

원저

대한구강보건학회지 : 제 30권 제 4호, 2006
J Korean Acad Dent Health Vol. 30, No. 4, 2006

자일리톨이 함유된 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물이 *Streptococcus mutans* 바이오플름에 미치는 효과

김해선¹, 권호근^{1,2,3}, 최충호⁴, 김백일^{1,2,3}¹연세대학교 치과대학 예방치과학교실, ²구강과학연구소, ³구강악안면경조직재생센터,⁴전남대학교 치과대학 예방치과학교실색인: 바이오플름, 자일리톨, *Curcuma xanthorrhiza*, *Streptococcus mutans*

1. 서 론

바이오플름은 박테리아나 효소와 같은 미생물이 표면위에서 성장하여 층을 형성하고 그들 스스로 polysaccharide나 glycoprotein을 분비하여 형성된 다세포성의 집합체를 말한다. 바이오플름은 그들의 형태 때문에 식세포작용과 같은 숙주 방어나 항생물질 등의 거친 환경에 대한 저항성이 상당히 높다. 단지 미국에서만 한해에 100만건의 원내 감염이 박테리아 바이오플름에 의하여 발생된다¹⁾.

구강영역에 있어서 바이오플름의 전형적인 형태는 치면세균막으로써 양대 구강질환인 치아우식증과 치주질환을 일으킨다. *Streptococcus mutans*(이하 *S. mutans*)는 치면세균막을 형성하는 주요 원인균으로 알려져 있다. 즉, *S. mutans*는 타액성 획득피막 성분인 당단백질에 부착하는 대표적인 세균 중 하나로 glucosyl transferase(GTase)를 생성하여 글

루칸을 합성한다. 합성된 글루칸은 점착성이 있어 세균이 치아 평활면에 잘 부착되게 하고 각종 세균들을 응집시킨다. 부착한 세균이 증식하면 치은염과 치아면의 소와 열구를 따라 치면세균막을 형성하여 치아우식증 및 치주질환을 발생시킨다²⁾. 따라서 *S. mutans*의 성장을 억제시키거나 치면의 부착을 감소시키기 위한 항균물질의 개발을 위해서 많은 연구들이 이루어져 왔다.

Curcuma xanthorrhiza Extracts(이하 CXE)의 *S. mutans*에 대한 선택적인 항균효과는 이미 여러 편의 논문으로 학계에 보고된 바 있으며, 최근에는 Rukayadi와 Hwang³⁾이 CXE가 *S. mutans* 바이오플름 형성 억제에도 탁월한 효과가 있다고 보고하였다. 김 등⁴⁾은 CXE가 함유된 치약의 구취 억제 효과를 보고하였으며, 역시 김 등⁵⁾은 임상 연구를 통해서 CXE oil이 함유된 구강분무액의 구취감소효과를 보고하였다. 또한 황 등⁶⁾은 CXE oil 및 죽엽배합 치

약이 치은염 완화에도 효과가 있다고 보고하였다. 그러나 이렇듯 구강내 여러 유해 균주들에 대해서 항균효과가 높은 천연물질인 CXE는 특유의 쓴맛이 강해서 제품에 일정량 이상을 사용하기에는 어려운 점이 있다.

한편, 자일리톨은 치아우식증 발생을 억제시키는 대체감미료로써 항우식효과에 대해서는 이미 잘 알려져 있다. 기존에 항균효과가 있는 자연추출물 및 합성 물질에 자일리톨을 추가함으로써 더 효과적인 항균력을 가지는 물질을 만들 수 있다는 보고들도 있다^{7,8)}. Nuuja 등⁹⁾의 연구에서 클로르헥시딘, 자일리톨, 불소를 혼합한 구강양치액(XYLIHEX)과 기존의 클로르헥시딘 및 불소 양치액간의 항균 효과를 비교해 본 결과 불소 양치액에 비해서 XYLIHEX와 클로르헥시딘으로 양치했을 때 *S. mutans*가 유의하게 감소함을 보고하였다. 또한 Thorild 등¹⁰⁾의 연구에서는 자일리톨과 솔비톨, 클로르헥시딘, 불소가 서로 혼합된 껌을 염마가 씹었을 때 그 자녀의 태액 내 *mutans streptococci*와 치아우식경험을 알아본 결과, 염마가 불소와 자일리톨, 솔비톨이 함유된 껌을 씹은 경우 그 자녀의 *mutans streptococci*의 수가 가장 낮았음을 보고하였다.

기존의 대부분의 항균물질에 대한 평가는 부유성 미생물(planktonic bacteria)을 중심으로 평가가 이루어져 왔다. 그러나 대부분에 미생물들은 실제 환경에서 바이오플름의 형태로 존재하고, 구강내에서 형성된 치면세균막도 역시 바이오플름 상태로 존재하고 있다. 그러므로 항균물질의 효능을 평가할 때 *in vitro* 모델을 이용해서 평가할지라도 실제 인체 상태와 유사한 바이오플름 모델에서 항균물질을 평가하는 것은 중요한 의미를 갖는다.

따라서 본 연구의 목적은 기존에 *S. mutans*에 대해서 선택적 항균효과가 높다고 보고된 CXE에 자일리톨을 혼합하여 만든 혼합물질에 대해서 다음과 같은 항균평가를 시도하였다. 첫째, 기존의 부유성 미

생물 모델을 이용하여 CXE에 자일리톨을 혼합하여 만든 혼합물질의 최소억제농도(이하 MIC)와 속효성 항균효과를 평가하였고, 둘째, 이 물질이 *S. mutans* 바이오플름에 미치는 효과에 대해 평가하였다.

2. 연구재료 및 방법

2.1. 항균물질

인도네시아에서 자라는 생강과(Zingiberaceae) 식물의 일종인 *Curcuma xanthorrhiza*의 뿌리로부터 추출된 CXE를 연세대학교 식품생물공학교실로부터 함량이 100%인 것을 제공받아 4°C의 저온실에서 보관하였고 자일리톨(sigma)은 25°C 실온보관하면서 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 CXE와 자일리톨은 1:1의 비율이었고 농도는 최저 5 ppm에서 최고 5,000 ppm까지의 농도를 사용하였다.

2.2. 균주의 배양

구강 미생물로는 *Streptococcus mutans* ATCC25175 균주를 한국생명공학연구원 생물자원 센터로부터 분양받아 사용하였으며, 이 균주를 brain heart infusion(BHI, Difco, USA) 배지를 이용하여 37°C incubator에서 20-24시간 배양하였다. 균체의 보존에는 BHI 배지에 1.5% agar를 첨가한 배지를 사용하여 4°C에서 보관하였고, 일주일 간격으로 계대 배양하였다. 실험에 이용된 균주는 37°C incubator에서 20-24시간 배양시킨 균주를 cell의 최종농도가 7.25×10^6 CFU/ml *S. mutans*가 되도록 희석하였다.

2.3. 부유상태의 *S. mutans*에 대한 MIC 측정

본 연구에서 항균 물질의 항균력 평가를 위한 MIC는 평판 계수법(Plate count technique)을 이용하였다. 즉, 준비된 tube에 실험에 사용하게 될 물질을 dimethyl sulfoxide(이하 DMSO)에 녹여서 제조

Table 1. Minimum inhibitory concentration of antibacterial agents on planktonic *S. mutans* (unit: ppm)

Antibacterial agents	MIC
CXE	5
Xylitol	-
CXE + Xylitol*	10

* Mixing CXE and Xylitol (1:1)

한 시료를 다시 DMSO에 순차적으로 희석하여 96-well microtiter plate(Becton Dickinson, New York, USA)에 20 μl 를 넣은 다음 여기에 $7.25 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ *S. mutans* stock solution에서 균 180 μl 를 따서 시료에 첨가하여 37°C에서 24시간 배양한 후 평판 계수법으로 균의 CFU/ml을 확인하여 MIC로 나타내었다.

2.4. 부유상태의 *S. mutans*에 대한 항균물질들의 속효성 평가

생균수 측정에 의한 속효성(fast effectiveness) 항균활성 평가는 탁도 측정법을 이용하였으며 살아있는 생균수를 확인하기 위하여 평판 계수법을 병행하였다. 즉, 최종농도가 $7.25 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ 인 *S. mutans* 180 μl 와 미리 만들어 놓은 항균물질 20 μl 를 혼합하여 96-well microtiter plate에 넣은 다음 37°C에서 각각 1, 2, 5, 10분 동안 처리한 후 ELISA reader (Bio-Rad)를 이용하여 655 nm에서 균의 optical density(이하 OD)를 측정한 뒤 평판 계수법을 실시하여 생균수를 확인하였다.

2.5. 바이오플름 형성, 처리 및 정량화

S. mutans 바이오플름 형성은 polystyrene microtiter plate를 이용하여 바이오플름을 형성한 Li 등¹¹과 Loo 등¹²의 방법을 변형하여 시행한 Rukayadi와 Hwang³의 방법을 이용하였다. Plate에 인공타액(10 mmol l⁻¹ KPO₄, 50 mmol l⁻¹ KCl, 1 mmol l⁻¹ CaCl₂, 0.1 mmol l⁻¹ MgCl₂, pH 7.0) 200 μl

를 넣고 37°C에서 2시간 동안 유지시킨 뒤 인공타액을 제거하였다. 3% (w/v) sucrose가 함유된 BHI broth 247 μl 를 첨가한 뒤 50 μl 의 $7.25 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ *S. mutans*를 접종하고 CXE와 자일리톨, 자일리톨 함유 CXE 3 μl 를 첨가하였다. 준비된 plate를 37°C에서 48시간 동안 유지시킨 후 부유 미생물을 제거하고 5 mM PBS (pH 7.0) 200 μl 로 2번 세척하였다.

바이오플름을 정량화하기 위해서 Djordjevic 등¹³과 Jin 등¹⁴에 의해 시행된 crystal violet 정량법을 이용하였다. 0.4% crystal violet solution 110 μl 를 세척된 바이오플름에 첨가한 후 45분 동안 염색하였다. 45분 뒤 distilled water 350 μl 로 4번 세척한 뒤 95% ethanol 200 μl 를 첨가하였다. 45분 뒤 100 μl 를 취하여 새로운 plate로 옮긴 후 ELISA reader를 이용하여 655 nm에서 OD 값을 측정하였다.

3. 연구결과

3.1. 부유 상태의 *S. mutans*에 대한 MIC

각종 항균물질의 농도를 최저 농도 5 ppm에서 최고 농도 5,000 ppm까지 하여 *S. mutans*에 대한 항균활성 검사를 실시한 결과 *S. mutans*에 대한 CXE의 MIC는 5 ppm으로 매우 낮게 나타난 반면 자일리톨은 실험에서 평가한 농도 범위 안에서는 MIC 값을 확인할 수 없었다. 그러나 자일리톨과 CXE를 혼합한 경우 MIC 값이 10 ppm으로 나타났다(Table 1).

3.2. 부유 상태의 *S. mutans*에 대한 속효성 평가

항균물질들의 속효성 평가를 알아보기 위해서 사용한 OD 값 측정의 타당성을 평가해본 결과 OD 값에 따른 *S. mutans*의 CFU/ml 값 간의 R square 값이 0.97로서 OD 값 측정이 *S. mutans*의 성장을 잘 예측할 수 있었음을 확인하였다(Fig 1).

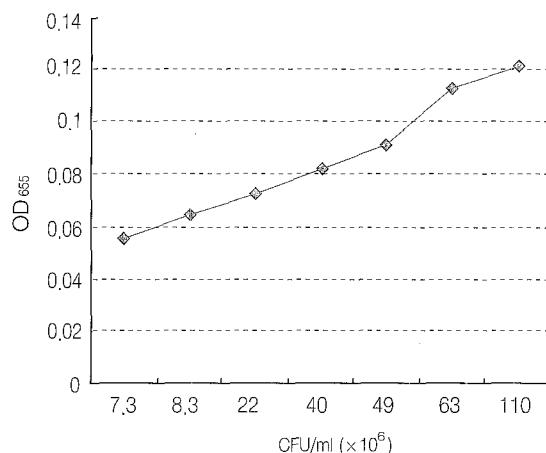


Fig. 1. Validity test between optical density (OD) and colony forming units (CFU) by plotting ($r^2 = 0.975$)

Table 2. Fast effectiveness of several antibacterial agents for planktonic *S. mutans*

Antibacterial agents	concentration (ppm)	Treatment Time (min)			
		1	2	5	10
CXE	0	6.59±0.23	6.64±0.22	6.61±0.23	6.56±0.23
	10	5.69±0.72	5.48±0.14	5.45±0.13	5.56±0.14
	25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Xylitol	0	6.74±0.26	6.62±0.05	6.62±0.52	6.76±0.29
	2,500	6.73±0.54	6.54±0.14	6.45±0.15	6.30±0.43
	5,000	6.50±0.36	6.47±0.35	6.37±0.28	6.47±0.23
CXE + Xylitol	0	6.53±0.30	6.70±0.30	6.72±0.57	6.70±0.10
	25	4.94±0.08	5.04±0.31	4.56±0.12	4.56±0.30
	50	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

All values are mean±standard deviation

CXE의 속효성을 이러한 방법에 근거하여 평가해 본 결과 25 ppm의 농도에서 *S. mutans*를 1분 안에 모두 사멸시키는 것으로 나타났다. 그러나 자일리톨은 5,000 ppm의 고농도에서 10분이 지난 후 까지도 균을 사멸시키지 못하였다. 반면 자일리톨과 CXE를 혼합한 경우 50 ppm의 비교적 저농도에서 1분 안에 거의 모든 균을 사멸하였다(Table 2).

3.3. *S. mutans* 바이오플룸에 대한 항균력 평가

S. mutans 바이오플룸에 대한 효과를 평가해본 결과 CXE는 50 ppm의 농도에서 *S. mutans* 바이오플룸의 형성을 거의 막을 수 있는 것으로 나타났다. 한편, CXE에 자일리톨을 혼합한 경우에도 50 ppm의

농도에서 *S. mutans* 바이오플룸 형성을 억제할 수 있었다. 하지만 자일리톨의 경우 5,000 ppm의 농도에서 조차 crystal violet의 OD 값이 0.051로써 *S. mutans* 바이오플룸의 형성을 거의 막지 못했다.

4. 고 안

치아 표면위의 바이오플룸인 치면세균막은 구강의 양대 질환인 치아우식증과 치주질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. 치면세균막 형성 초기에 관여하는 대표적인 균으로 *S. mutans*를 들 수 있다^{15,16}. *S. mutans*는 바이오플룸 개시와 성숙에 관련되어 있음을 보여주는 연구가 이루어져 왔다¹⁷. 따라서 이

Table 3. Effect of antibacterial agents on *S. mutans* biofilm

Antibacterial agents	concentration (ppm)	OD
CXE	0	0.028±0.008
	25	0.035±0.006
	50	0.001±0.001
Xylitol	0	0.045±0.004
	2,500	0.027±0.007
	5,000	0.051±0.003
CXE + Xylitol	0	0.036±0.007
	25	0.046±0.019
	50	0.002±0.002

러한 미생물의 성장을 억제시킬 수 있다면 바이오필름 형성을 초기에 막을 수 있고 그로 인한 치아우식증이나 치주질환을 예방할 수 있을 것이다.

그 노력의 일환으로 합성물질 및 천연물질을 이용한 구강내 미생물에 대한 항균력을 알아보기 위한 평가가 수많은 연구자들에 의해 이루어지고 있다. De Soete 등¹⁸⁾은 치주치료 시행 후 우식성 미생물 증가에 대한 연구에서 클로르헥시딘 0.2%와 amin fluoride/SnF₂가 혼합되어 있는 물질이 가장 오랫동안 큰 항균력을 나타냈다고 보고하였다. 불소와 *Sanguinaria*를 이용하여 임상적, 미생물학적 효과를 평가한 Kopczyk 등¹⁹⁾의 연구에서도 불소가 들어있는 *Sanguinaria* 함유 치약을 사용한 그룹의 치면세균막지수가 대조군에 비해 17.4% 더 낮았고, 치면세균막심각도지수는 41%, 치은염지수 18.1%가 더 낮았다. 그러나 불소가 들어있지 않은 *Sanguinaria* 함유 치약을 사용한 그룹의 치면세균막지수는 대조군에 비해 13.1% 더 낮았으며 치면세균막심각도지수는 33%, 치은염지수 16.7%가 더 낮게 나타난 것으로 보아 불소와 *Sanguinaria*의 상승작용에 의해서 치면세균막지수 및 치은염지수를 더 낮출 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서 이용한 인도네시아 천연 약용식물인 CXE는 이미 Hwang 등^{20,21)}에 의해 그 항균력이 뛰어남이 잘 알려졌다. 따라서 최근 CXE 함유 치약의 구

취억제 효과와 구강 유해균에 대한 선택적 항균 효과를 평가한 김 등⁴⁾의 연구에서 gas chromatography를 이용한 CXE의 구취억제 임상평가 결과, 구취를 약 75% 정도 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타났으며 관능검사에 의한 단기구취 임상평가에서 칫솔질 2시간 및 3시간 후에 실험군이 대조군에 비해서 통계적으로 유의한 수준으로 구취가 감소하였다($p < 0.05$). 또한 장기 구취 임상평가에서는 양치 2일과 3일 후에 실험군의 구취지수 값이 각각 4.12와 4.28을 나타낸 반면 대조군은 4.59와 4.72를 나타내어서 실험군의 구취 지수가 대조군의 구취지수 보다 유의한 수준으로 낮았다고 보고하였다. 한편 이미 설탕대체물로 잘 알려진 자일리톨은 항균력을 가지면서 단 맛을 내기 때문에 현재 제과산업에 널리 이용되고 있다. CXE를 자일리톨과 혼합할 경우 CXE의 항균력을 유지하면서 자일리톨의 단맛으로 CXE의 특유의 쓴맛을 없애주는 것이 가능하리라 여겨졌다. 따라서 본 연구에서는 CXE와 자일리톨을 혼합할 경우 *S. mutans*의 부유성 미생물 상태 및 바이오필름의 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

연구 결과 CXE에 자일리톨을 섞을 경우 CXE의 항균력은 거의 변함이 없었지만 자일리톨을 단독으로 사용한 경우에 비해서 항균력이 현저하게 향상되었다. 부유성 미생물 상태의 *S. mutans*에 대해서

CXE의 MIC는 5 ppm이었으나 자일리톨의 MIC는 실험 농도 범위 안에서는 확인할 수 없었다. 그러나 CXE에 자일리톨을 섞었을 때 MIC가 10 ppm까지 높아졌다. 이러한 결과는 0.1% 농도의 으름덩굴 추출물이 *S. mutans*의 성장을 5.26% 억제시킨다고 보고한 장 등²²⁾의 연구결과와 비교하였을 때 CXE와 자일리톨을 섞은 물질이 으름덩굴 추출물보다 더 큰 항균 효과를 나타내었다.

구강위생용품은 작용시간이 짧기 때문에 구강 내에서 수 분 안에 효과를 발휘할 필요가 있다. 그러므로 구강양치액, 구강 스프레이 등은 빠르게는 1분에서 5분 내에 효과를 발휘하는 것이 중요하다. 이러한 구강위생용품은 순식간에 구강내 타액과 섞여 희석되고 지속적인 삼킴으로 인해 효과를 볼 수 있는 시간이 굉장히 짧다. 따라서 CXE와 자일리톨을 혼합할 경우 얼마 만에 항균효과를 나타내는지 알아보기 위해 1, 2, 5, 10분 동안 부유성 *S. mutans*에 적용 시켜 항균력의 속효성을 평가하였다. CXE만 처리한 경우 1분 내에 25 ppm의 농도에서 거의 모든 균을 사멸시켰고, CXE와 자일리톨을 섞을 경우 50 ppm의 농도에서 1분 내에 거의 모든 균을 사멸시켰지만, 자일리톨의 경우 5000 ppm의 농도에서 10분이 지나도 항균력을 나타내지 않았다.

위의 결과 구강건조증 환자나 잇몸수술 환자와 같이 구강 내 미생물을 조절해야 하는 경우에는 CXE나 CXE와 자일리톨을 섞어서 이용한다면 기존의 다른 생약 추출물에 비해 더 낮은 농도로도 미생물을 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

미생물들은 실제로 주로 바이오플룸 형태로 존재하는데 바이오플룸내의 세균이 부유 상태의 미생물보다 항생물질에 대한 내성이 증가되어 이로 인한 감염증가를 일으킨다^{23,24)}. 이런 감염사례는 상당수의 항균물질이나 의약품들이 바이오플룸 형태가 아닌 부유성 미생물의 의거한 평가방법에 의해서 만들어졌기 때문에 일어난 결과로 생각되며, 따라서 부

유 상태의 미생물보다는 실제 구강상태에 좀 더 가까운 바이오플룸의 개념에 입각한 항균물질의 평가가 요구되어진다. 바이오플룸은 4단계를 거치며 성장한다. 즉, 부착기(adherent phase), 축적기(active accumulated phase), 정체 시작기(beginning plateau phase), 정체기(plateau accumulated phase)로 나뉜다²⁵⁾. 본 연구에서는 바이오플룸 형성 첫 단계에 해당하는 부착단계에 항균 물질을 적용하여 *S. mutans* 바이오플룸에 대한 효과를 알아본 결과 CXE는 50 ppm의 최종농도에서 *S. mutans* 바이오플룸의 형성을 거의 막았으며 CXE에 자일리톨을 혼합한 경우에도 CXE와 거의 비슷한 결과를 나타냈다. 하지만 자일리톨의 경우 5,000 ppm의 농도에서 조차 *S. mutans* 바이오플룸의 형성을 거의 막지 못했다. 따라서 CXE나 CXE와 자일리톨을 혼합한 물질을 지속적으로 사용한다면 바이오플룸 형성을 막을 수 있을 것으로 평가되었다.

본 연구에서는 *S. mutans*만을 이용하여 *in vitro* 실험을 진행하였지만 실제로 구강 내에서는 *S. mutans* 뿐만 아니라 수많은 구강 내 상주균들이 서로 상호작용으로 바이오플룸을 형성하기 때문에 향후 연구에서는 구강환경과 유사한 인공 바이오플룸을 형성하여 실험이 필요하리라 사료된다.

5. 결 론

본 연구에서는 *S. mutans* 바이오플룸 대한 항균력을 평가하기 위해 CXE, 자일리톨 그리고 CXE와 자일리톨을 혼합한 물질을 이용해 부유성 미생물 상태에서 각 항균물질의 MIC와 속효성에 대해 알아보고 다음단계로는 이러한 물질들이 *S. mutans* 바이오플룸 형성에 어떠한 영향을 미치는지 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CXE, CXE와 자일리톨 혼합물의 MIC는 각각 부유성 *S. mutans*에 대해 5 ppm, 10 ppm으로 나타

- 났으며 자일리톨은 실험에서 사용한 5,000 ppm 이하의 농도에서는 MIC를 관찰할 수 없었다.
2. 부유성 *S. mutans*에 대해서 각종 항균물질의 속 효성을 평가한 결과, CXE, CXE와 자일리톨 혼합물은 각각 25 ppm과 50 ppm의 농도에서 1분 안에 *S. mutans*를 사멸시켰으나 자일리톨은 실험에 사용한 5,000 ppm 이하의 농도에서는 10분이 지난 후에도 *S. mutans*의 사멸을 확인할 수 없었다.
 3. *S. mutans* 바이오플름에 대한 억제 효과를 평가한 결과 CXE는 최종농도 50 ppm에서 crystal violet의 OD 값이 0.001 ± 0.001 로써 *S. mutans* 바이오플름의 형성을 거의 억제하였으며, CXE에 자일리톨을 혼합한 경우에도 최종농도 50 ppm

에서 crystal violet의 OD 값이 0.002 ± 0.002 로써 CXE와 거의 비슷한 억제효과를 나타냈다. 하지만 자일리톨의 경우 5,000 ppm의 농도에서 조차 crystal violet의 OD 값이 0.051 ± 0.003 로써 *S. mutans* 바이오플름의 형성을 전혀 억제하지 못했다.

이상의 결과로 CXE를 자일리톨과 섞어서 이용하였을 경우 CXE 특유의 항균효과는 부유성 미생물 상태 및 바이오플름 모두에서 크게 저해하지 않으면서 자일리톨이 갖고 있는 맛이나 재광화 촉진효과 등의 장점을 결합한 구강위생용품 개발이 가능하리라 사료되었다.

참고문헌

1. <http://www.biofilmsonline.com>
2. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol 1992;63(4):322-331.
3. Rukayadi Y, Hwang JK. Effect of coating the wells of a polystyrene microtiter plate with xanthorrhizol on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. J Basic Microbiol. 2006;46(5):410-415.
4. 김백일, 김상년, 장석윤 외 7인. *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 및 함유 치약의 구취 억제 효과와 구강 유해균에 대한 선택적 항균 효과. 대한구강보건학회지 2005;29(2):221-237.
5. 김백일, 정승화, 김민영 외 3인. *Curcuma xanthorrhiza* oil이 함유된 구강분무액의 구취감소효과에 관한 임상적 연구. 대한구강보건학회지 2006;30(1):75-84.
6. 황수정, 김상년, 장석윤 외 5인. *Curcuma xanthorrhiza* oil 및 죽염배합세차제의 치은염억제효과. 대한구강보건학회지 2005;29(4):451-462.
7. Scheinin A, Banoczy J. Xylitol and caries: the collaborative WHO oral disease preventive programme in Hungary. Int Dent J 1985;35(1):50-57.
8. Scheinin A, Banoczy J, Szoke J, et al. Collaborative WHO xylitol field studies in Hungary:I. Three-year caries activity in institutionalized children. Acta Odontol Scand 1985; 43(6):327-347.
9. Nuuja T, Meurman JH, Torkko H. Xylitol and the bactericidal effect of chlorhexidine and fluoride on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Acta Odontol Scand 1993;51(2):109-114.
10. Thorild I, Lindau B, Twetman S. Salivary *mutans streptococci* and dental caries in three-year-old children after maternal exposure to chewing gums containing combinations of xylitol, sorbitol, chlorhexidine, and fluoride. Acta Odontol Scand 2004;62(5):245-250.
11. Li YH, Tan N, Aspiras MB, et al. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. J Bacteriol 2002;184:2699-2708.
12. Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J Bacteriol 2000;182:1374-1382.
13. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2002;68(6):2950-2958.
14. Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol 2003;41(7):2961-2967.
15. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu Rev Microbiol

- 2000;54:413-437.
16. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:486-505.
 17. Biswas S, Biswas I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 2005;73:6923-6934.
 18. De Soete M, Dekeyser C, Pauwels M, Teughels W, van Steenberghe D, Quirynen M. Increase in cariogenic bacteria after initial periodontal therapy. *J Dent Res* 2005;84(1):48-53.
 19. Kopczyk RA, Abrams H, Brown AT, Matheny JL, Kaplan AL. Clinical and microbiological effects of a *sanguinaria*-containing mouthrinse and dentifrice with and without fluoride during 6 months of use. *J Periodontol* 1991;62(10):617-622.
 20. Hwang JK, Shim JS, Baek NI, Pyun YR. Xanthorrhizol: a potential antibacterial agent from *Curcuma xanthorrhiza* against *Streptococcus mutans*. *Planta Med* 2000;66(2):196-197.
 21. Hwang JK, Shim JS, Pyun YR. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. *Fitoterapia* 2000;71(3):321-323.
 22. 장기완, 강동오, 김환규. 수종 우식원인균에 대한 유품덩굴 (*Akebia quinata*) 추출물의 항세균 및 saliva - coated hydroxyapatite beads에 대한 부착억제효과. *대한구강보건학회지* 1997;21(4):675-684.
 23. Evans RC, Holmes CJ. Effect of vancomycin hydrochloride on *staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicro Agents Chemother* 1987;31:889-894.
 24. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001;9:34-39.
 25. Li YH, Hanna MN, Svensater G, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J Bacteriol* 2001;183(23):6875-6884.

Abstract

Effect of *Curcuma xanthorrhiza* extract containing xylitol on *Streptococcus mutans* biofilms

Hae-Sun Kim¹, Ho-Keun Kwon^{1,2,3}, Choong-Ho Choi⁴, Baek-Il Kim^{1,2,3}

¹Department of Preventive Dentistry and Public Oral Health

²Oral Health Research Center

³Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, College of Dentistry, Yonsei University

⁴Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Chonnam University

Key words: biofilm, *Curcuma xanthorrhiza*, *Streptococcus mutans*, xylitol

Objectives: The purpose of this study was to evaluate the effect of *Curcuma xanthorrhiza* extract (CXE) containing xylitol on planktonic *Streptococcus mutans*(*S. mutans*) and *S. mutans* biofilms. Minimum inhibitory concentrations, the fast effectiveness antibacterial agents and antibacterial activity against *S. mutans* biofilms were examined for the evaluation.

Methods: *S. mutans* were exposed to antibacterial agents at different concentrations(from 5 ppm to 5,000 ppm) for different time exposures(1, 2, 5, 10 minutes and 24 hours). Biofilm formation was quantified by a crystal violet assay. The amount of the crystal violet stain was measured with a tunable microplate reader at 655 nm. The activity of antibacterial agents were expressed as the optical density of biofilm.

Results: MICs of CXE and CXE containing xylitol were 5 ppm, 10 ppm on planktonic *S. mutans*. However, xylitol could not find any MICs in concentration of this experiments. As a result of the fast effectiveness of antibacterial agents, CXE and CXE containing xylitol were able to completely inhibit growth of bacteria when they were exposed to these antibacterial agents for 1 minute in concentrations of 25 ppm, 50 ppm on planktonic *S. mutans*. However, xylitol could not inhibit growth of *S. mutans*. According to antibacterial activity of antibacterial agents against *S. mutans* biofilms, CXE and CXE containing xylitol inhibited *S. mutans* biofilm formation in concentration of 50 ppm. However, xylitol also couldn't inhibit growth of *S. mutans* biofilm formation.

Conclusions: As the result of this study, CXE containing xylitol with a highly selective antibacterial activity appears to be an attractive candidate.