

Effects of Methanol Extracts from *Diospyros malabarica* Stems on Growth and Biofilm Formation of Oral Bacteria

Hye Soo Kim¹, Hyun Sook Kwon², Chul Hwan Kim³, Sang Woo Lee⁴, Kongmany Sydara⁵ and Soo Jeong Cho^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, 33 Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea

²National Development Institute of Korean Medicine, Gyeongsan 38540, Korea

³Freshwater Bioresources Utilization Bureau, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju-si 37242, Korea

⁴International Biological Material Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 34141, Korea

⁵Institute of Traditional Medicine, Ministry of Health, Vientiane Capital, Lao People's Democratic Republic

Received December 26, 2017 / Revised January 12, 2018 / Accepted January 16, 2018

This study was conducted to investigate the potential of medicinal plants as oral health materials derived from natural products. Among the extracts from 200 medicinal plants grown in Nepal, Laos, Mongolia, Bangladesh, Vietnam, and China, stem extracts from *Diospyros malabarica* (1 mg/disc) showed the highest antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 and *Streptococcus mutans* ATCC25175. The *D. malabarica* stem extracts showed antibacterial activity similar to chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, and triclosan, which were used as a positive control, as well as higher antibacterial activity against *S. mutans* ATCC25175 than *P. gingivalis* ATCC33277. The *D. malabarica* stem extracts showed bactericidal action (MBC, 0.4 mg/ml) against *P. gingivalis* ATCC33277 and bacteriostatic action against *S. mutans* ATCC25175. The biofilm production rate of *S. mutans* ATCC25175 and the expression of the *comX* gene associated to biofilm formation in the cultures treated with 0.2-1.0 mg/ml of *D. malabarica* stem extracts were suppressed in a concentration-dependent manner. Based on the above results, it can be concluded that *D. malabarica* stem extracts can be used as oral health material derived from natural materials, as demonstrated by the bacteriostatic action and inhibition of biofilm formation against *S. mutans* ATCC25175.

Key words : Biofilm formation, *comX*, *Diospyros malabarica*, *P. gingivalis*, *S. mutans*

서론

사람에게 흔히 나타나는 치아우식증(충치, dental caries)과 치주염(periodontitis)은 감염성 세균에 의한 구강질환이다. 구강질환을 유발하는 대표적인 감염성 세균에는 *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces*, *Odontolyticus* 등이 있다[8, 17]. *Streptococcus mutans*는 대표적인 치아우식증 원인균으로 구강 내 바이오필름 형성에 중요한 역할을 한다[13]. 치아우식증은 세균에 의해 치아 표면에 바이오필름(biofilm)인 플라그(dental plaque)가 형성되고 플라그에 상주하는 세균이 섭취된 음식물의 탄수화물(포도당, 과당 등)을 분해하면서 유기산(젖산)을 세포외로 방출함으로써 치아 법랑질이 탈회되어 발생한다[3]. *Porphyromo-*

*nas gingivalis*는 대표적인 치주염 원인균으로 잇몸 사이의 치주포켓에 서식하며 잇몸조직을 이루는 콜라겐(collagen)을 분해하는 효소를 분비하는 세균이다. 치주염은 부착조직과 치조골의 파괴를 동반하는 질환으로 치아에 지속적으로 형성되는 플라그가 직접적인 원인이다. 구강 바이오필름인 플라그는 수백여 종의 미생물이 구강 내 표면 위에 부착하면서 지속적인 상호작용을 하고, 숙주 및 외부 환경에 따라 끊임없이 변화하며 구강 건강에 영향을 미친다[2]. 바이오필름을 형성한 세균 집단은 치아 표면에 부착하여 다당류로 구성된 세균막을 형성함으로써 부유성 세균에 비해 영양분 고갈, 산성도 변화, 삼투압 증감, 온도 변화, 독성물질 등 여러가지 환경적 스트레스에 대해 현저히 증가된 저항성을 나타낸다고 알려져 있다[10, 23, 26, 28]. 따라서 구강질환을 효과적으로 예방하기 위해서는 구강미생물의 바이오필름 형성을 제어할 필요가 있다. 일반적으로 구강케어제품에는 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan 등의 항생제가 함유되어 있고 치과에서는 ampicillin, erythromycin, penicillin 등의 항생제가 구강미생물의 증식을 억제하기 위해 광범위 항생제로 사용되고 있다[15]. 그러나 항생제는 바이오필름 내부까지 침투하여 항균작용을 나타내기 어렵고 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclo-

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3397, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sjcho@gntech.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

san, cetylpyridium chloride (CPC) 등의 합성물질과 항생제의 지속적인 사용은 구강미생물 군총의 변화를 유발하여 항생제 내성을 일으킬 뿐만 아니라 치아의 변색과 구토, 설사 등의 부작용을 일으킬 수 있다[5]. 이러한 인체 및 환경 안정성과 관련된 문제들이 대두되면서 항균력이 우수하면서도 인체 및 환경 독성이 낮은 천연물유래 구강소재에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[1, 6, 25]. *S. mutans*에 대해 항균작용이 있는 식물로는 황금, 백두옹, 후박, 일황련, 고삼, 오미자, 지의류, 세이지, 감초, 벌집, 치커리, 꿀풀 등이 보고되었고[6, 8, 21] *P. gingivalis*에 대해 항균작용이 있는 식물로는 금잔화, 멜리사, 조롱나무, 아르니카 몬타나, 양아욱, 상백피 등이 보고되었다[9, 18].

인도감나무(*Diospyros malabarica*)는 인도, 일본, 나이지리아, 필리핀 등지에 자생하며 아유르베다 의학에서 피부 감염 등으로 인한 작열감, 발열, 설사, 이질, 당뇨, 요로 감염, 말라리아에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[12, 24]. 인도감나무에 대한 생리활성은 인도감나무 열매의 항산화 활성, 껍질의 항산화 활성과 anti-diarrhoea activity 등이 보고되었으며 항균 활성에 관한 연구는 미비한 실정이다[19, 22].

본 연구에서는 구강미생물에 대한 인도감나무 줄기 추출물의 항균활성과 바이오필름 생성 억제 효과를 조사하여 천연물 유래 구강건강소재로써 인도감나무 줄기 추출물의 이용 가능성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 추출물

구강미생물에 대한 추출물의 항균활성을 알아보기 위해 사용된 균주는 그람음성균인 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277와 그람양성균인 *Streptococcus mutans* ATCC25175로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양받아 사용하였다. *P. gingivalis* ATCC33277는 tryptic soy agar hemin menadione 배지에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였고 *S. mutans* ATCC25175는 brain-heart infusion agar (BHIA; BD, Franklin Lakes, USA)에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였다. 실험에 사용된 추출물은 네팔, 라오스, 몽골, 방글라데시, 베트남, 중국 등지에 자생하는 200여 종의 약용작물에서 추출한 메탄올 추출물이며 한국생명공학연구원 해외생물소재센터(KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

추출물의 항균활성

구강미생물에 대한 추출물의 항균활성은 agar diffusion method [7]에 따라 추출물의 농도가 1 mg/disc인 paper disc (8 mm diameter, ADVANTEC, Tokyo, Japan)를 *P. gingivalis* ATCC33277와 *S. mutans* ATCC25175가 도말된 고체배지에 얹어 배양한 다음 paper disc 주위에 나타난 clear zone의 크기를

측정하여 조사하였다. 양성 대조구로는 구강케어제품에 사용되고 있는 chlorhexidine (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), sodium lauryl sulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), triclosan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 등을 사용하였다.

추출물의 최소성장억제 농도(MIC)와 최소살균농도(MBC) 측정

추출물의 최소성장억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 액체 배지 희석법을 이용하여 알아보았다[11]. 구강미생물인 *P. gingivalis* ATCC33277와 *S. mutans* ATCC 25175는 37°C에서 24시간 동안 혐기배양한 다음 배양액을 액체배지에 희석하였다(O.D₆₀₀=0.4-0.6). 희석된 배양액에 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg/ml 농도로 추출물을 처리한 다음 각각의 배양조건에 따라 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 균주의 증식이 나타나지 않는 최소 농도를 최소성장억제농도로 정하였다. 구강미생물에 대한 추출물의 항균효과가 살균작용에 의한 것인지 정균작용에 의한 것인지 확인하기 위해 최소성장억제농도로 확인된 추출물 농도로부터 그 이상의 농도에 해당하는 배양액을 고체배지에 도말하였으며 37°C에서 24시간 동안 혐기배양한 다음 균수의 99.9%가 사멸된 추출물의 농도를 최소살균농도(minimal bactericidal concentration, MBC)로 정하였다.

추출물의 바이오필름 생성 억제

추출물이 *P. gingivalis* ATCC33277와 *S. mutans* ATCC25175의 바이오필름 생성에 미치는 영향은 Zhou 등[29]의 방법을 이용하여 조사하였다. 구강미생물은 고체배지에 도말하여 24시간 동안 혐기배양한 다음 액체배지에 현탁하여(O.D₆₀₀=0.4-0.6) 96-wellplate에 분주하였다. 균주가 분주된 96-well plate에 0.2-2.0 mg/ml 농도의 추출물을 처리한 다음 37°C에서 혐기배양하면서 바이오필름 생성을 유도하였다. 96-well plate에 형성된 바이오필름은 멸균 증류수로 2회 세척한 다음 건조한 후 0.25% safranin으로 20분 동안 염색하였다. 바이오필름 생성 억제능은 safranin에 염색된 바이오필름을 70% 에탄올에 용해한 후 575 nm에서 spectrophotometer (Softmax M5, Molecular Devices, USA)로 흡광도를 측정하여 확인하였다.

추출물의 바이오필름 생성 관련 유전자 발현 억제

추출물이 구강 미생물의 바이오필름 생성 관련 유전자 발현에 미치는 영향은 Li 등[16]과 Cramton 등[4]의 방법을 이용하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)으로 확인하였다. Total RNA는 액체배지에 현탁한(O.D₆₀₀=0.4-0.6) 구강미생물에 0.2-1.0 mg/ml 농도의 추출물을 처리한 다음 37°C에서 배양한 후 배양액을 원심분리하여 얻은 pellet 으로부터 RNeasy Kit (Qiagen, Hillden, Germany)를 이용하여 분리하였다. cDNA는 total RNA 1 ug, 5X RT buffer 8 ul

(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 2.5 mM spermidine, 50 mM DTT), 2.5 mM dNTP 4 ul, oligo-dT (100 pmol/ul) 1 ul, RNase inhibitor (4 unit/ul) 2 ul, M-MLV reverse transcriptase (5 unit/ul) 2 ul를 반응시켜 합성하였다. RT-PCR은 AccuPower premix[®] (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 95°C에서 5분, 94°C에서 30초, 62°C에서 2분씩 30 cycle을 반복한 다음 72°C에서 10분 동안 수행하였고 유전자의 발현양상은 PCR product를 1.0% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

통계처리

모든 실험은 5회 이상 반복실험을 수행하여 얻어진 결과이며 실험결과와 평균값과 표준오차는 SAS (Statistical analysis system, USA) program을 사용하여 구하였고 Duncan's 다중검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

인도감나무 줄기 추출물의 항균활성

네팔, 라오스, 몽골, 방글라데시, 베트남, 중국 등지에 자생하는 200여 종의 약용작물로부터 추출한 메탄올 추출물의 *P. gingivalis* ATCC33277과 *S. mutans* ATCC25175에 대한 항균활성을 측정한 결과, 200여 종의 추출물 중 인도감나무(*Diospyros malabarica*) 줄기 추출물이 *P. gingivalis* ATCC33277과 *S. mutans* ATCC25175에 대해 가장 우수한 항균활성을 나타내었으며 *P. gingivalis* ATCC33277에 비해 *S. mutans* ATCC25175에 대한 항균활성이 우수하였다. 양성 대조구로 사용한 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate와 triclosan은 시판되고 있는 구강케어제품에서 각각 0.1%, 0.2%와 0.3%의 농도로 사용되고 있으며 본 실험에서는 인도감나무 줄기 추출물과 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan의 항균활성을 1 mg/disc의 농도에서 비교하였다. 그 결과 인도감나무 줄기 추출물은 *S. mutans* ATCC25175에 대해 양성대조구로 사용한 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan과 유사한 항균활성을 나타내었다(Fig. 1). 따라서 인도감나무 줄기 메탄올 추출물은 양성대조구인 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan과 비교될 수 있는 우수한 항균활성을 가진 천연물유래 구강

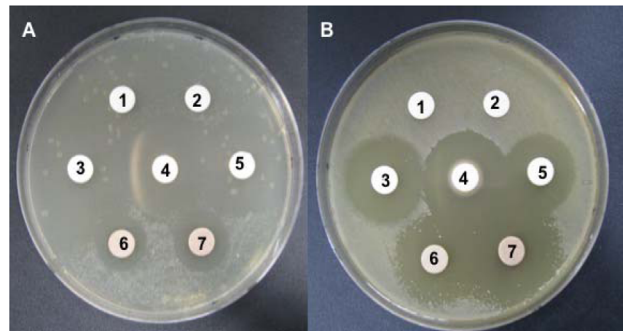


Fig. 1. Antimicrobial activity of methanol extract of *D. malabarica* stems against *P. gingivalis* ATCC33277 (A) and *S. mutans* ATCC25175 (B). 1: DMSO as a negative control, 2: methanol as a negative control, 3: sodium lauryl sulfate as a positive control (1 mg/ml), 4: chlorhexidine as a positive control (1 mg/ml), 5: triclosan as a positive control (1 mg/ml), 6: methanol extracts of *D. malabarica* stems (1 mg/ml), 7: methanol extracts of *D. malabarica* stems (2 mg/ml).

건강소재로써 개발 가능성이 있다고 판단된다.

인도감나무 줄기 추출물의 최소성장억제 농도 및 최소살균 농도

P. gingivalis ATCC33277과 *S. mutans* ATCC25175에 대한 항균활성이 다른 추출물에 비해 우수한 인도감나무 줄기 추출물의 최소성장억제 농도와 최소살균농도를 측정하였다(Table 1). 추출물은 *P. gingivalis* ATCC33277에 비해 *S. mutans* ATCC25175에 대해 높은 항균활성을 나타내었으며 *P. gingivalis* ATCC33277에 대한 추출물의 MIC는 0.4 mg/ml이었고 *S. mutans* ATCC25175에 대한 추출물의 MIC는 0.2 mg/ml였다. *P. gingivalis* ATCC33277에 대한 추출물의 MIC인 0.4 mg/ml 및 그 이상의 농도에 해당하는 배양액을 고체배지에 배양한 결과 0.4 mg/ml 및 그 이상의 농도에서 colony를 관찰할 수 없었으므로 *P. gingivalis* ATCC33277의 MBC는 0.4 mg/ml로 결정하였다. 그러나 *S. mutans* ATCC25175에 대한 추출물의 MIC인 0.2 mg/ml 및 그 이상의 농도에 해당하는 배양액을 고체배지에 배양한 결과 0.2 mg/ml 및 그 이상의 농도에서 모두 colony를 관찰할 수 있었다. 따라서 인도감나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis* ATCC33277에 대해서는 살균작용을 하고 *S. mutans*

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of methanol extract of *D. malabarica* stems against *P. gingivalis* ATCC33277 and *S. mutans* ATCC25175

Strains	Concentration (mg/ml)							MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2.0		
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277	+ ^a	+/- ^c	- ^b	-	-	-	-	0.4	0.4
<i>S. mutans</i> ATCC25175	+	-	-	-	-	-	-	0.2	ND ^d

^a: growth on test medium. ^b: no growth on test medium. ^c: slow growth on test medium. ^d: non-detection.

ATCC25175에 대해서는 정균작용을 하는 것으로 판단된다.

인도감나무 줄기 추출물이 바이오필름 생성에 미치는 영향

인도감나무 줄기 추출물이 *P. gingivalis* ATCC33277와 *S. mutans* ATCC25175의 바이오필름 형성에 미치는 영향은 Zhou 등[29]의 방법을 이용하여 조사하였다. 바이오필름의 양적 분석방법은 Zhou 등[29]과 Stepanovic 등[27]의 방법이 많이 사용되고 있으나 세균 중에 따른 분석방법은 아직 정립되지 않았기 때문에 바이오필름을 생성하는 세균 중에 따른 다양한 분석 방법의 정립이 필요하다[4, 18]. *P. gingivalis* ATCC 33277와 *S. mutans* ATCC25175 배양액에 추출물을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg/ml 농도로 처리하였을 때, *P. gingivalis* ATCC33277 배양액에서는 바이오필름이 생성되었지만(data not shown) *S. mutans* ATCC25175에서는 바이오필름 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 추출물이 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg/ml 농도로 처리된 배양액에서 *S. mutans* ATCC 25175의 바이오필름 생성율은 각각 87.9%, 33.5%, 31.3%, 27%, 24.7%, 18.3%로 추출물의 농도가 높아질수록 바이오필름 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었고 균주의 생육도 추출물의 농도(0.2-0.8 mg/ml)가 높아질수록 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 식물추출물인 백질려 추출물의 농도가 높아질수록 바이오필름 생성율이 감소한다는 백질려 추출물이 *S. mutans*의 항치아우식에 미치는 영향에 관한 Lee [14] 등의 보고와도 일치하는 결과이다. 따라서 인도감나무 줄기 추출물은 정균작용에 의해 *S. mutans*의 생육을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 바이오필름 생성도 억제할 수 있는 천연물유래 구강건강소재로써 개발 가능성이 있다고 판단된다.

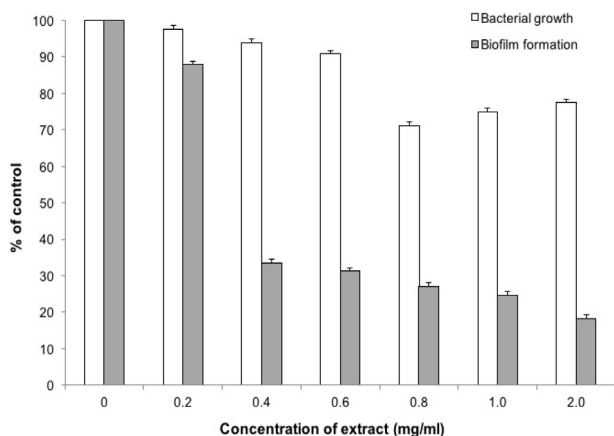


Fig. 2. Bacterial growth and biofilm formation of *S. mutans* ATCC 25175 in brain-heart infusion broth (BHIB) treated with methanol extracts of *D. malabarica* stems (0.2-2.0 mg/ml). Growth and biofilm formation were measured under anaerobic condition. All assays were performed in triplicate, and mean values and standard deviations are shown.

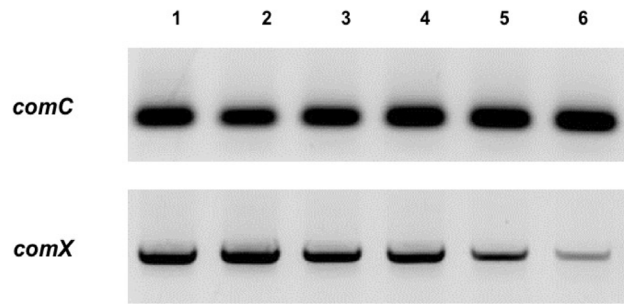


Fig. 3. The *comC* and *comX* gene expression of *S. mutans* ATCC 25175 treated with methanol extracts from *D. malabarica* stems. The concentration of extracts is as follows: lane 1, 0 mg/ml as a control; lane 2, 0.2 mg/ml; lane 3, 0.4 mg/ml; lane 4, 0.6 mg/ml; lane 5, 0.8 mg/ml; lane 6, 1.0 mg/ml.

인도감나무 줄기 추출물이 S. mutans ATCC25175의 바이오필름 형성 관련 유전자(*comC*, *comX*) 발현에 미치는 영향

추출물이 *S. mutans*의 바이오필름 형성 관련 유전자 발현에 미치는 영향은 *comC* 유전자(Forward: 5'-GACTGATGAATT AGAGATTATCATTGG-3', Reverse: 5'-TTTCCCAAAGCTT GTGTAATAACT-3')와 *comX* 유전자(Forward: 5'-GGTCTA CAATTTACACCTTTACCT-3', Reverse: 5'-GCTGCGCCGCC ACTTTTTGGGAAGGCAAAG)를 primer로 이용한 RT-PCR로 확인하였으며 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. RT-PCR로 추출물(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml) 농도에 따른 *comC*와 *comX* 유전자의 발현 변화를 확인한 결과, *S. mutans* ATCC2 5175의 *comC* 유전자 발현은 추출물의 농도에 따라 큰 변화가 없었지만 *comX* 유전자 발현은 추출물의 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타내었고 1.0 mg/ml 농도의 추출물과 함께 *S. mutans* ATCC25175를 배양했을 때 추출물을 처리하지 않고 배양한 *S. mutans* ATCC25175에 비해 *comX* 유전자 발현이 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다. *comX* 유전자는 *comC*, *D*, *E* 유전자와 함께 *S. mutans*의 genetic competence에 관여하는 유전자이며 *S. mutans*의 genetic competence에 필수적인 quorum-sensing signaling system에서 신호전달에 관여하는 유전자이다. Li [16] 등의 보고에 의하면 quorum-sensing signaling system은 *S. mutans*의 genetic competence에 필수적이며 *comC*, *D*, *E*, *X* 유전자 결손 돌연변이체는 비정상적인 바이오필름을 형성한다고 보고하였다[14]. 따라서 추출물의 처리 농도에 따라 *comX* 유전자의 발현이 감소하였으므로 인도감나무 줄기 추출물은 바이오필름 생성을 억제할 수 있는 천연물유래 구강건강소재로써 개발 가능성이 있다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2016년 경남과학기술대학교 기성희연구비 지

원사업에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

References

- Adolfsson, E. M., Pettersson, M., Parkkonen, J. and Sturve, J. 2002. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* **46**, 1485-1489.
- Bakaletz, L. O. 2004. Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 552-568.
- Burne, R. A. 1998. Oral Streptococci products of their environment. *J. Dent. Res.* **77**, 445-452.
- Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W. and Gotz, F. 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* **67**, 5427-5433.
- Chen, C. P., Lin, C. C. and Tsuneo, N. 1989. Screening of Taiwanese crude drugs for antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. *J. Ethnopharmacol.* **27**, 285-295.
- Choi, M. S. and Ahn, K. S. 2014. Antibacterial effect of bamboo charcoal on *Streptococcus mutans*. *J. Kor. Soc. Dent. Hyg.* **14**, 95-100.
- Davidson, P. M. and Parish, M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.* **43**, 148-152.
- Huh, M. K. and Kim, H. J. 2014. Antibacterial effect on leaf-extract from *Nelumbo nucifera* against oral microorganism. *J. Kor. Soc. Dent. Hyg.* **14**, 117-122.
- Iauk, L., Lo Bue, A. M., Milazzo, I., Rapisarda, A. and Blandino, G. 2003. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother. Res.* **17**, 599-604.
- Kim, H. E. 2014. Change of paradigms in caries-associated bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J. Dent. Hyg. Sci.* **14**, 87-93.
- Kim, S. K., Shin, M. K., Auh, Q. S., Lee, J. Y., Hong, J. P. and Chun, Y. H. 2007. Effect of phytoncide on *Porphyromonas gingivalis*. *J. Oral. Med. Pain.* **32**, 137-150.
- Kumar, S., Shukla, Y. N., Lavania, U. C., Sharma, A. and Singh, A. K. 1997. Medicinal and aromatic plants: prospects for India. *J. Med. Arom. Pl. Sc.* **19**, 361-365.
- Kuramitsu, H. K., He, X., Lux, R., Anderson, M. H. and Shi, W. 2007. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 653-670.
- Lee, D. H., Yu, H. H., Jung, S. Y., Moon, H. D., Kim, S. M., Jeon, B. H. and You, Y. O. 2007. Anticariogenic preproperties of the ethanol extract of *Tribuli fructus* against *Streptococcus mutans*. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **21**, 1148-1153.
- Lee, Y. S., Jang, K. A. and Cha, J. D. 2012. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 1-7.
- Li, Y. H., Tang, N., Aspiras, M. B., Lau, P. C. Y., Lee, J. H., Ellen, R. P. and Cvitkovitch, D. G. 2002. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **184**, 2699-2708.
- Lin, M., Savaiano, D. and Harlande, S. 1991. Influence of nonfermented dairy products containing bacterial stater cultures on lactose maldigestion in humans. *J. Dairy Sci.* **74**, 87-95.
- Loo, C. Y., Corliss, D. A. and Ganeshkumar, N. 2000. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J. Bacteriol.* **182**, 1374-1382.
- Mahesh, S. R., Mohan, G. K., Namdev, Y. G. and Sanjay, J. S. 2013. Evaluation of anti-diarrheal activity of *Diospyros malabarica* bark extract. *Bangladesh J. Pharmacol.* **8**, 49-53.
- Park, K. M., You, J. S., Lee, H. Y., Baek, N. I. and Hwang, J. K. 2003. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *J. Ethnopharmacol.* **84**, 181-185.
- Poureslami, H. 2012. The effects of plant extracts on dental plaque and caries. MY.(ed.). Croatia: In tech. **2012**, 96-402.
- Pranjal, S. and Debabrat, B. 2014. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Gardenia jasminoides ellis* and *Diospyros malabarica* kostel. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **5**, 199-204.
- Pratt, L. A. and Kolter, R. 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 598-603.
- Ramsewak, R. S., Nair, M. G., Stommel, M. and Selanders, L. 2003. *In vitro* antagonistic activity of monoterpenes and their mixtures against 'toe nail fungus' pathogens. *Phytother. Res.* **17**, 376-379.
- Rule, K. L., Ebbett, V. R. and Vikesland, P. J. 2005. Formation of chloroform and chlorinated organics by free-chlorine-mediated oxidation of triclosan. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3176-3185.
- Stoodly, P., Sauer, K., Davies, D. G. and Costerton, J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187-209.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. and Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS.* **115**, 891-899.
- Stewart, P. S. and Costerton, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138.
- Zhou, L., Ding, Y., Chen, W., Zhang, P., Chen, Y. and Lv, X. 2013. The *in vitro* study of ursolic acid and oleanolic acid inhibiting cariogenic microorganisms as well as biofilm. *Oral Dis.* **19**, 494-500.

초록 : 인도감나무 줄기 추출물이 구강미생물의 생육과 바이오필름 생성에 미치는 영향

김혜수¹ · 권현숙² · 김철환³ · 이상우⁴ · 공마니 시다래⁵ · 조수정^{1*}

(¹경남과학기술대학교 제약공학과, ²한약진흥재단, ³국립낙동강생물자원관 담수생물특성연구실, ⁴한국생명공학연구원, ⁵라오스 약용식물연구소)

본 연구는 천연물유래 구강건강소재로써 약용작물의 이용 가능성을 알아보기 위해 수행되었으며 네팔, 라오스, 몽골, 방글라데시, 베트남, 중국 등지에 자생하는 200여 종의 약용작물로부터 추출한 메탄올 추출물 중 인도감나무 줄기 추출물(1 mg/disc)이 *P. gingivalis* ATCC33277와 *S. mutans* ATCC25175에 대해 가장 우수한 항균활성을 나타내었으며 양성대조군으로 사용한 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan과 유사한 항균활성을 나타내었다. 인도감나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis* ATCC33277에 비해 *S. mutans* ATCC25175에 대해 높은 항균활성을 나타내었으며 *P. gingivalis* ATCC33277에 대해서는 살균작용(MBC, 0.4 mg/ml)을, *S. mutans* ATCC25175에 대해서는 정균작용을 하는 것으로 확인되었다. 인도감나무 줄기 추출물이 0.2-1.0 mg/ml 농도로 처리된 배양액에서 *S. mutans* ATCC25175의 바이오필름 생성율과 바이오필름 생성관련 유전자 *comX*의 발현은 추출물의 농도가 높아 질수록 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하면 인도감나무 줄기 추출물은 치아우식증 원인균인 *S. mutans* ATCC25175에 대한 정균작용과 바이오필름 생성 억제능이 우수하기 때문에 천연물유래 구강건강소재로써 이용 가능성이 높을 것으로 판단된다.