.5 ml를 첨가하고, 대조액에는 표준액 대신 증류수 1 ml을 가했다. 또한 sample 1 ml과 여기에 80% phenol 25 µl와 진한 황산 2.5 ml를 첨가했다. 시험관을 잘 혼합한 후 30°C에서 20분간 반응시켜, 실온으로 냉각한 다음, 표준액 및 대조액의 흡광도를 490 nm에서 측정했다.

(9) 단백질 정량 측정

배지내 단백질 변화는 BCA kit를 이용하였다. 표준액의 조제는 검량곡선을 그리기 위하여 표준물질로 BSA(Bovine Serum albumine)를 이용하였다. BSA를 1 mg/ml로 stock solution을 만들고, 증류수로 희석하여 단계별 표준액을 만들었다. 검량선의 작성은 20 ml용 시험관에 BCA 혼합액(100:2)을 4 ml 가하여, 여기에 단계별 표준액을 각각 0.1 ml씩 첨가하고, 대조액에는 표준액 대신 증류수 0.2 ml을 가했다. 또한 sample 1 ml에 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

한국산 한약재 추출물이 *S. mutans*의 glucan 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양액 내 다당류의 양은 한 등의 방법¹⁵⁾을 변형하여 실행하였다. 시료 채취를 위하여 BHI 배지에 한약재 추출물을 첨가(2 mg/ml)하여 각 시간별로 수확하여 배지를 4°C 냉장고에 보관하였다. 보관된 배지내의 다당류 함량은 다음과 같이 측정하였다. 다당류를 얻기 위하여 채취된 배지에 2.5N의 농도가 되도록 NaOH를 가하고 12시간 동안 방치시켰다. 방치된 배양액에 acetic acid를 가하여 중화한 다음 cell debris를 원심분리하여 제거한 후, 상층액에 3배량(v/

Table 2. Antimicrobial effects of a medicinal herb extracts against *S. mutans* KCTC 3065

Serial No.	Korean name	Name of herbal medicines	clear zone (mm)
DH-01	Goihwa	<i>Sophorae flos</i>	ND*
DH-02	Gilkyung	<i>Platycodi radix</i>	ND*
DH-03	Duchung	<i>Eucommiae cortex</i>	ND*
DH-04	Soksae	<i>Equiseti herba</i>	ND*
DH-05	Ogapi	<i>Acanthopanax cortex</i>	ND*
DH-06	Usul	<i>Achyranthis radix</i>	1
DH-07	Doin	<i>Persicae semen</i>	ND*
DH-08	Haedongpi	<i>Kalopanax cortex</i>	ND*
DH-09	Cheonma	<i>Gastrodiae rhizoma</i>	0.6
DH-10	Pogongyung	<i>Toraxaci herba</i>	ND*
DH-11	Mokdanpi	<i>Moutan cortex radix</i>	0.5
DH-12	Goldamcho	<i>Caraganae radix</i>	ND*
DH-13	Ganghwal	<i>Angelicae koreanae radix</i>	1
DH-14	Mogun	<i>Imperata rhizoma</i>	ND*
DH-15	Hwanggum	<i>Scutellariae radix</i>	3.5
DH-16	Dansam	<i>Salviae radix</i>	ND*
DH-17	Baekdugu	<i>Amomi cardamomi fructus</i>	1
DH-18	Bokbunja	<i>Rubi fructus</i>	1
DH-19	Gamguk	<i>Chrysanthemi flos</i>	1.7
DH-20	Golyonpi	<i>Meliae cortex</i>	ND*
DH-21	Bija	<i>Torreyae semen</i>	ND*
DH-22	Jibuja	<i>Lycopi herba</i>	6.3
DH-23	Baekdanhang	<i>Santali album lignum</i>	0.5
DH-24	Daepungja	<i>Hydnocarpi semen</i>	0.5
DH-25	Gumaengja	<i>Rosae laevigatae fructus</i>	1
DH-26	Binlangja	<i>Arecae semen</i>	0.8
DH-27	Ganghwang	<i>Curcuma longae rhizoma</i>	0.7
DH-28	Tosaja	<i>Cuscutae semen</i>	ND*
DH-29	Baeklyom	<i>Ampelopsis radix</i>	ND*
DH-30	Baeksunpi	<i>Dictamni radice cortex</i>	ND*
DH-31	Baekgulchae	<i>Chelidonii herba</i>	0.5
DH-32	Gosam	<i>Sophorae radix</i>	ND*
DH-33	Guchuk	<i>Cibotii rhizoma</i>	ND*
DH-34	Sansaja	<i>Crataegi fructus</i>	1
DH-35	Sanyak	<i>Dioscoreae rhizoma</i>	1
DH-36	Sandugun	<i>Sophorae subprostratae radix</i>	ND*
DH-37	Sukchangpo	<i>Acori graminei rhizoma</i>	0.6
DH-38	Choyongdam	<i>Labiatae flos</i>	ND*
DH-39	Sokdan	<i>Phlomidis radix</i>	0.8
DH-40	Sungma	<i>Cimicifugae rhizoma</i>	0.7
DH-41	Siho	<i>Bupleuri radix</i>	ND*
DH-42	Sini	<i>Magnoliae flos</i>	1
DH-43	Gongsain	<i>amomi xanthioidis fructus</i>	ND*
DH-44	Yonkyo	<i>Forsythiae fructus</i>	ND*
DH-45	Aeyop	<i>Artemisiae asiaticae herba</i>	3
DH-46	Chodugu	<i>Katsumadai alpiniae semen</i>	ND*
DH-47	Pohwang	<i>Typhae pollen</i>	ND*
DH-48	Indong	<i>Lonicerae flos</i>	0.8
DH-49	Jeonho	<i>Anthriscis radix</i>	1
DH-50	Gungang	<i>Zingiberis rhizoma</i>	1.2

Table 2. Continued

Serial No.	Korean name	Name of herbal medicines	clear zone (mm)
DH-51	Eumyangguk	<i>Epimedium herba</i>	3.3
DH-52	Jogudong	<i>Ramulus uncaria cum uncis</i>	1.5
DH-53	Jinbum	<i>Aconitum flos</i>	ND*
DH-54	Magamok	<i>Sorbus cortex</i>	ND*
DH-55	Mahwang	<i>Ephedrae herba</i>	ND*
DH-56	Jinpi	<i>Citrus unshin peel</i>	1
DH-57	Daehwang	<i>Rhei Rhizoma</i>	ND*
DH-58	Chuncho	<i>Zanthoxyli pericarpium</i>	ND*
DH-59	Chunlunja	<i>Meliae fructus</i>	1.2
DH-60	Chungsangja	<i>Caricae fici fructus</i>	1
DH-61	Chukbaeyop	<i>Meliae flos</i>	ND*
DH-62	Donggoaja	<i>Benincasae semen</i>	ND*
DH-63	Danggui	<i>Angelicae gigantis radis</i>	ND*

*ND: Not Detective

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 건조량(mg/ml)을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 항균활성

63종의 한약제로부터 추출물을 얻어 *S. mutans*에 대한 항균효과와 특성을 paper disc method로 측정한 결과는 Table 2와 같다.

*S. mutans*에 대해서 천마, 목단피, 백단향, 대풍자, 빈랑자, 강황, 백굴채, 석창포, 속단, 인동 등이 1 mm 이하의 저해환 직경을 나타내었으며, 우슬, 강활, 백두구, 복분자, 금앵자, 산사자, 산약, 신이, 전호, 진피, 청상자 등은 1 mm의 균중식 억제력을 보였고, 감국이 1.7 mm, 건강이 1.2 mm, 조구동이 1.5 mm, 천련자가 1.2 mm의 균중식 억제력을 보였다. 또한 음양곽은 3.3 mm, 애엽은 3 mm의 균중식 억제력을 보였으며, 특히 지부자, 황금 등 2개 한약제 추출물에서 뚜렷한 저해환 직경을 나타내어 항균활성이 확인되었으며(Figs. 1, 2), 지부자는 6.3 mm, 황금이 3.5 mm로 나타났다(Table 2).

2. 최소저해농도

*S. mutans*에 대해 비교적 높은 항균활성을 나타낸 한약제 추출물 지부자, 황금을 대상으로 최소저해농도를 측정한 결과는 Table 3과 같다.

지부자 추출물의 경우는 2.5 mg/ml 첨가시 생육이 관찰되지 않았으며, 황금 추출물 역시 2.5 mg/ml 첨가시 생육이 관찰되지 않았다. 따라서 *S. mutans*에 대한 지부자, 황금 추출물의 최소저해농도는 5 mg/ml으로 나타났다(Figs. 3, 4).

3. 한약제 추출물이 *S. mutans* 배양환경에 미치는 영향

한약제 추출물이 *S. mutans*의 생육에 미치는 효과를 측정하기 위해 지부자, 황금 추출물을 2 mg/ml의 농도로 첨가한

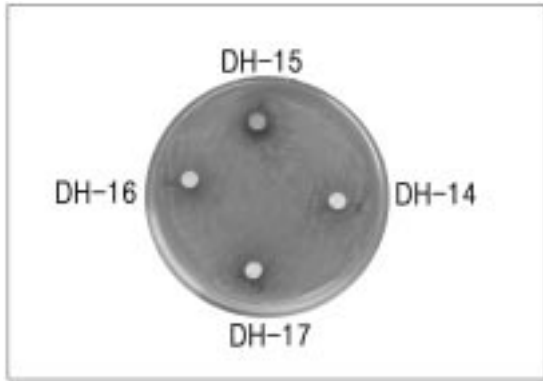


Fig. 1. Antimicrobial activity by paper disc method of the DH-15 *Scutellariae* radix extracts on the growth of *S. mutans* KCTC 3065.

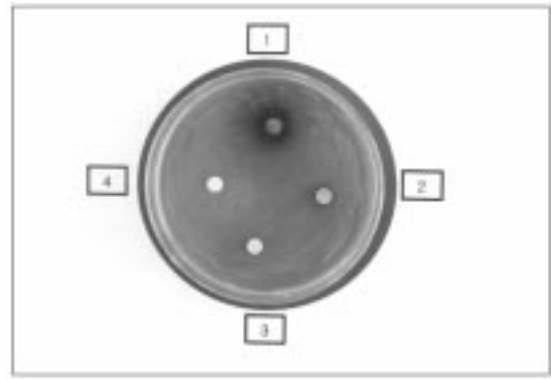


Fig. 3. Minimal inhibitory concentrations of the *Scutellariae* radix extracts on the growth of *S. mutans* KCTC 3065. (1) 10 mg/ml (2) 5 mg/ml (3) 2.5 mg/ml (4) 1.25 mg/ml

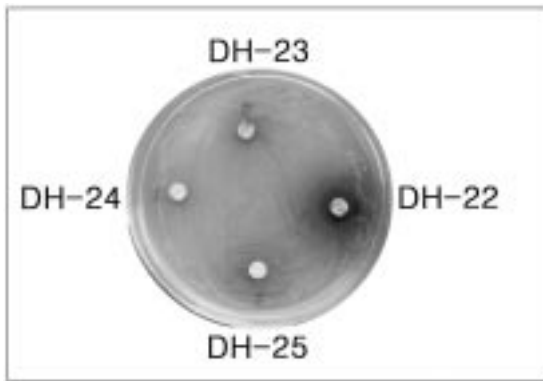


Fig. 2. Antimicrobial activity by paper disc method of the DH-22 *Lycopi* herba extracts on the growth of *S. mutans* KCTC 3065.

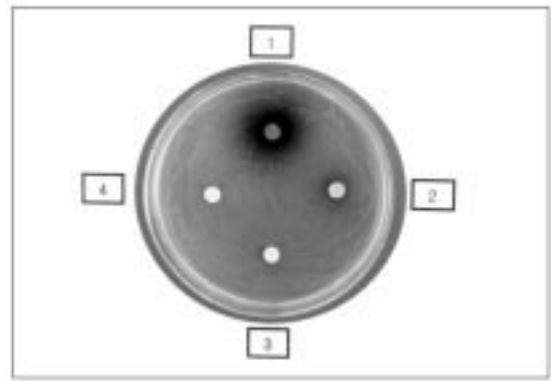


Fig. 4. Minimal inhibitory concentrations of the *Lycopi* herba extracts on the growth of *S. mutans* KCTC 3065. (1) 10 mg/ml (2) 5 mg/ml (3) 2.5 mg/ml (4) 1.25 mg/ml

Table 3. Minimal inhibitory concentrations of the herbal medicines extracts on the growth of *S. mutans* KCTC 3065

The herbal medicines extracts	Minimal growth inhibitory concentrations mg/ml of the medicinal herb extracts
<i>Scutellariae</i> radix	5
<i>Lycopi</i> herba	5

후 균의 생육을 spectrophotometer로 측정 한 결과 Figs. 5-8 과 같다.

(1) 생장곡선에 미치는 영향

지부자 추출물의 *S. mutans* 생장에 대한 효과는 대조군은 배양 8시간 후에 흡광도 1.05로 최대의 생장을 보였으나, 지부자 추출물(2 mg/ml)을 투여한 배지에서는 생장이 지연되어 16시간 후에 흡광도 0.91로 최대의 생장을 나타냈다. 황금 추출물의 경우 대조군이 배양 8시간 후에 1.05로 최대의 생장을 보였으며, 황금추출물(2 mg/ml)을 투여한 배지에서는 생장이 지연되어 16시간 후에 0.87로 최대의 생장을 나타냈다(Fig. 5).

이와 같은 결과는 제한된 시간동안 구강내에 잔류하여 항우식 효과를 나타내는 치약, 구강세척제 등의 성분으로 이들 한약재 추출물을 첨가하면 우식을 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

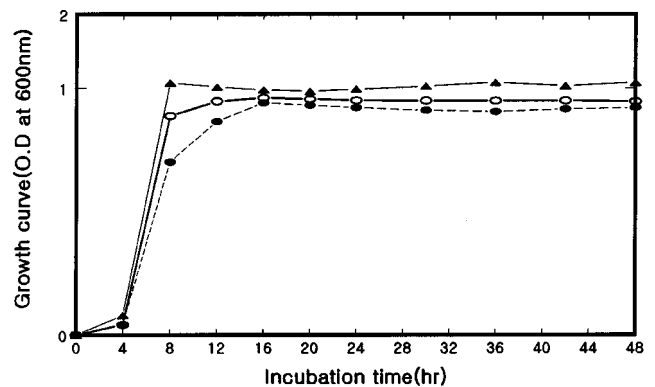


Fig. 5. Growth curve of *S. mutans* by addition of *Lycopi* herba and *Scutellariae* radix extracts.

-○- *Lycopi* herba, -●- *Scutellariae* radix, -▲- Control

(2) pH 변화에 미치는 영향

지부자 추출물을 *S. mutans* 배지에 첨가하여 8시간 동안 배양한 후 pH를 측정 한 결과 대조군은 pH 5.08로 급격한 변화를 보였지만, 지부자 추출물이 투여된 배지는 pH 5.80으로 비교적 완만한 변화를 보였다. 황금 추출물의 경우 대조군은 pH 5.08로 급격한 변화를 보였지만, pH 5.74로 비교적 완만하게 감소하였다(Fig. 6).

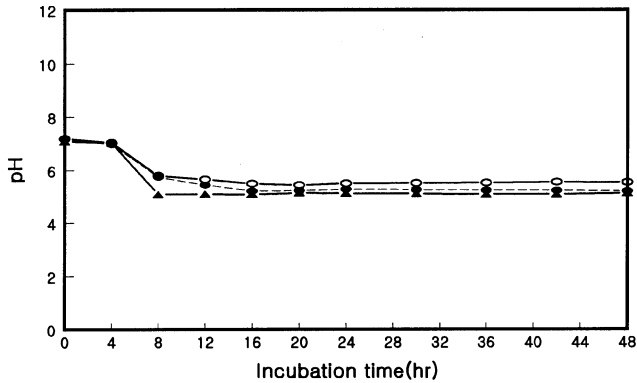


Fig. 6. The pH changes in *S. mutans* culture medium by addition of *Lycopi herba* and *Scutellariae radix* extracts
 -○- *Lycopi herba*, -●- *Scutellariae radix*, -▲- Control

이상과 같이 *S. mutans* 배지내 pH 변화에 선발된 한약재 추출물의 효과를 알아본 결과 *S. mutans* 균의 증식 곡선과 밀접한 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

구강의 pH는 정상적인 경우는 중성이지만, 당을 많이 섭취하는 경우에는 치면세균막내 세균에 의해 산이 생성되어 pH가 떨어지고, 5.4 이하로 떨어지게 되면 치아우식증을 유발한다. 따라서 본 실험의 결과 지부자, 황금 추출물은 모두 대조군에 비해 pH의 급격한 변화를 세균의 증식 억제와 같은 방법으로 억제하는 것으로 나타났으므로 향후 항우식 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

(3) 탄수화물 변화에 미치는 영향

한국산 한약재 추출물을 *S. mutans*에 첨가한 후 시간별 배양시 배지내의 탄수화물 변화를 알아보았다. 대조군이나 지부자 추출물이 첨가된 배지의 초기 총 탄수화물의 양은 ml당 2.5~3 mg의 탄수화물이 정량되었다.

배양 8시간 후 대조군은 0.81 mg/ml 이었으나, 지부자 추출물이 투여된 배지는 1.70 mg/ml로 탄수화물의 양이 거의 변하지 않았으며, 황금 추출물의 경우 역시 배양 8시간에 1.84 mg/ml로 탄수화물의 양이 거의 변하지 않았다(Fig. 7).

(4) 단백질 변화에 미치는 영향

한약재 추출물이 첨가된 배지에 *S. mutans* KCTC 3065를 배양하고 시간별 변화하는 단백질량을 측정하였다. 배양 0시간에서는 모든 배지에서 10 mg/ml의 단백질이 정량되었다. 균체의 최대 생장률을 보인 8시간에서는 대조군이 8.39 mg/ml이었고, 지부자 추출물이 투여된 배지는 9.52 mg/ml의 단백질이 정량되었다(Fig. 8). 지부자는 명아주과에 속하는 일년생 초목으로 이뇨와 해독작용¹⁶⁾이 있다. 성분에 관한 연구로 Nazar 등¹⁷⁾이 *Kochia indica*에서 monobromo derivative 및 수지성 alkaloid 성분인 reineckate 결정을 분리하였고, Tandon 등¹⁸⁾이 *Kochia trichophylla*의 benzene 및 에탄올 분리에서 saturated hydrocarbon hentriacontane, hentriacontanol, triterpenoid 계와 saponin으로 oleanolic acid를 기본으로 하여 glucose, arabinose 및 rhamnose가 결합되어 있음을 보고하였으며, Kernan 등¹⁹⁾은 지부자 종자를 이용하여 oleanolic acid의 정량을 보고한 바가 있다. *S. mutans*에 대한 지부자의 연구는 전무하여 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

황금 추출물이 투여된 배지는 9.28 mg/ml의 단백질이 정량

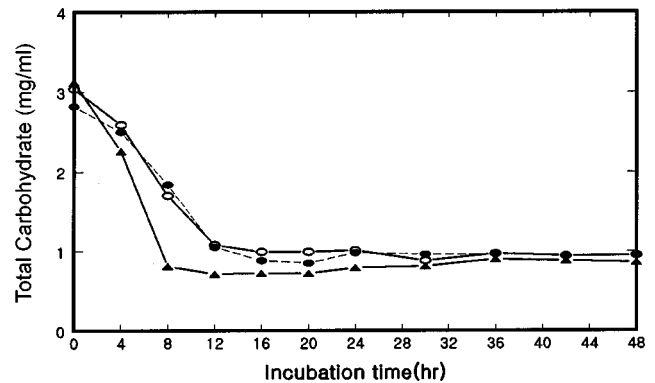


Fig. 7. The changes of total carbohydrate in *S. mutans* culture medium by addition of *Lycopi herba* and *Scutellariae radix* extracts.

-○- *Lycopi herba*, -●- *Scutellariae radix*, -▲- Control

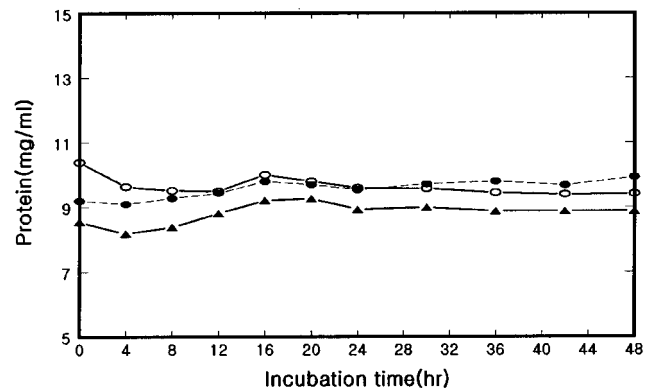


Fig. 8. Protein changes in *S. mutans* culture medium by addition of *Lycopi herba* and *Scutellariae radix* extracts.

-○- *Lycopi herba*, -●- *Scutellariae radix*, -▲- Control

되었다(Fig. 8). 황금은 항염 및 항균작용이 인정되어 널리 사용되어져 왔다. 주성분으로는 wogonin, baicalein, baicalin 등 지금까지 40여 종의 flavone 및 관련화합물이 분리 보고 되었으며²⁰⁾, 그 약리작용으로는 담즙배설촉진작용²¹⁾, 항알레르기 작용²²⁾, 지질대사개선작용²³⁾ 등이 알려져 있다. 이외에도 황금 추출물내의 baicalin flavonoid가 생체내 호르몬의 항상성에 영향을 주고 항염 및 항경련 효과도 있다는 보고가 있다²⁴⁾. 따라서 앞으로 구강질환에 대한 황금의 작용에 관하여 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

4. 한약재 추출물이 *S. mutans*의 다당류 생성에 미치는 효과

*S. mutans*의 다당류는 치아우식증에 관여하는 치면세균막을 형성하는데 가장 중요한 역할을 하는 다당류이다. 따라서 본 연구에서는 한약재 추출물이 *S. mutans*의 다당류 생성을 어느 정도 억제하는지 확인하기 위하여 액체배지에서 시간별 다당류의 양적 변화를 알아보았다. Table 4에서 보는 바와 같이 대조군에서는 배양 8시간만에 300 mg/100 ml의 다당류를 얻었으나, 지부자의 경우 200 mg/100 ml, 황금이 220 mg/100 ml의 다당류가 생성되어, 대조군 대비 약 50%의 감소효과를 보였다(Fig. 9).

Table 4. Effects of herbal medicines on *S. mutans* KCTC 3065 polysaccharide production

Sample Names	Time (hr) polysaccharide (mg/100ml cultured medium)					
	0	8	12	16	24	48
<i>Scutellariae radix</i>	16	220	200	175	155	150
<i>Lycopi herba</i>	15	200	180	170	165	160
Control	20	300	280	220	220	210

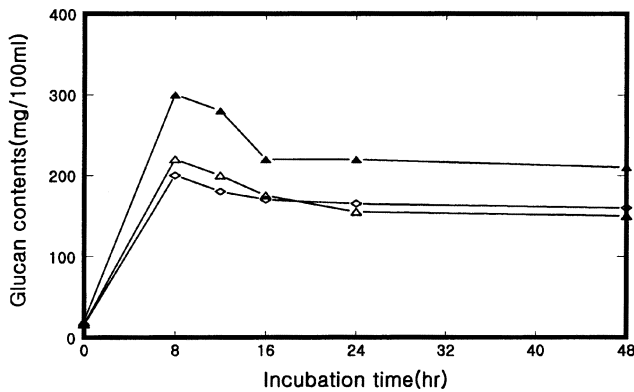


Fig. 9. The effect of *Lycopi herba* and *Scutellariae radix* on *S. mutans* KCTC 3065 polysaccharide production.

-○- *Lycopi herba*, -◇- *Scutellariae radix*, -▲- Control

이는 초기 투여량이 최소억제농도보다 적은 ml당 2 mg으로 투여했기 때문인 것으로 사료되며, 한²⁵⁾ 등이 연구한 다당류 분획의 화학적 특성을 확인한 바 glucan성 다당류였다.

이상의 결과로 지부자, 황금 추출물은 치면세균막 형성에 중요하게 작용하는 *S. mutans*의 다당류 생성을 억제할 것으로 여겨지며 이들 추출물의 활용은 새로운 항우식 물질의 요구에 적절히 대응할 수 있는 천연성 소재로써 의미가 있는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 국내에서 유통되는 63종의 한약제 열수 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균효과를 paper disc method로 검색하여, 항균효과가 우수한 지부자, 황금의 *S. mutans* 성장에 관한 영향을 평가하였다.

- 63종의 한국산 한약제 열수 추출물의 항균효과를 탐색한 결과 *S. mutans*에 대한 항균력이 우수한 순서는 지부자, 황금순이었다. Paper disc method에 의한 항균활성 측정 (20 mg/ml 투여) 결과는 지부자가 6.3 mm, 황금이 3.5 mm 이었다.
- 한약제 추출물의 *S. mutans* 성장에 대한 효과는 대조군이 8시간에서 1.05로 최대 성장률을 보였으나, 지부자, 황금 추출물 2 mg/ml을 투여한 배지에서는 16시간 만에 0.91, 0.87로 최대 성장을 보였다.
- S. mutans*를 8시간 동안 배양한 후 배지내 pH를 측정 한 결과 대조군은 5.08 이었으며, 지부자, 황금 추출물이 투여된 배지는 5.80, 5.74 이었다.

- S. mutans*를 8시간 동안 배양한 후 배지내 탄수화물 변화량을 측정 한 결과 대조군은 0.81 mg/ml 이었으며, 지부자, 황금 추출물이 투여된 배지는 1.70 mg/ml, 1.84 mg/ml 이었다.
- S. mutans*를 8시간 동안 배양한 후 배지내 단백질 변화량을 측정 한 결과 대조군은 8.39 mg/ml 이었으며, 지부자, 황금 추출물이 투여된 배지는 9.52 mg/ml, 9.28 mg/ml 이었다.
- S. mutans*의 다당류 생성에 미치는 효과는 대조군의 경우 배양 8시간에 300 mg/100 ml을 생성하였으나, 지부자, 황금 추출물이 투여된 배지에서는 200 mg/100 ml, 220 mg/100 ml을 생성하였다.

참고문헌

- Hamada S, Koga T, Ooshima T: Virulence factors of *streptococcus mutans* and dental caries prevention. J Dent Res 63: 407-411, 1984.
- Gibbons RJ, van Houte J: Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu Rev Microbiol 29: 19-44, 1975.
- McGhee JR, Michalek SM: Immunobiology of dental caries Microbial aspects and local immunity. Ann Rev Microbiol 35: 595-635, 1981.
- Namba T, Tsunozuka M, Hattori M, Kadota S, Kikuchi T: Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines Screening of crude drugs for inhibitory action on plaque formation. Proc. Symp. WAKAN-YUKU 15: 179-186, 1982.
- Miyoshi M, Imoto T, Kasagi T: Antieurodontic effect of various fraction extracted from the leaves of *Gymnema sylveser*. J Yonago Med Ass 38: 127-137, 1987.
- Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K, Tanaka T, Ooshima T, Kamada S: Inhibitory effect of Oolong tea polyphenols on glycosyltransferase of mutans streptococci. Appl Environ Microbiol 59: 968-973, 1993.
- Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T, Kawabata S, Hamada S: Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. Caries Res 27(2): 124-129, 1993.
- Otaka S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M: Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res 25(6): 438-443, 1991.
- Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T: Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*-A cariogenic bacterium. Agr Bio Chem 53(9): 2307-2311, 1989.
- Takasago K: Inhibitor of cariogenic bacteria. Japan patent 25890, 1990.
- 유윤정, 박용석, 광월아, 윤준호, 민연숙, 권호근, 이승일: 황연, 후박 및 구연산 혼합제제물에 의한 *Streptococcus mutans*의 증식 및 hydroxyapatite 비드 부착 억제 효과. 대한구강보건학회지 20(2): 259-270, 1996.
- 도동선, 민병선, 배기환: 관중의 항균성물질 분리 및 충치균에 대한 항균력 평가. 약학회지 40(4): 478-481, 1996.
- 유윤정, 광월아, 조장기, 장희순, 권호근, 이승일, 박용석, 박재환: 자몽씨, 결명자 및 당귀에 의한 *Streptococcus mutans*의 증식 억제 효과. 대한구강보건학회지 20(1): 107-120, 1996.
- 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.
- 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.
16. 陳存仁: 韓方醫藥大事典. 동도문화사. 361, 1984.
 17. Nazar Singh, I.S. Nirula: Chemical investigation of *Kochia indica*. Indian. J Pharm 21(4): 4-7, 1958.
 18. Tandon JS, Agarwal NP: Chemical examination of *Kochia trichophylla*, Indian. J Chem 4: 545, 1966.
 19. Jack A, Kernan, EwenCoxworth, Sharon Fleming: Micro-determination of triterpene sapogenin content of *Kochia scoparia* seed using Gas-liquid chromatography. J Agr Food Chem 21(2): 232-234, 1973.
 20. Tang W, Eisenbrand G: Chinese Drugs of plant origin. Springer Verlag pp. 919-929, 1992.
 21. Kenichi Abe, Osamu Inoue, Eizaburo Yumioka: Biliary excretion of metabolites of baicalun and baicalein in rats. Chem Pharm Bull 38(1): 208-211, 1990.
 22. Kubo M, Matusuda H, Kimura Y, Okuda H, Higashino M, Tani T, Namba K, Arichi S: Studies on Scutellariae Radix. VII. Anti-arthritic and anti-inflammatory action of methanolic extract and flavonoid components from Scutellariae Radix. Chem Pharm Bull 33: 2411-2415, 1984.
 23. Kubo M, Matusuda H, Kimura Y, Okuda H, Arichi S: Scutellariae Radix. X. Inhibitory effects of various flavonoids on histamine release peritoneal mast cells *in vitro*. Chem Pharm Bull 32: 2724-2729, 1984.
 24. Kimura Y, Okuda H, Tani T, Arichi S: Studies on Scutellariae Radix. IV. Effects of various flavone compounds on lipid peroxidation in rat liver. Chem Pharm Bull 30: 1792-1795, 1982.
 25. 한만덕, 이준우, 나수정, 이은숙, 전은숙: 분획으로 분리한 *Streptococcus mutans* KCTC 3065 다당류의 화학적 특성. 대한구강보건학회지 24(3): 259-270, 2000.

(Received May 28, 2002; Accepted June 24, 2002)

