

Anticariogenic Effects of Different Types of Tea

Ilyong Jeong, Juyoung Lee, Miah Kim, Daewoo Lee, Yeonmi Yang, Jaegon Kim

Department of Pediatric Dentistry and Institute of Oral Bioscience, School of Dentistry, Chonbuk National University

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of green tea, black tea, barley tea and roasted corn tea used in South Korea to make tea on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. The aqueous samples of 4 types of tea were extracted from commercial tea bags using cold water (7°C) or hot water (72°C). *S. mutans* UA 159 was introduced into 96-well plates which contained the tea samples and 1% sucrose media. Crystal violet staining was used to assess the effects of teas on *S. mutans* biofilm formation. In both groups of green tea and black tea, the biofilm significantly decreased with the solution of 50 µL aqueous sample in 200 µL media and 100 µL aqueous sample in 100 µL media ($p < 0.05$). *S. mutans* biofilm with 25 µL of barley tea or roasted corn tea aqueous sample in hot water (72°C) for 10 minutes showed significant decrease compared of green tea or black tea ($p < 0.05$). In this study, green tea and black tea suppress the formation of *S. mutans* biofilm.

Key words : Anticariogenic effects, *Streptococcus mutans*, Green tea, Black tea, Barley tea, Roasted corn tea

I. 서 론

치아우식증은 대표적인 만성질환 중 하나로 치면에 부착하는 치면세균막에 의해 발생한다. 치면세균막 내 세균은 영양소 중 탄소화물을 대사하여 산성 조건을 형성하고 이로 인해 *Streptococcus mutans*가 증식하여 치면세균막의 산성화를 심화시켜 치아의 탈회를 일으킨다[1,2].

최근 치아우식증을 효과적으로 예방하기 위하여 *S. mutans*의 증식을 억제하는 기능과 당으로부터 글루칸(glucan) 합성에 관여하는 glucosyltransferase 활성을 저해하는 항우식 물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[3]. 특히 녹차나 홍차, 커피, 과일 주스 뿐만 아니라 천연 추출물을 이용하여 우식 유발균인 *S. mutans*에 미치는 영향과 이러한 음료나 추출물 등의 특정 활

성 성분에 의한 항우식 효과에 대해 많은 연구 결과들이 존재한다[4-9].

특정 활성 성분 중 대표적인 것은 녹차에 들어있는 폴리페놀(polyphenol)의 일종인 카테킨(catechin)이 있으며, 이는 glucosyltransferase에 대한 강력한 저해활성을 갖는다고 알려져 있다[10]. 이러한 녹차 외에도 커피, 홍차, 보리차, 결명자차, 마테차 등 다양한 차의 항우식 효과에 대한 연구가 계속 이루어지고 있다[11].

차의 효과나 항균성에 관한 연구들은 대부분 차를 알코올(alcohol)을 이용하여 12 - 24시간 정도 추출하고 농축한 그 추출물을 세균에 적용하는 것이 일반적이다. 그러나 이러한 추출 방법은 일상생활에서 추출해서 마시는 방법과는 상이하기 때문에 일상생활에 적용하기는 어렵다.

Corresponding author : Jaegon Kim

Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Chonbuk National University, 20, Geonji-ro, Deokjin-gu, Jeonju, 54907, Republic of Korea

Tel: +82-63-250-2223 / Fax: +82-63-250-2131 / E-mail: pedokjg@jbnu.ac.kr

Received June 19, 2017 / Revised July 17, 2017 / Accepted July 14, 2017

따라서 이 연구의 목적은 우식에 효과가 알려진 녹차뿐만 아니라 한국인들이 흔히 마시는 홍차, 보리차, 옥수수차의 티백을 이용하여 일상에서 쉽게 사용할 수 있는 정수기의 7°C 냉수나 72°C 온수로 5분 또는 10분 동안 우려내는 일상적인 방법으로 차를 추출하였을 때 각각의 추출물이 *S. mutans* biofilm 성장에 미치는 효과를 알아보고자 한다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 재료 및 추출

이 연구에 사용된 차 종류는 일상에서 주로 마시는 녹차 (Green tea; GR, Dongsuh, Seoul, Korea), 홍차(Black tea; BL, Dongsuh, Seoul, Korea), 보리차(Barley tea; BA, Dongsuh, Seoul, Korea), 옥수수차(Roasted Corn tea; RC, Dongsuh, Seoul, Korea)이며 시중에서 쉽게 구입할 수 있는 티백 형태였다(Table 1). 침출 우림에 사용된 용매는 정수기 7°C 냉수와 72°C 온수를 사용하였다. 4종류의 차 티백 약 1.1 g을 200 mL의 7°C 냉수 또는 72°C 온수에 5분 또는 10분간 담고 추출물을 얻은 후 원심분리(10,000 rpm, 4°C, 10분)하고 0.22 µm 시린지 필터(Millex-GV Syringe Filter Unit, Merckmillipore, USA)를 이용하여 여과시켰다. 여과 후 최종 추출물은 4°C의 냉장고에 보관하였다.

2. 세균 및 배양

본 연구에 사용한 *mutans streptococci*의 표준 균주는 *S. mutans* UA159로 한국생명공학연구원(KCTC, Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 이 균주를 brain heart infusion(BHI, BD bioscience, Fanklin Lakes, NJ, USA) 액체배지에서 1, 2차 계대배양 후 동일 배지에 식균하여 37°C의 항온기에서 24시간 배양한 후 다음 실험에 사용하였다.

3. 집락수 측정 및 주사전자현미경 관찰

HA disc를 넣은 24개의 웰 플레이트(well plates)에 7°C 냉수와 72°C 온수로 추출한 4종류의 차 추출물을 1.5 mL를 첨가한 후, *S. mutans* UA159 균주를 2×10^6 CFU/mL이 되도록 접종하고 총 volume이 2.8 mL이 되도록 하여 37°C의 항온기에서 24시간 배양하였다. 대조군은 같은 환경 하에 24시간 배양 후 차 추출물을 넣지 않고 1% sucrose가 들어있는 BHI 액체 배지에서 균주를 배양한 것으로 하였다.

집락수 측정을 위해 HA disc를 0.1 M potassium phosphate buffer(KPB, pH 7.0)로 2회 세척한 후 초음파 장치(VCX 130PB, Sonic & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)를 이용하여 HA disc에 부착된 균이 떨어지도록 하였다. 이후 균액을 희석하고 BHI agar plate에 도말하여 집락형성단위(colony forming unit, CFU)를 측정하였다.

또한 HA disc에 부착된 균의 관찰을 위해 4°C에서 2.5% glutaraldehyde로 고정한 후 다음날 20 mM KPB (pH 7.0)로 세척하고 25%, 50%, 75%, 90%, 100% 에탄올을 이용하여 탈수 후 자연건조 하였다. 이후 HA disc를 가속전압 15 kVp 하에서 100배의 비율로 주사전자현미경(scanning electron microscopy ; SEM, JEOL JSM-5900LV, LabX, Ontario, Canada)으로 관찰 하였다.

4. Biofilm 형성 분석 및 흡광도 측정

S. mutans biofilm 형성 분석을 위해 96개의 웰 플레이트에 BHI 액체 배지 100 µL의 1% sucrose와 각각의 차 추출물(100, 50, 25 µL)을 넣고 25 µL의 *S. mutans*를 접종(2×10^6 CFU/mL)하고 실온의 생수를 사용하여 총 volume이 225 µL가 되게 하였다. 대조군은 BHI 액체 배지 100 µL의 1% sucrose와 25 µL의 *S. mutans*를 접종(2×10^6 CFU/mL)하고 실온의 생수 100 µL를 사용하여 총 volume이 225 µL가 되게 하였다. 이 후 37°C에서 혐기

Table 1. The types of tea used in this study

Tea	Code	Manufacturer	Type
녹차(Green tea)	GR	Dongsuh, Seoul, Korea	Tea bag
홍차(Black tea)	BL		
보리차(Barley tea)	BA		
옥수수차(Roasted corn tea)	RC		

GR = Green tea, BL = Black tea, BA = Barley tea, RC = Roasted corn tea

배양하였고 0.01% crystal violet을 이용하여 상온에서 10분 동안 염색을 한 후 0.89% NaCl로 두 번 씻어내고 spectrophotometer를 이용하여 각각의 차 추출물의 *S. mutans* biofilm에 대한 성장 억제 효과를 595 nm에서 흡광도(optical density, OD_{595nm})로 측정하였다.

5. 통계 처리

실험은 모두 4회 반복하였으며, 흡광도(OD_{595nm}) 결과는 Reciprocal log₂로 전환하여 계산하였으며 자료 분석은 통계프로그램인 SPSS(version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 차 종류 및 추출 표본 크기에 따른 CFU와 Reciprocal log₂는 Kruskal-Wallis test를 사용하였고, Mann-Whitney test로 사후 검정을 시행하였다. 추출 온도와 추출 시간에 따른 CFU와 Reciprocal log₂는 Mann-Whitney test로 유의성을 검증하였고 모든 통계적 분석 방법에서 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

III. 연구 성적

1. 추출 온도에 따른 수산화인회석에서의 부착능

Fig. 1은 녹차 및 홍차, 보리차, 옥수수차를 추출물이 수산화인회석에서 *S. mutans* 부착 억제 효과가 있는지 알아보기 위해 각각의 티백을 7°C 냉수와 72°C 온수로 10분 동안 담그고 추출물을 얻어 BHI 액체배지에 *S. mutans*와 HA disc를 넣고 24시간 배양한 후 집락수를 측정된 결과이다. 7°C 냉수로 추출한 차의 추출물과 함께 *S. mutans*를 배양했을 때 측정된 집락수는 네 종류 차 모두 대부분 약 200×10^5 CFU/mL의 집락수를 보였고 차 종류에 대해서는 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나 녹차를 72°C 온수로 추출했을 경우에는 약 44×10^5 CFU/mL의 집락수를 보여 그 수가 가장 낮았으며 다른 차 종류에 대해서 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$). 한편 물 온도에 따른 통계적 유의성을 확인한 결과 녹차에서만 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$).

Fig. 2는 대조군과 4종류의 차를 7°C 냉수와 72°C 온수로 추출하였을 때 그 추출물에 따른 *S. mutans*의 HA disc 부착 정도를 관찰한 대표적인 주사전자현미경 사진이다. 7°C 냉수로 추출한 녹차(Fig. 2B)와 홍차(Fig. 2D)의 경우 대조군(Fig. 2A)과 비교 시 HA disc에 부착된 집락수가 적거나 비슷하였고, 보리차(Fig. 2F)와 옥수수차(Fig. 2H)의 경우 그 집락수가 대조군과 비슷한 양상을 보였다.

녹차와 홍차의 경우, 7°C 냉수로 추출하였을 때(Fig. 2B, D)보다 72°C 온수로 추출한 경우(Fig. 2C, E)에 관찰되는 집락수가 현

저히 적었다. 반면, 보리차와 옥수수차의 경우 7°C 냉수로 추출하였을 때(Fig. 2F, H)와 72°C 온수로 추출하였을 때(Fig. 2G, I)를 비교 시 관찰되는 집락수가 비슷하였다.

2. 추출 온도에 따른 *S. mutans* biofilm 성장

Fig. 3은 녹차 및 홍차, 보리차, 옥수수차를 추출할 때의 온도에 따른 *S. mutans* biofilm 성장 정도를 알아보기 위해 각각의 티백을 7°C 냉수와 72°C 온수로 10분간 담그고 추출물을 얻어 BHI 액체배지에 *S. mutans* 25 μ L와 각각 추출표본 100 μ L를 넣고 37°C에서 혐기 배양한 후, 595 nm에서 흡광도를 측정된 결과이다.

녹차와 홍차, 보리차의 경우, 7°C 냉수로 추출한 경우보다 72°C 온수로 추출한 경우 biofilm 성장 정도가 낮았으며 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 한편 차 종류에 대해서는 7°C 냉수로 추출했을 때 네 종류의 차 모두 비슷한 정도

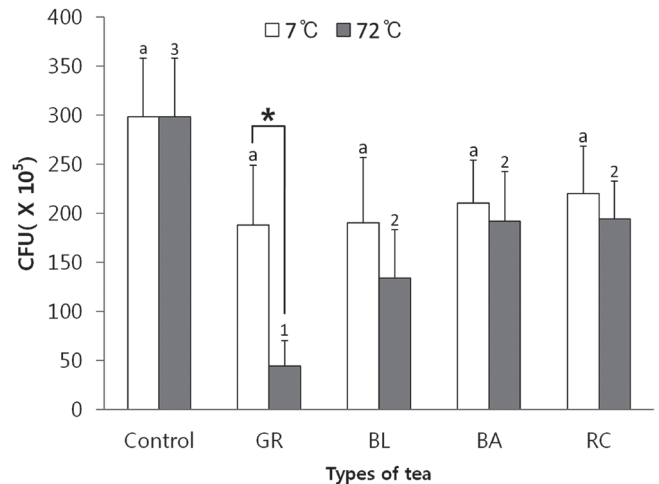


Fig. 1. Colony forming units (CFU) assay after treatment of 4 tea solutions on *S. mutans* biofilm. Aqueous samples (100 μ L) were made using tea bags infused in cold water (7°C) or hot water (72°C) for 10 minutes.

Differences in superscript letters indicate statistically significant differences among 4 types of tea extracted using cold water (7°C), and differences in superscript numbers indicate statistically significant differences among 4 types of tea extracted using hot water (72°C).

Kruskal-Wallis & Mann-Whitney test (* : $p < 0.05$)

GR = Green tea, BL = Black tea, BA = Barley tea, RC = Roasted corn tea

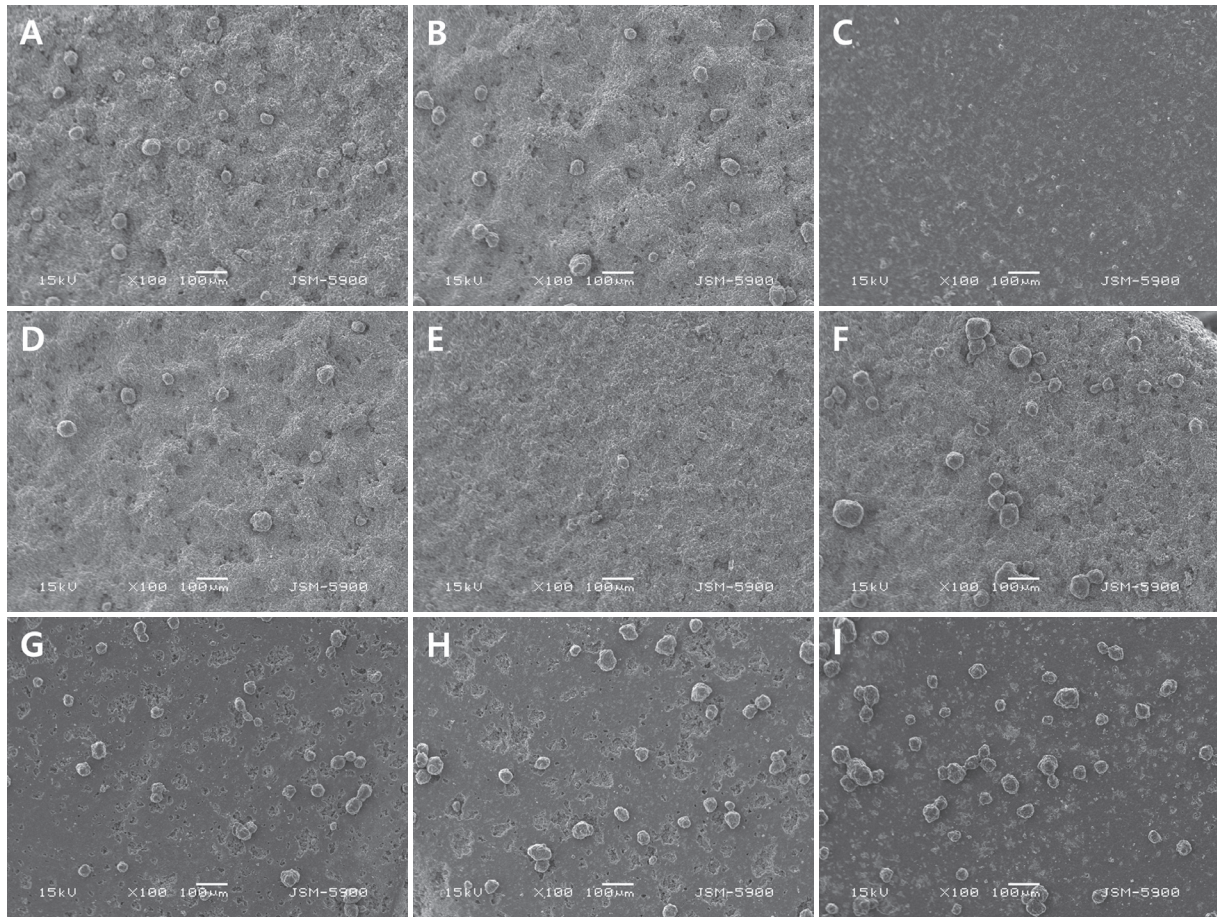


Fig. 2. Scanning electron micrograph of *S. mutans* colony on hydroxyapatite(HA) discs (magnification × 100).
 A : Control group, B : Green tea (7°C), C : Green tea (72°C), D : Black tea (7°C), E : Black tea (72°C), F : Barley tea (7°C), G : Barley tea (72°C), H : Roasted corn tea (7°C), I : Roasted corn tea (72°C).

의 biofilm 성장 정도를 보였으며 통계적으로 유의하지 않았고, 72°C 온수로 추출했을 때 녹차와 홍차에서 biofilm 성장이 가장 억제되었고 서로 통계적으로 유의하지 않았지만 나머지 차와는 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$).

3. 추출 시간에 따른 *S. mutans* biofilm 성장

Fig. 4는 녹차 및 홍차, 보리차, 옥수수차의 추출 시간에 따른 *S. mutans* biofilm 성장 정도를 알아보기 위해 각각의 티백을 72°C 온수로 5분 또는 10분간 담그고 추출물을 얻어 BHI 액체배지에 *S. mutans* 25 μ L와 각각의 추출표본 100 μ L를 넣고 37°C에서 혐기 배양한 후, 595 nm에서 흡광도를 측정된 결과이다.

추출 시간에 대해서 네 종류 차는 모두 통계적으로 유의하지 않았다. 한편 차 종류에 대해서는 5분간 추출한 경우 녹차, 홍차,

보리차, 옥수수차 순서로 biofilm 성장이 억제 되었고 네 종류 차 모두 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$). 10분간 추출한 경우도 녹차, 홍차, 보리차, 옥수수차 순서로 biofilm 성장이 억제 되었지만 녹차와 홍차는 서로 통계적으로 유의하지 않았고 나머지 차와는 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$).

4. 추출량에 따른 *S. mutans* biofilm 성장

Fig. 5는 녹차 및 홍차, 보리차, 옥수수차의 추출량에 따른 *S. mutans* biofilm 성장 정도를 알아보기 위해 각각의 티백을 72°C 온수로 10분간 담그고 추출물을 얻어 BHI 액체배지에 *S. mutans* 25 μ L와 각각의 추출표본 25, 50, 100 μ L를 넣고 37°C에서 혐기 배양한 후, 595 nm에서 흡광도를 측정된 결과이다.

녹차와 홍차는 25 μ L를 추출했을 때보다 100 μ L 또는 50 μ L

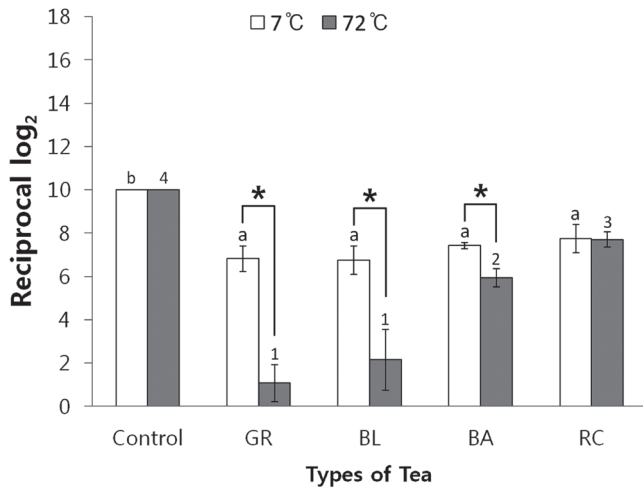


Fig. 3. Influence of 4 tea solutions on *S. mutans* biofilm. Aqueous samples (100 μ L) from different types of tea extracted using cold water (7°C) or hot water (72°C) for 10 minutes. Differences in superscript letters indicate statistically significant inhibitory activity differences among 4 types of tea in cold water (7°C), and differences in superscript numbers indicate statistically significant inhibitory activity differences among 4 types of tea in hot water (72°C). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney test (* : $p < 0.05$) GR = Green tea, BL = Black tea, BA = Barley tea, RC = Roasted corn tea

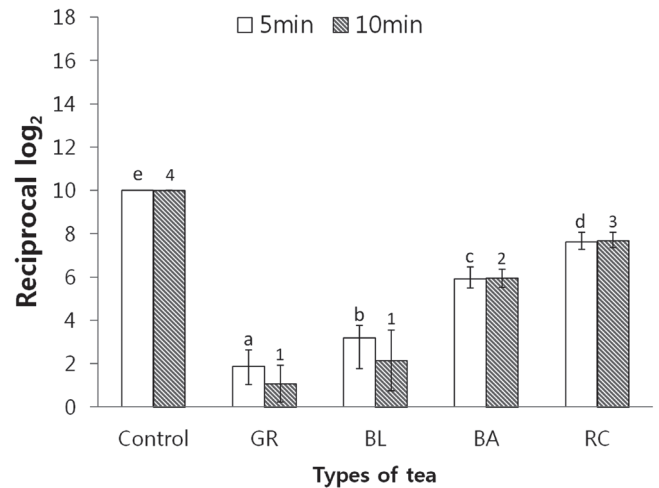


Fig. 4. Influence of 4 tea solutions on *S. mutans* biofilm. Aqueous samples (100 μ L) from different types of tea extracted using hot water (72°C) for different times. Differences in superscript letters indicate statistically significant inhibitory activity differences among 4 types of tea extracted using hot water (72°C) for 5 minutes, and differences in superscript numbers indicate statistically significant inhibitory activity differences among 4 types of tea extracted using hot water (72°C) for 10 minutes. Kruskal-Wallis & Mann-Whitney test ($p < 0.05$) GR = Green tea, BL = Black tea, BA = Barley tea, RC = Roasted corn tea

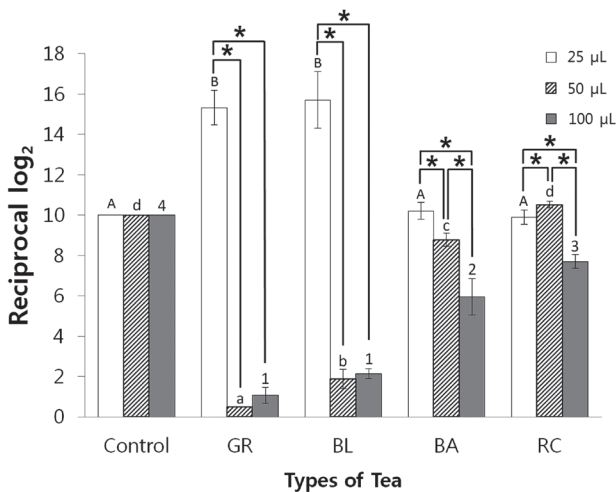


Fig. 5. Influence of 4 tea solutions on *S. mutans* biofilm. Aqueous samples (25, 50, 100 μ L) from different types of tea extracted using hot water (72°C) for 10 minutes. Differences in superscript capital letters indicate statistically significant inhibitory activity differences among 4 types of tea (sample size 25 μ L) extracted using hot water (72°C) for 10 minutes, differences in superscript small letters indicate statistically significant inhibitory activity differences among 4 types of tea (sample size 50 μ L) extracted using hot water (72°C) for 10 minutes, and differences in superscript numbers indicate statistically significant inhibitory activity differences among 4 types of tea (sample size 100 μ L) extracted using hot water (72°C) for 10 minutes. Kruskal-Wallis test & Mann-Whitney U test (* : $p < 0.05$) GR = Green tea, BL = Black tea, BA = Barley tea, RC = Roasted corn tea

를 추출하였을 때 biofilm의 성장이 저해되었고 추출량에 대해 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$). 보리차는 추출 표본의 크기가 작을수록 biofilm 성장이 커졌으며 그 값은 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$). 옥수수차는 추출 표본크기가 100 μ l일 때 다른 두 표본크기에 비해 biofilm 성장이 억제 되었으며 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$).

IV. 총괄 및 고찰

치아우식증은 치아의 경조직에서 발생하는 질환으로 치아, 음식, 치태의 3대 요소에 대한 개념이 확립된 후 시간, 불소, 타액, 생활습관, 사회경제적 요인 등 여러 인자에 의해 발생하는 전염성 질환이다[12]. 특히 치아우식증의 발생에 있어서 미생물의 존재가 필수적이라는 것이 무균 동물 실험에서 밝혀진 이후 우식 유발균에 대한 연구는 계속되어오고 있다[13].

초기 치아우식증과 관련된 세균은 mutans streptococci 중 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*의 2종으로 각각 80%와 20% 비율로 분리된다[14]. 이 중 *S. mutans*는 glucosyltransferase를 분비하여 글루칸 등의 세포외 다당류를 만들어낸다[15]. 생성된 글루칸은 타액과 혼합되어 세균이 치아에 부착할 수 있도록 도와주고, 부착된 세균이 물리적인 힘에 의해 치아 표면에서 떨어지는 것을 막아준다. *S. mutans*의 fructosyltransferase는 프룩탄(fructan) 합성에도 기여하여 치면세균막 형성에 연관이 있는 것으로 알려져 있다[16]. 이렇게 형성된 치면세균막에 구강 내 혐기성 세균이 세포내 다당류를 분해하여 유기산을 생성한다. 생성된 유기산은 치아의 법랑질을 구성하는 hydroxyapatite 같은 인산칼슘화합물을 분해하여 치아우식증을 유발한다[17].

한편 녹차와 홍차는 심혈관질환, 항산화효과, 항암효과, 콜레스테롤 저하, 항염증 효과, 항균효과, 바이러스 감염 억제 효과, 당뇨예방 효과 등의 다양한 생리활성을 나타낸다[3]. 녹차와 결명자차를 이용한 *S. mutans*에 대한 항균작용 실험에서는 녹차추출물은 α -amylase의 활성 억제를 보이는 폴리페놀을 함유하고 있어 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*에 대한 성장 억제능력을 가지고 있다고 하였다[9].

이러한 폴리페놀 중 대표적인 것은 카테킨으로 이에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 여러 종류의 차에 다양한 형태와 양으로 존재하는 카테킨은 녹차류가 홍차류보다 약 3배가 많다고 밝혀졌으며, 이러한 카테킨은 글루칸 생성의 억제로 항우식효과, 세균 성장의 억제로 항균 효과 등이 있다[18].

녹차 속 카테킨은 다양한 종류가 존재하는데 epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin

gallate (ECG), epicatechin (EC) 등이 대표적이다[19]. 그 중 epigallocatechin-3-gallate (EGCg)는 치태의 pH 감소를 억제하고, *S. mutans*로부터 산 생성을 억제하는데 효과적이다[20].

이전 연구에서는 알코올을 이용하여 차잎을 12 - 24시간 동안 우려내어 추출물을 얻었다[6-9]. 하지만 이는 일상생활에서 차를 추출하는 방법과 매우 다르다는 한계가 존재하기 때문에, 이번 연구에서는 사람들이 일상적으로 차를 추출하는 방법과 유사하게 티백을 정수된 물로 우려내어 추출물을 얻어 녹차와 홍차, 보리차, 옥수수차를 추출 시간과 온도를 달리해서 추출하였을 경우 *S. mutans* biofilm의 성장에 대한 영향을 알아보고자 하였다.

각 차의 추출물이 *S. mutans*의 수산화인회석에 대한 부착능에 미치는 영향을 알아본 결과, 녹차와 홍차는 *S. mutans*가 HA disc에 부착하는 것을 억제하였으며 7°C 냉수로 추출하였을 때보다 72°C 온수로 추출하였을 때 부착 억제 효과가 커졌다. 그러나 보리차와 옥수수차의 경우, 7°C 냉수나 72°C 온수로 추출하였을 때 각각의 추출물이 *S. mutans*가 HA disc에 부착하는 것에 영향을 미치지 않았다. Liu[21]는 녹차의 폴리페놀 성분이 *S. mutans*의 치아 부착 효과를 감소시킨다고 하였다. 녹차와 마찬가지로 홍차에서 추출된 폴리페놀 성분은 *S. mutans*가 수산화인회석에 부착되는 것을 억제하며, 온수로 추출할 경우 폴리페놀의 함량이 증가하여 이러한 억제 효과가 더욱 증가한 것으로 보인다. 한편 보리차는 우식 유발균의 부착을 억제하는 작용을 갖고 있으며, 보리차의 추출물에 존재하는 폴리페놀이나 malanoidins가 우식 유발균의 치면 부착을 억제한다[22]. 그러나 이번 연구에서 보리차는 *S. mutans*가 HA disc에 부착하는 것을 억제하는데 있어서 그 효과가 미미하였다. 이는 보리차를 추출하는 조건이 달라 추출물의 폴리페놀 함량이 부착 억제 효과를 나타낼 만큼 충분하지 못했기 때문으로 보인다.

다른 연구에 따르면 다양한 종류의 차들 중에서 폴리페놀 물질이 높은 함량을 나타낸 것은 홍차, 녹차 그리고 마테차로 확인되었다[11]. 한편 Yanagida 등[23]은 사과에서 추출된 폴리페놀은 녹차에서 추출한 것과는 달리 *S. mutans*의 성장에 아무런 영향을 미치지 못한다고 하였으며 이는 식물에 따른 폴리페놀의 항균 작용에 차이가 있음을 시사한다. 따라서 옥수수차의 추출물에는 폴리페놀 성분이 적거나 식물에 따른 폴리페놀 성분의 항균 작용에 차이가 있어 *S. mutans*의 수산화인회석에 대한 부착능을 억제하지 못한 것으로 보인다.

이 연구에서 각 차의 추출 온도에 따른 *S. mutans* biofilm 성장 정도를 알아본 결과, 녹차와 홍차, 옥수수차를 7°C 냉수로 추출하였을 때에는 *S. mutans* biofilm 성장 억제 효과가 작았으나, 72°C 온수로 추출하였을 때에는 그 효과가 크게 나타났다. 여러 종류의 차를 추출조건을 달리하였을 때 이화학적 성분을 분석한

이전 연구에서 녹차, 홍차 등의 차잎을 증류수로 추출할 때 추출 온도가 증가할수록 카테킨 추출량이 증가하였고, 70°C일 때 카테킨 함량이 가장 높았으며 그 이상의 온도에서는 추출량이 더 이상 증가하지 않았다[24]. 따라서 이번 연구에서 7°C 냉수보다 72°C 온수로 추출하였을 때 각 차의 폴리페놀 추출량이 증가하여 *S. mutans* biofilm 성장에 대한 억제 효과가 크게 나타났을 것으로 생각된다. 그러나 옥수수차는 추출 온도에 따른 차이를 보이지 않았다. 이는 옥수수차에 포함된 폴리페놀의 기본함량이 적거나 그 작용이 달라서, 추출 온도를 높여도 *S. mutans* biofilm 성장 억제 효과를 가지는 성분이 옥수수차 추출물에는 없기 때문으로 보인다.

각 차의 추출 시간에 따른 *S. mutans* biofilm 성장 정도를 알아본 결과, 녹차와 홍차는 10분간 추출하였을 때 5분간 추출하였을 때보다 biofilm 성장이 억제되었다. 그러나 보리차와 옥수수차는 추출 시간에 따른 차이를 보이지 않았다. 이 등[24]의 연구에서 녹차, 홍차 등의 차잎을 증류수로 추출할 때 추출시간이 증가할수록 카테킨 함량이 증가하였고, 추출시간이 5분일 때 가장 많은 증가를 보였고, 10분간 추출하였을 때에는 더 큰 증가를 보이지 않았다. 또한 신 등[25]은 녹차 티백을 상온에서 추출할 때 10시간까지는 추출시간이 증가할수록 폴리페놀 함량이 증가한다고 하였다. 녹차와 홍차의 경우, 추출 시간을 5분 더 증가시켰을 때 폴리페놀 성분이 더 많이 추출되어 *S. mutans* biofilm 성장 억제 효과가 증가하였을 것으로 보인다. 그러나 보리차의 경우 추출 시간이 5분 증가된 것은 폴리페놀 성분을 더 많이 추출하기에는 부족하여 *S. mutans* biofilm 성장 억제 효과에 영향을 끼치지 못한 것으로 생각된다.

각 차의 추출량에 따른 *S. mutans* biofilm 성장 정도를 알아본 결과, 녹차와 홍차, 보리차는 추출량이 증가할수록 *S. mutans* biofilm의 성장이 억제되는 경향을 보였으나, 성장 억제 효과의 차이는 모두 상이하였다. 반면 옥수수차는 추출량에 따른 *S. mutans* biofilm 성장 억제 효과에 있어서 통계적으로 유의하였으나 비례하지 않았다.

녹차와 홍차의 경우, 100 μ L를 추출하였을 때보다 50 μ L를 추출하였을 때 *S. mutans* biofilm의 성장 억제 효과가 증가하였다. 그러나 25 μ L를 추출한 경우에는 대조군에 비해 biofilm의 성장이 더욱 촉진되었다. 이전 연구에서도 녹차 추출물이 *S. mutans*에 대해 농도 의존적으로 세균 성장이 감소하는 경향을 보였으나, 추출량이 너무 적은 경우에는 오히려 대조군보다 세균 성장이 증가한다고 하였다[9]. 추출량이 너무 적은 경우에는 추출물 내 폴리페놀 성분에 비해 다른 성분이 *S. mutans* biofilm의 성장에 영향을 미치는 것으로 추측된다. 보리차는 추출량이 증가함에 따라 *S. mutans* biofilm의 성장 억제 효과가 증가하였

며, 25 μ L를 추출하였을 때에는 대조군과 유사한 성장 정도를 보였다.

보리차의 추출물은 일정하게 농도 의존적으로 *S. mutans*에 대해 성장 억제 효과를 보이거나, 그 효과는 녹차와 홍차에 비해 작았다. 그러므로 보리차가 녹차와 홍차만큼의 효과를 보이기 위해서는 추출량을 더 증가시켜야 할 것으로 보인다.

옥수수차는 추출량이 25 μ L와 50 μ L일 때에는 *S. mutans* biofilm의 성장 억제 효과를 보이지 않았으나, 100 μ L를 추출하였을 때에는 약간의 성장 억제 효과를 나타내었다. 하지만 농도에 따른 효과를 보였다고 하기에는 그 값이 미미하였다. 따라서 옥수수차의 추출물은 *S. mutans* biofilm의 성장 억제 효과가 거의 없는 것으로 판단된다.

총괄적으로 이 연구에서 사용한 차 중에서 녹차와 홍차를 일상적인 방법인 72°C 온수로 추출하였을 때 *S. mutans* biofilm 형성 억제에 효과가 있었지만 추출량이 적으면 오히려 *S. mutans* biofilm 성장 억제 효과가 떨어졌다. 비록 이번 연구의 방법에 있어서 기존의 차 연구 방법이 아닌 일상적으로 흔히 마시는 방법으로 차를 추출하였을 때를 가정하여 실험한 결과이다 보니 차의 이화학적 성분 분석이나 최소 억제 농도에 대한 연구가 부족한 한계점이 존재한다. 또한 실제 음용 환경을 위해 정수된 물을 사용하여 차의 추출물을 얻었더라도 원심분리 후 세균과 함께 배양한 연구과정은 실제 음용 환경과는 다르다는 한계점도 있다. 따라서 세균 성장 억제에 대한 정확한 원인과 연구한 차의 성분 분석에 대해서는 향후 정성, 정량 분석 실험을 통해 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

이 연구에서는 일상적인 생활에서 흔히 얻을 수 있는 정수된 물을 사용하여 차를 마실 경우 차에 들어 있는 성분이 *S. mutans* biofilm에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려 하였다. 따라서 녹차, 홍차, 보리차, 옥수수차를 정수기를 이용하여 일상적으로 마시는 방법으로 추출하되, 추출 온도와 추출 시간, 추출량에 따른 *S. mutans* biofilm의 성장 정도를 비교하였다. 추출온도는 7°C와 72°C, 추출시간은 5분, 10분, 추출량은 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L로 달리 하였을 때의 *S. mutans* biofilm의 성장에 미치는 영향을 알아보았다.

추출온도에 대해서는 녹차와 홍차, 보리차에서 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$). 추출시간에 대해서는 72°C 온수로 100 μ L를 추출하였을 때 네 종류 차 모두 통계적으로 유의하지 않았다. 추출량에 따른 비교에서는 녹차와 홍차의 경우 25 μ L의 적은 양을 추출하였을 때 100 μ L의 많은 양을 추출하였을 때 보다 *S.*

mutans biofilm 형성이 더 많았으며 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$).

References

1. Takahashi N, Nyvad B : Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*, 42:409-418, 2008.
2. Heo NR, Lee KH, An SY, *et al.* : Cariogenic potential of nutritional supplements for children on bovine teeth. *J Kor Acad Pediatr Dent*, 41:233-240, 2014.
3. Badria FA, Zidan OA : Natural products for dental caries prevention. *J Med Food*, 7:381-384, 2004.
4. Choi HD, Koh YJ, Park YK, *et al.* : Anticariogenic activity and glucosyltransferase inhibitory effects of extracts from pine needle and twig. *Kor J Food Sci Tech*, 39:336-341, 2007.
5. Daglia M, Cuzzoni MT, Dacarro C : Antibacterial activity of coffee. *J Agric Food Chem*, 42:2270-2272, 1994.
6. Touyz LZG, Amsel R : Anticariogenic effects of black tea (*Camellia sinensis*) in caries prone-rats. *Quintessence Int*, 32:647-650, 2001.
7. Sakanaka S, Kim M, Yamamoto T, *et al.* : Antibacterial substance in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agr Biol Chem*, 53:2307-2311, 1989.
8. Weiss EL, Lev-Dor R, Sharon N, *et al.* : Inhibitory effect of a high-molecular-weight constituent of cranberry on adhesion of oral bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 42:285-292, 2002.
9. Lim SH, Seo JS, Yoon YJ, *et al.* : Effect of leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed extract from *Casia tora* on viability of *Mutans Streptococci* isolated from the interface between orthodontic brackets and tooth surfaces. *Kor J Orthod*, 33:381-389, 2003.
10. Hattori M, Kusumoto IT, Hara Y, *et al.* : Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 38:717-720, 1990.
11. Kim MG, Oh MS, Yoon MH, *et al.* : A study on antioxidant activity and antioxidant compound content by the types of tea. *J Food Hyg Saf*, 31:132-139, 2016.
12. Korean Academy of Pediatric Dentistry : Textbook of Pediatric Dentistry, 5th ed. Yenang, 273-276, 2014.
13. Orland FJ : A review of dental research using germfree animals. *Ann N Y Acad Sci*, 78:285-289, 1959.
14. Yoo YK, Ro JS, Chang KW, *et al.* : The antibacterial effects of some propolis constituents against *S. mutans*, *Lactobacilli* and *Actinomyces*. *J Korea Acad Oral Health*, 20:65-74, 1996.
15. Johnson JR, Gjermo P, Eriksen H : Effect of 2 years use of chlorhexidine-containing dentifrices on plaque, gingivitis and caries. *Eur J Oral Sci*, 83:288-292, 1967.
16. Rozen R, Bachrach G, Bronshtetyn M, *et al.* : The role of fructans on dental biofilm by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett*, 195:205-210, 2001.
17. Fears KP, Gonzalez-Begne M, Koo H, *et al.* : Surface-induced changes in the conformation and glucan production of glucosyltransferase adsorbed on saliva-coated hydroxyapatite. *Langmuir*, 31:4654-4662, 2015.
18. Hamillton-Miller JMT : Anti-cariogenic properties of tea(*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol*, 50:299-302, 2001.
19. Hashimoto F, Ono M, Shimizu K, *et al.* : Evaluation of the anti-oxidative effect(in vitro) of tea polyphenols. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67:396-401, 2003.
20. Xu X, Zhou XD, Wu CD : Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes. *Arch Oral Biol*, 57:678-683, 2012.
21. Liu TL : Mechanism and clinical studies on the anti-caries effect of green tea polyphenols. *Kor Soci Food Sci Tech Symp*, 6:83-91, 2003.
22. Kim YJ, Kim CC, Kim KK : Effect of roasted barley tea on the adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads of cariogenic *mutans streptococci*. *J Kor Acad Pediatr Dent*, 29:618-624, 2002.
23. Yanagida A, Kanda T, Cordeiro JGO, *et al.* : Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of *mutans streptococci*. *J Agric Food Chem*, 48:5666-5671, 2000.
24. Lee YS, Jung SA, Kim JH, *et al.* : A study on change in chemical composition of green tea, white tea, yellow tea, oolong tea and black tea with different extraction conditions. *Kor J of Food Nutri*, 28:766-773, 2015.
25. Shin YR, Lee KC, Eun JB : Physicochemical characteristics and sensory evaluation of a green tea infusion extracted with different amounts at room temperature (25°C). *J Kor Tea Soci*, 21:46-52, 2015.

국문초록

음용 차의 항우식 효과

정일용 · 이주영 · 김미아 · 이대우 · 양연미 · 김재곤

전북대학교 치의학전문대학원 소아치과학교실 및 구강생체과학연구소

이 연구의 목적은 한국인들이 일상적으로 마시는 서로 다른 네 종류의 차 티백을 이용하여 차가운 생수나 뜨거운 생수로 5분 또는 10분 동안 우려내는 일상적인 방법으로 차를 추출하였을 때 각각의 추출물이 *Streptococcus mutans* 세균막 성장에 미치는 효과를 알아보고자 하였다. 균주는 *S. mutans* UA 159를 이용하였고 1%의 sucrose와 각각의 차 추출물을 웰 플레이트에 넣고 배양하였다. 추출 온도에 따른 세균막 형성을 비교 했을 때 녹차와 홍차에서 추출 온도가 높을 때 세균막 형성이 적었고 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$). 추출 시간을 달리 하고 72°C 온수로 많은 양을 추출 했을 경우 세균막 형성을 비교 했을 때는 네 종류 차 모두 추출 시간에 대해서 통계적으로 유의하지 않았다. 한편 추출량에 따른 비교에서는 녹차와 홍차의 경우 같은 시간, 같은 온도로 추출하였을 때 추출량이 적다면 오히려 세균막 성장이 증가하였다.