

Antimicrobial and Anti-oral Malodor Efficacy of *Schizandra chinensis* Extracts against Oral Pathogens

Nam Suk Hed¹, Hye Jung Choi², Su Mi Hwang³, Young Whan Choi⁴, Young Geun Lee⁵ and Woo Hong Joo^{2*}

¹Department of Dental Hygiene, Masan University, Changwon 630-729, Korea

²Department of Biology and Interdisciplinary Program for Biotechnology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

³Department of Clinical Pathology, Masan University, Changwon 630-729, Korea

⁴Department of Horticultural Bioscience, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

⁵Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Received June 25, 2012 / Revised November 8, 2012 / Accepted November 23, 2012

This study was conducted to investigate the antimicrobial and anti-oral malodor effect of *Schizandra chinensis* extracts against oral pathogens. *S. chinensis* methanol (MeOH) extract showed better antimicrobial activities against oral pathogens than the *S. chinensis* hot water extract did. In particular, ethylacetate (EA) fraction of *S. chinensis* MeOH extract had the greatest effects against *Streptococcus mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivaris subsp. thermophils* and *Porphyromons gingivalis*. The anti-malodor effect of *S. chinensis* against the generation of volatile sulfur compounds (VSC), such as hydrogen sulfide, methyl mercaptan, and dimethyl sulfide, was estimated using oral chroma in a practical study. The results showed that 2% MeOH extract of *S. chinensis* against the production of hydrogen sulfide, methyl mercaptan, and dimethyl sulfide had inhibitions of 91.15, 78.72 and 71.58%, respectively. These results showed that *Schizandra chinensis* extract had antimicrobial activity against several oral pathogens and exhibited significant effects on the inhibition of VSCs. Thus, *Schizandra chinensis* extract could be an alternative to available synthetic chemicals and oral hygiene products.

Key words : Antimicrobial activity, anti-oral malodor effect, *Schizandra chinensis*, oral pathogens

서 론

구취는 국내·외를 막론하고 사회생활을 하는데 있어서 큰 장애요인으로 작용하는 질환으로, 삶의 질이 향상되면서 구취 제거에 대한 관심이 증가하고 있다. 구취는 구강 내 요인, 생리적 요인, 심리적 요인 그리고 병리학적 요인 등이 복합적으로 작용하여 나타나는 질환으로, 특히 구강 내 요인이 주요한 원인으로 알려져 있다[15].

세균에 의해 발생되는 구취의 주요 성분은 hydrogen sulfide, methyl mercaptan, dimethylsulfide와 같은 휘발성 황화합물(volatile sulfur compounds, VSCs)이며, 그 외에도 putrescine, cadaverine, short-chain fatty acids, butyric acid, propionic acid와 같은 아민류, indole, skatole, pyridine과 같은 페닐화합물이 알려져 있다[7].

현재 구취제거 방법은 주로 치실질, 칫솔질, 혀솔질, 껌씹기

그리고 향균물질을 첨가한 구강 양치액이 사용되고 있으며, 이러한 구강양치액용 향균물질로는 chlorhexidine, triclosan 및 cetylpyridinium chloride (CPC) 등의 합성물질들이 주로 사용되고 있다. 그러나 장기간 사용시 정상 균총에 영향을 미치며 향균물질에 대한 내성균이 출현하는 등 인체의 안정성 측면에서 많은 문제가 야기되고 있다[13]. 따라서 체내에 부작용을 유발하지 않고, 구강 병원균에 대한 선택적 향균력이 우수한 소나무, 강황, 사방오리나무 등 천연소재를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다[3, 4, 9].

오미자는 생약재 및 식품원료로 이용되고 있는 약용식물로 치매예방[8], 항산화[5], 항암[19], 항염증[2] 및 향균활성[1]이 보고되고 있다. 오미자의 향균효능은 많은 연구를 통해 알려져 있으나, 구강병원균에 대한 향균효능에 대한 체계적인 연구 보고는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 오미자 추출물을 이용하여 구강 내 병원균에 대한 향균 효과를 검증하고, 이를 토대로 향구취 효과에 대해 알아보고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 실험균주

실험에 사용된 오미자는 전북 장수군에서 수확하여 건조된 오미자를 (주) 광명생약에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

용한 균주는 치아우식과 치주질환에 직접 또는 간접적인 원인 균으로 알려진 그람양성 세균 3종(*Streptococcus mutans* (KCTC 3065), *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (KACC 11857), *Streptococcus sanguinis* (KACC 11301)), 그람음성 세균 1종(*Porphyromonas gingivalis* (KCTC 5352))과 효모 1종(*Candida albicans* (ATCC 10231))을 한국농업유전자원정보센터(Korean Agricultural culture collection, KACC)와 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받아 사용하였다.

추출 및 분획

추출법에 따른 활성을 비교하고자 건조된 오미자 1 kg을 각각 99.5% methanol (MeOH)을 이용한 용매추출과 물을 이용한 열수 추출을 실시하였다. 각 추출물은 여과한 뒤 rotary vacuum evaporator (Ratavapor R-121, Buchi, Switzerland)로 감압농축하여 MeOH 추출물과 열수 추출물을 얻었다. 추출물은 증류수에 현탁시킨 뒤, *n*-hexane (HX), dichloromethane (DCM) 그리고 ethylacetate (EA)를 사용하여 분획하였다.

총 페놀성 화합물의 함량 측정

페놀 화합물의 함량은 Folin-Ciocalteu 방법으로 측정하였다[17]. 1 mg/ml 농도의 각 분획물을 45 ml의 증류수와 1 ml의 Folin-ciocalteu reagent와 혼합하고 3분 뒤 2% Na₂CO₃을 첨가하였다. 혼합물이 잘 반응하도록 간헐적으로 섞어주면서 실온에서 2시간 반응시킨 다음, spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도 측정하였다. 플라보노이드의 함량은 aluminium chloride colorimetric 방법에 준하여 측정하였다[18]. 1 mg/ml 농도의 각 분획물 0.5 ml에 2% aluminium chloride solution을 첨가하여 실온에서 1 시간 반응시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 각각 gallic acid (10-500 µg/ml)와 rutin (20-100 µg/ml)을 사용하여 검정곡선을 작성하였으며 이를 바탕으로 오미자 분획물의 총 페놀성 화합물의 함량을 환산하였다.

구강병원균에 대한 항균활성 조사

구강병원균에 대한 분획물의 항균효능은 paper disc 법으로 측정하였다[14]. 각 분획물은 15 µg/disc 농도로 접종하였

으며, 양성대조군은 120 µg/disc 농도로 사용하였다. 혐기성균은 Anaerobic jar (Merck, Germany)를 사용하였으며, 각 공시 균주는 최적배양 조건에서 24-48시간 배양한 후 생육저지환의 크기(mm)로 항균활성을 검증하였다.

Oral chroma를 이용한 구취억제 효능 조사

구취억제 효능 측정은 cysteine challenge test 방법[10]에 준하여 oral chroma (CHM-1, Abilito, Japan)를 사용하여 측정하였다. 최근 6개월 이내 특별한 투약경력이 없는 건강한 사람 5명을 대상으로 실험을 진행하였으며, 실험 전 3시간 동안 음식물 섭취 및 칫솔질과 같은 일체의 구강위생관리를 제한하였다. 모든 실험자는 5분 간격으로 2회 기저 구취수준을 측정한 뒤, 구취 유발을 위해 3 mM의 cysteine 용액 10 ml을 30초간 양치하게 하였다. 4분 후 구강 내 가스를 모은 뒤 oral chroma 에 0.5 ml을 주입하여 휘발성 황화합물의 농도를 측정하였다. 실험군은 2% MeOH 추출물을 추가로 처리하게 하였으며, 대조군은 시판되는 가그린 민트® 용액(0.02%, sodium fluoride; 0.1%, sodium lauryl sulfate; 0.01%, zine chloride)을 처리하게 하여 비교하였다. 모든 실험은 3회씩 반복 측정하였고, VSCs relative ratio로 구취제거 효과를 계산하였다.

통계처리

수집된 자료는 SPSS 18.0 for Windows (SPSS INC. USA)를 이용하여 분석하였다.

결 과

페놀성 화합물의 함량

시료로 사용된 국산 오미자의 항균효능을 조사하기 전에 시료와 보관정도에 따라 유효성분의 변화가 있으므로 표준적인 성분을 가지고 있는지 확인하고자 페놀성 화합물 함량을 측정하였다. 오미자 분획물의 페놀 화합물의 함량은 gallic acid로 작성한 검정곡선을 바탕으로 산출하였다(Table 1). 오미자의 HX 분획물은 933.09 µg/mg으로 가장 많은 페놀 화합물을 함유하고 있는 것으로 나타났고, DCM 분획물과 EA 분획물은 각각 287.38과 198.68 µg/mg으로 나타났다. 플라보노이드의 함량 검정은 rutin으로 작성한 검정곡선을 바탕으로 환산하였다. 오미자의 HX 분획물과 DCM 분획물의 플라보노

Table 1. Extraction yields, total phenolic and flavonoid contents of the extracts from *Schizandra chinensis* Baill

	Yields (g/1 kg)	Total phenolics (µg/mg)	Total flavonoids (µg/mg)
MeOH	680 ^a	285.35±11.80 ^b	63.94±2.58 ^c
HX	17	933.09±6.36	74.41±4.36
DCM	2.6	287.38±8.34	70.19±1.35
EA	69.4	198.68±8.01	18.97±0.88

^aExtracts / 1 kg *Schizandra chinensis* Baill.

^bGallic acid equivalents (y=0.0011416x-0.002922, R²=0.9984; mean±S.D; n=3).

^cRutin equivalents (y=0.01565x+0.1819, R²=0.9986; mean±S.D; n=3).

이드 함량은 각각 74.41과 70.19 µg/mg을 함유하고 있는 것으로 나타났고, EA 분획물에는 18.97 µg/mg의 다소 적은 양이 함유되어 있는 것으로 조사되었다. 페놀과 플라보노이드 성분은 항당뇨, 혈압상승 억제, 항암, 항바이러스, 항산화, 항균 등 다양한 생리활성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 실험에 사용한 오미자가 페놀과 플라보노이드 화합물을 평균적으로 가지는 시료로 판단되어 이하의 실험을 진행하였다.

구강병원균에 대한 오미자 분획물의 항균활성

오미자 MeOH 추출물의 EA 분획물은 15 mg/disc 농도에 서 그람음성 세균인 *P. gingivalis*에 대한 생육 억제환이 23.5 mm로 나타났으며, 그람양성 세균인 *S. mutans*, *S. sanguinis* 및 *S. salivaris subsp. thermophols*에 대해서도 각각 17, 21 mm 그리고 22.5 mm인 것으로 조사되어 항균활성이 가장 우수한 분획인 것으로 확인되었다. 열수 추출물에서는 잔여 분획물에서 *S. sanguinis*, *S. salivaris subsp. thermophols* 및 *P. gingivalis*에 대한 억제 활성이 큰 것으로 나타났으며, *C. albicans*에 대한 활성은 나타나지 않았다(Table 2). 따라서 열수 추출물보다는 MeOH 추출물이 구강병원균에 대한 항균활성이 더 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

오미자의 구취억제 효과 측정

Oral chroma를 이용하여 구취의 주요 성분인 휘발성 황화

합물을 측정함으로써 오미자 추출물의 구취억제 효과를 확인하였다(Table 3). 2% MeOH 추출물은 기저 구취 수준과 비교하면 황화수소를 91.15% 감소시켰으며, 메틸머캅탄은 78.32% 그리고 황화디메틸은 71.58% 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 오미자 추출물이 시판 중인 가그린 민트보다 황화수소와 황화디메틸을 감소시키는 효과는 더 뛰어나며, 메틸머캅탄을 제거하는 효과는 가그린 민트와 비슷함을 확인할 수 있었다.

고 찰

치아우식은 치아를 파괴하여 기능을 못하게 하는 주요 원인이며, 구취를 발생시키는 주요 요인으로도 작용한다. 실제로 구강질환 환자 특히 치아우식증 환자에게서 휘발성 황화합물이 증가됨이 보고된 바 있다[13]. 산화적 스트레스는 구강질환의 진행에 영향을 미치는데 페놀 화합물, 플라보노이드 및 비타민C 등의 항산화성 물질은 산화적 스트레스를 억제하여 구강질환 개선효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[16]. 다양한 페놀성 화합물을 대상으로 *S. mutans*에 대한 항균활성을 조사한 연구에서 hydroxycinnamic acid group보다는 hydroxybenzoic acid group의 항균활성이 더 높은 것으로 나타나 페놀성 화합물의 작용기에 따라 항균활성에 차이가 나는 것으로 보고되고 있다[11]. 본 연구에서 오미자는 페놀성 화합물의 함량이 많은 HX 분획물보다 EA 분획물의 항균활성이 더 우수

Table 2. Antibacterial activity of methanol extracts and hot water extracts from *Schizandra chinensis* Baill against oral pathogens

		<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. salivaris</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>C. albicans</i>
MeOH extract	HX	ND ^a	ND	ND	ND	ND
	DCM	ND	9±0.14	10±0.14	14.5±0.80	ND
	EA	17±0.35 ^b	21±0.14	22.5±0.50	23.5±0.14	ND
	Residual layer	8.5±0.70	ND	ND	17.5±0.85	ND
Hot water extract	DCM	ND	ND	ND	12.2±0.30	ND
	EA	12±0.14	ND	ND	21.3±0.35	ND
	Residual layer	ND	14.5±0.80	8.5±0.50	17.2±0.70	ND
	TC ^c	27.8±1.35	21.8±0.80	22.5±1.41	24.8±0.35	ND

^aND, not detected.

^bValues are means±SD (n=3).

^cTC, tetracycline was used as a reference for antimicrobial activity.

Table 3. 2% *Schizandra chinensis* Baill extracts solution mouth rinsing effects on the production of volatile sulfur compounds

	H ₂ S	CH ₃ SH	(CH ₃) ₂ S
Control group (Cysteine)	3.39±4.76 ^a	0.47±1.08	0.95±1.94
<i>Schizandra chinensis</i> Baill	0.30±0.305	0.10±0.18	0.27±0.31
<i>p</i> -value	0.004 [*]	0.324	0.739
Garglin mint [®]	1.10±1.17	0.08±0.15	0.48±1.14
<i>p</i> -value	0.083	0.662	0.392

VSC relative ratio=VSC concentration/baseline.

^ang/10 ml.

^{*}Statistically significant by Mann-Whitney test (*p*<0.05).

한 것으로 나타나, 항균작용을 나타내는 주요 페놀성 화합물은 EA 분획물에 더 많이 함유되어 있음이 확인되었다. 솔잎 및 가지의 열수 추출물과 용매 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균활성 조사에서 용매추출물의 활성이 더 뛰어나미 보고되었으며[3], 각각의 최소저해농도는 20과 10 mg/ml로 나타나 오미자의 *S. mutans*에 대한 항균활성이 더 우수한 것으로 나타났다. 생강근경 추출물은 20 µg/ml 농도에서 *S. mutans*를 억제하며, 구취억제 효능 측정에서 황화수소를 74.8% 감소시킴이 보고되었다[9]. 오미자 추출물의 항균활성은 생강근경 추출물보다 낮은 것으로 조사되었으나, 구취억제 효능면에서는 황화수소를 91.15% 감소시킴으로써 더 우수함이 본 연구에서 확인되었다. 정향, 오미자 및 감초 등의 생약제를 혼합한 청구감로수를 사용하여 메틸머캅탄 억제 효능을 분석한 연구 결과에서, 가그린 민트가 46.77% 구취를 억제할 때, 청구감로수는 82.28% 억제한다고 보고되고 있다[6]. 이러한 결과는 2% 오미자 추출물을 사용한 본 연구의 결과와 유사한 구취 억제효능으로 구취를 감소시키는 주요 생약제는 오미자임을 알 수 있다. 본 연구에서는 구취의 주요 원인물질인 황화수소, 메틸머캅탄 및 디황화메틸 모두를 가스 크로마토그래피로 확인하여 종합적으로 기능성을 판단함으로써 황화수소, 메틸머캅탄 및 디황화메틸 중 일부의 데이터만으로 구취 억제능을 판단한 논문보다 좀 더 체계적인 연구결과임을 알 수 있다. 또한 오미자는 생약제로 민간에서 장기간 사용되어 왔으며 독성이 없어 다른 식물에 비해 안전성이 매우 높으므로 오미자 추출물은 구강양치 및 구강스프레이로 개발 가능성이 충분한 소재임이 본 연구에서 확인되었다. 오미자 추출물에 의한 보다 구체적인 구취제거 효능은 실제 구강에서의 균총 변화를 조사함으로써 가능할 것으로 판단되므로 후속 연구를 통하여 구취제거 메커니즘의 해석이 요구된다.

감사의 글

본 연구는 2011~2012년도 창원대학교 교내 연구비로 연구 되었으므로 이에 감사드립니다.

References

1. Chang, H. S. and Choi, H. 2012. Antimicrobial activities of medicinal herb extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **41**, 261-269.
2. Chen, N., Chiu, P. Y. and Ko, K. M. 2008. Schisandrin B enhances cerebral mitochondrial antioxidant status and structural integrity, and protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Biol Pharm Bull* **31**, 1387-1391.
3. Choi, H. D., Koh, Y. J., Choi, I. W., Kim, Y. S. and Park, Y. K. 2007. Anticariogenic activity and glucosyltransferase inhibitory effects of extracts from pine needle and twig.

Korean J Food Sci Technol **39**, 336-341.

4. Choi, H. J., Heo, N. S., Choi, Y. W., Lee, Y. G., Jeong, Y. K. and Joo, W. H. 2012. Antimicrobial and anti-halitosis effects of *Alnus firma* extracts. *J Life Sci* **22**, 1071-1076.
5. Choi, Y. H., Takamatsu, S., Khan, S. I., Srinivas, P. V., Ferreira, D., Zhao, J. and Khan, I. A. 2006. Schisandrene, a dibenzocyclooctadiene lignan from *Schisandra chinensis*: structure-antioxidant activity relationships of dibenzocyclooctadiene lignans. *J Nat Prod* **69**, 356-359.
6. Eom, G. H. and Kim, J. S. 2007. Deodorizing effect of *Cheonggugamrosu*. *Korean J Orient Int Med* **28**, 354-362.
7. Goldberg, S., Kozlovsky, A., Gordon, D., Gelernter, I., Sintov, A. and Rosenberg, M. 1994. Cadaverine as a putative component of oral malodor. *J Dent Res* **73**, 1168-1172.
8. Hung, T. M., Na, M. K., Min, B. S., Ngoc, T. M., Lee, I. S., Zhang, X. F. and Bae, K. H. 2007. Acetylcholinesterase inhibitory effect of lignans isolated from *Schizandra chinensis*. *Arch Pharm Res* **30**, 685-690.
9. Kim, B. I., Kim, S. N., Chang, S. Y., Moon, J. T., Kim, Y. S., Hwang, J. K., Jeong, S. H., Kim, M. Y., Kim, H. S. and Kwon, H. K. 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 Korean Acad Dnet Health* **29**, 222-237.
10. Kim, H. D. 2011. Deodorizing Effects and Improvements of Oral Hygiene Status by Dentifrice Containing Ginger Extracts. Ph. D. dissertaion, Inje University, Gimhae, Korea.
11. Kim, S. J., Park, I. B., Kang, S. G., Chung, D. O. and Jung, S. T. 2005. Anticariogenic activity and glucosyltransferase inhibition of phenolic compounds. *Korean J Food Culture* **20**, 603-607.
12. McBain, A. J., Bartolo, R. G., Catrenich, C. E., Charbonneau, D., Ledder, R. G. and Gilbert, P. 2003. Exposure of sink drain microcosms to triclosan: population dynamics and antimicrobial susceptibility. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5433-5442.
13. Morita, M. and Wang, H. L. 2001. Relationship of sulcular sulfide level and oral malodor in subjects with periodontal disease. *J Periodontol* **72**, 79-84.
14. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, pp. 1527-1539, 7th eds., ASM, Washington DC.
15. Quirynen, M., Zhao, H. and van Steenberghe, D. 2002. Review of the treatment strategies for oral malodour. *Clin Oral Investig* **6**, 1-10.
16. Sanbe, T., Tomofuji, T., Ekuni, D., Azuma, T., Tamaki, N. and Yamamoto, T. 2007. Oral administration of vitamin C prevents alveolar bone resorption induced by high dietary cholesterol in rats. *J Periodontol* **78**, 2165-2170.
17. Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144-158.
18. Woisky, R. G. and Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res* **37**, 99-105.

19. Yim, S. Y., Lee, Y. J., Lee, Y. K., Jung, S. E., Kim, J. H., Kim, J. E., Kim, H. J., Son, B. G., Park, Y. H., Lee, Y. G., Choi, Y. W. and Hwang, D. Y. 2009. Gomisin N isolated

from *Schisandra chinensis* significantly induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in hepatic carcinoma. *Mol Med Report* **2**, 725-732.

초록 : 오미자 추출물의 구강병원균에 대한 항균효과 및 구취억제 효과

허남숙¹ · 최혜정² · 황수미³ · 최영환⁴ · 이영근⁵ · 주우홍^{1,2*}

(¹마산대학교 치위생학과, ²창원대학교 생명공학협동과정, ³마산대학교 임상병리과, ⁴부산대학교 원예생명자원학과, ⁵부산대학교 식품공학과)

본 연구는 오미자 추출물의 구강병원균에 대한 항균활성과 항구취 효과를 조사하기 위해 수행되었다. 오미자 MeOH 추출물이 열수추출물에 비해 구강병원균에 대한 항균활성이 더 뛰어난 것으로 나타났다. 특히 MeOH 추출물의 EA 분획물은 *Streptococcus mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivaris subsp. thermophils* 그리고 *Porphyromons gingivalis*에 대한 활성이 뛰어난 것으로 조사되었다. 오미자 2% MeOH 추출물의 항구취 효과를 oral chroma를 이용한 실제실험에서 측정된 결과, 황화수소, 메틸머캅탄 그리고 황화디메틸을 각각 91.15, 78.72 그리고 71.58% 감소시키는 것으로 측정되었다. 본 연구 결과, 오미자 추출물은 몇몇의 구강병원균에 대한 항균활성을 보였고 휘발성 화합물을 억제하는 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 그러므로 오미자의 추출물은 항균용 합성약품과 구강위생용품을 대체할 수 있는 소재로 판단된다.