

구강내 미생물에 대한 서양산 고추냉이(*Armoracia rusticana*) 뿌리 추출물의 항균효과

유난영 · 박호원 · 이주현 · 서현우

강릉대학교 치과대학 소아치과학교실 및 구강과학연구소

국문초록

서양산 고추냉이(*Armoracia rusticana*)는 향신료로서의 역할뿐만 아니라 항균 효과로도 주목을 받고 있다. 고추냉이의 항균성분은 isothiocyanate류로 그 중에서도 allyl isothiocyanate(AIT)가 항균활성이 강한 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 최소억제농도와 최소살균농도를 측정하여 다양한 구강내 미생물(*Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus*(d) ATCC 27607, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 29522, *Candida albicans* ATCC 10261)에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균효과를 알아보고, 이를 대표적 항균제인 클로르헥시딘의 항균활성과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 연구에 사용된 7종의 구강내 미생물에 대해 최소억제농도는 30-125ppm, 최소살균농도는 125-500ppm을 나타냈으며, 특히 세균보다는 효모인 *C. albicans*에 대해 강한 항균활성을 나타낸다.
2. 클로르헥시딘 역시 7종의 구강내 미생물에 대해 항균효과를 나타냈으며, 최소억제농도는 0.15-2.5%, 최소살균농도는 0.4-2.5%로 측정되었다.

이상의 결과로 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 클로르헥시딘과 비교하여 더 낮은 농도에서 클로르헥시딘과 유사한 정도의 항균효과를 나타냄을 알 수 있다.

주요어 : 서양산 고추냉이 뿌리 추출물, Allyl isothiocyanate(AIT), 클로르헥시딘, 항균효과

I. 서 론

사람의 구강내에는 약 500종 이상의 상주균이 존재하며, 그 수는 타액 1ml당 혹은 치면 세균막 1mg당 10^8 - 10^9 에 이른다¹⁾. 이 균들은 치아우식증이나 근관 감염, 그리고 치주 질환 등의 여러 구강내 질환의 주요 원인이 된다. 치아우식증은 치태 내 세균에 의해 치아 경조직이 탈회되는 현상으로, 주 원인균은 *mutans streptococci*(이하 MS)로 알려져 있으며²⁾, MS 중에서도 *S. mutans*와 *S. sobrinus*가 인간의 구강내에서 가장 많이 발견되고, 사람의 치아우식증과 가장 깊은 관련성을 갖고 있

다. *Lactobacillus acidophilus*와 *Lactobacillus casei* 등의 *Lactobacillus spp.*가 우식의 진행과정에 관련이 있으며, 일부 *Actinomyces*도 약간 관련이 있다고 한다³⁾. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*와 같은 그람 음성균은 종종 치주병소에서 분리되며 치주질환의 개시(onset) 및 진행과 연관있음이 밝혀져 왔다⁴⁻⁶⁾. 특히 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 급진성 치주염(aggressive periodontitis) 중 국소적 급진성 치주염의 주요 원인균으로 알려져 있다⁷⁾. 따라서, 질환에 연관이 있는 구강내 세균에 대한, 특히 치면 세균막에 영향을 미칠 수 있는 항균제의 사용은 치아우식증이나 치주질환을 예방하는데 중요한 역할을 할 수 있다.

클로르헥시딘(Chlorhexidine digluconate, CHX)은 양이온성 bisbiguanide계 화합물로서 이러한 목적으로 널리 사용되는 대표적인 항균제이다⁸⁾(Fig. 1). 클로르헥시딘은 그람 양성균,

교신저자 : 박 호 원

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

그람 음성균, 효모, 곰팡이, 통성 혐기성균, 호기성균 모두에 작용하는 광범위 항균제로⁹⁻¹¹⁾, 미생물의 세포벽에 흡착(adsorption)되어 세포내 물질(intracellular components)을 누출시킴으로써 그 작용을 나타낸다¹²⁾. 저농도에서는 칼륨이나 인과 같은 저분자량의 물질을 누출시킴으로써 정균효과를 나타내고, 고농도에서는 단백질 가교로 인한 세포질(cytoplasm)의 침전이나 응고를 야기해 살균효과를 나타낸다⁹⁾. 따라서, 항세균막(antiplaque) 치료의 "gold standard"로 치아우식증 예방과 치은염, 치주염 등의 치주질환의 치료 보조제로써 매우 효과적이며¹³⁾, 또한 근관치료시 근관세척용액이나 근관내 소독 목적으로도 사용되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 그러나 클로르헥시딘은 치아나 수복물의 변색을 일으키며, 그 외 미각저하증이나 미각이상¹⁷⁾, 입안에서 작열감을 유발할 수 있는 점 등의 문제를 가진다.

최근 여러 분야에서 합성물을 대체할 수 있는 천연물을 이용한 항균제 개발에 대한 관심이 증가되고 있다. 그 중 서양산 고

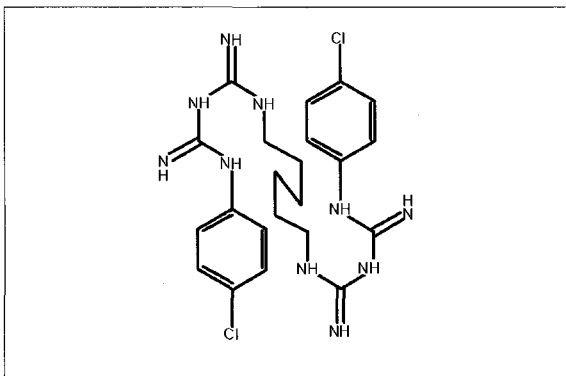


Fig. 1. Chemical structure of chlorhexidine digluconate.

추냉이(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. 고추냉이(*Wasabia japonica*)의 항균활성에 대해서는 일본에서 많은 연구가 진행되었으며, 고추냉이의 항균성분은 isothiocyanate류로 그 중에서도 allyl isothiocyanate(AIT)가 항균활성이 강한 것으로 보고된 바 있다¹⁸⁾. 휘발성 향기성분인 AIT는 매운맛의 주성분으로 고추냉이에서 추출된 정유 중에 약 80%를 차지하며 그 외 20여종의 휘발성 성분이 확인되었다^{19,20)}.

AIT는 식물체내에서 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^{21,22)}(Fig. 2).

앞선 연구들을 통해 다양한 세균에 대한 AIT의 항균효과를 확인할 수 있었다. Nishida²³⁾와 Inoue 등²⁴⁾은 일본산 고추냉이(*Wasabia japonica*)의 정유가 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*에 특히 강한 항균 효과를 나타낸다고 하였고, Hasegawa 등²⁵⁾은 일본산 고추냉이나 AIT가 *Vibrio parahaemolyticus*의 성장을 억제한다고 보고하였다. 또한 Shin과 Lee²⁶⁾와 Shin 등²⁷⁾은 일본산 고추냉이 뿌리 추출물이 식품의 부패나 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aspergillus parasiticus* 등에 항균활성이 있다고 하였으며, 동일한 추출물이 *Helicobacter pylori*에 대해서도 항균 효과가 있다고 보고하였다. 그러나 AIT가 구강내 세균에 미치는 항균효과에 대한 연구 결과는 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 효과적이고 경제적인 천연의 다양한 구강용 제재 개발의 기초 자료를 제공할 목적으로 구강 미생물에

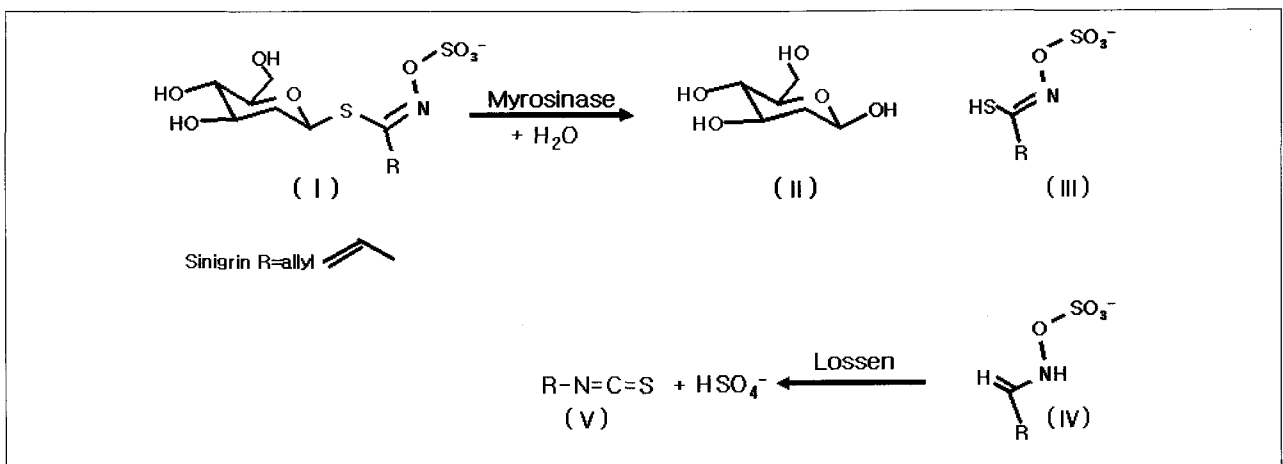


Fig. 2. Schematic of the degradation of β -D-S-glucosides (I) by myrosinase (β -thioglucoside glucohydrolase) and related biochemistry. The initial hydrolysis of (I) gives rise to glucose (II) and (III), which will be in equilibrium with (IV). (IV) is then thought to undergo a Lossen rearrangement to produce the isothiocyanate (V) and sulfate.

대한 서양산 고추냉이(*Armoracia rusticana*) 뿌리 추출물의 항균효과를 알아보고, 이를 대표적 항균제인 클로르헥시딘의 항균효과와 비교하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1.1 시료

서양산 고추냉이(Horseradish, *Armoracia rusticana*) 뿌리 분말은 중국에서 재배된 것으로 Biocoats Co. Ltd.(Seoul, Korea)에서 구입하여 시료로 사용하였으며, 항균 효과의 비교를 위해 5% 클로르헥시딘(알파헥시딘, Sungkwang Co. Ltd., Bucheon, Korea)을 사용하였다.

1.2 항균성 물질의 추출

증류수를 이용하여 서양산 고추냉이에서 항균성 물질을 추출하였다(Fig. 3). 고추냉이 분말 200g을 증류수 550mL와 혼합하여 AIT 생산을 최대화하기 위하여 40℃에서 120분간 유지시

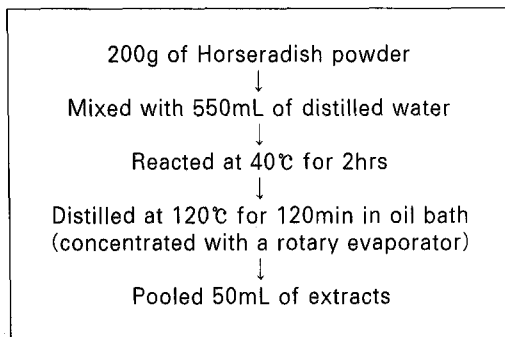


Fig. 3. Procedures for Extraction of AIT from Horseradish.

켰다. 그 후 120℃의 oil bath에서 120분간 증류시키고, 추출액 50mL를 -20℃에 보관하면서 시료로 사용하였다(Fig. 3).

1.3 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 AIT 함량 분석

추출한 액의 AIT 농도를 측정하기 위하여 추출액 1ml를 헥산(hexane) 1ml와 혼합한 후, 60℃ 항온 수조(RW-3025G shaking water bath, Jeio Tech Co., Ltd, Kimpo, Korea)에서 1시간 동안 가열하였다. 이를 다시 실온으로 냉각하고, 헥산층 1μl를 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 41,302±6.98ppm의 AIT를 함유하고 있었다(Fig. 4). 본 실험에서는 이 추출액에 증류수를 가하여 농도별로 희석하여 사용하였다.

1.4 사용균주 및 배지

항균 효과를 측정하기 위하여 사용한 균주는 Table 1과 같으며, 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC, Daejeon, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 치아 우식증 유발 및 진행과정과 관련하여 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei*를 사용하였으며, 치주 질환과 관련하여 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*를, 치수 및 근단 병소와 관련하여 *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*²⁸⁾를 사용하였다. 실험 전 각 미생물을 Table 1과 같은 배양배지에 접종한 후, 세균은 37℃에서, 효모는 25℃에서 24-48시간 동안 전배양하여 사용하였다.

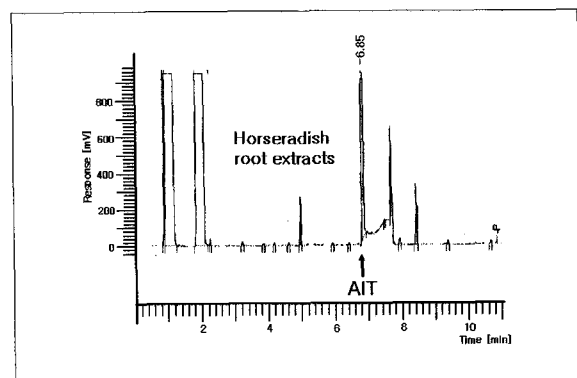
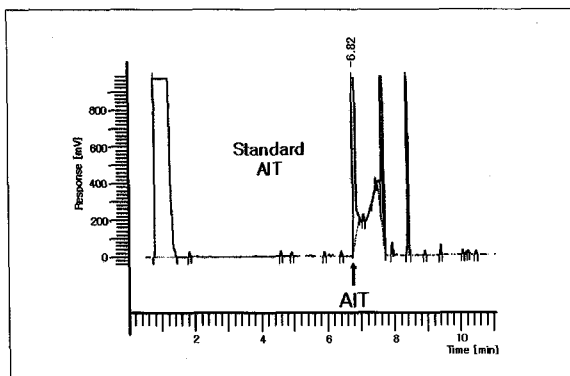


Fig. 4. Gas Chromatogram of standard AIT and AIT extracted from Horseradish (*Armoracia rusticana*).

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial activity test

	Aerobic Condition	Media for Cultivation
Gram Positive		
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Facultative Anaerobic	BHI broth ¹
<i>Streptococcus sobrinus(d)</i> ATCC 27607	Facultative Anaerobic	BHI broth
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Facultative Anaerobic	MRS broth ²
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Facultative Anaerobic	BHI broth
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Facultative Anaerobic	Trypticase soy broth ³
Gram Negative		
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522	Facultative Anaerobic	Trypticase soy broth
Yeast		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10261	Aerobic	YM broth ⁴

¹ Brain heart infusion (Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)

² Lactobacilli MRS(Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)

³ Trypticase soy broth, BBL, 211043; New No.) with 5% defibrinated sheep blood

⁴ Yeast Malt (YM: 3 g yeast extract, 3 g malt extract, 5 g peptone, 10 g dextrose, 1L distilled water) broth (Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)

2. 연구방법

2.1 항균 활성 측정 시험

· 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균

서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균활성은 disk paper method를 이용하여 측정하였다. 전배양하여 640nm(UV 1600 PC, Shimadzu, Tokyo, Japan) 파장에 대한 흡광도(A₆₄₀)가 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei*, *S. aureus*는 0.700-0.750, *E. faecalis*, *A. actinomycetemcomitans*는 0.750-0.800, *C. albicans*는 0.350-0.400으로 일정하게 현탁된 배양액 100μl를 멸균된 spreader를 사용하여 각 배양액과 동일한 평판배지에 도말한다. 멸균된 직경 8mm filter paper disk (Whatman No.2)에 고추냉이 뿌리 추출물을 30μl씩 흡수시키고 세균 및 효모가 도말된 각각의 배지에 밀착시킨 후, 세균은 37℃에서 24시간, 효모는 25℃에서 48시간 배양하였다. 배양 후 disk 주변 투명환(clear zone)의 유무로 항균효과의 여부를 확인할 수 있었다.

· 클로르헥시딘 사용균

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

2.2 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

· 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균

각 균주를 96-well flat-bottom microplate(Greiner bio-

one GmbH, Frickenhaus en, Germany)의 각 well에 5μl씩 분주하였다. 분주 후, 세균과 효모는 전배양 배지와 동일한 멸균배지를 50μl 분주하였다. 여기에 일정단계 희석(4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25ppm)한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 50μl 분주하고, 세균은 37℃에서 24시간, 효모는 25℃에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세균과 효모의 증식유무를 micro plate reader(OD: 560nm, PowerWave 340, Bio-Tek Instrument Inc., California, USA)로 측정하였다.

· 클로르헥시딘 사용균

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균과 동일한 방법으로 각 균주에 대한 클로르헥시딘의 최소억제농도를 측정하였다. 클로르헥시딘은 5%를 원액으로 각 단계별로 증류수에 희석(5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04%)하여 사용하였다.

2.3 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC) 측정

· 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균

MBC의 측정은 Bamba 등²⁹⁾의 방법을 이용하였다. MIC 측정 후 증식이 확인되지 않은 배양액을 한 백금이 취하여 세균은 plate count agar(PCA, Difco Lab., Detroit, USA) plate, 효모는 YM agar plate에 streak하여 세균은 37℃에서 24시간, 효모는 25℃에서 48시간 동안 배양하여 증식유무를 확인하였다.

· 클로르헥시딘 사용군

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

Ⅲ. 연구 결과

1. 항균 활성 측정 결과

서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘은 실험에 사용된 모든 균주에서 paper disk 주위로 투명환을 형성하였다 (Fig. 5). 이로써 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘은 연구에 사용된 구강내 세균에 대해 항균 활성을 나타냄을 알 수 있다.

2. 최소억제농도(MIC)

2.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MIC

연구에 사용된 구강내 미생물에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MIC를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 실험 결과, 7종류의 구강내 미생물 중 특히 *C. albicans*에 대한 MIC가 31.3ppm 이하로 가장 낮았으며, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei*, *A. actinomycetemcomitans*의 MIC는 62.5ppm으로 같았다. 그리고 *S. aureus*, *E. faecalis*의 MIC는 125ppm으로 동일하였다.

2.2 클로르헥시딘의 MIC

연구에 사용된 구강내 미생물에 대한 클로르헥시딘의 MIC를 측정한 결과는 Table 2와 같다. *L. casei*는 약 0.16%에서 증식이 저해되었고, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*의 MIC는 0.63%였다. 그 외 *S. mutans*와 *A. actinomycetemcomitans*는 1.25%, *S. sobrinus*는 2.5%에서 MIC를 기록하였다.

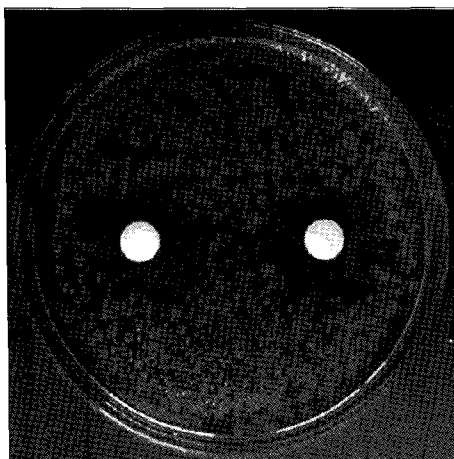
3. 최소살균농도(MBC)

3.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MBC

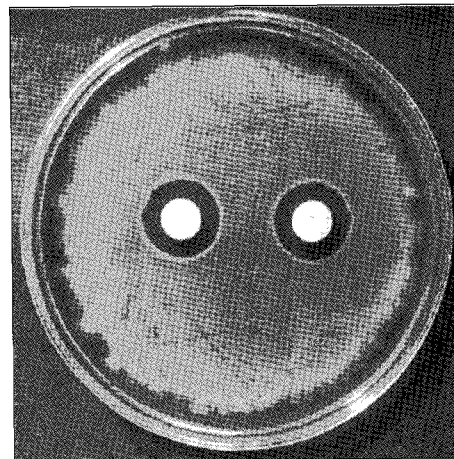
연구에 사용된 구강내 미생물에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MBC를 측정한 결과는 Table 3과 같으며, MIC와 마찬가지로 *C. albicans*의 MBC는 62.5ppm으로 가장 낮은 값을 나타냈다. *L. casei*는 125ppm, *S. aureus*는 250ppm의 MBC를 기록했으며, 그 외 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *E. faecalis*, *A. actinomycetemcomitans*는 500ppm에서 살균 효과를 보였다.

3.2 클로르헥시딘의 MBC

연구에 사용된 구강내 미생물에 대한 클로르헥시딘의 MBC를 측정한 결과 MIC와 마찬가지로 *L. casei*의 MBC가 0.63%로 가장 낮은 농도에서 살균효과를 나타냈다. *S. mutans*, *S. aureus*, *C. albicans*의 MBC는 1.25%, *S. sobrinus*, *E. faecalis*, *A. actinomycetemcomitans*는 2.5%에서 MBC를 기록하였다(Table 3).



Horseradish extract (200ppm = 0.02%).



Chlorhexidine (5%).

Fig. 5. Antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*.

Table 2. MIC values for Horseradish root extracts and chlorhexidine towards oral pathogens.

Strains	Samples	
	Horseradish Root Extracts(ppm)	Chlorhexidine(%)
<i>S. mutans</i>	62.5	1.25
<i>S. sobrinus</i>	62.5	2.5
<i>L. casei</i>	62.5	0.16
<i>S. aureus</i>	125	0.63
<i>E. faecalis</i>	125	0.63
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	62.5	1.25
<i>C. albicans</i>	<31.3	0.63

Table 3. MBC values for Horseradish root extracts and chlorhexidine towards oral pathogens.

Strains	Samples	
	Horseradish Root Extracts(ppm)	Chlorhexidine(%)
<i>S. mutans</i>	500	1.25
<i>S. sobrinus</i>	500	2.5
<i>L. casei</i>	125	0.63
<i>S. aureus</i>	250	1.25
<i>E. faecalis</i>	500	2.5
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	500	2.5
<i>C. albicans</i>	62.5	1.25

IV. 총괄 및 고찰

Allyl isothiocyanate(AIT)는 십자화과에 속하는 모든 식물에 존재하는 천연 화합물로서 액체나 기체 상태에서 강한 항균 활성을 가지는 것으로 보고되었지만³⁰⁾, 그 항균 기전(antimicrobial mechanism)은 잘 알려져 있지 않다. Kawakishi와 Toshiyuki^{31,32)}는 AIT가 미생물의 성장을 억제하는 농도에서 단백질 구조를 변화시킨다고 하였고, Kojima와 Ogawa³³⁾는 산소섭취(oxygen uptake)와 같은 미생물의 대사작용에 영향을 미친다고 하였다.

본 연구에서는 서양산 고추냉이(*Armoracia rusticana*) 뿌리 추출물이 구강내의 다양한 병원성 미생물에 대해 나타내는 항균 효과에 대해 살펴보았으며, 이를 대표적 항균제인 클로르헥시딘의 항균 효과와 비교하였다. 식물체의 정유함량은 보통 0.04-0.5%로 부위에 따라 그 함량이 다르며^{34,35)}, 고추냉이는 뿌리 부위의 정유함량이 가장 많다^{18,36)}고 보고되었으므로, 본 실험에서는 고추냉이의 뿌리 부위를 사용하여 추출한 정유를 회석하여 사용하였다. 정유 회석 시 알코올을 이용할 경우 나타날 수 있는 항균효과의 상승을 고려하여 증류수를 이용하였다.

Disk paper method를 이용하여 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘의 항균활성의 유무를 알아본 결과 두 군 모두에서 연구에 사용된 균주에 대해 투명환을 형성하여 항균효과를 나타냄을 알 수 있었다. 그러나, 투명환의 모양이나

colony의 퍼짐양상은 두 군에서 다르게 나타났다. 클로르헥시딘은 disk paper를 중심으로 형성된 투명환의 경계가 뚜렷하고, 평판배지에 자란 colony의 간격이 치밀한 반면 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 경우 그 경계가 불분명하였으며, colony의 간격도 클로르헥시딘에 비해 덜 치밀하였다. 이것은 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 휘발성으로 인해 시료와 직접 접촉하지 않은 부분까지 영향을 받았기 때문에 나타난 결과로 생각된다.

서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 실험 결과 7종류의 미생물 중 *C. albicans*에 대한 MIC가 31.3ppm 이하로 가장 낮았으며, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei*, *A. actinomycetemcomitans*의 MIC는 62.5ppm으로 같았다. 그리고 *S. aureus*, *E. faecalis*의 MIC는 125ppm으로 동일하였다. MBC 역시 *C. albicans*가 62.5ppm으로 가장 낮았으며, 다른 모든 균주에서 대부분 MIC의 2배 내지 3배 농도에서 MBC를 기록하였다. Shin과 Lee²⁶⁾와 Shin 등³⁷⁾은 AIT의 증류수 추출물²⁶⁾이나 휘발성 AIT계 화합물³⁷⁾을 이용한 항균성 실험에서 AIT는 세균보다 곰팡이에 강한 항균활성을 보였으며, 세균의 경우 그람 양성균보다는 그람 음성균에 항균활성이 강하다고 보고하였다. 본 실험에서도 고추냉이 뿌리 추출물은 효모인 *C. albicans*에 가장 효과적이었으며, 그람 음성균인 *A. actinomycetemcomitans*의 MIC는 다른 그람 양성균과 비슷하거나 낮은 농도로 나타나 위의 연구 결과들과 거의 일치하는 결과를 보여주었다. 클로르헥시딘의 실험 결과 특히 *Lactobacillus casei*에 강한 항균

활성을 나타냈고, 그 외 균주들에 대해서도 0.16-2.5% 정도의 농도에서 항균활성을 나타냈으며, 이는 다른 여러 연구 결과들과 일치한다. Zickert 등³⁸⁾은 1% 클로르헥시딘 젤이 13-14세 아동에서 타액내 *S. mutans*의 수를 감소시킬 수 있다고 하였고, Vianna 등³⁹⁾은 *E. faecalis*, *S. aureus*, *C. albicans*에 대해 0.2%, 1%, 2% 클로르헥시딘 모두 항균효과를 나타낸다고 하였다. 또한 Löe와 Schiott⁴⁰⁾은 0.2%, 2% 클로르헥시딘을 적절하게 사용한다면 치은염을 감소시킬 수 있다고 하였다. 따라서 이번 실험 결과 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 구강내 세균들에 대해 일반적으로 사용되는 광범위 항균제인 클로르헥시딘과 필적할 정도의 항균효과가 있다고 볼 수 있다.

이번 연구는 다음과 같은 몇 가지 한계점을 가지고 있다. 첫째, 본 연구에서는 제한된 7종의 구강내 미생물을 대상으로 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균효과를 평가하였다. 앞으로 *Lactobacillus acidophilus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* 등 병원성을 지닌 다양한 구강내 미생물에 대한 항균효과 평가가 필요하며, 클로르헥시딘이 편성 혐기성(obligate anaerobe)균에는 항균효과가 크지 않음을 고려해 보았을 때, 특히 편성 혐기성 균주에 대한 항균 효과도 연구되어야 할 것이다.

둘째, 본 연구에서는 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과를 알아보기 위하여 표준균주를 이용하였다. Lim 등⁴¹⁾은 녹차 추출물(CHMC-2032)이 표준균주인 *S. mutans* KCTC 3065와 *S. sobrinus* KCTC 3088에 대해 동일한 세균 성장 억제 효과를 보였지만, 교정 환자로부터 분리된 균주들에 대한 효과에서는 차이가 있었다고 보고하였다. 따라서 앞으로 임상 분리균주에 대한 고추냉이 추출물의 항균효과를 연구하고, 이를 표준균주와 비교하는 것이 필요하다. 또한 더 나아가 *in vivo*에서의 항균효과도 연구해야 할 과제이다.

셋째, 본 실험은 구강내 미생물에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 단독 사용과 클로르헥시딘 단독 사용 시 항균 효과만을 평가하였다. Filoche 등⁴²⁾에 의하면 클로르헥시딘을 계피, 마누카(*manuka*), *L. morrisonii* 등의 다양한 정유(essential oil)와 혼합하여 사용 시 세균막(biofilm) 증식 억제를 위해서는 클로르헥시딘 단독 사용 시보다 1/4-1/10 정도 적은 양이 필요하다고 하였다. Ahn 등³⁷⁾도 AIT 단독 또는 초산(acetic acid) 단독으로 사용할 때보다 혼합하여 사용할 때 실험 대상 균주에 대하여 증식 억제 효과가 2-10배 이상 상승했다고 보고하였다. 따라서, 향후 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘을 혼합하여 사용하였을 경우 혹은 다른 항균제와의 병용에 따른 항균효과의 변화에 대한 연구가 계속되어야 할 것이다.

마지막으로 서양산 고추냉이 뿌리에서 추출된 정유 중 AIT는 약 80%를 차지하며 그 외 20여종의 다른 휘발성 성분도 포함하고 있다. 따라서, AIT 뿐 아니라 다른 성분들에 의한 항균효과 및 그 상승작용도 나타날 수 있으므로 이에 대한 연구가 좀 더 필요할 것으로 생각된다.

여러 한계점에도 불구하고 이번 연구는 고추냉이 뿌리 추출

물의 구강내 미생물에 대한 항균효과를 평가했다는 점에서 가치가 있다. 지금까지 구강내 미생물에 대해 여러 다양한 식물체 추출물의 항균효과를 보고한 연구는 많았지만^{41,43-46)}, 고추냉이 뿌리 추출물을 이용한 연구는 처음이므로 의미가 있다 하겠다. 또한 재배조건이 까다롭고, 가격이 비싼 일본산 고추냉이(*Wasabia japonica*) 대신 쉽게 구할 수 있고, 경제적인 서양산 고추냉이(*Armoracia rusticana*)의 뿌리 분말을 이용하였다는 점에서 앞으로 구강용 제재로의 개발 가능성이 더 클 것으로 생각된다.

V. 결 론

사람의 구강내에는 약 500종 이상의 상주균이 존재하며, 이들은 치아우식증이나 근관 감염, 그리고 치주 질환 등의 여러 구강내 질환을 유발할 수 있다. 본 연구에서는 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 이용하여 다양한 구강용 제재를 개발하기 위한 기초자료를 제공할 목적으로 구강 미생물에 대한 항균효과를 알아보고, 이를 대표적 항균제인 클로르헥시딘의 항균효과와 비교하였다.

1. 본 연구에 이용된 7종의 구강내 미생물에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 최소억제농도는 약 30-125ppm (0.003-0.012%)으로써 모든 균주에 대해 항균효과를 나타냈으며, 특히 세균보다는 효모인 *C. albicans*에 강한 항균활성을 보였다.
2. 본 연구에 이용된 7종의 구강내 미생물에 대한 클로르헥시딘의 최소억제농도는 약 0.15-2.5%로 모든 균주에 대해 항균효과를 나타냈다. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 매우 낮은 농도(0.003-0.012%)에서 클로르헥시딘(0.15-2.5%)과 대등한 항균효과를 보였다.

이상의 결과로 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 본 연구에 이용된 7종의 구강내 미생물에 대해 매우 낮은 농도에서 항균효과를 나타냄을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Rosan B, Lamont RJ : Dental plaque formation. *Microbes Infect*, 2:1599-1607, 2000.
2. Loesche WJ, Straffon LH : Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infect Immun*, 26:498-507, 1979.
3. PD Marsh, B Nyvad : The oral microflora and biofilms on teeth. In: Fejerskov O, Kidd E, eds. *Dental Caries, the Disease and its Clinical Management*. Oxford: Blackwell Munksgaard, 29-48, 2003.
4. Slots J : The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res*, 85:114-

- 121, 1977.
5. Slots J, Bragd L, Silkstrom M, et al. : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*, 13:570-577, 1986.
 6. Slots J, Listgarten MA : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 15:85-93, 1988.
 7. Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang : *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard, 218-225, 2003.
 8. Cervone F, Tronstad L, Hammond B : Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol*, 1:33-36, 1990.
 9. Hennessey TS : Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontol Res*, 8:61-67, 1973.
 10. Budtz-Jorgensen E, Loe H : Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. *Scand J Dent Res*, 80:457-464, 1972.
 11. Davies A : The mode of action of chlorhexidine. *J Periodont Res*, 8:68-75, 1973.
 12. Gjermo P : Chlorhexidine in dental practice. *J Clin Periodontol*, 1:143-152, 1974.
 13. Scheie AA : The role of antimicrobials. In: Fejerskov O, Kidd E, eds. *Dental Caries, the Disease and its Clinical Management*. Oxford: Blackwell Munksgaard, 179-188, 2003.
 14. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, et al. : The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg*, 53:518-522, 1988.
 15. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, et al. : Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*, 36:267-275, 2003.
 16. Siqueira JF Jr, Uzeda M : Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod*, 49:167-169, 1997.
 17. Schaupp H, Wohnaut H : Disturbances of taste from oral disinfectants. *HNO*, 26:335-341, 1978.
 18. Gildemeister E, Fr Hoffmann : *The volatile oils*. John Wiely & Sons Inc. 2nd ed., USA, p516, 1961.
 19. Kumagai H : Analysis of volatile components in essential oil of upland wasabi and their inhibitory effects on platelet aggregation. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58:2131-2135, 1994.
 20. Ina K : Volatile components of wasabi (*Wasabia japonica*) and horseradish (*Cochleria armoracia*). *Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi*, 18:365-370, 1981.
 21. 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.
 22. Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, et al. : A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact*, 103:79-129, 1997.
 23. Nishida M : Studies on the pungent component. Antibacterial properties of essential oil of *Eutrema wasabi* Maxim. *Yakugaku Zasshi*, 78:435-443, 1958.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Shin IS, Lee JM : Study on antimicrobial and antimutagenic activity of horseradish(*Wasabia japonica*) root extracts. *J Korean Fish Soc*, 31:835-841, 1998.
 27. Shin IS, Masuda H, Naohide K : Bactericidal activity of wasabi(*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *Int J Food Microbiol*, 94:255-261, 2004.
 28. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB : Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J*, 29:69-75, 1996.
 29. 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.
 30. Isshiki K, Tokuoka K, Mori R, et al. : Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56:1476-

- 1477, 1992.
31. Kawakishi S, Toshiyuki K : Interaction of oxidized glutathione with allyl isothiocyanate. *Phytochemistry*, 24:715-718, 1985.
 32. Kawakishi S, Toshiyuki K : Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. *J Agri Food Chem*, 35:85-88, 1987.
 33. Kojima M, Ogawa K : 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.
 34. Jo KS, Kim HK, Ha JH, et al. : Flavor compound and storage stability of essential oil from garlic distillation. *Korean J Food Sci Tech*, 22:840-845, 1990.
 35. Kim YH, Lee JC, Choi YH, et al. : Essential oils of *Thymus quinquecostatus* Celakov. and *Tymus magus* Nakai. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2:234-240, 1994.
 36. Lee SW, Jeong SS, Sok DK, et al. : Allyl isothiocyanate content in different plant parts of *Wasabia japonica* Mastum. *Korean J Crop Sci*, 42:281-285, 1997.
 37. Ahn ES, Kim JH, Shin DW : Antimicrobial effects of allyl isothiocyanates on several microorganisms. *Korean J Food Sci Technol*, 31:206-211, 1999.
 38. Zickert I, Emilson CG, Krasse B : Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 27:861-868, 1982.
 39. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, et al. : In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 97:79-84, 2004.
 40. Loe H, Schiott CR : The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man, *J Periodont Res*, 5:79-83, 1970.
 41. Lim SH, Suh JS, Yun YJ, et al. : Effect of leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Casia tora* on viability of *Mutans Streptococci* isolated from the interface between orthodontic brackets and tooth surfaces. *Korea J Orthod*, 33:381-389, 2003.
 42. Filoche SK, Soma K, Sissons CH, et al. : Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol*, 20:221-225, 2005.
 43. Kulik E, Lenkeit K, Meyer J : Antimicrobial effects of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on oral microorganisms. *Schweiz Monatschr Zahnmed*, 110:125-130, 2000.
 44. Barnabe W, de Mendonca Neto T, Pimenta FC, et al. : Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil*, 31:453-459, 2004.
 45. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, et al. : A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol*, 19:61-54, 2004.
 46. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, et al. : In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol*, 45:141-148, 2000.

Abstract

THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF HORSERADISH(*ARMORACIA RUSTICANA*)
ROOT EXTRACTS AGAINST ORAL PATHOGENS

Nan-Young Yu, Ho-Won Park, Ju-Hyun Lee, Hyun-Woo Seo

*Department of Pediatric Dentistry, Oral Science Research Center, College of Dentistry
Kangnung National University*

In this study, the antimicrobial effects of Horseradish(*Armoracia rusticana*) root extracts against oral pathogens were investigated, and also compared with that of chlorhexidine. The following 7 microorganisms were used in this study: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus*(d) ATCC 27607, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 29522, *Candida albicans* ATCC 10261. Horseradish root extracts and chlorhexidine were tested to determine their minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC).

The results of this study can be summarized as follows:

1. Horseradish root extracts showed antimicrobial effect against the tested oral pathogens. MIC and MBC of this extracts were 30-125, 125-500ppm, respectively. Especially, it was the most effective against *C. albicans* of other tested microorganisms.
2. Chlorhexidine also showed antimicrobial effect against the tested oral pathogens. MIC of chlorhexidine range between 0.15 and 2.5%, MBC are 0.4-2.5%.

In conclusion, it was suggested that AIT had similar antimicrobial effects in the lower concentration, compared with that of chlorhexidine.

Key words : Horseradish(*Armoracia rusticana*) root extracts, Allyl isothiocyanate(AIT), Chlorhexidine, Antimicrobial effect