

# *Fusobacterium nucleatum* 의 유황화합물 생성에 영향을 미치는 인자

오인근 · 박은혜 · 오종석\* · 양규호

전남대학교 치과대학 소아치과학과 교실 및 치의학 연구소 전남대학교 의과대학 미생물학교실\*

## 국문초록

구취를 일으키는 구강 내 혐기성 세균 일종인 *Fusobacterium nucleatum*은 유황 성분이 함유된 배지에서 H<sub>2</sub>S와 같은 휘발성 유황화합물을 생성하고 철 성분과 결합하면 FeS를 형성한다. 구강내 여러 인자에 의하여 *Fusobacterium nucleatum*에 의하여 생성되는 유황화합물 농도가 달라진다. 본 연구에서는 *Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성시 영양 물질과 pH의 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 배지에 sodium thiosulfate가 1.0% 되도록 첨가하면 배지의 흡광도는  $0.817 \pm 0.032$ 로, L-cysteine hydrochloride를 0.05% 되도록 첨가하면  $1.297 \pm 0.024$ 가 되었다.
2. 배지에 자일리톨을 첨가하면 배지의 흡광도는  $0.799 \pm 0.032$ 인데 반하여 포도당과 병합으로 첨가하면  $1.775 \pm 0.003$ 으로, 과당과 병합으로 첨가하면  $1.648 \pm 0.022$ 로 증가하였다.
3. 배지의 pH가 5.5 이상이면 휘발성 유황화합물 농도는 20,000 ppb 이상이였다. 배지의 흡광도는 배지 내 L-cysteine hydrochloride 농도가 높을수록 높았으며, 배지의 pH가 산성으로 갈수록 낮았다.
4. 배지 위에 증류수나 식염수가 있을 때, 그리고 그 양이 적을수록 휘발성 유황화합물 농도는 높았다. 이상의 결과를 종합하면 *Fusobacterium nucleatum*에 의한 유황화합물 생성이 자일리톨과 산에 의하여 억제되었다.

**주요어** : *Fusobacterium nucleatum*, 유황화합물, 자일리톨

## I. 서 론

구취(halitosis, oral malodor)는 구강 및 인접 기관으로부터 유래되는 냄새로서 많은 사람이 구취를 호소한다. 사람들이 구취에 대해 민감하게 반응하여 일부 사람들은 구취 문제로 사람을 피하기도 하며, 구취가 심한 경우는 신경정신과적 문제를 일으키기까지 한다. 일반 사람들의 관심과 더불어 구취의 원인, 진단, 치료에 관한 연구가 Tonzetic<sup>1,2)</sup>에 의해 이루어졌다.

구취의 85-90%가 구강에서 유래하고 5-10%는 코로부터, 3%는 편도선으로부터, 기타 1%로 추정하고 있다<sup>3)</sup>. 구취의 주요 성분은 시스테인(cystein)으로부터 만들어지는 황화수소(hydrogen sulfide)와 메치오닌으로부터 만들어지는 메틸머캡탄(methyl mercaptan)이다. 그외의 성분으로는 스카톨(scatole), 카다베린(cadaverine), 푸트레신(putrescine), 이소바린산(isovaleric acid)이 있다<sup>3)</sup>. 이러한 성분은 세균 특히 혐기성 세균에 의해 발생되는데 이러한 구취 발생 세균은 주로 혀의 가장 뒷 면에 존재한다. 이 부위는 타액에 의한 세정 작용이 잘 안 되고 많은 작은 함몰이 있어 세균이 계속적으로 살아가는 장소가 된다. 일부 사람의 혀 뒷 면에서 일어나는 postnasal drip은 세균이 증식할 수 있는 근거지로 제공되고 있다. 혀 뒷 면에서

의 혐기성 세균 증식이 구취의 원인으로 가장 중요하지만 그 외 소홀한 구강 위생 관리, 치은 염증, 잘못된 치아 치료, 깨끗하지 못한 틀니, 구강내 염증 같은 원인에 의해서도 발생한다.

구강에서 혐기성 세균이 탈락 상피세포와 백혈구 등을 분해하여 휘발성 유황화합물(volatile sulfur compounds)을 생성한다. 휘발성 유황화합물은 유황을 함유하는 시스테인과 메치오닌과 같은 아미노산으로부터 주로 생성되는 것으로 보고되고 있다<sup>4)</sup>. 시스테인으로부터 황화수소를 생성하는 세균은 *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Centipeda*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*이며, 메치오닌으로부터 메틸머캡탄을 만드는 세균은 *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 황화수소나 메틸머캡탄을 생성하는 주요 세균인 *Fusobacterium nucleatum*은 혐기성 세균으로 구강에 정상적으로 존재하면서 치주염을 일으키는 그람음성 세균이다.

구강에는 구취 발생에 영향을 미치는 여러 인자들이 존재한다. 단백질과 탄수화물과 같은 영양 물질과 pH의 변화가 혐기성 세균의 구취 발생에 영향을 미칠 수 있으며, 타액의 양도 영향을 미칠 것이다.

본 연구에서는 *Fusobacterium nucleatum*이 유황화합물을

생성할 때 영향을 미치는 여러 인자에 대해 연구하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1) 공시세균 및 배양

*Fusobacterium nucleatum*(ATCC 10953, Rockville, MA, USA)을 공시하였으며, 배양은 동결 건조로 보관중인 세균을 1.0% yeast extract를 첨가한 brain heart infusion broth(BHI, Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C, 혐기 상태에서 24시간 배양하였다.

### 2) 유황화합물 생성에 대한 유황 성분의 영향

*Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성에 미치는 유황 성분의 영향을 관찰하기 위하여 BHI broth에 1.0% yeast extract, 0.1 M MOPS (3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.1% ferrous sulfate를 첨가하여 pH 7.5로 조정하였다. 유황 분자가 있는 sodium thiosulfate, L-cysteine hydrochloride( $C_3H_7NO_2S \cdot HCl$ ), L-methionine ( $CH_3S(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$ )을 농도 별로 각각 첨가한 1.0 ml 용액을 1.5 ml의 microcentrifuge tube에 넣고  $2 \times 10^7$  *Fusobacterium nucleatum*을 접종하였다. 혐기 상태에서 24시간 배양한 후, 액체 배지내 FeS 농도를 알기 위하여 분광광도계(spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan) 700 nm 파장에서 배지의 흡광도(optical density)를 측정하였으며 3번 실험을 반복하여 평균을 구하였다. 흡광도 측정 시 blank는 sodium thiosulfate, L-cysteine hydrochloride, L-methionine을 첨가하지 않은 배지에 *Fusobacterium nucleatum*을 접종한 것을 이용하였다. 24시간 배양한 세균 배양액을 희석하여 1.0% yeast extract, 0.0005% hemin, 0.0001% vitamin K1, 5.0% sheep blood를 첨가한 BHI agar(Difco, Detroit, MI, USA) 상에 접종하여 혐기 상태에서 48시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

### 3) 유황화합물 생성에 대한 탄수화물의 영향

*Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성에 미치는 탄수화물의 영향을 관찰하기 위하여 0.1 M MOPS, 0.05% L-cysteine hydrochloride, 0.1% ferrous sulfate를 첨가한 tryptic soy broth(Difco, Detroit, MI, USA)의 pH를 7.5로 조정한 다음, 포도당, 갈락토스, 과당, 유당, 자당, 솔비톨, 자일리톨을 각각 0.25%가 되도록 단독 또는 병합으로 첨가한 1.0 ml 용액을 1.5 ml의 microcentrifuge tube에 넣고  $2 \times 10^7$  *Fusobacterium nucleatum*을 접종하였다. 이 때 대조군에는 배지에 탄수화물을 첨가하지 않았다. 혐기 상태에서 24시간 배양한 후, 휘발성 유황화합물 농도를 측정하기 위하여 시험관 뚜껑을 열고 10 ml 주사기로 배양액 위에서 가스 1 ml를 취하고 주사기 피스톤을 10 ml까지 잡아당겨 10배 희석한 후 Halimeter®(Interscan, Chatsworth, CA, USA)에 장착된

관을 통해 가스를 서서히 주입하여 측정하였으며 3회 실험을 반복하여 평균을 구하였다. 배지의 흡광도는 분광광도계 700 nm 파장에서 측정하였으며 3번 실험을 반복하여 평균을 구하였다. 흡광도 측정시 blank는 L-cysteine hydrochloride만 첨가하지 않은 배지에 *Fusobacterium nucleatum*을 접종한 것을 이용하였다.

### 4) 유황화합물 생성에 대한 pH의 영향

*Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성에 미치는 pH의 영향을 관찰하기 위하여 1.0% yeast extract, 0.05% L-cysteine hydrochloride를 첨가한 BHI broth에 0.1 M MOPS를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군을 만들고 pH를 각각 7.5, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0으로 조정하여 1.0 ml 용액을 1.5 ml의 microcentrifuge tube에 넣고  $2 \times 10^7$ 의 *Fusobacterium nucleatum*을 접종하였다. 혐기 상태에서 24시간 배양한 후, 위의 방법으로 휘발성 유황화합물 농도를 측정하였다. 배지의 흡광도를 보기 위하여 1.0% yeast extract, 0.05% L-cysteine hydrochloride, 0.1% ferrous sulfate를 첨가한 BHI broth에 0.1 M MOPS를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군을 만들고 pH를 각각 7.5, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0으로 조정하여 1.0 ml 용액을 1.5 ml의 microcentrifuge tube에 넣고  $2 \times 10^7$ 의 공시세균을 접종하였다. 혐기 상태에서 24시간 배양한 후, 위의 방법대로 배지의 흡광도를 측정하였다. 그리고 배양액의 pH를 측정하였다.

생성된 유황화합물 농도에 대한 L-cysteine hydrochloride 농도와 pH의 영향을 관찰하기 위하여 BHI broth에 1.0% yeast extract, 0.1 M MOPS, 0.1% ferrous sulfate를 첨가하고 pH를 7.5로 조정한 다음, L-cysteine hydrochloride를 0.025%, 0.05%, 0.1%를 첨가한 1.0 ml 용액을 1.5 ml의 microcentrifuge tube에 넣고  $2 \times 10^7$  *Fusobacterium nucleatum*을 접종하였다. 혐기 상태에서 24시간 배양한 후, 배양액 용액의 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 조정하였다. 실온에 1일간 방치한 다음, 위의 방법대로 배지의 흡광도를 측정하였다.

### 5) 휘발성 유황화합물 농도에 대한 증류수와 식염수의 영향

고체배지상에서 *Fusobacterium nucleatum*에 의해 생성되는 휘발성 유황화합물 농도에 미치는 용액 유무와 용액 양의 영향을 관찰하기 위하여 1.0% yeast extract, 0.0005% hemin, 0.0001% vitamin K1을 첨가한 BHI agar 4 ml를 시험관에 넣고 *Fusobacterium nucleatum* 배양액 0.1 ml를 접종하였다. 5분간 건조시킨 다음, 1, 2, 3, 4, 5 ml 증류수와 0.85% NaCl 용액 1.0 ml를 각각 첨가하여 혐기성 배양기에서 37°C, 24시간 배양하였다. 배양한 후, 위의 방법대로 휘발성 유황화합물 농도를 측정하였다.

6) 통계적 처리

각 군의 휘발성 유황화합물 농도와 배지의 흡광도를 Mann-Whitney test를 이용하여 비교하였으며 p value가 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 평가하였다.

Ⅲ. 연구성적

1) 유황화합물 생성에 대한 유황 성분의 영향

*Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성에 미치는 유황 성분의 영향을 관찰하기 위하여 배지에 sodium thiosulfate를 0.125%가 되도록 첨가하면 배지의 흡광도는  $0.137 \pm 0.027$ , 0.25%에서는  $0.348 \pm 0.078$ , 0.5%에서는  $0.645 \pm 0.045$ , 1.0%에서는  $0.817 \pm 0.032$ 로 증가되었다. 이 때 *Fusobacterium nucleatum*의 생균수는 ml당  $1.4 \times 10^8$ 에서  $2.6 \times 10^8$ 으로 비슷하였다. Sodium thiosulfate의 농도가 2.0%가 되면 배지의 흡광도나 생균수가 감소되었다(Table 1). 배지에 L-cysteine hydrochloride를 0.025%가 되도록 첨가하면 배지의 흡광도는  $1.306 \pm 0.002$ , 0.05%에서는  $1.297 \pm$

$0.024$ , 0.1%에서는  $1.317 \pm 0.037$ , 0.2%에서는  $1.318 \pm 0.001$ , 0.4%에서는  $1.313 \pm 0.003$ 으로 비슷하였으며, 이 때 *Fusobacterium nucleatum*의 생균수는 ml당  $2.0 \times 10^8$ 에서  $5.4 \times 10^8$ 으로 비슷하였다(Table 2). 배지에 L-methionine을 0.025%가 되도록 첨가하면 배지의 흡광도는  $-0.010 \pm 0.052$ , 0.05%에서는  $0.020 \pm 0.080$ , 0.1%에서는  $0.004 \pm 0.100$ , 0.2%에서는  $0.004 \pm 0.089$ , 0.4%에서는  $-0.110 \pm 0.084$ 로 모두 낮았으며, 이 때 공시세균의 생균수는 ml당  $3.4 \times 10^7$ 에서  $5.4 \times 10^7$ 으로 비슷하였다(Table 3).

2) 유황화합물 생성에 대한 탄수화물의 영향

*Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성에 미치는 탄수화물의 영향을 관찰하였을 때, 대조군에서의 휘발성 유황화합물 농도는  $1040 \pm 207$  ppb이었고 배지에 포도당을 첨가하면  $932 \pm 548$  ppb, 갈락토스를 첨가하면  $669 \pm 231$  ppb, 과당을 첨가하면  $1,840 \pm 260$  ppb, 유당을 첨가하면  $1,700 \pm 208$  ppb, 자당을 첨가하면  $903 \pm 117$  ppb, 솔비톨을 첨가하면  $1,465 \pm 535$  ppb로 유의한 차이가 없었으나, 자일리톨을 첨가하면 254

**Table 1.** Effect of sodium thiosulfate on the production of sulfur compounds by *Fusobacterium nucleatum*

Concentration (%)	OD <sub>700</sub> * ± SD	CFU**/ml
0.125	$0.137 \pm 0.027$	$1.4 \times 10^8$
0.25	$0.348 \pm 0.078$	$2.6 \times 10^8$
0.5	$0.645 \pm 0.045$	$2.4 \times 10^8$
1.0	$0.817 \pm 0.032$	$1.4 \times 10^8$
2.0	$0.243 \pm 0.066$	$3.6 \times 10^8$

\*: Optical density at 700 nm in spectrophotometer  
 \*\*: Colony forming unit

**Table 2.** Effect of L-cysteine HCl on the production of sulfur compounds by *Fusobacterium nucleatum*

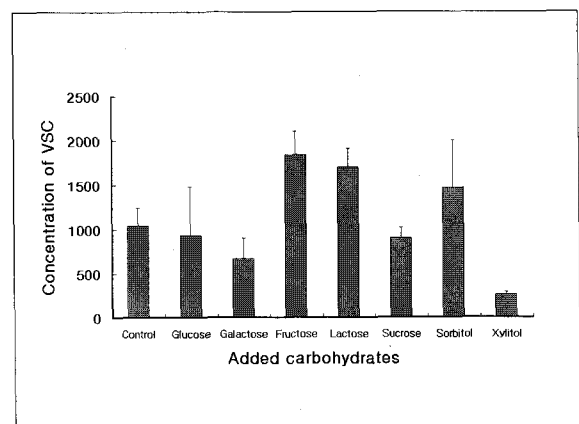
Concentration (%)	OD <sub>700</sub> * ± SD	CFU**/ml
0.025	$1.306 \pm 0.002$	$2.5 \times 10^8$
0.05	$1.297 \pm 0.024$	$3.0 \times 10^8$
0.1	$1.317 \pm 0.037$	$5.0 \times 10^8$
0.2	$1.318 \pm 0.001$	$5.4 \times 10^8$
0.4	$1.313 \pm 0.003$	$2.0 \times 10^8$

\*: Optical density at 700 nm in spectrophotometer  
 \*\*: Colony forming unit

**Table 3.** Effect of L-methionine on the production of sulfur compounds by *Fusobacterium nucleatum*

Concentration (%)	OD <sub>700</sub> * ± SD	CFU**/ml
0.025	$-0.010 \pm 0.052$	$5.4 \times 10^7$
0.05	$0.020 \pm 0.080$	$4.6 \times 10^7$
0.1	$0.004 \pm 0.100$	$3.9 \times 10^7$
0.2	$0.004 \pm 0.089$	$3.6 \times 10^7$
0.4	$-0.110 \pm 0.084$	$3.4 \times 10^7$

\*: Optical density at 700 nm in spectrophotometer  
 \*\*: Colony forming unit



**Fig. 1.** Effect of 0.25% carbohydrates on the concentration of volatile sulfur compounds produced by *Fusobacterium nucleatum*. The concentration of volatile sulfur compounds was measured with Halimeter®. Control was that none of any carbohydrate was added to the media.

±29 ppb로 감소되었다(p<0.05)(Fig. 1). 배지의 흡광도는 대조군에서는 1.339±0.210이었고 배지에 포도당을 첨가하면 1.355±0.010, 갈락토스를 첨가하면 1.337±0.128, 과당을 첨가하면 1.543±0.049, 유당을 첨가하면 1.685±0.083, 자당을 첨가하면 1.743±0.010, 솔비톨을 첨가하면 1.767±0.045로 유의한 차이가 없었으나, 자일리톨을 첨가하면 0.883±0.018로 감소되었다(p<0.05)(Fig. 2). 자일리톨과 다른 당과의 병합 시의 효과를 보았을 때, 자일리톨 단독으로 첨가하면 배지의 흡광도는 0.799±0.032인데 반하여 포도당과 자일리톨을 병합으로 첨가하면 1.775±0.003으로, 과당과 자일리톨을 병합으로 첨가하면 1.648±0.022로 증가되었다(Fig. 3).

3) 유황화합물 생성에 대한 pH의 영향

*Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성에 미치는 pH의 영향을 관찰하였을 때, ferrous sulfate를 첨가하지 않은 배지에서는 MOPS의 유무와 관계없이 배지의 pH를 5.5 이상으로 조정하여 배양하면 휘발성 유황화합물 농도는 20,000 ppb 이상이었고 pH도 큰 차이가 없었다. 배지의 pH를 5.0으로 조정하여 배양하면 139±34, 202±35로 감소되었다(Table 4). Ferrous sulfate가 0.1% 되도록 첨가한 배지에 0.1 M MOPS를 첨가하여 배지의 pH를 7.5로 조정하여 *Fusobacterium nucleatum*를 배양하면 배지의 흡광도는 1.091±0.006, pH 7.0에서는 1.073±0.040, pH 6.5에서는 1.328±0.013이었으나, pH 6.0 이하에서는 배양전보다 오히려 투명하여져서 흡광도가 마이너스가 되었다. MOPS를 첨가하지 않은 배지에서도 pH 7.5에서는 1.095±0.010, pH 7.0에서는 1.349±0.039, pH 6.5에서는 1.077±0.057, pH 6.0 이하에서는 마이너스가 되었다(Table 5).

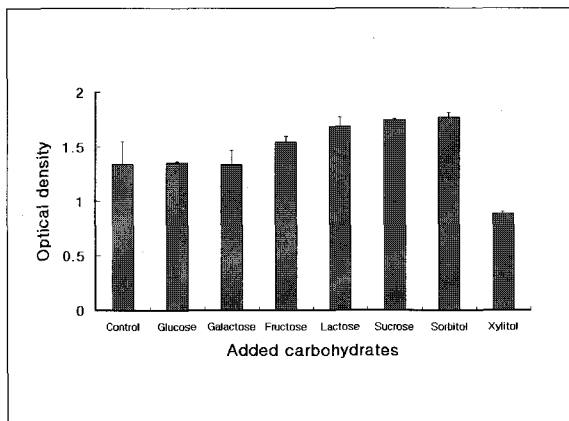


Fig. 2. Effect of 0.25% carbohydrates on the optical density of sulfur compounds produced by *Fusobacterium nucleatum*. The optical density of sulfur compounds was measured at 700 nm in spectrophotometer. Control was that none of any carbohydrate was added to the media.

*Fusobacterium nucleatum*에 의해 유황화합물 생성 후, 생성된 유황화합물에 대한 pH의 영향을 관찰하기 위하여 0.025% L-cysteine hydrochloride를 함유한 배양액의 pH를 7.0으로 조정하여 실온에 24시간 방치하면 배지의 흡광도는 0.495±0.009이었다. 그러나 배지의 pH를 6.5로 조정하면 배지의 흡광도는 0.178±0.193으로 감소되고 pH를 6.0 이하로 조정하면 배지의 흡광도는 마이너스가 되었다. 0.05% L-cysteine hydrochloride를 함유한 배양액에서는 pH를 7.0으로 조정하면 배지의 흡광도는 0.767±0.041이었으며, pH를 6.5, 6.0으로 조정하면 각각 0.629±0.031, 0.356±0.129로 감소되었고 pH를 5.5 이하로 조정하면 배지의 흡광도는 마이너스가 되었다. 0.1% L-cysteine hydrochloride를 함유한 배양액에서는 pH 7.0에서의 배지 흡광도는 0.985±0.020이었으며, pH가 4.5에서도 0.902±0.050으로 pH에 의한 차이가 크지 않았다(Table 6).

4) 휘발성 유황화합물 농도에 대한 증류수나 식염수의 영향

BHI agar에 *Fusobacterium nucleatum*을 증류수나 식염수를 가하지 않고 배양한 후 생성된 휘발성 유황화합물 농도는 2,230±120 ppb이었으나, 증류수 1 ml를 가하고 배양하면 휘발성 유황화합물 농도는 4,230±680 ppb로 증가되었다. 증류수 2 ml를 가하면 779±478 ppb로, 3 ml를 가하면 487±131 ppb로, 4 ml를 가하면 145±25 ppb로, 5 ml를 가하면 42±3 ppb로 감소되었다. 식염수 1 ml를 가하고 배양하면 휘발성 유황화합물 농도는 4,147±1,343 ppb로 증류수 1 ml를 가할 때와 비슷하였다(Table 7).

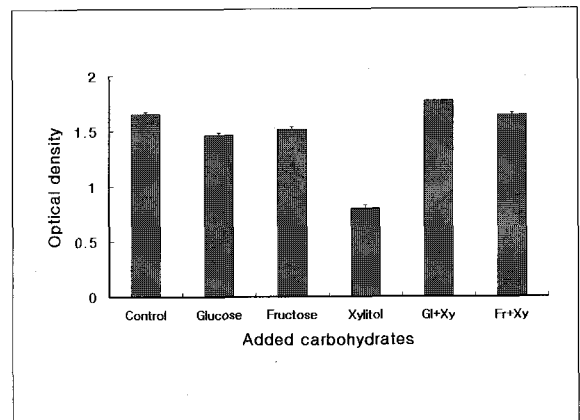


Fig. 3. Effect of 0.25% glucose and 0.25% fructose on the reduction of optical density by 0.25% xylitol. The optical density of sulfur compounds produced by *Fusobacterium nucleatum* was measured at 700 nm in spectrophotometer. Control was that none of any carbohydrate was added to the media.

**Table 4.** Concentration of volatile sulfur compounds after culturing *Fusobacterium nucleatum* in the media of various pH without ferrous sulfate

Initial pH	Media with 0.1 M MOPS		Media without MOPS	
	Conc. of VSC (ppb)	Final pH	Conc. of VSC (ppb)	Final pH
7.5	>20,000	6.93	>20,000	6.24
7.0	>20,000	6.49	>20,000	6.13
6.5	>20,000	6.15	>20,000	6.02
6.0	>20,000	5.81	>20,000	5.80
5.5	>20,000	5.38	>20,000	5.50
5.0	139±34	4.74	202±35	4.78

**Table 5.** Optical density of sulfur compounds produced by *Fusobacterium nucleatum* cultured in the media of various pH with 0.1% ferrous sulfate

Initial pH	Media with 0.1 M MOPS		Media without MOPS	
	OD <sub>700</sub> *	Final pH	OD <sub>700</sub>	Final pH
7.5	1.091±0.006	6.92	1.195±0.010	6.34
7.0	1.073±0.040	6.48	1.349±0.039	6.10
6.5	1.328±0.013	6.17	1.077±0.057	5.93
6.0	-0.209±0.108	5.65	-0.394±0.142	5.30
5.5	-0.118±0.012	4.95	-0.222±0.034	4.89
5.0	-0.054±0.019	4.55	-0.448±0.016	4.58

\*: Optical density at 700 nm in spectrophotometer

**Table 6.** Effect of adjusted pH on the concentration of sulfur compounds produced by *Fusobacterium nucleatum* in the media containing various concentrations of L-cysteine hydrochloride

pH	OD <sub>700</sub> * in the media containing L-cysteine HCl at the concentration of		
	0.025%	0.05%	0.1%
4.5	-1.121±0.048	-0.297±0.020	0.902±0.050
5.0	-1.042±0.002	-0.177±0.006	0.919±0.031
5.5	-0.975±0.037	-0.096±0.010	0.919±0.033
6.0	-0.059±0.077	0.356±0.129	0.872±0.054
6.5	0.178±0.193	0.629±0.031	0.984±0.016
7.0	0.495±0.009	0.767±0.041	0.985±0.020

\*: Optical density at 700 nm in spectrophotometer

**Table 7.** Effect of added distilled water and saline solution above culturing solid media on the concentration of volatile sulfur compounds produced by *Fusobacterium nucleatum*

Added fluid	Conc. of VSC (ppb)
No	2,230±120
Distilled water 1 ml	4,230±680
2 ml	779±478
3 ml	487±131
4 ml	145±25
5 ml	42±3
0.85% NaCl solution	4,147±1,343

#### IV. 고 찰

구취를 일으키는 휘발성 유황화합물의 주요 성분은 황화수소와 메틸머캡탄이며, 그외 다이메틸 설퍼이드(dimethyl sulfide)와 다이메틸 다이설퍼이드(dimethyl disulfide) 등이 있다. 이러한 휘발성 유황화합물은 메치오닌, 시스테인, 시스틴(cystine)을 갖고 있는 단백질로부터 생성된다<sup>1)</sup>. 음식물 찌꺼기와 더불어 타액은 아미노산으로 가수분해되기 쉬운 단백질을 많이 함유하고 있어 구취 발생에 중요한 유황 공급원이 되며, 혀는 특히 그 해부학적 특수성으로 인해 설대의 침착을 용이하게 하고 혐기성 세균의 증식을 조장하게 한다.

구취는 주로 혀에 존재하는 미생물에서 기인하며, 치은 연하 치태내에 80가지 이상의 구강 세균이 있고 *in vitro*에서도 휘발성 유황화합물이나 구취 유발성 지방산을 생성할 수 있는 것으로 보고되었다<sup>6)</sup>. Kleinberg와 Codipilly<sup>7)</sup>는 12종의 그람음성 세균과 13종의 그람양성 세균이 악취를 발생시키는 기질로 아미노산을 사용한다고 보고하였다. 결국 구취를 발생시키는 세균은 여러 종으로 특히 *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella alcalescens*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loeschii*, *Treponema denticola*, *Klebsiella pneumoniae* 등과 같은 그람음성 혐기성 세균이 주요한 구취 생성균이다.

구취의 정량적 측정은 코로 직접 냄새를 맡는 것에서 측정기기를 이용한 방법에 이르기까지 다양하게 발전되어 왔다. 가스 크로마토그래피(gas chromatography)로 구취를 동정하고 정량하는 방법은 가장 정확하다고 알려져 있지만, 전문적인 지식이 필요하고 고가이며 이동성이 떨어지고 측정시간이 오래 걸려 치과 진료실에서 사용하기에 적절하지 않다<sup>8,9)</sup>. 최근 Halimeter<sup>®</sup>로 알려진 휴대용 유황 검사기(portable sulfide monitor)가 보급되어 황화수소와 메틸머캅탄의 농도를 10억분의 1단위(ppb)까지 측정할 수 있고 가스 크로마토그래피에 비해 값이 저렴하며 숙련되지 않은 사람도 사용할 수 있고 이동성이 있으며 측정이 간편하고 재현성이 있어 편리하게 환자의 구취를 객관적으로 정량할 수 있다<sup>10,11)</sup>. 공기중으로 나오는 황화수소와 메틸머캅탄을 측정하는 것과는 달리 액체에서도 황화수소가 철 성분과 결합하여 검정색의 침전물 즉 FeS를 만드므로 배지 흡광도를 분광광도계로 측정할 수 있다<sup>12)</sup>. 본 논문에서는 Halimeter<sup>®</sup>와 분광광도계로 *Fusobacterium nucleatum*이 생성하는 유황화합물의 양을 측정하여 비교하였다.

*Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성에 미치는 배지내 유황 성분의 영향을 관찰하기 위하여 배지에 sodium thiosulfate를 0.125%에서 1.0%를 첨가하였을 때, 세균 숫자는 증가하지 않으면서 배지의 흡광도는  $0.817 \pm 0.032$ 로 증가하였다. 결국 *Fusobacterium nucleatum*이 sodium thiosulfate를 분해하여 이용하고 있다는 것을 의미한다. 배지에 L-cysteine hydrochloride를 가하면 세균 숫자는 증가하지 않으면서 배지의 흡광도는 약 1.300으로 증가하였으나, L-methionine을 가하면 세균수나 배지의 흡광도가 전혀 증가하지 않은 것은 Persson 등<sup>5)</sup>의 연구에서와 같이 *Fusobacterium nucleatum*이 L-methionine을 분해하나 메틸머캅탄이 만들어져 분광광도계로 측정되지 않기 때문이다. 배지에 L-methionine 첨가시 흡광도가 마이너스로 되는 것은 검정색을 나타내는 FeS가 생성이 안되면서 배지 성분이 배양시 세균에 의하여 분해되어 세균을 접종하기 전보다 배지의 색이 옅게 됨에 따라 배지의 흡광도가 감소되기 때문으로 생각된다.

*Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성에 미치는 탄수화물의 영향을 관찰하였을 때, 포도당, 갈락토스, 과당, 유당, 자당, 솔비톨을 첨가시 유의한 차이가 없었으나, 자일리톨을 첨

가하면 휘발성 유황화합물 농도나 배지의 흡광도가 감소하였다. 치아우식증을 감소시킬 목적으로 사용되고 있는 자일리톨은 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제하여 일어나며, 이러한 증식 억제작용은 일부 다른 연쇄상구균에 대해서도 일어난다<sup>13)</sup>. 자일리톨은 *Streptococcus mutans*의 phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase system에 의하여 세균 내로 운반되고 인산화되어 xylitol phosphate가 된다. 이 xylitol phosphate는 세균 내에서 대사되지 않고 축적되어서 다른 인산화가 된 탄수화물이 세포에 해로운 것처럼 xylitol phosphate도 *Streptococcus mutans*에 독성을 나타내어 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제하기 때문이다<sup>14)</sup>. 세균 내 xylitol phosphate가 축적되어 증식이 되지 않은 현상은 *Lactobacillus casei*<sup>15)</sup>와 *E. coli*<sup>16)</sup>에서도 보고되었다. *Fusobacterium nucleatum*에 자일리톨과 과당 또는 포도당과 병합으로 첨가하면 배지의 흡광도는 다시 증가하여 자일리톨 단독시의 유황화합물 생성 억제작용은 없어지게 되었다. 이러한 병합효과는 *Streptococcus mutans*에서도 유사하여 자일리톨 증식 억제작용이 과당이나 자당에 의해서 없어지게 되는 것으로<sup>17)</sup> 보아 *Fusobacterium nucleatum*에 대한 자일리톨의 작용도 같은 기전으로 일어나는 것으로 추정된다. *Fusobacterium nucleatum*에 탄수화물 첨가시 Fig. 1에서와 같이 Halimeter<sup>®</sup>를 사용하여 측정된 휘발성 유황화합물 농도에 비교하여 Fig. 2에서의 분광광도계에 의한 배지의 흡광도가 자일리톨을 제외한 탄수화물 첨가시 차이가 별로 나지 않은 것으로 보아 배지의 흡광도 측정이 덜 예민한 것으로 생각된다. 그러나 배지에서의 흡광도 측정은 액체 배지내 유황화합물의 양을 측정하거나 높은 농도의 유황화합물 농도시 유리할 것으로 본다.

*Fusobacterium nucleatum*의 유황화합물 생성에 미치는 pH의 영향을 관찰하였을 때, ferrous sulfate를 첨가하지 않은 배지에서 pH 5.5 이상에서는 휘발성 유황화합물을 큰 차이 없이 생성하였다. Ferrous sulfate를 첨가한 배지에서는 pH 6.0 이하에서는 마이너스가 되었다. Kolmos와 Schmidt<sup>18)</sup>도 황화수소 생성균이 FeS를 보이지 않는 위음성을 나타내는 이유가 탄수화물의 발효로 인한 배지의 산성화에 기인한다고 보고하였다. *Fusobacterium nucleatum*에 의해 생성된 유황화합물에 대한 pH의 영향을 관찰하였을 때, 0.025% L-cysteine hydrochloride를 함유한 배양액의 pH를 6.0 이하로 조정하거나 0.05% L-cysteine hydrochloride를 함유한 배양액의 pH를 5.5 이하로 조정하면 배지의 흡광도는 마이너스가 되었다. 그러나 0.1% L-cysteine hydrochloride를 함유한 배양액에서는 pH를 4.5로 조정하여도 pH 7.0에서와 배지의 흡광도는 비슷하였다. 배지 내 L-cysteine hydrochloride의 농도가 높으면 많은 양의 황화수소가 만들어져 FeS의 농도도 증가함에 따라 pH가 감소하여도 배지의 흡광도가 감소되지 않았다.

*Fusobacterium nucleatum*을 고체배지 상에 배양할 때, 증류수나 식염수가 있으면 없을 때보다도 휘발성 유황화합물 농도는 높아지는데 이는 *Fusobacterium nucleatum*에 의해 생

성된 휘발성 유황화합물을 용액에 있다가 서서히 공기중에 방출하는 것으로 사료된다. 그러나 배지상에 증류수 양이 많아질수록 휘발성 유황화합물 농도는 급격히 감소하게 되는데 이는 증류수 양이 많아질수록 유황화합물이 증류수에 더 높은 농도로 녹는 것으로 생각된다. 앞으로 이러한 결과를 토대로 *Fusobacterium nucleatum*에 의한 유황화합물 즉 구취 생성 억제에 대한 연구가 지속되어야 될 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Tonzetich J : Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. J Periodontol, 48:13-20, 1977.
2. Tonzetich J : Oral malodor: an indicator of health status and oral cleanliness. Int Dent J, 28:309-319, 1977.
3. Rosenberg M : The science of bad breath. Sci Am, 286:72-78, 2002.
4. Schmidt NF, Missan SR, Tarbett WJ : The correlation between organoleptic mouth-odor ratings and levels of volatile sulphur compounds. Oral Surg, 45:560-567, 1978.
5. Persson S, Edlund M-B, Claesson R, et al. : The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol, 5:195-201, 1990.
6. 김영구, 이승우, 정성창 : 구취 진단 및 연구방법. 2판, 신홍인터내셔널, 서울, 1-15, 1998.
7. Kleinberg I, Codipilly M : The biological basis of oral malodor formation. In: Rosenberg M : Bad breath: research perspective. 1st ed, Ramot Publishing, Tel Aviv, 13-39, 1995.
8. Rosenberg M, Christopher AG, McCulloch CAG : Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. J Periodontol, 63:776-781, 1992.
9. Solis-Gaffar MC, Niles HP, Rainieri WC, et al. :

Instrumental evaluation of mouth odor in a human clinical study. J Dent Res, 54:351-357, 1975.

10. Rosenberg M, Septon I, Bar-Ness R, et al. : Halitosis measurement by an industrial sulphide monitor. J Periodontol, 62:487-489, 1991.
11. Yaegaki K, Coil JM : Examination, classification, and treatment of halitosis: clinical perspectives. Can Dent Assoc, 66:257-261, 2000.
12. Williams ST, Goodfellow M : Use of peptone iron agar for the detection of hydrogen sulfide. J Bacteriol, 91:907, 1966.
13. Vadeboncoeur C, Trahan L, Mouton C, et al. : Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. J Dent Res, 62:882-884, 1983.
14. Trahan L, Bareil M, Gauthier L, et al. : Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. Caries Res, 19:53-63, 1985.
15. London J, Hausman S : Xylitol-mediated transient inhibition of ribitol utilization by *Lactobacillus casei*. J Bacteriol, 150:657-661, 1982.
16. Reiner AM : Xylitol and D-arabitol toxicities due to derepressed fructose, galactitol, and sorbitol phosphotransferases of *Escherichia coli*. J Bacteriol, 132:166-173, 1977.
17. Calmes R : Involvement of phosphoenolpyruvate in the catabolism of caries-conducive disaccharides by *Streptococcus mutans*: lactose transport. Infect Immun, 19:934-942, 1978.
18. Kolmos HJ, Schmidt J : Failure to detect hydrogen-sulphide production in lactose/sucrose-fermenting Enterobacteriaceae, using triple sugar iron agar. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica - Section B, Microbiology, 95:85-87, 1987.

Reprint request to:

Kyu-Ho Yang, D.D.S., M.S.D., Ph.D.  
 Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Chonnam National University  
 8, Hak-Dong, Dong-Gu, Gwangju, 501-757, Korea  
 E-mail : khyang@chonnam.ac.kr

Abstract

FACTORS AFFECTING THE PRODUCTION OF SULFUR COMPOUNDS BY  
*FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*

In-Gyun Oh, Eun Hae Park, Jong-Suk Oh\*, Kyu-Ho Yang

*Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry and Dental Research Institute,  
Department of Microbiology, College of Medicine\*, Chonnam National University*

*Fusobacterium nucleatum*, one of the bacteria causing halitosis, produces the volatile sulfur compounds (VSC) such as H<sub>2</sub>S in the media containing sulfur components, and forms FeS by binding with iron component. The various factors of oral cavity affect the concentration of sulfur compounds produced by *Fusobacterium nucleatum*. In this study, the effect of nutrients and pH on the production of sulfur compounds by *Fusobacterium nucleatum* was studied with the following results.

1. The optical density of broth was increased to  $0.817 \pm 0.032$  and  $1.297 \pm 0.024$  by adding 1.0% sodium thio-sulfate and 0.05% L-cysteine hydrochloride in the media, respectively.
2. Though the optical density of broth was  $0.799 \pm 0.032$  by adding volatile sulfur compounds (VSC) only in the media, it was increased to  $1.775 \pm 0.003$  and  $1.648 \pm 0.022$  by adding xylitol combined with glucose and fructose, respectively.
3. The concentration of VSC was above 20,000 ppb in the media above pH 5.5. The optical density of broth was still high in the media with L-cysteine hydrochloride of higher concentration, being low in the media of lower pH.
4. The concentration of VSC was high when there was distilled water or saline solution on the media, and their amount was small.

These results suggest that the production of sulfur compounds by *Fusobacterium nucleatum* was inhibited by xylitol and acid.

**Key words** : *Fusobacterium nucleatum*, Volatile Sulfur Compounds (VSC), Xylitol