



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.

A61K 8/99 (2006.01)

A61Q 11/00 (2006.01)

(45) 공고일자

2007년06월13일

(11) 등록번호

10-0727338

(24) 등록일자

2007년06월05일

(21) 출원번호

10-2001-7001841

(65) 공개번호

10-2001-0072440

(22) 출원일자

2001년02월12일

(43) 공개일자

2001년07월31일

심사청구일자

2004년07월16일

번역문 제출일자

2001년02월12일

(86) 국제출원번호

PCT/EP1999/005473

(87) 국제공개번호

WO 2000/09080

국제출원일자

1999년07월26일

국제공개일자

2000년02월24일

(81) 지정국

국내특허 : 오스트레일리아, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 일본, 대한민국, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 루마니아, 싱가포르, 터키, 미국, 남아프리카,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

(30) 우선권주장

98202707.0

1998년08월12일

유럽특허청(EPO)(EP)

(73) 특허권자

소시에떼 데 프로듀이 네슬레 소시에떼아노님
 스위스 연방 비베시 1800

(72) 발명자

니제르쟝-리샤르
 스위스체하-1073사비니성띠에드꾸르따라이에6

구겐하임베른하르트
 스위스체하-8703엘렌바흐체트라웁홀츠슈트라쎄65

꼬멜리엘레나-마리아
 스위스체하-1005로잔느슈멘드몽메일랑8

스팅엘레프란체스카
 스위스체하-1018로잔느루뜨드시그날10

꼬꼰첼리피에르산드로
 이탈리아아이-29100피아첸자비아에밀리아파르멘제84우니.까또리까텔
 사끄로이스띠뚜또디마이끄로바이올로지아

(74) 대리인

특허법인코리아나

(56) 선행기술조사문현

EP0699689

심사관 : 김범수

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 외인성 유산균의 구강 미소세균총내 도입

(57) 요약

충치, 치태 및 치주감염의 예방 또는 치료용 조성물의 제조를 위한, 구강의 상재 미소세균총의 일부가 아니고, 저산성화성이며 치아의 균막에 직접적으로 접착할 수 있는 유산균의 용도 및 이들로 제조된 조성물.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

스트렙토콕커스 씨모필러스 (*Streptococcus thermophilus*), 락토콕커스 락티스 아종 락티스 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 및 락토콕커스 락티스 아종 락티스 바이오바르 디아세틸락티스 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 유산균을 함유하는 구강 건강용 조성물.

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

제 14 항에 있어서, 충치, 치태 및 치주감염의 예방 또는 치료를 위하여 유효량의 유산균을 함유하는 구강 건강용 조성물.

청구항 19.

제 18 항에 있어서, 유산균을 10^4 ~ 10^9 cfu/g 함유하는 구강 건강용 조성물.

청구항 20.

삭제

청구항 21.

제 14 항에 있어서, 균주 스트렙토콕커스 씨모필러스 (*Streptococcus thermophilus*) CNCM I-1984, 스트렙토콕커스 씨모필러스 (*Streptococcus thermophilus*) CNCM I-1985, 락토콕커스 락티스 아종 락티스 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) CNCM I-1986, 락토콕커스 락티스 아종 락티스 바이오바르 디아세틸락티스 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*) CNCM I-1987 및 스트렙토콕커스 씨모필러스 (*Streptococcus thermophilus*) LMG P-18997로 이루어진 균으로부터 선택되는 일종 이상의 유산균을 함유하는 구강 건강용 조성물.

청구항 22.

제 14 항에 있어서, 조성물이 추가로 우유; 발효유; 카제이노-글리코매크로펩티드, 미셀라 (micellar) 카제인, 플루오르화 미셀라 카제인 또는 응유로부터 선택되는 우유 유도체; 또는 박테리오신을 포함하는 구강 건강용 조성물.

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

하기의 기술내용에서, 구강은 구강점막(잇몸, 입술, 뺨, 구개 및 입바닥), 혀 및 치아(인공구조물포함)로 이루어진, 인간 또는 애완동물과 같은 동물의 구강을 의미한다.

구강의 상재 미소세균총에는 구강내 자연적으로 생존하는 모든 미생물이 포함되며 이는 구강 표면상에 영구히 상재할 수 있기 때문이다. 또한 구강의 상재 미소세균총에는 비록 잇몸틈 및 치주 포켓이 건강한 구강에 존재하지 않더라도 치아경질부와 연질 조직사이의 계면영역(치아-잇몸연결부)에 생존하는 세균이 포함된다. 이러한 미소세균총에는 *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Arachnia*, *Rothia*, *Alcaligenes*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Neisseria/Branhamella*, *Veillonella*, *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter*, *Eikenella*, *Actinobacillus*, *Capnocytophga*, *Haemophilus*, *Simonsiella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Wolinella/Selenomonas*, *Mycoplasma*, *Candida*, *Spirochaetes*, *Protozoa*로부터 선택된 미생물이 포함된다.

일시적 미소세균총에는 구강에 때때로 존재할 수 있으나, 영구히 상재하지 않는 외인성 세균이 포함된다. 이러한 일시적 미소세균총에는 모든 식품 미생물, 예컨대 *bifidobacteria* (*B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. breve* 및 *B. longum*); *lactococci* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 및 *Lactococcus lactis* subsp. *lactic* biovar *diacetylactis*); *streptococci* (*Streptococcus thermophilus*, *S. lactis*, *S. lactis* *cremoris* 및 *S. lactis* *diacetylactis*); *lactobacilli* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum* 및 *L. johnsonii*를 포함하는 액시도필 (acidophile)군; 참조 Fujisawa et al., *Int. J. Syst. Bact.*, 42, 487-491, 1992); *pediococci* (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* 및 *Pediococcus halophilus*); *enterococci*; *staphylococci* (*Staphylococcus xylosus* 및 *Staphylococcus carnosus*); *micrococci* (*Micrococcus varians*); *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis* 및 *Saccharomyces* 속 이스트; 및 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* 및 *Penicillium* 속 곰팡이가 포함될 수 있다.

본 발명의 첫번째 목적은, 충치, 치태 및 치주감염의 예방 또는 치료용 조성물의 제조를 위한, 구강의 상재 미소세균총의 일부가 아니고, 저산성화성이며 치아의 균막에 직접적으로 점착할 수 있는 유산균의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 유산균은 저산성화성이고 치아의 균막에 직접적으로 점착할 수 있어, 이러한 유산균으로 제조된 조성물은 치아의 병원체를 제거하거나 이들의 부착을 방지시킨다. 본 발명에 따른 유산균은 "저산성화성"이며, 이는 상기 유산균이 병원성 균주보다 산성화성이 덜하다는 것을 의미한다. 따라서, 이것은 약 5.5-7의 구강내 pH에 기여한다. 이것은 바람직하게는 유제품 (dairy) 기원으로부터 유래한다.

본 발명에 따른 유산균은 특이적 또는 비특이적 상호작용 및/또는 점착 인자를 통해 치아의 균막에 점착한다. 특이적 점착 인자는 단백질 또는 다당류이다.

일종 이상의 유산균은 *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 및 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*로 이루어진 군 및 특히 균주 CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986, CNCM I-1987 및 LMG P-18997로 이루어진 군에서 선택된다.

이러한 균주는 치아의 균막에 대한 이들의 침착력 때문에 유산균들중에서 선택되었으며, 이들의 최적 성장온도는 약 37°C이고, 이것은 구강내 온도이다. 더욱이 이것은 글루코오스 및 수크로오스를 발효시킬 수 있고, 우식원성 균주의 병원성의 인자인 글루칸을 합성하지 않는다.

본 발명의 다른 목적에 따라, 유산균을 유전공학적으로 개질시켜 이것이 점착인자를 통해 치아의 균막에 점착하도록 하는 것이 고려중이다. 치아의 균막에 이미 점착되어 있는 유산균에 있어서, 이러한 개질은 상기 균주가 치아의 표면에 좀더 점착성이 되도록 만들고자 하는 것이다. 마찬가지로, 임의의 비점착성 유산균 (*Lactobacilli*는 아님)은 유전공학적으로 개질시켜 치아의 균막에 점착시킬 수 있다.

유산균의 이러한 개질은 예컨대 유전자 X17390, X14490 또는 X53657 (GenBank accession numbers)을 삽입시켜 달성할 수 있다. 이러한 유전자는 에스.뮤탄스에서 타액 당단백질에 대한 점착을 매개하는 Antigen I/II 의 발현에 관련이 있다.

본 발명에 따라, 유산균을 유전공학적으로 개질시켜 저산성화성로 하는 것이 또한 가능하다. 이미 낮은 산성화성인 유산균에 있어서는 상기 개질은 이의 유산 생산을 감소시켜 상기 효과를 증가시키고자 하는 것이다.

이러한 개질은 많은 방법, 바람직하게는 하기 문헌에 기재된 프로토콜중의 하나에 따라 달성될 수 있다 : Boumerdassi et al., Appl. Environ. Microbiol., 63, 2293-2299, 1997; Platteeuw et al., Appl. Environ. Microbiol., 61, 3967-3971, 1995; Ito et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 1569-1573, 1994.

본 발명에 따라, 유전공학적으로 개질된 또는 개질되지않은 일종 이상의 유산균은 인간 또는 애완동물과 같은 동물에서 충치, 치태 및 치주감염의 예방 또는 치료를 위한 조성물의 제조를 위해 "유효량"으로 사용한다. 이러한 양은 바람직하게는 10^4 내지 10^9 cfu/g 이다.

또한 우유 유도체, 예컨대 우유 또는 발효유 또는 임의 형태의 카제이노-글리코매크로펩티드, 미셀라 카제인, 플루오르화 미셀라 카제인, 응유 또는 박테리오신으로부터 선택한 우유 유도체와 배합하여 일종 이상의 유산균을 사용하는 것이 가능하다.

선택된 균주의 생물학적 특징

발효패턴 : 49 개의 단순당을 api 50 CH bioMerieux 스트립 테스트 (bioMerieux SA, 69280 Marcy-l'Etoile, France) 으로 시험하였고 그 결과는 표 1에 나타내었다.

산성화 그래프 : 산성화 그래프를 하기 조건하 37°C에서 구하였다:

- *S. sobrinus* OMZ 176: FUM 수크로오스 1% 및 FUM 글루코오스 1%
 - *S. thermophilus* CNCM I-1985: Belliker 수크로오스 1 % 및 Belliker 글루코오스 1 %
- 접종은 항상 5%이고; pH는 매 20 분마다 기록하였다.

수크로오스 발효유래의 *S. thermophilus* CNCM I-1985은 pH를 4.5로 낮추는 반면, *S. sobrinus* OMZ 176은 4로 낮춘다.

[표 1]

L.lactis CNCM I-1987, L.lactis CNCM I-1986, *S. thermophilus* CNCM I-1984, *S. thermophilus* CNCM I-1985 및, *S. thermophilus* LMG P-18997의 당발효.

| 당 | L. lactis CNCM I-1987 | L. lactis CNCM I-1986 | S. th. CNCM I-1984 | S. th. CNCM I-1985 | S. th. LMG P-18997 |
|---------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 아도니톨 | +++ | | | | |
| 아에스쿨린 | ++ | +++ | | | |
| 아미그달린 | +++ | | | | |
| D-아라비노스 | | | | | |
| L-아라비노스 | | | | | |
| D-아라비톨 | | | | | |
| L-아라비톨 | +++ | | | | |
| 아르부틴 | +++ | +++ | | | |
| 셀로비오스 | +++ | ++++ | | | |
| 둘시톨 | | | | | |
| 에리트리톨 | | | | | |
| D-프룩토오스 | + | ++++ | | | |
| D-프코스 | | | | | |
| L-프코스 | | | | | |
| 갈락토오스 | ++ | ++++ | | | |
| 베타-겐티오비오스 | | +++ | | | |
| 글루코네이트 | | | | | |
| 2-케토-글루코네이트 | | | | | |
| 5-케토-글루코네이트 | | | | | |
| 글릭낙 | + | ++++ | + | ++ | ++ |
| D-글루코오스 | + | ++++ | | | |
| 글리세롤 | | | | | |
| 글리코겐 | | | | | |
| 이노시톨 | | | | | |
| 이눌린 | | | | | |
| 락토오스 | + | ++++ | +++ | ++++ | ++++ |
| D-락소오스 | | | | | |
| 말토오스 | ++ | | | | |
| 만니톨 | +++ | ++ | | | |
| D-만노오스 | + | ++++ | | | |
| 멜레지토오스 | | | | | |
| 멜리비오스 | | | | | |
| 알파-메틸-D-글루코시드 | | | | | |
| 알파메틸-D-만노시드 | | | | | |
| D-라피노오스 | | | | | |
| 람노오스 | | | | | |
| 리보오스 | | | | | |
| 살리신 | ++ | ++ | | | |
| 소르비톨 | +++ | +++ | | | |

| | | | | | |
|-------------|-----|--|-----|------|-----|
| L-소르보오스 | | | | | |
| 전분 | | | | | |
| 수크로오스 | | | | | |
| D-타가토오스 | | | | | |
| 트레할로오스 | | | | | +++ |
| D-투라노오스 | | | | | |
| 자일리톨 | ++ | | +++ | ++++ | |
| D-자일로오스 | ++ | | | | |
| L-자일로오스 | +++ | | | | |
| 베타-메틸-자일로시드 | | | | | |

+ , ++ , +++, +++, +++++ 는 발효가 3, 6, 24 또는 48시간후 개시되었는지 보여준다.

본 발명의 두번째 주 목적은 구강의 상재 미소세균총의 일부가 아니고 저산성화성이며 치아의 균막에 직접적으로 점착할 수 있는 유산균을 함유하는 구강의 건강을 위한 조성물에 관한 것이다.

이러한 조성물은 특히 충치, 치태 및 치주감염의 예방 또는 치료를 위한 것이다.

상기 유산균 균주는 *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 및 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*로 이루어진 균, 바람직하게는 균주 CNCM I-1984, CNCM I-1985, LMG P-18997, CNCM I-1986 및 CNCM I-1987로 이루어진 균에서 선택한다.

구강의 건강을 위한 이러한 조성물에서 유산균 균주는 전술한 바와 같이 유전공학적으로 개질될 수 있다.

상기 유산균 균주는 식품, 애완동물 식품, 화장품 또는 약학 조성물에 포함될 수 있다.

따라서, 이러한 조성물은 바람직하게는 치약, 마우스린스, 검, 스프레이, 음료, 캔디, 유아포뮬라, 아이스크림, 냉동디저트, 스위트 셀러드 드레싱, 유제제, 치즈, 쿠아르크, 요구르트, 산성화우유, 커피크림 또는 생우유이다.

이러한 조성물에서 유산균 균주는 단독으로 또는 우유 유도체와 배합하여 시너지효과의 제품을 수득할 수 있다. 따라서, 이러한 구강 건강용 조성물에는 하기의 것들이 함유된다 :

-구강의 상재 미소세균총의 일부가 아니고 저산성화성이며 치아의 균막에 직접적으로 점착할 수 있는 유산균;

-임의 형태의 유산 글리코펩티드, 응유 또는 박테리오신.

유산 글리코펩티드는 바람직하게는 카제이노-글리코매크로펩티드(CGMP)이고, 플루오르화 또는 비플루오르화 미셀라 카제인 (특허 EP 0 604 802 및 EP 0 748 591에 기재된 바와 같이 수득할 수 있다) 이거나 응유가 또한 첨가될 수 있다. 카제이노-글리코매크로펩티드는 바람직하게는 약 0.1%의 최소량으로 첨가된다. 또한 카제이노-글리코매크로펩티드는 치아 균막에 상기 유산균이 점착하는 것을 막지 못함이 밝혀졌다 (도 2 및 3).

시너지성 조성물이 또한 그람양성 구강 세균에 대해 활성인 일종 이상의 박테리오신을 첨가하여 제조할 수 있다. 이런 경우에서, 구강 위생 조성물은 정제된 박테리오신을 조성물의 중량으로 0.00001 내지 50%, 바람직하게는 0.00001 내지 15% 함유할 수 있다. 박테리오신은 바람직하게는 바리아신이다 (EP 0 759 469).

조성물이 분해되는 것을 보호하기 위해서, 지용성 산화방지제를 또한 포함시킬 수 있다. 적합한 산화방지제에는 "토코페롤", 부틸-히드록시아니솔 (BHA), 부틸-히드록시톨루엔 (BHT), 및 아스코르빌 팔미테이트가 포함된다. 지용성 산화방지제는 조성물의 중량의 0.005% 내지 0.5%, 바람직하게는 0.005% 내지 0.01%의 양으로 존재한다.

본 발명의 치약 조성물에서 사용하기에 적합한 연마제에는 탄산칼슘, 알루미노규산칼슘, 알루미나, 알루미나 수화물, 아연 오르토포스페이트, 플라스틱 입자 및 실리카가 포함되나 이중 실리카가 바람직한 연마제이다.

본 발명에 따른 조성물은 구강적으로 허용가능한 pH를 가지며 이범위내에서 상기 유산균의 활성은 손상되지 않는다. pH는 3.0-9.5 범위일 수 있으며, 바람직하게는 3.5 내지 6.5 일 수 있다.

이러한 조성물은 적절한 상대량으로 성분들을 함께 혼합하고 최종적으로 필요에 따라 pH를 원하는 값으로 조정하는 것을 포함하는 통상의 방법으로 제조할 수 있다.

치아에 점착할 수 있는 유산균을 스크리닝하는 방법에는 하기의 단계들이 포함될 수 있다 :

(1) 치아에 점착할 수 있는 유산균 균주의 특이 표면 단백질을 인식하는 모노클로날 항체를 제조하는 단계, 및

(2) 치아에 점착할 수 있는 균주의 모노클로날 항체를 사용하여 임의의 유산균 균주를 스크리닝하는 단계.

상기 모노클로날 항체는 주변에서 성장하는 다른 균주들중에서 유산균 균주를 검출하기 위한 도구로 사용된다.

본 발명은 여기에 기술된 특정 구현예에 의해 그 범위가 한정되는 것은 아니다. 사실, 여기에 기재된 것외에 발명의 다양한 변경이 전술한 기술내용 및 첨부한 도면으로부터 당업자에게는 명확할 것이다. 상기 변경은 청구범위의 범위 내에 속한다. 다양한 간행물이 여기에서 인용되었고, 이의 개시가 본 발명을 이해하는데 필요한 정도로 본 발명에 참고로 포함되어 있다. 세균 세포의 DNA 조작, 클로닝 및 형질전환은 다른언급이 없는한 샘브록등 (Sambrook et al., Molecular-Cloning, A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989)의 교재에 따라 실행하였다. 플라스미드, 균주 및 사용하는 다양한 배지의 간단한 설명 및 모노클로날 항체의 제조방법이 상기 예에 뒤따른다.

균주 *S. thermophilus* S118 (NCC 1529), S123 (NCC 1561), *L. lactis* subsp. *lactis* 29 (NCC 2211), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *dioacetylactis* 69 (NCC 2225)는 부다페스트조약하 Collection Nationale de Culture de Microorganismes(25 rue du docteur Roux, 75724 Paris, France) (각각 CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986 및 CNCM I-1987)에 1998.3.3일자로 기탁되었다 균주 *S. thermophilus* BF11116 (CNBL1177)는 부다페스트조약하 Belgian Coordinated Collections of Microorganisms LMG P-18997, (K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium)에 1999.7.5 일자로 기탁되었다. 이러한 기탁의 이용성과 관련된 모든 제약은 본 출원 또는 본출원에 대한 우선권의 수혜를 청구하는 다른 출원의 최초의 공표시 철회될 것이다.

도면의 간단한 설명

- 도 1a, 1b 및 1c 는 각각 *S. sobrinus* OMZ 176, *L. lactis* NCC2211 및 *S. thermophilus* NCC 1561에 대한 점착 포화그래프를 나타낸다.
- 도 2 는 결합된 세포의 수 대 CGMP의 증가량을 도표화하여 세 균주로부터 얻은 그래프를 나타낸다 .
- 도 3 은 결합된 세포의 수 대 As-CGMP 의 증가량을 도표화하여 세 균주로부터 얻은 그래프를 나타낸다.

실시예 1: 균주 및 배양조건

100 개이상의 균주(Nestle culture collection에 속함), 특히 하기의 23 개의 균주를 타액피복 히드록시아파타이트 비드에 부착하는 능력에 대하여 스크리닝하였다: *S. thermophilus* YS4 (NCC 2284), *S. thermophilus* Sfi6 (NCC 1971), *S. thermophilus* Sfi13 (NCC 2008), *S. thermophilus* Sfi21 (NCC 2038), *S. thermophilus* Sfi39 (NCC 2130), *S. thermophilus* Sfi42 (NCC 2145), *S. thermophilus* Sfi47 (NCC 2172), *S. thermophilus* S118 (NCC 1529), *S. thermophilus* S119 (NCC 1536), *S. thermophilus* S122 (NCC 1554), *S. thermophilus* S123 (NCC 1561), *S. thermophilus* S126 (NCC 1587), *L. lactis* subsp. *cremoris* 15 (NCC 92), *L. lactis* subsp. *cremoris* 25 (NCC 1932), *L. lactis* subsp. *cremoris* 136 (NCC 2419). *L. lactis* subsp. *diacetylactis* 8 (NCC 1970), *L. lactis* subsp. *diacetylactis* 28 (NCC 2057), *L. lactis* subsp. *diacetylactis* 69 (NCC 2225), *L. lactis* subsp. *diacetylactis* 80 (NCC 2272), *L. lactis* subsp. *lactis* 29 (NCC 2211), *L. lactis* subsp. *lactis* 50 (NCC 2224), *L. lactis* subsp. *lactis* 54 (NCC 2228), *S. macedonicus* 216 (NCC 2484).

5개 구강 균주, *S. sobrinus* OMZ 176, *S. oralis* OMZ 607, *A. naeslundii* OMZ 745, *V. dispar* OMZ 493 및 *F. nucleatum* OMZ 596 를 the Institute fuer Orale Mikrobiologie und Allgemeine Immunologie, University of Zuerich로부터 수득하였고 이것을 37°C에서 무산소생활(GasPackSystem,BBL)로 FUM 배지에서 배양하였다.

모든 균주는 -20°C의 글리세롤에서 저장하고 이들의 특정 최적온도에서 사용전 14시간동안 예비배양하였고; *S. sobrinus* OMZ 176은 FUM 배지 (Gmuer et al.)에서 성장하고 *lactococci* 및 *streptococci*는 M17 (Difco)에서 성장하였다 (단 Belliker (20 g 트립تون, 5 g 이스트 추출물, 2.5 g 젤라틴, 5 g 텍스트로오스, 5 g 수크로오스, 5 g 락토오스, 4 g NaCl, 0.5 g 아스코르브산, 10 g 육추출물을 물 1L에 용해시켜 제조)에서 성장하는 *S. thermophilus* NCC 1529, S 119, S 122, NCC 1 561 및 S 126 제외).

플레이트 카운팅을 위해: *S. sobrinus* OMZ 176를 Mitis-Salivarius agar (Difco)에 배양시키고, *S. thermophilus* NCC1529, S119, S122, NCC1561, BF 11116 및 S126를 Belliker agar (15g의 박토 아가를 액체 Belliker에 첨가하여 제조, Difco)에 배양시키고, 나머지 유산균 균주는 M17 agar (Oxoid)에서 배양시켰다.

실시예 2: 모노클로날항체의 제조

모노클로날 항체는 S-HA 디스크상에서 함께 성장하고 치태를 의태하는 생막을 형성하는 5 개의 구강 균주들중에서 *L. lactis* subsp. *lactis* NCC2211 를 검출하기 위한 도구로서 사용한다. 따라서 모노클로날 항체는 교차반응이 존재하지 않음을 입증하기 위하여 이러한 균주에 대하여 시험하였다.

이를 위해서, 모노클로날 항체는 그라나토 등 (Granato et al, "마우스 모노클로날 IgE 항체 항우 우유 락토글로불린으로 위장에서 알러지의 연구가 가능하다", Clin. Exp. Immunol., 63, 703-710, 1986) 에 의해 기술된 바와 같이 생산하였다.

실시예 3: 점착성 유산균의 선택

타액피복 히드록시아파타이트 비드 (S-HA)에 부착

유산균 유제품 균주들중에서 타액피복 히드록시아파타이트 비드(S-HA)에 부착할 수 있는 균주를 선택하기 위하여, Neeser et al. (1994) 에 의해서 앞서 기술된 절차를 약간 변형하여 사용하였다 : 비드 세척은 150 μl 부피로 실시하고 히아민 히드록시드는 벤제토니늄 히드록시드(Sigma)로 대체하였다.

간략히는, 모든 균주는 FUM 에서 대수 단계의 끝까지 성장시켰다 (단 Belliker 에서 배양한 *S. thermophilus* NCC 1529, S 119, S 122, NCC 1561 및 S 126 은 제외). *S. sobrinus* OMZ 176, *L. lactis* subsp. *lactis* NCC2211, 50 및 54, *S. thermophilus* NCC1529, S119, S122, NCC1561 및 S126 는 37°C에서 육성시키고, 나머지 *lactococci*는 30°C에서, 나머지 *streptococci*는 42°C에서 육성시켰다.

5mg의 히드록시아파타이트 비드 (BDH Chemicals Ltd, Poole, England)를 연구실의 자원자로부터 얻은 70 μl 정제 타액으로 피복하고 앞서 설명한 바와 같이 제조하였다 (Neeser et al., 1994). 타액 피복 비드를 4°C 에서 밤새워 보존시킨후, 세척시키고 (처음에는 증류수로 세척하고 이어서 HEPES 버퍼로 세척)최종적으로 물질대사적으로 표식된 세균 혼탁액 (세균은 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ¹⁴C 아세트산으로 보충된 이들의 배지에 육성시켰다)의 100 μl 로 접종시켰다. 접착이 37°C에서 45 분 동안 일어난후, 비결합 세균은 세척하여 제거하고 부착된 세포는 LKB 섬광 카운터 (type 1219 Rackbeta)로 직접적으로 계수하였다.

점착 퍼센티지는 각각의 웰에 첨가된 총 방사능에 대한 비드에 결합된 방사능으로 나타내었다. 모든 측정은 3 중으로 실시하였다. 표 2 는 여러 스크린된 균주 및 *S. sobrinus* OMZ176 (참조 균주)에 대하여 수득된 타액피복 히드록시아파타이트 비드에 대한 점착의 퍼센티지가 기재되어 있다.

[표 2]

여러 스크리닝된 균주에 대해서 얻어진 타액피복 히드록시아파타이트 비드에 대한 점착의 퍼센티지

| 균주 | %점착 (+/-SD) |
|--|--------------|
| <i>S. sobrinus</i> OMZ 176 | 2.23 +/-0.49 |
| <i>S. thermophilus</i> Sfi42 (NCC 2145) | 0.08 +/-0.02 |
| <i>S. thermophilus</i> Sfi47 (NCC 2172) | 0.14 +/-0.04 |
| <i>S. thermophilus</i> NCC1529 | 2.89 +/-0.60 |
| <i>S. thermophilus</i> S119 (NCC 1536) | 0.15 +/-0.04 |
| <i>S. thermophilus</i> S122 (NCC 1554) | 0.93 +/-0.17 |
| <i>S. thermophilus</i> NCC1561 | 2.19 +/-0.50 |
| <i>S. thermophilus</i> S126 (NCC 1587) | 1.19 +/-0.56 |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> 28 (NCC 2057) | 1.59 +/-0.17 |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> NCC2225 | 1.96 +/-0.40 |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> 80 (NCC 2272) | 1.20 +/-0.35 |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCC2211 | 2.85 +/-0.85 |

4개의 균주, *S. thermophilus* NCC1529 (CNCM I-1984), *S. thermophilus* NCC1561 (CNCM I-1985), *L. lactis* subsp. *lactis* NCC2211 (CNCM I-1986) (이후 *L. lactis* NCC2211로 약칭) 및 *L. lactis* subsp.*diacetylactis* NCC2225 (CNCM I-1987)는 *S. sobrinus* OMZ 176에 가까운 값을 보였다.

L.lactis NCC2211 및 *S. thermophilus* NCC1561을 구강의 온도인 37°C에서 매우 잘 생장하기 때문에 좀더 유망한 후보 균주로 선택한 반면, *L. diacetylactis* NCC2225는 30°C의 최적 성장 온도를 갖는다. 특히, *L. lactis* NCC2211은 수크로 오스상에서는 생장할 수 없으나, 광범위한 당을 발효시킬 수 있으며, 더욱이 다른 구강 균주는 이들의 인버타아제를 통해 글루코오스를 제공할 수 있다.

점착포화그래프

비드포화가 얻어질 수 있는지에 대해 입증하기 위하여, 결합된 CFU 대 웰에 접종된 CFU의 그래프를 구하였다. 50% 포화는 얻어진 그래프의 곡점으로부터 직접적으로 이끌어내었다. *S. sobrinus* OMZ 176, *L. lactis* NCC2211 및 *S. thermophilus* NCC 1561에 대한 점착 포화 그래프를 구하였다. 이것들은 도 1에 나타내었다.

3개의 균주에 대한 50% 비드 포화를 수득하기 위해서 웰내에 접종된 CFU 수 및 결합된 CFU의 대응하는 수를 그래프의 곡점으로부터 직접 유추하여 표 3에 나타내었다.

[표 3]
50% 비드포화를 얻기위한 웰당 접종시킨 CFU의 수

| | cfu/웰 | 결합된 cfu | %점착 |
|---------------------------------|----------|----------|-----|
| <i>S. sobrinus</i> OMZ 176 | 4.00E+07 | 4.00E+06 | 10% |
| <i>L. lactis</i> NCC2211 | 1.00E+07 | 9.00E+05 | 9% |
| <i>S. thermophilus</i> NCC 1561 | 3.00E+07 | 2.00E+06 | 7% |

실시예 4: 카제인노글리코매크로펩티드의 효과

L. lactis NCC2211 및 *S. thermophilus* NCC1561의 점착에 대한 CGMP의 영향을 연구하여 병원성 균주(즉 *S. sobrinus* OMZ 176)에 대한 상기 두 균주중의 하나의 우세를 촉진시키기 위한 이의 이용가능성을 입증하였다. 카제이노-글리코펩티드 (CGMP) 및 이의 탈시알릴화 유도체(As-CGMP)를 Nestec S. A., Lausanne (이들의 제조는 Neeser et al., 1994 참조)로부터 수득하였다.

투여량-반응 효과를 상이한 농도로 CGMP 또는 As-CGMP를 함유하는 $100\mu\text{l}$ 의 세균 혼탁액 (미리 계산된 50% 비드 포화에 해당하는 CFU/ml)을 웰에 접종시킨후 통상적으로 점착분석을 행하여 S-HA에 대한 점착에 대하여 조사하였다. 범위 0.05-3 mg/ml의 농도를 시험하였다. CGMP 또는 As-CGMP의 존재에서 세균의 예비 인큐베이션은 행하지 않았다.

도 2에서, 결합된 세포의 수 대 CGMP의 증가량을 도표화하여 세균주에 대하여 얻어진 그래프가 제공되어 있으며, 접종된 세포의 수는 각 균주에 대하여 앞서 계산된 50% 비드 포화에 해당하는 수이다. *S. sobrinus* OMZ 176의 경우에서 관찰되는 강력한 억제는 Neeser et al. (1994) 및 Schupbach et al. (J. Dent. Res., 75, 1779-1788, 1996)에 의해 수득된 앞선 결과를 확인해주었다.

도 2에서 입증하였듯이, 0.25 mg/ml는 *S. sobrinus* OMZ 176의 점착의 50% 억제를 가져오는 반면, *S. thermophilus* NCC1561로 동일한 효과를 갖기 위해서는 2 mg/ml 이상이 필요하였다. CGMP은 *L. lactis* NCC2211의 점착을 약간 향상시켰다.

CGMP의 경우에서와 같이, 탈시알릴화 유도체는 *S. sobrinus* OMZ 176의 점착을 억제하고; 단지 0.05 mg/ml 만이 점착 퍼센티지에서 50% 감소시키는데 필요하였다. As-CGMP는 *L. lactis* NCC2211 점착에 영향을 미치지 않는 반면, 이것은 *S. thermophilus* NCC1561 중의 하나를 약간 촉진시켰다 (도. 3).

실시예 5: 치약

10⁵ cfu/ml 의 일종 이상의 유산균 균주 CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986, CNCM I-1987 또는 LMG P-18997 를 동결건조형태로 하기를 함유하는 혼합물에 첨가하여 치약을 제조하였다:

세틸 피리디니움 클로라이드 1.65%

소르비톨 (70% 용액) 33.0%

글리세린 25.0%

소듐 카르복시메틸 셀룰로오스 2.0%

소듐 플루오라이드 0.25%

실리카 (RP 93) 26.3%

증점성 실리카(Sident 22) 8.1%

소듐 사카린 0.5%

폴록사미 (Pluronic F108) 3.2%,

이 치약은 충치, 치태 및 치주감염의 예방 또는 치료용이다.

실시예 6: 아이스크림

10.8% 유방, 13.5% 우유고형물 (비지방), 0.3% Emulstab(등록상표) SE30 및 0.3% Emulstab(등록상표) 포옴 (Grindsted, DK)를 함유하는 크림을 제조하고, 이어서 이것을 105°C에서 20 초간 살균하고, 75°C 및 300 bar에서 균질화 시킨후 38°C로 냉각시키고, 일종 이상의 유산균 균주 CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986, CNCM I-1987 또는 LMG P-18997을 10⁷-10⁸ cfu/ml 으로 지수 성장 단계에서 취한 MRS 배지중 예비배양물을 접종시켰다. 이어서 크림을 약 4.5의 pH 까지 38°C에서 10 시간동안 발효시켰다. 발효의 말미에서, 수크로오스 및 글루코오스 시럽을 여기에 첨가하였다. 크림의 조성은 하기 표 4에 나타내었다.

이어서 이 혼합물에 타격을 가해 4°C로 냉각시켜 4°C에서 저장한후 95°C 부피 팽창 정도로 냉각하였다.

[표 4]

| 성분 | 조성(kg) | 지방(%) | 비지방고형물(%) | 수크로오스(%) | 고형물함량(%) |
|------------------------|--------|-------|-----------|----------|----------|
| 크림(35%) | 30.83 | 10.79 | 1.54 | | 12.33 |
| 분말탈지유 | 12.45 | | 11.95 | | 11.95 |
| Emulstab(등록상표) SE30 | 0.41 | | | | 0.37 |
| Emulstab(등록상표) 포옴 | 0.41 | | | | 0.36 |
| 물 | 55.91 | | | | |
| 총:크림베이스 | 100.00 | 10.79 | 13.49 | - | 25.01 |
| 크림베이스 | 74.14 | 8.00 | 10.00 | - | 18.54 |
| 수크로오스 | 22.06 | | | 15.00 | 15.00 |
| 글루코오스시럽 | 3.80 | | | | 3.00 |
| 발효아이스크림 | 100.00 | 8.00 | 10.00 | 15.00 | 36.54 |

실시예 7: 요구르트

5 l MRS 배양 배지를 121°C에서 15 분간 살균한후 대략 10^9 cfu/ml 함유하는 *S.Thermophilus* 균주 CNCM I-1984, CNCM I-1985 또는 LMG P-18997중 일종 이상의 활성 배양물의 5부피%로 접종시켰다. 41°C에서 8 시간동안 인큐베이션시킨후, 4.5. 10^8 cfu/ml 함유하는 스타터를 수득하였다.

0.1% 이스트 추출물이 첨가된 10%의 건조물함량을 갖는 5 l 재구성 탈지유 을 121°C에서 15 분간 살균시키고 대략 10^9 세포/ml 을 함유하는 시판용 중점성 *Streptococcus thermophilus*의 활성 배양물의 2%로 접종시켰다. 41°C에서 4 시간동안 인큐베이션시킨후 4.5×10^8 세포/ml 를 함유하는 스타터가 수득되었다.

2.5% 탈지유 분말로 강화된후 90°C에서 30분간 살균된 3.7% 지방을 함유하는 전유의 1 배치에 균주 CNCM I-1984, CNCM I-1985 또는 LMG P-18997중 하나이상의 2부피% 스타터 및 중점성 *Streptococcus thermophilus*의 스타터 3부피% 를 접종시켰다. 접종된 우유를 교반시키고, 포트에 봇고 41°C에서 4 시간동안 인큐베이션시켰다.

수득된 요구르트는 양호한 탄탄하고 부드러운 조직을 가지며 구강의 건강을 위한 것이다

실시예 8: 추잉검

충치, 치태 또는 치주감염의 예방 또는 치료용 추잉검은 *S.Thermophilus* 균주 CNCM I-1984, CNCM I-1985 또는 LMG P-18997 중 일종 이상의 활성 배양물을 대량적으로 10^4 - 10^9 cfu/g 을 함유하도록 하기의 전형적인 성분들에 첨가하여 제조할 수 있다:

자일리톨 67.5%

검 베이스 20%

탄산칼슘 5%

글리세린 3%

Pluronic F127 2%

셀룰로오스 검 1%

밸라스트 화합물 0.5%

향미료 1%

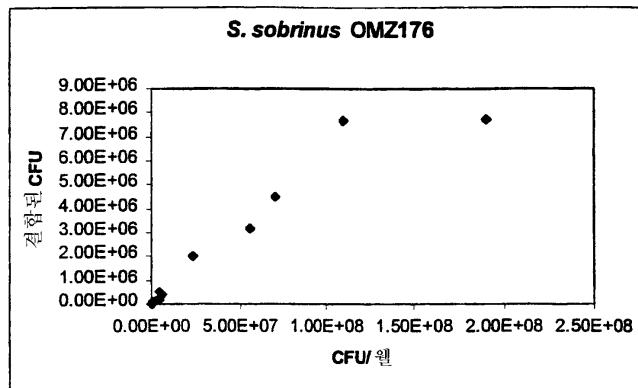
실시예 9: 애완동물사료 조성물

구강 건강용 애완동물 사료는 옥수수, 옥수수 글루텐 치킨 및 어류 밀, 염, 비타민 및 미네랄로 이루어진 사료혼합물을 제조하여 수득하였다. 사료 혼합물은 예비컨디셔너에 공급하여 습윤시켰다. 이어서 예비컨디셔너에서 방출되는 습윤된 사료를 압출기-쿠커로 공급시켜 젤라틴화시켰다. 압출기로부터 방출되는 이 젤라틴화된 매트릭스를 다이스를 통해 압출시켰다. 이 압출물을 개가 먹기에 적당한 조각으로 절단하여 약 110°C에서 약 20분간 건조시킨후 냉각시켜 약 0.6 수활성을 갖는 펠렛으로 형성시켰다.

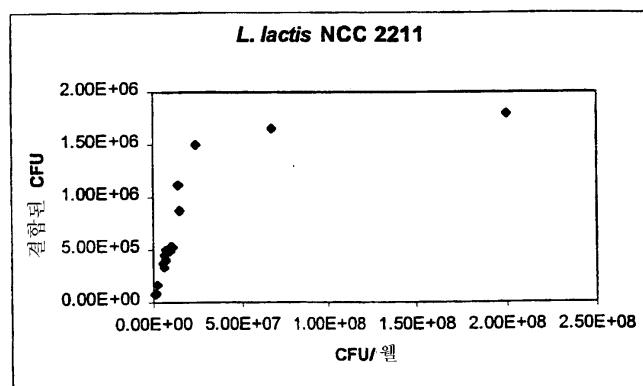
이 펠렛에 3 개의 코팅 혼합물을 분무하였다. 각 코팅 혼합물은 일종 이상의 *S. Thermophilus* 균주 CNCM I-1984, CNCM I-1985 또는 LMG P-18997 의 활성 배양물을 함유하나 하나의 코팅 혼합물은 코팅 기재로서 수소화 대두지방을 이용하고, 다른 하나의 코팅 혼합물은 코팅 기재로서 물을 사용하며 마지막 하나의 코팅 혼합물은 코팅 기재로서 단백질 다이제스트를 사용하였다. 이 펠렛은 대략 10^4 내지 10^9 cfu/g 의 상기 균주를 함유하였다.

도면

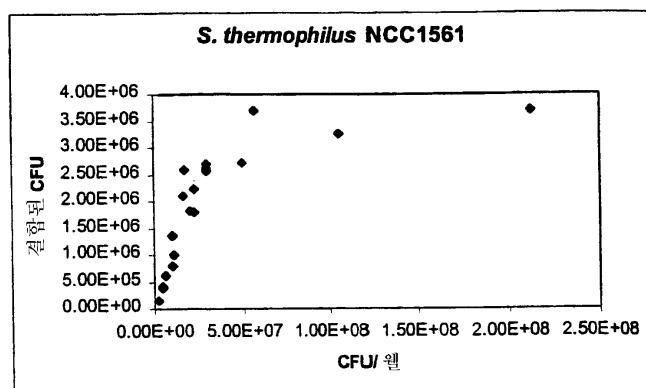
도면1a



도면1b

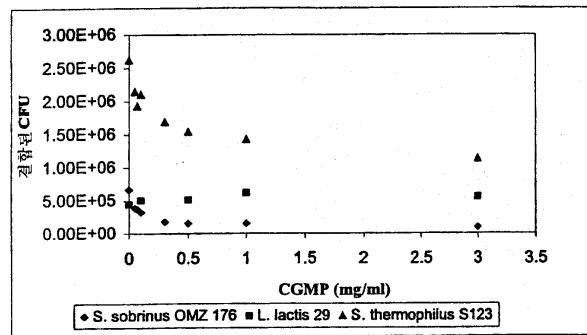


도면1c



도면2

S.sobrinus OMZ 176, L.lactis 29(NCC2211) 및 S.thermophilus S 123(NCC1561) 의 S-HA 비드 접착에 대한 CGMP 의 영향



도면3

S.sobrinus OMZ 176, L.lactis 29(NCC2211) 및 S.thermophilus S 123(NCC1561) 의 S-HA 비드 접착에 대한 As-CGMP 의 영향

