

Streptococcus mutans NCTC 10449에서 생산된 Glucosyltransferase의 정제 및 특성

김윤석·김여경·이기봉

(주)럭키 생활용품·화장품 연구소 미생물 연구실

Streptococcus mutans NCTC 10449가 생산하는 Glucosyltransferase를 순수 분리하고 그 특성을 조사하였다. 이 효소는 충치 형성 과정에서 insoluble glucan의 형성과 관련되어 있다. 이 효소의 분자량은 152,000이며 최적 pH와 온도는 각각 6.5와 35°C이며 중성 이상의 pH에서 산성에서 보다 다소 안정하였다. 이 효소의 활성에 대한 Km 값은 48 mM 정도였고, 이 효소에 의해 생산된 insoluble glucan은 타액으로 부터 분리된 균에 의해 생산된 insoluble glucan보다 dextranase에 의한 분해도가 높았다.

KEY WORDS □ *Streptococcus mutans*, glucosyltransferase

*Streptococcus mutans*는 인간이나 실험 동물에서 dental caries의 발생원인 plaque을 형성시키는 bacteria로 널리 알려져 있다. 이러한 *S. mutans*의 치아 표면에 부착하는 능력과 산 생성 능력이 미생물의 carigenicity(4, 10)를 결정한다.

*S. mutans*는 sucrose를 기질로 하여 Glucosyltransferase(GTase)를 이용하여 water insoluble glucan을 형성한다(2). 이때 형성된 glucan은 α -1,6-결합에 의해 연결된 glucose에 α -1,3-결합에 의해 branch형태로 glucose가 결합된 구조를 이루고 있다. 이러한 insoluble glucan의 경우 *S. mutans* cell이 치아 표면에 부착하는데 중요한 역할을 한다.

GTase는 cell-associated form과 cell-free form으로 존재하고 있다(8). 한 연구에 따르면 soluble enzyme이 각각 다른 물리적 특성을 갖는 최소 7가지 정도의 활성부분으로 분리되었다고 하며, 이러한 특성과 이 효소의 응집 현상때문에 효과적인 분리와 특성화에 대한 연구가 미비한 상태였다(7).

Montville 등(13)은 α -1,6-결합을 주로 함유한 soluble glucan을 형성하는 dextranucrase와 insoluble glucan을 형성하는 GTase 부분을 여러 strain으로 부터 분리하였으나 insoluble glucan을 형성하는 부분은 응집현상 때문에 순수분리에 어려움이 있음을 보고하였다. 이후 Fukui 등이 전구체를 필요로 하는 효소를 *S. mutans* 6715(serotype g)로 부터 분리하여 mutansynthetase라(5) 하였다. 이 효소는 dextranucrase에 의해 형성된 soluble glucan을 이용하는 것으로 확인되었다. 또한 Fukushima 등(6)은 *S. mutans* B13으로부터 각각 dextranucrase 및 mutansynthetase와 관련된 GTase 부분을 분리하고 이것이 insoluble glucan 형성에 필요하다고 보고하

였다.

Serotype b, c, e 와 f의 GTase는 a, d, g type과 면역학적으로 상이하며 전자의 GTase에 의해 형성된 insoluble glucan의 경우 α -1,3-결합의 비율이 낮고 생산량도 적으나 cell 응집력이 우수하다(9, 14, 15). 보통 구강내 plaque에서는 serotype c의 균주들이 많이 발견되며 따라서 이러한 serotype c 균주로부터 GTase의 분리는 dental caries의 예방을 위한 연구에 중요하다(14).

본 연구에서는 dental caries의 예방을 위한 기초로서 serotype c인 *S. mutans* NCTC 10449로 부터 GTase를 분리하여 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

사용균주는 *Streptococcus mutans* NCTC 10449로 serotype c이며 Todd Hewitt agar(Difco)에서 계대 배양 후 4°C에서 보관하며 사용하였고, stock 균주는 Brain Heart Infusion broth(Difco)에 배양한 세균에 glycerine과 Dimethylsulfoxide를 첨가하여 -70°C에서 보관하였다. Todd Hewitt agar상의 균은 BHI broth에서 2일간 배양시킨 후 접종액으로 사용하였다. GTase를 얻기위해 BHI broth에 *S. mutans*를 접종하여 2일간 배양시킨 후 원심분리(1000×g, 10 min)하여 균체를 제거하고 상등액만을 이용하였다. 타액으로 부터 insoluble glucan을 형성하는 균주를 선별하기 위해 *S. mutans* 선택배지인 Mitis Salivarius Agar에 타액을 희석하여 도말하였다. 여기에서 분리된 균을 sucrose가 함유된 BHI broth에서 배양하여 인공 plaque(이하 plaque) 형성을 확인하였다.

GTase의 활성도 측정

활성도 측정을 위해 sucrose(5%) 1 ml와 Dextran T-10(10 mg/ml) 0.2 ml, Merthiolate(10%) 10 μ l의 용액에 0.2 ml의 효소액을 가한 후 37°C에서 반응시켰다. GTase 활성도는 중합반응에 참여하지 않고 반응액상에 유리된 fructose를 Somogy-Nelson 방법(11)으로 정량하여 구하였다. 이때 1 unit는 1분당 1 μ M의 fructose를 유리할 수 있는 효소의 양으로 정하였다. 또한 insoluble glucan 형성에 대한 활성도 측정을 위해 반응액을 75% EtOH 침전을 통해 분리하고 증류수로 2회정도 씻어낸 후 Anthrone 방법(11)으로 측정하여 glucose를 표준으로 정량하였다. 이때의 활성도는 1분당 1 μ M의 glucose를 중합시킬 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

GTase의 정제

모든 분리 과정은 4°C에서 수행되었다. 균체가 제거된 배양액에 (NH₄)₂SO₄를 50% 포화시켜 원심분리(12000×g, 30 min)하고 이때 분리된 침전을 인산완충용액(pH 6.8, 50 mM)에 동일 용액으로 투석하였다. 이 조효소액을 첫 단계 정제과정인 Sephadex G-100 column(1.6×50 cm, 7 ml/hr)에서 분획하였다. 이 중 활성도가 나타나는 부분을 모아 농축하고 이를 Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 50 mM)으로 투석시켰다. 동일 용액으로 평형시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(1.6×30 cm, 30 ml/hr)을 이용하여 0.5 M NaCl을 함유한 동일 완충용액 100 ml와 NaCl을 함유하지 않은 용액 100 ml의 linear gradient로 용출을 실시하였다. 이 때 활성도가 나타나는 부분을 모아 농축시킨 후 Diethanolamine-HCl(pH 8.0, 0.25 mM) 완충용액으로 투석시킨다. 농축된 활성분을 Diethanolamine-HCl(pH 9.0, 25 mM)으로 평형시킨 Mono P column(FPLC용)에 흡착시킨 후 Polybuffer 96이 들어 있는 Diethanolamine-HCl(pH 8.0)로 pH gradient를 형성시켜 용출시켰다. 이때 활성도가 나타나는 부분을 (NH₄)₂SO₄ 80% 용액으로 처리하여 원심분리한 후 분리된 침전을 인산완충용액에 녹여 활성도 분석과 SDS-PAGE에 이용하였다.

분자량 측정

GTase의 분자량은 β -Amylase(200,000), Alcohol-dehydrogenase (150,000), Albumin(66,000), Carbonic anhydrase(29,000)을 표준 단백질로 하여 Sephacryl S-200 Gel filtration column(1.6×60, 0.15 ml/hr)에서 용출비로 측정하였다.

단백질량 측정

효소 단백질의 양은 bovine serum albumin(BSA)를 표준 단백질로 하여 Lowry 등(11)의 방법으로 측정하였다.

최적 pH와 안정성

효소의 활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 10 mM 초산 완충용액(pH 4-6)과 10 mM 인산 완충용액(pH 6-7), 10 mM Tris-HCl(pH 7-9), 10 mM Glycine-NaOH(pH 9-10) 완충용액을 사용하여 활

성도를 측정하였다. 또한 각 pH에서 효소 활성의 안정성을 조사하기 위해 위 완충용액으로 효소를 24 시간 처리한 후 잔존하는 효소 활성을 측정하였다.

최적 온도

효소의 활성에 대한 최적 온도를 조사하기 위해 50 mM 인산완충용액(pH 6.8)에 효소와 기질 첨가 후 20-60°C의 각 온도에서 활성도를 측정하였다.

Km value의 측정

GTase의 기질인 sucrose를 농도별로 효소와 반응시켜 GTase의 활성도를 측정하였고, 또한 glucose와 Dextran T-10의 각 농도에 대한 활성도를 측정하여 Lineweaver-burk 방정식에 의하여 Michaelis-Menten 상수를 계산하였다.

Insoluble glucan의 Dextranase에 의한 분해도 측정

S. mutans NCTC 10449의 GTase와 타액으로 부터 분리된 균주에 의해 형성된 insoluble glucan을 비교하기 위해 먼저 구강내 타액으로 부터 분리된 100 여개의 균주 중 plaque의 형성량이 많은 3종(S-103, S-130, S-166)을 선별하여 sucrose가 2% 함유된 BHI broth에서 배양하였다. 이때 기벽에 형성된 plaque를 0.5 N NaOH에 용해시켜 균체거를 위해 원심분리한 후 75% EtOH 침전을 통해 insoluble glucan을 분리시킨 후 동결 건조시켰다. *S. mutans* NCTC 10449의 GTase에 의해 형성된 insoluble glucan은 75% EtOH에 의해 형성된 침전을 증류수로 1-2회 씻어낸 후 동결 건조시켰다. Dextranase(Amano pharmaceutical Co Ltd.)에 의한 분해도를 측정하기 위해 각 insoluble glucan 5 mg을 Dextranase 5 ml(1000 u/ml)에서 4시간 반응시키고 이때 분리된 glucose의 양을 glucose oxidase-peroxidase(Sigma)를 이용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

S. mutans 배양 상등액 중의 GTase를 (NH₄)₂SO₄에 의한 salting out, Gel Chromatography(Fig. 1), Anion exchange Chromatography(Fig. 2) 그리고 Chromatofocusing(Fig. 3)을 통해 정제하였고, 이때 최종 효소단백질의 회수율과 정제도는 각각 3.3%와 216배 이었다.(Table 1) Mukasa 등(14)에 의한 *S. mutans* Ingbritt(serotype c)의 효소 정제시 본 효소와 유사한 정제 과정을 통해 최종 효소 단백질의 회수율과 정제도가 0.9%, 70배 이었다고 보고한 바 있다. 또한 Chludzinski 등(3)은 *S. mutans* 6715(serotype g)로 부터 효소를 분리하여 13%의 회수율과 1,515배의 정제도를 얻었다. 이러한 결과로 미루어 볼때 효소의 특성상 순수 분리가 매우 어려운 것으로 판단되었다. 정제과정 중 Fructosyltransferase의 혼입 가능성을 알아보기 위해 Glucose-oxidase를 이용하여 이 효소의 반응 생성물인 glucose를 측정하였으나 거의 활성도가 나타나지 않아 분리된 효소에는

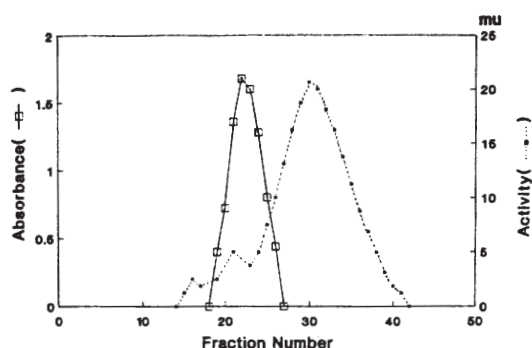


Fig. 1. Sephadex G-100 column chromatography of Glucosyltransferase (Column size=1.6×50 cm, flow rate 7 ml/hr, 3 ml/tube).

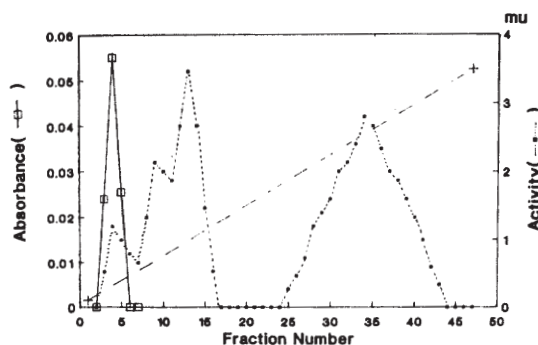


Fig. 2. DEAE-Sephadex column Chromatography of Glucosyltransferase (Column size=1.6×30 cm, flow rate 30 ml/hr, 5 ml/tube).

Fructosyltransferase의 혼입이 없음을 알 수 있었다 (14).

GTase는 분리 과정에서 나타난 것처럼 basic 효소로서 Ion-exchange chromatography나 chromatofocusing 수행시 초기에 모두 분리되고 있다. Cation exchange chromatography를 사용하여 이러한 초기 분리의 단점을 보완하려는 시도를 하였으나 흡착이 너무 강해 NaCl의 농도를 높여도 분리가 되지 않아 오히려 정제도가 떨어짐을 확인하였다.

Chromatofocusing 분획 효소액은 SDS-PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 확인한 결과 단일 band로 나타났다.

GTase의 특성

표준 단백질을 사용하여 Gel Chromatography에 의해 산출된 이 효소의 분자량은 152,000 정도였다. (Fig. 4) 이것은 *S. mutans* Ingbritt에서 분리된 효소의 분자량인 151,000(14)과 GS-5의 155,000(12) 등과 매우 유사한 값이다. 분리된 효소는 Dextran T-10과 같은 primer에 의해 활성도가 증가하였고, Chromatofocusing을 여러 pH 범위에서 실시한 결과 9 이상의 pI 값을 갖는 것으로 나타났다. 또한 sucrose

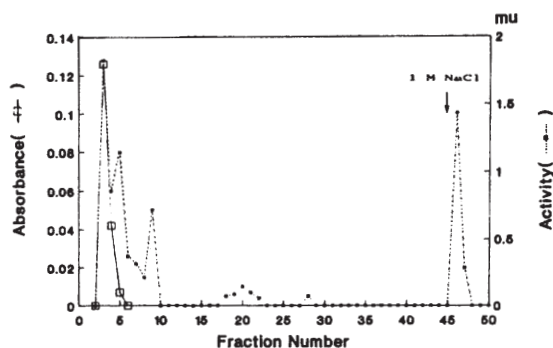


Fig. 3. Chromatofocusing of Glucosyltransferase using Mono P HR 5/20 column(pH 9-8).

Table 1. Purification of *Streptococcus mutans* NCTC 10449 Glucosyltransferase

| Step | Total protein (mg) | Total activity (IU) | Specific activity (mu/mg) | Yield (%) | Purification (folds) |
|---|--------------------|---------------------|---------------------------|-----------|----------------------|
| Culture broth | 14,400 | 142.3 | 9.88 | 100 | 1 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate | 1,070 | 130.5 | 122 | 91.7 | 12 |
| Sephadex G-100 | 426 | 123 | 289 | 86.5 | 29 |
| DEAE-Sephadex | 85 | 82.2 | 967 | 57.8 | 98 |
| Chromatofocusing | 2.2 | 4.7 | 2130 | 3.3 | 216 |

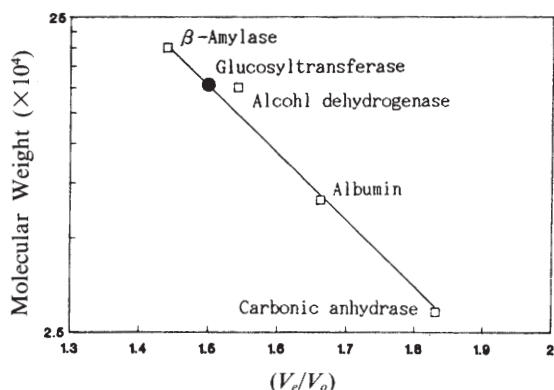


Fig. 4. Molecular weight determination of Glucosyltransferase by Gel Chromatography.

농도의 증가시 높은 농도에서는 오히려 insoluble glucan의 농도가 감소되었다.

효소에 대한 pH의 영향

정제된 효소는 pH 6.6에서 최고의 활성도를 나타내었고(Fig. 5) 균의 성장시 배양액의 pH가 4정도까지

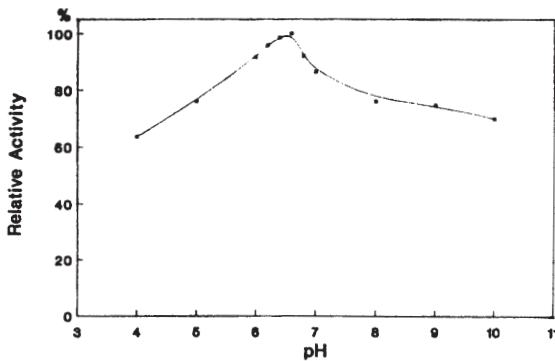


Fig. 5. Effect of pH on the Glucosyltransferase activity.

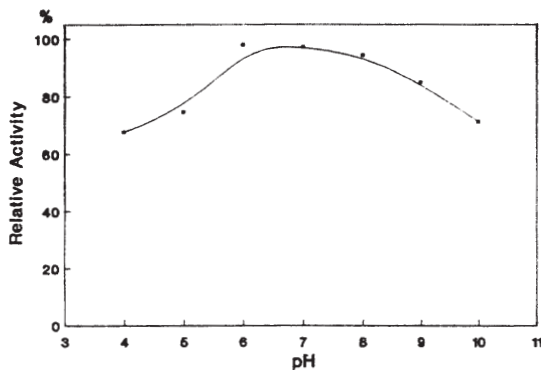


Fig. 6. Effect of pH on the Glucosyltransferase stability.

떨어짐에도 불구하고 염기성 상태에서 산성에 비해 오히려 안정한 것으로 나타났다(Fig. 6).

효소에 대한 온도의 영향

효소 반응의 최적 온도를 20-80°C 내에서 측정한 결과 35°C에서 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 7). *S. mutans* NCTC 10449의 GTase와 구강내 plaque으로 부터 분리된 균주에 의해 생산된 insoluble glucan의 비교

분리된 효소에 의해 생산된 insoluble glucan과 구강내 분리균이 생산한 insoluble glucan의 dextranase에 의한 분해도를 비교해 볼 때 *S. mutans* 10449로 부터 분리된 효소에 의해 생산된 insoluble glucan이 가장 잘 분해되었다(Fig. 8). 이 효소는 α -1,6-결합을 분해시키기 때문에 이러한 효소에 의해 분해가 잘 되지 않는 insoluble glucan의 경우 α -1,3-결합에 의한 branch가 많아 기질로서의 효과를 감소되었다고 볼 수 있다(9).

구강내 분리균의 insoluble glucan 형성량이 비교적 많았고 Dextranase에 의한 분해도가 낮은 것으로 미루어 분리균은 *S. mutans* 10449와 다른 성질을 나타내는 GTase를 생산하는 것으로 판단되며 본 실험 결과의 적용을 위해 분리균의 carigenicity 비교가 필요할 것으로 사료되었다.

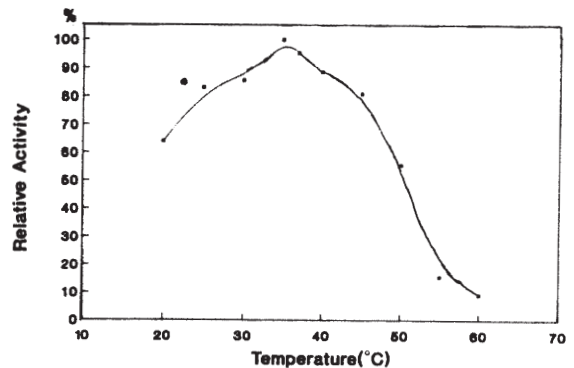
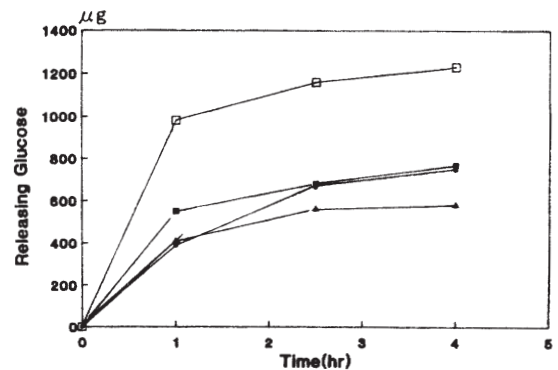


Fig. 7. Effect of temperature on the Glucosyltransferase.

Fig. 8. Hydrolysis of insoluble glucan by Dextranase
○, *S. mutans* NCTC 10449; ●, S-103; ▲, S-103; ●, S-166.

Km 값의 측정

본 효소의 sucrose에 대한 Km 값은 48 mM이었다. GTase의 glucose와 maltose의 대한 Km 값은 각각 129 mM, 100 mM(glucose 단위)로 측정되어 기질로서의 친화력이 상대적으로 약한 것으로 판단되었다. Balekjan 등(1)의 보고에 따르면 maltose와 lactose를 첨가한 배지에서 insoluble glucan 형성량은 sucrose 첨가 배지에 비해 매우 낮았고 오히려 이러한 이당류들에 의해 insoluble glucan의 형성량이 감소되었다. 이러한 효과는 이당류들에 의해 중합과정이 종결되는 것으로 추정되고 있다.

참 고 문 헌

1. Balekjian, A.Y., R.W. Longton, J.S. Cole, III and M.S. Guidry, 1977. The effect of disaccharides on the Plaque-forming potential of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* **56**, 1359-1363.
2. Carson, J., E. Newbrun and B. Crass, 1969. Purification and properties of dextranucrase from *Streptococcus sanguis*. *Archs. Oral. Biol.* **14**, 469-478.

3. Chludzinski, Andrew M., Greg R. Germaine and Charles F. Schachtele, 1974. Purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **118**, 1-7.
4. 최선진, 1984. 사람의 치아우식 병인으로서의 세균. *대한치과의사협회지*. **22**, 273-275.
5. Fukui, K., T. Moriyama, Y. Miyake, K. Mizutani and O. Tanaka, 1982. Purification and properties of Glucosyltransferase responsible for water-insoluble glucan synthesis from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **57**, 1-9.
6. Fukushima, K., R. Mtda, K. Tanaka and T. Ikeda, 1981. Resolution of *Streptococcus mutans* Glucosyltransferase into two components essential to water-insoluble sythesis. *FEBS Letter.* **128**, 213-216.
7. Guggenheim, B., and E. Newbrun, 1969. Extracellular Glucosyltransferase activity of an HS strain of *Streptococcus mutans*. *Helv. Odont. Acta.* **13**, 84-97.
8. Hamada, S. and M. Torii, 1978. Effects of Sucrose in culture media on the location of Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surface. *Infect. Immun.* **20**, 592-599.
9. Hamada, S., M.M. Suzanne, K. Hiroshi and J.R. McGhee, 1985. Molecular Microbiology and Immunology of *Streptococcus mutans*. ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER. International conference "Cellular, Molecular and Clinical Aspects of *Streptococcus mutans*." USA.
10. Harno, S., N. Yoshio and I. Maskuzu, 1982. Cariogenicity and some properties of laboratory *Streptococcus mutans*. *일본구강위생학잡지*. **32**, 17-23.
11. 김대봉, 이근배, 주충노, 김동훈, 이상섭, 김윤수, 박인권, 이세영, 1984. 실험생화학. 한국 생화학회 교재편찬위원회.
12. Kuramitu, Howard K., and Lillian Wondrack, 1983. Insoluble Glucan synthesis by *Streptococcus mutans* serotype c strains. *Infect. Immun.* **42**, 763-770.
13. Monteville, T.J. and C.L. Cooney, 1978. *Streptococcus mutans* Dextranucras: A Revies. In "Advances in applied microbiology." **24**, 55-84.
14. Mukasa, H., A. Shimamura and H. Tsumori, 1982. Purification and characterization of Basic Glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* Serotype c. *Biochemica Biophysica Acta.* **719**, 81-89.
15. Yakushii, T. and M. Inoue, 1984. Interserotype comparison of polysaccharide produced by extracellular enzymes from *Streptococcus mutans*. *Carbohydrate Research.* **127**, 253-226.

(Received April 14, 1992)

(Accepted April 27, 1992)

ABSTRACT: Purification and Characterization of Glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*

Kim, Yun-Seog, Yeo-Kyung Kim and Kee-Bung Rhee(Department of Microbiology, Lucky Householdgoods & Cosmetics Research Institute, Cheong Ju, Korea)

Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* NCTC 10449 was purified and characterized. It relates with production of insoluble glucan in dental caries. The molecular weight was estimated to be 152,000. The optimum pH and temperature was 6.5 and 35°C, respectively. The enzyme was stable in alkaline pH. The Michaelis constants of the enzyme for releasing of fructose were 48 mM. Hydrolysis rate of insoluble glucan by dextranase was higher in *S. mutans* NCTC 10449 than that of strains isolated from saliva.