International Journal of Oral Biology, Vol. 42, No. 1 March 31 2017, p. 25-31
Copyright ⓒ 2017, *The Korean Academy of Oral Biology*
http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2017.42.1.025
pISSN 1226-7155, eISSN 2287-6618

International Journal of Oral Biology

Anti-cariogenic Properties of α-Pinene, a Monoterpene in Plant Essential Oil

Bog-Im Park[1], Yong-Ouk You[1], Ji-Su Mo[1], So-Youn An[2], Na-Young Choi[3] and Kang-Ju Kim[4,*]

[1]*Department. of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Korea*
[2]*Department of Pediatric dentistry, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Korea*
[3]*Department of Home Economics Education, Wonkwang University,Iksan, Korea*
[4]*Department of Oral Microbiology & Immunology, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Korea*

(received February 21, 2017; revised March 10, 2017; accepted March 10, 2017)

Dental caries is the most common chronic disease in the dental field. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) is the most important bacteria in the formation of dental plaque and dental caries. In a previous study, we confirmed that the essential oil of *Chrysanthemum boreale* has antibacterial activity against *S. mutans.* Alpha-pinene is one of the major chemical components of *Chrysanthemum boreale* essential oil. In the present study, we investigated the inhibitory effects of α-pinene on cariogenic properties such as growth, acid production, biofilm formation, and bactericidal activity on *S. mutans*. Alpha-pinene at a concentration range of 0.25-0.5 mg/mL significantly inhibited the growth of *S. mutans* and acid production of *S. mutans*. Biofilm formation was significantly inhibited at > 0.0625 mg/mL α-pinene, similar to the data from scanning electronic microscopy. Under confocal laser scanning microscopy, the bacterial viability was decreased by α-pinene in a dose-dependent manner. These results suggested that α-pinene may be a useful agent for inhibiting the cariogenic properties of *S. mutans.*

*Correspondence to: Kang-Ju Kim, Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, South Korea 570-749
Tel: +82-63-850-6858, Fax: +82-63-850-7157
E-mail: kjkimom@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.

Key words: *Chrysanthemum boreale*, α-pinene, dental caries, *Streptococcus mutans*, bacteria, adhesion

서 론

정유(essential oil)는 식물의 꽃, 잎, 줄기, 뿌리 및 천연수지 등에서 얻은 향기가 강한 휘발성 성분을 의미한다. 정유의 효능은 항균, 항염증, 항진균, 항바이러스 및 항암 효과 등으로 알려져 있고, 천연물에서 얻어지는 정유는 동서양을 막론하고 오래 전부터 의약품, 향장품 및 식품첨가물로 이용되어 왔으며, 또한 정유의 독특한 향기를 활용하여 향기요법제, 화장품, 향수 및 비누 등으로도 사용되고 있다 [1-3]. 치아우식증은 현재 전 세계적으로 널리 분포해 있는 구강질환으로 한국인에게도 만연하여 치아상실의 주된 원인 중 하나이다 [4-8]. 구강내에는 500여종의 세균이 존재하는데, 치아우식증은 이러한 구강세균에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다 [9,10]. 구강세균 중 *Strepotococcus mutans* (*S. mutans*)는 치면세균막 형성과 치아우식증 발생의 주요한 원인균으로 보고된 바 있다 [11-13]. *S. mutans*는 구강내 치면세균막에 상주하며 섭취한 음식물에 포함된 당질을 분해하여 대사과정에서 유기산을 생성하여 분비하므로 치아의 경조직을 탈회시켜 파괴하고, 세균의 효소는 치아 경조직 단백질의 가수 분해를 일으킨다 [14-20].

산국 (*Chrysanthemum boreale; C. boreale*)은 10-11월에 걸쳐 전국의 야산에서 1-1.5 ㎝ 크기의 노란 꽃을 피우는 국화과 (Compositae)의 다년생 초본으로 야국(野菊)이라

고도 하는데 감국 (甘菊, *Chrysanthemum indicum*)과 함께 두통 및 염증성 질환에 전통적으로 많이 사용되어 왔으며, 산국을 소재로 만든 산국주나 국화차는 신라시대부터 오늘날까지 음용되어 왔다 [21,22]. 산국의 성분으로는 정유성분과 linarin, luteolin의 배당체, chrysanthemin, chrysanthemaxanthin, 다당류, coumarins, yejuhua lactone, 등이 함유되어 있고, 정유 중의 주요 성분은 camphor, comphene, carvone 등이 알려져 있다 [23-25]. 최근 연구결과에 따르면 산국 정유는 *S. mutans*의 biofilm 형성을 억제하며, 주요성분 중 하나로 α-pinene이 함유되어 있는 것이 밝혀졌다 [26]. 본 연구에서는 산국 정유의 주요성분 중 하나인 α-pinene이 *S. mutans*의 성장과 산 생성 억제 효과, biofilm 형성 억제효과 및 인공치아에 대한 *S. mutans* biofilm 억제효과, 주사 현미경을 이용한 *S. mutans* biofilm 생성 억제에 미치는 효과를 연구하여 우식활성억제에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 α-pinene는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 *S. mutans* ATCC 25175로 Brain heart infusion (BHI, Difco Lab., Detroit, MI, USA) 액체배지에 1-2차 계대배양 후 같은 배지에 식균하여 37℃의 항온기에서 24시간 배양하여 사용하였다.

*S. mutans*의 성장과 산 생성에 미치는 효과 측정

1%의 glucose가 들어 있는 BHI 액체배지에 α-pinene을 첨가한 후 균을 5×10^5 CFU/ml/well이 되게 접종하였다. 37℃의 항온기에서 24시간 배양한 후 BHI 액체배지를 기준으로 ELISA reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, pH meter (HANNA instrument, philippines)를 이용하여 pH를 측정하여 산 생성 억제 효과를 관찰하였다. 대조군은 α-pinene을 넣지 않고 시행하였다.

S. mutans biofilm 생성에 미치는 효과 측정

35 mm dish에 BHI 액체 배지와 α-pinene를 첨가한 후 5×10^5 CFU/ml가 되게 균을 접종하였다. 그 후, 37℃ incubator에서 24시간 배양한 뒤 상청액을 모두 제거하였다. 그런 다음, 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 96 well plate에 100 μl씩 분주하였다. 마지막으로 ELISA reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 실험물질을 넣지 않은 군을 대조군으로 하였다. 인공치 표면에 형성되는 biofilm을 측정하기 위하여 인공치 (Endura, Shofu Inc., Kyoto, Japan)에 BHI 액체배지와 α-pinene를 첨가하여 5×10^5 CFU/ml 농도로 세균을 접종하였다. 37℃ 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; SEM) 관찰

35 mm dish에 BHI 액체배지와 α-pinene를 첨가한 후 5×10^5 CFU/ml 균이 되게 접종하였다. 37℃ incubator에서 24시간 배양 후 상청액을 모두 제거하였다. 각각의 dish에 증류수 1.5 ml씩 넣어서 세척하였다. 그 뒤에 2.5% glutaraldehyde 용액 (in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, 4℃)에서 24시간 동안 고정시켰다. 에탄올 70%를 시작으로 80%, 95%, 100%로 농도를 상승 배열하여 세척, 탈수하였다. 동결 건조한 후 gold로 coating하여, SEM Scanning Electron Microscopy (SEM; JSM-6360, JEOL., Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하고 촬영하였다.

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

α-Pinene의 농도에 따른 *S. mutans*의 살균 효과를 관찰하기 위하여 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 이용하여 염색을 시행한 후 CLSM (LSM 510, Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다. BHI 액체배지에 α-pinene을 농도별로 첨가한 후, *S. mutans*를 5×10^5 CFU/ml로 접종한 후 상온에서 5분 동안 방치한 후 PBS (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 살아있는 세포를 관찰하기 위해 SYTO와 Propidium Iodide (PI)로 이중염색을 시행한 후 암실에서 CLSM을 이용하여 관찰 하였다.

통계처리

실험은 모두 3회 반복하였으며, 억제비율은 [(대조군-실험군)/대조군]×100의 식을 이용하여 계산하였다. 얻은 결과는 통계프로그램인 SPSS (ver 10.0)를 사용하여 평

균과 표준오차로 제시하였고, α=0.05 수준에서 실험군과 대조군의 평균치를 independent sample t-test로 유의성을 검증하였다.

결 과

세균 성장에 미치는 효과

α-Pinene의 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 관찰하기 위하여 BHI 액체배지에 α-pinene을 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도로 첨가한 후, *S. mutans*를 접종하여 37℃ 항온기에서 24시간 배양한 후 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. α-Pinene을 넣지 않은 대조군에서 0.291±0.004 흡광도를 나타내었다. α-Pinene을 0.0625 mg/ml 농도에서 0.295±0.003 흡광도를 나타내고, 0.125 mg/ml 농도에서는 0.244±0.053, 0.25 mg/ml 농도에서는 0.085±0.076, 0.5 mg/ml에서는 0.008±0.006 흡광도를 나타내었다. α-Pinene을 첨가한 실험군의 O.D 값은 대조군의 O.D 값에 비해 농도 의존적으로 유의한 차이를 보이며 낮아져 성장 억제 효과를 보였으며, 실험군은 각각의 농도에서 대조군에 비하여 각각 1.53%, 16%, 71%, 97%의 성장억제효과를 보였으며, 0.25 mg/ml 이상의 농도에서 유의성 있는 결과를 보였다.

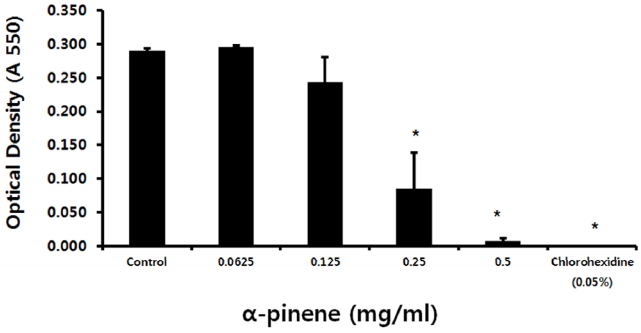

Fig. 1. Bacterial growth inhibition of *S. mutans*. The optical density (A550) was read using a spectrophotometer. *p < 0.05 compared to the control group.

산 생성에 미치는 효과

α-Pinene 첨가에 따른 *S. mutans*에 의한 유기산 생성 억제 효과를 알아보기 위해 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml 농도의 시료에 *S. mutans*를 접종하여 24시간 배양 후에 pH meter로 pH를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 대조군에서 세균을 배양하기 전 배지의 pH는 7.37±0.01로 중성 pH를 유지하였으나, 세균을 배양한 후 pH는 5.49±0.015로 떨어졌다. α-Pinene을 0.0625 mg/ml 농도로 투여한 군에서는 5.48±0.006, 0.125 mg/ml 농도에서는 5.59±0.057, 0.25 mg/ml 농도에서는 6.92±0.017, 0.5 mg/ml 농도에서는 7.37±0.006을 나타내었다. α-Pinene을 0.125 mg/ml 이상 투여한 군들에서는 농도 의존적으로 유의성 있게 pH하락이 억제되었으며, 특히 0.25 mg/ml 농도이상에서는 임계 pH (pH 5.5 - 5.6) 이상을 나타냈다.

Table 1. Inhibitory effect of a-pinene on acid production of *S. mutans*.

Conc.(mg/ml)	pH (before incubation)	pH (after 24hrs incubation)
Control	7.37±0.01	5.49±0.01[1)]
0.0625	7.37±0.01	5.48±0.00
0.125	7.37±0.00	5.59±0.05*
0.25	7.38±0.00	6.92±0.01*
0.5	7.37±0.00	7.37±0.00*
Chlorohexidine (0.05%)	7.37±0.00	7.36±0.01*

[1)] 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.

Biofilm 형성에 미치는 효과

α-Pinene의 *S. mutans* biofilm 생성 억제 효과를 본 결과 Fig. 2와 같다. α-pinene을 넣지 않은 대조군에서 0.870±0.008 흡광도를 나타내었다. 그러나 0.0625 mg/ml 농도에서 0.511±0.007 흡광도를 나타내었고, 0.125 mg/ml 농도에서는 0.301±0.026, 0.25 mg/ml 농도에서는 0.153±0.003, 0.5 mg/ml 농도에서는 0.111±0.005 흡광도를 나타내어, 0.0625, 0.12, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 *S. mutans* biofilm 생성 억제정도가 41%, 65%, 82%, 87%로 0.25 mg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다.($p < 0.05$). 특히 0.5 mg/ml 농도에서

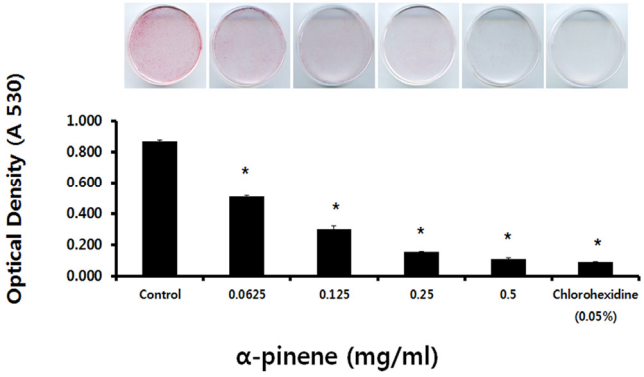

Fig. 2. The biofilms that formed on the culture dish surface were stained with 0.1% safranin. The bound safranin was released from the stained cells by 30% acetic acid, and the absorbance of the solution was measured at 530 nm. *p < 0.05 compared to the control group.

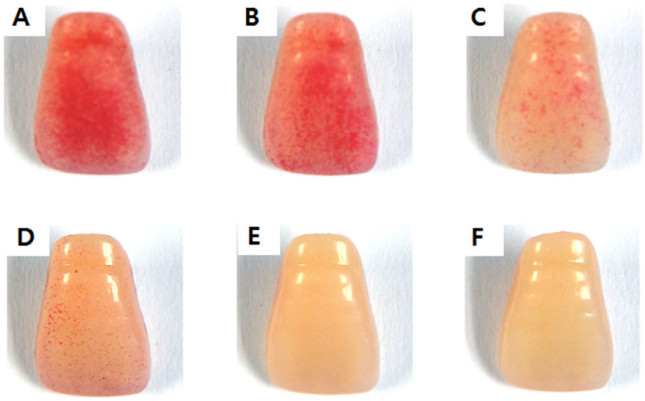

Fig. 3. *S. mutans* biofilms on resin tooth surface, which were incubated in α-pinene. (A) Control (B) 0.0625 mg/ml (C) 0.125 mg/ml (D) 0.25 mg/ml (E) 0.5mg/ml (F) Positive control (0.05% Chlorohexidine)

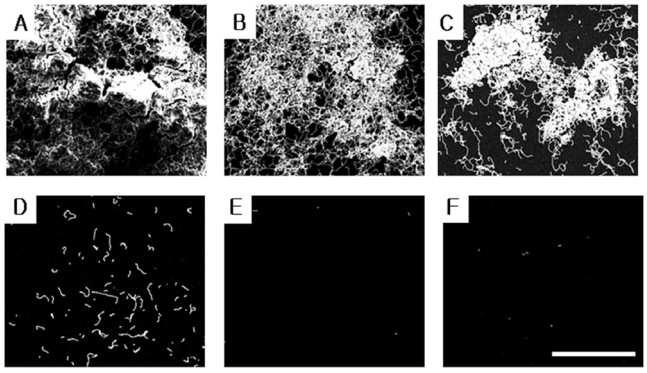

Fig. 4. Scanning electron microscopy. (A) Control (B) 0.0625 mg/ml (C) 0.125 mg/ml (D) 0.25 mg/ml (E) 0.5 mg/ml (F) Positive control (0.05% Chlorohexidine), Bar= 50 um

는 양성대조군인 0.05%의 chlorohexidine과 비슷한 효과를 관찰할 수 있었다. α-Pinene이 *S. mutans*의 인공치아에 *S. mutans* biofilm 생성을 억제하는지 알아본 결과 α-pinene을 처리하지 않은 대조군은 *S. mutans* biofilm이 많이 형성된 것을 볼 수 있으며, α-pinene의 농도가 높아질수록 *S. mutans* biofilm 생성이 억제되었다. 특히 0.5 mg/ml 농도에서는 *S. mutans* biofilm 생성 억제 효과가 더욱 뛰어남을 알 수 있었다(Fig. 3). 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 α-pinene의 *S. mutans* biofilm 생성 억제 효과를 관찰한 결과, Fig. 4와 같이 α-pinene을 처리하지 않는 대조군은 *S. mutans* biofilm이 많이 형성된 것을 볼 수 있으며, α-pinene의 농도가 높아질수록 전자현미경상으로도 확실히 *S. mutans* biofilm 생성이 억제됨이 관찰되었다. 특히 0.25 mg/ml 이상 농도에서는 *S. mutans* biofilm 생성 억제 효과가 더욱 뛰어남을 알 수 있으며, 특히 0.5 mg/ml 이상 농도에서는 *S. mutans* biofilm이 거의 형성 되지 않음을 알 수 있다.

공초점 레이저 현미경(CLSM)을 이용한 살균 효능

CLSM을 이용하여 관찰한 결과(Fig. 5), α-pinene을 첨가한 농도가 높아질수록 살아있는 세균(green color; SYTO stain)에 비하여 죽어있는 세균(red color; PI stain)이 증가하는 것이 관찰되어 α-pinene이 살균효과가 있다는 것이 밝혀졌으며 4 mg/ml 농도이상에서는 거의 모든 세균이 살균되는 것으로 확인되었다.

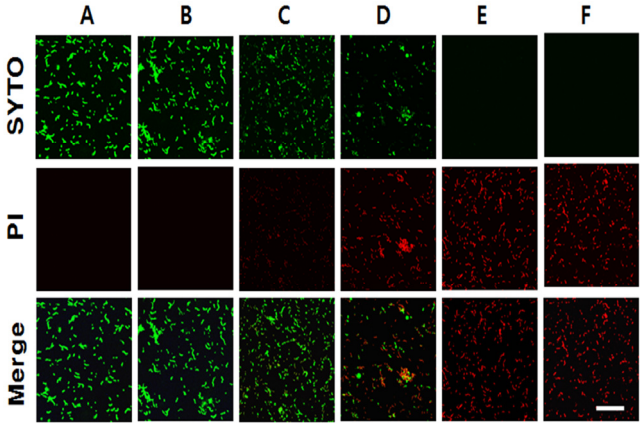

Fig. 5. Confocal laser Scanning microscopy. (A) Control (B) 0.5 mg/ml (C) 1 mg/ml (D) 2 mg/ml (E) 4 mg/ml (F) Positive control (0.05% Chlorohexidine), Bar= 50 um

고 찰

다양한 미생물이 서식하는 인체부위 중 하나인 구강은 병원성 감염균주 및 상주균이 서식하여 구강질환 뿐만 아니라 전신질환 발생의 원인이 되기도 한다. 치아우식증 및 치주질환은 세균에 의해 유발되는 구강질환인데, *S. mutans*는 치아우식증 및 치면세균막 형성과 관련된 주요한 병원성 미생물로 알려져 있다 [27,28]. 우리나라를 비롯한 세계 각국에서 세균 유래의 구강 질환 치료를 위하여 많은 항균물질들을 사용하여 왔다. 그럼에도 불구하고 치아우식증과 치주질환이 치아상실의 주요한 원인이 되는 것은 아직 기존의 구강질환 억제 물질이 충분한 효능을 갖고 있지 못하다는 증거이다. 또한 항균물질의 남용으로 인하여 미생물은 서서히 이들 약물에 내성을 갖게 되었다. 항균물질이 요구하는 효과는 병원성 미생물의 성장을 막거나 예방하는 것이지만, 이 약물 또한 숙주에게 해로운 방식으로 영향을 미치게 되는데, 이러한 부작용은 대부분의 항균물질에 공통적으로 나타나게 되었다. 이에 따라, 합성 항균물질을 대체할 수 있는 천연 항균 물질을 찾거나, 천연물에서 추출한 생물학적 활성 화합물의 다양한 연구가 수행되고 있다

[29]. 또한, 인체의 감염을 최소화하기 위한 연구들이 주목 받고 있다. 식물의 정유성분과 그 유도체는 오래 전부터 식품 향료, 음료 및 항균제로 사용되어 왔다 [30]. 따라서, 사람의 질병 및 치료를 위한 잠재적 항균제인 정유에 관한 연구가 중요한 과제가 되고 있다. 최근 연구결과에 따르면 산국 정유는 *S. mutans*의 biofilm 형성을 억제하며, 주요성분 중 하나로 α-pinene이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다 [26]. 본 연구에서는 산국 정유의 주성분인 α-pinene이 *S. mutans*의 성장과 산 생성 억제효과, biofilm 형성 억제효과 및 인공치아에 대한 *S. mutans* biofilm 억제효과 및 살균 효과를 연구하여 치아우식 활성억제에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

항균 효능을 측정하기 위하여 α-pinene을 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도로 사용하여 *S. mutans*에 대한 성장억제효과를 관찰한 결과 대조군에 비하여 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml 농도에서 각각 21.7%, 29.1%, 70.4%, 100% 의 성장억제 효과를 나타내었다. α-Pinene은 침엽수와 많은 다른 식물의 정유에서 발견되는 monoterpene 화합물로 [31], 선행연구에 따르면 pinene을 함유한 식물의 정유는 항균 효과를 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다 [32,33]. α-Pinene의 생물학적 활성으로는 살균, 살충, 항산화 및 진정 작용이 있는 것으로 알려져 있고, 다른 pinene과의 상승 작용을 하는 기능이 있음이 밝혀졌다 [34]. 또한 pinene을 함유한 허브의 정유에 대한 일부 연구에서는 항염증 효능이 밝혀지기도 하였다 [35,36].

본 실험에서 α-pinene이 *S. mutans*의 유기산 생성을 억제하는지 실험한 결과 α-pinene을 넣지 않은 대조군에서는 세균배양전 pH가 7.37±0.01로 중성 pH를 유지하였으나, 세균배양 후 pH가 5.49±0.015까지 하락하였다. α-Pinene 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml 농도에서 배양한 후 pH가 각각 5.48±0.006, 5.59±0.05, 6.92±0.017, 7.37±0.006으로, 0.25 mg/ml 농도 이상에서는 pH 하락이 억제되었다. 치아우식증을 유발하는 원인 중 하나인 *S. mutans*는 산생성능과 치면 부착능력이 뛰어난 균으로, 치면세균막 내 *S. mutans*는 당을 대사하여 유기산을 형성함으로서 치아의 경조직을 파괴하는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서는 α-pinene의 농도가 증가함에 따라 pH 하락이 억제되는 결과를 얻었다. 이러한 실험결과로 α-pinene이 *S. mutans*에 의한 유기산 생성을 억제하여 치아우식증에 억제효과를 나타낼 수 있음을 추정할 수 있다.

α-Pinene을 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도별로 처리하고, *S. mutans* biofilm 형성을 관찰한 결과, 대조군에서는 *S. mutans* biofilm이 많이 형성된 것을 볼 수 있었으나, α-pinene의 농도가 높아질수록 *S. mutans* biofilm 형성이 억제됨을 확인할 수 있었다. 특히 0.5 mg/ml 농도에서는 0.05%의 chlorohexidine과 비슷한 효과를 나타냄을 관찰할 수 있었으며, 각 농도별 α-pinene으로 *S. mutans*가 인공치 표면에 형성하는 biofilm 형성 억제능력을 측정해 본 결과, 대조군에 비하여 α-pinene의 농도가 높아질수록 *S. mutans* biofilm 형성을 억제함을 관찰할 수 있었다. SEM을 이용하여 관찰한 결과도 비슷하였는데 0.1 mg/ml 이상의 농도에서는 biofilm형성이 현저하게 억제되었음을 볼 수 있었다. 구강내 biofilm의 한 종류인 치면세균막은 가장 자주 발생하는 구강 질환인 치아우식증 및 치주질환의 일차적인 원인이 된다. 미생물에 의한 biofilm은 복잡한 세균 집단이며 인체와 환경에서 흔하게 나타난다 [37-39]. 본 연구에서 α-pinene이 dental biofilm 형성에 미치는 영향을 측정한 결과 α-pinene이 *S. mutans*에 의한 치아의 biofilm 형성 억제에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 식물유래 정유는 각종 세균, 곰팡이, 바이러스 등의 감염 방지와 성장억제제로 사용되어 왔고 [40], 정유의 치면세균막 억제 항균효과에 대한 연구가 다수 수행 되었다 [41,42]. 식물유래 정유가 치면세균막의 생성을 억제하는 기전은 세균의 세포벽을 파괴하여 효소 활성을 방해하고 세균의 군집을 막아서 치면세균막의 양을 감소 시키는 것으로 보고된 바 있다 [43,44]. Listerine® (Johnson & Johnson, New Jersey, USA)은 정유를 주성분으로 하는 대표적인 항균 구강세정액으로 상품화되어 판매되고 있고 [45], 오렌지 정유 또한 *S. mutans*의 성장을 저해하여 치아우식증을 예방한다는 보고가 있다 [46].

CLSM을 이용하여 α-pinene의 살균효능을 측정한 결과 α-pinene을 첨가한 농도가 높아질수록 살아있는 세균(green color; SYTO stain)에 비하여 죽어있는 세균(red color; PI stain)이 증가하는 것이 관찰되어 α-pinene이 살균효과가 있다는 것이 밝혀졌으며, 4 mg/ml농도 이상에서는 거의 모든 세균이 살균되는 것으로 확인되었다. PI는 적색 형광염료로 손상된 세포막을 가진 세균에만 침투하여 DNA를 염색시키는 특징이 있어 죽은 세포만을 염색시키는 것으로 알려져 있으며, SYTO는 녹색 형광염료로 살아있는 모든 세포내 핵산에 결합하여 형광을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 PI와 SYTO의 이중염색은 살아있는 세포와 죽은 세포를 구분하여 세균의 살균효능을 측정하는데 유용하게 사용되고 있다. 대조군에서는 주로 SYTO에 의해서만 염색이 일어나 녹색형광이 주로 관찰되나 α-pinene의 농도가 높아질수록 죽은 세균수가 증가되면서 적색형광이 증가 하는 것을 관찰함으로서 살균효능이 증가됨을 알 수 있었다 [47].

이상의 결과를 토대로 하여 볼 때, α-pinene이 *S. mutans*의 성장, 유기산의 생성, biofilm 형성을 억제하며, 살균효능을 보여 α-pinene이 비교적 높은 우식활성 억제 효능을

가지고 있는 것으로 판단되며 치아우식증에 대한 억제물질로써 사용될 수 있는 가능성을 기대할 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

Conflict of interest

The author's declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this work.

References

1. Nakagawa M. Evaluation of aroma therapeutic odor compounds on human biological reacition and its application. Aroma Res. 2000;1:30-36.
2. Kohlert C, van Rensen I, März R, Schindler G, Graefe EU, Veit M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. Planta Med. 2000;66:495-505. doi:10.1055/s-2000-8616.
3. Lee, SY, Kim, JG, Baik, BJ, Yang YM, Lee KY, Lee YH, Kim MA. Antimicrobial effect of essential oils on oral bacteria. J Korean Acad Pediatr Dent. 2009;36:1-11.
4. Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. Biotypes of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalisisolates*. J Med Vet Mycol. 1986;24:81-84.
5. Lee DH, Seo BR, Kim HY, Gum GC, Yu HH, You HK, Kang TH, You YO. Inhibitory effect of *Aralia continentalis* on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. J Ethnopharmcol. 2011;137:979-984. doi: 10.1016/j.jep.2011.07.015.
6. Park YN, Jeong SS, Zeng J, Kim, SH, Hong SJ, Ohk SH, Choi CH. Anti-cariogenic effects of erythritol on growth and adhesion of *Streptococcus mutans*. Food Sci Biotechnol. 2014;23:1587-1591. doi: 10.1007/s10068-014-0215-0.
7. Jeong Sl, Lee Sb, Moon HD, Ra JY, Lee KH, You YO. Inhibitory effect of continetalic acid from *Aralia continentalis* on *Streptococcus mutans* biofilm. Int J Oral Biol. 2012;31:177-184.
8. 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;2013:1-9. doi: 10.1155/2013/160592.
9. Lee SY, Kim JG, Baik BJ, Yang YM, Lee KY, Lee YH, Kim MA. Antimicrobial effect of essential oils on oral bacteria. J Korean Acad Pediatr Dent. 2009;36:1-11.
10. Lee KH, Kim BS, Keum KS, Yu HH, Kim YH, Chang BS, Ra JY, Moon HD, Seo BR, Choi NY, You YO. Essential oil of *Curcuma longa* inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation. J Food Sci. 2011;7:226-230. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02427.x.
11. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001 ;183:3770-3783. doi: 10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001.
12. Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol. 1998;13:195-216. doi:10.1111/j.1399-302x.1998.tb00698.x.
13. Julia D, Hooper SJ, Wilson MJ, Wade WG. *Prevotella histicola* sp. nov., isolated from the human oral cavity. Int J Syst Evol Microbiol. 2008;58:1788-1791. doi:10.1099/ijs.0.65656-0.
14. Rozen R, Bachrach G, Bronshtetyn M, Gedalia I, Steinberg D. The role of fructans on dental biofilm by *Streptococcus sobrinus, Streptococcus mutans, Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. FEMS Microbial Lett. 2001;195: 205-210. doi:https;//doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10522.x.
15. Jang SI, Lee HO, Kim KJ. Oral immunity. Iksan: daehaksa; 1988.
16. Kim JB, Choi YJ. Public oral health. Seoul: komoonsa; 1991.
17. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. Pol J Microbiol. 2014;63:127-135.
18. Fears KP, Gonzalez-Begne M, Love CT, Day DE, Koo H. Surface-induced change in the conformation and glucan production of glucosyl transferase adsorbed on saliva-coated hydroxy apatite. Langmuir. 2015;31:4654-4662. doi:10.1021/la504461h.
19. Hur SA. The vaccine against dental caries [dissertation]. Gwangju:Chonnam National University; 2010.
20. Kim KJ, Park BI, Min JH, Chae MS, Lim JY, Son HJ, Lee GH, An SY, Jeon BH, Choi NY, You YO. Inhibitory effect of *Galla chinensis* extract on cariogenic propeties of *Streptococcus mutans*. J Physiol & Pathol Korean Med. 2015;29:189-194.
21. Jung JY, Kim JH, Choi YH, Song GB. Comparison of virulence in xylitol-resistant mutans streptococci exposed to various carbohydrates. J Korean Acad Oral Health. 2011; 35:1-9.
22. Go GS, Kim MS. Coloured medicinal plants of Korea. Seoul: Academy Publishing Co Ltd;1990.
23. Kim TS. Wildgrass to be like medication. Seoul: Daewon Publishing Co Ltd; 1989.
24. Jang DS, Yang MS, Park KH. Sesquiterpene lactone from *Hemisteptia lyrata*. Planta Med. 1998;64:289-90. doi:10.1055/s-2006-957436.
25. Jang DS, Park KH, Choi SO, Nam SH, Yang MS. Antibacterial substances of the flower of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum Kitamura*. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol. 1997;40:85-88.
26. Kim BS, Park SJ, Kim MK, Kim YH, Lee SB, Lee KH, Choi NY, Lee YR, Lee YE, You YO. Inhibitory effects of *Chrysanthemum boreale* essential oil on biofilm formation and virulence factor expression of *Streptococcus mutans*.

Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:616309. doi: 10.1155/2015/616309.
27. Oda Y, Hayashi F, Wakita A, Nagatani Y, Okada M. Five-year longitudinal study of dental caries risk associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in individuals with intellectual disabilities. J Oral Sci. J-Stage. 2016;16-0325. doi.org/10.2334/josnusd.16-0325.
28. Okada M, Kawamura M, Oda Y, Yasuda R, Kojima T, Kurihara H. Caries prevalence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in japanese schoolchildren. Int J Paediatr Dent. 2012;22:342-348. doi:10.1111/j1365-263x.2011.01203.x.
29. Shahidi F. Antioxidants in food and food antioxidants. Nahrung. 2000;44:158-163. doi:10.1002/1521-3803(20000501)44;3<158::AID-FOOD 158>3.0.co;2-L.
30. Ghasemi Y, Faridi P, Mehregan I, Mohagheghzadeh A. *Ferula gummosa* fruits: an aromatic antimicrobial agent. Chem Nat Comp. 2005;41:311-314.
31. Lee JH, Lee BK, Kim JH, Lee SH, Hong SK. Comparison of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from three conifer trees; *Pinus densiflora, Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obusa*. J Microbiol Biotechnol. 2009;19:391-396. PMID: 19420996.
32. Hong EJ, Na KJ, Choi IG, Choi KC, Jeung EB. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. Biol Pharm Bull. 2004;27:863-866. http://doi.org/10.1248/bpb.27.863.
33. Kim DS, Lee HJ, Jeon YD, Han YH, Kee JY, Kim HY, Shin HJ, Kang JW, Lee BS, Kim SH, Kim SJ, Park SH, Choi BM, Park SJ, Um JY, Hong SH. Alpha-pinene exhibits anti-Inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF-κB pathway in mouse peritoneal macrophages. Am J Chin Med. 2015;43:731-742. http://dx.dor.org/10.1142/s0192415x15500457.
34. Mercier B, Prost J, Prost M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (alpha-and beta-pinenes): A review. Int J Occup Med Environ Health. 2009;22:331-342. doi: 10.2478/v10001-009-0032-5.
35. El-Readi MZ, Eid HH, Ashour ML, Eid SY, Labib RM, Sporer F, Wink M. Variations of the chemical composition and bioactivity of essential oils from leaves and stems of *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae). J Pharm Pharmacol. 2013;65: 1653-1663. doi:10.1111/jphp.12/42.
36. Popović V, Petrović S, Tomić M, Stepanović-Petrović R, Micov A, Pavlović-Drobac M, Couladis M and Niketić M. Antinociceptive and anti-edematous activities of the essential oils of two Balkan endemic Laserpitium species. Nat Prod Commun. 2014;9:125-128.
37. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol. 2000;1994; 5:78-111.doi:10.1111/j.1600-0757.1994.tb00020.x.
38. Page RC. The etiology and pathogenesis of periodontitis. Compend Contin Educ Dent. 2002;23:11-14. PMID:12789963.
39. Gamboa F, Estupinan M, Galindo A. Presence of *Streptococcus mutans* in saliva and its relationship with dental caries: antimicrobial susceptibility of the isolates. Univ Sci. 2004; 9:23-27.
40. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils- A review. Food Chem Toxicol. 2008;46:446-475. http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106.
41. Lee SY, Kim JK, Baek BJ, Yang YM, Lee KY, Lee YH, Kim MA. Antibacterial effect of essential oils on oral bacteria. J Korean Acad Pediatr Dent. 2009;36:1-11.
42. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19:61-64. doi:10.1046/j.0902-0055.2003.00111.x.
43. Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. Oral Microbiol Immunol 1994;9:202-208. doi:10.1111/j.1399-302x.1994.tb00059.x.
44. Ouhayoun JP. Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouth wash. J Clin Periodontol. 2003;30:10-12. doi:10.1034/j.1600-051x.30.s5.4.x.
45. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. J Clin Periodontol. 2004;31:878-884. doi:10.1111/j.1600-051x.2004.000578.x.
46. Kim SY, Kim HN, Jun EJ, Kim JB, Jeong SH. The growth inhibitory effect of some vegetable oils on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*. J Korean Acad Oral Health. 2016;40:24-30. doi.org/10.11149/jkaoh.2016.40.1.24.
47. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 2008;72:157-165. http://dx.doi.org/10.1016/j.minet2007.11.010.