Journal of Dental Hygiene Science Vol. 4, No. 1, pp. 45~48 (2004)

한국치위생과학회
THE KOREAN SOCIETY OF DENTAL HYGIENE SCIENCE

칡 추출물의 구강미생물에 대한 항균효과

이현옥† · 김창희[1] · 임진아[2] · 이미희[2] · 백승화[2]
원광보건대학 치위생과
[1]신성대학 치위생과
[2]원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Antimicrobial Effect of *Puerariae thunbergiana* Extracts against Oral Microorganism

Hyun-Ok Lee†, Chang-Hee Kim[1], Jin-A Lim[2], Mi-Hee Lee[2] and Seung-Hwa Baek[2]
Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-750, Korea
[1]Department of Dental Hygiene, Shinsung College, Dang Jin 343-861, Korea
[2]Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine and Institute of Basic Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

ABSTRACT In the current research for natural products with antimicrobial effects, various extracts of *Puerariae thunbergiana* and isoflavones against microorganisms were evaluated in terms of the minimum inhibitory concentrations (MIC). In general, *Candida albicans* was stronger antimicrobial activity than the other microorganisms such as *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus aureus*. The maximum activity was exhibited by methanol extract of the leaves of *Puerariae thunbergiana* Beth. against *Candida albicans*(MIC, 400 μg/mL). These results suggest that methanol extract of *Puerariae thunbergiana* has a potential antimicrobial activity.

Key words *Puerariae thunbergiana*, Antimicrobial effects, Minimum inhibitory concentration(MIC)

서 론

갈근(*Puerariae* Radix)은 우리나라를 비롯하여 중국 및 일본에서 자생하는 두과식물(Leguminosae)이며, 다년생 낙엽성 활엽 덩굴나무인 칡(*Puerariae thunbergiana* Beth.)의 뿌리 부분을 건조한 것이다. 갈근에는 10~15%에 달하는 전분과 9종류의 saponin, 혈관 확장, 혈당치 강하, 해열작용 등을 나타내는 flavonoids, 그리고 isoflavonoid인 daidzin과 근육의 긴장이나 경련을 완화시키는 진경작용을 나타내는 daidzein, 가장 많이 함유된 puerarin 등으로 구성되어 있다[1]. 한의학에서의 갈근은 청량성 발한제로서 상한, 중풍 초, 중기의 두통, 구갈, 이질, 복통, 발열, 무한 등에 활용되고, 또한 설사를 멈추게 하는데 탁효가 있으며, 모든 약독을 제거한다고 알려져 있다. 한방의학에서는 고혈압, 관상동맥경화증, 협심증, 노인성 당뇨 등에 이용하고 있으며[2], 혈압강하작용[3], 지방의 산화억제작용, 항염작용, 해독작용, 숙취제거의 효과, 항산화작용 및 보간작용 등의 활성을 관찰한 여러 연구들이 보고된[4-6] 바 있으나 미생물의 항균효과에 관한 보고는 미비한 상태이다. 본 연구는 칡의 뿌리, 줄기와 잎을 유기용매(*n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol)로 연속추출하여 얻은 칡 추출물과 생리활성 물질이 구강미생물에 대하여 항균효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

†Corresponding author
Tel: 82-63-840-1265
Fax: 82-63-840-1269
E-mail: holee@wkhc.ac.kr

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 칡(*Puerariae thunbergiana* Beth.)은 2002년 10월에 충남 논산시 노성면 가곡리산에서 채집한후에 음건하여 외부형태를 검정한 후, Blender로 분쇄하여 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과에 보관되어 있는 재료를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 추출방법

본 연구에 사용된 칡(뿌리, 줄기, 잎)을 세절하여 Blender로 분쇄하여 사용하였다. 칡의 부위별로 *n*-hexane으로 상온에서 24시간동안 진탕하면서 3회 반복 추출한 후, 헥산추출액을 0.4 μm 여과지로 여과하여 35°C에서 감압농축하여 헥산추출물을

얻었다. 위와 같은 방법으로 클로르포름, 에틸 아세테이트, 메탄올로 추출하여, 클로르포름 추출물, 에틸 아세테이트 추출물, 메탄올 추출물을 얻었다. 갈근탕과 승마갈근탕은 80ºC~85ºC에서 4시간동안 환류추출하여 물 추출물과 50% 에탄올 추출물을 얻었다.

2) 기기 및 시약

Rotary vaccum evaporator(EYELA : N-N Series, Swizerland), freezing dryer(-50ºC 이하, vaccum 5 microns Hg 이하 : F. D8510, Ilshin Lb Co.), CO_2 incubator (NUAIRE), ELISA reader(Molecular devices, spectra MAX 340, USA), Microscope(Olyimpus, CK2, USA). *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol(DAEJUNG)은 재증류하여 사용하였으며, 물은 3차 증류수를 사용하였다. Daidzein과 quercetin은 Aldrich사(U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

3) 사용균주 및 배지

실험에 사용된 균주는 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*, JC-2), *Staphylococcus epidermidis*(*S. epidermidis*, ATCC 12228), *Staphylococcus aureus*(*S. aureu*, ATCC 29213)와 *Candida albicans*(*C. albicans*, KCTC 1940)를 사용하였다.

세균배양에 사용된 배지는 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*는 Brain heart infusion (BHI, Difco)를 사용하였고, *C. albicans*는 Sabouroud(증류수 1L에 Bacto-peptone 10 g, Bacto-dextrose40g)를 사용하였다.

4) 항균력 측정

항균효과를 파악하기 위하여 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 액체배지 희석법[7-9]을 이용하였으며, 96-microwell plate(Nunclon, Denmark)에 각 추출물의 농도를 최고 3,200 μg/mL에서 최저농도 100 μg/mL 까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. 각 균주는 단일 콜로니를 액체배지에 접종하고, 37ºC 배양기에서 18시간동안 배양한 균주를 10^5 cells/m*l* 접종하여 37ºC 배양기에서 24시간 배양한 후, ELISA(Spectra Max 250, Molecula Deveces, USA)에 의한 흡수파장 630 nm에서 흡광도를 측정하여 배지의 탁도를 확인하였고, 순수 배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 MIC로 결정하였으며, MIC의 수치가 낮은 것을 항균 효과가 높은 것으로 판정하였다.

5) 시료의 처리

조제한 시료는 즉시 4ºC 냉장고에 저장하였고, 사용직전에 10% DMSO에 희석하여 실험에 사용하였다.

결과 및 고찰

칡의 뿌리, 줄기와 잎을 유기용매로 연속추출하여 얻은 칡 추출물 이용하여 구강미생물 중 치아우식원인균인 *S. mutans*[10-12], 구강 인두와 피부에 상주균이면서 화농성염증의 원인균인 *S. epidermidis*와 *S. aureus*[13,14], 구강에 상주하면서 면역력이 저하된 사람에게 기회감염을 나타내는 원인균인 *C. albicans*[13]에 대하여 항진균 효과를 파악하였다.

칡의 뿌리를 물과 유기용매를 사용하여 극성이 낮은 용매로부터 극성이 높은 용매로 상온에서 연속추출하여 얻은 추출물에서 항균효과를 측정한 결과, 극성이 낮은 헥산과 크로르포름 용매로 추출한 추출물에 대하여 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*에 대한 최소억제농도는 3,200 μg/mL 이상으로 항균활성이 나타나지 않았다. 그러나 *C. albicans*는 크로르포름 추출물에서 최소억제농도가 800 μg/mL으로 항진균활성이 관찰되었다. 에틸 아세테이트 추출물과 메탄올 추출물에 대하여 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus* 대한 최소억제농도는 3,200 μg/mL으로 항균활성이 나타났다. 진균인 *C. albicans*는 헥산 추출물을 제외하고는 모든 추출물에서 최소억제농도가 높은 800 μg/mL으로 항진균활성이 관찰되었다. 칡뿌리로 추출한 추출물은 효모형 진균인 *C. albicans*에 항진균 효과을 함유한 생리활성물질이 포함되어 있으리라 생각된다(Table 1).

Table 1. Minimal inhibitory concentrations(MIC) of the root of *Puerariae thunbergiana* Beth

Tested material	MIC_{50} (μg/mL)*			
	S. mutans	*S. epidermidis*	*S. aureus*	*C. albicans*
HXRP	>3,200	>3,200	>3,200	>3,200
CFRP	>3,200	>3,200	>3,200	800
EARP	3,200	3,200	3,200	800
MTRP	3,200	3,200	3,200	800

*Each extract was examined in tripliacte experiments. Plant extracts: HXRP; *n*-Hexane extract of the root of *Puerariae thunbergiana* Beth. CFRP; Chloroform extract of the root of *Puerariae thunbergiana* Beth. EARP; Ethyl acetate extract of the root of *Puerariae thunbergiana* Beth. MTRP; Methanol extract of the root of *Puerariae thunbergiana* Beth.

칡의 줄기를 물과 유기용매로 추출하여 얻은 추출물에서 항균효과를 측정한 결과, 헥산추출물, 크로르포름 추출물과 에틸 아세테이트추출물에 대하여 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*의 최소억제농도는 3,200 μg/mL 이상으로 항균활성이 나타나지 않았다. 그러나 *C. albicans*는 에틸 아세테이트 추출물에서 최소억제농도가 1,600 μg/mL으로 항균활성이 관찰되었다. 극성이 높은 메탄올추출물의 경우 *S. mutans*와 *C. albicans*는 최소억제농도가 800 μg/mL이었고, *S. epidermidis*와 *S. aureus*의 최소억제농도는 3,200 μg/mL로 나타났다. 따라서 극성용매로 추출한 추출물에서 항균 및 항진균물질이 함유되었으리라 생각된다(Table 2).

Table 2. Minimal inhibitory concentrations(MIC) of the trunk of *Puerariae thunbergiana* Beth

Tested material	MIC_{50} (μg/mL)*			
	S. mutans	*S. epidermidis*	*S. aureus*	*C. albicans*
HXTP	>3,200	>3,200	>3,200	>3,200
CFTP	>3,200	>3,200	>3,200	>3,200
EATP	>3,200	>3,200	>3,200	1,600
MTTP	800	3,200	3,200	800

*Each extract was examined in tripliacte experiments. Plant extracts: HXTP; *n*-Hexane extract of the trunk of *Puerariae thunbergiana* Beth. CFTP; Chloroform extract of the trunk of *Puerariae thunbergiana* Beth. EATP; Ethyl acetate extract of the trunk of *Puerariae thunbergiana* Beth. MTTP; Methanol extract of the trunk of *Puerariae thunbergiana* Beth.

칡의 잎을 물과 유기용매로 추출하여 얻은 추출물에서 항균효과을 측정한 결과, 헥산추출물, 크로르포름 추출물과 에틸 아세테이트추출물에 대한 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S.*

*aureus*의 최소억제농도는 3,200 μg/mL 이상으로 항균활성이 나타나지 않았다. 진균인 *C. albicans*는 헥산 추출물에서만 최소억제농도가 3,200 μg/mL으로 항진균활성이 관찰되었다. 칡의 잎 메탄올 추출물의 경우, *C. albicans*의 최소억제농도는 400 μg/mL이었고, *S. mutans*의 최소억제농도는 1,600 μg/mL, *S. epidermidis*와 *S. aureus*의 최소억제농도는 3,200 μg/mL으로 나타났다. 칡의 뿌리, 줄기 및 잎을 물과 유기용매로 추출한 추출물의 항균 및 항진균력의 최소억제농도 중에 잎의 메탄올추출물에서 효모형 진균인 *C. albican*에서 가장 높은 최소억제농도 400 μg/mL가 관찰되었다(Table 3).

Table 3. Minimal inhibitory concentrations(MIC) of the leaves of *Puerariae thunbergiana* Beth

Tested material	MIC_{50} (μg/mL)*			
	S. mutans	*S. epidermidis*	*S. aureus*	*C. albicans*
HXTP	>3,200	>3,200	>3,200	3,200
CFTP	>3,200	>3,200	>3,200	>3,200
EATP	>3,200	>3,200	>3,200	>3,200
MTTP	1,600	3,200	3,200	400

*Each extract was examined in tripliacte experiments. Plant extracts: HXTP; *n*-Hexane extract of the leaves of *Puerariae thunbergiana* Beth. CFLP; Chloroform extract of the leaves of *Puerariae thunbergiana* Beth. EALP; Ethyl acetate extract of the leaves of *Puerariae thunbergiana* Beth. MTLP; Methanol extract of the leaves of *Puerariae thunbergiana* Beth.

갈근을 기본으로 처방된 갈근탕과 승마갈근탕을 물과 50% 에탄올로 추출한 추출물에 대한 항균효과를 측정한 결과, 일반적으로 구강의 모든 균주에 대하여 갈근탕이 승마갈근탕보다 항균 및 항진균력이 비교적 높게 나타났다. 즉 칡의 뿌리, 줄기 및 잎에서 추출한 추출물의 항진균효과가 관찰된 것과 같이 효모형 진균인 *C. albican*에서 비교적 높은 항진균효과가 나타났다. 이와 같은 실험결과는 갈근탕과 승마갈근탕에 처방된 한약재가 갈근 이외의 한약재에 기인된 항진균활성물질에 의한 것으로 생각되며, 앞으로 갈근탕과 승마갈근탕에 선도한 약재에 대한 연구검토가 이루어져야 하리라 생각된다(Table 4).

Table 4. Minimal inhibitory concentrations(MIC) of galgeuntang and seungma-galgeuntang

Tested material	MIC_{50} (μg/mL)*			
	S. mutans	*S. epidermidis*	*S. aureus*	*C. albicans*
WTGT	1,600	3,200	3,200	800
ETGT	1,600	1,600	1,600	800
WTSM	3,200	3,200	1,600	800
ETSM	3,200	3,200	3,200	1,600
ETRP	3,200	3,200	3,200	800

*Each extract was examined in tripliacte experiments. Plant extracts: WTGT; Water extract of galgeuntang. ETGT; 50% Aqueous ethanol extract of galgeuntang. WTSM; Water extract of seungmagalgeuntang. ETSM; 50% Aqueous ethanol extract of seungmagalgeuntang. ETRP; Ethanol extract of the root of *Puerariae thunbergiana* Beth.

갈근에서 분리된 isoflavonoid인[18] puerarin, daidzin에 대하여 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*에 대한 최소억제농도는 3,200 μg/mL으로 미약한 항균활성이 나타났다. 이[15]는 고삼의 크로르포름 추추출물, 메탄올 추출물과 에틸아세테이트 추출물에 대하여 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*에 대한 최소억제농도가 25 μg/mL이었다고 보고하였고, 신 등[16]은 배암차즈기의 크로르포름 추출물에서 최소억제농도가 100 μg/mL이었다고 하였으며, 최 등[17]은 백출의 에탄올 추출물, 클로르포름 추출물과 에틸아세테이트 추출물이 *S. mutans*에 대하여 최소억제농도가 500 μg/mL이었다고 보고한 바 있다. 이와같은 연구결과를 비교하면, 칡 추출물 보다 고삼의 추출물의 항균효과가 더 우수한 것으로 생각된다. 칡의 구성성분인 daidzein과 quercetin의 최소억제농도는 3,200 μg/mL 이상으로 항균활성이 나타나지 않았으나, 진균인 *C. albicans*에 대한 최소억제농도는 800 μg/mL-3,200 μg/mL으로 나타났다(Table 5).

결과적으로 칡의 뿌리, 줄기와 잎의 연속추출물에서 항진균효과는 진균인 *C. albicans*에 대하여 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus* 보다 높은 활성이 관찰되었으며, 칡의 구성성분으로 보고된 isoflavonoid 보다 활성이 높게 측정되었다. 이와 같은 실험결과는 칡에 항진균활성을 나타내는 생리활성물질이 puerarin, daidzin, daidzein, quercetin 보다는 다른 활성물질이 함유되어 나타나는 것으로 생각된다. 향후 칡 추출물에 대한 항균 및 항진균물질을 분리 및 분석하여, 이들 활성물질에 대한 구강미생물의 억제효과를 연구하고자 한다.

Table 5. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of pure compounds

Tested material	MIC_{50} (μg/mL)*			
	S. mutans	*S. epidermidis*	*S. aureus*	*C. albicans*
Puerarin[18,19]	3,200	3,200	3,200	3,200
Daidzin[18,19]	3,200	3,200	3,200	800
Daidzein	>3,200	>3,200	>3,200	>3,200
Quercetin	>3,200	>3,200	>3,200	>3,200

*Each extract was examined in tripliacte experiments.

결 론

본 연구에서는 칡의 뿌리, 줄기와 잎을 유기용매로 연속추출하여 얻은 칡 추출물과 구성성분물질을 이용하여 구강미생물에 대한 항균 및 항진균효과를 검색하고 다음과 같은 실험결과를 얻었다.

칡의 줄기와 잎의 메탄올추출물에서 *S. mutans*에 대한 항균효과는 최소억제농도가 800 μg/mL와 1,600 μg/mL으로 나타났으나, 칡의 뿌리에서의 최소억제농도는 3,200 μg/mL로 나타났다. 칡의 뿌리 50% 에탄올 추출물과 승마갈근탕 물추출물에서 *S. epidermidis*, *S. aureus*에 대한 최소억제농도는 1,600 μg/mL으로 항균활성이 나타났으며, 칡 잎의 메탄올추출물에 대한 *C. albicans*의 최소억제농도는 400 μg/mL으로 가장 높은 항진균효과가 관찰되었다. 결과적으로 칡의 뿌리, 줄기와 잎의 연속추출물에서 항균효과는 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*보다 진균인 *C. albicans*에 대하여 높은 항진균활성이 관찰되었으며, 또한 칡의 구성성분으로 보고된 isoflavonoid 보다 항진균활성이 높게 측정되었다. 이와 같은 항진균력은 칡에 항진균활성을 나타내는 생리활성물질이 isoflavonoid 이나 flavonoid 보다는 다른 활성물질이 함유되어 나타나는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구에 사용된 갈근탕과 승마갈근탕을 제공하여 주신 경남 창원시 오시오한의원에게 감사드리며, 2003년도 원광보건대학 해외연구비에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드린다.

참고문헌

1. 장상문 외 4인: 한약자원식물학, 한문출판, 1996.
2. Huh J: Donguibogam, Namsandang, Vol. 3, 1984.
3. Fan LL, Dennis DO and Wand WJP: Pharmacologic studies on Radix of Puerariae. Effect of Puerariae on reginal myocardial blood-flow and cardic hemodynamics in dogs with acute myocardial ischemia. Chin Med J 98: 821-832, 1985.
4. Oh MJ, Lee KS, Son HY and Kim SY: Antioxidative components of Pueraria root, Korean J Food Sci Technol 22: 793-798, 1995.
5. Han SH, Kin JB, Min SG and Lee CH: The effects of *Puerariae* Radix catechins administration on liver function in carbon tetrachloride-treated rats. Korean J Soc Food Nutr 24: 713-720, 1995.
6. Lee JS, Lee KH and Jeong JH: Effects of extracts of *Puerariae* Radix on lipid metabolism in rats fed high fat diet. J Korean Soc Food Sci Nutr 28(1): 218-224, 1999.
7. Cho H, Weon RS, Yang EY and Kim JS: Antimicrobial effect of the extract of *Sophora flavescens* Ait (I). J Pharm Soc Korea 43: 419-422, 1999.
8. Kim KY, Chung DO and Chung HJ: Chemical composition and antimicrobial activities of *Houttuynia cordata* Thunb. Korean J Food Sci Technol 29(3): 400-406, 1997.
9. Chung BS, Kim HS and Kim SK: Susceptibility tests of *Candida* species isolated from vagina. J Korean Soc Microbiol 24(5): 523-526, 1989.
10. Hamada S, Koga T and Ooshima T: Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. J Dent Res 63: 407-411, 1984.
11. De Stoppelaar JD, Konig KG, Plasschaert AJM, van der Hoeven JJ: Derease in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Arch Oral 53: 1355-1360, 1974.
12. Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbial Rev 50: 353-380, 1986.
13. 김영권, 한만덕: 구강미생물학, 고문사, 183-184, 1998.
14. 민경희, 김치경, 조민기: 대학미생물학, 탐구당, 382-383, 1990.
15. 이현옥: 약용식물로부터 추출한 천연물질의 항균효과와 항암활성. 원광대학교 박사학위 논문, 39-40, 2001.
16. 신민교 외 7인: 배암차즈기 추출물의 세포독성과 항균효과. 생약학회지 32(1): 55-60, 2001.
17. 최은영 외 8인: 백출 추출물의 세포독성과 항균효과 검색. 동의생리병리학회지 16(2): 348-352, 2002.
18. Lee SJ, Baek HJ, Lee CH and Kim HP: Antiinflammatory activity of isoflavonoids from *Pueraria* Radix and biochanin A derivatives. Arch Pharm Res 17: 31-35, 1994.
19. Oh MJ, Lee KS, Son HY and Kim SY: Antioxidative components of *Pueraria* root. Kor J Food Sci Technol 22: 793-798, 1990.

(Received June 9, 2004; Accepted June 16, 2004)