우식치아와 정상치아의 교합면에서 분리한 *Streptococcus mutans*의 비교

박호원 · 정태성 · 정 진* · 김 신

부산대학교 치과대학 소아치과학교실, 구강미생물학교실*

국문초록

우식치아의 교합면과 정상치아의 교합면에서 균을 채취한 결과, 우식치아의 교합면에서는 3.43×10^5 CFU, 정상치아의 교합면에서는 3.47×10^3 CFU가 MSB 배지상에서 검출되었다. API test를 이용하여 당발효 및 생화학적 성상을 관찰한 결과, 우식치면에서 분리된 세균은 20종 모두 *S. mutans*였으나, 건강한 치면에서는 2개의 세균만 *S. mutans*로 동정되었다. 우식치면과 정상치면에서 분리된 균주 *S. mutans* SM1과 *S. mutans* SM2는 α-galactosidase 활성을 제외하곤 당발효 및 생화학적 성상이 모두 일치하였다. 증식에 있어서, 두 균주 모두 pH 5.5에서 증식이 가장 활발하였고, 자당의 농도는 SM1은 20%일 때 SM2는 5%일 때 최대 증식을 보였다. SM1은 배지의 $CaCl_2$ 농도가 16mM, KCl 농도가 160mM, $MgCl_2$ 농도가 6.4 mM 이었을 때 증식이 가장 활발하였고, SM2는 $CaCl_2$ 농도가 16mM, KCl 농도가 40mM, $MgCl_2$ 농도가 6.4mM 이었을 때 증식이 가장 활발하였다. Sodium bicarbonate 완충액과 Sodium phosphate 완충액의 경우, SM1과 SM2 모두 1mM에서 증식이 활발하였다. Tris 완충액의 경우, SM1은 1mM에서, SM2는 10mM에서 증식이 활발하였다. Potassium phosphate 완충액의 경우, SM2는 농도가 증가함에 따라 증식이 억제된 반면, SM1은 100mM 까지는 농도가 증가할수록 증식이 활발하였다. SM1과 SM2의 염색체를 추출한 후 primer *gtf*B-F961과 *gtf*C-R5574를 사용하여 *gtf* 유전자를 PCR 한 결과, 4.6kb의 단일 band를 얻었고 이 band를 분리하여 제한효소로 처리한 결과, *EcoR* Ⅰ처치시 *S. mutans* GS-5, SM1과 SM2 모두 약 0.8kb 와 3.8kb의 DNA절편을 보여 같은 양상을 나타냈고, *Hind*Ⅲ 처치시 GS-5와 SM1은 잘리지 않았고, SM2의 경우 2.4kb, 1.8kb, 400bp의 3조각의 절편으로 나뉘어 SM1과 SM2의 *gtf* 유전자의 상사성이 관찰되었다. BamH Ⅰ처치시 SM1과 SM2는 4조각의 절편으로 절단되어 같은 양상을 보였고, GS-5의 경우는 3조각의 절편으로 절단되었다. *Kpn* Ⅰ, *Sma* Ⅰ, *Xho* Ⅰ 그리고 *Pst* Ⅰ에는 절단되지 않았다.

주요어 : *streptococcus mutans*, glucosyltransferase, *gtf* 유전자, 치아우식

Ⅰ. 서 론

치아우식증은 특히 소아에 있어서 치아상실을 일으키는 가장 중요한 질환이다[1-3]. 치아우식증을 유발하는 가장 중요한 원인균은 산생성능과 치면부착성이 뛰어난 *Streptococcus mutans*이다[4-7]. *S. mutans*는 신생아의 구강에서는 존재하지 않으며 치아가 맹출한 후에야 구강에 출현하는 구강내 정상 상주균이다[8]. *S. mutans*는 자당을 포함하는 여러 가지 탄수화물을 분해하여 유산(lactic acid)을 생산하는데, 이 유산이 법랑질 탈회를 일으켜 치아우식증을 유발하게 된다[9-11]. 또한 glucosyltransferase라는 효소를 분비하여 자당으로부터 포도당 다량체인 글루캔(glucan)을 합성하는데, 글루캔 중에서도 비수용성 글루캔은 점성이 높아 *S. mutans*의 치면부착을 용이하게 하며, 그 외 구강 내 다른 *Streptococci*는 물론 부착능력이 없는 다른 세균의 부착이나 응괴를 가능하게 함으로써 치태형성에 기여한다[12-15]. 또, 물에 녹지 않는 성질 때문에 치태의 기본골격의 역할을 하며, 세균의 영양물질로도 작용한다[16-19].

Glucosyltransferase(gtf)는 글루캔을 합성하는 효소로 세균 염색체에 위치한 *gtf* 유전자의 발현으로 인해 생산된다. *S. mutans*는 정상적으로 수용성 글루캔과 비수용성 글루캔을 합성하는 glucosyltransferase를 생산한다. Glucosyltransferase B와 glucosyltransferase C는 α-1,3 결합이 풍부한 비수용성 글루캔을 합성하는 효소이고, glucosyltransferase D는 α-1,6 결합이 풍부한 수용성 글루캔을 합성하는 효소이다. Glucosyltransferase B와 glucosyltransferase C는 *gtf*B와 gtfC 유전자의 산물이며, glucosyltransferase D는 *gtf*D 유전자에 의해서 만들어진다[20-22]. *In vitro* 실험결과, 세균의 부착에 있어서 glucosyltransferase D는 거의 영향을 미치지 않지만

[23], glucosyltransferase B와 glucosyltransferase C는 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다[24,25]. 또, glucosyltransferase B는 주로 세균표면과의 결합에 관여하고 glucosyltransferase C는 hydroxyapatite 표면과의 결합에 관여함이 보고되었다[26]. 또한, *gtf*B와 *gtf*C 유전자를 변이(mutation)시킨 후 백서에 접종하였을 때 평활면 우식증이 현저하게 감소되었음이 보고되었다[27]. 즉, *gtf* 유전자 중에서도 비수용성 글루캔을 합성하는 *gtf* 유전자가 우식활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

구강내에는 300종 이상의 세균이 서식하고 있으며, 개인마다 균의 종류가 다양하다[8]. 또, 한 숙주일지라도 구강내 위치에 따라서 분포하는 세균이 다르다[8]. *S. mutans*는 글루캔과 같은 부착에 관여하는 물질을 가지고 있어 치면에 잘 부착하여 서식하는 세균이다. 어린이에서 *S. mutans*에 감염되는 시기가 빠를수록 높은 우식활성을 보이지만 *S. mutans* 감염이 항상 우식활성으로 나타나지는 않는데, 이것은 글루캔과 같은 점성과 부착성이 뛰어난 다량체의 합성능력이 우식활성에 중요한 독력인자(virulence factor)이기 때문이다. 12개월에서 30개월 된 아동을 대상으로 *S. mutans*와 치아우식증과의 관계를 관찰한 결과, *S. mutans* 숫자가 많을수록 높은 우식활성을 보였고, 비수용성 글루캔을 합성하는 활성이 높을수록 우식발생이 증가한다고 보고되었다[28]. 이와 같이 같은 종의 *S. mutans*일지라도 비수용성 글루캔을 합성하는 능력은 다를 수 있다. 즉, 비수용성 글루캔을 합성하는 *gtf* 유전자에 있어서 차이가 있거나 그 발현에 차이가 있을 수 있다. 따라서, 우식활성에 직접적으로 연관되는 gtfB와 *gtf*C 유전자의 상이성 여부를 관찰하는 것이 우식활성의 차이점을 이해하는 데 중요하다고 사료된다. 같은 숙주 내에는 수종의 *Streptococci*가 존재하고 있고, 같은 *Streptococci*일지라도 위치에 따라 다른 종의 *Streptococci*가 존재하고 있다. 우식치아와 정상치아에서 발견되는 *Streptococci*는 동일하지 않으며, 같은 *S. mutans*일지라도 우식활성에 관여하는 *gtf* 유전자는 동일하지 않을 것이다. 그러나, 지금까지 치아우식에 관여하는 *Streptococci*의 균종의 차이에 대해서는 보고되고 있지만[29,30], 우식치면과 정상치면에 존재하는 *S. mutans*의 *gtf* 유전자의 차이에 대해서는 보고된 바 없었다.

국민의 보건의식이 향상됨에 따라 구강위생에 대한 관심도 점점 증가하고 있다. 그래서 다양한 구강 청정제, 치태억제제나 치약 뿐 아니라 구강내 유해세균의 숫자를 감소시키고, 치태형성을 억제하는 식품에 대해서도 연구가 이루어지고 있다[31-35]. 이들 대부분은 치아우식증의 원인균인 *S. mutans*의 성장을 억제하거나 죽이는 물질에 대한 연구, 그리고 글루캔 합성 효소인 glucosyltransferase의 활성을 억제하여 치태형성과 우식발생을 억제하는 물질에 대한 연구이다. 우리가 섭취하는 음식은 물론 구강위생을 위해 사용하는 약품에 들어있는 성분들은 구강내 환경과 조화를 이루면서 세균의 성장을 증가 또는 억제시키고 우식활성에 영향을 미치게 된다. 따라서, 구강이나 식품 또는 약품에 존재하는 이온이나 완충액이 *S. mutans*의 성장에 미치는 영향을 관찰하는 것이 우식발생을 이해하는데 또한 필요하다고 생각되었다. 그러므로, 치아우식에 관여하는 *S. mutans*와 관여하지 않는 *S. mutans*와의 중요한 차이점을 구명하기 위해 직접 환자에서 분리한 *S. mutans*의 화학적 성상과 생존에 영향을 미치는 인자, 우식활성에 중요한 독력인자인 *gtf* 유전자의 비교가 치아우식증의 예방과 관리에 실제적인 도움을 줄 수 있다고 생각되었다.

본 연구에서는 한 개인에 있어서 정상치아와 우식치아의 교합면을 대상으로 세균을 채취하여 *S. mutans*를 분리하고, 분리된 세균의 생화학적 성상과 성장조건의 차이점을 관찰하였으며, 우식활성에 중요한 *gtf* B와 *gtf* C 유전자를 증폭한 후 제한효소로 처리하여 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)양상을 비교하였다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 세균의 분리, 배양 및 생균수 측정

부산대학교병원 소아치과에 내원한 4세 남아의 상악 우측 제2유구치 우식교합면과 상악 좌측 제2유구치 정상교합면으로부터 세균을 채취하였다. 먼저 타액이 묻지 않도록 대상치아를 고립시키고 멸균된 면봉을 30초간 교합면에 적용시켜 균을 채취한 후 1ml의 생리식염수에 넣었다. 1분간 vortex mix로 혼합한 후 생리식염수로 균액을 10, 100, 1,000배로 희석하여 15%의 자당, 0.2U/ml의 bacitracin이 함유된 Mitis-Salivarius agar (MSA, Difco, Detroit, MI, U.S.A.)에 0.5ml 씩 도말하였다. 37℃, 5% 탄산가스 배양기에서 48시간 동안 배양하여 생균수를 측정한 후, 각각 20개씩의 세균 집락을 선택하여 brain heart infusion(BHI, Difco, Detroit, MI, U.S.A.) broth에 접종하여 18시간 배양한 후 사용할 때까지 초저온 냉동고에 보관하였다. 한편, 동결건조로 보관중이던 *Streptococcus mutans* GS-5를 brain heart infusion(BHI, Difco, Detroit, MI, U.S.A.) broth에 접종하여 37℃, 5% 탄산가스 배양기에서 18시간 배양하였다.

2. 당발효 검사 및 생화학적 검사에 의한 세균의 동정

분리된 세균을 그람 염색하고 API 20S kit를 사용하여 당발효와 생화학적 특성을 검사하였다. 간단히 표기하면, 단일 집락만을 증류수에 현탁해서 BHI agar 상에서 37℃, 24시간 배양하여, 멸균된 면봉으로 증식된 세균을 취해서 증류수에 현탁하여 Macfarland scale #5로 조정한 후, API 20S kit (BioMerieux, Marcy l'Eroile, France)에 각각의 세균액을 접종하고 37℃에서 4시간 배양하였다. 반응액을 첨가해서 기질의 색깔 변화와 당의 산성화를 관찰하였다. 정확한 동정을 위해 24시간 후 재 판독하였다.

3. pH와 자당이 세균의 증식에 미치는 영향 측정

0.5% 효모추출물과 5% 자당을 첨가한 BHI broth를 각각

pH 5.5, 7.0, 8.5로 조절하여 시험관에 4ml 씩 준비하였다. 한편, 자당의 영향을 관찰하기 위해서는 0.5% 효모추출물을 첨가한 BHI broth에 자당의 농도가 각각 1.25%, 5%, 10%, 20%가 되도록 조절하여 4ml씩 시험관에 준비하였다. 여기에 1×10^5 CFU의 공시균을 접종하여 37℃에서 탄산가스 배양기에서 18시간 배양한 후 세균 배양액을 희석하여 BHI agar상에 도말하고 37℃ 탄산가스 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

4. Ca, K, Mg 이온 농도가 세균의 증식에 미치는 영향 측정

0.5% 효모추출물과 5% 자당을 첨가한 BHI broth에 $CaCl_2$ 농도를 각각 0.25, 1.0, 4.0, 16.0mM, KCl 농도를 각각 2.5, 10, 40, 160mM, $MgCl_2$ 농도를 각각 0.1, 0.4, 1.6, 6.4mM로 조절하여 상기와 같은 방법으로 생균수를 측정하였다.

5. Sodium bicarbonate, Tris, sodium phosphate, potassium phosphate 완충액이 세균의 증식에 미치는 영향 측정

0.5% 효모추출물과 5% 자당을 첨가한 BHI broth가 1 mM, 10mM, 100mM, 1M 완충액(pH 7.4)이 되도록 sodium bicarbonate, sodium phosphate, potassium phosphate (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)를 첨가하고, 0.1mM, 1mM, 10mM, 100mM Tris 완충액 (pH 7.4, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)이 되도록 Tris를 첨가하여 상기와 같은 방법으로 생균수를 측정하였다.

6. 세균의 염색체 추출

세균의 염색체는 Shiroza 등[21]의 방법을 변형하여 추출하였다. 분리세균 2×10^8 CFU를 5ml의 BHI broth에 접종하여 37℃, 5% 탄산가스 배양기에서 18시간 동안 배양한 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 균체에 3ml의 PEG(16%)-lysozyme(3.3mg/ml)-RNase A(166㎍/ml) 용액을 가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 원심분리하여 상청액을 제거하고 침전물을 2.5ml의 TE 완충액에 현탁하였다. 여기에 50㎕의 proteinase K와 250㎕의 10% SDS를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 4ml의 ethanol을 가하여 13,000 rpm에서 원심분리하고 상청액을 제거한 후, 침전물에 2.5ml의 1% SDS를 첨가하여 65℃에서 30분간 반응시키고 50㎕의 proteinase K(10mg/ml)를 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 혼합액에 동량의 phenol과 phenol/chlorform(25 : 24)으로 차례로 추출하여 상청액을 15ml tube에 옮기고 100% ethanol을 가하여 DNA를 침전시켰다. 70% ethanol을 가하여 침전물을 한 번 세척한 후 500㎕의 TE 완충액에 현탁하여 4℃에 보관하였다.

7. Oligonucleotide primer의 준비

글루캔 합성에 관여하는 glucosyltransferase를 지정하는 *gtf* 유전자를 증폭하기 위해 *Streptococcus mutans* GS-5의 *gtf*B와 *gtf*C 유전자를 포함하는 염기서열에 상보적인 primer 1쌍, 즉 *gtf*B-F961(5′-TCTAAGCAAGAAGCTGCTAGTACT-3′)과 *gtf*C-R5574 (5′-TGGTTGAGATGTTGCTGAAGTTGC-3′)를 바이오니아사에 의뢰하여 제조하였다. 제조된 primer는 100㎛M이었으며 사용할 때까지 저온냉동고에 보관하였다.

8. *gtf* 유전자의 증폭

위의 방법으로 분리한 genomic DNA 5㎕를 주형으로 하여 4.6kb의 *gtf* 유전자를 증폭하였다. Genomic DNA에 10X polymerase buffer, dNTP(200㎛M, each), primer(10pM, each), 0.625U의 Taq DNA polymerase(Takara Syuzo Co., Kyoto, Japan)를 가하여 총 50㎕의 반응액을 만들어 polymerase chain reaction(PCR)을 시행하였다. 본 실험에서는 GeneAmp PCR system 2400(Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, U.S.A.)을 이용하여 DNA를 증폭하였는데, 94℃에서 3분간 DNA를 초기 변성시킨 후 다음의 3단계를 30주기 반복하였다. DNA 변성은 94℃에서 2분, primer annealing은 55℃에서 2분, extension 단계는 72℃에서 15분간 반응시켰으며, 마지막 주기에서는 72℃에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 각각의 반응액에서 10㎕를 취하여 2㎕의 6X gel loading buffer(0.25% bromophenol blue /0.25% xylene cyanol/50% glycerol)와 혼합하여 0.7% agarose gel에 부하(loading)하였다. 이때 1㎍의 1kb ladder(Promega, Madison, WI, U.S.A.)를 동시에 부하하여 50V로 1시간 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide(0.5㎍/ml)용액으로 염색하여 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)를 이용하여 한천상에서 이동한 DNA band를 관찰하였다. 사진은 UV photographic apparatus (Polaroid, Cambridge, MA, U.S.A.)를 사용하여 촬영하였다.

9. RFLP 분석

중합효소 연쇄반응을 이용하여 증폭한 4.6kb의 DNA band를 QUIAEXⅡ Gel extraction kit(Qiagen Co., Germany)를 이용하여 elution한 후, 0.5㎍의 DNA에 2㎕의 10X 완충액과 증류수를 가하여 20㎕의 반응액을 만든 다음, *EcoR* Ⅰ, *Hind* Ⅲ, *BamH* Ⅰ, *Kpn* Ⅰ, *Sma* Ⅰ, *Xho* Ⅰ 그리고 *Pst* Ⅰ 등의 제한효소를 각각 0.5㎕(15U/㎕) 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.5M EDTA를 가하여 반응을 종결시킨 후 4㎕의 6 X gel loading buffer와 혼합하여 0.7% agarose gel에 부하(loading)하였다. 이때 1㎍의 1kb ladder(Promega, Co. U.S.A.)를 동시에 부하하여 20V로 12시간 전기영동을 시행한

후 ethidium bromide(0.5㎍/ml)용액으로 염색하여 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)를 사용하여 한천상에서 이동한 DNA band와 그 양상을 관찰하였다. 사진은 UV photogrkduaphic apparatus(Polaroid, Cambridge, MA, U.S.A.)를 사용하여 촬영하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. 우식치면과 정상치면에서의 세균 분리와 생균수 측정

우식치면과 정상치면에서 세균을 채취하여 15%의 자당과 0.2U/ml의 bacitracin이 함유된 Mitis-Salivarius agar)에서 배양한 결과, 우식치면에서는 전체 세균수가 3.43×10^5CFU였다. 육안상 2종류로 구별되었으며, 이중에서 작은 집락을 보이는 세균은 2.81×10^5CFU, 큰 집락을 보이는 세균은 6.69×10^4 CFU였다(Fig. 1). 정상치면에서는 전체 3.47×10^3 CFU 중에서 작은 집락의 세균이 1.52×10^3 CFU, 큰 집락의 세균이 1.97×10^3 CFU였다(Fig. 1). 따라서, 본 실험에서 대상으로 한 소아의 경우, 정상치면에서보다 우식치면에서의 세균이 100배 정도 많은 것으로 관찰되었다.

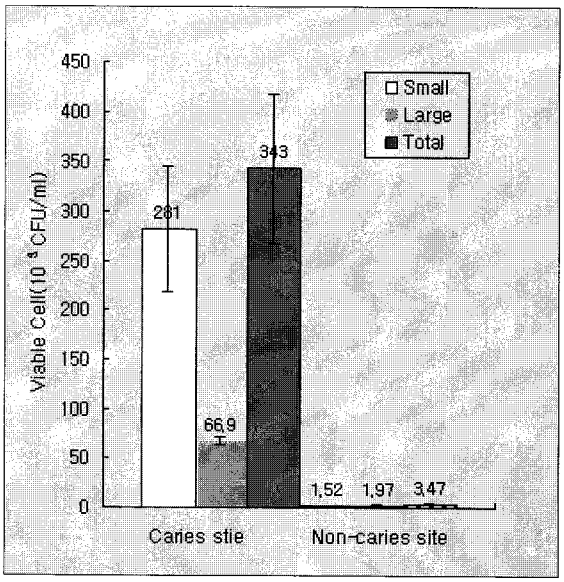


Fig. 1. Viable cell count from occlusal surfaces of caries and non-caries site. The total cells from caries site were about 100 folds of those in non-caries site.

2. 분리세균의 당발효와 생화학적 특성

MSB 배지에서 분리된 세균을 그람염색한 결과 모두 그람양성 세균이었으므로, 우식치면과 정상치면에서 분리한 세균 중에서 각각 20집락을 무작위로 선택하여 API 20S kit를 사용하여 당발효와 생화학적 특성을 검사한 결과, 우식치면에서 분리한 20집락 모두 *Streptococcus mutans*로 판정되었다. 반면, 정상치면에서는 5종의 세균이 검출되었는데, *Gemella morbillorum* 10집락, *Lactococcus lactis cremoris* 4집락, *Streptococcus mitis* 2집락, *Streptococcus acidominimus* 2집락, *Streptococcus mutans* 2집락이었다(Table 1). 우식치면에서 분리된 *Streptococcus mutans*와 정상치면에서 분리된 세균의 당발효와 생화학적 검사결과는 Table 2, 3과 같다. 우식치면에서 분리된 *Streptococcus mutans*는 당발효와 생화학적 특성의 검사결과, 2균주로 관찰되었는데, 각각의 비율은 70%와 30%였다. 이때 30%에 해당하는 *Streptococcus mutans*가 정상치면에서 분리된 *Streptococcus mutans*와 같은 당발효와 생화학적 성상을 보였다. 따라서, 이후부터는 우식치면에서 분리된 *Streptococcus mutans*를 SM1, 정상치면에서 분리된 *Streptococcus mutans*를 SM2로 명기하여 실험결과를 기술하였다. SM1과 SM2의 당발효와 생화학적 특성은 α-galactosidase 활성을 제외하면 같은 성상을 보이는 것으로 관찰되었다.

3. pH 및 sucrose가 세균의 증식에 미치는 영향

Streptococcus mutans SM1은 배지의 pH가 5.5일 때 가장 많은 증식을 보였고 그 다음이 pH 8.5, 7.0의 순서인데 반해 SM2의 경우에는 증식이 활발한 pH의 순서가 pH 5.5, 7.0, 8.5였다(Fig. 2-A). 자당의 경우 SM1은 20% 농도에서 가장 많은 생균수를 보인 반면, SM2의 경우 5%에서 가장 많은 생균수를 보였고 20%에서는 5%보다 생균수가 감소되었다(Fig. 2-B).

Table 1. Bacterial species and isolated rate from caries and non-caries site. In occlusal surface of caries molar, only *Streptococcus mutans* was isolated, but non-caries site showed five bacterial species and *Streptococcus mutans* were only 2 colonies among 20 colonies

species / site	Bacterial name	Number of colonies identified from 20 colonies (%)
Caries site	*Streptococcus mutans*	20 (100%)
Non- caries site	*Gemella morbillorum*	10 (50%)
	Lactococcus lactis cremoris	4 (20%)
	Streptococcus mitis	2 (10%)
	Streptococcus acidominimus	2 (10%)
	Streptococcus mutans	2 (10%)

4. Ca, K, Mg 이온 농도가 세균 증식에 미치는 영향

SM1의 경우 배지의 $CaCl_2$ 농도가 16.0mM(Fig. 3-A), KCl 농도가 160mM(Fig. 3-B)였을 때 세균증식이 가장 활발하였고, $MgCl_2$의 농도가 증가할수록 세균증식은 활발하여 6.4 mM에서 최대증식을 보였다(Fig. 3-C). SM2의 경우 배지의 $CaCl_2$ 농도가 16.0mM(Fig. 3-A), KCl 농도가 40 mM(Fig. 3-B), $MgCl_2$ 농도가 1.6mM과 6.4mM(Fig. 3-C)였을때 세균증식이 가장 활발하였다.

5. Sodium bicarbonate 완충액과 Tris 완충액이 세균증식에 미치는 영향

배지의 sodium bicarbonate 농도가 100mM 이상에서는 SM1과 SM2의 증식이 억제되었으며(Fig. 4-A), SM1의 경우 Tris 농도가 1mM였을때, SM2의 경우 10mM였을때 세균증식이 활발하였으며 100mM에서는 SM1과 SM2 모두 증식이 억제되었다(Fig. 4-B).

6. Sodium phosphate 완충액과 potassium phosphate 완충액이 세균증식에 미치는 영향

SM1과 SM2 모두 배지의 sodium phosphate 농도가 1 mM였을때 세균증식이 가장 활발했으며(Fig. 5-A), SM1의 경우 100mM 이상에서는 증식이 현저히 억제되었다. SM2의 경우 1,000mM 이상의 농도에서 증식이 현저하게 억제되었다. Potassium phosphate 농도는 SM1의 경우 100mM 였을때 SM2의 경우 1mM 였을때 세균증식이 가장 활발하였으며 SM2

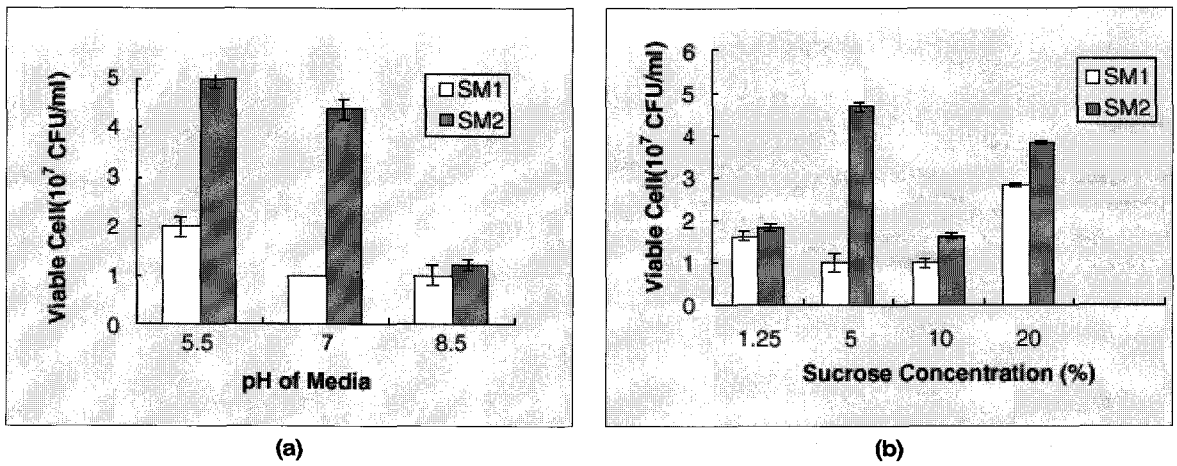
Table 2. Carbohydrate fermentation of isolated bacteria from caries and non-caries occlusal surfaces

	Streptococcus mutans(SM1)	*Streptococcus mutans*(SM2)	*Gemella morbillorum*	*Lactococcus lactis cremoris*	*Streptococcus mitis*	*Streptococcus acidominimus*
Ribose	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	-	-	-	-
Lactose	+	+	-	+	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+
Inulin	+	+	-	-	-	-
Raffinose	+	+	-	+	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-

Table 3. Biochemical characteristics of isolated bacteria from caries and non-caries occlusal surfaces

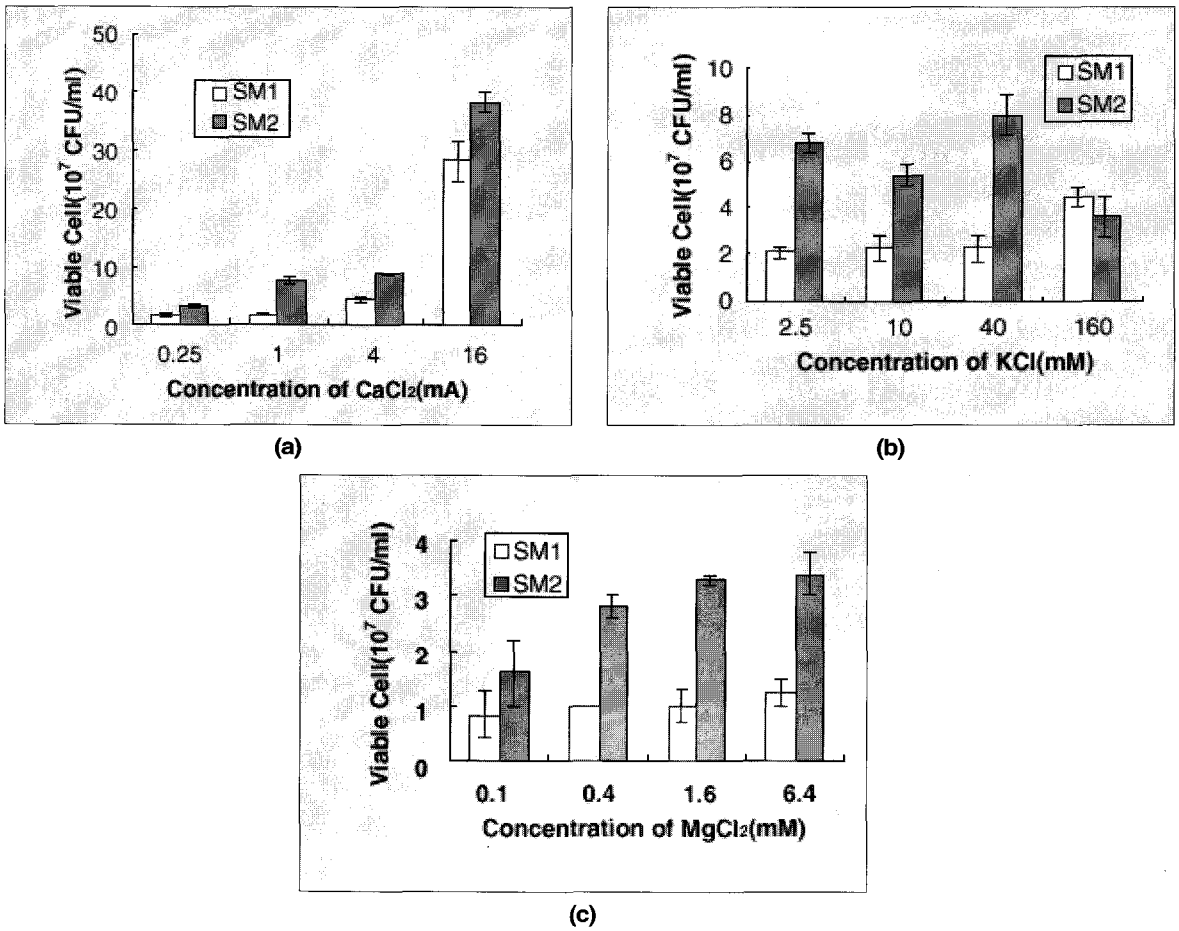
	Streptococcus mutans(SM1)	*Streptococcus mutans*(SM2)	*Gemella morbillorum*	*Lactococcus lactis cremoris*	*Streptococcus mitis*	*Streptococcus acidominimus*
VP	+	+	-	-	-	-
HIP	-	-	-	-	-	+
ESC	+	+	-	-	-	-
PYRA	-	-	-	-	-	-
αGAL	+	-	-	-	-	-
βGUR	-	-	-	-	-	-
βGAL	-	-	-	-	-	-
PAL	-	-	-	-	-	-
LAP	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	+	+	-

VP: Acetoin production, HIP: Hippurate hydrolysis, ESC: Esculin PYRA: Pyrolidonlyarylamidase, αGAL: α-galactosidase, βGUR: β-glucuronidase, βGAL: β-galactosidase, PAL: Alkaline phosphatase, LAP: Leucine arylamidase, ADH: Arginin dehydrolase



(a) (b)

Fig. 2. The effect of pH and sucrose on the growth of *S. mutans*. The growth of SM1 and SM2 were maximum in the media initially adjusted at pH 5.5(A). The viable cells of SM1 were maximum at 20% of sucrose in the media while the viable cells of SM2 were maximum at 5% of sucrose in the media(B).



(a) (b)

(c)

Fig. 3. The effect of $CaCl_2$, KCl, and $MgCl_2$ concentration on the cell concentration of *S. mutans* SM1 and SM2. Both SM1 and SM2 optimally grew at the concentration of 4.0mM of $CaCl_2$ in the media(A). The viability of SM1 was high at 160 mM of KCl, but SM2 grew optimally at 40mM of KCl(B). At 6.4mM of $MgCl_2$ in the media, both SM1 and SM2 showed optimal growth(C).

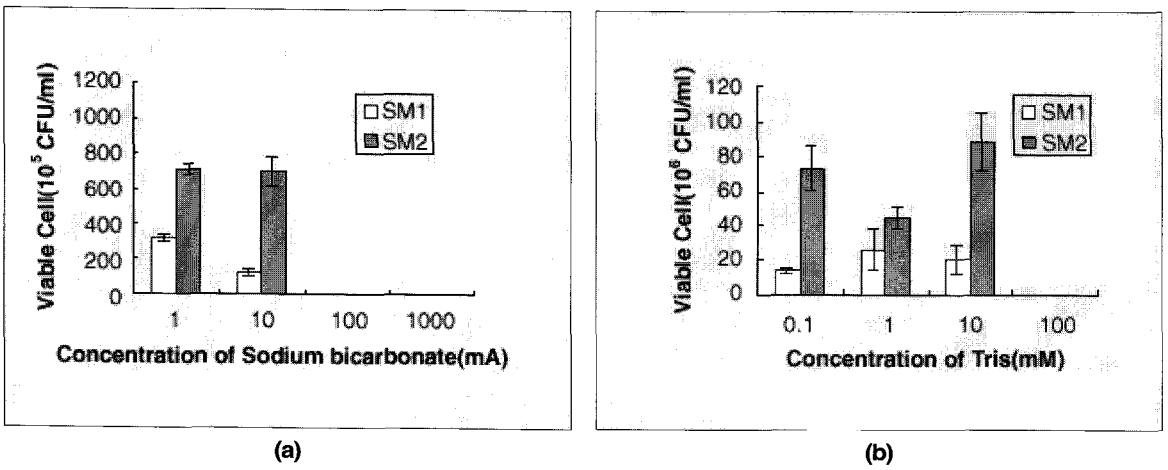


Fig. 4. The effect of sodium bicarbonate buffer and Tris buffer on the cell concentration of *S. mutans* SM1 and SM2. The viability of SM1 and SM2 were high at 1.0mM and 10mM of sodium bicarbonate buffer, respectively. But both are markedly reduced above 100mM in the media(A). The viability of SM1 was high at 1.0mM of Tris, but SM2 grew optimally at 10mM of Tris. Both are markedly reduced above 100 mM in the media(B).

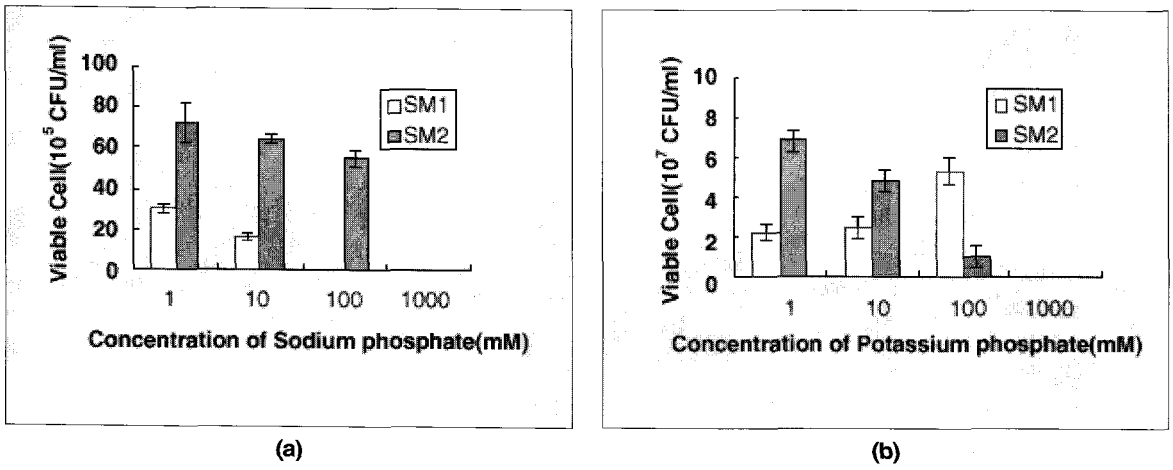


Fig. 5. The effect of sodium phosphate buffer and potassium phosphate buffer on the cell concentration of *S. mutans* SM1 and SM2. Both SM1 and SM2 optimally grew at the concentration of 1.0mM of sodium phosphate in the media. SM1 and SM2 markedly reduced above 100 mM and 1000mM, respectively(A). The viability of SM1 was high at 100mM of potassium phosphate, but SM2 grew optimally at 1.0mM of potassium phosphate. The viability of SM1 was increased according to the increase of potassium phosphate concentration up to 100mM , while the viability of SM2 was decrease according to the increase of potassium phosphate concentration in the media(B).

의 경우 100mM에서 세균증식이 현저하게 억제되었으나 SM1의 경우 100mM에서 가장 활발하였고, 100mM까지 농도가 증가할수록 세균증식도 증가되어 농도가 증가할수록 세균증식이 감소되는 SM2의 경우와 대조를 이루었다(Fig. 5-B).

7. *gtf* 유전자의 중합효소 연쇄반응

Primer *gtf*B-F961과 *gtf*C-R5574를 사용하여 반응을 30 주기 실시한 결과 positive control인 *S. mutans* GS-5와 임상분리 균주인 *S. mutans* SM1과 *S. mutans* SM2 모두에서 4.6kb의 DNA band를 확인할 수 있었다(Fig. 6).

8. *gtf* 유전자의 RFLP

중합효소 연쇄반응으로 증폭시킨 4.6kb의 DNA band를 전기영동을 시행한 후 gel elution (Quiagen, Co. Germany)하여 회수한 후 *EcoR* Ⅰ, *Hind*Ⅲ, *BamH* Ⅰ으로 절단한 결과 *EcoR* Ⅰ 처치시 *S. mutans* GS-5, SM1과 SM2 모두 약 0.8kb와 3.8kb의 DNA 절편을 보여 같은 양상이 나타났다(Fig. 7). *Hind*Ⅲ 처치시 GS-5와 SM1은 잘리지 않았고, SM2의 경우 3조각의 절편으로 나뉘었는데 대략 2.4kb, 1.8kb, 400bp로 나타났다(Fig. 8). *BamH* Ⅰ 처치시 SM1과 SM2는 4 조각의 절편으로 절단되어 같은 양상을 보였고, GS-5의 경우는 3 조각의 절편으로 절단되었다(Fig. 9). *Kpn* Ⅰ, *Sma* Ⅰ, *Xho* Ⅰ 그리고

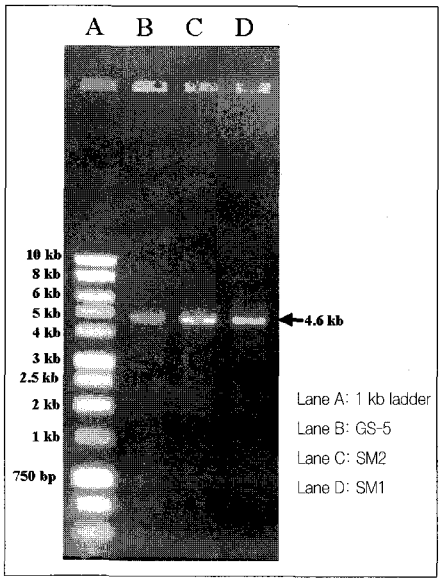


Fig. 6. PCR of the gtf gene. All encompass gtfB and gtfC.

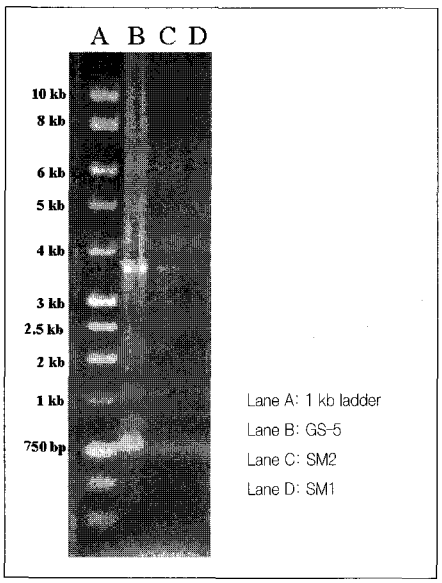


Fig. 7. PCR-RFLP of the gtf gene by EcoR I. EcoR I produced the same pattern such as 0.8kb and 3.8kb for S. mutans GS-5, SM1 and SM2.

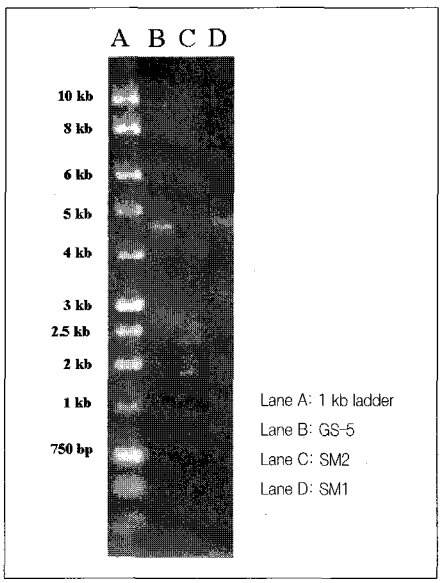


Fig. 8. PCR-RFLP of the gtf gene by Hind Ⅲ. DNA bands amplified from S. mutans GS-5 and SM1 weren't digested by Hind Ⅲ, but 3 fragments such as 2.4kb, 1.8kb and 400bp were examined for SM2.

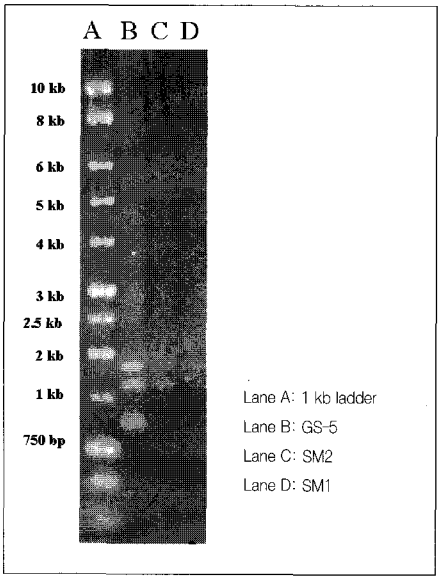


Fig. 9. PCR-RFLP of the gtf gene by BamH I. BamH I treatment showed 4 fragments for SM1 and SM2, while the 3 fragments for S. mutans GS-5.

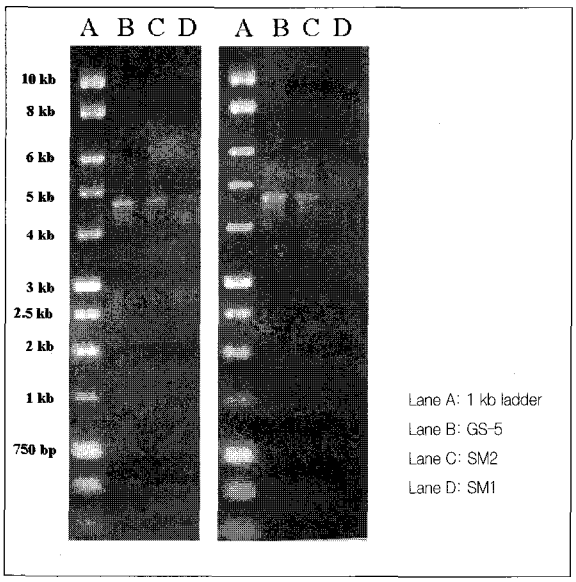


Fig. 10. The PCR products were not digested by Sma I (A), Xho I (B).

Pst I 에는 절단되지 않았다(Fig 10).

Ⅳ. 총괄 및 고안

치아우식증은 구강내 상주균인 *mutans streptococci*에 의해 유발되는 감염성 질환으로 숙주의 방어능력 이상으로 이 세균들의 숫자나 독성이 증가하게 되면 치아우식증이 유발된다. 치아우식증의 원인균으로 가장 잘 알려진 균은 산생성능과 내산성이 우수한 *S. mutans*이다. 8개의 혈청형 중에서 사람을 일차 숙주로 하여 혈청형 c, e, f를 가진 경우 *S. mutans*로 분류되는데[36-38], 치아우식증과 가장 밀접하게 연관되는 것은 혈청형 c이다[5]. *S. mutans*는 치아가 아직 맹출되지 않은 신생아의 구강에서는 발견되지 않으며, 치아가 전부 발거된 구강에서도 발견되지 않는 치아와 연관되어 존재하는 세균이다[8]. 신생아의 구강은 무

균상태이므로 유아의 구강내에 존재하는 *S. mutans*는 외부에서 감염된 것이다. 주 근원은 유아의 모친으로 생각되는데, 모친의 구강내 *S. mutans*의 숫자를 감소시키면 유아가 *S. mutans*를 갖게되는 속도와 정도가 감소됨이 보고되었다[39]. *S. mutans*가 일단 구강내에 들어오게 되면 음식물의 형태로 섭취되는 자당을 비롯한 각종 탄수화물을 에너지원으로 이용하고 부산물인 유산을 생산하게 되는데, *S. mutans*가 치면에 부착되어 존재하게 되면 유산이 치아표면과 지속적으로 접촉되면서 법랑질의 탈회가 유발된다[9,10]. *S. mutans*는 자당의 농도가 낮을 때 유산을 생산하고, 고농도의 자당이 있으면 유산 외에 글루캔을 합성한다고 보고되었다[10]. 자당의 존재하에 생산되는 글루캔은 우식원성 연쇄상구균의 에너지원일 뿐 아니라 세균의 치면부착과 응괴를 도와주어 세균의 성장과 증식에 유리한 환경을 제공한다[16-19]. 따라서, 글루캔을 합성하는 *S. mutans*는 열구와 소와가 있는 교합면 우식증은 물론, 평활면의 우식증을 유발하는 원인균이 된다[5,6]. 즉, 글루캔의 합성능력은 유산 생성능과 더불어 치아우식증을 유발하는 중요한 독력인자로 생각된다.

개인마다 구강내 존재하는 세균의 종류와 분포는 다양하며, 이는 개인의 식이와 구강관리 습관 등의 영향을 받아 각기 다른 구강환경이 조성되기 때문이다. 즉, 같은 종의 세균일지라도 산생성능과 내산성이 다를 수 있으며, 구강내 존재하는 bicarbonate 완충액을 비롯한 여러 완충액에 대한 적응능력, 산도, 자당의 농도 및 다양한 이온에 노출되었을 때의 생존 또는 증식능력이 다를 수 있다. 이는 한 개인의 구강내에서도 마찬가지일 것으로 생각된다. 즉, 한 종의 *S. mutans*일지라도 다양한 구강환경에 노출되었을 때 적응과 생존능력이 균주사이에 다를 수 있다. 더우기, 우식치면과 정상치면에 존재하는 *S. mutans*는 같은 종일지라도 서로 다른 특성을 나타낼 것으로 생각된다. 본 실험에서는 치아우식증으로 내원한 어린이의 우식치아와 정상치아의 교합면에서 세균을 분리, 동정한 후 우식치면과 정상치면에서 분리, 동정된 *S. mutans* SM1과 *S. mutans* SM2, 두 균주를 대상으로 당발효와 생화학적 성상에 관하여 관찰하였다. 먼저, 우식치면과 정상치면으로부터 계수된 oral *streptococci*는 우식치면에서 3.43×10^5 CFU로 정상치면의 3.47×10^3 CFU보다 100배 정도 많은 것으로 나타났다. 이는 정상치면보다 우식치면에 더 많은 *Streptococci*가 존재함을 나타내며, 치아우식에 *Streptococci*가 관여하고 있다는 임상적 증거로서 이전의 보고들과 일치하였다[40,41]. 분리세균을 당발효검사와 생화학적인 특성을 검사한 결과, 우식치면에서 분리된 균은 모두 *S. mutans*로 동정된 반면, 정상치면에서는 *S. mutans*의 비율이 10%에 불과하였는데, 이것은 분리대상 아동의 우식치면에 *S. mutans*가 직접적으로 관여하였음을 시사한다. 우식치면과 정상치면에서 분리된 *S. mutans* SM1과 SM2는 10개의 당발효검사 결과가 일치하였고, 생화학적 특성검사에서는 α-galactosidase 활성을 제외하고는 모두 일치하였다. 이 결과는 두 균주의 생화학적 특성이 거의 일치하므로 우식원성에 관여하는 다른 인자가 있음을 시사하는 것이라고 할 수 있겠다.

구강의 환경변화는 급속하며 또한 다양하다. 따라서, 구강내 산도와 영양분, 특히 자당의 농도에 따라, 두 균주의 증식에 변화가 있을 수 있으므로 산도, 자당과 각 이온의 농도 변화에 따른 세균증식의 변화를 생균수를 측정함으로써 관찰하였는데, 산도변화의 경우, 두 균주 모두 pH 5.5에서 최대 증식을 보였는데, 이는 산을 좋아하는 *S. mutans*의 증식이 염기성 환경에서 억제되는 것을 의미한다. SM1의 경우 pH 5.5에서의 증식이 pH 7.0에서보다 2 배 정도 증가한 반면, SM2의 경우에는 pH 5.5와 7.0에서 증식의 차이가 거의 없었는데, 이는 SM2보다는 SM1이 낮은 산도에서 증식이 활발함을 보여주는 결과라고 할 수 있다. 자당의 농도변화에 대해서는, SM1이 가장 높은 농도인 20%에서 가장 많은 생균수를 나타낸 반면, SM2의 경우 증식이 최대인 농도는 5%였으며, 그 다음이 20%였다. 이는 SM1이 SM2에 비해 자당의 더 높은 농도에서 증식이 활발함을 보여준다. 그러므로, 자당의 섭취량과 섭취 빈도가 증가할수록 구강내 자당의 농도가 높아지므로 SM1의 증식이 활발하여 우식을 유발하는 것으로 생각된다. 이온의 영향을 살펴본 결과, SM1과 SM2 모두 Ca이온 농도와 Mg이온의 농도가 증가할수록 증식이 활발하여 각각 16mM과 6.4mM에서 최대 생균수를 나타내었다. 이는 예방적으로 사용하는 구강 용품에 Ca이온과 Mg이온이 첨가될 경우 *S. mutans*의 증식을 촉진할 수 있음을 시사한다. K이온의 경우 SM1은 농도가 증가할수록 증식이 활발하여 160mM에서 최대 증식을 보였으나, SM2는 40mM에서 증식이 가장 활발하였고, 160mM에서는 오히려 증식이 억제되었다.

구강위생에 대한 관심이 높아지면서 건강한 치아와 청결한 구강을 갖기 위해 여러가지 물질들이 개발되고 있는데, 이들 물질을 식품이나 약품으로 제조하는 과정에서 완충물질을 첨가하게 된다. 따라서, 본 실험에서는 완충액의 농도 변화에 따른 SM1과 SM2의 증식 변화를 관찰하였다. 구강에서 가장 중요한 완충액은 bicarbonate 완충액이다[42]. 악하선에서 분비되는 타액의 bicarbonate 이온(HCO_3^-)의 농도는 자극이 되지 않은 상태에서 2.2mM이고 자극이 되면 35.3mM이 된다. 본 실험에서 sodium bicarbonate 완충액의 농도가 1mM과 10mM일 때 SM1과 SM2 모두 증식이 활발하였고, 100mM 이상에서는 증식이 억제되었다. 이는 타액내의 bicarbonate 완충액의 농도가 *S. mutans*의 증식에 비교적 좋은 조건이라는 것을 의미한다. Tris 완충액의 경우 SM1은 1mM의 농도에서, SM2는 10mM의 농도에서 최적활성을 나타냈으며, 두 균주 모두 100 mM에서 증식이 억제되었다. Sodium phosphate의 경우 1 mM 이상에서 두 균주의 증식이 모두 억제되었고, potassium phosphate의 경우 SM2는 1mM 이상에서 농도가 증가할수록 증식이 억제된 반면, SM1은 100mM까지는 농도가 증가할수록 증식이 더욱 활발하여 SM2와 대조되는 결과를 나타내었다. 이는 약품에 완충물질을 첨가할 경우 potassium phosphate 완충액을 사용하면 100mM의 농도까지는 치아우식증과 관련된 *S. mutans*의 증식을 증가시킬 수 있으므로, potassium phosphate 완충액보다는 sodium phosphate 완충액이 더 효과적임을 시사한다.

Glucosyltransferase는 글루캔을 합성하는 효소이다. 글루캔은 크게 수용성과 비수용성으로 나눌 수 있는데, Toda 등[43]은 글루캔이 한 가닥의 fibril로 구성된 수용성 글루캔과 두 가닥의 fibril로 구성된 비수용성 글루캔으로 이루어졌음을 전자현미경으로 관찰하였다. 비수용성 글루캔은 α-1,3으로 결합된 거대한 포도당 다량체로서[44-46], 점성을 가지고 있어 세균 상호간은 물론 치면과 잘 부착되도록 도와주며, 물에 녹지 않는 성질 때문에 치태의 골격으로 작용하여 치아우식증 뿐 아니라 치주질환을 유발하는 독력인자로 작용한다[44,46-48]. 따라서, *S. mutans*의 비수용성 글루캔을 합성하는 효소인 glucosyltransferase는 중요한 우식유발 물질로 볼 수 있으며, 한 개인의 구강내에 존재하는 *S. mutans*의 비수용성 글루캔의 합성 능력과 정도가 치아우식증의 유발에 결정적인 역할을 하는 것으로 사료된다. *S. mutans*는 3종의 *gtf* 유전자, *gtf*B, *gtf*C, *gtf*D의 발현에 의해 glucosyltransferase를 생산하는데, 수용성 글루캔을 합성하는 유전자는 *gtf*D이며, 비수용성 글루캔을 합성하는 유전자는 *gtf*B와 *gtf*C[20-22]이다. Aoki 등[24]과 Hanada와 Kuramitzu[25]는 *in vitro*에서 glucosyltransferase D가 세균부착에 거의 영향을 미치지 않으나, glucosyltransferase B와 C는 세균부착에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 또, 부착에 있어서 glucosyltransferase B는 주로 구강내 세균과의 상호결합에 관여하고 glucosyltransferase C는 hydroxyapatite 표면과의 결합에 관여함이 보고되었다[26]. Yamashita 등[27]은 *gtf*B와 *gtf*C 유전자를 변이시킨후 백서에 접종하였을 때 평활면 우식이 현저하게 감소되었음을 보고함으로써 평활면 우식에 있어 glucosyltransferase B와 glucosyltransferase C가 중요한 유발인자임을 보고하였다. 따라서, 직접 임상환아의 우식치면과 정상치면에서 *S. mutans*를 분리하여 glucosyltransferase를 encoding하는 *gtf* 유전자의 차이점을 비교하는 것은 치아우식 유발인자에 대한 이해에 중요할 것으로 사료되었다.

임상에서 분리한 *S. mutans* SM1과 *S. mutans* SM2의 *gtf* 유전자의 차이를 비교하기 위해 *gtf*B와 *gtf*C 유전자를 포함하는 유전자를 중합효소 연쇄반응을 이용하여 증폭시킨 결과 4.6kb의 DNA band를 확인할 수 있었다. 이 유전자를 제한효소 *EcoR* Ⅰ, *Hind* Ⅲ, *BamH* Ⅰ, *Kpn* Ⅰ, *Sma* Ⅰ, 그리고 *Xho* Ⅰ을 처치한 결과 *EcoR* Ⅰ처치시 *S. mutans* GS-5, SM1과 SM2 모두 약 0.8kb 와 3.8kb의 DNA 절편을 보여 같은 양상을 나타내었다. *Hind* Ⅲ 처치시 GS-5와 SM1은 잘리지 않았고, SM2의 경우 3조각의 절편으로 나뉘었는데 대략 2.4kb, 1.8kb, 400bp로 나타났다. *BamH* Ⅰ처치시 SM1과 SM2는 4조각의 절편으로 절단되어 같은 양상을 보였고, GS-5의 경우는 3조각의 절편으로 절단되었다. *Kpn* Ⅰ, *Sma* Ⅰ, *Xho* Ⅰ 그리고 *Pst* Ⅰ에는 절단되지 않았다. 이 결과, SM1과 SM2의 *gtf* 유전자는 *Hind* Ⅲ 처치시 SM1은 잘리지 않은 반면, SM2는 2조각의 절편으로 절단되어 다른 양상을 나타내었고, 그 밖의 다른 효소처리에 대해서는 같은 양상이 나타났음으로, *Hind* Ⅲ 처치 절편 부위에 유전자의 차이가 있다고 생각되며, 이 부분이 *S. mutans* SM1의 우식원성 결정에 중요한 역할을 하는 부위로 생각되었다. *S. mutans* SM1과 SM2의 *gtf* 유전자에 있어서 차이를 보이는 이 절편은 DNA sequencing을 통해 염기와 아미노산 잔기(residue)의 차이를 구명할 수 있으리라고 생각되며, 앞으로 계속 연구되어야 할 과제라고 사료되었다.

Ⅴ. 결 론

우식치아의 교합면과 정상치아의 교합면에서 균을 채취한 결과, 우식 치아의 교합면에서는 3.43×10^5 CFU, 정상치아의 교합면에서는 3.47×10^3 CFU가 MSB 배지상에서 검출되었다. API test를 이용하여 당발효와 생화학적 성상을 관찰한 결과, 우식치면에서 분리된 세균은 20 집락 모두 *S. mutans*였으나, 건강한 치면에서는 2개의 집락만 *S. mutans*로 동정되었다. 우식치면과 정상치면에서 분리된 균주 *S. mutans* SM1 과 *S. mutans* SM2는 α-galactosidase 활성을 제외하고는 당발효와 생화학적 성상이 모두 일치하였다. 증식에 있어서, 두 균주 모두 pH 5.5에서 증식이 가장 활발하였고, 자당의 농도는 SM1은 20%일 때 SM2는 5%일 때 최대 증식을 보였다. SM1은 배지의 $CaCl_2$ 농도가 16mM, KCl 농도가 160mM, $MgCl_2$ 농도가 6.4mM였을때 증식이 가장 활발하였고, SM2는 $CaCl_2$ 농도가 16mM, KCl 농도가 40mM, $MgCl_2$ 농도가 6.4mM였을때 증식이 가장 활발하였다. Sodium bicarbonate 완충액과 sodium phosphate 완충액의 경우, SM1과 SM2 모두 1mM에서 증식이 활발하였다. Tris 완충액의 경우, SM1은 1mM에서, SM2는 10mM에서 증식이 활발하였다. Potassium phosphate 완충액의 경우, SM2는 농도가 증가함에 따라 증식이 억제된 반면, SM1은 100mM 까지는 농도가 증가할수록 증식이 활발하였다. SM1과 SM2의 염색체를 추출한 후 primer *gtf*B-F961과 *gtf*C-R5574를 사용하여 *gtf* 유전자를 PCR 한 결과, 4.6kb의 단일 band를 얻었다. 이 band를 분리하여 제한효소로 처리한 결과, *EcoR* Ⅰ처치시 *S. mutans* GS-5, SM1과 SM2 모두 약 0.8kb 와3.8 kb의 DNA절편을 보여 같은 양상이 나타났고, *Hind* Ⅲ 처치시 GS-5와 SM1은 잘리지 않았으며, SM2의 경우 2.4kb, 1.8kb, 400bp의 3조각의 절편으로 나뉘어 SM1과 SM2의 gtf 유전자의 상이성이 관찰되었다. *BamH* Ⅰ처치시 SM1과 SM2는 4조각의 절편으로 절단되어 같은 양상을 보였고, GS-5의 경우는 3조각의 절편으로 절단되었다. *Kpn* Ⅰ, *Sma* Ⅰ, *Xho* Ⅰ 그리고 *Pst* Ⅰ에는 절단되지 않았다.

참고문헌

1. Haddad I, Haddadin K, Jebrin S et al. : Reasons for extraction of permanent teeth in Jordan. Int Dent J 49:343-346, 1999.
2. Beltran A, Guilar ED, Estupinan DS, Baez R: Analysis of prevalence and trends of dental caries in

the Americas between the 1970s and 1990s. Int Dent J 49:322-329, 1999.
3. Murray H, Locker D, Kay EJ : Patterns of and reasons for tooth extractions in general dental practice in Ontario, Canada. Community Dent Oral Epidemiol 24:196-200, 1996.
4. Asikainen S, Alauusua S : Bacteriology of dental infections. Eur Heart J Suppl Dec 14:43-50, 1993.
5. Koga T, Asakawa H , Okahashi N , Hamada S : Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity of serotype c *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 10:2873-83, 1986.
6. Tanzer JM : Essential dependence of smooth surface caries on, and augmentation of fissure caries by, sucrose and *Streptococcus mutans* infection. Infect Immun 25:526-31, 1979.
7. Hanada N : Current understanding of the cause of dental caries. Jpn J Infect Dis 53:1-5, 2000.
8. Willett NP, White RR, Rosen S : Oral micfoflora : In essential dental microbiology Appleton and Lange pp 319-339, 1991.
9. Minah GE, Loesche WJ : Sucrose metabolism by prominent members of the flora isolated from cariogenic and non-cariogenic dental plaques. Infect Immun 17:55-61, 1977.
10. Ruby JD, Goldner M , Hargreaves JA : *Streptococcus mutans*, an assessment of its physiological potential in relation to dental caries. Rev Can Biol 37:273-289, 1978.
11. Zucca M, Cenna S, Berzioli S et al. : *Streptococcus mutans* and dental caries : microbiological aspects G Bacteriol Virol Immunol 83(1-12):108-117, 1990.
12. Wenham DG, Davies RM, Cole JA: Insoluble glucan synthesis by mutansucrase as a determinant of the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 127(Pt 2):407-415, 1981.
13. Inoue M, Koga T, Sato S, Hamada S: Synthesis of adherent insoluble glucan by the concerted action of the two glucosyltransferase components of *Streptococcus mutans*. FEBS Lett 143:101-104, 1982.
14. Shimamura A, Tsumori H, Mukasa H : Three kinds of extracellular glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* 6715 (serotype g). FEBS Lett 157:79-84, 1983.
15. Rolla G, Scheie AA, Ciardi JE : Role of sucrose in plaque formation. Scand. J Dent Res 93:105-111, 1985.
16. Fitzgerald RJ, Jordan HV : Polysaccharide-producing bacteria and caries. In H.R. Harris (ed.), Art and science of dental caries research. Academic Press Inc, New York pp 79-86, 1968.
17. Guggenheim B : Extracellular polysaccharides and microbial plaque. Int Dent J 20: 657-678, 1970.
18. Hamad S, Slade HD : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44:331-384, 1980.
19. Tsumor H, Mukasa H, Zinnak Y : Synthesis of glucan on the cell surface of *Streptococcus mutans* : Chemical and scanning electron microscopic studies. Microbiol Immunol 26:677-688, 1982.
20. Honda O, Kato C, Kuramitsu HK : Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans gtfD* gene encoding the glucosyltransferase S-enzyme. J Gen Microbiol 136:2099-2105, 1990.
21. Shiroza T, Ueda S, Kuramitsu HK : Sequence analysis of the gtfB gene from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 169:4263-4270, 1987.
22. Ueda S, Shiroza T, Kuramitsu HK : Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. Gene 69:101-109, 1988.
23. Hanada N, Kuramitsu HK : Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. Infect Immun 57:2079-2085, 1989.
24. Aoki H. Shiroza T, Hayakawa M et al. : Cloning of a *Streptococcus mutans* Glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. Infect Immun 53: 587-594, 1986.
25. Hanada N, Kuramitsu HK : Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfC* gene coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. Infect Immun 56:1999-2005, 1988.
26. Vacca-smith AM, Bowen WH : Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. Arch Oral Biol 43:103-110, 1998.
27. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK : Role of *Streptococcus mutans gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen free rat model. Infet Immun 61: 3811-3817, 1993
28. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP : Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month old children. J Dent Res 79:1371-

1377, 2000.
29. Barletta RG, Michalek SM, Curtiss R : Analysis of the virulence of *Streptococcus mutans* serotype c *gtf*A mutants in the rat model system. Infect Immun 56:322-330,1988.
30. Munro C, Michalek SM, Macrina FL : Cariogenicity of Streptococcus mutans V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange, Infect Immun 59:2316-2323, 1991.
31. Namba T, Tsunezuka M, Hattori H: Dental caries prevention by traditional Chinese medicines. Planta Med 44:100-106,1982.
32. Rosen S, Elvin-Lewis M, Beck FM, Beck EX : Anticariogenic effects of tea in rats. J Dent Res 63:658-660, 1984.
33. Wolinsky LE, Sote OE : Isolation of natural plaque-inhibiting substances from 'Nigerian Chewing Sticks'. Cares Res 18:216-225, 1984.
34. Kohda H, Kozai K, Nagasaka NY et al. : Prevention of dental caries by oriental folk medicines: Active principles of *Zizyphi fructus* for inhibition of insoluble glucan formation by cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. Planta Med 2:119-120, 1986.
35. Lobene RR, Soparkar PM, Newman MB : The effects of a sanguinaria dentifrice on plaque and gingivitis. Compend Cont Educ Dent 7(suppl):185-189, 1986.
36. Slots J, Taubman MA : Characteristics of oral gram-positive species. : In contemporary oral microbiology and immunology. Mosby Year Book pp 366-369, 1992.
37. Coykendall AL, Bratthall D, O'Connor-K, Dvarskas RA : Serological and genetic examination of some nontypical *Streptococcus mutans* strains. Infect Immun 14:667-670, 1976.
38. Coykendall AL : Proposal to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status, based of their molecular composition. Int J Syst Bacteriol 27:26-30, 1977.
39. Kohler B, Bratthall D, Krasse B : Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. Archs Oral Biol 28:225-231, 1983.
40. Willett NP, White RR, Rosen S : Dental caries : In essential dental microbiology. Appleton and Lange pp 341-356, 1991.
41. Slots J, Taubman MA : Microbiology of dental caries. : In contemporary oral microbiology and immunology. Mosby Year Book pp 377-423, 1992.
42. Birkhed D, Heintze U : Salivary secretion rate, buffer capacity, and pH. In: Tenovuo J, editor. Human saliva: clinical chemistry and microbiology. Vol I Boca Raton (FL) : CRC Press, 25-73, 1989.
43. Toda Y, Moro I, Koga T et al. : Ultrastruture of extracellular polysaccharides produced by serotype c *Streptococcus mutans*. J Dent Res 66: 1364-1369, 1987.
44. Wenham DG, Davies RM, Cole JA : Insoluble glucan synthesis by mutansucrase as a determinant of the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 127(Pt 2): 407-415, 1981.
45. Inoue M, Koga T, Sato S, Hamada S : Synthesis of adherent insoluble glucan by the concerted action of the two glucosyltransferase components of *Streptococcus mutans*. FEBS Lett. 143:101-104, 1982.
46. Shimamura A, Tsumori H, Mukasa H : Three kinds of extracellular glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* 6715 (serotype g). FEBS Lett 157:79-84, 1983.
47. Theilade E, Theilade J : Role of plaque in the etiology of periodontal disease and caries. Oral Sci Rev 9:23-63, 1976.
48. Ratka-Kruger P, Schcher B, Raetzke P : Relation among oral hygiene, caries and gingivitis in 4- and 5-year old children in frankfurt/Main area. Oralprophylax 11:58-64, 1989.

Abstract

THE COMPARISON OF STREPTOCOCCUS MUTANS ISOLATED FROM OCCLUSAL SURFACES OF CARIES AND NON-CARIES TEETH

Ho-Won Park, Tae-Sung Jung, Jin Jung*, Shin Kim

Department of Pediatric Dentistry, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Pusan National University*

When oral microorganisms were sampled from occlusal surfaces of caries and non-caries teeth, 3.43×10^5 CFU and 3.47×10^3 CFU of bacteria were counted on MSB agar plates, respectively. All the 20 colonies isolated from a caries surface were *Streptococcus mutans* but, only two of 20 colonies were identified as *Streptococcus mutans* by API test. *S. mutans* SM1 from caries tooth and *S. mutans* SM2 from non-caries tooth showed the same results except for α-galactosidase activity on sugar fermentation tests and biochemical tests. For the bacterial replication, both SM1 and SM2 were actively multiplicated at pH 5.5. And the viability of SM1 was high at 20% of sucrose, while that of SM2 was high at 5% of sucrose in the media. SM1 actively replicated at 16mM of $CaCl_2$, 160mM of KCl, and 6.4mM of $MgCl_2$, and the replication of SM2 was increased at 16mM of $CaCl_2$, 40mM of KCl, 6.4mM of $MgCl_2$, At 1mM of sodium bicarbonate and sodium phosphate, both bacteria were actively multiplicated. SM1 and SM2 were actively replicated at 1mM and 10mM of Tris, respectively. For potassium phosphate buffer, SM1 grew well proportionally to the concentration up to 100mM, while the growth of SM2 were inhibited by the increase of concentration. The 4.6 kb of *gtf* gene was amplified with a pair of primer, *gtf*B-F961 and *gtf*C-R5574 by polymerase chain reaction from the chromosomal DNA of SM1 and SM2. When 4.6kb bands were eluted from gel and were treated with restriction enzyme, *EcoR* I produced the same RFLP like 0.8kb and 3.8kb of DNA fragments for *S. mutans* GS-5, SM1 and SM2. By *Hind* III, the PCR products weren't digested for *S. mutans* GS-5 and SM1, but 3 fragments such as 2.4kb, 1.8kb and 400bp were examined for SM2. These results indicated the difference between gtf genes of SM1 and SM2. *BamH* I treatment showed 4 fragments for SM1 and SM2, while the 3 fragments for *S. mutans* GS-5. The PCR products were not digested by *Kpn* I, *Sma* I, *Xho* I and *Pst* I.

Key words : *Streptococcus mutans*, Glucosyltransferase, *gtf* genes, Dental caries