약학회지 제 49 권 제 2 호 122~127 (2005)
Yakhak Hoeji Vol. 49, No. 2

藥學會誌

Streptomyces sp. M-20 균의 대사물에 의한 *Streptococcus mutans*의 Glucosyltransferase 활성 억제 효과

김 경 자#
순천향대 자연과학대학 생명과학부

(Received September 16, 2004; Revised March 15, 2005)

Inhibitory Effect of Metabolites isolated from *Streptomyces* sp. M-20 on Glucosyltransferase Activity from *Streptococcus mutans*

Kyoung-Ja Kim#
Division of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 336-745, Korea

Abstract — Dental caries is one of the most common oral diseases in the world. Glucosyltransferase (GTase) of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) plays an important role in the development of dental caries. For the purpose to develope anticaries, we examined the effect of metabolites isolated from *Streptomyces* sp. M-20 on GTase and the growth of *S. mutans*. *Streptomyces* sp. M-20 isolated from Mongolian soil showed 95~96% sequence homology with that of *Streptomyces lincolnensis*. The metabolites of *Streptomyces* sp. M-20 were partially purified by extraction with ethyl acetate, silica gel column chromatography and preparative TLC. Partially purified metabolite, red colored component (MR-20) in ethyl acetate fraction showed potent antibacterial activitiy against *S. mutans* and inhibitory activity against GTase purified from *S. mutans*, while another isolated yellow component (MY-20) showed no activity against *S. mutans*. The inhibitory activity of MR-20 against GTase was confirmed by activity staining on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The concentration of MR-20 for 50% inhibition (IC_{50}) against GTase activity was 60 μg/ml. These results suggest that MR-20 can be developed for antibacterial agent and anticaries.

Keywords □ glucosyltransferase (GTase), *Streptomyces* sp. M-20, *Streptococcus mutans*, anticaries, antimicrobial activity

치아 우식증[1,2]은 구강 내에서 원인세균이 생성하는 Glucosyltransferase(GTase)[3-5]에 의하여 당질로부터 점착성의 insoluble gluan(치석)이 형성되어 치아의 표면에 부착하게 되고, 이 glucan에 원인세균이 증식하면서 국소적으로 각종 유기산을 생성하여 치아 표면의 에나멜질을 분해하여 치아조직의 결손을 초래하는 세균성 치아 경조직 질환이라고 보고되어 있다[5]. 사람의 치아우식 원인균으로는 *Streptococcus* spp. 및 *Lactobacillus* spp.에 속하는 일부의 종들이 보고되어 있으며,[6] 그 중 *Streptococcus mutnas*(*S. mutans*)는 충치 발생에 가장 중요한 원인균으로 알려져 있다.[7] 전 세계적으로 가장 만연된 구강 내 질병의 하나인 치아 우식증(충치)은 스트레스등의 원인으로 면역기능이 약화되어 구강 내 미생물이 증가되어 생기는 것으로 식생활 패턴의 변화에 따라 증가된 당류 섭취량이 더해져 그 이환율이 점점 증가하고 있는 실정이다. 최근 충치 발생 기작에 대한 기초적인 연구와 함께 충치 예방의 측면에서 매우 활발한 연구가 이루어지고 있다.[8-11] 충치 예방의 가장 기본적인 방법으로는 이러한 충치 유발 세균을 치표면으로부터 제거하는 것이다.[12-15] 또한 치면 세균막 형성 저해제, 즉 *S. mutans*의 GTase 활성을 저해함으로 세균이 치아 표면에 부착하거나,[16] 세균과 세균의 응괴에 큰 도움을 주어 결과적으로 치석 형성과 치아 우식의 유발에 크게 영향을 미치는 치석의 형성을 억제하는 방법이 가장 유효한 충치 예방으로 인정되어 최근에는 GTase 활성을 억제시키려는 노력이 다양하게 시도되고 있다.[17-19] 충치 예방 및 치료약을 개발할 목적으로 *in vitro*에서 *S. mutans*에 대하여 항균활성을 조사한 결과, *Streptomyces* sp. M-20 균의 대사물의 추출액이 *S. mutans*에 대해 큰 항균 활성[20-22]을 나타낼 뿐만 아니라, 치석을 형성하는 GTase 활성의 저해 효과까지 나타내어, 이를 충치균에 대한 항미생물제제로 이용할 수 있으리라 사료되었다. 따라서 본 연

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 041-530-1352 (팩스) 041-530-1350
(E-mail) kyoungjakim@hotmail.com

구에서는 *Streptomyces* sp. M-20 균의 대사물을 추출 및 분획하고, 그 분획들의 *S. mutans*에 대한 항균 활성과 *S. mutans*의 GTase에 대한 저해 활성을 측정하여 충치 예방의 개발 가능성을 조사하였다.

실험 방법

실험 재료 및 시약

Thimerosal(Mercury-[(o-carboxyphenyl)thio]ethyl sodium salt, periodic acid, Schiff's reagent, Triton X-100, Dextran, SDS, DEAE-Sephacel, Sephadex G-100 등은 Sigma(St. Louis, USA)사에서, Silica 60G(230~400 mesh) 및 silica gel plate $60GF_{254}$는 Merk(Germany)사에서, brain heart infusion(BHI)는 Difco Lab.(Detroit, USA)에서 구입하였다. PCR premix 및 DNA 분리용 시약은 Bioneer (Korea)에서 구입하였으며, Gel extraction kit는 QIAgen(Hilden, Germany)에서 구입하였다. 그 외 실험에 사용한 시약 및 용매류는 국내외에서 시판하는 특급 시약을 사용하였다.

실험 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Streptococcus mutans*(KCTC 3065)이며 한국생명공학 연구원 유전자 은행실에서 분양 받아 1주에 한번씩 계대배양 하였으며 배지는 Brain Heart Infusion(BHI)을 사용하였다. *Streptomyces* sp. M-20 균은 본 실험실에서 몽골의 흙에서 분리한 균종으로 사용한 계대 배양을 위한 배지는 Tryptic Soy Broth(TSB)이며 대사물 생산에 사용된 배지는 0.5% glucose, 0.5% L-sodium glutamate, 0.25% K_2HPO_4와 0.05% $MgSO_4$를 함유한 최소 배지(PGI)로 28°C에서 진탕 배양하였다.

균주 동정

분리주인 M-20에서 분리된 chromosomal DNA를 PCR premix(AccuPower®PCR PreMix, Bioneer)kit를 이용하여 16s rDNA forward primer(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 20 pmol) 2 μl, 16s rDNA reverse primer(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 20 pmol) 2 μl, template 1 μl, deionized water 15 μl를 첨가하여 PCR을 실시하였다. PCR의 조건은 시작 denaturation 단계를 94°C에서 1분간 실시하였고, 94°C에서 1분, 51°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30 cycle 반응 후 마지막 extention 단계는 72°C에서 7분간 더 실시하였다. 반응 후 0.8% agarose gel에 전기영동을 실시하여 분리된 PCR산물을 Gel Extraction Kit(QIAquick®, Hilden, Germany)를 이용하여 설명서에 기재된 방법에 따라 gel로부터 추출하였다. 추출한 PCR산물을 agarose gel(1.5%)을 이용하여 추출 여부를 확인한 후 TaKaRa Korea의 유전자 해석센터에 의뢰하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 분석된 서열은 NCBI의 Blast search program을 이용하여 상동성 조사를 실시하였다.

Glucosyltransferase(GTase)의 분리

GTase의 분리 및 정제는 *S. mutans* KCTC3065를 Brain Heart Infusion(BHI) 배지에서 37°C, 72시간 배양한 다음, 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 10분) 후, cell pellet을 0.9% NaCl로 3회 washing하고, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5, 완충액 A)으로 1회 washing한 후, cell pellet의 무게와 동량의 완충액 A에 현탁하였다. 이 세포 현탁액을 초음파를 이용하여(sonic & materials ING, USA) cell을 깨고(Output watts 5, 30초씩, 6회), 원심분리(8,000 rpm, 20분, 4°C) 후 상층액에 ammonium sulfate를 50%까지 포화시키면서 첨가하였다. 그리고 다시 원심분리(8,000 rpm, 20분, 4°C)하여 그 침전물을 동량의 완충액 A에 용해시킨 후 동일한 완충액 A로 2번 투석하였다. 그 후, DEAE-Sephacel column chromatography(용출액 : 완충액 A, 0~1.0 M NaCl gradient, 용출 속도 : 2.5 ml/fraction)와 Sephadex G-100 column chromatography(용출액 : 완충액 A, 용출 속도 : 2.5 ml/fraction)를 통해 정제하여, 동결 건조하여 농축시킨 다음 -70°C에 보관하여 사용하였다.

GTase의 SDS-PAGE 및 active staining

분리된 GTase의 전기 영동은 6% SDS-PAGE를 이용하여 Laemmli 방법[23]으로 행하였으며 염색은 methanol-acetic acid-water(40 : 10 : 50, by volume)에 녹인 0.15%(w/v) Coomassie brilliant blue R-250를 이용하였으며, 탈색은 methanol-acetic acid-water(40 : 10 : 50, by volume)용액을 이용하였다. GTase의 활성 염색[24]을 위하여 SDS-PAGE 후 1% Triton x-100을 함유한 20 mM potassium phosphate buffer(pH 6.0, 완충액 C)로 4°C에서 3시간 동안 gel을 세척하였다. 그 후 겔을 0.125% sucrose, 1% Triton X-100, 2.5 mM EDTA, 0.01% thimerosal을 함유한 완충액 C에서 72시간 동안 배양한 후 1% periodic acid 에서 2시간 동안 배양한 뒤, 15% acetic acid 에서 2시간 동안 세척하였다. 빛을 차단한 통에 Schiff's reagent를 적당량 첨가 후 겔을 4°C에서 2시간 반응시키고 10% acetic acid에서 탈색시켜 관찰하였다.

GTase 억제 활성 측정

GTase 활성도[3]는 기질인 sucrose로부터 glucose가 글루칸 중합체(glucan polymer: dextran)로 편입되어 생성한 치석의 양을 측정하여 얻었다. 정제된 GTase 100 μl을 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5, 완충액 B) 1 ml와 혼합 후, 15% sucrose 100 μl와 0.03% dextran(5만~7만) 100 μl, 0.3% sodium azide 100 μl

와 혼합시켜 37°C에서 15시간 동안 반응시켰다. 반응 후 생성된 불용성 glucan을 분광 광도계로 550 nm에서 측정하였다. 대조군으로는 100 μl의 GTase 대신 100 μl의 완충액 B를 첨가한 것으로 나머지는 동일한 시약을 넣어 같이 반응시킨 것을 사용하였다. GTase 억제 활성도는 각 시료와 GTase를 미리 반응시킨 후 GTase 활성도를 측정하였으며 대조군으로는 시료를 녹인 용매 ethyl acetate를 시료대신 사용하였다.

항균력 실험

각 시료의 항균활성의 측정은 평판배지 디스크 확산법[25]을 사용하였다. 멸균된 Paper Disc(직경 8 mm)에 50 μl의 각 시료를 흡수시킨 후, *S. mutans*가 spread 되어 있는 항균 시험용 평판배지(BHI agar) 위에 놓아 밀착시켰다. 이것을 4°C에서 30분 방치한 후, 37°C에서 24시간 배양한 다음, paper disc 주변에 생긴 항균대의 직경을 1 mm까지 측정하였다. 대조군으로는 ethyl acetate를 paper disc에 동량 흡수시켜 이용하였다.

Streptomyces sp. M-20 균 대사물 추출

Streptomyces sp. M-20 균을 먼저 Tryptic Soy Broth(TSB) 액체배지 50 ml에 0.5% 농도로 접종 후 28°C에서 2일간 진탕 배양하였다. 이를 1 l의 PGI 배지에 0.5%로 접종하여 7일간 배양(28°C, 120 rpm) 하여 보라색 상등액으로 부터 다음과 같은 방법으로 대사물을 추출하였다. 대사물을 추출하기 위하여 filter paper(Whatman No. 4)를 이용하여 상등액과 세포을 분리하고, 상등액을 동량의 ethyl acetate(EtOAc)로 3회 추출하였다. 추출 후 EtOAc층을 수층과 분리하고, EtOAc 추출액에 Na_2SO_4를 넣어 여분의 수분을 제거한 후 감압증류하여 EtOAc층을 농축하였다. EtOAc를 이용하여 1차적으로 분리한 물질을 chloroform : methanol=2 : 1을 용출 용매로 silica gel column chromatography 하여 3개의 분획을 얻었다. 항균 활성이 높은 분획을 chloroform : methanol=20 : 1의 전개 용매로 silica gel preparative TLC 하여 각각의 다른 색을 나타내는 분획을 다시 EtOAc에 녹여 항균활성 및 GTase 억제 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

균주 동정

몽골의 흙에서 분리된 균종를 동정하기 위하여 균주에서 분리한 chromosomal DNA를 16s rDNA primer를 이용하여 PCR 반응후 TaKaRa Korea의 유전자 해석센터에 의뢰하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 분석된 서열은 NCBI의 Blast search program을 이용하여 상동성을 조사한 결과 *Streptomyces lincolnensis*와 95%~96% 일치하였으며 *Streptomyces* sp. M-20로 명명하였다.

Fig. 1 – *Streptomyces* sp. M-20 grown in PGI medium at 28°C for 7 days.

Streptomyces sp. M-20 균 대사물 의 추출 및 특성

Streptomyces sp. M-20 균의 PGI 배양 상등액이 배양 3일 후부터 연분홍색을 나타내기 시작하면서 5일 후에는 보라색을 나타내기 시작하였다(Fig. 1). 7일 후에 진보라색을 띠게 되고 배양 시간별로 항균력 및 GTase 억제 활성을 조사한 결과 7일 후 가장 강한 활성을 보였으므로 7일 후 배양 상등액을 ethyl acetate (EtOAc)로 추출하여 silica gel column chromatography와 preparative TLC 과정을 거쳐 분리한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 색을 나타내는 분획 중 노란 색(MY-20)을 나타내는 분획과 붉은 색(MR-20)을 나타내는 분획을 각각 EtOAc로 다시 추출하여 여러 가지 발색 시약으로 특성을 조사하였다. Table I에서 보는 바와 같이 MY-20은 Bial's reagent, phosphomolybdic acid(PMA)에서 발색 반응이 나타났다. 그러나 ammonium molybdate(VI), tin*(IV) chloride, Dragengorff's reagent, 2.4-

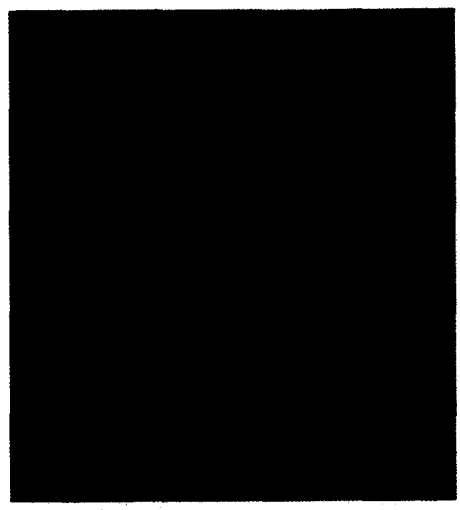

Fig. 2 – Preparative TLC of ethyl acetate extract fraction of supernatant from *Streptomyces* sp. M-20. Used plate is silica gel plate and developing solvent is chloroform : methanol= 20 : 1.

Table I – Visual reactions of MY-20 and MR-20 from *Streptomyces* sp. M-20

Visual reactions	MY-20	MR-20
Ammonium molybdate	-	-
Bial's reagent	+	+
Bontrager reagent	-	-
2.4-Dinitro-phenyl hydrazine	-	-
Dragengorff's reagent	-	-
Ehrlich reagent	-	-
Fluorescein	-	-
Ferric chloride	-	+
Ninhydrin	-	-
Perchloric acid	-	-
Phosphomolybdic acid (PMA)	+	-
Tin (IV) chloride	-	-
Vanilline sulfuric acid	-	-

+ : positive reaction, - : negative reaction.
MY-20 and MR-20 were isolated from supernatant of *Streptomyces* sp. M-20 by EtOAc extraction, silica gel column chromatography and silica gel preparative TLC.

dinitro-phenyl hydrazine, perchloric acid, Bontrager reagent, Ehrlich reagent, fluorescein, ferric chloride. ninhydrin에서는 반응을 보이지 않았다. 위 결과를 종합해 볼때 MY-20는 terpen 계열에 당이 붙어 있는 것으로 사료된다. MR-20는 발색 반응 중에서 vanilline sulfuric acid, Ehrlich reagent, Dragendorff's reagent, fluorescein(Lipid), ninhydrin 등에서는 발색하지 않았으며, ferric chloride, Bial's reagent에서는 발색하였다. 따라서 MR-20는 terpenes, amines, indoles, alkaloids, lipid, amino acids는 포함하지 않고, 당을 포함하고 있는 페놀성 물질이라 사료된다. 자세한 구조 결정은 현재 계속 연구중이다. Propolis[26]의 폴리 페놀 성분이 *S. mutans*에 대해 항균력을 가지고 있으며 GTase에 대해 억제 활성을 가지는 것으로 보고되었으며 사과의 폴리 페놀 성분은 GTase에 대해서는 억제 활성을 가지나 *S. mutans*의 성장은 억제하지 않는 것으로 보고되었다.[27] 미생물 대사물에서 추출한 MR-20의 경우 미생물의 대사 경로를 조절하여 대량 생산이 가능하므로 식물체나 다른 유기체에서 분리한 추출물과 비교시 산업적으로 유용하다고 사료된다.

Streptomyces sp. M-20 균 대사물의 항균력

Streptomyces sp. M-20 대사물을 추출 및 분획하여 노란 색을 나타내는 Rf 치 0.12의 분획물(MY-20)과 붉은 색을 나타내는 Rf 치 0.48의 분획물(MR-20)의 *S. mutans*에 대한 항균력을 평판 배지 디스크 확산법으로 조사한 결과, MR-20는 유의성있는 항균력을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 3). *S. mutans*에 대해서 항균력을 가지는 3-hydroxymethylene-2-thiopyrrolidine[28]의 경우 800 mg/l 이상의 농도에서는 치석 생성의 억제 정도가 낮은 농도에 비하여 오히려 감소하는 것으로 보고되었다. MY-20의 경우에는 *S. mutans*에 대해서는 항균력을 가지지 않는 것으로 나타났으나 *Helicobacter pyroli*와 같은 다른 균종에 대해서는 항균력을 가지는 것으로 나타났다(결과는 나타내지 않음). Benzimidazole[29]의 경우 위의 산 생산을 억제함으로써 *Helicobacter pyroli*에 항균력을 가지는 것으로 알려져 있다. MY-20의 *H. pyroli*에 대한 항균 기작은 현재 연구중이다.

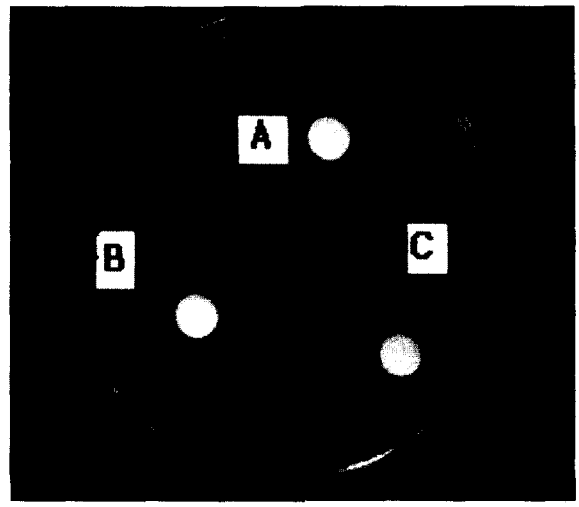

Fig. 3 – Agar diffusion assay of MR-20 isolated from *Streptomyces* sp. M-20 on *S. mutans*. A culture suspension of *S. mutans* grown in BHI was uniformly spread on plate of BHI agar. Discs soaked with MR-20 (B : 50 μg, C : 100 μg) were laid on the seeded plate; control (A) was disc soaked with ethyl acetate. Bacterial growth was observed over 1 day of incubation at 37°C.

Glucosyltransferase 억제 활성

*S. mutans*의 cell free extract로부터 50% 황산 암모니움 포화법, DEAE-Sephacel 크로마토 그래피와 Sephadex G-100 컬럼

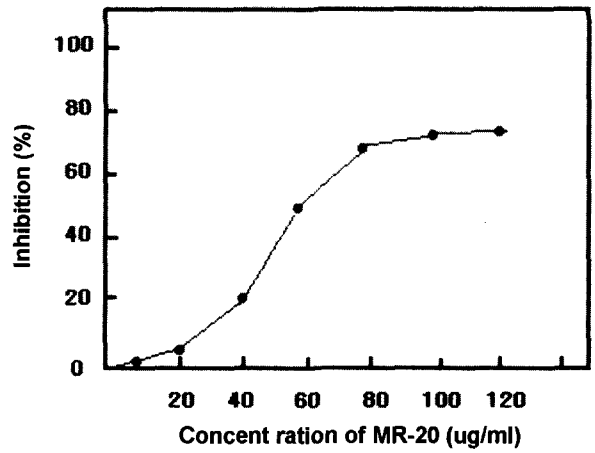

Fig. 4 – Dose response curve for inhibition of GTase by MR-20 isolated from *Streptomyces* sp. M-20. The enzyme was assayed in the presence of various concentration of MR-20 as described in Materials and Methods.

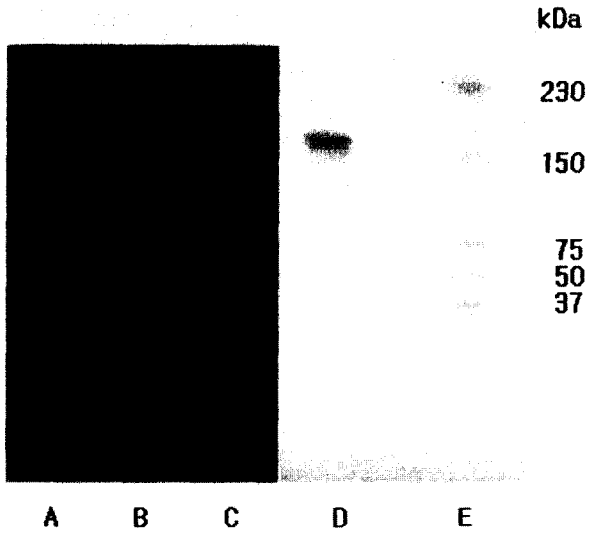

Fig. 5 – The direct interaction of GTase with MR-20 isolated from *Streptomyces* sp. M-20 . The effect of MR-20 is determined by activity staining. GTase was preincubated with buffer alone, ethyl acetate or MR-20, and subjected to SDS-PAGE as described in Materials and Methods. Activity stained GTase (A : preincubated with buffer, B : preincubated with MR-20, C : preincubated with ethyl acetate), Coomassie brilliant blue stained glucosyltransferase (D) and protein marker (E).

크로마토 그래피법으로 분리 및 정제한 GTase 활성에 대한 억제 활성을 조사한 결과, *Streptomyces* sp. M-20 균의 대사물의 추출물중 붉은 색을 나타내는 MR-20가 60 μg/ml에서 50%의 억제 활성을 보였으며, 80 μg/ml 이상의 농도에서는 70~75%의 억제 활성을 보였다(Fig. 4). MR-20 성분은 *S. mutans*에 대한 항균력과 GTase 억제 활성을 가지는 것으로 조사되었다. 1-deoxynojirimycin, 1',4',6' trideoxy-trichloro-galactosucrose와 같은 당 유도체와 Bengal, hypochlorite, Zn^{+2}, Cu^{+2}, Fe^{+2}, Fe^{+3} 등이 GTase 억제 활성을 가지는 것으로 보고되었다.[30]

Glucosyltransferase의 active staining

*S. mutans*의 GTase에 대한 활성 염색을 한 결과 효소 단독 혹은 시료를 녹인 용매인 EtOAc와 효소를 반응시킨 후에는 보라색 밴드로 나타났으나 *Streptomyces* sp. M-20 대사물의 추출물인 MR-20와 효소를 반응시킨 후에 조사한 결과 MR-20에 의한 GTase 억제 활성으로 인하여 효소의 보라색 밴드가 나타나지 않았다(Fig. 5). 이로써 MR-20 성분의 GTase 억제 활성이 명확하게 확인되었다.

결 론

몽골의 흙에서 분리, 동정한 *Streptomyces* sp. M-20 균의 sodium glutamate 함유 배지의 보라색 상등액을 ethyl acetate 추출 및 silica gel column chromatograohy, silica gel preparative TLC를 이용하여 분리한 붉은 색의 MR-20 성분이 치아 우식균인 *S. mutans*에 대하여 항균 활성 및 *S. mutans*로부터 분리 정제된 glucosyltransferase 억제 활성을 가짐을 밝혔다. MR-20 성분의 GTase 억제 활성을 SDS-PAGE 후 활성 염색을 통하여 효소의 보라색 밴드가 나타나지 않는 것으로 확인하였으며 IC_{50}는 60 μg/ml로 나타났다.

감사의 말씀

본 과제는 2003년도 순천향대 교내 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Beighton, D. and Brailsford, S. R. : Plaque microbiology of root caries. In: Newman, H. N. and Wilson, M. (eds.). Dental plaque revisited Cardiff, Bioline. 283 (1999).
2) Hardie, J. M. and Whiley, R. A. : Plaque microbiology of crown caries. In: Newman, H. N. and Wilson, M. (eds.). Dental plaque revisited Cardiff, Bioline. 283 (1999).
3) Hazlett, K. R., Mazurkiewicz, J. E. and Banas, J. A. : Inactivation of the gbpA gene of Streptococcus mutans alters structuraland functional aspects of plaque biofilm which are compensated by recombination of the gtfB and gtfC genes. *Infect. Immun.* **67**, 3930 (1999).
4) Minami, T., Fujiwara, T., Ooshima, T. and Hamada, S. : Interaction of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glucosyltransferases from mutans *Streptococci. Oral Microbiol. Immunol.* **5**, 189 (1990).
5) Ooshioma, T., Matsumura, M., Hoshino, T., Kawabata, S., Sobue, S. and Fujiwara, T. : Contributions of three glucosyl-transferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans. J. Dent. Res.* **80**, 1672 (2001).
6) Kim, J. H., Lee, D. S., Lim, C. W., Park, H. Y. and Park, J. H. : Antibacterial activity of sea-mustard, laminaria japonica extracts on the cariogenic bacteria, *Strptococcus mutans. J. Korean Fish. Soc.* **35**, 191 (2002).
7) Matsumoto, M., Minami, T., Sasaki, H., Sobue, S., Hamada, S. and Ooshima, T. : Inhibitory effects of oolong tea extract on caries inducing properties of mutans *Streptococci. Caries Res.* **3**, 441 (1993).
8) Kakiuchi, N., Hattori, M., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Okuda, T. and Namba, T. : Studies on dental caries prevention by traditional medicines. VIII. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus*

mutans. *Chem. Pharm. Bull*. **34**, 720 (1986).
9) Kamotsay, K., Herczegh, A., Rozgonyi, F., Nasz, I., Gintner, Z. and Banoczy, J. : Effect of fluoride on cariogenic oral microorganisms (an *in vitro* study). *Acta Microbiol. Immunol Hung*. **49**, 47 (2002).
10) Kozai, K., Miyake, Y., Kohda, H., Kamataka, S., Yamasak, K., Suginakza, H. and Nagasaka, K. : Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and urosonic aid. *Caries Res*. **21**, 104 (1987).
11) Koo, H., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Park, Y. K. and Bowen, W. H. : Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Ag. Chemoth*. **46**, 1302 (2002).
12) Fujiwara, M., Hayashi, Y. and Ohara, N. : Inhibitory effect of water-soluble chitosan on growth of *Streptococcus mutans*. *New Microbial*. **27**, 86 (2004).
13) Kubo, I., Muroi, H. and Himejima, M. : Antibacterial Activity aginst *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. *J. Agric. Food Chem*. **41**, 107 (1993).
14) Kubo, I., Muroi, H. and Kubo, A. : Antibacterial activity of long-chain alcohols against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem*. **41**, 2447 (1993).
15) Ohk, S. H., Yoo. Y. J. and Bai, D. H. Purification and characterization of *Streptococcus mutans* cell wall hydrolase from *Bacillus subtilis* YL-1004. *J. Microbiol. Biotechnol*. **11**, 957 (2001).
16) Tagashira, M., Uchiyama, K., Yoshimura, T., Shirota, M. and Uemitsu, N. : Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan synthesis of mutans *Streptococci*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **61**, 332 (1997).
17) Hamada, S., Kontani, M. and Hosono, H. : Peroxidase-catalysed generation of catechin oligomers that inhibit glucosyl-tranferase from *Streptococcus sobrinus*. *FEMS Microbiol*. **38**, 717 (1990).
18) Koo, H., Hayacibara, M. F., Schobel, B. D., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Park, Y. K., Vacca-Smith, A. M. and Bowen, W. H. : Inhibition of *Streptoccus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide prodection by apigenin and tt-farnesol. *J. Antimicrob. Chemother*. **52**, 782 (2003).
19) Nakahara, K., Kawabata, S. and Ono, H. : Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans *Streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol*. **59**, 968 (1993).
20) Park, C. S., Shin, Y. S., Ryu, I. W. and Lee, K. S. : Antimicrobial activity of extract from aloe vera peel against *Streptococcus mutans* JC-2. *Korean J. Food & Nutr*. **13**, 139 (2000).
21) Phan, T. N., Buckner, T., Sheng, J., Baldeck, T. D. and Marquis, R. E. : Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral *Streptococci* in suspensions and biofilms. *Oral Microbiol. Immun*. **19**, 31 (2004).
22) Radcliffe, C. E., Lamb, R., Blinkhorm, A. S. and Drucker, D. B. : Effect of sodium nitric and ascorbic acid production of *Streptococcus mutans*. *J. Dent*. **31**, 367 (2003).
23) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
24) Eto, A., Takaomi, C. S., Fukushima, K., Tomioka, S., Inai, S., Nisizawa, T. and Hanada, N. : Inhibitory effect of a self-derived peptide on glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem*. **274**, 15797 (1999).
25) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically 4th ed. Approved standard M7-A4. Villanova, Pennsylvania, National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997).
26) Koo, H., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Park, Y. K. and Bowen, W. H. : Effects of compounds found in propolis on *Streptococci mutans* growth and glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **46**, 1302 (2002).
27) Yanagida, A., Kanda, T., Tanabe, M., Matsudaira, F. and Oliveira, C. : Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutants *Streptococci*. *J. Agric. Food. Chem*. **48**, 5666 (2000).
28) Hashimoto, K., Ynagi, K., Fukushima, K. and Uda. Y. : Effect of 3-hydrocymethylene-2-thioxopyrrolidine on growth of two species of mutants streptococci and their *in vitro* plaque formation. *Inter. J. Antimicrob. Agents*. **17**, 97 (2001).
29) Nguyen, P. T., Baldeck, J. D., Olsson, J. and Marquis, R. E. : Antimicrobial actions of benzimidazoles against oral *Streptococci*. *Oral. Microbiol. Immunol*. **20**, 93 (2005).
30) Wunder, D. and Bowen, W. H. : Action of agents on glucosyltransferase from *Streptococci mutants* in solution and adsorbed to experimetal pellicle. *Arch. Oral. Biol*. **44**, 203 (1999).