

지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 Sesquiterpene lactones의 항균활성

장대식 · 박기훈 · 이종록 · 하태정 · 박윤배¹ · 남상해² · 양민석*

경상대학교 농화학과, ¹경상대학교 생화학과
²진주산업대학교 식품가공학과

초 록 : 지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 9종류의 sesquiterpene lactones에 대한 생리활성 실험의 일환으로, 10종의 세균에 대한 항세균활성과 6종의 식물병원균에 대한 항진균활성을 조사하였다. 항세균 활성실험에서는 지칭개에서 분리한 hemistepsin A와 B 그리고 산국에서 분리한 tulipinolide가 시험균주 전반에 대하여 강한 활성을 보였으며, 항진균 활성실험에서는 hemistepsin B, angeloylcumambrin B, tigloylcumambrin B, 그리고 costunolide가 광범위한 활성을 보였다. 또한, 항세균 활성실험과 항진균 활성실험 모두 비교적 뚜렷한 균주특이성을 나타내었다.(1998년 10월 15일접수, 1999년 2월 26일 수리)

서 론

국내에 자생하는 식물로부터 생리활성물질을 분리하고자 하는 연구의 일환으로 본 연구자 등은 국화과(compositae) 식물인 지칭개(*Hemisteptia lyrata* Bunge), 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura) 및 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)으로부터 이들의 유효성분으로 예상되는 9종의 sesquiterpene lactone을 분리하여 그 구조를 규명한 바 있다.¹⁵⁾

Sesquiterpene lactone은 민간 치료약으로 이용되어온 수많은 국화과 식물과 쓴맛을 나타내는 식물들로부터 분리되어 다양한 생리작용이 보고된 중요한 식물천연물군의 하나이다.⁹⁾ 이 화합물군의 생리활성으로는 항종양활성, 세포독성, 타감작용, 항균작용 및 살충성 등이 알려져 있으며,^{6,11)} 위장세포의 보호작용¹²⁾이나 진통작용¹³⁾ 등과 같은 다양한 약리활성을 가진다는 사실이 보고된 바 있다. 이 중에서 sesquiterpene lactone의 가장 대표적인 생물활성은 세포독성과 항종양활성으로서, helenalin, eupatoriopicrin, melampodin A, parthenin, xanthatin, parthenolide, artemisinin 등 다양한 골격을 가지는 sesquiterpene lactone들의 세포독성이나 항종양활성이 보고되었다.¹⁴⁾ 따라서 본 연구자 등은 지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 9종의 sesquiterpene lactone에 대한 생리활성실험의 일환으로 몇 종의 인체암세포주에 대한 세포독성 실험을 수행한 바 있다.¹⁵⁾

본 연구에서는 이들 9종의 sesquiterpene lactones을 대상으로 세포독성 이외의 다른 생리활성을 확인하고 식품보존료나 살균제로서의 활용가능성을 평가하기 위한 기초적인 실험으로서, 10종의 세균에 대한 항세균활성과 6종의 식물병원균에 대한 항진균실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험물질 및 재료

지칭개(*Hemisteptia lyrata* Bunge)의 전초에서 분리한 hemistepsin A와 hemistepsin B, 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura)의 꽃에서 분리한 angeloylcumambrin B, tigloylcumambrin B, hendelin 및 cumambrin B, 그리고 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)의 꽃에서 분리한 cumambrin A, costunolide 및 tulipinolide를 실험재료로 사용하였다.¹⁵⁾

사용미생물과 배지

항균 활성실험을 위해 사용된 세균은 Gram 양성균 5종 (*Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Bacillus cereus* ATCC 27348,

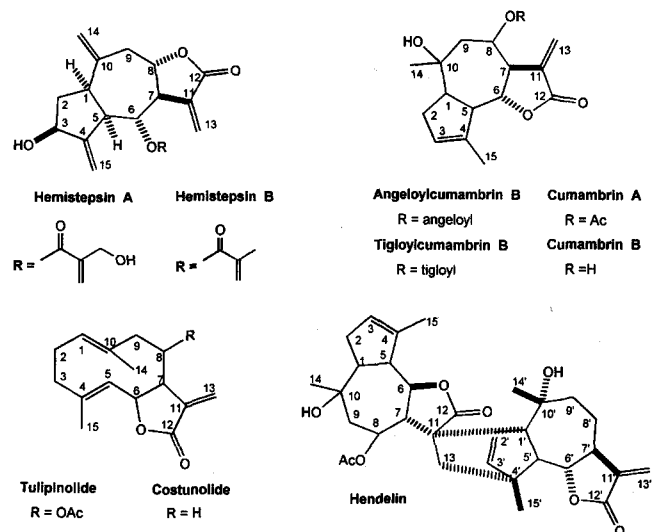


Fig. 1. The nine sesquiterpene lactones isolated from *H. lyrata*, *C. zawadskii* and *C. boreale*.

찾는말 : 지칭개, 구절초, 산국, sesquiterpene lactone, 항균활성
 *연락처자

Staphylococcus aureus ATCC 13301, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus faecalis* IFO 3971)과 Gram 음성균 5종(*Escherichia coli* ATCC 15489, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844, *Klebsidia pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10490)으로 한국미생물 보존센터(KCCM)에서 분양 받았다. 항진균 활성실험을 위해 사용된 6종의 식물병원균은 *Fusarium oxysporum*(채소 시들음병), *Rhizoctonia solani*(채소 갈록병), *Pythium ultimum*(모 갈록병), *Botrytis cinerea*(야채 잿빛곰팡이병), *Phytophthora capsici*(고추 역병) 및 *Pyricularia oryzae*(도열병)로 한국화학연구소에서 분양 받아 사용하였다.

배지는 세균의 경우 nutrient agar(Difco)를 사용하였으며 *V. parahaemolyticus*의 경우만 3% NaCl을 첨가하여 사용하였다. 그리고 곰팡이의 경우에는 Potato Dextrose Agar(PDA, Difco)를 사용하였다.

항미생물 활성측정

항세균 활성의 검정은 한천배지확산법(disc-agar plate diffusion method)으로 측정하였다.¹⁶⁾ 즉, 시료를 에탄올에 일정한 농도로 녹여 0.45 µm membrane filter(Milipore社, USA)로 여과하여 멸균된 filter paper disc(Toyo seisakusho, 8 mm)에 10 µl씩 흡수시킨 후 시험용 평판배지 위에 놓아 밀착시키고 30°C의 incubator에서 24시간 배양한 다음 disc 주변의 clear zone의 직경(mm)을 측정하였다.

식물병원균에 대한 항균 활성검정 역시 항세균 활성실험과 유사한 Petri plate 대치배양으로 조사하였다. 즉, 시료를 멸균된 filter paper disc(Toyo seisakusho, 8 mm)에 흡수시킨 후(최종농도 100 µg/disc) 생육배지의 한 가운데에 검정균총을 접종시킨 직경 9 cm의 Petri dish의 가장자리에 놓아 밀착시키고, 28°C의 incubator에서 3~7일간 배양한 다음 곰팡이의 성장저해도(100-성장도)를 조사하였다. 성장도(growth rate)는 대조구(ethanol 20 µl/disc)만 있을 때의 균사체 크기에 대한 시료가 있을 때의 균사체 크기의 백분율(%)로 구하였다.

결과 및 고찰

항세균활성

지칭개, 구절초 및 산국에서 분리된 9종의 sesquiterpene lactones을 대상으로 식품보존료로서의 이용가능성을 조사하기 위해서, 10종의 세균에 대한 항세균 활성을 측정하였다. 항세균 실험결과, Table 1에서 보는 바와 같이, 10종의 세균 중에서 Gram 음성균인 *V. parahaemolyticus*와 *P. aeruginosa*, 그리고 Gram 양성균인 *B. subtilis*, *B. cereus* 및 *S. aureus*에는 활성을 보인 반면에 그 나머지 5균주에 대해서는 전혀 활성이 없었다. Sesquiterpene lactone의 항균활성은 항종양 활성이나 세포독성의 경우와 마찬가지로 이들의 α -methylene- γ -butyrolactone group이 DNA synthesis 또는 transcription 과정을 방해하는데서 기인한다고 알려져 있다.⁶⁾ 전반적으로 볼 때, *V. parahaemolyticus*와 두 종의 *Bacillus*속

Table 1. Antibacterial activities of nine sesquiterpene lactones

Compounds (µg/disc)	Bacteria			Diameter of inhibitory zone (mm)							
	EC*	ST	VP	KP	PA	BS	BC	SA	SE	SF	
Hemistepsin A	100	**	-	16	-	9	17	19	12	-	-
	60	-	-	15	-	-	16	17	10	-	-
	40	-	-	14	-	-	15	15	9	-	-
	20	-	-	11	-	-	12	12	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	9	9	-	-	-
Hemistepsin B	100	-	-	16	-	9	16	17	11	-	-
	80	-	-	11	-	-	11	12	10	-	-
	60	-	-	10	-	-	9	10	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Angeloylcumambrin B	100	-	-	10	-	10	11	12	-	-	-
Tigloylcumambrin B	100	-	-	10	-	9	10	11	-	-	-
Cumambrin A	100	-	-	9	-	-	10	9	-	-	-
Cumambrin B	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hendelin	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Costunolide	100	-	-	11	-	-	11	10	-	-	-
Tulipinolide	100	-	-	15	-	9	18	13	13	-	-
	60	-	-	12	-	-	15	12	12	-	-
	40	-	-	12	-	-	12	10	11	-	-
	20	-	-	12	-	-	11	9	-	-	-
	10	-	-	10	-	-	9	-	-	-	-
Benzoic acid	400	NT***	NT	10	NT	NT	10	11	9	NT	NT
	200	NT	NT	-	NT	NT	-	-	-	NT	NT

*EC; *E. coli*, ST; *S. typhimurium*, VP; *V. parahaemolyticus*, KP; *K. pneumoniae*, PA; *P. aeruginosa*, BS; *B. subtilis*, BC; *B. cereus*, SA; *S. aureus*, SE; *S. epidermidis*, SF; *S. faecalis*.

—; "diameter of clear zone < 8.5 mm. *NT; did not test.

Table 2. Antifungal activities of nine sesquiterpene lactones against six phytopathogenic fungi (100 µg/disc)

Compounds	Fungi	FO*	RS	PU	BC	PC	PO
Hemistepsin A		**+	+++	+++	++	++	+++
Hemistepsin B		-	+	++	-	++	+
Angeloylcumambrin B		+	+	+	+	+	++
Tigloylcumambrin B		++	+	+	+	++	+++
Cumambrin A		+	+	++	-	++	+
Cumambrin B		-	-	++	-	++	-
Hendelin		-	-	-	++	-	-
Costunolide		++	+++	+	+	++	+
Tulipinolide		+	++	+	-	+	+

*FO; *F. oxysporum*, RS; *R. solani*, PU; *P. ultimum*, BC; *B. cinerea*, PC; *P. capsici*, PO; *P. oryzae*.

**Rate of growth inhibition (%): 0~10; -, 11~20; +, 21~30; ++, >30; +++.

세균에 대해 가장 높은 활성을 보였으며, 화합물별로는 지칭개에서 분리한 guaianolide인 hemistepsin A와 hemistepsin B 그리고 산국의 꽃에서 분리한 germacranolide인 tulipinolide가 우수한 항균활성을 보였다. 그러나 *E. coli* 등에 대해 항균활성이 있다고 보고된 angeloylcumambrin B¹⁷⁾의 경우, 본 실험에서는 *V. parahaemolyticus*를 비롯한 4종의 세균에 대해서는 어느 정도의 항균활성을 나타내었으나 *E. coli*에 대해서는 전혀 활성을 보이지 않았다.

Hemistepsin A, hemistepsin B, 그리고 tulipinolide의 경우, 현재 식품보존료로 광범위하게 이용하고 있는 benzoic acid에 비하면 강한 항균활성을 보여 식품보존료로서의 개발 가능성은 있지만, 본 실험에서의 항균력 측정방법이 paper disk법에 한정되어 있기 때문에 액체배지희석법에 의한 MIC 측정, 저장안정성, 독성 등에 대한 많은 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

항진균활성

9종의 sesquiterpene lactones을 대상으로 살균제로서의 이용가능성을 조사하기 위해서, 6종의 식물병원성균에 대한 항진균력을 한천배지확산법으로 측정하였다. 항진균실험 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 화합물의 종류와 균의 종류에 따른 일정한 활성의 경향은 찾아보기 어려웠으나, 전체적으로 볼 때, 항세균 활성실험에서 우수한 활성을 보였던 hemistepsin A가 6가지 실험 균주 모두에 대해 고른 활성을 보였다. 그리고 costunolide는 항세균 실험에서는 강한 활성을 보이지 않았지만 항진균실험에서는 tulipinolide보다 전반적으로 우수한 활성을 보여 항세균 활성과 항진균 활성의 작용기작이 다를 것으로 예상되었다. 대체적으로, 본 실험에서 사용된 sesquiterpenes는 *R. solani*(채소 잘록병), *P. ultimum*(모잘록병) 및 *P. capsici*(고추역병)에 대해 상대적으로 강한 활성을 보였다. 항진균활성을 가지는 sesquiterpene lactone에 대한 보고는 *Lactuca sativa*로부터 분리된 costunolide¹⁸⁾ 등을 제외하고는 비교적 적다. 그럼에도 불구하고, 본 실험에서는 9종의 sesquiterpene lactone 모두 적어도 1균주 이상의 식물병원균에 대해 활성을 보여 천연살균제로서의 가능성은 있지만, 활성실험이 상당히 높은 농도(100 µg/disc)에서 이루어졌으며 다른 여러 가지 실험

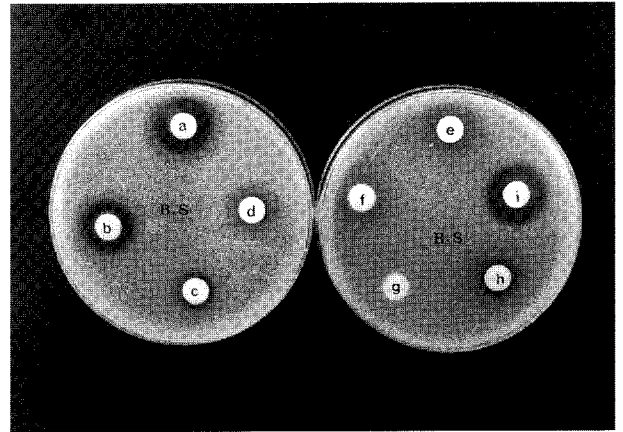


Fig. 2. Antibacterial activities of nine sesquiterpene lactones against *B. subtilis* (100 µg/disc). a; hemistepsin A, b; hemistepsin B, c; angeloylcumambrin B, d; tigloylcumambrin B, e; cumambrin A, f; cumambrin B, g; hendelin, h; costunolide, i; tulipinolide.

들이 뒷받침되어야 할 것이다.

감사의 글

이 연구는 1998년도 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과 중 일부입니다.

참고문헌

- Jang, D. S., Yang, M. S. and Park, K. H. (1998) Sesquiterpene Lactone from *Hemisteptia lyrata*. *Planta Med.* **64**(3), 289-290.
- Jang, D. S., Park, K. H., Choi, S. U., Nam, S. H. and Yang, M. S. (1997) Antibacterial substances of the flowers of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**(1), 85-87.
- Yang, M. S., Park, K. H., Jang, D. S., Choi, S. U., Nam, S. H. and Mooto, S. (1996) Cumambrin A in *Chrysanthemum boreale* Makino. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**(3), 207-211.
- Jang, D. S., Park, K. H. and Yang, M. S. (1998) Germacranolides from flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**(2), 67-70.
- Jang, D. S., Yang, M. S., Ha, T. J. and Park, K. H. (1998)

- Structural analogues of cumambrin B from the Flower of *Chrysanthemum boreale* M. Arch. Pharm. Res. **21**(5), 591-594.
6. Hoffmann, H. M. R. and Rabe, J. (1985) Synthesis and biological activity of α -methylene- γ -butyrolactones. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **24**, 94-110.
 7. Mew, D., Balza, F., Neil Tower, G. H. and Levy, J. G. (1982) Antitumour effects of the sesquiterpene Lactone parthenin. *Planta Med.* **45**, 23-27.
 8. Woerdenbag, H. J., Merfort, I., Mulder, N. H., Vrics, E. G. E., Hendriks, H. and Malingre (1986) Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of some sesquiterpene lactones on a human lung carcinoma cell line using the fast green dye exclusion assay. *Planta Med.* **51**, 112-114.
 9. Macias, F. A., Galindo, J. C. G. and Massanet, G. M. (1992) Potential alleopathic activity of several sesquiterpene lactone models. *Phytochem.* **31**(6), 1969-1977.
 10. Nezhun G., Jasmim, J. and Seminur, T. (1989) Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum argyrophyllum* var. *argyrophyllum*. *Phytochem.* **29**(5), 1467-1469.
 11. Ysrael, M. C. and Croft, K. D. (1990) Inhibition of leukotriene and platelet activating factor synthesis in leukocytes by the sesquiterpene lactone scandenolide. *Planta Med.* **56**, 268-270.
 12. Gtordano, O. S., Querreiro, E., Pestchanker, M. J., Guzman, J., Pastor D. and Guardia, T. (1990) The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Natural Products.* **53**(4), 803-809.
 13. Abad, M. J., Bermejo, P., Valverde S. and Villar, A. (1994) Anti-inflammatory activity of hydroxyachillin, a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*. *Planta Med.* **60**, 228-231.
 14. Cassady, J. M. and Suffness, M. (1980) Anticancer Agents Based on Natural Product Models. in *Medicinal Chemistry* (Cassady, J. M and Douros, J. D. ED.), Vol. 16, Chap. 7, Academic Press, London.
 15. Jang, D. S., Park, K. H., Kim, H. M., Hong, D. H., Chun, H. K., Kho, Y. H. and Yang, M. S. (1998) Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several Compositae plants. Part 1 Cytotoxicity against cancer cell lines. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**(3), 243-247.
 16. Piddok, L. J. V. (1990) Techniques used for the determination of antibacterial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 307-318.
 17. Haruna, M., Kato, M., Ito, K., Nikai, T., Sugihara, H. and Murata, H. (1981) Angeloylcumambrin B, an antimicrobial sesquiterpene lactone from *Chrysanthemum ornatum* var. *spontaneum*. *Phytochem.* **20**(11), 2583-2584.
 18. Grayer, R. J. and Harborne, J. B. (1994) A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochem.* **37**(1), 19-41.

Antimicrobial Activities of Sesquiterpene Lactones Isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*

Dae-Sik Jang, Ki-Hun Park, Jong-Rok Lee, Tae-Joung Ha, Yun-Bae Park¹, Sang-Hae Nam² and Min-Suk Yang* (Dept. of Agricultural Chemistry; ¹Biochemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea; ²Dept. of Food Processing, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea)

Abstracts : In the bioactivity test of nine sesquiterpene lactones isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*, we investigated their antimicrobial activities against ten bacteria and six phytopathogenic fungi. Hemistepsin A and hemistepsin B isolated from *H. lyrata* and tulipinolide isolated from *C. boreale* exhibited strong antibacterial activity. In the antifungal test, hemistepsin B, angeloylcumambrin B, tigloylcumambrin B and costunolide showed broad activity. Both antibacterial and antifungal experiments exhibited quite clear specificity against microbial strains.

Key words : *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii*, *Chrysanthemum boreale*, sesquiterpene lactone, antimicrobial activity

*Corresponding author