

토양 미생물에서 유리된 용균효소의
항우식 효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 기 원

토양 미생물에서 유리된 용균효소의
항우식 효과

지도 손 홍 규 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함


2000년 12월 일


연세대학교 대학원


치 의 학 과


김 기 원


김기원의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 손 흥 기 

심사위원 이 종 갑 

심사위원 최 병 재 

심사위원 이 승 크 

심사위원 이 제 현 

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없이 지도해 주시고 세심하게 살펴주신 손흥규 교수님과 이승일 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 중에서도 많은 조언과 질책으로 이끌어주신 이종갑 교수님, 최병재 교수님, 이제호 교수님께도 감사드리며 연구진행에 많은 도움을 주신 소아치과학 및 구강생물학 교실원의 도움도 잊을 수 없습니다.

또한 제가 지금의 자리에 오를수 있도록 항상 사랑과 관심을 보여주시고 격려해주신 양가 부모님께 감사드리며 무엇보다도 이 모든 기쁨을 사랑하는 아내 상은이와 소중한 딸 정민이와 나누고 싶습니다.

2000년 12월

저 자 씀

차 례

그림 및 표 차례	vii
국문 요약	viii
I. 서론	1
II. 연구재료 및 방법	6
1. 용균효소	6
2. <i>S. mutans</i> 의 배양	7
3. 인공타액의 제조	7
4. 인공 구강모델의 제작	8
5. MTT 검정법에 의한 용균효소의 세포독성능 평가	9
6. 인공 구강모델에서 Ca^{2+} 농도와 pH 변화의 측정	9
7. 용균효소가 <i>S. mutans</i> 에 의한 법랑질 탈회에 미치는 효과	10
8. 용균효소에 의한 <i>S. mutans</i> 의 부착능 평가	10
9. 용균효소가 법랑질 표면경도에 미치는 영향	11
III. 연구성적	13
1. MTT 검정법에 의한 용균효소의 세포독성능 평가	13
2. 인공 구강 모델의 재현성 검증	13
가) Ca^{2+} 농도에 따른 전압과의 상관관계	14
나) <i>S. mutans</i> 에 의한 pH 및 Ca^{2+} 변화	15
3. 용균효소가 <i>S. mutans</i> 에 의한 법랑질 탈회에 미치는 효과	16

4. 용균효소에 의한 <i>S. mutans</i> 의 부착능 평가	18
5. 용균효소가 법랑질 표면경도에 미치는 영향	19
6. 용균효소가 인공 우식 병소의 표면경도에 미치는 영향	19
IV. 고찰	20
V. 결론	24
참 고 문 헌	25
영 문 요 약	32

그림 및 표 차례

Fig. 1. Isolation of microorganism which produce lytic enzyme against <i>S. mutans</i>	6
Fig. 2. Schematic diagram of artificial mouth model.	8
Fig. 3. Cytotoxic activity of 4830 lytic enzyme against fibroblast.	13
Fig. 4. Calibration of mV values as a function of Ca^{2+} concentration.	14
Fig. 5. Calibration of mV values as a function of $\log Ca^{2+}$ concentration.	14
Fig. 6. Demineralization of HA bead caused by <i>S. mutans</i>	15
Fig. 7. The effect of lytic enzyme on pH.	16
Fig. 8. The effect of lytic enzyme on Ca^{2+} release.	17
Fig. 9. The effect of lytic enzyme on attachment of <i>S. mutans</i> to HA bead.	18
Table 1. Lytic activity against various strains which cause dental caries.	5
Table 2. Changes in surface hardness by lytic enzyme before and after microbial pH cycling for 15 days.	19

토양 미생물에서 유리된 용균효소의 항우식 효과

치아우식증은 파괴를 동반한 감염성 질환 (progressively infectious disease)으로 치태내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 다인성 질환이다. 치태내 세균중에서도 *Streptococcus mutans*가 치아우식을 일으키는 주 원인균이며, 치면에 부착한 세균은 국소적으로 자리잡아 점착성 gelatinous material인 bacterial plaque 형태로 치아의 특수한 부위에 응집됨으로써 치아우식증이 발생하는 일차적인 원인을 제공한다. 더욱이 섭취한 음식물의 종류와 시간에 의한 변수가 가세되어 치아우식의 진행정도가 결정되지만, host factor로서 치아 자체가 지니고 있는 탈회 에 대한 저항력과 크고 작은 타액선으로부터 흘러나오는 타액이 치아우식증 진행을 예방하는 중요한 인자로 평가되고 있다.

이런 치아우식증을 예방하기 위한 기존의 소극적인 방법과 달리 우식 초기에 관여하는 *S. mutans*를 선택적으로 억제할 수 있는 새로운 방법으로 토양미생물에서 유리되는 용균효소를 분리, 정제하여 사용하였다. *S. mutans*에 대한 활성이 우수한 용균효소 (4830으로 명명)를 선택하여 용균효소의 항우식 효과를 평가하였다. 이를 위해 용균효소의 세포독성능, 세균에 의한 hydroxyapatite bead의 pH 및 Ca^{2+} 유리량의 변화, 세균의 부착억제, 인공우식 법랑질의 경도변화를 분석하였다. 세포 독성능을 평가하기 위한 MTT 검사 결과 용균효소 4830은 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. *S. mutans*와 HA bead가 포함된 인공타액에 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 용균효소 4830을 넣었을 때, *S. mutans*에 의한 pH 변화는 용균효소를 넣지 않았을 때와 거의 차이가 없었으며, hydroxyapatite bead로부터 Ca^{2+} 의 유리량은 초기 20분 동안은 변화가 없다가 서서히 증가되었고 그후 지속적인 증가 양상을 보였다. 그러나 용균효소가 없을 경우와 비교하여 유리되는 양은 현저히 감소하였다. 용균효소 4830은 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 낮은 농도에서 HA bead에 *S. mutans*의 부착을

급격히 억제하였고 그후 서서히 감소하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 74% , 80%의 부착억제를 보였다. 치태가 형성된 인공우식 범랑질 시편을 탈회용액에 넣기전 용균효소 용액에 2분간 처리한 경우 인공우식 범랑질의 표면경도는 용균효소 용액을 처리하지 않았을 경우에 비해서 경도의 감소가 적었다.

이상의 결과로 미루어보아 용균효소 (4830)는 *S. mutans*에 의한 pH 변화에 영향을 미치지 않았으나, *S. mutans*의 치면 부착을 현저히 억제하고, 탈회를 방지함으로써 인공 우식 범랑질의 표면경도를 증가시키는 것으로 생각된다. 따라서 앞으로 이들 용균효소의 생체내 sensitivity, 독성유무, 안정성에 대한 검색이 이루어진다면, 구강내 세균 감염으로 유발되는 치아우식증을 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

핵심 되는 말: 치아 우식증, 용균효소, pH변화, Ca^{2+} 유리, 치면부착, 표면경도

토양 미생물에서 유리된 용균효소의 항우식 효과

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 손 홍 규 교수)

김 기 원

I. 서 론

치아우식증은 감염에 의한 다인자성 (multifactorial) 질환으로 아직도 이환율이 높은 질병으로 인식되고 있다. 이를 예방하기 위한 노력의 일환으로 여러 가지 형태의 예방법 및 치료방법이 개발되어 발병율은 다소 감소하였으나, 우리나라의 경우 아직도 어린이를 비롯한 성인에서 많이 발생되고 있다. 더욱이 치아우식증의 발생은 사람에 따라서 다르게 나타나기 때문에 치과영역에서 해결되어야 할 중요한 부분으로 간주되고 있다. 치아는 calcium phosphate로 이루어진 mineral matrix인데 구강내 존재하는 다양한 미생물이 쉽게 머물수 있는 곳으로 그 자체가 미생물의 영양원이라기 보다는 그 위에 타액과 음식에서 유래된 여러 물질들이 표면에 정착되어 있는 곳으로 볼 수 있다. 구강에 서식하는 세균은 주로 통성 혐기성균 (aerotolerant anaerobes)인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) 등과 *Lactobacilli*이며 약간의 호기성균 (aerobes) 등이 있다. *S. mutans*는 1924년 Clarke¹⁾에 의하여 치아면에서 처음 분리되었으며, Gram 양성, 통성 혐기성 균주로 *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus rattus* 등²⁾ 으로 세분된다. Krasse³⁾, Gibbons 등⁴⁾은 동물 실험결과 이 균주가 치아 우식증을 유발함을 밝혔으며,

Guggerbeim 등⁵⁾과 Rogers⁶⁾는 사람의 plaque로부터 이 균주를 분리하였다. 깨끗한 치아표면이 타액에 노출되면 타액내의 당단백질 (salivary glycoprotein)이 치아표면을 도포하여 얇은 무세포성의 단백질 피막인 획득피막 (acquired pellicle)을 형성한다. 구강내 *S. mutans*는 획득피막 결합단백질 (pellicle binding protein)을 매개로 치면에 결합한다.⁷⁾ 획득피막에 결합한 *S. mutans*는 glucosyl transferase를 분비하여 외부로부터 공급된 자당 (sucrose)과 반응하여 비수용성 포도당 중합체 (glucose polymer)인 mutan과 dextran을 합성한다.^{7,73)} *S. mutans*는 합성한 다당체중 mutan을 이용하여 치면에 부착하고 치면에서 증식하는 세균간의 결합력을 증가시킨다. 획득피막에 세균 부착이 계속 진행됨과 동시에 기질 단백질은 계속 침착되고 세균에 의하여 합성된 세포외 다당체들이 계속 침착되어 치태는 성숙하게된다. 치태 세균은 음식물이 공급되는 동안 자당을 이용하여 세포외 다당체를 합성하고 lactic acid 등의 산을 생성하지만 음식물이 공급되지 않을 경우 타액 당단백질의 oligosaccharide를 분해하여 formate, acetate, ethanol을 포함한 여러 종류의 유기산을 형성한다.^{74,75,76,77)} 이렇게 형성된 산에 의하여 치태의 pH가 5.5이하로 떨어져 치아 법랑질의 미세한 분해가 이어지면서 치아우식증이 유발된다.^{10,11,12)}

이와같이 치아 우식증은 세균에 의한 감염성 질환이며 여기에 섭취한 음식물의 종류 그리고 시간에 의한 변수가 가세되어 이 질환의 진행 정도가 결정되지만, 치아 자체가 지니고 있는 탈회에 대한 저항력과 크고 작은 타액선으로부터 흘러나오는 타액이 치아 우식의 진행을 예방하는 중요한 인자로 평가되고 있다. 치아 우식은 원천적으로 치아 자체의 탈회에 대한 저항력이나 타액의 세정작용으로 발생초기에 억제될 것으로 생각되나, 그럼에도 불구하고 치아 우식증이 발생하는 점으로 미루어 여러 가지 다른 요인들이 복합적으로 작용하는 다인자성 질환으로 생각되고 있다. 따라서 이런 치아우식증을 억제하기 위하여 여러 가지 방법이 이용되어 왔다. 치아우식을 예방하기 위한 가장 기본적인 것은 칫솔질을 하여 기계적으로 치태를 제거하는 방법이다. 그러나 칫솔질은 행동이 부자유한 소아나 신체 장애자들에게 적용하기에는 어려운 점이 있으며, 치면의 열구 (groove)나 와 (sulcus)에 있는 세균

을 제거하기에는 한계가 있기 때문에 치아우식 예방법에 대해 다른 측면에서의 접근이 요구되고 있다. 예를들어 불소처치법, 면역법, 항생제투여법, 그리고 천연추출물을 이용하여 치아우식을 억제하고자 하는 시도가 진행되고 있다. 이중 불소요법은 현재까지 가장 널리 이용되고 있는 방법으로 불소가 탈회를 억제하고 재광화를 촉진하는 물질로 알려져 있을 뿐 아니라¹³⁾, 실제 항균효과^{14,15,16,17)}도 있어 치아우식증 예방에 효과적인 것으로 생각된다. 그렇지만 불소를 사용하면 치아에 흰색반점을 나타나게 하는 이른바 불소증 (dental fluorosis)이 발생된다는 역학 연구결과^{18,19,20,21,22,23)} 때문에 현재 사용되고 있는 불소 농도에 대한 논란이 계속되고 있다. 불소요법 이외에 원인균에 대한 예방접종을 실시하여 예방하려는 시도가 진행되어 왔으며, 연구결과 *S. mutans* 자체나 이 세균이 생성하는 glucosyltransferase를 동물에 접종시켰을 때 치아우식 발생율이 감소하는 것으로 나타나, 면역학적인 방법으로도 치아우식을 예방할 수 있음이 입증되었다.^{26,27,28,29,30)} 그러나 *S. mutans*가 사람의 심장조직과 유사한 항원 구조를 가지고 있어 이 균주에 대하여 형성된 항체가 사람의 심장조직에 결합하여 심장조직을 파괴시킬 가능성이 제시되어 면역학적인 치아우식 예방법을 사람에게 적용하기 위해서는 정상조직의 교차반응을 해결하여야만 하는 또 다른 문제점이 대두될 수 있다. 이와 같이 불소이용법, 면역학적인 방법 이외에 항생제 투여법을 치아우식 예방에 이용할 수 있으나 사람에게 해를 줄 가능성이 있으므로, 최근에는 부작용이 없는 항우식물질을 주변에서 쉽게 접할 수 있는 천연추출물로부터 얻고자하는 노력이 시도되고 있다. 현재까지 전통약제, 녹차, 우롱차, 죽염 및 자몽씨 추출물 등이 비교적 비특이적으로 세균의 증식을 억제하여 항우식효과를 나타내는 것으로 알려졌다.^{39,40,41,42,43,44,45)}

이미 지적한 바와 같이 치아우식을 정복할 수 있는 방법은 다양하다고 할 수 있으나, 크게 두 가지 측면으로 치료방법을 나눌 수 있다. 즉, 한 가지는 비특이적으로 구강내 존재하는 모든 세균의 증식을 억제하여 치태형성을 차단하는 방법이고, 둘째는 특정 세균 즉, 치아우식 원인균에 대한 살균능력을 갖춘 물질을 찾아내어 이로부터 치아우식을 억제하는 약제를 개발하는 것이다. 첫번째 방법은 비특이적인

항균효과를 이용하여 치아우식을 예방할 수 있으나, 이러한 경우 구강 정상 세균총의 균형이 깨져 기회감염증에 걸리거나 외부로부터 들어온 병원성 세균이 구강내 정착하여 다른 질병을 일으킬 위험이 도사리고 있다.^{34,35,36,46)} 따라서 치아우식을 예방하기 위해서는 치아우식에 직접 관여하는 세균인 *S. mutans*에 선택성이 강하면서 특이적으로 작용하는 물질의 개발이 필요하다. 이처럼 치아우식을 예방할 수 있는 방법은 불소이용법, 면역학적 방법, 항생제 투여법 및 천연추출물 이용법 등 다양하다고 할 수 있으나, 치아자체의 변색, 교차반응, 내성균주 발현 및 비특이성 등의 단점도 나타나고 있어, 이들을 효과적인 방법으로 평가하기 힘들며 치아우식을 확실하게 예방할 수 있는 새로운 방법이 필요한 시점이다. 다시 말해서 이는 지금까지 사용되어 온 방법이 아닌 보다 근본적으로 원인균인 *S. mutans*를 선택적으로 살균할 수 있어야만 된다. 최근에는 토양내에 있는 다양한 미생물로부터 유리되는 효소중 용균효소^{49,50,61,62,63,64)}의 분리 및 정제가 가능하게 되었고, 이들 대부분의 용균효소 표적물은 사람의 세포에는 없고 세균에만 존재하는 세포벽^{69,70,71,72)}이므로 부작용을 일으킬 수 있는 불소이용법이나 면역학적 방법 및 항생제투여법 보다는 용균효소가 사람의 세포를 손상시킬 가능성이 적어 위험성이 낮다고 생각된다.

현재까지 찾아낸 용균효소의 치아우식증에 대한 작용을 알아보기 위하여 우식증의 원인이 되는 것으로 알려진 여러 균주에 대한 우식 활성을 측정된 결과 table 1과 같이 치아우식증의 1차 원인균인 *S. mutans*에 대한 용균능을 100으로 하였을 때 *S. sanguis*, *S. salivarius*에 대하여 90% 이상의 높은 용균능을 나타낸 반면 *Lactobacillus*에 대해서는 30% 이하의 낮은 용균능을 나타내었다. 따라서 이 효소는 치아우식에 일차적으로 관여하는 *S. mutans*에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 해석된다.

따라서 이 연구에서는 전국 각지에서 수집한 토양 표본에서 얻은 용균효소중 세균억제 효과가 뛰어난 것으로 밝혀진 용균효소 4830을 이용하여 이 효소가 법랑질 표면에 세균의 부착억제 및 인공 구강내에서 pH, Ca²⁺유리와 인공우식 법랑질의 표면경도에 미치는 정도를 평가함으로써 용균효소의 항우식 효과를 평가하였다.

Table 1. Lytic activity against various strains which cause dental caries

Strain	Reactivity(%)
<i>Bacillus subtilis</i>	31
<i>Staphylococcus aureus</i>	33
<i>Streptococcus mutans</i>	100
<i>Escherichia coil</i>	10
<i>Candia albicans</i>	16

II. 연구 재료 및 방법

1. 용균효소의 분리 정제

전국 각지에서 수집한 토양으로부터 Fig. 1.의 방법과 같이 평판 회석배양법에 의해 중성 세균 배지에서 생육하는 미생물을 검색하여 1,500 여종의 미생물을 분리하였다. 이들 미생물을 *S. mutans*가 현탁되어 있는 agar 배지에 접종하여 colony 주위에 투명환을 나타내는 균주들중 가장 효과가 우수한 용균효소를 4830으로 명하여 이들 용균효소의 배양 상층액을 methanol로 분리 정제한 후 본 실험에 사용하였다 (연세대학교 생명공학과에서 제공받음).

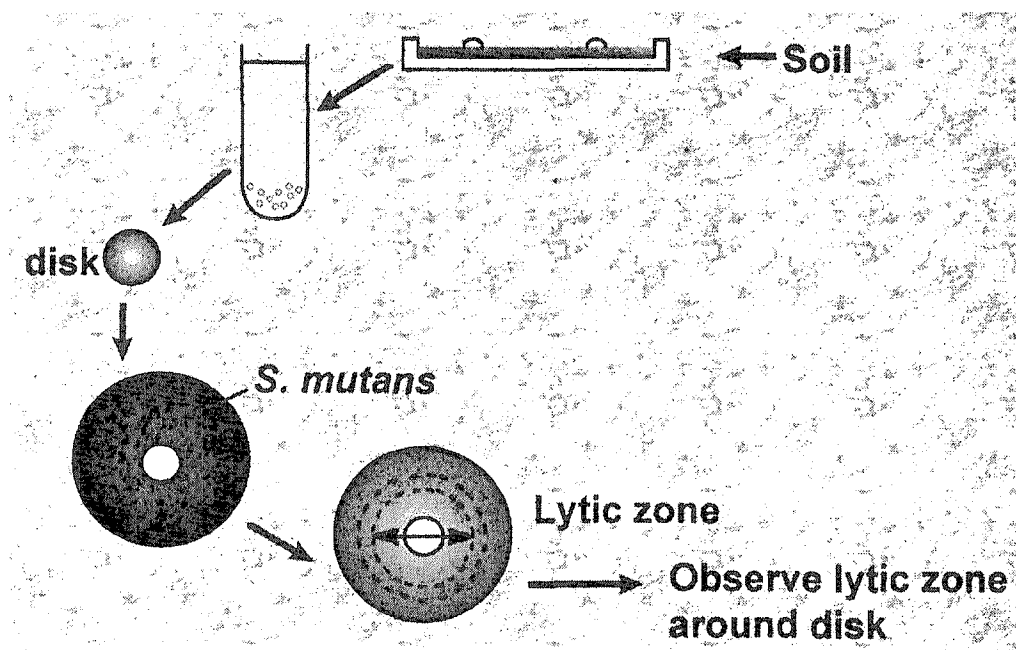


Fig. 1. Isolation of microorganism which produce lytic enzyme against *S. mutans*.

2. 세균의 배양

S. mutans (ATCC 3283)는 한국과학기술원 (KAIST)내 유전공학연구소에서 분양받아 brain heart infusion (BHI) 액체배지에 접종하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 2차 계 대배양한 후 실험에 사용하였다.

3. 인공타액의 제조

구강과 유사한 조건에서 실험하기 위해 일부 실험에서는 5.5 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM NaHCO₃, 20.7 mM KCl, 0.3 mM MgCl₂ 및 0.1 mM CaCl₂ 을 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하여 pH 6.8인 타액과 동일한 조성을 가진 용액을 제조하여 사용하였다.

4. 인공구강모델 (artificial mouth model)의 제작

구강은 혐기성 상태에 가까우며 항상 타액이 분비되고 수시로 음식물이 공급되는 장소이므로 인공구강 모델내에 gas와 용액 (인공타액, sucrose가 함유된 영양분 및 용균효소)의 공급이 가능한 형태로 제작하였으며, 37℃가 유지되는 항온수조에 위치시켰다. 먼저 HA bead에서 유리되는 Ca²⁺ 양과 pH 변화를 측정하기 위하여 모델 중앙에 인공타액과 HA, 그리고 *S. mutans* 등이 위치될 수 있는 내경 3.6 cm, 높이 6 cm, 총 용적 60 ml의 원통형 acryl chamber을 제작하였다. 구강내와 같이 37℃를 유지하기 위해 열순환기 (thermo-circulator)가 부착되도록 양 측면에 출입구를 만들었고, 이 부위를 열순환기와 연결하였다. 한편 구강모델은 자석교반기 위에 위치시켜 인공타액과 시약을 균일하게 섞었다 (Fig. 2).

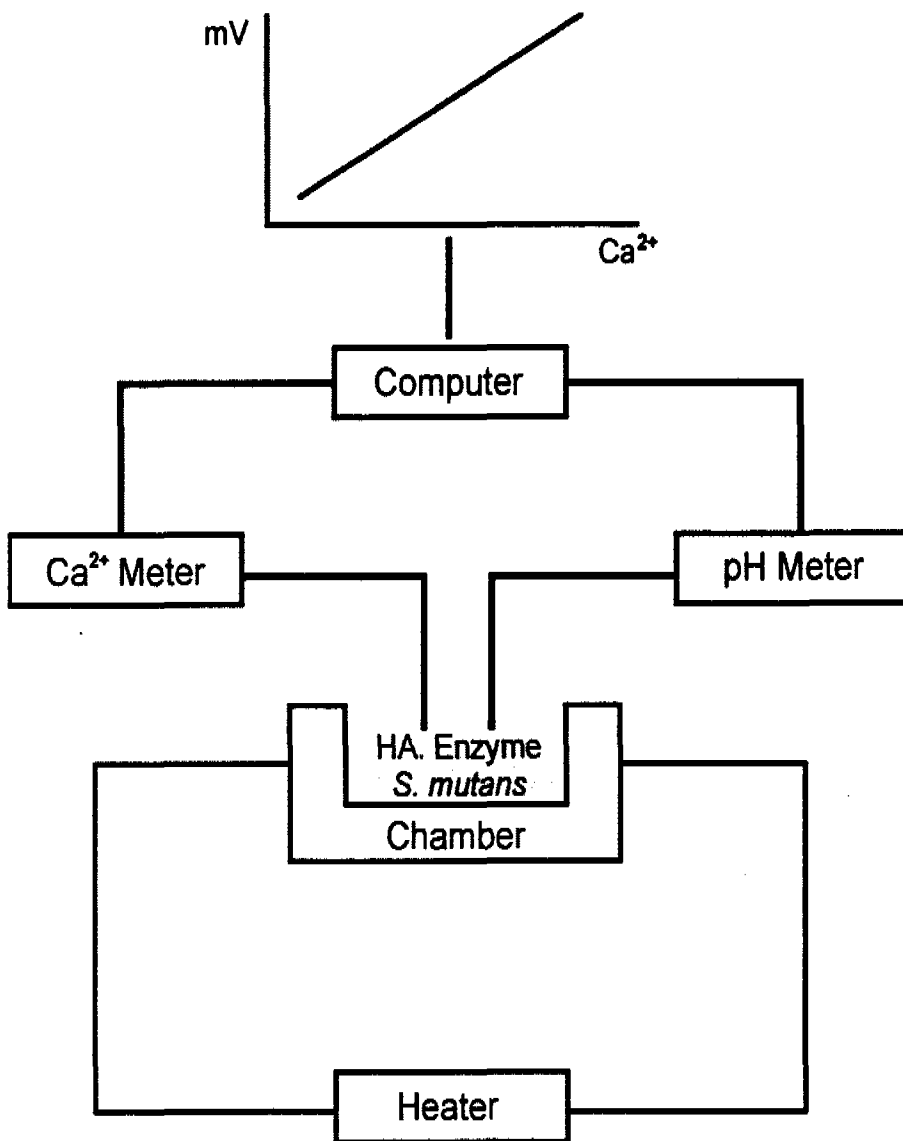


Fig. 2. Schematic diagram of artificial mouth model.

5. Methylthiazol Tetrazolium Bromide (MTT) 검정법에 의한 용균효소의 세포독성능 평가

항우식제는 구강에서 사용되므로 사람에게 투여하기 전에 반드시 정상세포에 대한 독성 유무를 확인하여야 한다. 이 실험에서는 구강을 둘러싸고 있는 치은 조직으로부터 치은섬유아세포를 분리 배양한 후 MTT 검정법으로 용균효소가 이 둘 세포증식에 미치는 영향을 분석하여 용균효소의 독성 유무를 검토하였다. MTT 검정법은 살아 있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT가 환원되어 blue formazan 결정이 생성되는데, 여기에 용해제를 넣고 분광분석기로 흡광도를 측정하여 간접적으로 살아있는 세포수를 측정하는 방법이다. 구강외과에 내원한 환자 중 매몰된 제 3 대구치 발치시 얻은 치은 조직편으로부터 분리 배양한 치은 섬유아세포를 배양 배지 0.16 ml당 5×10^3 되게 부유시킨 후 각 well에 0.16 ml 씩 분주하였다. 그 후 온도 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 24 시간 배양하여 세포를 부착시킨 다음 용균효소를 첨가하여 배양하였으며 배양이 끝나는 날 MTT 용액 (5 mg/ml) 0.05 ml을 각 well에 넣었다. 네 시간 동안 반응시킨 후 배지와 MTT 용액을 버리고 여기에 다시 dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.05 ml를 각 well에 넣고 결정이 남아 있지 않도록 잘 흔든 후, ELISA reader로 570 nm의 파장범위에서 흡광도를 측정하여 용균효소의 세포독성능을 평가하였다.

6. 인공 구강모델에서 Ca²⁺ 농도와 pH 변화의 측정

HA bead에서 유리되는 Ca²⁺ 양과 pH 변화를 측정하기 위하여 인공 구강모델을 제작 하였으며 사용된 HA는 Merck (Switzerland)에서 구입한 spheroidal로서 0.08 - 0.20 mm 크기의 bead를 사용하였다. Ca²⁺ 양과 pH변화는 ORION (모델 920A)사 제품 ion sensitive electrode (Ca²⁺ electrode 와 pH electrode)를 이용하여 측정하였다. HA bead에서 유리된 Ca²⁺와 인공 구강 모델내 pH 변화는 physiography (Biopac converter)를 통해 personal computer (PC)로 연결하여 유리되는 Ca²⁺ 농도

의 변화를 연속적으로 측정 하였다. 기록된 측정치가 전압값 (mV)이므로 Ca^{2+} 의 농도 (mM)로 환산하기 위해서 인공타액내 Ca^{2+} 농도가 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 mM이 되도록 하여 이때 mV 값에 의해 표준곡선을 만들고 직선회귀 방정식을 이용하여 Ca^{2+} 농도를 계산하였다 (Fig. 4, 5).

7. 용균효소가 *S. mutans*에 의하여 유도된 법랑질 탈회에 미치는 효과

*S. mutans*를 5000 rpm으로 15분간 원심 분리한 후 인공 타액으로 2회 세척 하였다. 구강모델내에서 인공타액 30 ml와 HA 30 mg 그리고 용균효소를 넣고 20분간 전해질의 평형상태가 이루어지도록 기다린 다음 평형에 도달하면 *S. mutans*을 주입 하였다. 먼저 *S. mutans*만을 넣고 Ca^{2+} 유리량을 측정한 다음 용균효소를 주입한 후의 Ca^{2+} 유리량과 비교 분석하였다.

8. 용균효소에 의한 *S. mutans*의 HA bead에 부착능 평가

[3H]-thymidine 동위원소로 표지화한 *S. mutans* 균액과 HA bead를 혼합한 용액에 용균효소를 첨가하여 용균효소의 *S. mutans*의 HA bead 부착 정도를 평가하였다.

가) 타액의 준비

타액은 20 - 30대 남자에게서 파라핀으로 자극하여 채취한 것을 얼음으로 냉각된 용기에 모아 혼합하였다. 타액에 존재하는 이물질 및 세균을 제거하고 효소를 불성화하기 위하여 60°C에서 30 분간 가열한 후 -20°C에 보관하였다.

나) *S. mutans*의 [3H]-thymidine 방사능 표지

방사능으로 표지된 세균을 얻기 위하여 배양배지에 *S. mutans*를 접종하고

[³H]-thymidine (specific activity, 20 Ci/mmol)을 배양배지 1 ml당 2 μCi되게 넣고 gas pack jar에서 24 시간 혐기 상태에서 배양하였다. [³H]-thymidine 동위원소로 표지화된 세균을 5 mM KCl 30 ml과 1 mM CaCl₂를 함유하는 pH 6.0의 2 mM potassium phosphate buffer로 세번 세정한 다음, KCl 완충액으로 660 nm에서 흡광도가 0.5 (균수 9 × 10⁹) 되게 세균을 현탁하여 1 ml씩 나누어 부착능 실험에 사용하였다.

다) HA 비드에 *S. mutans* 부착능

HA 비드 30 mg을 증류수로 다섯번 세척하여 작은 입자들을 제거한 다음 비드를 800 μl의 인공타액에 부유시켰다. HA 비드에 100 μl의 ³H-표지한 세균과 100 μl 용균효소 용액을 넣고, 37°C에서 10 rpm의 속도로 회전시켜 부착반응을 유도하였다. *S. mutans*가 부착된 비드를 KCl 완충액으로 세번 세척하여 37°C에서 하룻밤 건조시킨 후 5 ml의 scintillation fluid에 넣고 방사능 (cpm)을 측정하여 용균효소에 의한 *S. mutans*의 부착 효과를 분석하였다.

9. 용균효소가 인공 우식 법랑질 표면경도에 미치는 영향

가) 시편제작 및 초기 우식병소 형성

치아 우식증이 없고 건전한 법랑질 표면을 갖는 소의 영구전치를 사용하여 직경 3 mm의 원통형 법랑질 시편 12개를 만들어 600번 연마지로 연마하였다. 초기 우식 병소는 수산화 인산칼슘이 50% 포함된 0.1 mole 젓산과 0.2% carbapol을 함유한 pH 5.0 용액에 44시간 처리하여 형성하였으며 200 gm의 표면 경도계 하중으로 법랑질 표면의 상,하,좌,우 네 부위에서 Vickers Hardness (VHN)를 측정하여 평균 VHN이 25 - 45 범위를 갖는 시편을 사용하였다.

나) 처리시료

4830 용균효소 처리균을 pH 6.8의 완충 용액을 사용하여 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 제조하여 사용하였으며 대조균은 완충용액을 사용하였다. 완충용액은 이차 증류수를 사용하여 5.5 mM NaH_2PO_4 , 20.7 mM KCl , 2.5 mM NaHCO_3 , 0.3 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 되게 제조하였다.

다) 플랙의 형성 및 시편처리

0.25% 포도당이 함유된 세균배양용 배지내에서 세균을 8시간 배양한 다음 타액의 금속염과 설탕이 함유된 트립티케이스액상배지 20 ml에 배양된 세균을 접종한 후 펠리클이 형성된 시편을 넣었다. 12 시간 마다 새로운 트립티케이스배지를 공급하였고 총 36시간 동안 배양 처리 하여 시편 표면에 플랙이 형성되도록 하였다. 시편을 2분간 용균효소 용액에 접촉시킨후 2, 4, 10 시간 동안 탈회용액에 처리 하였으며 이외의 시간은 재광화 용액에 담근 후 표면경도의 변화를 평가하였다. 재광화 용액은 사람의 자극성 타액과 인공 타액을 1대 1로 혼합하여 사용하였다.

III. 연구 결과

1. 용균효소의 세포 독성능

효소가 일정한 농도로 함유된 배지에 치은섬유아세포를 배양 한 후 MTT 검정법에 따라서 용균효소의 세포독성능을 평가하였다. 용균효소의 농도를 증가시켜도 Optical Density (OD)값은 거의 변화가 없었으나, 250 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 치은섬유아세포의 증식을 억제하였다 (Fig. 3).

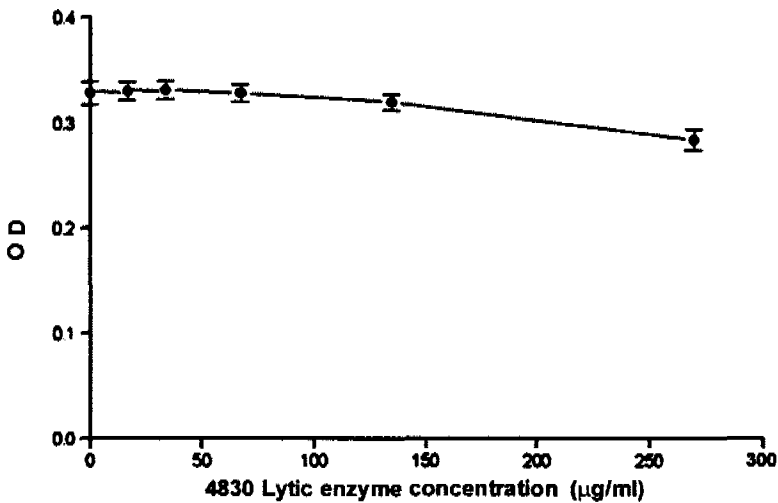


Fig. 3. Cytotoxic activity of 4830 lytic enzyme against gingival fibroblast.

2. 인공 구강 모델의 재현성 검증

가) Ca^{2+} 농도에 따른 전압과의 상관관계

인공타액내 Ca^{2+} 농도 (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 mM)를 점차 증가 시킴에 따

른 전압변화를 Ca^{2+} sensitive electrode로 측정하였고 (Fig. 4), 이를 지수함수로 나타냈다 (Fig. 5).

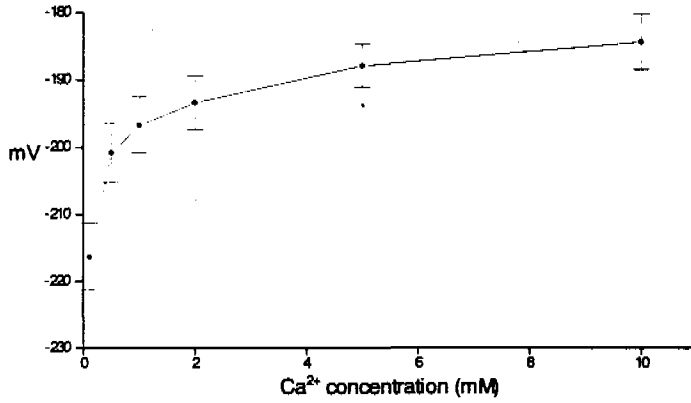


Fig 4. Calibration of mV values as a function of Ca^{2+} concentration (mM). Ca^{2+} values from 0.1 mM to 0.5, 1, 2, 5 and concentration was stepped between 10 mM.

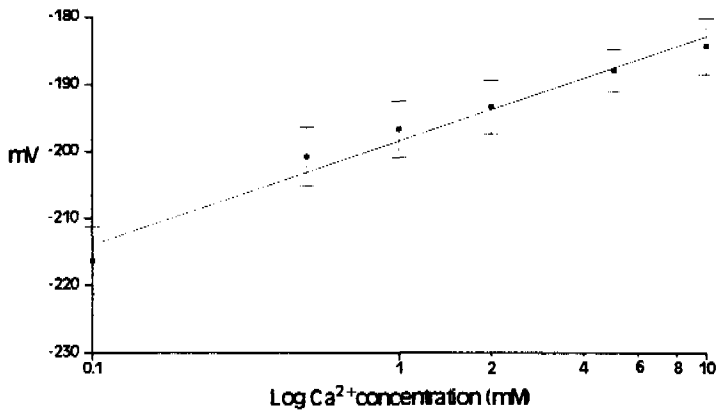


Fig 5. Calibration of mV values as a function of Ca^{2+} log concentration (mM).

나) *S. mutans*에 의한 pH 및 Ca^{2+} 변화

인공 타액과 HA bead (10 - 15 μ g)를 구강모델에 넣고 일정한 속도로 섞어주면서 pH 측정시 6.62 ± 0.02 로서 정상상태의 구강내 pH와 비슷했다. 약 30분 후 *S. mutans*를 넣으면 용액 내 pH가 점차 감소하여 150분후에는 4.78 ± 0.08 에 도달하였다. 용액내 Ca^{2+} 농도는 *S. mutans*를 넣은 후 천천히 증가하여 초기 0.1 mM에서 60분 후에는 0.50 ± 0.37 mM로 증가하였는데 이후부터 더욱 빠른 속도로 증가하여 150분 후에는 3.27 ± 0.28 mM 이 되었다 (Fig. 6).

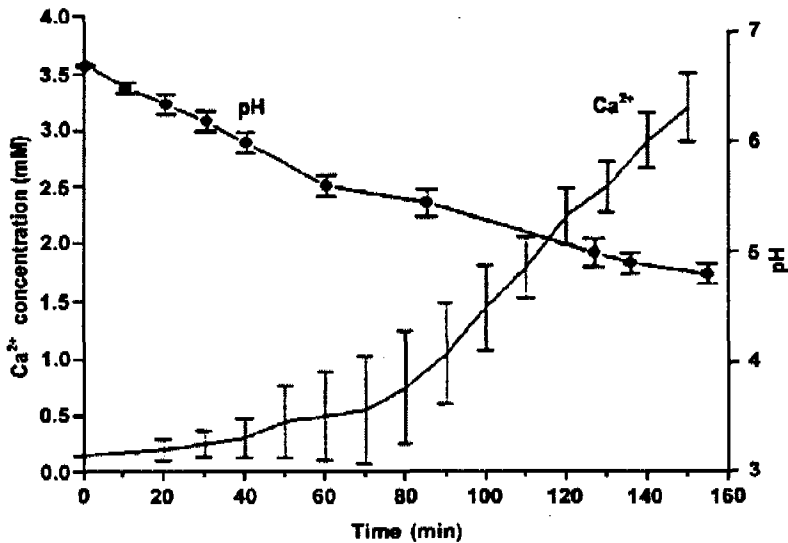


Fig. 6. Demineralization of HA bead caused by *S. mutans*. Ca^{2+} concentration measured in the artificial saliva was used as an index of the amount of demineralization. The amount of acid production from *S. mutans* was represented by the changes in pH.

3. 용균효소가 *S. mutans*에 의한 pH에 미치는 영향

HA bead를 포함한 인공타액에 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 4830 용균효소를 주입하면 pH는 초기에 변화가 없다가 10분 경과 후 부터 급격한 감소를 보였다. 그 후 40분 부터 점진적으로 pH 감소 속도가 줄었으나 용균효소를 넣지 않은 경우와 비교시 pH 감소는 비슷했다. *S. mutans*를 넣지 않은 상태에서는 pH 변화가 거의 없었고, 5 mM NaF (positive control)을 넣은 경우 pH는 초기 20분간 아주 적게 감소했으나 그 후 거의 일정한 수준을 유지하였다 (Fig. 7).

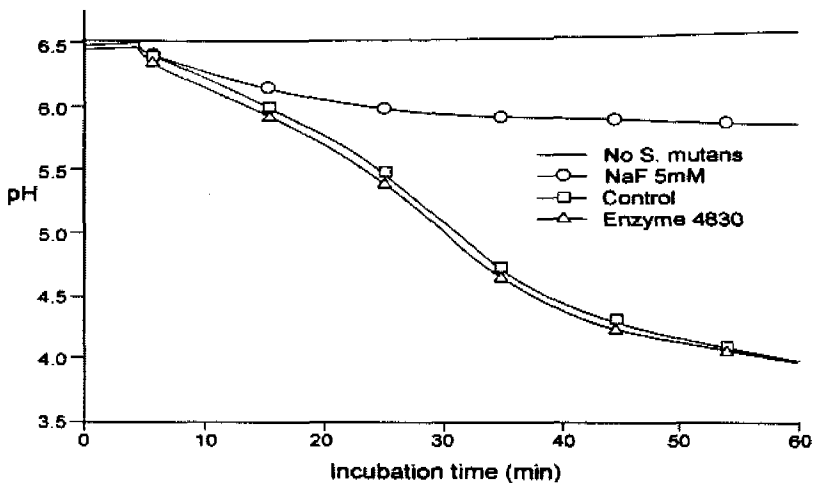


Fig. 7. The effect of lytic enzyme on pH caused by *S. mutans*. 4830 lytic enzyme played little role in the change of pH.

4. 용균효소가 *S. mutans*에 의한 Ca^{2+} 유리에 미치는 영향

HA bead를 포함한 인공타액에 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 4830 용균효소를 주입하면 초기 20분간 Ca^{2+} 유리량이 거의 없었으나, 시간이 경과할수록 점차 증가하여 100분이 지날때까지 계속 유리되었다. 용균효소가 없는 조건에서 20분간은 용균효소를 넣었을 경우와 유사하였으나, 그 후 부터 Ca^{2+} 유리량은 급격히 증가하였다 (Fig. 8).

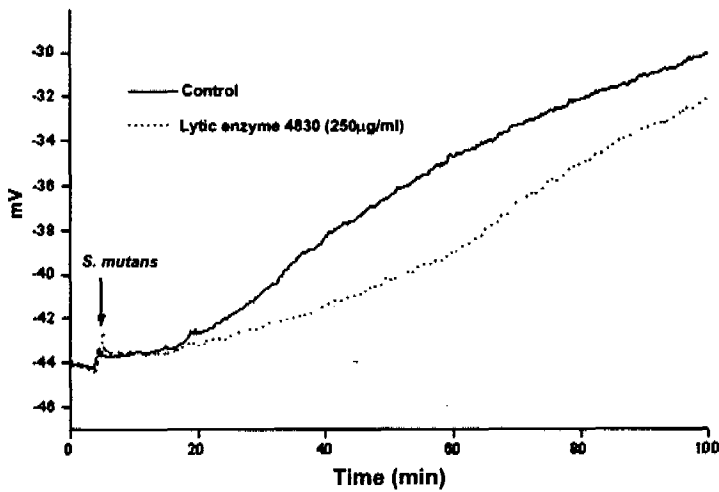


Fig. 8. The effect of lytic enzyme on Ca^{2+} release caused by *S. mutans*. Ca^{2+} release occurred slowly and progressively for the first 20 min, but demineralization was significantly inhibited by lytic enzyme 4830.

5. 용균효소에 의한 *S. mutans*의 HA bead 부착능 효과

[³H]-thymidine 동위원소로 표지화된 *S. mutans* 균주와 HA bead를 함유한 반응액에 다양한 농도의 용균효소를 처리하여 *S. mutans*의 부착능을 비교하였다. 부착된 세균수는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하에서 급격히 떨어지기 시작하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지 지속적으로 감소하였다. 그 후 *S. mutans*의 HA bead 부착 억제 효과는 완만히 감소하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 74%, 80%의 부착 억제 효과를 나타냈다 (Fig. 9).

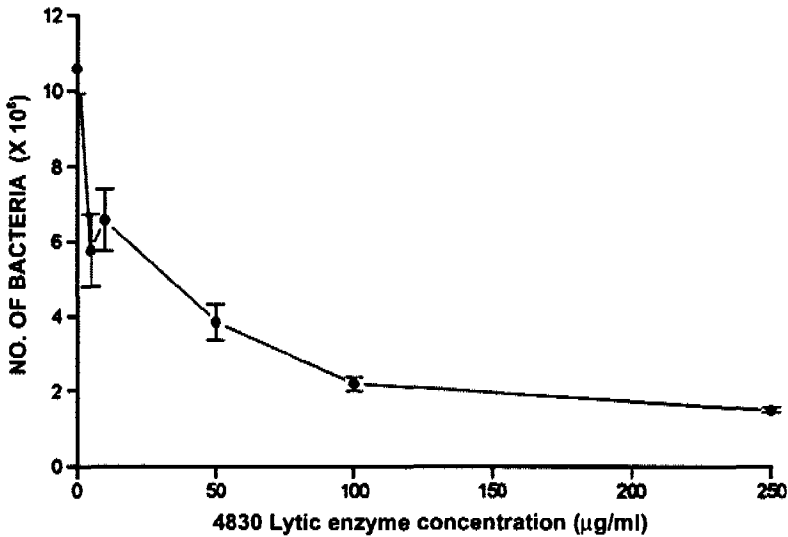


Fig. 9. The attachment of *S. mutans* to HA bead. The attachment of *S. mutans* to hydroxyapatite bead was significantly inhibited by 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lytic enzyme but the rate of attachment was decreased afterwards.

6. 용균효소가 인공 우식 병소의 표면경도에 미치는 영향

시편 처리전 VHN 측정부의 인접 부위에서 재차 VHN을 측정하여 표준편차를 계산하였다. 용균효소 용액을 처리한 시편과 처리하지 않은 시편 모두 초기 VHN은 37.6로 동일하였다. 15일 간의 pH cycling후 VHN은 24.1, 15.6으로 줄었는데 용균효소를 처리하였을때 감소가 더 적었다 (Table 2).

Table 2. Changes in surface hardness by lytic enzyme before and after microbial pH cycling for 15 days

	Surface hardness					
	Before treatment		After treatment		Difference	
	VHN	S.D.	VHN	S.D.	VHN	S.D.
Control	37.6	± 5.6	15.6	± 5.8	-20.0	± 3.2
Lytic enzyme (4830)	37.6	± 5.6	24.1	± 6.3	-13.6	± 3.1

IV. 고찰

경조직 우식으로 발생하는 치아우식증은 파괴를 동반한 감염성 질환 (progrssively infectious disease)으로 치태내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 다인자성 질환이다. 치태내 세균 중에서도 *S. mutans*가 주 원인균이며,^{73,74,75)} *S. mutans*는 치면에 부착, 증식 및 생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발한다. *S. mutans*는 치면의 획득 피막에 부착한 후 glucosyltransferase에 의하여 자당으로 부터 포도당 중합체 (glucose polymer)인 비수용성 mutan을 합성한다.^{76,77)} 합성된 mutans은 치면에서 증식하는 세균간의 결합을 증가시키며 부착한 *S. mutans*는 국소적으로 자리잡아 접착성 bacterial plaque 형태로 치아의 특수한 부위에 응집됨으로서 치아우식증이 발생하는 일차적인 원인을 제공한다고 보고 있다.

이러한 치아우식 유발성 물질인 cariogenic plaque에는 대단히 많은 양의 균 (2×10^8)이 포함되어 있으며 이 결과 자당이 포도당과 과당으로 분해되고 pH가 5.5이하로 떨어져 경조직인 치아를 탈회시킬 수 있는 조건이 조성된다. 즉 pH 감소에 의한 산생성 과정이 반복되면 법랑질의 미세한 분해가 이어지면서 탈회가 일어나 치아우식 병소가 발생하는 것이다. 이와같이 치아우식증은 세균에 의한 감염성 질환이며, 여기에 섭취한 음식물의 종류, 그리고 시간에 의한 변수가 가세되어 질환의 진행정도가 결정되지만 host factor로써 치아 자체가 지니고 있는 탈회에 대한 저항력과 크고 작은 타액선으로부터 흘러나오는 타액이 치아우식증 진행을 예방하는 중요한 인자로 평가되고 있다. 우식증은 pH 감소에 의한 산생성 과정이 반복되면서 법랑질의 미세한 분해가 이어지고 탈회가 일어나는 과정이다. 이 실험에서도 *S. mutans*를 HA bead가 있는 인공 타액에 넣었을 때 pH가 점차적으로 감소하고 이에 따라 칼슘 농도도 함께 증가하여 미생물에 의한 탈회는 산 발생과 밀접한 관계가 있음을 확인 하였다 (Fig. 6). 그러나 HA bead 탈회는 시간이 지남에 따라 서서히 증가하는 추세를 보이니 인공 타액내 pH는 감소속도가 점차적으로 줄어드는 양상을 보이므로써 인공 타액내 pH 변화와 탈회속도가 완전히 비례하지는 않았

다. 이와 같은 현상은 HA bead로 부터 탈회가 될 때 유리되는 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 에 의해 산이 중화되기 때문인 것으로 생각된다. 즉 HA bead의 탈회는 초기 60분 동안에는 천천히 일어나다 그 이후에 탈회속도가 더욱 빨리 진행되는 사실로 미루어, 실제 미생물에 의한 산 발생은 시간이 지날수록 증가하지만 HA bead로 부터 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 가 증가하여 생성되는 산을 중화시키기 때문에 pH 감소가 둔화된 것으로 생각된다. 한편 HA bead의 탈회도 뚜렷한 두단계의 양상을 나타냈는데 즉, 탈회 속도가 처음에 거의 증가하지 않다가 시간이 지남에 따라 점차 증가했는데 이는 *S. mutans*가 주입된 후 점차 활성도가 증가하기 때문인 것으로 생각된다 (Fig. 6). 다시 말해서 *S. mutans*는 -70°C 로 보관하다가 구강 모델에 주입하기 바로 전에 4°C 에서 원심분리한 후 37°C 의 인공타액에 주입되기 때문에 초기에는 세균의 활성도가 매우 낮아 탈회가 천천히 진행되고 시간이 지남에 따라 세균의 활성도가 높아지면서 탈회 진행 속도가 증가하는 것으로 보인다.

치아우식을 예방하고 억제하려는 수많은 연구가 이루어져 왔다. 일반적으로 치아우식은 숙주 요인과 병원체 요인 및 환경 요인이 복합적으로 작용하여 어느정도 시간 경과에 따라 발생하며 이 중 어느 하나 이상의 요인을 제거하거나 둘 이상의 요인이 상호 작용하는 기구를 차단함으로써 질병발생을 억제하거나 예방할 수 있다. 현재까지는 불화물을 복용함으로써 경도를 증가 시키거나 당 성분이 든 음식을 피하게 하는 식이조절법등 환경요인을 제거하는 방법이 임상적으로 널리 활용되고 있고 최근에는 부작용이 없이 지속적으로 작용할 수 있는 자연산물에 대한 연구가 이루어지고 있다. 구강내 미생물 중 치아우식의 원인 균으로 알려진 *S. mutans*를 억제함으로써 치아우식 발생을 감소시켜보려는 시도는 많이 있었으나 실제로 임상적인 측면에서 볼 때 구강내 세균의 감소를 계속 유지시키기 어렵고 우식 발생이 억제된 상태로 각종 세균간의 평형 상태를 지속적으로 이루게 하기 힘들며 치아면의 외부 표면으로부터 내부를 향해 산 부식에 의해 발생하는 치아우식을 미생물 조절이나 항균 작용 및 면역 작용을 기대하여 예방을 시도한다는 자체가 상당히 무리라는 생각에 미생물 요인 제거법은 크게 발전하지 못하였다. 치아우식증 치료에 대한 보다 적극적인 방법을 모색중 *Bacillus* 계통의 토양미생물이 *S. mutans*를 용균시키

는 물질을 분비한다는 사실을 확인하였으며 특히 토양내 미생물로부터 분리된 물질 중에는 세균의 세포벽을 공격하는 용균효소가 있음이 밝혀졌다^{9,50,61,62,63,64}. 이들 용균효소들은 치면세균막의 감소, 새로운 치면 세균막 형성 억제, 질병과 관련된 특이 세포의 선택적 억제, 독성 결정인자 발현 억제 등의 특징을 가져야한다. 이러한 용균효소중 연세대학교 생명공학과에서 분리 정제된 용균효소 (4830으로 명명)는 구강내 존재하는 정상균주중 치아우식에 일차적으로 관여하는 *S. mutans*에 가장 우수한 용균효과를 보였고 이 실험은 4830 용균효소를 이용하여 항우식 효과를 평가하였다 (Fig. 1). 용균효소 4830은 사람에게 존재하지 않는 세포벽을 용해시킴으로써 용균작용을 하나 농도에 따라서 세포독성이 있을수 있다. 독성 여부를 확인하고자 MTT 검사를 시행하였고, 그 결과 250 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포 증식을 억제하지 않았다 (Fig. 3). 따라서 모든 실험은 이 농도 이하에서 실행하였다. 사용된 인공 구강 모델에서 다양한 Ca^{2+} 의 농도에 따라 증가하는 전압값을 관찰할 수 있었으며 용균효소를 넣지않고 *S. mutans*를 인공 구강 모델에 넣었을 때 초기에는 정상 구강과 같은 pH 값을 보였다. 따라서 사용된 구강 모델이 비록 정확히 구강의 모든 조건을 재현하기에는 한계가 있으나 정상적으로 작동함을 입증할 수 있었다. 용균효소에 의한 탈회억제 실험에서 용균효소의 주입에도 불구하고 *S. mutans*에 의한 산생성능 차이는 없었다 (Fig. 7). 즉, 용균효소는 pH 의 감소를 억제하지 못하였다. 그러면 당연히 탈회되는 양도 용균효소 주입전 후에서 차이가 없을 것으로 생각되었으나 용균효소를 주입했을 때 탈회속도 및 그 양은 매우 감소하였다 (Fig. 8). 이는 탈회는 세균에의한 산생성에 의한다는 사실과 상반되는 결과로 전술한 바와 같이 산생성능은 억제되지 않았으나 탈회된 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 에 의해 유리된 산이 중화되어 pH 감소 속도가 줄어들지 않았나 생각된다. 그러나 용균효소의 Ca^{2+} 유리 억제 효과가 산생성능의 차이가 아닌 용균효소 그 자체의 특성 때문일 수도 있다. 용균효소의 부착억제 효과는 낮은 농도에서도 매우 뚜렷했다 (Fig. 9). 이 능력은 용균효소의 항우식 효과중 가장 주목해야 할 부분이라 생각된다. 왜냐하면 이 실험에서 단순히 인공타액을 사용하여 부착억제 정도를 평가하였는데, 실제 구강내 타액에는 다양한 세균억제 효소 및 완충 능력이 있다. 따라서 HA bead를 타액에 미리

coating하고 부착억제 실험을 시행했으면 억제효과는 더욱 우수했을것 이라고 추측된다. 또 용균효소를 먼저 처리하고 타액을 처리하거나 혹은 그 반대로 시행 한 후 억제 정도를 평가해보면 실제 어느 과정이 억제를 더욱 많이 시켰는지 알 수 있을 것이다. 용균효소에 의한 부착억제 이유는 아직 확실히 밝혀지지 않았으나 용균효소가 HA bead에 막을 형성하거나 다른 물질을 분비하여 *S. mutans*의 부착을 차단하는 것이 아닌가 본다.

결론적으로 이상의 실험결과로 미루어 용균효소 4830은 *S. mutans*의 산생성은 억제하지 않았으나 *S. mutans*의 HA bead에 대한 부착 및 Ca^{2+} 유리를 억제하였다. 또한 인공적으로 유발시킨 법랑질 표면경도를 증가시켰다. 따라서 용균효소는 *S. mutans*자체를 용해시키는 작용이외에 *S. mutans*의 치면부착 차단, 탈회억제 및 재광화를 촉진시켜 항우식효과를 나타내는 것으로 생각된다. 앞으로 이러한 용균효소의 항우식 효과를 포함하여 생체내 sensitivity, 독성유무, 안정성에 대한 검색이 완벽하게 이루어진다면 치과영역에서 아직도 난치병인 치아우식증을 억제할 수 있을 것이라고 기대된다.

V. 결론

치아우식증을 예방하기 위한 기존의 소극적인 방법과 달리 우식 초기에 관여하는 *S. mutans*를 선택적으로 억제할 수 있는 새로운 방법으로 토양미생물에서 유리되는 용균효소를 분리, 정제하여 사용하였다. *S. mutans*에 대한 활성이 우수한 용균효소(4830으로 명명)를 선택하여 용균효소의 항우식 효과를 평가하였으며 이를 위해 용균효소의 세포독성능, *S. mutans*에 의한 pH 및 Ca^{2+} 유리량 변화, HA bead에 *S. mutans* 부착능, 인공우식 범랑질의 경도변화를 분석하였다. 세포 독성능을 평가하기 위한 MTT 검사 결과 용균효소 4830은 $250 \mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. *S. mutans*와 HA bead가 포함된 인공타액에 $250 \mu\text{g/ml}$ 용균효소 4830을 넣었을 때, *S. mutans*에 의한 pH 변화는 용균효소를 넣지 않았을 때와 거의 차이가 없었으며, hydroxyapatite bead로부터 Ca^{2+} 의 유리량은 초기 20분 동안은 변화가 없다가 서서히 증가되었고 그후 지속적인 증가 양상을 보였다. 그러나 용균효소를 넣지 않았을 때와 비교하여 유리되는 양은 현저히 감소하였다. 용균효소 4830은 $100 \mu\text{g/ml}$ 이하의 적은 농도에서 HA bead에 *S. mutans*의 부착을 급격히 억제하였으나 농도가 증가함에 따라 부착억제는 서서히 감소하였고 $50 \mu\text{g/ml}$ 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 에서 74% , 80%의 부착억제를 보였다. 치태가 형성된 인공우식 범랑질 시편을 탈회용액에 넣기전 용균효소 용액에 2분간 처리한 경우 인공우식 범랑질의 표면경도는 용균효소 용액을 처리하지 않았을 경우에 비해서 경도의 감소가 적었다. 이상의 결과로 미루어 보아 용균효소(4830)는 *S. mutans*에 의한 pH 변화에 영향을 미치지 않았으나, *S. mutans*의 치면 부착을 현저히 억제하고, 탈회를 방지함으로써 인공우식 범랑질의 표면경도를 증가시키는 것으로 생각된다. 따라서 앞으로 이들 용균효소의 생체내 sensitivity, 독성유무, 안정성에 대한 검색이 이루어진다면, 세균 감염에 의한 질환의 효과적인 예방 및 치료, 구강내 세균 감염으로 유발되는 치아우식증을 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Hardie, J. M. and G. H. Bowden. 1974. Cell wall and serological studies *Streptococcus mutans*. Caries res. 8:301-306.
2. Singleton, P. and D. Sainsbury. 1987. Dictionary of Microbiology and Molecular biology, Pp. 847-849. 2th ed. Wiley-Interscience
3. Publication, New York. Krasse, b. 1996. Human *streptococci* and experimental caries in hamsters. Arch. oral. Biol. 11: 429-436.
4. Gibbons, R. J., K. s. Berman, P. Knoermer, and B. Kapsemalis. 1966. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming *streptococci* of human origin. Arch. Oral. Biol. 11: 549-560.
5. Grbbons, S. B. W. Hsiang, G. Musil, and D. D. Ziner. 1971. Viruses of cariogenic *streptococci*. J. Dent. Res. 50: 1594-1604.
6. Rogers, A. H. 1969. The ptoportional dlistribution. and characteristics of *streptococci* in human dental plaque. Caries Res. 3: 238-248.
7. Ikeda, T., H. J. Sand Lam, and E. L. Bradley, Jr. 1973. Changes in *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in piaque in relation to the initiation of dental caries in nigro children. Arch. Oral. Biol. 18: 555-556.
8. Fukushima, K., R. Motoda, K. Takada, and T. Ikeda. 1981. Resoluti of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases into two components essential to water-insoluble glucan synthesis. FEBS Lett. 128: 213-216.
9. Hamada, s, and M. Torii. 1980. Interaction of glucosyltransferase from *Strococcus mutans* with various glucans. J. Gen. Microbiol. 116: 51-59.
10. Rosan, B. 1994. Oral microbiology and immunology, 2nd ed, Pp 129-146. Nisengard and newman, Saunders.
11. Tanzer, J. M. 1992. Contemporary oral microbiology and immunology, Pp 377-424. Mosby year book.

12. Wolinsky, L. B. 1994. Oral microbiology and immunology, 2nd ed, Pp 341-359. Nisengard and Newman, Saunders.
13. Murray JJ: Appropriate use of fluorids for health. Geneva WHO. 1996.
14. Hamilton IR: Effects of fluoride on enzymatic regulation of bacterial carbohydrate metabolism. *Caries*. 11: 262, 1977.
15. Marquis RE: Diminished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride. *J Dent Res*. 69: 672, 1990.
16. Tenovuo J, Soderling E: Chemical aids in the prevention of dental disease in the elderly. *International Dent J*. 42: 355, 1992.
17. Horowitz HS: The need for toothpastes with lower than conventional fluoride concentrations for preschool-aged children. *J Public Health dent*. 52: 216, 1992.
18. Brunelle JA: The prevalence of dental fluorosis in US children, 1987. *J Dent Res*. 68: 995. 1989.
19. Ismail AI, Brodeur JM, Kanvane M, Boisclair G, Tessier C, Picotte L: Prevalence of dental caries and dental fluorosis in students, 11-17 years of age, in fluoridated and non-fluoridated cities in Quebec. *Caries Res*. 24: 290, 1990.
20. Riorden JJ: Dental fluorosis, Dental caries and fluoride exposure among 7-year-olds. *Caries Res*. 27: 71, 1993.
21. Konig KG: Role of fluoride tooth paste in a caries-preventive strategy. *Caries Res*. 27(suppl): 23, 1993.
22. Naccache H, Simard PL, Trahan L, Brodeur JM, Demers M, Lachapelle D; Factors affecting the ingestion of fluoride dentifrice by children. *J Public Health Dent*. 52: 222, 1992.
23. Larsen MJ, Richards A, Fejerskov O: Development of dental fluorosis according to age at start of fluoride administration. *Caries Res*. 19: 519,

1985.

24. Rozier RG: Reaction paper: Appropriate uses of fluoride-considerations for the '90s. *J Public Health Dent.* 51: 56, 1991.
25. Horowitz HS: Appropriate uses of fluoride: Consideration for the 90s-summary. *J Public Health Dent.* 51: 60, 1991.
26. McGhee JR, Michalek SM: Immunobiology of dental caries: Microbial aspects and local immunity, *Ann Rev Microbiol.* 35: 595, 1981.
27. Hamaada ST, Horkoshi T, Minami S, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated J, Ooshima T: Oral passive immunization against dental caries in rats glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 59: 4161, 1991.
28. Smith DJ, Taubman MA, Ebersole JL: Effects of local immunization with glucosyltransferase on colonization hamsters by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 37: 656, 1982.
29. Taubman MA, Smith DJ: Effects of local immunization with glucosyltransferase fractions from *Streptococcus mutans* on dental caries in rats and hamsters. *J Immunol.* 118: 710, 1977.
30. McGhee JR, Michal SM, Wavia JM, Rahman AER, Legler: Effective immunity to dental caries. Protection of gnotobiotic rats by local immunization with *Streptococcus mutans*. *J Immunol.* 114: 300, 1975.
31. Ferretti JJ, Shea c, Humphery MW: Cross- reactivity of *Streptococcus mutans* and human heart tissue. *Immun.* 30: 69, 1980.
32. Hughes M, MacHardy SM, Sheppard AJ, Woods NC: Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue. *Infect Immun.* 27: 576, 1980.
33. Van de Rijn I, Bleiweis AS, Zabriskie JB: Antigens in *Streptococcus mutans* cross reactive with human heart muscle. *J Dent Res.* 55: C59, 1976.

34. Sandham HJ: Criteria for assessment of adverse effects of chemotherapy on the oral microflora. J Dent Res.73: 692,1994.
35. Council on Dental therapeutics: Criteria for acceptance of chemotherapeutic products for the control of supragingival dental plaque and gingivitis. J Am Dent Assoc. 112: 529, 1986.
36. Kutter AGL: Production of bacteriocins by group a *streptococci* with special reference to the nephrogenic types. J Exp Med. 124: 279, 1966.
37. Page RC: Review of guide lines for acceptance of chemotherapeutic products for the control of supragingival dental plaque and gingivitis. J Dent Res. 68(Spec Iss): 1640, 1989.
38. Ranney RR: Criteria for efficacy of plaque control agents for periodontal disease: Microbiology. J Dent Res. 68(Spec Iss): 1655, 1989.
39. Wu-Yuan CD: Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis and aggregation of mutans Streptococci. J Dent Res. 67:51, 1988.
40. Wu-Yaun CD: In vitro screening of Chinese medical toothpastes: Their effects on growth and plaque formation of Mutans streptococci. Caries Res. 24: 198, 1990.
41. 강성호 : 수종의 차 음료가 *Streptococcus mutans*의 성장에 미치는 영향에 관한 연구. 대한 구강보건학회지. 14: 137, 1990.
42. Sakanaka SM, Kim M, taniguchi M, Yamamoto T: Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a carcinogenic bacterium. Agric Biol Chem. 53: 2307, 1989.
43. Kubo I, Muroi H, Himejima M: Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. J Agric Food Chem. 40: 245, 1992.
44. Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K, Tanaka T, Ooshima T, Hamada S: Inhibitory effect of Oolong tea polyphenols on glucosyltransferase of

- mutans streptococci*. Appl Environ Microbiol. 59: 968, 1993.
45. Shon WS, Yoo YC, Kim CY: The effect of NaCl and Bamboo salt on the growth of various oral bacteria. J Korean Academy Dent Health. 15: 252, 1991.
 46. Marsh PD: Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res. 71: 1431, 1992
 47. Jung MH, Kong IS, Bai DH, Yu JH: Purification and characterization of a bacteriolytic enzyme from alkalophilic Bacillus sp. J Microbiol Biochech. 2: 102, 1991.
 48. Kim TH, Lee DS, Hong SD: Purification and Characterization of a cell wall hydrolyzing enzyme produced by an alkalophilic bacillus sp. BL-29. J Microbiol Biothechnol. 5: 206, 1995.
 49. Yoshimoto T, Tsuru D: Studies on bacteriolytic enzymes: II. Purification and some properties of two types of staphylolytic enzymes from Streptomyces griseus. J Biochem. 72: 379, 1972.
 50. Oochi N, Azegami M, Ishii SI: Bacteriolytic enzyme induced from pyocinogenic Pseudomonas aeruginosa: Purification and characterization of PR1-lysozyme. J Biochem. 83: 727, 1978.
 51. Hayashi K, Kasumi T: Purification and Characterization of lytic enzyme produced by Streptomyces rutgersensis H-46. Agric Biol Chem. 45: 2289, 1981.
 52. Yokogawa K, Kawata S, Yoshimura Y: Lytic enzyme from Streptomyces glbisprus. Agric Biol Chem. 37: 799, 1973.
 53. Murao S, Takahara Y: Enzyme lytic against Pseudomonas aeruginosa produced by Bacillus subtilis YT-26. Agric Biol Chem. 39: 2305, 1974.
 54. Chung YJ, Kong IS, Kang YS and Yu JH: Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic Bacillus sp.. Korean J Appl Microbiol Bioeng. 18: 44, 1990.

55. Potvin C, Leclerc D, Tremblay G, Asselin A and Bellemare G: Cloning sequencing and expression of a bacteriolytic enzyme in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 214: 241, 1988.
56. Stolp H and Starr MP: Bacteriolysis. *Annu Rev Microbiol.* 19: 79, 1965.
57. Yu JH and Yoon SS: Production of β -galactosidase from alkalophilic *Bacillus* sp. YS309. *Korean J Appl Microbiol Bioeng.* 17: 524, 1989.
58. Yu JH and Yoon SS: Production of β -galactosidase from alkalophilic *Bacillus* sp. YS309. *Korean J Appl Microbiol Bioeng.* 17: 589, 1989.
59. Priest FG: Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev.* 41: 711, 1977.
60. Jung MH, Ohk SH, Yum DY, Kong IS, Bai DH and Yu JH: Nucleotide sequence of a bacteriolytic enzyme gene from *Bacillus* sp. *J microbiol Biotech.* 3: 73, 1993.
61. Croux C, Canard B, Goma G, and Soucaille P: Purification and characterization of an extracellular muramidase of *Clostridium* acetylated peptidoglycan. *Appl Environ Microbiol.* 58: 1075, 1992
62. Sawada H, Azegami M and Ishii S: Lytic enzyme produced by *Pseudomonas aeruginosa* concomitantly with bacteriophage PS17. Purification, characterization, and comparison with PR1-Lysozyme. *J Biochem.* 80 9: 275, 1981.
63. Kuroda A, Imazeki M and Sekiguchi J: Purification and characterization of a cell wall hydrolase encoded by the *cwlA* gene of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett.* 65: 9, 1991.
64. Strominger JL and Ghuyssen JM: Mechanism of enzymatic bacteriolysis 156: 213, 1967.
65. Rogers HJ, Taylor C, Rayter S, Ward JB: Purification and properties of autolytic endo- β -glucoamidase and the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase

- from bacillus subtilis strain. 168: J Gen Microbiol. 130: 2395, 1984.
66. Guinand M, Michel G, and Tipper DJ: Apperance of gamma -D- glutamyl-(L)meso-diaminopimealate peptidoglycan hydrolase during sporulation in *Bacillus sphaericus*. J Bacteriol. 120: 173, 1974.
 67. Ghuysen JM: Use of bacteriolytic enzyme in determination of wall structure and their role in cell metabolism. Bacteriol Rev. 32: 425, 1968
 68. Banks JG, Board RG, sparks NH: Natural antimicrobial systems and their potential food preservation in the future. Biotechnol Appl Biochem. 8: 103, 1986.
 69. Grant WD, Fermenter TR, Wood DA: Production of bacteriolytic enzymes and degradation of bacterial cell walls during growth of *Agricus bisporus* on *Bacillus subtilis*. J General Micrbiol. 130:761, 1984.
 70. Salton MRJ: Isolation of *Streptomyces spp.* capable of decomposing preparation of cell walls from various microorganisms and a comparision of their lytic activities with those of certain *actinomycetes* and myxobacteria. J Gen Microbiol. 12: 25, 1995.

ABSTRACT

Anticariogenic effect of lytic enzymes produced from microorganism in soil

Ki-Weon Kim, D.D.S., M.S.D.

Department of Dentistry, The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Heung-Kyu Son, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

Dental caries is perhaps one of the most common infectious diseases. Although caries prevalence in many countries has declined remarkably, dental caries in Korea remains to be controlled. The essential process in dental caries involves demineralization of tooth surface by lowering pH in dental plaque consisting of a variety of microorganism. It is believed that *Streptococcus mutans* plays a major role in the development of dental caries by producing high concentration of organic acid. In the dental caries development, there are four process which are the bacterial attachment, proliferation, glucose polymerization, and acid production. These observations justify a broadening of current caries prevention strategies, which presently rely heavily on lytic enzyme against bacteria, to include the incooperation of antimicrobial agents have a direct inhibitory effect on the growth and metabolism of oral organism, while chemotherapeutic agents can function indirectly by removing dental plaque or by interfering with microbial adhesion and plaque formation. The purpose of this study was to test the cariogenic potential of lytic enzyme 4830, isolated from Korean soil. Results were as follows. The enzyme 4830 was not cytotoxic

to normal peridontal ligament cells at below 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and played little role in the change of pH caused by *S. mutans*. Ca^{2+} release occurred slowly and progressively for the first 20 min, but demineralization was significantly inhibited by enzyme 4830. The attachment of *S. mutans* to HA bead and surface hardness was also significantly inhibited by the enzyme 4830 but the rate of attachment was decreased afterwards. Taken all together, it is suggested that lytic enzyme 4830 from the soil bacteria have an anticariogenic effect, by preventing attachment of bacteria to the enamel surface as well as by inhibiting the demineralization.

Key Words: Dental caries, lytic enzyme, pH, Ca^{2+} release, attachment, surface hardness.