

<원 저>

## *Weissella cibaria* CMU 경구투여가 비글의 구취 저하에 미치는 효과

도경효<sup>1</sup> · 박호은<sup>1</sup> · 강미선<sup>2</sup> · 김종태<sup>2</sup> · 여지은<sup>2</sup> · 이완규<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 수의과대학, <sup>2</sup>오라덴틱스 구강연구소

(접수: 2018년 3월 21일, 수정: 2018년 4월 29일, 게재승인: 2018년 5월 2일)

### Oral malodor-reducing effects by oral feeding of *Weissella cibaria* CMU in Beagle dogs

Kyung-Hyo Do<sup>1</sup>, Ho-Eun Park<sup>1</sup>, Mi-Sun Kang<sup>2</sup>, Jong-Tae Kim<sup>2</sup>, Ji-Eun Yeu<sup>2</sup>, Wan-Kyu Lee<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

<sup>2</sup>Research Institute, Oradentics Inc., Seoul 04781, Korea

(Received: March 21, 2018; Revised: April 29, 2018; Accepted: May 2, 2018)

**Abstract:** This study assessed the effects of *Weissella cibaria* (*W. cibaria*) CMU on oral health in male and female beagles (n = 18) by measuring oral malodor and periodontal disease-related parameters (calculus, plaque, and gingivitis indices). Oral malodor and indicators of periodontal disease were assessed in five treatment groups: negative control (scaling and 0.24 mg of maltodextrin, n = 3), positive control (0.24 mg of maltodextrin, n = 3), and *W. cibaria* CMU groups (each n = 4) at low (CMU-L,  $2 \times 10^7$  colony forming unit [CFU]), medium (CMU-M,  $2 \times 10^8$  CFU), and high (CMU-H,  $2 \times 10^9$  CFU) concentrations. After feeding with *W. cibaria* CMU for 6 weeks, total volatile sulfur compound concentrations in the CMU-L ( $2.0 \pm 1.04$  ng/10 mL), CMU-M ( $2.4 \pm 1.05$  ng/10 mL), and CMU-H ( $2.6 \pm 1.33$  ng/10 mL) groups were significantly lower than in the positive control group ( $3.2 \pm 1.65$  ng/10 mL). Also, CMU-L ( $1.4 \pm 0.83$  ng/10 mL) and CMU-H ( $1.9 \pm 1.14$  ng/10 mL) groups had methyl mercaptan levels lower than that in the positive control group ( $2.4 \pm 1.21$  ng/10 mL) at week 2. The plaque index was significantly lower in the CMU-H group ( $4.5 \pm 0.28$ ) than in the positive control group ( $5.9 \pm 1.08$ ) at week 6. *W. cibaria* CMU could be useful as a novel oral hygiene probiotics for reducing volatile sulfur compounds production and inhibiting plaque growth in companion animals.

**Keywords:** Beagle, *Weissella cibaria* CMU, methyl mercaptan, oral malodor, plaque index

## 서 론

구취란 구강이나 비강을 통해 나오는 악취 또는 입에서 나는 불쾌한 냄새를 말한다 [23]. 반려동물에서의 구취는 보호자들에게 불쾌한 느낌을 들게 하여 보호자와 반려동물과의 관계에 심각한 영향을 미칠 수 있기 때문에 수의학적 관점에서 동물에게서 구취가 난다는 것은 보호자와의 관계 형성에 있어 부정적인 요인으로 작용한다. 그뿐만 아니라 구취는 전신질환, 구강질환의 진단에 중요한 징후가 될 수 있기 때문에 중요한 의미가 있다.

구취는 구강, 비강, 상부 기도 및 소화기 상부에서 유래하며, 90% 정도가 구강 내 원인에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다 [27]. 전신질환을 배제할 경우, 구취는 구강 내 환경에 의해 주로 발생하게 되며 타액 혹은 치아 사이에 잔

류 음식물에 포함된 단백질 및 펩타이드 내 cysteine, methionine, cystine과 같은 아미노산을 미생물이 분해하여 발생한다 [7, 18]. 불쾌한 냄새의 주원인으로 알려진 것은 휘발성 황화합물(volatile sulfur compounds; VSC)이다. 그중 hydrogen sulfide(H<sub>2</sub>S)와 methyl mercaptan(CH<sub>3</sub>SH)이 구취를 유발하는 주요 황화합물로 알려져 있으며, 특히 치주질환이 있으면 methyl mercaptan 비율이 상대적으로 높다고 알려져 있다 [21]. 치주질환은 임상적으로 치은출혈, 종창, 치주낭의 형성 및 치주조직의 파괴 등을 보이며, 이러한 치주질환의 원인으로는 치주낭 내에 축적된 치태가 있다 [18].

이런 구강질환 및 구취를 관리하기 위해서는 전반적인 치아의 스케일링(scaling) 후 적절한 홈케어(home care)가 실시되어야 하지만, 칫솔질과 같은 물리적인 구강위생 유지방법은 보호자들에 의해 쉽게 이루어지기 힘들며 [1], 꾸준한 관

\*Corresponding author

Tel: +82-43-261-2960, Fax: +82-43-267-2595

E-mail: wklee@cbu.ac.kr

리가 힘들기 때문에 구강위생을 위한 간편한 제품 및 기술에 관한 연구가 많이 이루어져 있다.

구취 예방 및 억제를 위한 홈케어의 방법으로는 칫솔질과 같은 물리적 방법 외에도 화학적 방법으로 0.12% chlorhexidine gluconate가 구강세정제로 널리 사용되고 있다. 그러나 chlorhexidine gluconate의 경우, 광범위한 항균작용으로 치태 발생 억제 및 제거 기능이 있지만 미각 이상, 점막 자극, 치아 착색 및 정상 세균총의 사멸과 같은 부작용이 나타날 수 있다 [18].

이러한 부작용을 해결하고 보다 편리한 구강위생 관리를 위해 생균제(probiotics)에 대한 연구가 진행되고 있다. 구강용 생균제(oral care probiotics)는 기존 구강건강 관리 기술의 문제점을 보완하는 새로운 패러다임의 기술로, 기존 소독제, 치약 및 가글액 등이 닿지 않는 구강 내 사각지대까지 유해균 제거가 가능한 기술로 알려지고 있다. 또한 구강 내 질환을 유발하는 유해균에 대해서도 일시적 제거가 아닌 근본적이며 지속적인 효능을 기대할 수 있는 것으로 알려졌다. *Weissella*는 2002년에 분자생물학적 분류체계기술의 발달에 따라 *Lactobacillus* 속에서 새롭게 분류된 유산균으로, *Weissella cibaria* (*W. cibaria*)는 강산을 생성하지 않고 수용성 glucan과 과산화수소를 분비하여 충치 및 구취를 억제함으로써 구강에 유익한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다 [14-17].

현재까지 *W. cibaria* CMU는 구강 정착력이 우수한 구강용 생균제 균주로서 시험관 내 연구와 간단한 인체 적용시험을 통해 구취억제 가능성은 확인되어 있지만 [16, 17], 비글(Beagle)과 같은 실제 동물실험에서의 구취개선 효능시험은 아직 진행되지 못한 상황이다. 따라서 이 연구에서는 비글 구강에 6주간 *W. cibaria* CMU를 도포한 후 비글의 구취 및 치주질환과 관련된 임상지표를 측정함으로써 *W. cibaria* CMU 균주가 비글의 구강위생에 미치는 영향을 확인하여 보았다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

이 실험에 사용된 실험동물은 DHPPL 예방접종, 심장사상충 검사, 흉부·복부 방사선검사, complete blood cell count (CBC), 혈청화학검사 및 기생충 구제를 통해 임상학적으로 건강한 1~3년령, 체중  $9.8 \pm 2.18$  kg의 암컷 및 수컷 비글 18마리를 사용하였다. 이 실험에 사용한 동물실험계획은 충북대학교 실험동물 윤리위원회로부터 승인받아 진행되었다 (CBNUA-1062-17-01).

### 사육환경

충북대학교 실험동물지원센터의 사육조건에 따라 온도  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도 30~70%, 환기횟수 14~18회/h, 조명시간 12 h, 조도 150~300 Lux의 일정한 조건에서 독립된 비글용 우리에 한 마리씩 넣어 실험을 진행하였다. 사료는 (주)카길에그리프

리나(대한민국)에서 생산하는 실험동물용 개 사료(Agribands Purina, 대한민국)를 1일 평균 250 g씩 제한 급여하였다.

### 유산균 급여 및 실험군 편성

*W. cibaria* CMU(oraCMU)는  $5 \times 10^{10}$  CFU/g(CFU, colony-forming unit)의 분말 형태로 (주)오라덴텍스(대한민국)에서 제공받았으며, 분말을 제조할 때 사용된 부형제인 maltodextrin의 효능을 배제하기 위하여 대조군에는 maltodextrin만을 급여하였다. 실험군은 실험 시작 1주일 전 스케일링을 받은 구취 음성 대조군, 아무 처치도 하지 않은 양성 대조군, *W. cibaria* CMU 분말을 개체별로 각각  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^9$  CFU를 매일 급여한 저농도(CMU-L), 중농도(CMU-M) 그리고 고농도(CMU-H) CMU 투여군의 5군으로 나누었으며, 대조군에는 각 군당 3마리씩, CMU 투여군에는 각 군당 4마리씩 배정하였다.

실험 시작일부터 하루에 한 번, 대조군에는 0.24 mg의 maltodextrin을 2 mL의 phosphate-buffered saline(PBS)에 희석하여 경구도포 하였으며, CMU 저, 중, 고농도 투여군에는 개체별로 각각  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^9$  CFU를 2 mL의 PBS로 희석하여 경구도포 하였다.

### 관능평가

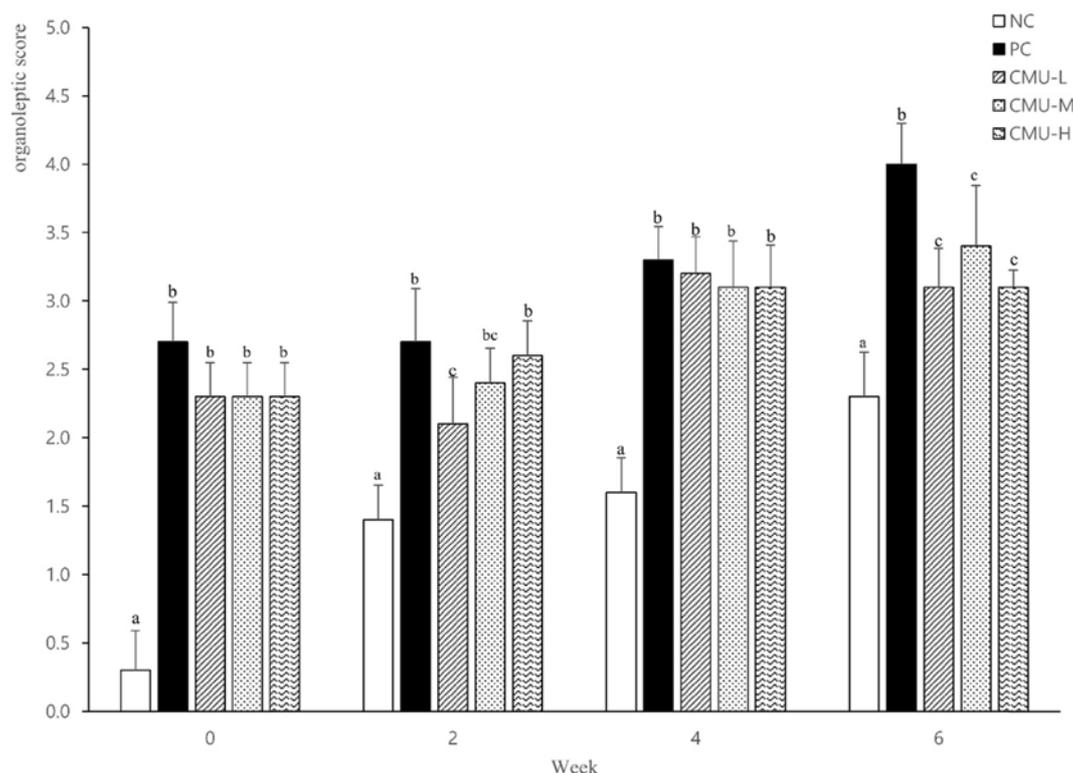
관능검사는 측정할 비글 개체의 입을 벌린 후 2 cm 떨어진 위치에서 구취를 평가하였으며, 숙련된 검사자 한 명이 Rosenberg 등 [24]의 기준에 따라 구취가 전혀 없는 경우는 0, 미약하게 인지할 수 있는 수준은 1, 명확히 인지할 수 있는 수준은 2, 중등도의 구취를 3, 강한 수준의 구취를 4, 심한 부패성 구취를 5로 점수화하였다.

### 구취성분의 측정

구취성분을 측정하기 위하여 휴대용 가스크로마토그래피(OralChroma CHM-2; Nissha FIS, Japan)를 이용하였으며, hydrogen sulfide, methyl mercaptan, dimethyl sulfide 및 구강 내 총 휘발성 황화합물 농도(total VSC)를 각각 ng/10 mL 단위로 측정하였다. VSC의 측정방법은 비글의 입을 3~5 초간 연 다음 입술을 감싸주어 30초 동안 코를 통해서만 숨을 쉴 수 있게 하였다. 그 후 비글의 좌측 견치와 제1 소구치 사이에 1 mL syringe를 삽입하여 구강 내 공기를 채집하였다. 채집한 구강 내 공기는 제조회사의 지시대로 OralChroma의 주입구에 삽입하였고, 그 후 측정된 결과를 기록하였다.

### 임상지표(치석, 치태, 치은염 지수)의 측정

임상지표를 측정하기 위해 측정 24시간 전 실험견을 절식시켰으며, 동물을 진정·마취시키기 위해 medetomidine(세다스타트; (주)유한양행, 대한민국) 0.07 mL/kg를 근육주사 한 후 측정하였다. 치이는 좌우 상악 제3 견치, 상·하악 견치, 상·하악 제2, 3, 4 전구치 및 상·하악 제1 구치를 대상으로 검사하였다. 실험 시작 직전과 2, 4, 6주째에 Warrick-



**Fig. 1.** The organoleptic scores in beagle dogs after consumption of a *Weissella cibaria* CMU. Data represents the mean  $\pm$  SD. Different superscript letters (a, b, and c) indicate the statistical differences determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ). Negative control (NC) group's teeth were scaled before experiment. NC and positive control (PC) groups were fed maltodextrin  $2.4 \times 10^{-4}$  g, daily. CMU-L group were fed *W. cibaria* CMU  $2.0 \times 10^7$  CFU, daily. CMU-M group were fed *W. cibaria* CMU  $2.0 \times 10^8$  CFU, daily. CMU-H group were fed *W. cibaria* CMU  $2.0 \times 10^9$  CFU, daily. CFU, colony-forming unit.

Gorrel method [9]에 따라 치석 지수(calculus index)를, Logan-Boyce modification plaque index [22]에 따라 치태 지수(plaque index)를, L e-Silness gingival index [20]에 따라 치은염 지수를 평가하였다.

#### 통계적 분석

통계적 처리는 SPSS 통계프로그램(ver. 12.0 for Windows; SPSS, USA)을 이용하였으며, 그룹 간의 유의성 검정은 ANOVA 후 Duncan's test로 사후검정을 사용하였다( $p < 0.05$ ).

## 결 과

#### 관능평가

6주간 진행된 관능검사 결과는 Figure 1에 나타내었다. 실험 2주째에 측정된 CMU-L군의 관능평가 지수는  $2.1 \pm 0.68$ 로, 양성 대조군( $2.7 \pm 0.78$ )보다 유의적인 감소를 나타내었다. 실험 6주째에도 양성 대조군( $4.0 \pm 0.60$ )과 비교하였을 때, CMU-L( $3.1 \pm 0.57$ )뿐만 아니라 CMU-M( $3.4 \pm 0.89$ ), CMU-H( $3.1 \pm 0.25$ )군 모두에서 관능평가 수치가 유의적으로 감소하였음을 확인하였다.

#### Total VSC

구취측정기(OralChroma)를 사용하여 구강 내 total VSC를 측정된 결과(Table 1), 실험 2주째부터 CMU-L( $2.0 \pm 1.04$  ng/10 mL), CMU-M( $2.4 \pm 1.05$  ng/10 mL), CMU-H( $2.6 \pm 1.33$  ng/10 mL)의 total VSC 수치는 양성 대조군( $3.2 \pm 1.65$  ng/10 mL)에 비해 모두 유의적으로 낮았다. 이와 같은 저하효과는 실험 4주째는 물론 실험종료 시점인 6주째에서도 모두 양성 대조군보다 CMU 투여군의 total VSC가 유의적으로 낮게 측정되는 것을 확인할 수 있었다.

#### Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)

황화수소의 농도를 측정된 결과, 모든 실험군은 실험 전 기간에 걸쳐 황화수소 농도 0.1 ng/10 mL 이하의 평균값을 나타내었으며, 실험군 간 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Table 2).

#### Methyl mercaptan (CH<sub>3</sub>SH)

각 군에 대한 methyl mercaptan 농도를 측정된 결과(Table 3), 실험 2주째에 양성 대조군( $2.4 \pm 1.21$  ng/10 mL)에 비해 CMU-L군은  $1.4 \pm 0.83$  ng/10 mL, CMU-M군은  $1.9 \pm 1.05$  ng/10 mL, CMU-H군은  $1.9 \pm 1.14$  ng/10 mL로써 통계적으로 모두 유의하게 감소했다. 또한, 실험 6주째에도 양성 대조군

**Table 1.** Concentrations of total volatile sulfur compounds in beagle dogs after consumption of *Weissella cibaria* CMU

Group	Week			
	0	2	4	6
NC	0.2 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.58 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.92 <sup>a</sup>	1.8 ± 1.02 <sup>a</sup>
PC	2.2 ± 0.72 <sup>b</sup>	3.2 ± 1.65 <sup>b</sup>	4.1 ± 1.78 <sup>b</sup>	4.0 ± 2.29 <sup>b</sup>
CMU-L	2.1 ± 1.30 <sup>b</sup>	2.0 ± 1.04 <sup>c</sup>	2.7 ± 0.80 <sup>c</sup>	1.6 ± 1.03 <sup>a</sup>
CMU-M	2.2 ± 1.36 <sup>b</sup>	2.4 ± 1.05 <sup>cd</sup>	2.2 ± 1.20 <sup>c</sup>	2.5 ± 1.29 <sup>c</sup>
CMU-H	2.2 ± 1.72 <sup>b</sup>	2.6 ± 1.33 <sup>d</sup>	2.3 ± 1.31 <sup>c</sup>	2.0 ± 1.30 <sup>ac</sup>

The values are expressed as mean ± SD in ng/10 mL. Different superscript letters indicate the statistical differences determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ). NC, negative control; PC, positive control.

**Table 2.** Concentrations of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in beagle dogs after consumption of *Weissella cibaria* CMU

Group	Week			
	0	2	4	6
NC	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.13 <sup>a</sup>
PC	0.0 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.11 <sup>a</sup>
CMU-L	0.1 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.09 <sup>a</sup>
CMU-M	0.0 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.10 <sup>a</sup>
CMU-H	0.1 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.01 <sup>a</sup>

The values are expressed as mean ± SD in ng/10 mL. Different superscript letters indicate the statistical differences determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Concentrations of methyl mercaptan (CH<sub>3</sub>SH) in beagle dogs after consumption of *Weissella cibaria* CMU

Group	Week			
	0	2	4	6
NC	0.1 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.43 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.51 <sup>a</sup>
PC	1.5 ± 0.84 <sup>b</sup>	2.4 ± 1.21 <sup>b</sup>	3.1 ± 1.64 <sup>b</sup>	2.6 ± 1.82 <sup>b</sup>
CMU-L	1.4 ± 1.28 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.83 <sup>c</sup>	1.8 ± 0.79 <sup>c</sup>	0.8 ± 0.69 <sup>ac</sup>
CMU-M	1.8 ± 1.04 <sup>b</sup>	1.9 ± 1.05 <sup>d</sup>	1.5 ± 0.96 <sup>c</sup>	1.5 ± 1.24 <sup>d</sup>
CMU-H	1.6 ± 1.26 <sup>b</sup>	1.9 ± 1.14 <sup>d</sup>	1.5 ± 1.04 <sup>c</sup>	1.1 ± 0.89 <sup>cd</sup>

The values are expressed as mean ± SD in ng/10 mL. Different superscript letters indicate the statistical differences determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Concentrations of dimethyl sulfide [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S] in beagle dogs after consumption of *Weissella cibaria* CMU

Group	Week			
	0	2	4	6
NC	0.1 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.50 <sup>ab</sup>	1.1 ± 0.75 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.83 <sup>ab</sup>
PC	0.6 ± 0.42 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.88 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.87 <sup>ab</sup>	1.3 ± 1.05 <sup>b</sup>
CMU-L	0.6 ± 0.49 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.52 <sup>ab</sup>	0.9 ± 0.61 <sup>ab</sup>	0.7 ± 0.81 <sup>a</sup>
CMU-M	0.4 ± 0.53 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.55 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.57 <sup>b</sup>	1.0 ± 1.12 <sup>ab</sup>
CMU-H	0.5 ± 0.55 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.58 <sup>ab</sup>	0.7 ± 0.72 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.83 <sup>a</sup>

The values are expressed as mean ± SD in ng/10 mL. Different superscript letters indicate the statistical differences determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

(2.6 ± 1.82 ng/10 mL)에 비해 CMU 투여군 모두에서 유의적으로 감소하였으며, 양성 대조군은 실험 초기 때보다 시간이 지날수록 methyl mercaptan 농도가 꾸준히 증가하였으나,

CMU 투여군에서는 실험 4주째에 CMU-M군과 CMU-H군에서 감소하기 시작하였으며, 실험 6주째에는 모든 군에서 감소하였다.

**Table 5.** Calculus index in beagle dogs after consumption of *Weissella cibaria* CMU

Group	Week			
	0	2	4	6
NC	0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.93 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.73 <sup>a</sup>	3.0 ± 1.42 <sup>a</sup>
PC	3.9 ± 1.49 <sup>b</sup>	4.8 ± 2.59 <sup>a</sup>	6.4 ± 1.46 <sup>a</sup>	7.1 ± 2.66 <sup>b</sup>
CMU-L	4.6 ± 3.20 <sup>b</sup>	4.9 ± 3.04 <sup>a</sup>	5.3 ± 1.38 <sup>a</sup>	5.7 ± 2.59 <sup>ab</sup>
CMU-M	3.9 ± 1.88 <sup>b</sup>	4.7 ± 1.61 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.91 <sup>a</sup>	5.7 ± 1.75 <sup>ab</sup>
CMU-H	3.0 ± 1.25 <sup>ab</sup>	3.8 ± 1.58 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.57 <sup>a</sup>	5.2 ± 1.03 <sup>ab</sup>

The values are expressed as mean ± SD. Different superscript letters indicate the statistical differences determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

**Table 6.** Plaque index in beagle dogs after consumption of *Weissella cibaria* CMU

Group	Week			
	0	2	4	6
NC	1.9 ± 1.26 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.73 <sup>a</sup>	3.8 ± 1.08 <sup>a</sup>
PC	4.4 ± 0.46 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.63 <sup>b</sup>	4.8 ± 0.57 <sup>a</sup>	5.9 ± 1.08 <sup>c</sup>
CMU-L	3.6 ± 0.60 <sup>ab</sup>	3.2 ± 0.77 <sup>ab</sup>	3.9 ± 0.75 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.78 <sup>bc</sup>
CMU-M	3.5 ± 0.12 <sup>ab</sup>	3.2 ± 0.25 <sup>ab</sup>	3.9 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.83 <sup>abc</sup>
CMU-H	4.3 ± 0.52 <sup>ab</sup>	3.3 ± 0.30 <sup>ab</sup>	4.1 ± 0.19 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.28 <sup>ab</sup>

The values are expressed as mean ± SD. Different superscript letters indicate the statistical differences determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

**Table 7.** Gingivitis index in beagle dogs after consumption of *Weissella cibaria* CMU

Group	Week			
	0	2	4	6
NC	0.1 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.15 <sup>a</sup>
PC	0.6 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.36 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.05 <sup>a</sup>
CMU-L	0.8 ± 0.37 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.35 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.18 <sup>ab</sup>	0.4 ± 0.13 <sup>a</sup>
CMU-M	0.6 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.24 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.14 <sup>a</sup>
CMU-H	0.7 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.27 <sup>ab</sup>	0.3 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.06 <sup>a</sup>

The values are expressed as mean ± SD. Different superscript letters indicate the statistical differences determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

### Dimethyl sulfide [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S]

Dimethyl sulfide 농도는 유산균 투여 2주째에 양성 대조군(0.8 ± 0.88 ng/10 mL)보다 CMU-M(0.5 ± 0.55 ng/10 mL)군에서 유의하게 감소하였다(Table 4). 또한, 실험 6주째에 양성 대조군(1.3 ± 1.05 ng/10 mL)보다 CMU-L(0.7 ± 0.81 ng/10 mL) 및 CMU-H(0.8 ± 0.83 ng/10 mL)군에서 유의적인 차이를 보였다.

### 임상지표의 측정

2주 간격으로 6주 동안 치석 지수를 평가한 결과, 실험 시작 이후 모든 개체에서 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 양성 대조군보다 CMU 투여군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Table 5). 그러나, 치태 지수를 평가한 결과, 유산균 투여 6주째에 양성 대조군(5.9 ± 1.08)보다 CMU-H(4.5 ± 0.28)군에서 유의하게 감소하였다(Table 6). 또한, Löe and Sillness 치은염 지수를 평가한 결과, 유산균 투여

4주째에 CMU-H군의 치은염 지수는 0.3 ± 0.03으로, 양성 대조군의 0.7 ± 0.11보다 유의적으로 감소하였다(Table 7).

## 고 찰

수의학적 관점에서 볼 때 반려동물의 구취는 보호자와의 관계 형성을 악화시키는 중요한 요인으로 작용할 수 있을 뿐만 아니라, 구강이나 전신질환을 진단할 수 있는 중요한 지표가 될 수 있어 중요한 의미가 있다. 기존에 개발된 구강 위생용 화학약제들은 즉효성의 장점은 있지만, 위장장애, 미각 이상, 점막 자극 및 치아 착색과 같은 많은 부작용을 나타내는 문제점이 있어서 부작용이 없고 안전한 구강위생제품의 개발이 필요한 상황이다 [5].

유산균은 오랫동안 발효식품 제조는 물론 변비 개선, 항암 작용, 면역기능 강화 등 유익한 기능을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다 [14]. 최근에는 유산균이 구강 건강을 위한 매

력적인 생균제로써 화학약제 대체품으로 각광받고 있는데, Çağlar 등 [3, 4]은 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus reuteri*가 치아우식균인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)를 감소시킨다고 보고하였으며, Hatakka 등 [11]은 *Lactobacillus rhamnosus* GG가 *Candida albicans*를 억제한다고 보고한 바 있다. 이 실험에서 사용한 *W. cibaria* CMU는 시험관 내 연구에서 *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*와 같은 치주질환 원인균에 대한 성장 억제능이 있으며, 사람을 대상으로 한 임상시험에서 구취의 주요 원인물질 중 하나인 methyl mercaptan의 생성을 효과적으로 억제한다고 알려졌다 [14-16]. 따라서 이 연구에서는 안전하고 부작용이 없는 구강 유래 생균제인 *W. cibaria* CMU를 비글에 투여한 뒤 구취 및 구취와 관련된 치주질환의 지표인 치석, 치태, 치은염 지수를 측정함으로써 그 효능을 평가하였다.

구취를 진단하는 가장 손쉬운 방법은 검사자의 후각을 이용하여 구취의 여부를 진단하는 것이다. Donaldson 등 [8]은 관능적 평가로도 충분히 구취를 진단하는데 유용한 기준으로 사용될 수 있다고 주장하였다. 관능검사는 검사자에 의한 오차가 발생할 수 있기 때문에 동일한 검사자가 구취를 실험기간 동안 지속해서 평가하는 방법을 사용하였다. 관능검사 결과, *W. cibaria* CMU를 투여한 모든 군은 실험 2주째부터 양성 대조군보다 구취가 유의적으로 감소한 결과를 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 실험종료 시점에서도 확인할 수 있었기 때문에 *W. cibaria* CMU의 구취 저하 효능을 관능검사를 통해 확인할 수 있었다.

그러나 관능검사의 단점은 똑같은 시료에 대해서도 검사자 간 후각각 역치의 차이가 존재하기 때문에 주관적인 측정치의 오차가 발생할 수 있다는 점이다 [25]. 관능검사만으로는 *W. cibaria* CMU의 투여와 구취 억제의 관계를 입증하기는 어렵기 때문에 이 실험에서는 관능검사 외에 구취 진단을 위한 객관적인 측정 자료 수집을 위하여 구취의 유발 요인에 대한 분석을 시행하였다. Henet 등 [12]과 Iwashita 등 [13]은 portable sulfide monitor가 개의 구취 측정에 있어 민감하고 재현성이 있으며 객관적인 측정방법인 것으로 보고하고 있다. 따라서 이번 실험에서는 구취의 객관적인 지표로 VSC 수치를 측정하기 위하여 portable sulfide monitor인 OralChroma라는 장비를 사용하였다.

실험 2주째, 모든 *W. cibaria* CMU 투여군의 total VSC는 양성 대조군보다 유의하게 감소한 결과를 나타내었으며, 이러한 유의적인 차이는 실험종료 시까지 관찰되었다. Total VSC는 구취의 종합적인 진단에 있어서 중요한 지표로 사용되고 있으며, Awano 등 [2]은 methyl mercaptan과 total VSC가 관능평가의 결과와 깊은 연관성이 있다고 보고하고 있다. 이 실험의 결과 또한 Awano 등 [2]의 연구 결과와 같이 methyl mercaptan과 total VSC의 감소와 함께 관능평가 지수의 감소가 관찰되었다.

황화수소, methyl mercaptan 및 dimethyl sulfide를 측정

함으로써 *W. cibaria* CMU 투여가 구강 내 VSC에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다. 이번 실험에서 황화수소의 농도는 실험군 간 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 모든 실험군에서 평균값 0.1 ng/10 mL 이하로 측정되었다. 따라서 *W. cibaria* CMU의 투여가 황화수소의 생성능에 미치는 영향에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

실험 2주째부터 *W. cibaria* CMU를 투여한 군은 양성 대조군보다 methyl mercaptan 수치가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었으며(Table 3), 이러한 유의적인 차이는 실험 종료 시까지 관찰되었다. methyl mercaptan은 구취의 불쾌한 냄새를 유발하는 주된 원인 중 하나로 알려졌으며 [20], 이러한 결과를 바탕으로 *W. cibaria* CMU는 methyl mercaptan의 생성을 저해함으로써 구취 개선 효과를 나타낸 것으로 판단된다.

Dimethyl sulfide는 구강 내 구취보다는 혈액이나 폐에서 발생하여 구강 외 구취에 더욱 중요한 역할을 하는 VSC이다 [26]. 이 연구 결과, 실험 2주째에서는 CMU-M군에서, 실험 6주째에서는 CMU-L군과 CMU-H군에서 양성 대조군보다 dimethyl sulfide의 수치가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 4주째에서는 *W. cibaria* CMU 투여군과 양성 대조군 간 유의적인 차이를 확인할 수 없었으며, 실험 6주째에서 CMU-M군은 양성 대조군과 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(Table 4). 이 실험에서는 *W. cibaria* CMU를 치아에 도포하는 형식으로 실험을 진행하였으며, 이러한 방법은 경구투여와 달리 혈액이나 폐에서 생성되는 dimethyl sulfide를 제어하는 데에는 다소 부적절하다고 할 수 있다. 추후 연구를 통해 *W. cibaria* CMU 균주의 dimethyl sulfide 억제능을 확인할 필요성이 있다. 한편, *W. cibaria* CMU의 methyl mercaptan 생성 저해능을 비글에서 명백히 확인할 수 있었으며, 이를 통해 *W. cibaria* CMU의 구취 감소의 주요 기전은 methyl mercaptan 생성 저해능이라 생각된다.

구취의 주요 구성 요소인 VSC는 단지 불쾌한 냄새만 발생시킬 뿐만 아니라 치은염의 초기 단계에 영향을 미치는 다른 인자들을 촉진시키는 역할을 하며, 질병을 발생시키는 데 영향을 미치는 병리적 요인으로도 작용할 수 있다 [7]. 이 실험에서 모든 군의 평균 치은염 지수는 1.0 미만으로 낮게 평가되었다. 치은염 지수는 개의 구강이나 전신 건강에 의해서도 많은 영향을 받으며, 이번 실험에서 실험견들의 전신 건강상태는 좋은 상태였기 때문에 치태와 치석이 존재하였음에도 치은염이 심하지 않았던 것으로 생각된다. 따라서 *W. cibaria* CMU의 치은염에 대한 효과를 확인하기 위해서는 치은염이 존재하는 개체에서의 후속 조사 연구가 필요할 것으로 생각된다.

치태는 충치와 치주질환의 발생에 중요한 역할을 하는 치아 표면의 미생물 막을 의미한다. 개와 고양이에서 사료 섭취 후 치관 표면이 당단백질 층으로 둘러싸이게 되고 이 층은 *Actinomyces*와 *Streptococci*와 같은 구강 내 세균이 쉽게 치관에 부착하게 한다 [10]. 세균성 치태가 치관 표면을 덮

게 되면, 초기 치태가 성장하면서 거친 부착면을 제공하여 다른 유기물들이 부착할 수 있도록 한다 [6, 24]. 따라서 치아 표면에 치태가 존재함으로 인해 치은염 및 치석이 발생한다고 할 수 있다 [9]. 이 연구에서는, 치태 지수를 2주 간격으로 평가한 결과, 실험 6주째에 CMU-H군의 치태 지수는 양성 대조군보다 유의적으로 낮게 측정되어 *W. cibaria* CMU 균주를 고농도 투여 시 치태 형성 저하 능력이 있음을 확인할 수 있었다(Table 6).

Kang 등 [14]은 자당(sucrose)이 있을 때 *W. cibaria* CMU가 치아우식균인 *S. mutans*와 경쟁적으로 당을 이용하여 *W. cibaria* CMU가 수용성 glucan을 만들어 *S. mutans*가 끈적 끈적한 불용성 glucan을 만들지 못하게 함으로써 치태 형성을 억제한다고 보고하였다. 또한, 구취 유발균인 *F. nucleatum*과의 공동 응집을 통해 다른 균과의 치태 형성을 억제하고, 구강 내에서 유해균을 쉽게 제거하며, 항균물질인 과산화수소를 다량으로 생성하는 능력이 있어서 구취 세균을 억제하여 구취를 억제한다고 보고하였다 [15-17].

이미 형성된 치석을 제거하는 방법으로 가장 효율적인 수단은 수의사의 관리하에 동물을 마취한 뒤 기계적으로 치석을 제거하는 스케일링을 시술받는 것이지만 이러한 방법은 보호자들이 홈케어로 실시하기 쉬운 방법이 아니다 [9]. 치태가 제거되지 않으면 수일 내에 거친 부착면을 제공하게 되어 다른 유기물이 타액 속의 미네랄과 결합하게 되고, 이 결합 때문에 치석이 형성되어 치아에 강력하게 부착된다 [10]. 따라서 치석의 발생 원인은 치태의 형성이라 할 수 있다. 이 실험에서는 실험기간 치석 지수에 있어서 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나 *W. cibaria* CMU 유산균의 치태 형성 억제능을 확인하였으며, 이를 통해 실험기간을 더 길게 설정하였을 때 치석 침착의 억제와 같은 결과를 확인할 수 있을 것으로 기대한다.

이 실험에서는 전신질환이 없는 건강한 동종 비글을 대상으로 하여 구취의 관능평가, 구취 성분의 측정, 치주질환의 지표인 치석 지수, 치태 지수, 치은염 지수를 측정하였으며, 이를 통해 *W. cibaria* CMU 유산균의 비글에서 구취 억제능을 확인할 수 있었다. 기존 구강 위생 제품은 부작용이 많고 문제의 근본적 해결이 어렵기 때문에 *W. cibaria* CMU 유산균은 이러한 문제점을 보완하고 대체할 수 있는 새로운 구강위생용 생균제로 적합한 균주인 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “R&D 재발견프로젝트”의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다(과제 번호: N0002203, 과제명: 구취 억제 oral probiotics의 식약처 건강기능식품 개별인정을 위한 기능성 평가와 보건식품개발).

## References

1. Albuquerque C, Morinha F, Requiça J, Martins T, Dias I,

- Guedes-Pinto H, Bastos E, Viegas C. Canine periodontitis: the dog as an important model for periodontal studies. *Vet J* 2012, **191**, 299-305.
2. Awano S, Koshimune S, Kurihara E, Gohara K, Sakai A, Soh I, Hamasaki T, Ansai T, Takehara T. The assessment of methyl mercaptan, an important clinical marker for the diagnosis of oral malodor. *J Dent* 2004, **32**, 555-559.
3. Çağlar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws of tablets. *Acta Odontol Scand* 2006, **64**, 314-318.
4. Çağlar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand* 2005, **63**, 317-320.
5. Chang HS, Hwang HJ, Kang EH, Lee JH, Chung DJ, Yang WJ, Chung WH, Kim DH, Park WD, Kim HY. [The effect of green tea bag in dogs with periodontal disease]. *J Vet Clin* 2009, **26**, 41-47. Korean.
6. Cleland WP Jr. Opportunities and obstacles in veterinary dental drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **50**, 261-275.
7. Culham N, Rawlings JM. Oral malodor and its relevance to periodontal disease in the dog. *J Vet Dent* 1998, **15**, 165-168.
8. Donaldson AC, Riggio MP, Rolph HJ, Bagg J, Hodge PJ. Clinical examination of subjects with halitosis. *Oral Dis* 2007, **13**, 63-70.
9. Gorrel C, Warrick J, Bierer TL. Effect of a new dental hygiene chew on periodontal health in dogs. *J Vet Dent* 1999, **16**, 77-81.
10. Harvey C, Serfilippi L, Barnvos D. Effect of frequency of brushing teeth on plaque and calculus accumulation, and gingivitis in dogs. *J Vet Dent* 2015, **32**, 16-21.
11. Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuutila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, Korpela R. Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly—a randomized controlled trial. *J Dent Res* 2007, **86**, 125-130.
12. Hennet P, Delille B, Davot JL. Oral malodor in dogs: measurement using a sulfide monitor. *J Vet Dent* 1995, **12**, 101-103.
13. Iwashita N, Sugita K, Shirai M, Murata S, Yanagisawa S, Goto S, Takagi Y, Asai F. Application of a portable gas chromatograph for quantitative measurement of canine oral malodor. *Fundam Toxicol Sci* 2017, **4**, 23-29.
14. Kang MS, Chung J, Kim SM, Yang KH, Oh JS. Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Res* 2006, **40**, 418-425.
15. Kang MS, Kim BG, Chung J, Lee HC, Oh JS. Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. *J Clin Periodontol* 2006, **33**, 226-232.
16. Kang MS, Lim HS, Kim SM, Lim YJ, Lee HC, Oh JS. [Quantitative analysis of *Weissella cibaria* against periodontopathic bacteria by real-time PCR]. *J Bacteriol Virol* 2009, **39**, 295-305. Korean.
17. Kang MS, Na HS, Oh JS. Coaggregation ability of *Weissella cibaria* isolates with *Fusobacterium nucleatum* and their adhesiveness to epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 2005, **253**, 323-329.
18. Kim JK, Kim SE, Bae CS, Shim KM, Choi SH, Jeong SJ, Kang SS. [Efficacy of alcohol-free cetylpyridinium chloride on

- periodontal disease in beagle dogs via drinking water additive and oral gel]. *J Biomed Res* 2013, **14**, 35-39. Korean.
19. **Kim SE, Shim KM, Yoo KH, Ryu JW, Koh HB, Moon CJ, Kim JC, Kim SH, Kang SS, Bae CS.** [Association between halitosis and periodontal disease related parameters in dogs]. *J Vet Clin* 2007, **24**, 192-196. Korean.
  20. **Löe H.** The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* 1967, **38**, 610-616.
  21. **Loesche WJ, Kazor C.** Microbiology and treatment of halitosis. *Periodontol 2000* 2002, **28**, 256-279.
  22. **Logan EI, Boyce EN.** Oral health assessment in dogs: parameters and methods. *J Vet Dent* 1994, **11**, 58-63.
  23. **Murata T, Yamaga T, Iida T, Miyazaki H, Yaegaki K.** Classification and examination of halitosis. *Int Dent J* 2002, **52** (Suppl 3), 181-186.
  24. **Nishihara T, Koseki T.** Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000* 2004, **36**, 14-26.
  25. **Rosenberg M, McCulloch CA.** Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J Periodontol* 1992, **63**, 776-782.
  26. **Tangerman A, Winkel EG.** Intra- and extra-oral halitosis: finding of a new form of extra-oral blood-borne halitosis caused by dimethyl sulphide. *J Clin Periodontol* 2007, **34**, 748-755.
  27. **Yaegaki K, Coil JM.** Genuine halitosis, pseudo-halitosis, and halitophobia: classification, diagnosis, and treatment. *Compend Contin Educ Dent* 2000, **21**, 880-889.