

치태에서 분리된 *Streptococcus mutans*에 대한 서양산 고추냉이(*Armoracia rusticana*) 뿌리 추출물의 항균효과

김혜경 · 박호원 · 신일식* · 이주현 · 서현우

강릉대학교 치과대학 소아치과학교실 및 구강과학연구소, *강릉대학교 해양생명공학부 식품미생물학연구실

국문초록

천연항균제의 개발에 대한 관심이 날로 증가하는 가운데, 다수의 연구들에서 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus parasiticus*, *Helicobacter pylori* 등 다양한 세균들에 대한 서양산 고추냉이의 항균 효과가 밝혀진 바 있다. 서양산 고추냉이가 치아우식증의 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대해서도 항균성을 나타낸다는 보고가 있으나, 아직까지 구강내에서 분리된 임상분리균주를 대상으로 한 연구는 미진한 실정이다.

본 연구에서는 사람의 구강내에서 분리 및 동정된 *Streptococcus mutans*에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과를, 대표적 항균제인 클로르헥시딘과 비교하여 알아보고, *Streptococcus mutans* 표준균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 효과와 비교하고자 하였다. 항균 효과를 평가하기 위해 최소억제농도와 최소살균농도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 연구에서 *Streptococcus mutans* 임상 분리균주와 표준균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 최소억제농도는 각각 평균 0.083~0.25% (833.33~2500 ppm), 평균 0.25% (2500 ppm)으로 나타나, 두 종류의 균주에 대한 항균 효과에는 뚜렷한 차이가 없는 것으로 나타났다.
2. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 0.083~0.25%의 농도에서 클로르헥시딘(0.0021~0.0041%)과 대등한 항균 효과를 가지는 것으로 나타났다.

주요어 : 서양산 고추냉이 뿌리 추출물, Allyl isothiocyanate (AIT), *Streptococcus mutans*, Chlorhexidine, 16s rRNA sequencing, API kit

I. 서 론

치아우식증은 치태 내 세균에 의해 치아 경조직이 탈회되는 현상으로, 치주질환과 함께 구강 내에서 발생하는 양대 구강병의 하나로 알려져 있다. 치아우식증은 어린이에서 치아 상실의 가장 큰 원인이며, 구강 보건의 향상에 따라 선진국에서는 과거에 비해 큰 감소 추세를 보이고 있으나 우리나라를 비롯한 많은

국가에서는 아직도 구강 건강에 있어 커다란 문제가 되고 있다.

치아우식증의 주된 원인균에 관해서는, 과거 여러 연구들에서 *Streptococcus mutans*(이하 *S. mutans*)는 초기 평활면 우식증^{1,2)}, *Lactobacillus* 종은 치면열구 우식증^{3,4)}, *Actinomyces*종들은 치근면 우식증⁵⁾ 특히 연관성이 높다는 사실이 보고된 바 있다. 그러나 최근 연구에 의하면 *Lactobacillus* 종들은 초기 치아우식증보다는 진행된 치아우식증 병소와 더 연관성이 높고, 치근면 치아우식증을 포함한 모든 치면의 치아우식증에는 *S. mutans*가 주요한 원인 세균으로 알려졌다^{6,7)}. 현재 *S. mutans*와 더불어 치아우식증 유발과 연관이 있는 연쇄상구균 5종을 총칭하여 mutans streptococci(이하 MS)라 하며, 여기에는 *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. rattus*, 그리고 *S. cricetus* 종들이 포함된다^{8,9)}.

교신저자 : 박 호 원

강원도 강릉시 지변동 123번지
강릉대학교 치과대학 소아치과학교실
Tel: 033-640-3157
E-mail: pedo@kangnung.ac.kr

MS 중에서도 *S. mutans*와 *S. sobrinus*가 사람의 구강 내에서 가장 많이 발견되고, 사람의 치아우식증과 가장 깊은 관련성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 일부 연구에 따르면 *S. mutans*보다는 오히려 *S. sobrinus*가 높은 우식활성과 연관성이 있다는 주장이 있으나, 대부분의 역학조사에서는 *S. mutans*가 *S. sobrinus*보다 우식부위에서 더 많이 출현한다고 보고하고 있다¹⁰⁻¹⁶. 또한 우리나라 어린이의 경우 *S. sobrinus*는 치아우식증에서 의미가 적은 것으로 판단되고 *S. mutans*가 더 중요하다는 보고가 있으며¹⁷, 최근 들어 *S. sobrinus*는 치아우식증과 관계가 없는 것으로 인식되고 있다¹⁸.

치아우식증을 예방하기 위한 여러 방법 중 *S. mutans*와 같은 병원체 요인을 제거하기 위한 화학적 항균제를 사용하는 방법이 있는데, 이에 대표적인 약제가 클로르헥시딘(Chlorhexidine digluconate, CHX)이다. Weitz 등¹⁹은 0.12% 클로르헥시딘으로 양치하였을 때 치면세균막 지수는 감소하였다고 하였으며, 이외에도 수많은 임상연구를 통하여 클로르헥시딘의 치면세균막 억제효과는 확실히 증명되었다²⁰⁻²⁶. 클로르헥시딘은 치아우식증에 관련된 세균들 뿐 아니라 그람 양성균 및 음성균, 효모, 통성 혐기성균, 호기성균 등에 작용하는 광범위 항균제로서²⁷⁻²⁹ 치과영역에 널리 사용되고 있으나, 치아나 수복물의 변색, 미각저하증 및 미각이상, 작열감 등의 문제점을 가지므로^{30,31}, 장기간 치아우식증의 예방을 위해 사용되기에는 적합하지 않은 면이 있다. 이에 따라 최근 클로르헥시딘과 같은 합성물을 대체할 수 있는 천연항균제 개발에 대한 관심이 증가되고 있다.

그 중 서양산 고추냉이(Horseradish, *Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey. & Scherb.; Cruciferae)는 유럽 동남부가 원산지인 다년생 숙근성 식물로 향신료로서의 역할뿐만 아니라 그 항균 효과도 주목을 받고 있다. 고추냉이의 항균 성분은 isothiocyanate류로 그 중에서도 allyl isothiocyanate (AIT)가 항균 활성이 강한 것으로 보고된 바 있다³². 휘발성 향기성분인 AIT는 매운맛의 주성분으로 고추냉이에서 추출된 정유 중에 약 80%를 차지하며 그 외 20여종의 휘발성 성분이 확인되었다^{33,34}.

AIT는 이전의 연구들을 통해서 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*³⁵⁻³⁸, *Vibrio parahaemolyticus*^{37,38}, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus parasiticus*, *Helicobacter pylori*^{38,39} 등 다양한 세균에 항균 효과를 나타냄이 밝혀졌으며, Masuda⁴⁰와 유 등⁴¹은 고추냉이 추출물이 치아우식증의 주요 원인균인 *S. mutans*에 대해서도 항균 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 구강 내에서 분리된 *S. mutans*에 대한 AIT의 항균 효과에 관해서는 아직까지 연구가 미진한 실정이다.

이에 본 연구에서는 사람의 구강 내에서 분리된 *S. mutans*에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과를, 대표적 항균제인 클로르헥시딘의 항균 효과와 비교하여 알아보고, 동시에 표준균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 효과와 비교하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1. 시료

본 실험에서 서양산 고추냉이 뿌리 분말은 Biocoats Co. Ltd.(Seoul, Korea)에서 구입한 중국산 분말을 사용하였으며, 항균 효과의 비교를 위해 5% 클로르헥시딘(알파헥시딘, Sungkwang Co. Ltd., Bucheon, Korea)을 사용하였다. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 중의 AIT 농도 측정 시 사용한 AIT 표준용액(>98% purity)은 Fluka Co. (Haan, Germany)의 제품을 사용하였으며, Hexane은 Showa Co.(Tokyo, Japan)의 제품을 이용하였다.

2. 항균성 물질의 추출

증류수를 이용하여 서양산 고추냉이에서 항균성 물질을 추출하였다. 고추냉이 분말 200 g을 증류수 550 mL와 혼합한 후, rotary evaporator (NE-1, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 AIT 생산을 최대화하기 위하여 40℃로 120분간 유지시켰다. 그 후 120℃의 oil bath(C-WHT, Changshin scientific co., Seoul, Korea)에서 120분간 증류시키고, 추출액 150 mL을 분획한 후, oil을 원심분리하여 AIT 농도를 측정하였다.

3. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 AIT 함량 분석

추출물의 AIT 농도를 측정하기 위하여 추출물 1 mL를 헥산(hexane) 1 mL와 혼합한 후, 60℃ 향온 수조(RW-3025G shaking water bath, Jeio Tech Co., Ltd, Kimpo, Korea)에서 1시간 동안 가열하였다. 이를 다시 실온으로 냉각하고, 헥산층 1 μL를 gas chromatography로 분석하였다. FID(flame ionization detector)가 부착된 GC(HP 6890 series, Hewlett Packard Development Co., California, USA)로 AIT 농도를 측정하였으며, column은 HP-Innowax capillary column (30 m × 0.32 mm I.d., 0.5 μm film thickness, Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA)을 사용하였다. Injection port와 FID의 온도는 각각 250℃, 260℃였으며, carrier gas는 질소(Nitrogen)를 사용하였다.

Standard AIT의 농도별 gas chromatography 결과를 수식화하여 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 AIT 함량을 적정하였으며, 그 결과 추출물은 약 650,670.97±1,370.26 ppm의 AIT를 함유하고 있었다(Fig. 1). 본 실험에서는 이 추출물에 멸균 배지를 가하여 double dilution법으로 희석하여 사용하였다.

4. 사용균주 및 배지

· 임상 분리균주의 획득 및 동정

a. 치면세균막의 채취

강릉대학교 치과병원 소아치과에 내원한 12세 미만의 환자들

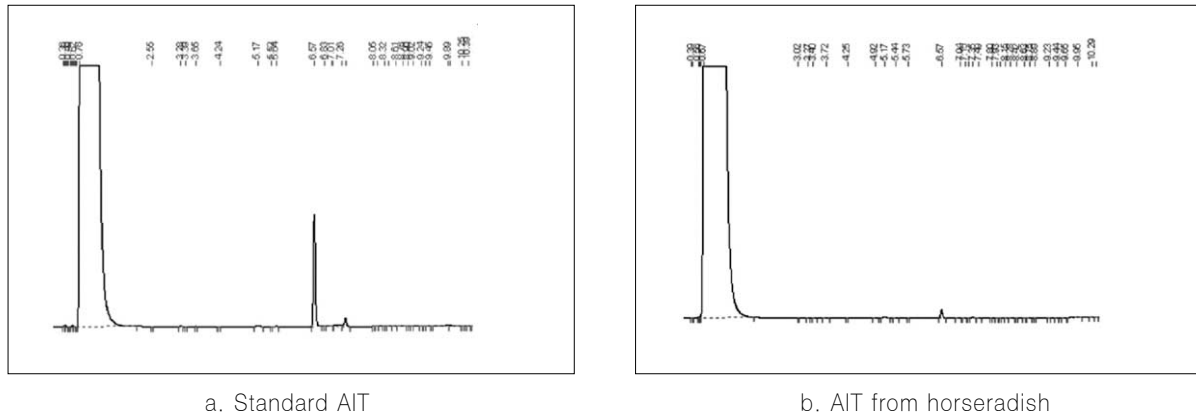


Fig. 1. Gas Chromatogram of standard AIT and AIT extracted from Horseradish (*Armoracia rusticana*).

중에서 구내경과 탐침(explorer)으로 검사하여 C2(C2: 상아질까지 진행된 치아우식증)이상의 우식치아를 갖고 있는 환자 중 문진을 통해 전신병력이 없고 최근 2주간 항생제 치료나 불소도포를 받은 적 없는 10명의 환자들을 선별하였다. 해당 환자들의 C2 우식치아의 와동내 혹은 치면에서 멸균된 탐침을 사용하여 치면세균막을 채취하였다. 채취된 치면세균막을 0.5ml의 생리식염수가 담긴 에펜도르프 튜브에 넣어 실험실로 운반하여 다음의 실험에 사용하였다.

b. 세균 배양 및 분리균주의 획득

채취한 치면세균막을 수 회 vortexing 하여 생리식염수로 10 배 희석한 후 15% sucrose, 0.5µg/ml의 bacitracin이 함유된 Mitis-Salivarius Agar (MSA, Difco, Detroit, MI, U.S.A.)에 0.1ml씩 도말하여 37℃, 5% CO₂ 세균배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 이 때 성장한 세균 군락 중 형태가 다른 것은 다른 종으로 생각하고 각각 한 군락을 채취하여 API kit(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용한 균주의 동정을 위해 sheep blood가 5% 첨가된 Columbia Blood agar base(CB, Difco, Detroit, MI, U.S.A)에 접종하였고, 37℃ CO₂ 세균배양기에서 48시간 배양하였다. 균주의 보관을 위해 CB plate에 증식된 세균을 한 백금이 취하여 Brain Heart Infusion (BHI, Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) broth에 접종하고 37℃, 5% CO₂ 세균배양기에서 배양하였다. 이 세균배양액 500µl와 Glycerol 500 µl을 에펜도르프 튜브에 담아 혼합하여 이후의 실험에 사용할 때까지 -70℃에 보관하였다.

c. 균주의 동정

CB plate에서 증식된 세균을 API 20 strep kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하여 동정하였고, API rapid ID32 strep kit (BioMerieux, Marcy l'

Eroile, France)를 사용하여 다시 한 번 동정하였으며 판독에는 mini-API (BioMerieux, Marcy l'Eroile, France)를 사용하였다. 보관중인 각각의 균주를 한 백금이 취해 Brain Heart Infusion agar (BHA, Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)에 streak하여 37℃, 5% CO₂ 세균배양기에서 24시간동안 배양한 후, 세균의 동정을 위해 마이크로젠사(Microgen Co. Ltd., Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 세균의 동정은 16s rRNA sequencing으로 이루어졌다. Sequencing은 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., California, U.S.A.)를 이용하여 진행하였고, PCR 반응은 PTC-225 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Massachusetts, U.S.A.)를 사용하였다.

이상 3회의 동정 결과 모두 *Streptococcus mutans*로 동정된 4개의 균주를 본 실험에 사용하였다.

· 표준균주 및 사용 배지

본 실험에서 사용된 표준균주는 *S. mutans* KCTC 3065이며, 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC, Daejeon, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 배지는 Brain Heart Infusion broth (BHI, Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)와 Brain Heart Infusion agar (BHA, Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)를 사용하였다.

2. 연구 방법

1. 항균 활성 측정 시험

· 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용군

서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균활성은 disk paper method를 이용하여 측정하였다. 각 균주를 전배양하여 660nm (V530 UV/VIS spectrophotometer, Jasco, Tokyo,

Japan) 파장에 대한 흡광도(A660)가 0.600-0.650으로 일정하게 현탁된 배양액 100 μ l를 BHI 평판배지에 분주한 후, 멸균된 spreader를 사용하여 균일하게 도말하였다. 멸균된 직경 10mm filter paper disk (Whatman No.2)에 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 30 μ l씩 흡수시킨 후 각 균주가 도말된 배지에 밀착시켜, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 세균배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 disk 주변에 형성된 투명한 (clear zone)의 유무로 항균효과의 여부를 확인할 수 있었다.

· 클로르헥시딘 사용군

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용군과 동일한 방법으로 각 균주에 대한 클로르헥시딘의 항균활성을 측정하였다.

2. 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

· 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용군

각 균주를 96-well flat bottom microplate (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany)의 각 well에 5 μ l씩 분주한 후, BHI 멸균배지를 50 μ l씩 분주하였다. 여기에 일정 단계 희석(1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156, 0.0078, 0.0039, 0.0019%)한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 50 μ l 분주하고, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각 균주의 증식 유무를 micro plate reader (OD: 660nm, EL800, Bio-Tek Instrument Inc., California, USA)로 측정하였다.

· 클로르헥시딘 사용군

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용군과 동일한 방법으로 각 균주에 대한 클로르헥시딘의 최소억제농도를 측정하였다. 클로르헥시딘은 5%를 원액으로 각 단계별로 멸균배지에 희석(0.31, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025, 0.0012, 0.0006%)하여 사용하였다.

3. 최소살균농도 (minimum bactericidal concentration, MBC) 측정

· 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용군

MBC의 측정은 Bamba⁴²⁾등의 방법을 사용하였다. MIC 측정 후 증식이 관찰되지 않은 배양액을 한 백금이 취하여 BHI 평판배지에 streak한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하여 증식유무를 확인하였다.

· 클로르헥시딘 사용군

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용군과 동일한 방법으로 각 균주에 대한 클로르헥시딘의 최소살균농도를 측정하였다.

· 모든 실험에서 동일한 실험을 3회 반복하여 평균과 표준편차를 산정하였다.

Ⅲ. 연구 결과

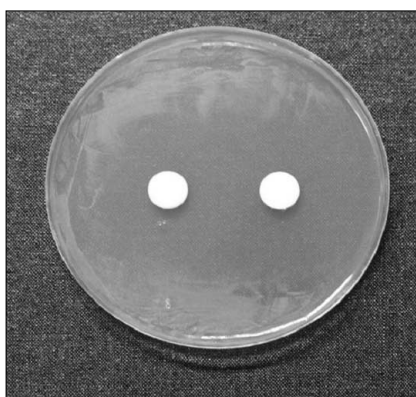
1. 항균 활성 측정 결과

서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘은 실험에 사용된 모든 임상분리균주 및 표준균주에서 paper disk 주위로 투명환을 형성하였으며(Fig. 2), 이로써 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘은 구강내에서 분리된 *Streptococcus mutans*에 대하여 항균 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

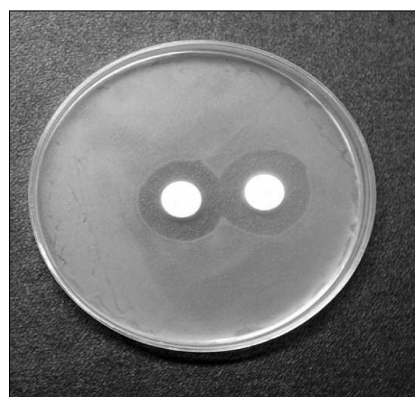
2. 최소억제농도 (MIC)

1. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MIC

S. mutans 임상 분리균주 및 표준균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 MIC의 평균 및 표준편차는 Table 1과 같다. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 실험 결과, 임상 분리균주에 대한 MIC는 균주마다 약간의 차이는 있었으나 총 3회의 실험 중 0.0625~0.25%의 범위에서 나타났으며, 표준균주에 대한 MIC는 0.25%로 나타났다.



a. Horseradish extract (80000ppm = 8%)



b. Chlorhexidine (5%)

Fig. 2. Antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* 1.

Table 1. MIC values for horseradish root extracts and chlorhexidine towards *S. mutans* (Mean±Standard deviation)

Strains	Horseradish Root Extracts (%)	Chlorhexidine (%)
<i>S. mutans</i> 1	0.167±0.072	0.0025±0.0022
<i>S. mutans</i> 2	0.25±0	0.0029±0.0019
<i>S. mutans</i> 3	0.125±0.108	0.0025±0.0022
<i>S. mutans</i> 4	0.083±0.036	0.0021±0.0008
<i>S. mutans</i> KCTC 3065	0.25±0	0.0041±0.0014

Table 2. MBC values for horseradish root extracts and chlorhexidine towards *S. mutans* (Mean±Standard deviation)

Strains	Horseradish Root Extracts (%)	Chlorhexidine (%)
<i>S. mutans</i> 1	0.667±0.289	0.0083±0.0029
<i>S. mutans</i> 2	0.833±0.289	0.0067±0.0029
<i>S. mutans</i> 3	0.417±0.144	0.0067±0.0029
<i>S. mutans</i> 4	0.417±0.144	0.0067±0.0029
<i>S. mutans</i> KCTC 3065	0.667±0.289	0.0083±0.0029

2. 클로르헥시딘의 MIC

임상 분리균주 및 표준균주에 대한 클로르헥시딘의 MIC를 측정 한 결과는 Table 1과 같다. 임상 분리균주에 대한 MIC는 평균 0.0025% 근처로 나타났으며 표준균주에 대한 MIC는 평균 0.0041%로 나타났다.

3. 최소살균농도(MBC)

1. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MBC

각 균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MBC를 측정 한 결과는 Table 2와 같다. MIC에서와 마찬가지로 균주마다 다소의 차이는 있었으나 임상 분리균주에 대한 MBC는 3회의 실험중 0.25~1%의 범위에서 나타났고, 표준균주에서는 0.5~1%의 범위에서 살균효과를 나타내었다.

2. 클로르헥시딘의 MBC

각 균주에 대한 클로르헥시딘의 MBC를 측정 한 결과는 Table 2와 같으며, 임상 분리균주와 표준균주간의 뚜렷한 차이 없이 0.01~0.005%에서 살균 효과를 나타냈다.

IV. 총괄 및 고찰

서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균성분 중 가장 항균 활성이 높은 allyl isothiocyanate (AIT)는 천연화합물로서, 식물체 내에서 포도당 및 황산수소칼륨과 결합된 glucosinolate, 즉 sinigrin이라는 향과 맛이 없는 안정된 화합물 상태로 존재하는데, 세포가 외부의 물리적인 힘에 의해 파괴되면 효소 myrosinase의 작용으로 AIT와 glucose, KHSO₄ 등이 생성되어 비로소 강렬한 신미가 생성된다^{43,44}. AIT의 항균 기전에 대해서 정확히 밝혀진 바는 없으나, AIT에 의한 미생물의 단백질 구조의

변화^{45,46} 혹은 산소섭취(oxygen uptake)와 같은 미생물 대사 작용의 변화⁴⁷ 등의 주장이 제기되고 있다.

본 연구에서 사용된 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 식물체의 정유로서 물에는 쉽게 녹지 않는 상태로, 희석 시 증류수나 멸균 배지와 혼합할 경우 비중이 더 높은 고추냉이 뿌리 추출물이 바닥으로 침전하게 된다. 이러한 경우 정유와 증류수의 분리 현상으로 인해 희석 시 농도의 오차가 발생할 수 있다. 에탄올과 혼합한다면 균일한 희석액을 얻을 수 있으나 에탄올 자체의 항균 작용으로 인해 상승 효과가 나타날 수 있으므로, 순수하게 고추냉이 뿌리 추출물만의 항균 효과를 평가하기 위해 정유의 희석은 멸균 배지로 시행하였다. 멸균 배지와 혼합 시 고추냉이 뿌리 추출물의 침전 및 분리 현상을 방지하기 위하여, 시료와 멸균 배지를 에펜도르프 튜브에 넣어 vortexing하는 방식으로 혼합하였다. 이러한 와류혼합방법을 통해 고추냉이 뿌리 추출물은 분산되어 알맹이의 부유물이 되고 배지와 균일하게 혼합이 가능하였다. 또한 밀폐가 가능한 에펜도르프 튜브를 사용함으로써 휘발성이 높은 고추냉이 뿌리 추출물 성분의 손실을 방지하였다.

Disk paper method를 이용하여 임상 분리균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘의 항균활성을 알아본 결과 두 군 모두에서 투명환을 형성하여 항균효과를 나타냄을 알 수 있다. 그러나 투명환의 모양이나 colony의 성장 양상은 두 군에서 다르게 나타났다. 유 등⁴¹의 보고에서와 같이, 클로르헥시딘은 disk paper 주위로 경계가 분명한 투명환을 형성한 반면, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 경우는 투명환의 경계가 불분명 하였으며, 주위 colony의 성장 양상이 성긴 모양으로 나타났다. 이것은 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 휘발성으로 인해 paper disk 인접한 부위의 세균 뿐 아니라 다소 떨어진 부위의 세균들까지 영향을 받은 결과로 생각된다.

서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 실험 결과, 사람의 구강내에

서 유래된 *S. mutans* 임상 분리균주의 MIC는 0.0625~0.25%, 표준균주의 MIC는 0.25%으로 나타났고, MBC의 경우에는 임상 분리균주는 0.25~1%, 표준균주는 0.5~1%의 수치를 기록하였다. 실험 대상 균주의 숫자가 적어 통계적인 분석은 시행하지 않았으나, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물이 *S. mutans* 임상 분리균주에 대하여 표준균주보다 같거나 약간 낮은 농도에서 항균 효과를 나타낸다는 사실을 확인할 수 있었다. 이는 클로르헥시딘에서도 마찬가지로 임상 분리균주에 대한 MIC는 약 0.0025%, 표준균주에 대한 MIC는 약 0.0041%를 기록하였고, MBC는 두 종류의 균주 모두 0.005~0.01%의 범위에서 나타났다. Lim 등⁹⁾은 녹차 추출물이 표준균주인 *S. mutans* KCTC 3065와 *S. sobrinus* KCTC 3088에 대해 동일한 세균 성장 억제 효과를 보였으나, 교정 환자로부터 분리된 균주들에 대한 효과에서는 차이가 있었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과는 임상 분리균주와 표준균주간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

균주의 동정 시 그람염색, colony의 형태, 생장필수요소, 효소 및 대사활성 등의 표현형적 특성(phenotypic profile)을 이용하는 전통적 방법은 결과가 안정적이지 않으며, 표현형적 특성은 외부의 스트레스나 세균의 진화에 의해 변화할 가능성이 있다⁴⁸⁾. 따라서 현대에는 보다 정확하고 빠른 균주의 동정을 위해 면역학적 방법, 유전학적 방법, 중-특이 primer를 사용한 polymerase chain reaction(PCR) 등의 방법을 사용하는 추세가 증가하고 있다. 본 연구에서는 두 종류의 API kit를 사용하여 1차적인 동정을 시행하고, 최종적으로 유전학적 방법을 선택하여 16s rRNA sequencing을 사용한 균주의 동정을 시행하였다. 16s rRNA sequencing은 가장 정확하나 고가의 비용으로 인해 시행이 어려운 Full genome sequencing을 대신하여 최근들어 널리 사용되고 있으며, 균종간의 16s rRNA gene sequence 차이로 균주를 동정하는 방법이다. 이 방법은 완벽하다고는 할 수 없으나 세균의 동정에 더욱 객관적이고 정확하며 신뢰할만한 방법으로 여겨지고 있다⁴⁹⁾.

이번 연구는 다음과 같은 몇 가지 한계점을 가지고 있다. 첫째, 본 연구에서는 사람의 구강에서 분리되어 *S. mutans*로 동정된 임상 분리균주 4주를 대상으로, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과를 평가하고, 그 결과를 표준균주에 대한 항균 효과와 비교하였다. 이 때 실험 대상이 된 임상 분리균주의 수가 적어 모든 사람의 구강에 존재하는 *S. mutans*에 서양산 고추냉이 뿌리 추출물이 효과가 있다고 일반화시키기는 어려운 점이 있다.

둘째, 이번 연구에서는 치아우식증의 주요 원인균인 *S. mutans*만을 구강내에서 분리하여 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과를 실험하였으나, *S. mutans* 이외에도 사람의 치아우식증과 관련되어 있는 *S. sobrinus*, *Lactobacillus* 종, *Actinomyces* 종 등의 세균도 구강내에서 분리하여, 이들 균주에 대해서도 항균 효과를 평가할 필요가 있다. 또한 치아우식증 관련

세균 외에도 치주질환이나 치근단 병소 등 다양한 구강내 질환과 관련된 세균에 대해서도, 임상 분리균주를 대상으로 한 연구가 필요하다.

셋째, 또한 이번 연구는 *in vitro*에서 진행된 실험으로, 추후 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 이용한 구강용 제제의 개발을 위해서는 *in vivo*에서의 항균 효과도 연구되어야 할 것이다.

마지막으로 본 연구에서는 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 효과를 클로르헥시딘과 비교하였는데, 추후 진행될 연구에서는 천연추출물을 원료로 하는 구강양치액인 리스테린(Listerine® Antiseptic, Pfizer Inc., Morris Plain, NJ, USA)과의 비교 연구도 필요할 것으로 생각된다. 리스테린은 0.064% thymol, 0.092% eucalyptol, 0.060% methyl salicylate, 0.042% menthol등의 에센셜 오일을 함유하는 구강양치액으로, 그 항균 효과는 다수의 연구들에서 밝혀진 바 있다⁵⁰⁻⁵³⁾. Overholser 등²⁴⁾에 의하면 리스테린을 0.12% 클로르헥시딘과 비교한 결과, 두 양치액 모두 치은연상세균막과 치은염을 감소시키는데 효과가 있었으나, 항균 효과면에서는 클로르헥시딘이 우수하였고, 반면 외인성 치아 착색이나 치석 형성 등의 부작용은 리스테린 사용시 유의하게 적게 나타났다고 보고하였다. 리스테린은 구미 국가에서는 널리 사용되고 있는 구강위생제제이나, 사용시 맛이 좋지 않고 작열감이 심하여 국내에서는 거의 사용되지 않고 있는 실정이다. 리스테린의 항균 성분이 천연추출물이라는 점에서는 서양산 고추냉이 추출물과 유사한 점이 있으나, 리스테린은 12세 미만의 아동에게는 삼킬 위험이 있어 사용이 추천되지 않는 제재임을 고려하면, 향신료로서 식품에 자유롭게 첨가가 가능한 고추냉이가 더욱 인체에 안전하면서 효과적인 항균 제제로 개발될 수 있을 것으로 생각된다.

몇 가지 한계점이 존재함에도 불구하고 이번 연구는 구강내에서 유래한 *S. mutans* 임상 분리균주를 대상으로 고추냉이 뿌리 추출물의 효과를 평가하였다는 점에서 의의가 있다. *S. mutans*의 표준균주와 임상 분리균주간에 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과가 큰 차이가 없음을 밝힘으로써 이후에 시행될 구강내에서의 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과 실험에 중요한 토대가 될 것으로 생각된다.

V. 결 론

서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 *S. mutans* 임상 분리균주에 대한 항균 효과를 대표적인 구강용 항균제인 클로르헥시딘과 비교하여 알아보고, 표준균주에 대한 항균 효과와의 차이를 평가하기 위해 본 연구를 시행하였다. 강릉대학교 치과병원 소아치과에 내원한 12세 미만의 환아들에서 치면세균막을 채취하여 *S. mutans* 임상 분리균주를 얻었으며, 이들의 동정은 API kit와 16s rRNA sequencing으로 시행하였다. 이들 분리균주와 표준균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 연구에서 *S. mutans* 임상 분리균주에 대한 서양산 고

추냉이 뿌리 추출물의 최소억제농도는 평균 0.083~0.25% (833.33~2500 ppm)이었으며, 표준균주에 대한 최소억제농도는 평균 0.25%(2500 ppm)으로 나타나, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 *S. mutans* 임상 분리균주에 대하여 표준균주와 같거나 약간 낮은 농도에서 항균 효과를 나타냄을 확인하였다.

2. *S. mutans* 임상 분리균주와 표준균주에 대한 클로르헥시딘의 최소억제농도는 각각 평균 0.0021~0.0029%, 0.0041%로 조사되었으며, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 마찬가지로 임상 분리균주에 대한 항균 효과가 약간 더 낮은 농도에서 나타났으나 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.
3. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 0.083~0.25%의 농도에서 클로르헥시딘(0.0021~0.0041%)과 대등한 항균 효과를 가지는 것으로 나타났으며, 이후 구강 내 실험을 통하여 실제로 사용될 항균성 제제의 농도 결정이 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Fitzgerald RJ, Keyes PH : Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J Am Dent Assoc, 61:9-19, 1960.
2. Michalek SM, McGhee JR, Shiota T, et al. : Virulence of *Streptococcus mutans* : Cariogenicity of *S. mutans* in adult gnotobiotic rats. Infect Immun, 15:466-471, 1977.
3. De Stoppelaar JD, Van Houte J, Backer Dirks O : The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. Caries Res, 3:190-199, 1969.
4. Krasse B : Relationship between caries activity and the number of lactobacilli in the oral cavity. Acta Odontol Scand, 12:157-172, 1954.
5. Jordan HV, Keyes PH, Bellack S : Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. J Periodontal Res, 7:21-28, 1972.
6. Gibbons RJ, Nygaard M : Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque forming streptococci. Arch Oral Biol, 3:1249-1262, 1968.
7. Loesche WJ : Dental Caries. A treatable infection. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, 1982.
8. Whiley RA, Beighton D : Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol,

- 13:195-216, 1998.
9. 임성훈, 서정순, 윤영주 등 : 녹차 및 결명자 추출물의 교정용 브라켓과 치면 사이의 경계부에서 분리된 mutans streptococci에 대한 항균 작용. 대한치과교정학회지, 33:381-389, 2003.
10. Loesche WJ : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev, 50:353-380, 1986.
11. van Houte J : Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res, 73:672-681, 1994.
12. Kohler B, Andreen I, Jonsson B : The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. Oral Microbiol Immunol, 3:14-17, 1988.
13. Coykendall AL : Classification and identification of the viridans streptococci. Clin Microbiol Rev, 2:315-328, 1989.
14. Carlsson P, Gaudour IA, Olsson B, et al. : High prevalence of mutans streptococci in a population with extremely low prevalence of dental caries. Oral Microbiol Immunol, 2:121-124, 1987.
15. Fujiwara T, Sasada E, Mima N, et al. : Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0~2-year-old children of Japan. Community Dent Oral Epidemiol, 19:151-154, 1991.
16. Hirose H, Hirose K, Isogai E, et al. : Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. Caries Res, 27:292-297, 1993.
17. 안승태, 박재홍, 이궁호 : 6세 이하의 어린이에서 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*의 분포에 관한 연구. 대한소아치과학회지, 32:207-215, 2005.
18. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, et al. : Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J Clin Microbiol, 40:1001-1009, 2002.
19. Weitz M, Brownstein G, Deasy M : Effect of a twice daily 0.12% chlorhexidine rinse on the oral health of a geriatric population. Clin Prev Dent, 14:9-13, 1992.
20. Loe H, Schiott CR : The effect of mouthrinses and topical applications of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. J Periodontal Res, 5:79-83 1970.
21. Loe H, Schiott CR, Karring G, et al. : Two years oral use of chlorhexidine in man. 1. General design and clinical effects. J Periodontal Res, 11:135-144, 1976.
22. Lang NP, Hotz P, Graf H. et al. : Effects of super-

- vised chlorhexidine mouthrinses in children. A longitudinal clinical trial. *J Periodontal Res*, 17:101-111, 1982.
23. Grossman E, Reiter G, Sturzenburger OP, *et al.* : Six-month study of the effects of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults. *J Perio Res*, 21:33-43, 1986.
 24. Overholser CD, Meiller TF, DePaola LG, *et al.* : Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*, 17:575-579, 1990.
 25. Featherstone JD, Zero DT : Laboratory and human studies to elucidate the mechanism of action of fluoride-containing dentifrices. In: Embery G, Rolla R, eds. *Clinical and biological aspects of dentifrices*. Oxford, England: Oxford University Press: 1992:41-50.
 26. Lagerlof F, Oliveby A : Clinical implications : new strategies for caries treatment. In: Stookey GH, Beiswanger B, eds. *Indiana Conference 1996: Early Detection of Dental Caries*. Indianapolis: Indiana University School of Dentistry; 1996.
 27. Hennessey TS : Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontol Res*, 8:61-67, 1973.
 28. Budtz-Jorgensen E, Loe H : Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. *Scand J Dent Res*, 80:457-464, 1972.
 29. Davies A : The mode of action of chlorhexidine. *J Periodont Res*, 8:68-75, 1973.
 30. Schaupp H, Wohnaut H : Disturbance of taste from oral disinfectants. *HNO*, 26:335-341, 1978.
 31. Bergstorm J, Holmberg B : The effect of chlorhexidine emulsion on plaque. An infra individual study of local application. *Swed Dent J*, 66:461-465, 1973.
 32. Gildemeister E, Fr Hoffmann : *The volatile oils*. John Wiley & Sons Inc. 2nd ed., p516, 1961.
 33. Hitomi Kumagai : Analysis of volatile components in essential oil of upland wasabi and their inhibitory effects on platelet aggregation. *BiosciBiotechBiochem*, 58:2131-2135, 1994.
 34. Kazuo Ina : Volatile components of wasabi (*Wasabia japonica*) and horseradish (*Cochleria armoracia*). *Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi*, 18:365-370, 1981.
 35. Nishida M : Studies on the pungent component. Antibacterial properties of essential oil of *Eutrema wasabi* Maxim. *Yakugaku Zasshi*, 78:435-443, 1958.
 36. Inoue S, Goi H, Miyauchi K, *et al.* : Inhibitory effect of volatile constituents of plants on the proliferation of bacteria-Antibacterial activity of plant volatiles. *J Antibact Antifung Agents*, 11:609-615, 1983.
 37. Hasegawa N, Matsumoto Y, Hoshino A, *et al.* : Comparison of effects of *Wasabia japonica* and allyl isothiocyanate on the growth of four strains of *Vibrio parahaemolyticus* in lean and fatty tuna meat suspensions. *Int J Food Microbiol*, 49:27-34, 1999.
 38. Il Shik Shin, Hideki Masuda, Kinai Naohide : Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *Int J Food Microbiol*, 94:255-261, 2004.
 39. 신일식, 이정모 : 고추냉이 뿌리의 항균활성 및 항변이원활성에 대한 연구. *한국수산학회지*, 31:835-841, 1998.
 40. Masuda H, Inoue T, Kobayashi Y : Anticaries effect of Wasabi components. *ACS symposium series* 859:142-153, 2003.
 41. 유난영, 박호원, 이주현 등 : 구강내 미생물에 대한 서양산 고추냉이 (*Armoracia rusticana*) 뿌리 추출물의 항균 효과. *대한소아치과학회지*, 33:447-456, 2006.
 42. Bamba H, Kondo Y, Wong RM, *et al.* : Evaluation of an assay method of the susceptibility of antimicrobial agents using a 96-well flat-bottom microplate and a microplate reader. *Am J Gastroenterol*, 92:659-664, 1997.
 43. Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ : Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 18:123-201, 1983.
 44. Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, *et al.* : A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact*, 103:79-129, 1997.
 45. Kawakishi S, T Kaneko : Interaction of oxidized glutathione with allyl isothiocyanate. *Phytochemistry*, 24:715-718, 1985.
 46. Kawakishi S, T Kaneko : Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. *J Agri Food Chem*, 35:85-88, 1987.
 47. Kojima M, K Ogawa : Studies on the effect of isothiocyanates and their analogues on microorganisms: (I) effects of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeasts. *J Ferment Technol*, 49:740-746, 1971.
 48. Ochman H, Lerat E, Daubin V : Examining bacteri-

- al species under the specter of gene transfer and exchange. Proc Natl Acad Sci USA, 102:6595-6599, 2005.
49. Clarridge JE 3rd : Impact of 16s rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev, 17:840-862, 2004.
 50. Bauroth K, Charles CH, Mankodi SM, *et al.* : The efficacy of an essential oil antiseptic mouthrinse vs. dental floss in controlling interproximal gingivitis : a comparative study. J Am Dent Assoc, 134:359-365, 2003.
 51. Fornell J, Sundin Y, Lindhe J. : Effect of Listerine® on dental plaque and gingivitis. Scand J Dent Res, 83:18-25, 1975
 52. Lusk SS, Bower GM, Tow HD, *et al.* : Effects of an oral rinse on experimental gingivitis, plaque formation, and formed plaque. J Am Soc Prev Dent, 4:31-34, 1974.
 53. Sharma N, Charles CH, Lynch MC *et al.* : Adjunctive benefit of an essential oil-containing mouthrinse in reducing plaque and gingivitis in patients who brush and floss regularly. A six-month study. J A Dent Asso, 135:496-504, 2004.

Abstract

THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF HORSERADISH(*ARMORACIA RUSTICANA*)
ROOT EXTRACTS AGAINST *STREPTOCOCCUS MUTANS* ISOLATED
FROM HUMAN DENTAL PLAQUE

Hye-Kyoung Kim, Ho-Won Park, Il-Shik Shin*, Ju-Hyun Lee, Hyun-Woo Seo

Department of Pediatric Dentistry, Oral Science Research Center, College of Dentistry, Kangnung National University
** Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University*

Recently interesting in development of antimicrobial agent from natural origin has been increased in these days. Many studies have been reported antimicrobial effect of Horseradish(*Armoracia rusticana*) root extracts against various microorganisms such as *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticu*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus parasiticus*, *Helicobacter pylori*. The main component related to antimicrobial activity in horseradish is well known as allyl isothiocyanate(AIT).

In this study, we investigated the antimicrobial effects of Horseradish(*Armoracia rusticana*) root extracts against *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque, *Streptococcus mutans* reference strain and compared with that of chlorhexidine.

Horseradish root extracts and chlorhexidine were tested to determine their minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC).

The result of this study can be summerized as follows:

1. Horseradish root extracts showed antimicrobial effect against both *S. mutans* isolated strain and reference strain, their MIC were respectively 0.083~0.25% (833.33~2500 ppm), 0.25% (2500 ppm). Horseradish root extracts showed antimicrobial effect against *S. mutans* isolated strain at same or slightly lower concentration compared with MIC of reference strain.
2. 0.083~0.25% horseradish root extracts showed similar antimicrobial effect with chlorhexidine (0.0021~0.0041%).

Key words : Horseradish(*Armoracia rusticana*) root extracts, Allyl isothiocyanate(AIT), *Streptococcus mutans*, Chlorhexidine, 16s rRNA sequence, API kit