

치면세균막 분해효소인 α -1,3 glucanase를 생산하는 미생물의 분리 및 효소 특성

조효상 · 허태련¹ · 윤정원*

수원대학교 공과대학 유전공학과, ¹인하대학교 공과대학 생물공학과

Isolation of α -1,3 Glucanase from Microorganism and the Production of High Activity α -1,3 Glucanase for Hydrolysis of Dental Plaque

Hou Sang Cho, Tae Ryon Hae¹ and Jeong Weon Yoon*

Department of Genetic Engineering, College of Engineering,
The University of Suwon, Suwon P.O. Box 77, 445-743, Korea

¹Department of Biological Engineering,
College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Abstract — Seventeen strains were isolated from soil, cattle rumen, cereal, sewage dregs, insect on agar plate containing insoluble glucan as a sole carbon source from immobilized *Streptococcus mutans*, which produced α -1,3 glucanase for lysis of dental plaque. Among these strains isolated from soil, SW-522 and SW-713 that had appeared to produce the high level of α -1,3 glucanase, degraded insoluble glucan from *S. mutans* 97.6% and 49.4%, respectively in 5 hours. The activity of crude α -1,3 glucanase from SW-522 was 1.3 mg insoluble glucan/min·mg protein. This enzyme was entirely degraded insoluble glucan on glass tube which produced by *S. mutans* in TH medium with 5% sucrose.

치아우식증 또는 충치는 사람이 치아를 상실하는 대표적인 원인질환이며 전세계적으로 널리 만연되고 있는 범발성 질환의 하나로서, 일본 및 우리나라의 경우에도 간식류에 의한 당섭취 증가와 평균수명이 늘어남에 따라 치아우식증의 발생이 증가하는 추세이므로, 그 효과적인 관리대책이 절실히 요구되고 있다(1).

경제개발의 결과로 국민생활수준이 향상되면서 치료에 앞서 치아우식증예방 측면의 중요성이 대두됨에 따라 치아우식증 발생기작에 관한 기초적인 연구와 함께 치아우식증예방의 측면에서도 매우 활발한 연구가 이루어져 다양한 억제방법이 검토되어 왔다(2, 3). 이 중에서 이미 형성된 치면세균막을 분해하는 glucanase에 의한 예방제 개발 방법도 연구되어

왔다(4).

*S. mutans*가 분비하는 GTase(EC 2.4.1.5)는 sucrose를 이용하여 glucose 중합체로 90% 이상의 α -1,3 결합(5)과 나머지는 α -1,6 결합으로 이루어진 불용성 glucan을 형성한다. 이것은 물에 녹지 않고, 치아표면에 부착하는 능력을 가졌기 때문에 치면세균막(dental plaque)을 형성시켜 초기 충치의 원인이 된다(6, 7). 그러므로 α -1,3 glucan을 분해하는 α -1,3 glucanase (EC 3.2.1.59)는 충치발생을 억제할 수 있다(8, 9).

지금까지 많은 종류의 endo glucanase와 exo glucanase가 밝혀졌지만(10, 11) 효소탐색용 기질을 *Aspergillus* species에서 얻은 pseudonigeran(α -1,3), nigeran(α -1,3, α -1,4)(12, 13) 또는 식물에 존재하는 α -1,3 glucan(14, 15) 등만을 사용하여 탐색하였으므로 *S. mutans*가 만들어 내는 불용성 glucan은 5% 정도만 분해시킬 수 있어, α -1,3 glucan에는 기질 특이성이 매우 낮은 glucanase를 발견하는데 그치고 있다.

Key word: *Streptococcus mutans*, dental plaque, insoluble glucan, α -1,3 glucanase

*Corresponding author

따라서 본 연구는 *S. mutans*를 가지고 불용성의 glucan을 생산한 후, 이 불용성 glucan만을 기질로 이용하여 자연으로부터 새로운 α -1,3 glucanase를 분비하는 미생물을 탐색하였고 이를 이용하여 치아우식예방제로서의 기초실험을 수행하였다.

재료 및 방법

시험균주 및 시료

균주는 *Streptococcus mutans* ATCC 10449로 serotype C를 사용하였으며, Todd Hewitt(Difco, TH) 배지에서 37°C로 배양한 후, 10% glycerol를 첨가하여 -20°C에서 보관하였다. 시험균주는 약 2일간 5% sucrose TH 배지에서 전배양시킨 균을 사용하였다. 연구대상 미생물은 α -1,3 glucanase 생산균이 있을 가능성이 있는 미생물들을 토양 미생물, 곤충의 장내 세균, 곡류기생곰팡이, 반추동물의 위 또는 하수구 찌꺼기 등에서 탐색하였다.

연구방법

Polyacrylamide(PA)에 의한 *S. mutans*의 고정화에 의한 불용성 glucan의 제조: 28 ml acrylamide-bisacrylamide(30 : 0.8)에 2 ml *S. mutans*를 넣고 잘 혼합한 후, 100 μ l ammonium persulfate(0.40 g/ml)와 100 μ l TEMED(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)를 넣은 다음 ice bath에 담긴 petri dish에 분주한다. 중합이 끝난 후 일정한 모양(1.5×1.5×0.1 cm)으로 자른 후 멸균 증류수에 세번 수세한다. 실온에서 drying 후 14 ml acrylamide-bisacrylamide(30 : 0.8)에 1 ml 증류수, 40 μ l ammonium persulfate, 100 μ l TEMED를 넣고 위에서 제조된 cube를 coating하였다. 다시 증류수로 washing하여 *S. mutans*가 고정화 된 28% PA(polyacrylamide) cube를 만들었다(16). 이렇게 PA cube에 고정화 된 *S. mutans*를 5% sucrose가 첨가된 TH배지에서 배양하여 순수한 불용성 glucan을 제조하였다.

α -1,3 glucanase를 분비하는 균주의 탐색

α -1,3 불용성 glucan 분해 능력이 있는 미생물을 얻기 위하여, 방선균이 주로 서식할 것으로 예상되는 미경작지의 지표면 2~5 cm 깊이로 토양을 채취하였으며, 수원 근교에서 하수구 찌꺼기, 정미소에 썩어 있는 겨에 서식하는 쌀도적 곤충의 장내미생물 또는 소위와 장내 미생물을 시료로하여 1 g을 멸균수 10

ml에 넣고 혼합시킨 후 30분 동안 실온에서 방치하였다가 상등액 1 ml를 취하여 10^{-3} 으로 희석한 다음 불용성 glucan이 유일 탄소원으로 첨가된 Czapek-dox 배지로, 이의 조성을 보면 배지 1 l당 insoluble glucan 5 g, NaNO₃ 3 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, agar 1.5%를 각각 가한 후 pH는 6.5로 조정하였다. 이 배지에 탐색대상물질을 0.1 ml씩 plating하여 glucanase 생산균을 탐색하였다. 한편, 방선균은 채취한 공시토양을 saline으로 10^{-3} 으로 희석한 후, actinomycetes isolation agar에 0.1 ml씩 plating하여 72시간 동안 배양하였다.

나타난 single colony를 broth media에서 liquid culture하여 activation 시킨 후, 보존용 slant에 계대 배양하여 4°C 냉장고에 보존하며 사용하였다.

α -1,3 glucanase 분비 균주 탐색용 agar plate 제조

균의 분리 배지는 sucrose를 불용성 glucan으로 바꾼 Czapek-dox 배지를 사용하였다. 불용성 glucan을 유일 탄소원으로한 불용성 glucan 배지에 분산도 말하여 방선균은 30°C, 장내미생물은 37°C에서 3일간 배양한 후, 균체 주위에 clear zone을 크게 생성한 colony나 colony 자체가 큰 것을 순수분리했다. 순수 분리된 균을 같은 배지에 계속 계대배양하여 비교적 높은 glucanase 활성을 보이는 균을 선발하였다.

α -1,3 glucanase 분비 균주의 액체배양

위에서 선별된 균주를 가지고 α -1,3 glucanase를 추출하기 위하여 Dextarch 배지를 soluble starch 1.0%, dextran T-10(Sigma) 0.5%, polypepton 0.5%, yeast extract 0.1%, K₂HPO₄ 0.4%, MgSO₄ 0.02%, KCl 0.02%, FeSO₄ 0.001%로 첨가한 후 pH는 6.5로 맞추어서 제조하여 배양하였다.

α -1,3 glucanase의 추출 및 부분 정제

불용성 glucan 배지를 사용하여 호기성과 혐기성 균을 각각 배양하였다. 원심분리로 cell를 제거한 상등액에 60% (NH₄)₂SO₄를 가한 다음, 4°C로 하룻밤 방치하여 침전시킨 후, 10,000×g로 20분간 원심분리하였다. 얻은 단백질을 침전에 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0)를 가하여 crude α -1,3 glucanase를 얻었다. 얻은 조효소를 동일한 buffer로 12시간 동안 투석시켰다(Fig. 1).

α-1,3 glucanase 활성 측정

배양액에서 추출한 α-1,3 glucanase를 아래와 같이 혼합하여 반응시킨 후, 각 test solution을 37°C 로 incubator에서 배양하면서 시간별로 불용성 glucan이

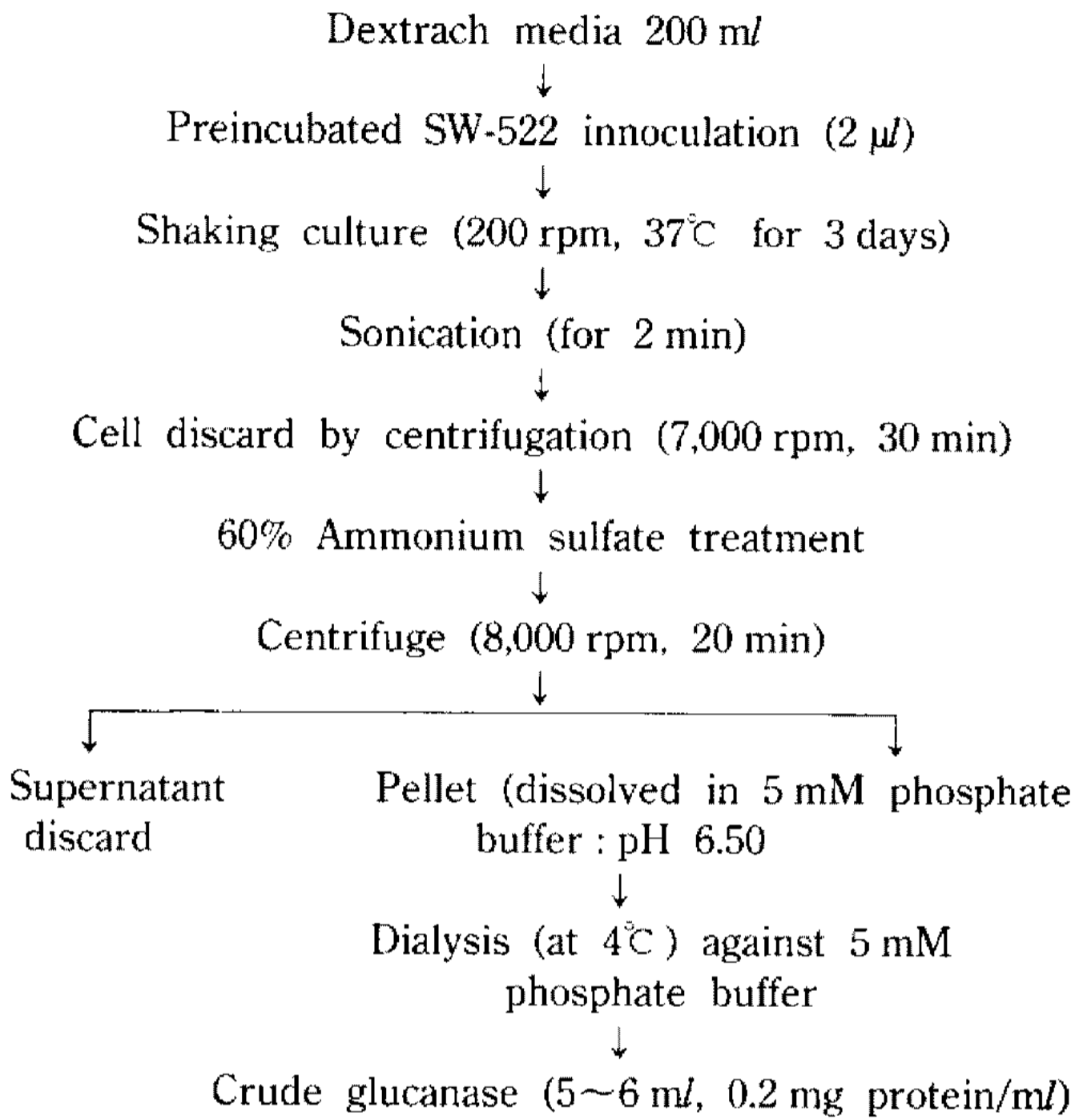


Fig. 1. Preparation of crude α-1,3 glucanase from SW-522 and SW-713.

분해되는 정도를 550 nm 흡광도에서 측정하였다(17).

Reaction mixture

α-1,3 glucanase(after dialysis) : 300 μl~1 ml

0.5% IG from *S. mutans* : 2 ml

0.2 M phosphate buffer(pH 6.0) : 2 ml

2% sodium azide : 50 μl

Loss of opalescence by optical density at 550 nm

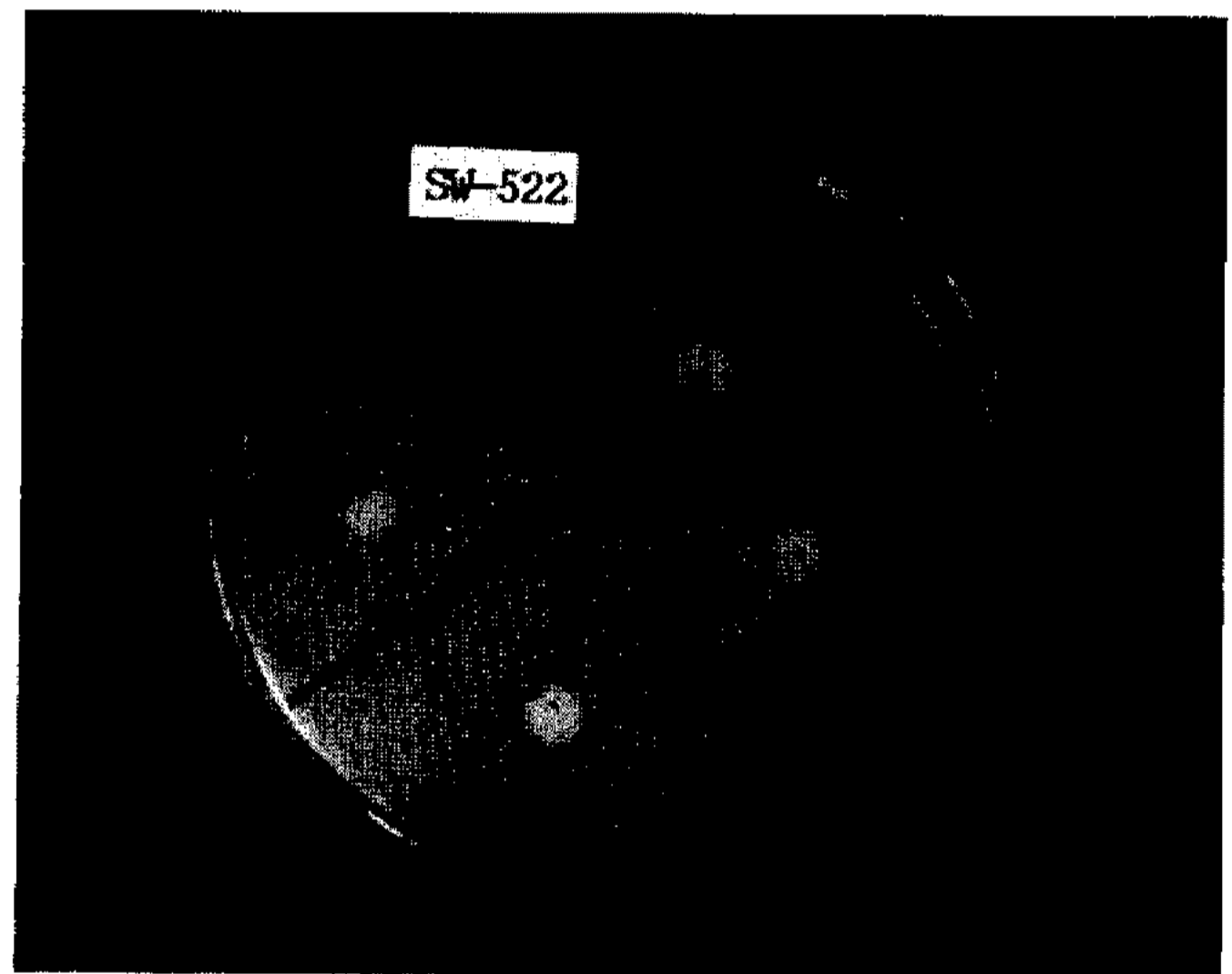


Fig. 2. The growth of α-1,3 glucanase producing microorganisms on α-1,3 glucanase agar plate.

Table 1. Microorganisms producing glucanase on agar plate containing α-1,3 glucan

Strain No.	Diameter of Growth zone (cm)	Clear zone (cm)	Culture Type	Source	Culture Temperature (°C)
SW-522	0.5	1.0	aerobic	Soil	30
SW-713	0.5	0.6	aerobic	Soil	30
104	1.0	0.5	aerobic	Soil	30
130	0.8	0.9	aerobic	Soil	30
1637	0.6	1.2	aerobic	Soil	30
1646	0.7	1.3	aerobic	Soil	30
CR-1	2.0	—	anaerobic	Rumen	37
CI-1	2.2	—	anaerobic	Rumen	37
CI-2	1.5	—	anaerobic	Rumen	37
RC-1	0.9	0.8	aerobic	Cereal	30
SD-1	0.7	0.7	anaerobic	Sewage dregs	30
SD-2	0.5	0.4	anaerobic	Sewage dregs	30
SD-3	0.2	0.9	anaerobic	Sewage dregs	30
CD-1	0.4	0.4	anaerobic	Chaff dregs	30
TJ-1	0.3	1.1	anaerobic	Insect	37
TJ-2	0.7	0.9	anaerobic	Insect	37
TJ-3	0.4	0.5	anaerobic	Insect	37

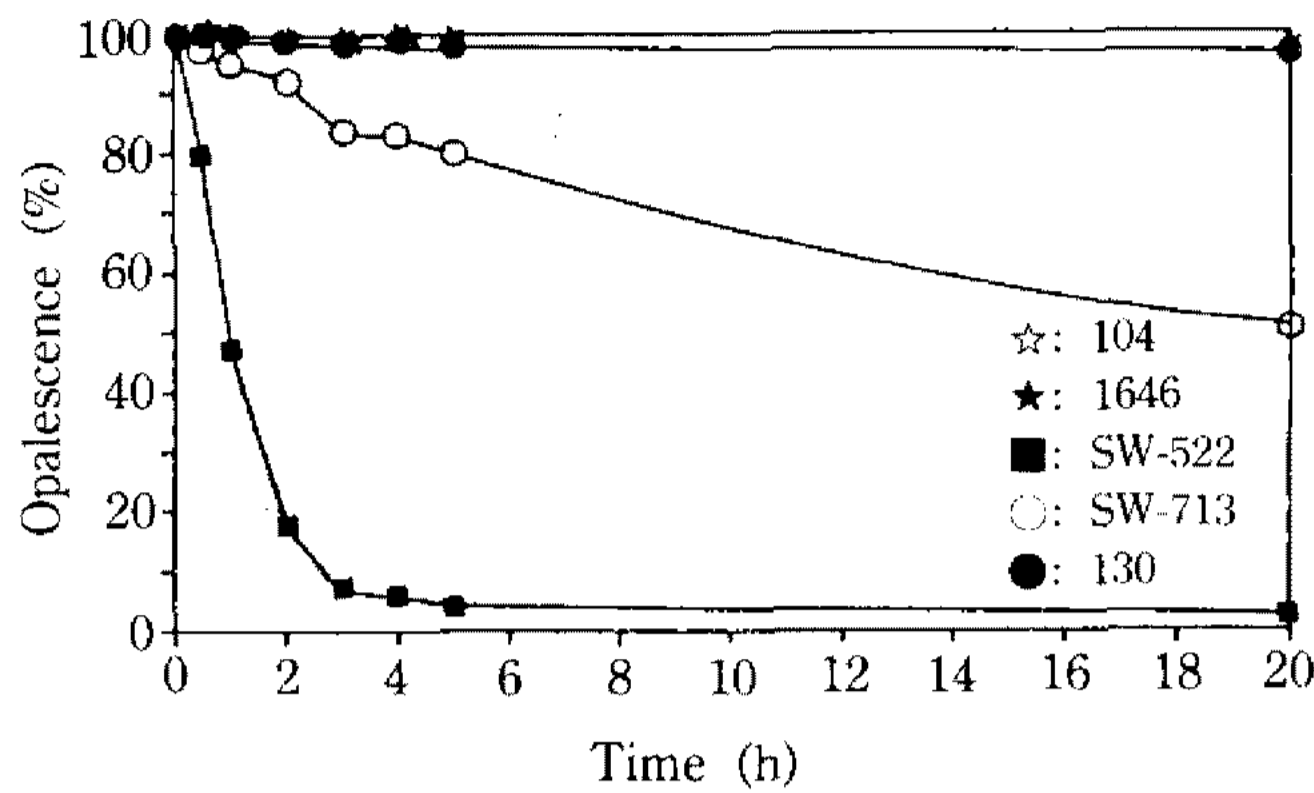


Fig. 3. Rate of loss of opalescence of α -1,3 glucanase-IG solution.

결 과

α -1,3 glucanase를 분비하는 미생물을 탐색할 때, agar plate상에서 각 균주들의 성장대와 그 주위에 형성되는 투명환(clear zone)을 미생물이 분비하는 α -1,3 glucanase에 의한 것으로 하여 α -1,3 glucanase 분비균주를 탐색하였다(Fig. 2). 그 중에서 투명환 및 성장대(growth zone)가 크게 형성되는 17가지의 균주를 분리하였다(Table 1). 이 균주들을 가지고 Dextarch-liquid culture media에 배양시켰더니, SW-522, SW-713 및 130의 배양액에서 α -1,3 glucanase의 역가가 특히 높은 것으로 나타났다. 액체 배양액에서 추출한 효소를 1차 정제(투석후)하여 조효소의 역가를 측정된 결과, SW-713의 α -1,3 glucanase(투석후)는 30분 경과 후에 2.87%, 1시간 경과 후, 5.16%, 2시간 후, 8.62%, 3시간 후, 16.67%, 4시간 후, 17.24%, 5시간 후, 20.11%, 20시간 후, 49.43%로 불용성 glucan을 분해했다. 또한, SW-522 α -1,3 glucanase는 30분 경과 후에 20.35%, 1시간 경과 후, 53.1%, 2시간 후, 82.6%, 3시간 후, 93.51%, 4시간 후, 94.4%, 5시간 후, 95.87%, 20시간 후, 97.64%로 불용성 glucan을 분해했다(Fig. 3). 특히, SW-522에서 추출한 조효소(1 mg protein)는 1분 동안에 *S. mutans*의 불용성 glucan 1.3 mg을 분해하는 활성을 나타내었다.

*S. mutans*를 5% sucrose가 함유된 TH 배지에 $100 \mu\text{l}$ (10^9 cells/ml)를 접종하여 9시간 배양시킨 후, test tube 벽에 형성된 plaque에 SW-522에서 추출한 α -1,3 glucanase 1 ml(0.2 mg protein)를 처리한 결과 12시간 후, 완전히 제거되어(Fig. 4), 이 효소를 이용한 강력한 치아우식증 예방효과가 기대되었다.

*S. mutans*가 만들어낸 불용성 glucan 2 ml에 시판

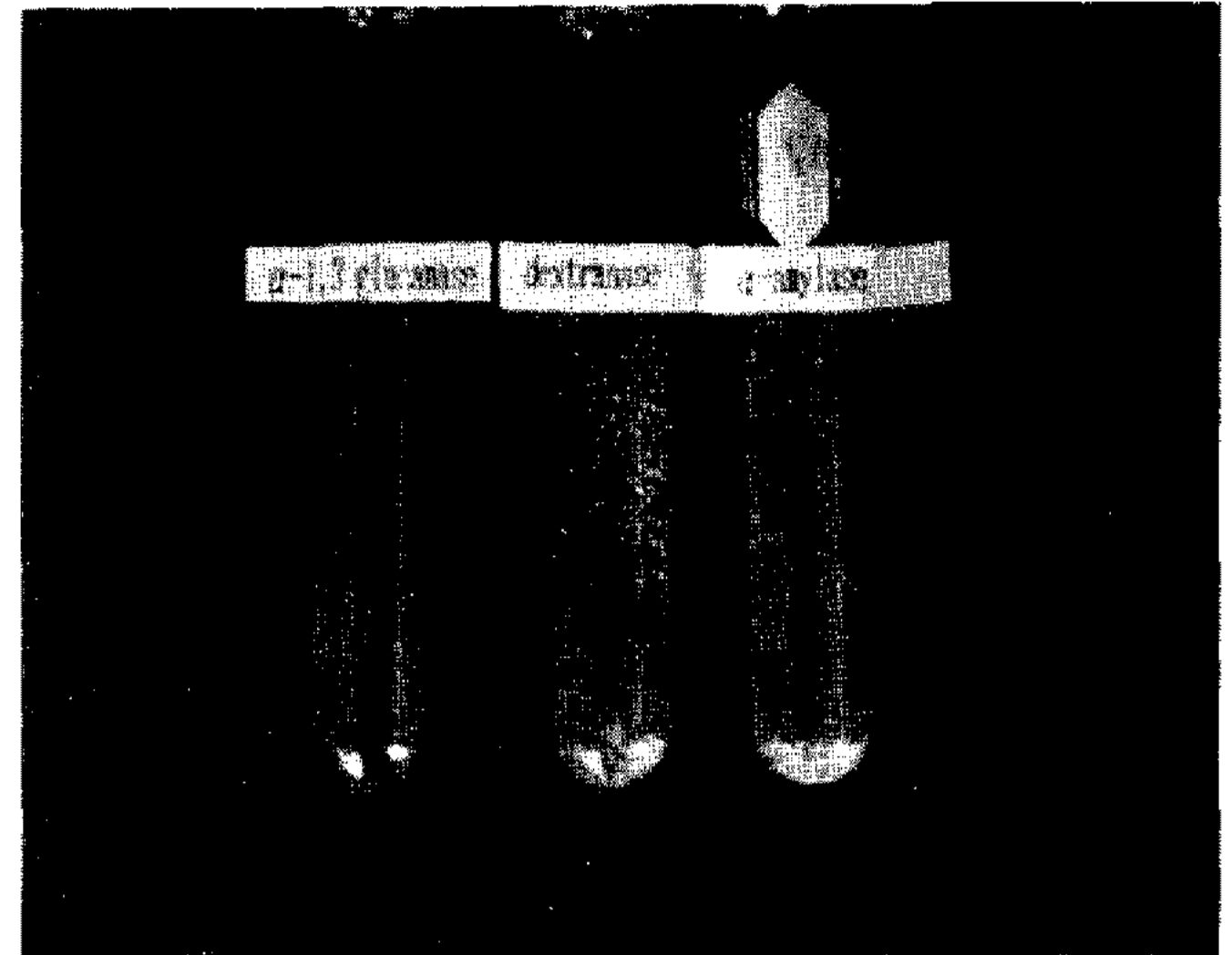


Fig. 4. Effect of insoluble glucanase from SW-522 on adhesive glucan from *S. mutans* in TH medium for 12 hours incubation at 37°C.

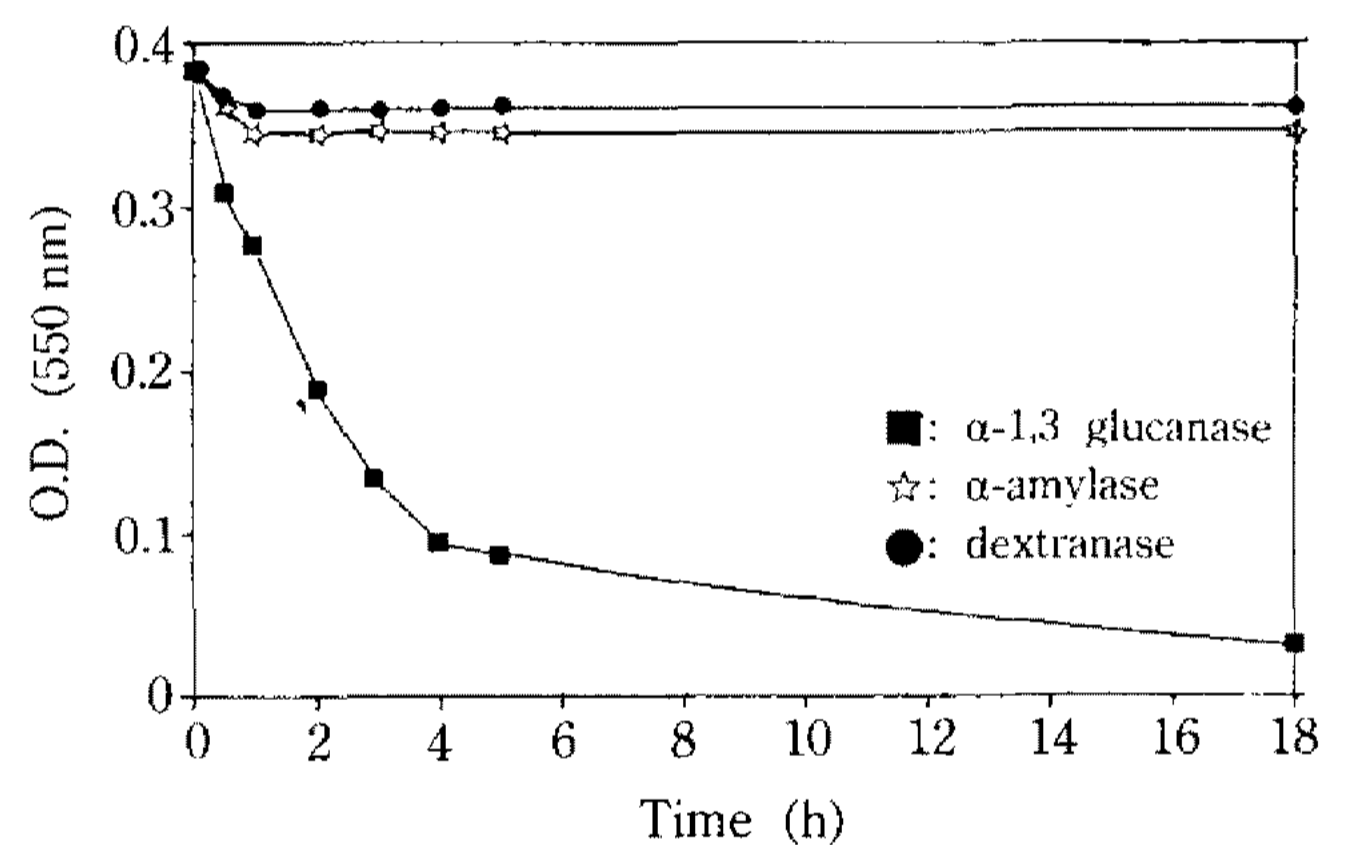


Fig. 5. Rate of loss opalescence of IG-solution by various enzyme.

α -amylase 1 ml/0.2 mg protein와 시판세치제에 첨가된 dextranase 1 ml/0.2 mg protein을 처리하였을 경우 불용성 glucan이 11% 미만으로 분해되었지만, SW-522의 α -1,3 glucanase 1 ml/0.2 mg protein은 불용성 glucan을 91.9%까지 분해하였다(Fig. 5).

고 찰

*S. mutans*가 기질인 sucrose를 이용하여 부착불용성 glucan을 합성하므로써 치아우식증이 발생된다. 따라서 부착불용성 glucan을 분해하는 glucanase를 찾아 형성된 치면세균막을 제거하고자하는 연구들이 많이 진행되어 왔다. Fitzgerald 등은 *Penicillium funiculosum*에서 얻은 dextranase은 철사(wire)에 형성된 plaque deposit를 제거할 수 있다고 발표했다(18).

그러나 Hamada와 Koga 등은 실제적으로 α -1,3 glucanase는 *S. mutans*가 만들어 낸 불용성 glucan을 분해하는 정도가 미약하다고 지적했다(19, 20). 한편, 1971년 Caldwell들은 dextranase가 함유된 mouth-wash를 사용하였을 때, dextranase가 plaque dextran을 분해시키는데 장시간 필요해 효과적인 mouth-wash를 할 수 없다고 지적했다(21). 1973년 Kelstrup들은 *Aspergillus nidulans*에서 얻은 α -1,3 glucanase를 충치가 있는 사람에게 투여했을 때 구강 내의 *S. mutans*의 비율이 낮게 나타났다고 발표했다(22). 지금까지 연구들은 *S. mutans*가 초기에 치아표면에 부착하거나 치면세균막 내의 축적을 제한하는 방법을 연구하였지만, 실제적으로 뚜렷한 효과를 얻지 못했으며 dextranase에 대한 기대도 거의 사라졌다. 저자들은 본 연구의 탐색 대상효소의 기질로 사용될 불용성 glucan을 대량생산하기 위하여 *S. mutans*를 고정화시킨 후 이로부터 배지로 glucosyltransferase를 분비시켜 배지 내에서 순수한 α -1,3 glucan을 제조하는 방법으로서 *S. mutans*의 세포고정화방법을 개발한 후, 이 불용성 glucan을 유일한 탄소원으로 하는 agar plate를 제조하여 자연으로부터 강력한 α -1,3 glucanase를 분비하는 새로운 미생물 17균주를 분리하였다. 방선균 SW-522는 다른 균에 비하여, 투명환이 크게 형성된 것을 볼 수 있었다. 이것은 균이 증식할 때 glucan 분해효소를 분비하여 이 효소가 agar plate상에서 확산되어 glucan을 분해하므로써 젓빛 glucan이 투명하게 변할 때 관찰되는 것이었다. 이 방선균 SW-522의 액체배양시 inducer로서 dextran T-10(M.W 10,200)을 사용하였는데, 이것은 1975년 Ebisue들이(13) *Flavobacterium*에서 효소생산시 액체배양에서 inducer로서 α -1,3 glucan을 사용한 방법과 유사하다.

방선균 SW-522는 불용성 glucan을 2시간 후 약 80% 이상으로 분해하였으며, 3시간 후에는 거의 모든 glucan이 분해되어 투명하게 되었다. SW-522의 α -1,3 glucanase의 역가는 1.3 mg IG/min·mg protein으로서 1972년 Guggenheim, 1975년 Inoue 등이 발견한 효소보다 십배 이상 높은 활성을 나타내었다(23, 24).

지금까지 발견된 α -1,3 glucanase는 *in vivo*하의 동물실험 및 임상실험에서 *S. mutans*로부터 생성되는 불용성 glucan을 거의 분해시키지 못해 뚜렷한 효과가 없었다. 그러나 SW-522의 α -1,3 glucanase는 시판 α -amylase나 기존의 세치제에 사용되어 온 dextra-

nase와는 달리 이 불용성 glucan을 97% 이상 거의 분해시키는 특이성을 가진 새로운 효소로 나타났는데, 이는 기질을 *S. mutans*가 생성한 glucan을 이용하였으므로 기질특이성이 뛰어난 α -1,3 glucanase임이 증명되었다. 한편, 이 효소는 *S. mutans*가 만들어내어서 test tube 벽면에 형성된 불용성 glucan과 *S. mutans*의 복합체인 plaque를 완전히 녹이는 것으로 보아, 임상실험에서도 치면세균막(dental plaque)을 직접 제거할 가능성이 크므로, 이 효소분비균의 대량배양 조건 및 효소의 정제방법이 완성되면 구강환경위생용품이나 기능성 식품에 첨가하여 충치예방제로 이용될 수 있다고 사료되었다.

요 약

*S. mutans*가 만들어내는 불용성 glucan을 완전히 분해시킬 수 있는 새로운 α -1,3 glucanase를 탐색하기 위하여 *S. mutans*가 직접 만들어 낸 불용성 glucan을 기질로 사용하여 자연으로부터 미생물을 탐색한 결과, 자연에 존재하는 여러 균주 중 17종의 불용성 glucan 분해능력을 가진 미생물을 분리하였으며 위 균주를 액체배양하여 배양액으로부터 α -1,3 glucanase를 추출한 결과, 균주 SW-522와 SW-713 균주에서 각각 97.6%와 49.3%의 불용성 glucan을 5시간 후에 분해시키는 효소역가를 보였다. SW-522의 α -1,3 glucanase의 역가는 1.3 mg IG/min·mg protein으로 기존의 발견된 효소보다 십배이상 높았고, SW-522의 α -1,3 glucanase는 *S. mutans*에 의해 test tube에 형성된 불용성 glucan을 12시간 후에 완전히 분해시켰으며 시판 α -amylase와 기존세치제에 사용되어온 dextranase는 불용성 glucan의 분해도가 각각 10.2%와 6.3%인데 비해 SW-522의 α -1,3 glucanase는 90% 이상의 분해도를 나타냈다.

따라서 새로운 α -1,3 glucanase는 세치제 또는 식품 등에 첨가하여 치아우식예방에 효과가 뛰어난 구강환경위생용품을 개발할 수 있다고 사료된다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술조성비(생물학적활성물질로부터 치아우식 예방제의 개발)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김주환, 김종배, 최유진, 김종열. 1983. 구강보건학. 개정증보판, 고문사.
2. Nagada, K. and T. Akira. 1982. The effects of daily mouth rinsing with Galactose on dental plaque formation. *일본구강위생학학회지*, **32**: 104-107.
3. Kobayashi, S., K. Koga., O. Hayasima. and Y. NaKano. 1988. Inhibitor effects of Millard reaction products on glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Agri. Biol. Chem.* **52**: 3169-3171.
4. Lee, K.Y. 1992. Study on the development of preventive agent of dental caries from biological active material. 대학소속 석사학위논문.
5. Guggenheim, B. 1970. Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. *Helv. Odontol. Acta.* **14**: 89-108.
6. Guggenheim, B. 1970. Extracellular polysaccharide and microbial plaque. *Int. Dent. J.* **20**: 157-678.
7. Hamada, S. and H.D. Slade. 1980. Mechanisms of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces *in vitro*. In E.H Beachey (ed.) *Bacterial adherence Chapman and Hall*. London. In press.
8. Bowen, W.H. 1969. Effects of dextranase on cariogenic and non-cariogenic dextrans. *Brit. Dent. J.* **124**: 347-349.
9. Fitzgerald, R.J., P.H. Keyes, T.H. Stoudt and D. M. Spinell. 1968. The effects of a dextranase preparation on plaque and caries in hamsters, a preliminary report. *J. Am. Dent. Assoc.* **76**: 301-304.
10. Hasegawa, S. and J. H. Nordin. 1969. Purification and properties of an endo- α -D-(1,3)-glucanase from *Trichoderma Viride*. *J. Biol. Chem.* **224**: 5460-5470.
11. Tsumoda, A., Y. Sakano and T. Kobayashi. 1978. Purification and properties of an Exo- α -1,3 glucanase from *Cladosporium resinae*. *Agri. Biol. Chem.* **42**: 1045-1053.
12. Nordin, J.H. and K.K. Tung. 1968. Structure of the tetrasaccharide produced by the hydrolysis of nigeran by the enzyme mycodextranase. *Biochem. Biophys. Acta.* **158**: 154-156.
13. Ebisue, S., K. Kato, S. Kotari and A. Misaki. 1975. Isolation and purification of flavobacterium α -1,3 glucanase hydrolyzing, insoluble, sticky glucan of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **124**: 1489-1501.
14. Bacon, J.S.D., D. Jones, V.C. Farmen and D.M. Webley. 1968. The courence of α -1,3 glucan in *Cryptococcus Schizosaccharomyces* and polyporus species and its hydrolysis by a *Streptomyces culture* filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **158**: 313-315.
15. Zonneld, B.J.M. 1971. A new type of enzyme, an exo-spilting α -1,3 glucanase from non-induced culture of *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **258**: 541-547.
16. 윤정원, 문혁수, 조효상, 김성주. 1992. Streptococcus mutans의 고정화에 의한 불용성 glucan의 대량제조에 관한 연구. *대한구강보건학회지*. **16**: 392-399.
17. Baily, R.W. and R.T.J. Clarke. 1958. A Bacterial dextranase. *J. Biochem.* **72**: 49-54.
18. Fitzgerald, R.J., D.M. Spinell and T.H. Stoudt. 1969. Enzymatic removal of artificial plaque. *Arch. Oral Biol.* **13**: 125-128.
19. Hamada, S., J. Mizyno, Y. Murayama, T. Ooshima, N. Masuda and S. Sobue. 1976. Effect of dextranase on the extracellular polysaccharide synthesis of *Streptococcus mutans*: chemical and scanning electron microscopy studies. *Infect. Immun.* **12**: 1415-1425.
20. Koga, T. and M. Inoue. 1979. Effects of dextranase on cell adherence glucan film formation and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Arch. Oral Biol.* **24**: 191-198.
21. Caldwell, R.C., C.H.J. Sandham, W.Y. Mann, S.B. Firm and A.J. Formicola. 1971. The effect of a dextranase mouthwash on dental plaque in young adults and children. *J. Am. Dent. Assoc.* **82**: 124-131.
22. Kelstrup, J., Y.D. Funder Nielsen and E.M. Moller. 1973. Enzymatic redution of the colorization of *Streptococcus mutans* in dental plaque. *Acta. Odontol. Scand.* **31**: 249-253.
23. Ebisue, S., K. Kato, S. Kotari and A. Misaki. 1975. Isolation and purification of *Flavobacterium* α -1,3 glucanase hydrolyzing, insoluble, sticky glucan of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **124**: 1498-1501.
24. Guggenheim, B., B. Regolati and H.R. Muhlemann. 1972. Caries and plaque inhibition by mutanase in rats. *Caries Res.* **6**: 289-297.
25. Inoue, M., T. Egami, K. Yokogawa, H. Kotami and T. Morioka. 1975. Isolation, Identification and some cultural conditions of *Streptomyces species* that produce water-insoluble polyglucan hydrolyase. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 1391-1800.

(Received April 8, 1993)