

항충치효과를 가진 식물 소재 탐색

최인욱* · 정창화 · 박용곤
한국식품개발연구원

Anticariogenic Activities of Various Plant Extracts

In-Wook Choi*, Chang-Hwa Jung and Yong-Kon Park
Korea Food Research Institute

As an effort to select powerful anti-cariogenic materials from natural resources, various plant extracts were examined for their anti-*S. mutans* and anti-glucosyltransferase (GTase) activities. The ethanol extracts of licorice bark, which was produced after water extraction of licorice, showed the most powerful anti-*S. mutans* as well as anti-GTase activities. When licorice bark was consecutively fractionated with n-hexane, chloroform, ethylacetate, and butanol, the chloroform fraction exhibited the strongest anti-*S. mutans* activities. This fraction was further fractionated into 4 fractions through a silica gel column, and according to HPLC analysis, anti-*S. mutant* activities seemed to come mostly from relatively hydrophobic materials.

Key words: anti-cariogenic, anti-*S. mutans*, anti-GTase, licorice

서 론

충치(dental caries, 치아우식증)는 치아, mutans 연쇄상구균, 탄수화물의 3가지 조건이 충족될 때 발생하며 초기 치아우식증과 관련되는 미생물에는 *Streptococcus mutans*와 *S. sobritus*의 2종이 각각 80%와 20% 수준으로 분리된다⁽¹⁾. 이들은 효율적인 에너지원인 sucrose를 기질로 해서 glucan과 fructan을 생성하며 이들을 합성하는 효소는 각각 glucosyltransferase(GTase)와 fructosyltransferase(FTase)로 이들 효소의 반응에 의해 불용성인 glucan이 치아의 표면에 부착되며 이렇게 형성된 미생물의 부착집단을 plaque라 한다⁽²⁻⁴⁾. 부착된 glucan에 충치균 등의 혐기성 세균에 의해서 유기산을 생성하며 이들은 치아의 에나멜질의 화학성분인 hydroxyapatite를 분해시켜 충치를 유발하게 된다^(5,6).

최근에는 구강내에서 효과적인 항충치작용을 가진 소재를 발굴하기 위해서 1) mutans균의 증식을 저해하는 작용^(7,8), 2) sucrose로부터 glucan 형성에 관여하는 GTase 활성저해 작용^(9,10), 3) mutans균이 이용하지 못하는 sucrose 대체 감미료 사용^(11,12) 등 천연물질로부터 항충치 물질을 분리하고자 하는 연구가 시도되어 왔으나 이들의 연구 결과는 대부분

폴리페놀 성분에 한정되어 졌다.

본 연구에서는 충치 예방 및 진행중단의 방법으로부터 지금까지 보고되어 있거나 민간에서 효과가 있다고 여겨지는 천연물로부터 치아우식증의 원인이 되는 *S. mutans*의 생장 및 GTase 활성 등의 억제에 대한 효과를 지닌 소재의 발굴을 통해 항충치 효과를 지닌 성분을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

항충치소재 선정을 위해 본 연구에서 사용된 시료는 상업용 식품첨가물인 녹차 polyphenol No. 201와 polyphenol CBFK(foodmate, Korea), 미숙사과 polyphenol(Applephenon, Japan), 키토산(한국키토산연구원)과 우롱차(Oolong tea), 황련(Coptidis rhizoma), 감잎(persimmon leaf), 뽕은감(Persimmon), 오배자(Nutgall), 육두구(Nutmeg), 미숙사과(Unripe apple polyphenol), 둥글레(*Polygonatum odoratum* Ohwi), 계피(Cassia cortex), 쑥(Artemisia) 및 감초(Licorice) 등을 사용하였다. 한약재는 경동시장에서 구입하였으며 10°C에서 보관하였다.

추출물의 제조

녹차 polyphenol, 미숙사과 polyphenol 분말은 물에 용해시켜 사용하였고, 우롱차, 황련, 감잎, 뽕은감, 오배자, 미숙사과, 육두구 및 계피는 90°C에서 1시간동안 열수추출 또는 75% 에탄올로 85°C에서 1시간동안 추출한 뒤 동결건조를 하

*Corresponding author : In-Wook Choi, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyon-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do, 463-420, Korea
Tel: 82-31-780-9097
Fax: 82-31-780-9234
E-mail: choiw@kfri.re.kr

였으며, 감초인 경우는 열수추출 후 얻어진 잔사에 75% ethanol로 추출한 시료를 사용하였다.

실험균주

Streptococcus mutans(KFRI 1171, 1172, 1175)을 brain heart infusion(BHI) broth에 접종하여 37°C shaking incubator에서 3회 계대 배양함으로써 활성을 회복시키고, 활성이 회복된 균주를 한천평판배지에 분주하여 37°C에서 24시간 혐기 배양하여 사용하였다.

항충치 효과 검증

Paper disc 법: 전 배양된 충치균을 10^6 CFU/mL로 희석한 후 각각 0.1 mL씩 test tube에 넣고 45°C로 유지되어 있는 top agar 2.5 mL를 가하여 잘 혼합한 후 BHI agar 위에 붓는다. 표면이 굳으면 paper disc(직경 8 mm)를 놓아 시료 추출물을 50 μ L씩 흡수시키고 37°C의 incubator에서 24시간 배양한 후 clear zone의 지름을 측정, 비교하였다.

Plate count법: 배양균주 0.1 mL와 시료 0.1 mL를 test tube에 넣고, top agar 2.5 mL를 가하여 BHI agar에 부어 굳힌 후 37°C incubator에서 24시간 배양한 후 colony 수를 측정하였다.

GTase 활성 억제 효과 시험

각 시료의 GTase에 의한 glucan의 합성을 저해하는 정도를 비교하기 위하여 Miyoshi 등⁽¹³⁾의 방법에 따라 충치균 배양액을 4°C에서 8,000 rpm, 5분간 원심분리시킨 후 그 상등액을 취하여 toyo filter paper No. 101로 여과하고, 그 여액을 1 N NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하고 다음 sodium azide 0.02% 첨가하여 제조한 GTase 조효소액에 1% sucrose와 시료를 농도별로 첨가하고 37°C, 24시간 반응시킨 후 표면에 부착된 glucan을 sonicator를 이용하여 최대한 현탁한 후 660 nm에서 탁도를 측정하여 sucrose 무첨가군과 비교한 상대치로 glucan 생성 억제 정도를 측정하였다.

항충치균 활성 분획 분리

항충치 효과가 뛰어난 75% 에탄올로 추출된 감초추출물을 n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol로 극성 차이에 따라 순차 분획하였다. 각 분획의 항균력을 paper disc법으로 측정하였다.

Silica gel adsorption chromatography

가장 활성이 뛰어난 chloroform 분획물을 silica gel 60G가

Table 1. HPLC condition for analyzing chloroform fractions of licorice bark eluted from silica gel column

	Pump: JASCO PU-980
Instrument	Detector: JASCO UV-975 (254 nm) Integrator: JASCO 807-IT
Column	YMC-pack ODS-AM (250×4.6 mm ID) Mobile phase = H ₂ O (A): Acetonitrile (B)
Condition	Program: A 40%-A 40%-A 20%-A 0% 5' 25' 35'

충진된 column(2×20 cm)에서 분리하였다. 용매는 chloroform과 메탄올 혼합용매를 이용하여 메탄올 농도를 0%에서 100%로 단계적으로 증가시키는 용출 방법으로 분획하였다.

HPLC에 의한 분석

Silica gel column으로 부터 분리된 4개 분획의 구성물질에 대한 정보를 얻기 위하여 HPLC를 이용하였으며 이때의 분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

결과 및 고찰

항충치균 소재의 탐색

대표적인 충치 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대하여 항균효과가 있는 소재를 선정하기 위하여 각 추출물의 충치균에 대한 생육 저해효과를 plate count법을 통하여 1차 선별을 하였다(Table 2). 전반적으로 열수추출물 보다 75% 에탄올 추출물에서 좀 더 높은 효과를 보였다. 항충치 효과가 있다고 보고된 육두구, 계피⁽⁸⁾와 녹차 추출분말⁽¹⁴⁾은 상대적으로 약한 효과를 나타내었으며, 미숙사과, 감잎, 황련, 우롱차 에탄올 추출물이 효과가 뛰어났다. 특히 감초(Licorice)를 열수추출하고 남은 잔사를 75% 에탄올로 추출하여 얻어진 감초추출물에서 가장 높은 항균력을 나타내었으며 이러한 결과는 감초 잔사 추출물을 이용한 새로운 항충치균 소재의 개발의 가능성을 보여주고 있다.

GTase 활성억제 소재 탐색

*S. mutans*균이 생성하는 GTase가 sucrose로부터 점착성이고 불용성인 glucan을 합성하므로 21시간 배양된 *S. mutans*균에서 조효소액을 분리하여 각 추출물이 GTase 활성에 미치는 영향에 대하여 조사하였다(Table 3). 대부분의 시료들에서 어느 정도 GTase의 활성을 저해하는 것으로 나타났으며 녹차인 경우는 항충치 효과는 약했지만 상대적으로 GTase 저해능은 우수하였다. 특히 감초인 경우는 감초박(Licorice bark) 에탄올추출물의 첨가가 GTase 활성을 강력하게 저해하여 불용성 glucan의 형성을 억제하였다.

감초박 추출물의 추출용매별 항충치 억제작용

항충치효과와 GTase 활성 억제가 가장 뛰어난 감초를 이용하여 항충치 기능을 가진 성분을 분리하기 위하여 열수추출물과 추출 후 남은 잔사에 100, 75, 50% ethanol, chloroform, hexane으로 추출한 추출물의 충치균에 대한(*S. mutans* KFRI 1171) 생육 억제 효과를 측정하고, 감초 열수추출물은 항충치 효과가 없었으며 감초박 n-hexane 추출물인 경우도 미미한 효과를 보인 반면, 감초박을 chloroform으로 추출하였을 경우 가장 강력한 항충치 효과를 나타내었으며 50% 이상의 에탄올 추출물에서도 강한 항충치 효과를 관찰할 수 있었다(Table 4). 에탄올 추출물도 항충치균 활성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 감초는 모든 한약재료에 옛날부터 빠지지 않고 사용되어 왔고, 특히 열수추출 후 얻어지는 단맛을 내는 성분인 glycyrrhizin은 그의 생리활성이 널리 인정되어 현재 산업적으로 다방면에서 이용되고 있다^(15,16). 그러나 산업적으로 이용되는 성분은 주로 수용성 성

Table 2. Anti-*S. mutans* activities of various extracts

Extracts	GTase inhibitory activity ¹⁾					
	Water extracts			75% Ethanol extracts		
	<i>S. mutans</i> KFRI			<i>S. mutans</i> KFRI		
	1171	1172	1175	1171	1172	1175
Unripe apple polyphenol	+	+	+	++	++	++
Applephenone	-	+	-	ND ²⁾	ND	ND
Coptidis rhizoma	+	+	+	++	+	+++
Persimmon	-	-	-	-	-	-
Persimmon leaf	-	++	-	+	++	+
Nutgall	+	+	+	-	-	+
Green tea No. 201	+	-	-	ND	ND	ND
Green tea CBFK	+	-	-	ND	ND	ND
Chitosan	+	+	+	ND	ND	ND
Nutmeg	-	-	-	-	-	-
Cassia cortex	-	-	-	-	-	-
Oolong tea	+	+	+	+	+	++
<i>Polygonatum odoratum</i> Ohwi	+	-	-	+	+	+
Artemisia	+	+	-	+	+	+
Licorice	-	-	-	+++	++++	++++

¹⁾The antimicrobial activities against *S. mutans* are represented as follows; +++++: The growth of *S. mutans* was decreased 10³~10⁴ CFU/mL; +++: ditto, 10²~10³; ++: ditto, 10¹~10²; +: ditto, 10⁰~10¹; -: No inhibition. The concentration of all samples was adjusted 0.1 mg/assay.

²⁾Not determined.

Table 3. GTase inhibiting activities of various extracts

Extracts	GTase inhibition rate (%) ¹⁾					
	Water extracts			75% Ethanol extracts		
	<i>S. mutans</i> KFRI			<i>S. mutans</i> KFRI		
	1171	1172	1175	1171	1172	1175
Unripe apple polyphenol	+	+	+	-	+++	-
Applephenone	+	+	+++	ND ²⁾	ND	ND
Coptidis rhizoma	+	++	++	++	+++	++++
Persimmon	-	-	-	-	-	-
Persimmon leaf	-	+	++	+	+	++
Nutgall	+	+	+	+	++	+++
Green tea No. 201	+	++	++	ND	ND	ND
Green tea CBFK	++	+	++	ND	ND	ND
Chitosan	+	+	+	ND	ND	ND
Nutmeg	-	-	-	-	-	-
Cassia cortex	-	-	-	-	-	-
Oolong tea	+	+	+	+	+	++
<i>Polygonatum odoratum</i> Ohwi	-	-	+	+	-	+
Artemisia	-	-	+	-	-	+
Licorice	-	-	-	++++	++++	++++

¹⁾The GTase inhibitory activities against *S. mutans* are represented as follows; +++++: The GTase activity was inhibited by adding at least 10 µL/mL; +++: ditto, at least 25 µL/mL; ++: ditto, at least 50 µL/mL; +: ditto, at least 100 µL/mL; -: No inhibition by adding 100 µL/mL.

²⁾Not determined.

분이고 열수추출 후 잔사는 폐기되고 있는 실정이다. 감초에서 폐기되는 잔사의 활용도에 대한 연구는 미비한 실정이나 잔사 용매추출물의 항균성⁽¹⁷⁾과 항산화 효과⁽¹⁸⁾가 보고된 바 있다. 따라서 열수추출후 폐기되는 잔사물을 활용한다는 측면에서 항충치 효과를 지닌 유효성분의 분리와 이를 이용한

항충치 가공품의 개발은 큰 의의가 있다고 생각된다. 본 결과에서는 감초박의 chloroform 분획에서 가장 강한 항균효과가 관찰되었지만 식품공전 상에 식품첨가물 제조를 위한 추출용매로는 ethanol로 제한되어 있기 때문에 75% ethanol로 추출하는 것을 원칙으로 하였다.

Table 4. Anti-*S. mutans* activities of licorice extracts measured by agar diffusion method

Solvent	Extracting Temp. (°C)		
	50	85	100
Water	8.0±0.0 ¹⁾	8.0±0.0	8.0±0.0
100% Ethanol	14.0±0.0	15.3±0.8	13.0±1.0
75% Ethanol	14.0±1.0	14.3±1.0	14.5±0.5
50% Ethanol	11.8±0.3	12.5±1.0	12.5±1.5
Chloroform	15.5±0.5	15.5±0.5	16.0±1.0
n-Hexane	8.5±0.5	9.5±0.5	8.0±0.0

¹⁾Diameter of paper disc = 8.0 mm.

Table 5. Ant-*S. mutans* activities of licorice bark extracts against agar diffusion method

Fraction	<i>S. mutans</i> KFRI 1171	<i>S. mutans</i> KFRI 1172	<i>S. mutans</i> KFRI 1175
n-Hexane	8±0.0 ¹⁾	8.5±0.2	8.0±0.0
Chloroform	11.0±0.5	13.0±0.5	13.0±0.7
Ethyl acetate	8.5±0.3	9.0±0.5	8.5±0.5
Butanol	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0

¹⁾Diameter of paper disc = 8.0 mm.

감초박 분획별 항충치효과

감초의 항충치 효과를 나타내는 원인물질을 분리·동정하기 위하여 75% ethanol 추출물에 n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 및 물로 순차적으로 분획하여 항충치효과 (*S. mutans* 1171, 1172, 1175)를 조사한 결과, chloroform 분획물에서 가장 강한 항균력을 나타내었다(Table 5). 감초에는 flavonoids, isoflavonoids, chalcones 및 coumarins 등 페놀성 물질이 다량 분포하고 있으며⁽¹⁹⁻²¹⁾, 이런 성분들이 강력한 항충치 효과를 보일 것으로 추정된다. 가장 항균력이 강한 chlo-

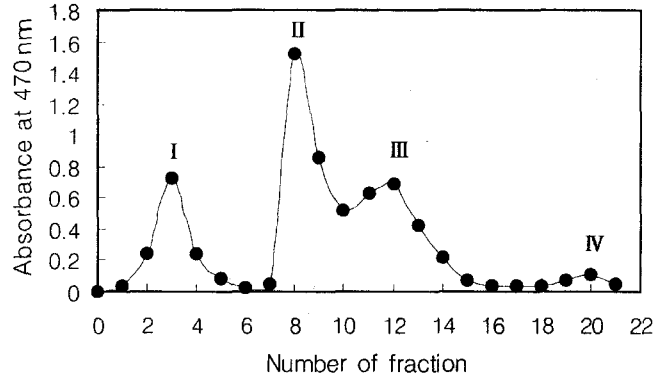


Fig. 1. Silica gel column chromatogram of chloroform fraction of licorice bark.

Table 6. Anti-*S. mutans* activities of chloroform fractions of licorice bark eluted from silica gel column

Fraction	I	II	III	IV
Cleared zone diameter (mm)	16.3 ¹⁾	9.0	8.0	8.0

¹⁾Diameter of paper disc = 8.0 mm.

roform 분획물을 silicagel column에서 4개의 분획으로 분리하였으며(Fig. 1). 이들 각 분획의 *S. mutans* 1171에 대한 생육저해 효과는 Table 6과 같다. *S. mutans* 1171에 대한 항균력은 분획 I (chloroform : methanol = 100 : 0)에서 거의 대부분 나타났으며, 이들 분획물을 HPLC상에서 YMC-pack column을 이용하여 각 분획의 구성성분을 비교해본 결과(Fig. 2), 분획 I은 다른 분획들에 비해 다소 소수성이 강한 구성성분이 차지하는 비율이 월등히 높은 것으로 나타나 이들 성분들이 감초 특유의 충치균 성장억제능 발현에 중요한 역할을 하리라 추정된다. 현재 이들 성분의 분리와 동정을 위한 실험을 진행 중에 있다.

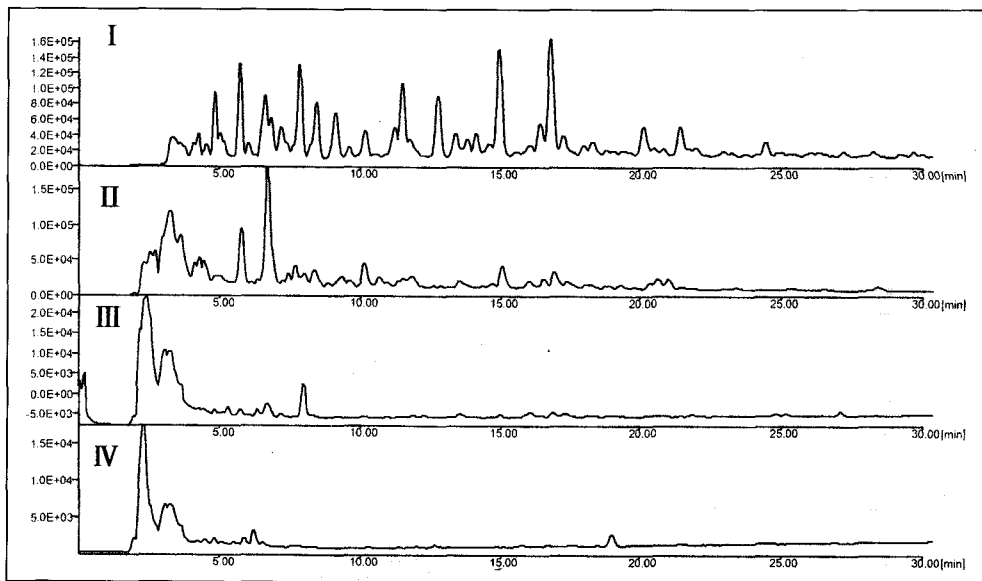


Fig. 2. HPLC chromatogram of each chloroform fraction eluted by silica gel column.

요 약

충치발생 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 각종 천연 물질의 항균효과와 GTase 저해활성을 조사한 결과, 미숙사과, 황련, 우롱차, 감초 등에서 항충치 효과를 나타내었으며, 그 중에서 감초를 열수추출한 다음 생성된 박을 75% 에탄올로 추출하여 얻어진 감초박 추출물이 가장 탁월한 생육저해 효과가 관찰되었다. 또한 이들 소재를 중심으로 충치균이 불용성 glucan을 생산하는 GTase 활성 저하에 미치는 영향을 살펴본 결과, 녹차, 오배자, 미숙사과 polyphenol 추출물 및 감초박 추출물이 GTase의 활성을 저해시키는 효과를 보였으며 특히 항충치 효과에서와 같이 감초박을 75% 에탄올로 추출한 감초박 추출물이 가장 뛰어난 GTase 활성억제 효과를 나타내었다. 감초박을 75% 이상의 에탄올로 추출한 추출물보다 chloroform으로 추출한 추출물에서 더욱 탁월한 항충치균 효과가 관찰되었다. 감초박을 75% 에탄올로 추출한 후, 각종 유기용매로 2차 분획하였을 때, chloroform으로 추출한 분획에서 가장 강한 항충치균 활성이 나타났다. 얻어진 추출물을 silicagel column상에서 4개의 분획으로 재차 분리하였고, 첫번째 분획에서 가장 강한 항충치균 활성을 나타내는 분획을 얻었으며, 이들 분획을 HPLC로 분석했을 때 항충치균에 대한 활성은 주로 소수성이 강한 물질에 의한 것이라고 추정되어졌다.

문 헌

1. Hamada, S., Ooshima, T., Torii, M., Imanishi, H., Masuda, N., Mizuno, J., Sobe, S. and Kotani, S. Dental caries induction in experimental animals by clinical strains of *Streptococcus mutans* isolated from Japanese children. *Microbiol. Immunol.* 22: 301-314 (1978)
2. Hamada, S. and Slade, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44: 331-384 (1980)
3. Hamada, S., Koga, T. and Ooshima, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.* 63: 407-411 (1984)
4. Koga T., Okahashi, T., Asakawa, H. and Hamada, S. Adherence of *Streptococcus mutans* to tooth surface, pp. 111-120. In: *Molecular Microbiology and Immunobiology of Streptococcus mutans*. Hamada, S., Michalek, M., Kiyono, H., Menaker, L. and McGhee, J.R. (eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands (1986)

5. Degar, M.D. and Walker, G.J. Metabolism of the polysaccharides of human plaque. *Caries Res.* 9: 21-28 (1975)
6. Gibbon, R.J. and Van-Houte, J. On the formation of dental plaque. *J. Periodontol.* 44: 347-360 (1973)
7. Jang, G.H., Ahn, B.Y., Oh, S.H., Choi, D.S. and Kwon, Y.J. Anticariogenic effects of *Coptis chinensis* franch extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1396-1402 (2000)
8. You, Y.S., Park, K.M. and Kim, Y.B. Antimicrobial activity of some medical herbs and spices against *Streptococcus mutans*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 187-191 (1993)
9. Cho, Y.J. Isolation of 3-galloylprocyanidin B₃, a glucosyltransferase inhibition from the Korean green tea leaves. *Agri. Chem. Biotechnol.* 43: 273-276 (2000)
10. Nakahara, K., Kawabata, H.O., Ogura, K., Tanaka, T., Ooshima, T. and Hamada, S. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans Streptococci. *Appl. Environmental Microbiol.* 4: 968-974 (1993)
11. Ooshima, T., Izumitani, A., Minami, T., Fujiwara, Y., Nakajima, Y. and Hamada, S. Trehalulose does not induce dental caries in rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.* 25: 277-282 (1991)
12. Ooshima, T., Izumitani, A., Minami, T., Yoshida, S. and Hamada, S. Noncariogenicity of maltitol in specific pathogen-free rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.* 26: 33-37 (1992)
13. Miyoshi, M., Imoto, T. and Kasagi, T. Antieurodontic effect of various fraction extracted from the leaves of *gymnema sylvestre*. *J. Yonago Med. Ass.* 38: 127-137 (1987)
14. Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y. and Hirasawa, M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res.* 25: 438-443 (1991)
15. Anon. GRAS status of licorice (*Glycyrrhiza*), ammoniated glycyrrhizin and mono ammonium glycyrrhizinate. *Federal Register.* 48: 54983-54990 (1983)
16. Fenwick, G.R. Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L.-composition, uses and analysis. *Food Chem.* 38: 119-143 (1990)
17. Ueno, R., Matsuda, T., Tago, K., Kunimi, Y. and Kanayama, T. Antimicrobial agents with solubilizers for food preservation. *Japanese Patent* 60, 233, 015, 131-137 (1985)
18. Maruzen Chemical Co. Ltd. Food antioxidants from liquorice extracts and gallic acid. *Japanese Patent* 60, 44, 580, 625-628 (1985)
19. Lutomski, J. Chemie und therapeutische verwendung von sussholz (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Pharm. Zeit* 12: 49-54 (1983)
20. Saitoh, T., Kinoshita, T. and Shibata, S. New isoflavan and flavanone from liquorice root. *Chem. Pharm. Bull.* 24: 752-755 (1976)
21. Saitoh, T., Kinoshita, T. and Shibata, S. Flavonols of liquorice root. *Chem. Pharm. Bull.* 24: 1242-1245 (1976)

(2003년 9월 16일 접수; 2003년 10월 29일 채택)