



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월12일  
(11) 등록번호 10-2587892  
(24) 등록일자 2023년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)  
C12R 1/01 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 1/205 (2021.05)  
A23L 33/135 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2021-0096084  
(22) 출원일자 2021년07월21일  
심사청구일자 2021년07월21일  
(65) 공개번호 10-2023-0014932  
(43) 공개일자 2023년01월31일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020130079227 A\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
주식회사 에치와이  
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)  
(72) 발명자  
모성준  
경기도 수원시 팔달구 267번길 32 705호  
남보라  
경기도 용인시  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
박혁

전체 청구항 수 : 총 3 항

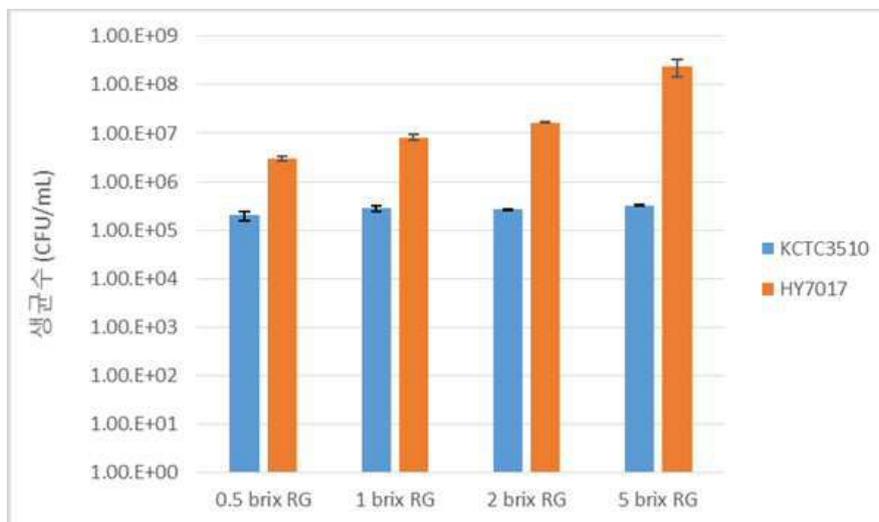
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **홍삼을 영양원으로 이용하여 균주의 특성이 강화되고 면역 기능이 증진된 락토바실러스 파라카제이 HY7017 균주 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 수탁번호 KCTC14616BP인 락토바실러스 파라카제이 HY7017 균주에 관한 것으로, 상기 락토바실러스 파라카제이 HY7017 균주는 홍삼 추출물을 영양원으로 이용하여 배양하면 증식되는 특징이 있고, 상기 균주를 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양하면 소화관 안정성, 장 부착능 및 면역기능 증진 효과를 나타낼 수 있어, 면역기능 증진용 식품 조성물 및 프로바이오틱스로 활용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2023.08)  
A23V 2200/324 (2013.01)  
A23V 2400/165 (2023.08)  
C12R 2001/01 (2021.05)

(72) 발명자

**배주현**

서울시 종로구 낙산길 198 창신쌍용 2단지 207동  
1508호

**김주연**

경기도 용인시 기흥구 탑실로 15 대주피오레 1단지

**박수동**

경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 33, 205동  
1903호 (보라동, 민속마을신창미션힐아파트)

**심재중**

경기도 용인시 수지구 신봉2로 신봉자이 1차 114동  
1002호

**이정열**

경기도 양평군 서종면 통점길 63

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170066071 A  
KR1020150050726 A  
KR102139732 B1  
KR101331171 B1  
KR100711930 B1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

수탁번호 KCTC14616BP인 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주로,  
 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양한 것인,  
 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 세포에서 NO를 발생시키거나, TNF- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$  분비량을 증가시키거나, NK세포를 활성화 시키는 것인,  
 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제 1항의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주, 이의 파쇄물 및 상기 균주 배양물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 프로바이오틱스.

**청구항 4**

제 1항의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주, 이의 파쇄물 및 상기 균주 배양물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 면역 기능 증진용 식품 조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 홍삼을 영양원으로 이용하여 균주의 특성이 강화되고 면역 기능이 증진된 락토바실러스 파라카제이 HY7017 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 면역이란, 몸 안에서 자기와 비자기를 정확히 식별하여, 자기가 아닌 비자기를 제거하는 인체의 중요한 기능이다. 면역력이 떨어지게 되면 자기와 비자기를 정확히 식별하지 못하거나 대응하지 못하여 여러 가지 질병에 걸리게 된다. 환경 오염 및 스트레스로 인하여 사람들의 전반적인 면역력이 떨어지게 되었으며, 이러한 상황 가운데 면역력을 증진시킬 수 있다고 알려져 있는 건강식품들이 흥행하고 있다. 그 중 하나가 프로바이오틱스 또는 유산균이다.

[0003] 유산균은 보통 젖산균이라고도 칭하는 최종 대사산물로 젖산을 만드는 박테리아로, 사람이나 동물의 소화관, 우유, 요구르트, 치즈, 김치, 식물 및 토양 등 자연계에 널리 분포되어 있으며, 인체의 소화계에 공생하면서 섬유질 및 복합 단백질들을 분해하여 중요한 영양 성분으로 만드는 역할을 담당한다. 이와 같이 사람을 포함한 동물의 위장관 내에서 숙주의 장내 미생물 환경을 개선하여 숙주의 건강에 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물을 통칭하여 프로바이오틱스 (probiotics)라고 한다. 최근에는 유산균에 대한 연구가 활발히 진행되어 일반식품뿐만 아니라 건강식품 및 약품으로써 이용되는 등 그 응용범위가 넓어지고 있다. 여기에 속하는 유산균은 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속, 페디오코커스(*Pediococcus*) 속, 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 스포로락토바실러스(*Sporolactobacillus*) 속, 및 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 등이 있다.

[0004] 이러한 유산균은 계속해서 연구되고 있음에도 아직 면역력 증진용 유산균은 매우 적은 편에 속한다. 그 이유는 유산균들이 소화관을 지나치며 대부분을 생존하지 못하기도 하고, 면역 반응을 활성화 시키는 것 자체가 너무나 어려운 과제이기 때문이다. 그러므로 면역반응을 증진시킬 수 있는 프로바이오틱스 개발이 필요한 실정이다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록공보 제10-1773059호(2017.08.31)

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 일 양상은 수탁번호 KCTC14616BP인 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주를 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주, 이의 파쇄물 및 상기 균주 배양물로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제 및 면역 기능 증진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 일 양상은 수탁번호 KCTC14616BP인 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주를 제공하는 것이다.

[0009] 상기 락토바실러스 파라카제이 HY7017 균주는 2021년 6월 16일 한국생명공학연구원 생물자원센터(KRIBB)에 기탁하였다. 수탁번호는 KCTC14616BP이다.

[0010] 상기 균주는 인삼으로부터 분리 및 동정한 것일 수 있다.

[0011] 일 구체예에 따르면, 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 홍삼 추출물을 영양원으로 사용할 수 있다. 상기 홍삼 추출물을 영양원으로 사용한다는 것은 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 균주가 증식할 수 있다는 것을 의미하는 것이다.

[0012] 일 실시예에 따르면, 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) 표준균주는 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배지의 농도에 따라 증식하지 않았으나, 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 홍삼 추출물을 포함하는 배지의 농도에 비례하여 증식하는 것을 확인하였다.

[0013] 일 구체예에 따르면, 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양한 것일 수 있다.

[0014] 상기 홍삼 추출물은 1 내지 10 브릭스(Brix), 2 내지 8 브릭스, 3 내지 7 브릭스일 수 있으며, 예를 들면 4 내지 6 브릭스일 수 있다.

[0015] 상기 홍삼 추출물을 포함하는 배지는 홍삼 추출물을 0.1 내지 10%, 0.5 내지 5%, 0.8 내지 4%로 포함하고 있는 것일 수 있으며, 예를 들면 1% 내지 3% 홍삼 추출물을 포함하는 배지일 수 있다.

[0016] 상기 홍삼 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어지는 균으로부터 선택된 용매로 추출된 것일 수 있다. 예를 들면, 주정일 수 있다.

[0017] 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 세포에서 NO를 발생시키거나, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  분비량을 증가시키거나, NK 세포를 활성화 시키므로 면역 기능을 증진시키는 것일 수 있다.

[0018] 일 실시예에 따르면, 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주가 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양된 경우, 일반 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주 대비 소화관 내 생존율, 장 내 부착성 및 면역 기능 증진 효능이 현저히 높아지는 것을 확인하였다.

- [0019] 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 세포에 처리하였을 때 세포에서 NO를 발생시키고, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  분비량을 증가시키며, NK 세포를 활성화시키므로 면역 기능을 증진하는 것을 확인하였다. 또한, 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 일반 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주 대비 더 현저히 면역기능을 증진하는 것을 확인하였다.
- [0020] 다른 양상은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주, 이의 파쇄물 및 상기 균주 배양물로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상을 포함하는 프로바이오틱스 제제를 제공하는 것이다.
- [0021] 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주에 관한 설명은 상기에 기재되어 있는 것과 동일하다.
- [0022] 일 구체예에 따르면, 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양한 것일 수 있다.
- [0023] 일 구체예에 따르면, 상기 균주 배양물은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주를 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양하여 수득한 배양물일 수 있다.
- [0024] 상기 프로바이오틱스는  $1 \times 10^1$  CFU/g 내지  $1 \times 10^{13}$  CFU/g의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017을 포함하는 것일 수 있으며, 1일 1 회 또는 2 회 이상으로 분할하여 투여할 수 있다.
- [0025] 상기 프로바이오틱스 제제는 면역기능 증진용으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0026] 또 다른 양상은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주, 이의 파쇄물 및 상기 균주 배양물로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상을 포함하는 면역 기능 증진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0027] 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주에 관한 설명은 상기에 기재되어 있는 것과 동일하다.
- [0028] 일 구체예에 따르면, 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주는 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양한 것일 수 있다.
- [0029] 일 구체예에 따르면, 상기 균주 배양물은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주를 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양하여 수득한 배양물일 수 있다.
- [0030] 상기 면역이란 체내에 존재하는 자기방어체계로서 인체가 외부로부터 침입해오는 각종 물질이나 생명체를 자기 자신에 대한 이물질로 인식하여 제거하고 대사시키는 과정을 의미하는 것으로, 상기 면역 기능 증진이란 외부의 이물질이나 병원체로부터 자신을 보호하는 기능이 증진된 것을 의미하는 것이다.
- [0031] 상기 식품 조성물로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 면역 기능 증진용 식품은 정제, 캡슐제, 환제, 액제 등의 형태를 포함한다.
- [0033] 본 발명의 면역 기능 증진용 음료 조성물은 필수 성분으로서 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주를 함유하는 것 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0034] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0035] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인

체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 피부 개선 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0037] 본 발명의 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있고, 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다. 아울러 본 발명의 락토바실러스 파라카제이 (*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주를 포함하는 건강기능식품은 당업자의 선택에 따라 식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HY7017 균주를 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함한다.

**발명의 효과**

[0038] 본 발명에 따른 락토바실러스 파라카제이 HY7017 균주는 홍삼 추출물을 영양원으로 이용하여 배양하면 증식되는 특징이 있고, 상기 균주를 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양하면 소화관 안정성, 장 부착능 및 면역기능 증진 효과를 나타낼 수 있어, 면역기능 증진용 식품 조성물 및 프로바이오틱스로 활용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0039] 도 1은 홍삼 배지에 따라 균주의 배양성을 확인한 데이터이다.
- 도 2는 균주의 16S rRNA를 Blast한 결과로, 락토바실러스 파라카제이와 99% 일치하다는 결과를 나타내는 데이터이다.
- 도 3은 API 50 HCL kit를 이용하여 균주를 동정한 결과이다.
- 도 4는 락토바실러스 파라카제이 표준균주와 락토바실러스 파라카제이 HY7017을 홍삼 배지에서 배양하여 증식 여부를 비교한 데이터이다.
- 도 5는 구강, 위, 및 소장 단계에서 배양에 따른 락토바실러스 파라카제이 표준균주 및 락토바실러스 파라카제이 HY7017의 생존율을 확인한 데이터이다.
- 도 6은 배양에 따른 락토바실러스 파라카제이 표준균주 및 락토바실러스 파라카제이 HY7017의 장 부착능을 확인한 데이터이다.
- 도 7은 락토바실러스 파라카제이 표준균주 및 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리에 따른 세포의 NO 발생량을 확인한 데이터이다.
- 도 8은 락토바실러스 파라카제이 표준균주 및 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리에 따른 세포의 TNF- $\alpha$  분비량을 확인한 데이터이다.
- 도 9는 락토바실러스 파라카제이 표준균주 및 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리에 따른 세포의 IFN- $\gamma$  분비량을 확인한 데이터이다.
- 도 10은 락토바실러스 파라카제이 표준균주 및 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리에 따른 NK 세포 활성도를 확인한 데이터이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0040] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] **실시예 1. 유산균 분리**

[0043] 인삼을 분쇄하여 0.02% 소듐 아지드(sodium azide)가 포함된 MRS 액체 배지에 넣고 37°C에서 24시간 배양하였다. MRS 아가 배지에 도말한 후 배양된 콜로니 중 성상이 서로 다른 단일 콜로니를 선별하였다. 선별한 균이 홍삼에서도 성장하는지 확인하기 위하여 주정으로 추출한 5 brix 홍삼추출물과 M9 최소배지를 혼합하여 2 brix 홍삼배지를 제조하였다. 분리된 각각의 균을 홍삼배지에 접종하고 24시간, 48시간 후 OD<sub>600</sub> 값을 측정하여 홍삼배지에서 성장하는 균주를 분리하였다. 하기 표 1에서 나타난 바와 같이, 분리한 균주들 중 strain 7을 홍삼배지에서 가장 잘 성장하는 균주로 선별하였다.

**표 1**

[0044]

구분	OD600	
	24h	48h
strain 1	0.001	0.001
strain 2	0.001	0.001
strain 3	0.002	0.004
strain 4	0.001	0.001
strain 5	0.01	0.02
strain 6	0.002	0.002
strain 7	0.043	0.089
strain 8	0.01	0.01
strain 9	0.021	0.058
strain 10	0.001	0.001

[0046] **실시예 2. 홍삼을 영양원으로 이용하는지 여부 확인**

[0047] 주정으로 추출한 5 brix 홍삼추출물을 이용하여 증류수와 혼합하여 홍삼 액체 배지 0.5 brix, 1 brix, 2 brix, 5 brix를 각각 제조한 후 상기 strain 7 균주를 접종하여 홍삼 액체 배지에서 생육이 가능한지 확인하였다.

[0048] 그 결과 도 1과 같이, 홍삼 액체 배지의 농도에 비례하여 생균수가 증가하는 것을 확인하므로, 분리한 균주가 홍삼배지에서 성장하는 것을 확인하였다.

[0050] **실시예 3. 균주 동정**

[0051] 분리한 균주인 strain 7의 동정 및 분류를 위해서 16S 리보솜 RNA 유전자(16S ribosomal RNA gene, 이하 16S rRNA)의 염기 서열을 두 개의 유니버설 프라이머(Universal primers)인 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 및 1492R(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')로 마크로젠에 의뢰하여 분석하였다.

[0052] 균주의 16S rRNA를 이용하여 NCBI blast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해서 상동성을 분석한 결과 도 2와 같이, 16S rRNA는 락토바실러스 파라카제이와 99% 일치하다는 것을 확인하였다.

[0053] 그 후, Biomerieux 사의 API 50 CHL kit를 이용하여 동정한 결과 도 3과 같이, 락토바실러스 파라카제이 속 파라카제이 3과 99.7% 유사하다는 결과를 확인하였다.

[0054] 이에 락토바실러스 파라카제이 속 새로운 균주임을 확인하여, 락토바실러스 파라카제이 HY7017로 명명하고, 2021년 6월 16일 한국생명공학연구원 생물자원센터(KRIBB)에 기탁하였다.

[0056] **실시예 4. 균주의 당 이용성 확인**

[0057] 균주의 당 이용성을 확인하기 위하여, Biomerieux 사의 API 50 CHL kit를 이용하여 당 이용성을 확인하였다.

[0058] 그 결과, 하기 표 2와 같이 분리한 균주의 당 이용성을 확인하였다.

**표 2**

[0059]

당	사용여부	당	사용여부
Control	-	에스쿨린	-
글리세롤	-	살리신	+
Erythritol	-	셀로비오스	+

D-아라비노스	-	말토스	-
L-아라비노스	-	유당	+
리보스	+	멜리비오스	-
D-크실로스	-	자당	+
L-크실로스	-	트레할로스	+
아도니톨	-	이눌린	-
β 메틸-D-크실로시드	-	멜레지토스	+
갈락토스	+	라피노스	-
포도당	+	전분	-
과당	+	글리코젠	-
만노스	+	크실리톨	-
소르보스	+	겐티오비오스	+
람노스	-	D-투라노스	+
둘시톨	-	D-라이노스	-
이노시톨	-	D-타가토스	-
만니톨	+	D-푸코스	-
소르비톨	+	L-푸코스	-
α-메틸-D-만노시드	-	D-아라비톨	-
α-메틸-D-글루코시드	-	L-아라비톨	-
N-아세틸-글루코사민	+	글루코나테	-
아미그달린	-	2-케토-글루코나테	-
아르부틴	-	5-케토-글루코나테	-

[0061] 실시예 5. 균주 특성 확인

[0062] 홍삼을 영양원으로 이용하는 것이 락토바실러스 파라카제이 HY7017의 특성인지를 확인하기 위하여, 대조군으로 락토바실러스 파라카제이 표준균주인 KCTC3510을 사용하여 실시예 2와 같이 실험하였다.

[0063] 그 결과 도 4와 같이, 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510은 홍삼 액체 배지의 농도에 관계없이 생균수가 일정한 것을 확인하였다. 따라서 홍삼 배지에서 홍삼을 영양원으로 사용하여 증식하는 것은 락토바실러스 파라카제이의 특성이 아닌 락토바실러스 파라카제이 HY7017의 특유의 성질인 것을 확인하였다.

[0065] 실시예 6. 소화관 안정성 확인

[0066] 6.1. 유산균 시료 제작

[0067] MRS 액체배지와 1% 홍삼이 첨가된 MRS 액체배지(이하 '1% RGB 배지')에 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510 또는 HY7017 균주의 콜로니를 넣고 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양이 완료된 유산균을 1/10씩 희석하여 10<sup>-7~9</sup>에서 MRS agar 배지를 이용하여 37℃ 2~3일간 배양해 균수를 측정하였다. 그 후, 4000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 균체를 PBS로 3회 세척하였다. 상기 측정된 균수를 기준으로 하여 세포 배양에 사용한 배지를 넣고 희석하여 사용하였다.

[0069] 6.2. 소화관 안정성 확인

[0070] M. Minekus et al., Food Funct. 2014 Jun;5(6):1113-24의 논문에서 사용된 실험법을 사용하여 소화모델에 사용되는 전해질 용액을 제조하고, Glahn, R.P et al. J Nutr. 1998 Sep;128(9):1555-61의 논문을 참고하여 효소 용액을 제조하였다. 또한, 각각의 소화 흡수과정 단계마다 증류수에서 같은 시간 동안 배양한 유산균을 대조군으로 설정하였다. 균수는 통상적인 생균수 측정 방법에 따라 생균수를 분석하였으며, 균주의 소화관 생존율(%)은 (소화 흡수과정을 거친 후의 생균수/소화 흡수과정을 거치기 전 대조군의 생균수) x 100으로 계산하였다.

[0072] 6.2.1. 구강단계(Oral phase)

[0073] 구강단계에서는 SSF(Simulated Salivary Fluid) 전해질 용액에 인체 유래 타액의 α-아밀라제와 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하고, SSF 시료의 최종 부피비가 50:50이 되도록 증류수(DW)로 조절한 후, 이를 37℃, 진탕배양기(shaking incubator)에서 2분간 반응시켰다.

[0074] 그 결과 도 5에서 보이는 바와 같이, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510은 구강 단계에서 94%가 생존하고, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510은 구강 단계에서 83%가 생존

하였다. 이를 통하여 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510의 경우 오히려 1% RGB 배지에서 배양한 균주가 생존 능력이 떨어지는 것을 확인하였다.

[0075] 반면, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 구강 단계에서 88%가 생존한 것이 확인되는 반면, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 구강 단계에서 97%가 생존하는 것을 확인하였다. 따라서 락토바실러스 파라카제이 HY7017는 홍삼 추출물이 포함된 배지에서 배양된 경우 오히려 구강 단계에서의 안정성이 향상된다는 것을 확인하였다.

[0077] **6.2.2. 위 단계(Gastric phase)**

[0078] 위 단계(Gastric phase)에서는 SGF(Simulated Gastric Fluid) 전해질 용액에 돼지유래 펩신과 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하고, pH 3.0이 되도록 하고 SGF 시료의 최종 부피비가 50:50가 되도록 증류수(DW)로 조절하였다. 이를 37℃ 진탕배양기에서 2분간 반응시켰다.

[0079] 그 결과 도 5에서 보이는 바와 같이, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510은 위 단계에서 73%가 생존하고, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510은 위 단계에서 58%가 생존하는 것을 확인하였다. 따라서 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510의 경우 1% RGB 배지에서 배양한 균주가 위에서의 생존 능력이 더 떨어진다는 것을 확인하였다.

[0080] 반면, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 위 단계에서 68%가 생존하였으며, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 위 단계에서 83%가 생존하는 것을 확인하였다. 따라서 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 홍삼 추출물이 포함된 배지에서 배양된 경우 위 단계에서의 안정성이 더 향상된다는 것을 확인하였다.

[0082] **6.2.3. 소장 단계(Intestinal phase)**

[0083] 소장 단계(Intestinal phase)에서는 SIF(Simulated Intestinal Fluid) 전해질 용액에 돼지유래 판크레아틴, 담즙산 및 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하고, pH 7.0이 되도록 하고 SIF 시료의 최종 부피비가 50:50가 되도록 증류수(DW)로 조절하였다. 이를 37℃ 진탕배양기에서 2분간 반응시켰다.

[0084] 그 결과 도 5에서 보이는 바와 같이, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510은 소장 단계에서 29%가 생존하였으며, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510은 28%가 생존하는 것을 확인하였다. 따라서 소장 단계에서의 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510의 안정성은 홍삼 추출물을 포함한 배지에서 배양한 균주와 일반 배지에서 배양한 균주 간 유의미한 차이가 없다는 것을 확인하였다.

[0085] 반면, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 소장 단계에서 48%가 생존하였으며, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 소장 단계에서 65%가 생존하는 것을 확인하였다. 따라서 락토바실러스 파라카제이 HY7017의 경우, 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 생장한 균주가 소장 내 안정성이 더 현저하다는 점을 확인하였다.

[0087] 그러므로 상기 실시예를 통하여 일반적인 락토바실러스 파라카제이 균주와 상이하게 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 홍삼 추출물을 포함하는 배지에서 배양된 경우 소화관에서 더 안정적으로 생존한다는 점을 확인하였다.

[0089] **실시예 7. 장 부착능력 확인**

[0090] 장내 부착성 실험을 위해 6 웰 플레이트에서 Caco-2 세포를 14일 동안 배양하여 단층막을 형성하였다. 부착실험 1시간 전에 항생제가 들어있지 않은 EMEM 배지를 각 웰에 1mL씩 넣어 주었다. 락토바실러스 파라카제이 표준균주 및 HY7017 균주를 MRS 액체배지와 1% 홍삼이 첨가된 MRS 액체배지(RGB)에 각각 1%(v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 PBS로 3회 세척하여 10<sup>8</sup> CFU/mL 농도로 EMEM 배지에 현탁한 후, 각 웰에 넣어주었다. 인큐베이터에서 1시간동안 배양한 후 3회 PBS로 세척하여 부착하지 못한 균을 제거하였다. 0.05% 트립신 1mL씩 넣고 12분 동안 배양하여 회수한 후 십진희석하여 BCP아가 배지에 도말하였다. 장내 상피세포 부착율(%)은 부착균수/투입균수 X 100으로 계산하여 산출하였다.

[0091] 그 결과 도 6에서 보이는 바와 같이, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 장 부착율이 2.3%인 반면, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017은 장 부착율이 4.3%였다. 따라서 홍삼 추출물을 영양원으로 사용하여 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017이 더 현저한 장 부착능력을 가진다는 점

을 확인하였다.

[0092] 그러나 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510의 경우, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510은 장 부착율이 4.6%인 반면, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510은 장 부착율이 4.3%로 배지에 따라 장 부착능력의 유의미한 차이가 없음을 확인하였다.

[0094] **실시예 8. NO 생성량 확인**

[0095] RAW 264.7 세포를 24웰 플레이트에 웰 당  $1 \times 10^5$  cell/ml씩 분주하고 여기에 각각의 배양배지에 배양한 유산균을  $10^5$ ,  $10^6$  및  $10^7$  CFU/ml로 처리하고, 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양하였다. 상층액을 취하여 50 $\mu$ l의 세포 배양 상층액에 동량의 그리스 시약(Griess reagent, 0.1%(w/v) N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride + 1%(w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid)을 넣고 혼합한 다음, 상온에서 10분간 방치하였으며, 그 후 스펙트로포토메터를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0096] 그 결과 도 7에서 보이는 바와 같이, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017을 처리하면 세포의 NO 발생량이 5.0 $\mu$ M인 반면, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017을 처리하면 세포의 NO 발생량이 8.5 $\mu$ M임을 확인하였다. 대조군으로 무처리군과 LPS를 처리한 군을 확인하였으며, 이를 통해 락토바실러스 파라카제이 HY7017을 처리한 세포가 무처리군 대비 NO 발생량이 증가하나, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017을 처리한 세포에서는 NO가 더 많이 발생한다는 것을 확인하였다.

[0097] 또한, MRS 액체배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510을 처리하면 세포의 NO 발생량이 5.5 $\mu$ M인 반면, 1% RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510을 처리하면 세포의 NO 발생량이 6.0 $\mu$ M로 배지에 따라 NO 발생량의 유의미한 차이가 없음을 확인하였다.

[0098] 면역 반응의 관점에서는 초기 염증반응이 있어야 면역세포가 활성을 띄게 되고 그로 인해 면역이 증진되므로, 항염증과는 정반대로 NO의 발현이 오히려 면역을 증가시키는 역할을 한다. 그러므로, 상기 실험으로부터 RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017 균주는 우수한 면역기능 증진 효과를 갖는 것을 확인할 수 있다.

[0100] **실시예 9. TNF- $\alpha$  단백질 분비량 확인**

[0101] RAW 264.7 세포를 24웰 플레이트에 웰 당  $1 \times 10^5$  cell/ml씩 분주하고 여기에 각각의 배양배지에 배양한 유산균을  $10^5$ ,  $10^6$  및  $10^7$  CFU/ml로 처리하고, 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양하였다. 50 $\mu$ l의 세포 배양 상층액을 취하여 염증 매개물질(Inflammatory mediator)인 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 ELISA 검사를 실시하였다. 대조군으로 무처리군과 LPS를 처리한 군을 확인하였으며, 비교군으로 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510을 사용하였다.

[0102] 그 결과 도 8에서 보이는 바와 같이, 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510을 처리한 세포에서 TNF- $\alpha$  분비량은 263 pg/mL, RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510을 처리한 세포에서 TNF- $\alpha$  분비량은 272 pg/mL, 락토바실러스 파라카제이 HY7017을 처리한 세포에서 TNF- $\alpha$  분비량은 198 pg/mL이며, RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017을 처리한 세포에서 TNF- $\alpha$  분비량은 386 pg/mL였다.

[0103] 이는 락토바실러스 파라카제이 HY7017이 세포에서 TNF- $\alpha$  분비를 증가시킨다는 점과 RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510을 처리한 경우, 세포의 TNF- $\alpha$  분비량이 일반 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510을 처리한 경우와 유의미한 차이가 없으나, RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리는 일반 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리 대비 더 현저히 세포의 TNF- $\alpha$  분비량을 증가시킨다는 점을 나타낸다.

[0105] **실시예 10. IFN- $\gamma$  단백질 분비량 확인**

[0106] 마우스의 비장세포를 6웰 플레이트에 웰당  $1 \times 10^6$  cell/ml로 분주하고, 각각의 배양배지에서 배양한 유산균을 처리하고 배양한 후, 상층액을 취하여 IFN- $\gamma$ 의 ELISA 검사를 실시하였다.

[0107] 그 결과 도 9에서 보이는 바와 같이, 무처리군에서는 2.9 pg/mL, LPS 처리군에서는 51 pg/mL, 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510 처리군에서는 4.3 pg/mL, RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510 처리군에서는 11 pg/mL, 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리군에서는 6 pg/mL, RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파

라카제이 HY7017 처리군에서는 24.5 pg/mL로 IFN- $\gamma$ 가 분비되었다.

[0108] 이는 락토바실러스 파라카제이가 세포의 IFN- $\gamma$  분비를 증가시키며, 락토바실러스 파라카제이가 RGB 배지에서 배양되었을 경우 세포의 IFN- $\gamma$  분비를 더 현저히 증가시킨다는 점과 락토바실러스 HY7017은 다른 균주 대비 RGB 배지에서 배양된 경우가 일반 배지에서 배양된 경우보다 세포의 IFN- $\gamma$  분비를 증가시키는 것이 더 현저하다는 점을 나타낸다.

[0110] **실시예 11. NK 세포 활성 확인**

[0111] 마우스의 비장세포에서 CD4a microbead (Miltenyi Biotec, Technology, Teterow, Germany) 를 이용하여 NK 세포를  $1 \times 10^5$  cell/well로 분리하고, v-bottom 96웰에 NK 세포와 YAC-1 세포를 1:1의 비율로 넣어주었다. 그 후, 락토바실러스 파라카제이 표준균주 및 HY7017을 처리하여 24시간 배양한 후, 상층액을 확보하였다. 확보한 상층액은 CytoTox 96®Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega)를 이용하여 세포 독성을 측정하였다. 대조군으로는 무처리군과  $\beta$ -glucan 처리군을 사용하였다.

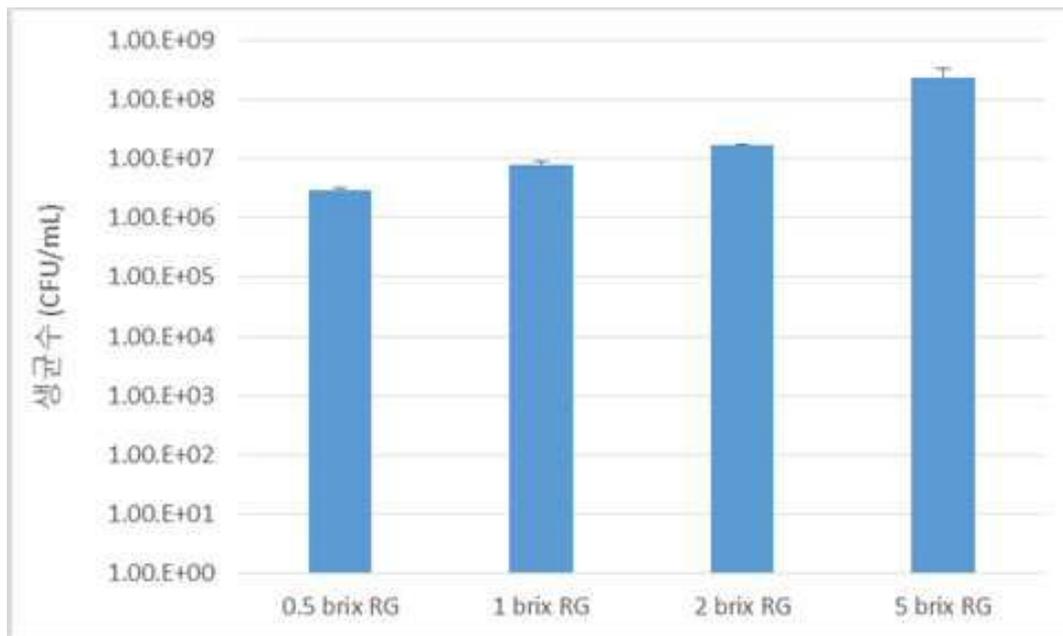
[0112] 그 결과 도 10에서 보이는 바와 같이, 세포독성이 무처리군에서는 4.4%이며,  $\beta$ -glucan은 10.5%, 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510 처리군에서는 7.3%, RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 KCTC3510 처리군에서는 7.9%, 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리군에서는 8.7%, RGB 배지에서 배양된 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리군에서는 10.2% 였다. 이를 통하여, 락토바실러스 파라카제이 HY7017 처리가 NK 세포를 활성화 시키며, 홍삼 추출물을 영양원으로 하여 배양하는 경우 NK 세포를 더욱 활성화시킨다는 점을 확인하였다.

**수탁번호**

[0114] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원  
 수탁번호 : KCTC14616BP  
 수탁일자 : 20210616

**도면**

**도면1**



도면2

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 0 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Lactobacillus paracasei complete sequence</a>	<a href="#">Lactobacilli</a>	1622	14363	96%	0.0	99.77%	2861969	<a href="#">NC_014334.2</a>
<a href="#">Lactobacillus casei DSM 20111 = JCM 1134 = ATCC 383 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Lactobacillus c</a>	1561	14036	96%	0.0	98.42%	2924929	<a href="#">NZ_AP012544.1</a>
<a href="#">Lactobacillus zeae isolate CCCT 9104 chromosome 1</a>	<a href="#">Lactobacilli</a>	1555	13997	96%	0.0	98.42%	3045762	<a href="#">NZ_LS991421.1</a>

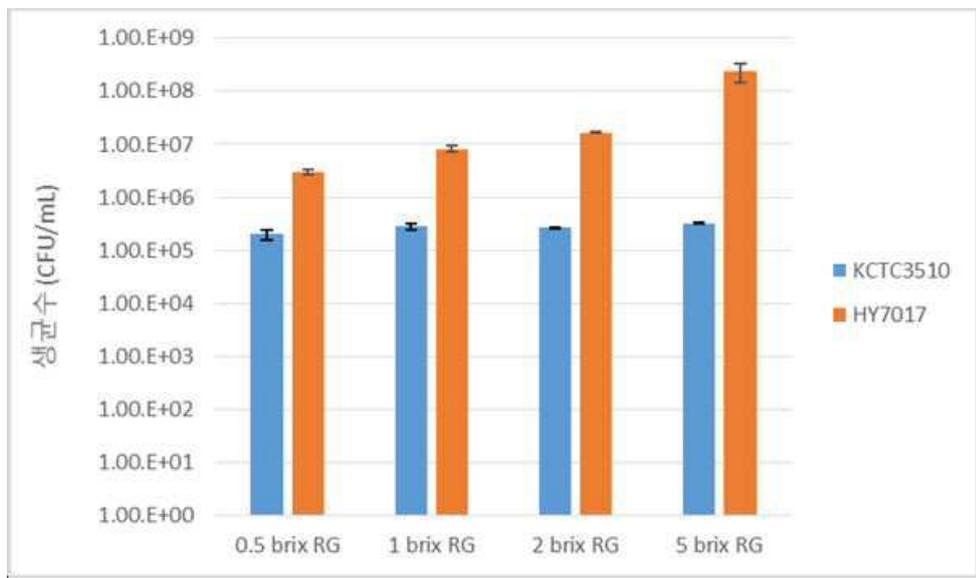
도면3

**DOUBTFUL PROFILE**

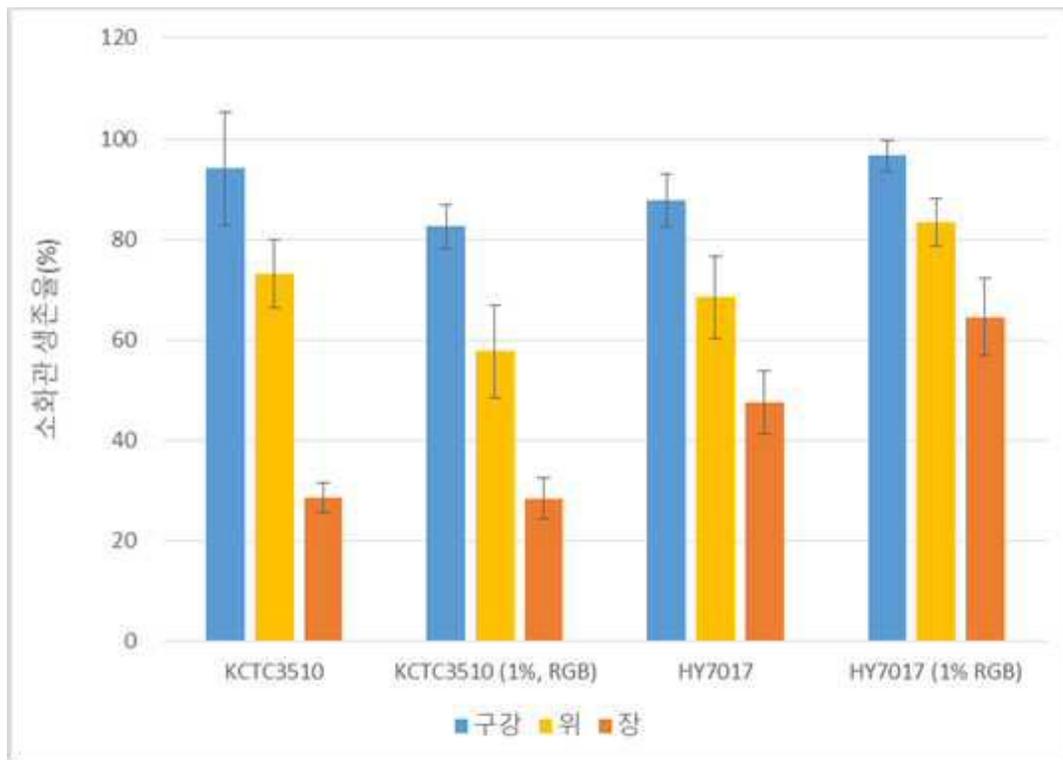
스트립	API 50 CHL V5.2
숫자화된 생화학적 패턴	-----+-----+++++-----+-----+-----+-----+-----
참고사항	

동정결과	% ID	T Index	상반되는 생화학적 특성(Test against)			
Lactobacillus paracasei ssp paracasei 3	99.7	0.26	SBE 20%	SOR 20%	AMY 99%	ARB 100%
			ESC 80%	MAL 80%	MLZ 20%	TUR 20%

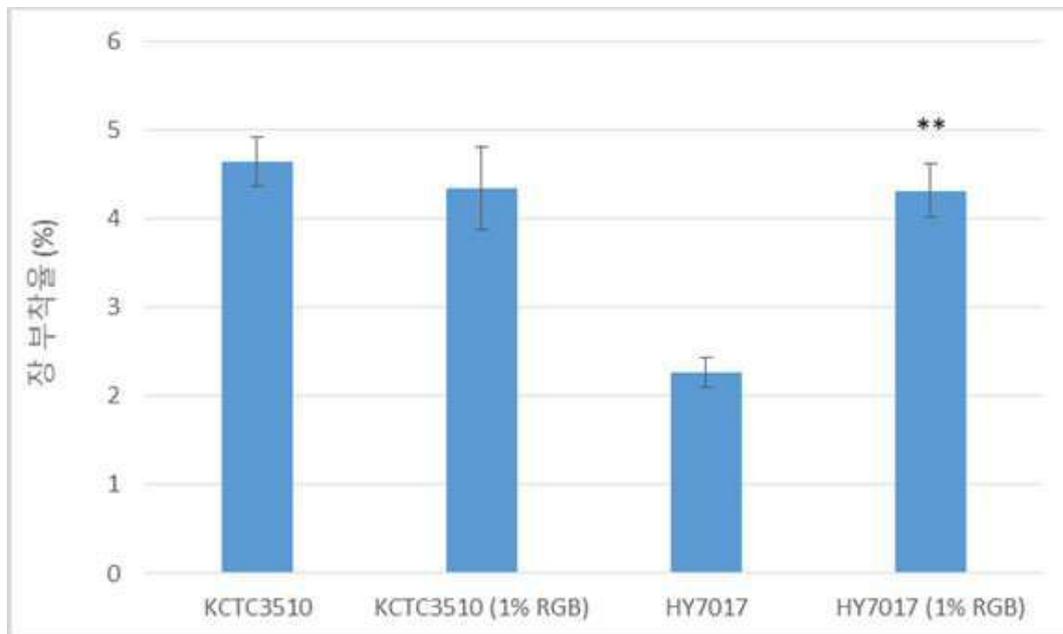
도면4



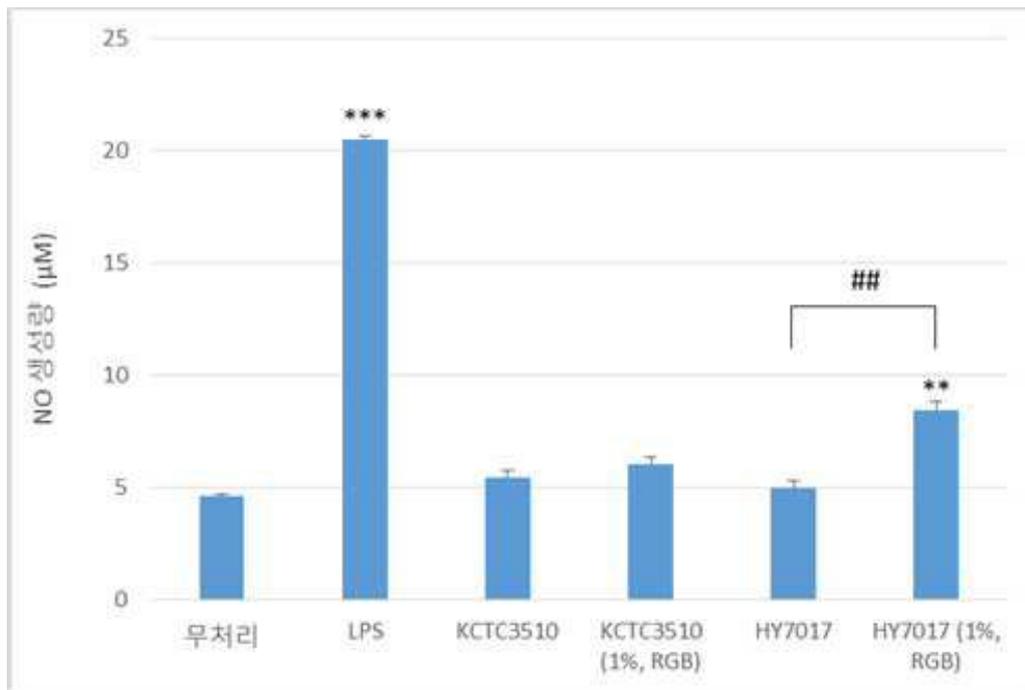
도면5



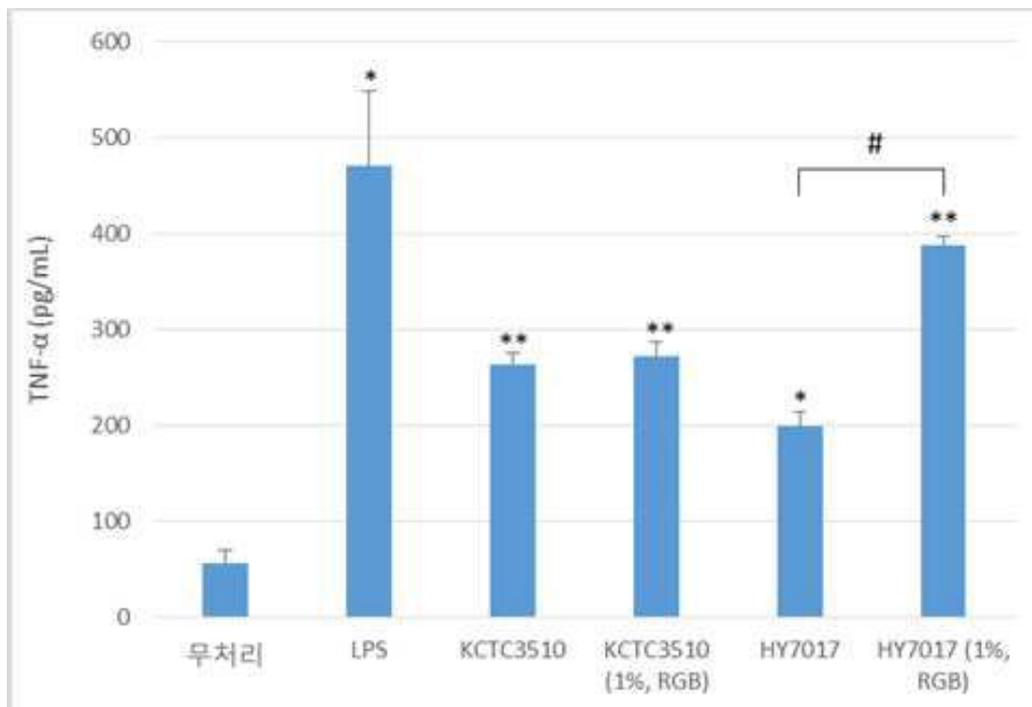
도면6



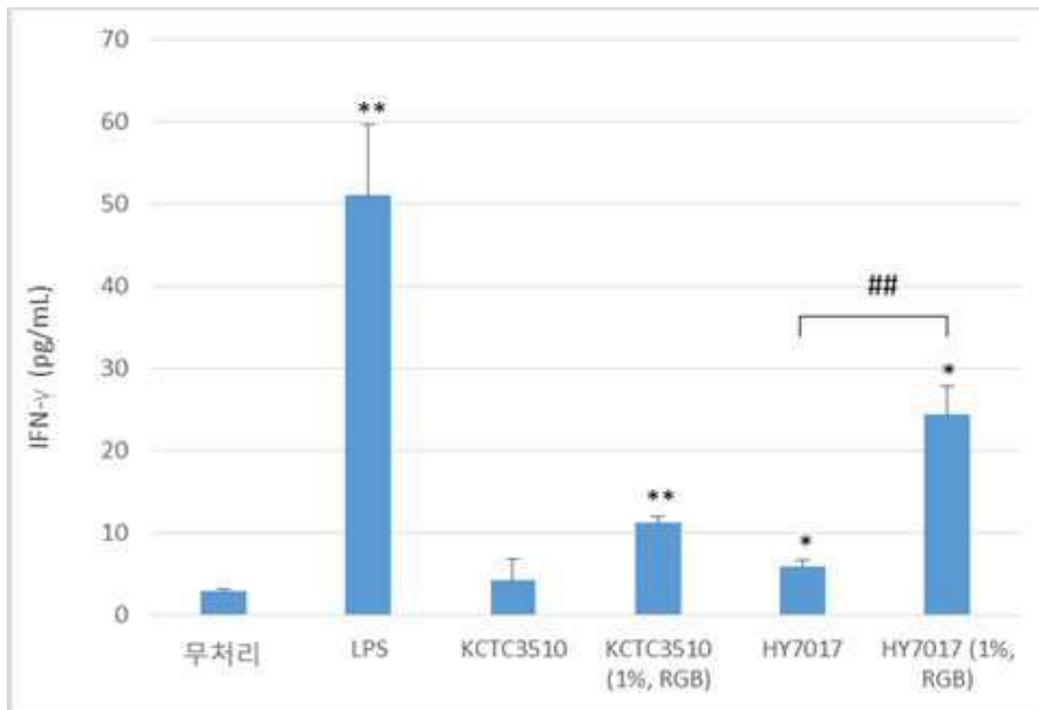
도면7



도면8



도면9



도면10

