

녹차추출물 배합세치제의 구강세균에 대한 항균력 평가

유은지¹, 조자원², 유현준², 예제승²¹단국대학교 보건복지대학원 구강보건학과, ²단국대학교 치과대학 예방치과

Antimicrobial effects of green tea extract-containing dentifrice

Eun-Ji You¹, Ja-Won Cho², Hyun-Jun Yoo², Jae-Seung Yea²¹Department of Oral Health, College of Health Science, Dankook University,²Department of Preventive Dentistry, College of Dentistry, Dankook University, Cheonan, Korea

Received: December 13, 2022

Revised: December 16, 2022

Accepted: December 19, 2022

Corresponding Author: Jae-Seung Yea

Department of Preventive Dentistry,
College of Dentistry, Dankook University,
119 Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan
31116, Korea

Tel: +82-41-550-0311

Fax: +82-41-553-6582

E-mail: dkuprev@gmail.com

https://orcid.org/0000-0002-5728-365X

Objectives: This study aimed to evaluate the antibacterial activity of green tea extract containing dentifrice on oral disease-causing bacteria.**Methods:** The antibacterial activity of green tea extract containing dentifrice was examined on the gram-positive bacteria *Actinomyces israelii*, *Enterococcus faecalis*, *Filifactor alocis*, *Streptococcus mutans*, and gram-negative bacteria *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*. *A. israelii*, *E. faecalis*, *F. alocis*, *S. mutans*, *F. nucleatum*, and *P. gingivalis* were cultured with green tea extract containing dentifrice or control dentifrice; they were then incubated at 37°C under anaerobic conditions and cultured. Following incubation, a microplate reader was used to measure the absorbance and observe the number of bacteria. Statistical significance tests were conducted using the Mann-Whitney test and SPSS 24.0.**Results:** Green tea containing dentifrice has antibacterial activity against *A. israelii*, *E. faecalis*, *F. alocis*, *S. mutans*, *F. nucleatum*, and *P. gingivalis*. Furthermore, green tea containing dentifrice killed more than 99.99% of 4 strains of gram-positive bacteria and 2 strains of gram-negative bacteria.**Conclusions:** The detergent with green tea extract is significantly reduced the bacteria applied in this experiment; dentifrice has a bactericidal and antibacterial effect against oral bacteria. Therefore, the detergent with green tea extract is thought to be helpful in preventing dental caries and periodontal disease.**Key Words:** Antimicrobial activity, Dentifrice, Green tea extract, Oral bacteria

서 론

구강 내에서 발생하는 양대 구강질환은 치아우식증과 치주질환이다. 치아우식증은 *Streptococcus mutans*에 의해 발생하는 질환이다^{1,2)}. 치주질환은 치태 내 치주원인균에 의한 치조골 파괴에 영향을 미쳐 치아상실 등을 발생시키며³⁾, 치주질환을 유발하는 주요 원인균으로는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* 등이 있다^{4,5)}.

치아우식증과 치주질환의 예방을 위한 기본적인 방법은 치면세균

막 관리법으로, 치면세균막 관리법 중 가장 기본적인 방법은 세치제를 이용한 칫솔질이다. 세치제는 치면세균막을 보다 효율적으로 세정하기 위한 보조적인 용품으로, 주요 성분은 세마제(abrasive agent), 세제(detergent), 습제(humectant)와 결합제(binding agent)가 있으며, 기타 향미제, 감미제, 방부제, 착색제 및 구강질환 예방제 등이 포함되어 있다⁶⁾. 세치제에 첨가되는 성분 중 구강질환 유발 세균에 대한 항균 성분으로는 이온성 물질, 비이온성 물질, 효소, 과산화물 및 당대체물, 계면활성제, 천연물질 등이 있다⁷⁾. 이 중에는 항균력을 가지고 있지만, 장기간 사용 시 구강 내 생태파괴, 치아착색, 다른 성분과의 반응으로 효과감소 등의 위해작용을 하는 성분이 있으며⁸⁾, 이로 인하여 천연물질

의 구강 유발 세균에 대한 항균 효과 연구가 활발히 진행되고 있다⁹⁻¹²⁾.

녹차의 카테킨류(catechin compounds)는 생리활성 물질로 알려진 다량의 폴리페놀류 성분이 포함되어 있으며, epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), epicatechin (EC), gallic acid (GA), catechin gallate (CG), gallic acid gallate (GCG), catechin (C) 등이 있다¹³⁾. 특히, EGCG 성분은 강한 흡수력 및 산화력을 가지고 있어, 미생물 성장억제, 항산화 작용, 암세포 성장억제 등의 효과가 있다고 하였다¹⁴⁾. 또한, 녹차의 카테킨과 같은 폴리페놀 화합물이 glucosyltransferase에 대한 강력한 저해활성을 갖는다고 하였고¹⁵⁾, Kim 등의 연구에서는 녹차잎 추출물의 농도가 높아질수록 *S. mutans*에 대한 항균력이 높아진다고 하였다¹⁶⁾.

본 연구는 녹차추출물 배합된 세치제의 구강질환 세균에 대한 살균력 및 항균력을 평가하여 녹차추출물 배합 세치제의 구강질환 유발 세균에 대한 억제 효능을 연구하였다.

연구재료 및 방법

1. 세균 배양

본 연구에서는 그람양성세균 4종과 그람음성세균 2종을 이용하였으며, ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 그람양성세균으로는 *Actinomyces israelii* ATCC 12102, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 및 *Filifactor alocis* ATCC 35896, *Streptococcus mutans* ATCC 25175를 사용하였으며, 그람음성세균으로는 *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 및 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277을 사용하였다. *A. israelii*, *E. faecalis* 및 *S. mutans*는 brain heart infusion (BHI; BD bioscience, San Jose, CA, USA) 액체배지를 이용하여 37°C 혐기 상태(H₂ 5%, CO₂ 10%, N₂ 85%)에서 배양하였고, *F. nucleatum* 및 *P. gingivalis*는 헤민(hemin: 1 µg/ml)과 비타민 K (0.2 µg/ml)를 첨가한 BHI를 이용하여 37°C 혐기 상태에서 배양하였다. *F. alocis*는 yeast extract, cysteine 및 arginine를 첨가한 columbia (BD bioscience) 액체배지를 이용하여 37°C 혐기 상태에서 배양하였다.

Table 1. Experimental dentifrice main ingredient combination

Division	Ingredient	Control dentifrice	Experimental dentifrice
Efficacy ingredient	Sodium chloride	-	20%
	Potassium nitrate	-	3%
	Calcium carbonate	-	20%
	Green tea extract	-	0.04%
	Sodium monofluorophosphate	-	0.76%
Formulation ingredients	Humectant, foaming agent, fragrance, etc. Other ingredients	Appropriate amount	Appropriate amount

2. 연구 세치제 준비 및 항균력 시험

본 연구에서 사용한 세치제의 성분 조합은 Table 1과 같으며, 항균력 시험은 Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)의 방법에 따라 평가되었다¹⁷⁾. 준비된 세치제를 50 ml 원추 튜브에 10 g씩 분배하여 넣고, 증류수를 이용하여 40 ml까지 채운 후, vortex 믹서를 이용하여 1분간 혼합하였다. 이후 10,000 × g에서 10분간 원심분리하였고, 상층액을 깨끗한 튜브로 옮겨 구강세균에 대한 항균력 시험에 사용하였다.

3. 살균력 시험

준비된 세치제에 세균을 넣고 1분간 반응시킨 후, 40 ml의 세균 배지를 넣고 *F. alocis*는 헤민, 비타민 K, cysteine 및 arginine이 포함된 혈액배지에 접종하였다. *F. nucleatum* 및 *P. gingivalis*는 헤민과 비타민 K가 포함된 혈액배지에 접종하였다. 또한 *A. israelii* 및 *E. faecalis*는 brain heart infusion 고체배지에 접종하였고, *S. mutans*는 mitis salivarius (BD bioscience) 고체배지에 접종하였다. 접종된 배지는 혐기상태에서 2일 또는 4일 동안 배양하여 세균 집락수를 측정하였다.

4. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검사는 IBM SPSS Statistics 24.0 (IBM Inc., Armonk, New York, USA)을 사용하여 군간 비교는 2-sample t-test 및 Mann-Whitney test로 분석하였으며, 군내 비교는 paired t-test, Wilcoxon's signed rank test로 분석하였다. 유의수준은 0.05로 하였다.

연구 성적

1. *A. israelii*에 대한 항균력 평가

*A. israelii*에 대한 녹차추출물 배합 세치제의 항균력을 알아보기

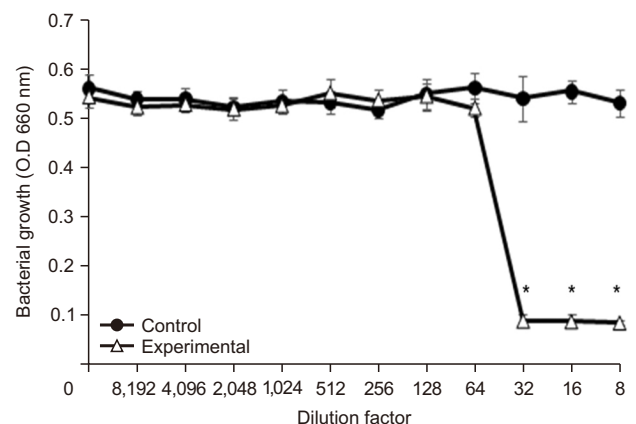


Fig. 1. Antibacterial activity test of the experimental dentifrice against *A. israelii*. *A. israelii* was cultivated with control or experimental in the various concentration. The growth of *A. israelii* was measured by spectrophotometer at 660 nm of wavelength. *Statistically significant compared to control group ($P < 0.05$).

위해, 항균력 검사를 시행한 결과 32배 희석한 농도에서 항균활성을 보였다($P<0.05$) (Fig. 1).

2. *E. faecalis*에 대한 항균력 평가

*E. faecalis*에 대한 녹차추출물 배합 세치제의 항균력을 알아보기 위해, 항균력 검사를 시행한 결과 8배 희석한 농도에서 항균활성을 보였다($P<0.05$) (Fig. 2).

3. *F. alocis*에 대한 항균력 평가

*F. alocis*에 대한 녹차추출물 배합 세치제의 항균력을 알아보기 위해, 항균력 검사를 시행한 결과 64배 희석한 농도에서 항균활성을 보였다($P<0.05$) (Fig. 3).

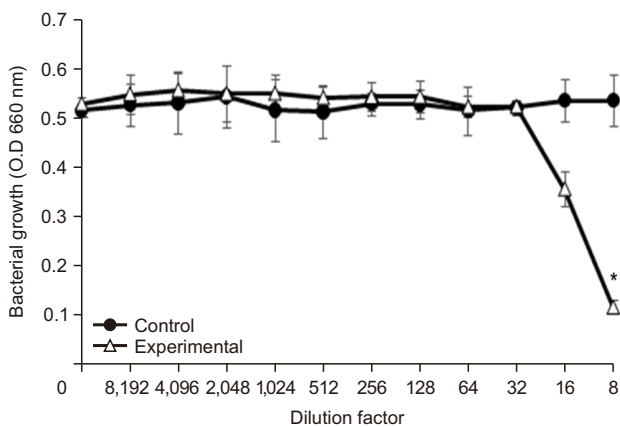


Fig. 2. Antibacterial activity test of the experimental dentifrice against *E. faecalis*. *E. faecalis* was cultivated with control or experimental in the various concentration. The growth of *E. faecalis* was measured by spectrophotometer at 660 nm of wavelength. *Statistically significant compared to control group ($P<0.05$).

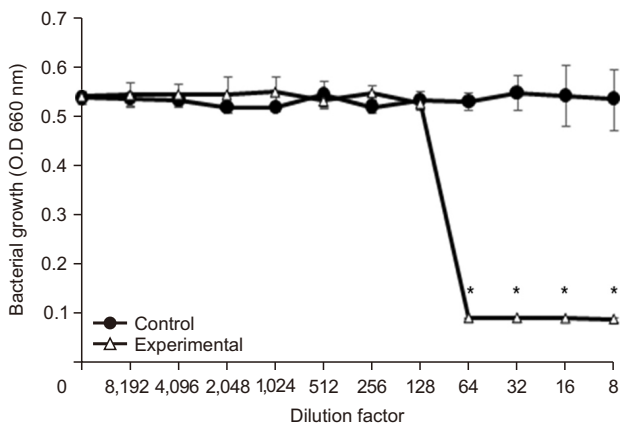


Fig. 3. Antibacterial activity test of the experimental dentifrice against *F. alocis*. *F. alocis* was cultivated with control or experimental in the various concentration. The growth of *F. alocis* was measured by spectrophotometer at 660 nm of wavelength. *Statistically significant compared to control group ($P<0.05$).

4. *F. nucleatum*에 대한 항균력 평가

*F. nucleatum*에 대한 녹차추출물 배합 세치제의 항균력을 알아보기 위해, 항균력 검사를 시행한 결과 64배 희석한 농도에서 항균활성을 보였다($P<0.05$) (Fig. 4).

5. *P. gingivalis*에 대한 항균력 평가

*P. gingivalis*에 대한 녹차추출물 배합 세치제의 항균력을 알아보기 위해, 항균력 검사를 시행한 결과 32배 희석한 농도에서 항균활성을 보였다($P<0.05$) (Fig. 5).

6. *S. mutans*에 대한 항균력 평가

*S. mutans*에 대한 녹차추출물 배합 세치제의 항균력을 알아보기 위해, 항균력 검사를 시행한 결과 64배 희석한 농도에서 항균활성을

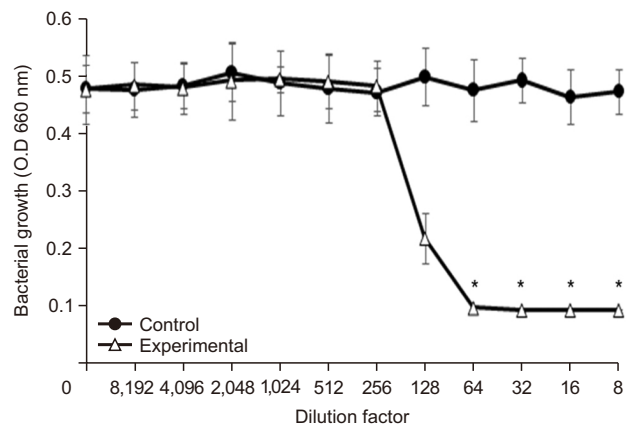


Fig. 4. Antibacterial activity test of the experimental dentifrice against *F. nucleatum*. *F. nucleatum* was cultivated with control or experimental in the various concentration. The growth of *F. nucleatum* was measured by spectrophotometer at 660 nm of wavelength. *Statistically significant compared to control group ($P<0.05$).

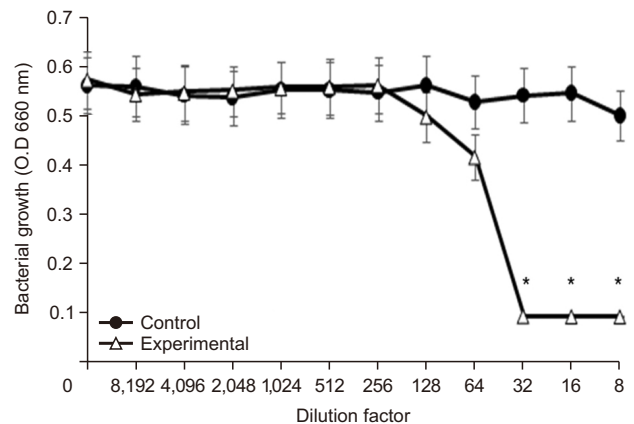


Fig. 5. Antibacterial activity test of the experimental dentifrice against *P. gingivalis*. *P. gingivalis* was cultivated with control or experimental in the various concentration. The growth of *P. gingivalis* was measured by spectrophotometer at 660 nm of wavelength. *Statistically significant compared to control group ($P<0.05$).

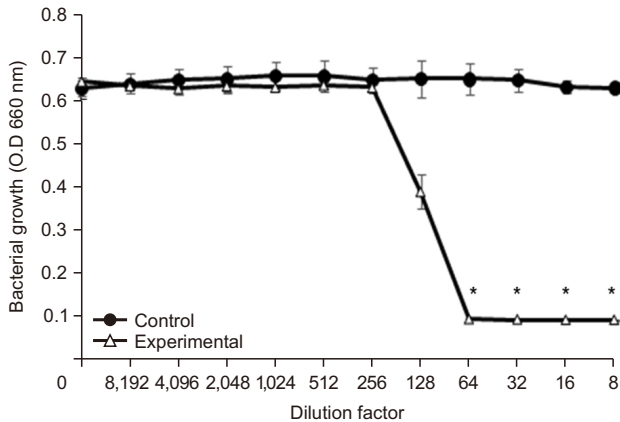


Fig. 6. Antibacterial activity test of the experimental dentifrice against *S. mutans*. *S. mutans* was cultivated with control or experimental in the various concentration. The growth of *S. mutans* was measured by spectrophotometer at 660 nm of wavelength. *Statistically significant compared to control group ($P < 0.05$).

보였다($P < 0.05$) (Fig. 6).

7. 살균력 시험결과

세치제 원액에 1분 동안 반응시켰을 때, 그람양성세균 4종 및 그람 음성세균 2종 모두 99.99% 이상 사멸된 것으로 확인되었다(Table 2).

고 안

세치제는 칫솔질을 할 때 보조적으로 사용하는 세제로 흔히 치약으로 불린다¹⁸⁾. 최근에는 세치제의 효능을 세정의 기본 역할 개념에서 한 단계 발전한 예방적 효능과 치료제 효과를 위한 성분들이 개발되고 있으며, 치면세균막에 의해 발생하는 구강 질환을 감소시키기 위한 연구가 더욱 활발해지고 있다. 이러한 추세에 따라 치아우식증과 치주질환을 유발시키는 세균에 대한 항균성분에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다¹⁹⁾.

녹차의 카테킨 성분에 의한 녹차잎의 항균, 항염증 효능은 다양한 연구를 통해 보고되었다. Maruyama 등은 녹차의 카테킨 함유한 세치제를 8주간 사용한 결과, 대조 세치제보다 치주원인균의 성장을 크게 감소시켰다고 하였고²⁰⁾, Lee 등이 연구한 녹차 및 결명자 추출물의 치주원인균 *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *P. gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*에 대하여 녹차추출물이 세균의 성장이 억제함을 관찰되었다²¹⁾. Min 등은 녹차추출물의 잇몸 염증반응 억제 효능평가 연구에서 *P. intermedia*에 의한 염증반응을 억제할 수 있다고 하였다²²⁾.

본 연구는 녹차추출물이 배합된 세치제가 구강 내 세균인 그람양성세균 4종 *A. israelii*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *F. alocis* 및 그람음성세균 2종 *F. nucleatum*, *P. gingivalis*에 대하여 녹차추출물 배합 세치제의 세균 억제 효능에 대하여 연구하고자 하였다. 녹차추출물 배합 세치제는 희석 농도에서도 구강질환 유발 세균에 대하여 항균력 및 살균력을 보였다. 이에 대하여 연구결과를 종합하여 보면, 녹차의 카테

Table 2. Result of sterilization test

(unit: CFU/ml)

Bacteria	Base	After 1 minute
<i>A. israelii</i>	1.77×10^6	<10 (99.99% over)
<i>E. faecalis</i>	1.97×10^6	<10 (99.99% over)
<i>F. alocis</i>	0.97×10^6	<10 (99.99% over)
<i>F. nucleatum</i>	2.03×10^6	<10 (99.99% over)
<i>P. gingivalis</i>	1.43×10^6	<10 (99.99% over)
<i>S. mutans</i>	1.47×10^6	<10 (99.99% over)

킨은 치아우식증과 치주질환 원인균에 대한 항균효과가 있음으로 판단되며, 구강치료보조제로도 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

본 연구는 모든 치주원인균을 대상으로 한 연구가 아니므로 일반화하기 어려운 점이 있으나, 치주질환 원인균으로 알려진 세균에 대한 항균실험 및 살균실험에서 효과가 나타났다는 것에 의의가 있다. 본 연구결과를 토대로 향후 구강질환 유발 세균에 효과적인 천연물질을 이용한 추가연구를 통해 치아우식증과 치주질환을 예방하는 세치제 개발을 위한 연구에 좋은 기초자료가 될 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 녹차추출물을 배합한 세치제의 구강질환 유발 세균에 대한 항균력 및 살균력에 대하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 도출하였다.

- 1) 녹차추출물 배합 세치제를 32배 농도로 희석한 농도에서 *A. israelii*에 대하여 항균력을 보였다($P < 0.05$).
- 2) 녹차추출물 배합 세치제를 8배 농도로 희석한 농도에서 *E. faecalis*에 대하여 항균력을 보였다($P < 0.05$).
- 3) 녹차추출물 배합 세치제를 64배 농도로 희석한 농도에서 *F. alocis*에 대하여 항균력을 보였다($P < 0.05$).
- 4) 녹차추출물 배합 세치제를 64배 농도로 희석한 농도에서 *F. nucleatum*에 대하여 항균력을 보였다($P < 0.05$).
- 5) 녹차추출물 배합 세치제를 32배 농도로 희석한 농도에서 *P. gingivalis*에 대하여 항균력을 보였다($P < 0.05$).
- 6) 녹차추출물 배합 세치제를 64배 농도로 희석한 농도에서 *S. mutans*에 대하여 항균력을 보였다($P < 0.05$).
- 7) 구강 세균에 대한 살균력을 실험한 결과, 1분 후 그람양성세균 4종과 그람음성세균 2종이 99.99% 이상 사멸하였다.

이를 토대로 녹차추출물을 배합한 세치제는 구강질환 유발 세균에 대하여 항균력 및 살균력을 가진 것으로 판단되며, 녹차추출물은 치아우식증 및 치주질환 예방을 위한 성분물질로 잠재적인 도움이 될 것으로 사료된다.

ORCID

Eun-Ji You, <https://orcid.org/0000-0003-4896-3159>

Ja-Won Cho, <https://orcid.org/0000-0003-1458-0416>

Hyun-Jun Yoo, <https://orcid.org/0000-0002-0100-8309>

References

1. Hamada S, Koga T, Ooshima T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. J Dent Res 1984;63:407-411.
2. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986;50:353-380.
3. Kim TI, Choi EJ, Chung CP, Han SB, Ku Y. Antimicrobial effect of *Zea Mays* L. and *Magnoliae* cortex extract mixtures on periodontal pathogen and effect on human gingival fibroblast cellular activity. J Korean Acad Periodontol 2002;32:249-255.
4. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res 1970;49:203-222.
5. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000 1997;14:12-32.
6. Park IS, Lee SH. A study on the amount of toothpaste used among some college students. J of Korean soc of Dent Hyg 2010;10:577-584.
7. Gjermo P, Rolla G. The plaque inhibition effect of chlorhexidine containing dentifrice. Scan J Dent Res 1971;79:126-132.
8. Ciancio SG. Agents for the management of plaque and gingivitis. J Dent Res 1992;71:1450-1454.
9. Kim BI, Kim SN, Chang SY, et al. A highly selective antibacterial effect of *Curcuma xanthorrhiza* extract against oral pathogens and clinical effectiveness of a dentifrice containing *Curcuma xanthorrhiza* extract for controlling bad breath. J Korean Acad Dent Health 2005;29:222-237.
10. Kim TI, Yeom HR, Ryu IC, Bae KH, Chung CP. Clinical and microbiological study on the effect of *Magnoliae* cortex and *Ginkgo biloba* extracts containing dentifrice in gingivitis. J Periodontal Implant Sci 1996;26:542-556.
11. Cho MJ, Hong SJ, Choi CH, Jeong SS. Effects of dentifrice containing extract of *Galla Rhois* or *Psoralea corylifolia* on inhibition of plaque formation. J Korean Acad Dent Health 2005;29:141-152.
12. Seo HW, Park HW, Kim JS, Lee SY, Shin IS. A control of plaque, gingivitis and anti-caries effect of dentifrice containing horseradish extracts. J Korean Acad Pediatr Dent 2012;39:26-33.
13. Chung HY, Yokozawa T. Studies on antiaging and antimutagenic mechanism of epigallocatechin 3-O-gallate isolated from green tea. Food Sci Ind 1995;28:46-58.
14. Sung KC. A study on the pharmaceutical characteristics and analysis of green-tea extract. J of the Korean Applied Sci and Tech 2006;23:115-124.
15. Adria FA, Zidan OA. Natural products for dental caries prevention. J Med Food 2004;7:381-384.
16. Kim SS, Won JH, Lee GE, Lee RR, Lee SM, Lee JH, Kang KH. Antibacterial effect of green tea, mulberry, and mate leaves extracts on *S. mutans*. J of Digital Convergence 2017;15:347-353.
17. Jorgensen JH. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria that grow aerobically. Infect Dis Clin North Am. 1993;7:393-409.
18. Choi MJ, Park JY, Lim MY, et al. Factors affecting usage of toothpaste in infants and preschoolers. J Korean Soc Dent Hyg 2017;17:49-62.
19. Hattori M, Kubumoto IT, Namba T. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. Chem Pharm Bull Tokyo 1990;38:717-720.
20. Maruyama T, Tomofuji T, Endo Y, et al. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. Arch Oral Biol 2011;56:48-53.
21. Lee ES, An TY, Yun JJ, Gug JG, Lee BL, Kim DG. Restraint effect on leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Cassia tora* against periodontopathogens. J Korean Acad Dent Health 2003;27:569-79.
22. Min DJ, Yi SW, Lee SH, et al. The Anti-inflammatory effect of green tea extract against *Prevotella intermedia*. J Soc Cosmet Scientists Korea 2011;37:67-73.