

## 다엽의 5가지 페놀성분과 R-(-)-carvone의 치아우식균 Mutans Streptococci에 대한 항균력 상승효과

송옥희<sup>1#</sup>, 강옥화<sup>1</sup>, 문수현<sup>1</sup>, 김민철<sup>1</sup>, 한영선<sup>1</sup>, 최성훈<sup>1</sup>, 이영섭<sup>2</sup>, 권동렬<sup>1\*</sup>

1 : 원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소

2 : 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 인삼특작이용팀

### Antimicrobial synergism of *Camellia sinensis*-isolated five phenol compounds and R-(-)-carvone against mutans streptococci

Ok-Hee Song<sup>1#</sup>, Ok-Hua Kang<sup>1</sup>, Su-Hyun Mun<sup>1</sup>, Min-Chul Kim<sup>1</sup>, Young-Sun Han<sup>1</sup>,  
Sung-Hoon Choi<sup>1</sup>, Young-Seob Lee<sup>2</sup>, Dong-Yeul Kwon<sup>1\*</sup>

1 : Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute,  
Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749

2 : Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, 92 Bisanro,  
Eumsung, Chungbuk 369-873, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : *Camellia sinensis* (Theaceae) possesses a various beneficial effects such as free radical-scavenging, inactivation of urokinase in cancer cell proliferation, antibacterial, and hypotensive. Dental caries is one of the most common oral infectious disease in a human. Oral microorganisms play a significant role in the etiology of dental caries. An aberration to this ecology due to dietary habits, improper oral hygiene or systemic factors lead to an increase in cariogenic microorganisms. Cariogenic microorganisms like *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* encourage the accumulation and adherence of plaque biofilm by metabolizing sucrose into glucans. The purpose of this study was to investigate the antimicrobial activity of phenolic compounds of *Camellia sinensis* and R-carvone, monoterpenes, is can be found naturally in numerous essential oils, on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*.

**Methods** : The antimicrobial activity of these compounds was determined by the broth microdilution method and checkerboard dilution assay to investigate the potential synergistic effects of each five compounds of *Camellia sinensis* (*C. sinensis*) and R-carvone.

**Results** : *C. sinensis*-isolated compounds and R-carvone were determined with MIC of more than 1,000 µg/mL. However, the combination test showed significant synergism against *S. mutans* and *S. sobrinus*, implicated in the lowered MICs.

**Conclusions** : These results suggest that combinatory application of phenolic five compounds (theophyllin, l-theanine, epicatechin, epicatechin gallate, and caffeine) from *C. sinensis* and R-carvone has a potential synergistic effect and thus may be useful as a mouthrinse in helping control cariogenic microorganism.

**Key words** : *Camellia sinensis*, R-carvone, theophyllin, l-theanine, epicatechin, epicatechin gallate, caffeine

\*Corresponding author : Dong-Yeul Kwon, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749.

· Tel : +82-63-850-6802 · Fax : +82-63-852-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr

#First author : Ok-Hee Song, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749.

· Tel : +82-63-850-6802 · Fax : +82-63-852-6802 · E-mail : rkds0818@daum.net

· Received : 20 May 2016 · Revised : 2 September 2016 · Accepted : 20 September 2016

# I. 서론

다엽은 차나무과 (Theaceae) 에 속하는 다년생 식물 차(茶)나무 *Camellia sinensis* L. 의 잎이다. 생엽은 수분이 75%이고 주요 성분으로는 폴리페놀, 아미노산, 탄수화물, 비타민 등이 있다<sup>1)</sup>. 차 잎의 약리작용은 항암, 항산화, 콜레스테롤 억제, 중추신경 흥분, 관상혈관 확장, 이뇨(利尿) 및 다량의 탄닌계열 성분으로 인한 항균 및 항바이러스 효과 등이 알려져 있으며, 녹차의 떫은 맛을 내는 카테킨(catechin)은 체내에 축적된 중금속 등의 독성물질을 배출시켜주는 해독작용을 가지고 있다<sup>2-3)</sup>.

다엽의 성분 중 theophylline은 평활근을 이완시켜 기관지 천식이나 담산통(膽疝痛)에 이용하고, 이뇨시키는 작용이 있다<sup>4-5)</sup>. 아미노산의 일종인 1-theanine은 GABA를 증가시켜 마음을 안정시키고 수면의 질을 향상시켜주는 기능을 한다<sup>6)</sup>.

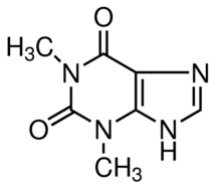


Fig. 1. Theophylline

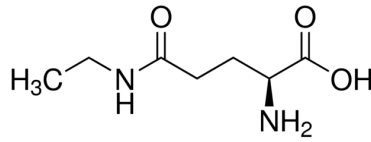


Fig. 2. L-theanine

녹차에 함유되어 떫은 맛을 내는 탄닌(tannin)은 폴리페놀(polyphenol) 성분으로 주된 구성 요소는 카테킨류이다. 건조된 녹차에 있는 성분의 30%를 차지하며 수렴(收斂), 해독, 살균 및 방부(防腐) 등의 작용이 있으며 항산화, 콜레스테롤 억제, 지방흡수억제, 혈압강하(血壓降下), 항알러지 등의 생리활성 기능이 있다<sup>7-8)</sup>. 녹차에 함유된 폴리페놀의 대표적인 4가지 카테킨(catechin)은 epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, epigallocatechin gallate가 있다.

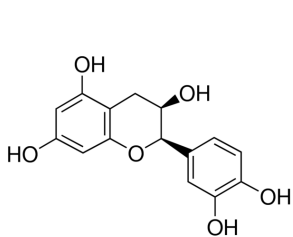


Fig. 3. Epicatechin

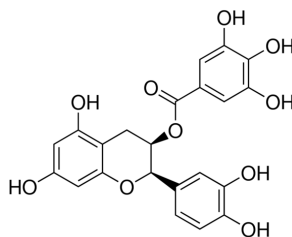


Fig. 4. Epicatechin gallate

전체 차 무게의 3% 정도만을 차지하는 caffeine은 중추신경을 흥분시키고 사고력을 높이며 피로를 없애주는 효과가 있다<sup>9)</sup>.

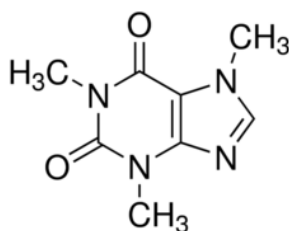


Fig. 5. Caffeine

녹차에는 가용성 불소(F)가 풍부하게 함유되어 있어 충치를 예방하고 구강 치석을 일으키는 *Streptococcus mutans*의 성장을 억제하며, 탄닌의 항균작용과 플라보놀(flavonol)성분의 구취제거 효과로 인해 치은염(齦齦炎)과 충치를 예방할 수 있다<sup>10-11)</sup>.

카르본(carvone)은 광학이성질체의 테르페노이드(terpenoid)계 정유 성분으로 두 종류의 분자 구조를 가지고 있다. 그 중 R(-)-carvone은 스피아민트 향이 나며, 다른 물질 S(+)-carvone은 캐러웨이(caraway) 향이 난다<sup>12-13)</sup>. 스피아민트(학명: *Mentha Spicata* L.) 정유의 주 활성성분인 R(-)-carvone은 감미제 및 향료로 사용되고 있으며, 강력한 향경련(鎮痙)효과와 메티실린 내성 황색포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)에 대한 항균활성이 있는 것으로 보고되어 있다<sup>14-15)</sup>.

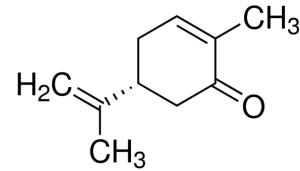


Figure 6. R(-)-carvone

치아우식증(齒牙齲蝕症, dental caries)은 석회화(石灰化) 조직의 일부가 용해되고 파괴되는 감염성 세균 질환으로써 세균, 음식물, 타액 등 여러 가지 요소들이 동시에 작용하여 일어나는 다인성 질환이다<sup>16)</sup>. Streptococci 균주는 구강 내 상재균으로 치아우식증을 유발하는 세균은 크게 mutans streptococci와 lactobacilli가 주를 이루는데, 주요원인균인 mutans streptococci에서는 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*가 있으며 lactobacilli와 일부 다른 세균들은 치아우식증의 진행에 관여하는 것으로 알려져 있다. Mutans streptococci는 치아우식증의 개시 뿐 아니라 우식의 진행에도 중요한 세균으로 인식되고 있다<sup>17-18)</sup>. 그 중에서도 가장 먼저 군집을 이루는 세균인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)는 치아표면의 획득피막(acquired pellicle)에 부착한 후 glucosyltransferase (GTase, 글루코실 전달효소) 및 fructosyltransferase (프럭토실 전달효소)와 같은 당전이 효소를 생산하여 당류로부터 불용성 glucan을 합성한다. 합성된 glucan은 치면에서 증식하는 세균간의 결합을 증가시키며, 이렇게 하여 치면에 부착한 세균들이 음식물로부터 당(sucrose)을 분해하여 유기산을 생성함으로써 치아의 무기질이 용해되어 치아우식증을 유발시킨다<sup>19-20)</sup>.

치아우식증 예방에 관한 연구로써 GTase 합성저해제, 치아우식 유발균인 *S. mutans*의 생육을 억제하는 항균제 등의 연구가 진행되고 있으며<sup>21-22)</sup>, 특히 녹차, 우롱차, 홍차, 구아바, 알로에, 대황 등의 천연물을 대상으로 한 항균물질의 효과 등이 보고되고 있다<sup>23-27)</sup>. 현재 주로 사용되고 있는 chlorhexidine은 강력한 항균력이 있는 반면 치아 착색과 구강 점막상피의 손상을 일으키며, penicillin, erythromycin, tetracycline과 같은 항생제는 치아착색, 소화기 장애 및 과민반응 등의 부작용을 나타내고 있다<sup>16,22)</sup>. 치아우식증을 예방하기 위해 항균제 및 면역억제제 사용 등의 방법이 있으나 기

회감염에 따른 내성균주와 부작용을 동반하여 이를 극복할 수 있는 방법의 일환으로 천연물질로부터 부작용이 없고 지속적 사용이 가능한 충치예방물질을 개발하려는 노력이 시도되고 있다<sup>28)</sup>.

본 연구는 치아우식증 치료제 개발을 위한 전 단계로써 다엽의 성분과 방향성 정유성분인 R-carvone의 병용이 치아우식증의 주 원인균인 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대한 항균 활성이 있음을 확인하고 이를 통해 치아우식증을 예방하는 제제로써 이용 가능성을 제시하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

Theophyllin, L-theanine, epicatechin, epicatechin gallate, caffeine 각각의 성분은 Sigma-aldrich (St. Louis, USA)로부터, R-(-)-carvone은 TCI (Tokyo Chemical Industry Co., LTD)로부터 구입하였다. Brain-Heart Infusion (BHI) (Becton, Dickinson and company)은 배지로써 사용하였다.

#### 2) 균주

본 실험에 사용한 균주 *Streptococcus mutans* [KCOM 1116, KCOM 1136]와 *Streptococcus sobrinus* [KCOM 1157, KCOM 1221]는 한국구강미생물자원은행 (Korean Collection for Oral Microbiology, KCOM)에서 구입하였다.

각각의 균주들은 -79°C deep freezer에서 보관하고, Brain-Heart Infusion agar(BHI agar)에 도말하여 37°C incubator에서 24시간 배양하였다.

### 2. 방법

#### 1) 최소억제농도

최소억제농도는 배지 미량 희석법(broth microdilution method)을 통해 측정하였다<sup>29-30)</sup>. 각 성분들을 Brain Heart Infusion (BHI)를 이용하여 약물을 순차적으로 희석하였고, 여기에 탁도 0.5 McFarland  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL을 기준으로 10  $\mu$ l 접종하여 최종적으로  $1.5 \times 10^5$  CFU/well이 되게 하였다. 다음으로 37°C incubator에서 18시간 배양한 후에 미생물이 증식되지 않는 가장 낮은 약물의 농도를 MIC로 측정하였다.

#### 2) 약물병용효과

두 약물의 병용효과를 보기위해 checkerboard dilution 법을 이용하였다. 5가지 차성분과 정유성분인 R-carvone을 농도 별로 병용하였을 때 항균효능의 변화를 통해 FICI (Fractional inhibitory concentration index)를 측정하였다<sup>31)</sup>.

FICI 산출기준은 다음과 같다.

$$\text{Fractional inhibitory concentration index (FICI)} \\ = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \text{A}/\text{MIC}_A + \text{B}/\text{MIC}_B$$

(A: 병용한 A약물의 농도, MIC<sub>A</sub>: A약물의 MIC)

$\text{FICI} \leq 0.5$ , synergy;  $0.5 < \text{FICI} \leq 0.75$ , partial synergy;  $0.75 < \text{FICI} \leq 1.0$ , additive effect;  $1.0 < \text{FICI} \leq 4.0$ , indifference;  $\text{FICI} > 4.0$ , antagonism을 따른다. 따라서 이들의 범위에 따라 두 항균물질의 시너지효과를 측정하였다.

#### 3) 통계분석

실험결과는 각 항목에 따라 평균치±표준편차 (SEM)를 구하여 그 유의성은 Student's t-test 분석법을 이용하여 신뢰수준 95% ( $p < 0.05$ )에서 통계적 유의차를 평가하였다.

## III. 결 과

### 1. 최소억제농도

#### (Minimum inhibitory concentration, MIC)

다엽의 5가지 성분의 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대한 최소억제농도(MIC)는 1,000  $\mu$ g/mL 이상이였다. R-carvone은 1,000~2,000  $\mu$ g/mL의 최소억제농도를 나타냈다.

Table 1. The antimicrobial activity of five compounds isolated from *Camellia sinensis* and R-carvone against *S. mutans* (KCOM 1116 and KCOM 1136) and *S. sobrinus* (KCOM 1157 and KCOM 1221).

Strains	MIC ( $\mu$ g/mL)					
	TP	LT	EC	ECG	CF	R-car
KCOM 1116	1,000<	1,000<	1,000<	1,000<	1,000<	1,000
KCOM 1136						
KCOM 1157	1,000<		1,000<			2,000
KCOM 1221	1,000		1,000	1,000<	1,000<	1,000

TP, theophylline; LT, L-theanine; EC, epicatechin; ECG, epicatechin gallate; CF, caffeine.

### 2. 약물병용효과

#### (Fractional inhibitory concentration, FIC)

#### 1) Theophyllin과 R-carvone의 병용효과

Theophyllin (TP)과 R-carvone (R-car)의 병용 시 최소억제농도는 각각 8~64배, 4~32배 감소하였으며, FICI 0.04~0.27의 시너지효과를 나타냈다.

#### 2) L-theanine과 R-carvone의 병용효과

L-theanine (LT)과 R-carvone (R-car)의 병용 시 최소억제농도는 각각 8~64배, 4~32배 감소하였으며, FICI 0.05~0.27의 시너지효과를 나타냈다.

#### 3) Epicatechin과 R-carvone의 병용효과

Epicatechin (EC)과 R-carvone (R-car)의 병용 시 최소억제농도는 각각 16~64배, 2~32배 감소하였으며, FICI 0.09~0.52의 시너지효과를 나타냈다.

Table 2. Results of the combination of theophylline (TP) and R-carvone (R-car) against *S. mutans* (KCOM 1116 and KCOM 1136) and *S. sobrinus* (KCOM 1157 and KCOM 1221).

Strains	agent	MIC (µg/mL)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
KCOM 1116	TP	1,000<	31.25	0.016	0.04	All synergy
	R-car	1,000	31.25	0.031		
KCOM 1136	TP	1,000<	250	0.125	0.25	
	R-car	1,000	125	0.125		
KCOM 1157	TP	1,000<	31.25	0.016	0.27	
	R-car	2,000	500	0.250		
KCOM 1221	TP	500	31.25	0.063	0.09	
	R-car	1,000	31.25	0.031		

Table 3. Results of the combination of l-theanine (LT) and R-carvone (R-car) against *S. mutans* (KCOM 1116 and KCOM 1136) and *S. sobrinus* (KCOM 1157 and KCOM 1221).

Strains	agent	MIC (µg/mL)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
KCOM 1116	LT	1,000<	250	0.125	0.19	All synergy
	R-car	1,000	62.5	0.063		
KCOM 1136	LT	1,000<	250	0.125	0.25	
	R-car	1,000	125	0.125		
KCOM 1157	LT	1,000<	31.25	0.016	0.27	
	R-car	2,000	500	0.250		
KCOM 1221	LT	1,000<	31.25	0.016	0.05	
	R-car	1,000	31.25	0.031		

Table 4. Results of the combination of epicatechin (EC) and R-carvone (R-car) against *S. mutans* (KCOM 1116 and KCOM 1136) and *S. sobrinus* (KCOM 1157 and KCOM 1221).

Strains	agent	MIC (µg/mL)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
KCOM 1116	EC	1,000<	31.25	0.016	0.52	Partial synergy
	R-car	1,000	500	0.500		
KCOM 1136	EC	1,000<	125	0.063	0.19	Synergy
	R-car	1,000	125	0.125		
KCOM 1157	EC	1,000<	62.5	0.031	0.28	Synergy
	R-car	2,000	500	0.250		
KCOM 1221	EC	500	31.25	0.063	0.09	
	R-car	1,000	31.25	0.031		

4) Epicatechin gallate와 R-carvone의 병용효과

Epicatechin gallate (ECG)와 R-carvone (R-car)의 병용 시 최소억제농도는 각각 16~128배, 2~64배 감소하였으며, FICI 0.03~0.52의 시너지 및 부분적 시너지효과를 나타냈다.

5) Caffeine과 R-carvone의 병용효과

Caffeine (CF)과 R-carvone (R-car)의 병용 시 최소억제

농도는 각각 8~64배, 4~32배 감소하였으며, FICI 0.04~0.28의 시너지효과를 나타냈다.

Table 5. Results of the combination of epicatechin gallate (ECG) and R-carvone (R-car) against *S. mutans* (KCOM 1116 and KCOM 1136) and *S. sobrinus* (KCOM 1157 and KCOM 1221).

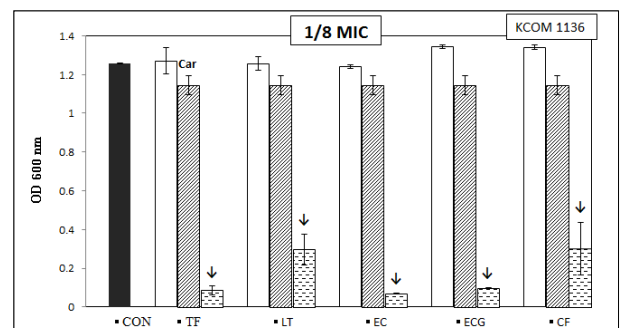
Strains	agent	MIC (µg/mL)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
KCOM 1116	ECG	1,000<	31.25	0.016	0.52	Partial synergy
	R-car	1,000	500	0.500		
KCOM 1136	ECG	1,000<	125	0.063	0.31	Synergy
	R-car	1,000	250	0.250		
KCOM 1157	ECG	1,000<	15.6	0.01>	0.03	Synergy
	R-car	2,000	31.25	0.016		
KCOM 1221	ECG	1,000<	31.25	0.016	0.05	
	R-car	1,000	31.25	0.031		

Table 6. Results of the combination of caffeine (CF) and R-carvone (R-car) against *S. mutans* (KCOM 1116 and KCOM 1136) and *S. sobrinus* (KCOM 1157 and KCOM 1221).

Strains	agent	MIC (µg/mL)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
KCOM 1116	CF	1,000<	250	0.125	0.16	All synergy
	R-car	1,000	31.25	0.031		
KCOM 1136	CF	1,000<	31.25	0.031	0.28	
	R-car	1,000	250	0.250		
KCOM 1157	CF	1,000<	31.25	0.016	0.04	
	R-car	2,000	62.5	0.031		
KCOM 1221	CF	1,000<	31.25	0.016	0.08	
	R-car	1,000	62.5	0.063		

6) *S. mutans* (KCOM 1136)에 대한 병용효과 1/8 MIC & 1/4 MIC 비교

다엽의 5가지 페놀성분과 R-carvone의 *S. mutans* (KCOM 1136)에 대한 항균 시너지효과에 기인하여 분할 저해농도인 1/8 MIC와 1/4 MIC를 병용하여 비교 분석한 결과, 각각의 단일 성분에서는 *S. mutans*에 대해 낮은 억제효과를 보였으나 병용했을 시 두 약물의 항균활성이 현저히 상승하였다.



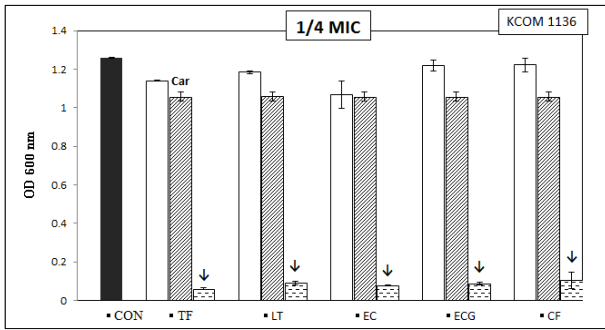


Fig. 7. Synergistic antimicrobial effect of *Camellia sinensis* isolated five compounds and R-carvone on *Streptococcus mutans* (KCOM 1136) proliferation. The bacterial cell viability was determined spectrophotometrically (optical density at 600 nm) after incubation for 24 h with 1/8 MIC and 1/4 MIC drugs. The data are average of three-independent experiments. TF, theophyllin; LT, l-theanine, EC, epicatechin; epicatechin gallate, ECG; CF, caffeine; CON, control (drug-free).

7) *S. sobrinus* (KCOM 1221)에 대한 병용효과 1/8 MIC & 1/4 MIC 비교

다엽의 5가지 페놀성분과 R-carvone의 *S. sobrinus* (KCOM 1221)에 대한 항균 시너지효과에 기인하여 분할 저해농도인 1/8 MIC와 1/4 MIC를 병용하여 비교 분석한 결과, 각각의 단일 성분에서는 *S. sobrinus*에 대해 낮은 억제효과를 보였으나 병용했을 시 두 약물의 항균활성이 현저히 상승하였다.

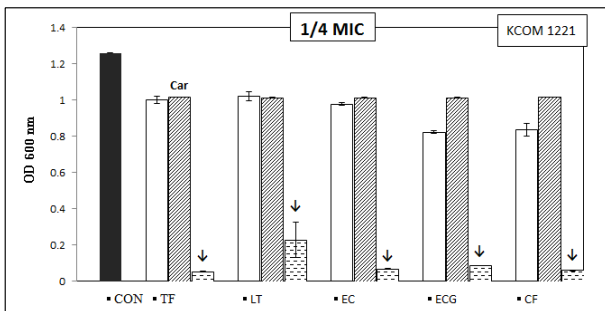
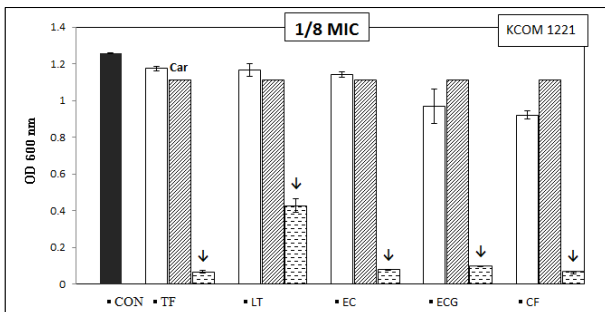


Fig. 8. Synergistic antimicrobial effect of *Camellia sinensis* isolated five compounds and R-carvone on *Streptococcus sobrinus* (KCOM 1221) proliferation. The bacterial cell viability was determined spectrophotometrically (optical density at 600 nm) after incubation for 24 h with 1/8 MIC and 1/4 MIC drugs. The data are average of double-independent experiments. TF, theophyllin; LT, l-theanine, EC, epicatechin; epicatechin gallate, ECG; CF, caffeine, CON, control (drug-free).

구강은 다양한 미생물이 서식하는데 용이한 환경을 제공하는데 있어서 상재균 및 병원성 감염균에 의한 구강질환이 많이 발생하는 인체부위이다. 치아우식증(충치)은 구강 내에 상재하고 있는 균에 의해 당질이 발효된 후 생성된 산에 의해 치아 법랑질(치아의 가장 외곽을 구성하는 조직)과 상아질(치아에서 가장 많은 부분을 차지하는 조직)이 부식된 상태이다. 이러한 구강 내 미생물의 생육을 억제하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 왔으나 원내 감염균에 의한 약제내성 문제가 대두되면서 대체약물의 필요성이 커지고 있다. 이에 본 연구에서는 천연 항균소재 중 다엽의 페놀성분과 방향성 식물에서 분리한 정유성분을 이용하여 구강균주에 대한 항균활성을 탐색하고자 4종의 표준 구강분리균주와 다엽의 5가지 성분과 방향성 정유성분인 R-carvone에 대한 항균실험을 진행하였다.

다엽의 페놀성 화합물이 생리활성에 미치는 영향은 다양하게 보고되어 있다. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 및 *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*)와 같은 그람양성균주와 *Escherichia coli* (*E. coli*) 및 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)와 같은 그람음성균주를 포함한 여러 가지 병원성 미생물에 대한 항균활성을 보였으며<sup>32)</sup>, 항산화 및 항암효과<sup>33-34)</sup> 등이 보고되었다. 선행 연구에서 *Camellia sinensis* L. 에탄올추출물은 치아우식 유발균(cariogenic microorganisms)인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)와 *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)의 활성 억제효과를 보여주었다<sup>35)</sup>.

정유 성분(essential oil)은 세균의 세포벽을 파괴하고, 효소활성을 방해하여 용균시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 사용한 R-carvone 또한 그람양성균인 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)에 대해서 항균력이 있음이 보고되었다<sup>16)</sup>. R-carvone을 S-carvone과 아미노글리코사이드(aminoglycoside)계 항생제인 gentamicin을 각각 병용하였을 때 MRSA에 대한 우수한 시너지효과를 보여주었다. R-carvone은 광학 이성질체를 나타내는 2종류의 분자구조 중 하나로서, 박하, 감국, 초피 등 다양한 식물의 정유 성분(essential oil)에 포함되어 있다. *In vitro*에서 *Mentha spicata* 정유성분의 78% 이상을 차지하는 carvone의 *S. aureus*를 포함한 여러 병원균에서 항균활성을 나타냈으며<sup>36)</sup>, N2a 신경모세포종(neuroblastoma) 세포의 증식억제를 통해 항암효과를 나타냈다<sup>37)</sup>.

본 연구에서는 다엽에 포함되어 있는 5가지 폴리페놀류와 방향성 테르페노이드계 정유성분인 R-carvone의 치아우식 유발균인 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대한 항균 상승효과(antimicrobial synergism)를 조사하였다. 그 결과, 다엽의 폴리페놀 성분인 theophylline, l-theanine, epicatechin, epicatechin gallate, caffeine과 R-carvone의 mutans streptococci (*S. mutans*, *S. sobrinus*)에 대한 최소억제농도(MIC)는 1,000  $\mu$ g/mL 이상에서 나타났으나, R-carvone의 병용 시 항균효과가 현저히 상승하였다. 이것은 병용한 두 약물의 mutans streptococci에 대한 시너지효과를 통해 단일로 사용하였을 때 보다 항균활성이 증진되었음을 짐작할 수 있다. 반면, 다엽의 폴리페놀 성분끼리의 병용 시 항균효과가 상승하지 않았던 것으로 보면 *C. sinensis* 분리성분이 R-carvone과는 상보적인 항균기전을 나타냄을 알 수 있다.

이러한 결과를 토대로 다엽의 분리성분과 R-carvone의

IV. 고 찰

병용이 치아우식증에 직접적인 영향을 미치는 mutans streptococci에 의해 생성된 유기산과 치아표면의 부착능력에 직접적인 저해효과를 나타내는지 분석하여 치아 우식에 효과적인 천연물질로써 그 기전을 명확히 입증하는 것이 앞으로의 과제라 하겠다.

## V. 결 론

본 연구에서 다엽의 폴리페놀 성분의 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대한 항균효과는 테르페노이드계 정유성분인 R-carvone과 병용함으로써 현저히 상승했다. 각 단일성분의 항균활성을 측정한 결과, 1,000 µg/mL 이상에서 저해효과를 나타냈으나, 다엽의 5가지 페놀류와 R-carvone의 병용결과 최소억제농도(MIC)가 각각 8~128배, 2~64배 감소하는 것으로 우수한 시너지효과를 나타냈다.

이로써, 다엽의 폴리페놀 성분과 R-carvone의 mutans streptococci에 대한 항균 시너지효과를 나타내는 것을 근거로 하여 향후 치아우식증을 개선 및 치료할 수 있는 치의약품을 개발하는 데 있어 다엽의 폴리페놀 성분과 R-carvone의 병합이 후보물질로써의 가능성이 있음을 시사하는 바이다.

## 감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원(No. 2008-0062484)으로 한국연구재단과 교육과학기술부의 재원으로 지원을 받아 수행된 산학협력 선도대학(LINC) 육성사업의 지원에 의해 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Kerio LC, Wachira FN, Wanyoko JK, Rotich MK. Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. *Food Chem*. 2013 ; 136 : 1405-13.
2. Hajiaghaalipour F, Kanthimathi MS, Sanusi J, Rajarajeswaran J. White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. *Food Chem*. 2015 ; 169 : 401-10.
3. Soares MB, Izaguirry AP, Vargas LM, Mendez AS, Spiazzi CC, Santos FW. Catechins are not major components responsible for the beneficial effect of *Camellia sinensis* on the ovarian  $\delta$ -ALA-D activity inhibited by cadmium. *Food Chem Toxicol*. 2013 ; 55 : 463-9.
4. Choby GW, Lee S. Pharmacotherapy for the treatment of asthma: current treatment options and future directions. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015 ; 5 : S35-40.
5. Maciążek-Jurczyk M, Sułkowska A, Bojko B, Równicka-Zubik J, Szkudlarek-Haśnik A, Zubik-Skupień I, Góra A, Dubas M, Korzonek-Szlacheta I, Wielkoszyński T, Zurawiński W, Sosada K. The influence of fatty acids on theophylline binding to human serum albumin. *Comparative fluorescence study. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2012 ; 89 : 270-5.
6. Abdou AM, Higashiguchi S, Horie K, Kim M, Hatta H, Yokogoshi H. Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors*. 2006 ; 26 : 201-8.
7. Jówko E. Green Tea Catechins and Sport Performance. In: Lamprecht M, editor. *Antioxidants in Sport Nutrition*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2015. Chapter 8.
8. Tadesse A, Hymete A, Bekhit AA, Mohammed SF. Quantification of total polyphenols, catechin, caffeine, L-theanine, determination of antioxidant activity and effect on antileishmanial drugs of ethiopian tea leaves extracts. *Pharmacognosy Res*. 2015 ; 7 : S7-S14.
9. Shmigol A, Kirischuk S, Kostyuk P, Verkhatsky A. Different properties of caffeine-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in peripheral and central mammalian neurones. *Pflugers Arch*. 1994 ; 426 : 174-6.
10. Ferrazzano GF, Roberto L, Amato I, Cantile T, Sangianantoni G, Ingenito A. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: an *in vivo* study. *J Med Food*. 2011 ; 14 : 907-11.
11. Araghizadeh A, Kohanteb J, Fani MM. Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *Med Princ Pract*. 2013 ; 22 : 368-72.
12. Snoussi M, Noumi E, Trabelsi N, Flamini G, Papetti A, De Feo V. *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. *Strains, Molecules*. 2015 ; 20 : 14402-24.
13. Pragadheesh VS, Yadav A, Chanotiya CS. Role of substituents in cyclodextrin derivatives for enantioselective gas chromatographic separation of chiral terpenoids in the essential oils of *Mentha spicata*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2015 ; 1002 : 30-41.
14. Souza FV, da Rocha MB, de Souza DP, Marçal RM. (-)-Carvone: antispasmodic effect and mode of action. *Fitoterapia*. 2013 ; 85 : 20-4.
15. Mun SH, Kang OH, Joung DK, Kim SB, Choi JG, Shin DW, Kwon DY. In vitro anti-MRSA activity of carvone with gentamicin. *Exp Ther Med*. 2014 ; 7 : 891-6.

16. Park KM, You JS, Lee HY, Baek NI, Hwang JK, Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *J Ethnopharmacol.* 2003 ; 84 : 181–5.
17. Oda Y, Hayashi F, Okada M. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in patients with intellectual disabilities. *BMC Oral Health.* 2015 ; 15 : 102.
18. Conrads G, de Soet JJ, Song L, Henne K, Sztajer H, Wagner-Döbler I, Zeng AP. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J Oral Microbiol.* 2014 ; 6 : 26189.
19. Tam A, Shemesh M, Wormser U, Sintov A, Steinberg D. Effect of different iodine formulations on the expression and activity of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase and fructosyltransferase in biofilm and planktonic environments. *J Antimicrob Chemother.* 2006 ; 57 : 865–71.
20. Browngardt CM, Wen ZT, Burne RA. RegM is required for optimal fructosyltransferase and glucosyltransferase gene expression in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 ; 240 : 75–9.
21. Katsura H, Tsukiyama RI, Suzuki A, Kobayashi M. *In vitro* antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 ; 45 : 3009–13.
22. Ren Z, Cui T, Zeng J, Chen L, Zhang W, Xu X, Cheng L, Li M, Li J, Zhou X, Li Y. Molecule Targeting Glucosyltransferase Inhibits *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015.
23. Araghizadeh A, Kohanteb J, Fani MM. Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *Med Princ Pract.* 2013 ; 22 : 368–72.
24. Subramaniam P, Eswara U, Maheshwar Reddy KR. Effect of different types of tea on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2012 ; 23 : 43–8.
25. Limsong J, Benjavongkulchai E, Kuvatanasuchati J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *J Ethnopharmacol.* 2004 ; 92 : 281–9.
26. Bertolini PF, Biondi Filho O, Pomilio A, Pinheiro SL, Carvalho MS. Antimicrobial capacity of *Aloe vera* and propolis dentifrice against *Streptococcus mutans* strains in toothbrushes: an in vitro study. *J Appl Oral Sci.* 2012 ; 20 : 32–7.
27. Kim JE, Kim HJ, Pandit S, Chang KW, Jeon JG. Inhibitory effect of a bioactivity-guided fraction from *Rheum undulatum* on the acid production of *Streptococcus mutans* biofilms at sub-MIC levels. *Fitoterapia.* 2011 ; 82 : 352–6.
28. Crevelin EJ, Caixeta SC, Dias HJ, Groppo M, Cunha WR, Martins CH, Crotti AE. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* against Cariogenic Bacteria. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015 ; 2015 : 102317.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard 7th ed, 2006; Document M7–A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA.
30. Mun SH, Joung DK, Kim YS, Kang OH, Kim SB, Seo YS, Kim YC, Lee DS, Shin DW, Kweon KT, Kwon DY. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine.* 2013 ; 20 : 714–8.
31. Mun SH, Kang OH, Joung DK, Kim SB, Seo YS, Choi JG, Lee YS, Cha SW, Ahn YS, Han SH, Kwon DY. Combination Therapy of Sophoraflavanone B against MRSA: In Vitro Synergy Testing. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013 ; 2013 : 823794.
32. Shin JS and Chung HS. Antibacterial Activities of Phenolic Components from *Camellia sinensis* L. on Pathogenic Microorganisms. *Journal of Food Science and Nutrition.* 2007 ; 135–40.
33. Tadesse A, Hymete A, Bekhit AA, Mohammed SF. Quantification of total polyphenols, catechin, caffeine, L-theanine, determination of antioxidant activity and effect on antileishmanial drugs of ethiopian tea leaves extracts. *Pharmacognosy Res.* 2015 ; 7 : S7–S14.
34. Conde VR, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Tea (*Camellia Sinensis* (L.)): a Putative Anticancer Agent in Bladder Carcinoma? *Anticancer Agents Med Chem.* 2014
35. Anita P, Sivasamy S, Madan Kumar PD, Balan IN, Ethiraj S. In vitro antibacterial activity of *Camellia sinensis* extract against cariogenic microorganisms. *J Basic Clin Pharm.* 2014 ; 6 : 35–9.
36. Shahbazi Y. Chemical Composition and In Vitro Antibacterial Activity of *Mentha spicata* Essential Oil against Common Food-Borne Pathogenic Bacteria. *J Pathog.* 2015 ; 2015 : 916305.
37. Aydın E, Türkez H, Keleş MS. Potential anticancer activity of carvone in N2a neuroblastoma cell line. *Toxicol Ind Health.* 2015 ; 31 : 764–72.