

405 nm 파장을 이용한 TiO₂ 의 광촉매
반응이 *S.mutans* 의 생장에 미치는 영향

연세대학교 대학원

치의학과

이 해 나

405 nm 파장을 이용한 TiO_2 의 광촉매
반응이 *S.mutans* 의 생장에 미치는 영향

지도교수 김 백 일

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014 년 1 월

연세대학교 대학원

치의학과

이 해 나

이해나의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 김 백일 _____ 인

심사위원 _____ 권 호근 _____ 인

심사위원 _____ 정 승화 _____ 인

연세대학교 대학원

2013 년 12 월

감사의 글

먼저 생애 처음으로 논문이란 걸 써보았는데, 이 한 논문에 엄청난 수고와 정성이 들어 간다는 것을 느꼈고, 한 논문이 써지기 까지 많은 분들의 도움과 배려가 필요하다는 것도 알았습니다. 부족한 저의 논문을 처음부터 끝까지 지도 감독해 주신 김백일 교수님과 권호근 교수님, 멀리 부산에서도 지도해주셨던 정승화 교수님께 감사드립니다. 너무나도 부족한 저의 논문을 검토해주시고 지도해주시느라 힘드셨을 텐데 한자, 한자 꼼꼼히 봐주시고 웃는 얼굴로 너그럽게 지도해주셔서 너무나도 감사드립니다. 또 미생물 실험을 하나도 몰랐던 저에게 정말 기초부터 탄탄히 하나하나 가르쳐주시고, 본인의 논문과 실험처럼 같이 고민해주시고 신경 써주신 강시묵 선생님께도 감사드립니다. 항상 친절하고 너그러우신 선배님이시지만 때론 제가 초심을 잃고 마음이 흐트러졌을 때 선생님의 따끔한 충고와 가르침이 다시 마음을 가다듬게 해주셨습니다. 죄송한 마음도 크지만 감사한 마음 잊지 않고 선배님 기억에 멋진 후배로 남을 수 있도록 노력하겠습니다. 길면 길고 짧으면 짧은 대학원 생활 동안 작은 것부터 큰 일 까지 도와주시고 함께 고생해주신 우리 교실 선배님, 후배님들도 감사드립니다.

대학원 처음 합격하였을 때 누구보다도 기뻐해주신 외할아버지, 외할머니 감사 드리고 오래 오래 건강히 사세요. 논문 쓴다고 힘들다고 투정도 부리고 짜증도 많이 냈는데 너그럽게 받아주시고 항상 옆에서 응원해주셨던 우리 가족들, 인생에 나아갈 길에 대해 상담해주고 존경하는 우리 삼촌들, 가장 가까이서 못나고, 모난 모습 보여도 다 받아주며 항상 내 편이 되어준 우리 사랑하는 엄마에게도 감사드립니다.

아직도 부족한 것이 많은 저이지만, 이번 계기로 단순한 논문뿐만이 아니라 인생에 있어서도 많은 것을 경험하고 배우며 성숙할 수 있었습니다. 앞서 많은 분들의 희생과 배려가 있어서 이 논문을 쓸 수 있었고, 제가 있을 수 있었습니다. 그 은혜 평생 잊지 않고 멋진 사람이 되어 갈아나가며 살도록 하겠습니다. 너무나도 감사 드립니다.

2014년 1월

이혜나 올림

차 례

그림 차례.....	VIII
표차례.....	IX
국문 요약.....	X
1. 연구 배경.....	1
2. 연구 방법.....	6
2.1 세균 및 배양조건.....	7
2.2 이산화티탄의 농도에 따른 항균력 평가.....	7
2.3 빛의 파장에 따른 항균력 평가.....	9
2.4 통계 방법.....	10
3. 연구 결과.....	11
3.1 이산화티탄 광촉매 시 자외선 조사시간 및 이산화티탄 농도에 따른 <i>S. mutans</i> 항균력 평가.....	11
3.2 이산화티탄 광촉매 시 광원 조사시간 및 빛의 파장에 따른	

<i>S. mutans</i> 항균력평가	15
4. 고찰.....	19
5. 결론.....	23
6. 참고문헌.....	24
7. 영문 요약.....	27

그림 차례

Fig.1. Mechanism of photocatalyst TiO_2	2
Fig.2. Process of study.....	6
Fig.3. Turbidity of TiO_2 solution according of TiO_2 concentration.....	8
Fig.4. Type of Light Sources.....	10
Fig.5. Bactericidal effect of TiO_2 concentration and irradiation time of UV (254 nm) on <i>S. mutans</i>	14
Fig.6. Bactericidal effect of wavelength and irradiation time on <i>S. mutans</i> ; TiO_2 concentrations $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	18

표 차례

Table 1. Type of Light Sources.....	10
Table 2. Bactericidal effect of TiO ₂ concentration and irradiation time of UV (254 nm) on <i>S. mutans</i>	13
Table 3. Bactericidal effect of wavelength and irradiation time on <i>S. mutans</i> ; TiO ₂ concentrations 0.1 mg · ml ⁻¹	17

국문요약

405 nm 파장을 이용한 TiO₂의 광촉매 반응이 *S.mutans*의 성장에 미치는 영향

치아 표면의 치면세균막을 효과적으로 제거하기 위해서 칫솔 등을 이용하는 물리적인 관리를 시행할 수 있으나 구강의 형태 및 치아의 구조에 따라 완전한 치면세균막 제거가 어려울 수 있으므로 화학적인 치태 조절방법의 병용이 필요하다. 최근 빛을 이용하여 산화력을 제어하는 광촉매 기술이 폐수처리, 공기정화 및 항균 등 다양한 분야에 활용되고 있다. 이 중 이산화티탄(Titanium dioxide, TiO₂) 광촉매는 독성이 없어 인체에 무해하며 자원이 풍부하여 사용에 큰 이점이 있다. 하지만 TiO₂의 광촉매 반응을 유도하기 위해서는 Ultraviolet ray 영역(UV, 250 ~ 380 nm)의 강한 빛이 사용되고 있으며, 이로 인해 인체에 직접적으로 적용하기에는 어려운 한계점이 있다.

이에 본 연구에서는 이산화티탄 광촉매 반응의 임상적 활용 가능성을 살펴보고자 현재 임상현장에서 사용하고 있는 QLF-D의 405 nm LED와 TiO₂ 광촉매 조합에 따른 *S. mutans*에 대한 항균력을 조사하였다.

이를 위해서 연구는 크게 2 단계로 시행되었다. 이산화티탄의 농도에 따른 항균력 평가를 위해 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg·ml⁻¹ distilled water의 농도로 제조한 TiO₂(Anatase type; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)용액 5 ml에 세균의 최종농도가 10⁴ CFU·ml⁻¹가 되도록 조정된 배양액 0.05 ml를 첨가하여 혼합하였다. 여기에 광촉매 반응을 유도하기 위해 UV 램프(wavelength = 254 nm, 40 W; G40T10, Sankyo denki, Japan)를 이용하여 5 분, 10 분, 20 분간 조사한 실험군과 빛을 조사하지 않은 대조군(0 분)으로 나누어 적용한 후 반응이 완료된 용액 100 μl를 BHI(Bacto™

Brain heart infusion; Dickinson and Company, USA) 고체배지에 접종하여 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양 후 세균 집락을 계측하여 생균수를 측정하였다. 또한 빛의 파장에 따른 항균력 평가를 위해 UV 램프를 비롯하여 QLF-D Biluminator™(wavelength = 405 nm, 36 W; Inspektor research system BV, Netherlands)를 적용하였다. 각기 다른 파장의 빛과 TiO₂ 를 함께 사용하였을 때의 항균력을 확인하기 위해 TiO₂ 의 농도를 0.1 mg · ml⁻¹ 로 조정된 용액 5 ml 와 세균의 최종농도가 10⁴ CFU · ml⁻¹ 가 되도록 조정된 배양액 0.05 ml 를 혼합한 후 각 광원을 0 분, 10 분, 20 분, 30 분, 40 분간 조사하여 광촉매 반응을 유도 하였다. 이후 반응이 완료된 용액 100 μl를 BHI 고체배지에 접종하여 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양 후 세균집락을 계측하여 생균수를 측정하였다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 기존의 대표적인 광원인 UV 조사 조건에서 다양한 농도의 이산화티탄 광촉매의 *S. mutans* 에 대한 항균력을 평가한 결과, UV 광조사 시간에 비례해서 항균효과가 높아졌고, 이산화티탄 0.1 mg · ml⁻¹ 농도에서 최적의 항균효과를 나타냈다.
2. UV 파장에서 최적의 항균효과를 나타낸 0.1 mg · ml⁻¹ 농도의 TiO₂ 를 이용하여 각기 다른 파장의 빛을 함께 사용했을 때 *S. mutans* 항균력을 비교한 결과 단파장 일수록 항균력이 높게 나타났으며 조사 시간이 증가할수록 항균력도 증가된 것을 확인하였다.
3. 20 분간 광 조사 시 QLF-D 는 UV 빛에 비해 약 54.34%의 항균력을 나타냈고, 30 분 광 조사 시 항균력이 94%로 UV 광원과 유사한 효과를 나타냈다(p=0.181).

UV 광원의 경우는 조사시간 20 분 만에 완전히 사멸하였고, QLF-D 광원의 경우는 조사시간 40 분 만에 완전히 사멸한 것을 확인하였다.

이상의 연구 결과 치아우식증의 주요 원인균인 *S. mutans* 는 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 농도의 TiO_2 광촉매를 UV 램프 (254 nm), QLF-D (405 nm)의 빛에너지로 활성화 시킬 경우 생장이 억제되었다. 따라서 향후 치면세균막을 모사한 바이오필름 모델에 적용 하여 유효성을 평가하고 항균력을 증진시킬 수 있는 방법을 고안하면 실제 구강에 적용 가능할 것이다.

핵심되는 말 : 광촉매, 파장, *Streptococcus mutans*, TiO_2

405 nm 파장을 이용한 TiO₂ 의 광촉매 반응이 *S. mutans* 의 생장에 미치는 영향

<지도교수 김 백 일 >

연세대학교 대학원 치의학과

이 해 나

1. 연구 배경

통성 혐기성이며 그람 양성균인 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)는 치아우식증의 주요 원인균으로 잘 알려져 있다(WJ.Loesche, 1996). 많은 연구자들이 구강 내 *S. mutans* 를 제거하거나 저해 또는 사멸시키기 위한 다양한 방법을 시도해 왔다. 치아 표면의 치면세균막을 효과적으로 제거하기 위해서 칫솔 등을 이용하는 물리적인 관리를 시행할 수 있으나 구강의 형태 및 치아의 구조에 따라 완전한 치면세균막 제거가 어려울 수 있다(Y.Jain, 2013). 그러므로 화학적인 치태 조절방법의 병용이 필요한데, 구강 내 유해 세균을 조절하기 위해서 항생제를 사용할 경우 구강 미세생태계 교란 및 내성을 갖는 세균이 발생할 수 있다(Y.Jain, 2013). 한편 항균력이 우수한 클로르헥시딘과 같은 항균물질은 장기간 사용 시 치아에 착색을 유발하거나 미각을 교란시키는 등 몇 가지 부작용이 보고되고 있어 사용에 주의가 필요하다(H.Jarvinen 등, 1993;L.Flotra 등,

1971). 따라서 사용이 간편하면서 부작용이 적고 복잡한 구조를 갖는 치아에 쉽게 적용할 수 있는 새로운 화학적 치태 조절법의 개발이 필요하다.

빛은 다양한 파장으로 구별되고 이에 따라 에너지를 갖는다. 이러한 빛 에너지를 이용한 광촉매(Photocatalyst)는 빛(Photo)과 촉매(Catalyst)의 합성어로 빛을 에너지원으로 이용하여 산화, 환원반응을 촉진시키는 반도체 물질을 의미한다(Koh Eun-Hee 등, 2006). 광촉매 반응으로 일어난 산화, 환원 반응은 유기물을 이산화탄소와 물로 분해시키며 미생물을 항균 하는 능력을 가지고 있다(Mills 등, 1998).

광촉매로 이용될 수 있는 물질 중 이산화티탄(TiO_2)은 인체에 적용하기 좋은 광촉매 소재로 알려져 있다(A.Fujishima 등, 2000). 지구 상에 많이 존재하는 원소인 티타늄이 산화된 형태인 이산화티탄은 자원적으로 풍부하고 가격이 저렴하다. 또한 이산화티탄은 내마모성, 내구성이 좋고, 물질 자체가 안전하고 쉽게 변하지 않으며, 인체에 독성을 나타내지 않는다. 이와 같이 이산화티탄은 촉매제로 사용하기에 많은 장점을 가지고 있어 광촉매에 가장 많이 사용된다(탁창우, 2007). 이산화티탄 광촉매는 380nm 이하의 빛에 의해 수산화 라디칼(hydroxyl radical: $\cdot\text{OH}$)과 초과산화 이온(superoxide ion: O_2^-)을 생성하여 강력한 산화반응을 일으킨다(Fig. 1). 이러한 활성 산소들은 유기물을 효과적으로 분해하기 때문에 항균, 탈취, 유해물 제거 등에 활용이 가능하다 (최정윤, 2005).

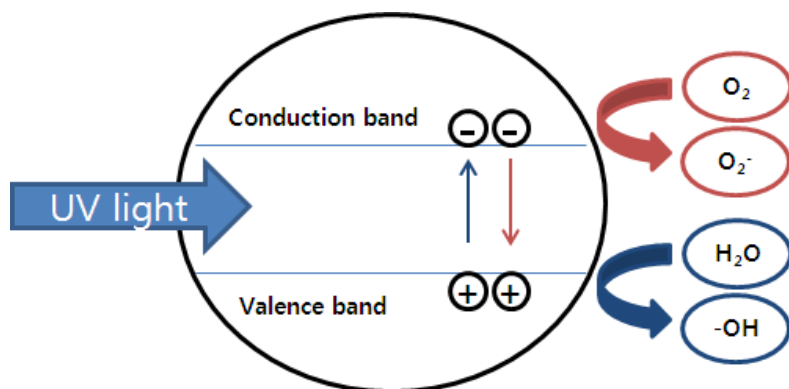


Figure 1. Mechanism of photocatalyst TiO_2

이산화티탄(TiO_2)의 광활성화(photoactivity) 연구는 20 세기부터 시작되었고 1956 년 Mashio 등이 이산화티탄의 자기산화(auto oxidation) 반응을 보고한 이후 전세계적으로 빛을 이용한 광촉매(photocatalyst)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(K.Hashimoto 등, 2005). 대부분의 연구는 물이나 공기 중의 유독 물질을 정화하는데 사용되었으며, 조명 기구 및 주방용기, 건축자재 등의 자정작용에 사용 되며, 거울이나 창내벽등의 김서림 방지에도 유용하게 사용되고 있다. 또한 수질, 토지 오염물 분해 등 환경 환경 유해물질, DNA, 내독소, 바이러스, 미생물을 분해하는 등 현재까지 광범위하게 연구되어왔다(Jae-Hong Park 등, 2006;최정운, 2005). 치의학 쪽에서는 교정용 와이어에 이산화티탄을 합성하거나 코팅하여 항균작용을 할 수 있게 하는 연구가 진행되고 있으며 각종 구강병을 야기하는 세균을 대상으로 항균효과를 평가하는 연구가 진행되었다(Eun-Hee Koh, 2006).

하지만 지금까지 이산화티탄을 이용하여 세균에 대한 항균효과를 조사한 연구는 대부분 UV 영역의 빛을 사용하였으며, *S. mutans* 에 대한 항균효과 또한 380 nm 이하의 빛을 이용한 연구들이 대부분이었다(T.satio 등, 1992). 비록 이산화티탄은 내구성, 내마모성이 우수하고 독성이 없어 인체에 무해하지만 380 nm 이하의 빛은 자외선 영역이기 때문에 빛 자체만으로도 유전자 변이를 유발할 수 있으며(K.Mackenzie 등, 1940), 특히 인체에 장시간 조사될 경우 피부암 등의 부작용이 일어날 가능성이 존재한다(DL.Narayanan 등, 2010). 이러한 단점을 극복하기 위해 가시광선 영역에서 반응하는 광촉매를 만들기 위한 연구가 진행되고 있으나, 대부분의 연구는 산업적으로 활용하기 위해 금속 이산화티탄의 표면을 개질하거나 다양한 전이 금속을 합성하는 방법으로만 연구되고 있다(정욱기, 2007). 따라서 실제 인체에 무해한 새로운 방법으로 치면세균막을 조절하는 것이 필요하다.

이에 Lee 등 (2012)은 광민감제(photosensitizer)의 하나인 에리트로신(erythrosine)

과 치과용 할로젠(halogen) 램프 광원을 이용하여 *S. mutans* 바이오 필름의 세포 사멸을 유도한다는 사실을 보고하여 빛을 이용한 치면세균막 관리의 가능성을 제시하였다(Lee YH 등, 2012). 하지만 아직 이산화티탄 광촉매에 치과용 광원을 적용하여 구강 미생물의 성장 억제에 대한 연구는 보고된 바 없는 실정이다.

최근에는 가시광선 영역의 빛을 치아에 조사해서 초기 우식증을 탐지할 수 있는 quantitative light-induced fluorescence(QLF)이라는 장비가 소개되었다. 이 장비는 405 nm 정도의 푸른색의 가시광선을 사용하며, 이 빛을 치아에 조사하면 건전한 치아의 경우 빛이 상아-법랑질 경계(DEJ)까지 투과한 뒤 반사되면서 녹색의 자연 형광(auto-fluorescence)이 발생하게 된다. 그러나 초기 우식증이 있는 병소의 경우 병소 부위에서 빛이 산란되면서 형광이 소실되어 검게 보인다. 이렇게 형광이 소실된 정도를 정량화시켜서 구체적인 수치로 제시하여 초기 우식증을 탐지 할 수 있다(Lee ES 등, 2013). 이러한 전통적인 구내 카메라 형태의 QLF는 2011년에 QLF-D Biluminator(이하 QLF-D)라는 새로운 형태로 발전하게 된다. QLF-D는 특수 광원과 필터가 내장된 디지털 카메라를 활용하여 일반 백색광원 영상과 QLF 형광 영상을 연속으로 촬영할 수 있는 제품이다. QLF-D는 405 nm 단파장의 빛을 이용하여 치아 또는 치태를 구성하는 세균의 대사산물의 하나인 포피린(porphyrin) 계열 물질의 형광(fluorescence) 현상을 유도하여 육안으로 쉽게 탐지할 수 있도록 도와주는 탐지기구이다(김백일, 2011).

이에 본 연구에서는 인체에 유해성 없이 광촉매를 통한 치면세균막 관리를 하기 위한 노력의 일환으로 현재 임상현장에서 사용하고 있는 QLF-D 의 405 nm LED 를 응용해 보고자 하였다. 이를 위해 다양한 농도의 이산화티탄을 적용하여 항균력이 최적화 되는 조건을 탐색하고 다양한 파장에 따른 *S. mutans* 의 항균효과를 비교해보고자 하였다. 세부 연구 목적은 다음과 같다.

1. 다양한 농도의 이산화티탄을 이용해 UV 조사 시 *S. mutans* 에 대한 항균력이 최적화되는 광촉매 반응조건을 탐색함.
2. 이산화티탄 광촉매에 서로 다른 파장의 광원을 조사하여 빛의 파장에 따른 *S. mutans* 항균력을 비교함.

2. 연구 방법

본 연구는 총 2단계로 진행되었다. 1단계에서는 자외선을 이용한 이산화티탄 광촉매 시 *S. mutans*에 대한 항균력이 최고가 되는 이산화티탄의 농도를 선정하고자 하였다. 2단계에서는 1단계에 찾은 최적의 이산화티탄 농도를 적용하여 빛의 파장에 따른 이산화티탄 광촉매의 *S. mutans*에 대한 항균력을 비교 평가하고자 하였다(Fig. 2).

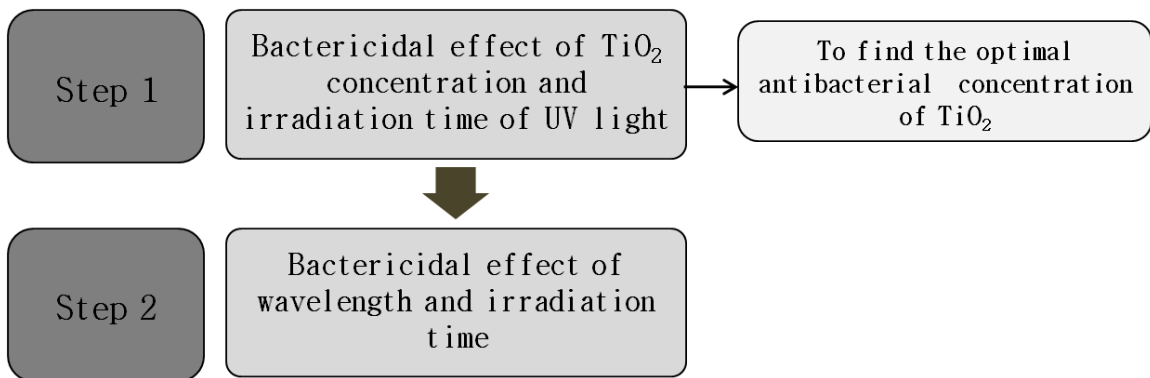


Figure 2. Process of study

2.1 세균 및 배양조건

본 연구에서는 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양 받아 사용하였다. 먼저 순수배양을 하기 위해 분양 받은 균주를 BHI(Brain Heart Infusion, Difco Co, USA) 고체배지에서 48 시간 동안 5% CO₂ 배양기(37℃)에서 배양한 후 잘 분리된 단일 집락을 백금이로 선별하여 BHI 액체배지에 접종하고 24 시간 배양하였다. 이후 세균 배양액을 항균 처리된 80% glycerol 용액과 1:1 로 혼합하여 밀봉한 후 -80℃에 보관하여 실험에 이용하였다.

2.2 이산화티탄의 농도에 따른 항균력 평가

이산화티탄(Titanium oxide, TiO₂, anatase type, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 농도에 따른 항균력을 비교하기 위해 분말형태인 이산화티탄을 멸균된 증류수에 혼합하여 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg · ml⁻¹ D.W 의 농도로 제조하였다(Fig. 3). 각 농도 별로 제조한 이산화티탄 용액 5ml 에 세균의 최종농도가 10⁴ CFU · ml⁻¹ 인 배양액 0.05 ml 를 첨가하여 petri dish 에서 마그네틱바로 stirring 하였다. 여기에 광촉매 반응을 유도하기 위해 기존 이산화티탄 광촉매에 주로 사용된 UV(wavelength = 254 nm, 40 W, Sankyo denki, G40T10, Japan) 빛을 5~20 분간 조사한 후 반응이 완료된 용액 100 μm를 BHI 고체배지에 접종하여 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양 후 생균수를 측정하였고, 모든 실험은 총 5 번 반복하였다.

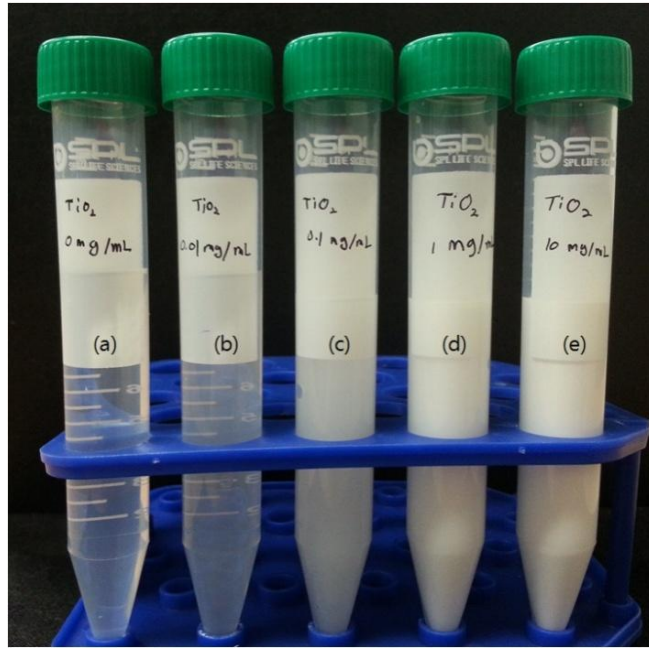


Figure 3. Turbidity of TiO_2 solution according of TiO_2 concentration (a) $0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, (b) $0.01 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, (c) $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, (d) $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, (e) $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

2.3 빛의 파장에 따른 항균력 평가

이산화티탄의 표면에서 활성산소를 생성시키기 위해 254 nm UV 램프를 비롯하여 405 nm LED 램프(36 W, QLF-D Biluminator™, Inspektor research system BV, Amsterdam, Netherlands)를 사용하였다(Table 1, Fig. 4). 각 광원에 따른 항균력을 확인하기 위해 분말형태인 이산화티탄을 멸균된 증류수에 혼합하여 0.1 mg · ml⁻¹ D.W 의 농도로 제조한 용액 5 ml 에 세균의 최종농도가 10⁴ CFU · ml⁻¹ 인 배양액 0.05 ml 를 첨가하여 petri dish 에서 마그네틱바로 stirring 하였다. 광촉매 반응을 유도하기 위해 각 광원을 10~40 분간 조사한 용액 100 μm 를 BHI 고체배지에 접종하여 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양 후 생균수를 측정하였고, 모든 실험은 총 5 번 반복하였다.

Table 1. Type of Light Sources.

	UV	QLF-D
Company	Sankyo denki	Inspektor Research system BV
Model	G40T10	QLF-D biluminator™
Wavelength	254 nm	405 nm
Power	40 W	36 W (3 W x 12 ea)

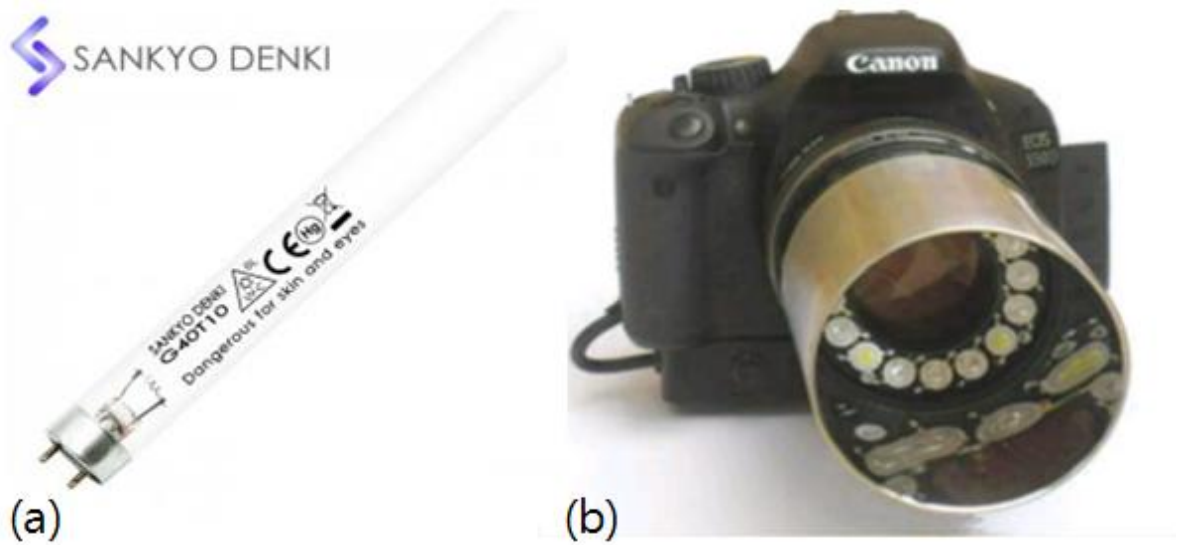


Figure 4. Type of Light Sources, UV light(a), QLF-D biluminator(b).

2.4 통계 방법

자외선 조사시간 및 이산화탄 농도에 따른 항균력 평가에서 조사시간 또는 농도에 따른 유의성을 검증하기 위해 일원분산분석(One-way ANOVA)을 수행하였다. 과장에 따른 항균력 평가 또한 조사시간 및 과장에 따른 유의성을 검증하기 위해 일원분산분석(One-way ANOVA)을 수행하였다. 모든 자료의 분석은 PASW 18.0(SPSS Inc, USA)을 사용하여 유의수준 0.05 에서 수행하였다.

3. 연구결과

3.1 이산화티탄 광조사 시 자외선 조사시간 및 이산화티탄 농도에 따른 *S. mutans* 항균력 평가

먼저 자외선의 광조사 시간이 증가할수록 *S. mutans* 에 대한 항균력은 유의미하게 증가되었다($P < 0.001$). 광조사를 하지 않은 경우 이산화티탄의 농도에 따른 항균력의 차이는 유의미하게 나타나지 않아, 광조사 없이 이산화티탄만으로는 *S. mutans* 의 생장에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다($P > 0.001$). 또한 이산화티탄 없이 자외선만으로도 10 분간 조사한 경우 3.66 log CFUs/ml 에서 2.05 log CFUs/ml 으로 약 43.98% 항균력을 나타냈다.

자외선을 10 분간 광조사 한 경우, 이산화티탄의 농도가 0.01 mg/ml 일 때 3.66 log CFUs/ml 에서 1.13 log CFUs/ml 으로 69.12% 의 항균력을 보였고, 0.1 mg/ml 일 때 3.68 log CFUs/ml 에서 0.25 log CFUs/ml 으로 93.20%의 가장 높은 항균력을 보였다. 더 높은 농도인 1.0 mg/ml, 10 mg/ml 일 경우, 각각 3.70 log CFUs/ml 에서 1.94 log CFUs/ml 으로 47.56%, 3.71 log CFUs/ml 에서 2.77 log CFUs/ml 으로 25.33% 로 항균력이 점차 감소하였다(Table 2, Fig 5).

Table 2. Bactericidal effect of TiO₂ concentration and irradiation time of UV (254 nm) on *S. mutans*.

Irradiation time (min)	N	Log (CFUs · ml ⁻¹) for the following TiO ₂ concentrations (mg · ml ⁻¹)				
		0	0.01	0.1	1	10
0	5	3.66±0.05 ^a	3.66±0.09 ^a	3.68±0.05 ^a	3.70±0.04 ^a	3.71±0.03 ^a
5	5	3.45±0.13 ^b	1.85±0.12 ^b	1.59±0.09 ^b	2.25±0.04 ^b	2.84±0.10 ^b
10	5	2.05±0.15 ^c	1.13±0.19 ^c	0.25±0.24 ^c	1.94±0.09 ^c	2.77±0.12 ^b
20	5	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	1.16±0.23 ^d	2.83±0.12 ^b

All values are mean±standard deviation.

Different letters within the same column indicate significant differences between groups by ANOVA and turkey' s post hoc test p<0.05

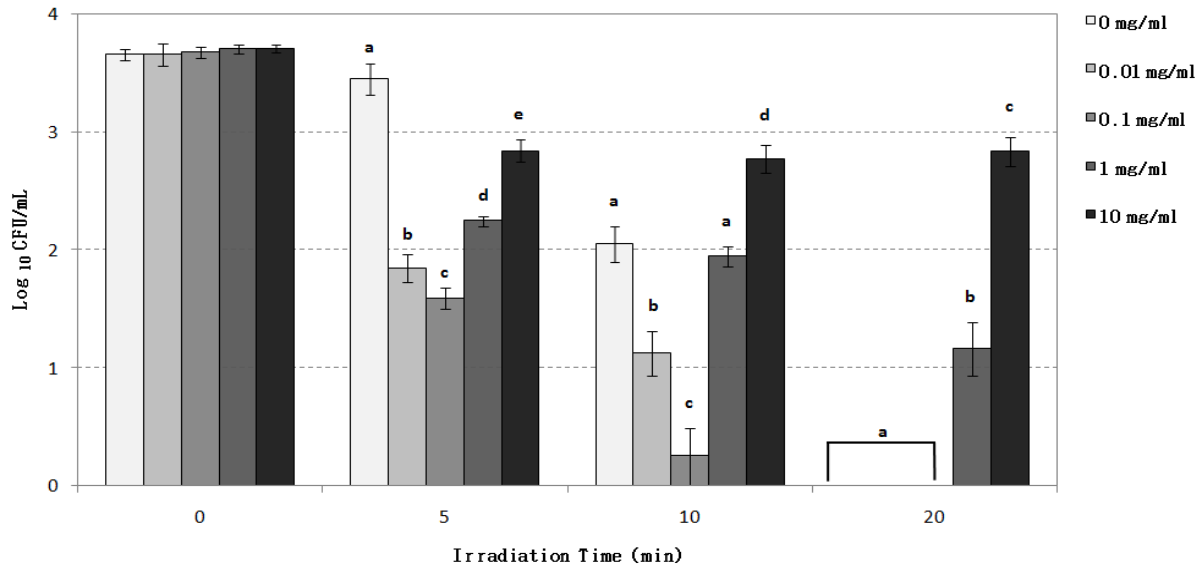


Figure 5. Bactericidal effect of TiO₂ concentration and irradiation time of UV

(254 nm) on *S. mutans*, Error bars present standard deviations.

Different letters within the same column indicate significant differences between groups by ANOVA (at each irradiation time and turkey' s post hoc test $p < 0.05$), CFU, colony-forming unit.

3.2 이산화티탄 광촉매 시 광원 조사시간 및 빛의 파장에 따른 *S. mutans* 항균력평가

광촉매에 의한 *S. mutans* 항균력은 빛의 파장이 단파장인 UV 가 높게 나타났으며 광 조사 시간에 비례하여 항균력이 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다 ($P < 0.001$). 20 분간 광 조사를 했을 때, 254nm 의 광원을 이용한 경우는 3.68 log CFUs/ml 에서 0.00 log CFUs/ml 으로 100% 의 항균력을 보인 반면, 405 nm 의 광원을 이용한 경우 3.68 log CFUs/ml 에서 1.68 log CFUs/ml 로 54.34% 의 항균력을 나타냈다.

254 nm 의 광원의 경우는 조사시간 20 분만에 완전히 사멸하였고, 405 nm 의 광원의 경우는 조사시간 40 분만에 완전히 사멸하였다(Table 3, Fig. 6).

Table 3. Bactericidal effect of wavelength and irradiation time on *S. mutans*:TiO₂ concentrations 0.1 mg · ml⁻¹.

Irradiation time (min)	N	Log (CFUs · ml ⁻¹) for the following wavelength	
		405 nm	254 nm
0	5	3.68±0.04 ^a	3.68±0.04 ^a
10	5	2.91±0.07 ^b	0.28±0.27 ^b
20	5	1.68±0.18 ^c	0.00±0.00 ^b
30	5	0.22±0.30 ^d	0.00±0.00 ^b
40	5	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b

All values are mean±standard deviation.

Different letters within the same column indicate significant differences between groups by ANOVA and turkey' s post hoc test p<0.05).

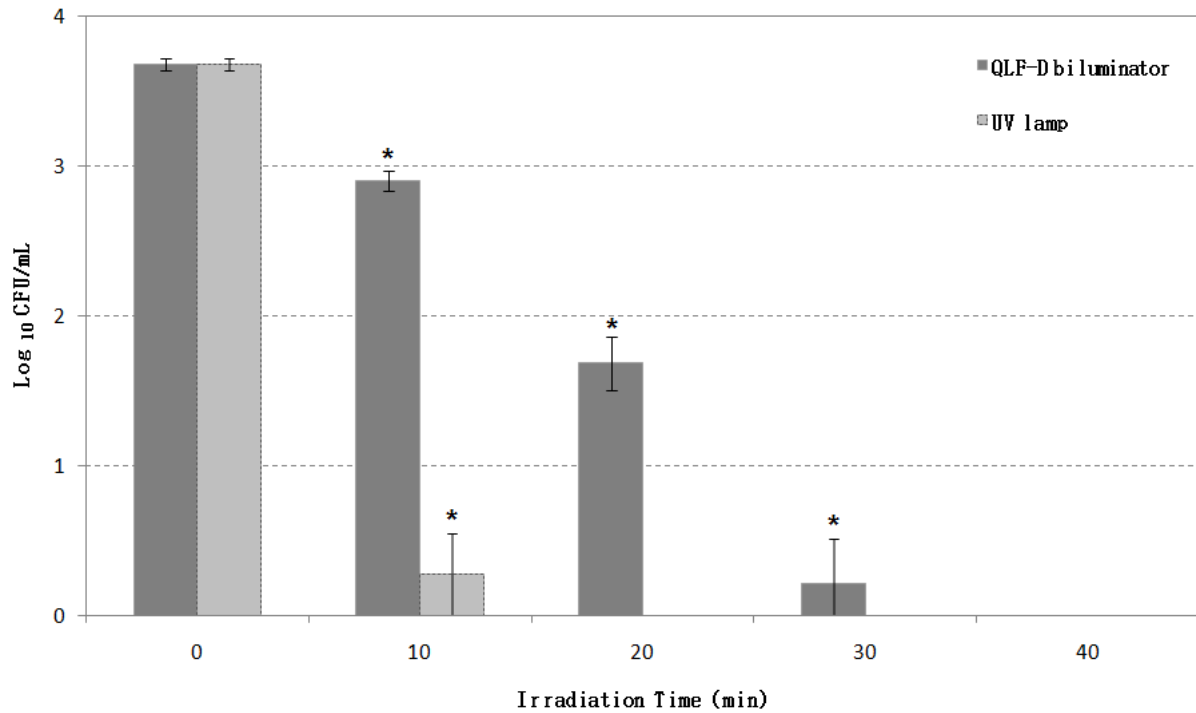


Figure 6. Bactericidal effect of wavelength and irradiation time on *S. mutans*:TiO₂ concentrations 0.1 mg · ml⁻¹, Error bars present standard deviations. *Compared with other groups, statistically significant with P<0.05. CFU, colony-forming unit.

4. 고찰

구강의 양대 만성질환인 치아우식증과 치주질환은 식이습관, 구강위생행태, 경제, 사회학적 상태를 비롯한 다양한 요인에 영향을 받지만, 직접적인 원인이 되는 것은 구강내 존재하는 미생물의 생태학적 변화이다(N.Takahashi 등, 2011). 특히, 치아우식증의 경우 치면세균막을 구성하는 미생물이 치아 경조직의 탈회와 재광화를 균형적으로 유지하는 상태에 있다가 외부 환경의 변화에 의해 산생성균이 우점종이 되는 상태(acidogenic stage)로 변화되고 이러한 상태가 지속될 경우 내산성균이 우점종인 상태(aciduric stage)가 되어 결국에는 치아조직이 파괴되어 버리는 현상이 발생하게 된다(N.Takahashi 등, 2011; JD.Featherstone, 2008). *S. mutans* 는 구강에 존재하는 대표적인 산생산성 및 내산성균주이기 때문에 여러 연구자들은 *S. mutans* 를 제거하거나 억제하기 위한 다양한 방법을 시도하고 있다.

본 연구에서는 *S. mutans* 를 억제하기 위해 이산화티탄을 이용하여 여러 광원에 따라 항균력에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다. 이산화티탄은 물에 불용인 무색의 결정이며 백색안료로 사용되고 티탄백이라 불린다. 사용 분야는 기타 도자기재, 연마재, 화장품, 제지 등에 사용되는 물질이다. 그 중 이산화티탄은 대표적인 광촉매제로 알려져 있다. 광촉매제로 사용하기에 내마모성, 내구성이 좋고 물질 자체가 안전하고 쉽게 변하지 않으며 무독물질이다. 또한 이산화티탄은 자원적으로 풍부하고 가격이 저렴하기 때문에 사용상에 많은 장점을 가진다(탁창우, 2007).

이산화티탄은 금속이기 때문에 결정구조에 따라 rutile, anatase, brookite 등 3 종류로 구분된다. 이들 중 광촉매를 이용한 항균 및 항균에는 anatase 이산화티탄이 더욱 효과적이라고 알려져 있다. rutile 은 이산화티탄 원자가 2 개 포함되어 있는 반면 anatase 는 직선상의 이산화티탄을 4 개 가지고 있는 구조이기 때문에 anatase 가

rutile 에 비해 강한 환원력을 가지게 된다. 또한 이산화티탄이 빛에너지를 흡수하여 전자가 생성되는 전도대의 위치가 rutile 보다 anatase 가 더 안정된 위치에 있고 더욱 큰 에너지를 발산할 수 있어 본 연구 또한 anatase type 의 이산화티탄을 이용하였다(A.Mills 등, 1998).

T.Saito 등(1992)은 *mutans streptococci* 속의 하나인 *Streptococcus sobrinus* AHT 균주를 이용하여 이산화티탄에 의한 항균작용에 대한 연구에서 TiO_2 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 의 농도에서 근적외선(300~400 nm; peak 325 nm)을 1 분간 조사할 경우 항균력이 가장 높게 나타났으며 $10^5 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 세포가 사멸되는 것을 확인하였다(T.Saito 등, 1992). 또한 J. L. Aguilar Salinas 등(2013)은 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 균주를 이용하여 이산화티탄에 의한 항균작용에 대한 연구에서 365 nm 의 자외선을 90 분 간 조사할 경우 TiO_2 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 과 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 농도에서 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 세포가 각각 99.92%, 99.99% 사멸되는 것을 확인하였다(J. L. Aguilar Salinas 등, 2013).

이와 같이 기존 선행연구들은 TiO_2 농도 $0.5 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 에서 가장 좋은 항균력을 보인 반면, 본 연구에서 농도 별 항균력은 이산화티탄의 농도가 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $0.01 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 의 순서로 높게 나타났다. 이러한 현상은 이산화티탄이 백색의 불투명한 금속이기 때문에 나타나는 현상이라고 볼 수 있다. 이산화티탄을 증류수에 섞게 되면 불투명한 하얀 용액이 되는데, 용액의 농도가 높아지면 불투명도가 진해지면서 빛이 투과를 못하여 광촉매가 일어나지 않는 것이다. 다시 말해서 이산화티탄이 빛 에너지를 받아 산화력을 나타내는 것은 표면에서 일어나는 반응이기 때문에 용액 내 농도가 높아질수록 빛이 투과될 수 있는 깊이가 줄어들고 결과적으로 빛과 만나는 표면적이 줄어들기 때문인 것이다(T.Saito 등, 1992).

최근 Gao 등(2013)은 UVA(Ultraviolet-A, peak wavelength = 360 nm)와 UVC(Ultraviolet-C, peak wavelength = 250 nm)를 이용하여 이산화티탄 표면의 UV-photofunctionalization 에 대한 차이를 연구한 결과, UVA 를 이용한 것 보다 UVC 를 이용한 것이 더 높은 생체활성화를 나타냄을 보고하였다(Y.Gao 등, 2013). 하지만 아직까지 파장에 따른 항균력의 차이를 확인한 연구는 없었다. 또한 UV 영역을 벗어나 가시광선영역의 빛을 응용한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 현재 치과임상현장에서 초기 우식 병소 및 성숙된 치태를 탐지하는데 활용하는 405 nm 를 활용하여 기존에 UV (254 nm)를 통해 항균력을 나타내는 이산화티탄의 광촉매를 유도하여 비교해 보았다. 본 연구에 의하면 20 분간 광조사 시 405 nm 의 빛은 약 54.34%의 항균력을 나타냈다. 254 nm 의 광원의 경우는 완전히 사멸하였고, 405 nm 의 광원의 경우는 조사시간 40 분 만에 완전히 사멸한 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 파장의 빛이 짧을수록 이산화티탄 광촉매에 의한 항균력에 효과적임을 알 수 있다($P < 0.001$). 하지만 UV 영역에 속하는 짧은 파장의 빛은 인체 조직에도 부정적인 영향을 끼칠 수 있다. 본 실험에서 자외선으로 광조사를 하지 않은 경우 이산화티탄의 농도에 따른 항균력의 차이는 유의미하게 나타나지 않아, 광조사 없이 이산화티탄만으로는 *S. mutans* 의 생장에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다($P > 0.001$). 이는 이산화티탄 자체는 무독성임을 의미한다. 따라서 약간 항균력이 낮게 나타나더라도 인체에 무해한 가시광선의 빛을 사용하는 것이 인체에 더욱 안전하며, 또한 빛을 이용하여 광촉매 반응을 유도하거나 정지시킬 수 있기 때문에 임상현장에서 비교적 쉽게 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

한편 본 연구에서는 자외선 영역의 파장(100 ~ 380 nm) 중에서도 단파장에 속하는 254 nm 를 사용하였고, 가시광선 영역의 파장(380 ~ 780 nm) 중에서도 자외선 영역과

가까운 단파장인 405 nm 를 사용하였다. 따라서 연구 결과가 다소 과대평가 되었을 가능성이 있다. 또한 254 nm 의 자외선으로 광 조사하여 이산화티탄 농도 최적의 농도를 찾았는데, 추후 임상현장에서 응용 되기 위해서는 본 연구에서 항균효과를 보인 405 nm 의 파장인 가시광선을 사용해야 할 것이다. 따라서 405 nm 광원을 이용하여 최적의 이산화티탄의 농도를 찾는 연구도 추후에 진행 되어야 할 것이다.

또한 부유성 세포를 대상으로 항균력을 평가했다는 한계점이 존재한다. 즉, 실제 구강 내 존재하는 세포는 치면세균막을 형성하고 있으며, 이로 인해 이산화티탄이 치면세균막의 내부로 침투할 가능성이 낮다. 하지만 이산화티탄은 강력한 산화력을 나타내기 때문에 치면세균막을 형성하는 불용성 유기물을 분해할 수 있을 것으로 예상된다. 만약 이산화티탄에 의해 치면세균막의 불용성 유기물이 쉽게 분해된다면 지속적인 빛 조사를 통해 치면세균막의 구조를 무너뜨리고 내부에 존재하는 세포를 노출시켜 직접적으로 균을 사멸 시킬 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 향후 연구를 통해 치면세균막을 실험실 상에서 재현한 바이오필름 모델을 이용하여 불용성 유기물의 분해와 내부 세포의 사멸 가능성을 확인해야 할 것이다.

5. 결론

본 연구는 치아우식증의 주요 원인균인 *S. mutans* 를 조절 하기 위한 새로운 방법을 제안하고자 기존 이산화티탄 광촉매에 주로 사용되었던 자외선 영역의 광원과 현재 임상현장에서 활용되고 있는 QLF-D 에 장착된 405 nm LED 램프의 광원에 의한 항균력을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 기존의 대표적인 광원인 UV 조사 조건에서 다양한 농도의 이산화티탄 광촉매의 *S. mutans* 에 대한 항균력을 평가한 결과, 이산화티탄의 농도 증가 및 UV 광조사 시간에 비례해서 항균효과가 높아졌다.
2. 빛의 파장에 따라서 이산화티탄 광촉매에 의한 *S. mutans* 항균력을 평가한 결과, 광원의 파장이 단파장 일수록 항균효과가 높았고, 광조사 시간에 비례하여 항균효과가 높아졌다.

이상의 결과를 통해 이산화티탄의 광촉매 반응은 인체에 무해한 405 nm 의 가시광선으로 유도될 수 있으며 향후 항균력을 보다 증가시킬 수 있는 방법을 고안한다면 임상현장에서 효과적으로 구강 내 *S. mutans* 를 억제하는데 활용 가능할 것으로 예상된다.

6. 참고문헌

1. 김백일: QLF의 원리와 임상적 활용, 대한치과의사협회지, 49(8), 443-450, 2011.
2. 김성일: 구강미생물에 대한 수용성 프로폴리스의 항균효과, 박사학위 논문, 조선대학교 대학원, 2008.
3. 정욱기: 가시광 감응형 광촉매 제조, 박사학위 논문, 조선대학교 대학원, 2007.
4. 최정윤: TiAg 합금의 광촉매용 TiO₂ 코팅층을 이용한 치아 우식 유발 세균에 대한 항균효과, 박사학위 논문, 연세대학교 대학원, 서울, 2005.
5. 탁창우: *Streptococcus mutans* 에 대한 티타늄 합금 산화막의 광촉매 항균효과, 석사학위 논문, 연세대학교 대학원, 서울, 2007.
6. A Mills, S Le Hunte: An overview of semiconductor photocatalysis. J Photochem Photobiol A 108: 1-35, 1998.
7. Andrew Mills, Michael McFarlane: Current and possible future methods of assessing the activities of photocatalyst films, Catalysis Today, 129, 22-28, 2007.
8. Choi Jung-Yoon, Chung Chooryung Judi, Oh Keun-Taek, Choi Yoon-Jeong, Kim Kyung-Ho: Photocatalytic Antibacterial Effect of TiO₂ Film of TiAg on *Streptococcus mutans*, Angle Orthodontist, Vol 79, No 3, 2009.
9. Fernández J, Kiwi J, Baeza J, Freer J, Lizama C, Mansilla HD: Orange II photocatalysis on immobilised TiO₂ Effect of the pH and H₂O₂. Applied Catalysis B, Environmental 48, 205-211, 2004.
10. Flotra L, Gjeremo P, Rolla G, Waerhaug J: Side effects of chlorhexidine mouth washes, Scand J Dent Res, 79(2):119-125, 1997.
11. Fujishima A, Honda K: Electrochemical photocatalysis of water at a semiconductor electrode. Nature 238: 37-38, 1972.
12. Fujishima A, Rao Tata N, Tryk Donald Al, Titanium dioxide photocatalysis. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 11-21, 2000.
13. Gao Y, Liu Y, Zhou L, Guo Z, Rong M, Liu X: The effects of different wavelength UV photofunctionalization on micro-arc oxidized titanium, PLoS One, 8(7):e68086, 2013.

14. Jain Y: A comparison of the efficacy of powered and manual toothbrushes in controlling plaque and gingivitis: a clinical study, *ClinCosmetInvestig Dent*, 5:3-9, 2013.
15. Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinen P: In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents, *Antimicrob Agents Chemother*, 37(5):1158-1159, 1993.
16. JD Featherstone: Dental caries: a dynamic disease process, *Aust Dent J*, 53(3):286-291, 2008.
17. Kazuhito Hashimoto, Hiroshi Irie, Akira Fujishima: TiO₂ Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects, *Japanese Journal of applied physics*, 44(12):8269-8285, 2005.
18. Koh Eun-Hee, Cho Jin-Hyoung: A comparative study of physical properties of TiO₂ thin films according to a coating method on orthodontic wires and brackets. *Korean J Orthod*, 36(6):451-64, 2006.
19. Lee ES, Kang SM, Ko HY, Kwon HK, Kim BI: Association between the cariogenicity of a dental microcosm biofilm and its red fluorescence detected by Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D), *J Dent*, 2013.
20. Lee YH, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY: The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing uni, *Int J Oral Sci*, 4(4):196-201, 2012.
21. Li YH, Lau PCY, Tang N, Svensater G, Ellen RP, Cvitkovitc DG: Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 184: 6333-6342, 2002.
22. LoescheWJ: *Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease*, Chapter 99, In: Baron S, ed. *Medical Microbiology* (4th). University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas: Galveston, 1996.
23. Mackenzie K, Muller HJ: Mutation Effects of Ultra-Violet Light in *Drosophila*, *Proceedings of the Royal Society B*, 129(857):491-517, 1940.
24. Mo Shang-Di, WY Ching: Electronic and optical properties of three phases of titanium dioxide: Rutile, anatase and brookite, *The American Physical Society*, vol.51, 1995.

25. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL: Ultraviolet radiation and skin cancer, *Int J Dermatol*, 49(9):978-986, 2010.
26. Park Jae-Hong, Kwon SooYoul: Solar Photochemical Degradation and Toxicity Reduction of Trichloroethylene(TCE), *Clean Technology*, vol.12, No.4, 244-249, 2006.
27. Salinas JLA, Aguilar JRP, Hernandez SAM, Cruz JS. Bactericidal Activity of TiO_2 on Cells of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Int J Photoenergy*, 2013.
28. Simon Wood, Daniel Metcalf, Deirdre Devine, Colin Robinson: Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamictherapy of oral plaque biofilms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 680-684, 2006.
29. T. Satio, T Iwase, J Horie, T Morioka: Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO_2 on *mutans streptococci*, *J.phtochem*, 14: 369-379, 1992.
30. Takahashi N, Nyvad B: The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives, *J Dent Res*, 90(3):294-303, 2011.

Abstract

Photocatalytic effect of TiO₂ with wavelength of 405 nm on the growth of
Streptococcus mutans

Interests in chemical agents and techniques for controlling the dental plaque are growing. Recent TiO₂ has noted as a photocatalyst to inhibit bacteria by oxidation of organic compounds and cells, because it is harmless to the human body and has many available resources. However, strong ultraviolet (UV, 250 ~ 380 nm) light is used to induce reaction of the photocatalytic TiO₂, it is difficult to apply to the human body directly. This study aimed to investigate antibacterial effect of TiO₂ catalyst under the various wavelength of light from dental optical equipments on *S. mutans* for clinical utilization of TiO₂.

To find the optimal antibacterial concentration of TiO₂, 0.01, 0.1, 1.0, and 10.0 mg · ml⁻¹ TiO₂ suspension was prepared with distilled water. Each 5 ml suspensions were mixed with 0.05 ml of culture medium which was adjusted at a final concentration of 10⁴ CFUs · ml⁻¹ of *S. mutans*. The photocatalytic reaction was induced by irradiating the UV light (wavelength = 254 nm, 40 W) for 0, 5, 10, and 20 min. After irradiation, 100 μm of the reaction mixture was immediately plated on BHI agar and these plates were incubated anaerobically at 37 °C and the colonies were counted after 24 hours. To compare antimicrobial activity according to various wavelengths, UV lamps and QLF-D Billuminator™ (wavelength = 405 nm, 36 W; Inspektor research system BV, Netherlands) were used. All photocatalytic reaction was carried out with 0.1 mg · ml⁻¹ TiO₂. The photocatalytic reaction was started by

each light source during 0, 10, 20, 30, 40 minutes. After the reaction, 100 μm of the reaction mixture was immediately plated on BHI agar and these plates were incubated anaerobically at 37 $^{\circ}\text{C}$ and the colonies were counted after 24 hours. The following results were obtained:

1. The most effective concentration of TiO_2 by UV irradiation with respect to its photocatalytic bactericidal effect on *S. mutans* was $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. The antibacterial effect of TiO_2 was strongly influenced by its concentration and irradiation time.
2. According to wavelength antibacterial activity was compared that wavelength shorter and increasing irradiation time showed that the antibacterial activity increased.
4. At 20 min irradiation time, QLF-D by the UV lamp showed antibacterial activity approximately 54.34%. When 30 min irradiation time, 94% antibacterial activity showed of UV light a similar effect ($p=0.818$). In the case of UV light, *S. mutans* was completely killed at 20 min irradiation time. In the case of QLF-D, *S. mutans* was completely killed at 40 min irradiation time.

As a result of the study, *S. mutans* growth was inhibited by irradiation with UV lamp (254 nm), QLF-D (405 nm) at $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ concentration of TiO_2 . Therefore,

photocatalytic reaction of TiO_2 could be applied in clinical field if it is confirmed the effectiveness on plaque biofilm model.

Key word : Photocatalytic, Wavelength, *Streptococcus mutans*, TiO_2