

*Streptomyces*의 mutanase 유도에 관한 연구

전남대학교 치과대학 소아치과학교실 및 미생물학교실*

양규호·정진*

Abstract

A STUDY ABOUT THE INDUCTION OF MUTANASE FROM STREPTOMYCES

Kyu-Ho Yang, D. D. S., M. S. D., Ph. D. Jin Chung, D. D. S., M. S. D.*

Department of Pediatric, Department of Microbiology,
College of Dentistry, Chonnam National University*

The mutan containing α -1,3 bond is an insoluble portion of glucan which is the main component of dental plaque. The secretion of mutanase was assessed with mutan-digesting *Streptomyces* isolated from soil, and the factors affecting its activity was studied, obtaining the following result.

Mutan-digesting *Streptomyces* was identified as *Streptomyces exfoliatus* by its characteristics. The effect of dextranase was identified on the media containing blue dextran. A clear zone was produced by *Streptomyces exfoliatus* on the media containing blue mutan, so showing the secretion of mutanase. A clear zone was significantly produced on the media overlaid with agar containing blue mutan. A clear zone was produced at 2 days after the inoculation of *Streptomyces exfoliatus* on the media containing below a concentration of 0.025% glucose, at 3 days on the media containing 0.05% glucose, and at 4 days on the media containing 0.1% glucose. Mutan-digestion wasn't appeared early by adding other carbohydrates.

The higher concentration of peptone, the later appearance of clear zone was on the media containing below a concentration of 0.1% peptone.

These results indicated that the secretion of mutanase was identified from mutan-digesting *Streptomyces* on the media containing blue mutan, and a clear zone was appeared lately on the media containing higher amount of glucose.

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

I. 서 론

치의학의 눈부신 발달에도 불구하고 구강내 중요 질환인 치아우식증(충치)과 치주질환은 아직도 많이 발생하고 있으며, 특히 소아에서는 치아우식증이 가장 중요한 질환이 되고 있다. 이러한 치아우식증의 발생에 있어서 중요한 역할을 하는 치태는 세균과 세균간 물질로 구성되어 있다¹⁻³⁾. 치태에 존재하는 세균에 의하여 자당(sucrose)으로 부터 합성되는 glucan은 치아우식증의 발생에 있어서 초기에 세균의 응괴와 치태 형성에 관여할 뿐만 아니라 형성된 치태의 기질로 작용하고 있다. 그 외에도 glucan은 치아우식증의 발생에 있어서 독성인자로 작용하면서⁴⁾, 점차 치아우식증이 진전됨에 따라 그 형태가 변화하게 된다^{5,6)}.

Glucan은 수용성인 dextran과 비수용성인 mutan으로 구분할 수 있으며, 이 중에서 mutan이 치태의 형성과 치아우식증 발생에 있어서 더 중요한 성분이다. Mutan은 주로 *Streptococcus mutans*에 의해 합성되고 있다. Yakushiji 등⁷⁾은 *Streptococcus mutans*로부터 형성된 glucan은 single- 또는 double-stranded fibrils로 구성되어 있고, single-stranded fibrils는 globule 구조로 되어 있다고 보고하였다. 또한 single-stranded fibrils는 dextranase(α -1,6-glucan hydrolase, EC 3.2.1.11)에 의하여 분해가 되나 double-stranded fibrils는 분해되지 않는다고 하였다. Double-stranded fibrils는 mutan으로서 dextran의 α -1,6 결합을 분해하는 dextranase에 대해 저항성을 보이는 α -1,3 결합을 갖고 있는 glucan이다.

치아 표면에 형성되는 세균의 군락은 치아우식증 발생에 영향을 미친다. 따라서 세균이 치아에 부착하여 군락을 형성하는 것을 억제함으로써 치태의 형성을 억제할 수 있게 된다. 이렇게 치태를 억제하기 위하여 미생물이 분비하는 효소를 이용하는 연구가 그동안 시도되어 왔다⁸⁻¹²⁾.

Waksman에 의하여 *Streptomyces griseus*로부터 streptomycin이 추출된 이래¹³⁾, 방선균류(*Actinomyces*)에 대한 연구가 계속되고 있다.

현재까지 방선균류로 부터 발견된 항생물질은 500종 이상으로 항생물질의 약 58% 이상을 차지하며, 이 중 82% 이상이 방선균류의 *Streptomyces* 속에 의해 만들어지고 있다¹⁴⁾. 또한 항암제, 효소저해제, 면역조절물질 등 방선균류를 이용한 생체활성물질이 계속 개발되고 있어 방선균류의 중요성이 강조되고 있다. 치태를 분해하는 효소도 방선균류로 부터 분리하려는 시도가 있었다^{15,16)}. 그러나 분리된 효소들은 주로 α -1,6 결합으로 이루어진 dextran에 작용하는 dextranase로서 이것들을 정제하여 치태 형성을 억제하려는 많은 동물실험이 시행되었으나 그 효과에 대해서는 많은 논란이 있어 왔으며, 인체를 대상으로한 실험에서는 큰 효과를 보지 못하였다^{8,9,11)}. 최근에는 치태의 기질을 형성하고 있는 mutan을 분해하는 치태 형성 억제제에 대한 연구가 진행되고 있다^{17,18)}.

본 연구에서는 치아우식증의 원인이 되는 치태의 중요한 기질로 작용하는 비수용성인 glucan 즉 mutan을 분해하는 mutanase를 연구하기 위하여 토양에서 분리한 *Streptomyces exfoliatus*로부터 mutanase의 분비를 증명하고 mutanase 생성에 영향을 미치는 여러 성장 인자들에 대해 연구하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

*Streptococcus mutans*의 배양

본 연구에서는 mutan을 만들기 위하여 *Streptococcus mutans* B-13(serotype d)을 공시하였으며, 배양은 동결 건조로 보관중인 세균을 brain heart infusion(BHI, Difco, Detroit, MI, USA) broth에 접종하여 37°C 탄산가스 배양기에서 하룻밤 배양하였다.

Mutan의 분리

Mutan을 분리하기 위하여 Takehara의 방법¹⁶⁾에 따라 *Streptococcus mutans*을 0.5% yeast extract와 10% sucrose를 첨가한 BHI broth(BHIYS)에 37°C, 3일간 탄산가스 배양기에서 배양하였다. 배양액을 4,000×g로 원심하여 3M

KOH 용액에서 100°C, 2시간 가열하여 녹인 후, 13,000×g로 30분간 원심하여 침전물을 제거하였다. KOH 용액으로 얻은 상청액은 빙초산으로 중화시키고 동량의 메탄올을 가하여 알칼리에 녹아 있는 비수용성 glucan을 침전시켰다. 50% 메탄올로 여러번 세척하여 침전물을 증류수에 부유시켜 냉동 건조시켰다.

Mutan 분해능 균주의 탐색

토양에서 분리된 *Streptomyces*들을 Bennett's agar(1% glucose, 0.2% peptone, 0.1% beef extract, 0.1% yeast extract, 1.5% agar)에 접종하여 27°C에서 5일간 배양하였다. 평판접시에 *Streptomyces*의 생육에 필요한 minimal essential agar(0.5% ammonium sulfate, 0.05% K₂HPO₄, 0.03% KOH, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.0001% glucose, 1.5% agar) 20ml에 1% 농도가 되게 mutan을 넣어 제작하였다. 여기에 배양된 *Streptomyces*을 접종하여 27°C에서 5일 내지 그 이상 배양하여 mutan을 분해하여 투명대를 만드는 균주를 mutan 분해능 균주로 선정하였다.

Mutan 분해능 *Streptomyces*의 동정

배지에서의 mycelial pigment의 색깔, 45°C에서의 증식 여부, 7% sodium chloride 함유 배지와 0.01% sodium azide 함유 배지에서의 증식 여부, neomycin에 대한 감수성, neomycin 이용 여부 등을 관찰하여 *Streptomyces*의 종을 동정하였다. Mutan 분해능 *Streptomyces*를 Bennett's agar에서 배양하면서 다음 실험에 사용하였다.

Blue mutan의 제조

Cibacron Blue F3GA(Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.4g을 12ml 증류수에 가하고, mutan 2g을 60°C의 증류수 70ml에 가하였다. 이들 두용액을 30분간 섞고 9g의 NaCl을 가하여 1시간 섞었다. 혼합액을 실온으로 냉각시킨 후, 5°C에서 증류수로 세척하여 반응을 하지 않은 색소를 제거하였다. 그리고 에탄올과 증류수를 2:1로 혼합한 후, 세척하고 냉동 건조시켜

blue mutan을 만들었다. 평판 접시에 minimal essential agar를 부어 굳힌 다음, 1% blue mutan이 함유된 0.6% 한천을 덮어 blue mutan이 함유된 배지를 제조하였다.

환원당 시험

Mutanase 생성 *Streptomyces*를 0.1%와 1% glucose나 mutan이 함유된 minimal essential broth에 16 내지 65 시간 배양한 후, 배양 상청액을 원심하여 20ml를 1mg mutan이 함유된 0.2N sodium acetate 용액(pH 5.5) 380ml에 가하였다. 37°C에서 1시간 배양하고 3, 5-dinitrosalicylic acid reagent(40g dinitrosalicylic acid, 8g phenol, 2g sodium sulfite, 800g Rochelle salt, 2% sodium hydroxide액 2liter를 물 4liter로 희석)를 가하여 15분간 열을 가한 다음, 실온으로 냉각하여 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan)를 가지고 550nm에서 그 흡수율을 측정하였다.

Dextranase의 분해능 비교

Dextranase(Sigma, St. Louis, MO, USA)의 효과를 보기 위하여 1% blue dextran, 1% blue mutan, 0.2% cibacron blue, 1% dextran과 0.2% cibacron blue의 혼합물이 들어 있는 배지를 만든 다음, 2unit의 dextranase를 처리하여 37°C에서 30분 배양한 후, 그 결과를 비교하였다.

Mutanase의 분해능 비교

Mutan 분해능 *Streptomyces*의 mutanase 분비를 보기 위하여 배지에 0.2% cibacron blue, 1% mutan과 0.2% cibacron blue의 혼합물, 1% blue dextran이나 1% blue mutan이 들어 있는 배지에 *Streptomyces*를 접종하여 37°C에서 1주일 배양하였다.

Mutan 분해능에 미치는 배지 구조의 영향

Minimal essential agar위에 1% blue mutan이 함유된 0.6% agar를 overlay하여 배지를 만들거나 1% blue mutan 함유 minimal essential agar를 만들었다. 여기에 mutan 분해능 *St-*

*reptomycetes*를 접종하고 37°C에서 1주일 배양하였다.

Mutan 분해능에 미치는 glucose 농도의 영향

Minimal essential agar위에 0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5%의 glucose를 가한 1% blue mutan 함유 0.6% agar를 overlay하여 배지를 만들었다. 여기에 mutan 분해능 *Streptomycetes*를 접종하고 37°C에서 1주일 배양하였다.

Glucose 존재하에서 mutan 분해능에 미치는 carbohydrate의 영향

1% glucose와 1% blue mutan 함유된 minimal essential agar에 1% 농도의 raffinose, nigeran, melizitose, panose를 가하여 배지를 만들었다. 여기에 mutan 분해능 *Streptomycetes*를 접종하고 37°C에서 1주일 배양하였다.

Mutan 분해능에 미치는 peptone의 영향

Minimal essential agar위에 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1%의 peptone을 가한 1% blue mutan 함유 0.6% agar를 overlay하여 배지를 만들었다. 여기에 mutan 분해능 *Streptomycetes*를 접종하고 37°C에서 1주일 배양하였다.

III. 성 적

Mutan 분해능 *Streptomycetes*의 동정

배지에서의 red-orange pigment를 생산하고 (Fig. 1) 45°C에서 증식하였다. 7% sodium chloride 함유 배지와 0.01% sodium azide 함유 배지에서의 증식이 억제되었으며, neomycin에 대해 감수성을 나타내고 neomycin을 이용치 않은 성질로 보아 *Streptomycetes exfoliatus*로 동정하였다.

환원당 시험

*Streptomycetes exfoliatus*의 mutanase 분비를 환원당 시험으로 보기 위하여 glucose와 mu-

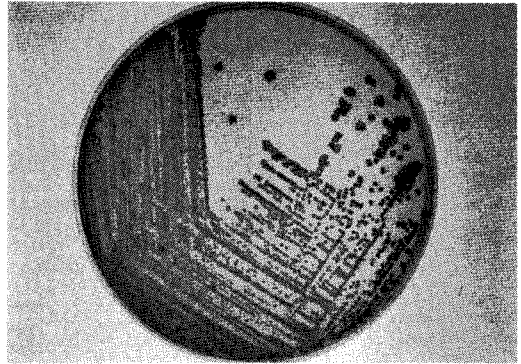


Fig. 1. *Streptomycetes exfoliatus* incubated on the Bennett's agar for 1 week.

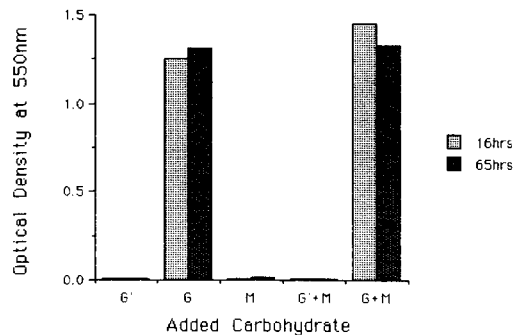


Fig. 2. Assessment of mutanase by dinitrosalicylic acid method. *Streptomycetes exfoliatus* was incubated in minimal essential broth added with 0.1% and 1% glucose (G' and G) or/and mutan (M) for 16 or 65 hrs. The culture supernatant was incubated with mutan at 37°C for 1 hr, and reacted with 3,5-dinitrosalicylic acid reagent. The reagent was measured at 550nm with spectrophotometer.

tan을 단독 또는 병합 처치시, 그림 2에서와 같이 1% glucose가 가해질 때는 환원당이 높게 나왔으나 0.1% glucose나 mutan이 가해질 때는 낮게 나와 mutanase 분비를 환원당 시험으로 동정할 수 없었다.

Dextranase 분해능 비교

Cibacron blue 함유 배지, dextran과 cibacron blue 함유 배지, blue mutan 함유 배지상에서 투명대를 볼 수 없었으나(Fig 3-A, B, D), blue dextran 함유 배지상에서는 dextranase에 의하여 cibacron blue와 dextran이 분해되어 투명대를 볼 수 있었다(Fig 3-C).

Mutanase 분해능 비교

Cibacron blue 함유 배지, mutan과 cibacron blue 함유 배지, blue dextran 함유 배지상에서 mutan 분해능 *Streptomyces exfoliatus*에 의한 투명대를 볼 수 없었다(Fig. 4-A, B, C). Blue mutan 함유 배지에서만 mutan 분해능 *Streptomyces exfoliatus*에 의한 투명대를 봄으로써 mutanase의 분비를 확인할 수 있었다(Fig. 4-D).

Mutan 분해능에 미치는 배지 구조의 영향

Minimal essential agar위에 1% blue mutan이 함유된 0.6% agar를 overlay한 배지 구조(Fig. 5-Left)에서 1% blue mutan 함유 minimal essential agar(Fig. 5-Right)에서 보다 분명한 투명대를 볼 수 있었다.

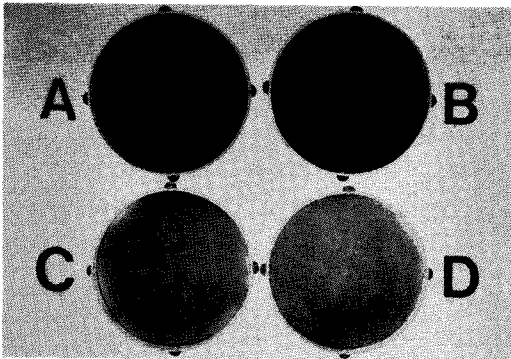


Fig. 3. Effect of dextranase on the media containing a variety of components. Two units of dextranase were added to the media containing cibacron blue (A), a mixture of 1% dextran and cibacron blue (B), or 1% blue dextran (C), 1% blue mutan (D). The plate was incubated at 37°C for 30 minutes.

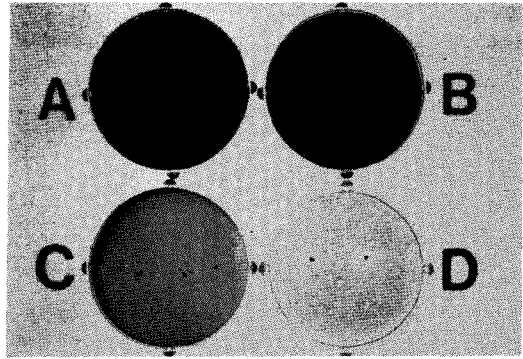


Fig. 4. Effect of *Streptomyces exfoliatus* on the minimal essential agar containing a variety of components. *Streptomyces exfoliatus* was inoculated to the media containing cibacron blue (A), a mixture of 1% mutan and cibacron blue (B), 1% blue dextran (C), or 1% blue mutan (D). The plate was incubated at 37°C for 1 week.

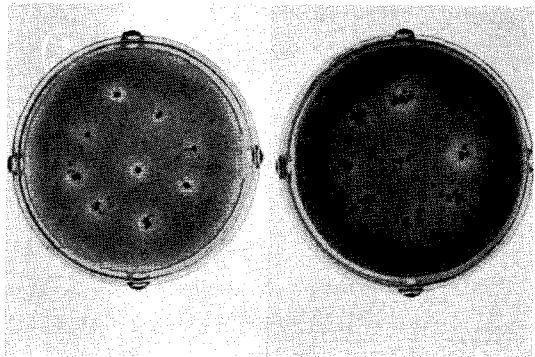


Fig. 5. Effect of media structure on the degradation of mutan by *Streptomyces exfoliatus*. Minimal essential agar was overlaid with 0.6% agar containing 1% blue mutan (Left), or minimal essential agar was mixed with 1% blue mutan (Right). The plate was incubated at 37°C for 1 week.

Mutan 분해능에 미치는 glucose 농도의 영향

0.025% 이하의 glucose를 함유한 배지에서는 *Streptomyces exfoliatus*를 접종한지 2일만에 투명대를 형성하였고 0.05% glucose 함유 배지에서는 3일, 0.1% glucose 함유 배지에서는 4일만에 투명대를 형성하였다(Tab. 1).

Glucose 존재하에서 mutan 분해능에 미치는 carbohydrate의 영향

0.1% glucose 함유 minimal essential agar에

1% 농도의 raffinose, nigeran, melizitose, panose를 가하여도 *Streptomyces exfoliatus*의 mutan 분해능에는 차이가 없었다.

Mutan 분해능에 미치는 peptone의 영향

0.1% 이하의 peptone을 함유한 배지에서는 *Streptomyces exfoliatus*를 접종한지 2일만에 투명대를 형성하였고 0.25% peptone 함유 배지에서는 3일, 0.5% peptone 함유 배지에서는 4일만에 투명대를 형성하였다(Tab. 2).

Table. 1. Effect of glucose on the degradation of blue mutan by *Streptomyces exfoliatus*.
Glucose of various concentrations was added to overlay agar containing 1% blue mutan. The plate was incubated at 37°C for 1 week.

Conc. of glucose (%)	Duration			
	2days	3days	4days	5days
0	+*	+	+	+
0.005	+ +	+	+	+
0.01	+ +	+	+	+
0.025	- +	+	+	+
0.05	- -	+	+	+
0.1	- -	-	-	+
0.25	- -	-	-	-
0.5	- -	-	-	-

* Positive means the formation of clear zone on the agar by the degradation of blue mutan.

Table. 2. Effect of peptone on the degradation of blue mutan by *Streptomyces exfoliatus*.
Peptone of various concentrations was added to overlay minimal essential agar containing 1% blue mutan. The plate was incubated at 37°C for 1 week.

Conc. of glucose (%)	Duration			
	2days	3days	4days	5days
0	+*	+	+	+
0.01	+	+	+	+
0.025	+	+	+	+
0.05	+	+	+	+
0.1	+	+	+	+
0.25	-	+	+	+
0.5	-	-	+	+
1	-	-	-	-

* Positive means the formation of clear zone on the agar by the degradation of blue mutan.

IV. 고 찰

구강내 치아우식증을 일으키는데 중요하게 작용하는 것으로 알려진 *Streptococcus mutans*는 치아의 저류(retentive) 부위에 군락을 잘 형성하고 구강의 점막에서는 별로 볼 수 없다. 즉 이 세균은 증식하여 군락을 형성하려면 치아가 있어야 한다. 따라서 치아가 미맹출된 유아의 구강에서는 *Streptococcus mutans*가 발견되지 않고 치아를 전부 잃어버린 경우에도 구강에서 *Streptococcus mutans*는 사라진다. 유아에 감염되는 *Streptococcus mutans*의 주요한 근원은 유아의 어머니로 생각되고 있으며 어머니 구강내에 있는 *Streptococcus mutans*의 숫자를 억제하면 유아가 *Streptococcus mutans*를 갖게 되는 속도와 정도를 감소시킬 수 있음이 보고되었다¹⁹⁾. *Streptococcus mutans* 균주는 8개의 혈청형(a-h)으로 나뉘고 이 중에서 혈청형 c가 전세계적으로 가장 많이 분리되고 있다⁴⁾. 자당이 함유된 음식을 먹인 실험동물의 구강에 *Streptococcus mutans*을 접종하였을 때, 치아우식증이 심하게 발생하였는데, 이것은 치아에 *Streptococcus mutans*가 증가하여 산이 많이 생성되기 때문이다^{4, 5, 20)}. *Streptococcus mutans*는 이 과정 중에 자당으로부터 세포의 다당류인 glucan과 fructan을 합성한다^{6, 21)}. Toda 등²²⁾은 투과전자현미경을 이용하여 *Streptococcus mutans* type c가 합성한 세포의 다당류의 초미세 구조를 관찰하여 다당류가 세가지 구성 성분, 즉 globule 구조의 fructan, single-stranded filament 구조의 dextran, double-stranded fibril 구조의 mutan으로 구성되어 있다고 보고하였다. 또한 주사전자현미경으로는 두 종류의 구조, 즉 globular body와 amorphous substance를 관찰하였다. 세포의 glucan은 *Streptococcus mutans* 외에도 다른 *Streptococcus* species, *Lactobacillus* species와 같은 구강세균에 의해 형성되는데, 이들 세균이 치아 표면에 부착하여 세균의 군락을 형성하는데 기여하고 있다²³⁻²⁶⁾. 비수용성 glucan인 mutan은 치아표면에 *Streptococcus mutans* 외에 다른 세균들의 증식을 촉진시키며, 수용성 glucan인 dextran과 fruc-

tan은 세균의 세포의 에너지 공급원이 되고 있다. 치태에 존재하는 이러한 다당류를 에너지 기질로서 이용하기 위해서 세균은 다당류를 분해하는 효소를 분비하고 있다. 인간의 치태에서 존재하는 일부 세균이 dextran을 분해할 수 있다고 하는데^{12, 15-17, 27, 28)}, 이러한 능력을 보이는 세균은 대부분 *Actinomycetaceae*, *Streptococci*, *Haemophili*, Gram-negative anaerobes로 알려져 있다.

양치질을 소홀히 할 수 있는 소아나 구강위생을 신경쓰지 않은 지역에 있어서는 mutan이 비수용성이기 때문에 분해되지 않고 치태의 기질로 작용함으로써 치아우식증과 치주질환이 발생하여 사람이 살아가기 곤란한 지경에 이를 것으로도 생각되지만 실제로는 그렇게 심하지 않다. 이러한 현상은 균형을 이루는 자연의 법칙대로 mutan을 분해하는 효소인 mutanase (endo-1, 3- α -D-glucanase, EC 3.2.1.59)가 또한 존재하기 때문이다. 이러한 mutanase는 다음과 같은 역할을 한다. 첫째로 mutan을 분해하며, 둘째로 mutan의 형성을 막고, 셋째로 mutan을 만드는 glucosyltransferase의 작용에 영향을 미치며, 넷째로 *Streptococcus mutans*의 응괴를 감소시키며, 다섯째로 in vitro에서 *Streptococci*의 부착을 억제하고 있다^{19-22, 27)}.

최근에 선진국들이 우리나라를 무역 및 기술 경쟁의 대상국으로 인정하게 되면서 물질 특허 개방과 아울러 미생물의 균주 특허 독점을 당할 수 있는 부다페스트 조약에 가입하였다. 이에 생물공업의 관련제품 생산에도 기술사용료와 물질 이용료를 지불하지 않으면 안되게 되었다. 국민의 복지와 건강에 대한 관심이 증대되면서 구강 보건에 대한 관심도 증진됨에 따라 선진국에서는 이미 기존의 방법을 이용한 구강 질환을 예방할 수 있는 방법보다 간편하고 효과적인 생물공업 제품을 이용하는 방법을 개발 중에 있다. 현재 사용되고 있는 생물공업 제품의 대부분은 미생물의 대사산물로부터 개발된 것으로 미생물의 생체활성물질이다. 미생물은 다양한 생리대사기전으로 수많은 종류의 생체활성물질을 만들지만 이들 중에서 극히 일부만이 현재 사람들이 이용하고 있다. 따라서

앞으로는 미생물의 대사산물 중 사람들이 이용할 수 있는 생체활성물질의 탐색이 시급히 요구되고 있는데, 치태 생성 억제제로서의 mutanase의 탐색과 그 생성 유도에 대한 연구는 현시점에서 아주 중요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 mutan을 분해하는 *Streptomyces exfoliatus*에서 분비되는 물질이 생리화적인 작용에 의하여 mutanase라는 것을 증명하고 인공 치태를 억제하는 것을 증명하는데 그 목적이 있다. Dextranase가 blue dextran이 함유된 배지에서만 cibacron blue와 dextran을 분해하듯이 *Streptomyces exfoliatus*가 blue mutan이 함유된 배지 상에서만 투명대를 형성하는 것을 보아 mutan에만 작용하는 것으로 사료된다(Fig. 4). Minimal essential agar위에 1% blue mutan이 함유된 0.6% agar를 overlay한 배지 구조에서 *Streptomyces exfoliatus*를 배양시 생기는 투명대가 1% blue mutan 함유 minimal essential agar 상에서 보다 분명한 이유는 *Streptomyces exfoliatus*가 분비하는 mutanase가 농도가 낮은 한천에서 blue mutan에 작용하기가 용이한 것으로 사료된다(Fig. 5). Glucose와 glucose의 polymer인 glucan이 있을 때 catabolite repression에 의하여 세균은 우선적으로 glucose를 이용하게 된다. 본 실험에서도 0.025% 이하의 glucose를 함유한 배지에서는 *Streptomyces exfoliatus*를 접종한지 2일만에 투명대를 형성하였고 0.05% glucose 함유 배지에서는 3일, 0.1% glucose 함유 배지에서는 4일만에 투명대를 형성하였다. 0.25% 이상의 glucose 함유 배지에서는 투명대를 형성하지 않았다(Tab. 1). 0.1% glucose 함유 minimal essential agar에 1% 농도의 raffinose, nigeran, melizitose, panose를 가하여도 *Streptomyces exfoliatus*의 mutan 분해능에는 차이가 없는 것을 볼 때, mutanase 분비 결정 인자는 glucose로 사료된다. *Streptomyces exfoliatus*의 증식을 촉진하기 위해서 배지에 첨가하는 peptone은 0.1% 이하에서는 세균을 접종한지 2일만에 투명대를 형성하였고 0.25%에서는 3일, 0.5%에서는 4일만에 투명대를 형성하였다. 이렇게 peptone의 농도가 증가할 수록 투명대가 늦게

형성하는 것은 peptone 속에 glucose가 들어 있기 때문으로 생각된다(Tab. 2).

앞으로 *Streptomyces exfoliatus*가 분비하는 mutanase의 성질을 계속 규명하고 mutanase를 정제하여 유전자를 cloning할 예정이다.

V. 결 론

토양에서 분리한 *Streptomyces*중 mutan을 분해하는 *Streptomyces*로 부터 분비되는 물질을 규명하고 그 분비에 영향을 미치는 인자에 대해 보고자 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Mutan을 분해하는 *Streptomyces*는 여러 성질로 보아 *Streptomyces exfoliatus*로 동정하였다. Dextranase의 효과는 blue dextran이 들어 있는 배지에서만 볼 수 있었으며, blue mutan이 들어 있는 배지에서 *Streptomyces exfoliatus*에 의한 투명대를 봄으로써 mutanase의 분비를 확인할 수 있었다. Blue mutan이 함유된 agar를 overlay한 배지 구조에서 분명한 투명대를 볼 수 있었다. 0.025% 이하의 glucose를 함유한 배지에서는 *Streptomyces exfoliatus*를 접종한지 2일만에, 0.05% glucose 함유 배지에서는 3일, 0.1% glucose 함유 배지에서는 4일만에 투명대를 형성하였다. 여기에 다른 carbohydrate를 가하여도 mutan 분해능에는 차이가 없었다. 0.1% 이하의 peptone을 함유한 배지에서도 농도가 증가할 수록 투명대의 출현 시기가 늦었다.

이상의 결과를 종합하면 mutan 분해능이 있는 *Streptomyces exfoliatus*는 blue mutan이 함유된 배지에서 투명대를 봄으로써 mutanase 분비를 확인할 수 있었으며, glucose나 peptone의 농도가 증가하면 투명대의 출현 시기가 늦었다.

참고문헌

1. McDougall, W.A. : Studies on the dental plaque. I. The histology of the dental plaque and its attachment. Aust. Dent. J., 8 : 261-273, 1963.
2. McDougall, W.A. : Studies on the dental

- plaque. II. The histology of the developing interproximal plaque. *Aust. Dent. J.*, 8 : 398–407, 1963.
3. Listgarten, M.A. : Structure of surface coatings on teeth. A Review *J. Periodontol.*, 47 : 139–147, 1976.
 4. Hamada, S. and H.D. Slade : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, 44 : 331–384, 1980.
 5. Mcghee, J.R. and S.M. Michalek : Immunobiology of dental caries : Microbial aspects and local immunity. *Ann. Rev. Microbiol.*, 35 : 595–638, 1981.
 6. Newbrun, E. : Polysaccharide synthesis in plaque. In : *Proceedings, Microbial Aspects of Dental Caries*, edited by Stiles, H.M., W.J. Loesche and T.C. O'Brien, Information Retrieval Inc., Washington, 649–664, 1976.
 7. Yakushiji, T., M. Inoue and T. Koga : Inter-serotype comparison of polysaccharides produced by extracellular enzymes from *Streptococcus mutans*. *Carbohydr. Res.*, 127 : 253–266, 1984.
 8. Staat, R.H., S.D. Langley and J.I. Swenson : In vivo relationships of the dextran-degrading oral microbiota to *Streptococcus mutans* and caries experience. *Caries Res.*, 16 : 18–25, 1982.
 9. Hull, P.S. : Chemical inhibition of plaque *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 431–442, 1980.
 10. Jorgensen, E.B. and J. Kelstrup : Enzymes as denture cleansers. *Scand. J. Dent. Res.*, 85 : 209–215, 1977.
 11. Poulsen, S., P.H. Pedersen and J. Kelstrup : Comparison of different measurements of development of plaque and gingivitis in man. *Scand. J. Dent. Res.*, 87 : 178–183, 1979.
 12. Kaster, A.G. and L.R. Brown : Extracellular dextranase activity produced by human oral strains of the genus *Bifidobacterium*. *Infect. Immun.*, 42 : 716–720, 1983.
 13. Waksman, S.A., H.C. Rully and D.B. Johnston : Isolation of streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, 52 : 393–397, 1946.
 14. Umezawa, H. : Trends in antibiotics research, Japan Antibiotics Research Association, Tokyo, 1982.
 15. Staat, R.H. and C.F. Schachtele : Characterization of a dextranase produced by an oral strain of *Actinomyces israelii*. *Infect. Immun.*, 12 : 556–563, 1975.
 16. Takehara, T., M. Inoue, T. Morioka and K. Yokogawa : Purification and properties of endo-alpha-1,3-glucanase from a *Streptomyces chartresis* strain. *J. Bacteriol.*, 145 : 729–735, 1981.
 17. Barrett, J.F., T.A. Barrett and R. Curtiss III : Purification and partial characterization of the multicomponent dextranase complex of *Streptococcus sobrinus* and cloning of the dextranase gene. *Infect. Immun.*, 55 : 792–802, 1987.
 18. Takada, K., T. Shiota and T. Ikeda : Characterization of glucan involved in the reduction of dental caries in rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1033 : 91–95, 1990.
 19. Kohler, B., D. Bratthall and B. Krasse : Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. *Archs. Oral Biol.*, 28 : 225–231, 1983.
 20. Gibbons, R.J. and J. van Houte : Dental caries. *Ann. Rev. Med.*, 26 : 121–136, 1975.
 21. Guggenheim, B. : Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.*, 20 : 657–678, 1970.
 22. Toda, Y., I. Moro, T. Koga, H. Asakawa and S. Hamada : Ultrastructure of extracellular polysaccharides produced by serot-

- ype c *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res., 66 : 1364–1369, 1987.
23. Dewar, M.G. and G.J. Walker : Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque. Caries Res., 9 : 21–35, 1975.
 24. Gibbons, R.J. and S.B. Banghart : Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. Archs. Oral Biol., 12 : 11–24, 1967.
 25. Gibbons, R.J. and J. van Houte : Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann. Rev. Microbiol., 29 : 19–44, 1975.
 26. Hammond, B.F. : Dextran production by a human oral strain of *Lactobacillus casei*. Archs. Oral Biol., 14 : 879–890, 1969.
 27. Guggenheim, B. and J.J. Burckhardt : Isolation and properties of a dextranase from *Streptococcus mutans* OMZ 176. Helv. Odont. Acta., 18 : 101–113, 1974.
 28. Johnson, I.H. : Glucanase-producing organisms in human dental plaques. Microbios, 61 : 89–98, 1990.