회향열수 추출물의 치면 세균막 형성 억제 효과

김상무[1] · 최창혁[2] · 김장원[3] · 원세라[3] · 이해익[3,*]

[1]강원도 춘천시 (주)에스앤디, [2]강원도 춘천시 중앙치과의원, [3]강원도 춘천시 강원대학교 생명공학부

The Anticaries Activity of Hot Water Extracts from *Foeniculum vulgare*

Sang-Moo Kim[1], Chang-Hyuk Choi[2], Jang-Won Kim[3], Se-Ra Won[3] and Hae-Ik Rhee[3,*]

[1]*S&D Co. Ltd., Chun-cheon 200-160 Korea*
[2]*Jung-Ang Dental Clinic, Chun-cheon 200-070 Korea*
[3]*Division of Biotechnology, Kangwon National University, Chun-cheon 200-701 Korea*

Received January 7, 2008; Accepted March 4, 2008

In this research, we screened for glucosyltransferase (GTase) inhibitors that effectively prevent the dental caries from 420 kinds of boiled water extracts of herbs and wild plants and searched for GTase inhibitory activities. Among them, 13 kinds of hot water extracts had high GTase inhibitory activities and especially, we focused on *Foeniculum vulgare* which showed the highest inhibitory activity on GTase. The boiled water extract of *F. vulgare* was stable at high temperature and showed as a mixed type of competitive and uncompetitive inhibition kinetic behavior. It did not have antibacterial effect on *Streptococcus mutans* and had inhibitory activity on GTase. Specially, in the clinical trial, the group treated by boiled water extract of *F. vulgare* showed more decrease of plague index at 4.8 point than untreated group. These results suggested that boiled water extract of *F. vulgare* can effectively suppress the plague formation as it inhibits the GTase activity.

Key words: Dental caries, *Foeniculum vulgare*, GTase inhibitor

서 론

충치는 세계적으로 가장 만연된 구강 내 질병의 하나이며 근년 이환율이 점점 증가하고 있다. 1970년대 이후 선진국에서는 그 유병율이 감소하는 추세이지만 개발도상국에서는 유병율이 증가하고 있는 실정이다. 사람의 충치 원인세균으로는 *Streptococcus* sp. 및 *Lactobacillus* sp.에 속하는 일부의 종들이 보고되어 있으며, 그중 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*가 가장 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.[1)] 구강 내에서 *S. mutans*와 *S. sobrinus*가 세포외로 분비하는 효소인 glucosyltransferase(GTase; sucrose 6-glucosyltransferase, EC 2.4.1.5)에 의하여 당질로부터 점착성의 불용성 glucan이 형성되어 치아의 표면에 부착하게 되고, 이 glucan에 원인세균이 증식하면서 국소적으로 각종 유기산을 생성하여 치아 표면의 enamel 질을 분해하는 것이 초기 발생기구인 것으로 알려져 있다.[1)]

최근 충치 발생 기작에 관한 기초적인 연구와 충치 예방에 관한 활발한 연구가 이루어져 왔다. 이중 치면 세균막 형성저해제 즉 GTase 활성 저해제가 가장 주요한 충치 예방수단으로 인정되어 관련된 저해물질 탐색에 많은 노력이 집중되고 있다. 충치의 생성을 억제하기 위해서는 충치원인 균을 제거한다거나 GTase의 활성을 억제시킴으로서 가능하다. 충치 예방을 억제하기 위하여 사용되어지고 있는 불소는 효과가 지속적이지 못하며 체내 축적되어 인체 골격에 좋지 않은 영향을 미치기 때문에[2)] 최근에는 부작용이 없는 천연물 기원의 항 충치제가 각광을 받고 있다. 현재까지 알려진 바로는 propolis,[3)] 우롱차,[4)] 홍차 및 *Harrisonia perforata*,[5)] *Magnolia officinalis*[6)] 등으로부터 GTase 저해 활성이 보고되었다.

따라서 본 연구에서는 천연물 기원의 GTase 저해제를 개발할 목적으로 한약재 및 국내 자생하고 있는 420종의 식물의 열수추출물을 대상으로 GTase 저해활성을 탐색하여 효소학적 성질 및 임상 특성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 균주. 본 실험에서 사용한 한약재 및 국내 식용식물은 강원도 춘천시 소재 건재상이나 시장에서 구입하였다. *Streptococcus mutans* KCTC3289는 한국과학기술원 유전공학연구소 유전자원센터 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였

*Corresponding author
Phone: +82-33-250-6481; Fax: +82-33-241-6481
E-mail: rheehae@kangwon.ac.kr

으며 배지는 brain heart infusion broth(BHI, Difco)을 사용하였다. 이밖에 시약은 시판 특급시약을 사용하였다.

시료의 추출. 시료를 가정용 mixer로 파쇄한 후 각각의 시료 1 g에 10배량의 증류수를 가하여 100°C에서 50분간 추출하였다. 추출물은 원심분리 후 상등액을 분리하여 -30°C deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

GTase의 제조. *S. mutans*를 2 *l*의 BHI배지에 접종하여 37°C에서 48시간 혐기적으로 배양한 후 배양액을 원심분리(4°C, 8,000 rpm, 10 min)하여 균체를 제거하였다. 배양액을 한외여과(molecular cut off 10,000)하여 200 m*l*로 농축한 후 50 mM potassium phosphate buffer(pH6.9)로 4°C에서 overnight 투석하였다. 투석이 끝난 효소액을 -30°C에서 보관하며 필요에 따라 적당히 희석하여 사용하였다.

GTase 저해 활성 측정. 추출물 0.15 m*l*를 GTase 효소액 0.1 m*l* 및 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.9) 0.5 m*l*와 혼합하여 37°C에서 3분간 pre-incubation 한 후 기질 8.4% sucrose 0.15 m*l*를 넣어 반응을 시작하였다. 1시간 반응 후 0.9 m*l*의 methanol을 첨가하여 반응을 정지시키고 반응 생성물인 insoluble glucan을 얻기 위해 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 여기서 얻어진 침전은 증류수 1 m*l*과 70% ethanol 1 m*l*로 순차적으로 세척한 후 증류수 0.25 m*l*과 anthrone 발색시약(anthrone 200 mg/H_2SO_4 100 m*l*) 1 m*l*을 첨가하여 100°C에서 10분간 가열하여 발색시켰다. 발색 반응 후 냉각하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

추출물의 안정성. 추출물의 온도 안정성을 보기 위하여 추출액을 30, 60, 80, 100°C에서 1, 6, 12시간 처리한 후 충분히 냉각시켜 저해 활성을 측정하였다. pH 안정성은 추출물에 0.1 N HCl을 가하여 pH 2, 4, 6이 되도록 한 다음 30°C에서 5, 10, 30분간 처리하였다. 처리 후 시료를 충분히 냉각시켜 바로 0.1 N NaOH를 가하여 pH 7로 보정 후 저해활성을 측정하였다. 아무런 처리를 하지 않은 추출물의 저해활성을 비교하여 그 안정성을 비교하였다.

치면 세균막 형성 억제 임상 실험. 치과적 질환이 없는 건강한 20대 대학생 10명(남녀 각 5명)의 개인별 glucan 생성 정도를 알아보기 위하여 모든 치면을 세마하여, 치면으로부터 세균막을 제거 후 동일한 치약과 잇솔을 제공하고 1주 정도 평상시대로 구강관리를 하게하였다. Plaque 측정 전날 아침 식사 후에만 잇솔질을 하고 이후에는 잇솔질을 하지 못하도록 하였다. 대상자들의 plaque 점수를 측정 후 prophylaxis 하여 치아표면을 깨끗이 닦아내었다. Plaque 점수순위로 대상자에게 1번부터 10번까지 번호를 부여하고 A그룹 5명, B그룹 5명으로 나누어 실험을 진행하였다. 당일 날 저녁식사 후부터 A군에게는 1g의 회향 분말을 20 m*l*에 희석하여 제공하고, B군에는 증류수 20 m*l*을 사용하도록 지시하였다. 용액의 사용은 3일 동안 식사 후 3분 이내 1분 동안 입을 헹구어내는 방법으로 2회 실시 하였다. 측정이 끝난 뒤 2주후에 재차 치면 세마를 실시하여 모든 실험자간에 동일한 조건이 되도록 구강환경을 조성하였으며, 1차 실험과 같은 방법으로 A, B그룹 교차실험 하였다. 치면 세균막 부착도 평점기준과 산출방법은 기간이 끝난 뒤 오후 정해진 시간에 치아의 협·설면을 disclosing solution을 이용하여 치석을 염색한 후 각각 5등분 하여 각 부분에 치면 세균막이 부착되어 있지 않을 경우에는 0점으로 부착되어 있을 경우에는 1점으로 치면 세균만 부착정도를 평점 하였다. 그룹 간 총 plaque 점수를 부위별 및 총점 평균으로 산출하여 T-test로 처리하였다.

결과 및 고찰

GTase 저해제의 Screening. 한약재 및 식용식물 420여종을 대상으로 열수 추출물 bank를 구축하여 GTase 저해활성을 탐색하였다. 그 결과 다수의 추출물에서 GTase 저해활성을 보이는 것으로 확인되었으며 이들 중 저해활성이 비교적 높게 나타난 13종의 식물을 선발하였다. 호황연, 대황, 초롱담, 회향 등이 60% 이상의 높은 GTase 저해활성을 보였고, 오미자, 흑임자, 우방자, 패장, 지각 등은 40~50%의 GTase 저해활성을 나타내었다(Table 1). 이들 GTase 저해활성을 나타내는 식물 중 활성이 가장 높으며 식용 가능한 식물인 회향을 최종 식물체로 선발하였다.

회향으로부터 GTase 저해제의 부분 정제. 회향 열수 추출물로부터 유효성분의 부분정제를 하기 위하여 회향 5 kg에 냉수 50 *l*를 가하고 1시간 교반한 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 냉수 추출이 끝난 회향에 45 *l*의 열수를 가하고 1시간 추출한 후 원심분리하여 상등액 45 *l*를 얻었다. 상등액에 활성탄 2.25 kg을 가하여 교반한 후 원심분리하여 활성탄을 제거하여 여과액 35 *l*를 얻었다. 여과액을 flash evaporator를 이용하여 2 *l*로 농축한 후 동결건조하여 부분 정제한 GTase 저해제 148 g을 얻었다. 회향의 열수 추출물은 다량의 당과 수용성 물질을 함유하며 짙은 갈색과 회향 특유의 향을 나타내고 있어 추출물을 그대로 사용하기에는 제한점이 많다. 그러나 전처리 과정으로 냉수 추출을 함으로서 당과 기타 수용성 물질을 제거할 수 있었으며 활성탄 처리로 탈색과 탈취가 가능하여 무색투명한 추출액을 얻을 수 있었다. 전체 과정을 통하여 활성수율은 90% 이상으로 효율적으로 GTase 저해제가 부분정제 되었으며 이를 본 연구의 실험 재료로 사용하였다.

회향 추출물의 안정성. 회향 열수 추출물의 산업적인 이용성

Table 1. Inhibition activities of hot water extracts from various plant species on GTase

Plant species	Parts	Inhibition (%)
Schisandra chinensis	fruit	42.8
Prunus mume	fruit	42.6
Melandryum firmum	whole plant	41.6
Arctium lappa L.	seed	45.0
Patrinia scabiosaefolia	whole plant	46.1
Sesamum indicum L.	seed	45.8
Magnolia kobus	bark	46.2
Plantago asiatica L.	seed	61.4
Gentiana scabra var. *buergeri*	root	63.6
Psoralea corylifolia L.	fruit	42.6
Foeniculum vulgare	fruit	64.9
Rheum undulatum L.	root	63.0
Portulaca oleracea L.	whole plant	44.5

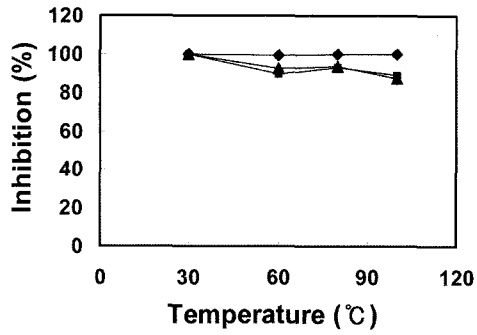

Fig. 1. Stability of *F. vulgare* extract(FVE) in various temperature. ◆: treated for 1 h, ■: treated for 6 h, ▲: treated for 12 h.

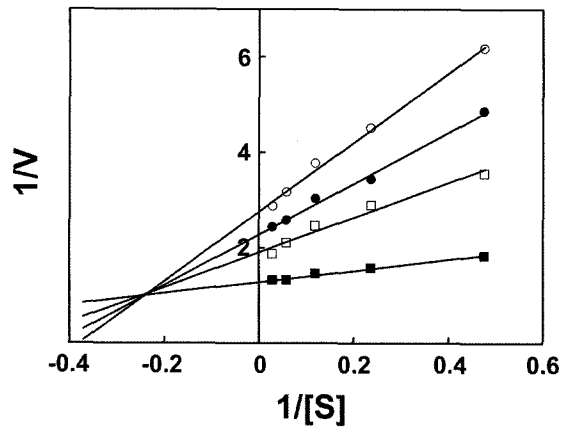

Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of glucosyltransferase in presence of FVE. Measuring the concentration of sucrose as a substrate in the absence or presence of FVE at different concentration determinate the inhibitory activity of FVE on glucosyltransferase. Inhibition type was determined by Lineweaver-Burk plot analysis of the data calculated from the result according to Michaelis-Menten Kinetics. ○: 1.0 mg/ml, ●: 0.5 mg/ml, □: 0.25 mg/ml, ■: 0.0 mg/ml.

을 확인하기 위한 가공특성으로 pH 및 열 안정성을 검토하였다. 회향 추출물을 60, 80, 100℃에서 각각 1시간 가열 후 활성을 측정한 결과 전 온도 범위에서 100%의 잔존활성을 나타내었으며, 100℃에서 6시간, 12시간 가열하여도 95% 이상의 잔존활성을 나타내어 회향 추출물은 열에 대한 안정성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 1). 한편 산성 영역의 pH에서는 전반적으로 불안정하여 pH 4 이하에서는 잔존 활성이 급격히 감소하여 pH 4에서 10분, 30분 처리 후에 약 40%, 30%의 잔존 활성을 보였으며 pH 2에서는 약 10%의 잔존활성을 나타내었다. 식품 가공 시 가열 과정이 많은 점을 감안하면 회향 추출물은 가공적성이 높은 편으로 판단된다. 그러나 산성 pH에서의 안정성이 낮으므로 약산성~중성 영역의 식품에 적용하여야 하는 제한성이 수반됨을 알 수 있다.

회향 기원 GTase 저해제 kinetic. 회향 추출물의 GTase에 대한 저해 양식을 규명하기 위하여 회향 추출물의 농도(0-1.0 mg/ml)를 달리하여 서로 다른 농도의 기질(0-0.5 M)에서 GTase에서의 저해 활성을 측정한 후 Lineweaver-Burk plot으로 분석하였다. 회향 추출물은 GTase에 대해 경쟁적 저해와 비경쟁적 저해의 혼합형으로 작용함을 알 수 있었다(Fig. 2).

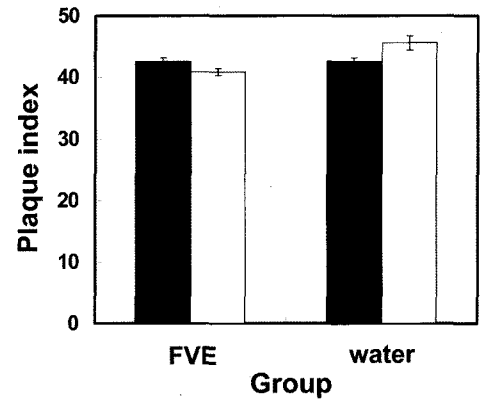

Fig. 3. The inhibitory activity of dental plaque formation by FVE. The water group presented highest plaque index, followed by the FVE group. there was a significant difference between the water group and the FVE group ($p<0.05$).■: before treated, □: after treated.

회향 추출물의 치면 세균막 생성 억제. 연구 대상 지원자 10명을 대상으로 치면 세균막 지수를 측정 후 총 A, B 2그룹으로 나누어 첫 한주는 A군의 회향 추출물을, B군이 증류수를 이용하여 식사 후 3분 이내 2회 사용하였으며 2주후 같은 방법으로 A, B군이 교차 사용하여 실험을 진행하였다. 측정 부위는 정해진 치아의 협면과 설면을 disclosing solution으로 dental plaque를 염색한 후 치아를 총 5등분으로 분할하여 plaque index를 측정하였다. 그 결과 회향 추출물을 사용한 군에서는 평균 1.8 plaque index가 감소하였고 증류수를 사용한 control군에서는 평균 3 point가 증가하였다. 두 그룹 모두 회향 추출물을 사용하였을 때 비슷한 plaque 감소 성향으로 재현성 있는 결과를 보여주었다(Fig. 3). 즉, 회향 열수 추출물을 사용하였을 때가 하지 아니하였을 때 보다 약 4.8 point의 plaque index 감소효과를 보여주어 회향의 열수추출물이 GTase 활성을 저해하여 plaque 형성을 효율적으로 억제 할 수 있는 것으로 판단되었다.

초 록

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus* 등과 같은 구강 세균에 의해 생산되는 효소인 glucosyltransferase(GTase; sucrose 6-glucosyltransferase, EC 2.4.1.5) 는 충치 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 GTase-I, GTase-SI, GTase-S 등 최소 3종의 isozyme이 알려져 있다.[7-10] GTase는 sucrose로부터 점착성이 있는 불용성의 glucan을 형성하고 이 glucan에서 구강 미생물이 증식하며 그 결과로 생성된 유기산에 의하여 치아표면의 에나멜 층이 부식되므로써 충치가 유발되게 된다.[11] 따라서 불용성 glucan의 생성을 유도하는 GTase의 활성을 조절하는 것은 충치 발생 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

본 연구자 등은 GTase를 효율적으로 저해하여 충치를 예방할 물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 약 420종 식물체의 ethanol 추출물로부터 GTase 저해 활성을 검색하여 보고한 바 있다. 수종의 식물체 ethanol 추출물은 *S. mutans*에 대한 정균

활성과 GTase 저해 활성을 동시에 나타내었으며 물질의 분리·정제로부터 oleic acid를 주성분으로 하는 불포화 지방산임이 밝혀진바 있다.[12] 본 연구에서는 약 420종 식물체의 열수추출물을 대상으로 GTase 저해 활성을 검색하였다. 그 중 13종의 열수 추출물에서 비교적 높은 GTase 저해활성이 분포 되고 있음을 확인하였으며 활성이 높은 회향을 대상 식물체로 하였다. 회향의 열수 추출물은 *S. mutans*의 생육에는 영향을 미치지 않고 GTase 활성을 저해하는 특징을 가지고 있다(data not shown). 특히 사람을 대상으로 한 회향 열수 추출물에 의한 치면 세균막 억제 임상 실험 결과 plaque index의 저하를 가져오는 것으로 나타나 회향 열수 추출물은 GTase 활성을 저해하여 충치 예방 목적으로 적용 할 수 있음을 알 수 있다. 회향은 한국을 비롯한 아시아권에서 식품의 향신료 및 민간요법에 널리 사용되는 식물이고 식품의 원료로 사용할 수 있는 소재이다. 회향의 열수 추출물은 열에 대해 높은 안정성을 나타내는 가공 특성을 가지고 있으므로 천연물 기원의 충치예방 기능성 식품으로서의 산업적 이용가치가 기대된다.

Key words: Dental caries, *Foeniculum vulgare*, GTase inhibitor

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신인력양성 사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kato, A. and Arima, K. (1971) Inhibitory effect of sucrose ester of lauric acid on the growth of *Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 596-601.
2. Kubo, I., Muroi, H. and Himejima, M. (1992) Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 245-248.
3. Duarte, S., Koo, H., Bowen, W. H., Hayacibara, M. F., Cury, J. A., Ikegaki, M. and Rosalen, P. L. (2003) Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of *mutans streptococci. Biol. Pharm. Bull.* **26**, 527-531.
4. Matsumoto, M., Hamada, S. and Ooshima, T. (2003) Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *FEMS Microb. Lett.* **228**, 73-80.
5. Limsong, J., Benjavongkulchai, E. and Kuvatanasuchati, J. (2004) Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans. J. Ethnopharmacol.* **92**, 281-289.
6. Huang, B. B., Fan, M. W., Wang, S. L., Han, D. X., Chen, Z. and Bian, Z. (2006) The inhibitory effect of magnolol from *Magnolia officinalis* on glucosyltransferase, Arch. *Oral Biol.* **51**, 899-905.
7. Yamashita, Y., Bowen, W. H., Burne, R. A. and Kuramitsu, H. K. (1993) Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect. Immun.* **61**, 3811-3817.
8. Aoki, H., Shiroza, T., Hayakawa, M., Sato, S. and Kuramitsu, H. K. (1986) Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infect. Immun.* **53**, 587-594.
9. Hanada, N. and Kuramitsu, H. K. (1988) Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect. Immun.* **56**, 1999-2005.
10. Hanada, N. and Kuramitsu, H. K. (1989) Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfD gene, coding for primer dependent soluble glucan synthesis. *Infect. Immun.* **57**, 2079-2085.
11. Loesche, W. J. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* **50**, 353-380.
12. Won, S. R., Hong, M. J., Kim, Y. M., Li, C. Y., Kim, J. W and Rhee, H. I. (2007) Oleic acid: an efficient inhibitor of glucosyltransferase. *FEBS Lett.* **581**, 4999-5002.