



## 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

韓 英 淑 教授指導

碩士學位 請求論文

연(蓮)의 부위에 따른 구강위생균에  
대한 항균작용

2010

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

李 銀 秀

# 목 차

## 논문개요

I. 서 론.....	13
II. 재료 및 방법 .....	21
1. 실험재료.....	21
1) 연꽃, 연잎, 연씨, 연방의 시료채취 .....	21
2) 시약 및 기구.....	21
3) 사용균주 및 배지 .....	21
2. 실험 방법 .....	24
1) 항균검색용 추출물의 추출조건 .....	24
2) 용매에 따른 분획물의 제조 .....	25
3) 시료의 추출물과 분획물의 항균력 측정.....	27
4) 농도별 미생물의 생육 저해 곡선.....	27
5) 미생물의 성장저해를 측정 .....	27
6) 추출물의 최소저해농도 (MIC) .....	28
7) 열 및 pH 안정성 측정 .....	28
III. 결과 및 고찰 .....	29
1. 추출물과 용매별 분획물의 수율.....	29
2. 충치 및 구취균에 대한 항균력 .....	30
2.1 항균물질의 Methanol 추출농도 .....	30
2.2 항균물질의 추출시간 .....	40
3. 항균물질의 분획.....	43
4. 추출물의 미생물에 대한 생육저해 .....	47

4.1 생육저해곡선 .....	47
4.2 미생물의 생육 저해율 측정 .....	55
5. 최소 저해 농도 (Minimum inhibitory concentration) .....	58
6. 추출물의 안정성 .....	60
6.1 열 안정성 .....	60
6.2 pH 안정성 .....	64
<b>V. 결 론</b> .....	<b>68</b>
<b>Reference</b>	
<b>Abstract</b>	

# List of Tables

Table 1. List of Microorganisms and media used for antibacterial activity tests.....	23
Table 2. Yield ratio of extraction of lotus by solvent .....	31
Table 3. Comparison of the antibacterial activity lotus flowers extracted with different concentration of methanol .....	34
Table 4. Comparison of the antibacterial activity of lotus leaves extracted with different concentration of methanol .....	34
Table 5. Comparison of the antibacterial activity of lotus seeds extracted with different concentration of methanol .....	35
Table 6. Comparison of the antibacterial activity of lotus pods extracted with different concentration of methanol .....	35
Table 7. Comparison of the antibacterial activity of lotus flowers extracted with different hour of methanol.....	41
Table 8. Comparison of the antibacterial activity of lotus leaves extracted with different hour of methanol.....	41
Table 9. Comparison of the antibacterial activity of lotus seeds extracted with different hour of methanol.....	41
Table 10. Comparison of the antibacterial activity of lotus pods extracted with different hour of methanol.....	41
Table 11. Comparison of the antibacterial activity of lotus flowers extracted with different fraction of methanol .....	45

Table 12. Comparison of the antibacterial activity of lotus leaves extracted with different fraction of methanol .....	45
Table 13. Comparison of the antibacterial activity of lotus seeds extracted with different fraction of methanol .....	46
Table 14. Comparison of the antibacterial activity of lotus pods extracted with different fraction of methanol .....	46
Table 15. Inhibitory effect of lotus against microorganisms for 24 hr at 37 °C .....	56
Table 16. Minimum inhibitory concentration of the extract of lotus against five microorganisms.....	59

# List of Figures

Figure 1. The multifactorial etiology of dental caries .....	16
Figure 2. <i>Nelumbo nucifera</i> .....	20
Figure 3. Schem of extraction and solvent fraction of methanol from <i>Nelumbo nucifera</i> .....	26
Figure 4. Growth curves of <i>S.mutans</i> in the media adding the extraction of <i>Nelumbo nucifera</i> .....	50
Figure 5. Growth curves of <i>S.sobrinus</i> in the media adding the extraction of <i>Nelumbo nucifera</i> .....	51
Figure 6 Growth curves of <i>S.sobrinus</i> in the media adding the extraction of <i>Nelumbo nucifera</i> .....	52
Figure 7. Growth curves of <i>F.nucleatum</i> in the media adding the extraction of <i>Nelumbo nucifera</i> .....	53
Figure 8. Growth curves of <i>A.actinomycetemcomitans</i> in the media adding the extraction of <i>Nelumbo nucifera</i> .....	54
Figure 9. Inhibitory effect of lotus against microorganisms for 24 hr at 37 °C.....	57
Figure 10. Relative growth promoting activity of the extract of <i>Nelumbo nucifera</i> for <i>S.mutans</i> and <i>S.sobrinus</i> at heat treatment .....	61
Figure 11. Relative growth promoting activity of the extract of <i>Nelumbo nucifera</i> for <i>S.sobrinus</i> and <i>F.nucleatum</i> at heat	

treatment .....	62
Figure 12. Relative growth promoting activity of the extract of <i>Nelumbo nucifera</i> for <i>A.actinomycescomitans</i> at heat treatment .....	63
Figure 13. Relative growth promoting activity of the extract of <i>Nelumbo nucifera</i> for <i>A.actinomycescomitans</i> at heat treatment .....	65
Figure 14. Relative growth promoting activity of the extract of <i>Nelumbo nucifera</i> for <i>S.mutans</i> and <i>S.sobrinus</i> at pH treatment .....	66
Figure 15. Relative growth promoting activity of the extract of <i>Nelumbo nucifera</i> for <i>A.actinomycescomitans</i> at pH treatment .....	67

## List of Photos

Photo 1. Antimicrobial activity of the methanol extract of <i>Nelumbo nucifera</i> flowers .....	36
Photo 2. Antimicrobial activity of the methanol extract of <i>Nelumbo nucifera</i> leaves .....	37
Photo 3. Antimicrobial activity of the methanol extract of <i>Nelumbo nucifera</i> seeds .....	38
Photo 4. Antimicrobial activity of the methanol extract of <i>Nelumbo nucifera</i> pods .....	39

# 논문개요

본 연구에서는 치주질환과 충치 예방을 위한 연의 부위별 항균효과를 탐색하기 위한 목적으로 국내에 자생하는 연 시료를 부위별로 연꽃, 연잎, 연씨, 연밥으로 구분하여 충치, 구취 관련 미생물 5 종 (*S.mutans*, *S.sobrinus* KCCM11897, *S.sobrinus* KCCM11898, *F.nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans*)에 대한 항균활성을 알아보기 위해 paper disc 법으로 극성이 다른 용매별 분획물에 대한 항균효과를 살펴보았다. 또한 각각의 추출물의 농도별 생육저해곡선과 미생물의 생육 저해율을 측정하였다. 최소한으로 저해할 될 수 있는 농도를 구하기 위해 최소저해농도를 구하였고, 항균물질이 열 및 pH 에 안정한지를 살펴 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 연의 각 부위중 연잎이 가장 수율이 높았는데 연꽃의 methanol 추출물 수율은 21% 였다. 추출물의 용매별 수율은 chloroform 분획물은 4.2%, ethyl acetate 분획물은 8.2%, water 분획물은 19%내외로 비교적 높은 수율을 나타내었다.
2. 추출물의 실험조건을 결정하기 위하여 methanol 의 농도를 달리하고 추출시간을 달리하여 실험한 결과 연꽃과 연잎은 50%의 농도로, 연씨와 연밥은 70%의 농도로 하였을 때 실험결과가 가장 우수하였다.

또한 추출시간의 경우 6 시간과 12 시간에서 추출한 물질의 항균효과가 가장 컸고 시간이 지남에 따라 약간 감소하는 경향을 보였다. 이에 따라 연의 항균물질은 12 시간 이내에 모두 추출이 이루어지는 것으로 사료된다.

3. 용매별 chloroform, ethylacetate 및 water 분획물로 항균효과를 살펴보았을 때 3 종의 용매 분획중 ethylacetate 분획 추출물이 5 종의 실험 균주에 대하여 다른 분획물에 비해 clear zone 이 비교적 넓어 높은 항균효과를 나타내었으며 특히 *S.mutans* 의 생육을 강력하게 억제했다.
4. 연의 부위별 추출물을 이용하여 균의 생육도를 균주별로 조사한 결과 *S.mutans* 에서는 모든 추출물에서 강력하게 생육저해를 하였다. 또한 *S.sobrinus* KCCM11897 에서는 연꽃과 연씨 추출물에서 확실한 생육저해를 확인할 수 있었다. 또 *S.sobrinus* KCCM11898 에서는 연씨 추출물에서 가장 항균효과가 우수함을 할 수 있었다. 구취를 유발하는 균주인 *F.nucleatum* 에서는 연잎 추출물이 가장 생육 저해 효과가 우수하였고, *A.actinomycetemcomitans* 에서도 연잎 추출물이 가장 효과가 좋음을 알 수 있었다. 각각의 균주 별로 가장 우수했던 연의 부위가 다르게 나타난 점을 미루어 보았을 때 항균효과의 선택적 이용이 가능 할 것으로 생각된다.

5. 생육저해율을 확인한 결과 연잎 추출물은 *S.mutans* 와 *S.sobrinus* KCCM11897 균주에 대하여 50%이상의 강력한 생육 저해율을 보여 가장 효과가 높게 나타났고 그 다음으로 연꽃에서는 *F.nucleatum* 와 *A.actinomycescomitans* 에서 모두 40%이상의 저해율을 나타내었다.
6. Broth microdilution 법을 시행하여 균의 최소저해 농도(MIC)를 측정한 결과는 연꽃 추출물이 *S.sobrinus* KCCM11897, KCCM11898 에 대해 625 µg/ml 의 농도로 MIC 값 중 가장 낮은 값을 나타냈고, 연잎 역시 *S.mutans* 와 *S.sobrinus* KCCM11897 에서 625 µg/ml 의 값을 나타내어 적은 양으로도 항균활성을 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.
7. 연의 부위별 추출물을 1 mg/disc 로 하여 40, 80, 100, 120°C에서 각각 1 시간 동안 열처리 한 후 균주 별로 생육정도를 측정한 결과 모든 처리구에서 대조구와 차이가 크지 않은 항균 활성을 보였는데 특히 120°C 의 처리에서도 methanol 추출물에서 항균활성이 있는 것으로 나타나 열에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다.

8. 연의 pH 변화에 대한 항균력을 조사하기 위해 각각의 추출물을 1 mg/disc 로 하여 pH 를 2, 5, 7, 9, 11 로 조절한 후 각각의 균주의 생육 정도를 조사한 결과 *S.mutans* *S.sobrinus* KCCM11897, KCCM11898 는 각각의 pH 조건에 대하여 대조군과 비교 시 큰 차이가 나타나지 않았으나 구취유발 균주인 *F.nucleatum* 와 *A.actinomycetemcomitans* 는 산성에 대해서는 안정한 반면 알칼리 쪽으로 갈수록 항균활성이 낮아짐을 알 수 있었다.

연은 강한 항균작용과 해독작용을 가진 물질로 다양한 질환에 이용되어져 왔고 구강 질환에 예방 효과가 있다는 문헌이 있으나 과학적 입증이 미비하였다. 이에 따라 구강 질환을 유발하는 균주를 이용하여 여러 가지 방법으로 항균 효과를 살펴보았을 때 연의 부위에 따라 항균성이 각기 다르게 나타났고, 이것은 즉 연의 부위별로 각기 다른 구강위생균에 선택적 이용이 가능함을 보여주었다. 이 논문의 결과를 바탕으로 연에 함유된 충치균과 구취균을 억제시켜 주는 성분에 대해 밝혀내고, 그 기능성 성분을 통해 다양한 구강 위생물질에 이용이 가능하리라 사료된다.

# I. 서론

## 1) 치아우식증의 일반적 개요

치아우식증이란 치아의 표면에 부착한 치면세균막 내의 세균에 의해 치아의 경조직이 파괴되는 병변으로 세균에 의해 생성된 유기산에 의해 치질의 무기질 성분(칼슘염)이 탈회되고, 다시 세균으로부터의 효소에 의해 유기질 성분이 분해되는 것이다<sup>(1)</sup>.

치아우식증의 유발원인으로는 식품의 구성성분, 플라그 내에 서식하는 *Streptococcus mutans*, *lactobacilli* 등의 박테리아, 타액, 미네랄과 불소와 같은 미량 원소들이다. 각 인자의 관여도는 서로 다르며, 치아나 치면의 형태와 구조에 따라 개인차이가 나타난다(Fig. 1).

최근 미국의 치주학회 (Board of trustees of the American Academy of Periodontology)에서는 구강질환을 유발하는 균들로 인해 치주조직(periodontium)이 세균과 그 생성물 및 염증의 저장고(reservoir) 역할을 하게 되어 당뇨, 임신부의 저체중아 분만, 그리고 심혈관계 질환의 위험요인이 될 수 있음을 제안하고 치주조직관리의 중요성을 부각시키고 있다<sup>(2)</sup>. 그럼에도 불구하고 국민들의 식생활변화로 인하여 아동의 90% 이상

치아우식을 경험했으며, 성인들의 80%이상이 잇몸병을 갖고 있다는 심각성을 대한치과의사협회가 보고한 바 있다<sup>(3)</sup>.

치아우식증은 치태 내 세균이 치아표면에 부착하는 것에서부터 시작된다. 음식물에 함유된 sucrose 가 유입되면 치아표면에 glucosyltransferase (GTase)를 생산하고, 불용성 포도당 중합체(glucose polymer)인 glucan 을 합성함으로써 치아표면에 치면세균막(dental plaque)를 형성해나간다. 그리고 결국 충치균등의 유해세균이 발효에 의해 lactic acid 나 citric acid 등의 산을 생성함으로써 에나멜층을 부식시켜 치아손실이 발생한다<sup>(4)</sup>.

이러한 구강질환을 억제하기 위하여 가장 광범위하게 사용되는 방법으로는 1) bisbiguanide 계의 chlorhexidine, 2) 유기 또는 무기불소 도포 3) 최근 항충치 효과로 연구된 D-xylitol, xylitol, D-sorbitol 등의 당대체 물질이 있다<sup>(5,6)</sup>. bisbiguanide 계의 chlorhexidine 은 양전하성 세제의 항생제로써 잇몸의 그람음성균을 억제하기 위하여 치주치료 시 사용된다. 이는 치아표면에 세균이 축적되기 위해 필요한 glucosyltransferase 효소와 대사에 필요한 phosphoenolpyruvate phosphotransferase 효소를 억제한다. 하지만, 에나멜질이나 치석의 표면에 흡착되어 영구적으로 갈색을 띠게하며, 또한 장기간 사용시 작열감(burning sensation)을 느끼거나 입맛을 잃게 한다.

유기 또는 무기불소에 의한 우식 세균의 억제 방법은 가장 널리 사용되고 있는 방법으로 치아우식증의 예방 및 초기우식증의 재광화를 촉진하고, 치아의 법랑질을 강하게 하여 세균의 효소작용을 억제한다. 또한 현재

시판중인 많은 치약이 불소첨가를 표방하고 있다<sup>(7)</sup>. 하지만 치아에 흰색 반점이 나타나는 불소침착증을 유발할 수 있고 최근에는 신경계 장애를 비롯한 전신마비를 유발한다는 주장이 제기 되고 있어 벨기에를 중심으로 유럽 전역에서 식품의 불소투입을 금지하자는 움직임이 확대 되고 있다<sup>(8)</sup>.

당대체물인 D-xylitol, xylitol, D-sorbitol 등은 체내에 흡수되었을 때 xylose-5-phosphate 를 형성하여 우식유발세균이 대사에 이용되지 못하고 그대로 배출하게 됨으로써 sugar 의 대체제로 저우식 유발성이 확인 되었으나 한꺼번에 대량 섭취 시 설사를 일으키고 가격이 비싸다는 단점이 있다. 또한 장기간 섭취 시 xylitol resistance strain 이라는 변이종을 생성함으로써 항충치 효과가 떨어진다는 연구결과가 확인되었다<sup>(9)</sup>.

이러한 방법들은 치아우식증의 예방의 완벽한 목적에 있어서 문제점을 갖고있다. 따라서 최근에는 질병치료에 부작용이 적고 기능성을 가진 천연항균제를 쓰는 경향이 늘어가고 있으며, 이러한 천연 물질로부터 구강미생물의 항균 물질을 분리해내는 일은 매우 중요하다고 할 수 있다.

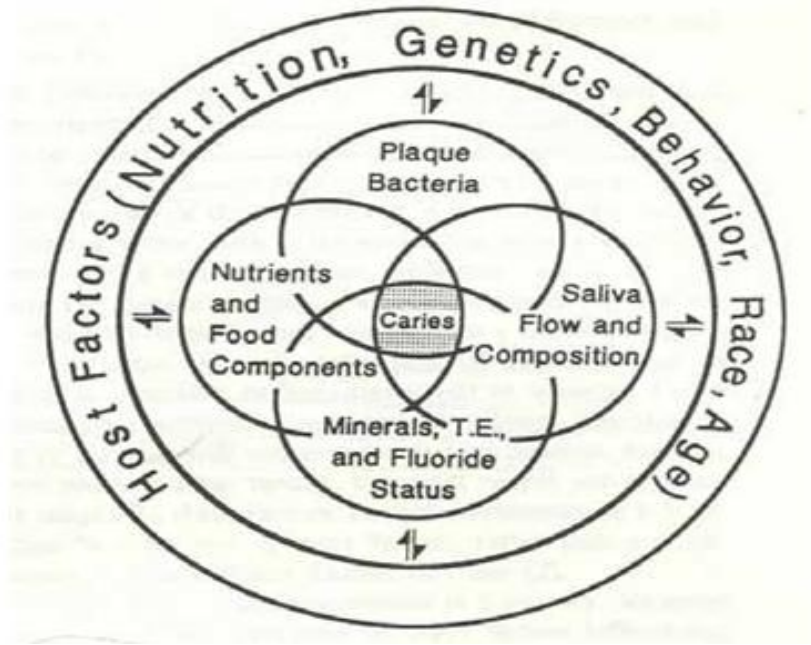


Fig. 1. The multifactorial etiology of dental caries<sup>(10)</sup>.

## 2) 연에서 생리활성 물질 탐색의 필요성

연(*Nelumbo nucifera*)은 수생식물 중 부엽식물에 속하는 쌍떡잎 식물로서 아시아 남부, 북 호주가 원산지이며 생약명은 연(蓮)으로 열매는 9~10 월경에 타원형의 수과(樹科)가 까맣게 익는다. 7~8 월에 홍색, 백색의 꽃이 피고, 직경 15~20 cm 이며 화경(花梗)은 엽병(葉柄)처럼 가시가 있고 끝에 1 개의 꽃이 달린다. 10 월에 열매가 익으며 견과(堅果)는 타원형이고 길이 2 cm 정도로서 먹을 수 있다<sup>(10,11)</sup>. 주로 연못이나 늪에서 자라며 논에서 재배되는 연잎은 원형으로 큰 잎이 뿌리줄기에서 나온다. 자르는 잎 뒷면의 중앙부에 달리며 가시 같은 돌기가 있고 꽃잎과 더불어 수면 위에 떠서 펼쳐진다<sup>(12)</sup>.

연의 과실 또는 종자(種子)를 연자(蓮子), 연의 성숙한 종자의 녹색 배아를 연자심(蓮子心), 연의 수술을 연수(蓮鬚), 잎을 하엽(荷葉), 근경(뿌리줄기)을 우(藕), 근경의 마디를 우절(藕節)이라고 한다.

연의 성분으로는 진통작용, 진정작용이 있는 roemerine, nuciferin, arnepavin, N-nornuciferine, pronuciferine, N-methylcoclaurine, leucodelphindin, nelunboside, gluconicacid, 10-nonacosanol, dehydroroemerine, dehydronuciferine, dehydroanonaine, N-

methylisococlaurine, N-methylcoclaurine, 주석산, 구연산, 호박산, 탄닌 등이 알려져있다<sup>(13)</sup>.

연은 예로부터 차와 술로 많이 이용하였다. 꽃으로는 연화차를, 잎으로는 하엽차를, 뿌리로는 연근차를 만들어 음용했고 인엽주 라고 하여 연꽃잎을 넣어 향기로운 술로 만들었다<sup>(14)</sup>. 음식의 경우 연근정과, 연근찜, 연근전, 연근죽 등의 요리에 주로 쓰였으며 생식으로도 이용해왔다<sup>(15)</sup>. 인도와 중국을 중심으로 열대, 온대의 동부아시아를 비롯한 한국, 중국, 일본 등에 널리 분포하고 있으며 관상용 식물 뿐만 아니라 양양적 음식으로써 중요한 역할을 하고있다.

연에 관한 지금까지의 연구결과를 보면 Bhat 등<sup>(16)</sup>이 연에 함유된 영양성분 분석결과를 발표했고, Rai 등<sup>(17)</sup>은 연씨의 항산화 효과, Chiang 등<sup>(18)</sup>은 연뿌리의 조리 시 물성의 변화를 연구하는 등 연에 관한 연구가 일부 이루어졌으나 비교적 최근에 진행되어 초기단계라고 할 수 있다. Lee 등<sup>(19)</sup>은 연잎의 용매 추출물에 대한 항산화 효과를 검증하여 일정 분획에서 시판 항산화제 보다 우수한 결과를 얻었고, Lee 등<sup>(20)</sup>이 식중독균에 대해 Benzoic acid 보다 우수한 항균효과를 입증하였다. 또한 Ko<sup>(21)</sup> 등은 백연잎의 물 추출물의 경우  $\alpha$ -amylase 를 억제하여 탄수화물의 소화 흡수를 지연시킨다고 보고하였고 Shin<sup>(22)</sup>을 통해 연잎 추출물이 혈청의 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 조절해주고 지질대사를 촉진시킨다는 결과를

보고하는 등 동물실험도 일부 행해 졌다. 하지만 국내에서는 이들이 발표된 연구결과의 전부라고 봐도 무방할 정도로 이에 대한 연구가 미비한 실정이다.

전통의학에서는 연의 효능에 대해 출혈성 위궤양이나 위염, 치질, 출혈, 설사, 두통과 어지럼증, 토혈, 산후 어혈치료, 해독 작용 등을 강조해왔고 감기나 심장병의 치료에도 사용되어 왔다. 또한 동의보감<sup>(23)</sup>에 따르면 백련잎의 꼭지를 따서 섭취하면 잇몸질환을 억제하여 충치, 구취 예방에 효과가 있다고 하였다. 따라서 본 연구를 통해 구강세균에 대해 항균성이 있음을 확인 해보고자 연을 부위별로 나눠 연꽃, 연잎, 연씨, 연밥의 추출물에 대한 항충치 및 구취예방 효과에 대해 탐색해 보고자 하였다.



Fig. 2. *Nelumbo nucifera*<sup>(24)</sup>

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 시료채취

본 실험에서 사용한 연꽃, 연잎, 연씨, 연밥은 2009 년 8 월에서 9 월 사이 충청북도(보은연꽃마을)에서 수집하여 대한식물도감<sup>(25)</sup>과 의생양술<sup>(26)</sup> 등을 참고로 하여 동정하였다. 동정된 연은 증류수로 2~3 회 수세한 뒤 물기를 제거한 후 7 일간 음건 하였고 분쇄기(HMF-340, Hanil, Korea)로 분쇄한 후 50 mesh standard sieve 를 통과시켜 추출용 시료로 사용하였다(Fig. 2).

#### 2) 시약 및 기구

시료의 추출에 사용한 용매 methanol, chloroform, ethylacetate 는 Jusei(Japan)사와 Duksan(Korea)사의 시약을 사용하였다. 항균성 측정을 위한 paper disc 는 Whatman(U.S.A)사의 제품을 사용하였으며 membrane filter 는 Advatec(U.S.A)사의 제품을 사용하였다.

#### 3) 사용균주 및 배지

실험에 사용된 균주는 한국미생물보존센터에서 충치, 구취를 유발하는 균주를, 생물자원센터로부터 구취 균주를 분양 받아 계대하여 37℃에서

24~48 시간 배양하여 활성화시켜 사용하였다. 충치 균주는 그람양성균의 *Streptococcus mutans* KCCM 40105, *Streptococcus sobrinus* KCCM 11897, *Streptococcus sobrinus* KCCM 11898 3 가지 균주를 사용하였으며, 구취 균주는 그람음성균의 *Fusobacterium nucleatum subsp. Nucleatum* KCCM42180, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* KCCM 41632 2 가지 균주를 사용하였다.

배지는 Trypticase Soy Agar (BBL, Becton Dickinson, MD, U.S.A.)와 Trypticase Soybean Broth (BBL, Becton Dickinson, MD, U.S.A.)를 사용하였고, 균주 접종 후 37℃ incubator 에서 24 시간 배양하였다. Incubator 의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였다(Table 1).

Table 1. List of microorganisms and media used for antibacterial activity test.

	Microorganism	Gram	Media	Temp. (°C)
	<i>Streptococcus mutans</i> KCCM40105	(+)	TSA&TSB	37
Cariogenic bacteria	<i>Streptococcus sobrinus</i> KCCM11897	(+)	TSA&TSB	37
	<i>Streptococcus sobrinus</i> KCCM11898	(+)	TSA&TSB	37
Periodontopathogen	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>subsp. nucleatum</i> KCCM42108	(-)	TSA&TSB	37
	<i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i> KCCM41632	(-)	TSA&TSB	37

## 2. 실험 방법

### 1) 항균 검색용 추출물의 추출조건

시료에 가장 적합한 추출조건을 찾기 위하여 메탄올 농도, 추출시간, 추출용매 등의 조건별로 각각 추출한 다음 여과(whatman No.2)하여 rotary vaccum evaporator (Eyela N-1NW, Tokyo Rikakikai Co.)로 50℃에서 감압 농축, 건조하여 수율을 측정하였다. 또한 수율을 측정한 건조물은 용매에 녹여 적당한 농도로 희석하여 항균활성에 사용하였다.

#### 1-1. 메탄올 농도별 추출

연꽃, 연잎, 연씨, 연밥을 각각 500 g 에 50, 70, 95, 99.5%의 메탄올을 중량 10 배를 가해 상온에서 24 시간 추출한 후 여과액을 감압농축, 건조하여 수율 및 항균활성을 측정하였다.

#### 1-2. 시간별 추출

연꽃, 연잎, 연씨, 연밥에 메탄올 중량의 10 배를 가하고 추출시간이 6, 12, 18, 24 시간이 되도록 순차적으로 여과하여 감압농축, 건조 후 수율 및 항균활성을 측정하였다.

## 2) 용매에 따른 분획물의 제조

연꽃, 연잎, 연씨, 연밥의 추출물 조제는 조제된 연의 분말시료와 methanol 을 1:10(w/v)의 비율로 혼합하여 실온에서 6 시간 동안 3 회 반복하여 교반 추출하였다. 이 추출액을 여과지(whatman No.2)로 여과한 후 회전 진공 증발기(Rotary evaporator R-124, BUCHI, Switzerland)로 45°C의 수욕상에서 감압 농축하였다.

methanol 추출물은 극성에 chloroform, ethylacetate 및 water 로 Fig. 3 에 나타난 바와 같이 순차적으로 용매 분획하였다. 즉 methanol 추출물에 10 배의 증류수와 n-hexane 을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 n-hexane 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 chloroform, ethylacetate, butanol, water 층을 분획하여 각각의 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 3 회 반복 실시하였다. 각 분획물은 해당 용매로 용해시켜 0.45  $\mu$ m membrane filter 로 제균한 후 4°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 고형분의 함량은 농축된 분획물 1 ml 을 취하여 105°C에서 건조 후 증발 잔사량을 계산하였다.

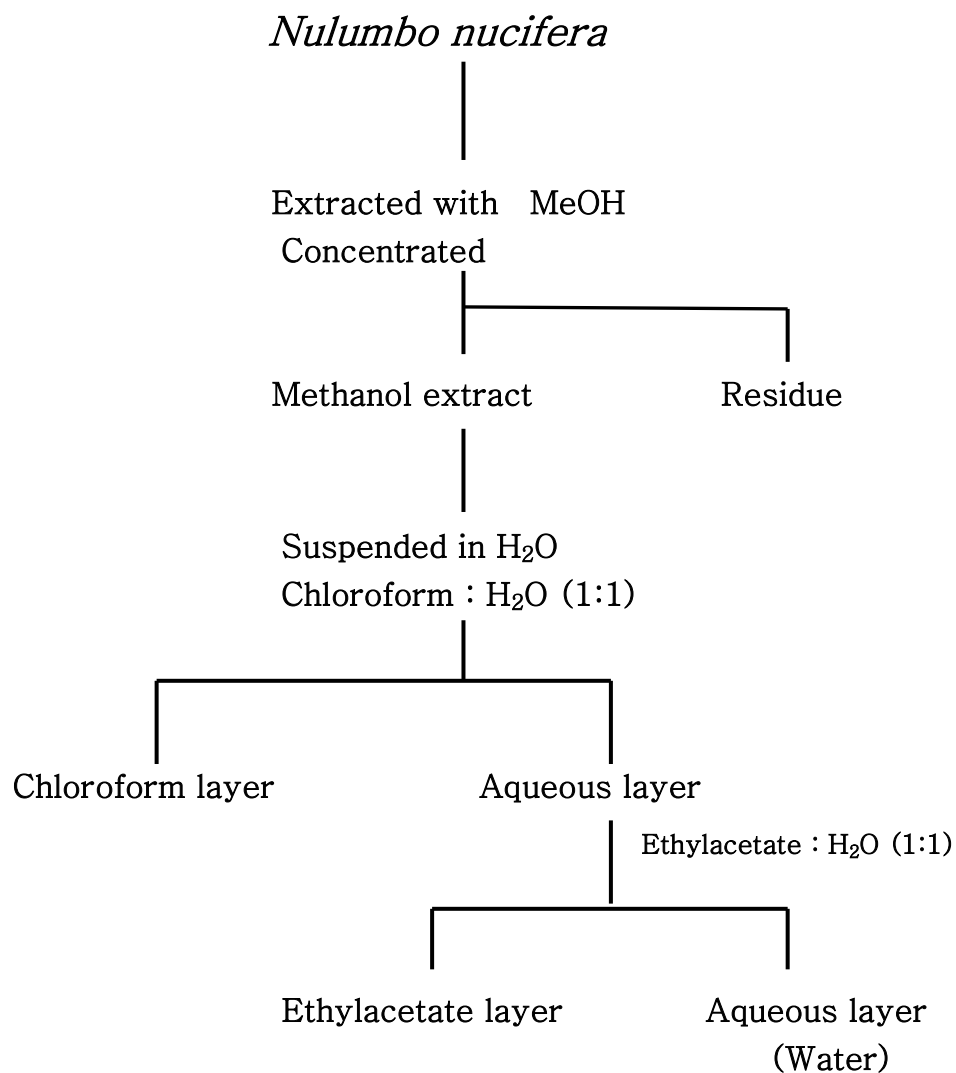


Fig. 3. Scheme of extraction and solvent fraction of methanol extract from *Nulumbo nucifera*

### 3) 추출물과 분획물의 항균력 측정

세균에 대한 항균력을 측정하기 위하여 paper disc methods 를 이용하였다. 각 균주 1 백금이를 취하여 10 ml 의 broth 에 접종하고, 37°C에서 18 시간 동안 배양하여 활성화 시켰다. 이 활성화 된 균주는 10  $\mu$ l를 TSA 배지에 도말하였다. 그리고 멸균된 paper disc (6.0 mm diameter and 1.0mm thickness, Whatman AA disc, England)에 1.0 mg/disc 의 농도로 각 추출물을 흡수시켜 추출용매에 휘발시키고 난 후, 균주를 도말한 TSA 배지 표면 위에 놓아 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 disc 주위의 inhibition zone 의 직경(mm)을 측정하였다. 대조균으로 DMS 를 같은 부피로 흡수시켜 휘발시킨 disc 를 사용하였고 위 실험은 3 회 반복 측정하였다.

### 4) 농도별 미생물 생육 저해곡선 측정

연 추출물의 생육저해 농도 측정은 농도별 항균력 측정과 마찬가지로 Turbidimetric Assay 로 하였다. 즉, 균이 활성화된 10 ml 의 TSB 배지에 추출물과 분획물을 농도별로 첨가하고 37°C에서 배양하면서 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 시간이 되는 때에 650 nm 에서 microplate reader (Biolog Inc. U.S.A.)로 흡광도를 측정하였다.

### 5) 미생물의 성장 저해율 측정

미생물의 성장 저해 측정은 TSB 배지 10 ml 에 추출물을 1000 ppm 농도로 주입하고, 각 균주의 활성액을 0.1 ml 접종하여 37°C에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 microplate reader (Biolog Inc. U.S.A.)를 이용하여 650 nm 에서 흡광도를 측정하고 다음식을 이용하여 성장 저해율(%)을 확인하였다.

$$\begin{aligned} & \% \text{ inhibitory effect} \\ = & \frac{(\text{Control}-\text{Control Blank}) - (\text{Treatment}-\text{Treatment Blank})}{(\text{Control}-\text{Control Blank})} \times 100 \end{aligned}$$

## 6) 추출물의 최소저해농도 (Minimum inhibitory concentration) 측정

각 균주의 최소저해농도(MIC)는 broth microdilution method<sup>(27)</sup>에 의해 다음과 같이 결정하였다. 즉, well plate 에 TSB 를 100  $\mu$ l 씩 분주하고 100  $\mu$ l의 추출물을 two-fold dilution 하여 농도를 조절한 후 균의 농도를  $2 \times 10^4 \sim 10^5$  CFU/ml 첨가하였다. 그 후 37°C에서 24 시간 배양한 뒤, 650nm 에서 microplate reader(Biolog Inc. U.S.A.)로 흡광도를 측정하였다. turbidity 가 나타나지 않은 well 의 해당 시료 농도를 MIC 값으로 결정하였다.

## 7) 열 및 pH 안정성 측정

추출물의 열 안정성을 측정하기 위해 40, 80, 100, 120°C에서 1 시간 동안 열처리한 후 처리 온도별로 추출물의 농도가 1mg/disc 가 되도록 paper disc method 로서 항균력 측정방법과 동일하게 측정하였다. pH 안정성은 pH 에 따라 용매를 2, 5, 7, 9, 11 로 조정한 후 시료를 가하고 37°C에서 1 시간 동안 방치한 다음 pH 7 로 중화시켜 열 안정성과 동일한 방법으로 측정, 비교하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 추출물과 용매별 분획물의 수율

연의 항균효과를 검토하기 위하여 각 부위별 시료를 자연건조 후 마쇄한 시료의 일부를 105℃에서 건조시킨 후 고형분 함량을 추출 수율로 계산한 결과는 Table 2와 같다.

연꽃의 경우 methanol 추출물이 17.2%로 가장 높은 수율을 나타내었고, 그 뒤를 이어 chloroform 분획물이 5.2%, Ethyl acetate 분획물이 4.5%로 비슷한 수율을 나타내었다. 그리고 water추출물은 1.2%로 가장 낮게 나타났다. 연씨 또한 methanol 추출물이 9.8%로 가장 높았고 water 추출물이 6.7%로 그 다음으로 높게 나타났다. 그 뒤로 ethylacetate가 5.2%, chloroform 1.8%로 아주 낮은 수율을 보여주었다. 연밥은 methanol 추출물이 8.9%, water 추출물이 4.3%, ethylacetate추출물이 2.4%, chloroform추출물이 1.8%로 이었다. 연잎의 경우, 각 부위별 추출물 중에서 수율이 가장 높게 나타났다. 그 중 methanol 추출물이 21%로 가장 높았고 water 추출물이 19.1%로 나타났다. 그 뒤로 ethylacetate는 8.2%, chloroform은 4.2% 였다. 즉, methanol, water, chloroform, ethylacetate 순으로 수율이 감소하였다.

천년초<sup>(28)</sup>, 거봉<sup>(29)</sup>, 영경퀴<sup>(30)</sup>의 결과에 따르면 용매 별 분획물의 수율은

용매의 극성이 높을수록 높게 나타낸다고 밝혔다. 또한 Hur<sup>(31)</sup> 등의 추출용매의 극성에 따라 추출 되어지는 물질이 다르다는 연구 결과를 통해 연잎은 극성이 높을 수록 추출 수율이 높은 것으로 보아 연잎에는 극성 물질이 많은 것으로 보인다.

추출용매의 수율은 항균성과도 관련이 있는데 Park<sup>(32)</sup> 등은 20종의 한약재를 다른 용매로 추출 시 용매나 시료에 따라 수율이 차이 난다고 밝히고 그에 따른 항균효과도 다르게 나타난다고 발표한 바 있다. 이에 따라 연 또한 추출용매나 부위에 따라 그 항균력이 다르게 나타날 것으로 예상된다.

Table 2. Yield ratio of extraction of *Nulumbo nucifera* by solvent

Sample	Solvent			
	Methanol Yeild <sup>a</sup>	Cloroform Yeild	Ethylacetate Yeild	Water Yeild
Flower	17.22%	5.22%	4.53%	1.24%
Leaf	21.45%	4.23%	8.26%	19.13%
Seed	9.83%	1.83%	5.92%	6.73%
Pod	8.93%	1.81%	2.45%	4.36%

<sup>a</sup>Extraction yield(%)

$$= (\text{solid in extract gr/ raw material gr ( dry weight) } ) \times 100$$

## 2. 총치 및 구취균에 대한 항균력

### 2.1 항균 물질의 Methanol 추출 농도

연의 부위별 추출 용매로 선택된 methanol을 50%, 75%, 95%, 99.9% 농도별로 추출하였을 때 메탄올 농도가 낮아질수록 수율이 높아지는 경향이었다.

Table3~6의 결과와 같이 메탄올 농도별 연꽃 추출의 *S.mutans*, *S.sobrinus* KCCM11897, *S.sobrinus* KCCM11898, *F.nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans*에 대한 항균활성은 methanol 50% 농도에서 가장 항균성이 높게 나타났고 그 다음으로 70%, 95% 의 농도 순으로 높게 나타났다. 99.5%의 농도에서는 *S.sobrinus* KCCM11898에서 약간 항균성이 있었으나 다른 균주에서는 거의 항균성이 나타나지 않았다. (photo. 1~4)

연잎에서는 50%, 70%, 95%의 농도에서 거의 비슷한 항균성을 보였고 99.5%에서는 거의 항균성이 미약하게 나타났으나 일부 균주에서는 거의 항균 효과가 없음을 보였다. 연씨의 경우 모든 농도에서 비슷한 항균 결과를 나타내었고 그 중 70%의 농도에서 전반적으로 가장 높게 나타났다. 다른 부위에 비해 미약한 항균성을 보였다. 연밥은 50%와 70%에서 항균활성이 높았으며 95%와 99.9%에서는 거의 항균성을 보이지 않았다.

이에 따른 결과 연꽃과 연잎은 메탄올 농도가 높을수록 추출 수율은 높아지나 반대로 항균활성이 낮아지는 경향으로 보아 연꽃과 연잎에

항균활성을 가지는 물질은 물에 추출이 잘 되는 성분이라고 판단된다. 즉, 메탄올 농도가 높아질수록 추출 수율은 증가하나 항균활성이 감소하였는데 이는 쌍화차의 에탄올 50% 농도까지는 가용성 고형분이 높아지고 그 이상의 농도에서는 낮아졌다는 보고<sup>(33)</sup>와 구기가, 당귀, 오미자, 오갈피 등의 식물성분 추출물도 에탄올의 농도가 높을수록 추출물의 가용성 고형분은 낮아지나 항균력이 높아졌다고 한 결과<sup>(34)</sup>와 유사하였다 (Fig. 4~7).

이와 같은 결과에 따라 연의 각 부위별 추출조건 중 메탄올의 농도는 가장 항균성이 우수했던 농도로 각각 달리하여 실험하기로 결정하였다. 연꽃과 연잎은 50%의 농도로, 연씨와 연밥은 70%의 농도의 메탄올 농도로 추출하기로 결정하였다.





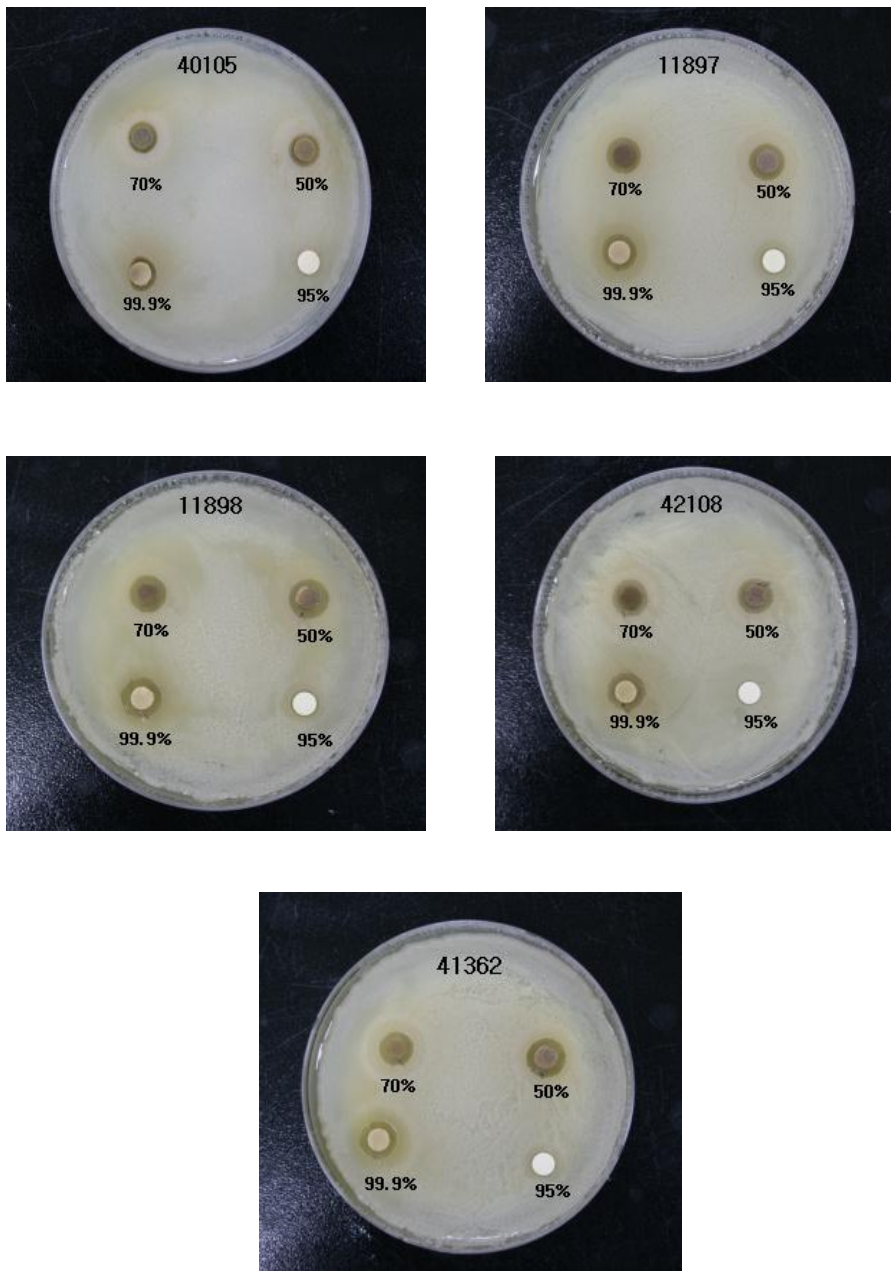


Photo 1. Antimicrobial activity of the methanol extract of *Nulumbo nucifera* Flowers

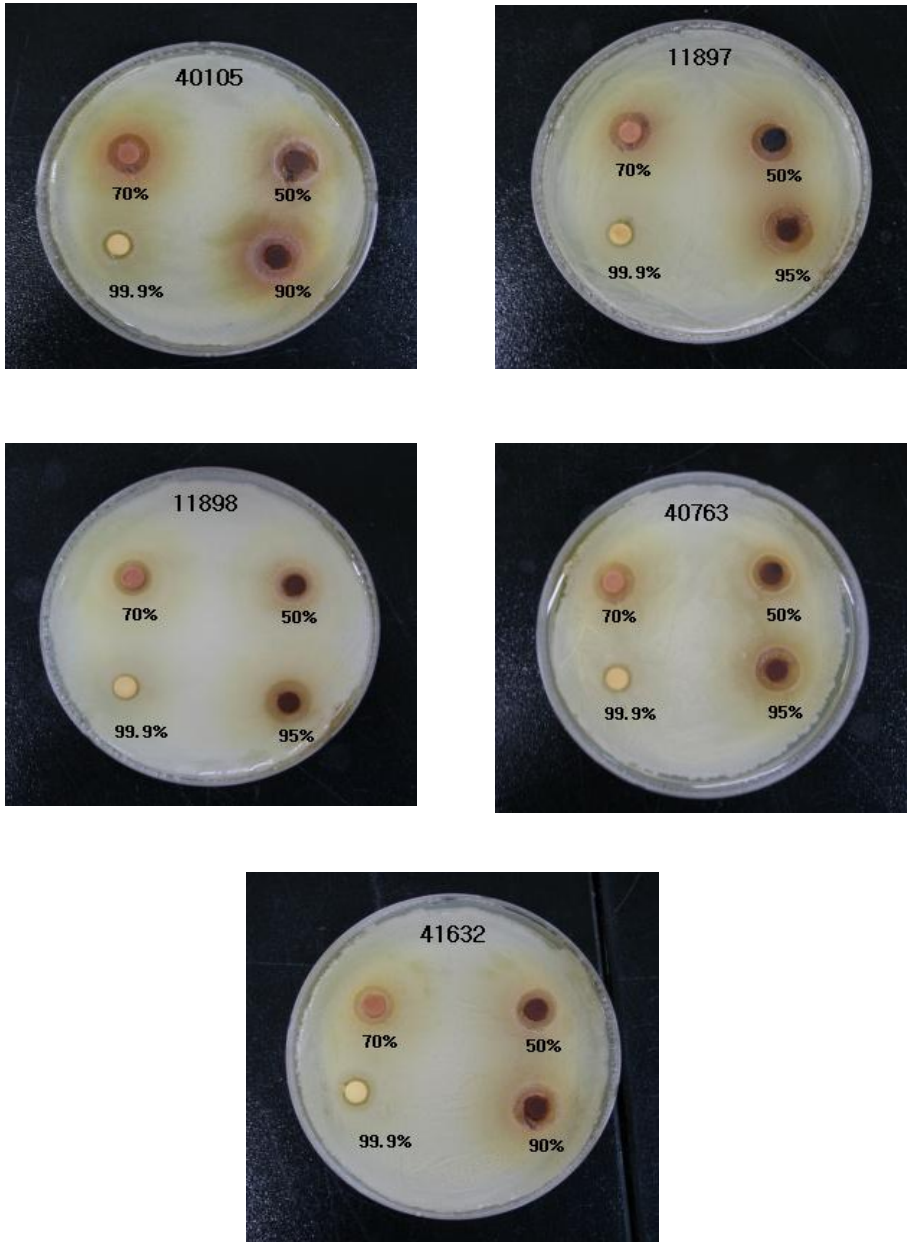


Photo 2. Antimicrobial activity of the methanol extract of *Nulumbo nucifera* Leaves

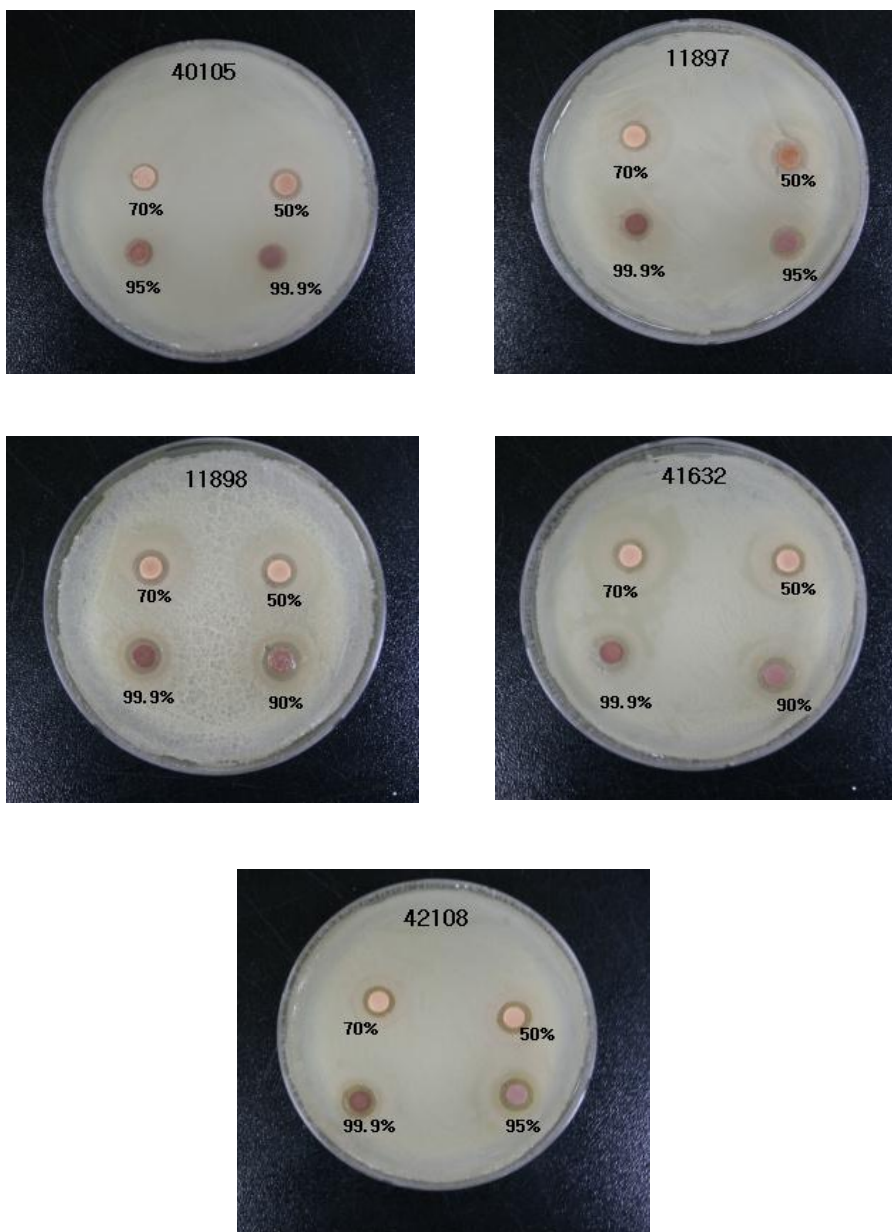


Photo 3. Antimicrobial activity of the methanol extract of *Nulumbo nucifera* Seeds

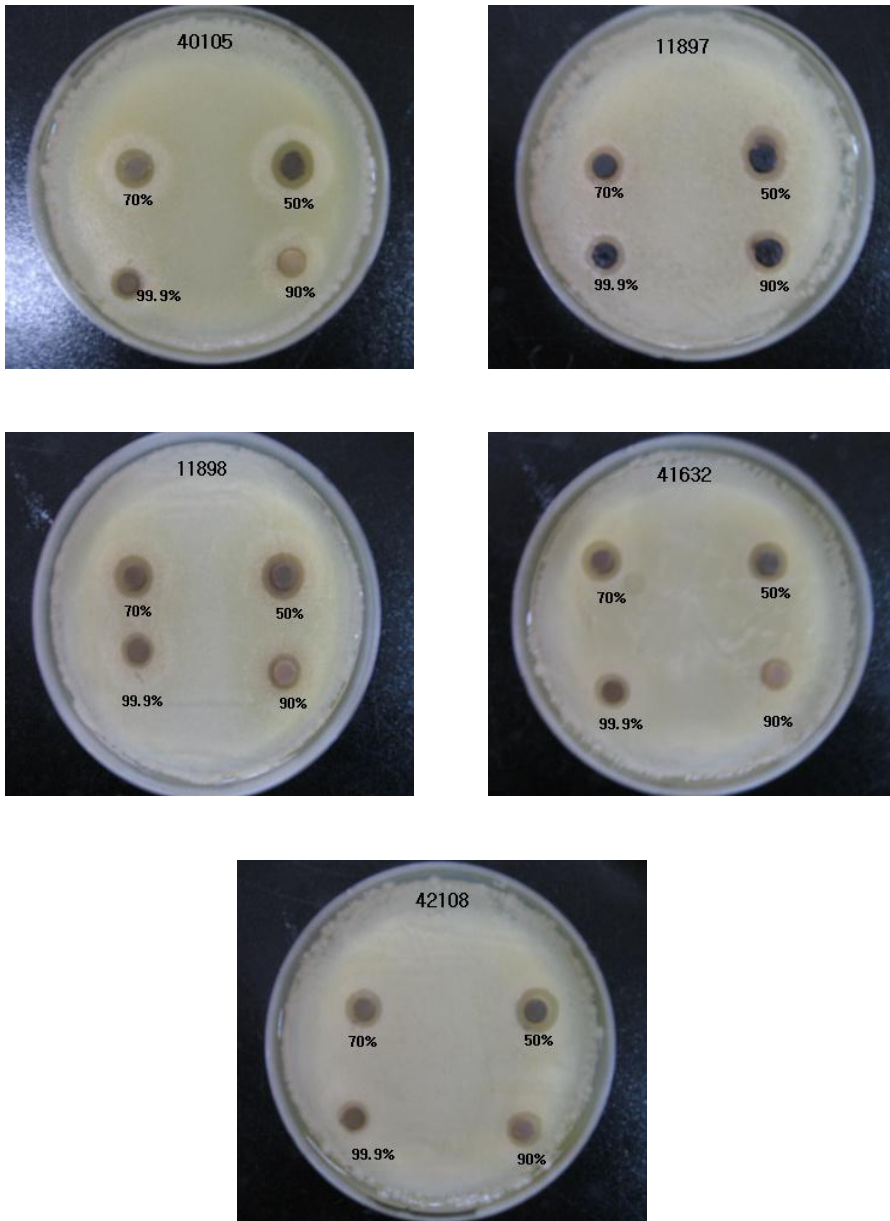


Photo 4. Antimicrobial activity of the methanol extract of *Nulumbo nucifera* Pods

## 2.2 항균 물질의 추출 시간

추출시간에 따른 영향을 살펴보기 위하여 연의 각각의 부위에 메탄올을 가해 상온에서 6, 12, 18, 24시간 추출하여 항균활성을 측정하였다. 추출시간을 6시간 단위로 추출하였을 때 Table 7~10의 결과와 같이 시간에 따른 항균활성은 연꽃의 경우 6시간 추출에서 가장 높았고 추출이 오래 진행될수록 항균력이 감소하는 결과를 나타내었다. 연잎 역시 6시간과 12시간에서 가장 높았고 시간이 지남에 따라 약간 감소하는 경향을 보였다.

연씨와 연밥은 6, 12시간에서 항균성이 높게 나타났으나 24시간 추출에서는 항균성이 감소하는 것을 보였다. 즉 수율은 6시간부터 증가하기 시작하였으나 12시간 이후부터는 거의 변화가 없고 24시간 추출에서는 오히려 그 활성이 감소하는 것으로 보아 12시간 이내에 추출이 모두 이루어지는 것으로 보인다.

이에 따라 항균 활성 물질의 추출 조건으로 연꽃, 연잎은 50%, 연씨, 연밥은 70%의 메탄올 농도로 상온에서 12시간 추출하는 것이 경제성 및 추출수율을 고려할 때 가장 효과적인 것으로 여겨진다.





### 3. 분획물의 항균력 측정

연의 MeOH 추출물을 1차적으로 chloroform , ethylacetate , 및 water 순으로 용매 분획하여 항균성을 검색하였다. 순차적으로 연의 MeOH 추출물을 계통 분획 후 항균성을 관찰한 결과는 Table 11~14, Photo 1~4와 같다.

3종의 용매 분획 중 ethylacetate 분획추출물이 5종의 실험 균주에 대하여 다른 분획물에 비해 비교적 광범위한 항균력을 나타내었으며 특히, 총치균의 80~90%를 차지하는 *S. mutans*의 성장을 저해했다. 또한 chloroform 추출물도 비교적 활성이 우수하였으며 *F.nucleatum*의 특정균에서 공통적으로 항균활성이 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과는 질경이의 MeOH 추출물을 n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 물 등을 순차적으로 분획한 결과와도 유사하게 나타났다<sup>(35)</sup>.

이러한 총치, 구취균에 대한 연의 항균효과는 페놀성 성분들은 페놀성분들에 기인한 것으로 판단된다. 식물세포에 존재하는 생리활성 물질 중 페놀성 성분들은 천연 항산화제로서 뿐만아니라 항균성능을 가지고 있다는 보고<sup>(36)</sup>에 따라 연에 함유되어있는 페놀성 물질에 의해 항균효과가 나타났다고 사료된다. 이는 연잎 추출물의 항균효과<sup>(37)</sup>를 검색한 연구결과에서 총 페놀 함량을 AOAC법에 의해 살펴본 결과 ethylacetate에서 가장 페놀함량이 높게 나타났고, 그 다음으로 chloroform, hexane, water 순으로 높게 나타났다는 연구결과에서도 뒷받침 된다.

따라서 연의 항균효과는 페놀성분과 관련이 있을 것으로 예상되며 페놀

함량의 정확한 성분분석과 동시에 연의 항균물질에 대한 연구가 추가적으로  
진행되어야 할 것으로 생각된다.





## 4. 추출물의 미생물에 대한 생육저해

### 4.1 생육저해곡선

#### 1) *Streptococcus mutans* KCCM 40105에 대한 생육저해

실험에 사용된 추출물들이 *S.mutans*의 생육특성에 미치는 영향은 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 연의 각 부위별 모든 추출물에서 생육저해가 나타났고 연꽃과 연씨는 4시간의 유도기에서는 농도 별로 차이를 보이지 않다가 8시간에 접어들며 농도 증가에 따른 효과를 보이기 시작했다.

연꽃, 연잎, 연씨, 연밥의 생육 저지대를 조사한 결과 paper disc method에서의 결과와는 달리 연밥 추출물에서 저해가 가장 뚜렷이 나타났다.

이러한 액체배양에서와 차이는 Tabak<sup>(38)</sup>등과 이<sup>(39)</sup>등의 결과에서도 나타난 것과 같이 고체 배양법과 액체배양법의 추출물의 확산 정도의 차이에 의한 것으로 생각된다.

#### 2) *Streptococcus sobrinus* KCCM 11897에 대한 생육저해

실험에 사용된 추출물들이 *S.sobrinus*의 생육특성에 미치는 영향은 Fig. 5에 나타난 바와 같다. 연씨 추출물은 12시간 이전까지는 균 증식이 높아져 대조구와 큰 차이가 없었으나 250, 500, 1000 ppm의 농도에서는 28시간 이후에 균 증식이 상당히 억제 됨을 알 수 있었다. 연의 각 부위 중에서는 연꽃과 연잎에서 생육 저해가 가장 잘 나타났고 연잎 추출물에서는

생육저해를 나타내기는 하였으나 시간이 흐를수록 농도 별 영향력이 줄어드는 결과를 나타내었다. 연밥 추출물에서는 대조군과 비교하여 거의 생육저해가 나타나지 않아 *S.sobrinus*에 대한 항균효과가 검증되지 않았다.

### 3) *Streptococcus sobrinus* KCCM 11898 에 대한 생육저해

실험에 사용된 추출물들이 *S. sobrinus* 의 생육특성에 미치는 영향은 Fig. 6에 나타낸 바와 같다. 모든 추출물에서 대조군과 비교하여 생육 저해 효과가 나타났다. 특히 연씨에서 항균효과가 가장 좋은 것으로 나타났고 농도에 의해 항균효과가 증가함을 알 수 있었다. 한편, 연꽃은 다른 농도에서는 생육저해를 보였으나 100 ppm 농도의 추출물을 넣었을 때는 오히려 대조군 보다 생육이 촉진 되었다. 이와 같은 결과는 Baek등<sup>(40)</sup>의 왕대 줄기 추출물의 시간경과에 따라 생육 저해 효과를 연구한 결과와 유사하였으며 그 이유는 낮은 농도의 추출물이 오히려 균의 생육을 촉진시키기 때문 이라고 사료된다.

### 4) *Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum* KCCM 42108 에 대한 생육저해

실험에 사용된 추출물들이 *F.nucleatum* 의 생육특성에 미치는 영향은 Fig. 7에 나타낸 바와 같다. *F.nucleatum* 은 8시간에서 급격히 균의 성장이 촉진되는 특성을 보였는데 연잎은 그 성장을 강력히 저해하는 효과를 가져왔다. 연씨 추출물은 처음 12시간까지는 생육 저해를 보이다가 그 이후

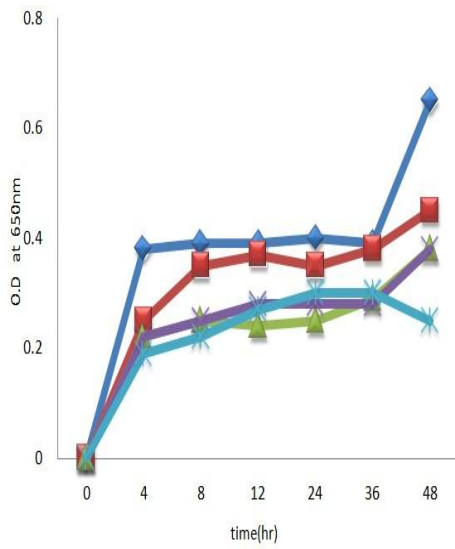
효과가 감소하여 대조군과 거의 비슷한 곡선을 나타냈고 이 균에 대하여 연밥 추출물은 항균효과를 거의 보이지 않았다.

5) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* KCCM 41632에 대한 생육저해

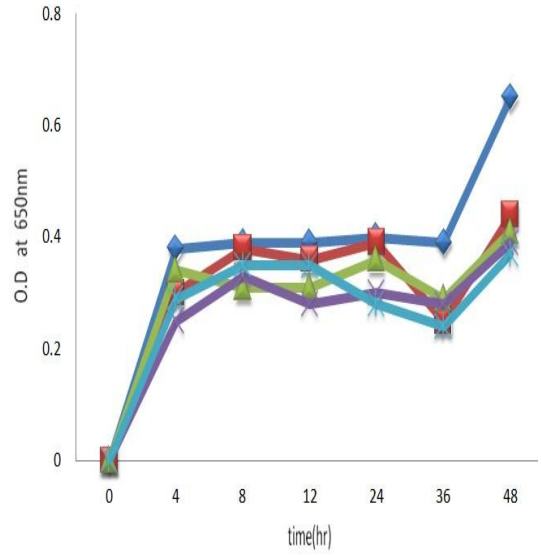
실험에 사용된 추출물들이 *A.actinomycetemcomitans* 의 생육특성에 미치는 영향은 Fig. 8에 나타낸 바와 같다. 모든 추출물에서 생육 저해 효과가 나타났으며 연씨는 *S.mutans*와 마찬가지로 4시간의 유도기에서는 저해효과를 보이지 않다가 8시간에서 농도에 따른 항균효과를 나타내기 시작하였다. 모든 추출물 중 연잎에서의 항균효과가 가장 컸으며 이는 paper disc의 결과와도 유사한 경향을 나타냈다.

그람양성균과 그람음성균의 전반적인 항균 활성의 비교에서는 그람양성균인 *S.mutans*와 *S.sobrinus*가 그람음성균인 *F.nucleatum*와 *A.actinomycetemcomitans* 에 비해 각 농도에서 흡광도가 더 낮게 나타나 항균활성이 높았음을 알 수 있었다. 이는 Nakamura<sup>(41)</sup>등이 보고한 바와 같이 그람 양성균의 세포벽은 peptidoglycan이 표면에 노출되어 항균 물질과 쉽게 결합되어 항균성을 나타내지만, 그람음성균은 lipopolysaccharide를 주성분으로 하는 외막이 peptidoglycan을 보호하여 항균물질이 결합되기 어렵기 때문에 항균성이 낮은 것으로 생각된다.

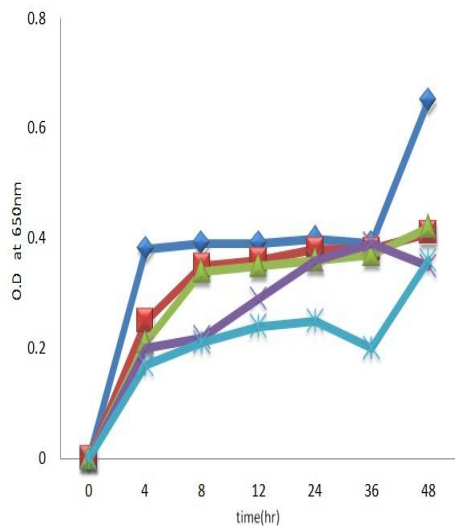
a. Flowers



b. Leaves



c. Seeds



d. Pod

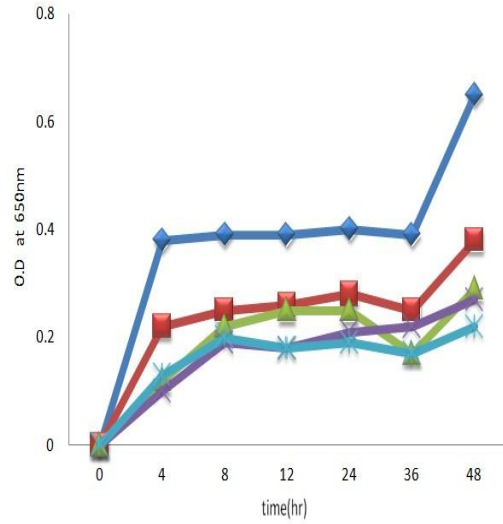
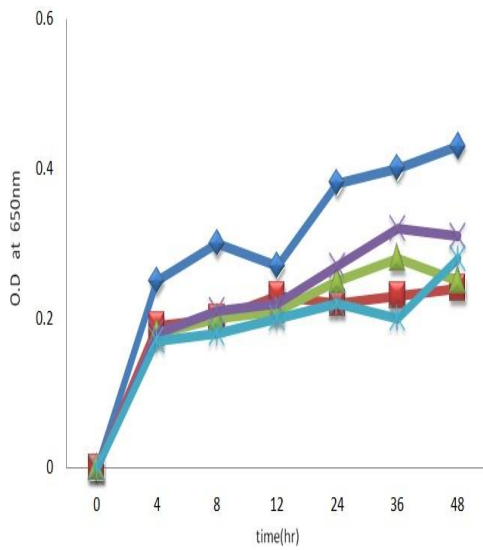
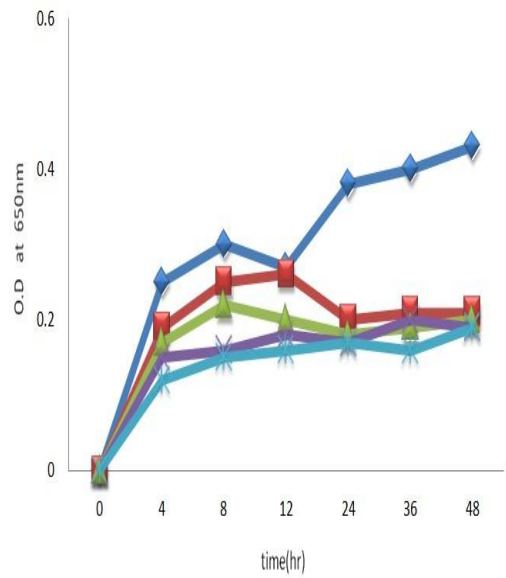


Fig. 4 Growth curves of *S.mutans* in the media adding the extract of *Nulumbo nucifera* (◆: 0 ppm, ■ : 100 ppm, ▲: 250 ppm, ✕: 500 ppm, \*:1000 ppm)

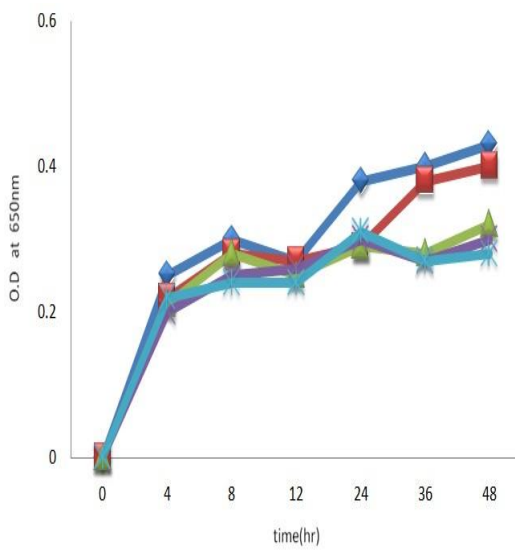
a. Flowers



b. Leaves



c. Seeds



d. Pod

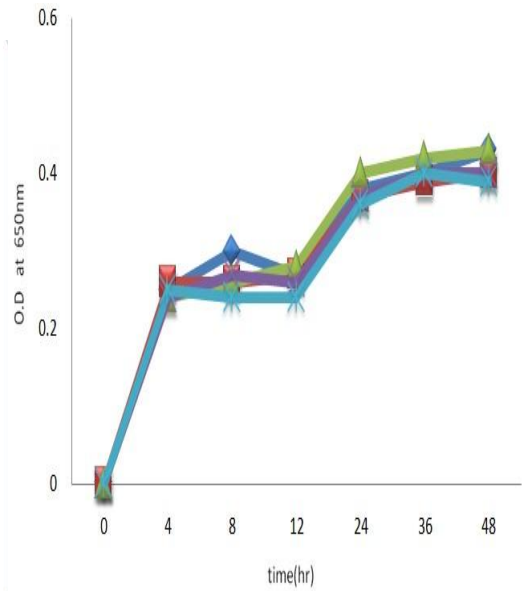
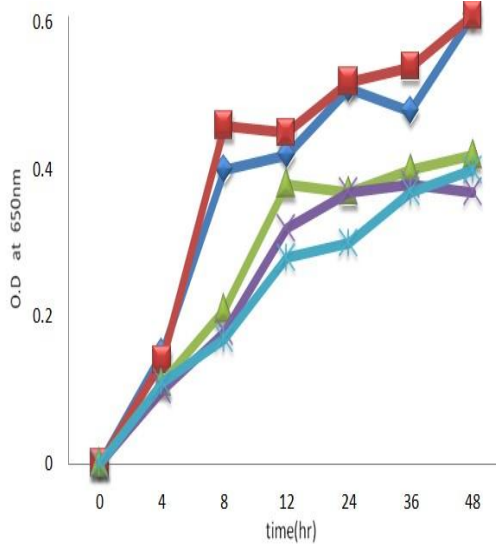
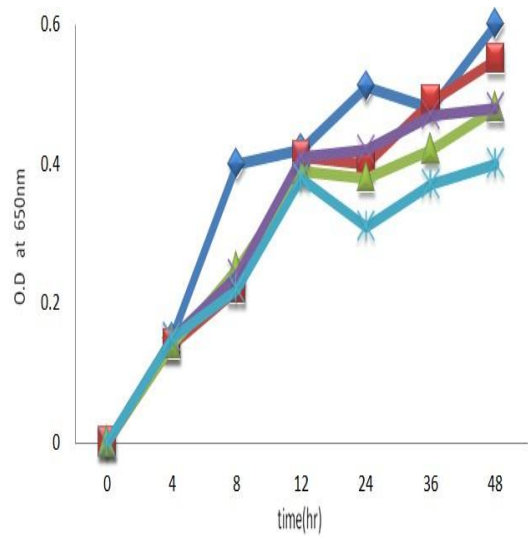


Fig. 5. Growth curves of *S. sobrinus* in the media adding the extract of *Nulumbo nucifera* (◆: 0 ppm, ■: 100 ppm, ▲: 250 ppm, ✕: 500 ppm, \*:1000 ppm)

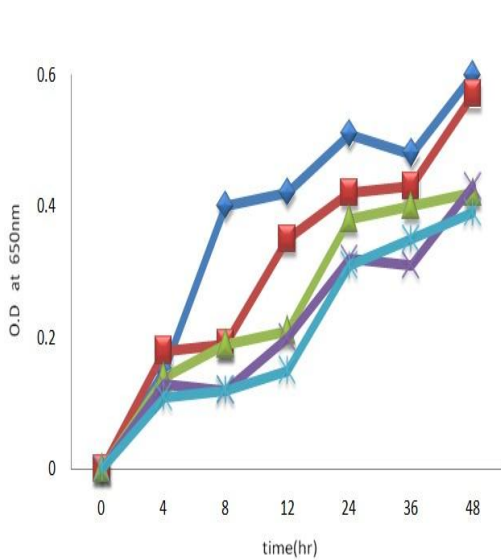
a. Flowers



b. Leaves



c. Seeds



d. Pod

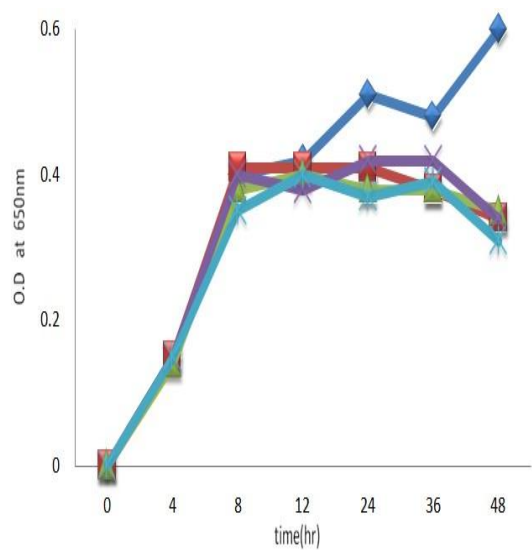
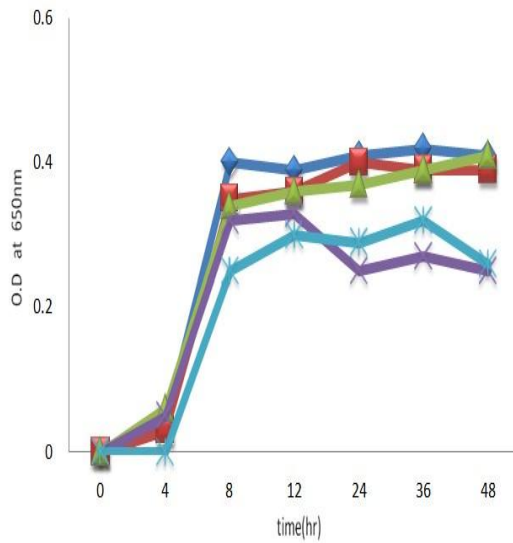
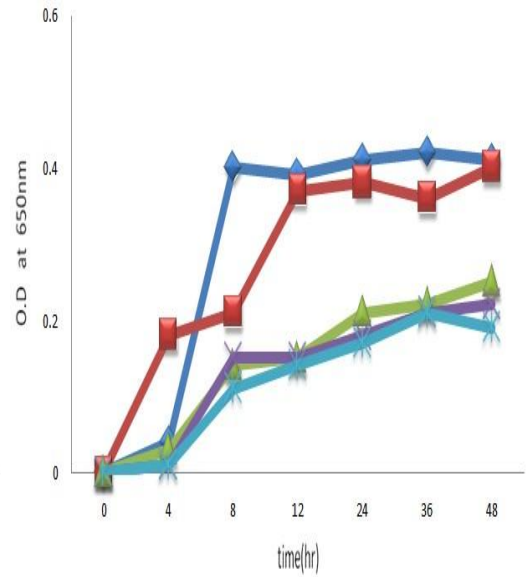


Fig. 6. Growth curves of *S. sobrinus* in the media adding the extract of *Nulumbo nucifera* (◆: 0 ppm, ■: 100 ppm, ▲: 250 ppm, ×: 500 ppm, \*:1000 ppm)

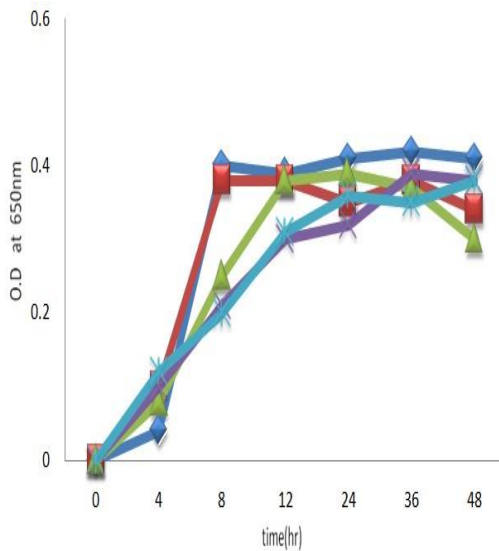
a. Flowers



b. Leaves



c. Seeds



d. Pod

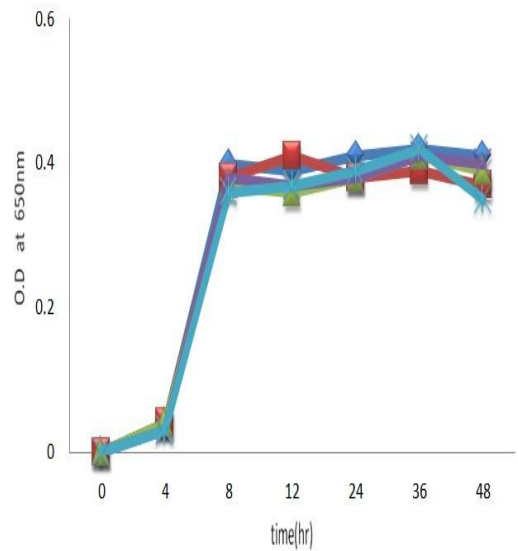
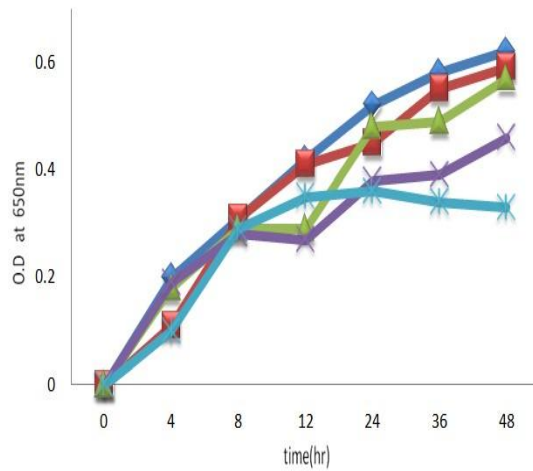
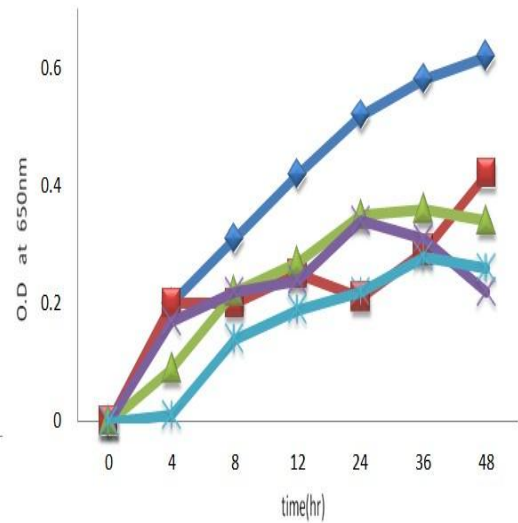


Fig. 7. Growth curves of *F.nucleatum subsp. nucleatum* in the media adding the extract of *Nulumbo nucifera* (◆: 0 ppm, ■ : 100 ppm, ▲: 250 ppm, ×: 500 ppm, \*:1000 ppm)

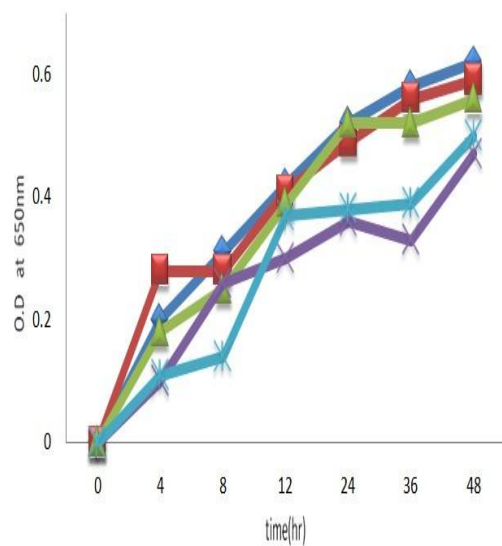
a. Flowers



b. Leaves



c. Seeds



d. Pod

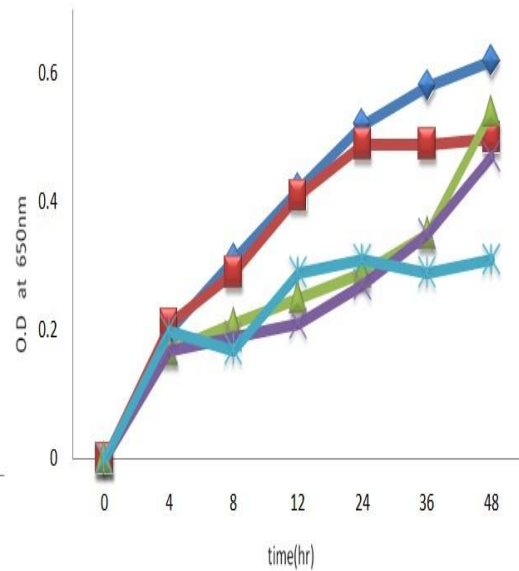


Fig. 8. Growth curves of *A. actinomycetemcomitans* in the media adding the extract of *N. nucifera* (◆: 0 ppm, ■: 100 ppm, ▲: 250 ppm, ×: 500 ppm, \*:1000 ppm)

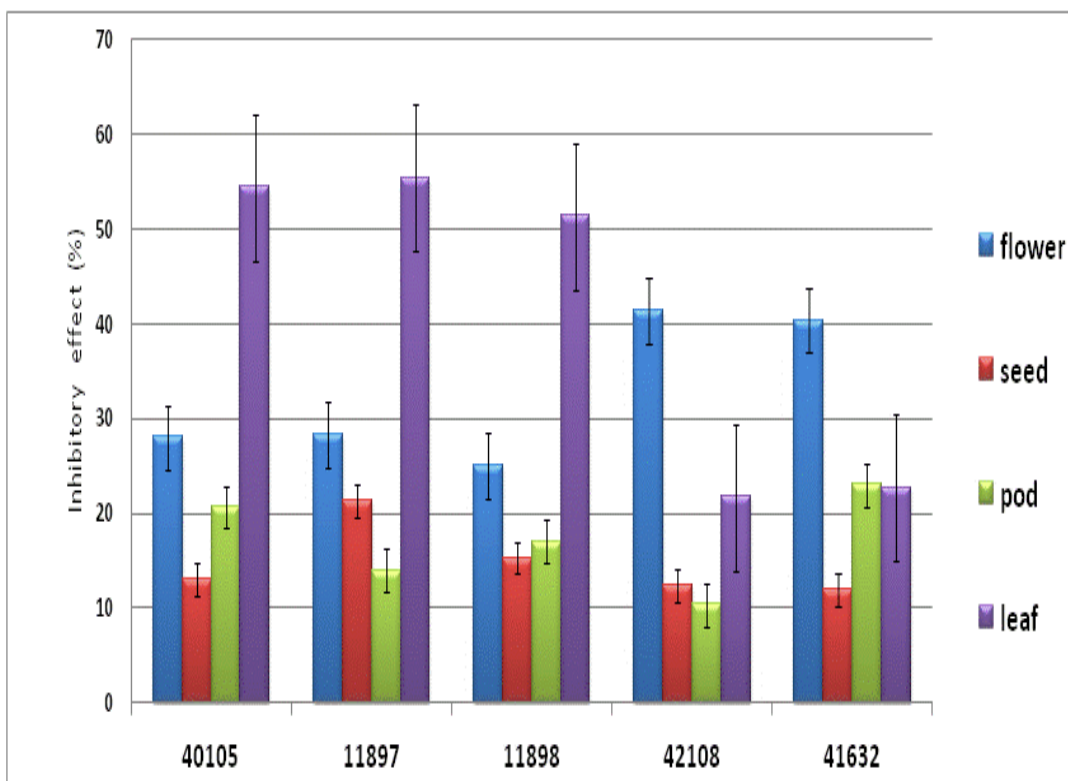
## 4.2 미생물의 생육 저해율 측정

연꽃, 연잎, 연씨, 연밥의 추출물의 농도를 1000 ppm 으로 하여 TSB 배지에 첨가한 후 미생물에 대한 생육저해를 알아보기 위하여 흡광도(Abs 650 nm)를 측정한 후 식에 따라 저해율을 구함으로써 Fig. 9 와 같이 나타내었다. 그 결과 모든 추출물에서 높은 생육 저해 효과를 나타내었고 그 중 연잎의 methanol 추출물은 균주에 대하여 50%이상의 강력한 생육 저해율을 보여 가장 효과가 높게 나타났다. 그 다음으로 연꽃에서는 *F.nucleatum* 과 *A.actinomycetemcomitans* 균주에서 모두 40%이상의 높은 항균활성을 나타내었다. 연씨와 연밥에서도 모든 균주에 대해 생육 저해율을 보였으나 20% 이하의 비교적 낮은 수준이었다(Table 15).

Table 15. Inhibitory effect of *Nulumbo nucifera* against microorganisms for 24 hr at 37°C

Sample	Inhibition effect				
	<i>S.</i> <i>mutans</i>	<i>S.</i> <i>Sobrinus</i>	<i>S.</i> <i>sobrinus</i>	<i>F.</i> <i>nucleatum</i>	<i>A.</i> <i>actinomycescomitans</i>
<b>Flower</b>	28.00±1.33%	28.33±2.88%	25.00±2.67%	41.33±0.45%	40.33±0.89%
<b>Seed</b>	13.00±2.00%	21.33±0.89%	15.33±2.89%	12.33±1.78%	12.00±0.67%
<b>Pod</b>	20.66±0.89%	14.01±2.00%	16.33±2.33%	10.33±0.45%	23.00±2.00%
<b>Leaf</b>	54.33±2.22%	55.34±1.78%	51.33±1.56%	21.67±1.56%	22.67±1.11%

Fig. 9 Inhibitory effect of *Nulumbo nucifera* against microorganisms for 24 hr at 37°C



## 5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

항균제 감수성 검사법으로 MIC 값을 측정하는 것이 가장 정확한 방법으로 알려져 있는데<sup>(43)</sup> 시험관 희석법, 한천 희석법, 미량 희석법(microdilution) 등이 여기에 속한다. 특히 미량 희석법은 소량의 배지와 항균제를 사용하기 때문에 정확성에 문제가 있을 수 있지만, 종래의 감수성 검사법보다 간편하고 경제적이며 신빙성이 있다는 보고<sup>(43-45)</sup>가 많이 나오고 있으며 실제 그 사용 빈도가 점점 증가하는 추세이다<sup>(46, 47)</sup>.

각 추출물에 대하여 broth microdilution 법을 시행하여 균의 최소저해농도를 측정한 결과는 Table 16 과 같았다. 연꽃은 *S. sobrinus* KCCM 11897, KCCM 11898에 대해서 625  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 MIC 값 중 가장 낮은 값을 나타내어 적은 양으로도 항균 활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 연잎 역시 높은 항균활성을 보였는데 *S.mutans*, *F.nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, 세 균주에서 625  $\mu\text{g/ml}$ 의 값을 나타내어 항균 효과가 우수함을 나타내었다. 연씨와 연밥에서는 대부분 2500  $\text{g/ml}$  이상의 농도에서 MIC 값이 나타나 그 항균활성이 낮음을 알 수 있었다.

본 연구에서는 5 종의 세균이 모두 빠른 시간의 생육도를 가지고 있다는 사실과 흡광도의 측정과 균의 발육 기준을 설정하여 MIC 값을 판정함으로써 미량희석법에 의한 오차를 줄이도록 하였다.

Table 16. Minimum inhibitory concentration of the extract of *Nulumbo nucifera* against several microorganisms.

Extract	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	<i>S.</i> <i>mutans</i>	<i>S.</i> <i>Sobrinus</i>	<i>S.</i> <i>sobrinus</i>	<i>F.</i> <i>nucleatum</i>	<i>A.</i> <i>actinomycetemcomitans</i>
Flower	2500	625	625	2500	1250
Seed	– <sup>1)</sup>	2500	2500	–	–
Pod	–	–	2500	1250	1250
Leaf	625	625	1250	625	–

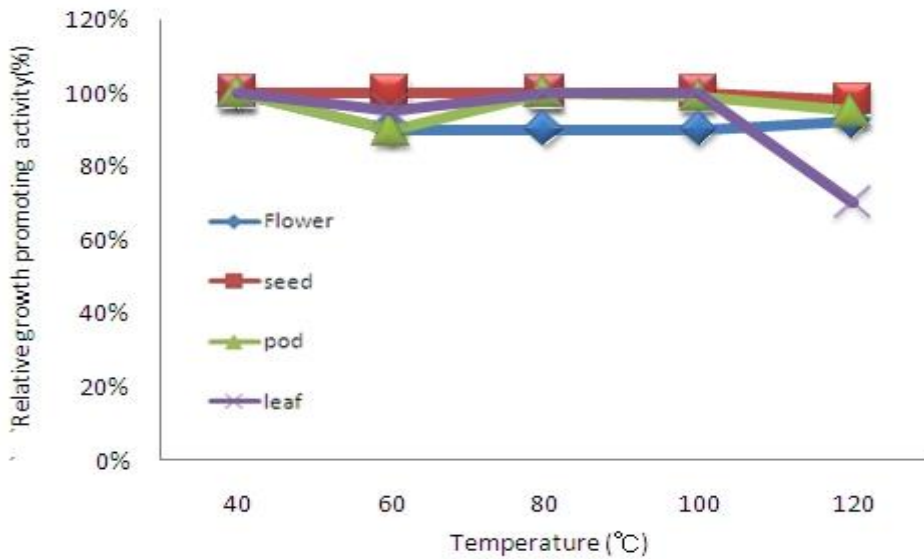
<sup>1)</sup> –: not detected.

## 6. 열 안정성

연의 각 추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 40, 80, 100, 120℃에서 각각 1시간 동안 열처리 한 *S.mutans*, *S.sobrinus* KCCM11897, *S.sobrinus* KCCM11898, *F. nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans*의 균에 대하여 생육정도를 측정한 결과는 Fig. 10~12와 같다. 그 결과 모든 열 처리 균에서 대조군과 차이가 거의 없는 항균 활성을 나타내었다. 120℃이상에서 그 활성이 약간 낮아지는 추출물도 있었으나 미약한 수준이었고 *F. nucleatum*을 제외한 모든 추출물에서 항균활성이 있는 것으로 보아 연 추출물은 열에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다. Baek 등은<sup>(48)</sup> 대나무 줄기 추출물을, Kong 과 Oh는<sup>(49)</sup> 신갈나무 잎 추출물을 121℃에서 15분간 열처리후 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogens* 등 2종의 균에 대한 항균효과를 측정한 결과 열에 안정하다고 보고하였다.

연은 일반적으로 오랫동안 차와 식품으로 이용해와 이미 안정성이 입증된 식재료이며, 식품성 항균물질은 열 안정성이 높은 것으로 여겨져 각종 식품 및 가공품등의 보존제로 직접 이용이 가능하리라 사료된다.

a. *S. mutans*



b. *S. sobrinus*

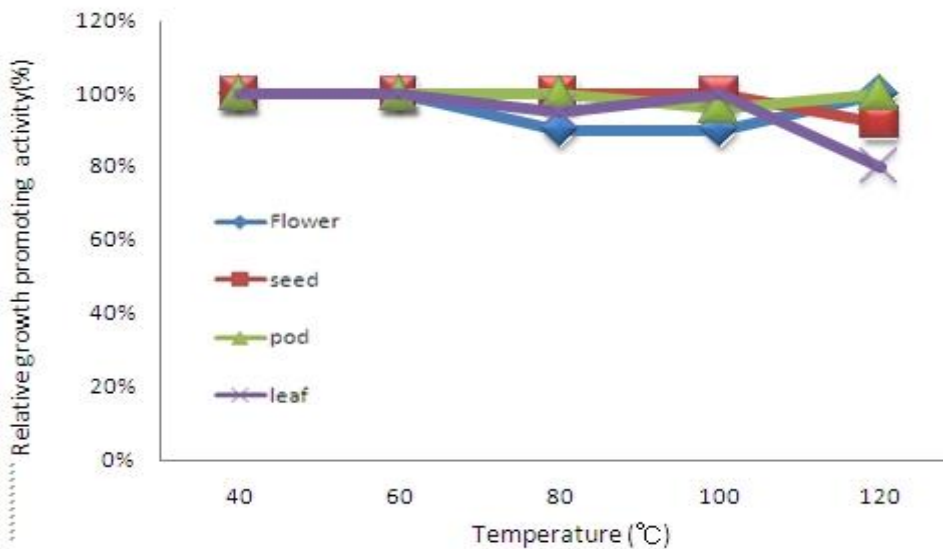
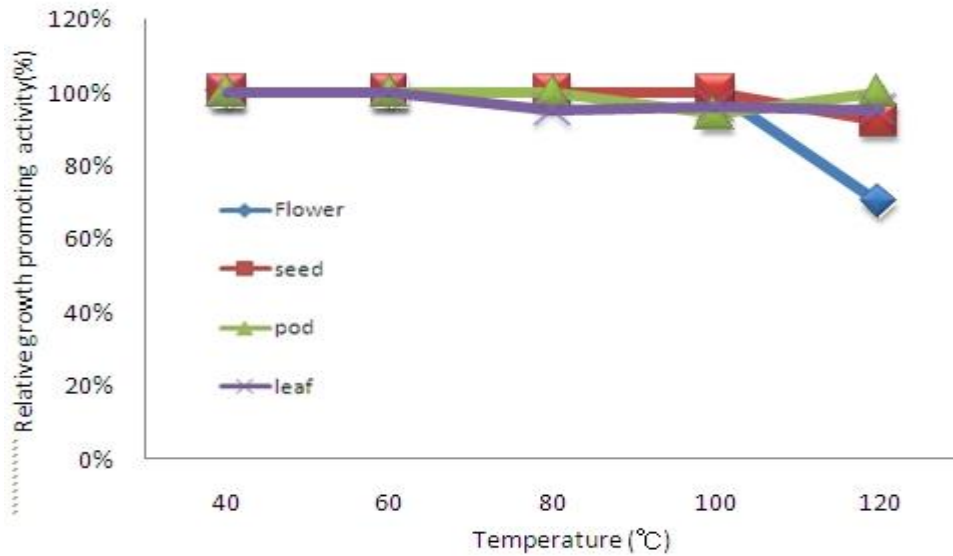


Fig. 10 Relative growth promoting activity of the extract of *Nulumbo nucifera* for *S. mutans* and *S. sobrinus* KCCM11897 at heat treatment

c. *S. sobrinus*



d. *F. nucleatum*

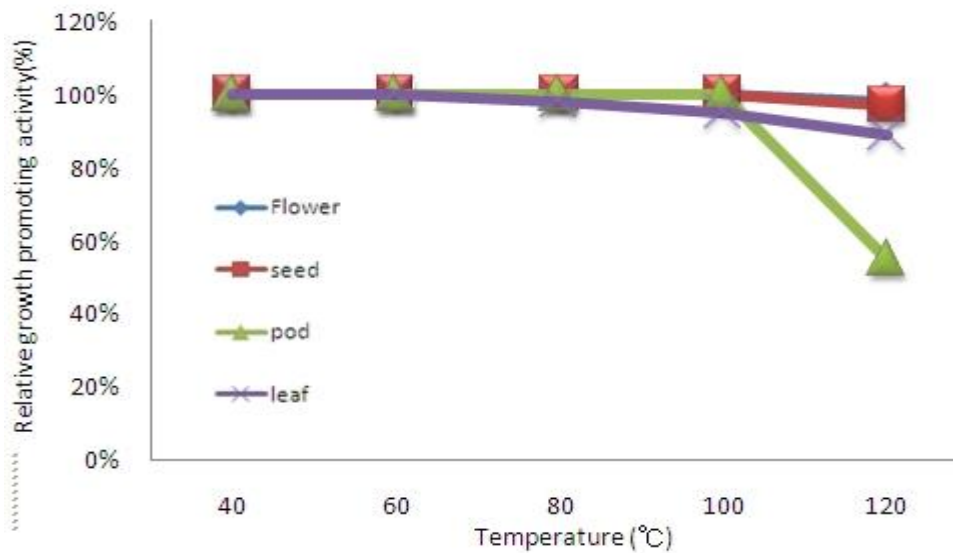


Fig. 11 Relative growth promoting activity of the extract of *Nulumbo nucifera* for *S. sobrinus* KCCM11898 and *F. nucleatum* at heat treatment

e . *A. actinomycetemcomitans*

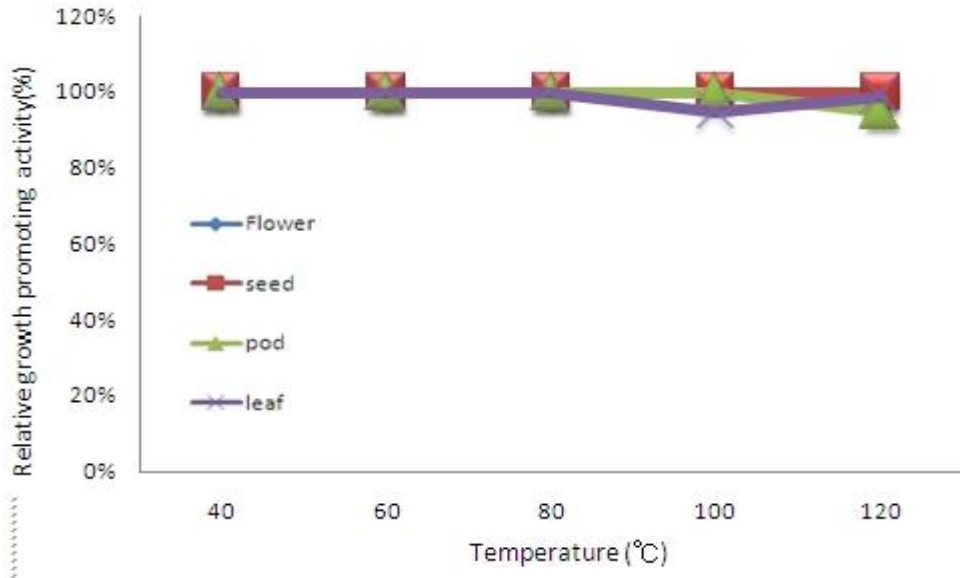


Fig. 12 Relative growth promoting activity of the extract of *Nulumbo nucifera* for *A. actinomycetemcomitans* at heat treatment

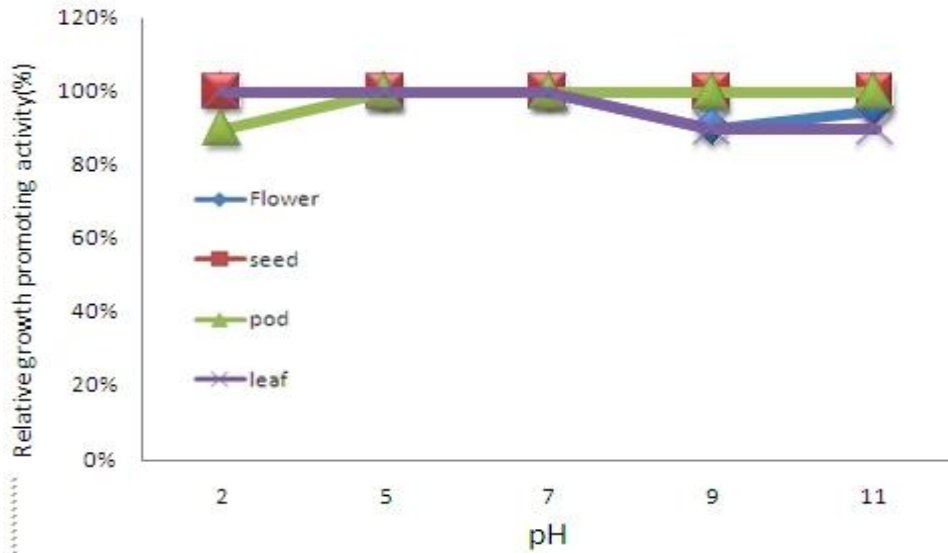
## 7. pH 안정성

연의 각 추출물의 pH변화에 대한 항균 활성을 조사하기 위하여 methanol 추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 pH를 2, 5, 7, 9, 11로 조절하고 1시간 동안 처리하여 *S.mutans*, *S.sobrinus* KCCM11897, *S.sobrinus* KCCM11898, *F. nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans*의 균에 대하여 생육 정도를 측정한 결과는 Fig. 13~15와 같다.

각각의 추출물은 각 pH조건에 대하여 대조군과 비교 시 항균활성에 있어 차이가 나타나지 않아 pH 안정성이 매우 우수함을 알 수 있었다. 한편 *S.sobrinus* KCCM11897, *S.sobrinus* KCCM11898은 산성에 대해서는 안정한 반면 알칼리 쪽으로 갈수록 항균활성이 낮아지는 경향을 나타내었다. 하지만 활성을 완전히 잃지 않고 비교적 높은 양상을 나타내었다.

일반적으로 세균은 pH 6~7부근에서 최적 생육을 나타내므로 pH를 낮게 조절함으로써 세균의 생육을 억제할 수 있다. 신<sup>(50)</sup>의 목본식물의 연구결과와 마찬가지로 연의 추출물, 그 중에서 연씨와 연밥은 넓은 pH spectrum을 보이는 것으로 나타나 기존의 합성 보존제와는 다른 기작을 가지고 있을 뿐 아니라 본래 식품의 맛과 성상 등이 변화하지 않는다는 장점을 지니고 있어 이용도가 넓을 것으로 예상된다. 각각의 부위별로는 연씨, 연밥은 연꽃과 연잎에 비해 열과 pH의 영향을 덜 받음을 알 수 있었다.

a. *S. mutans*



b. *S. sobrinus*

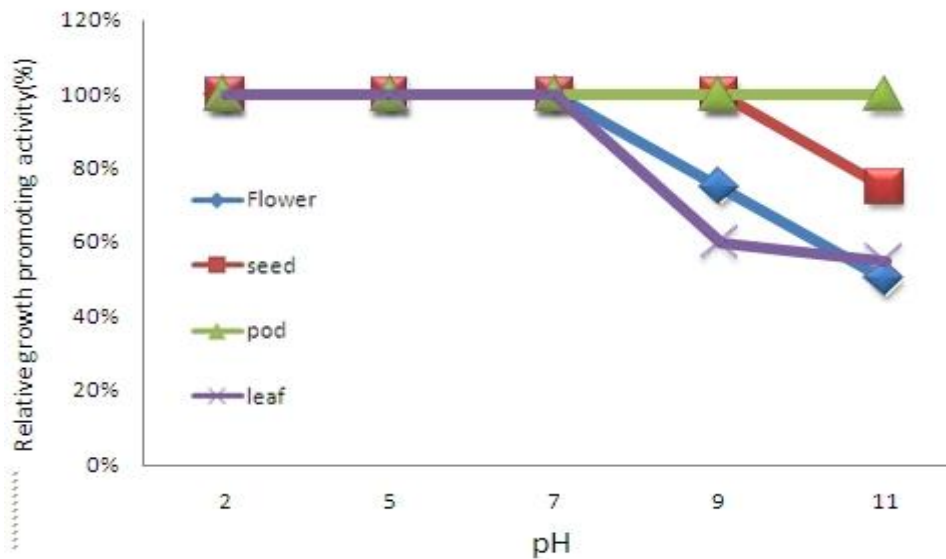
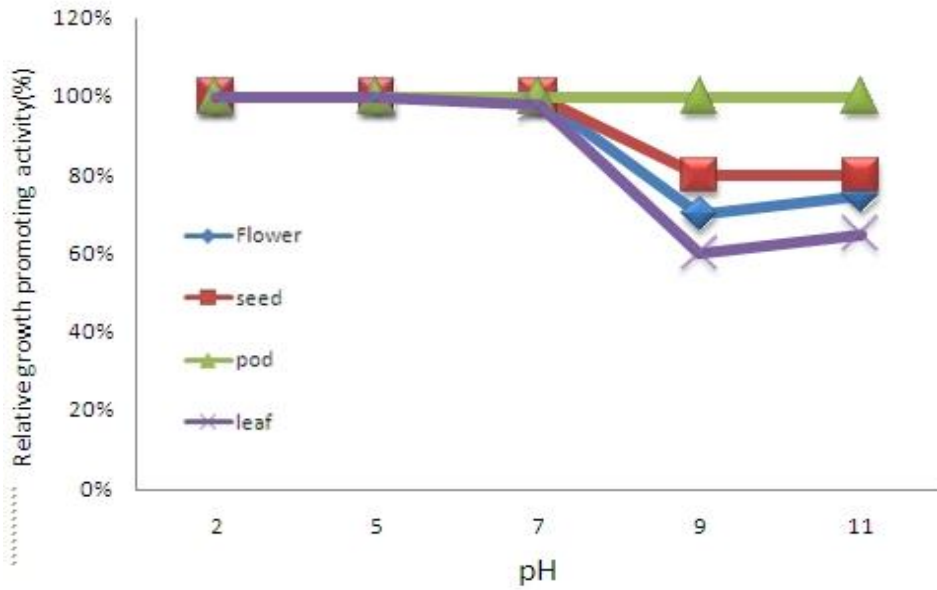


Fig. 13 Relative growth promoting activity of the extract of *Nulumbo nucifera* for *S. mutans* and *S. sobrinus* KCCM11897 at pH treatment

c. *S. sobrinus*



d. *F. nucleatum*

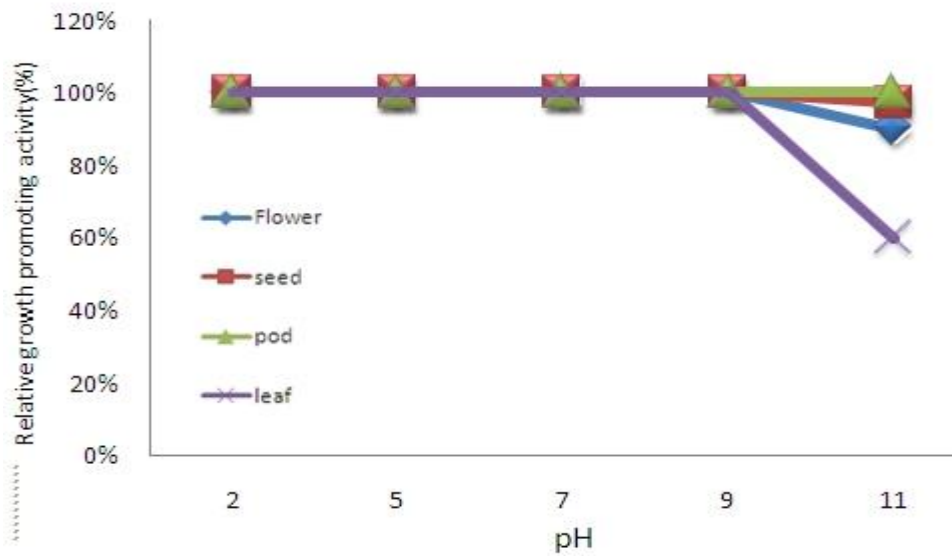


Fig. 14 Relative growth promoting activity of the extract of *Nulumbo nucifera* for *S. sobrinus* KCCM11898 and *F. nucleatum* at pH treatment

e . *A. actinomycetemcomitans*

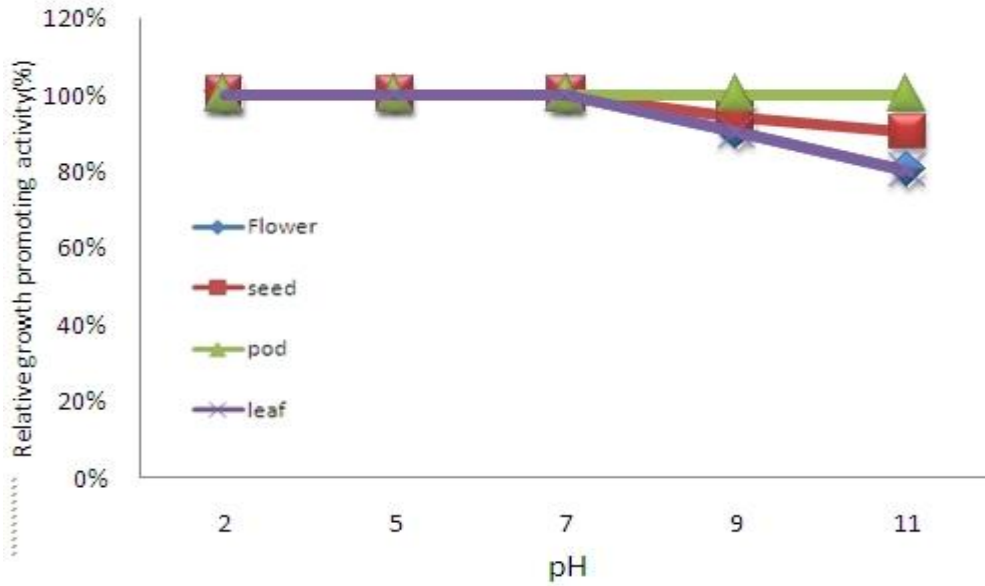


Fig. 15 Relative growth promoting activity of the extract of *Nulumbo nucifera* for *A. actinomycetemcomitans* at pH treatment

## V. 결 론

본 연구에서는 치주질환과 충치 예방을 위한 연의 부위별 항균효과를 탐색하기 위한 목적으로 국내에 자생하는 연 시료를 부위별로 연꽃, 연잎, 연씨, 연밥으로 구분하여 충치, 구취 관련 미생물 5 종 (*S.mutans*, *S.sobrinus* KCCM11897, *S.sobrinus* KCCM11898, *F.nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans*)에 대한 항균활성을 알아보기 위해 paper disc 법으로 극성이 다른 용매별 분획물에 대한 항균효과를 살펴보았다. 또한 각각의 추출물의 농도별 생육저해곡선과 미생물의 생육 저해율을 측정하였다. 최소한으로 저해할 될 수 있는 농도를 구하기 위해 최소저해농도를 구하였고, 항균물질이 열 및 pH 에 안정한지를 살펴 다음과 같은 결과를 얻었다.

6. 연의 각 부위중 연꽃이 가장 수율이 높았는데 연잎의 methanol 추출물 수율은 21% 였다. 추출물의 용매별 수율은 chloroform 분획물은 4.2%, ethyl acetate 분획물은 8.2%, water 분획물은 19%내외로 비교적 높은 수율을 나타내었다.

7. 추출물의 실험조건을 결정하기 위하여 methanol 의 농도를 달리하고 추출시간을 달리하여 실험한 결과 연꽃과 연잎은 50%의 농도로, 연씨와 연밥은 70%의 농도로 하였을 때 실험결과가 가장 우수하였다.

또한 추출시간의 경우 6 시간과 12 시간에서 추출한 물질의 항균효과가 가장 컸고 시간이 지남에 따라 약간 감소하는 경향을 보였다. 이에 따라 연의 항균물질은 12 시간 이내에 모두 추출이 이루어지는 것으로 사료된다.

8. 용매별 chloroform, ethylacetate 및 water 분획물로 항균효과를 살펴보았을 때 3 종의 용매 분획중 ethylacetate 분획 추출물이 5 종의 실험 균주에 대하여 다른 분획물에 비해 clear zone 이 비교적 넓어 높은 항균효과를 나타내었으며 특히 *S.mutans* 의 생육을 강력하게 억제했다.
9. 연의 부위별 추출물을 이용하여 균의 생육도를 균주별로 조사한 결과 *S.mutans* 에서는 모든 추출물에서 강력하게 생육저해를 확인할 수 있었다. 또한 *S.sobrinus* KCCM11897 에서는 연꽃과 연씨 추출물에서 확실한 생육저해를 확인할 수 있었다. 또 *S.sobrinus* KCCM11898 에서는 연씨 추출물에서 가장 항균효과가 우수함을 할 수 있었다. *F.nucleatum* 에서는 연잎 추출물이 가장 생육저해효과가 좋았고 *A.actinomycetemcomitans* 에서도 연잎 추출물이 가장 효과가 좋음을 알 수 있었다. 각각의 균주 별로 가장 우수했던 연의 부위가 다르게 나타난 점을 미루어 보았을 때 항균효과의 선택적 이용이 가능할 것으로 생각된다.

10. 생육저해율을 확인한 결과 연잎 추출물은 *S.mutans* 와 *S.sobrinus* KCCM 11897 균주에 대하여 50%이상의 강력한 생육 저해율을 보여 가장 효과가 높게 나타났고 그 다음으로 연꽃에서는 *F.nucleatum* 와 *A.actinomycetemcomitans* 에서 모두 40%이상의 저해율을 나타내었다.

9. Broth microdilution 법을 시행하여 균의 최소저해 농도(MIC)를 측정한 결과는 연꽃 추출물이 *S.sobrinus* KCCM11897, KCCM11898 에 대해 625 µg/ml 의 농도로 MIC 값 중 가장 낮은 값을 나타냈고, 연잎 역시 *S.mutans* 와 *S.sobrinus* KCCM11897 에서 625 µg/ml 의 값을 나타내어 적은 양으로도 항균활성을 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

10. 연의 부위별 추출물을 1 mg/disc 로 하여 40, 80, 100, 120°C에서 각각 1 시간 동안 열처리 한 후 균주 별로 생육정도를 측정한 결과 모든 처리구에서 대조구와 차이가 크지 않은 항균 활성을 보였는데 특히 120°C 의 처리에서도 methanol 추출물에서 항균활성이 있는 것으로 나타나 열에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다.

11. 연의 pH 변화에 대한 항균력을 조사하기 위해 각각의 추출물을 1 mg/disc 로 하여 pH 를 2, 5, 7, 9, 11 로 조절한 후 각각의 균주의

생육 정도를 조사한 결과 *S.mutans*, *S.sobrinus* KCCM11897, KCCM11898 는 각각의 pH 조건에 대하여 대조군과 비교 시 큰 차이가 나타나지 않았다. 하지만 구취유발 균주인 *F.nucleatum* 과 *A.actinomycetemcomitans* 는 산성에 대해서는 안정한 반면 알칼리 쪽으로 갈수록 항균활성이 낮아짐을 알 수 있었다.

연은 강한 항균작용과 해독작용을 가진 물질로 다양한 질환에 이용되어져 왔고 구강 질환에 예방 효과가 있다는 문헌이 있으나 과학적 입증이 미비하였다. 이에 따라 구강 질환을 유발하는 균주를 이용하여 여러 가지 방법으로 항균 효과를 살펴보았을 때 연의 부위에 따라 항균성이 각기 다르게 나타났고, 이것은 즉 연의 부위별로 각기 다른 구강위생균에 선택적 이용이 가능함을 보여주었다. 이 논문의 결과를 바탕으로 연에 함유된 충치균과 구취균을 억제시켜 주는 성분에 대해 밝혀내고, 그 기능성 성분을 통해 다양한 구강 위생물질에 이용이 가능하리라 사료된다.

## References

- (1) 김영권, 한만덕 : 구강미생물학, 고문사, pp261- 283 (1998)
- (2) 최연희 : 구강상태와 전신 건강과의 관련성. 연세대학교 박사학위논문(2001)
- (3) Nam S.H, Seo W.T, Chio S.D: Inhibition Effect by *Juniperus rigida* S. et Z. on Organic Acids Production from *Streptococcus mutans*, 41(5):395- 398 (1998)
- (4) Barira Islam, Shahper N.Khan, Asad U.Khan. Dental caries: From infection to prevention, 13(11):196-203 (2007)
- (5) 박광균 : Oral Biochemistry . 군자출판사, pp487- 509 (1999)
- (6) 김소영 : *Bacillus licheniformis* YS- 1005 가 생산하는 치아우식증 원인균 의 세포벽 용해 효소에 관한 연구. 연세대학교 석사학위논문 (1996)
- (7) 박기철 : 불소와 충치(Dental Caries and Fluorine). 최신의학사, pp28- 31 (1968)
- (8) 조영수, 정상호, 김광수 : 정수장 관리자를 위한 수돗물불소화사업기술, 건치신서 3 권 (1995)
- (9) Assev S, Stig S, Scheie AAa. Cariogenic traits in xylitol-resistant and xylitolsensitive mutans streptococci. Oral Microbiol Immunol 17: 95- 99 (2002)
- (10) Borsh T, Barthlott W. Classification and distribution of the genus *Nelumbo adans*(*Nelumbonaccae*). Beitr Biol Pflazen 68: 421-450 (1994)
- (11) Dalgren R. Rasmussen FN. Monov:otyledon evolution characters and phylogenetic estimation. J Evol Biol 16:255-265

- (12) Min Hu, Leif Skibsted, Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus, *Food Chemistry*, 76(3):327–328 (2002)
- (13) Yuk C.S, Coloured medicinal plants of Korea. Academy book Co, Seoul Korea. pp 219–230 (1990)
- (14) Kim YS, Jeon SS, Jeong ST. Effect of lotus root powder on the baking quality of white bread, *Korean J Food Cookery Sci.* 18(4):413–425 (2002)
- (15) Tuka Ono, Eri Hattori, Yukitaka Fukaya, Shoji Imai Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats, *J of Ethno*, 106(2):238–244 (2006)
- (16) Bhat R, Sridhar KR, Nutrition quality evaluation of electron beam-irradiated lotus(*Nelumbo nucifera*) seeds, *Food chem.* 105:322–327 (2008)
- (17) Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Pada Saha B, Mukherjee P.K: Antioxidants activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *Journal of Ethnopharmacology* 104(3):322–327 (2006)
- (18) Chiang P.Y and Luo Y.Y. Effects of pressurized cooking on the relationship between the chemical composition and texture changes of lotus root(*Nelumbo nucifera*). *Food Chemistry* 105(2): 480–484 (2007)
- (19) Lee K.S and Kim M.G Antioxidative activity of ethanol extract from lotus leaf. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 35 (2006)
- (20) Lee K.S, Oh C.S, Lee K.Y, Antimicrobial Effect of the Fractions extracted from Lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *Korean J soc Food Sci Nutr* 35(2).219–223 (2006)

- (21) Ko B.S, Jun D.W, Jang J.S, Effect of Sasa Borealis and white lotus roots and leaves on insulin action and secretion *in vitro*. Korean J food Sci Techno 38:114-120 (2006)
- (22) Shin M.K, Han S.H, Effects Lotus leaf powder on lipid concentrations in rat fed high fat diet rats, Korean J Food Culture 21(2):202-208 (2006)
- (23) 操絃經, 東醫寶鑑, 여강출판사 (2005)
- (24) 왕만, 연꽃의 세계, 김영사 (2007)
- (25) 이창목, 대한식물도감, 향문사 (1980)
- (26) 권혁세, 익생양술 vol.0.6, 민방연구소 (2002)
- (27) Amsterdam, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, 52-111.50 (1996)
- (28) Lee K.S, Kim M.G, Lee K.Y Antimicrobial effect of the extracts of cactus Chounnyouncho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. J. Korean Soc Food Sci Nutr, 33:1268-1272 (2004)
- (29) Park S.J, Oh D.H Free radical scavenging effect of seed and skin extracts of black olympia grape(*Vitis labruscana* L.) Korean J food Sci Technol ,35(1):121-124 (2003)
- (30) Lee H.K, Kim J.S, Kim N.Y, Kim M.J, Park S.U, Yu C.Y, Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from cisium japonicum var. ussuriense KITAMURA. Korean J Medicinak Crop Sci, 11(1):53-61(2003)
- (31) Hur S.S, Bae D.H, Kim S.U Properties of Chopi Oleoresin Extracted with Various Solvents and Effects of Extraction Conditions on Volatile Components, J. Korean Soc Food Sci Nutr, 27(3):406-412 (1998)

- (32) Park U.Y, Chang D.S, Cho H.R, Screening of antimicrobial activity for medicine herb extracts. J. Korean Soc. Food Nutr., 21:91–96 (1992)
- (33) Cho KY, Studies on extration conditions of SSANH WHA tea, J. Korean Soc. Food Nutr, 18:34–39 (1989)
- (34) Oh SL, Kim SS, Min BY, Chung DH, Composition of free sugar, free aminoic acid non–volatile organic acid and tannins in extracts of *L. chinesis M.*, *A. acutloba K.*, *Schizandra Chinesis B.*, and *A. sessilflorum S.* J. Korean Soc. Food Nutr 22:76–81(1993)
- (35) Jeon Y.O, Kim K.H, Kim S.I, Han Y.S, Screening of antimicrobial activity of the plantain extract, Korean Soc. Food Sci, 14(5):498–502 (1998)
- (36) Kim OM, Ha DJ, Jeong YJ, Antibacterial activity of vinegars on *Streptococcus mutans* caused dental caries, Korean J food Preserv 10:565–569 (2003)
- (37) Lee K.S, Oh C.S, Lee K.Y, Antioxidative Activity of Ethanol Extract from Lotus (*Nelumbo nucifera*) Leaf. J Korea soc Food Sci Nutr. 35(2).219–223 (2006)
- (38) Tabak M. Armom R., Potasman I. and Neeman I., In vitro inhibition of Helicobacter pylori by extracts of thyme, J. Appl. Bacteriol., 80:667–672 (1996)
- (39) 이정준, 김성훈, 장병식, 이중복, 허철성, 김태중, 백영진, 약용식물 추출물의 Helicobacter pylori 에 대한 항균활성, Korean J. Food Sci. Technol., 31(3), 764–770 (1999)
- (40) Baek J.W, Chung S.H, Moon GS. Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culms and leaves. Korean J Food Sci Technol 6:1073–1078 (2002)

- (41) Nakamura S, Kato Am, Kobatashi K. New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate J Agric Food chem 39(1):647-650 (1991)
- (42) Chitwood LA, Tube dilution antimicrobial susceptibility testing : Efficacy of a microtechnique applicable to diagnostic laboratories, Appl. Microbiol. 17:707 (1969)
- (43) Jone RN, Barry AL, Bigelow J, Gavan TL and Thornsberry C, Evaluation of the MICUR system for quantitative antimicrobial susceptibility testing : A multi phasic comparison with reference methods, J. Clin., Microbiol., 16:153 (1982)
- (44) Barry AL and Badal RE, Reliability of the micro dilution technique for detection of methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus, Am. J. Clin Pathol. 67:489 (1977)
- (45) Boyce JM, Lytle LS and Walsh DAm Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by microdilution and elution susceptibility systems, J. Clin Micobiol, 20, 1068 (1984)
- (46) Sutter VI, Emerman J, Randall E, Zabrandky RJ and Birk RJ, Establishment of MICs of moxalactam for control and reference anaerobic organi 는 in agar dilution and microdilution technique, Antimicrob. Agents Chemother. 27:42-43 (1985)
- (47) Gavan TL, Jones RN and Barry AL, Evaluation of the sensititre system for quantitative antimicrobial drug susceptibility ttesting, A collaborative study, Antimicrob. Agents Chemother. 17: 464 (1980)
- (48) Bhat R and Sridhar K.R. Nutritional quality evaluation of election beam-irradiated lotus(Nelumbo nucifera) seeds. Food Chemistry 107:174-183 (2008)

- (49) Kong Y.J, Oh DW. Effect of ethanol extract of *Quercus mongolica* leaf as natural food preservative. *Korean J soc Food Sci Nutr* 30:243–249 (2001)
- (50) 신김, 목본식물로부터 추출된 항균물질의 구조 및 특성, 박사학위논문, 산림자원학과, 고려대학교 (1998)
- (51) Harris NO, Garcia Godoy F. Primary Preventive dentistry. 6th ed. New Jersey: Prentice Hall, 6:13 (2004)
- (52) Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 50(4):353–385 (1986)
- (53) Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50(4):353–380 (1986)
- (54) Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* ,49(2):203–222 (1970)
- (55) Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microrbial challenge in periodontitis. *Periodontol* ,14:12–32 (2000)
- (56) Tonzetich J. Production and origin of oral malodor:a review of mechanisms and methods of analysis. *J periodontol* 48(1):13–20 (1997)

# Abstract

Anti oralmicrobial activity of the extracted from parts of Lotus

(*Nelumbo nucifera*)

Lee, Eun Soo

Department of Food and Nutrition

Graduate school

Sungshin Women's University

To prevent of periodontal disease and tooth decay to explore the antimicrobial substances, the substances from methanol extract of *Nulembo nucifera* which grows naturally in Korea were distinguished by part . ( Flower , Leaf , Seed , Pod )

Antimicrobial effect against five microorganisms (*S.mutans*, *S. sobrinus* KCCM11897 *S.sobrinus* KCCM11898, *F.nucleatum* , *A.actinomycetemcomitans*) were measured by paper disc method and the

growth inhibition rate. Then Minimum inhibitory concentration (MIC) was used to know the antimicrobial action of extract and then antimicrobial activity was looked at these temperatures whether how stable the following results were obtained. The results were obtained as follows :

1) Lotus flower showed the highest yield : MeOH 21% and chloroform fraction is 4.2%, ethylacetate fraction is 8.2%, water fraction is 19%.

2) Lotus flower and leaf the methanol concentration to 50% were the most anti-microbial. However, seed and pod with a methanol concentration of 70% was the most effective results. Also, In the extraction of 6 hours and 12 hours were superior antimicrobial activity. And then antimicrobial activity was reduced as time goes on. Accordingly, antimicrobial activity takes place all the extraction within 12 hours.

3) When examined about antimicrobial activity of methanol extract (MEex), chloroform fraction (Chfr), ethylacetate fraction (EAfr), and water fraction (WAfr) using paper disc method, EAfr showed an anti oral microbial effect against all test microorganisms.

4) Lotus flower and seed extract showed strong inhibition against *S.sobrinus* KCCM 11897, also *S.sobrinus* KCCM 11898 was inhibited by seed extract. *F.nucleatum* was strongly inhibited by leaf extract and this was the most effective against *A. actinomycetemcomitans*.

5) Inhibition rate of Lotus leaf was 50% against *S.mutans* and *S.sobrinus*. In both *F.nucleatum* and *A.actinomycetemcomitans* lotus flower 40% inhibition was observed.

6) MICs of microorganisms from extract by broth microdilution method lead as follows. Flower extracts against *S.sobrinus* had concentration of

625 µg/ml, and leaf extracts also had concentrations of 625 µg/ml as a test showed the lowest MICs value.

7) After heat treatment of extracts at 40, 80, 100 and 120 °C for an hour growth rate of oral microorganism was checked. All extracts with heat at 120 °C had antimicrobial activity, which means that is a very stable substances.

8) In result of growth of *S.mutans* and *S.sobinus* in the medium adding extracts treated various pH conditions (2, 5, 7, 9, 11) there was no difference of antimicrobial activity. So its stability on pH was high quality. While *F.nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* was stable against acid it had a trend that the more alkali side was the lower activity.

In the past, lotus with a strong antibiotic and detoxifying substances have been used in a variety of diseases. The effect of lotus to prevent oral disease but was insufficient to prove scientifically. By oral bacteria

that cause oral disease in many ways a look at the antimicrobial activity, the effects appears differently for each parts by lotus. This means that lotus different parts showed that the optional available. Based on the results of this study, after finding substance to inhibit microbacteria if applied to another oral bacteria, lotus will be available in a variety as a oral hygiene