

## Oleanolic acid 및 Ursolic Acid의 *Streptococcus downei*에 대한 항균작용

박재윤<sup>1</sup> · 김화숙<sup>†</sup>

<sup>1</sup>조선대학교 의과대학전문대학원 생화학 분자생물학교실, 전남과학대학 치위생과

### Antimicrobial Effect of Oleanolic Acid and Ursolic Acid against *Streptococcus downei*

Jae-Yoon Park<sup>1</sup> and Hwa-Sook Kim<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Department of Dental Hygiene, Chunnam Techno College, Chunnam 516-911, Korea

**Abstract** Oleanolic acid (OA) and ursolic acid (UA) are triterpenoid compound present in many plants. This study examined the antimicrobial activity of OA and UA against *Streptococcus downei*. The antimicrobial activity was evaluated by the minimal inhibitory concentration (MIC) and time kill curves. The MIC values of OA and UA for *S. downei* isolated from the Korean population were 8 µg/ml. OA and UA had a bactericidal effect on *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup> above 2 × MIC, 16 µg/ml and 8 µg/ml, respectively. The results suggest that OA and UA can be used in the development of oral hygiene products for the prevention of dental caries.

**Key words** Antimicrobial effect, Oleanolic acid, *Streptococcus downei*, Ursolic acid

## 서 론

치아우식증은 구강 내 치면세균막에 존재하는 세균들의 당질대사의 부산물로 분비되는 젖산 등의 유기산에 의해 법랑질 표면의 수산화인회석의 칼슘 등이 탈회되어 발생되는 대표적인 세균 감염성 구강질환이다<sup>1)</sup>. 치아우식증의 주요한 원인균종은 뮤탄스 그룹 연쇄상구균(뮤탄스 연쇄상구균)인 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 뮤탄스 연쇄상구균은 16S ribosomal RNA 유전자(16S rDNA)의 핵산염기서열 비교 분석법에 의해 다른 5종류의 연쇄상구균 그룹들로 분리되었다<sup>3)</sup>. 뮤탄스 연쇄상구균에는 *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. rattus*, 그리고 *S. cricetus* 종들이 속하는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 뮤탄스 연쇄상구균 중 *S. mutans*와 *S. sobrinus*는 사람의 구강 내에서 주로 서식하며 분리되었고, *S. downei*는 원숭이에서 분리, *S. rattus*는 흰쥐에서 분리, 그리고 *S. cricetus*는 햄스터에서 분리된 종이다. 하지만, 최근에 *S. downei*가 사람의 구강 내에서도 서식하는 것이 보고되었다<sup>4)</sup>.

세균 감염성질환의 치료 및 예방에 사용되는 대표적인

물질이 항생제이다. 그러나, 항생제를 지속적으로 사용할 경우 이에 대한 내성을 갖는 세균들이 발생하기 때문에 치아우식증과 같은 만성세균감염성질환의 예방을 위해 사용할 수는 없다. 이러한 항생제의 내성에 대한 단점을 극복하기 위한 노력으로 민간요법으로 사용되고 있는 천연물로부터 새로운 항균물질을 추출하려는 연구가 진행되고 있다<sup>5-9)</sup>. 최근 식용 및 의약품용 허브의 식물로부터 추출된 trieterpenoid saponins 유도체인 oleanolic acid (3β-3-hydroxyolean-12-en-28-oic acid, OA)와 ursolic acid (3β-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid, UA)가 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*에 대한 항균력이 있는 것으로 보고되었다<sup>10,11)</sup>. 그러나, 사람의 구강 내 서식하는 뮤탄스 연쇄상구균 중 *S. downei* 세균종에 대한 OA와 UA의 항균능을 알아보기 위한 연구는 이루어지지 않은 상태이다.

그러므로, 본 연구에서는 현재 치아우식증을 유발하는데 관여한다고 알려진 뮤탄스 연쇄상구균 중 최근에 사람의 구강 내에서 서식하는 것으로 밝혀진 *S. downei* 세균종을 이용하여 *S. downei*의 표준균주 및 한국인에서 분리 동정된 임상균주들에 대한 OA와 UA의 항균능을 알아보고자 시행하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author  
Tel: 061-360-5375  
Fax: 061-360-5377  
E-mail: marblehall76@hanmail.net

## 연구재료 및 방법

### 1. 세균 및 세균 배양

본 연구에 사용된 *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>은 America type culture collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 한국인에서 분리 동정된 4균주의 *S. downei*(KCOM 1165, KCOM 1166, KCOM 1167, KCOM 1168)들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, KCOM)에서 분양 받아 사용하였다. 이들 세균들은 Todd Hewitt(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 한천배지에 도말하여, 37°C 세균배양기에서 1-2일간 배양한 후 다음 실험에 사용하였다.

### 2. 최소성장억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

뮤탄스 연쇄상구균 균주들에 대한 OA와 UA(Sigma, St. Louis, MO, USA)의 항균성을 알아보기 위해 MIC를 액체배지희석법<sup>12)</sup>으로 측정하여 분석하였다. TH 액체배지를 이용하여 37°C 세균배양기에서 뮤탄스 연쇄상구균을 24시간 배양한 후, 파장 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여  $1 \times 10^6$  CFU/ml가 되도록 액체배지로 희석하였다. OA와 UA를 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 세균 배양액에 첨가(세균배양액의 1%가 되도록 첨가)하였다. 이때 OA와 UA는 Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma)에 녹여 사용하였다. 실험의 음성대조군은 DMSO를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였고, 양성대조군은 ampicillin (100 mg/ml)를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였다. 96 well plate에 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 37°C에서 24시간 동안 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험군 및 대조군은 모두 3반복씩 실험하였다.

### 3. Time Kill 분석

OA와 UA를 첨가한 후 시간이 경과함에 따른 *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>에 대한 항균활성을 조사하여, OA와 UA가 뮤탄스 연쇄상구균에 대해 정균제 또는 살균제로 작용하는지를 알아보기 위해 time kill 분석을 시행하였다. 활성 검사를 통해 얻은 MIC값을 기준으로 0.5×MIC, 1×MIC, 2×MIC 및 4×MIC의 농도에서 0, 3, 6, 12 및 24 h 경과함에 따른 활성을 측정하였다.

파장 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여  $1 \times 10^7$  CFU/ml가 되도록 TH 액체배지로 희석하고 96 well plate에 액체배지 270  $\mu\text{l}$ 를 분주 한 후 활성물질을 각각의 농도가 되도록 희석하여 희석된 균주 30  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응시켰다. 반응 시간에 따라 10  $\mu\text{l}$ 를 취하여 각각의 TH 한천배지에 도말하여 48시간 동안 배양한 후 형성된 균락을 계수화 하였다. 이 때, 6시간 이하 배양한 그룹은  $10^2$  및  $10^3$ 배 희석하였고, 나머지 그룹은  $10^3$  및  $10^5$ 배 희석하였다. 각 반응은 모두 3반복하여 평균하였다.

## 결 과

*S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>에 대한 OA의 MIC 값은 8  $\mu\text{g/ml}$ 에서 감수성을 보였고, 한국인에서 분리 동정된 4균주 *S. downei* KCOM 1165, KCOM 1166, KCOM 1167 및 KCOM 1168의 MIC 값에서도 동일한 결과를 얻었다. *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>에 대한 UA의 MIC 값은 4  $\mu\text{g/ml}$ 에서 감수성을 보였고, *S. downei* KCOM 1165에서도 동일한 값을 얻었지만, *S. downei* KCOM 1166, KCOM 1167 및 KCOM 1168에 대한 UA의 MIC 값은 8  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다(Table 1).

*S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>에 대한 OA와 UA의 time kill 분석 결과 2×MIC(각각 16  $\mu\text{g/ml}$ 과 8  $\mu\text{g/ml}$ ) 이상의 농도에서 세균성장억제 효과를 가졌다(Fig 1, 2).

Table 1. MIC test of OA and UA against *S. downei*

| Species & strains                                     | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |    |
|---|--------------------------|----|
|   | OA                       | UA |
| <i>S. downei</i> ATCC <sup>1</sup> 33748 <sup>T</sup> | 8                        | 4  |
| <i>S. downei</i> KCOM <sup>2</sup> 1165               | 8                        | 4  |
| <i>S. downei</i> KCOM 1166                            | 8                        | 8  |
| <i>S. downei</i> KCOM 1167                            | 8                        | 8  |
| <i>S. downei</i> KCOM 1168                            | 8                        | 8  |

<sup>1</sup>ATCC, America type culture collection; <sup>2</sup>KCOM, Korean collection for oral microbiology

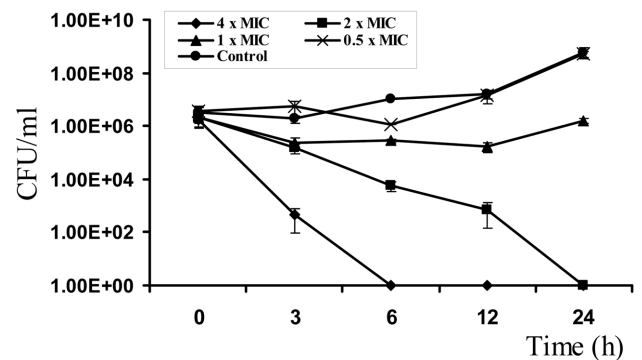


Fig. 1. Time kill curves of oleanolic acid on *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>.

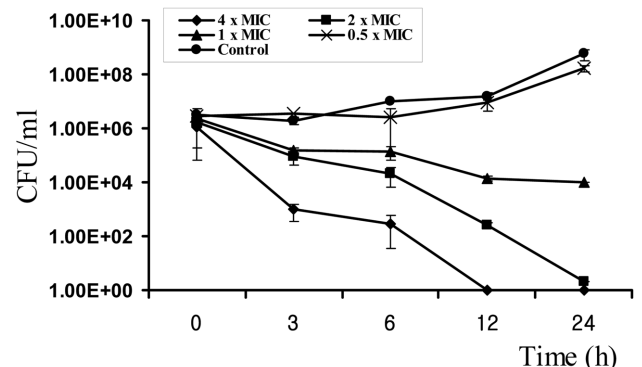


Fig. 2. Time kill curves of ursolic acid on *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>.

## 고 찰

Triterpenoid saponins 유도체인 OA와 UA는 이성질체로 생물학적 활성 때문에 치료제로서 관심이 집중되고 있다. OA는 항세균<sup>12)</sup>, 항진균<sup>13)</sup>, 항염증<sup>14)</sup>, anti-HIV<sup>15)</sup>, 항암<sup>16)</sup> 효과 등이 알려져 있다. 또한, OA는 CYP2E1의 발현을 억제하여 독성이 있는 대사물질의 형성을 막아주기 때문에 간을 보호하는 효과도 있다<sup>17)</sup>. UA는 항세균<sup>12)</sup>, 항암<sup>18)</sup>, 항염증<sup>19)</sup>, 간보호<sup>20)</sup> 효과 등으로 잘 알려져 있다. 특히, UA는 암세포의 성장과 전이에 필수적인 비정상적인 신혈관 형성을 막는 작용을 한다<sup>21)</sup>.

본 연구 결과 *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>에 대한 OA와 UA의 MIC 값은 각각 8 µg/ml와 4 µg/ml로 한국인에서 분리 동정된 *S. downei* KCOM 1165 균주의 MIC 값과 동일하였다. 하지만 *S. downei* KCOM 1166, KCOM 1167 및 KCOM 1168에 대한 UA의 MIC 값은 8 µg/ml로 *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>과 차이가 있었다. 최근 Scalon Cunha 등<sup>22)</sup>은 *Miconia* 종으로부터 추출한 OA와 UA를 이용하여 *S. mutans* ATCC 25275<sup>T</sup>에 대한 항균력을 MIC 값을 구하여 측정하였다. 그 결과 UA와 OA는 *S. mutans* ATCC 25275<sup>T</sup> 균주에 대하여 각각 80 µg/ml과 70 µg/ml의 MIC 값을 보였다. 그러나 김 등<sup>23)</sup>의 연구에 의하면 OA는 *S. mutans* ATCC 25275<sup>T</sup>와 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>에 대하여 두 균주 모두 8 µg/ml의 MIC 값을 갖는 것으로 보고되었고, 본 연구와 동일한 농도에서 감수성을 보였다. *S. mutans* ATCC 25275<sup>T</sup>에 대한 OA와 UA의 항균력에 차이를 보였는데 이는 OA 및 UA가 여러 가지 식물성 음식과 의약품 허브 및 식물에 존재하고 있고, 두 물질은 이성질체로서 화학적 구조의 차이에 의한 것으로 생각된다(Fig 3). 이러한 연구 결과에 의하면, OA보다는 UA가 뮤탄스 연쇄상구균에 대한 항균능이 우수한 것으로 생각된다.

OA와 UA의 *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>에 대한 항균작용이 정균작용에 의한 것인지 살균작용에 의한 것인지를 알아 보기 위해 time kill 분석을 시행하였다. 그 결과, OA와 UA의 2×MIC(각각 16 µg/ml과 8 µg/ml) 이상의 농도에서 *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>에 대해 살균작용을 갖는다는 것을 알 수 있었다. 현재까지 OA와 UA가 어떤 기전으로 살균작용을 갖는 것인지 연구된 결과는 충분하지 않지만, Fontanay 등<sup>24)</sup>의 연구에 의하면, 그람 양성균의 세포질막(cell membrane)에 hopanoid의 존재 여부와 생합성과 관련된 것으로 보고 되고 있다. OA와 UA는 세균의 세포질막에 존재하는 hopanoid의 구조와 유사하며, 이는 UA의 (3β)-3-hydroxyurs-12-en-28-oic acid, OA의 3β-3-hydroxyolean-12-en-28-oic acid 구조와 유사하다. 따라서 OA는 5개 *S. downei* 균주에 동일한 항균성을 나타냈으나, UA의 경우 균주에 따라 항균효과의 차이를 보였다(4 µg/ml, 8 µg/ml). 이는 세포막내 hopanoid의 양적 차이와 생

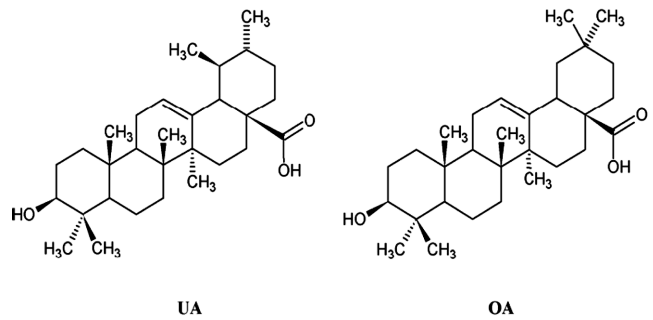


Fig. 3. Semi-plane chemical structure of ursolic acid(UA) and oleanolic acid(OA)

합성적 차이에 의해 항균활성의 차이가 있는 것으로 여겨진다. 그러나 이는 가설에 불과하기 때문에 추후 연구에 의해서 밝혀야 할 것으로 생각된다. 폐렴 및 세균성 심내막염 등의 전신질환과 관련된 미티스(mitis) 그룹의 연쇄상구균들이나 methicillin 저항성 포도상구균들도 그람 양성균임을 고려할 때, 전신질환의 예방 및 항생제 내성균주에 대한 항생제 대체제로 OA와 UA가 사용가능 할 것으로 생각된다.

이상의 연구결과를 종합할 때, triterpenoid saponins 유도체인 OA와 UA는 뮤탄스 연쇄상구균 중 사람의 구강내 서식하는 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*에 대해 살균제로 작용하는 항균능을 갖는다고 할 수 있다. 따라서 OA와 UA를 구강양치용액 및 치약 등의 구강위생용품 개발에 이용된다면 치아우식증을 예방하는데 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

Triterpenoid saponins 유도체인 OA와 UA가 치아우식증 원인균종의 하나인 *Streptococcus downei*의 표준균주(ATCC 33748<sup>T</sup>) 및 임상균주(4주)에 대하여, 액체배지희석법을 이용한 MIC값 측정 및 time-kill 분석법을 통한 살균작용 유무를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup> 및 *S. downei* 임상균주(4주)들의 OA 대한 MIC 값은 8 µg/ml로 동일하였고, UA의 대한 MIC 값은 *S. downei* 표준균주와 임상균주 간에 차이가 있었다.
2. Time-kill 분석법을 실시한 결과 OA와 UA는 *S. downei* ATCC 33748<sup>T</sup>에 대하여 2×MIC(각각 16 µg/ml과 8 µg/ml) 이상의 농도에서 살균작용을 갖는다는 것을 알 수 있었다.

이상의 연구결과를 종합할 때, triterpenoid saponins 유도체인 OA와 UA는 뮤탄스 연쇄상구균 중 최근에 사람의 구강내 치면세균막에 서식하는 것으로 밝혀진 *S. downei*에 대해 살균제로 작용할 수 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2001년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

## 참고문헌

1. Hamada S, Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44(2): 331-384, 1980
2. Loeshe WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 50(4): 353-380, 1986.
3. Kawamura Y et al.: Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol 45(2): 406-408, 1995.
4. Yoo SY et al.: First isolation of *Streptococcus downei* from human dental plaques. FEMS Microbiol Lett 249(2): 323-326, 2005.
5. Kubo I, Muroi H, Himejima M: Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. J Agri Food Chem 40(2): 245-248, 1992.
6. Kim DO et al.: Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. J Agri Food Chem 51(22): 6509-6515, 2003.
7. Lee ES et al.: Restraint effect on leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Casia tora* against periodontopathogens. J Korean Acad Dent Health 27(4): 569-579, 2003.
8. Lim SH et al.: Effect of Leaf-Extract from *Camellia sinensis* and Seed-Extract from *Casia tora* on viability of Mutans Streptococci isolated from the interface between orthodontic brackets and tooth surfaces. Korea J Orthod 33(5): 381-389, 2003.
9. Petti S, Scully C: Polyphenols, oral health and disease: A review. J Dent 37(6): 413-423, 2009.
10. Kozai K et al.: Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and ursolic acid. Caries Res 21(2): 104-108, 1987.
11. Whiley RA et al.: *Streptococcus downei* sp. nov. for Strains Previously Described as *Streptococcus mutans* Serotype h. Int J Syst Evol Bacteriol 38(1): 25-29, 1988.
12. Liu J: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. J Ethnopharmacol 49(2): 57-68, 1995.
13. Tang HQ et al.: Terpenoids and flavonoids from *Artemisia species*. Planta Med 66(4): 391-393, 2000.
14. Jeong TS et al.: Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. Planta Med 65(3): 261-263, 1999.
15. Kashiwada Y et al.: Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl ursolic acid derivatives. J Nat Product 63(12): 1619-1622, 2000.
16. Li Y, Matsuda H, Yoshikawa M: Effects of oleanolic acid glycosides on gastrointestinal transit and ileus in mice. Bioorg Med Chem 7(6):1201-1205,.
17. Jeong HG: Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury, Toxicol Lett 105(5): 215-222, 1999.
18. Es-saady D et al.: Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. Cancer Lett 106(2): 193-197, 1996.
19. Baricevic D et al.: Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. J Ethnopharmacol 75(2-3), 125-132, 2001.
20. Saraswat B et al.: Protective action of ursolic acid against chemical induced hepato-toxicity in rats. Indian J Pharmacol 28, 232-239, 1996.
21. Sohn KH et al.: Anti-angiogenic activity of triterpene acids. Cancer Lett 94(2), 213-218, 1996.
22. Scalon Cunha LC et al.: Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. Z Naturforsch C 62(9-10): 668-672, 2007.
23. Kim MJ et al.: Antimicrobial effects of oleanolic acid against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* isolated from a Korean population. Inter J Oral Biol 35(4): 191-195, 2010.
24. Fontanay S et al.: Ursolic, oleanolic and betulonic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. J Ethnopharmacol 120: 272-276, 2008.

(Received December 20, 2010; Revised February 16, 2011; Accepted February 24, 2011)

