



C O M M O N S D E E D

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 미차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



한국인의 교정환자로부터 새로운 생물형의 *Streptococcus mutans* 분리

Isolation of a new biotype of *Streptococcus mutans*
in Korean orthodontic patients

2005년 2 월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

정 동 기

한국인의 교정환자로부터 새로운 생물형의
Streptococcus mutans 분리

지도교수 김 광 원

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2004년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

정 동 기

정동기의 박사학위 논문을 인준함.

위원장	전북대학교	교수	김정기	인
위원	조선대학교	교수	김광원	인
위원	조선대학교	교수	김수관	인
위원	조선대학교	교수	임성훈	인
위원	조선대학교	교수	국중기	인

2004년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iv
I. 서 론	1
II. 연구 재료 및 방법	3
III. 연구결과	9
IV. 총괄 및 고안	25
V. 결 론	28
참고문헌	29

표 목 차

Table 1. Bacterial strains used in this study	3
Table 2. Interpretive standards for dilution susceptibility testing	8
Table 3. Biochemical tests of <i>Streptococcus mutans</i> isolated from Koreans	9
Table 4. Homology analysis of 16S rDNA sequences of <i>Streptococcus mutans</i> isolated from Koreans	17
Table 5. Minimum inhibitory concentration of antibiotics against <i>S. mutans</i> isolated from Koreans	19

도 목 차

Figure 1. Alignment of 16S rDNA sequence from <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T , <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478, <i>S. rattus</i> ATCC 19645, and clinical isolates from Korean orthodontic patients	10
Figure 2. Dendrogram derived from homology analysis from 16S rDNA sequence of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T , <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478, <i>S. rattus</i> ATCC 19645, and clinical isolates of <i>S. mutans</i> from Korean orthodontic patients	18
Figure 3. Growth curve and Change of pH in the culture solution of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T , <i>S. sobrinus</i> KCTC 3065, and <i>S. rattus</i> KCTC 3655 ^T in TH broth during 24 h	21
Figure 4. Growth curve and Change of pH in the culture solution of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T , <i>S. sobrinus</i> KCTC 3065, and <i>S. rattus</i> KCTC 3655 ^T in TH broth containing 0.2% sucrose during 24 h	22
Figure 5. Growth curve and Change of pH in the culture solution of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T , <i>S. sobrinus</i> KCTC 3065, and <i>S. rattus</i> KCTC 3655 ^T in TH broth containing 0.3% arginine during 24 h	23
Figure 6. Growth curve and Change of pH in the culture solution of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T , <i>S. sobrinus</i> KCTC 3065, and <i>S. rattus</i> KCTC 3655 ^T in TH broth containing 0.2% sucrose and 0.3% arginine during 24 h	24

ABSTRACT

Isolation of a new biotype of *Streptococcus mutans* in Korean orthodontic patients

Jeong, Dong Ki, D.D.S., M.S.D.

Advisor : Prof. Kim, Kwang-Won, D.D.S., M.S.D., Ph. D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

The 8 clinical strains of *S. mutans* were identified using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method based on dextranase gene. The aim of this study was to confirm the identification of the *S. mutans* strains using a 16S ribosomal RNA coding gene (16S rDNA) cloning and sequencing method, and to characterize the strains using biochemical and antibiotic susceptibility tests. The 16S rDNAs were amplified from the each of the clinical isolates by PCR using the universal primers for the bacteria. The amplicons were directly ligated with the pGEM-T easy vector. The insert DNA was sequenced using the dideoxy chain termination method. The biotype of the clinical isolates of *S. mutans* was determined by their ability to ferment 4 carbohydrates (mannitol, sorbitol, raffinose, and melibiose) and to deaminate arginine. The minimal inhibitory concentration for seven antibiotics against the clinical isolates of *S. mutans* was measured by a broth dilution assay. The results showed that the similarity of the nucleotide sequences from all of the clinical isolates was > 99% compared with that from *S. mutans* ATCC 25175^T. Six out of the 8 strains was biotype IV [Man(+), Sor(+), Raf(-), Mel(-), and Arg(-)] such as *S. sobrinus*. The remaining 2 strains of *S. mutans* did not coincide with the general biotype of

mutans streptococci. The 2 strains have the ability to ferment mannitol and sorbitol and to deaminate arginine. To our knowledge, this is a new biotype [Man(+), Sor(+), Raf(-), Mel(-), and Arg(+)], in which the two strains were named biotype VII. The susceptibility of these the 8 *S. mutans* strains to 7 antibiotics varied according to the strain. This indicates that the clinical isolates of *S. mutans* isolated from Korean subjects are similar to the type strain at the genetic level but there was some difference in the phenotype.

I. 서 론

구강 내에서 빈번하게 발생하는 양대 구강병 중 하나인 치아우식증의 발병에 있어서 세균의 존재가 필수적임이 무균동물을 이용한 실험^{11,24)}에서 밝혀졌다. 이후 여러 연구에 의하여 현재 치아우식증의 유발에 관여한다고 알려진 연쇄상구균을 총칭하여 mutans streptococci(뮤탄스 연쇄상구균)라고 하고, 사람에서 주로 분리되는 *Streptococcus mutans* 및 *S. sobrinus* 종, 원숭이에서 분리되는 *S. downei*과 *S. macacae*, 백서에서 분리되는 *S. rattus*과 *S. ferus*, 그리고 햄스터에서 분리되는 *S. cricetus* 등이 여기에 포함된다고 알려져 있다³⁷⁾.

일반적으로 병원성세균을 검출하는 방법으로는 병소 샘플에서 현미경을 이용하여 직접 관찰하는 방법, 세균배양법, 생화학 검사법, 간접면역형광법, 종특이 DNA 프로브법, 중합효소연쇄반응법 등이 있다. 이러한 방법들 중 뮤탄스 연쇄상구균은 선택배지인 mitis-salviarius bacitracin(MSB) agar¹³⁾를 이용하여 분리 동정할 수 있다. 하지만, 이러한 전통적인 방법은 비교적 정확하지 않고, 시간과 노동력이 많이 든다는 단점이 있다. 최근 이러한 7종의 뮤탄스 연쇄상구균들 중 *S. macacae* 및 *S. ferus* 균종을 제외한 나머지 5종의 뮤탄스 연쇄상구균을 dextranase 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 중합효소연쇄반응 프라이머를 설계하고, 이들의 반응산물을 *HaeIII* 제한효소로 절단한 다음 이들의 제한효소절편길이다양성을 전기영동으로 관찰하여 이들을 동정하는 방법이 개발되었다¹⁸⁾. 이러한 유전자형에 의한 뮤탄스 연쇄상구균의 분류이외에도 면역학적 방법을 이용한 혈청형(serotype)^{3,5,6,28)}이나, 생화학적 검사에 의한 생물형(biotype)^{32,33)}으로 뮤탄스 연쇄상구균을 분류하기도 한다. 현재까지 8가지(a-h) 혈청형^{3,6,28)}과, 6가지(I-VI) 생물형^{31,32,33)}이 존재하는 것으로 알려져 있다.

뮤탄스 연쇄상구균의 생물형의 분류에 의하면, 4가지 당질(mannitol, sorbitol, raffinose 및 melibiose)의 발효능과 arginine의 가수분해능 유무에 따라 구별한다. 제I형은 4가지 모든 당질을 발효시킬 수 있고, 제III형은 산소가 존재할 때

는 mannitol을 발효시킬 수 없지만, 혐기성 상태에서는 발효시킬 수 있고, 제V형은 melibiose를 제외한 모든 당질을 발효시킬 수 있는 균주들이다. 이러한 제I형, 제III형 및 제V형은 모두 arginine을 가수분해시킬 수 없고, *S. mutans* 균종에 속하는 것으로 알려져 왔다. 제II형은 모든 당질을 발효시킬 수 있으면서 arginine을 가수분해시킬 수 있는 것으로 *S. rattus*가 여기에 속한다. 또한, 제IV형은 4가지 당질 중에서 mannitol만을 또는 mannitol과 sorbitol만을 발효시킬 수 있고, arginine을 가수분해 시킬 수 없는 균주들로서, *S. sorbriuns* 균종이 여기에 속한다. 나머지 제VI형은 mannitol과 melibiose만을 발효시킬 수 있고, arginine을 가수분해시키지 못하는 균주로 원숭이에서 분리 동정된 혈청형 h인 *S. downei*(*S. mutans* serotype h)가 여기에 속한다. 최근 김¹⁾은 한국인의 교정환자의 브라켓 주변 및 인접 치면세균막에서 뮤탄스 연쇄상구균을 dextranase 유전자 핵산염기서열을 이용한 중합효소연쇄반응 및 제한효소절편길이다양성을 통하여 종 수준에서 동정하는 연구 결과를 발표하였다. 그 결과 *S. mutans*에서는 아직까지 보고되지 않은 생물형들이 발견되었다.

본 연구는 이들 균주들의 정확한 종 수준에서의 동정을 위해, 현재 세균 분류학적 측면에서 가장 신뢰성이 있는 것으로 알려진 16S rDNA 유전자 핵산염기서열결정법을 이용하여 이들 균주들을 동정하고자 하였다. 또한 이들 균주들의 특성을 알아보기 위해 7종 항생제에 대한 감수성 실험을 실시하였으며, 특히, arginine deiminase system이 잘 밝혀진 생물형 제II형인 *S. rattus*를 이용하여 arginine 존재가 치면세균막 내 pH 변화에 미치는 영향을 실험하여, arginine을 가수분해할 수 있는 *S. mutans* 균주들의 치면세균막 내의 산도 변화에 미치는 영향을 간접적으로 알아보고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세균 및 세균 배양

본 연구에 이용된 균주는 Table 1과 같았으며, 표준균주 및 참고균주들은 American type culture collection(ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA) 또는 한국유전자은행(Korean collection for type culture, KCTC, Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 또한 임상 분리 균주들은 조선대학교 치과대학 구강생화학교실에서 분양받아 사용하였다. 이를 세균들은 Todd Hewitt broth(TH broth, Difco, Lab., Detroit, MI, USA)에 접종하고, 37 °C CO₂ 세균 배양기에서 24시간 배양하여 다음의 실험에 이용하였다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strains	
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ^T	Type strain
<i>Streptococcus sobrinus</i> KCTC 3065	Reference strain
<i>Streptococcus rattus</i> KCTC 3655 ^T	Type strain
<i>Streptococcus mutans</i> ChDC YM14	Clinical isolate from Korean
<i>Streptococcus mutans</i> ChDC YM16	Clinical isolate from Korean
<i>Streptococcus mutans</i> ChDC YM37	Clinical isolate from Korean
<i>Streptococcus mutans</i> ChDC YM38	Clinical isolate from Korean
<i>Streptococcus mutans</i> ChDC YM42	Clinical isolate from Korean
<i>Streptococcus mutans</i> ChDC YM64	Clinical isolate from Korean
<i>Streptococcus mutans</i> ChDC YM65	Clinical isolate from Korean
<i>Streptococcus mutans</i> ChDC YM66	Clinical isolate from Korean

ATCC : American type culture collection

KCTC : Korean collection for type culture

ChDC : Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

2. 생물형 결정

Dextranase 유전자를 이용한 분자생물학적 방법으로 *S. mutans*라고 동정된 균주들의 생물형을 결정하기 위하여 다음의 생화학 검사를 시행하였다. 생물형의 판정 기준은 Shklair와 Keen³²⁾의 방법에 따라 시행하였다.

2-1. 당(mannitol, sorbitol, raffinose 및 melibiose) 분해능 실험

이는 세균이 배지 내에 포함되어 있는 특이 당질을 발효시킬 수 있는 능력을 알아보는 실험이다. Phenol red broth(Difco, Lab.)에 mannitol, sorbitol, raffinose 및 melibiose가 각각 1% 포함되도록 넣고, 이를 통상적인 방법으로 가압멸균한 후 200 μl 씩 96-well plate에 분주하였다. 24시간 동안 TH broth에서 배양한 20 μl 의 세균 배양액을 미리 분주해놓은 당이 첨가된 배지에 접종하고, 이를 48 시간동안 10% CO₂가 공급되는 37°C 세균 배양기에서 배양하였다. 이때 노란색일 경우 강한 양성(+), 오렌지색일 경우 약한 양성(±), 약한 붉은 색일 경우 음성(-)으로 판정하였다.

2-2. Arginine 가수분해능

이는 arginine dihydrolase에 의한 암모니아의 생성여부를 알아보는 실험이다. 먼저 TH broth에서 24시간 뮤탄스 연쇄상구균을 배양하고, 이들 세균배양액 20 μl 를 0.5% yeast extract, 0.5% tryptone, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% dextrose, 0.3% L-arginine hydrochloride가 혼합된 배지 200 μl 에 접종하여 48 시간동안 10% CO₂가 공급되는 37°C 세균 배양기에서 배양하였다. 여기에 20 μl 의 네슬러 용액(5% KI, 2% HgCl₂, 1N NaOH)을 떨어트려 짙은 갈색을 띠면 양성(+), 변화가 없으면 음성(-)으로 판정하였다.

3. 세균 genomic DNA의 추출

위 실험 1에서 *S. mutans*를 TH 액체배지에서 다시 배양한 세균배양액 1 mL 를 10,000x g 의 원심력을 이용하여 수확하고, 이를 G-spinTM Genomic DNA

Extraction Kit(iNtRON Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 이를 간략하게 설명하자면 다음과 같다. 세균을 수확한 다음 $50 \mu\text{l}$ 의 Pre-incubation 용액과 $3 \mu\text{l}$ 의 lysozyme 용액을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C 에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 $250 \mu\text{l}$ 의 G-buffer 용액을 넣고 잘 혼합한 다음 65°C 에서 15분간 반응시키고, $250 \mu\text{l}$ 의 Binding 용액을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spinTM column에 넣고 $13,000 \text{ rpm}$ 에서 1분간 원심분리한 후 column에 $500 \mu\text{l}$ 의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 $500 \mu\text{l}$ 의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spinTM column을 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 여기에 $100 \mu\text{l}$ 의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 $13,000 \text{ rpm}$ 에서 1분간 원심분리하여 genomic DNA를 추출하였다.

4. 중합효소연쇄반응을 이용한 16S rDNA의 증폭

앞에서 추출한 *S. mutans* 임상분리 균주들의 genomic DNA를 이용하여 16S rDNA 유전자를 클로닝하였다. 즉, 대부분의 세균의 16S rDNA 유전자를 증폭할 수 있는 universal PCR primer(27F; 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3', 1492R; 5'-TAC GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), AccuPower[®] Premix(Bioneer Corp. Deajeon, Korea)와 PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) PCR machine을 이용하여 16S rDNA를 증폭하였다. 이때 PCR의 조건은 다음과 같이 시행하였다. $20 \mu\text{l}$ 의 PCR 혼합용액이 되도록 20 pmoles 씩의 forward 및 reverse primers와 100 pg 의 세균 genomic DNA를 넣고 94°C 에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94°C 에서 1분간 변성, 55°C 에서 1분간 annealing, 72°C 에서 1분간 extension하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72°C 에서 10분간 extension하였다. 최종 반응물을 $2 \mu\text{l}$ 씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

5. 증폭된 16S rDNA의 클로닝 및 플라스미드 DNA 추출

앞에서 증폭한 16S rDNA를 pGEM-T easy vector(Promega Corp., Madison, WI, USA)에 제조회사의 지시에 따라 직접 클로닝하였다. 이때 삽입 유전자가 들어간 흰색 군락을 3 개씩을 선택하여 플라스미드를 추출하여 클로닝 성공여부를 결정하였다.

E. coli DH5α에 transformation시킨 각각의 재조합된 플라스미드 DNA는 통상의 alkaline lysis법³¹⁾으로 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp.)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 이를 간략히 설명하면, 세균배양액 1 ml를 30초간 원심분리(12,000x g)하고, 얻어진 세균 덩어리를 250 μl의 Resuspension buffer를 가하여 잘 혼탁한 후, 250 μl Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 μl의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 혼합한 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 100분간 원심분리(12,000x g)하여 상청액을 binding column tube에 옮기고, 1 분간 원심분리(12,000x g)하였다. 여과액은 버리고, binding column tube에 80% 에탄올을 700 μl 넣은 후 1분간 원심분리(12,000x g)하였다. binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 30초간 원심분리(12,000 x g) 하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 μl의 Elution buffer를 넣고 1분간 기다린 다음 다시 1분간 원심분리(12,000x g)하여 여과액을 -70℃에서 보관하여 핵산염기서열 결정에 사용하였다.

6. 핵산염기서열 결정 및 핵산염기서열의 상동성 검색

핵산염기서열 결정은 Bioneer 사에 의뢰하여 결정하였다. 이때 사용되는 프라이머는 ChDC-GEM-F(5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3'), Seq-F1(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'), Seq-R2(5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'), F16(5'-TAG ATA CCC YGG TAG TCC-3'), 및 ChDC-GEM-R(5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA

AC-3')를 이용하였으며, 그 결과는 SeqMan 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc., Maidison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다.

위에서 결정된 핵산염기서열을 GenBank 등의 데이터 베이스를 통하여 상동성 검색을 하여 *S. mutans* ATCC 25175^T의 것과 98% 이상의 상동성을 보이는 것을 *S. mutans* 균주라고 판정하였다

7. 항생제 감수성 실험

본 실험에서는 penicillin G, amoxicillin, Augmentin, ciprofloxacin, cefuroxime, erythromycin, 및 vancomycin 등 총 7개의 항생제를 씨그마사(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 여러 항생제에 대한 최소억제농도(minimal inhibitory concentration: MIC)는 Murray와 Jorgensen²⁵⁾의 방법에 따라 액체 배지 희석법으로 측정하였다. 이를 간략히 설명하면, 각각의 항생제의 농도가 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0 µg/ml 되도록 조절된 0.1 ml의 액체배지에, 450 nm의 파장에 대한 흡광도(A₄₅₀)가 0.05로 일정하게 혼탁된 세균배양액을 각각 0.1 ml씩 접종하고, 이를 각각의 세균에 최적의 성장 조건에서 48시간 배양한 후 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과를 음성대조군인 세균을 넣지 않은 배지의 흡광도 값과 비교하여 MIC 값으로 결정하였다. 이때 양성대조군으로는 항생제를 넣지 않고 세균 배양액으로 하였다. 이때 항생제에 대한 각각의 세균 균주의 민감도는 Table 2를 기준으로, 민감도를 결정하였다.

Table 2. Interpretive standards for dilution susceptibility testing [NCCL, 1997, 1999]

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Penicillin G (PEN)	8		16
Amoxicillin (AMX)	8		16
Augmentin (AMC)	8 or 4		32 or 16
Ciprofloxacin (CIP)	1	2	4
Cefuroxime axetil (CMX)	4	8-16	32
Erythromycin (ERY)	0.5	1-4	8
Vancomycin (VAN)	8		16

8. Arginine 첨가에 의한 및 세균 배양액의 수소이온농도지수(pH)의 변화

Arginine을 가수분해 할 수 있는 균주들에 의한 치면세균막 내 수소이온농도의 감소효과를 간접적으로 알아보기 위하여, arginine을 가수분해 할 수 있는 *S. rattus*와 그렇지 못하는 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*의 표준균주를 1) TH broth에서만 배양한 군, 2) TH broth에 sucrose를 0.2%가 되도록 첨가하여 배양한 군, 3) TH broth에 arginine이 0.3%가 되도록 첨가하여 배양한 군, 그리고 4) TH broth에 sucrose와 arginine이 각각 0.2%와 0.3%가 되도록 첨가하여 배양한 군으로 나누어 24시간 동안 배양하여 세균 성장과 세균 배양액의 수소이온농도 변화를 측정하였다. 각각의 실험군의 세균 성장은 Microplate Autoreader(Model: EL311SX, BIO-TEX Instruments Inc., Cortland, NY, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도(A₄₅₀)를 측정하여 구하였으며, 세균 배양액의 수소이온농도지수는 pH electrode(Model 91-5/06, Orion Research Inc., Boston, MA, USA)와 pH meter(Model 920, Orion Research Inc.)를 이용하여 측정하였다. 이때, 450 nm에서 흡광도(A₄₅₀)에서 0.1이 되도록 희석한 세균 배양액 500 μl 를 새로운 배지 20 ml에 초기 접종하여 세균 배양하였다. 그리고, 세균 성장과 세균 배양액의 수소이온농도 변화는 처음 19 시간 동안은 1 시간 간격으로 측정하였고, 그 후에는 23 시간째와 24 시간째에 측정하였다. 각각의 실험군은 3 배수씩 실험하였으며, 결과는 평균값으로 나타내었다.

III. 연구결과

1. 한국인에서 분리한 *S. mutans* 임상균주들의 생물형 결정

한국인의 교정환자 8명으로부터 얻은 8개의 *S. mutans* 임상균주들의 생화학 검사를 실시한 결과 지금까지 알려지지 않은 형(type)이 2 균주(ChDC YM16과 ChDC YM42)였고, 6 균주는 생물형 제IV형이었다(Table 3).

Table 3. Biochemical tests of *Streptococcus mutans* isolated from Koreans

Strain	Man	Sor	Raf	Mel	Arg	Biotype
ChDC YM16	+	+	-**	-	+	ND
ChDC YM42	+	+	-	-	+	ND
ChDC YM14	+	+	-	-	-	IV
ChDC YM37	+	+	-	-	-	IV
ChDC YM38	+	+	-	-	-	IV
ChDC YM64	+	+	-	-	-	IV
ChDC YM65	+	+	-	-	-	IV
ChDC YM66	+	+	-	-	-	IV

ChDC : Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

Man : fermentation of mannitol

Sor : fermentation of sorbitol

Raf : fermentation of raffinose

Mel : fermentation of melibiose

Arg : hydrolysis of arginine

+ : Positive reaction

- : Negative reaction

ND : Not determined

2. 한국인에서 분리한 *S. mutans* 임상균주들의 16S rDNA 핵산염기서열 결정 및 분석

한국인의 교정환자에서 분리된 *S. mutans* 임상균주들의 16S rDNA를 클로

닝하여 핵산염기서열을 결정한 결과 *S. mutans* ATCC 25175^T 표준균주의 것과 98% 이상 상동성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1과 Table 4). 일반적으로 생물형 제IV형이 *S. sobrinus*이기 때문에 본 연구에서 얻은 생물형 제IV형 균주들과 *S. sobrinus* ATCC 33478 균주의 16S rDNA 핵산염기서열을 비교한 결과 상동성이 90.2-94.7%인 것으로 조사되었다. 또한 16S rDNA 핵산염기서열만을 비교할 때, *S. mutans*는 *S. sobrinus*보다 *S. rattus*와 상동성이 높았다(Fig. 2).



Fig. 1. Alignment of 16S rDNA sequence from *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478, *S. rattus* ATCC 19645, and clinical isolates from Korean orthodontic patients.

	150	160	170	180	190	200	210	
140	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAATATTAAATTATTGCATGATAATTGAT							ATCC 25175
138	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAATATTAAATTATTGCATGATAATTGAT							ChDC YM160
138	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAATATTAAATTATTGCATGATAATTGAT							ChDC YM42
138	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAATATTAAATTATTGCATGATAATTGAT							ChDC YM14
138	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAATATTAAATTATTGCATGATAATTGAT							ChDC YM37
138	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAATATTAAATTATTGCATGATAATTGAT							ChDC YM38
138	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAATATTAAATTATTGCATGATAATTGAT							ChDC YM64
138	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAATATTAAATTATTGCATGATAATTGAT							ChDC YM65
138	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAATATTAAATTATTGCATGATAATTGAT							ChDC YM66
132	GATAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAAGAGGAGTTAAGTCACTATGTTAAGTGT							Ss ATCC 33478
120	ATTAGCGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAACCGATAAGAGAGTTAACACATGTTAGACGCT							Sr ATCC19645
	<hr/>							
	220	230	240	250	260	270	280	
210	TGAAAGATGCAAGCGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAAAGAGCTTA							ATCC 25175
208	TGAAAGATGCAAGCGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAAAGAGCTTA							ChDC YM16
208	TGAAAGATGCAAGCGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAAAGAGCTTA							ChDC YM42
208	TGAAAGATGCAAGCGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAAAGAGCTTA							ChDC YM14
208	TGAAAGATGCAAGCGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAAAGAGCTTA							ChDC YM37
208	TGAAAGATGCAAGCGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAAAGAGCTTA							ChDC YM38
208	TGAAAGATGCAAGCGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAAAGAGCTTA							ChDC YM64
208	TGAAAGATGCAAGCGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAAAGAGCTTA							ChDC YM65
208	TGAAAGATGCAAGCGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAAAGAGCTTA							ChDC YM66
202	TAAAAGAAGCATTGCTTCACTATCAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTTA							Ss ATCC 33478
190	TGAAAGATGCAAGAGCATCACTAGTAGATGGACCTGCCGTGTATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTTA							Sr ATCC19645
	<hr/>							
	290	300	310	320	330	340	350	
280	CCAAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTATGCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							ATCC 25175
278	CCAAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTATGCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							ChDC YM16
278	CCAAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTATGCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							ChDC YM42
278	CCAAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTATGCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							ChDC YM14
278	CCAAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTATGCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							ChDC YM37
278	CCAAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTATGCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							ChDC YM38
278	CCAAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTATGCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							ChDC YM64
278	CCAAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTATGCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							ChDC YM65
278	CCAAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTATGCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							ChDC YM66
272	CCTAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							Ss ATCC 33478
260	CCTAGGCAGCATACTAGCCGACCTGAGAGGGTACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT							Sr ATCC19645

Fig. 1. (*Continued in previous page*)

360	370	380	390	400	410	420
<hr/>						
350	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG					ATCC 25175
348	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	ChDC YM16				
348	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	ChDC YM42				
348	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	ChDC YM14				
348	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	ChDC YM37				
348	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	ChDC YM38				
348	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	ChDC YM64				
348	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	ChDC YM65				
348	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	ChDC YM66				
342	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGACCAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	Ss ATCC 33478				
330	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTCGGCAATGGGGGAACCTGACCAGCAACGCCCGGTGAGTG	Sr ATCC19645				
<hr/>						
430	440	450	460	470	480	490
<hr/>						
420	AAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGTCAGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG					ATCC 25175
418	GAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGTCAGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG	ChDC YM16				
418	AAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGTCAGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG	ChDC YM42				
418	AAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGTCAGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG	ChDC YM14				
418	AAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGTCAGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG	ChDC YM37				
418	AAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGTCAGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG	ChDC YM38				
418	AAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGTCAGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG	ChDC YM64				
418	AAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGTCAGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG	ChDC YM65				
418	AAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGTCAGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG	ChDC YM66				
412	AAGACGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTGAAGGGAAAGCAGTGTGAAGAGTGGAAAGCTTACACAG	Ss ATCC 33478				
400	AAGAAGGTTTCGGATCGTAAGCTCTGTTCAAGAGACGAACGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAG	Sr ATCC19645				
<hr/>						
500	510	520	530	540	550	560
<hr/>						
490	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC					ATCC 25175
488	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	ChDC YM16				
488	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	ChDC YM42				
488	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	ChDC YM14				
488	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	ChDC YM37				
488	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	ChDC YM38				
488	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	ChDC YM64				
488	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	ChDC YM65				
488	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	ChDC YM66				
482	TGACGGTAGCTTACCAAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	Ss ATCC 33478				
470	TGACGGTAACGTGACCAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGTCCCCAGC	Sr ATCC19645				

Fig. 1. (*Continued in previous page*)

570 580 590 600 610 620 630

```

560 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTCAAGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCT ATCC 25175
558 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTCAAGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCT ChDC YM16
558 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTCAAGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCT ChDC YM42
558 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTCAAGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCT ChDC YM14
558 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTCAAGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCT ChDC YM37
558 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTCAAGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCT ChDC YM38
558 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTCAAGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCT ChDC YM64
558 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTCAAGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCT ChDC YM65
558 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTCAAGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCT ChDC YM66
552 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTAGTAGTAAGTCTGAAGTTAAGGCATTGGCT Ss ATCC 33478
540 GTTGTCCGGATTATTGGCGTAAGGGAGCGCAGGCGGTAGTAGTAAGTCTGAAGTCAGGCAGTGCT Sr ATCC19645

```

640 650 660 670 680 690 700

```

630 CAACCATAGTGTGCTCTGAAACTGTCTGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG ATCC 25175
628 CAACCATAGTGTGCTCTGAAACTGTCTGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG ChDC YM16
628 CAACCATAGTGTGCTCTGAAACTGTCTGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG ChDC YM42
628 CAACCATAGTGTGCTCTGAAACTGTCTGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG ChDC YM14
628 CAACCATAGTGTGCTCTGAAACTGTCTGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG ChDC YM37
628 CAACCATAGTGTGCTCTGAAACTGTCTGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG ChDC YM38
628 CAACCATAGTGTGCTCTGAAACTGTCTGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG ChDC YM64
628 CAACCATAGTGTGCTCTGAAACTGTCTGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG ChDC YM65
628 CAACCATAGTGTGCTCTGAAACTGTCTGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG ChDC YM66
622 CAACCAATGTATGCTTGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG Ss ATCC 33478
610 TAACCATTGTGCTTGAAACTGCAGGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCG Sr ATCC19645

```

710 720 730 740 750 760 770

```

700 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAG ATCC 25175
698 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAN ChDC YM16
698 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAG ChDC YM42
698 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAG ChDC YM14
698 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAG ChDC YM37
698 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAG ChDC YM38
698 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAG ChDC YM64
698 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAG ChDC YM65
698 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAG ChDC YM66
692 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCCGGTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTCAGCAGCTGAG Ss ATCC 33478
680 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCCGGTGGCGAACGGCTCTGGTCTGTAAGCAGCTGAG Sr ATCC19645

```

Fig. 1. (*Continued in previous page*)

780 790 800 810 820 830 840

```

770 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG ATCC 25175
768 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG ChDC YM16
768 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG ChDC YM42
768 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG ChDC YM14
768 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG ChDC YM37
768 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG ChDC YM38
768 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG ChDC YM64
768 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG ChDC YM65
768 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG ChDC YM66
762 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGCTGAGTGCTAGG Ss ATCC 33478
750 GCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGCTGAGTGCTAGG Sr ATCC19645

```

850 860 870 880 890 900 910

```

840 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC ATCC 25175
838 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC ChDC YM16
838 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC ChDC YM42
838 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC ChDC YM14
838 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC ChDC YM37
838 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC ChDC YM38
838 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC ChDC YM64
838 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC ChDC YM65
838 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC ChDC YM66
832 TGTTAGGTCTTCCGGACTTAGTGCCGACGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC Ss ATCC 33478
820 TGTTAGGCCCTTCCGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC Sr ATCC19645

```

920 930 940 950 960 970 990

```

910 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA ATCC 25175
908 AAAGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA ChDC YM16
908 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA ChDC YM42
908 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA ChDC YM14
908 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA ChDC YM37
908 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA ChDC YM38
908 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA ChDC YM64
908 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA ChDC YM65
908 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA ChDC YM66
902 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA Ss ATCC 33478
890 AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG-AGCATGTGGTTAATTGAGCA Sr ATCC19645

```

Fig. 1. (*Continued in previous page*)

	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	
979	ACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCTATTCTTAGAGATAGGAAGTTACTTCGGTACAT							ATCC 25175
976	ACCGAA-AACCTTAC-AGGTCTTGACATCCGATGCTATTCTTAGAGATAGGAAGT-ACTTCCGTACAT							ChDC YM16
976	ACCGA-GAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCTATTCTTAGAGATAGGAAGTTACTTCGGTACAT							ChDC YM42
977	ACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCTATTCTTAGAGATAGGAAGTTACTTCGGTACAT							ChDC YM14
977	ACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCTATTCTTAGAGATAGGAAGTTACTTCGGTACAT							ChDC YM37
976	ACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCTATTCTTAGAGATAGGAAGTTACTTCGGTACAT							ChDC YM38
977	ACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCTATTCTTAGAGATAGGAAGTTACTTCGGTACAT							ChDC YM64
977	ACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCTATTCTTAGAGATAGGAAGTTACTTCGGTACAT							ChDC YM65
977	ACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCTATTCTTAGAGATAGGAAGTTACTTCGGTACAT							ChDC YM66
971	ACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCCGCTCTAGAGATAGAGTTTCTTCGGAACAT							Ss ATCC 33478
959	ACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCGATGCCGCTCTAGAGATAGAGTTTACTTTGTACAT							Sr ATCC19645
	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	
1049	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							ATCC 25175
1043	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							ChDC YM16
1045	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							ChDC YM42
1047	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							ChDC YM14
1047	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							ChDC YM37
1046	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							ChDC YM38
1047	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							ChDC YM64
1047	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							ChDC YM65
1047	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							ChDC YM66
1041	CGGAGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							Ss ATCC 33478
1029	CGGTGACAGGTGGTCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGAACGAGCG							Sr ATCC19645
	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	
1119	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							ATCC 25175
1113	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							ChDC YM16
1115	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							ChDC YM42
1117	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							ChDC YM14
1117	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							ChDC YM37
1116	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							ChDC YM38
1117	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							ChDC YM64
1117	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							ChDC YM65
1117	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							ChDC YM66
1111	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							Ss ATCC 33478
1099	CAACCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGA							Sr ATCC19645

Fig. 1. (*Continued in previous page*)

	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	
1189	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							ATCC 25175
1183	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCTCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							ChDC YM16
1185	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							ChDC YM42
1187	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							ChDC YM14
1187	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							ChDC YM37
1186	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							ChDC YM38
1187	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							ChDC YM64
1187	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							ChDC YM65
1187	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							ChDC YM66
1181	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTGGTAC							Ss ATCC 33478
1169	AGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGCTACAATGGTCGGTAC							Sr ATCC19645
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	
1259	AACGAGTTGGAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							ATCC 25175
1253	AACGAGTTGGAGGCCGGTGAACGGCAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							ChDC YM16
1255	AACGAGTTGGAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							ChDC YM42
1257	AACGAGTTGGAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							ChDC YM14
1257	AACGAGTTGGAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							ChDC YM37
1256	AACGAGTTGGAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							ChDC YM38
1257	AACGAGTTGGAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							ChDC YM64
1257	AACGAGTTGGAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							ChDC YM65
1257	AACGAGTTGGAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							ChDC YM66
1251	AACGAGTCGCAAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGTAGGCTGC							Ss ATCC 33478
1239	AACGAGTCGCAAGGCC-GGTGACGG-CAAGCTAATCTCTGAAAGCGATCTCAGTTGGATTGGAGGCTGC							Sr ATCC19645
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	
1327	AACTCGCTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							ATCC 25175
1323	AACTGGCTCCATGA-GTCCGAATCGCTAGTA-TCGCG-ATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							ChDC YM16
1323	AACTCGCTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							ChDC YM42
1325	AACTCGCTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							ChDC YM14
1325	AACTCGCTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							ChDC YM37
1324	AACTCGCTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							ChDC YM38
1325	AACTCGCTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							ChDC YM64
1325	AACTCGCTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							ChDC YM65
1325	AACTCGCTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							ChDC YM66
1319	AACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							Ss ATCC 33478
1307	AACTCGCTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG							Sr ATCC19645

Fig. 1. (*Continued in previous page*)

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	
1397	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG							ATCC 25175
1390	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG							ChDC YM16
1393	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG							ChDC YM42
1395	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG							ChDC YM14
1395	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG							ChDC YM37
1394	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG							ChDC YM38
1395	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG							ChDC YM64
1395	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG							ChDC YM65
1395	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG							ChDC YM66
1389	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCTTTA-GG						Ss ATCC 33478	
1377	CCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCGAAGTCGGTGAGGTAAACCGTTAA-G						Sr ATCC19645	
	1480	1490	1500	1510	1520			
1466	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC							ATCC 25175
1459	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACC							ChDC YM16
1462	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACC							ChDC YM42
1464	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACC							ChDC YM14
1464	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC							ChDC YM37
1463	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACC							ChDC YM38
1464	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACC							ChDC YM64
1464	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC							ChDC YM65
1464	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACC							ChDC YM66
1459	GGCCAGCCGCTAACGGTGGGATGGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC						Ss ATCC 33478	

Fig. 1. (Continued in previous page)

Table 4. Homology analysis of 16S rDNA sequences of *Streptococcus mutans* isolated from Koreans

Strains	Species match [GenBank accession number]	Homology (%)
ChDC* YM16	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175[AY188348]	98
ChDC YM42	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175 [AY188348]	99
ChDC YM14	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175[AY188348]	99
ChDC YM37	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175 [AY188348]	99
ChDC YM38	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175[AY188348]	99
ChDC YM64	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175[AY188348]	99
ChDC YM65	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175[AY188348]	99
ChDC YM66	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175[AY188348]	99

ChDC*: Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

Fig. 2. Dendrogram derived from homology analysis from 16S rDNA sequence of *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478, *S. rattus* ATCC 19645, and clinical isolates of *S. mutans* from Korean orthodontic patients.

3. 한국인 유래의 *S. mutans* 임상균주들의 7종 항생제에 대한 감수성 검사

특이한 생물형을 갖는 한국인 유래의 *S. mutans* 임상균주들과 표준균주인 *S. mutans* ATCC 25175^T의 항생제에 대한 감수성을 알아보기 위해 7종의 항생제에 대한 최소성장억제농도를 구하였다(Table 5). 그 결과, 표준균주인 *S. mutans* ATCC 25175^T은 penicillin G, amoxicillin, Augmentin 및 cefuroxacin에 감수성을, Erythromycin에는 중간내성을, ciprofloxacin과 vancomycin에 내성을 보였다.

한국인에서 분리 동정된 *S. mutans* 임상균주의 경우 *S. mutans* ChDC YM16과 *S. mutans* ChDC YM42 균주를 제외한 모든 균주가 penicillin G, amoxicillin, Augmentin 및 cefuroxime에 감수성을 갖었다. 특히, *S.*

mutans ChDC YM16과 *S. mutans* ChDC YM42 균주들은 Augmentin에서 감수성 또는 중간내성을 보였고, 나머지 모든 항생제에 대해서 중간내성 또는 내성을 보였다. Vancomycin에 대해서는 모든 균주가 내성을 갖는 것으로 나타났다.

Table 5. Minimum inhibitory concentration of antibiotics against *S. mutans* isolated from Koreans

Strains	MIC ($\mu\text{l}/\text{ml}$) against each of antibiotics						
	PEN	AMX	AMC	CIP	CMX	ERY	VAN
ATCC 25175 ^T	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	8	≤ 0.25	1	32
ChDC * YM16	16	16	8	>32	>32	>32	>32
ChDC YM42	16	16	8	>32	>32	1	16
ChDC YM14	8	2	2	2	4	0.25	16
ChDC YM37	8	1	1	>32	2	0.5	8
ChDC YM38	4	0.5	1	16	0.5	0.5	16
ChDC YM64	≤ 0.25	1	0.5	>32	0.5	>32	16
ChDC YM65	≤ 0.25	1	0.5	>32	0.5	≤ 0.25	16
ChDC YM66	≤ 0.25	0.5	2	>32	0.5	>32	16

ChDC : Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University
 PEN, penicillin G; AMX, amoxicillin; AMC, Augmentin; CIP, ciprofloxacin;
 CMX, cefuroxime axetil; ERY, erythromycin; VAN, vancomycin

4. Arginine 첨가에 의한 세균 성장 및 세균 배양액의 pH의 변화

류탄스 연쇄상구균 중 유일하게 arginine을 분해하여 암모니아를 생산할 수 있는 것으로 알려진 *S. rattus*와 그렇지 못하는 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*의 표준균주를 이용하여 배지에 arginine 첨가 유무에 따른 세균 성장과 배지의 pH 변화를 알아보았다(Fig. 3-6).

TH broth에 arginine이나 sucrose의 첨가 유무에 관계없이 *S. mutans*와 *S. rattus*는 *S. sobrinus*에 비해 doubling time이 짧은 것으로 나타났다(Fig. 3-6). 또한 세균 성장이 log phase에 접어들면서 배지의 pH도 감소하기 시작하였으며, stationary phase에 접어들면서 세균 배양액의 pH도 arginine이 첨가된 배지에서의 *S. rattus* 배양균을 제외하고는 일정하게 유지되었다.

S. mutans 및 *S. sobrinus*의 세균배양액은 arginine의 첨가 유무와 상관없이 포도당만 첨가된 경우보다 자당이 첨가된 배지에서 배양할 경우 세균배양액의 pH가 더욱 낮았다. 하지만 *S. rattus*의 경우 시간의 차이는 있었지만, arginine이 첨가된 배지에서는 자당이 첨가 유무와 관계없이 24시간 후에는 pH가 7까지 높아졌다.

*S. mutans*의 경우 배지에 자당이 첨가된 경우 세균 성장이 억제됨을 알 수 있었다. 하지만, 세균 배양액의 산도는 자당이 첨가된 경우에서 그렇지 않은 경우 보다 증가되었다. *S. rattus*의 경우 배지에 0.3% arginine이 첨가된 배지에서 세균 배양할 경우 성장이 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 5-6). 특히, 0.3% arginine만 첨가된 배지에서 *S. rattus*를 세균 배양할 경우 세균 배양액의 pH는 12시간 배양한 후(후기 로그기)에 약 6.7까지 낮아졌다가 1시간 후에 바로 7.5까지 회복되었다(Fig. 5). 이러한 조건에 0.2% 자당이 첨가되더라도 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*와는 달리 pH 5.0까지만 떨어졌다가, 그 후 2시간 뒤에 pH 6.0까지 올라갔다(Fig. 6).

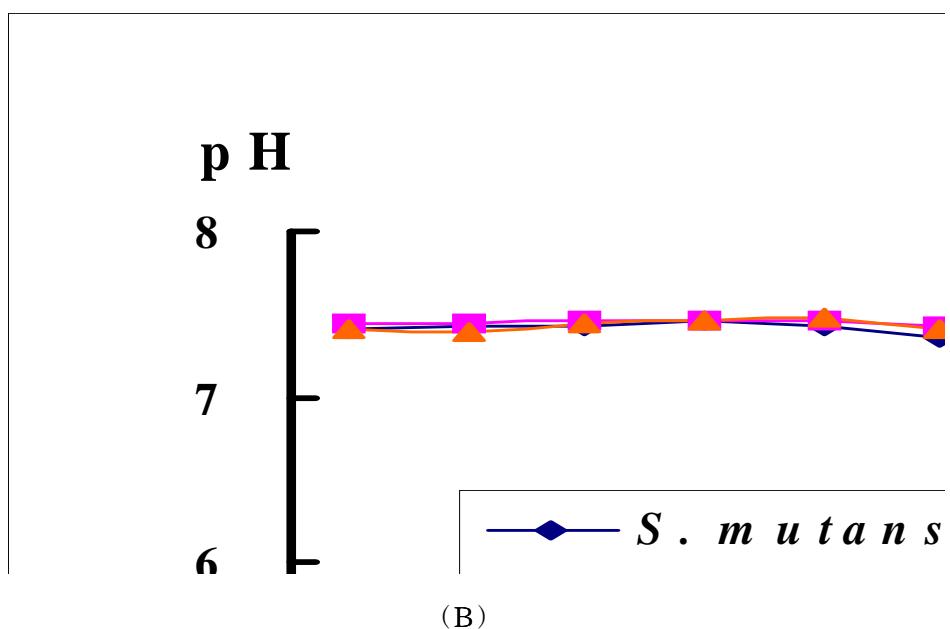
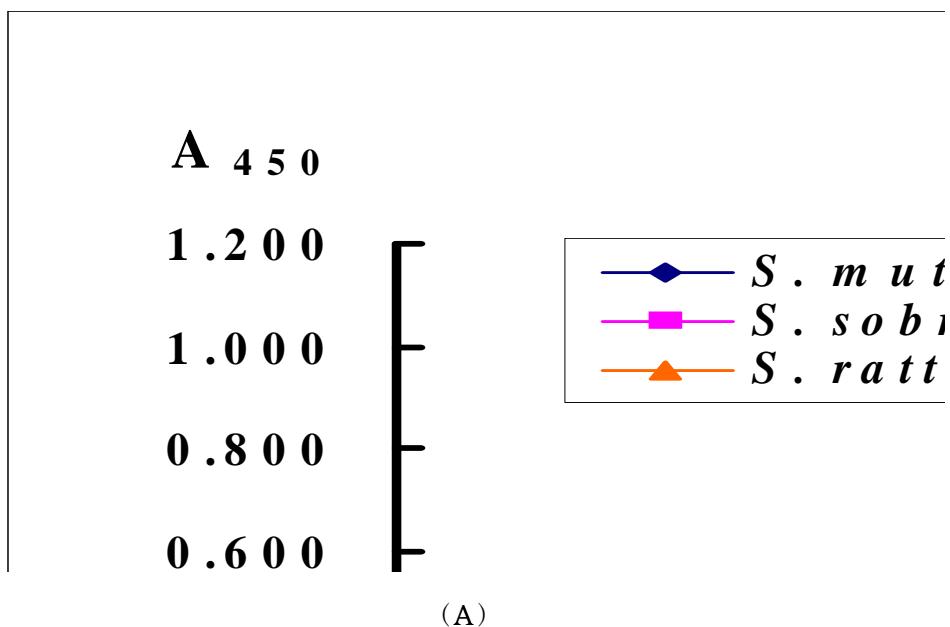


Fig. 3. (A) Growth curve and (B) change of pH in the culture solution of *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* KCTC 3065, and *S. rattus* KCTC 3655^T in TH broth during 24 h.

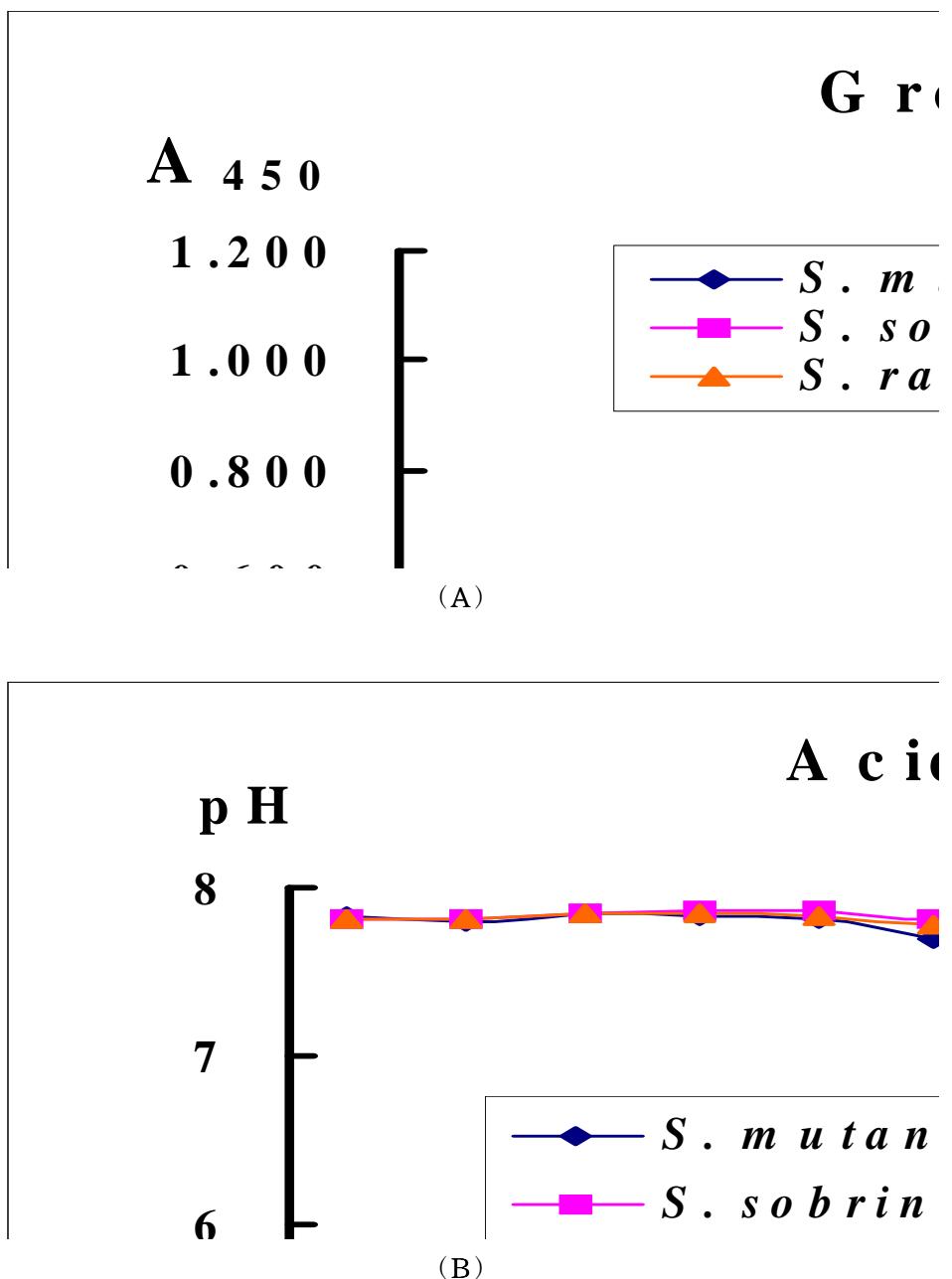


Fig. 4. (A) Growth curve and (B) change of pH in the culture solution of *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* KCTC 3065, and *S. ratti* KCTC 3655^T in TH broth containing 0.2% sucrose during 24 h.

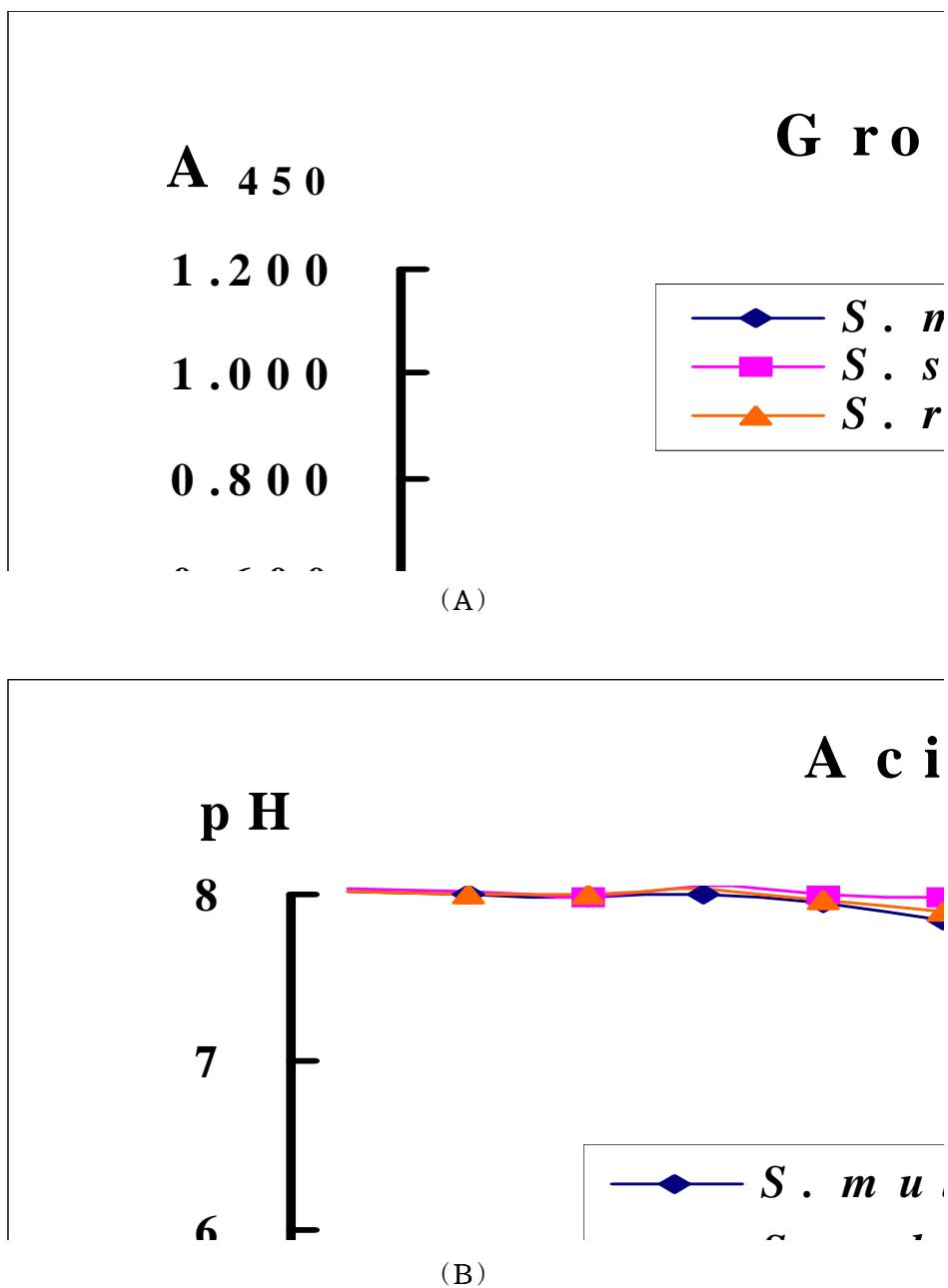


Fig. 5. (A) Growth curve and (B) change of pH in the culture solution of *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* KCTC 3065, and *S. ratti* KCTC 3655^T in TH broth containing 0.3% arginine during 24 h.

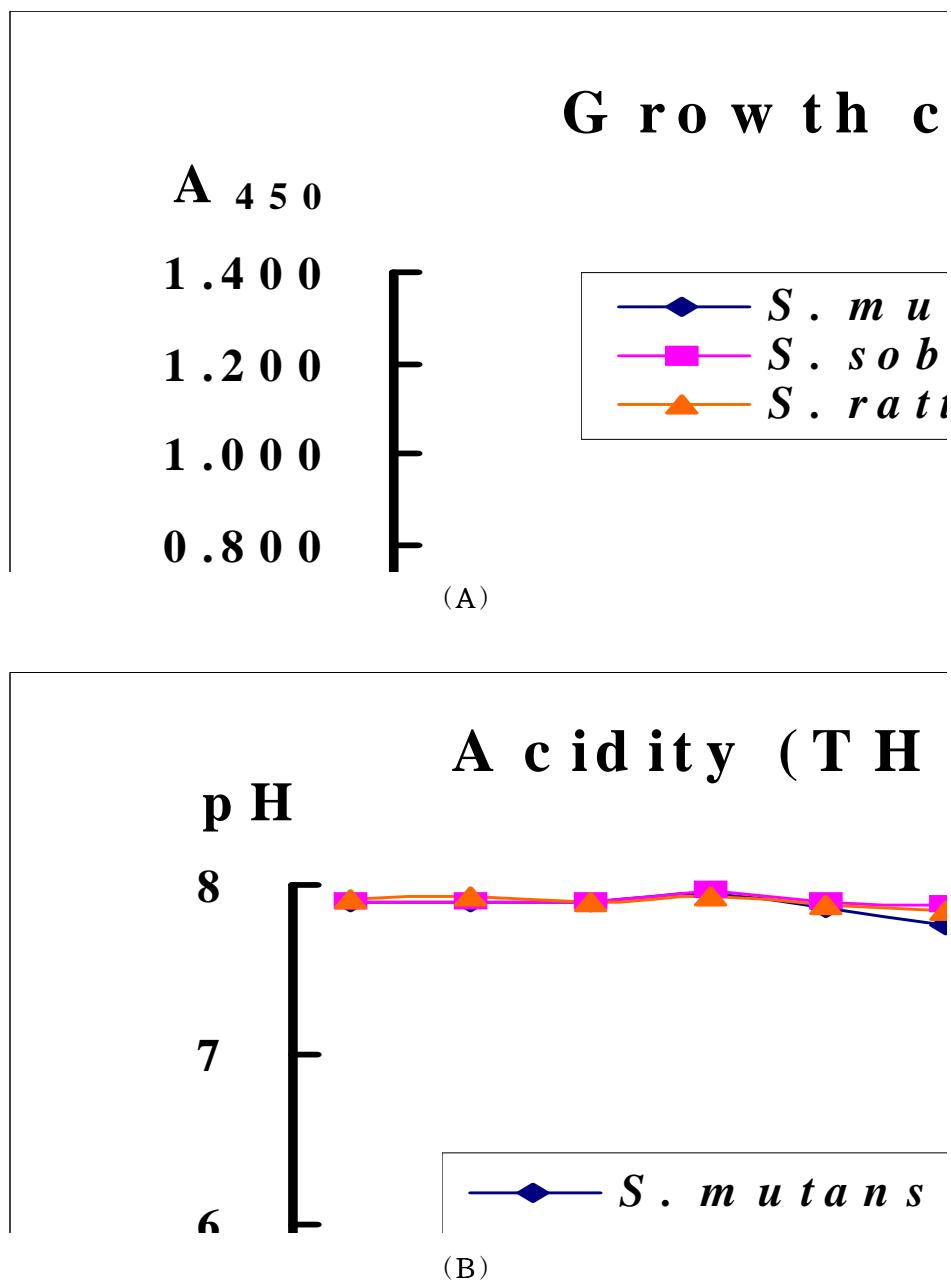


Fig. 6. (A) Growth curve and (B) change of pH in the culture solution of *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* KCTC 3065, and *S. ratti* KCTC 3655^T in TH broth containing 0.2% sucrose and 0.3% arginine during 24 h.

IV. 총괄 및 고안

본 연구에서는 기존에 알려져 있지 않았던 새로운 생물형(제VII형)을 갖는 *S. mutans* 2 균주와 생물형 제IV형과 같은 생화학적 특성을 갖는 *S. mutans* 6 균주를 분리 동정하였다. 특히, 새로운 제VII형이라고 명명한 *S. mutans*들은 arginine을 분해하여 암모니아를 생성할 수 있는 특성을 갖는다. 현재까지 알려지기로 뮤탄스 연쇄상구균 중 arginine을 분해할 수 있는 세균 종은 *S. rattus*가 유일한 것으로 알려져 있다. 최근 *S. rattus* FA-1 균주로부터 arginine deiminase(AD) 오페론이 클로닝되어 그 특성이 보고되었다¹⁵⁾. 그들의 보고에 의하면, arginine deiminase 오페론은 arginine을 가수분해하여 citrulline과 암모니아를 생산하는 데 관여하는 arginine deiminase(AD) 효소를 암호화하는 *arcA*를 포함하여 *arcB*(ornithine carbamoyltransferase), *arcC*(carbamate kinase), *arcD*(arginine-ornithine antiporter), *arcT*(putative aminopeptidase), *adiR*(a transcriptional regulator of the Crp/Fnr family) 들로 구성되어 있다고 한다. 이러한 점을 고려할 때, 차후 실험에서 본 연구에서 얻은 제VII형의 *S. mutans* 균주들에게도 AD 오페론이 존재하는지를 확인하고자 한다.

본 연구에서 arginine를 분해하여 암모니아를 생성할 수 있는 세균의 치면세균 막 내에서의 수소이온농도 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 *S. rattus* 균주를 이용하여 세균 배지에 arginine의 첨가에 따른 세균 배양액의 pH 변화를 관찰하였다. 그 결과 세균이 후기 로그기까지 성장할 때까지는 시간이 지남에 따라 세균 배양액의 pH가 감소하였지만, stationary phase에 가까워지면서 pH가 상승하기 시작하였다. 비록 0.2% 자당과 0.3% arginine이 첨가된 경우에서는 법랑질을 탈회시킬 수 있는 pH 5.0까지 내려가기는 하지만, 1시간 이내에 pH 6.0까지 회복됨을 알 수 있었다. 이처럼 arginine이 첨가된 배지에서 pH가 낮아지면서 다시 높아지는 현상의 정확한 이유는 현재로써는 알 수 없지만, *S. rattus*가 당질을 먼저 에너지원으로 이용하다가 세포외 기질의 pH가 낮아지면서

AD 오페론이 작동을 시켜 arginine을 분해하거나, 아니면 세균의 증식에 따른 배지 내 당질이 고갈되면서 에너지(ATP)를 생산해서 arginine을 분해하기 때문인 것으로 생각된다. 그러므로, 본 연구에서 분리된 2 균주의 제VII형의 *S. mutans*도 *S. rattus*와 같은 AD 오페론을 가지고 있음을 밝힌다면, 이 균주를 이용한 치아우식증 예방법의 개발이 가능할 것으로 생각된다. 즉, 본 연구에서 분리된 제VII형의 *S. mutans*가 사람에게서 유래된 것이기 때문에 유치가 맹출하기 시작한 유아 구강에 접종하고, arginine이 들어있는 용액으로 구강을 닦아준다거나, arginine을 첨가한 음료수나 우유를 먹게하여 구강 내에서 서식할 수 있도록 해주는 방법이 있을 것이다. 또한, 사람의 치면세균막 내 세균 종 중 AD system을 가지고 있는 균주가 *S. rattus*이외에도 *S. gordonii*, *S. sanguis*, *S. parasanguis*, 몇몇 *lactobacilli*와 *spirochetes* 등이 존재⁷⁾하기 때문에 기존의 불소가 함유된 구강양치액에 arginine을 첨가한다면, 식후 잇솔질을 하지 않은 상태에서도 효과적으로 치아우식증을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

생물형 제VII형인 *S. mutans* ChDC YM16의 16S rDNA 핵산염기서열은 NCBI에서 제공하는 blastn 프로그램을 이용한 상동성 검색을 한 결과 *S. mutans* ATCC 25175^T 표준균주와 98% 상동성을 보였기는 하지만, DNSTAR사의 MegAlign 프로그램의 ClustaIV법으로 분석한 결과로는 96.1%의 일치도 (Identity)를 보였다. 또한 16S rDNA 유전자이외의 다른 유전자의 핵산염기서열 분석법^{19,22,36)}을 이용하여 동정 실험을 추가로 해야 할 것으로 생각된다. 특히, 최근 세균들의 DNA-의존성 RNA 중합효소(RNAP)를 구성하는 4 종류의 subunits 중 하나인 rpoB 유전자를 이용하는 방법이 여러 세균들의 종 수준의 분류에 많이 이용되고 있다^{9,10,19,20,21,22,30)}. 특히, Drancourt 등(2004)은 *S. mutans*를 포함하는 연쇄상구균들의 RpoB 유전자 핵산염기서열을 이용한 종 수준에서의 분류를 보고하였다. 그러므로, *S. mutans* ChDC YM16균주의 rpoB 유전자를 클로닝 및 핵산염기서열분석법을 통한 동정을 차후에 진행하고자 한다.

최근 Kook 등²³⁾은 한국인에서 *S. mutans*라고 분리 동정된 10개의 균주들에 대한 7종 항생제에 대한 감수성 조사 결과를 보고하였다. 그들의 연구 결과에서도

본 연구의 제VII형의 *S. mutans* 균주들처럼 penicillin, amoxicillin, ciprofloxacin, cefuroxime axeti 및 vancomycin 등 여러 항생제에 내성을 갖는 균주(*S. mutans* ChDC YM25)가 발견되었다. 특히, Kook 등²³⁾의 연구 결과 10개의 *S. mutans* 임상분리균주들 중 9개가 vancomycin에 내성을 갖는다고 보고되었는데, 이는 본 연구 결과와도 유사한 양상을 갖는 것이었다. 이는 vancomycin에 내성을 갖는 *S. mutans*가 분리된 사람의 구강 내에는 다른 종의 그람양성 세균들도 vancomycin에 내성을 가질 수 있다는 것을 암시한다. 왜냐하면, 일반적으로 세균의 염색체 유전자 변이나, plasmid^{8,17)} 또는 transposone³⁴⁾에 매개되는 내성 유전자가 다른 세균 종에 전달될 수 있기 때문이다. 특정 항생제에 대한 내성유전자에는 beta-lactamase^{2,4,26,29)}나, aminoglycoside acetyltransferase^{27,35)}와 같은 효소나, 세포내로 유입된 항생제(리보조음의 단백질 생성을 저해하는 tetracycline이나 macrolide이나 DNA gyrase의 활성을 억제하는 quinolone 계)를 능동적으로 세포외로 유출하여 내성을 획득하는 다제내성 펌프(multidrug resistance pump, MDR) 단백질 등이 있다^{12,14,16)}. 본 연구에서 *S. mutans* ChDC YM16과 *S. mutans* ChDC YM42 균주의 경우 Augmentin을 제외한 모든 항생제에 대해 내성을 보였는데, 본 연구결과만으로는 어떠한 기전으로 그러한 현상을 보이는지 알 수는 없지만, 다제내성 펌프 유전자에 의한 것일 수 있고, 이들 유전자들이 conjugate plasmid나 transposone에 의해 여러 세균 종에 transfer되었을 가능성이 있는 것으로 사료된다. 이러한 내성 기전을 증명하기 위하여, 차후에 다제내성 펌프 유전자의 존재 유무를 분자생물학적 방법(중합효소연쇄반응법)으로 알아보고자 한다.

이상의 연구 결과를 종합할 때, 한국인에서 특이한 생물형을 갖는 *S. mutans* 균주를 분리 동정할 수 있었으며, 특히 arginine을 분해할 수 있는 제VII형의 균주들의 AD system의 존재를 확인하는 실험을 통한 arginine 분해 기전을 밝히는 실험을 추후 실행하고, 이를 검증할 수 있다면, 이 균주들을 이용한 새로운 치아우식증 예방법의 개발에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 한국인에서 dextranase 유전자를 이용한 분자생물학적 방법에 의해 *S. mutans*라 예비 동정된 8개의 *S. mutans* 임상균주들의 생화학 검사를 통한 생물형 결정 및 16S rDNA 유전자를 클로닝 및 핵산염기서열 결정, 7종의 항생제에 대한 감수성 조사 및 arginine 첨가에 의한 세균 성장 및 세균 배양액의 pH의 변화에 관한 실험을 시행하여 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. 한국인의 교정환자에서 생물형 제VII형이라 새로이 명명한 2 균주와 생물형 제IV형인 6 균주가 분리되었으며, 이들의 16S rDNA의 핵산염기서열을 분석하여 *S. mutans*라고 최종 동정하였다.
2. 한국인에서 분리 동정된 *S. mutans* 임상균주의 중 제VII형인 2 균주(*S. mutans* ChDC YM16과 *S. mutans* ChDC YM42)들은 penicillin, amoxicillin, ciprofloxacin, cefuroxime axetil, erythromycin 및 vancomycin에 내성을 갖었다.
3. Arginine deiminase system을 갖는 *S. rattus*를 0.3% arginine과 0.2% 자당이 첨가된 배지에서 세균 배양할 경우, 후기 로그기까지 성장할 때까지 pH 5.0까지 내려가는 하였지만, 그 후 1시간 이내에 pH 6.0까지 회복됨을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과를 종합할 때, 한국인에서 특이한 생물형을 갖는 *S. mutans* 균주를 분리 동정할 수 있었으며, 특히 arginine을 분해할 수 있는 제VII형의 균주들의 AD system의 존재를 확인하는 실험을 통한 arginine 분해 기전을 밝히는 실험을 추후 실행하고, 이를 검증할 수 있다면, 이 균주들을 이용한 치아우식증 새로운 예방법의 '개발에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 김미애 (2003) 교정환자의 브라켓과 치아경계부에 존재하는 치면세균막내 *mutans streptococci* 종 및 생물형의 식별. 조선대학교 대학원 박사학위논문.
2. Bauernfeind, A., Wagner, S., Jungwirth, R., Schneider, I. and Meyer, D. (1997) A novel class C beta-lactamase(FOX-2) in *Escherichia coli* conferring resistance to cephamicins. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2041-2046.
3. Beighton, D., Russell, R.R., and Hayday, H. (1981) The isolation of characterization of *Streptococcus mutans* serotype h from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Gen Microbiol.* **124**(Pt 2), 271-279.
4. Bonnet, R., Chanal, C., Ageron, E., Sirot, D., De Champs, C., Grimont, P., and Sirot, J. (2002) Inducible AmpC beta-lactamase of a new member Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3316-3319.
5. Bratthall, D. (1969) Immunodiffusion studies on the serological specificity of streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol Revy.* **20**, 231-243.
6. Bratthall, D. (1970) Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol Revy.* **21**, 143-152.
7. Burne, R.A. and Marquis, R.E. (2000) Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett.* **193**, 1-6.
8. Cloeckaert, A., Baucheron, S., Flaujac, G., Schwarz, S., Kehrenberg,

- C., Martel, J.L. and Chaslus-Dancla, E. (2000) Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2858-2860.
9. Drancourt M., Roux, V., Fournier, P.E. and Raoult, D. (2004) *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol.* **42**, 497-504.
10. Drancourt, M. and Raoult, D. (2002) *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* **40**, 1333-1338.
11. Fitzgerald, R.J. and Keyes, P.H. (1960) Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Amer Dent Assn.* **61**, 9-19
12. Furukawa, H., Tsay, J.T., Jackowski, S., Takamura, Y. and Rock, C.O. (1993) Thiolactomycin resistance in *Escherichia coli* is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by *emrAB*. *J Bacteriol* **175**, 3723-3729.
13. Gold, O.G., Jordan, H.V. and van Houte, J. (1973) A selective medium for the isolation of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* **18**, 1357-1364.
14. Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J. and Nishino, T. (1995) The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2567-2569.
15. Griswold, A., Chen, Y.Y., Snyder, J.A., and Burne, R.A. (2004) Characterization of the arginine deiminase operon of *Streptococcus rattus* FA-1. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 1321-1327.

16. Hamzehpour, M.M., Pechere, J.C., Plesiat, P. and Kohler, T. (1995) OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2392-2396.
17. Horii, T., Arakawa, Y., Ohta, M., Ichiyama, S., Wacharotayankun, R. and Kato, N. (1993) Plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum beta-lactams, including moxalactam. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 984-990.
18. Igarashi, T., Ichikawa, K., Yamamoto, A. and Goto, N (2001) Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the *dex* genes. *J Microbiol Methods*. **46**, 99-105.
19. Khamis, A., Raoult, D. and La Scola, B. (2004) *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol*. **42**, 3925-3931.
20. Khamis, A., Colson, P. Raoult, D. and Scola, B.L. (2003) Usefulness of *rpoB* gene sequencing for identification of *Afipia* and *Bosea* species, including a strategy for choosing discriminative partial sequences. *Appl Environ Microbiol*. **69**, 6740-6749.
21. Kim, B.J., S.H. Lee, M.A. Lyu, S.J. Kim, G.H. Bai, G.T. Chae, E.C. Kim, C.Y. Cha, and Y.H. Kook. (1999) Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol*. **37**, 1714-1720.
22. Ko, K.S., Lee, H.K., Park, M.Y., Lee, K.H., Yun, Y.J., Woo, S.Y., Miyamoto, H. and Kook, Y.H. (2002) Application of RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *J Clin Microbiol*. **40**, 2653-2658.

23. Kook, J.-K., Lim, S.-S., Yoo, S.Y., and Hwang, H.-K. (2004) Antibiotic susceptibility in mutans streptococci and *Streptococcus anginosus* isolated from dental plaque. *J Kor Acad Conserv Dent.* **29**, 462-469.
24. Krasse, B. (1966) Human streptococci and experimental caries in hamsters. *Arch Oral Biol.* **11**, 429-436.
25. Murray, P.R., and Jorgensen, J.H. (1981) Quantitative susceptibility test methods in major united states medical center. *Antimicrob Agents Chemother* **20**, 66-70.
26. Nelson, E.C. and Elisha, B.G. (1999) Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 957-959.
27. Noguchi, N., Emura, A., Matsuyama, H., O'Hara, K., Sasatsu, M. and Kono, M. (1995) Nucleotide sequence and characterization of erythromycin resistance determinant that encodes macrolide 2'-phosphotransferase I in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2359-2363.
28. Perch, B., Kjems, E., and Ravn, T. (1974) Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol.* **82**, 357-370.
29. Petrosino, J.F., Pendleton, A.R., Weiner, J.H., and Rosenberg, S.M. (2002) Chromosomal system for studying AmpC-mediated beta-lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1535-1539.
30. Renesto, P., Gouvernet, J. Drancourt, M. Roux, V. and Raoult, D. (2001) Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification

- of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol.* **39**, 430-407.
31. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Ed, 2nd. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
 32. Shklair, I.L. and Keene, H.J. (1974) A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* **19**, 1079-1081.
 33. Shklair, I.L. and Keene, H.J. (1976) Biochemical characterization and distribution of *Streptococcus mutans* in three diverse populations, In: Microbial aspects of dental caries. (Stiles, H.M., Loesche, W.J. and O'Brien, T.C., Eds.), pp. 201-210. Information Retrieval Inc., Washington.
 34. Simjee, S., White, D.G., McDermott, P.F., Wagner, D.D., Zervos, M.J., Donabedian, S.M., English, L.L., Hayes, J.R. and Walker, R.D. (2002) Characterization of *Tn1546* in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *J Clin Microbiol* **40**, 4659-4665.
 35. van Boxtel, R.A. and van de Klundert, J.A. (1998) Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* gentamicin resistance gene *aacC3* in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 3173-3178.
 36. Wertz, J.E., C. Goldstone, D.M. Gordon, and M.A. Riley. (2003) A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. *J Evol Biol.* **16**, 1236-1248.
 37. Whiley, R.A. and Beighton, D. (1998) Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* **13**, 195-216.