

자일리톨 처리 농도에 따른 자일리톨 감성균주와 내성균주의 독력 비교

임상욱 · 안상헌¹ · 송근배[†]

경북대학교 치의학전문대학원 예방치과학교실, ¹대구보건대학 치위생학과

Comparison of Virulence in Xylitol-Sensitive and -Resistant *Streptococcus mutans* to Different Concentrations of Xylitol

Sang-Uk Im, Sang-Hun Ahn¹ and Keun-Bae Song[†]

Dept. of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Jung-Gu, Daegu 700-412, Korea

¹Dental Hygiene, Daegu Health College, Buk-gu, Daegu 702-722, Korea

Abstract *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) is the major causative bacteria in dental caries. Xylitol is effective anticariogenic natural sugar substitute by inhibiting the virulence of *S. mutans*. However, long-term xylitol consumption leads to the emergence of the xylitol-resistant (XR) strains which means xylitol is no more inhibited their growth. We therefore confirmed the general characteristics and the virulence factors of the xylitol-sensitive (XS) and XR *S. mutans* for different concentrations of xylitol. *S. mutans* KCTC 3065 was maintained in TYE medium containing 0.4% glucose with 1% xylitol during 30 days at 37°C, 10% CO₂ to form XR strain. The strains were transferred to new medium every 24 hr and the same procedures without xylitol were repeated for the formation of XS *S. mutans*. Both XS and XR were cultured in different concentrations of xylitol (0%, 0.1% and 1%) then, cell growth, acid production and mRNA expression of *gff* genes were analyzed. Xylitol reduced the cell growth of XS *S. mutans* in dose-dependent manner, but not reduced that of XR. Xylitol inhibited acid production of XS in dose-dependent manner, but not inhibited that of XR. Xylitol reduced the *gffB* and *gffD* mRNA expression of XS *S. mutans* which genes synthesized soluble and insoluble extracellular polysaccharides, but not reduced that of XR. These results indicate that the virulence of XR *S. mutans* is different characters of XS strains, which suggests XR strains may have different cariogenicity of XS strains. Further study is needed to explain the mechanism related to extracellular polysaccharide in the XR strains.

Key words Glucosyltransferase, *Streptococcus mutans*, Virulence, Xylitol-sensitive, Xylitol-resistant

서 론

치아우식증은 구강내의 가장 대표적인 감염성 질환으로, 세균성, 식이성, 및 숙주성 요인에 의해 발생하게 된다. 음식으로 섭취된 탄수화물은 구강 내 존재하는 세균에 의해 분해되어 유기산을 만들어내고 이들이 치아 경조직의 탈회를 일으켜 우식이 진행된다¹⁻². 이러한 치아우식증의 효과적인 예방을 위해서 위험요인을 사전에 차단하는 것이 매우 중요하다고 하겠다. 치아우식증을 유발하는 대표적인 세균은 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)로 알려져 있으며³ 이들이 가지고 있는 독력인자는 영양의 저장고 역할도 담당하는 세포외 다당류 합성에 의한 세포부착력 외에도 탄수화물을 분해하여 lactic acid로 만드는 산생성

능력과 낮은 pH에서도 지속적인 성장과 대사 작용이 가능한 산내성, 치아 표면에 형성된 biofilm 내의 다른 경쟁 종의 성장을 억제하는 bacteriocin 형성 등이라 할 수 있다. sucrose를 glucose와 fructose로 분해하는 glucosyltransferase (GTF)와 fructosyltransferase (FTF)에 의해 glucose에서 glucan을, fructose에서 fructan을 합성하며⁴⁻⁶ 세포부착력은 이들 중 glucan과 중요한 관련이 있다. glucan은 glucose가 연결되는 방식에 따라 α -1,6 linked linear chain을 이루는 수용성인 dextran과 α -1,3 linked linear chain을 이루는 비수용성인 mutan으로 구분하며 치아 표면과 세포, 또는 세포간의 결합에 모두 중요하게 이용 된다⁷. 형성된 세포외 다당류 glucan은 치아 표면의 다양한 glycoprotein이나 세포 표면에 존재하는 glucan binding protein (GBP)에 의해 치아 표면의 획득피막에 부착하여 세균 부착을 매개하고, biofilm 내의 세균의 집락화를 촉진하여 치면세균막의 두께를 증가시키게 된다⁸⁻⁹.

자일리톨은 다양하게 사용되는 설탕 대체물 중 가장 효

[†]Corresponding author

Tel: 010-2762-2502

Fax: 053-423-2947

E-mail: kbsong@knu.ac.kr

과적인 5탄당 알코올로써 설탕과 유사한 단맛을 가지며 시원한 느낌을 준다. *S. mutans*에 의해서 탄수화물 대사에 이용되지 않으며 당대사를 억제하여 세균의 증식을 억제 혹은 지연시키며 이로 인해 산생성 또한 감소하게 된다¹⁰. 자일리톨은 fructose phosphotransferase system (fructose PTS)에 의해서 세포내로 들어와 다른 탄수화물들과 경쟁하게 되므로 당대사를 억제하고, 실제 대사에는 이용되지 않은 채 다시 세포외로 배출되는 xylitol futile cycle에 의하며 세균의 에너지원만을 소모시킨다¹¹. 자일리톨을 장기간 섭취한 환자에서 자일리톨에 내성을 가지는 균주 (xylitol-resistant; XR)가 발견됨에 따라¹²⁻¹³ 자일리톨 내성균주의 독력관련 특징이 자일리톨에 의해 성장이 억제되는 자일리톨 감성균주 (xylitol-sensitive; XS)와는 어떻게 다른지에 대한 비교연구¹⁴⁻¹⁵가 필요하게 되었으나 아직은 연구 실적이 미미하다. 몇몇의 연구에서 포도당 존재 하에서 자일리톨에 의해 *S. mutans*의 성장이 억제¹⁶⁻¹⁸ 되었으며, BHI 배지 상에서 첨가되는 자일리톨 농도에 의존적으로 성장이 억제되었다¹⁹. 또한 Kim²⁰의 연구에서 70% 이상의 자일리톨 함유된 용액으로 가글을 하는 경우 *S. mutans*의 활성도에 영향을 미치는 것으로 보고되었으며, Yeom 등²¹은 1%의 sucrose 포함된 BHI 배지에서 배양된 *S. mutans* Ingbritt는 자일리톨의 농도에 의존적으로 *gff* mRNA 발현이 억제됨을 Fluorescent in situ hybridization (FISH)법을 통해 보여주었다. 그러나 다른 보고에서는 자일리톨에 의한 *S. mutans*의 증식과 산생성 능력의 변화는 없다고 하였다²²⁻²³.

따라서 본 연구에서는 *S. mutans*의 자일리톨에 장기간 노출시켜 자일리톨에 내성이 있는 균주 (XR)를 형성하고, 다양한 농도의 자일리톨을 첨가함에 따라 자일리톨 감성균주 (XS)와 자일리톨 내성균주의 성장, 산생성 및 부착력에 영향을 미치는 세포의 다당류 합성관련 유전자 *gffB*와 *gffD*의 mRNA 발현을 비교해보기 위하여 연구를 수행하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1) 자일리톨 내성균주의 형성 및 배양

한국생명공학연구원 생명자원센터에서 분양받은 *S. mutans* KCTC 3065를 0.4% 포도당 (Sigma, MO, USA)이 포함된 TYE 액체배지 (Trypticase yeast extract: Difco Laboratories, MD, USA; 1.7% trypticase: Difco Laboratories, MD, USA; 0.3% yeast extract: Difco Laboratories, MD, USA; 0.5% sodium chloride: Sigma, MO, USA; 0.25% potassium phosphate: Sigma, MO, USA) 10 ml에 자일리톨 (Sigma Chemical MO, USA)을 최종농도가 1% (66 mM)가 되도록 첨가하여 37°C, 10% CO₂에서 혐기성 상태로 24시간 배양하였다. 다음날 동일한 조성의 배지에 전날의 세균배양액 100 µl를 혼합하여 이를 30일간 반복·

지속하였다. 대조군의 경우 자일리톨을 첨가하지 않고 동일한 조건으로 배양하였다.

2) 자일리톨 내성균주의 확인

배양 매 10일마다 타 균의 오염이 없음을 확인하기 위하여 GTFB specific primer를 이용하여 *S. mutans*임을 동정하였다. 자일리톨에 의해 성장이 뚜렷하게 억제되는 경우를 자일리톨 감성균주 (XS), 자일리톨을 첨가하거나 첨가하지 않거나 성장의 차이가 없는 경우를 자일리톨 내성균주 (XR)로 지칭하였다.

3) 자일리톨 처리농도

형성된 XR과 XS는 0.2% 포도당이 포함된 TYE 액체 배지 10 ml에 자일리톨 최종농도를 0%, 0.1%, 1%가 되도록 첨가하여 각각의 조건에서 성장, 산생성 및 유전자 발현 등의 독력관련 특징을 비교하였다.

2. 연구방법

1) 성장 및 산생성 측정

*S. mutans*를 각각의 배지에 OD₆₀₀이 0.05가 되도록 접종하여 37°C, 10% CO₂에서 총 12시간 동안 배양하였으며, 매 시간마다 세균배양액의 흡광도를 600 nm의 파장에서 측정 (ASYS, Austria)하고, 이를 바탕으로 doubling time (Td)을 계산하였다. 또한 산생성 정도를 확인하기 위하여 세균배양액을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 따로 분리하여 직접 혹은 냉장보관 하였다가 이를 pH meter (Radiometer Analytical, Villeurbanne, France)를 사용하여 측정하였다. 냉장보관의 유무와 pH 값의 차이는 전혀 없었다 (Data now shown).

2) *gff* 유전자 mRNA 발현 분석

*S. mutans*를 동일한 조건으로 배양시킨 후 Tri-Reagent (Molecular Research Center, OH, USA)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 분리된 RNA를 정량하고 2 µg을 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa, Japan)을 사용하여 역전사 하였으며, 이를 3차 증류수로 2배 희석하여 사용하였다. mRNA의 증폭과 분석은 Rotor-Gene 6000 (Corbett, Australia)과 SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, CA, USA)을 사용한 실시간 중합연쇄반응 (realtime reverse transcription-polymerase chain reaction; realtime RT-PCR)를 이용하였다. 실험에 사용한 primer는 Shemesh 등²⁴의 논문에서 근거하여 realtime RT-PCR이 가능하도록 200 bp 미만인 되도록 제작하였다 (Table 1). PCR 반응용액의 구성은 0.5 x syber green (Invitrogen, CA, USA), 4 µl cDNA, 0.2 mM dNTP mixture, 0.1 µM PCR primer를 포함하여 총 20 µl가 되도록 하였다. 반응 조건은 95°C, 15초간 initiation denaturation을 진행한 후 60°C에서 1분간 annealing과 extension을 진행하였으

Table 1. Real-time PCR primer for identification of *gtf* genes

Locus tag	Gene description	Primer sequences (5'-3')	
		Forward	Reverse
16S rRNA	Normalizing internal standard	CCTACGGGAGGCAGCAGTAG	CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA
SMU_1004	Glucosyltransferase-I (<i>gtfB</i>)	AGCAATGCAGCCAATCTACAAAT	ACGAACCTTGCCGTTATTGTCA
SMU_910	Glucosyltransferase-S (<i>gtfD</i>)	ACAGCAGACAGCAGCCAAGA	ACTGGGTTTGCTGCGITTTG

며, 유전자들의 발현정도의 비교를 위한 standard로 이용하기 위하여 *S. mutans*의 16S rRNA를 사용해서 normalization 하였다. 실험은 두 번 이상 RNA를 분리하여 진행하였으며 이 결과를 분석에 이용하였다.

3. 분석방법

수집된 모든 자료는 통계분석용 소프트웨어인 SPSS 14.0 프로그램 (SPSS Inc, IL, USA)을 이용하여 분석하였다. 자일리톨 감성균주와 내성균주 각각에서 자일리톨 농도에 따른 성장 및 산생성, 유전자 발현 정도의 차이는 Kruskal-Wallis 검정을 통해 분석하였으며, 자일리톨 감성균주와 내성균주 사이의 성장 및 산생성, 유전자 발현 정도의 차이는 Mann-Whitney 검정을 이용하여 비교하였다. 모든 통계분석에서 유의성 판정을 위한 유의수준은 5%로 고려하였다.

결 과

1. XR과 XS의 일반적인 특징비교

형성된 자일리톨 내성균주 (XR)와 감성균주 (XS)의 일

반적인 특징을 비교하기 위해 1%의 자일리톨을 첨가한 후 12시간동안 배양하며 XS와 XR의 성장과 산생성을 확인하였다. 1% 자일리톨이 첨가된 TYE에 배양된 XR의 경우에는 성장이 억제되지 않고 정상적인 시그모이드 성장곡선을 나타내나 동일한 액체배지에 배양된 XS의 경우에는 성장이 억제되는 경향을 보였다 (Fig. 1A). 마찬가지로 pH의 변화를 확인한 결과도 성장과 유사하게 1% 자일리톨이 첨가된 TYE에 배양된 XS의 경우에는 산생성이 억제됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B).

2. 0%, 0.1%, 1%의 자일리톨 농도에 따른 XR과 XS의 성장과 산생성의 비교

형성된 XR과 XS를 각각 0%, 0.1%, 1%의 자일리톨을 첨가하여 성장과 산생성의 변화를 관찰하였다 (Table 2, Fig. 2). 0%, 0.1%, 1%의 자일리톨이 첨가된 TYE에서 배양된 XS의 경우에는 자일리톨에 농도 의존적으로 성장이 억제되었으며 (Fig. 2A) 마찬가지로 산생성도 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다 (Fig. 2B). 반면, XR의 경우는 XS와 다르게 성장과 산생성의 경우 첨가된 자일리톨의 농도와 상관없이 모두 유사한 패턴을 보였다 (Table 2).

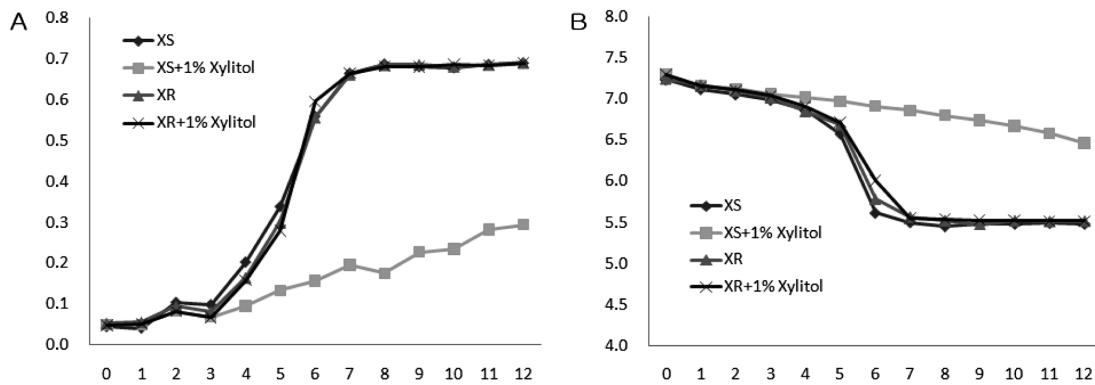


Fig. 1. The growth curves (A) and the pH curves (B) of XS and XR *S. mutans* in the presence or absence of 1% xylitol for 12 hours.

Table 2. The optical density of final growth and the pH value of XS and XR *S. mutans* in the presence of 0%, 0.1% and 1% xylitol for 12 hours

Xylitol % (mM)	XS			XR		
	Td	Final growth OD ₆₀₀	Final pH	Td	Final growth OD ₆₀₀	Final pH
0% (0 mM)	3.2±0.0	0.69±0.01	5.37±0.01	3.2±0.0	0.69±0.01	5.50±0.00
0.1% (6.6 mM)	3.4±0.0	0.58±0.01	5.58±0.01	3.2±0.0	0.69±0.01	5.50±0.00
1% (66 mM)	4.8±0.0	0.28±0.01	6.52±0.00	3.2±0.0	0.69±0.01	5.50±0.00

*Td = doubling time

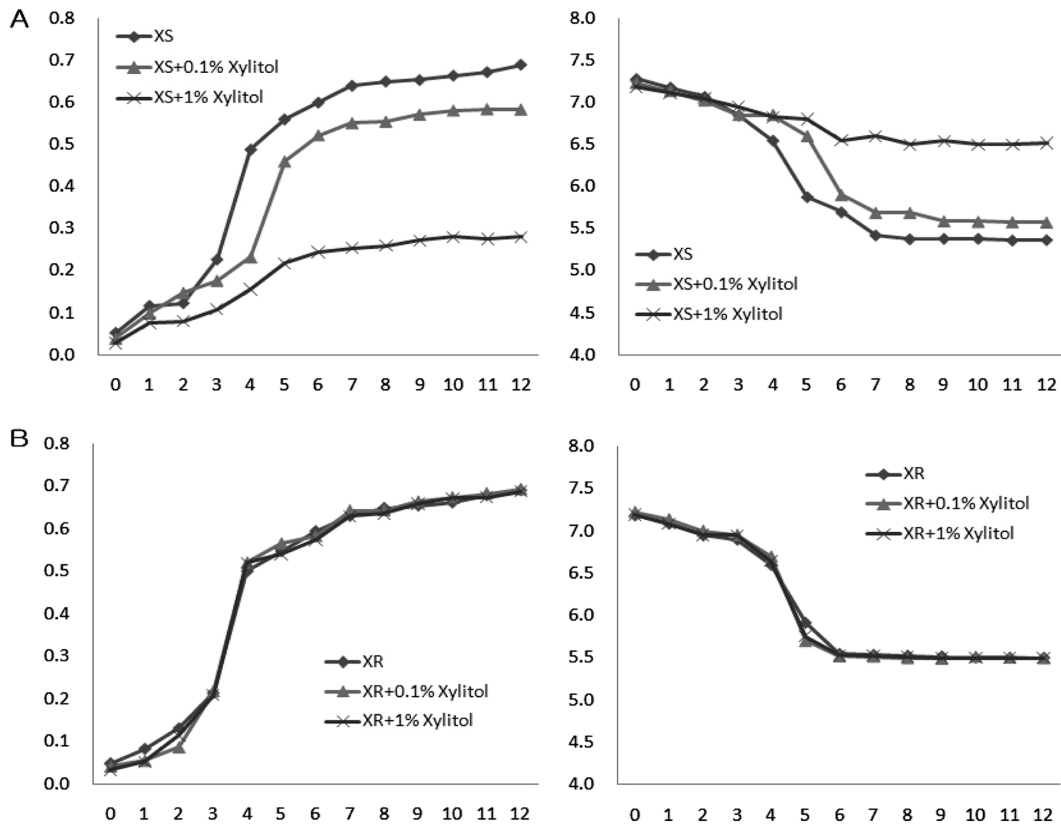


Fig. 2. The growth curves and the pH curves of XS (A) and XR (B) *S. mutans* in the presence of 0%, 0.1% and 1% xylitol for 12 hours.

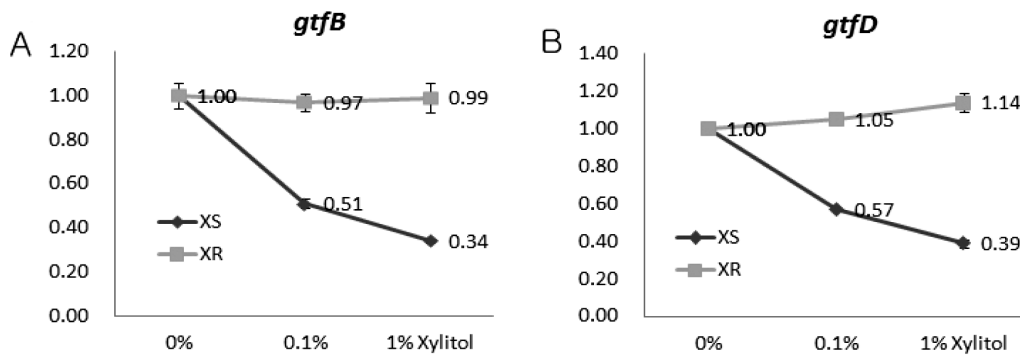


Fig. 3. Relative quantities of *gtfB* (A) and *gtfD* (B) mRNA expression of XS and XR *S. mutans* in the presence of 0%, 0.1% and 1% xylitol for 12 hours. The fold change of both bacteria in the presence of 0% xylitol was set as a standard (Fold changes=1.0) and data are expressed as mean±SD.

3. 0%, 0.1%, 1%의 자일리톨 농도에 따른 *gtf* 유전자의 발현 비교

첨가된 자일리톨의 농도에 따른 XS와 XR의 세포의 다당류 합성관련 유전자 *gtfB*와 *gtfD*의 mRNA 발현을 real-time RT-PCR을 통하여 확인한 결과 XR의 경우에는 성장이나 산생성과 마찬가지로 유전자의 발현의 차이가 거의 없는 데 비해, XS의 경우에는 첨가된 자일리톨에 농도 의존적으로 *gtfB*와 *gtfD*의 mRNA 발현이 감소하는 것이 확인되었다 (Fig. 3).

고찰

본 연구에서는 자일리톨의 내성을 가지는 *S. mutans* (XR)를 형성하여 이를 자일리톨 감성균주 (XS)와 비교하여 성장과 산생성, 세포의 다당류 합성에 관여하는 glucosyl-transferase의 발현을 확인하였다. Trahan 등^{13,25)}의 연구 결과에 따르면, XS를 자일리톨이 포함된 다양한 탄수화물 배지에서 지속적으로 배양하였을 때 XR이 출현함을 보고하였다. 본 연구 역시 *S. mutans*에 0.4%의 포도당과 1% 자일리톨이 첨가된 TYE 배지에서 30일 간 배양한 후

XR을 형성하였으며, 자일리톨이 첨가되었을 때 XR의 성장이나 산생성의 특징은 자일리톨이 첨가되지 않은 일반적인 XS의 성장이나 산생성과 유사하였으므로 자일리톨에 대한 내성이 생긴 균주가 형성됨을 확인할 수 있었다.

자일리톨에 의한 *S. mutans*의 성장 억제 메커니즘은 futile cycle로 설명할 수 있는데, 자일리톨은 세포 외부의 탄수화물을 세포 내로 운반하는 fructose PTS에 의해 유입되지만 당대사에 이용되지 못하고 세포 외부로 다시 배출되며, 이와 같은 과정이 반복되면서 점점 사용될 수 있는 에너지는 고갈되어 최종적으로 *S. mutans*의 성장이 억제되는 것이다^{10,25-26}. XS의 경우에는 자일리톨이 첨가되는 농도에 의존적으로 *gtfB*와 *gtfD*의 mRNA 발현이 감소하였으며 이는 포도당과 자일리톨의 경쟁에 의한 에너지 고갈이 자일리톨이 첨가되는 농도에 의해 어느 정도 조절됨을 의미한다. XR의 경우에는 자일리톨이 첨가되어도 자일리톨에 의한 성장이나 산생성이 억제가 일어나지 않는 이유는 자일리톨에 대한 감수성을 잃어버린 것으로 생각된다. *S. mutans*는 탄수화물을 대사하여 에너지원으로 이용하며, 당대사의 결과물로 산이 생성되므로, 성장과 산생성은 밀접한 관련을 가진다¹⁻². Soyer와 Frank²⁷는 당대사의 결과물 중 하나인 젖산을 측정함으로써 산생성이 *S. mutans*의 성장과 관련이 있음을 보고하였다. 본 연구 결과에서도 XS와 XR의 성장과 산생성을 비교하였을 때, 자일리톨이 존재하는 경우 XR의 성장과 산생성에는 변화가 없었으나 XS의 경우 자일리톨의 첨가에 따라 농도 의존적으로 성장과 산생성이 억제됨을 보였다.

*S. mutans*의 경우 세포외 다당류 합성과 관련된 3가지의 GTF를 생성하는데, GTFB는 주로 세포 표면에서 α -1,3 linked linear chain인 비수용성 mutan을 생성하고, GTFC는 주로 치면에서 비수용성/수용성 glucan을 생성하며, GTFD는 α -1,6 linked linear chain인 dextran을 생성한다⁷. Fujiwara 등²⁸은 *gtf* 유전자들의 발현이 *S. mutans*의 부착력에 중요함을 보였으며 특히 *gtfC*, *gtfD*는 초기부착에 중요하며 *gtfB*는 성장후기에 발현이 증가하며 초기부착을 강화시킨다고 하였다. Laflèche와 Trahan²⁹은 자일리톨 내성균주와 감성균주의 세포벽과 세포질 내의 다당류를 전자현미경으로 관찰하여 축적양상이 다름을 보고하였으며, Lee 등³⁰은 내성균주가 자당 의존적인 수산화인회석 부착력이 더 낮으며, 더 낮은 타액 농도에서 응집이 일어난다고 보고하였다. 이러한 보고들은 자일리톨의 첨가에도 불구하고 *gtf* 유전자의 mRNA 발현에는 큰 차이가 없는 자일리톨 내성균주가 치아우식유발력에는 어느 정도 차이가 있을 것이라는 예상을 가능하게 한다. 본 연구의 결과에서 XR에서는 자일리톨에 의해 성장과 산생성에 차이가 없을 뿐만 아니라 *gtf* 유전자의 발현에도 큰 차이가 없었다. 이는 자일리톨 내성균주가 감성균주에 비해 포도당이 존재할 경우 치아우식유발력이 낮다는 실험보고¹⁸와 상이한 내용으로, 아마도 단순히 mRNA

발현의 차이만으로 *S. mutans*의 치아우식유발력의 차이를 설명하기는 부족하며, 이는 형성된 GTF 효소의 번역 후 가공 및 이동, 산내성, 부착력과 관련된 다양한 유전자의 조절, bacteriocin 형성 등의 보다 다양한 메커니즘이 관련되어 있을 것으로 생각된다.

본 연구 결과는 다음과 같은 몇 가지 제한점을 가지고 있다. *S. mutans*의 독력을 확인할 수 있는 다양한 실험방법을 실시하지 않았기 때문에 *gtf* 유전자 발현과 치아우식유발력의 상관관계를 밝히지 못하였다. 또한 *gtf* 유전자의 mRNA 발현을 확인하기 위한 real-time RT-PCR의 결과는 각각의 균주의 자일리톨 농도에 대한 상대적인 양의 비교를 위해 0% 자일리톨을 기준으로 수치화 한 결과이므로 XS와 XR의 절대적인 발현의 차이를 확인하지 못하였다. 향후 연구에서는, XS와 XR에서 자일리톨의 처리 농도에 따라 세포외 다당류인 glucan의 합성이 절대적으로 억제되는지를 증명하기 위해 Lee 등³¹이 보고한 투과전자현미경 (TEM)을 통한 세포외 다당류의 실제적 확인이나 Wen 등³²이 보고한 microtiter plate assay로 polystyrene plate에 대한 부착력을 비교함으로써 보다 실증적인 결과를 도출해 내도록 하겠다.

요 약

본 연구는 표준균주 *S. mutans* KCTC3065를 이용하여 자일리톨에 내성을 가지는 자일리톨 내성균주 (XR)를 형성하고, 이들을 자일리톨이 존재하는 상태에서 배양하며 성장과 산생성, 세포외 다당류 합성관련 유전자 *gtfB*와 *gtfD*의 mRNA 발현 변화를 확인하고자 하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 장기간 자일리톨에 반복·지속 배양한 XR의 경우 1%의 자일리톨을 첨가된 TYE에 배양하여도 성장과 산생성이 억제되지 않았으므로, 형성된 XR은 자일리톨에 대한 내성을 잘 유지하는 것을 확인하였다.
2. XR과 XS를 각각 0%, 0.1%, 1%의 자일리톨을 첨가하여 성장과 산생성의 변화를 관찰한 결과 XS는 자일리톨에 농도 의존적으로 성장과 산생성이 농도 의존적으로 억제되었으나, XR은 XS와 다르게 첨가된 자일리톨의 농도와 상관없이 성장과 산생성 모두 비슷한 패턴을 보였다.
3. 첨가된 자일리톨의 농도에 따른 XS와 XR의 세포외 다당류 합성관련 유전자 *gtfB*와 *gtfD*의 mRNA 발현은 XR의 경우에는 성장이나 산생성과 마찬가지로 유전자의 발현의 차이가 거의 없는데 비해, XS의 경우에는 첨가된 자일리톨에 농도 의존적으로 *gtfB*와 *gtfD*의 mRNA 발현이 감소하는 것이 확인되었다.

이상의 실험 결과를 종합하면 XR의 일반적인 특징은 자일리톨에 의해 성장과 산생성이 억제되는 XS와 많이 다른 것으로 확인되었으며 자일리톨 농도에 따라 세포외

다당류 합성관련 유전자 *gtfB*와 *gtfD*의 mRNA 발현의 차이가 나타나지 않았으며 추후 세포의 다당류 합성을 실증할 수 있는 보충실험을 통해 보다 자세한 메커니즘을 분석하도록 하겠다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 2010년도 기본연구지원사업(유형2)(201013010000) 연구비와 충치예방연구회의 일부 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Zucca M et al.: *Streptococcus mutans* and dental caries: microbiological aspects. *G Bacteriol Virol Immunol* 83(1-12): 108-117, 1990.
- van Houte J: Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 73(3): 672-681, 1994.
- Oho T et al.: Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 15(4): 258-262, 2000.
- Yamashita Y et al.: Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun* 61(9): 3811-3817, 1993.
- Tsumori H, Kuramitsu H: The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GtfC enzyme. *Oral Microbiol Immunol* 12(5): 274-280, 1997.
- Matsumoto-Nakano M, Fuhita K, Ooshima T: Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 22(1): 30-35, 2007.
- Ebisu S et al.: The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase. *Carbohydr Res* 38: 374-381, 1974.
- Germaine GR et al.: *Streptococcus mutans* dextranase: functioning of primer dextran and endogenous dextranase in water-soluble and water-insoluble glucan synthesis. *Infect Immun* 16(2): 637-648, 1977.
- Gibbons RJ, Banghart SB: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Archs Oral Biol* 12(1): 11-24, 1967.
- Trahan L: Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. *Int Dent J* 45(suppl 1): 77-92, 1995.
- Assev S, Rölla G: Further studies in the growth inhibition of *Streptococcus mutans* OMZ176 by xylitol. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 94(2): 97-102, 1986.
- Gauthier L, Vadeboncoeur C, Mayrand D: Loss of sensitivity to xylitol by *Streptococcus mutans* LG-1. *Caries Res* 18(4): 289-295, 1984.
- Trahan L, Bourqueau G, Breton R: Emergence of multiple xylitol-resistant (fructose PTS-) mutants from human isolates of mutans streptococci during growth on dietary sugars in the presence of xylitol. *J Dent Res* 75(11): 1892-1900, 1996.
- Lee MN et al.: Quantitative comparison of mRNA expression of glucosyl-transferase (GTF) between xylitol-resistant (XR) and xylitol-sensitive (XS) mutans streptococci. *J Korean Acad Pediatr Dent* 33(1): 77-84, 2006.
- Chung SY et al.: Comparison of virulence in xylitol-resistant mutans streptococci exposed to various carbohydrates. *J Korean Acad Dent Health* 35(1): 1-9, 2011.
- Vadeboncoeur C et al.: Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. *J Dent Res* 62(8): 882-884, 1983.
- Assev S, Vegarud G, Rölla G: Growth inhibition of *Streptococcus mutans* strain OMZ 176 by xylitol. *Acta Pathol Microbiol Scand* 88(1): 61-63, 1980.
- Beckers HJ: Influence of xylitol on growth, establishment, and cariogenicity of *Streptococcus mutans* in dental plaque of rats. *Caries Res* 22(3): 166-173, 1988.
- Söderling E, Ekman TC, Taipale TJ: Growth inhibition of *Streptococcus mutans* with low xylitol concentrations. *Curr Microbiol* 56(4): 382-385, 2008.
- Kim JW: Effect of Xylitol on *Streptococcus mutans*. *J Dent Hyg Sci* 10(2): 123-129.
- Yeom JH et al.: The effect of xylitol on the expression of *gtf* gene. *J Korean Acad Pediatr* 31(2): 304-310, 2004.
- Kim BI et al.: Effects of sucrose / Xylitol Mixture on the Growth and Adhesiveness of *Streptococcus mutans*. *J Korean Acad Dent Health* 18(1): 169-181, 1994.
- Gauthier L, Vadeboncoeur C, Mayrand D: Loss of sensitivity to xylitol by *Streptococcus mutans* LG-1. *Caries Res* 18(4): 289-295, 1984.
- Shemesh M, Tam A, Steinberg D: Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. *Microbiology* 153(5): 1307-1317, 2007.
- Trahan L et al.: Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 19(1): 53-63, 1985.
- Trahan L, Néron S, Bareil M: Intracellular xylitol phosphate hydrolysis and efflux of xylitol in *Streptococcus sobrinus*. *Oral Microbiol Immunol* 6(1): 41-50, 1991.
- Soyer C, Frank RM: Influence of culture media on the growth of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in the presence of various carbohydrates and their derivatives. *J Biol Buccale* 7(3): 295-301, 1979.
- Fujiwara T et al.: Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *J Dent Res* 81(2): 109-113, 2002.
- Lafleche RG, Trahan L: EM Study of the Polysaccharides of Xylitol-Sensitive and Xylitol-Resistant *S. mutans* Fresh Isolates. *J Dent Res* 67(1 suppl): 1697, 1988.
- Lee HM et al.: A study on the cell property of xylitol-resistant *Streptococcus mutans* and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans*. *J Korean Acad Pediatr Dent* 30(4): 554-562, 2003.
- Lee YE et al.: Morphological changes in *Streptococcus mutans* after chewing gum containing xylitol for twelve months. *Curr Microbiol* 58(4): 332-337, 2009.
- Wen ZT et al.: Trigger factor in *Streptococcus mutans* in involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation. *Infect Immun* 73(1): 219-225, 2005.

(Received August 05, 2011; Revised October 14, 2011; Accepted October 17, 2011)

