

Effect of Natural Extracts on Oral Care Probiotics *Weissella cibaria* CMU and Periodontal Pathogens

Ji-Eun Yeu¹, Hyun-Jin Kim² and Mi-Sun Kang^{1*}

¹Research Institute, Oradentics Inc., Seoul 04781, Republic of Korea

²Institute of Biomaterial Implant, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 54538, Republic of Korea

(received November 1, 2018; revised November 11, 2018; accepted December 10, 2018)

The purpose of this study is to determine if natural extracts could be used as an additive in oral health food made with *Weissella cibaria* CMU (oraCMU). Natural extracts of green tea, mulberry leaf, licorice, and propolis, which are reported to have antimicrobial activities, were selected and used in this study. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of extracts on periodontal pathogens such as *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* and their synergy effects with oraCMU by the fractional inhibitory concentrations methods were measured. From the results obtained, all the extracts showed no effect on the growth of oraCMU. Green tea extract showed the best antibacterial activity with MIC of 1.8 mg/ml against both *F. nucleatum* and *P. gingivalis*. In addition, green tea extract had a synergistic effect with oraCMU against *F. nucleatum*. Therefore, these results suggested that green tea extract is available as an additive in oral health food made with oraCMU.

Key words: natural extracts, probiotics, *Weissella cibaria*, antibacterial, periodontal

*Correspondence to: Mi-Sun Kang, Research Institute, Oradentics Inc., 1805-ho, 25 Seongsuil-ro-4-gil, Seongdong-gu, Seoul 04781, Republic of Korea
Tel: +82-2-2138-2572, Fax: +82-2-2138-2579
E-mail: jeeenkang@oradentics.com
ORCID : 0000-0001-8078-4666

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.

서론

치주질환은 유병률이 높은 구강질환 중 하나로서 전세계적으로도 많은 사람들에게 부담을 주는 질환이다 [1]. 치주질환 발병과 관련하여 중요한 역할을 하는 원인균으로는 *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 등이 알려져 있다 [2]. 최근 치주질환이 제2형 당뇨병, 죽상동맥경화성 혈관 질환, 신진대사 증후군, 조산 및 저체중 출산, 폐렴 등 전신질환에 영향을 끼친다는 연구들이 발표되고 있으며 [3-5], 특히 치주질환을 일으키는 세균이 전신질환에 영향을 준다고 알려져 있으므로 구강내 세균 관리의 중요성이 부각되고 있다.

치주질환 치료의 약물요법은 항생제, 항균제 및 항염제로 나뉘고 있다. 항생제는 장시간 사용 시 내성균 발현, 과민 반응 및 위장장애 등의 부작용을 가지고 있다고 알려져 있다 [6]. 항균제 중 chlorhexidine은 치태 관리에 가장 효과적이며 경구용으로 전신 독성이 없다고 알려져 가장 널리 사용되고 있으나 지속적인 사용을 권장하지 않는 이유는 치아 염색 등 외관상의 문제와 미각 이상 및 구강점막의 작열감 등 부작용을 유발한다는 보고가 있기 때문이다 [7]. 또한, 항균제 중의 하나인 불소는 체내에 흡수되므로 치아불소증을 유발할 수 있다고 보고되고 있다 [8]. 이렇듯 현재까지 주요 치주질환 보조제들은 효과만큼이나 다양한 부작용을 가지고 있으므로, 이를 극복하기 위한 방법으로 최근에는 천연물과 프로바이오틱스 (probiotics)에 대한 연구가 많이

이루어지고 있다.

녹차 성분인 epigallocatechin gallate (EGCG)는 급진성 치주염과 관련 있는 것으로 알려져 있는 *A. actinomycetemcomitans*에 대해 항균력이 있다고 보고되고 있으며 [9], Min 등 [10]은 녹차 추출물이 *P. intermedia*에 의한 잇몸 염증 반응을 효과적으로 억제하였다고 보고하고 있다. 또한, 충치유발세균인 *Streptococcus mutans* 바이오필름에 대하여 빙잎 추출물이 강력한 억제력을 가지고 있고 미약하지만 *Staphylococcus epidermidis*와 *Staphylococcus aureus*에 대해서도 항균활성이 나타난다고 보고되고 있으며 [11,12], 프로폴리스는 *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* 등을 포함한 15종의 구강병원성세균에 대해 모두 항균력을 나타냈다고 보고되었다 [13]. 감초 뿌리 추출물은 *S. mutans*에 대한 강한 항균력을 가지며, 바이오필름 형성을 억제한다고 보고되고 있다 [14].

Weissella cibaria CMU, CMS1, CMS2, CMS3는 구강유산균으로서 본 연구진에 의해서 전체 유전자 서열이 분석되어 GenBank에 등록되었으며 [15], 국내 최초로 구강건강을 위한 식품원료로 식약처에 등록되었다. 또한, *S. mutans*의 바이오필름 형성을 억제하고 치주질환 원인균 *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*의 성장을 억제하며 [16,17], 구취유발세균에 의한 구취를 억제하는 등 [18] 구강 질환 예방 효과를 가지고 있어 *W. cibaria* CMU (oraCMU) 및 *W. cibaria* CMS1 (oraCMS1)은 최근 식품산업에서 구강건강유산균 (oral care probiotics)으로 상용화되어 사용되고 있다.

구강유산균 *W. cibaria*를 활용한 여러 가지 구강건강식품을 개발하기 위해서는 구강유산균의 생장에 영향을 미치지 않으면서 구강 건강에 도움을 주는 부원료에 대한 연구가 필요하지만 이에 대한 연구는 매우 미비한 상태이다. 따라서, 현재까지 천연추출물의 항균력에 대한 연구가 많이 되고 있으므로 천연추출물이 구강용 프로바이오틱스의 좋은 부원료로써 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 항균력이 있다고 알려져 있는 녹차, 빙잎, 감초, 프로폴리스 추출물 분말 4종을 선정하여 구강유산균 *W. cibaria* CMU의 생장에 영향을 주는지를 보고자 하였으며, 또한 치주병원균에 대한 항균 시너지 효과를 확인하여 구강건강식품의 부원료로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 연구에 사용된 *F. nucleatum* KCTC 2488, *P. gingivalis*

KCTC 5352는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 그리고 *W. cibaria* CMU (oraCMU)는 (주)오라덴틱스 (Seoul, Korea)에서 보관하고 있는 균주를 사용하였다. *F. nucleatum*은 yeast extract (10000 µg/ml) (Difco, Detroit, MI, USA), cysteine (500 µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA), hemin (5 µg/ml) (Kisan Bio Co., Ltd., Seoul, Korea), menadione (0.5 µg/ml) (Kisan Bio)을 첨가한 brain heart infusion broth (BHI broth, Difco)에, *P. gingivalis*는 hemin (5 µg/ml), menadione (0.5 µg/ml)이 첨가된 TSB Hemin Menadione broth (Kisan Bio)에 각각 접종하여 37°C 혐기조건 (AnaeroPack-Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Co., Tokyo, Japan)에서 48시간 배양하였으며, oraCMU는 De Man, Rogosa, Sharpe broth (MRS broth, Difco)에 접종하여 37°C 호기조건에서 16시간 배양하였다. 각각의 균은 실험에 이용하기 전에 본 배지에서 2회 계대배양한 후 실험에 이용하였다.

천연추출물이 oraCMU의 생장에 미치는 영향

본 연구에 사용된 녹차 추출물 (green tea extract), 빙잎 추출물 (mulberry extract), 감초 추출물 (licorice extract), 프로폴리스 추출물 (propolis extract)은 디에스푸드웰 (DS Food Well Co., Ltd., Gunpo, Gyeonggi-do, Korea)에서 제공받아 냉장보관하면서 실험에 사용하였다. 천연추출물이 구강유산균 oraCMU의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Jeong 등 [19]의 방법에 따라 다음과 같이 실험하였다. MRS broth 42.5 ml에 oraCMU 배양액 (멸균식염수로 균 현탁액을 만든 후, 600 nm에서의 흡광도 값을 0.4로 만든 균액)을 5%로 접종한 후 녹차, 빙잎, 감초, 프로폴리스 추출물 분말을 각각 MRS broth에 녹여서 3.13, 6.25, 12.5 mg/ml 농도로 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 균의 증식 정도를 측정하기 위하여 0, 8, 24시간 간격으로 배양액을 취한 후 microplate reader (VersaMax, Molecular devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 추출물 대신 추출물을 녹일 때 사용한 MRS broth만을 처리하여 동일하게 측정하였다.

천연추출물의 치주병원균에 대한 항균 효과

천연추출물의 치주병원균에 대한 항균 효과를 확인하기 위하여 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서 제시한 미세희석법 (micro-dilution)을 변형하여 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다 [20]. 즉, 천연추출물 분말을 각 균의 생장배지에 녹인 후 0.028, 0.056, 0.11, 0.23, 0.45, 0.9, 1.8, 3.6 mg/ml 농

도가 되도록 각 희석액을 100 μ l씩 96-well plate에 분주하고, *F. nucleatum* 및 *P. gingivalis* 배양액을 OD₆₀₀=0.05가 되도록 희석하여 100 μ l씩 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 혐기 배양하였다. 대조군으로는 추출물 대신 추출물을 녹인 각 균의 배지를 처리하여 사용하였으며, microplate reader를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

oraCMU의 치주병원균에 대한 항균 효과

oraCMU 배양액을 원심분리 (5,000 g, 10 min, 4°C)한 후 주사 필터 (0.45 μ m, Sartorius, Goettingen, Germany)를 이용하여 무균상청액 (cell-free supernatant; CFS)을 얻은 후 96-well plate에 각 치주병원균의 배지를 이용하여 2배씩 연속적으로 희석하여 62.5 mg/ml (v/v) 까지 분주하였다. *F. nucleatum*, *P. gingivalis*는 상기의 방법대로 균 배양액의 농도를 OD₆₀₀=0.05가 되도록 배지에 희석하여 100 μ l씩 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 혐기 배양하였다. 대조군으로는 CFS 대신 각 치주병원균의 배지를 처리하여 사용하였으며, microplate reader를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

녹차 추출물과 oraCMU의 항균 시너지 효과

녹차 추출물과 oraCMU의 시너지효과를 확인하기 위하여 Bonapace 등 [21]의 방법에 따라 FIC (fractional inhibitory concentrations) 지수를 측정하였다. 녹차 추출물을 각 치주병원균의 배지로 용해시킨 후 3.6 mg/ml부터 2배씩 연속적으로 희석하여 0.23 mg/ml까지 농도가 되도록 희석하였다. oraCMU는 상기의 방법대로 얻은 CFS를 250 mg/ml부터 각 치주병원균의 배지를 이용하여 2배씩 연속적으로 희석하여 15.63 mg/ml까지 희석하였다. 그 후 96 well plate에 녹차 추출물은 수평축 well에, oraCMU CFS는 수직축 well에 연속적인 희석액을 50 μ l씩 각각 분주하였다. *F. nucleatum*, *P. gingivalis*은 상기의 방법대로 균 배양액의 농도를 OD₆₀₀=0.05가 되도록 배지에 희석하여 각 well에 100 μ l씩 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 혐기 배양하였으며, OD₆₀₀의 변화가 0.05 이하인 농도를 확인하였다. 대조군으로는 천연추출물과 oraCMU CFS를 처리하지 않은 배지를 이용하였다. FIC 지수는 $\sum FIC = (A) / MIC(A) + (B) / MIC(B)$ 의 공식을 이용하여 구하였다. 여기에서 (A)와 (B)는 병합하여 처리하였을 때 나타나는 A와 B 각각의 MIC이며, MIC(A)와 MIC(B)는 단독으로 처리하였을 때 나타나는 각 A와 B의 MIC를 나타낸다. FIC 지수가 ≤ 0.5 이면 synergy, $> 0.5 \sim 1$ 이면 partial synergy, $> 1 \sim 4$ 이면 indifference, > 4 이면 antagonism으로 정의하였다. 또한, 녹차 추출물(0.1 mg/ml)을 처리한 실험군, oraCMU CFS (15.6 mg/ml)을 처리한 실험군, 녹차 추출물(0.1

mg/ml)과 oraCMU CFS (15.6 mg/ml)를 병합 처리한 실험군 및 무처리군을 대조군으로 하여 위상차현미경을 통해 녹차 추출물과 oraCMU CFS의 치주병원균에 대한 항균 시너지 효과를 확인하였다.

통계처리

천연추출물이 oraCMU의 생장에 미치는 영향 및 oraCMU의 치주병원균에 대한 항균효과에 대한 통계적 처리는 Mann-Whitney U test를 적용하였다. 또한, 천연 추출물 간의 항균 효과에 대한 비교 연구는 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 후 Duncan's test로 사후검정 하였다. 본 연구에 사용된 모든 통계분석은 유의수준 0.05에서 SPSS Version 21.0 (Statistical Packages for Social Science version 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

결 과

4가지 천연추출물이 구강유산균인 oraCMU의 생장에 영향을 주는지 알아보기 위하여 각 추출물을 농도별로 혼합하여 oraCMU를 24시간 동안 배양한 결과, 추출물의 농도와 상관없이 대조군과 비슷한 OD₆₀₀값을 나타내었다 (Fig. 1). 치주병원균에 대한 천연추출물의 항균력을 측정 한 결과, *F. nucleatum*에 대한 녹차 추출물의 MIC는 1.8 mg/ml로 가장 낮았으며, 감초, 뽕잎, 프로폴리스 추출물은 모두 3.6 mg/ml에서 약 50~60%의 항균력을 보였다 (Fig. 2a). 또한, *P. gingivalis*에 대한 녹차, 감초, 뽕잎 추출물의 MIC는 1.8 mg/ml이었으며, 프로폴리스 추출물의 MIC만이 3.6 mg/ml이었다 (Fig. 2b). oraCMU의 치주병원균에 대한 항균력을 측정 한 결과, *F. nucleatum*에 대한 oraCMU CFS의 MIC는 250 mg/ml이었으며, *P. gingivalis*에 대한 MIC는 125 mg/ml이었다 (Fig. 3). 그리고, 치주병원균에 대한 천연추출물과 oraCMU의 항균 시너지 효과를 확인 하기 위하여 본 연구에서 항균력이 가장 우수한 녹차 추출물을 이용하여 oraCMU CFS와 함께 각각 농도별로 희석한 후 병합에 따른 항균 시너지 효과를 확인한 결과 (Table 1), *P. gingivalis*에 대한 녹차 추출물 및 oraCMU CFS의 병합 MIC는 1.8 mg/ml, 62.5 mg/ml로 각각 나타났으며, FIC 지수는 1.5로 산출되어 항균 시너지 효과를 보이지 않았다. 그에 반해 *F. nucleatum*에 대한 녹차 추출물과 oraCMU CFS의 병합 MIC는 각각 0.1 mg/ml, 15.6 mg/ml로서, 단독 처리군에 비하여 모두 18배씩 감소하였으며, FIC 지수가 0.1로 산출되어 두 시료간의 항균 시너지를 보였다. 또한, 녹차 추출물과 oraCMU CFS의 *F.*

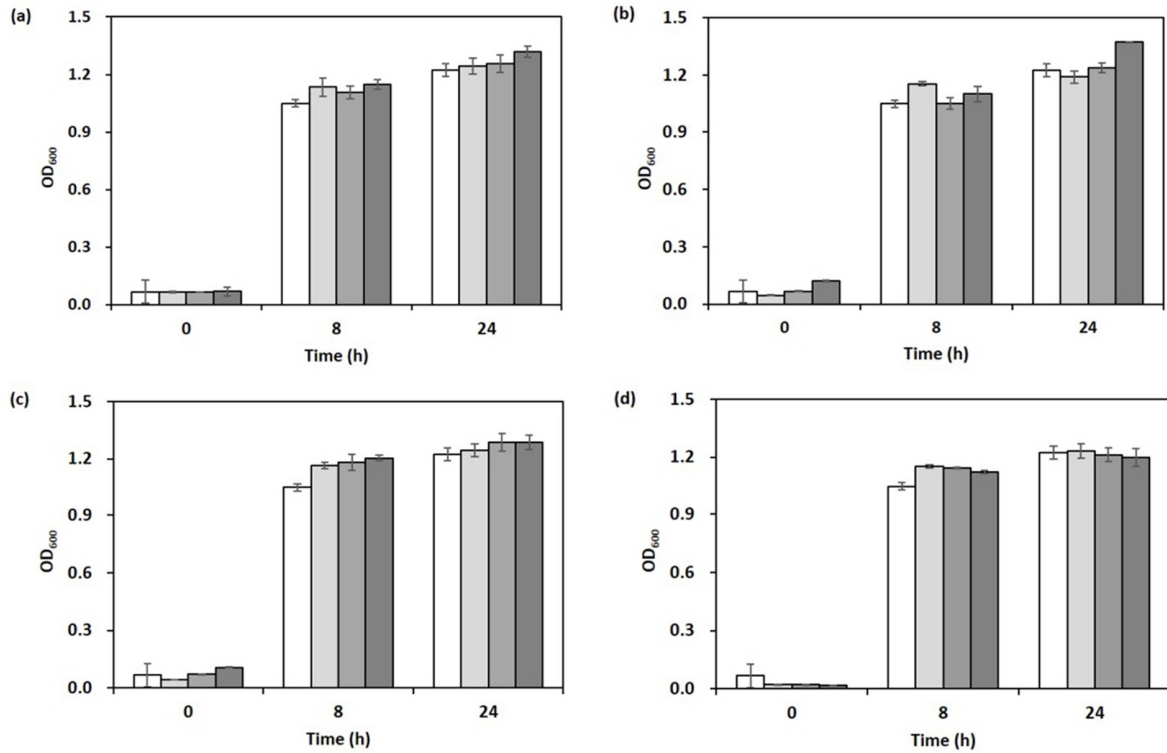


Figure 1. Effects of various concentrations of natural extracts including green tea (a), mulberry leaf (b), licorice (c), and propolis (d) on the growth of oraCMU. The growth of oraCMU was measured by optical density (600 nm). 0 mg/ml (□); 3.13 mg/ml (▨); 6.25 mg/ml (▩); 12.5 mg/ml (■). There was no statistically significant difference in the growth of oraCMU according to the concentration of natural extracts at each time. Values are means ± standard deviations of three independent experiments.

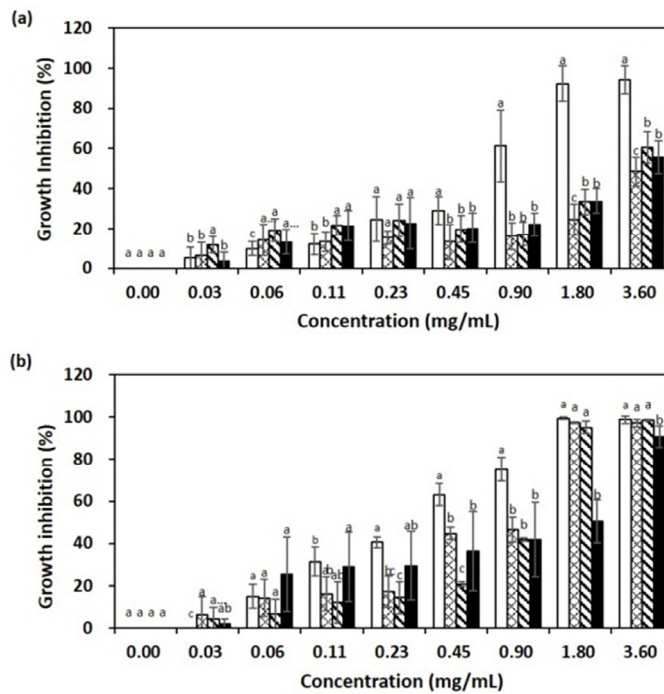


Figure 2. Growth inhibitory effects of various concentrations of natural extracts including green tea, mulberry leaf, licorice, and propolis against *F. nucleatum* (a) and *P. gingivalis* (b). Green tea extract (□); mulberry leaf extract (▨); licorice extract (▩); propolis extract (■). Means with different letters (a-c) above bars are significantly different ($p < 0.05$). Values are means ± standard deviations of three independent experiments.

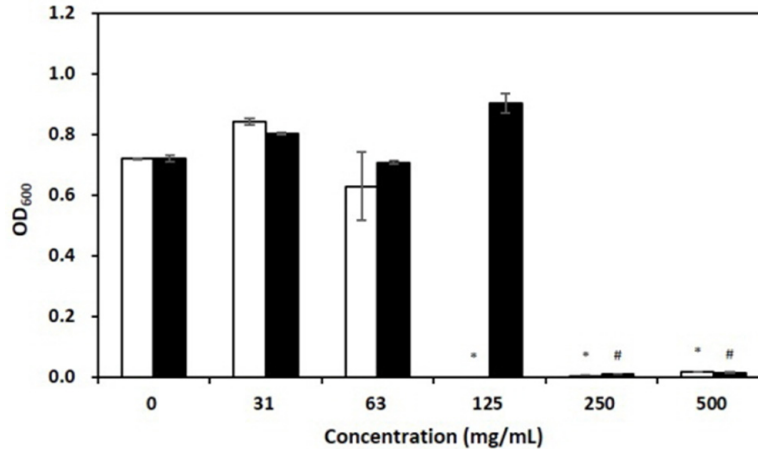


Figure 3. Growth inhibitory effects of cell-free supernatants of oraCMU against periodontopathic bacteria. The growth of *P. gingivalis* (□) and *F. nucleatum* (■) were measured by optical density at 600 nm (OD₆₀₀). **p* < 0.05, CFS of oraCMU-treated culture vs. untreated *P. gingivalis* control; #*p* < 0.05, CFS of oraCMU-treated culture vs. untreated *F. nucleatum* control. Values are means ± standard deviations of three independent experiments.

Table 1. Antimicrobial synergistic effect of green tea extract with cell-free supernatant (CFS) of oraCMU against *F. nucleatum* and *P. gingivalis*.

Strains	Treatment	MIC (mg/ml)		FIC Index*	Outcome
		Alone	Combination		
<i>F. nucleatum</i> KCTC 2488	green tea extract	1.8	0.1	0.1	Synergy
	CFS of oraCMU	250	15.6		
<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352	green tea extract	1.8	1.8	1.5	Indifference
	CFS of oraCMU	125	62.5		

* The FIC index was calculated using the formula of $FIC = (A) / MIC(A) + (B) / MIC(B)$. (A) is the minimum concentration with inhibitory effect in A dilution line, (B) is the minimum concentration with inhibitory effect in B dilution line, and MIC(A) and MIC(B) are the MICs of A and B, respectively. $FIC \leq 0.5$, synergy; $FIC 0.5 \sim 1$, partial synergy; $FIC 1 \sim 4$, indifference; $FIC > 4$, antagonism.

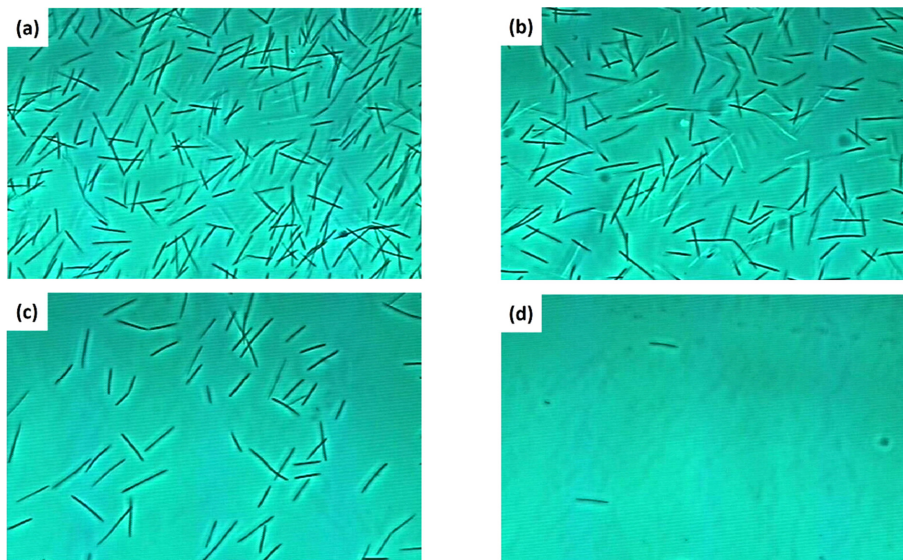


Figure 4. Phase-contrast microscopic analysis of antimicrobial synergy of green tea extract and oraCMU. (a) Untreated *F. nucleatum* control; (b) *F. nucleatum* with green tea extract (0.1 mg/ml); (c) *F. nucleatum* with cell-free supernatant (CFS) of oraCMU (15.6 mg/ml); (d) *F. nucleatum* with green tea extract (0.1 mg/ml) and CFS of oraCMU (15.6 mg/ml). Magnification, ×4000.

*nucleatum*에 대한 항균 시너지 효과를 위상차현미경을 통하여 관찰한 결과, *F. nucleatum*을 단독 배양했을 때보다 녹차 추출물과 oraCMU CFS를 병합하여 배양했을 때 *F. nucleatum*의 수가 확연히 감소하였다 (Fig. 4).

고 찰

치주질환은 치과질환에서 치아우식증과 함께 구강의 2대 질환 중 하나로 알려지고 있으며, 주로 구강내 유해세균에 의해 발생하고 있다. 따라서 구강 속에 있는 유해균을 없애기 위하여 다양한 항생제 및 chlorhexidine, zinc chloride과 같은 구강세정제의 항균작용에 대한 연구가 보고되고 있으나, 항생제는 내성균의 출현과 같은 부작용이 있으며, 구강세정제의 경우 일시적인 효과는 있지만 구강내 유익균과 유해균을 가리지 않고 죽여버리므로 장기간 사용시 오히려 부작용을 일으킬 수 있다 [1,6-8,22,23]. 따라서, 최근에는 화학제재의 대체제로서 천연추출물이나 유산균과 같은 프로바이오틱스의 활용이 연구되고 있다 [24,25].

W. cibaria CMU는 그람양성, 비포자 형성, 비운동성, hetero 유산발효, 카탈라아제 음성 막대모양 유산균으로서, 충치유발균인 *S. mutans*의 비수용 글루칸을 수용성 텍스트란으로 전환시켜 충치 발생을 억제한다고 알려져 왔다 [16]. 또한, 과산화수소를 많이 분비하여 여러 치주세균의 성장을 억제하고 구취를 억제하여 국내 (10-0605992) 및 미국 특허등록 (US 7250162B2) 되었으며, 구강상피세포에 대하여 치주병원균과 경쟁적으로 부착하여 구강에 이로운 역할을 한다고 보고되고 있다 [26,27]. 특히, 강산을 생성하지 않아 유산균 중에서 충치 유발 위험이 적고 구강이 건강한 어린이 타액에서 유래되어 구강 정착력이 좋아 oral care probiotics로서의 조건을 갖추고 있으며 [16,17], 2016년 식약처에 식품 원료로 등록되고 oraCMU로 상용화되어 국내 최초로 구강유산균 식품에 이용되고 있다.

본 연구에서는 치주병원균에 대한 항균능력을 가진 천연추출물이 oraCMU가 첨가되는 제품의 부원료로서 사용 가능성이 있는지를 검토하기 위하여 녹차, 뽕잎, 감초, 프로폴리스 추출물의 영향을 확인하였으며, 실험 결과, 4가지 추출물 모두 oraCMU 생장에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 또한, 4가지 추출물의 치주병원균에 대한 항균력을 측정된 결과, 녹차 추출물이 *F. nucleatum*에 대해서 농도 의존적으로 항균능력이 있으면서 항균력이 가장 우수하였으며, *P. gingivalis*에 대해서는 녹차, 뽕잎, 감초 추출물이 유사한 항균력을 가졌다. Fournier-Larente 등 [28]

은 strain이 각각 다른 *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* HW24D1, *P. gingivalis* W83에 대해서 녹차 추출물의 MIC가 각각 0.25, 0.5, 1 mg/ml이라고 보고하였으나, 본 연구에서는 *F. nucleatum*, *P. gingivalis* 모두 MIC가 1.8 mg/ml로 다소 높게 나타났다. 또한, Park 등 [29]은 여러 조건에서 얻은 뽕잎 추출물의 치주세균에 대한 항균력을 측정하였는데, *F. nucleatum*에 대하여 128 g/ml 이상, *P. gingivalis*에 대하여 4~128 g/ml 이상의 농도에서 MIC를 나타냈다고 보고하였다. 본 연구에서는 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*에 대한 뽕잎 추출물의 MIC가 각각 3.6 mg/ml, 1.8 mg/ml로서 기존 연구와는 차이를 보였다. 또한, Kim 등 [30]은 *P. gingivalis* KCTC 5352에 대한 프로폴리스의 MIC는 280 mg/ml로 보고하였으며, 이는 본 연구의 결과보다 높은 농도를 보였다. 이처럼 기존 연구의 결과와의 차이가 나는 이유는 아마도 연구에서 사용된 추출물의 원산지과 추출 조건 및 추출 용매가 서로 다르며, 실험에 이용된 균주 strain이 서로 다르기 때문이라고 사료된다.

본 연구에서는 여러 치주병원균에 대한 항균력이 있다고 알려진 oraCMU를 이용하여 oraCMU CFS를 농도별로 희석하여 *P. gingivalis* 및 *F. nucleatum*에 대한 항균력을 측정된 결과, 두 균주에 대해서 모두 농도의존적으로 항균력을 나타냄을 확인할 수 있었으며, *F. nucleatum* 보다 *P. gingivalis*의 MIC가 낮은 것으로 미루어 볼 때 oraCMU는 *P. gingivalis*에 대해서 더 높은 항균력을 가짐을 알 수 있었다.

현재까지 추출물 간 혹은 추출물과 항생제를 병합하여 항균 시너지 효과를 보는 연구는 많았으나 [31,32], 유산균과 추출물의 항균 시너지 효과를 확인한 연구는 거의 없었다. 본 연구에서는 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*에 대한 항균력이 가장 우수한 녹차 추출물과 oraCMU CFS를 병합하여 항균 시너지 효과를 측정된 결과, *P. gingivalis*에 대해서 FIC 지수가 1.5로서 > 0.5~4 범위에 들기 때문에 항균 시너지 효과가 나타나지 않은 것으로 판단되었으나, *F. nucleatum*에 대해서는 FIC 지수가 0.1로서 ≤ 0.5 범위에 들기 때문에 두 시료 간의 매우 높은 시너지 효과를 보이는 것으로 판단되었다. 또한, *F. nucleatum*에 대한 녹차 추출물과 oraCMU CFS의 항균 시너지 효과를 위상차현미경으로 관찰한 결과, *F. nucleatum* 단독 배양했을 때보다 녹차 추출물과 oraCMU CFS를 병합 배양하였을 때 *F. nucleatum*의 수가 확연히 줄어든 것을 눈으로 확인할 수 있었다.

향후 연구에서는 *P. gingivalis*에 대한 항균 시너지 효과를 나타내지 않으면서 *F. nucleatum*에 대해서만 항균 시너지 효과를 나타내는 이유에 대해서 밝히는 연구가 더 필요하며, 구강 질환과 연관된 다른 병원균들에 대해서도

항균 시너지 효과를 보이는데 이를 밝히는 연구가 필요하리라 생각된다. 이러한 결과들을 종합해 보면, 녹차 추출물은 oraCMU의 성장에 큰 영향을 주지 않고 오히려 oraCMU와의 항균 시너지 효과를 나타내므로, 녹차 추출물과 oraCMU를 병합하여 식품 등 다양한 구강 건강 제품에 응용가능하며, 각각의 단독 물질보다 병합하여 사용하였을 때 더욱 강력하게 구강 건강 예방 및 치료 효과를 발휘할 수 있으리라 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 정부 (교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 (2017R1D1A1B03030952) 및 2018년도 중소벤처기업부의 기술개발사업 지원에 의한 연구임 (C0564353).

Conflict of interest

The authors declare that have no competing interest.

References

- Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: The WHO approach. *J Periodontol*. 2005;76:2187-2193.
- Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24:469-477.
- Pham T. The association between periodontal disease severity and metabolic syndrome in Vietnamese patients. *Int J Dent Hygiene*. 2018;16:484-491.
- Turton M, Africa CWJ. Further evidence for periodontal disease as a risk indicator for adverse pregnancy outcomes. *Int Dent J*. 2017;67:148-156.
- Ionel A, Lucaciu O, Tbran F, Berce C, Toader S, Hurubeanu L, Bondor C, Cmpian RS. Histopathological and clinical expression of periodontal disease related to the systemic inflammatory response. *Histol Histopathol*. 2017;32:379-384.
- Kim TI, Choi EJ, Jeong JP, Han SB, Gu Y. Antimicrobial effect of Zea Mays L. and Magnoliae cortex extract mixtures on periodontal pathogen and effect on human gingival fibroblasts. *J. Kor. Academy Of Periodontology*. 2002;32:249-255.
- Van Strydonck DA, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol*. 2005;32:305-309.
- Browne D, Whelton H, Denis O'Mullane. Fluoride metabolism and fluorosis. *J Dent*. 2005;33:177-186.
- Hara K, Ohara M, Hayashi I, Hino T, Nishimura R, Iwasaki Y, Ogawa T, Ohyama Y, Sugiyama M, Amano H. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate precipitates salivary proteins including alpha-amylase: biochemical implications for oral health. *Eur J Oral Sci*. 2012;120:132-139.
- Min DJ, Yi SW, Lss Sh, Kim SS, Kim CH, Lee JH, Bae JH, Kim HK. The Anti-inflammatory effect of green tea extract against *Prevotella intermedia*. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 2011;37:67-73.
- Choi JL, Jung MA, Jung SH. Antimicrobial effect of mulberry leaves extracts against oral microorganism. *J Dent Hyg Sci*. 2006;6:251-254.
- Islam B, Khan SN, Haque I, Alam M, Mushfiq M, Khan AU. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:751-757.
- Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol*. 2000;45:141-148.
- Ahn SJ, Cho EJ, Kim HJ, Park SN, Lim YK, Kook JK. The antimicrobial effects of deglycyrrhizinated licorice root extract on *Streptococcus mutans* UA159 in both planktonic and biofilm cultures. *Anaerobe*. 2012;18:590-596.
- Kang MS, Yeu JE, Oh JS, Shin BA, Kim JH. Complete genome sequences of *Weissella cibaria* strains CMU, CMS1, CMS2, and CMS3 isolated from infant saliva in South Korea. *Microbiol Resour Announc*. 2017;5:1-2.
- Kang MS, Chung J, Kim SM, Yang KH, Oh JS. Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Res* 2006;40:418-425.
- Kang MS, Lim HS, Kim SM, Lim YJ, Lee HC, Oh JS. Quantitative analysis of *Weissella cibaria* against periodontopathic bacteria by real-time PCR. *J Bacteriol Virol*. 2009;39:111.
- Kang MS, Kim BG, Chung J, Lee HC, Oh JS. Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. *J Clin Periodontol* 2006;33:226-232.
- Jeong HM, Kim YS, Ahn SJ, Auh MS, Ahn JB, Kim KY. Effects of *Zizyphus jujuba* var. boeunensis extracts on the growth of intestinal microflora and its antioxidant activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011;40:500-508.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. Ninth ed. CLSI document M7-A8. Wayne Pennsylvania USA; 2012.
- Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;44:363-366.

22. Harper DS, Mueller LJ, Fine JB, Gordon J, Laster LL. Effect of 6 months use of a dentifrice and oral rinse containing sanguinaria extract and zinc chloride upon the microflora of the dental plaque and oral soft tissues. *J Periodontol.* 1990;61:359-363.
23. Chae GC, Auh QS, Chun YH, Hong JP. Antibacterial activity of artemisa Capillaris THUNB on oral bacteria. *J Oral Med Pain.* 2009;34:169-177.
24. Sakagami H, Tomomura M. Dental application of natural products. *Medicines.* 2018;5:21. doi: <https://doi.org/10.3390/medicines5010020>.
25. Kobayashi R, Kobayashi T, Sakai F, Hosoya T, Yamamoto M, Kurita-Ochiai T. Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective in preventing *Porphyromonas gingivalis*-accelerated periodontal disease. *Sci Rep.* 2017;7:545. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00623-9>.
26. Jang HJ, Kang MS, Yi SH, Hong JY, Hong SP. Comparative study on the characteristics of *Weissella cibaria* CMU and probiotic strains for oral care. *Molecules.* 2016;21:E1752.
27. Kang MS, Piao MS, Shin BA, Lee HC, Oh JS. Adhesion of *Weissella cibaria* to the epithelial cells and factors affecting its adhesion. *J Bacteriol Virol.* 2006;36:151-157.
28. Fournier-Larente J, Morin MP, Grenier D. Green tea catechins potentiate the effect of antibiotics and modulate adherence and gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol.* 2016;65:35-43.
29. Park SN, Lim YK, Cho E, Jo E, Park PS, Kook JK. Antimicrobial activity of mulberry leaf against mutans streptococci and periodontopathogens. *Int J Oral Biol.* 2014; 39:201-206.
30. Kim SA, Chung HJ. Antimicrobial effects of propolis against oral microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* 2013; 45:370-375.
31. Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48: 440-446.
32. Braga LC, Leite AA, Xavier KG, Takahashi JA, Bemquerer MP, Chartone-Souza E, Nascimento AM. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol.* 2005;51:541-547.