

Streptococcus salivarius 119의 인공치태 억제효과에 대한 연구

이민하 · 양규호 · 오종석*

전남대학교 치과대학 소아치과학교실, 의과대학 미생물학교실*

국문초록

경조직 우식으로 발생하는 치아우식증은 다인성 질환으로서 치태내 세균중에서도 *Streptococcus mutans*가 주 원인균이며, 치면에 부착, 증식 및 산생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발한다. *Streptococcus salivarius*는 사람의 구강에 정상적으로 존재하는 세균이다. 본 연구에서는 소아의 구강으로부터 분리된 *Streptococcus salivarius* 119의 특성과 *Streptococcus mutans* 및 *Streptococcus oralis*에 대한 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Streptococcus mutans*를 일회용 큐벤에서 배양시 550nm에서의 흡광도가 0.327이었으나, *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119의 혼합 배양시에는 0.119로 감소되었다.
2. 비커 와이어 검사에서 *Streptococcus mutans* 배양시 형성된 인공치태 무게는 84.7mg이었으나, *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119 혼합 배양시에는 12.3mg으로 감소되었다.
3. BHI broth에서 배양된 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 가한 비커 와이어 검사에서 형성된 인공치태 무게는 100.5mg인데 반해, 5% 자당이 함유된 BHI broth에서 배양된 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 가한 비커 와이어 검사에서는 20.4 mg이었다.
4. *Streptococcus oralis*와 *Streptococcus salivarius* 119 단독 배양시에는 각각 ml당 4.8×10^7 , 7.5×10^8 이었으나, 혼합 배양시에는 *Streptococcus oralis*는 4.2×10^7 , *Streptococcus salivarius* 119는 5.8×10^7 으로 감소하였다.
5. *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 thin layer chromatography를 실시한 결과, *Streptococcus salivarius* 119가 형성한 polymer는 글루칸이었다.
6. *Streptococcus salivarius* 119가 만드는 글루칸을 처리하여 thin layer chromatography를 실시한 결과, 1-6 결합이 주된 결합인 수용성 글루칸이었다.

이상의 결과를 종합하면 구강에서 분리된 *Streptococcus salivarius* 119에 의한 *Streptococcus mutans*의 인공치태 형성 억제작용은 수용성 글루칸 형성에 의한 것으로 사료되었다.

주요어 : 치태, 글루칸, 치아우식증

I. 서 론

구강 보건의 향상에도 불구하고 치아우식증은 현재도 빈발하는 구강내 만성 감염성 질환이다. 치아우식증 발생에 치태가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 이는 치태에 존재하는 세균들이 여러 가지 헤로운 대사산물을 만들기 때문이다¹⁾. 1924년 Clarke²⁾가 최초로 치태로부터 *Streptococcus*를 분리하여 *Streptococcus mutans*라 명명한 이래, 치아우식증의 발생에 있어서 가장 중요한 원인균으로 여겨지고 있다³⁻⁵⁾.

*Streptococcus mutans*는 세균 외부로 glucosyltransferase를 분비하여 자당으로 부터 점착성의 비수용성 다당류인 글루칸

(glucan)을 합성한다. 이 글루칸은 치태의 기본물질이 되어 *Streptococcus mutans*의 글루칸 수용체와 결합하여 치아 표면에 세균이 부착되도록 도와 준다. 치태내의 *Streptococcus mutans*는 탄수화물의 대사과정에서 다량의 유산을 생성하여 치아 표면을 탈회시킴으로써 치아우식증을 유발한다⁶⁾.

*Streptococcus mutans*가 구강내 치태를 형성하는 동안 *Streptococcus oralis*를 위시한 구강내 일부 세균들은 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제함으로써 치태형성을 저지하는 역할을 하게 된다^{7,8)}.

*Streptococcus mutans*에 의한 치아우식증을 예방하기 위하여 약제의 도포 및 양치 등이 연구되어 왔으나⁹⁻¹⁹⁾, 장기적인 효과

는 기대할 수 없어 정상적으로 존재하는 구강내 상주균을 이용하여 치아우식증을 예방하고자 하는 대치요법에 대한 연구가 보고되고 있다²⁰⁻²⁵. 이러한 연구의 시작은 효과적인 대치 세균을 분리하는데 있다. *Streptococcus mutans*의 돌연변이종으로 탄수화물 대사에 결함이 있거나²², lactate dehydrogenase 활성이 부족하여²⁰ 유산을 생성하지 못하는 세균은 치아우식 활성이 낮다는 것이 입증되었고, *Streptococcus mutans*처럼 치면에 집락을 이루고 치태를 형성하나 치아우식증을 일으키지 않는 *Streptococcus salivarius* TOVE-R도 분리되었다^{23,24}. 또한 구강내 *Enterococcus faecalis*는 항균제 기능을 나타내는 bacteriocin을 생성함으로써 연쇄상구균의 증식을 억제하기 때문에 대치 세균으로의 가능성이 있는 것으로 보고되고 있다²⁶.

*Streptococcus salivarius*는 *Streptococcus mutans*와 유전학적으로 가까운 세균으로 자당이 함유된 배지에서 글루칸을 형성한다. *Streptococcus mutans*는 1→3 결합이 주요 결합인 비수용성 글루칸을 형성하는데 비하여, *Streptococcus salivarius*는 주로 프럭탄(fructan)을 생산한다. *Streptococcus mutans*의 비수용성 글루칸 또는 치태 형성 과정에 *Streptococcus salivarius* 대부분이 억제작용을 나타내지 않는다.

본 연구에서는 아동의 구강에서 분리한 *Streptococcus salivarius* 119의 특성과 치아우식증의 발생에 중요한 *Streptococcus mutans*의 치태형성 및 증식에 미치는 영향을 보았으며, *Streptococcus mutans* 증식을 억제하는 세균종 대표적인 세균인 *Streptococcus oralis*의 증식에 대한 영향을 보았다. 또한 *Streptococcus mutans*의 치태형성을 억제하는 *Streptococcus salivarius* 119 생성물질을 thin layer chromatography로 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시세균 배양

Streptococcus mutans serotype c (Ingbritt strain), *Streptococcus oralis* (ATCC 35037, Rockville, MA, U.S.A.)를 공시하였으며, 배양은 동결 건조로 보관중인 세균을 brain heart infusion (BHI, Difco, Detroit, MI, U.S.A.) broth에 접종하여 37°C 배양기에서 배양하였다.

2. 비수용성 글루칸 형성 억제능이 있는 균주의 분리

본 실험에 사용된 비수용성 글루칸 형성 억제능이 있는 균주는 유치원 아동의 타액으로 부터 분리하였다. 이러한 억제능이 있는 균주를 분리하기 위하여 타액을 10⁻⁴으로 희석하여 5% 자당이 첨가된 BHI agar (BHIS agar) 상에 접종하고 37°C, 24시간 배양한 후, 글루칸을 만드는 *Streptococcus* 집락을 선택하였다. BHIS broth에 TES (N-tris(Hydroxy-methyl)-methyl-2-aminoethane-sulfonic acid, Sigma, St. Louis,

MO, U.S.A.) buffer 농도가 0.1 M이 되도록 조정하였다. 그 3ml를 일회용 큐벳에 넣고 50μl의 *Streptococcus* 배양액과 50μl의 *Streptococcus mutans* 배양액을 접종하였다. 대조군에서는 *Streptococcus mutans* 배양액만 접종하였다. 이것을 배양기안에 수평면에 대하여 30° 각도로 설치하고 37°C에서 2일간 배양하였다. 내용물을 제거하고 4ml의 증류수로 세척한 후, 3ml의 증류수를 가하여 분광광도계 550nm 파장에서 흡광도를 측정하여 *Streptococcus mutans*에 의한 비수용성 글루칸 형성 억제능이 있는 집락을 선택하였다.

3. 분리균주의 동정

비수용성 글루칸 형성 억제능이 있는 분리균주의 형태학적, 생물학적, 생화학적 성질 등은 Bergey's manual of systematic bacteriology에 있는 방법²⁷으로 검사하였다. 분리균주는 BHI broth에 배양한 후 glycerol의 최종농도가 20% (w/v) 되도록 첨가하여 -70°C에 냉동 보관하면서 필요에 따라 재접종, 배양한 후 실험에 사용하였다. 본 실험에서는 API 20S kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하여 분리된 세균을 동정하였다. 검사 방법은 단일 집락만을 증류수에 현탁해서 BHI agar 상에 접종하여 37°C, 24시간 배양하였다. 멸균된 면봉으로 증식된 세균을 취해서 증류수에 현탁하여 Macfarland scale #5로 조정하였는데, 이는 분광 광도계 550nm에서의 흡광도 1.5와 같았다. 세균의 탁도를 조정한 후 API 20S kit에 세균액을 접종하고 37°C에서 4시간 배양하였다. 반응액을 첨가해서 기질의 색깔 변화와 당의 산성화를 관찰하였다. 정확한 동정을 위해 24시간 후 재판독하였다. 분리된 *Streptococcus salivarius*를 *Streptococcus salivarius* 119로 명명하였다.

4. 일회용 큐벳에서의 비수용성 글루칸 형성 억제실험

BHIS broth에 TES buffer 농도가 0.1 M이 되도록 조정한 3ml를 일회용 큐벳에 넣고 50μl의 *Streptococcus salivarius* 119 배양액과 50μl의 *Streptococcus mutans* 배양액을 접종하였다. 대조군에서는 *Streptococcus mutans* 배양액만 접종하였다. 이것을 배양기안에 수평면에 대하여 30° 각도로 설치하고 37°C에서 1일간 배양하였다. 내용물을 제거하고 4ml의 증류수로 세척한 후, 3ml의 증류수를 가하여 분광광도계 550nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이것을 3회 반복하여 측정한 후 평균을 구하였다.

5. *Streptococcus salivarius* 119가 *Streptococcus mutans*의 인공 치태 형성과 생균수에 미치는 영향

BHIS broth에 0.1 M TES buffer를 첨가하여 pH를 7로 조정하는 다음, 비커에 40ml씩 준비하였다. 여기에 *Streptococcus*

*mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119를 각각 2×10^8 씩 접종하고 0.016 inch 스테인레스스틸 재질의 교정용 wire (Ormco, Glendora, CA, U.S.A.)를 50mg 내외가 되게 준비하여 3개씩 비커에 매달아 배지에 잠기도록 하였다. 대조군에서는 *Streptococcus mutans*만 접종하였다. 37°C 배양기에서 회전시키면서 15시간 배양한 후, 3개의 wire 상에 형성된 인공 치태의 무게를 평균하였다. 동시에 세균배양액을 회석하여 BHI agar 상에 접종하여 37°C 배양기에서 18시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

6. *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액이 *Streptococcus mutans*의 인공 치태 형성과 생균수에 미치는 영향

BHI broth와 BHIS broth에 0.1 M TES buffer를 첨가하고 pH를 7로 조정하여 *Streptococcus salivarius* 119를 배양한 다음, 3,000×rpm으로 20분간 원심하여 상청액을 얻어 끓는 물에 3분간 방치하여 상청액내에 남아 있는 세균을 사멸시켰다. 배양 상청액 20ml와 BHIS broth 20ml를 비커에 준비하였다. 여기에 *Streptococcus mutans*를 2×10^8 씩 접종하고 0.016 inch 스테인레스스틸 재질의 교정용 wire (Ormco, Glendora, CA, U.S.A.)를 50mg 내외가 되게 준비하여 3개씩 비커에 매달아 배지에 잠기도록 하였다. 대조군에서는 *Streptococcus mutans*만 접종하였다. 37°C 배양기에서 회전시키면서 15시간 배양한 후, 3개의 wire 상에 형성된 인공 치태의 무게를 평균하였다. 동시에 세균배양액을 회석하여 BHI agar 상에 접종하여 37°C 배양기에서 18시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

7. *Streptococcus salivarius* 119와 *Streptococcus oralis*와의 상호작용

BHIS broth에 0.1 M TES buffer를 첨가하여 pH를 7로 조정한 다음, 그 1ml에 *Streptococcus salivarius* 119와 *Streptococcus oralis* 배양액 각각 0.01ml를 접종하였다. 37°C 배양기에서 15시간 배양한 후, 세균배양액을 회석하여 BHI agar 상에 접종하고 37°C 배양기에서 18시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

8. *Streptococcus salivarius* 119 배양액의 성분 검사

Streptococcus salivarius 119를 BHIS broth에서 36시간 배양한 후, 원심하여 상청액을 얻었다. 상청액에 67% ethanol 용액을 가하여 섞고 원심한 다음, 상청액을 버렸다. 같은 조작을 2번 반복하고 원심하여 남은 침전물을 80°C oven에서 가열하였다. 침전물을 증류수에 녹인 것과 침전물을 1 M HCl 용액을 가하여 121°C oven에서 20분간 방치한 것을 포도당, 과당, 자당과 함께 silica gel에서 thin layer chromatography를 실시하였다. 이때 developer로 85% acetonitrile액을 사용하고

발색제로 5% H₂SO₄와 300mg/L α -naphthol이 든 methanol을 사용하여 121°C oven에서 10분간 방치하였다.

9. *Streptococcus salivarius* 119가 만드는 글루칸에 대한 thin-layer chromatography 검사

Streptococcus salivarius 119가 만드는 글루칸을 진공 건조한 5mg에 0.2ml의 DMSO를 가하여 80°C 수조에서 약 2시간 녹였다. 0.2ml의 Hakomori액을 가하여 잘 흔들어 섞은 후, 약 2시간 실온에 방치하였다. Hakomori액은 sodium hydride를 n-pentane으로 3차례 씻고 DMSO를 가한 후, 50°C로 가열하고 2~4시간 sonication한 다음, mineral oil을 가하여 제조하였다. Hakomori액을 가한 시료에 0.2ml의 methyl iodide를 가하여 30분 방치한 후, glass cap tube에 옮겨 3ml 증류수, 2ml chloroform, 1ml methanol을 가하여 강하게 섞어 주었다. 20~30분 후 층분리가 확인되면 윗층만 뽑아버리고 다시 3ml의 증류수로 2차례 추출하였다. 추출물을 sodium sulfate anhydrous 0.35g을 첨가하여 1시간 방치하고 오일층을 걷어낸 후, 55mm 여과지에 여과시켰다. Chloroform층을 공기로 말린 후 증류수 0.5ml와 trifluoro-acetic acid (99%) 0.5ml를 가하여 121°C에서 2시간 고압멸균하여 산 가수분해시키고 동결 건조장치에서 말린 다음, 0.01ml의 methanol에 녹였다. 이것을 silica gel에서 thin layer chromatography를 실시하였다. 이때 전개용매로 3 : 9 : 1의 acetonitrile : chloroform : methanol 액을 사용하였고 발색제로 5% H₂SO₄와 300mg/L α -naphthol이 든 methanol을 사용하여 121°C oven에서 10분간 방치하였다. 대조군으로 α 1→4 linkage를 갖는 maltotriose와 α 1→6 linkage를 갖는 gentiobiose를 사용하였다. Maltotriose와 gentiobiose를 같은 방법으로 methylation시키고 thin-layer chromatography를 실시하였다.

III. 성 적

1. 분리균주의 당발효 및 생화학적인 특성

분리균주를 BHI agar 상에 배양하였을 때, 백색의 집락을 형성하였다(Fig. 1). 분리균주를 API 20S kit를 사용하여 당발효 검사를 실시한 결과, sorbitol, lactose, raffinose, amido/starch를 분해하고 ribose, arabinose, mannitol, trehalose, inulin, glycogen은 분해하지 못하였다(Table 1). Voges-Proskauer 검사, β -glucuronidase 검사, β -galactosidase 검사, alkaline phosphatase 검사에서 양성을 보였고, hippurate 분해검사, pyrrolidonylarylamidase 검사, α -galactosidase 검사, β -glucosidase 검사, leucine arylamidase 검사 및 arginin dehydrolase 검사에는 음성을 보였다(Table 2). 이러한 당발효 및 생화학적 특성으로 분리균주를 *Streptococcus salivarius* 119로 명명하였다.

2. 일회용 큐벳에서의 비수용성 글루칸 형성 억제

Streptococcus mutans 단독 배양시에 비교하여 *Streptococcus salivarius* 119와의 혼합 배양시에는 일회용 큐벳면에 비수용성 글루칸 형성이 감소되었다(Fig. 2). 분광광도계의 파장 550 nm에서 흡광도는 *Streptococcus mutans* 배양시에는 0.327, *Streptococcus salivarius* 119 배양시에는 0.034, *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119의 혼합 배양시에는 0.119로 되어 (Table 3), 비수용성 글루칸 형성이 억제됨을 알 수 있었다.

Table 1. Carbohydrate fermentation of isolated *Streptococcus salivarius* 119

Carbohydrate	Fermentation reaction
Sorbitol, Lactose, Raffinose, Amidon/starch	Positive
Ribose, Arabinose, Mannitol, Trehalose, Inulin, Glycogen	Negative

Table 2. Biochemical characteristics of isolated *Streptococcus salivarius* 119

Biochemical reaction	sult
Voges-Proskauer reaction, β -glucosidase reaction β -galactosidase reaction, Alkaline phosphatase reaction	Positive
Hippurate hydrolysis reaction, α -galactosidase reaction Pyrrolidonylamidase reaction, α -galactosidase reaction β -glucuronidase reaction, Leucine arylamidase reaction Arginin dehydrolase reaction	Negative



Fig. 1. Morphology of *Streptococcus salivarius* 119 on the brain heart infusion agar.

3. *Streptococcus salivarius* 119가 *S. mutans*의 인공치태 형성과 생균수에 미치는 영향

비커 와이어 검사에서 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119 단독 배양시 형성된 인공치태 무게는 각각 84.7mg, 3.9mg이었다. *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119 혼합 배양시에는 12.3mg으로 현저히 감소되었다(Table 4).

배양 후 생균수 검사를 한 결과, 단독 배양시에는 ml당 5.7×10^8 이었고, *Streptococcus mutans* 119 단독 배양시에는 7.5×10^8 이었다. *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119의 혼합 배양시에는 *Streptococcus mutans*는 2.4×10^8 , *Streptococcus salivarius* 119는 6.4×10^8 이었다(Table 4).

Table 3. Inhibitory activity of isolated *Streptococcus salivarius* 119 on the production of water-insoluble glucan in disposable cuvette

Test bacterial strains	Optical density (550 nm)
<i>S. mutans</i>	0.327
<i>S. salivarius</i> 119	0.034
<i>S. mutans</i> + <i>S. salivarius</i> 119	0.119

Table 4. Inhibitory activity of isolated *Streptococcus salivarius* 119 on the formation of artificial plaque on the orthodontic wires and the replication of *Streptococcus mutans*

Test bacterial strains	Plaque weight(mg)	Viable cells(/ml)	
		<i>S. mutans</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. mutans</i>	84.7	5.7×10^8	
<i>S. salivarius</i>	3.9		7.5×10^8
<i>S. mutans</i> + <i>S. salivarius</i>	12.3	2.4×10^8	6.4×10^8

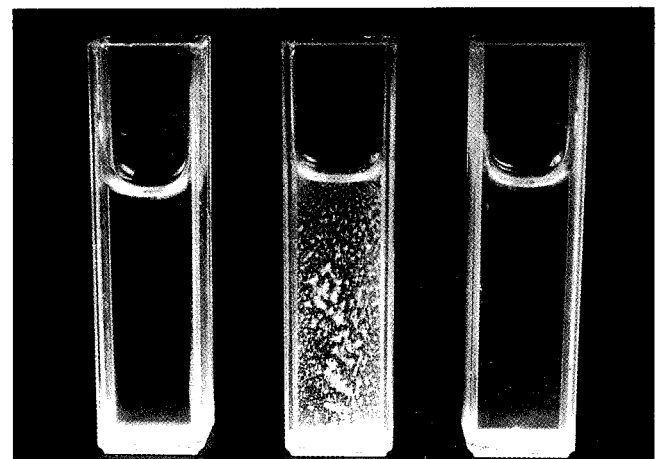


Fig. 2. Effect of *Streptococcus salivarius* 119 on the formation of insoluble glucan by *Streptococcus mutans*. *Streptococcus salivarius* 119 (Left), *Streptococcus mutans* (Middle), or *Streptococcus salivarius* 119 and *Streptococcus mutans* (Right) were inoculated into BHIS broth in the disposable cuvette, respectively.

Table 5. Supernatant of isolated *Streptococcus salivarius* 119 affecting on the formation of artificial plaque on the orthodontic wires and the replication of *Streptococcus mutans*

Sup. of <i>S. salivarius</i>	Plaque weight (mg)	Viable cells of <i>S. mutans</i> (/ml)
Cultured in BHI broth	100.5	5.7×10^8
Cultured in BHIS broth*	20.4	2.0×10^8

* BHIS broth : BHI broth containing 5% sucrose

Table 6. Relation of isolated *Streptococcus salivarius* 119 and *Streptococcus oralis*

Test bacterial strains	Viable cell count (/ml)	
	<i>S. oralis</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. oralis</i>	4.8×10^7	
<i>S. salivarius</i>		7.5×10^8
<i>S. oralis</i> + <i>S. salivarius</i>	4.2×10^7	5.8×10^7

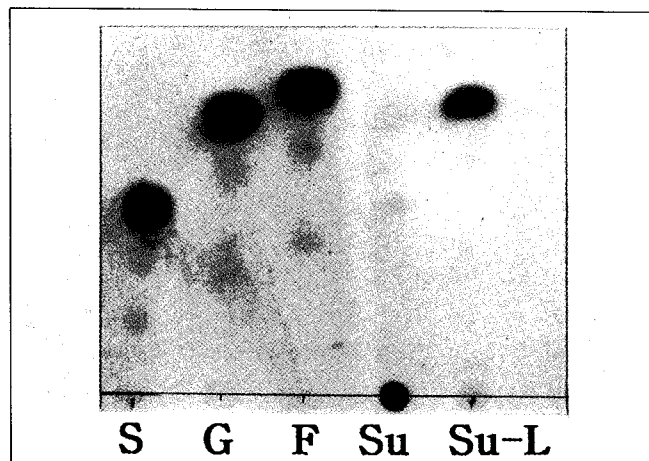


Fig. 3. Thin layer chromatography of products formed by *Streptococcus salivarius* 119. Thin layer chromatography was conducted on silica gel plate using acetonitrile. The supernatant of bacterial culture was treated by 67% ethanol and dried in 80°C oven, leaving the precipitate. The precipitate was added with distilled water (Su) or 1M HCl (Su-L). S, G, and F are sucrose, glucose, and fructose, respectively.

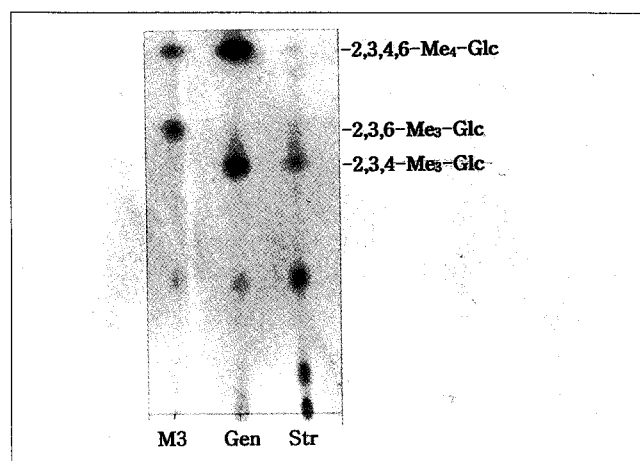


Fig. 4. Thin layer chromatography of glucan formed by *Streptococcus salivarius* 119. Thin layer chromatography was conducted on silica gel plate using 3/9/1 of acetonitrile/chloroform/methanol. The glucan formed by *Streptococcus salivarius* 119 (Str) was methylated. Maltotriose (M3) is a standard carbohydrate containing 1→4 linkage and gentiobiose (Gen) is a standard carbohydrate containing 1→6 linkage.

4. *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액이 *Streptococcus mutans*의 인공치태 형성과 생균수에 미치는 영향

BHI broth와 BHIS broth에서 배양한 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 각각 가한 비커 와이어 검사에서 *Streptococcus mutans*에 의하여 형성된 인공치태 무게는 각각 100.5mg, 20.4mg이었다 (Table 5).

동시에 생균수 검사를 한 결과, BHI broth에서 배양한 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 가한 배지에서 증식한 *Streptococcus mutans*는 ml당 5.7×10^8 이었고, BHIS broth에서 배양한 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 가한 배지에서 증식한 *Streptococcus mutans*는 ml당 2.0×10^8 이었다 (Table 5).

5. *Streptococcus salivarius* 119와 *Streptococcus oralis*와의 상호작용

Streptococcus oralis 단독 배양시에는 ml당 4.8×10^7 이었고, *Streptococcus salivarius* 119 단독 배양시에는 7.5×10^8 이었다. *Streptococcus oralis*와 *Streptococcus salivarius* 119의 혼합 배양시에는 *Streptococcus oralis*는 4.2×10^7 이었으며, *Streptococcus*

salivarius 119는 5.8×10^7 으로 감소하였다 (Table 6).

6. *Streptococcus salivarius* 119 배양액의 성분 검사

Streptococcus salivarius 119 배양 상청액을 thin layer chromatography를 실시한 결과, *Streptococcus salivarius* 119가 형성한 polymer는 글루칸이었다 (Fig. 3).

7. *Streptococcus salivarius* 119 생산 글루칸내 포도당 결합구조

Streptococcus salivarius 119가 만드는 글루칸을 처리하여 thin layer chromatography를 실시한 결과, 1-6 결합이 주된 결합인 수용성 글루칸이었다 (Fig. 4).

IV. 고 찰

치아우식증과 치주 질환의 발생에 중요한 역할을 하는 치태는 세균과 세균간 물질로 구성되어 있다²⁸. 치태 형성 초기에는 타액에서 유래한 당단백에 의해 획득 피막이 형성되는데 세균들은 초기에 이 피막과 비특이적으로 약하게 결합하고 나중에 세포의 다당류를 합성하여 강하게 결합한다. 세포의 다당류는 치태에 존재하는 세균에 의해 자당으로 부터 합성되는데 포도당의 중합체인 글루칸과 과당의 중합체인 프럭탄으로 구분되며, 글루칸은 수용성 글루칸인 dextran과 비수용성 글루칸인 mutan으로 구분된다^{29,30}. 세포의 다당류는 치아와 치주 건강에 중요한 역할을 하는데 이는 칫제, 세포의 다당류는 끈끈한 특성을 가지고 접착성이 강하여 세균의 부착 및 응집을 조장하고, 둘째, 세균이 필요로 하는 에너지의 저장소가 될 수 있으며, 셋째, 세균이 만드는 독소와 염증을 일으키는 물질을 포함하고 있기 때문이다³¹. 글루칸은 *Streptococcus mutans* 외에도 다른 *Streptococcus* 종들, *Lactobacillus* 종들과 같은 구강세균에 의해 형성된다.

치태의 형성 시간이나 섭취되는 음식과 상관없이 치태내에서 우세한 미생물은 그람 양성 *Streptococcus* 종들로, 이 중에서도 *Streptococcus mutans*는 동물실험과 사람의 치아우식증 연구에서 중요하게 연구되고 있다. *Streptococcus mutans*의 숫자는 음식물의 종류, 불소 및 전신적 항생제의 사용여부, 가족내 구성원의 *Streptococcus mutans* 숫자, 구강위생, 타액작용 그리고 치태내의 미생물의 상호작용등에 의해 영향을 받을 수 있다. 이러한 *Streptococcus mutans*를 억제하기 위하여 chlorhexidine^{1,11,12}, iodine¹⁰, penicillin¹³, vancomycin¹⁴⁻¹⁷, kanamycin¹⁸, 불소¹⁹ 등을 사용하여 치아우식 활성을 감소시킬 수 있으나, 그 효과는 지속적이지 못하였다. 최근 구강내 정상적으로 존재하는 세균을 이용하여 치아 질환을 예방하고자 하는 연구가 이루어지고 있다²⁰⁻²⁵. 대치 세균은 비병원성이면서 구강에서 지속적으로 증식하여 병원체와 접촉하였을 때, 병원체의 증식이나 그 작용을 억제할 수 있어야 한다. 이론적으로

통상의 치료 방법과 비교하여 이러한 대치 방법은 대치 세균의 간단한 접종으로 대치 세균의 지속적인 작용을 기대할 수 있으며, 자연적인 전염을 통해 대중 집단의 질병 예방 효과도 얻을 수 있다는 장점이 있다³². 치아우식증 예방에 이용될 수 있는 대치 세균은 치태 형성에 주된 역할을 하는 *Streptococcus mutans*를 억제하거나, *Streptococcus mutans*의 치태 형성을 억제하여야 한다.

*Streptococcus salivarius*는 생후 10~24시간 이내에 검출이 되어 모든 사람의 구강내에 존재하는데, 특히 혀의 뒷쪽이나 타액에 가장 많이 존재하는 세균으로 각각 혐기성 상태에서 배양되는 총세균의 20%를 차지하고 있다.

*Streptococcus oralis*는 주로 치면에 존재하며 영아의 구강내 연쇄상구균을 조사한 결과, 영아의 1/3에서 존재한다³³. 이 균은 세균성 심내막염³⁴, Behcet's 질환³⁵, 호중구 결핍성 암환자³⁶에서 분리되기도 한다. *Streptococcus mutans*의 치태형성과 증식에 대한 *Streptococcus oralis*의 작용은 H₂O₂를 분비하여 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제하고 치태 형성을 감소시킨다³⁷. H₂O₂는 미생물에 매우 독성이 강하고 아울러 구강점막에도 해를 줄 수 있다. 그러나 타액에서 이 H₂O₂는 peroxidase, thiocyanate와 반응하여 hypothiocyante가 되어 구강점막에 해가 없으면서 정균효과를 가지게 된다³⁸. 이러한 lactoperoxidase system과의 반응은 구강내 연쇄상구균의 대사 및 성장을 억제하는데 H₂O₂ 단독시보다 더 효과적임이 보고되고있다³⁹.

본 연구에서는 일회용 큐벳에서의 비수용성 글루칸 형성 억제 실험에서 *Streptococcus mutans* 단독 배양시의 0.327에 비교하여 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119의 혼합 배양시에는 0.119로 감소되었고, 비커 와이어 검사에서 *Streptococcus mutans* 단독 배양시 형성된 인공치태 무게 84.7mg에 비교하여 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119 혼합 배양시에는 12.3mg으로 현저히 감소되었다. *Streptococcus salivarius* 119에 의한 *Streptococcus mutans*의 인공 치태 형성 억제 기전을 알고자 BHI broth와 BHIS broth에서 배양한 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 각각 가한 비커 와이어 검사에서 *Streptococcus mutans*에 의하여 형성된 인공치태 무게는 각각 100.5mg, 20.4mg이었다. 이와 같은 결과는 5% 자당이 함유된 BHI broth에서 배양한 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액에 함유된 성분에 의한 것으로 사료되었다. 그래서 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 thin layer chromatography를 실시한 결과, *Streptococcus salivarius* 119가 형성한 polymer는 글루칸이었으며 (Fig. 3). 이 글루칸은 1-6 결합이 주된 결합인 수용성 글루칸이었다는 것을 (Fig. 4) 증명하였다. 즉 *Streptococcus salivarius* 119가 형성한 수용성 글루칸에 의하여 *Streptococcus mutans*의 비수용성 글루칸 형성이 억제되는 것으로 사료된다. 또한 과산화수소를 분비하여 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제한다고 알려진 구강에서 유익한 세균인 *Streptococcus oralis*³⁷에 대해서는 *Streptococcus salivarius* 119가 억제작용이 없는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 볼 때, *Streptococcus salivarius* 119는 수용성 글루칸을 생성하여 *Streptococcus mutans*의 비수용성 글루칸 생성을 저지함으로써 치태 형성을 억제하는 것으로 사료된다. 그러나 구강내 다른 상주균과 *Streptococcus salivarius* 119의 상호작용에 대한 연구는 앞으로 더 필요한 것으로 생각된다.

VI. 결 론

구강에서 분리된 *Streptococcus salivarius* 119의 특성과 *Streptococcus mutans*와 *S. oralis*에 대한 작용을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Streptococcus mutans*를 일회용 큐벳에서 배양시 550nm에서의 흡광도가 0.327이었으나, *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119의 혼합 배양시에는 0.119로 감소되었다.
2. 비커 와이어 검사에서 *Streptococcus mutans* 배양시 형성된 인공치태 무게는 84.7mg이었으나, *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus salivarius* 119 혼합 배양시에는 12.3mg으로 감소되었다.
3. BHI broth에서 배양된 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 가한 비커 와이어 검사에서 형성된 인공치태 무게는 100.5mg인데 반해, 5% 자당이 함유된 BHI broth에서 배양된 *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 가한 비커 와이어 검사에서는 20.4mg이었다.
4. *Streptococcus oralis*와 *Streptococcus salivarius* 119 단독 배양시에는 각각 ml당 4.8×10^7 , 7.5×10^8 이었으나, 혼합 배양시에는 *Streptococcus oralis*는 4.2×10^7 , *Streptococcus salivarius* 119는 5.8×10^9 으로 감소하였다.
5. *Streptococcus salivarius* 119 배양 상청액을 thin layer chromatography를 실시한 결과, *Streptococcus salivarius* 119가 형성한 polymer는 글루칸이었다.
6. *Streptococcus salivarius* 119가 만드는 글루칸을 처리하여 thin layer chromatography를 실시한 결과, $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합이 주된 결합인 수용성 글루칸이었다.

이상의 결과를 종합하면 구강에서 분리된 *Streptococcus salivarius* 119에 의한 *Streptococcus mutans*의 인공치태 형성 억제 작용은 수용성 글루칸 형성에 의한 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. 박기철 : 치아플렉(2). 치과연구. 43:23-30, 1998.
2. Clarke J.K. : On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. Br. J. Exp. Pathol. 5:141-147, 1924.
3. Gibbons RJ, van Houte J : Dental caries. Ann. Rev. Med. 26:121-136, 1975.
4. Loesche WJ : Chemotherapy of dental plaque infec-

- tions. Oral Sci. Rev. 9:65-107, 1976.
5. Hamada S, Slade HD : Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44:331-384, 1980.
6. Tanzer JM : Microbiology of dental caries. In: Contemporary oral microbiology and immunology, edited by Slots J. and Taubman M. St. Louis: Mosby, pp. 377-424, 1992.
7. Lumikari M, Soukka T, Nurmio S, Tenovuo J : Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase system in human saliva. Arch. Oral Biol. 36:155-160, 1991.
8. van der Hoeven JS, Camp PJM : Mixed continuous cultures of *Streptococcus mutans* with *Streptococcus sanguis* or with *Streptococcus oralis* as a model to study the ecological effects of the lactoperoxidase system. Caries Res. 27:26-30, 1993.
9. Emilson CG : Effect of chlorhexidine gel treatment on *Streptococcus mutans* population in human saliva and dental plaque. Scand. J. Dent. Res. 89:239-246, 1981.
10. Caufield PW, Gibbons RJ: Suppression of *Streptococcus mutans* in the mouths of humans by a dental prophylaxis and topically-applied iodine. J. Dent. Res. 58:1317-1326, 1979.
11. Schaeken MJM, de Haan P : Effects of sustained-release chlorhexidine acetate on the human dental plaque flora. J. Dent. Res. 68:119-123, 1989.
12. Mikkelsen L, Jensen SB, Schitt CR, Le H : Classification and prevalences of plaque streptococci after two years oral use of chlorhexidine. J. Periodont. Res. 16:645-658, 1981.
13. Maltz M, Zickert I : Effect of penicillin on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and lactobacilli in hamsters and in man. Scand. J. Dent. Res. 90:193-199, 1982.
14. DePaola PF, Jordan HV, Berg J : Temporary suppression of *Streptococcus mutans* in humans through topical application of vancomycin. J. Dent. Res. 53:108-114, 1974.
15. Jordan HV, Depaola PF : Effect of a topically applied 3% vancomycin gel on *Streptococcus mutans* on different tooth surfaces. J. Dent. Res. 53:115-120, 1974.
16. Jordan HV, Depaola PF : Effect of a prolonged application of vancomycin on human oral *Streptococcus*

- mutans* populations. Arch. Oral Biol. 22:193-197, 1977.
17. Depaola PF, Jordan HV, Soparkar PM : Inhibition of dental caries in school children by topically applied vancomycin. Arch. Oral Biol. 22:187-191, 1977.
 18. Loesche WJ, Bradbury DR, Woolfolk MP : Reduction of dental decay in rampant caries individuals following short-term kanamycin treatment. J. Dent. Res. 56:254-265, 1977.
 19. Woods R : The short-term effect of topical fluoride applications on the concentration of *Streptococcus mutans* in dental plaque. Aust. Dent. J. 16:152-155, 1971.
 20. Hillman JD : Lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*: Isolation and preliminary characterization. Infect. Immun. 21:206-212, 1978.
 21. Mao M, Rosen S : Cariogenicity of a "low-acid" mutant of *Streptococcus mutans*. IADR. Progr. & Abstr. 57:No. 787, 1978.
 22. Tanzer JM, Freedman ML : Genetic alterations of *Streptococcus mutans*' virulence. Adv. Exp. Med. Biol. 107:661-672, 1978.
 23. Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J : Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R. Infect. Immun. 48:44-50, 1985.
 24. Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J : Inhibition of ecological emergence of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R infection. Infect. Immun. 49:76-83, 1985.
 25. Abhyankar S, Sandham HJ, Chan KH : Serotype C *Streptococcus mutans* mutable to lactate dehydrogenase deficiency. J. Dent. Res. 64:1267-1271, 1985.
 26. Jett BD, Gilmore MS : The growth-inhibitory effect of the *Enterococcus faecalis* bacteriocin encoded by pAD1 extends to the oral streptococci. J. Dent. Res. 69:1640-1645, 1990.
 27. Sneath, PHA, Mair NS, Sharpe, ME, Holt, J.G. : Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2, Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1986.
 28. McDougall WA : Studies on the dental plaque. I. The histology of the dental plaque and its attachment. Aust. Dent. J. 8:261-273, 1963.
 29. Guggenheim B : Extracellular polysaccharides and microbial plaque. Int. Dent. J. 20:657-678, 1970.
 30. Gibbons RJ, Banghart SS : Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. Arch. Oral Biol. 12:11-24, 1967.
 31. Newbrun E : Polysaccharide synthesis in plaque. Microbiology Abstract Suppl. Microbial aspect of dental caries III:659, 1979.
 32. Hillman JD, Socransky SS : Replacement therapy for the prevention of dental disease. Adv. Dent. Res. 1:119-125, 1987.
 33. Smith DJ, Anderson JM, King WF, Van Houte J, Taubman MA : Oral streptococcal colonization of infants. Oral Microbiol. Immunol. 8:1-4, 1993.
 34. Douglas CW, Heath J, Hampton KK, Preston FE : Identity of viridans *Streptococci* isolated from cases of infective endocarditis. J. Med. Microbiol. 39:179-82,

Abstract

THE INHIBITORY EFFECT OF STREPTOCOCCUS SALIVARIUS 119
ON THE FORMATION OF ARTIFICIAL PLAQUE

Min-Ha Lee, Kyu-Ho Yang, Jong-Suk Oh*

*Department. of Pediatric Dentistry, College of Dentistry,
Department. of Microbiology, College of Medicine*, Chonnam National University*

Streptococcus salivarius is a normal inhabitant in the human oral cavity. *Streptococcus salivarius* 119 in this study was isolated from the oral cavity of child and identified, and its action mechanism on the formation of dental plaque by *Streptococcus mutans* was studied.

1. The optical density of absorbance at 550 nm was 0.327 in the culture of *Streptococcus mutans* in disposable cuvette, whereas being 0.119 in the combined culture of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius* 119.
2. The mean weight of produced artificial plaque on the wires in the beaker was 84.7mg in culture of *Streptococcus mutans* only, whereas being reduced to 12.3mg in the combined culture of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius* 119.
3. When *Streptococcus mutans* was cultured in the media containing culture supernatant of *Streptococcus salivarius* 119 in BHI broth, the mean weight of produced artificial plaque was 100.5mg on the wires, whereas being reduced to 20.4mg in the media containing culture supernatant of *Streptococcus salivarius* 119 in BHIS broth.
4. The viable cells of *Streptococcus oralis* and *Streptococcus salivarius* 119 were 4.8×10^7 and 7.5×10^8 per ml respectively after each culture, whereas being 4.2×10^7 and 5.8×10^7 per ml in the combined culture of *Streptococcus oralis* and *Streptococcus salivarius* 119.
5. The polymer produced by *Streptococcus salivarius* 119 was glucan on the thin layer chromatography.
6. The glucan produced by *Streptococcus salivarius* 119 was water-soluble glucan containing 1-6 linkages as the main linkage on the thin layer chromatography.

These results suggested that isolated *Streptococcus salivarius* 119 inhibited the formation of artificial plaque by the production of water-soluble glucan.

Key words : Plaque, Glucan, Dental caries