

## *Chromobacterium violaceum* YK 391의 세포내 Cytosine Deaminase와 5-Fluorocytosine의 병용사용이 치아우식 원인세균에 대한 항균성의 발현

김 정 · 정혁준<sup>1</sup> · 유대식<sup>1\*</sup>

수원여자대학 치위생과, <sup>1</sup>계명대학교 자연과학대학 미생물학과

**Revelation of Antibacterial Effect Against Cariogenic Bacteria in Combination with 5-Fluorocytosine and Cytosine Deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391.** Kim, Jung, Hyuck Jun Jung<sup>1</sup>, and Tae Shick Yu<sup>1\*</sup>. Department of Dental Hygiene, Suwon Women's College, Suwon 441-748, Korea, <sup>1</sup>Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea – The antibacterial effect against cariogenic bacteria was evaluated in combination of 5-FC and intracellular cytosine deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391. While *S. mutans*, *L. parabuchneri* and *A. naeslundii* showed antibacterial effect against 10 mM of 5-FU, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. agalactiae*, *L. lactis*, *A. israelii*, *A. viscosus* don't caused antibacterial effect. The addition of the cytosine deaminase and 10 mM of 5-FC to *S. mutans*, *S. sanguis*, *L. brevis*, *L. parabuchneri*, *L. oris* and *A. naeslundii* caused weakly antibacterial effect. *S. sanguis* caused weakly antibacterial effect against 10 mM of 5-FC. These results suggested that combination of the cytosine deaminase and 5-FC was showed the possibility to precautionary measures of dental caries.

**Key words:** Cytosine deaminase, 5-fluorocytosine, 5-fluorouracil, *Chromobacterium violaceum* YK 391

Cytosine deaminase(cytosine aminohydrolase, EC 3.5.4.1)는 핵산의 pyrimidine염기 중의 하나인 cytosine의 4번 탄소에 위치한 아미노기를 가수분해하여 uracil과 암모니아로 전환시키는 가수분해 효소이다. 이 효소는 1923년 빵 효모에서 처음 확인되었으며[10], 1975년 *Serratia marcescens*와 *Pseudomonas aureofaciens*로부터 효소학적 특성이 서로 다른 효소가 정제되어 그의 특성이 규명되었다[24, 25]. 그 뿐만 아니라 cytosine deaminase는 cytosine의 유도체 중의 하나인 5-fluorocytosine(5-FC)도 가수분해하여 5-fluorouracil(5-FU)을 형성시키기도 한다.

이와 같은 탈 아미노화 반응은 두 가지 측면에서 임상학적인 의의를 가지고 있다.

인간을 포함한 포유동물에서 cytosine deaminase활성은 어떤 기관 내에서도 발견할 수 없으나 5-FC를 구강으로 섭취할 때 소량의 5-FU가 혈액 내에서 발견되는데, 그 이유는 장내세균이 갖고 있는 cytosine deaminase에 의한 5-FU의 생성인 것으로 생각된다. 5-FC는 uracil의 fluoro화된 유도체인 5-FU와는 달리 진균의 성장을 억제하지 못하나[1] 진균류가 소유하고 있는 cytosine deaminase의 작용에 의해 5-FU로 전환되어 진균감염에 대한 화학요법 효과가 나타난다고 보고하였으며[9], 5-FC-2<sup>14</sup>C를 첨가한 배지에서 *Candida*

*albicans*를 배양하여 5-FC-2<sup>14</sup>C의 활성을 추적한 결과, RNA 분획 중에서 그 활성이 존재하는 것을 확인함으로써 5-FU는 핵산합성의 저해로 항 진균효과를 나타낸다고 했다[23].

핵산 관련 물질에 의한 핵산 대사과정의 저해는 DNA 혹은 RNA, DNA와 RNA합성 모두를 저해하는 것으로 알려져 있으며, 그 중 어떤 유기체나 생체기관의 핵산에 무작위로 작용하는 5-FU는 종양세포에 많은 uridine kinase에 의하여 deoxyuridine monophosphate로 되어 thymine산 생합성을 저해하므로 DNA 생합성을 억제하여 항종양 효과를 나타내게 되는데 이를 “thymine death”라 일컫는다. 이 5-FU의 항종양 효과의 mechanism은 capsule화된 효소를 암 환자의 종양세포 주위에 심어 넣은 후, 5-FC를 환자에게 시간차를 두어 투여하고 그것이 순환계를 따라 이동을 하다가 종양세포에 위치한 capsule화된 효소에 도착하면 5-FC가 5-FU로 탈 아미노화되어 생성된 5-FU가 종양세포에 작용하는 것으로 판단된다. 이러한 pyrimidine계 유도체 중에 항종양물질로는 5-FU, 5-fluoro-2'-deoxyuridine, 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorocytosine, cyclocytosine, 1-β-D-arabinofuranosyl cytosine, thioinosine, cytosine arabinoside 및 6-azauridine 등이 있는데 그중 5-FU를 항종양제로 사용한 임상연구가 알려져 있으나 5-FU를 장기간 인체에 투여할 시 면역억제 작용 및 간이나 신장 등에 부작용을 유발하는 것[3]으로 알려져 있어 이러한 부작용을 최소화하기 위한 연구가 시도되기 시작하였다.

최근 Kim 등[15]이 *in vitro* 상에서 인간 조직구성 림프종

\*Corresponding author

Tel: 82-53-580-5252, Fax: 82-53-580-5164

E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

세포제인 U-937, 인간 만성적인 골수성 빈혈을 유발하는 백혈병 세포제인 K-562 및 인간 대장암 세포제인 SNU-C4에 대하여 cytosine deaminase와 5-FC를 병행 투여함으로써 각각 80%, 70%, 90% 이상의 증식 저하를 나타낸다는 연구 결과를 보고하였다.

이상과 같이, cytosine deaminase는 pyrimidine nucleotide 대사계에서 중요한 역할을 담당하는 key enzyme일 뿐만 아니라 항진균제이며 인체에 무해한 5-FC[2, 18]와 cytosine deaminase를 병행 투여함으로써 탁월한 항종양효과를 나타내어 임상학적 측면에서도 이용가능성이 높은 효소이다.

또한 전세계적으로 일어나는 범발성(pandemic)질환인 치아우식을 유발하는 세균의 생육을 조절하여 치아우식을 예방하고자 노력하고 있으며, cytosine deaminase와 치아우식 원인세균의 생육저해에 대하여도 연구가 진행되고 있다. 치아의 미생물 감염에 의한 질병으로 치아우식증(dental caries)과 치주질환(periodontal disease)이 대표적이며 치아상실의 약 87.67%를 차지하는 치아우식증은 소득수준이 높아짐에 따라 간식류 및 당류섭취의 증가에 의해 점차적으로 늘어나는 추세에 있으므로 효과적인 관리 대책이 시급하며 일상생활과 매우 밀접하게 연관되어 있음에도 불구하고 그 실체에 대해서는 의외로 잘 알려져 있지 않다[17].

최근에 의학의 방향이 치료보다는 예방측면의 중요성이 대두됨에 따라 치아우식증도 발생기작에 관한 기초적인 연구 및 치아우식증 예방제의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되어 예방 치과학 분야의 발전이 기대되고 있다[12, 22]. 또한 치아우식 발생에 관한 학술은 산탈회설(acid-decalcification)[20, 21]이 가장 유력시되고 있다.

즉, 외부의 침입이 용이한 구강에는 일시적으로 존재하는 경과균(transient bacteria)과 정착하고 있는 상재균총(resident bacteria)으로 구분되어 있으며 구강연쇄구균 중 특히, *Streptococcus mutans*는 치아의 표면이 청결하지 못할 경우 시간이 지남에 따라 잇솔질이나 water spray로는 제거되지 않을 만큼 강하게 부착된 치면세균막(dental plaque)의 형성을 촉진시킨다. 즉, 세균이 갖고 있는 glucosyltransferase를 생산하여 glucose를 축합함으로써 집착성이 있고 불용성이며 다당체인 glucan을 형성하여 많은 세균이 공생하면서 치면세균막 세균총(plaque flora)이라는 생태계를 형성한다. 이러한 생태계를 형성하는 미생물의 비율은 모든 시기에 걸쳐 연쇄상구균이 우점종을 차지하며 점차적으로 시간이 경과함에 따라 호기성세균이 감소하고 혐기성세균이 증가한다. 특히 구강위생을 불결하게 하였을 경우 국소의 미생물이 증가함에 따라 숙주의 저항성과 미생물의 병원성 상호간의 균형이 깨어져 치아우식증, 치주질환과 같은 구강질환을 유발하게 되는데, 이 중 전세계적으로 치아상실 원인의 87%를 차지하고 있으며 치질의 탈 석회 즉, 경조직 중의 인산칼슘이 분해되어 칼슘의 용출이 일어나고 세균성효소에 의하여 유기질성분이 분해되는 치아우식증은 반드시 흔적을 남기게

된다. 치아우식증 중 가장 높은 발생빈도를 나타내는 소아 열구우식(pit and fissure caries)은 *S. mutans*, *S. sanguis*, *Lactobacillus* sp. 및 *Actinomyces* sp. 등이 관여하며, 평활면 우식(smooth surface caries)은 성인의 경우에는 치간인접면에서 주로 발생하고 소아에서는 순면의 평활면에서 주로 발생하며 주로 *S. mutans*가 관여한다. 또한 치근면우식(root surface caries)은 치근면의 표층에 주로 발생하고 *S. mutans*, *S. sanguis*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* 등이 관여하며, 심부 상아질우식(deep dental caries)은 에나멜우식이 진행되어 나타나는 것으로서 *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *S. mutans*, *S. sanguis* 및 *Lactobacillus* sp. 등의 세균이 관여한다.

따라서 본 연구에서는 *Chromobacterium violaceum* YK 391의 세포내 cytosine deaminase와 5-FC가 우식활성부위에서 발견되어지는 치아우식 원인세균의 생육에 미치는 영향을 규명하여 치아우식증의 예방법을 제시하고자 한다.

본 실험에 사용한 세포내 cytosine deaminase를 생산하는 세균은 Yu와 Kim[26]에 의해 분리된 *C. violaceum* YK 391을 사용했다. 검증세균으로는 치아우식이 진행된 치아로부터 직접 분리한 *S. agalactiae*, *S. intermedius*, *S. mitis*와 *S. mutans* KCTC 3001, *S. mutans* KCTC 3303, *S. mutans* KCTC 3302, *S. sanguis* KCTC 3284, *L. brevis* subsp. *brevis* KCTC 3102, *L. lactis* KCTC 2181, *L. oris* KCTC 3502, *L. parabuchneri* KCTC 3503, *A. israelii* KCTC 9054, *A. naeslundii* KCTC 9013, *A. viscosus* KCTC 9146은 한국과학기술원 유전자지원센터에서 분양 받아 사용하였다.

Cytosine deaminase의 정제는 Yu와 Kim[16]의 방법에 따라 정제했다.

치아우식 원인세균인 *Streptococcus*속 세균을 분리하기 위하여 대구광역시 시내 치과로부터 치아우식이 진행되어 기능을 상실한 치아를 발거하여 멸균생리식염수 10 ml에 옮겼다. 이 식염용액을 초음파 파쇄기(Model VCX 600, Sonics and Materials Inc., Danbury, CT. U.S.A)의 microtip을 사용하여 10°C에서 100 Hz로 15초간 초음파 처리하여 10, 100, 1000배로 희석했다. 희석세균액을 Mitis-Salivarius agar(MS)배지[29]에 옮겨 37°C에서 혐기적 조건에서 48시간 배양한 후, 계속하여 호기적 조건에서 배양하여 치아우식에 부착된 *Streptococcus*속 세균을 분리했다.

치아우식 원인세균에 대한 항균효과의 확인은 agar diffusion법을 사용하여 clear zone의 크기로서 확인하였다. 즉, 검증세균이 함유된 평판배지위에 10 mM 5-FC와 10 mM 5-FU 및 20 mM 5-FC와 150 µl 효소액(32 units/ml)과 적당량의 0.2 M Tris-HCl(pH 7.5)로 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 5-FC 효소 반응액을 각각 paper disc (Ø, 8 mm, Advantec Co.)에 얹고 37°C에서 1-2일간 배양한 다음, clear zone의 크기(mm)를 측정하여 확인하였다. *Streptococcus* sp.의 세균증식용 배지는 TH broth(beef heart, infusion from 500 g, neopeptone 200 g, NaCO<sub>3</sub> 2.5 g, dextrose 2

g, NaCl 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4 g)를, *Lactobacillus* sp.는 MRS broth(dextrose 20 g, proteose peptone No.3 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 5 g, sodium acetate 5 g, sorbitan monooleate complex 1 g, ammonium citrate 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.1 g, MnSO<sub>4</sub> 0.05 g)를, *Actinomyces* sp.는 C broth(brain heart, infusion from 375 g, calf brains, infusion from 100 g, yeast extract 4 g, neopeptone 20 g, proteose peptone 10 g, malt extract 10 g, NaCl 3.5 g, dextrose 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g)를 사용하였다.

치아우식이 진행된 치아에 부착된 *Streptococcus*속 세균을 분리한 결과, MS평판배지에 60여 개의 colony가 형성되었다. 이들 세균을 VITA EK GPI card(Bio-Merieux, Germany Co.)로 동정한 결과, 16균주가 *S. intermedius*이며, 14균주가 *S. mitis*이며, 8균주가 *S. agalactiae*로 동정되었다. 그리고 이들 세균은 치면세균막에 존재하고 산생성능력을 가졌을 뿐 아니라 우식병소내의 강한 산성의 환경에서 생존할 수 있는 내산성 치아우식 원인세균으로 간주되는 *S. mutans*[6, 11, 19]를 동정하기 위하여 먼저 mannito의 분해효소를 갖고 있음에 착안하여[8] TTC 용액(10% mannitol +4% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)을 분무하여 분홍색을 나타내는지를 조사한 결과, 13균주가 어두운 핑크색(dark pink)을 나타내었다. 이들 세균을 다시 MS배지에 polymyxin을 함유시킨 MSP배지[5]와 MS배지에 bacitracin을 함유시킨 MSB 배지[7]에 특이적으로 생육하는 특징을 이용하여 이들 배지에 접종하여 배양했으나 생육하지 않으므로 내산성 *S. mutans*는 분리할 수 없었다.

이상의 결과로, 치아우식이 너무 진행된 치아에서는 단정 지을 수는 없으나 치아우식 원인세균인 내산성 *S. mutans*는 존재하지 않는 것으로 추정된다.

Table 1은 5-FC, 5-FU와 5-FC 효소 반응액에 대한 치아우식으로부터 분리한 세균과 분양받은 치아우식원인세균에 대한 항균효과를 나타내었다. Table 1에 나타난 바와 같이, 분양 받은 치아우식 원인세균인 3종의 *S. mutans*와 *S. sanguis*는 5-FU와 5-FC 효소 반응액에 대하여 항균효과를 나타내며, 특히, *S. mutans* KCTC 3001는 5-FU에 대하여 높은 항균효과를 나타내었다. 그리고 치아로부터 분리한 wild type인 *S. intermedius*, *S. mitis*와 *S. agalactiae*는 5-FC, 5-FU와 5-FC 효소 반응액에서 항균효과를 전혀 나타내지 않았다. 특히, *S. sanguis* KCTC 3284는 5-FC에 대하여 약간의 항균효과를 나타내었다.

치아우식의 발생은 직접적 인자 외에도 치아와 타액, 음식물과 개인의 구강 내에서의 치면의 형태와 구조에 따라 서로 다르게 발생한다. 특히, 치아의 부위에 따른 치아우식의 분류에 있어서 *Lactobacillus*속 세균은 치아우식증 초기 연구에서 연구대상이 되어 왔으며[4], 가장 발생빈도가 높은 형의 치아우식인 교합면 우식시 가장 많이 발견될 뿐만 아니라 에나멜질 치아우식이 진행된 상태 또는 치관수복 후의

**Table 1. Growth inhibition of the 5-FC, 5-FU and combination of 5-FC and the enzyme mixture against cariogenic bacteria.**

Strains	Inhibitory clear zone (Ø, mm)			
	Conc. (mM)	5-FC	5-FU	Combination of the enzyme and 5-FC
<i>Streptococcus mutans</i> KCTC 3001	3	-	10	9
	5	-	13	9
	7	-	13	10
	10	-	15	11
<i>Streptococcus mutans</i> KCTC 3303	3	-	9	9
	5	-	9	9
	7	-	10	9
	10	-	10	9
<i>Streptococcus mutans</i> KCTC 3302	3	-	9	9
	5	-	9	10
	7	-	9	10
	10	-	10	10
<i>Streptococcus sanguis</i> KCTC 3284	3	9	9	9
	5	9	9	9
	7	9	10	9
	10	10	10	10
<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>brevis</i> KCTC 3102	3	-	10	9
	5	-	9	10
	7	-	9	9
	10	-	10	10
<i>Lactobacillus lactis</i> KCTC 2181	3	-	-	-
	5	-	-	-
	7	-	-	-
	10	-	-	-
<i>Lactobacillus oris</i> KCTC 3502	3	-	9	9
	5	-	9	10
	7	-	10	10
	10	-	9	10
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> KCTC 3503	3	-	11	11
	5	-	13	10
	7	-	15	12
	10	-	17	14
<i>Actinomyces israelii</i> KCTC 9054	3	-	-	-
	5	-	-	-
	7	-	-	-
	10	-	-	-
<i>Actinomyces naeslundii</i> KCTC 9013	3	-	12	10
	5	-	13	11
	7	-	15	11
	10	-	16	12
<i>Actinomyces viscosus</i> KCTC 9146	3	-	-	-
	5	-	-	-
	7	-	-	-
	10	-	-	-
<i>Streptococcus intermedius</i>	10	-	-	-
<i>Streptococcus mitis</i>	10	-	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	-	-	-

- : Non inhibition

2차우식으로 발생하는 상아질우식시에도 발생빈도가 높다.

*L. parabuchneri* KCTC 3503는 5-FU와 5-FC 효소 반응액에 대하여 강한 항균효과를 나타내었다. *L. brevis*와 *L. oris*도 5-FU와 5-FC 효소 반응액에 대하여 어느 정도의 감수성을 나타내었으나, *L. lactis*는 5-FC, 5-FU와 5-FC 효소 반응액에 대하여 항균효과를 전혀 나타내지 않았다.

이상의 결과로, *L. parabuchneri*, *L. brevis*와 *L. oris*균주는 항진균제인 5-FC와 cytosine deaminase와 함께 사용하면 젖산세균의 생육이 억제되어 치아우식을 예방할 수 있는 방법이 예시될 수 있다.

치아우식이 생기는 부위는 형태적으로나 구조적으로 서로 다르며, 분포되어 있는 미생물의 종류도 다양하다. 치아우식의 원인세균으로 알려진 *Actinomyces*속 세균의 경우에는 물리적으로 고려할 시 정착이 쉬운 교합면우식에서 발견될 뿐만 아니라 치근면의 표층인 시멘트질과 다른 부위의 우식병소보다도 혐기적 상태인 심부상아질의 치아우식시에도 *Lactobacillus*속 세균과 함께 발견된다. 특히, *A. naeslundii*는 치근면과 상아질 치아우식이 진행된 치아에서 쉽게 분리된다고 알려져 있다.

*A. naeslundii* KCTC 9013는 5-FU와 5-FC 효소 반응액에 대하여 항균효과를 나타내었으나, *A. israelii*와 *A. viscosus*는 5-FU, 5-FC와 5-FC 효소 반응액에 대하여 항균효과를 나타내지 않았다.

치아우식 원인세균인 *S. mutans* KCTC 3001, *L. parabuchneri* KCTC 3503와 *A. naeslundii* KCTC 9013는 5-FU에 대하여 항균효과가 매우 높았으며, *S. sanguis* KCTC 3284는 5-FC, 5-FU와 5-FC 효소 반응액에 대하여 약간의 항균효과를 나타내었다. 그러나 치아로부터 직접 분리한 wild type인 *Streptococcus* sp.와 분양 받은 *L. lactis* KCTC 2181, *A. israelii* KCTC 9054와 *A. viscosus* KCTC 9146는 5-FC, 5-FU와 5-FC 효소 반응액에 대하여 항균효과를 전혀 나타내지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, *Chromobacterium violaceum* YK 391의 세포내 cytosine deaminase와 항균효과가 없는 5-FC를 공존시키므로 구강병 관리의 원칙 중 하나인 미생물적 요인 즉, 치아우식 원인세균의 생육을 억제하므로 부분적으로 치아우식증을 예방할 수 있다고 사료된다.

## REFERENCES

1. Chakravarty, P. K., P. L. Carl, M. J. Weber, and J. A. Katzenellenbogen. 1983. Plasmin-activated prodrugs for cancer chemotherapy. Synthesis and biological activity of peptidylacivicin and peptidylphenylenediamine mustard. *J. Med. Chem.* **26**: 633-638.
2. Diasio, R. B., J. E. Bennett, and C. E. Myers. 1978. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Biochem. Pharmacol.* **27**: 703-708.
3. Diasio, R. B., B. E. Lakings, and J. E. Bennett. 1978. Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in humans: Possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**: 903-908.
4. Enright, J. J., H. E. Friesell, and M. O. Treschen. 1932. Studies of the cause and nature of dental caries. *J. Dent. Res.* **12**: 759-827.
5. Fitzgerald, R. J. and B. O. Adams. 1975. Increased selectivity mitis-salivarius agar containing polymyxin. *J. Clin. Microbiol.* **1**: 239-240.
6. Gibbons, R. J. and M. Nygaard. 1968. Synthesis of insoluble dextran and its signification in the formation of gelatin deposits by plaque-forming *Streptococci*. *Arch. Oral Biol.* **13**: 1249-1262.
7. Gold, O. G., H. V. Jordan, and J. van Houte. 1973. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **18**: 1357-1364.
8. Gold, O. G., H. V. Jordan, and J. van Houte. 1974. Identification of *Streptococcus mutans* colonies by mannitol-dependent tetrazolium reduction. *Arch. Oral Biol.* **19**: 272-272.
9. Grunberg, E., E. Titsworth, and M. Bennett. 1964. Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. In : *Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Ann. Arbor. Mich.* **6**: 566-568.
10. Hahn, A. and W. Lintzel. 1923. ber das verhalten von pyrimidinderivaten in den organismen.. Einfluss von hefe auf pyrimidinderivate. *Z. Biol.* **79**: 179-184.
11. Hamada, S. and Slade, H. D. 1980. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* **44**: 331-384.
12. Hunter, L. and M. Addy. 1987. Chlorohexide gluconate mouth wash in the management minor aphthous ulceration. *Brit. Dent. J.* **162**: 106-110.
13. Kennedy, K. A. 1987. Hypoxic cells as specific drug targets for chemotherapy. *Anti-Cancer Drug Des.* **2**: 181-194.
14. Kerr, D. E., P. D. Senter, W. V. Burnett, D. L. Hirschberg, I. Hellstrom, and K. E. Hellstrom. 1990. Antibody-penicillin-V-amidase conjugates kill antigen-positive tumor cells when combined with doxorubicin phenoxycetamide. *Cancer Immunol. Immunother.* **31**: 202-206.
15. Kim, T. H., J. Kim, and T. S. Yu. 1998. Revelation of antitumor effect in combination with 5-Fluorocytosine and extracellular cytosine deaminase. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**: 669-674.
16. Kim, J., H. S. Kim, and T. S. Yu. 2003. Purification and some properties of intracellular cytosine deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: ( in press).
17. Kim, Y. K. 1995. *Dental pathology.* ed. Kumoonsa.
18. Koechlin, B. A., F. Rubio, S. Palmer, T. Gabriel, and R. Duschinsky. 1966. The metabolism of 5-fluorocytosine-<sup>2</sup><sup>14</sup>C and of cytosine-<sup>14</sup>C in the rat and the disposition on 5-fluorocytosine-<sup>2</sup><sup>14</sup>C in man. *Biochem. Pharmacol.* **15**: 435-446.
19. Loesche, W. J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol., Rev.* **12**: 353-380.
20. Menaker, L. and J. R. Mcghee. 1982. Dental caries. In: Den-

- tal Microbiology (Mergenhagen, S. E., ed.), Harper and Row. Publisher Inc. 691-713.
21. Miller, W. D. 1889. Mikroorganismen der mundohle. *Georg. Thieme*, Leipzig.
  22. Okami, Y., O. Takashi, and O. Yoshiro. 1982. The structure of ribocitrin and its structure-activity relationship in the inhibition of dextransucrase of *S. mutans* E 49. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2449-2456.
  23. Ronald, M. A. 2000. *Handbook of Microbiological Media*. Ed. by Lawrence, C. P., CRC Press, Inc., p. 610.
  24. Sakai, T., T. S. Yu, H. Tabe, and S. Omata. 1975. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 1623-1629.
  25. Sakai, T., T. S. Yu, K. Taniguchi, and S. Omata. 1975. Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 2015-2020.
  26. Yu, T. S. and T. H. Kim. 1997. Isolation and identification of bacterium producing extracellular cytosine deaminase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 9-14.

**(Received March 24, 2003/Accepted July 9, 2003)**