

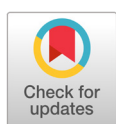
Journal of Korean Society of Dental Hygiene

Original Article

Lactobacillus reuteri 함유 Probiotics가 구강미생물의 생존 및 biofilm 형성에 미치는 영향

이수빈¹ · 이경희²

¹동서대학교 일반대학원 보건과학과 · ²동서대학교 치위생학과



The effects of *Lactobacillus reuteri*-containing probiotics on the viability and biofilm formation of oral microorganisms

Received: April 23, 2020

Revised: May 28, 2020

Accepted: June 02, 2020

Su-Bin Lee¹ · Kyung-Hee Lee²

¹Department of Health Science, Dongseo University

²Department of Dental Hygiene, Dongseo University

Corresponding Author: Kyung-Hee Lee, Department of Dental Hygiene, Dongseo University, 47, Jurye-ro, Sasang-gu, Busan, 47011, Korea. Tel: +82-51-320-2730, Fax: +82-51-320-2752, E-mail: kyhee@gdsu.dongseo.ac.kr

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to evaluate the inhibitory effects of probiotics containing *Lactobacillus reuteri* on *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. In addition, the degree of biofilm formation, initial acidity, buffering ability, and acid production performance were measured to confirm the dental caries-inducing ability. **Methods:** *S. mutans* (KCTC3065) and *A. actinomycetemcomitans* (KCTC2581) were used as experimental strains. The number of viable cells, degree of biofilm formation, initial pH, buffering capacity, and production performance were measured for comparing *L. reuteri*-containing probiotics and Bulgari. **Results:** The viability of *S. mutans* in the groups was reduced in the following order: Bulgari, probiotics, control. The degree of biofilm formation was significantly higher at 0% and gradually reduced at different concentrations ($p < 0.01$). At 2.5%, the absorbance of the probiotics and Bulgari groups differed significantly ($p < 0.01$). The acid formation ability differed significantly based on the performance of *S. mutans* in each product ($p < 0.05$). The absorbance of the probiotics group was significantly lower than that of the Bulgari group ($p < 0.01$). **Conclusions:** This study suggests that the use of *L. reuteri*-containing probiotics as an adjuvant for the prevention and decreasing of oral diseases may reduce their incidence, which can be considered one of the benefits of using probiotics.

Key Words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, biofilm, *Lactobacillus reuteri*, Probiotics, *Streptococcus mutans*

색인: 구강미생물, 락토바실러스 루테리, 바이오필름, 프로바이오틱스

서론

구강 미생물총은 700 종 이상의 다양한 미생물 중에 의해 형성되며[1], 이 복잡한 생태계는 부적절한 구강 위생습관, 식이상태, 흡연, 스트레스 및 전신질환을 포함한 다양한 요인에 의해 변화될 수 있다[2]. 구강 내 미생물에 의해 치아우식증, 치주질환 등의 구강 감염질환을 유발하는 것으로 나타났고[3], 최근에는 심혈관 질환[4], 당뇨병[5]을 포함한 여러 종류의 전신질환과 구강 내 미생물의 연관성에 대한 보고가 증가하고 있다.

Probiotics는 “적절한 양으로 섭취될 때 인간의 건강에 유익한 영향력을 주는 살아있는 미생물(FAO/WHO 2001)”로 정의될 수 있고[6], 그 중대표적으로 상용화된 Probiotics종으로는 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*이 있다[7]. 현재까지 연구된 Probiotics의 작용기전은 박테리오파지를 비롯한 대사물질 및 영양 상호작용에 의한 구강 내 환경을 조절하여 병원균 부착 및 증식을 억제하고, 장점막의 방어벽 기능을 강화하여 병원균 미생물의 군락화 및 biofilm 형성을 저해하여 감염에 대한 저항력을 증가시키는 것이다[8]. 다수의 연구결과에서 크론병과 궤양성 대장염과 같은 장질환, 알레르기 및 결장암 등에 Probiotics가 유효함이 증명되었다[9,10]. Probiotics의 구강 작용에 대한 메커니즘은 명확하게 설명되어 있지 않지만, 위장관에서 작용하는 메커니즘과 유사한 방식으로 그 효능을 발휘할 것으로 보인다[11].

치과계에서도 Probiotics 효능에 관한 관심이 증가되고 있으며, 특히 *Lactobacillus* 종들은 구강 생태계에서 중요한 역할을 담당하고 구강 질환 예방에 관련성이 있다고 보고되고 있다[12]. 구강에 대한 Probiotics 효능을 다룬 국내·외 연구에서 *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. reuteri*가 치아우식증과 치주염을 예방한다고 보고되었고[13-15], 그 중 *L. reuteri*는 reuterin이라 불리는 광역스펙트럼 항균물질을 생산하여[16] *S. mutans*, *Candida albicans* 등 구강병원성 세균인 그람 양성균과 그람 음성균의 증식을 억제한다[17]. 또한, *L. reuteri* 함유 정제를 섭취할 경우 타액 내 *S. mutans* (*Streptococcus mutans*)의 수준이 긍정적으로 감소한다고 보고되었다[15]. 이와 같이 *L. reuteri* 함유 Probiotics에 관한 선행연구는 *S. mutans* 증식 및 biofilm 형성과 관련하여 어떠한 영향을 주는지에 관한 연구는 미비한 실정이다. 또한, 치주질환에 관한 실험 연구에서는 대부분 매개변수(GI, PI, BOP, PPD, CAL 등) 측정에만 초점이 맞춰져 연구가 이루어져 왔다.

이에 본 연구에서는 *L. reuteri*를 함유한 Probiotics가 *S. mutans*와 *A. actinomycetemcomitans* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)에 대한 억제 효과에 미치는 영향을 평가하고자 한다. 또한, biofilm 형성, 초기 산도, 완충 능력 및 산 생성능을 측정하여 치아 우식 유발능을 확인하고자 하였다.

연구방법

1. 실험용액

실험에 사용된 용액은 *L. reuteri* 함유 Probiotics로 drop 형태 (Prodentis, BioGaia AB, Sweden, 2×10^8 CFU/ml)와 농후 발효유(Bulgaris, 남양유업, 한국, 1×10^8 CFU/ml)를 사용하였다. 이에 실험군 1은 *L. reuteri* 함유 Probiotics 처리군, 실험군 2는 농후 발효유 처리군, 대조군은 배양 배지 처리 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 사용된 제품의 주요 구성성분은 <Table 1>에 각각 표시하였다. 대조군으로는 *S. mutans* 만을 배양하여 관찰한 배지로 사용된 BHI 액체배지(Bacto™ brain heart infusion, Difco, USA)와 Columbia 액체배지(Columbia broth, MB cell, 한국)는 제조사의 권장사항에 따라 증류수와 혼합하여 교반하고, 121°C에서 15 분간 고압증기 멸균을 시행하였다.

2. 구강미생물 배양

치아우식증과 관련된 우식 균주 *S. mutans* (KCTC 3065)는 한국생물자원센터에서 분양받아 37°C, 호기상태에서 BHI 액체배지에 배양 후 실험에 사용하였고, 생균수 측정을 위하여 BHI 고체배지(Bacto™ brain heart infusion agar, Difco, USA)를 사용하였다. 또한, 치주질환 균주는 *A. actinomycetemcomitans* (KCTC 2581)를 37°C, 5% CO₂ 호기상태에서 Columbia 액체배지에 배양하여 활성화시킨 후 실험을 진행하였고, 5% Sheep blood (Sheep blood, 시너지이노베이션, 한국)를 첨가한 Columbia 고체배지(Columbia broth agar, MB cell, 한국)를 이용하였다.

Table 1. Composition of research materials

Product name	Probiotics contained in the product	Composition
Bulgaris (Namyang)	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Korean cow's milk (79.7%), Skim milk, Apple concentrated juice (6%), Isomalt oligosaccharide, Crystalline glucose
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
	<i>Bifidobacterium</i>	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
Prodentis (BioGaia AB)	<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 5289	Sunflower oil, medium chain triglyceride oil (palm kernel)
	<i>L. reuteri</i> DSM 17938	

3. 생균수 측정

*S. mutans*와 *A. actinomycetemcomitans*는 96 well plate에 농후 발효유와 *L. reuteri* Probiotics를 각각 0%, 2.5%, 5%, 10%가 되도록 BHI 액체배지로 희석하여 0.1 ml씩 분주하고 각각 균주를 0.1 ml (1×10^6 CFU/ml)를 접종하였다. *S. mutans*는 액체배지에서 24시간 배양 후 BHI 고체배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양된 생균수(CFU)를 측정하였고, *A. actinomycetemcomitans*는 액체배지에서 24시간 배양 후 5% Sheep blood를 첨가한 Columbia 고체배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양된 생균수(CFU)를 측정하였다.

4. Biofilm 형성 실험

S. mutans 생균수 측정을 위해 배양했던 96 well plate에서 배양액은 버리고 증류수 0.2 ml로 2회 세척한 다음 plate를 건조시켰다. 이후 0.1% Crystal violet 0.05 ml를 주입하여 15분간 실온에서 염색하고 증류수 0.2 ml로 2회 세척한 후 99% 에탄올 0.2 ml로 녹여서 흡광도 측정기기(Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™, USA)를 이용해 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 초기 산도 및 완충능 검사

농후 발효유, *L. reuteri* Probiotics (증류수 1:1 혼합 용액) 각각 10 ml를 Falcon에 담아 초기 산도를 pH-meter (Cond 7110 meter, WTW inoLab®, Germany)로 3회 측정 후 평균값을 구하였다. 완충능은 각 용액을 pH 7까지 변화시키는데 필요한 1M NaOH의 양으로 정의하며, 10 ml 용액에 1M NaOH를 첨가하여 혼합용액이 pH 7로 이르는 데 때까지 주입된 NaOH의 부피를 측정하였다.

6. 산생능 검사

농후 발효유, *L. reuteri* Probiotics 10% 용액에 1M NaOH를 첨가하여 혼합 용액이 pH 7이 되도록 중화한 후 5 ml씩 분주하여 *S. mutans* 균 0.5 ml (1×10^5 CFU/ml)을 첨가하였고 2초간 교반하였다. 이 용액을 37°C에서 8시간 배양하였으며, 2시간마다 꺼내어 변화된 pH를 pH-meter (Cond 7110 meter, WTW inoLab®, Germany)로 3회 측정하여 평균값을 구하였다.

7. 통계분석

IBM SPSS (Statistical Package for Social Science 24.0, Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 분석하였고, 유의수준(α)은 0.05로 통계적 검정을 실시하였다. CFU 측정, biofilm 형성 결과는 대조군과 각 그룹의 농도별 차이는 one-way ANOVA를 시행하였으며, 두 실험군 간의 차이는 t-test를 실시하였다. 초기 산도 및 완충능 실험은 one-way ANOVA를 통해 Tukey 사후검정을 이용하였다. 또한, 시간에 따른 산생능 실험 결과는 two-way ANOVA를 시행하였으며 Scheffe로 사후검정하였다.

연구결과

1. *S. mutans* 생균수 측정결과

L. reuteri Probiotics, 농후 발효유, 대조군에 *S. mutans*를 동량 접종 후 생균수를 측정한 결과, 농후 발효유는 8×10^6 CFU/ml, *L. reuteri* Probiotics 318×10^6 CFU/ml, 대조군 342×10^6 CFU/ml로 측정되었다. 생균수 측정에서 대조군과 비교 시 농후 발효유에서 유의미한 *S. mutans*의 생장을 억제하는 양상이 관찰되었다. 반면, 대조군과 비교 시 *L. reuteri* Probiotics의 *S. mutans* 세균 억제 효과는 관찰되지 않았으며, 두 실험군 간 비교 시 농후 발효유가 *L. reuteri* Probiotics에 비해 유의미하게 *S. mutans* 세균 생장 억제 효과를 보임을 확인하였다($p < 0.05$) (Fig. 1).

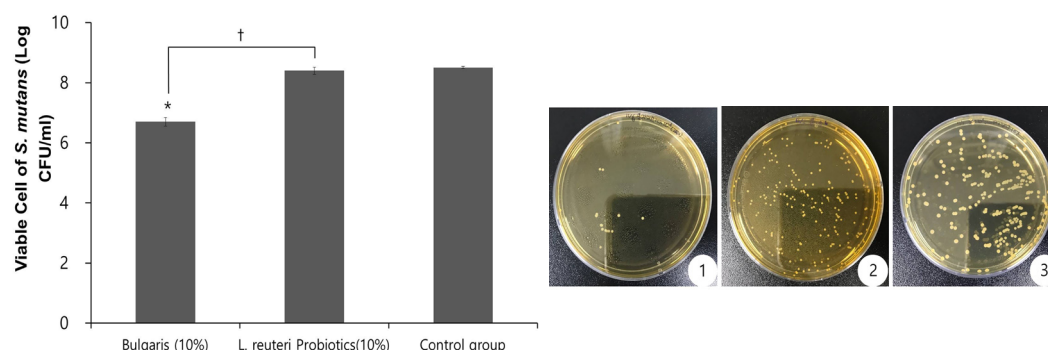


Fig. 1. (A) Comparison of viable cell count of *S. mutans* with all groups such as Bulgaris, *L. reuteri* Probiotics, and control. (B) Representative photograph for culture dishes for all group ① Bulgaris ② *L. reuteri* Probiotics ③ control ($p < 0.05$; Bulgaris vs control, $^{\dagger} p < 0.05$; Bulgaris vs *L. reuteri* Probiotics)

2. *A. actinomycetemcomitans* 흡광도 측정결과

L. reuteri Probiotics, 농후 발효유의 농도별 *A. actinomycetemcomitans* 흡광도 측정결과, 농후 발효유의 경우 농도별 측정에서 농도가 높아질수록 높은 흡광도(optical density)를 나타내어 *A. actinomycetemcomitans* 생장이 유의미하게 증가하는 양상이 관찰되었다. 하지만 *L. reuteri* Probiotics의 흡광도는 농후 발효유의 흡광도보다 현저히 낮게 나타나, *L. reuteri* Probiotics에 의하여 *A. actinomycetemcomitans* 생장이 억제됨을 확인하였다($p < 0.01$) <Fig. 2>.

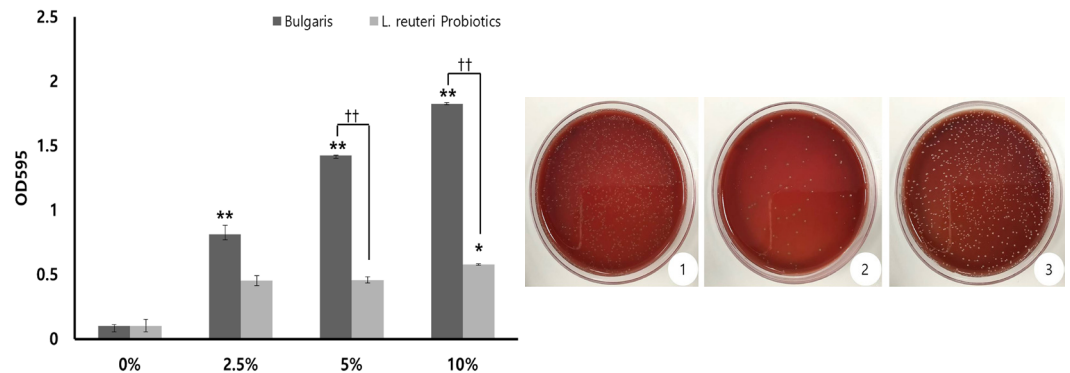


Fig. 2. (A) Absorbance on the number of viable cells of *A. actinomycetemcomitans* and all groups such as Bulgariis, *L. reuteri* Probiotics and control. (B) Representative photograph of culture dishes for all group ① Bulgariis ② *L. reuteri* Probiotics ③ control ($p < 0.05$, $p < 0.01$: 0% vs each % groups, $p < 0.01$: Bulgariis vs *L. reuteri* Probiotics)

3. Biofilm 형성 실험 결과

L. reuteri Probiotics, 농후 발효유에 *S. mutans*를 첨가한 후 biofilm 형성 정도를 비교 측정한 결과 <Fig. 3>, *L. reuteri* Probiotics, 농후 발효유 0%에서 높은 흡광도를 나타냈고, 0%와 비교하여 농도별 biofilm 감소량에 유의한 차이가 있었다($p < 0.01$). 2.5% 농도에서, *L. reuteri* Probiotics 및 농후 발효유의 흡광도는 유의한 차이가 있었다($p < 0.01$).

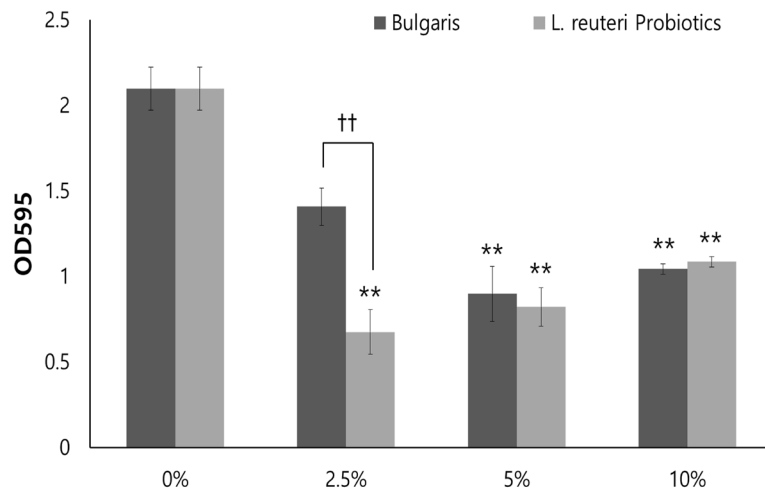


Fig. 3. Inhibitory effect of *L. reuteri* Probiotics and Bulgariis on biofilm formation on *S. mutans*. ($p < 0.01$: 0% vs each % groups, $p < 0.01$: Bulgariis vs *L. reuteri* Probiotics)

4. 초기 산도 및 완충능 검사

L. reuteri Probiotics, 농후 발효유, 대조군의 초기 산도 및 완충능 검사를 측정한 결과<Table 2>와 같았다. 초기 산도는 농후 발효유가 대조군에 비해 가장 낮았고($p<0.01$), *L. reuteri* Probiotics도 대조군과 유의한 차이를 보였다($p<0.01$). pH 7까지 이르는데 필요한 1M NaOH 양으로 정의하는 완충능은, 대조군 0 ml, *L. reuteri* Probiotics 0.07 ml, 농후 발효유가 0.73 ml로 높게 나타났으며, *L. reuteri* Probiotics와 농후 발효유의 유의한 차이를 보였다($p<0.05$).

Table 2. Initial pH and buffering capacity of Bulgari, *L. reuteri* Probiotics, and control groups

	Bulgari	<i>L. reuteri</i> Probiotics	Control groups
Initial pH	4.24±0.01**	5.94±0.13**	7.24±0.04
Buffer capacity (1M NaOH ml)	0.73±0.15*	0.07±0.02	0.00±0.00

* $p<0.05$, ** $p<0.01$: control vs group

5. 산생성능 검사

L. reuteri Probiotics, 농후 발효유 용액에 1M NaOH를 첨가하여 pH 7로 중화시킨 후 *S. mutans*와 혼합하여 2시간 간격으로 산도를 측정하였다. 6시간 경과 시 농후 발효유 실험군에서는 pH 5.5 이하로 감소였으며, 8시간 경과 후 *L. reuteri* Probiotics 10%는 pH 6.6, 대조군은 pH 7.0으로 유지되었다. *S. mutans*의 산생성능에 의한 pH 변화에는 집단 간의 유의한 차이가 있었다<Fig. 4>.

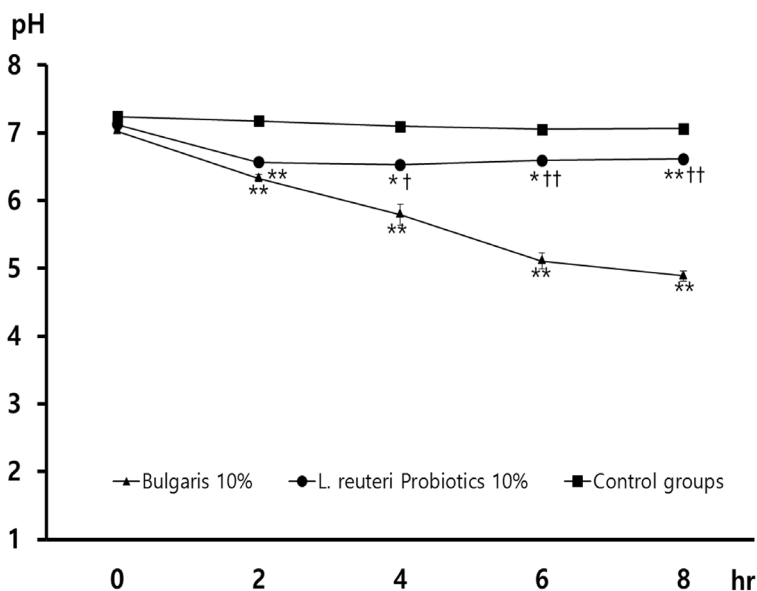


Fig. 4. Changes of pH in Bulgari, *L. reuteri* Probiotics, and control groups after incubation with *S. mutans*. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$: control vs group, † $p<0.05$, †† $p<0.01$: Bulgari vs *L. reuteri* Probiotics; two-way ANOVA followed by Scheffé's post-hoc comparison)

총괄 및 고안

Probiotics는 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 병원성 세균의 성장을 억제하며[18] 이들의 중요한 기전은 면역증진, 병원성 미생물과의 장내 영양소를 경쟁적으로 이용, 장내 세포 또는 장점막에 병원성 미생물의 부착 억제, 장 상피세포에 침입 억제, 항균물질의 생산 등을 통한 장 건강을 증진한다고 보고되었다[11]. 구강 내 Probiotics의 이용은 적어도 병원성 세균들과 경쟁적으로 작용하여 구강 미생물과 면역반응에 영향을 미치는 것으로 보이며, 구강 건강 및 구강질환의 예방에 도움을 줄 수 있다[19]. 즉, 구강 내 병원성 세균의 성장억제는 치아우식증, 치주질환 등 구강질환뿐만 아니라 음식 섭취와 함께 소화기관으로 이동하여 당뇨병, 심혈관 질환 등 전신질환의 예방 및 치료에도 중요한 역할을 한다[18]. 이에 본 연구에서는 시판되는 *L. reuteri* 함유 Probiotics가 구강 미생물의 억제 및 biofilm 형성 억제 작용을 하는지 평가하고자 하였다.

본 연구결과 치아우식증을 일으키는 *S. mutans* 사멸 효과에서 농후 발효유가 *L. reuteri* Probiotics와 대조군에 비하여 높은 *S. mutans* 사멸 효과를 보였다. Nikawa 등[14]의 연구에서 *S. mutans* 1 : *L. reuteri* 3로 희석 시 *S. mutans*균이 90% 이상 사멸할 수 있다고 보고하여 본 연구결과와 차이를 보였다. 이는 *L. reuteri* Probiotics와 *S. mutans* 희석 비율이 낮은데서 기인하는 것으로 *L. reuteri* Probiotics가 *S. mutans* 억제 효과를 나타내기에 충분한 균수에 도달하지 못했을 것으로 생각되며, 사용한 특정 제품에 함유된 균수가 변수로 작용하였을 것으로 판단된다. Ishihara 등[13]은 *L. reuteri*와 표현형이 유사한 *L. fermentum*가 *in vitro*에서 *S. mutans*에 대한 성장억제 효과를 가지고 있음을 보고하였고, Nikawa 등[14]은 *in vitro*에서 *L. reuteri* 함유 비율에 따른 *S. mutans*의 감소를 관찰하였다. 또한, Caglar[15] 등은 *L. reuteri* ATCC 55730을 첨가한 빨대 사용 및 정제를 3주간 복용하였을 때 타액 내 *S. mutans* 수가 감소했으며, 요구르트에 *L. reuteri*를 첨가하여 2주간 복용하는 실험에서 *L. reuteri* 함유 요구르트 복용이 타액 내 *S. mutans* 수를 감소시켜 치아우식 위험을 줄이는 긍정적인 효과를 보인 연구결과와 차이를 나타내었다[14]. 이는 *in vitro*에서 *L. reuteri* Probiotics가 *S. mutans* 억제 효과를 나타내기에 충분한 균수를 이루지 못하였기 때문이라고 사료된다.

Biofilm 형성에서 *L. reuteri* Probiotics는 낮은 농도(2.5%)에서도 biofilm 형성이 억제되는 양상을 보였으나, 농후 발효유의 경우에서도 높은 농도(5, 10%)에서 유의미하게 biofilm 형성이 억제되는 양상을 보여 Probiotics에 포함된 균의 종류에 따라 정도의 차이는 있지만 biofilm 형성을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 보인다. 이는 Söderling 등[20]의 연구에서 *L. reuteri* PTA 5289에 의한 biofilm 형성 억제효과를 보인다는 연구결과와 유사함을 보였다. 본 연구결과에서 대조군과 비교하여 농도별 biofilm 감소량의 차이가 나타난 이유는 타액으로 코팅된 Hydroxyapatites에 Probiotics가 결합하여 *S. mutans*의 부착을 감소시켰기 때문일 것으로 사료된다[21].

본 연구에 사용된 *L. reuteri* Probiotics 초기 산도를 측정된 결과, *L. reuteri* Probiotics의 pH는 5.94로 조사되었고, 이는 Stephan 이론에 의하면 pH 5.0 이하의 농도에서 치아표면의 탈회가 일어날 수 있다는 Stephan 곡선에 의한 우식발생 가능 범주에 해당되지 않으며, Sissons 등[22]은 치면세균막 내 *S. mutans*의 pH 농도가 5.5이하로 떨어지면 치아가 우식될 수 있음을 보고하였다. 타액에 산을 첨가함에 따라 생기는 산도 변화에 저항하는 능력을 완충능이라 정의하고, 본 연구에서 *L. reuteri* Probiotics의 완충능이 높게 관찰되어 구강 내 pH 7로 중화되기 쉬움을 보여 치아우식의 위험도가 낮음을 것으로 생각된다. Katz 등[23]은 타액 완충능 뿐만 아니라 식품 고유 완충능 또한 구강 내 타액 및 플라그 형성에 영향을 줄 수 있다고 하였고, 허 등[24]은 고유 pH가 중성에 가깝고 식품의 고유 완충능이 높으면 식품 자체가 구강 내 산도를 중화시킬 수 있어 탈회를 예방할 수 있다고 보고하여 본 연구결과를 지지한다. 또한, 본 연구에서 각 용액에 *S. mutans*를 접종 후 8시간 배양하여 산생성능을 평가한 결과, 6시간 경과 시 농후 발효유는 pH 5.5 이하를 나타내 탈회임계점을 넘

어졌고, *L. reuteri* Probiotics는 pH 6.5로 중성에 가까운 수치를 보여 유산이 생성되어 pH 변화가 큰 농후 발효유와 달리 *L. reuteri* Probiotics에 함유된 Probiotics에서 유당의 분해가 이루어지지 않아 산생성능의 변화가 적은 것으로 생각된다[25].

치주균인 *A. actinomycetemcomitans*의 사멸정도를 관찰한 결과 *L. reuteri* Probiotics가 *A. actinomycetemcomitans* 감소하는 양상을 관찰하였으며, Krasse 등[26]은 *L. reuteri* 정제 2주 복용 후 중등도에서 중증의 치은염 환자에서 치은 지수 및 플라그 지수를 감소를 보고하여 본 연구결과를 지지한다. Twetman 등[27]은 *L. reuteri* ATCC 55730 및 ATCC PTA.5289가 함유된 껌을 2주 동안 1일 10분 이상 씹을 경우, 씹는 기간 동안 BOP (bleeding on probing) 개선 및 GCF (gingival crevicular fluid) 양의 유의미한 감소효과를 보고하였다. Vivekananda 등[28]은 SRP (scaling+root planing) 치료와 함께 42일 동안 *L. reuteri* Probiotics 정제 복용 후 *A. actinomycetemcomitans* 90% 이상의 사멸 효과를 보인다는 연구결과와 유사함을 보였다. 이것은 *L. reuteri*가 우식유발균으로 알려진 *S. mutans*에 의한 치태형성 억제 및 치주질환 유발균인 *A. actinomycetemcomitans* 형성을 억제한 긍정적인 영향을 보이며, 장관계(장내)에 효능이 입증된 Probiotics가 구강병원균을 억제하는 목적으로 활용될 수 있음을 보여준다고 사료된다.

본 연구의 제한점으로는 *L. reuteri* 함유 Probiotics의 특정 제품을 선택하여 평가한 *in vitro* 연구로 특정 제품에 함유된 합성물에 의한 변수가 있었을 것으로 생각된다. 이에 향후에는 시중에 판매되는 다양한 제품의 *L. reuteri* 함유 Probiotics를 사용하여 플라그 형성 및 구강 질환발생에 대한 *L. reuteri* Probiotics의 효과를 비교 분석하고 제품에 포함된 다양한 합성물의 차이를 분석하는 구체적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 본 연구결과에서 *S. mutans* 감소 효과가 없었던 이유는 *L. reuteri* Probiotics와 *S. mutans* 희석 비율이 낮은데서 기인한 것으로 *L. reuteri* Probiotics가 *S. mutans* 억제 효과를 나타내기에는 충분한 균수에 도달하지 못했을 것으로 생각되며, 이는 사용한 특정 제품에 함유된 균수가 변수로 작용하였을 것으로 판단된다. 이에 Probiotics에 함유된 유익한 균들이 구강환경에서 영향력을 미치는지 정제형 Probiotics와 껌 type 중 어느 것에 더 유의성이 있는지 검증이 필요할 것으로 생각되며, 향후 이에 관한 추가적인 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다. 이러한 연구 제한점에도 불구하고 본 연구는 *L. reuteri* 함유 Probiotics가 치주질환을 유발하는 구강미생물의 증식이나 biofilm 형성에 미치는 영향 및 산도와 완충능, 산생성능 측정을 통해 우식유발능을 평가함으로써 구강질환 예방 및 증진을 위한 보조제로서의 *L. reuteri* 함유 Probiotics 활용에 대한 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

결론

시판되는 농후 발효유와 *L. reuteri* 함유 Probiotics를 선택하여 구강미생물의 증식이나 biofilm 형성에 미치는 영향을 평가하고, 각 용액의 산도와 완충능, 산생성능을 측정하여 다음과 같은 결과가 관찰되었다.

1. *S. mutans*의 생균수 측정 결과, 농후 발효유 8×10^6 CFU/ml, *L. reuteri* Probiotics 318×10^6 CFU/ml, 대조군 342×10^6 CFU/ml로 관찰되었으며, 농후 발효유에서 대조군과 *L. reuteri* Probiotics에 비해 유의미하게 *S. mutans* 억제 효과를 보였다($p < 0.05$).

2. 농도별 *A. actinomycetemcomitans* 흡광도 측정 결과, 농후 발효유의 경우 농도가 증가할수록 높은 흡광도(optical density)를 나타내어 *A. actinomycetemcomitans* 생장이 유의미하게 증가하는 양상을 보인 반면, *L. reuteri* Probiotics의 경우 각 농도에서 농후 발효유와 비교 시 유의미하게 낮은 흡광도를 나타내어 *A. actinomycetemcomitans* 생장이 억제됨을 관찰하였다($p < 0.01$).

3. Biofilm 형성 실험 결과, *L. reuteri* Probiotics와 농후 발효유에서 대조군과 비교하여 낮은 흡광도를 나타내어 biofilm 형성이 유의미하게 억제되는 양상을 보였다($p < 0.01$). 특히 2.5%의 *L. reuteri* Probiotics 낮은 농도에서도 농후 발효유보다 현저하게 biofilm 형성이 억제됨을 관찰하였다($p < 0.01$).

4. 초기 산도는 농후 발효유(4.24 ± 0.01)가 가장 낮았으며, *L. reuteri* Probiotics (5.94 ± 0.13), 대조군 (7.24 ± 0.04) 순으로 유의미한 차이를 보였다($p < 0.01$).

5. 완충능 측정결과 대조군, *L. reuteri* Probiotics, 농후 발효유 순으로 높게 나타났고, *L. reuteri* Probiotics와 농후 발효유의 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).

6. 산생성능을 평가하기 위해 pH 7로 중화시킨 후 *S. mutans*를 접종하여 배양하고 2시간 간격으로 산도를 측정한 결과, 6시간 경과 시 농후 발효유는 pH 5.5 이하로 감소하였으나, *L. reuteri* Probiotics는 pH 6.6으로 유지되어 산생성능에 의한 pH 변화에서 집단 간의 유의한 차이가 있었다.

이러한 결과는 *L. reuteri* 함유 Probiotics가 biofilm 형성, 초기 산도 및 산생성능을 적게 유도하며, 치주질환을 유발하는 *A. actinomycetemcomitans*의 감소에 긍정적인 영향을 나타내었다. 따라서 본 연구는 *L. reuteri* 함유 Probiotics의 유익한 효과를 고려할 때 구강질환의 예방 및 축진을 위한 보조제로 구강질환을 줄일 수 있음을 시사한다.

Acknowledgements

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (MOE) (NRF-2016R1D1A3B2008194).

Conflict of Interest

The authors declared no conflicts of interest.

Authorship

Conceptualization: SB Lee, KH Lee; Data collection: SB Lee; Formal analysis: SB Lee; Writing - original draft: SB Lee, KH Lee; Writing - review & editing: SB Lee, KH Lee

References

- [1] Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:653-70. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-07>
- [2] Milward MR, Chapple ILC. The role of diet in periodontal disease. *Clin Dent Health* 2013;52:18-21.
- [3] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010;192(19):5002-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
- [4] Joshupura, KJ, Rimm EB, Douglass CW, Trichopoulos D, Ascherio A, Willett WC. Poor oral health and coronary heart disease. *J Dent Res* 1996;75(9):1631-6. <https://doi.org/10.1177/00220345960750090301>
- [5] Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol* 2005;76:2075-84. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11-S.2075>
- [6] Ambalam PS, Prajapati JB, Dave JM, Nair BM, Ljungh Å, Vyas BRM. Isolation and characterization of antimicrobial proteins produced by a potential probiotic strain of human lactobacillus rhamnosus 231 and its effect on selected human pathogens and food spoilage organisms. *Microb Ecol Health Dis* 2009;21(3-4):211-20. <https://doi.org/10.3109/08910600903429052>
- [7] Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Et Assoc* 2001;101(2):229-41. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(01\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(01)00060-8)

- [8] Perdigon G, Alvarez S, Nader de Macias ME, Roux ME, de Ruiz Holgado AP. The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *J Food Protection* 1990;53(5):404-10. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.5.404>
- [9] Kruis W, Schütz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:853-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1997.00225.x>
- [10] Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45(7):1462-4. <https://doi.org/10.1023/A:1005588911207>
- [11] Meurman JH. Probiotics: Do they have a role in oral medicine and dentistry?. *Eur J Oral Sci* 2005;113(3):188-96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2005.00191.x>
- [12] Badet C, Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J* 2008;2:38. <https://doi.org/10.2174/1874285800802010038>
- [13] Ishihara K, Miyakawa H, Hasegawa A, Takazoe I, Kawai Y. Growth inhibition of *streptococcus mutans* by cellular extracts of human intestinal lactic acid bacteria. *Infect Immun* 1985;49(3):692-4.
- [14] Nikawa H, Makihiro S, Fukushima H, Nishimura Y, Ozaki K, Ishida S, et al. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decrease the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol* 2004;95(2):219-23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.006>
- [15] Caglar E, Kavaloglu Cildir S, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary *mutans streptococci* and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *lactobacillus reuteri* atcc 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand* 2006;64(5):314-8. <https://doi.org/10.1080/00016350600801709>
- [16] Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33(5):674-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.5.674>
- [17] Hasslöf P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacillian *in vitro* study. *BMC Oral Health* 2010;10(1):18. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-10-18>
- [18] Jeong EG, Lee JC, Seo JY, Kim SY, Kim WS, Yun WH, et al. Inhibitory effects of enterococcus faecium isolated from korean infants on oral pathogens. *J Korean Acad Periodontol* 2008;38(1):31-40. <https://doi.org/10.5051/jkape.2008.38.1.31>
- [19] Haukioja A. Probiotics and oral health. *Eur J Dent* 2010;4(03):348-55.
- [20] Söderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL. Probiotic lactobacilli interfere with *streptococcus mutans* biofilm formation *in vitro*. *Curr Microbiol* 2011;62(2):618-22. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9752-9>
- [21] Haukioja A, Loimaranta V, Tenovuo J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology* 2008;23(4):336-43. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00435.x>
- [22] Sissons CH, Wong L, Shu M. Factors affecting the resting ph of *in vitro* human microcosm dental plaque and *streptococcus mutans* biofilms. *Arch Oral Biol* 1998;43(2):93-102. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(97\)00113-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(97)00113-1)
- [23] Katz S, Olson BL, McDonald JL. Buffering capacity, sugar content, and cariogenicity of foods. *J Dent Res* 1974;53(FEB):206.
- [24] Hur YW, Kim SJ, Lee KH. *In vitro* study of baby food and breakfast cereal as for buffering capacity, acid production by *streptococcus mutans*, and synthetic hydroxyapatite decalcification. *J WonKwang Dent Res* 1990;1(1):167-76.
- [25] Shin HS, Kim SM, Choi NK, Yang KH, Kang MS. The effect of fermented milk on viable cell count and biofilm formation of *streptococcus mutans*. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2009;36(3):358-66.
- [26] Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J* 2006;30(2):55-60.

- [27]Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. Acta Odontol Scand 2009;67(1):19-24. <https://doi.org/10.1080/00016350802516170>
- [28]Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *lactobacilli reuteri* (prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. J Oral Microbiol 2010;2(1):5344. <https://doi.org/10.3402/jom.v2i0.5344>