



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월17일
(11) 등록번호 10-1648992
(24) 등록일자 2016년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A61K 8/99 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01) C12R 1/23 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7000589
(22) 출원일자(국제) 2009년05월19일
심사청구일자 2014년05월19일
(85) 번역문제출일자 2011년01월10일
(65) 공개번호 10-2011-0019420
(43) 공개일자 2011년02월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/003586
(87) 국제공개번호 WO 2009/149816
국제공개일자 2009년12월17일
(30) 우선권주장
08010641.2 2008년06월11일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
JP3921175 B2
Enzyme and Microbial Technology, Vol.36,
pp.83-90(2005.)*
Journal of Applied bacteriology, Vol.80,
pp.65-72(1996.)
W02006022471 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
바스프 에스이
독일 데-67056 루트빅샤펜
(72) 발명자
뵘트너, 메베스
독일 10407 베를린 온-셰르-스트라세 20아
랑, 크리스틴
독일 10625 베를린 괴테스트라세 59
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 입냄새 예방 및/또는 치료를 위한 용도 및 방법

(57) 요약

기술되는 것은 타액 중 펩티드 농도를 현격하게 감소시킴으로써, 입냄새 발생 요소인 구강 미생물총 중 혐기성 미생물에 의해 사용되는 기질을 고갈시킬 수 있는, 유산균 군에 속하는 미생물이다. 또한, 기술되는 것은 스트렙토코쿠스 살리마리우스의 생장은 자극할 수 있으나 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵기발리스의 생장은 자극하지 않는, 유산균 군에 속하는 미생물이다. 또한 기술되는 것은 상기-언급된 미생물을 함유하는 조성물, 입냄새 및/또는 구취를 예방 및/또는 치료하기 위한 그의 용도, 및 입냄새 및/또는 구취의 예방 및/또는 치료 방법이다.

(72) 발명자

비인, 마르쿠스

독일 84453 알트뮐도르프 스포트플라쯔스트라세 14

쉴링, 미카엘

독일 10439 베를린 쇠넨웨스트라세 6

레인들, 안드레아스

독일 68199 만하임 그랄스스트라세 10

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 분석 (a)에 적용하였을 경우 하기의 특성 (b)를 나타내는 것을 특징으로 하는, DSMZ 승인 번호 DSM 19825의 락토바실루스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), DSM 19826의 락토바실루스 아시도필루스, 및 DSM 19827의 락토바실루스 아시도필루스로 구성되는 군에서 선택되는 미생물:

분석 (a):

(a) 1×10^7 세포/ml의 개시 세포 밀도를 사용하여, 15 g/l의 펩티드를 함유하며 하기 조성

| | |
|------------------------------------|-----------------|
| 구아닌: | 0.1 g/l |
| 시토신: | 0.1 g/l |
| 티미딘: | 0.1 g/l |
| 2'-데옥시아데노신: | 0.1 g/l |
| 2'-데옥시우리딘: | 0.1 g/l |
| K ₂ HPO ₄ : | 2 g/l |
| 나트륨-아세테이트: | 5 g/l |
| MgSO ₄ -7수화물: | 0.1 g/l |
| 디-암모늄 수소 시트레이트: | 2 g/l |
| CaCl ₂ -2수화물: | 0.5 g/l |
| 올레산: | 0.1 % (w/v) |
| 시아노코발라민: | 0.02 mg/l |
| 리보플라빈: | 10 mg/l |
| 엽산: | 0.2 mg/l |
| 퍼리독살-5-포스페이트-1수화물: | 10 mg/l |
| 4-아미노벤조산: | 0.2 mg/l |
| D(+)-바이오틴: | 1 mg/l |
| 아스코르브산: | 500 mg/l |
| 니코틴산: | 10 mg/l |
| Ca-판토테네이트: | 10 mg/l |
| 티아민: | 1 mg/l |
| 코발트(II)-니트라트-6수화물: | 500 mg/l |
| MnSO ₄ -1수화물: | 20 mg/l |
| MgSO ₄ -7수화물: | 500 mg/l |
| Na ₂ MoO ₄ : | 0.04 mg/l |
| PTU-추출물: | 15 g/l 또는 7 g/l |
| D-글루코스-1수화물: | 10 g/l |

을 갖는 합성 배지에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 24시간 동안 미생물을 배양하고;

(b) 4000×g에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 제거하고;

(c) 생성되는 상청액 중 펩티드 농도를 측정함;

특성 (b):

미생물이 배양 배지 중 펩티드 농도의 감소시킴으로써, 24시간 동안 배양 후의 상청액 중 펩티드 농도가 15 g/l의 개시 농도에 비해 20% 이상 감소됨, 즉 미생물이 분석 (a)의 배지 중 펩티드 농도를 20% 이상 감소시킬 수 있음.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기의 분석 (A)에 적용하였을 경우 하기의 특성 (B)를 추가적으로 나타내는 미생물:

분석 (A):

(a) 1×10^7 세포/ml의 개시 세포 밀도를 사용하여, 100 ml의 합성 배지에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 24시간 동안 미생물을 배양하고;

(b) 이어서 4000×g에서 15분 동안 세포를 원심분리하고, 20 ml의 H₂O에 재현탁하고;

(c) 이어서 세포를 -80°C 로 냉동시키고, 진공하에 16시간 동안 동결건조하고;

(d) 10 mg의 동결건조된 세균을 H_2O 에 재현탁하고, $4000\times\text{g}$ 에서 10분 동안 원심분리하고;

(e) 7 g/l의 펩티드를 함유하는 합성 배지 1 ml를 세포 펠렛에 첨가하고, 세포를 배지에 재현탁하고, 호기성 조건하에 37°C 에서 5분 배양한 후, $4000\times\text{g}$ 에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 제거하고;

(f) 생성되는 배지 상청액 중 펩티드 농도를 측정함;

특성 (B): 동결건조된 세균이 배양 기간 개시시의 배지 중 농도 (7 g/l)에 비해 생성되는 배지 상청액 중 펩티드 농도를 20% 이상 감소시킴.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 7 g/l의 펩티드를 함유하는 합성 배지에 첨가하고 호기성 조건하에 37°C 에서 5분 동안 배양하였을 때 상기 배지의 펩티드 농도를 20% 이상 감소시키는 특성을 나타내는, 불활성 형태인 미생물.

청구항 7

제1항에 따른 미생물, 또는 7 g/l의 펩티드를 함유하는 합성 배지에 첨가하고 호기성 조건하에 37°C 에서 5분 동안 배양하였을 때 상기 배지의 펩티드 농도를 20% 이상 감소시키는 특성을 나타내는 제1항에 따른 미생물의 불활성 형태를 포함하는, 입냄새, 구취(halitosis), 또는 이들 모두를 감소시키기 위한 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 치약, 츄잉 껌, 로젠지, 구강 세척제, 구강 세정제, 치실 또는 치과용 테이프의 제조에 사용되는 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극할 수 있으나 스트렙토코쿠스 뮤탄스, 포르피로모나스 갱기발리스, 또는 둘 다의 생장은 자극하지 않는 것을 특징으로 하는, DSMZ 승인 번호 DSM 19825의 락토바실루스 아시도필루스, DSM 19826의 락토바실루스 아시도필루스, 및 DSM 19827의 락토바실루스 아시도필루스로 구성되는 군에서 선택되는 미생물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제10항에 있어서, 불활성 형태인 미생물.

청구항 14

제10항에 따른 미생물의 배양 상청액.

청구항 15

제10항에 따른 미생물, 상기 미생물의 불활성화 형태, 또는 상기 미생물의 배양 상청액을 포함하는, 입냄새, 구취(halitosis), 또는 이들 모두를 감소시키기 위한 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 치약, 츄잉 껌, 로젠지, 구강 세척제, 구강 세정제, 치실 또는 치과용 테이프의 제조에 사용되는 조성물.

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 타액 중 펩티드 농도를 현격하게 감소시킴으로써, 입냄새 발생 요소인 구강 미생물총 중 혐기성 미생물에 의해 사용되는 기질을 고갈시킬 수 있는, 유산균 군에 속하는 미생물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 스트렙토코쿠스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*)의 생장은 자극할 수 있으나 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 및/또는 포르피로모나스 갱기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 생장은 자극하지 않는, 유산균 군에 속하는 미생물에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 또한 상기-언급된 미생물을 함유하는 조성물, 입냄새 및/또는 구취를 예방 및/또는 치료하기 위한 그의 용도, 및 입냄새 및/또는 구취의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 구강 위생에 있어서의 보편적인 문제점으로 만성 악취 (구취)가 있다. 구취를 치료하는 보편적인 방법은 예컨대 멘톨을 함유하는 구강청정제 또는 츄잉-껌의 사용에 의해 불쾌한 냄새를 없애 또는 중화하는 것이다. 그러나, 이러한 방법들은 단기간에만 효과적일뿐, 장기간에 있어서는 그렇지 않다. 따라서, 구취를 예방 또는 치료하기 위한 장기적인 방법에 대한 필요성이 존재한다. 이러한 문제는 업계 사정상 거의 모두가 예를 들면 황화수소 및 메틸 메르캅탄과 같은 "취발성 황 화합물" (VSC)을 생산하는 혐기성 세균의 수를 감소시키는 것을 목표로 하는 다양한 방법들에 초점이 맞추어져 왔다.

[0004] 이러한 세균을 감소시키기 위한 한 가지 기술되어 있는 방법은 혀 찰과기(scraper)를 사용하여 혀 코팅을 제거함으로써 세균 증식을 위한 기질을 혀로부터 제거하는 것이다. 또 다른 방법은 염화 아연과 같은 금속 염, 또는 알콜 또는 클로르헥시딘과 같은 소독제를 사용하여 혀를 처리하는 것이다. 그러나, 이러한 방법의 단점은 금속 염과 소독제가 다른 무해하거나 심지어는 유익한 구강 미생물의 생장 역시 억제한다는 것이다.

[0005] 구취를 치료 또는 예방하기 위한 한 가지 접근법으로 기술되어 온 것은 타액의 pH를 생리학적으로 정상적인 수준으로 유지하는 것이다. 충치 및 점막 감염과 관련된 미생물 종은 산성의 pH를 선호하며; 치주 질병의 발병과 관련된 미생물 종은 정상을 초과하는 pH를 선호하는 반면, 우수한 구강 건강과 관련되는 미생물 종은 중성의 pH를 선호하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 기작을 사용하는 프로바이오틱(probiotic) 세균 (예컨대 락토바실러스(*Lactobacillus*) 및 스트렙토코쿠스)을 함유하는 조성물이 US200707137호 및 US2006018843호에 개시되어 있다. W02007/077210호는 건강한 구강 미생물총에 정상적으로 존재하는 초기 집락화 구강 세균의 군 (예컨대 스트렙토코쿠스 (오랄리스(*oralis*)), 유박테리움(*Eubacterium*), 네이세리아(*Neisseria*), 베일로네아(*Veillonella*))에서 선택되는 약하게 산을 생성시키거나 산을 생성시키지 않는 프로바이오틱스(probiotics)를, pH-상승 또는 pH-버퍼링 물질 (예컨대 비카르보네이트, 카르바미드, 포스페이트, 단백질 및/또는 염)을 포함하는 물질과 조합하여 사용하는, 우수한 구강 건강과 관련된 구강 미생물총의 재확립 방법에 대해 개시하고 있다. US2006045870호는 호기성 및 혐기성 조건하에 그와 상호작용하여 과산화 수소를 생성시킴으로써 VSC-생산 세균의 생장을 억제하는, 웨이셀라(*Weissella*) 속에 속하는 생 유산균에 대해 개시하고 있다. US2006171901호는

BLIS (박테리옌(bacteriocin)-유사 억제 물질)-생산 스트렙토코쿠스 살리바리우스 균주 및 그의 추출물과 관련된, 혐기성 세균, 특히 구취 야기 세균의 또 다른 생장 억제 방법에 대해 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 구취의 예방 및 치료에 가용한 상기 방법들의 단점은 이러한 방법들 대부분이 입냄새의 주요 원인으로 알려져 있는 VSC-생산 세균의 생장을 억제할 뿐만 아니라, 다른 무해한 구강 미생물의 생장 역시 억제한다는 것이다.
- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 입냄새 및/또는 구취의 예방 및/또는 치료를 위한 대안적인 수단 및 방법을 제공하는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0008] 이에 따라 제1 양태에서, 본 발명은 하기의 분석 (a)에 적용하였을 경우 하기의 특성 (b)를 나타내는 것을 특징으로 하는, 유산균 군에 속하는 미생물에 관한 것이다:
- [0009] 분석 (a):
- [0010] (a) 1×10^7 세포/ml의 개시 세포 밀도를 사용하여, 15 g/l의 펩티드를 함유하는 합성 배지에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 24시간 동안 미생물을 배양하고;
- [0011] (b) $4000 \times g$ 에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 제거하고;
- [0012] (c) 생성되는 상청액 중 펩티드 농도를 측정함;
- [0013] 특성 (b):
- [0014] 미생물이 배양 배지 중 펩티드 농도의 감소시킴으로써, 24시간 동안 배양 후의 상청액 중 펩티드 농도가 15 g/l의 개시 농도에 비해 20% 이상 감소됨, 즉 미생물이 분석 (a)의 배지 중 펩티드 농도를 20% 이상 감소시킬 수 있음.
- [0015] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 미생물은 또한 하기의 분석 (A)에 적용하였을 경우 하기의 특성 (B)를 나타낸다:
- [0016] (a) 1×10^7 세포/ml의 개시 세포 밀도를 사용하여, 100 ml의 합성 배지에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 24시간 동안 미생물을 배양하고;
- [0017] (b) 이어서 $4000 \times g$ 에서 15분 동안 세포를 원심분리하고, 20 ml의 H₂O에 재현탁하고;
- [0018] (c) 이어서 세포를 -80 °C로 냉동시키고, 진공하에 16시간 동안 동결건조하고;
- [0019] (d) 10 mg의 동결건조된 세균을 H₂O에 재현탁하고, $4000 \times g$ 에서 10분 동안 원심분리하고;
- [0020] (e) 7 g/l의 펩티드를 함유하는 합성 배지 1 ml를 세포 펠렛에 첨가하여, 세포를 배지에 재현탁하고, 37 °C에서 5분 동안 호기성 배양한 후, $4000 \times g$ 에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 제거하고;
- [0021] (f) 생성되는 배지 상청액 중 펩티드 농도를 측정함;
- [0022] 특성 (B): 동결건조된 세균이 배양 기간 개시시의 배지 중 농도 (7 g/l)에 비해 생성되는 배지 상청액 중 펩티드 농도를 20% 이상 감소시킴.
- [0023] 바람직한 구현예에서, 분석 (a) 또는 (A)에서의 펩티드 농도는 본 발명에 따른 미생물에 의해 30% 이상, 더욱 바람직하게는 40% 이상, 더욱 더 바람직하게는 50% 이상 감소된다.
- [0024] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 미생물은 분석 (A)에서의 펩티드 농도를 60% 이상, 더욱 더 바람직하게는 70% 이상 감소시킬 수 있다.
- [0025] 따라서, 본 발명은 그의 환경 중에서, 특히 침부된 실시예에 기술되어 있는 바와 같은 타액 중에서도 펩티드 농도를 효과적으로 감소시킬 수 있는 미생물을 제공한다. 알려져 있는 바와 같이, 입냄새는 건강한 구강 미생물총 (주로 스트렙토코쿠스 살리바리우스로 구성됨)과 병원성 구강 미생물총 (주로 혐기성 그람-음성 세균으로 구

성됨) 사이의 비가 타액 중에 존재하는 단백질을 휘발성 화합물로 분해하는 혐기성 그람-음성 세균쪽으로 이동 되는 것에 의해 야기된다. 이것은 입냄새를 야기하는 휘발성 황 화합물의 생성을 초래한다.

[0026] 본 발명의 미생물은 펩티드의 양을 감소시킴으로써 구강 미생물총 중 혐기성 그람-음성균의 기질을 고갈시키는 것에 의해 입냄새를 감소시킬 수 있다.

[0027] "합성 배지"라는 용어는 화학적으로 정의되어 있는 배지, 즉 화학적 조성이 알려져 있는 배지를 지칭한다. 상 기 합성 배지는 문제 미생물의 배양에 적합한 모든 합성 배지일 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 합성 배지는 US 6,340,585호에 개시되어 있는 바와 같은 합성 배지이다.

[0028] 바람직한 구현예에서, 합성 배지는 하기의 조성을 가지는 배지이다:

| | |
|---|------------------------|
| 구아닌: | 0.1 g/l |
| 시토신: | 0.1 g/l |
| 티미딘: | 0.1 g/l |
| 2'-데옥시아데노신: | 0.1 g/l |
| 2'-데옥시우리딘: | 0.1 g/l |
| K ₂ HPO ₄ : | 2 g/l |
| 나트륨-아세테이트: | 5 g/l |
| MgSO ₄ -7수화물: | 0.1 g/l |
| 디-암모늄 수소 시트레이트: | 2 g/l |
| CaCl ₂ -2수화물: | 0.5 g/l |
| 올레산: | 0.1 % (w/v) |
| 시아노코발라민: | 0.02 mg/l |
| 리보플라빈: | 10 mg/l |
| 엽산: | 0.2 mg/l |
| 피리독살-5-포스페이트-1수화물: | 10 mg/l |
| 4-아미노벤조산: | 0.2 mg/l |
| D(+)-바이오틴: | 1 mg/l |
| 아스코르브산: | 500 mg/l |
| 니코틴산: | 10 mg/l |
| Ca-판토테네이트: | 10 mg/l |
| 티아민: | 1 mg/l |
| 코발트(II)-니트라트-6수화물: | 500 mg/l |
| MnSO ₄ -1수화물: | 20 mg/l |
| MgSO ₄ -7수화물: | 500 mg/l |
| Na ₂ MoO ₄ : | 0.04 mg/l |
| PTU-추출물 (독일 소재 올리, 도이치 헤페베르케 (Ohly, Deutsche Hefewerke) 사): | 15 g/l (또는 달리 언급되는 대로) |
| D-글루코스-1수화물: | 10 g/l |

[0029]

[0030] "15 g/l의 펩티드를 함유하는" (또는 "7 g/l의 펩티드를 함유하는")이라는 용어는 합성 배지가 배양 기간 개시 시에 15 g/l의 펩티드 (또는 각각 7 g/l의 펩티드)를 함유한다는 것을 의미한다. 원칙적으로, 상기 펩티드는 모든 종류의 펩티드일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 합성 배지에 함유되어 있는 펩티드는 효모 추출물, 바람 직하게는 PTU 추출물의 형태이다. PTU 추출물은 독일 소재 올리, 도이치 헤페베르케 사로부터 구입될 수 있다. 이것은 고함량의 용이하게 가용한 펩티드를 포함하는 한외여과 저염 효모 추출물로서, 바람직하게는 하기의 특 성을 나타낸다:

평균 분석:

| | |
|-------------------------|-------|
| • 건조 물질: | 96% |
| • 건조 물질 중 단백질 (N×6,25): | 72.9% |
| • 건조 물질 중 총 질소: | 11.7% |
| • NaCl: | ≤1.0% |
| • 회분: | 10% |
| • pH (2 % 용액 중): | 5.7 |

[0031]

비타민 (통상):

| | |
|------------------------|---------------|
| • 티아민히드로클로리드×HCl (B1): | 1.2 mg/100g |
| • 리보플라빈 (B2): | 7.0 mg/100g |
| • 피리독신×HCl (B6) | 5.9 mg/100g |
| • 니코틴산: | 47.8 mg/100g |
| • 바이오틴: | 0.022 mg/100g |
| • Ca-D-판토텐레이트: | 17.9 mg/100g |
| • 엽산: | 3.7 mg/100g |

[0032]

[0033] 아미노산 프로파일(profile) (통상): 도 7에 나타낸 바와 같음.

[0034] "세포/ml의 개시 세포 밀도"라는 용어는 합성 배지가 배양 기간 개시시에 미생물에 의해 접종됨으로써, 1×10^7 세포/ml가 배지에 존재한다는 것을 의미한다.

[0035] 펩티드 농도는 업계 숙련자에게 알려져 있는 어떠한 방법에 의해서도 측정될 수 있다. 잘 알려져 있는 방법은 예를 들면 뷰렛(Biuret), 로우리(Lowry) 또는 브래드포드(Bradford)에 따른 방법이다. 또한, 소정의 시중에서 구입가능한 키트 또는 펩티드 농도를 측정하기 위한 기타 도구가 사용될 수 있다. 바람직한 일 예는 인비트로 겐(Invitrogen)사의 퀀트-잇 프로테인(Quant-it Protein) 키트와 같이 형광 염료를 기반으로 하는 도구 또는 키트이다. 상기 언급된 분석 (a) 및/또는 (A)에서의 펩티드 농도의 감소는 바람직하게는 첨부된 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 분석된다.

[0036] 첨부된 실시예에 나타낸 바와 같이, 놀랍게도, 그의 환경 중에서 펩티드 농도를 현격하게 감소시키는 능력을 가지는 유산균이 확인될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이와 같은 효과는 생균을 사용해서뿐만 아니라, 동결건조된 형태를 사용하여서도 관찰된다. 또한 실시예에서는, 본 발명에 따른 미생물이 상기한 분석에서뿐만 아니라 타액 중에서도 상기 언급된 효과를 나타낸다는 것, 및 타액에 첨가되었을 때, 본 발명에 따른 미생물의 존재가 H_2S 생성의 놀랄만한 감소를 초래한다는 것을 볼 수 있다.

[0037] 특히, 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 미생물은 또한 하기의 분석 (c)에 적용되었을 경우 하기의 특성 (d)를 나타낸다:

[0038] 분석 (c):

[0039] (a) 1×10^7 세포/ml의 개시 세포 밀도를 사용하여, 100 ml의 합성 배지에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 24시간 동안 미생물을 배양하고;

[0040] (b) 이어서 4000×g에서 15분 동안 세포를 원심분리하고, 20 ml의 H_2O 에 재현탁하고;

[0041] (c) 이어서 세포를 -80 °C로 냉동시키고, 진공하에 16시간 동안 동결건조하고;

[0042] (d) 10 mg의 동결건조된 세균을 딥-웰 플레이트(deep-well plate)에서 H_2O 에 재현탁하고, 4000×g에서 10분 동안 원심분리하고;

[0043] (e) 3 g/l의 펩티드를 함유하는 합성 배지 1 ml를 펠렛에 첨가하고, 37 °C에서 5분 동안 배양한 후, 4000×g에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 제거하고;

[0044] (f) 다음에, 상청액을 새로운 딥-웰 플레이트로 옮기고, 이어서 10 내지 100 μl , 바람직하게는 50 μl 의 비살균 인간 타액을 접종한 후, 납 아세테이트로 함침된 살균 여과지로 딥-웰 플레이트를 덮은 채 37 °C에서 6시간 동안 혐기성으로 배양하고;

[0045] (g) 여과지의 흑색화를 측정함으로써, 반응액 중 미생물에 의한 황화 수소의 생산을 모니터링함;

[0046] 특성 (d): 본 발명에 따른 미생물의 존재하에서는, 납 아세테이트 함침된 여과지의 흑색화가 상기 미생물을 사용하여 배지가 사전배양되지 않은 대조에 비해 감소됨. 여과지 흑색화의 감소는 배지를 접종하는 데에 사용되었던 비살균 인간 타액에 함유되어 있는 세균에 의한 H_2S 생성의 감소를 표시한다.

[0047] " H_2S 생성의 감소"라는 용어는 대조와 비교하였을 때 10% 이상, 더욱 바람직하게는 20% 이상, 더욱 더 바람직

하계는 30% 이상, 특히 바람직하게는 40% 이상, 심지어는 50% 이상의 H_2S 생성의 감소를 의미한다. 상기 감소는 예를 들면 여과지의 흑색화를 밀도측정 분석함으로써 측정될 수 있다. 다르게는, 단계 (f) 및 (g)에서의 황화 수소 생성은 여과지를 사용하여 측정되는 것이 아니라, 그 대신 기체크로마토그래피를 사용한 헤드스페이스(Headspace) 분석에 의해 측정된다.

- [0048] 제2 양태에서, 본 발명은 또한 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극할 수 있으나 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 강기발리스의 생장은 자극하지 않는 것을 특징으로 하는, 유산균 군에 속하는 미생물에 관한 것이다.
- [0049] 스트렙토코쿠스 살리바리우스 종 미생물의 성장과 관련한 "자극하다"라는 용어는 본 발명에 따른 미생물과 접촉하였을 때 상기 미생물의 생장이 증가된다는 것을 의미한다. 성장의 증가는 바람직하게는 증식, 즉 시간 단위 당 세포 분열의 증가를 의미한다. 다르게는, "자극하다"라는 용어는 개별 세포 크기의 증가를 지칭하기도 한다. 세균 세포의 크기는 염색제 SYBR 그린(Green) I (미국 소재 몰클라 프로브즈(Molecular Probes) 사)을 사용한 염색 후에 유세포 분석법(flow cytometry) (예를 들면 캘리포니아 산 호세 소재 벡톤-딕킨슨(Becton-Dickinson) FACSORT 사의 유세포 분석기)에 의해 측정될 수 있다. 세균 세포 크기는 측면-각 광 산란기 (SSC) 모드로 측정된다. 따라서, 성장의 증가는 시간 단위 당 생물량 생성의 증가를 의미한다.
- [0050] 각 미생물 성장의 자극은 바람직하게는 생체외에서, 더욱 바람직하게는 본 발명에 따른 미생물이 스트렙토코쿠스 살리바리우스와 접촉된 후 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장이 측정되는 분석에서 관찰될 수 있다. 생장은 상이한 시간 간격의 배양 후의 세포/집락 수를 계수함으로써 측정될 수 있으며, 본 발명에 따른 미생물을 함유하지 않는 대조와 비교됨으로써 성장의 증가가 존재하는지를 측정하는 것을 가능케 할 수 있다.
- [0051] 성장의 자극을 측정하기 위한 생체외 분석에 대해서는 실시예에 기술되어 있으며, 소위 "광도측정 공동-배양-분석"을 포함하고 있다. 요약하면, 상기 분석은 하기의 단계들을 포함한다:
- [0052] (a) 유산균 군에 속하는 시험될 미생물을 1/2 TSY 배지 중에서 1:100 (유산균:스트렙토코쿠스 살리바리우스)의 셀 계수 비로 스트렙토코쿠스 살리바리우스와 혼합하는 단계;
- [0053] (b) 배양 현탁액을 37 °C에서 12시간 동안 호기성으로 배양하는 단계;
- [0054] (c) 대조로서, 비소비(unconsumed) 1/2 TSY 배지 또는 MRS 광 배지를 사용하는 단계;
- [0055] (d) 지수 성장 동안, 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$)를 측정하거나, 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})를 측정하는 단계; 및
- [0056] (e) 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$) 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})가 대조와 비교하여 10% 이상 증가하였을 경우, 미생물을 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 성장을 자극할 수 있는 미생물로 분류하는 단계.
- [0057] "1/2 TSY 배지"라는 용어는 1:1 (부피:부피)의 비로 H_2O 와 희석된 TSY 배지를 지칭한다.
- [0058] 바람직한 구현예에서, 상기 배양은 96-웰-플레이트에서 수행된다. 다른 바람직한 구현예에서, 배양은 바이오 텍 파워웨이브(Bio Tek PowerWave) 마이크로플레이트 분광광도계 (독일 소재 바이오 텍 인스트루먼트즈(Biotek Instruments) GmbH 사)에서 수행된다.
- [0059] 바람직하게는, 상기 $OD_{600,max}$ 및/또는 V_{max} 는 하기와 같이 측정된다:
- [0060] 배양 개시 후 장기간의 시간, 바람직하게는 약 8 내지 12시간 동안 규칙적인 간격, 예를 들면 2.5분마다 OD_{600} 에서의 광학 밀도가 측정된다. $OD_{600,max}$ 의 측정에 있어서, OD_{600} 의 측정은 바람직하게는 배양 후 10시간 동안 수행된다.
- [0061] $OD_{600,max}$ 의 측정에 있어서, 평균 값은 3개의 최고 측정 값으로부터 계산된다.
- [0062] V_{max} 는 바람직하게는 가장 가파른 경사를 나타내는 15개의 연속되는 값을 선택함으로써 측정된다. V_{max} 를 표시하는 단위는 $mOD/\text{분}$ 이다. V_{max} 의 계산을 위한 OD_{600} 의 측정은 바람직하게는 배양 미생물의 지수 성장 단계를 포괄하는 것을 가능케 하는 시간 기간 동안 수행된다.
- [0063] 바람직하게는, 본 발명에 따른 미생물은 상기한 분석에서 대조에 비해 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 최대 광

학 밀도 ($OD_{600, \max}$) 또는 최대 성장 속도 (V_{\max})의 15% 이상, 더욱 바람직하게는 20% 이상, 더욱 더 바람직하게는 30% 이상, 특히 바람직하게는 40%, 50%, 60%, 70%, 심지어는 80% 이상 증가를 초래한다.

- [0064] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 상기 미생물은 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 성장을 자극할 뿐만 아니라, 건강한 구강 미생물총의 다른 미생물 1종 이상의 성장도 자극한다. 그와 같은 미생물의 예는 스트렙토코쿠스 오랄리스 및 스트렙토코쿠스 에피테르미디스이다. 이러한 세균의 자극은 상기한 바와 같은 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 상기 미생물은 또한 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 성장을 자극하지 않는다는 것을 특징으로 한다. 일 미생물은 그것과 접촉되었을 때 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스 성장의 증가를 초래하지 않을 경우, 일시적 병원성 미생물총 미생물의 성장을 자극하지 않는 것으로 간주된다. 성장의 자극 또는 그의 부재는 생체외에서 시험될 수 있다. 성장의 자극 또는 그의 부재를 측정하기 위한 생체의 분석에 대해서는 실시예에 기술되어 있으며, 소위 "광도측정 공동-배양-분석"을 포함하고 있다. 요약하면, 상기 분석은 스트렙토코쿠스 뮤탄스의 경우에 하기의 단계들을 포함한다:
- [0066] (a) 유산균 군에 속하는 시험될 미생물을 150 μ l의 합성 배지를 사용하여 96-웰-플레이트에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 24시간 동안 배양한 후, 4000×g에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 펠렛화하고, 상청액을 회수하는 단계;
- [0067] (b) 폐쇄된 15-ml 팔콘(Falcon) 튜브 내의 TSY 배지 5 ml 중에서 37 °C에서 밤새 스트렙토코쿠스 뮤탄스를 혐기성 배양하는 단계;
- [0068] (c) 스트렙토코쿠스 뮤탄스 세포 배양물을 2:1의 부피 비로 단계 (a)의 상청액과 혼합하는 단계;
- [0069] (d) 배양물 현탁액을 37 °C에서 12시간 동안 호기성으로 배양하는 단계;
- [0070] (e) 대조로서, 비소비 1/2 TSY 배지 또는 MRS 광 배지를 사용하는 단계;
- [0071] (f) 지수 성장 동안, 최대 광학 밀도 ($OD_{600, \max}$)를 측정하거나, 및/또는 최대 성장 속도 (V_{\max})를 측정하는 단계; 및
- [0072] (g) 최대 광학 밀도 ($OD_{600, \max}$) 및/또는 최대 성장 속도 (V_{\max})가 대조와 비교하여 증가하지 않았을 경우, 미생물을 스트렙토코쿠스 뮤탄스의 성장을 자극할 수 없는 미생물로 분류하는 단계.
- [0073] 다르게는, 상기 분석은 하기의 단계들을 포함할 수 있다:
- [0074] (A) 유산균 군에 속하는 시험될 미생물을 1/2 TSY 배지 중에서 1:100 (락토바실루스:S. 뮤탄스)의 세포 계수 비로 스트렙토코쿠스 살리바리우스와 혼합하는 단계;
- [0075] (B) 배양물 현탁액을 37 °C에서 12시간 동안 호기성으로 배양하는 단계;
- [0076] (C) 대조로서, 비소비 1/2 TSY 배지 또는 MRS 광 배지를 사용하는 단계;
- [0077] (D) 지수 성장 동안, 최대 광학 밀도 ($OD_{600, \max}$)를 측정하거나, 및/또는 최대 성장 속도 (V_{\max})를 측정하는 단계; 및
- [0078] (E) 최대 광학 밀도 ($OD_{600, \max}$) 및/또는 최대 성장 속도 (V_{\max})가 대조와 비교하여 증가하지 않았을 경우, 미생물을 스트렙토코쿠스 뮤탄스의 성장을 자극할 수 없는 미생물로 분류하는 단계.
- [0079] 포르피로모나스 킵리발리스의 경우, 분석은 하기의 단계들을 포함한다:
- [0080] (h) 유산균 군에 속하는 시험될 미생물을 150 μ l의 합성 배지를 사용하여 96-웰-플레이트에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 24시간 동안 배양하고, 4000×g에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 펠렛화하고, 상청액을 회수하는 단계;
- [0081] (i) 폐쇄된 15-ml 팔콘 튜브 내의 FAB 배지 5 ml 중에서 37 °C에서 밤새 포르피로모나스 킵리발리스를 혐기성 배양하는 단계;
- [0082] (j) 포르피로모나스 킵리발리스 세포 배양물을 2:1의 부피 비로 단계 (h)의 상청액과 혼합하는 단계;
- [0083] (k) 배양물 현탁액을 37 °C에서 45시간 동안 혐기성으로 배양하는 단계;

- [0084] (l) 대조로서, 비소비 FAB 배지를 사용하는 단계;
- [0085] (m) 배양 10, 15, 21, 39 및 45시간 후에, 광학 밀도 (OD_{600})를 측정하는 단계 (OD_{600}); 및
- [0086] (n) 각 측정 시간에서의 광학 밀도 (OD_{600})가 대조와 비교하여 증가하지 않았을 경우, 미생물을 포르피로모나스 킵기발리스의 성장을 자극할 수 없는 미생물로 분류하는 단계.
- [0087] 다르게는, 상기 분석은 하기의 단계들을 포함한다:
- [0088] (H) 유산균 군에 속하는 시험될 미생물을 FAB 배지 중에서 1:100 (락토바실루스:P. 킵기발리스)의 세포 계수 비로 포르피로모나스 킵기발리스와 혼합하는 단계;
- [0089] (I) 배양물 현탁액을 37 °C에서 45시간 동안 호기성으로 배양하는 단계;
- [0090] (J) 대조로서, 비소비 FAB 배지를 사용하는 단계;
- [0091] (K) 지수 성장 동안, 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$)를 측정하거나, 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})를 측정하는 단계; 및
- [0092] (L) 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$) 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})가 대조와 비교하여 증가하지 않았을 경우, 미생물을 포르피로모나스 킵기발리스의 성장을 자극할 수 없는 미생물로 분류하는 단계.
- [0093] 바람직한 구현예에서, 단계 (d) 및 (B)의 배양은 96-웰-플레이트에서 수행된다. 다른 바람직한 구현예에서, 배양은 바이오 텍 파워웨이브 마이크로플레이트 (독일 소재 Fa. 바이오텍 인스트루먼트 GmbH 사) 분광광도계에서 수행된다.
- [0094] 바람직한 구현예에서, 단계 (k) 및 (I)의 배양은 96-웰-플레이트에서 수행된다. 다른 바람직한 구현예에서, 배양은 휘틀리(Whitley) DG250 혐기성 워크스테이션(workstation) (독일 소재 마인트루프(Meintrup)-DWS 사)에서 수행된다.
- [0095] $OD_{600,max}$ 및 V_{max} 와 관련하여서는, 본원의 상기에 추가적으로 제시되어 있는 것과 동일한 것이 적용된다.
- [0096] 해당 미생물과 접촉하였을 때 생장이 증가하지 않거나, 약간만 증가하였을 경우, 미생물은 스트렙토코쿠스 뮤탄스 또는 포르피로모나스 킵기발리스의 미생물 성장을 자극하지 않는 것으로 간주된다. "약간 증가하는"은 생장이 대조와 비교하였을 때 5% 이하, 더욱 바람직하게는 대조와 비교하였을 때 2% 이하 증가한다는 것을 의미한다. "증가하지 않는"이라는 용어는 본 발명의 미생물과 접촉하였을 때, 본 발명의 미생물이 존재하지 않는 대조와 비교하여 스트렙토코쿠스 뮤탄스 또는 포르피로모나스 킵기발리스의 성장 사이에 통계적으로 의미있는 차이를 발견할 수 없다는 것을 의미한다. 바람직한 구현예에서, "증가하지 않는"이라는 용어에는 미생물이 실제로는 스트렙토코쿠스 뮤탄스 또는 포르피로모나스 킵기발리스 생장의 감소를 초래하는, 즉 그것이 해당 미생물의 성장을 억제하는 경우들도 포함된다.
- [0097] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 미생물은 스트렙토코쿠스 뮤탄스 또는 포르피로모나스 킵기발리스의 성장에 부정적인 영향을 주지 않는다. "부정적인 영향을 주지 않는"이라는 용어는 본 발명의 미생물과 접촉하였을 때, 본 발명의 미생물이 존재하지 않는 대조와 비교하여 스트렙토코쿠스 뮤탄스 또는 포르피로모나스 킵기발리스 생장의 억제를 발견할 수 없다는 것을 의미한다.
- [0098] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 미생물은 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵기발리스의 성장을 자극하지 않을 뿐만 아니라, 구강 미생물총 중 다른 병원성 미생물 1종 이상의 성장도 자극하지 않는다. 대표적인 병원성 구강 세균은 혐기성의 그람-음성 세균이다. 다른 예로는 악티노바실루스 악티노마이세탐코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), 악티노마이세스 나에슬룬디이(*Actinomyces naeslundii*), 푸소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 푸소박테리움 뉴클레아툼 폴리모르프(*Fusobacterium nucleatum polymorphum*), 프레보텔라 인터메디아(*Prevotella intermedia*), 솔로박테리움 무레이(*Solobacterium moorei*), 스트렙토코쿠스 고르도니이(*Streptococcus gordonii*), 스트렙토코쿠스 미티스(*Streptococcus mitis*), 스트렙토코쿠스 상귀니스(*Streptococcus sanguinis*), 탄넬라 포르신텐시스(*Tannerella forsythensis*) 및 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*)가 있다.
- [0099] 이들 세균에 대한 생장의 자극 또는 자극의 부재는 S. 뮤탄스 및 P. 킵기발리스에 대하여 상기한 바와 같은 분석에 의해 측정될 수 있다.

- [0100] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 상기 미생물은 살아있는 세포로서 뿐만 아니라 배양 상청액으로서도 스트렙토코쿠스 살리바리우스 생장의 자극 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다. 이는 본 발명에 따른 미생물로부터 획득되는 배양 상청액 역시 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장을 자극하는 효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 바람직하게는 이와 같은 효과는 하기의 분석으로 드러난다:
- [0101] (a) 스트렙토코쿠스 살리바리우스를 6-웰-플레이트에서 8 ml의 TSY 배지를 사용하여 37 °C에서 밤새 혐기성 배양하는 단계;
- [0102] (b) 유산균 군에 속하는 시험될 미생물을 150 μ l의 합성 배지를 사용하여 96-웰-플레이트에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 24시간 동안 배양하고, 4000 \times g에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 펠렛화하고, 상청액을 회수하는 단계;
- [0103] (c) 1/2 TSY 배지 중에서 단계 (a)의 스트렙토코쿠스 살리바리우스 세포 배양물을 2:1 내지 4:1의 부피 비로 단계 (b)의 상청액과 혼합하는 단계;
- [0104] (d) 배양물 현탁액을 37 °C에서 12시간 동안 호기성으로 배양하는 단계;
- [0105] (e) 대조로서, 비소비 1/2 TSY 또는 MRS 광 배지를 사용하는 단계;
- [0106] (f) 지수 성장 동안, 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$)를 측정하거나, 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})를 측정하는 단계; 및
- [0107] (g) 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$) 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})가 대조와 비교하여 10% 이상 증가하였을 경우, 미생물을 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장을 자극할 수 있는 미생물로 분류하는 단계.
- [0108] 바람직한 구현예에서, 배양은 96-웰-플레이트에서 수행된다. 다른 바람직한 구현예에서, 배양은 바이오 텍 파워웨이브 마이크로플레이트 분광광도계 (독일 소재 바이오텍 인스트루먼츠 GmbH 사)에서 수행된다.
- [0109] $OD_{600,max}$ 및 V_{max} 와 관련하여서는, 본원의 상기에 추가적으로 제시되어 있는 것과 동일한 것이 적용된다.
- [0110] 바람직하게는, 본 발명에 따른 미생물은 상기한 분석에서 대조에 비해 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$) 또는 최대 성장 속도 (V_{max})의 15% 이상, 더욱 바람직하게는 20% 이상, 더욱 더 바람직하게는 30% 이상, 특히 바람직하게는 40%, 50%, 60%, 70%, 심지어는 80% 이상 증가를 초래한다.
- [0111] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 미생물이 나타내는 스트렙토코쿠스 살리바리우스 생장의 자극은 열 처리에 대하여 내성으로서, 다시 말하자면 세포 (또는 그의 추출물) 또는 배양 상청액이 열 처리에 적용되었을 경우에도 그것이 발현된다. 상기 열 처리는 바람직하게는 60 °C 내지 100 °C 사이, 더욱 바람직하게는 70 °C 내지 90 °C 사이, 더욱 더 바람직하게는 75 °C 내지 85 °C 사이 온도, 가장 바람직하게는 80 °C 부근 또는 정확하게 80 °C의 온도에서의 열 처리이다.
- [0112] 일반적으로, 열 처리는 1분 이상의 시간 기간 동안 지속되어야 한다. 바람직하게는, 열 처리는 n분 이상의 시간 기간 동안 지속되며, 여기서 n은 2 내지 60 범위의 정수인데, n = 10 또는 15 또는 20인 것이 특히 바람직하다. 그러나, 원칙적으로 배양 시간에 있어서 상위 한계는 존재하지 않는다. 그러나, 바람직하게는 그것은 4, 3, 2 또는 1시간을 넘지 않는다. 가장 바람직한 열 처리는 배양기 중 80 °C의 온도에서 약 10분간이다. 가장 바람직한 열 처리는 세포의 단백질 및 소정 활력의 모든 기능을 폐지함으로써, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물을 그것이 여전히 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장을 자극할 수 있다는 점에서 다른 미생물과 구별하도록 해주는 것으로 생각된다. 따라서, 그것은 미생물이 생존하지 않아야 할 필요가 있는 경우에, 본 발명의 맥락에서 소정의 식품, 사료, 음료 또는 조성물에 사용하기에 매우 유용하다.
- [0113] 냉각시킨 후에는, 본원에서 상기한 바와 같은, 또는 첨부된 실시예에 기술되어 있는 바와 같은 분석에서, 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장을 자극하는 본 발명에 따른 미생물 (또는 그의 추출물) 또는 그의 배양 상청액의 능력이 측정된다. 본 발명에 따른 미생물의 배양 상청액에 있어서, 상응하는 분석은 바람직하게는 하기의 단계들을 포함한다:
- [0114] (h) 스트렙토코쿠스 살리바리우스를 6-웰-플레이트에서 8 ml의 TSY 배지를 사용하여 37 °C에서 밤새 혐기성 배양하는 단계;
- [0115] (i) 유산균 군에 속하는 시험될 미생물을 150 μ l의 합성 배지를 사용하여 96-웰-플레이트에서 혐기성 조건하에

37 °C에서 24시간 동안 배양한 후, 4000×g에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 펠렛화하고, 상청액을 회수하는 단계;

- [0116] (j) 상청액을 배양기에서 80 °C로 10분 동안 배양하고, 이어서 실온으로 냉각하는 단계;
- [0117] (k) 1/2 TSY 배지 중에서 단계 (a)의 스트렙토코쿠스 살리바리우스 세포 배양물을 2:1의 부피 비로 단계 (j)의 상청액과 혼합하는 단계;
- [0118] (l) 배양물 현탁액을 37 °C에서 12시간 동안 호기성으로 배양하는 단계;
- [0119] (m) 대조로서, 비소비 1/2 TSY 또는 MRS 광 배지를 사용하는 단계;
- [0120] (n) 지수 성장 동안, 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$)를 측정하거나, 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})를 측정하는 단계; 및
- [0121] (o) 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$) 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})가 대조와 비교하여 10% 이상 증가하였을 경우, 미생물을 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 성장을 자극할 수 있는 미생물로 분류하는 단계.
- [0122] 또한, 본 발명에 따른 미생물의 스트렙토코쿠스 류탄스 및/또는 포르피로모나스 강기발리스 생장의 비-자극 특성 역시 열 처리에 대하여 내성이다. 열 처리라는 용어의 정의와 관련하여서는, 상기에 제시되어 있는 것과 동일한 것이 적용된다.
- [0123] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 미생물이 나타내는 스트렙토코쿠스 살리바리우스 생장의 자극은 동결건조에 대하여 내성으로서, 다시 말하자면 세포가 동결건조 처리에 적용되었을 경우에도 그것이 발현된다. 상기 동결건조 처리는 바람직하게는 세포 (또는 그의 추출물) 또는 세포 상청액이 먼저 -80 °C로 냉동되고, 이어서 진공하에 16시간 동안 동결건조되는 동결건조 처리이다. 동결건조 처리 후에는, 상기에 이미 기술하였거나 첨부된 실시예에 기술되어 있는 바와 같은 분석에 의해 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 성장을 자극하는 본 발명에 따른 미생물의 능력이 시험될 수 있다. 본 발명에 따른 미생물의 배양 상청액에 있어서, 상응하는 분석은 바람직하게는 하기의 단계들을 포함한다:
- [0124] (p) 스트렙토코쿠스 살리바리우스를 6-웰-플레이트에서 8 ml의 TSY 배지를 사용하여 37 °C에서 밤새 혐기성 배양하는 단계;
- [0125] (q) 유산균 군에 속하는 시험될 미생물을 폐쇄된 100 ml 병 내의 합성 배지 50 ml 중에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 밤새 배양한 후, 4000×g에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 세포를 펠렛화하고, 상청액을 회수하는 단계;
- [0126] (r) 단계 (q)의 상청액 20 ml를 -80 °C로 냉동한 후, 진공하에 16시간 동안 동결건조하는 단계;
- [0127] (s) 동결건조된 상청액을 20 ml의 H₂O에 재현탁하는 단계;
- [0128] (t) 96 웰 플레이트 내의 1/2 TSY 배지 중에서 단계 (a)의 스트렙토코쿠스 살리바리우스 세포 배양물을 2:1의 부피 비로 단계 (s)의 상청액과 혼합하는 단계;
- [0129] (u) 배양물 현탁액을 37 °C에서 12시간 동안 호기성으로 배양하는 단계;
- [0130] (v) 대조로서, 비소비 1/2 TSY 또는 MRS 광 배지를 사용하는 단계;
- [0131] (w) 지수 성장 동안, 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$)를 측정하거나, 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})를 측정하는 단계; 및
- [0132] (x) 최대 광학 밀도 ($OD_{600,max}$) 및/또는 최대 성장 속도 (V_{max})가 대조와 비교하여 10% 이상 증가하였을 경우, 미생물을 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 성장을 자극할 수 있는 미생물로 분류하는 단계.
- [0133] 특히 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 미생물은 본 발명의 제1 및 제2 양태에서 기술된 특성 모두를 나타내는데, 각각 다시 말하자면, 제1 양태에 기술되어 있는 바와 같은 특성 (b) 및/또는 (B) (펩티드 농도의 현격한 감소)를 나타내며, 제2 양태에 기술되어 있는 바와 같은 특성 (스트렙토코쿠스 살리바리우스의 성장을 자극하는 것, 및 스트렙토코쿠스 류탄스 및/또는 포르피로모나스 강기발리스의 성장을 자극하지 않는 것)을 나타낸다.

- [0134] 상기한 바와 같은 본 발명에 따른 미생물은 그의 특성으로 인하여 구강 미생물총의 균형을 약취가 덜 발현되는 것과 관련된 개선을 초래하는 스트렙토코쿠스 살리바리우스 쪽으로 이동시킨다.
- [0135] 상기에서 분명히 알 수 있는 바와 같이, 상기-언급된 모든 특성들은 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물이 입냄새 및/또는 구취를 감소시키는 데에, 또는 입냄새 및/또는 구취, 특히 구강 미생물총의 병원성 미생물, 특히 혐기성 그람-음성 세균에 의해 야기되는 입냄새 및/또는 구취를 예방 및/또는 치료하는 데에 적합한 제제가 되도록 한다. 따라서, 본 발명에 따른 미생물은 입냄새의 감소에 효과를 가지며, 그에 따라 입냄새 및/또는 구취의 예방 및/또는 치료를 위한 유용한 제제이다.
- [0136] "입냄새를 예방하는"이라는 용어에는 입냄새의 예방이 포함된다. 따라서 예를 들면, 입냄새 발현의 원인이 되는 해당 미생물들과 접한 적은 없으나 접할 위험성, 즉 해당 미생물에 의해 감염될 위험성이 있을 수 있는 대상, 또는 아직 잘 균형잡힌 구강 미생물총을 가지고 있는 대상에게는, 해당 대상이 입냄새로 고통받지 않고자 하는 한, 본 발명의 미생물, 조성물, 용도 및 방법이 이익이 된다. 따라서, 본 발명의 미생물, 조성물, 용도 및 방법은 예를 들면 입냄새의 예방을 위하여 유아, 아동 또는 유년기의 동물에 적용될 수 있는데, 유아 또는 유년기 동물의 구강에는 보통 입냄새 발현의 원인이 되는 미생물이 없기 때문이다. 그러나, 본 발명에 따라 사용되는 바와 같은 미생물 및 조성물이 유아, 아동 또는 유년기 동물에 대한 투여로 제한되는 것은 아니다.
- [0137] "입냄새를 치료하는" 및 "구취를 치료하는"이라는 용어에는 생성되는 악취의 양을 감소시킬 목적으로 입냄새 및/또는 구취로 고통받는 대상에 대하여 본원에서 기술되는 바와 같은 미생물 또는 조성물을 투여하는 것이 포함된다.
- [0138] 임의로, 본 발명에 따른 미생물은 그의 입냄새 감소 효과 이외에도 그것이 투여되는 숙주 생물체에 대한 유익한 효과를 가지는 프로바이오틱 미생물이다. 일반적으로 허용되는 정의로써 "프로바이오틱"은 "장내 미생물 균형을 개선함으로써 숙주 동물에 유익한 영향을 주는 생 미생물 식이 보충제"이다.
- [0139] 따라서, 본 발명은 입냄새를 감소시키는 그의 효과 이외에도 프로바이오틱스로서 유용할 수 있는 식품-등급의 생물체인, 용이하게 투여가능한 세균의 용도를 제공한다.
- [0140] 놀랍게도, 배지로부터, 그리고 그에 따라 또한 타액으로부터 펩티드를 효율적으로 제거함으로써, 입냄새 발생을 초래하는 물질 생성의 원인이 되는 구강 미생물총에 존재하는 다른 미생물이 해당 물질을 생산하는 것을 예방하는, 본 발명에 따른 미생물의 효과는 동결건조된 형태, 또는 UV 광 또는 방사선을 사용한 처리로부터 생성되는 형태와 같은 미생물의 불활성화 형태를 사용하여서도 관찰될 수 있다.
- [0141] 가장 중요한 것은 상기 효과가 타액의 존재하에서도 발현된다는 것으로서, 이는 본 발명에 따른 미생물을 구강 적용의 형태로, 또는 식품, 사료 또는 음료용 첨가제로서 사용하기에 특히 적합하게 한다. 놀랍게도, 열적으로 불활성화되거나 동결건조된 형태, 특히 본원에서 개시되는 상기 미생물의 유사체, 유도체 또는 단편(들)은 여전히 상기한 분석에서 펩티드 농도를 특이적이고 효율적으로 감소시킬 수 있다.
- [0142] 마찬가지로, 본 발명의 제2 양태에서 기술된 바와 같은 본 발명에 따른 미생물의 특성, 즉 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며, 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 생장은 자극하지 않는 특성 역시 미생물 자체를 사용하여서 뿐만 아니라 미생물의 배양 상청액 및 불활성화 형태를 사용하여서도 발현된다. 특히, 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며, 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 생장은 자극하지 않는 특성은 열 처리에 대하여 내성이며, 동결건조 처리에 대하여 내성이다.
- [0143] 이러한 놀라운 효과들은 상기 미생물의 상기 불활성화 형태, 배양 상청액, 유사체(들) 또는 단편(들)은 물론, 그의 돌연변이 또는 유도체를, 입냄새 및/또는 구취를 예방 및/또는 치료하기 위하여 동물, 바람직하게는 인간 또는 포유동물에서 사용하기 위한 조성물에 사용하는 데에 유리하다. 특히 상기 불활성화 형태, 배양 상청액, 유사체 또는 단편은 임의의 조성물, 예를 들면 화장품 또는 약제학적 조성물, 식품 또는 사료 또는 음료 등에 용이하게 첨가될 수 있다. 또한, 그와 같은 불활성화 형태, 배양 상청액, 유사체 또는 단편의 제조는 저렴하고 용이하며, 그들은 펩티드 농도를 감소시키거나, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 생장은 자극하지 않는 그의 능력의 손실 없이 장기간의 시간 동안 저장될 수 있다. 본 발명에 따른 미생물의 특별한 장점은 그것이 동결건조 또는 분무-건조 또는 건조되었을 경우에 펩티드 농도를 감소시키거나, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 생장은 자극하지 않는 그의 능력을 유지한다는 것이다. 또한, 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스

스 강기발리스의 생장은 자극하지 않는 특성은 열 처리 후에도 유지된다. 상기 언급된 특성들은 본 발명에 따른 미생물을 본원에서 기술되는 조성물에 사용하기에 바람직한 성분이 되게 한다.

[0144] 또한, 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 미생물은 타액의 존재하에서도 상기한 특성들 (즉, 펩티드 농도의 감소, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스 생장의 자극, 및 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 강기발리스 생장의 비-자극)을 나타낸다. 타액은 침샘에 의해 합성되는 외부 분비물이다. 그것은 약 99%의 물 이외에 다수의 유기 및 무기 화합물들을 함유하는 복합 액체이다. 타액의 생리학적 성분들로는 특히 효소, 예를 들면 아밀라제, 카르보안히드라제, 라이소자임, 퍼옥시다제 또는 단백질, 예를 들면 뮤신, 락토펜, 프롤린-풍부 단백질, 시스타틴, 히스타틴 또는 스타테린 또는 가용성 IgA가 있다. 따라서, 타액 중에는 다양한 잠재적 방해 물질들이 존재하지만, 본 발명에 따른 미생물의 상기 언급된 특성들은 타액의 존재에 의해 방해받지 않는다.

[0145] 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 상기 언급된 특징들은 그것이 입냄새 및/또는 구취를 예방 및/또는 치료하기 위한 강력하고 효과적인 제제가 되게 하는데, 그것이 주로 다양한 형태로 특히 탄수화물 함유 음식물을 섭취한 후에 소정의 프로테아제들 및 낮은 pH 값을 가지는 타액이 존재하는 구강 및 치아를 포함한 입으로 투여되기 때문이다. 또한, 열 및/또는 동결건조에 대한 내성은 상기 음식물의 제조시에 음식물에 대한 첨가제로서 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물을 첨가함에 있어 유익한 효과를 가진다. 즉, 음식물은 종종 미생물의 생존력에 해로운 열 살균, 사전-조리, 저온살균 등에 적용되는 것이다.

[0146] 본 발명의 다른 구현예 및 장점들은 부분적으로는 본원의 상세한 설명에 제시되어 있으며, 부분적으로는 상세한 설명으로부터 자명할 수 있거나, 또는 본 발명의 실행시 습득될 수 있다.

[0147] 본 발명이 상세하게 기술되기 전에, 본 발명이 본원에서 기술되는 특정 방법론, 프로토콜, 세균, 박터, 및 시약 등으로 제한되지는 않는다는 것이 이해되어야 하는데, 그들이 변화할 수 있기 때문이다. 본원에서 사용되는 용어는 특정 구현예만을 기술하기 위한 것으로서, 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 본 발명의 영역을 제한하고자 하는 것은 아니라는 것 역시 이해되어야 한다. 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어들은 업계 일반의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0148] 바람직하게는, 본원에서 사용되는 용어는 문헌 ["A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W. Nagel, B. and Kolbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland]에 기술되어 있는 바와 같이 정의된다.

[0149] 본 명세서 및 이어지는 청구범위 전체에 걸쳐, 문맥상 다르게 요구되지 않는 한, "포함하다(comprise)"라는 말, 및 "포함하다(comprises)" 및 "포함하는"과 같은 변형은 언급된 정수 또는 단계, 또는 정수나 단계의 군을 포함하는 것을 의미하나, 임의의 다른 정수 또는 단계, 또는 정수나 단계의 군을 배제하는 것을 의미하지는 않는 것으로 이해될 것이다.

[0150] 수종의 문헌들이 본 명세서의 본문 전체에 걸쳐 인용된다. 전기 및 하기 모두에서, 본원에 인용되는 문헌들 (모든 특허, 특허 출원, 과학 논문, 제조자의 명세서, 지침 등 포함) 각각은 그 전체가 의거 참조로써 개재된다. 본원의 어떤 것도 본 발명이 이전 발명을 근거로 해당 개시를 선행하지 못한다고 승인하는 것으로 간주되어서는 아니 된다.

[0151] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용될 때, 단수 형태의 관사("a", "an" 및 "the")는 문맥상 분명하게 다르게 표시되지 않는 한 복수의 지시대상도 포함한다는 것에 유의해야 한다. 따라서 예를 들면, "시약(a reagent)"에 대한 언급은 1종 이상의 해당하는 상이한 시약들을 포함하며, "방법(the method)"에 대한 언급은 본원에서 기술되는 방법들을 위하여 변형 또는 치환될 수 있는, 업계 일반의 숙련자에게 알려져 있는 등가의 단계 및 방법들에 대한 언급을 포함한다.

[0152] 본 발명의 문맥에서 사용될 때, "유산균 군에 속하는 미생물"이라는 용어는 세균, 특히 그람-양성 발효 유박테리아(eubacteria), 더 구체적으로는 유산균을 포함한 락토박테리아세아에(lactobacteriaceae) 과에 속하는 미생물(들)을 포괄한다. 또한, 상기 용어는 상기한 특성들 (즉, 펩티드의 농도를 감소시키는 것, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 강기발리스의 생장은 자극하지 않는 것)을 유지하는, 상기 미생물(들)의 유도체 또는 돌연변이 또는 유사체 또는 단편, 예컨대 본원에서 기술되는 바와 같은 세포 추출물 또는 막 분획(membrane fraction)도 포괄한다. "유도체", "돌연변이", "유사체" 및 "단편"이라는 용어에 대해서는 본원에 다른 곳에 기술되어 있다. 분류학적 관점에서, 유산균은 스트렙토코쿠스, 엔테로코쿠스(Enterococcus), 류코노스톡(Leuconostoc), 및 락토바실루스의 하위군으로 나누어진

다. 상기 언급된 유산균 군에 속하는 미생물은 바람직하게는 락토바실루스 종이다. 유산균 군의 구성원에는 보통 포르피린 및 시토크롬이 결핍되어 있어서, 전자-전달 인산화를 수행하지 않으며, 그에 따라 기질-수준 인산화에 의해서만 에너지를 얻는다. 즉 유산균에서는, ATP가 탄수화물의 발효를 통하여 합성된다. 모든 유산균이 혐기성으로 성장하나, 많은 혐기성균들과 달리, 대부분의 유산균은 산소에 대해 민감성이 아니며, 그에 따라 그의 존재하에서는 물론, 그의 부재하에서도 성장할 수 있다. 따라서 바람직하게는, 상기 언급된 유산균 군에 속하는 미생물은 바람직하게는 락토바실루스 속에 속하는 내기성의 혐기성 유산균이다.

- [0153] 상기 언급된 유산균은 바람직하게는 길고 가느다란 것부터 짧고 구부러진 막대까지 변화하는 막대-형 또는 구형이며, 또한 바람직하게는 부동성 및/또는 무포자성으로서, 발효 대사의 주 생성물 또는 유일한 생성물로서 유산을 생산한다. 상기 언급된 미생물이 속하는 락토바실루스 속은 하기의 특징들에 의해 3종의 주요 하위군으로 나누어지며, 그에 따라 상기 언급된 락토바실루스 종은 하기 3종의 주요 하위군 중 하나에 속할 수 있는 것으로 간주된다:
- [0154] (a) 동종발효성(homofermentative) 락토바실루스
- [0155] (i) 엠덴-마이어호프 경로(Embden-Meyerhof pathway)를 통하여 글루코스로부터 85% 이상의 양으로 유산, 바람직하게는 유산의 L-, D- 또는 DL-이성질체(들)를 생산함;
- [0156] (ii) 45 °C의 온도에서는 성장하나, 15 °C의 온도에서는 그렇지 않음;
- [0157] (iii) 긴-막대 형상임; 및
- [0158] (iv) 세포 벽에 글리세롤 타이코산을 가짐;
- [0159] (b) 동종발효성 락토바실루스
- [0160] (i) 엠덴-마이어호프 경로를 통하여 유산, 바람직하게는 유산의 L- 또는 DL-이성질체(들)를 생산함;
- [0161] (ii) 15 °C의 온도에서 성장하며, 45 °C의 온도에서는 변이 성장을 나타냄;
- [0162] (iii) 짧은-막대 형상 또는 곤봉형임; 및
- [0163] (iv) 그의 세포 벽에 리비톨 및/또는 글리세롤 타이코산을 가짐;
- [0164] (c) 이종발효성 락토바실루스
- [0165] (i) 펜토스-포스페이트 경로를 통하여 글루코스로부터 50% 이상의 양으로 유산, 바람직하게는 유산의 DL-이성질체를 생산함;
- [0166] (ii) 이산화탄소 및 에탄올을 생산함;
- [0167] (iii) 15 °C 또는 45 °C의 온도에서 변이 성장을 나타냄;
- [0168] (iv) 길거나 짧은 막대 형상임; 및
- [0169] (v) 그의 세포 벽에 글리세롤 타이코산을 가짐.
- [0170] 상기한 특징들을 기준으로, 상기 언급된 미생물은 유산균 군, 특히 락토바실루스 속에 속하는 것으로 분류될 수 있다. 전통적인 분류학을 사용하는 것에 의해, 예를 들면 문헌 ["Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Williams & Wilkins Co., 1984)]의 관련 기술을 참조하여, 미생물이 락토바실루스 속에 속하는 것으로 결정될 수도 있다. 다르게는, 업계에 알려져 있는 방법, 예를 들면 그의 대사 지문(metabolic fingerprint), 즉 해당 미생물(들)이 당을 대사하는 능력의 비교 개관에 의해, 또는 예를 들면 문헌 [Schleifer et al., System. Appl. Microb., 18 (1995), 461-467] 또는 [Ludwig et al., System. Appl. Microb., 15 (1992), 487-501]에 기술되어 있는 다른 방법에 의해 미생물이 락토바실루스 속에 속하는 것으로 분류될 수 있다. 상기 언급된 미생물은 락토바실루스 속에 속하는 미생물에 대하여 통상적이며 업계에 알려져 있는 당 공급원들을 대사할 수 있다. 그러나 바람직하게는, 상기 언급된 미생물은 하기로 구성되는 군에서 선택되는 대사 지문을 가진다:
- [0171] (i) D-락토스는 대사하나, L-소르보스 및/또는 D-사카로스 및/또는 D-이눌린은 그렇지 않음,
- [0172] (ii) 이눌린을 대사함,
- [0173] (iii) L-소르보스는 대사하나, D-락토스 및/또는 D-사카로스 및/또는 이눌린은 그렇지 않음, 및

- [0174] (iv) L-소르보스, D-락토스 및 이눌린을 대사함.
- [0175] 바람직하게는, 상기 언급된 미생물은 하기로 구성되는 군에서 선택되는 대사 지문을 가진다:
- [0176] (i) D-락토스는 대사하나, L-소르보스, D-사카로스 및 이눌린은 그렇지 않음,
- [0177] (ii) L-소르보스, D-락토스 및 이눌린은 대사하나, D-사카로스는 그렇지 않음,
- [0178] (iii) L-소르보스는 대사하나, D-락토스, D-사카로스 및 이눌린은 그렇지 않음, 및
- [0179] (iv) L-소르보스, D-락토스, D-사카로스는 대사하나, 이눌린은 그렇지 않음.
- [0180] 물론, 상기 언급된 미생물이 상기 언급된 대사 지문 패턴에 언급되어 있는 당들의 대사로 제한되는 것은 아니며, 오히려 락토바실루스 종에 의해 보편적으로 대사되는 다른 당들을 대사할 수 있을 수도 있다.
- [0181] 상기 언급된 미생물의 락토바실루스 속으로의 귀속은 업계에 알려져 있는 다른 방법, 예를 들면 결정될 총 총 단백질의 SDS-PAGE 겔 전기영동을 사용하는 것, 및 그것을 알려져 있으며 이미 특성화되어 있는 락토바실루스 속의 균주와 비교하는 것에 의해 특성화될 수도 있다. 상기한 바와 같은 총 단백질 프로필을 제조하기 위한 기술은 물론, 그와 같은 프로필의 숫자 분석에 대해서는 업계 숙련자에게 잘 알려져 있다. 그러나, 결과는 공정의 각 단계가 충분히 표준화되었을 때에 한해서만 신뢰성이 있다. 미생물의 락토바실루스 속에 대한 귀속을 결정할 때의 정밀성 요건과 관련하여서는, 1994년 9월 12일 내지 16일자 벨기에 소재 겐트(Ghent) 대학교에서의 유럽 연합에 의해 개척된 "위크샵" (세균의 분류 및 동정을 위한 지문화(fingerprinting) 기술, 전체 세포 단백질의 SDS-PAGE) 동안 제시된 바와 같이, 포트(Pot) 등의 것과 같은 표준화된 절차들이 정기적으로 그의 창시자에 의해 대중에게 가용하게 된다. SDS-PAGE 전기영동 겔을 분석하기 위한 기술에 사용되는 소프트웨어는 결정적으로 중요한데, 종들 간의 상관도가 이 소프트웨어에 의해 사용되는 파라미터 및 알고리즘에 따라 달라지기 때문이다. 이론적으로 깊게 들어가려는 것은 아니나, 농도계에 의해 측정되고 컴퓨터에 의해 표준화된 밴드들의 정량 비교는 바람직하게는 피어슨 상관 계수를 사용하여 이루어진다. 그렇게 수득되는 유사성 매트릭스는 가장 유사한 프로필들을 함께 군화하는 것은 물론, 계통수를 구성하는 것도 가능케 하는 UPGMA (평균 연관을 사용한 비가중 쌍 군법(unweighted pair group method)) 알고리즘의 도움으로 조직화될 수 있다 (문헌 [Kersters, Numerical methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis, in Computer-assisted Bacterial Systematics, 337-368, M. Goodfellow, A.G. O'Donnell Ed., John Wiley and Sons Ltd, 1985] 참조).
- [0182] 다르게는, 상기 미생물의 락토바실루스 속으로의 귀속은 소위 리보프린터(Riboprinter) (상표명)에서 리보솜 RNA와 관련하여 특성화될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 언급된 종의 락토바실루스 속으로의 귀속은 상기 세균의 16S 리보솜 RNA 또는 16S 리보솜 RNA를 코딩하고 있는 그의 게놈 DNA의 뉴클레오티드 서열을 지금까지 알려져 있는 다른 유산균 속 및 종의 것과 비교하는 것에 의해 입증된다. 락토바실루스 속으로의 종의 귀속을 결정하기 위한 또 다른 바람직한 대안은 16S-23S rRNA 스페이서 영역을 표적으로 하는 종-특이적 PCR 프라이머의 사용이다. 또 다른 바람직한 대안은 그에 의해 균주 특이적 DNA 패턴이 생성됨으로써, 동정되는 미생물의 락토바실루스 속으로의 귀속을 결정하는 것을 가능케 하는, RAPD-PCR (문헌 [Nigatu et al., in Antonie van Leeuwenhoek (79), 1-6, 2001])이다. 미생물의 락토바실루스 속으로의 귀속을 결정하는 데에 유용한 다른 기술로는 제한 단편 길이 다형 (RFLP) (문헌 [Giraffa et al., Int. J. Food Microbiol. 82 (2003), 163-172]), 반복 요소의 지문화 (문헌 [Gevers et al., FEMS Microbiol. Lett. 205 (2001) 31-36]), 또는 세포 세포의 지방산 메틸 에스테르 (FAME) 패턴 분석 (문헌 [Heyrman et al., FEMS Microbiol. Lett. 181 (1991), 55-62])이 있다. 다르게는, 락토바실루스는 락틴 유형화 (문헌 [Annuk et al., J. Med. Microbiol. 50 (2001), 1069-1074]), 또는 그의 세포 벽 단백질의 분석 (문헌 [Gatti et al., Lett. Appl. Microbiol. 25 (1997), 345-348])에 의해 결정될 수 있다.
- [0183] 상기 언급된 미생물은 바람직하게는 락토바실루스 속, 더욱 바람직하게는 본원에서 기술되는 바와 같은 락토바실루스 종에 속하는 유산균, 특히 아시도필루스(*acidophilus*), 페넨툼(*fermentum*), 락티스(*lactis*), 델브루에키이(*delbrueckii*), 알기두스(*algidus*), 브레비스(*brevis*), 부크네리(*buchneri*), 카세이(*casei*), 카멜리아에(*camelliae*), 콜레오미니스(*coelehominis*), 크루스토룸(*crustorum*), 디올리보란스(*diolivorans*), 헤테로히오키이(*heterohiochii*), 힐가르디이(*hilgardii*), 김치이(*kimchii*), 린드네리(*lindneri*), 오리스(*oris*), 판테리스(*pantheris*), 파라부크너(*parabuchner*) 및 사에림네리(*saerimneri*)로 구성되는 군에서 선택되는 종에 속하는 락토바실루스 세균이다. 더욱 더 바람직하게는, 상기 락토바실루스는 락토바실루스 아시도필루스이다. 그러나, 상기 락토바실루스 종이 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 언급된 미생물은 바람직하게는 "단리" 또는

"정제"될 수 있다. "단리"라는 용어는 물질이 그의 원래 환경, 예를 들에 그것이 자연 발생인 경우에는 자연 환경으로부터 분리되는 것을 의미한다. 예를 들면, 자연 시스템의 일부 또는 모든 기존 물질들로부터 분리된 자연-발생 미생물, 바람직하게는 락토바실루스 종이 단리된다. 그와 같은 미생물은 조성물의 일부일 수 있는데, 조성물이 그의 자연 환경의 일부가 아니라는 점에서 역시 단리된 것으로 간주되어야 한다.

[0184] "정제"라는 용어는 절대적인 순도를 요구하는 것이 아니라, 오히려 상대적인 정의로서 의도되는 것이다. 라이 브러리로부터 수득되는 개별 미생물은 통상 미생물학적으로 균일하게 정제되는데, 다시 말하자면 그것은 업계에 알려져 있는 방법에 의해 아가 플레이트 상에 선상 도말될 때 단일 집락으로서 성장한다. 바람직하게는, 이와 같은 목적으로 사용되는 아가 플레이트는 락토바실루스 종에 대하여 선택성이다. 그와 같은 선택성 아가 플레이트에 대해서는 업계에 알려져 있다.

[0185] 더욱 바람직하게는, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물은 DSM 19825, DSM 19826, DSM 19827의 DSMZ 승인 번호를 가지는 락토바실루스 아시도필루스, 또는 그의 돌연변이 또는 유도체로 구성되는 군에서 선택되는데, 여기서 상기 돌연변이 또는 유도체는 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력을 유지한다. "DSMZ 승인 번호를 가지는 락토바실루스 아시도필루스"라는 용어는 바스프(BASF) AG 사에 의해 2007년 11월 1일자로 'Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH' ("DSMZ")에 기탁되었으며, 그에 따른 기탁 번호 DSM 19825, DSM 19826, DSM 19827을 가지는 락토바실루스 아시도필루스 종에 속하는 미생물의 세포에 관한 것이다. 상기 DSMZ는 독일 38124 브라운슈바이, 인호펜스트르. 7b에 소재한다.

[0186] 상기 언급된 DSMZ 기탁은 특허 절차를 목적으로 한 미생물 기탁의 국제 공인에 관한 부다페스트 조약의 조항에 의거하여 이루어졌다.

[0187] 유산균, 바람직하게는 기탁된 락토바실루스 아시도필루스 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 "돌연변이 또는 유도체"는 바람직하게는 각 기탁된 균주와 동일한 특징을 가지는데, 다시 말하자면 전기한 바와 같은 분석 (a) 및 또는 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력을 유지하거나, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킹기발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 유지한다. 예를 들면, 상기 유도체는 유전적으로 조작될 수 있다. 본 발명의 문맥에서, "유전적으로 조작된"이라는 용어는 재조합 DNA 기술에 의해 유전적 변형이 영향을 받아 유전자가 변경되도록 생체의 및 생체내에서 원하는 핵산을 변형시키는, 업계 숙련자에게 알려져 있는 방법에 대한 그의 가장 넓은 의미로 사용된다. 따라서 바람직하게는, 상기 방법은 재조합 핵산의 클로닝, 서열분석 및 변형을 포함한다. 이와 같은 목적에 적절한 벡터에는 예를 들면 EP-B1 506 789호, EP-B1 316 677호, EP-B1 251 064호, EP-B1 218 230호, EP-B1 133 046호 또는 WO 89/01970호에 기술되어 있는 바와 같은 락토바실루스 종용 발현 벡터들이 포함된다. 프라이머, 효소, 중간 구성물의 클로닝을 위한 다른 숙주 세포 등이 사용될 수 있으며, 숙련 기술자에게 알려져 있다. 바람직하게는, 유전적으로 조작된 돌연변이는 그의 세균 염색체 또는 플라스미드(들)에 포함되어 있거나, 또는 그의 세균 염색체 및/또는 플라스미드(들)에 포함되어 있는 재조합 핵산을 보유하는 유산균, 바람직하게는 기탁된 락토바실루스 종의 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 세포를 포함한다. 상기 재조합 핵산은 바람직하게는 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물에 대하여 외래성이다. "외래성"은 그 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 분자가 숙주 세포와 관련하여 이종유래 (이는 상이한 계통 배경을 가지는 세포 또는 생물체로부터 유래함을 의미함)이거나, 또는 숙주 세포와 관련하여 동종유래이나 해당 핵산 분자의 자연 발생 상응물과 상이한 계통 환경에 위치한다는 것을 의미한다. 이는 상기 핵산 분자가 숙주 세포와 관련하여 동종유래인 경우에는 그것이 상기 숙주 세포의 자연적인 계통 상 위치에 위치되지 않는다는 것, 특히 그것이 상이한 유전자들에 의해 둘러싸여 있다는 것을 의미한다. 이와 같은 경우, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체 프로모터의 조절하에, 또는 이종유래 프로모터의 조절하에 있을 수 있다. 숙주 세포 내에 존재하는 상기한 벡터 또는 핵산 분자는 숙주 세포의 계통에 통합될 수 있거나, 또는 염색체외에서 소정 형태로 유지될 수 있다. 이와 관련하여, 상기한 핵산 분자가 동종유래 재조합을 통하여 돌연변이 유전자를 복원 또는 생성시키는 데에 사용될 수 있다는 것 역시 이해되어야 한다.

[0188] 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 돌연변이, 바람직하게는 기탁된 락토바실루스 균주의 돌연변이는 바람직하게는 인공적으로 돌연변이된다. 본 발명에 있어서, "돌연변이되는"이라는 용어는 예를 들면 자연적으로, 또는 물리적 수단 또는 화학적인 화합물/물질/제제, 예컨대 EMS 또는 ENU에 의해 야기되는, 유전 물질, 즉 핵산의 영구적인 변형(들)을 의미한다. 상기 변형에는 그로 인해 핵산/유전자/염색체가 변형되고, 그것은 특히 예컨대 주요한 부정적인 효과로 이어지는 이상 유전자 발현/전사/해독 또는 불활성 유전자 생성물, 구성성 활성/불활성 유전자 생성물을 야기할 수 있는, 핵산/유전자/염색체 내에서의 전환(transition) 또는 변환(transversion)과 같은 점 돌연변이, 하나 이상 염기의 삭제/삽입/첨가가 포함된다. 바람직하게는, 돌연변이는 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력의 증가를 초래한다. 따라서,

업계 숙련자에게 알려져 있는 방법에 의해, 원하는 유전자(들) 또는 원하는 유전자(들)의 돌연변이(들)에 돌연변이(들)을 보유하는 기탁 미생물의 돌연변이 세포가 유도되는 것 역시 바람직하다. 임의의 적합한 방법/표현형에 의해, 돌연변이되거나 유전적으로 조작된 세균 세포가 선택될 수 있다는 것 역시 선행 기술에 알려져 있다. 본 발명의 문맥에서, 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 증가된 펩티드 농도 감소 능력을 가지거나, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 가지는 돌연변이는 전기 또는 첨부된 실시예에 기술되어 있는 방법에 따라 시험될 수 있다. 그러나, "돌연변이"라는 용어에는 그의 개념, 즉 세균 염색체에 자연-발생의 자발적 돌연변이를 보유하는, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 세포, 바람직하게는 기탁된 미생물의 세포 역시 포함된다. "자발적 돌연변이"는 자연적으로, 즉 인간에 의한, 또는 돌연변이원인의 노출에 의한 직접적인 유전자 조작 없이 일어나는 돌연변이이다. 자발적 돌연변이의 선택은 균주를 배양한 후, 예를 들면 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키거나, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 생장은 자극하지 않는 능력의 증가를 나타내는 변이체 세균의 능력에 의해 원하는 변이체를 선택함으로써 수행될 수 있다 (예를 들면 문헌 [Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001)]; [Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)] 참조). 예를 들어, 그와 같은 돌연변이는 배양 중에 예를 들면 DNA 복제와 연계된 정상적인 세포 분열 과정 동안에, 또는 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물 돌연변이의 계대(passaging) 및/또는 보존 동안에 발생할 수 있다.

[0189] 본 발명은 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 유도체에 관한 것이기도 하다. "유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 유도체"라는 용어에는 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 불활성화 형태, 유사체 또는 단편이 포함되며, 여기서 상기 불활성화 형태, 유사체 또는 단편은 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 유지한다.

[0190] 본 발명에 있어서, "불활성화 형태"라는 용어에는 락토바실루스 속에 속하는 미생물에 대하여 특이적인 플레이트 상에서 더 이상 단일 집락을 형성할 수 없는, 본 발명에 따른 사멸되거나 불활성화된 세포가 포함된다. 상기 사멸 또는 불활성화 세포는 무손상이거나 파손된 세포 막 중 어느 것을 가질 수 있다. 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 세포를 사멸시키거나 불활성화하기 위한 방법에 대해서는 업계에 알려져 있다. 문헌 [El-Nezami et al., J. Food Prot. 61 (1998), 466-468]은 UV-조사에 의해 락토바실루스 종을 불활성화하기 위한 방법에 대해 기술하고 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 미생물의 세포는 첨부된 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 열적으로 불활성화되거나 동결건조된다. 상기한 바와 같은 세포의 동결건조는 그것이 용이하게 저장 및 취급되면서도, 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 그의 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 유지할 수 있다는 장점을 가진다. 또한, 동결건조된 세포는 업계에 알려져 있는 조건하에 적절한 액체 또는 고체 배지에 적용되었을 경우, 다시 생장될 수 있다. 동결건조는 업계에 알려져 있는 방법에 의해 수행된다. 바람직하게는, 그것은 실온, 즉 16 °C 내지 25 °C 사이의 임의의 온도에서 2시간 이상 동안 수행된다. 특히 바람직하게는, 그것은 진공하에 16시간 동안 수행된다. 또한, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 동결건조된 세포는 4 °C의 온도에서 4주 이상 동안 안정하며, 그에 따라 역시 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시킬 수 있거나, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킵리발리스의 생장은 자극하지 않을 수 있다.

[0191] 열적 불활성화는 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 세포를 80 °C의 온도에서 10분 이상 동안 배양함으로써 달성될 수 있다. 열적 불활성화는 상기 세포 및 또는 상청액을 주변 압력 2 bar의 포화 수증기 존재하에 121 °C의 온도에서 20분 이상 동안 오토클레이빙함으로써 달성될 수 있다. 바람직하게는, 세포 또는 배양 상청액의 열적 불활성화는 열 처리와 관련하여 전기한 바와 같이 달성된다.

[0192] 대안으로써, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물 세포의 열적 불활성화는 상기 세포를 -20 °C에서 4주, 3주, 2주, 1주, 12시간, 6시간, 2시간 또는 1시간 이상 동안 냉동시킴으로써 달성된다. 바람직하게는 70%, 75% 또는 80%, 더욱 바람직하게는 85%, 90% 또는 95% 이상, 특히 바람직하게는 97%, 98%, 99%, 더욱 특히 바람직하게는 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 이상, 가장 특히 바람직하게는 100%의, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 유사체 세포가 사멸되거나 불활성화되나, 그

들은 여전히 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 강기발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 가진다. 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 불활성화 형태, 유사체 또는 단편이 실제로 사멸 또는 불활성화되었는지의 여부는 업계에 알려져 있는 방법, 예를 들면 생존력의 시험에 의해 시험될 수 있다.

[0193] "불활성화 형태" 또는 "유사체"라는 용어에는 상기한 미생물의 용해질, 분획, 예컨대 막 분획, 또는 추출물 역시 포괄되며, 여기서 상기 용해질, 분획 또는 추출물은 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 강기발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 유지한다. 이러한 능력은 본원에서 기술되는 바와 같이, 특히 첨부된 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 시험될 수 있다. 전기한 바와 같은 본 발명에 따른 미생물의 용해질, 분획 또는 추출물이 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 강기발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 나타낼 수 없는 경우라면, 숙련자가 예를 들면 하기에 예시되는 업계 공지의 방법에 의해, 감소를 억제하는 물질이 제거되도록 상기 용해질, 분획 또는 추출물을 추가 정제할 수 있다. 이후, 업계 숙련자는 상기 용해질, 분획 또는 추출물을 그것이 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시킬 수 있는지 여부에 대하여 다시 시험할 수 있다.

[0194] 본 발명에 있어서, "용해질"이라는 용어는 본 발명에 따른 미생물 세포의 수성 매체 중 용액 또는 현탁액을 의미한다. 그러나, 상기 용어는 어떠한 방식으로든 제한적인 것으로 간주되어서는 아니 된다. 세포 용해질은 예를 들면 DNA, RNA, 단백질, 펩티드, 탄수화물, 지질 등과 같은 거대분자, 및/또는 아미노산, 당, 지질 산(lipid acid) 등과 같은 미세분자, 또는 이들의 분획을 포함한다. 또한, 상기 용해질은 평활 또는 과립 구조의 것일 수 있는 세포 잔재물을 포함한다. 바람직하게는, 상기 용해질은 세포 벽 또는 세포 막 또는 이들 모두, 또는 세포 벽 또는 세포 막 또는 이들 모두의 일부 또는 단편을 포함한다. 미생물의 세포 용해질을 제조하기 위한 방법에 대해서는 업계에 알려져 있는데, 예를 들자면 프렌치 프레스(French press), 유리 또는 철 구슬을 사용한 세포 밀(mill), 또는 효소적 세포 용해 등을 사용하는 것에 의한다. 또한, 세포를 용해하는 것은 세포 개방/파괴 용으로 업계에 알려져 있는 다양한 방법들과 관련된다. 세포를 용해하기 위한 방법이 중요한 것은 아니며, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물 세포의 용해를 달성할 수 있는 어떠한 방법도 사용될 수 있다. 적절한 것은 업계 숙련자에 의해 선택될 수 있는데, 예를 들어 세포의 개방/파괴는 효소적으로, 화학적으로 또는 물리적으로 수행될 수 있다. 효소 및 효소 콕테일의 비-제한적인 예는 프로테아제 K와 같은 프로테아제, 리파제 또는 글리코시다제이며; 화학물질의 비-제한적인 예는 이온운반물질(ionophore), 나트륨 도데실 술페이트와 같은 세제, 산 또는 염기이고; 물리적 수단의 비-제한적인 예는 프렌치-프레스와 같은 고압, 삼투물농도(osmolarity), 열 또는 저온과 같은 온도이다. 또한, 단백질분해 효소가 아닌 다른 효소, 산, 염기 등의 적절한 조합을 사용하는 방법이 활용될 수도 있다. 예를 들면, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 세포는 냉동 및 해동, 더욱 바람직하게는 -70 °C 미만의 온도에서 냉동시키고 30 °C를 초과하는 온도에서 해동하는 것에 의해 용해되는데, 특히 -75 °C 미만 온도에서의 냉동이 바람직하며, 35 °C를 초과하는 온도에서의 해동이 바람직하고, 가장 바람직한 것은 -80 °C 미만의 냉동 온도 및 37 °C 초과와 해동 온도이다. 상기 냉동/해동이 1회 이상, 더욱 바람직하게는 2회 이상, 더욱 더 바람직하게는 3회 이상, 특히 바람직하게는 4회 이상, 가장 바람직하게는 5회 이상 반복되는 것 역시 바람직하다.

[0195] 따라서, 업계 숙련자라면, 상기한 일반적 설명을 참조하고, 필요에 따라 해당 방법을 적절하게 변형 또는 변형함으로써, 원하는 용해질을 제조할 수 있다. 바람직하게는, 기술된 바와 같은 용해질 용으로 사용되는 수성 매체는 물, 생리 식염수, 또는 버퍼 용액이다. 세균 세포 용해질의 장점은 그것이 용이하게 제조될 수 있으며, 기술적인 설비가 적게 요구되기 때문에 비용 효율적으로 저장될 수 있다는 것이다.

[0196] 바람직하게는, "추출물"이라는 용어는 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 세포이하 구성요소, 예를 들면 단백질, DNA, RNA, 펩티드, 탄수화물, 지질 등과 같은 거대분자, 및/또는 아미노산, 당, 지질 산 등과 같은 미세분자, 또는 임의의 다른 유기 화합물 또는 분자, 또는 상기 거대분자 및/또는 미세분자의 조합, 또는 이들의 임의 분획을 의미하는 것으로서, 여기서 상기 추출물은 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 강기발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 유지한다. 이러한 특성들은 본원에서 기술되는 바와 같이, 특히 첨부된 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 시험될 수 있다. 바람직하게는, 상기 추출물은 세포 벽 또는 세포 막 또는 이들 모두, 또는 세포 벽 또는 세포 막 또는 이들 모두의 일부 또는 단편을 포함

한다. 더욱 바람직하게는, "추출물"이라는 용어는 무-세포 매체 중 임의의 상기한 세포이하 구성요소들을 지칭한다.

[0197] 다른 바람직한 구현예에서, 추출물은 전기한 바와 같이 세포 개방/파괴 용으로 업계에 알려져 있는 다양한 방법에 따라 세포를 용해시킴으로써, 및/또는 업계 숙련자에게 알려져 있는 임의의 적절한 액체, 매체 또는 버퍼 중의 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물 배양물, 또는 그와 같은 배양물 또는 임의의 다른 적합한 세포 현탁액의 용해질의 원심분리 절차 상청액으로서, 수득될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 추출물은 정제된 용해질 또는 세포 배양 상청액, 또는 이들의 임의의 분획 또는 하위분획일 수 있으며, 여기서 상기 정제된 용해질 또는 세포 배양 상청액, 또는 이들의 임의의 분획 또는 하위분획은 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 갱기발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 유지한다. 이러한 특성들은 본원에서 기술되는 바와 같이, 특히 첨부된 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 시험될 수 있다. 용해질, 배양 상청액 또는 추출물의 분획화 및 정제를 위한 적합한 방법에 대해서는 업계 숙련자에게 알려져 있으며, 예를 들면 친화성 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피, 역상-크로마토그래피, 및 컬럼에 다른 크로마토그래피 재료를 가지는 크로마토그래피, 또는 배치법, 기타 분획화 방법, 예를 들면 여과법, 예컨대 한외여과, 투석, 원심분리에서의 크기-배제를 사용한 투석 및 농축, 밀도-구배 또는 단계 매트릭스 중에서의 원심분리, 침전, 예컨대 친화성 침전, 염침가-용해 또는 염침가-석출 (암모늄술페이트-침전), 알콜 침전, 또는 임의의 다른 적합한 단백질화학적, 분자 생물학적, 생화학적, 면역학적, 화학적 또는 물리적 방법이 포함된다.

[0198] 본 발명에 있어서, 용해질은 상기-언급된 용해질로부터의 분자 분획 조제물이기도 하다. 이러한 분획은 업계 숙련자에게 알려져 있는 방법, 예를 들면 친화성 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피, 역상-크로마토그래피, 및 컬럼에 다른 크로마토그래피 재료를 가지는 크로마토그래피를 포함한 크로마토그래피, 또는 배치법, 기타 분획화 방법, 예를 들면 여과법, 예컨대 한외여과, 투석, 원심분리에서의 크기-배제를 사용한 투석 및 농축, 밀도-구배 또는 단계 매트릭스 중에서의 원심분리, 침전, 예컨대 친화성 침전, 염침가-용해 또는 염침가-석출 (암모늄술페이트-침전), 알콜 침전, 또는 용해질의 상기 구성요소들을 분리하기 위한 기타 단백질화학적, 분자 생물학적, 생화학적, 면역학적, 화학적 또는 물리적 방법에 의해 수득될 수 있다. 바람직한 구현예에서는, 다른 것에 비해 더 면역원성인 분획이 바람직하다. 업계 숙련자라면, 적합한 방법을 선택하고, 상기한 일반적인 설명 및 본원 실시예의 구체적인 설명을 참조하여 그의 면역원 잠재력을 측정하고, 필요에 따라 해당 방법을 적절하게 변형 또는 변경할 수 있을 것이다.

[0199] 따라서, "불활성화 형태 또는 유사체" 라는 용어 역시 본 발명 미생물의 여과액을 포괄하며, 여기서 상기 여과액은 바람직하게는 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 갱기발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 유지한다. 이러한 특성들은 본원에서 기술되는 바와 같이, 특히 첨부된 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 시험될 수 있다. 전기한 바와 같은 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 여과액이 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 갱기발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 가질 수 없는 경우라면, 숙련자가 예를 들면 하기에 예시되는 업계 공지 방법에 의해, 상기 감소 및/또는 생장 자극을 억제하는 물질이 제거되도록 상기 여과액을 추가 정제할 수 있다. 이후, 업계 숙련자는 상기 여과액을 그것이 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시킬 수 있는지, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극할 수 있으나 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 갱기발리스의 생장은 자극하지 않는지 여부에 대하여 다시 시험할 수 있다.

[0200] "여과액"이라는 용어는 업계 숙련자에게 알려져 있는 임의의 적절한 액체, 매체 또는 버퍼 중의 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물 배양물의 원심분리 절차의 상청액으로서 수득된, 전기한 바와 같은 본 발명 미생물의 무-세포 용액 또는 현탁액을 의미하기도 한다. 그러나, 상기 용어는 어떠한 방식으로든 제한적인 것으로 간주되어서는 아니 된다. 상기 여과액은 예를 들면 DNA, RNA, 단백질, 펩티드, 탄수화물, 지질 등과 같은 거대분자, 및/또는 아미노산, 당, 지질 산 등과 같은 미세분자, 또는 이들의 분획을 포함한다. 미생물의 여과액을 제조하기 위한 방법에 대해서는 업계에 알려져 있다. 또한, "여과액"은 업계에 알려져 있는 다양한 방법들과 연관된다. 정확한 방법이 중요한 것은 아니며, 전기한 바와 같은 본 발명 미생물 세포의 여과를 달성할 수 있는 어떠한 방법도 사용될 수 있다. 여과액이라는 용어에는 예를 들면 원심분리에 의해 세포를 펠렛화하고, 생성되는 상청액을 회수함으로써 수득되는 배양 상청액도 포함된다.

[0201] 특히 바람직한 구현예에서, 여과액, 가장 바람직하게는 배양 상청액은 특히 전기한 바와 같은 열 또는 동결건조

에 의해 추가적으로 처리된다.

- [0202] 본 발명에 따른 미생물의 "단편"은 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물 세포의 모든 부분을 포괄한다. 바람직하게는, 상기 단편은 막-조제(membrane-preparation)에 의해 획득되는 막 분획이다. 락토바실러스 속에 속하는 미생물의 막 조제물은 업계에 알려져 있는 방법에 의해, 예를 들면 문헌 [Rollan et al., Int. J. Food Microbiol. 70 (2001), 303-307], [Matsuguchi et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10 (2003), 259-266] 또는 [Stentz et al., Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000), 4272-4278] 또는 [Varmanen et al., J. Bacteriology 182 (2000), 146-154]에 기술되어 있는 방법을 사용하여 획득될 수 있다. 다르게는, 전체 세포 조제물 역시 고려된다. 바람직하게는, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 본원에서 기술되는 유도체 또는 단편은 전기한 바와 같은 분석 (a) 및/또는 분석 (A)에서 펩티드 농도를 감소시키는 능력, 및/또는 스트렙토코쿠스 살리바리우스의 생장은 자극하며 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및/또는 포르피로모나스 킹기발리스의 생장은 자극하지 않는 능력을 유지한다.
- [0203] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 상기 언급된 미생물, 그의 불활성화 형태, 유도체 또는 돌연변이, 또는 유사체 또는 단편을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 바람직하게는 예컨대 입냄새 및/또는 구취의 치료 및/또는 예방을 위한 화장품 조성물 또는 약제학적 조성물, 또는 사료 또는 식품 조성물이다.
- [0204] 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 고체 형태의 조성물 중에 mg 당 10^2 내지 10^{12} 세포, 바람직하게는 10^3 내지 10^8 세포 사이의 양으로 상기한 바와 같은 미생물을 포함한다. 액체 형태 조성물의 경우, 미생물의 양은 ml 당 10^2 내지 10^{13} 세포 사이이다. 그러나, 특정 조성물에 있어서, 미생물의 상기 양은 본원에서 기술되는 바와 같이 달라질 수 있다.
- [0205] 화장품 조성물은 화장용 또는 구강용으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 약제학적으로, 또는 구강용으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 사료 또는 식품 조성물은 구강용으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0206] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 미생물, 그의 불활성화 형태, 유도체 또는 돌연변이, 또는 유사체 또는 단편의, 상기 언급된 본 발명에 따른 미생물, 그의 불활성화 형태, 유도체 또는 돌연변이, 또는 유사체 또는 단편을 포함하는 조성물, 특히 입냄새 및/또는 구취의 예방 및/또는 치료를 위한 화장품 조성물, 사료 또는 식품 조성물 또는 약제학적 조성물의 제조를 위한 용도에 관한 것이다.
- [0207] 그와 같은 조성물은 본 발명에 따른 미생물을 화장용으로, 구강용으로 또는 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 배합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0208] 본 발명에 따라 사용될 때, "조성물"이라는 용어는 상기한 바와 같은 1종 이상의 미생물 또는 돌연변이 또는 유도체, 또는 상기 미생물의 불활성화 형태 또는 유사체 또는 단편을 포함하는 조성물(들)과 관련된다. 본 발명에 따라 사용될 때의 하기에 기술되는 조성물은 상기 언급된 성분들을 소정의 조합으로 포함하는 것으로 간주된다. 그것은 임의로 입냄새 및/또는 구취를 예방하는 데에 적합한 1종 이상의 다른 성분을 포함할 수 있다. 따라서, 그것은 임의로 이하에 기술되는 다른 성분들의 소정 조합을 포함할 수 있다. "입냄새 및/또는 구취를 예방하는 데에 적합한 성분"이라는 용어는 입냄새를 감소시키는 것으로 업계에 알려져 있는 화합물 또는 조성물 및/또는 이들의 조합을 포괄한다. 그 예는 금속 염, 예컨대 염화 아연, 또는 살균제, 예컨대 허를 치료하는 데에 사용되는 알콜 또는 클로르헥시딘이다. 또 다른 예로는 타액의 pH를 생리학적으로 정상적인 수준에서 유지하는 것을 돕는 화합물이 있다. 이들은 pH-상승 또는 pH-버퍼링 효과를 가지는 물질 (예컨대 비카르보네이트, 카르바미드, 포스페이트, 단백질 및/또는 염)일 수 있다. 충치 및 점막 감염과 관련된 미생물 종은 산성 pH를 선호하며; 치주 질병의 발병과 관련된 미생물 종은 정상을 초과하는 pH를 선호하는 반면, 우수한 구강 건강과 관련되는 미생물 종은 중성의 pH를 선호하는 것으로 알려져 있다. 다른 예는 US200707137호, US2006018843호 또는 W02007/077210호에 개시되어 있는 바와 같은 프로바이오틱 세균 (예컨대 락토바실러스 및 스트렙토코쿠스), 또는 US2006045870호에 기술되어 있는 바와 같이 호기성 및 혐기성 조건하에 그와 상호작용하여 과산화 수소를 생성시킴으로써 VSC-생산 세균의 생장을 억제하는, 웨이셀라 속에 속하는 유산균이다. 마지막으로, BLIS (박테리옌-유사 억제 물질)-생산 스트렙토코쿠스 살리바리우스 균주 및 그의 추출물이 이와 같은 맥락으로 언급될 수 있다 (US2006171901호).
- [0209] 본 발명에 따라 사용될 때의 조성물은 임의로 입냄새 및/또는 구취를 예방하는 데에 적합한 1종 이상의 상기 언급된 임의 성분을 포함할 수 있다는 것에 유의해야 한다. 따라서, 상기 조성물은 2종, 3종, 4종, 5종 이상 등,

즉 "n중"의 임의 성분을 함유할 수 있으며, 여기서 "n"은 2를 초과하는 정수이나, 제한적인 것은 아니다. 상기 임의 성분은 어떠한 가능한 조합으로도 조합될 수 있다.

- [0210] 상기 조성물은 고체, 액체 또는 기체 형태일 수 있으며, 특히 분말(들), 정제(들), 필름 조제물(들), 용액(들), 에어로졸(들), 과립, 환약, 현탁액, 에멀션, 캡슐, 시럽, 액체, 엘릭시르, 추출물, 팅크제 또는 유체 추출물의 형태, 또는 구강 투여에 특히 적합한 형태일 수 있다.
- [0211] 구강 투여에 적합한 액체 조제물, 예를 들면 시럽은 물, 통상적인 당류 예컨대 슈크로스, 소르비톨 및 프럭토스, 글리콜 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜, 오일 예컨대 참깨 종자 오일, 올리브 오일 및 대두 오일, 방부제 예컨대 p-히드록시벤조에이트 에스테르, 보존제 예컨대 p-히드록시벤조에이트 유도체, 예를 들면 p-히드록시벤조에이트 메틸 및 나트륨 벤조에이트, 그리고 기타 재료 예컨대 향미제, 예를 들면 딸기 향미 또는 페퍼민트를 사용하여 제조될 수 있다.
- [0212] 또한, 구강 투여에 적합한 조제물, 예를 들면 정제, 분말 및 과립은 통상적인 당류 예컨대 슈크로스, 글루코스, 만니톨, 및 소르비톨, 전분 예컨대 감자, 밀 및 옥수수, 무기 재료 예컨대 탄산 칼슘, 황산 칼슘, 탄산 수소 나트륨, 및 염화 나트륨, 식물 분말 예컨대 결정 셀룰로스, 감초 분말 및 용담 분말, 부형제 예컨대 파인덱스(pinedex), 분해제 예컨대 전분, 아가, 젤라틴 분말, 결정 셀룰로스, 카르멜로스 나트륨, 카르멜로스 칼슘, 탄산 칼슘, 탄산 수소 나트륨 및 나트륨 알기네이트, 윤활제 예컨대 마그네슘 스테아레이트, 활석, 수소화 식물성 오일, 마크로골(macrogol), 및 실리콘 오일, 바인더 예컨대 폴리비닐 알콜, 히드록시프로필 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 카르멜로스, 젤라틴, 및 전분 아교액, 계면활성제 예컨대 지방산 에스테르, 및 가소제 예컨대 글리세린을 사용하여 제조될 수 있다. 필름 조제물(들)은 업계에 알려져 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 필름 제조의 예는 본원의 실시예 19에 제시되어 있다.
- [0213] 일반적인 구강 투여의 경우, 상기한 미생물 또는 유사체 또는 단편의 투여량은 (건조 중량으로) 세포 수와 관련하여, 또는 질량과 관련하여 하기하는 바와 같을 수 있는데, 예를 들면 일 당 또는 매일 수회 분량으로, 대상당 1 μ g 내지 50 g, 1 μ g 내지 10 g, 1 μ g 내지 5 mg, 1 μ g 내지 1 mg 또는 임의의 기타 중량이다. 또한 비-인간 동물에 투여하는 경우, 투여량은 동물의 연령 및 종, 그리고 그의 증상의 특성 또는 중증도에 따라 달라진다. 어떠한 특별한 제한도 없이, 동물에 대한 투여량은 매일 1회 또는 매일 수회 분량으로, 1 kg 체중 당 0.1 mg 내지 10 g, 바람직하게는 1 kg 체중 당 1 mg 내지 1 g이다. 그러나, 이러한 투여량 및 투약 회수는 개별 조건에 따라 달라진다.
- [0214] 바람직하게는, 본 발명에 따른 조성물은 화장용으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가적으로 포함하는 화장품 조성물이다. 더욱 바람직하게는, 상기 조성물은 치약, 츄잉 껌, 로젠지, 구강 세척제, 구강 세정제, 치실 또는 치과용 테이프이다.
- [0215] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 본 발명의 조성물과 관련하여 상기한 바와 같은 그의 미생물, 불활성화 형태, 돌연변이, 유도체, 유사체 또는 단편을 포함하며, 추가적으로 화장용 또는 구강용으로 허용가능한 담체를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 조성물과 관련하여 언급된 바와 같이, 그의 미생물, 불활성화 형태, 돌연변이, 유도체, 유사체 또는 단편은 전기한 바와 같은 미생물, 불활성화 형태, 돌연변이, 유도체, 유사체 또는 단편이다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 화장품 조성물은 구강 적용에 사용하기 위한 것이다. 따라서, 그것은 크림치약, 치약, 치분, 국소 구강 젤, 구강 세정제, 의치 제품, 구강스프레이, 로젠지, 구강 정제, 츄잉 껌, 치실 또는 치과용 테이프의 형태일 수 있다.
- [0216] 본원에서 사용될 때의 "구강용 또는 화장용으로 허용가능한 담체"라는 용어는 본 발명 조성물을 안전하고 효과적인 방식으로 구강에 적용하기 위하여 사용될 수 있는 적합한 운반체를 의미한다. 그와 같은 운반체에는 플루오르화 이온 공급원, 추가 향치석제, 버퍼, 다른 연마 재료, 과산화물 공급원, 알칼리 금속 비카르보네이트 염, 증점 재료, 습윤제, 물, 계면활성제, 이산화 티타늄, 향미 시스템, 감미제, 자일리톨, 착색제, 및 이들의 혼합물과 같은 재료들이 포함될 수 있다. 본원에서 사용될 때의 "안전하고 효과적인 양"이라는 용어는 구강의 조직 및 구조를 손상하지 않으면서 치아를 세척하고 오염물/플라크/치은염/치석을 감소시키기에 충분한 양을 의미한다.
- [0217] 본 발명 전기 조성물의 pH는 바람직하게는 약 3.0 내지 약 9.0의 범위로써, 바람직한 pH는 약 5.5 내지 약 9.0이며, 가장 바람직한 pH는 7.0 내지 약 8.5 또는 9.0이다.
- [0218] 화장품 조성물은 일반적인 사용 과정에서 특정 치료제의 전신 투여를 목적으로 의도적으로 삼켜지는 대신, 오히려 구강 활성을 목적으로 치아 표면 및/또는 구강 조직의 실질적인 전체와 접촉하기에 충분한 시간 동안 구강

내에서 유지되는 제품이다. 구강 조성물은 단일 상 구강 조성물일 수 있거나, 또는 2종 이상 구강 조성물의 조합일 수 있다.

- [0219] 본원에서 사용될 때, "치약"이라는 용어는 다르게 특정되지 않는 한 페이스트, 젤, 또는 액체 제제를 의미한다. 치약 조성물은 깊은 줄무늬, 표면 줄무늬, 다층형, 페이스트를 둘러싼 젤을 가지는 것, 또는 이들의 임의 조합과 같은 임의의 원하는 형태일 수 있다. 치약 조성물은 물리적으로 분리된 분배기 구획에 함유되어, 차례로 분배될 수 있다. 치약 조성물에 대해서는 예를 들면 EP-B1 0 617 608호에 기술되어 있다.
- [0220] 바람직한 치약 조성물은 실시예 13 내지 16에 기술되어 있다. 상기한 성분들 이외에도, 본 발명의 치약 조성물은 그 일부가 하기되는 다양한 임의의 치약 성분들을 함유할 수 있다. 임의의 성분에는 예를 들면 접착제, 발포제, 향미제, 감미제, 추가 항플라크제, 추가 연마제, 및 착색제가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 및 기타 임의의 성분에 대해서는 예를 들면 US 5,004,597호; US 4,885,155호; US 3,959,458호; 및 US 3,937,807호에 추가적으로 기술되어 있다.
- [0221] 예를 들면, 크립치약은 계면활성제, 킬레이팅제, 플루오르화물 공급원, 치아 미백 활성물질 및 치색 변형 물질, 증점제, 습윤제, 향미제 및 감미제, 알칼리 금속 비카르보네이트 염, 각종 담체 및/또는 기타 활성 제제를 포함할 수 있다.
- [0222] 본 발명에 따라 사용될 때의 바람직한 임의의 제제들 중 한 가지는 계면활성제, 바람직하게는 사르코시네이트 계면활성제, 이세티오네이트 계면활성제 및 타우레이트 계면활성제로 구성되는 군에서 선택되는 것이다. 본원에서 사용하기에 바람직한 것은 이러한 계면활성제들의 알칼리 금속 또는 암모늄 염이다. 본원에서 가장 바람직한 것은 하기의 나트륨 및 칼륨 염이다: 라우로일 사르코시네이트, 미리스토일 사르코시네이트, 팔미토일 사르코시네이트, 스테아로일 사르코시네이트 및 올레오일 사르코시네이트.
- [0223] 또 다른 바람직한 임의의 제제는 킬레이팅제 예컨대 타르타르산 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 시트르산 및 알칼리 금속 시트레이트, 그리고 이들의 혼합물이다. 킬레이팅제는 세균의 세포 벽에서 발견되는 칼슘을 착물화할 수 있다. 킬레이팅제는 또한 해당 생물량을 무손상으로 유지하는 것을 돕는 칼슘 다리로부터 칼슘을 제거함으로써 플라크를 붕괴시킬 수 있다.
- [0224] 25 °C에서, 및/또는 그것이 사용되었을 때, 약 0.0025 중량% 내지 약 5.0 중량%, 바람직하게는 약 0.005 중량% 내지 약 2.0 중량%의 조성물 중 플루오르화 이온 농도를 생성시키기에 충분한 양으로 치약에 존재하는 추가적인 수용성 플루오르화 화합물 및 기타 구강 조성물을 가짐으로써 항충치 효과를 제공하는 것이 보통이다. 매우 다양한 플루오르화 이온-산출 재료들이 본 발명 조성물 중 가용성 플루오르화물의 공급원으로서 사용될 수 있다. 적합한 플루오르화 이온-산출 재료의 예는 US 3,535,421호 및 US 3,678,154호에서 발견된다. 대표적인 플루오르화 이온 공급원에는 플루오르화 제1주석, 플루오르화 나트륨, 플루오르화 칼륨, 나트륨 모노플루오로포스페이트 및 많은 다른 것들이 포함된다. 플루오르화 제1주석 및 플루오르화 나트륨은 물론, 이들의 혼합물이 특히 바람직하다.
- [0225] 본 발명의 것과 같은 구강 위생 조성물은 과산화물, 퍼보레이트, 퍼카르보네이트, 퍼옥시산, 퍼술페이트, 금속 클로라이드, 및 이들의 조합과 같은 표백 또는 산화제들을 포함한 치아 미백 활성물질을 포함할 수도 있다. 적합한 과산화 화합물에는 과산화 수소, 요소 퍼옥시드, 칼슘 퍼옥시드, 및 이들의 혼합물이 포함된다. 바람직한 퍼카르보네이트는 나트륨 퍼카르보네이트이다. 다른 적합한 미백제에는 칼륨, 암모늄, 나트륨 및 리튬 퍼술페이트, 및 퍼보레이트 1수화물 및 4수화물, 그리고 나트륨 피로포스페이트 퍼옥시수화물이 포함된다. 적합한 금속 클로라이드에는 칼슘 클로라이드, 바륨 클로라이드, 마그네슘 클로라이드, 리튬 클로라이드, 나트륨 클로라이드, 및 칼륨 클로라이드가 포함된다. 바람직한 클로라이드는 나트륨 클로라이드이다. 추가적인 미백 활성물질은 히포클로라이드 및 이산화 염소일 수 있다.
- [0226] 치아 미백제로서의 표백제 이외에도, 치아 색상 변형 물질이 본 발명에 유용한 구강 위생 활성물질로 고려될 수 있다. 이들 물질은 소비자를 만족시키기 위한 치아 색상 변형에 적합하다. 이들 물질은 치아 표면에 적용되었을 때 광의 흡수 및 또는 반사와 관련하여 해당 표면을 변형시키는 입자를 포함한다. 상기 입자는 해당 입자를 함유하는 필름이 치아 또는 치아들의 표면 상에 적용되었을 때 외관상의 이익을 제공한다.
- [0227] 크립치약 또는 젤을 제조합에 있어서는, 바람직한 조성물의 밀도를 제공하고, 사용시 바람직한 활성물질 방출 특성을 제공하고, 보관 안정성을 제공하고, 조성물의 안정성을 제공하는 등을 위하여, 약간의 증점 재료를 첨가할 필요가 있다. 바람직한 증점제는 카르복시비닐 중합체, 카라기난, 히드록시에틸 셀룰로스, 라포나이트 (LAPONITE®: 록우드 어디티브스 리미티드(Rockwood Additives Limited)에서 제조됨) 및 셀룰로스 에테르의 수

용성 염 예컨대 나트륨 카르복시메틸셀룰로스 및 나트륨 카르복시메틸 히드록시에틸 셀룰로스이다. 천연 고무 예컨대 카라야 고무, 크산탄 고무, 아라비아 고무, 및 트라가칸트 고무가 사용될 수도 있다. 콜로이드성 마그네슘 알루미늄 실리케이트 또는 미분할 실리카가 질감을 추가 개선하기 위하여 증점제의 일부로서 사용될 수 있다.

[0228] 본 발명 조성물 국소, 구강 운반체의 또 다른 임의 성분은 습윤제이다. 습윤제는 크림치약 조성물이 공기에 노출되었을 때 경화되는 것을 방지함으로써, 조성물에 입에 대한 습윤감을 부여하고, 특정 습윤제의 경우에는 크림치약 조성물에 바람직한 단맛을 부여하는 기능을 한다. 습윤제는, 순수 습윤제 기준으로, 보통 본원 조성물의 약 0 중량% 내지 약 70 중량%, 바람직하게는 약 5 중량% 내지 약 25 중량%를 구성한다. 본 발명의 조성물에 사용하기에 적합한 습윤제에는 식용 다가 알콜 예컨대 글리세린, 소르비톨, 자일리톨, 부틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 프로필렌 글리콜, 특히 소르비톨 및 글리세린이 포함된다.

[0229] 향미제 및 감미제가 조성물에 첨가될 수도 있다. 적합한 향미제에는 노루발풀의 오일, 페퍼민트의 오일, 스피어민트의 오일, 정향나무 싹 오일, 멘톨, 아네톨, 메틸 살리실레이트, 유칼립톨, 계피, 1-메틸 아세테이트, 세이지, 유제놀, 파슬리 오일, 옥산온, 알파-이리손, 마요람, 레몬, 오렌지, 프로페닐 구아에톨, 신나몬, 바닐린, 티몰, 리날룰, CGA로 알려져 있는 신남알데히드 글리세롤 아세탈, 및 이들의 혼합물이 포함된다. 향미제는 일반적으로 조성물의 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%의 농도로 조성물에 사용된다.

[0230] 사용될 수 있는 감미제에는 전기한 바와 같은 슈크로스, 글루코스, 사카린, 텍스트로스, 레블로스, 락토스, 만니톨, 소르비톨, 프럭토스, 말토스, 자일리톨, 사카린 염, 타우마틴, 아스파탐, D-트립토판, 디히드로찰콘, 아세술팜 및 씨클라메이트 염, 특히 나트륨 씨클라메이트 및 나트륨 사카린, 그리고 이들의 혼합물이 포함된다. 조성물은 바람직하게는 조성물의 약 0.1 중량% 내지 약 10 중량%, 바람직하게는 약 0.1 중량% 내지 약 1 중량%의 이러한 제제를 함유한다.

[0231] 본 발명의 조성물은 알칼리 금속 비카르보네이트 염을 포함할 수도 있다. 알칼리 금속 비카르보네이트 염은 물에 가용성이며, 안정화되지 않는 경우 수성 시스템에서 이산화 탄소를 방출하는 경향이 있다. 베이킹 소다로도 알려져 있는 나트륨 비카르보네이트가 바람직한 알칼리 금속 비카르보네이트 염이다. 본 발명 조성물은 약 0.5% 내지 약 30%, 바람직하게는 약 0.5% 내지 약 15%, 가장 바람직하게는 약 0.5% 내지 약 5%의 알칼리 금속 비카르보네이트 염을 함유할 수 있다.

[0232] 상업적으로 적합한 구강 성분의 제조에 사용되는 물은 바람직하게는 낮은 이온 함량의 것 및 유기 불순물이 없는 것이어야 한다. 물은 일반적으로 본원 수성 크림치약 조성물의 약 10 중량% 내지 약 50 중량%, 바람직하게는 약 20 중량% 내지 약 40 중량%를 구성한다. 이러한 물의 양에는 첨가되는 자유수 및 다른 재료, 예컨대 소르비톨과 함께 도입되는 것이 포함된다. 이산화 티타늄이 본 발명 조성물에 첨가될 수도 있다. 이산화 티타늄은 백색의 분말로서, 조성물에 불투명도를 부여한다. 이산화 티타늄은 일반적으로 치약 조성물의 약 0.25 중량% 내지 약 5 중량%를 구성한다.

[0233] 본 발명 조성물의 pH는 바람직하게는 버퍼링제의 사용을 통하여 조정된다. 본원에서 사용될 때, 버퍼링제는 조성물의 pH를 약 4.5 내지 약 9.5의 범위로 조정하는 데에 사용될 수 있는 제제를 지칭한다. 버퍼링제에는 모노나트륨 포스페이트, 트리나트륨 포스페이트, 수산화 나트륨, 나트륨 카르보네이트, 나트륨 산 피로포스페이트, 시트르산, 및 나트륨 시트레이트가 포함된다. 버퍼링제는 본 발명 조성물의 약 0.5 중량% 내지 약 10 중량%의 농도로 투여될 수 있다. 치약 조성물의 pH는 치약의 3:1 수성 슬러리, 예를 들면 물 3 부 대 크림치약 1 부에서 측정된다.

[0234] 본 발명 조성물에 사용될 수 있는 다른 임의 제제에는 알킬- 및 알콕시-디메티콘 코폴리올에서 선택되는 디메티콘 코폴리올, 예컨대 C12 내지 C20 알킬 디메티콘 코폴리올 및 이들의 혼합물이 포함된다. 매우 바람직한 것은 상표명 아빌(Abil) EM90으로 시판되는 세틸 디메티콘 코폴리올이다. 디메티콘 코폴리올은 일반적으로 약 0.01 중량% 내지 약 25 중량%, 바람직하게는 약 0.1 중량% 내지 약 5 중량%, 더욱 바람직하게는 약 0.5 중량% 내지 약 1.5 중량%의 농도로 존재한다. 디메티콘 코폴리올은 긍정적인 치아 감각상의 이익을 제공하는 것을 돕는다. 기타 유용한 담체에는 2상 치약 제제 예컨대 [US 5,213,790호](#); [US 5,145,666호](#); [US 5,281,410호](#); [US 4,849,213호](#) 및 [US 4,528,180호](#)에 개시되어 있는 것들이 포함된다.

[0235] 화장품 조성물은 향미생물제와 같은 다른 활성 제제를 포함할 수도 있다. 그와 같은 제제에 포함되는 것으로는 수용성의 비-양이온성 향미생물제 예컨대 할로겐화 디페닐 에테르, 페놀 및 그의 동족체를 포함한 페놀계 화합물, 모노 및 폴리-알킬 및 방향족 할로페놀, 레소르시놀 및 그의 유도체, 비스페놀계 화합물 및 할로겐화 살리

시아닐리드, 벤조산 에스테르, 및 할로겐화 카르바닐리드가 있다. 수용성 향미생물제에는 특히 4차 암모늄 염 및 비스-비퀴니드(biquanide) 염이 포함된다. 트리클로산 모노포스페이트가 추가적인 수용성 향미생물제이다. 4차 암모늄 제제에는 4급 질소 상의 1개 또는 2개의 치환체 (통상적으로 알킬 기)가 약 8 내지 약 20개, 통상적으로는 약 10 내지 약 18개 탄소 원자의 탄소 사슬 길이를 가지는 반면, 나머지 치환체들 (통상적으로 알킬 또는 벤질 기)은 약 1 내지 약 7개 탄소 원자와 같이 더 작은 수의 탄소 원자를 가지며 통상적으로는 메틸 또는 에틸 기인 것들이 포함된다. 브롬화 도데실 트리메틸 암모늄, 염화 테트라데실피리디늄, 브롬화 도미펜, 염화 N-테트라데실-4-에틸 피리디늄, 브롬화 도데실 디메틸 (2-페녹시에틸) 암모늄, 염화 벤질 디메틸스테아릴 암모늄, 염화 세틸 피리디늄, 4차화 5-아미노-1,3-비스(2-에틸-헥실)-5-메틸 헥사히드로피리미딘, 염화 벤즈알코늄, 염화 벤즈에토늄 및 염화 메틸 벤즈에토늄이 통상적인 4차 암모늄 항세균제의 예이다. 다른 화합물로는 US 4,206,215호에 개시되어 있는 바와 같은 비스[4-(R-아미노)-1-피리디늄] 알칸이 있다. 다른 향미생물제 예컨대 구리 비스글리시네이트, 구리 글리시네이트, 아연 시트레이트, 및 아연 락테이트 역시 포함될 수 있다. 효소는 본 발명 조성물에 사용될 수 있는 또 다른 유형의 활성물질이다. 유용한 효소에는 프로테아제, 용해 효소, 플라크 매트릭스 억제제 및 옥시다제의 범주에 속하는 것들이 포함되는데: 프로테아제에는 파페인, 펩신, 트립신, 피신, 브로멜린이 포함되며; 세포 벽 용해 효소에는 라이소자임이 포함되고; 플라크 매트릭스 억제제에는 텍스트란제, 뮤타나제가 포함되며; 옥시다제에는 글루코스 옥시다제, 락테이트 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 요산 옥시다제, 양고추냉이 퍼옥시다제, 마이엘로퍼옥시다제, 락토퍼옥시다제, 클로로퍼옥시다제를 포함한 퍼옥시다제가 포함된다. 상기 옥시다제는 항-미생물 특성 이외에 미백/세척 활성도 가진다. 그와 같은 제제에 대해서는 US 2,946,725호 및 US 4,051,234호에 개시되어 있다. 기타 향미생물제에는 클로르헥시딘, 트리클로산, 트리클로산 모노포스페이트, 및 향미 오일 예컨대 티몰이 포함된다. 트리클로산 및 이러한 유형의 기타 제제에 대해서는 US 5,015,466호 및 US 4,894,220호에 개시되어 있다. 항-플라크 이익을 제공하는 이러한 제제들은 치약 조성물의 약 0.01 중량% 내지 약 5.0 중량%의 농도로 존재할 수 있다.

[0236] 본원에서 사용될 때의 "씹임 검"이라는 용어는 씹기에 적합하며, 임의의 적합한 양, 바람직하게는 조성물의 2 중량% 이상 양의 업계 숙련자에게 알려져 있는 탄성체를 포함하는 과자류 조성물을 의미한다. 적합한 로젠지 및 씹임 검 성분에 대해서는 예를 들면 US 4,083,955호; US 6,770,264호 또는 US 6,270,781호에 개시되어 있다. 바람직한 로젠지는 실시예 11 및 12에 기술되어 있는 것들이다. 바람직한 씹임 검 조성물은 실시예 17에 기술되어 있다.

[0237] 본 발명에 따른 조성물은 바람직하게는 탄성체, 또는 수 종의 서로 다른 탄성체의 혼합물을 포함한다. 탄성체 성 재료에 대해서는 일반적으로 업계에 알려져 있으나, 예시적인 예를 들자면 스티렌-부타디엔 고무 (SBR); 합성 고무; 폴리이소부틸렌 및 이소부틸렌-이소프렌 공중합체; 천연 검; 치클; 천연 고무; 젤루통; 발라타; 구타 페르차; 레치 캡시; 소르바; 및 이들의 혼합물이 포함된다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 약 2 중량% 내지 약 30 중량%, 더욱 바람직하게는 약 5 중량% 내지 약 25 중량%의 탄성체를 포함한다. 이러한 농도는 씹임 검의 원하는 최종 질감에 의해 결정되는데, 탄성체의 총 농도가 약 2% 미만일 경우, 기본 조성물에 탄성, 씹는 질감, 및 응집성이 결핍되는 반면, 약 30%를 초과하는 농도에서는 제제가 딱딱하고, 질기며 단단하게 씹히기 때문이다. 바람직하게는, 탄성체 용매 역시 본 발명의 조성물에 존재하는데, 그것이 탄성체 성분의 연화를 돕기 때문이다. 본원에 사용하기 위한 탄성체 용매의 바람직한 예에는 부분적으로 수소화된 목재 로진의 펜타에리트리톨 에스테르, 목재 로진의 펜타에리트리톨 에스테르, 부분적으로 이량체화된 로진의 글리세롤 에스테르, 중합체화된 로진의 글리세롤 에스테르, 톨 오일의 글리세롤 에스테르, 목재 또는 고무 로진, 부분적으로 수소화된 로진의 글리세롤 에스테르, 부분적으로 수소화된 로진의 메틸 에스테르, 및 이들의 혼합물이 포함된다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 약 2 중량% 내지 약 50 중량%, 더욱 바람직하게는 약 10 중량% 내지 약 35 중량%의 탄성체 용매를 포함한다.

[0238] 본 발명에 따른 로젠지는 예를 들면 이당류가 윤활제 (예컨대 마그네슘-스테아레이트)와 같은 임의의 적절한 정제화 조제와 임의 조합된 압축가능 고체 담체에 분산된 후, 정제로 압축되는, 업계에 알려져 있는 압축 정제 형성 기술에 의해 제조될 수 있다. 그와 같은 정제 제제화를 위한 고체 담체 성분은 타액-가용성 고체, 예컨대 냉수-가용성 전분 또는 단당류일 수 있으며, 그에 따라 로젠지는 로젠지가 입안에서 유지될 때, 입에서 용이하게 용해되어 함유되어 있는 이당류 산을 구강/인두 점막과의 접촉 및 그에 의한 흡수를 위하여 타액 용액 중에 방출하게 된다. 상기한 제제의 pH는 약 4 내지 약 8.5의 범위일 수 있다.

[0239] 본 발명에 따른 로젠지는 다른 업계에 알려져 있는 고체 단위 투약 제제화 기술을 활용하여 제조될 수도 있다.

[0240] 본 발명에 따른 구강 세척제 또는 구강 세정제는 바람직하게는 하기와 같을 수 있다:

- [0241] A 올룸 멘타에(Olium menthae) 1.2 부
- [0242] 텅튜라 아르니카에(Tinctura Arnicae) 3.0 부
- [0243] 텅튜라 미르아에(Tinctura Myrrhae) 3.0 부
- [0244] 트윈(Tween) 5.0 부
- [0245] B 스피리투스(Spiritus) 90% 50.0 부
- [0246] C 나트륨 벤조에이트 0.2 부
- [0247] 감미제 (예컨대 아스파르탄) 0.02 부
- [0248] 증류수 합계 100으로.
- [0249] A는 잘 혼합되어야 하며, B가 교반하에 첨가된 후, 이어서 C가 첨가된다. 생성되는 투명 액체는 제조 후 48시간 이내에 여과되어야 한다. 또 다른 바람직한 구강 세척제는 실시예 18에 기술되어 있다.
- [0250] 투약 형태가 액체 또는 고체인지에 관계없이, 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 투약 형태는 환자의 입에서 일정 시간 기간 동안 유지됨으로써, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 미생물 또는 유사체 또는 단편의 환자의 구강과의 접촉을 촉진한다.
- [0251] 본원에서 사용될 때의 "치실" 및 "치과용 테이프"라는 용어는 치간 및 잇몸하 표면에 축적되는 분해성 식품 물질을 격퇴 및 제거하고, 구강에 축적되는 세균, 플라크 및/또는 치석을 격퇴 및 제거하기 위한 재료를 지칭한다. 치실 또는 치과용 테이프는 전기한 바와 같은 본 발명에 따른 미생물 이외에도, 세척제, 연마제, 치석 억제 성분, 미백제, 계면활성제, 및/또는 플루오르화물, 항미생물제, 화학치료제 또는 항생제와 같은 활성 성분들을 추가적으로 함유할 수 있다. 다른 추가적인 제제로는 향플라크 제제, 향미제 및 착색제가 있다. 예를 들면, 치실 또는 치과용 테이프는 업계 숙련자에게 알려져 있는 임의의 적합한 형태, 예컨대 US 3,664,915호, US 3,953,566호, US 3,962,153호, US 4,096,227호, US 4,187,390호, US 4,256,806호, US 4,385,093호, US 4,478,665호, US 4,776,358호, US 5,033,488호, US 5,209,251호, US 5,220,932호, US 5,518,012호, US 5,718,251호, US 5,765,576호 또는 US 5,911,228호에 기술되어 있는 바와 같은 PTFE (테플론 (Teflon)) 치실의 형태, 예컨대 US 3,800,812호, US 4,974,615호, US 5,760,117호, US 5,433,226호, US 5,479,952호, US 5,503,842호, US 5,755,243호, US 5,884,639호, US 6,003,525호 또는 US 6,027,592호에 기술되어 있는 바와 같은 모노필라멘트 치간 장치의 형태, 또는 생물성분 테이프의 형태일 수 있다. 바람직하게는, 상기 치실 또는 치과용 테이프는 예를 들면 US 20050226820호에 기술되어 있는 바와 같은 탄성체 코팅 모노필라멘트의 형태, 또는 예를 들면 US 20020144704호에 기술되어 있는 바와 같은 배향 열가소성 기반의 치과용 테이프 형태일 수 있다.
- [0252] 전기한 바와 같은 화장품 조성물은 인간 구강 투여 분야에서는 물론, 수의과의 구강 투여 분야에서 바람직하게는 비-인간 포유동물, 더욱 바람직하게는 애완동물을 위하여 사용될 수 있다. 화장품 조성물이 수의과 구강 투여 분야에서 사용되는 경우, 조성물은 업계 숙련자에게 알려져 있는 바와 같은 해당 투여에 적합한 다른 성분들을 함유할 수 있다.
- [0253] 본 발명은 본 발명에 따른 미생물 또는 그의 불활성화 형태의, 입냄새 및/또는 구취의 치료 및/또는 예방용 약제학적 조성물의 제조를 위한 용도에 관한 것이기도 하다. 바람직하게는, 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가적으로 포함한다.
- [0254] 약제학적 조성물은 치료적 유효량의 본 발명 미생물을 포함하며, 다양한 형태, 예를 들면 고체, 액체, 분말, 수성, 동결건조 형태로 제제화될 수 있다.
- [0255] 본원에서 기술되는 바와 같이, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 환자에게 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, "약제학적으로 허용가능한"이라는 용어는 동물, 더 구체적으로는 인간에서 사용하도록 감독 기관 또는 기타 일반적으로 알려져 있는 약전에 의해 승인된 것임을 의미한다.
- [0256] "담체"라는 용어는 그에 의해 치료제가 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 운반체를 지칭한다. 그와 같은 담체는 약제학적으로 허용가능한 것으로서, 다시 말하면 사용되는 투약량 및 농도에서 수용자에게 비독성이다. 그것은 바람직하게는 등장성, 저장성 또는 약한 고장성이며, 슈크로스 용액에 의해 제공되는 것과 같은 상대적으로 낮은 이온 강도를 가진다. 그와 같은 약제학적 담체는 물 및 오일과 같은 살균 액체일 수 있으며, 땅콩

오일, 대두 오일, 광물 오일, 참깨 오일 등과 같은 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들이 포함된다. 염수 용액 및 수성 텍스트로스와 글리세롤 용액 역시 특히 주사가능 용액용의 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 약제학적 부형제에는 전분, 글루코스, 슈크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 이온, 건조 탈지 우유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등이 포함된다. 상기 부형제는 전기한 바와 같은 락토스를 함유할 수 있는데, 가장 바람직하게는 그것은 무-락토스이다. 필요에 따라, 조성물은 소량의 침윤제 또는 에멀전화제, 또는 pH 버퍼링제를 함유할 수도 있다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 에멀션, 정제, 환약, 캡슐, 분말, 지속-방출 제제 등의 형태를 취할 수 있다. 구강 제제는 약제학적 등급의 만니톨, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 마그네슘 카르보네이트 등과 같은 표준 담체를 포함할 수 있다. 적합한 약제학적 담체의 예는 E.W. 마틴(Martin)의 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences"]에 기술되어 있다. 탈지 우유, 탈지 우유 분말, 비-우유 또는 비-락토스 함유 제품이 사용될 수도 있다. 탈지 우유 분말은 통상적으로 포스페이트 버퍼링된 염수 (PBS)에 현탁되어, 단백질성 오염물 및 생 오염물을 박멸하기 위해 오토클레이빙 또는 여과된 다음, 냉동 건조, 열 건조, 진공 건조, 또는 동결건조된다. 약제학적 담체로서 기능할 수 있는 물질의 다른 소정 예는 당, 예컨대 글루코스 및 슈크로스; 전분 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그의 유도체 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말화된 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 활석; 스테아르산; 마그네슘 스테아레이트; 칼슘 술페이트; 칼슘 카르보네이트; 식물성 오일, 예컨대 땅콩 오일, 면실 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 테오브로마(theobroma)의 오일; 폴리올 예컨대 프로필렌 글리콜, 글리세린, 소르비톨, 만니톨, 및 폴리에틸렌 글리콜; 아가; 알긴산; 무-발열원수; 등장 염수; 덩굴월굴 추출물 및 포스페이트 버퍼 용액; 탈지 우유 분말은 물론, 예를 들면 비타민 C, 에스트로겐 및 에치나세아(echinacea)와 같이 약제학적 제제에 사용되는 기타 비-독성의 친화성 물질들이다. 침윤제 및 윤활제 예컨대 나트륨 라우릴 술페이트는 물론, 착색제, 향미제, 윤활제, 부형제, 정제화제, 안정화제, 항-산화제 및 보존제 역시 존재할 수 있다.

[0257] 업계에 잘 알려져 있는 구강 투여에 적합한 다양한 담체 및/또는 부형제가 본 발명의 목적에 사용될 수 있다. 필요에 따라, 조성물은 예를 들면 보존제, 경화제, 윤활제, 에멀전화제, 안정화제, 에센스 등과 같은 다양한 공지의 첨가제들을 추가적으로 함유할 수 있다. 해당 조성물은 적합한 양의 담체와 함께, 바람직하게는 정제된 형태로 치료적 유효량의 상기 언급된 화합물을 함유함으로써, 환자에 대한 적절한 투여를 위한 형태를 제공하게 된다. 제형은 투여 모드와 어울려야 한다.

[0258] 일반적으로, 성분들은 별도로, 또는 단위 투약 형태로 함께 혼합되어, 예를 들면 활성 제제의 양을 표시하는 앰플 또는 사체와 같은 폐쇄 밀봉 용기 내의 건조 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되어야 하는 경우, 그것은 살균된 약제학적 등급의 물 또는 염수를 함유하는 주입 병에 의해 분배될 수 있다.

[0259] 본 발명의 약제학적 조성물은 중성 또는 염 형태로 제제화될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염에는 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유래하는 것들과 같이 음이온을 사용하여 형성되는 것들, 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화 제2철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래하는 것들과 같이 양이온을 사용하여 형성되는 것들이 포함된다.

[0260] 적절한 투약량 범위를 확인하는 것을 돕기 위하여, 임의로 생체의 분석이 사용될 수 있다. 제제에 사용될 정밀한 투여량은 또한 투여 경로, 및 질병 또는 장애의 중증도에 따라 달라지게 되므로, 개업의의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 효과적인 투여량은 생체의 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유도되는 투여량-응답 곡선으로부터 외삽될 수 있다. 바람직하게는, 약제학적 조성물은 직접, 또는 보조제와 조합되어 투여된다. 보조제는 클로로퀸, 양성자성 극성 화합물, 예컨대 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세롤, EtOH, 1-메틸 L-2-피롤리돈 또는 이들의 유도체, 또는 비양성자성 극성 화합물 예컨대 디메틸설폭시드 (DMSO), 디에틸설폭시드, 디-n-프로필설폭시드, 디메틸설포, 설포란, 디메틸포름아미드, 디메틸아세트아미드, 테트라메틸우레아, 아세토니트릴 또는 이들의 유도체로 구성되는 군에서 선택될 수 있다. 이러한 화합물들은 pH 제한과 관련된 조건에서 첨가된다. 본 발명에 따라 사용될 때의 조성물은 척추동물에 투여될 수 있다. 본원에서 사용될 때의 "척추동물"은 업계 일반의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지도록 되어 있다. 구체적으로, "척추동물"은 포유동물, 더 구체적으로는 인간을 포괄한다.

[0261] "투여되는"이라는 용어는 상기 언급된 조성물 치료적 유효 투여량의 투여를 의미한다. "치료적 유효량"은 투여의 목적이 되는 효과를 산출하는 투여량을 의미하며, 바람직하게는 상기 효과는 항우식성(anticariogenic)이다. 정확한 투여량은 치료의 목적에 따라 달라지게 되며, 알려져 있는 기술들을 사용하여 업계 숙련자에 의해 확인 가능할 것이다. 업계에 알려져 있는 바와 같이, 그리고 상기한 바와 같이, 전신 대 국소 전달, 연령, 체중, 일

반적 건강, 성, 음식, 투여 시간, 약물 상호작용 및 이상의 중증도에 관한 조정이 필요할 수 있으며, 업계 숙련자에 의해 일상적인 실험을 사용하여 확인가능할 것이다.

[0262] 본 방법은 인간 치료 및 수의과 적용분야 모두에 대하여 적용가능하다. 원하는 치료 활성을 가지는 본원에서 기술되는 화합물은 본원에서 기술되는 바와 같이, 생리학적으로 허용가능한 담체 중에서 환자에게 투여될 수 있다. 도입 방식에 따라, 상기 화합물은 하기에 논의되는 바와 같은 다양한 방식으로 제제화될 수 있다. 치료적 활성 화합물의 제제 중 농도는 약 0.1 - 100 중량%로 변화할 수 있다. 제제는 단독으로, 또는 다른 치료와의 조합으로 투여될 수 있다.

[0263] 약제학적 조성물의 투여는 구강, 피하, 정맥내, 동맥내, 결절내, 수질내, 건초내, 심실내, 비내, 기관지내, 경피, 결절내, 직장내, 복막내, 근육내, 폐내, 질, 직장, 또는 안대를 포함하여, 상기 논의된 바와 같은 다양한 방식으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0264] 바람직하게는, 투여는 구강 또는 협측이다. 주치의 및 임상 관리인이 투약 처방계획을 결정하게 된다. 의료 업계에 잘 알려져 있는 바와 같이, 임의의 일 환자에 대한 투약량은 환자의 크기, 체표면적, 연령, 투여될 구체적인 화합물, 성, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강, 및 동시에 투여되는 다른 약물을 포함한 많은 요인들에 따라 달라진다. 통상적인 투여량은 예를 들면 0.001 내지 1000 μg 의 범위일 수 있으나; 특히 상기 언급된 요인들에 따라 이와 같은 예시 범위 미만이거나 그를 초과하는 투여량도 고려된다.

[0265] 투약량은 바람직하게는 1주에 1회 주어져나, 치료의 진행 동안에는, 투약량이 훨씬 더 긴 시간 간격으로 주어질 수 있으며, 필요에 따라서는 훨씬 더 짧은 시간 간격으로, 예를 들면 매일 주어질 수 있다. 바람직한 경우에는, 본원에서 기술되는 방법 및 업계 숙련자에게 알려져 있는 다른 방법을 사용하여 면역 응답이 모니터링되고, 예컨대 시간, 양 및/또는 조성물과 관련하여 투약이 적정화된다. 진행은 주기적 평가에 의해 모니터링될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 국소적 또는 전신적으로 투여될 수 있다. 약제학적 조성물이 공동-치료 접근법에, 다시 말하면 다른 약제 또는 약물, 예를 들면 본원에서 기술되는 중치 예방, 치료 또는 개선용의 다른 약물과의 공동-투여에 사용되는 것 역시 고려된다.

[0266] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 미생물의, 입냄새 및/또는 구취 치료 및/또는 예방용 조성물의 제조를 위한 용도 (여기서 상기 조성물은 식료품 또는 사료임), 및 본 발명에 따른 미생물, 그의 불활성화 형태, 돌연변이, 유도체, 유사체 또는 단편을 포함하는 식료품 또는 사료에 관한 것이다. 바람직하게는, 식료품 또는 사료 형태의 조성물은 구강에 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가적으로 포함하는 전기한 바와 같은 미생물, 그의 불활성화 형태, 돌연변이, 유도체, 유사체 또는 단편을 포함하는 식품 또는 사료 조성물이다.

[0267] "식품" 또는 "사료"에는 포유동물, 예를 들면 인간 또는 동물, 예컨대 본원에서 기술되는 바와 같은 애완동물용의 임의의 식용, 섭취가능 및/또는 음용가능 물질이 포함된다. 식품 및 사료에 대해서는 본원의 다른 곳에 기술되어 있다. "구강용으로 허용가능한 담체"에 대해서는 전기되어 있으며, 바람직하게는 비독성이고, 식품 및/또는 사료 등급의 것이다. 또한, 상기 용어는 본 발명에 따라 사용될 때의 약제학적 조성물과 관련하여 언급된 담체 역시 포괄한다.

[0268] 본 발명에 있어서, "식료품"이라는 용어는 모든 식용가능 및 음용가능 식품 및 음료를 포괄한다. 따라서, 상기 미생물, 그의 불활성화 형태, 유도체, 유사체 또는 단편은 식품 또는 음료에 포함될 수 있다. 이들은 예를 들면 검, 스프레이, 음료, 캔디, 이유식, 아이스크림, 냉동 디저트, 스위트 샐러드 드레싱, 우유 조제물, 치즈, 쿠아르크, 무-락토스 요구르트, 산성화 우유, 커피 크림 또는 거품 크림 등이다.

[0269] 우유-기재의 제품들이 본 발명의 영역 내에서 고려된다. 그러나, 우유는 소, 염소, 양, 버펄로, 얼룩말, 말, 당나귀, 또는 낙타 등과 같은 동물 유래의 것을 의미하는 것으로 이해된다. 우유는 천연 상태, 재구성 우유, 탈지 우유, 또는 예를 들면 지방, 효모 추출물의 단백질, 펩톤 및/또는 계면활성제와 같이 세균의 생장 또는 발효 우유의 차후 처리에 필요한 화합물이 보충된 우유일 수 있다. 우유라는 용어는 보통 식물성 우유로 지칭되는 것들, 다시 말하자면 해당 추출물이 용액 또는 콜로이드성 현탁액 중에 단백질을 함유하며, 화학적 작용, 산발효 및/또는 열에 의해 응고가능한, 콩과 식물 (대두, 이집트콩, 렌즈콩 등) 또는 지방종자 (평지, 대두, 참깨, 면 등)와 같이, 처리되었거나 그렇지 않은 식물 재료의 추출물에도 적용된다. 마지막으로, 우유라는 용어는 동물 우유와 식물성 우유의 혼합물을 나타내기도 한다.

[0270] 본 발명의 미생물, 그의 불활성화 형태, 또는 유도체 또는 유사체 또는 단편이 유사한 내용물을 가지는 요구르트 등에 첨가되는 경우, 약 10^5 - 10^7 세포/ml의 농도로 본 발명의 미생물을 첨가하는 것이면 일반적으로

충분하다.

- [0271] 그와 같은 식품, 음료 또는 사료는 식품, 음료 또는 사료의 미가공 또는 조리된 재료에 활성 성분을 첨가하는 것을 포함하는 일반적인 식품 및 음료 또는 사료 제조 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 식품, 음료 또는 사료는 식품, 음료 또는 사료에 일반적으로 사용되는 것과 동일한 방식으로 성형 및 과립화될 수 있다. 상기 성형 및 과립화 방법에는 과립화 방법 예컨대 유동 층 과립화, 진탕 과립화, 압출 과립화, 롤링 과립화, 기체 스트림 과립화, 압밀 성형 과립화, 크래킹 과립화, 분무 과립화, 및 사출 과립화, 코팅 방법 예컨대 팬 코팅, 유동 층 코팅, 및 건조 코팅, 퍼프(puff) 건조, 과스트림법, 발포 매트법, 팽창법 예컨대 마이크로파 배양법, 및 압출 과립화 기계 및 압출기를 사용한 압출법이 포함된다.
- [0272] 본 발명의 식품, 음료 또는 사료에는 활성 성분으로서 본 발명의 미생물, 그의 불활성화 형태, 유도체 또는 유사체 또는 단편을 포함하는 모든 식품, 음료 또는 사료가 포함된다. 생성되는 식품, 음료 또는 사료가 입냄새를 감소시키는 그의 활성을 제공할 수만 있다면, 상기 식품, 음료 또는 사료 중의 활성 성분은 어떠한 농도로도 구체적으로 제한되지는 않는다. 활성 성분의 농도는 해당 활성 성분을 포함하는 식품, 음료 또는 사료의, 또는 본원에서 기술되는 세포 수들과 관련하여, 바람직하게는 0.001 내지 100 중량%, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 100 중량%, 가장 바람직하게는 0.1 내지 100 중량%이다.
- [0273] 활성 성분이 첨가되는 구체적인 식품 또는 음료에는 예를 들면 주스, 활력 음료, 스프, 차, 신 우유 음료, 낙농 제품 예컨대 발효 우유, 빙과류, 버터, 치즈, 가공 우유 및 탈지 우유, 육류 제품 예컨대 햄, 소시지, 및 햄버거, 생선 육류 케이크 제품, 계란 제품 예컨대 조미 계란 롤 및 계란 응고유, 과자류 예컨대 쿠키, 젤리, 스낵, 및 츄잉 껌, 빵, 국수, 피클, 훈제 제품, 건조 생선 및 조미료가 포함된다. 식품 또는 음료의 형태에는 예를 들면 분말 식품, 캔디형(sweet-like) 식품, 병입 식품, 캔입 식품, 레토르트 식품, 캡슐 식품, 정제 식품 및 유체 식품이 포함된다.
- [0274] 유아가 섭취할 본 발명에 따른 식품 또는 음료는 바람직하게는 유아용의 영양 조성물이다. 그와 같은 유아용 영양 조성물에는 유아용으로 제조된 개질 우유, 단백질-분해 우유, 특정 영양 개질 우유, 또는 유아 식품 및 아동용으로 제조된 식품이 포함된다. 유아용 영양 조성물의 형태에는 건조 및 분쇄된 분말 우유, 및 유아 식품이 포함되며, 아이스크림, 발효 우유, 및 유아 섭취용 젤리와 같은 일반 식품도 포함되나, 구체적으로 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0275] 본 발명에 따른 유아용 영양 조성물은 원칙적으로 단백질, 지질, 당류, 비타민 및/또는 무기질로 구성된다. 상기 영양 조성물에서, 활성 성분은 이러한 성분들과 블렌딩된다.
- [0276] 단백질에는 우유 단백질 예컨대 탈지 우유, 카세인, 치즈 유장, 유장 단백질 농축물, 및 유장 단백질 분리물 및 그의 분획 예컨대 알파 s-카세인, 베타-카세인, 알파-락토알부민 및 베타-락토글로불린이 포함된다. 또한, 계란 단백질 예컨대 계란 난황 단백질, 계란 흰자 단백질, 및 오발부민, 또는 대두 단백질 예컨대 탈지 대두 단백질, 분리 대두 단백질, 및 농축 대두 단백질이 사용될 수 있다. 이밖에, 밀 글루텐, 생선 육류 단백질, 소 육류 단백질 및 콜라겐과 같은 단백질들이 만족스럽게 사용될 수도 있다. 또한, 이러한 단백질들의 분획, 그의 산 또는 효소 처리 유래의 펩티드, 또는 유리 아미노산 역시 만족스럽게 사용될 수 있다. 상기 유리 아미노산은 질소 공급원으로서 기능할 수 있으며, 특정 생리학적 작용을 제공하기 위하여 추가적으로 사용될 수 있다. 그와 같은 유리 아미노산에는 예를 들면 타우린, 아르기닌, 시스테인, 시스틴 및 글루타민이 포함된다. 상기 지질에는 동물 지방 및 오일 예컨대 우유 지방, 라드, 쇠고기 지방 및 생선 오일, 식물성 오일 예컨대 대두 오일, 평지씨 오일, 옥수수 오일, 코코넛 오일, 야자 오일, 야자인 오일, 홍화 오일, 들깨 오일, 아마씨 오일, 달맞이꽃 오일, 중간 사슬 지방산 트리글리세리드, 및 면실 오일, 세균 생성 지방 및 오일, 그리고 이들의 분획화 오일, 이들의 수소화 오일, 및 이들의 에스테르 교환 오일이 포함된다. 블렌딩될 지질의 양은 용도에 따라 달라진다.
- [0277] 상기 당류에는 예를 들면 1종 이상의 전분, 가용성 다당류, 텍스트린, 단당류 예컨대 슈크로스, 본원에서 기술되는 바와 같은 락토스, 말토스, 글루코스, 및 프럭토스 및 기타 올리고당류가 포함된다. 그와 같은 당류의 총량은 바람직하게는 영양 조성물 중 총 고체에 대하여 40 내지 80 중량%이다. 또한, 아스파탐과 같은 인공 감미제가 만족스럽게 사용될 수 있다. 인공 감미제의 양은 적절하게는 영양 조성물 중 총 고체 당 0.05 내지 1.0 중량%이다.
- [0278] 상기 비타민에는 필수 성분으로서의 라이코펜이 포함되며, 해당 비타민이 유아에게 투여될 수 있지만 하다면, 추가적으로 예를 들어 비타민 예컨대 비타민 A, 비타민 B 군, 비타민 C, D, 및 E, 및 비타민 K 군, 엽산, 판토

텐산, 니우틴아미드, 카르니틴, 콜린, 이노시톨 및 바이오틴이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그와 같은 비타민은 바람직하게는 유아용 영양 조성물 중 총 고체 당 10 mg 내지 5 g 중량으로 존재한다.

- [0279] 또한, 상기 무기질에는 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 나트륨, 철, 구리, 아연, 인, 염소, 망간, 셀레늄 및 요오드가 포함된다. 그와 같은 무기질은 바람직하게는 유아용 영양 조성물 중 총 고체 당 1 mg 내지 5 g 중량으로 존재한다.
- [0280] 상기한 성분들 이외에도, 본 발명에 따른 유아용 영양 조성물은 영양 조성물에 바람직하게 블렌딩되는 임의의 성분, 예를 들면 식이 섬유, 뉴클레오타이드, 핵산, 향미제, 및 착색제와 함께 블렌딩될 수 있다.
- [0281] 본 발명에 따른 식품 또는 음료는 건강 식품 또는 음료, 또는 입냄새를 예방 및/또는 치료하기 위한 기능성 식품 또는 음료로서 사용될 수 있다.
- [0282] 본 발명에 따른 식품 또는 음료가 섭취될 때, 섭취되는 양이 구체적으로 제한되는 것은 아니다. 섭취되는 양은 일반적으로 활성 성분의 총량 기준 매일 0.1 내지 50 g, 바람직하게는 0.5 g 내지 20 g이다. 상기 식품 또는 음료는 하루에서 5년까지, 바람직하게는 2주 내지 1년의 기간 동안 상기 양으로 계속해서 섭취된다. 본원에서, 섭취되는 양은 식품 또는 음료를 섭취하는 개체의 증상의 중증도, 그의 연령 및 체중 등에 따라 적절한 범위로 조정될 수 있다.
- [0283] 본 발명에 따른 사료는 상기 활성 성분을 포함하는 모든 사료일 수 있다. 상기 사료에는 예를 들면 개, 고양이 및 래트용의 애완동물 사료, 소 및 돼지용의 소 사료, 닭 및 칠면조용의 닭 사료, 그리고 도미류 및 방어류용의 생선 사육 사료가 포함된다.
- [0284] 상기 사료는 예를 들면 곡물, 겨, 지방종자 가루, 동물-유래 미가공 사료 재료, 기타 미가공 사료 재료 및 정제 제품을 포함한 미가공 사료 재료에 전기한 바와 같은 활성 성분을 적절하게 블렌딩함으로써 제조될 수 있다.
- [0285] 상기 곡물에는 예를 들면 마일(mile), 밀, 보리, 귀리, 호밀, 현미, 메밀, 조, 중국 조, 피, 옥수수, 및 대두가 포함된다.
- [0286] 상기 겨에는 예를 들면 쌀겨, 탈지 쌀겨, 왕겨, 최저-등급 밀가루, 맥아, 보리 겨, 체질 펠렛(screening pellet), 옥수수 겨, 및 옥수수 눈이 포함된다.
- [0287] 상기 지방종자 가루에는 예를 들면 대두 가루, 대두 분말, 아마씨 가루, 면실 가루, 땅콩 가루, 홍화 가루, 코코넛 가루, 야자 가루, 참깨 가루, 해바라기 가루, 평지씨 가루, 케이폭(kapok) 씨 가루 및 겨자 가루가 포함된다.
- [0288] 동물-유래의 미가공 사료 재료에는 예를 들면 생선 분말, 수입 분말, 전립소맥분, 및 코스트(coast) 가루, 생선 가공성물질, 육류 분말, 육류 및 뼈 분말, 혈액 분말, 분해 모발, 뼈 분말, 도살 부산물, 깃털 가루, 누에 번데기, 탈지 우유, 카세인, 건조 유장 및 크릴이 포함된다.
- [0289] 기타 미가공 사료 재료에는 예를 들면 식물 줄기 및 잎 예컨대 알팔파, 건초 더미(hey cube), 알팔파 잎 가루, 및 개아카시아 잎 가루, 옥수수 가공 산업 유래의 부산물, 예컨대 옥수수 글루텐 가루, 옥수수 글루텐 사료 및 옥수수 함침액, 전분, 당, 효모, 발효 산업 유래의 부산물 예컨대 맥주 잔류물, 맥아 뿌리, 증류주 잔류물 및 콩 소스 잔류물, 그리고 농업 부산물 예컨대 감귤 가공 잔류물, 대두 응고유 잔류물, 커피 잔류물, 및 코코아 잔류물, 카사바, 잠두, 구아 가루, 해초, 스피룰리나(spirulina) 및 클로렐라가 포함된다.
- [0290] 상기 정제 제품에는 예를 들면 단백질 예컨대 카세인 및 알부민, 아미노산, 전분, 셀룰로스, 당류 예컨대 슈크로스 및 글루코스, 무기질 및 비타민이 포함된다.
- [0291] 본 발명에 따른 사료를 동물에 제공하는 경우, 섭취될 사료의 양이 구체적으로 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 바람직하게는 활성 성분의 양을 기준으로 일 당 1 kg 체중 당 0.1 mg 내지 50 g, 바람직하게는 일 당 1 kg 체중 당 0.5 mg 내지 20 g이다. 사료는 하루에서 5년까지, 바람직하게는 2주 내지 1년의 기간 동안 이와 같은 양으로 계속 섭취된다. 역시, 섭취되는 양은 사료를 섭취하는 동물의 종, 연령 및 체중 등에 따라 적절한 범위로 조정될 수 있다.
- [0292] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 미생물, 그의 불활성 형태, 돌연변이, 유도체, 유사체 또는 단편을 포함하는 식품, 음료 또는 사료용의 첨가제는 물론, 본 발명에 따른 미생물, 그의 불활성 형태, 돌연변이, 유도체, 유사체 또는 단편의, 입냄새 및/또는 구취 치료 및/또는 예방용 조성물의 제조 (여기서 상기 조성물은 식품, 음료 또는 사료용의 첨가제임)를 위한 용도에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 식품 또는 음료용 첨가

제에는 유아용 영양 조성물을 위한 첨가제가 포함된다.

- [0293] 상기 식품용 첨가제는 식품, 음료 또는 사료용 첨가제를 제조하는 일반적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 필요할 경우, 식품, 음료 또는 사료에서의 일반적인 용도를 위한 첨가제들, 예를 들면 문헌 [Food Additive Handbook] (문헌 [The Japan Food Additives Association; issued on January 6, 1997])에 기술되어 있는 첨가제들이 만족스럽게 첨가될 수 있는데, 감미제, 착색제, 보존제, 증점제 및 안정화제, 향산화제, 색상 고정제, 표백제, 방부제, 겔 베이스, 고미제, 효소, 증백제, 산성화제, 조미료, 에멀션화제, 강화제, 제조용 제제, 향미제, 및 향신료 추출물이 포함된다. 또한, 약제학적 정제에 대하여 전기에 언급하였던 통상적인 당류, 전분, 무기 물질, 식물 분말, 부형제, 분해제, 윤활제, 바인더, 계면활성제, 및 가소제가 만족스럽게 첨가될 수 있다.
- [0294] 상기 첨가제에는 하기의 첨가제들이 포함된다.
- [0295] 상기 감미제에는 아스파탐, 감초, 스테비아, 자일로스 및 라캉카 (나한과(Momordica grosvenori) 과실)이 포함된다. 상기 착색제에는 카로테노이드 및 투르메릭 올레오레진(turmeric oleoresin), 플라보노이드, 캐러멜 색상, 스피룰리나 색상, 클로로필, 퍼플 스위트 포테이토 색상, 퍼플 양 색상, 들깨 색상, 및 블루베리 색상이 포함된다.
- [0296] 상기 보존제에는 예를 들면 나트륨 술파이트, 벤조에이트, 벤조인 추출물, 소르베이트, 및 프로피오네이트가 포함된다. 상기 증점제 및 안정화제에는 예를 들면 고무 예컨대 아라비아 고무 및 크산탄 고무, 알기네이트, 키틴, 키토산, 알로에 추출물, 구아 고무, 히드록시프로필 셀룰로스, 나트륨 카세인, 옥수수 전분, 카르복시메틸 셀룰로스, 젤라틴, 아가, 텍스트린, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 알콜, 미세섬유 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 해초 셀룰로스, 나트륨 폴리아크릴레이트, 나트륨 폴리포스페이트, 카라기난 또는 효모 세포 벽이 포함된다.
- [0297] 상기 향산화제에는 예를 들면 비타민 C 군, 나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트, 칼슘 에틸렌디아민테트라아세테이트, 에리토르브산, 오리자놀, 카테킨, 퀘르세틴, 정향나무 추출물, 효소-처리 루틴, 사과 추출물, 참깨 씨 추출물, 디부틸히드록시톨루엔, 회향 추출물, 양고추냉이 추출물, 미나리 추출물, 차 추출물, 토코페롤, 평지씨 추출물, 커피 콩 추출물, 해바라기 씨 추출물, 페롤리온산, 부틸히드록시아니솔, 블루베리 잎 추출물, 밀랍 추출물, 후추 추출물, 봉선화 추출물, 마늘산, 유칼립투스 추출물, 및 로즈마리 추출물이 포함된다.
- [0298] 상기 색상 고정제에는 예를 들면 나트륨 니트라이트가 포함된다. 상기 표백제에는 예를 들면 나트륨 술파이트가 포함된다.
- [0299] 상기 방부제에는 예를 들면 o-페닐 페놀이 포함된다. 상기 겔 기재에는 예를 들면 아세틸리시놀레에이트 메틸, 우루시 왁스, 에스테르 겔, 엘레미 수지, 우루큐리 왁스, 카우리검, 카르나우바왁스, 글리세린 지방산 에스테르, 경랍 왁스, 코파이바발삼, 코팔 수지, 고무, 쌀 겨 왁스, 케인 왁스, 셀락, 젤루통, 슈크로스 지방산 에스테르, 탈중합 천연 고무, 파라핀 왁스, 전나무 발삼, 프로필렌 글리콜 지방산 에스테르, 분말화 펄프, 분말화 쌀 외피, 호호바 오일, 폴리이소부틸렌, 폴리부텐, 미세결정질 왁스, 유향수지 겔, 밀랍 및 칼슘 포스페이트가 포함된다.
- [0300] 상기 고미제에는 예를 들면 이소-알파-비터산, 카페인, 카와라타케 (운지 (Coriolus versicolor)) 추출물, 기나수피(redbark cinchona) 추출물, 황벽나무 수피 추출물, 용담 뿌리 추출물, 향신료 추출물, 효소적으로 개질된 나린진, 자마이카 카시아(Jamaica cassia) 추출물, 테아브로민, 나린진, 카시아 추출물, 암생트 추출물, 이소도니스 추출물, 올리브 차, 비터 오렌지 (시트러스 아루란툼(Citrus aurantium)) 추출물, 호프 추출물 및 워우드 추출물이 포함된다.
- [0301] 상기 효소에는 예를 들면 아밀라제, 트립신 또는 레닛(rennet)이 포함된다.
- [0302] 상기 증백제에는 예를 들면 우루시 왁스 및 재팬 왁스가 포함된다. 상기 산성화제에는 예를 들면 아디프산, 이타카니아산, 시트르산, 숙신산, 나트륨 아세테이트, 타르타르산, 이산화 탄소, 유산, 파이트산, 푸마리온산, 말산 및 인산이 포함된다. 상기 조미료에는 예를 들면 아미노산 예컨대 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 글루타민, 알라닌, 이소류신, 글리신, 세린, 시스틴, 타이로신, 류신, 및 프랄린, 핵산 예컨대 나트륨 이노시네이트, 나트륨 우리디네이트, 나트륨 구아닐레이트, 나트륨 시티딜레이트, 칼슘 리보뉴클레오티드 및 나트륨 리보뉴클레오티드, 유기 산 예컨대 시트르산 및 숙신산, 염화 칼륨, 염화 나트륨-감소 염수, 조 염화 칼륨, 유장염, 트리칼륨 포스페이트, 디칼륨 수소 포스페이트, 칼륨 디수소 포스페이트, 디나트륨 수소 포스페이트, 나트륨 디수소 포스페이트, 트리나트륨 포스페이트 및 클로렐라 추출물이 포함된다.
- [0303] 상기 강화제에는 예를 들면 아연 염, 비타민 C 군, 다양한 아미노산, 5-아데닐산, 염화 철, 헤스페리딘, 다양한

소성 칼슘, 다양한 비-소성 칼슘, 디벤조일티아민, 수산화 칼슘, 칼슘 카르보네이트, 티아민 히드로클로리드 염, 두날렐라(Dunallevia), 오아로텐(Oarotene), 토코페롤, 니코틴산, 당근 카로텐, 야자 오일 카로텐, 칼슘 판토테네이트, 비타민 A, 히드록시폴리딘, 칼슘 디수소 피로포스페이트, 제1철 피로포스페이트, 제2철 피로포스페이트, 페리틴, 헴 철, 메나퀴논, 엽산 및 리보플라빈이 포함된다.

[0304] 상기 제조용 제제에는 예를 들면 가공 보조제 예컨대 아세톤 및 이온 교환 수지가 포함된다. 상기 향미제에는 예를 들면 바닐라 에센스가 포함되며, 상기 향신료 추출물에는 예를 들면 고추 추출물이 포함된다.

[0305] 본 발명에 있어서, 이러한 다양한 첨가제들은 투여 모드를 고려하여 활성 성분 첨가될 수 있다.

[0306] 본 발명에 따른 조성물은 본 발명에 따른 미생물을 포함한다. 상기 조성물이 상기 미생물을 프로바이오틱 미생물의 형태로 포함하는 것이 고려된다. 즉, 프로바이오틱 효과 이외에도, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 프로바이오틱 미생물은 입냄새 및/또는 구취를 치료 및/또는 예방하는 데에 유용하다. 상기 프로바이오틱 미생물의 양은 치료될 이상, 바람직하게는 입냄새를 상당히 긍정적으로 변형시키기에 충분하도록 많으나, 순수한 의료적 판단의 범위 내에서 심각한 부작용을 방지하기에 충분하도록 적은 (합리적인 이익/위험 비인) 것이다. 상기 프로바이오틱 미생물의 유효량은 달성될 구체적인 목표, 치료되는 환자의 연령 및 신체적 이상, 기본 질병의 중증도, 치료 기간, 동시 치료의 특성 및 사용되는 구체적인 미생물에 따라 달라지게 된다. 따라서, 상기 프로바이오틱 미생물의 유효량은 원하는 효과를 제공하게 될 최소량이 된다. 예를 들어, 0.05 ml의 포스페이트 버퍼링된 염수 용액, 또는 0.05 ml의 아가 현탁액 중에 생존가능 또는 비-생존가능 전세포(whole cell)로서의 1×10^9 세균, 또는 건조 중량 등가의 세포 벽 단편이 존재하게 되면, 약 0.05 ml 내지 약 20 ml의 양으로 투여될 경우 효과적이다.

[0307] 결정적인 실질적 장점은 상기 프로바이오틱 생물체가 구강 경로에 의한 것과 같은 편리한 방식으로 투여될 수 있다는 것이다. 투여 경로에 따라, 상기 프로바이오틱 생물체를 포함하는 활성 성분은 해당 생물체를 불활성화할 수 있는 효소, 산 및 기타 천연 조건의 작용으로부터 해당 생물체를 보호하는 재료로 코팅될 필요가 있을 수 있다. 비구강 투여가 아닌 다른 것에 의해 프로바이오틱 생물체를 투여하기 위해서는, 그것이 불활성화를 방지하는 재료에 의해 코팅되거나, 또는 그것과 함께 투여되어야 한다. 예를 들면, 프로바이오틱 생물체는 효소 억제제와 함께 공동-투여되거나, 또는 리포솜 내에서 공동-투여될 수 있다. 효소 억제제에는 췌장 트립신 억제제, 디이소프로필플루오로포스페이트 (DFP) 및 트라실롤이 포함된다. 리포솜에는 수-중-유-중-수 P40 에멀션은 물론, 락토바실루스 또는 그의 부산물을 비호생식 표면으로 수송하는 통상적이거나 특별하게 설계된 리포솜이 포함된다. 예를 들면 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 이들의 혼합물, 그리고 오일 중의 분산액이 제조될 수도 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매체 및 상기 열거된 것들에 속하는 필요로 하는 다른 성분들을 함유하는 살균 운반체에 다양한 살균 프로바이오틱 생물체를 도입함으로써 제조된다. 살균 주사가능 용액 제조용 살균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 그의 미리 살균-여과된 용액으로부터 활성 성분 플러스 임의의 추가적으로 원하는 성분의 분말을 산출하는 진공-건조 및 냉동-건조 기술이다. 추가적인 바람직한 제조 방법에는 동결건조 및 열-건조가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0308] 상기 조성물에는 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 세포가 예컨대 생균, 농축 또는 건조 형태로 거기에 첨가되는 본원에서 기술되는 바와 같은 허용가능한 약제학적 담체를 포함하는, 구강 또는 협측 투여를 목적으로 하는 생성물 역시 포함된다. 물론, 상기 미생물의 불활성화 형태, 유도체 또는 유사체 또는 단편, 또는 본원에서 개시되는 상기 미생물, 그의 유도체 및/또는 유사체 및/또는 단편의 임의 조합 역시 첨가될 수 있다. 이러한 생성물들은 섭취가능 현탁액, 젤, 디퓨저(diffuser), 캡슐, 경질 젤라틴 캡슐, 시럽의 형태로, 또는 업계 숙련자에게 알려져 있는 임의의 다른 생약 형태로 제공될 수 있다.

[0309] 상기 프로바이오틱 생물체가 상기한 바와 같이 적합하게 보호되는 경우라면, 활성 화합물은 예를 들면 불활성의 회석제 또는 동화가능한 식용 담체와 함께 구강 투여될 수 있거나, 또는 그것은 경질 또는 연질의 외피 젤라틴 캡슐에 봉입될 수 있거나, 또는 그것은 위장을 통과하도록 설계되는 (즉, 장 코팅되는) 정제로 압축될 수 있거나, 또는 그것은 직접 음식의 식품과 함께 도입될 수 있다. 구강 치료 투여를 위해서는, 프로바이오틱 생물체가 부형제와 함께 도입되어, 섭취가능한 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼(wafer) 등의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물 또는 조제물은 구강 투약 단위 형태가 예를 들면 ml 당 약 1×10^9 생존가능 또는 비-생존가능의 예컨대 락토바실루스를 함유하도록 제조된다. 프로바이오틱 생물체는 편리하고 효과적으로 투여되도록, 적합한 약제학적으로 또는 식품으로 허용가능한 담체와 함께 전기 개시된 바와 같은 투약 단위 형태에 유효량으로 배합된다. 단위 투약 형태는 예를 들면 ml 당 대략 10^9 생존가능

또는 비-생존가능한 예컨대 락토바실루스의 양으로 주 활성 화합물을 함유할 수 있다. 프레바이오틱스 (prebiotics)와 같은 보충 성분을 함유하는 조성물의 경우, 투약량은 일반적인 투여량 및 상기 성분들의 투여 방식을 참고하여 결정된다.

[0310] 다른 구현예에서, 본 발명은 입냄새 및/또는 구취의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 예방 및/또는 치료 방법은 전기한 바와 같은 본 발명에 따른 미생물, 또는 상기 미생물의 불활성화 형태, 또는 돌연변이, 유도체, 유사체 또는 단편을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0311] 바람직하게는, 치료될 대상은 동물이다. 더욱 바람직하게는, 상기 동물은 포유동물이며, 더욱 더 바람직하게는 상기 포유동물은 애완 포유동물이다. 바람직한 구현예에서, 상기 애완동물은 개, 고양이, 햄스터, 원숭이, 래트 또는 마우스이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 동물은 소, 말, 돼지, 당나귀, 양 또는 염소이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 포유동물은 인간이다.

[0312] 본 발명 치료 및/또는 예방 방법의 맥락에서, 본 발명에 따른 미생물의 투여는 업계 숙련자에게 알려져 있는 어떠한 적합한 형태로도 수행될 수 있다. 바람직하게는, 상기 투여는 임의로 예를 들면 전기한 바와 같은 약제학적 또는 화장용 담체 또는 부형제를 함유할 수 있는 전기한 바와 같은 조성물의 사용 및 적용을 포함한다. 투여의 투약량 및 시간 과정은 업계 숙련자에게 알려져 있는 임의의 적합한 정보에 따라 설정될 수 있다. 바람직하게는, 상기 투약량 및 시간 과정은 전기한 바와 같이 설정될 수 있다.

[0313] 하기에 기술되어 있는 바와 같은 도 1 내지 7에 의해 본 발명을 예시한다:

[0314] 도 1은 타액 중에 존재하는 그람 음성 혐기성 세균에 의한 H_2S 생산에 대한 락토바실루스의 펩티드 농도 감소의 영향을 분석한 실험의 결과를 나타낸다.

[0315] 도 2는 실시예 3에 기술되어 있는 바와 같은 S. 살리바리우스의 생장에 대한 락토바실루스 상청액의 영향을 분석한 실험의 결과를 나타낸다.

[0316] 도 3은 실시예 5에 기술되어 있는 바와 같은 P. 킵기발리스의 생장에 대한 락토바실루스의 영향을 분석한 실험의 결과를 나타낸다.

[0317] 도 4는 실시예 6에 기술되어 있는 바와 같은 S. 살리바리우스의 생장에 대한 열-처리 락토바실루스 상청액의 영향을 분석한 실험의 결과를 나타낸다.

[0318] 도 5는 본 발명에 따른 락토바실루스에 의한 펩티드 농도의 감소를 분석한 실험의 결과를 나타낸다.

[0319] 도 6은 본 발명에 따른 동결건조된 락토바실루스에 의한 펩티드 농도의 감소를 분석한 실험의 결과를 나타낸다.

[0320] 도 7은 PTU 추출물의 통상적인 아미노산 프로필을 나타낸다.

[실시예]

[0322] 예시적인 목적으로만 제시된 것으로서, 어떠한 방식으로든 본 발명의 영역을 제한하고자 하는 것은 아닌 하기의 실시예로부터, 본 발명 및 그의 많은 장점들에 대한 더 우수한 이해가 이루어질 것이다.

[실시예 1]

[0324]

배지

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| <u>TSY-배지:</u> | |
| TSY-혼합물 (미국 소재 디프코(Difco) 사) | 30 g/l |
| 효모 추출물 (독일 소재 도이치 헤페베르케 사) | 3 g/l |
| <u>MRS 광-배지:</u> | |
| 펩톤 트립티케이스: | 1.0 g/l |
| 효모 추출물: | 0.5 g/l |
| 디-암모늄 수소 시트레이트: | 0.2 g/l |
| 나트륨-아세테이트: | 0.5 g/l |
| MgSO ₄ -7수화물: | 0.050 g/l |
| MnSO ₄ -1수화물: | 0.025 g/l |
| D-글루코스-1수화물: | 1 g/l |
| K ₂ HPO ₄ : | 0.2 g/l |
| 올레산: | 0.1 % (w/v) |

합성 배지:

| | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 구아닌: | 0.1 g/l |
| 시토신: | 0.1 g/l |
| 티미딘: | 0.1 g/l |
| 2'-데옥시아데노신: | 0.1 g/l |
| 2'-데옥시우리딘: | 0.1 g/l |
| K ₂ HPO ₄ : | 2 g/l |
| 나트륨-아세테이트: | 5 g/l |
| MgSO ₄ -7수화물: | 0.1 g/l |
| 디-암모늄 수소 시트레이트: | 2 g/l |
| CaCl ₂ -2수화물: | 0.5 g/l |
| 올레산: | 0.1 % (w/v) |
| 시아노코발라민: | 0.02 mg/l |
| 리보플라빈: | 10 mg/l |
| 엽산: | 0.2 mg/l |
| 페리독살-5-포스페이트-1수화물: | 10 mg/l |
| 4-아미노벤조산: | 0.2 mg/l |
| D (+)-바이오틴: | 1 mg/l |
| 아스코르브산: | 500 mg/l |
| 니코틴산: | 10 mg/l |
| Ca-판토테네이트: | 10 mg/l |
| 티아민: | 1 mg/l |
| 코발트(II)-니트레이트-6수화물: | 500 mg/l |
| MnSO ₄ -1수화물: | 20 mg/l |
| MgSO ₄ -7수화물: | 500 mg/l |
| Na ₂ MoO ₄ : | 0.04 mg/l |
| PTU-추출물 (독일 소재 올리, 도이치 헤페베르케 사): | 15 g/l (또는 다른 곳에서 설명된 바와 같이) |
| D-글루코스-1수화물: | 10 g/l |

[0325]

FAB 배지:

| | |
|-----------------|------------|
| 펩톤 혼합물 | 15.0 g/l |
| 효모 추출물 | 10.0 g/l |
| 나트륨 디옥살리콜레이트 | 0.5 g/l |
| 엽화 나트륨 | 2.5 g/l |
| 아가 No. 1 | 0.75 g/l |
| L-시스테인 HCl | 0.5 g/l |
| 레사주린(Resazurin) | 0.001 g/l |
| 나트륨 비카르보네이트 | 0.4 g/l |
| 하에민(Haemin) | 0.005 g/l |
| 비타민 K | 0.0005 g/l |

[0326]

[0327]

저장 및 생장

[0328]

균주의 저장 및 생장은 일반적인 절차에 따라 이루어질 수 있다. 예를 들면, 균주는 -80 °C에서 냉동물로서 저장될 수 있다. 1 ml의 배양물을 MRS-배지 중에서 정상 단계 (OD₆₀₀/mL 4-8)로 생장시키고, 500 μl의 살균된 50 % 글리세린 용액과 혼합한 후, 냉동시킬 수 있다.

[0329]

S. 살리바리우스의 배양물을 TSY-배지 중에서 정상 단계 (OD₆₀₀/mL 1-2)로 생장시키고, 상기 언급된 바와 같이 처리하였다. 실험에 바람직하게 사용된 S. 살리바리우스 균주는 S. 살리바리우스 DSM 20560 (앤드류스 (Andrews) 및 호더(Horder), 1906)이었다.

[0330]

S. 살리바리우스 (DSM 20560)는 물론 분리물의 배양도 6-웰-플레이트에서 8 ml의 TSY-배지를 사용하여 37 °C에서 밤새 혐기성으로 수행하였다.

- [0331] 락토바실루스 (DSM 19825, 19826, 19827)를 96-웰-플레이트 내의 합성 배지 150 μ l 중에서 37 °C에서 24시간 동안 혐기성 배양하였다.
- [0332] 1/2 TSY 배지 중에서 1:100 (락토바실루스:S. 살리바리우스)의 세포 계수 비로, 락토바실루스와 S. 살리바리우스의 혼합을 수행하였다. 이것은 96-웰-플레이트에서 수행하였다.
- [0333] 상기 배양 현탁액을 바이오텍 파워웨이브 마이크로플레이트 분광광도계에서 37 °C에서 12시간 동안 배양하였다.
- [0334] 대조로서, 락토바실루스 배양물 대신 비소비 1/2 TSY-배지 또는 MRS 광-배지를 사용하였다.
- [0335] 10시간의 배양 후 ($OD_{600, max}$), 또는 지수 성장 동안 (V_{max})에 락토바실루스가 있는 것과 없는 것의 최대 광학 밀도 ($OD_{600, max}$) 또는 최대 성장 속도 (V_{max})를 비교함으로써, S. 살리바리우스의 성장 자극을 볼 수 있었다.
- [0336] 자극은 최대 광학 밀도 ($OD_{600, max}$) 또는 최대 성장 속도 (V_{max})의 10% 이상 증가로 정의하였다.
- [0337] **실시예 2**
- [0338] **균주의 분류학적 분류**
- [0339] 해당 탄수화물 발효 패턴에 따라 균주의 분류학적 분류를 수행하였다. API 50 CH (프랑스 소재 바이오메리유크 (bioMerieux) 사) 시스템을 사용하여 이를 측정하고, APILAB PLUS 소프트웨어 버전 3.3.3 (프랑스 소재 바이오메리유크 사)를 사용하여 분석하였다.
- [0340] **실시예 3**
- [0341] **락토바실루스 상청액에 의한 스트렙토코쿠스 살리바리우스 성장 자극 시험**
- [0342] 실시예 1에서와 같이 세균을 배양하였다. 4000×g에서의 15분 동안의 원심분리에 의해 락토바실루스 (구체적으로 DSM 19826)의 상청액을 수득하였다. 1/2 TSY-배지 중에서 2:1 내지 4:1 (S. 살리바리우스:락토바실루스-상청액)의 부피비로 락토바실루스 상청액의 S. 살리바리우스와의 혼합을 수행하였다. 이것은 96-웰-플레이트에서 수행하였다. 상기 배양 현탁액을 바이오텍 파워웨이브 마이크로플레이트 분광광도계에서 37 °C에서 12시간 동안 배양하였다. 대조로서, 락토바실루스 상청액 대신 비소비 1/2 TSY-배지 또는 MRS 광-배지를 사용하였다.
- [0343] 실시예 1에서와 같이 성장 자극을 분석하였다. 락토바실루스의 상청액에 의한 S. 살리바리우스 성장의 성공적인 자극을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0344] **실시예 4**
- [0345] **구강 미생물총의 구강 병원성 구성원인 S. 류탄스의 비-자극**
- [0346] 실시예 1에서와 같이 S. 살리바리우스 배양물을 성장시켰다. 폐쇄된 15 ml 팔콘 튜브 내의 TSY 배지 5 ml 중에서 밤새 스트렙토코쿠스 류탄스 (DSM 20253)을 성장시켰다. 상기 구강 세균을 2:1의 부피비로 락토바실루스 상청액과 혼합하고, 실시예 1에서와 같이 성장을 분석하였다. 대조로서, 락토바실루스 상청액 대신 비소비 1/2 TSY-배지를 사용하여 구강 세균을 배양하였다.
- [0347] 락토바실루스에 의한 구강 병원성 S. 류탄스 성장의 자극을 관찰할 수 없었다.
- [0348] 또한, 하기의 분석에 의해 S. 류탄스 성장의 비-자극을 분석할 수 있다:
- [0349] 락토바실루스 (예컨대 DSM 19825, 19826, 19827)를 96-웰-플레이트 내의 합성 배지 150 μ l 중에서 37 °C에서 24시간 동안 혐기성 배양한다. 스트렙토코쿠스 류탄스 (DSM 20253)를 폐쇄된 15 ml 팔콘 튜브 내의 TSY 배지 5 ml 중에서 혐기성 조건하에 37 °C에서 밤새 성장시킨다. 1/2 TSY 배지 중에서 1:100 (락토바실루스:S. 류탄스)의 세포 계수 비로 락토바실루스와 S. 류탄스의 혼합을 수행한다. 이것은 96-웰-플레이트에서 수행한다. 상기 배양 현탁액을 바이오텍 파워웨이브 마이크로플레이트 분광광도계에서 37 °C에서 12시간 동안 호기성 배양한다. 대조로서, 락토바실루스 배양물 대신 비소비 1/2 TSY-배지를 사용한다.
- [0350] **실시예 5**
- [0351] **구강 미생물총의 구강 병원성 구성원인 P. 킵기발리스의 비-자극**
- [0352] 실시예 1에서와 같이 S. 살리바리우스 배양물을 성장시켰다. 폐쇄된 15 ml 팔콘 튜브 내의 FAB-배지 5 ml 중에서 37 °C에서 밤새 포르피로모나스 킵기발리스 (DSM 20709)를 혐기성 성장시켰다. P. 킵기발리스를 2:1의 부피

비로 락토바실루스 상청액 (DSM 19826의 것)과 혼합하고, 96-웰-플레이트에서 혐기성으로 배양하였다. 대조로서, 락토바실루스 상청액 대신 비소비 FAB-배지를 사용하여 P. 강기발리스를 배양하였다.

[0353] 락토바실루스에 의한 구강 병원성 P. 강기발리스 생장의 자극이 관찰되지 않았다. 결과를 도 3에 나타내었다.

[0354] 또한, 하기의 분석에 의해 P. 강기발리스 생장의 비-자극을 분석할 수 있다:

[0355] 락토바실루스 (예컨대 DSM 19825, 19826, 19827)를 96-웰-플레이트 내의 합성 배지 150 μ l 중에서 37 °C에서 24시간 동안 혐기성 배양한다. 포르피로모나스 강기발리스 (DSM 20709)를 폐쇄된 15 ml 팔콘 튜브 내의 FAB 배지 5 ml 중에서 37 °C에서 밤새 혐기성 성장시킨다. FAB 배지 중에서 1:100 (락토바실루스:P. 강기발리스)의 세포 계수 비로 락토바실루스와 P. 강기발리스의 혼합을 수행한다. 이것은 96-웰-플레이트에서 수행한다. 상기 배양 현탁액을 휘틀리 DG250 혐기성 워크스테이션 (독일 소재 마인트루프-DWS 사)에서 37 °C에서 45시간 동안 호기성 배양한다. 대조로서, 락토바실루스 배양물 대신 비소비 FAB 배지를 사용한다.

[0356] 실시예 6

[0357] 락토바실루스의 자극 능력의 온도 내성

[0358] 실시예 1에서와 같이 세균을 성장시켰다. 배양기에서 80 °C로 10분 동안 락토바실루스 상청액 (DSM 19827의 것)을 배양하였다. 상청액을 실온으로 냉각한 후, 상기 락토바실루스 상청액을 1:2의 부피비로 성장시킨 S. 살리바리우스 배양물과 혼합하고, 대조 실험을 포함하여 실시예 1에서와 같이 자극을 분석하였다 (역시 구강 병원성 세균을 사용하여 실시예 4 및 5에 개괄된 바와 같이 자극을 분석하였음. 구강-병원성 세균에 대한 락토바실루스의 비-자극 거동이 열 처리에 의해 영향을 받지 않는다는 것이 입증되었음). S. 살리바리우스에의 자극 활성화에 대한 열 처리의 영향은 관찰할 수 없었다. 결과를 도 4에 나타내었다.

[0359] 실시예 7

[0360] 동결건조에 대한 자극의 민감성

[0361] 실시예 1에서와 같이 S. 살리바리우스를 성장시켰다. 폐쇄된 100 ml 병 (독일 소재 스크트(Schott) 사) 내의 합성 배지 50 ml 중에서 37 °C에서 밤새 락토바실루스를 혐기성 배양하였다. 4000×g에서의 15분 동안의 원심 분리에 의해 락토바실루스 상청액을 수득하였다. 20 ml의 상청액을 -80 °C로 냉동시키고, 진공하에 16시간 동안 동결건조하였다. 동결건조된 상청액을 20 ml의 H₂O에 재현탁하였다. 재현탁된 상청액을 96 웰 플레이트 내의 1/2 TSY 배지 중에서 2:1 (S. 살리바리우스:재현탁 상청액)의 비로 S. 살리바리우스 배양물과 혼합하였다. 대조 실험을 포함하여 실시예 1에서와 같이 성장 자극을 분석하였다.

[0362] 자극 활성화는 동결건조에 의해 감소되지 않았다.

[0363] 실시예 8

[0364] 락토바실루스에 의한 펩티드 농도의 감소

[0365] 실시예 1에서와 같이 락토바실루스 (DSM 19827)를 배양하였다. 15 g/l의 펩티드 (PTU-추출물)를 함유하는 합성 배지에서 주 배양물을 배양하였다. 상기 배지에 10 μ l의 배양 현탁액을 접종하고, 37 °C에서 24시간 동안 혐기성으로 배양하였다. 다음에, 펩티드 농도를 측정하였는데, 24시간 후에 그것은 20% 이상 감소된 것으로 밝혀졌다.

[0366] 상기 결과는 성장 락토바실루스에 의한 펩티드 농도의 효과적인 감소를 보여주는 것으로서, 도 5에 예시되어 있다.

[0367] 실시예 9

[0368] 동결건조에 대한 펩티드 농도 감소의 민감성

[0369] 100 ml의 합성 배지 중에서 37 °C에서 24시간 동안 락토바실루스 (DSM 19827)를 배양하였다. 전 배양물을 4000×g에서 15분 동안 원심분리하고, 20 ml의 H₂O에 재현탁하였다. 20 ml의 재현탁된 락토바실루스를 -80 °C로 냉동시키고, 진공하에 16시간 동안 동결건조하였다.

[0370] 펩티드 흡수 분석을 위하여, 10 mg의 동결건조된 락토바실루스를 H₂O에 재현탁하고, 4000×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 7 g/l의 펩티드를 함유하는 1 ml의 합성 배지를 펠렛에 첨가하고, 37 °C에서 5분 배양한 후, 원

심분리에 의해 세포를 제거하였다. 상청액 중 펩티드 농도를 측정하였다. 세포 제거 후 배지 중 펩티드 농도는 2 g/l로 감소하였다. 이는 동결건조된 락토바실루스 mg 당 펩티드 0.5 mg의 섭취에 해당한다.

[0371] 도 6에 예시된 바와 같이, 이러한 결과는 동결건조 상태의 락토바실루스에 의한 펩티드 농도의 효과적인 감소를 보여준다.

[0372] 실시예 10

[0373] 그람 음성 혐기성 세균에 의한 H₂S 생산에 대한 락토바실루스에 의한 펩티드 농도 감소의 영향

[0374] 실시예 8에서와 같이 락토바실루스를 배양하고 동결건조하였다. 실험을 위하여, 10 mg의 동결건조된 락토바실루스를 덤-웰-플레이트 내의 H₂O 중에 재현탁하고, 4000×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 3 g/l의 펩티드를 함유하는 합성 배지 1 ml를 펠렛에 첨가하고, 37 °C에서 5분 배양 후, 원심분리에 의해 세포를 제거하였다. 배지의 pH는 배양에 의해 변화되지 않았다. 다음에, 배지에 50 µl의 비살균 인간 타액을 접종하고, 37 °C에서 6 시간 동안 혐기성으로 배양하였다. 납 아세테이트로 함침된 살균 여과지를 사용하여 덤-웰-플레이트를 덮었다. 여과지의 흑색화에 의해 타액 중 미생물에 의한 황화 수소의 생산을 모니터링하였다.

[0375] 락토바실루스를 사용한 사전-배양이 없는 대조 실험과 흑색화를 비교함으로써, 락토바실루스 처리된 배지에서의 H₂S 생산의 감소를 관찰하였다.

[0376] 이러한 결과는 락토바실루스를 사용한 배지의 사전-배양이 인간 타액 중의 미생물을 사용한 배지의 차후 배양 동안 H₂S 생산의 감소를 초래한다는 것을 보여준다.

[0377] 실시예 11

[0378] 로젠지 조성물 (I)

[0379] 바람직하게는 DE-C2 36 45 147호 8페이지의 실시예 4에 기술되어 있는 바와 같이 로젠지 조성물이 제조되는데, 여기에서는 상기 실시예 4에 언급되어 있는 성분들 이외에도, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물이 로젠지 mg 당 10² 내지 10¹², 바람직하게는 10³ 내지 10⁸ 세포의 양으로 첨가된다.

[0380] 실시예 12

[0381] 로젠지 조성물 (II)

[0382] 바람직하게는 DE-C2 36 45 147호 8페이지의 실시예 5에 기술되어 있는 바와 같이 로젠지 조성물이 제조되는데, 여기에서는 상기 실시예 5에 언급되어 있는 성분들 이외에도, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물이 로젠지 mg 당 10² 내지 10¹², 바람직하게는 10³ 내지 10⁸ 세포의 양으로 첨가된다.

[0383] 실시예 13

[0384] 치약 조성물

[0385] 바람직하게는 DE-C2 36 45 147호 8페이지의 실시예 3에 기술되어 있는 바와 같이 치약 조성물이 제조되는데, 여기에서는 상기 실시예 3에 언급되어 있는 성분들 이외에도, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물이 치약 mg 당 10² 내지 10¹², 바람직하게는 10³ 내지 10⁸ 세포의 양으로 첨가된다.

[0386] 실시예 14

[0387] 백악-기재 치약 조성물

[0388] 바람직하게는 문헌 ["Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995] 205페이지의 챕터 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel"에 기술되어 있는 바와 같이 백악-기재 치약 조성물이 제조되는데, 여기에서는 상기 205페이지의 챕터에 언급되어 있는 성분들 이외에도, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물이 백악-기재 치약 mg 당 10² 내지 10¹², 바람직하게는 10³ 내지 10⁸ 세포의 양으로 첨가된다.

[0389] 실시예 15

[0390] 규산/플루오르화 나트륨 기재의 젤-치약

- [0391] 바람직하게는 문헌 ["Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995] 205페이지의 챕터 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel"에 기술되어 있는 바와 같이 규산/플루오르화 나트륨 기재의 젤-치약 조성물이 제조되는데, 여기에서는 상기 205페이지의 챕터에 언급되어 있는 성분들 이외에도, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물이 규산/플루오르화 나트륨 기재 젤-치약 mg 당 10^2 내지 10^{12} , 바람직하게는 10^3 내지 10^8 세포의 양으로 첨가된다.
- [0392] **실시예 16**
- [0393] **항치석 치약 조성물**
- [0394] 바람직하게는 문헌 ["Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995] 206페이지의 챕터 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel"에 기술되어 있는 바와 같이 항치석 치약 조성물이 제조되는데, 여기에서는 상기 206페이지의 챕터에 언급되어 있는 성분들 이외에도, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물이 항치석 치약 mg 당 10^2 내지 10^{12} , 바람직하게는 10^3 내지 10^8 세포의 양으로 첨가된다.
- [0395] **실시예 17**
- [0396] **추잉 검 조성물**
- [0397] 바람직하게는 DE-C2 36 45 147호 9페이지의 실시예 6에 기술되어 있는 바와 같이 추잉 검 조성물이 제조되는데, 여기에서는 상기 실시예 6에 언급되어 있는 성분들 이외에도, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물이 추잉 검 mg 당 10^2 내지 10^{12} , 바람직하게는 10^3 내지 10^8 세포의 양으로 첨가된다.
- [0398] **실시예 18**
- [0399] **농축 구강세척제 조성물**
- [0400] 바람직하게는 문헌 ["Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995] 206페이지의 챕터 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel"에 기술되어 있는 바와 같이 농축 구강 세척제 조성물이 제조되는데, 여기에서는 상기 206페이지의 챕터에 언급되어 있는 성분들 이외에도, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물이 농축 구강세척제 조성물 ml 당 10^2 내지 10^{13} 세포의 양으로 첨가된다.
- [0401] **실시예 19**
- [0402] **필름 조제물**
- [0403] 필름의 제조:
- [0404] 1. 수상
- [0405] - 60 °C로 물을 가열함
- [0406] - 교반하에 아스파탐 (감미제)를 첨가함
- [0407] - 아스파탐을 완전히 용해시킴
- [0408] - 예를 들면 콜리코트(Kollicoat) IR (폴리비닐알콜 상의 폴리에틸렌글리콜) 또는 PVP (폴리비닐피롤리돈) 또는 천연 중합체 예컨대 알기네이트와 같은 중합체성의 수용성 필름 형성제를, 그것이 용해될 때까지 교반하에 첨가함
- [0409] - 10분 후, 잔존 거품을 제거함
- [0410] - 혼합물의 냉각 후, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물을 최종 방향 필름 당 10^2 내지 10^{12} , 바람직하게는 10^3 내지 10^8 세포의 양으로 첨가함; 다르게는, 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 돌연변이 또는 유도체, 또는 유산균 군에 속하는 상기 언급된 미생물의 유사체 또는 단편이 첨가될 수 있음
- [0411] 2. 오일 상
- [0412] - 페퍼민트-오일 중에 멘톨을 용해시킴

- [0413] - 교반하에, 페퍼민트 오일-멘톨-혼합물에 폴리소르베이트 80을 첨가함
- [0414] - 다음에, 상기혼합물을 교반하에 프로필렌-글리콜에 첨가함
- [0415] - 임의로 착색제 (예컨대 색소,레이크(lake))가 첨가될 수 있음
- [0416] 3.
- [0417] - 교반하에, 오일 상을 천천히 수상과 혼합함
- [0418] 4.
- [0419] - 절단 장치를 사용하여 기계적으로 얇은 필름을 생성시킴
- [0420] 샘플 제제:

| | 제제 I | | 제제 II | |
|------------|--------|-------------|--------|-------------|
| | 중량 [g] | 필름 중 조성 [%] | 중량 [g] | 필름 중 조성 [%] |
| 상 I | | | | |
| 아스파탐 | 0.7 | 1.4 | 0.7 | 1.8 |
| 폴리코트 IR | 35.0 | 68.5 | 25.0 | 65.8 |
| 아스코르브산 | - | - | 1.0 | 2.6 |
| 제리 향미제 | | | 6.0 | 15.8 |
| 탈염수 | 85.0 | - | 80.0 | |
| 상 II | | | | |
| 멘톨 | 1.4 | 2.7 | - | |
| 페퍼민트 오일 | 5.6 | 11.0 | - | |
| 폴리소르베이트 80 | 0.7 | 1.4 | - | |
| 프로필렌 글리콜 | 7.0 | 13.7 | 5.0 | 13.2 |
| 그린 레이크 | 0.7 | 1.4 | - | |
| 아조루빈 레이크 | - | - | 0.3 | 0.8 |
| 합계 | 136.1 | 100.0 | 118.0 | 100.0 |
| 고체 함량 | 51.1 | | 38.0 | |

- [0421]
- [0422] 본원에 개시되어 있는 본 발명의 상세한 설명 및 실시예를 고려할 때, 업계 숙련자라면, 본 발명의 다른 구현에 및 용도가 분명할 것이다. 모든 문헌, 모든 U.S. 및 외국 특허들, 및 모든 U.S. 및 외국 특허 출원들을 포함하여, 어떠한 이유로든 본원에서 인용되는 모든 참고문헌들은 모든 목적에 있어서 구체적이고도 전체적으로 참조로써 개재된다. 상기 상세한 설명 및 실시예는 하기의 청구범위에 의해 표시되는 본 발명의 진정한 영역 및 기술사상에 의해서만 대표되는 것으로 간주하고자 한다.

수탁번호

- [0423]
- 기탁기관명 : DSMZ
- 수탁번호 : DSMZ19825
- 수탁일자 : 20071101

기탁기관명 : DSMZ

수탁번호 : DSMZ19826

수탁일자 : 20071101

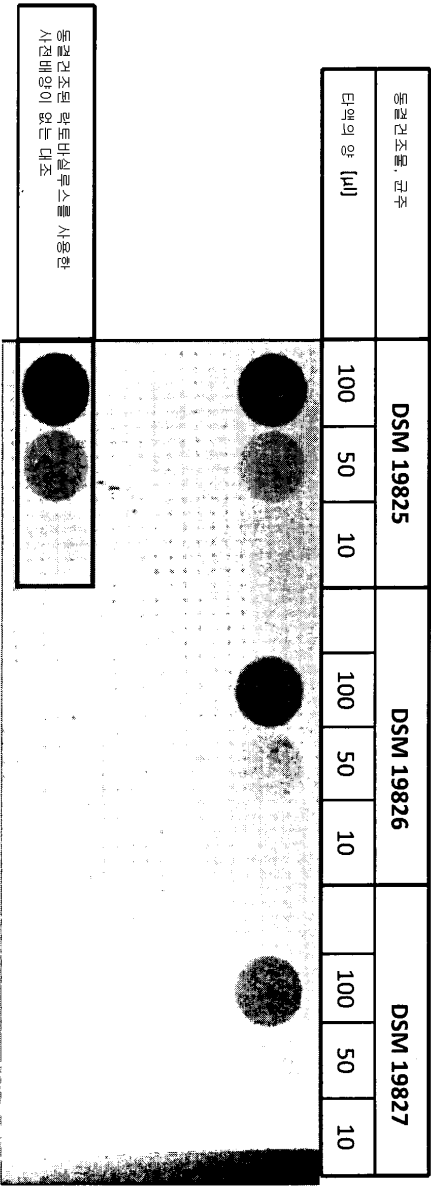
기탁기관명 : DSMZ

수탁번호 : DSMZ19827

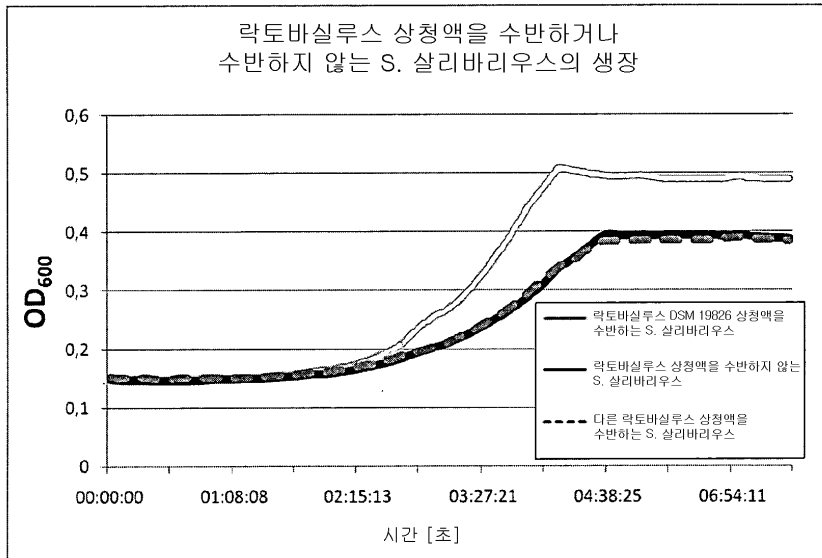
수탁일자 : 20071101

도면

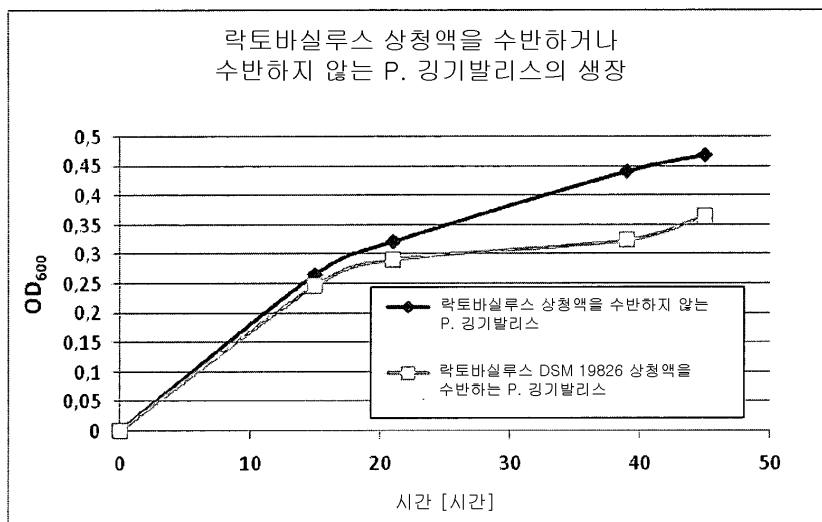
도면1



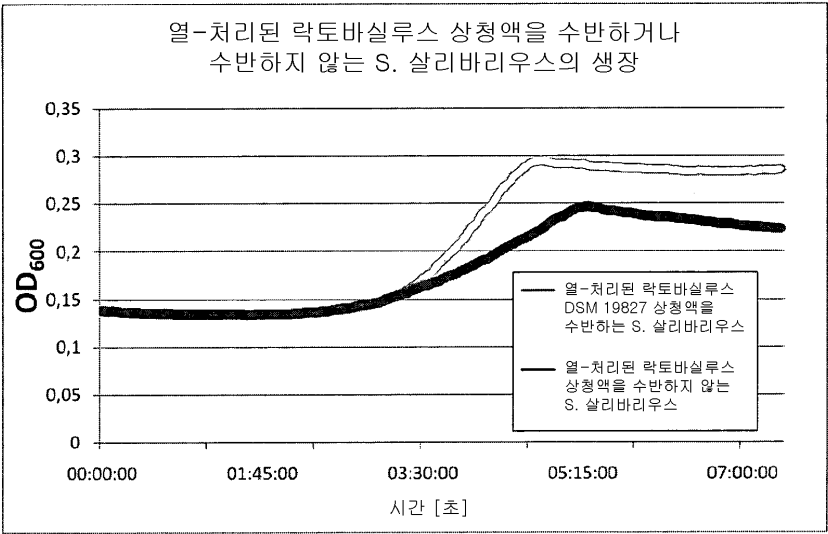
도면2



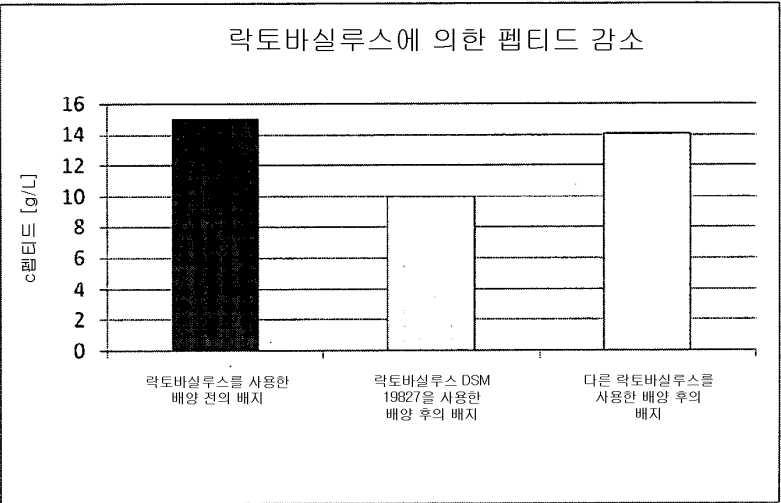
도면3



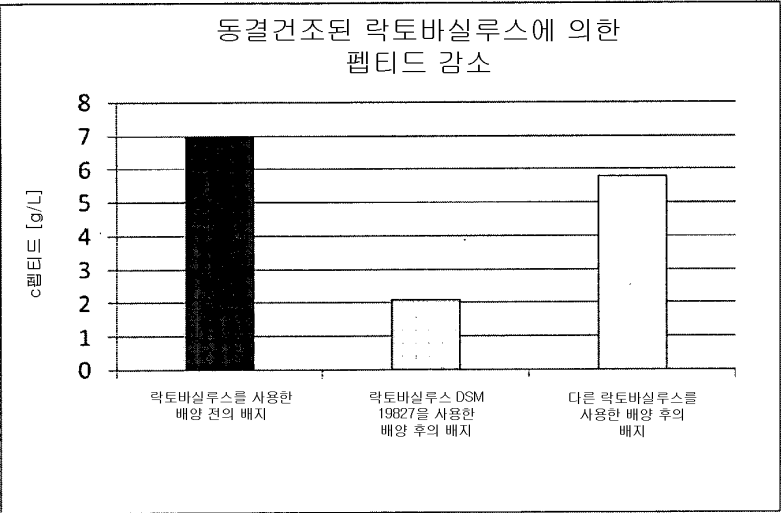
도면4



도면5



도면6



도면7

