

구강 내 사슬알균 종들에 대한 제3인산나트륨과 구연산의 탈부착 효과

정충현¹ · 조형훈² · 최광주² · 강승용³ · 양남용^{3*}

¹광주호산치과, ²조선대학교 의과대학 안과, ³조선대학교 의과대학 미생물학교실

Trisodium phosphate 12 hydrate와 citric acid monohydrate의 혼합액은 유리구슬(ϕ 7 mm)에 부착된 *Streptococcus mutans* (KCTC 3065)와 *Streptococcus mitis* (KCTC 3556) 및 *Streptococcus salivarius* (KCTC 3960)에 대하여 강한 탈부착효과를 보였다. 각 사슬알균 종들은 각각 3개의 유리구슬들이 들어있는 BHI 액체배지에서 18시간 흔들 배양되었다. 배양 후, 3개의 짧은 핀들이 부착된 핀셋을 사용하여 유리구슬들을 꺼낸 다음, 유리구슬에 맺힌 균액을 제거하기 위하여 생리식염수로 가볍게 세척하였다. 각 균주당 3개의 유리구슬들을 시약들이 들어있는 시험관에 넣고 vortex mixer로 10분씩 와동(渦動)하였다. 칫솔질과 유사한 효과를 얻기 위해 각 시험관들에 물에 젖지 않는 기름종이 조각들을 40 mg씩 넣었다. 구강 내 사슬알균 종이 아닌 *Streptococcus agalactiae*는 5분간 와동(渦動)하였다. 각 시험관에서 취한 샘플들을 10배 계단 희석하여 BHI 한천 배지와 혼합하고 배양한 다음, 집락수를 계수하였다. 사슬알균 종 당 실험을 3번 반복하였고, 시약에 의해 탈부착된 균수를 평균하여 생리식염수 대조군의 평균으로 나누어 그 배수를 탈부착 효과로 계산하였다. *Streptococcus mutans*에 대하여 구연산-제3인산나트륨-식염수 혼합액(이하 CTS, pH 6.0)의 탈부착 효과는 생리식염수 대조군에 비해서 평균 12.5배였으며, 제3인산나트륨-식염수 혼합액(이하 TS, pH 8.4)은 평균 7.5배였고, 구연산-식염수 혼합액(이하 CS, pH 4.6)은 6.0배였다. *Streptococcus salivarius*에 대해서 CTS는 7.2배, TS는 2.6배, CS는 2.8배였다. *Streptococcus mitis*에 대해서 CTS는 2.4배였고, TS는 3.4배였으나 CS는 0.3배로 탈부착 효과가 없었다. 구강 내 사슬알균 종이 아닌 *Streptococcus agalactiae*에 대해서 CTS는 0.7배, TS는 0.6배, CS는 0.6배로 3가지 시약에 대하여 탈부착효과가 전혀 없었다. 이러한 결과들은 충치와 아급성 심내막염의 원인균인 구강 내 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* 및 *Streptococcus mitis*가 CTS혼합물에 의해서 구강으로부터 쉽게 제거될 수 있음을 의미한다. 따라서 이러한 결과를 응용하면 새로운 개념의 치약을 개발할 수 있을 것으로 생각되며, 충치의 예방 및 발치 후 아급성 심내막염의 예방에 도움이 될 것으로 사료된다.

Key words □ citric acid, oral *Streptococcus species*, trisodium phosphate

제3인산나트륨(Trisodium phosphate, TSP, Na_3PO_4)은 미국 식품의약품에 의해서 GRAS (generally recognized as safe)로 분류되는 물질이며 식품위생분야에서 널리 사용되고 있다. TSP를 사용하여 도살된 가금류에 부착된 *Salmonella*의 수를 감소하는 프로세스(TSP 8~12% 용액에 15초 동안 도살된 가금류를 적시는 과정)가 미국 농림부에 의해서 승인되었다. 그 후 많은 연구자들이 초산 혹은 젖산을 TSP와 함께 사용하여 각종 가금류, 소고기, 달걀 등에서 *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella species* 등 병원성 세균의 오염제거 실험을 했고 좋은 결과를 보고하였다. 그러나 식품에 사용된 산(1~2%)과 TSP의 농도(2~12%)는 구강 미생물의 탈부착 실험에 사용하기에는 너무 많은 양이다.

본 연구자들의 문헌 조사에 따르면, 구강 미생물의 연구에 낮은 농도의 구연산(0.3%)과 TSP (0.8%)를 적용한 보고는 찾을 수 없었다. 저자들은 3종의 구강 사슬알균 종들과 1종의 비구강 사슬알균에 대하여 구연산과 TSP의 탈부착 효과를 측정하는 실험

모델을 고안하였다. 본 연구의 목적은 충치와 아급성 심내막염의 원인균들이 일정 규격의 유리구슬에 부착된 상태에서 낮은 농도의 TSP와 구연산 용액에 의하여 탈부착되는 정도를 측정하여 새로운 개념의 치약의 개발 가능성을 추론하는 것이다.

재료 및 방법

표준 균주

실험에 사용된 균주들은 *Streptococcus agalactiae* (KCCM 40417), *Streptococcus mitis* (KCTC 3556), *Streptococcus mutans* (KCTC 3065) 및 *Streptococcus salivarius* (KCTC 3960)이다.

재료 및 시약

구연산-제3인산나트륨-식염수 혼합액(CTS, pH 6.0)은 citric acid monohydrate (Sigma, USA) 0.3 g과 trisodium phosphate 12 hydrate (Sigma, USA) 0.8 g을 생리식염수 100 ml에 용해하였다. 제3인산나트륨-식염수 혼합액(TS, pH 8.4)은 TSP 12 hydrate 0.8 g을 100 ml 생리식염수에 용해하였고 pH는 5 N HCl을 사용하여 조정하였다. 구연산-식염수 혼합액(CS, pH 4.6)은 citric

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-62-230-6350, Fax: 82-62-232-3125
E-mail: nwyang@chosun.ac.kr

acid monohydrate 0.4 g을 100 ml 생리식염수에 용해하였고 pH는 5 N NaOH로 조정하였다. 대조군 시약으로 0.85% 생리식염수를 사용하였다.

실험 과정

균주들을 BHI 액체배지(BHI, Difco, USA)와 유리구슬(SI 5013, ϕ 7 mm, SiliBead, Germany)들이 들어있는 일회용 조직배양 플라스틱 플라스크(25 cm², CORNING, USA)에 넣고 진탕 배양기(HAN BAEK SCIENTIFIC CO., Korea)에서 70 rpm의 속도로 배양하였다. 18시간 후에 3개의 가느다란 핀이 부착된 핀셋을 사용하여 유리구슬들을 꺼내었는데, 이렇게 하는 이유는 부착된 균이 핀셋에 의하여 제거되는 가능성을 최소한으로 줄이기 위한 것이다. 핀셋으로 집어낸 유리구슬들은 구슬에 묻은 균액을 제거하기 위하여 생리식염수 내에서 가볍게 적셨다. 상기 시약혼합액 4가지가 각각 들어있는 시험관들에 각 3개의 유리구슬들을 넣었으며, 각 시험관들에 칫솔질과 유사한 효과를 내기위하여 2~3 mm로 자른 기름종이(K-ace, Korea) 40 mg씩을 넣었다. 시험관들을 vortex mixer (GW-92VM, Whasin, Korea)에서 레벨 10의 속도로 10분간 흔들었다. 그러나 비구강 내 시술알균인 *Streptococcus agalactiae*는 5분간 흔들었다.

시약 혼합액이 들어있는 시험관들에서 샘플을 취하여 생리식염수로 10배 계단 희석하여 10⁻²~10⁻³ 희석액에서 다시 샘플 1 ml씩을 취하여 3개의 평판에 분주한 다음, BHI agar 15 ml과 혼합하여 굳힌 다음, 5 ml을 평판 위에 덧 씌워 다시 굳혔다. 이어서 평판들을 CO₂ 배양기에 넣고 48시간 동안 배양하고 집락의 수를 계수하여 평균을 내었다. 각 시약에 대한 평균 집락수를 대조군의 평균으로 나누어 그 배수를 탈부착 효과로 정하였다. 이러한 실험을 각 시술알균 종들에 대하여 3번 반복하였고, 각각의 시약의 배수들을 다시 평균하여 각 시약의 최종 평균 배수 값 최종 탈부착 효과로 정하였다.

결과 및 고찰

구연산-제3인산나트륨-식염수 혼합액(CTS, pH 6.0)의 *Streptococcus mutans*에 대한 탈부착 효과는 대조군에 대하여 평균 12.5배였다. 제3인산나트륨-식염수 혼합액(TS, pH 8.4)은 평균 7.5배, 구연산-식염수 혼합액(CS, pH 4.6)은 6.0배였다(Table 1).

*Streptococcus salivarius*에 대해서는 대조군에 비하여 CTS가 7.2배, TS가 2.6배, CS가 2.8배였다(Table 1). *Streptococcus mitis*에 대해서 CTS는 2.4배, TS는 3.4배의 탈부착효과를 보였으나 CS는 0.3배로 탈부착 효과가 없었다(Table 1). 구강내 시술알균 종이 아닌 *Streptococcus agalactiae*에 대해서는 CTS가 0.7배, TS와 CS가 동일하게 0.6배를 보임으로써 대조군보다 탈부착효과가 적었다(Table 1). 3가지 시약혼합액들 중에서 CTS 혼합액이 *S. mutans*와 *S. salivarius*에 대해서 가장 강한 항부착 효과를 나타내었다(Fig. 1).

구연산이 정균효과를 가지고 있다는 사실은 잘 알려져 있으며, 식품의약품업에서 널리 사용되고 있다. 제3인산나트륨(TSP)도 식품 위생분야에서 세계적으로 사용되고 있다(1, 2). 1992년 미국 농림부는 가금류에서 살아있는 *Salmonella*를 감소시키는 방법으로 고농도(8~12%)의 TSP 용액을 일정한 조건에서 사용하는 방법을 승인하였다(9). 이후 많은 연구자들이 다양한 가금류(4, 7), 소고기(6), 달걀(8) 등에서 *Listeria monocytogenes* (3, 4, 5, 8, 11, 13), *E. coli* O157:H7 (6), *Salmonella species* (6, 13, 14), *Yersinia enterocolitica*와 *Edwardsiella tarda* (8)같은 병원성 세균의 오염제거에 관한 연구 결과들을 보고하였다. 그들은 흔히 오염제거 물질로 1~2% 초산(12) 혹은 1~2% 젖산 용액(17)에 일정 시간 동안 고기를 적시고 이어서 2~12% TSP 용액에 다시 적셔서 세균의 감소 정도를 측정하였다. 또한 그 결과 고기 저장수명이 우수하다는 사실도 보고하였다(15). 저자들의 문헌조사에 의하면 구강 내 미생물들을 제거하기 위하여 낮은 농도의 구연산과 TSP의 혼합물을 사용한 실험 결과는 아직까지 없었다.

실제로 1~2% 초산 혹은 젖산 농도는 매우 산도가 높아서 그대로 구강 내에 적용하기 어렵다. TSP는 특히 2% 이상 사용할 경우에는 pH가 매우 높아서 시간 경과에 따라서 구강 내 조직에 손상을 준다. 따라서 구강 내에 부착하여 살아가는 미생물에 대한 실험을 하기 위해서는 훨씬 낮은 농도로 구강 내 pH 변화에 크게 영향을 주지 않는 정도의 산 및 알칼리 용액을 사용해야 한다. 저자들은 *universal buffer*의 일종인 boric acid, citric acid, trisodium buffer (16)에서 착안하여 낮은 농도의 구연산과 제3인산나트륨을 사용하여 구강 내 pH 변화에 큰 영향을 주지 않는 정도의 pH 6.0 정도의 혼합액을 만들어서 실험에 적용하였다. pH 6.0 정도의 pH를 갖는 두 성분의 양은 일수 구연산이 0.3 g/100 ml, 12수 TSP가 0.8 g/100 ml이었다. 이를 생리 식염

Table 1. The de-adherence degree against *Streptococcus* species by solutions

Reagent solutions (pH)	Average of de-adherence multiple numbers ^a			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. agalactiae</i>
CTS (6.0) ^b	12.5	7.2	2.4	0.7
TS (8.4) ^c	7.5	2.6	3.4	0.6
CS (4.6) ^d	6.0	2.8	0.3	0.6

^a The arithmetic mean of multiple numbers that colony counts of each reagent were divided by that of normal saline.

^b CTS, citric acid-triphosphate-saline solution

^c TS, trisodium phosphate-saline solution

^d CS, citric acid-saline solution

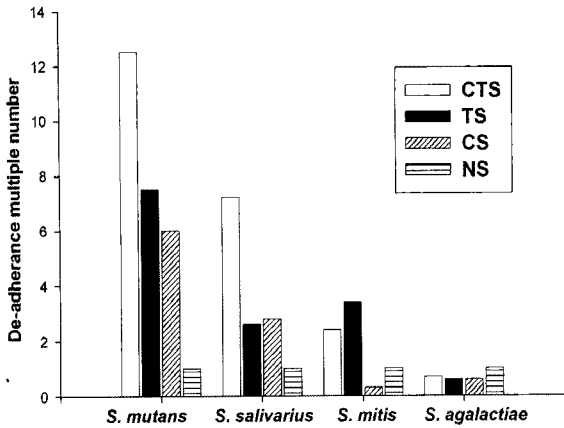


Fig. 1. The comparison of de-adherence multiple numbers of reagent solutions (CTS, citric acid-triphosphate-saline; TS, triphosphate-saline; CS, citric acid-saline; NS, normal saline control)

수에 용해하여(CTS) 저자들이 고안한 실험 모델에 사용한 결과, *S. mutans*는 생리식염수 대조군에 비하여 평균 12.5배의 세균 탈부착 효과를 보였고, *S. salivarius*에 대해서는 평균 7.2배의 탈부착 효과를 나타내었다(Table 1). 12수 제3인산나트륨 0.8 g/100 ml를 생리식염수에 용해하고 5 N HCl로 pH를 8.4로 조정된 용액(TS)은 *S. mutans*에 대하여 대조군보다 7.5배의 탈부착 효과를 보였고, *S. salivarius*에 대해서는 2.6배의 탈부착 효과를 나타내었다(Table 1). 일수 구연산 0.4 g/100 ml를 생리식염수에 용해하고 5 N NaOH로 pH를 4.6으로 조정된 용액(CS)은 *S. mutans*에 대하여 대조군에 비해 6.0배의 탈부착 효과를 보였고, *S. salivarius*에 대해서는 2.8배의 탈부착 효과를 나타내었다(Table 1). 이러한 결과로 추론하자면, 구연산-제3인산나트륨 혼합액이 상기 *S. mutans*와 *S. salivarius*에 대하여 상승적인 탈부착 효과를 보인다는 것이다. *S. mitis*에 대해서는 약간 의외의 결과가 나왔다. CTS는 2.4배, TS는 3.4배의 탈부착 효과를 보였으나 CS는 이 균주에 대하여 탈부착 효과가 없었다(Table 1).

비구강 내 사슬알균 종인, *Streptococcus agalactiae*는 예상했던 바와 같이 CTS가 0.7, TS가 0.6, CS가 0.6배의 탈부착 효과를 나타내어 대조군보다 낮았다(Table 1). 구연산과 제3인산나트륨은 소량을 사용할 경우, 인체에 해롭지 않다. 본 연구자들의 실험 모델에 의하면 식품 위생 분야에서 사용된 양보다 적은 양으로도 구강 내 사슬알 균종들인 *S. mutans*, *S. salivarius* 및 *S. mitis*에 대하여 우수한 탈부착 효과를 나타내었다. Giese 등은 TSP가 닭고기 표면조직의 얇은 지방층을 제거함으로써 닭고기 표면에서 세균들을 제거하며, 세균의 성장에 필수적인 금속 이온들의 킬레이트화를 통해서 간접적인 항균효과를 갖는다고 하였다(10). Ray 등은 유기산들이 낮은 pH와 해리 혹은 비해리 산(酸)분자들 때문에 그람 음성세균들에 대하여 정균 효과를 갖는다고 보고한 바 있다(18). 저자들은 구연산과 제3인산나트륨이 사슬알균 종들의 glycolyx의 부착성에 영향을 주기 때문에 유리구슬에 부착된 사슬알균들을 탈부착하는 것으로 추정하고 있다. CTS 혼합물의 pH는 6.0이므로 이보다 더 산도가 낮은 신 김치, 콜라, 초산

음료에 비해서 구강내 pH 변화에 큰 영향을 주지 않을 것으로 판단한다.

CTS 혼합물은 pH가 더 낮은 CS나 더 높은 TS보다 더 효과적인 탈부착 효과를 나타내었다(Fig. 1). 따라서 이러한 결과를 적절한 치약 매질과 혼합하면, 충치나 아급성 심내막염에 효과적인 새로운 개념의 치약을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

이 연구는 2001학년도 조선대학교 대학연구비의 지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. Article, 1994. Rhone-Poulenc advances TSP poultry rinse uses. *Chemical Marketing Reporter* Vol. 245 Issue 10, p18, 1/8p.
2. Burros, M. 1992. U.S. approves chicken treatment to cut salmonella. *New York Times* Vol. 142 Issue 49119, pC1.
3. Capita, R., C. Alonso-Calleja, M.C. Garcia-Fernandez, and B. Moreno. 2001. Influence of strain and trisodium phosphate concentration on growth parameters of *Listeria monocytogenes* in vitro. *Let. Appl. Microbiol.* 32, 428-432.
4. Capita, R., C. Alonso-Calleja, R. Rodriguez-Perez, B. Moreno, and M.C. Garcia-Fernandez. 2002. Influence of poultry carcass skin sample site on the effectiveness of trisodium phosphate against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 65, 853-856.
5. Capita, R., C. Alonso-Calleja, M. Prieto, M.C. Garcia-Fernandez, and B. Moreno. 2003. Effectiveness of trisodium phosphate against *Listeria monocytogenes* on excised and non-excised chicken skin. *J. Food Prot.* 66, 61-64.
6. Cutter, C.N. and M. Rivera-Betancourt. 2000. Interventions for the reduction of *Salmonella typhimurium* DT 104 and non-O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* on beef surfaces. *J. Food Prot.* 63, 1326-1332.
7. Ellerbroek, L., E.M. Okolocha, and E. Weise. 1997. Decontamination of poultry meat trisodium phosphate and lactic acid. *Rleischwirtschaft* 77, 1092-1094.
8. Favier, G.L., M.E. Escudero, and A.M. de Guzman. 2001. Effect of chlorine, sodium chloride, trisodium phosphate, and ultraviolet radiation on the reduction of *Yersinia enterocolitica* and mesophilic aerobic bacteria from eggshell surface. *J. Food Prot.* 64, 1621-1623.
9. Giese, J. 1992. Salmonella reduction process receives approval. *Food Technol.* 46, 110.
10. Giese, J. 1992. Experimental process reduces Salmonella on poultry. *Food Technol.* 46, 112.
11. Goncalves, A.C., R.C.C. Almeida, M.A.O. Alves, and P.F. Almeida. 2005. Quantitative investigation on the effects of chemical treatments in reducing *Listeria monocytogenes* populations on chicken breast meat. *Food Control* 16, 617-622.
12. Kim, C.R., K.H. Kim, and S.B. Suh. 2000. Microbiological and sensory evaluations of chicken wings treated with acetic acid and trisodium phosphate during retail and refrigerated storage. *Korean J. Poult. Sci.* 27, 189-195.
13. Kim, J. and D.L. Marshall. 2002. Influence of catfish skin mucus on trisodium phosphate inactivation of attached *Salmonella typh-*

- imurium*, *Edwardsiella tarda*, *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 65, 1146-1151.
14. Liao, C.H. and P.H. Cooke. 2001. Response to trisodium phosphate treatment of *Salmonella chester* attached to fresh-cut green pepper slices. *Can. J. Microbiol.* 47, 25-32.
15. Okolocha, E.C. and L. Ellerbroek. 2005. The influence of acid and alkaline treatments on pathogens and the shelf life of poultry meat. *Food Control* 16, 217-225.
16. Perrin, D.D. and B. Dempsey. 1974. Buffers for pH and metal ion control, 1st ed., p. 156. Halsted Press, a Division of John Wiley & Sons, Inc, New York, USA.
17. Ramirez, A.J., G.R. Acuff, L.M. Lucia, and J.W. Savell. 2001. Lactic acid and trisodium phosphate treatment of lamb breast to reduce bacterial contamination. *J. Food Prot.* 64, 1439-1441.
18. Ray, B. and W.E. Sandine. 1991. Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. In B. Ray and M. Baeschel (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

(Received October 1, 2008/Accepted November 18, 2008)

ABSTRACT : The Anti-Sticking Effect of Mixture of Trisodium Phosphate and Citric Acid on Oral *Streptococcus* species

Choong-Hyun Jung¹, Hyung-Hun Cho², Gwang-Ju Choi², Seung-Yong Kang³, and Nam-Woong Yang^{3*} (¹Hosan Dental Clinic, Gwangju, 506-805, Republic of Korea, ²Department of Ophthalmology, Chosun University Medical School, Gwangju, 501-759, Republic of Korea, ³Department of Microbiology, Chosun University Medical School, Gwangju, 501-759, Republic of Korea)

Trisodium phosphate 12 hydrate and citric acid monohydrate mixture showed the strong anti-sticking effect on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus salivarius*, which are adhered to glass beads. Each *Streptococcus* species was shaking-cultured in brain heart infusion broth containing three glass beads. After 18 hr, glass beads were slightly washed into normal saline by three-pin-pointed pincette. Each three glass-beads set was put into reagent-containing tubes, which have 40 mg of bits of weighing paper for gaining brushing effect as similar as brushing one's teeth. The tubes were shaken by vortex mixer for 10 min except non-oral microbe, *Streptococcus agalactiae* (5 min). The samples were colony-counted by serial agar dilution method. Experiment was repeated three times for each *Streptococcus* species. The relative ratios of bacterial de-adherence by reagents were calculated in comparison with normal saline control. The de-adherence degree of citric acid-trisodium phosphate-saline mixture (CTS, pH 6.0) against *Streptococcus mutans* came to an average of 12.5 times compared with normal saline control. Trisodium-saline (TS, pH 8.4) showed the average of 7.5 times, and citric acid-saline (CS, pH 4.6) showed 6.0 times compared to the control group. The bacterial de-adherence degree against *Streptococcus salivarius* was each 7.2, 2.6 and 2.8 times in above reagent sequence in comparison with saline control. CTS and TS showed 2.4 and 3.4 times of anti-sticking effect on *Streptococcus mitis* respectively, but CS had no anti-sticking effect on this bacterium. CTS, TS and CS showed 0.7, 0.6, and 0.6 times on non-oral microbe, *Streptococcus agalactiae*, separately compared with saline control. These results show that oral *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, and *Streptococcus mitis*, which are causative of dental caries or sub-acute endocarditis, may be easily removed from oral cavity by CTS mixture. It is conceivable that our experimental results will enable the development of a new conceptive toothpaste to prevent dental caries or sub-acute endocarditis after drawing teeth.