

한국재래간장으로부터 구강질환 방제균의 선별 및 동정

엄수정 · 이여진 · 김진락 · 이은탁 · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Isolation and Identification of the Antagonistic Microorganisms Against *Streptococcus* spp. Causing Dental Caries in Korean Soy Sauce

Soo-Jung Um, Yeo-jin Lee, Jin-Rack Kim, Eun-Tag Lee and Sang-Dal Kim*

Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources,
Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract

The antagonistic microorganisms against *Streptococcus sanguis*, *S. salivarius* and *S. mutans* causing the dental caries of oral diseases were isolated from Korean traditional soy sauce. Twenty five strains were isolated by pairing culture, paper disc culture and dual culture methods. The isolate NG 06 strain was observed with various cultural and physiological test, and Biolog[®] Bacterial Identification System. The strain was identified as *Bacillus racemilacticus*. The isolate NG 16 strain was confirmed to Gram-positive, rods, endospore production, utilization of melibiose, casein hydrolysis and starch hydrolysis. Also the second strain NG 16 was identified as *B. amyloliquefaciens*.

Key words – antagonistic bacteria, dental caries, Korea soy sauce

서 론

우리 민족은 옛부터 콩을 원료로 한 발효식품들을 많이 이용하여 왔다. 그 중에서 간장은 콩을 주원료로 하는 대표적인 발효식품으로서 각 가정의 음식 맛을 좌우하는 기본 조미료나 아미노산 공급원으로 사용되어 왔다. 예전에는 농촌에서 소규모로 전통식 메주를 이용하여 재래식 간장을 제조하여 왔으나 최근에는 장류식품의 국제적인 관심이 증대되면서 장류업체들이 제조한 산분해 간장, 혼합간장, 밀코지를 이용한 양조간장 등이 대량생산되어 판매되

고 있는 실정이다[6].

지금 까지 메주와 간장에서 서식하는 세균은 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. citreus*, *Micrococcus caseolyticus*, *Sarcina maxima* 및 *Staphylococcus aureus* 등이고, 사상균은 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium kaupscinskii*, *Mucor abundans* 등이며 효모는 *Rhodotorula flava*, *Torulopsis versatilis* 등이 보고되어 있다[19].

재래식 간장에 관한 연구에는, 재래식 메주의 형태에 따른 간장의 품질검토, 메주에 콩 이외에 밀을 첨가한 간장의 품질비교, 재래식 간장의 맛성분 분석연구 등과 간장양조용 원료대체, 재래식 간장의 표준화, 간장발효에 관여하는 미생물, 효소, 제조법 및 안정성 등 다방면의 연구되어 있으며, 최근에는 항암작용, 노화지연, 호르몬분비촉진 등의 효과가 보고되어 있다.[2-4,6-13] 그러나 매일 섭취하는

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-810-2395, Fax : 053-811-4319
E-mail : sdkim@yumail.ac.kr

식품의 하나인 간장 중에서 우리 인체중 가장 먼저 접촉하게 될 치아우식 등 구강질환의 원인균에 대한 방제효과가 있는가 하는 구강질환 방제에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 즉 우리나라 대부분의 사람들이 매일 먹고 있는 간장이 치아우식증과 치주조직병 등의 구강질환을 예방하는데 관련이 있는가에 대한 중요한 연구는 아직 보고되어지지 않고 있다.

*Streptococcus sanguis*는 치아경조직에 대하여 매우 높은 친화력을 보유하고 있으며, 구강 내의 경조직인 치아가 맹출하여야만 출현하는 세균으로 초기에 치면에 부착하여 균락을 이루는 구강질환세균이다[14,15,23]. 또 이 세균은 치아균태의 주된 연쇄상구균으로 치아균태(dental plaque)형성에 크게 기여한다. *S. salivarius*는 균태내에 존재하는 주된 세균이다. 주로 혀에서 서식하며 치은연하 및 치은연상, 치면세균막에서도 어느 정도 발견이 된다[20]. *S. mutans*는 인간에 있어서 치아우식증을 야기하는데 가장 중요한 역할을 하며[1,8,16,17] 이 세균의 숫자는 치아우식증의 발병과 진행정도와 관계가 있으며 실험동물인 설치류와 유인원류에서 치아우식 원인인이 이미 밝혀졌다[18].

본 연구는 각 가정에서 재래식으로 제조한 간장을 대상으로 구강질환원인균인 *Streptococcus sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*의 생육을 저해시키는 미생물을 분리 및 선별과 동정을 행하였다. 이 연구를 바탕으로 치아우식증과 치주조직병 등의 구강질환들이 우리 국민들이 매일 섭취하는 간장과 어떠한 관계가 있는지 파악하고 간장에서 분리한 균주들이 어떤 기작에 의해 항균효과를 나타내는지 연구해서 구강질환 치료 및 예방에 좋은 구강세정제나 항균제품 개발의 기초자료로 사용하고자 한다.

실험재료 및 방법

재래간장 발효균의 분리

균 분리원인 간장은 대구, 경북지역의 일반 가정에서 재래식으로 전통적으로 제조한 간장 6종을 사용하였다. 균주의 분리방법은 시료 원액 0.5ml와 멸균된 생리식염수 4.5ml를 섞어 10⁴까지 단계별로 희석하였으며, 이들을 Nutrient agar배지(nutrient 0.8%, agar 1.5%)에 0.1ml씩을 유리봉으로 도말하여, 30℃에서 1일간 배양하여 생성되는 colony를 분리하였다.

치아우식 방제미생물의 평판배양에 의한 선별

치아우식등 구강질환 원인균 *Streptococcus sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*를 BHI 액체 배지(Brain Heart Infusion, Bacto® DIFCO. USA)에 전배양한 배양액 0.1ml를 NA(Nutrient agar)배지에 유리봉으로 도말하고 plate의 가장자리에서 2.5cm 떨어진 곳에 분리균을 희석 접종하여 3일간 30℃에 배양한 후 구강질환 원인균의 생육을 억제하는 clear zone을 형성하는 길항균을 선별하였다.

치아우식 방제미생물의 액체배양에 의한 선별

구강질환 원인균 *Streptococcus sanguis*의 방제미생물 선별은 BHI 액체배지에 전배양한 배양액 0.1ml를 NA배지에 유리봉으로 도말하고, 평판배양으로 선별한 구강질환 방제미생물을 Nutrient broth 배지에 하루 전 30℃에서 180rpm으로 shaking 배양한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 filtration해서 6mm 크기의 paper disc에 묻혀 *S. sanguis*을 도말한 NA 배지에 올려놓아 30℃에서 2일간 배양한 후 clear zone을 형성하는 길항균을 선별하였다.

구강질환 원인균 *S. salivarius* 방제미생물의 선별은 LB 배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%)를 250 ml flask에 50ml씩 담고 평판배양으로 선별한 구강질환 방제미생물을 접종하여 2일간 30℃에서 180rpm으로 shaking incubator에서 배양한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 회수한 후 BHI 액체 배지 45ml와 filter된 상등액 5ml에 *S. salivarius*를 0.1ml 접종하고, 대조균은 BHI 액체 배지 45ml에 LB배지 5ml 섞어 *S. salivarius*를 접종하였다. 3일간 30℃에 배양한 후 배양액 3ml를 분광광도계를 사용하여 600nm의 파장에서 얻은 흡광도 값으로 대조균과 분리균의 균체량 차이를 측정하였다.

치아우식균 *S. mutans* 방제미생물의 선별은 LB 배지에 방제미생물을 접종하여 2일간 30℃에서 180rpm으로 배양한 후 상등액을 회수하여 BHI 액체배지 45ml와 filter된 상등액 5ml에 *S. mutans*를 0.1ml 접종하고, 대조균은 BHI 액체 배지 45ml에 LB배지 5ml 섞어 *S. mutans*를 접종하였다. 3일간 30℃에 배양한 후 배양액을 600nm의 파장에서 얻은 흡광도 값으로 대조균과 방제 미생물의 상등액을 첨가한 균체량 차이를 측정하였다.

선별한 구강질환 원인균 방제미생물의 동정

최종적으로 구강질환균에 길항력을 높게 나타내는 균주

2종을 선별하였다. 선별균의 분류학적 동정을 위해서는, Bergey's manual of systematic bacteriology[5]의 세균 분류 동정 지침서의 시험 항목을 기준으로 하여 각 항목을 실험하였고, 최종적으로 Biolog사의 동정시스템(MicroLog™3)을 사용하여 검정실험 하였다. 각 실험에 사용한 배지조성과 실험방법은 Bergey's manual of systematic bacteriology[5]을 참조하였다.

결과 및 고찰

재래간장 발효균 분리

대구, 경북지역의 일반 가정에서 채취한 간장 6종을 희석해서 NA배지에서 순수 분리한 결과 육안으로 관찰하여 형태적으로 다른 25종의 균주들을 single colony으로 분리했다.

구강질환 방제미생물의 1차 선발

재래 간장에서 분리한 25종의 분리균 중에서 구강질환 원인균 *Streptococcus sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans* 들에 대한 길항균의 선발을 발육저지측정법을 이용해서 생육을 억제하는 clear zone을 크게 형성하는 방제균을 선발하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 *S. sanguis*, *S. salivarius*에 대해서 길항력이 높은 방제균을 선발할 수 있었다.

Table 1. Selection of antagonistic bacteria against the pathogens causing oral diseases from Korean Soy sauce

Strains	Inhibition activity	
	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
NG 01	-	+
NG 05	+	+
NG 06	+++	+
NG 08	-	-
NG 15	-	-
NG 16	+++	+++
NG 17	-	+
NG 18	+	+
NG 22	-	-
NG 25	-	-

Symbol : ++, 90% or more positive ; -, 10% or less positive ; +, 11-89% positive.

All strains were grown at 30°C for 72hours on Nutrient agar plate.

구강질환 원인균 방제미생물의 최종 선발

1차, 2차 선발의 결과로 방제력이 높은 간장발효 균주로 최종적으로 NG 06, NG 16를 선발하였다. *Streptococcus sanguis*에 대한 방제력은 획선을 이용한 발육저지 측정법과 원판확산(paper disc)법을 이용한 clear zone의 크기를 관찰하였다. 방제거리를 확인한 결과 *S. sanguis*에 대해서는 두 균주 NG 06, NG 16 모두 방제력이 보였다(Fig. 1), *S. sanguis*에 대한 상등액의 clear zone을 확인한 결과 두 균주 모두가 방제력이 보였다(Fig. 3).

*S. salivarius*에 대한 방제력은 발육저지 측정법으로 실험하였으나 BHI agar 배지에서 잘 자라지 않아 실험 결과의 정확성을 위해 BHI 액체배지에서 대조균과 분리균의 균체량 차이를 관찰하였다. *S. salivarius*에 대한 방제거리 측정 결과 NG 06은 방제력이 크게 나타나지 않았고 NG 16은 방제력이 보였다(Fig. 2). *S. salivarius*에 대한 균체량 확인 결과 모두 방제력이 보였다(Fig. 4).

*S. mutans*에 대한 방제력은 발육저지 측정법으로 실험하였으나 BHI agar 배지에서 잘 자라지 않아 실험 결과의 정확성을 위해 BHI 액체 배지에서 대조균과 분리균의 균체량 차이를 관찰하여 방제력을 나타내는 균주를 선발하였다. *S. mutans*는 BHI 액체배지에서 균체량 차이를 관찰한 결과 NG 06, NG 16 모두 방제력을 나타내었다(Fig. 4). 따라서 한국재래 간장에서 분리한 두 균주는 치아우식 등 구

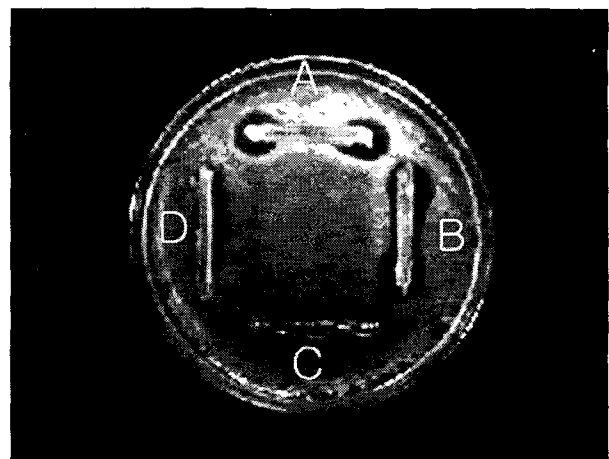


Fig. 1. Inhibition of the growth of *Streptococcus sanguis* by the bacteria isolated from Korean soy sauce. A, D : The other bacteria, B : NG 06, C : NG 16. Nutrient agar plate at 30°C for 24hrs.

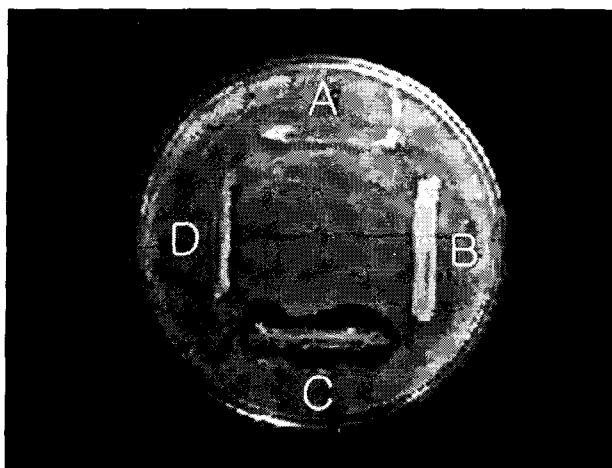


Fig. 2. Inhibition of the growth of *Streptococcus salivarius* by the bacteria isolated from Korean soy sauce
A, D : The other bacteria, B : NG 06, C : NG 16.
Nutrient agar plate at 30°C for 24 hrs.

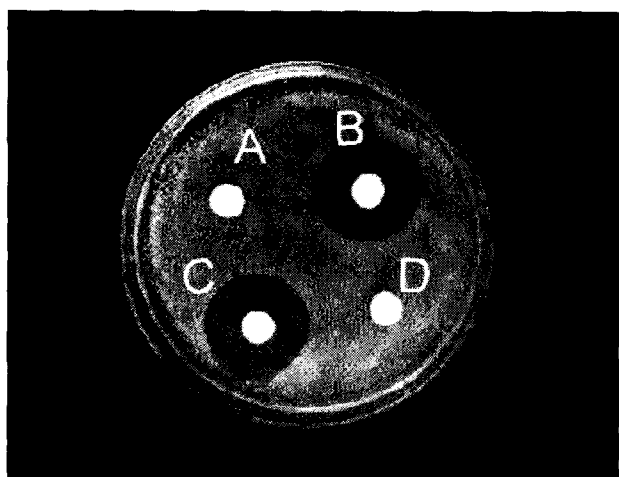


Fig. 3. Inhibition of the growth of *Streptococcus sanguis* by paper disc culture on nutrient agar plate at 30°C for 48 hours.
A, D : The other bacteria, B : NG 16, C : NG 06.

강질환을 예방할 수 있는 길항력이 있음을 확인하였으며, 향후 활용방법 등을 연구하면 좋은 구강질환 방제용 치약이나 구강제품으로 가능성이 크다고 생각되어진다.

선별 구강질환 방제미생물의 동정

선별균의 동정을 위해 그람염색과 포자염색을 실시한 결과 NG 06, NG 6은 그람양성의 간균으로 *Bacillus* sp.과 근연성을 보였으며, 또한 Bergey's manual of systematic

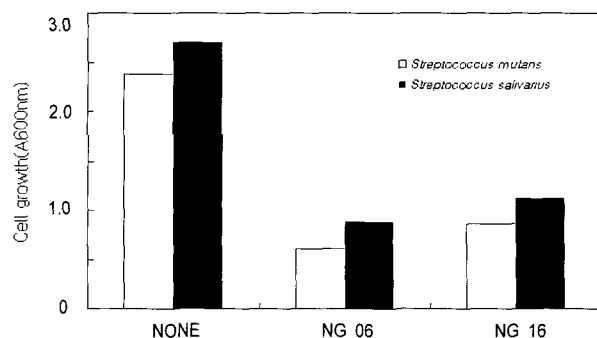


Fig. 4. Inhibition of the growth of *Streptococcus salivarius* and *S. mutans* by dual culture method on Brain Heart Infusion broth at 30°C for 72 hours.

bacteriology[5]의 세균분류 동정표에 의해 각종 동정에 필요한 배양학적, 형태학적, 그리고 생화학적 특성을 시험한 결과와 Biolog사의 세균동정시스템(MicroLog™ 3)을 이용하여 검정 실험한 결과 NG 06은 *Bacillus racemilacticus*로 NG 16은 *B. amyloliquefaciens*로 최종 확인, 동정되었다 (Table 2).

요 약

최근 발효식품의 건강학적 활용면에 관한 연구는 활발히 진행되고 있다. 또한 발효식품 중에 가장 중요한 간장 발효미생물의 건강제품의 활용에 대해서 많은 연구가 진행되었다. 재래식 간장에 관한 연구결과로 항암작용, 노화 지연, 호르몬 분비 촉진 등이 보고되고 있으나, 구강질환 원인균에 대한 방제효과가 있는가에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 본 연구는 치아우식 등 구강질환 원인균인 *Streptococcus sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans* 등의 성장을 억제하는 방제균을 선별하고 이들을 동정하기 위해 시행되었다. 우선 25종의 간장발효 균주를 분리하였고, 그 중 구강질환 방제력이 높은 2 균주(NG 06, NG 16)를 선별하였다. Bergey's manual of systematic bacteriology의 세균분류동정표에 의해 각종 동정에 필요한 배양학적, 형태학적, 생화학적 특성을 시험한 결과와 Biolog[®]사의 세균동정시스템(MicroLog™ 3)을 이용하여 검정 실험한 결과 NG 06은 *Bacillus racemilacticus*로 NG 16은 *Bacillus amyloliquefaciens*으로 최종 확인, 동정되었다(Table 3). 앞으로 이 균들이 생산해내는 항균물질의 길항 기작에 관한 연구

Table 2. Identification of strain NG 06 and NG 16 on their physiological and biochemical characteristics

Characteristics	NG 06	NG 16	<i>Bacillus racemilacticus.</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Gram strains	+	+	+	+
Rod-Shaped	+	+	+	+
Endospores produced	+	+	+	+
Motile	+	+	+	+
Catalase test	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	D	ND
MR test	+	+	D	+
VP test	+	+	+	+
Utilization of				
Melibiose	-	+	+	+
Galactose	+	+	-	-
Cellobiose	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-
Hydrolysis of				
Casein	+	+	ND	+
Starch	+	+	ND	+
Gelatine	+	+	+	+
Growth at pH				
6.8, nutrient broth	+	+	+	+
5.7	+	+	+	+
Growth in NaCl				
2%	+	+	+	ND
5%	+	+	+	+
7%	+	+	ND	ND
10%	+	+	ND	-
Growth at				
10°C	-	-	-	-
30°C	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+
50°C	-	-	-	-

Symbol : +, 90% or more of strains positive ; -, 10% or less of strains positive ; d, 11-89% of strains positive ; D, substantial proportion of species differ ; ND, no data available.

The isolated strain NG 06 was identified as *Bacillus racemilacticus*.

The isolated strain NG 16 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*.

Table 3. Identification of NG 06 and NG 16 with Biolog system (MicroLog™ 3)

Strain	Biolog system	Similarity
NG 06	<i>Bacillus racemilacticus</i>	97%
NG 16	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	96%

와 그 효능을 검증하고자 하며 그 항균물질 효과생산 최적조건에 대한 연구를 수행할 계획이다. 나아가 세치제 및 구강위

생용품으로 활용면에 관한 연구를 확대하고자 한다.

참 고 문 헌

1. Bratthall D. and B. Köhler 1976. *Streptococcus mutans* serotypes : some aspects of their indentification, distribution, antigenic shifts and relationship to caries. *J Dent Res.* 55, C15-C21.
2. Chang, C. H. 1965. Chemical changes during the fer-

- mentation of Korean soy-sauces and connection with its fermentative period, *Agr. Chem. and Biotech.* **11**, 35-41.
3. Chang, C. H. 1966. Free-sugars in ordinary Korean soy-sauce. *Agr. Chem. and Biotech.* **7**, 35-37.
 4. Chang, C. H. 1967. Organic acid in Agriculture Korean soy-sauces. *Agr. Chem. and Biotech.* **8**, 1-9.
 5. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th., *Williams & Willkins*, U.S.A
 6. J. Y. Yoo, H. G. Kim and D. J. Kwon. 1998. Improved process for preparation of traditional Kanjang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27(2)**, 268-274.
 7. Kim, J. K. and C. S. Kim. 1980. The taste components of ordinary Korean soy-sauces. *Agr. Chem. and Biotech.* **23**, 89-105.
 8. Kim K. K, S. J. Choe, C. Y. Lim and W. H. Chang 1983. Relationship between the caries experience of Korean school children and the distribution of *Streptococcus mutans* in dental plaque. *J Korean Soc Microbiol.* **18**, 11-21.
 9. Kim, S. S. 1978. Effect of meju shapes and strains on the quality of soy sauce, *J. Food Sci. Technol.* **10**, 63-72.
 10. Kim, Z. U., M. J. Cho and S. S. Kim. 1969. Studies on the preparation of improved soy-sauce kojis, *Agr. Chem. and Biotech.* **11**, 35-41.
 11. Lee, C. J. and H. S. Koh. 1976. Standardization of Korean soy sauce, *Korean J. Food Sci. Technol.* **8**, 247-252.
 12. Lee, J. M., S. B. Ann, Y. S. Kim, Y. M. Hong and J. H. Yu. 1974. Studies on the substitution of raw material for soy sauce, *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **2**, 89-93.
 13. Lee, J. M., Y. S. Kim, Y. M. Hong and J. H. Yu. 1972. Studies on the substitution of raw material for soy sauce, *Korean J. Food Sci. Technol.* **4**, 182-186.
 14. Liljemark W. F. and R. J. Gibbons 1972. Proportional distribution and relative adherence of *Streptococcus miteor(mitis)* on various surfaces in the human oral cavity. *Infect. Immun.* **6**, 852-859.
 15. Loesche W. J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* **50**, 353-380.
 16. Loesche W. J, J. Rowan, L. H. Straffon and P. J. Loops 1975. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infect. Immun.* **11**, 1252-1260.
 17. Loesche W. J. and L. H. Straffon 1979. Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human tissue decay. *Infect. Immun.* **26**, 498-507.
 18. McGhee J. R. and S. M. Michalek 1981. Immunobiology of dental caries : Microbial aspects and local immunity. *Ann Rew Microbiol.* **35**, 595-638.
 19. Kwon, O. J. J. K. Kim and Y. G. Chung. 1986. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *J. Korean Agr. Chem. Soc.* **29**, 422-428
 20. Schneyer L. H. 1955. Method for the collection of separate submaxillary and sublingual salivas in man. *J. Dent. Res.* **34**, 257-261.
 21. Seo, J. S. and T. S. Lee. 1992. Free amino acid in traditional soy sauce prepared from meju under different formations, *Korean J. Diet. Culture* **7**, 323-328.
 22. Seo, J. S. and T. S. Lee. 1993. The contents of free sugars and alcohol in traditional soy sauce prepared from meju under different formations, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **6**, 103-108.
 23. Van Houte J, R. Gibbons and S. B. Banghart 1970. Adherence as a determinant of the presence of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* on the human tooth surface. *Archs Oral.* **15**, 1025-1034.

(Received July 11, 2003; Accepted August 16, 2003)