大韓本草學會誌 제27권 제3호(2012년 5월)
Kor. J. Herbology 2012 ; 27(3) : 23-29
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2012.27.3.23

지유(地楡) 부탄올 분획물의 *Streptococcus mutans* 항균활성 및 항산화 효과

박근혜, 이진태, 안봉전*

대구한의대학교 화장품약리학과

Anti-microbial Effect on *Streptococcus mutans* and Anti-oxidant Effect of the Butanol Fractions of Sanguisorbae Radix.

Geun-Hye Park, Jin-Tae Lee, Bong-Jeun An*

Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Korea.

ABSTRACT

Objective : Sanguisorbae Radix(SO). that belong to Rosaceae is widely distributed in Asia including Korea, Japan and China. It has been used as traditional medicine from old times as a treatment for anti-inflammatory drugs. This study was designed to investigate the effects of n-BuOH fractions of SO on anti-oxidant effect and anti-microbial effect on *Streptococcus mutans (S. mutans)*.

Methods : The anti-microbial effect of *n*-BuOH fractions of SO. was assessed by the paper disk diffusion method and anti-oxidant effect was assessed by the DPPH radical scavenging effect, Superoxide anion radical scavenging effect and SOD like ability.

Results : DPPH radical scavenging of the *n*-BuOH fraction from SO in 50 ug/mL was shown to be Fr-2 (89.9%), Fr-3 (88.7%), Fr-4 (76.3%), Fr-1 (59.4%), Fr-5 (56.2%). Superoxside anion radical scavenging activity of the n-BuOH fraction from SO. in 50 ug/mL for Fr-3 was shown to be 78%. SOD-like activity of n-BuOH fraction from the SO in 1000 ug/mL for Fr-3 were shown to be 76.1% respectively. The *n*-BuOH fraction from the SO had high anti-microbial effect on *S. mutans*.

Conclusion : As a result, the *n*-BuOH fraction from SO. has good anti-microbial and anti-oxidant effects in a concentration-dependent manner.

Key words : Sanguisorbae Radix, anti-oxidant, anti-microbial

서 론

구강은 입술, 혀, 잇몸, 구강 점막으로 이루어진 인체에 중요한 기관으로 외부와 직접적으로 통하고 있어 환경적으로 세균들이 증식하기 알맞은 조건을 가지고 있다[1]. *Streptococcus mutans* (S. mutans)는 충치 원인균으로 glucosyltransferase (GTase) 라는 효소를 분비하며 GTase가 음식물 중 자당을 분해함으로써 불용성 글루칸 (glucan)을 형성한다. 글루칸은 구강내 다른 미생물들과 치아에 부착되어 치면 세균막 (dental plaque) 을 생성하고 이것은 치주질환의 원인이 된다[2]. 또, 산화적 스트레스에 의한 산화작용은 구강내 염증을 유발하기도 한다. 활성산소는 생체조직을 공격하여 세포를 산화, 손상시키는 유해산소로 인체 내의 대사과정에서 불가피하게 발생하며 병원체나 이물질을 제거하기 위한 생체방어 과정에서도 활성산소가 대량 발생하기도 한다[3]. 산화적 스트레스가 병적인 상태를 유발하게 되면, 체내 항산화 시스템은 산화적 스트레스를 제거하여 항상성을 유지하게 한다. 인체내 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) 등을 포함하는 항산화 관련 해독 효소 및 Vitamin C, α -tocopherol 등을 포함하는 항산화 물질들이 존재한다[4-8]. 이러한 항산화 효소 및 물질은 체내 대사과정에서 발생되는 활성산소를 적극적으로 억제함으로써, 이를 손상시키는 체외의 어떤 요인이 발생하지 않을 경우 산화-환원의 균형을 유지한다. 활성산소가 암, 만성형 염증성질환과 같은 인체질환을 유발하거나 악화시키는 주요 원인으로 알려지면서 식용 또는 약용식물로부터 합성 항산화제에 비해 항산화 효과

*Corresponding author
· Phone : +82-53-819-1435 · Fax : +82-53-819-1435 · E-mail : anbj@dhu.ac.kr
· 접수 : 2012년 4월 25일 · 수정 : 2012년 4월 28일 · 채택 : 2012년 4월 28일

가 동등하거나 우수한 천연소재를 발굴하여 각종 인체질환을 개선 또는 치료하기 위한 방향으로 연구되고 있다[9-10]. 지유(地楡)는 중국, 일본 및 우리나라 전 지역에서 널리 분포하고 있으며, 장미과(Rosacease)에 속한 오이풀과 같은 다년생 식물의 뿌리를 생약에서 지유(地楡)라 하고[11], 신맛과 쓴맛, 떫은맛을 내며 무향, 무독이다[12]. 한방에서 주로 양혈지혈(凉血止血)의 효과와 해독렴창(解毒斂瘡)의 효과가 있어 지혈과 상처부의의 치료에 사용되어왔으며[13] 특히, 피부염(皮膚炎), 점막염(粘膜炎), 습진(濕疹), 화상(火傷)에 외용하는 것으로 알려져 있다[14]. 지유(地楡)의 약리성분으로는 뿌리에 ziguglycoside Ⅰ,Ⅱ와 pomolic acid등이 함유되어 있고 가지에는 quercetin과 kaempferol의 배당체와 ursolic acid 등 triterpenoid계 saponin이 함유되어 있으며 잎에는 vitamin C, 꽃에는 chrysanthemin, cyanin이 함유되어 있다[15]. 본 연구에서는 항산화, 항균 효과가 우수한 천연소재 개발의 일환으로 한약재로 사용되어지고 있는 지유(地楡) 70% acetone 추출물에서 분획한 *n*-BuOH 분획물을 polystylene과 divinyl benzene이 중합된 수지 Diaion Hp-20 컬럼을 통과시켜 확보한 fraction(Fr-1~Fr-5)에서 항산화활성을 확인하였으며, 치주질환 효능 소재의 개발을 위한 기초 자료를 제공하기 위하여 GTase 억제 효과와 *S. mutans* 항균 효과를 함께 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 실험에 사용한 지유(地楡)는 경북 안동시 북후면에서 채취한 오이풀의 뿌리를 건조하여 이물질을 제거하고 세척한 후, 음건하여 실험재료로 사용하였으며, 표본시료는 대구한의대학교 화장품약리학과 신소재실험실에 보관하고 있다.

2) 시약 및 기기

항균력 측정 실험에서 사용한 공시 균주는 충치균 *Streptococcus mutans* (KCCM 11823)을 계대 배양하여 사용하였다. 전 배양 및 본 배양을 위한 액체배지는 brain heart infusion(BHI)를 Difco Lab. (Sparks, USA) 에서 구입하여 사용하였으며, 고체배지는 agar powder를 첨가하여 사용하였다. 항산화능 실험에 사용된 시약인 1-1-diphenyl N pyrogallol, nitro-blue tetrazolium (NBT) 등은 Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다. 실험에 사용된 기기는 BOD Incubator (Hanbaek Co. Korea), autoclave (Hanbaek Scientific Co. Korea), ELISA reader (Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 추출물의 제조

시료의 제조는 이물질을 제거하고 세척한 후, 음건하여 70% 아세톤을 시료 중량의 10배 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출 하여 추출물을 얻었다. 지유(地楡) 아세톤 추출물을 수용액으로 현탁하여, 용매의 극성에 따라 CHCl, EtOAc, n-BuOH, H_2O 층으로 순차적으로 용매 분획하여 Fig. 1.과 같이 n-BuOH 분획물을 얻은 후, Diaion Hp-20 컬럼을 이용하여 H_2O : MeOH (0:100% → 100%:0) 통과시켜 본 실험의 시료로 사용하였다.

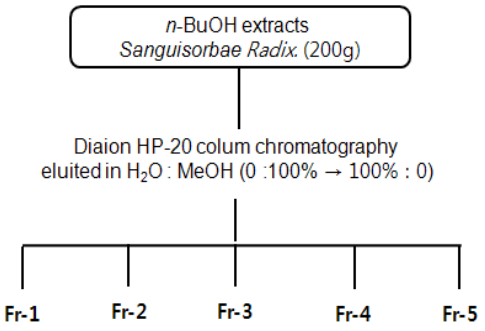


Fig. 1. Purification procedure for the solvent fraction from SO.

2) DPPH radical 소거능 측정

DPPH 전자공여능 (EDA; electron donating ability)은 Blois의[16] 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액 2 mL에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 1 mL 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무 첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

3) Superoxide anion radical 소거능 측정

Superoxide anion radical 소거능은 nitro-blue tetrazolium (NBT) 환원방법에 의해 측정하였다[17]. 각 시료용액 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.4 mL에 Xanthine (0.4 mM)과 NBT (0.24 mM)을 녹인 기질액 1 mL을 첨가하고 xanthine oxidase (0.2 U/mL) 1 mL를 가하여 37℃에서 20분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL을 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응 액 중에 생성된 superoxide anion radical의 양을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

4) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성능 측정

SOD 유사활성은 Marklund의[18] 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.2 mL에 Tris-HCl의 완충용액(50 mM Tris+10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1.0 N HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유

사활성은 시료용액의 실험구와 대조구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

5) GTase 활성 억제효과

각 시료의 GTase에 의한 gulcan의 합성을 저해하는 정도를 비교하기 위하여 Miyoshi의[19] 방법을 사용하였다. *S. mutans* 배양액을 4℃에서 8,000 rpm, 5분간 원심분리 후 그 상등액을 취하여 여과지(Whatman paper NO.2)로 여과하고, 그 여액을 1N NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정한 다음 sodium azide를 0.02% 첨가하여 GTase 조효소액을 제조하였다. 조효소액 0.5mL에 2% sucrose 1mL과 농도별 시료 0.05mL를 첨가하고 37℃, 24시간 반응시킨 후 voltex하여 생성된 glucan을 분산시키고 660 nm에서 탁도를 측정하여 sucrose 무첨가군과 비교한 상대치로 glucan 생성 억제 정도를 측정하였다.

6) 생육 저해환 (Clear zone) 측정

항균력 측정은 paper disc법[20]으로 측정하였다. 평판 배지에 single colony 배양된 각 균주를 1 백금이를 취해서 액체배지 10 mL에서 18~24시간 배양하여 활성화시킨 후, 다시 액체배지 10 mL에 균액을 0.1 mL접종하여 3~6시간 본 배양한 후 평판배지 1개당 균수가 약 1×10^7 cells이 되게 접종하여 멸균 면봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 filter paper disc (8 mm, Whatman, Japan)를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 50 uL/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켜 37℃에서 18~24시간 배양하여 disc 주위의 clear zone (mm)의 직경을 측정하였다.

결 과

1. 수율

지유(地楡) n-BuOH fraction은 각 Fr-1 (64.0g), Fr-2 (25.3g), Fr-3 (68.0g), Fr-4 (50.2g), Fr-5 (11g)을 얻었으며, Fr-1과, Fr-3에서 수율이 가장 높음을 확인했다 (Table 1).

Table 1. Yields of fractions isolated from SO.

Samples	Yeild (g)
1	64.0
2	25.3
3	68.0
4	50.2
5	11

1 : H2O 100% isolated from SO.
2 : Methanol 20% isolated from SO.
3 : Methanol 40% isolated from SO.
4 : Methanol 60% isolated from SO.
5 : Methanol 100% isolated from SO.

2. 항산화효과

1) DPPH radical 소거능

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 비교적 안정화된 radical로 추출물들의 생리활성 물질이 DPPH와 반응하여 환원되어 자색으로 탈색되는 정도에 따라 활성 정도를 측정한다. 자유라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 DPPH radical 소거능은 자유라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다. 지유(地楡) *n*-BuOH 분획물의 fraction의 전자공여능을 측정결과는 Fig. 2 에서와 같이 50 μg/mL 농도에서 Fr-2 (89.9%), Fr-3 (88.7%), Fr-4 (76.3%), Fr-1 (59.4%), Fr-5 (56.2%) 순으로 radical 소거능을 확인하였으며, Fr-2에서 가장 높은 전자공여능을 확인 할 수 있었다. 대조군 EGCG와 비교하면 동일한 농도에서 다소 낮은 효능을 나타냈지만 EGCG는 단일물질이며 Fr-2를 ODS colum으로 분리한다면 더 높은 효능효과를 기대 할 수 있으리라 사료된다.

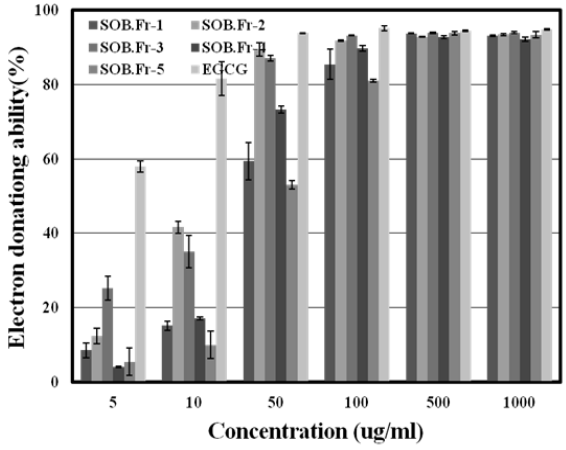


Fig. 2. Electron donating ability of constituents isolated from SO.

SOB.Fr-1 : H_2O 100% isolated from SO.
SOB.Fr-2 : Methanol 20% isolated from SO.
SOB.Fr-3 : Methanol 40% isolated from SO.
SOB.Fr-4 : Methanol 60% isolated from SO.
SOB.Fr-5 : Methanol 100% isolated from SO.
EGCG : (-)-epigallo-catechin-3-O-gallate.
Results are means ± S.D. of triplicate data.

2) Superoxide anion radical 소거능

Superoxide anion radical 소거능 측정은 xanthine oxidase가 xanthine을 기질로 하여 uric acid를 생성하는 과정에 생성되는 superoxide anion radical을 지유(地楡) *n*-BuOH fraction 과 반응시켜 nitro blue tetrazolium (NBT)로 radical 소거능을 확인하는 방법이다. Xanthine oxidase에 의해 생성되는 radical의 생성저해 효과는 Fig. 3과 같이 지유(地楡) *n*-BuOH fraction (50 μg/mL)에서 Fr-3 (78%)와 Fr-2 (60%)의 높은 radical 소거능을 확인하였으며, Fr-2와 Fr-4, 5는 60% 이하의 radical 소거능을 확인하였다. 대조군인 vit-C와 비교할 때 Fr-5를 제외한 다른 fraction에서 vit-C보다 우수한 효능을 확인하였다.

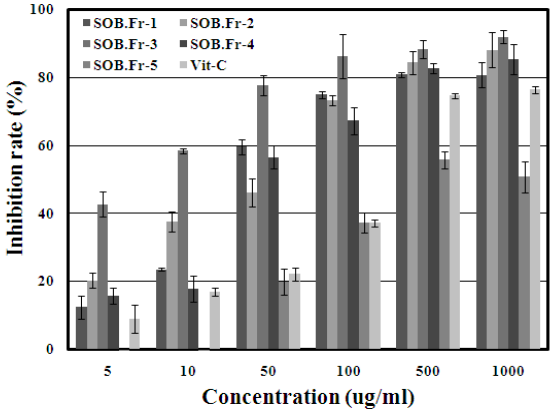


Fig. 3. Superoxide anion radical scavenging activity of constituents isolated from SO.

SOB.Fr-1 : H_2O 100% isolated from SO.
SOB.Fr-2 : Methanol 20% isolated from SO.
SOB.Fr-3 : Methanol 40% isolated from SO.
SOB.Fr-4 : Methanol 60% isolated from SO.
SOB.Fr-5 : Methanol 100% isolated from SO.
Vit-C : L-ascorbic acid.
Results are means ± S.D. of triplicate data.

3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성능

항산화 효소중의 하나인 superoxide dismutase(SOD)는 천연 항산화제이며 SOD 유사활성능은 superoxide와 반응하여 갈변현상을 나타내는 pyrogallol의 자동산화 반응 억제능을 측정하는 방법이다[21]. 지유(地楡) *n*-BuOH 분획물 fraction의 SOD 유사활성을 측정한 결과 Fig. 4과 같이 Fr-3 (1000 μ g/mL) 농도에서 76.1%의 효능 효과를 확인하였다. 대조군인 Vit.C와 비교하면 낮은 효능 효과를 확인하였지만, 시료의 농도가 증가함에 따라 활성이 증가함을 확인하였다.

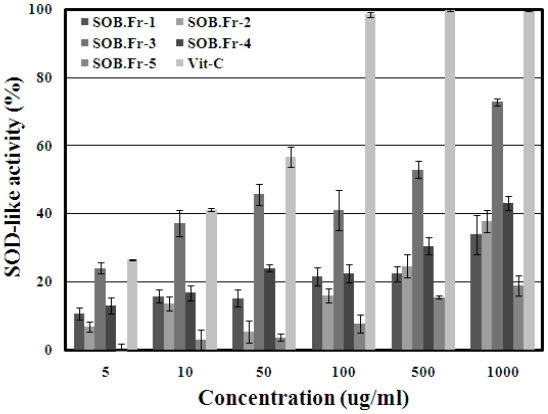


Fig. 4. SOD-like activity of constituents isolated from SO.

SOB.Fr-1 : H_2O 100% isolated from SO.
SOB.Fr-2 : Methanol 20% isolated from SO.
SOB.Fr-3 : Methanol 40% isolated from SO.
SOB.Fr-4 : Methanol 60% isolated from SO.
SOB.Fr-5 : Methanol 100% isolated from SO.
Vit-C : L-ascorbic acid.
Results are means ± S.D. of triplicate data.

3. GTase 억제효과

*S. mutans*의 GTase 활성저해가 가장 유효한 충치 예방수단으로 인정되고[22] 있으므로 지유(地楡) n-BuOH 분획물 fraction의 Gtase의 활성에 미치는 영향을 확인한 결과 Fig. 5와 같이 전체 fraction에서 60% 이하의 낮은 저해활성을 보였지만 양성대조군인 EGCG의 GTase 억제능이 60% 정도의 저해활성을 보임과 비교하면 양호한 활성을 확인하였다. 또한 농도 의존적으로 GTase 활성이 증가하였다. 이와같은 결과로 GTase 억제능은 극성이 낮은 fraction 보다는 극성이 높은 fraction에서 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

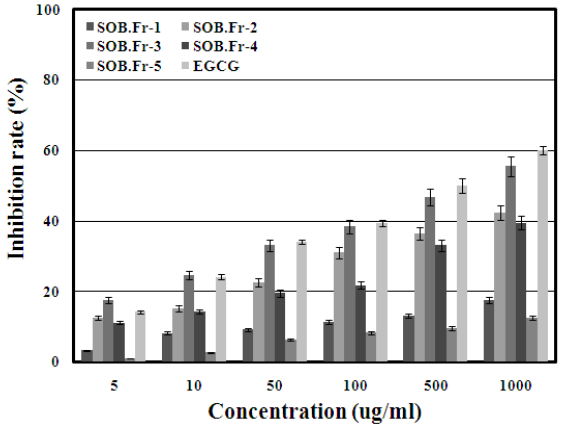
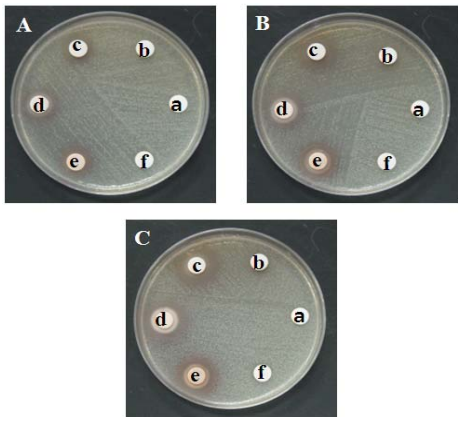


Fig. 5. Inhibition rate of constituents isolated from SO. on GTase.

SOB.Fr-1 : H_2O 100% isolated from SO.
SOB.Fr-2 : Methanol 20% isolated from SO.
SOB.Fr-3 : Methanol 40% isolated from SO.
SOB.Fr-4 : Methanol 60% isolated from SO.
SOB.Fr-5 : Methanol 100% isolated from SO.
EGCG : *(-)-epigallo-catechin-3-O-gallate.*
Results are means ± S.D. of triplicate data.

4. 항균효과

지유(地楡) *n*-BuOH 분획물 fraction의 항균 효과를 알아보기 위하여 *S. mutans* 균 배양 한 후 시료를 농도별 (1, 2, 4 %)로 처리하여 24~48 시간 후에 항균활성을 확인하였다. 결과 Fig. 6 에서 나타난 바와 같이, 지유(地楡) *n*-BuOH 분획물 fraction을 1%, 2%, 4%의 농도로 처리하였을 때 clear zone이 형성되었으며, a, b, f (water, Fr-1, 5)에서는 항균활성을 나타내지 않았다. c, d, e (Fr-2, 3, 4)의 2% 농도에서 각 8 mm, 7 mm, 7 mm, 생육저해 환이 형성되었으며 추출물의 농도에 비례하여 효능이 증가하는 것을 알 수 있었다 (Table 2).



A : 1mg/disc. B : 2mg/disc. C : 4mg/disc.

Fig. 6. Antimicrobial activity of constituents isolated from SO. on *S. mutans*.

a : Water
b : (Fr-1) H_2O 100% isolated from SO. (Fr-1)
c : (Fr-2) Methanol 20% isolated from SO.
d : (Fr-3) Methanol 40% isolated from SO.
e : (Fr-4) Methanol 60% isolated from SO.
f : (Fr-5) Methanol 100% isolated from SO.
Results are means ± S.D. of triplicate data.

Table2. Antimicrobial activity of constituents isolated from SO. on *S. mutans*.

Materials	(mg/disc)		
	A	B	C
a	–[a']	–	–
b	–	–	–
c	3[b'] ± 0.3	8 ± 0.1	10 ± 0.8
d	6 ± 0.7	7 ± 0.1	9 ± 0.2
e	5 ± 0.1	7 ± 0.5	9 ± 0.2
f	–	–	–

a': no inhibition, b': inhibition zone diameter(mm)

a : Water
b : (Fr-1) H_2O 100% isolated from SO.
c : (Fr-2) Methanol 20% isolated from SO.
d : (Fr-3) Methanol 40% isolated from SO.
e : (Fr-4) Methanol 60% isolated from SO.
f : (Fr-5) Methanol 100% isolated from SO.
(A: 1mg/disc, B: 2mg/disc, C: 4mg/disc)

고 찰

Hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radical, 산화질소를 포함하는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 조직손상이나 증가된 유해반응과 관련 되며, 치주질환(齒周疾患)의 원인 또는 진행 과정 중 발생하는 활성산소는 치주조직을 손상시켜 치주질환을 유발하거나 진행 중인 치주질환을 악화시키는 작용을 한다. 이러한 활성산소의 과산화지질이 정상적으로 소거되지 않았을 때, 구강 피부가 유리기로 인한 산화적 스트레스를 받게 되면서 변색이 되고 거칠어지며, 구강 각 부위에 염증 혹은 혓바늘이 생기게 된다. 산화적 스트레스를 줄임으로서 구강의 병적 질환을 치료할 수 있음을 알 수 있다. 산화적 스트레스는 산화환원 반응시 산화반응이 우세하여 생체 내 산화제와 항산화제 사이의 균형이 깨질 때 발생된다[23]. 이로 인해 초과 생성된 ROS (reactive oxygen species)는 다른 지방 성분들과 연쇄반응에 의하여 과산화지질(lipid peroxide)을 생성하고, 단백질과 DNA 손상, 및 변형, 생체막 손상 등을 일으킬 수 있다[24]. 그러나 신체는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 산화적 손상에 대항하여 신체를 보호하기 위한 효율적인 방어 시스템이 있으며[25] 그중 SOD는 세포에서 superoxide radical에 대한 첫 번째 방어기제로써 superoxide radical을 과산화수소와 물론 환원시키는 중요한 작용을 하기 때문에 산화적 스트레스에 대한 항산화 지표로서 많이 측정되고 있다[26]. Superoxide radical은 음이온 유리기로 한 개의 쌍을 이루지 않은 전자를 가지고 있으며 불안정하기 때문에 시간이 흐르면 분해되어 peroxidase를 형성한다. 인체 내에서 superoxide는 산화작용을 이용해 이물질을 제거하는 역할을 하는 NADPH 산화효소에 의해서 다량으로 만들어지며 노화 현상과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. 항산화효소 중의 하나인 superoxide dismutase (SOD)는 반응성이 매우 강한 superoxide radical ($\cdot O_2^- - \cdot 2O_2 + 2e^- \rightarrow 2\cdot O_2^-$)과 반응하여 hydrogen peroxide (H_2O_2)생성을 촉매 하는 효소로 산소를 소비하는 모든 생물 종에 존재하며 대표적인 활성산소 저해제이다. 가장 독성이 강한 hydroxy radical의 생성을 예방하는 작용을 하여 현재 항염증 소재나 피부 노화방지를 위한 미용소재로 화장품등의 첨가제로서 사용되어지고 있다. 또한, 충치의 원인인 *S. mutans*의 활성을 저해하여 GTase 활성을 저해함으로써 치주질환을 개선시킬 수 있으며, 구강내의 종합적인 치료와 예방을 위해서는 항균과 항산화 반응을 핵심으로 연구하는 것이 중요하다고 사료된다. 지유(地楡) *n*-BuOH 분획물에서 활성이 높은 부분을 분리하기 위하여 Diaion Hp-20 컬럼을 통과시켜 유기화합물을 흡착시킨 다음 유기용매의 비율을 높여 극성이 큰 화합물로 부터 극성이 작은 화합물 순으로 소분획하여 활성검증을 실시하였다. 본 연구의 실험결과에서 지유(地楡)에서 분리한 5가지 화합물(Fr-1~Fr-5)의 항균실험은 충치원인균인 *S. mutans*의 활성을 효과적으로 저해 시켰다. 그리고 Fr-2, 5 에서는 항균활성을 나타내지 않았지만, Fr-3, 4, 5에서는 2% 농도에서 생육저해 환이 형성되었으며, 추출물의 농도에 비례하여 항균활성이 증가함을 알 수 있었다. 항산화력 측정실험에서는 Fr-2와 Fr-3에서 가장 높은 DPPH radical 소거능과 Superoxide anion radical 소거활성을 확인하였다. SOD 유사활성능 측정에서는 DPPH radical 소거능과 Superoxide anion radical 소거능 보다는 활성이 낮음을 확인하였다. GTase 억제능 실험에서는 전체 시료에서 60% 이하의 낮은 저해활성을 보였지만 양성대조군인 EGCG의 GTase 억제능이 60% 정도의 저해활성을 보임과 비교하면 양호한 활성을 확인하였다. GTase 억제능에서도 Fr-3과 Fr-2의 시료가 가장 우수한 효능을 보임이 산화적 스트레스가 GTase 억제능에 연관관계가 있다는 보고와도 일치하였다. 본 연구를 종합한 결과 지유(地楡)는 우수한 항산화 활성, 항균활성 및 GTase억제능을 확인함으로 구강의 종합적인 질환들을 개선하고 예방할 수 있음을 기대할 수 있다고 사료되며, 관련 제품을 개발할때 본 연구결과를 기초자료로 활용할 수있으리라 사료된다.

결론 및 요약

본 실험에서는 지유(地楡) n-BuOH 소분획물의 항산화활성을 확인하였으며, 치주질환 효능 소재로 활용하고자 GTase 억제 효과와 *S. mutans* 항균효과를 함께 검증하였다. 실험을 통하여 분석한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 지유(地楡) n-BuOH 분획물의 Fr-3이 DPPH radical과 Superoxide anion radical 소거능에서 가장 높은 효능효과를 확인하였으며, 시료의 농도에 비례하여 활성이 증가함을 확인하였다.
2. 지유(地楡) n-BuOH 분획물(Fr-1~Fr-5)의 SOD 유사활성능은 500ug/ml의 농도에서 50% 이상의 효능으로 같은 농도에서 radical 소거능과 비교하면 낮은 효능효과를 확인하였다.
3. 지유(地楡) n-BuOH 분획물의 Gtase 억제능은 Fr-3이 가장 높은 효능을 나타내었으며, 500ug/ml의 농도에서

50%에 가까운 억제능을 확인하였다.

4. 지유(地楡) n-BuOH 분획물은 구강 내 충치원인균인 *S. mutans*의 활성을 효과적으로 저해하였으며, 농도 의존적으로 활성이 증가하였다.

이상의 실험결과 지유(地楡) n-BuOH 분획물이 우수한 항균력과 항산화 효능을 가지는 것으로 확인되었으며, 구강 질환을 개선하고 치료하는데 있어 합성제제 들을 대체 할 수 있는 치료 보조제로 적용 가능성이 있다고 본다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성사업(M-02-20090304152224)으로 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. Lee SL, Kim JG. Anti-microbial activity of soybean extract against oral microbes. Kor J Env Hlth. 2006 ; 32(2) : 192-197.
2. Park HS, Min KJ, Cha CG, song JW, son JC. Antimicrobial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell by extract of Paeonia lactiflora. Kor J Env Hlth. 2007 ; 33(1) : 21-29.
3. Aruoma OI. Free radical, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J Am Oil Chem soc. 1998 ; 75 : 199-212.
4. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. Curr Med Chem. 2010 ; 17(28) : 3262-3288.
5. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic Biol Med 1999 ; 27 : 916-921.
6. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. Mol Aspects Med. 2009 ; 30(1-2) : 29-41.
7. Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. Ann Hepatol. 2004 ; 3(3) : 86-92.
8. Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system : role and significance in human body. Indian J Exp Biol. 2002 ; 40(11) : 1233-1239.
9. Geronikaki AA, Gavalas AM. Antioxidants and inflammatory disease : synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. Comb Chem High Throughput Screen. 2006 ; 9 : 425-442.
10. Kumar S., Kuma D., Manjusha., Saroha K., Singh N., Vashishta B. Antioxidant and free radical scavenging potential of Citrullus colocynthis (L.) Schrad. methanolic fruit extract. Acta Pharm. 2008 ; 58 : 215-220.
11. An BJ, Lee JT, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee JY, son JH. Antioxidant effect and application as natural ingredients of Korean Sanguisorbae officinalis L. J Korean soc Appl Biol Chem. 2004 ; 47(2) : 244-250.
12. Lim JP. Herb biochemistry. Sinil books. 2003 : 247.
13. Seo BI, Jung KY. The comprehensible herbology. Daegu Haany University Press . 2004 : 267.
14. Son KJ, Lee SA, Lee G D, Kim YS, Jeon JG, Chang KY. Effects of crude Sanguisorbaofficinalis L. extract on the growth and the adherence to hydroxyapatite beads of mutans streptococci. J Korean acad dent health. 2004 ; 28(1) : 97-104.
15. Kang BS, Ko UC, Kim SH, No SH, Shin YB, Song HJ, Shin MG, Ann DG, Lee SI, Lee YJ, Lee TH, and Ju YS. Collaboration with a national college of oriental medicine herbology professor association. In Herbology. Yonglim Press, Seoul, Korea. 1994 : 392-393.
16. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958 ; 26 : 1199-1120.
17. Stirpe F and Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). J Biol Chem. 1969 ; 244(14) : 3855-3863.
18. Marklund S and Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974 ; 47(3) : 469-474.
19. Miyoshi M, Imoto T, Kasagi T. Antieurodontic effect of various fraction extracted from the leaves of Gymnema sylvestre. J Yonago Med Ass. 1987 ; 37 : 127-137.
20. Davidson PM and Parish ME. Method for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technol., 1989 ; 43 : 148-155.
21. Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M and Takahashi Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. phytochemistry. 1993 ; 33(3) : 557-561.
22. Kwon IB, Lee YW, An BJ, and Lee SY. Inhibitory effect of Cacao bean husk extract on Glicosyl transferase from Streptococus mutans B13. Korean J Biotechnol Bioeng. 1993 ; 8 : 75-82.
23. Ferreira, LF and Reid MB. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. J Appl physiol. 2008 ; 104(3) : 853-860.
24. Freeman BA and Crapo JD. Biology of disease, free radicals and tissue injury. Lab Inves. 1982 ; 47(5) : 412-426.

25. Wierzba TH, Olek RA, Fedeli D and Falcioni G. Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. J Physiol Pharmacol. 2006 ; 57(10) : 115-131.
26. Lloyd, D. Microbial ecology. How to avoid oxygen. Science. 1999 ; 286(5438) : 249.