원저

대한구강보건학회지 : 제 29권 제 2호, 2005
J Korean Acad Dent Health Vol. 29, No. 2, 2005

Curcuma xanthorrhiza 추출물 및 함유 치약의 구취 억제 효과와 구강 유해균에 대한 선택적 항균 효과

김백일, 김상년[1], 장석윤[1], 문교태[1], 김윤석[1], 황재관[2], 정승화, 김민영, 김해선, 권호근
연세대학교 치과대학 예방치과학교실
[1]LG 생활건강 기술연구원 오랄케어 연구팀
[2]연세대학교 공과대학 생명공학과

색인 : 구취, 치약, 항균효과, Curcuma xanthorrhiza, mutans streptococci, Xanthorrhizol

1. 서 론

구강건강을 해치는 양대 질환인 치아우식증과 치주질환은 모두 치태에 의해서 유발되는 질환이며, 최근 관심이 집중되고 있는 구취도 설태 및 치태 축적에 의해서 유발되는 질환이다. 이중 치아우식증은 구강세균에 의해 법랑질, 상아질, 백악질 등의 치아 경조직이 탈회되는 현상으로 치주병과 함께 치아를 상실하게 만드는 주된 질병이다. 이 질환의 원인 요소는 크게 숙주요인, 병원체 요인 및 환경 요인으로 나눌 수 있으며 이 중 하나인 병원체 요인으로는 mutans streptococci 중 *Steptococcus mutans*가 주된 원인균으로 알려져 있다[1-3]. 1890년 Miller가 치아우식증 유발 세균을 적절히 조절만 하면 치아우식증 발생을 예방할 수 있다고 보고한 뒤, 항균 물질을 발견하고 상용화시키기 위해서 수많은 연구자들이 노력해왔다[4]. 한편 치주질환의 경우도 최근 구강 내 특정 세균의 감염에 의해서 진행된다는 사실이 밝혀졌으며, 원인 균주로는 혐기성 균주인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum* 등이 관련되어 있다고 알려져 있다[5,6]. 이런 치주질환 유발 균주들은 또한 단백질의 부패 현상인 구취의 원인균[7-9]으로도 지목되고 있어서, 이러한 구강질환을 예방하려면 무엇보다도 구강 내 각종 질병유발 균주들의 감소가 중요하다는 것을 알 수 있다. 지금까지 이러한 목적으로 사용되어온 항균제로는 chlorhexidine, triclosan, cetylpyridinium chloride(CPC)등의 합성 물질이 주로 사용되어 왔으나, 이들은 지속적 사용 시 인체 및 환경 안정성과 관련하여 문제의 소지를 안고 있다[10,11]. 또한 이들 물

연락처 : 김백일. 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과대학 예방치과학교실
전화 : (02) 2228-3070 전송 : (02) 392-2926 E-mail : drkbi@yumc.yonsei.ac.kr

질은 모든 균주에 걸쳐서 매우 광범위한 무차별 항균력을 보여 정상 세균총의 균형 파괴 및 저항성 균주 출현 등으로 구강생태계의 균형을 깨뜨릴 가능성이 존재한다[12-14]. 따라서 구강 환경 내에서 이상적인 항균제로는 구강 내 다른 정상 세균총 보다는 치아우식증의 원인 균주 및 치주염이나 구취 유발 세균에 대한 선택적 항균력이 우수하면서도 인체 및 환경 독성의 위험성이 낮은 물질이 요구된다. 이러한 요구사항을 충족시킬 수 있는 물질로는 합성물질보다는 천연 식품에서 유래하여 추출된 천연 항균제가 바람직하다고 사료된다. 그동안 국외[15-18]뿐만 아니라 우리나라에서도 이러한 천연 추출물을 이용한 항균연구가 활발히 진행되어 왔는데, 정 등[19]은 자몽종자 및 차 추출물을 이용한 구내 분무액의 항균효과를 시험하였고, 배 등[20]은 녹차 및 솔잎추출액에 불소와 CPC를 병용한 구강양치액의 구취감소효과를 평가하였다. 또한 홍 등[21]은 금은화와 포공영추출물이 첨가된 치약의 치태 및 치은염 감소효과를 보고하였고, 김 등[22]은 호장근의 항세균효과 및 항부착효과에 대해서 평가한 바 있었다.

한편 본 연구에서 관심을 가졌던 천연물질인 *Curcuma xanthorrhiza*의 뿌리는 생강과(Zingiberaceae) 식물의 일종으로서 일반적으로 Temu lawak 또는 Javanese turmeric으로 알려진 인도네시아의 전통 약용식물이다[23]. *Curcuma xanthorrhiza*의 약리활성으로는 항암효과[24], Triglyceride 감소효과[25], 간 보호효과(hepatoprotective effect)[26], 신독성(nephrotoxicity) 감소효과[27], 항염작용[28,29], 항전이(anti-metastasis)작용[30] 등이 보고된 바 있다.

*Curcuma xanthorrhiza*의 뿌리 부분에 함유되어 있는 잔토리졸(xanthorrhizol, 1,3,5,10-bisabolatetraen-3-ol)은 sesquiterpenoid 계열의 화합물로써, 1970년 독일의 Rimpler 등에 의해서 처음 분리되었다[31]. 이렇게 추출된 잔토리졸은 분자량 218의 저분자 화합물로써 무색, 무취일 뿐만 아니라 열이나 pH 변화에도 매우 안정한 화합물이다.

*Curcuma xanthorrhiza*의 구강균주에 대한 탁월한 효능은 황 등[32,33]에 의해 처음 알려지기 시작했는데, 추출 성분 중에서 잔토리졸이 항균을 나타내는 주된 활성 성분임을 규명하였다. 황 등은 치아우식증 관련 균주인 *S. mutans*에 대한 최소성장억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)를 잔토리졸과 chlorhexidine간에 비교한 결과 2와 1 ㎍/㎖로 나타났다. 또한 치주질환 및 구취발생에 깊이 관여 하는 *Porphyromonas gingivalis*에 대해서는 각각 32와 8 ㎍/㎖이었고, *Actinomyces viscosus*에서는 각각 16과 4 ㎍/㎖로써 chlorhexidine과 비슷한 항균효과를 나타냈다고 보고하였다[32]. 잔토리졸의 효능은 대표적 천연물인 Polyphenol, Caracrol, Isoeugenol, Eucalyptol, Thymol 등과 비교해 볼 때도 월등히 우수한 것이었다. 특히, 잔토리졸은 5 ppm의 농도에서 1분 안에 치아우식증 유발 균주를 완전히 사멸시키는 빠르고 강력한 항균활성을 나타내었다[33]. 이러한 속효성(fast effectiveness)의 항균활성은 수분 이내에 항균 활성을 요구하는 각종 산업용 구강위생 제품에 적용하는데 매우 유효한 특성이라고 여겨진다. 또한 잔토리졸은 치주염을 유발하는 *Porphyromonas gingivalis*에 대해서도 32 ppm에서 생육을 완전히 억제하는 효과를 나타내었다[32]. 그러나 잔토리졸은 구강 내 다른 정상 상재균에 대해서는 특별히 강한 항균력을 나타내지 않아 치아우식증 및 치주염 원인균에 대해서만 선택적으로 높은 항균성을 갖는 물질인 것으로 밝혀졌다[32].

본 연구에서는 이미 보고 된 *Curcuma xanthorrhiza*의 우수한 항균력이 치약 등 구강 위생제로 개발되어 실질적인 제품으로 응용 가능한지를 타진하기 위해서 구강 유해균에 대한 선택적 항균력, 치아 표면에 잔류(Substantivity)에 의한 지속적 항균 효과, 타액 내 mutans streptococci에 대한 선

표 1. 실험 치약과 대조 치약의 구성성분과 배합비율

구분	구성성분	실험치약	대조치약
세마제	덴탈타입실리카	20.0%	20.0%
주성분	불화나트륨	0.22%	0.22%
	Curcuma xanthorrhiza 추출물*	0.40%	-
	염산피리독신	0.05%	0.05%
	피로인산나트륨	1.00%	1.00%
기타성분	비결정성소르비톨액	적량	적량
	착향제, 산탄검, 정제수등	적량	적량

* *Curcuma xanthorrhiza* 추출물: 잔토리졸 함량이 25%로 추출물 0.4% 적용 시 치약 내 순수 잔토리졸 함량이 0.1% 였음.

택적 항균력 평가 및 다양한 차원의 구취억제 임상 효과를 관찰하여 보고하고자 하였다.

2. 연구재료 및 방법

2.1. *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 및 실험용 치약

유럽 약전에 등재 된 Tumeric, Javanese (Curcumae xanthorrhizae rhizoma[23])인 *Curcuma xanthorrhiza*의 뿌리를 핵산으로 추출한 뒤 용매를 제거하여 추출물을 제조하였으며 잔토리졸 함량이 25%인 것을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 실험 치약과 대조치약의 성분은 표 1과 같다.

2.2. 유해 구강균주에 대한 항균력

2.2.1. 치아우식증 원인균주에 대한 속효성 항균 효과

DMSO(Dimethyl Sulphoxide, Sigma, USA)에 준비된 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물을 BHI(Brain Heart Infusion Broth, Difco, USA)액체 배지에 순수 잔토리졸 농도가 5, 10, 20, 40, 80, 150, 200, 300, 400 ㎍/㎖ 되도록 처리하였다. triclosan(USP, Ciba, Swiss)도 역시 동일한 농도로 처리하였다. 여기에 전 배양한 4가지 종류의 mutans streptococci (*Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 33535, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27352, *Streptococcus mitis* ATCC 903) 각각을 10^7 CFU/㎖ 되도록 접종하여 상기실험 물질 농도에 접촉하게 한 뒤, 5분 후 백금이로 BHI agar에 도말하여 48시간 동안 5% CO_2로 조절된 항온 배양기에서 배양하여 균이 자라지 않는 농도를 "5분 접촉 사멸 최소농도"로 결정하였다. 5분이라는 접촉 시간 내 항균 효능을 본 이유는 치약이나 구강양치액 및 구내 스프레이 등 구강 위생제품은 통상 구강 환경 내에서 접촉하는 시간이 짧기 때문에 5분을 최종 접촉 시간으로 채택하였다.

2.2.2. 치주염 및 구취 유발균주에 대한 항균효과

Yeast extract(0.5%), Hemin(5.0 ㎍/㎖), Menadione(0.2 ㎍/㎖l) 및 Cysteine hydrochloride (0.05%)를 함유한 Trypticase Soy Broth(BD Co., USA)에 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 및 triclosan을 각기 다른 농도가 되도록 DMSO 용액을 투여하여 제조한 뒤, 동일 배지에 전 배양 된 3가지 종류의 대상균주(*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586)를 10^5 CFU/㎖가 되도록 접종한 뒤 H_2 15%, CO_2 5%, N_2 80%로 조절된 37℃ 혐기성 배양기(Bactron, Sheldon Manufacturing, USA)에서 3일간 배양하였다. 탁도를 보이지 않는 농도를 최소 성장 억제 농도(MIC)로 결정하였다.

2.2.3. 타액 내 mutans streptococci 및 호기성 총 세균에 대한 선택적 항균력 비교

금새 채취된 타액을 이용하여 mutans streptococci와 호기성 정상 세균총에 대해서 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 상대 항균력을 triclosan과 비교하였다. 우선 건강한 성인으로부터 파라핀으로 자극성 타액을 채취한 뒤 균일하게 한 다음 1 ml씩 분주하였다. 여기에 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물을 순수 잔토리졸의 최종 농도가 각각 10, 20, 40, 80, 150, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 μg/ml에 되도록 처리하였다. Mutans streptococci에 대한 항균력을 평가하기 위해서 첫 번째로는 Dentocult-SM Kit(Orion사, Finland)를 이용하여 일반 배양기에서 배양하였고, 두 번째로는 타액 샘플의 일정량을 Sucrose 15%, Bacitracin 3.25 mg/l, Tellurite 100 mg/l을 함유하는 Mitis Salivarius agar(Difco, USA)를 이용하여 5% CO_2 배양기에서 3일간 배양하였다. 또한 전체 호기성 세균에 대한 항균력을 평가하기 위해서 타액 샘플을 BHI agar에 도말하여 배양하였다. 잔토리졸의 상대적인 항균력을 평가하기 위해서 대조군으로써 triclosan을 동일한 농도로 처리하여 병행 실험하였다. 배양 결과는 5분 접촉 후 Colony가 자라지 않는 즉 "5분 접촉 사멸 최소농도"를 사용하여 비교하였다. 5회간 반복실험에 사용된 타액공여자는 서로 중복되지 않도록 하였다.

2.2.4. 잔토리졸 함유 치약의 항균력 평가

잔토리졸이 함유된 실험 치약과 대조 치약을 멸균 이온수를 사용하여 중량비로 40배에서 2,560배까지 2배씩 연속 희석한 용액 1 ml에 이전에 속효성 항균효과 평가에서 사용한 것과 동일한 4가지 종류의 mutans streptococci를 10^7 CFU/ml 되도록 접종하여 5분간 접촉시킨 뒤 10 μl를 취해서 BHI agar에 넣고, 48시간 동안 5% CO_2로 조절된 항온배양기에서 배양하여 균이 자라지 않는 "5 분 접촉 사멸 최대 희석배수"를 결정하였다. 이때 최종 잔토리졸 농도는 320배, 640배, 1,280배, 2,560배 희석인 경우 각각 3.12 ppm, 1.56 ppm, 0.78 ppm, 0.39 ppm이었다.

2.3. 지속적 항균 효과

(Long-lasting Antimicrobial Substantivity)

2.3.1. 우치 실험

잔토리졸의 농도가 1%와 0.5%가 되도록 DMSO에 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물을 조제하고, 불소는 NaF를 사용하여 불소이온 농도가 1100 ppm이 되도록 하였으며, chlorhexidine(Sigma, USA)은 1.0%가 되도록 수용액으로 조제하였다. 각 용액 100 μl를 우치 표면에 적용하여 10분 간 방치한 뒤 각 치아를 20분간 탈 이온수로 심하게 Vortex로 세척하여 우치 표면에 도포된 항균물질들이 씻겨나갈 기회를 충분히 부여하였다. 그 후 우치 표면에 Sucrose(5%)와 Phenol red(0.1%)를 함유한 BHI agar(0.75% soft agar)에 *S. sobrinus* ATCC 27351를 첨가한 균액 (10^8 CFU/ml)을 250 μl 코팅하여 배양하면서 색상 변화를 관찰하였다. 실험은 각 물질당 3개씩의 우치를 사용하였다.

2.3.2. Hydroxyapatite Disk를 이용한 잔류효과 평가

실질적으로 세균이 생성한 산에 의해서 칼슘이 용출되는 현상을 관찰하기 위해 상기 2.3.1과 유사한 조작을 인공 hydroxyapatite disk(Clarkson Chromatography products Inc. USA, 직경 0.5 inch, 두께: 0.04~0.06 inch)에서 수행하였다. 항균 물질들의 사용 농도는 불소는 1100 ppm을 사용하였고, 잔토리졸, chlorhexidine, triclosan등의 항균제는 0.2%와 1%를 사용했으며, 20분간 서서히 교반 하여 상대적인 세척효과는 우치 실험보다 적게 하였다. 9시간 배양 후 색상 변화를 관찰한 뒤 탈 이온수를

Disk당 1 ml씩 넣어서 칼슘을 용출시켰고, 이를 10배 희석하여 용출된 칼슘 농도를 ICP(Inductively Coupled plasma, JY 38 Plus, France)로 분석하였다.

2.4. 구취 억제 효과

Curcuma xanthorrhiza 추출물을 실제로 사람에 적용할 경우에도 구취 억제 효능이 있는지 알아 보기위해 인체를 대상으로 임상시험을 시행하였다. 본 임상시험에 참여한 피검자들은 전신질환이 없는 건강한 20~30대 남녀로서, 치아우식증이나 치주질환에 이환되지 않았으며, 치열이 비교적 고른자만을 대상으로 선정하였다. 또한 본 실험에 들어가기 전에 연구진행과정에 대해서 충분히 설명하였고, 동의서를 받고서 진행하였다.

2.4.1. Gas chromatography방법을 이용한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 구취 억제 임상 평가

전신적으로 건강한 피검자 21명을 대상으로 오전중에 L-Cysteine 용액(6 mM) 0.2 ml를 혀에 도포하고 나서 3분 후에 휘발성 황 화합물(Volatile Sulfur Compound, VSC)을 측정하였다. 이때 VSC에 선택적인 Gas chromatography(GC)와 FPD(Flame Photometric Detector)로 황화수소(H_2S)의 농도를 측정하여 각 개인의 초기값(대조치)을 결정하였다. 오후에는 동일인을 대상으로 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물(잔토리졸 0.1%)과 Propylene Glycol 용액 400 μl를 혀에 도포 후 동일한 Cysteine 용액을 200 μl를 도포한 뒤 3분 후에 황화수소를 측정하였다. GC(Agilent 3050 series)에서는 Cosmosil 330 teflon을 컬럼으로 사용하였으며, 황 화합물에 대하여 선택성이 뛰어난 FPD(Flame Photometric Detector)를 장착하여 사용하였다. GC내의 캐리어 가스는 He을 24 ml/min의 속도로 통과시켰으며 컬럼의 온도는 70℃로 유지하였다. 검출기 내의 기체 흐름은 수소와 공기가 75 ml/min와 100 ml/min의 속도로 통과하도록 설정하였으며 검출기의 온도는 180℃를 유지하도록 하였다. 시료의 투입을 위하여 투입구 부분에는 5 ml 폴리에틸렌 팁을 장착하여 피험자의 입에 물게 하고, 50 ml의 주사기로 배기구 부분에서 입안의 공기를 배출토록 하였으며, 이중 30 ml가 테플론 튜브 loop에 남도록 하였다. 이중 10 ml가 투입밸브의 개방에 의하여 GC 컬럼 내로 유입되어 최종 분석되도록 하였다.

2.4.2. 관능검사에 의한 구취 억제 임상 평가

Curcuma xanthorrhiza 추출물 0.4%(잔토리졸 0.1%)를 함유한 실험 치약과 대조 치약을 이용하여 구취 관능 임상 평가를 수행하였다. 구취 관능 임상 평가에는 내경이 3/8 인치이고 외경이 1/2 인치인 길이 1 m의 테프론 튜브를 장착한 90 × 120 cm의 벽을 제작하여 사용하였다. 테프론 튜브는 내화학성이 뛰어나 구강 내에서 발생한 황 화합물과 반응하지 않도록 하기 위하여 사용하였다. 제작된 벽의 한쪽 편에는 2명의 구취 평가자들이 위치하였고, 다른 한편에 피험자들이 위치하여 1분간 함구토록 한 후 구강 내에 있는 공기만을 호기토록 하여 평가자들이 표 2의 척도에 의거하여 구취 지수를 평가하였다.

구취검사는 2명의 검사자가 수행하였는데 구취 평가자간의 일치도는 Pearson 상관계수로 0.81을 나타내어 검사자간에 매우 높은 신뢰도를 가짐을 확인하였다.

(1) 단기 구취 평가

표 2에 기술했던 구취 관능 평가 방법을 이용하여 24~33세, 16명의 피험자(남: 6명, 여: 10명)를 대상으로 교차(cross-over)하여 실험 치약과 대조 치약을 배포한 칫솔을 사용하여 1분간 칫솔질을 하고 100 ml의 물로 충분히 세척한 뒤 구취 관능 평가를 수행

표 2. 구취 관능 평가 척도[34]

점수	호기 시 냄새	점수	호기 시 냄새
0	냄새가 없다. 잔향이 느껴진다.	5	냄새가 난다(불쾌한 듯 안한 듯).
1	냄새가 아주 약하다.	6	냄새가 약간 불쾌하다.
2	냄새가 약하다.	7	냄새가 불쾌하다.
3	냄새를 확실히 인식 할 수 있다.	8	냄새가 심하게 불쾌하다.
4	냄새가 있지만 불쾌하지 않다.	9	냄새가 참기 힘들 정도로 불쾌하다.

하였다. 실험치약 평가 기간과 대조치약 평가 기간 사이에는 3일간의 wash out 기간을 설정하였다. 실험 치약의 구취 억제 효과를 확인하기 위하여 칫솔질 직후, 1시간, 2시간 그리고 3시간 후에 구취 관능평가를 수행하였다.

(2) 장기 구취 평가

피험자는 19~26세의 남 · 여 71명을 대상으로 구취 관능평가 실시 후에 35명은 실험군으로 36명은 대조군으로 편성하였다. 본 실험에 들어가기 전에 스케일링과 치면 세마를 통하여 모든 피시험자의 실험 조건을 동일하게 유지하였으며, 3일 동안의 평가 기간 중 칫솔질, 치실, 흡연 및 음주는 금하도록 하였다. 실험 치약과 대조 치약 30 *ml* 슬러리를 매일 오전과 오후에 걸쳐 하루 2번씩 2분 동안 양치하도록 한 후 100 *ml*의 물로 충분히 세척하도록 하였다. 치약 슬러리는 치약과 증류수를 1대 2 중량비로 제조하였다. 구취 평가는 방문 후 1분간 입을 다물고 있게 하고 표 2의 평가 척도에 의하여 1일, 2일 및 3일까지 실시하였다.

2.5 통계분석방법

Gas chromatography방법을 이용한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 구취 억제 임상 평가에 대한 통계처리는 자료의 정규 분포성을 가정하기 어려웠기 때문에 비모수통계가 타당하다고 사료되어 Wilcoxon Signed Rank test를 실시하였다. 관능검사를 통한 실험 치약의 구취 억제 임상 평가에 있어 단기 구취 평가 결과에 대한 통계처리는 paired t-test를 이용하였으며, 장기 구취 평가결과는 t-test를 통하여 실험군과 대조군간에 통계적 유의성을 검정하였다. 모든 연구결과의 통계처리는 Windows SAS(Statistical analysis system Institute Inc., Cary, USA) 8.1 통계 패키지를 이용하였다.

3. 연구 성적

3.1. 치아우식증 원인균주에 대한 속효성 항균 효과

Curcuma xanthorrhiza 추출물과 대조군으로 사용된 triclosan간에 5분 이내에 항균력을 보이는 5분 접촉 사멸 최소농도가 표 3에 나타나 있다. 4가지 종류의 mutans streptococci에 대하여 잔토리졸이 triclosan에 비해 전반적으로 낮은 5분 접촉 사멸 최소농도를 나타냈다.

3.2. 치주염 및 구취 유발균주에 대한 항균효과

구취 및 치주염을 유발하는 혐기성 균주인 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586에 대한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 내 잔토리졸의 최소 성장 억제 농도(MIC)는 각각 15, 10, 10 *μg/ml* 이었으며 triclosan은 10, 5, 5 *μg/ml* 로 나타났다.

3.3. 타액 내 mutans streptococci 및 호기성 총 세균에 대한 선택적 항균효과

치아우식 원인균인 mutans streptococci에 대한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 내 잔토리졸의 5분

표 3. 치아 우식증균주에 대한 속효성 항균 효과 (㎍/㎖)

	Streptococcus mutans ATCC 25175	*Streptococcus mutans* ATCC 33535	*Streptococcus sobrinus* ATCC 27352	*Streptococcus mitis* ATCC 903
Curcuma xanthorrhiza 추출물*	20	10	20	20
Triclosan	40	40	40	80

* 잔토리졸 함량 기준

표 4. 타액 내 mutans streptococci 및 호기성 총 세균에 대한 5분 접촉 사멸 최소농도(㎍/㎖)

실험 횟수	N	Xanthorrhizol*		Triclosan	
		MSB[a]	BHI[b]	MSB[a]	BHI[b]
1회차	8	80	1000 이상	150	200
2회차	10	80	1000 이상	80	300
3회차	36	80	1000 이상	100	200
4회차	37	80	1000 이상	200	300
5회차	10	40	1000 이상	150	300

* 순수 잔토리졸 함량 기준
[a] Mitis-salivarius Bacitracin Agar
[b] Brain Heart Infusion Agar

접촉 사멸 최소농도는 triclosan과 유사했으나, 일반 호기성 정상 세균총에는 효과가 triclosan 보다 떨어짐을 알 수 있었다(표 4). 그러므로 triclosan은 병원성균 뿐 아니라 일반 세균의 정상 세균총에도 광범위 항균력을 가지고 있는 반면 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물은 치아우식증 유발균주에만 매우 선택적인 항균력을 보여 주고 있다. 또한 그림 1은 Dentocult SM Kit을 이용한 결과로써, 타액 내 mutans streptococci에 대한 잔토리졸의 항균력이 triclosan보다 우수함을 보여 주고 있다.

3.4. 치약의 항균력 평가: 세균 5분 접촉 사멸 최대 희석배수 결과

Curcuma xanthorrhiza 추출물을 함유한 실험 치약은 1:640 희석농도에서 5분간 접촉 시 4가지 종류의 mutans streptococci(*Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 33535, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27352, *Streptococcus mitis* ATCC 903)가 모두 사멸되었으나 대조 치약에서는 그 보다 높은 농도인 1:320 희석농도에서 세균이 사멸되어 실험 치약의 항균 효능이 대조 치약보다 우수한 것을 알 수 있었다.

3.5. 지속적 항균 효과

3.5.1. 우치 실험

본 실험은 세균이 당대사를 한 뒤 최종산물로 형성되는 산생성양을 Phenol red를 사용하여 비색법으로 확인한 것으로써, 세균활동이 왕성하여 당분해를 통해 pH가 내려가면 Phenol red(pH 6.6~8.0 사이 색상 변화)가 본래의 빨간색에서 오렌지색을 거쳐 노란색이 되는데, 만일 항균물질이 표면에 잔류하면서 시간 경과에 따라 서서히 방출되어 균 성장이 억제되면 색상이 초기 색상 그대로 빨간색(pH 7.4~7.6)을 유지하게 된다. 그림 2에서 보듯이 9시간 배양 후 음성 대조군, 불소 처리군, chlorhexidine 1%를 처리한 우치 모두에서 노란색으로의 색상 변화가 나타난 반면, *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 처리군에서는 그대로 빨간색을 유지하여 균에 의한 산생성이 억제됨을 알 수 있었다.

그림 1. 타액 내 mutans streptococci에 대한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물(Cx)과 Triclosan(Tc)간에 농도별 항균효과(Dentocult SM kit)

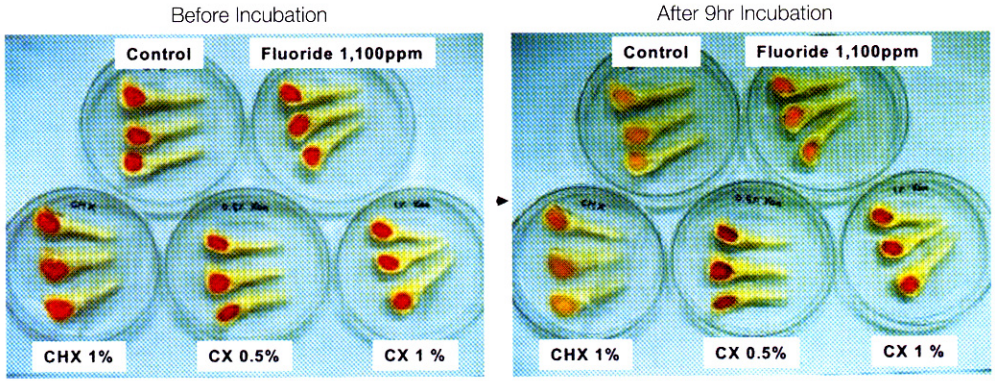

그림 2. 우치 표면에 치아우식 유발균의 배양 및 산생성에 따른 Phenol red의 색상 변화
(CHX: Chlorhexidine, CX: *Curcuma xanthorrhiza*)

3.5.2. Hydroxyapatite disk를 이용한 잔류 효과 평가

인공 hydroxyapatite disk에 시험물질을 도포하고서 9시간 배양 후 색조변화를 관찰한 결과 대조군에서는 산생성에 의해서 완전히 노란색으로 변한 반면, 불소군에서는 색깔이 붉은 색에서 노란색으로 변하는 중이였으며, chlorhexidine, triclosan 및 잔토리졸 1%와 0.2% 처리군에서는 그대로 빨간 색을 유지하여 균에 의한 산생성이 억제됨을 알 수 있었다. 또한 유리 칼슘 농도를 분석한 결과 chlorhexidine, triclosan 및 잔토리졸 처리군은 대조군 및 불소 처리군에 비해서 유의하게 칼슘 유리가 억제되는 것을 알 수 있었다(그림 3, $p < 0.05$).

3.6. 구취억제 효과

3.6.1. Gas chromatography를 이용한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 구취억제 임상평가

표 5는 GC를 활용하여 측정된 황화수소를 비교함으로써, 사람에 있어서의 구취발생 정도를 평가한 결과를 보여주고 있다. 대조군은 오전에 Cysteine만 처리하였고, 실험군은 동일인을 오후에 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물로 처리 후 Cysteine을 처리했을 때 발생된 황화수소를 비교한 것이다. *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 처리 후 구강 내 황화수소의 수준이 현저히 감소하였으며, 구취를 약 75%정도 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타났다($p < 0.01$).

3.6.2. 관능검사에 의한 구취 임상평가 실험 결과

(1) 단기 구취 평가

남 · 여 16명을 대상으로 실험군과 대조군간의 교

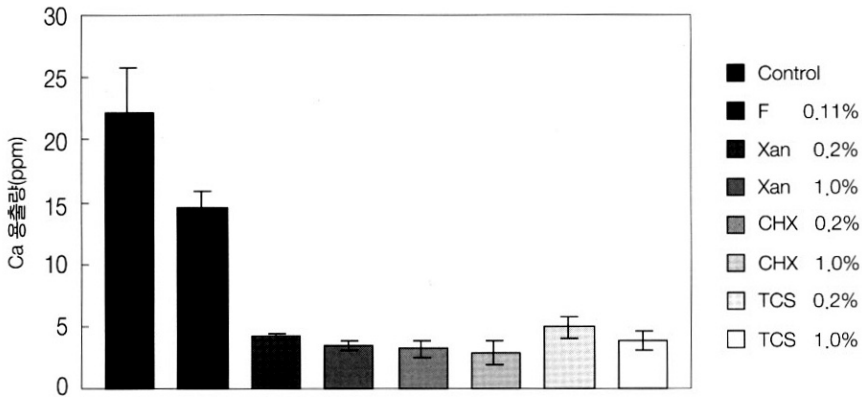

그림 3. 인공 hydroxyapatite disk를 이용한 칼슘 용출량 비교(Xan: 잔토리졸, CHX: Chlorhexidine, TCS: Triclosan)

표 5. Gas chromatography를 이용한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 구취억제 임상평가

구분	피검자수(명)	H_2S Area	Difference	감소율	P값*
대조군	21	320,492 ± 341,694	239,615 ± 312,480	74.8%	$p < 0.01$
실험군	21	80,876 ± 112,726			

*: Wilcoxon signed rank test

차실험을 통하여 얻은 결과가 표 6에 제시되어 있다. 칫솔질 1시간 후에 구취 관능 지수는 실험치약과 대조치약간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 칫솔질 2시간 후에는 실험치약이 2.84, 대조치약이 3.34의 구취 지수를 나타냈으며, 3시간 후에는 실험치약이 3.73, 대조치약이 4.34로 나타났다. 칫솔질 2시간 및 3시간 이후에는 실험군이 대조군에 비해서 통계적으로 유의한 수준으로 구취가 감소하였다($p < 0.05$).

(2) 장기구취 평가

남 · 여 71명을 대상으로 3일간 칫솔질을 금지한 상태에서 치약 슬러리만으로 하루 2회 양치를 시킨 뒤 구취변화를 측정한 결과 Base line 상태와 치약 슬러리 사용 1일차에서는 실험군과 대조군 간에 구취발생정도에 있어서 유의한 차이가 나타나지 않았다(표 7). 그러나 치약 슬러리 양치 2일과 3일 후에는 실험군의 구취 지수 값이 각각 4.12와 4.28을 나타내었고, 대조군은 4.59와 4.72를 나타내어서 실험군의 구취 지수가 대조군의 구취지수 보다 유의한 수준으로 낮음을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

4. 고 안

최근 들어 환경 친화적인 생활을 추구하는 시류에 더불어 각종 화학물질에 대한 여러 가지 부작용에 대한 우려가 증가되고 있다. 이러한 문제가 구강위생용품 분야에도 동일하게 적용되어서, 각종 구강위생용품에 함유되어 항 세균효과를 나타내는 물질도 가능하면 천연물에서 찾고자하는 시도가 많다. 외국에서는 Propolis[35,36], Oolong tea[37], Funoran[38] 등을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있고, 국내에서는 자몽씨 추출물[19]이나 녹차나 솔잎[20], 호장근[22], 패(*Ishige okamura*)[39], 으름덩굴[40] 등의 천연 추출물을 이용해서 항균효과를 알아보려는 시도가 있어왔다. 그러나 대부분의 천연 추출물들은 합성 항균제에 대항할 만한 효능이 부족하거나 가격이나 기존 원료와의 상용성 측면, 원료에 따른 독성 등 실제로 제품화

표 6. 치약 사용 후 시간 경과에 따른 구취 관능평가 결과(Mean±SD)

구분	피검자 수(명)	칫솔질 직후	1시간 후	2시간 후	3시간 후
실험군	16	0.02±0.06	1.48±1.09	2.84±1.21	3.73±1.12
대조군	16	0.19±0.54	2.08±1.02	3.34±0.94	4.34±1.14
p값*		0.23	0.08	0.02	0.00

*: paired t-test

표 7. 치약 슬러리 사용 일수에 따른 구취관능 평가 결과(Mean±SD)

구분	피검자 수(명)	치면세마 전	1일차	2일차	3일차
실험군	35	3.93±1.21	4.10±0.94	4.12±0.76	4.28±0.81
대조군	36	3.96±1.27	4.11±0.85	4.59±0.94	4.72±0.90
p값*		0.94	0.81	0.03	0.05

*: t-test

시키기에는 많은 어려움이 있어서, 산업제품으로의 실제 개발은 미미한 실정이다. 이런 산업화 요인에 비춰 볼 때 본 연구에서 이용한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물인 잔토리졸은 구강 유해균인 치아우식증, 치주질환 및 구취 원인균에 대한 선택적 항균 효과가 우수하였고, 원료 공급이 용이하며, 원료 내에 주성분인 잔토리졸의 함량이 높아서 개발 가능성이 높은 천연소재라 할 수 있다. 기존의 화학합성 항균제의 부작용 중 하나는 일반적으로 선택적 항균력 대신에 광범위한 항균력[12]을 발휘하기 때문에 구강 내 정상 세균총의 균형을 깨뜨려서 숙주에 대한 자연적 이점을 손상시키며, 또한 저항성균주의 출현을 가속화시켜 항균물질에 대한 교차 내성의 심각성을 갖고 있다[13,14]. 예를 들어 Chlorinated Diphenylether인 triclosan은 *Pseudomonadaceae* 종 이외에는 거의 모든 균주에 걸쳐서 광범위 항균력을 보여 주는 것으로 알려져 있다. 작용 기전은 *Escherichia coli* 등 여러 세균의 지방산 생합성에 필수 효소인 enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI)을 억제하여 항균력을 발휘하는 것으로 밝혀졌고, sub-lethal 농도에서는 FabI 유전자 돌연변이체를 보이는 균주의 저항성을 유도한다는 보고도 있다[41,42]. 또한 이들 저항 균주는 화학 구조적으로 관련이 없는 다른 종류의 항균제에 교차 저항을 유도할 수 있다는 가능성도 제기되었다[41,42]. 본 연구 결과에서도 triclosan은 타액 내 구강 유해 세균 뿐 아니라 일반 호기성 정상 세균총에도 강한 항균력을 보이고 있었다. 이에 비해 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물인 잔토리졸은 치아우식증 유발균주인 mutans streptococci에 대한 5분 접촉 사멸 최소농도는 triclosan과 유사했지만, 일반 호기성 정상 세균총에는 효과농도가 1000 ppm이상으로 triclosan(200 ppm)보다 항균효과가 확실히 떨어짐을 알 수 있었다. 그러므로 triclosan은 병원성균 뿐만 아니라 일반 정상 세균총에도 광범위 항균력을 가지고 있는 반면, *Curcuma xanthorrhiza* 추출물은 구강질환을 유발하는 병원성 균주에만 매우 선택적인 항균력을 가져서, 장기간 사용한다 하더라도 구강 내 정상 세균총의 균형에 별다른 영향을 끼치지 않을 것으로 평가되었다.

치약에는 항균 물질 뿐만 아니라 치약을 구성하고 있는 여러 성분들이 함께 존재하는데, 항균물질이 이런 여러 성분과 조화를 이루면서 항균력을 보존하는 것이 중요하다. 일반적으로 치약에는 계면활성제로써 SLS(Sodium Lauryl Sulfate)가 함유되어 있는데, 이 물질은 음이온 성질이 강한 물질이다. 그 결과 대표적인 양이온 항균물질인 chlorhexidine은 치약에 포함시키기 어려운 것으로 알려져 있다. 그러

나 본 연구에서는 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물을 함유한 실험치약과 대조치약을 5 분간 세균과 접촉시켜서 세균을 사멸시킬 수 있는 농도까지 계속 희석시킨 결과, 실험 치약은 1:640 희석비율에서 5분 접촉 시 세균이 사멸되었으나, 대조 치약에서는 그보다 높은 농도인 1:320 희석비율에서 세균이 사멸되었다. 즉, 본 실험에서 사용한 실험 치약의 항균효능이 대조 치약보다 우수한 것을 알 수 있었으며, 치약 내 여러 성분과의 적합성에도 큰 문제는 없는 것으로 판단되었다.

구강 조직 내 약효물질의 임상적 효능을 평가하기 위해서는 첫째로 그 약물 자체의 효능이고, 두 번째로는 그 약물이 병소에서 유효 농도 이상으로 얼마나 오랫동안 유지되는가하는 점이다. Marsh[43]는 치태 조절에 사용된 항균물질이 실험실 실험에서는 효능이 좋다하더라도, 실제로 구강 내에 적용된다면 타액에 의해서 희석되거나, 연하작용에 의해서 쉽게 제거되기 때문에 유효농도 이하로 감소되기 쉽다고 주장하였다. 즉, 치아나 점막 표면, 치태 표면에 약물이 부착해서 존재하는 잔류성(substantivity)이 매우 중요하다[44]. 잔류성이 낮은 물질은 약물 도포내지는 구강위생제 사용 후 즉시 타액에 의해 제거 되므로 유효 농도를 유지하기가 쉽지 않으며 더욱이 구강위생제품은 사용 후 물로 세정 하는 경우가 대부분이므로 세정 작용에 대항하여 조직 표면에서의 잔류하는 정도는 매우 중요한 속성이다. 본 연구에서 지속적 항균 효과(antimicrobial substantivity)를 평가하기 위해서 우치 표면을 불소, chlorhexidine, *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 등으로 처리한 뒤 20분간 Vortex 세척 후 치아우식증 유발균을 배양시켜서 이로 인해 발생한 산 생성의 정도를 Phenol red를 이용한 색상 변화로 관찰하였다. 그 결과 *Curcuma xanthorrhiza* 군에서는 불소나 chlorhexidine을 사용한 군에 비해서 상대적으로 산생성이 억제됨을 알 수 있었다. 이는 불소와 chlorhexidine이 수용성(hydrophilic)인 성질을 띠는데 비해서 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물은 소수성(hydrophobic)을 띠기 때문으로 판단된다. 또한 이러한 지속적 항균효과는 hydroxyapatite disk 모델을 통한 유리 칼슘 정량을 통해서도 본 추출물이 치아 표면에 부착하여 서서히 방출되는 성질을 가졌음을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

건강의 개념이 단순한 질병의 유무가 아니라 사회적인 개념도 포괄하게 됨에 따라서, 과거에 비하여 통증을 유발하는 구강질환 뿐만 아니라 삶의 질과 연관된 구취에 대한 관심도 증가하고 있는 실정이다. 구취는 일차적으로 구강 내 혐기성 세균에 의한 부패 현상으로 주로 황 성분 함유 아미노산인, 펩타이드 및 단백질의 부패 과정을 통해 형성되는 휘발성 황 화합물(VSC)에 기인한다. 이외 부패과정 중 생성되는 amine, indole, skatole과 저급 휘발성 지방산인 propionic acid, butyric acid, valeric acid 등도 VSC와 함께 어우러져 특유의 구취를 구성하고 있다. 본 임상 실험 결과 구취 및 치주염을 유발 하는 혐기성 균주인 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586에 대한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 우수한 실험실 상의 항균 효능이 실제 임상에서도 구취억제로 연결되었음을 알 수 있었다. 구취 측정 방법 중에서 Gas chromatography(GC)에 황화합물에 매우 감도가 우수한 FPD(Flame Photometric Detector)를 장착하면 호기속의 황 화합물을 나노그람 이하까지 측정할 수 있는 매우 정교한 기기가 될 수 있다[7]. 본 임상실험에서 GC를 활용하여 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 구취 감소효과를 평가한 결과, 추출물 처리 후 구강 내 VSC 수준이 현저히 감소하여 평균 75%까지 구취가 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 효능은 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물을 치약에 배합하였을 경우에도 그대로 존재하여, 대조 치약에 비해 임상

적으로 우수한 구취 감소 효과를 나타내고 있었다. 단기 구취감소 효과를 남 · 여 16명을 대상으로 실험군과 대조군간의 교차실험을 통하여 얻은 결과 칫솔질 후 2시간 경과 후에는 실험치약이 평균 2.84, 대조치약이 3.34의 구취 지수를 나타내었으며, 3시간 경과 후에는 실험치약이 3.73, 대조치약이 4.34로 나타났다. 즉 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물을 함유한 실험치약이 칫솔질 후 2~3시간 이후까지 구취감소효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 남 · 여 71명을 대상으로 칫솔질을 배제한 3일간 장기구취 평가에서는 실험 착수 2일과 3일 후에는 실험군의 구취 지수가 각각 평균 4.12와 4.28을 나타냈고, 반면에 대조군은 4.59와 4.72를 나타내어 실험치약이 대조치약 보다 구취감소에 효과적이었다.

본 연구 결과 *Curcuma xanthorrhiza*에서 추출한 잔토리졸은 치아우식, 치주병 및 구취 유발 균주에 선택적인 항균력을 가지면서 잔류효과도 뛰어난 안정된 화합물로 확인되었다. 그러나 어떠한 기전에 의해서 이러한 항균효과가 발현되는지에 대해서는 향후 자세한 미생물학적인 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다. 또한 본 실험을 통하여 잔토리졸이 구강 내 유해세균의 증식과 성장을 억제한다는 사실은 밝혀졌으나, mutans streptococci의 치면부착에 관여하는 glucosyltransferase와 같은 효소작용까지도 억제하는지에 대해서는 추후 연구를 통해서 밝혀야할 것이다.

5. 결 론

본 연구에서는 *Curcuma xanthorrhiza*에서 추출한 잔토리졸의 구강 내 유해균에 대한 선택적 항균력, 치아 표면에 잔류에 의한 지속적 항균 효과, 타액 내 mutans streptococci에 대한 선택적 항균력 평가 및 다양한 차원의 구취억제 임상 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치아우식증 원인균인 mutans streptococci에 대한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 5분 접촉 사멸 최소 농도가 잔토리졸 함량 기준으로 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 33535, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27352, *Streptococcus mitis* ATCC 903에서 각각 20, 10, 20, 20 ㎍/㎖이었다.
2. 구취 및 치주염을 유발 하는 혐기성 균주인 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586에 대한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 최소 성장 억제 농도(MIC)는 추출물 중 잔토리졸 함량으로 각각 15, 10, 10 ㎍/㎖이었다.
3. 타액 내 mutans streptococci에 대한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 5분 접촉 사멸 최소 농도가 추출물 중 잔토리졸 함량 기준으로 80 ppm였으나, 일반 호기성 정상 세균총에서는 1,000 ppm까지도 효과가 없는 것으로 나타났다. 즉, *Curcuma xanthorrhiza* 추출물은 구강내 병원성 균에만 매우 선택적인 항균력을 보여서 장기간 사용 시에도 구강 환경 내 정상 세균총의 균형에 영향을 끼치지 않을 것으로 사료되었다.
4. *Curcuma xanthorrhiza* 추출물을 함유한 치약의 항균력을 평가하기 위해서 세균의 5분 접촉 사멸 최대 희석배수를 대조치약과 비교한 결과 실험치약은 1:640 희석 농도에서 5분간 접촉했을 때 mutans streptococci가 사멸되었으나, 대조 치약에서는 그보다 높은 농도인 1:320 희석 농도에서 세균이 사멸되었다.
5. *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 지속적 항균 효과를 평가하기 위해서 우치 표면에 불소, chlorhexidine, *Curcuma xanthorrhiza* 추출물로 처리한 뒤 20분간 Vortex 세척 후 치아우식 유발

균을 배양하여 산 생성 정도를 Phenol red 비색법으로 평가한 결과, *Curcuma xanthorrhiza* 추출물군에서는 다른 물질에 비해서 상대적으로 산생성이 억제됨을 알 수 있었다. 또한 이는 hydroxyapatite disk 모델을 통한 유리 칼슘 정량을 통해서도 본 추출물이 치아 표면에 부착하여 서서히 방출되는 성질을 가졌음을 재차 확인할 수 있었다.

6. 임상시험을 통해서 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 구취억제 효과를 Gas chromatography를 활용하여 평가한 결과, 평균 75%의 구취 억제 효과를 나타냈다($p < 0.01$).
7. *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 함유 치약의 구취 억제 효과를 관능검사를 이용하여 단기 및 장기로 나눠서 임상시험 평가를 시행하였다. 단기 구취 평가에서는 남 · 여 16명을 대상으로 실험군과 대조군간의 교차실험을 시행한 결과 칫솔질 후 2시간 후에는 실험치약이 평균 2.84, 대조치약이 3.34의 구취 지수를 나타냈으며, 3시간 후에는 실험치약이 3.73, 대조치약이 4.34로 나타나서 칫솔질 후 2시간 및 3시간 이후의 실험군과 대조군간의 구취 지수는 통계적으로 유의한 수준으로 실험치약이 우수한 것으로 나타났다($p < 0.05$).
8. 장기구취 평가에서는 남 · 여 71명을 대상으로 실험 착수 2일과 3일 후에는 실험군의 구취 지수가 각각 4.12와 4.28로 나타났고, 대조군은 4.59와 4.72로써 2일차 및 3일차 결과에서는 실험치약을 사용한 피시험자들의 구취 지수가 대조치약을 사용한 피시험자들 보다 낮게 나타났다($p < 0.05$).

이상의 연구 결과를 종합해 볼 때 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물은 치아우식, 치주병 및 구취 유발 균주에 선택적인 항균력을 가지면서 잔류효과도 뛰어난 안정한 화합물로 확인되었다.

참고문헌

1. Harris NO, Garcia Godoy F. Primary preventive dentistry. 6th ed. New Jersey: Prentice Hall;2004:6-13.
2. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariologenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980;44(2):331-384.
3. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986;50(4):353-380.
4. Miller WD. The micro-organisms of the human mouth. the local, general diseases which are caused by them. 1890;reprinted. Basel: Karger;1973.
5. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res 1970;49(2):203-222.
6. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000 1997;14:12-32.
7. Tonzetich J. Production and origin of oral malodor:a review of mechanisms and methods of analysis. J Periodontol 1977;48(1):13-20.
8. Kleinberg I, Codipilly M. The Biological basis of oral malodor formation. In: Rosenberg M, ed. Bad Breath: Research Perspective. 1st ed. Tel Aviv:Ramot Publishing; 1995:13-39.
9. Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methylmercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol 1990;5(4):195-201.
10. Adolfsson Erici M, Pettersson M, Parkkonen J, Sturve J. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. Chemosphere 2002;46(9-10):1485-1489.
11. Rule KL, Ebbett VR, Vikesland PJ. Formation of chloroform and chlorinated organics by free-chlorine-mediated oxidation of triclosan. Environ Sci Technol 2005;39(9):3176-3185.
12. Furia TE, Schenkel AG. A new, broad-spectrum bacteriostat. Soap Chem Specialties 1968;44:47-50,116-122.
13. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Exposure of sink drain microcosms to triclosan: population dynamics and antimicrobial susceptibility. Appl Environ Microbiol 2003;69(9):5433-5442.
14. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of *in vitro*

plaque ecosystems. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(11):3531-3538.
15. Duarte S, Koo H, Bowen WH, et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. Biol Pharm Bull 2003;26(4):527-531.
16. Koo H, Cury JA, Rosalen PL, Ambrosano GM, Ikegaki M, Park YK. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. Caries Res 2002;36(6):445-448.
17. Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. Caries Res 1999;33(6):441-445.
18. Sato S, Yoshinuma N, Ito K, et al. The inhibitory effect of funoran and eucalyptus extract-containing chewing gum on plaque formation. J Oral Sci 1998;40(3):115-117.
19. 정세환, 배광학, 문혁수, 백대일, 김종배, 박덕영. 자몽종자 추출물과 차추출물 및 UDCA를 배합한 구내분무액의 *S. mutans*와 구취 감소효과 및 치은염완화효과에 관한 연구. 대한구강보건학회지 1998;22(1):37-46.
20. 배광학, 이병진, 장윤경 외 6인. NaF CPC 녹차추출액 및 솔잎 추출물을 배합한 구강양치액의 치주질환예방효과와 구취 감소효과 및 치아우식증예방효과에 관한 연구. 대한구강보건학회지 2001;25(1):51-59.
21. 홍석진, 최유진, 임희순, 손재범, 정성숙. 금은화와 포공영추출물이 첨가된 치약의 치면세균막 및 치은염에 미치는 영향. 대한구강보건학회지 2001;25(4):347-355.
22. 김신규, 송주희, 김종배, 장기완, 전재규. 호장근의 항세균효과 및 항부착효과. 대한구강보건학회지 2005;29(1):80-90.
23. Council of Europe. European Pharmacopoeia Supplement: Tumeric, Javanese Curcumae xanthorizae rhizoma. 3rd ed. Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia;2001;1557-1558.
24. Itokawa H, Hirayama F, Funakoshi K, Takeya K. Studies on the antitumor bisabolane sesquiterpenoids isolated from *Curcuma xanthorrhiza*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1985; 33(8):3488-3492.
25. Yasni S, Imaizumi K, Sin K, Sugano M, Nonaka G. Identification of an active principle in essential oils and hexane-soluble fractions of *Curcuma xanthorrhiza* ROXB. Showing triglyceride-lowering action in rats. Food Chem Toxicol 1994;32(3):273-278.
26. Lin SC, Lin CC, Lin YH, Supriyatna S, Teng CW. Protective and therapeutic effects of *Curcuma xanthorrhiza* on hepatotoxin-induced liver damage. Am J Chin Med 1995; 23(3-4):243-254.
27. Kim SH, Hong KO, Hwang JK, Park KK. Xanthorrhizol has a potential to attenuate the high dose cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. Food Chem Toxicol 2005;43(1):117-122.
28. Claeson P, Pongprayoon U, Sematong T, et al. Non-phenolic linear diarylheptanoids from *Curcuma xanthorrhiza* : A novel type of topical anti-inflammatory agents: structure-activity relationship. Planta Med 1996; 62(3):236-240.
29. Claeson P, Panthong A, Tuchinda P, et al. Three non-phenolic diarylheptanoids with anti-inflammatory activity from *Curcuma xanthorrhiza*. Planta Med 1993;59(5):451-454.
30. Choi MA, Kim SH, Chung WY, Hwang JK, Park KK. Xanthorrhizol, a natural sesquiterpenoid from *Curcuma xanthorrhiza*, has an anti-metastatic potential in experimental mouse lung metastasis model. Biochem Biophys Res Commun 2005;326(1):210-217.
31. Rimpler H, Hansel R, Kochendoerfer L. Xanthorrhizol, a new sesquiterpene from *Curcuma xanthorrhiza*. Z Naturforsch B 1970;25(9):995-998.
32. Hwang JK, Shim JS, Pyun YR. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. Fitoterapia 2000;71(3):321-323.
33. Hwang JK, Shim JS, Baek NI, Pyun YR. Xanthorrhizol: A Potential Antibacterial Agent from *Curcuma xanthorrhiza* against *Streptococcus mutans*. Planta Med 2000;66(2):196-197.
34. Sharma NC, Galustians HJ, Qaquish J, et al. The clinical effectiveness of a dentifrice containing triclosan and a copolymer for controlling breath odor measured organoleptically twelve hours after toothbrushing. J Clin Dent 1999;10(4):131-134.
35. Duarte S, Koo H, Bowen WH, et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. Biol Pharm Bull 2003;26(4):527-531.
36. Koo H, Cury JA, Rosalen PL, Ambrosano GM, Ikegaki M, Park YK. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. Caries Res 2002;36(6):445-448.
37. Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. Caries Res 1999;33(6):441-445.

38. Sato S, Yoshinuma N, Ito K, et al. The inhibitory effect of funoran and eucalyptus extract-containing chewing gum on plaque formation. J Oral Sci 1998;40(3):115-117.
39. 민윤기, 노재승, 이수경, 장기완. 패(Ishige okamura)추출물의 치아 우식원인균에 대한 항 세균 효과. 대한구강보건학회지 1977;21(1):41-50.
40. 장기완, 강동오, 김환규. 수종 우식원인균에 대한 으름덩굴(Akebia quinata)추출물의 항세균 및 saliva-coated hydroxyapatite beads에 대한 부착 억제 효과. 대한 구강보건학회지 1997;21(4):675-684.
41. Heath RJ, Rock CO. Enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) plays a determinant role in completing cycles of fatty-acid elongation in *Escherichia coli*. J Biol Chem 1995;270(44):26538-26542.
42. Levy CW, Roujeinikova A, Sedelnikova S, et al. Molecular basis of triclosan activity. Nature 1999;398(6726):383-384.
43. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res 1992;71(7):1431-1438.
44. Scheie AA. The Role of antimicrobials. In Ole Fejerskov and Edwina Kidd: Dental Caries:The Disease and its clinical Management. Oxford UK: Blackwell Publishing Ltd; 2003:179-187.

Abstract

A highly selective antibacterial effect of *Curcuma xanthorrhiza* extract against oral pathogens and clinical effectiveness of a dentifrice containing *Curcuma xanthorrhiza* extract for controlling bad breath

Baek-Il Kim, Sang-Nyun Kim[1], Sug-Youn Chang[1], Kyo-Tae Moon[1], Yun-Seog Kim[1], Jae-Kwan Hwang[2], Seung-Hwa Jeong, Min-Young Kim, Hae-Sun Kim, Ho-Keun Kwon

Department of Preventive Dentistry and Public Oral Health, College of Dentistry, Yonsei University

[1]LG Household & Health Care R&D Park

[2]Department of Biotechnology, College of Engineering, Yonsei University

Keywords: antibacterial, bad breath, Curcuma xanthorrhiza, dentifrice, mutans streptococci, xanthorrhizol

Objectives: The aim of this study was to determine potential for developing oral hygiene products containing *Curcuma xanthorrhiza* extract (Cx) of which antibacterial activity against cariogenic mutant streptococci and G(-) anaerobic bacteria with odorigenic and periopathogenic capacity has been published.

Methods: With growing concerns about synthetic antibacterials, a concept of a selective antibacterial activity of Cx against mutants streptococci while showing a minimal damage on normal flora was developed. The minimal bactericidal concentrations exerted by Cx and triclosan to mutants streptococci and aerobic normal flora were determined from the concentrations in which no bacteria survived on either MS agar or BHI agar, respectively. The substantive antibacterial activity on the tooth surface was compared by adopting a protocol that cleansed bovine teeth/hydroxyapatite pretreated with Cx, chlorhexidine, ticlosan and fluoride were layered with soft agar containing *S. sobrinus*, sucrose, and phenol red as a pH indicator and incubated for their residual activity. The effectiveness of a dentifrice containing Cx for controlling breath odor was evaluated by a panel of two judges using a nine-point hedonic scale. Two separated sets of clinical designs, a double blind, cross-

over of 16 subjects for short term effect and a double blind 3 day nonbrushing model using 71 subjects for long-term effect were performed to evaluate clinical effects on bad breath.

Results: The Cx exhibited a highly selective activity against mutants streptococci with almost no effect on aerobic normal flora upto 1,000 ppm, while triclosan did show a strong effect on bacteria without discrimination. The greater substantive Cx proved by both bovine teeth and HA disk was considered as a promise for dentifrice and mouthwash application. The results of two clinical study support the conclusion that dentifrice with Cx provides effective control of bad breath compared to placebo dentifrice.

Conclusions: Altogether, Cx with a highly selective antibacterial activity appears to be an attractive candidate as a replacement for chemicals and oral hygiene products with Cx will be a new paradigm delivering natural benefit for consumers.