
귤피 추출물의 항균효과

최보람*, 강제구**, 강경희***

Antibacterial Effects of Extracts from Citrus Peels

Bo-ram Choi*, Jaeku Kang**, Kyung-hee Kang***

요 약 생약제제 중에서 귤피는 항산화작용, 순환기계 질병의 예방, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 지질 저하 작용, 면역 증강작용, 모세혈관 강화작용 등이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 귤피 추출물이 치아우식 원인균으로 알려진 *S. mutans*에 미치는 항균효과와 GTase활성에 미치는 영향에 대해 알아보하고자 하였다. 추출물을 5, 10, 20 mg/ml의 농도로 배지에 첨가한 후 *S. mutans*의 성장억제효과를 확인한 결과, 농도가 높을수록 colony의 수가 현저히 줄어드는 것을 관찰 할 수 있었다. 8 시간 후 측정하였을때 5 mg/ml에서 92%, 10 mg/ml에서 95%, 20 mg/ml에서 99%의 높은 성장억제율을 나타내었다. 또한 추출물의 GTase 활성 저해율을 측정한 결과, 추출물의 농도가 높아 질수록 저해율이 급격히 증가하는 것으로 나타났으며, 5 mg/ml에서는 42%의 강한 활성 저해 효과를 보였다.

주제어 : *S. mutans*, 귤피, 항균효과, 성장, GTase

Abstract It has been reported that dried orange peel in a medicine prepared from crude drugs has antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic, anti-bacterial, and anti-viral functions, prevents circulatory diseases, reduces lipids, improves immunity, and strengthens capillary vessels. This study attempted to identify the antibacterial effects of dried orange peel extract on *S. mutans* causing dental caries, and its effects on GTase activation. The extract was put on the medium at the concentration of 5, 10 and 20 mg/ml and its effects on the inhibition of *S. mutans* growth were examined. Analysis found that the higher the concentration was, the more the number of colonies was reduced. In accordance with the measurement after 8 hours, the extract displayed a high growth inhibition rate: 92% at a concentration of 5 mg/ml, 95% at a concentration of 10 mg/ml and 99% at a concentration of 20 mg/ml. Furthermore, the GTase deactivation rate by the extract was measured. The higher the concentration of extract was, the more rapidly the deactivation rate increased. The deactivation rate of the extract was significant at 42% at a concentration of 5mg/ml.

Key Words : *S. mutans*, Citrus peel, Antibacterial effect, Growth, GTase

1. 서론

치아우식증은 치태 내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 구강질환의 가장 대표적인 질환으로, 구강 내에 상주하는 세균의 발효작용에 의하여 생기는 젖산으로 인해 치아의 경조직이 탈회되어 유발된다[18]. 치아우식증의 원인균으로는 *Streptococcus mutans*가 주 원인균으로 알려져 있으며, *S. mutans*는 구강 내에 상주

하여 치아 표면에 부착, 증식하여 섭취하는 음식물의 영양소를 이용하여 젖산 생성 과정을 거쳐 치아우식증을 유발한다. 또한 치면의 획득피막에 부착한 후, glucosyltransferase(이하 GTase)와 같은 당전이효소를 생산하여 당을 중합시키고 불용성 glucan을 생성한다. 생성된 glucan은 치면에서 증식하는 다른 세균들이 치아에 쉽게 결합하도록 유도함으로써 치아 우식증을 최종적으로 유발시킨다[6].

*원광대학교 치과대학 대전치과병원 치과위생사

**건양대학교 의과대학 약리학교실 조교수

***건양대학교 의과대학 치위생학과 조교수

논문접수: 2012년 12월 1일, 1차 수정을 거쳐, 심사완료: 2012년 12월 20일

치아우식증을 예방하기 위해서는 주 원인균인 *S. mutans*에 대항하는 항균성 물질을 사용하고, 치아표면에 *S. mutans*의 부착과 불용성 glucan을 생성하는 GTase를 억제하는 것이 중요하다고 보고되었다[10]. 치아우식증 예방에 관한 연구는 다양한 추출물로 진행되고 있으며, 최근에는 항생제가 인체에 미치는 부작용 때문에 안전하게 사용할 수 있는 천연 항균물질과 생약제제를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다.

감귤류는 우리나라 과수 생산량의 30%를 차지하고 있는 국내 제 1의 과일이다[4]. 귤피는 운향과(Rutaceae)에 속한 상록 소교목인 귤(*Citrus unshiu* Markovich)의 성숙한 과실의 과피(Citri Pericarpium)를 건조시킨 것으로, 예로부터 메스꺼움, 소화불량, 해수, 가래를 없애주고 또한 이뇨작용에도 효과가 있어 한약재로 사용되어 왔다 [1]. 귤피에는 flavonoid, alkaloid, lignin, monoterpeneoid, sesquiterpeneoid, triterpeneoid 등의 기능성 물질을 다량으로 함유하고 있어 연구가치도 높은 것으로 알려져 있다 [13]. 유해물질의 제거뿐 아니라, 항산화작용, 순환기계 질병의 예방, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 지질 저하 작용, 면역 증강작용, 모세혈관 강화작용 등이 보고되고 있다. Jung 등[9]은 귤피 추출물의 Alloxan 유도 HIT-T15 세포에서의 산화적 손상에 대한 억제효과, Park 등[14]은 귤피 발효추출물의 항산화 효과 및 효소 활성 증가 효과, Hyon 등[7]은 제주산 감귤류 귤피의 항산화 활성, Eun 등 [5]은 귤피의 마우스에서의 면역세포 조절효과, Jung 등[8]은 귤피의 항관절염 효과에 대해 보고하였다.

이처럼 귤피는 중요한 생리적 기능물질들을 함유하고 있는 다양한 개발 가능성을 지닌 유용자원임이 분명하다. 그러나 귤피가 민간에서 치료제로 사용되어져 왔으며 차와 가공식품 등으로 지금까지도 사용되고 있지만 구강세균과 관련 연구는 거의 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 귤피 추출물이 치아우식 원인균인 *S. mutans*에 미치는 항균효과와 GTase활성에 미치는 효과를 알아보고 항균, 항우식 천연물질로의 가능성을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 추출물 준비

연구 재료는 국내(제주)산 100% 귤피가루를 구입하여

사용하였다. 귤피가루 60 g과 ethanol 600 ml을 혼합하여 상온에서 24시간동안 보관한 후에 초음파를 1시간동안 가해준 뒤 vacuum여과기를 통과시켰다. 여과된 추출물을 감압농축기를 이용하여 농축된 귤피추출물을 얻었다. 추출물은 1.25 g/ml의 농도로 증류수에 희석한 상태로 냉장 보관하여 사용하였다.

2.2 사용 균주 및 배양

S. mutans KCTC 3065를 분양받아 Brain Heart Infusion (BHI, Difco, USA) 액체배지에 37°C 배양기에서 2일간 2회 계대 배양하여 사용하였다.

2.3 추출물의 농도에 따른 흡광도 측정

추출물을 5, 10, 20 mg/ml 농도로 희석한 후 실험군 BHI 액체배지 5 ml에 각각 첨가하였고 control에는 추출물을 첨가하지 않았다. 각각의 배지에 2회 계대 배양시킨 *S. mutans* 균주를 20 μ l씩 접종하여 37°C 배양기에서 배양하면서 2, 4, 6, 8, 10, 12 시간 간격으로 Sampling 하여 흡광도 값을 측정하였다. 흡광도는 분광광도계에서 600 nm로 측정하였고 모든 실험군은 3개씩 반복하여 평균값을 내었다.

2.4 추출물의 농도에 따른 시간별 집락수 측정

추출물을 5, 10, 20 mg/ml의 농도로 희석한 후 실험군 BHI 액체배지 5 ml에 각각 첨가하였고 control에는 추출물을 첨가하지 않았다. 각각의 배지에 2회 계대 배양시킨 *S. mutans* 균주를 20 μ l씩 접종하였다. 접종 후 37°C 배양기에서 배양하면서 8, 12시간 간격으로 100 μ l씩 Sampling 하여 멸균증류수에 10(-6)배로 희석한 후 agar plate에 접종하였다. 그 후 37°C에서 3일 동안 배양 후 귤피가루 추출물의 농도에 따른 시간별 집락수(Colony Forming Unit, 이하 CFU)를 측정하였다. 모든 실험군은 3개씩 반복 실험하여 평균값을 내었다. 추출물에 의한 *S. mutans*의 성장 억제율은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = \frac{(\text{대조군의 세균수} - \text{추출물 함유군의 세균수}) \times 100}{\text{대조군의 세균수}}$$

2.5 추출물의 GTase 저해활성 측정

S. mutans 배양액을 4°C에서 4,500 rpm으로 5분간 원심분리시킨 후 상정액을 취하여 여과지(whatman paper

NO. 2)로 여과시킨 후 조효소액 안정화를 위하여 10N NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조정하였다. 그 후 시료액 총무게의 0.02%에 해당하는 sodium azide를 첨가하여 GTase 조효소액을 제조하였다. 조효소액 0.5 ml에 2% sucrose 1 ml와 추출물의 농도별 시료 0.05 ml를 첨가하고 37°C, 20 시간동안 배양시킨 후 vortex하고 흡광도 660 nm에서 측정하였다. control에는 추출물대신 증류수를 0.05 ml 첨가하였고, Blank에는 2% sucrose 대신 증류수를 첨가하였다. 모든 실험군은 3개씩 반복하여 평균값을 측정하였다. 대조군과 비교한 추출물 함유군의 GTase 활성 저해율은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = (\text{대조군의 흡광도} - \text{추출물 함유군의 흡광도}) \times 100 / \text{대조군의 흡광도}$$

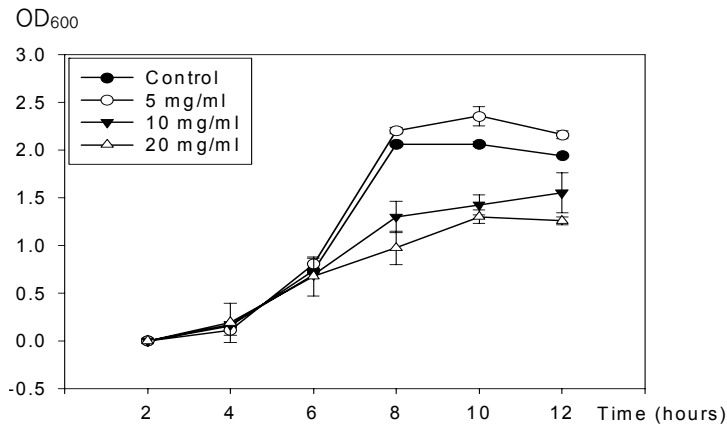
3. 결과

3.1 추출물의 농도에 따른 흡광도

굴피가루 추출물을 5, 10, 20 mg/ml 농도로 BHI 액체 배지 5 ml에 각각 첨가하여 균주와 함께 배양하여 시간에 따라 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도 값에 비교했을 때 5 mg/ml의 추출물을 넣은 실험군은 큰 변화가 없었으며, 10 mg/ml의 추출물에서는 6시간부터 흡광도 값이 대조군과 급격한 차이를 나타내는 것을 볼 수 있었으며, 20 mg/ml의 추출물에서도 흡광도 값이 대조군과 급격한 차이를 나타내었다[그림 1].

3.2 추출물의 농도에 따른 시간별 집락수

굴피가루 추출물을 5, 10, 20 mg/ml 농도로 BHI 액체 배지 5 ml에 각각 첨가하여 시간에 따라 배양 한 다음, 멸균증류수에 10(-6)배로 희석하여 agar plate에 접종 후,



[그림 1] 굴피 추출물의 농도에 따른 S. mutans의 성장곡선

Incubating time	concentration (mg/ml)			
	0	5	10	20
8hr				
12hr				

[그림 2] 굴피 추출물의 농도에 따른 S. mutans의 CFU

〈표 1〉 굴피 추출물의 농도에 따른 *S. mutans*의 성장억제율

concentration (mg/ml)	8 hour		12 hour		Mean±SD
	log ₁₀ CFU/ml	Inhibition rate (%)	log ₁₀ CFU/ml	Inhibition rate (%)	
0	9.17±0.13	0	9.52±0.18	0	
5	8.09±0.06*	92.05±1.08	8.38±0.18*	92.83±2.82	
10	7.78±0.35*	94.78±5.11	7.81±0.32*	97.88±1.27	
20	6.92±0.39*	99.33±0.43	7.23±0.46*	99.34±0.49	

* p<0.05

균주의 성장 억제 효과를 알아보기 위해 CFU 값과 대조군에 대한 억제율을 측정 한 결과, 각각의 실험군 모두 유의한 변화를 나타냈다(p<0.001). 농도가 높을수록 colony의 수가 현저히 줄어드는 것을 관찰 할 수 있었다[그림 2]. 12시간 경과 후, 대조군에서는 9.52±0.18 log₁₀ CFU/ml 굴피추출물 5 mg/ml 첨가한 배지에서는 8.38±0.18 log₁₀ CFU/ml, 10 mg/ml 첨가한 배지에서는 7.81±0.32 log₁₀ CFU/ml, 20 mg/ml 첨가한 배지에서는 7.23±0.46 log₁₀ CFU/ml 으로 나타났다<표 1>. 또한 성장억제율을 측정 한 결과, 굴피추출물 5 mg/ml 첨가한 배지에서는 92.83±2.82%, 10 mg/ml 첨가한 배지에서는 97.88±1.27%, 20 mg/ml 첨가한 배지에서는 99.34±0.49%로 나타났다.

3.3 추출물의 GTase 활성 저해 효과

농도별 굴피가루 추출물이 *S. mutans*가 생성하는 GTase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 대하여 추출물의 농도가 높아질수록 흡광도 값이 점차 감소하는 것으로 나타났다. 추출물을 0.3125 mg/ml 처리한 경우 저해율은 8.8±3.8%, 0.625 mg/ml 처리한 경우 저해율은 9.7±3.0%, 1.25 mg/ml 처리한 경우 저해율은 25.9±1.0%, 2.5 mg/ml 처리한 경우 저해율은 30.9±3.3%, 5 mg/ml 처리한 경우 저해율은 41.6±2.2%로 나타났다<표 2>.

〈표 2〉 GTase 활성저해율

농도(mg/ml)	OD ₆₀₀	Inhibition rate (%)	Mean±SD
0	0.54±0.11	-	
0.3125	0.49±0.02	8.8±3.8	
0.625	0.49±0.02	9.7±3.0	
1.25	0.40±0.01	25.9±1.0	
2.5	0.37±0.02	30.9±3.3	
5	0.32±0.01	41.6±2.2	

4. 고찰

치아우식증 등을 예방하기 위한 방법으로 치약의 주성분에 구강질환의 원인이 되고 구취를 발생시키는 구강내의 미생물에 대해 살균작용을 하거나 그 대사작용을 저지시키는 작용을 하는 방부살균제를 배합하여 사용한다.

그러나, 일반적으로 사용되는 방부살균제는 방부력의 저하 또는 불활성화를 방지하기 위하여 방부살균제를 과다하게 첨가함으로써 인하여 구강점막을 자극하여 물질 또는 홍반 등을 야기시키거나 중추신경장애 등의 부작용을 발생시킬 수 있다. 이와 같은 부작용을 최소화하기 위해 각종 살균제들과 각종 식물추출물을 치약 조성물에 배합하여 사용하는 연구들이 보고되고 있으나 [2][3], 프라그형성에 중요한 역할을 하는 균체의 효소 GTase의 활성 억제효과가 빈약하거나, 좋은 효과를 나타내는 경우에도 소비자가 친숙하지 않은 물질을 사용함으로써 소비자가 그 효능을 인지하며 못하여 제품에 대한 신뢰성을 얻지 못하는 경우가 많이 있다.

우리나라 제 1의 과일인 감귤의 껍질은 중요한 생리적 기능물질들을 함유하고 유용한 연구자원이다. Yoo 등 [17]은 굴피 100 g당 무기질 함량은 칼륨 3029±110 mg, 칼슘 705±20 mg, 마그네슘 495±10 mg으로 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 인, 나트륨, 철, 아연 순으로 포함하고 있음을 보고하였으며, Yang 등[16]은 굴피 추출물이 팩텐계 통의 다당류에 기인한 높은 장관면역활성을 나타낸다고 보고하였다.

본 연구에서는 이러한 굴피추출물이 치아우식원인균으로 알려진 *S. mutans*에 미치는 항균효과와 GTase활성에 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

굴피가루 추출물을 5, 10, 20 mg/ml 농도로 배지에 각각 첨가하였을 때 10 mg/ml과 20 mg/ml에서 흡광도 값이 대조군과 급격한 차이를 나타내었으며, CFU를 측정 한 결과 추출물을 첨가하였을 때 colony 수가 확연하게

줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. 12시간 후에 Sampling 한 경우, 대조군 대비 5 mg/ml에서 92.83%, 10 mg/ml에서 97.88%, 20 mg/ml에서 99.34%의 억제효과가 나타났다. 이러한 결과로 귤피 추출물은 *S. mutans*의 성장을 억제하는 항균효과를 가지고 있음을 본 연구에서 확인 할 수 있었다. Lee 등[12]은 *Helicobacter pylori*에 대한 귤피의 항균활성을 보고한 바 있으며, Shin 등[29]은 식중독균인 *Listeria monocytogenes* 균주에 대하여 clear zone diameter가 15mm 이상으로 뚜렷한 항균성이 확인된다고 보고한 바 있다.

추출물 첨가에 따른 GTase 활성억제효과를 알아보기 위한 실험 결과, 추출물을 첨가하였을 때 GTase 활성이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 추출물을 0.3125 mg/ml 처리한 경우 저해율은 8.8±3.8%, 0.625 mg/ml 처리한 경우 9.7±3.0%, 1.25 mg/ml 처리한 경우 25.9±1.0%, 2.5 mg/ml 처리한 경우 30.9±3.3%, 5 mg/ml 처리한 경우 41.6±2.2%로 나타나 그 효과는 추출물의 농도가 높아질수록 증가하였으며 5 mg/ml에서는 약 42%의 강한 활성 저해 효과를 보였다. Kim and Kim[11]은 귤피 추출물이 tyrosinase 저해 활성을 27.5% 나타낸다고 보고한 바 있다. 뿐만아니라 Jung 등[8]은 귤피 추출물이 염증반응을 유발하는 TNF- α 의 분비를 억제함으로써 항염 효과를 나타낸다고 보고한 바 있다.

이러한 결과를 토대로 볼 때 귤피는 항균 및 항우식 활성을 나타내는 기능성 천연물질로서 이용가치가 클 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

[1] 육창수(1997). 아세아 생약도감. 도서출판 경원, 서울. pp 273-274.
 [2] 정은주 외 6인(2010). 손바닥 선인장 열매 추출물의 *Streptococcus mutans*에 대한 성장 억제 효과, *Journal of Korean Academy of Oral Health*, 34(1):28-35.
 [3] 최희돈, 고윤정, 최인옥, 김윤숙, 박용곤(2007). 솔잎 및 소나무 가지 추출물의 항충치 활성 및 glucosyltransferase 억제 효과, *한국식품과학회지*, 3(39):336-341.
 [4] 통계청(2009). 농산물생산조사 통계 DB.
 [5] Eun JS, Yum JY. Effect of *Aurantii nobilis*

Pericarpium and Aurantii immaturi Pericarpium on Immunocytes in Mice, *Kor J Pharmacogn*, 29(3):173-8.
 [6] Hanada S, Slade HD(1990). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiol Rev*, 35: 331-384.
 [7] Hyon JS, Kang SM, Mahinda S, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH. Antioxidative Activities of Dried and Fresh Citrus Peels in Jeju, *Korean J Food Cookery Sci*, 26 ; 1 : 88-94.
 [8] Jung JK, Kun Ho Son KH, Kim YS, Park YK(2011). Effect of Citri Pericarpium ethanol extract on collagen-induced arthritis in mice, *Kor J Herbology*, 26(3):1-6
 [9] Jung HK, Jeong YS, Park CD, Park CH, Hong JH. Effect of the Ethanol Extract from Citrus Peels on Oxidative Damage in Alloxan-induced HIT-T15 Cell, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39 ; 8 : 1102-6.
 [10] Katsura H, Tsukiyama RI, Suzuki A, Kobayashi M(2001). In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11): 3009-3013.
 [11] Kim SH, Kim IC(2008). Antioxidative Properties and Whitening Effects of the *Eucommiae cortex*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Cnidii rhizoma*, *J East Asian Soc Dietary Life*, 18(4):618-623.
 [12] Lee JJ, Kim SH, Chang BS, Lee JB, Huh CS, Kim TJ, Baek YJ(1999). The Antimicrobial Activity of Medicinal Plants Extracts against *Helicobacter pylori*, *Korean J Food Sci Technol*, 31(3):764-770.
 [13] Manthey JA, Grohmann K(2001). Phenolics in citrus peel byproducts: Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses, *J Agric Food Chem*, 49: 3268-3273.
 [14] Park SY, Yoo HN, Im JM, Kwon HJ, Cho YS, Choi YH, Kim EM, Kim TY. Effect of the Fermentation extract from Citrus Peels on antioxidant and enzyme activity, *The Korean Society of Food Preservation*, 2010:307
 [15] Shin DH, Kim MS, Han JS(1997). Antimicrobial

- Effect of Ethanol Extracts from Some Medicinal Herbs and Their Fractionates against Food-Born Bacteria, Korean J Food Sci Technol, 29(4):808-816.
- [16] Yang HS, Yu KW, Choi YM(2004). Isolation of Polysaccharides Modulating Mouse's Intestinal Immune System from Peels of Citrus unshiu, J Korean Soc Food Sci Nutr, 33(9):1476-1485.
- [17] Yoo YK, Kim CE, Kim DI, H D, Hwang IK(2005). Antioxidant Activity and Physicochemical Characteristics of Tangerine Peel Tea Prepared with Citrus unshiu Cultivated in Cheju, Korean J Food Cookery Sci, 21(3):354-359.
- [18] You JS(2001). Studies on antimicrobial activities of Kuwanon G isolated from the root bark of Morus alba L.against Streptococcus mutans, MS Thesis, Kangwon University.

최 보 람(Bo-ram Chi)



- 2012년 2월 : 건양대학교 치위생학과 (치위생학사)
- 2012년 3월 ~ 현재 : 원광대학교 치과대학 대전치과병원 치과위생사
- 관심분야 : 구강보건, 치위생
- E-Mail : sure50@hanmail.net

강 재 구(Jaeku Kang)



- 2005년 2월 : 성균관대학교 약학부 (약학박사)
- 2008년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 의과대학 의학과 조교수
- 관심분야 : 암, 세포치료
- E-Mail : jaeku@konyang.ac.kr

강 경 희(Kyung-hee Kang)



- 2010년 2월 : 경북대학교 미생물학과 (이학박사)
- 2008년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 의과대학 치위생학과 조교수
- 관심분야 : 구강보건, 치위생
- E-Mail : dhkhkang@konyang.ac.kr