아출의 치아우식균에 대한 항균활성

전 훈 · 유달산 · 서진주 · 홍종기 · 추지연 · 강인탁 · 박영서 · 임종필*

우석대학교 약학대학

Antibacterial Activities of *Zedoariae Rhizoma* against the *Streptococcus Mutans*

Hoon Jeon, Dal San Yoo, Jin Joo Seo, Jong Ki Hong, Jee Yeon Choo, In Tak Kang, Yeong Seo Park, Jong Pil Lim*

College of Pharmacy, Woosuk University

In order to investigate antibacterial activities of *Zedoariae Rhizoma* against *Streptococcus mutans* ATCC27351, paper disc test, minimal inhibitory concentration (MIC) test and pH check were carried out. The 80% ethanol extract of *Zedoariae Rhizoma*(ZXE) showed significant activity. The MIC of ZXE was 25.0mg/ml.

Key words : *Zedoariae Rhizoma*(莪朮), *Streptococcus mutans*, inhibition activities

서 론

齒牙齲蝕症은 전 세계적으로 가장 흔하면서도 쉽게 근절되지 않는 구강 내 질병의 하나이며, 요즘 간편 식사 종류의 다양화와 식생활 패턴의 변화에 따라 그 이환율이 점점 증가하고 있다. 齒牙齲蝕은 구강 내에서 원인 세균이 생성하는 glucosyltransferase에 의하여 당질로부터 점착성의 불용성 glucan이 형성되어 치아의 표면에 부착하면 이 glucan에 원인세균이 증식하면서 국소적으로 각종 유기산을 생성하여 치아 표면의 enamel질을 분해하는 것이 초기 발생기전으로 알려져 있다[1,2]. 齒牙齲蝕 원인세균으로는 *Streptococcus spp.* 및 *Lactobacillus spp.*에 속하는 일부의 종들이 보고되어 있으며, 그 중 *Streptococcus mutans* 등이 가장 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[3,4]. 따라서 齒牙齲蝕을 예방하기 위해서는 원인세균의 증식억제가 가장 중요하다고 볼 수 있다. 그 동안 Namba 등[5]은 중국 및 일본산 약용식물 60여종의 추출물을 이용하여 齒牙齲蝕菌의 생육억제실험을 시행한 결과 *Magnoliae Cortex*가 항균효과가 강하다고 보고한 바 있고, Park 등[6]이 몇 가지 약용식물 추출물이 항균효과가 있다고 보고한 바 있다.

민간요법 가운데 일부 지방에서는 齒牙齲蝕에 대하여 아출 삶은 물로 양치를 하거나 가루 내어 잇몸에 바르는 일이 있다[7].

* 교신저자 : 임종필, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490 우석대학교 약학대학
· E-mail : limjp@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1571

· 접수 : 2006/07/19 · 수정 : 2006/08/30 · 채택 : 2006/09/25

莪朮(*Zedoariae Rhizoma*)은 蓬朮 또는 蓬莪朮로 불리며 生薑科(Zingiberaceae)에 속하는 *Curcuma zedoaria* Roscoe의 뿌리줄기를 그대로 또는 수증기로 쪄서 말린 것으로, 중국을 비롯한 열대지방에서 생산되며 거의 난형을 이루고, 지름 25-40㎜, 길이 4-6㎝이다. 성분으로는 zingiberene, curcumol, curcumenone, curdione, isocurcumol, curzerene, turmerol 등이 함유되어 있다. 藥理作用으로는 抗癌, 動脈血流量 增加, 流產, 抗菌 作用 등이 있어 子宮頸部癌, 皮膚癌, 腕腹脹痛, 高脂血症 등에 사용한다. 性味는 辛苦, 溫하고 歸經은 肝經, 脾經으로 效能은 破血祛瘀, 行氣止痛이다[8].

그동안 莪朮에 대한 연구로는 Sasaki 등[9]은 莪朮 성분이 혈관의 이완 및 혈액응고를 억제하여 혈류를 개선시킬 수 있는데 이는 어혈에도 효과가 있다고 하였으며, Yoshioka 등[10]은 莪朮 중의 sesquiterpene 화합물이 항염증작용을 나타내는데 이는 항산화활성에 의한 것이라고 보고하였고, Syu 등[11]은 莪朮 중의 curcuminoid가 난소암 세포인 OVCAR-3세포에 대하여 세포독성을 나타낸다고 보고한 바 있으며, Matsuda 등[12]은 sesquiterpene 화합물이 간보호활성을 나타낸다고 보고하였다. 이러한 연구들은 대체로 莪朮의 효능인 破血祛瘀, 行氣止痛에 대하여 확인한 실험으로 이해할 수 있다.

그러나 민간에서 莪朮이 齒牙齲蝕 치료에 이용되고 있음에도 莪朮의 齒牙齲蝕菌에 대한 실험은 보고 된바가 없다. 이에 莪朮의 齒牙齲蝕菌에 대한 항균 효과가 있는지를 확인하고자 실험을 하여 보고한다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 균주

본 실험에 사용한 莪朮은 전주시 보화당약업사에서 구입한 것 중 정품만을 선별하여 세절한 후 환류냉각장치에 각기 10배량의 증류수, 80% 메탄올 및 80% 에탄올을 넣어 3시간 씩 가열 추출하고 여과한 뒤 감압 농축한 다음 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 실험에 사용한 균주는 *Streptococcus mutans* ATCC27351로 하였다. 세균배양 및 보존에는 brain heart infusion medium(BHI, Difco Co, USA)을 사용하였다(Table 1).

Table 1. Strains and cultivation conditions for dental caries bacteria.

Strains	Cultivation conditions
Streptococcus mutans ATCC27351	BHI(Brain Heart Infusion) media 37℃, Facultatively anaerobic

2. 齒牙齲蝕菌의 생육저지환 측정

齒牙齲蝕菌 (*Streptococcus mutans*)에 대한 생육저지환 (inhibition zone diameter) 측정은 paper disc 방법으로 측정하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각의 생육배지로 멸균된 기층용 배지를 petri dish에 15ml씩 분주하여 응고시키고, BHI 배지 2.5ml씩을 시험관에 분주하여 멸균한 후, 미리 배양하여둔 齒牙齲蝕菌 배양액 0.1ml를 첨가하여 잘 혼합한 후, 기층용 배지 위에 고르게 퍼지도록 도포한 뒤 응고시켜 2중의 균 접종 평판배지를 만들어 사용하였다. 莪朮의 상기 추출물을 녹여 만든 각각의 시료용액(10mg/100㎕)을 멸균된 filter paper disc(Toyo, 8mm, Japan)에 20㎕씩을 흡수시켜 건조한 후 시험용 평판배지 위에 놓아 밀착시키고 37℃에서 24시간 배양한 다음 disc 주변의 clear zone의 직경을 측정하였다(Fig. 1).

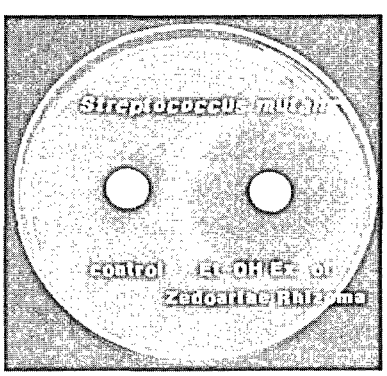

Fig. 1. Inhibition zone by 80% ethanol extract of *Zedoariae Rhizoma* against *Streptococcus mutans*.

3. 최소발육저지농도(MIC) 측정

조제된 각 추출물의 최소발육저지농도 (Minimal Inhibitory Concentration; MIC)측정은 Lorian[13]의 방법에 준하여 측정하였다. 37℃에서 24시간 배양한 균액을 BHI broth에 약 10^3 CFU/ml 되도록 접종한 후 멸균된 시험관에 무균적으로 분주하고 각 추출액을 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2 및 1.6 mg/ml 되도록 첨가한 후 37℃에서 3일간 배양하여 spectrophotometer (Milton Roy, Genesys 5, USA)로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 추출물 농도에 따른 pH 변화 측정

상기 MIC를 측정하기 위한 에탄올 추출물의 농도별 시험액을 첨가하여 배양이 끝난 배지의 pH를 pH meter(Orion, 701A, USA)로 측정하였다.

5. 통계처리

실험성적의 통계처리는 student's t-test로 하였으며 유의수준은 0.05이하로 하였다.

결 과

1. 용매에 따른 추출물 수득량

실험용 莪朮을 세절한 후 환류냉각장치에 각기 10배량의 증류수, 80% 메탄올 및 80% 에탄올을 넣어 각각 3시간 씩 가열 추출하고 여과한 뒤 감압 농축한 다음 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 용매별 수득량은 Table 2와 같다.

Table 2. Extracted yield of *Zedoariae Rhizoma* by various solvents.

Solvents	Extracted yield(%)†
Distilled water	13.2
80% methanol	11.7
80% ethanol	10.9

† *Zedoariae Rhizoma* were extracted for 3 hours by heating and the filtrate was lyophilized.

2. 齒牙齲蝕菌 생육저지환 측정결과

Paper disc법으로 측정한 齒牙齲蝕菌 (*Streptococcus mutans*)에 대한 용매별 추출물의 생육저지환(inhibition zone diameter) 측정결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Growth inhibition by various extracts of *Zedoariae Rhizoma* against *Streptococcus mutans*

Extracts of *Zedoariae Rhizoma*	Inhibition zone diameter (mm)†
Distilled water ex.	9.5±0.3
80% methanol ex.	12.5±0.1
80% ethanol ex.	17.2±0.8*

† Paper discs were absorbed with each extract of *Zedoariae Rhizoma* and incubated for 24 hours at 37℃. Values are means±S.E. *Significantly different from the control at the $p<0.05$ level.

3. 齒牙齲蝕菌에 대한 MIC 측정결과

Lorian(1991)의 방법에 준하여 측정한 각 추출물의 최소발육저지농도 (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) 측정결과는 Table 4와 같고 그 사진은 Fig. 2와 같다.

Table 4. Minimal Inhibitory Concentration(MIC) by various extracts of *Zedoariae Rhizoma* against *Streptococcus mutans*.

Extracts of *Zedoariae Rhizoma*	MIC (mg/ml)†
Distilled water ex.	>50.0
80% methanol ex.	50.0
80% ethamol ex.	25.0

† Incubated for 3 days at 37℃ in brain heart infusion medium(10^5CFU/mL) with each extract of *Zedoariae Rhizoma*.

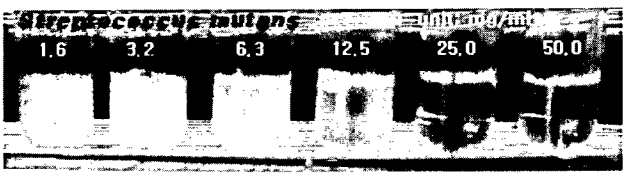

Fig. 2. MIC of 80% ethanol extract of *Zedoariae Rhizoma* against *Streptococcus mutans.*

4. 에탄올추출물 농도에 따른 pH 변화 측정 결과

MIC를 측정하기 위하여 제조한 莪朮의 80% 에탄올 추출물의 농도별 추출액을 齒牙齲蝕菌에 첨가하여 배양이 끝난 액체배지의 pH를 측정한 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Change of pH according to the concentration of 80% ethanol extracts of *Zedoariae Rhizoma*(ZXE) cultured with *Streptococcus mutans.*

Concentration of ZXE(mg/ml)	pH
0.0(control)	6.21±0.11
1.6	6.20±0.09
3.2	6.29±1.01
6.3	6.28±0.82
12.5	6.42±0.45
25.0	6.97±0.19*
50.0	6.98±0.23

† Incubated for 3 days at 37℃ in brain heart infusion medium(10^5CFU/mL) with each extract of *Zedoariae Rhizoma*. Values are means±S.E. *Significantly different from the control at the $p<0.05$ level.

고 찰

근래에 들어서 합성의약품에 대한 불신이 커지면서 화학적으로 합성되지 아니하고 천연약재 중에서 齒牙齲蝕을 예방하거나 잇몸질환을 치료하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 이미 그 효과가 발표된 약재 이외에 새로운 천연약물을 찾는 것은 뜻이 있는 일이라고 생각된다. 莪朮은 오래전부터 지역에 따라 齒牙齲蝕이나 잇몸 질환에 끓인 물로 양치하거나 가루 내어 바르는 일이 있어[7] 그 효과여부를 실험한 결과 齒牙齲蝕菌(*Streptococcus mutans*)에 대하여 항균작용이 있음을 확인할 수 있었다.

莪朮을 추출하기 위하여 일반적으로 생약 추출에 많이 사용하는 증류수, 80% 메탄올과 80% 에탄올을 각기 이용하여 추출한 결과 수득량은 증류수 추출물이 제일 많았고 에탄올 추출물이 제일 적었다. 이는 수용성 함유물이 알코홀에 용해되는 추출물보다 많음을 의미하고 있다.

Paper disc법으로 측정한 齒牙齲蝕菌 (*Streptococcus mutans*)에 대한 생육저지환(inhibition zone diameter)의 측정결과를 보면 증류수로 추출한 추출물의 경우 저지환의 크기가 9.5mm임에 비하여, 80% 에탄올로 추출한 추출물의 경우 17.2mm로 거의 2배의 저지환을 형성함을 보아 에탄올추출물의 효력이 더욱 강력함을 알 수 있었다.

각 추출물의 최소발육저지농도 (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) 측정결과를 보면 paper disc 법에서와 마찬가지로 ethanol추출물의 경우가 가장 항균력이 좋았으며 MIC는 25.0mg/ml이었다. 이는 方藥合編의 藥性歌[14]에 '得酒醋良'이라 하여 술을 첨가하면 더 효과가 양호하다는 내용과 맥락을 같이 하는 것으로 해석할 수 있다.

에탄올 추출물에 대한 농도별 pH변화를 보면 에탄올 엑스 농도가 25.0mg/ml의 경우control에 비해 유의성 있는 pH의 상승을 나타내었고, 그 이상의 농도에서도 비슷한 결과를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 齒牙齲蝕症의 發生은 口腔微生物이 生産하는 酸에 의해 齒面이 脫灰되어 發生된다고 하는 化學細菌說[15,16]을 뒷받침해주는 것이라고 생각된다.

莪朮은 일반적으로 破血祛瘀, 行氣止痛藥으로 이용되고 있으나 위에서 연구한 결과를 종합해볼 때 齒牙齲蝕症에도 충분히 활용할 만한 가치가 있다고 생각된다.

결 론

莪朮(*Zedoariae Rhizoma*)의 齒牙齲蝕菌(*Streptococcus mutans* ATCC27351)에 대한 항균효과를 시험하기 위하여 증류수, 80% 메탄올 및 80% 에탄올로 각기 3시간동안 가열 환류추출한 수득량은 증류수로 추출할 때가 가장 많았다. Paper disc 법과 MIC 측정법으로 齒牙齲蝕菌에 대한 항균효과를 측정한 결과 에탄올 추출물의 경우가 가장 항균효과가 컸으며 MIC는 25mg/ml이었다. pH 변화를 조사한 결과 에탄올추출물 25mg/ml일 때가 pH 6.97로 유의성 있게 높았다. 이런 결과로 보아 莪朮은 齒牙齲蝕症 豫防 및 治療에 좋은 效能을 나타내므로 부작용 없는 구강보건제로 이용할 가치가 있는 약물이다.

감사의 글

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(우석대학교 헬스케어 기술개발사업단).

참고문헌

1. Lee, K.Y., Cho, H.S., Yoon, J.W., Hae, T.R. Study on the development of preventive agent of dental caries from biological active materials. I. Development of disc PAHA for an artificial tooth and preventive effect on dental caries from plant extracts. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 8l: 126-132, 1993 .
2. 김대범, 주훈, 백병주, 송완엽, 송요한. *Streptococcus mutans*의 우식 활성에 미치는 propolis의 영향. 대한소아치과학회지 22: 231-238, 1995.
3. Hardie, J.M., Whiley, R.A. The genus *Streptococcus*-Oral. In The Procaryotes, 2nd ed. A. Balows, HG Truper, M Dworkin, W Harder and KH Schleifer, ed. Springer-Verlag, New York, pp 1421-1449, 1992.
4. Harty, D.W.S., Oakey, H.J., Patrikakis, M., Hume, E.B.H.

and Knox, K.W. Pathogenic potential of *Lactobacilli*. Int. J. Food Microbiol., 24: 179-189, 1994.

5. Namba, T., Tsunezuka, M., Hattor, M., Kadota, S., Kijuchi, T. Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines-screening of crude drugs for inhibitory action on plaque formation. Proc. Symp. 15: 179-186, 1982.
6. Park, V.Y., Chnag, D.S., Cho, N.R. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb. J. Korean Food Nutr. 21: 91-96, 1992.
7. 民間療法研究會, 民間療法全書, 서울, 宇一社, p 228, 1963.
8. 林鍾弼, 本草生藥學, 信一商社, pp 280-282, 2005.
9. Sasaki, Y., Goto, H., Tohda, C., Hatanaka, F., Shibada, N,. Shimada, Y., Terasawa, K., Komatsu, K. Effects of curcuma drugs on vasomotion in isolated rat aorta, Biol. Pharm. Bull. 26: 1135-1143, 2003.
10. Yoshioka, T., Fujii, E., Endo, M., Wada, K., Tokunaga, Y., Shiba, N., Hohsho, H., Shibuya, H, Muraki, T. Antiinflmmatory potency of dehydrocurdion, a zedoary-derived sesquiterpene. Inflamm. Res. 47: 476-481, 1998.
11. Syu, W.J., Shen, C.C., Don, M.J., Ou, J.C., Lee, G.H., Sun, C.M. Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from *Curcuma zedoaria*. J. Nat. Prod. 61: 1531-1534, 1998.
12. Matsuda, H., Morikawa, T., Ninomiya, K., Yoshikawa, M.: Hepatoprotective constituents from *Zedoariae rhizoma*: absolute stereostructures of three new carabrane-type sesquiterpenes, curcumenolactones A, B. and C. Bioorg. Med. Chem. 9: 909-916, 2001.
13. Lorian, V. Antibiotics Laboratory Medicine. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 17-105, 1991.
14. 黃度淵, 對譯證脈方藥合編, 南山堂, p 157, 1984.
15. Miller, W.D. Die Microorganismem des Mundhohle, Leipzig, p 209, 1989.
16. Miller, W.D. New theories concerning decay of teeth. D. Cosmos, 47: 1293, 1905.