

## Effect of the Ethanol Extract of Propolis on Formation of *Streptococcus mutans* Biofilm

Bog-Im Park<sup>1</sup>, Yeon-Woo Jung<sup>1</sup>, Young-Hoi Kim<sup>2</sup>, Sang-Moo Lee<sup>3</sup>, Lee-Seong Kwon<sup>3</sup>, Kang-Ju Kim<sup>4</sup>, So-Youn An<sup>5</sup>, Na-Young Choi<sup>6</sup> and Yong-Ouk You<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

<sup>3</sup>RAPHA PROPOILS Co, Jeonju, Korea

<sup>4</sup>Department of Oral Microbiology & Immunology, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Korea

<sup>5</sup>Department of Pediatric dentistry, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Korea

<sup>6</sup>Department of Home Economics Education, Wonkwang University, Iksan, Korea

(received November 24, 2016; revised December 16, 2016; accepted December 17, 2016)

*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) is one of the most important bacteria in the formation of dental plaque and dental caries. *S. mutans* adheres to an acquired pellicle formed on the tooth surface, and aggregates with many oral bacteria. It initiates plaque formation by synthesizing glucan from sucrose, which is catalyzed by glucosyltransferases. Propolis is a resinous mixture produced by honeybees, by mixing saliva and beeswax with secretions gathered from wood sap and flower pollen. Bees prevent pathogenic invasions by coating the propolis to the outer and inner surface of the honeycomb. Propolis has traditionally been used for the treatment of allergic rhinitis, asthma and dermatitis. We investigated the inhibitory effects of propolis ethanol extract on biofilm formation and gene expression of *S. mutans*. The biofilm formation of *S. mutans* was determined by scanning electron

microscopy (SEM) and safranin staining. We observed that the extract of propolis had an inhibitory effect on the formation of *S. mutans* biofilms at concentrations higher than 0.2 mg/ml. Real-time PCR analysis showed that the gene expression of biofilm formation, such as *gfpB*, *spaP*, *brpA*, *relA* and *vicR* of *S. mutans*, was significantly decreased in a dose dependent manner. The ethanol extract of propolis showed concentration dependent growth inhibition of *S. mutans*, and significant inhibition of acid production at concentrations of 0.025, 0.05, 0.1 and 0.2 mg/ml, compared to the control group. These results suggest that the ethanol extract of propolis inhibits gene expression related to biofilm formation in *S. mutans*.

**Key words:** propolis, dental caries, *Streptococcus mutans*, dental biofilm

\*Correspondence to: Yong-Ouk You, Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, South Korea 570-749.

Tel:82-63-850-6926, Fax:82-63-850-7157

E-mail : hope7788@wku.ac.kr

ORCID : 0000-0002-7754-3033

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

치아우식증은 10대 만성질환 중에서 유병률이 15.8%로 가장 높은 것으로 알려져 있으며, 영구치의 치아우식증 이환율은 약 80%에 이르는 것으로 알려지고 있다. 치아우식증은 치면세균막에 존재하는 세균이 당 대사를 통하여 유기산을 생성하고, 생성된 유기산에 의해 치질이 탈회되는 과정으로 이루어지는 세균성 질환이다[1-4].

치아우식증을 일으키는 대표적인 원인균은 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)로 구강 내에 상주하며 치아 표면에 부착, 증식하여 섭취하는 음식물의 영양소를 이용하여 젖산과 같은 유기산 생성 과정을 거쳐 치아우식증을 유발하는 것으로 알려져 있다[5-8]. *S. mutans*는 치면의 획득피막에 부착하여 불용성 glucan같은 세포외다당류를 생성하는데, 생성된 세포외다당류는 치아표면의 세균과 단단히 결합하여 바이오필름(biofilm)의 일종인 치면세균막을 형성한다. 이 때 생성된 glucan은 *S. mutans*의 glucan 수용체와 결합하여, *S. mutans*가 치아 표면에 부착하는 작용을 강화시킨다. 치면세균막 내의 *S. mutans*는 탄수화물의 대사과정을 통하여 다량의 유기산을 생성하여 치아 표면으로부터 인산과 칼슘같은 무기질을 탈회시켜 초기 치아우식증 병소를 만든다.

치면세균막의 형성은 세균의 부착, 증식 및 집락화과정을 거쳐서, 세포외다당류를 합성하는 단계로 이루어짐으로, 치면세균막을 억제하기 위한 연구에 세균부착과 관련된 기전에 대한 연구가 많이 수행되고 있으며, 세균부착의 초기단계에 세균의 표면과 획득피막(acquired pellicle)사이의 상호작용에 대한 연구와 부착에 관여하는 독력인자 (virulence factor)의 발현에 관한 연구가 시행되고 있다[9-11]. 또한, 세균의 세포외다당류 합성, 바이오필름 형성 및 구강세균 대사에 관여하는 독력인자 발현에 관한 연구도 시행되고 있다[12].

프로폴리스(propolis)는 식품의약품 안전처에 건강기능식품으로 등록된 물질로써, 꿀벌이 전나무, 버드나무 등 각종 나무로부터 모은 다양한 수액과 꽃에서 모은 꽃가루에 꿀벌 자신의 밀랍(beeswax) 등 분비물을 이용하여 만든 천연 항생물질이다[13-16]. 프로폴리스 합성의 본래 목적은 꿀벌이 외부로부터 침입하는 세균으로부터 벌집과 유충을 보호하기 위한 것이다[17,18]. 최근 여러 가지 연구를 통하여 프로폴리스 효능의 약리효과가 밝혀지고 있다. 프로폴리스는 항균 및 항산화 작용을 가지고 있으며[18-20], 프로폴리스에 들어있는 플라보노이드는 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 프로폴리스는 알레르기 비염, 천식 및 피부염 등의 질환 치료에도 사용되고 있고[21-24]. 최근 치아우식 예방제도로 많이 개발되고 있다.

본 연구에서는 프로폴리스 에탄올 추출물이 덴탈 바이오필름(dental biofilm)형성에 미치는 영향을 측정하고 *S. mutans*에서 발현되는 바이오필름 형성 유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰하였으며, 세균의 성장과 대사에 미치는 영향을 실험하였고, 주요성분을 GC-MS와 HPLC를 이용하여 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 프로폴리스 추출물 준비

실험에 사용한 프로폴리스는 (주)라파프로폴리스에서 추출한 것을 사용하였다. 프로폴리스 원피를 주정(에탄올 95%)에 1: 4 비율로 추출한 후 여과하여 상온에서 Rotatory evaporator(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)농축 하였다. 시료를 추출한 에탄올의 농도는 배지에 희석하였을 때 최종 1%가 되게 조정하였으며, 대조군도 1% 에탄올의 농도가 되도록 준비하였다.

### 균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 *S. mutans* ATCC 25175로 Brain heart infusion (BHI, Difco, USA) 액체배지에 1-2차 계대배양 후 같은 배지에 식균하여 37°C의 항온기에서 24시간 배양하여 사용하였다. 바이오필름 형성을 위한 배지로는 0.1% sucrose가 첨가된 BHI를 사용하였다.

### *S. mutans* 바이오필름 생성에 미치는 효과 측정

35mm dish에 BHI 액체 배지와 프로폴리스 에탄올 추출물을 첨가한 후  $5 \times 10^5$  CFU/ml가 되게 균을 접종하였다. 그 후, 37°C incubator에서 24시간 배양한 뒤 상청액을 모두 제거하였다. 각각의 dish에 증류수를 1.5 ml씩 넣어서 washing 하였다. 0.1%의 safranin으로 30초 동안 염색한 후 증류수로 두 번 세척하고 건조하여 사진 촬영을 한 다음, 30% acetic acid로 safranin stain을 용해시켜 96well plate에 100  $\mu$ l씩 분주 후 ELISA reader (Molecular Devices Co., CF., U.S.A.)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시험물질을 넣지 않은 균을 대조군으로 하였다.

### 인공치 표면의 바이오필름 형성에 미치는 영향 측정

인공치(Endura, Shofu Inc., Kyoto, Japan)에 BHI 액체 배지와 프로폴리스 추출물을 첨가하고  $5 \times 10^5$  CFU/ml 농도로 세균을 접종하였다. 37°C incubator에서 24시간 배양 후 여액을 모두 제거하였다. 각각의 인공치에 증류수 1.5 ml씩 넣어서 세척하였다. 0.1%의 safranin으로 30초 동안 염색한 후 증류수로 두 번 세척하고 건조하여 사진 촬영을 시행하였다.

### 주사전자현미경(Scanning electronic microscope)을 이용한 바이오필름 형성 관찰

35 mm dish에 BHI 액체배지와 프로폴리스 추출물을 첨가한 후  $5 \times 10^5$  CFU/ml 균이 되게 접종하였다. 37°C

incubator에서 24시간 배양 후 상청액을 모두 제거하였다. 각각의 dish에 증류수 1.5 ml씩 넣어서 washing 하였다. 그 다음 2.5% glutaraldehyde 용액 (in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, 4°C)에서 24시간 동안 고정시켰다. 에탄올 70%를 시작으로 80%, 95%, 100%로 농도를 상승 배열하여 세척, 탈수하였다. 동결 건조한 후 gold로 coating하여, Scanning Electron Microscopy (SEM)을 이용하여 관찰하고 촬영하였다.

#### 실시간 중합연쇄반응 (Real-time PCR) 분석

BHI 액체배지에 프로폴리스 추출물을 농도별로 첨가하여 *S. mutans*를 37°C 항온기에 24시간 배양한 후, 3000 rpm, 4°C, 10분 원심분리 하였다. 상청액을 버리고 PBS로 세척한 후 Trizol(Gibco-BRL, NY USA) 1ml을 넣어 반응시켰다. Chloroform 용액 200 $\mu$ l를 넣고 세포벽을 깨기 위하여 실온에 10분간 반응시켰다. 원심분리(13000 rpm, 4°C, 10분)하여 상청액을 새로운 tube에 옮겨준 후 1:1 동량으로 isopropanol를 넣어준 후 상온에 15분 반응시켰다. 다시 원심분리(12000rpm, 4°C, 15분)하여 상청액을 제거 후, 70% 에탄올을 1 ml 넣어주었다. 원심분리(10000 rpm, 4°C, 7분)하여 에탄올을 제거한 후, DEPC water를 넣어주어 RNA를 용해시킨 후, Biospce-nano(Shimadzu, Japan)으로 RNA를 정량하였다. 추출한 RNA에 Revertaid premium first stand cDNA Synthesis Kit(Life science, EU)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. M Shemesh 등[25]의 연구방법에 따라 Step one Plus Real-Time PCR system (AB Applied biosystems, USA)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 실험에 사용된 primer는 Table. 1과 같다. 반응조건은 95°C에서 15

초간 초기 denaturation 후 60°C에서 1분간 annealing과 extension과정을 거치도록 하고, 72°C에서 30초간 extension을 하였다. DNA증폭은 SYBR green 형광을 이용하여 측정하였으며 SYBR green의 측정값을 critical threshold cycle (Ct)로 정하고 *S. mutans*의 16S rRNA와 비교하여 normalization을 수행하고 각각의 유전자들의 발현정도를 비교하였다.

#### *S. mutans*의 성장과 산 생성에 미치는 효과 측정

1%의 glucose가 들어 있는 BHI 액체배지에 프로폴리스 추출물을 첨가한 후 균을 5 $\times$ 10<sup>5</sup> CFU/ml/well이 되게 접종하였다. 37°C의 항온기에서 24시간 배양한 후 BHI 액체배지를 기준으로 ELISA reader (Molecular Devices Co., CF., U.S.A.)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, pH meter (HANNA instrument, philippines)를 이용하여 pH를 측정하여 산 생성 억제 효과를 관찰하였다. 대조군은 프로폴리스 추출물을 넣지 않고 시행하였다.

#### 공초점 레이저 현미경(Confocal Laser Scanning Microscopy; CLSM) 관찰

프로폴리스 추출물의 농도에 따른 *S. mutans*의 살균 효과를 관찰하기 위하여(Bacterial Live/Dead kit) CLSM을 이용하여 관찰하였다. 프로폴리스 추출물을 농도별로 첨가한 후, *S. mutans*를 5 $\times$ 10<sup>5</sup> CFU/ml로 접종한 후 상온에서 5분 동안 방치한 후 PBS(pH 7.2)로 3회 세척하였다. 살아있는 세포를 관찰하기 위해 SYTO(green color)와 죽은 세포를 관찰하기 위해 Propidium Iodide; red color (PI)로 염색을 시행하였다. 암실에서 CLSM을 이용하여 관찰을 하였다.

**Table 1.** Nucleotide sequences of primer used for Real-time PCR in this study

Gene*	Gene description	Primer sequences (5'-3')	
		Forward	Reverse
<i>16s rRNA</i>	Normalizing internal standard	CCTACGGGAGGCAGCAGTAG	CAACAGAGCTTACGATCCGAAA
<i>gtfB</i>	Glucosyltransferase B (gtfB)	AGCAATGCAGCCAATCTACAAAT	ACGAACCTTTGCCGTTATTGTCA
<i>gtfC</i>	Glucosyltransferase C (gtfC)	GGTTTAACGTCAAATTAGCTGTAT TAGC	CTCAACCAACCGCCACTGTT
<i>gtfD</i>	Glucosyltransferase D (gtfD)	ACAGCAGACAGCAGCCAAGA	ACTGGGTTTGCTGCGTTTG
<i>brpA</i>	Biofilm-regulation protein	GGAGGAGCTGCATCAGGATTC	AACTCCAGCACATCCAGCAAG
<i>gbpB</i>	GBP	ATGGCGGTTATGGACACGTT	TTTGGCCACCTTGAACACCT
<i>relA</i>	Guanosine tetra (penta)- phosphate synthetase	ACAAAAAGGGTATCGTCCGTACAT	AATCACGCTTGGTATTGCTAATTG
<i>spaP</i>	Cell surface antigen, SpaP	GACTTTGGTAATGGTTATGCATCAA	TTTGTATCAGCCGGATCAAGTG
<i>vicR</i>	Two-component regulatory system	TGACACGATTACAGCCTTTGATG	CGTCTAGTTCTGGTAACATTAAGTC CAATA

\*Based on the NCBI *S. mutans* genome database.

**GC-MS를 이용한 프로폴리스 추출물의 성분 분석**

프로폴리스 추출물 중의 휘발성 성분분석을 위한 gas chromatograph(GC)는 HP제 6890 series를 사용하였고, gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)는 2010 plus GC-QP-2010 mass selective detector(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 분석하였다. GC 및 GC-MS 분석을 위한 칼럼은 Supelcowax 10 capillary (30 m x 0.32 mm; Bellefonte, PA, USA)을 사용하였고, 칼럼온도는 50℃에서 230℃까지 분당 3℃의 속도로 승온 하였다. 또한, injector와 detector 온도는 각각 250℃, carrier gas는 helium (1.2ml/분)을 사용하였다. 각 성분의 동정은 GC-MS 분석에 의해 얻어진 mass spectrum과 n-paraffin mixture(C<sub>6</sub> - C<sub>30</sub>)를 사용하여 구한 retention index(RI)를 NIST/NBS의 mass spectral library와 retention index(RI)와 비교하여 동정하였다.

**HPLC를 이용한 프로폴리스 추출물의 성분 분석**

프로폴리스 주요지표 성분인 phenolic acids를 분석하기 위하여, 프로폴리스 추출물 1g을 취하여 70% methanol aqueous solution (v/v) 5 ml을 첨가하여 20 min 동안 초음파 추출하였다. 각 시료는 원심분리 후 상청액을 70% methanol aqueous solution. (v/v)을 이용 적당량 희석하여 검액으로 사용하였다. 이 중 15 µl를 High Performance Liquid Chromatography; Agilent 1200 series (HPLC)에 주입하여 분석을 진행하였다. 결과는 프로폴리스의 주요 phenolic acids 표준물질인 caffeic acid, p-coumaric acid, salicylic acid와 trans-cinnamic acid를 retention time과 비교하여 3번 반복 측정하였고 표준시료의 peak 면적에 의해 산출된 값을 기준으로 평균과 표준편차로 나타내었다.

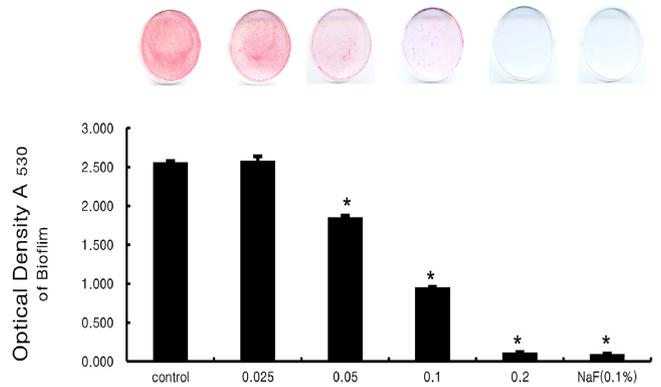
**통계처리**

실험은 모두 3회 반복하였으며, 억제비율은 [(대조군-실험군)/대조군]×100의 식을 이용하여 계산하였다. 얻은 결과는 통계프로그램인 SPSS (ver 10.0)를 사용하여 평균과 표준오차로 제시하였고, α=0.05 수준에서 실험군과 대조군의 평균치를 independent sample t-test로 유의성을 검증하였다.

**결 과**

**프로폴리스 추출물의 바이오필름 형성에 미치는 효과 측정**

프로폴리스 추출물의 *S. mutans* 바이오필름 생성 억제 효과를 본 결과 Fig. 1과 같다. 프로폴리스 추출물을 넣지 않은 대조군에서 2.562±0.021 흡광도를 나타내었다. 그러

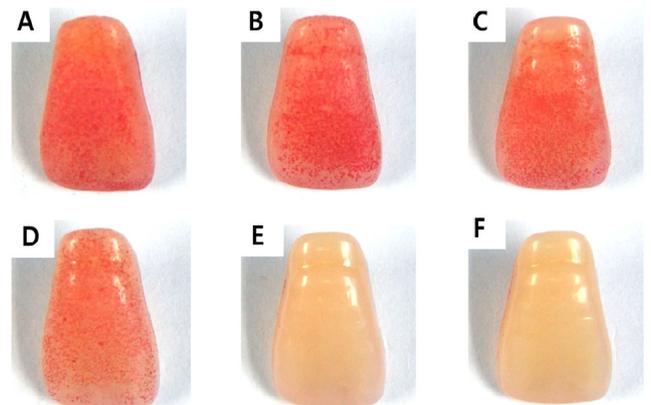


**Fig. 1.** The biofilms that formed on the dish surface were measured by staining with 0.1% safranin. the bound safranin was released from the stained cells with 30% acetic acid, and the absorbance of the solution was measured at 530 nm.

나, 0.025 mg/ml 농도에서 2.584±0.079 흡광도를 나타내었고, 0.05mg/ml 농도에서는 1.855±0.025, 0.1mg/ml 농도에서는 0.954±0.008, 0.2 mg/ml 농도에서는 0.116±0.003 흡광도를 나타내었다. 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 *S. mutans* 바이오필름 생성 억제정도가 0.8%, 27.6%, 62.8%, 95.5%를 나타내었으며, 0.05 mg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(p <0.05). 특히 0.2 mg/ml 농도에서는 0.1%의 불화나트륨(NaF)과 흡사한 효과를 관찰할 수 있었다.

**인공치 표면에 형성되는 바이오필름 관찰**

프로폴리스 추출물이 인공치 표면에 *S. mutans* 바이오필름의 생성을 억제하는지 실험한 결과(Fig. 2), 프로폴리스 추출물을 처리하지 않은 대조군은 바이오필름이 많이 형성된 것을 관찰 할 수 있으며, 프로폴리스 추출물의 농

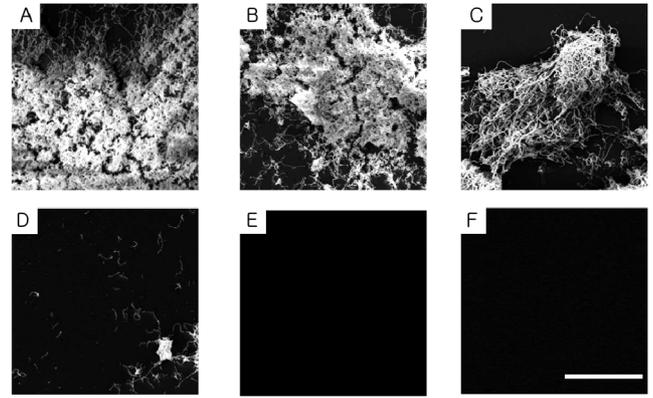


**Fig. 2.** *S. mutans* biofilms on resin tooth surface, which were incubated in propolis. (A) Control (B) 0.025 mg/ml (C) 0.05 mg/ml (D) 0.1 mg/ml (E) 0.2 mg/ml (F) Positive control (0.1% NaF)

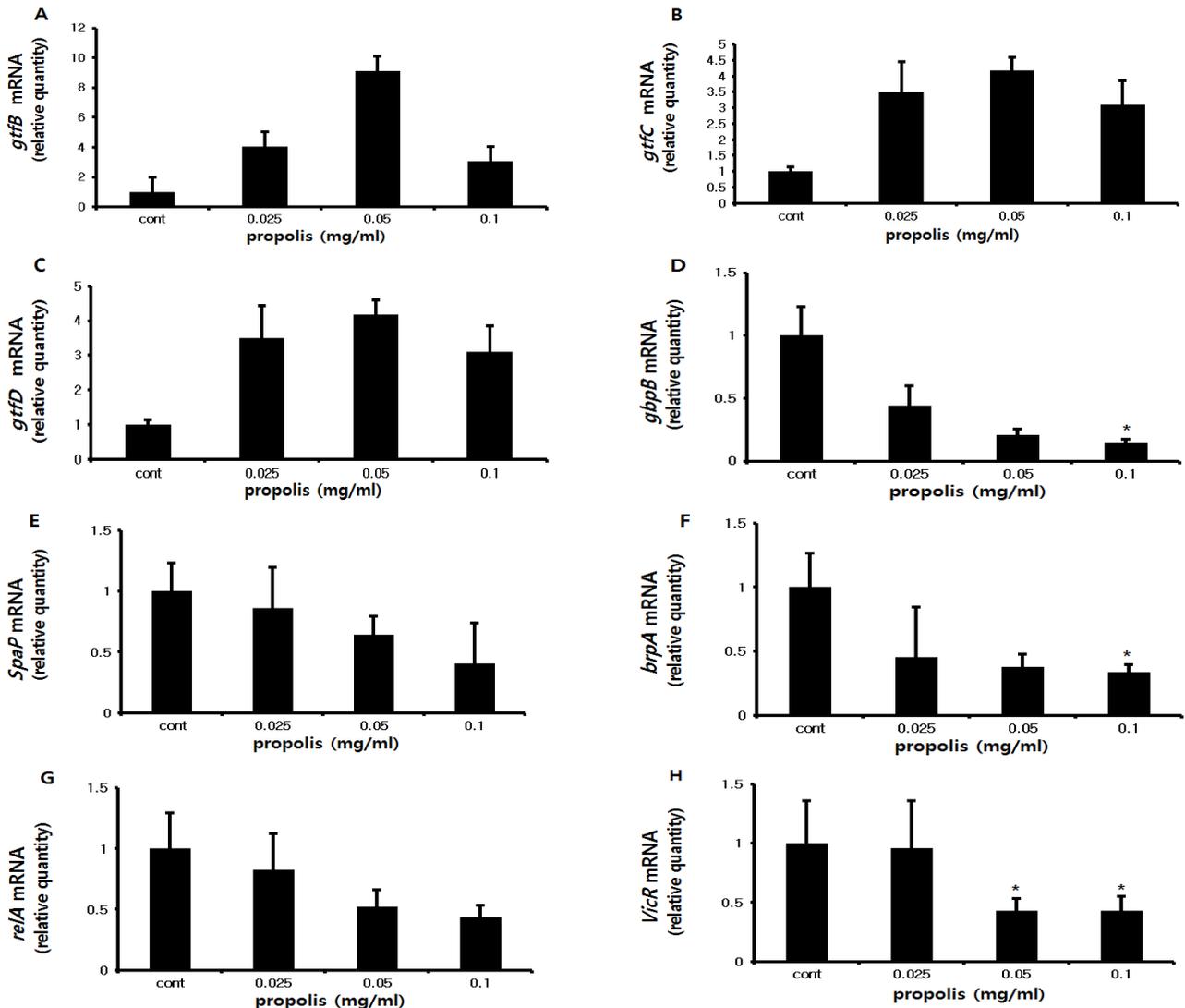
도가 높아질수록 *S. mutans* 바이오필름 형성이 억제되었다. 특히 0.2 mg/ml 농도에서는 *S. mutans* 바이오필름이 거의 형성되지 않음을 알 수 있었다.

#### 주사전자현미경(SEM)을 이용한 바이오필름 관찰

SEM을 이용하여 *S. mutans* 바이오필름 생성 억제 효과를 이용하여 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 프로폴리스 추출물을 처리하지 않는 대조군은 많이 바이오필름이 형성된 것을 관찰할 수 있으며, 프로폴리스 추출물의 농도가 높아질수록 전자현미경상으로도 확실히 *S. mutans* 바이오필름 생성이 억제됨이 관찰되었다. 특히 0.1 mg/ml 이상 농도에서는 *S. mutans* 바이오필름 생성 억제 효과가 더욱 뛰어남을 알 수 있으며, 특히 0.2 mg/ml 이상 농도에서는 *S. mutans* 바이오필름이 거의 형성되지 않음을 알 수 있다.



**Fig. 3.** Scanning electron microscopy of *S. mutans* biofilms grown in propolis. A) Control (B) 0.025 mg/ml (C) 0.05 mg/ml (D) 0.1 mg/ml (E) 0.2 mg/ml (F) Positive control (0.1% NaF), Bar= 50  $\mu$ m



**Fig. 4.** Real time-PCR analysis of genes expressions related to biofilm formation. *S. mutans* was cultured and treated with various concentration of propolis and real time-PCR analysis were performed as described in the Materials and Methods. values are expressed as the mean  $\pm$  SD. Significance was determined at \* $P < 0.05$  When compared with control.

**실시간 중합연쇄반응 (Real-time PCR) 분석**

프로폴리스 추출물을 sub-minimal inhibitory concentration (sub-MIC) 이하의 농도(0.025 - 0.2 mg/ml)로 처리한 후, *S. mutans*의 바이오필름 형성 유전자 발현을 관찰한 결과 sub-MIC 수준의 프로폴리스 추출물에 의하여 부착에 관여하는 유전자 *gfpB*는 유의성있게 감소하였고, *spaP*의 발현도 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다 (Fig. 4). *S. mutans*의 glucose uptake system인 glucose phosphotransferase system(PTS)의 조절 및 acid tolerance에도 기여하는 유전자 *relA*가 sub-MIC 수준에서 감소하는 경향을 보였고, acid tolerance에도 기여하는 유전자 *bfpA*도 sub-MIC 수준에서 감소하였다. *gfpB*, *gfpC*, *gfpD*의 발현을 조절하는 *vicR*도 발현이 sub-MIC 수준에서 감소하였다. 그러나, 프로폴리스 추출물은 GTase B, C와 D를 합성하는 유전자 *gtfB*, *gtfC*와 *gtfD*의 발현에는 감소효과가 없었다.

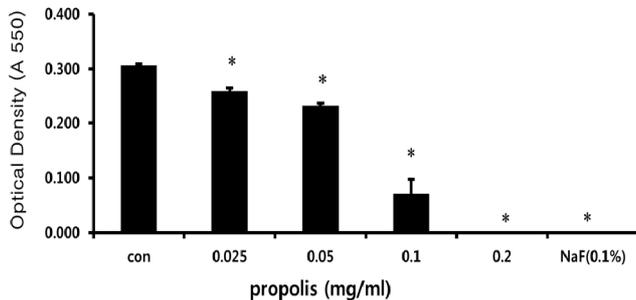
**프로폴리스 추출물의 *S. mutans* 성장에 미치는 효과**

세균성장 억제효능을 관찰하기 위하여 BHI 액체배지에 프로폴리스 추출물을 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도로 첨가한 후, *S. mutans*를 접종하여 37°C 항온기에서 24시간 배양한 후 흡광도를 측정하여 Fig. 5과 같다. 프로폴리스 추출물을 넣지 않은 대조군에서 0.307±0.004 흡광도를

나타내었다. 그런데, 0.025 mg/ml 농도에서 프로폴리스 추출물은 0.260±0.007 흡광도를 나타내고, 0.05 mg/ml 농도에서는 0.233±0.006, 0.1 mg/ml 농도에서는 0.071±0.038, 0.2 mg/ml 농도에서는 0.017±0.001 흡광도를 나타내었다. 프로폴리스 추출물을 첨가한 실험군의 O.D 값은 대조군의 O.D 값에 비해 농도 의존적으로 유의한 차이를 보이며 성장 억제 효과를 보였다. 실험군은 각각의 농도에서 대조군에 비하여 각각 15.2%, 24%, 76.9% 및 100%의 성장억제효과를 나타내었다.

**프로폴리스 추출물의 *S. mutans* 산 생성에 미치는 효과**

프로폴리스 추출물 첨가에 따른 *S. mutans*에 의한 유기산 생성 억제 효과를 알아보기 위해 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도의 시료에 *S. mutans*를 접종하여 24시간 배양 전, 후에 pH meter로 pH를 측정하여 Table 2과 같다. 세균 배양 전 pH는 7.36~7.37로 중성 pH를 유지했으나 세균 배양 후 프로폴리스 추출물을 넣지 않은 대조군에서 pH는 5.39±0.006를 나타내었다. 프로폴리스 추출물은 0.025 mg/ml 농도에서 5.38±0.006, 0.05 mg/ml 농도에서는 5.40±0.01, 0.1 mg/ml 농도에서는 6.68±0.115, 0.2 mg/ml 농도에서는 7.34±0.006을 나타내었다. 프로폴리스 추출물처리군은 대조군에 비해 농도 의존적으로 pH 하락을 억제하였으며(p<0.05), 특히 0.1 mg/ml 농도 이상에서는 임계 pH (pH 5.5 - 5.6) 이상을 나타냈다.



**Fig. 5.** The growth of *S. mutans* under various concentrations of ethanol extract of propolis. \*p < 0.05 was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean value different from the control group.

**공초점 레이저 현미경을 이용한 살균 효능 실험**

CLSM을 이용하여 관찰한 결과 (Fig. 6) 프로폴리스 추출물을 첨가한 농도가 높아질수록 살아있는 세균(SYTO stain; green color)에 비하여 죽어있는 세균(PI stain; red color)이 증가하는 것이 관찰되어 프로폴리스 추출물이 살균효과가 있다는 것이 밝혀졌으며 0.2 mg/ml 농도 이상에서는 거의 모든 세균이 살균되는 것으로 확인되었다.

**프로폴리스의 GC-MS를 이용한 성분분석**

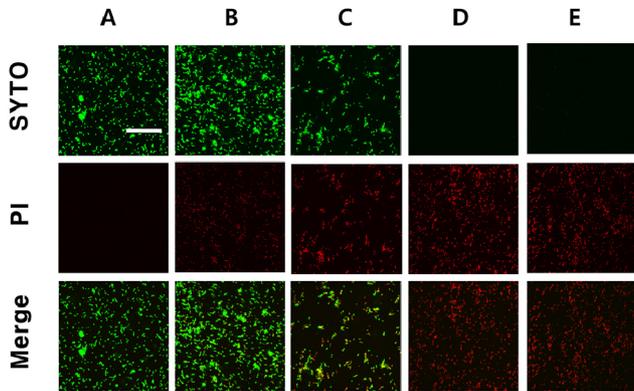
프로폴리스의 주요성분을 분석하기 위하여 GC-MS분석

**Table 2.** The pH of *S. mutans* culture after treated with the various concentrations of ethanol extract of propolis

Conc.(mg/ml)	pH(before incubation)	pH(after incubation)
Control	7.36±0.00	5.39±0.00 <sup>1)</sup>
0.025	7.36±0.00	5.38±0.00
0.05	7.37±0.00	5.40±0.01
0.1	7.37±0.00	6.68±0.11
0.2	7.36±0.00	7.34±0.00
NaF (0.1%)	7.37±0.00	7.36±0.00*

<sup>1)</sup> Value represent the Mean±SE obtained from triplicate experiment

\*p < 0.05 was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.



**Fig. 6.** Scanning confocal laser microscopy of *S. mutans* treated with propolis extract. (A) Control, (B) 0.2 mg/ml, (C) 0.4 mg/ml, (D) 0.8 mg/ml, (E) Positive control (0.1% NaF), Bar= 50  $\mu$ m

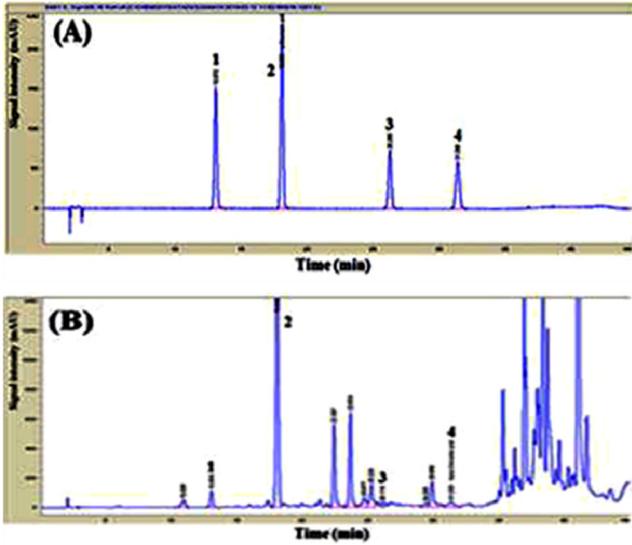
을 시행한 결과 2,3-Butanediol 및 그 이성체(52.05%), Ethyl hydrocinnamate(9.67%), 1,3-Di-tert-butylbenzene(7.95%), 5-(2,5-dimethylphenyl)-2(3H)-furanone(7.44%) 및 allyl 3-prenylcinnamate(4.11%)가 주요성분으로 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다(Table 3).

#### HPLC를 이용한 프로폴리스 추출물의 지표성분 분석

프로폴리스 추출물의 지표성분(caffeic acid, *p*-coumaric acid, salicylic acid와 *trans*-cinnamic acid)의 분석은 HPLC를 이용하였으며 standard solution 및 sample extracts에서 검출된 표준성분의 chromatogram 결과는 아래와 같다 (Fig. 7). 확립된 분석법에 의하여 각 프로폴리스의 지표성분을 확인 결과, caffeic acid (1)의 peak retention time (RT)은 13.1 min이었고, *p*-coumaric acid (2)는 18.1 min, salicylic acid

**Table 3.** Compounds identified in ethanol extract of propolis

tR(min)	Retention index	Components	Peak area(%)
6.990	1018	$\alpha$ -Pinene	0.63
8.867	1093	Sabinene	0.05
10.832	1148	1-(1-Ethoxyethoxy)propane	1.27
13.276	1210	1-(1-Ethoxyethoxy)propane	1.95
16.975	1288	Unknown	1.24
25.740	1452	1,3-Di-tert-butylbenzene	7.95
30.257	1533	2,3-Butanediol	30.91
30.808	1543	2,3-Butanediol (isomer)	8.57
32.893	1581	2,3-Butanediol (isomer)	12.57
36.329	1645	Acetophenone	0.14
37.650	1669	$\beta$ -Cedrene	0.17
48.346	1877	Ethyl hydrocinnamate	9.67
52.301	1960	Caryophyllene oxide	0.17
55.791	2034	<i>trans</i> -Nerolidol	1.00
56.780	2056	Globulol	0.15
59.082	2106	Spathulenol	0.67
64.993	2141	Ethyl palmitate	0.45
57.778	2177	2,6-Di-tert-butyl phenol	0.15
70.935	2385	2,3-Dihydrobenzofuran	0.39
73.360	2447	Ethyl stearate	0.10
74.107	2466	Ethyl oleate	0.74
75.988	2514	Ethyl linoleate	0.72
78.571	2582	Ethyl linolenate	0.42
79.663	2611	5-(2,5-Dimethylphenyl)-2(3H)-furanone	7.44
87.285	2823	Allyl 3-prenylcinnamate	4.11
89.841	2898	Palmitic acid	1.25
Total			92.88



**Fig. 7.** HPLC chromatograms of standard mixtures and EtOH extracts of propolis. (A) Standard mixtures detected at 320 nm; 1. caffeic acid, 2. *p*-coumaric acid, 3. salicylic acid, 4. *trans*-cinnamic acid. (B) EtOH extracts of propolis; 1. caffeic acid (245.57 $\mu$ g/ml), 2. *p*-coumaric acid (2477.47 $\mu$ g/ml), 3. salicylic acid (80.91 $\mu$ g/ml), 4. *trans*-cinnamic acid (80.91 $\mu$ g/ml).

(3)는 26.2 min, *trans*-cinnamic acid (4)는 31.4 min이었다. 지표성분을 이용하여 프로폴리스 주요 성분들의 함량을 측정된 결과 caffeic acid 245.57 $\mu$ g/ml, *p*-coumaric acid 2477.47  $\mu$ g/ml, salicylic acid 80.91 $\mu$ g/ml와 *trans*-cinnamic acid 87.68  $\mu$ g/ml로 확인되었다.

## 고찰

최근에는 치아우식증 예방을 위하여 여러 방법이 시도되고 있다. 천연물은 과거부터 오랜 역사동안 약물로 쓰여져 왔고, 현대에도 신약개발의 원천이 되고 있다. 프로폴리스는 약리작용에 대한 연구가 활발하게 이루어져 항산화작용, 항균작용, 항암활성등에 관한 연구가 보고되고 있으며 치아우식증 예방제로 개발도 활발하게 이루어지고 있다. 본 연구에서는 프로폴리스가 덴탈 바이오필름 형성에 미치는 영향을 측정하고, 바이오필름 형성과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였으며, 세균성장과 대사에 따른 유기산 형성에 미치는 영향을 측정하고 GC-MS와 HPLC를 이용하여 주요성분을 분석하였다.

이에 본 연구에서는 프로폴리스를 에탄올로 추출한 후 각 농도별 프로폴리스 추출물 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도별 시료에 대한 *S. mutans* 바이오필름 생성 억제 실험에서, 대조군에서 *S. mutans* 바이오필름이 많이 형성된 것을 볼수 있으나, 프로폴리스 추출물의 농도가 높아

질수록 *S. mutans* 바이오필름 생성이 억제됨을 확인할 수 있었다. 특히, 0.2 mg/ml 농도에서는 0.1%의 불화나트륨(NaF)과 흡사한 효과를 관찰할 수 있었으며, *S. mutans* 바이오필름 생성 억제 효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 또한, 각 농도별로 프로폴리스 추출물이 치아 표면의 *S. mutans* 생성의 억제 정도를 알아보기 위해, 인공치에서의 *S. mutans* 바이오필름 생성 억제 효과를 확인한 결과에서도, 대조군에 비하여 프로폴리스 추출물의 농도가 높아질수록 *S. mutans* 바이오필름 생성이 억제되었음을 볼 수 있었다. SEM을 이용하여 관찰한 결과 프로폴리스 추출물의 농도가 높아질수록 *S. mutans* 바이오필름 형성 억제 효과가 0.1mg/ml 이상의 농도에서는 바이오필름형성이 현저하게 억제되었음을 볼 수 있었다. 이러한 연구결과는 프로폴리스를 함유한 구강세정제를 어린이들에게 사용한 후 *S. mutans*의 수가 감소하였다는 연구과 유사한 연구결과를 보였다[26].

Real-time PCR 분석을 통한 *S. mutans*의 바이오필름 형성 유전자 발현을 관찰한 결과 sub-MIC 수준의 프로폴리스 추출물에 의하여 부착에 관여하는 유전자 *gfpB*는 유의성있게 감소하였고, *spaP*의 발현도 감소하는 경향을 보였다. *S. mutans*의 glucos uptake system인 glucose phosphotransferase system (PTS)의 조절 및 산 내성에도 기여하는 유전자 *relA*가 sub-MIC 수준에서 감소하는 경향을 보였고, 산 내성에도 기여하는 유전자 *brpA*도 sub-MIC 수준에서 유의성있게 감소하였다, *gfpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *fff*의 발현을 조절하는 *vicR*도 발현이 sub-MIC 수준에서 유의성있게 감소하였다. 그러나 프로폴리스 추출물은 GTfase B, C, D를 합성하는 유전자 *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*의 발현에는 감소효과가 없었다. 이러한 실험 결과는 프로폴리스 추출물의 바이오필름 억제 효능이 주로 *spaP*와 *gfpB*의 발현을 억제함으로써 나타내는 것으로 생각된다. 프로폴리스는 세포외 다당류합성에 관여하는 유전자보다는 부착에 관여하는 유전자의 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 연구결과는 프로폴리스 polyphenol-rich 추출물이 *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*의 발현을 감소시켰다는 연구결과와는 차이가 있었다[27]. 이러한 차이는 시료의 추출과정에 따른 활성성분의 함량에 차이 때문에 발생한 것이 아닐까 추정한다. 그러나, 이러한 사실을 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 시행되어야 하리라 사료된다.

프로폴리스 추출물을 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml의 농도별 시료를 사용하여 *S. mutans*에 대한 성장억제효과를 관찰한 결과 *S. mutans*의 성장률이 대조군에 비하여 에탄올 추출물 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도에서 각기 15.2%, 24%, 76.9%, 100% 의 성장억제 효과를 나타내었다. 또한, 프로폴리스 추출물을 넣지 않은 대조군에서

pH는  $5.39 \pm 0.00$ 을 나타내었지만, 프로폴리스 추출물 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도에서, 각각  $5.38 \pm 0.05$ ,  $5.40 \pm 0.01$ ,  $6.68 \pm 0.11$ ,  $7.34 \pm 0.00$ 의 값으로서, 0.1 mg/ml 농도이상에서는 치아우식증에서 무기질 탈회가 일어나는 임계 pH 이상을 나타냈다. 프로폴리스 추출물의 농도가 증가함에 따라 pH가 증가하는 것으로 보아 프로폴리스 추출물이 *S. mutans*에 의한 유기산 생성을 억제하여 치아우식증 억제 효과를 나타낼 수 있음을 의미한다.

공초점 레이저 현미경(CLSM)을 이용한 관찰에서도 첨가한 프로폴리스 추출물의 농도가 높아질수록 *S. mutans* 바이오필름 생성 억제 효과 및 살균 효과가 관찰되었으며, 살아있는 세포를 관찰하기 위해 SYTO(green color)와 죽은 세포를 관찰하기 위해 propidium iodide; red color (PI)을 확인하였고 0.2 mg/ml 이상의 농도에서는 현저하게 나타났다.

프로폴리스 추출물은 GC 및 GC-MS로 분석하였다. 그 결과 총 27종의 휘발성 성분들이 검출되었으며 2,3-butanediol 및 그 이성체 (52.05%), ethyl hydrocinnamate (9.67%), 1,3-di-tert-butylbenzene (7.95%), 5-(2,5-dimethylhenyl)-2(3H)-furanone (7.44%) 및 allyl 3-prenylcinnamate (4.11%)가 주성분으로 함유되어 있었다. HPLC 분석에 의해 프로폴리스에 함유된 phenolic acid류를 분석한 결과, caffeic acid (1)는 RT 13.1분, *p*-coumaric acid (2)는 18.1분, salicylic acid (3)는 26.2분, *trans*-cinnamic acid (4)는 31.4분에서 검출되었다. 표준품을 이용하여 프로폴리스에 함유된 주요 phenolic acid들의 함량을 측정된 결과 caffeic acid  $245.57 \mu\text{g/ml}$ , *p*-coumaric acid  $2477.47 \mu\text{g/ml}$ , salicylic acid  $80.91 \mu\text{g/ml}$  및 *trans*-cinnamic acid  $87.68 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 함유되어 있었다.

이상의 결과를 토대로 하여 볼 때, 프로폴리스 추출물은 *S. mutans* 바이오필름 형성 유전자의 발현을 억제하여 *S. mutans* 바이오필름 생성을 감소시켰으며, *S. mutans*의 성장 억제 및 유기산의 생성 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2016학년도 원광대학교의 교비지원에 의해 수행됨.

## Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## References

1. Categorical data by Frequent sickness(Total). National Health Insurance Statistical Yearbook. Table VI-3, 2015.
2. Loe H. Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J.* 2000;50:129-139. doi:10.1111/j.1875-595X.2000.tb00553.x.
3. Smith DJ. Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13:335-349. doi:10.1586/erv.09.143.
4. Hong MH. Study on detection of oral Bacteria in the saliva and risk factors of adults. *J Korean Med Sci.* 2014;15:5675-5682. doi:10.5762/KAIS.2014.15.9.5675.
5. Song HJ, kim JG, Yang YM, Baik BJ, Kim MA, Jeong HK. Distribution and transmission of *Streptococcus mutans* among children and their mothers. *J Korean Acad Pediatr Dent.* 2011;38:9-16. doi:10.5933/JKAPD.2011.38.1.009.
6. Park SN, Lee Dk, Lim YK, Kim HS, Cho E, Jin DH, Kim SG, Kook JK. Antimicrobial Effect of carvacrol against cariogenic and periodontopathic bacteria. *Kor J Microbiol.* 2012;48:52-56. doi : 10.7845/kjm.2012.48.1.052.
7. Park KM, You JS, Lee HY, Beak NI, Hwang JK, Kuwanon G: Antibacterial agents from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *J Ethnopharmacol.* 2003;8:181-185. doi : 10.1016/S0378-8741(02)00318-5
8. Choi SJ, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY. Optimum treatment parameters for photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* Biofilms. *J Korean Acad Pediatr Dent.* 2015;42:2288-3819. doi : 10.5933/JKAPD.2015.42.2.151.
9. Kim HK, Park HW, Shin IS, Lee JH, Seo HW. The antimicrobial effect of horseradish(*Armoracia rusticana*) root extracts against *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque. *J Korean Acad Pediatr Dent.* 2008; 35:225-234.
10. Park YN. The inhibitive effect of erythritol on growth and acidogenic ability of *Streptococcus mutans*. *J Digital Policy & Management.* 2013;11:515-522. doi: 10.14400/JDPM.2013.11.12.515.
11. Kim KJ, Park BI, Min JH, Chae MS, Lim JY, Son HJ, Lee GH, An SY, Jeon BH, Choi NY, You YO. Inhibitory Effects of *Radix Pulsatillae* Extract on Insoluble Glucan Synthesis and Adhesion of *Streptococcus mutans*. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2016;30:27-32. doi:http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.02.30.1.27.
12. Jeong SI, Kim BS, Keum KS, Lee KH, Kang SY, Park BI, Lee YR, You YO. Kaurenoic acid from *Aralia continentalis* Inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:160592. doi: 10.1155/2013/160592.
13. Katsura H, Tsukiyama RI, Suzuki A, Kobayashi M. *In vitro* antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms, *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 45: 3009-3013. doi:10.1128/AAC.45.11.3009-3013.2001.
14. Woo SO, Hong IP, Han SM. Comparison of total flavonoids

- and phenolic contents of propolis collected in Korea. *J. Apic.* 2015;30:293-298. doi:10.17519/apiculture.2015.11.30.4.293.
15. Choi WY, Lee JY, Jung HY, Kun J, Ok Lk, Jung SH. Oral environmental change in the natural oral cleaner containing propolis. *J Korean Soc Dent Hyg.* 2015;15:319-324. doi:10.13065/jksdh.2015.15.02.319.
  16. Han GJ, Shin DS, Kim JS, Cho YS, Jeong KS. Development of meat seasoning sauce using propolis. *Korean J. Food Cookery SCI.* 2005;21:888-894.
  17. Kim HJ, Hwangbo S, Lee SW. Studies on the antioxidant effect of Korean propolis. *Korean J Food Sci Animal Res.* 2002;22:77-80.
  18. Han GJ, Shin DS, Kim JS, Cho YS, Jeong KS. Effects of propolis addition on quality characteristics of oriental medicinal seasoning pork. *Korean J Food Sci Technology.* 2006;38:75-81.
  19. Kim SA, Chung HJ. Antimicrobial effects of propolis against oral microorganisms. *Korean J Food Sci Technology.* 2013;45:370-375. doi: 10.9721/KJFST.2013.45.3.370
  20. Kwun HS, Nam SH, Park MK, Cho MS, Cheon SH. Antimicrobial activities of propolis against oral candidiasis by *Candida Albicans*. *JKAIS.* 2014;9:5644-5651. doi:10.5762/KAIS.2014.15.9.5644
  21. Kim HS, Jung BO, Chung SJ. Antioxidant activity of chitosan with propolis. *J. Chitin Chitosan.* 2012;17:91-96.
  22. Kim SG, HongI IP, Woo SO, Jang HR, Han SM. A new analysis of p-coumaric acid and trans-cinnamic acid in propolis by UPLC. *Kor J Pharmacognosy.* 2016;47:186-191.
  23. Kim YH, Kwon HS, Kim DH, Park IH, Park SJ, Shin HK, Kim JK. Immunomodulatory effects of propolis and fermented-propolis in BALB/c mice. *Korean J Food Sci Technology.* 2008;40:574-579.
  24. Song HN, Gil B. Analysis of nutritional composition and phenolic compound in propolis collected from falseacacia and chestnut tree in Korea. *Korean J Food Sci Technology.* 2002;34:546-551.
  25. Shemesh M, Tam A, Steinberg D. Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. *J Med Microbiol.* 2007;56:1528-1535. doi: 10.1099/jmm.0.47146-0.
  26. Hegde KS, Bhat SS, Rao A, Sain S. Effect of Propolis on *Streptococcus mutans* counts: An *in vivo* Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2013;6:22-5. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1180.
  27. Veloz JJ, Saavedra N, Alvear M, Zambrano T, Barrientos L, Salazar LA. Polyphenol-Rich Extract from Propolis Reduces the Expression and Activity of *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases at Subinhibitory Concentrations. *Biomed Res Int.* 2016;2016:4302706. doi: 10.1155/2016/4302706.