

*Candida albicans*에 대한 중성 전기분해수소수의 항진균 효과

박미정¹, 최연희¹, 송근배¹, 김은경²경북대학교 ¹치과대학 예방치과학교실, ²과학기술대학 치위생학과

Antifungal effects of hydrogen water on the growth of *Candida albicans*

Mi-Jung Park¹, Youn-Hee Choi¹, Keun-Bae Song¹, Eun-Kyong Kim²¹Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu,²Department of Dental Hygiene, College of Science & Technology, Kyungpook National University, Sangju, Korea**Received:** September 4, 2019**Revised:** October 29, 2019**Accepted:** November 11, 2019**Corresponding Author:** Eun-Kyong Kim
Department of Dental Hygiene, College of
Science & Technology, Kyungpook
National University, 2559 Gyeongsang-
daero, Sangju 37224, Korea
Tel: +82-54-530-1423
Fax: +82-54-530-1429
E-mail: jinha01@naver.com

https://orcid.org/0000-0001-9582-1415

*이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로
한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사
업임(No.2017R1D1A1B03031243).**Objectives:** This study assessed the antifungal effects of neutral electrolysis hydrogen water, an agent known for its oral anti-bacterial effects on the growth of *C. albicans* *in vitro*.**Methods:** Hydrogen water, denture cleansing agent, and Listerine® were compared to a tap water control. We serially cultured *C. albicans* KCTC 27239 in SD media to analyze the inhibitory effect of each treatment on growth. We evaluated the data using repeated-measures ANOVA test and one-way ANOVA test, and a significant difference was defined as $P < 0.05$.**Results:** Hydrogen water significantly inhibited the growth, but not the biofilm formation, of *C. albicans* compared to tap water control at 1-, 5-, and 10-minute time points ($P < 0.05$).**Conclusions:** The growth of *C. albicans* was slower in hydrogen water than in tap water, thereby suggesting an inhibitory effect of hydrogen water. Hydrogen water may, therefore, be utilized as an antibacterial and preventive agent without any harmful effect on denture and oral tissues.**Key Words:** Antifungal effect, *Candida albicans*, Hydrogen water

서론

*Candida albicans*는 건강한 사람의 점막에 흔히 상재하는 진균성 병원체로, *Candida*종 중에서 가장 독성이 강한 것으로 알려져 있고, 심각한 질환에 걸렸거나 면역력이 약화된 환자에게 점막 또는 피부부를 통한 감염을 유발할 수 있는 기회 감염균이다¹⁾. 인구의 30-50% 정도에서 감염을 일으키지 않은 상태로 구강에 존재하는 것으로 알려져 있으나 당뇨, 악성종양, HIV 감염, 고령, 영양결핍, 광범위 항생요법, 구강건조증, 흡연, 의치 및 보철 장치 등에 따라 구강 건강에 악영향을 끼칠 수 있게 된다²⁾. 구강 캔디다증의 증상으로는 작열통, 압통, 입맛의

변화, 자극성 음식 섭취 시 불편감, 연하곤란 등이 있으며 의치 구내염(denture stomatitis)은 일반적으로 의치를 장착한 노인의 2/3 정도에서 나타나는 의치 지지조직의 캔디다 감염이다^{3,4)}. 이는 의치 장착자의 약 60-65%가 겪는 염증성 질환으로⁴⁾ 대체로 증상이 없으나 의치 구내염 환자의 28% 내지 70%에서 점막 출혈 및 증식, 작열감 혹은 동통, 구취, 불편한 미각, 구강건조 등을 호소한다⁵⁾.

이러한 캔디다 감염을 예방하기 위하여 항균작용이 있는 구강양치액이나 의치세정제를 사용하여 왔다⁵⁾. 항균작용이 있는 구강양치액의 경우 장기간 사용 시 내성균을 만들거나, 균교대증과 같은 부작용을 일으킬 수 있으며 알코올을 함유한 경우 구강건조증 등을 유발할 수

있으므로 장기간의 주기적 사용이 권장되지 않는 경우가 있다⁶⁾. 또한 시판 중인 의치세정제를 기계적, 화학적 세척과 병행하여 사용할 경우 캔디다 균을 포함한 유해한 세균을 효과적으로 제거하는 것으로 알려져 있으나 우발적으로 음용 시 심각한 부작용을 유발할 수 있으므로 중증질환을 가진 노인의 경우 사용에 주의가 필요하다^{7,8)}. 이러한 이유로 좀 더 안전하고 효과적으로 캔디다 균을 제거할 수 있는 유기산이나 오존수와 같은 새로운 의치세정제가 연구되고 있다⁹⁾.

최근 수소분자를 풍부하게 포함한 수소수가 인체에 유익한 기능을 하는 것으로 알려지고 있다¹⁰⁾. 수소수에 함유된 수소분자는 인체 내에서 산화환원작용을 통해 활성산소와 결합하여 소변으로 배출시키는 항산화 작용과 건강에 유해한 세균을 제거하는 항균작용을 하는 것으로 보고되었다¹¹⁻¹³⁾. 수소수는 다양한 방법으로 제조가능한데 이 중 전기분해수소수는 물을 전기분해하여 수소를 생성시키는 방식으로 제조되며, 물의 성분이나 전극, 격막방식에 따라 산성 또는 중성을 나타낼 수 있다¹⁴⁾. 산성 전기분해수의 경우 박테리아에 대한 항균작용과 바이오필름 제거, 성장 억제 효과에 대한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 또한 중성의 전기분해수소수는 주요 충치 유발균인 *Streptococcus mutans* 균의 치아 부착 억제에 효과적이고 음용 시에도 인체에 무해하므로 어린이를 포함하여 장애인 또는 뇌혈관질환 등으로 빨기 기능이 어려운 환자 또는 노인환자 등에게 안전하게 사용할 수 있다¹⁶⁾. 이러한 수소수의 구강세균에 대한 효과를 고려하여, 이번 연구에서는 중성 전기분해수소수(이하: 수소수)의 *C. albicans*에 대한 항진균 효과 및 바이오필름 내의 *C. albicans* 성장 억제 효과를 평가하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험 균주 및 배양

한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받은 *Candida albicans* KCTC 27239을 Saubouraud's dextrose (SD, KisanBio, Seoul, Korea)와 8% glucose (D-glucose, minimum 99.5%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다¹⁷⁾. *C. albicans*는 SD 한천배지에 접종하여 37°C에서 호기 상태로 48시간 동안 배양한 후 집락을 채취하여 SD 액체 배지에 접종하였으며 37°C에서 호기 상태로 24시간 동안 배양 후 계대 배양하여 12시간 활성화 한 후 대수증식기에 있는 균주를 균감소를 실험에 사용하였다. 그리고 바이오필름 생성을 위해 8% glucose가 포함된 SD 액체 배지에 집락을 접종하여 37°C에서 호기 상태로 24시간 동안 배양하였다¹⁷⁾.

2. 수소수 제작

수돗물 300 ml를 무격막 수소수생성기(Natural gargle & denture plus, Ebioteco, Seoul, Korea)에 넣고 DC 24 V 전압을 공급하여 5분 동안 실온에서 동작시켜 중성의 전기분해수소수를 생성시켰다. 생성된 수소수는 여과하여 10분 내에 사용하였다.

3. 중성 전기분해수소수의 *C. albicans*에 대한 항진균 효과

C. albicans 집락을 SD 액체 배지에 접종 후 37°C에서 하룻밤 동안 배양 후 의료용효소분석기(OASYS UVM340, Biochrom, Salz-

burg, Austria)를 사용하여 흡광도가 550 nm에서 0.5임을 확인 후 실험을 시작하였다. 원심분리(12,000 rpm x g for 3 min at 4°C) 하여 수거한 *C. albicans*를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)을 이용하여 세척하고 다시 원심분리를 이용하여 *C. albicans* 균을 수거하였다. 이 후 1 ml의 수돗물, 수소수, 의치세정제(좋은습관®, 동화약품, Korea), 리스테린(리스테린®, Johnson & Johnson, Thailand)을 각각 1, 5, 10분간 접촉시키고, 즉시 SD 액체 배지를 사용하여 10⁰에서 10⁸ 까지 연속 희석하였다. 100 µl의 희석된 현탁액을 SD 한천배지에서 37°C에서 48시간 동안 배양하여 colony forming unit (CFU)을 측정하였다. 위 과정을 3회 반복 시행하였다.

4. Biofilm 내 *C. albicans*의 성장 억제 효과

활성화 된 *C. albicans* 균주를 8%의 glucose가 포함된 SD 액체 배지에 접종 후 37°C에서 2시간 배양시켰다. 이후 12-well plate에 인공타액을 도포 후 30분간 건조시키고 *C. albicans*가 배양된 SD 액체 배지를 각 well에 1 ml씩 주입하였으며, 이 후 3일간 24시간마다 8%의 glucose가 포함된 SD 배양액을 교체해 주면서 well 표면에 바이오필름이 형성되도록 하였다. 3일 후 상층액은 조심스럽게 제거 한 뒤 PBS를 이용하여 5분간 1회 well을 세척하여 부유된 세균을 제거하였다. 이 후 각 well에 형성된 바이오필름에 수돗물, 수소수, 의치세정제, 리스테린을 각각 1, 5, 10분간 접촉시킨 후, 다시 8%의 glucose가 포함된 SD 배양액을 1 ml 주입한 후 24시간마다 배지를 교체 하여 48시간 배양하였다. 이후 well 표면에 형성된 바이오필름을 수거하기 위해 상층액은 조심스럽게 제거 한 뒤 PBS를 이용하여 1회 세척하고 각 well에 Crystal violet으로 염색과 건조를 거친 이후, 10% acetic acid를 이용하여 바이오필름을 추출하여 흡광도를 측정하였다. 위 과정을 3회 반복 시행하였다.

5. 통계분석

수소수의 *C. albicans*에 대한 항진균 효과와 바이오필름 내 *C. albicans* 성장 억제 효과를 비교하기 위하여 결과간의 정규성을 확인하여 모수적 검정을 시행하였다. 시료에 따른 항진균 효과 차이는 일원배치분산분석 후, Tukey test로 사후분석을 시행하였고, 처리시간에 따른 항진균 효과를 비교하기 위하여 반복측정 분산분석 후, Bonferroni로 사후분석을 시행하였다. 통계분석은 IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하고 유의수준은 5%로 설정하였다.

연구 성적

1. *C. albicans*의 성장곡선

*C. albicans*에 수소수, 수돗물, 의치세정제, 리스테린을 각각 5분씩 처리하여 성장곡선을 관찰한 결과이다(Fig. 1). 리스테린을 제외한 나머지 세 군의 성장곡선에서 정체가 흡광도가 유사한 것을 확인할 수 있었다.

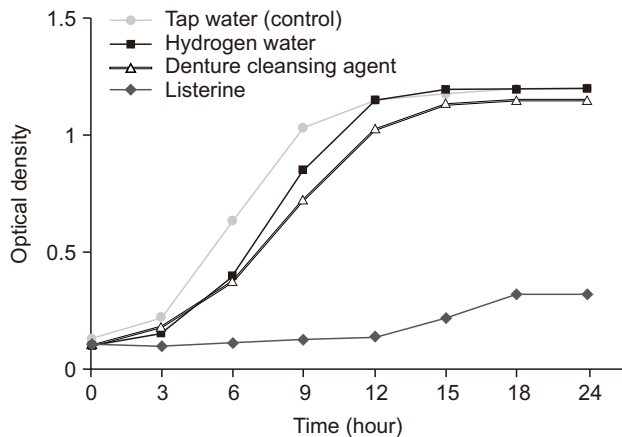


Fig. 1. Intervention growth curve of *C. albicans*. *C. albicans* growth curve of exponential growth phase.

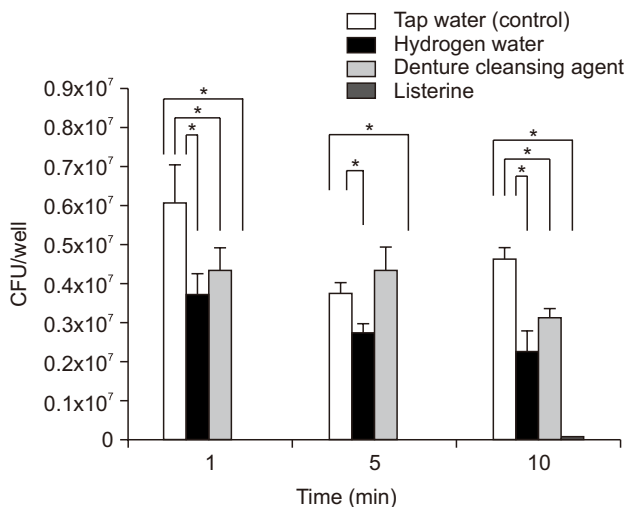


Fig. 2. Antifungal effect of the various rinsing water against *C. albicans* according to processing time. The data were analysed by one-way ANOVA test and denoted by Tukey's post-hoc analysis. * Indicates a significant difference compared with control ($P < 0.05$).

2. 중성 전기분해수소수의 *C. albicans*에 대한 항진균 효과

Fig. 2는 수소수의 *C. albicans*에 대한 항진균 효과에 대해 실험한 결과이다. 처리시간에 따른 각각의 시료들 간 진균 수의 변화량 비교에서는 1분 동안처리 시 수돗물과 수소수 처리군, 수돗물과 의치세정제 처리군, 수돗물과 리스테린 처리군, 수소수와 리스테린 처리군, 의치세정제와 리스테린 처리군에서 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다($P < 0.05$), 5분 처리 시 비교에서는 수돗물과 수소수 처리군, 수돗물과 의치세정제 처리군, 수돗물과 리스테린 처리군, 수소수와 의치세정제 처리군, 수소수와 리스테린 처리군, 의치세정제와 리스테린 처리군에서 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다($P < 0.05$). 그리고 10분 처리 시 진균 수의 변화량 비교에서는 수돗물과 수소수 처리군, 수돗물과 의치세정제 처리군, 수돗물과 리스테린 처리군, 수소수와 리스테린 처리군, 의치세정제와 리스테린 처리군에서 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었으나($P < 0.05$), 1분과 10분 비교에

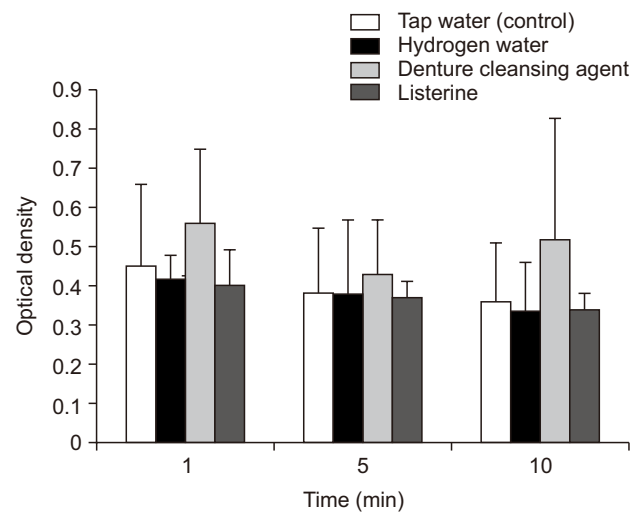


Fig. 3. Antifungal effect of the various rinsing water against *C. albicans* biofilm according to processing time. The data were analysed by one-way ANOVA test and denoted by Tukey's post-hoc analysis.

서 수소수와 의치세정제 처리군의 진균 수 변화량은 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P > 0.05$). 수소수의 경우 처리 시간의 증가(1분, 5분, 10분)에 따라 항진균 효과가 증가하였으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$, Data not shown).

3. Biofilm 내의 *C. albicans*에 대한 중성 전기분해수소수의 항진균 효과

수소수의 *C. albicans* biofilm 내 *C. albicans* 성장 억제 효과에 대해 실험한 결과이다(Fig. 3). *C. albicans* 바이오필름에 수소수를 처리하였을 때 대조군인 수돗물에 비하여 흡광도는 감소하였지만 통계적으로 유의한 차이는 없었고($P > 0.05$), 의치세정제, 리스테린 처리군 모두 대조군인 수돗물과 비교하였을 때도 흡광도의 변화량에서는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다($P > 0.05$). 수소수와 의치세정제, 리스테린 처리군 간에서도 흡광도 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($P > 0.05$). 그리고 수돗물, 수소수, 의치세정제, 리스테린의 1분 처리군 간의 비교, 5분 처리군 간의 비교, 10분 처리군 간의 흡광도 비교 결과 역시 통계적으로 유의하지 않았으며($P > 0.05$), 또한 각각의 수돗물, 수소수, 의치세정제, 리스테린의 처리 그룹 내에서의 1분, 5분, 10분 처리 시의 흡광도의 평균 간 차이는 있었지만 통계적으로 유의하지 않았다($P > 0.05$, Data not shown).

고 안

이번 연구에서는 중성 전기분해수소수, 수돗물, 의치세정제, 리스테린을 *C. albicans*와 각각 1분, 5분, 10분 간 접촉한 후 항진균 효과를 비교하였다. 처리시간은 구강가글제로서의 평가를 위하여 시판 중인 구강가글제 사용법에서 추천 가글 시간인 1분을 적용하였으며, 의치세정제로서의 평가를 위하여 의치 미생물에 대한 세정효과에 관한 연구¹⁸⁾에서 적용한 5분을 선택하였고, 5분 이상 사용 시 효과가 있는

지를 평가하기 위하여 10분 처리를 시행하였다.

수소수를 1분, 5분, 10분간 *C. albicans*에 처리하였을 때, 대조군인 수돗물에 비하여 통계적으로 유의한 항진균 효과가 있었다 ($P<0.05$). 수소수와 *C. albicans*의 접촉 시간이 1분, 5분, 10분으로 증가함에 따라 집락형성을 감소시켰으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 리스테린 처리군과 비교 시 리스테린이 수소수에 비해 항진균 효과가 더 우수하였다($P<0.05$). 바이오필름 내 *C. albicans* 성장 억제 효과는 대조군인 수돗물에 비하여 수소수, 의치세정제, 리스테린 처리군에서 모두 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 또한 각 처리군 내에서 처리 시간에 따른 바이오필름 내 *C. albicans* 성장 억제 효과 또한 유의한 차이가 없었다. 수소수는 수돗물보다 *C. albicans*에 대한 항진균 효과가 있고, 접촉시간이 10분 이내일 경우 시판용 의치전용 세정제에 비해 항진균 효과가 우수하였다.

수돗물을 전기분해할 경우 자유 염소이온(free chlorine), 활성 산소(reactive oxygen), 활성 수소(reactive hydrogen) 등이 생성되어 세균막의 세포막에 손상을 주어 항균 능력을 나타내는 것으로 알려져 있다¹⁹. 특히, 음극에서 생성되는 산성의 전기분해수소수의 경우 강한 항균작용을 보이나 낮은 pH로 인해 구강에 직접 적용하거나 구강장치물에 사용하기에는 부적절한 면이 있었다²⁰. 그러나 이번 연구에서 사용된 전기분해수소수의 경우 중성의 pH로 구강에 직접 적용 가능한 장점이 있다.

노인의 경우 일반적으로 인지력 저하, 시력의 감퇴, 손놀림의 부자유 등으로 인해 의치 관리 및 세정능력이 떨어지므로 간편하게 사용할 수 있는 화학적 의치세정제가 필요하나 세정제의 음용사고 발생 시 이로 인한 독성이 크고 장기간 사용 시 경제적 부담 증가 등으로 인해 의치를 잘 관리하는데 어려움이 많다²¹. 반면에 전기분해수소수는 수돗물을 전기분해하기 때문에 가정에서 전용제조기를 통해 쉽게 제조 가능하고 또한 안정성이 높아 삼켜도 인체에 무해하므로 기존의 의치세정제에 비해 장점이 있다고 할 수 있다²².

이 연구의 한계점으로는 첫 번째, 수소수의 바이오필름 내 *C. albicans* 성장 억제 실험 결과에서 통계적으로 유의미한 차이를 관찰하지 못하였는데, 이는 바이오필름 내부에 있는 *C. albicans*의 경우 수소수의 침투가 어려우므로 수돗물에 비해 유의한 차이가 없었던 것으로 생각된다. 의치세정제, 리스테린에서도 동일한 이유로 수돗물에 비해 유의한 차이가 없었던 것으로 유추된다. 그러므로 최대의 항진균 효과를 위해 의치의 기계적 세정이 병행되는 것이 바람직하리라 판단된다. 두 번째로 수소수를 10분 이내로 처리한 점을 들 수 있다. 구강가글 시 대체로 1분 정도 소요되므로 1분, 5분, 10분으로 처리하여 실험을 진행하였으나 처리시간이 증가할수록 증가된 항진균 효과를 보였으므로 향후 최고의 항진균 효과를 위한 최적의 처리시간에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

그럼에도 불구하고 충치유발균에 대한 연구에 비해 전기분해수소수를 이용하여 *C. albicans*에 대한 항진균 효과 및 바이오필름 내의 성장 억제 효과에 관한 보고는 많지 않다⁵. 그러므로 이번 연구결과를 통해 중성의 전기분해수소수의 구강가글 및 의치세정제로써의 효과를 평가하는데 기여하였다고 판단되며 이러한 연구결과를 바탕으로 전기분해수소수의 항진균 기능에 대한 보다 심도 있는 연구가 필요하리라 검토되었다.

결론

중성 전기분해수소수의 *C. albicans*에 대한 항진균 효과 및 바이오필름 내 *C. albicans* 성장 억제 효과 평가를 통해 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 중성 전기분해수소수의 *C. albicans*에 대한 항진균 효과는 1분, 5분, 10분 처리군 모두 수돗물에 비해 우수하였으며 시판 중인 의치세정제와 유사하였다.

2. 중성 전기분해수소수의 *C. albicans*에 대한 항진균 효과는 처리시간이 증가함에 따라 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

3. *C. albicans* 바이오필름 내 *C. albicans* 성장 억제 효과는 대조군(수돗물), 수소수, 의치세정제, 리스테린에서 1분, 5분, 10분간 비교에서 처리시간에 따른 감소 경향은 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

ORCID

Mi-Jung Park, <https://orcid.org/0000-0002-1379-2057>

Youn-Hee Choi, <https://orcid.org/0000-0001-5712-8097>

Keun-Bae Song, <https://orcid.org/0000-0002-5416-5500>

References

1. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. J Oral Rehabil 1987;14:217-227.
2. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol 2001;9:327-335.
3. Shafer WC, Hine MK, Levy BM. A textbook of oral pathology. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co.;1983:393-397.
4. Budtz-Jørgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. Community Dent Oral Epidemiol 1975;3:115-119.
5. Stohler C. Etiology and occurrence of denture stomatitis: a review of the literature. Schweiz Monatsschr Zahnmed 1984;94:187-194.
6. Kim YJ. Pathogenic microorganisms & antibiotics. Seoul: World science;2010:349-354.
7. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. J Oral Rehabil 2007;34:606-612.
8. Murdoch-Kinch CA, Mallatt ME, Miles DA. Oral mucosal injury caused by denture cleanser tablets: a case report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995;80:756-758.
9. Izumi S, Ryu M, Ueda T, Ishihara K, Sakurai K. Evaluation of application possibility of water containing organic acids for chemical denture cleaning for older adults. Geriatr Gerontol Int 2016;16:300-306.
10. Zhang JY, Liu C, Zhou L, Qu K, Wang R, Tai MH, et al. A review of hydrogen as a new medical therapy. Hepatogastroenterology 2012;59:1026-1032.
11. Jeng ES, Kim DH, Lee KJ. The antioxidative effect of hydrogen water drinking in blood. Korean J Waters 2016;5:25-28.
12. Lee SH, Baek DH. Antibacterial activity of hydrogen-rich water against oral bacteria. Int J Oral Biol 2013;38:81-85.
13. Pyo KR, Yoo YS, Baek DH. Antifungal effect of electrolyzed hydrogen water on *Candida albicans* biofilm. J Dent Rehabil Appl Sci

- 2015;31:212-220.
14. Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies. *Catal Today* 2009;139:244-260.
15. Waters B, Amazonas M, Hung YC. Electrolyzed oxidizing water generation methods. *J Funct Water* 2012;7:1-13.
16. Kim J, Lee HJ, Hong SH. Inhibition of streptococcal biofilm by hydrogen water. *J Dent* 2017;58:34-39.
17. Weerasekera MM, Wijesinghe GK, Jayarathna TA, Gunasekara CP, Fernando N, Kottegoda N, et al. Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016;111:697-702.
18. Kim YM, Choi YS, Cho IH. Cleansing effect of the alkaline ionized water on microorganisms of the denture surface. *J Korean Acad Prosthodont* 2011;49:138-144.
19. Kiura H, Sano K, Morimatsu S, Nakano T, Morita C, Yamaguchi M, et al. Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration. *J Microbiol Methods* 2002;49:285-293.
20. Nakagawara S, Goto T, Nara M, Ozawa Y, Hotta K, Arata Y. Spectroscopic characterization and the pH dependence of bactericidal activity of the aqueous chlorine solution. *Anal Sci* 1998;14:691-698.
21. Baran I, Nalçacı R. Self-reported denture hygiene habits and oral tissue conditions of complete denture wearers. *Arch Gerontol Geriatr* 2009;49:237-241.
22. Saitoh Y, Harata Y, Mizuhashi F, Nakajima M, Miwa N. Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Toxicol Ind Health* 2010;26:203-216.