

치태 형성과 휘발성 유황화합물 생성을 억제하는 *Lactobacillus salivarius*의 분리 및 동정

김미형 · 양규호 · 최남기 · 김선미 · 오종석*

전남대학교 치과대학 소아치과학교실 및 치의학 연구소 · 전남대학교 의과대학 미생물학교실*

국문초록

우리 인체에는 의학적으로 유용한 기능을 가진 세균들이 정상적으로 존재하며 구강내에도 독특한 기능을 나타내는 세균들이 상재한다. 본 연구에서는 치아우식증이 없는 소아의 타액에서 분리한 유산균 2주가 *Streptococcus mutans*에 의한 인공 치태 형성과 혐기성 세균에 의한 휘발성 유황화합물 생성을 억제하는 것을 확인하고, API 50 CHL medium kit를 이용한 생화학적 검사와 16S rDNA sequencing으로 동정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리균주는 2주 모두 그람양성 간균으로 과산화수소를 생성하였다.
2. 인공치태의 무게는 *Streptococcus mutans*의 단독 배양시 $124.4 \pm 30.4\text{mg}$ 이었으나, 분리균 주와 병합 배양시에는 각각 $5.2 \pm 2.0\text{mg}$, $10.6 \pm 6.6\text{mg}$ 으로 현저하게 감소하였다($p < 0.05$).
3. *Streptococcus mutans*의 생균수는 단독 배양시 ml당 3.4×10^9 이었으나, 분리균주와 병합 배양시에는 각각 ml당 4.6×10^8 과 2.4×10^8 으로 감소하였다.
4. *Fusobacterium nucleatum*을 30분간 진탕한 후 측정된 상청액의 흡광도는 1.286이었으나, *Fusobacterium nucleatum*과 분리균주를 병합으로 30분간 진탕한 후 측정된 상청액의 흡광도는 각각 0.628과 0.497로 감소하였으며, 상호 결합 정도는 29.4%와 57.8%이었다.
5. *Fusobacterium nucleatum*의 단독 배양시 cysteine과 FeSO_4 를 첨가한 배지를 가한 후 측정된 침전물의 배지 흡광도는 1.794이었으나, 분리균주와 병합 배양시 측정된 침전물의 배지 흡광도는 각각 1.144와 0.915로 감소하였으며, *Porphyromonas gingivalis* 단독 배양시 침전물의 배지 흡광도는 1.932이었으나 분리균주와 병합 배양시에는 침전물의 배지 흡광도가 각각 1.170과 1.266으로 감소하였다.
6. 분리균주를 API 50 CHL medium kit로 탄수화물 발효검사를 시행한 결과, 분리균주 1주는 *Lactobacillus salivarius*로, 다른 분리균주는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*로 동정되었다.
7. 분리균주를 16S rDNA partial sequencing으로 동정한 결과, 2주 모두 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*와 유전자 유사치가 99.60%, 99.73%를 보여 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*로 동정되었다.

이상의 결과를 종합하면 치아우식증이 없는 소아의 타액에서 분리된 유산균 중 과산화수소를 분비하여 인공치태 형성과 휘발성 유황화합물 생성을 억제하는 분리균주는 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*로 동정되었다.

주요어 : *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*

I. 서 론

교신저자 : 양 규 호

광주광역시 동구 학1동 8번지

전남대학교 치과병원 소아치과학교실

Tel : 062-220-5476

E-mail : hellopedo@hanmail.net

치태란 치아표면에 붙은 점착성의 당단백질 피막에 구강내 세균이 부착하여 집락을 형성하고, 치면의 일부를 덮고 있는 세균막이다. 치태내의 세균에 의해 생성되는 산, 내독소 및 외독소 등은 치아와 치아 주위조직에 위해작용을 하여 치아우식증과 치

주질환의 원인요소가 된다¹⁻⁶). 특히 치태내의 *Streptococcus mutans*는 세균 외부로 glucosyltransferase(GTF)를 분비하여 자당(sucrose)으로부터 α -1,6-glucose linkage가 주된 결합인 수용성 글루칸(glucan)과 α -1,3-glucose linkage가 90% 이상인 비수용성 글루칸, 즉 뮤탄 (mutan)을 합성한다^{4,5}). 뮤탄은 치태의 주성분이 되고, 점착성이 높아 구강내 세균의 부착 및 응집을 강하게 유도하여 세균이 증식하는 토대가 된다⁶).

치아우식증의 발생에는 주된 원인균인 *Streptococcus mutans* 외에도 강산을 생산하는 유산간균 (lactobacilli)이 주목을 받고 있다. 유산간균 중 *Lactobacillus casei*나 *Lactobacillus acidophilus*는 치아우식증 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, *Lactobacillus salivarius*도 실험동물에서 치아우식증을 일으키는데 관여하는 것으로 보고되었다⁷).

지금까지 치아우식증을 예방하기 위한 다양한 연구들이 진행되어 왔다. *Streptococcus mutans*에 대한 억제 효과를 발휘하는 항균제를 사용하거나^{8,9}, 치아의 내산성을 높이는 불소 도포법^{10,11}, 탄수화물 섭취를 제한하는 식이요법¹² 등이 연구되어 왔으나, 장기적인 효과를 기대할 수 없었다.

최근에는 구강내 상재균을 이용하여 치아우식증을 예방하고자 하는 대치요법이 연구되고 있으며¹³⁻¹⁷, *Streptococcus oralis* 등 구강내 일부 세균들은 과산화수소를 분비하여 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제함으로써 치태 형성을 억제한다고 보고되었다¹⁸⁻²⁰). 이러한 세균은 비병원성이면서 지속적으로 증식하여 뮤탄을 생성하는 *Streptococcus mutans*를 억제하거나 뮤탄 생성을 차단할 수 있다.

이와 같이 이로운 방향으로 작용하는 정상세균 중 유산간균은 대표적인 유산균으로 유해균 발육을 억제하는 효과가 강하여 발효식품과 유산균 제제, 의약품 등으로 사용되고 있으며, *Streptococcus mutans*를 억제하거나 치태 형성을 억제하는 *Lactobacillus* 종의 분리 및 동정이 연구되고 있다^{21,22}).

구취 (halitosis)는 구강 및 인접 기관으로부터 유래되는 냄새로서 구강내 세균에 의해 생성되는 휘발성 유황화합물에 의해 유발되는데, Kleinberg와 Codipilly²³는 12종의 그람음성 세균과 13종의 그람양성 세균이 구취를 발생시키는 기질로 아미노산을 사용한다고 보고하였다. 특히 *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella alcalescens*, *Prevotella loeschii*, *Treponema denticola* 등과 같은 혐기성 그람음성 세균들은 주요한 구취 생성균이다. 구취의 주요성분은 황화수소(hydrogen sulfide)나 메틸머캡탄(methylmercaptan)이며, 이러한 휘발성 유황화합물은 메치오닌, 시스테인, 시스틴과 같은 아미노산을 가지고 있는 단백질로부터 생성된다²⁴).

구취 억제에는 구강내 혐기성 세균의 증식을 억제하는 것이 가장 효과적이므로 분리균주가 구취와 치주질환을 유발시키는 원인균으로 지목되고 있는 혐기성 그람음성 세균인 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*에 작용하여 발생기산소를 방출하는 과산화수소를 분비함으로써 휘발성 유황화합

물의 생성에 영향을 줄 것으로 사료된다.

본 연구는 치아우식증이 없는 소아의 타액에서 분리한 유산균 2주가 과산화수소를 분비하여 *Streptococcus mutans*에 의한 인공치태 형성과 생균수의 증식에 미치는 영향을 조사하고 혐기성 세균과의 관계를 파악하며, 분리균주의 생화학적 성질과 16S rDNA partial sequencing에 의한 동정을 실시하여 치아우식증과 치주질환 및 구취를 예방하기 위한 probiotic bacteria의 연구개발에 기여하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시세균 및 배양

사용 균주로 *Streptococcus mutans* serotype c(Ingbritt strain)와 *Porphyromonas gingivalis*(ATCC, Rockville, MA, USA) 그리고 *Fusobacterium nucleatum*(ATCC, Rockville, MA, USA)을 공시하였으며, 배양은 동결 건조로 보관중인 *Streptococcus mutans*를 brain heart infusion 액체배지(BHI, Difco, Detroit, MI, USA)에 *Porphyromonas gingivalis*는 Pg broth(1/2BHI, 0.5% yeast extract, 5 μ g/ml hemin, 1 μ g/ml Vit. K1)에 *Fusobacterium nucleatum*은 Fn broth(BHI, 1% yeast extract, 5 μ g/ml hemin, 1 μ g/ml Vit. K1)에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

2. 유산균의 분리 및 동정

광주지역 유치원생 중 치아우식증이 없는 소아의 타액을 채취하여 유산간균 분리용 배지인 Rogosa 한천배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 타액을 100배 희석하여 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 후 집락을 취하였다. 이것을 다시 MRS 한천배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 접종, 배양하여 약 2,000주의 유산간균을 분리하였다. BHI 액체배지와 MRS 액체배지(Difco, Detroit, MI, USA)가 동량으로 섞인 배지에 5% 자당과 0.1 M MES(2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, Usb, Cleveland, OH, USA) buffer를 첨가하여 pH 7로 조정 한 다음, 시험관에 4 ml씩 준비하였다. 여기에 18시간 배양한 *Streptococcus mutans*와 분리균주를 병합으로 접종하고 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 배양한 후 *Streptococcus mutans*의 인공치태 형성을 억제하는 세균을 선택하였다. MRS 액체배지에 분리균주를 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양한 다음, TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethyl Benzidine, 0.25mg/ml)와 peroxidase(0.01mg/ml)를 첨가한 MRS 한천배지에 유산균 배양액 3 μ l씩 접종하여 호기성 배양기에서 배양시 파랑색의 집락형성 여부로 과산화수소의 생성 여부를 관찰하였으며, *Streptococcus mutans*에 의한 인공치태 형성을 억제하면서 과산화수소를 분비하는 유산간균 2주를 최종적으로 분리하였다. 분리균주 2주를 MRS 액체배지에 배양한 후 글리세롤의 최종농도가

20%(w/v) 되도록 첨가하여 -80℃에 냉동 보관하면서 필요에 따라 접종, 배양하여 실험에 사용하였다. 분리균주는 그람염색을 실시하고 카탈라아제 시험 (catalase test)은 MRS 한천배지에 분리균주를 접종하여 37℃에서 1일간 배양한 후 3% 과산화수소를 가할 때 기포 발생 여부로 판정하였다. 배양온도에 의한 영향을 알기 위하여 MRS 한천배지에 분리균주를 접종하여 15℃와 45℃에서 각각 배양한 후 분리균주의 증식 여부를 관찰하였다. 유산 발효 형태를 구별하기 위하여 분리균주를 MRS 액체배지에 24시간 배양한 후 배양액을 흔들지 않은 상태에서 백금을 화염에 달구어 배양액에 넣었다가 꺼낼 때 기포가 생기면 탄산가스가 녹아 있기 때문에 heterofermentive로 판정하고, 기포가 생기지 않으면 homofermentive로 판정하였다.

3. *Streptococcus mutans*의 인공치태 형성과 생균수에 미치는 분리균주의 영향

5% 자당과 0.1M MES buffer가 첨가된 BHI 액체배지와 MRS 액체배지를 동량 섞어 비이커에 40ml 준비하였다. 여기에 *Streptococcus mutans*와 분리균주를 각각 8×10^6 CFU (colony forming unit)를 접종하고 0.016 inch 스테인레스 스틸 재질의 교정용 와이어(Ormcoc, Glendora, CA, USA)를 50 mg 내외가 되게 준비하여 3개씩 비이커에 매달아 배지에 잠기도록 하였다. 대조군에서는 *Streptococcus mutans*만 접종하였다. 37℃ 배양기에서 회전시키면서 24시간 배양한 후 3개의 와이어상에 형성된 인공치태 무게의 평균치를 구하였다. 그리고 세균배양액을 회석하여 BHI 한천배지와 MRS 한천배지 상에 접종하여 37℃ 배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

4. 분리균주와 혐기성 세균의 결합실험

혐기성 세균인 *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*와 분리균주의 결합정도를 보기 위하여 *Fusobacterium nucleatum*은 Fn broth에서 *Porphyromonas gingivalis*는 Pg broth에서 1일간 배양하고 유산균은 MRS 액체배지에서 18시간 배양한 후 원심하여 (6,000rpm, 10분, 4℃) 0.85% 식염수에 1회 세척한 후 부유하였다. 시험관에 세균 부유액 1ml씩을 단독 또는 병합으로 10초간 혼합하고 37℃, 110rpm으로 30분간 진탕한 후 3분간 실온에 방치하였다. 상청액 0.5ml를 취하여 분광광도계(spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan) 660nm 파장에서 흡광도(optical density)를 측정하여 분리균주와 혐기성 세균과의 상호결합 정도를 계산하는데 이용하였다. 각 균주의 자가결합 정도는 30분간 진탕한 후 흡광도 수치를 진탕 전의 흡광도 수치로 나눈 값을 1에서 뺀 다음, 100을 곱해 준 값을 퍼센트로 표시하였다. 두 균주의 상호결합 정도는 각 균주의 흡광도 평균값에서 두 균주의 병합 부유시의 흡광도 수치를 뺀 다음, 각 균주의 흡광도 평균값으로

나누어 100을 곱해 준 값을 퍼센트로 표시하였다.

5. 혐기성 세균의 휘발성 유황화합물 생성에 대한 분리균주의 억제 실험

*Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*에 의한 휘발성 유황화합물의 생성 정도를 알고자 액체배지에서 생성된 FeS 농도를 분광광도계로 측정하였다. *Fusobacterium nucleatum*은 Fn broth에서, *Porphyromonas gingivalis*는 Pg broth에서 1일간 배양하고 유산균은 MRS 액체배지에 18시간 배양한 후 원심하여 0.85% 식염수에 1회 세척한 후 부유하였다. 시험관에 세균 부유액을 1ml씩 단독 또는 병합으로 10초간 혼합하고 37℃, 110rpm으로 30분간 진탕하였다. 상청액 1ml를 버리고 남은 침전물 1ml에 0.1% cysteine, 0.1M MES, 0.2% FeSO₄를 가한 Fn broth 또는 Pg broth에 2ml를 가하여 1일간 혐기성 상태에서 배양한 다음, 배지내 FeS 농도를 알기 위하여 분광광도계 700nm 파장에서 배지 흡광도를 측정하였으며 실험을 3번 반복하여한 후 평균을 산출하였다.

6. 분리균주의 탄수화물 발효시험

탄수화물 발효시험은 API 50 CHL medium kit (bioMérieux sa, Marcy-l'Étoile, France)를 사용하였다. 약술하면 분리균주 배양액 50μl를 5ml MRS 액체배지에 접종하여 하룻밤 배양한 다음, 3,500rpm에서 10분간 원심하고 5ml PBS buffer로 침전물을 세척하고 다시 3,500rpm에서 10분간 원심하였다. 침전물을 멸균수 2ml로 현탁시킨 후 시험관내 5ml 멸균수에 현탁액을 100μl씩 떨어뜨려 McFarland Standard 2 농도 보다 약간 진한 농도로 맞추어 그 2배(약 400μl)를 API 50 CHL medium 10ml에 접종하여 섞고 API 50CHL strips에 150μl씩 가하고 mineral oil을 첨가하였다. 증류수를 넣은 판에 10 strip을 5개씩 넣은 후 뚜껑을 닫고 37℃에서 호기 배양하면서 24시간, 48시간 배양한 후 결과를 판독하였다. 탄수화물이 발효되어 산이 생성되면 배지에 포함되어 있는 bromocresol purple에 의해 배지가 노란색으로 변하고, esculin이 보라색에서 검은색으로 변하면 양성으로 판정하였다. 동정 프로그램인 APILAB plus로 검사 결과를 분석하였다.

7. 배양된 균주로부터의 DNA 추출

배양된 균주로부터의 DNA 추출은 Toda 등²⁷⁾의 방법으로 하였다. 약술하면 분리균주를 MRS 액체배지에 배양하여 6,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상청액은 버리고 침전물을 0.15M NaCl, 0.1M EDTA(pH 8.0), 15mg/ml lysozyme 용해액 2ml에 부유시켜 37℃에서 10분마다 완전히 섞어주면서 1시간 방치하였다. 이것을 얼음 속에서 냉각한 후 0.1M

NaCl, 0.5M Tris-HCl(pH 8.0), 10% sodium dodecyl sulfate 용액 2ml를 가하고 ice/NaCl bath에서 10분간 방치한 다음, 55°C에서 10분간 방치하였다. 다시 얼음에서 냉각시키고 2ml의 phenol(Tris-buffered, pH 7.4)을 가하였다. 이것을 4°C에서 6,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 4ml의 상청액을 새로운 시험관으로 옮겨 0.4g polyvinyl-pyrrolidone을 가하고 실온에서 15분간 진탕하였다. 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합액(50 : 49 : 1)을 가하고 그 혼합액을 4°C에서 6,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상청액 3.5ml를 버린 후 냉각된 isopropanol 3.5ml를 가하여 섞은 다음, 20°C에서 하룻밤 방치하였다. DNA 침전물을 10분간 9,000rpm으로 원심분리하여 70% ethanol로 세척하고 진공건조기에서 건조시킨 다음, 20 μ l의 멸균 증류수에 부유시켰다.

8. 16S rDNA 증폭 및 sequencing

16S rDNA를 증폭하기 위하여 27F (5'-AGAGTTTG-ATCMTGGCTCAG-3')와 1522R (5'-AAGGAGGT-GWTCCARCC-3') primer를 사용하였다. PCR을 위한 reaction mixture의 구성은 template DNA 10ng, 200 μ M dNTP, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 40mM KCl, 0.15mM MgCl₂, 3mM MgSO₄, 20 μ g BSA, 0.005 U Vent polymerase, 1U Taq polymerase, 그리고 primer 27F와 1522R로 각각 0.5 μ M로 총 50 μ l로 하였다. 온도 cycling은 GenAmp™ PCR system 9700(PE Applied Biosystems, Warrington, England)을 이용하여 predenaturation 과정으로 94°C에서 3분간 수행하였고 denaturation(94°C, 30초), annealing(50°C, 30초), elongation(72°C, 5분) 반응을 총 30회 반복하고 post-elongation(72°C, 10분)을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후 16S rDNA 크기를 확인하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega, Madison, WI, USA)으로 정제하였다. 염기서열 분석은 capillary 방식의 ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems, Warrington, England)를 사용하였으며, 분석에 사용된 sequencing kit는 ddNTP에 형광물질 label 방식인 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems, Warrington, England)를 사용하였다.

9. 계통발생학적인 분석

공시균의 16S rDNA sequence를 DNA-DIST, NEIGHBOR, DRAWGRAM 프로그램이 포함된 Phylogeny Inference Package (PHYLIP) version 3.5 c를 사용하여 분석하였다.

10. 통계적 처리

분리균주와 *Streptococcus mutans*의 병합 배양시 인공치태의 무게 감소는 Mann-Whitney test를 이용하여 분석하였으며, 통계학적 유의성은 p 값이 0.05 이하인 경우로 하였다.

III. 연구 성적

1. 분리균주의 동정

분리균주 2주 모두 MRS 한천배지 상에서 작은 백색의 집락을 만들었다(Fig. 1, 2). 분리균주들은 과산화수소를 생성하여 TMB와 peroxidase를 첨가한 MRS 한천배지에서 파랑색의 집락을 형성하였다(Fig. 3). 분리균주들은 그람양성 간균으로 카탈라아제 음성이었으며, 15°C에서 증식하지 못하였으나 45°C에서는 증식하였다. 분리균주 모두 heterofermentive하였다.

2. *Streptococcus mutans*의 인공치태 형성과 생균수에 미치는 분리균주의 영향

비이커 와이어 검사에서 분리균주인 *Lactobacillus* 1과 *Streptococcus mutans*의 병합 배양시 인공치태 형성은 *Streptococcus mutans*의 단독 배양시와 비교하여 현저히 감소하였다(Fig. 4). *Streptococcus mutans*의 단독 배양시 형성된 인공치태의 무게는 124.4 \pm 30.4mg이었으나, 분리균주와 병합 배양시에는 각각 5.2 \pm 2.0mg, 10.6 \pm 6.6mg으로 현저히 감소되었다(p<0.05) (Table 1).

배양 후 생균수 검사를 한 결과, *Streptococcus mutans*의 단독 배양시에는 ml당 3.4 \times 10⁹이었고, *Lactobacillus* 1의 단독 배양시에는 3.4 \times 10⁸, *Lactobacillus* 2의 단독 배양시에는 1.8 \times 10⁹이었다. *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus* 1과의 병합 배양시에 *Streptococcus mutans*는 4.6 \times 10⁸, *Lactobacillus* 1은 5.2 \times 10⁸이었고, *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus* 2의 병합 배양시에는 *Streptococcus mutans*는 2.4 \times 10⁸, *Lactobacillus* 2는 2.0 \times 10⁹으로 *Streptococcus mutans*가 억제되었다(Table 1).

3. 분리균주와 혐기성 세균과의 상호결합

Lactobacillus 1의 단독 부유시에는 660nm 파장에서 상청액 흡광도가 2.358이었으나 30분간 진탕한 후 0.494로 감소하여 자가결합 정도가 79.1%이었으며, *Lactobacillus* 2의 단독 부유시에는 상청액 흡광도가 2.376에서 30분간 진탕한 후 1.070으로 감소하여 자가결합 정도가 55.0%이었다. *Fusobacterium nucleatum*의 단독 부유시에는 상청액 흡광도가 1.626에서 30분간 진탕한 후 1.286으로 감소하여 자가결합 정도가 21.0%이었으며, *Porphyromonas gingivalis*의 단독

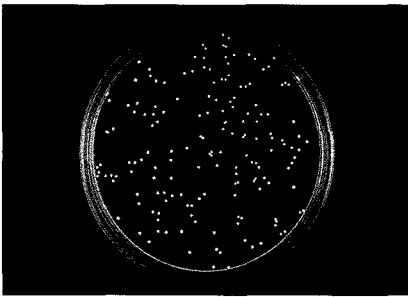


Fig. 1. Colonies of isolated *Lactobacillus* 1 on MRS agar after 24 hours-growth. The colonies are small and white.

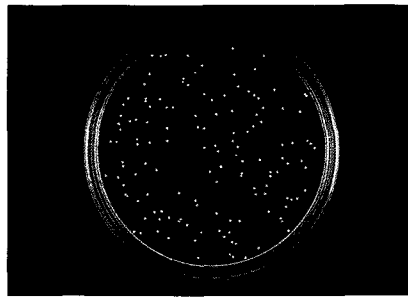


Fig. 2. Colonies of isolated *Lactobacillus* 2 on MRS agar after 24 hours-growth. The colonies are small and white.

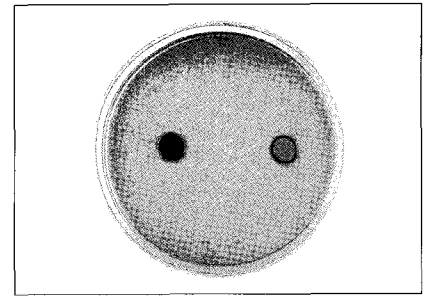


Fig. 3. Formation of blue colonies by isolated *Lactobacillus* 1 and 2 on MRS agar containing TMB and peroxidase in aerobic incubation for 48 hours-growth.

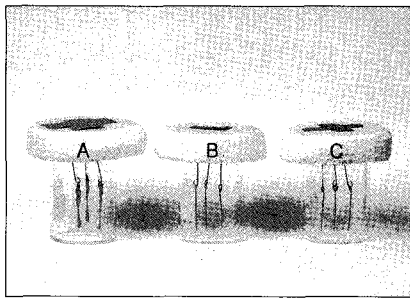


Fig. 4. Effect of isolated *Lactobacillus* 1 on the formation of artificial plaque by *Streptococcus mutans*. *Streptococcus mutans* (A), *Streptococcus mutans* and isolated *Lactobacillus* 1 (B), and isolated *Lactobacillus* 1 (C) were inoculated into BHI broth mixed with MRS broth containing 5% sucrose in the beaker, respectively.



Fig. 5. Coaggregation of isolated *Lactobacillus* 2 with *Fusobacterium nucleatum*.

부유시에는 상청액 흡광도가 1.070에서 30분간 진탕한 후 0.995로 감소하여 자가결합 정도가 7.1%이었다. *Lactobacillus* 1과 *Fusobacterium nucleatum*과의 병합 부유시에는 30분간 진탕한 후 상청액 흡광도가 0.628로 감소하여 상호결합 정도가 29.4%이었으며, *Lactobacillus* 2와 *Fusobacterium nucleatum*과의 병합 부유시에는 30분간 진탕한 후 상청액 흡광도가 0.497로 감소하여 상호결합 정도가 57.8%이었다. *Lactobacillus* 1과 *Porphyromonas gingivalis*와의 병합 부유시에는 30분간 진탕한 후 상청액 흡광도는 1.034이었으며, *Lactobacillus* 2와 *Porphyromonas gingivalis*의 병합 부유시에는 30분간 진탕 후 상청액 흡광도가 1.295이었다(Table 2). *Lactobacillus* 2와 *Fusobacterium nucleatum*과의 병합 부유액 침전물을 그림염색 한 결과 상호 결합된 모습을 볼 수 있었다(Fig. 5).

4. 혐기성 세균의 휘발성 유황화합물 생성에 대한 분리균주의 억제

*Fusobacterium nucleatum*의 단독 배양시 침전물에 cysteine과 FeSO₄를 첨가한 배지를 가하고 1일간 배양한 후 배지는 검정색으로 나타났으며 흡광도가 1.794이었고, *Porphyromonas gingivalis*의 단독 배양시 침전물에 배지를 가하고 1일간 배양한 후의 배지도 검정색으로 나타났으며 흡광도는 1.932이었다. *Lactobacillus* 1과 *Fusobacterium nucleatum*과의 병합 배양시 침전물에 배지를 가하고 1일간 배양한 후의 배지는 검정색으로 변화하지 않았으며 흡광도는 1.144이었고, *Lactobacillus* 2와 *Fusobacterium nucleatum*과의 병합 배양시 침전물에서도 배지는 검정색으로 변화하지 않았으며 흡광도는 0.915이었다. *Lactobacillus* 1 및 *Lactobacillus* 2와 *Porphyromonas gingivalis*와의 병합 배양시 침전물에 배지를

Table 1. Inhibitory effect of isolated Lactobacilli on the formation of artificial plaque on the orthodontic wires and the replication of *Streptococcus mutans*

Tested bacterial strains	Plaque weight (mg)	Number of viable cells (CFU/ml)	
		<i>Lactobacillus</i>	<i>S. mutans</i>
<i>Lactobacillus</i> 1		3.4×10^8	
<i>Lactobacillus</i> 2		1.8×10^9	
<i>S. mutans</i>	124.4±30.4		3.4×10^9
<i>Lactobacillus</i> 1 + <i>S. mutans</i>	5.2±2.0*	5.2×10^8	4.6×10^8
<i>Lactobacillus</i> 2 + <i>S. mutans</i>	10.6±6.6*	2.0×10^9	2.4×10^8

*: p<0.05 CFU: Colony forming unit

Table 2. Coaggregation of isolated Lactobacilli with *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*

Tested bacterial strains	Optical density at 660nm		Autoaggregation(%)	Coaggregation(%)
	0min	30min		
<i>Lactobacillus</i> 1	2.358	0.494	79.1	
<i>Lactobacillus</i> 2	2.376	1.070	55.0	
<i>F. nucleatum</i>	1.626	1.286	21.0	
<i>P. gingivalis</i>	1.070	0.995	7.1	
<i>Lactobacillus</i> 1 + <i>F. nucleatum</i>		0.628		29.4
<i>Lactobacillus</i> 2 + <i>F. nucleatum</i>		0.497		57.8
<i>Lactobacillus</i> 1 + <i>P. gingivalis</i>		1.034		
<i>Lactobacillus</i> 2 + <i>P. gingivalis</i>		1.295		

Table 3. Isolated Lactobacilli affecting the optical density of sulfur compounds produced by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*

Tested bacterial strains	Optical density at 700 nm	Color of cultured solution
<i>F. nucleatum</i>	1.794	Black (+)
<i>P. gingivalis</i>	1.932	Black (+)
<i>Lactobacillus</i> 1 + <i>F. nucleatum</i>	1.144	Black (-)
<i>Lactobacillus</i> 2 + <i>F. nucleatum</i>	0.915	Black (-)
<i>Lactobacillus</i> 1 + <i>P. gingivalis</i>	1.170	Black (-)
<i>Lactobacillus</i> 2 + <i>P. gingivalis</i>	1.266	Black (-)

가하고 1일간 배양한 후의 배지는 검정색으로 변화하지 않았으며 흡광도는 각각 1.170과 1.266이었다(Table 3).

5. 분리균주의 탄수화물 발효검사

탄수화물 발효검사 결과, *Lactobacillus* 1은 galactose, glucose, fructose, mannose, mannitol, sorbitol, N-acetylglucosamine, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, raffinose를 분해하였고, *Lactobacillus* 2는 glucose, fructose, mannose, mannitol, N-acetylglucosamine, maltose, lactose, sucrose, trehalose, xylitol, D-arabitol을 분해하였다(Table 4). 이상의 성적을 API 50 CHL medium

kit의 동정 프로그램인 APILAB plus로 판독한 결과, *Lactobacillus* 1은 *Lactobacillus salivarius* (가능성 99.9%), *Lactobacillus* 2는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (가능성 68.4%), *Aerococcus viridans* (가능성 20.8%), *Leuconostoc lactis* (가능성 6.9%), *Lactobacillus salivarius* (가능성 2.9%)로 판정되었다(Table 5).

6. 16S rDNA sequencing

Lactobacillus 1의 16S rDNA 750 bps를 sequencing한 결과는 Fig. 6과 같았으며, 다른 세균의 16S rDNA 유전자 염기 순서와 비교한 결과, *Lactobacillus salivarius* subsp.

Table 4. Carbohydrate fermentation of isolated Lactobacilli

Carbohydrates	<i>Lacto</i> <i>-bacillus</i> 1	<i>Lacto</i> <i>-bacillus</i> 2	Carbohydrates	<i>Lacto</i> <i>-bacillus</i> 1	<i>Lacto</i> <i>-bacillus</i> 2
Salicin	-	-	Glycerol	-	-
Cellobiose	-	-	Erythritol	-	-
Maltose	+	+	D-Arabinose	-	-
Lactose	+	+	L-Arabinose	-	-
Melibiose	+	-	Ribose	-	-
Sucrose	+	+	D-Xylose	-	-
Trehalose	+	+	L-Xylose	-	-
Inulin	-	-	Adonitol	-	-
Melezitose	-	-	β Methyl-D-xyloside	-	-
Raffinose	+	-	Galactose	+	-
Starch	-	-	Glucose	+	+
Glycogen	-	-	Fructose	+	+
Xylitol	-	+	Mannose	+	+
Gentiobiose	-	-	Sorbose	-	-
D-Turanose	-	-	Rhamnose	-	-
D-Lyxose	-	-	Dulcitol	-	-
D-Tagatose	-	-	Inositol	-	-
D-Fucose	-	-	Mannitol	+	+
L-Fucose	-	-	Sorbitol	+	-
D-Arabitol	-	+	α -Methyl-D-mannoside	-	-
L-Arabitol	-	-	α -Methyl-D-glucoside	-	-
Gluconate	-	-	N-Acetyl-glucosamine	+	+
2-Keto-gluconate	-	-	Amygdalin	-	-
5-Keto-gluconate	-	-	Arbutin	-	-
			Esculin	-	-

Table 5. Identification of isolated Lactobacilli using API 50 CHL medium kit and APILAB plus program

Isolated Lactobacilli	Possible name of isolates(Possibility percent)
<i>Lactobacillus</i> 1	<i>Lactobacillus salivarius</i> (99.9%)
<i>Lactobacillus</i> 2	<i>Lactobacillus delbrueckii lactis</i> (68.4%), <i>Aerococcus viridans</i> (20.8%), <i>Leuconostoc lactis</i> (6.9%), <i>Lactobacillus salivarius</i> (2.9%)

5'-GGCGCCGTGCCTAATACATGCAAGTCNAACGAACTTCTTACACCGAATGCTTGCATTACCGTAA
 GAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGA
 AACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCG
 CTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAAGTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTA
 GCCGAAGTCAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 TAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAANAAGGTCTTCGGA
 TCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTCAATTCGATGACGGTATCTAAC
 CAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAACAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTT
 ATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTA
 GTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGACGAGAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGATATATGGAAGACACCATGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGTTCGAAA-
 3'

Fig. 6. Sequence of 16S rDNA 750 bps in *Lactobacillus* 1.

5'-GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAAACTTTCTTACACCGAATGNTTGCATTCACCGTAA
 GAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGGA
 AACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCG
 CTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAAGTACTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTA
 GCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAG
 TAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGA
 TCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTATCTAAC
 CAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTT
 ATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTA
 GTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGTTC-3'

Fig. 7. Sequence of 16S rDNA 749 bps in *Lactobacillus* 2.

Table 6. 16S rDNA similarity of isolated *Lactobacillus* 1 for other bacteria

Strains	Similarity (%)	Nucleotide differences
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> ATCC 11742	99.60	3/745
<i>L. aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i> ATCC 43234	92.93	52/735
<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 27780	92.60	55/743
<i>Lactobacillus mali</i> ATCC 27053	92.07	58/731
<i>Lactobacillus agilis</i> DSM 20509	91.95	59/733
<i>Lactobacillus animalis</i> NCDO 2425	91.42	57/664
<i>Lactobacillus animalis</i> ATCC 35046	90.92	66/727
<i>Lactobacillus buchneri</i> NCDO 110	90.24	62/635
<i>Lactobacillus manihotivorans</i> LMG 18010	88.56	85/743
<i>Lactobacillus collinoides</i> JCM 1123	88.29	87/743
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393	88.04	89/744
<i>Lactobacillus zeae</i> ATCC 15820	87.82	91/747
<i>Lactobacillus perolens</i> L532	87.79	91/745

Table 7. 16S rDNA similarity of isolated *Lactobacillus* 2 for other bacteria

Strains	Similarity (%)	Nucleotide differences
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> ATCC 11742	99.73	2/745
<i>L. aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i> ATCC 43234	93.06	51/735
<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 27780	92.73	54/743
<i>Lactobacillus mali</i> ATCC 27053	92.20	57/731
<i>Lactobacillus agilis</i> DSM 20509	92.09	58/733
<i>Lactobacillus animalis</i> NCDO 2425	91.42	57/664
<i>Lactobacillus animalis</i> ATCC 35046	91.06	65/727
<i>Lactobacillus buchneri</i> NCDO 110	90.24	62/635
<i>Lactobacillus manihotivorans</i> LMG 18010	88.83	83/743
<i>Lactobacillus collinoides</i> JCM 1123	88.43	86/743
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393	88.17	88/744
<i>Lactobacillus zeae</i> ATCC 15820	87.95	90/747
<i>Lactobacillus perolens</i> L532	87.92	90/745

salicinius ATCC 11742와 유사치가 99.60%로 가장 높아 (Table 6). *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*로 동정되었다. *Lactobacillus* 2의 16S rDNA 749 bps를 sequencing한 결과는 Fig. 7에서와 같았으며, 다른 세균의 16S

rDNA 유전자 염기순서와 비교한 결과, *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* ATCC 11742와 유사치가 99.73%로 가장 높아 (Table 7), *Lactobacillus* 2도 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*로 동정되었다.

IV. 고 찰

치태형성의 주된 원인균인 mutans streptococci 군은 항원성에 따라 8개의 혈청형 (a-h)으로 나눌 수 있는데, 본 연구에 사용된 혈청형 c가 세계적으로 가장 많이 분리되고 있다²⁶⁾. Toda 등²⁷⁾은 *Streptococcus mutans* 혈청형 c가 합성한 세포외 다당류의 초미세구조를 전자현미경으로 관찰하였는데, 글루칸이 한 가닥으로 구성된 수용성인 텍스트란과 두 가닥으로 구성된 비수용성인 뮤탄으로 이루어졌음을 보고하였다. 뮤탄은 치태의 기질을 형성하고, 치태내의 *Streptococcus mutans*는 탄수화물의 대사과정을 통해 다량의 유산을 생성하여 치아표면을 탈회시킴으로써 치아우식증을 유발한다.

구강내에 상재하는 유산간균과 치아우식증과의 직접적인 역할과 기전에 대해서는 증명되지 않았지만, 유산간균에 의한 산생성 및 유산간균의 내산성과 같은 특성 때문에 과거에는 유산간균이 치아우식증의 유발균으로 생각한 시기가 있었다⁷⁾. 그러나 유산간균은 경조직에의 부착능이 없고 치태내에 존재하는 균수가 총 배양세균의 1% 이하를 차지하는 소수이며²⁸⁾, 치아 법랑질을 탈회시키는 산의 대부분이 *Streptococcus mutans*에 의해 생성되므로 유산간균이 치아우식증의 시발인자는 아니지만, 깊은 상아질 우식병소에서 많은 수가 발견되고 치아우식증의 진행인자로서 작용하여 진행성 상아질 우식증과 관련이 있는 것으로 보고되었다^{7,29)}.

그러나 본 연구에서 분리한 유산간균은 *Streptococcus mutans*에 의한 인공치태 형성을 억제하면서 과산화수소를 분비하는 성질을 가지고 있다. Smith 등³⁰⁾은 타액과 치아우식증에 대한 유산간균의 연구에서 거의 모든 유산간균이 박테리옌 (bacteriocin)을 생성하고, 여성의 질 내에 상재하는 유산간균은 과산화수소를 분비하여 항균력을 가지고 있으며, 병원체와 결합력이 높아 내독소의 활성을 억제한다고 보고하였다^{31,32)}.

과산화수소는 포유동물의 세포에 손상을 줄 수 있으나³³⁾, 구강미생물에 의해 생성되는 과산화수소의 양은 매우 적어 구강 점막에 손상을 거의 주지 않는다³⁴⁾. 그러나 구강내 혐기성 세균은 발생기 산소를 방출하는 과산화수소에 매우 예민하므로 과산화수소에 의하여 억제될 뿐만 아니라^{35,36)}, 과산화수소의 산소 분자가 거품으로 방출되면서 치태와 음식물 잔사들을 제거하는 기계적 효과와 그 자체로서의 항균 효과 및 화학적 조직 치유 작용 등과 함께 구취의 치료에도 이용되고 있다³⁷⁾. 더구나 본 연구에서처럼 과산화수소를 분비하는 유산간균과 휘발성 유황화합물을 생성하는 혐기성 세균이 상호결합되어, 두 종류의 세균이 긴밀하게 접촉하게 되면 유산간균에 의해 생성되는 소량의 과산화수소에 의해서도 혐기성 세균이 억제되기 때문에 구취가 현저히 감소될 것으로 생각된다. 이러한 구강내 항세균 성분을 생성하는 세균의 작용은 구강환경의 균형을 깨뜨리지 않으면서 효과를 지속적으로 발휘할 수 있어 구강건강의 유지에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

치아우식증과 치주질환을 예방하기 위해서는 세균의 증식산

물인 치태의 형성이 억제되어야 한다. 비이커 와이어 검사에서 형성된 인공치태의 무게는 *Streptococcus mutans*의 단독 배양시 $124.4 \pm 30.4 \text{mg}$ 이었으나, 분리균주와 병합 배양시에는 각각 $5.2 \pm 2.0 \text{mg}$, $10.6 \pm 6.6 \text{mg}$ 으로 현저하게 감소되었다 ($p < 0.05$). 생균수 검사에서도 *Streptococcus mutans*의 생균수는 단독 배양시 ml당 3.4×10^9 이었으나, 분리균주와 병합 배양시에는 각각 ml당 4.6×10^8 과 2.4×10^8 으로 감소되어 분리균주 2주 모두 치태의 형성을 억제하고 *Streptococcus mutans*의 숫자를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 이러한 효과는 분리균주가 유산을 만드는 유산균이라도 세균들이 증식할 수 있는 토대 역할을 하는 치태 형성을 억제하기 때문에 치아의 탈회 및 치아우식증의 유발이 억제되리라 생각한다.

치태 형성 초기에는 주로 연쇄상구균이나 유산간균과 같은 호기성 그람양성 세균들이 많이 존재하지만, 치태가 수일 내에 제거되지 않고 계속 치면에 저류되어 있을 경우, 세균들의 증식과 대사과정을 통하여 그 층은 더욱 두터워지며 외층에는 새로운 세균들이 계속 부착하게 된다. 그러므로 원래의 치태층은 산소가 부족하게 되어 혐기성 그람음성 세균들로 바뀌게 되고 이러한 세균들에 의하여 구취가 유발되며 치아 주위조직에 위해 작용을 가하여 치은염 및 치주질환의 원인이 된다³⁸⁾.

본 연구에서는 분리균주가 혐기성 세균인 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*에 상호결합하는 정도를 각각 흡광도로 측정 한 결과, 분리균주는 이들과 상호결합을 하였으며, 특히 *Fusobacterium nucleatum*과의 상호결합 정도가 높게 나타났다. 비록 *Porphyromonas gingivalis*와의 상호결합 정도는 *Fusobacterium nucleatum*과의 상호결합 정도에 비해 낮았으나, 분리균주와 *Porphyromonas gingivalis*의 병합 배양시 30분간 진탕한 후의 상청액 흡광도가 각각의 상청액 흡광도의 합보다 감소되어 분리균주와 *Porphyromonas gingivalis*와의 상호결합이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*는 유황성분이 함유된 배지에서 배양할 때, 황화수소가 만들어져 철 성분과 결합하여 검정색의 침전물 즉 FeS를 생성하므로 분광광도계 700nm 파장에서 배지의 흡광도를 측정하여 그 증식 정도를 간접적으로 파악할 수 있었다. *Fusobacterium nucleatum*이나 *Porphyromonas gingivalis*의 단독 배양시 배지 흡광도에 비하여 분리균주와의 병합 배양시 배지 흡광도가 감소되었으며, 배지는 모두 검정색으로 변하지 않았다. 이것은 분리균주가 *Fusobacterium nucleatum*과 *Porphyromonas gingivalis*와 상호결합을 한 다음, 분리균주가 분비하는 과산화수소가 이들 세균의 증식을 억제함으로써 휘발성 유황화합물의 생성이 억제되고 FeS 즉 검정색 침전물의 생성이 감소되어 배지의 흡광도가 떨어진 것으로 사료된다.

종래 미생물을 동정하기 위하여 이용하던 배양이나 혈청학적 방법에 비교하여 미생물에 존재하는 고유한 유전자를 이용하여 동정하는 방법은 민감도와 정확성에 있어서 월등하기 때문에 최근에 세균으로부터 추출한 DNA에 rRNA 유전자 probe를

hybridization시킨 후 제한효소로 처리한 결과로 세균을 분류하기 시작하였다⁴⁾. 분리균주의 16S rDNA 염기 서열을 비교하면 세균이 진화과정상 유연관계가 가까울수록 염기 서열은 비슷하고 진화과정상 유연관계가 멀수록 염기서열의 유사성은 감소하게 된다.

본 연구에서도 분리균주 2주를 API 50 CHL medium kit로 탄수화물 발효 검사를 시행하여 동정한 결과, *Lactobacillus salivarius*(가능성 99.9%)와 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*(가능성 68.4%)로 나타났으나 분리균주의 16S rDNA 유전자를 sequencing한 결과는 다르게 나타났다. 16S rDNA 유전자와 비교한 결과 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*의 유전자와 유사치가 99.6% 이상을 보여 분리균주 2주 모두 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*로 동정되었으며, API 50 CHL medium kit를 이용한 동정 결과와는 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 따라서 최종적인 세균의 동정은 유전자 분석에 의해 이루어져야 될 것으로 사료된다.

이상의 결과로 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*가 과산화수소를 분비하여 인공치태 형성과 혐기성 세균에 의한 휘발성 유황화합물의 생성을 억제하는 효과가 있음이 확인되었으나, 향후 이 연구의 결과가 구강에서도 동일하게 임상적으로 검증된다면 분리균주를 치아우식증과 치주질환 및 구취의 예방과 치료를 위한 probiotic bacteria로 개발하여 구강건강의 증진에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 치아우식증이 없는 소아의 타액에서 분리한 유산균 2주가 *Streptococcus mutans*에 의한 인공치태 형성과 혐기성 세균에 의한 휘발성 유황화합물 생성을 억제하는 것을 확인하고, API 50 CHL medium kit를 이용한 생화학적 검사와 16S rDNA sequencing으로 동정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리균주는 2주 모두 그람양성 간균으로 과산화수소를 생성하였다.
2. 인공치태의 무게는 *Streptococcus mutans*의 단독 배양시 124.4±30.4mg이었으나, 분리균주와 병합 배양시에는 각각 5.2±2.0mg, 10.6±6.6mg으로 현저하게 감소하였다 (p<0.05).
3. *Streptococcus mutans*의 생균수는 단독 배양시 ml당 3.4×10⁸이었으나, 분리균주와 병합 배양 시에는 각각 ml당 4.6×10⁸과 2.4×10⁸으로 감소하였다.
4. *Fusobacterium nucleatum*을 30분간 진탕한 후 측정된 상청액의 흡광도는 1.286이었으나, *Fusobacterium nucleatum*과 분리균주를 병합으로 30분간 진탕한 후 측정된 상청액의 흡광도는 각각 0.628과 0.497로 감소하였으며, 상호결합 정도는 29.4%와 57.8%이었다.

5. *Fusobacterium nucleatum*의 단독 배양시 cysteine과 FeSO₄를 첨가한 배지를 가한 후 측정된 침전물의 배지 흡광도는 1.794이었으나, 분리균주와 병합 배양시 측정된 침전물의 배지 흡광도는 각각 1.144와 0.915로 감소하였으며, *Porphyromonas gingivalis*의 단독 배양시 침전물의 배지 흡광도는 1.932이었으나, 분리균주와 병합 배양시에는 침전물의 배지 흡광도가 각각 1.170과 1.266으로 감소하였다.
6. 분리균주를 API 50 CHL medium kit로 탄수화물 발효 검사를 시행한 결과, 분리균주 1주는 *Lactobacillus salivarius*로, 다른 균주는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*로 동정되었다.
7. 분리균주를 16S rDNA partial sequencing으로 동정한 결과, 2주 모두 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*와 유전자 유사치가 99.60%, 99.73%를 보여 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*로 동정되었다.

이상의 결과를 종합하면 치아우식증이 없는 소아의 타액에서 분리된 유산균 중 과산화수소를 분비하여 인공치태 형성과 휘발성 유황화합물 생성을 억제하는 분리균주는 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*로 동정되었다.

참고문헌

1. Ernest N : Cariology. 3rd ed, Quintessence Publishing, Chicago, 13-134, 1989.
2. Schilling KM, Bowen WH : Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. Infect Immun, 60:284-295, 1992.
3. Wiater A, Choma A, Szczodrak J : Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study. J Basic Microbiol, 39:265-273, 1999.
4. Rolla G, Scheie AA, Ciardi JE : Role of sucrose in plaque formation. Scand J Dent Res, 93:105-111, 1985.
5. Loesche WJ : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev, 50:353-380, 1986.
6. Slots J, Taubman M : Contemporary oral microbiology and immunology. Mosby, 377-424, 1992.
7. Seppa L, Luoma H, Forss H, et al. : Invasion of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus salivarius* in early caries lesions of gnotobiotic rats. Caries Res, 23:371-374, 1989.
8. Schaeken MJ, De Haan P : Effects of sustained-release chlorhexidine acetate on the human dental

- plaque flora. J Dent Res, 68:119-123, 1989.
9. Mikkelsen L, Jensen SB, Schiøtt CR, et al. : Classification and prevalences of plaque streptococci after two years oral use of chlorhexidine. J Periodontal Res, 16: 645-658, 1981.
 10. Woods R : The short-term effect of topical fluoride applications on the concentration of *Streptococcus mutans* in dental plaque. Aust Dent J, 16: 152-155, 1971.
 11. Zachrisson BU : Fluoride application procedures in orthodontic practice, current concepts. Angle Orthod, 45:72-81, 1975.
 12. Hogg SD : Chemical control of plaque. Dental Update, 17:330-333, 1990.
 13. Hillman JD, Socransky SS : Replacement therapy for the prevention of dental disease. Adv Dent Res, 1:119-125, 1987.
 14. Hillman JD : Lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*: Isolation and preliminary characterization. Infect Immun, 21:206-212, 1978.
 15. Abhyankar S, Sandham HJ, Chan KH : Serotype C *Streptococcus mutans* mutable to lactate dehydrogenase deficiency. J Dent Res, 64:1267-1271, 1985.
 16. Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J : Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R. Infect Immun, 48:44-50, 1985.
 17. Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J : Inhibition of ecological emergence of mutans streptococci naturally transmitted between rats and consequent caries inhibition by *Streptococcus salivarius* TOVE-R infection. Infect Immun, 49:76-83, 1985.
 18. 김선미, 양규호, 정성수 등 : *Streptococcus oralis*의 인공 치태 억제효과에 대한 연구. 대한소아치과학회지, 26:77-87, 1999.
 19. Lumikari M, Soukka T, Nurmio S, et al. : Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase system in human saliva. Arch Oral Biol, 36:155-160, 1991.
 20. van der Hoeven JS, Camp PJM : Mixed continuous culture of *Streptococcus mutans* with *Streptococcus sanguis* or with *Streptococcus oralis* as a model to study the ecological effects of the lactoperoxidase system. Caries Res, 27:26-30, 1993.
 21. Chung J, Ha ES, Park HR, et al. : Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. Oral Microbiol Immunol, 19:214-216, 2004.
 22. 김용덕 : *Streptococcus mutans*의 뮤탄 생성을 억제하는 유산 간균의 동정. 전남대학교 대학원 학위논문, 2003.
 23. Kleinberg I, Codipilly M : The biological basis of oral malodor formation. In: Rosenberg M : Bad breath: research perspective. 1st ed, Ramot Publishing, Tel Aviv, 13-39, 1995.
 24. Tonzetich J : Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. J Periodontol, 48:13-20, 1977.
 25. Rochelle PA, Fry JC, Parkes RJ, et al. : DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. FEMS Microbiol Lett, 100:59-66, 1992.
 26. Hamada S, Slade HD : Biology, Immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev, 44:331-384, 1980.
 27. Toda Y, Moro I, Koga T, et al. : Ultrastructure of extracellular polysaccharides produced by serotype c *Streptococcus mutans*. J Dent Res, 66:1364-1369, 1987.
 28. 김영권, 한만덕 : 구강미생물학. 교문사, 서울, 245-249, 2001.
 29. Krishnakumar R, Singh S, Subba Reddy VV : Comparison of levels of mutans streptococci and lactobacilli in children with nursing bottle caries, rampant caries, healthy children with 3-5 dmft/DMFT and healthy caries free children. J Indian Soc Pedod Prev Dent, 20:1-5, 2002.
 30. Smith Si, Aweh AJ, Coker AO : Lactobacilli in human dental caries and saliva. Microbios, 105:77-85, 2001.
 31. Ocana VS, Pesce de Ruiz Holgado AA, Nader-Macias ME : Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. Curr Microbiol, 38:279-284, 1999.
 32. Willcox MD, Patrikakis M, Harty DW, et al. : Coaggregation of oral lactobacilli with streptococci from the oral cavity. Oral Microbiol Immunol, 8:319-321, 1993.
 33. Bradley MO, Erickson LC : Comparison of the effects of hydrogen peroxide and x-ray irradiation on toxicity, mutation, and DNA damage/repair in mammalian cells (V-79). Biochim Biophys Acta, 654:135-141, 1981.
 34. Holmberg K, Hallander HO : Production of bacterici-

- dal concentrations of hydrogen peroxide by *Streptococcus sanguis*. Arch Oral Biol, 18:423-434, 1973.
35. Leke N, Grenier D, Goldner M, et al. : Effects of hydrogen peroxide on growth and selected properties of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett, 174:347-353, 1999.
36. Ohwada T, Shirakawa Y, Kusmoto M, et al. : Susceptibility to hydrogen peroxide and catalase activity of root nodule bacteria. Biosci Biotechnol Biochem, 63:457-62, 1999.
37. Wennstrom J, Lindhe J : Effect of hydrogen peroxide on developing plaque and gingivitis in man. J Clin Periodontol, 6:115-130, 1979.
38. 김종배, 백대일, 문혁수 등 : 임상예방치학. 3판, 고문사, 서울, 69-78, 2000.
39. Grimont F, Grimont PAD : Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann Inst Pasteur Microbiol, 137B:165-175, 1986.

Abstract

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* INHIBITING
THE FORMATION OF ARTIFICIAL PLAQUE AND THE PRODUCTION
OF VOLATILE SULFUR COMPOUNDS

Mi-Hyung Kim, 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*

*Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Chonnam National University and Dental Research Institute,
Department of Microbiology, College of Medicine, Chonnam National University**

There are normal inhabitants doing medically useful functions in the body. There are many kinds of bacteria performing specific functions in the oral cavity. Two strains of lactic acid bacteria were isolated from inhabitants of caries-free children's oral cavity, which inhibited the formation of artificial plaque by *Streptococcus mutans* and the production of volatile sulfur compounds by anaerobic bacteria. The isolates were identified by the test using API 50 CHL medium kit and 16S rDNA partial sequencing.

1. Two isolates were Gram-positive bacilli and produced hydrogen peroxide.
2. When *Streptococcus mutans* was cultured in the media, the mean weight of formed artificial plaque on the orthodontic wires was 124.4 ± 30.4 mg, whereas being reduced to 5.2 ± 2.0 mg and 10.6 ± 6.6 mg in the media cultured with *Streptococcus mutans* and each isolate, respectively ($p < 0.05$).
3. The number of viable cells of *Streptococcus mutans* was 3.4×10^9 per ml in the cultured solution, whereas those of *Streptococcus mutans* in the combined culture with each of isolates were 4.6×10^8 and 2.4×10^8 per ml.
4. The optical density was 1.286 in the supernatant of *Fusobacterium nucleatum* after vortexing for 30 minutes, whereas in the supernatant of combined *Fusobacterium nucleatum* and each isolate, they were reduced to 0.628 and 0.497, which the percentages of coaggregation between them were 29.4% and 57.8%, respectively.
5. The optical density of *Fusobacterium nucleatum* precipitate was 1.794 in the culture media containing cysteine and FeSO_4 , being reduced to 1.144 and 0.915 in the coaggregated precipitates of *Fusobacterium nucleatum* and each isolate. The optical density of *Porphyromonas gingivalis* precipitate was 1.932 in the culture media, being reduced to 1.170 and 1.266 in the coaggregated precipitates of *Porphyromonas gingivalis* and each isolate.
6. When two isolates were tested with API 50 CHL medium kit, those were identified as *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*.
7. The similarity values of 16S rDNA sequence between each of isolates and *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* were 99.60% and 99.73%, respectively, meaning that isolates were *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*.

These results indicated that two strains isolated from caries-free children's saliva, which inhibited the formation of artificial plaque and the production of volatile sulfur compounds, were identified as *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*.

Key words : *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*