

구취를 유발하는 혐기성 세균의 증식을 억제하는 유산 간균의 분리 및 동정

김미형, 김선미¹

광주보건대학 치위생과, 전남대학교 치과대학 소아치과학교실¹

색인: 구취, 혐기성세균, 유산 간균, 동정

1. 서 론

구취(halitosus)는 구강이나 비강, 상기도 및 소화기 상부에서 유래하는 냄새로서 사회생활에서 중요한 문제로 대두되고 있다. 구취유발 조건의 약 90%는 치아우식증, 설태, 불량보철물, 치주질환 등 구강 내 원인이며, 나머지 약 10%는 호흡기, 소화기, 내과적 질환 및 정신심리적 원인 등 구강 외 원인으로 추정된다¹⁾.

최근 구강건강에 대한 관심이 증대되면서 구강병의 예방과 치료뿐만 아니라 구취의 원인과 제거방법에 관한 다양한 연구들이 활발하게 수행되고 있다²⁻³⁾. Morris 등⁴⁾과 Tonzetich 등⁵⁾은 각각 치면세마와 잇솔질에 의한 구취억제 효과를 측정 보고하였으며, 대부분의 구취는 타액분비의 감소 및 황화합물을 생성하는 혐기성 세균과 밀접한 관련이 있고, 항균성분이 구취제거에 효과가 있음이 보고되었다. 구취의 주요 성

분은 황화수소(hydrogen sulfide)나 메틸머캡탄(methylmercaptan)이며, 이러한 휘발성 황화합물은 메치오닌, 시스테인, 시스틴과 같은 아미노산을 갖고 있는 단백질로부터 생성된다⁶⁾. Kleinberg와 Codipilly⁷⁾는 12종의 그람음성 세균과 13종의 그람양성 세균이 구취를 발생시키는 기질로 아미노산을 사용한다고 보고하였으며 주요한 구취 생성균으로는 *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella alcalescens*, *Prevotella loeschii*, *Treponema denticola* 등과 같은 혐기성 그람음성 세균들로 밝혀졌다.

본 연구에서 분리한 유산간균은 과산화수소를 분비하는 성질을 가지고 있다. Smith 등⁸⁾은 타액과 치아우식증에 대한 유산간균의 연구에서 거의 모든 유산간균이 박테리오신(bacteriocin)을 생성하고, 여성의 질 내에 상재하는 유산간균은 과산화수소를 분비하여 항균력을 가

지고 있으며, 병원체와 결합력이 높아 내독소의 활성을 억제하는 것으로 보고하였다⁹⁻¹⁰⁾.

과산화수소는 포유동물의 세포에 손상을 줄 수 있으나¹¹⁾, 구강미생물에 의해 생성되는 과산화수소의 양은 매우 적어 구강점막에 손상을 거의 주지 않는다¹²⁾. 그러나 구강내 혐기성 세균은 발생기 산소를 방출하는 과산화수소에 매우 예민하므로 과산화수소에 의하여 억제될 뿐만 아니라¹³⁻¹⁴⁾, 과산화수소의 산소분자가 거품으로 방출되면서 치태와 음식물 잔사들을 제거하는 기계적 효과와 그 자체로서의 항균효과 그리고 국소조직 손상부위에 산소를 공급함으로써 화학적 조직 치유 작용 등과 함께 구취의 치료에도 이용되고 있다¹⁵⁾.

구취 억제는 구강내 혐기성 세균의 증식을 억제하는 것이 가장 효과적이므로 분리균주가 구취와 치주질환을 유발시키는 원인균으로 지목되고 있는 혐기성 그람 음성 세균인 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*에 작용하여 발생기 산소를 방출하는 과산화수소를 분비함으로써 휘발성 황화합물의 생성에 영향을 줄 것으로 사료된다.

본 연구는 소아의 타액에서 과산화수소를 분비하는 유산균 2주를 분리하여 구취와 치주질환을 유발하는 원인균으로 지목되고 있는 혐기성 세균과의 관계를 파악하며, 분리균주의 생화학적 성질을 탄수화물 발효실험을 통한 동정을 실시하여, 치주질환 및 구취를 예방하기 위한 항균제의 연구개발에 기여하고자 실시하였다.

2. 연구대상 및 방법

2.1 공시세균 및 배양

사용 균주로 *Porphyromonas gingivalis*(ATCC, Rockville, MA, USA)와 *Fusobacterium nuclea-*

tum(ATCC, Rockville, MA, USA)을 공시하였으며, 배양은 동결건조로 보관중인 *Porphyromonas gingivalis*는 Pg broth(1/2 BHI, 0.5% yeast extract, 5 µg/ml hemin, 1 µg/ml Vit. K₁)에 *Fusobacterium nucleatum*은 Fn broth(BHI, 1% yeast extract, 5 µg/ml hemin, 1 µg/ml Vit. K₁)에 접종하여 37°C에서 배양하였다.

2.2 유산균의 분리 및 동정

광주지역 유치원 아동의 타액을 채취하여 유산균 분리용 배지인 Rogosa 한천배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 타액을 100배 희석하여 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후 집락을 취하였다. 이것을 다시 MRS 한천배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 접종, 배양하여 약 2,000주의 유산 간균을 분리하였다. MRS 액체배지에 분리균주를 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 다음, TMB(3, 3', 5, 5'-Tetramethyl Benzidine, 0.25 mg/ml)와 peroxidase(0.01 mg/ml)를 첨가한 MRS 한천배지에 유산균 배양액 3 µl씩 접종하여 호기성 배양기에서 배양시 파란색의 집락 형성 여부로 과산화수소 생성 여부를 검사하였으며, 과산화수소를 분비하는 유산 간균 2주를 최종적으로 분리하였다. 분리균주 2주는 MRS 액체배지에 배양한 후 글리세롤의 최종농도가 20%(w/v) 되도록 첨가하여 -80°C에 냉동 보관하면서 필요에 따라 접종, 배양하여 실험에 사용하였다. 분리균주는 그람염색을 실시하고 카탈라아제 시험(catalase test)은 MRS 한천배지에 분리균주를 접종하여 37°C에서 1일 배양한 후 3% 과산화수소를 가할 때 기포 발생 여부로 판정하였다. 배양온도에 대한 영향을 알기 위하여 MRS 한천배지에 분리균주를 접종하여 15°C와 45°C에서 각각 배양한 후 분리균주의 증식 여부를 관찰하였다. 유산 발효형태를 구별

하기 위하여 분리균주를 MRS 액체배지에 24시간 배양한 후 배양액을 흔들지 않은 상태에서 백금이를 화염에 달구어 배양액에 넣었다가 꺼낼 때 기포가 생기면 탄산가스가 녹아 있기 때문에 이중발효로 판정하고 기포가 생기지 않으면 동중발효로 판정하였다.

2.3 분리균주와 혐기성 세균의 결합실험

혐기성 세균인 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*가 분리균주와의 결합 정도를 보기 위하여 *Fusobacterium nucleatum*은 Fn broth에서 *Porphyromonas gingivalis*는 Pg broth에서 1일간 배양하고 유산균은 MRS 액체 배지에서 18시간 배양한 후 원심하여 (6,000 rpm, 10 min, 4°C) 0.85% 식염수에 1회 세척한 후 부유하였다. 시험관에 세균 부유액 1 ml씩을 단독 또는 혼합으로 10초간 혼합하고 37°C, 110 rpm으로 30분간 진탕한 후 3분간 실온에 방치하였다. 상청액 0.5 ml를 취하여 분광광도계(spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan) 660 nm 파장에서 흡광도(optical density)를 측정하여 분리균주와 혐기성 세균과의 상호 결합 정도를 계산하는데 이용하였다. 각 균주의 자가결합 정도는 30분간 진탕한 후 흡광도 수치를 진탕 전의 흡광도 수치로 나눈 값을 1에서 뺀 다음, 100을 곱해 준 값을 퍼센트로 표시하였다. 두 균주의 상호결합 정도는 각 균주의 흡광도 평균값에서 두 균주의 혼합 부유액의 흡광도 수치를 뺀 다음, 각 균주의 흡광도 평균값으로 나누어 100을 곱해 준 값을 퍼센트로 표시하였다.

2.4 혐기성 세균에 의한 휘발성 황화합물 생성에 대한 분리균주의 억제 실험

*Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*에 의한 휘발성 황화합물의 생성 정

도를 액체배지에서 생성된 FeS 농도를 분광광도계로 측정하였다. *Fusobacterium nucleatum*은 Fn broth에서, *Porphyromonas gingivalis*는 Pg broth에서 1일간 배양하고 유산균은 MRS 액체 배지에 18시간 배양한 후 원심하여 0.85% 식염수에 1회 세척한 후 부유하였다. 시험관에 세균 부유액을 1 ml씩 단독 또는 혼합으로 37°C, 110 rpm으로 30분간 진탕하였다. 상청액 1 ml를 버리고 남은 침전물 1 ml에 0.1% cysteine, 0.1M MES, 0.2% FeSO₄를 가한 Fn broth 또는 Pg broth 2 ml를 가하여 1일간 혐기성 상태에서 배양한 다음, 배지 내의 FeS 농도를 알기 위하여 분광광도계 700 nm에서 배지 흡광도를 측정하였으며 실험을 3번 반복한 후 평균을 산출하였다.

2.5 분리균주의 탄수화물 발효검사

탄수화물 발효검사는 API 50 CHL medium kit(bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하였다. 약술하면, 분리균주 배양액 50 µl를 5 ml MRS 액체배지에 접종하여 하룻밤 배양한 다음, 약 3,500 rpm에서 10분간 원심하고 5 ml PBS buffer로 침전물을 세척하고 다시 약 3,500 rpm에서 10분간 원심하였다. 멸균수 2 ml로 현탁시킨 후 시험관에 5 ml 멸균수에 현탁액을 100 µl씩 떨어뜨려 McFarland Standard 2 농도보다 약간 진한 농도로 맞추어 그 2배(약 400 µl)를 API 50 CHL medium 10 ml에 접종하여 섞고 API 50 CH strips에 150 µl씩 가하고 mineral oil을 첨가하였다. 증류수를 넣은 판에 10 strip을 5개씩 넣은 후 뚜껑을 닫고 37°C에서 호기 배양하면서 24시간, 48시간 배양한 후 결과를 판독하였다. 탄수화물이 발효되어 산이 생성되면 배지에 포함되어 있는 bromocresol purple에 의해 배지가 노란색으로 변하고, esculin이 보라색에서 검은색으로 변하면 양성

으로 판정하였다. 검사결과는 동정 프로그램인 APILAB plus로 분석하였다.

3. 연구성적

3.1 분리균주의 동정

분리균주 2주 모두 MRS 한천배지상에서 작은 백색의 집락을 만들었다. 분리균주들은 과산화수소를 생성하여 TMB와 peroxidase를 첨가한 MRS 한천배지에서 파랑색의 집락을 형성하였다. 분리균주들은 그람양성 간균으로 카탈라아제 음성이었으며, 15°C에서 증식하지 못하였으나 45°C에서는 증식하였다. 분리균주 모두 이종발효하였다.

3.2 분리균주와 혐기성 세균과의 상호결합

Lactobacillus 1의 단독 부유시 660 nm에서 상청액 흡광도가 2.358에서 30분간 진탕한 후

0.494로 감소하여 자가결합 정도가 79.1%이었으며, *Lactobacillus* 2의 단독 부유시에는 상청액 흡광도가 2.376에서 30분간 진탕한 후 1.070으로 감소하여 자가결합 정도가 55.0%이었다. *Fusobacterium nucleatum*의 단독 부유시에는 상청액 흡광도가 1.626에서 30분간 진탕한 후 1.286으로 감소하여 자가결합 정도가 21.0%이었으며, *Porphyromonas gingivalis*의 단독 부유시에는 상청액 흡광도가 1.070에서 30분간 진탕한 후 0.995로 감소하여 자가결합 정도가 7.1%이었다. *Lactobacillus* 1과 *Fusobacterium nucleatum*과의 혼합 부유시에는 30분간 진탕한 후 상청액 흡광도가 0.628로 감소하여 상호결합 정도가 29.4%이었으며, *Lactobacillus* 2와 *Fusobacterium nucleatum*과의 혼합 부유시에는 30분간 진탕한 후 상청액 흡광도가 0.497로 감소하여 상호결합 정도가 57.8%이었다. *Lactobacillus* 1과 *Porphyromonas gingivalis*와의 혼합 부유시에는 30분간 진탕한 후 상청액 흡광도는 1.034이었으

표 1. 분리균주(*Lactobacilli*)와 *Fusobacterium nucleatum*과의 상호결합

Tested bacterial strains	Optical density at 660 nm		Autoaggregation(%)	Coaggregation(%)
	0 min	30 min		
<i>Lactobacillus</i> 1	2.358	0.494	79.1	■
<i>Lactobacillus</i> 2	2.376	1.070	55.0	■
<i>F. nucleatum</i>	1.626	1.286	21.0	■
<i>Lactobacillus</i> 1 + <i>F. nucleatum</i>		0.628		29.4
<i>Lactobacillus</i> 2 + <i>F. nucleatum</i>		0.497		57.8

표 2. 분리균주(*Lactobacilli*)와 *Porphyromonas gingivalis*와의 상호결합

Tested bacterial strains	Optical density at 660 nm		Autoaggregation(%)	Coaggregation(%)
	0 min	30 min		
<i>Lactobacillus</i> 1	2.358	0.494	79.1	■
<i>Lactobacillus</i> 2	2.376	1.070	55.0	■
<i>P. gingivalis</i>	1.070	0.995	7.1	■
<i>Lactobacillus</i> 1 + <i>P. gingivalis</i>		1.034		■
<i>Lactobacillus</i> 2 + <i>P. gingivalis</i>		1.295		■

표 3. *Fusobacterium nucleatum*의 휘발성 황화합물 생성에 대한 분리균주(*Lactobacilli*)의 억제

Tested bacterial strains	Optical density at 700 nm	Color of cultured solution
<i>F. nucleatum</i>	1.794	Black
<i>Lactobacillus</i> 1 + <i>F. nucleatum</i>	1.144	Blackless
<i>Lactobacillus</i> 2 + <i>F. nucleatum</i>	0.915	Blackless

표 4. *Porphyromonas gingivalis*의 휘발성 황화합물 생성에 대한 분리균주(*Lactobacilli*)의 억제

Tested bacterial strains	Optical density at 700 nm	Color of cultured solution
<i>P. gingivalis</i>	1.932	Black
<i>Lactobacillus</i> 1 + <i>P. gingivalis</i>	1.170	Blackless
<i>Lactobacillus</i> 2 + <i>P. gingivalis</i>	1.266	Blackless

며, *Lactobacillus* 2와 *Porphyromonas gingivalis*의 혼합 부유시에는 30분간 진탕 후 상청액 흡광도가 1.295이었다<표 1, 2>.

3.3 혐기성 세균의 휘발성 황화합물 생성에 대한 분리균주의 억제

*Fusobacterium nucleatum*의 단독 배양시 침전물에 cysteine과 FeSO_4 를 첨가한 배지를 가하고 1일간 배양한 후 배지는 검정색으로 나타났으며 흡광도가 1.794이었고, *Porphyromonas gingivalis*의 단독 배양시 침전물에 배지를 가하고 1일간 배양한 후의 배지도 검정색으로 나타났으며 흡광도는 1.932이었다. *Lactobacillus* 1과 *Fusobacterium nucleatum*과의 혼합 배양시 침전물에 배지를 가하고 1일간 배양한 후의 배지는 검정색으로 변화하지 않았으며 흡광도는 1.144이었고, *Lactobacillus* 2와 *Fusobacterium nucleatum*과의 혼합 배양시 침전물에서도 배지는 검정색으로 변화하지 않았으며 흡광도는 0.915이었다. *Lactobacillus* 1 및 *Lactobacillus* 2와 *Porphyromonas gingivalis*와의 혼합 배양시 침전물에 배지를 가하고 1일간 배양한 후의 배지는 검정색으로 변화하지 않았으며 흡광도는 각각 1.170과 1.266이었다<표 3, 4>.

표 5-1. 분리균주(*Lactobacilli*)의 탄수화물 발효검사

Carbohydrates	<i>Lactobacillus</i> 1	<i>Lactobacillus</i> 2
Glycerol	-	-
Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	-	-
Ribose	-	-
D-Xylose	-	-
L-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
β Methyl-D-xyloside	-	-
Galactose	+	-
Glucose	+	+
Fructose	+	+
Mannose	+	+
Sorbose	-	-
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
Mannitol	+	+
Sorbitol	+	-
α -Methyl-D-mannoside	-	-
α -Methyl-D-glucoside	-	-
N-Acetyl-glucosamine	+	+
Amygdalin	-	-
Arbutin	-	-
Esculin	-	-

3.4 분리균주의 탄수화물 발효검사

탄수화물 발효검사 결과, *Lactobacillus* 1은 galactose, glucose, fructose, mannose, mannitol, sorbitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, raffinose를 분해하였고, *Lactobacillus* 2는 glucose, fructose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, lactose, sucrose, trehalose, xylitol, D-arabitol을 분해하였다(표 5-1, 5-2).

표 5-2. 분리균주(*Lactobacillus*)의 탄수화물 발효검사

Carbohydrates	<i>Lactobacillus</i> 1	<i>Lactobacillus</i> 2
Salicin	-	-
Cellobiose	-	-
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Melibiose	+	-
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+
Inulin	-	-
Melezitose	-	-
Raffinose	+	-
Starch	-	-
Glycogen	-	-
Xylitol	-	+
Gentiobiose	-	-
D-Turanose	-	-
D-Lyxose	-	-
D-Tagatose	-	-
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	+
L-Arabitol	-	-
Gluconate	-	-
2-Keto-gluconate	-	-
5-Keto-gluconate	-	-

이상의 성적을 API 50 CHL medium kit의 동정 프로그램인 APILAB plus로 판독한 결과, *Lactobacillus* 1은 *Lactobacillus salivarius*(가능성 99.9%), *Lactobacillus* 2는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*(가능성 68.4%), *Aerococcus viridans*(가능성 20.8%), *Leuconostoc lactis*(가능성 6.9%), *Lactobacillus salivarius*(가능성 2.9%)로 판정되었다(표 6).

표 6. API 50 CHL medium kit와 APILAB plus program을 이용한 분리균주(*Lactobacillus*)의 동정

Isolated lactobacilli	Possible name of isolates (Possibility percent)
<i>Lactobacillus</i> 1	<i>Lactobacillus salivarius</i> (99.9%)
<i>Lactobacillus</i> 2	<i>Lactobacillus delbrueckii lactis</i> (68.4%), <i>Aerococcus viridans</i> (20.8%), <i>Leuconostoc lactis</i> (6.9%), <i>Lactobacillus salivarius</i> (2.9%)

4. 증결 및 고안

구강에는 구취발생에 영향을 미치는 여러 인자들이 존재한다. 단백질과 탄수화물 같은 영양물질과 pH의 변화가 혐기성 세균의 구취 발생에 영향을 미칠 수 있으며, 타액의 양이나 치태의 유무, 그리고 치태를 형성하는데 관여하는 *Streptococcus mutans*도 영향을 미칠 것이다. 타액은 아미노산으로 가수분해되기 쉬운 단백질을 많이 함유하고 있어 구취 발생에 중요한 공급원이 되며, 특히 혀는 그 해부학적 특수성으로 인해 설태의 침착을 용이하게 하고 혐기성 세균의 증식처가 된다¹⁶⁻¹⁸⁾.

구취는 주로 혀에 존재하는 미생물에서 기인하며, 80가지 이상의 구강세균이 치은연하 치면세균막에 존재하고, 이 세균들은 *in vitro*에서도

취발성 황화합물이나 구취 유발성 지방산을 생성할 수 있는 것으로 보고되었다¹⁹⁾. 치태형성 초기에는 주로 연쇄상 구균이나 유산 간균과 같은 호기성 그람양성 세균들이 많이 존재하지만, 치태가 수일 내에 제거되지 않고 계속 치면에 저류되어 있을 경우, 세균들의 증식과 대사 과정을 통하여 그 층은 더욱 두터워지며 외층에는 새로운 세균들이 계속 부착하게 된다. 그러므로 원래의 치태층은 산소가 부족하게 되어 혐기성 그람음성 세균들로 바뀌게 되고, 이러한 세균들에 의하여 구취가 유발되며 치아 주위조직에 위해작용을 가하여 치은염 및 치주질환을 유발하는 원인요소가 된다²⁰⁾.

우리 인체에는 의학적으로 유용한 기능을 갖는 세균들이 정상적으로 존재하는데, 구강에도 강산을 생성하거나 과산화수소를 분비는 다양한 유산균들이 상재한다²¹⁻²³⁾. 구취의 억제에는 취발성 황화합물을 생성하는 혐기성 세균의 증식을 억제하는 것이 가장 효과적이므로 본 연구에서는 과산화수소를 분비하는 유산간균 2주를 분리하여 혐기성 세균의 억제효과를 조사하였다. 본 연구에서처럼 과산화수소를 생성하는 유산간균과 취발성 황화합물을 생성하는 혐기성 세균이 상호결합되어, 두 종류의 세균이 긴밀하게 접촉하게 되면 유산간균에 의해 생성되는 소량의 과산화수소에 의해서도 혐기성 세균이 억제되기 때문에 구취가 현저히 감소될 것으로 생각되었다. 이러한 구강내 항세균 성분을 생성하는 세균의 작용은 구강환경의 균형을 파괴시키지 않으면서 효과를 지속적으로 발휘할 수 있어²⁴⁻²⁵⁾ 구강건강의 유지에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

표 1, 2에서 분리균주가 혐기성 세균인 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*에 상호결합하는 정도를 각각 흡광도로 측정된 결과, 분리균주는 이들과 상호결합을 하

였으며, 특히 *Fusobacterium nucleatum*과의 상호결합 정도가 높게 나타났다. 비록 *Porphyromonas gingivalis*와의 상호결합 정도는 *Fusobacterium nucleatum*과의 상호결합 정도에 비해 낮았으나, 분리균주와 *Porphyromonas gingivalis*의 혼합 배양시 30분간 진탕한 후의 상청액 흡광도가 각각의 상청액 흡광도의 합보다 감소되어 분리균주와 *Porphyromonas gingivalis*와의 상호결합이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*는 유황성분이 함유된 배지에서 배양할 때, 황화수소가 만들어져 철 성분과 결합하여 검정색의 침전물 즉 FeS를 생성하므로 분광광도계 700 nm 파장에서 배지의 흡광도를 측정하여 그 증식 정도를 간접적으로 파악할 수 있었다. *Fusobacterium nucleatum*이나 *Porphyromonas gingivalis*의 단독 배양시 배지 흡광도에 비하여 분리균주와의 혼합 배양시 배지 흡광도가 감소되었으며, 배지는 모두 검정색으로 변하지 않았다. 이것은 분리균주가 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*와 상호결합을 한 다음, 분리균주가 생성하는 과산화수소가 이들 세균의 증식을 억제함으로써 취발성 황화합물의 생성이 억제되고 FeS, 즉 검정색 침전물 생성이 감소되어 배지의 흡광도가 떨어진 것으로 사료된다.

본 연구에서 분리균주 2주를 탄수화물 발효로 검사하는 API 50 CHL medium kit로 동정 시험을 시행한 결과, *Lactobacillus salivarius*(가능성 99.9%)와 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*(가능성 68.4%)로 차이가 있음을 알 수 있었다. 종래 미생물을 동정하기 위하여 이용하던 배양이나 혈청학적 방법에 비교하여 미생물에 존재하는 고유한 유전자를 이용하여 동정하는 방법은 민감도와 정확성에 있어서 월등하기 때문에 최근에 세균으로부터 추출한 DNA에

rRNA 유전자 probe를 hybridization시킨 후 제한효소로 처리한 결과로 세균을 분류하기 시작하였다²⁶⁾. 그러므로 향후 최종적인 세균의 동정은 유전자 분석에 의해 이루어져야 될 것으로 사료된다.

본 연구에서 *Lactobacillius salivarius*와 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*가 과산화수소를 분비하여 혐기성 세균에 의한 휘발성 황화합물의 생성을 억제하는 효과가 있음이 확인되었으나, 이 연구의 결과가 사람의 구강에서도 동일하게 임상적으로 검증된다면 분리군주를 치주질환 및 구취의 예방과 치료를 위한 항균제로 개발하여 구강건강의 증진에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

5. 결 론

본 연구는 구취의 예방과 치료를 위한 Probiotic bacteria를 개발하여 구강건강 증진에 기여하고자 소아의 타액에서 유산균 2주를 분리하여 그 분리군주가 구취를 유발하는 혐기성 세균에 의한 휘발성 황화합물 생성을 억제하는 것을 확인하고, API 50 CHL medium kit를 이용한 생화학적 검사로 동정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리군주 2주는 그람양성 간균으로 과산화수소를 생성하였다.
2. *Fusobacterium nucleatum*을 30분간 진탕한 후 상청액 흡광도는 1.286이었으나, *Fusobacterium nucleatum*과 분리군주를 혼합으로 30분간 진탕한 후의 상청액 흡광도는 각각 0.628과 0.497로 감소하였으며, 상호결합 정도는 29.4%와 57.8%이었다.
3. *Fusobacterium nucleatum*의 단독 배양시 침전물에 Cysteine과 FeSO_4 를 첨가한 배지를

가할 때 배지는 검정색으로 나타났으며 침전물의 배지 흡광도는 1.794이었으나, 분리군주와 혼합 배양시에는 배지는 검정색으로 변화되지 않았으며 배지 흡광도가 각각 1.144와 0.915로 감소하였다.

4. *Porphyromonas gingivalis*의 단독 배양시 침전물에 Cysteine과 FeSO_4 를 첨가한 배지를 가할 때 배지는 검정색으로 나타났으며 침전물의 배지 흡광도는 1.932이었으나, 분리군주와 혼합 배양시에는 배지는 검정색으로 변화되지 않았으며 배지 흡광도가 각각 1.170과 1.266으로 감소하였다.
5. 분리군주 2주의 탄수화물 발효검사를 API 50 CHL medium kit로 검사한 결과, 분리군주 1주는 *Lactobacillus salivarius*로, 다른 군주는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*로 동정되었다.

참고문헌

1. Attia EL, Marshall KG. Halitosis. Can Med Assoc J 1982;1281-1285.
2. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol Scand 1964;22:221-235.
3. Dominic P, Allentown L. Halitosis an etiologic classification, a treatment approach and prevention. Oral surg 1982;54:521-529.
4. Morris PP, Read RR. Halitosis-variations in mouth and total breath odor intensity resulting from prophylaxis and antisepsis. J Dent Res 1949;28:324-333.

5. Tonzetich J. Reduction of malodor by oral cleaning procedure. *Oral Sur* 1976;42:172-181.
6. Tonzetich J. Production and origin of oral malodor. a review of mechanisms and methods of analysis. *J Periodontol* 1977;48:13-20.
7. Kleinberg I, Codipilly M. The biological basis of oral malodor formation. research perspective. 1st ed, Ramot Publishing 1995:13-39.
8. Smith Si, Aweh AJ, Coker AO. Lactobacilli in human dental caries and saliva. *Microbios* 2001;105:77-85.
9. Ocana VS, Pesce de Ruiz Holgado AA, Nader-Macias ME. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Curr Microbiol* 1999;38:279-284.
10. Willcox MD, Patrikakis M, Harty DW, et al. Coaggregation of oral lactobacilli with streptococci from the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:319-321.
11. Bradley MO, Erickson LC. Comparison of the effects of hydrogen peroxide and x-ray irradiation on toxicity, mutation, and DNA damage/repair in mammalian cells (V-79) *Biochim Biophys Acta* 1981;654:135-141.
12. Holmberg K, Hallander HO. Production of bactericidal concentrations of hydrogen peroxide by *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol* 1973;18:423-434.
13. Leke N, Grenier D, Goldner M, et al. Effects of hydrogen peroxide on growth and selected properties of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 1999;174:347-353.
14. Ohwada T, Shirakawa Y, Kusumoto M, et al. Susceptibility to hydrogen peroxide and catalase activity of root nodule bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:457-62.
15. Wennstrom J, Lindhe J. Effect of hydrogen peroxide on developing plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol* 1979;6:115-130.
16. Guggenheim B. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int Dent J*, 1970;20:657-678.
17. Babaahmady KG, Challacombe SJ, Marsh PD, et al. Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children. *Caries Res*, 1998;32:51-58.
18. 임희순. *Fusobacterium nucleatum*에 의해 생성되는 유황 화합물 검출 방법의 비교 및 억제물질의 효과 2002:전남대학교 대학원 박사학위논문.
19. Persson, S, Edlund, M-B, Claesson, R, and Carlsson, J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 1990;5:195-201.
20. 김종배, 백대일, 문혁수 등. *임상예방치학*. 3판. 서울: 2000;69-78.
21. Slots J, Taubman M, St. Louis. *Contemporary oral microbiology and immunology*. Mosby, 1992:377-424.
22. 김선미, 양규호, 정성수 등. *Streptococcus*

- oralis*의 인공치태 억제효과에 대한 연구. 대한소아치과 학회지, 1999;26:77-87.
23. Lumikari M, Soukka T, Nurmio S, et al. Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase system in human saliva. Arch Oral Biol, 1991;36:155-160.
24. Chung J, Ha ES, Park HR, et al. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. Oral Microbiol Immunol, 2004;19:214-216.
25. 김용덕. *Streptococcus mutans*의 류탄 생성을 억제하는 유산 간균의 동정. 2003:전남대학교 대학원 박사학위논문.
26. Grimont F, Grimont PAD. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1986;137B:165-175.

Abstract

Isolation and identification of *Lactobacillus* inhibiting the production of halitosis by anaerobic bacteria

Mi-Hyung Kim, Seon-Mi Kim¹

Department of Dental Hygiene, Gwang-Ju Health College,

¹College of Dentistry, Chonnam National University

Key words: Halitosis, Identification, Isolation, *Lactobacillus*

There are normal inhabitants doing medically useful functions in the body. There are many kinds of bacteria performing specific functions in the oral cavity. Two strains of lactic acid bacteria were isolated from normal inhabitants of children's oral cavity, which inhibited the the production of halitosis by anaerobic bacteria. The authors identified the isolates by the test using API 50 CHL medium kit.

1. Two isolates were Gram-positive bacilli and produced hydrogen peroxide.
2. The optical density was 1.286 in the supernatant of *Fusobacterium nucleatum* after vortexing for 30 minutes, whereas in the supernatant of combined *Fusobacterium nucleatum* and each isolate, they were reduced to 0.628 and 0.497, which the percentages of coaggregation between them were 29.4% and 57.8%, respectively.
3. The optical density of *Fusobacterium nucleatum* precipitate was 1.794 in the culture media containing cysteine and FeSO₄, being reduced to 1.144 and 0.915 in the coaggregated precipitates of *Fusobacterium nucleatum* and each isolate.
4. The optical density of *Porphyromonas gingivalis* precipitate was 1.932 in the culture media, being reduced to 1.170 and 1.266 in the coaggregated precipitates of *Porphyromonas gingivalis* and each isolate.
5. When two isolates were tested with API 50 CHL medium kit, those were identified as *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*.