J Korean Soc Food Sci Nutr
43(9), 1380~1387(2014)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.9.1380

고체발효 한약재 추출물을 함유한 구강세척제 개발

조병제[1] · 홍준영[2] · 김미정[2] · 송영옥[2]

[1]체담한방병원
[2]부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

Development of Mouthwash Products with Solid Fermented Oriental Medicinal Herb

Byung-Je Cho[1], Jun Young Hong[2], Mijeong Kim[2], and Yeong Ok Song[2]

[1]Chedam Hospital of Korean Medicine
[2]Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute, Pusan National University

ABSTRACT The purpose of this study was to develop a mouthwash product with solid fermented oriental medicinal herb (OMH). Solid fermentation of magnolia, liquorice, and cnidium by *Phellinus linteus* mycelium was carried out successfully when 30% water was added to the medium, whereas 10% brown rice powder was required as an extra nutrient for solid fermentation of mint besides water. The amount of total phenol compounds and DPPH radical scavenging activity of OMH increased significantly ($P<0.05$) upon solid fermentation. Anti-microbial activities of fermented OMH also increased and were approximately 100-fold greater than those of unfermented samples. Oral pathogens such as *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, or *Streptococcus mutans* were used for determination of anti-microbial effects of OMH. Formulation of the mouthwash was developed based on the results of the sensory evaluation. Among seven formulas, the best formula chosen by the sensory evaluation was as follows: mouthwash prepared with 0.075% ethanol extract of solid fermented OMH as a main ingredient, 83.64% hot water extract of mint and clove (100:15, v/v) as a mouthwash base component, and other miscellaneous ingredients, including sodium fluoride, menthol, and surfactants. Data from a consumer's preference test with 30 participants, overall acceptance, and willingness to buy the product developed in this study were all significantly higher for the tested mouthwash compared to mouthwash on the market manufactured with OMH but with a different formula. Duration of freshness of the mouthwash after usage as determined by Breath Checker was not significantly different between the two samples, although the duration of our product was slightly longer than that of the commercial product mentioned above.

Key words: mouthwash, solid fermentation, oriental medicinal herb, anti-microbial activity, *Phellinus linteus* mycelium

서 론

생활수준이 향상되고 대인 활동의 기회가 증대됨에 따라 구강세척제는 현대인의 필수품으로 그 사용량이 증가하고 있다. 대부분의 구강세척제는 구강 내 항균 기능 및 충치균 생성 억제 효능이 있는 chlorhexidine, triclosan 및 CPC cetylpyridinium chloride(CPC) 등의 화학합성 제재를 함유하고 있으며, 일부 제품에는 항생제를 첨가한 제품들도 시판되고 있어 장기간 사용 시 항생제 내성 부작용을 일으킬 수 있는 문제점이 지적되고 있다(1). 뿐만 아니라 chlorhexidine은 항균 효과는 높으나 장기 사용 시 치아 및 혀의 변색, 미각 이상, 점막 자극 과민증을 유발하고, 관능적으로 소비자의 기호를 떨어뜨리는 점이 지적되고 있다(2). 이에 화학성분의 부작용을 줄이고 장기간 사용해도 안전한 천연물을 원료로 하는 구강세척제에 대한 요구가 증가하고 있고 세신, 정향, 후박, 감초, 박하, 길경 천궁 및 은행잎 등과 같은 구강질환 균에 대한 항균 효과가 높은 한약재(3)가 한방구강세척제 제조에 주로 사용되고 있다. 현대인은 사회활동이 증가함에 따라 타인과의 만남의 기회가 많아지는데 호기를 통해 발산되는 나쁜 입 냄새인 구취는 자칫 사회생활을 방해하는 요인으로 작용할 수 있다. 구취의 발생 원인으로는 노인에서 흔히 나타나는 타액 분비 감소와 같은 생리적 요인(4), 구강 내 위생 관리 소홀로 인한 염증 및 흡연 등과 같은 구강 내 요인(5,6) 또는 간, 위, 식도 질환에 의한 구강 외적인 요인(7) 등이 있다. 한의학에서는 비장 또는 위장에 열이 있거나 음식이 소화되지 않은 채 위에 남아 있거나 호르몬 교란에 의해서도 구취가 발생된다고 한다(7). 뿐만 아니라 구강은 외부와 바로 연결되어 있는 기관으로 미생물들이 쉽게 들어올 수 있으며, 음식을 섭취하는 기관으로 영양성분이

Received 11 August 2014; Accepted 27 August 2014
Corresponding author: Yeong Ok Song, Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
E-mail: yosong@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2847

풍부하여 균이 서식하기에 가장 좋은 조건을 지니고 있다. 일반적으로 30종 이상의 균이 상주하고 있으며 이들의 부패 작용에 의해 구취가 발생하는 비율이 가장 높다고 보고되고 있다(3). 구취를 제거하기 위해 근본적인 원인을 제거하기도 하지만 일반적으로 이를 닦거나 구강세척제로 입안을 헹구는 간단한 작업 등으로 구취를 일시적으로 제거한다.

최근 한약재의 약효를 강화시키고 자체의 독성은 약화시키기 위해 생물전환 기법 중 발효 기법을 널리 사용하고 있다. 건조 한약재를 발효시키기 위해 고체발효가 시도되고 있는데 고체발효는 액체발효와 달리 미생물 접종 및 생장이 어려워 건조 약재를 연화시키거나 수분활성도를 조절하거나, 영양배지를 만드는 등 미생물이 성장할 수 있는 다양한 조건이 갖추어져야 성공할 수 있다. 고체발효에 주로 사용하는 균주는 진균류인 버섯 균사체(8)와 곰팡이(9)가 있고 유산균(10) 또는 고초균(11) 등의 세균류도 사용하고 있다. 버섯은 항암, 항염증, 면역증진 효과를 지니고 있고 이러한 건강 기능성은 균사체가 자실체보다 4배 이상 높다고 한다(12). 뿐만 아니라 균사체는 자실체보다 대량 배양이 가능하며 효능이 더 우수한 것으로 알려져 있다(13) 상황버섯은 항암 등과 같은 다양한 건강 기능성이 보고되고 있으며(14, 15) 상황버섯 균사체 역시 항혈전능(16), 항산화(17), 항암 및 항염증(18), 면역증진(19) 등의 약리 작용이 보고되어 있다. 상황버섯, 영지버섯, 노루궁뎅이버섯의 균사체로 수삼을 고체발효 하였을 때 수삼의 조지방 함량은 증가하고 단백질 함량은 감소하였다고 보고하여 균사체에 의한 생물전환이 일어났음을 확인하였다. 뿐만 아니라 고체발효 한약재 수삼의 면역증강 활성은 수삼 및 균사체보다 높았으며, 특히 상황버섯 균사체로 발효시킨 수삼에서 가장 높았고 이는 버섯균사체로 고체발효 시킨 수삼은 수삼과는 다른 화학적 조성을 포함하고 있기 때문이라고 설명하였다(20). 상황버섯 균사체를 쌀에 접종시켜 술을 제조하였을 때 일반 주정을 사용하여 제조한 술보다 간의 염증 관련 단백질 발현을 억제하고 활성산소 생성을 저해하였다고 보고하였다(21). 따라서 생리활성 작용이 탁월한 버섯 균사체가 한약재를 영양원으로 하여 생육할 수 있다면 균사체가 지닌 생물학적 변환 능력에 의해 한약재의 약리성분이 변화하여 그 기능이 증가될 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구에서는 발효 한약재를 유효성분으로 함유하는 한방구강세척제를 개발하고자 후박, 감초, 천궁, 박하 및 정향을 상황버섯균사체로 고체발효 하였다. 이를 위하여 각 한약재의 고체발효 조건을 확립하고, 발효 전후의 항산화 및 구강질환 균에 대한 항균활성을 확인한 후 구강세척제 조성비를 확립하며, 개발한 발효 한방구강세척제의 효과를 시판중인 한방구강세척제와 비교하였다.

재료 및 방법

균주 및 한약재

고체발효에 사용한 상황버섯 균사체(*Phellinus linteus* mycelium, KACC 43899)는 농업유전자원정보센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC, Suwon, Korea)에서 분양받았다. 한방구강세척제에 주로 사용되고 있는 한약재 중 항균활성이 있는 것으로 알려진 후박, 감초, 천궁, 박하 및 정향은 건조된 국산 한약재를 사용하였다. 항균활성 실험에 사용한 구강질환 균인 *Staphylococcus epidermis* KACC 13234, *Streptococcus pyogenes* KACC 11858, *Candida albicans* KACC 30004는 농업유전자원정보센터에서, *Streptococcus mutans* KCTC 3065는 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Daejeon, Korea)에서 분양받았다.

계대배양 및 액체 종균액 제조

분양받은 상황버섯 균사체는 potato dextrose agar 고체배지에 도말한 후 저온 배양기(27±1°C, J-100M, Jisico, Seoul, Korea)에서 14일 간격으로 계대 배양하였다. 고체배지에서 계대 배양한 *P. linteus*를 ∅ 8 cork borer로 조각을 내고 potato dextrose broth로 제조한 액체배지 150 mL에 5~6조각을 접종하여 shaking water bath(27±1°C, speed 130 rpm, HB-205SW, Hanbaek Sci., Bucheon, Korea)에서 14일간 배양하였다. 배양 후 덩어리 형태로 자란 균사체를 한약재에 접종시키기 위해 멸균된 glass beads를 넣고 균사체를 깨어 균질화한 것을 액체 종균액으로 사용하였다.

한약재의 고체발효

후박, 감초, 천궁, 박하 및 정향을 잘게 파쇄하여 121°C에서 30분간 고온가압 멸균한 후 상온에서 30분간 식혔다. 이를 500 mL 삼각 플라스크에 100 g씩 넣고 20%(w/v)의 상황버섯 액체 종균액을 접종한 후 즉시 실리스토퍼로 입구를 막아 멸균 환경을 유지하였다. 균사체를 접종한 한약재는 배양기에서 27±1°C, 21일간 발효를 진행하였다. 한약재의 최적 발효 조건을 확립하기 위해 수분 첨가량, 영양배지 농도를 달리하여 발효를 진행하였다. 1차로 수분을 0~30% 첨가하여 고체발효를 시도하였으며, 수분 첨가에 의해 발효 일어나지 않은 한약재의 경우에는 수분 첨가와 영양원으로 현미가루 10%(w/w)를 함께 첨가하였다. 고체발효 중 발생할 수 있는 오염 여부 및 균사의 생장 정도는 육안으로 확인하였다.

에탄올 추출

고체발효가 종료된 한약재에 10배의 에탄올(w/v, 99.5% ethanol, Duksan, Korea)을 첨가한 후 추출기(KMC-130sh; Vision Scientific Co., Ltd., Daegu, Korea; speed

level: max, temp. level: 7)에서 90분간 추출하였다. 동일 시료를 2회 반복 추출한 후 얻어진 추출액을 여과(No. 2 filter paper, Whatman, Clifton, NJ, USA)하였다. 얻어진 여액을 진공회전농축기(rotavator R-200, Büchi, Flawil, Switzerland)에서 1차 농축하고 동결건조(SFDSM06, Samwon, Busan, Korea)하여 실험에 사용하였다.

총 페놀 함량 및 DPPH radical 소거능 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 비색 정량법(22)으로 측정하였다. 즉 농도별로 제조한 시료에 증류수와 Folin-Ciocalteu reagent를 혼합하여 상온에서 7분간 반응시키고, 7% Na_2CO_3을 첨가하여 상온에서 90분간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 중의 페놀 함량은 tannic acid 표준 곡선을 이용하여 tannic acid에 대한 당량으로 환산하여 나타내었다.

DPPH radical 소거능 측정은 시료와 60 μM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 96 well plate에 넣고 잘 혼합하여 암소에서 30분간 방치시킨 후 ELISA reader(MODEL-680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 대조군에 대한 저해율(%)로 나타내었다. DPPH radical 소거능은 IC_{50}으로 나타내었다.

항균활성 측정

구강세척제 개발을 위하여 4종의 구강질환 균을 분양받아 배양하여 사용하였다. 즉 구강 인두와 피부에 상주하는 화농성 염증균인 *Staphylococcus epidermis*, 치주 피부에 침투하여 연쇄구균성 화농을 유발하는 *Streptococcus pyogenes*, 아구창과 의치성 구내염 및 구각염의 원인균인 기회감염진균 *Candida albicans*, 사람의 치아우식 및 충치 원인균 *Streptococcus mutans*이다(23). 항균활성은 Paper Disk법을 이용하여 발효 전후의 효과를 상대적으로 비교하였다(24). 균주별 배지(Table 1)를 petri dish에 분주하여 굳힌 다음 해당 구강질환 균을 멸균 증류수에 10^{-1}의 농도로 희석하여 배지에 도말하고 멸균한 paper disk(지름 8 mm, Advantec, Tokyo, Japan)를 배지 위에 올린 후 한약재 에탄올 추출물을 40 μL씩 점적하여 24시간 배양하였다. 한방

Table 1. Oral pathogens used in this study for the determination of anti-microbial activity of oriental medicinal herbs

Bacteria	Strain number	Temp.	Media[1)]
Staphylococcus epidermidis	KACC 13234	37°C	TSA
Streptococcus pyogenes	KACC 11858	37°C	BHIA
Candida albicans	KACC 30004	25°C	YMA
Streptococcus mutans	KCTC 3065	37°C	BHIA

[1)]TSA: Tryptic Soy Agar (Difco, Detroit, MI, USA), BHIA: Brain Heart Infusion Agar (Difco), YMA: Yeast Malt extract Agar (Difco).

구강세척제의 유효성분으로 사용할 발효 한약재 혼합물의 최적 배합 비를 찾기 위하여 각 발효 한약재 에탄올 추출물을 다양한 비율로 혼합하여 항균활성을 측정하였다.

한방구강세척제 기본 베이스 제조 및 조성비 확립

한방구강세척제의 기본 베이스로 사용하기 위하여 박하와 정향을 각각 중량 대비 20배(w/v)의 물로 2시간 30분, 2회 추출하여 열수 추출물을 제조한 후 이를 다양한 비율로 혼합하여 관능평가를 실시한 결과를 바탕으로 최적 배합 비를 선정하였다. 한방구강세척제 조성비를 확립하기 위하여 한방베이스, 발효 한약재 혼합추출물, L-menthol, sodium fluoride, poloxamer 407, glycerin, propylene glycol, 수소화 40 피마자유 및 ethanol을 조성물로 하는 구강세척제를 제조하여 관능평가에 의해 최적 조성비를 확립하였다. 최적의 조성비로 발효 한방구강세척제 시제품을 제작하여 시판 중인 한방구강세척제와 효과를 비교하였다.

관능검사 및 구강세척 효과 확인

구강세척제의 조성비를 확립하기 위해 관능검사를 실시하였다. 흰 종이컵에 10 mL의 발효 한방구강세척제를 담아 제시하였다. 시료에 대한 편견을 없애기 위해 종이컵에 난수표에서 추출한 세 자리 숫자를 표기하였으며, 시료는 무작위 순으로 제시하였다. 구강세척제 10 mL를 입안에 머금은 시간은 총 30초이며 이 시간 내에 3회 가글하도록 하였다. 관능평가 항목은 전반적인 기호도, 쓴맛, 구강세척제 사용 후 상쾌감(박하 맛), 구강세척제 사용 후 불쾌감, 시료 구매의사에 대해 9점 척도로 평가하였고, 구강세척제 사용 후 주관적으로 느끼는 상쾌감 지속시간에 대해 질문하였다. 관능평가원은 총 10명이었다.

개발한 발효 한방구강세척제 시제품의 소비자 선호도 조사에서 구강세척제 사용 후 상쾌감이 지속되는 시간을 휴대용 구취 측정기(Breath Checker, HC-212M, Tanita, Tokyo, Japan)로 측정하였다. Breath Checker는 입 냄새의 강도를 6단계로 측정하여 0~5점으로 나타내는 기기로 냄새의 강도가 높을수록 점수가 높게 나타난다. 본 연구를 위해 각 개인의 입 냄새를 먼저 측정하여 기준 치로 설정하고, 구강세척제 사용한 후 30분까지(예비검사 결과) 5분 간격으로 입 냄새를 측정하여 측정 수치가 기준 수치로 되돌아오는데 소요된 시간을 지속시간으로 하였다. 각 개인별로 시간을 측정한 후 30명의 산술적 평균을 구하였다. 측정 시 개인적인 오차를 줄이기 위해 참여자 30명은 예비 실험을 통해 측정기 사용에 익숙해지도록 훈련하였다. 정확한 측정을 위하여 입과 측정기 센서까지의 간격을 1~1.5 cm로 유지하고 기기에 수치가 나타날 때까지 숨을 불어넣었다. 구강세척제 사용은 상기의 관능검사 시와 동일하게 실시하였다. 시판 중인 한방구강세척제(예닥터 후레쉬파인, Fresh Fine Co., Seoul, Korea)를 대조군으로 사용하였다. 실험은 2일에 거쳐 실시하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고 고체발효 전후 한약재의 효과 검증은 Student's t-test(SPSS 20.0 version, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)로 실시하였다. 발효 한방구강세척제 개발 및 소비자 선호도 조사를 위해 실시한 관능검사 결과는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하고, 사후 검증으로 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 유의수준 0.05에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

고체발효 조건 확립

상황버섯 균사체 액체 종균액을 한약재의 20%(w/w)로 첨가하고 물을 첨가함으로써 배지의 수분 함량을 높여 고체발효 조건을 조절하였다. 첨가한 물의 양이 한약재 중량의 15%(w/w) 이하였을 때는 모든 한약재에서 발효가 일어나지 않았으나 물을 30% 첨가하였을 때 후박, 감초 그리고 천궁에서는 발효가 일어나 고체발효에 성공하였다. 그러나 박하와 정향에서는 발효가 진행되지 않아 영양원으로 현미가루를 10%(w/w) 첨가하였을 때 박하에서만 발효가 진행되었고 정향에서는 발효가 일어나지 않았다. 이는 정향이 진균류에 대한 항균력이 높아 상황버섯 균사체의 생장을 억제하였기 때문으로 생각된다. 고체발효에 소요된 시간은 한약재에 따라 다소 다르나 3주 정도 소요되었으며 Fig. 1에서 보는 바와 같이 한약재 표면적의 90% 이상 덮을 정도로 상황버섯 균사체가 성장한 것을 육안으로 확인할 수 있었다.

고체발효에 의한 한약재의 총 페놀 함량 및 DPPH radical 소거능 증가

상황버섯 균사체로 고체발효에 성공한 후박, 감초, 천궁 그리고 박하의 총 페놀 함량은 발효 전에 비해 유의적으로 증가하였다(Table 2, $P<0.001$). 고체발효 한약재의 DPPH radical 소거능을 IC_{50} 값으로 나타내었을 때 후박과 감초의 DPPH IC_{50}은 고체발효에 의해 유의적으로 낮아져(Table 2, $P<0.01$) DPPH radical 소거 활성이 증가하였음을 확인하였다. 그러나 천궁 및 박하는 고체발효에 의해 DPPH radical 소거 활성은 증가하였으나 발효 전과 유의적인 차이는 보이지 않았다. 고체발효에 의한 한약재의 페놀 함량 증가 정도와 DPPH 소거능 IC_{50}은 비례적으로 나타나지 않았

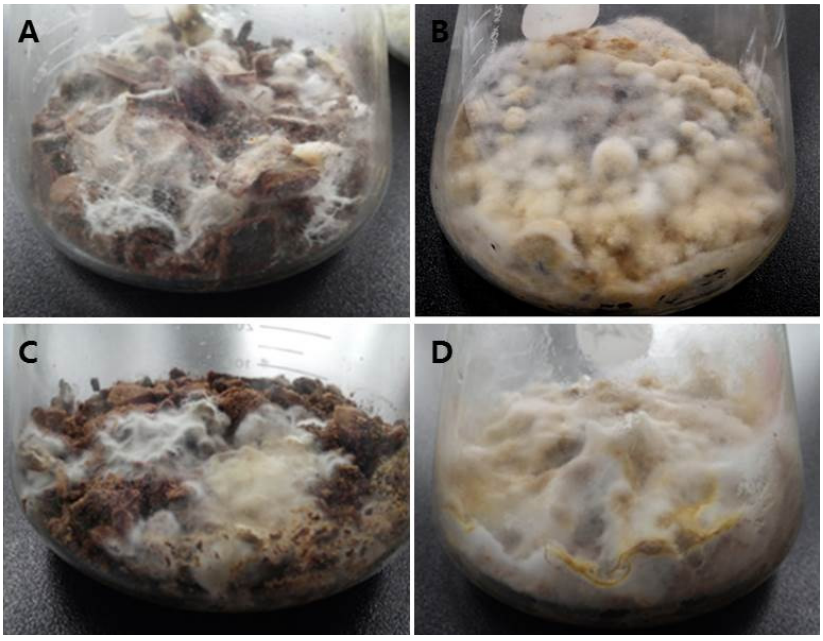

Fig. 1. Solid fermentation of dried oriental medicinal herb by *Phellinus linteus* mycelium. Solid fermentation of magnolia (A), liquorice (B), and cnidium (C) were carried out successfully when 30% water was added to the medium while mint (D) needed additional 10% brown rice powder as a nutrient source besides water.

Table 2. Increase in total phenol compounds and DPPH radical scavenging activity of oriental medicinal herbs after solid fermentation by *Phellinus linteus* mycelium

Herbs	Phenol compounds (μg tannic acid/mg)		DPPH radical scavenging activity (IC_{50}, μg/mL)	
	Un-fermented	Fermented	Un-fermented	Fermented
Magnolia	249.7±0.25	292.2±0.36***	111.3±6.74	79.8±1.97**
Liquorice	171.6±0.41	218.4±0.13***	98.6±0.33	79.9±1.53***
Cnidium	39.3±0.08	56.1±0.21***	788.5±34.06	716.8±0.98*
Mint	33.1±0.83	41.8±0.17***	762.4±1.18	724.4±40.12^{NS}

Values are mean±SD. NS: not significantly different.
$^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ by Student's t-test.

으나 발효 한약재의 유리기 소거능이 증가한 것은 발효에 의해 페놀 화합물이 증가되었기 때문으로 생각된다. 한방약재 추출물에 송이버섯 균사체와 동충하초 균사체를 혼합하여 발효시켰을 때 한방배지의 총 페놀 함량과 DPPH 유리기 소거능이 증가하였다고 보고하였다(13).

본 연구에 사용한 후박, 감초, 천궁 및 박하는 다양한 약리작용에 따른 생리활성을 조절하는 효과가 있으며 이들 한약재는 항균 및 항산화 효과를 지니고 있다. 후박은 quercetin, afzelin 및 rutin의 flavonoid와 magnolol, honokinol, ovovatol과 같은 lignan계 화합물 및 sesquiterpene 등을 함유하고 있고(23), 감초는 뿌리에 saponin인 glycyrrhizin을 함유하고 있어 항산화, 항바이러스 효과가 있다. 천궁은 항산화(25)와 소염 및 진통 작용(26)이 있고, 박하(Menthae Herba)는 항산화(27), 항염증(28) 및 방사선에 대한 보호효과(29)가 있음이 알려져 있다. 상황버섯 균사체도 항산화 활성을 지니고 있는데, 상황버섯 균사체의 생리활성 성분인 히스피딘은 BHA나 α-tocopherol과 유사한 항산화 활성을 지니고 있다(17)고 보고되고 있다. 본 연구에서 고체발효에 의해 한약재의 페놀 함량 및 유리기 소거능이 증가한 것은 발효 중 상황버섯 균사체에 의한 한약재의 항산화 관련 성분이 증가하였을 뿐만 아니라 상황버섯 균사체 증식에 따른 항산화 활성 증가도 함께 나타났기 때문으로 생각된다.

고체발효에 의한 항균 효과 증대

후박, 감초, 천궁 및 박하를 상황버섯 균사체로 고체발효시켜 구강질환 균에 대한 항균활성을 증가시키고자 하였다. 연구에 사용된 균은 구강, 인후 화농성 염증균 *Sta. epidermidis*, 치주염을 일으키는 연쇄구균성 화농균 *Str. pyogenes*, 아구창과 의치성 구내염 및 구각염의 원인균인 *Can. albicans*, 치아우식 및 충치 원인균인 *Str. mutans* 4종이었다. 감초는 4종의 구강질환 균에 대해 항균활성을 나타내었고, 후박은 *Can. albicans*에 대한 항균활성은 나타나지 않은 반면 천궁은 이 균에 대해서만 항균활성을 나타내었다. 그리고 박하는 고체발효에 성공하였으나 모든 구강질환 균에 대해 항균활성을 나타내지 않았다. 발효 전 한약재의 항균활성은 1,000 mg/mL에서 나타나 미미하였으나 고체발효에 의해 10 mg/mL에서 유사한 항균 효과가 확인되어 고체발효에 의해 한약재의 항균 효과가 유의적으로 증가되었음을 확인하였다(Table 3).

구취는 구강 내 염증 반응이 있는 경우 특히 치주 질환이 있는 사람에서 흔히 발견된다. 후박 추출물은 치주 질환 균의 생육을 억제할 뿐만 아니라 치주 인대 세포 내 콜라겐 분해 효소의 활성을 저해하는 효과가 알려져 있다(30). 이러한 후박의 항균 효과는 tetracycline 또는 chlorhexidine보다 약하나 listerine보다 높으며(31) 세포 독성도 다른 생약제에 비해 현저히 낮다고 보고되고 있다(32). 감초는 혓바늘이라고 부르는 아프타성 궤양에 효과가 있는데 궤양의 크기를 줄여 통증을 감소시킨다고 보고되고 있으며(33), 감초 성분 중 licoricidin과 licorisoflavan A는 치아 우식의 원인균인 *Str. mutans*과 *Str. sobrinus*와 치주 균인 *Porphyromonas gingivalis*와 *Prevotella intermedia*의 생장을 억제한다고 보고되고 있다(34). 박하 정유 성분은 미생물의 생장을 억제하는 효과가 있는데 주로 대장균과 살모넬라균에 대해 항균활성이 높은 것으로 보고되고 있다(35). 박하의 정유 성분 중 L-menthol은 진통제, 흥분제, 건위제로 사용되기도 하나 신선하고 상쾌한 향 때문에 박하는 청량제나 향료로 치약, 잼, 사탕, 화장품 및 담배 등의 제품에 주로 사용되고 있다(36). 상황버섯 균사체는 한약재에 함유되어 있는 항균성분을 발효에 의해 생물전환 시킴으로써 활성을 더욱 증가시킨 것으로 생각된다. Park 등(20)의 연구에서 수삼을 버섯균사체로 고체발효 시켰을 때 발효하지 않은 수삼과는 달리 조지방 함량은 증가하고 단백질 함량은 감소하는 결과로 보아 발효에 의해 화학 조성이 달라졌다고 보고하였다. 고체발효 수삼은 lipopolysaccharide(LPS)로 처리한 대식세포에서 수삼보다 nitric oxide(NO)의 생성을 촉진함으로써 감염 미생물의 생육을 억제하는 효과를 나타내었다. 고체발효 한 수삼의 면역증진 효과는 상황버섯균사체로 고체발효 한 수삼에서 가장 효과가 높았다고 보고하였다(20).

발효 한약재 조성비 확립 및 한방구강세척제의 관능평가

발효한 한약재를 유효성분으로 하는 구강세척제 개발을 위하여 발효에 의해 항균활성이 증가한 후박, 감초, 천궁을 선정하고, 이들의 에탄올 추출물을 일정 비율로 혼합한 후 구강질환 균의 생육억제 정도를 살펴보았을 때 후박 5 : 감

Table 3. Increase in anti-microbial activity of oriental medicinal herbs after solid fermentation by *Phellinus linteus* mycelium (Clear zone, mm)

Microorganism	*Sta. epidermidis*		*Str. pyogenes*		*Can. albicans*		*Str. mutans*	
Concentration (mg/mL)	1,000	10	1,000	10	1,000	10	1,000	10
	R[1)]	F[2)]	R	F	R	F	R	F
Magnolia	14	13	13	19	−	−	16	17
Liquorice	16	12	18	10	14	12	15	12
Cnidium	−	−	−	−	11	11	−	−
Mint	−	−	−	−	−	−	−	−

[1)]R: raw material, dried oriental medicinal herb. [2)]F: fermented oriental medicinal herb.
−: anti-microbial activity was not detected.

Table 4. Anti-microbial activity of mixture of oriental medicinal herb prepared with different combination of each extract (10 mg/mL, clear zone, mm)

Magnolia : Liquorice : Cnidium	Microorganism			
	Sta. epidermidis	*Str. pyogenes*	*Can. albicans*	*Str. mutans*
5:3:2	13	16	12	15
3:5:2	11	13	10	12
1:1:1	12	14	10	13

초3 : 천궁2의 배합 비율에서 가장 높은 항균활성을 보였다(Table 4).

본 연구에서는 한방구강세척제를 개발하기 위하여 구강세척제에 가장 많은 부분을 차지하는 베이스 성분을 박하와 정향 열수 추출물로 하였다. 박하와 정향 열수 추출물을 제조한 후 다양한 비율로 혼합하였을 때, 박하 열수 추출물 100과 정향 열수 추출물 15를 부피비로 혼합하였을 때의 관능검사 결과가 가장 높은 점수를 받았다(data not shown). 한방베이스에 발효 한약재 에탄올 추출물과 L-menthol, sodium fluoride, poloxamer 407, glycerin, propylene glycol, 수소화 40 피마자유, 그리고 ethanol을 참기하여 조성비를 개발하였다. 사전조사에 의하면 구강세척제에 함유되어 있는 유효성분이 0.03~2.00% 정도이고 대부분 1% 미만임(제품 조사 결과)을 감안하여 본 연구에서는 발효 한약재 혼합물 0.15%를 기본으로 하고, L-menthol과 sodium fluoride의 함량을 달리하여 A~D 한방구강세척제 조성비를 확립하고(Table 5) 관능검사를 실시하였다. 모든 한방구강세척제에서 한약 특유의 쓴맛이 강하여 전체적인 기호도가 9점 척도에서 4점 정도로 낮았다. 쓴맛을 보강하기 위해 L-menthol의 함량을 증가하였음에도 불구하고 큰 차이가 없었다(Table 6). 이에 발효 한약재 혼합 유효성분을 다양한 농도로 기본 베이스에 첨가하여 쓴맛에 대한 평가를 실시하였을 때 0.075% 함유량이 적합한 것으로 나타났다(data not shown). 구강세척제의 혼탁도를 낮추기 위해 용해보조제 또는 계면활성제를 첨가하고 다른 첨가제의 농도를 달리하여 E~G 조성비를 개발하고(Table 5) 관능검사를 실시하였다. 발효 한약재의 함량을 낮추고 glycerin을 첨가하였을 때 구강세척제의 쓴맛이 감소함으로써 기호도가 증가하였다. L-Menthol 사용량에 따른 관능평가 결과를 살펴

Table 5. Various formulation of mouthwash developed in this study (%)

	Mouthwash						
	A	B	C	D	E	F	G
Ethanol extracts of fermented oriental medicinal herbs	0.15	0.15	0.15	0.15	0.075	0.075	0.075
L-Menthol	−	−	0.02	0.05	0.05	0.06	0.07
Sodium fluoride	−	0.01	−	−	−	−	−
Poloxamer 407	−	−	−	−	0.15	0.15	0.15
Glycerin	−	−	−	−	6	6	6
Propylene glycol	−	−	−	−	5	5	5
40 Hydrogenated castor oil	−	−	−	−	0.075	0.075	0.075
Ethanol	5	5	5	5	5	5	5
Base for the mouthwash[1)]	94.85	94.84	97.83	94.80	83.65	83.64	83.63
Total	100	100	100	100	100	100	100

[1)]Dried mint and licorice were extracted with 20 volume of water for 150 minutes, respectively, for 2 times and then 100 portion of mint extracts and 15 portion of licorice extracts were mixed.

Table 6. Sensory evaluation data of mouthwash developed with ethanol extracts of solid fermented oriental medicinal herbs as a main components

	Mouth wash samples[1)]						
	A	B	C	D	E	F	G
Overall acceptance	4.29±1.60^{NS}	5.00±1.63	4.14±2.19	3.71±1.98	5.25±1.49	5.63±2.00	5.63±1.77
Bitterness	3.86±1.07$^{ab2)}$	5.57±1.27^{a}	4.00±2.31^{ab}	3.29±1.70^{b}	4.63±1.69^{ab}	4.88±1.89^{ab}	5.00±1.51^{ab}
Mint flavor	4.14±1.68^{NS}	4.29±1.50	4.43±2.15	4.43±2.51	5.38±1.19	5.38±1.16	5.00±1.31
Taste after use	4.86±2.34^{ab}	5.43±1.40^{ab}	3.57±1.51^{b}	3.71±2.14^{ab}	5.63±1.77^{ab}	5.88±2.03^{a}	5.38±2.07^{ab}
Will-ness to purchase	3.57±1.81^{NS}	3.86±1.77	3.86±2.12	3.29±1.70	4.25±1.67	4.38±2.33	4.63±1.60
Duration for sensing the refreshment after mouthwash use (min)	9.29±4.50^{bcd}	7.14±2.67^{d}	12.14±2.67^{b}	15.71±3.45^{a}	10.00±3.78^{bcd}	11.25±3.54^{bc}	7.50±2.67^{cd}

Values are mean±SD (n=10).
[1)]Refer Table 6 for the composition of mouthwash, A~G.
[2)]Data with different letters (a-d) in the row are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.
NS: not significantly different.

Table 7. Results of consumer's preference test

	Mouthwash	
	Product from current study[1)]	Commercial product[2)]
Overall acceptance	4.89±1.55*	4.11±1.26
Bitterness	4.96±1.86NS	5.75±1.46
Mint flavor	5.43±1.55NS	4.61±1.52
Taste after use	4.96±1.86NS	5.75±1.46
Will-ness to purchase	4.86±1.67**	3.46±1.29
Duration of sensing the refreshment after mouthwash use (min)	15.42±5.82NS	15.42±6.90
Time laps to the base line[3)] after mouthwash use (min)	14.82±5.69NS	13.75±5.20

Values are mean±SD (n=30).
[1)]Refer 'F' in the Table 6.
[2)]Ye Doctor Fresh Fine (Fresh Fine Co.).
[3)]Oral smell of individual participant was detected just before mouthwash use by Breath Checker (HC-212M, Tanita).
*P<0.05, **P<0.01 by Student's t-test.
NS: not significantly different.

보았을 때 민트향은 차이가 없었으나 구강세척제 사용 후의 느낌과 사용 후 입안에서 지속되는 시간에 대한 본인의 느낌에 대한 항목에서 F 시료는 G 시료에 비해 유의적으로 높은 점수를 받았다(P<0.05, Table 6). 이에 7종의 시료 중에서 F 시료를 최종으로 선택하고 이 조성비로 구강세척제 시제품을 제작하여 시판되고 있는 한방구강세척제(예닥터 후레쉬파인, Fresh Fine Co.)와 소비자 기호도 조사를 실시하였다. 관능요원 30명을 대상으로 제품의 관능평가 및 구강세척제 사용 후의 효과를 구취 측정기로 측정하였다(Table 7). 시제품에 대한 종합적인 평가 점수는 시판 제품보다 유의적으로 높았으며(P<0.05) 구매의사 역시 유의적으로 높게 나타났다(P<0.01). Breath Checker를 사용한 지속성 검사 결과, 개발한 시제품과 시판 한방제품 사이에 유의적인 차이는 없었다.

요 약

본 연구에서는 발효 한약재를 사용하여 한방구강세척제를 개발하고자 후박, 감초, 천궁, 박하 및 정향을 상황버섯균사체로 고체발효 하였다. 후박, 감초 천궁은 수분을 30% 첨가한 조건에서 고체발효에 성공하였으며, 박하는 30% 수분과 현미가루 10%를 영양성분으로 제공하였을 때 고체발효가 진행되었다. 그러나 정향은 진균류에 대한 항균활성이 강하여 상황버섯균사체를 이용한 고체발효에 성공하지 못하였다. 고체발효 한약재 에탄올 추출물의 총 페놀 함량 및 DPPH 소거능은 발효 후 유의적으로 상승하였으며 항균효과 역시 상승하였다. 구강질환 균인 *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* 또는 *Streptococcus mutans*에 대해 후박, 감초 및 천궁이 항균활성을 보였으며, 항균활성은 고체발효에 의해 약 100배 정도 증가하였다. 한방구강세척제 조성비를 확립하기 위하여 발효한 후박, 감초 및 천궁의 에탄올 추출물을 5:3:2로 혼합하였을 때 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 이들 발효 한약재 에탄올 추출물 혼합액 0.075%를 유효성분으로 하고 박하와 정향 열수 추출물(100:15, v/v) 83.64%를 베이스로 하는 한방구강세척제 조성을 관능검사에 의거 결정하고 시제품을 제조하였다. 본 연구에서 개발한 발효 한방구강세척제와 시판하고 있는 한방구강세척제에 대한 소비자 선호도 조사(n=30)를 실시하였을 때 본 연구에서 개발한 제품이 종합적인 평가 점수에서 유의적으로 높았으며 구강세척제 사용 후 지속 효과를 구취 측정계로 측정하여 시간을 산출하였을 때 유의적인 차이는 없었으나 발효 한방구강세척제의 지속 효과가 다소 길었다.

감사의 글

본 과제(결과물)는 교육부의 재원으로 지원을 받아 수행된 산학협력 선도대학(LINC) 육성사업의 연구 결과입니다.

REFERENCES

1. Kim DH, Yoo YS, Joo KB, Lee KJ. 2011. The evaluation of efficacy on oral cavity cleaner (dental cleaner). *Korea Journal of Waters* 2: 1-8.
2. Gagari E, Kabani S. 1995. Adverse effects of mouthwash use: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 80: 432-439.
3. Yu YE, Park EY, Jung DH, Byun SH, Kim SC, Park SM. 2010. Antibacterial effect of oriental medicinal herbs on dental pathogens. *The Korean Journal of Microbiology* 46: 200-206.
4. Kim YJ, Park KM. 2012. Effects on salivation, xerostomia and halitosis in elders after oral function improvement exercises. *J Korean Acad Nurs* 42: 898-906.
5. Tonzetich J. 1977. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. *J Periodontol* 48: 13-20.
6. Cho JW, Shin SC, Seo HS. 2003. Tongue plaque removal effect according to tongue cleaner types. *J Korean Acad Dent Health* 27: 75-85.
7. Lee JH, Kim ME, Kim KS, Kim SB. 2003. Study on the development of gargle solution containing medicinal herb extract for oral malodor. *J Oral Med Pain* 28: 1-10.
8. Liang CH, Syu JL, Mau JL. 2009. Antioxidant properties

of solid-state fermented adlay and rice by *Phellinus linteus*. *Food Chem* 116: 841-845.
9. Dinis MJ, Bezerra RM, Nunes F, Dias AA, Guedes CV, Ferreira LM, Cone JW, Marques GS, Barros AR, Rodrigues MA. 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresource Technol* 100: 4829-4835.
10. Seesuriyachan P, Kuntiya A, Hanmoungjai P, Techapun C, Chaiyaso T, Leksawasdi N. 2012. Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 912-917.
11. Khan AW, Zohora US, Rahman MS, Okanami M, Ano T. 2012. Production of iturin A through glass column reactor (GCR) from soybean curd residue (okara) by *Bacillus subtilis* RB14-CS under solid state fermentation (SSF). *Adv Biosci Biotechnol* 3: 143-148.
12. Kim HS, You JH, Jo YC, Lee YJ, Park IB, Park JW, Jung MA, Kim YS, Kim SO. 2013. Inhibitory effects of *Phellinus linteus* and rice with *Phellinus linteus* mycelium on obesity and diabetes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1029-1035.
13. Lee H, Kim H, Chong M, Cho H, Choi Y, Lim K, Lee K. 2008. Physiological activity of extracts from mixed culture of medicinal herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. *Kor J Herbology* 23: 1-8.
14. Rhee YK, Han MH, Park SY, Kim DH. 2000. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. *Korean J Food Sci Technol* 32: 477-480.
15. Song WY, Sung BH, Kang SK, Choi JH. 2010. Effect of water extracts from *Phellinus linteus* on lipid composition and antioxidative system in rats fed high fat high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 71-77.
16. Seo HC. 2011. Optimization of anticoagulant production from *Phellinus linteus* mycelia. *Kor J Mycol* 39: 117-121.
17. Park IH, Chung SK, Lee KB, Yoo YC, Kim SK, Kim GS, Song KS. 2004. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Arch Pharm Res* 27: 615-618.
18. Kang HW, Lee MH, Seo GS. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Phellinus linteus* HN1009K. *Kor J Mycol* 41: 243-247.
19. Lee BE, Ryu SY, Kim EH, Kim YH, Kwak KA, Song HY. 2012. Immunostimulating effect of mycelium extract of *Phellinus linteus*. *Kor J Pharmacogn* 43: 157-162.
20. Park CK, Kim H, Tu Q, Yu KW, Jeong HS, Lee HY, Jeong JH. 2009. Chemical composition and immunostimulating activity of the fermented Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) with mushroom mycelium by solid culture. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1145-1152.
21. Lee JH, Choi YH, Lee YT, Choi SH, Chung KY, Jeong YK, Choi BT. 2004. Effect of the evaporating extract from liquor of fermentation using mycelium of *Phellinus linteus* on the expression of inflammatory proteins and the generation of reactive oxygen species. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 18: 1825-1831.
22. Tarko T, Duda-Chodak A, Sroka P, Satora P, Jurasz E. 2008. Physicochemical and antioxidant properties of selected polish grape and fruit wines. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 7: 35-45.
23. Park SH, Yun UJ, Shin JH, Kwon BM, Bae KH. 2006. The comparison of morphological and constituents of the leaves of *Magnolia officinalis*, *M. biloba* and *M. obovata*. *Kor J Pharmacogn* 37: 278-286.
24. Davidson PM, Parish ME. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *J Food Sci Technol* 1: 148-155.
25. Lee JH, Choi HS, Chung MS, Lee MS. 2002. Volatile flavor components and free radical scavenging activity of *Cnidium officinale*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 330-338.
26. Cho SK, Kwon OI, Kim CJ. 1996. Anti-inflammatory and analgesic activities of the extracts and fractions of *Cnidii rhizoma*. *Kor J Pharmacogn* 27: 282-287.
27. Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 135-140.
28. Kumar A, Samarth RM, Yasmeen S, Shatma A, Sugahara T, Terado T, Kimura H. 2004. Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita*. *Biofactors* 22: 87-91.
29. Lim HS, Kim JH, Ha H, Seo CS, Shin HK. 2012. Comparative study of the anti-inflammatory effects of Menthae Herba from Korea and China. *Kor J Pharmacogn* 43: 231-238.
30. Chang B, Lee Y, Ku Y, Bae K, Chung C. 1998. Antimicrobial activity of magnolol and honokiol against periodontopathic microorganisms. *Planta Med* 64: 367-369.
31. Kim TI, Choi EJ, Chung CP, Han SB, Ku Y. 2002. Antimicorbial effect of *Zea mays* L. and *Magnoliae* cortex extract mixtures on periodontal pathogen and effect on human gingival fibroblast cellular activity. *J Korean Acad Periodontol* 32: 249-255.
32. Chang BS, Son SH, Chung CP, Bae KH. 1993. The effects of honokiol and magnolol on the antimicrobial, bacterial collagenase activity, cytotoxicity and cytokine production. *J Korean Acad Periodontol* 23: 145-158.
33. Martin MD, Sherman J, van der Ven P, Burgess J. 2008. A controlled trial of a dissolving oral patch concerning Glycyrrhiza (licorice) herbal extract for the treatment of aphthous ulcers. *Gen Dent* 56: 206-210.
34. Gafner S, Bergeron C, Villinski JR, Godejohann M, Kessler P, Cardellina JH, Ferreira D, Feghali K, Grenier D. 2011. Isoflavonoids and coumarins from *Glycyrrhiza uralensis*: antibacterial activity against oral pathogens and conversion of isoflavans into isoflavan-quinones during purification. *J Nat Prod* 74: 2514-2519.
35. Lee SE, Park CG, Cha MS, Kim JK, Seong NS, Bang KH, Bang JK. 2002. Antimicrobial activity of essential oils from *Mentha arvesis* L. var. *piperascens Malivaud* and *Agastache rugosa* O. Kuntze on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10: 206-211.
36. Jung KH, Seong NS, Lee YJ. 2005. A study on the anti-oxidation effects of menthae herba (Ⅰ). *Kor J Herbology* 20: 103-112.