

Dental Plaque Streptococci가 생산하는 세포외 다당류에 관한 연구*

II. 분리한 세포외 다당류의 화학적성상

서울대학교 치과대학 구강생화학교실

정 태 영

.....> Abstract <.....

STUDIES ON THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES PRODUCED BY ISOLATED DENTAL PLAQUE STREPTOCOCCI

II. CHEMICAL NATURE OF PURIFIED EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE

Tai-Young Chung

Dept. of Oral Biochemistry College of Dentistry, S.N.U.

The present investigation describes the chemical nature of purified extracellular polysaccharides synthesized by two resembling streptococci, *Streptococcus salivarius* strain SD-1 and *Streptococcus mitis* strain SD-9, which was isolated from human dental plaque, with the following results.

1. Extracellular polysaccharide by *Streptococcus salivarius* strain SD-1 is recovered mostly in Fraction I- and II-45% of the present purification procedure, leaving trace amount in Fraction I- and II-70%.
2. The dextran is the major polysaccharides in Fraction I- and II-45% of both strains with minor amounts of levan.
3. The Fraction I- and II-45% of both strains contain glucose and fructose, which its 70% of the same fractions glucose only.
4. It appears that the glycerol was the major end product of the Smith degradation of the Fraction I- 45% of both strains.

서 론

Dental plaque에서 분리한 구강미생물은 sucrose를 기질로 공급하였을때 많은 양의 다당류(多糖類)를 합성할수있다는 보고가 있다 (Oeskov와 Pulson, 1931; Niven, Smiley와 Sherman, 1941; Snyder et al.,

1955; Manly, 1951; Wood와 Critchley, 1966; Gibbons et al., 1966; Donohue, Kestenbaum과 King, 1966; Guggenheim과 Schroeder, 1967). 세균에 의해 생산된 다당류는 dental plaque의 탄수화물의 존재를 양성반응으로 나타내게 하며 이 다당류의 성장에 관하여 많은 학자들의 관심을 끌게 하였다.

* 이 논문은 문교부연구조성비로 일부를 충당하였음

5.0% sucrose broth에서 혈청학적으로 HS-group에 속하는 *Streptococcus mutants*에 의해 합성되는 세포외다당류는 dextrans이고 (Clarke, 1924; Carlsson, 1967), Guggenheim, 1967), 같은 균주이나 혈청학적으로 FA-group에 속하는 Streptococci는 상기와 같은 동일한 조건하에서 합성되면 dextran과 levan을 생산한다는 보고가 있다 (Wood와 Critchley, 1966; Guggenheim, 1968).

또한 구강내에 상주하는 streptococci에 의해 액체배지에서 합성된 다당류의 불용성 분획을 화학적분석방법 및 전자현미경을 이용하여 분리하였다는 보고도 있다 (Guggenheim과 Schroeder, 1967).

본 실험은 저자가 dental plaque에서 분리한 2종의 Streptococci 유사균, 즉 *Streptococcus salivarius*

Strain SD-1과 *Streptococcus mitis* Strain SD-9에 의해 5% sucrose를 함유하는 brain-heart infusion배지에서 합성한 세포외다당류를 분리하고 화학적 성상을 구명하여 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1) 균주 :

저자가 dental plaque에서 분리한 2종의 Streptococci 유사균, 즉 *Streptococcus salivarius* 유사균 Strain SD-1 과 *Streptococcus mitis* 유사균 Strain SD-9를 사용하였다.

이들 균주는 5.0% sucrose를 함유하는 brain-heart infusion 배지에 일주일씩 계대하여 유지시켰다.

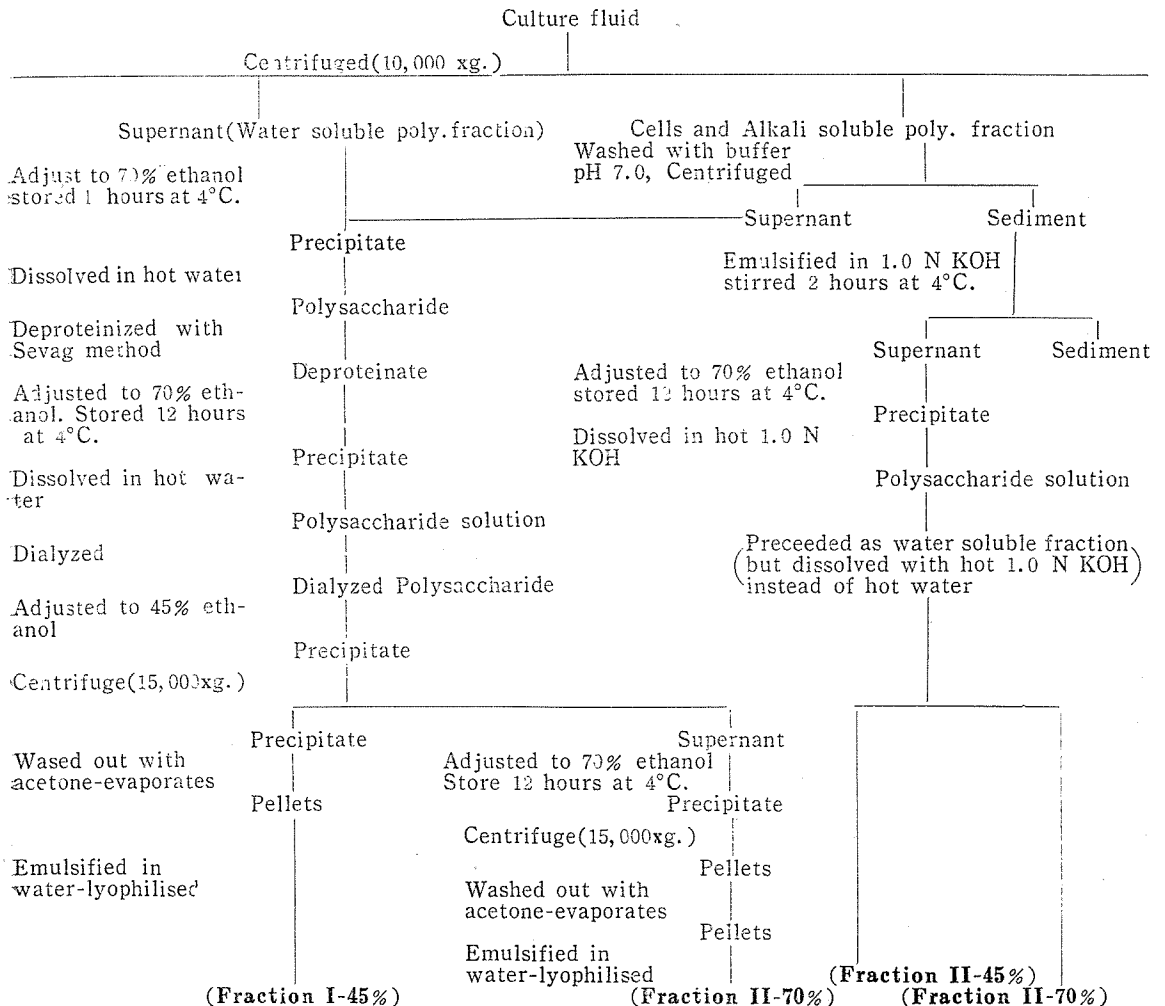


Fig. 1: Procedure of isolation of extracellular polysaccharides.

2) 배양조건 :

5.0% sucrose가 함유한 brain-heart infusion을 사용하였으며 37°C에서 24시간 배양하였다. 그후 다당류를 분리하기 전까지는 4°C에 보관하였다.

3) 다당류의 분리 :

다당류의 분리방법은 Fig.1에 도표로 표시한것과 같이 대부분 Guggenheim과 Schroeder법(1967)에 의해 시행하였다.

간략하게 기술하면 배양균을 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 제거하고 수용성분획(water soluble fraction)을 ethanol의 최종농도가 70%되게 조정하여 얻었다.

Water insoluble fraction과 세균은 2 N KOH에 4°C에서 2시간동안 유탕시키고 12,000×g에 15분간 원심분리하여 alkali성상청액을 얻었다.

alkali성상청용액을 ethanol의 최종농도가 70%되게 조정하여 침전물을 얻었다.

그후 water와 alkali soluble fraction에서 얻은 각 침전물은 소량의 증류수와 KOH에 용해시키어 Sevag와 Lackman(1938)법에 의해 단백을 제거하였다. 양 fraction에서 얻은 계담백물을 다시 ethanol을 70%로 조정하여 침전물을 얻었고 또 각각 증류수와 KOH에 용해시키어 무기물을 제거키 위하여 4°C에서 12시간동안 투석을 시행하였다.

그후 양 fraction에 최종농도가 45%되게 ethanol을 조정하여 침전물(Fraction I-과 II-45%)을 얻었다. 따라서 이의 상청액을 최종농도가 70%되게 ethanol을 증가시키어 다시 15,000×g에서 15분간 원심분리하여 침전물(Fraction I-과 II-45%)을 얻었다.

이렇게 해서 얻은 다당류 fraction은 70°C에서 진공 건조시키고 P₂O₅가 들어 있는 dessicator에 넣어 보관하였다.

4) 분석방법 :

(1) H₂SO₄분해 :—다당류(5.0 mg)를 밀폐된 시험관에서 2 N H₂SO₄ (1.0 ml, 3 hours)로 분해시키고, 산은 P₂O₅가 들어 있는 진공하에서 증발시키었으며 H₂O로서 세척을 중성이 될때까지 계속하였다.

(2) 총탄수화물량 :—산분해후 각 subfraction의 총탄수화물량은 Dische(1955)방법에 의해 anthrone시약을 사용하여 Spectronic 20으로 비색정량하였다.

(3) Glucose정량 :—각 fraction의 glucose함량은 glucose oxidase법(Hogget, 1957)에 의해 정량하였고 환원당은 Somogyi법(1945)으로, ketohexose는 Roe

(1949)법에 의한 resorcinol을 이용하여 정량하였다.

(4) Thin-layer chromatography:—중화시킨 subfraction의 정성분석을 위해 thin-layer chromatography를 행하였는데 chromatography는 0.1N boric acid에 포화시킨 Kiesel gel G판에 n-butyl alcohol: acetone: water(40:50:10)용매에 전개시키고 sugar는 Waldi(1965)에 의한 silver nitrate로 발색시키었다.

또한 0.02N sodium acetate에 포화시킨 Kiesel gel G의 thin-layer에 ethyl acetate: i-propyl alcohol: water(66:22:11)에 전개시키어 anisaldehyde glacial acetic acid로 발색시키어 전자의 방법과 비교하였다.

그리고 같은조건의 thin-layer판에 표준 sugar와 비교하였다.

(5) Smith degradation(Akher et al., 1952) :—다당류(5.0 mg)을 0.18 M sodium metaperiodate(5.0 ml)에 용해시키고 암소에 24시간 실온에서 저장하였다. 그후 sodium borohydride(20 mg)를 첨가하고 24시간동안 방치하였다. 이에 따라 산화와 환원후에 얻어진 용액을 4°C에서 24시간 투석하고 건조시키었다. 투석에서 얻어진 polyalcohol은 상술한 산분해과정에서 행한 것과 같은 방법으로 분해하여 thin-layer chromatography를 시행하여 최종산물을 추적하였다.

Table I : Yields(mg/100 ml culture medium) from different polysaccharide preparations produced by resembling *Streptococcus salivarius* strain SD-1 and *Streptococcus mitis* strain SD-9 incubated for 24 hours.

Strains	Incubation (hours)	Fraction I		Fraction II	
		45%	70%	45%	70%
SD-1	24	145	Tr	25	Tr
SD-9	24	52	Tr	18	Tr

Tr = Traces

실험 결과

1) 다당류의 수확:

Streptococcus salivarius 유사균, Strain SD-1과 *Streptococcus mitis* 유사균, Strain SD-9의 배양액에서 얻어진 다당류의 함량은 Table I에서 보는 바와같다. 많은 양의 다당류가 *Streptococcus salivarius* 유사균, Strain SD-1의 Fraction I-45%에서 얻어졌다. 또한 *Streptococcus mitis* 유사균, Strain

Table II : Total carbohydrate and monosaccharides of Fraction I -45% isolated from both strains after hydrolysis and neutralization.

Strains	Amounts subjected to hydrolysis		Total carbohydrate (Anthrone method)		Glucose (G. O. -method)		Ketoheptose (Roe method)	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
SD-1	5.0	100	4.65	93	4.10	82	0.05	0.01
SD-9	5.0	100	4.44	89	3.95	79	0.40	0.08
Dextran	5.0	100	5.10	102	4.75	95	0	0

Dextran was used as control.

SD-9,에서는 Fraction II -45% (18 mg)에 비하여 Fraction I -45% (52 mg)에서 비교적 많은양을 얻었다. 각균주의 Fraction I -과 II -70%의 다당류량은 배양액 100 ml에 1 mg 이하를 함유하여 실제로 시료를 모으기가 힘들어 실험을 하기가 어려웠다.

2) 탄수화물함량 :

anthrone법으로 측정 한 두균주에서 분리한 subfraction의 총탄수화물양과 glucose oxidase법으로 측정 한 glucose양은 Table II에서 보는 바와같다.

Fraction II -45%와 Fraction I -과 II -70%의 탄수화물양은 Fraction I -45%에 비해 대단히 미량 함유하여 측정치못하였다.

3) Thin-layer chromatography :

양 균주에서 얻은 각 다당류 fraction을 산분해하여 분리한 monosaccharide는 Table III에서 보는바와같다. Fraction I -과 II -70%는 대단히 미량 (<1mg)함유함으로 분리과정중 최종 원심분리전에 증발시키면 갈색의 절긴잔사가 남게된다. 이잔사(evaporates)를 산분해시키어 chromatography를 행하였다.

양균주에서 얻은 Fraction I -과 II -45%에서 glucose와 fructose가 검출되었고, Fraction I -과 II -70%,

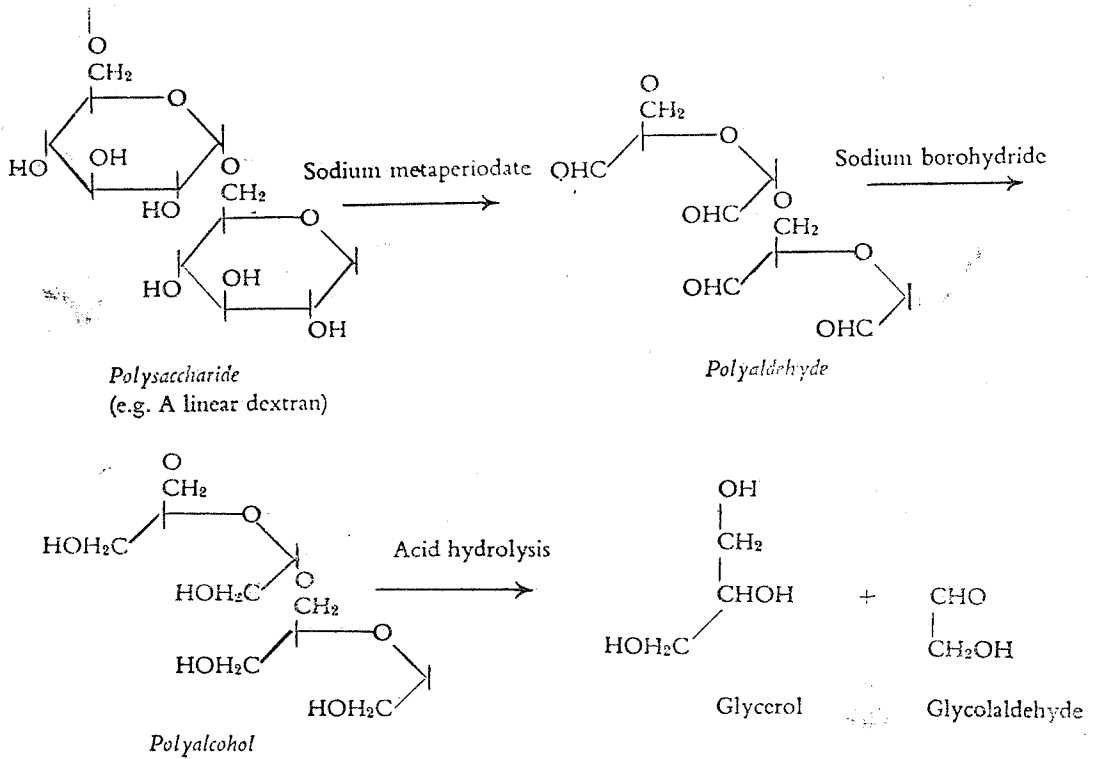


Fig. 2 The Smith degradation of polysaccharides.

Table III : Monosaccharide composition of the different fractions of polysaccharides by Thin-layer chromatography.

Strain	Nature of monosaccharide in							
	Fraction I 45% Evaporates				Fraction II 45% Evaporates			
	Gl	F	Gl	F	Gl	F	Gl	F
SD-1	+++	+	+	-	++	+	+	-
SD-9	++	+	+	-	++	+	+	-

Gl = Glucose + = Small spot
 F = Fructose ++ = Medium spot
 +++ = Large spot

즉 "evaporates"는 glucose만 검출되었다.

그리고 Table II의 결과와 비슷하게 glucose spot가 fructose spot보다 더욱 크게 나타나는것도 관찰할수 있었다.

(4) Smith degradation(Fig. 2) :

양 streptococci 균주의 Fraction I-45%의 구조를 구명키 위하여 이들 다당류의 분해산물을 Akhel et al. 법(1952)으로 시행하였는데 glycerol 이 주요한 최종산물로 thin-layer판에 나타났고 미량의 분해되지 않은 glucose와 spotting결에 약간의 유기질이 남아있는 상을 볼수있었다.

고 찰

세포외다당류는 dental plaque내에 존재하는 세균에 의해 생산이 됨으로 구강미생물에 의한 세포외 다당류 합성은 치아우식 발생에 중요한 인자가 될수있다는 보고는 많이 있다(Niven, Smiley와 Sherman, 1941; Dain, Neal와 Seely, 1956; Carlsson, 1965; Krasse, 1956; Gibbons et al. 1956; van Houte, 1957; Wood와 Critchley, 1966; Gibbons와 Banghart, 1967; Stoppelaar et al. 1957; Guggenheim과 Schroeder, 1937). 이러한 사실로 해서 본 실험에서는 dental plaque streptococci의 배양액에서 세포외다당류의 합성양, 화학적조성 및 그의 성상을 구명하려고 시도하였다.

배양액의 배양조건, 접종시간등이 각 다당류분획의 합성양과 그의 비에 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. 본 실험에서 선택한 24시간내에 5% sucrose를 함유하는 brain-heart infusion 배양액의 Fraction I-45%의 수확은 최고양에 달했다.

Fraction I-과 II-70%는 침전물을 얻기가 힘들어

최종분리과정전에 전체적으로 증발시키어 갈색의 무정형의 잔사를 얻었다.

양 균주의 Fraction I-45%의 총탄수화물양은 Dische(1955)법으로 측정된 결과는 분획된 총양의 89~93%의 범위로 나타났다.

glucose oxidase법으로 측정된 glucose는 약간 적은 비를 나타냈는데 이는 산분해 및 중화시에 시료의 손실과시료의 불완전분해로 일어난것이라 추측할수있다.

Fraction I-45% 분해물의 keto-hexose양은 대단히 적은 양(<1mg)으로 나타났다.

다당류의 주요한 구성성분을 구명키 위하여 세포외다당류를 H₂O와 alkali에 추출하고 ethanol농도에 따라 침전물을 분리하여 thin-layer chromatography로 검출한 결과 glucose가 양균주의 Fraction I-과 II-45%에 주요한 구성성분이고 소량의 fructose만이 증명되었다. 그래서 이들 fraction은 대부분이 polyglucan이고 소량의 polyfructan을 함유하는것 같다.

세포외다당류내의 결합양식을 구명하고 그의 화학구조를 구명키 위하여 Smith degradation(Akher et al. 1952)를 Fraction I-45%에서 시행하였는데 다당류가 기본적인 saccharide linkage를 갖이는 polyol로 분해된것 같다. glycerol이 thin-layer chromatography에서 검출되는 오직 하나의 polyol이라는 사실은 양 균주의 Fraction I-45%의 중요한 glycosidic linkage가 1:6, 1:2-hexopyranoside와 2:6-fructofuranoside형이라고 추측된다.

1:6, 1:2-gluco-pyranoside linkage는 dextran의 특징적인 결합양식이고 2:6-fructofuranoside는 levan에 해당된다고 하였으므로 (Sacey와 Barker, 1960) 양 균주에서 합성된 세포외다당류의 Fraction I-45%는 dextran과 levan이라고 할수있다.

일반적으로 우식성세균은 세포외다당류를 합성할수 있다고 알려져있다 (Keyes, 1950; Fitzgerald와 Keyes, 1961; Gibbons et al., 1966; Gibbons와 Banghart, 1967). 세포외 dextran 형성의 결과로서 우식성 세균의 sucrose broth 배양액은 배양판에 빈번히 움작되는 세균의 gelatinous mass를 형성하는 것으로 알려져있는데, 이는 dextran 형성이 이들 세균에 의해 plaque 형성을 할수있게 한다고 추측하였다(Gibbons et al., 1956).

그래서 일종의 치아우식율시험(Shafer, 1949; Krasse, 1965)에서 sucrose가 높은 빈도의 치아우식율 유발시킨다는것은 치아우식세균에 의해 세포외다당류합성을 증가시키는 능력과 관계가 있으며 따라서 plaque 생성과도 관계가 있는것이다.

본 실험에서 세포외다당류가 sucrose를 첨가한 배지

에서 형성되고 산분해주요산물이 glucose와 fructose라는 사실은 세포외효소인 dextransucrase와 levansucrase에 의해 dextran과 levan이 합성된다는것으로 다시 한번 증명하게 되었다. 더욱이 glycerol이 Smith degradation의 주요종산산물이라는 사실은 1:6, 1:2-hexopyranoside와 2:6-fructofuranoside만이 분해되어 glycerol을 형성할수있다는 가설을 증명하게 되었다.

결 론

본 실험은 dental plaque 에서 분리한 2종의 Streptococcus 유사균, 즉 *Streptococcus salivarius* 유사균, Strain SD-1, 과 *Streptococcus mitis* 유사균, Strain SD-9에 의해 5% sucrose가 첨가된 brain heart infusion 배지에서 합성된 세포외 다당류를 분획 분리하여 화학적조성을 구명하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *Streptococcus salivarius* 유사균, Strain SD-1에 의해 합성된 세포외다당류는 본 실험에서 분리한 방법에 의하면 Fraction I -과 II-45%에서 대부분이 얻어졌고 fraction I -과 II-70%에서는 대단히 미량만을 얻었다.

2. 양균주의 Fracion I -과 II-45%에서 dextran이 주 다당류이고 levan이 소량 함유되었다.

3. 양균주의 Fraction I -과 II-45%의 산 분해물은 glucose와 fructose이고 Fraction I -과 II-70%의 산분해물은 glucose만이 나타났다.

4. 양균주의 Fraction I -45%의 Smith degradation의 주요종산산물은 glycerol로 나타났다.

(본 논문을 완성함에 있어 시종 지도교열하여 주신 은사 김동순 교수님과 이기녕 교수님께 심심한 사의를 표하며 아낌없이 협조하여 주신 구강병리학교실원 및 서울대 의대 생화학교실원 제위에게 감사하는 바이다.

또한 세균분리와 동정에 귀중한 시간을 할애하여 주신 연세대 의대 미생물학교실 고춘명선생님께 아울러 고마움의 뜻을 표한다)

REFERENCES

Akher, M., Hamilton, J.K., Montgomery, R. and Smith, F.: A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. J. amer. chem. Soc. 74:4970, 1952.
 Carlsson, J.: Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. Odont. Revy. 18:55, 1967.

Carlsson, J.: Zooglea-forming streptococci, resembling streptococcus sanguis, isolated from dental plaque in man. Odoat. Revy. 13:348, 1935.
 Chung, T.Y.: Dental plaque bacterial flora and its dextransucrase activity. Korean dent. Ass. 9: 807, 1971.
 Clarke, J.K.: Cited by Bowen, H.W.: Dental caries in monkeys. Advances in Oral Biology. Vol. II. Academic prcss, New York, 1966.
 Dain, J.A., Neal, K.L. and Seely, W.H.: The effect of carbon dioxide on polysaccharide production by streptococcus bovis. J. Bact. 72:204, 1956.
 Dische, Z.: New color reactions for determination of polysaccharides. In Glick, D., (ed): Methods of biochemical analysis. vol. 2, New York, Interscience Pub. Inc. p.325. 1955.
 Donhue, J.J., Kestenbaum, R.C. and King, W. J.: Abstr. 58. 14th meeting. Internat. Ass. dent, Res., U.S.A. 1963.
 Fitzgerald, R. J. and Keyes, P.H.: Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J. am. dent. Ass. dent. Cosmos 61 : 9, 1930.
 Gibbons, R.J., Berman, K.S., Knoetiner, P. and Kapsimalis, B.: Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. Archs oral Biol. 11:549, 1936.
 Gibbons, R.J. and Banghart, S.B.: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. Archs oral Biol. 1:11, 1957.
 Guggenheim, B.: Streptococci of dental plaques. Caries Res. 2:147, 1968.
 Guggenheim, B. and Schroeder, H. E.: Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. Helv. odont. Acta 11:131, 1957.
 Huggett, A.St.G. and Nixon, D. A.: Enzymic determination of blood glucose. Biochem. J. 66: 12P, 1957.
 Keyes, P.H.: Recent advances in dental caries research. Bacterial findings and biological implications. Internat. dent. J. 12:443, 1960.

- Krasse, B.: The effect of caries-inducing streptococci in hamsters fed diets with sucrose or glucose. *Archs oral Biol.* 10:223, 1965.
- Krasse, B.: Human streptococci and experimental caries in hamsters. *Archs oral Biol.* 11: 429, 1966.
- Manly, R.S.: Retention of carbohydrate from sugar solutions by salivary sediment. *J. dent. Res.* 40:379, 1961.
- Niven, C.F., Smiley, K.L. and Sherman, J.M.: The polysaccharide synthesized by streptococcus salivarius and streptococcus bovis. *J. biol. Chem.* 140:105, 1941.
- Oerskov, J. und Poulson, K.A.: Das fäufige Vorkommen von Streptokokken in menschlichen Rachen, die bei Wachstum auf der Oberfläche fester, Saccharose (oder Raffinose) enthaltender Substrate exzessiv Polysaccharid produzieren. *Zentr. Bakt. Parasitenk.* 120: 125, 1931.
- Roe, J.H., Epstein, J.H. and Goldstein, N.P.: *J. biol. Chem.* 178:839, 1949.
- Stacey, M. and Barker, S.A.: *Polysaccharides of micro-organisms.* Clarendon Press, Oxford. p.140. 1960.
- Sevag, M.G. and Lackman, D.B.: Streptococcal nucleoproteins. *J. biol. Chem.* 124:425, 1938.
- Shafer, W. G.: The caries-producing capacity of starch, glucose, and sucrose diets in the Syrian hamster. *Science, N.Y.* 110:143, 1949.
- Snyder, M.L., Hackedorn, H.M., Martin, D.O. and Johnson, D.D.: The synthesis of mucinous polysaccharide from sucrose by oral bacteria. *J. dent. Res.* 34:368, 1955.
- Somogyi, M.: A new reagent for determination of sugars. *J. biol. Chem.* 160:61, 1945.
- de Stoppeelaar, J.D., van Houte, J. and de Moor, C.E.: The presence of dextran forming bacteria, resembling streptococcus bovis and streptococcus sanguis, in human dental plaque. *Archs oral Biol.* 12:1199, 1967.
- Waldi, D.: Spray reagents for thin-layer chromatography; in thin-layer chromatography. E. Stahl, ed. Springer-Verlag, Berlin, New York. p. 483, 1965.
- Wood, J. M. and Critchley, P.: The soluble carbohydrates of the plaque matrix. *Abstr.* 81. 14th meeting. *Internat. Ass. dent. Res.* 1966.
- Wood, J.M. and Critchley, P.: The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic streptococcus. *Archs oral Biol.* 11:1039, 1966.
- van Houte, J.: Iodophilic polysaccharide in bacteria from the dental plaque. Thesis, University of Utrecht, The Netherlands. 1967