

## 산에 대한 *Streptococcus mutans* KCTC 3065의 스트레스 반응에 관한 연구

강경희<sup>†</sup> · 김지영  
경남정보대학 치위생과

### Analysis of Acid Stress Response in *Streptococcus mutans* KCTC 3065

Kyung-Hee Kang<sup>†</sup> and Ji-Young Kim

Department of Dental Hygiene, Kyungnam College of Information & Technology, Busan 617-701, Korea

**ABSTRACT** Dental caries is initiated by the acid accumulated in dental plaque. *Streptococcus mutans*, one of a major causal agents of dental caries, is component of the dental plaque and produces various organic acids such as lactic acid as the end-product of glycolysis. As a consequence, we investigated the acid stress response of *S. mutans* KCTC 3065 in this study. The addition of lactic acid to the growth media had a concentration-dependent effect on the growth of *S. mutans*. *S. mutans* exhibited higher maximum culture OD compared with the more acidic growth pH values. At treatment of concentration of 20 mmol/L lactic acid in the mid-log phase, cell growth was reduced to 40% relative to the control. The following results were obtained with the treatment of cells with a concentration of 20 mmol/L lactic acid in the mid-log phase for 2hrs: Analysis of fatty acids extracted from cells showed that growth at a concentration of 20 mmol/L lactic acid resulted in changes in C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub> and C<sub>18:1</sub> fatty acids. Protein profiles investigated by SDS-PAGE showed that approximately 70, 60, 45, 40 and 23 kDa proteins were highly expressed in *S. mutans* KCTC 3065.

**Key words** *Streptococcus mutans*, Acid stress, Growth

## 서 론

현대인의 식생활 형태의 변화에 따른 당의 섭취 증가와 신체 내·외의 다양한 원인으로 인한 면역기능의 약화로 구강 내 미생물은 증가하는 추세에 있으며<sup>1)</sup> 의료기술의 비약적인 발전으로 인간의 수명이 연장되고 경제성장으로 인한 소득의 증가와 건강에 관한 인식 향상으로 인하여 치아건강에 대한 관심과 요구는 날로 증가하고 있다.

가장 대표적인 구강 내 질병중의 하나인 치아우식증은 치면에 부착된 치면세균막에 축적되어진 산에 의해 치질이 탈회됨으로써 치아조직의 결손을 초래하는 세균성 치아 경조직 질환이다<sup>2,3)</sup>. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces sp.*, *Rothia sp.*, *Nocardia sp.*, *Bac-teroides sp.*, *Neisserria sp.*, 등은 함께 관여하여 구강병 발생원인 중 미생물적 요인을 형성하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 특히, *S. mutans*는 치면세균막에 존재하고 있으면서 산생성능을 갖고 있을 뿐만 아니라 우식병소내의 강한 산성환경에서도 생존할 수 있는 내산성을 가지고 있어 인간의 우식 원인균으로 가장 주목받고 있다<sup>5)</sup>.

*S. mutans*는 구강내에 상재하는 통성 혐기성 균으로 치면의

피막에 부착후 sucrose를 기질로 하여 glycolysis의 end-product로서 lactic acid를 생산하며, glucosyl transferase를 분비하여 glucose중합체인 불용성 glucan을 형성 한다. 이러한 glucan은 불용성의 점액성물질로서 치아 표면에 부착하여 치면에 세균부착을 도우며 생성된 유기산을 국소적으로 체류시킴으로 치질의 탈회를 가속화 시키는 역할을 한다. 결과적으로 *S. mutans*는 치면에 부착하여 당질 대사를 통하여 고농도의 산을 생산하고 enamel을 탈회시킴으로써 치아우식을 유발시킨다<sup>6,7)</sup>.

많은 연구들은 *S. mutans*가 구강내의 다양한 세균들 중에서도 pH 4와 같은 낮은 pH에서도 당질 대사를 수행하며 생존할 수 있는 내산성 균주로서 산에 대하여 가장 잘 견디는 균주로 보고해 왔으며<sup>8,9)</sup>, *S. mutans*의 이러한 능력은 다른 구강내 세균과 구분되는 특성으로서 충치의 진행에 있어서 결정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>10,11)</sup>.

현재 우리 나라에서 진행되는 *S. mutans* 관련 연구는 항균 및 유기산 억제효과를 지니는 천연물질의 탐색에 관한 것이 대부분이다<sup>12,13)</sup>. 그러나 치아우식증에 대한 근본적인 원인해결을 위해서는 *S. mutans*에 의한 치아우식증 발병과정의 분자생물학적 기작과 *S. mutans*가 구강내부 환경에 노출시 겪는 다양한 stress에 저항하는 능력 등을 분석하는 연구가 필요하며<sup>14)</sup>, 특히 *S. mutans*의 산에 대한 stress에 저항하는 방어기작에 관한 연구는 치아우식증에 대한 병독성 해결에 있어서 주요한 해결책을 제시할 수 있을 것으로 사료되어진다.

따라서 본 실험에서는 산에 대한 *S. mutans*의 스트레스 반

<sup>†</sup>Corresponding author

Tel: 051-320-2922

Fax: 051-320-2900

E-mail: khkangda@hanmail.net

응을 이해하기 위하여 *S. mutans* KCTC 3065을 이용하여 lactic acid를 농도별로 첨가 하였을 때 일어나는 반응을 생리적인 측면에서 살펴보고자 하였으며 acid stress 동안에 균주의 생장곡선, 세포막 지방산 변화와 산에 대한 민감성 및 단백질 패턴 변화를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 생명공학연구소로부터 분양받은 *S. mutans* KCTC 3065를 사용하였으며, 균주의 보관 및 배양은 brain heart infusion(BHI) 배지를 사용하였다.

### 2. 배양

고압 멸균한 BHI배지에 *S. mutans*를 1 loop접종하고 37°C에서 12시간 배양하여 전 배양한 균주로 사용하였다.

### 3. Growth test

고압 멸균한 BHI 액체배지에 0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM의 lactic acid를 농도별로 각각 첨가하고 전 배양한 균주를 1% 접종한 후, 37°C에서 배양하면서 Spectrophotometer (Uvicon 932, USA)를 이용하여 600 nm에서 OD값을 측정하였다. 또한 고압 멸균한 BHI 액체배지에 전 배양한 균주를 1% 접종하여 37°C에서 지수증식기까지 배양한 후, 0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM의 lactic acid를 농도별로 각각 첨가하여 위와 같은 방법으로 OD값을 측정하였다.

### 4. 지방산 분석

고압 멸균한 BHI 액체배지에 전 배양한 균주를 1% 접종하여 37°C에서 지수증식기까지 배양한 후, 배양한 균체에 20 mM의 lactic acid를 처리하고 2시간동안 시간대별로 균체를 모아 세척한 후 screw cap tube에 옮겼다. 15% NaOH를 첨가한 50% methanol 1 ml을 가하고 100°C에서 30분간 가열한 후 냉각하여 6.0 N HCl 325 ml과 methanol 275 ml을 혼합한 용액을 2 ml을 가하고 80°C에서 10분간 가열한 후 냉각하였다. Hexan과 Methy-tert Butyl Ether를 동량으로 섞은 용액을 1.25 ml 첨가한 뒤 10분간 잘 혼합하여 반응액을 실온에서 정치하여 2개의 층으로 분리시킨 뒤 하등액을 제거하고 0.25 M NaOH를 3 ml 첨가하여 5분간 혼합하였다. 포화 NaCl를 적당량 가하여 층 분리를 확실하게 한 후 상등액을 screw sample vial(Hewlett Packard)로 옮겨 시료로 사용하였다.

지방산 분석에는 Hewlett Packard series II gas chromatograph model 5890A(Microbial ID, Inc., Delaware, USA)를 이용하였다. 이용한 separation column은 25 cm×0.22 cm×0.33 cm methyl phenyl silicone fused silica capillary column(HP 1909B-102)을 사용하였고, Microbial Identification System Software (Microbial ID, Inc., Delaware, USA)를 통해 지방산의 profile을 확인하였다.

### 5. 산에 대한 민감성 측정

고압 멸균한 BHI 액체배지에 전 배양한 균주를 1% 접종하여 37°C에서 지수증식기까지 배양한 후, lactic acid를 각각

0, 60, 70, 80 mM로 농도별로 첨가하여 0, 30, 60, 90 min 반응 후 BHI 한천배지에 5 μl 떨어뜨려 37°C에서 24시간 배양하여 결과를 관찰하였다.

## 6. SDS-PAGE Gel Electrophoresis

BHI 액체배지에 전 배양한 균주를 1% 접종한 후, 37°C에서 배양하여 지수증식기까지 배양시켜 20 mM의 lactic acid를 첨가하여 2시간동안 acid shock를 주었다. 이 후 균체를 원심 분리하여 침전시켰고, 생리식염수로 세척하였다. Glass bead와 0.1 mM PMSF가 포함된 lysis buffer(80 mM Tris-Cl pH 7.3)를 2 : 1 : 1의 비율로 넣고 Micromixer를 이용하여 2분간 6회 lysis 시켰다. 균체를 원심분리하여 상등액을 취한 후 Bradford 법으로 단백질을 정량하고 12% SDS-PAGE Gel에 loading하여 전기영동 하였다. CBB-R(0.001% Coomassie Blue R-250, 45% methanol, 10% acetic acid)으로 염색 후 탈색하여 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. *S. mutans* KCTC 3065의 생육곡선

Lactic acid를 배지에 농도별로 첨가하여 농도에 따른 *S. mutans*의 성장패턴을 조사하였다. Fig. 1에서 보듯이 배지에 lactic acid의 함량을 증가시킬수록 균주의 생육이 저해되는 것을 알 수 있으며 40 mM 이상의 lactic acid를 첨가한 배지에서는 흡광도의 증가가 거의 없었다. Lactic acid를 첨가하지 않았을 때의 최대 흡광도는 1.35였고, 10 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 1.15로 정상조건에 비해 생육이 감소하였다. 30 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 최대흡광도가 0.86으로 정상조건에 비해 생육이 현저하게 감소하였으며, 40 mM에서는 최대흡광도가 0.11로 시간의 경과에 따른 흡광도의 증가가 거의 없었다. 또한 lactic acid를 첨가하지 않은 정상배지에서는 약 8시간이 경과하여 정지기에 도달하는 반면, lactic acid의 농도가 증가되는 배지일수록 정지기에 도달하는데 시간이 오래 소요되어, 10 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 약 12시간 후에 정지기에 도달하였으며, 20 mM과 30 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 약 24시간 후에 정지기에 도달하여 정상조건에 비해 정지기에 도달하는데 3배의 시간이 소요되었다.

균의 성장이 가장 활발한 지수증식기 일 때 lactic acid를 첨가한 결과(Fig. 2), 10 mM의 lactic acid를 첨가한 배지에서는 최대흡광도가 1.30으로 30 mM의 lactic acid를 첨가한

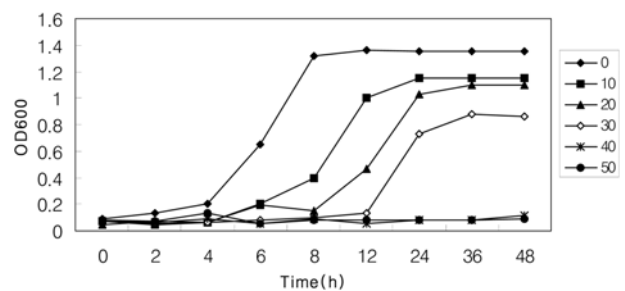


Fig. 1. Growth Curve. Cells were grown in BHI media(pH 7.2) containing 0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM and 50 mM of lactic acid for 48hrs at 37°C.

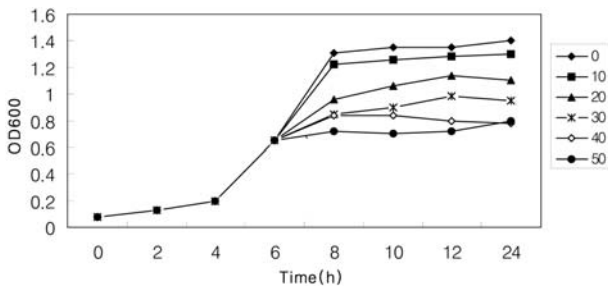


Fig. 2. Growth Curve. Lactic acid was added in the exponential phase of growth with different concentrations of 0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM and 50 mM for 24hrs at 37 °C.

배지에서는 0.95로 나타났으며 40 mM에서는 최대흡광도가 0.84로 시간의 경과에 따른 흡광도의 변화가 거의 없었다. 또한 10 mM의 lactic acid를 첨가한 배지에서는 약 8시간이 경과하여 정지기 상태로 접어들었으며, 20 mM과 30 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 약 10시간 후에 정지기에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과로 배지에 첨가된 lactic acid의 함량에 비례하여 *S. mutans*의 성장이 완만해 지는 것을 알 수 있었으며 유도기일 때 lactic acid를 첨가한 경우와 지수증식기일 때 lactic acid를 첨가한 경우의 OD값을 비교해 보면 지수증식기에 lactic acid를 첨가한 경우가 유도기에 비해 균의 성장이 더 활발한 것을 관찰 할 수 있었는데, 이는 지수증식기까지 성장하는 동안 대사과정을 통하여 생성되어지는 산에 대하여 *S. mutans*가 특유의 산 적응 기작에 의하여 적응한 결과로 사료되어진다.

2. 산에 대한 균주의 Survival Test

지수증식기의 균주를 취하여 0, 60, 70 그리고 80 mM 농도의 lactic acid를 처리한 후 각각 0, 30, 60, 90 min 후에 colony의 생성을 관찰하여 균주의 생존유무를 살펴보았다 (Fig. 3).

70 mM의 농도로 lactic acid를 처리하고 90분후부터는 colony의 밀도가 급격히 낮아지며 생존에 영향을 받는 것을 관찰할 수 있었으며, lactic acid의 농도가 80 mM이상에서는 생존이 거의 불가능한 것을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과로 *S. mutans*는 80 mM이상의 고농도의 산에

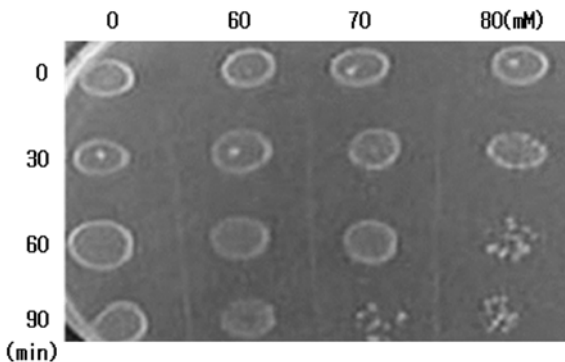


Fig. 3. Survival test against lactic acid. Cells growing in the exponential phase were treated with 60, 70 and 80 mM of lactic acid for 90min at 37°C.

노출되는 경우 생육이 불가능한 것을 알 수 있었다.

3. Lactic acid 처리 시 세포막 지방산 조성 분석

일반적으로 세포막의 지방산들은 포화지방산과 불포화지방산으로 혼합되어 있으며, 불포화 지방산은 이중결합의 수에 따라 그 포화도가 조금씩 차이를 보인다. *S. mutans* KCTC 3065의 지방산 조성을 분석한 결과, C<sub>16:0</sub>과 C<sub>18:1</sub>이 전체의 약 70%를 차지하는 것을 알 수 있었으며, acid stress 동안에는 C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, 그리고 C<sub>18:1</sub>에 변화를 나타내었다. 불포화지방산인 C<sub>18:1</sub>은 30.92%에서 33.89%로 증가하였으며 포화지방산인 C<sub>14:0</sub>과 C<sub>16:0</sub>은 각각 5.02%에서 2.62%로, 39.16%에서 33.69%로 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4). 일반적으로 stress 하에서 막 지방산들은 막의 손상을 받아 포화지방산이 감소하고 불포화 지방산의 비가 증가하며 이로 인하여 막의 유동성이 증가한다고 알려져 있다<sup>15,16</sup>. 위 결과에서도 stress가 가해지는 시간에 따라 불포화도가 증가하고 포화도는 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 그러나 불포화 지방산인 C<sub>16:1</sub>의 경우 7.21%에서 4.38%로 감소하는 상이한 결과를 나타내 앞으로의 연구에서 이에 대한 원인 규명이 필요할 것으로 사료되어진다.

4. Lactic acid 처리 시 단백질 패턴 분석

*S. mutans*를 BHI 액체배지에서 지수증식기까지 배양시켜 20 mM의 lactic acid를 처리하고 2시간동안 시간대별로 균체를 모아 단백질을 회수하여 단백질 패턴을 관찰하였다. SDS-PAGE 전기영동을 통하여 확인한 결과, acid stress동안 발현이 증가된 단백질은 약 70, 60, 45, 40, 그리고 23 kDa의 분자량을 가지는 단백질들로 band가 증가하는 것을 가시적으로 확인할 수 있었다(Fig. 5).

이들 단백질은 acid stress에 관여하는 단백질들로 추정되며, 다른 논문에서 발표된 많은 stress proteins들과도 연관성이 큰 것으로 판단된다<sup>17,18</sup>. 이미 알려진 acid stress protein 중에는 Hsp90, Hsp70, Hsp60 등이 보고 되고 있으며 acid shock protein은 heat shock stress, oxidative stress 등과 같은 stress response와도 서로 관련이 있다고 보고 되고 있다<sup>19,20</sup>. *S. mutans*가 다른 구강내 미생물들과는 달리 내산성 가질 수 있는 요인으로 스트레스단백질의 발현은 매우 중요하며 따라서 앞으로의 연구에서는 스트레스 단백질을 동정하고 유전자 발현 형태 및 관련대사를 밝혀내는 연구가 계속적으로 행해져야 할 것으로 사료되어진다.

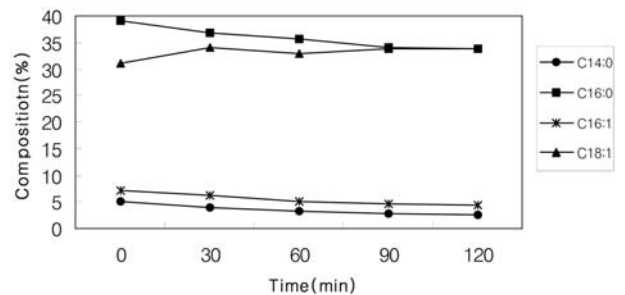


Fig. 4. Fatty acid composition. Exponentially grown cells were treated with 20 mmol/L lactic acid. Fatty acid composition was measured at 0, 30, 60, 90 and 120 min.

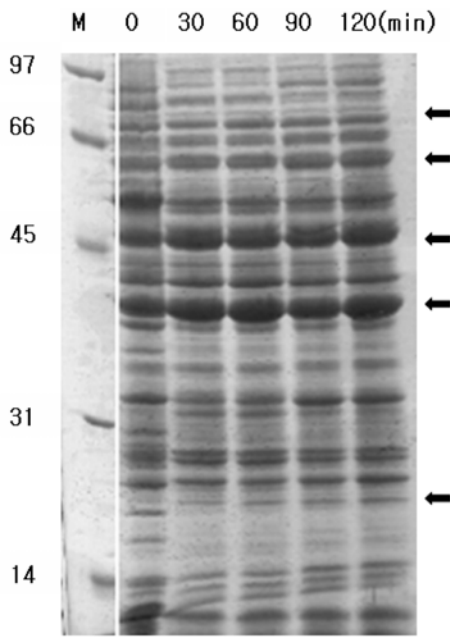


Fig. 5. Protein display using SDS-PAGE Gel Electrophoresis. Protein standards were : rabbit muscle phosphorylase B(97 kDa); bovin serum albumin(66 kDa); ovalbumin(45 kDa); bovin carbonic anhydrase(31 kDa); hen egg lysozyme(14 kDa)

## 요약

본 실험에서는 *S. mutans* KCTC 3065을 이용하여 lactic acid를 첨가하였을 때 일어나는 스트레스 반응을 살펴보고자 하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 배지에 lactic acid를 농도별로 첨가하여 농도에 따른 생육저해현상을 조사한 결과, 배지에 첨가된 lactic acid의 함량에 비례하여 *S. mutans*의 성장이 완만해지며, 지수증식기일 때 lactic acid를 첨가하였을 경우 유도기일 때 lactic acid를 첨가한 경우보다 균의 성장이 활발한 것을 알 수 있었다.
2. 대수증식기의 균주를 취하여 0, 60, 70, 80 mM 농도의 lactic acid를 처리한 후 colony의 생성으로 균주의 생존 유무를 관찰한 결과, 70 mM의 농도로 lactic acid를 처리하고 90분후부터는 colony의 밀도가 급격히 낮아지며 생존에 영향을 받는 것을 관찰할 수 있었으며, lactic acid의 농도가 80 mM이상에서는 생존이 거의 불가능한 것으로 나타났다.
3. Acid stress 동안에 지방산 조성의 변화를 관찰한 결과,  $C_{18:1}$ 은 30.92%에서 33.89%로 증가하였으며  $C_{14:0}$ 은 5.02%에서 2.62%로  $C_{16:0}$ 은 39.16%에서 33.69%로 감소하였다.
4. Acid stress 동안에 단백질 패턴의 변화를 관찰한 결과, 약 70 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 40 kDa 그리고 23 kDa의 단백질 발현이 증가되는 것을 볼 수 있었다.

## 참고문헌

1. Houte JV: Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int den J* 30: 305-308, 1980.
2. Marsh PD: Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 71(7): 1431-1438, 1999.
3. Inoue M, Koga T: Properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. *Infect Immunity* 25: 922-929, 1979.
4. Bende GR, Sutton SCV, Marquis RE: Acid tolerance, proton permeabilities and membrane ATPase of oral streptococci. *Infect Immun* 53: 331-338, 1986.
5. Li YH, Lau PCY, Tang N, Svensater G, Ellen RP, Cvitkovic DG: Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 184: 6333-6342, 2002.
6. Muroi H, Kubo I: Combination effects of anti-bacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. *J Agric Food Chem* 4: 1102-1105, 1993.
7. Luck TA: Review of its action on *Mutans streptococci* and dental plaque-its clinical significance. *Int Dent J* 45: 77-92, 1999.
8. Belli WA, Marquis RE: Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 57: 1134-1138, 1991.
9. Goldberg I, Eschar L: Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition. *Appl Environ Microbiol* 33: 489-496, 1997.
10. Guggenheim B: Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int Dent J* 20: 657-678, 1970.
11. Hanada N, Takehara T: (1-3)-alpha-D-glucan synthase from *Streptococcus mutans* AHT(serotype) does not synthesise glucan without primer. *Carbohydr Res* 168(1): 120-124, 1987.
12. Hwang JK, Kim HJ, Shim JS, Pyun YR: Bactericidal activity of chitosan on *Streptococcus mutans*. *Kor J Food Sci Technol* 31: 522-526, 1999.
13. Chun JY, Ryu IH, Lee SU, Lee KS: Isolation and Identification of novel alkaliphilic *Bacillus alkalophilus* JY-827 with anticaries micobe *Streptococcus mutans*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 28: 243-250, 2000.
14. Han YK, Song SS, Lee IS: Acid tolerance response of *Streptococcus mutans* at anaerobic condition. *J Dent Hygiene Sci* 1: 7-11, 2001.
15. Bardi LC, Marzona M: *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *Int J Food Microbiol* 47: 133-140, 1999.
16. Bencheikroun K, Bonaly R: Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in presence of surfactant. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 673-678, 1992.
17. Van HJ, Lopman J, Kent RO: The final pH of bacteria comprising the predominant flora of sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res* 75: 1008-1014, 1996.
18. Hahn K, Faustoferrri RC, Quivey JR: Induction of an AP endonuclease activity in *Streptococcus mutans* during growth at low pH. *Mol Microbiol* 31: 1489-1498 1999.
19. Suzuki T, Tagami J, Hanada N: Role of F1F0-ATPase in the growth of *Streptococcus mutans* GS5. *J Appl Microbiol* 88: 555-562, 2000.
20. Svensater G, Sjogreen B, Hamilton I: Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology* 146: 107-117, 2000.

(Received February 12, 2007; Accepted March 21, 2007)

