



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월26일  
(11) 등록번호 10-2491641  
(24) 등록일자 2023년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)  
A61K 35/74 (2015.01) A61P 1/02 (2006.01)  
C12R 1/01 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 1/205 (2021.05)  
A23L 33/135 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2022-0032897  
(22) 출원일자 2022년03월16일  
심사청구일자 2022년03월16일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020120035923 A  
KR102217525 B1  
US20200100536 A1  
Life, Vol.11, 268, pp.1-14(Epub.2021.03.24.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
(주)메디톡스  
충청북도 청주시 청원구 오창읍 각리1길 78  
(72) 발명자  
김태훈  
인천광역시 연수구 신송로82번길 6, 402동 1303호(송도동, 송도풍림아이원4단지아파트)  
류동욱  
경기도 시흥시 시흥대로 404, 101동 1501(광석동, 시흥시청역 동원로얄듀크)  
최우진  
경기도 수원시 영통구 중부대로448번길 28, 202동 1105호(원천동, 원천 레이크파크아파트)  
(74) 대리인  
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 치주 질환 유발균을 억제하는 활성을 갖는 락티카제이바실러스 파라카제이 균주 및 그 용도

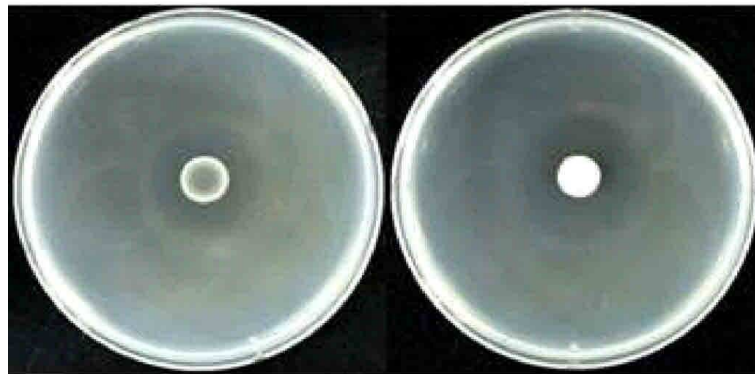
(57) 요약

치주 질환 유발균을 억제하는 활성을 갖는 락티카제이바실러스 파라카제이 균주 및 그 용도를 제공한다.

대표도 - 도2

LMT18-32 균체

LMT18-32 배양액



(52) CPC특허분류

*A61K 35/74* (2013.01)

*A61P 1/02* (2018.01)

*C12R 2001/01* (2021.05)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

치주 질환 유발균을 억제하는 활성을 갖는 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스(*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*) LMT18-32 (기탁번호: KCTC14823BP) 균주로서, 상기 치주 질환 유발균은 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)인 것인 균주.

**청구항 2**

치주 질환 유발균을 억제하는 활성을 갖는 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스(*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*) LMT18-32 (기탁번호: KCTC14823BP) 균주의 배양물로서, 상기 배양물은 미생물, 배양액, 미생물 용균물 또는 미생물 용균물의 상등액인 것이고, 상기 치주 질환 유발균은 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)인 것인 배양물.

**청구항 3**

락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스(*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*) LMT18-32 (기탁번호: KCTC14823BP) 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 치주 질환 유발균을 억제하는데 사용하기 위한 조성물로서, 상기 치주 질환 유발균은 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)이고, 상기 배양물은 미생물, 배양액, 미생물 용균물 또는 미생물 용균물의 상등액인 것이고, 치주 질환을 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한 약제학적 조성물.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

청구항 3에 있어서, 상기 치주 질환은 치주염 또는 충치인 것인 조성물.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스(*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*) LMT18-32 (기탁번호: KCTC14823BP) 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 치주 질환 유발균을 억제하는데 사용하기 위한 조성물로서, 상기 배양물은 미생물, 배양액, 미생물 용균물 또는 미생물 용균물의 상등액인 것이고, 상기 치주 질환 유발균은 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)이고, 치주 질환을 예방 또는 개선하는 활성을 가진 식품인 것인 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 치주 질환 유발균을 억제하는 활성을 갖는 락티카제이바실러스 파라카제이 균주 및 그 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 구강 건강에 대한 태도가 개선되었음에도 불구하고, 치주 질환은 여전히 만연한 문제로 남아 있다. 이 질환에 대한 현행 치료법은 치은하 플라크를 제거하고 치아 뿌리 표면을 매끄럽게 하여 잇몸의 재부착을 촉진하고자 하는 스케일링(*scaling*) 및 치근활택술(*root planting*)이 있다. 치료는 고통스럽고 종종 광범위한 가정 간호 준수

와 후속 방문을 필요로 한다. 또한, 스케일링 및 치근활택술은 예방적 치료 옵션은 아니어서, 비용 효율성이 떨어진다. 때로 치료를 위해 항생제가 처방되지만, 이는 항생제 내성 및 인간 미생물총에 대하여 영향을 미칠 수 있다.

[0003] 따라서, 종래 기술에 의하더라도 여전히 새로운 치주 질환 예방 또는 치료법이 요구되고 있다.

### 선행기술문헌

#### 비특허문헌

(비특허문헌 0001) Life, Vol. 11, 268, pp.1-14(Epub.2021.03.24.)

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0004] 일 양상은 치주 질환 유발균을 억제하는 활성을 갖는 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스 (*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*) LMT18-32 (기탁번호: KCTC14823BP) 균주 또는 이의 배양물을 제공한다.

[0005] 다른 양상은 상기 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 치주 질환 유발균을 억제하는데 사용하기 위한 조성물을 제공한다.

[0006] 다른 양상은 상기 균주 또는 이의 배양물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 치주 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

#### 과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 치주 질환 유발균을 억제하는 활성을 갖는 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스 (*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*) LMT18-32 (기탁번호: KCTC14823BP) 균주 또는 이의 배양물을 제공한다. 상기 배양물은 미생물 또는 그 조합의 배양액, 배양액 추출물, 또는 단백질 추출물일 수 있다. 상기 추출물은 미생물 또는 그 조합을 용균시킨 용균물, 또는 이를 원심분리하여 침전물을 제거하고 남은 상등액일 수 있다.

[0008] 상기 치주 질환 유발균은 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)인 것일 수 있다. 상기 균주는 pH 2 내지 4 또는 0.1% 이상, 예를 들면, 1.5% 이상, 2.0% 이상, 또는 3.0% 이상의 산, 예를 들면 담즙산 함유 용액에서 생존 가능한 것일 수 있다. 또한, 상기 균주는 활성 산소 제거능을 가진 것일 수 있다. 상기 치주 질환은 치주염 또는 충치일 수 있다. 상기 산은 유기산, 무기산 또는 그 조합일 수 있다. 상기 유기산은 개체를 구성하는 것 또는 그 대사 과정에서 발생하는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 유기산은 아미노산, 아세트산, 프로피온산, 젖산, 부티르산, 펜탄산, 글루콘산, 또는 아디프산일 수 있다.

[0009] 다른 양상은 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스(*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*) LMT18-32 (기탁번호: KCTC14823BP) 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 치주 질환 유발균을 억제하는데 사용하기 위한 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 조성물에 있어서, 상기 배양물은 미생물 또는 그 조합의 배양액, 배양액 추출물, 또는 그 조합의 단백질 추출물일 수 있다. 상기 추출물은 미생물 또는 그 조합을 용균시킨 용균물, 또는 이를 원심분리하여 침전물을 제거하고 남은 상등액일 수 있다.

[0011] 상기 조성물에 있어서, 상기 치주 질환 유발균은 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)일 수 있다. 상기 균주는 pH 2 내지 4 또는 0.1% 이상, 예를 들면, 1.5% 이상, 2.0% 이상, 또는 3.0% 이상의 산, 예를 들면 담즙산 함유 용액에서 생존 가능한 것일 수 있다. 또한, 상기 균주는 활성 산소 제거능을 가진 것일 수 있다. 상기 치주 질환은 치주염 또는 충치일 수 있다. 상기 산은 유기산, 무기산 또는 그 조합일 수 있다. 상기 유기산은 개체를 구성하는 것 또는 그 대사 과정에서 발생하는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 유기산은 아미노산, 아세트산, 프로피온산, 젖산, 부티르산, 펜탄산, 글루콘산, 또는 아디프산일 수 있다.

[0012] 상기 조성물은 치주 질환을 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한 약제학적 조성물일 수 있다. 상기 조성물은 상

기 균주를 유효성분으로서 포함하는 것일 수 있다. 상기 조성물은 치주 질환을 예방 또는 개선하는 활성을 가진 식품인 것일 수 있다.

- [0013] 상기 조성물은 식품학적으로 또는 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0014] 상기 조성물 중 상기 미생물 또는 그 조합 또는 그 배양물 또는 추출물을 "식품학적 유효량" 또는 "치료학적 유효량"으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 조성물에 있어서, "치료학적 유효량"은 치료를 필요로 하는 개체에 투여되는 경우 치료 효과를 나타내기 위해 충분한 양을 의미한다. 용어 "치료"는 개체, 예를 들면 사람을 포함한 포유류에서 질환 또는 의학적 증상, 예를 들면 비만 질병을 치료함을 의미하고, 이는 다음을 포함한다: (a) 질환 또는 의학적 증상의 발생을 예방, 즉, 환자의 예방적 치료; (b) 질환 또는 의학적 증상의 완화, 즉, 환자에서 질환 또는 의학적 증상의 제거 또는 회복 야기; (c) 질환 또는 의학적 증상의 억제, 즉, 개체에서 질환 또는 의학적 증상의 진행을 늦추 또는 정지; 또는 (d) 개체에서 질환 또는 의학적 증상을 경감. 상기 "유효량"은 당업자가 적절하게 선택할 수 있다. 상기 "유효량"은 0.01mg 내지 10,000mg, 0.1mg 내지 1000mg, 1mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 1000mg, 0.01mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 10mg, 또는 0.01mg 내지 1mg일 수 있다.
- [0015] 상기 조성물은 경구 투여될 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 정제, 캡슐제, 수성액제 또는 현탁제 등의 다양한 형태로 제제화될 수 있다. 경구용 정제의 경우 락토즈, 옥수수 전분 등의 부형제 및 마그네슘 스테아레이트와 같은 활택제가 통상 가해질 수 있다. 경구 투여용 캡슐제의 경우, 락토즈 및/또는 건조 옥수수 전분이 희석제로서 사용될 수 있다. 경구용 수성 현탁제가 필요할 경우, 활성성분을 유화제 및/또는 현탁화제와 결합시킬 수 있다. 필요할 경우, 특정 감미제 및/또는 향미제를 가할 수 있다. 상기 조성물은 구강에 투여되는 것일 수 있다. 상기 조성물은 구강 투여 제형일 수 있다.
- [0016] 다른 양상은 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스(*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*) LMT18-32 (기탁번호: KCTC14823BP) 균주, 이의 배양물 또는 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 치주 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0017] 상기 투여는 상기한 조성물을 투여하는 것일 수 있다. 상기 균주에 대하여는 상기한 바와 같다.
- [0018] 상기 방법에 있어서, 당업자는 투여시 투여경로는 환자의 상태에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 상기 투여는 경구, 또는 국부 투여일 수 있다. 상기 투여는 구강에 투여하는 것, 구강에 투여 후 구강에 머물게 하는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 방법에 있어서, 투여량은 전술한 바와 같이 환자의 상태, 투여 경로, 주치의의 판단 등과 같은 다양한 인자들에 따라서 다양해진다. 효과적인 투여량은 체외실험 또는 동물 모델 시험에서 얻어진 용량-반응곡선으로부터 추정할 수 있다. 투여되는 조성물에 존재하는 본 발명의 화합물의 비율 및 농도는 화학적 특성, 투여 경로, 치료적 투여량 등에 따라 결정될 수 있다. 상기 투여량은 개체에게 약 1 µg/kg 내지 약 1 g/kg per day, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 500 mg/kg per day의 유효량으로 투여될 수 있다. 상기 용량은 개체의 나이, 체중, 감수성, 또는 증상에 따라 변경될 수 있다.
- [0020] 상기 방법에 있어서, 상기 개체는 사람을 포함한 포유동물일 수 있다. 상기 개체는 예를 들면, 사람, 개, 고양이, 소, 돼지, 염소, 또는 말과 같은 가축일 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 있어서, 상기 균주 또는 조성물은 코팅되거나 캡슐화된 것일 수 있다. 상기 캡슐화는 제어된 방출을 허용하는 이점, 예를 들어 물과의 접촉시, 또는 장기간 동안의 연속적인 재방출의 이점을 가질 수 있다. 더욱이, 상기 조성물은 제품의 저장 수명을 개선하기 위해 분해로부터 보호되는 것일 수 있다. 활성 성분들의 캡슐화를 위한 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 다수의 캡슐화 재료뿐만 아니라 특정 요구들에 따라 조성물에 그것들을 적용하는 방법도 이용가능하다.
- [0022] 또한, 상기 균주 또는 조성물은 용액, 현탁액, 유액, 정제, 과립, 파우더 또는 캡슐의 형태일 수 있다.
- [0023] 상기 균주 또는 조성물은 치약, 치아 겔, 치아 파우더, 치아 세정액, 치아 세정품, 구강 세정제, 구강 스프레이, 치실, 츄잉껌 또는 로젠지(lozenges)일 수 있다.

**발명의 효과**

- [0024] 일 양상에 따른 미생물 또는 그 조합 또는 그 배양물 또는 추출물은 치주 질환을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

[0025] 다른 양상에 따른 조성물은 치주 질환을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

[0026] 다른 양상에 따른 방법에 의하면, 치주 질환을 효율적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0027] 도 1은 LMT18-32 균주와 KCTC3074<sup>T</sup> 균주의 게놈을 주형으로 한 RAPD PCR 결과 얻어진 산물을 전기 영동한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 LMT18-32 균체 및 그 배양액의 포르피로모나스 긴기발리스 KCTC5352<sup>T</sup>에 대한 생육저해 실험 결과를 나타낸 사진이다.

도 3은 LMT18-32 및 trolox의 항산화 활성을 ABTS 분석법으로 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0028] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**[0029] 실시예 1. 균주의 분리**

**[0030] 1. 균주의 분리**

[0031] 균주의 분리는 가정에서 직접 담근 전통 발효 식품인 김치를 100 g 취하여 멸균수에 희석하고, 스토마커(stomacher)로 5 분간 균질화하였다. 균질화된 샘플은 단계적으로 희석하여 브로모페놀블루(Sigma, USA)를 포함하는 MRS (Difco, USA) 아가 평판 배지에 도말하여 37 °C에서 2 내지 3일간 배양하였고 나타난 콜로니들을 형태 및 색깔 별로 구별하여 다시 순수 분리하여 최종 균주를 얻었다. 이하 이를 LMT18-32이라 한다. 순수 분리된 유산균 LMT18-32는 계통을 확인하기 위하여 하기와 같이 16S rDNA 계통 분석을 실시하였다.

**[0032] 2. 16S rDNA 분석**

[0033] 선별된 유산균 LMT18-32는 27F (서열번호 2)과 1492R (서열번호 3)의 프라이머 세트와 LMT18-32의 게놈을 주형으로 하여 PCR를 수행하여, 16S rDNA 증폭 산물을 얻었다. 상기 증폭 산물의 뉴클레오티드 서열을 시퀀싱을 통하여 확인하였다.

[0034] 그 결과 LMT18-32의 16S rDNA는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 또한, 상기 16S rDNA의 뉴클레오티드 서열을 NCBI blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 사용하여 해석하였다. 계통수 분석 결과, LMT18-32는 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스 종과 같았다. LMT18-32의 16S rDNA는 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스 종과 서열 동일성이 100.0%이었다. 따라서, LMT18-32 균주는 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스 종에 속하는 새로운 균주로 확인되었다.

**[0035] 3. 선별된 LMT18-32 균주와 타입 균주의 16S DNA 서열 비교**

[0036] 선별된 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스 LMT18-32 균주와 타입 균주(type strain)와의 서열 동일성을 확인하기 위해 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스 KCTC3074<sup>T</sup>를 KCTC로부터 상업적으로 구입하였다. LMT18-32 균주와 KCTC3074<sup>T</sup> 균주의 서열을 비교한 결과, 16S rDNA 서열 동일성이 100.0%임을 확인하였다. 또한, 선별된 LMT18-32 균주와 타입 균주 KCTC3074<sup>T</sup>의 유전적 유연관계를 조사하기 위해 각각의 균주 LMT18-32와 KCTC3074<sup>T</sup>은 OPA-13 (서열번호 4)의 프라이머와 각각의 균주의 게놈을 주형으로 하여 다형 DNA의 랜덤 증폭(Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) PCR을 수행하여, 증폭 산물을 얻었다. 증폭 산물은 RedSafe™ nucleic acid staining solution (iNTRON Biotechnology, Korea)이 포함된 1.2% 아가로즈 겔 에서 전기영동 한 후, ChemiDoc™ imaging system (Bio-Rad, USA)로 촬영하여 DNA 밴드 패턴을 얻었다. 도 1은 LMT18-32 균주와 KCTC3074<sup>T</sup> 균주의 게놈을 주형으로 한 RAPD PCR 결과 얻어진 산물을 전기 영동한 결과를 나타낸 도면이다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 두 균주 사이에 전기 영동 결과는 다른 밴드 패턴을 보였다.

[0037] 이러한 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스 LMT18-32와 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 툴러란스 KCTC3074<sup>T</sup>의 DNA 밴드 패턴의 차이는 두 균주가 유전적 유연관계의 차이가 있음을 나타낸다. 따라서 LMT18-



32 균주는 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 종에 속하는 새로운 균주임을 확인하였다. 이에 상기 균주를 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 (*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*) LMT18-32로 명명하고 이를 한국생명공학연구원 소재 한국세포주은행 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2021년 12월 15일자로 기탁번호 KCTC14823BP로 기탁하였다.

[0038] 실시예 2. 치주염 유발 균주 포르피로모나스 긴기발리스에 대한 유산균의 항균 활성 측정

[0039] 상기 선발 균주의 치주염 유발 포르피로모나스 긴기발리스에 대한 항균 활성을 측정하기 위해 한국생명공학연구원 소재 한국세포주은행 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 포르피로모나스 긴기발리스 KCTC5352<sup>T</sup>를 분양 받아 사용하였다. 먼저 포르피로모나스 긴기발리스를 TSA (Difco, USA) 아가 배지에서 37 °C, 96 시간 혐기 배양한 후, 포르피로모나스 긴기발리스를 이용하여 포르피로모나스 긴기발리스가 1x10<sup>6</sup> CFU/ml로 첨가된 TSA 아가 플레이트를 제작하였다.

[0040] 다음으로 치주염 유발하는 포르피로모나스 긴기발리스의 생육을 저해하는 유산균을 선발하기 위하여, 실시예 1에서 분리된 상기 유산균을 각각 MRS 액체 배지에서 37 °C, 24시간 동안 배양하였다. 이때는 OD600은 약 2.0이었다. 이후 상기 배양된 유산균으로부터 유산균체는 각각 10μl씩 포르피로모나스 긴기발리스가 첨가된 TSA 아가 플레이트에 점적하였고 유산균 배양액은 배양액만을 회수하기 위해 원심분리 후, 상등액만을 0.22μm 크기 필터로 필터하여 포르피로모나스 긴기발리스가 첨가된 TSA 아가 플레이트에 디스크 페이퍼를 올려 필터된 배양액을 각각 100μl씩 분주하여 37 °C에서 96시간 혐기 배양하였다. 96시간 배양 후, 포르피로모나스 긴기발리스의 생육을 저해하여 나타난 생육저해환을 측정하였다. 그 결과는 표 1 및 도 2에 나타내었다.

[0041] 도 2는 LMT18-32 균체 및 그 배양액의 포르피로모나스 긴기발리스 KCTC5352<sup>T</sup>에 대한 생육저해환 실험 결과를 나타낸 사진이다.

표 1

유산균		포르피로모나스 긴기발리스 KCTC5352 <sup>T</sup> 생육저해환(단위 mm)
락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32	균체	23
	배양액	32

[0043] 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32 균체 및 배양액을 사용한 경우 저해환 길이는 각각 23mm 및 32mm이었다. 이는 실험에 사용된 838종 중 80종의 유산균이 치주염을 유발하는 포르피로모나스 긴기발리스 균주에 우수한 항균 활성을 나타내었으며, 그 중에서 가장 우수한 항균 활성을 갖는 것이다.

[0044] 실시예 3. 균주의 형태학적 및 발효특성 조사

[0045] 1. 균학적 특성분석

[0046] 치주염 유발 균주에 항균 활성이 우수한 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32를 MRS 평판 배지에서 배양하고 콜로니의 형태를 관찰하였고 콜로니 형태는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

	LMT18-32
형태	원형
크기	0.7mm
색	크림색
불투명도	불투명
용기	블록
표면	매끄러움
호기적 성장	+
혐기적 성장	+

[0048] 2. 선발된 유산균주의 당 발효 특성당 발효 특성은 API 50 CHL 키트(BioMerieux, France)를 이용하여 공급회사

의 실험방법에 따라 조사하였다. 치주염 유발 균주에 항균 활성이 우수한 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32의 당 발효 특성을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

	LMT18-32
글리세롤	-
에리트리톨	-
D-아라비노스	-
L-아라비노스	-
D-리보스	+
D-자일로스	-
L-자일로스	-
D-아도니톨	+
메틸-β D-자일로피라노사이드	-
D-갈락토스	+
D-글루코스	+
D-프럭토스	+
D-만노스	+
L-소르보스	+
L-람노스	-
둘시톨	-
이노시톨	-
만니톨	+
D-소르비톨	+
메틸 α α D-만노피라노사이드	-
메틸 α D-글루코피라노사이드	-
N-아세틸글루코사민	+
아미그달린	-
아르부틴	-
에스쿨린	+
살리신	+
D-셀로비오스	+
D-말토스	+
D-락토스	-
D-멜리비오스	-
D-사카로스	+
D-트레할로스	+
이눌린	+
D-멜레지토스	+
D-라피노스	-
아미돈	-
글리코젠	-
차일리톨	-
젠티오비오스	-
D-투라노스	+
D-라이소스	+
D-타가토스	+
D-푸코스	-
L-푸코스	-
D-아라비톨	-
L-아라비톨	-
포타슘 글루코네이트	+
포타슘 2-케토글루코네이트	-
포타슘 5-케토글루코네이트	-

[0049]

[0050]

그 결과, 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32는 총 22개의 당을 이용하는 것으로 확인되었



다.

[0051] 실시예 4. 안정성

[0052] 1. 유산균의 내산성 조사

[0053] 상기 유산균 LMT18-32가 구강 내에서 프로바이오틱스로서의 효능을 발휘하기 위해서는 섭취 후 낮은 pH의 환경을 통과하거나 유지되어야 한다. 예를 들면, 상기 균주는 치면의 세균막인 플라크 내에 서식하는 박테리아, 예를 들면, *S. mutans* 등이 배출하는 산성 환경에서 유지 또는 성장할 수 있는 것일 수 있다. 치주염 유발 균주에 대한 항균 활성이 우수한 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32의 내산성을 조사하기 위해서 MRS 액체 배지에 접종 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 다음으로 MRS 액체 배지를 HCl (Sigma, USA)을 이용하여 pH 2.5로 조정된 pH 2.5 MRS 액체 배지를 준비하였고 배양된 유산균을 pH 2.5 MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 이때, 접종 직후의 유산균을 회석하여 MRS 평판 배지에 도말 하였고, pH 2.5 MRS 액체 배지에서 2시간 배양된 유산균도 MRS 평판 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, MRS 평판 배지 위의 유산균 집락 수를 계수하여 측정된 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

[0054]

	LMT18-32 (CFU/ml)
MRS (pH 6.8)	$4.0 \times 10^9$
MRS (pH 2.5)	$3.9 \times 10^9$

[0055] 그 결과, 치주염 유발 균주에 대한 항균 활성이 우수한 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32는  $3.9 \times 10^9$  CFU/ml 균 수를 유지하여 높은 생존율을 보여 주었다. 이러한 유산균들의 특징은 충치가 유발된 산성 pH 환경에서도 유지 또는 성장 즉, 산 내성을 갖는 것으로 예상할 수 있다. 충치가 발생하는 플라크 내에는 *S. mutans*와 같은 박테리아에 의하여 산이 방출되어 산성을 띄고 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 위의 생리적 pH와 가까운 pH 3보다 낮은 pH에서 유산균 수를 유지하였기 때문에 위산분비로 인한 낮은 pH에서도 안정하게 생존수가 유지 가능하며, 섭취 시 장내 도달율이 높을 것으로 예상할 수 있다.

[0056] 2. 유산균의 내담즙성 조사

[0057] 유산균의 내담즙을 조사하기 위해 다음의 방법으로 실험을 실시하였다. 치주염 유발 균주에 항균 활성이 우수한 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32를 MRS 액체 배지에 접종 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 다음으로 장관 내 담즙산염 농도가 0.1% 내외임을 감안하여, 0.3%의 담즙산염 (Bile salt, Sigma, USA)이 함유된 MRS 액체 배지를 준비하였고 배양된 유산균을 0.3% Bile salt MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였다.

[0058] 이때, 접종 직후의 유산균을 회석하여 MRS 평판 배지에 도말 하였고, 0.3% Bile salt MRS 액체 배지에서 2시간 배양된 유산균도 MRS 평판 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, MRS 평판 배지 위의 유산균 집락 수를 계수하여 측정된 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

[0059]

	LMT18-32 (CFU/ml)
MRS (0% Bile salt)	$4.0 \times 10^9$
MRS (0.3% Bile salt)	$1.4 \times 10^9$

[0060] 그 결과, 치주염 유발 균주에 대한 항균 활성이 우수한 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32는  $1.4 \times 10^9$  CFU/ml 균 수를 유지하여 높은 생존율을 보여 주었다. 따라서 장관 내 담즙산염 농도가 0.1% 내외임을 감안하여 장 내에서도 충분히 생존율이 높을 것으로 예상할 수 있다.

[0061] 실시예 5. 유산균의 ABTS 라디칼 소거 활성

[0062] 치주질환은 감염성 및 염증성 과정이 연속적으로 발생하면서 활성산소 (ROS, reactive oxidative species)가 생

성되고 이 활성산소들이 치주염을 악화시킨다 (J Indian Soc Periodontol. 2013 Jul-Aug; 17(4): 411-416.). 이때 항산화제가 활성산소를 제거하여 산화 스트레스 감소를 통해 치주질환 개선에 도움을 준다.

[0063] 따라서 치주염 유발 균주에 항균 활성이 우수한 락티카제이바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LMT18-32의 항산화 효능을 확인하기 위해 ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 분석(assay)을 수행하였다.

[0064] 이 분석은 ABTS는 포타슘 퍼셀레이트에 의해 전자를 잃어 짙은 청녹색을 띠지만 항산화 물질이 존재하는 경우, 그 전자공여능으로 인하여 색이 옅어지는 바, 이 과정을 보고 항산화능을 측정하는 방법이다. 먼저 14mM ABTS (38.4mg/10ml; Sigma, USA)와 6mM 포타슘 (8.1096mg/10ml; Sigma, USA)를 1:1 비율로 섞고 상온에서 16시간 암반응하여, 양이온(ABTS<sup>+</sup>)을 형성 시켰다. 이렇게 만들어진 ABTS<sup>+</sup> 용액은 1/10 희석하여 사용하였다. 유산균은 OD600 약 2.0으로 배양 후, 배양액만을 회수하기 위해 원심분리하여 상등액만을 0.22 $\mu$ m 크기 필터로 필터하였다. 필터한 배양액 20 $\mu$ l 와 ABTS<sup>+</sup> 용액 180 $\mu$ l를 96 웰 플레이트에서 10분간 암반응시켰다. 이후, 반응이 끝난 시료는 마이크로플레이트 리더를 이용하여, 734nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성대조군으로 항산화 물질인 비타민 E의 전구체 trolox (1mg/ml; Sigma, USA)를 사용하였다. 도 3은 LMT18-32 및 trolox의 항산화 활성을 ABTS 분석법으로 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

[0065] 도 3에 나타난 바와 같이, LMT18-32의 배양액 10% 농도는 82.9%로 높은 항산화 활성을 보여주었다. 따라서, 상기 LMT18-32는 활성산소 억제제로 작용하여 치주 질환 예방 또는 치료와 같은 구강 건강 개선에 도움을 줄 수 있다.

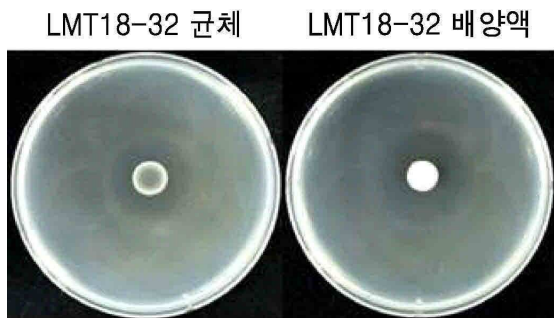
**도면**

**도면1**

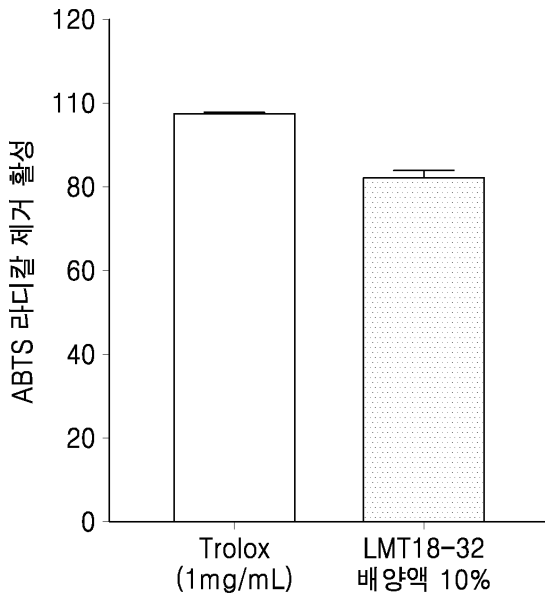


M : 마커  
 1 : *L. paracasei* subsp. *tolerans* LMT18-32  
 2 : *L. paracasei* subsp. *tolerans* KCTC3074<sup>T</sup>

**도면2**



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Medytox Inc.

<120> Lacticaseibacillus paracasei strain for suppressing periodontal disease inducing bacteria and use thereof

<130> PN142655KR

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1403

<212> DNA

<213> Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans LMT18-32

<400> 1

```

gagttctcgt tgatgatcgg tgcttgacc gagattcaac atggaacgag tggcggacgg      60
gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccttaa gtgggggata acatttgaa acagatgcta      120
ataccgata gatccaagaa ccgcatggtt cttggctgaa agatggcgta agctatcgt      180

tttggatgga cccgcggcgt attagctagt tggtaggta atggctcacc aaggcgaatga      240
tacgtagccg aactgagagg ttgatcgcc acattgggac tgagacacgg cccaaactec      300
tacgggagcg agcagtaggg aatcttcac aatggacgca agtctgatgg agcaacgccg      360
cgtgagtgaa gaaggcttc gggtcgtaa actctgtgt tggagaagaa tggtcggcag      420
    
```

agtaactgtt gtcggcgtga cggtatccaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 480  
 agcccggtga atacgtaggt ggcaagcgtt atccggatth attgggcgta aagcgagcgc 540  
 aggcggtttt ttaagtctga tgtgaaagcc ctcggcttaa ccgaggaagc gcatcggaaa 600  
  
 ctgggaaact tgagtgcaga agaggacagt ggaactccat gtgtagcggg gaaatgcgta 660  
 gatatatgga agaaccaccag tggcgaaggc ggctgtctgg tctgtaactg acgtgaggc 720  
 tcgaaagcat ggtagcgaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgatga 780  
 atgctaggtg ttggagggtt tccgcccttc agtgccgcag ctaacgcatt aagcattccg 840  
 cctggggagt acgaccgcaa ggttgaact caaaggaatt gacggggggcc cgcacaagcg 900  
 gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcttt 960  
 tgatcacctg agagatcagg tttcccttc gggggcaaaa tgacaggtgg tgcattggtg 1020  
  
 tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga acgagcgcaa cccttatgac 1080  
 tagttgccag catttagttg ggcactctag taagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg 1140  
 tgggatgac gtcaaatcat catgccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg 1200  
 atggtacaac gaggtagcag accgcgaggt caagctaate tcttaaagcc attctcagtt 1260  
 cggactgtag gctgcaactc gcctacacga agtcggaatc gctagtaatc gcggatcagc 1320  
 acgcccggt gaatacgttc ccggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgagagttt 1380  
 gtaacaccgc aagccggtgg cgt 1403

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 2

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 3

ggttaccttg ttacgactt 19

<210> 4

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 4

cagcaccac

10