

마 추출물의 구강병 원인균에 대한 항균력

정 기 옥

대구보건대학 치위생과

색인: 구강병 원인균, 마, 항균력

1. 서 론

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 있다¹⁾. *S. mutans*는 치면에 부착, 증식 및 산 생성과정을 거쳐 치아 우식을 유발한다²⁾.

치주질환은 구강위생이 불량할 때 치면세균막이 축적되면 치은의 염증과 치주낭이 형성되며 이 곳에 산소 분압이 낮아 혐기성 세균이 급증하고 이 치면세균막을 관리하지 않으면 치면세균막이 더 형성되어 치주인대의 염증과 치조골을 흡수시키고 치아의 동요를 야기시켜 결국에는 치아상실을 초래하는 중년기 이후의 주요 구강병이다³⁾. 최근의 연구들은 흑색집락형성

Gram 음성 혐기성 세균이 주 원인균이라고 밝히고 있으며, *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*)는 치주염, 특히 성인형 치주염과 깊은 연관성이 있는 것으로 치근단 감염과 치주질환을 일으키는 세균 중 가장 독성이 강한 것으로 보고되었다⁴⁾.

치과치료 후의 병원성 감염을 유발하는 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)는 심내막염, 균혈증, 복막염 그리고 연조직 감염 등에 이 균이 깊이 관여하고 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 건강인의 비강, 인후의 점막이나 피부에 정상 세균총으로 존재하며, 기회감염을 통하여 국소 및 전신감염을 유발하는 그람양성구균으로 화농성 감염의 80% 이상을 차지하는 감염성 질환의 주요 원인균이다⁵⁾.

구강질환에 천연추출물을 이용하여 안전성이 높고 내성균주의 출현 및 조직의 위해 작용도 적어 부작용 없이 지속적으로 작용할 수 있는

새로운 물질을 개발하고자 다양한 연구가 진행되고 있다. 마(*Dioscorea batatas* 이하 *Yam*)는 Dioscoreaceae과, Dioscorea속에 속하는 다년생 덩굴식물로서 마에 관한 연구로는 콜레스테롤 저하작용⁶⁾ 마 점질물의 중금속 제거능과 혈압 상승호르몬인 안지오텐신 변환효소(angiotensin converting enzyme) 저해 효과⁷⁾ 등의 보고가 있었다. 마를 이용한 구강위생에 미치는 바를 관찰한 연구가 미흡하여 본 연구에서는 마를 대상으로 보편적인 추출법인 methanol에 추출한 다음 좀더 우수한 항균활성 물질을 찾고자 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 등의 용매 분획별 추출물로서 항균력을 조사하여 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

2.1.1 재료

이 실험에서 사용한 마는 대구 약령시 약재 상에서 건조상태의 것을 구입하여 사용하였다

2.1.2 기기 및 시약

실험에 사용한 기기로는 CO₂ incubator (Sanyo, MCO-17 AIC, Japan), anaerobic chamber (Thermo, Forma Scientific Co., U.S.A), ELISA reader (Molecular Device, SpecTRA MAX 340, Austria), high speed centrifuge 등이었고, 그 외 실험실에서 사용하는 일반기구들을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획에 사용된 용매로써 methanol, n-hexane 등은 J. T. Baker사 (U.S.A.)의 특급시약을 사용하였으며, hemin, vitamin K₁ 등은 Sigma사(U.S.A.), Brain Heart Infusion broth, Brain Heart Infusion agar, Mitis

Salivarius agar, Muller Hinton broth, Muller Hinton agar, Trypticase Soy broth, Trypticase Soy agar, hemin, menadione 등은 Difco사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. Potassium tellurite, bacitracin 등은 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였다.

2.1.3 시료의 추출 및 분획

분쇄한 각 시료에 10배량(w/v)의 80% methanol을 가하여 24시간씩 3회 정치하여 추출하고, 추출액은 여과지(Adventec toyo2, Toyo Roshi Kaisha, Japan)를 사용하여 2회 감압 여과하고 rotary vacuum evaporator로 농축하였다. 이를 동결건조 후 dry keeper에 보관하여 사용하였으며, 메탄올 추출물의 용매분획은 항균성 검색에서 항균활성이 높게 나타난 마추출물이 methanol 추출물에 일정량의 증류수를 가하여 현탁 시킨 후 증류수와 동량의 n-hexane을 가하여 진탕하고 방치한 다음 분획 후 농축하여 n-hexane 분획을 얻었다. 남아있는 수용성층을 이와 같은 방법으로 chloroform, ethyl acetate 및 n-butanol을 첨가하여 순차 분획한 후 농축하여 각각 chloroform 분획, ethyl acetate 분획 및 n-butanol 분획을 얻었고 남은 수용성층은 농축하여 물 분획으로 하였다. 위 시료들은 동결건조 후 dry keeper에 보관하여 사용하였다.

2.2 항균성 시험

2.2.1 사용균주 및 배지

이 실험에 사용한 균주들은 *S. mutans* KCTC 5316, *P. gingivalis* KCTC 5352, *S. aureus* KCTC 1927로 한국생명공학연구소로부터 분양받아 사용하였다.

2.2.2 디스크 확산법

시료의 항균성 검색은 paper disk(Ø 6mm)를

이용한 agar diffusion법(국립보건원 1985)으로 실험하였다. Agar plate에 미리 배양한 균 배양액을 McFarland No. 0.5 농도가 되게 희석시킨 후 멸균 면봉으로 도말하고 추출물을 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)에 용해한 후 paper disk에 30 μ l를 흡수시켜 건조시켰다. 용매를 완전히 휘발시킨 다음 agar plate 표면에 paper disk를 놓아 밀착시키고 멸균수 20 μ l로 확산시켰다. 박테리아는 37°C 배양기에서 24~48시간 배양한 후, disk 주위의 inhibition zone (mm)의 직경을 측정하였다.

2.2.3 최소성장억제농도 측정

마 핵산 추출물의 최소성장억제농도(minimal inhibitory concentration: MIC)를 측정하기 위해 액체배지희석법⁸⁾을 이용하였다. 96-microwell plate에 broth를 분주한 후 시료 최고농도 16 mg/ml에서 최저농도 0.0625 mg/ml까지 연속적으로 단계 희석하였다. 균 배양액을 McFarland No. 0.5 농도가 되게 희석한 후, 다시 100배 희석한 균액을 각 well에 분주하여 박테리아는 37°C 배양기에서, 균의 증식이 없는 농도를 최소성장억제농도로 하였다.

2.2.4 농도에 따른 생균수 측정

마 핵산 추출물의 *S. mutans*에 대한 생육저해 작용은 BHI broth에 초기 균수가 약 10^6 CFU/ml가 되도록 조정하여 측정하였다. 마 핵산 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도로 첨가 후, 37°C, CO₂ 배양기에 24시간 배양하면서 일정량의 배양액을 Mitis Salivarius agar(1%

potassium tellurite, 0.2 unit bacitracin)에 접종하여 배양시간에 따른 생균수를 측정하였다.

2.3 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 자료의 분석과 통계처리는 SAS 8.01을 사용하여 Levene 통계량을 이용하여 등분산에 대한 검정 한 다음, 등분산이 인정되면 각 실험군에 대한 다중검증을 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.

3. 결과 및 고찰

3.1 항균성 시험

3.1.1 마 메탄올 추출물의 항균성

구강미생물에 대한 항균성을 검색하기 위하여 메탄올로 추출하여 1차 항균성을 조사한 결과는 <표 1>과 같다. 마는 *S. mutans*에 대해 강한 항균성이 나타났으며 *P. gingivalis*, *S. aureus* 2종의 균주에 대해 항균성이 나타나지 않았다.

3.1.2 마 메탄올 추출물의 용매 분획별 항균성

항균활성이 우수한 마의 메탄올 추출물을 각종 용매로 분획하여 항균활성을 측정한 결과는 <표 2> 및 <그림 1>과 같다. *S. mutans*에는 특이적으로 마의 핵산분획 추출물에서 항균력이 가장 우수하였으나 *P. gingivalis*, *S. aureus* 2종에서

Table 1. Antibacterial activities of methanol extract of *Yam*

(10 mg/ml)

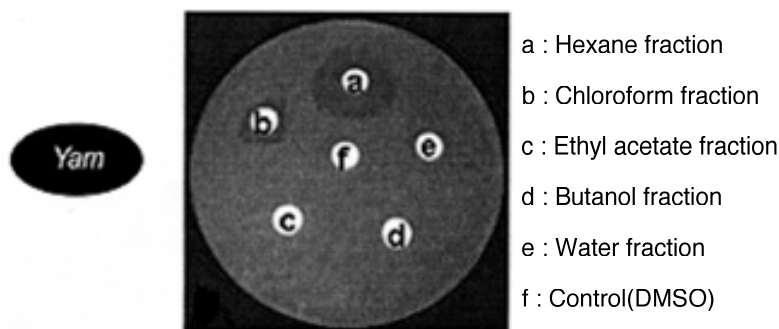
Botanical name	Inhibition zone (mm)*		
	<i>S. mutans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Dioscorea batatas</i>	17	-	-

*: Diameter, -: No inhibition

Table 2. Antibacterial activities of various solvent fractions from methanol extract of *Yam* (10 mg/ml)

Strains	Inhibition zone (mm)*				
	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Water
<i>S. mutans</i>	23±1.7	12±1.0	-	-	-
<i>P. gingivalis</i>	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 3 experiments, *: Diameter

Fig. 1. Antibacterial activities of various fractions from methanol extract of *Yam*(10 mg/ml)

는 항균력이 없었다. 분획별로는 헥산에서 가장 항균력이 강하였으며 *S. mutans*에 가장 항균력이 우수하였다. 전형오는⁹⁾ 오미자의 헥산 추출물이 *S. mutans*에 대해 강한 항균력이 있음을 보고하였고, 남상해 등¹⁰⁾은 두송실의 헥산 추출물이 *S. mutans*에 강한 항균력이 있다고 보고하였다. 이 실험에서도 마찬가지로 마 역시 헥산 분획의 추출물에서 우수한 항균력을 보였다.

3.1.3 마 헥산 추출물의 최소성장억제 농도

마 헥산 추출물의 *S. mutans*에 대한 최소성장억제농도(minimal inhibitory concentration: MIC)를 측정한 결과 마가 0.25 mg/ml 나타났

다. 오미자의 헥산 추출물에서 *S. mutans*에 대한 효과가 있어 헥산을 3종의 분리된 활성물질 gomisin N, gomisin A, Schizandrol A를 얻었다고 보고하였다⁹⁾. Chung 등¹¹⁾은 육두구에서 분리된 macelignan이 *S. mutans*와 *S. aureus*에 성장억제효과가 나타났다고 보고되었다. 김신규 등¹²⁾은 호장근으로 부터 분리, 동정한 emodin이 *S. mutans*에 성장억제효과가 나타났다고 보고하였다. 이와 같은 선행연구에서는 마보다 모두 낮은 농도에서도 성장억제를 보인 것으로 보아 이들은 순수 물질을 분리하여 측정한 결과이므로 마 또한 순수 물질을 분리, 동정하여 실험한다면 더 낮은 농도에서도 성장억제력을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

Table 3. Minimal inhibitory concentrations of hexane extracts on the growth of oral bacteria (10 mg/ml)

Strains	Concentration (mg/ml)
	<i>Yam</i>
<i>S. mutans</i>	0.25

Each value represents the mean of 3 experiments

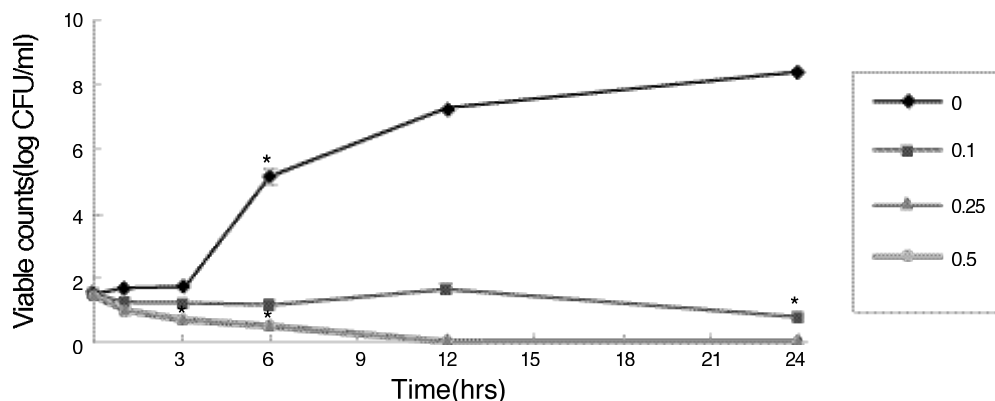


Fig. 2. Inhibitory effect of hexane fraction of Yam on the growth of *S. mutans* (mg/ml)

* pE0.05 compared with control

3.1.4 마 헥산 추출물의 농도에 따른 생균수 측정

*S. mutans*의 생균수를 측정한 결과는 <그림 2>와 같다. 마 헥산 추출물을 첨가하지 않은 배지의 대조군에는 3시간 이후부터 급격히 균수가 증가하기 시작하여 6시간부터 통계적으로 유의하게 증가하였다(pE0.05). 한편, 마 헥산 추출물을 0.1 mg/ml의 농도로 첨가한 경우는 12시간까지 균수가 초기와 유사하였으나, 24시간 이후 통계적으로 유의하게 균수가 점차 감소하였다(pE0.05). 0.25 mg/ml의 농도에서는 3시간 동안 균수가 초기와 유사하였으나, 6시간 이후부터 시간이 지남에 따라 통계적으로 유의하게 감소되었고 24시간 이후 완전 사멸하였다(pE0.05). 또한 0.5 mg/ml의 농도에서는 3시간부터 감소하기 시작하여 24시간 이후 완전 사멸하여 시간이 지남에 따라 통계적으로 유의하게 감소됨을 보였다. 마의 헥산 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 *S. mutans*의 생균수가 감소되었다. 통계학적인 분석결과, 시간의존적 농도별 생균수는 1시간까지는 유의성이 없었으나 3시간 이후부터는 0.5 mg/ml에서만 유의하게 감소되었으며, 6시간 이후 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml 모두에서 대조군과 비교하여

유의하게 감소되었다(pE0.05). 12시간부터 모든 군에서 유의한 차이를 보여, 농도의존적 유의한 생균감소를 보았으며, 24시간 이후에는 0.1 mg/ml과 비교한 결과 0.25와 0.5 mg/ml에서 완전사멸을 보여 농도의존적 시간의존적으로 생균감소를 보여 통계학적 유의성을 나타내었다(pE0.05). 이 실험의 결과, 0.25 mg/ml 농도에서 24시간 이후 균이 완전 사멸한 것은 최소성장억제농도(MIC)가 0.25 mg/ml인 것과 일치하였다.

4. 결 론

마 추출물의 용매 분획별 구강병 원인균에 대한 항균력을 조사하였다. 마의 메탄올 추출물을 용매 분획별로 항균력을 조사한 결과, 마 헥산 추출물은 3균주와 비교한 결과 특이적으로 *S. mutans*에서만 항균력이 있었고 *P. gingivalis*, *S. aureus* 2균주에 대해 항균력이 나타나지 않았다. *S. mutans*에 대한 마 헥산 추출물의 최소성장억제농도(MIC)는 마가 0.25 mg/ml이었다. 마의 헥산 추출물의 *S. mutans*에 대한 시간, 농도별 생균수를 비교해본 결과 6시간 이후 0.1,

0.25, 0.5 mg/ml 모두에서 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였고 24시간 이후 0.1 mg/ml과 비교시 0.25, 0.5 mg/ml에서 각각 통계적으로 유의하게 감소됨을 확인하였다.

참고문헌

1. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infect Immun* 1975;11(6):1252-1260.
2. Hamada S, Koga T, Ooshima T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J Dent Res* 1984;63(3):407-11.
3. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1976;84(1):1-10.
4. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 1988;52(1):134-52.
5. 김강주. 치과영역 포도상구균(*Staphylococcus*)의 분포 및 항생제 내성. 대한치과의사협회지 1996;34(2):110-118.
6. 권정숙, 손인숙, 심지형, 권인숙, 정구민. 마(Dioscorea)의 콜레스테롤 저하작용 및 그 작용기전. *한국영양학회지* 1999;32(6):637-643.
7. 하영득, 이삼빈, 박연길. 마 점질물의 중금속 제거능과 ACE저해효과. *한국식품영양과학회지* 1998;27(4):751-755.
8. 국립보건원. 병원미생물검사기준. 1985: 55-67.
9. 전형오. *Streptococcus mutans*에 대한 오미자(*Schizandra chinensis*)의 항균활성 성분. 충남대학교 대학원 석사학위논문 2000.
10. 남상해, 양민석, 최상도, 장대식, 서원택. 두송실에 의한 충치균의 유기산 생성억제 효과. *한국농화학회지* 1998;41(5):395-398.
11. Chung JY, Choo JH, Lee MH, Hwang JK. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans*(nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine* 2006;13:261-266.
12. 김신규, 송주희, 김종배, 장기완, 전재규. 호장근의 항세균효과 및 항부착효과. 대한구강보건학회지 2005;29(1):80-89.

Abstract

Antibacterial activities against oral microbes by *Yam* extract

Gi-Ok Jung

Department of Dental Hygiene, Daegu Health College

Key words : Antibacterial Activity, Oral Microbes, *Yam*

Yam was stepwise extracted with hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water. Antibacterial activity of each extract was investigated.

1. Methanol extract of *Yam* was examed against to antibacterial effects on *S. mutans* KCTC 5316, *P. gingivalis* KCTC 5352, *S. aureus* KCTC 1927 by means of agar diffusion method.
2. The methanol extract of *Yam* was showed very powerfull antibacterial activity on *S. mutans*, but not showed on *P. gingivalis*, and *S. aureus*.
3. The MIC of *Yam* hexane fraction was 0.25 mg / ml for *S. mutans* KCTC 5316.
4. The *Yam* hexane fraction strong inhibited the growth of *S. mutans*, in the culture medium at concentration of 0.25 mg / ml.