

*Streptococcus mutans*를 억제하는 오배자 구성물질의 분리 및 정제에 관한 연구

신애리¹, 옥승호^{2,3}, 최충호^{1,3}, 홍석진^{1,3}전남대학교 치의학전문대학원 ¹예방치과학교실, ²구강미생물학교실, ³치의학연구소

Identification and partial purification of antibacterial compounds against *Streptococcus mutans* from *Galla Rhois*

Ae-Ri Shin¹, Seung-Ho Ohk^{2,3}, Choong-Ho Choi^{1,3}, Suk-Jin Hong^{1,3}¹Department of Preventive & Public Health Dentistry, Chonnam National University School of Dentistry,²Department of Oral Microbiology, Chonnam National University School of Dentistry,³Dental Science Research Institute, Chonnam National University School of Dentistry, Gwangju, Korea

Received: September 10, 2015

Revised: March 14, 2016

Accepted: March 21, 2016

Corresponding Author: Suk-Jin Hong
Department of Preventive & Public Health
Dentistry, Chonnam National University
School of Dentistry, 33 Yongbong-ro,
Buk-gu, Gwangju 61186, Korea
Tel: +82-2-62-530-5835
Fax: +82-2-62-225-9618
E-mail: sjhong@chonnam.ac.kr

*This research was supported by Basic
Science Research Program through
the National Research Foundation of
Korea (NRF) funded by the Ministry of
Education (2011A0012875).

Objectives: This study aims to identify and partially purify antibacterial compounds against *Streptococcus mutans* from *Galla Rhois* extract.

Methods: *Galla Rhois* was extracted with n-hexane or ethanol and concentrated in a rotary evaporator. The antibacterial effect of the *Galla Rhois* extract against *S. mutans* was determined by the paper disc-diffusion method with n-hexane, ethanol, methanol, ethyl acetate, dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone, and distilled water as the solvents. The active compounds were purified by partition chromatography, thin-layer chromatography (TLC), and high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results: The antibacterial effect of the n-hexane extract was more effective against *S. mutans* than the ethanol extract ($P < 0.05$). The antibacterial component of *Galla Rhois* was partially purified using partition chromatography and HPLC, and the antibacterial activity was confirmed.

Conclusions: The partially purified component of *Galla Rhois* showed strong antibacterial effect against *S. mutans*. These results confirm that the antibacterial compounds of *Galla Rhois* can be used for the prevention of dental caries.

Key Words: Antibacterial compounds, Column chromatography, *Galla Rhois*, Partition chromatography, *Streptococcus mutans*, Thin-layer chromatography

서론

치아우식증은 일반적인 감염성 질환으로 *Streptococcus mutans* (이하 *S. mutans*)는 치아우식증을 일으키는 가장 중요한 세균이다¹⁾. *S. mutans*의 성장을 억제하는 마늘, 딸베리 등 항균효과가 있는 다양한 식물추출물의 구성물질을 확인하는 많은 연구가 진행

되고 있다²⁻⁵⁾.

그 중 오배자(*Galla Rhois*)는 불나무 앞에 오배자 진딧물이 산란하여 생긴 벌레집으로서 예로부터 수렴지시제, 외상출혈 치료에 사용되어져 왔으며 그들의 높은 tannin의 함량 덕분에 tannic acid나 pyrogallol의 제조원료 등에 이용되어져 왔다. 오배자의 약효와 성분에 관한 연구에서는 항암효과, 장내 세균 억제효과, 항당

노 효과가 검토되었고 이들 약효의 주성분은 gallic methylester임이 보고되었다⁶⁻⁸⁾.

구강 내 세균에 대한 연구의 오배자 추출물 제조방법은 다양하다. Xie Q 등⁹⁾은 *S. mutans*에 대한 오배자의 항균성을 확인하기 위해 증류수에 60-70°C에서 10시간 동안 혼합하여 추출물과 30% ethanol fraction한 추출물을 사용하였고, Cho 등¹⁰⁾은 추출물이 인공치태의 형성을 억제함을 확인함을 증명하기 위해 오배자 분말을 증류수에 80°C로 4시간 동안 혼합하여 획득한 추출물을 사용하였으며, Lee 등¹¹⁾은 구강에서 분리된 미생물에 대한 오배자의 항균성을 확인하기 위해 분말상태의 오배자를 물과 에탄올에 24시간 동안 혼합한 추출물을 사용하였다.

추출물은 추출방법과 추출용매, 실험세균에 따라 항균성에 차이가 있었다. 구강 내 세균 이외에도 *Salmonella*, 장내 세균 등에 대한 오배자 추출물의 항균성 및 항진균성을 확인하는데 다양한 추출용매와 추출방법이 사용되었고 각 균주마다 항균성을 나타내는 추출용매와 추출방법 또한 차이가 있음이 보고되었다^{8,12-14)}. Park 등¹⁵⁾은 20여종의 한약재에 대한 항균성 물질을 추출할 때 추출 온도, 추출용매의 농도 및 종류에 따라 항균성이 차이가 났음을 보고하였다. Yu 등¹⁶⁾은 여러 한약재에 대한 항균성을 확인한 결과 추출용매와 균주의 종류에 따라 항균성에 차이가 있음을 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 오배자에 대한 기존 연구에서의 추출방법과 추출용매를 달리하여 치아우식증 원인균인 *S. mutans*에 대한 오배자의 항균성을 확인하고, 구강병 예방을 위한 새로운 항균 물질을 분리, 정제하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 생약재료 및 추출방법

생약재료로 건조된 오배자(MIRYONG Herbal, China)를 구입하여 사용했다.

Lee 등¹¹⁾의 연구에 사용된 추출방법을 바탕으로 건조된 오배자 600 g을 절구로 분쇄한 후 체눈크기 300 μ m의 체에 거른 후 여과된 오배자 분말을 2배 부피의 hexan과 에탄올에 각각 혼합하여 실온에서 24시간 동안 추출하고 Whatman[®] filter paper #541 (125 mm)에 여과한 후 진공농축기(Centrifugal vacuum concentrator, Ecospin3180C, HANIL, KOREA)를 사용하여 40°C에서 농축하였다. 농축된 오배자 hexan추출물과 오배자 에탄올추출물은 밀폐하여 -20°C로 냉동 보관하여 실험하였다.

2. 실험균주 및 배양

전남대학교 미생물학교실에 동결건조 되어 보관중인 *S. mutans* KCTC 3065를 사용하였다. 균주를 brain heart infusion (BHI, Difco, USA) 액체배지에 접종하여 37°C의 배양기(Forma Scientific Co, USA)에 24시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다. 세균 감별염색법인 그람염색방법(gram staining)을 사용하여 배양된 균을 확인하였다. 여러 번 계대배양 하여 활성화 한 후 실험에 사용하였다.

3. 추출용매에 따른 오배자 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균력 검사

한천배지확산법(paper disc diffusion)을 실시하여 추출용매에 따른 오배자 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균력을 측정하였다. *S. mutans*를 여러 번 계대배양하여 활성화하고 BHI 액체배지에 10⁷ CFU/ml로 희석한 균을 BHI 고체배지에 100 μ l를 도말하였다. 실험균으로 농축된 추출물에 hexan, 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, DMSO, 아세톤, 증류수를 50 mg/ml로 희석하여 사용하였고 대조균으로는 추출물을 희석한 용매(hexan, 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, DMSO, 아세톤, 증류수)를 사용하였다. Paper disc (8 mm, Whatman, USA) 위에 실험균과 대조균을 각각 50 μ l씩 점적하여 건조한 후 실험균주가 도말된 BHI 고체배지위에 올려놓았다. 37°C의 배양기에 24시간 동안 배양하여 disc 주위의 투명한 직경을 측정하였다.

4. 오배자 추출물의 분배 크로마토그래피

분배 크로마토그래피(Partition chromatography)를 이용하여 오배자 추출물의 항균활성물질을 분리하기 위한 시도를 하였다. 농축 전 오배자 hexan추출물 25 ml와 증류수 25 ml를 혼합한 후 chromatography ball column으로 hexan과 증류수의 층을 분리하여 오배자 hexan분획과 오배자 증류수분획을 획득했다. *S. mutans*에 대한 항균성을 측정하기 위하여 한천배지확산법을 실시하였고 대조균으로 증류수를 혼합하기 전의 오배자 hexan추출물과 hexan을 사용하였다.

5. 오배자 추출물의 항균활성물질 분석

박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography; TLC)를 이용하여 오배자 추출물의 항균활성물질 분석하였다. Silica gel이 입혀진 TLC판(TLC Silica gel 60 F254, Merck, Germany)의 아래 쪽 끝부분에서 2 cm 높이에 연필로 선을 긋고 반대방향으로 5 cm 자른 후 TLC판(TLC1)에 그려진 선의 중앙에 오배자 hexan추출물 10 μ l를 헤마토크리트 유리관을 이용하여 점적하고 드라이기를 이용하여 건조하는 과정을 반복하였다. 나머지 TLC판(TLC2)은 그려진 선을 따라 오배자 hexan추출물 150 μ l를 TLC1과 동일한 방법으로 점적과 건조를 반복했다.

전개제로는 에틸아세테이트와 클로르포름, 그리고 1:1로 혼합한 에틸아세테이트와 클로르포름을 사용하였고 제조 후 각각 전개통에 1 cm의 높이로 전개제를 넣었다. TLC1과 TLC2를 전개통에 넣고 전개제가 증발되지 않게 덮개 가장자리에 vacuum grease를 바른 후 덮었다. 전개제가 각 TLC판의 위쪽 1 cm까지 도달했을 때 TLC판을 빼내어 자연건조 하였다. TLC1은 황산을 분무하여 발색된 전개양상을 통해 오배자 추출물의 구성물질이 분리되는 양상과 그 지점을 확인하였고, TLC2는 추출물의 전개가 시작되었던 지점에서 전개제가 마지막으로 도달한 지점까지를 4등분 하여 single edge blade를 이용하여 silica gel을 긁어내었다. 4부위로 분리하여 획득한 silica gel (3 g)과 동일량의 hexan(3 g)을 혼합한 후 5분 동안 원심분리하여 각 fraction (추출물의 시작점부터 S1, S2, S3,

S4)을 획득하였다.

대조군으로는 핵산을 사용하였고 핵산과 혼합한 각 분획에 대하여 한천배지확산법을 시행하여 *S. mutans*에 대한 항균력 검사를 하였다.

6. 오배자 추출물의 항균활성물질 분리 및 정제

컬럼 크로마토그래피(Column chromatography)를 이용하여 오배자 추출물의 항균활성물질을 분리, 정제를 하였다. Silica powder (SILICA GEL 60, Merck Millipore, Germany) 400 g과 핵산 400 ml를 혼합하여 20 cm 높이의 column에 packing한 후 오배자 핵산추출물을 25 μ l 넣어 column의 밸브를 열고 추출물이 전개되는 동안 silica powder가 건조되지 않도록 핵산을 넣어주었다. 떨어지는 fraction을 1 ml 씩 fraction tube에 담아 총 30개의 fraction (Fr. 1-30)을 얻었다. Spectrophotometer (unicam atomic absorption, HITACHI, UK)를 사용하여 핵산으로 보정한 후 500 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Fr. 1-30에 대하여 한천배지확산법을 사용하여 *S. mutans*에 대한 항균력을 검사하였고 대조군으로 핵산을 사용하였다.

7. 자료분석

오배자 추출물의 추출용매에 따른 투명한의 직경은 비모수적 방법인 Kruskal - Wallis test를 사용하였고, 군 간의 비교는 Mann-Whitney U test를 사용하였다. 통계분석은 SPSS (Statistical Packages for Social Science 21.0. SPSS Inc. Chicago, IL, USA) 통계 프로그램으로 수행하였으며 유의수준은 0.05로 하였다.

연구 성적

1. 추출용매에 따른 오배자 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균력

오배자 핵산추출물은 증류수를 제외한 6가지의 용매(핵산, 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, DMSO, 아세톤)에 희석했을 때 그

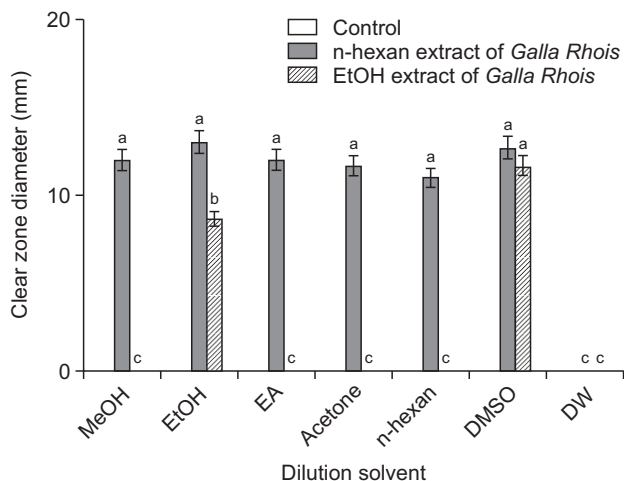


Fig. 1. Clear zone diameter of *S. mutans* in extractant solution of *Galla Rhois* extract.

리고 오배자 에탄올추출물은 에탄올과 DMSO에 희석했을 때 *S. mutans*의 성장억제 효과가 나타났다($P<0.05$). 따라서 오배자 추출물은 에탄올보다 핵산에 추출했을 때 *S. mutans*의 성장을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2. 오배자추출물의 항균활성물질 분리

극성이 다른 증류수와 핵산으로 partition chromatography를 실시한 결과 증류수분획에서는 항균활성이 나타나지 않았지만 핵산분획에서 높은 항균활성이 나타나 오배자 추출물의 항균력이 있는 구성물질이 증류수에 분리되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

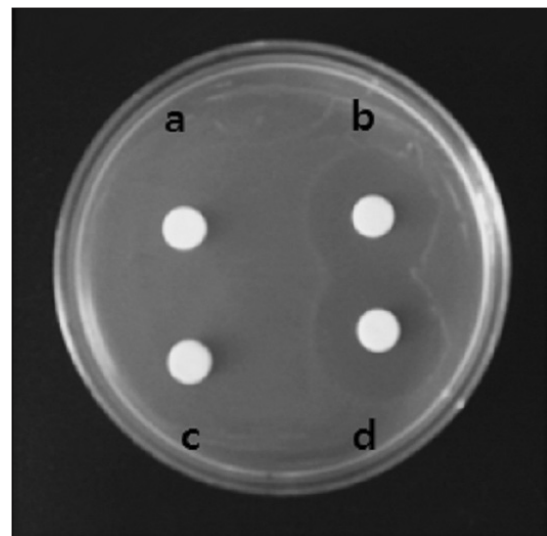


Fig. 2. Growth inhibitory activity of n-hexan extract from *Galla Rhois* against *S. mutans* by paper disc diffusion method after partition chromatography (a: n-hexan, b: *Galla Rhois* n-hexan extract, c: n-hexan fraction of *Galla Rhois* n-hexan extract, d: ethanol fraction of *Galla Rhois* n-hexan extract).

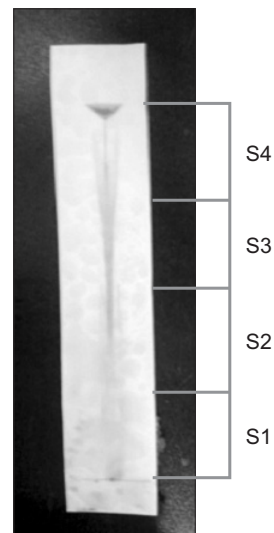


Fig. 3. TLC pattern of the n-hexan extract from *Galla Rhois*.

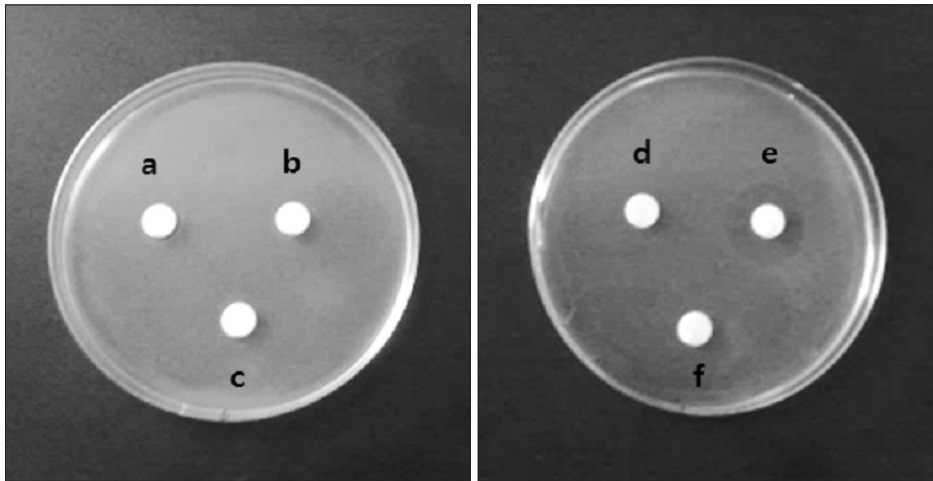


Fig. 4. Growth inhibitory activity of n-hexan extract from *Galla Rhois* against *S. mutans* by paper disc diffusion method after TLC (a: fraction S1, b: fraction S2, c: n-hexan, d: fraction S3, e: fraction S4, f: n-hexan).

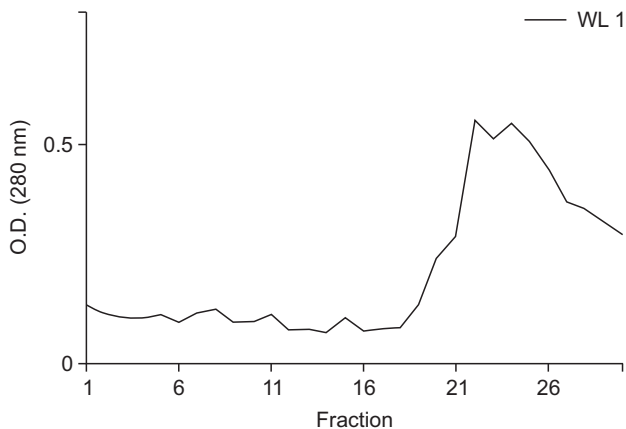


Fig. 5. Chromatogram of n-hexan extract of *Galla Rhois* by Column chromatography.

3. 오배자 추출물의 항균활성물질 분석

Thin layer chromatography를 통해 silica gel에서 황산에 의해 발색된 오배자 추출물의 전개양상을 확인하여 분획을 나누었고 (Fig. 3), 에틸아세테이드와 클로르포름을 각각 전개제로 사용했을 때는 *S. mutans*에 대한 항균활성이 나타나지 않았지만 1:1로 혼합한 에틸아세테이드와 클로르포름을 전개제로 사용하였을 때는 4개로 분리된 fraction S1, S2, S3, S4 중 S4에서 *S. mutans*에 대한 항균활성이 나타났다 (Fig. 4).

4. 오배자 추출물의 항균활성물질 분리 및 정제

오배자 핵산추출물을 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻어진 fraction 30개에 대해 흡광도를 측정한 결과 Fr. 22에서 가장 높은 흡광도 값이 나타난 것을 확인하였다 (Fig. 5). 또한 Fr. 22, 23, 24에서 *S. mutans*에 대한 높은 항균활성이 나타났다 (Fig. 6). 따라서 오배자 핵산추출물의 항균활성물질을 분리하고 정제할 수 있었다.

고 안

구강 내 환경은 세균이 성장하기 좋은 적절한 온도, 습도 등의 조건을 갖추어 다양한 균들이 상주하고 그 중 *S. mutans*는 치아우식증을 일으키는 필수적인 역할을 한다¹⁷⁾.

치아우식증 예방을 위한 세균의 성장을 억제하고 치면부착을 감소시키기 위한 항균제로 클로르헥시딘 등의 합성화합물이 사용되고 있다. 그러나 이 항균제를 사용했을 때 *S. mutans*의 성장억제 효과는 뛰어나지만 미각이상, 구강건조증, 치아변색 등과 같은 부작용을 일으킬 수 있기 때문에 중요한 문제가 되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 따라서 *S. mutans*의 성장을 억제하는데 효과적이면서 부작용이 적은 항균제의 개발을 위하여 여러 나라에서는 천연식물로부터 항균효과를 확인하고 그 구성물질을 분리하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다²⁻⁵⁾.

오배자는 불나무 잎에 오배자 진딧물이 산란하여 생긴 벌레집으로서 예로부터 수렴지시제, 외상출혈 치료 등에 사용되어져 왔으며, 약효와 성분에 관한 연구로 항암효과, 장내 세균 억제효과 등에 대하여 검토되었다⁶⁻⁸⁾. 또한 조 등¹¹⁾의 연구에서 오배자의 안전성을 확인하고자 치은섬유모세포에 독성실험을 진행한 결과 세포에 독성을 일으키지 않아 안전성을 검증받았다.

이에 본 연구에서는 다양한 효능이 검증되었고 항균효과가 보고되었으며 안전한 오배자를 실험재료로 선택하여 *S. mutans*의 성장을 억제하는 가장 효과가 좋은 추출용매를 확인하고 항균물질을 분리하고 정제하여 항균효과를 보강하고 기존의 화학적 항균물질에 대체할 수 있는 새로운 항균물질을 발견하고자 하였다.

천연식물의 약리효과는 추출 방법과 추출 용매에 따라 다르게 나타나는데 이는 추출하는 방법과 용매에 따라 추출 되어지는 물질이 달라지기 때문이다. 그렇기 때문에 추출 방법과 추출 용매를 선정하는 것은 추출물의 효과를 증가시키는데 중요한 요인이다. 분쇄한 오배자를 Cho 등¹⁰⁾의 연구에서는 증류수를 사용하여 80°C에서 4시간 동안 추출하여 *S. mutans*의 억제효과가 나타났으나 Lee 등¹¹⁾은 증류수를 사용하여 실온에 24시간 동안 추출한 추출물을 실험한 결과 억제효과가 나타나지 않았다. 동일하게 증류수로 사용했으나 항균효과는 차이를 나타냈다. 또한 유 등¹⁶⁾의 연구

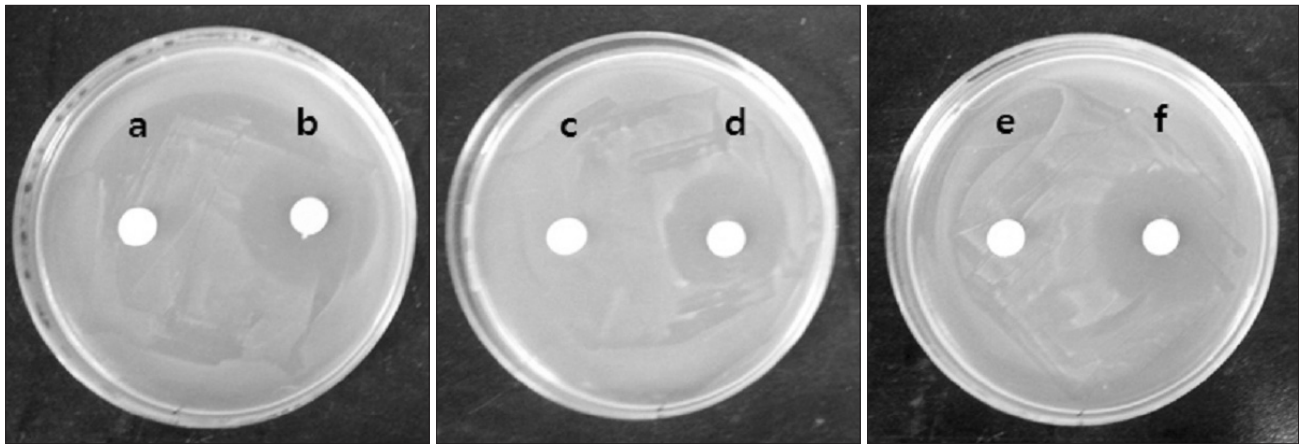


Fig. 6. Growth inhibitory activity of n-hexan extract from *Galla Rhois* against *S. mutans* by paper disc diffusion method after Column chromatography (a: n-hexan, b: fr. 22, c: n-hexan, d: fr. 23, e: n-hexan, f: fr. 24).

에서는 다양한 천연식물을 여러 가지 추출용매에 추출하여 피부세균에 처리한 결과 추출용매에 따라 항균력이 달라지는 결과를 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 예비 실험을 통해 다양한 추출용매에 *S. mutans*의 억제효과를 확인한 결과 hexan과 에탄올에서 높은 항균활성을 나타내 추출용매로 선택하여 추출하고 농축하였다. 농축된 hexan과 에탄올추출물을 추출용매를 포함한 7가지 용매(hexan, 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, DMSO, 아세톤, 증류수)에 희석하여 용해되는 양상 및 *S. mutans*의 억제효과를 확인했다. 오배자 hexan추출물은 7가지 용매에 적절하게 용해되어 실험에 모두 사용할 수 있었다. 그러나 오배자 에탄올추출물은 메탄올, 아세톤, 증류수로 희석했을 때 용매에 의해 성질이 sticky하게 변해 실험에 사용할 수 없었고 hexan과 에틸아세테이트로 희석했을 때는 용매가 증발했다. 각 용매에 희석한 오배자 추출물들의 *S. mutans* 성장억제효과는 항균제의 감수성검사에서 가장 흔히 사용되는 방법인 한천배지확산법을 시행하여 측정하였다. 그 결과 증류수로 희석했을 때를 제외한 모든 오배자 hexan추출물에서 항균활성이 나타났다. 또한 오배자 에탄올추출물은 DMSO와 에탄올에 희석했을 때 항균활성이 나타났다. 따라서 *S. mutans*의 성장을 억제하는 효과를 고려할 때 오배자에 대한 최적의 추출용매로 hexan을 사용하였다.

오배자 hexan추출물의 용매에 대한 친화성 차이를 통해 항균활성물질을 분리하기 위하여 극성이 다르고 혼합되지 않는 hexan과 멸균된 증류수에 추출물을 혼합하여 partition chromatography를 실시했다. 그 결과 증류수분획에서는 항균활성이 나타나지 않았지만 hexan분획에서 높은 항균활성이 나타나 오배자 추출물의 항균력을 나타내는 구성물질이 증류수에 분리되지 않음을 확인할 수 있었다. 그 후 오배자 추출물의 항균활성물질을 분리하기 위한 전개제를 선택하기 위해 thin layer chromatography를 통해 분석했다. 그 결과 에틸아세테이트와 클로르포름을 각각 전개제로 사용했을 때는 *S. mutans*에 대한 항균력이 나타나지 않아 항균물질을 확인할 수 없었다. 이는 추출물이 에틸아세테이트와 클로르포름보다 silica에 친화력이 높다는 것을 의미한다. 하지만 에틸아세테이트와 클로르포름을 1:1로 혼합하여 성질이 변환하여 전개제

로 사용하였을 때 4개로 분리된 fraction S1, S2, S3, S4 중 S4에서 *S. mutans*에 대한 항균활성이 나타나 추출물의 분리를 성공할 수 있었다. 따라서 column chromatography의 전개제로 1:1로 혼합한 에틸아세테이트와 클로르포름을 사용하였다. 그러나 column chromatography를 시행한 결과 1:1로 혼합한 에틸아세테이트와 클로르포름이 항균물질을 잘 분리하지 못 하는 반면 hexan을 전개제로 사용했을 때 항균물질이 잘 분리되어 전개제로 hexan을 사용했다. hexan을 사용하여 오배자 hexan추출물을 전개하여 30개의 fraction을 획득하였고 spectrophotometry를 사용하여 500 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도로 측정했는데 500 nm로 측정할 경우 흡광도 값이 음의 값으로 측정되어 결과적으로 280 nm에서의 흡광도를 측정했다. 30개의 fraction 중 Fr. 22에서 가장 높은 흡광도를 나타내는 것을 확인하였고 Fr. 22, 23, 24에서 *S. mutans*에 대한 높은 항균활성이 나타났다. 따라서 오배자 hexan추출물의 새로운 항균활성물질을 분리하고 정제할 수 있었다.

오배자는 독성이 없다고 알려져 있으나¹⁰⁾ 새로운 항균활성물질에 대한 안전성을 검증받기 위해 세포독성평가에 관한 연구가 진행되어야 하고 독성평가 후 항균활성물질을 치아우식증 환자에게 직접 적용함으로써 그 효과를 확인하는 실험이 필요할 것이다. 또한 분리한 새로운 항균활성물질에 대한 정확한 성분을 알기 위해서는 성분분석의 과정이 필요할 것으로 생각된다. 더불어 그 성분분석을 통해 기존에 연구된 항균물질인 gallic methylester, gallic acid 등과 비교하는 연구가 필요하다^{8,21)}.

본 연구에서 오배자 hexan추출물은 추출용매에 따라 증류수를 제외한 6가지(hexan, 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, DMSO, 아세톤)의 용매에 희석했을 때 *S. mutans*의 성장을 억제했고 오배자 에탄올추출물은 에탄올과 DMSO에 희석했을 때 성장억제 효과가 나타나서 오배자 추출물은 에탄올에 추출한 경우보다 hexan에 추출했을 때 *S. mutans*의 성장을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그 결과를 바탕으로 partition chromatography, thin layer chromatography, column chromatography를 시행하여 새로운 항균물질을 분리, 정제할 수 있었다. 분리와 정제과정을 거쳐 획득

한 오배자 추출물의 항균물질을 치약이나 구강양치액에 첨가하여 사용한다면 치아우식증을 일으키는 *S. mutans*의 성장을 억제하는 예방제제로 사용할 수 있을 것이라 생각된다.

결론

본 연구는 오배자 추출물의 추출방법 및 추출용매에 따른 *S. mutans*의 성장을 억제하는 효과와 새로운 항균물질을 분리, 정제하기 위해 시행하였다. 추출물의 세균 성장 억제효과는 한천배지 확산법을 이용하여 추출방법 및 추출용매에 따른 투명환의 직경을 측정함으로써 *S. mutans*의 성장억제를 확인하였다. 또한 분배 크로마토그래피와 박층 크로마토그래피, 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 새로운 항균물질을 분리, 정제하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 추출용매에 따른 오배자 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균력을 측정했을 때 오배자 핵산추출물은 증류수를 제외한 6가지의 용매(헥산, 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, DMSO, 아세톤)에 희석했을 때 *S. mutans*의 성장을 억제했고, 오배자 에탄올추출물은 에탄올과 DMSO에 희석했을 때 성장억제 효과가 나타났다 ($P<0.05$). 그러므로 오배자 추출물은 에탄올에 추출한 경우보다 핵산에 추출했을 때 *S. mutans*의 성장을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

2. 오배자추출물의 친화성차이를 통한 항균활성물질의 분리를 위해 극성이 다른 증류수와 핵산으로 분배 크로마토그래피를 실시한 결과 증류수분획에서는 항균활성이 나타나지 않았지만 핵산분획에서 높은 항균활성이 나타나 오배자 추출물의 항균력이 있는 구성물질이 증류수에 분리되지 않음을 확인할 수 있었다.

3. 오배자 추출물의 항균활성물질 분석을 위해 TLC 분석법을 사용한 결과 1:1로 혼합한 에틸아세테이트와 클로르포름을 전개제로 사용하였을 때 4개로 분리된 fraction S1, S2, S3, S4 중 Fr. S4에서 *S. mutans*에 대한 항균활성이 나타났다.

4. 오배자 핵산추출물의 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분리 및 정제한 결과 얻어진 fraction 30개에 대하여 흡광도를 측정해 Fr. 22에서 가장 높은 흡광도 값이 나타난 것을 확인하였고 *S. mutans*에 대한 항균활성을 측정한 결과 Fr. 22, 23, 24에서 높은 항균활성이 나타났다. 따라서 오배자 핵산추출물의 항균활성물질로 Fr. 22, 23, 24를 분리, 정제할 수 있었다.

이상의 결과, 오배자 추출물은 추출용매에 따라 항균력의 차이를 나타내었고 그 결과를 바탕으로 partition chromatography, thin layer chromatography, column chromatography를 시행하여 새로운 항균물질을 분리, 정제할 수 있었다. 항균활성을 높일 수 있는 추출용매를 발견했다는 점에 의의가 있고, 분리와 정제과정에서 획득한 오배자 추출물의 항균물질을 치약이나 구강양치액에 첨가하여 사용함으로써 치아우식증 예방을 위한 구강 내 항균제제로의 가능성을 제시하였다.

References

- Marsh P, Martin M. Oral microbiology. 4th ed. Oxford: Wright 1999;82-103.
- Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. Arch Oral Biol 2005;50:645-651.
- Islam B, Khan SN, Haque I, Alam M, Mushfiq M, Khan AU. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from Morus alba. J Antimicrob Chemother 2008;62:751-757.
- Naderi NJ, Niakan M, Kharazi Fard MJ, Zardi S. Antibacterial activity of iranian green and black tea on *Streptococcus mutans*: An in vitro study. J Dent 2011;8(2):55-59.
- Xu X, Zhou XD, Wu CD. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(3):1229-1236.
- An BJ. Effect of inhibition on glucosyltransferase and antimicrobial activity of polyphenol fraction of gallnut and red grape husk. Kor J Postharvest Sci Technol 2001;8:217-223.
- Cha BC, Lee SB. Antioxidative and free radical scavenging effects of *Rhus javanica* Linne. Kor J Medicinal Crop Sci 1998;6(3):181-187.
- Ahn YJ, Lee CO, Kweon JH, Ahn JW, Park JH. Growth-inhibitory effects of *Galla Rhois*-derived tannins on intestinal bacteria. J Appl Microbiol 1998;84:439-443.
- Xie Q, Li JY, Zuo YL, Zhou XD. The effect of galla chinensis on the growth of cariogenic bacteria in vitro. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2005;23:82-84.
- Cho MJ, Hong SJ, Choi CH, Jeong SS. Effects of dentifrice containing extract of *Galla Rhois* or *Psoralea corylifolia* on inhibition of plaque formation. J Korean Acad Oral Health 2005;29(2):141-152.
- Lee YS, Han OK, Bae MJ, Kim KJ, Shin SW, Lee SK, et al. Antimicrobial and anticancer effects of *Galla Rhois* on pathogens isolated from oral and KB human oral epidermoid carcinoma cells. Korean J Oriental Physiology & Pathology 2003;17(6):1427-1432.
- Tian F, Li B, Ji B, Yang J, Zhang G, Chen Y, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. Food Chem 2009;113:173-179.
- Choi JG, Kang OH, Lee YS, Oh YC, Chae HS, Jang HJ, et al. In vitro activity of methyl gallate isolated from galla rhois alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of salmonella. J Microbiol Biotechnol 2008;18(11):1848-1852.
- Lee JJ, Bae JH, Kim DH, Lim JJ, Kim DG, Lee HJ, et al. Intracellular replication inhibitory effects of *Galla Rhois* ethanol extract for *Brucella abortus* infection. J Ethnopharmacol 2011;138(2):602-609.
- Park U, Chang DS, Cho HR. Screening of Antimicrobial Activity for Medicinal Herb Extracts. J Korean Soc Food Nutr 1992;21:91-96.
- Yu YE, Park EY, Jung DH, Byun SH, Kim SC, Park SM. Antibacterial activity of oriental medicinal herb extracts against skin pathogens. J Life Sci 2010;20(7):1143-1150.
- Elizabeth Peninisi, A mouthful of microbes. Science 2005;307:1899-1901.
- Cem A. Gran, Eylem Zaim, I l l Bakirsoy, Emel Soykan. Short-term side effects of 0.2% alcohol-free chlorhexidine mouthrinse used as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: A double-blind clinical study. J Periodontol 2006;77(3):370-384.
- Fltra L, Gjermo PER, Rlla G, Waerhaug J. Side effects of chlorhexidine mouth washes. Eur J Oral Sci 1971;79:119-125.
- Fltra L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. J Periodontal Res 1973;8:41-44.
- Kang MS, Oh JS, Kang IC, Hong SJ, Choi CH. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. J Microbiol 2008;46(6):744-750.