

Characterization of *Streptococcus mutans* Ingbritt Sucrose-glucan Glucosyltransferase and the Inhibition Effect of Chitin Derivatives on its Activity

Wan-Taek Ju · Myeong-Sim Ji · Ro-Dong Park

Streptococcus mutans Ingbritt sucrose-glucan glucosyltransferase 특성과 그 활성에 미치는 키틴 유도체들의 효과

주완택 · 지명심 · 박노동

Received: 2 July 2012 / Accepted: 30 July 2012 / Published Online: 30 September 2012
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2012

Abstract Sucrose-glucan glucosyltransferase (Gtf) is an important enzyme involved in the cavity formation process where insoluble glucan is synthesized. In this study, we purified Gtf from *Streptococcus mutans* Ingbritt through ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-150, CM-Sephadex, and DEAE-Sephadex column chromatographies. A 13-fold of purification was achieved with a total yield of 6.3%. The apparent molecular mass of the enzyme was determined to be 66 kDa on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The optimal pH and temperature were established to be 6.0 and 40°C, respectively. The enzyme activity could be inhibited to 22–59% by 1 mM Hg²⁺, Cu²⁺ and Al³⁺, and to 68% by 1 mM EDTA. It was also inhibited 40% by 2 mM xylitol and 35–45% by 0.05% soluble chitosan, glycol chitosan, and glycol chitin. This is the first report to reveal the inhibition effect of chitin derivatives on Gtf activity, which may be further applicable to develop gargles to overcome cavity.

Keywords glycol chitin · glycol chitosan · *Streptococcus mutans* Ingbritt · sucrose-glucan glucosyltransferase · xylitol

서론

인간이나 실험 동물에서 충치의 발생원인인 치석을 형성시키는 대표적인 병인 세균이 *Streptococcus mutans*이다. *S. mutans*의 치아 표면 부착과 산 생성 활성이 미생물의 충치형성능력 carigenicity을 결정한다(Harno 등, 1982; Choi, 1984).

*S. mutans*는 sucrose-glucan glucosyltransferase (Gtf)을 포함한 수종의 세포외 효소를 분비하며(Carson 등, 1969), 분비된 2종류 Gtf (Gtf-I, Gtf-S)와 fructosyltransferase (Ftf)가 부착성 불용성의 다당류를 생합성하는 것으로 알려졌다(Kenny과 Cole, 1983). Gtf는 설탕으로부터 고분자 다당류인 수용성 또는 불용성의 글루칸을 생성하며, 이 글루칸은 *S. mutans* 세포가 치아 표면에 부착하는데 중요한 역할을 한다(Tanzer 등, 2008).

*S. mutans*에서 3가지 Gtf가 확인되었다. Gtf B는 α -1,3 결합의 불용성 글루칸을 생합성하며, Gtf D는 α -1,6 결합의 수용성 글루칸을, Gtf C는 α -1,3 및 α -1,6 혼합 분지형태의 글루칸을 생합성한다(Aoki 등, 1986; Hanada과 Kuramitsu, 1988; 1989). 이 3종의 Gtf 유전자(*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*)가 *S. mutans* GS-5 등에서 클로닝되었다(Kuramitsu, 1993; Fujiwara 등, 1998). 근래 *S. mutans*의 Gtf B, C, D는 급성 또는 만성 심내막염(endocarditis)에서 interleukin-6을 포함한 cytokine의 생산을 유도하는 모듈린(modulins)으로 기능한다고 알려졌다(Shun 등, 2005).

한편, Gtf는 세포막 결합형과 유리형으로 존재하고 있다. Gtf-I은 주로 세포막에 위치하며 8M의 요소의 처리로 추출할 수 있다(Hamada 등, 1989; Mukasa 등, 1989). 또 Gtf-S는 체외로 분비되는데, 이 유리형 효소는 *S. mutans*에서 각각 다른 물리적 특성을 갖는 최소 7종의 동위효소로 분리되었다(Kenny과 Cole, 1983). 수용성 글루칸을 형성하는 dextransucrase와 불용성 글루칸을 형성하는 Gtf가 여러 균주로부터 분리되었으나 불

W.-T. Ju · R.-D. Park (✉)
Department of Agricultural Chemistry, Graduate School, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea
E-mail: rdpark@chonnam.ac.kr

M.-S. Ji
Yeongam-Gun Agricultural Technology Center, Jeollanamdo 526-821, Republic of Korea

용성 글루칸을 형성하는 효소는 자기 응집현상 때문에 순수분리에 어려움이 있다 (Moneville과 Cooney, 1978).

*S. mutans*는 탄수화물 항원에 따라 혈청학적으로 3종의 혈청형 (serotype) *c*, *e*, *f*로 분류된다. 혈청형 *c*는 2종의 Ftf와 둘 또는 그 이상의 Gtf를 만들어내는데 보통 구강 내 치석에서는 혈청형 *c*의 균주들이 많이 발견되며 가장 우세한 종으로 손꼽힌다 (Kenny과 Cole, 1983). 따라서 이러한 혈청형 *c* 균주로부터 Gtf의 분리 정제와 특성 규명은 충치의 예방을 위한 연구에서 중요하다.

본 연구에서는 충치의 예방을 위한 기초자료를 제공하고자 *S. mutans* Ingbritt 배양액으로 Gtf를 분리 정제하고 그 효소적 특성을 조사하였으며, 특히 키틴 유도체의 저해효과를 검토하였다.

재료 및 방법

시약. Chitin과 Chitosan은 KittoLife Co. (Korea)에서, chitin oligomers (DP, Degree of polymerization, 2-6), chitosan oligomers (DP 2-7)는 Seikagaku Co. (Japan)에서 구입하였다. Glycol chitosan (MW 300 kDa)과 glycol chitin (MW 300 kDa)은 Trudel과 Asselin (1989)에 따라, soluble chitosan (MW 300 kDa)은 통상적 방법 (Gao et al., 2012)에 따라 조제하여 사용하였다. Xylitol, *p*-nitrophenyl- β -D-cellobioside, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- β -D-acetylglucosaminide 등을 비롯한 생화학 시약들은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

균주 및 배양. 균주 *S. mutans* Ingbritt는 전남대학교 의학대학에서 분양받았으며, BHI broth에 *S. mutans*를 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액을 조효소로 이용하였다.

효소의 정제. 모든 정제과정은 4°C에서 수행되었다. 배양액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 80% 포화시켜 원심분리(9000 × g, 30 min, 2회)하여 침전물을 얻었으며, 이를 인산완충용액(0.05 M, pH 6.0)에 녹여 동일 용액으로 투석한 후 농축하였다. 이 효소액을 Sephadex G-150 column (2.8 cm × 60 cm)에 통과시켜 효소활성이 있는 부분을 모아 CM-Sephadex column (2.8 cm × 60 cm)을 통과시켰다. 이 때 0, 0.1, 0.2 M NaCl을 함유한 동일 완충용액으로 계단식 방법으로 용출시켜 분획하였다. 이중 활성분획을 모아 농축하여 DEAE-Sephadex column (1.5 cm × 30 cm) 통과시키는데 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 M NaCl을 함유한 동일 완충용액을 계단식 방법으로 용출하여 분획하였다. 활성도가 가장 높은 분획들을 모아 농축하고 이를 효소의 특성 연구에 사용하였다.

효소 활성의 측정. 활성도 측정을 위해 5% sucrose 1, 10 mg/mL dextran T-10 0.2 mL, 10% merthiolate 10 μ L의 혼합용액에 효소액 0.2 mL를 (pH 6.0) 첨가하여 37°C에서 24시간 반응시켰다 (Mukasa 등, 1982). 이후 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 환원당 정량법에 따라 550 nm에서 생성된 환원당을 측정하였다 (Miller, 1959). 1 unit는 1시간당 1 μ mol의 glucose를 유리할 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

분자량 측정. 정제된 Gtf의 순도와 분자량은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 측정하였으며, 표준 분자 마커로는 phosphorylase (97,400), serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), trypsin inhibitor (21,500), lysozyme (14,400)을 사용

하였다. 단백질은 Coomassie brilliant blue R-250로 염색하였다 (Laemmli, 1970). 단백질 함량은 UV-Spectrophotometer (Hitachi Model U-2001, USA)로 280 nm에서 측정하거나, 또는 bovine serum albumin (BSA)을 표준 단백질로 하여 Micro Bradford 법으로 (Bradford, 1976) 측정하였다.

pH와 온도의 영향. pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 3–6의 0.15 M citrate buffer와 pH 6–9의 0.15 M phosphate buffer, pH 9–10의 0.15 M bicarbonate buffer를 사용하였다. 10% sucrose 0.5 mL, 10 mg/mL dextran T-10 0.2 mL, 10% merthiolate 10 μ L, 효소액 0.2 mL, 그리고 각각의 pH 3–10의 완충용액 0.5 mL을 넣고 잘 혼합하여 37°C에서 24시간 반응시킨 후 생성된 환원당을 측정하였다. 또한 각 pH에서 효소의 안정성을 조사하기 위하여 위의 완충용액에 혼합한 효소를 24시간 4°C에 보관한 다음 잔존하는 효소활성을 측정하였다. 최적 온도를 조사하기 위해 효소액 0.2 mL, 5% sucrose 1 mL, 10 mg/mL dextran T-10 0.2 mL, 10% merthiolate 10 μ L을 혼합한 (pH 6.0) 후 25–70°C의 온도에서 24시간 반응시킨 후 DNS 환원당 정량법으로 생성된 환원당을 측정하였다.

금속이온의 영향. 금속이온 영향은 5% sucrose 0.66 mL, 10 mg/mL dextran T-10 0.1 mL, 10% merthiolate 10 μ L을 혼합한 (pH 6.0) 후, 각각의 금속이온 용액의 농도가 1 mM 또는 10 mM이 되도록 0.1 mL의 각 금속이온 용액을 넣고 마지막으로 효소액 0.1 mL를 넣고 혼합하고, 37°C에서 24시간 반응시킨 후 DNS 환원당 정량법으로 생성된 환원당을 측정하였다.

Xylitol의 영향. 껌에 첨가하는 감미료인 자일리톨의 영향을 조사하였다. 0–80 mM xylitol 100 μ L, 5% sucrose 660 μ L, 10 mg/mL dextran T-10 100 μ L, 10% merthiolate 10 μ L 혼합액에 효소액 130 μ L를 가하고 (pH 6.0), 37°C에서 24 h 동안 반응시키고 DNS법으로 생성된 환원당을 측정하였다.

Chitin 유도체들의 영향. Soluble chitosan, glycol chitosan, glycol chitin, chitin oligomers, chitosan oligomers, *p*-nitrophenyl- β -D-cellobioside, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- β -D-acetylglucosaminide 등의 키틴과 키토산 유도체들이 Gtf 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 0–5% 유도체 100 μ L, 5% sucrose 660 μ L, 10 mg/mL dextran T-10 100 μ L, 10% merthiolate 10 μ L의 혼합액에 효소액 130 μ L를 혼합하여 (pH 6.0) 37°C에서 24 h 동안 반응시키고 DNS법으로 생성된 환원당을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제. Gtf를 생산하는 균으로 알려진 *S. mutans* Ingbritt를 BHI broth에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 원심분리하여 조효소액을 얻었으며, 80% 황산암모늄을 가하여 단백질을 침전시켰다. 이를 Sephadex G-150 column (Fig. 1A), CM-Sephadex column (Fig. 1B), DEAE-Sephadex column (Fig. 2)에 차례로 통과시켜 정제된 Gtf를 얻었다. Gtf의 회수율과 정제도는 각각 6.28%와 13.0배였다 (Table 1).

Mukasa 등 (1982)은 *S. mutans* Ingbritt (serotype c)에서 Gtf를 회수율 0.9%, 정제도 70배로 정제하였으며, Chludzinski 등 (1974)은 *S. mutans* 6715 (serotype g)로부터 효소를 분리하여 13%의 회수율과 1.5배의 정제도를 얻었는바, 연구자에 따라 또는 실험방법에 따라 차이가 있어 보였다.

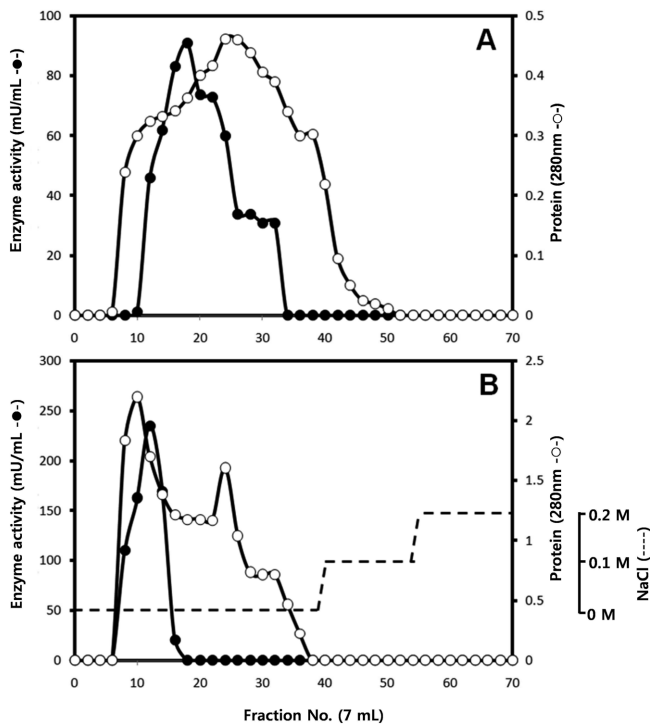


Fig. 1 Purification of a glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* Ingbritt on Sephadex G-150 column (A) and CM-Sephadex column (B). Fractions of 7 mL per tube were collected.

S. mutans Gtf는 Sephadex G-150 컬럼에서 일찍 용출되는 것으로 보아 분자량이 크며(Fig. 1A), CM-sephadex 컬럼에서 거의 공극부피(void volume)에서 용출되며(Fig. 1B) DEAE-Sephadex 컬럼에서 0.3 M NaCl 용액 분획에서 용출되는 것으로(Fig. 2) 보아 산성 단백질인 것으로 보였다.

효소의 온도 및 분자량. Fig. 3은 정제된 효소의 10% SDS-PAGE 전기영동 결과로서, 단일띠로 나타났으며, 그 분자량은 66 kDa이었다. 이 66 kDa Gtf는 *S. mutans* (serotype c)에서 불용성 글루칸을 생합성하는 효소로 분리 정제된 158 kDa (Mukasa 등, 1989), 155 kDa (Mukasa 등, 1982), 153 kDa (Kenny와 Cole, 1983), 152 kDa (Kim 등, 1992), 140 kDa (Kuramitsu와 Wondrck, 1983), 130 kDa (Hanada 등, 1987) 등에 비하여 분자량이 거의 절반에 해당하는 산성 단백질인 것이 특징적이다. 한편, 세포 배양매지에서 99 kDa Gtf가 정제되었는바 (Grahame과 Mayer, 1984; Mukasa 등, 1985), 이는 Gtf 다중복합체가 단백질단분해(proteolysis)되어 생성되었을 가능성이 제기된 바 있다.

한편, *S. mutans* 이외의 *Klebsiella pneumoniae* AS-22

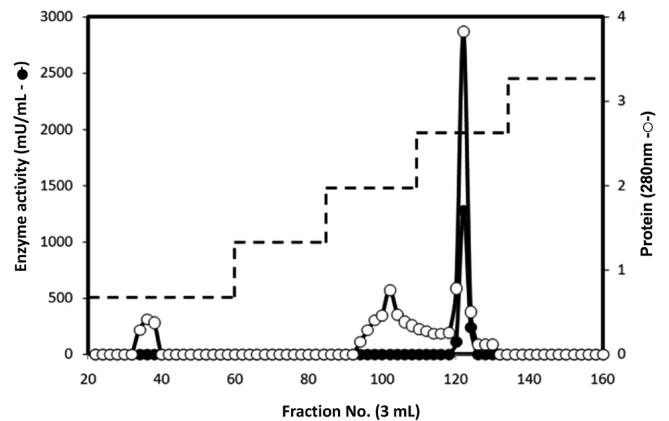


Fig. 2 DEAE-Sephadex column chromatography of the glucosyltransferase from *S. mutans* Ingbritt. Fractions of 3 mL per tube were collected.

(Gwande과 Patkar, 2001)와 *Synechococcus sp.* PCC 7942 (Chung 등, 2000)에서 분리된 Gtf의 분자량은 각각 75, 39.2 kDa이었다.

최적 pH와 최적온도. Fig. 4A에서 보는 바와 같이, 정제된 효소 Gtf의 최적 pH는 pH 4.5–6.5이었으며, 중성 이상의 pH에서 보다는 4.5 이하의 산성에서 활성이 높았다. *S. mutans*에서 분리된 Gtf의 최적 pH는 pH 4.5–6.8 범위이며(Kuramitsu과 Wondrack, 1983; Mukasa 등, 1985; Kim 등, 1992), *Klebsiella pneumoniae* AS-22와 *Synechococcus sp.* PCC 7942에서 정제된 Gtf의 최적 pH는 pH 6–9 또는 pH 10의 중성 이상이었다 (Chung 등, 2000; Gwande과 Patkar, 2001).

Fig. 4B는 효소의 온도 반응 곡선으로, 최적온도는 40°C였다. 대체로 Gtf는 35–50°C에서 최적온도를 나타냈다(Kim 등, 1992; Chung 등, 2000; Gwande와 Patkar, 2001). 이 균주는 구강 치석에서 가장 흔히 발견되는 점을 고려할 때, 인간의 체온과 유사한 범위의 최적온도를 가졌다고 하겠다.

금속이온의 영향. 치석을 형성하는 다당류의 대부분은 *S. mutans*의 Gtf와 fructosyltransferase에 의하여 합성된다(Loesche, 1986). 그러므로 주요 치석 형성 효소 활성의 억제제는 세균의 부착과 치석물질 축적의 조절에 매우 중요한 수단이 된다.

Table 2에 금속 이온 영향을 정리하였다. 1 mM 농도의 Hg²⁺, Cu²⁺, Al³⁺에서 효소의 활성은 22–59%의 저해를 받았으며, 이들 금속이온의 농도 높아지면 더욱 강하게 저해를 받았다. 1–10 mM의 요소는 저해효과를 나타내지 않았다. 치석 생성 억제제로 알려진 Zn²⁺는 1 mM 농도에서는 거의 영향을 미치지 않았으며, 10 M에서 약 20%의 저해를 나타냈다. 한편, *S. mutans*에서 생산된 Gtf B, C, D는 금속이온들 5 mM Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ 등에 의하여 40–80% 저해받았다(Wunder와 Bowen,

Table 1 Purification table of the glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* Ingbritt

| Purification Procedure | Volume (mL) | Total protein (mg) | Total activities (Units) | Specific activity (U/mg) | Recovery (%) | Purification fold |
|---|-------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|-------------------|
| Crude Enzyme | 1670 | 49.3 | 9.4 | 0.19 | 100 | 1 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation | 24 | 9.6 | 1.6 | 0.167 | 17 | 0.879 |
| Sephadex G-150 | 100 | 2.91 | 2 | 0.687 | 21.3 | 3.62 |
| CM-Sephadex | 35 | 0.64 | 1.2 | 1.875 | 12.8 | 9.87 |
| DEAE-Sephadex | 4 | 0.24 | 0.59 | 2.46 | 6.29 | 12.98 |

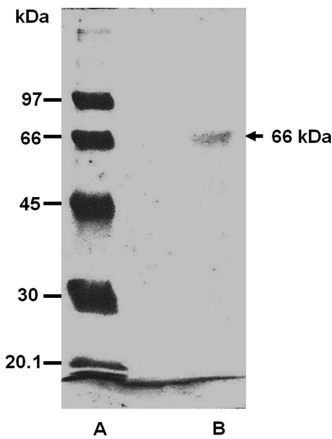


Fig. 3 SDS-PAGE of the glucosyltransferase purified from *S. mutans* Ingbritt. A: Molecular weight marker, B: Purified enzyme

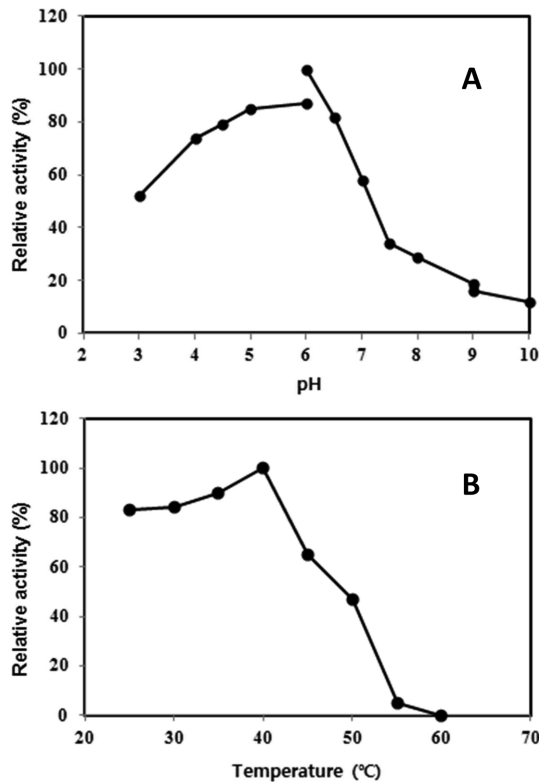


Fig. 4 Effect of pH (A) and temperature (B) on the glucosyltransferase from *S. mutans* Ingbritt.

1999). 대신, 1–10 mM의 K^+ 과 Mg^{2+} 는 효소의 활성을 3–10% 증강시켰다. 이는 *Synechococcus* sp. PCC 7942에서 분리된 Gtf가 Mg^{2+} , Mn^{2+} 이온의 존재하에 활성화되었다는 결과와 유사한 것이다(Chung 등, 2000).

Xylitol의 영향. Fig. 5는 껌 감미료의 하나인 자일리톨의 Gtf에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 자일리톨은 정제된 *S. mutans*의 Gtf의 활성을 강하게 억제하였다. 2 mM 농도에서 약 40%, 4 mM 농도에서 약 60%의 활성이 억제되었다. Lee 등(2009)은 xylitol 껌을 장기간 씹을 때 *S. mutans*의 colony의 수가 점차

Table 2 Effect of salts and EDTA on the activity of the purified glucosyltransferase from *S. mutans* Ingbritt

| Inhibitor | Concentration (mM) | Relative activity (%) |
|-----------|--------------------|-----------------------|
| None | - | 100 |
| $AlCl_3$ | 1 | 77.0 |
| | 10 | 35.9 |
| $CuSO_4$ | 1 | 78.0 |
| | 10 | 38.2 |
| $ZnSO_4$ | 1 | 97.0 |
| | 10 | 79.6 |
| $HgCl_2$ | 1 | 41.2 |
| | 10 | 38.4 |
| KCl | 1 | 108 |
| | 10 | 110 |
| $MgSO_4$ | 1 | 103 |
| | 10 | 103 |
| Urea | 1 | 96.0 |
| | 10 | 98.0 |
| EDTA | 1 | 31.5 |
| | 10 | 26.7 |

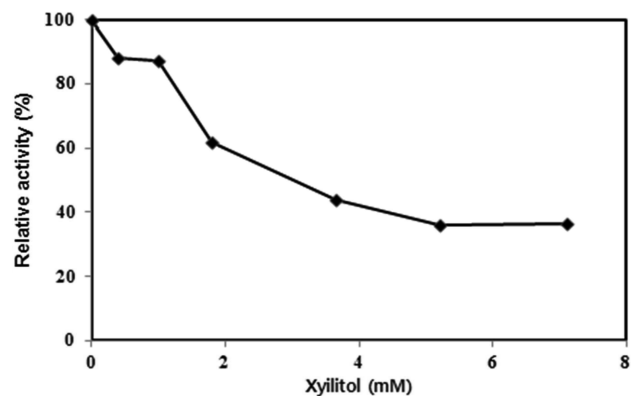


Fig. 5 Effect of xylitol on the glucosyltransferase from *S. mutans* Ingbritt.

줄어들었고, 치아에의 부착력 또한 약해졌을 뿐만 아니라, 콜로니의 크기도 대조구에 비하여 작아졌으며, 콜로니 표면으로부터 점질물질의 분비와 Gtf B 유전자의 발현이 감소하는 것을 규명한 바 있다. 이는 자일리톨을 활용하면 *S. mutans*에 의한 세포외 다당류의 합성을 억제하여 콜로니의 성장과 크기를 감소시킬 수 있다는 것을 제시하는 것이다. 하지만 이와 상이한 연구 결과도 있다. Xylitol과 sorbitol이 시험한 농도 100–200 mM에서 Gtf B, C, D의 활성에 영향을 미치지 않았으며(Wunder와 Bowen, 1999), 또 하나의 주요 구강 병원 세균인 *S. sobrimus*의 Gtf의 활성에 xylitol이나 sorbitol은 거의 영향을 미치지 않았다는(Figura 등, 2008) 보고 등이 그렇다.

키틴 유도체들의 영향. 다양한 키틴 유도체들의 Gtf 활성에 미치는 영향을 조사하였던 바, 그 중 soluble chitosan, glycol chitosan, glycol chitin이 Gtf 효소 활성을 강력하게 억제하는 것으로 나타났으며, 그 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 이들 농도 0.05%에서 35–45%의 활성이 억제되었다. 이처럼 키틴 유도체가 Gtf 활성을 억제한다는 보고는 최조이다.

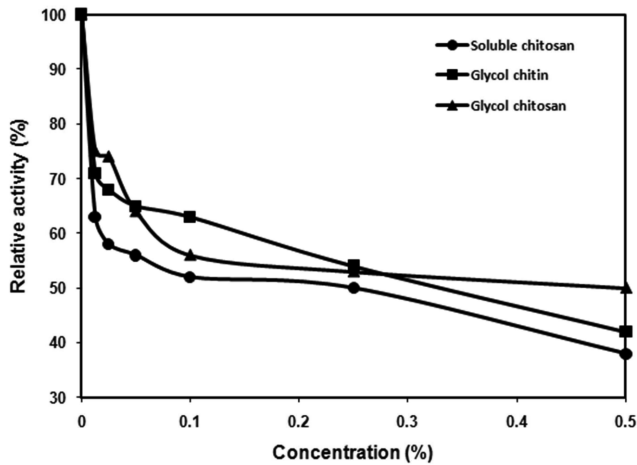


Fig. 6 Effect of chitin derivatives on the glucosyltransferase from *S. mutans* Ingbritt.

나머지 chitin oligomers, chitosan oligomers, *p*-nitrophenyl-N-β-D-acetylglucosaminide *p*-nitrophenyl-β-D-cellobioside, *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, 등은 Gtf의 활성에 영향을 미치지 않거나 미미한 영향을 미쳤다(자료 미제시).

치석 생성의 억제에 유효한 화합물을 찾기 위한 노력이 활발하다. 이 물질들의 목표 효소는 Gtf와 Ftf이다. 폴리페놀을 많이 함유하는 시스투스차(Cistus-tea)로 입을 헹구면 Gtf의 활성에는 영향이 없었으나 치아에 글루칸의 생필름 형성이 억제되었으며(Hannig 등, 2008), 우롱차 페놀 OTF₆의 강력한 Gtf 활성 억제는 *S. mutans* Gtf의 글루칸 결합부위(glucan-binding domain)에 비경쟁적으로 결합하여 글루칸의 합성을 억제하였다(Matsumoto 등, 2003). 한편, magnolol과 honokiol은 Streptococci 효소 Gtf B, C, D, S를 강력하게 억제하는 것으로 밝혀져 새로운 천연 구강청결제의 가능성을 제시한 바 있다(Jun 등, 2004).

초 록

충치 형성 과정에 중요한 불용성 글루칸의 합성과 관련된 sucrose-glucan glucosyltransferase (Gtf)를 *Streptococcus mutans* Ingbritt의 배양액에서 염석과, Sephadex G-150, CM-Sephadex, DEAE-Sephadex column을 통과시켜 정제하였다. 회수율 6.3%였으며, 정제율 13배였다. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 이 효소의 분자량은 66 kDa이며, 최적 pH와 온도는 각각 6.0과 40°C이었다. 이 효소는 0.1 mM Hg²⁺, Cu²⁺, Al³⁺에 의하여 22–59% 저해되었다. 이 효소는 2 mM 자이리톨에 의하여 40% 저해 받았으며, 0.05% 수용성 키토산, 글리콜 키토산, 글리콜 키틴에 의하여 35–45% 저해되었다. 키틴 유도체가 Gtf 활성을 억제한다는 보고는 본 연구가 최초이며, 이는 키틴 유도체를 구강청결제의 소재로 활용할 수 있음을 제시한다.

Keywords chitin derivatives · *Streptococcus mutans* Ingbritt · sucrose-glucan glucosyltransferase · xylitol

감사의 글 이 연구는 2011년도 전남대학교 연구년교수연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

Aoki H, Shiroza T, Hayakawa M, Sato S, and Kuramitsu HK (1986) Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infect Immunol* **53**, 587–94.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–54.

Carson JE, Newbrun K, and Crass B (1969) Purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus vaninus*. *Archs Oral Biol* **14**, 469–78.

Chludzinski AM, Germaine GR, and Schachtele CF (1974) Purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **118**, 1–7.

Choi SJ (1984) Bacteria as an etiological agent of human dental caries. *J Korean Dental Association* **22**, 293–5.

Chung HJ, Kim YA, Kim YJ, Choi YK, Hwang YK, and Park YS (2000) Purification and characterization of UDP-glucose: tetrahydrobioprotein glucosyltransferase from *Synechococcus sp.* PCC 7942. *Biochim Biophys Acta* **1524**, 183–8.

Figura A, Dols-Lafargue M, Heyraud A, Chambat G, Lonvaud-Funel A, and Badet C (2008) Effect of antiplaque compounds and mouthrinses on the activity of glucosyltransferases from *Streptococcus sobrinus* and insoluble glucan production. *Oral Microbiol Immunol* **23**, 391–400.

Fujiwara T, Terao T, Hoshino T, Kawabata S, Ooshima T, Sobue S et al. (1998) Molecular analysis of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Letters* **161**, 331–6.

Gao XA, Zang YF, Park RD, Huang X, Zhao XY, Xie J et al. (2012) Preparation of chitoooligosaccharides from chitosan using crude enzyme of *Bacillus cereus* D-11. *J Appl Biol Chem* **55**, 13–7.

Gawande BN and Patkar AY (2001) Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glucosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme Microbiol* **28**, 735–43.

Grahame DA and Mayer RM (1984) The origin and composition of multiple forms of dextransucrase from *Streptococcus sanguis*. *Biochim Biophys Acta* **786**, 42–8.

Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Okahashi N, and Koga T (1989) Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water insoluble glucan from serotype c *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* **135**, 335–44.

Hanada N and Kuramitsu HK (1988) Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect Immunol* **56**, 1999–2005.

Hanada N and Kuramitsu HK (1989) Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfD gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infect Immunol* **57**, 2079–85.

Hanada N, Takehara T, and Saeki E (1987) Purification and characterization of third glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* serotype g. *J Gen Microbiol* **133**, 1351–8.

Hannig C, Spitzmueller B, Al-Ahmad A, and Hannig M (2008) Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the *in vitro* pellicle. *J Dentistry* **36**, 540–5

Harno S, Yoshio N, and Masknzu I (1982) Carogenicity and some properties of laboratory *Streptococcus mutans*. *J Dental Health* **32**, 17–23

Jun L, Jifang S, Miaoquan L, Yingyan L, and Xihong X (2004) Effects of magnolol and honokiol on the activities of streptococcal glucosyltransferases both in solution and adsorbed on an experimental pellicle. *Lett Appl Microbiol* **39**, 459–65.

Kenny A and Cole JA (1983) Identification of a 1,3-α-glucosyltransferase involved in insoluble glucan synthesis by a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* **16**, 159–2.

Kim YS, Kim YK, and Rhee KB (1992) Purification and characterization of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Korean J Microbiol* **30**,

- 213–7.
- Kuramitsu HK (1993) Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics: Critical review. *Oral Biol Med* **4**, 159–76.
- Kuramitsu HK and Wondrack L (1983) Insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans* serotype c strains. *Infect Immunol* **42**, 763–70.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
- Lee YE, Choi YH, Jeong SH, Kim HS, Lee SH, and Song KB (2009) Morphological changes in *Streptococcus mutans* after chewing gum containing xylitol for twelve months. *Curr Microbiol* **58**, 332–7.
- Loesche W (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* **50**, 353–80.
- Matsumoto M, Hamada S, and Ooshima T (2003) Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *FEMS Microbiol Lett* **228**, 73–80.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* **31**, 426–8.
- Moneville TJ and Cooney CL (1978) *Streptococcus mutans* dextranase: A Review. *Advances Appl Microbiol* **24**, 55–84.
- Mukasa H, Shimamura A, and Tsumori H (1982) Purification and characterization of Basic Glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* serotype c. *Biochem Biophys Acta* **719**, 81–9.
- Mukasa H, Shimamura A, and Tsumori H (1989) Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing insoluble from *Streptococcus mutans* serotype c. *J Gen Microbiol* **135**, 2055–63.
- Mukasa H, Shimamura A, and Tsumori H (1985) Isolation and characterization of extracellular glucosyltransferase synthesizing insoluble glucan from *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect Immunol* **49**, 790–6.
- Shun CT, Lu SY, Yeh CY, Chiang CP, Chia JS, and Chen JY (2005) Glucosyltransferases of viridans streptococci are modulins of interleukin-6 induction in infective endocarditis. *Infect Immunol* **73**, 3261–70.
- Tanzer JM, Thompson AM, Grant LP, Vickerman MM, and Scannapieco FA (2008) *Streptococcus gordonii*'s sequenced strain CH1 glucosyltransferase determines persistent but not initial colonization of teeth of rats. *Archs Oral Biol* **53**, 133–40.
- Trudel J and Asselin A (1989) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **178**, 362–6.
- Wunder D and Bowen WH (1999) Action of agents on glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. *Archs Oral Biol* **44**, 203–14.