

Streptococcus mutans 의 Plaque 형성에 미치는 Dextranase 와 Glucose-oxidase 의 영향

김윤석 · 안재현* · 정광례* · 이기봉

럭키 HG · CM 연구소 미생물연구실

*구강제품연구실

Effect of dextranase and glucose-oxidase on the formation of plaque by *Streptococcus mutans*

Kim, Yun-Seog, Jae-Hyun Ahn*, Kwang Lai Jeong* and Kee-Bung Rhee

Department of Microbiology, Department of Oral Care Products*,

Lucky Household-goods & Cosmetics Research Institute, Cneong Ju, Korea

ABSTRACT: Dextranase and glucose-oxidase was investigated as an anti-plaque agent and a component of dentifrice. *In vitro* synthesis of the water-insoluble glucan was decreased with increasing amount of dextranase and glucose-oxidase. Dextranase was effective on the decrease and degradation of plaque even at the low concentration. Glucose-oxidase was effective on the decrease of viable *S. mutans*, and the formation of plaque decreased. But it is not effective on the degradation of plaque. As a research for addition of enzyme to the dentifrice components, we formulated the Model Dentifrice for stabilization of enzyme. At the Model Dentifrice, we confirmed the stability of enzyme by evaluation of activity for a long time.

KEY WORDS □ *Streptococcus mutans*, Dextranase, Glucose-oxidase

Streptococcus mutans 는 인간이나 실험동물에서 dental caries 의 발생원인 plaque 를 형성하는 bacteria 로 널리 알려져 있다. 이러한 *S. mutans* 의 치아 표면에 부착하는 능력과 산생성 능력이 미생물의 cariogenicity (Harno 등, 1982 ; 최, 1984) 를 결정한다.

S. mutans 는 sucrose 를 기질로 하여 Glucosyltransferase (GTase) 와 Fructosyltransferase (FTase) 에 의해 각각 glucan 과 fructan (Walker 등, 1984 ; Carson 등, 1969) 을 생성한다. 이때 GTase 에 의해 합성되는 water-insoluble glucan 이 cell 의 치아 표면의 축적에 참여한다. 이러한 축적과정에서 합성된 glucan 이 타액과 섞이며 치아 표면에 부착하는 과정은 두 단계로 나뉘는데 초기에는 cell-to-pellicle adherence 가 일어나고, 이어서 cell-to-cell adherence 가 이루

어진다 (Toda 등, 1987 ; Hamada 등, 1980, 1985 ; Hidehiko 등, 1973). 이러한 cell 의 부착은 hydrogen bond, hydrophobic bond, lectin-like interaction 등으로 이루어진다. 이 plaque 내부는 혐기적 조건이 되어 *Lactobacillus* (Ellen 등, 1985) 등의 혐기성 미생물들이 번식하여 이에 의해 산이 생성되고 형성된 산은 치아를 부식시키는데 이때 plaque 는 외부에서 작용하는 타액의 산 중화능력을 차단시킨다.

GTase 와 cell 의 결합위치와 관련하여 serotype d, g 의 GTase 는 cell-bound glucan 에 결합위치를 갖고, serotype C 의 경우에는 lipoteichoic acid, cell surface protein, cell-associated glucan 에 결합위치를 갖는다 (Hamada 등, 1985).

S. mutans 에 의한 water-insoluble glucan 의

합성과 이에 의한 cell adherence 를 억제하는 방법으로 Ribocitrin(Okami 등, 1982) 등을 이용하는 방법, Sugar 유도체를 이용하는 방법 (Balekjian 등, 1980; Imai 등, 1984; Nagada 등, 1982), Chlorohexidine 과 같은 살균제를 이용하는 방법 (Hunter 등, 1987), Urea 등의 pH 상승제를 이용하는 방법 (Pearce 등; 1984), 효소를 이용하는 방법 (Fitzgerald 등; 1968) 등이 연구되고 있다. 한편 구강위생에 있어 필수적으로 사용되는 dentifrice 의 경우 이러한 억제제의 응용이 다각적으로 검토되고 있는데 불소 (Schaeken 등, 1968)를 이용하는 dentifrice 만이 널리 상용되고 있다. 이러한 것은 구강위생용품의 원료로서 상기 억제제들의 응용에 관한 연구가 아직 미흡한 상태이기 때문이다. 그러므로 본 연구에서는 glucan 의 α -1,6-결합을 분해하는 효소인 dextranase (EC 3.2.1.11)와 glucose 를 이용하여 H₂O₂를 생성함으로써 살균작용을 나타내는 glucose-oxidase (EC 1.1.3.4)를 plaque 형성 원인균의 제거 및 water-insoluble glucan 형성억제와 분해에 이용하며 (Pellio 등, 1986), 보다 나은 효소의 안정성과 효과적인 이용을 위해 dentifrice 성분으로서의 응용을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

사용균주는 *Streptococcus mutans* NCTC 10449 로 serotype C 이며 Mitis Salivarius agar 에 계대 배양 후 4°C 에서 보관하며 사용하였고, stock 균주는 Heart Infusion broth (HI broth; Difco) 에 배양한 세균에 glycerin 과 Dimethylsulfoxide 를 첨가하여 -20°C 에서 보관하였다. Mitis Salivarius agar 상의 균은 Brain Heart Infusion broth (BHI broth; Difco) 에서 약 2 일간 배양시킨 후 점종액으로 사용하였고, plaque 형성시에는 HI broth 에 sucrose 를 첨가하여 배양시켰다. 배양에 사용한 CO₂ incubator (Queue System, Model No.2720) 는 N₂:CO₂=95:5 로 조정하였다.

Enzymes

Dextranase 는 *Chaetomium erraticum* 에서 분리한 것으로 optimum temperature 와 pH 는 각각 55-55°C 와 5.5-6.5 이다. Glucose-oxidase 는 *Aspergillus niger* 로부터 분리한 것을 이용하였

다. 각 효소는 Amano (Amano phamaceutical Co., Ltd.) 로부터 공급받아 실험에 사용하였다.

Plaque 형성 억제

HI broth 에 효소와 sucrose 를 농도별로 첨가한 배지에 *S. mutans* 배양액 (6×10⁶ CFU/ml) 을 2% 첨가하여 CO₂ incubator 에서 용기를 30°로 기울여 16 시간을 배양한 후 배지액과 미부착 균체를 제거하고 기벽에 붙어있는 *in vitro* 상의 plaque 를 0.5 N NaOH 에 녹여 550 nm 에서 탁도를 측정하였다. 이를 다시 원심분리한 후 균체를 제거한 액을 Anthrone method (김 등, 1984) 로서 glucose 를 단위로 당정량하였다.

Plaque 분해

S. mutans 를 sucrose 를 1% 첨가한 HI broth 에서 용기를 30°로 기울여 배양한 후 배지액과 미부착 균체를 제거하고 부착된 plaque 에 효소를 각 농도별로 첨가한 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 를 첨가하여 역시 30°로 기울여 37°C 에서 30 분간 반응시키고 plaque 형성억제제와 동일한 방법으로 반응 후 남아있는 plaque 양을 측정하였다.

Soluble glucan 의 분해

Dextran T-70 (MW; 70,000, 동경화성공업(주)) 을 이용하여 Dextran T-70 의 농도별 용액에 dextranase 와 glucose-oxidase 를 각각 첨가하여 37°C 에서 30 분간 반응시키고 modified Benedict method (김 등, 1984) 로서 환원당을 정량하였다.

Dentifrice 성분과의 compatibility

Dentifrice 의 주요성분은 연마제, 결합제, 보습제, 기포제 등으로 나뉜다. 본 실험에서는 연마제로서 Dicalcium phosphate Dihydrate (DCPD), Alumina, Silica 를 사용하였고 결합제로는 Carboxyl Methyl Cellulose (CMC), Carrageenan, Xantan-gum 을 사용하였고, 보습제로는 Sorbitol, Glycerine, Propylene-glycol, Polyethyleneglycol-300 을 사용하였으며, 기포제로는 Polyoxyethylene-Polyoxypropylene-Copolymer (POE-POP-Copolymer), Sodium Lauryl Sulfate (SLS) 를 사용하였다. 이외에도 첨가성분인 Fluoride 에 있어 Sodium Mono Fluoro Phosphate (SMFP) 와 NaF 를 사용하였다. 이 원료와 효소의 혼합액에서 100 일간 효소활성의 변화를 관찰하였고, 각 원료에 대한 활성감소의 반감기를 통하여 비교하였다.

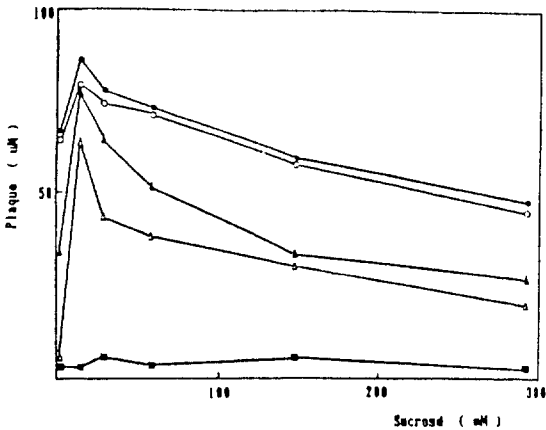


Fig. 1. Effect of dextranase on the production of plaque by *Streptococcus* mutants NCTC 10449.
 ●, No Dextranase; ○, 10 u/ml; ▲, 100 u/ml; △, 1,000 u/ml; ■, 10,000 u/ml.

결과 및 고찰

Dextranase 에 의한 plaque 형성 억제

Fig.1은 sucrose 농도변화에 따른 dextranase의 plaque 형성억제효과를 측정된 것이다. Dextranase는 각각 10,000 u/ml, 1,000 u/ml, 100 u/ml, 10 u/ml을 사용하였는데 10,000 u/ml에서는 거의 plaque의 형성을 거의 100% 억제하였고, 100 u/ml 이상의 농도에서 효과적으로 plaque 형성을 억제 할 수 있었다(Fitzgerald 등, 1968; Guggenheim 등, 1967). 또한 plaque 형성에 참여하지 않은 water-insoluble glucan 중 dextranase에 의해 soluble한 형태로 전환된 것이외에 부분분해 등으로 기벽에 느슨하게 붙어 있는 것이 배양액 제거시에 떨어져 나옴으로써 실제 plaque 양이 감소가 되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 dextranase의 작용하에서 생성된 water-insoluble glucan이 정상적으로 형성된 것에 비해 α -1,3-결합의 비율이 높고 부착능력이 매우 떨어진다는 보고(Hamada 등, 1985)와 일치하는 것이었다.

Dextranase 에 의한 plaque와 soluble glucan의 분해

Dextranase는 glucan 중의 α -1,6-결합을 분해시킨다. 그러므로 α -1,3-결합의 비율이 매우 높은 water-insoluble glucan의 경우 주로 α -1,6-결합으로 이루어진 soluble glucan보다 분해율이 매우 떨어진다는(Hamada 등, 1985). Fig.2에서

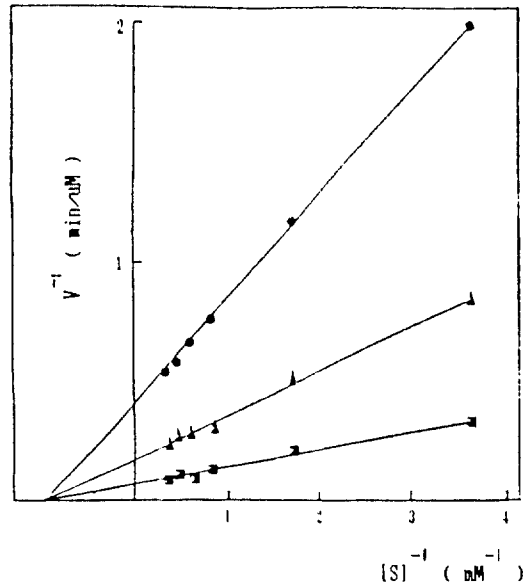


Fig. 2. Lineweaver-Burk Plotes of dextranase on the degradation of plaque.
 ●, 100 u/ml; ▲, 1,000 u/ml; ■, 10,000 u/ml.

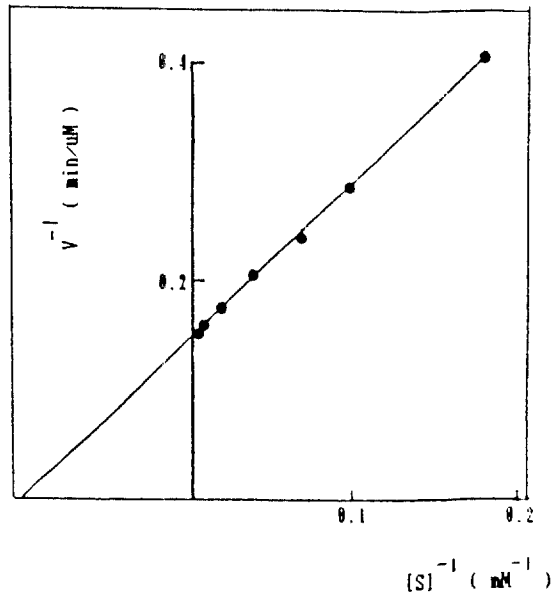


Fig. 3. Lineweaver-Burk Plotes of dextranase (10 u/ml) on the degradation of Water-Soluble Glucan. (Dextran-T-70, MW: 70,000)

와 같이 soluble glucan의 경우 dextranase 10 u/ml 첨가시 6.7 uM/min의 분해효과가 나타나는 반면 plaque에서는 10,000 u/ml, 1,000 u/ml, 100 u/ml 첨가시에 각각 2.5 M/min, 1.05 uM/

min, 0.475 μ M/min 의 분해속도가 나타났다. 이와 같이 plaque 의 분해시에는 cross-link, branching, subbranching 등으로 효소의 결합이 이루어지기가 어렵기 때문에 형성 억제시보다 효과가

떨어지는 것으로 보고되고 있다(Guggenheim 등, 1968; Bowen 등, 1968). 그러나 이러한 plaque 분해능은 임상적인 적용에서 상당히 효과적인 것으로 나타나고 있다(Fitzgerald 등, 1968).

Table 1. Effect of glucose-oxidase and dextranase on the production and degradation of plaque by *S. mutans*

Agent	Production of plaque				Degradation of plaque	
	* Total Amount of cell	Relative growth (%)	* Adherent cell	Relative Adherence (%)	* Adherent cell	Relative Adherence (%)
None	0.9	100	0.29	100	1.5	100
GOD(40u/ml)	0.05	6	0.02	9	1.12	75
GOD(30u/ml)	0.07	8	0.03	12	1.23	82
GOD(20u/ml)	0.08	9	0.04	15	1.35	90
GOD(10u/ml)	0.15	17	0.1	35	1.45	97
DN(10,000u/ml)	0.73	81	0.02	7	0.33	22
DN(1,000u/ml)	0.77	86	0.16	55	0.84	56
DN(100u/ml)	0.75	84	0.23	82	1.11	74
DN(10u/ml)	0.86	95	0.27	95	1.38	92

GOD: Glucose oxidase

DN: Dextranase

*Optical density at 550nm in 0.5N NaOH

Table 2. Results of dextranase and glucose-oxidase compatibility test to main components of dentifrice

Group	Main components	Dose (%)	Half life of Dextranase (Days)	Half life of Glucose-oxidase (Days)
Abrasives	DCPD	52.08	54.7	25.6
	Alumina	52.08	7.7	< 10
	Silica	20.83	24.9	< 10
Humectants	Glycerine	31.25	62.2	16.2
	Sorbitol	31.25	243.8	21.7
	PEG 300	31.25	87.8	< 10
	PG	31.25	65.1	< 10
Foaming Agents	SLS	2.08	< 10	< 10
	POE-POP-Copolyme	2.08	43.2	10.7
Binder	CMC	1.04	82.8	38.6
	Carrageenan	1.04	79.3	48.4
	Xanthan-Gum	1.04	42.1	28.4
Fluoride	NaF	0.24	94.0	35.8
	SMFP	0.80	103.7	32.2
Control	Deionized	—	39.9	19.1
	Water			

1) DCPD: Dicalcium Phosphate Dihydrate, 2) PEG 300: Polyethylene Glycol 300, 3) PG: Propylene-Glycol, 4) SLS: Sodium Lauryl Sulfate, 5) POE-POP-Copolymer: Polyoxyethylene-Polyoxypropylene-Copolymer, 6) CMC: Carboxy Methyl Cellulose, 7) NaF: Sodium Fluoride, 8) SMFP: Sodium Monofluorophosphate, 9) NC: Non-Calculable

Glucose-oxidase 에 의한 plaque 형성억제와 plaque 분해

Glucose-oxidase 를 *S. mutans* 배양시에 첨가하였을 경우 효과적인 균 성장 억제작용으로 인해 plaque 의 감소가 있음을 확인하였다(Afeshth 등, 1983; Rotgans 등, 1979). Table 1 에서와 같이 glucose-oxidase 는 viable cell 의 감소에 있어 상당한 효과가 있었다. Glucose-oxidase 20 u/mI 이상에서는 균의 증식이 억제되어 plaque 양도 20% 이하로 감소되었다. 그러나 plaque 의 분해에 있어 이러한 농도에서는 미약한 효과만이 나타나고, 40 u/mI 이상에서만 어느 정도의 분해 효과를 기대할 수 있으나 이 농도에서는 균의 성장이 거의 없는 상태이다. 이러한 glucose-oxidase 를 dextranase 를 동시에 사용하였을 경우 각각을 단독으로 사용하였을 경우보다 dextranase 에 의해 glucose-oxidase 의 기질이 생성된다는 면에서 낮은 농도에서도 보다 증가된 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다(Pellico, 1968).

Dentifrice 성분과의 compatibility

각 dentifrice 성분과 Model Dentifrice 에서의 activity 변화를 activity 반감기로서 Table 2 에 나타내었다.

각 성분중 습윤제의 경우 Glycerine 과 Sorbitol 이 dextranase 의 안정화에 도움이 되는 것으로 나타났다(Charles 등, 1977). 그러나 기포제 성분은 효소안정성에 도움이 되지 못하며 SLS 의 경우 오히려 안정성을 떨어뜨리는 것으로 나타났다. Table 3 은 각 성분이 효소의 안정화에 대한 기여도와 dentifrice 의 성상을 고려하여 구

Table 3. Components of Model Dentifrice

Component	Amount(%)
DCPD	42.0
Alumina	5.0
Glycerine	10.0
Sorbitol	20.0
Carrageenan	1.0
SLS	1.5
POE-POP-copolymer	1.0
SMFP	0.76
Additives	trace

1) DCPD: Dicalcium phosphate dihydrate

2) SLS: Sodium lauryl sulfate

3) SMFP: Sodium monofluorophosphate

성된 Model Dentifrice 의 조성이다.

이러한 Model Dentifrice 에 각 효소를 첨가하여 활성의 변화를 관찰한 결과 dextranase 의 경우 938.7 일의 반감기를 나타냈고, glucose-oxidase 의 경우 186.2 일의 반감기를 나타내었다. 이러한 결과로 각 단일 원료에 첨가시보다 매우 안정성이 증가된 것을 확인하였다. 이러한 Model Dentifrice 에서의 높은 안정성은 각 dentifrice 성분의 상호작용에 의한 것으로 사료된다. 그러므로 앞으로는 이러한 안정제에 의한 효소의 안정성을 보다 높이는 방법이 연구되어져야겠다. 이상의 결과로서 효소는 dentifrice 내에서 매우 안정한 상태로 plaque 형성억제와 분해에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

Dextranase 와 glucose-oxidase 의 항치아우식 인자로서의 효과와 dentifrice 성분으로서의 이용 가능성을 검토하였다. Water-insoluble glucan 에 의한 plaque 의 형성은 dextranase 와 glucose-oxidase 를 사용함으로써 억제할 수 있었다. Dextranase 의 경우 낮은 농도에서도 plaque 의 형성억제와 분해에 매우 효과적이었다. Glucose-oxidase 의 경우 살균작용에 의해 생균수를 줄임으로써 plaque 의 형성억제에는 효과적이었으나 분해작용은 미약하였다. Dentifrice 의 각 성분에 대한 compatibility test 를 통해 효소의 안정화를 위한 Model Dentifrice 를 구성하였고, Model Dentifrice 에서의 activity 변화를 관찰한 결과 안정성이 오랫동안 유지됨을 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구에 사용된 균주를 제공해 주신 서울대학교 치과대학 최선진 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

1. Afeshth, J. and G. Rolla, 1983. Clinical experiments with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase. *Caries Res.* **17**, 472-475.

2. **Balekjian, A.Y., D.W. Turner, W.R. Cotton and M.S. Guidry**, 1980. The inhibitory effects of hydrolytic products of Starch on *in vitro* colonization by *Streptococcus mutans*. *J. Den. Res.* **59**(12), 2076-2079.
3. **Bowen, W.H.**, 1968. Effects of dextranase on cariogenic and non-cariogenic dextrans. *Brit. Dent. J.* **124**, 347-349.
4. **Calson, J., E. Newbrun and B. Crass**, 1969. Purification and properties of Dextranase from *Streptococcus sanguis*. *Archs. Oral. Biol.* **14**, 469-478.
5. **최선진**, 1984. 사람의 치아우식 병인으로서의 세균. *대한치과의사협회지*. **22**(4), 273-275.
6. **Ellen, R.P., D.W. Banting and E.D. Filler**, 1985. *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* dection in the assesment of dental root surface Caries Risk. *J. Den. Res.* **64**(10), 1245-1249.
7. **Fitzgerald, R.J., P.H. Keyes, T.H. Stoudt and D.H. Spinnell**, 1968. The effects of a dextranase preparation on plaque and caries in hamster, a preliminary report. *J. Amer. Dent. Ass.* **76**, 301-304.
8. **Gray, C.J. and Catherine M. Livinstone**, 1977. Properties of enzymes immobilized by the diazotized m-Diaminobenzene method. *Biotechnology and Bioengineering*. **19**, 349-364.
9. **Guggenheim, B.**, 1968. *Streptococci* of dental plaques. *Carise Res.* **2**, 147-163.
10. **Guggenheim, B. and H.E. Schroeder**, 1967. Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic *Streptococci*. *Helv. Odont. Acta.* **11**, 131-152.
11. **Hamada, S., M.M. Suzane, K. Hiroshi and J.R. McGhee**, 1985. Molecular Microbiology and Immunobiology of *Streptococcus mutans*. ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER. International Conference "Cellular, Molecular and Clinical Aspects of *Streptococcus mutans*". USA.
12. **Hamada, S. and T. Mituso**, 1980. Interaction of Glucosyltransferase from *Sireptococcus mutans* with various glucans. *J. Gen. Microb.* **116**, 51-59
13. **Harno, S., N. Yoshio and I. Maskuzu**, 1982. Cariogenicity and some properties of Laboratory *Streptococcus mutans* strains. *일본구강위생학회잡지*. **32**(1), 17-23
14. **Hunter, L. and M. Addy**, 1987. Chlorohexidine gluconate mouthwash in the management minor aphthous ulceration. *Br. Dent. Jor.* **162**, 106.
15. **Imai, S. and T. Nisizawa**, 1984. Screening of sugar inhibitory against Sucrose-dependent synthesis and adherence of insoluble glucan production by *Streptococcus mutans*. *J. Den. Res.*, **63**(11), 1293-1297
16. **김대봉, 이근배, 주충노, 김동훈, 이상섭, 김윤수, 박인원, 이세영**, 1984. 실험생화학. 한국생화학회 교재편찬위원회.
17. **Nagada, K. and T. Akira**, 1982. The effects of daily mouth rinsing with Galactose on dental plaque formation. *일본구강위생학회잡지*. **32**(4), 104-107
18. **Okami, Y., O. Takasi and O. Yoshiro**, 1982. The structure of Ribocitrin and its structure-activity relationship in the inhibition of dextranase of *Streptococcus mutans* E49. *Agri. Biol. Chem.* **46**(10), 2449-2456.
19. **Pearce, E.I.F. and E.M. Hancock**, 1984. The ureolitic microflora of immature dental plaque before and after rinsing with a urea-based mineralizing solution. *J. Den. Res.* **63**(8), 1037-1039.
20. **Pellico, M.A. and Robert E. Montgomery**, 1986. DI-ENZYME DENTIFRICE. United State Patent 4,578,265.
21. **Rotgans, J. and H. Hogendoorn**, 1979. The effects of toothbrushing with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase on plaque accumulation and gingivais. *Caries Res.* **13**, 144-149.
22. **Shaeken, M.J.M., M.H.De Jong and J.S. Van Der Hoven**, 1986. Effects of highly concentrated Stannous Fluoride and Chlorohexidine regimes on human Dental Plaque Flora *J. Den. Res.* **56**(1), 57-61.
23. **Toda, Y., I. Moro, T. Koga and S. Hamada**, 1987. Ultrastructure of extracellular polysaccharide produced by serotype c *Streptococcus mutans*. *J. Den. Res.* **66**(8), 1364-1369.

(Received July 21, 1989)