

## *Streptococcus salivarius*의 요소분해효소 활성에 관한 연구

경희대학교 치과대학 치과보존학교실

정상백 · 최호영 · 민병순 · 박상진 · 이진용 · 최기운

ABSTRACT

### UREASE ACTIVITY OF *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS*

Sang-Baek Chung, Ho-Young Choi, Byung-Soon Min,  
Sang-Jin Park, Jin-Yong Lee, Ki-Woon Choi

*Department of Conservative Dentistry, Division of Dentistry, Graduate School Kyung-Hee University*

Dental caries is induced by organic acids produced by oral bacteria. In order to prevent dental caries, therefore, it is essential to maintain neutral pH in the oral cavity. Urea plays a major role in oral pH homeostasis. Urea is hydrolyzed by bacterial ureases to ammonia, causing a pH elevation. *Streptococcus salivarius* has been shown to be a major contribution to oral ureolysis. Synthesis of urease by *S. salivarius* appears to be constitutive, but can be greatly enhanced by low pH. It is, therefore, conceivable that ureolytic activity of *S. salivarius* from a carious lesion is greater than that of the bacterium from a healthy tooth. In the present study, urease activity of *S. salivarius* isolates from dental plaque of carious lesions was compared with that of the isolates from plaques of the teeth and the dorsum of the tongue; 45 *S. salivarius* strains were isolated from carious lesions (>C2) of 21 individuals with dental caries and 30 strains from 10 individuals without dental caries.

The results were as follows:

1. All the 21 individuals with dental caries harbored ureolytic *S. salivarius* whereas 3 of 13 individuals without dental caries harbored non-ureolytic strains of *S. salivarius*.
2. All the 45 *S. salivarius* isolates from carious lesions showed urease activity. In contrast, of 30 isolates from individuals without dental caries, 17 isolates (56.7%) did not demonstrate urease activity, or if any, very little (<5  $\mu$  mol/min/mg).
3. Urease activity of the isolates from carious lesions was greater than that of the isolates from individuals without dental caries : the urease activity ranged from 42 to 381  $\mu$  mol/min/mg and from 0 to 208  $\mu$  mol/min/mg, respectively.
4. At acid pH(5.5), the isolates which showed intermediate urease activity at pH 7.0 demonstrated even higher activity whereas the isolate with no or lower urease activity did not show any significant difference in their activity. However, the isolates with the greatest urease activity from both individuals with and without dental caries, exhibited a rather much lower urease activity at pH 5.5.

The overall results suggest that isolates may have their own urease activity but the isolates exposed to chronic acidic environment of the carious lesion might elevate urease activity of *S. salivarius*, which in turn, might influence on survival of *S. salivarius* itself and other bacteria, establishing a new oral bacterial ecosystem.

## I. 서 론

인체에서 단백질과 그 외 생화학물질을 합성하고 남은 아미노산은 그대로 체내에 저장되거나 배출되지 않고 대사과정에 이용되어 부산물로 암모니아( $\text{NH}_4^+$ )가 생성된다. 암모니아의 일부는 다시 생합성에 이용되고 여분의 암모니아는 간에서 대부분 요소로 전환되어 소변으로 배출된다.<sup>1)</sup> 요소는 구강내에서도 발견되는데 타액, 특히 치은열구액에서 높은 농도로 나타난다.<sup>2,3)</sup> 구강내에서 발견되는 요소는 요소분해효소에 의해 2 mol의 암모니아와 1 mol의 carbamate로 가수분해되고, carbamate가 자연 가수분해에 의해 탄산이 된다. 수용액내에서 요소가 가수분해되어 생성된 암모니아와 탄산이 나타내는 최종 효과는 pH 상승이다.<sup>3)</sup> 따라서 구강내에서 요소가 많이 발견되는 부위 일수록 pH가 높게 나타나고 있다.<sup>2)</sup>

구강내의 요소 중 일부는 역 ornithine cycle에 의해 사용되지만<sup>4)</sup> 대부분은 구강세균의 요소분해효소에 의해 분해된다.<sup>5)</sup> 요소분해효소에 의해 분해된 요소로부터 암모니아가 생성되고, 이 암모니아가 수용액에서 물분자와 반응하여 발생된  $[\text{OH}]$ 가 타액과 치태내의 pH를 상승시켜 알칼리 pH로 전환시키는데 중요한 역할을 하며<sup>6)</sup> 요소의 양이 많을 수록 알칼리 pH가 더 오래 지속될 수 있음이 보고되었다.<sup>7)</sup> Sissons등<sup>8)</sup>은 구강내의 요소분해는 타액과 치태내의 일부 특정 세균에 의해 이루어지며 특히 streptococci가 중요한 역할을 한다고 제시하였다. 계속된 연구에서 요소 대사에 관여하는 가장 중요한 세균은 *Streptococcus salivarius*(이하 *S. salivarius*라 함)라고 보고하였다.<sup>9)</sup>

출생 당시의 구강은 무균상태이나 첫 울음과 동시에 외부에 노출되며 곧 타인과의 접촉과 수

유를 통해 외부의 미생물이 구강내로 유입되기 시작한다. 대부분의 미생물은 구강내에 일시적으로 존재하나 며칠 사이에 상주균총이 형성된다. *S. salivarius*는 가장 먼저 구강내에 집락하여, 구강내에 가장 흔하게 발견되는 세균이며, 치아표면보다는 설배에 주로 정착하고 타액내에도 나타난다.<sup>10, 11)</sup> *S. salivarius*는 강한 요소분해효소 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.<sup>9, 12)</sup>

요소분해효소(EC 3.5.1.5)는 콩팥이나 무척추 동물, 진핵세포 미생물, 세균을 포함한 원핵세포 미생물에서 발견된다.<sup>3)</sup> *S. salivarius*를 포함한 세균의 요소분해효소는 일반적으로 분자량이 서로 다른 3개의 subunit으로 되어 있으며, 니켈을 필요로 하는 효소이다.<sup>13)</sup> 요소분해효소는 여러 세균에서 병원인자로서 작용하는 것으로 보고되고 있다. 예를 들어, 신우신염의 주원인균은 대장균이지만 일부 신우신염은 요소분해효소를 분비하는 *Proteus mirabilis*(이하 *P. mirabilis*라 함)에 의해서도 유발되는데, 이는 요소분해효소가 직접적으로 신장조직을 파괴하기 때문인 것으로 보고되고 있다.<sup>14)</sup> *Helicobacter pylori*(이하 *H. pylori*라 함) 역시 요소분해효소 활성이 있는 세균으로써 위궤양을 유발시키는 것으로 보고되다. 대부분의 세균은 위에서 강한 위산에 의해 사멸되지만 *H. pylori*는 낮은 pH의 위내에서 강한 요소분해효소 활성을 이용해 암모니아를 생성하여<sup>15)</sup> 위점막의 pH를 높이면서 위액의 분비를 억제하고<sup>16)</sup> 위점막에 독작용을 나타내거나<sup>16,17)</sup> 산화물을 생성함으로써 위점막을 자극한다.<sup>18)</sup> 요석형성에도 요소분해효소를 분비하는 여러 종류의 세균들, 특히 *P. mirabilis*가 중요한 원인균으로 보고되고 있다.<sup>19)</sup> 요석은 세균의 요소분해효소가 요소를 가수분해하여 형성된 암모니아가 주변환경을 알칼리 상태로 변화시켜, 정상 pH에서는 수용성이던 다가의 이온들이

과포화 상태가 되어 침전됨으로써 형성된다.<sup>3),20)</sup>

구강에서도 이와 같은 현상이 나타나는데, 타액내에 있는 특정 단백질에 의해 과포화상태임에도 불구하고 수용성 상태로 존재할 수 있는 칼슘이온<sup>21)</sup> 등이 요소분해효소의 활성으로 요소가 가수분해되어 구강내 pH가 상승하면서 침전하게 되면 치석이 형성될 수 있다.<sup>22)</sup> 한편 요소분해로 형성된 암모니아는 치태세균에 의해 질소원으로 재이용될 수 있고 특히 pH의 변화를 유도하여 구강의 세균 생태계에도 커다란 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.<sup>12,23)</sup> 실제, 당이 대사되어 pH가 낮아졌을 경우 같은 산생산균이라도 *Streptococcus mutans*(이하 *S. mutans*라 함)와 *Lactobacillus casei* 같은 산내성균의 수는 크게 증가하는 반면, *Streptococcus sanguis*(이하 *S. sanguis*라 함) 같은 산 내성이 없는 세균은 감소한다.<sup>24, 25)</sup> 이것은 치아우식증 유발에서 산생산, 산내성인 *S. mutans*와 *Lactobacillus casei* 같은 세균의 중요성을 반영하는 것이다. *S. mutans*의 산내성은 거의 모든 세균의 성장이 정지될 수 있을 만한 산성 pH에 대해서도 *S. mutans* 본래의 타고난 저항성과 환경의 산성변화에 대한 적응성이 있기 때문이다.<sup>25,26,27)</sup> 반면 *S. sanguis*는 *S. mutans* 보다는 산에 대한 저항성이 적어<sup>28)</sup> 우식부위에서 숫자가 점차 감소하게 된다. 구강내 세균 중 가장 강한 요소분해효소 활성을 보이는 *S. salivarius*가 위와 같은 상황에서 요소를 분해하여 pH를 상승시킨다면 *S. salivarius* 자신이나 주변 세균들을 산성피해로부터 보호하고 결과적으로 구강세균 생태계에 변화를 초래할 것이며, 치아우식증 진행에도 영향을 미칠 것으로 보인다.

요소분해효소는 세균에 따라 상황에 관계없이 계속해서 일정량이 생산되기도 하지만<sup>29,30)</sup> 주변 환경의 질소공급이 부족할 경우,<sup>31,32)</sup> 성장정도나 세균세포의 분화정도에 따라,<sup>33,34)</sup> 요소가 유입되었을 때,<sup>29,35,36)</sup> 요소분해효소 생산이 유도, 증가될 수 있다.<sup>3,37,38)</sup> Sisson 등<sup>12)</sup>은 *S. salivarius*는 많은 양의 요소분해효소를 계속해서 생산하지만 환경의 변화, 특히 낮은 pH에서 요소분해효소 활성이 증가하는 것을 관찰하였다. 계속된 연구에서 *S. salivarius*의 요소분해효소 활성은 성장중에 계

속 높게 나타나고 성장정지기에서 요소분해효소가 분해되는 것을 관찰하였으며, 또한 요소분해효소의 활성은 산소와 cysteine에 의해서 감소될 수 있다고 보고하였다.<sup>39)</sup> Chen과 Burne<sup>40)</sup>도 낮은 pH에서 그리고 포도당이 많을 때 요소분해효소의 활성 및 요소분해효소 mRNA가 크게 증가하는 것을 확인하였고, 이 요소분해효소 활성은 생존에 중요한 기전일 것이라고 추정하였다.

이와 같이 실험관내 실험에서 낮은 pH에서 *S. salivarius*의 요소분해효소 활성이 증가하였다는 보고에 따라, 저자는 치아우식증이 환부에서 분리된 *S. salivarius*는 치아우식증이 없는 사람의 치태나 설태에서 분리한 *S. salivarius*보다 요소분해효소 활성이 높을 것이라는 가정하에 본 연구를 진행하였다. 동시에 구강내 pH가 높으면 치아우식증보다는 치석형성, 그리고 치은염이 발생하고, 반대로 pH가 낮으면 치아우식증이 유발되기 쉽다는 통설의 타당성도 확인하기 위하여 *S. salivarius*의 요소분해효소 활성을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험균주 및 배양

실험에 사용할 *S. salivarius* 균주를 수집하기 위해 우선, 실험균으로 육안으로 식별되는 치아우식증 환자 21명의 2도 이상의 우식와동 표면에서 치태를 채취하였고 대조균으로 경희대학교 치과대학생 중 치아우식증이 없는 학생 13명의 치태와 설태를 채취하였다. 채취한 치태와 설태는 brain heart infusion(BHI; Difco)액체배지로 수송하여 vortex mixer로 진탕한 후  $10^1 \sim 10^3$ 까지 단계희석 한 다음 Mitis-Salivarius(MS; Difco) 한천배지에 도말하여 37°C 혐기성 배양기(10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>)에서 1일간 배양하였다. 배양된 균집락들 중에서 *S. salivarius*의 특징<sup>41)</sup>인 크고, 점액성이 있고 약간 투명한 청색의 집락을 1인당 2~3개씩 선택하여 본 실험에 사용하였다.

## 2. *S. salivarius*의 동정

선택된 집락들을 다시 MS 한천배지에 희석도 말법을 이용하여 혐기성 배양기에서 1일간 배양한 후 독립집락임을 확인하였다. 확인된 독립집락을 BHI 액체배지에 혐기적으로 배양한 후 배양된 균을 흡광광도계(Ultrospec 2000; Pharmacia Biotech., U.S.A)로 측정하여 540 nm에서 흡광도 1.2로 조정하였다. 조정된 균액은 API 20 Strep kit(BioM rieux, France)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 동정하였다. 즉, 배양된 균액을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 수집한 후 resuspension medium으로 재부유하여 그 중 500  $\mu$ l를 GP medium에 첨가하고 나머지 균액은 identification strip 중 VP에서 ADH 부분에 150  $\mu$ l씩 분주하였고, GP medium에 혼합된 균액은 RIB에서 GLYG 부분까지 250  $\mu$ l씩 분주하여 4시간동안 혐기적으로 배양하였다. 배양된 strip을 꺼낸 뒤 identification strip 중 VP 부분에는 VP1과 VP2 시약을 한방울씩 첨가하였으며, HIP 부분에는 MIN 시약을 두방울, PYRA에서 ADH까지는 ZYM A와 ZYM B를 각각 1방울씩 첨가하여 10분간 상온에서 배양 후 kit manual에 나와있는 판독표와 비교하여 양성, 음성 반응을 판정하였다. GP medium에 균액을 혼합한 부분은 18시간 동안 혐기적으로 더 배양한 후 비교하였다.

## 3. 요소분해효소 활성검사

요소분해효소 활성검사는 Collins와 Falkow<sup>30)</sup> 및 Chen 등<sup>42)</sup>이 사용한 방법을 혼합, 변형하여 사용하였다. *S. salivarius*로 확인된 집락은 BHI 액체배지에서 1일간 혐기적으로 배양하여 증식된 균체를 2% 요소가 첨가된 새로운 BHI 액체배지에 1:20의 비율이 되도록 옮겨 성장 대수기(540 nm에서 흡광도 1.0)까지 혐기적으로 배양하였다. 배양된 균액을 5,000 rpm에서 원심분리하여 균체를 수집한 후 멸균증류수로 3회 세척한 후, 멸균증류수 200  $\mu$ l를 첨가하여 재부유하였다. 재부유된 균액 중 12  $\mu$ l를 사용 직전에 준비된 15  $\mu$ l의 40% 요소, 173  $\mu$ l의 요소분해효소

완충용액(20 mM phosphate buffer in 0.6% NaCl, pH 7.0)과 혼합한 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 이 균액에 지시약으로 500  $\mu$ l의 phenol-nitroprusside와 500  $\mu$ l의 alkaline hypochlorite를 첨가하여 vortex mixer로 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 뒤 흡광광도계를 이용하여 635 nm에서 비색농도를 측정하였다. 대조 비색농도곡선은  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 이용하여 결정하였으며, 시료의 측정치를 이 곡선에 대입하여 생성된 암모니아의 농도를 측정하였다. 실험에 사용된 균액의 농도를 맞추기 위한 단백질 농도의 결정은 Lowry 방법<sup>43)</sup>을 이용하여 측정하였다. 요소분해효소 활성도는 세균(단백질) 1 mg이 첨가된 요소로부터 1분 동안 생성할 수 있는 암모니아의 양( $\mu$ mol/min/mg)으로 나타내었다.

## 4. 산성 pH에서의 요소분해효소 활성 검사

요소분해효소 활성이 없는 균주부터 가장 활성이 높은 균주사이에서 대조군에서 7 균주, 실험군에서는 4 균주를 선택하여 대상으로 하고 pH 5.5에서 요소분해효소 활성을 측정하고 중성상태에서 측정된 요소분해효소 활성과의 차이를 관찰하였다. 활성검사는 위와 동일한 방법대로 시행하되 요소분해효소 완충용액은 phosphate buffer 대신 20 mM citrate(pH 5.5)를 사용하였다.

## III. 실험 성적

### 1. *S. salivarius*의 분리

실험군으로 치아우식증 환자의 우식외동 표면으로부터 치태를 채취하여 얻은 *S. salivarius* 균들과 대조군으로 치과대학생 중 치아우식증이 없는 학생에서 치태와 설태로부터 채취하여 얻은 균들을 API 20 Strep kit(BioM rieux, France)를 이용하여 동정한 결과 실험군에서는 21명의 환자에서 총 45개의 *S. salivarius*를 그리고 대조군에서는 13명에서 총 30개의 *S. salivarius*를 분리하였다.

**Table 1.** Mean ureolytic values of *S. salivarius* isolated from subjects with and without dental caries.

Subjects (No.)	Urease activity ( $\mu$ mol/min/mg) of subjects <sup>a</sup> :	
	without dental caries	with dental caries
1	0.08	171.24 <sup>b</sup>
2	100.52	83.72
3	0.36	42.09
4	0.74	157.10
5	208.04	83.74
6	ND	77.91
7	ND	68.57
8	70.05	37.55
9	ND	111.95
10	93.26	43.70
11	141.02	75.99
12	123.83	177.65
13	2.53	98.56
14		381.64
15		100.21
16		350.85
17		191.17
18		137.83
19		175.70
20		306.29
21		208.35

<sup>a</sup> Urease activity represents an amount of ammonium produced from urea per min by 1 mg of the bacterium (protein) used for the experiment.

<sup>b</sup> The results shown are the mean values of urease activity of the *S. salivarius* isolates from an individual in a representative experiment. Two or three colonies showing a characteristic colonial morphology of *S. salivarius* were selected from an individual and the identified isolates as *S. salivarius* were used for the experiment. Urea hydrolysis experiments were repeated several times and almost identical results were obtained from the experiments.

ND : not detected

**Table 2.** Urease activity of *S. salivarius* isolates.

urease activity ( $\mu$ mol/min/mg)	No. of isolates from subjects <sup>a</sup>	
	without dental caries	with dental caries
0 ~ 5	17	0
6 ~ 10	0	0
11 ~ 40	0	3
41 ~ 70	2	7
71 ~ 100	3	12
101 ~ 150	4	7
151 ~ 200	2	7
201 ~ 300	2	3
over 301	0	6

<sup>a</sup> Numbers of the *S. salivarius* isolates which show different ranges of urease activity.

## 2. *S. salivarius*의 요소분해효소 활성

실험군과 대조군에서 분리된 총 75개의 *S. salivarius* 균주에 대한 요소분해효소 활성을 측정 한 결과 실험군의 경우 21명의 환자에서 분리된 모든 *S. salivarius*가 요소분해효소 활성을 나타내었다. 대조군의 경우 13명중 3명에게서 분리된 *S. salivarius*는 요소분해효소 활성을 전혀 나타나지 않았으며, 요소분해효소 활성을 보인 10명중 4명은  $5\mu$ mol/min/mg 이하의 매우 낮은 요소분해효소 활성을 나타내었다(Table 1). 각 환자별로 측정된 실험군의 *S. salivarius* 요소분해효소 활성 수치는 대조군에 비해 매우 다양하게 나타났는데, 최소  $37.55\mu$ mol/min/mg에서 최고  $381.64\mu$ mol/min/mg까지 10배 정도의 큰 차이를 보인 반면, 비교적 높은 요소분해효소 활성을 보인 대조군의 *S. salivarius* 균주는  $70.05\sim 208.04\mu$ mol/min/mg로 상호간에 최고 약 3배 정도의 차이를 나타내었다. 분리된 균주들을 중심으로 관찰했을 때(Table 2), *S. salivarius*로 분리, 동정된 총 75개의 균주들 중에서 58개의 균주가  $10\mu$ mol/min/mg 이상의 요소분해효소 활성을 나타내었다. 실험군에서는 45개 균주 모두가  $10\mu$ mol/min/mg 이상의 요소분해효소 활성

**Table 3.** Urease activity of *S. salivarius* isolates at neutral and acidic pH.

Isolates from subjects:	pH 7.0	pH 5.5
without dental caries	ND	4.65
	0.08	0.20
	0.36	5.78
	93.26	102.15
	100.52	173.78
	141.02	233.62
	208.04	62.44
with dental caries	42.09	15.47
	83.72	182.11
	83.74	218.38
	381.64	145.68

ND : not detected.

을 나타내었으며, 이 중 100~300  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 의 범위의 요소분해효소 활성을 보인 균주는 29개(64.4%)였고, 300  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  이상의 요소분해효소 활성을 나타낸 균주도 6개(13.3%)가 존재하였다. 반면 대조군에서는 30개의 분리 균주들 중에서 17균주에서 요소분해효소 활성이 없거나 5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 이하의 낮은 요소분해효소 활성을 보였고, 나머지 13개 균주에서는 40  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 이상의 비교적 높은 요소분해효소 활성을 나타내었으나 실험군에서와는 달리 300  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 이상의 요소분해효소 활성을 나타내는 균주는 없었다.

### 3. 산성 pH에서 요소분해효소 활성의 변화

대조군 균주 중 중성 pH에서 100  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 이하의 활성을 보인 균주는 차이가 없었으나 100~140  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  정도 활성을 보인 균주는 산성 pH에서 약 70% 정도 활성이 증가하였다. 그러나 가장 높은 활성을 보인 균주는 208에서 오히려 62  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 활성이 크게 감소하였다. 실험군 균주 중 낮은 활성을 보인 균주와 높은 활성을 보인 균주들은 산성 pH에서 오히려 활성이 감소하였고 83  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 을

보인 두 균주는 활성이 182, 218  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 각각 상승하였다.

## IV. 총괄 및 고안

구강내에서 요소대사의 주 역할은 pH 조절기능이다.<sup>12)</sup> 요소는 타액내에 있는 여러 미생물에 의한 역 ornithine cycle에 의해 대사되기도 하지만<sup>4)</sup> 대부분은 타액이나 치태내 세균의 요소분해효소에 의해 분해되어 암모니아를 생성하게 되고 이것은 구강내 pH를 상승시키는 요인이 된다.<sup>3)</sup> 요소분해효소를 생산하는 구강내 세균은 streptococci로는 *S. salivarius*를 포함하여 *S. bovis*, *S. gordonii*, *S. sanguis*, *S. mitior/mitis* 등이 있으나<sup>9,42,44,45)</sup> *S. salivarius*와 같은 강한 요소분해효소 활성은 보이지 않고, 또 자주 관찰되지도 않는다.<sup>46)</sup> 그 외 *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Haemophilus parainfluenzae* 등이 있다<sup>8,9,47,48,6)</sup>. 현재까지는 *S. salivarius*가 구강내에서 발견되는 가장 강한 요소분해효소 생산균으로 알려지고 있다.<sup>9,12,39,40)</sup>

*S. salivarius*는 설배에 주로 존재하면서 타액내에서도 가장 많이 발견되는 균이다.<sup>10,11,49)</sup> 또한 초기치태세균으로 일시적으로 치아표면에 나타나기도 하지만 일반적으로 치아표면에는 적게 나타나고 특히 치태가 성숙되어감에 따라 *S. salivarius*의 수는 크게 감소한다.<sup>50)</sup> *S. salivarius*가 치아표면에 적게 나타나는 이유는 치아표면에 흡착되어 있는 타액단백질과의 친화성이 없고<sup>51,52,53)</sup> 또한 치태 세균간의 응집현상에도 크게 관여하지 않기 때문이라고 생각된다.<sup>54)</sup> 본 실험에서 대조군의 경우, 치태를 시료로 사용하였을 때 *S. salivarius*를 분리하는데 실패하는 경우가 많았으며 이는 정상 치아의 치태에는 *S. salivarius*가 극히 적게 존재하고 있다는 사실을 반영하는 것으로 생각된다. 이 때문에 대조군인 경우 치태뿐만 아니라 설배에서 시료를 채취하여 *S. salivarius*를 분리하였다. 그러나 치아우식증 환자의 2도 이상 우식와동에서는 언제나 많은 수의 *S. salivarius*를 발견할 수 있었다. 우식와동에서 *S. salivarius*가 쉽게 발견되는 이유는 분명하지

않으나 우식으로 인한 불규칙한 치아표면 때문에 물리적으로 함입되었을 가능성이 있고, *S. salivarius*는 요소분해효소를 생산하는 세균이기 때문에 산내성균인 *S. mutans*나 *S. sorbinus*<sup>10, 25)</sup>처럼 우식부위에서 다른 세균보다는 쉽게 생존할 수 있었기 때문인 것으로 사료된다.

구강내세균의 요소분해능력은 개인차가 심해 10배 이상의 차이를 보이고<sup>5,7,8,50,56)</sup> 이것은 개인의 타액과 치태의 pH에 영향을 미친다.<sup>7,45,57)</sup> 개인의 요소분해 능력은 구강내 세균분포, 특히 *S. salivarius*의 분포율이나 요소분해효소 활성정도가 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다. 이와 같은 경향은 본 실험에서도 나타났다. 실험군의 경우 21명의 환자에서 분리된 모든 *S. salivarius*가 요소분해효소 활성을 보였으며, 활성정도는 최소 37.55  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 에서 최고 381.64  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 10배 정도의 차이가 나타났다(Table 1). 한편 대조군의 경우 13명 중 3명에서 분리된 *S. salivarius*는 요소분해효소 활성이 전혀 나타나지 않았고 나머지 10명 중 4명이 5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 이하의 활성을 보였다. 나머지 6명은 70.05~208.04  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 의 요소분해효소 활성을 나타냈다. 한편, 분리된 균주를 중심으로 분석한 결과(Table 2), 총 75개 균주 중 58개 균주는 활성을 보인 반면(77.3%), 17개 균주는 0~5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  정도로 거의 요소분해효소 활성을 보이지 않았다(22.7%). 이것은 Feltham과 Sneath<sup>46)</sup>, Hardie등<sup>44)</sup>이 분리한 *S. salivarius*의 약 75%가 요소분해효소 활성을 나타낸다고 보고한 내용과 일치한다.

요소분해효소 생산균의 요소분해효소 생산능력은 분리한 후 계대하는 동안에 상실될 가능성이 있고 기술적인 문제 때문에 요소분해효소 활성이 검출되지 않을 수도 있다.<sup>9)</sup> 본 실험에서 분리된 *S. salivarius*균주 중 22.7%가 요소분해효소 활성을 보이지 않았으나 이는 위의 이유 때문인 것 같지는 않다. 이는 본 실험에서 요소분해효소 활성검사를 하기 전까지 여러번의 계대과정을 거쳤고 여러번 검사하여 요소분해효소 생산균주인 경우 언제나 거의 비슷한 정도의 요소분해효소 활성을 관찰했기 때문이다. Sisson 등<sup>12)</sup>은 *S. salivarius*의 경우 요소분해효소는 어떤

경우에도 항상 생산되는 기본적인(constitutive) 단백질임을 관찰하였다. 따라서 본 실험에서 요소분해효소를 생산하지 않는 *S. salivarius*균주는 실험기간 동안에 요소분해효소 생산능력을 상실하였기 때문이라기 보다는 요소분해효소 생산능력이 원래 형성되지 않았기 때문인 것으로 생각된다.

*S. salivarius*는 요소분해효소를 항상 생산하지만 여러 가지 환경적 요인에 의해 요소분해효소 생산량은 달라지는 것으로 보고되고 있다. 여러 요인 중 특히 포도당의 유입이 많을 경우<sup>40)</sup>와 pH가 낮을 때<sup>12,39,40)</sup> 요소분해효소 활성이 크게 증가한다. 본 실험에서는 우식이환부에서 *S. salivarius*를 분리하여 요소분해효소 활성을 관찰하였다. 이들 45개의 *S. salivarius* 분리균주는 모두 요소분해효소 활성을 보였으며 균주 대부분의 요소분해효소 활성은 100  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  이상이었고 그 중에서도 300  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  이상의 높은 활성을 보인 균주도 13%나 되는 반면, 대조군의 경우 30개 균주 중 17개 균주(57%)가 요소분해효소 활성이 없거나 거의 없는 것으로 나타났다(Table 2). 이 결과는 우식부위, 즉 낮은 pH 부위에 존재하는 *S. salivarius*가 높은 요소분해효소 활성을 보인다는 사실을 반영한 것으로 생각된다. 그러나 본 실험은 실험관과 같은 인위적인 상황에서 요소분해효소를 비교한 것이 아니고 인체의 구강내에서 실제로 일어나고 있는 우식이환부에 존재하는 *S. salivarius*의 활성을 직접 확인, 비교했다는 데에서 큰 의미를 찾을 수 있다. 이전의 보고들에 의하면 요소분해효소는 우식부위와 같이 낮은 pH에 존재하는 세균들의 생존뿐만 아니라 구강내 여러 세균의 생존에 커다란 영향을 미칠 것으로 추측된다.<sup>4~9, 12, 39, 40, 41, 57)</sup> 그러나 요소분해효소가 생태계에 어떤 영향을 미치는지에 대한 구체적인 사실이 보고된 바는 아직 없으며, 또한 요소분해효소 활성이 치아우식증 진행에 실제 어떤 영향을 미치는지도 알려진 바가 없다. 상대적으로 낮은 pH 상태인 우식이환부에서 발견되는 요소분해효소 활성이 큰 *S. salivarius*는 자신 뿐만 아니라 우식이환부에 있는 산에 내성이 없는 다른 균들의 생존도 도와준다는 가능성을 생각해 볼 수 있다.

즉, 산생산이 되더라도 요소분해에 의한 암모니아 생성으로 인해 중화되어 치아우식증이 중단될 수 있다고 단순하게 생각할 수도 있으나, 반대로 산을 생산하면서도 산내성이 없거나 적은 균이 pH가 중화된 상태에서 생존할 수 있음으로써 계속 산을 생산하면서 치아우식증을 진행시킬 수 있다는 가능성도 생각할 수 있다. 산내성 균인 *S. mutans*가 요소분해효소 생산균이라는 사실이나<sup>42)</sup> 본 실험에서 보듯이 치아우식증이 없는 치태나 설태에서 분리한 *S. salivarius*가 낮은 요소분해효소 활성을 보인 반면 우식와동에서 분리한 균주들은 대체로 높은 요소분해효소 활성을 보인다는 사실은 후자의 가능성도 있음을 암시하는 것으로 사료된다.

외부 pH의 변화는 세균의 일반적인 대사활동에 직접적으로 커다란 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.<sup>58, 59)</sup> 따라서 요소분해효소 생산에 있어 pH 이외에 다른 요인들이 작용하거나 이들 요인들이 pH인자와 함께 작용했을 가능성도 있다. Sisson<sup>9, 30)</sup>은 *S. salivarius*가 성장정지기에 이르면 요소분해효소는 분해되고, 높은 pH에서도 마찬가지로 요소분해효소가 분해되는 현상을 관찰하였다. 한편, *S. salivarius*가 요소분해효소를 기본적인 물질로 생산하기<sup>12)</sup> 때문에 생산되는 요소분해효소의 양은 항상 일정한데 단지 요소분해효소의 활성이 pH에 따라 달라져서 요소분해효소의 최대활성은 낮은 pH(5.5)에서 발휘되며 pH가 중성이거나 알칼리일 경우 요소분해효소가 분해되어 감소할 것이라고 가정할 수도 있다. 앞서 서술했듯이 환경변화에 의해 요소분해효소가 유도되는 것이라면 분리 후 여러번의 계대과정에서, 그리고 중성 pH에서 반복해서 요소분해효소 활성을 검사했을 때 활성이 낮게 나타날 수도 있었으나 본 실험에서 요소분해효소 활성의 감소는 관찰되지 않았다. 이 같은 사실은 *S. salivarius* 균주 각자는 고유의 요소분해효소 생산능력이 있으나 요소분해효소가 특정환경에 노출되었을 때 활성이 감소될 수 있다는 앞의 가정과 우식부위와 같은 특정환경에 장기간 노출되었을 때에는 *S. salivarius*의 요소분해효소 생산이 유도될 수 있다는 가정이 가능하다. 본 연구에서 분리한 일부 균주들에 대한 요소분

해효소 활성검사시 pH를 5.5로 낮추었을 때, 중간정도(80~140  $\mu$ mol/min/mg)의 요소분해효소 활성을 보인 균주는 약 1.7~2.6배 증가하였으나 활성이 거의 없는 균주는 차이가 없었고, 대조군과 실험군에서 가장 높은 활성을 보인 균주는 오히려 감소하였다(Table 3)는 사실은 이 가정들을 설득력있게 하고 있다. 이러한 가정을 입증하기 위해서는 앞으로 모든 균주들에 대해 요소분해효소 유전자의 존재유무, pH 변화에 의한 요소분해효소 활성의 정도를 관찰하고, 동일인에서 우식이환부와 정상치아표면의 치태, 또는 설태에서 분리한 *S. salivarius*의 요소분해효소 활성을 비교 관찰하는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요소분해에 의한 구강 pH 변화 때문에 요소를 이용하여 구강건강을 증진시키고자 하는 시도가 있어왔다.<sup>47, 55, 56)</sup> 무기질화 시키는 제재에 불소와 요소가 첨가된 경우 신속히 fluorohydroxyapatite 형성이 촉진되어 우식방어작용이 있을 것으로 추측하고 있다.<sup>55)</sup> 최근에는 요소분해효소 유전자를 무해한 치태세균에 분자생물학적 기술로 삽입하여 그 세균을 치아에 정착시킨 후 계속해서 치아표면에서 요소를 분해시켜 치태나 타액의 pH를 일정 pH 이상으로 유지시키려는 시도도 이루어지고 있다.<sup>40)</sup> 그러나 이런 시도가 실제 구강건강을 어느 정도 증진시킬지는 의문이다. 요소분해에 의한 과도한 암모니아 생성은 오히려 pH를 상승시켜 치석형성을 유도하거나<sup>22)</sup> 직접 치주조직에 독작용을 나타낼 수 있기 때문에<sup>60)</sup> 임상적용을 위해선 많은 실험을 통한 검증이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

치아우식증은 치태내 세균이 생산한 유기산에 의해 유발되기 때문에 이의 예방을 위해 타액이나 치태의 pH를 중성상태로 유지하는 것이 중요하다. 구강내 환경이 산성 pH로 변할 때 pH 항상성 유지에 가장 중요한 역할을 하는 요소이며, 이는 대부분의 요소가 구강세균의 요소분해효소에 의해 분해되어 암모니아를 형성하여 pH를 높이기 때문이다. 구강내에서 가장 높은 요소분해



효소 활성을 나타내는 균은 *Streptococcus salivarius*이고 이 세균의 요소분해효소 활성은 환경인자 중 특히 pH가 낮아질 때 증가한다.

본 실험에서는 상대적으로 낮은 pH를 유지하는 우식이환부에서 분리한 *S. salivarius* 균주는 정상치아의 치태 혹은 설태에서 분리한 균주보다 요소분해효소 활성이 높을 것이라는 가정 하에 치아우식증 환자 21명의 2도 이상 우식와동 치태로부터 45개 *S. salivarius* 균주를 채취하여 실험균으로 하고, 대조균으로는 정상치아를 갖는 13명의 경희대학교 치과대학생으로부터 채취한 치태와 설태에서 30개의 균주를 분리하여 요소분해효소 활성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험군 21명 모두에서 요소분해효소 활성이 있는 *S. salivarius*를 분리한 반면, 대조군에서는 13명 중 3명에서 요소분해효소 활성이 없는 *S. salivarius*가 분리되었다.

2. 실험군에서 분리된 45개 *S. salivarius* 균주 모두가 요소분해효소 활성을 보인 반면, 대조군에서 분리된 30개 균주 중에 17개 균주(56.7%)가 요소분해효소 활성이 전혀 없거나 거의 없는 것 ( $<5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )으로 나타났다.

3. 실험군에서 분리된 *S. salivarius*의 요소분해효소 활성은  $42\sim 381 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 대조군의 *S. salivarius* 요소분해효소 활성( $0\sim 208 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )보다 높게 나타났다.

4. 산성 pH(5.5)에서 일부 분리균주에 대한 요소분해효소 활성을 관찰한 결과 중성 pH에서  $80\sim 140 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 의 활성을 나타낸 균주는 1.7~2.6배정도 요소분해효소 활성이 증가하였으나 활성이 거의 없던 균주는 산성 pH에서도 큰 차이가 없었고, 반면 대조군과 실험군에서 가장 높은 활성을 보였던 균주는 산성 pH에서 오히려 활성이 1/3~1/2.5 정도로 감소하였다.

## REFERENCES

1. Stryer, L. : Amino acid degradation and the urea cycle. p.495~516. In L. Stryer(ed.), Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York. 1988.
2. Golub, L. M., Borden, S. M., and Kleinberg, I. :

- Urea content of gingival crevicular fluid and its relation to periodontal disease in humans. *J. Periodontol. Res.* 6:243~251. 1971.
3. Mobley, H.L.T., and Hausinger, R. P. : Microbial ureases : significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* 53:85~108. 1989.
4. Biswas, S. D., and Kleinberg, I. : Effect of urea concentration on its utilization, on the pH and the formation of ammonia and carbon dioxide in a human salivary sediment system. *Archs. Oral Biol.* 16:759~780. 1971.
5. Sissons, C. H., and Cutress, T. W., and Pearce, E. I. F. : Kinetics and product stoichiometry of ureolysis by human salivary bacteria and artificial mouth plaques. *Archs. Oral Biol.* 30:781~790. 1985.
6. Salako, N. O., and Kleinberg, I. : Incidence of selected ureolytic bacteria in human dental plaque from sites with differing salivary access. *Archs. Oral Biol.* 34:181~189. 1987.
7. Sissons, C. H., and Cutress, T. W. : *In vitro* urea-dependent pH-changes by human salivary bacteria and dispersed, artificial-mouth, bacterial plaques. *Archs. Oral Biol.* 32:181~189. 1989.
8. Sissons, C. H., Hancock, E. M., and Cutress, T. W. : The source of variation in ureolysis in artificial plaques cultured from human salivary bacteria. *Archs. Oral Biol.* 33:721~726. 1988.
9. Sissons, C. H., Hancock, E. M., Perinpanayagam, H. E. R., and Cutress, T. W. : The bacteria responsible for ureolysis in artificial dental plaque. *Archs. Oral Biol.* 33:727~733. 1988.
10. Liljemark, W. F., and Bloomquist, C. : Humoral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 7:180~198. 1996.
11. Scheie, A. A. A. : Mechanisms of dental plaque formation. *Adv. Dent. Res.* 8:246~253. 1994.
12. Sissons, C. H., Perinpanayagam, H. E. R., Hancock, E.M., and Cutress, T. W. : pH-regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*. *J. Dent. Res.* 69:1131~1137. 1990.
13. Hausinger, R. P. : Nickel utilization by microorganisms. *Microbiol. Rev.* 51:22~42. 1987.
14. Braude, A. I., and Sieminski, J. : Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis. *J. Bacteriol.* 80:171~179. 1960.
15. Miederer, S. E., and Grübel, P. : Profound increase

- of *Helicobacter pylori* urease activity in gastric antral mucosa at low pH. *Digest. Dis. Sci.* 41:924~949. 1996.
16. Flazell, S. L., and Lee, A. : *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back diffusion, and gastric ulcers. *Lancet* ii:15~17. 1996.
  17. Chen, X. G., Correa, P., Offerhaus, J., Rodriguez, E., Janner, F., Hoffman, E., Fox, J., Hunter, F., and Diavolitsis, S. : Ultrastructure of the gastric mucosal harboring *Campylobacter*-like organisms. *Am. J. Clin. Pathol.* 86:575~582. 1986.
  18. Davis, G. R., Simmonds, N. J., Stevens, T. R. J., Sheaff, M. T., Banatvala, N., Laureson, I. F., Blake, D.R., Rampton, D. S. : *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production *in vivo*. *Gut* 35:179~185. 1994.
  19. Leusmann, D. B., and Sabinski, F. : Potential contribution of optional urease-positive bacteria to idiopathic urinary calcium stone formation. II. Microlith formation kinetics in a fermenter model of the urinary tract infected by optional urease-positive microorganisms. *Urol. Res.* 24:73~78. 1996.
  20. Rosenstein, I. J. M. : Urinary calculi: microbiological and crystallographic studies. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 23:245~277. 1986.
  21. Hay, D. J., and Moreno, E. C. : Statherin and the acidic proline-rich proteins. p.131~150. In J. O. Tenovou(ed.), *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*. CRC Press. Inc., Boca Raton. 1989.
  22. Mandel, I. D., and Thompson, R. H. : The chemistry of parotid and submaxillary saliva in heavy calculus formers and non-formers. *J. Periodontol.* 38:310~315. 1967.
  23. Van der Hoeven, J. S., Jong, M. H., Ropers, A.H., and Camp, P. S. M. : A conceptual model for the co-existence of *Streptococcus* spp. and *Actinomyces* spp. in dental plaque. *J. Dent. Res.* 63:389~392. 1984.
  24. Bradshaw, D. J., McKee, A. S., and Marsh, P. D. : Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communication *in vitro*. *J. Dent. Res.* 68:1298~1302. 1989.
  25. Van Houte, J. : Role of microorganisms in caries etiology. *J. Dent. Res.* 73:672~681. 1994.
  26. Marquis, R. E., Bender, G. R., Murray, D. R., and Bong, A. : Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:198~200. 1987.
  27. Belli, W. A., and Marquis, R. E. : Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1134~1138. 1991.
  28. Bowden, G. H., and Hamilton, I. R. : Environmental pH as a factor in the competition between strains of oral streptococci, *S. mutans*, *S. sanguis*, and 'S. mitior' growing in continuous culture. *Can. J. Microbiol.* 33:824~827. 1987.
  29. Rosenstein, I., Hamilton-miller, J. M. T., and Brumfitt, W. : The effect of acetohydroxamic acid on the induction of bacterial ureases. *Invest. Urol.* 18:112~114. 1980.
  30. Collins, C. M., and Falkow, S. : Genetic analysis of *Escherichia coli* urease gene: evidence for two distinct loci. *J. Bacteriol.* 172:7138~7144. 1990.
  31. Cussac, V., Ferrero, R. L., and Labigne, A. : Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 174:2466~2473. 1992.
  32. Friedrich, B., and Magasanik, B. : Urease of *Klebsiella aerogenes*: control of its synthesis by glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* 131:446~452. 1977.
  33. Falkinham, J. O., and Hoffman, P. S. : Unique developmental characteristics of the swarm and short cells of *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* 158:1037~1040. 1984.
  34. Allison, C., Lai, H.-C., and Hughes, C. : Co-ordinate expression of virulence genes during swarm cell differentiation and population migration of *Preteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* 6:1583~1591. 1992.
  35. Nicholson, E. B., Concaugh, E. A., Foxall, P. A., Island, M. D., and Mobley, H. L. T. : *Proteus mirabilis* urease: transcriptional regulation by UreR. *J. Bacteriol.* 175:465~473. 1993.
  36. Rosenstein, I. J., Hamilton-Miller, J. M. T., and Brumfitt, U. : Role of urease in the formation of infection stones: comparison of ureases from different sources. *Infect. Immun.* 32:32~37. 1981.
  37. Mobley, H. L. T., Island, M. D., and Mausinger, R. P. : Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59:451~480. 1995.
  38. Collins, C. M., and D'Orazio, S. E. : Bacterial

- ureases: structure regulation of expression and role in pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 9:907~913. 1993.
39. Sissons, C. H., Perinpanayagam, H. E. R., and Hancock, E. M. : Processes involved in the regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius* by pH. *Oral Microbiol. Immunol.* 7:159~164. 1992.
  40. Chen, Y.-Y. M., and Burne, R. A. : Analysis of *Streptococcus salivarius* urease expression using continuous chemostat culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 135:223~229. 1996.
  41. 浜田茂幸, 増田典男, 鳥居光男, 齶蝕原性 シンサ球菌の分離. 同定法. *日本歯醫評論.* 415:125~131. 1977.
  42. Chen, Y.-Y. M., Clancy, K. A., and Burne, R. A. : *Streptococcus salivarius* urease : genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque *Streptococcus*. *Infect. Immun.* 64:585~592. 1996.
  43. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265~275. 1951.
  44. Hardie, J. M., Whilley, R. A., and Sackin, M. J. : A numerical taxonomic study of oral streptococci. p. 59~60. In S. E. Holm and P. Christensen(ed.), Basic concepts of streptococci and streptococcal diseases. Reed Books. Great Britains. 1982.
  45. Smith, R. F., and Bodily, H. L. : Urease-positive oral viridans streptococci. *J. Dent. Res.* 46:1111. 1967.
  46. Feltham, R. K. A., and Sneath, P. H. A. : Construction of matrices for computer-associated identification of aerobic gram-positive cocci. *J. Gen. Microbiol.* 128:713~720. 1982.
  47. Gallagher, I. H. C., Pearce, E. I. F., and Hancock, E. M. : The ureolytic microflora of immature dental plaque before and after rinsing with a urea-based mineralizing solution. *J. Dent. Res.* 63:1037~1039. 1984.
  48. Wijeyeweera, R. L., and Kleinberg, I. : Arginolytic and ureolytic activities of pure cultures of human oral bacteria and their effects on the pH response of salivary sediment and dental plaque *in vitro*. *Archs. Oral Biol.* 34:43~53. 1989.
  49. Socransky, S. S., and Manganiello, S. D. : The oral microbiota of man from birth to senility. *J. Periodontol.* 42:485~484. 1971.
  50. Socransky, S. S., Manganiello, A. D., Propas, D., Oram, V., and Van Houte, J. : Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J. Periodontol. Res.* 12:90~106. 1977.
  51. Gibbons, R. J. : Bacterial adhesion to oral tissue: a model for infectious diseases. *J. Dent. Res.* 68:750~760. 1989.
  52. Socransky, S. S., and Haffajee, A. D. : Microbial diseases: a critical assesment. *J. Periodontol. Res.* 26:195~212. 1991.
  53. Jenkinson, H. F., and Lamont, R. J. : Streptococcal adhesion and colonization. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 8:175~250. 1997.
  54. Kolenbrander, P. E., and London, J. : Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* 175:3247~3252. 1993.
  55. Pearce, E.I.F. : Therapeutic modification to the mineral ion composition of dental plaque. *Caries Res.* 18:103~114. 1984.
  56. Pearce, E. I. F. : Effect of plaque mineralization on experimental dental caries. *Caries Res.* 16:460~471. 1982.
  57. Sissons, C. H., and Cutress, T. W. : pH changes during simultaneous metabolism of urea and carbohydrate by human salivary bacteria *in vitro*. *Archs. Oral Biol.* 33:579~587. 1988.
  58. Slonczewski, J. L., Gonzales, T.N., Bartholomew, F. M., and Holt, N. J. : Mu d-directed *lacZ* fusions regulated by low pH in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:842~851. 1988.
  59. Aliabadiz, Z., Park, Y.-K., Slonczewski, J. L., and Foster, J. W. : Novel regulatory loci controlling oxygen- and pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 170:842~851. 1988.
  60. Helgeland, K. : pH and the effect of NH<sub>4</sub>Cl on human gingival fibroblasts. *Scand. J. Dent. Res.* 93:39~45. 1985.