



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년05월10일
(11) 등록번호 10-1143734
(24) 등록일자 2012년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/03 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7025744
(22) 출원일자(국제) 2005년05월30일
심사청구일자 2009년12월04일
(85) 번역문제출일자 2006년12월07일
(65) 공개번호 10-2007-0030819
(43) 공개일자 2007년03월16일
(86) 국제출원번호 PCT/SE2005/000805
(87) 국제공개번호 WO 2005/121312
국제공개일자 2005년12월22일
(30) 우선권주장
10/869,185 2004년06월14일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
JP2003299480 A

전체 청구항 수 : 총 18 항

(73) 특허권자
바이오가이아 에이비
스웨덴, 에스이-103 64 스톡홀름, 우편사서함 3242
(72) 발명자
콘놀리, 에이몬
스웨덴, 리딩고 에스-181 30, 모션스바겐 3
물리스탐, 보
스웨덴, 레룸 에스-443 31, 세테르폴리츠바겐 12
(74) 대리인
강명구

심사관 : 이규안

(54) 발명의 명칭 치아우식증 및 치아우식증을 유발하는 박테리아를 감소시키기 위한 유산균의 선별과 용도

(57) 요약

본 발명은 구강 점액소(oral mucin)와 치태(dental plaque)에 대한 우수한 결합 능력과 함께 저해 활성을 통하여 포유동물의 구강에서 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)의 충수를 감소시키고, 따라서 치아우식증을 예방, 감소 또는 치료하는 능력에서 선별된 락토바실러스(*Lactobacillus*)의 새로운 균주 및 인간 투여용으로 우식증의 예방 또는 치료를 위한 약품을 비롯한, 상기 균주로부터 유래된 산물에 관계한다.

특허청구의 범위

청구항 1

락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 균주 ATCC PTA-5289의 생물학적으로 순수한 배양액.

청구항 2

락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 균주 ATCC PTA-5290의 생물학적으로 순수한 배양액.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 균주 ATCC PTA-5289 또는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 균주 ATCC PTA-5290에서 선택된 적어도 하나의 균주를 포함하는, 치아우식증 박테리아의 성장을 억제시키는 제품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 식품인 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 7

제 6항에 있어서, 식품은 요구르트, 젤리, 푸딩, 츄잉 껌, 마름모꼴 정제, 캔디, 초콜릿, 비스킷, 쿠키, 치즈, 주스, 차에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 8

제 6항에 있어서, 식품은 우유-함유 제품인 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 9

제 8항에 있어서, 식품은 요구르트인 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 10

제 5항에 있어서, 치아 치료 제품인 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 11

제 10항에 있어서, 구강청정제인 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 12

삭제

청구항 13

항-우식성 제품을 생산하는 방법에 있어서, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 균주 ATCC PTA-5289 또는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 균주 ATCC PTA-5290에서 선택된 적어도 하나의 균주의 세포를 제품에 첨가하는 것을 포함하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 제품은 식품인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 식품은 요구르트, 젤리, 푸딩, 츄잉 껌, 캔디, 마름모꼴 정제, 초콜릿, 비스킷, 쿠키, 치즈, 주스, 차에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서, 식품은 우유-함유 제품인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 식품은 요구르트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 13항에 있어서, 치아 치료 제품인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 치아 치료 제품은 구강청정제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 13항에 있어서, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 세포가 제품에 피포(encapsulation)되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 세포가 제품에서 수소처리된 야자 기름에 피포(encapsulation)되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 2003년 1월 29일자로 제출된 미국 특허 출원 제 10/353,407호의 일부 계속 출원이다.

[0002] 본 발명은 비-병원성 항-우식성 유산균 균주의 용도 및 구강 박테리아, 예를 들면, 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)와 다른 우식증-유발 병원균에 의해 유발되는 치아우식증(dental caries)의 치료와 예방에서 이들 균주, 이의 변이체, 대사물질 또는 구성요소를 이용한 산물과 방법에 관계한다.

배경기술

[0003] 인간 및 다른 포유동물의 구강에는 다수의 상이한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 종들을 비롯하여 다양한 종류의 박테리아가 존재한다. 1890년에, Miller는 "Chemico-Parasitic Theory"에서 우식증이 치아의 하이드록시헵타이드(hydroxyhepatite)를 분해시키는 소화 탄수화물로부터 산을 생성하는 구강 박테리아에 의해 유발된다는 가설을 제시하였다. 이후, 일차적으로, 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 군과 이차적으로, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 군중에서 통상적인 구강 박테리아 군총이 우식증 발생에 관여한다는 것이 노토바이오틱(gnotobiotic) 쥐에서 입증되었다. 구강에 존재하는 이들 "산생성(acidogenic)" 종들이 치아우식증의 존재와 발생에 연관한다(Locsche WJ, Microbiolog Rev., 1986:50:353-380). 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 군에는 7가지 박테리아 종이 존재하는데, 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)(혈청형 c,e,f)가 전체 인간 분리물의 90%에서 발견된다(Linder L., Oral Mikrobiologi 1996, ISBN 91-7205-037-3). 우식증의 개시는 치태(dental plaque) 내에서 상대적으로 높은 비율의 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)를 요구하는 것으로 확인되고 있다. 이들 박테리아는 치아 표면에 잘 부착되고, 다른 박테리아 유형보다 많은 양의 산을 당으로부터 생산하며, 산성 환경에서 다른 박테리아보다 더욱 효과적으로 생존하고, 자당으로부터 세포외 다당류를 생산한다. 치태에서 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 비율이 높으면(2-10% 범위), 환자는 우식증의 위험이 높다. 이런 비율이 낮으면(0.1% 미만), 환자는 우식증의 위험이 낮다. 이들이 다른 박테리아보다 높은 내산성을 보유하기 때문에, 치태 내에서 산성 조건은 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)의 생존과

재생에 유리하다.

- [0004] 다른 2가지 유형의 박테리아 역시 상아질(dentin)을 통한 우식증의 진행과 연관한다. 이들은 여러 종의 락토바실러스(*Lactobacillus*) 및 액티노마이세스 비스코서스(*Actinomyces viscosus*)이다. 이들 박테리아 역시 고도 산 생산성이고, 산성 조건에서 잘 생존한다. 치아우식증에 락토바실러스(*Lactobacillus*)의 관련이 확립되었다(Smith et al., Microbios 105: 77-85, 2001). 실제, 상이한 선별 배지 또는 다른 기술을 이용한, 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 총수의 추정에 더하여 타액에서 락토바실러스(*Lactobacillus*) 총수의 추정 은 우식증의 위험이 높은 군을 확인하는 “우식증 검사법”으로서 수년간 이용되고 있다. 따라서, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주는 고도 우식성인데, 이들 중에서 일부가 인간 치태로부터 분리되었다(Fitzgerald et al., J. Dent. Res. 60: 919-926, 1981).
- [0005] 박테리아가 치아우식증의 형성에서 일차 병원균이 되기 위해서는 여러 필요 특성의 조합이 요구된다(tinder, 1996): 치아 표면에 부착되고 이식하는 능력; 치아의 제한된 표면에 다수 축적되는 능력; 음식물에서 발견되는 탄수화물로부터 산을 신속하게 생산하는 능력; 치태에서 낮은 pH 하에서도 산 생산을 지속하는 능력.
- [0006] 식이 수크로오스는 치태의 두께와 화학적 성질 모두를 변화시킨다. 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)와 일부 다른 치태 박테리아는 단당류 성분(글루코오스와 프럭토오스) 및 세포외 다당류를 조합하는 수크로오스의 이당류 결합의 에너지를 이용한다. 이들은 치태의 두께를 실질적으로 증가시키고, 이의 세포외 공간의 화학적 성질을 액체로부터 겔로 변화시킨다. 겔은 일부 이온의 이동을 제한한다. 두꺼운 겔-치태는 타액 완충으로부터 보호되는, 치아 표면에서 산성 환경의 발생을 가능하게 한다. 수크로오스와 접촉하지 않는 치태는 훨씬 얇고 완충제에 의해 훨씬 효과적으로 제거된다. 이런 이유로, 수크로오스의 비율이 높은 음식물은 우식증 위험을 증가시킨다. 더욱 두꺼운 치태는 구멍과 갈라진 틈 및 구강 위생이 불량한 환자의 잇몸모서리(gingival margin) 주변에서 발생한다.
- [0007] 상기 질환의 이런 특성을 고려하면, 치아우식증의 예방과 치료는 예로써 박테리아에 대한 기질을 감소시키는 수단으로서 식이 변화를 통하여 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 효과를 방해함으로써 치아 표면 구조의 보강 또는 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*) 박테리아 총수의 감소를 요한다. 따라서, 현재까지 시도된 치료법은 아래와 같다: 국소 클로르헥시딘(topical chlorhexidine)과 국소 플루오르화물(topical fluoride)과 같은 약품을 이용하여 미세균총(microflora)을 변화시키는 노력; 식이 변화 및 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)에 의해 잘 대사되지 않는 감미료, 예를 들면, 솔비톨, 아스파르탄, 자일리톨로의 대체에 의한 식이 수크로오스의 양적 감소; 식이 선택에 의한 식사 빈도의 감소; 특히 양치질동안 매일 적용을 통한 플루오르화물 첨가; 활발한 저작(chewing)동안 유동을 강화시키는 물리적 자극을 이용하거나, 유동을 감소시키는 약물을 변경하거나, 또는 유동을 강화시키는 약물을 사용함으로써 타액 유동의 증가.
- [0008] 여러 다양한 방식으로 치아우식증을 예방하는 효과를 평가하였다, 가령, 한 조성물은 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)에 특이적인 박테리오파지에 의해 생산된 세포용해 효소를 이용한다(U.S. Patent No. 6,399,098, Fischetti et al.). 또한, 유전자조작으로 락토바실러스 지에(*Lactobacillus zae*) 균주를 변형하여 유해성 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 박테리아를 중화시키는 항체를 상기 균주의 표면에서 생산하였다(Hammarstrom L., July 2002 issue of Nature Biotechnology); 하지만, 유전자 조작된 미생물을 이용하는 이런 방식은 안정성 승인 문제에 직면하고 있다.
- [0009] 이에 더하여, 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*)의 한 균주(ATCC 53013, 균주 GG)는 스트렙토코커스 사브리누스(*Streptococcus sabrinus*)와 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)를 전반적으로 감소시키는 생균 방법으로 장려되었다(Nase et al., Caries Res. 35: 412-420, 2001). 다른 연구에서는 발효유에서 발효용 배양균으로서 상기 균주의 활용이 우유에 존재하는 인간 우식성 박테리아에 대한 항체의 역가에 영향을 주지 않는다는 것을 입증하였다(Wei et al., Oral Microbio. & Immunol. 17: 9-15, 2002). 락토바실러스 람노수스(*L. rhamnosus*) GG는 발효 특성과 분리 출처를 비롯한 여러 방식에서 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)와 구별된다. 치태의 형성에 저해 활성을 보이는 것으로 밝혀진 다른 미생물은 내성세균(*Enterococcus*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*) V20, 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*) 1370(Oh, U.S. Patent No. 6,036,952) 등이다. 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)를 저해하기 위하여, 소위 “경쟁 배제(competitive exclusion)”를 이용한 다른 연구가 수행되었다. 가령, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 균주 ATCC 55730은 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)를 저해하는 것으로 밝혀졌다(Nikawa H. et al, News release by Hiroshima University July 11, 2002). 일본에서 LS1로 시판되고 있는 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*)(LS1) 균주를 함유하는 정제 산물(Prente Ltd. Japan)은 스트렙토코커스 뮤탄

스(*S. mutans*)를 저해하는 것으로 주장되고 있다.

- [0010] 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)를 비롯한 다양한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 종의 균주가 생균 제제에 이용되고 있다. 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)는 동물의 위장관에서 자연 발생 거주자의 하나이며, 소장에서 주로 발견되고 인간을 비롯한 건강한 동물의 출산 채널, 모유, 입에서도 종종 발견된다. 이는 항생 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(참조: U.S. Patent No. 5,439,678, 5,458,875, 5,534,253, 5,837,238, 5,849,289). 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 세포가 글리세롤의 존재에서 혐기성 조건하에 성장되는 경우에, 이들은 루테린(reuterin)(β -하이드록시-프로피온알데하이드)으로 알려진 항균 물질을 생산한다.
- [0011] 전통적인 유기산 이외에 다른 항균 물질, 예를 들면, “루테리사이클린(reutericyclin)” (Holtzel, A. et al. Angewandte Chemie International Edition 39, 2766 - 2768, 2000), “PCA(피로글루탐산)” (Yang, Z. Dissertation, Univ. of Helsinki, March 2000), “루테리신(reuterin) 6” (Toba T, et al., Lett Appl Microbiol 13: 281-6) 역시 보고되었다. 또한, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)를 비롯한 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 영양분의 국소 경쟁(local competition) 및 다른 대사 상호작용(metabolic interaction)을 통하여 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)와 같은 다른 미생물을 저해하는 능력을 보유하는 것으로 알려져 있다.
- [0012] 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)의 점액소 결합 단백질(mucin binding protein)이 분리되고 기술되었다(참조: U.S. Patent No. 6,100,388). 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주는 다양한 세포주와 숙주 점액에 부착되는 것으로 보고되었다. 이는 생균 활성에 중요한 것으로 추정되며, 병원성 박테리아에서 독력 인자(virulence factor)의 개념으로부터 유래되는데, 지난 수십년동안 이런 상호작용의 다양한 정렬이 발견되었다(Klemm, P. and Schembri, M. A.(2000) Bacterial adhesins: function and structure. Int. J. Med. Microbiol. 290, 27-35). 하지만, 구강 점액소(oral mucin) 및 다른 기원의 점액소에 부착되는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주 능력 사이에 중요한 차이가 존재한다는 사실은 별로 알려지지 않고 있는데, 일부 균주는 구강 점액소와 다른 점액소, 예를 들면, 위 점액소 모두에 효과적으로 부착되고, 다른 균주는 위 점액소에 효과적으로 부착되지만 구강 점액소에는 덜 효과적으로 부착되고, 또 다른 균주는 어떤 종류의 점액소에도 효과적으로 부착되지 않는다. 이런 이유로, 본 발명의 선별 방법의 일부로서, 최적 균주를 찾기 위하여 구강 점액소가 이용된다.
- [0013] 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)에 의한 효과적인 항균 활성과 일부 결합 특성의 가능성이 알려져 있고, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 균주 ATCC 55730과 락토바실러스(*Lactobacillus*) GO ATCC 53103의 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*) 저해 효과 역시 알려져 있고, 일부 다른 유산균이 항-우식성인 것으로 주장되고 있긴 하지만, 구강에서 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 총수 및 결과적으로 우식증을 감소시키는 능력에서 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주 사이에 실질적인 차이가 존재하는지의 여부 및 이들 균주가 선별될 수 있는지의 여부는 아직 확인되지 않았다.
- [0014] 이런 이유로, 본 발명의 목적은 구강 점액소에 대한 우수한 부착 능력과 함께 항균 활성을 통하여 구강에서 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 총수를 감소시키고, 결과적으로 치아우식증을 예방, 감소 또는 치료하는 능력에서 선별된 더욱 우수한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주를 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 인간 투여용으로 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)와 연관된 우식증의 예방 또는 치료를 위한 약품을 비롯하여, 상기 균주, 이의 변이체, 대사물질 또는 구성요소를 함유하는 산물을 제공하는 것이다.
- [0015] 다른 목적과 이점은 아래의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위에 의해 더욱 명백하다.
- [0016] **본 발명의 요약**
- [0017] 본 발명은 구강 점액소와 치태에 대한 우수한 결합 능력과 함께 저해 활성을 통하여 포유동물의 구강에서 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)의 총수를 감소시키고, 따라서 치아우식증을 예방, 감소 또는 치료하는 능력에서 선별된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주, 이의 변이체, 대사물질 또는 구성요소 및 인간 투여용으로 우식증의 예방 또는 치료를 위한 약품을 비롯한, 상기 균주로부터 유래된 산물에 관계한다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적과 이점은 아래의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위에 의해 더욱 명백하다.
- 발명의 상세한 설명**
- [0019] 본 발명은 구강 점액소에 대한 특징적인 우수한 결합 능력과 함께 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)에 대한 우수한 항균 활성으로 치아우식증을 예방, 감소 또는 치료하는 적어도 한가지의 선별된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주의 세포, 대사물질 또는 구성요소를 함유하는 치아우식증 박테리아의 성장과 활성을

저해하는 산물을 제시한다. 이들 균주는 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) CE2-7F(ATCC PTA 4965), 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) MF2-3(ATCC PTA-4964), 특히 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) FJ1 "Prodentis"(ATCC PTA-5289)와 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) FJ3(ATCC PTA-5290)이다. 이들 균주는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)에서 공개적으로 입수가 가능하며, 2개의 후자 균주는 2003년 7월 29일자로 여기에 수탁되었다.

[0020] 본 발명에 이용된 선별 방법에서, 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)의 저해 효과는 생존 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 세포의 전체 세포 체적(total cell volume)과 상관하는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)의 ATP(아데노신 삼인산염) 수준을 결정하는 방법으로 측정된, 성장된 검사 균주의 상층액에서 분비된 대사물질과 구성요소에 의한 저해를 개별적으로 분석하는 전통적인 미생물학적 방법으로, 이들 박테리아 세포를 이용하여 검사된다. 부착 능력은 마이크로역가 웰에 코팅된 구강 점액을 이용하여 측정된다(ref. Jonsson et al. 2001 FEMS Microbiol.lett. 204: 19-22). 분비된 대사물질과 세포 구성요소로 저해와 부착을 검사하는 이유는 선별 기준을 충족하는 비-생존 세포 또는 죽은 세포의 일부도 본 발명에 이용될 수 있기 때문이다.

[0021] 이의 상세는 실시예로부터 더욱 명확하게 이해될 것이다.

[0022] 본 발명의 산물은 치아우식증에 대한 예방제 또는 치료제로서 구강에 배치되는 임의의 산물, 또는 영양적 또는 호흡 목적의 산물, 예를 들면, 식품 제품, 치아 치료 제품(가령, 구강청정제) 또는 다른 특정한 건강 제품, 휴잉 검, 마름모꼴 정제 등일 수 있다. 본 발명에 사용하기 특히 적합한 식품 제품은 요구르트와 같은 우유-함유 제품 및 주스, 드링크 등이다. 본 발명에 사용되는 치아 치료 제품은 치약, 액체 치아 세척제, 구강청정제, 항-구취 제품 등이다.

[0023] 본 발명에 따른 산물의 효능을 위하여 요구되는, 선별된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 세포, 또는 이의 대사물질이나 구성요소의 농도는 식품 유형 및 섭취되는 식품의 양(또는 구강에서 비-식품 치아 치료 제품의 사용 시간)에 좌우되긴 하지만, 바람직하게는 산물의 일일 섭취량(daily intake)당 대략 10^5 - 10^8 CFU(콜로니-형성 단위) 이상이다. 최대 10^{10} - 10^{11} CFU가 가능하며, 산물의 관능(organoleptic) 특성(풍미 또는 향기)에 부정적인 영향을 주지 않으면서 효능을 증가시키는데 이용될 수 있다. 산물이 요구르트 또는 다른 유산 발효 제품이면, 상기 산물을 생산하는데 이용되는 유산 제조 균주는 가급적, 이런 특정 목적에 적합한 표준 배양액인데, 본 발명의 항-우식성 박테리아, 또는 이의 대사물질이나 구성요소는 상기한 바와 같이 요구르트의 일일 제공량(daily serving)당 대략 10^6 - 10^8 CFU 이상의 수준으로 산물의 발효 전후에 첨가될 수 있다.

[0024] 적절하게는, 본 발명의 산물은 선별된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주, 또는 이의 대사물질이나 구성요소를 저해 또는 사멸시키거나, 또는 이의 항-우식성 활성을 간접하는 다른 항생 성분을 전혀 함유하지 않는다.

[0025] 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주, 또는 이의 대사물질이나 구성요소는 이런 유형의 산물의 제조를 위한 당분 야에 공지된 수단으로 원료에 혼합되거나, 또는 상기 산물에 혼합되거나 피복되는 첨가제일 수 있다. 세포가 이용되고, 본 발명의 선별된 식품이나 다른 산물의 제조에 가열 단계가 필요한 경우에, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주는 가열이후에 첨가되어야 한다. 선별된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 세포가 산물 내에 존재하면, 상기 산물은 장기간동안 60-70°C 이상으로 가열하지 않는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 특징은 아래의 실시예를 참조하면 더욱 분명하게 이해되지만, 이들 실시예는 본 발명을 한정하지 않는다.

실시예

[0027] 실시예 1. 균주의 선별 방법

[0028] 본 발명에 이용되는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주의 선별은 아래의 3 단계 방식으로 수행될 수 있다:

[0029] a) 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주 세포에 의한 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 저해 효과의 평가

[0030] 저해 효과를 측정하는데 이용되는 균주의 한가지 실례는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) ATCC 25175(the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA로부터 입수가 가능)이다. 상기 분리물은 0.5 % 효모 추출액(Disco)으로 보충된 트립티케이스 소이 액체배지(trypticase soy broth)(TSBY)(Disco, Detroit, USA)에서 성장시킨다. 이들 세포는 기하급수적 성장기동안 1000 x g에서 원심분리로 수확하고, PBS로 2회 세척

하며, 동일 완충액에 재부유시킨다. 세포 현탁액은 저-밀도 초음파 장치에 가하여 박테리아 집합체를 분산시킨다.

[0031] 검사 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주는 MRS 액체배지(Disco)에서 성장시키고, 기하급수적 성장기동안 1000 x g에서 원심분리로 수확하며, 인산염 완충액(PBS; pH 6.8)으로 2회 세척하고, 동일 완충액에 재-부유시킨다.

[0032] 박테리아 현탁액의 광학 밀도(optical density)는 1 cm 광로(light path)를 갖는 1.0 ml 큐벳(cuvette)에서 측정하고, 현탁액은 1.0×10^8 CFU(콜로니 형성 단위)/ml의 최종 농도로 조정한다.

[0033] 저해 측정은 아래와 같이 수행된다: 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 현탁액 및 락토바실러스(*Lactobacillus*)의 현탁액은 무균 원심분리 튜브(전체 부피 100 μ l)에서 100-0, 75-25, 50-50, 25-75의 비율로 혼합하고, 최대 10 ml까지 BHI 액체배지를 첨가하며, 10초간 와동 혼합하고, 부드럽게 교반하면서 37°C에서 90 분간 배양한다. 대조로서, 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*) 현탁액은 대조 튜브(락토바실러스(*Lactobacillus*) 없음)에서 동등 부피의 PBS와 혼합한다. 이후, 각 현탁액은 1000 x g에서 원심분리로 세척하고, PBS로 2회 세척하며, MS 아가에 도말하여 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 CFU 계수를 측정한다. 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 생존 %는 아래의 공식으로 구한다.

[0034] 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 생존 % =

[0035] [락토바실러스(*Lactobacillus*)와 함께 배양된 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 CFU]/[PBS와 함께 배양된 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 CFU] x 100

[0036] 상기 측정은 최소한 삼중 샘플로 수행된다. 모든 획득된 수치 데이터는 통계학적으로 분석한다.

[0037] b) 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주의 대사물질이나 구성요소에 의한 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 저해 효과의 평가

[0038] 저해 효과를 측정하는데 이용되는 균주의 한가지 실례는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) ATCC 25175(the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA로부터 입수가가능)이다. 상기 분리물은 0.5 % 효모 추출액(Disco)으로 보충된 트립티케이스 소이 액체배지(trypticase soy broth)(TSBY)(Disco, Detroit, USA)에서 성장시킨다. 이들 세포는 기하급수적 성장기동안 1000 x g에서 원심분리로 수확하고, PBS로 2회 세척하며, 동일 완충액에 재부유시킨다. 세포 현탁액은 저-밀도 초음파 장치에 가하여 박테리아 집합체를 분산시키고, 10^8 CFU/ml의 최종 농도로 조정한다.

[0039] 검사 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주는 MRS 액체배지(Disco)에서 성장시키고, 기하급수적 성장기동안 1000 x g에서 원심분리로 수확하며, 인산염 완충액(PBS; pH 6.8)으로 2회 세척하고, 동일 완충액에 재-부유시킨다.

[0040] 박테리아 현탁액의 광학 밀도(optical density)는 1 cm 광로(light path)를 갖는 1.0 ml 큐벳(cuvette)에서 측정하고, 현탁액은 1.0×10^8 CFU/ml의 최종 농도로 조정한다. 100 μ l의 락토바실러스(*Lactobacillus*) 현탁액은 2.0 ml MRS 액체배지에 첨가하고, 왕복 교반(reciprocal shaking)(120 rpm)하면서 37°C에서 48시간동안 배양한다. 배양이후, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 세포는 원심분리로 제거하고, 생성된 상층액은 여과한다(구멍 크기 0.25 μ m).

[0041] 저해 측정은 아래와 같이 수행된다: 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 100 μ l 현탁액은 1.0 ml TSBY에 첨가하고, 락토바실러스(*Lactobacillus*)의 각 검사된 균주의 상층액은 혼합하고 왕복 교반(reciprocal shaking)(120 rpm)하면서 37°C에서 24시간동안 배양한다. 대조로서, 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*) 현탁액은 대조 튜브(락토바실러스(*Lactobacillus*)로부터 상층액이 존재하지 않음)에서 동등 부피의 MRS와 혼합한다. 이후, 각 현탁액은 1000 x g에서 원심분리로 세척하고 PBS로 2회 세척하며, 성장된 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 아테노신 삼인산염의 양은 Nikawa, H. et al. Journal of Dentistry, Vol 26, No 1, pp. 31-37, 1998에 기술된 방법을 이용하여 측정한다.

[0042] c) 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주의 구강 점액소에 대한 부착 능력의 평가

[0043] 검사되는 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 수집한다. 이들 박테리아는 37°C에서, MRS 액체배지(Difco)에서 16시

간동안 성장시킨다. 평판은 CO₂+N₂ 대기하에 혐기성 병(GasPak System, BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)에서 배양한다.

[0044] 인간 타액과 같은 구강 점액은 앞서 기술된 바와 같이, 수집하고 원심분리하며 멸균 여과하고 마이크로역가 웰에 코팅한다. 이들 점액은 200 ml의 차가운 인산염 완충액(PBS)(1000 ml의 dH₂O당 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0.2 g KH₂PO₄)에 수집하고 0.05% Tween 20으로 보충한다(PBST). 생성된 현탁액은 먼저, 11000g에서 10분간, 이후 26000g에서 15분간 원심분리하여 세포와 미립자를 제거한다. 대안으로, 위 점액소(Sigma, M1778)가 이용된다. 가공되지 않은 점액소 제조물은 20℃에서 보관한다. 점액소 물질은 50 mM Na₂CO₃ 완충액, pH 9.7에서 대략 100 µg ml⁻¹로 희석하고, 천천히 회전시키면서 4℃에서 마이크로역가 웰(Greiner)(웰당 150 µl)에서 하룻밤동안 배양한다. 이들 웰은 1% Tween 20을 포함하는 PBS로 1시간동안 차단하고, 이후 PBST로 세척한다. BSA로 코팅된 웰은 대조로서 이용된다.

[0045] 검사되는 균주는 상기한 바와 같이 성장시키고 0.05% Tween 20로 보충된 인산염-완충액(PBS)(pH 7.3)(PBST)에서 1회 세척하며 동일한 완충액에서 OD₆₀₀ 0.5로 희석한다. 100 µl 박테리아 현탁액은 각 웰에 첨가하고 4℃에서 하룻밤동안 배양한다. 이들 웰은 PBST로 4회 세척하고, 결합은 역상 현미경(inverted microscope)으로 검사한다. 완충액은 따라 버리고, 결합은 웰이 건조된 이후, BioRad Gel Doc 2000 장치(BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 웰의 전체 표면에서 측정한다. 모든 측정은 삼중으로 수행된다.

[0046] 이러한 측정법에 따라, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 세포를 이용한 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 저해와 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*)의 대사물질과 구성요소를 이용한 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 저해에서 최적의 결과를 보이고, 또한 경구 점액소에 대한 부착에서 최적의 결과를 보이는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주가 선별된다.

[0047] 실시예 2. 균주의 선별

- [0048] 1. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) SD2112(ATCC 55730)
- [0049] 2. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 20016(DSM 20016)
- [0050] 3. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) MM2-3(ATCC PTA-4659)
- [0051] 4. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) CF2-7F(ATCC PTA-4965)
- [0052] 5. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) MF2-3(ATCC PTA-4964)
- [0053] 6. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) MP14-C(Culture collection of Biogaia AB, Raleigh NC, USA)
- [0054] 7. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) MF52-1F(Culture collection of Biogaia AB, Raleigh NC, USA)
- [0055] 8. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) MM7(Culture collection of Biogaia AB, Raleigh NC, USA)
- [0056] 9. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) FJ1, "Prodentis"(ATCC PTA-5289)
- [0057] 10. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) FJ3(ATCC PTA-5290)
- [0058] 11. 락토바실러스 살리바리우스(*L. salivarius*) LS1(Frente Ltd.(Japan)에 의해 LS1 정제로부터 분리됨)
- [0059] 12. 락토바실러스 람노수스(*L. rhamnosus*) GG(ATCC 53103)

[0060] 본 연구에서, 상기 기재된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주는 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 저해와 구강 점액소에 대한 부착의 선별 기준을 이용한 평가에 의해 선택되고, 실시예 1에 제시된 방법이 이용된다. 이러한 측정법에 따라, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 세포를 이용한 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 저해와 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*)의 대사물질과 구성요소를 이용한 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*)의 저해에서 최적의 결과를 보이고, 또한 경구 점액소에 대한 부착에서 최적의 결과를 보이는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주가 선별된다. 저해의 결과는 표 1에 도시되고, 부착의 결과는 표 2에 도시된다.

표 1

[0061] 상기 측정법에 따른, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주 세포 및 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*)의 상층액으

로 스트렙토코커스 뮈탄스(*S. mutans*)의 저해(S = 선별됨)

균주	CFU/g 생존 <i>S. mutans</i> 비율 10:1	CFU/g 생존 <i>S. mutans</i> 비율 3:1	CFU/g 생존 <i>S. mutans</i> 비율 1:1	pmol/ℓ 상층액 측정예 서 <i>S. mutans</i> 의 ATP 양	다음 단계로 선별
<i>L. reuteri</i> SD2112	2.0E+08	8.0E+07	6.0E+07	94644.9	-
<i>L. reuteri</i> DSM 20016	1.0E+08	2.0E+07	7.0E+06	479.1	S
<i>L. reuteri</i> MM2-3	1.0E+08	7.0E+07	5.0E+07	35125.3	-
<i>L. reuteri</i> CF2-7F	1.0E+08	1.0E+07	7.0E+05	438.6	S
<i>L. reuteri</i> MF2-3	2.0E+08	2.0E+07	4.0E+06	33158.8	S
<i>L. reuteri</i> MF14-C	9.0E+07	8.0E+07	7.0E+07	29644.3	-
<i>L. reuteri</i> MF52-1F	1.0E+08	8.0E+07	7.0E+07	3120.7	-
<i>L. reuteri</i> MM7	2.0E+08	8.0E+07	7.0E+07	100110.0	-
<i>L. reuteri</i> FJ1	1.0E+08	4.0E+06	7.0E+04	3374.3	S
<i>L. reuteri</i> FJ3	1.0E+08	1.0E+07	4.0E+05	11364.1	S
<i>L. salivarius</i> LS1	1.0E+08	8.0E+08	7.0E+09	502.8	-
<i>L. rhamnosus</i> GG	2.0E+08	8.0E+07	7.0E+07	16113.2	-

표 2

[0062] 상기 측정법에 따른, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주의 부착(S = 선별됨)(FS = 최종 선별됨)

균주	ODXmm ² 위 접액소	ODXmm ² 구강 접액소	선별 단계	선별 이전 단계	최종 선별
<i>L. reuteri</i> SD2112	0.39	0.78	-	-	-
<i>L. reuteri</i> DSM 20016	9.42	7.85	S	S	FS
<i>L. reuteri</i> MM2-3	11.6	3.55	S	-	-
<i>L. reuteri</i> CF2-7F	11.73	5.77	S	S	FS
<i>L. reuteri</i> MF2-3	6.04	2.82	S	S	FS
<i>L. reuteri</i> MF14-C	0.2	0.17	-	-	-
<i>L. reuteri</i> MF52-1F	0.94	1.45	-	-	-
<i>L. reuteri</i> MM7	0.39	2.14	-	-	-
<i>L. reuteri</i> FJ1	7.51	2.77	S	S	FS
<i>L. reuteri</i> FJ3	7.11	5.9	S	S	FS

<i>L. salivarius</i> LS1	0.19	1.15	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> GG	0.5	0.33	-	-	-

[0063] 실시예 3. 선별된 균주를 함유하는 산물의 제조

[0064] 본 실시예에서, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) FJ1 "Prodentis"(ATCC PTA-5289)는 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*) 저해와 점액소 결합에 대한 상기한 방법을 이용한, 실시예 2에서 앞서 언급된 선별에서 전체적으로 긍정적인 결과의 우수한 성장 특징에 기초하여 선별되고, 츄잉 검에 첨가된다. 상기 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 균주는 당업계에서 락토바실러스(*Lactobacillus*)를 성장시키기 위한 표준 방법을 이용하여, 성장되고 냉동 건조된다.

[0065] 선별된 균주를 함유하는 츄잉 검의 제조 공정의 한가지 실례는 아래의 단계를 포함하는데, 부형제, 충전제, 향료, 인캡슐레이터(encapsulator), 윤활제, 고화방지제(anticaking agent), 감미료 및 당분야에 공지된, 츄잉 검 산물의 다른 성분이 상기 산물의 효능에 영향을 주지 않으면서 이용될 수 있다:

[0066] 1. 용융(melting). Softisan 154(SASOL GMBH, Bad Homburg, Germany)를 용기에서 용융시키고 이를 70℃로 가열하여 결정성 구조를 완전히 분쇄한다. 이후, 이를 52 - 55℃(경화점(hardening point)보다 약간 높은 온도)로 냉각시킨다.

[0067] 2. 과립화(granulation). 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 냉동-건조된 분말을 Diosna 고전단 혼합기(high-shear mixer)/과립화기(granulator), 또는 등가물에 이전한다. 대략 1분간, 용융된 Softisan 154를 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 분말에 천천히 첨가한다. 추가의 매싱 시간(massing time)이 필요하지 않다. 첨가동안 절단기(chopper)를 이용한다.

[0068] 3. 습식 분체(wet-sieving). 과립화직후, Tornado 제분기를 이용하여 과립을 1-mm 체 망(sieving net)에 통과시킨다. 체로 걸러진 과립은 PVC-코팅된 알루미늄 호일로 만들어진 알루-파우치(alu-pouch)에 포장하고 히트실러(heatsealer)로 밀봉하여 건조 파우치(desiccant pouch)와 함께, 파우치(pouch)를 형성하고, 혼합 때까지 냉동 보관한다. 과립된 배치(batch)는 2개의 정제 배치로 분할한다.

[0069] 4. 혼합. 모든 원료를 혼합기에서 균질한 혼합물로 혼합한다.

[0070] 5. 압착(compression). 최종 혼합물을 회전 정제 프레스(rotary tablet press)의 호퍼(hopper)로 이전하고, 765 mg의 전체 중량을 갖는 정제를 Kilian 압착 장치에서 압착한다.

[0071] 6. 벌크 포장(bulk packaging). 츄잉 검을 분자 체(molecular sieve)의 건조 파우치(drying pouch)와 함께, 알루-백(alu-bag)에 포장한다. 알루-파우치(alu-pouch)는 플라스틱 버킷(plastic bucket)에 집어넣고, 최종 포장에 앞서 적어도 1주일동안 서늘한 장소에 보관한다.

[0072] 당업계에서 표준적인 공정 제어(in-process control)는 아래의 표 3에 도시한다:

표 3

[0073]

IPC	검사 방법	한계
1	외관 시각적으로	투명하고 균질한 용액
2	온도 온도계	52 - 55℃
3	락토바실러스 루테리(<i>L. reuteri</i>) 측정	CM003
4	외관 시각적으로	푸른색 반점으로 착색된 크립, 양 측면에 무색의 볼록 정제.
	균일한 질량(uniformity of mass) Ph. Eur.	765 mg ± 5 %

[0074] 본 실시예에서, 선별된 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 배양액은 이후, 10^7 CFU/산물 g의 수준으로 상기한 바와 같이 첨가되고, 추잉 껌은 우식증을 예방하는 수단으로 인간에 의해 이용된다. 수소처리된 야자 기름인 SOFTISAN™의 이용은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 세포가 지방에 피포되고 환경적으로 보호될 수 있도록 하는데, 이는 본 발명의 바람직한 구체예의 다른 독특한 측면이다.

[0075] 상기한 바와 같이, 본 발명의 산물은 추잉 껌 이외의 형태일 수 있고, 당분야에 공지된, 기초 산물을 제조하는 표준 방법은 선별된 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 배양액을 함유하는 본 발명의 산물을 제조하는데 유익하게 이용될 수 있다.

산업상 이용 가능성

[0076] 대표적인 특정 구체예가 본 명세서에 기술되긴 했지만, 본 발명의 기술적 사상 또는 범위를 벗어나지 않은 다양한 개변이 가능하다.