

## *Streptomyces exfoliatus*가 생성하는 mutanase에 의한 인공치태 억제 작용

전남대학교 치과대학 소아치과학교실 및 미생물학교실\*, 의과대학 미생물학교실\*\*

송도원 · 양규호 · 정 진\* · 오종석\*\*

### Abstract

#### INHIBITION OF ARTIFICIAL PLAQUE BY MUTANASE PRODUCED FROM *Streptomyces exfoliatus*

Do-Won Song, Kyu-Ho Yang, Jin Chung\*, Jong Suk Oh\*\*

*Dept. of Pediatric, Dept. of Microbiology\*, College of Dentistry,  
Dept. of Microbiology, College of Medicine\*\*, Chonnam National University*

The main component of dental plaque is the mutan containing the  $\alpha$ -1,3 bond. The following results were obtained by using a blue mutan to assess the factors affecting the mutan-digesting activity of *Streptomyces exfoliatus* isolated from soil.

A clear zone was produced by mutanase-producing *Streptomyces exfoliatus* on the minimal essential agar containing blue mutan. *Streptomyces exfoliatus* digested more blue mutan in the minimal essential broth at pH 7.0 than at pH 5.5 or 8.5. *Streptomyces exfoliatus* digested more blue mutan at 37°C than at 32°C or 42°C ( $P < 0.05$ ). When the concentration of  $\text{CaCl}_2$  was increased in the minimal essential broth, the digestion of blue mutan was increased ( $P < 0.05$ ). The optimal concentration of KCl was 10mM to digest blue mutan, but a similar amount of blue mutan was digested at the range of 0.1mM to 6.4mM of  $\text{MgCl}_2$ . When the culture supernatant of *Streptomyces exfoliatus* was mixed with 2X brain heart infusion broth containing 0.5% yeast extract and 10% sucrose, less artificial plaque was formed by Streptococcus mutans on the orthodontic wire ( $P < 0.05$ ).

These results indicated that the secretion of mutanase was identified in culture supernatant of mutan-digesting *Streptomyces exfoliatus*, suppressing the formation of artificial plaque by *Streptococcus mutans*.

## I. 서 론

치의학의 눈부신 발달에도 불구하고 구강내 질환인 치아우식증과 치주질환은 여전히 빈발하고 있으며, 특히 소아에서는 치아우식증이 매우 중요한 질환이 되고 있다. 이러한 치아우식증의 발생에 있어서 주된 역할을 하고 있는 치태는 세균과 세균간 물질로 구성되어 있다<sup>1-3)</sup>. 치태에 존재하는 세균에 의하여 자당 (sucrose)으로 부터 합성되는 glucan은 치아우식증의 발생에 있어서 초기에 세균의 응괴와 치태형성에 관여할 뿐만 아니라 형성된 치태의 기질로 작용하고 있다. 그 외에도 glucan은 치아우식증의 발생에 있어서 독성인자로 작용하면서<sup>4)</sup>, 점차 치아우식증이 진전됨에 따라 그 형태가 변화하게 된다<sup>5,6)</sup>.

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 등<sup>7)</sup>은 *Streptococcus mutans*로 부터 형성된 glucan은 single- 또는 double-stranded fibrils로 구성되어 있고, single-stranded fibrils는 globule 구조로 되어 있다고 보고하였다. 또한 single-stranded fibrils는 dextranase ( $\alpha$ -1,6-glucan hydrolase, EC 3.2.1.11)에 의하여 분해가 되나 double-stranded fibrils는 분해되지 않는다고 하였다. Double-stranded fibrils는 mutan으로서 dextran의  $\alpha$ -1,6 결합을 분해하는 dextranase에 대해 저항성을 보이는  $\alpha$ -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 왔다<sup>8-12)</sup>.

Waksman에 의하여 *Streptomyces griseus*로 부터 streptomycin이 추출된 이래<sup>13)</sup>, 방선균류 (*Actinomycetes*)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 있다<sup>14)</sup>. 또한 항암제, 효소저해제, 면역조절물질 등 방선균류를 이용한 생체활성물질이 계속 개발되고 있어 방선균류의 중요성이 강조되고 있다. 치태를 분해하는 효소도 방선균류로 부터 분리하려는 시도가 있었다<sup>15,16)</sup>. 그러나 분리된 효소들은 주로  $\alpha$ -1,6 결합으로 이루어진 dextran에 작용하는 dextranase로서 이것들을 정제하여 치태형성을 억제하려는 많은 동물실험이 시행되었으나 그 효과에 대해서는 많은 논란이 있어 왔으며, 인체를 대상으로한 실험에서는 큰 효과를 보지 못하였다<sup>8,9,11)</sup>. 최근에는 치태의 기질을 형성하고 있는 mutan을 분해하는 치태형성 억제제에 대한 연구가 진행되고 있다<sup>17,18)</sup>.

본 연구에서는 토양에서 분리한 *Streptomyces exfoliatus*의 mutanase 분비와 그 활성에 영향을 미치는 여러 인자들을 비교 검토함으로써 구강내 중요 질환인 치아우식증의 원인이 되는 치태형성 억제 가능성에 대해 연구하여 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

*Streptococcus*의 배양: 본 연구에서는 mutan을 만들기 위하여 *Streptococcus sobrinus* B-13 strain (serotype d)을 공시하였으며, 배양은 동결 건조로 보관중인 세균을 Brain heart infusion (BHI, Difco, Detroit, MI, USA) broth에 접종하여 37°C 탄산가스 배양기에서 16시간 배양하였다.

Mutan의 분리: Mutan을 분리하기 위하여 Takehara의 방법<sup>16)</sup>에 따라 *Streptococcus sobrinus*를 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

연은 상청액은 빙초산으로 중화시키고 동량의 메탄올을 가하여 알칼리에 녹아 있는 비수용성 glucan을 침전시켰다. 50% 메탄올로 여러번 세척하여 침전물을 증류수에 부유시켜 냉동 건조시켰다.

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.

*Streptomyces exfoliatus*의 배양 : 토양에서 분리되어 *Streptomyces exfoliatus*로 동정된 세균을 Bennett's agar (1% glucose, 0.2% peptone, 0.1% beef extract, 0.1% yeast extract, 1.5% agar)에서 배양하였다.

Blue mutan 함유 배지에서의 mutanase 분비 동정 : 1% blue mutan이 함유된 minimal essential agar (0.5% ammonium sulfate, 0.05%  $K_2HPO_4$ , 0.03% KOH, 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.001%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.0001% glucose, 1.5% agar)에 *Streptomyces exfoliatus*와 mutanase를 분비하지 않은 *Streptomyces*를 접종하여 37°C에서 1주일 배양하였다.

Mutan 분해능에 미치는 배지의 영향 : *Streptomyces exfoliatus*를 1% blue mutan이 함유된 minimal essential agar, Bennett's agar, nutrient agar에 접종하여 37°C에서 1주일 배양하였다.

Mutan 분해능에 미치는 pH와 온도의 영향

: *Streptomyces exfoliatus*를 1% mutan이 함유된 minimal essential broth에서 배양한 다음,  $2.3 \times 10^9$ /ml의 세균 배양액 1ml를 1.5ml minimal essential broth에 접종하고 최종 농도가 1%가 되도록 0.5ml의 blue mutan액을 가하여 배양하였다. 이 때 배양액의 pH를 5.5, 7.0, 8.5로 조정하였고 배양 온도는 32°C, 37°C, 42°C로 조정하였다. 이 때 대조군으로 *Streptomyces exfoliatus* 배양 상청액 대신에 minimal essential broth를 넣어 같은 조건으로 배양하였다. 1주와 2주 배양 후, blue mutan의 분해로 인한 상청액의 색깔 변화를 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 610nm에서 측정하였으며, 이 수치에서 대조군 수치를 감하였다. 이러한 과정을 3차례 반복하여 평균치를 구하였다.

Mutan 분해능에 미치는 Ca, K, Mg 이온의 영향 : *Streptomyces exfoliatus*를 1% mutan이 함유된 minimal essential broth에서 배양한 다음,  $2.3 \times 10^9$ /ml의 세균 배양액 1ml를 1.5ml minimal essential broth에 접종하고 최종 농도가 1%가 되도록 0.5ml의 blue mutan액을 가하여 배양하였다. 이 때 배지의  $CaCl_2$  농도를 0.25, 1.0, 4.0, 16.0mM로, KCl 농도를 2.5, 10, 40, 160mM로,  $MgCl_2$  농도를 0.1, 0.4, 1.6, 6.4mM로 변경하였다. 위와 같은 방법으로 3차례 반복 측정하여 평균치를 구하였다.

인공치태 형성 억제 검사 : Hamada의 방법<sup>10)</sup>을 변형하여 *Streptomyces exfoliatus*를 0.5% mutan이 함유된 RL 배지 (0.05% Beef extract, 0.05% Yeast extract, 0.03% Peptone, 0.9% NaCl, 0.2% Ammonium citrate, 0.01%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.005%  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.03% glucose)에서 5일간 배양하고 13000rpm으로 30분간 원심하였다. 그 상청액을 0.22 $\mu$ m 구멍 크기의 여과막에 여과시키고, 여과된 상청액과 동량의 2X BHIYS 배지를 비커에 넣었다. 여기에 약 41mg의 0.016 inch stainless steel 교정용 wire (ORMCO, Glendora, CA, USA)를 준비하여 배양액에 잠기도록 비커에 매달았다. 배지 1

ml당  $2.5 \times 10^6$ 개의 *Streptococcus mutans* (Ingbritt strain, serotype c)를 접종하고 stirring을 하면서 37°C 탄산가스 배양기에서 5시간 배양하여 배양액내의 pH와 *Streptococcus mutans*의 생균수를 측정 한 후, 무게를 측정하였다. 이와 같은 조작을 3차례 반복하여 평균치를 구하였다. 이 때 대조군으로 BHIYS 배지에 *Streptococcus mutans*를 접종하여 동일한 과정을 시행하였다.

통계적 처리 : 각군간의 차이는 Kruskal-Wallis test와 Median 2-sample test를 이용하여 비교하였으며 통계학적인 유의성은 p value가 0.05 이하인 경우로 하였다.

### III. 성 적

Blue mutan 함유 배지에서의 mutanase 분비 동정 : Blue mutan이 함유된 배지상에 *Streptomyces exfoliatus*를 배양할 때 투명대를 관찰함으로써 mutanase 분비를 확인할 수 있었다. 그러나 mutanase를 분비하지 않은 *Streptomyces* 배양시는 투명대를 관찰할 수 없었다 (Fig. 1).

Mutanase 분비능에 미치는 배지의 영향 : Blue mutan이 함유된 minimal essential agar 상에서만 *Streptomyces exfoliatus*가 투명대를 형성하였고 Bennett's agar나 nutrient agar 상에서는 투명대를 형성하지 않았다 (Fig. 2).

Blue mutan 분해에 미치는 pH와 온도의 영향 : 배양액의 pH가 7.0일 때 blue mutan이 가장 잘 분해되었으며, pH 5.5나 8.5일 때는 분해 정도가 낮았으나 유의성은 없었다 (Fig. 4). 배양 온도가 37°C일 때 blue mutan이 가장 잘 분해되었으며, 32°C나 42°C일 때는 분해 정도가 유의성있게 낮았다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5).

Blue mutan 분해에 미치는 Ca, K, Mg 이온의 영향 : 배지의  $\text{CaCl}_2$  농도가 증가할수록 blue mutan의 분해 정도가 증가하였다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6). KCl 농도가 10mM일 때 blue mu-

tan의 분해 정도가 높았으나 유의성은 없었다 (Fig. 7).  $\text{MgCl}_2$  농도는 0.1mM에서 6.4mM의 범위에서 blue mutan 분해 정도가 비슷하였다 (Fig. 8).

인공치태 형성 억제 검사 : BHIYS 배지에 *Streptococcus mutans*를 5시간 배양한 대조군에 비교하여 RL배지에 *Streptomyces exfoliatus*를 배양한 상청액과 2X BHIYS broth와 합하여 *Streptococcus mutans*를 5시간 배양한 실험군에서는 교정용 wire 상의 인공치태 형성이 억제되었다 (Fig. 9). 대조군에서는 배양액의 pH가 6.6으로 되었고 *Streptococcus mutans*의 생균수는 ml당  $1.1 \times 10^8$ 으로 증가하였으며, 증가된 인공 치태의 무게 평균치는 77.3mg이었으나, 실험군에서는 배양액의 pH가 6.6으로 되었고 *Streptococcus mutans*의 생균수는 ml당  $2.5 \times 10^8$ 으로 증가하였으며, 증가된 인공 치태의 무게 평균치는 2.3mg으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 10).

### IV. 고 찰

*Streptococcus mutans*는 사람에서 구강내 치아우식증을 일으키는 중요한 원인균으로 알려져 있다. *Streptococcus mutans*는 치아의 저류 (retentive) 부위에 군락을 잘 형성하나 구강의 점막에서는 별로 볼 수 없다. 즉 이 세균은 증식하여 군락을 형성하려면 치아가 있어야 한다. 따라서 치아가 미생출된 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 어머니의 구강내에 있는 *Streptococcus mutans* 숫자를 감소시키면 유아가 *Streptococcus mutans*를 갖게되는 속도와 정도를 감소시킬 수 있음이 보고되었다<sup>20)</sup>. *Streptococcus mutans* 균주는 8개의 혈청형 (a-h)으로 나뉘고 이중에서 혈청형 c가 전세계적으로 가장 많이 분리되고 있다<sup>4)</sup>. 자당이 함유된 음식을 먹인 실험동물의 구강에 *Streptococcus mu-*

tans를 접종하였을 때, 치아우식증이 심하게 발생하였는데, 이것은 치아에 *Streptococcus mutans*가 증가하여 산이 많이 생성되기 때문이다<sup>4, 5, 21</sup>. *Streptococcus mutans*는 이 과정 중에 자당으로 부터 세포의 다당류인 glucan과 fructan을 합성한다<sup>6, 22</sup>. Toda 등<sup>23</sup>은 투과전자 현미경을 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 구조를 갖는 mutan으로 구성되어 있다고 보고하였다. 또한 주사전자 현미경으로는 두종류의 구조, 즉 globular body와 amorphous substance를 관찰하였다. 비수용성 glucan인 mutan은 치아 표면에 *Streptococcus mutans* 외에 다른 세균들의 증식을 촉진시키며, 수용성 glucan인 dextran과 fructan은 세균의 세포의 에너지 공급원이 되고 있다. 세포의 glucan은 *Streptococcus mutans* 외에도 다른 *Streptococcus species*, *Lactobacillus species*와 같은 구강세균에 의해 형성되는데, 이들 세균이 치아 표면에 부착하여 치태를 형성하는데 기여하고 있다<sup>24-27</sup>.

양치질을 소홀히 하는 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- $\alpha$ -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 glucosyltransferase (GTF)의 작용에 영향을 미치며, 넷째로 *Streptococcus mutans*의 응괴를 감소시키며, 다섯째로 in vitro에서 *Streptococci*의 부착을 억제하고 있다<sup>20-23, 28</sup>.

최근에 선진국들이 우리나라를 무역 및 기술 경쟁의 대상국으로 인정하게 되면서 우리나라는 물질 특허 개방과 아울러 미생물 균주를 특허로

독점할 수 있는 부다페스트 조약에 가입하게 되었다. 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 질환 예방 방법보다 간편하고 효과적인 생물공업 제품을 이용하는 방법을 개발중에 있다. 현재 사용되고 있는 생물공업 제품의 대부분은 미생물의 대사산물로 부터 개발된 것으로 미생물의 생체활성물질이다. 미생물은 다양한 생리대사 기전으로 수많은 종류의 생체활성물질을 만들지만 이들 중에서 극히 일부만이 현재 사람들에 의하여 이용되고 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. *Streptomyces exfoliatus*가 blue mutan이 함유된 배지에서는 투명대를 형성하는 것을 보아 mutan에만 작용하는 것으로 사료된다 (Fig. 1). Blue mutan을 함유한 액체배지에서는 대개의 다른 효소와 같이 pH 7.0이나 37°C 배양온도에서 blue mutan을 가장 잘 분해하였다. Blue mutan의 분해에 있어서 이온들의 영향을 보았을 때, calcium 이온에 대해서 농도가 증가할 수록 blue mutan의 분해가 유의성있게 증가한 것으로 보아 mutanase가 calcium 의존성 효소로 사료된다.

인공치태 형성을 억제하는 검사를 실시한 결과, RL배지에 *Streptomyces exfoliatus*를 배양한 상청액과 2X BHIYS broth와 합한 대조군에서는 증가된 인공 치태 무게 평균이 2.3 mg으로, BHIYS 배지에 *Streptococcus mutans*를 배양한 대조군의 77.3mg에 비하여 유의성있게 감소하였다 ( $P < 0.05$ ). 이 때 *Streptomy-*

ces exfoliatus 배양 상청액이 *Streptococcus mutans*의 증식에 영향을 미쳐 배양 5시간 후의 생균수는 ml당  $2.5 \times 10^8$ 으로 대조군의 ml당  $1.1 \times 10^8$ 보다 높게 검출되었다. 이것으로 보아 wire상의 인공 치태 억제제인 *Streptomyces exfoliatus* 배양 상청액내에 있는 mutanase에 의한 것으로 사료되었다. 앞으로 *Streptomyces exfoliatus*가 분비하는 mutanase를 정제하고 그 유전자를 cloning하는 일을 계속할 계획이며, 본 실험에서의 mutan 분해능 증감이 mutanase 분비의 변화에 기인하는가 mutanase 활성도의 변화에 기인하는가도 더 추구하고 예정이다.

## V. 요약

*Streptomyces exfoliatus*의 mutan 분해 능력에 영향을 미치는 인자에 대해 알아 보고자 blue mutan을 이용한 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Blue mutan이 들어 있는 배지에서 *Streptomyces exfoliatus*에 의한 투명대를 봄으로써 mutanase의 분비를 확인할 수 있었다. Blue mutan이 들어 있는 여러 종류의 배지 중에서 minimal essential agar 상에서 *Streptomyces exfoliatus*가 투명대를 형성하였다. Minimal essential broth의 pH가 7.0일 때 pH가 5.5나 8.5일 때보다 blue mutan이 잘 분해되었으며, 배양 온도가 37°C 때 32°C나 42°C 때보다 잘 분해되었다 ( $P < 0.05$ ). Minimal essential broth에서의 blue mutan의 분해는  $\text{CaCl}_2$  농도가 증가할 수록 ( $P < 0.05$ ),  $\text{KCl}$  농도가 10mM일 때 증가하였으나,  $\text{MgCl}_2$  농도는 0.1mM에서 6.4mM의 범위에서 비슷하였다. *Streptomyces exfoliatus* 배양 상청액을 0.5% yeast extract와 10% sucrose를 첨가한 2배의 BHI broth에 가한 경우 교정용 wire상에서의 *Streptococcus mutans*에 의한 인공치태 형성이 유의성있게 억제되었다 ( $P < 0.05$ ).

이상의 결과를 종합하면 *Streptomyces exfoliatus*에서 생성되는 배양 상청액내의 mutanase가 인공치태 형성에 억제 작용이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

## 참고 문헌

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 Slade, H.D. : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev., 44 : 331-384, 1980.
5. McGhee, J.R. and Michalek, S.M. : 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., Loesche, W.J. and O'Brien, T.C. Information Retrieval, Inc., Washington, 649-664, 1976.
7. Yakushiji, T., Inoue, M. and Koga, T. : Inter-serotype comparison of polysaccharides produced by extracellular enzymes from *Streptococcus mutans*. Carbohydr. Res., 127 : 253-266, 1984.
8. Staat, R.H., Langley, S.D. and Swenson, J.I. : 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 Kelstrup, J. : Enzymes as denture cleansers. Scand. J. Dent. Res., 85 : 209-215, 1977.

11. Poulsen, S., Pedersen, P.H. and Kelstrup, J. : 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 Brown, L.R. : Extracellular dextranase activity produced by human oral strains of the genus *Bifidobacterium*. *Infect. Immun.*, 42 : 716–720, 1983.
13. Waksman, S.A., Rully, H.C. and Johnston, D.B. : 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 Schachtele, C.F. : Characterization of a dextranase produced by an oral strain of *Actinomyces israelii*. *Infect. Immun.*, 12 : 556–563, 1975.
16. Takehara, T., Inoue, M., Morioka, T. and Yokogawa, K. : Purification and properties of endo-alpha-1,3-glucanase from a *Streptomyces chartresis* strain. *J. Bacteriol.*, 145 : 729–735, 1981.
17. Barrett, J.F., Barrett, T.A. and Curtiss III, R. : 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., Shiota, T. and Ikeda, T. : Characterization of glucan involved in the reduction of dental caries in rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1033 : 91–95, 1990.
19. Hamada, S., Mizuno, J., Murayama, Y., Ooshima, T., Masuda, N. and Sobue, S. : Effect of dextranase on the extracellular polysaccharide synthesis of *Streptococcus mutans* : chemical and scanning electron microscopy studies. *Infect. Immun.*, 12 : 1415–1425, 1975.
20. Kohler, B., Bratthall, D. and Krasse, B. : Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. *Archs. Oral Biol.*, 28 : 225–231, 1983.
21. Gibbons, R.J. and van Houte, J. : Dental caries. *Ann. Rev. Med.*, 26 : 121–136, 1975.
22. Guggenheim, B. : Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.*, 20 : 657–678, 1970.
23. Toda, Y., Moro, I., Koga, T., Asakawa, H. and Hamada, S. : Ultrastructure of extracellular polysaccharides produced by serotype *c* *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, 66 : 1364–1369, 1987.
24. Dewar, M.G. and Walker, G.J. : Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque. *Caries Res.*, 9 : 21–35, 1975.
25. Gibbons, R.J. and Banghart, S.B. : Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Archs. Oral Biol.*, 12 : 11–24, 1967.
26. Gibbons, R.J. and van Houte, J. : Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29 : 19–44, 1975.
27. Hammond, B.F. : Dextran production by a human oral strain of *Lactobacillus casei*. *Archs. Oral Biol.*, 14 : 879–890, 1969.
28. Guggenheim, B. and Burckhardt, J.J. : Isolation and properties of a dextranase from *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Helv. Odont. Acta.*, 18 : 101–113, 1974.

## 논문 사진부도 설명

- Fig. 1. Effect of mutanase produced by *Streptomyces exfoliatus* on the minimal essential agar containing blue mutan. Mutanase-producing *Streptomyces exfoliatus* (Left) and -nonproducing *Streptomyces* (Right) were inoculated to the media containing 1% blue mutan. The plate was incubated at 37°C for 1 week. A clear zone was formed by mutanase-producing *Streptomyces exfoliatus*.
- Fig. 2. Effect of media on the production of mutanase by *Streptomyces exfoliatus*. *Streptomyces exfoliatus* was inoculated to nutrient agar (A), Bennett's agar (B), or minimal essential agar (C), containing 1% blue mutan. The plate was incubated at 37°C for 1 week. A clear zone was formed by *Streptomyces exfoliatus* inoculated to minimal essential agar.
- Fig. 3. Digestion of blue mutan in the minimal essential broth by *Streptomyces exfoliatus*. *Streptomyces exfoliatus* was inoculated into the minimal essential broth containing blue mutan (Left). After incubating for 1 week, clear broth was changed to blue one (Right).
- Fig. 4. Effect of pH on the activity of mutanase produced by *Streptomyces exfoliatus*. The pH of minimal essential broth containing 1% blue mutan was adjusted to 5.5, 7.0 or 8.5. The broth was inoculated with  $2.3 \times 10^9$ /ml *Streptomyces exfoliatus*, and incubated at 37°C for 1 and 2 weeks.
- Fig. 5. Effect of temperature on the activity of mutanase produced by *Streptomyces exfoliatus*. The temperature of minimal essential broth containing blue mutan was adjusted to 32°C, 37°C or 42°C. The broth was inoculated with  $2.3 \times 10^9$ /ml *Streptomyces exfoliatus*, and incubated at 37°C for 1 and 2 weeks.
- Fig. 6. Effect of CaCl<sub>2</sub> on the activity of mutanase produced by *Streptomyces exfoliatus*. The CaCl<sub>2</sub> of minimal essential broth containing blue mutan was adjusted to 0.25, 1.0, 4.0 or 16.0mM. The broth was inoculated with  $2.3 \times 10^9$ /ml *Streptomyces exfoliatus*, and incubated at 37°C for 1 and 2 weeks.
- Fig. 7. Effect of KCl on the activity of mutanase produced by *Streptomyces exfoliatus*. The KCl of minimal essential broth containing blue mutan was adjusted to 2.5, 10, 40 or 160mM. The broth was inoculated with  $2.3 \times 10^9$ /ml *Streptomyces exfoliatus*, and incubated at 37°C for 1 and 2 weeks.
- Fig. 8. Effect of MgCl<sub>2</sub> on the activity of mutanase produced by *Streptomyces exfoliatus*. The MgCl<sub>2</sub> of minimal essential broth containing blue mutan was adjusted to 0.1, 0.4, 1.6 or 6.4mM. The broth was inoculated with  $2.3 \times 10^9$ /ml *Streptomyces exfoliatus*, and incubated at 37°C for 1 and 2 weeks.
- Fig. 9. Effect of the culture supernatant of *Streptomyces exfoliatus* containing mutanase on artificial plaque of orthodontic wire. *Streptococci* mutans was incubated in the BHIYS broth (Left) and in the mixture of 2X BHIYS broth and culture supernatant of *Streptomyces exfoliatus* in the RL broth (Right). The 0.016 inch stainless steel wires were incubated in the stirred media at 37°C for 5 hrs.
- Fig. 10. Effect of the culture supernatant of *Streptomyces exfoliatus* on artificial plaque of



orthodontic wire. The BHIYS broth (Control) and the mixture of 2X BHIYS broth and culture supernatant of *Streptomyces exfoliatus* in the RL broth (Experimental) were inoculated with *Streptococcus mutans*. The 0.016 inch stainless steel wires were incubated in the stirred media at 37°C for 5 hrs, and measured. The result was the mean of triplicate cultures.

사진부도 1

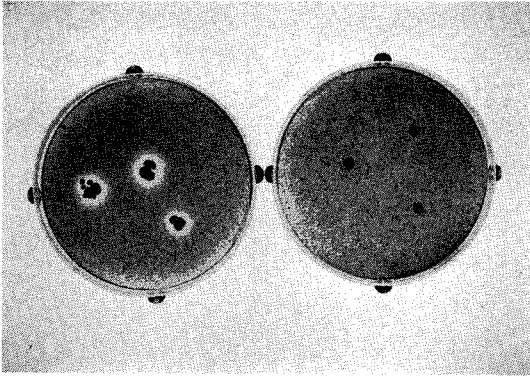


Fig. 1

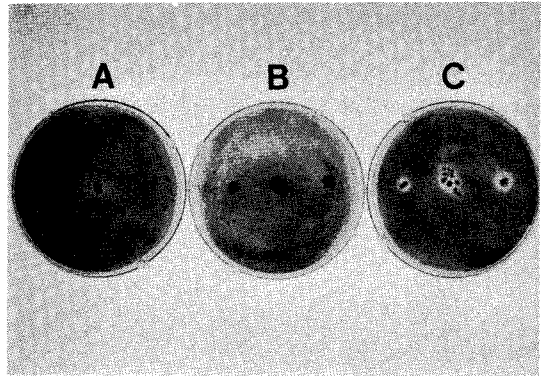


Fig. 2

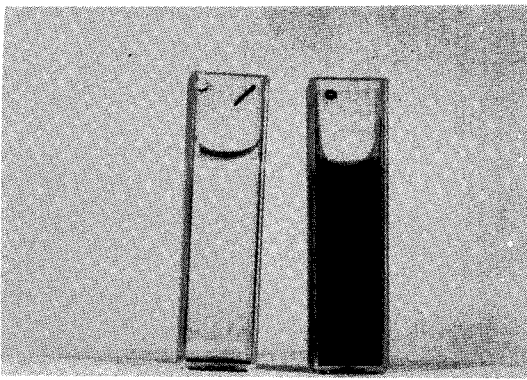


Fig. 3

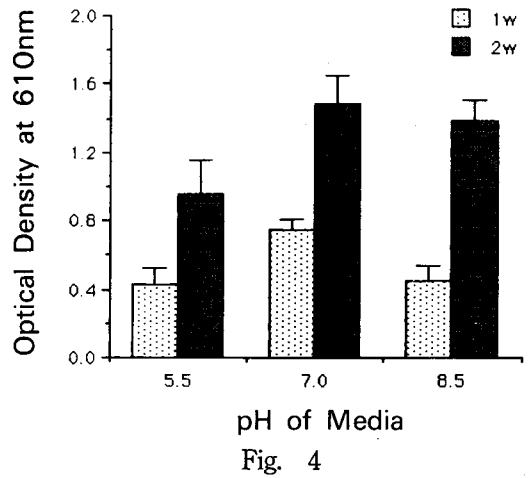


Fig. 4

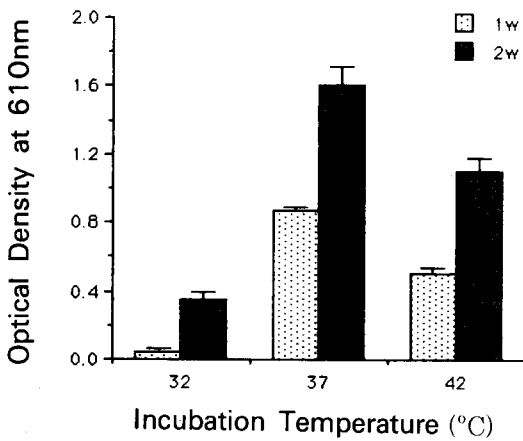


Fig. 5

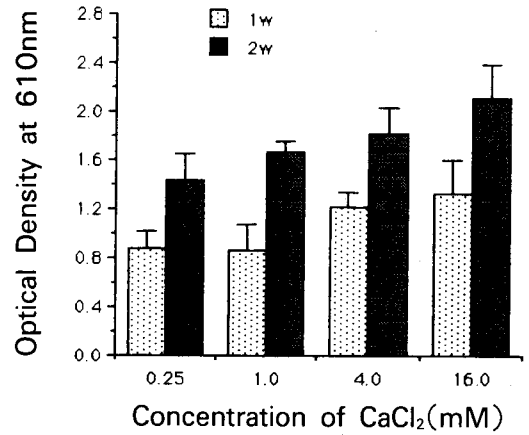


Fig. 6

사진부도 2

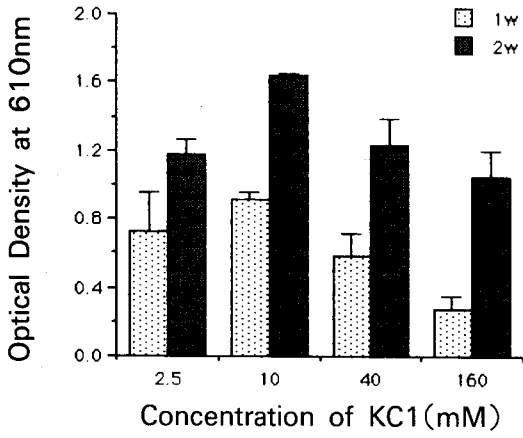


Fig. 7

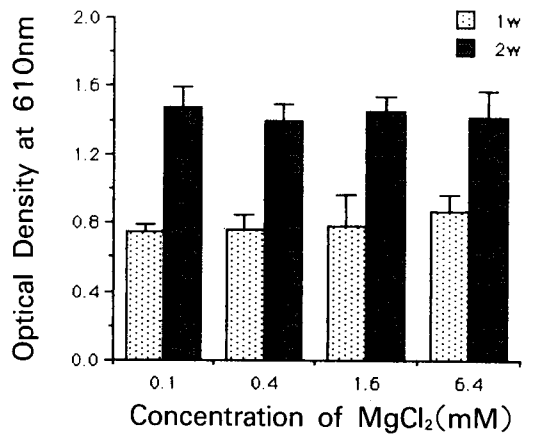


Fig. 8

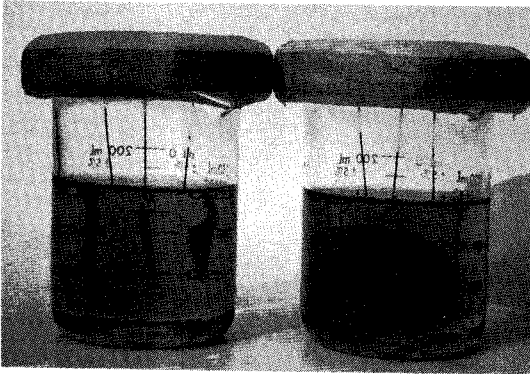


Fig. 9

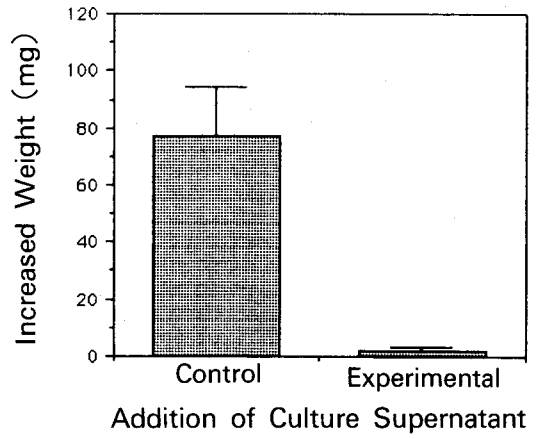


Fig. 10