

발간등록번호
11-1541000-000769-01

제 출 문

농림수산식품부장관 귀하

잎파래를 이용한 구강건강소재 및 제품 개발 (Development of oral health material and products derived from *Enteromorpha linza*)

이 보고서를 “잎파래를 이용한 구강건강소재 및 제품 개발에 관한 연구
(Development of oral health material and products derived from
Enteromorpha linza)” 과제의 보고서로 제출합니다.

기 장 물 산 (주)

2010 년 11 월 일

농 립 수 산 식 품 부

주관연구기관명 : 기장물산(주)
주관연구책임자 : 김 양 춘
연 구 원 : 박 남 희
연 구 원 : 이 경 용
연 구 원 : 황 선 영
위탁연구기관명 : 신라대학교
RIS 사업단
위탁연구책임자 : 최 인 순
선 임 연 구 원 : 최 재 석
연 구 원 : 최 은 영

요 약 문

- ① 해조류 잎파래로부터 구강질환을 일으키는 균에 대해 항균 활성을 가지는 물질을 분리, 정제하는 효과적인 분리정제방법을 확립하기 위한
- ② 항균 활성 물질의 대량 생산 기술 및 시제품의 물리적 특성 연구 등 산업화를 위한 기술 개발
- ③ 바다 폐기물로 버려지는 제주도 연안의 잎파래를 활용하여 자원화 함으로써 쓰레기 수거에 소요되는 경제적 손실을 감소하고 해양오염 해소에 기여하기 위한
- ④ 해조 자원에서 분리한 천연 구강건강소재 개발로 해조산업 및 천연물 분리 연구 활성화와 해조류 양식 산업의 소득증대에 이바지하기 위한

I. 제 목

잎파래를 이용한 구강건강소재 및 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

국내 연안의 대형해조류가 외국의 경우에 비하여 손색이 없는 생리활성물질의 훌륭한 원천이며 산업적 개발가치가 큰 것으로 나타나고 있다. 그러나 해조류를 이용한 구강질환 예방 소재 및 고부가가치화와 관련된 연구는 충분히 이루어지고 있지 않은 실정이다.

치주질환은 *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)와 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)를 포함한 한 그룹의 gram-negative 치주 병원균에 의해 시작된 만성 염증 질환이다. *P. intermedia*와 *P. gingivalis*는 치근막염의 다양한 형태의 발달과 관련되어 있다(Socransky et al. 1999). 치은염이나 치주염과 같은 일부 구강질환의 경우 이들을 치료 또는 예방하기 위하여 개발된 항생제 혹은 화학약품은 매우 제한적이므로(Leke N, Grenier D, Golgner M, Mayrand D et al. 1999), 대부분의 경우 치주질환수술 등의 수술요법이나 기계적 요법에 의해 치료하고 있으며, 그 예방을 위한 방법은 제한적으로 제안되고 있다. 따라서 본 연구는 구강질환 예방 소재를 잎파래로부터 분리정제하고, 최적의 추출방법과 산업화 연구를 통하여 천연 구강건강소재의 개발과 실용화를 목표로 한다.

2. 중요성

연구개발 목표성취에서 얻어지는 결과에 대하여 산업적·기술적인 중요성을 요약하면 다음과 같이 정리된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

구분	연구개발내용	연구개발범위
1차년도 (2009년)	<p>잎파래를 이용한 항치주염, 치은염 구강건강소재 개발</p> <p>1. 잎파래의 항균물질 추출 조건 확립 2. 잎파래 추출물 및 분획물의 항균활성 3. 잎파래의 항균물질 정제조건 확립 4. 잎파래의 정제된 항균물질의 항균활성 5. 잎파래를 이용한 간이임상(위탁개발)</p>	<p>1. 잎파래의 전처리 및 에탄올 추출물 및 물 추출물, 분획물의 제조 2. 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균활성, 최소저지농도(MIC)를 이용한 항균활성 측정 3. 잎파래로부터 항균물질 정제 및 규명 4. 잎파래로부터 정제된 항균물질과 standard 물질 및 그 외 지방산의 항균활성 5. 구강질환예방에 관한 간이 임상으로 항균 효능 확인</p>
2차년도 (2010년)	<p>항균활성 물질의 구조 분석 및 구강건강 제품 개발</p> <p>1. 정제된 항균활성 물질의 구조분석(위탁개발) 2. 구강위생소재를 함유한 제품 결정 3. 시제품의 항균 효능 평가 4. 시제품의 물리적 특성 평가 5. Pilot 추출 생산 공정개발(위탁개발)</p>	<p>1. GC/MS, NMR을 이용한 항균물질의 구조분석 2. 치약 또는 구강청정제 제품 개발 3. 치약 시제품 제조 및 항균 효능 평가 4. 치약 시제품의 pH, 점도, 굴절률, 색도 등 물리적 특성 확인 5. 잎파래 항균 물질 대량 추출 생산 방법 확인</p>

IV. 연구개발결과

1. 잎파래로부터 구강건강 소재개발

- 우리나라 해안에서 용이하게 수득할 수 있고 예로부터 식자재로 사용된 해조류 잎파래로부터 대표적인 구강질환인 치은염과 치주염 모두에 특이적으로 항균활성을 나타냄을 확인하였다.
- 용매 극성에 따른 분획, Sephadex LH-20 gel chromatography와 reverse-phase high performance liquid chromatography(Alltima C18 column, 10 mm ID x 25cm)법을 이용하여 항균활성 물질을 분리하였다.
- 항균활성 물질은 역상 HPLC 상에서 95% acetonitrile을 전개용매로 사용하여 isocratic으로 수행하였을 때 6.2분과 7.8분에서 분취되었고 LC-MS, GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectroscopy 법을 이용하여 분석한 결과, 불포화지방산인 6,9,12,15-octadecatetraenoic acid (stearidonic acid, C_{18:4, n-3})와 9,12,15-octadecatrienoic acid (gamma-linolenic acid, C_{18:3, n-6})로 규명되었다.
- Stearidonic acid의 수율은 건조 잎파래 분말로부터 6.33 × 10⁻³% 이었고 gamma-linolenic acid의 수율은 6.47 × 10⁻³% 이었다. SA와 GLA의 MIC(최소저해농도) 값은 치은염균(*P. intermedia*)에서 39.06 μg/mL, 치주염균(*P. gingivalis*)에서 9.76 μg/mL으로 높은 항균활성을 나타내었다. 이는, 기존에 많이 사용되고 있는 항생제인 chlorhexidine의 치주염균에 대한 항균활성의 MIC값이 8 μg/mL인 것과 비교하면 매우 높은 수준의 효능이라는 것을 알 수 있다. 이러한 결과로부터 잎파래에서 분리한 SA는 치주질환을 예방하는 천연 구강건강소재로 사용가능하며 그 개발가치가 매우 높다고 사료된다.
- 그 외 불포화지방산을 이용하여 SA, GLA와 함께 항균활성 비교 실험을 진행하였고 SA, GLA와 비슷한 활성을 나타내는 불포화 지방산으로 ALA(α -linolenic acid, 18:3n-3), EPA(eicosapentaenoic acid, 20:5n-3), DHA(docosahexaenoic acid, 22:6n-3), LA(linoleic acid, 18:2n-6), AA(arachidonic acid, 20:4n-6)가 있음을 확인하였다.

2. 잎파래 항균활성에 관한 간이임상

- 잎파래 항균활성에 관한 간이임상을 위해 잎파래를 주성으로 추출한 뒤 추출물을 함유한 구강청정제를 제조하였다

- 잎파래 추출물이 함유된 구충청량제는 임상지수 뿐만 아니라, 치은염 관련 균에 대한 강력한 anti-bacterial 효능을 가지고 있음을 이 결과를 통해서 알 수 있었다.

3. 잎파래 항균 물질의 산업화연구

- 잎파래로부터 분리한 항균물질인 불포화지방산 SA와 GLA를 추출하기 위해 헥산을 이용하여 추출물을 대량 제조하였다.
- 잎파래 헥산 추출물을 함유한 치약 시제품을 제조하였고 2%를 함유하였을 때 치은염과 치주염에 항균활성이 나타남을 확인하였다.
- 치약 시제품의 물리화학적 특성을 확인한 결과 점도, 굴절률, pH, 색도 모두 농도의존적이었으며 색도를 제외하고는 제품화 하는데 문제가 없음을 확인하였다.
- 잎파래를 헥산으로 추출하였을 경우 잎파래의 고유 향기도 함께 추출되는 장점이 있는 반면 잎파래 특유의 색소도 함께 추출되어 색소제거의 공정을 추가해야 할 필요성이 제기되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 연구개발 결과를 (주)그린원일에 OEM(Original Equipment Manufacturing)하여 구강용품(치약 등)으로 제품화할 계획이다.
- 잎파래에서 분리한 항균활성 물질인 SA와 GLA를 함유한 추출물에 대한 국내 기허가 사용례가 없고 용법·용량, 유효 성분의 종류 및 분량에 관한 정확한 데이터가 없어 앞으로 추가 연구가 필요하다. 불포화지방산인 SA와 GLA를 함유한 잎파래의 대량 추출 조건을 수립하고 제제의 안전성 및 안정성을 비롯하여 제형 연구를 통해 추후 산업화할 계획이다.

SUMMARY

Title of project

Development of oral health material and products derived from *Enteromorpha linza*

Introduction

Object

Seaweed off the coast of Korea appears to be a prominent source of bioactive substances, as compared to seaweed found in other areas, and has great industrial development value.

In this regard, there has been insufficient research performed on oral disease prevention material and the higher business value of the use of seaweed.

Periodontitis is a chronic inflammatory disease initiated by a group of gram-negative periodontal pathogens including *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) and *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). *P. intermedia* and *P. gingivalis* have been implicated in the development of various forms of periodontal disease (Socransky et al. 1999).

Antibiotics or other drugs are rarely recommended to treat or prevent periodontitis(Leke N, Grenier D, Golgner M, Mayrand D et al. 1999). Therefore, in most cases, periodontitis is cured by operative therapy or mechanotherapy.

Thus, we focused on the development and commercialization of natural oral health material through research into optimum isolation and purification methods and industrial applications of the seaweed *E. linza*.

Significance

The significance of the industrial and technical implications obtained from research and development goal achievements may be summarized as follows:

- ① Establishment of an effective isolation and purification method of the material from the seaweed *E. linza* that has antimicrobial activity against *P. intermedia* and *P. gingivalis*, which cause periodontal disease.
- ② Technological development, including mass production of antimicrobial compounds and physical properties of a prototype.
- ③ Contribution to the marine pollution solution by utilizing *E. linza* off the Cheju Island coast, thrown away as sea waste, to create resources and reduce economic losses involved in garbage gathering.
- ④ Contribution to income enhancement of the seaweed farming industry, seaweed industrialization, and natural product separation research revitalization through natural oral health material development through separation from seaweed resources.

Oral health material development from *E. linza*

– Development confirmed that the seaweed *E. linza*, which has been traditionally used as a food material and is easily obtained from the Korean

seashore, showed specific antimicrobial activity against *P. intermedia* and *P. gingivalis* of typical periodontal disease.

– Polarity fractionation, Sephadex LH-20 gel chromatography and reverse-phase high-performance liquid chromatography (Alltima C18 column, 10 mm ID × 25 cm) were performed to identify the active component. The active compound was at 95% (in 6.2 min and 7.8 min) acetonitrile by RP-HPLC and identified as the unsaturated fatty acid, 6,9,12,15-octadecatetraenoic acid (stearidonic acid, C_{18:4, n-3}) and 9,12,15-octadecatrienoic acid (gamma-linolenic acid, C_{18:3, n-6}) by LC-MS, GC-MS, and ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy.

– Stearidonic acid and gamma-linolenic acid yield from dried seaweed tissue was 6.33 × 10⁻³ % and 6.47 × 10⁻³ %, respectively. MIC values were 39.06 μg/mL against *P. intermedia* and 9.76 μg/mL against *P. gingivalis*. MIC value of chlorhexidine was 8 μg/mL against *P. gingivalis*. These data suggest, therefore, that *E. linza* extracts and stearidonic acid may prove useful for treatment of periodontitis.

– There were polyunsaturated fatty acids (PUFAs) present such as alpha-linolenic acid (ALA, 18:3n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), linoleic acid (LA, 18:2n-6) and arachidonic acid (AA, 20:4n-6), which show antimicrobial activity, as compared with stearidonic acid (SA) and γ-linolenic acid (GLA).

The clinical simplicity of *E. linza* antimicrobial activity

– We manufactured a gargle containing an *E. linza* extract created with ethanol fermentation for a relatively simple clinical manifestation of *E. linza* antimicrobial activity.

– We determined that the gargle, which had the *E. linza* extract, had a powerful antibacterial effect not only on the clinical index but also on the gram-negative periodontal pathogens *P. intermedia* and *P. gingivalis*.

Research into the industrial applications of the *E. linza* antibiotic material

– An extract was manufactured using hexane to extract the polyunsaturated fatty acid, SA and GLA, which was the antibiotic material separated from *E. linza*.

– We confirmed antimicrobial activity against *P. intermedia* and *P. gingivalis* with the dentifrice prototype containing 2% of the *E. linza* hexane extract.

– We found no problem in this regard, apart from the fact that viscosity, index of refraction, pH, and color were concentration-dependent, as determined by the physical and chemical properties of the dentifrice prototype.

– The pigment elimination process was added to the extraction of *E. linza* by the hexane because of the advantage of the unique aroma of the extraction and the disadvantage of the extraction having its own pigment.

Research results and practical use plan

– The plan is to make buccal cavity goods (dentifrice, etc.) using Original Equipment Manufacturing (OEM) of Green Wonil Co. Ltd.

– It does not admitted to the experience using the extract containing the SA and GLA in domestic.

– Further study is needed because of a lack of exact data about the type and quantity of effective components.

– The plan is to industrialize the dosage from research on the safety and stability of *E. linza* containing SA and GLA, a polyunsaturated fatty acid.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction 17

 1. Research goal 17

 2. Necessity of the project 17

Chapter 2. Technical status of domestic and foreign state 24

Chapter 3. Contents and results of the project 38

 1. Experimental methods 38

 2. Contents 60

 3. Results 61

Chapter 4. Achievement and contribution of the project 117

Chapter 5. Application plans of the results 120

**Chapter 6. Overseas scientific and technical information
 obtained in the course of the research** 122

Chapter 7. References 126

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	18
제 1절 연구개발의 목적	18
제 2절 연구개발의 필요성	18
제 2 장 국내외 관련기술의 현황	24
제 1절 국내 관련연구의 현황과 문제점	24
제 2절 국외 관련연구의 현황과 문제점	33
제 3절 시장규모	36
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	38
제 1 절 연구수행 방법	38
1. 잎파래로부터 구강건강 소재 개발	38
가. 잎파래의 향균물질 추출조건 확립	38
(1) 해조류 잎파래의 전처리	38
(2) 해조류 에탄올 추출물 및 물 추출물의 제조	38
(가) 잎파래 에탄올 추출물	38
(나) 잎파래 물 추출물	38
(3) 잎파래 분획물의 제조	38
(가) 잎파래 분획물의 제조	38
(나) 분획물 I, II	39
(다) 분획물 III	39
(라) 분획물 IV	39
(마) 분획물 V	39
(바) 보관	39
나. 잎파래 추출물 및 분획물의 향균활성	40

(1) 잎파래의 향균활성 실험 방법	40
(가) 향균활성 실험 방법	40
(나) 대상 균주와 대상 배지	40
(2) 종이 디스크를 이용한 향균활성	40
(3) 최소저지농도(MIC)를 이용한 향균활성	41
다. 잎파래의 향균물질 정제조건 확립	42
(1) 잎파래로부터 향균물질 정제	42
(가) 잎파래 분획물의 수율	42
(나) Sephadex LH-20 gel chromatography를 이용한 정제	42
(다) TLC를 이용한 정제	42
(라) HPLC를 이용한 정제	43
(2) 잎파래로부터 향균물질 규명	43
(가) ESI-MS를 이용한 분자량 분석	43
(나) 향균물질의 Methyl ester화	43
(다) GC/MS를 이용한 정성 분석	43
(라) NMR을 이용한 구조 분석	44
(마) 잎파래 향균물질 순도검정	44
라. 잎파래로부터 정제된 향균물질의 향균활성	44
(1) 잎파래로부터 정제된 향균물질의 향균활성	44
(가) Sephadex 분획물의 향균활성	44
(나) HPLC 분획물의 향균활성	44
(다) Standard 물질의 향균활성	45
(라) 그 외 지방산의 향균활성	45
(마) 다양한 치주질환 원인균에 대한 향균활성	45
(2) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 향균활성	46
(가) Standard 물질의 향균활성	46
(나) 그 외 지방산의 향균활성	46
2. 잎파래 향균활성에 관한 간이임상	47
가. 간이임상을 위한 시제품 제조	47

(1) 잎파래 추출물 제조	47
(2) 잎파래 sephadex 분획물 제조	47
(3) 간이임상을 위한 시제품 제조	47
(4) 간이임상을 위한 시제품의 항균활성	48
(5) 시제품의 품질분석	48
(가) 총 폴리페놀 함량분석	48
(나) Chlorophyll <i>a</i> & <i>b</i>	48
(다) 총 지방산 함량분석	48
(라) 유리 지방산 조성 및 함량분석	49
나. 간이임상시험 연구 대상	49
다. 간이임상시험 연구 설계	49
라. 간이임상 지수 검사	50
(1) Plaque index	50
(2) Gingival index	51
(3) Bleeding on proving	51
(4) <i>P. gingivalis</i> 와 <i>P. intermedia</i> 총균수의 측정	52
(가) Subgingival plaque 수집	52
(나) Real time PCR법 시행	52
(5) 임상시험 대상군의 특징	53
3. 잎파래 항균 물질의 산업화 연구	56
가. 구강건강소재를 함유한 제품 결정	56
(1) 시제품개발	56
(가) 구중청량제 시제품 개발	56
(나) 치약 시제품 개발	56
① 치약 베이스 제조	56
② 잎파래 주정 추출물 제조	56
③ 순도검정	56
나. 잎파래 항균물질 함유 시제품의 항균 효능 평가	56
(1) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균활성	56

(가) 주정 추출물의 항균활성	56
(나) 치약 시제품의 항균활성	57
다. 잎파래 항균물질 함유 시제품의 물리·화학적 특성 확인	57
라. Pilot 추출 생산 공정 개발	58
(1) 잎파래 주정 추출물 제조 공정	58
(2) U/F 한외여과막 장치를 이용한 제조 공정	58
제 2절 연구내용	60
제 3절 연구결과	61
1. 잎파래로부터 구강건강 소재 개발	61
가. 잎파래의 항균물질 추출조건 확립	61
(1) 잎파래의 항균물질 추출 조건	61
(가) 잎파래의 에탄올 추출물 및 물 추출물 제조	61
(나) 잎파래 분획물의 제조	62
나. 잎파래 추출물 및 분획물의 항균활성	63
(1) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균 활성	63
(2) 최소저지농도(MIC)를 이용한 항균활성	67
다. 잎파래의 항균물질 정제 조건	69
(1) 잎파래로부터 항균물질 정제	69
(가) 잎파래 분획물의 수율	69
① 용매 분획물의 수율	69
② Sephadex LH-20 gel chromatography 분획물의 수율	69
③ HPLC 분획물의 수율	71
(나) Sephadex LH-20 gel chromatography를 이용한 정제	72
(다) TLC를 이용한 정제	73
(라) HPLC를 이용한 정제	74
(2) 잎파래로부터 항균물질 규명	75
(가) ESI-MS를 이용한 분자량 분석	75
(나) GC/MS를 이용한 정성 분석	76
(다) NMR을 이용한 구조 분석	77

(라) 잇파래 항균물질 추출 및 정제 과정 도식화	84
(마) 잇파래 항균물질 순도검정	86
라. 잇파래로부터 정제된 항균물질의 항균활성	88
(1) 최소저지농도(MIC)를 이용한 항균활성	88
(가) Sephadex 분획물의 항균활성	88
(나) HPLC 분획물의 항균활성	91
(다) Standard 물질 및 그 외 지방산의 항균활성	92
(라) 다양한 치주질환 원인균에 대한 항균활성	93
(2) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균활성	94
(가) Standard 물질 및 그 외 지방산의 항균활성	94
2. 잇파래 항균활성에 관한 간이임상	97
가. 간이임상을 위한 샘플 제조	97
(1) 간이임상을 위한 샘플	97
(2) 간이임상을 위한 샘플의 항균활성	98
(3) 간이임상을 위한 샘플의 품질 분석	98
(가) 총 폴리페놀, chlorophyll a, b, 총 지방산 함량분석	98
(나) 유리지방산 조성 및 함량분석	99
나. 간이임상 연구 결과	104
(1) Plaque index, Gingival index, Bleeding on proving 결과	104
(2) <i>Prevotella Intermedia</i> 균과 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 균 의 Ct 값 변화량	107
3. 잇파래 항균 물질의 산업화 연구	109
(1) 시제품 개발	109
(가) 구증청량제 시제품 개발	109
(나) 치약 시제품 개발	110
① 치약 베이스 제조	110
② 잇파래 주정 추출물 제조	111
③ 순도검정	112

나. 잇파래 항균물질 함유 시제품의 항균 효능 평가	113
(1) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균 활성	113
(가) 주정 추출물의 항균활성	113
(나) 치약 시제품의 항균활성	114
다. 잇파래 항균물질 함유 시제품의 물리·화학적 특성 확인	115
라. Pilot 추출 생산 공정개발	115
(1) 잇파래 주정 추출물 제조 공정	115
(2) U/F 한외여과막 장치를 이용한 제조 공정	116
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	117
제 1절 연도별 연구목표	117
제 2절 평가의 착안점 및 달성도	118
제 3절 관련분야의 기여도	119
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	120
제 1절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)	120
제 2절 교육, 지도, 홍보 등 기술확산 계획 등	121
제 3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등	121
가. 특허 계획	121
나. 논문 계획	121
제 4절 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등	121
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	122
제 7 장 참고문헌	126

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

해조류 잎과래로부터 치은염균, 치주염균에 특이적으로 항균활성을 가지는 항균활성 물질을 분리, 정제함으로써 화학물질이 아닌 천연 소재를 함유한 부작용의 가능성이 적은 구강건강제품(치약 등)을 개발하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

○ 3면이 바다인 우리나라는 해양자원이 풍부하며, 특히 해조류는 400만 톤 이상의 전 세계 수확량 중 80만 톤을 생산하는 국가로 전통적으로 해조 생산과 이용이 활발하다. 또한 국내 연안의 대형해조류가 외국의 경우에 비하여 손색이 없는 생리활성물질의 훌륭한 원천이며 산업적 개발가치가 큰 것으로 나타나고 있으므로, 해조류를 이용한 고부가가치 기능성 소재 및 제품 개발에 대한 전망은 밝다. 이 중 잎과래(*Enteromorpha linza*)는 예비실험 결과 대표적인 구강질환인 치주염과 치은염에 대해 우수한 항균 활성을 나타내므로 천연 기능성 구강건강소재로 활용함으로써 고부가가치 제품 개발이 기대되어 지는 해조류이다.

○ 치과 의학상 충치, 치주염 및 치은염 등을 포함하는 다양한 구강질환은 여러 가지 원인에 의해 발병할 수 있다. 원인은 전신적인 원인 및 국소적인 원인으로 나눌 수 있는데, 보다 중요한 원인은 국소적인 원인인 것으로 알려져 있다. 국소적인 원인으로 가장 중요한 것은 구강 내에 상주하는 세균 즉, 병원성 미생물이다.

○ 한편, 자연계에는 수만 종에 이르는 미생물들이 각종 생태계에 폭 넓게 서식하고 있으며, 이러한 미생물들은 여러 질병 및 오염의 원인이 되기도 한다. 예를 들어, 사람의 구강 내에는 현재까지 밝혀진 바에 의하면 약 300 여종의 미생물이 치아표면, 치근부의 치아와 잇몸사이, 혀의 표면 등에 상주하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이러한 미생물의 존재는 적절한 구강위생 활동이 이루어지는 경우 정상적 현상이라 할 수 있다.

○ 그러나, 적절한 구강위생 활동이 이루어지지 아니하는 경우, 상기한 미생물 중 병원성 미생물에 의해 충치, 구취, 치은염 또는 치주질환 등 각종 구강질환이 야기될 수 있으며, 심한 경우 치아를 상실할 수도 있다. 일례로, 구강 내에 상주하는 병원성 미생물의 발효작용에 의해 치아에 부착된 음식찌꺼기의 당분이나 전분 등의 탄수화물이 분해되어 생기는 젖산이 치아 경조직의 석회를 탈각시켜 충치가 발생할 수 있고, 혐기성 병원균체들이 대량 증식하는 경우 다양한 구강질환의 원인이 될 수 있다.

○ 보다 상세하게는, 구강 내에 상주하는 병원성 미생물은 치아표면에 부착하여 몇 시간만 지나면 치태라고 하는 세균군집을 형성하고 증식하게 되며, 처음에는 눈에 보이는 치은 상부의 치아 표면에 집중적으로 병원성 미생물이 부착하여 치태를 형성하지만, 점차 진행되면 치은하부에 있는 치아표면에도 치태가 형성되게 된다. 상기 치태가 치아표면에서 형성될 경우, 상기 병원성 미생물은 구강 내에 들어온 당분을 이용하여 산을 생산하고 이 산은 치아의 주성분인 무기질을 탈회시킴으로써 치아가 파괴되는 충치를 유발할 수 있다.

○ 한편, 치은하부 치태에 있는 세균들 중 특히 혐기성 그람음성 미생물들은 독소, 단백질 분해효소 등을 분비하여 치주조직을 직접 파괴하거나 우리 몸의 면역 세포들과 반응함으로써 다양한 면역물질의 생산을 유도하고 이들 물질이 치주조직의 염증과 파괴를 초래할 수 있다.

○ 치아나 치주조직은 한번 파괴되면 치료는 될 수 있지만, 원래의 조직 상태로 복구되지 않는다는 점에서 그 심각성이 있고, 따라서 이들 국소원인의 대표적 요인인 병원성 미생물이 구강 내에서 번식하는 과정을 근본적으로 차단하는 것이 구강질환을 예방 또는 신속히 치료하는 방법일 수 있다.

○ 이와 같은 구강질환을 유발하는데 가장 중요한 역할을 하는 미생물로는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 포피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 또는 프레보텔라 인터메디아(*Prevotellaintermedia*) 등이 있다.

○ 따라서, 종래 미생물들에 대한 살균 및 정균작용을 갖는 항생제를 포함한 다양한 종류의 항균제제가 충치, 치주질환 또는 치은염 등의 억제 및 치료제로써 개발되어 왔다.

그러나, 치은염이나 치주염과 같은 일부 구강질환의 경우 이들을 치료 또는 예방하기 위하여 개발된 항생제 혹은 화학약품은 매우 제한적이므로(Leke N et al., 1999), 대부분의 경우 치주질환수술 등의 수술요법이나 기계적 요법에 의해 치료하고 있으며, 그 예방을 위한 방법은 제한적으로 제안되고 있다.

○ 또한, 항생제의 경우 설사, 구토 등을 포함한 신체 전반에 대한 전신적인 부작용을 일으킬 수 있고, 구강 내 내성균의 출현 및 균교대증을 유발할 수 있기 때문에 장기적인 사용이 곤란하여 단지 치료제만으로 이용될 수 있는 단점이 있다. 예를 들어, 현재 널리 사용되고 있는 항생제인 클로로헥시딘(chlorohexidin)은 고농도로 구강 내에 사용하거나 혹은 저농도로 오랫동안 사용할 경우, 혀나 치아에 착색을 일으키고, 구강점막이 벗겨지거나, 미각이상을 일으키는 등의 부작용이 발생할 수 있으며, 균교대증이 유발될 수 있는 부작용이 있고, 발암성이 있어 임산부의 경우 사용이 제한된다는 단점이 있고(Flatra L et al., 1971), 트리클로산(triclosan)의 경우, 세포독성이 높아 장기간 사용시 부작용의 우려가 높고 내성균주의 발현이라는 문제점이 있다.

○ 이 외에 항균제인 불소의 경우는 충치예방효과는 뚜렷하지만 아직까지 치주나 치수, 치근단 질환에 대한 효과는 보고된 바 없고, 치약이나 구강청정제에 사용되고 있는 항균제인 생쿠이나린(Sanguinarine)은 구강 내에서 세균에 대한 효과가 불분명하고 가격이 비싸다는 단점이 있으며, 리스테린(Listerine)은 알코올이 주성분으로 실제 구강 내에서는 일시적인 효과내지는 약간의 정균작용만이 인정되고, 장기간 사용시 조직에 대해 위해 작용이 나타날 수 있다는 단점이 있으며, 최근 미백제로 사용되는 퍼옥사이드(Peroxide)의 경우 세균에 대한 독성이 있으나, 동시에 인체조직에도 독작용을 나타내어 안정성에 문제가 있다는 문제점이 있다.

○ 따라서, 수술요법이나 기계적 요법에 비하여 그 예방 또는 치료가 용이하고, 장기간 사용하여도 항생제와 같이 내성이나 안정성에 대한 문제가 대두되지 아니하며, 부작용도 문제되지 아니하는 천연물질 유래의 구강질환 예방 또는 치료 조성물을 개발하는 것이 시급한 실정이다. 특히, 3면이 바다여서, 해양자원이 풍부한 우리나라의 지리적 환경을 고려하면 해양 동·식물을 포함한 해양 천연물질로부터 구강질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 개발하고자 하는 요구가 증가되고 있다.

나. 경제·산업적 측면

○ 해조류는 대체로 1차 가공품의 형태로 이용되고 있으나 기 체결된 한-아세안 FTA와 향후 체결이 예상되는 한-중 FTA로 인해 저가 해조류가 국내에 반입됨으로써 국내 해조류 산업에 치명적인 영향을 미칠 것으로 전망된다. 이를 대비하기 위해 국내 해조류를 이용한 고부가가치 소재 및 제품의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

○ 파래는 양식을 통해 연간 800톤 정도 생산되고 10억원 정도의 생산금액을 나타내며 주로 1차 가공 식품으로밖에 이용되지 않고 있으므로 보다 다양한 고차 가공 상품의 개발이 요구되어지고 있다. 또한 최근에 제주도 연안에서는 파래의 과잉번식으로 인해 환경이 오염되는 등 해양 폐기물로 버려지고 있는 파래의 활용방안 및 대책방안이 시급한 실정이다.

○ 다음은 2010년 8월 15일 게재된 제주일보의 [동부지역 해안파래 몸살] 기사내용의 전문이다.

“썩는 냄새가 사방에 퍼지면서 울레를 걷는 관광객들은 코를 막고 있어요.”

여름철마다 성산, 구좌 등 제주 동부지역 해안을 뒤덮고 있는 구멍갈파래가 최근 대량으로 밀려와 악취가 진동하고 있다. 쓰레기 썩는 냄새와 비슷한 고약한 악취가 진동하면서 울레1코스로 지정된 성산을 해안도로를 걷는 울레꾼들은 눈살을 찌푸리고 있다는 것. 성산읍 오조리 주민 오모씨(46)는 “해안으로 밀려온 파래가 쌓이면서 썩어가는 가운데 지난 10일 태풍 ‘덴무’의 영향으로 대규모 파래떼들이 다시 유입돼 견잡을 수 없는 상황에 이르렀다”고 밝혔다. 태풍 ‘덴무’가 해안으로 밀려 보낸 파래는 구좌읍 하도리를 시작으로 종달리를 거쳐 성산읍 시흥리, 오조리, 신양리까지 20km가 넘는 해안을 따라 대형 띠를 두른 것으로 나타났다. 파도에 밀려든 파래는 해안가에 쌓이고, 쌓이면서 주민들은 ‘파래가 담을 쌓았다’고 전하고 있으며 청정바다가 썩어가고 있다고 호소하고 있다. 주민들은 “예전 오조리 해안에선 조개를 잡으러 온 피서객들이 많았으나 파래가 쌓이면서 지난해부터는 사람들의 발길이 끊겼다”고 밝혔다. 지난해부터 성산 및 구좌 해안가에 쌓인 파래가 수거되지 않으면서 초록색이 탈색돼 하얗게 변할 정도로 썩어가고 있는데 일주도로까지 냄새가 진동하는 등 악취 오염원으로 꼽히고 있다. 여기에 어업인들은 고동(보말)을 채취할 하지 못할 정도로 파래가 밀려오면서 어장 황폐화도 우려하고 있다. 더구나 당국의 홍보에 따라 일부 농업인들은 파래를 감귤원과 밭에 거름으로 사용했으나 작물 생육에 별 효과가

없어 농가에서도 퇴비로 사용하지 않는 것으로 알려졌다. 더 큰 문제는 해안경관을 잠식시키고 악취까지 풍기고 있는데도 당국은 파래 이상 번식 원인을 규명하지 못하는 데 있다. 아울러 손을 댈 수 없을 정도로 파래가 쌓이면서 수거에도 어려움을 겪고 있다. 성산읍 관계자는 “지난해 장비를 동원해 파래를 수거했으나 양이 너무 많아 감당하기 어려웠고, 수거를 해도 쓰레기매립장에선 받아 주지 않아 처리할 곳도 마땅치 않다”고 밝혔다. 한편 당국은 파래의 대량 번식 및 유입에 대해 ▲온난화에 따른 수온상승 ▲오염된 중국 연안에서 밀려 온 유입설 ▲영양물질이 많은 지하수 유입 등을 제시했으나 지금까지 뚜렷한 원인은 규명되지 않고 있다. 한편 제주도는 파래를 이용해 전복 먹이 등 어분 제조, 축산 가공 부산물과 파래를 혼합 가공해 동물성 양식사료 등으로 상업화 시킬 계획이나 현재 가공시설이 완공되지 않아 여름철마다 파래는 천덕꾸러기로 전락하고 있다.

- 제주일보 <좌동철 기자>roots@jejunews.com -

○ 따라서, 본 과제 의 최종목적은 파래를 이용한 구강건강소재 및 제품 개발이며 이를 통해 구강질환을 예방함으로써 국민 구강건강에 이바지하고 해조 산업의 고부가가치화에 기여하는 것이다. 또한, 버려지는 과잉 파래를 무료로 수거하여 값비싼 항균활성 물질을 분리함으로써 해양오염을 방지하고 제주도 연안의 관광이미지 개선에 이바지하며 의약품 소재로 수출함으로써 외화획득 및 수입대체 효과를 기대할 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

○ 우리민족은 김, 미역, 다시마 등의 해조류를 즐겨 식용으로 하여 왔기 때문에 예로부터 조식민족(藻食民族)으로 지칭되어 왔고 현재도 연간 약 45만톤에 이르는 해조류를 생산, 소비하고 있는 실정이나, 거의 대부분 단순가공품으로 제작되고 있는 수준이다.

○ 2006년 전국에서 실시한 국민구강건강실태조사 결과 장년층 이상의 구강건강에 대한 주관적인식이나 염려수준은 2003년에 비해 악화된 모습을 보여 주었다. 또한, 구강질환으로 인한 손실은 '05년 전체 건강보험급여비의 4.1%(1조 275억원)이나 비보험을 포함하면 3~4조원으로 추정된다. 이는 근로손실일 889만일, 경제손실비용 약 5조원에 해당한다. 이것은 선진국과 비교하여 열악한 상태로 꾸준한 건강투자 정책과 정부

예산 지원이 필요하다. 또한, 구강검진·교육을 강화하고, 예방과 조기 치료 위주의 정책이 필요한데 그 중 하나가 구강질환을 예방할 수 있는 소재와 제품의 개발이다.

제 2 장 국내외 관련기술의 현황

제 1 절 국내 관련연구의 현황과 문제점

1. 국내 기술 현황

가. 구강질환의 발생원인

○ 일반적으로 구강질환은 구강에 살고 있는 각종 세균들에 의해 발생한다. 이들 세균은 충치를 발생시키는 세균과 잇몸질환을 유발시키는 세균으로 구분할 수 있으며, 대표적으로 충치 유발균인 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)균과 치주질환 유발균인 포피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)를 들 수 있다. 그 외에도 프레보텔라 인터메디아(*Prevotella intermedia*), 액티노바실러스 액티노마이세텀 코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 또는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 포함하는 칸디다 속(*Candida spp.*)의 병원성 미생물에 의해 치주염, 치은염, 충치, 구강내 점막궤양, 구취, 구강건조증 및 아구창이 발병된다.

나. 치주질환의 원인균

○ 치은염은 치은조직에 발생한 초기상태의 염증이며 치면세균막과 밀접한 관련이 있다. 치면세균막이란 섭취한 음식물의 당단백질 성분이 치아표면에 부착된 얇은 막인 치구(dental pellicle)에 구강 내 각종 세균들이 부착하여 형성되는 점착성 세균덩어리의 막이며 치태 또는 플라그(dental plaque)라고도 한다. (Kim et al., 2005)

○ Socransky의 보고에 의하면 치태내의 세균을 6종류로 나눌 수가 있는데, 호기성세균이며 치아표면에 초기에 군집을 이루는 병원성이 낮은 Actinomyces, yellow complex, green complex, purple complex 와 혐기성세균이며 추가치태축적을 일으키는 병원성이 높은 orange complex, red complex로 분류할 수 있다고 하였다. 그 중 치은염의 진행과 관련이 높은 orange complex에는 *Prevotella intermedia*(*P intermedia*), *Peptostreptococcus micros*(*P micros*), *Prevotella nigrescens*(*P nigrescens*), *Campylobacter gracilis*(*C gracilis*), *Campylobacter rectus*(*C rectus*), *Campylobacter showae*(*C showae*), *Eubacterium nodatum*(*E nodatum*), *Fusobacterium nucleatum*(*F nucleatum*), *Fusobacterium polymorphum*(*F polymorphum*), *Streptococcus constellatus*(*S constellatus*)가 있으며 이들은 치태 형성 후반기에 등장하고 초기호기성세균과 red complex를 연결해주는 역할을 한다.

red complex에는 *Porphyromonas gingivalis*(*P gingivalis*), *Bacteroides forsythus*(*B forsythus*), *Treponema denticola*(*T denticola*)가 속해 있으며 이들은 병원성이 매우 높은 균으로 건강한 치주낭에서는 출현비율이 적으나, 염증성 치주낭에서는 자주 발견되는 치주염의 원인균으로 알려져 있다. (Socransky & Haffajee, 2002)

○ 본 연구에서는 초기 치은염과 관련이 깊은 orange complex중에서 *P. intermedia*와 치주염의 진행과 관련이 깊은 red complex중에서 *P. gingivalis*를 선택하여 치은염 억제효과의 지표로 삼았다.

○ *P. gingivalis*는 치주질환의 가장 중요한 원인균으로 black pigmented bacteroides, 그람음성, 혐기성 세균이며 운동성이 없는 비당분해성의 간균이다. 또한 태생적으로 일부 항생제에 대하여 저항성을 갖는 동시에 다른 많은 항생제에 저항성을 획득하는 경향을 보이는 세균으로서, 구강세균중에서 가장 강하고 많은 독성인자를 갖고 있는 세균이다. 독성인자들의 종류는 *P. gingivalis*의 외막에 있는 내독소와 콜라겐 분해효소, 탈인산분해효소 등이 있다. (Lamont & Jenkinson, 1998) 치주질환이 있을 때 치주병소 내 *P. gingivalis*의 수가 증가되며 치주질환이 진행됨에 따라 열구상피에 침투하는 *P.gingivalis*가 빈번히 발견된다. *P. gingivalis*는 치주치료를 하면 감소되거나 제거되며, 치주질환이 재발하는 병소에서는 또 다시 발견된다. (Tanner et al., 1984)

○ 또다른 혐기성 Bacteriodes인 *P. intermedia*는 성인성 치주염이나 ANUG 임신성 치은염등과 같은 여러 가지 종류의 치주질환에 원인균 중의 하나로 알려져 있고, *P. gingivalis*와는 달리 건강한 치주를 가진 성인에게서도 발견되고 있다.

○ 치은염과 치태와의 상관관계는 Löe 실험치은염모형에서도 잘 나타나는데 Löe에 의하면 치은염은 치태의 존재유무와 치태가 치면에 부착되어 있는 시간과 밀접한 상관관계가 있다고 하였다. (Löe et al., 1965)

○ 그러므로 치태의 형성 억제 및 제거는 치은염의 예방 및 치유를 위해 매우 중요하다.

○ 치태의 형성 억제 및 제거를 하기 위한 대표적인 방법으로 잇솔질법이 있다. 잇솔질은 치은연상치태를 제거하는데 있어 탁월한 방법이지만 정상치열의 치아사이나 치은열구부위에는 기구도달이 어려워 치은연상치태제거가 불충분하여 치간변연치은부에서 높은 치은염 발생율을 보이는 단점이 있었다. (Alexander, 1971)

○ 이러한 단점을 보완하기 위하여 보다 안전하고 효과적인 항치태 기능을 가진 구강양치액의 보조적 사용의 필요성이 증가하였고 현재 여러 유효성분들이 연구되어지고 있다. (다음과 같은 제제들이 구강양치액의 원료로 사용되어 지고 있다.)

○ 대표적인 구강양치액의 유효성분들로는 chlorhexidine, triclosan과 같은 phenol계, dextranase와 같은 효소계, 아연, 주석, 구리 등을 함유한 금속염, sanguinarine, bisbiguanides계의 thymol, menthol과 같은 essential oil등이 있다. (Ciancio, 1986), (Lusk, Bowers, Tow, & Watson et al., 1974)

○ bisbiguanide계인 chlorhexidine disgluconate는 현재 가장 많이 사용되고 있는 구강세정제 유효성분으로써 항치태, 항치은염 효과가 있으며 경조직과 연조직 모두에 부착능력이 뛰어나며 서서히 방출되는 장점이 있는 반면, 맛이 쓰며, 치아 착색 유발, 구강점막 작열감 유발, 그리고 구강내 보철수복물의 변색 등의 단점을 가지고 있다. (Renton - Harper, Addy, Moran & Doherty et al, 1996; Moran, Addy & Newcombe, 1997)

○ dextranase는 치태 세균중 Streptococcus mutans등이 생성하는 α (1-6) linked glucan인 dextran을 분해하는 효소로 정식명칭은 α (1-6) Glucan 6-glucanohydrolase이다. 1960년대에 Fitzgerald 등이 동물실험을 통하여 치태형성을 억제한다는 것을 밝힌 이후에 구강세정제 유효성분으로 많이 쓰이고 있다. 그러나 치태내의 다른 세균들이 생성하는 nondextranous plaque에는 효과가 없다는 단점이 있다. (Fitzgerald, Keyes, Stoudt, & Spinell, 1968)

○ 금속염은 과량 사용시 독성이 우려되며 구강 내 환경이 알칼리성일 때는 항균활성이 없는 불용성의 수산화금속으로 전환된다. (Hull, 1980)

○ Sanguinarine은 Sanguinaria Canadensis의 근경에서 분리된 sanguinarine이라는 alkaloid종류로 넓은 항균범위를 가지고 있어 구강양치액으로 사용되어 왔다. 그러나 구강내 전암병소인 구강백반증(oral leukoplakia)과의 연관성과 구강 내 물질과의 접합력이 너무 강해 약효가 저하된다는 문제점이 보고되었다. (Chung. Choo, & Lee et al., 2006; Goodsen, 1989)

○ Essential oil이란, 향기가 나는 식물에서 물리적으로 분리한 휘발성 물질을 일컫는다. essential oil은 오랫동안 방향제, 화장품, 향수, 비누, 세제, 향신료 등으로 이용되어 왔고 최근에는 향균, 항염증, 항진균, 항바이러스효과 등이 보고되어 구강세정제의 유효성분으로 주목받고 있다. 그러나 이들의 생리활성 효과는 대부분 방향성 원료에 의해 결정되는데 이 원료가 이용하기에 부적절한 냄새를 함유한 경우가 적지 않아 상품화하는데 어려움이 있었다. (Schmidt, Jirovetz, & Buchbauer et al., 2005)

○ 이러한 단점을 보완하기 위하여 식물을 중심으로 내성균주의 형성과 부작용없이 지속적으로 사용할 수 있는 천연항생물들이 지속적으로 연구되고 있다. 현재 연구되고 있는 식물추출물들을 보면 녹차추출물과 솔잎추출물(배광학, 이병진와 장운경외, 2001), 백두옹추출물(정진광, 정진형와 임성빈외, 2000), 후박추출물(김태일, 염혜리와 유인철외, 1996), 금은화와 포공영추출물(홍석진, 최유진와 임희순외, 2001)등이 보고되었다.

○ 본 연구에서는 여러 식물군 중에서 산업적 측면에서 접근하기 쉽고 다양한 생리활성물질을 포함하고 있어 잠재력과 시장성장성이 클 것으로 예상되는 해양식물자원을 주목하였다.(Mayer and Hamann, 2002; Newman et al., 2003).

○ 특히 해양식물자원중에서 해조류에는 다양한 bioactive compound들이 포함되어 있으며 항바이러스, 항박테리아, 향균, 구충효과를 가진 compound들도 다수 포함되어 있다. (Newman et al., 2003; del Val et al., 2001)

○ 그러나 현재까지 해조류의 연구보고를 보면 다른 병원균, 곰팡이, yeast등에 대한 항균효과 연구보고는 많으나 (Gonzalez et al. Ünci T.NEY et al.), 구강양치액 유효성분으로 개발하기 위하여 필요한 치은염관련균인 *P. intermedia*와 *P.gingivalis*의 억제효과에 대한 연구는 거의 보고가 없었다.

○ 이에 본 연구에서는 대한민국에 자생하고 있는 57종의 해조류를 수집하여 앞서 조사한 치은염 관련균인 *P. intermedia*와 *P. gingivalis*의 생육억제효과에 대하여 연구하였으며, 생육억제효과가 높은 *Enteromorpha linza*(*E. linza*; 일파래)의 phenolic compound 분획을 임상시험구강양치액으로 제조하였다. 이 양치액을 사용하였을 때 실험자의 치은염 발생이 완화되는지 알아보기 위하여 실험군으로 *E. linza extract* 추출물을, 양성대조군으로 기존에 시판되고 있는 listerine®(한국존슨앤존슨, Positive Control)을 사용하였다. 실험자의 치은개선효과를 알아보기 위하여 plaque index (PI), gingival index (GI), bleeding on probing (BOP)를 측정하였고, 치은염관련균인 *P. intermedia*와 *P. gingivalis*의 수를 Real time PCR을 이용하여 측정하였다.

다. 기존 항균제의 문제점

○ 종래 상기 미생물들에 대한 살균 및 정균작용을 갖는 항생제를 포함한 다양한 종류의 항균제제가 치주염 또는 치은염 등의 억제 및 치료제로써 개발되어 왔다. 그러나, 치은염이나 치주염과 같은 일부 구강질환의 경우 이들을 치료 또는 예방하기 위하여 개발된 항생제 혹은 화학약품은 매우 제한적이므로 대부분의 경우 치주질환수술 등의 수술요법이나 기계적 요법에 의해 치료하고 있으며, 그 예방을 위한 방법은 제한적으로 제안되고 있다.

- 항생제의 경우 설사, 구토 등을 포함한 신체 전반에 대한 전신적인 부작용을 일으킬 수 있다.
- 구강내 내성균의 출현 및 균교대증을 유발할 수 있다.
- 장기적인 사용이 곤란하여 단지 치료제만으로 이용될 수 있는 단점이 있다.

다음 표1은 기존에 사용되고 있는 항균제제의 효능과 부작용에 관해 요약한 것이다.

Table 1. It is the efficacy effect and disadvantage of the anti-microbial component used in an existing and content about the side effect.

	anti-microbial component	efficacy effect	disadvantage & side effect
1	chlorohexidine (CHX)	구강 미생물총의 변화를 일으키지 않는 것으로 보고되고 있어 구강 청정제의 사용에 따른 기회감염의 위험을 최소로 줄임	고농도로 구강 내에 사용하거나 혹은 저농도로 오랫동안 사용할 경우, 혀나 치아에 착색을 일으키고, 구강점막이 벗겨지거나, 미각이상을 일으키며 균교대증이 유발될 수 있고, 발암성이 있어 임신부의 경우 사용이 제한됨
2	cetylpyridinium chloride (CPC)	치아의 표면에 부착하는 성질이 있어서 단기간 사용할 경우 치태의 축적을 25-35% 정도 억제할 수 있음	고농도로 사용할 경우는 치아의 착색과 과도한 치석의 축적을 야기함
3	불소 (Fluorine)	충치예방효과 있음	치주나 치수, 치근단 질환에 대한 효과는 보고된 바 없음
4	리스테린 (Listerine)	알코올이 주성분으로 실제 구강 내에서는 일시적인 효과내지는 약간의 정균작용만 있음	장기간 사용시 조직에 대해 위해 작용이 나타날 수 있음
5	트리클로산 (Triclosan)	구취에 효과 있음	세포독성이 높아 장기간 사용시 부작용의 우려가 높고 내성균주의 발현이라는 문제점이 있음
6	생쿠이나린 (Sanguinarine)	천연 항균제로서 치약 및 구강 세척제로 널리 이용되어 왔음	구강내의 백혈구를 감소시킨다는 연구결과가 발표된 후 사용이 제한되고 있음
7	퍼록사이드 (Peroxide)	세균에 대한 독성이 있음	인체조직에도 독작용을 나타내어 안정성에 문제가 있음

○ 이러한 살균제들은 세균 표면에 있는 음이온성의 인산기나 카르복실기를 목표로 양 이온성 살균제가 흡착하여 세포벽에 있는 효소가 저해되고 최후에는 세균의 세포벽을 파괴하여 살균을 하는 메카니즘을 따른다.

라. 개선 방안 및 전망

○ 구강 건강 기능성 식품의 섭취

● 구강질환을 예방하기 위한 가장 좋은 방법은 병원성 미생물이 구강 내에서 번식하는 과정을 근본적으로 차단하는 것이다. 따라서 항균 성분이 들어있는 구강질환 예방 음료를 섭취하거나 구강청정제를 사용함으로써 어느 정도 예방 가능하다.

● 한 예로서 자일리톨은 설탕 대체 천연 소재 감미료로써 직접적으로 충치균의 활성을 억제하는 것이 아니고 충치균의 생장을 저해하여 충치형성을 줄여 주는 역할을 하고 있다. 즉 충치균이 자일리톨을 흡수하나 분해시키지 못하므로 그대로 배출하게 되고 다시 흡수하여 배출하는 과정을 되풀이하도록 함으로써 충치균 생육을 저해함으로써 충치형성 원인 물질을 적게 배출하도록 하는 것이다. 이러한 자일리톨의 항 충치효과는 식후 칫솔질을 한 이후 자일리톨을 섭취하였을 경우에 더욱 효과를 높일 수 있다. 자일리톨 시장이 2003년 2400억원 규모로 성장하면서 제조업체 간 경쟁이 더욱 치열해지고 있다. 그러나 현재까지 국내에서는 자일리톨 외에는 기능성 소재를 함유한 대표적인 구강질환 예방 식품이 출시되지 않고 있는 실정이다.

● 유산균이 충치균과 치주염균을 억제해 구강건강에도 영향을 미칠 수 있다는 연구결과가 나왔다. 이는 대한보건협회가 주최한 제15회 ‘유산균과 건강’ 국제학술심포지엄에서 발표됐다. 구강 질환 예방 유산균이 함유된 요구르트나 우유를 입에 머금고 있다 삼키는 것만으로도 충치균과 치주염균의 생성을 억제해 준다고 하니 앞으로 유산균을 이용해 충치, 치주염 등 구강질환을 예방할 수 있다는 기대감도 커지고 있다.

● 구강청정제의 경우 동아제약에서 개발된 가그린이 대표적인 상품이다. 가그린은 불소 성분의 함유로 충치예방 효과를 보여주는 대중적인 제품으로 불소에 의한 살균작용에 의해 유해균을 살균, 입냄새의 원인이 되는 프라그를 억제해 준다. 그러나 불소는 위에서 언급했듯이 치주나 치수, 치근단 질환에 대한 효과는 보고된 바 없으므로 충치예방

이외에 치주나 치수, 치근단 질환을 예방할 수 있는 구강청정제의 개발이 요구되고 있다.

○ 구강 건강 소재의 개발

● 최근에는 자연추출물에 대한 관심이 증가하면서 각종 식물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 구강에의 효과들이 알려지면서 많은 식물 추출물들이 구강질환예방 및 구취억제와 관련된 구강용 조성물에 응용되고 있다.

● 또한 대부분의 연구가 천연물에서 새로운 항생물질을 찾는 데에 집중되고 있다. 수술 요법이나 기계적 요법에 비하여 그 예방 또는 치료가 용이하고, 장기간 사용하더라도 항생제와 같이 내성이나 안정성에 대한 문제가 대두되어지지 아니하며, 부작용도 문제되지 아니하는 천연물질 유래의 구강질환 예방조성물을 개발하는 것이 시급한 실정이다.

● 특히, 3면이 바다여서, 해양자원이 풍부한 우리나라의 지리적 환경을 고려하면 해양 동식물을 포함한 해양 천연물질로부터 구강질환을 예방 할 수 있는 조성물을 개발할 수 있는 가능성이 높다.

● 따라서, 천연물로부터 부작용이 없는 항충치 및 항치주질환 물질을 분리하는 것이 필요하며, 충치 및 치주질환을 유발하는 균을 선택적으로 사멸시킬 수 있는 강력한 소재 개발에 대한 연구가 주를 이룰 전망이다.

마. 국내 특허 현황

○ 아래의 표 2는 최근 국내에 공개 출원된 특허 중 구강질환 예방 및 치료 조성물을 다룬 것이다. 충치와 치주염에 대한 항균활성에 대한 연구가 주를 이루며 치주, 치은염 모두에 효능이 있는 조성물에 대한 연구는 드문 실정이다.

Table 2. Recently, the oral disease prevention and treatment composition are handled among the patent which is applied from a domestic.

공개특허번호	내용
1 2005-0010 082	인체에 무해하면서 천연항생물질로 알려진 은용액, 은분말 또는 은 박막편을 첨가하여 뛰어난 살균효과 및 항균효과를 가지면서 아울러 치아를 희게 하고 입안을 상쾌하게 하는 구강용 조성물을 제공하고 있다.
2 2005-0035 954	충치 유발균인 스트렙토코커스 뮤탄스(<i>S. mutans</i>) 및 치주질환 유발균인 포피로모나스 긴기발리스(<i>P. gingivalis</i>)에 대한 항균활성이 매우 높은 리그닌 유도체를 함유하여 충치 및 잇몸질환 예방에 효과적인 항균제를 제공하고 치약조성물, 구강 청정제, 검, 캔디 등 다양한 제형의 조성물에 이용하는 것을 개시하고 있다.
3 2001-0001 476	구강 살균제, 치주질환 억제제 및 플라보노이드를 함유하여 구강내 세균, 치주질환 및 악취 유발물질을 제거하여 구취를 억제하는 구강용 조성물을 제공한다. 이때 사용되는 구강 살균제는 트리클로산, 세틸피리디늄클로라이드, 상귀나린, 티몰 등에서 선택된 1종 또는 2종 이상을 사용하여 제조하는 조성물을 제공하고 있다.
4 2001-0026 581	정향 추출물을 함유하여 입안 가글시 청량감을 제공할 뿐만 아니라 항균활성으로 인한 구취제거 및 잇몸질환을 예방하는데 뛰어난 효과가 있고 기존의 청정제가 지니지 못한 진통효과를 가지는 구강청정 조성물을 제공하고 있다.
5 2001-0035 980	녹차추출물에 의한 치약 제조방법에 대하여 개시하고 있다. 녹차추출물의 주성분인 카테킨 성분의 높은 항균력으로 항균작용 및 항충치의 역할이 뛰어나며 또한 입안의 입냄새를 제거하는데 효과가 탁월하여 구취제로서의 역할이 뛰어나다고 나타내고 있다.
6 2001-0006 218	석류추출물을 함유한 구강 위생 증진용 조성물에 대해 개시하고 있다. 석류 추출물이 활성산소와 산화질소 생성을 억제시키는 작용이 우수하여 이러한 항산화 효능을 통하여 구강위생을 증진시키는 데 역할이 뛰어나다고 나타내고 있다.
7 1998-0014 437	다공성 탄산칼슘을 첨가하여 트리클로산과 같은 수불용성 비양이온계 살균제의 살균 활성 저하를 막아 치태제거, 구취방지 및 치아 착색물질의 제거에 효과적인 구강용 조성물을 제공하고 있다.

※ 출처 : 과학기술정보통신서비스 yeskisti

제 2 절 국외 관련연구의 현황과 문제점

1. 국외 기술 현황

가. 일본의 기술 현황

○ 일본은 노령인구의 증가와 함께 구강건강 제품에 대한 관심이 증가하면서 기능성 구강건강소재에 대한 연구를 비롯하여 관련 산업이 활발한 나라이다. 일본에서는 이미 해조류 다시마의 기능성 소재를 이용한 껌이나 필름 등을 출시하는 등 해조류를 이용한 기능성 소재 및 제품이 개발되고 있으나 우리나라는 아직까지 구강건강식품은 출시되지 않고 있는 실정이다.

○ 일본의 대표적인 구강 건강 소재와 제조회사는 다음 표3과 같다.

Table 3. The representative Oral Health material and the manufacturer of Japan are as follows.

제조사	기능성 소재	용도	효능·효과
1 산쇼 (三生) 의약사	매스틱 수지 (유향수 수지)	스페인 포르투갈 프랑스 그리스 터키 등의 지중해 연안과 카나리아제도 및 열대 아프리카에서 자생하는 관목의 수지로 껌 용도 말고도 소프트 캡슐 형태의 건강보조식품에도 소재로 이용되고 있다.	매스틱 껌이 입 속에 있는 세균의 증식을 억제하고 이의 표면에 바이오 필름을 형성하며 잇몸의 염증을 유의하게 억제한다는 것을 임상 연구에서 확인했다.
		구강 청량제로 매스틱 수지와 자일리톨을 배합한 X-젤 캡슐과 입 안에서 녹는 S-캡슐 등을 개발했다.	이들 제품은 입 안에 있는 세균이나 위 속에 있는 세균에 대한 항균 효과가 있을 것으로 기대되고 있다.
2 아사히 비루사	폴리페놀류	폴리페놀류 소재인 사과 추출물 애플 페논 (폴리페놀 함유량 50%)의 주성분은 사과의 쓴맛 성분(축합형 탄닌) 등으로 건강 음료나 과자류에 이용되고 있다.	이 제품은 입냄새를 없애거나 충치가 생기게 하는 효소를 저해하는 작용을 한다. 특히 소취 용도의 상품에 많이 이용, 최근 수요가 크게 늘어나고 있다.
3 기코 망사	크랜베리 추출물	크랜베리 추출물(유기산 10% 이상, 폴리페놀 4.5% 이상)과 크랜베리 파우더(과즙 고형분 50%)를 이 건강용 기능성 식품이나 치주염 예방용, 치약의 소재로 공급하고 있다.	요로 감염증 예방 효과와 함께 치주염의 원인이 되는 치석 형성을 억제하는 효과가 있다.
4 택21 (TAC 21)사	피코 로리	알로에 썬 인삼 노송나무 해초 등에서 추출한 엑스와 환원 활성수 등 천연 소재를 분말제품으로 제공하며 환원 활성수란 지하수를 환원 활성수 장치에서 순환시켜 분자를 미소화한 것이다.	입냄새나 입 안 세균을 제거하고 치주염 등의 개선 효과가 있다.

※ 출처: 식품유통신문(2004.09.01)

나. 국외 특허 현황

○ 아래 표 4의 일본과 미국에 최근 공개 출원된 특허에서도 알 수 있듯이 치주염에 관한 항균제의 연구만 있을 뿐 치주, 치은염에 관한 항균활성에 대한 연구는 드문 것을 알 수 있다.

Table 4. It is the periodontitis bacillus and overseas patent situation toward the antibacterial activity of the marginal gingivitis bacillus.

	공개특허번호	국가	특허 제목	내용
1	JP-0127919 (2006-04-04)	일본	PERIODONTITIS CURATIVE AGENT WITH MANUKA HONEY AS MAIN INGREDIENT AND SUPPLEMENT	뉴질랜드의 토착 식물인 manuka에서 유래된 꿀에서 치주염을 유발하는 박테리아의 성장을 저해하는 항균제를 개발하였다.
			PERIODONTITIS CURATIVE AGENT WITH MANUKA HONEY AS MAIN INGREDIENT AND SUPPLEMENT	충치를 유발하는 <i>Streptococcus mutans</i> 의 증식을 억제하는 항균제의 개발과 이를 함유한 식품의 조성물에 대한 내용이다.
2	JP-0187494 (2005-06-27)			
3	US-0762038 (2007-06-12)	미국	Compounds for the Treatment of Periodontal Disease	치주염에 효능이 있는 물질의 구조와 조성, 방법에 관한 내용이다.
4	US-0739393 (2007-04-24)		Oral Care Composition with Silicone Composite	실리콘이 다공성 교차연결 폴리머에 흡수된 합성물이 구강 케어 조성물로 포함 될수 있어서 구강 점막에 존재하는 박테리아의 성장을 저해한다.

※ 출처 : 과학기술정보포털서비스 yeskist

제 3 절 시장규모

1. 시장 규모

아래 표 5와 같이 구강용품 시장의 전체 규모를 나타내었다.

Table 5. It is the entire size of the buccal cavity product market.

(단위 : 억원)

구 분	현재의 시장규모 (2007년)	예상 시장규모 (2009년)
세계시장규모	12,000	15,000
한국시장규모	4,480	6,000
※ 구강용품 시장 전체 규모		
※ 산출근거 : KIET 해외산업정보		

○ 세계 구강용품 시장 규모는 2007년 1조 2천억원에서 2009년 1조 5천억원으로 증가할 것으로 예상되며 국내 구강용품 시장 규모는 2007년 4천 480억원에서 2009년 6천억원으로 증가할 것으로 예상된다.

※ 산출근거 : KIET 해외산업정보

○ 중국

중국은 현재 세계의 치약대국이 되었으며 생산규모는 세계에서 1위를 차지하고 있다. 현재 치약 생산량은 60억 개에 달하며 매출규모는 약 80억 위안을 기록하고 있다. 한 연구기관의 통계에 따르면 주요 브랜드의 시장비중은 Colgate가 23%, Crest이 20%, Zhonghua가 10%, Signal이 10%, Liangmianzhen이 4%, Heimei가 4%, 기타가 12%를 차지하였다. 즉 위에서 언급한 브랜드들이 이미 전체 시장의 약 90%를 차지하고 있다.

○ 일본

일본의 구강용품 시장 현황은 세정, 구취 예방 등 에티켓 용도가 주류로, 가글은 충치 예방이나 잇몸병 예방 등이 주 용도이다. 최근 소비자의 치아 건강에 대한 관심이 높아지고 오럴 케어 시장이 정체중인 가운데 다소의 시장 성장은 이루어지고 있다. 2005년은 각사가 적극적으로 TVCM을 투입해 판촉활동을 강화하고 있다. 올해도 각사

가 이 분야의 주력도를 높이고 있어 수요가 늘어날 전망이다.

※ 2006 일본 욕실용 화장품 시장 동향 (KIET 해외산업정보)

○ 독일

독일은 유럽의 구강위생용품 시장의 18.5%를 차지하고 있다. 구강위생용품 시장의 연간 성장률은 2002년에서 2005년 사이에 변화가 심하였다. 2002년 0.4% 감소하였던 시장은 2003년 1.1% 증가하였고 2005년 시장규모는 16억 5,000만 달러이다. 물량으로는 약 6억 개 가량이 판매된 셈이다. 2005년에 치약 시장은 9억 9,400만 달러였으며 전체 시장의 60.4%를 차지하였다. 칫솔 시장은 2억 7,900만 달러로 전체 시장의 16.9%를 차지한다.

※ 2006년 독일 구강위생용품 시장 (KIET 해외산업정보)

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. 잎파래로부터 구강건강 소재 개발

가. 잎파래의 항균물질 추출조건 확립

(1) 해조류 잎파래의 전처리

시험에 사용한 잎파래는 2009년 3월 제주도에서 채집된 것으로 부착생물을 제거한 후, 깨끗한 담수로 씻어 실온에서 완전히 건조시킨 다음, 마쇄기를 이용하여 분쇄한 것을 사용하였다. 분쇄한 잎파래의 추출물은 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

(2) 잎파래 에탄올 추출물 및 물 추출물의 제조

(가) 잎파래 에탄올 추출물

분쇄한 잎파래 분쇄물 150g에 95% 에탄올 100mL를 가하여 하루 동안 상온에서 추출하여 조추출액을 얻었다. 조추출액을 여과하여, 수득한 여액을 감압증발기를 사용하여 감압 농축하고, 0.22 μ m 필터를 이용하여 제균 처리를 수행하였으며, 제균 처리한 추출물의 농도를 40mg/mL로 조절하여 에탄올 추출물을 제조하였다. 수득한 에탄올 추출물은 사용 시까지 급속 냉동고(deep freezer)에서 -20 $^{\circ}$ C로 보관하였다.

(나) 잎파래 물 추출물

조추출액을 여과하고 남은 잔류물에 증류수 100mL를 가하여 하루 동안 상온에서 추출한 후, 0.22 μ m 필터를 이용하여 제균 처리를 수행하고, 제균 처리된 물 추출물의 농도를 40mg/mL로 조절하여 물 추출물을 제조하였다. 수득한 물 추출물은 사용 시까지 급속 냉동 냉장고(deep freezer)에서 -20 $^{\circ}$ C로 보관하였다.

추출물의 수율은 하기 표 1에 나타내었다.

(3) 잎파래 분획물의 제조

(가) 잎파래 분획물의 제조

상기에서 수득한 분쇄한 잎파래 분쇄물 150g에 에탄올과 물을 중량을 기준으로 4:1로 혼합한 혼합용매 즉, 80% 에탄올 1,500mL를 가하여 하루 동안 상온에서 추출하여 조추출액을 얻었으며, 조추출액을 필터를 이용하여 여과함으로써, 조추출액의 여액과 잔류된 고상의 잔류물을 수득하였고, 고상의 잔류물은 건조과정을 수행하였다

(Harborne JB. 1998).

(나) 분획물 I, 분획물 II

건조된 고상의 잔류물에 에틸아세테이트 100mL를 가하고 추출과정을 수행한 후에, 여과하여 에틸아세테이트 분획물(분획물 II)과 잔류된 고상의 잔류물을 수득하였다. 수득한 고상의 잔류물을 건조시킨 후에, 상기 건조시킨 잔류물에 100 $^{\circ}$ C의 물 100mL를 가하고, 30분간 추출과정을 수행하여 물 분획물(분획물 I)을 제조하였다.

(다) 분획물 III

상기 조추출액을 여과하여 수득한 여과액을 감압증발기를 사용하여 약 1/10로 농축하고, 약 40 $^{\circ}$ C로 냉각시킨 후에, 2M 황산을 가하여 pH를 pH 3으로 조절하였다. pH를 조절한 추출액에 클로로포름 100mL를 가하고 추출과정을 수행하는 과정을 각 3회 반복하여 유기층의 분획물을 수득하여 클로로포름 분획물(분획물 III)을 제조하였다.

(라) 분획물 IV

유기층을 분리한 수용액층에 암모니아용액을 가하여 pH를 pH 10으로 조절하였고, pH를 조절한 수용액층에 클로로포름과 에탄올을 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매 100mL를 가하고 2회 추출과정을 수행한 후에, 추가로 클로로포름 100mL를 가하고 1회 추출과정을 수행한 유기층의 분획물을 혼합한 유기층의 분획물을 수득하여 클로로포름과 에탄올 혼합액의 분획물(분획물 IV)을 제조하였다.

(마) 분획물 V

클로로포름과 에탄올 혼합액의 분획물을 수득하고 남은 잔류 수용액층을 완전히 증발시켜 건조한 후, 건조물에 에탄올 100mL를 가하고 추출과정을 수행하여 에탄올 분획물(분획물 V)을 수득하였다.

(바) 보관

수득한 분획물은 0.22 μ m 필터를 이용하여 제균 처리를 수행하고, 제균 처리된 분획물의 농도를 40mg/mL로 조절하였으며, 농도를 조절한 분획물은 사용 시까지 급속 냉동 냉장고(deep freezer)에서 -20 $^{\circ}$ C로 보관하였다.

나. 잇따래 추출물 및 분획물의 항균 활성

(1) 잇따래의 항균활성 실험 방법

(가) 항균활성 실험 방법

제조된 잇따래 추출물 및 분획물에 대하여, 평판배지 확산법(Agar diffusion method) 및 최소저지농도(MIC)를 이용하여 치은염의 원인균인 프레보텔라 인터메디아(*Prevotella intermedia*)와 치주염의 원인균인 포피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균활성을 측정하였다. 실험은 NCCLS Guide Line M11-A6에 준하여 실험하였다.

(나) 대상 균주와 배양 배지

상기 프레보텔라 인터메디아 균주는 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea)에서 분양하는 *Prevotella intermedia* 25611 KCTC를 사용하였고, 포피로모나스 긴기발리스 균주는 Achigakuin University Graduate School of dentistry(Nagoya, Japan)에서 치주질환 환자에서 분리하여 수득한 *Porphyromonas gingivalis* 381을 분양받아 사용하였다. 두 균주는 모두 37°C로 유지된 혐기성 챔버(Anaerobic chamber)인 Bactron IV Chamber(SHELLAB, USA)에서 배양하였으며, 배양을 위한 혐기조건은 5% CO₂, 10% H₂, 및 85% N₂로 유지하였고, 배양배지는 하기 조성의 배지를 사용하였다.

- 배양배지의 조성 : Tryptic Soy Agar (TSA, Difco Laboratories, USA) with 5% defibrinated Sheep Blood +5.0 mg/L (final) hemin (H5533, Sigma Chemical Co. USA) solution +1.0 mg/L (final) menadione (M5625, Sigma Chemical Co. USA) solution.

(2) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균 활성

구강질환의 원인 균주인 프레보텔라 인터메디아와 포피로모나스 긴기발리스에 대한 항균활성은 종이 디스크(paper disk)를 사용하여 평판배지 확산법으로 수행하였다. 항균활성은 항균대상물질인 잇따래 추출물 및 분획물이 함유된 종이 디스크를 이용하였다. 종이 디스크는 에탄올 추출물 각각 1mg, 3mg 및 5mg, 물 추출물 각각 1mg, 5mg 및 10mg과 분획물(분획물 I 내지 분획물 V) 5mg 씩을 각각 30 μ l 용매를 이용하여 녹이고, 추출물 또는 분획물 용액을 직경 8mm, 두께 1.5mm의 종이 디스크

(paper disk, Advantec Filter Paper, Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan)에 흡수시킨 후에, 용매를 완전히 증발시켜 제조하였다. 용매는 각각의 추출용매 또는 분획용매와 동일한 것을 사용하였으며, 구체적으로는 에탄올 추출물의 경우 에탄올을, 물 추출물의 경우 증류수를, 분획물 I의 경우 증류수를, 분획물 II의 경우 에틸아세테이트를, 분획물 III의 경우 클로로포름을, 분획물 IV의 경우 클로로포름과 에탄올을 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를, 분획물 V의 경우 에탄올을 사용하였다. 제조된 종이 디스크를 각 병원균, *Prevotella intermedia* 25611과 *Porphyromonas gingivalis* 381이 도말된 Trypticase Soy Agar 평판배지에 올려 놓고, 혐기성 조건으로 37°C에서 48시간 배양하여 평판배지 확산법을 수행하였다. 항균활성의 측정은 종이 디스크(paper disk) 주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기(mm 단위)를 측정하고 비교하는 방법으로 수행하였고, 모든 시험은 독립적으로 3회 반복하였다.

(3) 최소저지농도(MIC)를 이용한 항균 활성

항균 활성이 우수한 것으로 확인된 상기에서 제조된 잇따래 추출물과 에틸아세테이트 분획물인 분획물 II, 클로로포름을 분획용매로 이용한 분획물 III 및 클로로포름과 에탄올을 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를 이용한 분획물 IV(클로로포름과 에탄올 혼합액의 분획물)에 대하여, 액체배지감수성실험(Broth Microdilution Susceptibility Tests)법을 이용하여 상기 시료 즉, 잇따래 추출물 및 분획물의 농도를 2배씩 연속희석(two-fold serial dilution)하면서 상기 시료의 최소저지농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 측정하는 방법으로 치은염의 원인균인 프레보텔라 인터메디아(*Prevotella intermedia*)와 치주염의 원인균인 포피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 항균활성 및 최소저지농도를 측정하였다. 액체배지감수성 실험법은 NCCLS Guide Line M11-A6을 응용하였다(National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard. NCCLS Document M11-A6. Villanova, Pa, NCCLS(2004)). 최소저지농도를 측정하기 위한 시료는 추출물 및 분획물에 대하여 무균 여과처리를 수행한 후에, 최고 농도 5mg/mL에서 최저 9.76 μ g/mL에 이르도록 10% DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma, USA) 생리식염수를 용매로 사용하여 단계적으로 2배씩 연속 희석하여 제조하였다. 또한, 대상 시험균주인 프레보텔라 인터메디아와 포피로모나스 긴기발리스의 대상 균액은 상기 균주를 활성화시키기 위해, defibrinated Sheep Blood(5%), hemin (5.0 g/L), menadione (1.0

mg/L)를 첨가한 Tryptic Soy 액체배지에서 24시간 동안 전배양하고, 맥파란 (Mcfarland) 0.5로 탁도를 조절한 후에, 상기 균주의 세포수가 약 1×10^6 CFU/mL가 되도록 희석액인 상기 액체배지를 이용하여 희석하여 준비하였다. 최종농도가 약 1×10^6 CFU/mL가 되도록 조절한 대상 균액을 96-well U-form micro plate (Falcon, USA)의 각 well에 100 μ L를 넣고, 상기 2배씩 연속 희석하여 제조한 시료를 차례대로 각 well에 100 μ L씩 첨가하였다. well의 한 줄은 blank로서 균액 대신 배지를 주입하였으며, 대조구로서 시료 대신 액체배지를 100 μ L씩 넣었다. 시료를 첨가한 후, 37°C의 조건에서 혐기성 배양기(anaerobic incubator)를 이용하여 2일간 배양한 후, 균의 성장 정도를 육안 및 도립현미경(Inverted microscope TMS, Nikon)으로 관찰하여 최소저농도(MIC)를 결정하였고, 모든 시험은 독립적으로 3회 반복하였다.

다. 잎파래의 항균물질 정제조건 확립

(1) 잎파래로부터 항균물질 정제

(가) 잎파래 분획물의 수율

분획물의 수율은 분획물의 활성만큼 중요한 요소이다. 정제 과정에 있어서 항균활성이 비슷한 두 물질이 있다면 수율이 높은 물질을 선택하는 것은 당연한 일일 것이다. 정제과정이 진행됨에 따라 타겟 물질의 양은 줄어드는데 최종 물질의 수율이 높을수록 생산 단가 측면에서 유리하기 때문이다. 따라서 분획물마다 양을 측정하고 수율이 높은 분획물을 선택하였다.

(나) Sephadex LH-20 gel chromatography를 이용한 정제

클로로포름 분획물(분획물 III)을 sephadex LH-20 gel column(25-100 μ L, 85.5g, 2.2cm i.d. \times 90cm)에서 methanol을 전개용매로 사용하여 유속 1mL/min으로 용출하였다. Void volume은 110mL이고 10mL씩 총 20개 falcon tube에 담아서 각각 MIC를 측정하였다.

(다) TLC를 이용한 정제

C18 alluminum plate(5cm \times 10cm)를 이용하여 Thin-Layer Chromatography(TLC)를 수행하였다. 전개용매는 극성(polarity)에 따라 acetonitrile(polarity 6.2), ethanol(polarity 5.2), methanol(polarity 5.1), ethyl

acetate(polarity 4.4), chloroform(polarity 4.1), iso-propanol(polarity 3.9)을 사용하였고 sephadex 분획물을 spotting하여 Rf(retention factor)값을 관찰하였다. Rf는 용질이 이동한 거리(D1)를 용매가 이동한 거리(D2)로 나눈 값으로 정의한다.

$$Rf = D1 / D2$$

(라) HPLC를 이용한 정제

활성이 있는 분획을 모아 C₁₈ column(10 mm i.d. \times 25cm)(Alltima C₁₈ 5u column, USA)을 이용하여 HPLC(WatersTM Delta 600 Prep 150mL)로 정제하였다. 4.0mL/min의 유속에서 95% Acetonitrile을 등용매로 UV 197nm에서 monitoring하면서 항균성 있는 2개의 물질 S14-2(9.5mg), S14-3(9.7mg)을 각각 분리하였다.

(2) 잎파래로부터 항균물질 규명

(가) ESI-MS를 이용한 분자량 분석

잎파래에서 분리한 항균 물질을 규명하기 위해 ESI-MS를 이용하여 분자량을 분석하였다. 분석은 한국기초과학연구소(KBSI, KOLAS 국제공인시험기관)에 의뢰하였다. 한국기초과학연구소의 분석기기는 LC QDECA XP (Thermo Finnigan)이고 분석 조건은 다음과 같다. Ionization source는 ESI(electrospray ionization)이고 Polarity는 Positive, Negative이며 Analyze type은 Ion trap analyzer이다. 그리고 Mass range는 250 ~ 2000 m/z이고 Scan mode는 MS였다.

(나) 항균물질의 methyl ester화

분리, 정제된 활성 물질을 isocratic으로 수득한 후 항균물질을 methyl ester화시켰다. methyl ester화는 신라대학교 산학협력단 식품분석센터에 의뢰하였다. 분석 조건은 정제한 항균물질 S14-2와 S14-3의 1/2량에 12% BF₃/MeOH 용액 2mL을 가하고 100°C에서 10분간 가열하여 methyl ester화 하였다. 여기에 포화식염수 5mL을 가하고, 이어서 iso-octane 1mL을 가하여 잘 흔들어 methyl ester 유도체들을 iso-octane 층으로 이행시켰다. Iso-octane 층은 따로 분리하여 질소 기류 하에서 농축한 다음 hexane 1mL 용액으로 조제하였다(윤 외, 2007).

(다) GC/MS를 이용한 정성 분석

methyl ester화된 항균물질을 Gas Chromatography/Mass Spectrometer를 측정하

여 정성 분석하였다. 분석은 한국기초과학연구소(KBSI, KOLAS 국제공인시험기관)에 의뢰하였다. 사용된 기기는 GC/MSD(5975C, Agilent)이고 column은 HP-5MS(30m×250 μ m×0.25 μ m), flow rate는 1 mL/min, carrier gas는 helium, injection volume 1 μ l, split ratio 20:1, oven temperature은 80℃에서 2분 hold, 5도/분 300도까지 승온의 조건에서 측정하였다. 분석 후, 활성물질의 질량스펙트럼과 라이브러리 search를 통해 얻어진 결과를 비교하여 일치하는 퍼센트 정도에 의해 정량/정성 분석을 하였다.

(라) NMR을 이용한 구조 분석

유기물(천연물, 합성물)의 화학적 구조 분석에 사용되는 방법으로 분자량을 분석한 정제물질을 1 mg/mL의 농도로 조절하고 MeOD에 녹인 후, FT-NMR(Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer, 퓨리에 변환 핵자기공명 분석기, JEOL(Japan), JNM ECP-400)을 통해 구조 분석하였다. 또한, DEPT, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC와 같은 여러 가지 NMR 기법을 이용하여 두 화합물의 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR의 signal들을 동정하였다.

(마) 잎파래 항균물질 순도검정

잎파래 항균물질인 S14-2와 S14-3의 순도검정을 위해 기준물질 및 methanol 용매의 순도검정을 HPLC로 분석하였다. 기준물질과 S14-2와 S14-3을 동일 농도, 동일 조건에서 분석하여 chromatogram을 적분 후 %면적을 이용하여 비교, 분석하였다.

라. 잎파래로부터 정제된 항균물질의 항균활성

(1) 최소저지농도(MIC)를 이용한 항균활성

(가) Sephadex 분획물의 항균활성

잎파래 에탄올 추출물로부터 Sephadex LH-20 gel chromatography를 통해 10mL 씩 총 20개의 분획물을 분취하였다. 분획물들은 S1~S20으로 명명하였다. S1~S20의 항균활성은 치주염균, 치은염균에 대한 최소저지농도(MIC)로 측정하였다.

(나) HPLC 분획물의 항균활성

Sephadex 분획물로부터 최소저지농도(MIC)가 낮은 활성 분획만을 모아 HPLC를 통해 정제하였다. HPLC 정제 결과 3개의 메인 peak를 확인하였고 이들의 최소저지농도

(MIC)를 측정하여 가장 항균활성이 높은 peak를 선택하였다.

(다) Standard 물질의 항균활성

잎파래 추출물에서 시작하여 정제과정을 거쳐 얻은 물질 S14-2와 S14-3의 항균활성이 가장 뛰어나다는 것을 확인하였다. S14-2의 구조를 분석한 결과 Stearidonic acid[SA; moroctic acid; (6Z,9Z,12Z,15Z)octadecatetraenoic acid; Δ 6,9,12,15-octadecatetraenoic acid; all-*cis*-6,9,12,15-octadecatetraenoic acid]로 규명되었다(José Luis Guil-Guerrero et al., 2007). Stearidonic acid는 carbon chain을 18개 가지고 있고 acyl chain에 4개의 이중결합으로 구성된 ω -3 불포화지방산(polyunsaturated fatty acid)으로 분자량은 276.4이고 녹는점은 -57℃이다. S14-3은 GC-MS 분석 결과 9,12,15-octadecatrienoic acid; gamma-linolenic acid로 규명되었고 분자량은 278.23이고 끓는점은 230~232℃이다. 기준물질인 stearidonic acid(49509-1mL, analytical standard, fluka, sigma-aldrich)와 gamma-linolenic acid(L2378-100mg, sigma-aldrich)의 항균활성을 비교하기 위해 최소저지농도(MIC)를 측정하였다.

(라) 그 외 지방산의 항균활성

Stearidonic acid와 같은 불포화지방산에는 C₁₈ PUFA인 ALA(α -linolenic acid, 18:3n-3)와 LA(linoleic acid, 18:2n-6)가 있고 이들은 필수 지방산이라고 불린다. 불포화지방산은 크게 두 종류로 분류되는데 ω -3 지방산과 ω -6 지방산으로 나뉜다. ω -3 지방산에는 ALA(α -linolenic acid, 18:3n-3), SA(stearidonic acid, 18:4n-3), EPA(eicosapentaenoic acid, 20:5n-3), DHA(docosahexaenoic acid, 22:6n-3)가 있고 ω -6 지방산에는 LA(linoleic acid, 18:2n-6), GLA(γ -linolenic acid, 18:3n-6), dihomo GLA(DGLA, 20:3n-6), AA(arachidonic acid, 20:4n-6)가 있다(José Luis Guil-Guerrero et al., 2010). 따라서, 이들 불포화지방산에 대한 항균활성을 비교하기 위해 최소저지농도(MIC)를 측정하였다.

(마) 다양한 치주질환 원인균에 대한 항균활성

치은염과 치주염을 일으키는 원인균에는 대표적인 *P. intermedia*와 *P. gingivalis* 외에도 표6 에서와 같이 다양한 균이 있다. 따라서, 이들 균에 대해 SA와 GLA가 항균효능이 있는지를 측정하기 위해 최소저지농도(MIC)를 측정하였다.

Table 6. Bacterial strains and culture conditions used.

Bacterium	Strains	Culture media	Culture conditions	NCCLS Guideline
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	KCTC 3698	Brucella broth + 3% horse serum	37°C, 72h, anaerobic conditions	M11-A6
<i>Candida albicans</i>	KCTC 17485	RPMI 1640 medium	37°C, 48h, aerobic conditions	M27-A2
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. vincenti</i>	KCTC 5105	Schaedler broth	37°C, 72h, microaerobic conditions	M11-A6
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	KCTC 381	Tryptic soy agar + 5% sheep blood + 5 µg/mL hemin + 1 µg/mL menadione	37°C, 48h, anaerobic conditions	M11-A6
<i>Prevotella intermedia</i>	KCTC 25611	Tryptic soy agar + 5% sheep blood + 5 µg/mL hemin + 1 µg/mL menadione	37°C, 48h, anaerobic conditions	M11-A6
<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC 3065	BHI broth + 3% horse serum	37°C, 24h, aerobic conditions	M7-A6

(2) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균활성

(가) Standard 물질의 항균활성

Stearidonic acid와 gamma-linolenic acid를 구입하여 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균활성을 확인하였다.

(나) 그 외 지방산의 항균활성

ω -3 지방산에는 ALA(α -linolenic acid, 18:3n-3), SA(stearidonic acid, 18:4n-3), EPA(eicosapentaenoic acid, 20:5n-3), DHA(docosahexaenoic acid, 22:6n-3)가 있고 ω -6 지방산에는 LA(linoleic acid, 18:2n-6), GLA(γ -linolenic acid, 18:3n-6), dihomo GLA(DGLA, 20:3n-6), AA(arachidonic acid, 20:4n-6)가 있다. 따라서, 이들 불포화지방산을 구입하여 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균활성을 확인하였다.

2. 잎파래 항균 활성에 관한 간이임상

가. 간이임상을 위한 샘플 제조

(1) 잎파래 추출물 제조

잎파래 분말 100g에 주정(fermentation ethanol, 95%순도, 우리주정(주)에서 구입) 600mL을 넣어 26°C에서 170rpm으로 2시간 동안 shaking incubator에서 추출하였다. 추출물을 filter paper(No.2)로 여과 후 evaporator를 사용하여 농축하였다. 이러한 추출과정을 3번 반복하여 추출물을 농축시킨 후 100mg/mL의 농도로 희석하여 millipore membrane filter(0.2µm)를 glass 주사기를 사용하여 여과하였다.

(2) 잎파래 Sephadex 분획물 제조

잎파래 추출물의 항균활성을 증진시키기 위해 lipophilic Sephadex(LH20100-100g, sigma-aldrich)로 충전한 gel chromatography법을 수행하여 정제 과정을 한번 거친 분획물을 제조하였다. 컬럼은 TE column(pyrex, 25 × 1000mm, 24/40 size)를 이용하였고 잎파래 추출물(100mg/mL) 6mL을 loading 하여 flow rate 1mL/min으로 분취하였다. 이때 전개용매는 ethanol(발효주정)이고 void volume은 113mL이었다. 샘플은 10mL씩 분취하였고 분취물을 FE-1(FE는 fermentation ethanol의 약자)이라고 명명하였다. 샘플은 FE-1에서 FE-20까지 총 20개를 분취하였고 이 중 항균활성을 나타내는 샘플은 FE-10~FE-15로 총 60mL이었다. 즉, void volume 113mL과 항균활성이 나타나지 않는 샘플을 제외한 부분의 샘플만 취득하여 간이임상 실험 샘플로 사용하였다. Sephadex 분획물의 수율(yield)은 잎파래 분말 대비 0.024%였다. Sephadex 분획물은 evaporator를 이용하여 감압농축시킨 후 100mg/mL로 희석시키고 millypore membrane filter(0.2 µm)를 사용하여 filtration하여 간이임상 실험에 사용하였다.

(3) 간이임상을 위한 시제품 제조

간이임상을 위한 시제품은 200mL 규격의 시약병에 담아 사용하였다. 간이임상의 샘플 용도가 가글, 즉 양치를 위한 것이므로 시약병 뚜껑에도 눈금이 있는 것을 사용하였다. 실험에 사용될 sephadex 분획물 100mg/mL을 3mL 첨가하고 정제수 197mL을 첨가하여 최종 시제품 농도가 1.5mg/mL이 되도록 제조하였다. 임상대상자들의 기호를 위해 페퍼민트 향을 첨가하였는데 페퍼민트 오일(새싹마트 www.saessakmart.co.kr)

3 μ L을 첨가하였다.

(4) 간이임상을 위한 시제품의 항균활성

항균활성은 상기 액체배지 감수성 실험법을 이용하여 치은염균, 치주염균에 대한 최소저지농도(MIC) 실험을 수행하였다.

(5) 시제품의 품질 분석

잎파래 주정 추출물과 세파텍스 추출물 및 가글 양치액 시제품의 품질관리를 위해 총 폴리페놀, chlorophyll a, b, 총 지방산 함량 및 수율을 분석하였다.

(가) 총 폴리페놀 함량분석

총 페놀 화합물은 Folin-Denis 방법으로 측정하였다(Dural, B. et al, 2001). 시료 1mL에 95% ethanol 1mL와 증류수 5mL을 첨가하고, 1N Folin-ciocalteu reagent 0.5mL를 넣어 섞어준 다음, 5분간 방치한 후, 5% Na₂CO₃ 1mL를 가한 후, 흡광도 725nm에서 측정하였다. 정량은 gallic acid으로 작성한 표준곡선을 이용하여 함량을 계산하였다(김재영 et al, 2009).

(나) Chlorophyll a & b

클로로필 a와 b의 함량은 서로 다른 파장에서의 흡광도를 측정하여 계산식에 대입하여 분석하였다. 시료를 희석하여 663nm와 646nm에서 각각 측정하여 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Total chlorophyll (mg l}^{-1}\text{)} = 17.3A_{646} + 7.18A_{663}$$

$$\text{Chlorophyll a (mg l}^{-1}\text{)} = 12.21A_{663} - 2.81A_{646}$$

$$\text{Chlorophyll b (mg l}^{-1}\text{)} = 20.13A_{646} - 5.03A_{663}$$

(다) 총 지방산 함량분석

유리 튜브에 100 μ L 증류수(reference tube), 100 μ L 시료 또는 100 μ L olive oil(standard)을 ethanol에 녹여 준비하였다. 각각의 튜브에 2mL의 황산(ACS reagent grade)을 넣고 90 $^{\circ}$ C water bath에서 10분간 반응시켰다. 5분간 식힌 후, 5mL의 phosphoric acid-vanillin reagent를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C water bath에서 15분간 반응시켰다. phosphoric acid-vanillin reagent는 0.120g의 vanillin에 20mL의 증류수를 넣고 85% phosphoric acid로 100mL을 맞추어 제조하였다. 튜브는 실내 온도로

10분간 식힌 후 530nm에서 흡광도를 측정하였다(J. Izard et al, 2003).

(라) 유리 지방산 조성 및 함량분석

Stearidonic acid를 포함한 유리 지방산 38종 및 기타지방산의 조성비와 함량을 측정하였다. 시료는 잎파래 주정 추출물이고 신라대학교 식품분석센터에 의뢰하여 GC로 분석하였다.

나. 간이임상시험 연구 대상

본 연구는 2009년 5월 1일부터 2009년 8월31일까지 차 의과대학교 분당캠퍼스에 다니는 19-45세의 남녀성인을 대상으로 진행되었다. 연구대상선정기준은 실험부위(11, 16, 26, 31, 36, 46번 치아)에 치아가 발치되지 않았고, 교정 장치를 부착하지 않았고, 화농성 치주병이나 다발성 치아우식증이 없는 전신적으로 건강하고 최근 3개월 이내에 항생제를 투여 받은 적이 없으며, 연구목적과 시험방법에 대해 충분히 이해하고 서면으로 동의를 한 자로 정하였다. 선정기준을 통과한 최초임상시험참가자는 총 57명이었으나, 그 중 2명은 시험도중에 탈락하였고 55명을 최종임상시험대상자로 선정하였다. 표 6과 같이 임상시험대상자의 연령, 성별, 학력, 현재와 과거의 흡연유무, 하루 평균 잇솔질 횟수를 측정하여 기초자료로 이용하였다.

E. linza extract 양치액사용군과 리스테린 양치액사용군 결정방법은 지원자가 검사실에 온 순서대로 번호를 매겨서 3의 배수인 경우는 리스테린 양치액을 그 외의 경우는 *E. linza extract* 양치액을 배포하였다.

Table 7. Distributions of the subjects

Characteristics	listerine [®]	<i>E. linza</i>
Total subjects	18	35
Male N(%)	11(61)	14(40)
Female N(%)	7(31)	22(60)
Mean age	24	25
Age range	21-34	21-29

다. 간이임상시험 연구 설계

구강양치액 사용이 임상시험연구대상자의 구강위생습관에 영향을 최소로 주기 위하여 연구기간동안 현재 사용하고 있는 치약과 칫솔 그리고 잇솔질 방법은 변화를 주지 않았다. 구강양치액 사용방법은 연구자가 제공한 *E. linza extract* 이 포함된 구강세정제 또는 리스테린®용액을 병에서 일정량(10ml)를 덜어서 1분간 입에 머금으면서 우물우물 거린 후 뱉는 방법으로 하루 2회(아침, 저녁 잇솔질후 2시간이 경과한 후에 세정함) 사용하게 하였다. 사용 후 10분간은 입안을 물로 헹구지 못하게 하여 세정제의 잔류효과를 높였다.

임상시험검사는 표 7과 같이 총 5회에 걸쳐서 진행되었다. 0주째 1회차 시작검사로 기초 설문조사와 임상지수검사를 한 후 치은연하치태를 채취하여 세균정량검사를 하였고 구강양치액을 사용하도록 지시하였다. 1주째 2회차검사, 2주째 3회차검사, 4주째 4회차검사까지 임상지수검사와 세균정량검사를 하였고 구강양치액을 사용하도록 지시하였다. 4주째부터 6주째까지 2주간은 구강양치액 사용을 중단하도록 하였다. 6주째에 마지막 5회차검사로 임상지수검사와 세균정량검사를 하였다.

Table 8. Study design

0 Weeks	1 Weeks	2 Weeks	3 Weeks	4Weeks	6 Weeks
1st check(baseline) (experiment) <i>E. linza</i> gargling (control) listerine® gargling	2nd check	3rd check	No check	4th check	5th check
----->					

라. 간이임상 지수 검사

(1) Plaque Index

치면세균막부착정도는 표 8과 같이 Turesky(1970)가 변형한 Quigley와 Hein의 치면세균막평점 기준에 따라, 각 실험대상자의 11, 31, 16, 26, 36, 46번 치아의 협설측 치면을 각각 근심 원심 중앙치면으로 구분하여 6개 부위를 측정하였다. 그 뒤 개인의 치면세균막지수는 각 부위별 측정치의 합계를 검사대상치아면수로 나누어 구하였다.

Table 9. Criteria for plaque index

Plaque Index (Løe & Silness)	
0	No plaque
1	Separate flecks of plaque at the cervical margin of the tooth
2	A thin continuous band of plaque (up to 1 mm) at the cervical margin of the tooth
3	A band of plaque wider than 1mm but covering less than 1/3 of the crown of the tooth

(2) Gingival Index

연구대상자의 치은염 정도는 표 9와 같이 Løe & Silness (1977)의 치은염평점 기준에 따라서, 각 실험대상자의 11, 31, 16, 26, 36, 46번 치아의 협설측 치은연을 각각 근심 원심 중앙치은염으로 구분하여 6개 부위를 측정하였다. 그 뒤 개인의 치은염지수는 각 부위별 측정치의 합계를 검사대상치아면수로 나누어 구하였다.

Table 10. Criteria for gingival index

Gingival Index (Løe & Silness)	
0	Normal gingiva
1	Mild inflammation, slight change in color, slight edema
2	Moderate inflammation, redness, edema, and glazing
3	Severe inflammation, marked redness and edema, ulcerations

(3) Bleeding on probing

치간출혈지수정도는 표 10과 같이 Saxer and Muhlemann(1975)의 치간출혈지수 기준에 따라 periodontal probe로 11, 31, 16, 26, 36, 46번 치아의 근심, 원심, 협측면의 치은열구를 25g의 압력으로 탐침한 후 30초가 지나서 평가하였다. 그 뒤 개인의 치간출혈지수는 각 부위별 측정치의 합계를 검사대상치아면수로 나누어 구하였다.

Table 11. Criteria for bleeding on probing

bleeding on probing (Saxer & Muhlemann)	
0	No bleeding
1	탐침후 점상출혈이 보이는 경우
2	선상으로 출혈이 있는 경우
3	삼각형 형태의 출혈을 보이는 경우
4	치간유두 전체에 출혈이 확산된 경우

(4) *P. gingivalis* 및 *P. intermedia* 수의 측정

(가) Subgingival plaque 수집

치은연하치태를 수집하기 위해서 시험자의 구강을 건조시킨 다음, 상악우측제일대구 치 협측치은열구에서 치면열구액을 채취하였다. 치면열구액 채취법은 Løe와 Holm-Pederson이 제안한 방법을 사용하였다. 우선 멸균된 Absorbent Paper Point (#40 Meta Biomed Co., LTD)를 조직의 최소의 자극을 위해서 치주낭내에 약간의 저항감을 느낄 때까지 치은열구에 삽입하여 30초 동안 열구액이 스며들도록 한 후 치주낭에서 paper point를 제거하였다. 그 후 멸균된 0.2ml phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4)이 들어있는 1ml tube에 수집하여 열음이 들어있는 아이스박스에 보관하였다. 그 뒤 DNA 추출을 위해 실험실로 당일에 옮겨 -70℃에 보관하였다. (Loe H., & Holm-Pederson P. 1965)

(나) real time PCR법 시행

시험자로부터 채취한 열구액을 차가운 1ml의 PBS buffer에 담은 후, DNA를 추출하였다. 그 방법은 intron사의 G-spin genomic DNA extraction kit에 의해 추출하였으며, 추출한 DNA를 이용하여 real time PCR를 하였다. 구강 내 상주하는 치주병원균 중에 *P. gingivalis*균과 *P. intermedia*의 primer 염기서열은 표 11과 같다.

두 종의 sense primer와 antisense primer를 각각 1ul, cyber-green 6ul, template DNA 1ul, 그리고 3차 멸균수 3ul를 첨가하여 최종 용량이 12ul가 되게 하였다. 72 well에 분주하여 Rotor-Gene 3000 real time Thermal cycler를 이용하여 증합효소연쇄반응을 시행하였다. 이 때 사용한 real time PCR의 조건은 최초 변성을 위해 95℃에서 15분간, 이후 45번의 증합효소연쇄반응 cycle은 96℃에서 10초, 45℃에서 15초, 75℃에서 15초간 시행하였으며, 데이터 분석은 Rotor-Gene analysis software version 6.0을 이용하였다.

이 때 사용된 재료와 기구는 다음과 같다.

- ㉠ PBS buffer (Gibco),
- ㉡ Genomic DNA extraction kit (G-spin for bacterial, intron 17121),
- ㉢ real time PCR (Rotor-Gene 3000, Corbett),
- ㉣ cyber-green (Qiagen)

(5) 임상시험 대상군의 특징

총 55명이 참가했으며, 그 중 두명은 본 실험계획에 불성실하게 참여하여 제외시켜 53명만이 계획된 임상실험에 임했다. 임상시험에 참가한 53명의 성별분포는 표 12와 같이 여성이 53%로 남성에 비해서 약간 많았고, 연령대는 19-24세가 68%를 차지하였다. 또한 미혼이 98%로 압도적으로 많았고, 학력은 전부 대학이상의 학력을 가졌다. 구강위생 관리 상태는 표 13과 같이 흡연율은 22%이고, 일일 양치질 횟수는 3회가 가장 많았다. 또한 구강보조용품으로 치실(15%)과 가글링제(14%)를 가장 많이 사용하고 있었다. 치과내원은 81%가 부정기적으로 아플 때만 이용하였고, 주기적으로 스케일링을 한 경우는 9%였다.

Table 12. Oligonucleotide primers and probes used for Real-Time PCR

	sense	antisense
<i>p. gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG	ACTGTTAGCAACTACCGATG
<i>p. intermedia</i>	GTTGTGAAATTTAGGTGCTC	CAGGGTATCTAATCCTGTTC

Table 13. Participant's general demographics

성별	명수 (n=53)	백분율 (%)
남성	25	47
여성	28	53
연령		
19-24세	36	68
25-29세	15	28
30-34세	2	4
결혼상태		
미혼	52	98
기혼	1	2
최종학력		
대학재학	41	77
대학원재학	12	23

Table 14. Participant's dental demographics

흡연상태	명수 (n=53)	백분율 (%)
현재흡연자	6	11
과거흡연자	6	11
무흡연자	41	77
잇솔질횟수		
일일 1회	2	4
일일 2회	22	42
일일 3회	29	55
구강위생용품		
가글링제	7	13
치실	7	13
치간칫솔	5	9
없음	34	65
정기구강검사		
6개월	3	6
1년	7	13
정기검사없음	14	26
통증시 내원	29	55
정기적인 스켈링		
받음	5	9
안받음	48	91

3. 잎파래 향균 물질의 산업화 연구

가. 구강건강소재를 함유한 제품 결정

(1) 시제품 개발

(가) 구중청량제 시제품 개발

잎파래로부터 분리한 향균활성 물질을 이용하여 구중청량제를 개발할 예정이다. 시중에 판매되고 있는 구중청량제에는 대표적으로 동아제약의 가그린과 한국존슨앤존슨의 리스테린이 있다. 구중청량제는 휴대가 간편하고 시공간의 제약을 받지 않으면서 구강을 청결하게 할 수 있다는 점에서 대중들에게 보편화 되어 있는 인기 아이템이다.

(나) 치약 시제품 개발

① 치약 베이스 제조

치약 시제품 제작을 위해 그린원일(주)로부터 치약 베이스를 제공받았다. 치약 시제품은 치약 베이스 중량 대비 잎파래 주정 추출물을 각각 1%, 2% 그리고 4%가 되도록 혼합하여 제조한다.

② 잎파래 주정 추출물 제조

잎파래로부터 분리한 향균활성 물질인 불포화지방산 stearidonic acid와 gamma-linolenic acid를 추출하기 위해 발효주정(fermentation ethanol, 95%, 우리주정(주))을 이용하였다. 잎파래 분말 100g당 주정 1L를 넣고 170~180 rpm의 shaking incubator에서 하루 동안 추출하였다. 추출물은 여과하여, 수득한 여액을 감압 증발기를 사용하여 감압 농축하고, 0.22 μm 필터를 이용하여 제균 처리를 수행하였으며, 제균 처리한 추출물은 주정으로 용해하였다.

③ 순도검정

잎파래로부터 분리한 향균활성 물질의 순도검정을 HPLC로 분석하였다. 잎파래 주정 추출물을 SA, GLA와 같은 조건하에서 분석하고 적분 한 후 peak의 %면적을 이용하여 분석하였다.

나. 잎파래 향균물질 함유 시제품의 향균 효능 평가

(1) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 향균 활성

(가) 주정 추출물의 향균활성

잎파래 주정 추출물을 10mg/ml, 20mg/ml, 40mg/ml 의 농도로 제조하였다. syringe filter를 이용하여 filtering한 후 실험에 사용하였다. 각 균을 평판배지에 도말 접종한

다음, 직경 8 mm의 멸균된 paper disk (ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 평판배지의 표면에 밀착시켰다. 잎파래 주정 추출물을 50μl씩 paper disk에 점적하고 37 °C로 유지된 혐기성 배양기(5% CO₂, 10% H₂, 및 85% N₂)에서 배양하면서 생성된 투명환의 크기(mm)로 향균 활성을 측정하였다. 모든 시험은 독립적으로 3회 반복하였다.

(나) 치약 시제품의 향균활성

치약 시제품의 향균활성을 확인하기 위해, 치약 베이스 중량 대비 각각 1%, 2%, 4%의 잎파래 주정 추출물을 첨가한 치약 시제품 원액의 향균활성을 평판배지 확산법을 이용하여 측정하였다. 구강질환의 원인 균주인 프레보텔라 인터메디아와 포피로모나스 긴기발리스는 NCCLS Guide Line M11-A6에 준하여 실험하였다. 각 균을 평판배지에 도말 접종한 다음, 직경 8 mm의 멸균된 paper disk (ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 평판배지의 표면에 밀착시켰다. 잎파래 주정 추출물을 함유한 치약 원액을 50 μl씩 점적하고 37 °C로 유지된 혐기성 배양기(5% CO₂, 10% H₂, 및 85% N₂)에서 배양하면서 생성된 투명환의 크기(mm)로 향균 활성을 측정하였다. 모든 시험은 독립적으로 3회 반복하였다.

다. 잎파래 향균물질 함유 시제품의 물리·화학적 특성 확인

시제품의 물리·화학적 특성을 확인하기 위해 pH, 점도 및 굴절률(Refractive Index) 및 색도를 측정하였다. 잎파래 향균활성 물질이 농도별로 함유된 치약시제품의 pH는 25°C에서 보관한 농도별 치약 시제품을 증류수로 10배 희석하여 원심분리한 상등액을 pH meter(SevenEasy pH S-20K, Mettler-Toledo GmbH, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 점도는 Brookfield(DV-II+Pro, USA)사의 점도계를 사용하여 25°C에서 스피들(spindle) No. S94(T-bar;D)로 4 rpm에서 1분간 측정하였다. 굴절률은 굴절계(ABBE Refractometer DR-A1, ATAGO CO., LTD. Japan)를 사용하여 25°C에서 측정하였다. 치약의 색도는 치약표면에 색차계(Milnolta CR-200, Japan)를 사용하여 명도(lightness, L), 적색도(redness, a), 황색도(yellowness, b)를 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다. 이때 표준 백판의 L값 90.72, a값 -1.07, b값 5.56을 기준으로 측정하였다.

라. Pilot 추출 생산 공정개발

(1) 잎파래 주정 추출물 제조 공정

주정(에탄올)은 무색투명한 알코올 성분인 유동성 액체로서, 특유의 방향과 자극성을 가지고 있으나 독성은 없으며, 발효주정은 곡물을 원료로 미생물이나 효소에 의해 발효하여 증류 생산한 것을 말한다. 즉, 전분이나 당분이 함유된 물료를 발효시켜 알콜분 95도 이상으로 정제한 것으로 주류, 장류, 식초, 식품, 의약품, 향료, 연초발효, 화장품 등 다양한 분야에서 사용할 수 있는 주정이다.

잎파래 분말과 발효주정을 이용하여 잎파래 주정 추출물을 대량 제조하였다. 이는 대형 플라스크와 대형 shaking incubator 만으로 제조가 가능하였다. 먼저 잎파래 분말 500g을 용기에 담고 주정을 잎파래 분말의 9-10배인 4.5-5L를 담고 추출하였다. 추출조건은 온도 18-20℃, 175-180rpm에서 shaking하면서 overnight하였다. 추출물은 여과하여, 수득한 여액을 감압증발기를 사용하여 감압 농축하고, 0.22 μm 필터를 이용하여 제균 처리를 수행하였으며, 제균 처리한 추출물은 95% 주정으로 녹였다.

(2) U/F 한외여과막 장치를 이용한 제조 공정



Fig. 1. U/F M/F Ceramic Laboratory Test Kit

그림 1의 TAMI Valisette kit는 solution의 Separation, Concentration, Decolorization 등을 할 수 있는 lab system이다. Ceramic system은 inorganic membrane으로 일반적인 Organic membrane과 달리 온도, 압력, TMP, ph, cleaning solution 등에 강하며 TFF(Tangential flow filtration)방식으로 Membrane 재생을 통하여 장기간 사용 할 수 있다. 0.14 μm microfiltration은 Fat removal from whey

가 가능한 사이즈로 지방을 분리할 수 있다. 따라서, 0.14 μm filter를 setting하여 잎파래 주정 추출물로부터 지방을 분리하여 대량 생산하였다.

제 2 절 연구내용

1. 잎파래로부터 구강건강 소재 개발

- 잎파래의 향균물질 추출조건 확립
- 잎파래 추출물 및 분획물의 향균활성
- 잎파래의 향균물질 정제조건 확립
- 잎파래로부터 정제된 향균물질의 향균활성

2. 잎파래 향균활성에 관한 간이임상

- 간이임상을 위한 샘플 제조
- 간이임상시험 연구대상
- 간이임상시험 연구 설계
- 간이임상 지수검사

3. 잎파래 향균물질의 산업화 연구

- 구강건강소재를 함유한 제품 결정
- 잎파래 향균물질 함유 시제품의 향균 효능 평가
- 잎파래 향균물질 함유 시제품의 물리·화학적 특성 확인
- Pilot 추출 생산 공정개발

제 3 절 연구결과

1. 잎파래로부터 구강건강 소재 개발

가. 잎파래의 향균물질 추출조건 확립

(1) 잎파래의 향균물질 추출 조건

(가) 잎파래의 에탄올 추출물 및 물 추출물 제조

분쇄한 잎파래의 에탄올 추출물 및 물 추출물은 그림 2에 기재된 바와 같은 방법으로 제조 조건을 확립하였다.

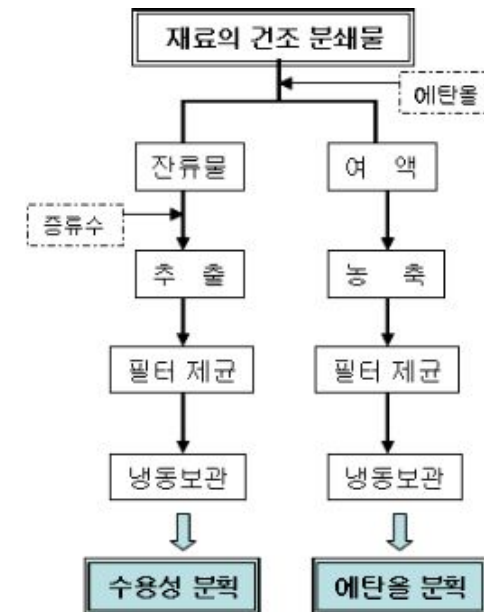


Fig. 2. The extraction method of the *Enteromorpha linza*

(나) 잎파래 분획물의 제조

잎파래의 분획물은 그림 3에 기재된 바와 같은 방법으로 제조 조건을 확립하였다. 그림 3에 기재된 방법은 Harborne(1998)의 활성성분 분리방법을 응용하였다(Harborne, J. B. Phytochemical Methods. 3rd ed. Chapman & Hall, London, pp. 302(1998)). 그리고 잎파래 에탄올 및 물 추출물과 분획물의 수율 및 성상과 색은 표 15와 같다.

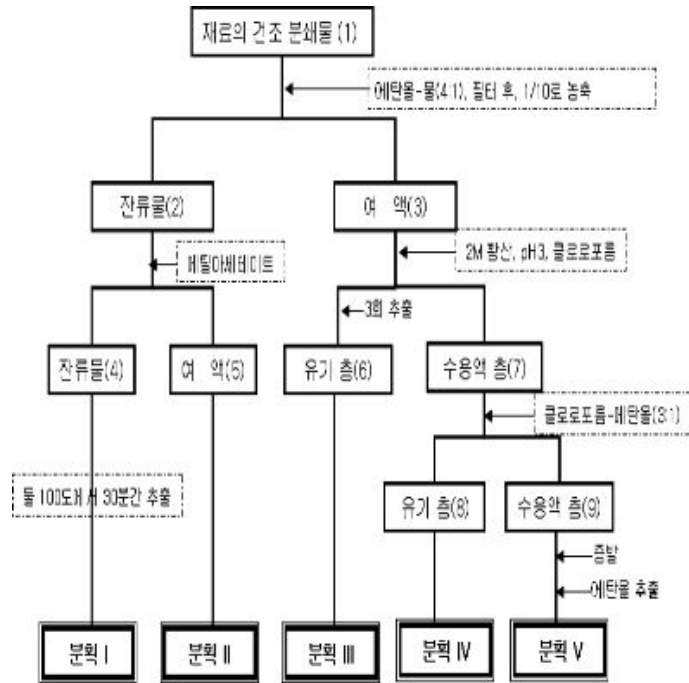


Fig. 3. The fractionation method of the *Enteromorpha linza* by Harborne, J. B. Phytochemical Methods

Table 15. Total weight and properties of the *Enteromorpha linza* extract and fraction

extract and fraction type	weight(g)	properties	color
Ethanol extract	6.2	liquid	light green
Water extract	6.3	liquid	dark green
Fraction I(water fraction)	5.0	mucus liquid	dark green
Fraction II(ethyl acetate fraction)	0.6	liquid	dark green
Fraction III(chloroform fraction)	4.4	liquid	brown
Fraction IV(chloroform and ethanol fraction)	0.2	liquid	brown
Fraction V(ethanol fraction)	10	liquid	yellow

나. 잎파래 추출물 및 분획물의 항균활성

(1) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균 활성

치은염의 원인균인 프레보텔라 인터메디아에 대한 항균 활성의 결과를 그림 4, 5 내지 그림 6에 나타내었고, 결과의 평균값을 항균 활성 값으로 하기 표 16에 기재하였으며, 대조에 및 비교예로 아무런 시료를 사용하지 아니한 대조에 1과 항생제인 가나마이신(Kanamycin)을 사용한 비교예 1의 치은염의 원인균인 프레보텔라 인터메디아에 대한 항균 활성의 결과를 표 16에 나타내었다. 하기 표에 기재된 수치는 저해환의 직경에서 디스크의 직경 8mm의 크기를 제외한 값((측정값 - 8mm)/2)이다.

그림 4 및 그림 5와 표 16에 나타난 바와 같이, 잎파래 추출물의 경우 에탄올 추출물은 1 mg을 첨가한 경우에도 항균 활성을 나타내었고, 추출물의 함량이 증가함에 따라 항균 활성도 우수해지는 것으로 나타났으나, 물 추출물의 경우 항균 활성이 없는 것으로 확인되었다. 또한, 그림 6 및 표 16에 나타난 바와 같이, 잎파래 분획물의 경우, 에틸아세테이트 분획물인 분획물 II, 클로로포름을 분획용매로 이용한 분획물 III 및 클로로포름과 에탄올을 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를 이용한 분획물 IV의 경우 우수한 항균 활성을 나타내었으며, 특히 분획물 III 및 분획물 IV는 에탄올 추출물에 비하여도 현저히 우수한 항균활성을 나타낼 뿐만 아니라, 가나마이신을 사용한 비교예 1에 비해서도 우수한 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었고, 분획물 IV의 경우 다른 추출물, 분획물 및 비교예와 비교하여 현저하게 우수한 항균활성을 나타내는 것으로

확인되었다. 그러나, 물 분획물인 분획물 I 및 에탄올 분획물인 분획물 V의 경우 항균 활성이 없는 것으로 확인되었다.

Table 16. The antimicrobial activity using the paper disk against *Prevotella intermedia*

type	ethanol extract (mg)			water extract (mg)			fraction					control	kana- mycin
	1	3	5	1	5	10	I	II	III	IV	V	1	1
mean (mm)	1.8	1.8	2.0	0	0	0	0	1.3	2.3	4.0	0	0	0
error (mm)	±0.3	±0.1	±0.2	-	-	-	-	±0.15	±0.15	±0	-	-	-

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

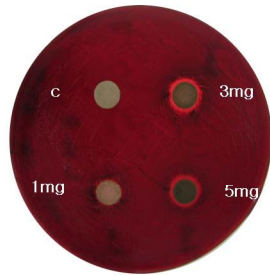


Fig. 4. Paper disk of the ethanol extract against *Prevotella intermedia*



Fig. 5. Paper disk of the water extract against *Prevotella intermedia*

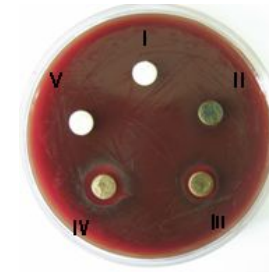


Fig. 6. Paper disk of the fraction against *Prevotella intermedia*

치주염의 원인균인 포피로모나스 긴기발리스에 대한 항균 활성의 결과를 그림 7, 8 내지 그림 9에 나타내었고, 결과의 평균값을 항균 활성 값으로 하기 표 17에 기재하였고, 대조에 및 비교예로 아무런 시료를 사용하지 아니한 대조에 2와 항생제인 가나마이신(Kanamycin)을 각 디스크(disk) 당 0.5mg 사용한 비교예 2의 치주염의 원인균인 포피로모나스 긴기발리스에 대한 항균 활성의 결과를 표 17에 나타내었다.

하기 표에 기재된 수치는 저해환의 직경에서 디스크의 직경 8mm의 크기를 제외한 값((측정값 - 8mm)/2)이다.

그림 7 및 그림 8과 표 17에 나타낸 바와 같이, 잎파래 추출물의 경우 에탄올 추출물은 1 mg을 첨가한 경우에도 우수한 항균 활성을 나타내었고, 추출물의 함량이 증가함에 따라 항균 활성도 우수해지는 것으로 나타났으나, 물 추출물의 경우 항균 활성이 없는 것으로 확인되었다. 또한, 그림 9 및 표 17에 나타낸 바와 같이, 잎파래 분획물의 경우, 에틸아세테이트 분획물인 분획물 II, 클로로포름을 분획용매로 이용한 분획물 III 및 클로로포름과 에탄올을 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를 이용한 분획물 IV의 경우 가나마이신을 사용한 비교예 2에 비해서도 우수한 항균활성을 나타내었으며, 특히 분획물 IV는 에탄올 추출물에 비하여도 현저히 우수한 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 그러나, 물 분획물인 분획물 I 및 에탄올 분획물인 분획물 V의 경우 항균 활성이 없는 것으로 확인되었다.

Table 17. The antimicrobial activity using the paper disk against *Porphyromonas gingivalis*

type	ethanol extract (mg)			water extract (mg)			fraction					control	kanamycin
	1	3	5	1	5	10	I	II	III	IV	V	2	2
mean (mm)	2.1	2.4	2.8	0	0	0	0	1.0	1.6	4.3	0	0	0
error (mm)	±0.2	±0.1	±0.2	-	-	-	-	±0.1	±0.2	±0.15	-	-	-

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

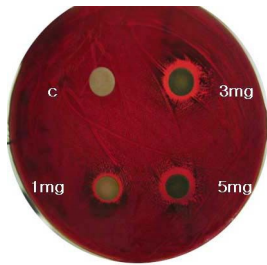


Fig. 7. Paper disk of the ethanol extract against *Porphyromonas gingivalis*



Fig. 8. Paper disk of the water extract against *Porphyromonas gingivalis*

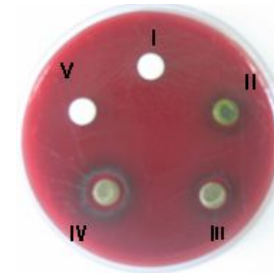


Fig. 9. Paper disk of the fraction against *Porphyromonas gingivalis*

(2) 최소저지농도(MIC)를 이용한 항균활성

실험에 의해 측정된 최소저지농도(MIC)의 평균값으로 나타난 프레보텔라 인터메디아에 대한 각 시료의 최소저지농도는 표 18에 나타내었고, 최소저지농도(MIC)의 평균값으로 나타난 포피로모나스 긴기발리스에 대한 각 시료의 최소저지농도는 표 19에 나타내었다.

표 18에 나타난 바와 같이, 프레보텔라 인터메디아에 대한 에탄올 추출물의 최소저지농도는 에틸아세테이트 분획물인 분획물 II와 동일하고 클로로포름을 분획용매로 이용한 분획물 III과 클로로포름과 에탄올을 증량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를 이용한 분획물 IV의 최소저지농도가 동일한 값을 나타내었다. 클로로포름을 분획용매로 이용한 분획물과 클로로포름과 에탄올을 증량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를 이용한 분획물의 경우, 최소저지농도가 가장 낮은 것으로 확인되었다.

Table 18. The MIC value of the *Enteromorpha linza* extract against *Prevotella intermedia*

	ethanol extract	fraction II	fraction III	fraction IV
MIC (μ g/ml)	1250	1250	625	625
MIC (%)	125.0	125.0	62.5	62.5

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

또한, 표 19에 나타난 바와 같이, 포피로모나스 긴기발리스에 대한 에틸아세테이트

분획물인 분획물 II의 최소저지농도는 에탄올 추출물의 최소저지농도의 4배이고, 상기 에탄올 추출물의 최소저지농도는 클로로포름을 분획용매로 이용한 분획물 III과 클로로포름과 에탄올을 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를 이용한 분획물 IV의 최소저지농도의 8배이어서, 클로로포름을 분획용매로 이용한 분획물과 클로로포름과 에탄올을 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를 이용한 분획물의 경우, 최소저지농도가 가장 낮은 것으로 확인되었다.

Table 19. The MIC value of the *Enteromorpha linza* extract against *Porphyromona gingivalis*

	ethanol extract	fraction II	fraction III	fraction IV
MIC (μ g/ml)	1250	312	156	156
MIC (%)	125.0	31.2	15.6	15.6

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

분획물 III과 분획물 IV의 최소저지농도가 동일한 데 비하여, 상기 종이 디스크를 이용한 항균 활성의 측정 결과에서는 분획물 III과 분획물 IV의 결과가 동일하지 않았다. 그 이유는 잎파래 추출물이나 잎파래 분획물에 포함된 항균물질이 배지(agar plate)상으로 확산되는 확산속도에 의한 것으로, 종이 디스크를 이용한 항균 활성 실험 결과가 아닌 최소저지농도를 측정한 실험 결과가 보다 정확한 것으로 예상되었다. 따라서, 항균활성이 높은 분획물은 클로로포름을 분획용매로 사용한 분획물과 클로로포름과 에탄올을 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를 이용한 분획물로 최종 결정되었다.

결과를 종합해 보면, 잎파래의 추출물 및 분획물을 평판배지 확산법(Agar diffusion method)과 액체배지감수성실험(Broth Microdilution Susceptibility Tests) 기법을 이용하여 치은염의 원인균인 프레보텔라 인터메디아와 치주염의 원인균인 포피로모나스 긴기발리스에 대한 항균활성을 확인한 결과, 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물 및 클로로포름과 에탄올을 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 혼합용매를 이용한 분획물의 경우, 우수한 항균활성이 인정되어, 상기 잎파래 추출물은 치은염 및 치주염의 치료 또는 예방효과가 우수한 것으로 확인되었다.

특히, 비교예로 사용된 항생제와 달리 잎파래 추출물의 경우, 예로부터 식자재로 사용된 천연물로부터 수득한 것이므로 기존의 항생제가 가지는 부작용이나 내생균과 관련된 문제도 발생되지 아니하고, 우리나라 해안에서 용이하게 수득할 수 있는 해조류인 잎파래를 이용하는 것이므로 경제적으로도 유익하여 그 산업적 가치가 매우 크다 할 것이다.

다. 잎파래의 항균물질 정제 조건

(1) 잎파래로부터 항균물질 정제

(가) 잎파래 분획물의 수율

① 용매 분획물의 수율

잎파래 에탄올 추출물로부터 용매 분획한 분획물의 수율은 하기 표 20과 같다. 분획물 III(클로로포름 분획물)과 분획물 IV(클로로포름과 에탄올 혼합액의 분획물)의 항균 활성이 높았으나 수율은 분획물 III이 높으므로 수율이 높은 분획물 III을 선택하였다.

Table 20. Yield of fraction isolated from the *E. linza* ethanol extract

Fraction No.	Fraction I	Fraction II	Fraction III	Fraction IV	Fraction V
weight (g)	5	0.6	4.4	0.2	10
yield (%)	3.33	0.40	2.93	0.13	6.66

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

② Sephadex LH-20 gel chromatography 분획물의 수율

클로로포름 분획물(분획물 III)을 sephadex LH-20 gel chromatography 법으로 정제하였고 샘플 1개당 10mL씩 총 20개의 샘플을 수득하였다. sephadex 분획물의 수율은 하기 표 21과 같다.

Table 21. Yield of sephadex fraction isolated from the Fraction III

sephadex fraction No.	weight(g)	yield(%)
S1	0.0617	4.11×10^{-2}
S2	0.1067	7.11×10^{-2}
S3	0.2105	1.40×10^{-1}
S4	0.6487	4.32×10^{-1}
S5	0.9848	6.57×10^{-1}
S6	0.8749	5.83×10^{-1}
S7	0.4132	2.75×10^{-1}
S8	0.3050	2.03×10^{-1}
S9	0.2467	1.64×10^{-1}
S10	0.2041	1.36×10^{-1}
S11	0.4582	3.05×10^{-1}
S12	0.3987	2.66×10^{-1}
S13	0.3465	2.31×10^{-1}
S14	0.1731	1.15×10^{-1}
S15	0.0719	4.79×10^{-2}
S16	0.0446	2.97×10^{-2}
S17	0.0342	2.28×10^{-2}
S18	0.0139	9.2×10^{-3}
S19	0.0098	6.5×10^{-3}
S20	0.0069	4.6×10^{-3}

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

③ HPLC 분획물의 수율

Sephadex 분획물 중 S14의 평균활성이 높았으므로 S14의 HPLC 정제를 수행하였고, HPLC 정제 결과 3개의 peak를 얻을 수 있었다. 3개의 peak에 대한 수율은 하기 표 22와 같다.

Table 22. Yield of HPLC fraction isolated from the sephadex fraction S14

HPLC fraction No.	weight(g)	yield(%)
S14-1	0.0187	1.24×10^{-2}
S14-2	0.0339	2.26×10^{-2}
S14-3	0.0292	1.94×10^{-2}
단일 S14-1	0.0088	5.86×10^{-3}
단일 S14-2	0.0095	6.33×10^{-3}
단일 S14-3	0.0097	6.47×10^{-3}

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

(나) Sephadex LH-20 gel chromatography를 이용한 정제

클로로포름 분획물(분획물 III)을 sephadex LH-20 gel chromatography법을 이용해 정제한 결과 하기 그림 10과 같이 짙은 갈색의 추출물이 분자량 크기에 따라 색깔별로 분리되어 분리능이 확연히 뛰어남을 관찰할 수 있었다. 분획물을 10mL씩 수득하여 총 20개의 분획물을 수득하였다.

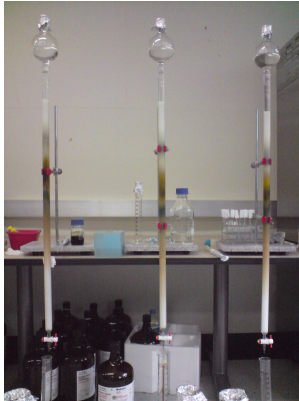


Fig. 10. Picture of the sephadex LH-20 gel chromatography

(다) TLC를 이용한 정제

Sephadex 분획물을 이용하여 TLC를 실험한 결과 하기 표 23에서와 같이 용매에 따른 Rf값을 확인하였다. 하기 표 24에서와 같이 전개용매 acetonitrile에서 스펙트럼의 분리가 용이함을 관찰하였다.

Table 23. Purification used by TLC

elution solvent	Rf		
	acetonitrile(P6.2)	isopropanol(P3.9)	chloroform(P4.1)
s-10	0.17/0.4/0.74	-	-
s-11	0.19/0.39/0.73	-	-
sample s-12	0.19/0.74	-	-
s-13	0.19/0.24/0.76/0.87	0.47/0.73	0.11/0.69/0.76
s-14	0.26/0.77/0.87	0.73	0.11/0.19/0.67

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Table 24. Feature of Thin-layer chromatography (TLC)

solvent	Aceto-nitrile	Ethanol	Methanol	Ethyl Acetate	Chloroform	iso-Propanol
polarity index	5.8	5.2	5.1	4.4	4.1	3.9
TLC						

(라) HPLC를 이용한 정제

Sephadex 분획물 중 활성이 있는 분획을 모아 HPLC를 이용하여 정제하였다. S14의 샘플을 UV/VIS spectrophotometer로 스캔한 결과 197nm에서 피크의 최대점이 관찰되었다. HPLC chromatogram은 하기 그림 11과 같고 메인 peak 3개를 각각 분취하였다.

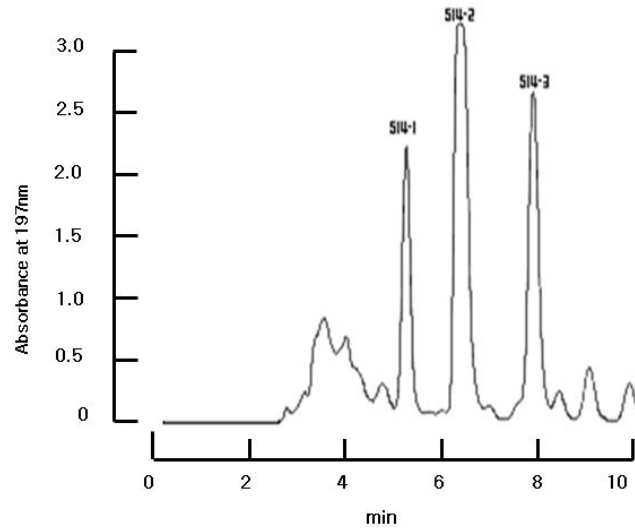


Fig. 11. HPLC chromatogram of the S14

(2) 잎파래로부터 항균물질 규명

(가) ESI-MS를 이용한 분자량 분석

잎파래에서 분리한 항균 물질을 규명하기 위해 ESI-MS를 이용하여 분자량을 분석하였다. 그림 12에서와 같이 S14-2의 분자량은 negative mode에서 551.1 m/z로 추정되었다. 이 값은 $[2M-H]^-$ 로 S14-2의 두 분자가 서로 붙어있는 것으로 추정되며 S14-2의 분자량은 275.5로 추정되었다.

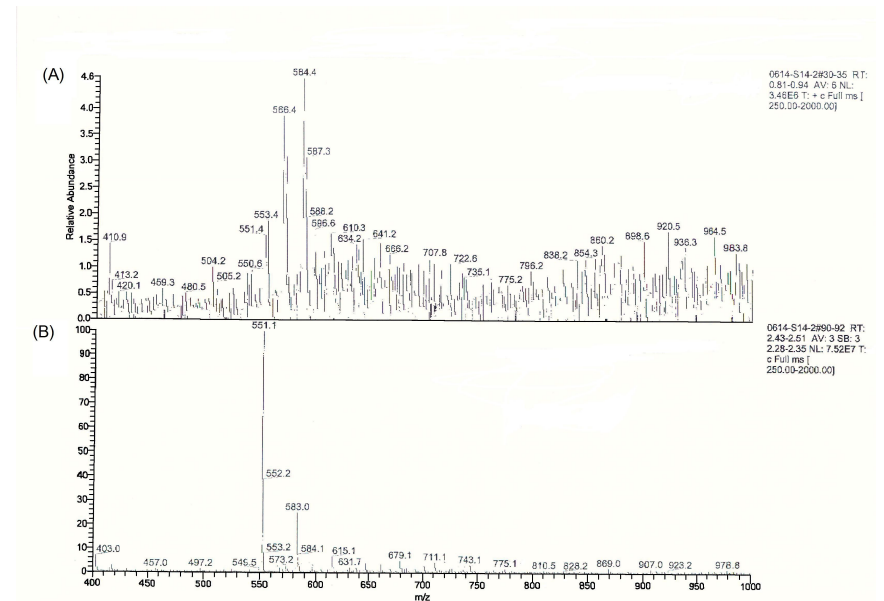


Fig. 12. ESI-MS data of the S14-2 sample analyzed by KBSI

(A) positive mode (B) negative mode

(나) GC/MS를 이용한 정성 분석

methyl ester화된 S14-2와 S14-3의 샘플을 GC/MS로 분석한 결과 Stearidonic acid와 100%, gamma-linolenic acid와 95% 일치한다는 결과가 나왔다. S14-2는 sigma-aldrich에서 구입한 SA standard를 methyl ester화하여 GC/MS로 분석하고 그 스펙트럼의 일치도를 비교한 결과 동일한 물질이라는 결론을 얻었고 S14-3은 methyl ester화하여 GC/MS로 분석하여 라이브러리 설치를 통해 GLA라는 결론을 얻었다. SA의 GC/MS 스펙트럼은 그림 13과 같고 GLA의 GC/MS 스펙트럼은 그림 14와 같다.

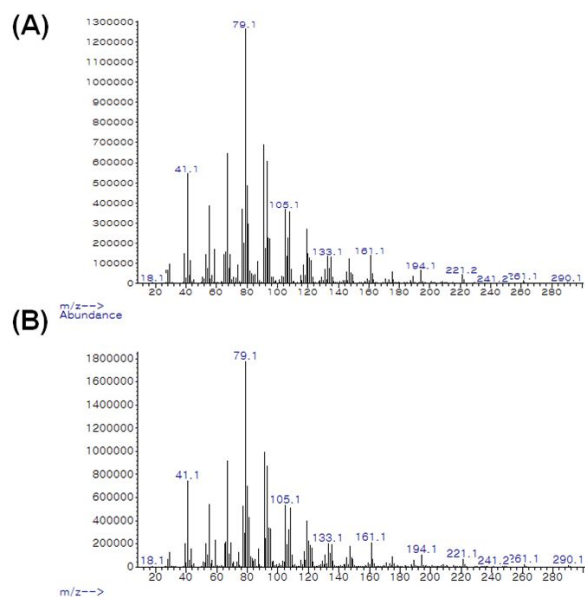


Fig. 13. GC/MS chromatograms of the antimicrobial substances analyzed by Korea basic science institute(GC/MSD, 5975C Agilent).

(A) stearidonic acid, methyl ester(standard)

(B) S14-2

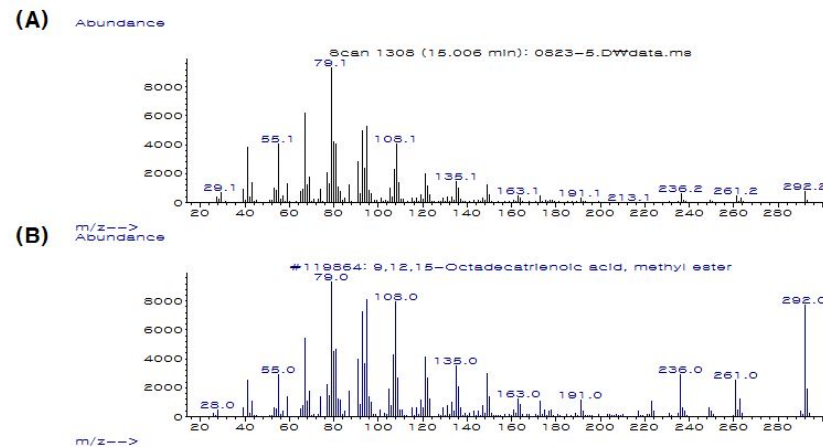


Fig. 14. GC/MS chromatograms of the antimicrobial substances analyzed by Korea basic science institute(GC/MSD, 5975C Agilent).

(A) S14-3

(B) gamma-linolenic acid, methyl ester(standard)

(다) NMR을 이용한 구조 분석

유기물(천연물, 합성물)의 화학적 구조 분석에 사용되는 방법으로 분자량을 분석한 정제물질을 1 mg/mL의 농도로 조절하고 MeOD에 녹인 후, FT-NMR(Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer, 퓨리에 변환 핵자기공명 분석기, JEOL(Japan), JNM ECP-400)을 통해 구조 분석하였다. 또한, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC와 같은 여러 가지 NMR 기법을 이용하여 화합물의 signal을 완전히 동정하고 구조를 분석하여 standard 물질과 비교 분석한 뒤 물질을 명명하였다.

^1H -NMR의 signals는 다음과 같고 스펙트럼은 하기 그림 15에 나타내었다. 1개의 methyl proton은 δ 0.965(3H, t, H-18)에서 나타났고, 8개의 methylene protons은 δ 1.41(2H, m, H-4), δ 1.61(2H, m, H-3), δ 2.10-2.08(4H, m, H-5, H-17), δ 2.27(2H, t, H-2), δ 2.83-2.81(6H, m, H-8, H-11, H-14), 그리고 8개의 methine proton signals는 다음과 같이 나타났다. δ 5.36-5.34(8H, m, H-6,

H-7, H-9, H-10, H-12, H-13, H-15, H-16) ; carboxyl group의 proton(H-1)은 δ 4.89에서 나타났다.

상기 $^1\text{H-NMR}$ spectrum으로부터 $^1\text{H-NMR}$ 의 signal을 분석한 결과, 1개의 methyl proton과 8개의 methylene proton signal, 8개의 methine proton signal이 관찰되었다.

또한, 하기 그림 16에 나타난 S14-2의 Carbon(^{13}C) NMR의 스펙트럼을 통해 확인된 바와 같이, $^{13}\text{C-NMR}$ 의 signal은 다음과 같다.

1개의 carbonyl carbon은 δ_c 177.53(C-1)에서 나타났고, 1개의 methyl carbon은 δ_c 14.65(C-18), 8개의 methylene carbons은 δ_c 21.49(C-17), δ_c 25.73(C-3), δ_c 26.43(C-8), δ_c 26.52(C-11), δ_c 26.54(C-14), δ_c 27.90(C-5), δ_c 30.19(C-4), δ_c 34.83(C-2), 그리고 8개의 methine carbons은 δ_c 128.19(C-15), δ_c 128.95(C-7), δ_c 129.01(C-13), δ_c 129.19(C-9), δ_c 129.29(C-12), δ_c 129.40(C-10), δ_c 130.66(C-6), δ_c 132.78(C-16)과 같이 나타났다.

하기 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum으로부터 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 signal을 분석한 결과, 1개의 carbonyl carbon(C-1), 1개의 methyl carbon(δ 14.65), 8개의 methylene carbon 및 8개의 methine carbon이 관찰되었다.

또한, 하기 그림 17에 나타난 S14-2의 COSY NMR 스펙트럼을 통해 분석한 결과, 말단 methyl proton(H-18), methylene proton(H-17, H-5) 및 methine proton(H-16)이 첫 번째 이중 결합이 세 번째 위치에 존재하는 것으로 확인되는 일련의 COSY 상관관계를 나타내, 상기 S14-2의 말단의 methyl carbon(C-18)으로부터 첫 번째 이중 결합의 위치가 세 번째 위치(n-3 또는 C-16)에 존재하는 것이 확인되었다.

또한, 하기 그림 18에 나타난 S14-2의 HMQC NMR 스펙트럼 및 그림 19에 나타난 S14-2의 HMBC NMR 스펙트럼을 통해 탄소(carbon) 및 수소(proton)의 상관관계를 분석한 결과, 상기 S14-2는 최종적으로 6번, 9번, 12번, 15번 위치에 이중결합을 갖는 탄소수 18개의 지방산인 6, 9, 12, 15-옥타데카테트라에노익산(octadeca-6, 9, 12, 15-tetraenoic acid, C18:4)의 구조를 갖는 것으로 예상되었다.

S14-2의 예상구조인 6, 9, 12, 15-옥타데카테트라에노익산의 구조를 하기 그림 20에 나타내었다. 그리고 gamma-linolenic acid의 구조는 그림 21과 같다.

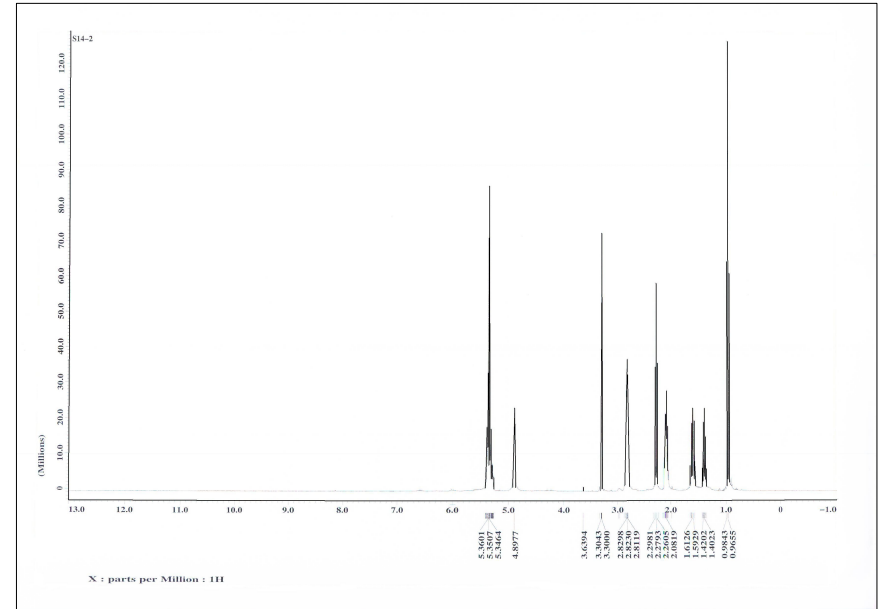


Fig. 15. Proton(^1H) NMR spectrum of the S14-2 peak

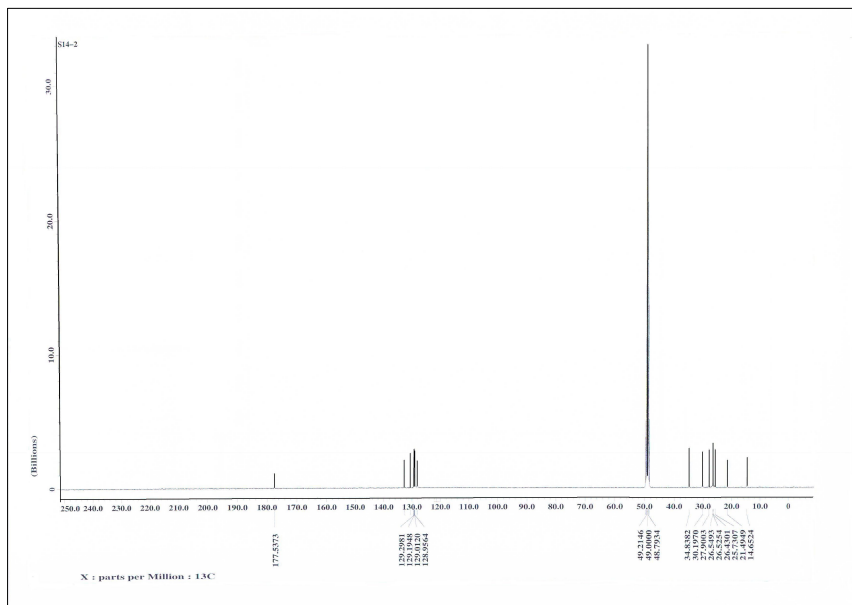


Fig. 16. Carbon(¹³C) NMR spectrum of the S14-2 peak

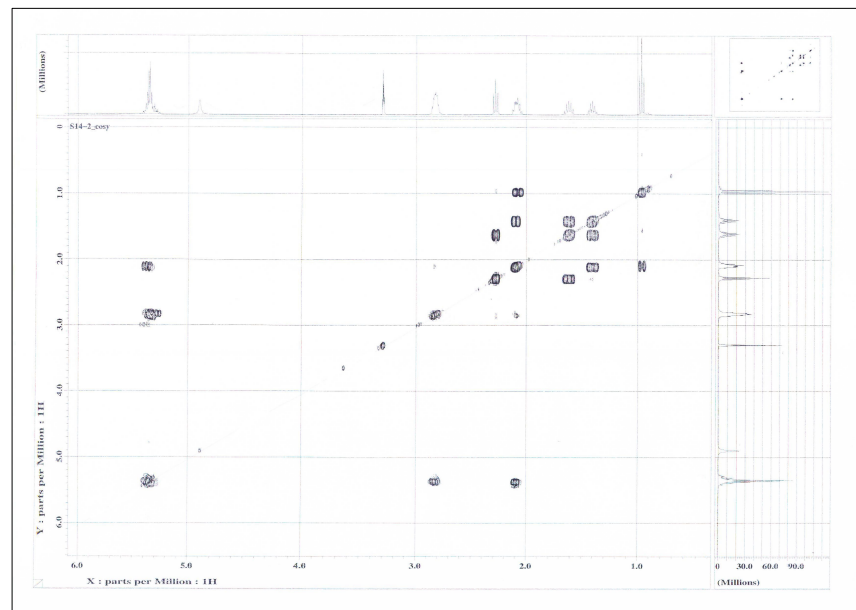


Fig. 17. COSY spectrum of the S14-2 peak

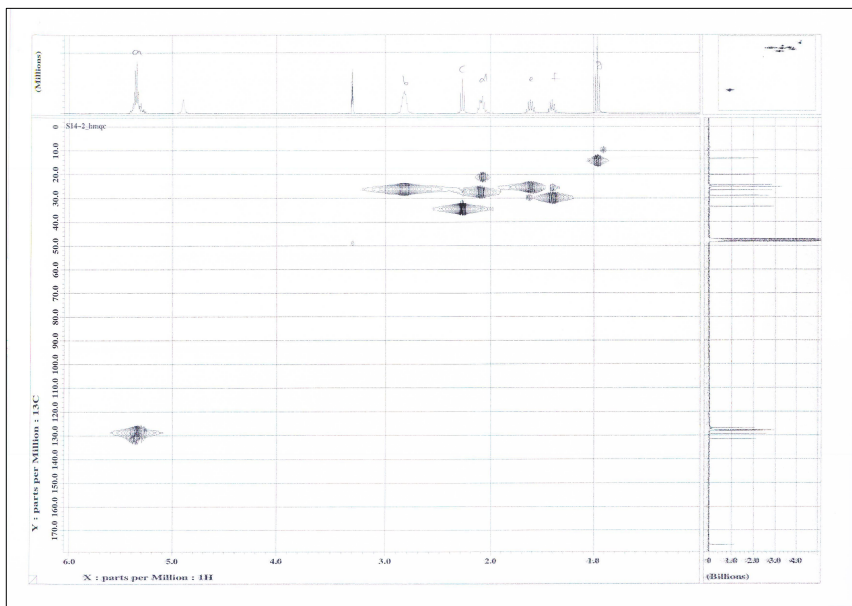


Fig. 18. HMQC spectrum of the S14-2 peak

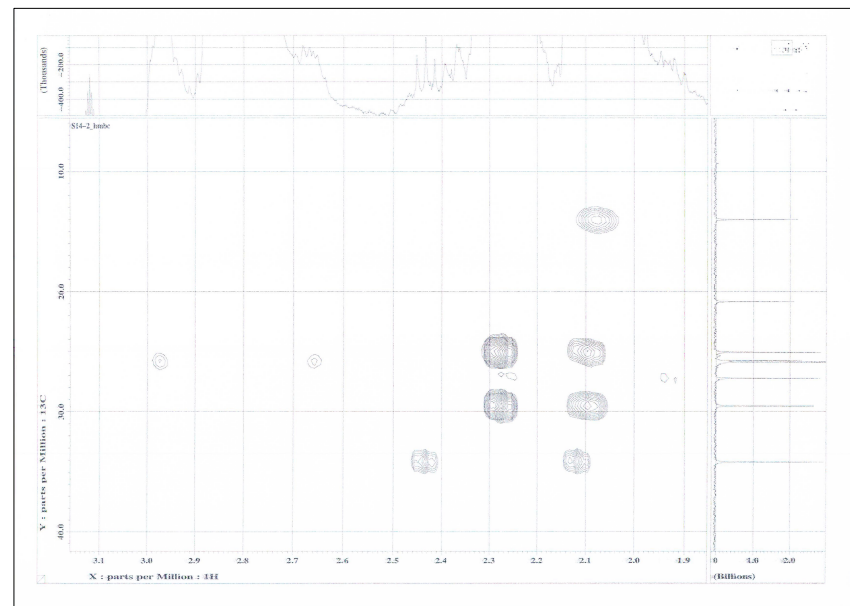


Fig. 19. HMBC spectrum of the S14-2 peak

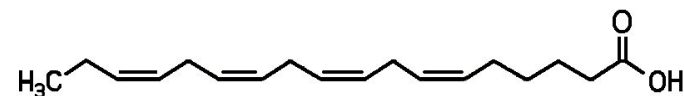


Fig. 20. The structure of the octadeca-6, 9, 12, 15-tetraenoic acid (C18:4 ω -3), or stearidonic acid (SA), or morotic acid

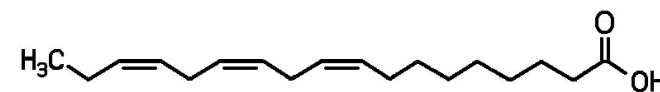


Fig. 21. The structure of the 9,12,15-octadecatrienoic acid (C18:4 ω -6), or gamma-linolenic acid (GLA)

(라) 잎파래 항균물질 추출 및 정제 과정 도식화

잎파래 분말에서 최종 항균물질인 stearidonic acid를 얻는 추출 및 정제 과정을 그림 22와 같이 도식화하였다. 각 정제 단계마다 물질의 수율도 함께 나타내었다. 잎파래 분말 150g을 추출하여 9.5mg($6.33 \times 10^{-3} \%$)의 stearidonic acid와 9.7mg($6.47 \times 10^{-3} \%$)의 gamma-linolenic acid를 획득하였다.

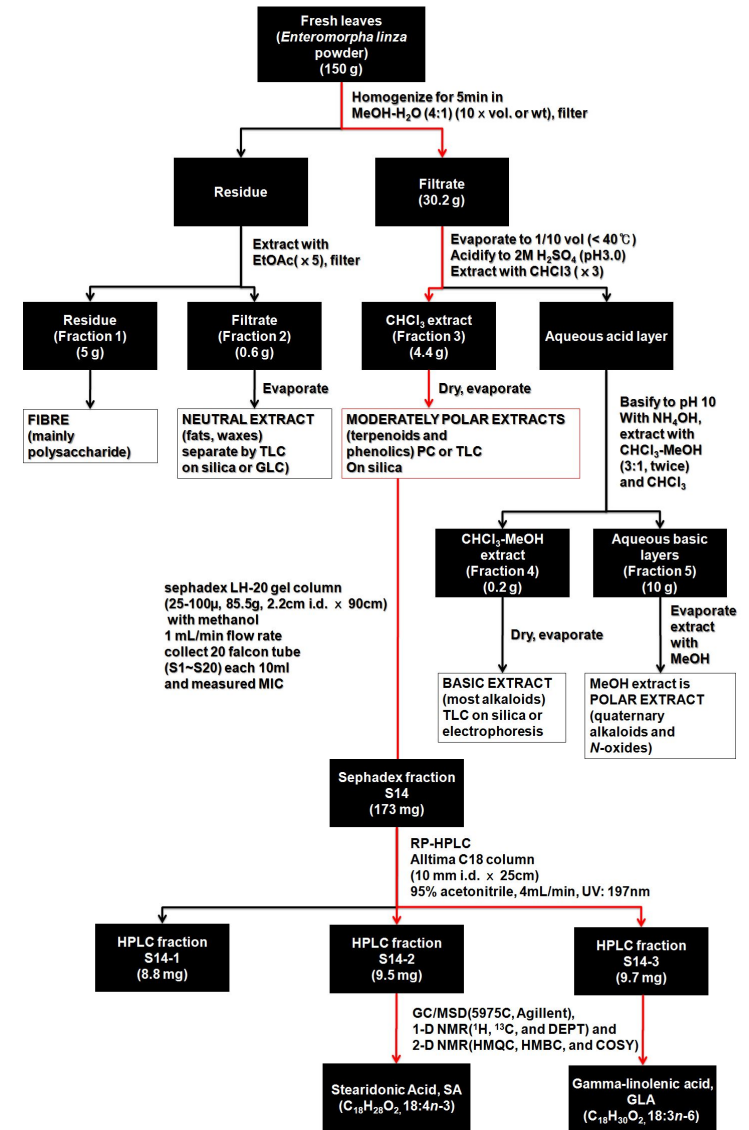


Fig. 22. Purification step of the antimicrobial activity compound isolated from *Enteromorpha linza*

※ ↓ : purification step of the stearidonic acid and gamma-linolenic acid

(마) 잎파래 항균물질 순도검정

잎파래 항균물질인 S14-2와 S14-3의 순도검정을 HPLC로 분석하였다. 기준물질인 stearidonic acid와 gamma-linolenic acid, S14-2, S14-3을 동일 농도(10mg/mL), 동일 조건(95% ACN)에서 분석하여 적분 후 %면적을 이용하여 분석하였다. 참고로 그림 23과 같이 용매로 사용된 methanol을 분석하였을 경우 3.232분에서 95%면적을 나타내었다. S14-2를 HPLC로 분석한 결과는 그림 24의 (B)에 나타난 것과 같이 처음 나온 peak는 용매(Methanol) 획분으로 3.219분에서 4.86%면적을 나타내었고 두 번째의 peak는 노이즈 peak로 추측되며 3.853분에서 2.55%면적을 나타내었다. 세 번째의 peak는 S14-2의 획분으로 6.355분에서 89.78%면적을 나타내었다. 또한, 그림 24의 (A)와 같이 기준물질인 SA를 HPLC로 분석한 결과 첫 번째의 peak는 용매 분획으로 3.239분에서 5.69%면적을 나타내었고 두 번째 6.332분에서 92.46%면적을 나타내었다. 즉, S14-2의 획분은 89.78%의 면적비를 보여 정제된 기준물질인 SA(92.46%)와 유의한 수준의 순도를 나타내었다.

S14-3을 HPLC로 분석한 결과는 그림 25의 (B)에 나타난 것과 같이 두 번째 나온 획분으로 7.759분에서 78.56%면적을 나타내었고 첫 번째 SA의 획분(6.281분)이 14%면적 나타냈다. 또한, 기준물질인 GLA를 HPLC로 분석한 결과 7.878분에서 75.89%의 면적을 나타내었다. 즉, S14-3의 획분도 78.56%의 면적비를 보여 정제된 기준물질인 GLA(75.89%)와 유의한 수준의 순도를 나타내었다.

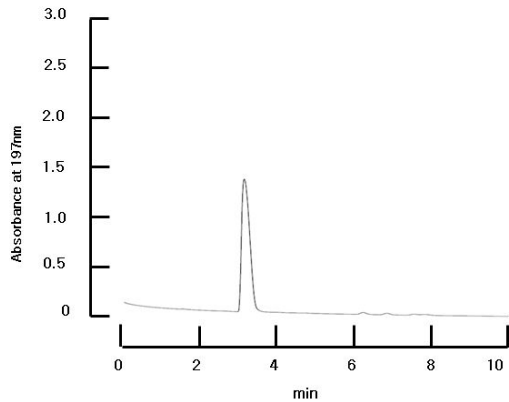


Fig. 23. HPLC chromatogram of the methanol solvent

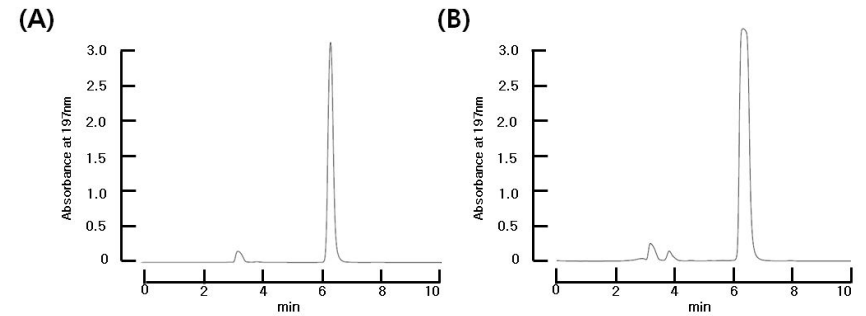


Fig. 24. HPLC chromatograms of the antimicrobial substance on the C₁₈ column by the RP-HPLC, 95% acetonitrile, 4.0min/mL, UV 197nm.
(A) stearidonic acid (standard)
(B) S14-2

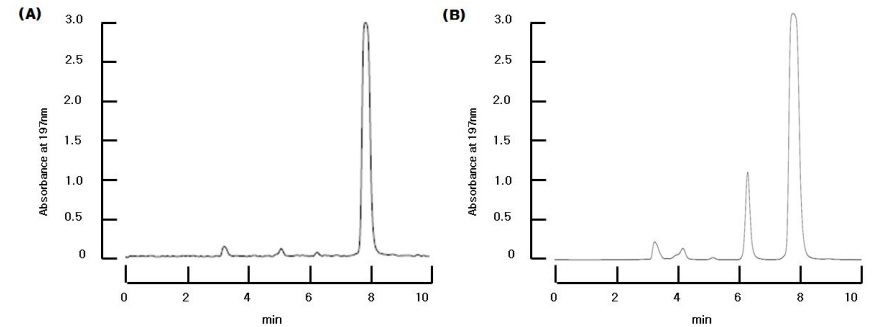


Fig. 25. HPLC chromatograms of the antimicrobial substance on the C₁₈ column by the RP-HPLC, 95% acetonitrile, 4.0min/mL, UV 197nm.
(A) gamma-linolenic acid (standard)
(B) S14-3

라. 잎파래로부터 정제된 항균물질의 항균활성

(1) 최소저지농도(MIC)를 이용한 항균활성

(가) Sephadex 분획물의 항균활성

세파덱스 분획물 S1~S20까지의 MIC 농도는 다음 표 25, 26와 같다. 이중 S13, S14의 MIC 농도는 치은염균에서는 모두 78.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 치주염균에서는 S13은 39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, S14는 19.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 S14가 S13보다 치주염균에 대한 최소저지농도(MIC)가 낮아 S14를 선택하였다.

Table 25. The MIC value of the sephadex fraction against *Prevotella intermedia*

	Medium	Medium + strain	1250 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	625	312.50	156.25	78.12	39.06	19.53	9.76	sephadex fraction No.	MIC value ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
S20											S20	1250
S19											S19	1250
S18											S18	-
S17											S17	-
S16											S16	625
S15											S15	156.25
S14											S14	78.12
S13											S13	78.2
S12											S12	156.25
S11											S11	156.25
S10											S10	312.5
S9											S9	312.5
S8											S8	312.5
S7											S7	312.5
S6											S6	1250
S5											S5	1250
S4											S4	1250
S3											S3	1250
S2											S2	-
S1											S1	-

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Table 26. The MIC value of the sephadex fraction against *Porphyromona gingivalis*

	Medium	Medium + strain	1250 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	625	312.50	156.25	78.12	39.06	19.53	9.76	sephadex fraction No.	MIC value ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
S20											S20	312.5
S19											S19	78.12
S18											S18	1250
S17											S17	625
S16											S16	625
S15											S15	39.06
S14											S14	19.53
S13											S13	39.06
S12											S12	39.06
S11											S11	312.5
S10											S10	312.5
S9											S9	312.5
S8											S8	625
S7											S7	625
S6											S6	1250
S5											S5	1250
S4											S4	625
S3											S3	625
S2											S2	625
S1											S1	1250

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.

Differences were considered significant at $p < 0.05$.

(나) HPLC 분획물의 항균활성

sephadex 분획물 S14를 HPLC 정제한 결과 3개의 sub fraction으로 분리되었다. S14-1, S14-2, S14-3의 MIC 농도는 다음 표 27과 같다. 이 중 S14-2와 S14-3의 MIC 농도는 치은염 균에서는 39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 치주염 균에서는 9.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 낮아 우수한 항균효능을 나타내었다.

Table 27. The MIC value of the HPLC sub fractions against *Prevotella intermedia* and *Porphyromona gingivalis*

HPLC sub fractions	(ug/ml)	
	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Porphyromona gingivalis</i>
S14-1	156.25	39.06
S14-2(SA)	39.06	9.76
S14-3(GLA)	39.06	9.76

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

(다) Standard 물질 및 그 외 지방산의 항균활성

S14-2, S14-3과 동일한 물질인 stearidonic acid와 gamma-linolenic acid는 불포화 지방산이다. 따라서, 불포화 지방산의 종류별로 시그마에서 시약을 구입하여 SA와 함께 항균활성을 비교 분석하였다. 최소저지농도(MIC)는 하기 표 28과 같다. 불포화 지방산의 종류에는 omega-3 지방산인 ALA(α -linolenic acid, 18:3n-3), SA(stearidonic acid, 18:4n-3), EPA(eicosapentaenoic acid, 20:5n-3), DHA(docosahexaenoic acid, 22:6n-3)가 있고 omega-6 지방산인 LA(linoleic acid, 18:2n-6), GLA(γ -linolenic acid, 18:3n-6), AA(arachidonic acid, 20:4n-6)가 있다. 치은염균(*P. intermedia*)에서는 ALA와 AA가 19.53 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 항균 활성이 가장 우수했고 다음으로 SA, EPA, LA, GLA가 39.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나타났고 DHA는 78.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 그리고 치주염균(*P. gingivalis*)에서는 모든 지방산의 활성이 9.76 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 우수한 활성을 나타내었다. 이는 대한구강보건학회지 제 29권 제 2호(2005)의 [Curcuma zanthorrhiza 추출물 및 함유 치약의 구취 억제 효과와 구강 유해균에 대한 선택적 항균 효과]에서 치주염균에 대한 chlorhexidine의 MIC가 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것과 비교하면 매우 우수한 항균활성이라는 것을 확인할 수 있다. 또한, 천연물질인 Curcuma zanthorrhiza의 치주염균에 대한 MIC가 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것과 비교하면 SA와 GLA의 항균활성이 3배 이상 높다는 것을 알 수 있다.

Table 28. The MIC value of the PUFAs against *Prevotella intermedia* and *Porphyromona gingivalis*

(unit : $\mu\text{g}/\text{ml}$)

PUFAs	MIC		
	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Porphyromona gingivalis</i>	
n-3	ALA, 18:3n-3	19.53	9.76
	SA, 18:4n-3	39.06	9.76
	EPA, 20:5n-3	39.06	9.76
	DHA, 22:6n-3	78.12	9.76
n-6	LA, 18:2n-6	39.06	9.76
	GLA, 18:3n-6	39.06	9.76
	AA, 20:4n-6	19.53	9.76

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

(라) 다양한 치주질환 원인균에 대한 항균활성

치은염과 치주염을 일으키는 원인균에는 대표적인 *P. intermedia*와 *P. gingivalis* 외에도 표29 에서와 같이 다양한 균이 있다. 따라서, 이들 균에 대해 SA와 GLA가 항균 효능이 있는지를 측정하기 위해 최소저지농도(MIC)를 측정된 결과, GLA는 모든 균에서 항균효능을 나타내었고 특히 *P. gingivalis*와 *Fusobacterium nucleatum subsp. vincenti*에서 뛰어난 활성을 나타내었다. 반면 SA는 *Fusobacterium nucleatum subsp. vincenti*를 제외한 모든 균에 대해 항균효능을 나타내었고 특히 *P. gingivalis*와 *P. intermedia*에서 뛰어난 활성을 나타내었다.

Table 29. The MIC value of the SA and GLA against several oral pathogens.

Bacterium	Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		SA	GLA
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	KCTC 3698	312	312
<i>Candida albicans</i>	KCTC 17485	625	156
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. vincenti</i>	KCTC 5105	-	19.53
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	KCTC 381	9.76	9.76
<i>Prevotella intermedia</i>	KCTC 25611	39.06	39.06
<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC 3065	625	312

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

(2) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균활성

(가) Standard 물질 및 그 외 지방산의 항균활성

종이 디스크를 이용한 항균활성에서 저지환의 크기는 종이 디스크의 크기인 8mm를 제외한 크기의 1/2을 측정한다. 그림 26와 표 30에서와 같이 치은염균(*P. intermedia*)에서 저지환의 크기가 큰 순서대로 나열하면 ALA > EPA > SA > DHA = GLA > LA > AA 와 같다. 그림 27과 표 30에서와 같이 치주염균(*P. gingivalis*)에서는 SA = AA > GLA > DHA > ALA > EPA > LA 순서대로 항균활성이 나타났다. 종이 디스크의 결과와 MIC의 결과가 차이가 나는 이유는 종이 디스크의 경우 각 시료가 배지에 확산되는 확산속도가 달라 균의 성장 저해에 영향을 미친 것으로 추측되었다. 따라서, 종이 디스크의 결과보다 MIC의 결과가 더 신뢰성이 있다고 판단되었다.



Fig. 26. The paper disk activity of the PUFAs against *Prevotella intermedia*.

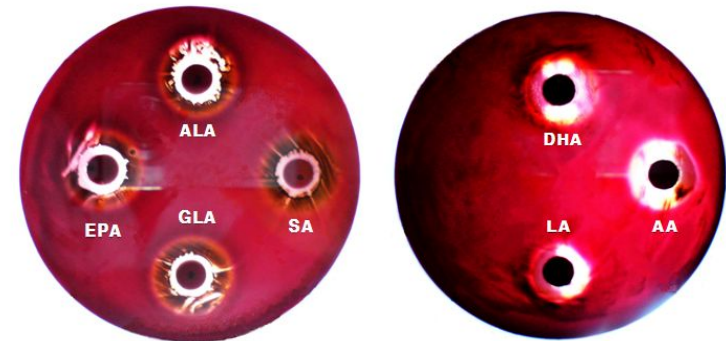


Fig. 27. The paper disk activity of the PUFAs against *Porphyromonas gingivalis*.

Table 30. The paper disk diffusion assay of the PUFAs against *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis*.

PUFAs	Paper disk diffusion assay (mm)		
	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
n-3	ALA, 18:3n-3	4.33±0.19	3.00±0.58
	SA, 18:4n-3	3.67±0.19	3.50±0.88
	EPA, 20:5n-3	4.00±1.17	3.00±0.33
	DHA, 22:6n-3	3.25±0.84	3.17±1.17
n-6	LA, 18:2n-6	3.00±1.30	2.67±0.84
	GLA, 18:3n-6	3.25±1.26	3.33±0.77
	AA, 20:4n-6	2.67±0.51	3.50±1.20

* Values represent the mean ± SD (n≥3).

** All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at p<0.05. Statistical significance is student t-test as compared to controls.

2. 잇파래 항균활성에 관한 간이임상

가. 간이임상을 위한 샘플 제조

(1) 간이임상을 위한 샘플

간이임상을 위한 샘플은 200mL 규격의 시약병에 담아 사용하였고 하기 그림 28과 같다.



잇파래(*E. linza*) 양치액 샘플
(좌:정면, 우:측면)

Fig. 28. Gargle sample from *Enteromorpha linza* for simple clinical trials

(2) 간이임상을 위한 샘플의 항균활성

항균활성은 상기 액체배지 감수성 실험법을 이용하여 치은염균, 치주염균에 대한 최소저지농도(MIC) 실험을 수행하였다. 결과는 표 31과 같이 치은염균과 치주염균에서 FE-S10에서부터 FE-S15까지 MIC 농도가 거의 일정하므로 이 부분을 수득하여 간 이임상을 위한 샘플로 사용하였다.

Table 31. The MIC value of the fermentation ethanol extract for clinical trials against *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis*

(단위 : $\mu\text{g}/\text{ml}$)

fermentation ethanol extract	MIC		Yield (1g기준)
	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
	ATCC 25611	381	
crude extract (control)	1250	1250	
FE-S10	312	625	25mg
FE-S11	312	625	45mg
FE-S12	312	625	69mg
FE-S13	625	625	112mg
FE-S14	312	312	115mg
FE-S15	312	625	35mg

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

(3) 간이임상을 위한 샘플의 품질 분석

(가) 총 폴리페놀, chlorophyll a, b, 총 지방산 함량 분석

간이임상을 위해 제작한 샘플의 단계별로 품질을 분석한 결과 잎파래 주정 추출물보다 세파텍스 추출물에 세 가지 지수가 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 즉, 분자량 크기에 의해 분리되는 세파텍스 정제 단계를 거치는 동안 생리활성이 증가함을 확인할 수 있었다.

Table 32. Total polyphenol, chlorophyll a, b and lipid contents of *E. linza* extract and gargle test product.

	<i>E.linza</i> powder	Ethanol extract (1mg/ml)	Sephadex extract (1mg/ml)	Gargle test product (1mg/ml)
Polyphenol (ug/ml)	-	27.53±0.011	56.12±0.004	48.53±0.04
Chlorophyll a (ug/ml)	-	24.23	29.63	37.89
Chlorophyll b (ug/ml)	-	20.49	37.77	46.92
Total Lipid ^a (ug/ml)	-	14.71	16.29	16.26
Yield (%)	100	1.55	0.01	-

^a Concentration of standard (olive oil) was 600mg/dl.

* Values represent the mean ± SD (n≥3).

** All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical significance is student t-test as compared to controls.

(나) 유리지방산 조성 및 함량분석

간이임상을 위해 제작한 잎파래 주정 추출물의 지방 함량은 1.2%였다(그림 29). 이 중 대표적인 유리지방산 37종(stearidonic acid 포함)과 기타 지방산의 조성비를 분석한 결과 그림 30에서와 같이 Palmitic acid 12.5%, Stearidonic acid 11.8%, Oleic acid 6%, Linolenic acid 5.9%, Linolelaidic acid 5.1%로 이들 5종류의 유리지방산이 총 지방산 중 41.3%를 차지하고 있을 정도로 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 세파텍스 추출물에 대한 지방산 함량 분석 결과 0.9%를 함유하고 있었고 유리 지

방산 37종(stearidonic acid 포함)과 기타 지방산의 조성비를 분석한 결과 그림 31에
 서와 같이 Palmitic acid 11.2%, Stearidonic acid 15.3%, Oleic acid 6.4%,
 Linolenic acid 8%, Linolelaidic acid 4.2%로 이들 5종류의 유리지방산이 총 지방산
 중 45.1%를 차지하고 있을 정도로 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 특히, 치주염
 균과 치은염균에 항균 활성을 나타내는 물질이라고 밝혀진 stearidonic acid와
 linolenic acid의 함량이 주정 추출물에서는 총 17.7%이고 세파텍스 추출물에서는 총
 23.3%로 증가하였다. 즉, 분자량 크기에 따른 물질 분리를 통해 불포화지방산의 함량
 을 30% 증가시킬 수 있어 산업화 공정에 분자량 크기에 따른 분리 단계를 포함하는
 것이 항균 효능을 극대화시킬 수 있음을 예상할 수 있었다. 따라서, 의약품기준에 맞
 추어 실제 산업화를 고려했을 때 잎파래 분말을 주정으로 추출한 후 분자량 크기별로
 분리해내는 제조 공정(U/F 한외여과막 장치)을 거친 후 분리해낸 물질을 치약에 첨가
 하는 것이 산업화하는데 있어 수율적인 부분과 안정성 면, 기술적인 면에서 유리할 것
 이라 사료되었다.



신라대학교
산학협력단 식품분석센터

[신라대학교] 부산 사상구 폐법동 산1-1
Tel. 051-999-5678 Fax. 051-999-6930
http://sanhak.silla.ac.kr

식품시험성적서

검사 책임자	정	소재학	부	김영훈
-----------	---	-----	---	-----

제 목 : 시험성적서 교부 발 음 : 부산 기장군 일광면 신평리 49

검사완료일 : 2011년 03월 10일 기장물산 귀하

발 급 번 호 : 12-110223-02 [619-911]

접수번호	12-110223-02-01	접수일자	2011년 02월 23일
업 체 명	기장물산(주)	대 표 자	김영훈
제 조 일 자		유통 기 한	
제 품 명	잎파래 에탄올 추출물	식 품 유 형	기타
검 사 목 적	참고용	검 사 항 목	지방산 함량

귀하께서 의뢰하신 검체에 대하여 다음과 같이 시험성적서를 교부합니다.

시 험 항 목 및 결 과

시 험 항 목	결 과
지방산 함량(mg/5.65g)	67.8
	

상기 판정은 의뢰된 시험항목에 한함
 비교: 이 시험성적서는 제시된 검체에 한하며 시험의외목적 이외 광고, 선전 등에 이용할 수 없습니다.

2011년 03월 10일

신라대학교 산학협력단 식품분석센터



Fig 29. Total lipid content of *E. linza* ethanol extract.

Peak No.	지방산명	조성비 (%)	함량 (g/100g)	함량 (g/5.65g)	함량 (mg/5.65g)
1	C4:0 Butyric Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
2	C6:0 Caproic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
3	C8:0 Caprylic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
4	C10:0 Capric Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
5	C11:0 Undecanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
6	C12:0 Lauric Acid	0.1	0.001	0.00007	0.07
7	C13:0 Tridecanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
8	C14:0 Myristic Acid	0.3	0.004	0.00020	0.20
9	C14:1 Myristoleic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
10	C15:0 Pentadecanoic Acid	0.1	0.001	0.00007	0.07
11	C15:1 cis-10-Heptadecanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
12	C16:0 Palmitic Acid	12.5	0.150	0.00848	8.48
13	C16:1 Palmitoleic Acid	0.9	0.011	0.00061	0.61
14	C17:0 Heptadecanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
15	C17:1 cis-10-Heptadecanoic Acid	0.3	0.004	0.00020	0.20
16	C18:0 Stearic Acid	0.2	0.002	0.00014	0.14
17	C18:1 n9t Elaidic Acid	0.5	0.006	0.00034	0.34
18	C18:1 n9c Oleic Acid	6.0	0.072	0.00407	4.07
19	C18:2 n6t Linolelaidic Acid	5.1	0.061	0.00346	3.46
20	C18:2 n6c Linoleic Acid	1.0	0.012	0.00068	0.68
21	20:0 Arachidic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
22	C18:3 n6 r-Linoleic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
23	C20:1 cis-11,14-Eicosadienoic Acid	0.1	0.001	0.00007	0.07
24	C18:3 n3 Linolenic Acid	5.9	0.071	0.00400	4.00
25	C21:0 Heneicosanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
26	- Stearidonic Acid	11.8	0.142	0.00800	8.00
27	C22:0 Behenic Acid	0.5	0.006	0.00034	0.34
28	C20:3, n6 cis-8,11,14-Eicosatrienoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
29	C22:1 n9 Erucic acid	0.2	0.002	0.00014	0.14
30	C20:3 n3 cis-11,14,17-Eicosatrienoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
31	C20:4 n6 Arachidonic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
32	C23:0 Tricosanoic Acid	0.1	0.001	0.00007	0.07
33	C22:2 cis-13,16-Docosadienoic Acid	0.6	0.007	0.00041	0.41
34	C24:0 Lignoceric Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
35	C20:5 n3 cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid	0.3	0.004	0.00020	0.20
36	C24:1 Nervonic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
37	C22:6 n3 cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
38	- 기타 지방산	53.5	0.642	0.03627	36.27
총 지방산 함량			67.8(mg/5.65g)		

윗파래 에탄올 추출물의 지방 함량 : 1.2%

Fig 30. Free fatty acid percentage of *E. linza* ethanol extract.

Peak No.	지방산명	조성비 (%)	함량 (g/100g)	함량 (g/4.63g)	함량 (mg/4.63g)
1	C4:0 Butyric Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
2	C6:0 Caproic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
3	C8:0 Caprylic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
4	C10:0 Capric Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
5	C11:0 Undecanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
6	C12:0 Lauric Acid	0.2	0.002	0.00008	0.08
7	C13:0 Tridecanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
8	C14:0 Myristic Acid	0.5	0.005	0.00021	0.21
9	C14:1 Myristoleic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
10	C15:0 Pentadecanoic Acid	0.2	0.002	0.00008	0.08
11	C15:1 cis-10-Heptadecanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
12	C16:0 Palmitic Acid	11.2	0.101	0.00467	4.67
13	C16:1 Palmitoleic Acid	1.3	0.012	0.00054	0.54
14	C17:0 Heptadecanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
15	C17:1 cis-10-Heptadecanoic Acid	0.5	0.005	0.00021	0.21
16	C18:0 Stearic Acid	0.3	0.003	0.00013	0.13
17	C18:1 n9t Elaidic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
18	C18:1 n9c Oleic Acid	6.4	0.058	0.00267	2.67
19	C18:2 n6t Linolelaidic Acid	4.2	0.038	0.00175	1.75
20	C18:2 n6c Linoleic Acid	1.0	0.009	0.00042	0.42
21	20:0 Arachidic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
22	C18:3 n6 r-Linoleic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
23	C20:1 cis-11,14-Eicosadienoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
24	C18:3 n3 Linolenic Acid	8.0	0.072	0.00333	3.33
25	C21:0 Heneicosanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
26	- Stearidonic Acid	15.3	0.138	0.00638	6.38
27	C22:0 Behenic Acid	0.3	0.003	0.00013	0.13
28	C20:3, n6 cis-8,11,14-Eicosatrienoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
29	C22:1 n9 Erucic acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
30	C20:3 n3 cis-11,14,17-Eicosatrienoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
31	C20:4 n6 Arachidonic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
32	C23:0 Tricosanoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
33	C22:2 cis-13,16-Docosadienoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
34	C24:0 Lignoceric Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
35	C20:5 n3 cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid	0.5	0.005	0.00021	0.21
36	C24:1 Nervonic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
37	C22:6 n3 cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid	0.0	0.000	0.00000	0.00
38	- 기타 지방산	50.1	0.451	0.02088	20.88
총 지방산 함량			41.67(mg/4.63g)		

Fig 31. Free fatty acid percentage of *E. linza* sephadex extract.

나. 간이입상 연구 결과

(1) Plaque index, Gingival index, Bleeding on proving 결과

임상시험기간동안 *E. linza* extract 사용군 35명과 LISTERINE® 사용군 18명의 치균세균막지수는 그림 32, 치은염지수는 그림 33, 치은출혈지수는 그림 34에 나타나있다. 그림 32은 *E.linza* extract 양치액 사용군과 LISTERINE® 양치액 사용군의 치균세균막지수를 측정 한 것으로, one-way ANOVA test를 이용하여 통계처리 하였으며, 검정은 터키 검정 (Tukey' s HSD tes)을 하였다.

E.linza extract 양치액을 사용한 군에서 baseline (0주)과 비교했을 때 1주와 2주는 각각 15.6%, 17.5% 치균세균막의 감소를 보였으나, 통계적으로 유의 하지 않은 결과를 보였다. 그러나 양치액 사용 4주후에서는 52.4%의 치균세균막의 감소율을 보였으며, 또 하나 흥미로운 점은 양치액을 사용하지 않은 4-6주 기간의 치균세균막 지수는 4주와 비교했을 때 통계적으로 유의하지 않았다. 이러한 결과는 *E.linza* extract 양치액의 anti-plaque 효능이 양치액을 사용하지 않은 2주 동안 유지되었음을 보여준다. 그리고 양성 대조군으로 사용한 LISTERINE® 군 역시 *E.linza* extract 양치액과 유사한 결과를 보였다.

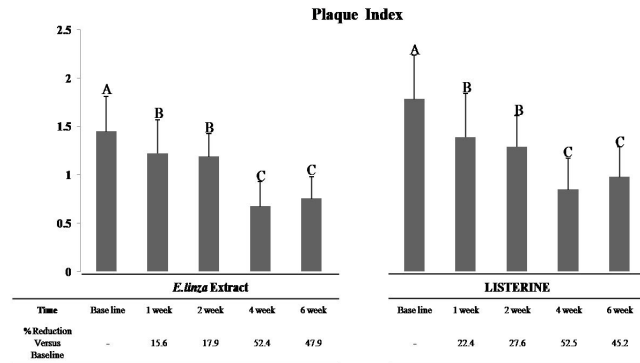


Fig. 32. Comparison of mean plaque index values on *E. linza* extract and LISTERINE® at the baseline and 1, 2, 4, and 6 weeks. The data presents the means SEMs of the three different experiments. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA. $P < 0.001$. A, B, and C was statistically significant differences.

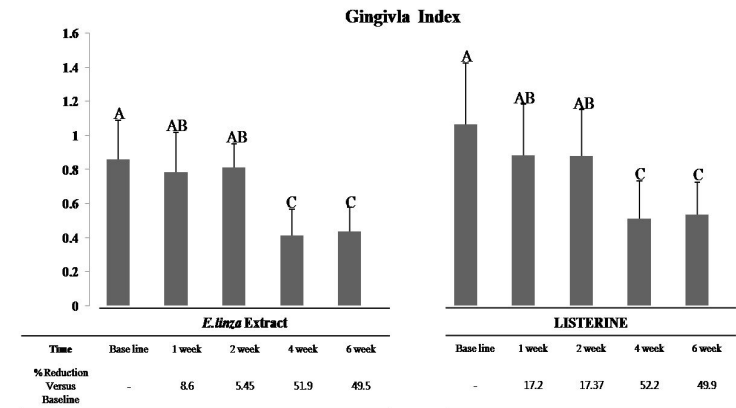


Fig. 33. Comparison of mean Gingival index values on *E. linza* extract and LISTERINE® at the base line and 1, 2, 4, and 6 weeks. The data presents the means SEMs of the three different experiments. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA. $P < 0.001$. A, B, and C was statistically significant differences

치은염지수 결과는 그림 33에 표시하였으며, 치은염지수 역시 치균세균막 지수와 유사한 감소 패턴을 보였다. *E.linza* extract 양치액 실험군에서 baseline (0주), 1주, 그리고 2주경과 후를 비교하였을 때, 각각 8.6%, 5.45%의 감소율을 보여 세 그룹간의 유의적 차이는 없었다. 하지만 4주경과 후 치은염지수는 baseline보다 51.9%의 감소율을 보였으며, 양치액을 사용하지 않은 이주 동안의 치은염지수는 4주경과 후의 치은염지수와 통계적으로 차이는 없었다. 또한 치은염지수 역시 LISTERINE® 과 *E.linza* extract 양치액과 비교했을 때 유사한 결과를 보였다.

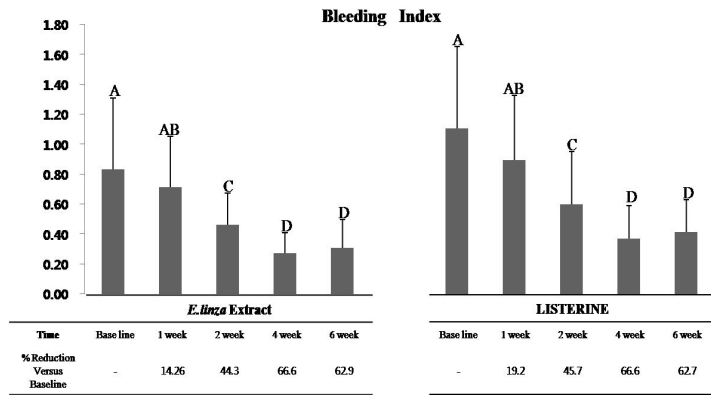


Fig. 34. Comparison of mean Bleeding index values on *E. linza* extract and LISTERINE® at the base line and 1, 2, 4, and 6 weeks. The data presents the means SEMs of the three different experiments. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA. $P < 0.001$. A, B, C, and D was statistically significant differences

그림 34은 치은출혈지수를 나타낸 것으로, baseline과 1주경과 후 치은출혈지수는 통계적으로 유의하지 않았으나, 2주경과 후의 치은출혈지수는 44.3%의 치은출혈지수의 감소율을 보였다. 또한 치은출혈지수 역시 4주경과 후 66.6%의 상당한 치은출혈지수의 감소율을 보였으며, 양치약을 사용하지 않은 기간 동안 그 효능이 유지됨을 알 수 있었다.

E. linza extract 양치액의 치균세균막, 치은염, 그리고 치은출혈지수 결과를 보았을 때, LISTERIN 실험군과 유사한 결과를 보였다. 이는 *E. linza* extract 양치액이 LISTERIN과 같은 강력한 anti-plaque/ml 효능을 가지고 있다는 것을 의미한다. 그리고, *E. linza* extract 양치액은 세 지수중 치은출혈지수에 보다 더 뛰어난 효과를 가지고 있음을 본 실험을 통해 확인하였다.

(2) *Prevotella Intermedia*균과 *Porphyromonas gingivalis*균의 Ct 값 변화량

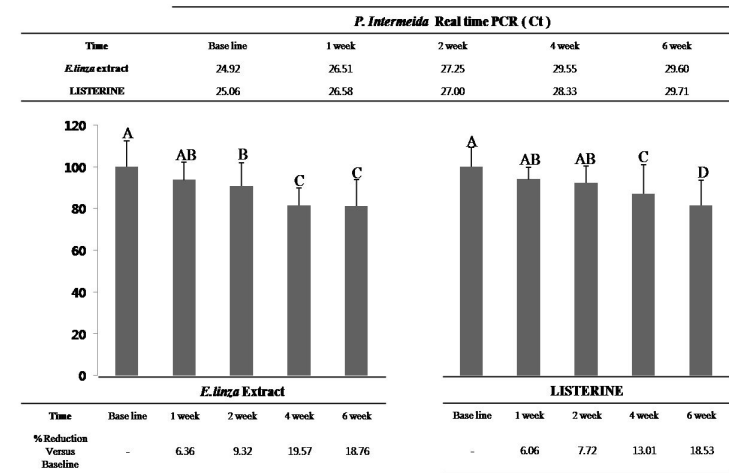


Fig. 35. Comparison of *P. intermeida* survival rate on *E. linza* extract and LISTERINE® at the base line and 1, 2, 4, and 6 weeks. The data presents the means SEMs of the three different experiments. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA. $P < 0.001$. A, B, C, and D was statistically significant differences

*P. Intermedia*균은 정상적인 사람과 치은염 초기 단계에서 주로 발생하는 균으로써 *E. linza* extract 양치액 사용한 후, 구강내 *P. Intermedia*균의 감소량을 Real-time PCR를 통해 확인하였으며, 그 결과는 그림 35에 나타내었다. *E. linza* extract 양치액을 사용한 결과 baseline과 1주 경과후의 결과는 통계적으로 유의하지 않았다. 그리고 2주와 4주경과 후의 *P. Intermedia*균의 감소율은 각각 9.32%, 19.57%의 감소율을 보였다. 특히 임상지수 결과와 같이 4주경과 후의 감소율이 가장 높았으며, 양치액을 사용하지 않은 6주경과 후의 결과와는 통계적으로 유의하지 않았다. 또한 LISTERIN의 결과와 *E. linza* extract 양치액의 결과 역시 유사한 감소 패턴을 보였다.

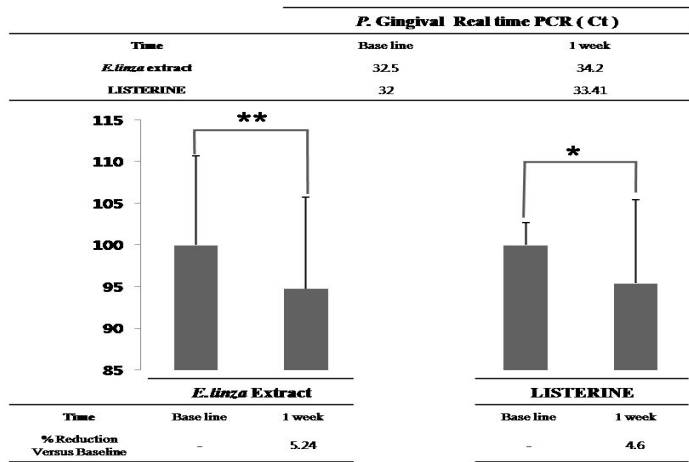


Fig. 36. Comparison of *P. gingivalis* survival rate on *E. linza* extract and LISTERINE® at the base line and 1 week. The data presents the means SEMs of the three different experiments. Statistical analysis was performed using the T-test. **; $P < 0.001$, *; $P < 0.05$

*P.gingivalis*균은 치은염 환자에 주로 발견되는 균으로 *E.linza* extract 양치액의 사용결과는 그림 36에 나타내었으며, t-test를 사용하여 통계처리하였다. *P.gingivalis*균은 정상인보다는 치은염 환자에 주로 관찰되는 균으로써 양치액 사용 후 2주경과 후부터는 *gingivalis*균의 양이 미비하여 검출이 용이하지 못했다. 그리고 baseline과 1주 후 경과를 비교했을 때, *E.linza* extract 양치액의 감소율이 LISTERIN에 의한 감소율보다 통계적으로 더 유의 하였다. *E.linza* extract 양치액은 임상지수 뿐만 아니라, 치은염 관련 균에 대한 강력한 anti-bacterial 효능을 가지고 있음을 이 결과를 통해서 알 수 있었다.

※ 통계는 one-way ANOVA를 하였으며, 리스테린과 잇파래 추출물은 따로 통계를 냈다. base line , 1주, 2주, 4주, 6주의 잇파래, 리스테린 각각의 통계를 구한 것이다.

*p.gingivalis*는 정상인에게서는 많이 존재하지 않으며 치주염 환자에게 주로 발견된다. 그래서 저희 시험대상자들은 정상인이었기에, 그 발현량이 극히 적었으며, 2주부터는 검출이 되지 않았다.(intermedia 경우는 정상인에게서도 확인 가능하다.)

3. 잇파래 항균 물질의 산업화 연구

가. 구강건강소재를 함유한 제품 결정

(1) 시제품 개발

(가) 구중청량제 시제품 개발

입냄새 기타 불쾌감의 방지를 목적으로 하는 내용제 및 양치제인 경우 「의약외품범위 지정」(보건복지부고시) 제2호가목1)의 구중청량제로 분류될 수 있으며, 이를 희고 튼튼하게 하며, 구중청결, 치아, 잇몸 및 구강내의 질환예방 등을 목적으로 하는 치약제인 경우에도 동 규정 제2호가목4)에 해당하는 의약외품으로 분류될 수 있다.

그러나, 구중청량제의 경우 입냄새 및 기타 불쾌감을 방지하는 목적 외에 구강내의 질환예방을 목적으로 하는 경우 의약품에 해당하였다. 따라서, 구중청량제를 제품화하기 위해서는 구강질환 예방 목적을 제외시키던지 의약품으로 개발하던지 둘 중 한 가지를 선택해야한다. 여건상 의약품 개발은 불가능하고 추후 임상시험이나 안전성·유효성 연구를 수행하면 의약품 개발도 가능할 것이라 예상한다. 반면, 의약외품으로써의 구중청량제 개발 역시도 구취 억제 등의 추가 실험이 필요하며 stearidonic acid와 gamma-linolenic acid를 첨가하는 제품 개발이 가능하다. 구중청량제에 stearidonic acid, gamma-linolenic acid 또는 잇파래 추출물을 첨가하여 만들 경우 식약청에 품목허가를 받아야한다. 따라서, 구중청량제보다 상대적으로 품목허가를 받기 쉬운 치약으로 상품화하기로 하였다.

(나) 치약 시제품 개발

① 치약 베이스 제조

치약 시제품 제작을 위해 그린원일(주)로부터 치약 베이스를 제공받았다. 치약 베이스의 성분은 아래 표 33과 같고 이들의 제조는 그린원일(주)에서 담당하였다. 치약 시제품은 치약 베이스에 잎파래 항균활성 물질을 각각 1%, 2% 그리고 4%가 되도록 혼합하여 제조하였다.

Table 33 . Ingredients of test dentifrice product

Ingredient	% (w/w)
Water	적량
Silicon dioxide	8.00
덴탈타입 실리카	10.00
Sorbitol	51.00
Methylparaben	0.15
Polyethylene glycol 1500	4.00
Glycerin	5.00
감미제	적량
CMC(점증제)	적량
향	적량

② 잎파래 주정 추출물 제조

잎파래로부터 분리한 항균활성 물질인 오메가-3 불포화지방산 stearidonic acid를 추출하기 위해 주정을 이용하였다. 잎파래 분말 100g당 주정 1L를 넣고 170~180 rpm의 shaking incubator에서 하루 동안 추출하였다. 추출물은 여과하여, 수득한 여액을 감압증발기를 사용하여 감압 농축하고, 0.22 μ m 필터를 이용하여 제균 처리를 수행하였으며, 제균 처리한 추출물은 95% 발효주정으로 녹였다. 이렇게 제조된 주정 추출물과 치약 베이스를 섞어 치약 시제품을 제조하였고 그림 37과 같다. 주정 추출물은 치약 베이스 중량 대비 1%, 2%, 4%의 농도로 첨가하였다.

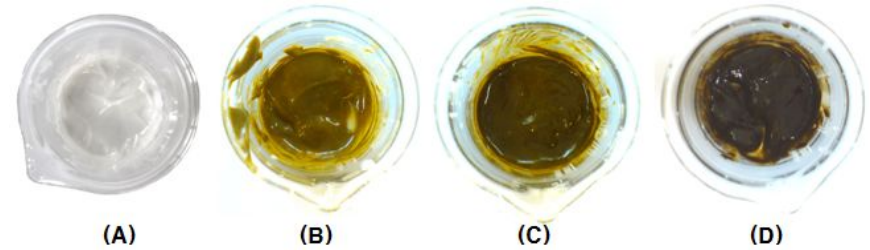


Fig. 37. Picture of the dentifrice product contain *E. linza* extract

- (A) Control(dentifrice base)
- (B) 1% *E. linza* extract
- (C) 2% *E. linza* extract
- (D) 4% *E. linza* extract

③ 순도검정

잎파래 주정 추출물의 순도검정을 HPLC로 분석하였다. 이것을 적분하여 peak를 % 면적으로 계산하여 순도를 결정하였다. 그 결과, HPLC로 분석한 결과를 그림 38에 나타낸 것과 같이 6.305분에 보여지는 peak가 SA 획분이며 39.89 %면적을 나타내었다. 즉, 약 40%의 순도를 나타내었다. 그리고 7.818분에 보여지는 peak가 GLA 획분으로 20.77 %면적을 나타내었다. 즉, SA의 획분은 40%의 면적을 보여 40%의 순도를 나타내었고 GLA의 획분은 20%의 면적을 보여 20%의 순도를 나타내었다.

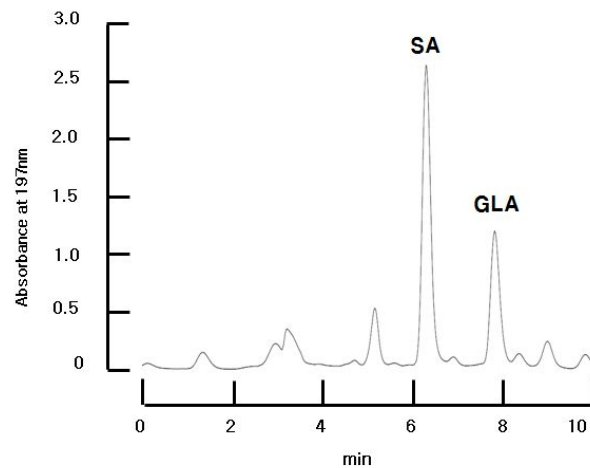


Fig. 38. HPLC chromatogram of the *E. linza* ethanol extract

나. 잎파래 항균물질 함유 시제품의 항균 효능 평가

(1) 종이 디스크(paper disk)를 이용한 항균 활성

(가) 주정 추출물의 항균활성

잎파래 주정 추출물을 10mg/mL, 20mg/mL, 40mg/mL의 농도로 조제하여 종이 디스크 실험을 통해 항균활성을 확인하였다. 표 34에서와 같이 농도가 증가할수록 디스크의 저지환 크기도 점차 커짐을 확인할 수 있었고 이로 인해 잎파래 주정 추출물의 항균활성은 농도 의존성임을 확인하였다.

Table 34. The paper disk diffusion assay of the *E. linza* ethanol extract against *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis*.

	Paper disk diffusion assay (mm)	
	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Control(Ethanol)	—	—
ethanol extract	10mg/mL	0.75±1.06
	20mg/mL	1.13±0.53
	40mg/mL	1.75±0.35

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

(나) 치약 시제품의 항균활성

잎파래 주정 추출물을 함유한 치약 시제품의 항균활성을 확인한 결과 표 35에서와 같이 잎파래 주정 추출물의 함량이 높아질수록 저지환의 크기가 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, 치약 시제품의 물리화학적 특성을 동시에 고려하여 추출물의 함량을 결정해야 할 것이라 사료된다.

Table 35. The paper disk diffusion assay of dentifrice test product containing *E. linza* ethanol extract against *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis*.

	Paper disk diffusion assay (mm)	
	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Porphyromona gingivalis</i>
Control (Ethanol)	-	-
a	2.15±1.47	0.85±0.96
b	2.45±1.47	1.15±0.73
c	3.45±1.47	1.78±0.45

* a: dentifrice product without *E. linza* ethanol extract, b and c: dentifrice product with mixtures of *E. linza* ethanol extract, 1, 2 and 4%, respectively.

** All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at p<0.05.

다. 잎파래 항균물질 함유 시제품의 물리·화학적 특성 확인

시제품의 물리·화학적 특성을 확인하기 위해 pH, 점도 및 굴절률(Refractive Index) 및 색도를 측정하였다. 표 36에서와 같이 치약 시제품에 혼합했을 때 물리·화학적으로 비교적 안정한 것으로 확인되어 치약 이외의 구강 위생관련제품에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 단, 표 36에서와 같이 잎파래 추출물을 혼합하였을 때 명도(lightness)값이 낮아 치약을 사용하는 사용자 입장에서 다소 거부감을 느낄 수 있으므로 색을 제거하는 공정이 추가로 필요할 것이라 사료된다.

Table 36. pH, refractive index, viscosity and color value of dentifrice product made by *E. linza* ethanol extract 1%, 2% and 4% concentration.

	control	1%	2%	4%
pH	6.61±0.09	6.93±0.08	6.70±0.12	6.90±0.04
Refractive index (nD)	1.4408	1.4397	1.4397	1.4404
Viscosity (cps)	220,000	180,000	160,000	150,000
Color				
<i>L</i> (lightness)	64.24	33.61	27.51	24.85
<i>a</i> (redness)	-0.04	0.05	0.42	0.34
<i>b</i> (yellowness)	1.68	9.18	6.08	3.36

* All measurements were done triplicate, and values are average of three replication. Differences were considered significant at p<0.05.

라. Pilot 추출 생산 공정개발

(1) 잎파래 주정 추출물 제조 공정

잎파래 주정 추출물에 함유되어 있는 지방산의 함량은 1.2%였다. 이 중 유리 지방산에 해당하는 37종과 stearidonic acid 그리고 기타지방산의 조성비를 분석하였다. 그 결과 Palmitic acid의 조성비는 12.5%, Stearidonic acid의 조성비는 11.8%, Oleic acid의 조성비는 6%, Linolenic acid의 조성비는 5.9%, Linolelaidic acid의 조성비는 5.1%, 기타지방산은 53.5%였다. 즉, 잎파래 주정 추출물 100g 중에서 SA가 0.142g, LA가 0.071g이 추출되었다. 따라서, 항균활성 물질은 잎파래를 주정으로 추출했을 시 추출물 100g 중에 총 0.213g을 수득할 수 있다.

(2) U/F 한외여과막 장치를 이용한 제조 공정

Ultrafiltration 0.14 μ m filter를 사용하여 잎파래 주정 추출물을 분리하였다. 1Kg의 잎파래 분말과 4L의 주정으로 24시간 추출한 잎파래 주정 추출물을 U/F 한외여과막 장치를 이용해 분리하였을 경우 수율은 6.897g으로 0.69%의 수율을 얻을 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표

사업년도	연구개발목표
1차년도 (2009년)	<p>잎파래를 이용한 항치주염, 치은염 구강건강소재 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 잎파래의 항균물질 추출 조건 확립 2. 잎파래 추출물 및 분획물의 항균활성 3. 잎파래의 항균물질 정제조건 확립 4. 잎파래의 정제된 항균물질의 항균활성 5. 잎파래를 이용한 간이임상(위탁개발)
2차년도 (2010년)	<p>항균활성 물질의 구조 분석 및 구강건강 제품 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 정제된 항균활성 물질의 구조분석(위탁개발) 2. 구강위생소재를 함유한 제품 결정 3. 시제품의 항균 효능 평가 4. 시제품의 물리적 특성 평가 5. Pilot 추출 생산 공정개발(위탁개발)

제 2 절 평가의 착안점 및 달성도

사업년도	평가의 착안점	달성도
1차년도 (2009년)	<p>잎파래를 이용한 항치주염, 치은염 구강건강소재 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 잎파래의 항균물질 추출 조건 확립 확인 2. 잎파래 추출물 및 분획물의 항균활성 확인 3. 잎파래의 항균물질 정제조건 확립 확인 4. 잎파래의 정제된 항균물질의 항균활성 확인 5. 잎파래를 이용한 간이임상(위탁개발) 확인 	100
2차년도 (2010년)	<p>항균활성 물질의 구조 분석 및 구강건강 제품 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 정제된 항균활성 물질의 구조분석(위탁개발) 확인 2. 구강위생소재를 함유한 제품 결정 확인 3. 시제품의 항균 효능 평가 확인 4. 시제품의 물리적 특성 평가 확인 5. Pilot 추출 생산 공정개발(위탁개발) 확인 	100
최종평가	<ol style="list-style-type: none"> 1. 잎파래로부터 구강건강소재 분리 및 규명 2. 구강건강소재를 이용한 산업화 연구 및 시제품 개발 	100

제 3 절 관련분야의 기여도

- 국내 해조산업의 발전에 기대
- 구강건강소재를 이용하여 구강질환 예방을 목적으로 하는 구강용품 및 구강식품 등 관련 상품 개발 가능
- 자일리톨과 같은 구강질환 예방 소재로 개발하여 소재 수출로 인한 외화획득 가능
- 치은염, 치주염 등 구강질환 예방을 위한 기능성 식품으로 개발 가능하며 국민구강건강에 이바지함

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

기 개발된 구강건강소재를 제품화(치약 및 구강청정제) 및 실용화, 산업화하기 위해서는 우선 식품의약품안전청의 판매허가 및 심사를 득해야 한다. 따라서, 허가를 위해 필요한 자료를 조사하고 증명할 수 있는 서류를 준비해야 한다. 실제로 식약청의 제품화지원센터에 상기와 같은 내용을 문의하였다. 즉, 입냄새 기타 불쾌감의 방지를 목적으로 하는 내용제 및 양치제인 경우 「의약품범위지정」(보건복지부고시) 제2호가목1)의 구중청량제로 분류될 수 있으며, 이를 회고 튼튼하게 하며, 구중청결, 치아, 잇몸 및 구강내의 질환예방 등을 목적으로 하는 치약제인 경우에도 동 규정 제2호가목4)에 해당하는 의약품으로 분류된다고 한다. 그러나, 우리가 개발한 것처럼 치은염 및 치주염 등 치주질환에 사용하는 물품은 의약품으로 분류될 수 있다고 하였다.

또한, 안전성·유효성 심사대상 여부 및 임상시험성적에 관한 자료의 범위 등 상세한 제출자료의 범위는 동 품목에 대한 보다 자세한 정보가 필요하다고 하였다. 다만, 위탁제조(OEM)시 수탁사의 기허가 구중청량제 품목 보유 및 제조 여부와는 상관없이, 질의 품목의 유효성분의 종류 및 분량, 국내 기허가 사용례, 물품의 효능·효과, 용법·용량, 의약품/의약품으로의 분류 등에 따라 심사 및 제출 자료의 범위가 달라질 수 있다고 하였다. 참고로, 의약품으로 구취 방지제, 구강위생 등에 사용하는 제제는 「의약품등의품목허가신고심사규정」(식약청고시) [별표16] I. 에 따라, 효능·효과를 입증할 수 있는 자료(효력시험자료를 포함한 약리작용에 관한 자료 등)가 요구될 수 있으며, 반드시 임상시험성적에 관한 자료를 제출할 필요는 없다고 하였다. 그러나 만약 임상시험을 통해 효력을 입증하고자 한다면, 약사법 시행규칙 제 4항에 따라 식약청장의 임상시험계획 승인 없이 임상시험을 실시할 수 있음을 고지받았다.

따라서, 우리는 잎과래에서 분리한 항균활성 물질인 stearidonic acid를 함유한 추출물을 이용하여 간이임상을 진행한 바 있고 그 효력을 입증하였으므로 구강위생 제제로 사용이 가능할 것으로 판단하였다.

제 2 절 교육, 지도, 홍보 등 기술확산 계획 등

없음

제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

가. 특허 계획

본 사업을 통해 개발된 천연 구강건강소재인 잎과래에서 정제된 물질 stearidonic acid와 불포화지방산의 항균활성 실험에 관한 연구를 구강치료 예방 또는 치료용 조성물이라는 명칭으로 2011년 1월 12일 특허 출원을 하였다. 출원인은 위탁기관인 신라대학교 산학협력단과 기장물산(주)이 공동출원 하였고 출원번호는 10-2011-0003139 (접수번호 1-1-2011-0026116-68)이다.

나. 논문 계획

본 사업기간 동안 중국 청도에서 열린 국제학회 2010 IMBC(the 9th International Marine Biotechnology Conference, <http://www.IMBC2010.org>)에 "**Antimicrobial activity of 6,9,12,15-octadecatetraenoic acid (stearidonic acid) of *Enteromorpha linza* against *Prevotella intermedia* and *Porphyromonasgingivalis***"이라는 주제로 poster presentation을 하였다. 그리고 여기에 추가 연구를 보강하여 Journal of applied phycology에 SCI 논문을 투고할 예정이다.

제 4 절 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등

본 사업에서 밝혀낸 물질 stearidonic acid와 gamma-linolenic acid 및 기타 불포화지방산을 산업화하기 위하여 원료로부터 타겟 물질을 대량 생산해 낼 수 있는 공정기술을 보강하고 이를 치약에 적용하여 상품을 개발하는데 주력할 계획이다. 또한, 잎과래를 이용하여 항염증, 항노화 등 기타 생리활성 탐색을 추후 연구할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 치은염이나 치주염과 같은 일부 구강질환의 경우 이들을 치료 또는 예방하기 위하여 개발된 항생제 혹은 화학약품은 매우 제한적이다.(Leke N et al., 1999)

○ 현재 널리 사용되고 있는 항생제인 클로로헥시딘(chlorhexidin)은 고농도로 구강 내에 사용하거나 혹은 저농도로 오랫동안 사용할 경우, 혀나 치아에 착색을 일으키고, 구강점막이 벗겨지거나, 미각이상을 일으키는 등의 부작용이 발생할 수 있으며, 균교대증이 유발될 수 있는 부작용이 있고, 발암성이 있어 임신부의 경우 사용이 제한된다는 단점이 있다.(Fla tra L et al., 1971)

○ 치은염은 치은조직에 발생한 초기상태의 염증이며 치면세균막과 밀접한 관련이 있다. 치면세균막이란 섭취한 음식물의 당단백질 성분이 치아표면에 부착된 얇은 막인 치구(dental pellicle)에 구강 내 각종 세균들이 부착하여 형성되는 점착성 세균덩어리의 막이며 치태 또는 플라그(dental plaque)라고도 한다.(Kim et al., 2005)

○ Socransky의 보고에 의하면 치태내의 세균을 6종류로 나눌 수가 있는데, 호기성세균이며 치아표면에 초기에 군집을 이루는 병원성이 낮은 Actinomyces, yellow complex, green complex, purple complex 와 혐기성세균이며 추가치태축적을 일으키는 병원성이 높은 orange complex, red complex로 분류할 수 있다고 하였다. 그 중 치은염의 진행과 관련이 높은 orange complex에는 *Prevotella intermedia*(*P intermedia*), *Peptostreptococcus micros*(*P micros*), *Prevotella nigrescens*(*P nigrescens*), *Campylobacter gracilis*(*C gracilis*), *Campylobacter rectus*(*C rectus*), *Campylobacter showae*(*C showae*), *Eubacterium nodatum*(*E nodatum*), *Fusobacterium nucleatum*(*F nucleatum*), *Fusobacterium polymorphum*(*F polymorphum*), *Streptococcus constellatus*(*S constellatus*)가 있으며 이들은 치태 형성 후반기에 등장하고 초기호기성세균과 red complex를 연결해주는 역할을 한다. red complex에는 *Porphyromonas gingivalis*(*P gingivalis*), *Bacteroides forsythus*(*B forsythus*), *Treponema denticola*(*T denticola*)가 속해 있으며 이들은 병원성이 매우 높은 균으로 건강한 치주낭에서는 출현비율이 적으나, 염증성 치주낭에서는 자주 발견되는 치주염의 원인균으로 알려져 있다. (Socransky & Haffajee,

2002)

○ *P. gingivalis*는 치주질환의 가장 중요한 원인균으로 black pigmented bacteroides, 그람음성, 혐기성 세균이며 운동성이 없는 비당분해성의 간균이다. 또한 태생적으로 일부 항생제에 대하여 저항성을 갖는 동시에 다른 많은 항생제에 저항성을 획득하는 경향을 보이는 세균으로서, 구강세균중에서 가장 강하고 많은 독성인자를 갖고 있는 세균이다. 독성인자들의 종류는 *P. gingivalis*의 외막에 있는 내독소와 콜라겐 분해효소, 탈인산분해효소 등이 있다. (Lamont & Jenkinson, 1998) 치주질환이 있을 때 치주병소 내 *P. gingivalis*의 수가 증가되며 치주질환이 진행됨에 따라 열구상피에 침투하는 *P.gingivalis*가 빈번히 발견된다. *P. gingivalis*는 치주치료를 하면 감소되거나 제거되며, 치주질환이 재발하는 병소에서는 또 다시 발견된다. (Tanner et al., 1984)

○ 또다른 혐기성 Bacteriodes인 *P. intermedia*는 성인성 치주염이나 ANUG 임신성 치은염등과 같은 여러 가지 종류의 치주질환에 원인균 중의 하나로 알려져 있고, *P. gingivalis*와는 달리 건강한 치주를 가진 성인에게서도 발견되고 있다.

○ 치은염과 치태와의 상관관계는 Löe 실험치은염모형에서도 잘 나타나는데 Löe에 의하면 치은염은 치태의 존재유무와 치태가 치면에 부착되어 있는 시간과 밀접한 상관관계가 있다고 하였다. (Löe et al., 1965)

○ 그러므로 치태의 형성 억제 및 제거는 치은염의 예방 및 치유를 위해 매우 중요하다.

○ 치태의 형성 억제 및 제거를 하기 위한 대표적인 방법으로 잇솔질법이 있다. 잇솔질은 치은연상치태를 제거하는데 있어 탁월한 방법이지만 정상치열의 치아사이나 치은열구부위에는 기구도달이 어려워 치은연상치태제거가 불충분하여 치간변연치은부에서 높은 치은염 발생율을 보이는 단점이 있었다. (Alexander, 1971)

○ 이러한 단점을 보완하기 위하여 보다 안전하고 효과적인 항치태 기능을 가진 구강양치액의 보조적 사용의 필요성이 증가하였고 현재 여러 유효성분들이 연구되어지고 있다. (다음과 같은 제제들이 구강양치액의 원료로 사용되어 지고 있다.)

○ 대표적인 구강양치액의 유효성분들로는 chlorhexidine, triclosan과 같은 phenol계, dextranase와 같은 효소계, 아연, 주석, 구리 등을 함유한 금속염, sanguinarine, bisbiguanides계의 thymol, menthol과 같은 essential oil등이 있다. (Ciancio, 1986), (Lusk, Bowers, Tow, & Watson et al., 1974)

○ bisbiguanide계인 chlorhexidine disgluconate는 현재 가장 많이 사용되고 있는 구강세정제 유효성분으로써 항치태, 항치은염 효과가 있으며 경조직과 연조직 모두에 부착능력이 뛰어나며 서서히 방출되는 장점이 있는 반면, 맛이 쓰며, 치아 착색 유발, 구강점막 작열감 유발, 그리고 구강내 보철수복물의 변색 등의 단점을 가지고 있다. (Renton - Harper, Addy, Moran & Doherty et al, 1996; Moran, Addy & Newcombe, 1997)

○ dextranase는 치태 세균중 Streptococcus mutans등이 생성하는 $\alpha(1-6)$ linked glucan인 dextran을 분해하는 효소로 정식명칭은 $\alpha(1-6)$ Glucan 6-glucanohydrolase이다. 1960년대에 Fitzgerald 등이 동물실험을 통하여 치태형성을 억제한다는 것을 밝힌 이후에 구강세정제 유효성분으로 많이 쓰이고 있다. 그러나 치태내의 다른 세균들이 생성하는 nondextranous plaque에는 효과가 없다는 단점이 있다. (Fitzgerald, Keyes, Stoudt, & Spinell, 1968)

○ 금속염은 과량 사용시 독성이 우려되며 구강 내 환경이 알칼리성일 때는 항균활성이 없는 불용성의 수산화금속으로 전환된다. (Hull, 1980)

○ Sanguinarine은 Sanguinaria Canadensis의 근경에서 분리된 sanguinarine이라는 alkaloid종류로 넓은 항균범위를 가지고 있어 구강양치액으로 사용되어 왔다. 그러나 구강내 전암병소인 구강백반증(oral leukoplakia)과의 연관성과 구강 내 물질과의 접합력이 너무 강해 약효가 저하된다는 문제점이 보고되었다. (Chung, Choo, & Lee et al., 2006; Goodsen, 1989)

○ Essential oil이란, 향기가 나는 식물에서 물리적으로 분리한 휘발성 물질을 일컫는다. essential oil은 오랫동안 방향제, 화장품, 향수, 비누, 세제, 향신료 등으로 이용되

어 왔고 최근에는 향균, 항염증, 항진균, 항바이러스효과 등이 보고되어 구강세정제의 유효성분으로 주목받고 있다. 그러나 이들의 생리활성 효과는 대부분 방향성 원료에 의해 결정되는데 이 원료가 이용하기에 부적절한 냄새를 함유한 경우가 적지 않아 상품화하는데 어려움이 있었다. (Schmidt, Jirovetz, & Buchbauer et al., 2005)

○ 이러한 단점을 보완하기 위하여 식물을 중심으로 내성균주의 형성과 부작용없이 지속적으로 사용할 수 있는 천연항생물질이 지속적으로 연구되고 있다. 현재 연구되고 있는 식물추출물들을 보면 녹차추출물과 솔잎추출물(배광학, 이병진와 장윤경외, 2001), 백두옹추출물(정진광, 정진형와 임성빈외, 2000), 후박추출물(김태일, 염혜리와 유인철외, 1996), 금은화와 포공영추출물(홍석진, 최유진와 임희순외, 2001)등이 보고되었다.

○ 본 연구에서는 여러 식물군 중에서 산업적 측면에서 접근하기 쉽고 다양한 생리활성물질을 포함하고 있어 잠재력과 시장성장성이 클 것으로 예상되는 해양식물자원을 주목하였다.(Mayer and Hamann, 2002; Newman et al., 2003).

○ 특히 해양식물자원중에서 해조류에는 다양한 bioactive compound들이 포함되어 있으며 항바이러스, 항박테리아, 항균, 구충효과를 가진 compound들도 다수 포함되어 있다. (Newman et al., 2003; del Val et al., 2001)

○ 그러나 현재까지 해조류의 연구보고를 보면 다른 병원균, 곰팡이, yeast등에 대한 항균효과 연구보고는 많으나 (Gonzalez et al. Ünci T.NEY et al.), 구강양치액 유효성분으로 개발하기 위하여 필요한 치은염관련균인 *P. intermedia*와 *P.gingivalis*의 억제효과에 대한 연구는 거의 보고가 없었다.

제 7 장 참고문헌

- Ciancio, S G. 1986. Drugs in dentistry. Agents for plaque control. *Dental management*. 26(2) : 58-
- C.B. Huang and J.L. Ebersole. 2010. A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. *molecular oral microbiology*. 25 : 75-80
- Chung. J.Y., Choo J.H., Lee M.H. 2006. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 13(4) : 261-266
- Ciancio, S G. 1986. Drugs in dentistry. Chlorhexidine and plaque control. *Dental management*. 26(5) : 58-
- Ciancio, S G. 1986. Drugs in dentistry. Cephalosporins. *Dental management*. 26(9) : 60-
- Ciancio, S G. 1986. Antibacterial agents and periodontal therapy. *New York state dental journal*. 52(5) : 17-21
- Davey ME, Costerton JW. 2000. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontol*. 42 : 13-26
- del Val, A. 2001. Simplifying Binary Propositional Theories into Connected Components Twice as Fast. *Lecture notes in computer science*. 2250 : 392-406
- Dural, B. and K. Shetty. 2001. The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed Anise root extract. *J. food Biochem*. 25:361-377
- Flåtra L, Gjerme P, Rølla G, Waerhaug J. 1971. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. *Scand. J. Dent. Res*. 79(1): 119-125
- Genco RJ, Sojar H, Lee JY, Sharma A, Bedi G, Cho MI, et al. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae: structure function and insertional inactivation mutants.
- Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J, Mergenhagen S, eds. 1994. Molecular

- pathogenesis of periodontal disease. *Boca Raton: American Society for Microbiology Press*. : 13-23.
- Haffajee AD, Socransky SS. 2000. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm, communities, development and treatment. *Periodontol*. 42 : 7-12
- Hafström C, Dahlén G. 1997. Pathogenicity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates in a wound chamber models in rabbits. *Oral Microbiol Immun*. 12(3) : 148-154
- Harborne JB. 1998. *Phytochemical methods*, 3rd edn. Chapman & hall, London
- Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol*. 20 : 168-238
- Izard J., Limberger R.J. 2003. Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *Journal of Microbiological Methods*. 55 : 411-418
- Jay Whelan. 2009. Dietary Stearidonic Acid is a Long Chain(n-3) Polyunsaturated Fatty Acid with Potential Health Benefits^{1,2}. *The Journal of Nutrition Critical Review*. 139 : 5-10
- Jirovetz Leopold, Buchbauer Gerhard. 2005. Chemical composition and olfactory characterization of essential oils of fruits and seeds of African pear (*Dacryodes edulis*(G. Don)H. J. Lam) from Cameroon. *Favour and fragrance journal*. 20(2) : 215-218
- Jose Luis Guil-Guerrero, Miguel Angel Rincon-Cervera and Elena Venegas-Vesegas. 2010. Gamma-linolenic and stearidonic acids: Purification and upgrading of C18-PUFA oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 112 : 1068-1081
- Jose Luis Guil-Guerrero. 2007. (Review Article)Stearidonic acid(18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. *Eur. Journal of Lipid Sci. Technol*. 109 : 1226-1236
- Kenji Ishihara, Masakazu Murata, Maski Kaneniwa, Hiroaki Saito, Wataru Komatsu, and Kazuki Shinohara. 2000. (Note)Purification of Stearidonic Acid (18:4(n-3)) and Hexadecatetraenoic Acid (16:4(n-3)) from Algal Fatty

Acid with Lipase and Medium Pressure Liquid Chromatography. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(11) : 2454–2457

Korea Food & Drug Administration. 2004. The regulation of inspection for declaration of item permission of medical supplies and others. No. 2008–56

Leke N, Grenier D, Golgner M, Mayrand D. 1999. Effects of hydrogen peroxide on growth and selected properties of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol. Letters.* 174 : 347–353

Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. 1982. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol.* 53(4) : 223–30

Masaki Kaneniwa, Yutaka Itabashi, and Toru Takagi. 1987. Unusual 5–Olefinic Acids in the Lipids of Algae from Japanese Waters. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 53(5), 861–866

Mayer, A.M.S., Hamann, M.T. 2002. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Toxicology & pharmacology.* 132(3) : 315–339

Mochammad Amin Alamsjah, Shotaro Hirao, Fumito Ishibashi, and Yuji Fujita. 2005. Isolation and Structure Determination of Algicidal Compounds from *Ulva fasciata*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry.* 69(11) : 2186–2192

MOHAMMED NURUL ABSAR KHAN, JI–YOUNG CHO, MIN–CHUL LEE, JI–YOUNG KANG, NAM GYU PARK, HITOSHI FUJII, AND YONG–KI HONG. 2007. Isolation of Two Anti-inflammatory and One Pro-inflammatory Polyunsaturated Fatty Acids from the Brown Seaweed *Undaria pinnatifida*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 55 : 6984–6988

Moran, J. ; Addy, M. ; Newcombe, R. 1997. A 4–day plaque regrowth study comparing an essential oil mouthrinse with a triclosan mouthrinse. *Journal of clinical periodontology.* 24(9) : 636–639

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Reference methods

for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard–6th eds., Vol.23, NCCLS Document M11–A6. Pennsylvania

Noemi Ruiz–López, Richard P. Haslam, Monica Venegas–Caleron, Tony R. Larson, Ian A. Graham, Johnathan A. Napier and Olga Sayanova. 2009. The synthesis and accumulation of stearidonic acid in transgenic plants: a novel source of 'heart–healthy' omega–3 fatty acids. *Plant Biotechnology Journal* 7 : 704–716

Quoc–Hai Luyen, Ji–Young Cho, Jea–Suk Choi, Ji–Young Kang, Nam Gyu Park, Yong–Ki Hong. 2008. Isolation of algal spore lytic C17 fatty acid from the crustose coralline seaweed *Lithophyllum yessoense*. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811–008–9387–4

Renton–Harper, E., Addy, M., Moran, J. 1996. A Comparison of Chlorhexidine, Cetylpyridinium Chloride, Triclosan, and C31G Mouthrinse Products for Plaque Inhibition. *Journal of periodontology.* 67(5) : 486–489

Shawna L Lemke, John L Vicini, Hong Su, Daniel A Goldstein, Margaret A Nemeth, Elaine S Krul, and William S Harris. 2010. Dietary intake of stearidonic acid–enriched soybean oil increases the omega–3 index: randomized, double–blind clinical study of efficacy and safety^{1–3}. *The American J. of Clinical Nutrition* 92 : 766–775,

Socransky S.S., Haffajee AD. 1991. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res.* 26(3 Pt 2) : 195–212

Socransky S.S., Haffajee A.D., Ann Ximenez–Fyvie L.A. 1999. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontology 2000.* 20 : 341–362

Socransky, S. S. ; Haffajee, A. D. 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000.* 28(1) : 12–55

(국내문헌)

국립독성연구원. 2005. WHO 권장 임상시험에 관한 국제윤리기준

김백일, 김상년, 장석윤, 문교태, 김윤석, 황재관, 정승화, 김민영, 김해선, 권호근. 2005. Curcuma xanthorrhiza 추출물 및 함유 치약의 구취 억제 효과와 구강 유해균에 대한 선택적 항균 효과. 대한구강보건학회지. 29(2) : 222-237

김재영, 이용섭, 임용호. 2009. 수종의 한약재 추출물의 항산화 활성 및 항진균 활성. 미생물학회지. 37(1) : 42-48

김태일, 엄혜리, 류인철. 1996. 후박 및 은행물 추출물을 함유한 치약의 임상 및 미생물학적 효과에 관한 연구. 대한치주과학회지. 26(2) : 542-556

남택정, 변재형, 최재수, 이진우, 이동수, 권지영, 김인혜, 최요한. 해조다당류의 기능성 증진 및 실용화 기술개발에 관한 연구. 2003. 수산특정연구개발사업 최종보고서

식품의약품안전청, 의약품 안전국. 2008. 『의약품등의품목허가·신고·심사규정』 中의약품등의안전성·유효성심사관련해설서. 행정간행물 등록번호 11-1470000-001797-01

윤소미, 장준호, 이종수. 2007. 미역 추출물로부터 충치 원인균, Streptococcus mutans 에 대한 항균물질의 분리 및 동정. 한국식품영양과학회지. 36(2) : 149-154

이보배, 하유미, 신수화, 제경모, 김순래, 최재석, 최인순. 2009. 구강질환 원인균에 대한 자몽종자추출물과 법제유향수 함유 치약시제품의 항균효과. 생명과학회지. 19(7) : 956-962

이재명, 임성빈, 정진형. 치주질환 치료와 구취 감소의 상관관계에 대한 연구. 단국대학교 치과대학 치주과학교실 B-5 : 50-51

(주)대웅제약 중앙연구소, 서울대학교 치과대학. 1998. 후박과 대추로부터 치주질환 치료제 개발. 1998년 보건의료기술연구개발사업 최종보고서

정진광, 정진형, 임성빈. 2001. 백두옹 추출물의 치주조직 세포에 활성화도 및 항염 효과에 관한 연구. 대한치주과학회지. 31(1) : 149-165

정성화, 정진형, 임성빈. 2000. 백두옹 추출물의 치주 병인균에 대한 항균효과. 대한치주과학회지 30(3) : 661-676

홍석진. 2001. 금은화와 포공영추출물이 첨가된 치약의 치면세균막 및 치은염에 미치는 영향. 대한구강보건학회지. 25(4) : 347-355

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.