Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 28, No. 5, 243–250 (2000)

치아 우식 미생물 *Streptococcus mutans*에 대해 항균활성을 갖는 신규 호알칼리성 *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827의 분리 및 동정

전주연 · 류일환 · 이상욱[1] · 이갑상*
원광대학교 농화학과, [1](주)푸드텍 연구개발실

Isolation and Identification of Novel Alkalophilic *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827 with Anticaries microbe *Streptococcus mutans*. **Chun, Ju-Yean, Il-hwan Ryu, Sang-Uk Lee[1], and Kap-Sang Lee*.** *Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea [1]R&D Center, Foodtech Co., 93-21 Maryong-ri, Seosu-myeon, Kunsan 537-940, Korea* – The study was performed to investigate the excellent microbial anticaries substance which is more effective than the chlorohexidine in the dental caries treatment. For the screening of alkaliphilic microorganism, more than 1200 bacterial strains were isolated from sea soil sample. A typical strain which produced the most excellent antimicrobial substance was selected. The strain was identified novel alkalophillic *Bacillus* sp. through the results of morphological, biochemical and chemotaxonomical characteristics and 16S rDNA sequencing and designated as *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827.

Key words: *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827, Anticaries, Purification, Identification.

치주 및 치은 질환은 치석미생물과 관련된 감염질환임은 잘 알려진 사실이다[1]. 즉, 치아의 표면에 정착한 caries-inducing *streptococci*가 생산하는 산의 작용에 의해 치표면의 ename1질이 용해되고, 이러한 과정이 계속 진행되어 결국 세균에 의한 탈회작용이 상아질에까지 영향을 미침으로써 치아우식증이 발병하는 것으로 알려져 있다. 치아우식은 치아 hard조직의 세균성 질환으로서 치아구조가 국부적이고 점진적으로 붕괴되는 것이다[2]. Keyes 등[3,4]은 설치류의 우식은 고당 식이를 섭취하고 cariogenic *streptococci*가 감염되었을 때 나타난다고 보고하였으며, 이들에 의해 분리된 질환유도 포도상구균은 변종 포도상구균(mutans *streptococcus*)로 동정되었다. 그 외 *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S.cricetus*, *S. rattus* 및 *S. sanguis*등 *mutans streptococcus*와 *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Actinomyces aneslundii*, *A. aneslundii genospecies* 2, *S. salivarius*, *S. sanuis*, *E. faecalis*등이 분리되었다[5]. 인간의 치과질환을 유발하는 한 종류의 균만을 규정하는 것에는 어려운 점이 많으나 질환의 시작 및 진전에 *S. mutans*, *S. sobrinus* 등과 같은 mutans *streptococcus*와 *Lactobacillus*가 관여하고 이 두 그룹의 세균종은 탄수화물을 빠르게 lactic acid와 같은 산으로 대사시키고 스스로 낮은 pH 환경에 적응할 수 있다. 많은 연구에서 mutans *streptococcus*와 *Lactobacillus*의 수와 분리 빈도의 증가가 직접적으로 관련이 있음이 보고되었다. *Lactobacillus*의 증가는 비교적 느리게 일어나고, 임상적으로 파악할 수 있는 손상시에만 최고조에 달한다고 보고되었다[6]. 이는 mutans *streptococcus*가 질환의 개시에 관여하고 *Lactobacillus*는 질환의 진전에 관여함을 의미한다. Marsh는[7,8] 어떤 요소가 토착 미생물종의 변이를 유발하고 이로인해 질병의 발병이 일어난다는 생태학적 프라그 가설(ecological plaque hypothesis)를 제안하였다. 이것은 중성 pH에서는 mutans *streptococcus*와 *Lactobacillus*는 전체 미생물총에서 저농도로 존재하며, 탄수화물의 대사는 프라그내 pH를 저하시키고 이러한 조건에서 *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*와 같은 산에 민감한 미생물의 수를 감소시키고, *S. mutans*와 *Lactobacillus*의 수가 증가하게 되며 이로인해 치아표면에 병변이 발생한다는 것이다.

최근 이와같은 충치발생 기작에 관한 기초적인 연구와 함께 충치 예방의 측면에서도 매우 활발한 연구가 이루어지고 있으며 이를 응용한 다양한 구강청결제 및 치약의 개발이 이루어지고 있다. 1)충치 유발성 세균인 *S. mutans*의 구강으로부터의 제거, 2)*S. mutans*의 치면부착 저해, 3) sucrose를 포함하는 음식물의 섭취 방지 또는 대체 감미료 (palatinose, mannitol, sorbitol 등) 개발, 4)치면을 강화하여 *S. mutans*에 대한 저항성을 강화하는 등의 방법이 광범위하게 검토되었다. 이중 충치 유발성 세균인 *S. mutans*의 살균효과를 나타내는 물질을 검색하기 위하여 천연물과 미네랄을 중심으로 다양한 연구가 이루어지고 새로운 화합물들이 개발되었다. 최근 Mackay 등[9]은 *S. mutans*의 정균 및 살균효과를 갖고 있는 histidine-rich polypeptide를 이하

*Corresponding author
Tel. 063-850-6675, Fax. 063-850-6675
E-mail: microbio@gaebyok.ac.kr

선(parotid)에서 분리하고 저이온강도 완충액에서 이 histidine-rich polypeptide와 *S. mutans*를 전배양시 세균의 성장 및 세포분화를 저해하였다고 보고하였다. Marsh 등[10]은 항치석활성을 갖고 있는 광범위 항균제인 triclosan의 효과를 증진시키기 위하여 다른 분자와 결합을 시도하였다. Triclosan과 결합시킨 polyvinyl methyl ether maleic acid는 치아표면에 triclosan의 보존력을 증가시켜 항균 및 항치석 효과를 증진시킨다고 보고하였다. Imazato 등[11,12]은 12-metaacryl oxydodecylpyridium bromide (MDPB)와 10-metaacryl oxydecyl dihydrogen phosphate(MDP)를 polymer화시키고 methanol로 세척 후 *S. mutans*에 대한 살균효과를 측정한 결과 강력한 살균효과 및 프라그 억제 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 광범위 항균제를 사용하고 있을 뿐 구강미생물에 대해 특이적인 항균제는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 충치 및 치주 질환의 발병요인이 되는 원인균 *S. mutans*의 생육을 저해하고 치태형성에 관여하는 glucosyltransferase의 작용을 저해하는 물질을 생산하는 새로운 호알칼리성 미생물을 분리, 정제, 동정하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 균주는 서해 군산 인근 만경강 유역의 갯벌 토양에서 채취한 시료에서 분리한 균주 중에서 *S. mutans*에 대하여 항균활성이 우수한 균주를 선발하여 사용하였으며, 분리된 균들은 4°C에서 냉장보관하였다.

배지

S. mutans 생육 저해 물질을 생산하는 호알칼리성 균주를 분리하기 위하여 GPY 평판 한천 배지(1% glucose, 0.5% pepton, 0.5% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1% Na_2CO_3, 1.5% agar, distilled water 1 L, pH 11.0)를 사용하였으며 실험목적에 따라 배지성분 중 Na_2CO_3의 %(w/v)농도를 달리하여 배지의 초기 pH를 조절하였다.

Streptococcus mutans 생육저해물질 생산균주의 분리

서해 군산 인근 만경강 유역의 갯벌 토양에서 채취한 시료를 생리식염수로 3회 희석하여 분리용 고체배지에 상기 시료의 현탁액을 도말하여 25°C에서 3일간 정치배양하였다. 항균활성을 나타내는 균주를 선별하기 위하여 고체배지에 형성된 각각의 colony를 동일한 조성의 액체배지에 백금이로 1회 접종하고, 25°C에서 3일 동안 진탕배양하였다. 배양액을 12,000 × g에서 20분간 원심분리하여 배양 상등액을 분리하고 *S. mutans*를 피검균으로 사용한 평판배지에서 투명대를 형성하는 colony를 1차 선발하였다. 1차 분리균 중에서 피검균에 대하여 투명대의 크기가 가장 우수한 균주를 2차 선별하여 보존하면서 다음 실험에 사용하였다.

항균물질 생산균주의 동정

형태 및 배양학적 특성

분리균주의 크기와 형태는 Gerhardt 등[13]의 방법에 따라 그람염색하여 광학현미경(Nicon, FK-IIA,Japan)으로 관찰하였다. 또한 분리균주의 정밀한 외형을 관찰하기 위하여 2.0% phosphotungstic acid로 negative 염색하여 gold coating한 뒤 전자현미경(Philips, SEM 515, Netherland)을 이용하여 관찰하였으며 glucose-nutrient agar 배지, skim milk 배지, Luria-Bertani 배지에서 생육한 집락의 형태, 크기, 색깔 등을 관찰하였고, 반유동고체배지(tryptose 1.0%, sodium chloride 0.5%, agar 0.5%)에 배양하여 운동성을 조사하였다.

생리학적 특성

균주의 생리적 특성으로는 casein 분해능, 전분 분해능, gelatin 액화력, 당발효성, indole 생성능, nitrate 환원력, catalase와 oxidase 생산능을 조사하였다. 선별된 균주의 생리학적 성질은 Microbiology a laboratory manual[14], Manual of methods for bacteriology[13], Bergey's manual of determinative bacteriology[15] 등에 수록되어 있는 일반적인 세균동정법에 따라 행하였다.

화학적특성

분리균주의 화학적 특성은 Komagata와 Suzuki[16]의 Method in Microbiology, Miller[17]의 Microbial identification system(MIS)에 준하여 분석하였다. 분석방법으로는 세포벽내의 Fatty acid type, DNA base composition(G+C mole content), DNA sequence 등을 조사하였다. 지방산분석은 동결건조 균체 20 mg과 5% 무수 methanolic-HCl 2.0 mL를 시험관에 넣고 100°C에서 3시간 가열하여 지방산을 fatty acid methylester(FAME)화 하였다. Methylester화시킨 지방산을 실온에서 냉각시킨 후 증류수 1.0 mL를 가하고 FAME를 n-hexane 3.0 mL로 3회 반복 추출하였으며, n-hexane 추출물에 2배의 증류수를 첨가하여 혼합한 후, 원심분리하여 n-hexane층만을 분리하여 질소가스로 농축하였다. 농축된 FAME를 n-hexane에 재용해시키고 이를 분석시료로 사용하였다. 지방산 분석은 gas chromatography (Hewlet-Packard, 5890-II, U.S.A)로 분석하였으며, column은 capillary column을 사용하였고, detector는 flame ionization detector(FID), injection 온도는 250°C, column 온도는 200°C, 운반가스는 질소가스를 사용하였다. 16S rDNA 유전자 분석은 (주)마이크로 아이디사가 개발한 PHYDIT 프로그램을 사용하여 수행하였다. Sequence를 rRNA 이차구조를 참고하여 alignment한 후, % simmilarity

값과 G+C mole 함량을 구하였다. 또한 Jukes & Cantor model[18]에 의하여 evolutionnary distance를 계산하였으며, Neighbor-joining method[19]에 의하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하였다. 이때 tree의 scale bar는 0.1 substitution per site를 의미한다

항균활성 측정

*S. mutans*에 대한 항균력 측정은 brain heart infusion soft agar 배지에 피검균을 도말하고 cup cylinder 방법을 이용하여 37°C에서 48시간 배양하여 생성된 투명대의 크기로 측정하였다.

결과 및 고찰

Streptococcus mutans 생육 저해 물질 생산균주의 분리

S. mutans 생육 저해 물질 생산균주를 선별하기 위하여 갯벌 토양으로부터 분리한 항균물질 생산 균주 1,150 균주 중 *S. mutans*에 대하여 저지환을 나타내는 균주를 1차 선별하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 가장 큰 저지환의 크기를 나타낸 JY-827 균주를 최종 선별하여 본 연구에 사용하였다.

분리균주의 동정

형태 및 배양학적 특성

분리균주 JY-827의 고체배지에서의 특성은 glucose-nutrient agar medium, skim milk medium, luria-bertani medium 등 중성의 배지에서는 거의 생육이 되지 않았으며, 알칼리성 평판배지(pH 11.0)에서는 Table 1에서 보는 바와 같이 colony 형태는 원형이었고, 색깔은 유백색이었으며 표면은 볼록하고 매끄러운 상태였다. 또한 알칼리성 액체배지에서 생육은 좋았으며 호기성이였고, 균체의 침전현상은 보이지 않았다. 이 균주의 형태학적 특성은 Fig. 2의 전자현미경 사진과 같이 구균으로서 그 크기는 200 × 250 μm로 비교적 size가 큰편이였으며, 편모는 수많은 편모가 균체 전체를 덮고 있는 형태였으며, 운동성이 관찰되고, Gram 양성이였다.(Table 2)

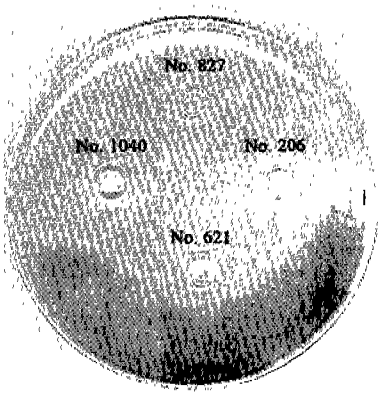

Fig. 1. Antimicrobial activity of microorganism isolated from sea soil sample.

생리학적 특성

분리균주 JY-827의 생리적 특성을 검토한 결과 Table 3과 같다. 생육범위는 pH 9.0~12.0이었고, 생육온도 범위는 15~45°C이었다. 또한 염농도 10%까지 생육이 가능하였으며, catalase 양성, oxidase 양성 및 starch, casein, cellulose 분해능이 있었다. 또한 생리학적 유사도를 검토한 결과

Table 1. Morphological properties of the strain JY-827

Shape	Cocci
Cell size	200 × 250 μm
Motility	Motile
Flagella	Positive
Spore	Oval central
Gram stain	Positive
Sporangium swellen	Negative

Morphological properties were examined after 72 hours cultivation of the strain JY-827 in the liquid medium at initial pH 11.0

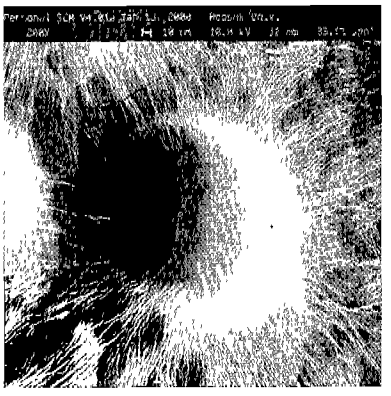

Fig. 2. Scanning electron microscopic photogram of strain JY-827.
* Bar represents 10 μm

Table 2. Culture characteristics of the JY-827

A) Colony on the solid medium at initial pH 11.0 (25, 5day)	
Form	Circular
Sulfase	Smooth
Elevation	Convex
Margin	Entire
Opacity	Opaque
Brilliancy	No glistening
Color	White cream
Chrogenesis	None
B) Liquid medium at initial pH 11.0	
Growth abundant, turbid without sediment	

Table 3. Physiological properties of the strain JY-827

Temperature range for growth	15~45°C
pH range for growth	9.0~12.0
NaCl tolerance for growth	≤10%
Catalase	+
Oxidase	+
Lecithinase	+
Lipase	-
Phenylalanin deamination	-
Hydrolysis of	
Starch	+
Casein	+
Cellulose	+
Esculin	+
Indol production	+
Levan formation from sucrose	+
NH_3 production from argine	+
NH_3 production from pepton	+
Gelatin liquefaction	+
Methyl-red test	-
Voges-Proskauer reaction	+
Nitrate reduction	+
Action on milk	
Coagulation	-
Peptonization	-
Oxidation-Fermentation test	Fermentation
Growth on nutrient plate	-

-: negative, +: positive

Table 4와 같이 L-rhamnose를 이용하지 못하였으나 glucose, sucrose, raffinose는 잘 이용하였다. 이상의 Biological Assimilation Test에서 *Curtobacterium pusillum*과 약 11.3%의 유사도를 나타내어 새로운 미생물일 가능성이 있는 것으로 판단하였다.

화학적 특성

분리균주 JY-827의 생리학적 특성시험에서 극히 낮은 유사도를 나타내어 보다 정확한 동정을 하기 위하여 분리균주의 세포 지방산 분석, G+C mole 함량 분석, 유전자 배열분석을 행하였다.

분리균주 JY-827의 세포 지방산 성분을 검토한 결과, Fig. 3과 Table 5에서와 같이 주성분은 iso-15:0과 anteiso-15:0인 branched type으로 각각의 함량은 40.09%와 28.92 %를 나타내었다. 이는 *Bacillus*속 세균의 대표적인 특성으로, Suzuki와 Komagata 등[20]의 *Bacillus*속 세균의 지방산 주성분은 13-methyl tetradecanoic acid(C15:0-iso), 12-methyl tetradecanoic acid (C15:0-anteiso)인 blanched type이라는 보고와 일치하는 경향을 보였으나, reference와 비교결과 *B. megaterium*과는 약 22.7%의 유사도를 나타내었으며, *B. subtilis*와는 약 13.8%, *B. licheniformis*와는 약 20.5% 그리고 *Brevibacillus agri*와 약 32.0%의 유사도를 보여 그 신뢰성이 극히 낮다고 판단하여, G+C mole 함량 분석을 행한 결과 G의 함량은 약 23.79%였으며, C의 함량은 약 31.16%로 G+C mole의 함량은 약 55%로 나타

Table 4. Biological assimilation test by the strain JY-827

Water	-	α-D-lactose	-	L-alanin	-
α-cyclodextrin	+	Latutin	-	L-alanyl-glycine	+
β-cyclodextrin	+	Maltose	+	L-asparagin	-
L-pyroglutamic acid	-	Maltotriose	+	L-glutamic acid	-
Glycogen	+	D-mannitol	+	D-xylose	+
Inulin	-	D-mannose	+	L-malic acid	+
Manman	-	D-melezitose	+	Dextin	+
Tween 40	-	D-melibiose	+	L-serin	-
Tween 80	-	3-methylglucose	+	2,3-butandiol	-
N-acethyl-D-glucosamine	-	α-methyl-D-galactoside	-	Glycerol	+
N-acethyl-D-mannosamine	-	β-methyl-D-galactoside	-	Adenosin	-
Amygdalin	-	α-methyl-D-glucoside	+	2-deoxyadenosin	-
L-arabinose	-	β-methyl-D-glucoside	+	Inosine	-
D-arabitol	-	γ-methyl-D-glucoside	-	Thymidine	+
Arbutin	+	Adenosin-5-monophosphate	-	palatinose	+
Cellobiose	+	Thymidine-5-monophosphate	-	D-psicose	+
D-fructose	+	Uridin-5-monophosphate	-	D-raffinose	+
D-galactose	+	Fructose-6-phosphate	-	L-rhamnose	-
D-galacturonic acid	-	Glucose-1-phosphate	-	D-ribose	+
Gentiobiose	+	Glucose-6-Phosphate	-	Salicin	+
D-gluconic acid	-	D-L-α-glycerol phosphate	-	Sedoheptulose	-
α-D-glucose	+	D-sorbitol	+	Latamide	-
m-inositol	-	Stachyose	+	D-lactic acid methyl ester	-

Table 4. Continued

L-fucose	-	Sucrose	+	L-lactic acid	-
D-tagatose	+	D-trehalose	+	D-malic acid	-
Turanose	+	α-hydroxybutyric acid	-	Metyl pyruvate	-
Xylitol	+	β-hydroxybutyric acid	+	Succinamic acid	-
Acetic acid	+	γ-hydroxybutyric acid	+	Succinic acid	-
p-hydroxyphenyl acetic acid	-	mono-methyl succinate	+	N-acethyl-L-glutamic acid	+
α-ketoglutaric acid	+	Propionic acid	+	Alaninamic acid	-
α-ketovaleic acd	+	Pyruvic acid	+	D-alanin	-

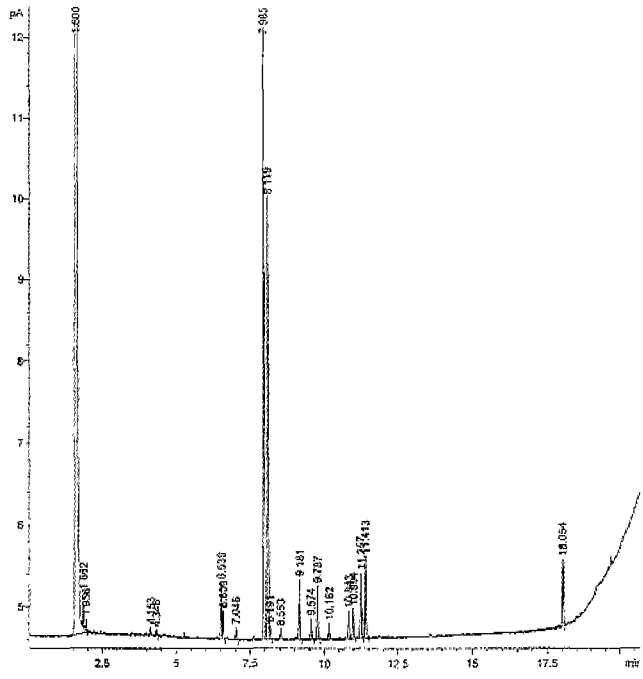

Fig. 3. Gas chromatogram of cellulra fatty acid of strain JY-827.

ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGA
GCTTGCTCCCGGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTA
ACCTGCCCCTTAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACG
GGATAATAAAGAGAATCACCTGATTCTCTTTTGAAAGACGGTTTCG
GCTGTCACTAAGGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGG
TAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGAGGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGAA
GAACAAGTACCGGCGTAACTACCGGTACCTTGACGGTACCTCACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCT
TCTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGGGGCTCAACCCCGAGCGGCCATT
GGAAACTGGGAAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATGCCCGTAGTGCCGAAGTAAACACA
TTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTC
TGGAGACAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAA
GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAAT
CATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGG
TACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTGGAGCCAATCCCATAAAGCCA
TTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAA
TTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
TCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAA
GTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAAAT
GATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGA

Fig. 4. 16S rDNA sequence of strain JY-827.

났다. 이는 일반적으로 *Bacillus* sp.의 특성과 유사한 결과를 나타내었다.

또한 16S rDNA sequencing PHYDIT 프로그램을 사용하여 16S rDNA 유전자 분석을 행한 결과 1492 bp.의 염기서열을 결정하고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 또한 이를 근거로 reference와 비교하여 % simmilarity를 구한 결과, 본 균주는 *Bacillus*속에 속하는 세균으로 판명되었으며, *B. clausii*의 표준균주와 95.7% 유사도를 나타내어 가장 가까운 균이라 할 수 있으나 형태학적, 생리학적 특성 및 세포지방산 성분 등의 차이로 인해 *B. clausii*와 같은 종의 균이라고 볼 수는 없다. 그러므로 현재 75종의 *Bacillus*속 중 새로운 종이라 판단하여 *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827균이라 명명하였다. 또한 Neighbor-joining method에 의하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하고 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 이때 tree의 scale bar는 0.1 substitution per site를 의미한다.

Table 5. Major cellular fatty acid of the strain JY-827

C14:0 iso	3.49%
C14:0	0.85%
C15:0 iso	40.09%
C15:0 anteiso	28.92%
C15:0	0.74%
C16:0 w7c alcohol	4.07%
C16:0 iso	-
C16:0	1.50%
C16:1 w11c	3.80%
C16:0	1.14%
Ciso17:1 w10c	2.12%
C17:0 iso	4.78%
C17:0 anteiso	6.26%
suggest ID (similarity)	*Brevibacillus agri* (32.0%)

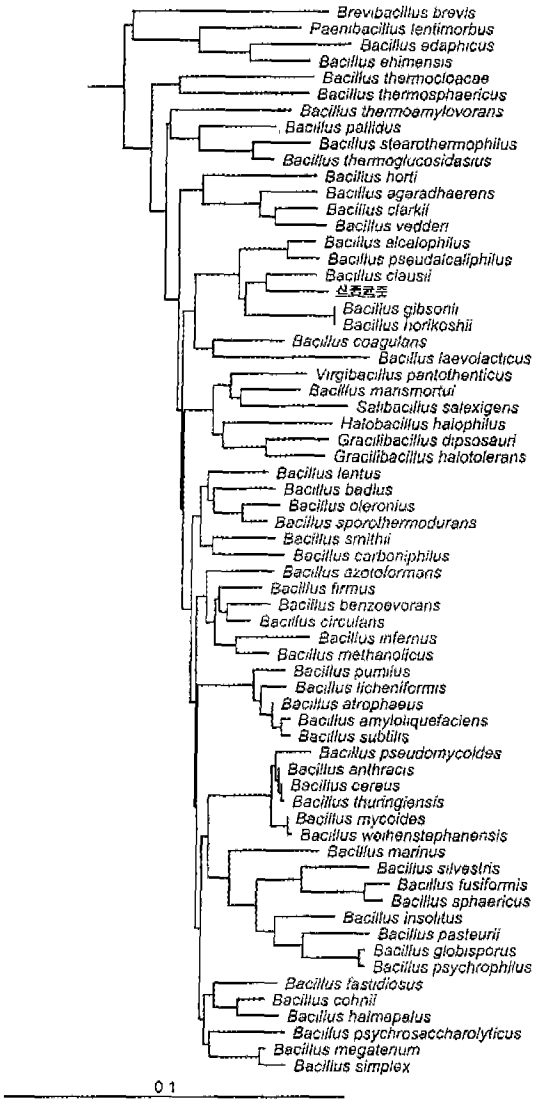

Fig. 5. Phylogenetic tree of *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827.

요 약

Streptococcus mutans 생육 저해 물질 생산균주를 선별하기 위하여 갯벌 토양으로부터 *S. mutans*에 대하여 저지환을 나타내는 1,150 균주 중 1차 선별하였고, 이중 가장 큰 저지환의 크기를 나타낸 JY-827 균주를 선별하여 제 특성을 확인하여 동정한 결과, 분리균주 JY-827의 colony 형태는 원형이었고, 색깔은 유백색이었으며 표면은 볼록하고 매끄러운 상태였다. 호기성이였으며, 균체의 침전현상은 보이지 않았다. 이 균주의 형태학적 특성은 구균으로서 그 크기는 200 × 250 μm으로 비교적 size가 큰편이였으며, 편모는 수많은 편모가 균체 전체를 덮고 있는 형태였으며, 운동성이 관찰되고, Gram 양성이였다. 생육범위는 pH 9.0~12.0이었고, 생육온도 범위는 15~45°C이었다.

분리균주 JY-827의 세포 지방산 성분을 검토한 결과, 주성분은 iso-15:0과 anteiso-15:0인 branched type으로 각각의 함량은 40.09%와 28.92%를 나타내었다. G+C mole의 함량은 약 55%로 나타났으며, 16S rDNA sequencing을 행한 결과 1492 bp.의 염기서열을 결정하고, referance와 비교하여 % simmilarity를 구한 결과 이 균주는 *Bacillus*속에 속하는 세균으로 판명되었으며, 새로운 종이라 판단하여 *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827균이라 명명하였다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 원광대학교의 교비지원비의 일부에 의해서 연구된 결과로 학교 당국에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Hanmada, S., T. Koga, and T. Ochima. 1984. Virulence fac-

Table 6. Similarity against reference of strain JY-827

Strain	Similarity (%)	Differences/compared (nt)
Bacillus clausii DSM 8716T	95.70	64/1489
Bacillus alcalophilus DSM 485T	95.42	64/1396
Bacillus pseudalcaliphilus DSM 8725T	94.84	77/1492
Bacillus gibsonii DSM 8722T	94.35	84/1488
Bacillus horikoshii DSM 8719T	94.22	86/1488
Bacillus oleronius DSM 9356T	93.03	103/1478
Bacillus cohnii DSM 6307T	93.01	104/1488
Bacillus pallidus DSM 3670T	92.88	106/1488
Bacillus halmapalus DSM 8723T	92.87	106/1487
Bacillus benzoevorans ATCC 49005T	92.83	100/1395
Bacillus methanolicus NCIMB 13114T	92.74	108/1487
Bacillus firmus IAM 12464T	92.73	107/1472
Bacillus circulans ATCC 4513T	92.67	99/1350
Bacillus marinus DSM 1297T	92.66	109/1486

Table 6. Continued

Strain	Similarity (%)	Differences/compared (nt)
Bacillus azotoformans ATCC 29788T	92.43	100/1321
Bacillus licheniformis ATCC 14580T	92.33	114/1486
Bacillus atrophaeus NCIB 12899T	92.30	101/1312
Bacillus fastidiosus DSM 91T	92.29	107/1388
Bacillus carboniphilus JCM 9731T	92.14	117/1488
Bacillus sporothermodurans DSM 10599T	92.12	117/1484
Bacillus pumilus ATCC 7061T	92.06	108/1360
Bacillus thuringiensis IAM 12077T	91.99	118/1473
Bacillus badius ATCC 14574T	91.99	114/1423
Bacillus cereus IAM 12605T	91.92	119/1473
Bacillus lentus IAM 12466T	91.92	119/1472
Bacillus subtilis ATCC 6051T	91.82	114/1394
Bacillus mycoides DSM 2048T	91.80	113/1378
Bacillus simplex DSM 1321T	91.78	115/1399
Bacillus amyloliquefaciens ATCC 23350T	91.77	114/1385
Bacillus anthracis Sterne	91.76	114/1384
Bacillus coagulans IAM 12463T	91.74	121/1465
Bacillus weihenstephanensis DSM 11821T	91.60	123/1465
Bacillus smithii DSM 4216T	91.54	126/1489
Bacillus laevolacticus IAM 12321T	91.38	127/1474
Bacillus agaradhaerens DSM 8721T	91.26	130/1488
Bacillus insolitus DSM 5T	91.23	119/1357
Bacillus psychrosaccharolyticus ATCC 23296T	91.20	120/1363
Bacillus infernus TH-23T	91.15	131/1480
Bacillus globisporus ATCC 23301T	91.12	132/1487
Bacillus megaterium IAM 13418T	91.04	132/1474
Bacillus silvestris DSM 12223T	90.99	134/1487
Bacillus thermoglucosidasius DSM 2542T	90.96	120/1327
Bacillus psychrophilus ATCC 23304T	90.90	131/1440
Bacillus vedderi DSM 9768T	90.75	136/1470
Bacillus pasteurii NCIB 8841T	90.73	125/1349
Bacillus clarkii DSM 9768T	90.73	138/1489
Gracilibacillus dipsosauri DSM 11125T	90.67	126/1351
Bacillus pseudomycoides DSM 12442T	90.65	138/1476
Bacillus thermoamylovorans CNCM I-1378T	90.57	140/1485
Bacillus horti JCM 9943T	90.48	141/1481
Gracilibacillus halotolerans DSM 11805T	90.37	143/1485
Bacillus marismortui DSM 12325T	90.36	143/1483
Virgibacillus pantothenticus IAM 11061T	90.28	143/1471
Halobacillus halophilus NCIMB 9251T	90.12	142/1437
Bacillus thermosphaericus DSM 10633T	90.10	146/1475

tor of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.* **63:** 407–411.

2. Marsh, P. D. 1991. Sugar, fluoride, pH, and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc. Dent. Soc.* **87**: 515–525.
3. Fitzgerald, R. J. and P. H. Keyes. 1960. Demonstration of the etiologic role of *Streptococci* in experimental caries in the hamster. *J. Am. Dent. Assoc.* **61**: 9–19.
4. Keyes, P. H. 1960. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. *Arch. Oral Biol.* **1**: 304–320.
5. Loesche, W. J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* **50**: 353–380.
6. Burt, B. A., W. J. Loesche, and S. A. Eklund. 1985. Stability of elected plaque species and their relationship to caries in a child population over 2 years. *Caries Res.* **19**: 193–200.
7. Marsh, P. and M. Martin. 1992. In Oral, 3rd ed. Chanpman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.
8. Marsh, P. D. 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent. Res.* **8**: 263–271.

9. Mackay, B. J., J. Iacono Denepitiyal, B. Kroets, and J. J. Pollock. 1984. Growth-inhibitory and bactericidal effect of human parotid salivary histidin-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* **44**: 695–701.
10. Marsh P. D. and D. J. Bradshaw. 1993. Microbiological effect of Newasent in dentifrices for plaque control. *J. Int. Dent.* **43:** 399.
11. Imazato, S., T. Imai, R. R. B. Russell, M. Torii, and S. Ebisu. 1998. Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion promoting monomer. *J. Biomed. Mat. Res.* **39**: 511–515.
12. Imazato, S., N. Ebi, H. Tarumi, R. R. B. Russell, T. Kaneko, and S. Ebisu. 1999. Bactericidal acivity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomat.* **20:** 899–903.
13. Gerhardt, P., R. G. E. Murry, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips. 1981. *Manual of method for bacteriology*, 410–441.
14. Cappuccino, J. G. and N. Sherman. 1975. *Microbiology a laboratory manual*, Benjamin and Cummings, California.
15. Buchanan, R. E and N. E. Gibbson. 1974, *Bergey's manual of determination bacteriology*, 529-550, 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
16. Komagata, K. and K. I. Suzuki. 1987. *In Method in Microbiology.* Academic press, **19**: 161–207.
17. Miller, L. A. 1983. Single derivatization Method for bacterial fatty acid Methyl eates including hydroxy acid, *J. Clin. Microbiol.* **16**: 584-586.
18. Jukes, T. H. and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. *In Mammalian protein metabolism*. 21–132.
19. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-42571.
20. Suzuki, K and K, Komagata. 1983. *IJSB(International Journal of Systematic Bacteriolog),* **33:** 188–200.

(Received September 7, 2000)