

虫齒에서 분리한 *Streptococcus mutans* 에 관하여

2. Streptococcal Polysaccharide

李 建 桂 · 李 培 咸

(대한 중외제약(주) · 건국대학교 생물학과)

Characterization of *Streptococcus mutans* isolated from Human Dental Plaque.

2. Streptococcal Polysaccharide.

Lee, Kon Joo and Bae Ham Lee

(Dae Han Choong-Wae Pharm. and Dept. of Biology Kon Kuk Univ.)

ABSTRACT

Cariogenic *Streptococcus mutans* produces a constitutive extracellular enzyme dextranucrase or glucosyltransferase that is capable of hydrolyzing sucrose and synthesizing the glucose polymer dextran.

In this work we investigated to the dextrans produced by eight strains of *Streptococcus mutans*. After, 30hours the synthesized polysaccharide is 1.86mg to 4.41mg per ml on sucrose medium, and the polysaccharide is similar. Polysaccharide syntheiezd by enzyme in cell free medium is 11.4 mgto 2.36mg per ml after 10 hours.

서 론

Streptococci에 의해서 mucoid polysaccharide가 생산된다고 처음 보고된 것은 1930년 Oerskow에 의해서며, 그 후 *Streptococcus salivarius*에 의해 sucrose로부터 생산되는 polysaccharide가 levan type이라는 것이 Snyder등(1955)에 의해 밝혀졌다. Dental plaque에서 polysaccharides의 존재에 대한 처음 보고는 McDougall(1964)에 의해서, Gibbons 등(1967), Wood(1967)에 의

하여 dextran type이라고 보고되었다. Gibbons 등(1963)은 *Streptococcus mitis*에 의한 polysaccharide 생성과 화학적 분석을 보고 하였고 Cybulska등(1963)은 *S. sanguis*에 의한 polysaccharides 생산에 대해 보고하였다. 1968년 Guggenheim은 충치 유발 streptococci의 특징은 sucrose로부터 extracellular polysaccharide를 생산한다는 것을 밝혔고, Carlsson(1968a)은 몇 종의 구강 streptococci에 의해 sucrose로부터 생산되는 polysaccharides에 관해 보고하였고, Fitzgerald등(1968), Carlsson(1968)등에 의해 이

들 polysaccharide가 주로 dextran이라고 보고 되었다. Cariogenic strain에 의해 생긴 dextran은 주로 α -1,6-linkage이고, 일부는 1,2, 1,3, 가끔 1,4 결합도 있다(Wood등, 1966; Gibbons등, 1967; Guggenheim, 1967; Guggenheim, 1970; Gibbons등, 1968; Robrish등, 1972).

Streptococci에 의해 생산되는 polysaccharide는 충치의 시작이나 진행에 있어 매우 중요한 작용을 한다. 그 중 중요한 것은 물에 녹지않고 분해가 잘 되지 않고 흡착성이 커서 미생물들 치아에 강력하게 접촉시키는 작용(Gibbons등, 1968; Macabe등, 1967)과 음식 찌꺼기 같은 영양분이 없을때 영양원으로 작용하는 점이다. 즉 polysaccharide는 Saliva protein, tooth mineral과 같이 결합하여 불용성의 침전형태로 되어 이것이 분해되어 영양원으로 작용한다(Gibbons and Banghart, 1967)

이러한 작용의 *in vivo*, *in vitro* 실험이 Gibbons등(1968), Guggenheim등(1972)에 의해서 연구되었다. 그 후 Dextran synthesis에 관련되는 효소인 Dextranoglucosidase와 Dextranucrase에 대한 연구가 Walker(1972), Carlsson(1970), Fukui등(1974)에 의해서 이루어지고 있다.

본인들은 前報에서 분리한 46 strains 중 8 strains에 대한 효소에 의한 polysaccharide의

생산, 배양 중의 polysaccharide의 축적, 축적된 polysaccharide의 특성 및 성장곡선에 관해 조사하였다.

실험 재료 및 방법

1. 공시 균주

전보(Lee등, 1979)에서 분리한 균주중 S-5, S-11, S-14, S-15, S-16, S-26, S-38, S-43을 실험에 공시하였다. 각 균주는 Table 1,2에서 보는 바와같이 생리적 특징 및 당 발효능에서 약간씩 차이가 있다.

2. 배지

계대용 배지 : Gibbons등(1963)에 따랐다.

접종용 균액 : 계대용 배양에서 Todd-Hewitt broth(Diffco)에 접종하여 18시간, 37°C culture를 사용하였다.

3. 효소에 의한 polysaccharide 생산

37°C 18시간 culture의 접종용 균액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 여기에 penicillin GK를 ml당 1,500unit를 첨가하고, 다시 10분간 원심분리하여 상등액을 효소액으로 하였다. 기질로는 5% sucrose solution에 0.5% polysorbate 80(v/v)을 넣어 membrane filter method(0.2 μ m, 47mm)로 무균화하여 Cybulska등(1963)에 따라 실험하였다. sucrose

Table 1. Characters of caries Streptococci

	S-5	S-11	S-14	S-15	S-16	S-26	S-38	S-43
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9.6	+	-	+	-	-	+	-	-
Blood agar(anae.)	+	+	+	+	+	+	-	+
Blood agar(ae.)	+	+	+	+	+	+	-	+
in 4% NaCl	+	+	+	+	+	+	-	+
in 6.5% NaCl	+	-	-	+	+	-	-	-
Hydrolysis of aesculin	+	-	+	-	+	+	-	-
Reaction of litmus milk	R	L	R	R	R	L	L	L
Reduction of methylene blue								
0.1%	+	-	-	-	-	-	-	-
0.01%	+	-	-	+	-	-	-	-

++ : positive, -- : negative

Table 2. Fermentation reaction of caries Streptococci

	S-5	S-11	S-14	S-15	S-16	S-26	S-38	S-43	%
D(+) Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Inulin	+	+	+	+	+	+	+	+	100
D(-) Mannitol	-	+	+	+	+	+	+	+	95.7
D(-) Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	95.7
Lactose	+	+	+	+	+	-	+	-	95.7
D(-) Mannose	+	+	+	+	+	+	-	+	93.5
D(-) Arabinose	+	+	+	-	-	-	-	-	63.1
D(+) Xylose	+	-	+	-	-	-	-	-	32.1

% : positive % for the 46 strains + : positive - : negative

solution은 pH6.0으로 하고, 37°C에서 반응시켰다.

4. Growth Curve

5% glucose broth(w/v)에 0.5% polysorbate 80(v/v)을 가해 접종용 균액을 1loop씩 접종하고, 37°C에서 배양하였다. 540nm에서 접종한 sample을 즉시 100°C에서 5분간 boiling한 것을 대조로 하여 투과도를 측정하였다. 측정은 Hitachi 200-02를 사용하였다.

5. *Strept. mutans* 배양중 polysaccharides 생산

5% sucrose Todd-Hewitt(w/v)에 0.5% polysorbate 80(v/v)을 가해 membrane filter method(0.2μm, 47mm)로 무균화하여 접종 후 37°C에서 배양하였다. polysaccharide의 측정은 Cybulska등(1963)에 따랐다.

6. Polysaccharide 특징

5% sucrose Todd-Hewitt(w/v) 100ml에 37°C 48시간 배양 후 생성된 polysaccharide를 Carlson(1970)에 따라 정제하여 IR spectrophotometer (Perkin Elmer 737)을 이용하여 흡수 파장을 조사하고, 이들을 1N H₂SO₄에 넣어 100°C 수욕 내에서 2시간동안 boiling하여 가수분해시킨 후 BaCO₃로 중화시켜 glucose를 대조로 하여 Thin layer chromatography method에 따라 조사하였다.

plate는 silicagel G plate로 사용하고, 전개 용매는 ethyl acetate: pyridine: D.W.(2:1:2)와 3-butanol: acetic acid: D.W.(4:1:5)를

쓰고(Lederer and Lederer, 1957), 발색 시약은 Anilin-diphenylamine phosphoric acid(Egon Stahl, 1969)를 사용하였다.

결 과

1. Enzyme에 의한 polysaccharide의 생성

Fig. 1에서 보는 바와같이 sucrose solution에 효소액을 첨가한 후 일정시간 간격으로 생성된 polysaccharide를 측정된 결과 S-5가 10시간후 glucose로서 ml당 2, 36mg으로 가장 많고, S-11, S-14, S-38, S-43이 2.0~2.2mg, S-15, S-26은 1.8~1.9, S-16은 1.4mg/ml였다.

2. growth curve

Fig. 2에서 보는 바와같이 Optical density는 S-5, S-11, S-14는 3시간 후부터 가속되며, S-15, S-38은 5시간 후부터, S-16, S-26, S-43은 12시간 후부터 증식이 빨라진다. 30시간 후 S-5가 2.17로 가장 높고, S-11이 1.682, S-14가 1.670, S-15간 1.477, S-26이 1.220, S-38이 1.446, S-43이 1.866이고, S-16은 0.910으로 가장 optical density가 낮았다.

3. 배양중 polysaccharide축적

Fig. 3에서 보는 바와같이 배양 중 polysaccharide축적은 균주에 따라 차이를 보여 36시간 후 S-5가 4.41, S-11이 4.21, S-14가 3.48, S-15가 3.02, S-38이 3.72, S-26이 3.66, S-43이 3.41이고 S-16이 1.89였다.

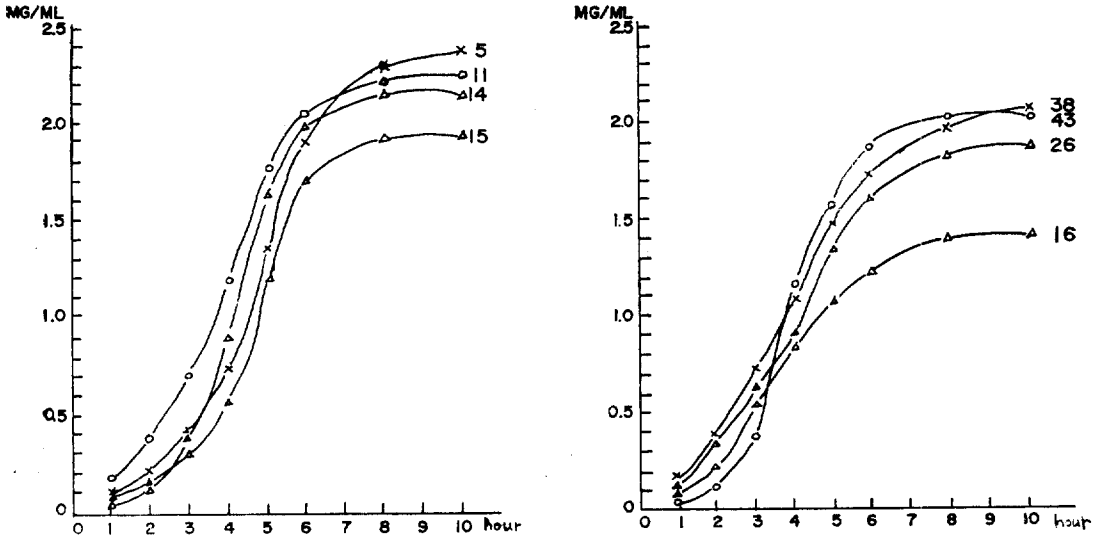


Fig. 1. Polysaccharide synthesized by the enzyme in cell free medium

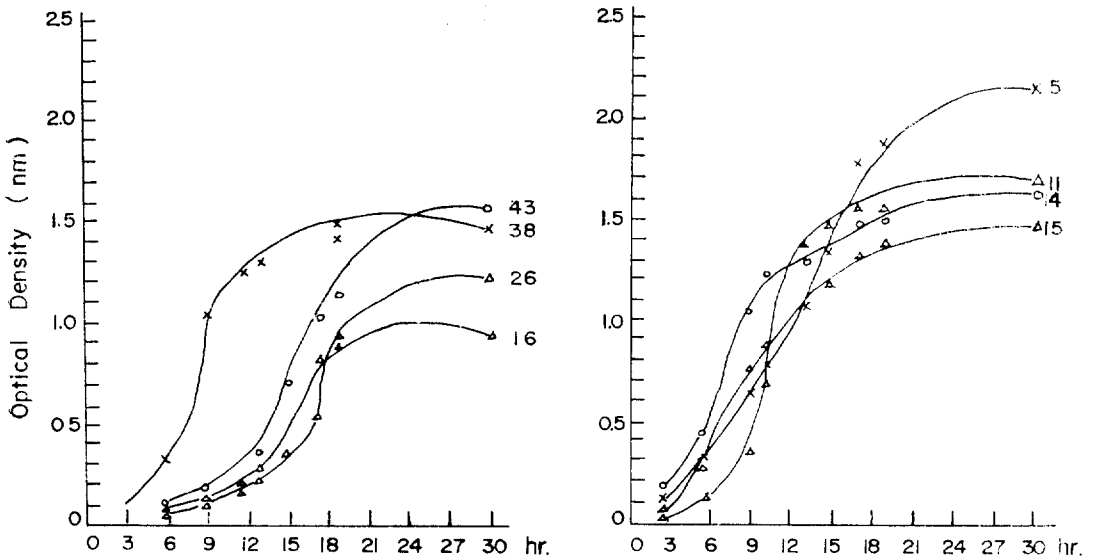


Fig. 2. Growth curve of the *Streptococci*

4. Polysaccharide의 특징

Fig. 4에서 보는 바와같이 Infrad Spectrophotometer상에서 3260, 2925, 1658, 1550, 1450~1000, 930, 867, 813cm⁻¹에서 794cm⁻¹ 근처에 약한 peak가 보인다.

8가지 균주들의 polysaccharides의 peak는 거의 유사하다(Fig. 4).

polysaccharide의 1N H₂SO₄ 가수분해물의 glucose를 대조로 한 TLC확인에서 8균주의 polys-

accharides가 거의 동일한 Rf value에서 확인된다.

Table 3에서 보는 바와같이 Ethyl acetate pyridine H₂O 경우 glucose 0.22에, Hydrolysate는 0.2이고, Butanol acetic acid H₂O 경우 glucose는 0.98, Hydrolysate는 0.96이었다. Ethyl-acetate pyridine-H₂O로 전개시켰을 경우 Rf value 0.8 근처에서 sulfuric acid로 추가 발색시킬 경우 약한 반점이 나온다.

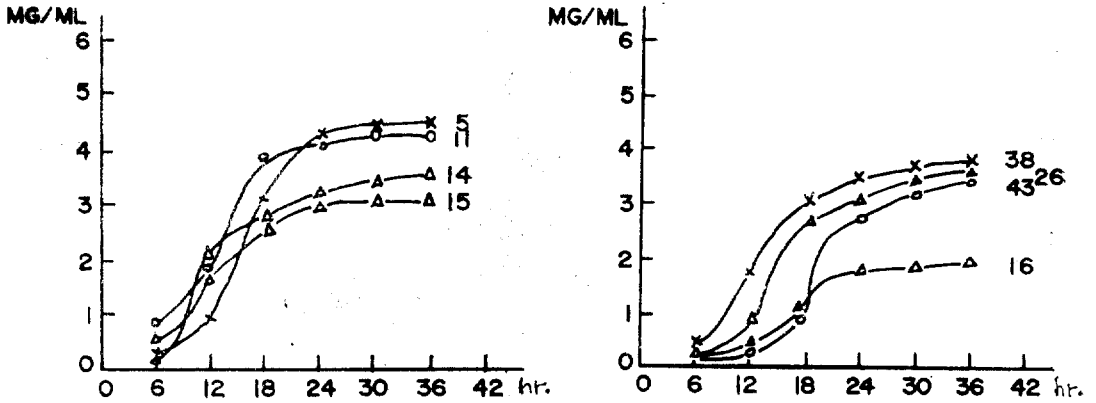


Fig. 3. Polysaccharide synthesized by *Streptococcus mutans*.

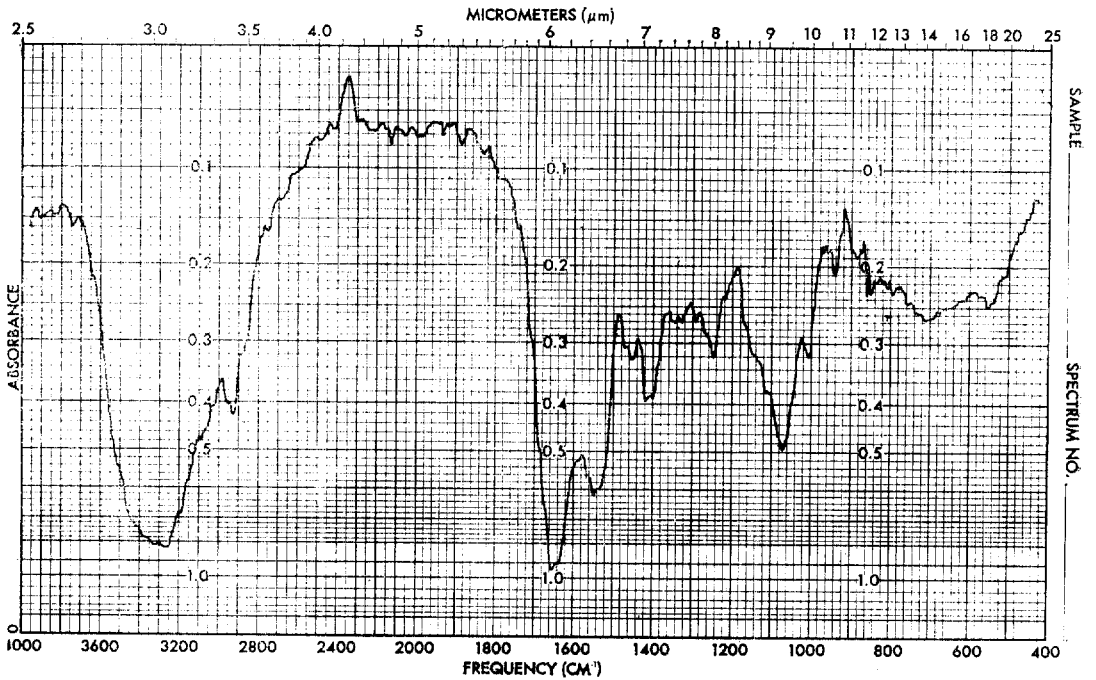


Fig. 4.

Table 3. Analysis of polysaccharide from *Strept. mutans*

Hydrolysed extract Chromatography	Hydrolysate	Glucose
Rf value(Ethyl acetate:Pyridine:D.W.)	0.2, 0.8	0.22
Rf value(Butanol:Acetic Acid:D.W.)	0.96	0.98

고찰

Oral streptococci에 의한 sucrose에서 polysaccharide의 형성은 충치 유발에서 가장 중요한 기작이 되고있다. 본 실험에서는 충치에서 분리한 균주들을 이용하여 sucrose에서 형성되는 polysaccharide의 양과 시간적 관계 및 polysaccharides의 특징을 조사하였다.

배양중 polysaccharides의 축적은 Fig. 3에서 보는 바와같이 12시간에서 S-11, S-14, S-15, S-38은 축적량이 50% 정도되고, 기타 균주들도 18~24시간에 50%이상의 축적량을 보인다. 균주에 따라 30시간 후 4.41mg에서 1.89mg으로 88.2%에서 37.8%까지 축적하였다. Walker(1972)에 의해서 OMZ176에서 3.83mg이 축적된다고 보고되었다. 이러한 polysaccharides의 양은 충치의 진행과 밀접한 관계가 된다. 대부분 사람들의 구강 세척 습성은 1일 1~3회로 잔류 음식물이 남는 시간이 있어 이 시간 동안 충분히 polysaccharide가 축적되리라 본다. 생성된 polysaccharide는 음식물이 없을 때 영양원으로 이용되고 균 부착에 도움을 주어 충치를 진행시킨다. 이들 polysaccharide는 sucrose액에서 배양중 glass tube에 흡착되어 세척이 거의 불가능

할 정도로 난용성으로 분해가 어렵다. cell free 상태에서도 효소에 의해서 다량의 polysaccharides가 생성된다.

또한, 생장 곡선에서도 대부분이 접종 6~12 시간 후 가속되어 생장 속도와 polysaccharide축적 사이에 거의 유사한 곡선이 된다.

생성된 polysaccharide의 가수분해 결과 glucose보다 약간 낮은 Rf value를 보였고, ethylacetate-pyridine-H₂O로 전개시켰을 때 Rf value 0.8근처의 반점은 확실한 것을 밝힐 수 없었다.

Hydrolysate는 *Strept. mitis*에 의해 생성된 polysaccharide(Gibbons, 1963)의 보고와 유사하다. Polysaccharide에 대한 IR Spectrophotometer graph로 볼 때 930, 867, 813cm⁻¹에서 peak가 나타나는데 이는 Barker등(1955)에 의해 보고된 polyfructosans의 특징과 일치한다. 이 polyfructosans는 α-1,6-linked로 주로 연결되어 있다. 그리고 794cm⁻¹근처에서 약한 peak가 나오는데 이는 내부에 α-1,3 bonds가 있는 것이다. 이것으로 볼 때 축적된 polysaccharide는 동일형의 polysaccharide로 주로 α-1,6로 결합되고, 내부에 1,3결합이 있는 것으로 본다. 이것은 Guggenheim(1972), Lewicki등(1971), Long등(1972), Ebisu등(1974)에 의해서 밝혀진 구조에서 동일한 것으로 생각된다.

적요

*Streptococcus mutans*에 의한 sucrose로 부터 축적된 polysaccharide를 조사한 결과

1. 균주가 따라 36시간 후 4.41mg/ml로 부터 1.86mg/ml사이의 polysaccharide가 축적되고
2. 효소에 의해서도 10시간 후 2.36mg/ml에서 1.4mg/ml의 polysaccharide가 생성되고
3. 생성된 polysaccharide는 동일형의 polysaccharide였다.

REFERENCES

1. Barker, S.A., F. Pautard, and I.R. Siddigui, 1955. The structure of polysaccharide synthesized by a *Streptococcus* isolated from a propy fermentation. Chem. and Ind. 1450-1451.
2. Carlsson, J., 1968-a. A numerical taxonomic study of human oral *Streptococci*. *Odont. Revy* 19, 137-160.
3. Carlsson, J., 1968-b. Plaque formation and *Streptococcal* colonization on teeth. *Odont. Revy* 19, Suppl. 1-14.
4. Carlsson, J., 1970. A levansucrase from *Streptococcus mutans*. *Caries. Res.* 4, 97-113.
5. Ceska, M., K. Granath, B. Norman, and B. Guggenheim, 1972. Structural and enzymatic studies on glucans synthesized with glucosyltransferases of some strain of oral *Streptococci*. *Acta. Chem. Scand.* 26, 2223-2230.
6. Cybulska, J. and R. Pakula, 1963. *Streptococcal* polyglucosidase. 1. A medium suitable for

- polyglucosidase production. *Exp. Med. Microbiol.* **15**(3), 187-198.
7. Ebisu, S., A. Misaki, K. Kato, and S. Kotani, 1974. The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans* formed in the absence and presence of dextranase. *Carbohydr. Res.* **38** 374-381.
 8. Ellwood, D.C., J.K. Baird, J.R. Hunter, and V.M.C. Longyear, 1976. Variation in surface polymers of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res. Special issue* **55**, 42-49.
 9. Egon, S., 1969. Thin layer Chromatography. New York
 10. Fitzgerald, R.J., P.H. Keyes, T.H. Stoudt, and D.M. Spinell. 1968. The effect of a dextranase preparation on plaque and caries in hamsters, a preliminary report. *J.A.D.A.* **76**, 301-304.
 11. Fukui, K., Y. Fukui, and T. Moriyama, 1974. Purification and properties of dextran sucrose and invertase from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **118**(3), 796-804.
 12. Gibbons, R. J., 1972. Microbial ecological models and dental diseases. *Virginia Dent. J.* **49**, 7-15.
 13. Gibbons, R.J., B. Kapsimalis, 1963. Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by *Streptococcus mitis*. *Arch. oral Bio.* **8**, 319-329.
 14. Gibbons, R.J. and J. van Houte, 1973. On the formation of dental plaque. *J. Periodontol* **44**, 347-390.
 15. Gibbons, R.J., K.S. Berman, P. Knoettner, and B. Kapsimalis, 1966. Dental caries and alveolar bone loss in notobiotic rats infected with capsule forming *Streptococci* of human origin. *Arch. oral Biol.* **11**, 549-560.
 16. Gibbons, R.J., and S.J. Banhart, 1967. Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Arch. oral Biol.* **12**, 11-24.
 17. Gibbons, R.J., and M. Nygard, 1968. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque forming *Streptococci*. *Arch. oral Biol.* **13**, 1249-1262.
 18. Guggenheim, B., 1968. Microbiology plaque with special reference to *Streptococci Caries Res.* **2**, 147-163.
 19. Guggenheim, B., 1970. Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyl transferases from a strain of *Streptococcus mutans*. *Helv. odont. Acta.* **24**, 89-108.
 20. Guggenheim, B. and B. Regolati and H.R. Mühlemann, 1972. Caries and plaque inhibition by mutanase in rats. *Caries Res.* **6**, 289.
 21. Guggenheim, B. and H.E. Schroeder, 1967. Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic *Streptococci*. *Helv. odont. Acta.* **11**, 131-152.
 22. Lee, K.J. and B.H. Lee, 1979. in press
 23. Lederer, E. and M. Lederer, 1971. Chromatography Elsevier. New, York 1957.
 24. Lewicki, W.J., L.W. Long and J.R. Edwards, 1971. Determination of the structure of a broth dextran produced by a cariogenic *Streptococcus*. *Carbohydr. Res.* **17**, 175-182.
 25. Long, L.W. and J.R. Edwards, 1972. Detailed structure of a dextran from a cariogenic bacterium. *Carbohydr. Res.* **24**, 216-217.
 26. Oerskow, J., 1930. *Zentralbl. f. Bakt.* **119**, 88 (quoted Cybulska *et al.*)
 27. McCabe, R.M., P.H. Keyes and A. Howell, 1967. An *in vitro* method for assessing the plaque forming ability of oral bacteria. *Arch. oral Biol.* **12**, 1653-1656.
 28. McDougall, W.A. 1964. Studies on the dental plaque. 4. Levans and the dental plaque. *Aust. dent. J.* **9**, 1-5.
 29. Robrish, S.A., W., Reid, and M. Krichevsky, 1972. Distribution of enzymes forming polysaccharides from sucrose and the composition of extracellular polysaccharide synthesized by *Streptococcus mutans*. *Appl. Microbiol.* **24**, 184-190.
 30. Walker, G.J., 1972. Some properties of a dextran glucosidase isolated from oral *Streptococci* and its use in studies on dextran synthesis. *J. Dent. Res.* **51**, 409-414.
 31. Wood, J.M., 1967. The amount, distribution

- and metabolism of soluble polysaccharides in human dental plaque. *Arch. oral. Biol.*, **12**, 849—858.
32. Wood, J.M. and P. Critchley, 1966. The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic *Streptococcus*. *Arch. Oral. Biol.* **11**, 1039—1042.