



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월24일
(11) 등록번호 10-2503641
(24) 등록일자 2023년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/747 (2015.01) A61P 1/04 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) C12R 1/245 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0095944
(22) 출원일자 2021년07월21일
심사청구일자 2021년07월21일
(65) 공개번호 10-2023-0014515
(43) 공개일자 2023년01월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR101718465 B1
KR1020200145941 A*
조선일보 기사, 조성호, [독자적 배양 기술로 ‘포스트바이오틱스’ 개발] (2021.06.22.)*
한국미생물학회지, 1984, 19(1):41-48.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 에치와이
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
정승희
인천광역시 연수구 송도국제대로 261 (송도동)
홍동기
경기도 용인시 기흥구 금화로 82번길 17
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박혁

전체 청구항 수 : 총 5 항

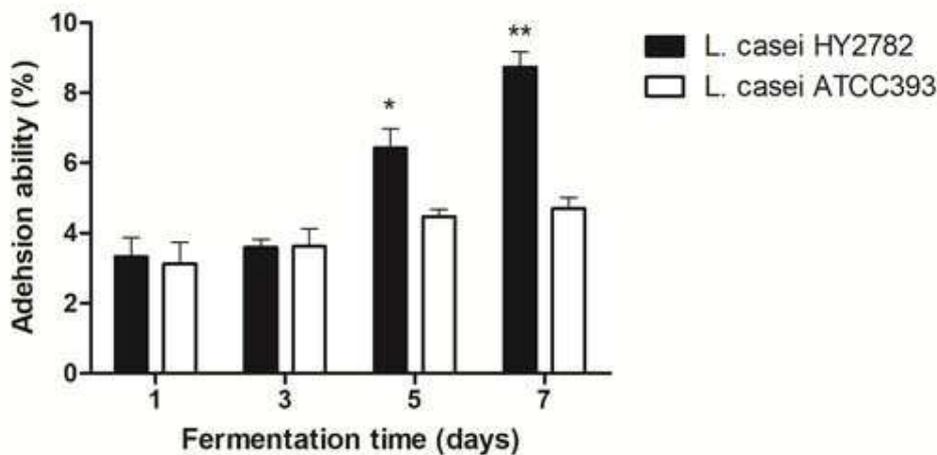
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 프로바이오틱스의 장기 배양공법

(57) 요약

본 발명은 프로바이오틱스의 장기 배양공법에 관한 것으로, 상기 프로바이오틱스 장기 배양 방법 (Long-Term Fermentation)은 종래 프로바이오틱스 배양 기간에 비하여, 프로바이오틱스를 장기간 배양함으로써 프로바이오틱스의 장 세포 부착 능력을 증가 시키고, 장벽강화 기능을 나타내는 밀착연접단백질의 증가, 구체적으로는 ZO-1, 오클루딘 (Occludin, OCLN), CLDN1 및 CLDN3 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시킬 수 있으며, 산성 환경에 노출시켜 산과 담즙에 대한 적응성이 증가, 구체적으로 구강, 위산, 소/대장에서의 생존율을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 35/747 (2013.01)

A61P 1/04 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

C12R 2001/245 (2021.05)

(72) 발명자

방소정

경기도 화성시 동탄대로시범길 236 931동 301호

허 건

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85번길

심재중

경기도 용인시 수지구 신봉 2로 26 신봉자이 1차
114동 1002호

이정열

서울특별시 서초구 반포대로 310-6 105동 2904호

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 카제이 HY2782(Lactobacillus casei HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP) 균주를 배지에 접종하는 단계; 및

상기 접종된 배지의 균주를 30 내지 35℃에서 6 내지 8일간 배양하는 단계;

를 포함하는 장기 배양 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 방법으로 배양된 배양물을 포함하는 식품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 식품 조성물은 장내 부착력을 증가시키는 것인 식품 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 식품 조성물은 장내 생존율을 증가시키는 것인 식품 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 식품 조성물은 밀착연접단백질 ZO-1, 오클루딘 (Occludin, OCLN), CLDN1 및 CLDN3 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것인 식품 조성물.

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 프로바이오틱스의 장기 배양공법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 프로바이오틱스(Probiotics)는 '장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제제'라

고 Fuller가 1989년 정의한 것을 시작으로 2001년에 발표된 '충분한 양을 섭취하였을 때 숙주의 건강에 도움이 되는 살아있는 미생물'이라는 FAO/WHO 정의가 널리 사용되고 있다. 이에 더하여 1999년 Salminen 등은 '숙주에 유익한 작용을 갖는 미생물 제제 또는 미생물의 성분'으로 정의하여 생균에서부터 사균으로까지 프로바이오틱스의 범위를 확대시킨 해석도 있다. 프로바이오틱스를 포함한 인간의 장내 미생물이 인간의 건강에 중요한 영향을 미친다는 연구결과 및 과학적 자료가 증가함에 따라 프로바이오틱스에 대한 소비자들의 인식이 더욱 확대되었으며, 그에 따라 프로바이오틱스 제품의 수요가 점차 증가하고 있다. 현재 식약처에서 등재한 락토바실러스(Lactobacillus) 11종(*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. delbruekii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*)과 락토코커스(Lactococcus) 1종(*Lc. lactis*), 엔테로코커스(Enterococcus) 2종(*E. faecium*, *E. faecalis*), 스트렙토코커스(Streptococcus) 1종(*S. thermophilus*), 비피도박테리움(Bifidobacterium) 4종(*B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis subsp. lactis*)까지 19종의 균주에 대하여 프로바이오틱스로 고시하였고 많은 기업체들이 프로바이오틱스에 대한 연구 및 제품을 판매하고 있다.

[0004] 유산균이 프로바이오틱스로 특성화 되려면 위와 십이지장을 통과하여 최종적으로 장에 도달하고 장 상피 세포에 부착하여 기능성을 나타내야한다. 프로바이오틱스는 장 점막에서 장벽 기능 향상에 기여할 수 있으며 장 상피 세포의 다양한 신호 시스템을 조절하여 밀착연접 구조의 생리적 장벽 기능을 돕는 단백질 형성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 프로바이오틱스가 장 환경 및 장 상피 세포와의 긍정적인 상호작용을 통해 건강 증진 효과를 나타내기 위해서는 장에 정착하여 서식화 하는 능력이 필수적이다. 대표적인 상업용 프로바이오틱스인 비피도 박테리아가 인간의 장 환경에 서식하는 데 필요한 기능을 상실한 것으로 보고 되었습니다. 따라서 프로바이오틱스를 경구로 복용 할 경우 생존 능력과 장에 도달하고 장 환경을 공동화하는 능력을 조사 할 필요가 있다. 이전 연구에 따르면 젖산균이 일정 시간 동안 산성 환경에 노출되면 산과 담즙에 대한 적응성이 증가 한다고 보고 되었다. 또한 산성 스트레스가 장 세포에 부착하는 유산균의 능력을 향상시킬 수 있다고 알려졌다. 이전 연구에 따르면 *L. casei* ATCC 393은 실험관 실험에서 상당한 장 부착 능력을 가지고 있다고 알려져 있다.

[0005] 한편, 발효유 개발에 있어, 유산균의 배양기간은 품질유지기한 내 프로바이오틱스 생존력 및 스타터 배양과의 상호 작용, 제품의 감각적 특성을 고려하여 결정된다. 이전 연구에서는 유산균의 성장과 신진대사가 24시간 배양 후 대부분이 중단되는 것으로 알려져 있다.

[0006] 그러나, 일부 균주에 있어서는 성장과 신진대사가 일치하지 않는 것이 알려졌고, 산성환경에 노출된 젖산 박테리아는 산과 담즙에 대한 적응성이 증가된다는 것이 알려졌다.

[0007] 이에, 본 발명의 발명자들은 장 부착 능력을 높이기 위한 연구를 한 결과, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 1. KR 10-2019-0075791 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 일 양상은 락토바실러스 카제이 HY2782(Lactobacillus casei HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP) 균주를 배지에 접종하는 단계 및 상기 접종된 배지의 균주를 25 내지 40℃에서 5 내지 9일간 배양하는 단계를 포함하는 장기 배양 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 방법으로 배양된 배양물을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 방법으로 배양된 배양물을 포함하는 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 락토바실러스 카제이 HY2782(Lactobacillus casei HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP) 균주를 배지에

접종하는 단계 및 상기 접종된 배지의 균주를 25 내지 40℃에서 5 내지 9일간 배양하는 단계를 포함하는 장기 배양 방법을 제공한다.

- [0015] 상기 접종하는 단계는 락토바실러스 카제이 HY2782(Lactobacillus casei HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP) 균주를 배지에 접종하는 단계이다.
- [0016] 상기 락토바실러스 카제이 HY2782(Lactobacillus casei HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP) 균주가 접종되는 배지는 유산균의 성장 및 대사에 요구되는 영양성분을 포함하지만 한다면 배지 종류는 크게 제한되지 않으며, 유산균 성장 및 대사에 최적의 공지의 배지를 사용할 수 있다. 구체적으로 MRS 배지, TGY 배지, BHI 배지, M17 배지, 탈지유(skim milk) 배지 등이 있을 수 있으며, 구체적으로는 탈지유 및 포도당을 포함하는 배지를 사용할 수 있다.
- [0017] 또한 배지의 pH 는 유산균 균주가 생육, 대사할 수 있는 범위라면 크게 제한되지 않으며, 일 예로 약 pH 4.5~7.0이다.
- [0018] 상기 배양하는 단계는 상기 접종된 배지의 균주를 25 내지 40℃에서 5 내지 9일간 배양하는 것으로, 본 발명의 일 구체예에서, 상기 배양하는 단계는 30 내지 35℃에서 6 내지 8일간, 더욱 구체적으로 30℃에서 7일간 배양하는 것일 수 있다. 일반적으로 유산균은 짧게는 6시간 내지 길게는 3일 정도만 배양시키는데, 이는 유산균을 장기 배양할 경우 유산균의 성장율의 저하, 제조된 배양물을 활용한 제품의 감각적 특성 저하와 품질유지기한의 단축의 문제를 고려할 것이다. 그러나 최근 유산균이 일정 시간 동안 산성 환경에 노출되면 산과 담즙에 대한 적응성이 증가한다는 것과 산성 환경의 스트레스가 유산균의 장 세포 부착 능력이 증가한다는 것이 알려졌다. 따라서, 본 발명에서는 유산균을 산성 환경 노출시켜 산과 담즙에 대한 적응성 증가를 통한 구강, 위산, 소/대장에서의 생존율 증가와 장 세포 부착 능력을 높이기 위해 유산균을 종래의 배양 기간보다 장기배양 (Long-Term Fermentation, LTF), 구체적으로 5 내지 9일간 배양시키는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 방법으로 배양된 배양물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0021] 상기 배양물이란 특정 미생물을 배양 배지에서 배양하여 수득한 배양액, 농축 배양액, 배양액의 건조물, 배양 여과액, 농축 배양 여과액, 또는 배양 여과액의 건조물을 의미하며, 상기 배양액은 특정 균주들을 포함하는 것을 의미하고, 상기 배양 여과액은 특정 균주들을 실질적으로(여기서, 실질적으로는 여과 등에 의해 분리되는 특정 균주들을 배제한다는 것을 의미하는 것으로서 여과액에 균주들이 완전히 배제된다는 것을 의미하지는 않는다) 포함하지 않는 것을 의미한다. 상기 배양물은 그 제형이 한정되지 아니한다.
- [0022] 상기 식품 조성물은 장내 부착력을 증가 및/또는 장내 생존율을 증가시키는 것일 수 있다. 전술한 바와 같이, 본 발명의 배양액은 프로바이오틱스를 장기 배양하여 얻어진 것이기 때문에, 프로바이오틱스는 장기 배양 과정에서 프로바이오틱스의 대사, 발효 등으로 생성되는 물질과 산성 환경의 스트레스에 노출되어 장 세포 부착능력이 증가되어 있고, 이를 통해 프로바이오틱스 배양액을 포함하는 식품 조성물은 장내 부착력을 증가 및 장내 생존율을 증가시킬 수 있다. 또한 장벽강화 기능을 나타내는 밀착연접단백질의 증가, 구체적으로는 ZO-1, 오클루딘 (Occludin, OCLN), CLDN1 및 CLDN3 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시킬 수 있다. 상기 발현 증가는 단백질의 생성 증가뿐만 아니라, DNA 또는 mRNA의 발현 증가를 의미할 수 있다.
- [0023] 이와 관련하여, 장내 자극이나 손상으로 인해 장 세포들 간의 밀착연접이 느슨해지면, 유해 물질 (가령, 병원균, 독성물질, 항원 등)이 장 상피에서 과량 투과되어 면역 시스템의 혼란과 염증 반응이 유발된다. 특히, 밀착연접이 느슨해져 장 투과성이 증가된 상태를 장 누수증후군이라 부르고, 이는 복부팽만, 설사, 복통 과민성 대장 증후군 등의 질환을 유발한다. 이 때 본 발명의 조성물은 ZO-1, 오클루딘 (Occludin, OCLN), CLDN1 및 CLDN3 중 어느 하나 이상의 발현 증가를 통해 장벽기능을 강화시키고 이를 통해 장 질환을 예방 또는 개선할 수도 있다.
- [0024] 또한, 상기 식품 조성물은 구강, 위산, 소/대장에서의 생존율 증가된 것일 수 있다. 전술한 바와 같이 장기 배양을 통해 유산균을 산성 환경에 노출시킴으로써 산과 담즙에 대한 적응성이 증가되었고, 그를 통해 구강, 위산, 소/대장에서의 생존율 증가와 장 세포 부착 능력을 높아진 것일 수 있다.
- [0025] 상기 식품 조성물은 장 질환 예방 또는 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 건강기능식품 또는 기능성 음료로 용이하게 활용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0026] 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨

가제, 건강기능식품 및 기능성 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

- [0027] 본 발명에 따른 상기 식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 상기 식품으로는 특수영양식품 (예, 조제유류, 영, 유아식등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류 (예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품 (예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류 (예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품 (예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료 (예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0028] 상기 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 상기 기능성 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 장 질환 증상의 개선 또는 예방용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0030] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본 발명의 식품 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 예시로 상기 배양물은 50 내지 500 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 더욱 구체적으로 300 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 농도일 수 있다. 상기 배양물이 상기 범위 외의 농도일 경우 본 발명이 목적하는 장내 부착력의 증가 및 장내 생존율의 증가 효과를 얻기 어렵다.
- [0032] 본 발명의 식품 조성물의 일 예시로, 식품에 포함되는 배양물의 양은 전체 식품 조성물 중량의 0.001중량% 내지 100중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 1중량% 내지 99중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 50g, 바람직하게는 0.01g 내지 1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명은 상기 방법으로 배양된 배양물을 포함하는 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명에 있어서, "염증성 장 질환"이란 염증에 의해 발생하는 장 질환을 의미하며 장의 정상적인 기능 손상에 의해 야기되는 질환을 포함한다.
- [0036] 상기 염증성 장 질환(IBD)은 크론병, 베체트병에 수반되는 장 병변, 궤양성 대장염, 출혈성 직장 궤양 및 회장낭염을 포함하며, 크론병 및 궤양성 결장염을 포함하는 질환군을 지칭한다. 궤양성 결장염은 단지 대장에만 영향을 미친다. 궤양성 결장염에서의 염증 및 궤양은 대장의 4개 층 중 가장 안쪽에 있는 2개의 층인 점막층 및 점막하층에 제한된다. 크론병에서 염증 및 궤양은 소장 및 대장 둘 다에서 장벽의 모든 층을 통해 확장할 수 있다.
- [0037] 한편, 과민성 대장 증후군은 기질적 원인이 없이 장기간 반복되는 복부팽만감 등의 복부 불편감 및 복통과 더불어 설사, 변비 등의 배변 습관의 변화를 동반하는 만성 질환이며 그 증상이 정신적인 요인이나 스트레스를 유발하는 사회 환경에 의해서 악화되기도 한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, "예방"이란 상기 조성물의 투여로 장 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 포함한다.
- [0039] 본 발명에 있어서, "개선"이란 치료 또는 증상의 경감을 의미하고, 구체적으로는 장 질환의 치료 또는 증상의

경감을 의미한다.

- [0040] 본 발명에 따른 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물은 상기 배양물 그 자체로도 구성될 수 있으나, 구체적으로는 보관 안정성, 제형으로의 가공성, 제품에서의 다른 성분과의 양립성 등을 향상시키기 위해 다양한 보조 첨가제를 더 포함할 수 있다. 사용되는 보조 첨가제는 그 기능에 따라, 계면활성제, 증강제, 점도 조절제, 착색제, 향미료 등 그 종류가 다양하며, 구체적으로 글리세린(Glycerin), 캐스터 오일 (Caster oil), 글리신(Glycine), 트윈(Tween), 덱스트린(Dextrin), 유기산(예를 들어, 락트산, 타르타르산, 아딕산, 숙신산, 시트르산, 아스코르브산, 글리콜산, 말산, 만델산, 아세트산, 소르브산, 벤조산, 및 살리실산), 향균 효소, 당, 당 알코올, 구아 검, 셀룰로오스 검, 실리콘 소포제, 인공 감미료 등이 있다. 또한, 본 발명의 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물은 액상 형태, 고형의 분말 형태, 또는 에멀전 형태로 존재할 수 있으며, 보관 안정성 및 취급의 용이성을 고려할 때 에멀전 형태인 것이 바람직하다. 분말 형태의 조성물의 제조방법은 일 예로 배양물에 완충제(Buffering agent)로 글리신(Glycine)을 소량 첨가하여 용해시키고, 농축한 후 분무건조기(Spray dryer) 또는 동결건조기로 건조하는 방법일 수 있다. 액상 형태의 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물의 제조방법은 일 예로 배양물에 글리세린(Glycerin), 덱스트린(Dextrin)을 소량 첨가하고 용해시킨 후 젖산(Lactic acid)으로 pH를 5.0으로 조정하는 방법일 수 있다. 에멀전 형태의 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물의 제조방법은 일 예로 배양물에 유상 매질 및 유화 안정제를 첨가하고 전단력을 가하여 에멀전화시키는 단계를 포함하는 방법일 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 락토바실러스 카제이 HY2782균주의 장기 배양물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, 용어 "유효량(또는, 유효한 양)"은 바람직한 효과를 전달하기에는 매우 충분하지만 의학적 판단 범위 내에서 심각한 부작용을 충분히 방지할 정도로 적은 양을 의미한다. 본 발명의 조성물에 의하여 체내에 투여되는 배양물의 양은 투여 경로, 투여 대상을 고려하여 적절하게 조정될 수 있다.
- [0043] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.
- [0044] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 부형제, 희석제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다. 본 발명의 약학적 조성물은 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 상기 유효성분 이외에 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 활택제, 결합제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 1종 이상 사용할 수 있다. 붕해제로는 한천, 전분, 알긴산 또는 이의 나트륨염, 무수인산일수소 칼슘염 등이 사용될 수 있고, 활택제로는 실리카, 탈크, 스테아르산 또는 이의 마그네슘염 또는 칼슘염, 폴리에틸렌 글리콜 등이 사용될 수 있으며, 결합제로는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨카복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리딘, 저치환도 하이드록시프로필셀룰로오스 등이 사용될 수 있다. 이외에도 락토즈, 텍스트로오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로오스, 글리신 등을 희석제로 사용할 수 있으며, 경우에 따라서는 일반적으로 알려진 비등 혼합물, 흡수제, 착색제, 향미제, 감미제 등을 함께 사용할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은 대상 개체에 매일 일회 이상 투여될 수 있다. 단위 투여량은 사람 피험자 및 다른 포유동물을 위한 단위 투여에 적합하게 물리적으로 분리된 단위를 의미하며, 각 단위는 적절한 약학적 담체를 포함하며 치료 효과를 나타내는 본 발명의 배양물의 예정된 양을 함유한다. 성인 환자의 경구 투여용 투여 단위는 본 발명의 배양물 0.001 g 이상을 함유하는 것이 바람직하며, 본 발명의 약학적 조성물 경구 투여량은 일회에 0.001 내지 1,000 g, 바람직하게는 0.01 내지 400 g이다. 본 발명의 배양물의 약학적 유효량은 0.01 내지 200 g/1일이다. 그러나, 투여량은 환자의 장 질환의 심각도 및 사용되는 미생물과 보조 유효 성분에 따라 가변

적이다. 또한, 일일 총 투여량을 여러 횟수로 분할하여 필요에 따라 연속적으로 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량 범위는 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 아니한다.

발명의 효과

[0049] 본 발명의 프로바이오틱스의 장기 배양 방법 (Long-Term Fermentation)은 종래 프로바이오틱스 배양 기간에 비하여, 프로바이오틱스를 장기간 배양함으로써 장 세포 부착 능력을 증가 시키고, 장벽강화 기능을 나타내는 밀착연접단백질의 증가, 구체적으로는 ZO-1, 오클루딘 (Occludin, OCLN), CLDN1 및 CLDN3 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시킬 수 있으며, 산성 환경에 노출시켜 산과 담즙에 대한 적응성이 증가, 구체적으로 구강, 위산, 소/대장에서 생존율을 증가시킬 수 있다. 상기 장기 배양을 통해 얻어진 배양물을 활용하여 장 질환을 예방 또는 개선시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1 은 *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393를 이용한 발효유의 물리 화학적 특성을 확인한 결과이다 (도 1 (a) pH, 도 1 (b) 적정 산도 (TA) 및 도 1 (c) *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393을 이용한 발효유의 배양시간에 따른 생균 수). 결과는 세 번의 독립적인 실험 (n = 3)의 평균 ± SD으로 표시함.

도 2는 *Lactobacillus casei* HY2782 (a) 또는 *L. casei* ATCC393 (b)를 이용한 발효유의 소화관 생존율을 나타낸 결과이다. 발효 1일차 샘플과 비교하여 통계적으로 유의미한 차이를 표시하였다 (* p <0.05, ** p <0.01).

도 3은 *Lactobacillus casei* HY2782 및 *L. casei* ATCC393을 이용한 발효유의 HT-29 세포에 대한 장 부착 능력을 나타낸 결과이다. 발효 1일차 샘플과 비교하여 통계적으로 유의미한 차이를 표시하였다 (* p <0.05, ** p <0.01).

도 4는 *Lactobacillus casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393의 배양시간에 따른 발효유샘플을 Caco-2 세포에서 10 시간 처리한 후 밀착연접단백질 ZO-1 (a), OCLN (b), CLDN1 (c) 및 CLDN3 (d)을 코딩하는 유전자의 상대적 mRNA 발현량을 확인한 결과이다. 발효 1 일차 각 샘플과 통계적으로 유의미한 차이를 표시하였다(* p <0.05, ** p <0.01).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1: LTF 공법으로 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 배양 및 발효유의 제조**

[0055] *L. casei* HY2782는 한국야쿠르트 프로바이오틱스 라이브러리에서 확보 하였으며, *L. casei* ATCC393은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 이후 *L. casei* 균주는 MRS 배지 (BD Difco, Maryland, USA)에서 37 ° C에서 24 시간 동안 혐기조건에서 배양한 후 1 ml을 취하여 탈지유 (RSM; Oxoid, Basingstone, UK) 에 접종하고 37 ° C에서 24 시간 동안 배양하되, 접종 농도는 MRS 한천배지 에서 37 ° C에서 72 시간 동안 측정하였다.

[0056] 그리고, 두 가지 프로바이오틱 균주 각각에 대해 3 % 포도당과 10 % 탈지분유를 물에 용해하여 교반하고 90℃에서 60분 동안 가열한 뒤, 우유를 30° C로 빠르게 냉각하고 살균처리된 사립유에 준비된 접종균을 각각 1 %를 무균적으로 접종하고 30 ° C에서 7 일 동안 배양하여 발효유를 제조하였다.

[0058] **실험예 1: 재료 및 방법**

[0059] 이후의 실험 결과는 아래의 재료 및 방법으로 얻었다.

[0060] 1-1. pH 측정

[0061] 샘플의 pH는 표준 pH 미터 (Mettler Toledo, Switzerland)를 사용하여 25 ° C에서 측정하였다.

[0063] 1-2. 적정산도

[0064] 적정산도 (TA)는 0.5 % 페놀프탈레인을 지표로 사용하여 0.1N NaOH로 각 샘플 9g을 적정하여 측정 되었습니다. 결과는 젖산 g / 100g으로 표시되었다.

[0066] 1-3. 유산균 수

[0067] *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393을 함유한 발효유 1ml를 멸균펩톤 수 (Oxoid) 9mL에 희석하고 적절한 희석액을 MRS 한천 (Difco BD, Sparks, MD)에 도말하고 37 °C에서 72 시간 동안 배양하였고, 유산균 수를 확인하였다.

[0068]

[0069] 1-4. 프로바이오틱스 소화관 생존율

[0070] SSF (모사 타액), SGF (모사 위액) 및 SIF (모사 장액)를 준비하였다. 모사된 타액, 위액, 장액은 실험진행 전에 37 °C로 가열되었다. *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393이 포함 된 5 mL의 발효유를 50 mL 튜브에 계량하였다. SSF에 0.3 M CaCl₂ X 2H₂O 26 μL, 증류수 976 μL 및 6.55 mg / mL α-아밀라아제 용액 4 mL를 첨가하여 경구 단계를 수행하였다. 그 후 1M NaOH를 첨가하여 pH를 7로 올리고, 혼합물을 계속 흔들면서 37 °C에서 2 분 동안 배양하였다. 앞서 언급 한 단계에서 위 단계는 0.3 mol / L CaCl₂ X 2H₂O 6 μL, 증류수 및 용액 694 μL, SGF에 0.07 mg / mL 펩신 9.1 mL를 첨가하여 수행되었다. 1M HCl을 첨가하여 pH를 3으로 조정하고, 혼합물을 37 °C에서 2 시간 동안 지속적으로 흔들면서 인큐베이션 하였다. 앞서 언급한 단계에서 위액 소화물은 2 시간 동안 흔들면서 37 °C에서 유지되었다. 마지막으로, 장액 소화물은 40 μL의 0.3 M CaCl₂ X 2H₂O, 1.31 mL의 증류수, 2.5 mL의 160 mM 담즙 추출물 및 16 mL의 22.15 mg / mL 췌장 용액과 SIF에 혼합되었다. 1M NaOH를 첨가하여 pH를 7로 올리고, 혼합물을 계속 흔들면서 37 °C에서 2 시간 동안 배양하였다. 각 단계가 끝날 때 부분 표본을 수집하여 얼음 위에 놓았다. 발효유에서 *L. casei* HY2782 및 *L. casei* ATCC393의 생존율은 소화 전 단계와 각 단계에서 측정 된 대조군 샘플의 생존율과 비교하였다.

[0072] 1-5. 대장세포 배양

[0073] 인간 결장 직장 선암 세포주 HT-29 및 Caco-2를 사용하였다. 두 세포주 모두 미국의ATCC에서 구입했습니다. 이 두 세포주는 Dulbecco의 Modified Eagle 배지 (Gibco, USA)에 10 % 소태아혈청 (FBS; Gibco) 및 1 % 페니실린 및 스트렙토마이신을 첨가하여 37 °C, CO₂ 5% 에서 배양하였다.

[0075] 1-6. 부착율 측정

[0076] 세포를 1.0 x 10⁴ 세포 / 웰로 6-well 플레이트에 분배하고 각 샘플을 PBS에서 1.0 x 10⁸ CFU / mL로 희석하여 각 웰에 접종하고 5 % CO₂, 37 °C에서 2 시간 동안 배양하였다. HT-29 세포에 유산균의 부착율을 확인 하기 위하여 세포를 PBS로 3 회 세척하고 0.05 % 트립신-EDTA로 10 분간 처리하여 세포를 분리하였다. 분리 된 세포를 멸균 펩톤 수로 단계적으로 희석하고 MRS 한천 플레이트에 접종하였다. 플레이트를 37 °C에서 72 시간 동안 배양하여 콜로니 (A₁, CFU / mL)를 계수하였다. *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393 발효유 샘플의 처리 균수를 분석했습니다 (A₀, CFU / mL). 부착율은 다음과 같이 계산하였다.

[0078] % 부착율 = (A₁/A₀) X 100

[0080] 1-7. mRNA 발현 분석

[0081] Caco-2 결장암 세포주를 6-well 배양 플레이트의 웰에 3×10세포/웰의 밀도로 접종하였다. 그런 다음 배지는 1-2 일마다 새로 교체하였다. Caco-2 단층은 분화하기 위해 21 일 동안 주입되었다. *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393을 함유하는 발효유를 PBS에서 1.0 x 10⁸ CFU / mL로 희석하고 6 개의 웰에 접종하였다. 10 시간 노출 (37 °C, 5 % CO₂) 후 용액을 제거하고 단층을 PBS로 세척하였다. 총 RNA는 RNeasy Mini Kit (QI-AGEN, San Diego, CA, USA)를 사용하여 정제 된 Caco-2 세포에서 추출되었으며 Dnase 처리는 제조업체의 지침에 따라 사용되었다. RNA 농도 및 순도는 제조업체의 지침 (NanoDrop Technologies Inc., DE, USA)에 따라 NanoDrop ND-1000 UV / Vis 분광 광도계를 사용하여 측정하였다. RNA 무결성은 bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, USA)을 사용하여 평가되었으며 RNA 무결성 번호가 ≥ 8 인 샘플 만 mRNA 실험에 사용되었다. 총 RNA는 High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 역전사되었다. 실시간 증합 효소 연쇄 반응 (RT-PCR) 분석은 TaqMan 유전자 발현 Mastermix (Life Technologies, Austin, TX, USA)를 사용하여 QuantStudio 6 Real-Time PCR 시스템 (Thermo Fisher 150 Scientific)에서 수행되었다. 열 순환 조건 : 50 °C에서 1 분 동안 열 활성화 및 95 °C에서 10 분 동안 변성, 이어서 95 °C에서 15 초 및 60 °C에서 1 분 동안 40 사이클. TaqMan 프로브 (Applied Biosystems)를 사용하여 다음 유전자를 측정하였다. 글리세르 알데히드-3-포스페이트 탈수소 효소 (GAPDH, Hs02786624_g1)를 표준으로

사용하고 밀착연접단백질 1 (ZO-1, Hs01551871_m1), 오클루딘(OCLN, Hs05465837_g1), claudin 1 (CLDN1, Hs00221623_m1) 및 claudin 3 (CLDN3, Hs00265816_s1)는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 각 표적 유전자의 상대적 발현을 계산하기 위해 사용되었다. 이러한 분석은 MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-TimePCR experiments) 지침에 따라 수행되었다.

[0083] 1-8. 통계적 분석

[0084] 모든 데이터는 MS Excel (버전 2016; Microsoft, Redmond, WA, USA)에서 수집되었다. 데이터는 3 개의 독립적인 실험의 평균 \pm SD의 대표적인 결과입니다. 상대 수준의 차이는 SPSS 소프트웨어 (버전 26, IBM, Somers, NY, USA)에서 짝을 이루지 않은 Student 's t-test에 의해 평가되었으며 p 값이 <0.05 (*) 또는 <0.01 (**) 인 항목은 통계적으로 고려되었다.

[0086] 실험예 2: 실험 결과

[0087] 2-1. 유산균 생장 특성

[0088] *L. casei* HY2782 및 *L. casei* ATCC393의 배양과정 중 미생물 활성으로 인해 pH와 적정산도의 변화를 확인하였다. 사용된 프로바이오틱스 균주에 따라 탈지유의 pH는 7 일 발효 후 6.7에서 3.51-3.67으로 감소하였다 (도 1 (a)). *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393을 사용한 발효유의 적정산도는 발효 7 일 후 초기 값인 0.27에서 1.89-2.31로 증가하였다 (도 1 (b)). 발효유에서 *L. casei* HY2782 및 *L. casei* ATCC393의 생존 가능 계수의 변화는 배양과정 전반에 걸쳐 결정되었다. *L. casei* HY2782는 2 일째에 가장 높은 성장률과 가장 높은 생균 수, 특히 8.50×10^9 CFU / mL를 보였고, 발효 3 일의 7.10×10^9 에서 7.00×10^9 CFU / mL로 약간 감소했다. 7 일 배양과정에서 *L. casei* ATCC393의 경우 가장 높은 생균 수 3.88×10^9 CFU / mL으로 3 일 째에 관찰되었으며, 4 일 발효 후 2.13×10^9 CFU / mL으로 약간 감소하였으며, 7 일차에 3.09×10^9 CFU / mL 으로 나타났다 (도 1 (c)). 두 프로바이오틱스 균주는 모두 장기 배양 과정에서 낮은 pH와 높은 TA를 나타내었으나, 생균 수의 감소는 유의적으로 나타나지 않았다.

[0090] 2-2. 소화모델에서의 프로바이오틱스 생존율

[0091] 다양한 배양 시간에 대한 *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393을 함유 한 발효유는 모의 구강, 위, 장 단계를 기반으로 평가되었으며, 소화전 생존율을 대조군으로 사용하였다. 구강 단계에서 *L. casei* HY2782 1일차 발효유 91.2 % 에서 7일차 발효유 99.7 %으로 생존율이 약간 증가했으며, *L. casei* ATCC393 1일차 발효유67.8 % 에서 7일차 발효유 86.6 %으로 1일차 발효유의 생존율 대비 7일차 발효유가 유의적으로 생존율이 증가하는 것을 확인하였다. 위 단계에서는 발효 7 일 후 *L. casei* HY2782 (27.8 % ~ 76.1 %)와 *L. casei* ATCC393 (14.6 % ~ 71.8 %)의 생존율이 초기 단계의 생존율에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인 하였다. 장 단계에서는 발효 7일 후 *L. casei* HY2782 (9.8 % ~ 48.3 %)와 *L. casei* ATCC393 (8.8% ~ 29.4%)의 생존율이 1일차 발효유와 비교하여 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. *L. casei* HY2782는 *L. casei* ATCC393 (도 2 (b)) 과 비교하여 모사된 소화관 모델에서 장기 배양 (도 2 (a)) 과정 중 유의적으로 더 높은 생존율을 나타냈다. 이러한 결과를 바탕으로 장기 배양을 진행을 통하여 소화과정에서 프로바이오틱스의 생존율을 향상 시킴을 확인하였다.

[0093] 2-3. 장 부착능력

[0094] 장 상피 세포에 부착하는 *L. casei* HY2782 및 *L. casei* ATCC393의 능력은 프로바이오틱스 균주의 선택을 위한 하나의 주요기준이다. 프로바이오틱스의 점막 부착 시간이 길어지면 위장 면역 체계와 숙주에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 장에 대한 접착력은 프로바이오틱스 균주의 효율성과 일치한다. 도 3에서 볼 수 있듯이, *L. casei* HY2782의 발효 1일차 샘플은 장 부착율이 3.3 % 에서 발효 7일차 샘플 8.7 %으로 장 세포에 대한 부착력이 크게 증가한 반면, *L. casei* ATCC393의 경우 발효 1일차 샘플은 3.1% 에서 발효 7일차 샘플은 4.7% 으로 부착력이 약간 증가하였다. 이 결과를 바탕으로 *L. casei* HY2782는 장기 배양을 통해 장내 부착력을 향상 및 그에 따른 장내 생존율을 향상 시킬 수 있음을 확인하였다 (도 3).

[0096] 2-4. 밀착연접단백질 관련 유전자 발현

[0097] *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393을 이용한 발효유가 다양한 배양시간에서 Caco-2 세포에 미치는 영향의 분자 메커니즘을 조사하기 위해, 밀착연접단백질 TJP1 (ZO-1), occludin (OCLN), claudin-1 (CLDN1) 및 claudin-3 (CLDN3)을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 qRT-PCR을 통해 확인하였다 (도 4). 결과는 장기 발효의 장점을 확인하였습니다. Caco-2 단층에서 밀착연접단백질 관련 유전자 발현의 증가는 장벽 강화기능의 조절에 중

요하다. *L. casei* HY2782 또는 *L. casei* ATCC393을 처리 한 Caco-2 세포는 ZO-1 (도 4 (a)), OCLN (도 4 (b)), CLDN1 (도 4 (c)) 및 CLDN3 (도 4 (d))의 발현이 처리되지 않은 컨트롤에 비해 증가되는 것을 확인하였다. 특히 *L. casei* HY2782의 1일차 에서 7일차 발효유를 처리하였을 경우 ZO-1 (1.21에서 1.63), OCLN (1.29에서 2.42), CLDN1 (1.13에서 1.77) 및 CLDN3 (1.26에서 2.0) 유의적으로 크게 증가했다. 그러나 *L. casei* ATCC393의 1일차 에서 7일차 발효유를 처리 하였을 경우 ZO-1 (1.18 에서 1.19), OCLN (1.22 에서 1.19), CLDN1 (1.12 에서 1.28) 및 CLDN3 (1.23에서 1.22)으로 장기 배양에 따른 증가가 발생하지 않았다. 이 결과를 통하여 *L. casei* HY2782는 장기간 발효를 통해 장세포에서 밀착연접단백질 관련 mRNA 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 *L. casei* HY2782는 장기 배양을 통하여 장벽 기능을 향상시킬 수 있다.

[0099] **실험예 3: 고찰 및 결론**

[0100] 상기의 결과를 통해 *L. casei* HY2782균주가 장기 배양을 통하여 소화관의 생존율 증가, 장 세포에 대한 부착능력 향상, 장 장벽 강화를 통한 점막 보호와 같은 유익한 효과가 있음을 확인하였다.

[0101] 상기한 결과를 통해 *L. casei* HY2782 균주가 배양 시간에 따라 밀착연접에 관련된 유전자의 발현증가와 소화과정에서 향상된 생존력 및 장 부착 능력의 증가를 보여 주었기 때문에 배양시간의 중요성을 확인하였다.

[0102] 구체적으로, *L. casei* HY2782를 함유 한 발효유의 효능을 발견하기 위해 장기 배양방법을 고려하였다. *L. casei* HY2782균주가 장기 배양을 통하여 소화관 생존율 및 장 부착 능력, 밀착연접단백질에 관련된 유전자의 발현이 향상되는 효과 등의 유익한 특성을 가지고 있음을 확인하였다.

[0104] **실시예 2: 식품 조성물의 제조**

[0105] **실시예 2-1. 기능성 음료의 제조**

[0106] 먼저 액상과당 13 중량%, 백설탕 2.5 중량%, 갈색설탕 2.5 중량%, 혼합과즙농축액 56 Brix⁰ 10.9 중량%, 펙틴 1.0 중량%, 후레쉬후르츠 믹스 에센스 0.1 중량% 및 정제수 70 중량%를 30 내지 35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여, 혼합과즙시럽을 제조하였다.

[0107] 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4 중량%와 실시예 1의 균주 배양물을 동결건조시킨 동결건조 분말 0.1 중량% 및 나머지를 정제수 69.5 중량%로 조합하여 150 bar에서 균질화한 후 10℃이하로 냉각하여 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성 음료를 제조하였다.

[0109] **실시예 2-2. 건강기능식품의 제조**

[0110] 실시예 1의 균주 배양물을 동결건조시킨 동결건조 분말 0.1 중량%에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E, 초산 에스테르 및 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 실시예 4의 동결건조 분말 100 중량부 대비 10 중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기의 혼합물에 멸균 정제수 10 중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1 내지 2mm의 과립상으로 성형하였다. 성형된 과립을 40 내지 50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12 내지 14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 제조된 과립을 적당량씩 압출 성형하여 정제 또는 분말로 만들거나 경질 캡슐에 충전 하여 경질 캡슐 제품으로 제조하였다.

[0112] **실시예 3. 약학적 조성물의 제조**

[0113] **실시예 3-1. 액제의 제조**

[0114] 실시예 1의 배양물, 이성화당 및 만니톨을 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음, 정제수를 가하여 전체가 100ml가 되도록 조절하고 이를 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[0116] **실시예 3-2. 캡슐제의 제조**

[0117] 실시예 1의 배양물을 동결건조한 동결건조분말에 옥수수전분, 유당 및 스테아린산 마그네슘을 완전히 혼합한 후 약전 제제총칙 중 캡슐제 제조방법에 따라 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0119] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내

에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0121]

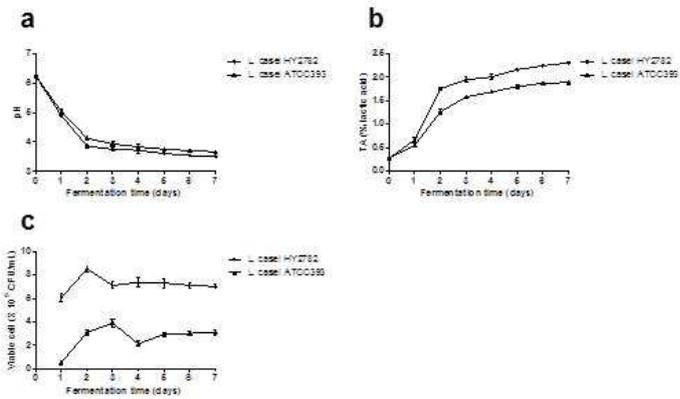
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13438P

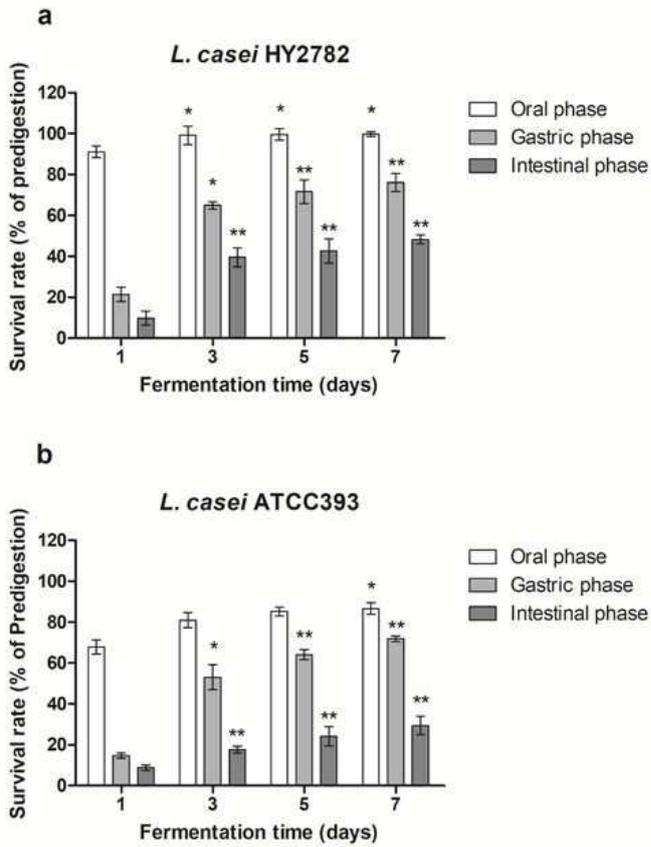
수탁일자 : 20171219

도면

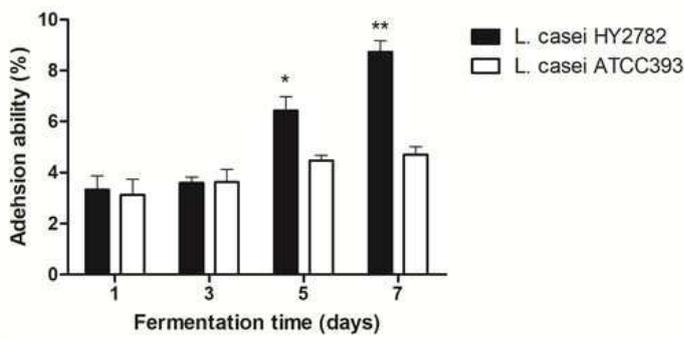
도면1



도면2



도면3



도면4

