S. mutans에 抗菌力을 나타내는 菌株의 培養學的 性質

대구보건대학 치기공과
박 명 호

=Abstract=

Nutritional and Cultural characterizations of microorganism capable of producing antagonistic activity against Streptococcus mutans

Park, Myung Ho

Dept. of Dental laboratory Technology, Taegu Health College

The optimum culture conditions for an antibiotics from Actinomyces sp. were investigated. The optimum composition of medium for antibiotics production was 1% glucose, 1% soybean meal, 0.5% NaCl, 0.1% $CaCO_2$, and the optimum initial pH was 7.0. And the antibiotics showed highest anctivity when the strain isolated from soil was aerobically cultivated at 28℃ for 72hours under the optimum conditions. A production of the antibiotics from Actinomyces sp. begins at the 36th hours and then reached the maximum at the stationary phase developed at the 72th hours under the optimum conditions.

Ⅰ. 서 론

사람의 몸은 미생물과 끊임없ㅣ 접촉하고 있으며 실제로 사람의 몸속과 피부에는 수십조의 세균이 존재하고 있고 이 균들의 대부분은 사람의 건강에 도움을 주며 소수의 균들은 필수적인 역할을 하고 있다 이와 같이 사람의 조직과 세균 사이에 형성된 관계를 통하여 사람의 몸속에 존재하는 균들을 총체적으로 normal flora이라고 한다. 이러한 미생물은 대부분이 몸이 외부로 노출된 부분인 피부, 구강, 호흡기도, 장관, 비뇨생식기도에 거의 언제나 존재한다. 그 중 구강 미생물상은 사람의 몸중 가장 복잡하며 다른 기관에 비하여 이질적이다. 즉, 구강은 공기, 물, 음식, 손가락 등을 통하여 집다한 세균에 노출되어 있고 온도 또한

세균이 증식하기에 적합하여 다양한 미생물이 상재균총(bacterial flora)을 형성하고 있을 뿐만 아니라, 수분도 풍부하고 영양분이 끊임없이 공급되어 세균이 잔류하기에 용이한 조건이 되도록 치간이 갖추어져 있어 호기성세균과 혐기성세균 및 통성혐기성 세균이 많이 증식하고 있다. 특히, 구강내의 협점막 표면, 혀의 표면, 치아표면, 치은열구, 타액 등의 각 부위마다 환경에 따라 장착하여 증식한 상재균(resident bacteria)에 의해 상재균총을 형성하고 있다(Arnim,1959). 실제적으로 구강내에서는 22속 56종 이상의 세균이 분리되는데(Bowden etal, 1979) 구강상재균총은 항상 일정하지 않으며 사람에 따라서 또한 같은 사람이라도 연령과 건강상태, 식사의 내용이나 구강의 위생상태에 따라서 구강 세균의 종류와 비율이 달라진다.

그 중 치아는 구강 미생물의 자연상의 영향을 미쳐 치아가 없는 경우 생후 1년의 영아의 구강에는 연쇄구균, 유산균 등의 통성 혐기성균과 소수의 호기성균이 있으며 치아가 발생하면서 차츰 미생물 상이 호기성 세균으로 변화하면서 구강병 발생원인 중 미생물적 요인을 형성하고 있는 것으로 알려져 있다.(Bowden and Hardie, 1978 : Holmberg and Nord, 1975: Slack and Gerencser, 1975) 특히, 치아상실의 87.67%를 차지하고 있는 치아우식증을 유발하는 것으로 알려져 있는 미생물인 Streptococcus sorbrinus와 S. mutans는 젖산을 분비할 뿐만아니라 전자의 균주는 타액의 당단백질과 친화력이 있어 치아의 표면에 집락을 형성하여 치아표면에 치아우식을 유발하며 후자의 균주는 부착성이 강하면서 불용성인 다당류(dextran)를 생성하여 타액의 lysozyme과 lactoperoxidase등과 같은 항균성 물질에 대해 보호작용을 하고 생성된 산이 타액에 의해 희석되지 않도록 하며 우식병소내의 강한 산성의 환경에서 생존할 수 있는 내산성을 가졌다는 것에 의해 통상적으로 원인균으로 알려져 있다.(Gibbons 1984: Jorden et al., 1968: Gibbons and Fitzgerald, 1969 : Hamada and Slade, 1980: Loesche, 1998) 저자는 S. mutans에 대해 특이적으로 작용할 뿐만 아니라 구강내에서 가장 많이 발견되는 streptococci에 대해서도 뛰어난 항균력을 나타내는 방선균주를 분리하였다(박과 김, 1998). 그리하여, 이 균주를 대상으로 하여 항생물질 생산의 최적배양조건을 규명하였기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 사용시약

Na_2HPO_4, KCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCO_3$, cyclohexamide, malidixic acid, methanol 등은 Sigma Co.(U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 그 외의 실험에 사용한 재료 및 시약들은 특급품을 구입하여 사용하였다.

2. 사용균주

토양으로부터 채취한 검체를 멸균 생리식염수로 10배씩 희석한 후 0.05% 비타민 용액(thiamine-HCl 0.5mg, riboflavin 0.5mg, niacin 0.5mg, pyridoxine-HCl 0.5mg, inositol 0.5mg, Ca-pantothanate 0.5mg, p-aminobenzate 0.5mg, biotin 0.25mg)을 함유한 HV agar medium (humic acid 0.1%, Na_2HPO_4 0.05%, KCl 0.171%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, $CaCO_3$ 0.002%, 0.05%, cyclohexamide 0.005%, nalidixic acid 0.002%, Agar 1.75%, pH 7.0; Compound were added after autocalve과 mathanol medium(K_2HPO_4 0.3%, NH_4NO_3 0.3%, NaCl 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, methanol 1.0%, agar 1.5%, pH 7.0)에 토양 희석액 0.1ml씩 도말하여 28°C에서 4~6일간 배양하였다.(Hayakawa and Nonomura, 1987). 생성된 colony 중 서로 상이하다고 생각되는 수백종의 방선균 집락을 채취하고 보관용 배지(Glucose 1.0%, asparagine 0.05%, K_2HPO_4 0.055, agar 1.75%, pH 6.8)에 1백금이 접종하여 28주 중 항균력이 가장 뛰어난 248번 균주를 실험균주로 사용하였다.

3. 배양배지

최적 배지 조성을 설정하기 위하여 기본배지에 여러 가지 탄소원과 질소원을 첨가하여 배조조성을 검토하였다. 종균배양은 기본배양배지 120ml를 분주한 500ml 삼각 flask 에 본공시균주를 1백금이 접종하여 28℃, 120rpm으로 3일간 진탕배양하였다.

4. 생육도 측정

건조균체량은 배양액 10ml를 취하여 2,500rpm(Toyo model, RS-206)에서 20분간 원심분리하여 침전된 균체를 0.1N HCl과 증류수로 세척한 뒤 Toyo filter paper로 여과한 후 37℃에서 24시간 동안 건조시켜 무게를 측정하였다.

5. Stater의 조제

공시균주를 미생물 보존배지에 접종하여 포자가 충분히 형성될 때까지 배양하였다. 그 후, 0.1% Tween 80용액으로 포자를 현탁시킨 후 이를 전배양균으로 사용하였다.

6. 미생물 보존

배양한 균체를 20% glycerol 용액에 현탁하여 deep freezer(-80℃)에 넣어 보관하였다.

III. 결과 및 고찰

토양으로부터 분리한 방선균주가 생성하는 항생물질 생성을 위한 배지의 최적화를 위하여 배지 중의 질소원, 탄소원, 초기 pH 및 배양온도의 영향, 배양 시간에 따른 항생물질의 생성능을 검토하였다.

1. 탄소원의 영향

분리 공시 균주의 항생물질 생성에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 NaCl 0.5%, $CaCO_3$ 0.1%를 첨가한 항생물질 생성배지(pH 7.0)에 각종의 탄소원을 1%씩 되게 첨가하고 250ml 진탕 플라스크에 100ml씩 넣은 후 starter를 증류수로 희석하여 1%되게 각각 접종하였다. 이것을 28℃에서 배양한 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 사용하여 항생물질 활성을 측정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이, 실험균은 단당류인 glucose와 fructose, 이당류인 maltose와 sucrose에서 비교적 양호하여 이들에 대한 농도별 영향을 검토한 결과 fructose의 경우는 농도가 1%에서 glucose의 경우는 농도가 1%에서 배양시간 48시간째에 가장 양호한 결과를 나타내었다. 그리고 이당류인 maltose의 경우에는 농도가 3%에서 배양시간은 48시간째 양호한 결과를 나타내었으며 surose 의 경우에는 비교적 모든 농도에서 거의 같은 양의 항생물질이 생성되었다.(data not shown) 이 결과에서 1%의 포도당이 가장 최적의 항생물질 생산성을 나타내었으므로 이를 탄소원으로 결정하여 다음 실험에 임하였다.

Table 1. Effect of carbon sources on the antibiotics production

Source (1%)	Inhibition zone (ϕ, mm)			
	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
Glucose	-	15	34	23
Maltose	21	25	34	23
Soluble starch	-	-	10	-
Dextrin	-	-	13	21
Glycerin	12	17	22	21
Sucrose	20	23	20	22
Fructose	25	26	26	26

Various carbon sources were added at the final concentration of 1.0% to the basal medium that consisted of 0.5% NaCl, 0.1% $CaCO_3$, and pH adjusted to 7.0. The culti-vation were carried out at 28℃ for 120 hour with shaking(150 rpm).

2. 질소원의 영향

항생물질의 생성에 미치는 질소원의 영향을 알아보기 위하여 glucose 1%, NaCl 0.5%, $CaCO_3$ 0.1%를 첨가한 항생물질 생성배지(pH 7.0)에 유기질소원과 무기 질소원의 최종 농도가 1%되게 첨가하고 250ml 진탕 플라스크에 100ml씩 넣은 후, 포자 현탁액을 1%씩 접종하였다. 이것을 28℃에서 5일간 진탕배양하여 24시간 단위로 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 모아서 항생물질 활성을 paper disc법으로 측정한 결과 Table 2에서 보는 바와 같다. Table 2에서 보는 바와 같이 Corn steep linquer, soybean meal과 casaminopacid에서 비교적 양호한 결과를 나타내어 이들의 농도별 영향을 검토한 결과 corn steep linquer의 경우는 농도가 1%에서 배양시간 48시간째에 가장 양호하였으며, soybean meal의 경우는 농도가 1%에서 배양시간 72시간째에 가장 양호한 결과를 나타내었다.(dada not shown) 그리고 casamino acid의 경우에는 농도가 3%에서 배양시간은 72시간째 양호한 결과를 나타내었다. 이 결과에서 보는 바와 같이 1.0%의 soybean meal이 가장 최적의 항생물질 생산성을 나타내었으므로 이를 질소원으로 결정하여 다음 실험에 임하였다.

Table 2. Effect of nitrogen sources on the antibiotics production

Source (1%)	Time (day)			
	2	3	4	5
	Inhibition zone (ϕ, ㎜)			
Polypeptone	-	20	32	37
Bacto - soytone	12	18	26	30
Beef extract	-	18	20	28
Corn steep linquer	25	27	34	32
Malt extract	-	-	12	16
Trypton	-	12	16	26
Soybean meal	20	41	50	40
Yeast extract	-	15	29	24
Ammonium nitrate	-	-	-	11
Ammonium sulfite	-	-	8.0	8.0
Ammonium chloride	-	-	-	-
KNO_3	-	-	-	-
Casamino acid	10	21	23	23
Asparagine	0	11	12	12
Ammonium sulfate	0	12	15	17

Culture conditions were same as those in Table 1.

3. 초기 pH 및 온도의 영향

공시 균주가 생성하는 항생물질의 생성에 미치는 초기 pH의 영향을 알아보기 위하여 glucose 1%, soybean meal 1%, $CaCO_3$ 0.1%, NaCl 0.5%을 함유한 항생물질 생성배지에 초기 pH를 각각 다르게 조절하여 공시 균주를 배양하였다. 배양 72시간째 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 paper disc법으로 활성을 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 본 항생물질의 생성은 배지의 초기 pH가 6.5에서 7.5까지 폭넓은 pH 영역에서 양호하였으며, 특히 pH 7.0에서 항생물질의 생성이 가장 좋았고 균의 생육도 가장 양호하였다.

최적 배지 조성의 배지에서 공시 균주의 항생물질 생성에 미치는 배양온도의 영향을 검토하기 위하여 항생물질 생성 최적배지에 starter 1%를 접종하여 항생물질 생성에 미치는 온도의 영향을 알아보았다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 공시 균주의 생성능은 28℃와 30℃에서 가장 양호하였으나 이중 28℃에서 균의 생육과 더불어 항생물질의 생성능이 양호하였다.

4. 배양시간에 따른 세포의 항생물질의 생성

최적 배지 조성에 배지에 공시 균주를 접종하여 28℃에서 진탕 배양하면서 배양시간에 따른 공시 균주의 증식도와 항생물질 생성능을 측정하였다.

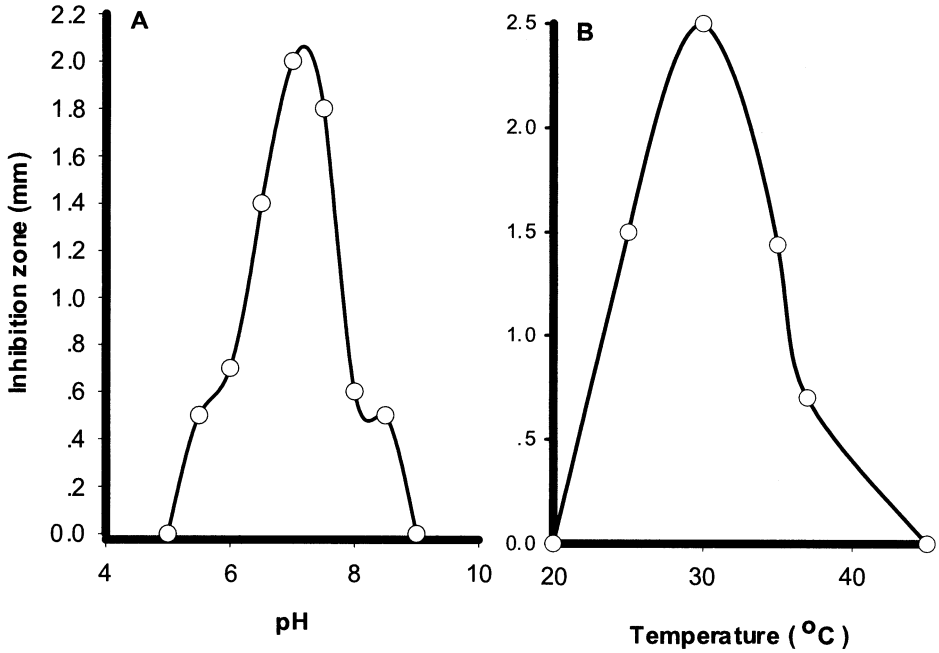

Fig 1. Effect of initial pH and temperature on the antibiotics compound production(A, pH: B, temperature)

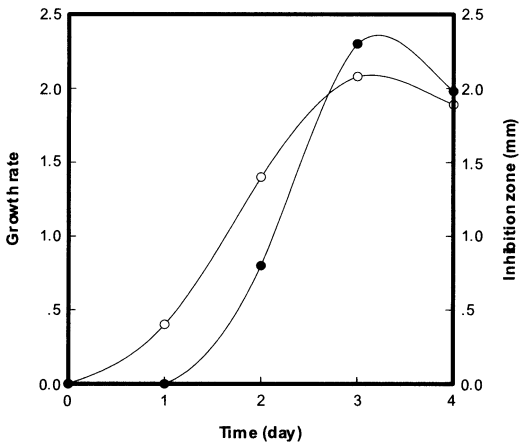

Fig 2. Growth and antibiotics production pattern of the isolated strain No. 248. The culture conditions were same as those of Table 1.(○ : Growth rate, ● : Inhibition zone)

Fig. 2에서 보는 바와 같이 공시 균주는 24시간의 유도기를 거쳐 배양 48시간 이후에 최대 증식도를 나타냈으며 배양시간째 항상물질 생산의 최대값을 나타내었다.

Ⅳ. 요 약

토양시료로부터 치아우식원인균인 S. mutans에 대하여 항균력을 나타내는 방선균주를 순수분리하여 분리균주를 공시균주로 하여 항생물질 생성에 미치는 환경인자를 규명하였다.

본 공시균주의 항생물질 생성 최적배지조성은 Bacto-soytone 1%, glucose 1%, NaCl 0.5%, $CaCO_3$ 0.1% 였으며 배지의 초기 pH는 7.0이었다. 또한 항생물질은 28°C에서 진탕배양시 생성의 최적조건이었으며 본 공시균주는 24시간 유도기를 거쳐 배양 72시간째 항생물질의 생성과 더불어 균의 최대증식도를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Arnim, S. S., 1959, Microcosm of the human mouth. J. Tenn. State Dent. Assoc., 39 : 3-28.
2. Bowen, W. H., 1969, The effect of dextranase on cariogenic and non-cariogenic dextrans. Brit. Dent. J., 124 : 347-349.
3. Bowden, G. H. and Hardie, J. M., 1978, Gram-positive pleomorphic(coryneform) organism from the mouth. In: Coryneform bacteria(Bousefield, I. J. and Calley, A. G. eds.), Academic Press, London, 235-263.
4. Holmberg, K. and Nord, C. E., 1975, Numerical taxonomy and laboratory identification of Actinomyces and Arachnia and some related bacteria. J. Gen. Microbiol., 91 : 1744-1751.
5. Slack, J. M. and Gerencser, M. A., 1975, Actinomyces, filamentous bacteria, biology and pathogenicity, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota.
6. Gibbons, R. J., 1984, Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. J. Dent. Res., 63:378-385.
7. Gibbons, R. J. and Fitzgerald, R. J., 1969, Dextran-induced agglutination of *Streptococcus* mutans, and its potential role in the formation of microbial dental plagues. J. Bacterial., 98 : 341-346.
8. Hamada, S. and Slade, H. D., 1980, Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbial. Rev., 44 : 331-384.
9. Loesche, W. J., 1986, Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbial. Rev., 50 : 353-380.
10. Hayakawa, M. and Nonomura, H., 1987, Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. J. Fermet. technol,. 65 : 501~509.