

Streptococcus의 유당분해에 대한 자일리톨의 효과

신강호 · 양규호 · 최남기 · 김선미* · 오종석**

전남대학교 치과대학 소아치과학교실 및 치의학 연구소, 광주보건대학 치위생과*,
전남대학교 의과대학 미생물학교실**

국문초록

자일리톨은 탄소 5개가 있는 탄수화물로 치아우식증을 억제할 목적으로 사용되는 자당 대체물이다. 본 논문은 구강 중요 세균인 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*에서 유당분해에 대한 자일리톨의 작용을 관찰하고자 하였다. 세균에 대한 유당과 자일리톨의 병합효과를 보기 위하여 분광광도계를 이용한 흡광도를 측정하였고 생균 수 검사를 실시하였다. *Streptococcus mutans* 또는 β -galactosidase에 의한 유당분해에 대한 자일리톨 효과를 보기 위하여 thin layer chromatography와 lactose-PTS activity test를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에 *Streptococcus mutans*를 배양하면 배양액 흡광도가 배양 8시간에 증가하지 않다가 배양 24시간에 증가하였다. 배양 8시간에서의 생균수도 유당 단독보다 유당과 자일리톨 병합 첨가 시 적게 나타났다.
2. 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에 *Streptococcus oralis*와 *Streptococcus salivarius*를 배양하면 배양액 흡광도가 배양 8시간에 증가하지 않다가 배양 24시간에 증가하였다.
3. 배지에 유당 단독으로 첨가할 때보다도 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에 *Streptococcus mutans*를 8시간 배양하면 thin-layer chromatography상 남아있는 유당이 많았으나, 배양 24시간에는 모든 유당이 분해되었다.
4. 배지에 유당 단독으로 첨가할 때보다도 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에서 *Streptococcus mutans*의 lactose-PTS 활성도가 낮았다.
5. 배지에 유당 단독으로 첨가할 때보다도 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에 β -galactosidase 작용시 thin-layer chromatography상 유당이 많았다.

이상의 결과는 자일리톨이 *Streptococcus*의 유당 이용을 억제함을 시사하였다.

주요어 : *Streptococcus*, 자일리톨, 유당분해

1. 서 론

치아우식증의 발생에 있어서 *Streptococcus mutans*는 가장 중요한 원인균이다¹⁻³⁾. *Streptococcus mutans*는 세균 외부로 glucosyltransferase를 분비하여 자당으로부터 점착성의 비수

용성 글루칸(glucan)을 합성한다. 비수용성 글루칸은 치태의 기본물질로 *Streptococcus mutans*가 글루칸 수용체와 결합하여 치아 표면에 부착할 수 있도록 도와 준다. 치태의 *Streptococcus mutans*로 탄수화물이 대사되어 유산이 만들어 지고 이 유산으로 치아 표면이 탈회되어 치아우식증이 유발된다⁴⁾.

자일리톨은 5탄당 알코올로 치아우식증을 억제하기 위하여 사용되는 자당 대체물이다. 음식에 자당을 사용한 경우와 비교하여 자일리톨을 사용한 경우 85% 이상에서 치아우식증 감소를 보였다⁵⁾. 이와 같은 효과는 쥐를 대상으로 한 실험에서도 볼 수 있었다⁶⁾. 자일리톨에 의한 치아우식증의 감소는 자일리톨이

교신저자 : 양 규 호

광주광역시 동구 학동 8번지
전남대학교 치과대학 소아치과학교실
Tel : 062-220-5476
E-mail : hellopedo@hanmail.net

*Streptococcus mutans*의 증식을 억제하여 일어나며, 이러한 증식 억제작용은 다른 연쇄상구균에 대해서도 일어난다⁷⁾. *Streptococcus mutans*에 자일리톨을 가하면 *Streptococcus mutans*의 phosphoenolpyruvate : fructose phosphotransferase system에 의하여 자일리톨이 세균내로 운반되고 인산화되어 xylitol phosphate가 된다. 이 xylitol phosphate는 세균내에서 대사되지 않고 축적되어 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제한다⁸⁾. 자일리톨의 인산화는 탄수화물의 종류에 따라 차이가 있는데 과당이 있을 때는 억제되고 포도당, 만노스, 갈락토오스가 있을 때는 억제되지 않는다⁸⁾.

*Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sanguis* 배양시 배지에 유당을 첨가하면 lactose-phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system(lactose PTS)과 β -galactosidase의 생산이 유발된다⁹⁾. *Streptococcus mutans*에서 유당은 주로 lactose PTS에 의해 세포내로 운반되고 유당의 갈락토오스의 6 위치에 인산화가 일어난다. 인산화가 된 유당은 phospho- β -galactosidase에 의해 포도당과 galactose 6-phosphate로 분해되어 이용된다⁹⁾.

자일리톨은 소량을 섭취할 때는 장관에서 서서히 흡수되어 간에서 포도당으로 대사가 되나, 다량 섭취시는 위장관 장애가 발생한다¹⁰⁾. 이 때 발생하는 위장관 장애는 유당을 분해하지 못해 일어나는 삼투성(osmotic) 설사 형태다¹⁰⁾. 소아가 섭취하는 음식물중 우유 등에 함유되어 있는 유당은 중요한 탄수화물이다. 치아우식증 발생을 억제하려는 목적으로 자일리톨을 다량 섭취시 장관내 유당의 대사과정에 영향을 미칠 것이다. 동시에 구강세균으로 중요한 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*의 유당 대사에도 자일리톨이 영향을 미칠 것으로 사료된다.

본 연구는 구강세균으로 중요한 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*의 유당 대사에 대한 자일리톨의 영향을 보고자 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시세균 및 배양

Streptococcus mutans Ingbritt strain, *Streptococcus oralis*(ATCC 35037, Rockville, MA, USA), *Streptococcus salivarius*는 보관중인 것을 공시하였으며, 공시세균은 M17 액체배지(Difco, Detroit, MI, USA)에서 37°C, 18시간 배양하였다.

2. *Streptococcus mutans*의 증식에 미치는 유당과 자일리톨의 영향

Tryptone yeast extract 액체배지(1.7% tryptone, 0.3% yeast extract, 0.5% sodium chloride, 0.25% potassium

phosphate)에 1%, 2%, 4%, 8% 유당을 단독 또는 4% 자일리톨과 병합하여 첨가하였고, 0.2% 포도당을 첨가한 tryptone yeast extract 액체배지에 1%, 2%, 4%, 8% 자일리톨을 단독으로 첨가하였다. 배지 10ml에 2×10^7 *Streptococcus mutans*를 접종하여 37°C 배양기에서 2, 4, 6, 8시간의 단기간과 24시간의 장기간 배양하였다. 배양액의 흡광도(optical density)를 분광광도계(spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan) 660nm에서 측정하였으며 3번 실험을 반복하여 평균을 구하였다. 8시간과 24시간 배양한 세균배양액을 희석하여 M17 고체배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하고 37°C 배양기에서 18시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

3. *Streptococcus oralis*의 증식에 미치는 유당과 자일리톨의 영향

전술한 tryptone yeast extract 액체배지에 1%, 2%, 4%, 8% 유당을 단독 또는 4% 자일리톨과 병합하여 첨가하였다. 배지 10ml에 2×10^7 *Streptococcus oralis*를 접종하여 37°C 배양기에서 2, 4, 6, 8시간의 단기간과 24시간의 장기간 배양하였다. 배양액의 흡광도를 분광광도계 660nm에서 측정하였으며 3번 실험을 반복하여 평균을 구하였다. 8시간과 24시간 배양한 세균배양액을 희석하여 M17 고체배지에 접종하고 37°C 배양기에서 18시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

4. *Streptococcus salivarius*의 증식에 미치는 유당과 자일리톨의 영향

Tryptone yeast extract 액체배지에 1%, 2%, 4%, 8% 유당을 단독 또는 4% 자일리톨과 병합하여 첨가하였다. 배지 10 ml에 2×10^7 *Streptococcus salivarius*를 접종하여 37°C 배양기에서 2, 4, 6, 8시간의 단기간과 24시간의 장기간 배양하여 위의 방법대로 배양액의 흡광도와 생균수를 산정하였다.

5. 유당과 자일리톨 함유 배지에서 배양한 *Streptococcus mutans* 배양액의 thin layer chromatography

*Streptococcus mutans*의 유당 분해시 자일리톨 첨가 시의 영향을 보기 위하여 배양액에 남아있는 유당의 양을 thin layer chromatography로 비교하였다. Tryptone yeast extract 액체배지에 4% 유당 단독 또는 4% 자일리톨과 병합하여 첨가하였다. 배지 10 ml에 2×10^7 *Streptococcus mutans*를 접종하여 37°C 배양기에서 8시간과 24시간 배양한 후, 3,000rpm으로 20분간 원심하여 상청액을 얻었다. 이를 0.4% 포도당, 0.4% 갈락토오스, 0.4% 유당과 함께 실리카겔에서 1.5 μ 씩 loading하였다. 실리카겔을 85% acetonitrile 용액에서 전개하고 0.03% α -naphthol과 5% H₂SO₄가 든 메탄올을 발색제로 사용하여 121°C 오븐에서 15분간 발색시켰다.

6. *Streptococcus mutans*의 lactose-PTS 활성도에 미치는 xylicol의 영향

*Streptococcus mutans*의 lactose-PTS 활성도에 미치는 자일리톨의 영향을 보기 위하여 tryptone yeast extract 액체배지에 0.2% 포도당을 첨가하고 0.2% 유당을 단독 또는 0.2% 자일리톨과 병합으로 첨가하였다. 배지 4ml에 2×10^7 *Streptococcus mutans*를 접종하여 37°C 배양기에서 8시간 혐기 배양한 후, 배양액의 흡광도를 분광광도계 600 nm에서 측정하였다. 배양액 1ml에 100mM cold phosphate buffer(pH 7.0), 50mM mercaptoethanol 0.5ml, toluene 10 μ /ml를 첨가하여 실온에서 5분간 강하게 흔들여 주었다. 5mM o-nitrophenyl- β -D-galactoside(ONPG)와 10mM P-enolpyruvate(PEP)가 함유된 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 1ml를 기질로 준비하였는데, 대조군은 PEP를 가지지 않았다. 준비된 기질 400 μ 에 toluene으로 처리한 세포 100 μ 를 섞어 37°C에서 15분간 방치한 다음, 1M Na₂CO₃ 250 μ 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 10분간 방치한 후, 3,000 \times rpm로 10분간 원심하여 얻은 상청액을 분광광도계 420nm에서 흡광도를 측정하였다. ONPG와 PEP를 함유된 기질을 가한 세포 상청액으로 부터의 흡광도로부터 ONPG만 함유된 기질을 가한 세포 상청액으로 부터의 흡광도를 뺀 수치를 lactose-PTS 활성도로 삼았다. Lactose-PTS 활성도는 Miller units로 표시하였는데 $A_{420} = \Delta T(\text{min}) \times \text{amount of sample} \times A_{600}$ 으로 나누어 1000을 곱한 값으로 하였다.

7. β -galactosidase를 첨가한 유당과 자일리톨 함유 배지의 thin layer chromatography

β -galactosidase에 의한 유당 분해시 자일리톨의 영향을 보기 위하여 tryptone yeast extract 액체배지에 4% 유당 단독

또는 4% 자일리톨과 병합으로 첨가하였다. 배지 5ml에 60 units/ml β -galactosidase(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA)를 가하여 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심하여 상청액을 얻었다. 10배로 희석한 상청액을 0.4% 포도당, 0.4% 갈락토오스, 0.4% 유당과 함께 실리카젤에서 1.5 μ 씩 loading하였다. 실리카젤을 85% acetonitrile 용액에서 전개하고 0.03% α -naphthol과 5% H₂SO₄가 든 메탄올을 발색제로 사용하여 121°C 오븐에서 15분간 발색시켰다.

III. 연구 성적

1. *Streptococcus mutans* 배양액의 흡광도에 미치는 유당과 자일리톨의 영향

Tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus mutans*를 접종한 대조군에서 배양액의 흡광도는 배양 시간이 경과하여도 증가하지 않았으나, 배지에 유당을 첨가하면 배양 시간이 경과함에 따라 배양액의 흡광도가 증가하여 배양 24시간에 유당 1% 첨가한 배양액의 흡광도는 1.388, 2% 첨가 시 1.375, 4% 첨가 시 1.322, 8% 첨가 시 1.358이었다(Fig. 1). 포도당(0.2%)을 첨가한 tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus mutans*를 접종한 대조군에서 배양 시간에 따라 배양액의 흡광도가 증가하여 배양 6시간에 0.920으로 증가하였다가 배양 24시간에 0.852가 되었다. 여기에 1% 자일리톨 첨가 시 배양 24시간에 배양액의 흡광도는 0.642로 감소되었고 자일리톨의 농도가 높아짐에 따라 배양액의 흡광도는 더욱 감소되어 2% 자일리톨 첨가 시 0.604, 4% 자일리톨 첨가 시 0.536, 8% 자일리톨 첨가 시 0.435로 각각 나타났다(Fig. 2). 유당과 4% 자일리톨을 병합 첨가한 tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus mutans*를 배양하면 배양 8시간의 배양액 흡광도는 유당 1% 첨가 시 0.275, 2% 첨가 시

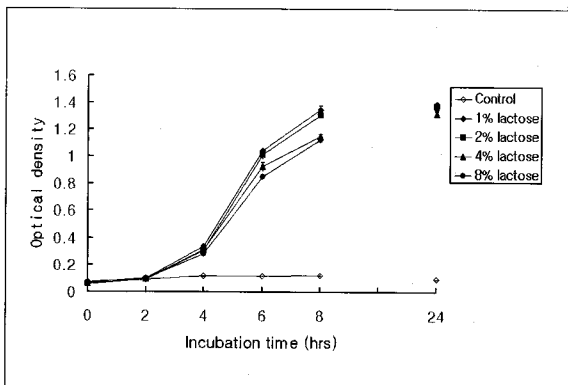


Fig. 1. Effect of lactose on the replication of *Streptococcus mutans*. The optical density was measured at 660nm in the spectrophotometer.

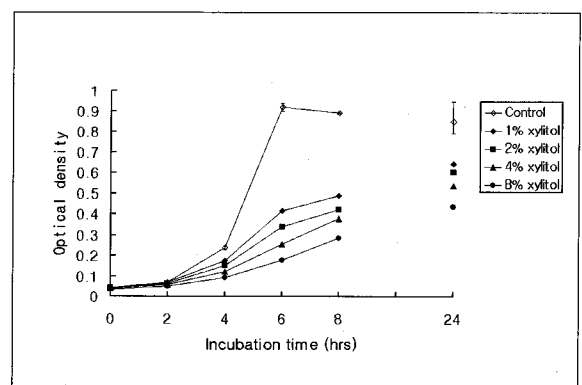


Fig. 2. Effect of xylitol on the replication of *Streptococcus mutans* in the media containing 0.2% glucose. The optical density was measured at 660nm in the spectrophotometer.

0.269, 4% 첨가 시 0.261, 8% 첨가 시 0.193이었다. 배양 24시간에는 유당 1% 첨가 시 1.162, 2% 첨가 시 1.124, 4% 첨가 시 1.006, 8% 첨가 시 0.874이었다(Fig. 3).

2. *Streptococcus mutans*의 생균수에 미치는 유당과 자일리톨의 영향

Tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus mutans*를 8시간 배양한후 배양액의 생균수는 유당을 첨가하지 않은 대조군에서 ml당 $2.3 \pm 1.4 \times 10^8$, 유당 1% 첨가 시 ml당 $30.4 \pm 3.1 \times 10^8$, 2% 첨가 시 $29.4 \pm 2.3 \times 10^8$, 4% 첨가 시 $31.2 \pm 3.9 \times 10^8$, 8% 첨가 시 $39.8 \pm 1.3 \times 10^8$ 이었다. 배지에 자일리톨을 병합 첨가하면 배양액의 생균수는 대조군에서 ml당 $0.5 \pm 0.5 \times 10^8$, 유당 1% 첨가 시 ml당 $2.2 \pm 0.4 \times 10^8$, 2% 첨가 시 $2.4 \pm 0.3 \times 10^8$, 4% 첨가 시 $2.9 \pm 0.3 \times 10^8$, 8% 첨가 시 $3.5 \pm 1.9 \times 10^8$ 으로 적었다(Fig. 4). *Streptococcus mutans*를 24시간 배양한 후 배양액의 생균수는 대조군에서 ml당 $1.4 \pm 0.3 \times 10^8$, 유당 1% 첨가 시 ml당 $6.0 \pm 0.6 \times 10^8$, 2%

첨가 시 $5.8 \pm 0.5 \times 10^8$, 4% 첨가 시 $2.8 \pm 0.4 \times 10^8$, 8% 첨가 시 $8.2 \pm 1.3 \times 10^8$ 이었다. 배지에 자일리톨을 병합 첨가하면 배양액의 생균수는 대조군에서 ml당 $1.5 \pm 0.4 \times 10^8$, 유당 1% 첨가 시 ml당 $3.8 \pm 0.2 \times 10^8$, 2% 첨가 시 $3.1 \pm 0.5 \times 10^8$, 4% 첨가 시 $4.3 \pm 0.3 \times 10^8$, 8% 첨가 시 $4.8 \pm 0.7 \times 10^8$ 이었다(Fig. 5).

3. *Streptococcus oralis* 배양액의 흡광도에 미치는 유당과 자일리톨의 영향

Tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus oralis*를 접종한 대조군에서 배양액의 흡광도는 배양 시간이 경과하여도 증가하지 않았으나, 배지에 유당을 첨가하면 배양 시간이 경과함에 따라 배양액의 흡광도가 증가하여 배양 8시간에 유당 1% 첨가한 배양액의 흡광도는 1.088, 2% 첨가 시 1.026, 4% 첨가 시 0.903, 8% 첨가 시 0.944이었다. 배양 24시간에는 유당 1% 첨가한 배양액의 흡광도는 1.100, 2% 첨가 시 1.027, 4% 첨가 시 0.865, 8% 첨가 시 1.063이었다(Fig. 6). 유당과

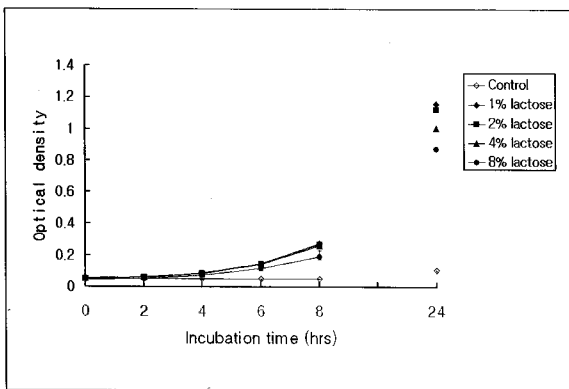


Fig. 3. Combined effect of lactose and 4% xylitol on the replication of *Streptococcus mutans*. The optical density was measured at 660 nm in the spectrophotometer.

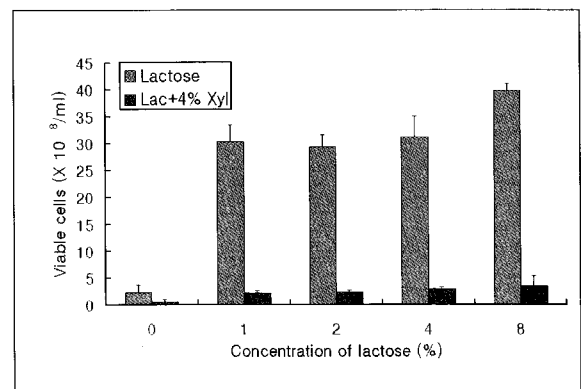


Fig. 4. Effect of lactose and xylitol on the viable cell numbers of *Streptococcus mutans* after incubating the media for 8 hours.

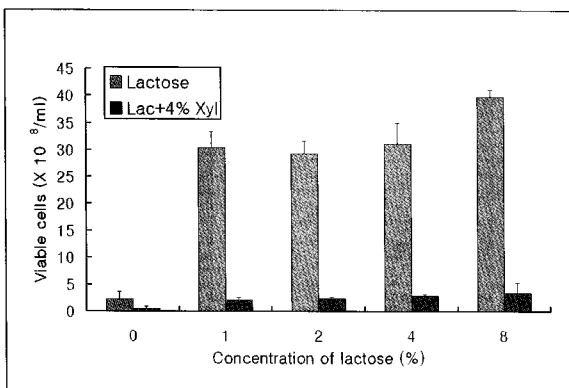


Fig. 5. Effect of lactose and xylitol on the viable cell numbers of *Streptococcus mutans* after incubating the media for 24 hours.

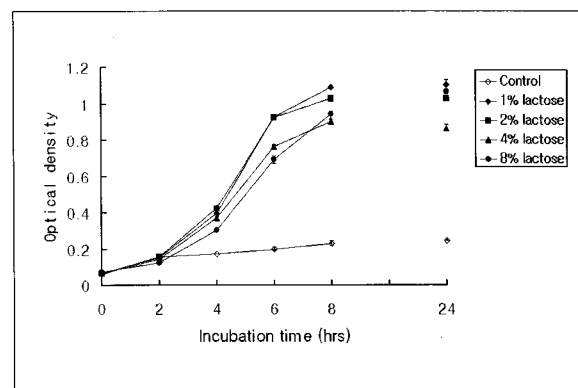


Fig. 6. Effect of lactose on the replication of *Streptococcus oralis*. The optical density was measured at 660nm in the spectrophotometer.

4% 자일리톨을 병합 첨가한 tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus oralis*를 배양하면 배양 8시간의 배양액 흡광도는 유당 1% 첨가 시 0.249, 2% 첨가 시 0.252, 4% 첨가 시 0.227, 8% 첨가 시 0.285이었다. 배양 24시간에는 유당 1% 첨가 시 0.715, 2% 첨가 시 0.626, 4% 첨가 시 0.499, 8% 첨가 시 1.198이었다(Fig. 7).

4. *Streptococcus oralis*의 생균수에 미치는 유당과 자일리톨의 영향

Tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus oralis*를 8시간 배양한 후 배양액의 생균수는 유당을 첨가하지 않은 대조군에서 ml당 $0.6 \pm 0.3 \times 10^8$, 유당 1% 첨가 시 ml당 $9.4 \pm 0.8 \times 10^8$, 2% 첨가 시 $7.2 \pm 1.2 \times 10^8$, 4% 첨가 시 $7.6 \pm 0.9 \times 10^8$, 8% 첨가 시 $13.0 \pm 1.5 \times 10^8$ 이었다. 배지에 자일리톨을 병합 첨가하면 배양액의 생균수는 대조군에서 ml당 $0.4 \pm 0.5 \times 10^8$, 유당 1% 첨가 시 ml당 $4.4 \pm 1.2 \times 10^8$, 2% 첨가 시 $7.0 \pm 2.1 \times 10^8$, 4% 첨가 시 $3.0 \pm 1.2 \times 10^8$, 8% 첨가 시 $1.5 \pm 0.6 \times 10^8$ 이었다(Fig. 8). *Streptococcus oralis*를 24시간 배양한 후 배양액의 생균수는 대조군에서 ml당 $39.4 \pm 3.1 \times 10^6$, 유당 1% 첨가 시 ml당 $1.9 \pm 0.8 \times 10^6$, 2% 첨가 시 $2.2 \pm 0.4 \times 10^6$, 4% 첨가 시 $2.1 \pm 0.6 \times 10^6$, 8% 첨가 시 $2.5 \pm 1.5 \times 10^6$ 이었다. 배지에 자일리톨을 병합 첨가하면 배양액의 생균수는 대조군에서 ml당 $7.4 \pm 1.2 \times 10^6$, 유당 1% 첨가 시 ml당 $45.0 \pm 2.2 \times 10^6$, 2% 첨가 시 $7.4 \pm 4.2 \times 10^6$, 4% 첨가 시 $6.2 \pm 1.2 \times 10^6$, 8% 첨가 시 $86.0 \pm 12.5 \times 10^6$ 이었다(Fig. 9).

5. *Streptococcus salivarius* 배양액의 흡광도에 미치는 유당과 자일리톨의 영향

Tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus salivarius*를 접종한 대조군에서 배양액의 흡광도는 배양 시간이 경과하여도 증가하지 않았으나, 배지에 유당을 첨가하면 배양

시간이 경과함에 따라 배양액의 흡광도가 증가하여 배양 8시간에 유당 1% 첨가한 배양액의 흡광도는 1.852, 2% 첨가 시 1.801, 4% 첨가 시 1.745, 8% 첨가 시 1.771이었다. 배양 24시간에는 유당 1% 첨가한 배양액의 흡광도는 1.634, 2% 첨가 시 1.669, 4% 첨가 시 1.552, 8% 첨가 시 1.666이었다(Fig. 10). 유당과 4% 자일리톨을 병합 첨가한 tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus salivarius*를 배양하면 배양 8시간의 배양액 흡광도는 유당 1% 첨가 시 0.164, 2% 첨가 시 0.189, 4% 첨가 시 0.191, 8% 첨가 시 0.139이었다. 배양 24시간에는 유당 1% 첨가 시 0.847, 2% 첨가 시 0.926, 4% 첨가 시 1.066, 8% 첨가 시 0.760이었다(Fig. 11).

6. *Streptococcus salivarius*의 생균수에 미치는 유당과 자일리톨의 영향

Tryptone yeast extract 액체배지에 *Streptococcus salivarius*를 8시간 배양한 후 배양액의 생균수는 유당을 첨가하지 않은 대조군에서 ml당 $0.9 \pm 0.2 \times 10^8$, 유당 1% 첨가 시 ml당

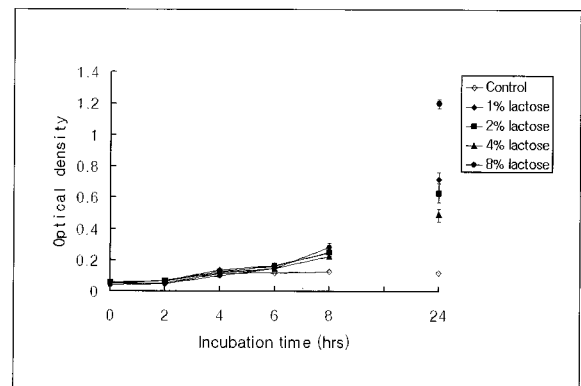


Fig. 7. Combined effect of lactose and 4% xylitol on the replication of *Streptococcus oralis*. The optical density was measured at 660 nm in the spectrophotometer.

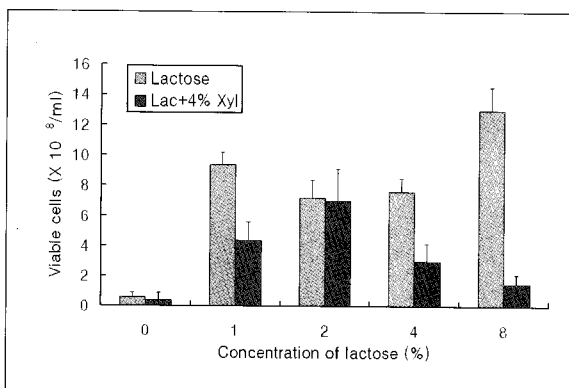


Fig. 8. Effect of lactose and xylitol on the viable cell numbers of *Streptococcus oralis* after incubating the media for 8 hours.

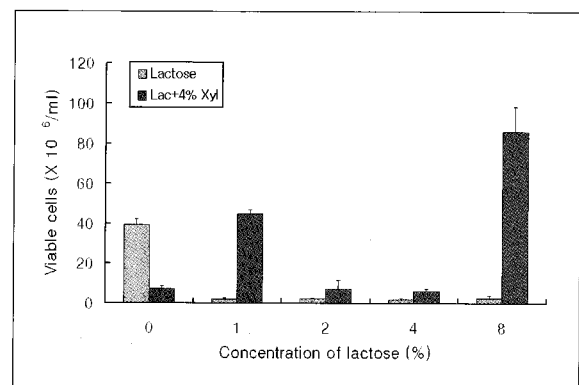


Fig. 9. Effect of lactose and xylitol on the viable cell numbers of *Streptococcus oralis* after incubating the media for 24 hours.

8.4±0.7×10⁸, 2% 첨가 시 7.0±1.2×10⁸, 4% 첨가 시 5.6±1.4×10⁸, 8% 첨가 시 9.0±0.9×10⁸이었다. 배지에 자일리톨을 병합 첨가하면 배양액의 생균수는 대조군에서 ml당 0.7±0.3×10⁸, 유당 1% 첨가 시 ml당 1.4±1.5×10⁸, 2% 첨가 시 1.7±1.2×10⁸, 4% 첨가 시 4.2±0.7×10⁸, 8% 첨가 시 2.8±0.4×10⁸이었다(Fig. 12). *Streptococcus salivarius*를 24시간 배양한 후 배양액의 생균수는 대조군에서 ml당 6.3±2.2×10⁷, 유당 1% 첨가 시 ml당 1.8±0.6×10⁷, 2% 첨가 시 2.4±1.2×10⁷, 4% 첨가 시 2.7±0.5×10⁷, 8% 첨가 시 3.5±0.9×10⁷이었다. 배지에 자일리톨을 병합 첨가하면 배양액의 생균수는 대조군에서 ml당 2.7±2.3×10⁷, 유당 1% 첨가 시 ml당 17.4±3.1×10⁷, 2% 첨가 시 24.8±2.5×10⁷, 4% 첨가 시 29.0±1.6×10⁷, 8% 첨가 시 27.0±5.4×10⁷이었다(Fig. 13).

7. 유당과 자일리톨 함유 배지에서 배양한 *Streptococcus mutans* 배양액의 thin layer chromatography

Tryptone yeast extract 액체배지에서 *Streptococcus mutans*를 8시간 배양할 때, 4% 유당을 첨가한 경우(StL)에 비교하여 4% 유당과 4% 자일리톨을 병합 첨가한 경우(StLX) 유당 이용이 억제되어 배지에 남아있는 유당이 많았다(Fig. 14). 배지에서 *Streptococcus mutans*를 24시간 배양할 때 4% 유당을 첨가한 경우(StL)나 4% 유당과 4% 자일리톨을 병합 첨가한 경우(StLX) 8시간 배양할 때와는 달리 thin layer chromatography상 남아있는 유당이 없어 유당이 모두 분해되었음을 나타내었다(Fig. 15).

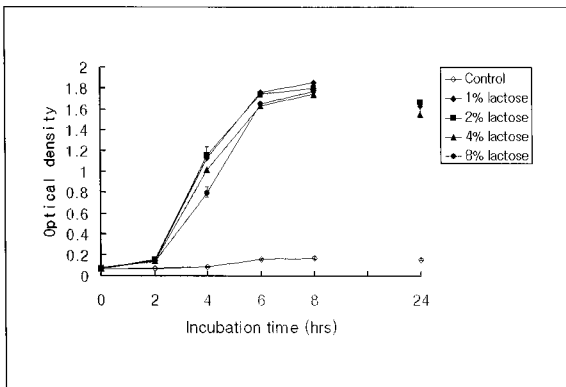


Fig. 10. Effect of lactose on the replication of *Streptococcus salivarius*. The optical density was measured at 660 nm in the spectrophotometer.

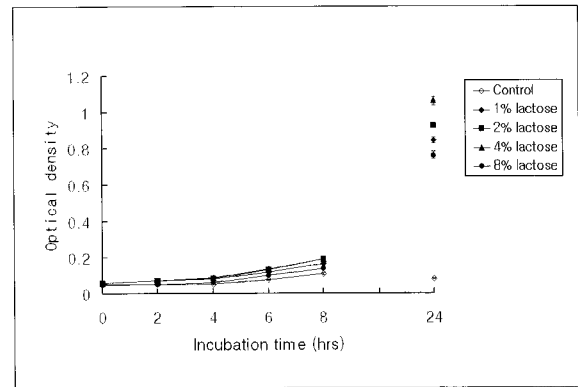


Fig. 11. Combined effect of lactose and 4% xylitol on the replication of *Streptococcus salivarius*. The optical density was measured at 660 nm in the spectrophotometer.

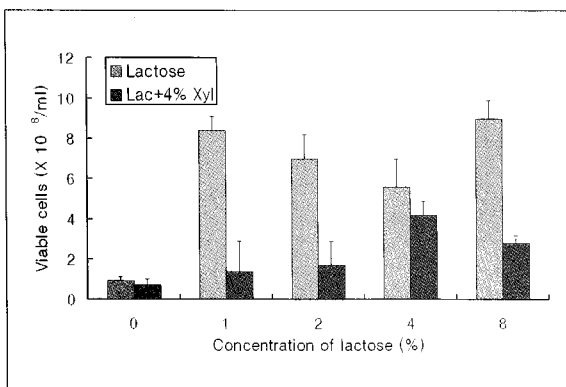


Fig. 12. Effect of lactose and xylitol on the viable cell numbers of *Streptococcus salivarius* after incubating the media for 8 hours.

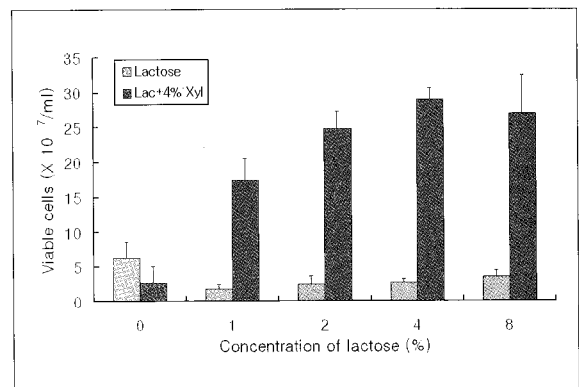


Fig. 13. Effect of lactose and xylitol on the viable cell numbers of *Streptococcus salivarius* after incubating the media for 24 hours.

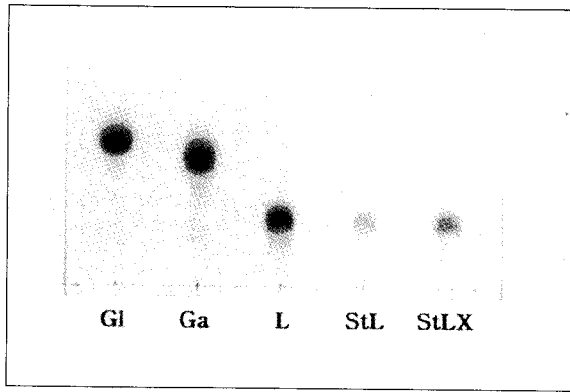


Fig. 14. Thin layer chromatography of culture supernatants formed by *Streptococcus mutans* for 8 hours. *Streptococcus mutans* was cultured in tryptone yeast extract broth with lactose only (StL) or with lactose and xylitol (StLX) for 8 hours. Thin layer chromatography was conducted on silica gel plate using acetonitrile. Gl, Ga and L stand for glucose, galactose and lactose, respectively.

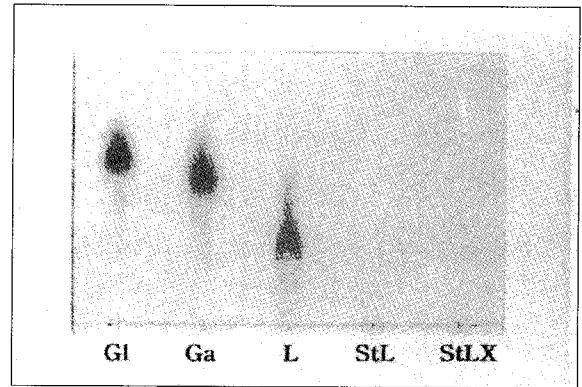


Fig. 15. Thin layer chromatography of culture supernatants formed by *Streptococcus mutans* for 24 hours. *Streptococcus mutans* was cultured in tryptone yeast extract broth with lactose only (StL) or with lactose and xylitol (StLX) for 24 hours. Thin layer chromatography was conducted on silica gel plate using acetonitrile. Gl, Ga and L stand for glucose, galactose and lactose, respectively.

Table 1. The effect of xylitol on the lactose-PTS activity of *Streptococcus mutans* after 8 hours growth

Media	Substrates	A ₄₂₀	A ₆₀₀	Specific activity*	Lactose-PTS activity*
TYE broth	ONPG + PEP	0.030	1.002	19.96	5.99
+ lactose	ONPG	0.021	1.002	13.97	
TYE broth	ONPG + PEP	0.023	0.953	16.09	3.50
+ lactose + xylitol	ONPG	0.018	0.953	12.59	

*Units of activity are Miller units.

$$\text{Miller units} = \frac{A_{420}}{\Delta T(\text{min}) \times \text{amount of sample} \times A_{600}} \times 1000$$

ONPG ; o-nitrophenyl-β-D-galactoside, PEP ; P-enolpyruvate

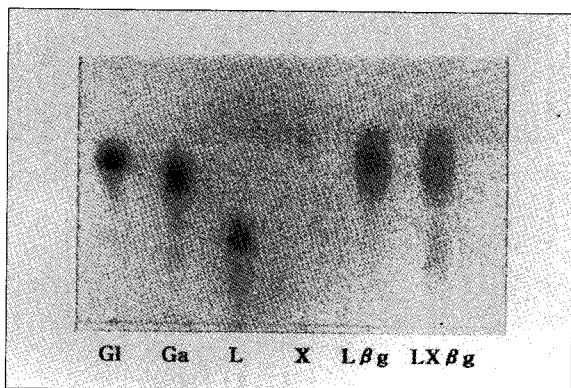


Fig. 16. Effect of xylitol on the lysis of lactose by β-galactosidase. Lactose was incubated with β-galactosidase for 24 hours. Xylitol was added (LXβg) or was not added (Lβg). Thin layer chromatography was conducted on silica gel plate using acetonitrile. Gl, Ga and L stand for glucose, galactose and lactose, respectively.

8. *Streptococcus mutans*의 lactose-PTS 활성도에 미치는 xylitol의 영향

Tryptone yeast extract 액체배지에 유당만 첨가하였을 때 lactose-PTS 활성도는 5.99이였으나, 유당과 자일리톨을 병합 첨가하였을 때는 3.50으로 낮았다(Table 1).

9. β-galactosidase를 첨가한 유당과 자일리톨 함유 배지의 thin layer chromatography

Tryptone yeast extract 액체배지에 4% 유당을 첨가하여 β-galactosidase를 작용한 경우(Lβg)보다 4% 유당과 4% 자일리톨을 병합 첨가하여 β-galactosidase를 작용한 경우(LXβg) thin layer chromatography상 유당이 많았다(Fig. 16).

IV. 고 찰

세균내로 탄수화물을 운반하고 인산화시키는 것은 phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system(PTS)이다. PTS는 수용성 단백질(enzyme I, E I)과 막결합 단백질(enzyme II, E II)로 구분된다. 구강내 연쇄상구균에서 탄수화물의 운반과 인산화는 PTS에 의해 이루어지며, 특히 *Streptococcus mutans*에서 자일리톨의 운반과 인산화는 fructose PTS에 의해 이루어진다¹¹⁾. *Streptococcus mutans*에 대한 자일리톨의 증식 억제작용은 과당이나 자당을 가하면 일어나지 않는데, 그 이유는 fructose PTS에 과당이 자일리톨보다 먼저 결합되어 자일리톨의 운반과 인산화가 억제되기 때문이다. Fructose PTS에 의해 *Streptococcus mutans* 내로 운반되어 생성된 xylitol phosphate는 대사되지 않고 축적되어, 다른 인산화가 된 탄수화물이 세포에 해로운 것처럼 xylitol phosphate도 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제한다⁹⁾. 세균내 xylitol phosphate가 축적되어 세균의 증식이 억제되는 현상은 *Lactobacillus casei*¹²⁾와 *E. coli*¹³⁾에서도 보고되었다. 자일리톨은 xylitol phosphate로 형성될 뿐만 아니라 구강내 세균의 glycosyltransferase, invertase, sugar permease의 활성을 변화시켜¹⁴⁾ 치아우식증의 발생을 감소시킨다.

*Streptococcus oralis*는 주로 치면에 존재하며 영아의 구강내 연쇄상구균을 조사한 결과, 영아의 1/3에서 존재한다¹⁵⁾. *Streptococcus oralis*는 H₂O₂를 분비하여 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제하고 치태 형성을 감소시킨다¹⁶⁾. H₂O₂는 미생물에 매우 독성이 강하고 아울러 구강점막에도 해를 줄 수 있다. 그러나 타액에서 이 H₂O₂는 peroxidase, thiocyanate와 반응하여 hypothiocyanate가 되어 구강점막에 해가 없으면서 정균효과를 가지게 된다¹⁷⁾. 이러한 lactoperoxidase system과의 반응은 구강내 연쇄상구균의 대사 및 성장을 억제하는데 H₂O₂ 단독시보다 더 효과적임이 보고되고 있다¹⁸⁾. *Streptococcus salivarius*는 생후 10~24시간 이내에 검출이 되고 모든 사람의 구강내에 존재하는데, 특히 혀의 윗쪽이나 타액에 가장 많이 존재하는 세균으로 혐기성 상태에서 배양되는 세균중 총세균 숫자에서 20%를 차지하는 정상세균이다.

본 연구에서는 배지에 *Streptococcus mutans*를 배양할 때 유당의 농도에 관계없이 배양시간이 경과함에 따라 배양액의 흡광도가 증가하였으나, 자일리톨을 첨가할 때는 그 농도가 높아짐에 따라 배양액의 흡광도가 감소하였다. 배지에 유당과 자일리톨을 병합 첨가하면 *Streptococcus mutans* 배양액의 흡광도와 생균수가 배양 8시간까지 증가하지 않다가 배양 24시간에 배양액의 흡광도가 증가하였다. 유당과 자일리톨을 병합 첨가 시 배양시간이 경과한 후 *Streptococcus mutans*의 증식이 이루어진 것은 증식에 사용되는 유당의 이용이 저해되었다가 배양시간이 경과함에 따라 *Streptococcus mutans*가 유당을 점차적으로 이용한 것으로 생각된다. *Streptococcus oralis* 경우에도 *Streptococcus mutans*와 같이 유당의 농도에 관계없

이 배양시간이 경과함에 따라 배양액의 흡광도가 증가하였으나, 배지에 유당과 자일리톨을 병합 첨가하면 배양 8시간까지 *Streptococcus oralis* 배양액의 흡광도가 증가하지 않다가 배양 24시간에 배양액의 흡광도가 증가하였다. *Streptococcus oralis*도 유당과 자일리톨을 병합 첨가하면 증식에 사용되는 유당의 이용이 처음 저해되었다가 배양시간이 경과함에 따라 유당을 점차적으로 이용한 것으로 생각된다. *Streptococcus salivarius* 배양시 유당의 농도에 관계없이 배양 8시간에 배양액의 흡광도가 높았다가 배양 24시간이 되면 약간 낮아졌는데 이는 증식이 빠르게 이루어지기 때문이다. 배지에 유당과 자일리톨을 병합 첨가하면 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus oralis*에서와 같이 *Streptococcus salivarius* 배양액의 흡광도도 배양 8시간까지 증가하지 않다가, 배양 24시간에 증가하였다. *Streptococcus salivarius*의 배양액 생균수는 배양 24시간에 유당 단독시와 비교하여 유당과 자일리톨을 병합 첨가 시 유의하게 많았다. 배지에 유당과 자일리톨을 병합 첨가 시 배양시간이 경과한 후 *Streptococcus salivarius*의 증식이 이루어진 것은 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus oralis*에서와 같이 *Streptococcus salivarius*의 증식에 사용되는 유당의 이용이 저해되었다가 배양시간이 경과함에 따라 *Streptococcus salivarius*가 유당을 이용한 것으로 생각된다. *Streptococcus mutans* 배양액을 thin layer chromatography한 결과, 유당 단독보다 유당과 자일리톨을 병합 첨가하여 8시간 배양할 때 유당 이용이 억제되어 배지에 남아있는 유당이 많았으나, 24시간 배양하면 유당을 첨가한 배지에서나 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에서 유당이 모두 분해되어 thin layer chromatography상 유당이 보이지 않았다.

*Streptococcus mutans*의 유당 이용에 관한 자일리톨의 영향을 보기 위하여 유당의 세포내 운반 및 인산화를 담당하는 lactose-PTS 활성도를 본 결과, 유당만 첨가할 때보다도 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에서 lactose-PTS 활성도가 낮았다. 유당을 분해하는 β -galactosidase에 대한 자일리톨의 영향을 보기 위하여 유당 첨가 배지와 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에 β -galactosidase를 각각 작용시 thin layer chromatography상 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에서 분해되지 않고 남아있는 유당이 많았다. 이러한 결과는 이탄당인 유당의 분해에 작용하는 β -galactosidase가 배양 초기 자일리톨에 의해 억제되어 세균의 증식이 억제되었다가, 분해된 유당에 의하여 일부 세균이 증식되어 β -galactosidase를 만들어 배양시간이 경과한 후 세균의 증식이 이루어진 것으로 사료된다. 물론 *Streptococcus mutans*내로 운반되어 인산화가 된 유당의 분해효소인 phospho- β -galactosidase에 대한 영향을 보아야 했지만 획득하기가 어려워 β -galactosidase에 대한 영향을 대신 보았다.

앞으로 *Streptococcus mutans*의 세균의 증식과 대사에 관련된 다른 효소에 대한 자일리톨 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

구강 중요 세균인 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*의 유당분해에 대한 자일리톨의 작용을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에 *Streptococcus mutans*를 배양하면 배양액 흡광도가 배양 8시간에 증가하지 않다가 배양 24시간에 증가하였다. 배양 8시간에서의 생균수도 유당 단독보다 유당과 자일리톨 병합 첨가 시 적게 나타났다.
 2. 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에 *Streptococcus oralis*와 *Streptococcus salivarius*를 배양하면 배양액 흡광도가 배양 8시간에 증가하지 않다가 배양 24시간에 증가하였다.
 3. 배지에 유당 단독으로 첨가할 때보다도 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에 *Streptococcus mutans*를 8시간 배양하면 thin-layer chromatography상 남아있는 유당이 많았으나, 배양 24시간에는 모든 유당이 분해되었다.
 4. 배지에 유당 단독으로 첨가할 때보다도 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에서 *Streptococcus mutans*의 lactose-PTS 활성도가 낮았다.
 5. 배지에 유당 단독으로 첨가할 때보다도 유당과 자일리톨을 병합 첨가한 배지에 β -galactosidase 작용시 thin-layer chromatography상 유당이 많았다.
- 이상의 결과는 자일리톨이 *Streptococcus*의 유당 이용을 억제함을 시사하였다.

참고문헌

1. Gibbons RJ, van Houte J : Dental caries. Ann Rev Med, 26:121-136, 1975.
2. Loesche WJ : Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev, 9:65-107, 1976.
3. Hamada S, Slade HD : Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev, 44:331-384, 1980.
4. Tanzer JM : Contemporary oral microbiology and immunology. Microbiology of dental caries. Mosby St. Louis, pp 377-424, 1992.
5. Scheinin A : Caries control through the use of sugar substitutes. Int Dent, J 26:4-13, 1976.
6. Leach SA, Green RM : Effect of xylitol-supplemented diets on the progression and regression of fissure caries in the albino rat. Caries Res, 14:16-23, 1980.

7. Vadeboncoeur C, Trahan L, Mouton C, et al. : Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. J Dent Res, 62:882-884, 1983.
8. Trahan L, Bareil M, Gauthier L, et al. : Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. Caries Res, 19:53-63, 1985.
9. Hamilton IR, Lo GCY : Co-induction of β -galactosidase and the lactose-P-enolpyruvate phosphotransferase system in *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus mutans*. J Bact, 136:900-908, 1978.
10. Makinen KK : Effect of long-term, peroral administration of sugar alcohols on man. Swedish Dent J, 8:113-124, 1984.
11. Calmes R : Involvement of phosphoenolpyruvate in the catabolism of caries-conductive disaccharides by *Streptococcus mutans*: lactose transport. Infect Immunity, 19:934-942, 1978.
12. London J, Hausman S : Xylitol-mediated transient inhibition of ribitol utilization by *Lactobacillus casei*. J Bact, 150:657-661, 1982.
13. Reiner AM : Xylitol and D-arabitol toxicities due to derepressed fructose, galactitol, and sorbitol phosphotransferases of *Escherichia coli*. J Bact, 132:166-173, 1977.
14. Makinen KK : Biochemical principles of the use of xylitol in medicine and nutrition with special consideration of dental aspects. Experientia, 30:1-160, 1978.
15. Smith DJ, Anderson JM, King WF, et al : Oral streptococcal colonization of infants. Oral Microbiol Immunol, 8:1-4, 1993.
16. 김선미, 양규호, 정성수 등 : *Streptococcus oralis*의 인공 치태 억제효과에 대한 연구. 대한소아치과학회지, 26:77-87, 1999.
17. Carlsson J, Iwamu Y, Yamada T : Hydrogen peroxide excretion by oral Streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. Infect Immun, 40:70-80, 1983.
18. Thomas EL, Milligan TW, Joyner RE, et al : Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral Streptococci. Infect Immun, 62:529-535, 1994.

Abstract

THE EFFECT OF XYLITOL ON THE LACTOSE FERMENTATION OF STREPTOCOCCUS

Kang-Ho Shin, D.D.S., Kyu-Ho Yang, D.D.S., Ph.D., Nam-Ki Choi, D.D.S., Ph.D.,
Seon-Mi Kim, D.D.S., Ph.D.*, Jung-Suk Oh, M.S.D., Ph.D.**

Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Chonnam National University and Dental Research Institute

*Department of Dental Hygiene, Gwang-ju Health College**

*Department of Microbiology, College of Medicine, Chonnam National University***

Xylitol is a 5-carbons carbohydrate, which can be replaced with sucrose for preventing dental caries. To study the effect of xylitol on the fermentation of lactose in bacteria, the important oral bacteria such as *Streptococcus(S.) mutans*, *S. oralis* and *S. salivarius* were studied. The optical density using spectrophotometer and the cell concentration were assessed to evaluate the combined effect of lactose and xylitol against the bacteria. Thin layer chromatography and lactose-PTS activity test were performed to evaluate the effect of xylitol on the fermentation of lactose in *S. mutans* and by β -galactosidase with the following results.

1. The optical density of *Streptococcus mutans* culture was not increased for 8 hours-incubation in the media added with lactose and xylitol, but was increased at 24 hours-incubation. The number of viable cells at 8 hours-incubation was smaller in the media containing lactose and xylitol in comparison with lactose only.
2. The optical densities of *Streptococcus oralis* culture and *Streptococcus salivarius* culture were not increased for 8 hours-incubation in the media added with lactose and xylitol, but were increased at 24 hours-incubation.
3. When *Streptococcus mutans* was incubated for 8 hours in the media added with lactose and xylitol, the amount of remained lactose was larger compared with the media added with lactose only. But all lactose was fermented in both media after 24 hours-incubation.
4. When *Streptococcus mutans* was incubated in the media added with lactose and xylitol, the activity of lactose-PTS was higher compared with the media added with lactose only.
5. When β -galactosidase was incubated in the media added with lactose and xylitol, the amount of remained lactose was larger compared with the media added with lactose only.

These results indicated that xylitol inhibited the fermentation of lactose by *Streptococcus*.

Key words : *Streptococcus*, Xylitol, Lactose fermentation