

유산균 발효유가 *Streptococcus mutans*의 생균수 및 biofilm 형성에 미치는 영향

신혜성 · 김선미 · 최남기 · 양규호 · 강미선*

전남대학교 치의학전문대학원 소아치과학교실, 치의학 연구소 및 2단계 BK 21, *의과대학 미생물학교실

국문초록

유산균이 위장관과 구강건강에 probiotics로서 긍정적인 영향을 미치고 있음이 보고되고 있다. 이에 시판되는 유산균 발효유 5종과 우유를 선택하여 우식유발 원인균인 *S. mutans*에 대한 증식억제 및 biofilm 형성에 미치는 영향을 평가하고, 발효유의 산도, 완충능, 산생성능, 칼슘과 인의 함량을 측정하였다.

유산균 발효유에 *S. mutans*를 주입한 후 생균수를 측정한 결과 모든 발효유의 %가 증가함에 따라 *S. mutans* 수가 감소했으나 우유에서는 변화가 없었다.

10% 유산균 발효유에 *S. mutans*를 주입한 후 biofilm 형성 정도를 측정한 결과 액티브 GG, 불가리스는 biofilm 형성이 감소하였고, 이오는 유의한 변화가 없었으며, 투티, 에이스, 우유는 증가하였다($P<0.05$).

유산균 발효유 및 우유의 산도를 측정한 결과 이오(3.48 ± 0.01), 투티(3.67 ± 0.02), 에이스(3.71 ± 0.02), 액티브 GG(4.04 ± 0.02), 불가리스(4.19 ± 0.02) 순으로 나타났다.

유산균 발효유의 산생성능을 평가한 결과 불가리스가 가장 높은 산생성능을 보였으며 액티브 GG, 에이스, 투티, 이오, 우유 순으로 산도 하강 경향을 나타냈다.

이상의 결과는 유산균 발효유가 초기산도 및 산생성능 측정 결과 우식유발 가능성이 있음을 나타냈다. 그러나 유산균 발효유 중에서 농후발효유가 우식유발균인 *S. mutans*를 억제하였고 biofilm 형성을 감소시켜 긍정적인 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

주요어 : *S. mutans*, 유산균 발효유, Biofilm

I. 서 론

치아우식증은 구강 내 세균이 섭취한 음식의 탄수화물을 분해하여 유기산을 생성하고 이것이 치아 경조직의 무기질을 탈회시켜 발생하는 감염성 질환으로¹⁾, 치아우식의 초기 발생에 영향을 미치는 구강 내 세균으로는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*가 잘 알려져 있다.

*S. mutans*는 Gtf(glucosyltransferase)를 분비해 자당으로부터 비수용성 세포외 다당류인 글루칸(glucan)을 합성하며 이는 점착성을 나타내어 치아 평활면에 세균 부착을 도움으로써 치태형성에 관여하고 치아우식증을 야기한다^{1,2)}.

따라서 *S. mutans*에 의한 치아우식을 억제하기 위해 여러 방법이 시도되었으며²⁾, 그 중 치아우식 예방을 위해 probiotics

를 이용한 방법 즉, 구강 환경은 유지하면서 병인만을 선택적으로 제거하는 치료법에 대한 연구가 진행되고 있다³⁾. 특정 유산균이 첨가된 치즈나 요구르트, 우유 등을 이용하여 *S. mutans*의 증식 및 치태형성을 억제하려는 여러 시도가 보고된 바 있으며⁴⁻⁶⁾, 일부에서 긍정적인 효과가 보고되었다^{6,7)}.

유산균발효유는 위장관 내에서 소화 흡수를 촉진시키고 유해 세균을 억제하여 유익한 세균의 생육을 촉진시킴으로써 정상작용과 노화방지에 효과가 있으며⁸⁾, 구강건강에도 유익한 효과가 있음이 보고되었고 최근에는 치아건강을 위한 유산균 음료가 출시된 바 있다. 국외연구에서 특정 유산균이 *S. mutans*의 증식이나 치태형성을 억제하는 효과가 보고된 바 있지만 국내 유산균 발효유에 대한 연구는 발효유의 산도가 높아 치아의 탈회를 야기하는 우식원성 식품으로 분류하고 있다^{9,10)}. 또한 국내

교신저자 : 김 선 미

광주광역시 북구 우봉동 300번지 / 전남대학교 치의학전문대학원 소아치과학교실 / 062-530-5668 / hellopedo@hanmail.net

원고접수일: 2009년 03월 18일 / 원고최종수정일: 2009년 06월 22일 / 원고채택일: 2009년 06월 30일

발효유에 관한 연구는 대부분 유산균 발효유의 산도와 침식능에 초점이 맞춰져 있으며, 시판 유산균 발효유가 *S. mutans*의 증식이나 치태형성에 어떠한 영향을 주는지에 대한 연구는 거의 없었다. 이에 국내에서 시판되는 액상발효유 3종과 농후 발효유 2종 등 총 5종을 대상으로 유산균 발효유가 *S. mutans*의 증식이나 biofilm 형성에 미치는 영향을 평가하여 보고자, *S. mutans*를 접종 배양하고 생균수와 biofilm 형성량을 측정하였으며, 또한 각 유산균 발효유의 산도와 완충능, 산생성능 및 칼슘과 인 이온의 성분분석을 시행하여 각 제품의 우식유발능을 비교평가 하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험 음료 선정

시중에 판매되는 유산균 발효유 중 유산균 수가 ml당 1천만 마리 이상이며 무지유고형분 함량이 3.0% 이상인 액상발효유 3종(한국야쿠르트 투티, 한국야쿠르트 에이스, 남양 이오)과 유산균 수가 ml당 1억마리 이상이며 무지유고형분 함량이 8.0% 이상인 농후 발효유 2종(남양 불가리스, 매일 액티브 GG)을 대상으로 하였고, 대조군으로는 우유(빙그레 참 맛 우유)를 사용하였다. 각 제품의 주요 구성성분은 표 1에 표시되어 있다.

배지로 사용된 0.25% glucose trypticase soy broth(TSB)는 제조사의 지시사항에 따라 증류수와 혼합하여 교반한 후 121°C에서 15분간 멸균 후 사용하였다.

2. *S. mutans* 배양

동결 보관중인 *S. mutans* serotype c(Ingbritt strain)를 이용하였으며 2 ul를 TSB 20 ml에 접종하여 37°C 배양기에 서 배양하였다.

3. *S. mutans* 생균수 측정

96 well plate에 유산균 발효유와 우유를 각각 0%, 2.5%, 5%, 10%가 되도록 TSB로 희석하여 0.1ml씩 첨가하고 *S. mutans* 0.1 ml(5.0×10^6 CFU/ml)를 접종하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 TSB agar에 접종하여 37°C에서 48시간 배양하여 자란 생균수를 측정하였다.

4. Biofilm 형성 실험

1) 유산균 발효유에 대한 *S. mutans*의 biofilm 형성 실험

96 well plate에 유산균 발효유와 우유를 최종 농도가 0%, 2.5%, 5%, 10%가 되도록 TSB에 희석하여 각각 0.1 ml씩 넣고, *S. mutans* 0.1 ml (5.0×10^6 CFU/ml)를 접종하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 배양액을 버리고 증류수 0.2 ml로 2회 세척한 후 plate를 건조시켰다. 이후 15분간 실온에서 0.1% crystal violet 0.05 ml를 넣어 염색하고 0.2 ml 증류수로 2회 세척한 후 99% 에탄올 0.2 ml로 녹여서 Precision microplate reader(E max, Molecular Device, USA)를 이용해 OD₅₉₅에서 측정하였다.

또한 유산균 발효유와 우유 자체의 biofilm 형성을 확인하기 위해 *S. mutans*를 넣지 않고 유산균 발효유와 우유가 0%, 2.5%, 5%, 10%가 되도록 TSB에 희석하여 0.2 ml를 넣어 같은 방법으로 실험을 시행하였다.

2) 자당이 첨가된 경우 유산균 발효유에 대한 *S. mutans*의 biofilm 형성 실험

자당이 첨가된 경우 유산균이 biofilm 형성에 미치는 영향을 조사하기 위해 유산균 발효유와 우유에 5% 자당을 첨가하여 1)과 같은 방법으로 시행하였다.

Table 1. Compositions of fermented milks and milk

Product name	Lactic acid bacteria	Composition
Tootee (Korea Yakult)	<i>Streptococcus thermophilus</i> HY9012 <i>L. lactis</i> HY499	Skim milk 3.52%, Maltitol Syrup 10%, Isomalt oligosaccharide
Ace (Korea Yakult)	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Bifidobacterium</i>	Skim milk 3.7679%, Sucrose, Fructooligosaccharide, Crystalline glucose monohydrate
E5 (Namyang)	<i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus paracasei</i>	Skim milk 35.592%, High Fructose Corn Syrup, Isomalt oligosaccharide, Dextrose, Cyclodextrin Syrup, Sucralose
Bulgaris (Namyang)	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Korean cow's milk 79.7%, Skim milk, Apple concentrated juice 6%, Isomalt oligosaccharide, Crystalline glucose
Active GG (Maeil)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Korean cow's milk 50%, High Fructose Corn Syrup, Apple and pear concentrated juice, Fructooligosaccharide 1%, Skim milk, Crystalline glucose
Natural taste milk (Binggrae)	None	Korean cow's milk 100%

5. 초기 산도 및 완충능 검사(적정산)

상온의 유산균 발효유 25 ml를 비커에 담아 초기 pH를 pH meter(Digital pH meter, Corning, USA)로 측정하였다. 완충능은 각 유산균 발효유를 pH 7까지 변화시키는데 필요한 1M NaOH의 양으로 정의하였으며, 25 ml의 유산균 발효유에 1M NaOH를 첨가하여 혼합용액이 pH 7에 도달할 때까지 투입된 NaOH 부피를 측정하였다.

6. 산생성능 검사

1) 유산균 발효유의 산생성능 검사

5종의 유산균 발효유와 우유에 1M NaOH를 첨가하여 혼합용액이 pH 7이 되도록 중화한 후 각 용액을 12.5 ml씩 멸균된 비커 5개에 분주하였다. 각 용액과 동량의 멸균된 TSB 용액을 혼합하고 37°C에서 10시간 배양하였으며 2시간마다 비커 1개씩을 꺼내어 각 용액의 pH를 측정하였다.

2) *S. mutans* 첨가 후 유산균 발효유의 산생성능 검사

5종의 유산균 발효유와 우유에 1M NaOH를 첨가하여 혼합용액이 pH 7이 되도록 중화한 후 각 용액을 12.5 ml씩 멸균된 비커 5개에 분주하였다. 각 용액과 동량의 멸균된 TSB 용액을 혼합하고 *S. mutans* 0.1 ml를 첨가하여 2초간 교반하였다. 이 용액을 37°C에서 10시간 배양하였으며 2시간마다 비커 1개씩을 꺼내어 각 용액의 pH를 측정하였다.

7. 칼슘, 인 이온 농도 측정

유산균 발효유와 우유의 칼슘과 인의 농도는 ICP-Atomic Emission Spectrometer(OPTIMA 4300DV, Perkin Elmer)를 이용해 측정하였다.

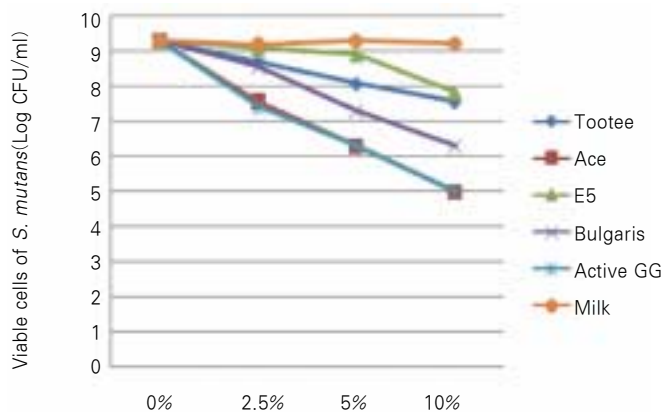


Fig. 1. Viable cell count of *Streptococcus mutans* in fermented milks and milk by concentration of drinks.

8. 통계분석

각 유산균 발효유의 biofilm 형성량은 Friedman test를 이용하여 유의성 검정을 시행하였으며, 각 발효유의 첨가 비율의 증가에 따른 차이검정은 Mann-Whitney U Test를 시행하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. *S. mutans* 생균수 측정 결과

농도를 달리한 각 유산균 발효유에 *S. mutans*를 동량 접종하고 생균수를 측정한 결과 *S. mutans*만을 접종한 발효유 0%에서와 모든 농도의 우유에 균을 접종한 경우, 생균수의 유의한 차이가 없었다. 그러나 모든 유산균 발효유는 농도가 증가함에 따라 *S. mutans*의 생균수가 감소하였으며, 액티브 GG, 에이스, 불가리스, 투티, 이오 순으로 *S. mutans* 감소 양상을 나타냈다(Fig. 1).

2. Biofilm 형성 실험 결과

1) 유산균 발효유에 의한 *S. mutans*의 biofilm 형성 실험

각 유산균 발효유만의 biofilm 형성량은 불가리스에서 가장 높았으며, 에이스, 액티브 GG, 투티, 이오 순으로 나타났다. 유산균 발효유에 *S. mutans*를 첨가한 후 biofilm 형성 정도를 비교 측정한 결과 액티브 GG, 불가리스는 biofilm이 감소하였고, 이오는 유의한 변화가 없었으며, 투티, 에이스, 우유는 biofilm이 증가하였다($P < 0.05$)(Fig. 2).

2) 자당을 첨가한 경우 유산균 발효유의 *S. mutans*에 대한 biofilm 형성 억제효과 평가

5% 자당이 함유된 경우, 불가리스, 액티브 GG, 에이스는 유

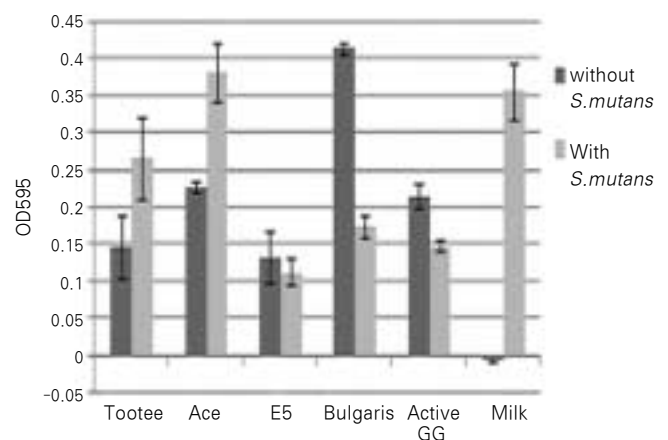


Fig. 2. Biofilm formation of 10% fermented milks and 10% milk according to presence of *Streptococcus mutans*. The optical density was measured at 595nm in the spectrophotometer.

산균 발효유 없이 5% 자당에 *S. mutans*를 접종한 것(0%)보다 biofilm 형성량이 감소하였다. 반면 우유는 농도가 증가함에 따라 biofilm 형성량이 점차 증가했다(Fig. 3). 불가리스, 액티브 GG, 에이스, 투티, 이오, 우유 순으로 나타났다.

자당이 첨가되지 않은 실험과 비교하였을 때, 모든 농도의 이오와 2.5%, 5%의 액티브 GG를 제외한 나머지 유산균 발효유 및 우유는 자당 첨가 시 유의하게 높은 탁도(optical density)를 나타냈다($P < 0.01$).

3. 초기 산도 및 완충능 검사

실험 유산균 발효유의 산도는 이오가 pH 3.48로 가장 낮았고, 불가리스가 pH 4.19로 가장 높았으며 우유는 pH 6.39였다. 액상발효유는 평균 pH 3.62, 농후발효유는 평균 pH 4.12로 액상발효유의 평균 pH가 더 낮은 것으로 나타났다. 산도는

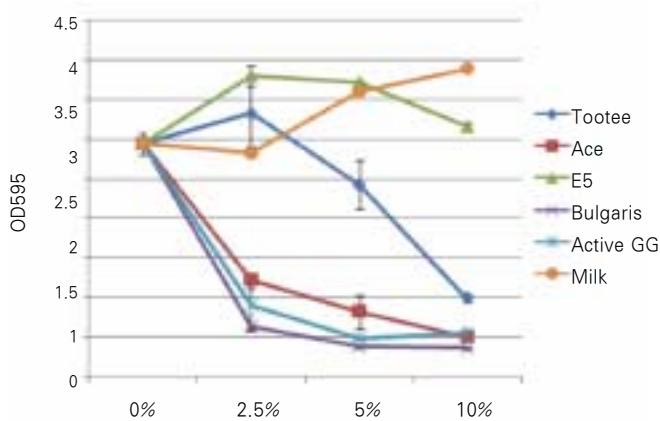


Fig. 3. Inhibitory effect of fermented milks contained 5% sucrose on the biofilm formation of *S. mutans* by concentration of drinks.

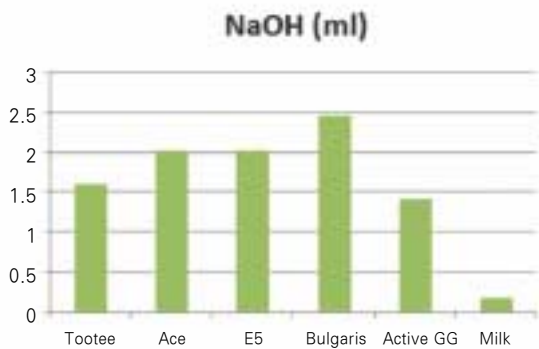


Fig. 5. Buffering capacity of fermented milks and milk.

이오가 가장 낮았고 투티, 에이스, 액티브 GG, 불가리스 순으로 높아졌다(Table 2, Fig. 4).

완충능은 pH 7까지 이르는데 필요한 1M NaOH 양으로 정의하였을 때, 액티브 GG가 1.43 ml로 가장 낮았으며, 불가리스가 2.47 ml로 가장 높았다. 액티브 GG, 투티, 이오, 에이스, 불가리스의 순으로 나타났다(Table 2, Fig. 5).

4. 산생성능 검사

1) 유산균 발효유의 산생성능 검사

pH 7로 중화시킨 각 발효유 및 우유를 TSB와 혼합하여 배양한 후 2시간 간격으로 산도를 측정하였을 때 2시간 경과 시 pH 5.5 이하로 감소한 제품은 불가리스였으며, 4시간 경과 시는 액티브 GG, 6시간 경과 시는 에이스가 pH 5.5 이하로 감소하였다. 우유는 변함이 없었다(Fig. 6).

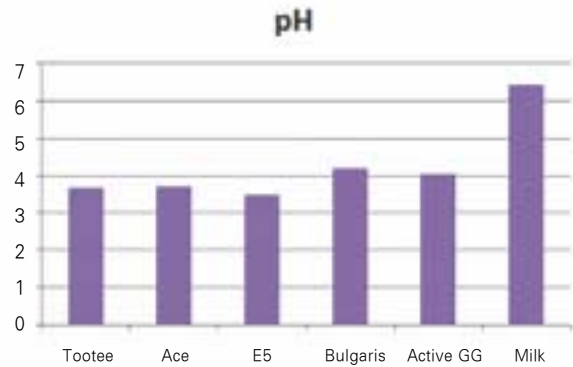


Fig. 4. The pH of fermented milks and milk.

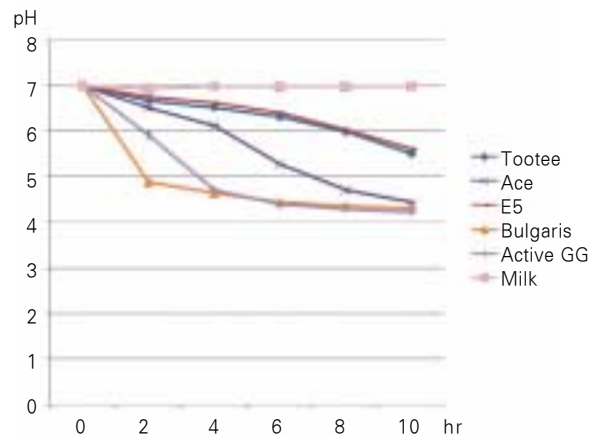


Fig. 6. pH change of fermented milks and milk by incubation time.

Table 2. The pH and buffering capacity of fermented milks and milk

	Toottee	Ace	E5	Bulgaris	Active GG	Milk
Initial pH	3.67 ± 0.02	3.71 ± 0.02	3.48 ± 0.02	4.19 ± 0.02	4.04 ± 0.02	6.39 ± 0.02
Buffer capacity (1M NaOH ml)	1.62 ± 0.02	2.04 ± 0.05	2.02 ± 0.02	2.47 ± 0.05	1.43 ± 0.30	0.18 ± 0.01

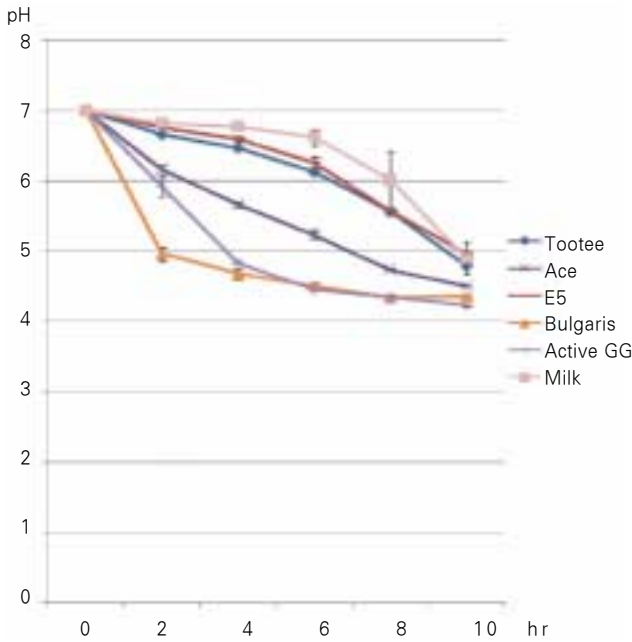


Fig. 7. pH change of fermented milks and milk with *S. mutans* by incubation time.

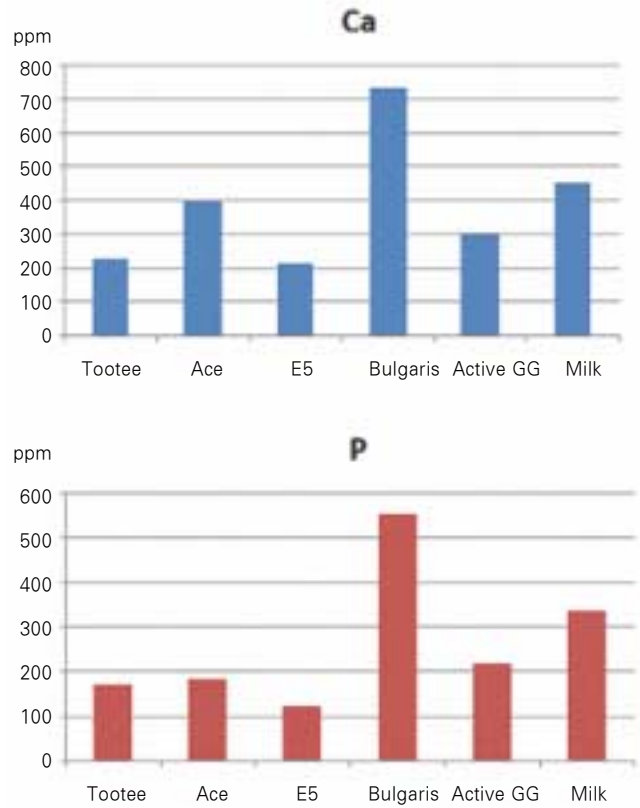


Fig. 8. Concentration of Ca and P ions in fermented milks and milk.

Table 3. Concentration of Ca and P ions in fermented milks and milk

Concentration(ppm)	Toottee	Ace	E5	Bulgaria	Active GG	Milk
Ca	228.3	396.7	215.2	732.7	301.4	453.2
P	171.3	184.5	122.6	552.1	220.3	336.5

2) *S. mutans* 접종 후 유산균 발효유의 산생성능 검사

*S. mutans*와 유산균 발효유 및 우유를 배양한 경우, *S. mutans*를 접종하지 않은 경우와 비슷한 양상을 나타냈으며, 8시간 이후에는 모든 제품이 pH 5.5 이하의 산도를 나타냈다. 우유도 시간이 경과함에 따라 pH가 감소하였으며 10시간 경과 후 pH 5.5 이하로 감소하였다(Fig. 7).

5. 칼슘과 인의 성분분석

각 발효유와 우유의 칼슘과 인에 대한 성분 분석 결과 불가리스가 가장 많은 칼슘과 인 함량을 보였으며 우유에 함유된 양보다 더 많았다(Table 3, Fig. 8). 칼슘은 불가리스, 우유, 에이스, 액티브 GG, 투티, 이오 순으로, 인은 불가리스, 우유, 액티브 GG, 에이스, 투티, 이오 순으로 함유되어 있었다.

IV. 고 찰

Probiotics는 음식에 첨가되어 숙주에 이로운 영향을 주는 살아있는 장내 미생물을 뜻하는 것으로 이는 20세기 초에 메치니코프가 불가리아 사람들이 장수하는 원인을 그들이 많이 섭취하는 살아있는 균이 함유되어 있는 발효유에 있다고 제안한 것에서 인식되기 시작하였다⁷⁾.

대표적인 probiotics으로는 유산균이 있으며 이는 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* 등으로 크게 분류된다⁷⁾. 이들이 장내에서 probiotics로서의 작용을 나타내는 기전으로는 첫째 면역을 자극하며, 둘째 병원성 미생물과 장내에서 제한된 영양소를 경쟁적으로 이용하는 영양소 경쟁적 이용, 셋째 병원성 미생물이 장상피세포나 장점막에 부착하는 것을 억제, 넷째 장 상피세포에 침입을 억제, 다

첫째 항균물질의 생산으로 장 건강을 증진시킨다¹¹⁾.

또한 probiotics으로 사용되는 유산균의 구강 내 우식관련 균주에 미치는 영향에 대해 연구가 이루어져왔다. Nikawa 등¹²⁾은 *L. reuteri*가 *S. mutans*의 수를 감소시켰음을 보고하였고, Kang 등¹³⁾은 *Weissella cibaria*가 *S. mutans*에 의한 치태형성을 억제함을 보고하였다. 이것은 대부분 유산균이 우식 유발균으로 널리 알려진 *S. mutans*를 억제한 긍정적인 영향을 보고한 자료로서 장관계에 유익한 probiotic 유산균이 구강 내 치아우식 원인균을 억제하는 목적으로 이용될 수 있음을 나타내는 기본 자료가 된다.

앞의 결과를 구강 내에서 증명하기 위한 여러 연구가 진행되었는데 이때는 우리가 일상적으로 섭취할 수 있는 식품에 유산균을 넣거나 특정 유산균이 함유된 식품을 이용하여 그 결과를 관찰하였다. 요거트에 *Bifidobacterium DN-173 010*을 첨가한 실험에서 Caglar 등¹⁴⁾은 타액 내 *S. mutans*의 감소를 보고하였다. Näse 등⁴⁾은 *Lactobacillus rhamnosus GG(LGG)*를 우유에 첨가하여 7개월간 섭취하게 하였을 때, 우식활성도와 타액과 치태내의 *S. mutans* 수가 감소했으며, 이 때 LGG는 자당이나 유당 분해를 못하므로 치아에 유해효과가 없음을 설명하였다. Ahola 등⁵⁾은 역시 LGG를 첨가한 치즈를 3주간 섭취하였을 때 통계적 유의성은 없으나 상당한 *S. mutans*의 감소를 보고하였고 특히 구강 내에 *S. mutans*가 많은 사람에서 더 효과가 있었음을 보고했다. Hong 등¹⁾은 *Lactococcus lactis 1370*을 함유한 유산균 양치액을 멸균한 우유에 함유하여 양치하게 했을 때, 1일 후 유의한 수준의 치태형성 억제율을 보였음을 보고하였다.

또한 일부 연구자들은 *Lactobacillus*가 당 섭취에 영향을 받으며 우식과 관련이 있다고 주장하나 몇몇 연구자들은 *Lactobacillus*가 치아우식의 개시에 거의 관여하지 않으며, 모든 *Lactobacillus*가 우식을 유발하는 것은 아니며, 유산균 발효유의 완충능에 의해 세균의 산생성이 완충되므로 우식진행에 영향을 준다고 주장하였다¹⁵⁾.

한편 유산균을 포함한 대표적 식품으로는 유산균 발효유가 있는데 이에 대한 국내 연구는 발효유의 산도나 침식능에 초점이 맞춰져 있었고^{9,16-18)}, 우식유발균 억제에 대한 영향은 거의 논의되지 않았다. 따라서 본 논문에서는 국내 시판되는 유산균 발효유의 우식유발능 평가 차원에서 발효유가 우식유발 원인균인 *S. mutans*의 억제 및 biofilm 형성 억제 작용을 하는지 평가하였다.

유산균 발효유 및 우유의 산도를 측정한 결과 이들 모두 pH 5 이하의 값을 나타내어 Stephan curve에서 나타난 우식발생 가능 범주에 해당되었다¹⁹⁾. 그러나 최와 신²⁰⁾은 pH와 치아의 침식이 직접 비례하지는 않는다고 알려져 있는데 이는 음료가 구강 내에 섭취되면 음료의 산도가 적정 산도로 변화되기 때문이라 하였으며, 치아를 탈회시키는 요인은 다양하여 산도뿐만 아니라 적정산, 구강 내 완충작용, 음이온 등이 관여한다고 하였다.

완충능은 중성의 pH를 만들기 위해 필요한 수산화나트륨의 부피로 액티브 GG, 투티가 좋은 결과를 나타냈고 불가리스가 가장 높은 값을 나타내어 결과적으로 산성 환경이 구강 내에서 오래 유지되고 중화되기 어려움을 나타냈다.

산생성을 평가한 결과 모든 유산균 발효유가 균을 접종하지 않았을 때에도 시간이 경과됨에 따라 산도가 증가 되었는데, 2시간 경과 시 불가리스는 pH 5.5 이하를 나타냈고, 배양 10시간 후 우유는 산도의 변화가 없었으며 투티와 이오는 pH가 낮아졌으나 탈회임계점(pH 5.5)까지 미치지 않았고, 유산균의 수가 많은 에이스, 불가리스, 액티브 GG는 탈회 임계점 이하로 감소되었다. 이는 유산균 자체가 유산을 생성하기 때문으로 생각된다²¹⁾. 그러나 유산균은 또한 bacteriocin과 H₂O₂ 등을 생성하며²¹⁾, 이는 감수성 세균에 대해 살균작용을 하여 장 내 유해균의 억제작용을 함이 보고된 바 있다^{22,23)}. 따라서 이와 같은 기전으로 유산균에 의해 이번 실험에서 *S. mutans*가 억제된 것으로 추정된다.

한편 유산균 발효유에 *S. mutans*를 접종 후 10시간 배양한 결과 접종하지 않은 실험과 비교 시 우유가 큰 폭의 pH 감소를 나타내었으며 10시간 후 모든 발효유 및 우유의 산도가 pH 5 이하로 감소되어 치아의 탈회 임계점을 넘어섰다. 그러나 균 접종 전에도 낮은 pH 값을 보였던 농후발효유와 에이스의 산도는 크게 변하지 않았으며 투티, 이오, 우유의 pH가 감소하였다. 이는 유산균에 의한 *S. mutans* 생균수 감소가 컸던 농후발효유와 에이스는 *S. mutans*에 의한 추가 산생성에 따른 산도의 변화가 없었으나 *S. mutans* 감소효과가 낮았던 투티와 이오는 유산균의 산생성과 더불어 *S. mutans* 또한 자당을 분해하여 산을 생성한 것으로 생각된다. 우유는 *S. mutans*를 접종하기 전에는 산생성을 하지 않다가 균 접종 후 유당의 분해로 인한 산생성을 한 것으로 생각된다.

유산균 발효유의 산성 환경은 다수의 연구에서 논의되었는데 심 등⁹⁾은 이러한 산성 환경이 치아에 좋지 못하여 유산균 발효유에 2시간 동안 침잠시켰을 때 치아에 상당한 침식을 일으키고 이러한 침식이 발효유의 칼슘, 인, 불소의 농도와 상관관계가 있음을 보고하였다. 그러나 유산균 발효유의 침식효과에 대해 Wongkhantee 등¹⁶⁾과 Lussi 등¹⁷⁾, 그리고 Kargul 등¹⁸⁾은 어떤 종류의 요거트도 치아에 침식을 일으키지 않으며 이는 칼슘과 인의 영향 때문임을 인공타액 순환 실험으로 증명하였다. 유산균의 산생성이 치아의 탈회에 부정적인 영향을 미칠 수 있으나 유산균이 우식원균 억제 효과를 나타낼 수 있는 복잡한 관계가 되므로 유산균 발효유의 산도가 우식유발에 미치는 영향 및 유산균과 우식 유발균과의 상호작용 기전은 더 연구가 필요하다.

*S. mutans*에 의한 biofilm 형성량을 비교하기 위해 crystal violet으로 염색 후 탁도(optical density)를 측정하였다. 10% 유산균 발효유 자체와 균 접종 후의 biofilm 형성량을 비교한 결과, 투티와 에이스는 균 접종 후 탁도가 증가했고, 이오는 유의한 변화가 없었다. 반면에 액티브 GG와 불가리스는 균 접종

후 biofilm이 오히려 감소하였는데 이는 유산균이 *S. mutans*를 억제한 결과로 생각된다. 또한 농후발효유에서만 이러한 효과가 나타난 것으로 보아 농후발효유가 액상발효유보다 *S. mutans*를 더 많이 억제하기 때문으로 생각된다.

또한 5% 자당을 첨가한 실험에서 대부분의 발효유가 자당이 포함되지 않은 경우보다 더 많은 biofilm이 형성되었으나 각각의 발효유는 농도가 높아짐에 따라 유산균의 *S. mutans* 억제 작용에 의해 biofilm 형성량이 감소하였다. 반면에 유산균이 함유되지 않은 우유는 biofilm이 증가하였다.

각 발효유에 *S. mutans*를 접종한 후 *S. mutans*의 생균수를 측정된 실험에서 우유와 발효유의 %가 증가함에 따라 우유에서는 생균수의 변화가 없었으나, 5종의 발효유에서는 *S. mutans* 생균수가 감소하였다. 역시 액티브 GG, 에이스, 불가리스, 투티, 이오 순으로 감소되어 유산균 함량이 많은 농후발효유가 액상발효유보다 *S. mutans*를 더 억제하는 것으로 생각되었다.

이번 연구는 구강 건강을 증진시킬 수 있음을 광고하는 1종의 유산균 발효유(투티)와 위장관에 유익함을 내세우는 제품 4종을 선택하였는데, 모든 제품이 여러 종의 유산균을 함유한 시판 제품이고, 또한 여러 합성물이 첨가되어 있어 변수가 있을 가능성이 있다. 향후 치태형성 및 우식발생에 대한 유산균 발효유의 영향을 조사하는 생체 내 연구가 필요할 것으로 생각된다.

또한 유산균 발효유는 건강 증진을 추구하는 현대에 그 소비량이 증가하고 있고 치아 맹출 단계의 어린이가 많이 섭취하는 음료이므로 칼슘과 인 등 치아 탈회를 막는 무기질의 함량을 개선하고, 우식유발균에 대한 억제효과가 분명한 유산균을 이용하여 위장관뿐만 아니라 구강건강까지 고려한 제품을 개발해 나가야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

시판되는 유산균 발효유 5종(투티, 에이스, 이오, 불가리스, 액티브 GG)과 우유를 선택하여 우식유발 원인균인 *S. mutans*에 대한 증식억제 및 biofilm 형성에 미치는 영향을 평가하고, 발효유의 산도 및 완충능, 산생성능, 칼슘과 인의 함량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

유산균 발효유 및 우유의 산도를 측정된 결과 이오(3.48±0.01)가 가장 낮았으며, 불가리스(4.19±0.02)가 가장 높았다. 액상발효유는 평균 pH 3.62, 농후발효유는 평균 pH 4.12로 액상발효유의 평균 pH가 더 낮은 것으로 나타났다.

완충능을 측정된 결과 불가리스(2.47±0.05)가 가장 높아 산도를 중성으로 만들기 어려우며 액티브 GG(1.43±0.30)가 유산균 발효유 중 완충능이 가장 낮아 중성으로 만들기 쉬운 것으로 나타났다.

발효유 및 우유의 성분 중 치질을 탈회로부터 보호하는 무기질인 칼슘은 불가리스에 가장 많이 함유되어 있었고 우유, 에이스, 액티브 GG, 투티, 이오 순으로 함유되었으며, 인은 불가리

스에 가장 많이 함유되었고, 우유, 액티브 GG, 에이스, 투티, 이오 순으로 함유되어 있었다.

유산균 발효유의 산생성능을 평가하기 위해 pH 7로 중화시킨 후 *S. mutans*를 접종하여 배양하고 2시간 간격으로 산도를 측정된 결과 불가리스가 가장 높은 산생성능을 보였으며 액티브 GG, 에이스, 투티, 이오, 우유 순으로 산도 하강 경향을 나타냈다.

*S. mutans*의 생균수를 측정된 결과 우유는 변함이 없었으나 모든 발효유에서 발효유의 %가 증가함에 따라 *S. mutans* 수가 감소했다.

또한 10% 유산균 발효유의 *S. mutans* 포함 여부에 따른 biofilm 형성 정도를 측정된 결과 *S. mutans*를 포함한 경우 액티브 GG, 불가리스는 biofilm 형성이 감소하였고, 이오는 유의한 변화가 없었으며, 투티, 에이스, 우유는 biofilm 형성이 증가하였다($P<0.05$).

이상의 결과는 유산균 발효유가 초기산도 및 산생성능 측정 결과 우식유발 가능성이 있음을 나타냈다. 그러나 유산균 발효유 중에서 농후발효유가 우식유발균인 *S. mutans*를 억제하였고 biofilm 형성을 감소시켜 긍정적인 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 홍석진, 오종석, 이상대 등 : 치태형성억제세균이 구강내 치태형성에 미치는 영향. 대한구강보건학회지, 22:81-90, 1998.
2. 김태근, 양규호, 오종석 : *Streptococcus mutans*의 치태형성에 대한 *Leuconostoc lactis* 51의 영향. 대한소아치과학회지, 27:549-556, 2000.
3. Anderson MH, Shi W : A probiotic approach to caries management. *Pediatr Dent*, 28:151-153, 2006.
4. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, et al. : Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on Dental caries and caries risk in children. *Caries Res*, 35:412-420, 2001.
5. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalain T, et al. : Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol*, 47:799-804, 2002.
6. Meurman JH, Stamatova I : Probiotics: contributions to oral health. *Oral Diseases*, 13:443-451, 2007.
7. Twetman S, Stechsen-Blicks C : Probiotics and oral health effects in children. *Int J Pediatr Dent*, 18:3-10, 2008.

8. 이정열, 허철성, 백영진 : 유산균 발효유의 이용과 건강증진. Korean Dairy Techno, 17:58-71, 1999.
9. 심정호, 정태성, 김신 : 수중 유산균 발효유의 범랑질 침식 효과에 대한 연구. 대한소아치과학회지, 31:555-563, 2004.
10. 박영남 : *Streptococcus mutans*를 접종한 수종의 어린이 음료의 우식활성능에 관한 연구. 2008년 전남대학교 대학원 석사학위 논문.
11. Rolfe RD : Probiotics and gastrointestinal health. J Korean Public Health Assoc, 27:181-192, 2001.
12. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, et al. : *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of *mutans streptococci*. Int J Food Microbiology, 95:219-223, 2004.
13. Kang MS, Chung J, Kim SM, et al. : Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. Caries res, 40:418-425, 2006.
14. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, et al. : Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary *mutans streptococci* and *lactobacilli* in young adults. Acta Odontologica Scandinavica, 63:317-320, 2005.
15. Caufield PW, Li Y, Dasanayake A, et al. : Diversity of *Lactobacilli* in the oral cavities of young women with dental caries. Caries Res, 41:2-8, 2007.
16. Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, et al. : Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials. J Dent, 34:214-220, 2006.
17. Lussi A, Kohler N, Zero D, et al. : A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. Eur J Oral Sci, 108:110-114, 2000.
18. Kargul B, Caglar E, Lussi A : Erosive and buffering capacities of yogurt. Quintessence Int, 38:381-385, 2007.
19. 김종배, 백대일, 문혁수 등 : 임상예방치학. 고문사, 서울, 72, 2000.
20. 최대영, 신승철 : 우리나라 시판 식음료의 수소이온농도지수 측정실험. 대한구강보건학회지, 20:399-410, 1996.
21. Meurman JH : Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? Eur J Oral Sci, 113:188-196, 2005.
22. Vuyst LD, Leroy F : Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. J Mol Microbiol Biotechnol, 13:194-199, 2007.
23. 김상현, 이명숙, 장동석 : *Lactobacillus plantarum* LMC 7945가 생산하는 bacteriocin의 항균력과 그 특성. J Fd Hyg Safety, 10:65-71, 1995.

Abstract

THE EFFECT OF FERMENTED MILK ON VIABLE CELL COUNT AND BIOFILM FORMATION OF
STREPTOCOCCUS MUTANS

Hye-Sung Shin, Seon-Mi Kim, Nam-Ki Choi, Kyu-Ho Yang, Mi-Sun Kang*

Department of pediatric dentistry, Chonnam national university school of dentistry, Dental Research Institute and Second stage of BK21

**Department of Microbiology, Collge of Medicine*

Lactic acid bacteria worked positively on gastrointestinal tract and oral environment. So I selected commercial five fermented milks and milk, and then I evaluated their effect of growth inhibition and biofilm formation of cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*. And also calculated the acidity, buffering capacity, concentration of Ca and P ion and pH change of those drinks.

After adding *S. mutans* to fermented milks viable cell count of *S. mutans* in milk was not statistically different but those in all fermented milks were decreased as concentration of fermented milk increased.

When I measured the amount of formed biofilm in 10% fermented milks and milk with *S. mutans* and compared with those without *S. mutans*, the amount was decreased in Active GG and Bulgaris while being increased in Tootie, Ace and milk ($P < 0.05$).

The fermented milk with the lowest pH value was E5 (3.48 ± 0.01), and the highest was Bulgaris (4.19 ± 0.02). pH change of the fermented milks and milk with *S. mutans* was measured. The highest acid producing fermented milk was Bulgaris, and followed by Active GG, Ace, Tootie, E5, Milk.

These results indicated that fermented milks had caries activity due to the value of initial acidity and acid producing capacity. But, concentrated fermented milks had the inhibitory effect against *S. mutans*, and also had high volume of Ca and P ion that protected teeth. So I suggest that they have positive effect on teeth.

Key words : *S. mutans*, Fermented milk, Biofilm