KOREAN J. FOOD & NUTR.
Vol. 12, No. 2, 199~203(1999)

*Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus acidophilus*에 대한 Polylysine의 항균활성

전주연 · 이갑상* · 신용서*
원광보건대학 치위생과, *원광대학교 생명자원과학대학 응용미생물학교실

Antimicrobial Activity of Polylysine against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*

Ju-Yean Chun, Kap-Sang Lee* and Yong-Seo Shin*
Dept. of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-749, Jeonbuk, Korea
**College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Jeonbuk, Korea*

Abstract

To evaluate antidental caries activity of polylysine, cell growth and acid production of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* were microbiologically monitored in anaerobic broth system containing various concentration of polylysine. The pH and heat stability of polylysine having antimicrobial activity were also examined. Two tested microbes were fairly well grown in broth containing polylysine 0.1 mg /ml, however, inhibited at 1 and 2 mg /ml of polylysine concentration. Especially, lag times of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* were prolonged to about hour at 1.0 and 2.0 mg /ml of polylysine. Acid production of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* was also decreased by polylysine. Antimicrobial activity of polylysine was not affected by the change of pH and the heat treatment.

Key words : polylysine, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, antimicrobial activity.

서 론

치아우식은 치면세균막내에 존재하는 *Streptococcus mutans*와 같은 산생성균들이 치면에 부착하여 구강으로 섭취된 음식물 중의 발효성 당을 대사에 이용하여 생성된 유기산의 작용으로 치아의 법랑질이나 백악질이 파괴되어 발생되는 범발성 질환 중의 하나이다[1,2].

이러한 치아우식증에 대한 예방치학적 연구로써 칫솔질, 항균제제의 개발, glucosyltransferase 합성저해제의 개발, 비발효성 당의 선택적 섭취와 같은 측면에서 진행되어 왔으며, 그 중 *Streptococcus mutans*에 대한 항균활성을 갖는 물질의 개발과 그 효과에 관한 연구들이 최근 들어 국내외에서 상당수 진행되어 왔다[3~8].

Corresponding author : Yong Seo Shin

즉 불소, 클로로헥시딘과 같은 화학물질의 사용 효과, 항생제와 효소제의 사용 효과 등의 연구가 있다. 특히 수천년 동안 식이를 통해 그 안정성이 입증된 녹차[5], 가자[9], 황백[1] 등의 천연물을 대상으로 항균제제의 개발 및 그 효과 등이 연구되어지고 있다. 그러나 이러한 것들은 dental fluorosis, 내성균 출현, 구강점막 세포의 궤양이나 박리 및 경제성과 같은 문제점들이 발생되고 있어 실용화된 예는 흔치 않다[10~12].

한편 polylysine은 아미노산인 L-lysine의 homopolymer이며 물에 대한 용해도가 비교적 우수하여 식품, 치약 및 양치용액의 첨가물로써 적용방법이 기술적으로 용이할 뿐만 아니라 그 적용범위도 상당히 넓다. 또한 polylysine은 polypeptide로 인체에 무독하고, 구강유입시 구강내에서 그 기능을 수행하는데 장애가 없을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 새로운 형태의 항우식 활성

제제의 개발을 목적으로 polylysine의 *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus acidophilus*에 대한 항균활성 및 산생성의 억제 능력을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

Streptococcus mutans JC-2(*Sc. mutans*)는 원광대학교 치과대학 미생물학교실, *Lactobacillus acidophilus*(*Lac. acidophilus*)는 생명공학연구소의 유전자은행으로부터 분양을 받아 20% glycerol이 포함된 brain heart infusion broth(Difco, USA)에 넣어 −70℃의 Deep freezer에 보관하였으며 실험에 사용하기 전 3회 계대 배양하였다.

2. 항균활성 측정

Cap screw tube에 BHI broth을 넣고 혼합기체(CO_2 : 15%, H_2 : 5%, N_2 : balance)로 bubbling 시켜 용존산소를 제거한 후 살균(120℃, 15분)하고, 40℃로 냉각시킨 배지에 제균한 polylysine(Sigma Chemical Co., USA)을 0, 0.1, 1.0 및 2.0mg/ml 농도로 첨가시켰다. 준비된 배지에 시험균을 4% (v/v)되게 접종하고 37℃의 anaerobic control glove box(Sheldon Manufacturing, USA)내에서 24시간 동안 배양하면서 경시적인 균의 생육을 Spectrophotometer(Varian DMS 200, USA)를 이용하여 620nm에서 optical density로 측정하였다[13].

3. 산 생성량 측정

시험균에 의해 생성되는 유기산의 함량 변화는 pH와 적정산도를 측정하여 평가하였다. 즉 pH는 *Sc. mutans*와 *Lac. acidophilus* 배양액에 직접 pH 전극(ORION SA 720, USA)을 넣고 측정하였으며, 적정산도는 배양액 10g에 증류수 40ml를 가한 후 0.1N NaOH 용액을 표준용액으로 하여 적정하고 소비된 NaOH량을 젖산량으로 환산하였다.

4. Polylysine 항균활성의 pH 및 열 안정성

Polylysine의 항균활성에 대한 pH 및 열 안정성을 평가하였다. pH 안정성의 경우에는 완충용액을 이용하여 BHI 배지의 pH를 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0으로 조정하고 *Sc. mutans*의 경시적인 생육을 optical density로 측정하였다. Polylysine의 열 안정성의 경우, 대조구는 살균, 냉각한 BHI broth에 제균된 polylysine을 첨가하고, 시험구는 polylysine이 첨가된 BHI broth을 60℃에서 30분간, 120℃에서 15분간 살균하여 *Sc. mutans*의 성장상태를 측정하여 평가하였다.

결 과

1. Polylysine의 항균활성

Sc. mutans JC-2와 *Lac. acidophilus*의 항균에 미치는 polylysine의 억제 효과를 평가하기 위해 BHI broth에 polylysine을 0, 0.1, 1.0, 2.0mg/ml의 농도로 첨가하고 배양하면서 경시적으로 측정한 *Sc. mutans*와 *Lac. acidophilus*의 생육곡선은 Fig. 1 및 2와 같다. 즉 polylysine의 첨가로 두 시험균의 생육이 억제되는 경향이었다. 0.1mg/ml의 첨가농도에서는 대조구와 같이 정상적인 생육곡선을 나타내어 그 항균활성이 뚜렷하지 않았으나 1.0과 2.0mg/ml의 첨가농도에서는 *Sc. mutans*나 *Lac. acidophilus*의 생육에 대해 뚜렷한 항균활성을 나타내었으며, 특히 lag time이 두 시험균 모두에서 1시간 정도 연장되는 효과가 있었다.

2. 시험균의 산생성량에 미치는 polylysine의 영향

Polylysine의 시험균에 대한 산생성 억제능력을 평가하기 위해서 *Sc. mutnas*와 *Lac. acidophilus* 배양액의 pH와 적정산도를 측정한 결과는 Fig. 3, 4, 5 및 6과 같다. 즉, pH는 두 시험균간의 유의적인 차이 없이 polylysine의 첨가로 그 감소폭이 미미하였으나 0.1mg/ml 첨가 농도에서는 대조균과 큰 차이가 없이 감소폭이 크게 나타났다. 적정산도는 Fig. 5과 6

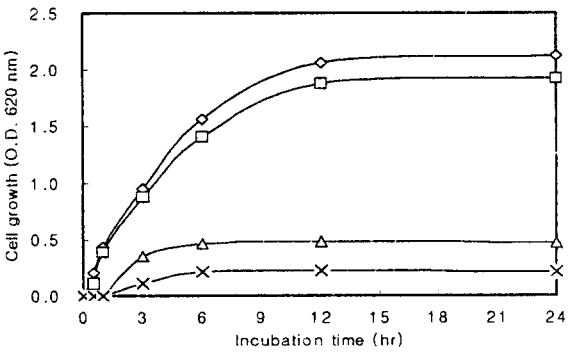

Fig. 1. Inhibitory effect of polylysine on the growth of *Streptococcus mutans* in anaerobic culture. ◇ : 0.0 mg/mL, □ : 0.1 mg/mL, △ : 1.0 mg/mL, × : 2.0 mg/mL.

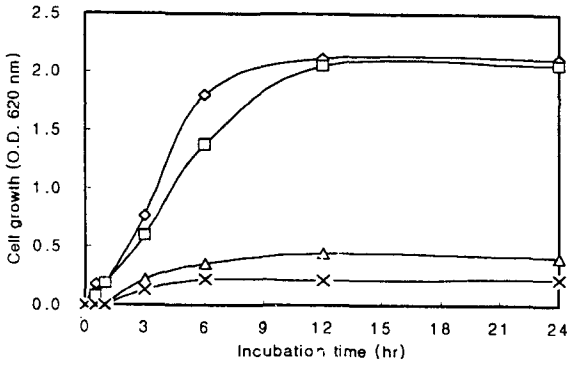

Fig. 2. Inhibitory effect of polylysine on the growth of *Lactobacillus acidophilus* in anaerobic culture. ◇ : 0.0 mg /mL, □ : 0.1 mg /mL, △ : 1.0 mg /mL, × : 2.0 mg /mL.

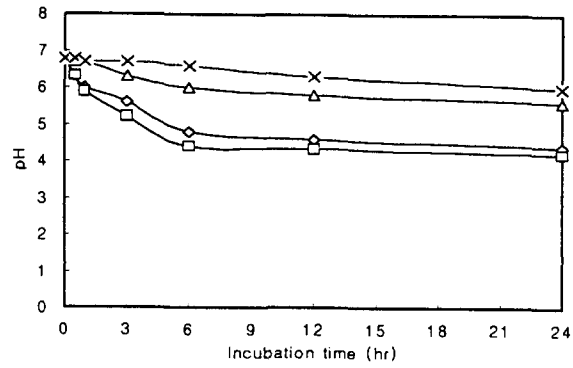

Fig. 3. Effect of polylysine on the pH of anaerobic cultures of *Streptococcus mutans*. ◇ : 0.0 mg /mL, □ : 0.1 mg /mL, △ : 1.0 mg /mL, × : 2.0 mg /mL.

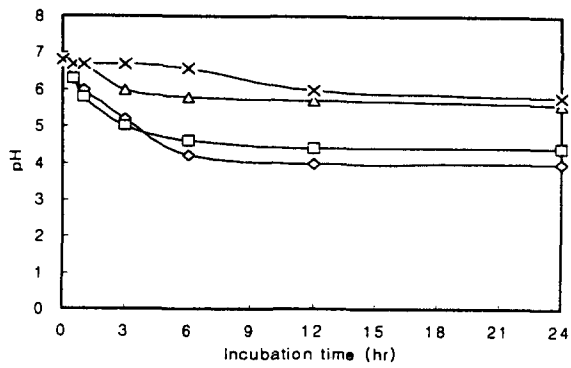

Fig. 4. Effect of polylysine on the pH of anaerobic cultures of *Lactobacillus acidophilus*. ◇ : 0.0 mg /mL, □ : 0.1 mg /mL, △ : 1.0 mg /mL, × : 2.0 mg /mL.

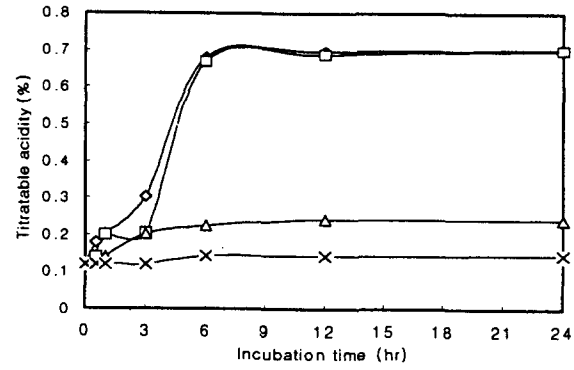

Fig. 5. Effect of polylysine on the titratable acidity of anaerobic cultures of *Streptococcus mutans*. ◇ : 0.0 mg /mL, □ : 0.1 mg /mL, △ : 1.0 mg /mL, × : 2.0 mg /mL.

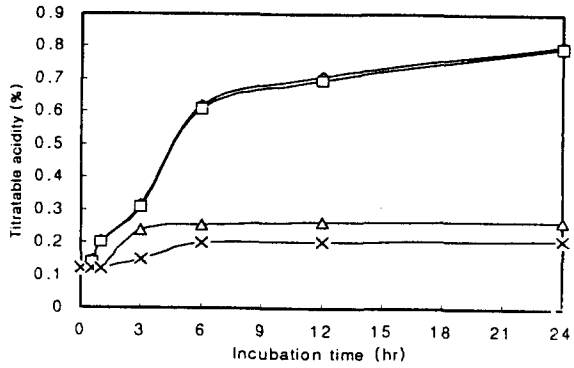

Fig. 6. Effect of polylysine on the titratable acidity of anaerobic cultures of *Lactobacillus acidophilus*. ◇ : 0.0 mg /mL, □ : 0.1 mg /mL, △ : 1.0 mg /mL, × : 2.0 mg /mL.

에서 보는 바와 같이 균의 생육과 거의 유사한 변화를 보였다. 즉, polylysine의 첨가로 인해 적정산도도 감소하는 경향이었으나 polylysine 0.1mg /ml 첨가 농도에서는 대조균과 유의적인 차이가 보이지 않았다.

3. Polylysine 항균활성의 pH 및 열 안정성

Polylysine의 항균활성에 대한 pH 및 열처리의 영향을 조사한 결과는 Fig. 7 및 8과 같다.

Polylysine은 pH가 5.0~8.0으로 조정된 배지 내에서도 그 항균활성이 소실되지 않은 것으로 나타나 pH 안정성이 뛰어난 것으로 평가되었으며, 60℃에서 30분간의 열처리 뿐만 아니라 120℃에서 15분간의 열처리에도 그 항균활성을 유지하고 있어 열 안정성이 매우 우수한 것으로 나타났다.

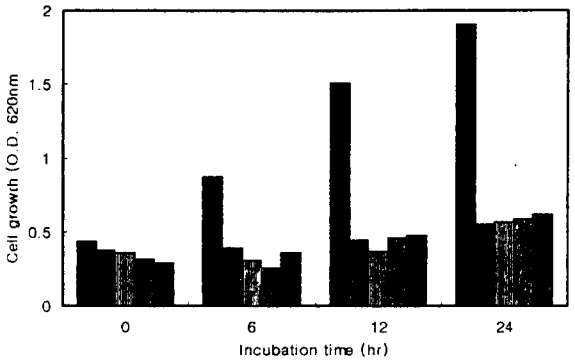

Fig. 7. pH stability of polylysine on the antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*.
■ ; Non-treatment of polylysine + pH 7.0
▦ ; Treatment of polylysine(2mg /ml) + pH 5.0
▥ ; Treatment of polylysine(2mg /ml) + pH 6.0
▧ ; Treatment of polylysine(2mg /ml) + pH 7.0
▤ ; Treatment of polylysine(2mg /ml) + pH 8.0

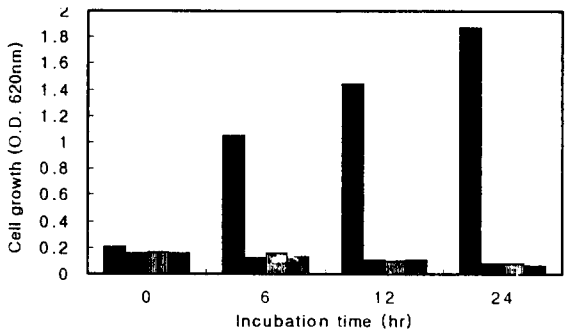

Fig. 8. Heat stability of polylysine on the antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*. ■ ; Non-treatment of polylysine, ▦ ; Treatment of polylysine(2mg /ml) + Nontreatment of heat, ▥ ; Treatment of polylysine(2mg /ml) + 60℃ for 30min, ▤ ; Treatment of polylysine (2mg /ml) + 120℃ for 15min.

고 찰

치아우식증에 대한 다양한 예방법 등이 시행되고 있음에도 불구하고 우리 나라의 치아우식 이환율은 계속 증가 추세에 있으며, 예방치과학 분야에서는 좀 더 적극적이고 다각적인 치아우식예방법 등이 연구 시행되고 있다. 즉 지금까지 알려진 불화물 이용법, 치면세균막 관리, 식이조절 등의 방법과 더불어 항 미생물 제재에 관한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. 그 동안 항 미생물 제재는 주로 천연물인 녹차추출물, propolis[14], flavonoid[15], 황백추출물[1], 해조류 추출물인 funoran[16], berberine[17] 등이 항균효과가 있는 것으로 보고되었다. Polylysine은 필수아미노산의 일종인 L-lysine이 직쇄상으로 연결된 구조로 미생물 배양으로 얻어지는 물질로 주로 식품의 보존성 향상에 사용할 목적으로 연구가 진행 중에 있다.

Polylysine은 천연물로 안정성이 높고 많은 종류의 미생물에 대해 증식을 억제하며, 열에 대한 안정성이 높고 물에 대한 용해성 또한 양호한 것이 특징이다. 이러한 polylysine을 본 연구에서는 두 치아우식 원인균에 대한 항균활성과 산생성 억제능력, polylysine의 항균활성에 대한 pH 및 열 안정성을 평가하였다.

Polylysine의 *Sc. mutans* JC-2와 *Lac. acidophilus*에 대한 항균효과는 0.1mg /ml 첨가농도에서는 항균활성이 대조구와 같았으나, 1.0mg /ml, 2.0mg /ml의 첨가농도에서는 뚜렷한 항균활성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 polylysine이 어떠한 항균 mechanism에 의해 균의 생육을 억제시키는지는 현재까지 문헌을 통해 고찰할 수 없을 정도로 연구된 바가 없기 때문에 단백질성 물질의 항균활성 mechanism 연구방법 앞으로의 중요한 연구과제가 될 것으로 생각된다. Polylysine이 *Sc. mutans*와 *Lac. acidophilus*의 산생성 능력에 어떠한 영향을 주는가 평가하기 위해 두 시험균의 배양액의 pH와 적정산도를 측정하였다. 즉, polylysine 1.0mg /ml, 2.0mg /ml에서는 두 시험균 모두 pH의 감소폭이 미미하였고, 적정산도는 균의 생육과 유사하게 나타나 polylysine의 첨가로 적정산도도 감소하는 것으로 나타났다. 즉 이러한 pH와 적정산도의 변화는 polylysine에 의해 시험균의 산생성량이 감소된 것으로 판단되며, 이는 *Sc. mutans*와 *Lac. acidophilus*의 대사과정이 억제되어 산생성량이 감소되었거나, 균의 증식이 억제되어 대조군에 비해 첨가군의 균수가 상대적으로 적은 것에 기인된 것으로 해석할 수 있다. Polylysine의 항균활성에 대한 pH 및 열안정성을 조사한 결과 polylysine은 pH 5.0~8.0으로 조정된 배지내에서도 그 항균활성이 소실되지 않은 것으로 나타났고 열처리에 대해서 항균활성을 유지하고 있어 열안정성 또한 우수한 것으로 나타났다. 대부분의 단백질성 polypeptides는 pH나 열처리에 의해 그 3차 구조가 변화되어 야기되는 변성에 의해 그 생리적 활성이 소실되어 산업적 이용에는 한계가 있다고 보고되고 있다. 이러한 측면에서 볼 때 항균활성을 갖는 polylysine의 산업적 이용에 따른 가공 적정성은 매우 우수한 것으로

생각된다. 이상의 결과로써, polylysine은 인체에 무독할 뿐만 아니라 우식 원인균이라 할 수 있는 *Sc. mutans*와 *Lac. acidophilus*의 생육을 억제하고 산 생성량을 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타나 각종 우식 활성예방제제로써 가능성이 있을 것으로 보인다.

요 약

단백질성의 치아우식 예방제를 개발하기 위해 polylysine을 선정하고 *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus acidophilus*의 생육과 산생성량에 미치는 영향을 anaerobic broth system에서 미생물학적인 방법에 준하여 조사하였으며, polylysine의 항균활성에 대한 pH와 열 안정성을 조사하였다. *Streptococcus mutnas*와 *Lactobacillus acidophilus*의 생육은 polylysine의 첨가농도가 증가할수록 감소하였으며 1.0mg /ml 이상의 첨가농도에서는 두 시험균의 lag time이 약 1시간 정도 연장되는 효과가 있었다. 시험균의 산 생성량도 polylysine에 의해 감소되었으며 특히 1.0mg /ml의 첨가농도에서 그 효과가 뚜렷하였다. Polylysine은 pH 5.0~8.0에서도 그 항균활성이 유지되었으며, 60℃에서 30분간, 120℃에서 15분간의 열 처리에도 그 항균활성이 소실되지 않았다.

감사의 말

이 논문은 1998년도 원강보건대학 교내 연구비에 의하여 수행된 결과로 이에 감사드린다.

참고문헌

1. 박정순, 김선숙, 김성효, 이갑상, 신용서 : 황백물추출물이 *Streptococcus mutans* JC-2의 생육과 산생성에 미치는 억제효과, *대한구강보건학회지*, 19, 439~446(1995).
2. 김종배 : 공중구강보건학. 초판. 고문사, 서울, p. 53~67(1987).
3. 배기환, 김봉희, 명평근 : 충치균에 대한 생리활성 생약성분의 분리 및 약효 평가 (1), *약학회지*, 2, 104~108(1987).
4. Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M. and Yamamoto, T. : Antibacterial substances in Janpanese green tea extract against *Streptococcus mutans*. A cariogenic bacterium, *Agri. Biol. Chem.*, 9, 2307~2311(1982).
5. 김선숙 : 탄닌 및 비타민 B_6가 *Streptococcus mutans* 10449의 성장 및 시험관벽부착에 미치는 영향, 원광대학교 대학원 석사학위논문(1991).
6. 전체옥, 서유택, 전기봉 : 천연물로부터 *Streptococcus mutans* 및 glucosyltrans- ferase저해제 개발, 대한치주연구소 산학연 학술 심포지움, p. 49~63(1993).
7. 유영선, 박기문, 김영배 : 생약재 및 향신료의 *Streptococcus mutans*증식 억제효과, *한국산업미생물학회*, 21, 187~191(1993).
8. Kozai, K., Miyake, Y., Kohda, H., Kamataka, S., Yamasak, K., Suginakza, H. and Nagasaka, K. : Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and urosonic acid, *Caries Res.*, 21, 104~108(1987).
9. 남용옥, 이갑상, 강은주 : 가자추출물이 *Streptococcus mutans* JC-2의 산생성에 미치는 억제효과 및 치은세포 활성에 미치는 영향, *대한구강보건학회지*, 20, 156~164(1996).
10. Ismail, A. I., Brodeur, J. M., Kanvanagh, M., Boisclair, G., Tessier, C. and Picotte, L. : Prevalence of dental caries and dental fluorosis in students. 11-17 years of age, in fluoridated and non-fluoridated cities in Quebec, *Caries Res.*, 24, 290~297(1990).
11. Riordan, J. J. : Dental fluorosis, Dental caries and fluoride exposure among 7-year-olds, *Caries Res.*, 27, 71~77(1993).
12. Brunelle, J. A. : The prevalence of dental fluorosis in US children, 1987 [abstract]. *J. Den. Res.*, 68, 995~999(1989).
13. 신용서: 장관조건하에서 젖산균의 생존과 그 유용성에 관한 연구, 원광대학교 대학원 박사학위 논문(1994).
14. 유영관, 노재승, 김주심 : *S. mutans, Lactobaccilli* 및 *Actinomyces*에 대한 수종 Propolis 추출물의 항세균 효과, *대한구강보건학회지*, 20, 65~74(1996).
15. 정대인, 노재승, 장기완 : 수종 Flavonoids의 우식원인균에 대한 항세균 효과, *대한구강보건학회지*, 20, 189~202(1996).
16. Saeki, Y., Kato, T., and Naito, Y. : Inhibitory effects of funoran on the adherence and colonization of *mutans streptococci, Caries Res.*, 30, 119~125(1996).
17. 장기완, 고광준, 유영관 : Berberine의 *mutans streptococci*에 대한 항세균 효과, *대한구강보건학회지*, 21, 537~544(1997).

(1999년 4월 30일 접수)