

Effects of Foreign Plant Extracts on Cell Growth and Biofilm Formation of *Streptococcus Mutans*

Kyung Hoon Moon¹, Yun-Chae Lee² and Jeong Nam Kim^{1,2*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²Department of Integrated Biological Science, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received March 16, 2019 / Revised April 30, 2019 / Accepted April 30, 2019

Chemically synthesized compounds are widely used in oral hygiene products. However, excessively long-term use of these chemicals can cause undesirable side effects such as bacterial tolerance, allergy, and tooth discoloration. To solve these issues, significant effort is put into the search for natural antibacterial agents. The aim of this study was to assess the extracts of foreign native plants that inhibit the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. Among the 300 foreign plant extracts used in this study, *Chesneya nubigena* (D. Don) Ali extract had the highest antimicrobial activity relatively against *S. mutans* with a clear zone of 9 mm when compared to others. This plant extract also showed anti-biofilm activity and bacteriostatic effect (minimal bactericidal concentration [MBC], 1.5 mg/ml). In addition, the plant extracts of 19 species decreased the ability of *S. mutans* to form biofilm at least a 6-fold in proportion to the tested concentrations. Of particular note, *C. nubigena* (D. Don) Ali extract was found to inhibit biofilm formation at the lowest concentration tested effectively. Therefore, our results reveal that *C. nubigena* (D. Don) Ali extract is a potential candidate for the development of antimicrobial substitutes, which might be effective for caries control as well, as demonstrated by its inhibitory effect on the persistence and pathogenesis of *S. mutans*.

Key words : Antimicrobial substitutes, biofilm formation, foreign plant extracts, growth, *Streptococcus mutans*

서 론

치아우식증(dental caries)은 감염성 구강질환으로 치아 표면에 서식하는 세균의 당 대사를 통해 생성되는 젖산에 의한 치아 부식을 말한다[12, 32]. 대표적인 치아우식증 유발 균주의 하나로써 *Streptococcus mutans*가 알려져 있다[21]. *S. mutans*의 병원성 인자로는 젖산(lactic acid)의 생합성, 치아에 형성된 타액 펠리클(salivary pellicles)에 결합 할 수 있는 표면 부착소의 발현, 자당(sucrose)을 기질로 이용하여 glucosyltransferases (Gtfs)와 glucan binding proteins (GBPs) 매개로 형성되는 생물막(biofilm)이 있다[19, 26]. 치아우식증 유발 균주에 있어 생물막 형성은 감염성에 중요한 인자이지만, 일반적으로 생물막내에는 유해균의 증식을 억제하는 유익균도 함께 공생한다. 그러나 당 대사로 인해 생물막 내 pH가 낮아지게 되면, *S. mutans*와 같은 내산성 균주는 생활사에 이점을 얻을 수 있다[23]. 이 세균들이 지속적으로 산을 생성하면 *S. mutans*의

세포 수를 상대적으로 증가시키고 치태 내의 산성화가 유지되고 결국 치아우식원성 생물막으로 전환된다[1]. 따라서 치아우식증을 효과적으로 예방하기 위해서는 *S. mutans*의 성장을 억제할 뿐만 아니라 생물막 형성의 저해에 관한 연구가 함께 이루어져야 한다.

치아우식증 예방을 위해 *S. mutans*에 항균효과가 있는 항생제로 penicillin과 erythromycin 등이 보고가 되어있지만, 이런 항생제의 장기간 사용 시 내성균이 출현하는 위험성을 증가시킨다[3]. 또한, chlorhexidine, delmopinol과 같은 화합물을 이용하면 충치균의 성장과 치태 형성을 감소시키는 효과와 함께 알레르기, 치아 변색, 설사와 같은 부작용을 유발할 수 있다는 연구 보고가 있다[11, 24]. 최근에는 이러한 문제점을 해결할 수 있는 항균 대체제를 찾는 연구가 국내뿐만 아니라 국외에서도 활발히 진행되고 있다. 국내의 경우, 자몽 종자추출물(Grapefruit seed extract) [36]과 관중(*Crassirhizomae Rhizoma*)의 메탄올추출물[7]에서 *S. mutans*에 대한 항균 활성이 나타나는 것을 발견하였고, 황련(*Coptis chinensis*) 추출물은 Gtfs 활성 억제 및 세균의 부착 능력을 저해하는 효과가 보고되었다[16]. 또한, 세신(*Asarum sieboldii*)의 추출물은 *S. mutans*의 부착능과 비수용성 글루칸 합성에 대한 억제 효과가 입증되었다[35]. 더욱이 이와 같은 연구결과를 활용한 식물추출물 함유 치약의 임상적인 효능 또한 증명되었다[4, 18].

국외의 연구로는 일본산 녹차(*Camellia sinensis*)의 추출물

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2269, Fax : +82-51-514-1778

E-mail : kimjn@pusan.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.

이 *S. mutans*의 성장을 저해하고[29], 인도 마늘(*Allium sativum*)과 암라(*Embllica Officinalis*)의 항균 활성과 세균의 부착 억제 효과에 대한 연구결과가 보고되었다[15]. 그리고 브라질에 자생하는 마(yam)의 일종인 *Dioscorea altissima*과 포포나무과(*Annonaceae*)의 한 종인 *Annona hypoglauca*가 *S. mutans*의 생물막 형성을 저해할 수 있다는 연구결과도 보고되었다[2].

본 연구는 해외 자생식물 유래 추출물 중 치아우식증 원인 균인 *S. mutans*의 성장을 억제하거나 생물막 형성을 저해하는 효과가 있는 식물추출물을 선별하는데 목적을 두고 있다. 이러한 식물추출물은 *S. mutans* 매개 치아우식증의 제어에 효과적으로 활용될 수 있으며, 더 나아가 구강헬스케어 제품에 이용될 수 있는 고부가가치 식물추출물의 확보에 기여할 것으로 기대한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

본 연구에서는 해외 식물 유래 추출물의 항균 활성의 유무를 확인하기 위해 두 종류의 그람양성 균주 *Streptococcus mutans* UA159와 *Streptococcus sanguinis* (ATCC® 10556TM), 그리고 그람음성 균주 *Escherichia coli* DH10B를 사용하였다. *S. mutans*와 *S. sanguinis* 균주는 Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. *E. coli* 균주는 Luria Bertani (LB, Difco Laboratories, Detroit, MI) 배지를 사용하여 37°C, 호기성 조건하에서 배양하였다.

식물 추출물

본 실험에서 사용된 식물추출물은 해외생물소재센터(IBMRC; <http://www.ibmrc.re.kr/>)에서 무상으로 분양 받았으며, 중국, 캄보디아, 라오스, 베트남 등지에서 자생하는 300종의 식물에서 유기 용매인 에탄올 또는 메탄올을 이용하여 추출물을 획득하였다(Table 1). 식물추출물의 항균 활성을 측정하기 위해 동결 건조된 식물추출물을 50 mg/ml의 동일한 농도가 되도록 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 사용하였다.

디스크 확산법을 이용한 항균 활성 측정

본 연구에서 선정된 세 균주(*S. mutans*, *S. sanguinis*, *E. coli*)에 대한 해외 식물 추출물의 항균 활성을 검증하기 위해 디스크 확산법을 수행하였다[33]. 37°C에서 18시간 동안 전 배양한 후, 액체배지에 본 배양한(O.D.₆₀₀=0.3-0.5) 각 세균을 BHI 또는 LB 고체배지에 150 µl씩 분주하여 도말하였다. 도말된 배지 위에 일정 간격으로 디스크를 올린 후, 디스크 위에 50 mg/ml 농도의 추출물을 20 µl씩 첨가하였다. 준비된 배지는 5% CO₂ 또는 호기적 조건하에서 24시간 동안 배양한 후, 디스크 주위에 형성된 억제환의 크기를 측정하여 항균 활성 유무를

확인하였다.

생물막(biofilm) 형성 측정법

식물추출물이 *S. mutans*의 생물막 형성에 주는 효과를 판별하기 위해 생물막 형성 측정법을 이용하였다[27]. 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 18시간 배양한 *S. mutans*를 BHI 액상 배지에 본 배양한 후(O.D.₆₀₀=0.3-0.5), 배양액을 18 mM 포도당과 2 mM 자당이 첨가된 biofilm medium (BM) [22]에 1:100의 비율이 되도록 접종하고, 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 96-well plate에 액체 BM 배지 200 µl를 주입하고 추출물 농도 변화에 따른 영향을 측정하기 위해 추출물의 농도구배(최종농도 1.25, 2.50 또는 3.75 mg/ml) 별로 각 well에 첨가하였다. 96-well plate에 형성된 생물막을 0.1% crystal violet으로 15분 간 염색하고 증류수로 세척하였다. 다음으로 1:4(v/v) 아세톤-에탄올 용액으로 생물막에 흡착된 crystal violet을 용해시켜 ELISA microplate reader (Bio-Rad, Hercules, model 680, CA, USA)를 이용하여 파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

최소살균농도 측정

식물추출물의 최소살균농도(minimal bactericidal concentration, MBC)는 다음의 방법으로 측정되었다[5]. *S. mutans*는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 18시간 배양 후, 배양액을 BHI 액체 배지에 희석하여 실험에 사용하였다(O.D.₆₀₀=0.3-0.5). 96-well plate에 각각 추출물 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 mg/ml 농도로 처리된 BHI 배지 200 µl에 1:100의 비율로 균 2 µl를 접종하였다. 96-well plate에서 24시간 배양한 배양액을 BHI 고체 배지에 각각 10 µl를 접종한 후, 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. *S. mutans*의 군집이 관찰되지 않는 식물추출물의 최소 농도를 MBC로 정하였다.

통계분석

모든 실험은 동일한 과정으로 3번 이상 반복 실행되었다. 실험 결과의 통계분석은 SPSS (statistical package for social science) 프로그램을 이용하여 analysis of variance (ANOVA) 분석법을 적용하였으며 least significant difference (LSD)로 신뢰수준 95%($p < 0.05$)에서 통계적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

*S. mutans*의 생육성장을 억제하는 *Chesneya nubigena* (*D. Don*) *Ali* 추출물

치아우식증 원인균인 *S. mutans*에 대한 중국, 캄보디아, 라오스, 베트남 등지에서 자생하는 300종의 식물에서 추출한 에탄올, 메탄올 추출물의 항균력을 검사하기 위해 디스크 확산 실험을 진행하였다. 식물추출물의 항균효과를 비교하기 위한

Table 1. List of plants used in this study

Botanical name	Country	Extraction solvent
<i>Astragalus bhotanensis</i> Baker	China	Ethanol 95%
<i>Ribes glaciale</i> Wall.	China	Ethanol 95%
<i>Aralia chinensis</i> L.	China	Ethanol 95%
<i>Sedum kantschaticum</i> Fisch.	China	Ethanol 95%
<i>Ranunculus tanguticus</i> (Maxim.) Ovcz.	China	Ethanol 95%
<i>Claoxylon longifolium</i> (Blume) Endl. ex Hassk.	China	Ethanol 95%
<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	China	Ethanol 95%
<i>Rumex nepalensis</i> Spreng.	China	Ethanol 95%
<i>Elsholtzia fruticosa</i> (D. Don) Rehder	China	Ethanol 95%
<i>Rosa sweginzowii</i> Koehne	China	Ethanol 95%
<i>Cassiope pectinata</i> Stapf	China	Ethanol 95%
<i>Litsea populifolia</i> (Hemsl.) Gamble	China	Ethanol 95%
<i>Potentilla parvifolia</i> Fisch. ex Lehm.	China	Ethanol 95%
<i>Vaccinium gaultheriifolium</i> (Griff.) Hook. f. ex C.B. Clarke	China	Ethanol 95%
<i>Astragalus mahoschanicus</i> Hand.-Mazz.	China	Ethanol 95%
<i>Pedicularis decora</i> Franch.	China	Ethanol 95%
<i>Sorbus obsoletidentata</i> (Cardot) T.T.Yu	China	Ethanol 95%
<i>Ranunculus ficariifolius</i> H. Lev. & Vaniot	China	Ethanol 95%
<i>Vitex quinata</i> (Lour.) F.N. Williams	China	Ethanol 95%
<i>Myricaria rosea</i> W.W. Sm.	China	Ethanol 95%
<i>Vaccinium bracteatum</i> Thunb.	China	Ethanol 95%
<i>Anaphalis bulleyana</i> (Jeffrey) C.C. Chang	China	Ethanol 95%
<i>Pleurospermum nanum</i> Franch.	China	Ethanol 95%
<i>Chesneya nubigena</i> (D. Don) Ali	China	Ethanol 95%
<i>Gentiana purdomii</i> C. Marquand	China	Ethanol 95%
<i>Scutellaria hypericifolia</i> H. Lev.	China	Ethanol 95%
<i>Cremanthodium pleurocaule</i> (Franch.) R.D. Good	China	Ethanol 95%
<i>Pedicularis roylei</i> Maxim.	China	Ethanol 95%
<i>Bridelia tomentosa</i> Blume	China	Ethanol 95%
<i>Corydalis adrienii</i> Prain	China	Ethanol 95%
<i>Thalictrum finetii</i> B. Boivin	China	Ethanol 95%
<i>Lonicera tangutica</i> Maxim.	China	Ethanol 95%
<i>Ribes griffithii</i> Hook. F. & Thomson	China	Ethanol 95%
<i>Berberis jamesiana</i> Forrest & W.W. Sm.	China	Ethanol 95%
<i>Acer caudatifolium</i> Hayata	China	Ethanol 95%
<i>Lonicera setifera</i> Franch.	China	Ethanol 95%
<i>Bauhinia glauca</i> subsp. <i>hupehana</i> (Craib) T.C. Chen	China	Ethanol 95%
<i>Vitis davidii</i> (Rom. Caill.) Foex	China	Ethanol 95%
<i>Pertya phyllicoides</i> Jeffrey	China	Ethanol 95%
<i>Astragalus yunnanensis</i> Franch.	China	Ethanol 95%
<i>Syncalathium souliei</i> (Franch.) Ling	China	Ethanol 95%
<i>Saussurea neofranchetii</i> Lipsch.	China	Ethanol 95%
<i>Thalictrum alpinum</i> L.	China	Ethanol 95%
<i>Anaphalis nepalensis</i> Spreng.	China	Ethanol 95%
<i>Polygonum coriaceum</i> Sam.	China	Ethanol 95%
<i>Rhodiola kirilowii</i> (Regel) Maxim.	China	Ethanol 95%
<i>Taraxacum sikkimense</i> Hand.-Mazz.	China	Ethanol 95%
<i>Senecio nemorensis</i> L.	China	Ethanol 95%
<i>Jasminum nudiflorum</i> fo. <i>pulvinatum</i> (W.W. Sm.) P.S. Green	China	Ethanol 95%
<i>Epilobium sikkimense</i> Hausskn.	China	Ethanol 95%
<i>Salvia subpalmatinervis</i> E. Peter	China	Ethanol 95%
<i>Heteropappus crenatifolius</i> (Hand.-Mazz.) Grierson	China	Ethanol 95%
<i>Salvia przewalskii</i> Maxim.	China	Ethanol 95%

Table 1. Continued

Botanical name	Country	Extraction solvent
<i>Berberis dictyophylla</i> Franch.	China	Ethanol 95%
<i>Sabina saltuaria</i> (Rehder & E.H. Wilson) W.C. Cheng & W.T. Wang	China	Ethanol 95%
<i>Podocarpium podocarpum</i> var. <i>fallax</i> (Schindl.) Yen C. Yang & P.H. Huang	China	Ethanol 95%
<i>Acer caudatum</i> var. <i>prattii</i> Rehder	China	Ethanol 95%
<i>Pedicularis trichoglossa</i> Hook. f.	China	Ethanol 95%
<i>Aruncus sylvester</i> Kostel. ex Maxim.	China	Ethanol 95%
<i>Potentilla stenophylla</i> (Franch.) Diels	China	Ethanol 95%
<i>Acer cappadocicum</i> var. <i>sinicum</i> Rehder	China	Ethanol 95%
<i>Androsace zambalensis</i> (Petitm.) Hand.-Mazz.	China	Ethanol 95%
<i>Salix brachista</i> C.K. Schneid.	China	Ethanol 95%
<i>Aster yunnanensis</i> Franch.	China	Ethanol 95%
<i>Eupatorium chinense</i> L.	China	Ethanol 95%
<i>Thesium refractum</i> C.A. Mey.	China	Ethanol 95%
<i>Ligularia sagitta</i> (Maxim.) Mattf. Ex Rehder & Kobuski	China	Ethanol 95%
<i>Salix tetrasperma</i> Roxb.	China	Ethanol 95%
<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.	Cambodia	Methanol
<i>Hymenocardia punctata</i> Wall. ex Lindl.	Cambodia	Methanol
<i>Aniseia martinicensis</i> (Jacq.) Choisy	Cambodia	Methanol
<i>Ficus heterophylla</i> L. f.	Cambodia	Methanol
<i>Alternanthera sessilis</i> (L.) R. Br. ex DC.	Cambodia	Methanol
<i>Crudia chrysantha</i> (Pierre)K.Schum.	Cambodia	Methanol
<i>Combretum acuminatum</i> Roxb.	Laos	Methanol
<i>Terminalia corticosa</i> Pierre ex Laness.	Laos	Methanol
<i>Dillenia ovata</i> Wall.	Laos	Methanol
<i>Xylia xylocarpa</i> var. <i>kerrii</i> (Craib & Hutch.) I.C. Nielsen	Laos	Methanol
<i>Miliusa velutina</i> (Dunal) Hook. f. & Thomson	Laos	Methanol
<i>Nauclea orientalis</i> (L.) L.	Laos	Methanol
<i>Tetrameles nudiflora</i> R. Br.	Laos	Methanol
<i>Helicteres hirsuta</i> Lour.	Laos	Methanol
<i>Cleidion spiciflorum</i> (Burm.f.) Merr.	Laos	Methanol
<i>Spondias bipinnata</i> Airy Shaw & Forman	Laos	Methanol
<i>Randia siamensis</i> (Miq.) Craib	Laos	Methanol
<i>Goniothalamus laoticus</i> Ban	Laos	Methanol
<i>Bauhinia brachycarpa</i> Wall. ex Benth.	Laos	Methanol
<i>Pterospermum megalocarpum</i> Tardieu	Laos	Methanol
<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Oken	Laos	Methanol
<i>Pavetta indica</i> var. <i>canescens</i> Pit.	Laos	Methanol
<i>Stixis scandens</i> Lour.	Laos	Methanol
<i>Castanopsis calathiformis</i> (Skan) Rehder & E.H.Wilson	Laos	Methanol
<i>Toddalia asiatica</i> (L.) Lam.	Laos	Methanol
<i>Canthium filipendulum</i> Pierre ex Pit.	Laos	Methanol
<i>Polyalthia suberosa</i> (Roxb.) Thwaites	Laos	Methanol
<i>Phyllanthus emblica</i> L.	Laos	Methanol
<i>Maclurodendron oligophlebium</i> (Merr.) T.G. Hartley	Laos	Methanol
<i>Canthium berberidifolium</i> Geddes	Laos	Methanol
<i>Phyllanthus reticulatus</i> Poir.	Laos	Methanol
<i>Achyranthes bidentata</i> Blume	Laos	Methanol
<i>Heliotropium indicum</i> L.	Laos	Methanol
<i>Tabernaemontana pauciflora</i> Blume	Laos	Methanol
<i>Conarus bariensis</i> Pierre	Laos	Methanol
<i>Ficus glomerata</i> Roxb.	Laos	Methanol
<i>Protium serratum</i> (Wall. ex Colebr.) Engl.	Laos	Methanol
<i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir.	Laos	Methanol

Table 1. Continued

Botanical name	Country	Extraction solvent
<i>Canarium subulatum</i> Guill.	Laos	Methanol
<i>Caesalpinia digyna</i> Rottler	Laos	Methanol
<i>Harrisonia perforata</i> (Blanco) Merr.	Laos	Methanol
<i>Microcos tomentosa</i> Sm.	Laos	Methanol
<i>Elephantopus scaber</i> L.	Laos	Methanol
<i>Knema mixta</i> de Wilde	Laos	Methanol
<i>Ancistrocladus tectorius</i> (Lour.) Merr.	Laos	Methanol
<i>Syzygium zimmermannii</i> (Warb. ex Craib) Merr. & L.M. Perry	Laos	Methanol
<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	Laos	Methanol
<i>Gardenia sootepensis</i> Hutch.	Laos	Methanol
<i>Dasymaschalon lomentaceum</i> Finet & Gagnepain	Laos	Methanol
<i>Scleropyrum wallichianum</i> (Wight & Arn.) Arn.	Laos	Methanol
<i>Lepisanthes rubiginosa</i> (Roxb.) Leenh.	Laos	Methanol
<i>Kibatalia macrophylla</i> (Pierre ex Hua) Woodson	Laos	Methanol
<i>Argyrea brachypoda</i> (Kerr) Ooststr.	Laos	Methanol
<i>Pterolobium punctatum</i> Hemsl.	Laos	Methanol
<i>Helicteres isora</i> L.	Laos	Methanol
<i>Tiliacora triandra</i> Diels	Laos	Methanol
<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng.	Laos	Methanol
<i>Memecylon myrsinoides</i> Blume	Laos	Methanol
<i>Caesalpinia mimosoides</i> Lam.	Laos	Methanol
<i>Fagraea fragrans</i> Roxb. ex Carey & Wall.	Laos	Methanol
<i>Sambucus williamsii</i> Hance	Laos	Methanol
<i>Ficus hirta</i> var. <i>hirta</i> Vahl	Laos	Methanol
<i>Diospyros montana</i> Roxb.	Laos	Methanol
<i>Sindora siamensis</i> Teysm. ex Miq.	Laos	Methanol
<i>Calycopteris floribunda</i> (Roxb.) Lam. ex Poir.	Laos	Methanol
<i>Lagerstroemia villosa</i> Wall. ex Kurz	Laos	Methanol
<i>Antidesma acidum</i> Retz.	Laos	Methanol
<i>Walsura trichostemon</i> Miq.	Laos	Methanol
<i>Oxyceros horridus</i> Lour.	Laos	Methanol
<i>Mesua ferrea</i> L.	Laos	Methanol
<i>Polyalthia evecta</i> var. <i>baochianensis</i> (Pierre) Fin. & Gagnep.	Laos	Methanol
<i>Spatholobus roxburghii</i> Benth.	Laos	Methanol
<i>Cassytha filiformis</i> L.	Laos	Methanol
<i>Peltophorum dasyrhachis</i> Kurz ex Baker in Hook. f.	Laos	Methanol
<i>Morinda elliptica</i> (Hook. f.) Ridl.	Laos	Methanol
<i>Mitragyna hirsuta</i> Havil.	Laos	Methanol
<i>Dillenia hookeri</i> Pierre	Laos	Methanol
<i>Vatica harmandiana</i> Pierre	Laos	Methanol
<i>Castanopsis argyrophylla</i> King ex Hook. f.	Laos	Methanol
<i>Helicteres angustifolia</i> L.	Laos	Methanol
<i>Uvaria rufa</i> Blume	Laos	Methanol
<i>Stereospermum neuranthum</i> Kurz	Laos	Methanol
<i>Boerhavia chinensis</i> (L.) Rottb.	Laos	Methanol
<i>Hoya carnosa</i> (L. f.) R. Br.	Laos	Methanol
<i>Vitex quinata</i> (Lour.) F.N. Williams	Laos	Methanol
<i>Myriopteron extensum</i> (Wight & Arn.) K. Schum.	Laos	Methanol
<i>Holarrhena curtisii</i> King & Gamble	Laos	Methanol
<i>Desmodium longipes</i> Craib	Laos	Methanol
<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	Laos	Methanol
<i>Drynaria quercifolia</i> (L.) J. Sm.	Laos	Methanol
<i>Rhodammia dumetorum</i> (DC.) Merr. & L.M. Perry	Laos	Methanol

Table 1. Continued

Botanical name	Country	Extraction solvent
<i>Erythroxylum cuneatum</i> Kurz	Laos	Methanol
<i>Memecylon edule</i> Roxb.	Laos	Methanol
<i>Holarrhena antidysenterica</i> (L.) Wall. ex A. DC.	Laos	Methanol
<i>Vanilla aphylla</i> Blume	Laos	Methanol
<i>Bauhinia curtisii</i> Prain ex King	Laos	Methanol
<i>Oldenlandia capitellata</i> var. <i>pedicellata</i> Pit.	Laos	Methanol
<i>Urceola minutiflora</i> (Pierre) D.J. Middleton	Laos	Methanol
<i>Uvaria micrantha</i> (A. DC.) Hook. f. & Thomson	Laos	Methanol
<i>Hedyotis subcarnosa</i> Wall. ex Craib	Laos	Methanol
<i>Melochia umbellata</i> (Houtt.) Stapf	Laos	Methanol
<i>Pedilanthus tithymaloides</i> (L.) Poit.	Laos	Methanol
<i>Dalbergia velutina</i> Benth.	Laos	Methanol
<i>Buddleja asiatica</i> Lour.	Laos	Methanol
<i>Rubus alceifolius</i> Poir.	Laos	Methanol
<i>Rothmannia wittii</i> Bremek.	Laos	Methanol
<i>Adinandra integerrima</i> T. Anderson	Laos	Methanol
<i>Flemingia grahamiana</i> Wight & Arn.	Laos	Methanol
<i>Clausena excavata</i> Burm. f.	Laos	Methanol
<i>Rourea minor</i> (Gaertn.) Alston	Laos	Methanol
<i>Brucea javanica</i> (L.) Merr.	Laos	Methanol
<i>Ziziphus attopensis</i> Pierre	Laos	Methanol
<i>Ganitrus sphaerica</i> Gaertn.	Laos	Methanol
<i>Scindapsus officinalis</i> (Roxb.) Schott	Laos	Methanol
<i>Diospyros filipendula</i> Pierre ex Leconte	Laos	Methanol
<i>Callicarpa arborea</i> Roxb.	Laos	Methanol
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	Laos	Methanol
<i>Strychnos nux-blanda</i> A.W. Hill	Laos	Methanol
<i>Triumfetta pilosa</i> Roth	Laos	Methanol
<i>Urceola minutiflora</i> (Pierre) D.J. Middleton	Laos	Methanol
<i>Smilax macrophylla</i> Willd.	Laos	Methanol
<i>Entada reticulata</i> Gagnep.	Laos	Methanol
<i>Fernandoa brilletii</i> (Dop) Steenis	Vietnam	Methanol
<i>Magnolia nana</i> Dandy	Vietnam	Methanol
<i>Croton glandulosus</i> L.	Vietnam	Methanol
<i>Ficus racemosa</i> L.	Vietnam	Methanol
<i>Ancistrocladus wallichii</i> Planch.	Vietnam	Methanol
<i>Fagraea auriculata</i> Jack	Vietnam	Methanol
<i>Glochidion obscurum</i> (Roxb. ex Willd.) Blume	Vietnam	Methanol
<i>Heterosmilax borneensis</i> A. DC.	Vietnam	Methanol
<i>Callerya cochinchinensis</i> (Gagnep.) A. Schott	Vietnam	Methanol
<i>Hiptage umbellulifera</i> Arenes	Vietnam	Methanol
<i>Araucaria cunninghamii</i> Aiton ex D. Don	China	Ethanol 95%
<i>Mallotus apelta</i> (Lour.) Mull. Arg.	China	Ethanol 95%
<i>Lagerstroemia speciosa</i> (L.) Pers.	China	Ethanol 95%
<i>Elaeocarpus hainanensis</i> Oliv.	China	Ethanol 95%
<i>Rhoeo discolor</i> (L'Her.) Hance ex Walp.	China	Ethanol 95%
<i>Citrus medica</i> L.	China	Ethanol 95%
<i>Cassia tora</i> L.	China	Ethanol 95%
<i>Tamarix chinensis</i> Lour.	China	Ethanol 95%
<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.	China	Ethanol 95%
<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton	China	Ethanol 95%
<i>Ricinus communis</i> L.	China	Ethanol 95%
<i>Casuarina equisetifolia</i> L.	China	Ethanol 95%

Table 1. Continued

Botanical name	Country	Extraction solvent
<i>Melastoma normale</i> D. Don	China	Ethanol 95%
<i>Microcos paniculata</i> L.	China	Ethanol 95%
<i>Cratoxylum ligustrinum</i> (Spach) Blume	China	Ethanol 95%
<i>Prunus fordiana</i> Dunn	Vietnam	Methanol
<i>Maesa elongata</i> Mez	Vietnam	Methanol
<i>Diospyros hayatae</i> Lecomte	Vietnam	Methanol
<i>Eurya japonica</i> var. <i>harmandii</i> Pierre	Vietnam	Methanol
<i>Maesa membranacea</i> A. DC.	Vietnam	Methanol
<i>Lithocarpus gigantophyllus</i> (Hickel & A. Camus) A. Camus	Vietnam	Methanol
<i>Helicia formosana</i> Hemsl.	Vietnam	Methanol
<i>Elaeagnus delavayi</i> Lecomte	Vietnam	Methanol
<i>Syzygium chloranthum</i> (Duthie) Merr. & L.M. Perry	Vietnam	Methanol
<i>Glochidion sphaerogynum</i> (Mull. Arg.) Kurz	Vietnam	Methanol
<i>Aidia henryi</i> (E. Pritz.) T. Yamaz.	Vietnam	Methanol
<i>Archidendron pellitum</i> (Gagnep.) I.C. Nielsen	Vietnam	Methanol
<i>Syzygium fastigiatum</i> (Blume) Merr. & L.M. Perry	Vietnam	Methanol
<i>Strobilanthes echinata</i> Nees	Vietnam	Methanol
<i>Rhododendron oxyphyllum</i> Franch.	Vietnam	Methanol
<i>Vaccinium iteophyllum</i> Hance	Vietnam	Methanol
<i>Symplocos longifolia</i> H.R.Fletcher	Vietnam	Methanol
<i>Clianthus scandens</i> (Lour.) Merr.	Vietnam	Methanol
<i>Carpinus poilanei</i> A. Camus	Vietnam	Methanol
<i>Aralia foliolosa</i> var. <i>sikkimensis</i> C.B. Clarke	Vietnam	Methanol
<i>Rubus obcordatus</i> (Franch.) Thuan	Vietnam	Methanol
<i>Salacia noronhioides</i> Pierre	Vietnam	Methanol
<i>Rubus involucratus</i> Focke	Vietnam	Methanol
<i>Psychotria yunnanensis</i> Hutch.	Vietnam	Methanol
<i>Lindera spicata</i> Kosterm.	Vietnam	Methanol
<i>Camellia sinensis</i> var. <i>bohea</i> cultivars	Vietnam	Methanol
<i>Mespilus bengalensis</i> Roxb.	Vietnam	Methanol
<i>Lithocarpus annamensis</i> (Hickel & A. Camus) Barnett	Vietnam	Methanol
<i>Glochidion lanceolarium</i> (Roxb.) Voigt	Vietnam	Methanol
<i>Lithocarpus lepidocarpus</i> (Hayata) Hayata	Vietnam	Methanol
<i>Symplocos henschelii</i> (Moritzi) Benth. ex C.B. Clarke	Vietnam	Methanol

지표미생물로서 구강 토착미생물인 *S. sanguinis*와 그람음성 균주인 *E. coli*도 실험에 이용하였다. *E. coli*의 경우 2종의 식물 추출물에서 생육 억제환이 관찰되었으며, *S. sanguinis*의 경우 4종의 추출물에서 육안으로 식별이 가능한 생육억제환이 관찰되었다(Fig. 1). *E. coli*의 경우 *Ribes glaciale* Wall. 추출물에서 직경 9 mm, *Chesneya nubigena* (D. Don) Ali 추출물에서 직경 10 mm 정도의 미세한 억제환을 관찰할 수 있었고, *S. sanguinis*에서는 *C. nubigena* (D. Don) Ali 추출물에서 직경 10 mm, *Salvia przewalskii* Maxim. 추출물에서 직경 13 mm, *Perilla frutescens* (L.) Britton 추출물에서 직경 12 mm, *Murraya koenigii* (L.) Spreng. 추출물에서 직경 13 mm의 억제환을 확인할 수 있었다. 그러나 총 300종의 식물추출물 중 *C. nubigena* (D. Don) Ali 추출물만이 *S. mutans*에 생육 저해 효과를 나타냈다(직경 9 mm)(Fig. 1). *C. nubigena* (D. Don) Ali 추출물의 최소성장억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정

하려 시도했지만, 추출물의 본래 탁도 때문에 시야 또는 분광계를 이용한 MIC 측정이 불가능하였다. 다음으로 추출물의 최소살균농도(minimal bactericidal concentration, MBC)를 측정한 결과, 1.5 mg/ml 농도에서 *S. mutans*의 균집을 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

C. nubigena (D. Don) Ali는 분류학적으로 중국 자생식물로서 콩과 식물에 속하지만 이 추출물의 생리활성 및 효능에 관한 연구는 미비한 것으로 보인다[37]. 본 실험에서 사용된 *C. nubigena* (D. Don) Ali는 디스크 확산 실험과 최소살균농도 측정 실험 결과를 통해 추출물 내 *S. mutans*의 생육을 저해할 수 있는 낮은 농도의 항균 활성 소재가 함유되어 있는 것으로 판단된다. 그리고 사용된 다른 두 종의 균주에 항균 활성을 나타내는 결과로 보아 다양한 그람양성균 또는 그람음성균의 생육을 저해할 수 있을 것으로 예측된다.

S. przewalskii Maxim은 중국에서 의학 치료용으로 쓰이는

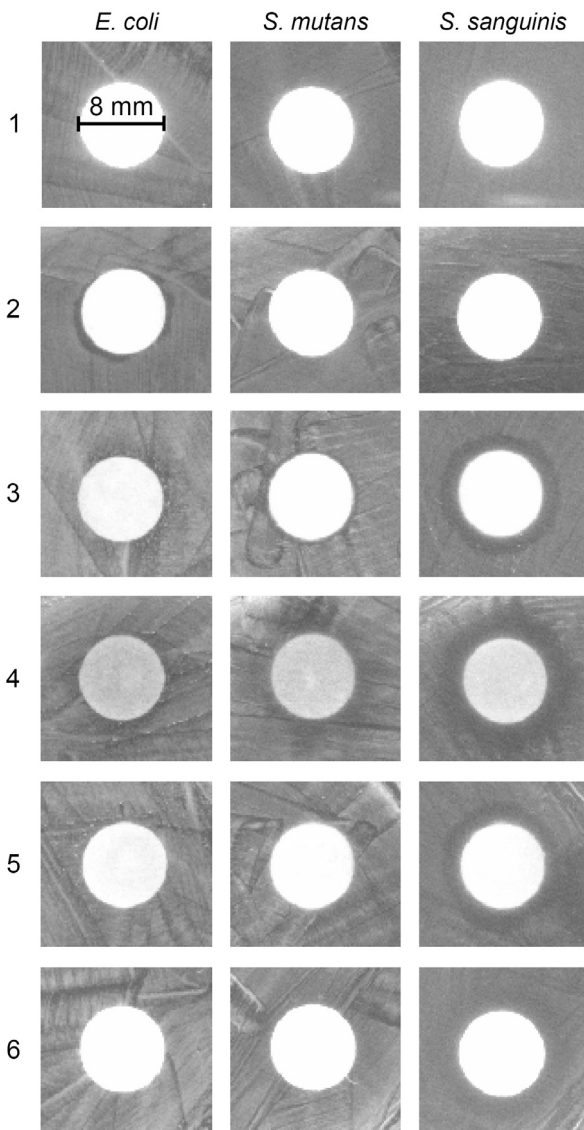


Fig. 1. Evaluation of antimicrobial activity of plant extracts. 1, DMSO as a negative control; 2, ethanol extract of *R. glaciale* Wall.; 3, ethanol extract of *C. nubigena* (D. Don) Ali; 4, ethanol extract *S. przewalskii* Maxim.; 5, ethanol extract of *P. frutescens* (L.) Britton; 6, methanol extract of *M. koenigii* (L.) Spreng.

식물로 지역 주민들이 심혈관 질환 치료를 위해 사용한 것으로 알려져 있다[20]. 앞선 연구에서 *S. przewalskii* Maxim의 페놀산 추출물이 사구체 신염 치료에 이용될 수 있다는 가능성을 확인하였다[6]. *S. przewalskii* Maxim로부터 유래한 essential oils의 항균 효과를 확인하기 위해 최소성장억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정 한 결과, *E. coli*나 *Pseudomonas aeruginosa*와 같은 그람음성균보다 *Staphylococcus aureus*와 *S. epidermidis*가 높은 감수성을 나타내었다(MIC, 2.5 mg/ml) [30]. 또한, *S. przewalskii*의 essential oil은 효모인 *Candida albicans*에 항진균성 활성이 있는 것

을 확인하였다(MIC, 5.0 mg/ml). 본 실험에서는 *S. przewalskii* Maxim을 에탄올 추출하여 사용한 반면에, 이 연구에서는 미세 번식을 통해 얻은 *in vitro*의 *S. przewalskii* 식물과 분양 받은 종자로부터 번식시켜 얻은 *in vivo*의 *S. przewalskii* 식물의 essential oils을 이용하여 MIC를 측정하였다. *In vitro* 식물과 *in vivo* 식물의 essential oil 활성을 비교해본 결과, *in vitro* 식물로부터 얻은 추출물이 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에 더 강한 항균 활성을 가지는 것으로 관찰되었으며, essential oil 성분 검사 결과로 *in vivo*보다 *in vitro*에서의 oxygenated monoterpenes 비율이 2배 더 많은 것을 확인하였다. 탄화수소 화합물보다 산소 함유 화합물이 일반적으로 높은 항균 활성과 항진균 활성을 가진다고 알려져 있고[17], Oxygenated monoterpenes의 주성분 중 하나인 borneol은 뛰어난 항균 활성을 나타내는 것으로 보고 되었다[9].

P. frutescens (L.) Britton은 들깨종에 속하는 꿀풀과(Lamiaceae) 식물로 중국에서는 자소(紫蘇)라고 불리는데 자소는 우리나라에서 흔히 말하는 들깨의 아종이다. 선행 연구에서 구강 내 병원성 세균에 대한 들깨의 항균 활성을 확인하기 위해 MIC를 측정 한 결과, 들깨 추출물이 실험에 사용된 *S. mutans* GS5, *S. mutans* OMZ175, *S. mutans* ATCC25175, *S. mutans* ATCC273524 모두에 항균 활성을 가지는 것으로 확인되었고 (MIC, 0.1, 0.1, 0.2, 0.05 mg/ml), 들깨에서 유래된 polyphenol 중 luteolin에서 항균 활성을 관찰하였다[34]. *S. mutans* GS5 strain에 관한 들깨의 ethanol 추출물과 ethyl acetate 추출물의 MIC 값을 비교해보면 ethanol 추출의 항균 활성(MIC, 1.6 mg/ml)보다 ethyl acetate 추출물의 항균 활성(MIC, 0.1 mg/ml)이 높은 것으로 보고되었다. 또한, 들깨로부터 얻은 polyphenol 중에서 luteolin 성분이 *S. mutans* GS5 strain에 강한 항균 활성이 있는 것을 확인하였다(MIC, 0.1 mg/ml). Luteolin은 이 실험에서 사용한 다른 식물의 polyphenol인 quercetin 물질과 같이 hydroxyl group 구조를 가지는 반면, apigenin 성분은 hydroxyl group 구조를 가지지 않는다. 이 구조를 가지는 polyphenol 성분은 여러 Streptococci에 항균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 실험에 사용한 들깨의 아종 *P. frutescens* (L.) Britton을 ethanol 추출이 아닌 ethyl acetate 추출하여 실험을 수행할 필요가 있다고 판단된다. 그리고 이 추출물이 *S. sanguinis*에 대한 항균 활성이 있는 것으로 보아 luteolin과 같이 hydroxyl group 구조를 가지는 polyphenol과 유사한 성분을 함유하고 있을 것으로 추측된다.

추출물의 농도에 비례적으로 *S. mutans*의 생물막 형성을 저해

생물막 형성 분석법을 이용하여 총 300종의 해외 자생식물 추출물이 *S. mutans*의 생물막 형성능력에 어떠한 영향을 주는 지 확인하였다. 19종의 추출물에서 추출물의 농도가 1.25 mg/ml에서 2.50, 3.75 mg/ml로 증가할수록 생물막 형성은 비례적

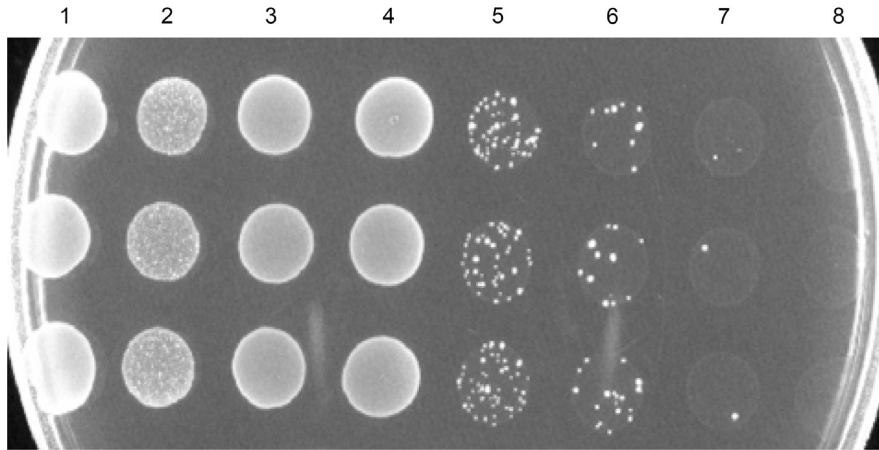


Fig. 2. Minimum bactericidal concentration (MBC) of ethanol extract of *C. nubigena* (D. Don) Ali against *S. mutans*. 1, 0.8 mg/ml; 2, 0.9 mg/ml; 3, 1.0 mg/ml; 4, 1.1 mg/ml; 5, 1.2 mg/ml; 6, 1.3 mg/ml; 7, 1.4 mg/ml; 8, 1.5 mg/ml.

으로 감소하였다(Fig. 3). 즉 추출물 농도에 의존하여 *S. mutans*의 생물막 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 사용한 *Citrus medica* L.와 같은 감귤속에 속하는 3종류의 citrus에서 추출된 essential oils의 생물막 형성에 대한 효과는 다른 연구팀에 의해 수행되었다[33]. *Citrus hystrix* (Kaffir lime) essential oils은 24시간 배양했을 때, 0.25%

chlorhexidine과 비슷한 수준으로 *S. mutans* 생물막을 저해하는 것으로 나타났다. *C. monstrosa* (pomplia)와 *C. paradise* (grapefruit) essential oils은 *P. aeruginosa*의 생물막을 약 50% 저해하였고, *C. albicans*은 생물막을 70%까지 저해하였다. *Aspergillus fumigatus*는 grapefruit essential oil에 의해서만 생물막이 저해되었는데, 농도에 따라 생물막의 20, 50, 70%를

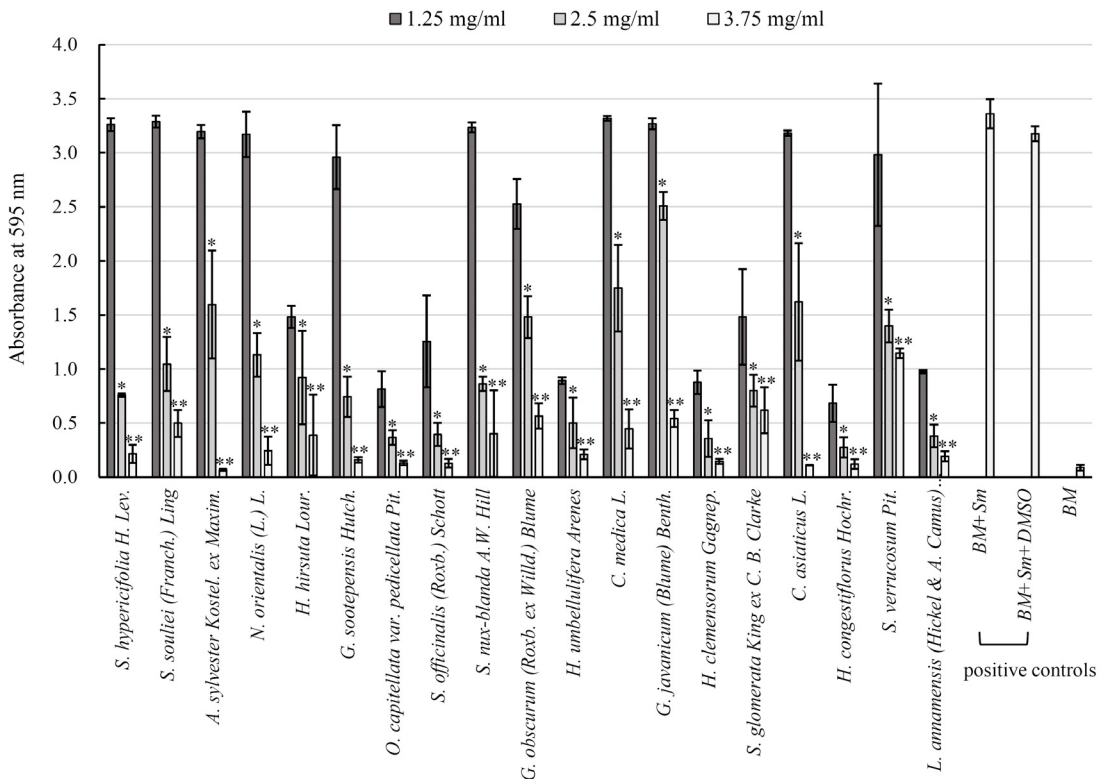


Fig. 3. Effect of the plant extracts on biofilm formation. The black, gray or white boxes indicate that *S. mutans* cells were treated with 1.25, 2.50 or 3.75 mg/ml concentrations of each plant extract, respectively. All assays were performed in triplicate. *, $p < 0.05$ compared to the cells treated with 1.25 mg/ml concentration of plant extract, **, $p < 0.05$ compared to the cells treated with 3.75 mg/ml concentration of plant extract. BM, biofilm media; Sm, *S. mutans*; DMSO, dimethyl sulfoxide.

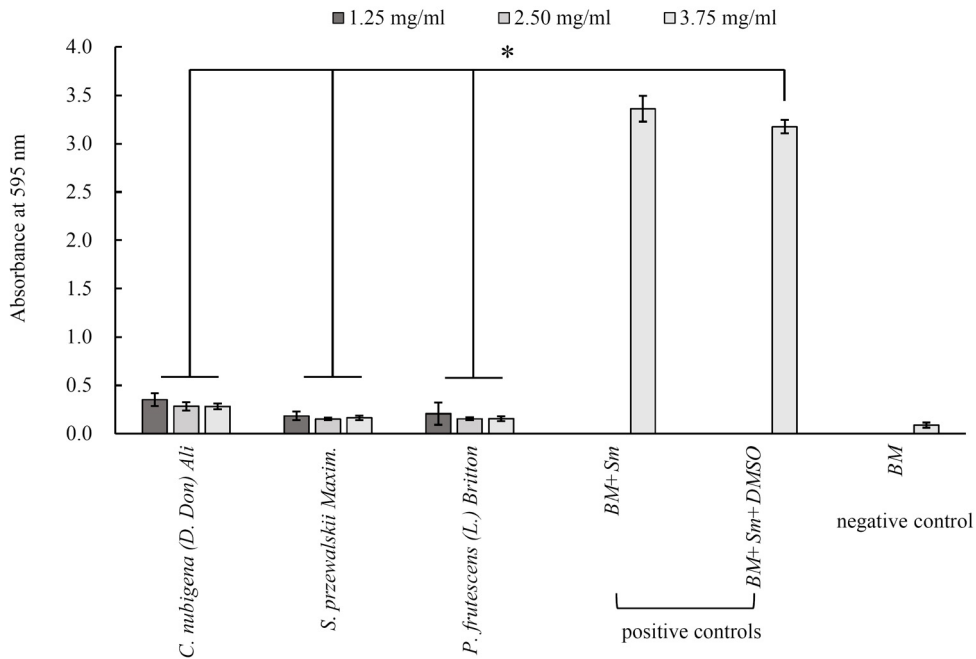


Fig. 4. Anti-biofilm effect of the plant extracts. The black, gray or white boxes indicate that *S. mutans* cells were treated with 1.25, 2.50 or 3.75 mg/ml concentrations of each plant extracts, respectively. All assays were performed in triplicate. *, $p < 0.05$ compared to the control (BM + Sm + DMSO). BM, biofilm media; Sm, *S. mutans*; DMSO, dimethyl sulfoxide.

저해하였다(concentration, 10, 50, 100 mg/l, respectively). 앞선 연구에서 사용한 *C. hystrix*은 일반적으로 태국에서 향신료로 쓰이는 물질이다. 잎과 껍질 부위를 essential oils로 추출하여 *S. mutans*의 생물막 저해 효과에 확인한 결과, 추출물의 농도에 따라 저해 효과가 증가하는 것으로 관찰했다. 본 실험에서는 *C. medica* L. 잎, 줄기 부위를 에탄올 추출하여 사용하였으며, *C. hystrix*와 비슷하게 추출물의 농도에 따라 *S. mutans*의 생물막 형성을 저해하지만 항균 활성을 나타내지 않았다.

그 밖에 *Helicteres hirsuta* Lour. 잎과 줄기 추출물의 항암 활성[28], *Nauclea orientalis* (L.) L.의 향말라리아 치료제 성분 [14], *Scindapsus officinalis* (Roxb.) Schott의 소염제로서의 효과 [8] 등의 여러 연구가 있지만, *S. mutans*에 관한 항균 활성에 관한 연구는 미비한 것으로 보인다. 생물막은 항균 활성 물질로부터 균을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, *S. mutans*에게는 중요한 병원성 인자 중 하나이다[31]. 본 연구에서 19종 식물추출물의 *S. mutans*에 대한 생물막 저해 효과는 추출물의 농도 증가와 비례관계를 이루는 것으로 관찰되었다.

추출물의 *S. mutans*에 대한 항균력과 생물막 형성 저해의 연관성

추출물의 농도와 비례적으로 효과가 나타나는 결과와 다르게 최저 측정 농도인 1.25 mg/ml에서부터 생물막 형성을 저해하는 식물추출물을 비교해 보았다(Fig. 4). 먼저 *S. mutans*에 항균 활성이 관찰되는 *C. nubigena* (D. Don) Ali 추출물의 생물막 형성에 대한 효과를 보면, 실험에 사용한 최저 농도에서부

터 생물막 생성을 억제하는 효과를 확인할 수 있었다. 또한, *S. mutans*에 대한 항균 활성을 나타내지 않았던 *S. przewalskii* Maxim.과 *P. frutescens* (L.) Britton. 추출물들도 최저 농도에서부터 생물막 형성을 저해하였다. 즉, 이 결과를 통해 우리는 추출물의 종류에 따라 항균작용, 생물막 형성 저해 또는 두가지 효과를 모두 나타내는 기능적인 차이가 있을 것으로 예측할 수 있다. 이와 유사하게 xylitol은 설탕의 천연 대체제로 충치 예방에 효과가 있는 것으로 널리 알려져 있다[25]. 그러나 앞서 확인된 생물막 저해 추출물과 유사하게 디스크 확산 실험에서 생육 억제능이 관찰되지 않았다[10]. 이러한 추출물의 기능적 차이는 항균 활성과 생물막 저해 작용에 관련된 대사 작용 및 분자 기작이 서로 다르고 추출물에 의해 영향을 받는 목표 유전자가 서로 다르다는 것으로 해석될 수 있다. 그러므로 전사체분석 기법(RNA-seq)을 활용한 후속 연구를 진행하여 특정 천연추출물의 항균기작 분석 및 중요 목표유전자를 확보하고 항균 대체제로써 천연추출물의 기능적 가치를 판단할 필요가 있다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)의 지원으로 수행되었음.

References

1. Babaahmady, K. G., Challacombe, S. J., Marsh, P. D. and

- Newman, H. N. 1998. Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children. *Caries Res.* **32**, 51-58.
2. Barnabe, M., Saraceni, C. H., Dutra-Correa, M. and Suffredini, I. B. 2014. The influence of Brazilian plant extracts on *Streptococcus mutans* biofilm. *J. Appl. Oral. Sci.* **22**, 366-372.
 3. Bidault, P., Chandad, F. and Grenier, D. 2007. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. *J. Can. Dent. Assoc.* **73**, 721-725.
 4. Choi, E. G. and Lee, H. J. 1994. The effect of a dentifrice containing several herb medicine of plaque and gingivitis. *J. Kor. Acad. Oral Health* **18**, 401-409.
 5. Coudron, P. E. and Stratton, C. W. 1995. Use of time-kill methodology to assess antimicrobial combinations against metronidazole-susceptible and metronidazole-resistant strains of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**, 2641-2644.
 6. Dai, D. S., Liu, X., Yang, Y., Luo, X. M., Tang, R. X., Yin, Z. C. and Ren, H. Q. 2015. Protective effect of *Salvia Przewalskii* extract on puromycin-induced podocyte injury. *Am. J. Nephrol.* **42**, 216-227.
 7. Do, D. S., Min, B. S. and Bae, G. H. 1996. Isolation of the antibacterial constituents from *Crassirhizomae rhizoma* and evaluation of activity. *J. Pharm. Sci.* **40**, 478-481.
 8. Dong, H., Geng, Y., Wang, X., Song, X., Wang, X. and Yu, J. 2018. Chemical constituents from *Scindapsus officinalis* (Roxb.) Schott. and their anti(-)inflammatory activities. *Molecules* **23**, 2577.
 9. Dorman, H. J. and Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 308-316.
 10. Eskandarian, T., Motamedifar, M. P., Arasteh, S., Eghbali, S., Adib, A. and Abdoli, Z. 2017. Comparison of antimicrobial effects of titanium tetrafluoride, chlorhexidine, xylitol and sodium fluoride on *Streptococcus mutans*: An *in vitro* study. *Electron. Physician* **9**, 4042-4047.
 11. Garcia-Godoy, F. and Hicks, M. J. 2008. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J. Am. Dent. Assoc.* **139 Suppl**, 25S-34S.
 12. Gjermo, P., Rolla, G. and Arskaug, L. 1973. Effect on dental plaque formation and some *in vitro* properties of 12 bisbiguanides. *J. Periodontal. Res. Suppl.* **12**, 81-92.
 13. Hasan, S., Danishuddin, M. and Khan, A. U. 2015. Inhibitory effect of *zingiber officinale* towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Microbiol.* **15**, 1.
 14. He, Z. D., Ma, C. Y., Zhang, H. J., Tan, G. T., Tamez, P., Sydara, K., Bouamanivong, S., Southavong, B., Soejarto, D. D., Pezzuto, J. M. and Fong, H. H. 2005. Antimalarial constituents from *Nauclea orientalis* (L.) L. *Chem. Biodivers.* **2**, 1378-1386.
 15. Jain, I., Jain, P., Bisht, D., Sharma, A., Srivastava, B. and Gupta, N. 2015. Comparative evaluation of antibacterial efficacy of six Indian plant extracts against *Streptococcus mutans*. *J. Clin. Diagn. Res.* **9**, ZC50-ZC53.
 16. Jang, G. H., Ahn, B. Y., Oh, S. H., Choi, D. S. and Kwon, Y. J. 2000. Anticariogenic effects of *Coptis chinensis* Franch extract. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **32**, 1396-1402.
 17. Kalembe, D. and Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**, 813-29.
 18. Kim, T. I., Yeom, H. R., Ryu, I. C., Bae, K. H. and Chung, C. P. 1996. Clinical and microbiological study on the effect of *Magnoliae cortex* and *Ginkgo biloba* extracts containing dentifrice in gingivitis. *J. Periodontal. Implant. Sci.* **26**, 140-154.
 19. Koga, T., Asakawa, H., Okahashi, N. and Hamada, S. 1986. Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity of serotype c *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2873-2883.
 20. Li, J. T., Dong, J. E., Liang, Z. S., Shu, Z. M. and Wan, G. W. 2008. Distributional difference of fat-soluble compounds in the roots, stems and leaves of four *Salvia* plants. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* **41**, 44-52.
 21. Loesche, W. J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* **50**, 353-380.
 22. 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.
 23. Marsh, P. D. 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* **149**, 279-294.
 24. Mei, M. L., Chu, C. H., Low, K. H., Che, C. M. and Lo, E. C. 2013. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* **18**, e824-e831.
 25. Milgrom, P., Ly, K. A., Roberts, M. C., Rothen, M., Mueller, G. and Yamaguchi, D. K. 2006. Mutans streptococci dose response to xylitol chewing gum. *J. Dent. Res.* **85**, 177-181.
 26. Mitchell, T. J. 2003. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 219-230.
 27. O'Toole, G. A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* **47**, 2437
 28. Pham, H. N. T., Sakoff, J. A., Bond, D. R., Vuong, Q. V., Bowyer, M. C. and Scarlett, C. J. 2018. *In vitro* antibacterial and anticancer properties of *Helicteres hirsuta* Lour. leaf and stem extracts and their fractions. *Mol. Biol. Rep.* **45**, 2125-2133.
 29. Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M. and Yamamoto, T. 1989. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2307-2311.
 30. Skala, E., Kalembe, D., Wajs, A., Rozalski, M., Krajewska, U., Rozalska, B., Wieckowska-Szakiel, M. and Wysokinska, H. 2007. *In vitro* propagation and chemical and biological studies of the essential oil of *Salvia przewalskii* Maxim. *Z. Naturforsch. C.* **62**, 839-848.
 31. Stewart, P. S. and Costerton, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138.
 32. Tanzer, J. M. 1995. Dental caries is a transmissible infectious disease: the Keyes and Fitzgerald revolution. *J. Dent. Res.* **74**, 1536-1542.

33. Wiwattanarattanabut, K., Choonharuangdej, S. and Srithavaj, T. 2017. *In vitro* anti-cariogenic plaque effects of essential oils extracted from culinary herbs. *J. Clin. Diagn. Res.* **11**, DC30-DC35.
34. Yamamoto, H. and Ogawa, T. 2002. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 921-924.
35. Yu, H. H., Seo, S. J., Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, K. J., Jeon, B. H. and You, Y. O. 2003. Effect of *Asarum sieboldii* extracts on the growth, acid production, adhesion, and insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **17**, 666-671.
36. Yu, Y. J., Kwak, W. A., Cho, J. G., Chang, H. S., Kwon, H. K., Lee, S. I., Park, Y. S. and Park, J. H. 1996. Effect of grapefruit seed, *Cassiae torae Semen* and *Angelicae gigantis Radix* on growth *Streptococcus mutans*. *J. Kor. Acad. Oral Health* **20**, 107-120.
37. Zhang, M. L., Wen, Z. B., Hao, X. L., Byalt, V. V., Sukhorukov, A. P. and Sanderson, S. C. 2015. Taxonomy, phylogenetics and biogeography of *Chesneya* (*Fabaceae*), evidenced from data of three sequences, ITS, *trnS-trnG*, and *rbcL*. *Biochem. Syst. Ecol.* **63**, 80-89.

초록 : 해외 자생식물추출물이 *Streptococcus mutans*의 세포 성장 및 생물막 형성에 미치는 영향

문경훈¹ · 이윤채² · 김정남^{1,2*}

(¹부산대학교 자연과학대학 미생물학과, ²부산대학교 자연과학대학 생명시스템학과)

화학적으로 합성된 물질들이 주로 구강 위생 제품에 사용된다. 그러나 이러한 화학 물질을 장기간 사용 시, 내성 발생이나 알레르기, 치아변색과 같은 부작용이 발생할 수 있다. 이런 문제를 해결하기 위해 식물로부터 유래된 항균 물질의 사용과 이러한 항균 물질들의 탐색을 위한 노력이 계속 진행되고 있다. 본 연구를 통해 *Streptococcus mutans*의 성장과 생물막 형성을 저해하는 해외 자생식물을 탐색하고자 하였다. 본 실험에는 총 300종의 해외 자생식물 추출물이 사용되었으며, 그 중 *Chesneya nubigena* (*D. Don*) *Ali* 추출물이 *S. mutans*에 대한 비교적 높은 항균 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(clear zone, 9 mm; MBC, 1.5 mg/ml). 또한, 19종의 식물추출물이 농도에 비례적으로 *S. mutans*의 생물막 형성량을 최소 6배 이상 감소시키는 것을 확인하였다. 특히, *C. nubigena* (*D. Don*) *Ali* 추출물은 1.25 mg/ml의 낮은 농도에서부터 효과적으로 생물막 형성을 억제하는 것으로 관찰하였다. 본 연구를 통하여 *C. nubigena* (*D. Don*) *Ali* 추출물이 *S. mutans*의 생육 성장과 생물막 형성 저해 효과를 나타내었으며, 이를 통해 본 식물추출물이 충치 예방과 치료에 효과가 있는 항균 대체재 개발의 후보 소재로써 평가된다.