

## Xylitol-resistant *Streptococcus mutans*와 xylitol-sensitive *Streptococcus mutans*의 세포 성질에 관한 비교연구

이흥모 · 김정옥 · 장기택 · 이상훈 · 한세현 · 김종철

서울대학교 치과대학 소아치과학교실

### 국문초록

Xylitol은 대체감미제로써 mutans streptococci에 의해서 대사되지 않으며 오히려 이들 균체내에서 glucose대사를 억제하여 mutans streptococci의 성장을 저해하고, 산성 대사물의 생산을 감소시킴으로써 치아우식억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 xylitol에 의해 성장의 억제를 받는 *S. mutans* strain을 xylitol-sensitive( $X^S$ ) strain이라고 한다. 하지만 xylitol에 지속적으로 노출될 경우 더 이상 xylitol에 의해 성장억제가 나타나지 않는 xylitol-resistant( $X^R$ ) strain이 출현함이 실험적이나 임상적으로 보고 되었다.

본 연구는  $X^S$  strain과 여기에서 얻은 변이종  $X^R$  strain의 성장과 세포의 pH 그리고 수산화인회석 표면에 대한 부착능과 세균응집능을 비교함으로써  $X^R$  strain의 출현이 xylitol의 치아우식억제효과에 미치는 영향을 확인하고자 하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1.  $X^R$  strain은  $X^S$  strain의 성장과 세포의 pH와 차이를 나타내지 않았다.
2.  $X^R$  strain과  $X^S$  strain은 수산화인회석 부착능에 있어서 차이를 나타내지 않았으며( $p>0.05$ ), 자당 의존성 수산화인회석 부착에서는  $X^R$  strain에 비해  $X^S$  strain이 더 높은 부착능을 나타내었다( $p<0.05$ ).
3. 타액유도성 응집에서는  $X^R$  strain이 더 낮은 타액의 농도에서 응집 반응을 보였다.

**주요어** : Xylitol, *Streptococcus mutans*, Xylitol-resistant, 수산화인회석 부착, 응집

### I. 서 론

Mutans streptococci는 치아우식증과 가장 관련이 깊은 세균으로 알려져 있다. 사람에게 가장 많이 나타나며 높은 우식원성을 보이는 mutans streptococci는 *Streptococcus mutans*(c, e, f)와 *Streptococcus sobrinus*(d, g)이다. 이들의 우식원성은 자당으로부터 접착성의 비수용성 glucan을 생산하는 능력과 깊은 관련이 있는 것으로 보고 되고 있다. Mutans streptococci의 효소인 glucosyltransferase(GTF)는 자당을 분해하여 glucose의 중합체인 glucan을 합성한다. 합성된 glu-

can은 이 세균의 glucan부착단백질(glucan-binding protein)에 부착하여 균체부착-glucan(cell-associated glucan)이 되고 여기에 GTF가 부착하여 균체부착-GTF(cell-associated GTF)가 형성된다<sup>1)</sup>. 이 균체부착-GTF가 자당을 이용하여 생산한 비수용성 glucan이 실제적으로 mutans streptococci의 치아표면 집락화에 직접적으로 작용한다. 이처럼 자당은 치아우식 유발의 주요한 원인일 뿐만 아니라, 비만 등의 전신질환과도 관련이 되어있어 대체감미제에 대한 관심이 증가되고 있다.

많은 대체감미제 중에서 가장 주목을 받고 있는 것이 바로 xylitol이다. Xylitol은 5탄당 알코올로 pentitol이라고도 불리며, 설탕과 같은 정도의 단맛을 내고 시원한 느낌을 주는 것이 그 특징이다<sup>2)</sup>. Xylitol이 대체감미제로써 매우 효과적인 이유는 일부의 구강세균에 의해 대사될 수 있지만, mutans streptococci에 의해서는 대사되지 않고 오히려 이들 균체내에서 glucose대사를 억제하여 mutans streptococci의 증식을 지연시키며, 이에 따라 산성 대사물의 생산이 감소되기 때문이다<sup>3)</sup>.

교신저자 : 김종철

서울시 종로구 연건동 28-1

서울대학교병원 치과병원 소아치과

Tel : 02-760-3819

E-mail : kimcc@plaza.snu.ac.kr

Mutans streptococci는 constitutive fructose phosphotransferase system(constitutive fructose PTS)을 통하여 xylitol을 균체내로 전이시킨다. 이때 전이되는 xylitol은 constitutive fructose PTS에 의해 인산기가 부착된 xylitol-5-phosphate의 형태로 균체내에 축적된다. 균체내로 축적된 xylitol-5-phosphate는 fructose-6-phosphate와 phosphofructokinase에 대하여 경쟁반응을 함으로써 결과적으로 glycolysis를 억제하고, phosphoglucosomerase와 pyruvate kinase활성의 90% 이상과 6-phosphofructokinase활성의 약 50% 가량을 감소시킨다<sup>4)</sup>. 또한 glucose-dependent ATP 합성을 70-80% 가량 감소시킨다는 연구결과도 보고 되었다<sup>5)</sup>. 이렇게 축적된 xylitol-5-phosphate는 다시 인산기가 제거되어 균체외로 배출되는데, 이와 같은 배출은 PTS를 통한 xylitol의 섭취와 더불어서 이른바 'futile cycle'을 이루게 된다. 대사과정을 통한 에너지의 획득없이 세균의 에너지만을 소모시키는 'xylitol-futile-cycle'은 mutans streptococci의 성장억제에 기여하게 된다<sup>4)</sup>. 이밖에도 xylitol은 치면부착을 위해 필수적인 세포벽의 lipoteichoic acid(LTA) 감소를 유발시키며, 화학적인 구조상의 특징으로 인해 칼슘 등의 다가이온들과 작용하여 안정적인 복합체를 형성하고, 이것이 타액과 치태 중의 인산칼슘의 안정화에 기여한다고 알려져 있다. 또한 타액의 분비를 촉진하며, 이하선, 구개선 타액의 단백질 증가, amylase의 작용 증가, carbonic anhydrase, lactoperoxidase, invertase-like enzyme, thiocyanate ions의 증가가 나타난다고 보고 되기도 하였다<sup>6-8)</sup>. 이와 같은 변화는 xylitol이 타액의 완충작용과 정균작용을 증가시켜 치아우식에 대한 체내방어기전을 증진시킴을 의미한다.

전술된 기전에 의하여 xylitol에 의해 성장이 억제되는 *S. mutans* strain을 xylitol-sensitive( $X^S$ ) strain이라고 한다. 반면,  $X^R$  strain을 xylitol이 포함된 배지에서 지속적으로 배양을 할 경우 더 이상 xylitol에 의해 성장억제가 나타나지 않는 변이종이 형성됨이 보고 되었는데<sup>9)</sup>, 이러한 strain을 xylitol-resistant( $X^R$ ), xylitol-insensitive, 또는 xylitol-tolerance strain이라고 한다.  $X^R$  strain이 xylitol에 의해 성장이 억제되지 않는 이유는 xylitol을 균체내로 전이시키며 인산화시키는 constitutive fructose PTS의 활성이 없거나 매우 낮기 때문이다<sup>10-12)</sup>. 따라서  $X^R$  strain은 균체내에 xylitol-5-phosphate를 축적시키지 않고, 'futile-cycle'을 형성하지도 않기 때문에 세균의 성장은 억제되지 않는다. 지속적인 xylitol의 섭취 시 구강내에도  $X^R$  strain이 발생함이 보고 되었으며, 이렇게 형성된  $X^R$  strain은 타액과 치태내에서 모두 발견될 뿐 아니라 수년간 지속된다고 한다<sup>3)</sup>.

만일 xylitol에 의해 *S. mutans*의 성장이 억제되지 않는다면 치아우식에방을 위한 대체감미제로써 그 의미가 감소될 수밖에 없다. 따라서 현재까지 많은 연구자들이  $X^R$  strain의 xylitol 내성의 원인과 이것이 미치는 영향을 밝히기 위해 연구를 진행하였다.

Berkers<sup>13)</sup>는 쥐를 통한 실험에서  $X^R$  strain이  $X^S$  strain에 비해서 glucose 존재하에서 치아우식유발력이 낮다고 보고하였으며, Lafleche와 Trahan<sup>14)</sup>은  $X^R$  strain과  $X^S$  strain의 세포벽과 세포질내의 다당질(polysaccharide)을 전자현미경으로 관찰하여 이들의 축적양상이 서로 다를 것을 보고하였다. Soderling과 Trahan<sup>15)</sup>은 부착력과 응집현상의 변화가  $X^R$  strain을 구강내에서 제거시키기가 유리하여 치아우식유발력이 감소된다고 보고하였으며, 두 strain의 peptidolytic, proteolytic activity에 차이가 없음이 보고 되기도 하였다<sup>16)</sup>. 또한  $X^R$  strain의 발생으로 인해 세균 부착력의 변화는 미생물의 조건에 따라 증가하거나 감소한다는 보고도 있다<sup>17)</sup>.

이 연구의 목적은  $X^S$  strain과  $X^R$  strain의 성장과 세포의 pH 그리고 수산화인회석 표면에 대한 부착능과 세균응집능을 비교함으로써  $X^R$  strain의 출현이 대체감미제로서의 xylitol의 치아우식억제효과에 미치는 영향을 확인하고자 하는데 있었다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 실험 균주

실험에 사용한 균주는 서울대학교 치학연구소 균주은행에서 분양받은 *Streptococcus mutans* Ingbritt strain을 사용하였다. 균주는 -40°C에서 동결건조로 보관중인 것을 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 TYE 액체배지(Trypticase yeast extract: 1.7% trypticase, 0.3% yeast extract, 0.5% sodium chloride, 0.25% potassium phosphate)에 24시간 간격으로 2회 연속 배양 후 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) Xylitol-resistant( $X^R$ ) strain의 획득

$X^R$  strain을 얻기 위하여 Trahan 등<sup>18)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다.

TYE 액체배지 10ml에 0.4%의 glucose를 첨가한 후, 최종 농도가 1%(66mmol/L)가 되도록 xylitol(Danisco, Denmark)을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. 24시간마다 0.1ml의 세균배양액을 동일한 조성의 새로운 배지 10ml에 재배양을 하였다. 대조군( $X^S$  strain)은 xylitol을 첨가하지 않고 동일하게 배양하였다.

9일간 연속적으로 재배양한 균주는 MSA 배지와 TYE agar 배지에서 2일간 배양하여, colony를 관찰하여 타균에 의해 오염이 되었는지를 검사하였다. 오염이 되지 않은 것으로 확인된 정지기(Stationary growth phase)의 균주 0.5ml를 0.2% glucose를 포함하는 10ml의 TYE배지에 접종하여 잘 혼합한 후 2개로 나누고, 0.1ml의 50% xylitol(최종농도 1%)을 첨가하고, 다른 한편에는 동일 부피의 증류수를 첨가하였다. 5%

CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하며, 2시간마다 분광광도계(Spectronic 20D+, USA)를 사용하여 660nm의 파장에서 배양액의 흡광도(optical density)를 측정하였다.

분광광도계를 이용하여 균주의 성장곡선을 측정한 뒤, xylitol을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 성장곡선이 동일한 경우 이 균주를 X<sup>R</sup> strain으로 설정하였다.

2) X<sup>S</sup>, X<sup>R</sup> strain의 성장곡선과 세포의 pH 측정

앞서 획득한 X<sup>R</sup>과 동일한 조건에서 xylitol을 첨가하지 않은 배지에서 배양한 X<sup>S</sup> strain을 0.2%의 glucose와 1%의 xylitol이 첨가된 배지와 0.2%의 glucose만 첨가된 배지에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 각각 배양하였다. 2시간마다 배양액의 흡광도를 660nm의 파장에서 분광광도계를 사용하여 성장곡선을 측정하였으며, pH meter를 이용하여 세포의 pH를 측정하였다.

3) 수산화인회석(HA; Hydroxyapatite) beads 부착

타액으로 인한 변수를 제거하기 위해 1명의 건강한 성인을 대상으로 파라인 왁스를 이용하여 자극성 타액을 채취하였다. 채취된 타액은 4°C, 8,000g에서 15분간 원심분리하여 상청액을 60°C에서 30분간 가열하여 효소를 불활성화 시킨 후 여과하여 멸균하였고 사용 시까지 -20°C로 냉동하여 보관하였다.

Spheroidal HA beads(Biorad, USA; grain size 80-350 μm)는 증류수로 세척하고 건조시킨 후 Polypropylene tube에 40mg씩 담고, 준비한 타액 1ml를 첨가하여 60분간 일정하게 뒤섞은 다음 buffered KCl 용액(pH 7.0)으로 2회 세척하여 여분의 타액을 제거하였다.

X<sup>R</sup>과 X<sup>S</sup> strain의 배지에 [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine (Amersham, USA)을 최종농도가 0.5μCi/ml가 되도록 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 배양한 균주를 3,000g으로 20분간 원심분리하고, buffered KCl 용액으로 2회 세척하였다.

세척된 균주는 buffered KCl 용액을 사용하여 세포농도를 1 × 10<sup>6</sup> cell/ml이 되도록 맞추고, 이 용액 200μl를 scintillation counter(Beckman, USA)로 측정하여 세균수와 방사선량을 미리 산정하였다.

[methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine으로 표지된 균주를 각 tube에 1ml씩 접종하고, 2시간 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양한 후 HA beads를 buffered KCl 용액으로 2회 세척하고 건조시킨 후 건조가 끝난 HA beads를 scintillation vial에 옮기고 scintillation fluid를 첨가하여 잘 혼합한 후 scintillation counter로 측정하였다.

4) 자당의존성 수산화인회석(sucrose dependent hydroxyapatite) beads 부착

위의 방법과 동일한 방법으로 균주와 HA beads를 준비하며, [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine으로 표지된 균주의 접종 시 최종농도가 1%가 되도록 자당을 첨가하여 2시간 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C

에서 배양한 후 HA beads를 buffered KCl 용액으로 2회 세척하고 건조한 뒤 scintillation counter로 방사선량을 측정하였다.

5) 타액 유도성 응집(saliva induced agglutination)

Levine 등<sup>19)</sup>의 방법을 이용하였으며, 타액은 얼음 속에 보관 중인 tube에 이를 깨끗이 닦은 건강한 성인 1명의 자극성타액을 채취하였다. 채취된 타액은 4°C, 10,000g로 원심분리하여 상청액을 냉장고에 보관하며, 채취 후 2시간 이내에 사용하도록 하였다.

Microtitre plate의 well에 100μl의 신선한 타액을 넣고, 다른 well들에 50μl의 완충용액(5mM CaCl<sub>2</sub>와 0.154M NaCl 첨가한 pH 7.2의 0.1M Tris-HCl buffer)을 넣었다. 100μl의 타액 중 50μl를 다음 well에 담겨 있는 완충용액에 넣고 잘 혼합한 후 다시 50μl의 혼합용액을 다음 well로 옮겨 2배씩 단계 희석 하였다.

X<sup>R</sup>과 X<sup>S</sup> strain을 배양하여 4°C, 8,000g에서 20분간 원심분리한 후 buffer 용액을 이용하여 2차례 수세하여 균용액의 흡광도가 1.0이 되도록 조정된 후 각 well에 50μl씩 첨가하여 상온에서 3시간동안 배양하였다. 각 well들을 관찰하여 well의 바닥에 명확한 침전물이 형성된 경우에 응집된 것으로 하며, 응집소에 대한 응집역가(agglutination titer)는 응집이 일어난 최대 희석농도로 나타내었다.

6) 실험자료의 분석

X<sup>R</sup> strain의 확인을 위해 X<sup>S</sup> strain의 성장곡선과의 각 시간대별 배양액의 흡광도를 Mann-Whitney U test를 통해 검정하였으며, 수산화인회석 부착실험에서 특정 두 실험군간의 차이를 검정하기 위해서도 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 통계 분석은 SPSS for Windows ver 11.0을 사용하였다.

III. 연구성적

1. X<sup>S</sup> strain과 X<sup>R</sup> strain의 성장곡선과 세포의 pH의 측정

배양시작 후 10시간이 되었을 때 xylitol을 첨가한 X<sup>S</sup>균을 제외한 모든 군에서 정지기(stationary phase)를 보였다. 이때 xylitol을 첨가하지 않은 X<sup>S</sup>군과 X<sup>R</sup>군 그리고 xylitol을 첨가한 XR군간에는 시간대별로 각 군간의 성장양상이 유사하게 나타났다(Fig. 1). Xylitol을 첨가한 X<sup>S</sup>군의 경우 6시간 배양 이후부터 다른 군에 비해 성장이 억제됨을 보였으며, 12시간 배양까지도 지속적으로 흡광도의 증가가 나타났다.

세포의 pH의 경우도 성장곡선과 마찬가지로 xylitol을 첨가한 X<sup>S</sup>군의 세포의 pH는 나머지 다른 군들에 비해 pH의 감소가 둔화되었으며, xylitol을 첨가한 X<sup>S</sup>균을 제외한 다른 군들간의 시간별 세포의 pH의 감소양상은 유사하였다(Fig. 2).

X<sup>R</sup> strain은 xylitol에 의해 성장이나 세포의 pH에 영향을

받지 않았으며, X<sup>S</sup> strain과 성장이나 세포의 pH에서 차이를 나타내지 않았다.

2. 수산화인회석 부착실험 및 자당의존성(sucrose dependent) 수산화인회석 부착실험

각 균의 부착세균량을 Fig. 3에 나타내었다. 수산화인회석 부착능 비교에서 X<sup>S</sup>균은 X<sup>R</sup>균에 비해 더 높은 세균부착량을 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다(p>0.05). 또한 자당의존성 수산화인회석 부착에서 X<sup>S</sup>균과 X<sup>R</sup>균 모두 자당을 첨가하지 않은 수산화인회석 부착보다 더 많은 세균의 부착이 측정되었

으며, 통계적으로 유의차를 보였다(p<0.05). 자당을 첨가한 X<sup>S</sup>균과 X<sup>R</sup>균의 비교에서는 X<sup>S</sup>균이 X<sup>R</sup>균에 비해 더 많은 양의 세균의 부착이 측정되었으며, 이는 통계적인 유의차를 나타내었다(p<0.05).

3. 타액 유도성 응집(saliva induced agglutination)

X<sup>R</sup>균은 1/512배로 희석한 타액에서, X<sup>S</sup>균은 1/128배로 희석한 타액에서까지 응집현상이 관찰되었다. 타액을 첨가하지 않은 각각의 대조군에서는 응집현상이 관찰되지는 않았다(Table 1).

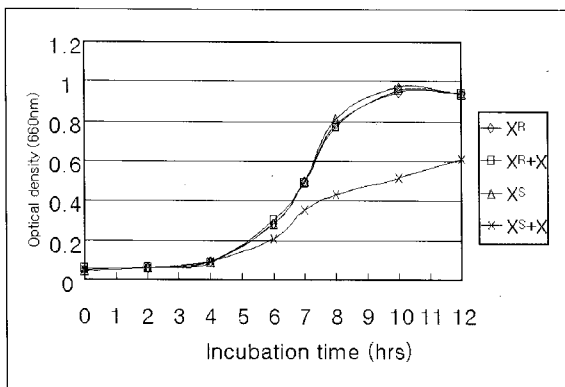


Fig. 1. Growth of the X<sup>R</sup>/X<sup>S</sup> pair of *Streptococcus mutans* Ingbritt with and without 1% xylitol(X<sup>R</sup>: xylitol-resistant *S. mutans*, X<sup>R</sup>+X: xylitol-resistant *S. mutans* with 1% xylitol, X<sup>S</sup>: xylitol-sensitive *S. mutans*, X<sup>S</sup>+X: xylitol-sensitive *S. mutans* with 1% xylitol).

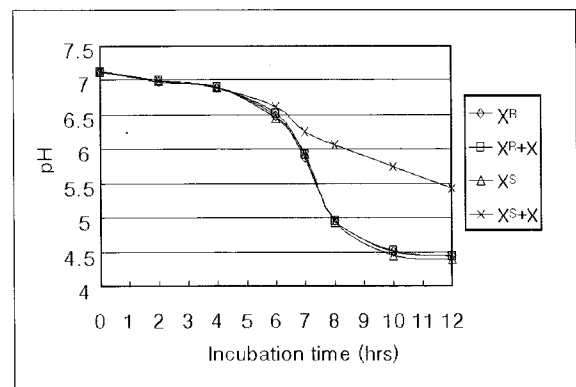


Fig. 2. The extracellular pH curves of the X<sup>R</sup>/X<sup>S</sup> pair of *Streptococcus mutans* Ingbritt with and without 1% xylitol(X<sup>R</sup>: xylitol-resistant *S. mutans*, X<sup>R</sup>+X: xylitol-resistant *S. mutans* with 1% xylitol, X<sup>S</sup>: xylitol-sensitive *S. mutans*, X<sup>S</sup>+X: xylitol-sensitive *S. mutans* with 1% xylitol).

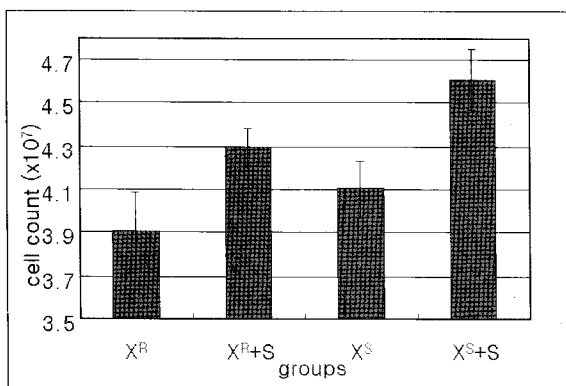


Fig. 3. Adhesivity of cells of *Streptococcus mutans* Ingbritt to HA beads(X<sup>R</sup>: xylitol-resistant *S. mutans*, X<sup>R</sup>+S: xylitol-resistant *S. mutans* with 1% sucrose, X<sup>S</sup>: xylitol-sensitive *S. mutans*, X<sup>S</sup>+S: xylitol-sensitive *S. mutans* with 1% sucrose).

Table 1. Bacteria agglutination induced by saliva

strains	agglutination titer
Xylitol-resistant <i>S. mutans</i>	× 512
Control(xylitol-resistant <i>S. mutans</i> with buffered solution)	-
Xylitol-sensitive <i>S. mutans</i>	× 128
Control(xylitol-sensitive <i>S. mutans</i> with buffered solution)	-

The mark (-) indicates that no agglutination was induced by the initial concentration of saliva

IV. 총괄 및 고찰

숙주와 치태내에서 다른 미생물의 영향을 받는 복합적인 구강내 환경을 시험관내 환경과 동일시 할 수는 없지만, 본 실험에서는 각각 X<sup>S</sup>, X<sup>R</sup> strains에 있어서 *S. mutans*의 주요 독력인자인 세균의 성장, 세포의 pH, 수산화인회석 부착과 세균응집능을 비교하고자 하였다. 본 실험의 X<sup>R</sup> strain 획득과정에서 X<sup>S</sup> strain이 지속적으로 xylytol에 노출되는 경우 X<sup>R</sup> strain이 출현되며, 이 변이종은 xylytol에 의해서 성장과 세포의 산성대사물 생성에 영향 받지 않는다는 기존의 연구를 다시 한번 확인하는 결과를 보여주었다<sup>9)</sup>. 반면 X<sup>S</sup> strain의 경우 xylytol에 의해 성장의 억제와 세포의 산생성이 크게 저해됨을 보여 주었는데, 이 결과는 역시 xylytol의 *S. mutans*에 대한 성장억제에 관한 기존 연구 결과와 일치하는 것이었다.

X<sup>R</sup> strain의 발생과 관련하여 실험관내에서의 인위적인 생성 뿐 아니라 X<sup>R</sup> strain의 출현에 관한 임상적인 연구도 이미 보고되었다. Trahan과 Mouton<sup>10)</sup>은 상업적인 xylytol 제품을 장기간 사용한 사람의 타액내에서 constitutive fructose-PTS의 활성이 극히 낮은 X<sup>R</sup> strains 비율이 전체 mutans streptococci에서 87%에 이르며, xylytol 함유 식품을 섭취하지 않는 사람의 경우 10%만이 X<sup>R</sup> strain이라 보고하였다. 이와 관련하여 xylytol의 섭취가 전혀 없거나, 혹은 매우 작은 양의 xylytol이 섭취되더라도 한번 형성된 높은 비율의 X<sup>R</sup> strain은 유지될 수 있다고 하였다<sup>20)</sup>.

Benchabane 등<sup>12)</sup>은 constitutive fructose PTS의 유전정보를 지정하는 *fxp operon*의 *fxpC*가 억제된 *S. mutans*는 xylytol에 의해 성장이 억제되지 않음을 실험적으로 보여 줌으로써, X<sup>R</sup> strain의 발현은 constitutive fructose PTS의 활성의 억제에 의해 발생하는 것임을 증명하였는데, *fxpC*는 constitutive fructose PTS에서 xylytol을 전이하는 역할을 하는 IIABC 단백질의 유전정보를 가지고 있다.

현재까지 적어도 20개 이상의 서로 다른 PTS 단백질과, 다양한 PTS 단백질과 작용하는 10개의 non-PTS 단백질이 발견되었으며, 이와 같은 PTS의 구조적 복잡성은 X<sup>R</sup> strain의 발생과 깊은 연관성을 가지는 것으로 보인다. 다시 말하면, 구조적인 PTS의 특성으로 인해 관련유전자의 단일변이로도 다면발현(pleiotropic)의 변이종이 생성될 수 있을 것으로 추정되는 것이다. X<sup>R</sup> strain은 자연발생적인 여러 위치에서의 변이, 즉 EII 복합체를 형성하는 하나 이상의 peptide를 encoding하는 유전자, 조절 유전자, promotor등의 변이들이 PTS의 기능변화를 가져오는 것으로 보고 있으며<sup>9)</sup>, 실제로 이와 유사하게 Gauthier 등<sup>21)</sup>은 2-deoxyglucose에 대해 저항력을 가지는 *S. salivarius*에서 유전자 상의 여러 위치에서 변이들이 존재함을 보고하였다. Xylytol의 존재하에서 배양할 경우 다양한 X<sup>R</sup> strain이 선택적으로 성장한다고 보고 되었는데, 이렇게 발현된 X<sup>R</sup> strain들은 공통적인 phenotypic trait(매우 낮은 constitutive fructose-PTS activity)을 가지지만, 개별적인 고유성질을

을 나타낸다고 하였다. 실험적으로 다른 탄수화물 당류와 xylytol을 첨가하여 조건이 다른 배지에서 배양한 후 얻은 xylytol-resistant mutants들의 성장률이 서로 다름이 보고 되었다<sup>18)</sup>. 이렇게 성장속도의 차이를 보이는 것은 strain간의 유전적 변이의 차이가 성장속도로 발현된 것으로 추정되며, X<sup>R</sup> strain이 다양한 타입으로 존재함은 X<sup>R</sup> strains이 PTS에 영향을 미치는 개별적인 자연발생적인 단일변이(single mutation)들의 총체적인 영향에 의해 형성될 가능성으로 해석될 수 있다.

본 실험에서는 X<sup>R</sup>과 X<sup>S</sup> strain의 우식원성을 비교하기 위하여 수산화인회석 부착실험과 세균응집실험을 하였다. 수산화인회석 부착실험의 경우 X<sup>R</sup>과 X<sup>S</sup> strain 간의 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 자당의존성 수산화인회석 부착실험에서는 자당을 첨가하지 않았을 때 보다 X<sup>R</sup>과 X<sup>S</sup> strain에서 모두 부착세균 수의 증가를 가져왔으며, X<sup>S</sup> strain의 경우 X<sup>R</sup> strain에 비해 부착세균수의 증가가 더 크게 나타났다. 이들 부착 세균수의 차이는 모두 통계적인 유의성을 나타내었다. 일반적인 미생물의 치아표면의 초기부착은 미생물 표면의 adhesins과 타액피막의 specific pellicle receptors가 관여한다. 하지만 이런 기전에 의해 부착가능한 미생물의 수는 이용 가능한 receptor 수가 한정되어 있어 제한적이며, 실제로 치태내에서 발견되는 미생물의 수보다 현격히 작은 수치를 보인다. 따라서 치태내의 많은 수의 미생물은 타액피막에 존재하는 초기 부착위치의 수와 무관한 추가적인 기전을 통한 부착이 필요한 것이다. 타액 피막의 초기 부착위치에 집락화된 미생물은 미생물 자신과 이들의 생성물로 구성되는 기초 토대를 형성하게 되고, 이 변형된 표면이 이차 군락을 유도하는 추가적인 위치를 제공한다. 이런 군집에는 동형성(homotypic), 이종성(heterotypic) 세포상호작용을 통한 세균의 응집(aggregation)과 타액성분에 의한 세균의 응집(agglutination)을 포함하기도 하는데, 세균의 생성물이 이차 군집에 많은 관여를 하게 된다. 미생물의 세포의 효소인 glucosyltransferase에 의해 생성된 glucan이 이런 세포의 군집을 촉진시키는 세균 대사물이다. 미생물은 효소나 glucan과 직접 결합할 수도 있으며, 미생물 세포벽의 lipoteichoic acid가 glucan과 결합할 수도 있다<sup>22)</sup>.

*Streptococcus mutans*는 3가지의 서로 다른 glucosyltransferase를 가지고 있는데, 이들중 glucosyltransferase B(GTF-I)와 glucosyltransferase C(GTF-SI)는 주로 불용성 glucan을 생성하며, glucosyltransferase D(GTF-S)는 수용성 glucan을 주로 형성한다. 이때 불용성 glucan이 세균의 부착에 있어 더 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들 효소가 결여된 변이종을 이용한 실험의 경우 평활면 부착의 현저한 감소를 보여주며, 부착에 있어서 glucosyltransferase B와 glucosyltransferase C가 더 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>. 따라서 이번 실험에서 자당을 첨가함에 따라 X<sup>S</sup> strain 부착이 더 많이 증가된 것은 X<sup>R</sup>과 X<sup>S</sup> strain에서 glucosyltransferase의 활성에 있어서의 차이나 혹은 세포 표면의 변화로 인한 glucan과의 상호작용에 변화가 나타났음으로 해석할

수 있으며, X<sup>R</sup> strain으로의 변이 과정에서 이러한 변화가 발생하였음을 의미한다고 추정할 수 있다. 본 실험에서는 생성된 glucan의 정량적인 측정과 glucosyltransferase의 활성, 그리고 세포표면의 단백질의 변화를 비교하지 않았기 때문에 실제적인 차이가 어디에서 나타났는지 확인하기는 어렵다. 하지만, 본 실험의 결과 X<sup>S</sup> strain에 비해 X<sup>R</sup> strain에 있어서 자당의존성 수산화인회석부착 세균량이 적게 나타난 것은 임상적으로 자당의 노출이 빈번한 구강내 환경에서 X<sup>R</sup> strain은 X<sup>S</sup> strain에 비해 치아 표면에 대한 부착세균수가 적고, 이것은 치아우식유발에 차이를 나타낼 수도 있는 가능성을 내포한다 할 수 있다.

타액유도성 응집실험에서 X<sup>R</sup>군이 더 낮은 농도의 타액에서 응집반응을 보였다. 구강내 환경을 단순히 시험관내에서의 세균응집으로 완전한 검증을 이루기는 어렵지만 타액내 응집소 (agglutin)에 대한 반응성을 확인할 수 있다. 본 실험의 결과는 기존 연구에서 X<sup>R</sup> strain의 경우 응집반응이 X<sup>S</sup> strain보다 더 빨라 구강내에서 더 쉽게 응집되어 치태에서 탈락되기 쉬워진다는 연구 결과<sup>15)</sup>와 상응하는 결과를 보였다. Rosan 등<sup>24)</sup>은 비록 세포응집반응이 초기 미생물의 부착을 증진시키지만, 전체의 효과는 세균을 치태내로부터 제거하는 정화작용을 증진시킨다고 보고하였고, Simosson 등<sup>25)</sup>도 높은 타액의 응집효과가 낮은 수준의 치태 형성과 연관이 있다고 보고하였다. Trahan 등<sup>20)</sup>은 지속적인 xylitol 섭취자와 비섭취자간의 타액과 치태내의 X<sup>R</sup>과 X<sup>S</sup> strains의 수를 연구하였는데 이 연구에서 치태내의 X<sup>R</sup> strain의 비율이 상응하는 타액내 비율에 비해 상대적으로 낮으며, 이것은 치태로부터의 탈락이 용이할 수 있음을 의미하며, 치태내에서 탈락된 X<sup>R</sup> strains이 타액의 연하로 인해 쉽게 제거가 가능할 것이라고 제안하였다. 이번 연구의 결과도 역시 X<sup>R</sup> strain이 X<sup>S</sup> strain보다 치태내에서 탈락되기 용이하며, 치아우식유발능이 더 낮을 수 있다는 가능성을 보여주었다. 하지만 세포응집능에 대한 정량적 측정은 이루어지지 않았으며, 치태내의 환경과 실험에 이용된 전타액을 동일시 할 수 없기 때문에 실제 임상적인 유의성을 가지기 위해서는 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

Lavoie와 Trahan<sup>17)</sup>은 X<sup>R</sup> strain과 X<sup>S</sup> strain의 glass surface에 대한 자당의존성 수산화인회석 부착실험에서 환자분리균주(fresh isolated strain)의 경우 X<sup>S</sup> strain이 X<sup>R</sup> strain에 비해 4배 이상 많은 부착이 있었으며, 실험실보관균주(lab strain)의 경우는 오히려 X<sup>S</sup> strain이 오히려 2배 더 낮은 부착을 보였다고 보고하였다. 또한 Söderling과 Trahan<sup>15)</sup>은 타액내에서 X<sup>R</sup> strain이 2배 가량 X<sup>S</sup> strain보다 더 빨리 응집되며, 세포단백질에 대한 SDS-PAGE와 수산화인회석 부착 실험에서는 차이가 없다고 보고하였으며, 비록 부착능에는 차이가 없었으나 더 높은 응집능으로 인해 구강내에서 탈락되어 제거되기 유리하다고 보고하였다. Trahan<sup>3)</sup>은 xylitol 장기간 섭취자의 구강내에 존재하는 xylitol-resistant mutans streptococci가 치아우식유발력이 낮으며, 따라서 xylitol의 치아우식 억제 효과에 기여한다고 주장하였다. 즉 xylitol-sensitive mutans

streptococci에서 xylitol-resistant mutans streptococci로의 변화가 xylitol의 치아우식억제효과의 상실이라 볼 수 없으며, 새로운 변이종들의 감소된 독립인자가 치아우식예방 작용기전의 하나로 고려 될 수 있다고 하였다. 하지만 이와는 반대로 Assev 등<sup>26)</sup>은 X<sup>R</sup> strain과 X<sup>S</sup> strain의 우식원성 비교를 위해 산생성과 다당질 생성량을 조사하였는데, 이들의 실험에서는 X<sup>R</sup> strain과 X<sup>S</sup> strain간의 차이가 나타나지는 않았으며, 오히려 X<sup>R</sup> strains의 경우 lactate의 생산이 더 많은 것으로 보고하기도 하였다.

본 실험의 결과 X<sup>R</sup> strain의 경우 수산화인회석 부착에는 변화가 없었으나, 자당의존성 수산화인회석 부착실험에 있어서는 X<sup>S</sup> strains에 비해 세균부착량이 적었으며, 세포응집반응은 X<sup>S</sup> strain에 비해 X<sup>R</sup> strain이 더 높은 반응성을 보이는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 X<sup>R</sup> strain이 X<sup>S</sup> strain에 비해 구강내 치면 침착이 적고, 타액에 의해 응집이 잘되어 구강내에서 제거되기 유리하여, 치아우식유발능이 더 낮을 수 있다는 가능성을 보여준다. 하지만 본 실험은 이들에 대한 정확한 정량적인 측정과 임상적인 연구, 그리고 X<sup>R</sup> strains의 변이된 유전자에 대한 연구 및 세균의 독립인자의 변화에 대한 원인의 파악이 이루어지지 않았으며, xylitol의 항우식작용은 앞서 서론에 밝힌 바와 같이 미생물적인 측면이외에도 숙주에 대한 측면과 생화학적인 측면이 동시에 존재하고 있으므로 X<sup>R</sup> strain의 출현이 xylitol의 항우식작용에 미치는 영향을 쉽게 판단하기에는 어려움이 따른다.

현재까지는 X<sup>R</sup> strains에 대한 많은 연구가 이루어지지 않은 상태이며, 이들의 독립인자들에 대한 포괄적, 임상적 연구가 이루어져야 정확한 X<sup>R</sup> strain에 대한 결과를 얻을 수 있을 것이며, 이것이 대체감미제로 각광받는 xylitol의 임상적인 치아우식예방효과에 유효성을 증명하는 중요한 핵심사안이 될 것이다.

## V. 결 론

X<sup>R</sup> strain과 X<sup>S</sup> strain의 성장과 세포의 pH를 비교하고, 수산화인회석에 부착하는 정도와 타액 유도성 응집능을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. X<sup>R</sup> strain은 X<sup>S</sup> strain의 성장과 세포의 pH와 차이를 나타내지 않았다.
2. X<sup>R</sup> strain과 X<sup>S</sup> strain은 수산화인회석 부착능에 있어서 차이를 나타내지 않았으나(p>0.05), 자당 의존성 수산화인회석 부착에서는 X<sup>R</sup> strain에 비해 X<sup>S</sup> strain이 더 높은 부착능을 나타내었다(p<0.05).
3. 타액유도성 응집에서는 X<sup>R</sup> strain이 더 낮은 타액의 농도에서도 응집 반응을 보였다.

참고문헌

1. Abo H, Matsumura T, Kodama T, et al. : Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water insoluble glucan synthetase). J Bacteriol, 173:989-996, 1991.
2. Newbrun E : Cariology 3rd ed. Quintessence book, 1989.
3. Trahan L : Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque - its clinical significance. International Dental Journal, 45:77-92, 1995.
4. Assev S, Rolla G : Further studies on the growth inhibition of *Streptococcus mutans* OMZ 176 by xylitol. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand, 94:97-102, 1986.
5. Forbord B, Osmundsen H : On the mechanism of xylitol dependent inhibition of glycolysis in *Streptococcus sobrinus* OMZ 176. Int J Biochem, 24:509-514, 1992.
6. Bird L, Baum BJ, Makinen KK, et al. : Xylitol associated changes in amylase and protein content of monkey parotid saliva. J Nutr, 107:1763-1767, 1977.
7. Makinen KK, Tenovuo J, Scheinin A : Xylitol-induced elevation of lactoperoxidase activity in human saliva. J Dent Res, 55:652-660, 1976.
8. Makinen KK, Virtanen KK, Makinen PL, et al. : Enzyme levels of parotid saliva after stimulation with xylitol and sucrose. Caries Res, 14:164-165, 1980.
9. Gauthier L, Vadeboncoeur C, Mayrand D : Loss of sensitivity to xylitol by *Streptococcus mutans* LG-1. Caries Res, 18:289-296, 1984.
10. Trahan L, Mouton C : Selection for *Streptococcus mutans* with an altered xylitol transport capacity in chronic xylitol consumers. J Dent Res, 66:982-988, 1987.
11. Trahan L, Bareil M, Gauthier L, et al. : Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. Caries Res, 19:53-63, 1985.
12. Benchabane H, Buckley ND, Trahan L, et al. : Inactivation of the *Streptococcus mutans* fxpC gene confers resistance to xylitol, a caries-preventive natural carbohydrate sweetener. J Dent Res, 81(6):380-386, 2002.
13. Berkers H : Influence of xylitol on growth, establishment, and cariogenicity of *Streptococcus mutans* in dental plaque of rats. Caries Res, 22:166-173, 1988.
14. Lafleche RG, Trahan L : EM study of the polysaccharides of xylitol-sensitive and xylitol-resistant *S. mutans* fresh isolates. J Dent Res, 67:325, 1988.
15. Söderling E, Trahan L : Altered agglutination pattern of xylitol-resistant *S. mutans* 10449 cells. J Dent Res, 71:734, 1992.
16. Söderling E, Trahan L, Lenander-Lumikari : Growth of xylitol-resistant versus xylitol-sensitive *S. mutans* strains in saliva. Acta Odontol Scand, 56:116-121, 1998.
17. Lavoie L, Trahan L : Sucrose mediated hard surface adherence of xylitol-sensitive and xylitol-resistant *S. mutans* fresh isolates and laboratory strains. J Dent Res, 67:325, 1988.
18. Trahan L., Bourgeau G., Breton R. : Emergence of multiple xylitol-resistant(fructose PTS-) mutans from human isolates of mutans streptococci during growth on dietary sugars in the presence of xylitol. J Dent Res, 75(11):1892-1900, 1996.
19. Levin MJ, Herzberg MC, Levine MS, et al. : Specificity of salivary-bacterial interactions: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoprotein with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. Infect Immun, 19:107-115, 1978.
20. Trahan L, Söderling E, Drean MF, et al. : Effect of xylitol consumption on the plaque-saliva distribution of mutans streptococci and the occurrence and long-term survival of xylitol resistance strain. J Dent Res, 71:1785-1791, 1992.
21. Gauthier L, Thomas S, Gagnon G, et al. : Positive selection for resistance to 2-deoxyglucose gives rise, in *Streptococcus salivarius* to seven classes of pleiotropic mutans, including ptsH and ptsI missense mutans. Molecular Microbiol, 13:101-1109, 1994.
22. Vickerman MM, Jones GW : Sucrose-dependent accumulation of oral streptococci and their adhesion-defective mutans on saliva-coated hydroxyapatite. Oral Microbiol Immunol, 10:175-182, 1995.
23. Tsumori H, Kuramitsu H. : The role of the

- Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role the GtfC enzyme. *Oral Microbiol Immunol*, 12:274-280, 1997.
24. Rosan B, Appelbaum B, Golub E, et al. : Enhanced saliva-mediated bacterial aggregation and decreased bacterial adhesion in caries-resistant versus caries-susceptible individuals. *Infect Immun*, 38:1056-1059, 1982.
25. Simonsson T, Ronstrom A, Rundergren J, et al. : Rate of plaque formation-some clinical and biochemical characteristics of 'heavy' and 'light' plaque former. *Scand J Dent Res*, 95:97-103, 1987.
26. Assev S, Stig S, Scheie AA : Cariogenic traits in xylitol-resistant and xylitol-sensitive mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol*, 17:95-99, 2002.



Abstract

A STUDY ON THE CELL PROPERTY OF XYLITOL-RESISTANT  
*STREPTOCOCCUS MUTANS* AND XYLITOL-SENSITIVE *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Hong-Mo Lee, Jung-Wook Kim, Ki-Taeg Jang, Sang-Hoon Lee,  
Se-Hyun Hahn, Chong-Chul Kim

*Department of Pediatric Dentistry, Seoul National University*

Xylitol has been used as sugar substitute to prevent dental caries. It is not fermented by most dental plaque bacteria and interferes with the growth of mutans streptococci. Therefore the production of acidic metabolites and the growth of mutans streptococci are inhibited. *S. mutans* strains which are inhibited to grow under the presence of xylitol are referred as xylitol-sensitive( $X^S$ )strains. However, experimental and clinical studies have shown that there were mutated groups of *S. mutans* strains that are not affected by xylitol. They are referred as xylitol-resistant( $X^R$ ) strains.

The aim of the present study was to investigate that emergence of  $X^R$  strain would effect on the anticariogenicity of xylitol by comparing the growth rate, the extracellular pH, hydroxyapatite adhesion and the agglutination of the  $X^R/X^S$  strains.

Overall we came out with following results :

1. No difference in the growth rate and the extracellular pH was found between the  $X^S$  strain and the  $X^R$  strain.
2. No difference in adhesion to hydroxyapatite surface was found between the  $X^R$  strain and the  $X^S$  strain ( $p>0.05$ ) and adhesion of the  $X^S$  strain was greater than that of  $X^R$  strain in the sucrose-dependent adhesion to hydroxyapatite ( $p<0.05$ ).
3. The  $X^R$  strain was agglutinated in the lower concentration of saliva than that of  $X^S$  strains.

**Key words** : Xylitol, *Streptococcus mutans*, Xylitol-resistant, Hydroxyapatite adhesion, Agglutination