

Dental Plaque Streptococci가 생산하는

세포외 다당류에 관한 연구*

I. Dental Plaque Flora 및 그의 Dextransucrase 생산능

서울대학교 치과대학 구강생화학교실

정 태 영

> Abstract <

STUDIES ON THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES PRODUCED BY ISOLATED DENTAL PLAQUE STREPTOCOCCI.

I. DENTAL PLAQUE BACTERIAL FLORA AND ITS DEXTRANSUCRASE ACTIVITY

Tai-Young Chung

Dept. of Oral Biochemistry, College of Dentistry, S.N.U.

This report was concerned with the isolation and identification of bacterial flora in the human dental plaque and the dextransucrase activity of isolated species.

The results were obtained as follows:

1. The bacterial flora, isolated from the human dental plaque, was identified as 3 species of resembling streptococci, *Streptococcus salivarius* strain SD-1, *Streptococcus mitis* strain SD-9, *Streptococcus sanguis* strain SD-10, 3 species of resembling lactobacilli, *Lactobacillus brevis* strain SD-3, *Lactobacillus acidophilus* strain SD-2 and SD-7, resembling *Staphylococcus* sp. and one species of resembling *Leuconostoc mesenteroides* strain SD-6.
2. The dextransucrase activities of resembling *Streptococcus mitis* strain SD-9 and *Streptococcus salivarius* strain SD-1 were exhibited the highest among the isolated species of human dental plaque.

서 론

탄수화물 특히 sucrose를 함유하는 음식물을 섭취하면 dental plaque가 많이 형성되는 것을 관찰하였고

(Carlsson과 Egelberg, 1965), 이는 plaque세균에 의해 sucrose를 이용하여 intermicrobial matrix를 형성하는 것으로 추측하였다(Carlsson, 1965). 이러한 추측은 plaque내에 dextran을 합성하는 streptococci가 많은

*이 논문은 문교부연구조성비로 일부를 충당하였음

비율을 찾아하는 것으로 알 수 있다. 또한 Critchley et al.(1966)과 Leach et al.(1966)에 의하면 plaque matrix의 주요성분이 dextran으로 구성되어 있음을 관찰하였다.

세균에 의해 생산되는 dextransucrase는 많은 학자에 의해 연구되었는데 Hehre(1941)가 최초로 발표한 이래 Koepsell과 Tsuchiya(1952), Tsuchiya et al.(1952), Tsuchiya와 Stringer(1954), Tsuchiya et al.(1955), Bailey et al.(1957), Stringer와 Tsuchiya(1958), Bovey(1959), Neely(1959)등이 계속 연구하였으며 근년에 와서 Eisenberg와 Hestrin(1963)은 dextransucrase는 sucrose에서 glucose를 운반하여 polyglucose chain의 합성을 촉매하는 효소로서 α -1, 6-glucan: D-fructose, 2-glucosyltransferase(EC 2.4.1.5)라 하였고, Neely(1960)는 Leuconostoc과 Streptococci에서 이 효소를 분리 추출하였다.

본 실험은 dental plaque에서 dextran을 생산하는 균주를 순수분리 배양하여 동정하고 이들 균주의 dextransucrase 생산능을 측정하여 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

Dental plaque :

20세에서 35세에 이르는 10명의 남자를 대상으로 치석을 제거한 후 48시간동안 이를 닦지않은 상태에서 dental plaque을 채취하였다.

Dental plaque는 멸균된 scaler를 사용하여 상악구 치협근부에서 채취하였고, 채취된 dental plaque는 멸균 saline에 부유시킨 다음 약 1분간 glass homogenizer에서 균등하게 부유시키어 사용하였다.

균주분리방법 :

Brain heart infusion blood agar와 Bromocresol purple(BCP) media를 각각 2개씩 만들어 부유액 0.1 ml.를 부어넣고 각각의 배지를 혐기성 및 호기성으로 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 이 배양에서 형성된 colony에서 순수배양균을 얻기 위하여 같은 배지에서 계속 계대 배양을 하여 Gram stain과 발육조건 및 생화학적 검사를 시행하여 Bergy's manual에 의해 균주를 동정하였다.

Dextransucrase활성측정 :

순수분리배양된 균주를 5.0% sucrose가 함유한 Brain heart infusion media에 접종하여 37°C에서 24시간동안 배양한 다음 이 배양액을 10,000g로 10분간 원심분리 시키어 상청액을 효소액으로 사용하였다.

Dextransucrase활성은 Somogyi의 copper-reduction법에 의해 유리되는 fructose를 측정하여 효소의 역가를 측정하였다. 즉 0.125M sucrose, 0.05M sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 효소액(배양액)을 혼합시켜서 37°C water bath에서 1시간동안 반응시켰다. control로서 0분의 반응액도 같은 방법으로 만들었다. 이 반응액의 작용을 정지시키기 위하여 0.04N NaOH를 반응액의 5배되게 첨가하였다. 그후 Somogyi법에 의해 유리된 fructose를 정량하였다. 또한 환원당 정량이 타 물질의 혼합이 될 우려가 있으므로 Dische의 ketohexose 정량법을 동시에 사용하여 Somogyi법과 비교하였다.

1 dextransucrase unit는 Tsuchiya et al. (1951)에 의해 1시간에 sucrose 1 mg.을 dextran으로 전환하는데 필요한 효소의 양으로 표시한다(fructose도 계산하여 0.52mg의 유리).

Table I Growth character and biochemical characteristics of bacteria isolated from dental plaque

Strain No.	Growth Temperature			Biochemical Test*										Growth Character		Remarks
	10° C	37° C	47° C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	6.5% NaCl	10% Bile salt	
SD-1		+	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	<i>Streptococcus sa. var. us</i>
SD-2		+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
SD-3		+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Lactobacillus brevis</i>
SD-4		+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	Unidentified Gram positive bacilli (<i>Lactobacillus</i> sp. ?)
SD-5		+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	"
SD-6	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
SD-7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i> sp.
SD-8	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
SD-9	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Streptococcus m. tis</i>
SD-10	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Streptococcus sauguis</i>

* 1Lactose
2Glucose
3Maltose
4Sucrose

5Raffinose
6Salicin
7Mannose
8Sorbitol

9Arabinose
10.....Xylose

** +positive
-negative
±doubtful

실험 결과

균주분리 :

10명의 남자에서 채취한 dental plaque에서 분리한 균주를 순수배양하여 얻은 결과는 Table I에서 보는 바와 같다.

즉 순수배양균을 얻기 위하여 Brain heart infusion blood media를 배지로 하였고 또한 Lactobacilli를 분리하기 위하여 Bromocresol purple(BCP) media를 사용하여 양 배지에서 배양된 균주를 Gram stain, 생화학적 검사와 발육성상등을 관찰하여 Bergy's manual에 의해 동정하였다.

이 중에 Streptococci에 유사한 균주로 Strain SD-1, SD-9와 SD-10등 3종으로 각각 *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*와 *Streptococcus sanguis* 유사균으로 동정하였다.

Strain SD-6는 Gram positive cocci로서 *Leuconostoc mesenteroides* 유사균으로 동정하였다. Gram positive non-spore forming bacilli인 Strain SD-3은 *Lactobacillus brevis* 유사균이고, Gram positive non-spore forming bacilli인 Strain SD-2와 SD-8은 *Lactobacillus acidophilus* 유사균으로 동정하였다.

그외 Strain SD-7은 Staphylococcus sp.이었으며 동정치못한 Gram positive bacilli가 Strain SD-4와 SD-5의 2균주로서 *Lactobacillus* sp.가 아닌가 추측하게 되었다.

Dextranase역가 :

Sucrose 5.0%를 함유하는 Brain heart infusion media에 pH를 6.8로 조절하고 각각의 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 원심분리시켜 상청액을 Dextranase의 효소액으로 하여 효소의 활성을 측정 한 결과는 Table II와 같다. 24시간 배양후의 pH의 범위는 4.6~6.4이다.

Table II Dextranase activity of culture medium of dental plaque flora.

Strains	Dextranase activity (mg. fructose liberated/ml.)
<i>Streptococcus salivarius</i> SD-1	4.47
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SD-2	2.36
<i>Lactobacillus brevis</i> SD-3	0.26
<i>Staphylococcus</i> sp. SD-7	2.22
<i>Streptococcus mitis</i> SD-9	5.55
<i>Streptococcus sanguis</i> SD-10	2.63

효소의 역가는 기질을 sucrose로 하여 이때 유리되는 fructose의 양을 정량하여 dextran형성율을 측정하였다.

Streptococcus mitis Strain SD-9와 *Streptococcus salivarius* Strain SD-1에서 제일 많이 fructose를 유리하여 효소액 ml.당 5.55mg.과 4.47mg.을 각각 유리하였으며 *Streptococcus sanguis* Strain SD-10에서 2.63mg., *Lactobacillus acidophilus* Strain SD-2에서 2.36mg을 유리하였다.

Strain SD-4, SD-5와 SD-8에서는 fructose를 유리하지 않았다.

고 찰

본 실험은 dental plaque에서 균주를 분리, 순수배양하고 그의 균학적성상을 관찰하고 이들 균주에 의해 세포의 다당류 특히 dextran을 합성하는 효소인 dextranase의 생산능을 관찰하였다.

Carlsson(1967)은 구강내의 여러부위와 dental plaque에서 non-haemolytic streptococci의 분포를 관찰하였는데 plaque에서 분리한 균주중에 dextran-forming *Streptococcus sanguis* 유사균이 가장 많이 존재하고 다른 부위에는 비교적 적게 존재한다하였으며 차아표면이 이들 streptococci의 가장 적합한 서식처로 sucrose를 이용하여 다당류를 생성하는 능력이 가장 크다고 하였다.

본 실험에서도 *Streptococcus sanguis* 유사균이 검출되었고 dextranase의 활성도 비교적 높은 정도이었다.

Stoppelaar, van Houte와 Moor(1967)등은 dextran형성균인 *Streptococcus bovis*와 *Streptococcus sanguis* 유사균을 분리하였고 Wood와 Critchley(1966)등은 치아우식성 *Streptococci* Strain FA-1에서 생산하는 다당류를 추출하고 다당류의 화학적인 성상을 구명하였다. 또한 Guggenheim et al. (1966)등은 흰쥐구치우식에서 *Streptococcus mutans* OMZ 261을 순수분리하였고 Guggenheim and Schroeder(1967)은 구강환경이 나쁜 소년의 dental plaque에서 *Streptococcus mutans* OMZ 176을 분리하였다. Gibbon과 Banghart (1967)는 흰쥐와 사람에서 분리한 치아우식성 *Streptococci*와 *Lactobacillus acidophilus*에 의해 합성되는 세포의 dextran은 면역학적으로 유사하고 dextran과 같은 polymer를 합성하며 10% sucrose에서 많은 양의 다당류를 생성하는 것을 실험적으로 관찰하였다. 또한 Hammond(1969)는 치은열개에서 분리한 *Lactobacillus*

*casei*에서 접착성이 있는 dextran과 같은 세포외 다당류의 합성을 관찰하였는데 이 dextran은 다른 *Lactobacillus casei*에 의해 생성되는 capsular heteropolysaccharide와는 다르나 immunodiffusion법으로 관찰한 수개의 Streptococci의 dextran과는 유사함을 관찰하였다.

본 실험에서 관찰한 Lactobacilli는 *Lactobacillus brevis* Strain SD-3과 *Lactobacillus acidophilus* Strain SD-2와 Strain SD-8의 3종으로 dextran-sucrase의 활성이 Strain SD-8에서는 거의 없음이 관찰되었다. 또한 본 실험에서는 *Leuconostoc mesenteroides*는 미량의 fructose만을 유리하는 것으로 보아 dextran-sucrase의 활성이 거의 없음을 알 수 있다.

본 실험과 다른 연구자들의 결과와 차이가 나는 것은 균주의 종류에 따라 발육조건, 특히 발효성탄수화물의 성장에 따라 다당류가 과립성이질다당류(capsular heteropolysaccharide), 세포외dextran 혹은 세포외dextran과 세포내 glycogen-amylopectin의 혼합물이 형성될 수 있기 때문이다. 또한 효소활성에 영향을 줄 수 있는 인자 즉 pH, 기질의 종류와 양, 온도 및 growth phase등도 다른 연구가들과 차이가 있을 수 있기 때문이다.

앞으로 dextran-sucrase생산균에 대한 연구를 계속하여 효소를 분리 추출하고 이에 의해 생성되는 dextran의 물리화학적 성상을 구명하여야 할 것이다.

결 론

본 실험은 20세에서 35세에 이르는 10명의 한국인 남자의 dental plaque에서 분리한 균주를 동정하고 그 균주의 dextran-sucrase생산능을 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. Streptococci에 유사한 균주로 *Streptococcus salivarius* Strain SD-1, *Streptococcus mitis* Strain SD-9, *Streptococcus sanguis* Strain SD-10등 3종이며, Lactobacilli에 유사한 균주는 *Lactobacillus acidophilus* Strain SD-2와 Strain SD-8 및 *Lactobacillus brevis* Strain SD-3등 3종이다.

그외 *Leuconostoc mesenteroides* Strain SD-6와 *Staphylococcus* sp. Strain SD-7등이 각각 1종으로 나타났다.

2. 분리된 dental plaque flora 중에 *Streptococcus mitis* Strain SD-9와 *Streptococcus salivarius* Strain SD-1이 dextran-sucrase의 활성이 제일 높았다.

REFERENCES

- Bailey, R.W., Barker, S.A., Bourne, E. J. and Stacey, M. 1957: Immunopolysaccharides. Part VII. The transglucosylase action of betacoccus arabinosaceus dextran-sucrase. J. chem. Soc. 3536.
- Bovey, F.A. 1959: Enzymatic polymerization. I. Molecular weight and branching during the formation of dextran. J. polym.Sci. 35,167.
- Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R. 1957: Bergy's manual of determinative bacteriology, 7th ed. The Williams R. Wilkins Co. Baltimore.
- Carlsson, J. and Egelberg, J. 1965: Effect of diet on early plaque formation in man. Odont. Revy. 16, 112.
- Carlsson, J. 1965: Zooglea-forming streptococci, resembling streptococcus sanguis, isolated from dental plaque in man. Odont. Revy. 16, 348.
- Carlsson, J. 1965: Effect of diet on presence of streptococcus salivarius in dental plaque and saliva. Odont. Revy. 16, 336.
- Carlsson, J. 1967: Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. Odont. Revy. 18, 55.
- Critchley, P., Wood, J. M., Saxton, C.A. and Leach, S.A. 1966: The polymerization of dietary sugars by dental plaque, p. 34. Abstr. of Papers, ORCA Congress. Perugia. Italy.
- Dische, Z. 1955: New color reactions for determination of sugars in polysaccharides p.315 In Glick, D., ed. Methods of biochemical analysis vol. 2, New York, Interscience Pub. Inc.
- Eisenberg, F., Jr. and Hestrin, S. 1963: Glycosyl transfer by levansucrase and dextran-sucrase. Bull. res. Coun. Israel. 11A4, 269.
- Gibbons, R.J. and Banghart, S.D. 1967: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic ba-

- acteria and its presence in human dental plaque. *Archs oral Biol.* 12, 11.
- Guggenheim, B., König, K.G., Herzog, E. and Mühlemann, H.R. 1966: The cariogenicity of different dietary carbohydrates tested on rats in relative gnotobiosis with a streptococcus producing extracellular polysaccharide. *Helv. odont. Acta.* 10, 101.
- Guggenheim, B. and Schroeder, H.E. 1967: Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. *Helv. odont. Acta.* 11, 131.
- Hammond, B.F. 1969: Dextran production by a human oral strain of lactobacillus casei. *Archs oral Biol.* 14, 879.
- Hehre, E.J. 1941: Production from sucrose of a serologically reactive polysaccharide by a sterile bacterial extract. *Science* 93, 237.
- Koepsell, M. and Tsuchiya, H.M. 1952: Enzymatic synthesis of dextran. *J. Bact.* 63, 293.
- Leach, S.A., Critchley, P., Kolendo, A.B. and Saxton, C.A. 1966: Salivary glycoproteins as components of the enamel integuments. p. 67. *Abstr. of Papers, ORCA Congress. Perugia, Italy.*
- Neely, B.W. 1958: Studies on the enzyme dextranucrase. I. The effect of pH on enzyme activity. *J. am. chem. Soc.* 80, 2010.
- Neely, B.W. 1960: Dextran: structure and synthesis *Adv. carbohyd. Chem.* 15, 341.
- de Stoppelaar, J.D., van Houte, J. and Moor, C.E. 1967: The presence of dextran-forming bacteria, resembling streptococcus bovis and streptococcus sanguis, in human dental plaque. *Archs oral Biol.* 12, 1199.
- Stringer, C.S. and Tsuchiya, H.M. 1958: A kinetic study of dextranucrase. *J. am. chem. Soc.* 80, 6620.
- Somogyi, M. 1945: A new reagent for the determination of sugars. *J. biol. Chem.* 160, 61.
- Tsuchiya, H. M., Koepsell, H.J., Corman, J., Bryant, G., Bogard, M.O., Feger, V.H. and Jackson, R.W. 1952: The effect of certain cultural factors on production of dextranucrase by leuconostoc mesenteroides. *J. Bact.* 64, 521.
- Tsuchiya, H. M. and Stringer, C.S. 1954: Transglucosylation reactions of enzyme preparations from leuconostoc mesenteroides. NR-RL B-512. *Bact. Proc.* 54, 98.
- Tsuchiya, H.M., Hellman, N.N., Koepsell, H.J., Corman, J., Stringer, C.S., Rogovin, S.P., Bogard, M.O., Bryant, G., Feger, V.H., Hoffman, C.A., Sonti, F.R. and Jackson, R.W. 1955: Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran. *J. am. chem. Soc.* 77, 2412.
- Wood, J.M. and Critchley, P. 1966: The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic streptococci. *Archs oral Biol.* 11, 1039.