

*Streptococcus mutans*의 혐기적 산 내성도 평가

한양금[†] · 송상선¹ · 이인수¹

대전보건대학 치위생과

¹한남대학교 미생물학과

Acid Tolerance Response of *Streptococcus mutans* at Anaerobic Condition

Yang-Keum Han, Sang-Sun Song¹ and In-Soo Lee¹

Daejeon Health Sciences College, Daejeon Metropolitan City, 300-711, Korea

¹Hannam University, Daejeon Metropolitan City, 306-791, Korea

ABSTRACT *Streptococcus mutans* is one of the primary bacteria that cause dental caries which further result in plaque build up. Acid production resulted from carbohydrate metabolism can threaten survival of the bacteria. However some populations of *S. mutans* which are exposed to low acidic condition for a period of time would develop resistance and tolerance of cells to acidity that will enhance the chance of survival. Similar acid tolerances has been reported in case of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *E. coli*, *Shigella flexneri*. These acid tolerance responses(ATR) have been evolved in a similar manner as *S. mutans*. The protein produced in acidic condition has been proven to be important for ATR and confirmed by using chloramphenicol procedure. We hypothesize here that proteins synthesized in response to acid shock and other elements are important for ATR of cells. In this study we have confirmed that *S. mutans* developed acid tolerance and resistance against anaerobic condition. Mutational DNA analysis responsible for acid tolerance should be additionally required in the future. Since the development of acid tolerance that is essential for the survival of *S. mutans* and development of dental caries, ATR of *S. mutans* should be farther to prevent dental caries.

Key words Anaerobic chamber, *Streptococcus mutans*, acid tolerance response

서 론

*Streptococcus mutans*는 그람양성 세균으로 치아우식증의 주요한 원인 세균이다. *S. mutans*는 DNA 염기성분 및 DNA/DNA 상동성 연구에 의해서 크게 *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. mutans*, *S. sorbrinus*, *S. ferus*, *S. downei*, *S. macacae* 등 8종으로 혈청형적 분류가 가능하다. *S. mutans*는 통성혐기성 세균이지만, 혐기적인 조건에서 최적 생장이 이루어지고, 호기적인 조건에서의 생장을 위해서는 추가적으로 CO₂(5%)의 공급이 필요하다¹⁾. 또한 생육 조건이 복잡하고, 성장 속도가 느리기 때문에 실험적으로 많이 이용되는 일반 장내세균들에 비해 일부에 한정되어 배양되고 있다. 이러한 이유로 우리나라에서 *S. mutans*에 대해 많은 연구가 체계적으로 이루어지지 못했었고, 주로 서구 유럽이나, 미국, 일본 등과 같은 나라에서 다양한 연구가 진행되어 왔다.

현재 우리나라에서 진행되는 *S. mutans* 관련 연구는 항균 및 유기산 억제 효과를 지니는 천연 화학물질의 탐색을 목적

으로 하는 것이 주류를 형성하고 있다²⁻⁵⁾.

하지만 이러한 치아우식증에 대한 접근은 세균의 병독성 해결을 위한 근본적인 해결책을 제시하기에는 역부족인 것이며, 치아우식증에 대한 직접적인 방지를 위해서는 좀더 다양하고 체계적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 즉 *S. mutans*에 의한 치아우식증 발병과정의 분자생물학적 기작과 구강내부 환경에 노출시 겪는 다양한 stress에 저항하는 능력 등을 분석하는 것이 선행되어야 할 것이다.

*S. mutans*에 의한 치아우식 유발과정은 세균에 의해 합성된 불용성 glucan의 치아부착, 각종 구강세균과 엉켜서 형성되는 치석 그리고 탄수화물이 세균에 의해 발효되어 생성된 유기산으로 인해 구강내 pH가 낮아지게 되고, 즉 유기산은 구강내의 pH를 5.5 이하로 낮추어 치아의 인산칼슘 중 Ca²⁺을 녹여 치아 표면을 부식시키는 것으로 설명되어지고 있다¹⁾. 또한 효소 GTase(glucosyltransferase)에 의해 glucose를 불용성 glucan을 합성하며, 이는 세균들을 치아에 단단히 고정시켜 우식을 촉진한다⁶⁾. 이러한 일련의 과정 중에서 발생하는 과도한 산생성이 치아우식의 가장 큰 원인을 제공하게 된다. 구강내 치태(plaque)에서의 산생성 정도를 측정된 연구결과에 따르면 구강내 탄수화물 유입시 biofilm 발생기간과 유입되는 탄수화물의 농도에 따라서 치태(plaque)내의 pH가 pH 7.0에서 pH 4.0

[†]Corresponding author

Tel: 042-630-5854

Fax: 042-630-5848

E-mail: ykhan@djhealth.ac.kr

이하로 낮아지는 시간이 20분이 채 걸리지 않으며, 생성된 후 2일 정도 된 치태(plaque)에 5% sucrose가 공급될 경우에는 약 3분이면 급격한 pH의 감소가 일어난다고 보고되었다^{6,7)}.

결국 *S. mutans*는 탄수화물 분해 중 과도하게 생성된 유기산에 의해서 급격히 낮아진 구강 내 산성 조건에서 생존해 왔으며, 그것이 가능하게 했던 세균의 특수한 산 적응 및 저항기작이 존재하고 있음을 알 수 있다. 또한 이와 유사한 형태로 구강 내 낮은 pH에 노출되어 생활하고 있는 경우는 *Lactobacillus* species나 *S. mutans* 외의 Streptococci를 그 예로 들 수 있다⁸⁾. 이들 세균들은 모두 치아우식증 유발과 관련되어 있으며, 과도 발생한 유기산에 의해서 급격히 낮아진 구강내 산성조건에서의 생존을 위한 산적응 기작이 인간에게 치아우식증을 유발하는 다양한 병독성 요소들과 관련 있음을 추정하는 것은 어려운 일이 아닐 것이다.

이미 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 같은 병원성 세균의 경우 세균의 생활사 중 경험하게 되는 다양한 stress에 대한 많은 연구가 진행되었으며⁹⁾, 이 세균의 경우 생장기에 따른 산저항기작이 RpoS 의존적 반응과 정지기 산저항기작 등 적어도 두 가지가 존재하는 것으로 밝혀졌다^{10,11)}. 그리고 점진적으로 *E. coli*, *Shigella flexneri* 등의 장내세균 등에 대해서도 산저항기작 연구가 진행되고 있고, 산에 대한 저항능력을 나타내는 특성이 병원성을 나타내는데 대단히 중요한 역할을 한다는 결과가 밝혀지고 있다¹²⁾.

이상에서 말한 것과 같이 *S. mutans*의 경우도 *Salmonella* 등의 장내 세균에서와 마찬가지로 생활사 중에서 다양한 환경변화를 구강 내에서 경험하게 되며, 특히 탄수화물 분해에 의해서 급격히 증가한 산에 노출된 경우에 생존하는 방법은 산저항 및 적응기작을 보유한 다른 세균의 경우와 같이 특유의 산 적응 및 방어기작의 존재를 추측 가능하게 한다. 또한 이것은 치아우식증을 유발하는 중요한 병독성 요소로 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 이 연구에서는 병원성 *S. mutans*의 일반적인 생리성상을 알아보고, 구강내 치태(plaque)에서의 혐기적인 조건과 동일한 실험적 환경을 조성하여 *S. mutans*의 혐기적 산 적응 및 산 저항능의 존재를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배양 배지

본 실험에 사용된 세균은 구강내부의 치아우식에 가장 직접적인 원인제공을 하는 것으로 알려져 있는 병원성 *Streptococcus mutans*(ATCC25175)이며, 세균배양을 위한 증균 배지로 Brain Heart Infusion(BHI), Tryptone Yeast Extract Glucose(TYEG) 그리고 Tryptone Yeast Extract Glucose(TYEG)를 변형한 반-최소 고체배지 및 액체배지를 사용하였다^{6,8,13)}(Table 1). 세균의 증식은 최적 생장 조건인 37°C 혐기적인 조건에서 정치배양에 의해서 이루어졌다. 산저항능을 실험하기 위한 혐기적 배양을 위해서 anaerobic/environment chamber(Sheldon Manufacturing, Inc / 5% H₂, 5% CO₂, 90% N₂)와 GasPak(BBL Co.)에서 사용되었다. *S. mutans*의 고체 및 액체 배지에서의 생육 특성을 알아보기 위해서 BHI 고체 배지에서 계대배양된 균체를 BHI 및 TYEG 액체 배지에서 혐기배양한 세균을 대상으로 관찰하였다. 세균의 배양액의 pH 변화를 알아보기 위해서 사용된

Table 1. Media composition used in this study

BHI medium	
Calf brains Infusion	200.0 g
Beef heart Infusion	250 g
Protease peptone	10.0 g
Bacto dextrose	2.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Disodium phosphate	2.5 g
Distilled water	1.0 l
TYEG medium	
Pancreatic digest of casein	20.0 g
Yeast extract	3.0 g
Glucose	3.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Disodium phosphate	2.5 g
Distilled water	1 l
TYEG modified semi defined medium	
Casamino acid	200.0 mg
Yeast extract	3.0 g
Glucose	3.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Disodium phosphate	2.5 g
Distilled water	1.0 l

pH meter는 orion 720A이고, 세포의 생장단계를 측정하기 위해서는 spectrophotometer (Turner Co.)가 사용되었다.

2. 혐기적 산 내성도 조사

혐기성 조건내에서 *S. mutans*의 산저항능을 알아보기 위해서 anaerobic chamber에서 brain heart infusion(BHI) 배지를 통해 정제 배양 되어진 배양액을 3분간 원심분리(5000 rpm) 하여 생리식염수로 washing 한 후에 tryptone yeast extract glucose(TYEG; 20 mM glucose / 40 mM phosphate · citrate buffer) 액체배지에 균체를 접종하여 본 배양을 실시하였다. *S. mutans*가 대수 생장기(O.D_{600nm} = 0.4) 까지 증균되면, 무기산인 HCl을 이용해서 각각 pH 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0으로 기조정 된 TYEG 액체배지(heat block을 이용하여 37°C로 전가열)에 각각 동량의 균체를 접종하고 시간별로 세균의 생존율을 측정하였다. 각각 0, 3, 6, 9, 16, 24시간후의 생존율 및 생장율을 비교하였다. 그리고 그 결과에 따라서 산저항능 조사를 실시하기 위한 *S. mutans*의 준치사 pH와 치사 pH가 결정되었다.

3. 혐기적 산 적응능 조사

혐기적 산 내성도 조사에 의해서 결정된 *S. mutans*의 준치사 pH인 pH 5.0과 치사 pH인 pH 3.0을 기준으로 37°C anaerobic acid tolerance response(ATR) 조사는 5% H₂, 5% CO₂ 및 90%의 대기로 조정된 anaerobic chamber(Sheldon Manufacturing, Inc)에서 수행되었다. Adapted와 unadapted로 나누어서 실험을 실시하였는데, adapted의 경우 THYG 액체 배지(pH 7.5)에서 생장시킨 균체의 배양액을 1/50 농도로 THYG 반-최소 액체 배지에 접종하여 O.D_{600nm} = 0.4가 되도록 정치 배양한 다음, 무기산인 HCl을 사용하여 배양액을 준

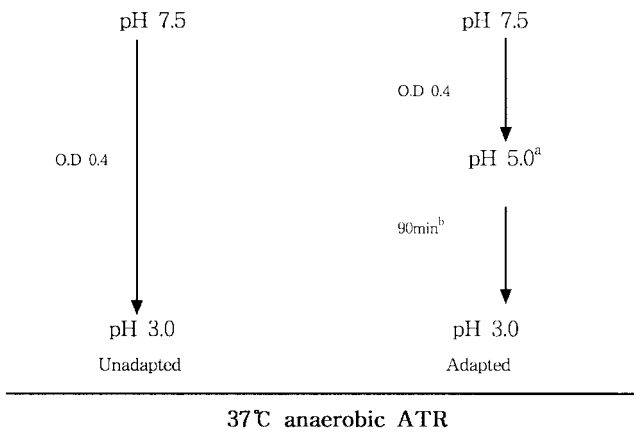


Fig. 1. Schematic representation of acidification tolerance response test.

Cells were grown in TYEG semi defined media(pH 7.5) at 37°C in anaerobic. (a) The pHs of cultures were adjusted pH 5.0 with inorganic acid.; (b) For acid adaptation in pH 5.0, cells were incubated in anaerobic chamber for 90 min.

치사 pH 인 pH 5.0으로 조정하고, 1시간 30분 동안 재배양 하여, 산적응을 경험하게 한 후, 다시 pH 3.0으로 조정하여 시간별로 세균의 생존율을 조사함으로써 측정되었다. Adapted ATR 조사의 대조군인 unadapted의 경우는 세균세포들을 OD_{600nm} = 0.4 까지 배양시킨 다음, 배양액을 pH 3.0으로 조정하여 시간별로 생존율을 조사함으로써 결정되었다(Fig. 1).

4. 세포의 산 노출시간에 따른 chloramphenicol 처리 효과

*S. mutans*는 혐기적 산저항 및 적응능이 있는 것으로 확인 되었으며, 이 결과를 토대로 이와 같은 anaerobic ATR 현상이 산성 조건에서 유도되어지는 protein에 의한 것인지를 확인 하기 위해서 protein 합성 저해제인 chloramphenicol을 사용하여 이용하였다. 37°C에서 TYEG 반-최소 액체 배지(pH 7.5)에서 O.D_{600nm} = 0.4까지 증균되어진 세균을 pH 5.0으로 조정 한 뒤 0, 30, 60, 90분간 재배양 후에 chloramphenicol을 각각 첨가(2 mg/ml)하였고¹⁴⁾, 다시 90, 60, 30, 0분간 재배양 후에 최종 pH를 3.0으로 조정하여 시간에 따른 생존율을 조사하여서 *S. mutans*의 anaerobic ATR이 protein에 의한 유도인지를 결정하였다.

결과 및 고찰

1. 사용 균주의 생리성상 및 특징

*S. mutans*의 혐기조건에서의 생리성상은 anaerobic chamber 내에서 brain heart infusion(BHI) 액체배지와 고체배지에 각각 배양하였을 경우 액체배지에서 생육된 균체에 대해서 Gram 염색을 실시하여 *Streptococcus* spp.의 특징인 그람양성, chain 형성과 타원형의 생육을 관찰할 수 있었고, 고체배지에서 배양한 경우는 우유빛의 광택이 있는 작은 크기의 colony를 볼 수 있었다^{1,2)}(Fig. 2).

2. 혐기적 산 내성도 조사

*S. mutans*의 혐기적 산 저항능 조사는 pH가 기조정된

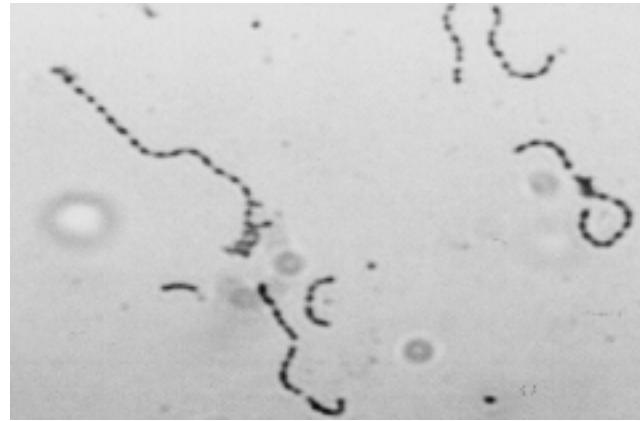


Fig. 2. Light microscopy of Gram-stained *S. mutans* (magnification: × 1000)

TYEG(glucose 20 mM / phosphate·citrate buffer) 액체배지에서 이루어졌다. 각각의 액체배지에 동량의 균체 전배양액을 접종한 다음 시간별로 생존율을 측정하여서 결정되었다. 세균의 수는 세균배양액을 희석하여서, brain heart infusion 고체배지에 dropping 한 뒤 생육된 colony를 희석배수와 곱해서 계수할 수 있었다. 시간에 따른 생존율 결과를 보면 배양액 pH가 2.5~3.0 사이의 배양액에 노출된 경우는 균체 접종 후 약 3시간 이내에 모든 균이 사멸한 것을 알 수 있었다. 즉 배양액 pH가 3.0~3.5 사이에서 *S. mutans*의 치사 pH를 결정할 수 있었다. 그리고 배양액 pH가 5.0~5.5 인 경우에는 산 노출시간과 관계없이 균체의 감소가 없었으며, pH 5.5의 배양액에 접종된 균체의 경우 6~9시간 사이부터 증균이 일어나는 것을 알 수 있었다. 또한 pH 5.0 인 배양액의 경우는 접종 후 9~16시간 까지는 균체의 수가 일정하게 유지되는 것으로 나타났다. 이것은 배양액 pH가 5.0 정도에서 균체의 static state(정지상태)가 이루어지는 것을 보여주는 것으로, 준치사 pH를 결정할 수 있었다. 그리고 9~16시간 이후부터는 다시 증균이 일어났다. 따라서 *S. mutans*의 혐기조건에서 준치사 pH는 pH 5.0이며, 치사 pH는 pH 3.0으로 결정되었다. 따라서 이 결과를 이용하여 혐기적 조건내에서의 산저항능 조사를 할 수 있게 되었다.

3. 혐기적 산 적응능 조사

혐기적 산 내성도 조사로 결정된 *S. mutans* 준치사 및 치사 pH를 기준으로 37°C anaerobic acid tolerance response(ATR)를 실시하였다. 준치사 pH에서 적응기를 경험한 경우와 그렇지 못한 경우에 따라서 adapted와 unadapted로 나누어서 실험을 실시하였다.

혐기적 산 내성도 조사의 결과는 Fig. 3에서 나타난 바와 같다. *S. mutans*의 혐기 생장시 산적응기를 경험한 adapted의 경우가 pH 5.0에서의 산적응기를 경험하지 못한 unadapted 경우보다 월등히 높은 생존율을 보여주는 것을 알 수 있다. 산적응기를 경험하지 못한 균체의 경우는 pH 3.0의 산성조건에 노출된 지 4시간 만에 산적응기를 경험한 균체와 비교하여 약 10,000% 정도의 생존율 감소를 나타내고 있었다. 이것은 *S. mutans*가 준치사 pH 인 약 pH 5.0 인 약산성의 조건이

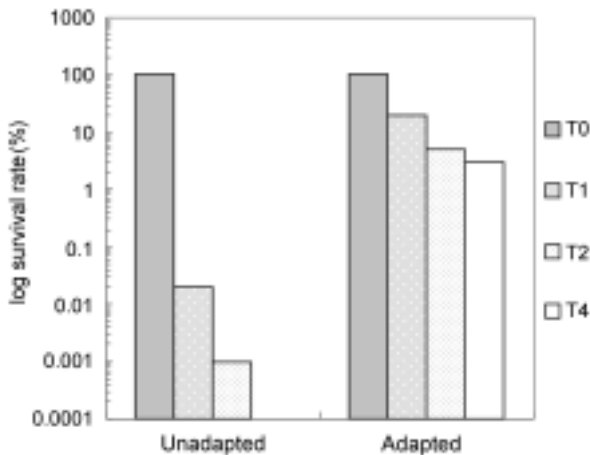


Fig. 3. Log-phase anaerobic acid tolerance responses of S. mutans.

Cells grown to mid log phase in TYEG semi-defined medium were adaptation protocols prior to acid challenge at pH 3.0 for 37°C. Acid shock adaptation at pH 5.0 for 37°C were conducted for 90 min before acid challenge. Unadapted cell culture were adjusted directly to challenge pHs. The bars represent average percent survival at pH 3.0 condition 0, 1, 2 and 4h.

주어질 경우에 산 저항능을 소유할 수 있게 되는 것을 의미하는 것이다. 또한 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *E. coli* 그리고 *Shigella flexneri* 등의 장내 세균 등에서 주로 알려졌던 산 적응 및 저항능은 구강 내부에서 치아우식증을 유발하는 *S. mutans*에도 보유하고 있음을 말하는 것이다¹⁰⁻¹³).

4. 세포의 산 노출시간에 따른 chloramphenicol 처리 효과

*S. mutans*는 혐기적 산 저항 및 적응력이 acid shock에 의해서 발생하는 protein의 유도에 의한 것인지를 조사하기 위해서 산적응 시간에 따라서 chloramphenicol을 처리하였는데, Fig. 4의 결과와 같이 산적응 시기에 있어서 chloramphenicol에 의해서 노출된 시간과 생존율과 반비례하는 결과를 나타내

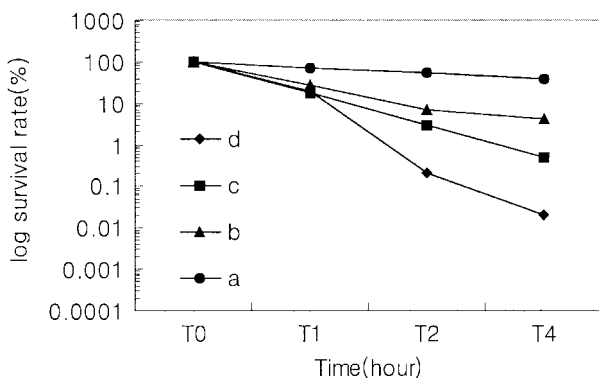


Fig. 4. The effect of chloramphenicol(Cm, 0.2 mg/ml) on cell survival at sublethal acidic condition.

Cells grown mid log phase to adaptation acid challenge at pH 5.0. (a) The addition of Cm at 90 min after the pH challenge.; (b) The addition of Cm at 60 min after the pH challenge.; (c) The addition of Cm at 30 min after the pH challenge.; (d) The addition of Cm at 0 min after the pH challenge. The bars represent average percent survival at pH 3.1 after 0, 1, 2 and 4 hours, respectively.

었다. 이것은 chloramphenicol에 의해서 acid shock에 의해서 유도되어지는 산 저항 및 적응력에 관계되는 protein의 합성이 억제되는 것을 의미한다. 하지만 chloramphenicol 처리 후에 산 적응기를 경험한 균체도 일정 개체수 이상이 생존할 수 있는 것은 *S. mutans*의 anaerobic log-phase ATR에 관여하는 다른 요소가 존재하고 있음을 추정할 수 있게 한다.

요 약

*Streptococcus mutans*는 인간에게 치아우식증을 유발하는 주요 세균으로 구강내에서 치태(plaque)가 형성되고, 탄수화물을 분해하면서 발생하는 유기산에 의해서 생존에 위협을 받게 된다. 하지만 약산성 조건에 노출되어서 산을 경험한 *S. mutans*는 강산성의 조건에서도 생존할 수 있는 산 저항 및 적응능을 획득하게 된다. 이러한 산 저항능은 *Salmonell enterica* serovar Typhimurium, *E. coli* 그리고 *Shigella flexneri* 등에서 확인되었던 acid tolerance response(ATR)과 유사한 기작에 의해서 얻어진 것을 알 수 있었다. 이 현상은 산성조건을 경험할 때 유도되는 protein이 주요한 역할을 하는 것을 chloramphenicol 처리에 의해서 알 수 있었다. 동시에 acid shock에 의해서 유도되는 protein 이외에 여러 가지 요소들이 복합적으로 이런 생존 능력을 갖게 하였을 것이라는 가정을 할 수 있게 되었다. 이 연구에 의해서 *S. mutans*의 혐기적 조건에서의 산 적응기작을 확인하였으며, 산 저항성에 관여하는 유전자의 돌연변이체를 이용한 실험이 추가적으로 필요하다. *S. mutans*가 구강내에 생존하는데 필수적인 산 저항기작이 결국 치아우식증 유발의 병독소로 중요한 역할을 하기 때문에 치아우식증의 근본적인 해결을 위한 연구의 일환으로 반드시 시행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2000년 대전보건대학 교내 학술비 지원에 의한 것임.

참고문헌

1. Sneath HAP, Mair NS, Sharpe ME: Oral Streptococci. Bergey's manual of Systematic bacteriology 12: 1054-1063, 1986.
2. Hwang JK, Kim HJ, Shim JS, Pyun YR: Bactericidal Activity of Chitosan on *Streptococcus mutans*. Kor J FOOD SCI TECHNOL 31: 522-526, 1999.
3. Moon YH, Lee YH, Min BS, Bae KH: Antibacterial Constituents from *Scutellariae Radix* against *Streptococcus mutans* OMZ176. Kor J Pharmacogn 28: 99-103, 1997.
4. 남상해, 서원택, 최상도, 장대식, 양민석: 두송식에 의한 충치균의 유기산 생성 억제효과. Agricultural Chemistry and Biotechnology 41: 395-398, 1998.
5. Chun JY, Ryu IH, Lee SU, Lee KS: Isolation and Identification of Novel Alkalophilic *Bacillus alkalophilishaggy* JY-827 with Anticaries microbe *Streptococcus mutans*. Kor J Appl Microbiol Biotechnol 28: 243-250, 2000.
6. Tsumori H, Minami T, Kuramitsu HK: Identification of Essential Amino Acids in the *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases. J Bacteriol: 3391-3396, 1997.
7. Imfeld T, Lutz F: Intraplaque acid formation assessed in vivo in

- children and young adults. *Pediatr Dent* 2: 87-93, 1980.
8. Yamada T, Igarashi K, Mitsutomi M: Evaluation of cariogenicity of glycosylsucrose by a new method of measuring pH under *in situ* human dental plaque. *J Dent Res* 59: 2157-2162, 1980.
 9. Rallu F, Gruss A, Maquin E: *Lactobacillus lactis* and stress. *Antonie Leeuwenhoek* 70: 243-251, 1996.
 10. Kim YC, Lee S, Lee KM, Lim SY, Park YK, Baik HS, Park KR, Lee IS: Anaerobic Acid Tolerance Response in *Salmonella typhimurium*. *Kor J Life Science* 9: 169-175, 1999.
 11. Lee IS, Lim J, Hall KH, Bearson B, Foster JW: The Stationary-phase sigma factor Rpos is required for sustained induction of acid tolerance in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 17: 155, 1995.
 12. Lee IS, Slonczewski JL, Foster JW: A low-pH-inducible, stationary - phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 176: 1422, 1994.
 13. Small P, Blankenhorn D, Welty D, Zinzer E, Solnczewski JL: Acid and Base resistance in *Escherichia coli*, partial purification and *Shigella flexneri*. The role of rpoS and growth pH. *J Bacteriol* 176: 1729, 1994.
 14. Bowden GH, Hardie JM, Fellery ED: Antigens from *Actinomyces* species and their value in identification. *J Dent Res* 55: A192-A204, 1976.
 15. Etchegaray J, Inouye M: CspA, CspB, and CspG: Major cold shock Proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis. *J Bacteriol* 181: 1827-1830, 1999.

