

구강질환 원인균에 대한 자몽종자추출물과 법제유황수 함유 치약시제품의 항균효과

이보배¹ · 하유미¹ · 신수화¹ · 제경모² · 김순래² · 최재석¹ · 최인순^{1,3*}¹신라대학교 RIS사업단, ²(주)웰바이코리아, ³신라대학교 생물과학과

Received April 8, 2009 / Accepted May 25, 2009

Antimicrobial Activity of Test Dentifrice Product Containing Grapefruit Seed Extract and Processed Sulfur Solution against Oral Pathogens. Bo-Bae Lee¹, Yu-Mi Ha¹, Su Hwa Shin¹, Kyoung Mo Je², Soon Rae Kim², Jae-Suk Choi¹ and In Soon Choi^{1,3*}. ¹RIS Center, Industry-Academic Cooperation Foundation, Silla University, ²WellbuyKorea Co. Ltd., ³Department of Biological Science, Silla University - The aim of this study was to assess the effects of dentifrice-containing grapefruit seed extract (GSE) and processed sulfur solution (PSS) on antimicrobial effects against oral pathogens. We first evaluated the antimicrobial effects of GSE and PSS against oral microbes: *Streptococcus mutans* (*Sm*), *Prevotella intermedia* (*Pi*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Candida albicans* (*Ca*). When antimicrobial activity against *Sm*, *Pi*, *Pg* and *Ca* was tested, at 40 µl/disk, the inhibition zones of GSE were 11.0, 9.5, 8.0 and 9.0 mm, respectively. With the same method, the inhibition zones of PSS were 2.0, 3.5, 0.0 and 1.5 mm, respectively. In the micro broth dilution method, the MIC values of GSE against *Sm*, *Pi*, *Pg* and *Ca* were 0.24, 0.06, 0.10 and 15.63 µl/ml, respectively. The MIC values of PSS were 0.12, 3.91, >125 and 7.81 µl/ml, respectively. When pH, refractive index, viscosity and color value of dentifrice-containing GSE and PSS were measured, there were no significant changes in these physical properties compared to the control samples. Antimicrobial activities of dentifrice products containing 0.5% GSE and 0.5% PSS against oral pathogens were 7.3, 4.3, 2.2 and 1.5 mm, respectively. According to these results, we conclude that there may be a role for GSE and PSS in the development of new oral supplies.

Key words : Antimicrobial activity, grapefruit seed extract, processed sulfur solution, oral pathogens, oral ailments

서 론

구강은 외계와 직접 접하고 있기 때문에 항상 미생물의 침입을 받고 있으며 영양적·생리적으로 세균이 증식하는데 적합하여 항상 많은 세균이 정착하는 상재 세균총을 이룬다. 보통 사람의 구강에는 30종 이상의 세균이 분리되며 구강세균총은 각 개인, 연령, 건강상태, 식이상태 또는 위생상태에 따라 그 종류와 비율이 달라지는 것으로 알려져 있다[28]. 대표적인 구강질환 원인균으로는 *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* 및 *Candida albicans* 등이 있으며, 이같은 구강 내 미생물의 활동으로 인해 치아우식, 치은염, 치주염, 아구창 및 구강 내 염증 등의 다양한 구강질환이 발생하게 된다[11,33]. 치아우식증은 구강질환의 가장 대표적인 질환으로 치아파괴를 동반한 감염성 질환으로, *S. mutans*가 치면에 부착, 증식 및 산 생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발하는 것으로 알려져 있다[13,31]. 치은염은 치은에서 발생한 염증으로, 대표적인 증상은 치은발적과 출혈이다. 치은염을 방지하여 염증이 계속 진행되었을 경우 치주염으로 발전하게 되는데 [15], 치주염은 치아를 지지하는 결체조직과 골조직의 파괴로

이어지는 염증성 질환이다[16]. 효모성 진균인 *Candida* sp.에 의해서 발병되는 칸디다증은 발병부위에 따라 질 칸디다증, 심부점막감염(식도염, 질염 및 장 칸디다증) 등을 유발하며, 구강점막에 발생시 아구창을 유발하게 된다[23]. 그러므로 구강질환의 예방과 치료를 위해 이러한 세균 등의 생장과 활동을 억제하는 것이 필수적이며, 현재 항균제로 가장 많이 사용되고 있는 것들로서는 bisbiguanides 제제(cholrohexidin)와 4급 암모늄 제제(cetylpyridium, benzalkonium chloride) 및 페놀화합물(triclosan) 등이 있다[26,30,45,47]. 그러나 이들 화학제들이 많은 부작용을 야기함에 따라 천연물로부터 장기간 사용이 가능하면서 효과가 우수한 구강질환 예방 물질을 찾고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다[1,14,38,39,43]. 또한 생약성분 및 천연성분이 함유된 치약의 구강유해균에 대한 항균효과를 확인하는 연구들도 활발히 진행되고 있다[9,13,18,21].

자몽종자추출물(Grapefruit seed extract, GSE)에 함유된 naringin 등의 flavonoid는 항균효과[40], 항산화 효과[5], 항돌연변이 유발효과[17], 항염증 효과[41] 및 항아테롬형성효과[27]를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. GSE의 항균효과는 *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* 및 *V. parahaemolyticus* 등과 같은 식중독균과 전염병 원인균에 대한 연구가 대부분이며[6,8,10,20,25], 구강질환 원인균과 관련된 연구는 미흡한 실정이다[2,12,19].

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5645, Fax : +82-51-999-5644

E-mail : ischoi@silla.ac.kr

유황은 인체에 직접적으로 투여될 경우 독성이 강하여 부작용을 초래하는 것이 일반적이다. 따라서 독성이 있는 유황은 법제를 통하지 않고서는 약으로 쓰이지 않으며[7], 국내에서도 법제 유황의 경구투여가 실험용 쥐에 있어서 특기할 만한 간독성을 유발하지 않고 안전성이 확보된다고 보고하고 있다[44]. 유황은 서양의학에서는 의약품으로 국부자극제, 피부질환, 변비, 치질 등에 이용하였고 동양에서는 그 독성을 제거한 후, 지혈작용, 신경마비, 냉수족 등을 치료하는 약품으로 사용하였을 뿐만 아니라[8], osteocalcin과 estrogen을 유의성 있게 증가시켜 골다공증 등의 골질환 사용가능성에 대해서도 보고된 바 있다[22]. 또한 마늘과 양파 추출물에 있는 함유유황유기화합물은 현대적인 항생제가 나오기 전에는 티푸스, 콜레라, 이질 등 질병의 치료약으로 널리 사용되어 왔을 뿐만 아니라[3,4], 여러 종류의 병원성 미생물의 생육을 억제하는 것으로 보고되고 있으나, 구강질환 원인균에 대한 항균활성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다[28].

본 연구는 GSE와 법제유황수(Processed sulfur solution, PSS)의 구강질환 예방 및 치료제로서의 가능성을 평가하기 위해 구강질환 원인균 4종에 대한 항균효과를 확인하고, GSE와 PSS를 함유한 치약 시제품을 제조하여 시제품의 항균효과와 물리·화학적 특성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험 재료

실험 재료로 사용된 GSE는 현재 시판되고 있는 천연항균제(DF-100, Chemie Research & Manufacturing Co., Inc, USA)로서 자몽종자추출액 70%와 glycerine 30%로 구성되어 있다. PSS는 신미산업(Busan, Korea)에서 생산한 제품을 사용하였으며, 제조방법은 다음과 같다. 먼저 유황 20 g과 수산화칼슘 25 g을 증류수 140 ml에 함께 혼합하고, 100°C로 가열하여 용해시킨 후, 촉매로서 황산나트륨 5 g과 염화칼슘 2 g을 첨가하여 130°C로 2시간 가열하여 반응시켰다. 그 후 시트르산(citric acid) 3 g을 첨가하고 180°C로 2시간 가열하여 반응시킨 다음, 상기반응물을 침전, 여과하여 얻어진 상정액 120 ml를 PSS (유황함량: 117,000 ppm)로 하였다[18]. GSE와 PSS의 건조수율을 측정된 결과, 각각 1.090 g/ml과 0.141 g/ml이었다.

실험 균주 및 배양조건

GSE와 PSS의 구강질환 원인균에 대한 항균효과를 측정하기 위하여 *Streptococcus mutans* 3065 KCTC, *Prevotella intermedia* 25611 KCTC, *Porphyromonas gingivalis* 381 및 *Candida albicans* 17485 KCTC 균주는 생물자원센터(Daejeon, Korea)로부터 분양받아 사용하였으며, *P. gingivalis*는 Aichigakuin University Graduate School of dentistry (Nagoya, Japan)에서 치주질환 환자에서 분리하여 수득한 것을 분양받아 사용

하였다. *S. mutans* 균주는 5% serum (GIBCO BRL, USA)이 포함된 brain heart infusion (OXOID, England) agar 배지로 배양하였고, *P. intermedia*와 *P. gingivalis* 균주는 10% sheep blood와 0.1%의 hemin (Sigma, USA)과 vitamin K₁ (Sigma, USA)이 포함된 tryptic soy agar (Difco, USA) 배지로 배양하였으며, *C. albicans*는 5% serum을 포함한 Sabourand 배지로 배양하였다. 배양조건으로 *S. mutans*와 *C. albicans* 균주의 경우, 37°C로 유지된 호기 조건의 배양기(VS-1203PFC-L, Vision Science Co., Ltd., Korea)에서 배양하였으며, *P. intermedia*와 *P. gingivalis* 균주는 37°C로 유지된 혐기성 배양기인 Bactron IV Chamber(SHELLAB, USA)에서 배양하였으며, 이때 혐기조건은 5% CO₂, 10% H₂, 및 85% N₂로 유지하였다.

항균활성 측정

구강질환 원인균에 대한 GSE와 PSS의 항균활성은 평판배지 확산법을 이용하여 측정하였다. 호기성 조건에서 배양한 *S. mutans*와 *C. albicans*는 NCCLS Guide Line M2-A8 [35]에 준하여 실험하였고, 혐기성 균주인 *P. intermedia*와 *P. gingivalis*는 NCCLS Guide Line M11-A6 [37]에 준하여 실험하였다. 각 공시 균들을 평판배지에 도말 접종한 다음, 직경 8 mm의 멸균된 paper disk (ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 평판배지의 표면에 밀착시켰다. GSE와 PSS를 각각 10, 20 및 40 µl씩 점적하고 37°C로 유지된 혐기성 배양기(5% CO₂, 10% H₂, 및 85% N₂) 및 호기성 배양기에서 48시간 배양하면서 생성된 투명환의 크기(mm)로 항균 활성을 측정하였다.

최소억제농도(MIC) 측정

GSE와 PSS의 최소억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)를 측정하기 위하여 액체배지감수성실험법(Broth Microdilution Susceptibility Tests)을 이용하였다. *S. mutans* 균주는 BHI broth 배지를 사용하여 NCCLS Guide Line M7-A6 [36]에 준하여 MIC값을 측정하였고, *P. intermedia*와 *P. gingivalis* 균주는 GAM broth (Nissui, Japan)배지를 사용하여 NCCLS Guide Line M11-A6 [37]에 준하여 MIC값을 측정하였으며, *C. albicans* 균주는 Sabourand broth 배지를 사용하여 NCCLS Guide Line M27-A2 [34]에 준하여 MIC 값을 측정하였다. 최소억제농도를 측정하기 위하여 대상균액은 각각의 균주에 적합한 액체배지에서 24시간 동안 전배양하면서 활성화시켜, Mcfarland 0.5로 탁도를 조절한 후에 최종농도가 1×10⁶ cells/ml이 되도록 하여 GSE와 PSS의 농도를 2배 연속희석(two-fold serial dilution)하면서 MIC 값을 측정하였다.

GSE와 PSS 함유 치약 시제품의 제조 및 특성

항균물질로서 GSE와 PSS의 가능성을 확인하기 위하여, 치약 시제품을 제조하여 물리화학적 특성을 확인하였다. 치약 베이스는 바이오생명공학연구소(Hanam, Gyeonggi-do,

Korea)에서 제공받았으며, Silicon dioxide, Aminocaproic acid, Aluminium chlorhydroxy allantoin, Glycerin, Polyethylene glycol 1500, Sorbitol, CMC, Chitosan, Xylitol, Sodium saccharin, Methyl parahydroxy benzoate 및 물을 함량별로 각각 칭량하여 순차적으로 모두 투입한 후, 진공 상태를 유지하여 45~50°C에서 25~30분간 가열하면서 교반하여 제조하였다(Table 3). 치약 시제품은 치약 베이스에 GSE와 PSS를 각각 0.1%, 0.25% 그리고 0.5%가 되도록 혼합하여 제조하였다. 시제품의 물리·화학적 특성을 확인하기 위해 pH, 점도 및 굴절률(Refractive Index) 및 색도를 측정하였다. GSE와 PSS가 농도별로 함유된 치약시제품의 pH는 25°C에서 보관한 농도별 치약 시제품을 증류수로 10배 희석하여 원심분리 한 상등액을 pH meter (SevenEasy pH S-20K, Mettler-Toledo GmbH, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 점도는 Brookfield (DV-II+Pro, USA)사의 점도계를 사용하여 25°C에서 스피들(spindle) No. S94 (T-bar;D)로 4 rpm에서 1분간 측정하였다. 굴절률은 굴절계(ABBE Refractometer DR-A1, ATAGO CO., LTD. Japan)를 사용하여 25°C에서 측정하였다. 치약의 색도는 치약표면에 색차계(Milnolta CR-200, Japan)를 사용하여 명도(lightness, L), 적색도(redness, a), 황색도(yellowness, b)를 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다. 이때 표준 백판의 L값 98.11, a값 -0.33, b값 +2.13을 기준으로 측정하였다.

GSE와 PSS 함유 치약 시제품의 항균활성

각각 0.1, 0.25 그리고 0.5%의 GSE와 PSS가 함유된 치약시제품의 항균활성을 평판배지확산법을 이용하여 측정하였다. 치약은 구강에서 사용 시 타액에 의해 희석되는 점을 감안하여 시제품 원액, 2배 및 4배 희석액을 사용하여 항균활성을 측정하였다. 이때, 희석액으로는 멸균 증류수를 사용하였다. 각 공시 균들을 평판배지에 도말 접종한 다음, 직경 8 mm의 멸균된 paper disk(ADVANTEC, Japan)에 농도별로 제조된 치약시제품 원액, 멸균수로 2배 및 4배로 희석한 치약용액을 40 µl씩 점적하여 평판배지의 표면에 밀착 시킨 후, 각 균주의 특성에 맞게 37°C로 유지된 혐기성 배양기 및 호기성 배양기에서 48시간 배양하면서 생성된 투명환의 크기(mm)로 항균활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

GSE와 PSS의 항균활성

평판배지확산법을 이용하여 확인된 구강원인균에 대한 GSE와 PSS의 항균활성을 Table 1에 나타내었다. GSE는 모든 균주에 대해서 항균활성을 나타냈으며, 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히, 충치 원인균인 *S. mutans*의 경우 10, 20 및 40 µl/disk의 농도에서 각각 7.0, 8.5 및 11.0 mm의 투명환이 형성됨에 따라 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 치은염의 원인균인 *P. intermedia*, 치주염의 원인균인 *P. gingivalis* 그리고 이구강의 원인균인 *C. albicans*에 대해서도 40 µl/disk의 농도에서 각각 9.5, 8.0 및 9.0 mm로 나타나 높은 활성을 나타내었다.

PSS를 각각의 균주에 10, 20 및 40 µl/disk로 처리한 결과, *P. intermedia*의 경우, 1.0, 2.5 및 3.5 mm로 모든 농도에서 활성을 나타내었다. *S. mutans*와 *C. albicans*에 대해서는 40 µl/disk의 농도에서 각각 2.0와 1.5 mm로 활성을 보였으나 10, 20 µl/disk의 농도에서는 활성을 나타내지 않았다. *P. gingivalis*의 경우에는 모든 농도에서 투명환이 형성되지 않았다. 이상의 결과에서 평판배지확산법으로 측정했을 때는 전반적으로 GSE가 PSS에 비해 구강질환 원인균에 대해 더 높은 항균활성을 보이는 것으로 나타났다.

GSE의 여러 성분 중 naringin과 같은 flavonoid는 항균활성을 나타내는 물질로 알려져 있으며[32], naringin의 경우 *P. gingivalis*에 대해 항균활성을 가진다는 보고가 있다[46]. 그리고 GSE에는 ascorbic acid, ascorbyl palmitate 및 tocopherol 등도 포함되어 있는데 이는 미생물의 세포벽 및 세포막의 기능을 약화시키고 효소활성을 저해한다고 알려져 있다[29]. GSE에서 보여진 항균효과는 naringin과 같은 polyphenolic flavonoid와 그 외 GSE에 포함된 다양한 기능성 성분들로부터 기인한 것으로 추측되어 진다. 또한 GSE는 그람 음성과 양성 모두에서 항균활성을 나타내는데[42], 본 연구결과에서도 그람 음성인 *P. intermedia*와 *P. gingivalis* 그리고 그람 양성인 *S. mutans*와 *C. albicans* 모두에서 활성을 보이는 것으로 나타났다.

GSE와 PSS의 최소억제농도(MIC)

구강질환 원인균에 대한 GSE와 PSS의 MIC 값을 Table 2에

Table 1. Anti-microbial activity of grapefruit seed extract and processed sulfur solution against oral microbes (unit: mm)

Strains	GSE (µl/disk)			PSS (µl/disk)		
	10	20	40	10	20	40
<i>Streptococcus mutans</i>	7.0±0.1	8.5±0.6	11.0±0.3	-	-	2.0±0.3
<i>Prevotella intermedia</i>	6.0±0.3	7.5±0.1	9.5±0.3	1.0±0.1	2.5±0.1	3.5±0.1
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4.5±0.1	5.5±0.1	8.0±0.6	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	4.5±0.3	6.5±0.1	9.0±0.3	-	1.0±0.3	1.5±0.3

All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at p>0.05.

나타내었다. *S. mutans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* 및 *C. albicans*에 대한 GSE의 MIC 값은 각각 0.24, 0.06, 0.10 및 15.63 $\mu\text{l/ml}$ 로 나타났다. *S. mutans*, *P. intermedia* 및 *C. albicans*에 대한 PSS의 MIC 값은 각각 0.12, 3.91, 7.81 $\mu\text{l/ml}$ 로 나타났다. *P. gingivalis*에 대한 PSS의 MIC를 측정할 바 125 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도에서는 항균활성을 나타내지 않았는데, 이는 평판배지확산법을 이용한 항균활성의 결과와도 일치하며, PSS는 *P. gingivalis*에 대하여 항균활성을 나타내지 않는 것을 알 수 있었다. GSE와 PSS의 MIC값 측정결과 각각 *P. intermedia*와 *S. mutans*에서 가장 높은 항균활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. GSE는 혐기성 조건에서 배양한 *P. intermedia*와 *P. gingivalis*에서 항균활성이 더 높게 나타났으며, PSS는 호기성 조건에서 배양한 *S. mutans*와 *C. albicans*에 활성이 더 높게 나타났다. 그러므로, GSE와 PSS를 각각 단독으로 사용하는 것보다 복합적으로 사용하는 것이 다양한 구강질환 원인균에 대해 더 효과적인 예방 및 치료 효과를 나타낼 것으로 사료된다. GSE와 PSS에 대하여 평판배지확산법에 의한 항균결과와 MIC 측정에 따른 결과가 다른 경향을 보이는 것으로 나타났는데 이는 고체배지와 액체배지 상에서 GSE와 PSS의 용해도와 확산속도가 다르기 때문으로 추정된다.

GSE와 PSS 함유 치약 시제품의 물리·화학적 특성

치약은 의약외품으로 분류되며, 식품의약품안전청 고시 제 2008-56호 의약품등의 품목허가·신고·심사 규정에서 정상,

확인, 함량, 질량(용량)편차시험 및 pH 등을 시험항목으로 정하고 있는데[24], 본 연구에서는 GSE와 PSS가 함유된 치약의 상업적 활용 가능성을 타진하기 위해, pH뿐만 아니라 굴절율, 점도, 색도 등의 물리적 특성도 확인하였다. GSE와 PSS가 각각 0.1, 0.25 그리고 0.5%씩 함유된 치약 시제품을 제조하여 항균물질을 포함하지 않은 치약을 대조군으로 하여 각각의 특성을 비교하였다(Table 4). 그 결과, 대조군 치약의 pH는 5.97이었으며, GSE와 PSS의 농도가 높아질수록 pH가 증가하여 0.5% 함유 치약의 경우 6.00으로 나타났으나, 그 차이가 미미한 것으로 보아 GSE와 PSS가 치약의 pH에는 크게 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다. 굴절률의 경우에도 대조군이 1.4301로 나타났고, 0.1, 0.25 및 0.5%에서 각각 1.4311, 1.4355 및 1.4389로 나타나 점점 증가하는 것을 알 수 있었다. 점도를 측정할 결과, 410,000에서 370,000 cps로 GSE와 PSS를 첨가하지 않은 대조군의 420,000 cps보다 낮아 농도가 증가할수록 점도가 다소 감소하는 경향을 보였으나 치약을 1 cm 짜내었을 때 떨어지지 않고 20초간 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 치약 시제품의 Hunter 색도 변화를 측정할 결과, 농도가 증가할수록 명도를 나타내는 L값은 점점 감소하는 경향을 보여 대조구에서는 94.71, 0.5%에서는 85.85로 나타났다. 적색도를 나타내는 a값은 농도가 증가할수록 색도가 증가하는 경향을 보였으며, 대조구에서는 0.42이고, 0.5%에서는 0.63로 측정되었다. 황색도를 나타내는 b값 역시 0.38에서 5.45의 값을 나타내며 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

GSE와 PSS 함유 치약 시제품의 항균활성

치약 시제품의 항균활성을 확인하기 위해, 각각 0.1, 0.25, 0.5%의 GSE와 PSS를 첨가한 치약 시제품 원액 및 이를 2배 증류수로 2배와 4배로 희석한 치약시제품 용액의 항균활성을 평판배지확산법을 이용하여 측정하였다(Fig. 1). *S. mutans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* 및 *C. albicans*에 대한 0.5% 치약 시제품 원액의 항균활성을 확인한 결과, 각각 2.3, 1.2, 2.2 그리고 1.7 mm로 나타났고, 2배 희석한 0.5% 치약 시제품에서는 각각 7.3, 4.3, 2.2 그리고 1.5 mm로 나타났으며, 4배 희석한 0.5% 치약 시제품에서는 각각 4.8, 3.3, 1.5 그리고 1.0 mm의 항균활성을 나타내었다. *S. mutans*와 *P. intermedia*의 경우 2배 희석한 치약에서 가장 높은 항균활성을 나타내었고, *P. gingivalis*는 치약 시제품 원액과 2배 희석한 치약에서 비슷한 수준의 항균활성을 나타내었다. 반면에, *C. albicans*는 치약 시제품을 희석할수록 항균활성이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. GSE와 PSS를 첨가하지 않은 대조군 치약 원액과 2배 및 4배 희석한 치약 용액에서는 항균활성을 보이지 않았다.

치약은 칫솔과 더불어 가장 널리 사용되고 빈도가 높은 구강위생용품이지만 잇솔질만으로는 효과적으로 치태를 제거하는데 한계가 있다. 그러므로 잇솔질에 의한 치태 제거 효과를 높이기 위해, 치약에 불소뿐만 아니라 chlorohexidine, san-

Table 2. MIC values of Grapefruit Seed Extract and processed sulfur solution on oral microbes

Strains	GSE ($\mu\text{l/ml}$)	PSS ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Streptococcus mutans</i>	0.24	0.12
<i>Prevotella intermedia</i>	0.06	3.91
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0.10	>125
<i>Candida albicans</i>	15.63	7.81

All measurements were done triplicate.

Table 3. Ingredients of test dentifrice product

Ingredient	% (w/w)
Silicon dioxide	15.0
Aminocaproic acid	0.2
Aluminum chlorohydroxy allantoinate	0.2
Glycerin	4.0
Polyethylene glycol 1500	4.0
Sorbitol	60.0
CMC	1.0
Chitosan	0.2
Xylitol	0.2
Sodium saccharin	0.1
Methyl parahydroxy benzoate	0.2
Water	14.9

Table 4. pH, refractive index, viscosity and color value of dentifrice product made by GSE and PSS

Test dentifrice product	a	b	c	d	
pH	5.97	5.97	5.98	6.00	
Refractive index (nD)	1.4301	1.4311	1.4355	1.4389	
Viscosity (cps)	420,000	410,000	40,000	370,000	
Color value	<i>L</i> (lightness)	94.71	88.91	88.26	85.85
	<i>a</i> (redness)	0.42	0.48	0.56	0.63
	<i>b</i> (yellowness)	0.38	4.97	5.29	5.45

a: dentifrice product without GSE and PSS. b, c and d: dentifrice product with mixtures of GSE and PSS, 0.1, 0.25 and 0.5%, respectively. All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

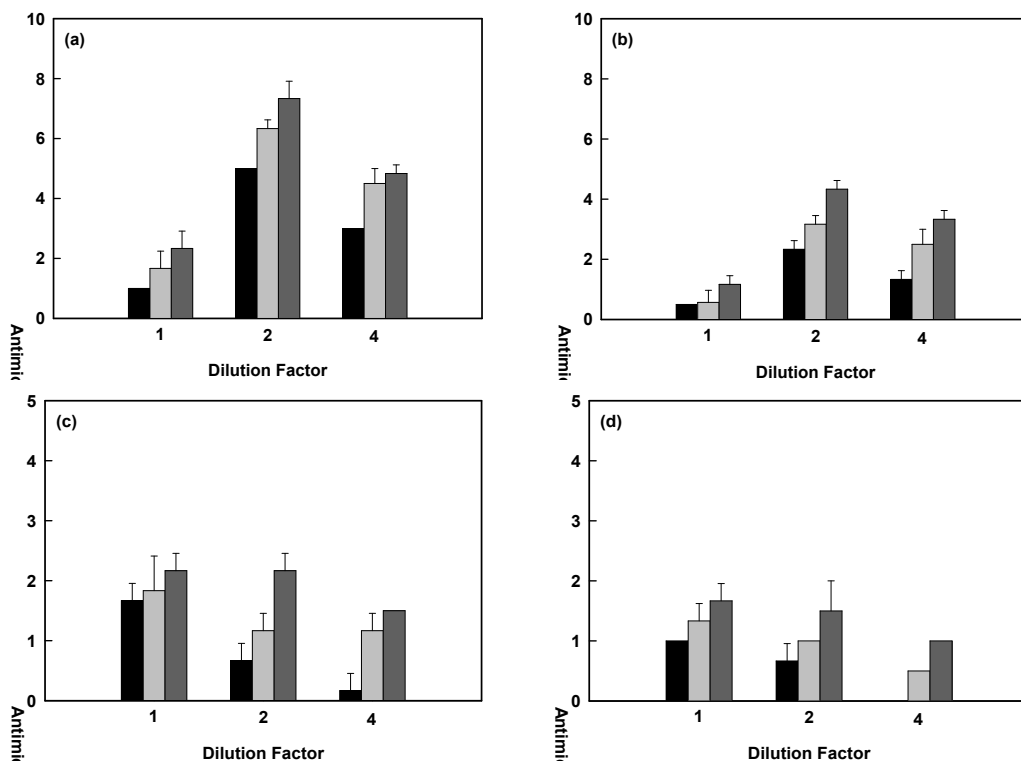


Fig. 1. Antimicrobial activity of dentifrice test product containing GSE and PSS (0.1%: ■, 0.25%: □, 0.5%: ▒) against oral microbes, *Streptococcus mutans* (a), *Prevotella intermedia* (b), *Porphyromonas gingivalis* (c) and *Candida albicans* (d) of different dilution factor (1: control, 2: 2-fold dilution, 4: 4-fold dilution). Data are the averages of triplicate experiment. Statistical significance was calculated using Student's *t*-test and deemed statistically significant at $p < 0.05$.

guinaria, triclosan과 같은 항균제를 첨가하고 있는데, 이들 항균제의 경우 치아 또는 연조직을 변색시키고 치석 형성을 증진시키거나, 구강에 작열감을 나타내는 등의 부작용이 있어 천연 항균제를 이용한 치약개발이 많이 이루어지고 있다. 자몽종자추출물은 식중독균 및 전염병균에 대한 항균효과가 있는 것으로 보고되고 있으나[6,8,10,20,25], 구강질환 원인균과 관련된 연구는 미흡한 것으로 알려져 있다. 자몽종자추출물을 구강에 적용한 이전의 연구를 살펴보면, 정 등[19]은 자몽종자추출물과 차추출물 및 UDCA를 배합한 구내분무액의 구취 원인균 및 구취 감소효과에 대해 보고한 바 있고, 배 등[2]은

자몽종자 추출물과 eucalyptus oil 및 플라보노이드를 배합한 세치제의 구취제거효과에 대해서 보고한 바 있으며, Filoche et al. [12]은 자몽종자추출물을 포함하는 다양한 essential oil 배합액이 *S. mutans* 등의 균주에 대해 높은 항균효과를 가진다고 보고한 바 있어 주로 자몽종자추출물과 다양한 천연 항균 물질들을 혼합하여 구취감소 및 제거효과를 확인하거나 충치 원인균인 *S. mutans*에 대한 항균효과를 확인한 것으로 나타났다. 본 연구에서는 자몽종자추출물(GSE)만을 사용하여 충치, 치은염, 치주염 및 아구창의 원인균에 대한 항균효과를 확인하였을 뿐만 아니라 또 다른 천연항균제인 법세유황수(PSS)를

사용하여 치주염 원인균을 제외한 주요 구강질환 원인균에 대한 항균활성도 확인하였다. 또한 이들 두 종류의 천연항균 물질을 사용하여 제조한 치약시제품의 항균효과도 확인할 수 있었다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때, 구강질환 예방 및 치료제로서 GSE와 PSS의 가능성을 확인할 수 있었으며, 치약시제품에 혼합했을 때 물리 화학적으로 비교적 안정한 것으로 확인되어 치약 이외의 구강 위생관련제품에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

구강질환 원인균에 대한 자몽종자추출물(GSE)과 법제유황수(PSS)의 항균활성을 확인하기 위해, 평판배지확산법 및 액체감수성실험법으로 *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* 및 *Candida albicans*에 대한 항균활성을 측정하였다. 평판배지확산법의 경우, GSE의 농도가 40 µl/disk일 때, *S. mutans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* 및 *C. albicans*에 대한 항균활성은 각각 11.0, 9.5, 8.0, 9.0 mm로 나타났으며, PSS의 농도가 40 µl/disk일 때에는 각각 2.0, 3.5, 0.0, 1.5 mm로 나타났다. 또한 액체배지감수성실험에서 GSE에 대한 MIC 값은 0.24, 0.06, 0.10, 15.63 µl/ml이었으며, PSS에 대한 MIC 값은 각각 0.12, 3.91, >125, 7.81 µl/ml이었다. 치약 시제품의 항균효과를 확인하기 위해, GSE와 PSS가 농도별로 함유된 치약시제품 원액과 2배 및 4배 희석액을 제조하여 평판배지확산법을 수행한 결과, 0.5% 치약 시제품의 2배 희석액에서 각각 7.3, 4.3, 2.2 그리고 1.5 mm로 나타났다. 치약 시제품의 물리·화학적 특성을 확인한 결과, pH, 점도, 굴절 및 색도 변화에 있어서 모두 안정성을 보였고, 이상의 결과를 바탕으로 기능성 치약과 같은 구강질환 예방 및 치료제 개발 가능성을 확인하였다.

References

- Bae, K. H., E. J. Jun, S. M. Lee, E. J. Lee, D. I. Paik, and J. B. Kim. 2005. The antimicrobial effect of CTS 50 chitosan on oral pathogenic microorganisms. *J. Korean Acad. Dent. Health* **29**, 58-66.
- Bae, K. H., S. H. Noh, and H. S. Moon. 2002. A study on the halitosis reduction by dentifrice containing triclosan, GFSE, eucalyptus oil and flavonoid. *J. Korean Acad. Dent. Health* **26**, 251-257.
- Block, E. 1986. The art and science. In folk medicine, pp. 125-137, In Steiver, R. P. (ed.), American Chemical Society, Washinton, DC.
- Block, E. 1992. The organosulfur chemistry of the genus allium-Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew Chem Int. Fd. Engi.* **31**, 1135-1178.
- Chen, Y. T., R. L. Zheng, Z. J. Jia, and Y. Ju. 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med* **9**, 19-21.
- Choi, J. D., I. W. Seo, and S. H. Cho. 1990. Studies on the antimicrobial activity of grapefruit seed extract. *Bull. Korean Fish Soc.* **23**, 297-302.
- Choi, K. H. and C. H. Kim. 2002. Growth inhibition of extract from sulfur fed duck carcass against various cancer cell lines. *J. Korean Soc. Food Science of Animal Resources.* **22**, 348-351.
- Cho, J. H., B. J. Min, O. S. Kwon, K. S. Shon, Y. G. Jin, H. J. Kim, and I. H. Kim. 2005. Effects of MSM (Methyl sulfonyl methane) supplementation on growth performance and digestibility of Ca and N in pigs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 361-365.
- Cho, M. J., S. J. Hong, C. H. Choi, and S. S. Jeong. Effects of dentifrice containing extract of *Galla Rhois* or *Psoralea corylifolia* on inhibition of plaque formation. *J. Korea Acad. Dent. Health* **29**, 141-151.
- Cho, S. H., I. W. Seo, J. D. Choi, and I. S. Joo. 1990. Antimicrobial and antioxidant activity of grapefruit and seed extract on fishery products. *Bull. Korean Fish Soc.* **23**, 289-296.
- de Soet, J. J., C. van Loveren, A. J. Lammens, M. J. Pavčić, C. H. Homburg, J. M. ten Cate, and J. de Graaff. 1991. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* **25**, 116-122.
- Filoché, S. K., K. Soma, and C. H. Sissons. 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol. Immunol.* **20**, 221-225.
- Hamada, N. and T. Takehara. 1984. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.* **63**, 407-411.
- Hong, S. J., E. G. Choi, J. B. Son, and S. S. Jeong. Clinical effect of herbal extract containing dentifrice on the dental plaque and gingivitis. *J. Korea Acad. Dent. Health* **24**, 171-183.
- Hwang, S. J., S. N. Kim, S. Y. Chang, W. H. Ha, I. S. Kim, B. H. Jin, D. I. Paik, and H. D. Kim. 2005. Gingivitis suppression effect of the de novo dentifrice containing *Curcuma xanthorrhiza*, bamboo salt and various additives. *J. Korean Acad. Dent. Health* **29**, 451-462.
- Ishikawa, I., K. Nakashima, T. Koseki, T. Nagasawa, H. Watanabe, S. Arakawa, H. Nitta, and T. Nishihara. 1997. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol.* **2000** **14**, 79-111.
- Jagetia G. C. and T. K. Reddy. 2002. The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. *Mutat. Res.* **519**, 37-48.
- Jang, Y. I. and T. R. Song. 2007. Sulphur solution containing and sulphur and method for manufacturing the same. Korea patent 10-2007-0000628.
- Jung, S. H., K. H. Bae, H. S. Moon, D. I. Paik, S. H. Jung, and D. Y. Park. 1998. Effects of mouth spray containing GSE, tea extract & UDCA on antimicrobial effect of

- Streptococcus mutans*, reducing of oral malodor and reduction of gingivitis. *J. Korean Acad. Dent. Health* **22**, 37-46.
20. Kang, D. H., S. S. Chun, D. H. Chung, and S. H. Cho. 1994. Antimicrobial effect of grapefruit seed extract on *vibrio parahaemolyticus* isolated from the southern adjacent sea of Korea. *J. Fd. Hyg. Safety* **9**, 141-149.
 21. Kim, B. I., S. N. Kim., S. Y. Chang, K. T. Moon, Y. S. Kim, J. K. Hwang, S. H. Jeong, M. Y. Kim, H. S. Kim, and H. K. Kwon. 2005. A highly selective antibacterial effect of *Curcuma xanthorrhiza* extract against oral pathogens and clinical effectiveness of a dentifrice containing *Curcuma xanthorrhiza* extract for controlling bad breath. *J. Korea Acad. Dent. Health* **29**, 222-237.
 22. Kim, S. H. and Y. B. Seo. 1996. Effect of processed sulphur on experimental bone disease. *Korean J. Oriental Medical Pathology*. **10**, 79-87.
 23. Koh, C. M., K. H. Lee, J. Y. Park, M. C. Kim and D. S. Cha. 1997. Comparison of virulence factor expression between blood isolates of *Candida albicans* and commensal strain isolated from healthy volunteers. *Korean J. Biotechnol. Bioeng* **32**, 429-434.
 24. Korea Food & Drug Administration. 2004. The regulation of inspection for declaration of item permission of medical supplies and others. No.2008-56.
 25. Kumar, M. and J. S. Verwal. 1998. Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *J. Appl. Microbiol.* **84**, 213-215.
 26. Lang, N. P. and M. C. Brex. 1986. Chlorhexidine digluconate agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J. Periodont. Res.* **16**, 74-89.
 27. Lee C. H., T. S. Jeong, Y. K. Choi, B. H. Hyun, G. T. Oh, E. H. Kim, J. R. Kim, J. I. Han, and S. H. Bok. 2001. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 681-688.
 28. Lee, S. L. and J. G. Kim. 2006. Anti-microbial activity of soybean extract against oral microbes. *Kor. J. Env. Hlth* **32**, 192-197.
 29. Lee, T. E. 1987. Efficacy report of DF-100. Conference of genetics & cell biology. University of Malaya, Kuala Lumpur.
 30. Lee, Y. S., S. G. Kim, T. C. Yang, G. S. Kim, J. G. Jeon, and K. W. Chang. 2006. The antibacterial and growth inhibitory effect of some essential oils against the oral micro-organisms. *J. Korean Acad. Dent. Health* **30**, 490-496.
 31. Loesche, W. J., J. Rowan, L. H. Straffon, and P. J. Loos. 1975. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infect. Immun.* **11**, 1252-1260.
 32. Mandalari, G., R. N. Bennett, G. Bisignano, D. Trombetta, A. Saija, C. B. Faulds, M. J. Gasson, and A. Narbad. 2007. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 2056-2064.
 33. Min, Y. K., J. K. Jeon, S. G. Kim, and K. W. Chang. 2001. Inhibitory effects of *Schizandra chinensis* extracts on the growth and adsorption to saliva - coated HA beads of some oral bacteria. *J. Korean Acad. Dent. Health* **25**, 165-183.
 34. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard-2nd eds., Vol.22, NCCLS Document M27-A2. Pennsylvania.
 35. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Reference methods for antimicrobial disk susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard-6th eds., Vol.23, NCCLS Document M2-A8. Pennsylvania.
 36. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Reference methods for antimicrobial susceptibility testing of aerobic bacteria; Approved Standard-6th eds., Vol.23, NCCLS Document M7-A6. Pennsylvania.
 37. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Reference methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard-6th eds., Vol.24, NCCLS Document M11-A6. Pennsylvania.
 38. Pan, P. H., M. B. Finnegan, L. Sturdivant, and M. L. Barnett. 1999. Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse *in vitro*. *J. Clin. Periodontol.* **26**, 474-476.
 39. Pirrs, G., R. Pianotti R, T. W. Feary, J. McGuiness, and T. Masurat. 1981. The *in vivo* effects of an antiseptic mouthwash on odorproducing microorganisms. *J. Dent. Res.* **60**, 1891-1896.
 40. Rauha, J. P., S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kähkönen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, and P. Vuorela. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiology* **56**, 3-12.
 41. Read, M. A. 1995. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. *Am. J. Pathol.* **147**, 235-237.
 42. Reagor, L., J. Gusman, L. McCoy, E. Carino, and J. P. Heggors. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I. An *in vitro* agar assay. *J. Altern. Complement Med* **8**, 325-332.
 43. Renvert, S. and D. Birkhed. 1995. Comparison between 3 triclosan dentifrices on plaque, gingival and salivary microflora. *J. Clin. Periodontol.* **22**, 63-70.
 44. Song, I. S., D. H. Youn, and S. Y. Hwa, 2007. Effect of oral administration of processed sulphur on hepatotoxicity. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* **21**, 898-906.
 45. Svaton, B., C. A. Saxton, and G. Rolla. 1990. Six-month study of effects of a dentifrice containing zinc citrate and triclosan on plaque, gingival health, and calculus. *Scand J. Dent. Res.* **98**, 301-304.
 46. Tsui, V. W., R. W. Wong, and A. B. Rabie. 2008. The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogenesis *in vitro*. *Phytother. Res.* **22**, 401-406.
 47. Wennstrom, J. and J. Lindhe. 1985. Some effects of a sanguinarine containing mouth wash on developing plaque and gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* **12**, 86-91.