

분획으로 분리한 *Streptococcus mutans* KCTC 3065 다당류의 화학적 특성

한만덕, 이준우¹, 나수정, 이은숙, 전은숙²

김천대학 치위생과, ¹경북전문대 식품가공과, ²대구가톨릭대 위생과학과

색인 : *Streptococcus mutans*, 세포외다당류, 세포벽다당류, 글루칸, 분리, 특성

1. 서 론

Mutans streptococci는 구강에서 상재하는 통성 혐기성 세균으로 mannitol과 sorbitol을 모두 발효시키며, sucrose에서 배양할 경우 많은 양의 세포외 다당류(extracellular polysaccharide, 이하 ECP)를 생성한다. 균체의 혐막을 구성하는 ECP는 주로 glucan과 levan의 화학적 특성을 갖고 있다. 특히 glucan은 sucrose가 기질로 제공될 때 세포의 glucosyltransferase에 의해 세포표면에서 합성되며, 치면세균막의 matrix형성, 세균의 치면부착, 기타 이종 세균류의 응집 등에 관여하며, 치아 표면에서 생성된 발효산물(주로 acid)을 국소적으로 잔존시켜 치질의 탈회를 촉진시키는데 관여한다¹⁾. 또한

glucan은 타액성 pellicle에 선택적인 부착이 가능하며, 건강한 치아에 다른 세균의 선택적 부착을 유도하는 특성 때문에 많은 연구자들의 관심대상이 되어 왔다²⁾. 최근 Wiater 등³⁾은 우식성 streptococci 다당류의 분자적 구조에 관한 연구에서, 불용성 glucan은 1,3 및 1,6 결합이 가장 많고 3,6결합이 주 branch를 갖는 (1→3),(1→6)- α -D-glucan이며, 균주에 따라 glucan의 결합은 매우 다양한 것으로 보고 하였다.

Mutans streptococci를 구성하는 또 다른 다당류는 균체내 저장성 다당류(intracellular polysaccharide, 이하 IPS)와 세포벽 다당류(cell wall polysaccharide, 이하 CWP)이다. IPS는 sucrose와 같은 기질이 풍부한 조건에서 당을 분해한 후

glycogen과 유사한 물질로 세포질 내에 저장되었다가 외부 구강환경의 식이성 당이 결핍되면 분해되어 산 생성을 지속하는데 이용된다⁴⁵⁾. 반면에 CWP는 주로 세포 골격을 유지하며 아미노산과 결합된 hexosamine성의 당들로 구성되어 있다⁶⁷⁾. Bleiweis가 보고한 *S. mutans*의 세포벽에 관한 연구에 의하면 1) rhamnose, glucose 및 galactose 2) galactose와 rhamnose로 구성되어 있으며, 이중 가장 보편적인 다당류로는 glucose와 rhamnose이며, 세포벽 구성당의 정성적 및 정량적 조성은 균주에 따라 차이가 있는 것으로 보고되었다⁸⁹⁾. Mukasa와 Slade는 *S. mutans* Group A의 세포벽 항원성에 대해서 연구하였으며, 항원특이성은 다당류가 갖는 D-glucose의 서열에 의존된다고 보고하였다¹⁰⁾.

이상과 같이 *S. mutans*의 다당류는 치면세균막 형성에 의한 치아우식증 유발, 표면 항원성 다당류에 의한 면역반응 유도, 그리고 심내막염 감염 등에 작용한다. 이 같은 작용은 인체에 대한 부정적인 효과를 의미하며, 그 외 또 다른 생리활성 작용을 유도할 가능성이 있다. 따라서 본 연구는 *S. mutans* 다당류의 생리적 활성을 알아보기 위해 우선적인 연구로 균체에서 다당류를 분리하고 그 화학적 특성을 알아 보았다.

2. 연구재료 및 방법

2.1. 균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 *Streptococcus mutans* KCTC 3065이었으며, 균주의 보관 및 배양은 brain heart infusion medium을 사용하였다.

2.2. 시약

실험에 사용한 시약과 dialysis tubing bag(M.W. cut off 10,000)은 Sigma사 제품을 사용하였으며, 단백질 정량은 Pierce사의 정량 kit를 사용하였다.

2.3. 배양

pH 5.5로 조정된 100 ml의 brain heart infusion 배지를 15 lb에서 15분간 고압 멸균하였다. *S. mutans*를 1 loop접종하고 혐기자(BBL Co.)에서 37°C로 2일간 배양하였다.

2.4. 균체의 및 세포벽성 다당류의 분리

배양액으로부터 세포외성 다당류와 세포벽성 다당류의 추출 방법은 한 등¹¹⁾의 방법을 변형하여 실행하였다(Fig. 1). ECP의 추출 및 분리는 다음과 같이 실행하였다. 3일간 배양된 100 ml의 균배양액을 6000×g에서 원심 분리한 후, 수획된 침전물에 20 ml의 saline을 넣고 강하게 흔들어 수세한 다음 상기와 동일한 조건으로 원심 분리하였다. 이와 같은 수세방법으로 3회 반복하여 얻어진 모든 상정액에 TCA(trichloroacetic acid)를 최종 농도 2.5%가 되도록 첨가하였다. 그 후 상정액에 70%의 농도가 되도록 에탄올(99.9%)을 가하고 냉장고에서 하루동안 방치하였다. 방치된 용액은 원심분리(6000×g)함으로써 ECP 분획을 침전시켰다. 침전된 다당류 분획은 다시 증류수에 희석시킨 후 dialysis tubing bag(M.W. cut off 10,000)에 넣어 흐르는 물에서 5일 동안 투석시켰다. 최종적으로 투석된 분획들은 6000×g에서 원심 분리하고 동결건조 함으로써 ECP를 분리하였다.

CWP의 추출과정은 다음과 같다. 앞서 ECP를 얻기 위해 1차 원심 분리를 하여 얻어진 침전물에 100 ml의 증류수를 가하고 3N의 농도가 되도록 NaOH를 가하고 12시간동안 교반시켰다. 교반된 용액은 위상차 현미경을 이용하여 세포벽의 파쇄를 확인한 후에 acetic acid를 가하여 중화 한 다음, 원심 분리하여 cell debris를 침전시켜 제거하였다. 상정액은 3배량(v/v)의 에탄올을 가하여 하루동안 방치시켜 다당류를 침전시킨 후, 고속원심분리기(Beckman XL-90)로 원심분리(15,000×g)하여 세포벽 성분을