

# 피톤치드 처리 후 구강 내 잔존 *S. thermophilus*의 *P. gingivalis*에 대한 효과

경희대학교 치의학전문대학원 구강내과학교실<sup>1</sup>, 신구대학 치위생과<sup>2</sup>, 경희대학교 구강생물학연구소<sup>3</sup>

정성희<sup>1,2</sup> · 어규식<sup>1</sup> · 전양현<sup>1</sup> · 홍정표<sup>1,3</sup>

치주질환과 구취를 유발시키는 중요한 원인균인 *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균효과와 항균작용은 이미 연구되어 있으나, 정상인의 구강상주균에 대한 연구는 아직 희귀한 편이다. 이에 본 연구에서는 건강한 정상인의 타액에 편백 피톤치드를 첨가하였을 때 사멸되지 않고 생존하는 타액세균을 분리하여 구강 유해균과 함께 배양한 후 구강 유해균에 대한 생존 타액세균의 억제효과를 파악함으로써 향후 프로바이오틱으로 작용할 수 있는 구강상주균의 균종을 동정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상인의 전타액에 1% 피톤치드를 적용하였을 때 잔존 생균수는 감소하는 경향을 보였다.
2. 피톤치드 적용 후 생존한 주 세균종은 *S. thermophilus* (53%)로 나타났다.
3. 피톤치드 적용 후 생존한 균을 *P. gingivalis* A7A1-28과 *P. gingivalis* W83에 교차배양한 결과 생존균의 대부분(72.5%) 이 *P. gingivalis* A7A1-28과 *P. gingivalis* W83의 성장을 억제하였다.
4. 생존 *S. thermophilus*의 85.8%, *S. sanguinis*는 75.8%가 *P. gingivalis* 를 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어, *P. gingivalis* 등 구강 내 유해균을 직접 억제할 수 있는 것으로 알려진 피톤치드로 처리할 경우 피톤치드에 생존하는 구강상주균이 *P. gingivalis*에 대해 부가적으로 억제작용을 할 수 있기 때문에 피톤치드의 사용은 치주질환을 예방하고, 그 결과 치주질환 및 구취환자의 구강 환경을 크게 개선할 수 있을 것으로 생각된다.

주제어: 피톤치드, 16S rDNA sequencing, *P. gingivalis*, *S. thermophilus*

## I. 서 론

타액은 구강건강의 유지에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 타액은 구강점막의 보호기능과 윤활, 완충 기능이 있어 구강조직을 외부의 자극으로부터 보호한다. 타액은 구강세균의 활동을 조절하는 기능도 있어 구강에 나타나는 세균의 종류(분포)를 결정하는데 중요한 인자이며 결과적으로는 구강감염질환의

개시나 진행에도 중요한 역할을 한다. 따라서 타액 분비의 감소나 타액 조성의 변화, 구강에 유입된 음식이나 약물이 타액에 용해됨에 따라 또는 전신적으로 흡수되어 타액으로 일부 유출됨에 따라 타액구강세균의 분포에 영향을 미치고, 결과적으로 구강감염질환에 대한 위험성이 증대되거나 감소될 수 있다.

타액 내에는 약 500종 이상의 세균이 존재하는데<sup>1)</sup> 이들 대부분의 세균은 구강 상주균으로서 정상 구강 점막에 항원을 제공하며 구강의 면역기능을 높이고 병원균의 침입 및 정착을 방해함으로써 구강의 항상성과 건강을 유지하는 중요한 역할을 한다.<sup>2)</sup>

치주질환은 세균에 의한 감염질환으로서 성인에서 치아상실을 초래하는 가장 중요한 원인이다. 치주질환을 예방하거나 치주질환의 진행을 억제하기 위해서는 치태, 즉 세균을 제거하는 것이 필수적이다. 치태세균을 제거하기 위해 칫솔질이나 치실사용 등과

교신저자 : 홍정표  
 서울시 동대문구 회기동 1번지  
 경희대학교 치과대학 구강내과학교실, 구강생물학연구소  
 전화 : 02-958-9358  
 Fax : 02-968-2043  
 E-mail : unicomfort@khu.ac.kr

원고접수일: 2008-12-16  
 원고수정일: 2009-01-23  
 심사완료일: 2009-02-09

같은 기계적인 방법과 항생제나 구강세정제 등을 사용하는 화학적인 방법이 있다. 현실적으로 화학적인 방법만으로 치태의 세균을 물리적인 방법처럼 제거하기에는 한계가 있다. 그러나 치태의 세균은 타액에 존재하는 세균에서부터 유래하기 때문에 화학제제를 사용하여 타액의 세균을 사멸 또는 활성을 억제할 수 있다면 결과적으로 치태를 조절할 수 있기 때문에 물리적 방법과 병행하여 화학제제를 적극적으로 사용하고 새로운 화학제제를 발견 또는 개발하는 것이 필요하다.

구강세균을 제어하기 위해 사용되는 화학제제는 대부분 항균 목적으로 사용되고 있고, 대표적인 항균제는 항생제이다. 그러나 항생제는 인체 위해작용, 내성균의 출현, 균교대증과 같은 부작용 때문에 구강감염질환의 예방이나 구강세균의 지속적인 억제를 통한 치료목적으로 장기간 사용할 수 없다. 항생제 이외에 구강세정제를 사용할 경우 구강세정제 내에 강력한 화학제제를 포함시킬 수도 있으나 강력한 만큼 병원균과 함께 구강 상주균도 제거될 가능성도 커진다. 따라서 구강세정제의 용도로 화학제제를 사용할 경우에는 구강환경의 항상성을 유지하는 데에 중요한 역할을 하는 구강 상주균에 대한 고려가 있어야 한다. 이런 이유로 합성 화학제제보다는 구강 상주균을 가능하면 건강하게 유지시킨 채로 병원균만을 억제시킨다는 차원에서 최근 천연 추출물의 활용이 대두되고 있다.<sup>3,4)</sup>

수목은 광합성 작용으로 태양의 빛에너지를 이용하여 이산화탄소와 물로부터 탄수화물을 만들고 산소를 방출하며, 2차적으로 피톤치드와 같은 성분을 생산하여 수목 자신을 보호하는 다양한 역할을 한다.<sup>5)</sup> 예를 들어, 피톤치드 성분은 다른 식물에 대한 생장저해작용, 곤충이나 동물로부터 줄기나 잎을 보호하기 위한 섭식저해작용, 곤충이나 미생물에 대하여 기피·유인·살충작용을 하거나 병원균에 감염되지 않도록 살균작용<sup>6-8)</sup> 등을 행하는 allelochemical이다.

수많은 식물들이 피톤치드를 생산하지만 피톤치드를 흔히 wood essential oil<sup>9)</sup>이라고도 명명하는 사실에서 알 수 있듯이 깊은 산속 같은 나무가 많은 지역에서 보다 쉽게 냄새를 통해 접할 수 있다. 피톤치드는 휘발성분의 화합물로서 terpene계열이 주 성분이다. 이 휘발성분들은 식물 종류에 따라 수십 종에서 많은 것은 200여 종에 달하며 주성분인 terpene/terpenoid을 비롯하여 phenolics, alkaloid, phenyl-

propane, acetogenin, steroid 등의 유기화합물로 구성되어 있다.<sup>10-12)</sup> 수종별 피톤치드의 양을 비교하면 잣목이나 활엽수보다는 소나무, 잣나무, 편백나무 같은 침엽수에서 훨씬 많은 피톤치드가 발생하는데 이러한 식물을 수증기증류하거나 압축하여 얻는 추출액인 정유(essential oil)형태로 일상생활에 이용되고 있다.<sup>10,11)</sup>

결과적으로 식물 자신에 의해 배출되는 이러한 유기화합물이 환경조절에 중요한 역할을 담당하며, 식물의 방어기작으로 인지되고 있는 이러한 현상들을 화학 물질 따위를 방출해 자기 영역 안에서 만 생물의 생존을 억제한다는 의미의 타감(他感)작용 즉 알레로파시(allelopathy)라고도 한다.<sup>13)</sup>

이미 다양한 식물에서 추출되는 피톤치드는 광범위한 미생물에 대해 항균효과가 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>14-20)</sup> 치아우식증이나 치주질환, 기타 구강감염질환의 원인균들에 대한 식물 추출물이나 정유의 항균효과를 관찰하는 연구가 활발히 이루어지면서 이들 질환을 예방하거나 진행을 억제하는 목적으로 사용할 수 있는 항균제 후보 물질들이 속속 보고되고 있으나<sup>19-24)</sup> 건강한 사람의 구강 상주균의 효과에 대한 연구는 미미한 편이다.

이에 저자는 치주조직이 건강한 사람의 타액을 농도의 편백 피톤치드로 처리하였을 때 사멸되지 않고 생존하는 세균을 분리하여 동정함으로써 상주균이 피톤치드에 생존할 수 있음을 알 수 있었으며, 또한 편백 피톤치드 처리 후에도 생존하는 상주균들, 특히 *Streptococcus thermophilus*가 치주질환 원인균인 *P. gingivalis*에 대한 억제효과가 있음을 관찰하였다. 본 연구는 피톤치드가 *P. gingivalis*와 같은 구강 유해균을 효과적으로 억제할 수 있을 뿐만 아니라 피톤치드는 구강 상주균 집단을 혼란시키지 않고 유지시키며, 그 결과 살아남는 상주균은 *P. gingivalis*를 효과적으로 다시 한번 억제시킬 수 있다는 관점에서 피톤치드의 사용은 구강건강을 증진시키는 효과를 포함하는 프로바이오틱 효과가 있는 구강 상주균을 선택, 유지시킬 수 있다는 가능성에 대하여 논의한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

임의로 선출한 20명의 건강한 사람의 전타액(whole saliva)을 채취하여 사용하였으며, 항균실험에

사용된 피톤치드는 편백나무(*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.)에서 추출한 정유로서 (주)SH제약에서 구입하였다(SH HINOKITOL®). 실험에 사용할 *Porphyromonas gingivalis* 표준균주로는 *P. gingivalis* 균주 중에서 병원성이 강한 것으로 알려진 A7A1-28(ATCC 53977)과 W83 균주<sup>25,26)</sup>를 선택하였다. 실험균주를 배양한 액체배지로 Tryptic soy broth (TSB; Difco)에 hemin (5 µg/ml)과 vitamin K1 (0.2 µg/ml)을 첨가하여 사용하였으며, 한천배지로 같은 액체배지 조성에 1.5% agar-agar와 5% 면양적혈구를 추가하여 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 피톤치드 적용 후 전타액 내 생존균 배양

치주질환이 없는 건강한 25~30세 남자 피검자 20명을 대상으로 타액을 수집하였다. 각 피검자로부터 자극제 없이 전타액(whole saliva) 3ml을 채취한 직후 3개의 microcentrifuge tube에 무균적으로 1 ml씩 분주하였다. 이 중 1개 tube는 생리식염수로 1:10 단계 희석하였다. TSB 혈액한천배지에 10<sup>1</sup>~10<sup>11</sup>까지 단계 희석된 타액을 100 µl씩 도말한 후 37°C에서 혐기적(85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>)으로 24시간 배양하였다.

나머지 2개의 tube에는 피톤치드를 최종농도 1%가 되도록 각각 첨가하고 37°C에서 1개 tube는 15분, 또 다른 tube는 30분간 혐기상태로 정치시켰다. 정치 후, 위에서와 같이 생리식염수로 1:10 단계희석한 다음 100 µl씩 TSB 혈액한천배지에 도말하고 나서 37°C에서 혐기적(85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>)으로 4~5일 배양하였다.

배양 후 집락수가 100~200개 되는 배지를 선택하여 집락수를 정확히 세어 생존수(viable cell count, colony forming unit)를 측정함으로써 피톤치드에 의해 감소한 타액 내 세균수를 계산하였다.

한편 각 피검자로부터 10개의 집락을 취하여 균동정을 위한 sequencing과 *P. gingivalis*에 대한 억제효과를 관찰하기 위한 실험균주로 사용하였다. 즉, 1% 피톤치드를 30분간 처리하고 나서 피검자의 희석 타액 샘플을 도말하여 10개의 집락이 형성된 배지가 있을 때는 10개 모두를 취하였고, 이런 배지가 없는 피검자의 경우는 10개 보다 다소 많은 집락이 형성된 배지를 선택하여 이들 집락 중에서 무작위로 10개의 집락을 취하였다.

### 2) 생존 구강상주균의 동정

#### (1) 세균으로부터 DNA 추출

각 피검자로부터 10개씩의 집락을 취하여 TSB 액체배지에 배양하였다. 배양 균액 2 ml을 취하여 원심 분리 후 균 pellet을 lysozyme 용액 (5 mg/ml) 200 µl에 재부유하였다. 실온에서 30분간 정치시킨 후 Golbang<sup>27)</sup> 등의 방법에 따라 균을 proteinase K와 guanidium thiocyanate로 처리한 다음 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 5분간 공기 중에서 건조시킨 다음 50 µl의 0.2 µm-filtered reverse-osmosis deionized water에 용해시켰다.

#### (2) 16S rDNA 영역 PCR 및 염기서열 분석

PCR, 그리고 앞으로 수행할 sequencing에 앞서 primer를 대장균의 16S rDNA sequence에 따라 제작하였다. 16 rDNA sequence를 거의 포함함으로써 균 동정하는 데에 충분한 길이(1,534 bp)의 sequence를 얻기 위해 primer를 준비하였다. 우선 시작 부위와 끝 부위의 sequence를 위한 1개 set의 primer로서 9F (*E. coli* 16S rDNA sequence 9-27; 5'-GAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')와 1542R (16S rDNA sequence 1542-1525; 5'-AGAAAGGAGGTGAT-CCAGCC-3') primer를 사용하였다. Sequence가 길어져 중간부위의 sequence가 부정확해지는 현실적인 문제를 해결할 목적으로 또 다른 1개 set의 primer로서 341F (16S rDNA sequence 341-357; 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 1100R (16S rDNA sequence 1114-1100; 5'-GGGTTGCGC-TCGTTG-3') primer를 사용하였다. 위에서 얻은 각 샘플 1 µl의 template bacterial DNA를 1x *Taq* buffer (Invitrogen), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 각 dNTP 0.2mM, 0.2 µM primer, 2.5 U Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen)와 함께 reverse-osmosis deionized water를 첨가하여 최종 용량을 100 µl로 조정하였다.

우선 94°C에서 PCR 반응 혼합액을 5분간 처리한 다음, 30회의 PCR cycle은 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분 30초 동안 시행하였고, 여기서 얻은 PCR product는 72°C에서 10분간 최종 extension시킨 다음 4°C에서 보관하였다. PCR product는 바이오니아 PCR Purification Kit를 사용하여 정제하였다.

#### (3) Sequencing PCR

Sequencing PCR primer는 같은 9F와 1542R, 341F와 1100R을 사용하였으며, PCR 조건으로는 96°C에서

1분 처리한 다음, 96°C 10초, 50°C 4초, 60°C 4분의 PCR cycle을 35회 반복하였다.

Sequencing PCR product를 정제하기 위하여 에탄올을 25  $\mu$ l에 3 M sodium acetate 1  $\mu$ l를 첨가, 혼합한 후 실온에서 15분간 배양한 다음 microcentrifuge에서 3000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 침전된 PCR product를 70% 에탄올 150 $\mu$ l로 세정한 후 3000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상온에서 30분 이상 공기 중에서 충분히 건조시켰다. Hi-Di formamide 10  $\mu$ l에 sequencing PCR product를 용해한 다음 automated DNA sequencer (ABI 3130x1; Applied Biosystems)상에서 sequencing을 수행하였다.

Sequencing으로 얻은 각 샘플의 data를 PHYDIT program에 적용함으로써 전체 sequence를 만들었으며, 이 sequence를 NCBI Blast program에 적용하여 NCBI database와 비교함으로써 샘플의 종명(species)을 동정하였다.

### 3) Antibacterial effect의 확인

냉동보관 해온 *P. gingivalis* A7A1-28과 *P. gingivalis* W83을 TSB 혈액한천배지에 계대배양하였다. 배양된 각 *P. gingivalis* 균주를 새로운 TSB 혈액한천배지 상에 거리를 두고 2개 줄로 그어 접종하였다. 한편 타액 샘플에서 분리한 균주를 TSB 혈액한천배지에 배양한 다음 백금이를 사용하여 각 *P. gingivalis* 접종선과 직각으로 교차하도록 5개 균주를 적당한 간격으로 접종하였다. 이렇게 1개 TSB 혈액한천배지 당 총 10개의 분리균주를 접종한 다음 혐기적(85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>)으로 48시간 배양하였다. 배양 후 분리균주의 접종선과 교차하는 자리에서 분리균주는 증식하여 뚜렷한 집락을 관찰할 수 있지만 *P. gingivalis*의 집락은 형성되지 않았을 경우 분리균주는 *P. gingivalis*에 대한 억제효과가 있는 것으로 판단하였다.

## III. 실험결과

### 1. 피톤치드의 살균효과

피검자의 타액에 원래 존재하고 있던 세균 수와 타액을 피톤치드로 처리하고 난 다음에 타액 내에 생존하는 세균 수를 TSB 혈액한천배지에 타액을 도말, 배양하여 나타난 집락의 수로 측정하였다(Table 1). 타액에 원래 존재하는 세균의 수는 15~16,200,000 x

10<sup>6</sup>/ml로 피검자에 따라 개인차가 큰 것으로 나타났다.

타액 세균은 1% 피톤치드와 함께 배양했을 때 일반적으로 감소하는 추세를 보였다. 피톤치드와 함께 15분간 배양했을 때 타액 내 세균 수가 10% 이하로 감소한 피검자가 4명, 10~20% 감소한 피검자가 2명이었다. 나머지 14명의 피검자에서는 세균 수가 크게 감소하여 최대 99.7%가 감소, 즉 사멸한 것으로 나타났다.

타액을 피톤치드와 함께 30분간 처리했을 때 타액 내 세균 수의 감소는 15분간 처리했을 때 보다 두드러졌다. 피톤치드를 15분간 처리했을 때와 비교하여 30분간 처리했을 때 세균 수에 변화가 없었던 피검자는 5명이었고, 나머지 15명의 타액 내 세균 수는 더욱 감소하여 처리하지 않았을 때의 세균 수 대비 14.6~99.6%까지 감소하였다.

### 2. 피검자별 생존균주의 동정결과

각 피검자의 타액을 1% 피톤치드로 처리한 다음 타액 내 생존하는 세균을 10개씩 무작위로 선택, 배양하여 DNA를 추출한 다음 PCR로 증폭하여 16S rDNA sequencing을 시행하여 균을 동정하였다(Table 2). 이들 피검자에서 피톤치드 처리 후 생존한 세균의 종은 *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguis*), *Streptococcus pneumoniae*으로 동정되었고 일부는 동정이 불가능한 세균종이었다.

특히 *S. thermophilus*는 모든 피검자의 타액에서 피톤치드 처리 후 생존하는 유일한 세균종으로 나타났다. 생존 세균종 중에서 *S. thermophilus*만 나타난 피검자가 3명이었고, 생존 세균종 중에서 *S. thermophilus*가 가장 많이 생존하는 것으로 나타난 피검자도 12명이나 되었다.

생존하는 세균종으로 *S. sanguinis*가 관찰된 피검자는 13명, *S. pneumoniae*는 9명이었다.

피검자 중 1명에서는 피톤치드 후 생존하는 10개 세균 모두 균 동정이 불가능한 것으로 나타났다.

피검자 20명의 타액을 피톤치드로 처리한 후 생존하는 세균을 각 피검자로부터 각각 10개씩 무작위로 선택하여 16S rDNA sequence로 동정한 총 200개의 세균에 대한 세균종 분포도를 조사하였다(Table 3). *S. thermophilus*가 가장 많이 생존한 세균종으로서 생존 세균 200개 중 106개로 53%를 차지하였다. 생존 세균 중 *S. sanguinis*는 16.5%, *S. pneumoniae*는 12%이었다.

Table 1. Number of surviving bacteria in saliva treated with 1% phytoncide

| Subjects | Incubation time with 1% phytoncide |                   |                  |
|----------|------------------------------------|-------------------|------------------|
|          | 0 min                              | 15 min            | 30 min           |
| 1        | 49.0 (100)                         | 37.0 (75.5)       | 38.0 (77.6)*     |
| 2        | 35.7 (100)                         | 31.0 (86.8)       | 27.1 (75.9)      |
| 3        | 5920000.0 (100)                    | 5260000.0 (88.9)  | 2960000.0 (50.0) |
| 4        | 356000.0 (100)                     | 95000.0 (9.8)     | 1000.0 (0.3)     |
| 5        | 372000.0 (100)                     | 1000.0 (0.3)      | 1000.0 (0.3)     |
| 6        | 284.0 (100)                        | 214.0(75.4)       | 173.0 (60.9)     |
| 7        | 296.0 (100)                        | 44.0 (14.9)       | 2.0 (0.7)        |
| 8        | 22000.0 (100)                      | 9000.0 (40.9)     | 4000.0 (18.2)    |
| 9        | 3700.0 (100)                       | 200.0 (5.4)       | 200.0 (5.4)      |
| 10       | 77.0 (100)                         | 71.0 (92.2)       | 5.0 (6.5)        |
| 11       | 87.0 (100)                         | 81.0 (93.1)       | 91.0 (104.6)     |
| 12       | 16.1 (100)                         | 7.4 (46.0)        | 3.6 (22.4)       |
| 13       | 15.0 (100)                         | 5.0 (33.3)        | 1.0 (6.7)        |
| 14       | 16200000.0 (100)                   | 12040000.0 (74.3) | 5760000.0 (35.6) |
| 15       | 58.0 (100)                         | 12.0 (20.7)       | 12.0 (20.7)      |
| 16       | 19.0 (100)                         | 9.0 (47.4)        | 8.0 (42.1)       |
| 17       | 111.0 (100)                        | 136.0 (122.5)     | 55.0 (49.5)      |
| 18       | 584.0 (100)                        | 352.0 (60.3)      | 220.0 (37.7)     |
| 19       | 720.0 (100)                        | 711.0 (98.8)      | 616.0 (85.6)     |
| 20       | 423.0 (100)                        | 217.0 (51.3)      | 95.0 (22.5)      |

\*; number of viable bacterial cells (10<sup>6</sup>) in saliva after treatment with 1% phytoncide for 30 min (% relative to the number of the cells at 0 min)

4. 생존세균의 *P. gingivalis*에 대한 억제효과

피톤치드 처리 후 생존한 분리균주를 *P. gingivalis* 접종선에 직각으로 접종하고 나서 배양한 다음 *P. gingivalis*의 집락이 형성되지 않는 경우 *P. gingivalis* 억제균으로 판단하였다(Table 4). 실험결과, *P. gingivalis*에 의해 억제되는 분리균주는 하나도 없었다. 반면 *P. gingivalis*를 억제하는 분리균주는 200개 중 145개로 72.5%나 되었고, 이들 억제균주는 실험에 사용한 *P. gingivalis* 표준균주 A7A1-28과 W50 두 균주 모두 억제하였다.

한편, 세균종에 따라 *P. gingivalis*를 억제하는 능력에 차이가 났지만(Table 5 참조) 같은 세균종이라도 피검자에 따라 *P. gingivalis* 억제능력에 차이를 보였다. 피톤치드 처리 후에 가장 많이 생존한 세균종

으로 동정된 *S. thermophilus*, 특히 피검자 #1,2,3,4,5, 6,9,12,13,16,18에서 분리한 모든 *S. thermophilus* 균주는 *P. gingivalis*를 억제하였으며 이들 피검자에서 분리된 다른 세균종의 균주도 모두, 또는 거의 모두 *P. gingivalis*를 억제하는 것으로 나타났다. 반면 #8 피검자에서 분리된 5개의 *S. thermophilus* 균주들의 경우는 1개 균주만 *P. gingivalis*를 억제하는 것으로 나타났는데 이들 피검자에서 분리된 다른 세균종의 균주도 모두 *P. gingivalis*에 대해 억제효과가 없는 것으로 관찰되었다. 한편, 한 피검자 내에서 분리된 *S. thermophilus* 균주 중에서 *P. gingivalis*를 억제하는 균주의 비율의 높고 낮음에 따라 다른 세균종의 *P. gingivalis* 억제균주의 비율도 비슷한 양상을 보였다 (피검자 #10,11,14,19,20).

Table 2. Distribution in each subject of bacterial species isolated from the saliva treated with 1% phytoncide for 30 min

| Subjects | Bacterial species isolated        | No. of isolates(%) |
|----------|-----------------------------------|--------------------|
| 1        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 10/10(100)*        |
| 2        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 10/10(100)         |
| 3        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 10/10(100)         |
| 4        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 7/10(70)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 2/10(20)           |
|          | ND                                | 1/10(10)           |
| 5        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3/10(30)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 3/10(30)           |
|          | ND                                | 4/10(40)           |
| 6        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 4/10(40)           |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 2/10(20)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 1/10(10)           |
|          | ND                                | 3/10(30)           |
| 7        | ND                                | 10/10(100)         |
| 8        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 5/10(50)           |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 2/10(20)           |
|          | ND                                | 3/10(30)           |
| 9        | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 4/10(40)           |
|          | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 2/10(20)           |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 2/10(20)           |
|          | ND                                | 2/10(20)           |
| 10       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 6/10(60)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 2/10(20)           |
|          | ND                                | 2/10(20)           |
| 11       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 6/10(60)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 2/10(10)           |
|          | ND                                | 2/10(20)           |
| 12       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 5/10(50)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 5/10(50)           |
| 13       | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 4/10(40)           |
|          | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3/10(30)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 3/10(30)           |
| 14       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3/10(30)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 2/10(20)           |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 2/10(20)           |
|          | ND                                | 3/10(30)           |
| 15       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 9/10(90)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 1/10(10)           |
| 16       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 4/10(40)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 3/10(30)           |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 3/10(30)           |
| 17       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 9/10(90)           |
|          | ND                                | 1/10(10)           |
| 18       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 4/10(40)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 3/10(30)           |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 1/10(10)           |
|          | ND                                | 2/10(20)           |
| 19       | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 4/10(40)           |
|          | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3/10(30)           |
|          | ND                                | 3/10(30)           |
| 20       | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 4/10(40)           |
|          | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3/10(30)           |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 2/10(20)           |
|          | ND                                | 1/10(10)           |

\*; Number of the bacterial species out of 10 isolates from the #1 subject (%)

ND; not determined.

Table 3. Distribution of the bacterial species isolated from the phytoncide-treated saliva

| Bacterial species                 | No. of bacteria(%) |
|-----------------------------------|--------------------|
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 106(53.0)          |
| <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 33(16.5)           |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 24(12.0)           |
| ND                                | 37(18.5)           |
|                                   | 200(100.0)         |

ND; not determined

피톤치드에 저항하여 생존한 200개의 분리균주 중에서 *P. gingivalis*를 억제하는 균주를 세균종에 따라 Table 5에 정리하였다. *P. gingivalis*에 대한 억제효과는 세균종에 따라 차이를 보였다. *S. thermophilus*는 85.8%가 *P. gingivalis*에 대해 억제효과를 보였으며 *S. sanguinis*는 75.8%, *S. pneumoniae*는 50%가 억제효과를 보였다. 균 동정이 불가능한 균주 37개 중에서도 45.9%인 17개가 *P. gingivalis*에 대해 억제효과가 있는 것으로 나타났다.

#### IV. 총괄 및 고안

타액은 말하고, 씹고, 삼키는 운동을 할 때 유효작용을 할 뿐 만 아니라 세균, 백혈구, 조직 및 음식물 잔사를 삼킬 수 있게 하여 위장 내에서 세균과 유해물질이 불활성화 되도록 한다.<sup>28)</sup> 타액 내에는 최소한 500종 이상의 세균이 있으며, 배양이 불가능하여 아직 검출되지 못한 세균도 상당히 존재하나 병원성 세균은 소수에 불과하고 세균 중 99%는 무해하다.<sup>29)</sup> 이들의 대부분은 구강 상주균으로서, 병원성 세균이 구강 내에 정착하는 것을 방해한다. 뿐만 아니라 이들 구강 상주균은 면역계의 형성과 건강한 선천성면역 반응을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

그러나 구강 상주균 중 특정 미생물 군이 증식하면 구강 내 질환이 발병하기도 한다. 대표적 구강감염성 질환인 치아우식증과 치주질환을 비롯하여 치수 및 치근단 감염, 구강안면 조직 또는 악골 감염 등, 구강 악안면 영역에서 일어나는 대부분의 질환이 입안에 항상 존재하는 미생물에 의한 감염에서 비롯된 것이다.<sup>28)</sup>

이러한 유해성 구강 상주균에는 mutans streptococci, *Porphyromons*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, spirochetes, *Candida albicans* 등이 있다. 이들이 상주균으로 구강에 존재하다가 유해균으로 전환되는 데에는, 즉 기회감염(opportunistic infection)을 유발하는 데에는 촉발인자가 관여하고, 이로 인해 이들 유해균이 우세해지고 구강질환이 야기된다.<sup>1)</sup> 예를 들어 mutans streptococci는 치아우식증의 원인균으로서 과거 *S. mutans*라고 명명되었던, 다양한 생화학적, 혈청학적, 유전적으로 이질성을 갖는 세균군이다. 구강 내로 sucrose가 유입되면 상주균 중에서 mutans streptococci가 glucosyltransferase를 이용하여 비수용성 glucan을 합성하면서 더욱 용이하게 치아표면에 존재할 수 있고 그 결과 치태에서 mutans streptococci의 분포가 우세하게 된다.<sup>30,31)</sup> Mutans streptococci 중에서 사람의 우식병소에서 주로 나타나는 종은 *S. mutans*와 *S. sobrinus*이다.<sup>32,33)</sup> 일반적으로 *S. mutans*가 *S. sobrinus*보다 우식병소에서 많이 나타난다.<sup>34,35)</sup>

국소성 급진성 치주염은 청소년기에 급속한 치주조직의 파괴가 야기되어 일찍이 치아상실을 가져오므로써 환자의 삶의 질에 커다란 영향을 미칠 수 있는 구강질환이다.<sup>4)</sup> 급진성 치주염환자 중 많은 사람들이 비정상적인 화학주성을 보이는 다형핵백혈구를 가지고 있는데 이러한 결핍은 capnophilic 그람음성 구간균인 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)가 많이 나타나는 것과 관련이 있거나, 혹은 그 직접적인 원인이 될 수 있다. *A. actinomycetemcomitans*는 환부 부위에서 채취한 치은연하 치태에 높은 비율로 존재하고, 백혈구독소와 같은 강한 독성인자를 생산하고 있으며, 질환이 진행되고 있는 환자의 몸에서는 이 균에 대한 항체역가가 증가하나 성공적인 치주치료 후에는 출현빈도와 항체역가가 감소하면서 증상이 사라지는 사실로 미루어 급진성 치주염에 *A. actinomycetemcomitans*가 특이적으로 관련되어 있는 것으로 보인다.<sup>36)</sup>

성인형(만성) 치주염은 성인에서 가장 빈발하는 질환으로 성인의 70~80%가 경험하고 있으며 치아상실을 초래하는 가장 중요한 질환이다. 치주염과 관련하여 가장 중요한 세균군을 red complex라고 부르며 여기에는 *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* 및 *Treponema denticola*가 포함된다.<sup>37)</sup> Red complex는 사춘기 전에는 잘 나타나지 않지만 사춘기 이후에 주

Table 4. Inhibitory effect of bacterial isolates from the phytoncide-treated saliva on *P. gingivalis* strains

| Subjects | Bacterial species isolated        | No. of isolates inhibiting <i>P. gingivalis</i> (%) |
|----------|-----------------------------------|---|
| 1        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 10/10(100.0)*                                       |
| 2        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 10/10(100.0)  |
| 3        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 10/10(100.0)  |
| 4        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 7/7(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 2/2(100.0)  |
|          | ND                                | 1/1(100.0)  |
| 5        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3/3(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 3/3(100.0)  |
|          | ND                                | 4/4(100.0)  |
| 6        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 4/4(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 2/2(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 1/1(100.0)  |
|          | ND                                | 3/3(100.0)  |
| 7        | ND                                | 4/10(40.0)  |
| 8        | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 1/5(20.0)   |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 0/2(0.0)  |
|          | ND                                | 0/3(0.0)  |
| 9        | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 3/4(75.0)   |
|          | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 2/2(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 2/2(100.0)  |
|          | ND                                | 0/2(0.0)  |
| 10       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 2/6(33.4)   |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 0/2(0.0)  |
|          | ND                                | 1/2(50.0)   |
| 11       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3/6(50.0)   |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 0/2(0.0)  |
|          | ND                                | 1/2(50.0)   |
| 12       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 5/5(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 5/5(100.0)  |
| 13       | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 3/4(75.0)   |
|          | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3/3(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 3/3(100.0)  |
| 14       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 2/3(66.7)   |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 1/2(50.0)   |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 0/2(0.0)  |
|          | ND                                | 0/3(0.0)  |
| 15       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 8/9(88.9)   |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 1/1(100.0)  |
| 16       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 4/4(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 3/3(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 2/3(66.7)   |
| 17       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 9/9(100.0)  |
|          | ND                                | 0/1(0.0)  |
| 18       | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 4/4(100.0)  |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 2/3(66.7)   |
|          | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 1/1(100.0)  |
|          | ND                                | 2/2(100.0)  |
| 19       | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 1/4(25.0)   |
|          | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 2/3(66.7)   |
|          | ND                                | 1/3(33.3)   |
| 20       | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 1/4(25.0)   |
|          | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 2/3(66.7)   |
|          | <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 1/2(50.0)   |
|          | ND                                | 0/1(0.0)  |

\*; All the bacteria (10 out of 10; 100%) isolated from #1 subject were shown to inhibit the growth of *P. gingivalis* strains. Note that *P. gingivalis* strains A7A1-28 and W50 were used for the experiment. The isolates that inhibited the one also inhibited the other *P. gingivalis* strain.

ND; not determined.

Table 5. Comparison of bacterial species isolated from the phytoncide-treated saliva for *P. gingivalis*-inhibiting activity

| Bacterial species                 | No. of isolates inhibiting <i>P. gingivalis</i> (%) |
|-----------------------------------|---|
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 91/106(85.8)  |
| <i>Streptococcus sanguinis</i>    | 25/33(75.8)   |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 12/24(50.0)   |
| ND                                | 17/37(45.9)   |
|                                   | 145/200(72.5)                                       |

ND; not determined

로 나타나며 임신 4개월에 급격히 증가하는 것으로 미루어 호르몬 변화와 관련이 있는 것으로 보이며,<sup>38,39)</sup> 잇몸에서 출혈이 있을 때 이들 red complex는 적혈구를 용혈시켜 heme/iron을 취함으로써 치은연 하치태에서 red complex가 우세하게 존재하는 데에 도움을 주고 있다.<sup>40,41)</sup> 이들은 trypsin-like activity로 통칭되는 강력한 cysteine proteases 활성을 갖고 있으며<sup>42-44)</sup> 이를 통해 치주조직을 파괴하는 데 직접 관여하거나 조직의 단백질분해효소를 활성화시키고 염증반응을 유도하여 간접적으로 치주조직 파괴에 관여한다.<sup>45-47)</sup>

이와 같은 유해성 세균들을 억제할 수 있다면 다양한 구강감염질환을 예방하거나 치료할 수 있을 것이다. 이러한 목적으로 사용되는 고전적인 화학제제로는 클로르헥시딘(chlorhexidine)이 있다. 클로르헥시딘은 세균의 활동을 억제하고 치면에 오래기간 작용할 수 있기 때문에 치태 억제효과가 강하나 구강 내에서 장기간 사용 시 구강 상주균의 균형을 파괴하는 등의 부작용이 있다. 이에 최근 천연물을 이용한 항균 물질들이 주목을 끌고 있다.<sup>48)</sup>

모든 식물의 추출물은 그 구성 성분의 80%가 항균 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 고등식물이 생산하여 미생물의 생육에 미치는 물질을 항균성물질 또는 식물성살균소 등으로 부르고 있으나, 우리에게서 피톤치드라는 용어로 친근하다.<sup>18)</sup> 피톤치드(phytoncide)는 ‘식물’(Phyto)과 ‘죽이다’(Cide)를 뜻하는 그리스어의 합성어로 1929년 플레밍에 의해 페니실린이 처음 발견되며 동식물간에 상호작용의 존재가 알려지게 된 1년 후 1930년 레닌그라드대학의 B.P. Tokin

교수가 마늘이나 양파, 소나무 등에서 나오는 냄새나는 물질이 아메바 등 원생동물과 장티푸스, 이질, 결핵균 등을 사멸한다는 사실을 발견하고, 이런 현상을 일으키는 물질을 피톤치드라고 명명하였다.<sup>49)</sup> 식물은 생활하면서 만들어내는 2차 대사산물을 이용하여 주변의 다른 식물 또는 세균류를 포함한 각종 미생물에 스트레스를 주는데, 이러한 스트레스는 주변의 식물과 미생물을 방해하는 작용으로 나타나며, 이러한 현상을 식물의 방어기작이라고 하여<sup>50)</sup> 식물 생존과 적응에 중요한 역할을 하게 된다.<sup>51)</sup> 이와 같이 식물이 화학물질을 생성하여 주위로 방산함으로써 다른 식물들에게 직, 간접적으로 해를 입히는 것을 알레로파시(allelopathy)라고 한다.<sup>52)</sup> 알레로파시 효과에 관여하는 화학물질, 즉 allelochemicals는 증기, 압축, 추출 등의 방법으로 정유(essential oil)의 형태로 정제할 수 있으며 정유 속에 포함되어 있는 휘발성(방향성)의 향미생물 allelochemic 유기화학물의 주성분은 terpene이고, 그 외에 phenolics, alkaloid, phenylpropane, acetogenin, steroid 등이 있다.<sup>12)</sup>

수목별 피톤치드의 양을 비교해보면 침엽수보다는 침엽수에서 훨씬 많은 피톤치드가 발생한다. 침엽수 가운데 우리에게 가장 널리 알려진 나무는 소나무와 잣나무인데 피톤치드의 발생량은 잣나무가 우위에 있다. 소나무, 잣나무와 더불어 피톤치드는 침엽수 종인 편백나무에서 다량 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>49)</sup> 편백나무는 측백나무과에 속하는 나무로 일본이 원산지인데, 우리나라의 남부지방에 조림된 후 성공적으로 생육하여 우리의 나무가 된 침엽수이다. 편백나무의 피톤치드의 전신적 효과를 살펴보면 스트레스 완화작용, 강력한 항균작용, 소취작용 및 유해물질의 중화, 진정작용과 쾌적효과, 알레르기 및 피부질환의 개선, 면역기능증대 등이 있다.<sup>49)</sup> 편백 피톤치드는 그 효능이 다른 피톤치드에 비해 월등한 것으로 알려져 있다.<sup>53)</sup>

김 등<sup>54)</sup>은 *P. gingivalis*에 대한 편백 피톤치드의 항균효과를 관찰한 결과, *P. gingivalis*는 편백 피톤치드가 0.008%만 존재해도 성장이 억제되며 0.01% 농도면 *P. gingivalis*를 완전히 사멸할 수 있는 것으로 나타났다. 또한 김 등의 연구에서 편백 피톤치드가 *P. gingivalis*의 superoxide dismutase 발현을 억제하는 것이 관찰되었다. 이는 *P. gingivalis* 주변에 산화물질이 축적될 때 이 산화물질의 독성을 중화시켜줄 수 있는 능력이 떨어진다는 것을 반영하는데, 이런 억제효과가 *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균기전

의 일부를 설명하는 것으로 생각된다. 또한 박 등<sup>55)</sup>은 편백 피톤치드를 사용했을 때 입냄새를 제거하는 데 큰 효과가 있음을 발표하였다. 입냄새는 *P. gingivalis*를 비롯한 다양한 치주질환 원인균 등 sulfide 생성균에 의해 유발되기 때문에<sup>56)</sup> 박 등의 연구결과는 피톤치드는 다양한 세균에 대한 항균효과가 있을 것임을 암시한다.

구강세균에 대한 피톤치드의 항균효과에 대한 보고를 토대로 본 연구는 편백 피톤치드의 타액세균에 대한 항균효과를 관찰하였으며, 피톤치드 처리 후 생존하는 타액세균은 어떤 세균종이며 이들 생존세균은 치주염의 중요한 원인균인 *P. gingivalis*에 대한 억제효과가 있는지를 in vitro 실험으로 관찰하였다. 정상인의 타액에 1% 피톤치드를 적용하였을 때 피검자에 따라 타액세균에 대한 피톤치드의 항균효과는 매우 다양하게 나타났으나 전체적인 경향은 타액세균의 생존수가 감소하는 것으로 나타났다. 이는 피톤치드가 구강 상주균에 대하여 일반적으로 사멸효과를 발휘한다는 것을 시사한다.

1% 피톤치드로 타액을 처리한 후 최종적으로 생존하는 균주를 각 피검자당 10개씩 무작위로 임의 선택하여 수집한 총 200개의 균을 16S rRNA sequence로 동정하였다. 동정 결과 생존하는 세균종은 대부분 *S. thermophilus*로서 200개 중 106개로 53%를 차지하였다. 다음으로 *S. sanguinis*가 33개로 16.5%를 차지하였고, *S. pneumoniae*도 일부 발견되었다.

*S. thermophilus*의 정식명칭은 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*이고, 그람양성의 통성혐기성 세균이며 젖산을 생성하는 균(lactic acid-producing bacterium)으로 요구르트를 만드는 주된 세균이다.<sup>57)</sup> *S. thermophilus*가 타액 내에 존재한다는 뚜렷한 증거는 없으나 초기치태에 상당수 존재한다는 것이 관찰되고 있고,<sup>58)</sup> 대부분의 초기치태 세균은 타액에서 유래되기 때문에 잘 검출되지 않을 정도로 소수의 *S. thermophilus*가 타액 내에 존재하는 것으로 사료된다. 그러나 본 실험결과에서는 1% 피톤치드에 의해 타액세균 중 일부 또는 상당수가 사멸되었기 때문에 *S. thermophilus*가 상대적으로 우세하게 나타났을 것으로 판단된다.

종전의 구강세균의 동정법은 배양 후 생화학적, 효소학적 성상 등을 기준으로 하여 진행하였기 때문에 *S. thermophilus*가 실제 타액 내에 존재하는 양보다 적게 검출되었을 가능성도 배제할 수 없다. 최근 들어 생화학이나 효소활성의 특성을 기준으로 동정되었던

많은 세균의 세균종(species)뿐만 아니라 속명(genus)까지도 변경되는 일이 흔히 일어나고 있다. 이와 같은 속명, 종명의 변화가 가능해진 것은 세균에 대한 DNA, 또는 RNA의 분석법이 개발되어 세균에 대한 유전적 성상을 더 자세히 관찰할 수 있게 되었기 때문이다. 따라서 본 실험에서 사용한 16S rDNA sequence를 기준으로 한 동정법이 기존의 전통적이거나 방법에 의한 세균의 동정 보다 정확한 기준을 제시하는 것으로 사료된다.

본 연구에서 1% 피톤치드로 처리한 후 생존하는 균종 중 *S. thermophilus*로 동정된 세균의 경우, 16S rDNA sequence를 NCBI의 Blast program으로 NCBI database에 등록된 균주들과의 sequence homology를 비교했을 때 가장 높은 sequence homology(98% 이상)를 보이는 균주들은 *S. thermophilus* 종에 속하는 것으로 나타났다. 2개의 균주가 97% 이상의 homology를 보이면 같은 균종으로 간주할 수 있기 때문에<sup>59)</sup> 이들 생존균주를 *S. thermophilus*로 동정하였다. 한편, *S. thermophilus*로 동정된 생존균주의 sequence에 대해 *S. thermophilus* 다음으로 높은 sequence homology를 보이는 균주들은 *S. sanguinis*(과거 *S. sanguis*)종에 속하였으며, 이는 *S. thermophilus*의 sequence homology에 비해 대부분 2% 정도 homology가 낮게 나타났다. 16S rRNA sequence에서 2%정도의 차이는 유전적으로 상당한 차이를 의미하기 때문에 *S. sanguinis*보다는 *S. thermophilus*로 확신할 수 있었다.

생존균주 중에 *S. pneumoniae*로 동정되는 세균도 다수 나타났다. *S. pneumoniae*는 비강인두(nasopharynx)에 존재하는 상주균이며 어린아이의 타액 내에서 관찰되었다는 보고가 있다.<sup>60)</sup> 현재까지 알려진 바로는 *S. pneumoniae*는 91개의 변이종이 있으며 폐렴, 뇌수막염, 심내막염 등을 일으키는 주요 원인균으로 알려져 있다.<sup>61)</sup> 분류상으로는 *Streptococcus mitis* group에 속하며 같은 분류에 속하는 *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*와는 유전학적으로 매우 높은 유사성을 보이고 있다.<sup>62)</sup> 실제 *S. pneumoniae*로 동정된 생존균주들의 sequence는 NCBI 등록 *S. sanguinis*와 1% 정도의 sequence homology 차이를 보이고 있다. NCBI database에 등록되어 있는 *S. sanguinis* 종에 속하는 균주의 수가 다른 균종에 비해 상대적으로 매우 적기 때문에 현재 NCBI database를 토대로 16S rDNA sequence만으로 구강의 *S. sanguinis*와 *S. pneumoniae*를 구별, 동정

하기 보다는 부가적인 생화학적 검사 등을 통해 균 종명을 확인하는 절차가 필요할 것으로 생각된다. 생존균주로서 *S. pneumoniae*가 구강에 존재한다고 해도 이 때문에 더 많은 폐렴 등이 유발될 가능성은 낮은 것으로 보인다. 아직까지 피톤치드를 사용하여 폐렴이 발생하였다는 부작용이 보고된 사례는 없다.

1% 피톤치드로 타액을 처리한 후 최종적으로 생존한 타액균주 중 임의로 선택한 200개의 균주가 *P. gingivalis*를 억제할 수 있는 지 관찰하였다. 총 200개의 균주 중에서 145개 균주(72.5%)가 *P. gingivalis*를 억제하는 것으로 나타났다. 특히 *S. thermophilus*는 106개 균주 중 91개 균주(85.8%)가 *P. gingivalis* 억제균주로 판명되었다. *S. thermophilus*를 비롯한 모든 *P. gingivalis* 억제균주는 두 *P. gingivalis* 균주를 동시에 억제하는 것으로 관찰되었다. 반면 *P. gingivalis*에 의해 성장이 억제되는 타액 생존균주는 없었다. *P. gingivalis* A7A1-28과 *P. gingivalis* W83은 mouse의 등에 주사하였을 때 결절만 형성하는 일반 균주들과는 달리 abscess를 형성하고 결국은 mouse를 죽이는 높은 병원성을 갖는다고 보고되었다.<sup>25,26)</sup> 또한 *P. gingivalis* A7A1-28과 W83은 fimbriae 유전자형 중에서 type II와 IV에 속하는 데, 이 type들은 중증의 치주염에서 많이 발견되기 때문에<sup>63)</sup> 치주염의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 따라서 피톤치드는 치주질환을 예방하거나 치료하는 데에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대한다.

타액을 피톤치드로 처리한 후 타액에 생존하는 세균의 대부분은 상주균이면서 치주질환의 원인균을 억제한다는 것은 생태학적으로 매우 고무적인 일이며, 특히 생존균주 중에서 가장 많이 나타난 *S. thermophilus*의 억제효과는 의미 있는 발견이라고 생각된다. 아직까지 *S. thermophilus*가 *P. gingivalis*를 억제한다는 발표된 직접적인 연구보고는 없다. 그러나 구강 이외의 신체부위에서 질병을 야기하는 균들에 대한 억제효과는 잘 알려져 있다. 요구르트에 starter 균주로 사용되는 *S. thermophilus*는 bacteriocin을 생산하고, 이 bacteriocin은 일부 *Bacillus* 균종을 비롯하여 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*<sup>64)</sup>, *Clostridium butylicum* 및 *Clostridium sporogenes*<sup>65)</sup>를 억제하는 것으로 보고되고 있다. 한편, 김 등<sup>66)</sup>은 유산균과 구강건강 심포지엄 발표에서

*Lactococcus lactis*와 *S. thermophilus*에 강황이 첨가된 기능성 발효유가 치은연하치태 내 *P. gingivalis*와 *T. denicola*의 수를 감소시키고 성인의 치주질환을 억제한다는 결과를 보고하였다. 그러나 이 억제효과가 산생산균 때문인지 첨가된 강황 때문인지는 앞으로 분석이 필요할 것으로 보인다. 최근 흥미롭게도 “생” 요구르트에 함유되어 있는 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*는 구강세균에 의해 생성되는 구취의 원인인 hydrogen sulfide를 감소시킨다(The Times[online] 2008년 2월 16일자)는 보고가 있었다. 이런 사실들은 본 연구에서 관찰한 *S. thermophilus*가 *P. gingivalis*를 억제한다는 사실을 간접적으로 지지하는 결과라고 생각된다.

*S. thermophilus*의 균집이 다른 병원성균이 치아표면에 부착하는 것을 막아주는 역할을 할 수도 있고,<sup>58)</sup> *S. thermophilus*는 구강 상주균이면서 구강 유해균을 억제할 수 있기 때문에 구강건강을 증진하는 프로바이오틱 목적으로 사용하는 등 인체에 매우 유익한 방향으로 사용이 가능해 보인다. 숙주에 이로운 세균의 작용을 의미하는 프로바이오틱 효과가 있는 *Bifidobacterium lactis*와 *S. thermophilus*는 장기간 사용하더라도 인체에 안전하다는 것이 입증되고 있다.<sup>67)</sup> 장내 정상세균이 사람에게 이로운 것처럼 구강에서도 프로바이오틱 효과가 있는 *S. thermophilus*를 구강건강과 전신건강을 위해 보존되는 것이 필요하다. 편백 피톤치드를 항균목적으로 사용하였을 때 유해 구강세균은 사멸하지만 *S. thermophilus*는 사멸하지 않고, 오히려 생존하는 *S. thermophilus*는 유해균을 부가적으로 억제할 수 있기 때문에 편백 피톤치드의 사용은 구강감염질환의 예방과 치료, 예후 관리에 효과적일 것으로 판단된다.

한편, 치주질환의 치료 효과를 높이기 위해 치태 내에서 일어나는 세균의 대사작용에 영향을 줄 수 있도록 *S. thermophilus* 등을 효율적으로 전달하는 방법을 고안해 낸다면 이를 이용한 구강 위생 제품은 치주질환과 구취의 예방 및 치료 후의 예후 관리에 매우 유용하게 사용할 수 있을 것이라고 생각된다.

## V. 결 론

치주질환과 구취를 유발시키는 중요한 원인균인 *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균효과와 항균작용은 이미 연구되어 있으나, 정상인의 구강상주균에 대한 연구는 아직 희귀한 편이다. 이에 본 연구에서는

건강한 정상인의 타액에 편백 피톤치드를 첨가하였을 때 사멸되지 않고 생존하는 타액세균을 분리하여 구강 유해균과 함께 배양한 후 구강 유해균에 대한 생존 타액세균의 억제효과를 파악함으로써 향후 프로바이오틱으로 작용할 수 있는 구강상주균의 균종을 동정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상인의 전타액에 1% 피톤치드를 적용하였을 때 잔존 생균수는 감소하는 경향을 보였다.
2. 피톤치드 적용 후 생존한 주 세균종은 *S. thermophilus* (53%)로 나타났다.
3. 피톤치드 적용 후 생존한 균을 *P. gingivalis* A7A1-28과 *P. gingivalis* W83에 교차배양한 결과 생존균의 대부분(72.5%)이 *P. gingivalis* A7A1-28과 *P. gingivalis* W83의 성장을 억제하였다.
4. 생존 *S. thermophilus*의 85.8%, *S. sanguinis*는 75.8%가 *P. gingivalis* 를 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어, *P. gingivalis* 등 구강 내 유해균을 직접 억제할 수 있는 것으로 알려진 피톤치드로 처리할 경우 피톤치드에 생존하는 구강상주균이 *P. gingivalis*에 대해 부가적으로 억제작용을 할 수 있기 때문에 피톤치드의 사용은 치주질환을 예방하고, 그 결과 치주질환 및 구취환자의 구강 환경을 크게 개선할 수 있을 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Papapanou PN. Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol* 2002;7:54-61.
2. 신금백. Peroxidase System 제제를 이용한 구강건조증의 치료. 타액과 타액선 토론회 1995; 55-58.
3. Welsh C. Complementary therapies in hospice care: touch with oils—a pertinent part of holistic care. *Am J hospice Palliat Care* 1997;Jan/Fab:42-44.
4. Lis-Balchin M. Essential oils and aromatherapy: their modern role in healing. *J R Soc Health* 1977; 117:324-329.
5. Muller CH. Allelopathy as a factor in ecological process. *Vegetation* 1969;18:348-357.
6. Gocho S. Antibacterial action of aroma compounds in vapor state. *Int J Antimicrob Agents* 1991;19:329-334.
7. Gocho S. The factors affecting antibacterial action of FDA vapor. *Int J Antimicrob Agents* 1991;19:389-393.

8. 谷田員光克, 大平辰朗. 바이오아스 變換計劃研究報告. *農林水産技術會義* 1990;24:36.
9. Li Q, Nakadai A, Matsushima H, Miyazaki Y, Krensky AM, Kawada T, Morimoto K. Phytoncides (wood essential oils) induce human natural killer cell activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006;28: 319-333.
10. 강하영, 오종환. 침엽수 침엽 정유의 방향성 이용적성. *임업연보* 1994;49:177-185.
11. 강하영, 이성숙, 최인규. 침엽수 수엽 정유의 항균성에 관한 연구. *한국임산에너지학회지* 1993;13:71-77.
12. Whittaker RH, Feeny PP. Allelochemicals, chemical interactions between species. *Science* 1971;171: 757-770.
13. Rice EL. Allelopathy. 2nd ed., USA, 1984, Academic Press Inc., pp. 79-110.
14. Haagen-Smit AJ. The essential oils. Vol.1, USA, 1960, Van Nostrand company Inc., pp. 77-83.
15. 高橋信孝, 丸茂晋吾, 大岳 望 共著. 生理活性天然物化學. 第2版, 日本, 1981, 東京大學出版會, pp. 99-116.
16. Rudman P. The causes of natural durability in timber(9), the antifungal activity of heartwood extractives in wood substrate. *Holzforchung* 1962;16:74-77.
17. Rudman P. The causes of natural durability in timber(11), some tests on fungi toxicity of wood extractives and related compounds. *Holzforchung* 1963;17:54-57.
18. 강하영. 수목 추출 성분의 생화학적 역할. *목재공학* 1994;22:5-11.
19. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:61-64.
20. Schoenknecht FD, Sabath LD, Thornsberry C. Susceptibility tests: special tests. In Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th ed., Washington DC, 1985, American Society for Microbiology, pp. 1000-1008.
21. Alviano WS, Mendonca-Filho RR, Alviano DS *et al.* Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:101-105.
22. Cha JD, Jeong MR, Jeong SI *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A. capillaris*. *Planta Med* 2005;71:186-190.
23. Cha JD, Jeong MR, Choi HJ *et al.* Chemical

- composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia*. *Planta Med* 2005;71:575-577.
24. Chung JY, Choo JH, Lee MH, Hwang JK. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine* 2006;13:261-266.
  25. Ebersole JL, Kesavalu L, Schneider SL, Machen RL, Holt SC. Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. *Oral Dis* 1995;1:115-128.
  26. Neiders ME, Chen PB, Suido H, Reynolds HS, Zambon JJ, Shlossman M, Genco RJ. Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontal Res* 1989;24:192-198.
  27. Golbang N, Burnie JP, Klapper PE, Bostock A, Williamson P. Sensitive and universal method for microbial DNA extraction from blood products. *J Clin Pathol* 1996;49:861-863.
  28. 김각균. 구강질환에 대한 타액의 면역기능. 타액과 타액선 토론회 1995;38-41.
  29. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2000;2:1599-1607.
  30. Minah GE, Loesche WJ. Sucrose metabolism by prominent members of the flora isolated from cariogenic and non-cariogenic dental plaques. *Infect Immun* 1977;17:55-61.
  31. Walker GJ, Brown RA, Taylor C. Activity of *Streptococcus mutans* alpha-D-glucosyltransferases released under various growth conditions. *J Dent Res* 1984;63:397-400.
  32. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980;44:331-384.
  33. Whaley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:195-216.
  34. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-380.
  35. Carlsson P, Gandour IA, Olsson B, Rickardsson B, Abbas K. High prevalence of *mutans streptococci* in a population with extremely low prevalence of dental caries. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:121-124.
  36. Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:29-55.
  37. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
  38. Kornman KS, Loesche WJ. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 1982;35:256-263.
  39. Mombelli A, Rutar A, Lang NP. Correlation of the periodontal status 6 years after puberty with clinical and microbiological conditions during puberty. *J Clin Periodontol* 1995;22:300-5.
  40. Chu L, Bramanti TE, Ebersole JL, Holt SC. Hemolytic activity in the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*: kinetics of enzyme release and localization. *Infect Immun* 1991;59:1932-1940.
  41. Grenier D. Characteristics of hemolytic and hemagglutinating activities of *Treponema denticola*. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:246-249.
  42. Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodontal Res* 1997;32:120-125.
  43. Tanner A C, Strzempko M N, Belsky C A, McKinley G A. API ZYM and API An-Ident reactions of fastidious oral gram-negative species. *J Clin Microbiol* 1985;22:333-335.
  44. Fenno JC, Lee SY, Bayer CH, Ning Y. The opdB locus encodes the trypsin-like peptidase activity of *Treponema denticola*. *Infect Immun* 2001;69:6193-6200.
  45. Kesavalu L, Holt SC, Ebersole JL. Trypsin-like protease activity of *Porphyromonas gingivalis* as a potential virulence factor in a murine lesion model. *Microb Pathog* 1996;20:1-10.
  46. DeCarlo AA, Grenett HE, Harber GJ, Windsor LJ, Bodden MK, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Induction of matrix metalloproteinases and a collagen-degrading phenotype in fibroblasts and epithelial cells by secreted *Porphyromonas gingivalis* proteinase. *J Periodontal Res* 1998;33:408-420.
  46. Potempa J, Banbula A, Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000;24:153-192.
  48. Cox SD, Mann CM, Marham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* 2000;88:170-175.
  49. 이종한. 피부감염모낭층에 대한 피톤치드의 역할. 중앙대학교 학위논문 2005;19-21.
  50. Lovett JV, Ryuntyu MY, Liu DL. Allelopathy: Chemical communication and plant defense. *J Chem Ecol* 1989;15:1193-1202.

51. Patrick ZA. Allelopathy mechanism and their exploitation for biological control. *Anandian J Plant Pathol* 1986;8:225-228.
52. Wink M. Plant breeding, importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Ther Appl Gen* 1988;75:225-233.
53. 강하영. 피톤치드의 비밀. *역사넷* 2003:15-20.
54. 김선규, 신미경, 어규식, 이진용, 홍정표, 전양현. *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균효과. *대한구강내과학회지* 2007;32:137-150.
55. 박재봉, 어규식, 전양현, 이진용, 홍정표. 피톤치드의 입냄새 제거효과. *대한구강내과학회지* 2007;32:151-156.
56. Nakano Y, Yoshimura M, Koga T. Methyl mercaptan production by periodontal bacteria. *Int Dent J* 2002;52(Suppl 3):217-220.
57. Guarner F, Perdigon G, Corthier G, Salminen S, Koletzko B, Morelli L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br J Nutr* 2005;93:783-786.
58. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci* 2005;113:188-196.
59. Stackebrandsdt E, Liesack W. Nucleic acids and classification. In *Handbook of New Bacterial Systematics* (edited by Goodfellow M, O'Donnell AG), Academic Press. 1993:151-194.
60. Könönen E, Jousimies-Somer H, Bryk A, Kilp T, Kilian M. Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J Med Microbiol* 2002;51:723-730.
61. Dagan R. Treatment of acute otitis media - challenges in the era of antibiotic resistance. *Vaccine* 2000;19(Suppl 1):S9 - S16.
62. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:406-408.
63. Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and periodontal health status. *J Dent Res* 2000;79:1664-1668.
64. Ivanova I, Miteva V, Stefanova TS et al. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int J Food Microbiol* 1998;42:147-158.
65. Kabuki T, Uenishi H, Watanabe M, Seto Y, Nakajima H. Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *J Appl Microbiol* 2007;102:971-980.
66. Kim YJ, Seol YJ, Choi BK, Le SH. Preventive effect of the functional fermented milk contained probiotic cultures and Curcuma xanthorrhiza extract on oral disease. 제15회 국제학술심포지엄 보고서(유산균과 건강-유산균과 구강건강) 2007:82-95.
67. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr* 2004;79:261-267.

- ABSTRACT -

The Effect of *S. thermophilus* Isolated from Saliva Treated with  
Phytoncide on *P. gingivalis*

Sung-Hee Jung D.M.D.,M.S.D.<sup>1,2</sup> Q-Schick Auh, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.<sup>1</sup>,  
Yang-Hyun Chun, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.<sup>1</sup>, Jung-Pyo Hong, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.<sup>1,3</sup>

*Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Kyung Hee University<sup>1</sup>*

*Department of Dental Hygiene, Shin Gu College<sup>2</sup>*

*Institute of Oral biology, School of Dentistry, Kyung Hee University<sup>3</sup>*

The antibacterial effect of phytoncide on *Porphyromonas gingivalis*, which is the main causative agent of periodontal disease and halitosis, has been reported. However, little is known about its effect on normal oral microflora. The present study was performed to observe the effect of phytoncide on oral normal microflora and the inhibitory effect of surviving resident oral bacteria on *P. gingivalis*. In this study, saliva from each of 20 healthy subjects was treated with 1% phytoncide from Japanese Hinoki (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.). Surviving salivary bacteria were isolated on blood agar plates and identified by 16S rDNA sequencing. In order to select inhibitory isolates against *P. gingivalis*, the isolates from the phytoncide-treated saliva were cultured with *P. gingivalis*. The results were as follows:

1. In general, the number of bacteria in saliva from periodontally healthy subjects was decreased when the saliva was treated with 1% phytoncide.
2. The majority of the salivary bacteria surviving the treatment of phytoncide were *S. thermophilus* (53%).
3. Most of the surviving salivary bacteria (72.5%) inhibit the growth of *P. gingivalis* A7A1-28 and *P. gingivalis* W83 on blood agar plates.
4. Among the surviving *S. thermophilus*, 85.8% of them were observed to inhibit *P. gingivalis* strains and 75.8% of the surviving *S. sanguinis* were inhibitory.

Taken together, oral resident bacteria surviving phytoncide, which has been shown to inhibit *P. gingivalis*, may exert an additional inhibitory activity against the periodontopathic bacterium. Therefore, phytoncide can be used for preventing and ceasing the progress of periodontal disease and halitosis, and thus is expect to promote oral health.

Key words: Phytoncide, 16S rDNA sequencing, *P. gingivalis*, *S. thermophilus*