

Lactococcus lactis 1370가 인공치태 형성에 미치는 영향

부산대학교 치과대학 미생물학교실¹, 전남대학교 의과대학 미생물학교실

정진¹ · 임성이 · 오종석

=Abstract=

Effect of *Lactococcus lactis* 1370 on the Formation of Artificial Plaque

Jin Chung¹, Sung-Yee Yim and Jong Suk Oh

Department of Microbiology, College of Dentistry, Pusan National University¹,

Department of Microbiology, Medical School, Chonnam National University

Streptococcus mutans is the most important causative bacteria of dental caries among the oral bacteria. *Lactococcus lactis* 1370 was isolated from the oral cavity of child. The effect of *Lactococcus lactis* 1370 on the formation of artificial plaque by *Streptococcus mutans* was studied.

1. The insoluble substances and bacteria were much more attached on the wall of disposable cuvette in the culture of *Streptococcus mutans* than in the combined culture of *Streptococcus mutans* and *Lactococcus lactis* 1370.

2. The mean weight of produced artificial plaque on the wires in the beaker was 131.7 mg in the culture of *Streptococcus mutans* only, whereas being reduced to 6.4 mg in the combined culture of *Streptococcus mutans* and *Lactococcus lactis* 1370 ($p < 0.05$). The viable cell didn't show the significant difference between them after culturing.

3. When *Streptococcus mutans* was cultured in the media containing culture supernatant of *Lactococcus lactis* 1370 cultured in M17 broth containing 0.5% yeast extract and 5% sucrose, the mean weight of produced artificial plaque was 8.0 mg on the wires, whereas being 125.4 mg in the media without culture supernatant of *Lactococcus lactis* 1370 ($p < 0.05$). The viable cell didn't show the significant difference between them after culturing.

4. When *Streptococcus mutans* was cultured in the media containing soluble polymer produced by *Lactococcus lactis* 1370, the mean weight of produced artificial plaque was significantly reduced compared with being cultured in the media without soluble polymer ($p < 0.05$). The viable cell didn't show the significant difference between them after culturing.

5. The soluble polymer produced by *Lactococcus lactis* 1370 was glucan.

6. The glucan produced by *Lactococcus lactis* 1370 was water-soluble glucan containing α -1,6-glucose linkage as the main linkage.

These results suggest that the artificial plaque formed by *Streptococcus mutans* is inhibited by water-soluble glucan produced by *Lactococcus lactis* 1370.

Key Words: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus mutans*, Glucan, Plaque

접수 : 2000년 4월 10일, 게재결정 : 2000년 6월 23일

*Corresponding author: 오종석, 501-190 광주광역시 동구 학동 5번지, 전남의대 미생물학교실

전화: 062-220-4134, Fax: 062-228-7294, e-mail: joh@chonnam.chonnam.ac.kr

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

서 론

치아우식증은 구강 질환 중 흔히 볼 수 있는 만성 감염성 질환으로 가장 중요한 원인 세균은 *Streptococcus mutans*이다²⁰. *Streptococcus mutans* 군은 8개의 혈청형 (a-h)으로 나뉘고 혈청형 c, e, f는 *Streptococcus mutans*, 혈청형 d, g는 *Streptococcus sobrinus*로 명명된다¹⁰. *Streptococcus mutans*는 glucosyltransferase (GTF)라는 효소를 생산하여 자당 (sucrose)으로부터 세포외 다당류인 글루칸 (glucan)을 합성한다³¹. 글루칸은 α -1,6-glucose linkage만 갖는 덱스트란 (dextran), α -1,6-glucose linkage가 주된 결합인 수용성 글루칸과 α -1,3-glucose linkage가 주된 결합인 비수용성 글루칸 즉 뮤탄 (mutan)으로 구분되는데, *Streptococcus mutans*는 치태 형성에 있어서 기본 물질인 비수용성 글루칸을 만들어 치아우식증의 발생에 있어서 중요한 역할을 한다^{7,9,33}. 즉 *Streptococcus mutans*는 치태를 매개로 하여 치아에 존재하면서 치아 표면을 탈회시켜 치아우식증을 유발한다³⁰.

*Streptococcus mutans*가 만드는 GTF는 자당으로부터 α -1,3-glucose linkage가 주된 결합인 비수용성 글루칸과 α -1,6-glucose linkage가 주된 결합인 수용성 글루칸을 생성한다²⁰. 이 GTF에는 세 종류가 있는데, 이 중 GTF-S는 수용성 글루칸을 생성하고 GTF-I와 GTF-SI는 비수용성 글루칸을 생성한다^{3,12,13}. 이 효소들은 세 개의 *gtf* 유전자에 의해 생성되는데, *gtfB* 유전자에 의해서 GTF-I, *gtfC* 유전자에 의해서 GTF-SI, *gtfD* 유전자에 의해서 GTF-S가 생성되며^{3,12,13}, 두 개의 기능적 domain 즉, glucan binding domain (GBD)과 sucrose binding domain을 갖고 있다. GTF가 어떤 종류의 글루칸을 생성하는가의 여부나 primer에 의존적인가의 여부는 carboxyl terminal에 있는 GBD와 관련성이 높다²⁹.

유산구균 (*Lactococcus*)은 유산균 중에서 사람들이 먹을 수 있는 가장 안전하면서도 단맛을 내는 정상적으로 존재하는 유익한 세균이다. *Lactococcus lactis* 1370 (유산구균 1370)는 소아의 구강으로부터 분리된 세균으로 *Streptococcus mutans*의 치태 형성을 억제하는 것으로 보고되었다¹.

본 연구에서는 *Streptococcus mutans*의 인공치태 형성에 대한 *Lactococcus lactis* 1370의 억제 효과와 그 기전을 보고자 하였다.

재료 및 방법

공시세균 및 배양

본 연구에서는 전남의대 미생물학교실에 보관 중인 *Streptococcus mutans* Ingbritt strain과 소아의 구강으로부터 분리한 *Lactococcus lactis* 1370를 공시하였으며, 배양은 동결건조로 보관중인 세균을 M17 broth (Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하였다.

일회용 큐벤에서의 비수용성 물질과 세균 부착 억제

Koga 등¹⁹의 방법을 변형하여 실험하였다. 0.5% 효모추출물과 5% 자당이 함유된 M17 broth (M17YS broth)에 TES (N-tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane-sulfonic acid; 2-((2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino)ethane sulfonic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA) buffer 농도가 0.1 M 이 되도록 조정된 3 ml를 일회용 큐벤에 넣고 50 μ l의 *Lactococcus lactis* 1370 배양액과 50 μ l의 *Streptococcus mutans* 배양액을 단독 또는 병합으로 접종하였다. 이것을 배양기 안에 수평면에 대하여 30° 각도로 설치하고 37°C에서 1일간 배양하였다. 내용물을 제거하고 4 ml의 증류수로 세척한 후, 3 ml의 증류수를 가하여 일회용 큐벤의 벽에 부착된 비수용성 물질과 세포를 분광광도계 550 nm 파장에서 흡광도 (optical density)로 측정하였다. 이것을 3회 반복하여 측정 후 평균을 구하였다.

Lactococcus lactis 1370가 인공치태 형성과 생균수에 미치는 영향

McCabe 등²⁴의 방법을 변형하여 실험하였다. M17YS broth에 0.1 M TES buffer를 첨가하여 pH를 7로 조정된 다음, 비커에 40 ml씩 준비하였다. 여기에 2×10^8 의 *Streptococcus mutans*와 2×10^8 의 *Lactococcus lactis* 1370를 단독 또는 병합으로 접종하고 0.016 inch 스테인레스스틸 재질의 교정용 wire (Ormco, Glendora, CA, USA)를 50 mg 내외가 되게 준비하여 3개씩 비커에 매달아 배지에 잠기도록 하였다. 37°C 배양기에서 회전시키면서 9시간 배양한 후, 3개의 wire상에 형성된 인공치태의 무게를 평균하였다. 동시에 세균 배양액을 회석하여 M17 agar상에 접종하여 37°C 배양기에서 18시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

Lactococcus lactis 1370 배양 상청액이 인공 치태 형성과 생균수에 미치는 영향

M17YS broth에 0.1 M TES buffer를 첨가하고 pH를 7로 조정하여 *Lactococcus lactis* 1370를 6시간 배양한 다음, 3000×rpm으로 20분간 원심하여 상청액을 얻어 끓는 물에 3분간 방치하여 상청액 내에 남아 있는 세균을 사멸시켰다. 배양 상청액 20 ml와 M17YS broth 20 ml를 비커에 준비하여 위와 같은 방법으로 실험하였다.

Lactococcus lactis 1370 생성 수용성 폴리머가 인공치태 형성과 생균수에 미치는 영향

Lactococcus lactis 1370를 M17YS broth에서 36시간 배양한 후, 원심하여 상청액을 얻었다. 상청액에 67% 에탄올 용액을 가하여 섞고 원심한 다음, 상청액을 버렸다. 같은 조작을 2번 반복하고 원심하여 남은 침전물을 80℃ oven에서 건조시켜 수용성 폴리머를 준비하였다²⁸⁾. M17YS broth 40 ml와 건조된 수용성 폴리머 2.5% 또는 1.25%를 각각 비커에 준비하여 위와 같은 방법으로 실험하였다.

Lactococcus lactis 1370 생성 수용성 폴리머의 성분

Lactococcus lactis 1370를 M17YS broth에서 36시간 배양하여 얻은 상청액 그리고 위와 같은 방법으로 얻은 수용성 폴리머를 1 M HCl 용액을 가하여 121℃ oven에서 20분간 방치한 것을 포도당, 과당, 자당과 함께 silica gel에서 thin-layer chromatography를 실시하였다. 이때 developer로 85% acetonitrile액을 사용하고 발색제로 5% H₂SO₄와 300 mg/L α -naphthol이 든 메탄올을 사용하여 121℃ oven에서 10분간 방치하였다.

Lactococcus lactis 1370 생성 글루칸의 포도당 결합 구조

Lactococcus lactis 1370가 만드는 글루칸을 메틸레이션²⁷⁾ 시키기 위하여 진공 건조한 5 mg에 0.2 ml의 dimethylsulfoxide를 가하여 80℃ 수조에서 약 2시간 녹였다. 0.2 ml의 Hakomori액을 가하여 잘 흔들어 섞은 후, 약 2시간 실온에 방치하였다. Hakomori액은 sodium hydride를 n-pentane으로 3차례 씻고 dimethylsulfoxide를 가한 후, 50℃로 가열하고 2~4시간 고주파로 분해 (sonication)한 다음, 미네랄 오일을 가하여 제조하였다. Hakomori액을

가한 시료에 0.2 ml의 methyl iodide를 가하여 30분 방치한 후, glass cap tube에 옮겨 3 ml 증류수, 2 ml chloroform, 1 ml methanol을 가하여 강하게 섞어 주었다. 20~30분 후 층분리가 확인되면 윗층만 뽑아버리고 다시 3 ml의 증류수로 2차례 추출하였다. 추출물을 sodium sulfate anhydrous 0.35 g을 첨가하여 1시간 방치하고 오일층을 걷어낸 후, 55 mm 여과지에 여과시켰다. Chloroform층을 공기로 말린 후 증류수 0.5 ml와 trifluoroacetic acid (99%) 0.5 ml를 가하여 121℃에서 2시간 고압멸균하였다. 메틸레이션이 된 글루칸을 산 가수분해시키고 동결건조장치에서 말린 다음, 0.01 ml의 메탄올에 녹였다. 이것을 silica gel에서 thin layer chromatography를 실시하였다. 이때 전개용매로 3 : 9 : 1의 acetonitrile : chloroform : methanol액을 사용하였고 발색제로 5% H₂SO₄와 300 mg/L α -naphthol이 든 메탄올을 사용하여 121℃ oven에서 10분간 방치하였다. 대조군으로 α -1,4-glucose linkage를 갖는 maltotriose와 α -1,6-glucose linkage를 갖는 gentiobiose를 사용하였다. Maltotriose와 gentiobiose를 같은 방법으로 메틸레이션시키고 thin-layer chromatography를 실시하였다.

통계적 처리

각 군간의 무게 차이는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 비교하였으며 통계학적인 유의성은 p value가 0.05 이하인 경우로 하였다.

결 과

비수용성 물질과 세균 부착에 미치는 *Lactococcus lactis* 1370의 영향

M17YS broth에서의 *Streptococcus mutans* 단독 배양시 흡광도는 1.765, *Lactococcus lactis* 1370 단독 배양시 흡광도는 0.479이었으며, 병합 배양시 흡광도는 0.848이었다 (Table 1).

인공치태 형성과 생균수에 미치는 *Lactococcus lactis* 1370의 영향

*Streptococcus mutans*와 *Lactococcus lactis* 1370를 각각 9시간 배양하였을 때 형성된 인공치태 평균 무게는 131.7±12.5 mg, 5.0±1.4 mg이었고, 병합 배양하면 6.4±2.3 mg으로 감소되었다 (p<0.05) (Fig. 1 and Table 2).

동시에 생균수 검사 결과, *Streptococcus mutans*

Table 1. Inhibitory activity of *Lactococcus lactis* 1370 on the production of water-insoluble substance and bacteria attached to the wall of disposable cuvette

Tested bacterial strains	Optical density at 550 nm
<i>Streptococcus mutans</i> (<i>S. mutans</i>)	1.765
<i>Lactococcus lactis</i> 1370	0.479
<i>S. mutans</i> + <i>Lactococcus lactis</i> 1370	0.848

Table 2. *Lactococcus lactis* 1370 affecting the formation of artificial plaque on the orthodontic wires and the replication of *S. mutans*

Tested bacterial strains	Plaque weight (mg)	Viable cells of <i>S. mutans</i> (/ml)
<i>S. mutans</i>	131.7±12.5	7.6×10 ⁸
<i>S. mutans</i> + <i>L. lactis</i> 1370	6.4±2.3	5.4×10 ⁸
<i>L. lactis</i> 1370	5.0±1.4	

*: p<0.05

Table 3. Supernatant of *Lactococcus lactis* 1370 affecting the formation of artificial plaque on the orthodontic wires and the replication of *S. mutans*

Tested bacterial strain and substance	Plaque weight (mg)	Viable cells of <i>S. mutans</i> (/ml)
<i>S. mutans</i>	125.4±10.6	7.2×10 ⁸
<i>S. mutans</i> + Supernatant of <i>L. lactis</i> 1370	8.0±3.7	6.3×10 ⁸

*: p<0.05

Table 4. Soluble polymer produced by *Lactococcus lactis* 1370 affecting the formation of artificial plaque on the orthodontic wires and the replication of *S. mutans*

Tested bacterial strain and substance	Plaque weight (mg)	Viable cells of <i>S. mutans</i> (/ml)
<i>S. mutans</i>	115.0±26.6	1.3×10 ⁸
<i>S. mutans</i> + 2.5% Soluble polymer	22.7±1.4	1.9×10 ⁸
<i>S. mutans</i> + 1.25% Soluble polymer	33.8±2.0	3.0×10 ⁸

*: p<0.05

단독 배양시 *Streptococcus mutans*의 숫자는 ml당 7.6×10⁸이었고, *Lactococcus lactis* 1370와 병합 배양시는 5.4×10⁸으로 의미있는 차이는 없었다 (Table 2).

인공치태 형성과 생균수에 미치는 *Lactococcus lactis* 1370 배양 상청액의 영향

*Streptococcus mutans*를 M17YS broth에 9시간 배양하였을 때 형성된 인공치태 평균 무게는 125.4±10.6 mg이었고, M17YS broth에서 *Lactococcus*

lactis 1370를 배양한 배양 상청액과 M17YS broth를 1:1로 가하고 *Streptococcus mutans*를 배양하면 인공치태 평균 무게는 8.0±3.7 mg으로 감소되었다 (p<0.05) (Table 3).

동시에 생균수 검사 결과, *Streptococcus mutans* 배양시 세균의 숫자는 ml당 7.2×10⁸이었고, *Lactococcus lactis* 1370 배양 상청액을 가한 경우는 ml당 6.3×10⁸으로 배양 상청액을 가하지 않을 때와 의미있는 차이는 없었다 (Table 3).

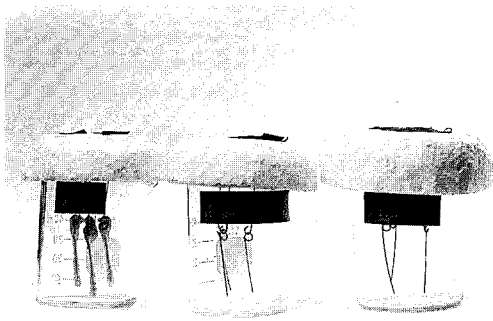


Figure 1. Effect of *Lactococcus lactis* 1370 on the formation of artificial plaque by *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). *S. mutans* (Left), *S. mutans* and *Lactococcus lactis* 1370 (Middle), or *Lactococcus lactis* 1370 (Right) were inoculated into M17 broth containing 0.5% yeast extract and 5% sucrose in the beaker, respectively.

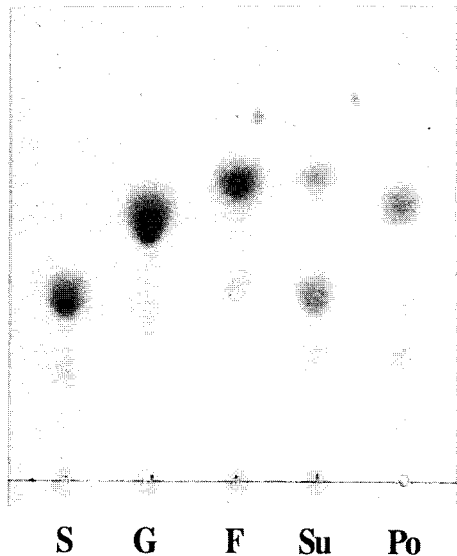


Figure 2. Thin layer chromatography of soluble polymer produced by *Lactococcus lactis* 1370. Thin layer chromatography was conducted on silica gel plate using acetonitrile. The supernatant of bacterial culture (Su) was treated by 67% ethanol and dried in 80°C oven, leaving the precipitate. The precipitate was added with 1 M HCl (Po). S, G, and F are sucrose, glucose, and fructose, respectively.

인공치태 형성과 생균수에 미치는 *Lactococcus lactis* 1370 생성 수용성 폴리머의 영향

*Streptococcus mutans*를 M17YS broth에 9시간 배

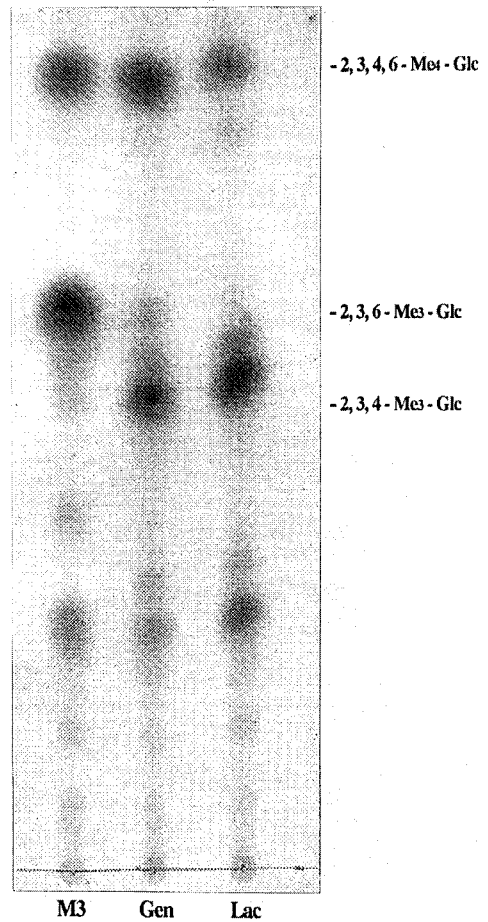


Figure 3. Thin layer chromatography of glucan produced by *Lactococcus lactis* 1370. Thin layer chromatography was conducted on silica gel plate using 3/9/1 of acetonitrile/chloroform/methanol. The glucan formed by *Lactococcus lactis* 1370 (Lac) was methylated. Maltotriose (M3) is a standard carbohydrate containing α -1,4-glucose linkage and gentiobiose (Gen) is a standard carbohydrate containing α -1,6-glucose linkage.

양하였을 때 형성된 인공치태 평균 무게는 115.0 ± 26.6 mg이었고, *Lactococcus lactis* 1370 생성 수용성 폴리머 2.5%를 가하면 인공치태 평균 무게는 22.7 ± 1.4 mg으로 ($p < 0.05$), 1.25%를 가하면 33.8 ± 2.0 mg ($p < 0.05$)으로 감소되었다 (Table 4).

동시에 생균수 검사 결과, *Streptococcus mutans* 배양시 세균의 숫자는 ml당 1.3×10^8 이었고, *Lactococcus lactis* 1370 생성 수용성 폴리머를 가한 경우는 각각 ml당 1.9×10^8 , 3.0×10^8 으로 수용성 폴

리머를 가하지 않을 때와 의미있는 차이는 없었다 (Table 4).

Lactococcus lactis 1370 생성 수용성 폴리머

Lactococcus lactis 1370 배양 상청액을 thin-layer chromatography를 실시한 결과, Fig. 2의 Su line에서와 같이 과당과 자당을 볼 수 있었다. Fig. 2의 Po line에서는 폴리머 (polymer)를 1 M HCl 용액으로 가수분해시 포도당과 같은 위치에 있는 것으로 보아 *Lactococcus lactis* 1370가 생성한 수용성 폴리머는 포도당의 중합체인 글루칸이었다 (Fig. 2).

Lactococcus lactis 1370 생성 글루칸의 포도당 결합 구조

Fig. 3에서 M3 line은 α -1,4-glucose linkage를 갖는 포도당이 위치하고 Gen line에서는 α -1,6-glucose linkage를 갖는 포도당이 위치하며, 그 사이는 α -1,3-glucose linkage를 갖는 포도당이 위치한다. *Lactococcus lactis* 1370가 생성한 글루칸을 메틸레이션하여 가수분해한 다음 thin-layer chromatography를 실시한 결과, Fig. 3의 Lac line에서와 같이 글루칸에서 분해된 포도당은 주로 α -1,6-glucose linkage를 갖는 포도당이었으며, 약간의 α -1,3-glucose linkage를 갖는 포도당도 보였다. 즉 *Lactococcus lactis* 1370가 생성한 글루칸은 α -1,6-glucose linkage를 갖는 포도당이 많고 α -1,3-glucose linkage를 갖는 포도당이 적은 수용성 글루칸이었다 (Fig. 3).

고 찰

Streptococcus mutans 군은 항원성에 따라 8개의 혈청형 (a-h)으로 나눌 수 있는데, 이 중 혈청형 c가 전세계적으로 가장 많이 분리되고 있으며, 구강내 치태 형성의 주된 세균이다¹⁰⁾. *Streptococcus mutans* c 혈청형이 생성한 세포의 다당류의 초기 세 구조를 투과전자 현미경으로 관찰하면 세가지 성분, 즉 구형의 프럭탄 (fructan), 한가닥 섬유 구조의 텍스트란, 두가닥 섬유 구조의 뮤탄으로 구성되어 있다³⁷⁾. 프럭탄과 텍스트란은 세균의 세포외 에너지 공급원이 되고 비수용성 글루칸인 뮤탄은 치아 표면에 *Streptococcus mutans* 외에 다른 세균들의 증식을 촉진시킨다. 세포외 글루칸은 *Streptococcus mutans* 외에도 다른 *Streptococcus*

species, *Lactobacillus* species와 같은 구강 세균에 의해 생성되는데, 이들 세균이 치아 표면에 부착하여 치태를 형성하는데 기여하고 있다^{6~8,11)}. 치태는 세균과 세균간 물질로 구성되어 있다²⁵⁾. 치태 형성 초기에는 타액에서 유래된 당단백에 의해 획득 피막이 형성되는데 세균들은 초기에 이 피막과 비특이적으로 약하게 결합하다가 세포외 다당류를 생성하게 되면 강하게 결합한다. 세포외 다당류는 치아와 치주 건강에 중요한 역할을 하는데, 이는 첫째, 세포외 다당류는 끈끈한 특성을 가지고 접착성이 강하여 세균의 부착 및 응집을 조장하고, 둘째, 세균이 필요로 하는 에너지의 저장소가 될 수 있으며, 셋째, 세균이 만드는 독소와 염증을 일으키는 물질을 포함하고 있기 때문이다.

치태의 형성 시간이나 섭취되는 음식과 상관없이 치태내에서 우세한 미생물은 그람 양성인 *Streptococcus*로서, 이 중에서도 *Streptococcus mutans*는 동물실험과 사람의 치아우식증 연구에서 중요하게 사용되고 있다. *Streptococcus mutans*의 숫자는 음식물의 종류, 불소 및 전신적 항생제의 사용 여부, 가족내 구성원의 *Streptococcus mutans* 숫자, 구강위생, 타액작용 그리고 치태내의 미생물의 상호작용 등에 의해 영향을 받을 수 있을 것이다. 이러한 *Streptococcus mutans*를 억제하기 위하여 chlorhexidine^{26,32)}, iodine⁴⁾, penicillin²³⁾, vancomycin^{5,17,18)}, kanamycin²¹⁾, 불소³⁹⁾ 등을 사용하여 치아우식 활성을 감소시킬 수 있으나, 그 효과는 지속적이지 못하는 것으로 사료된다.

최근 구강내 정상적으로 존재하는 세균을 이용하여 치아 질환을 예방하고자 하는 연구가 이루어지고 있다^{2,14,15,34~36)}. 이러한 세균은 비병원성이면서 구강에서 지속적으로 증식하여 병원체와 접촉하였을 때, 병원체의 증식이나 그 작용을 억제할 수 있어야 한다. 이론적으로 통상의 치료 방법과 비교하여 이러한 대치 방법은 세균이 점종되면 증식되어 지속적인 작용을 기대할 수 있으며, 자연적으로 전파되어 대중 집단의 질병 예방 효과도 얻을 수 있다는 장점이 있다¹⁵⁾. 치아우식증 예방에 이용될 수 있는 세균은 치태 형성에 주된 역할을 하는 *Streptococcus mutans*나 그 치태 형성을 억제할 수 있거나, 정상적인 *Streptococcus mutans*를 대치할 수 있어야 한다. 탄수화물 대사에 결합이 있는 *Streptococcus mutans*³⁴⁾나 lactate dehydrogenase 활성이 부족하여^{2,14)} 유산을 생성하지 못

하는 세균이 이용된다. 치태를 형성하나 치아우식증을 일으키지 않는 *Streptococcus salivarius* TOVE-R도 분리되었다^{35,36}). 또한 *Enterococcus faecalis*는 항균제 기능을 나타내는 bacteriocin을 생성함으로써 연쇄상구균의 증식을 억제하고¹⁶), *Streptococcus oralis*와 같은 세균은 H₂O₂를 분비하여 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제함으로써 치태 형성을 저지한다^{22,38}).

Streptococcus mutans Ingbritt strain은 혈청형 c형으로 α-1,3-glucose linkage가 주된 결합인 비수용성 글루칸을 생성하기도 하지만 때로는 α-1,6-glucose linkage가 주된 결합인 수용성 글루칸을 생성할 때도 있다. *Lactococcus*는 유산균의 일종으로 그람 양성균의 연쇄상 모양의 구균이다. 본 연구에 사용된 *Lactococcus lactis* 1370는 특이하게 수용성 글루칸만을 생성하여 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제하지 않으면서 치태 형성을 억제하고 있다. 그러나 다른 *Lactococcus* strain은 *Streptococcus mutans*의 인공치태 형성을 억제하지 못한다. 구강에서의 *Streptococcus mutans*에 의한 치태 형성은 여러 인자에 의해서 영향을 받는다. 이러한 인자 중에는 치태의 주 성분인 글루칸 생성에 관여하는 세 종류의 GTF 효소의 GBD에 결합하는 글루칸의 종류에 따라 생성되는 글루칸 종류와 양이 달라지는데²⁹), 즉 *gtf* 유전자의 최종 산물인 비수용성 글루칸과 수용성 글루칸에 의한 영향이 클 것으로 생각된다. M17YS broth에서 배양된 *Lactococcus lactis* 1370 배양 상청액이나 수용성 폴리머를 M17YS broth에 가하여 *Streptococcus mutans*를 배양하였을 때, 가하지 않은 경우에 비하여 비커 와이어 검사에서 *Streptococcus mutans*의 비수용성 글루칸 생성을 현저하게 억제하였다. 이는 *Lactococcus lactis* 1370가 생성하는 수용성 글루칸에 의하여 GTF-S에 의한 수용성 글루칸 생성이 증가된 것으로 사료된다. 앞으로 이러한 상호작용이 유전자 수준에서 연구가 되어야 될 것으로 생각한다.

결 론

구강 질환으로 중요한 치아우식증은 구강 세균 중 *Streptococcus mutans*가 주 원인균이며, 치면에 부착, 증식 및 산생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발한다. *Lactococcus lactis* 1370는 소아의 구강으로부터 분리한 세균이다. *Streptococcus mutans*의 인

공치태 형성에 대한 *Lactococcus lactis* 1370의 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 일회용 큐벳에 부착된 비수용성 물질과 세균이 *Streptococcus mutans* 단독 배양시 보다 *Streptococcus mutans*와 *Lactococcus lactis* 1370의 병합 배양시 약 반으로 감소되었다.

2. 비커 와이어 검사에서 *Streptococcus mutans* 배양시 형성된 인공치태 무게는 131.7 mg이었으나, *Streptococcus mutans*와 *Lactococcus lactis* 1370 병합 배양시에는 6.4 mg으로 감소되었다 ($p < 0.05$). 생균수에 있어서 의미있는 차이는 없었다.

3. *Lactococcus lactis* 1370 배양 상청액을 가했을 때 인공치태 무게는 8.0 mg으로 배양 상청액을 가하지 않을 때의 125.4 mg에 비교하여 현저히 감소되었다 ($p < 0.05$). 생균수에 있어서는 의미있는 차이는 없었다.

4. *Lactococcus lactis* 1370 생성 수용성 폴리머를 가하면 가하지 않을 때와 비교하여 인공치태 무게는 현저히 감소되었다 ($p < 0.05$). 생균수에 있어서는 의미있는 차이는 없었다.

5. *Lactococcus lactis* 1370가 생성한 수용성 폴리머는 글루칸이었다.

6. *Lactococcus lactis* 1370가 만드는 글루칸은 α-1,6-glucose linkage가 주된 수용성 글루칸이었다.

이상의 결과에서 *Streptococcus mutans*에 의해 형성된 인공치태는 *Lactococcus lactis* 1370가 만드는 수용성 글루칸에 의하여 억제되는 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

- 1) 양규호, 김선미, 정진, 오종석: 치태형성 억제 세균의 분리. 대한소아치과학회지 **26**: 466-472, 1999.
- 2) Abhyankar S, Sandham HJ, Chan KH: Serotype C *Streptococcus mutans* mutable to lactate dehydrogenase deficiency. *J Dent Res* **64**: 1267-1271, 1985.
- 3) Aoki H, Shiroza T, Hayakawa M, Sato S, Kuramitsu HK: Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infect Immun* **53**: 587-594, 1986.
- 4) Caufield PW, Gibbons RJ: Suppression of *Streptococcus mutans* in the mouths of humans by a dental prophylaxis and topically-applied iodine.

- J Dent Res* **58**: 1317-1326, 1979.
- 5) DePaola PF, Jordan HV, Soparkar PM: Inhibition of dental caries in school children by topically applied vancomycin. *Arch Oral Biol* **22**: 187-191, 1977.
 - 6) Dewar MD, Walker GJ: Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque. 1. Dextranase activity of streptococci, and the extracellular polysaccharides synthesized from sucrose. *Caries Res* **9**: 21-35, 1975.
 - 7) Gibbons RJ, Banghart SS: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Arch Oral Biol* **12**: 11-24, 1967.
 - 8) Gibbons RJ, Houte JV: Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann Rev Microbiol* **29**: 19-44, 1975.
 - 9) Guggenheim B: Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int Dent J* **20**: 657-678, 1970.
 - 10) Hamada S, Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* **44**: 331-384, 1980.
 - 11) Hammond BF: Dextran production by a human oral strain of *Lactobacillus casei*. *Arch Oral Biol* **14**: 879-890, 1969.
 - 12) Hanada N, Kuramitsu HK: Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect Immun* **56**: 1999-2005, 1988.
 - 13) Hanada N, Kuramitsu HK: Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infect Immun* **57**: 2079-2085, 1989.
 - 14) Hillman JD: Lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*: Isolation and preliminary characterization. *Infect Immun* **21**: 206-212, 1978.
 - 15) Hillman JD, Socransky SS: Replacement therapy for the prevention of dental disease. *Adv Dent Res* **1**: 119-125, 1987.
 - 16) Jett BD, Gilmore MS: The growth-inhibitory effect of the *Enterococcus faecalis* bacteriocin encoded by pAD1 extends to the oral streptococci. *J Dent Res* **69**: 1640-1645, 1990.
 - 17) Jordan HV, DePaola PF: Effect of a topically applied 3% vancomycin gel on *Streptococcus mutans* on different tooth surfaces. *J Dent Res* **53**: 115-120, 1974.
 - 18) Jordan HV, DePaola PF: Effect of prolonged topical application of vancomycin on human oral *Streptococcus mutans* populations. *Arch Oral Biol* **22**: 193-197, 1977.
 - 19) Koga T, Inoue M: Effects of dextranases on cell adherence, glucan-film formation and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Arch Oral Biol* **24**: 191-198, 1979.
 - 20) Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* **50**: 353-380, 1986.
 - 21) Loesche WJ, Bradbury DR, Woolfolk MP: Reduction of dental decay in rampant caries individuals following short-term kanamycin treatment. *J Dent Res* **56**: 254-265, 1977.
 - 22) Lumikari M, Soukka T, Nurmio S, Tenovuo J: Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase system in human saliva. *Arch Oral Biol* **36**: 155-160, 1991.
 - 23) Maltz M, Zickert I: Effect of penicillin on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and lactobacilli in hamsters and in man. *Scand J Dent Res* **90**: 193-199, 1982.
 - 24) McCabe RM, Keyes PH, Howell A Jr: An in vitro method for assessing the plaque forming ability of oral bacteria. *Arch Oral Biol* **12**: 1653-1656, 1967.
 - 25) McDougall WA: Studies on the dental plaque. I. The histology of the dental plaque and its attachment. *Aust Dent J* **8**: 261-273, 1963.
 - 26) Mikkelsen L, Jensen SB, Schiött CR and Løe H: Classification and prevalences of plaque streptococci after two years oral use of chlorhexidine. *J Periodont Res* **16**: 645-658, 1981.
 - 27) Mukerjea R, Kim D, Robyt JF: Simplified and improved methylation analysis of saccharides, using a modified procedure and thin-layer chromatography. *Carbohydr Res* **292**: 11-20, 1996.
 - 28) Murchison H, Larrimore S, Curtiss R III: In vitro inhibition of adherence of *Streptococcus mutans* strains by nonadherent mutants of *S. mutans* 6715. *Infect Immun* **50**: 826-832, 1985.

- 29) Nakano YJ, Kuramitsu HK: Mechanism of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase: hybrid-enzyme analysis. *J Bacteriol* **174**: 5639-5646, 1992.
- 30) Rolla G: Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand J Dent Res* **97**: 115-119, 1989.
- 31) Rolla G, Scheie AA, Ciardi JE: Role of sucrose in plaque formation. *Scand J Dent Res* **93**: 105-111, 1985.
- 32) Schaeken MJ, De Haan P: Effects of sustained-release chlorhexidine acetate on the human dental plaque flora. *J Dent Res* **68**: 119-123, 1989.
- 33) Tanzer JM: Microbiology of dental caries. In: Slots J and Taubman M (eds), Contemporary oral microbiology and immunology. St. Louis, Mosby, pp 377-424, 1992.
- 34) Tanzer JM, Freedman ML: Genetic alterations of *Streptococcus mutans*' virulence. *Adv Exp Med Biol* **107**: 661-672, 1978.
- 35) Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J: Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R. *Infect Immun* **48**: 44-50, 1985.
- 36) Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J: Inhibition of ecological emergence of mutans streptococci naturally transmitted between rats and consequent caries inhibition by *Streptococcus salivarius* TOVE-R infection. *Infect Immun* **49**: 76-83, 1985.
- 37) Toda Y, Moro I, Koga T, Asakawa H, Hamada S: Ultrastructure of extracellular polysaccharides produced by serotype c *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* **66**: 1364-1369, 1987.
- 38) van der Hoeven JS, Camp PJ: Mixed continuous cultures of *Streptococcus mutans* with *Streptococcus sanguis* or with *Streptococcus oralis* as a model to study the ecological effects of the lactoperoxidase system. *Caries Res* **27**: 26-30, 1993.
- 39) Woods R: The short-term effect of topical fluoride applications on the concentration of *Streptococcus mutans* in dental plaque. *Aust Dent J* **16**: 152-155, 1971.