



Journal of Korean Society of Dental Hygiene

Original Article **자당 및 탄산음료 섭취 후 생성되는 구강 내 치아우식 유발성 유기산의 농도 차이**

박정은 · 장종화¹

경희대학교 치과대학 예방/사회치과학교실 · ¹한서대학교 치위생학과

The concentration differences of dental caries induced organic acids which are produced after intake of sucrose and carbonated drinks

Received: 2 March 2017

Revised: 1 May 2017

Accepted: 2 May 2017

Jung-Eun Park · Jong-Hwa Jang¹

Department of Preventive and Social Dentistry, School of Dentistry, Kyung Hee University

¹Department of Dental Hygiene, Hanseo University

Corresponding Author: Jong-Hwa Jang, Department of Dental Hygiene Science, Hanseo University, 46 Hanseo 1-ro, Haemi-myun, Seosan, Chungcheongnam-do, 356-706, Korea, Tel: +82-41-660-1574, Fax: +82-41-660-1579, E-mail: jhjang@hanseo.ac.kr

ABSTRACT

Objectives: This study aims to evaluate carbonated drinks induced dental caries with qualitative analysis and to compare with oral organic acids including lactate, acetate, propionate, formate, butyrate, pyruvate and valerate which cause caries when taking either 10% sucrose drinks or carbonated drinks. **Methods:** Saliva was collected from six study subjects before and after (start, 5, 10, 30 minutes) taking water intake upon (A) 10% sucrose intake, (B) 10% sucrose intake, and (C) carbonated drink intake, then they were centrifuged at 1,200 rpm followed by removing bacteria and enzymes with syringe filtering, performing a qualitative analysis with HPLC conductivity detection (GP50 gradient pump, ED 50 detector) after saliva pre-treatment under isocratic 100 mM NaOH mobile phase. **Results:** Higher risk of dental caries was evaluated in order of C>B>A, with the results of total oral organic acids' concentration, lactates of organic acids and organic acids produced after 5 minutes from the 3 types of drinks intake. **Conclusions:** Carbonated beverages were estimated to develop higher dental caries induction than beverages containing 10% sucrose because of the high organic acid concentration in the mouth after its intake.

Key Words: Carbonated beverage, Dental caries, HPLC, Organic acid, Saliva

색인: HPLC, 유기산, 치아우식증, 타액, 탄산음료

서론

최근 경제수준의 향상과 식품산업의 발달, 생활의 변화에 일상생활 속에서 음료섭취는 증가 추세에 있다[1]. 세계보건기구(WHO)는 음료 중 탄산음료의 섭취가 곧 과도한 설탕 섭취로 이어져 체중 증가와 비만의 원인 및 만성질환에 대한 위험성을 높일 수 있음을 경고한 바 있다[2]. 당 음료를 포

함한 각종의 탄산음료는 당뇨병, 심혈관계 질환 등 전신적인 건강뿐만 아니라[3,4] 음료를 직접적으로 섭취하는 구강 내 환경을 변화시켜 치아우식 및 부식을 유발할 수 있다.

치아우식은 치아표면에 부착된 치면세균막을 형성하고 있는 우식 유발성 세균에 의하여 생성되는 유기산(organic acid)에 의하여 치아 경조직 중 칼슘과 인 성분이 용해되어 생기는 현상으로 발생하며[5-9], 치아부식은 구강 내 미생물과 관계없이 화학적 용해를 통하여 치아의 경조직이 손실되는 것을 의미한다[10].

특히 콜라나 사이다와 같은 탄산음료는 pH 2-3가량 되는 산성음료 및 고농도의 유기산과 당이 포함되어 있어 치아 경조직의 소실에 대한 문제가 제기되고 있다[11-13].

탄산음료 내에 첨가된 주요 산 화합물은 탄산 및 인산과 같은 무기산 이외에도 관능기로 COOH를 가지고 있는 저분자의 카르복실산이 존재하는데[14], 이 유기산은 치아의 경조직에 직접적인 접촉에 의하여 표면에 흡착하여 수산화인회석으로부터 칼슘 및 인을 용해시키는 작용을 한다[15,16]. 또한 다양한 음료 내에 포함된 유기산은 타타르산(tartaric acid), 아스코르브산(ascorbic acid) 및 구연산(citric acid) 등이 포함되어 있으며 탄산음료 내에는 그밖에 탄산(carbonic acid) 및 인산(phosphoric acid) 등이 포함되어 있어 pH 2-3 정도의 낮은 pH를 결정하게 된다. 또한 포도당(glucose), 과당(fructose) 및 자당(sucrose)와 같은 당의 함량은 약 80-90 g/L 정도로 검출된 바[13], 유기산과 당 성분으로 인하여 치아우식 및 부식의 유발 가능성은 기타의 다른 음료보다도 매우 높다고 볼 수 있다. 2차적으로 음료 내에 함유된 당성분에 의하여 구강 내 세균에 의한 발효과정을 거치게 되면 구강 내 세균에 의한 유기산이 생성되기 때문에 이로 인한 타액 pH 저하는 더욱 가속화 될 수 있다.

Keyes[17]는 치아우식의 원인 중 숙주요인에 해당하는 타액의 성분, 점조도, 완충작용 등 치아우식 유발에 큰 영향을 준다고 보고하여, 실제로 우식 유발성 음료를 섭취한 후 실제 구강 내에서 세균과 타액의 성분에 의해 생성되는 유기산에 대한 정량적인 평가가 필요하다고 볼 수 있다.

기존의 연구에서는 음료 내에 포함된 총 유기산과 당의 함량과 구강 내 pH를 측정하여 치아우식 유발성을 측정하는 연구가 선행되었다[18,19]. 그러나 실제로 탄산음료를 섭취한 후 구강 내 세균에 의해 생성되는 유기산을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC; high performance liquid chromatography)로 분석하여 각각의 유기산을 성분별로 정량분석을 실시한다면 보다 면밀하게 치아우식 유발성을 평가할 수 있을 것이다.

지금까지 유기산을 분석하기 위한 방법으로는 모세관 전기영동(CE) [20,21], HPLC-MS/MS [22,23], 가스 크로마토그래피-질량분석기(GC-MS) [24] 및 전도도검출기(conductivity detection) [25] 등이 이용되고 있다. 다양한 분석방법들 중에서도 타액 시료분석의 연구목적으로 비교적 경제적이면서도 목적 물질에 대한 선택성이 높은 검출방법인 전도도검출기를 활용하여 분리분석을 실시하였다.

본 연구에서는 10% sucrose를 포함한 음료와 시판중인 탄산음료를 섭취하였을 때 실제 구강 내에서 생성되는 치아우식 유발성 유기산(acetate, butyrate, formate, lactate, propionate, pyruvate, valerate)을 HPLC Conductivity detection을 이용하여 정량분석을 실시하고 결과적으로 탄산음료의 치아우식 유발능을 평가하고자 하였다.

연구방법

1. 연구재료

실험에 사용된 유기산 표준물질(acetate, butyrate, formate, lactate, propionate, pyruvate, valerate)과 분석에 사용된 이동상 NaOH 100 mM은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이동상 제조 및 표준물질 및 시료희석에 사용된 탈이온수($\geq 18 \text{ M}\Omega$)는 Millipore사(Bedford, MA, USA)의 MILLI-Q Water system을 이용하여 제조하였다.

2. 타액 채취

연구대상자는 치아우식증, 임플란트, 보철물, 당뇨병, 치은염 및 대사질환자를 제외한 건강한 성인 남녀 6명의 지원자를 대상으로 실시하였고 각 대상자마다 3종의 음료 섭취, 타액 채취 및 타액분석을 6회 반복 측정하였다. 본 연구는 단국대학교 연구윤리심의위원회의 심의를 거쳐 승인(No. 2016-09-005) 후 시행하였다. 연구대상자의 타액 채취는 2016년 12월 1일부터 15일까지 동일한 시간대에(오전 11시 경) 수집하였다. 30 mL의 sucrose 용액(10%, w/v) 섭취 후 30 mL의 생수섭취를 대조군 A음료, 30 mL의 sucrose 용액(10%, w/v)섭취를 대조군 B음료, 30 mL 탄산음료를 실험군 C음료라 지칭한다. 대조군으로 분류한 A와 B 음료의 조제는 3차 증류수 100 mL에 10 g의 sucrose를 전자저울로 정밀히 측정하여 실온에서 희석하여 사용하였다. 실험군 C음료는 액상과당, 백설탕, 인산이 포함된 355 mL에 당류 39 g이 함유된 탄산음료로서 시중에 판매되고 있는 음료를 사용하였다. 타액 채취는 3종의 음료를 섭취하기 전과 후의 타액을 수집하였으며, 연구 대상자는 음료섭취 및 타액 채취 1시간 이전에 칫솔질 및 구강위생용품 사용을 완료하였다. 각 음료를 일일 1회당 실험에 참가하여 타액을 채취하였다. 각 음료를 섭취하기 이전을 대조군으로 기준하였으며, 음료를 구강 내 60초간 머금게 한 뒤 뱉어내게 한 후부터 즉시, 5분, 10분 및 30분이 된 시점에서 비자극성 타액을 채취하여 각 타액을 control, 0, 5, 10 그리고 30분으로 설정하였다. 본 연구에 대한 설계 및 과정은 <Fig. 1>과 같다.

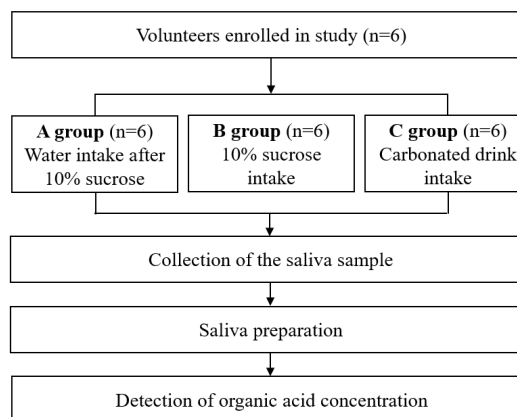


Fig. 1. Flow chart of study design

3. 타액 전처리

수집된 모든 타액 시료는 갈색용기에 수집하여 1,200 rpm으로 5분간 원심분리를 하였으며, 상층액을 증류수에 20배 희석한 뒤, 필터(hydrophobic polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane; pore size: 0.20 mm; Advantec MFS, Inc., Tokyo, Japan)과정을 세균 및 효소를 제거하였다. 수집된 모든 타액은 상기와 같은 전처리과정을 거쳐 즉시 HPLC에 주입하였으며, 10분 이상 실온에 방치된 시료는 폐기 처리하였다.

4. HPLC 분석

유기산을 분석하기 위한 장비로는 Dionex ion chromatography system (GP50 gradient pump, ED 50 conductivity detector)을 사용하였으며, Chromeleon 6.8 version의 software를 사용하였다. 분석에 사용된 고정상(column)은 Dionex IonPac AG11-HG column (50 mm × 4 mm)를 사용하였으며, IonPac AS11-HG (250 mm × 4 mm)의 guard column으로 보호하였다. 이동상은 NaOH 100 mM를 이용하여 용매의 농도가 일정하게 유지되는 등용매용리(isocratic elution)를 적용하였으며 유속은 0.7 mL/min, 주입량 10 µL, 25°C에서 분석하였다.

5. 자료 분석

3종의 각 음료에 대한 정규성 검정을 위해 Kolmogorov-Smirnov test 검정과 Shapiro wilks test 검정을 사용하였다. 분석한 결과 정규분포에 유의하지 않아 대조군의 유기산의 함량과 섭취 후 유기산 함량을 대응표본 검정을 위해 비모수 검정법인 Wilcoxon Signed rank test를 실시하였다. 본 연구에서 실시한 통계적 분석방법은 IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) 이용하였으며 유의성 검정은 0.05 수준을 고려하였다.

연구결과

1. 각 유기산 표준용액의 검정결과

각 유기산 표준용액의 검정결과는 <Table 1> 과 같다. 0.25-1.25 mM 농도 범위에 대한 검량선의 직선성(Linearity)을 측정한 결과 R²값 직선성은 0.984-0.999의 범위를 나타냈기 때문에 각 성분에 대한 결정계수가 농도와 면적 값으로 얻어진 회귀모형이 98-99%의 직선성이 형성된다는 것을 의미한다.

2. 10% Sucrose 음료 섭취 후 생수 섭취한 군에서 구강 내 치아우식 유발성 유기산의 농도

A 음료를 섭취한 후 구강에서 생성되는 유기산의 농도는 <Table 2>와 같다. 각 유기산들 중 당 용액을 섭취한 후 최고 농도는 섭취 5분 후 총 유기산의 농도가 7.86 mM으로 분석되었다. 특히 A 음료 섭취 후 5분 경과한 시점에서 propionate와 pyruvate의 증가량은 통계적으로 유의한 차이가 있었다

Table 1. Linear range, linear equation and correlation coefficient (r^2) for organic acid

Compound	Linear range (mM)	Linear equation*	r^2
Acetate	0.25 - 1.25	$y = 0.0009x + 0.5401$	0.9999
Butyrate	0.25 - 1.25	$y = 0.0014x + 0.2571$	0.9941
Formate	0.25 - 1.25	$y = 0.0031x + 0.2639$	0.9989
Lactate	0.25 - 1.25	$y = 0.0024x + 0.5513$	0.9940
Propionate	0.25 - 1.25	$y = 0.0015x + 0.3829$	0.9995
Pyruvate	0.25 - 1.25	$y = 0.0009x + 0.0340$	0.9895
Valerate	0.25 - 1.25	$y = 0.0010x + 0.1532$	0.9847

* $y=ax+b$ y is the peak area and x is sample concentration

Table 2. Oral organic acids concentration produced after taking of 10% Sucrose solution and water

	Acetate	Butyrate	Formate	Lactate	Propionate	Pyruvate	Valerate	Total
Control	1.91±2.46	N.D.	0.35±0.44	1.45±1.46	0.23±0.30	0.20±0.44	N.D.	4.14±5.11
0 (Mean±SD)	0.85±0.54	N.D.	0.03±0.04	1.17±1.23	0.16±0.18	0.46±0.71	N.D.	2.67±2.70
Amount ^a (%)	-1.06 (-55.45)	-	-0.32 (-90.57)	-0.29 (-19.70)	-0.07 (-29.76)	0.26 (131.67)	-	
p^*	0.600	-	0.068	0.917	0.600	0.068	-	
5 (Mean±SD)	1.76±1.06	N.D.	0.14±0.16	4.55±4.11	0.47±0.32	0.94±1.33	N.D.	7.86±6.98
Amount ^a (%)	-0.15 (-7.61)	-	-0.21 (-60.75)	3.10 (213.73)	0.24 (105.85)	0.74 (370.00)	-	
p^*	0.917	-	0.225	0.116	0.028	0.043	-	
10 (Mean±SD)	2.09±0.94	N.D.	0.14±0.21	3.26±2.59	0.37±0.24	0.65±0.62	N.D.	6.51±6.20
Amount ^a (%)	0.18 (9.60)	-	-0.22 (-60.94)	1.81 (124.70)	0.14 (60.98)	0.45 (225.00)	-	
p^*	0.917	-	0.138	0.249	0.463	0.080	-	
30 (Mean±SD)	2.81±2.97	N.D.	0.55±1.13	1.10±1.51	0.54±0.59	0.00±0.00	N.D.	5.00±6.20
Amount ^a (%)	0.90 (47.31)	-	0.19 (54.72)	-0.36 (-24.53)	0.32 (138.54)	-0.20 (-100.00)	-	
p^*	0.600	-	0.500	0.249	0.225	0.180	-	

^aIncrement and decrement concentration of organic acid compared to controls

*Wilcoxon signed rank test (mM) $p<0.05$

N.D. not detected.

($p<0.05$).

Butyrate와 valerate는 모든 연구 대상자들에게서 검출되지 않았다. 또한 lactate 및 pyruvate는 음료섭취 후 5-10분 경 유기산의 농도가 급격하게 증가하는 양상을 보이다가 30분 후에는 서서히 그 농도가 회복되었다.

3. 10% Sucrose 용액을 섭취 후 구강에서 생성되는 유기산의 농도

대조군 B 음료를 섭취한 후 구강에서 생성되는 유기산의 농도는 <Table 3>과 같다. 각 유기산들

중 음료를 섭취한 후 최고 농도는 섭취 5분 후 총 유기산의 농도가 9.59 mM인 것으로 나타났다. B 음료 섭취 후 5분 경과한 시점에서 propionate의 농도가 유의적으로 증가하였으며($p<0.05$), butyrate와 valerate를 제외한 나머지 유기산은 0.11-4.49 mM이 증가하였다. 음료섭취 후 유기산의 농도가 증가하는 양상을 보이다가 30분 후에는 서서히 그 농도가 회복되었다.

Table 3. Oral organic acids concentration produced after taking of 10% Sucrose solution

	Acetate	Butyrate	Formate	Lactate	Propionate	Pyruvate	Valerate	Total
Control	1.67±1.98	N.D.	0.03±0.06	1.29±1.25	0.21±0.36	0.15±0.24	N.D.	3.35±3.64
0 (Mean±SD)	0.86±0.74	N.D.	0.02±0.02	1.31±1.38	0.16±0.14	0.50±0.47	N.D.	2.85±2.77
Amount ^a (%)	-0.80 (-48.16)	-	-0.01 (-34.88)	0.02 (1.16)	-0.05 (-25.65)	0.35 (240.91)	-	
p^*	0.345	-	0.498	0.753	0.917	0.225	-	
5 (Mean±SD)	2.10±1.82	N.D.	0.14±0.16	5.79±4.41	0.63±0.44	0.93±0.81	N.D.	9.59±3.94
Amount ^a (%)	0.43 (25.98)	-	0.11 (386.05)	4.49 (347.42)	0.42 (196.86)	0.79 (536.36)	-	
p^*	0.249	-	0.068	0.075	0.028	0.080	-	
10 (Mean±SD)	1.03±0.79	N.D.	0.06±0.09	5.68±11.21	0.41±0.50	0.11±0.18	N.D.	7.28±12.77
Amount ^a (%)	-0.63 (-38.03)	-	0.03 (113.95)	4.38 (338.92)	0.19 (91.10)	-0.04 (-27.27)	-	
p^*	0.917	-	0.593	0.463	0.463	1.000	-	
30 (Mean±SD)	1.98±2.59	N.D.	0.21±0.37	2.57±2.67	0.47±0.44	0.02±0.06	N.D.	5.24±6.12
Amount ^a (%)	0.31 (18.61)	-	0.18 (625.58)	1.27 (98.32)	0.25 (119.37)	-0.12 (-84.09)	-	
p^*	0.600	-	0.223	0.345	0.345	0.180	-	

^aIncrement and decrement concentration of organic acid compared to controls

*Wilcoxon signed rank test (mM) $p<0.05$

N.D. not detected.

4. 탄산음료 섭취 후 구강에서 생성되는 유기산의 농도

실험군 C 음료를 섭취한 후 구강에서 생성되는 유기산의 농도는 <Table 4>와 같다. 각 유기산들 중 음료를 섭취한 후 최고 농도는 섭취 5분 후 총 유기산의 농도가 18.54 mM인 것으로 나타났다. C 음료를 섭취 후 5분 경과한 시점에서 lactate와 pyruvate의 농도가 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 음료섭취 후 유기산의 농도가 증가하는 양상을 보이다가 30분 후에는 서서히 그 농도가 회복되었다.

5. 10% Sucrose 음료와 탄산음료의 구강 내에서 생성된 유기산의 농도 비교

3종의 음료를 섭취한 후 타액 내 유기산을 분석한 그래프는 <Fig. 2>과 같다. 대조군 A에 비하여 B 음료를 섭취하고 5-10분경과 후 lactate의 농도가 높게 검출되었다. 실험군 C음료에서 각종의 유기산이 다량으로 생성되었으며, 특히 lactate 및 pyruvate의 증가량이 통계적으로 유의한 것으로 나타났다.

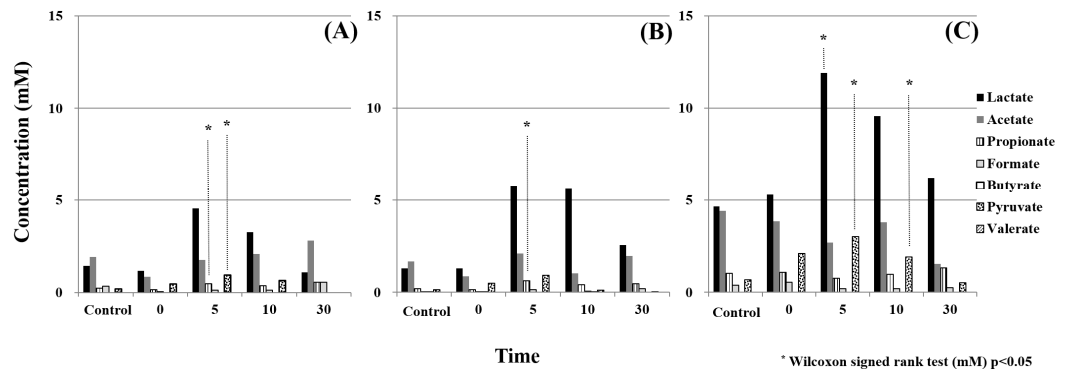
Table 4. Oral organic acids concentration produced after taking of carbonated drinks

Coke	Acetate	Butyrate	Formate	Lactate	Propionate	Pyruvate	Valerate	Total
Control	4.39±6.56	N.D.	0.40±0.58	4.64±5.63	1.04±2.16	0.69±1.51	N.D.	11.16±16.44
0 (Mean±SD)	3.85±5.75	N.D.	0.54±1.27	5.29±6.48	1.07±1.39	2.10±2.29	N.D.	12.85±17.19
Amount ^a (%)	-0.54 (-12.35)	-	0.14 (36.53)	0.65 (14.01)	0.03 (2.67)	1.41 (203.86)	-	
<i>p</i> [*]	0.600	-	0.715	0.917	0.917	0.116	-	
5 (Mean±SD)	2.68±2.96	N.D.	0.19±0.27	11.91±10.66	0.75±0.82	3.02±3.81	N.D.	18.54±18.52
Amount ^a (%)	-1.71 (-39.03)	-	-0.21 (-52.86)	7.27 (156.69)	-0.29 (-27.83)	2.33 (337.20)	-	
<i>p</i> [*]	0.463	-	0.500	0.046	0.917	0.043	-	
10 (Mean±SD)	3.78±3.89	N.D.	0.20±0.21	9.57±8.82	0.98±1.29	1.92±1.93	N.D.	16.45±16.14
Amount ^a (%)	-0.61 (-13.92)	-	-0.20 (-50.00)	4.93 (106.25)	-0.06 (-6.08)	1.23 (178.74)	-	
<i>p</i> [*]	0.463	-	0.500	0.173	0.917	0.028	-	
30 (Mean±SD)	1.53±1.91	N.D.	0.24±0.43	6.22±5.10	1.33±1.85	0.53±0.65	N.D.	9.84±9.94
Amount ^a (%)	-2.87 (-65.27)	-	-0.15 (-38.55)	1.58 (34.02)	0.29 (27.72)	-0.16 (-23.67)	-	
<i>p</i> [*]	0.753	-	0.465	0.753	0.599	0.500	-	

^aIncrement and decrement concentration of organic acid compared to controls

^{*}Wilcoxon signed rank test (mM) *p*<0.05

N.D. not detected.



(A) Water intake after 10% sucrose

(B) 10% sucrose intake

(C) Carbonated drink intake

Fig. 2. Oral organic acids concentration after taking of three types of drinks

3종의 음료 섭취 후 구강 내에서 생성된 유기산 농도의 대조군 농도 대비 증감량의 비(ratio)는 <Table 5>, <Fig. 3>와 같다. <Table 5>와 같이 대조군 A와 B 음료를 비교하면 총 유기산의 농도가 섭취 후 5-10분경과 후 B 음료에서 1.66배 이상 높은 것으로 보았을 때, A 음료에 비하여 B 음료가 치아우식 유발성 유기산의 생성정도가 높다고 판단할 수 있다.

실험군 C 음료와 A 음료를 비교하면 섭취 후 5-10분경과 후 총 유기산이 1.98배 이상으로 C 음료가 유기산의 생성정도가 높았으며, 특히 lactate 및 pyruvate는 2.34, 3.14배의 차이를 보였다. C 음료

와 B 음료를 비교하면 섭취 후 5분경과 후 C음료가 총 유기산이 1.19배 높았으며, lactate 및 pyruvate는 1.62, 2.96배의 차이를 보여 결과적으로 치아우식 유발성 유기산의 농도는 C>B>A 음료 순으로 높았음을 확인하였다.

Table 5. Each increment and decrement rate ratio of organic acid compared to controls

Type of beverage	Min ^d	Acetate	Butyrate	Formate	Lactate	Propionate	Pyruvate	Valerate	Total
B/A ^a	0	0.76	0.00 ^e	0.03	-0.05	0.80	1.34	0.00 ^e	0.34
	5	-2.98	0.00 ^e	-0.52	1.45	1.73	1.06	0.00 ^e	1.67
	10	-3.45	0.00 ^e	-0.15	2.42	1.39	-0.09	0.00 ^e	1.66
	30	0.34	0.00 ^e	0.93	-3.57	0.80	0.62	0.00 ^e	2.19
C/A ^b	0	0.51	0.00 ^e	-0.45	-2.27	-0.41	5.34	0.00 ^e	-1.15
	5	11.80	0.00 ^e	0.98	2.34	-1.20	3.14	0.00 ^e	1.98
	10	-3.33	0.00 ^e	0.92	2.72	-0.46	2.74	0.00 ^e	2.24
	30	-3.17	0.00 ^e	-0.79	-4.44	0.92	0.82	0.00 ^e	-1.54
C/B ^c	0	0.68	0.00 ^e	-14.47	43.33	-0.51	3.98	0.00 ^e	-3.34
	5	-3.96	0.00 ^e	-1.89	1.62	-0.69	2.96	0.00 ^e	1.19
	10	0.97	0.00 ^e	-6.06	1.12	-0.33	-30.83	0.00 ^e	1.35
	30	-9.25	0.00 ^e	-0.85	1.24	1.14	1.32	0.00 ^e	-0.70

^aThe ratio of the organic acids concentration when control B group/ control A group.

^bThe ratio of the organic acids concentration when experimental C group/ control A group.

^cThe ratio of the organic acids concentration when experimental C group/ control B group.

^dAfter (start, 5, 10, 30 minutes) taking A, B, and C drink.

^eThe number of "0.00" was not detected. So it is calculates as "0.00". (Ref. table 2-4)

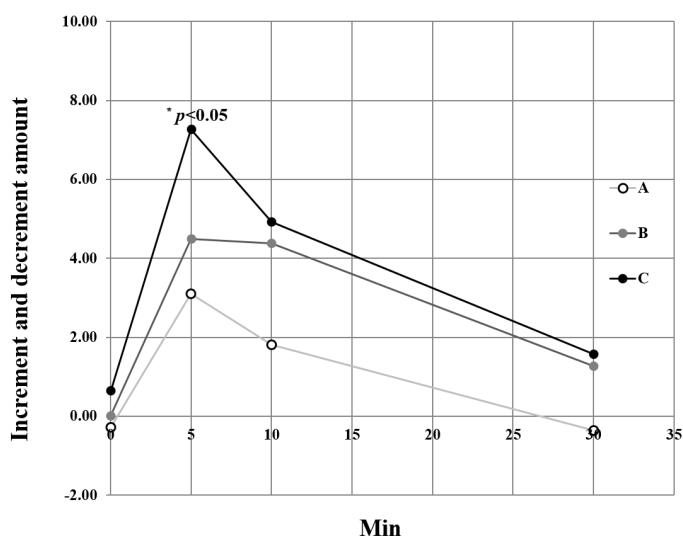


Fig. 3. Increment and decrement in lactate concentration compared to controls, following the time to the three types of drinks intake

(A) Water intake after 10% sucrose (B) 10% sucrose intake (C) Carbonated drink intake

<Fig. 3>는 3종의 음료에서 생성된 치아우식 유발능에 대표적인 성분인 lactate의 시간경과에 따른 농도의 증감량을 나타낸 그래프이다. Lactate의 함량은 섭취 후 5분경과 후 다량으로 생성되었으며, 농도의 증가량은 C>B>A 음료 순으로 나타났다. 실험군 C음료에서는 5분이 경과한 시점에서 통계적으로 유의한 수준으로 농도가 증가하였다. 대조군 A 음료는 서서히 초기농도로 회복되었으나, 대조군 B와 실험군 C 음료는 느리게 회복되는 양상을 보였다.

총괄 및 고안

탄산음료는 치아우식 유발성 당과 음료의 맛을 결정하는 탄산, 인산, 각종의 유기산이 포함되어 있어 음료자체의 낮은 pH를 결정하고, 섭취 후 구강 내 세균의 발효작용에 의하여 치아우식 및 부식을 가속화시킬 수 있다. 이에 본 연구자들은 탄산음료 섭취 후 실제 구강 내의 세균에 의해 생성되는 치아우식 유발성 유기산(Lactate, acetate, propionate, formate, butyrate, pyruvate 및 valerate)을 분리 분석하여 치아우식 유발능을 객관적으로 평가하고자 하였다.

당을 섭취하면 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)순환을 통한 해당 과정의 결과로 pyruvate로 전환되며, 생성된 pyruvate는 혐기성 조건 하에서 lactate, acetate, propionate, formate 및 butyrate 등과 같은 다양한 유기산으로 발효된다[26-28]. 이렇게 발효된 유기산은 미생물의 유형에 따라 다양하게 나타나는 것으로 보고되고 있는데 대표적으로 lactate는 세균의 대사에 가장 풍부한 부산물로서 *Streptococcus*, *Actinomyces* and *Lactobacillus*가 관여하는 것으로 알려져 있으며, propionate는 *Propionibacterium*, *Clostridium propionicum* 및 *Lactobacillus buchneri*에 의해 생성된다고 보고되고 있다[29-34]. 결국 당과 구강 내 세균에 의해서 생성되는 유기산은 구강 내 pH의 하강과 더불어 구강 내 미생물들에 대한 연관성에 의해 치아우식과 관련한 구강질환에 영향을 줄 수 있는 요인으로 작용하게 된다.

본 연구에서 적용한 탄산음료는 탄산 및 인산으로 구성된 음료로서, pH는 2.34인 것으로 측정되었다. 기타의 탄산음료의 pH가 약 2.92로 실험에 적용된 탄산음료가 보다 치아우식유발성이 크다는 전제하에 선택하게 되었다. 또한 10%의 sucrose 음료는 Park 등[25]의 연구 디자인을 참조하여 실험을 디자인하였으며, 탄산음료 내 포함된 비슷한 양의 당이 포함되어 있어 10%의 sucrose와 함께 비교한다면 보다 명확하게 치아우식 유발능을 판단할 수 있을 것으로 사료되었다.

스테판[35]의 곡선에 의하면 당을 섭취한 후 임계 pH 까지 하강하는 시간은 약 3분 정도로서 비교적 빠른 시간 내에 하강하는데 본 연구에서도 대조군 A, B 음료 및 실험군 C 음료를 섭취한 후 5분경 채취한 타액에서 유기산의 농도가 급격하게 높아졌음을 확인하였다. 유기산의 농도가 높아질수록 타액 내 pH 또한 하강한다는 것을 의미하기 때문에 음료섭취 후 5분 이상, 또는 음료를 오랫동안 구강 내에 머무름 시간을 주게 된다면 치아우식 유발성은 더욱 높아질 수 있다. 이후 타액의 자정작용에 의해 구강 내가 세척되면서 약 30분에는 점차 유기산의 농도가 회복되었다. 기존의 문헌에 의해서도 당 섭취 후 30분과 60분 후의 유기산의 농도는 감소하였으나 큰 차이가 없었기 때문에[25], 구강 내 유기산 농도의 지속성은 타액의 유출량과 점조도가 큰 작용을 할 것으로 사료된다.

타액 실험의 특성상, 실험시 타액 내 대조군 유기산의 농도가 일정치 않았는데 인체 유래물인 타액 시료의 특성상 각 개인의 편차가 크게 작용하며, 전신적 건강 및 타액 분비량 등에 영향을 미칠 수 있다는 점을 감안해야 한다. 따라서 본 연구에서는 각 유기산의 농도를 비율(ratio)과 대조군 대비 증감량을 기준으로 비교하였다.

연구결과 대조군 A, B음료 및 실험군 C 음료섭취 중 구강 내 총 유기산 농도를 다량으로 생성한 음료는 C>B>A 음료의 순으로 나타났다. 당 섭취 후 구강 내 pH가 하강하는 시기인 5분 경과후의 유기산의 증가량 또한 C>B>A 음료 순으로 나타났다. 특히 법랑질 탈회에 기여하는 유기산은 pyruvate와 formate 보다 lactate가 수소이온 방출능이 강하여 lactate가 기여도가 높다고 알려져 있다[36]. Bayer의 연구에 따르면 lactate의 함량이 1.36 g/L일 경우 치아 경조직의 경도 저하율이 66.4%에 달한다고 보고하였기 때문에[37], 본 실험에서 분리 분석한 다양한 유기산 중에서도 치아우식에 기여도가 높은 유기산은 lactate라 볼 수 있다. 그렇다면 음료섭취 후 유기산이 다량으로 생성되는 시간인 5분과 치아우식의 기여도가 높은 lactate만을 비교할 경우의 결과상에서도 C>B>A 음료 순으로 평가되었다. 이러한 점은 탄산음료 내에는 당 성분뿐만 아니라, 음료자체의 맛을 결정하는 탄산, 인산, 구연산 및 각종의 유기산 성분들이 포함되어 있어 구강 내 pH를 더욱 저하시키고, 세균의 활동을 더욱 활발하게 하여 sucrose가 함유된 음료보다 더 높은 농도의 유기산이 생성된 결과라고 볼 수 있다.

본 실험에서는 다양한 유기산 성분들 중에서도 acetate와 formate의 농도가 감소하다가 시간이 경과함에 따라 오히려 증가하는 양상을 보였는데, 이러한 결과는 구강 내 유기산 생성에 관여하는 미생물에 의한 영향이 있을 수 있을 것으로 보인다. 또한 Park 등[25]과 Yoo와 Ahn[38]의 유기산 실험에서도 연구대상자들의 대부분의 유기산 중 acetic acid가 가장 흔하게 발견되는 성분으로서 당 성분이나 자극성 타액의 분비로 인해 일시적으로 감소하다가 본래의 초기 농도로 회복되는 과정으로 볼 수 있을 것으로 생각된다.

또한 치아우식 유발능을 평가하기 위한 방법으로는 개별 유기산뿐만 아니라, 총 유기산의 농도와 치아우식 유발능의 기여도가 비교적 높은 lactate의 농도를 병행하여 평가하여야 할 것으로 보인다.

실험군 C음료를 섭취 후 propionate의 농도가 낮아지는 양상을 보였는데 대조적으로 lactate와 pyruvate의 농도는 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 시간이 경과함에 따라 propionate의 농도가 서서히 증가하였다. 이러한 결과는 비록 propionate의 농도가 감소하는 양상을 보일지라도 총 유기산의 농도와 치아우식 유발능에 기여하는 lactate의 농도가 증가하였기 때문에 상대적인 유기산 성분을 함께 평가하여야 할 것이며, 연구대상자들의 생물학적 요인과 구강 내 미생물에 영향을 받았을 가능성이 있다고 보여 진다.

또한 모든 연구대상자에게서 butyrate와 valerate가 검출되지 않았는데 사전연구[25]의 당섭취 후 생성되는 유기산의 농도를 분석한 연구결과에서도 일부의 연구대상자에게서는 해당 유기산이 검출되지 않은 것과 동일한 결과를 보였다. 각 유기산에서도 반응하는 당의 종류와 미생물의 종류 및 양이 상이하기 때문에 나타나는 결과라 사료된다.

대조군 A와 B 음료에서도 유기산의 생성농도에는 차이가 있었는데 B음료는 음료를 섭취한 후 이어서 생수를 섭취하지 않은 결과 유기산이 가장 많이 생성되는 5분경에 A 음료보다 1.67배 높은 농

도의 유기산이 생성되었다. 이는 당을 섭취한 후 물과 같은 구강 내의 유기산의 농도를 희석한 결과라 생각된다.

따라서 본 실험에서와 같이 탄산음료 또는 당 함유 음료를 섭취한 후에는 유기산 성분의 희석 또는 구강 내에 잔류량을 감소시키기 위하여 물 섭취, 또는 타액 분비를 통한 구강 내 자정작용에 의해 유기산 성분을 희석시키는 것이 필요하다고 사료된다[39]. 또한 기본적으로 구강 내 치면세균막관리[40] 뿐만 아니라 유기산을 생성하는 당 및 탄산음료의 무분별한 섭취 습관을 고려하여 치아우식에 취약한 대상자들로 하여금 구강보건교육이 선행되어야 할 것이다.

본 연구의 제한점은 실험에 적용된 A, B 및 C 음료 내에 자당 이외의 당이 포함되어 있을 수 있으며, 이에 따른 해당과정으로 인하여 유기산 성분과 농도에 영향을 줄 가능성이 있을 것으로 사료된다. 추후 연구에서는 실험에 적용되는 음료 내의 당의 종류와 함량을 고려하여야 할 것이다. 또한 각 유기산 성분마다 작용하는 구강 내 미생물에 차이가 있기 때문에 타액 내 유기산 성분과 구강 내 미생물 검사를 병행하여 연구가 진행된다면 보다 객관적인 치아우식 유발능 평가를 할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구는 많은 사람들에게 기호음료로 자리 잡은 탄산음료의 치아우식 유발능을 당 음료와 비교한 연구로서 예방치과 분야의 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

결론

본 연구는 탄산음료의 치아우식 유발능을 평가하기 위하여 구강 내에서 세균에 의해 생성되는 유기산(acetate, butyrate, formate, lactate, propionate, pyruvate 및 valerate)의 농도를 HPLC 분석방법을 통하여 10%의 sucrose 용액과 비교하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1. 대조군 A 음료인 10%의 sucrose 음료 및 생수를 섭취했을 때 구강에서 생성되는 총 유기산의 농도가 7.86 mM, 대조군 B 음료인 10%의 sucrose 만을 섭취했을 때 9.95 mM, 실험군 C 탄산음료를 섭취했을 때 18.54 mM이 검출되어 C>B>A 음료 순으로 유기산 성분이 생성되었다.
2. 3종의 음료 섭취 후 5분 후 유기산의 농도가 급격히 증가하였으며, 5분에 채취한 타액에서 C>B>A 음료 순으로 다량의 유기산이 검출되었다.
3. 유기산 중 치아우식 유발능이 높은 lactate 성분의 농도 또한 C>B>A 음료 순으로 나타났으며, 실험군 C 음료를 섭취 후 30분 이후에도 타액 내 유기산의 농도가 지속적으로 잔류하였다.

결과적으로 10%의 sucrose가 포함된 음료보다 탄산음료는 섭취 후 구강 내 유기산의 생성농도가 높기 때문에 치아우식 유발능이 높은 것으로 평가되었다.

Acknowledgements

이 논문은 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구 지원 사업(2014R1A1A3051084와 2017R1A2B4012865).

References

- [1] Hwang EJ, Yoo JH, Shin JY, Bae MJ, Jo SI. Association of sugar-sweetened beverages consumption and hypertension in Korean adults: Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2012-2013. *Korean J Fam Pract* 2016;6:446-5. <https://doi.org/10.21215/kjfp.2016.6.5.446>
- [2] WHO technical staff. Reducing consumption of sugar-sweetened beverages to reduce the risk of unhealthy weight gain in adults. e-Library of Evidence for Nutrition Actions (eLENA). September 2014. [Cited 2017 Feb 20]. https://www.who.int/elena/titles/bbc/ssbs_adult_weight/en/
- [3] Srinath Reddy K, Katan MB. Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases. *Public Health Nutr* 2004;7:167-86. <https://doi.org/10.1079/phn2003587>
- [4] Steyn NP, Mann J, Bennett PH, Temple N, Zimmet P, Tuomilehto J et al. Diet, nutrition and the prevention of type 2 diabetes. *Public Health Nutr* 2004;7:147-65. <https://doi.org/10.1079/phn2003586>
- [5] Adegboye AR, Twetman S, Christensen LB, Heitmann BL. Intake of dairy calcium and tooth loss among adult Danish men and women. *Nutrition* 2012;28:779-84. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.11.011>
- [6] Somborac M. Improving nutrition for better oral health. *J Can Dent Assoc* 2010;76:a131.
- [7] Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004;38:34-44. <https://doi.org/10.1159/000074360>
- [8] Danielsson Niemi L, Hernell O, Johansson I. Human milk compounds inhibiting adhesion of mutans streptococci to host ligand-coated hydroxyapatite *in vitro*. *Caries Res* 2009;43:171-8. <https://doi.org/10.1159/000213888>
- [9] Kashket S, DePaola DP. Cheese consumption and the development and progression of dental caries. *Nutr Rev* 2002;60:97-103. <https://doi.org/10.1301/00296640260085822>
- [10] Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996;104:151-5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00063.x>
- [11] Cavalcanti AL, Costa Oliveira M, Florentino VG, dos Santos JA, Vieira FF, Cavalcanti CL. Short communication: *in vitro* assessment of erosive potential of energy drinks. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010;11:253-5. <https://doi.org/10.1007/bf03262757>
- [12] Pinto SC, Bandeca MC, Silva CN, Cavassim R, Borges AH, Sampaio JE. Erosive potential of energy drinks on the dentine surface. *BMC Res Notes* 2013;6:67. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-67>
- [13] Kang JO, Jang JH. Investigation of cariogenic effects of commercial sports drinks by HPLC analysis. *Int J Clin Prev Dent* 2013;9:231-8.
- [14] Yoo SM, Park YD, Ahn GS. Analysis of dental cariogenic carboxylic acids in 10 kinds of energy drinks. *Int J Clin Prev Dent* 2013;9:53-8.
- [15] Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Yoshioka M, Snauwaert J, Abe Y, et al. Adhesion to and decalcification of hydroxyapatite by carboxylic acids. *J Dent Res* 2001;80:1565-9. <https://doi.org/10.1177/00220345010800061701>
- [16] Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate *in vitro*. *Arch Oral Biol* 2005;50:541-52. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.11.002>
- [17] Keyes PH. Present and future measures for dental caries control. *J Am Dent Assoc* 1969;79:1395-404. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1969.0037>
- [18] Lussi A, von Salis-Marincek M, Ganss C, Hellwig E, Cheaib Z, Jaeggi T. Clinical study monitoring the pH on tooth surfaces in patients with and without erosion. *Caries Res* 2012;46:507-12. <https://doi.org/10.1159/000339783>
- [19] Owens BM, Kitchens M. The erosive potential of soft drinks on enamel surface substrate: an *in*

- vitro* scanning electron microscopy investigation. J Contemp Dent Pract 2007;8:11-20.
- [20] Fanguy JC, Henry CS. The analysis of uric acid in urine using microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. Electrophoresis 2002;23:767-73. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200203\)23:5<767::aid-elps767>3.3.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200203)23:5<767::aid-elps767>3.3.co;2-#)
- [21] Guo WP, Lau KM, Fung YS. Microfluidic chip-capillary electrophoresis for two orders extension of adjustable upper working range for profiling of inorganic and organic anions in urine. Electrophoresis 2010;31:3044-52. <https://doi.org/10.1002/elps.201000297>
- [22] Buescher JM, Moco S, Sauer U, Zamboni N. Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. Anal Chem 2010;82(11):4403-12. <https://doi.org/10.1021/ac100101d>
- [23] Birkler RI, Støttrup NB, Hermansson S, Nielsen TT, Gregersen N, Bøtker HE, et al. A UPLC-MS/MS application for profiling of intermediary energy metabolites in microdialysis samples--a method for high-throughput. J Pharm Biomed Anal 2010;53:983-90. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.06.005>
- [24] Paik MJ, Cho EY, Kim H, Kim KR, Choi S, Ahn YH, et al. Simultaneous clinical monitoring of lactic acid, pyruvic acid and ketone bodies in plasma as methoxime/tert-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode. Biomed Chromatogr 2008;22:450-3. <https://doi.org/10.1002/bmc.966>
- [25] Park YD, Jang JH, Oh YJ, Kwon HJ. Analyses of organic acids and inorganic anions and their relationship in human saliva before and after glucose intake. Arch Oral Biol 2014;59:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.10.006>
- [26] Takahashi N, Yamada T. Glucose and lactate metabolism by *actinomyces naeslundii*. Crit Rev Oral Biol Med 1999;10:487-503. <https://doi.org/10.1177/10454411990100040501>
- [27] Sommer P, Klein JP, Scholler M, Frank RM. Lactate dehydrogenase from *streptococcus mutans*: purification, characterization, and crossed antigenicity with lactate dehydrogenases from *lactobacillus casei*, *actinomyces viscosus*, and *streptococcus sanguis*. Infect Immun 1985;47:489-95.
- [28] Gent-Ruijters ML, Meijere FA, Vries W, Stouthamer AH. Lactate metabolism in propionibacterium pentosaceum growing with nitrate or oxygen as hydrogen acceptor. Antonie Van Leeuwenhoek 1976;42:217-28. <https://doi.org/10.1007/bf00394118>
- [29] Schweiger G, Buckel W. On the dehydration of (R)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by clostridium propionocum. FEBS Lett 1984;171:79-84. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80463-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80463-9)
- [30] Oude Elferink SJ, Krooneman J, Gottschal JC, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Appl Environ Microbiol 2001;67:125-32. <https://doi.org/10.1128/aem.67.1.125-132.2001>
- [31] Zeng AP, Biebl H, Schlieker H, Deckwer WD. Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation. Enzyme Microb Technol 1993;15:770-9. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90008-p](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90008-p)
- [32] Hoshino E, Sato M. Production and degradation of formate by *Veillonella dispar* ATCC 17745. J Dent Res 1986;65:903-5. <https://doi.org/10.1177/00220345860650060801>
- [33] Cai G, Jin B, Saint C, Monis P. Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum*. J Biotechnol 2011;155:269-74. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.004>
- [34] Kenealy WR, Waselefsky DM. Studies on the substrate range of *Clostridium kluyveri*; the use of propanol and succinate. Arch Microbiol 1985; 141:187-94. <https://doi.org/10.1007/bf00408056>
- [35] Stephan RM. Changes in the hydrogen-ion concentration on tooth surfaces and in carious lesions. J Amer Dent Ass 1940;27:718-23. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1940.0178>
- [36] Margolis HC, Moreno EC. Kinetics of hydroxyapatite dissolution in acetic, lactic, and phosphoric acid solutions. Calcif Tissue Int 1992;50:137-43. <https://doi.org/10.1007/bf00298791>

- [37] Beyer M, Reichert J, Bossert J, Sigusch BW, Watts DC, Jandt KD. Acids with an equivalent taste lead to different erosion of human dental enamel. *Dent Mater* 2011;27:1017-23. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.07.001>
- [38] Yoo SM, Ahn GS. Correlation of oral microorganism and carboxylic acid in oral cavity. *Int J Clin Prev Dent* 2015;11(3):165-70. <https://doi.org/10.15236/ijcpd.2015.11.3.16565>
- [39] Jeon YJ, Choi JS, Han SJ. The effect of dry mouth improvement by oral exercise program in elderly people. *J Korean Soc Dent Hyg* 2012;12:293-305. <https://doi.org/10.13065/jksdh.2012.12.2.293>
- [40] Kim SH. The effect of plaque control (tooth brushing instruction) for oral health improvement on periodontitis patients. *J Korean Soc Dent Hyg* 2011;11:293-301.