

Beneficial Effects of *Lactobacillus casei* ATCC 334 on Halitosis Induced by Periodontopathogens

Ki-Ho Lee¹ and Dong-Heon Baek^{2,*}

¹Department of Advanced General Dentistry, Dankook Dental Hospital

²Department of Oral Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Dankook University, Seoul, Republic of Korea

(received February 19, 2014; revised February 28, 2014; accepted March 01, 2014)

Halitosis is caused by consumption of certain foods or drinks and production of volatile sulfur compounds (VSCs) by periodontopathogens. VSCs-related halitosis is not easily removed using mechanical or chemical therapies such as dental floss, plaque control and mouth rinse. *Lactobacillus* are known to be probiotics and stimulate immune systems of human. Furthermore, *L. casei* ATCC 334 and *L. rhamnosus* GG have an effect on protection of dental caries *in vitro* studies. The aim of this study was to investigate effect of *Lactobacillus* on halitosis by *Fusobacterium nucleatum*- and *Porphyromonas gingivalis*-producing VSCs and to analyze inhibitory mechanism. The periodontopathogens were cultivated in the presence or the absence *Lactobacillus*, and the level of VSCs was measured by gas chromatograph. For analysis of inhibitory mechanisms, the susceptibility assay of the spent culture medium of *Lactobacillus* against *F. nucleatum* and *P. gingivalis* was investigated. Also, the spent culture medium of *Lactobacillus* and periodontopathogens were mixed, and the emission of VSCs from the spent culture medium was measured by gas chromatograph. *L. casei* and *L. rhamnosus*

significantly reduced production of VSCs. *L. casei* and *L. rhamnosus* exhibited strong antibacterial activity against *F. nucleatum* and *P. gingivalis*. The spent culture medium of *L. casei* inhibited to emit gaseous hydrogen sulfide, methyl mercaptan and dimethyl sulfide from the spent culture medium of periodontopathogens. However, the spent medium of *L. rhamnosus* repressed only dimethyl sulfide. *L. casei* ATCC 334 may improve halitosis by growth inhibition of periodontopathogens and reduction of VSCs emission.

Key words: halitosis, probiotics, periodontopathogens, volatile sulfur compounds

서론

구취는 구강 또는 비강을 통하여 나오는 불쾌한 냄새로 정의되며, 원인으로는 호흡기계, 위장관계 및 기타 전신 질환과 관련된 구취와, 치아우식증, 치주질환, 불량 보철물 및 정상적인 타액 분비가 안 되는 구강 내 원인들이다[1]. 구강 내 원인에 의한 구취환자가 많은 부분을 차지하며, 구강 내 구취 원인을 보면 구강세균에 의한 원인과 생리적인 원인으로 나눌 수 있다[2,3]. 이중에 구취환자의 80%정도가 구강세균에 의한 음식물 부패로부터 휘발성 황화합물 생성이 기인하는 것으로 알려졌다[4]. 휘발성 황 화합물은 주로 혐기성 세균에 의해서 발생되며, 황을 함유하는 cysteine과 methionine같은 아미노산이 포함된 단백질이 효소에 의해서 분해될 때 생성되는 것으로 보고되고 있다[5]. Cystein에서 수산화황(H₂S)이 만들어지고,

*Correspondence to: Dong-Heon Baek, Department of Oral Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Dankook University, 119 Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan, Chungnam, 330-714, Republic of Korea.
Tel: +82-41-550-1997, Fax: +82-41-
E-mail: micro94@gmail.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

methionine에 의해서 유화메틸(CH₃SH), 디메틸설파이드((CH₃)₂S)이 생성된다. *Porphyromonas gingivalis*는 그람음성 혐기성 세균이며, benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) 시험 양성 세균으로 많은 종류의 효소를 갖고 있다[6]. 이 효소 중에 트립신유사 효소(trypsin-like enzyme)에 의해서 휘발성 황화합물인 수산화황, 유화메틸, 디메틸설파이드를 생성한다[7,8]. *Fusobacterium nucleatum* 또한, cystein과 methionine을 이용하여 휘발성 황화합물을 만드는 것으로 알려져 있다[9,10].

프로바이오틱은 살아있는 미생물로 사람의 건강에 이로운 영향을 주는 세균으로[11], 이 세균을 이용하여 사람의 건강 유지와 이 세균의 특징에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 프로바이오틱 중에 lactobacilli는 병원성 세균으로부터 사람을 보호해주며, 선천 면역을 자극하는 것에 의해서 건강을 유지시키는데 중요한 역할을 한다[12,13]. *L. casei* 및 *L. rhamnosus*는 항균제제를 분비하는 것과 면역체계의 자극에 의해서 장관계 건강에 가장 효과적으로 보고되었다[14,15]. 또한 치아우식에 대해서도 예방효과가 있는 것으로 알려졌다[16,17].

이 연구의 목적은 구강건강에 도움을 주는 *L. casei* 및 *L. rhamnosus*가 치주병원균인 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*의 휘발성 황화합물 생성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하고 메커니즘을 분석하는데 있다.

재료 및 방법

세균 및 세균 배양

본 실험에 사용된 균주로는 구취유발 관련 세균으로 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, 및 *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586을 사용하였으며 Brain heart infusion (BHI; BD bioscience, San Jose, CA, USA)에 헤민(hemin; 5 ug/ml) 및 비타민 K (0.2 ug/ml)를 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 혐기상태 (H₂ 5%, CO₂ 10% 및 N₂ 85%)에서 배양하였다. 프로바이오틱으로는 *Lactobacillus casei* ATCC 334 및 *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103)을 사용하였으며, Man Rogosa and Sharpe (MRS; BD bioscience, San Jose, CA, USA)배지를 이용하여 37°C에서 배양하였다.

프로바이오틱스의 항균활성도 측정

L. casei 및 *L. rhamnosus*를 배양 후, 7,000 x g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 갖고 항균력 시험을 수행하였다. 항균 감수성 시험은 Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)의 방법대로 수행하였다[18].

민과 비타민 K를 첨가한 BHI (180 μl)를 96-well 폴리스티렌 배양접시(SPL Lifescience, Gyeonggi)의 각 well에 분주하고 두 프로바이오틱스 세균 배양액 (180 μl)을 첫 번째 well에 넣고 다채널피펫을 이용하여 두 배씩 연속희석을 한다. 37°C 혐기상태에서 36시간 배양 후 흡광도계를 이용하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다.

휘발성 황 화합물 측정

F. nucleatum 및 *P. gingivalis*를 프로바이오틱스와 혼합 또는 단독 배양 후, 세균 배양액 1 ml를 깨끗한 50 ml 원추튜브에 옮겼다. 또한 휘발성 황 화합물 억제 메커니즘을 조사하기 위해서, 프로바이오틱 세균을 배양액을 7,000 x g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 분리하고 이를 0.22 μm 폴리비닐리덴플로라이드 필터(PVDF; Millipore co., Belleica, MA, USA)로 여과멸균을 수행하고, 프로바이오틱 침전물은 인산완충용액으로 세척후 4°C에 보관하였다. 여과멸균한 프로바이오틱 배양액 및 프로바이오틱 세균을 *F. nucleatum* 및 *P. gingivalis*의 배양액과 혼합하고 깨끗한 50 ml 원추튜브에 옮긴다. 5분간 실온에서 방치 후, 용액표면 바로 위에 있는 공기를 10 ml 주사기를 이용하여 얻었다. 1 ml 눈금까지 주사기를 누르고 다시 10 ml 눈금까지 당겨서 공기를 희석한다. 그 후 가스 크로마토그래프(Oral chroma™; FIS Inc., Itami, Hyogo, Japan)을 이용하여 황화수소(H₂S), 유화메틸(CH₃SH) 및 디메틸설파이드((CH₃)₂S)를 측정하였다.

통계학적 유의성 검사

대조군과 실험군의 통계학적 유의성 검사는 SPSS 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하고 Mann-whitney 및 U-test를 이용하여 분석하였다. P 수치는 0.05 미만일 때 통계학적 유의성이 있다고 고려되었다.

결 과

치주병원균에 의한 황화합물 생성에서 프로바이오틱의 효과

치주병원균에 의한 황화합물 생성 시 프로바이오틱스의 효과를 조사하기 위하여 혼합배양을 실시하였다. 치주병원균인 *F. nucleatum* 및 *P. gingivalis*를 프로바이오틱스와 혼합 또는 단독배양 후, 휘발성 황 화합물을 가스 크로마토그래프로 측정하였다. *L. casei*와 *L. rhamnosus*, 두 프로바이오틱스 모두 치주병원균에 의한 황화합물 생성을 유의성 있게 억제시켰다(Fig. 1). *L. rhamnosus*에 비해 *L. casei*가 두 치주병원균에 의한 황화합물의 생성을 더

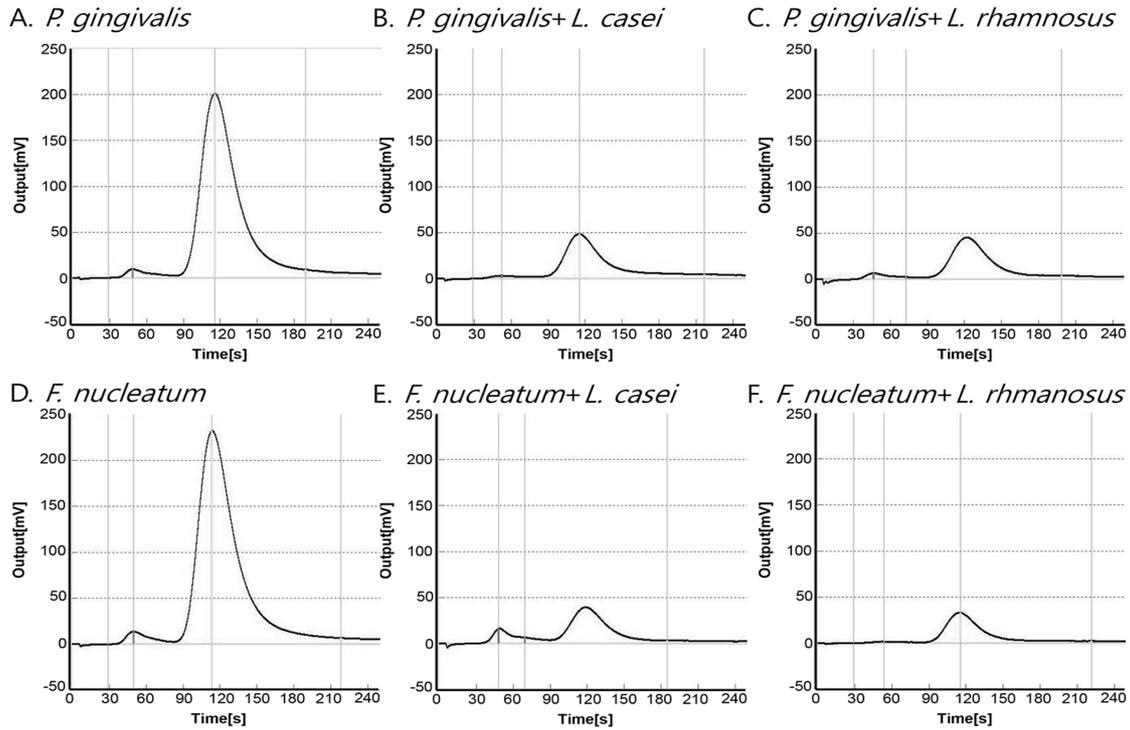


Fig. 1. Reductive effect of probiotics on oral malodor induced by periodontopathogens. *F. nucleatum* or *P. gingivalis* were cultivated in the presence or the absence of probiotics, and then VSCs was collected using syringe above the bacterial suspensions. The level of VSCs was measured by gas chromatograph (Oral chroma™). The level of VSCs was expressed with histogram.

Table 1. Production of VSCs by periodontopathogens with or without probiotics

Samples		Volatile sulfur compounds (bpp)		
		H ₂ S	CH ₃ SH	(CH ₃) ₂ S
<i>F. nucleatum</i>	None	31.75 ± 9.17	1648.25 ± 236.18	29.16 ± 7.16
	+ <i>L. casei</i>	6.25 ± 3.68	33.5 ± 6.13	4.34 ± 0.81
	+ <i>L. rhamnosus</i>	12.5 ± 1.29	293.5 ± 34.00	12.62 ± 3.46
<i>P. gingivalis</i>	None	41.75 ± 12.44	2023.16 ± 148.32	43.52 ± 11.32
	+ <i>L. casei</i>	6.32 ± 5.14	14.64 ± 3.65	5.32 ± 2.44
	+ <i>L. rhamnosus</i>	15.52 ± 3.24	314.25 ± 46.37	13.22 ± 4.32

The data value are expressed as mean±SD

많이 억제시켰다(Table 1). *L. casei*의 경우 세가지 황화합물에 대하여 적게는 대략 20% (H₂S)에서 많게는 2% (CH₃SH)까지 감소시켰으며, *L. rhamnosus*는 대략 40% (H₂S)에서 15% (CH₃SH)까지 감소시켰다.

프로바이오틱의 항균활성도 검사

*L. casei*와 *L. rhamnosus*에 의한 황화합물 생성 억제가 차이가 났다. 그래서 메커니즘을 조사하기 위해서, 치주병원균의 성장 억제에 의해서 황화합물의 생성을 억제하는지 조사하기 위해서 프로바이오틱스의 배양액으로 항균활성도 검사를 수행하였다. CLSI에서 추천하는 방법으

로 항균활성도를 수행한 결과 *L. casei* 및 *L. rhamnosus*는 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*에 대하여 각각 배양액 12.5% 및 6.25%에서 항균활성을 나타내었다(Fig. 2). 그러나 두 프로바이오틱스에 대한 항균활성도의 차이는 보이지 않았다.

L. casei 배양액에 의한 황화합물 억제

두 프로바이오틱스는 치주병원균의 황화합물 생성에 대한 억제 차이를 보였지만, 항균활성도에서는 차이를 보이지 않았다. 그래서 프로바이오틱스 배양액을 치주병원균 배양액을 혼합하고 휘발성 황화합물을 측정하였다.

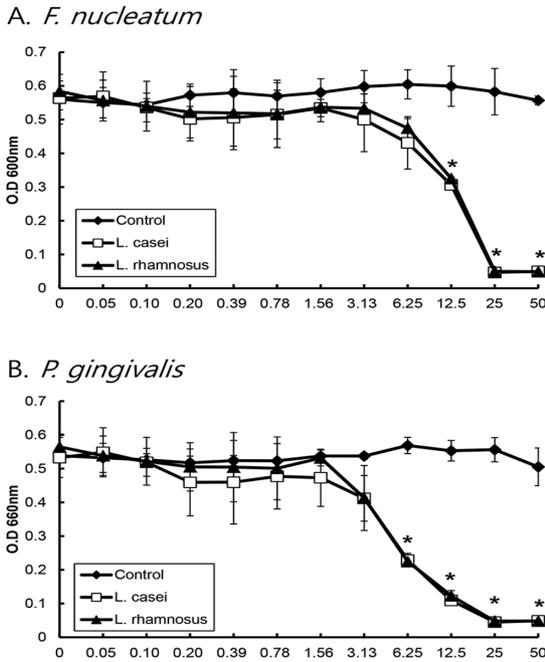


Fig. 2. Antibacterial activity of probiotics against periodontopathogens. After cultivation of probiotics, the spent culture media were collected by centrifugation. The periodontopathogens were incubated with the spent culture medium of *L. casei* or *L. rhamnosus* in the various concentrations. The growth of *F. nucleatum* (A) and *P. gingivalis* (B) were measured by spectrophotometer at 600 nm. The experiments were performed in triplicate and the representative data are shown. * Statistically significant compared with untreated control bacteria ($p < 0.05$). Control group was treated with fresh MRS medium.

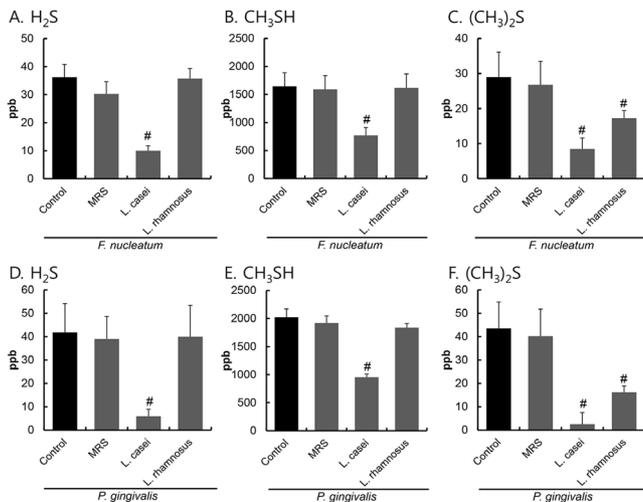


Fig. 3. The effect of the spent culture medium of probiotics on VSCs emission. The spent culture medium of *F. nucleatum* (A-C) and *P. gingivalis* (D-F) were mixed with the spent culture medium of *L. casei* and *L. rhamnosus*. The level of VSCs was measured by gas chromatograph (Oral chroma™). The experiments were performed in triplicate and the representative data are shown. # Statistically significant compared with untreated control bacteria ($p < 0.05$).

Fig. 3에서 보이는 바와 같이, *L. casei*의 경우 세 가지 휘발성 황화합물의 양을 유의성 있게 감소시켰지만, *L. rhamnosus*는 디메틸설파이드만 감소시켰다. 프로바이오틱스 배양 배지에 의한 영향인지 살펴보기 위해서 가장 대조군(mock control)으로 사용하였다.

고찰

구취환자 중 대부분이 구강세균에 의한 원인으로 음식물 섭취 또는 생리적인 작용보다 더 많이 차지하고 있다[4]. 구취는 구강세균 중 혐기성 세균에 의해서 주로 발생하며, 이들 세균의 특징은 BANA 시험 양성 세균들로[8], 트립신 유사 효소를 생성하여 cysteine이나 methionine이 들어있는 단백질을 분해하여 휘발성 황화합물을 만든다[19]. 일시적인 구취는 대부분 음식에 의한 원인이어서 구강가글제를 이용하여 비교적 쉽게 제거될 수 있지만, 구강혐기성 세균이 관련된 만성 구취는 세균이 생성한 휘발성 황화합물이 혀 및 치은 열구액에 침착되면서 지속적으로 발생된다[1,3]. 구취 치료를 위해서 물리적인 치료방법으로 치실을 사용하거나 화학적인 방법으로 구강가글제 사용이 일반적이었다[3,5]. 그러나 최근에는 프로바이오틱 세균인 *Streptococcus salivarius* K12를 이용한 구취치료를 위한 시도가 이루어졌다[20].

*L. casei*와 *L. rhamnosus*는 프로바이오틱 세균으로 최근에 이 세균들의 사람 면역 및 항균활성도 때문에 여러 가지 질병의 예방 및 치료에 사용되고 있다[12,21]. 특히, 이 세균을 이용한 요거트를 이용한 임상실험 결과 치우아식에 예방이 있다고 보고되었다[17]. 그러나 아직 구취에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

본 연구에서 치주병원균인 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*에 의해서 생성되는 휘발성 황화합물에 대해서 *L. casei* 및 *L. rhamnosus* 모두 유의적인 억제효과를 보였다. 치주 병원균을 *L. casei* 및 *L. rhamnosus*와 혼합 또는 단독 배양하였을 때, 혼합 배양한 곳에서 휘발성 황화합물의 양이 적게는 20%, 많게는 4%까지 감소된 것을 확인하였으며, 두 프로바이오틱 중에 *L. casei*가 휘발성 황화합물 생성을 좀 더 많이 억제시키는 것으로 나타났다. 이러한 차이가 lactobacilli가 갖고 있는 항균활성 때문인지 두 프로바이오틱 세균 배양액을 분리하여 최소억제농도 시험을 수행한 결과, 두 프로바이오틱 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그래서 차이를 보이는 원인이 다른 메커니즘에 있을 것이 고려되어, *L. casei* 및 *L. rhamnosus* 배양액과 *F. nucleatum* 및 *P. gingivalis* 배양액을 혼합하고 배양액에서 방출되는 휘발성 황화합물의 양을 측정하였다.

그 결과 *L. rhamnosus* 배양액과 혼합한 용액에서는 수산화황과 유화메틸만 유의적 감소를 보였지만 *L. casei* 배양액과 혼합한 용액에서는 세 가지 휘발성 황화합물에서 유의적인 감소를 보였다. Sreekumar 등의 연구결과에서 *L. rhamnosus*는 다른 프로바이오틱 세균보다 휘발성 황화합물 중 수산화황과 유화메틸을 더 많이 생성하지만, 디메틸설파이드는 적게 생성한다[22]. *L. casei*의 경우도 휘발성 황화합물을 생성한다고 보고되고 있지만, 이번 실험에서 사용한 균주인 *L. casei* ATCC 334만 유일하게 휘발성 황화합물을 생성하지 못한다[23]. 결국 두 프로바이오틱 세균의 배양액을 이용한 실험에서는 *L. rhamnosus*의 항균활성에 의해서 치주병원균의 성장을 억제하지만 *L. rhamnosus* 세균 자체가 치주병원균에 의해서 생성시킨 양만큼 휘발성 황화합물을 생성하여 차이를 보이지 않은 것이며, *L. casei*는 항균활성에 의해서 치주병원균의 성장을 억제시킬 뿐만 아니라 *L. casei*가 분비하는 물질이 휘발성 황화합물에 부착하여 액체로부터 발산을 억제하는 사료된다. 휘발성 황화합물 생성에 있어서 혼합배양 시에는 감소되지만 배양액을 혼합하였을 때는 감소하지 않는 결과를 바탕으로 *L. rhamnosus*에 의한 휘발성 황화합물 생성보다 치주병원균에 의한 휘발성 황화합물 생성이 더 많다는 것이 예측된다. *S. salivarius* K12는 항균활성에 의해서 구취를 감소시킨다고 보고되었지만[20], 본 연구에서 수행한, 배양액을 이용하여 한 실험을 하여야 정확한 구취 감소효과를 예측할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 기존 구취감소에 사용한 프로바이오틱 세균이 아닌 새로운 *L. casei* 및 *L. rhamnosus*를 이용하여 구취감소 효과를 체외실험을 통해서 조사하였다. 두 프로바이오틱 모두 구취감소 효과를 보이지만 *L. rhamnosus*도 휘발성 황화합물을 생성하므로, *L. casei* ATCC 334가 구취 치료 및 예방을 위한 프로바이오틱 세균으로 더 좋은 효과가 있을 것으로 사료된다.

References

1. Spielman AI, Bivona P, Rifkin BR. Halitosis. A common oral problem. N Y State Dent J. 1996;62:36-42.
2. Tonzetich J. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. J Periodontol. 1977;48:13-20.
3. Loesche WJ, Kazor C. Microbiology and treatment of halitosis. Periodontol 2000 2002;28:256-279.
4. Van den Broek AM, Feenstra L, De Baat C. A review of the current literature on management of halitosis. Oral Dis. 2008;14:30-39.
5. Krespi YP, Shrimme MG, Kacker A. The relationship between oral malodor and volatile sulfur compound-producing bacteria. Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;135:671-676.
6. Nakayama K. Molecular genetics of *Porphyromonas gingivalis*: gingipains and other virulence factors. Curr Protein Pept Sci. 2003;4:389-395.
7. De Boever EH, De Uzeda M, Loesche WJ. Relationship between volatile sulfur compounds, BANA-hydrolyzing bacteria and gingival health in patients with and without complaints of oral malodor. J Clin Dent. 1994;4:114-119.
8. Kozlovsky A, Gordon D, Gelernter I, Loesche WJ, Rosenberg M. Correlation between the BANA test and oral malodor parameters. J Dent Res. 1994;73:1036-1042.
9. Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol. 1990;5:195-201.
10. Pianotti R, Lachette S, Dills S, Desulfuration of cysteine and methionine by *Fusobacterium nucleatum*. J Dent Res. 1986;65:913-917.
11. Gill H, Prasad J, Probiotics, immunomodulation, and health benefits. Adv Exp Med Biol. 2008;606:423-454.
12. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young R J. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. J Pediatr. 1999;135:564-568.
13. Meurman JH, Stamatova I, Probiotics: contributions to oral health. Oral Dis. 2007;13:443-451.
14. Köll P, Mändar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarström L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. Oral Microbiol Immunol. 2008;23:139-147.
15. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res Microbiol. 2001;152:167-173.
16. Meurman JH, Antila H, Korhonen A, Salminen S. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* in vitro. Eur J Oral Sci. 1995;103:253-258.
17. Glavina D, Gorseta K, Skrinjaric I, Vranic DN, Mehulic K, Kozul K. Effect of LGG yoghurt on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in children. Collegium antropologicum 2012;36:129-132.
18. Wayne P. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard. 7th ed, ed. P. Wayne. 2007: Clinical and Laboratory Standards Institute.
19. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. J Clin Microbiol. 1992;30:427-433.
20. Masdea L, Kulik EM, Hauser-Gerspach I, Ramseier AM, Filippi A, Waltimo T. Antimicrobial activity of *Streptococcus salivarius* K12 on bacteria involved in oral malodour. Arch Oral Biol. 2012;57:1041-1047.

21. Singh VP, Sharma J, Babu S, Rizwanulla, Singla A. Role of probiotics in health and disease: a review. *J Pak Med Assoc.* 2013;63:253-257.
22. Sreekumar, R. Sreekumar R, Al-Attabi Z, Deeth HC, Turner MS. Volatile sulfur compounds produced by probiotic bacteria in the presence of cysteine or methionine. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48:777-782.
23. Irmeler S, Schafer H, Beisert B, Rauhut D, Berthoud H. Identification and characterization of a strain-dependent cystathionine beta/gamma-lyase in *Lactobacillus casei* potentially involved in cysteine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;295:67-76.