KOREAN J. FOOD CULTURE
Vol. 20, No. 3(2005) pp. 341~345

감국(*Chrysanthemun indicum* L.) 추출물의 항충치효과와 Glucosyltransferase 저해활성 탐색

김선재 · 박윤미 · 정순택
목포대학교 식품공학과 및 식품산업기술연구센터(RRC)
(2005년 4월 21일 접수)

Anticariogenic Effects and Inhibition of Glucosyltransferase Activity of *Chrysanthemun indicum* L. Extracts

Seon-Jae Kim, Yun-Mi Park, and Soon-Teck Jung
Dept. of Food Engineering and Food Industrial Technology Research Center, Mokpo National University
(Received April 21, 2005)

Abstract

The anticariogenic effects and inhibition of glucosyltransferase activity of *Chrysanthemun indicum* L. extracts were investigated against 5 strains of microorganisms. The ethanol extracts of *Chrysanthemun indicum* L. showed the growth inhibition effects on the *Streptococcus mutans* and oral bacteria. The inhibition rate of glucosyltransferase activity of *Chrysanthemun indicum* L. extracts showed 78.4 to 92.3% range. The extracts were analysed by using solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, TLC, HPLC techniques. Three components whose molecular weights ranged from 200 to 400 were confirmed to have the anticariogenic activity.

Key Words : anticariogenic effects, inhibition of glucosyltransferase activity, *Chrysanthemun indicum* L.

I. 서 론

충치(치아우식증) 치태내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 구강내 질병으로 현대인에게 그 발병율이 증가하고 있다[1,2]. 충치는 *Streptococcus mutans*가 주원인균으로 작용하며 구강 내 치아 표면에 부착하여 당의 발효에 의해 산을 발생시켜 치아표면을 파괴시키는 것으로 알려져 있다[3,4]. *S. mutans*는 균체표층에 glucosyltransferase (GTase)를 분비하며 음식물 중 sucrose로부터 불용성 glucan을 형성하고, 이러한 glucan은 구강내 미생물과 치면에 치면세균막(dental plague)를 생성한다[5,6]. 따라서 이러한 충치발생균인 *S. mutans*의 성장을 억제할 수 있다면 충치 예방 및 그 발생 빈도의 감소효과가 있을 것으로 기대되어진다. 충치와 관련된 연구로는 GTase 합성저해제의 개발, 항균제재의 개발 등[7-10]의 연구와 녹차, 오룡차, 황백, 후박피, flavonoids, 해조류 추출물인 funoran, 알로에 등[11-17]의 천연물을 이용한 항미생물 물질 개발 등이 보고되고 있다.

감국(甘菊, *Chrysanthemin indicum L.*)은 국화과에 속하는 다년생 초본으로[18] 꽃잎이 황색이고 6~10월에 걸쳐 개화하며 크기가 1.5cm 내외인 꽃봉우리가 줄기의 끝부분에 밀집되어 있다. 감국은 해열, 소염, 혈압저하작용, 두통해소 그리고 결핵균 및 각종 바이러스에 대한 억제효과 등의 약효가 알려져 있다[19]. 특히 감국은 예로부터 약용, 향료, 국화주, 국화차 및 떡류 등 음식물 첨가제로서도 널리 애용되고 있다[20]. 감국의 성분분석은 apigenin, luteolin, acacetin, lactone, essential oil, sesquiterpene 그리고 알킬배당체성분 등[21-26]으로 다양한 기능성 성분에 대하여 연구가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 오랫동안 생약재로 사용되어오고 있는 감국의 용매분획추출물에 대해 항미생물활성 및 glucosyltransferase 활성저해 효과를 검토하고, 활성물질에 대해 column chromatography, HPLC 등의 기기를 이용하여 활성물질을 분리하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용된 감국은 전라남도 지역에서 생산하는 것으로

교신저자: Seon-Jae Kim, Food Industrial Technology Research Center, Mokpo National University, Muan, Jeonnam 534-729, Korea Tel : 82-61-450-6453
Fax : 82-61-454-1521 E-mail : foodkim@mokpo.ac.kr

화순군 소재의 전남생약농업협동조합에서 판매하는 건재를 사용하였다.

2. 감국의 추출

감국 3.4kg에 ethanol 15 L를 가하여 상온에서 24시간 동안 침지시키고 glass filter(G_3)로 여과하여 여액과 잔사를 얻었고, 이 잔사를 ethanol로 2회 반복하여 추출·여과하였다. 얻어진 여액을 cooling aspirator(CCA-1100, Eyela, Japan)가 장착된 진공농축기(N-1000, Eyela, Japan)로 35℃에서 감압농축하여 ethanol 추출물을 얻었다.

3. 사용균주 배양

본 실험에 사용한 균주는 충치관련 균주로 *Streptococcus mutans* ATCC 25175와 본 실험실에서 분리한 충치균 SM 5, M 6, SM 12, SM 23 등 5가지 균주를 brain heart infusion(BHI, Difco, USA) broth에 접종하여 37℃에서 3회 계대배양하여 사용하였다. 각 phenol성 화합물을 sigma사 제품, BHI 배지는 Difco Co.(Detroit Michigan, USA) 제품을 사용하였다.

4. 항미생물활성 측정

항미생물활성 시험용 평판 배지의 조제는 멸균된 배지에 균주를 0.05%씩 접종하여 20mL씩 petri dish에 부어 응고시켰다. 화합물의 항미생물 검색은 한천 배지 확산법(disk plate method)으로 측정하였다. 즉, 추출물을 0.2g 및 1.0g 에 상당하는 량으로 조제하여 멸균된 filter paper disc(Toyo, 8 mm, Japan)에 흡수시킨 후, 용매를 완전히 휘발시키고 시험용 평판 배지 위에 놓아 밀착시켰다. 이어 0.85% 멸균 식염수로 시료를 배지위에 확산시켜, 37℃의 배양기에서 24시간 배양한 다음 disc 주변의 저해환의 직경(mm)을 측정하였다.

5. 이화학적 성분의 측정

GTase의 활성은 Endo 등[27]의 방법에 따라 조효소액을 제조하고 sucrose를 기질로 하여 생성된 불용성 glucan을 분광광도법으로 측정하였다. 즉 시험관에 기질용액(sucrose 12.5g, sodium azide 0.25g을 1L의 10mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 용해시켜 121℃에서 15분간 멸균) 0.8mL, 조효소액 0.04mL, 농도별 시료 0.02mL, 멸균수 0.14mL을 첨가하여 최종 부피를 1mL가 되도록 조정하였다. 시험관을 30° 기울인 상태로 효소액을 37℃에서 24시간 동안 반응시키고, vortexing하여 glucan을 분산시킨 다음 spectrophotometer(HP 8452, Hewlett Parkard, USA)로 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구의 경우 시료 대신에 멸균수를 첨가하였으며, 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = (\text{대조액의 흡광도값} - \text{시료액의 흡광도값}/\text{대조액의 흡광도값}) \times 100$$

6. 용매분획 및 chromatography 분리정제

감국의 ethanol 추출물은 Kim 등[28]의 방법에 의하여 ethylacetate와 buffer용액을 이용하여, ethyl acetate 가용 산성획분(ethylacetate-soluble acidic fraction), ethylacetate 가용 중성획분 (ethylacetate-soluble neutral fraction) 그리고 수상획분을 분리하였다. 산성 및 중성획분에 존재하는 항미생물 활성물질은 silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography 그리고 HPLC를 이용하여 분리정제를 실시하였다.

먼저 silica gel adsorption chromatography는 silica gel(120g, 70-230 mesh, column chromatography용, Merck사)을 ethylacetate로 slurry를 만들어 column에 충진시키고, ethylacetate-methanol 용매계를 이동상으로 하여 methanol 농도를 0~100% 씩 증가시키는 step-wise 방법으로 용출분획 하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography는 Sephadex LH-20(25-100mesh, Pharmacia사)을 methanol-chloroform(4:1, v/v) 용매계로 하여 column(bed volumn 250mL)에 충진하고 동 용매계로 용출분획 하였다.

Thin layer chromatography (TLC)는 시료를 methanol : chloroform(1:1, v/v) 용매계로 plate(Kiesegel 60 F_{254}, 20×20cm, 1.0mm, Merck사)에 banding한 후, UV 및 육안에 의해 확인된 분리양상에 따라 절취하고, methanol : chloroform (1:1, v/v) 용매계로 용출분획하였다.

HPLC는 먼저 시료를 Sep-pak(C_{18} type과 silica type)으로 전처리하고 filter(GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF, 0.2μm)로 여과한 후, Radial-Pak C_{18} column(0.8×10.0cm)과 CLC-ODS column(0.46×25cm)은 분당 각각 1.0mL와 0.5 mL로 용출분획 하여 항미생물활성 및 GTase 억제 효과를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 감국 추출물의 항충치 효과

감국 추출물의 항미생물활성을 검색하기 위해서 *Streptococcus mutans* 와 구강에서 분리한 세균 등에 대해 건조 감국 0.2g, 1.0g에 상당하는 ethanol 추출물로 항미생물활성을 경시적으로 측정하고 관찰한 결과는 〈Table 1〉에 나타냈다. 감국 0.2g 상당의 추출물에서는 *Streptococcus mutans*와 구강에서 분리된 SM 5 및 SM 23에 대해 증식억제 효과를 나타냈다. 감국 1.0g 상당의 추출물에서도 구강에서 분리된 SM 6와 SM 12 등을 제외한 *Streptococcus mutans*와 구강에서 분리된 SM 5 및 SM 23에서 증식억제효과가 뚜렷하게 나타났다. 이들 3 균주에 대한 증식억제 효과는 배양 5일까지 지속되는 것을 관찰할 수 있어, 감국 ethanol 추출물이 충치균 및 구강세균에 대하여 강한 증식억제효과를 나타냄을 알 수 있었다.

<Table 1> Anticariogenic activities of ethanol extracts of *Chrysanthemin indicum* L. against various microorganism

Microorganism	Incubation time (hr)									
	24		48		72		96		120	
	A[1]	B[2]	A	B	A	B	A	B	A	B
Streptococcus mutans ATCC 25175	12[3]	15	11	14	11	14	9	14	9	14
SM 5 [4]	12	16	12	15	12	15	10	15	9	15
SM 6	10	10	9	-[5]	-	-	-	-	-	-
SM 12	9	9	9	9	-	10	-	9	-	9
SM 23	13	16	13	14	11	14	10	14	10	13

[1] Extract of 0.2g dry weight equivalent of *Chrysanthemin indicum* L.
[2] Extract of 1.0g dry weight equivalent of *Chrysanthemin indicum* L.
[3] Clear zone on plate (mm)
[4] Bacteria isolated from the mouth
[5] No inhibition

감국 등 국화과에 속하는 식물에 대한 항미생물 검정은 Jang 등[29]이 *Chrysanthemum*속 식물에 대해 항미생물활성을 측정하였는데, *Vibrio parahaemolyticus*와 *Bacillus subtilis* 등에 대해 강한 항미생물활성을 나타냈다고 보고하였고, 감국과 같은 속에 있는 산국도 상기의 세균들에 강한 항미생물활성을 나타냈다[30]. 최근에 문 등[31]이 약용식물 추출물에 대한 항미생물활성을 검정하면서 감국의 methanol 추출물이 충치세균 *Streptococcus mutans*에 대해 유의적인 증식억제활성을 나타내었고, 기타 포도상구균 및 토양세균 등에 대해서도 활성을 나타내 본 연구결과에서도 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제하는 경향과 동일한 결과를 나타냈다.

2. 감국추출물의 GTase 저해효과

감국 ethanol 추출물의 GTase활성에 대한 저해효과를 살펴보기 위해 조효소 반응액에 감국 추출물이 10mg, 20mg, 50mg, 100mg/mL의 농도가 되도록 하여 반응시킨 후 나타난 결과는 〈Table 2〉와 같다. 감국 ethanol 추출물의 반응농도에 따라 GTase 저해효과는 78.4~92.3%로 나타나 농도가 증가할수록 활성도 함께 증가하는 경향을 나타냈다.

An[32]이 오배자와 적포도과피의 추출물을 이용한 GTase의 활성 억제효과를 검토한 결과는 농도 1.08mg/mL에서 GTase의 활성을 99% 정도 저해하였고, 츄잉검 등의 충치예방물질로 이용되고 있는 mutastein도 상기의 농도하에서 99%의 저해효과를 나타냈다고 보고하였다. 본 연구에서는 감국을 ethanol로 추출한 것 만을 가지고 GTase 저해활성을 측정하였지만, 상기의 연구는 오배자와 적포도과피 추출물을 여과하고 Sephadex LH-20 column chromatography를 행한 후 얻어진 정제액을 동결건조하여 분말형태의 것을 사용하여, 본 연구와의 검정 과정 및 농도에 차이가 있어 GTase의 활성 값을 정확히 비교하기는 어려우나, 본 연구결과를 분석하여 볼 때 감국 ethanol 추출물이 GTase 활성 저해에 대해 효과가 높다고 판단되었다.

<Table 2> Effect of GTase inhibition of *Chrysanthemin indicum* L. ethanol extract.

Concentration(mg/mL)	Inhibition rate(%)
10	78.4
20	80.6
50	86.5
100	92.3

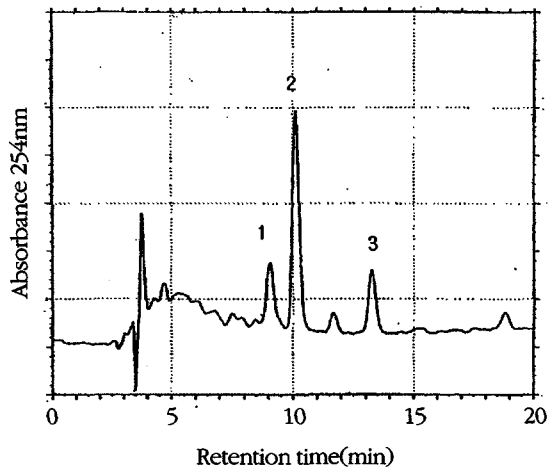
3. 감국의 항충치물질의 정제

감국 3.4kg을 ethanol로 추출하고 용매분획하여 얻어진 수용액획분, 산성획분, 중성획분에 대하여 감국 4.0g에 상당하는 추출물로 항충치활성을 검정한 결과, 중성획분에서 높은 활성을 나타냈다. 감국추출물의 용매분획의 결과로 보아 감국에 존재하는 항충치물질은 중성물질이며 methanol 용매계에 잘 이행하는 것으로 보아 어느 정도 극성을 갖는 물질로 판단되었다.

용매분획에서 활성을 나타내는 중성획분(5g)을 정제하고자 silica gel adsorption chromatography로 분획하고 *Streptococcus mutans*를 검정미생물로 하여 감국 30g에 상당하는 추출물로 항미생물활성을 검정한 결과, ethylacetate내 methanol 농도가 10~30% 용출획분에서 활성이 인정되어 활성획분 2.5g을 얻었다.

상기의 silicagel adsorption chromatography에서 얻어진 활성획분(2.5g)을 methanol : chloroform 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration (bed volumn 200mL)으로 분획하고 *Sreptococcus mutans*를 검정미생물로 하여 감국 70g에 상당하는 추출물로 항미생물활성을 검정하였다. Sephadex LH-20 column의 bed volumn에 대한 elution volumn의 비(Ve/Vt)가 0.65-0.89의 용출범위에서 활성이 인정되었으며 활성물질 0.9g을 얻을 수 있었다. Molecular sieve 효과를 갖는 Sephadex LH-20 column의 용출양상[28]으로 보아 감국에 존재하는 항충치물질은 분자량이 200-400정도의 물질로 추정되었다.

Sephadex LH-20 column chromatography에서 얻어진 활성획분에 대하여 TLC를 행한 결과, 5개의 band로 분리되어 각각의 band를 분취하고 용출된 획분에 대하여 *Sreptococcus mutans*을 검정 미생물로하여 감국 100g에 상당하는 추출물로 항미생물 활성을 검정하였다. TLC 상에서 가장 활성이 높은 획



<Fig. 1> HPLC chromatogram on CLC-ODS column of the active fractions from *Chrysanthemin indicum* extract

분은 Rf 0.27-0.31로서 356.6mg을 얻었다. 이러한 결과로 TLC상에서 감국의 항충치물질의 분포 양상은 단일물질이 아니라 복수의 물질이 존재하는 것으로 판단되었다.

4. HPLC에 의한 항충치물질의 분리

이상의 정제과정에서 어느 정도 정제가 이루어졌기에 HPLC 분석을 시도하였다. TLC 상에서 얻어진 활성획분에 대하여 Radial-Pak C_{18} column을 사용한 reverse phase의 HPLC로 분획하였다. 항충치활성은 감국 200g에 상당하는 추출물로 항충치활성을 검정한 결과 retention time이 7.1~12.4분에서 활성이 인정되어 활성획분 103.5mg을 얻었다.

Semi-preparative HPLC에 의해 정제된 활성획분에 대해 분석용 CLC-ODS column을 이용한 HPLC로 분리하여 얻어진 peak를 분취하여 항충치활성을 검정한 결과는 〈Fig. 1〉에 나타낸 바와 같이 retention time이 9.11분, 10.02분 그리고 13.4분에서 활성이 인정되었다.

이상의 결과로 보아 감국에 존재하는 항충치물질은 약간의 극성을 띤 중성의 물질로 200-400정도의 분자량을 갖는 주요 성분이 3종인 활성본체가 존재한다고 판단되며, 이들 물질에 의해 항충치활성이 발현되고 있다고 생각된다. 감국에 존재하는 항충치물질은 1.6~4.0 μg/g dry wt의 수준으로 나타났다.

IV. 요 약

감국에 존재하는 항충치활성 물질 및 glucosyltransferase 저해 효과에 대한 정보를 얻고자 본 연구를 시도하였다. 감국 ethanol 추출물의 항충치활성을 *S. mutans* 및 구강세균에 대해 검색한 결과, *S. mutans*와 2종의 구강세균에 대하여 활성이 높게 나타났다. 감국 ethanol 추출물의 농도에 따라 GTase 저해효과는 78.4~92.3%의 범위로 나타나 농도가 증가할 수록 활성도 함께 증가하는 경향을 나타냈다. 감국을 ethanol로 추출, 용매분획하여 얻어진 활성성분을 silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, TLC 그리고 HPLC 등의 방법으로 분석한 결과, 감국에 존재하는 항충치활성 물질은 약간의 극성을 띠는 중성물질로 분자량이 200-400정도 되는 저분자 물질인 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신인력양성사업의 연구결과로 수행되었으며(2003년, 전라남도 생약초 중심 생물산업 관련 브랜드 상품화 개발) 연구수행에 많은 도움을 준 목포대학교 식품산업기술연구센터 (RRC)에 감사드립니다.

■ 참고문헌

1) Menaker L. The Biologic Basis of Dental Caries, Harper and Row. Hagerstown. p 68, 1980
2) Hamada S, Slade HD. Biology immunolgy and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44: 331-384, 1980
3) Inoue M, Koga T. Properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. Infect Immunity 25: 922-929, 1979
4) Muroi H, Kubo I. Combination effects of antbacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. J Agric Food Chem 41: 1102-1105, 1993
5) Hwang JK, Kim HJ, Shim JS, Pyun YR. Bactericidal activity of chitosan on *Streptococcus mutans*. Korean J Food Sci Technol 31(2): 522-526, 1999
6) Hanada N, Takehara T. (1-3)-alpha-D-glucan synthase from *Streptococcus mutans* AHT (serotype g) does not synthesise glucan without primer. Carbohydr Res 168: 120-124, 1987
7) An BJ, Choi JY, Kwon IB, nishioka I, Choi C. Structure and isolation of glucosyltransferase inhibitor from *Jack Fruit* leaf. Korean Biochem J 25(4): 347-357, 1992
8) Kozai K, Miyake Y, Kohda H, Kamataka S, Yamasak K, Suginakza H, Nagasaka K. Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and urosonic acid. Caries Res 21: 104-108, 1987
9) You YS, Park KM, Kim YB. Antimicrobial activity of some medical hedial herbs and spices against *Streptococcus mutans*. Korean J Appl Microbiol Biotechnol 21(2): 187-191, 1993
10) Kubo I, Muroi H, Himejima M. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. J Agric Food Chem 41: 107-111, 1993
11) Kubo I, Muroi H, Himejima M. Antimicrobial activity of green tea flavor components their combination effect. J Agric Food Chem 40: 245-248, 1992

12) Ooshima T, Minami T, Aono W, Tamura Y, Hamada S. Reduction of dental plague deposition in humans by oolong tea extrac. Caries Res 28: 146-149, 1994
13) Park CS, Shin YS. Effect of Phellodendir Cortex L. on the activity of glucosyltransferase and human gingival cell, growth and menbrane permeability of *Streptococcus mutans* JC-2. J Korean Acad Dent Health 20(2): 189-202, 1996
14) Lee YS, Park HJ, You JS, Park hH, kwon IB, Lee HY. Isolation of anticarioriogenic compount from *Mognoliae bark*. Korean J Food Sci Teahnol 30(1): 230-236, 1998
15) Chung DI, Ro JS, Chang KW. Antibacterial effect of some flavonoids against cariogenic bacteria. J korean Acad Dent Health 20(2): 189-202, 1996
16) Saeki Y, Kato Y, Naito Y, Takazoe I, Okuda K. Inhibitory effects of funoran on the adherence and colonization of mutans streptococci. Caries Res 30: 119-125, 1996
17) Park CS, Shin YS, Ryu IW, Lee KS. Antimicrobial activity of extracts from *Aloe vera* pell against *Streptococcus mutans* JC-2(I). Koeran J Food Nutr 13(2): 139-145, 2000
18) Yuk CS. Original colors pictorial book of the Korean medicinal use. Academy books, Seoul. p 537, 1990
19) Shin GC, Shin YC. New our talk large a dictionary. Samsung publishing company, Seoul. p 68, 1992
20) Park CS. *Chrysanthemum raise & tublular*. Chungwoon publishing company, Seoul. p 21, 1965
21) Ryu SY, Choi SU, Lee CO, Lee SH, Ahn JW, Zee OP. Antitumor activity of some phenonic components in plants. Arch Pharm Res 17: 42-44, 1994
22) Chatterjee A, Saekar S, Saha SK. Acacetin 7-O-galactopyranoside from *Chrysanthmum indicum*. *Phytochem* 20: 1761-1767, 1981
23) Chen Z, Peijuan X. Structural determination of yejuhua lactone, isolated from *Chrysanthmum indicum* L. *Yaoxue Xuebao* 22: 67-70, 1987
24) Uchio Y, Tomosu K, Nakyama M, Yamamura A, Waki T. Constituents of the essential oils from three terpenoid species of *Chrysanthemum*. *Phytochem* 20: 2691-2693, 1981.
25) Mladenova K, Tsankova E, Hung D. New sesquiterpenoids from *Chrysanthmum indicum*. var. tuneful. Planta Med 54: 553-559, 1988.
26) Jung KY, Oh SR, Kim CS, Kim JH, Lee HK. A naw alkyl alcohol glycoside from Chrysanthemi Flos. *Kor J Pharmacogn* 27: 15-19, 1996
27) Endo A, Murakawa S, Mutastein A. A new inhibitor of adhesive-insoluble glucan synthesis by glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. The J Antibiotics 335(3): 203-207, 1983
28) Kim SJ, Park KH. Antimicrobial substances in leek (*Allium tuberosum*). Korea J Food Sci Technol 28(3): 604-608, 1996
29) Jang DJ, Nam SH, Choi SU, Jang MS. Antibacterial activity of some *Chrysanthemum* spp. Agri Chem Biotech 39(4): 315-319, 1996
30) Nam SH, Yang MS. Antibacterial activities of extracts from *Chrysantherum boreal* M. Agri Chem Biotech 39(3): 269-272, 1995
31) Moon JS, Kim SJ. Antimicrobial effect of methanol extracts from some medicinal herbs and the content of phenolic compounds. Korean J Food Preservation 11(2): 207-213, 2004
32) An BJ. Effect of inhibition on glucosyltransferase and antimicrobial activity of polyphenol fraction of gallnut and red grape husk. Korean J. Postharvest Sci Technol 8(2): 217-223, 2001