pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 6, pp. 544~550 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.6.544

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

*Porphyromonas gingivalis*의 병인인자 Gingipain 억제능을 갖는 *Weisiella cibaria* SPM402와 *Lactobacillus paracasei* SPM412

서채현 · 강소원 · 최성숙*
삼육대학교 약학대학

Inhibition Effects of *Weisiella cibaria* SPM402 and *Lactobacillus paracasei* SPM412 against Gingipains as a Major Virulence Factor for *Porphyromonas gingivalis*

Chae Hyeon Seo, Kang SoWon, Sungsook Choi*
College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul, Korea

(Received September 5, 2023/Revised October 12, 2023/Accepted October 24, 2023)

ABSTRACT - To develop a functional probiotic that inhibits gingipain, a major virulence factor of *Porphyromonas gingivlais* (*P. gingivalis*), we screened over 30 probiotic strains for their ability to inhibit gingipian activity. We investigated the inhibition of expression of gingipain genes *kgp*, *rgpA*, and *rgpB* as well as gingipain activity, using freeze dried cell-free supernatants of *Weisiella cibaria* SPM402 (WC402) and *Lactobacillus paracasei* SMP412 (LP412), both of which demonstrated antibacterial activity against *P. gingivalis*. Thus, it was verified that *kgp* expression was reduced by approximately 0.71±0.02 folds and *rgpB* expression was reduced by approximately 0.71±0.14 folds at a concentration of WC402 10 mg/mL. Meanwhile, at the same concentration of 10 mg/mL of LP412, *kgp* expression was reduced by approximately 0.19±0.08 folds, *rgpA* expression was reduced by approximately 0.09±0.02 folds, and *rgpB* expression was reduced by approximately 0.24±0.03 folds. At a concentration of 10 mg/mL, Kgp activity was inhibited by approximately 78.65±3.58% (cell associated gingipain, CAG), 82.45±1.22% (cell-free gingipain, CFG) by WC402 and 80.71±2.11% (CAG), and 85.81±0.05% (CFG) by LP412 respectively. Rgp activity was also effectively inhibited by approximately 78.6±1.01% (CAG), 86.78±0.47% (CFG) and 82.93±1.26% (CAG), 88.81±0.36% (CFG) by WC402 and LP412 respectively. Based on these results, *W. cibaria* SPM402 and *L. paracasei* SPM412 can be regarded as functional probiotics with the ability to inhibit gingipain activity and exhibit antibacterial effects against *P. gingivalis.*

Key words: Gingipain, *Porphyromonas gingivlais, Weiseilla cibaria, Lactobacillus paracasei,* Kgp, Rgp

치주질환은 만성 염증성 질환의 하나로 잇몸 출혈, 치아 손실 등 구강 건강에 직접적인 영향을 미칠 뿐 아니라 고혈압, 당뇨, 심혈관질환, 골다공증, 알츠하이머와 같은 전신성 질병과도 관련이 있다고 알려져 있다[1-3]. 치주질환은 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* 와 *Tannerella forsythia*로 구성된 red complex군으로 분류하는 세균이 대표적인 발병의 원인으로 알려져 있다[4]. 이 중 *P. gingivalis*는 절대혐기성 그람음성세균으로 협막, 핌브리아(Fimbriae), lipopolysaccharide (LPS), 헤마글루티닌(haemagglutinins) 및 gingipain 이라 불리는 cystein protease 가 주요 병인인자로 알려져 있다[5]. Gingipain은 숙주의 결합조직을 파괴하여 세균의 침투를 수월하게 하고 숙주의 면역반응을 간섭하며 잇몸을 약화하시는데 기여하는 대표적인 병인인자이다[3,6]. Gingipain은 Lys-X 결합을 분해하는 lysine-specific gingipain (lys-gingipain, Kgp)와 Arg-X의 결합을 분해하는 arginine-specific gingipain (arg-gingipain, Rgp)으로 분류하며 Rgp는 RgpA와 RgpB로 나누어 진다[7]. Gingipain은 Kallikrein/Kinin System을 활성화하여 bradykinin을 유리하고 그 결과 치주인대 섬유모세포와 파골세포에

*Correspondence to: Sungsook Choi, College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 01795, Korea
Tel: +82-2-3399-1606; Fax: +82-2-3399-1617
E-mail: sschoi@syu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 뼈의 재흡수를 촉진하며 혈액응고 시스템을 활성화시켜 다량의 thrombin생성을 촉진하고 그 결과 치주염 발병 부위의 염증을 악화시킨다[8-10]. 그 외에도 보체계 간섭, 싸이토카인 네트워크 조절장애, 단핵구 내 LPS수용체 파괴 등 숙주의 선천면역계를 간섭하여 *P. gingivlais*가 숙주의 면역계를 회피하여 생존이 가능하게 한다[3]. Gingipain은 *P. gingivalis*의 막에 결합된 상태(cell-associated gingipain, CAG)와 세포밖으로 분비된 상태 (cell-free gingipain, CFG)로 존재하며 *P. gingivalis*가 생성하는 전체 단백질의 약 85%를 차지 한다[6,7]. 최근 치주질환의 원인을 구강내 정상 세균총의 균형이 파괴되고 그 결과 병원성 세균의 증식이 활발해진 것에 기인한다는 연구결과들이 보고되고 있고, 병원성 세균 또는 그 세균의 병인인자에 대한 probiotics의 역할에 대한 연구결과들도 활발히 도출되고 있다[11,12]. 따라서 본 연구에서는 *P. gingivalis*의 대표적인 병인인자로 치주질환 및 전신질환 발생에 관여하는 gingipain의 활성에 대한 유산균의 일종인 *Weisiella cibaria* SPM402와 *Lactobacillus paracasei* SPM412의 효능에 대한 연구결과를 보고하고자 한다.

Materials and Methods

사용균주 및 배양

본 실험에 사용한 *P. gingivalis* KCTC5352는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Jeongeup, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 배양은 Brain Heart Infusion (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 5% 농도의 Horse Blood Defibrinated (MBcell, BNFKOREA, Gimpo, Korea)와 menadione을 2.5 μg/mL 농도로 첨가한 배지에 AnaeroBag (Chongqing PangTong Medical Devices Co., Ltd, Chongqing, China)을 사용하여 37°C, 48시간 혐기 배양하였다. 액체배양에는 horse blood 대신 horse serum (Sigma Louis, St. Louis, MO, USA)을 5% 농도로 첨가하였다. 본 실험에 사용한 유산균 *Weisiella cibaria* SPM402와 *Lactobacillus paracasei* SPM412는 발효식품에서 분리하여 마크로젠(Macrogen, Seoul, Korea)에서 동정하여 실험실에 보관하고 있던 균주로 *P. gingivalis*에 대한 항균력이 우수함을 확인하고 본 연구에 사용하였다. 실험에 사용한 시료는 두 균주를 De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) 액체배지(BD Difco™, Becton Dickinson)에 37°C, 24시간 배양 후 원심분리하여 얻은 상등액을 동결 건조하여 분말로 만든 후 해당 농도로 조제 후 0.2 μm 여과멸균 하여 사용하였으며 *W. cibaria* SPM402의 상등액은 WC402로, *L. paracasei* SPM412의 상등액은 LP412로 표기하였다.

WC402와 LP412의 *P. gingivalis* 에 대한 항균력 측정

*P. gingivalis*에 대한 *W. cibaria* SPM402와 *L.paracasei* SPM412의 항균력을 확인하기 위하여 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)측정은 CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) 가이드라인을 따라 micro-dilution method로 실시하였다[13]. WC402와 LP412를 각각 최고 농도 50%부터 최소 1% 농도까지 함유하도록 배지를 만들었으며 균 접종량은 혐기성균이라 1×10^6 CFU/mL농도로 접종 후 37°C, 48시간 배양하여 균의 성장이 확인되지 않는 가장 낮은 농도를 MIC로 결정하였다. pH 7.0, pH 4.5의 MRS 배지를 50% 농도로 함유하도록 조정한 배지에도 균을 접종하여 pH와 배지 자체에 의한 성장영향도 확인했으며 *P. gingivalis*에 대한 moxifloxacin (Hanmi, Seoul, Korea)항균력을 측정하여 본 실험에 대한 정도 관리를 하였다. MIC를 확인 후 각 농도별 배양액 10 μL을 WC402, LP412를 함유하지 않은 배지에 접종 후 37°C, 48시간 배양 후 균의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 농도를 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC)로 결정하였다.

WC402와 LP412에 의한 gingipain 유전자 발현 억제

*P. gingivalis*의 gingipain 유전자 발현에 대한 WC402와 LP412의 효과를 확인하고자 액체배지에 *P. gingivalis*를 37°C, 48시간 전배양 한 후 새로운 액체배지에 1×10^8 CFU/mL 농도가 되도록 접종 후 8시간 배양한 후 RNA 분리

Table 1. Primer sequences for gingipain genes for qRT-PCR analysis

Gene		Sequence (5'→3')	Tm (°C)
16S rRNA	F	TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA	57.8
	R	ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	57.8
kgp	F	TCA AGC AGT TCG ATG CAA GC	58.3
	R	ACT TGG GTC AGT TCT TGT CC	58.3
rgpA	F	TAT CCT TCG TGA TGT GCG TG	57.3
	R	GCT GTA ACG GGA GAA GCA AT	57.3
rgpB	F	CAT TCT CCT CTC TGT TGG GA	57.3
	R	CGT AGG GGA TTT GAT CAG GA	57.3

하였다. 이때 대조군은 *P. gingivalis*만 배양하였고, WC402와 LP412를 MIC보다 낮은 5 mg/mL와 10 mg/mL로 처리한 군을 시험군으로 하였다. RNA분리는 GeneAll Hybrid-R™ regent (GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 실시하였으며 본 실험에 사용한 primer는 제노텍(Genotech, Daejeon, Korea)에서 합성하였으며 그 염기서열은 Table 1에 나타내었다. Total RNA 0.1 μg을 template로 하여 AccuPower CycleScript RT premix (dN12) (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 37°C에서 30초, 48°C에서 4분, 55°C에서 30초 반응을 15회 반복 후, 95°C에서 5분간 heat inactivation 조건으로 역전사반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 이용하여 gingipain 유전자의 발현 변화를 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)을 실시하여 확인하였다. qRT-PCR반응은 cDNA 3 μL, 각 primer (10 pmol) 1 μL, PowerSYBR Green PCR Mastermix (Life Technologies Pty Ltd, NY, USA) 10 μL를 넣고 nuclease free water를 넣어 최종 부피가 20 μL가 되도록 하였다. 이후 StepOne realtime PCR System (Life technologies Co., Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 95°C에서 10분간 변성 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초간 합성을 40회 반복 수행 후, 95°C에서 1.6°C/sec 로 60°C까지 낮추어 1분간 정지 후 0.1°C/sec 95°C까지 올리는 단계를 거쳐 생성된 PCR 산물의 melting curve 분석을 실시하였다. 결과 분석은 house keeping gene인 *16S rRNA*를 기준으로 *kgp*, *rgpA*, *rgpB* 의 발현을 상대정량 분석하는 ddCt 분석을 실시하여 분석하였으며, 1.5배 이상의 차이를 유의적인 발현 변화로 판단하였다[14].

WC402와 LP412에 의한 gingipain 효소활성 억제

P. gingivalis 유래 gingipain 효소 활성은 King[15] 등의 형광펩타이드를 사용한 분석방법을 참고하여 시행하였다. 전배양한 *P. gingivalis*를 액체배지에 1×10^8 CFU/mL로 접종 후, 37°C, 48시간 혐기배양 후, 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상등액과 균을 분리하였다. 상등액을 0.2 μm filter여과 후 0.2 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 세포외분비 gingipain (CFG)으로 사용하였다. 침전으로 얻은 균체는 4×10^9 CFU/mL농도로 Dulbeco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Sigma-Aldrich)에 현탁하고 0.2 mM PMSF를 첨가하여 세포막 결합 gingipain (CAG)로 사용하였으며, 효소액은 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다. 형광펩타이드 Boc-VLK-AMC (Bachem Americas Inc., Torrance, CA, USA)는 Kgp의 기질로, Boc-VPR-AMC (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan)는 Rgp의 기질로 각각 20 mM 농도로 DMSO에 조제 후 50 μL씩 소분해 -70°C에 보관하였으며 사용시 DPBS에 희석하여 2 mM로 만들어 사용하였다. 반응중지용 시약인 Na-Tosyl-L-lysine chlomethyl ketone hydrocloride (TLCK, Sigma-Aldrich)는 DMSO에 10 mM 농도로 조제 후 -20°C에 보관하였고, 사용할 때는 DPBS에 희석해서 사용하였다. 예비실험을 통해 결정한 희석배수에 따라 DPBS (1 mM cystein 함유)에 CAG stock은 50배, CFG stock은 10배 희석한 효소액 20 μL을 37°C에서 10분간 전 배양하였다. 각 농도별 WC402와 LP412를 첨가하고, Boc-VLK-AMC와 Boc-VPR-AMC를 0.2 mM이 되도록 넣어 최종 부피가 100 μL가 되도록 하여 37°C에서 15분간 배양 후, 1.5 mM TLCK 50 μL를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 형광분광측정기 (Spark®, Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 excitation 360 nm, emission 460 nm 파장에서 기질의 분해로 발생하는 형광을 측정하였다. Gingipain의 활성 억제는 시료를 처리하지 않고 효소만 처리한 군의 형광을 대조군으로 gingipain 억제제인 leupeptin (Sigma-Aldrich) 10 μM을 처리한 군과 시료 처리군의 형광의 강도를 다음의 수식에 대입하여 계산하였다.

$$\text{Gingipain inhibition (\%)} = (1-OD_{treatment}/OD_{control}) \times 100$$

통계분석

모든 통계분석은 3회 반복실험을 통해 얻은 평균값 ± 표준편차로 나타내었다. 통계분석은 GraphPad Prism® (ver. 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego ,CA, USA)을 이용하여 One-way ANOVA이용하여 Kruskal-Wallis 검정 후 통계를 바탕으로 처리하였다. 사후 검정은 Dunn's Multiple Comparison test를 이용하였다.

Results and Discussion

WC402와 LP412의 *P. gingivalis*에 대한 항균활성

WC402와 LP412의 *P. gingivalis*에 대한 항균효과를 확인한 결과 두 시료 모두 MIC는 25 mg/mL, MBC는 50 mg/mL로 확인되었다(Table 2). WC402와 LP412는 모두 *P. gingivalis*에 대해 우수한 성장억제능을 확인할 수 있었으며 pH 4.5 및 pH7 조건의 배지를 시료 최고 농도로 사용한 경우 성장이 정상적으로 이루어져 배지 및 pH의 영향은 배제할 수 있었다. 최근 *Lactobacillus reuteri* AN417의 배양 상등액의 *P. gingivalis*에 대한 MIC 값이 10% (100 mg/mL)로 보고한 결과와 비교해도 매우 우수한 항균 효과임을 확인할 수 있었다[16].

Table 2. Antimicrobial activity of WC402 and LP412 against *P. gingivalis* KCTC5352

MIC (mg/mL)		MBC (mg/mL)	
WC402	LP412	WC402	LP412
25	25	50	50

Gingipain 유전자 발현에 대한 WC402와 LP412의 영향

WC402와 LP412의 gingipain 유전자 mRNA 합성에 미치는 영향을 확인한 결과 WC402는 5 mg/mL에서는 *kgp*, *rgpA* 및 *rgpB*의 mRNA 합성에 대한 영향은 유의미하지 않았고 10 mg/mL에서는 *rgpA*의 발현이 대조군과 비교하여 약 0.71±0.02배, *rgpB*의 발현은 약 0.71±0.14배 발현되어 약간의 억제효과가 있었으며 *rgpA*의 발현은 억제되지 않았다. LP412 5 mg/mL에서는 대조군과 비교하여 *kgp*는 약 0.79±0.10배, *rgpA*는 0.57±0.11배 발현되어 억제효과를 확인하였고 *rgpB*의 발현은 억제되지 않았다. 한편 LP412 10 mg/mL에서 대조군과 비교하였을 때 *kgp*는 0.19±0.08배, *rgpA* 0.09±0.02배, *rgpB* 0.24±0.03배 발현되어 3가지 유전자의 발현이 현저히 억제됨을 확인하였다(Fig. 1). 최근, resveratol에 의한 gingipain 유전자 발현이 sub-MIC농도에서 0.5-0.7배 발현된 연구결과 및 quercetin에 의한 gingipain 유전자 발현이 50 μM에서 0.428-0.0884배, 100 μM에서 0.170-0.0340배 발현된 연구 결과와 비교해 볼 때 LP412 10 mg/mL농도에서 gingipain 유전자 발현 억제는 매우 우수한 것으로 판단된다[17,18].

Gingipain 효소 활성에 대한 WC402와 LP412의 영향

WC402와 LP412의 직접적인 gingipain 효소 활성에 대한 영향을 형광펩타이드를 기질로 확인하였다. WC402의 경우 10 mg/mL에서 Kgp는 78.65±3.58% (CGA), 82.45±1,22% (CFG) 억제되었고 Rgp는 78.63±1.01% (CAG), 86.78±0.47% (CFG) 억제되었으며 농도 의존성을 나타내었다. LP412 10 mg/mL에서 Kgp는 80.70±2.11% (CAG), 85.80±0.05% (CFG) 억제되었고 Rgp는 82.93±1.26% (CAG), 88.81±0.36% (CFG) 억제되었으며 농도 의존성을 나타내었다(Fig. 2,3). 두 시료 모두 CAG와 보다 CFG에 대한 억제능이 약간 우수하였으며, Kgp보다는 Rgp 억제능이 약 3% 정도 우수했으며 전반적으로 WC402보다는 LP412가 상대적으로 억제능이 우수하였다. 대표적인 Rgp 저해제인 10 μM leupeptin의 Rgp 저해능이 90.74±0.43-90.90±0.78%인데 LP412 10 mg/

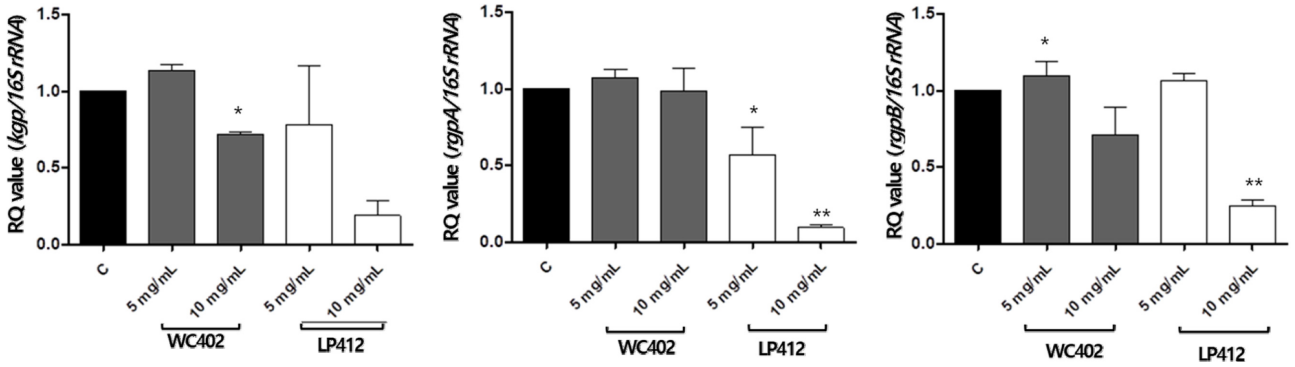

Fig. 1. Effects of WC402 and LP412 on the expressions of gingipain genes. C; control, *P. gingivalis* cultured without WC402 or LP412. All data were performed in triplicate and expressed as mean ± SD. **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with control.

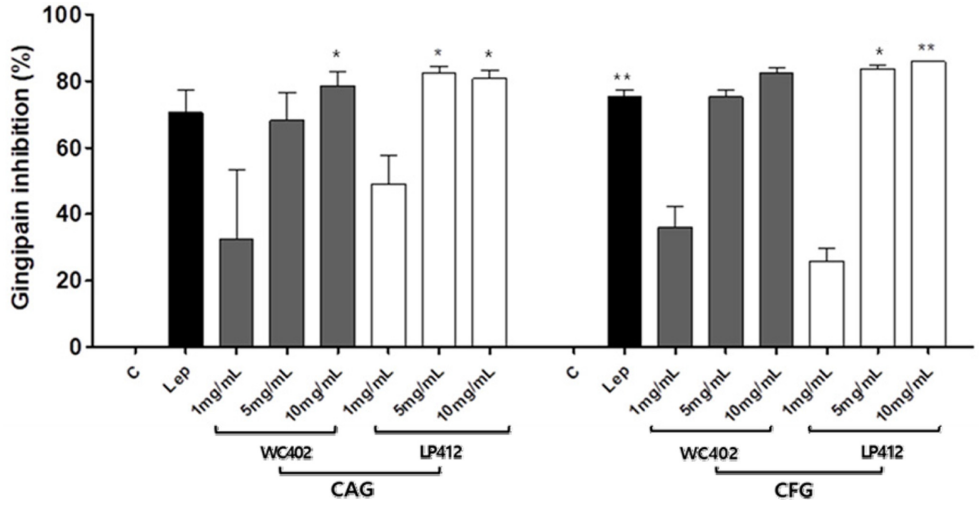

Fig. 2. Effects of WC402 and LP412 on the *P. gingivalis* Kgp activity. C; control, Kgp activity was measured without inhibitor. Lep; Kgp activity was measured in the presence of 10 μM leupeptin. All data were performed in triplicate and expressed as mean ± SD. **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with control.

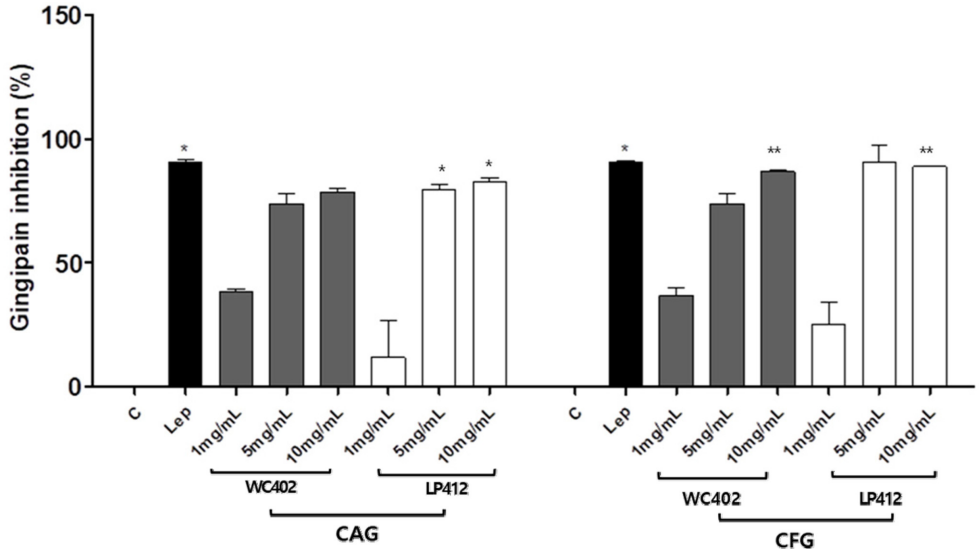

Fig. 3. Effects of WC402 and LP412 on the *P. gingivalis* Rgp activity. C; control, Rgp activity was measured without inhibitor. Lep; Rgp activity was measured in the presence of 10 μM leupeptin. All data were performed in triplicate and expressed as mean ± SD. **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with control.

mL에서 Rgp 저해능이 82.93±1.26-88.81±0.36%인 것을 비교해 볼 때 LP412의 gingipain에 대한 억제 효과가 우수함을 알 수 있었다. Huck등[19]의 연구에서 *Akkermansia muciniphila*를 *P. gingivalis*와 co-culture하였을 때, Kgp 45%, Rgp 75% 정도 억제된 결과와 비교하였을 때, WC402와 LP412는 Kgp와 Rgp에 대하여 억제 효과가 우수함을 알 수 있었다. Gingipain은 세균 감염에 의한 치주염이 발생한 부위에서 부종, 치은열구액 생성에 기여하는 혈관투과성을 증가시켜 세균의 증식에 필요한 영양분을 지속적으로 공급할 수 있다. 또한 Kallikrein/Kinin System을 활성화하여 bradykinin을 유리하고 그 결과 치주인대섬유모세포와 파골세포에서 뼈의 재흡수를 촉진한다[9,10]. 특히 보체계 구성성분인 C3, C4, 및 C5 분해하여 보체계 활성화 방해로 선천면역을 억제한다[20-22]. 최근 gingipain을 대상으로 한 백신 개발이나 강력한 gingipain활성 제해제를 치료제로 개발하는등 gingipain을 표적으로한 신약개발을 진행중이다[23,24]. 홍차성분인 theaflavin, 크렌베리 유래 폴리페놀성 화합물, 유칼립투스의 macrocarpals등도 sub-MIC 농도에서 gingipain 유전자 발현 억제 및 효소활성을 억제하는 두가지 기능이 있는 것으로 보고된 대표적인 천연물이다[25-27]. 발효식품에서 주로 분리되는 유산간균목 그람양성균인 *Weissella cibaria* SPM402와 *Lactobacillus paracasei* SPM412의 배양 상등액은 항균효과를 나타내지 않는 MIC 이하 농도(10 mg/mL, MIC=25 mg/mL)에서 gingipain 유전자 발현 및 효소활성을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 따라서 두 균주는 치주질환 뿐 아니라 전신성 질환의 원인이 될 수 있는 *P. gingivalis*의 병인 인자 gingipain을 효과적으로 저해하는 신규 프로바이오틱스 기능성 소재로 개발 가능성이 있음을 확인하였다.

국문요약

치주질환의 원인균인 *Porphyromonas gingivlais* (*P. gingivalis*)의 병인인자중 하나인 gingipain 효소에 대한 억제활성을 갖는 유산균을 개발하고자 본 연구실에 보관중인 30여종의 유산균 배양상등액의 활성을 검색하였다. 그 결과 발효식품에서 분리, 동정한 *Weisiella cibaria* SPM402와 *Lactobacillus paracasei* SMP412가 *P. gingivalis*에 대한 항균효과, gingipain 유전자 발현억제 및 gingipain 효소활성 억제능이 확인되었다. *W. cibaria* SPM402 의 배양 상등액 WC402는 10 mg/mL에서 *kgp* 유전자는 0.71±0.02배 발현되었고, *rgpB* 유전자는 0.71±0.14배 발현되 약간의 발현억제 효과가 확인되었다. 반면 *L. paracasei* SMP412의 배양상등액 LP412는 10 mg/mL 농도에서 *kgp* 유전자는 0.19±0.08배, *rgpA* 유전자는 0.09±0.02배, *rgpB* 유전자는 0.24±0.03배 발현되어 LP412의 뛰어난 gingipain 유전자 발현억제 효과를 확인하였다. 10 mg/mL농도에서, Kgp 효소 활성은 WC 402에 의해 78.65±3.58% (CAG), 82.45±1.22% (CFG), LP412에 의해 80.71±2.11% (CAG), 85.81±0.05% (CFG) 억제되었다. 동일한 농도에서 Rgp 활성은 WC402에 의해 78.6±1.01% (CAG), 86.78±0.47% (CFG), LP412에 의해 82.93 ±1.26% (CAG), 88.81±0.36% (CFG) 억제되었다. 이상의 결과들을 통해 WC402와 LP412는 *P. gingivalis*에 대한 항균효과 뿐 아니라 병인인자 gingipain을 효과적으로 억제하는 기능성 유산균임을 확인하였다.

Acknowledgement

본 연구는 삼육대학교 교내연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Chae Hyeon Seo https://orcid.org/0009-0007-7006-9709
Kang So Won https://orcid.org/0009-0000-1756-0926
Sungsook Choi https://orcid.org/0000-0002-0303-0999

References

1. Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W., Periodontal diseases. *Lancet,* **366**, 1809-1820 (2005).
2. Bostanci, N., Belibasakis, G.N., *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol*. *Lett*., **333**, 1-9 (2012).
3. Abdi, K., Chen, T., Klein, B. A., Tai, A.K., Coursen, J., Liu, X., Mechanisms by which *Porphyromonas gingivalis* evades innate immunity. *PLoS ONE*, **12**, e0182164. (2017).
4. Parahitiyawa, N.B., Scully, C., Leung, W.K., Yam, W.C., Jin, L.J., Samaranayake, L.P., Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. *Oral Dis*., **16**, 136-145 (2010).
5. Aleksijević, L.H., Aleksijević, M., Škrlec, I., Šram, M., Šram, M., Talapko, J., *Porphyromonas gingivalis* virulence factors and clinical significance in periodontal disease and coronary artery diseases. *Pathogens*., **11,** 1173 (2022).
6. Xu, W., Zhou, W., Wang, H., Liang, S., Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol*., **120**, 45-84 (2020).
7. Li, N., Collyer, C.A., Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* - complex domain structures confer diverse functions. *Eur. J. Microbiol*. *Immunol*. (Bp)., **1**, 41-58 (2011).
8. Inomata, M., Ishihara, Y., Matsuyama, T., Imamura, T., Maruyama, I., Noguchi, T., Matsushita, K., Degradation of vascular endothelial thrombomodulin by arginine- and lysine-specific cysteine proteases from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontol.*, **80**, 1511-1517 (2009).
9. Rapala-Kozik, M., Bras, G., Chruscicka, B., Karkowska-Kuleta, J., Sroka, A., Herwald, H., Nguyen, K.A., Eick, S., Potempa, J., Kozik, A., Adsorption of components of the plasma kinin-forming system on the surface of *Porphyromonas gingivalis* involves gingipains as the major docking platforms. *Infect. Immun*., **79**, 797-805 (2011).
10. Farrugia, C., Stafford, G.P., Murdoch, C., *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles increase vascular permeability. *J. Dent. Res*., **99**, 1494-1501 (2020).
11. Seminario-Amez, M., López-López, J., Estrugo-Devesa, A., Ayuso-Montero, R., Jané-Salas, E., Probiotics and oral health: A systematic review. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, **22**, e282-e288 (2017).
12. Amato, M., Di Spirito, F., D'Ambrosio, F., Boccia, G., Moccia, G., De Caro, F., Probiotics in Periodontal and peri-implant health management: biofilm control, dysbiosis reversal, and host modulation. *Microorganisms*., **10**, 2289. (2022).
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)(2009), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th Informational Supplement. Document M100-S19, CLSI, Wayne, PA, USA
14. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X., An improvement of the 2ˆ(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinforma. Biomath.*, **3**, 71-85 (2013).
15. King, G., Jefferson, M., Thomas, E.L., Stein, S.H., Jefferia, J.H., Babu, J., Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* gingipain activity by prenylated flavonoid, Sanggenol A. *OJDOH*, **2**, 1-6. (2019).
16. Yang, K.M., Kim, J.S., Kim, H.S., Kim, Y.Y., Oh, J.K., Jung, H.W., Park, D.S., Bae, K. H., *Lactobacillus reuteri* AN417 cell-free culture supernatant as a novel antibacterial agent targeting oral pathogenic bacteria. *Sci. Rep.*, **11**, 1631 (2021).
17. Kugaji, M.S., Kumbar, V.M., Peram, M.R., Patil, S., Bhat, K.G., Diwan, P.V., Effect of resveratrol on biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *APMIS*., **127**, 187-195 (2019).
18. He, Z., Zhang, X., Song, Z., Li, L., Chang, H., Li, S., Zhou, W., Quercetin inhibits virulence properties of *Porphyromas gingivalis* in periodontal disease. *Sci. Rep.*, **10**, 18313 (2020).
19. Huck, O., Mulhall, H., Rubin, G., Kizelnik, Z., Iyer, R., Perpich, J.D., Haque, N., Cani, P.D., de Vos, W.M., Amar, S., *Akkermansia muciniphila* reduces *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation and periodontal bone destruction. *J. Clin. Periodontol*., **47**, 202-212 (2020)
20. Liang, S., Krauss, J.L., Domon, H., McIntosh, M.L., Hosur, K.B., Qu, H., Li, F., Tzekou, A., Lambris, J.D., Hajishengallis, G., The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. *J. Immunol*., **186**, 869-877(2011).
21. Popadiakm, K., Potempa, J., Riesbeck, K., Blom, A.M., Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J. Immunol.*, **178,** 7242-7250 (2007).
22. Potempa, J., Pike, R.N., Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun*., **1,** 70-87(2009).
23. Grenier, D., La, V.D., Proteases of *Porphyromonas gingivalis* as important virulence factors in periodontal disease and potential targets for plant-derived compounds: a review article. *Curr. Drug Targets*, **12**, 322-331 (2011).
24. O'Brien-Simpson, N.M., Holden, J.A., Lenzo, J.C., Tan, Y., Brammar, G.C., Walsh, K.A., Singleton, W., Orth, R.K.H.,

Slakeski, N., Cross, K.J., Darby, I.B., Becher, D., Rowe, T., Morelli, A.B., Hammet, A., Nash, A., Brown, A., Ma, B., Vingadassalom, D., McCluskey, J., Kleanthous, H., Reynolds, E.C., A therapeutic *Porphyromonas gingivalis* gingipain vaccine induces neutralising IgG1 antibodies that protect against experimental periodontitis. *N.P.J. Vaccines*, **1**, 16022 (2016).

25. Kong, L., Qi, X., Huang, S., Chen, S., Wu, Y., Zhao, L., Theaflavins inhibit pathogenic properties of *P. gingivalis* and MMPs production in *P. gingivalis*-stimulated human gingival fibroblasts. *Arch. Oral Biol.*, **60**,12-22 (2015).
26. Yamanaka, A., Kouchi, T., Kasai, K., Kato, T., Ishihara, K., Okuda, K., Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res*., **42**, 589-592 (2007).
27. Nagata, H., Inagaki, Y., Yamamoto, Y., Maeda, K., Kataoka, K., Osawa, K., Shizukuishi, S., Inhibitory effects of macrocarpals on the biological activity of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol. Immunol*., **21**, 159-163 (2006).