



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월24일
(11) 등록번호 10-2291775
(24) 등록일자 2021년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/135 (2016.01) A61K 35/747 (2014.01)
A61P 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A61K 35/747 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0008934
(22) 출원일자 2021년01월21일
심사청구일자 2021년01월21일
(56) 선행기술조사문헌
BMC MICROBIOLOGY 제10권, 문서번호: 316, 1_11
쪽, 2010년 12월 09일.
KR1020200145941 A*
KR101979761 B1*
JP2020054262 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 에치와이
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
정승희
인천광역시 연수구 송도국제대로 261
홍동기
경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 17
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 7 항

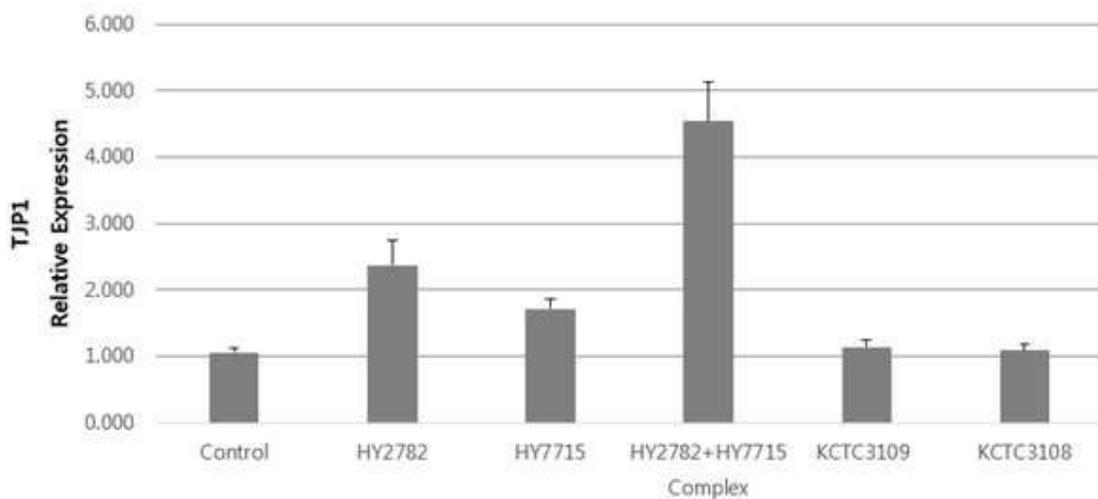
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 발효 배양액 혼합물을 포함하는 식품 조성물

(57) 요약

본 발명은 발효 배양액 혼합물을 포함하는 식품 조성물 및 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 식품 조성물 및 약학적 조성물은 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715, 기탁번호 KCTC 13101BP)균주 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하여 밀착연접단백질(Tight junction)으로 TJP-1, TJP-2 및 오클루딘(Occludin) 및 뮤신(MUC2 및 MUC4)의 발현을 증가시켜 장 질환을 예방 또는 개선시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/3204 (2013.01)

A23Y 2220/00 (2013.01)

(72) 발명자

방소정

경기도 화성시 동탄대로시범길 236, 931동 301호

허건

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85

심재중

서울특별시 관악구 관악로30길 27, 121동 1303호

이정열

경기도 양평군 서종면 통점길 63

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 카제이 HY2782(Lactobacillus casei HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(Lactobacillus plantarum HY7715, 기탁번호 KCTC 13101BP)균주 배양물을 1:0.05 내지 1:2 중량비로 포함하는 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주 배양물은 상기 균주들이 포함 또는 포함되지 않는 배양물인 식품 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 배양물과 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주 배양물이 혼합된 혼합물은 50 내지 500 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 농도인 식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 식품 조성물은 밀착연접단백질(Tight junction) 및 뮤신의 발현을 증가시키는 것인 식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 밀착연접단백질은 TJP-1, TJP-2 및 오클루딘 (Occludin) 이고, 뮤신은 MUC2 및 MUC4 인 식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 식품 조성물은 장 세포 부착능력을 향상시키는 것인 식품 조성물.

청구항 8

락토바실러스 카제이 HY2782(Lactobacillus casei HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(Lactobacillus plantarum HY7715, 기탁번호 KCTC 13101BP)균주 배양물을 1:0.05 내지 1:2

중량비로 포함하는 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발효 배양액 혼합물을 포함하는 식품 조성물 및 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 프로바이오틱스(Probiotics)는 '장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제제'라고 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] 한편, 과민성 대장 증후군(Irritable Bowel Syndrome)은 복통 및/또는 변화된 장 거동 또는 배변 습관과 관련된 불편함을 특징으로 하는 증상으로, 이러한 증상은 구조적 또는 생화학적 이상으로는 설명되지 않는다. 긴박뇨, 복부 팽만 및 불완전한 장 운동의 느낌 역시 IBS의 일반적 증상이다. 따라서, 이 질환은 기능성 팽만감, 비심장성 흉통, 비-궤양성 소화불량 및 만성적인 변비 또는 설사 등의 질환을 포함하는 기능성 위장 장애로 분류된다. 특히, IBS는, 관련 증상이 환자의 안녕과 정상적인 기능성 측면 모두에 작용하기 때문에, 복통 및 불편함을 넘어 이환율과 삶의 질에 막대한 영향을 미친다.

[0005] 염증성 장질환(Inflammatory Bowel Disease)은 장관 내 비정상적인 만성 염증이 호전과 재발을 반복하는 질환으로서, 장의 모든 염증성 질환을 포함하며, 구체적인 예로 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염 또는 베체트 병(Behcet's disease)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. IBS 및 IBD를 치료하기 위한 약물 개발 분야에서 막대한 연구들이 수행되고 있다. 이와 관련하여, 다양한 항우울제들이, 임상 실험에서 그 효능은 보통 수준이고 이의 임상적인 활용성은 상당한 부작용으로 인해 제한적임에도 불구하고, 대중적으로 사용되고 있다. 세로토닌성 제제들에서도 전반적인 IBS 증상들에 대한 효능이 입증되고 있다. 그러나, 최근 안전성에 대한 문제들로 인해 그 적용이 여러가지로 제약되고 있으며, 이에 IBS에 대한 새로운 치료제를 개발하는데 관심이 크게 증폭되고 있다.

[0006] 상기한 염증성 장질환 및 과민성 대장 증후군을 포함하는 장 질환의 예방 또는 개선에 탁월한 효과를 보이는 소재의 개발이 여전히 있기에, 상기 효과를 보이는 균주를 찾기 위한 연구는 수많은 연구 기관에서 지속하고 있는 실정이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 장 질환 예방 또는 개선 효과가 우수한 소재를 개발하기 위해 지속적인 연구를 한 결과, 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782)배양물과 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715)배양물 중 어느 하나 이상이 장 질환을 예방 또는 개선하는 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

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

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715, 기탁번호 KCTC 13101BP)균주 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715, 기탁번호 KCTC 13101BP) 균주 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715, 기탁번호 KCTC 13101BP) 균주 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주는 생명공학연구원 생물자원 센터에 2017년 12월 19일에 *Lactobacillus casei* HY2782이름으로 기탁된 균주이다 (기탁번호: KCTC 13438BP).
- [0015] 또한, 상기 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2016년 9월 8일에 *Lactobacillus plantarum* HY7715이름으로 기탁된 균주이다 (기탁번호: KCTC 13101BP).
- [0016] 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 여과등에 의해 분리되는 특정 균주들을 배제한다는 것을 의미하는 것으로서 여과액에 균주들이 완전히 배제된다는 것을 의미하지는 않는다.) 포함하지 않는 것을 의미한다. 상기 배양물은 그 제형이 한정되지 아니하고, 일 예로 액체, 예멸전, 또는 고체일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에서 상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주 배양물은 상기 균주들이 포함 또는 포함되지 않는 배양물일 수 있다. 구체적으로 상기 각 균주들을 개별적으로 배양한 후 별도의 여과 없이 균주를 포함하는 것이거나 배양물을 원심분리하여 상등액을 회수하고, 0.45 μm 필터를 이용하여 균주를 제거한 배양물일 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 균주를 배양하기 위한 배지의 종류로는 크게 제한되지 않으며, 선택된 혼합 균에 최적인 공지의 배지를 사용할 수 있다. 구체적으로 MRS 배지, TGY 배지, BHI 배지, M17 배지, 탈지유(skim milk) 배지 등이 있다. 또한 배지의 pH는 선택된 균주들에 양립될 수 있는 범위라면 크게 제한되지 않으며, 일 예로 약 4.5~7.0이다. 본 발명에 따른 균주들을 배양하기 위한 배양 온도 또한, 선택된 균주들에 양립할 수 있는 범위라면, 크게 제한되지 않으며, 일 예로 약 25~45℃이다.
- [0019] 본 발명의 일 예시로 상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 배양물과 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주 배양물은 1:0.05 내지 1:2 비율로 혼합한 것일 수 있다. 구체적으로 1:0.1 내지 1:1 비율, 더욱 구체적으로는 1:0.2 비율로 혼합한 것일 수 있다. 상기 두 균주의 배양물이 상기한 혼합 비율 외의 범위로 혼합될 경우, 본 발명이 목적하는 장 질환 예방 또는 개선의 효과를 얻기 어렵다.
- [0020] 본 발명의 일 예시로 상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 배양물과 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주 배양물이 혼합된 혼합물은 50 내지 500 μl/ml, 더욱 구체적으로 300 μl/ml 농도일 수 있다. 상기 혼합물이 상기 범위 외의 농도일 경우 본 발명이 목적하는 장 질환 예방 또는 개선의 효과를 얻기 어렵다.
- [0021] 본 발명의 일 예시로 상기 조성물은 밀착연접단백질(Tight junction) 및 뮤신의 발현을 증가시키는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 밀착연접단백질은 TJP-1, TJP-2 및 오클루딘(Occludin) 이고, 뮤신은 MUC2 및 MUC4 일 수 있고, 이들의 발현 증가는 단백질의 생성 증가뿐만 아니라, DNA 또는 mRNA의 발현 증가를 의미할 수 있다.

- [0022] 구체적으로 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, 밀착 연접이 느슨해져 장 투과성이 증가된 상태를 장 누수증후군이라 부르고, 이는 복부팽만, 설사, 복통 과민성 대장 증후군 등의 질환을 유발한다. 이 때 본 발명의 조성물은 밀착연접단백질로서 TJP-1, TJP-2 및 오클루딘의 발현을 증가시켜 장 벽을 강화시키고 이를 통해 장 질환을 예방 또는 개선할 수 있다 (도 1 내지 3).
- [0023] 또한, 상기 뮤신의 발현 증가를 통해 장 점막 보호, 대변의 이동 촉진, 유산균의 정착 및 증식에 도움을 줄 수 있고, 이를 통해 장 질환을 예방 또는 개선할 수 있다 (도 4 및 5).
- [0024] 한편 본 발명의 일 예시로 상기 조성물은 장 세포 부착능력을 향상시키는 것일 수 있다. 본 발명의 조성물은 전문술한 뮤신의 발현 증가를 통해 장의 상피세포에 점막층을 형성을 촉진하고, 장에 도달한 유익균 (가령, 유산균)이 점막층에 부착되어 장에서의 세포 부착능력이 향상되는 효과를 얻을 수 있다.
- [0025] 상기 식품 조성물은 장 질환 예방 또는 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품첨가제, 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, 식품첨가제, 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)를 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), 펙틴산 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 식품 조성물에 있어서, 단독 또는 혼합 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.
- [0033] 본 발명은 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715, 기탁번호 KCTC 13101BP)균주 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, "장 질환"이란 복부 팽만감, 복부 불편감, 병원성 미생물에 의한 감염성 설사, 위장염, 염증성 장질환, 신경성 장염 증후군, 과민성 대장 증후군, 소장 미생물 과성장증 및 장 급이성 설사로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 장의 정상적인 장벽 기능 손상에 의해 야기되는 질환을 포함한다.

- [0035] 상기 염증성 장 질환(IBD)은 크론병, 베체트병에 수반되는 장 병변, 궤양성 대장염, 출혈성 직장 궤양 및 회장 낭염을 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.
- [0036] 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.
- [0037] 본 발명에 있어서, "예방"이란 상기 조성물의 투여로 장 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 포함한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, "개선"이란 치료 또는 증상의 경감을 의미하고, 구체적으로는 장 질환의 치료 또는 증상의 경감을 의미한다.
- [0039] 본 발명에 따른 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물은 상기 균주들의 개별 배양물 또는 균주들의 배양물을 혼합한 혼합물 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), 텍스트린(Dextrin), 유기산(예를 들어, 락트산, 타르타르산, 아딕산, 숙신산, 시트르산, 아스코르브산, 글리콜산, 말산, 만델산, 아세트산, 소르브산, 벤조산, 및 살리실산), 항균 효소, 당, 당 알코올, 구아 검, 셀룰로오스 검, 실리콘 소포제, 인공 감미료 등이 있다. 또한, 본 발명에 따른 피부 개선용 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 피부 개선용 조성물의 제조방법은 일 예로 균주들을 개별 배양하여 얻은 배양물 또는 각 균주의 배양물들을 혼합한 혼합물에 완충제(Buffering agent)로 글리신(Glycine)을 소량 첨가하여 용해시키고, 농축한 후 분무건조기(Spray dryer) 또는 동결건조기로 건조하는 방법일 수 있다. 액상 형태의 피부 개선용 조성물의 제조방법은 일 예로 균주들을 개별 배양하여 얻은 배양물 또는 각 균주의 배양물들을 혼합한 혼합물에 글리세린(Glycerin), 텍스트린(Dextrin)을 소량 첨가하고 용해시킨 후 젖산(Lactic acid)으로 pH를 5.0으로 조정하는 방법일 수 있다. 에멀전 형태의 피부 개선용 조성물의 제조방법은 일 예로 균주들을 개별 배양하여 얻은 배양물 또는 각 균주의 배양물들을 혼합한 혼합물에 유상 매질 및 유화 안정제를 첨가하고 전단력을 가하여 에멀전화시키는 단계를 포함하는 방법일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 배양물 및 락토바실러스 플라타렘 HY7715 균주 배양물 중 어느 하나 이상만을 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.
- [0041] 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 미생물의 양은 투여 경로, 투여 대상을 고려하여 적절하게 조정될 수 있다.
- [0042] 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.
- [0043] 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.
- [0044] 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.

[0045] 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.

[0046] 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 단독 또는 혼합 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 성분에게 따라 가변적이다. 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

[0048] 본 발명의 발효 배양액 혼합물을 포함하는 식품 조성물 및 장 질환 예방 또는 개선용 약학적 조성물은 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715, 기탁번호 KCTC 13101BP)균주의 배양물을 포함하여 밀착연접단백질(Tight junction)으로 TJP-1, TJP-2 및 오클루딘(Occludin) 및 뮤신(MUC2 및 MUC4)의 발현을 증가시켜 장 질환을 예방 또는 개선시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1 내지 3은 다양한 균주 배양물 또는 이들의 혼합물의 밀착연접단백질(Tight junction) 관련 유전자 발현을 비교한 그래프이다.

도 4 및 5는 다양한 균주 배양물 또는 이들의 혼합물의 점액(Mucin) 관련 유전자 발현을 비교한 그래프이다.

도 6는 다양한 균주 배양물 또는 이의 혼합물의 *L. casei*, *L. plantarum*, *B. latics* 유산균의 장세포 부착능력 향상 결과를 비교한 그래프이다.

도 7는 연속식 소화관 모델에서 본 발명 배양 혼합물을 함유하고 있는 HY2782 유산균 제품의 배양기간에 따라 구강, 위 및 장내에서 초기균수대비 생존율(%)을 비교한 그래프이다.

도 8는 본 발명 배양 혼합물을 함유하고 있는 HY2782 유산균 제품의 배양기간에 따라 장세포 부착능력 향상 결과를 비교한 그래프이다.

도 9는 연속식 소화관 모델에서의 다양한 균주 배양물 또는 이의 혼합물(A: 음성대조군(배양물이 제거된 유산균 분말제품), B, C제품: HY2782 배양물 함유, D제품 HY2782 배양물과 HY7715 배양물의 혼합) 투여시 구강, 위 및 장내에서 초기균수대비 생존율(%)을 비교한 그래프이다.

도 10은 다양한 균주 배양물 또는 이의 혼합물(A제품: 음성대조군(배양물이 제거된 유산균 분말제품), B, C제품: HY2782 배양물 함유, D제품 HY2782 배양물과 HY7715 배양물의 혼합) 투여시 장내에서 장세포 부착율(%)을 비교한 그래프이다.

도 11는 다양한 균주 배양물 또는 이의 혼합물(A제품: 음성대조군(배양물이 제거된 유산균 분말제품), B, C제품: HY2782 배양물 함유, D제품 HY2782 배양물과 HY7715 배양물의 혼합) 투여시 장세포에서 밀착연접단백질 유전자의 발현을 비교한 자료이다.

도 12 내지 16 본 발명 배양물의 최적 혼합비율을 확인하기 위하여 밀착연접단백질(Tight junction) 관련 유전자 발현 및 점액(Mucin) 관련 유전자 발현을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 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.
- [0053] **실시예 1: 배양 혼합물의 제조**
- [0054] **실시예 1-1. 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782, 기탁번호 KCTC 13438BP)균주 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715, 기탁번호 KCTC 13101BP)균주의 배양**
- [0055] 상기 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782) 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715)를 MRS 액체배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다.
- [0057] **실시예 1-2. 배양물의 준비 및 배양 혼합물의 제조**
- [0058] 상기 실시예 1-1에서 배양이 완료된 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782) 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715(*Lactobacillus plantarum* HY7715)의 MRS 배양균을 원심분리기 3000rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 확보한 후 1L Filter System (0.45 μm CA)을 통해 균주 배양물을 최종적으로 제조하였다.
- [0059] 상기 제조된 HY2782 배양물과 HY7715 배양물을 1:0.2의 중량비로 혼합하여 프로바이오틱스 배양 혼합물을 제조하였다.
- [0061] **실험예 1: 밀착연접단백질관련 유전자 발현의 확인**
- [0062] 본 발명 배양 혼합물의 밀착연접단백질 관련 유전자 발현을 확인하였다.
- [0064] **실험예 1-1. 인체유래 장상피세포(intestinal epithelial cell)의 배양**
- [0065] 10% FBS(fetal bovine serum) antibiotics free DMEM 배지(Gibco, USA)에서 인체유래 장상피세포(Caco-2)와 DMEM을 1:4의 중량비율로 2~3일에 한 번씩 계대 배양하여 사용하였다(배양 조건: 5% CO₂가 공급되는 37℃ 배양기). 계대를 위하여 DMEM 배지를 제거하고 PBS 4ml로 1회 세척한 후, Trypsin-EDTA Solution 1X(1XTE, Sigma)를 1ml 처리하여 배양기에 10~15분 동안 넣어두었다. 인체유래 장상피세포(Caco-2)의 부착이 떨어진 것을 확인한 후 DMEM 배지 4ml를 넣어 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 회수하였다. 상기 회수된 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 1,200rpm으로 3분 동안 원심분리를 한 후, 상등액을 조심스럽게 제거하고, DMEM 배지 1ml를 넣어 세포 펠렛을 풀어 주었다. 인체유래 장상피세포(Caco-2)와 DMEM 배지를 1:4의 중량비율로 희석한 후 100Ψ 세포배양접시에 넣고 잘 혼합한 후 배양기에서 2~3일간 배양하여 사용하였다.
- [0067] **실험예 1-2. 배양물이 처리된 인체유래 장상피세포(Caco-2)에서의 RNA 추출**
- [0068] 상기 실험예 1-1의 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 6 웰에 웰당 2x10⁴ cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다. FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 실시예 1-2의 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주의 배양물과 배양 혼합물, 양성 대조군으로 KCTC3109 배양물과 KCTC3108 배양물을 각각 300μl/ml의 농도로 상기 각 웰의 인체유래 장상피세포(Caco-2)에 처리하였다. 배양물이 처리된 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 8시간 동안 배양한 후, PBS로 2번 세척해 준 후 easy-spin™ lysis buffer(iNtRON, USA) 1ml를 넣고 상기 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 용해하였다. 상기 용해된 인체유래 장상피세포(Caco-2)에서 easy-spin™ [DNA free] Total RNA Extraction Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA 순도와 분해정도는 ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop, Wilmington, USA)와 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)로 확인하였다.
- [0069] 그 결과 도 1 내지 3에서 확인되는 바와 같이, 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주의 배양물 모두 음성 대조군 (control) 및 양성 대조군 (KCTC3109, KCTC3108)에 비하여 TJP1, TJP2 및 오클루딘 (Occludin)의 유전자 발현량이 증가한 것을 확인하였고, 배양 혼합물의 경우 각 배양여과액에 비해서도 높은 유전자 발현량의 증가를 확인할 수 있다.
- [0071] **실험예 2: 점액 (뮤신) 관련 유전자 발현의 확인**
- [0072] 본 발명 배양 혼합물의 점액 (뮤신) 관련 유전자 발현을 확인하였다.
- [0073] 구체적으로 배양물이 처리된 인체유래 장상피세포(Caco-2)에서의 RNA 추출하기 위해 상기 실험예 1-1의 인체유

래 장상피세포(Caco-2)를 6 웰에 웰당 2×10^4 cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다. FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 실시예 1-2의 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주의 배양물과 배양 혼합물, 양성 대조군으로 KCTC3109 배양물과 KCTC3108 배양물을 각각 $300 \mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도로 상기 각 웰의 인체유래 장상피세포(Caco-2)에 처리하였다. 배양물이 처리된 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 8시간 동안 배양한 후, PBS로 2번 세척해 준 후 easy-spin™ lysis buffer(iNTRON, USA) 1ml를 넣고 상기 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 용해하였다. 상기 용해된 인체유래 장상피세포(Caco-2)에서 easy-spin™ [DNA free] Total RNA Extraction Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA 순도와 분해정도는 ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop, Wilmington, USA)와 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)로 확인하였다. qRT-PCR를 이용하여 유전자 발현 실험을 진행하였다. 데이터의 값은 delta delta Ct($\Delta\Delta\text{Ct}$)값을 이용하여 $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ 으로 상대값을 구해서 나타내었다.

[0074] 그 결과, 도 4 및 5에서 확인되는 바와 같이, 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양 여과액 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주의 배양 여과액 모두 음성 대조군 (control) 및 양성 대조군 (KCTC3109, KCTC3108)에 비하여 MUC2 및 MUC4의 유전자 발현량이 증가한 것을 확인하였고, 배양 혼합물의 경우 각 배양 여과액에 비해서도 높은 유전자 발현량의 증가를 확인할 수 있다.

[0076] **실험예 3: 장세포 부착율의 확인**

[0077] 본 발명 배양 혼합물의 유산균 장세포 부착율을 아래의 실험방법으로 확인하였다.

[0078] 인체 유래 대장상피세포(HT-29)는 한국세포주은행에서 분양받았다.

[0079] 10% FBS(fetal bovine serum) antibiotics free DMEM 배지(Gibco, USA)에서 인체유래 대장상피세포(HT-29)와 DMEM을 1:4의 중량비율로 2~3일에 한 번씩 계대 배양하여 사용하였다(배양 조건: 5% CO2가 공급되는 37℃ 배양기). 계대를 위하여 DMEM 배지를 제거하고 PBS 4ml로 1회 세척한 후, Trypsin-EDTA Solution 1X(1XTE, Sigma)를 1ml 처리하여 배양기에 10~15분 동안 넣어두었다. 인체유래 대장상피세포(HT-29)의 부착이 떨어진 것을 확인한 후 DMEM 배지 4ml를 넣어 인체유래 대장상피세포(HT-29)를 회수하였다. 상기 회수된 인체유래 대장상피세포(HT-29)를 1,200rpm으로 3분 동안 원심분리를 한 후, 상등액을 조심스럽게 제거하고, DMEM 배지 1ml를 넣어 세포 펠렛을 풀어주었다. 인체유래 대장상피세포(HT-29)와 DMEM 배지를 1:4의 중량비율로 희석한 후 100Ψ 세포배양접시에 넣고 잘 혼합한 후 배양기에서 2~3일간 배양하여 사용하였다. Monolayer를 형성한 HT-29 세포를 PBS 완충액으로 세척한 다음 6 웰에 웰당 5×10^5 cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다. HY2782배양물과 HY7715배양물, HY2782배양물과 HY7715배양물의 혼합물을 처리하고, 음성대조군에는 FBS가 들어가지 않은 DEMEM배지를 처리하였다. FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 각각의 유산균 HY2782(*L. casei*), HY7715(*L. plantarum*), HY8002(*B. lactis*) 생균제를 1×10^9 cfu/ml의 농도가 되도록 현탁한 다음 각각 웰 플레이트에 접종하여 2시간 동안 배양 하였다. 배양 종료 후, PBS로 5회 세척하여 부착되지 않은 유산균을 제거한 다음 0.05% 트립신-0.02%EDTA를 2분간 처리하여 웰 플레이트에 부착되어 있는 HT-29세포와 유산균을 분리하였다. 분리한 세포는 희석수를 이용하여 10진법으로 희석하고 MRS 또는 BL 아가 플레이트에서 배양한 후 생균수를 측정하였다. (Trends. Food. Sci. Technol., 1999, Vol.10, pp 405-410; Korean Soc. Food. Sci. Nutr., 2016, Vol.45, pp 12-19).

[0081] 상피세포 부착율은 하기의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{장부 부착율(\%)} = \frac{\text{부착유산균수(CFU/ml)}}{\text{초기유산균현탁액생균수(CFU/ml)}} \times 100$$

[0082]

[0084] 그 결과, 도 6에서 확인되는 바와 같이, 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물 및 락토바실러스 플란타럼 HY7715 균주의 배양물 모두 음성 대조군 (control) 및 양성 대조군 (KCTC3109, KCTC3108)에 비하여 HY2782, HY7715, HY8002 균주의 장 세포 부착율이 높은 것을 확인하였고, 배양 혼합물의 경우 각 배양물에 비해서도 높은 장 세포 부착율의 증가를 확인할 수 있다.

[0086] **실험예 4: 연속식 소화관 모델에서의 균주 생존율 확인**

- [0087] 본 발명 배양 혼합물을 함유하고 있는 HY2782 유산균 제품의 배양기간에 따른 제품의 소화관 생존율을 확인하였다.
- [0088] 제품의 배양기간에 따라 D-0일(HY2782 seed), D+1일, D+2일, D+3일, D+4일, D+5일, D+6(D제품)일 배양을 진행한 각각 제품의 연속식 소화관 모델에서의 균주 생존율을 확인 하였다
- [0089] 각각의 제품은 최종 농도가 1×10^9 cfu/ml이 되도록 PBS(phosphate buffer saline)에 용해하여 시료를 준비하였다.
- [0090] M. Minekus et al. (Food Funct. 2014 (5) : 1113-1124) 등의 논문을 참고하여 소화모델에 사용되는 전해질 용액을 제조하였고, 전해질 용액의 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

구분	Simulated Salivary Fluid (SSF, mmol/L)	Simulated Gastric Fluid (SGF, mmol/L)	Simulated Intestinal Fluid (SIF, mmol/L)
KCl	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	13.6	25	85
NaCl	—	47.2	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.15	0.1	0.33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.06	0.5	—
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	1.5 (0.75)	0.15 (0.075)	0.6 (0.3)

[0093] 구강 단계에서는 준비된 시료에 SSF 전해질 용액, 인체 유래 타액의 α -amylase를 첨가하여 37℃에서 2분간 반응 후 SGF 전해질 용액과 돼지 유래 펩신을 첨가하고 pH 3.0으로 조절하여 37℃에서 2시간 동안 반응하였다. 소장단계에서는 앞서 소화된 시료에 돼지 유래 판크레아틴, 담즙산을 첨가하여 pH 7.0으로 조절한 뒤 37℃에서 2시간 동안 반응하였다. 마지막 흡수 단계에서는 앞서 소화된 시료에 자연막소포(Brush Border Membrane Vesicles)를 첨가하고 pH 7.0으로 조절한 뒤 37℃에서 4시간 동안 반응하였다. 모든 소화흡수과정을 거친 후에 잔존하는 프로바이오틱스 균수는 통상적인 유산균 생균수 측정 방법에 따라 생균수를 분석하였으며, 균주의 소화관 생존율은 소화흡수 전의 초기 균수와 비교하여 생존율(%)로 표현하였다.

[0094] 그 결과, 도 7에서 확인되는 바와 같이, 구강, 위 및 장 모델 모두에서 배양기간에 따라 소화관 생존율이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0096] **실험예 5: 장세포 부착율의 확인**

[0097] 본 발명 배양 혼합물을 함유하고 있는 HY2782 유산균 제품의 배양기간에 따른 제품의 장세포 부착율을 확인하였다.

[0098] 상기 실험예 3과 동일한 방식으로 진행하였으며 제품의 배양기간에 따라 D-0일(HY2782 seed), D+1일, D+2일, D+3일, D+4일, D+5일, D+6일(D제품) 배양을 진행한 각각 제품을 1×10^9 cfu/ml의 농도가 되도록 현탁한 다음 각각 웰 플레이트에 접종하여 2시간 동안 배양 하였다. 배양 종료 후, PBS로 5회 세척하여 부착되지 않은 유산균을 제거한 다음 0.05% 트립신-0.02%EDTA를 2분간 처리하여 웰 플레이트에 부착되어 있는 HT-29세포와 유산균을 분리하였다. 분리한 세포는 희석수를 이용하여 10진법으로 희석하고 MRS 또는 BL 아가 플레이트에서 배양한 후 생균수를 측정하였다.

[0099] 그 결과, 도 8에서 확인되는 바와 같이, 배양기간에 따라 장세포 부착율이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0101] **실험예 6: 소화관 생존율 확인**

[0102] 본 발명 배양 혼합물의 연속식 소화관 모델에서의 균주 생존율을 확인하였다.

[0103] 상기 실험예 4와 동일한 방식으로 진행하였으며 각각의 제품은 최종 농도가 1×10^9 cfu/ml이 되도록

PBS(phosphate buffer saline)에 용해하여 시료를 준비하였다.

[0104] 그 결과, 도 9에서 확인되는 바와 같이, 구강, 위 및 장 모델 모두에서 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물이 포함되어있는 HY2782 유산균 (B제품 및 C제품) 및 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물과 락토바실러스 플라타렘 균주의 배양 혼합물이 포함되어 있는 HY2782 유산균 (D제품)에서 음성대조군 (상기 발효 배양물이 포함되어 있지 않은 HY2782 유산균 분말, A제품)에 비하여 높은 초기 균주 대비 생존율을 확인하였다.

[0106] **실험예 7: 장세포 부착율의 확인**

[0107] 본 발명 배양 혼합물의 유산균 장세포 부착율을 확인하였다.

[0108] 상기 실험예 3과 동일한 방식으로 진행하였으며 A, B, C, D 제품을 1×10^9 cfu/ml의 농도가 되도록 현탁한 다음 각각 웰 플레이트에 접종하여 2시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, PBS로 5회 세척하여 부착되지 않은 유산균을 제거한 다음 0.05% 트립신-0.02%EDTA를 2분간 처리하여 웰 플레이트에 부착되어 있는 HT-29세포와 유산균을 분리하였다. 분리한 세포는 희석수를 이용하여 10진법으로 희석하고 MRS 또는 BL 아가 플레이트에서 배양한 후 생균수를 측정하였다.

[0109] 그 결과, 도 10에서 확인되는 바와 같이, 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물 (B제품 및 C제품) 및 배양 혼합물 (D제품)에서 음성대조군 (유산균 분말제품, A제품)에 비하여 높은 장 세포 부착율을 확인하였다.

[0111] **실험예 8: 배양균이 처리된 인체유래 장상피세포(Caco-2)에서의 유전자 발현 분석**

[0112] 상기 실험예 1-1의 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 6 웰에 웰당 2×10^4 cells로 접종한 후, 24-48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다. FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 A제품, B제품, D제품을 각각 $500 \mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도로 상기 각 웰의 인체유래 장상피세포(Caco-2)에 처리하였다. 배양물이 처리된 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 8시간 동안 배양한 후, PBS로 2번 세척해 준 후 easy-spin™ lysis buffer(iNtRON, USA) 1ml를 넣고 상기 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 용해하였다. 상기 용해된 인체유래 장상피세포(Caco-2)에서 easy-spin™ [DNA free] Total RNA Extraction Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA 순도와 분해정도는 ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop, Wilmington, USA)와 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)로 확인하였다. 각각의 RNA 라벨링(labeling)과의 혼성화(hybridization)는 Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol(Agilent Technology, V 6.5, 2010)에 따라 마크로젠(Macrogen inc., Korea)에서 마이크로어레이(microarray)를 수행하여 분석하였다. 마이크로어레이(Microarray) 결과는 Agilent Feature Extraction software v11.0 (Agilent Technologies)를 통해 추출되어, Agilent feature extraction protocol에 따라 분석되었다. 유전자풍부화(Gene enrichment)와 특정 프로브(probe)에 대한 기능적 주석 분석(Functional Annotation analysis)은 gene ontology(www.geneontology.org/)와 KEGG(<http://kegg.jp>)를 통해 진행하였다. Significant data에 대하여, expression level(normalized value)이 유사한 샘플 및 probes를 그룹화하는 Hierarchical Clustering analysis (Euclidean Method, Complete Linkage)를 수행하고, 이를 Heatmap(<https://software.broadinstitute.org/morpheus>)으로 나타내었다.

[0113] 그 결과, 표 2 및 도 11에서 확인되는 바와 같이, 유산균 분말 A제품, 락토바실러스 카제이 HY2782 배양균 (B제품 및 C제품) 및 HY2782 배양균과 HY7715 배양물 혼합물(D제품)에서 음성대조군(Control) 대비 밀착연접단백질 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였으며, 유산균 분말 A제품 대비 B, C 제품이 상대적으로 높은 유전자 발현량의 증가를 확인할 수 있었으며, D 제품이 가장 높은 유전자 발현량의 증가를 확인할 수 있다. 표 2의 결과를 Hierarchical Clustering analysis (Euclidean Method, Complete Linkage)를 수행하고, 이를 Heatmap(<https://software.broadinstitute.org/morpheus>)으로 도 11에 나타내었다.

표 2

Symbol	Fold Change (of Control)				Description of role in relation to tight junctions
	A	B	C	D	
TJP2	1.11	1.15	1.21	1.36	tight junction bridging protein
OCN	1.12	1.17	1.25	1.76	tight junction bridging protein
CLDN4	1.21	1.24	1.24	1.36	tight junction bridging protein
CLDN3	1.12	1.34	1.26	1.82	tight junction bridging protein
VASP	1.13	1.23	1.32	1.54	tight junction bridging protein
RUNX1	1.15	1.33	1.61	1.40	tight junction bridging protein
AFDN	1.17	1.26	1.27	1.60	tight junction bridging protein
SYNPO	1.16	1.25	1.26	2.02	tight junction bridging protein
CGNL1	1.02	1.39	1.50	1.51	tight junction bridging protein
ITCH	1.07	1.10	1.38	1.24	ubiquitin-ligase molecule that regulates occludin degradation
VEGFA	1.46	1.48	1.50	2.15	cytokine that indirectly regulates tight junction formation and strengthens
JUB	1.26	1.37	1.38	1.96	major cytoplasmic protein that forms a complex with cadherins
HNF4A	1.28	1.33	1.34	1.48	transcription regulator that acts on occludin
CD2AP	1.06	1.09	1.06	1.08	scaffolding molecule that regulates the actin cytoskeleton
VCL	1.14	1.22	1.25	1.40	cytoskeletal protein
MAGI3	1.07	1.10	1.12	1.19	tight junction bridging protein
MPP5	1.02	1.12	1.11	1.28	tight junction plaque protein associated with claudins
FGFR1	1.70	2.24	1.97	2.24	tight junction bridging protein
NECTIN2	1.05	1.18	1.15	1.58	tight junction bridging protein
CTNND1	1.20	1.36	1.33	1.48	tight junction bridging protein
SNAI1	1.08	1.19	1.26	1.42	tight junction bridging protein
GATA3	-1.19	-1.21	-1.41	-1.83	Inflammatory bowel disease (IBD)
NFKB1	-1.11	-1.19	-1.30	-1.27	Inflammatory bowel disease (IBD)

[0114]

[0116]

또한 염증성 장질환(IBD)을 유발시키는 유전자(GATA3, NFKB1) 발현량의 감소를 확인하였을 때 A제품, B제품, C제품 및 D제품에서 음성대조군(Control) 대비 염증성 장질환 유발 유전자의 발현이 감소되는 것을 확인하였으며, 유산균 분말 A제품 대비 B, C 제품이 상대적으로 높은 유전자 발현량의 감소를 확인할 수 있었으며, D 제품이 가장 높은 유전자 발현량의 감소를 확인할 수 있다.

[0118]

실험예 9. 발효 혼합물 최적 혼합비율 확인

[0119]

본 발명 배양 혼합물의 최적 혼합비율을 확인하였다. 상기 실험예 1-1의 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 6 웰에 웰당 2×10^4 cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다. FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 실시예 1-2의 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물 및 락토바실러스 플라타린 HY7715 균주의 배양물을 1:0.2, 1:0.5, 1:1 비율로 혼합하여 배양 혼합물을 제조한 후 300 μ l/ml의 농도로 상기 각 웰의 인체유래 장상피세포(Caco-2)에 처리하였다. 배양물이 처리된 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 8시간 동안 배양한 후, PBS로 2번 세척해 준 후 easy-spin™ lysis buffer(iNtRON, USA) 1ml를 넣고 상기 인체유래 장상피세포(Caco-2)를 용해하였다. 상기 용해된 인체유래 장상피세포(Caco-2)에서 easy-spin™ [DNA free] Total RNA Extraction Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA 순도와 분해정도는 ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop, Wilmington, USA)와 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)로 확인하였다. qRT-PCR를 이용하여 유전자 발현 실험을 진행하였다. 데이터의 값은 delta delta Ct($\Delta \Delta Ct$)값을 이용하여 $2^{-(\Delta \Delta Ct)}$ 으로 상대값을 구해서 나타내었다.

[0120]

그 결과 도 12 내지 16에서 확인되는 바와 같이, 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물 및 락토바실러스 플라타린 HY7715 균주의 배양물 모두 음성 대조군 (control)에 비하여 TJP1, TJP2 및 오클루딘 (Occludin), MUC2, MUC4 의 유전자 발현량이 증가한 것을 확인하였다. 락토바실러스 카제이 HY2782 균주의 배양물 및 락토바실러스 플라타린 HY7715 균주의 배양물 1:0.2 혼합비율이 가장 우수하게 나타나는 것을 확인하였다.

[0122]

실시예 2: 식품 조성물의 제조

[0123]

실시예 2-1. 기능성 음료의 제조

[0124]

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.

[0125]

상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4 중량%와 실시예 1 배양 혼합물을 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.

[0127]

실시예 2-2. 건강기능식품의 제조

[0128] 실시예 1 배양 혼합물을 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 충전하여 경질 캡슐 제품으로 제조하였다.

[0130] **실시예 2-3. 발효제품의 제조**

[0131] 원유 95.36 중량%와 탈지분유(또는 혼합분유) 4.6 중량%를 교반하여 15℃에서의 비중이 1.0473 내지 1.0475, 적정산도는 0.2 내지 0.22%, pH는 6.55 내지 6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix⁰)는 16.3 내지 16.5% 정도가 되도록 혼합하여 유산균 배양액을 제조하였다. 그 후에 유산균 배양액을 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 40℃로 냉각한 뒤 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02 중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP(Bromocresol purple) 배지에서 총 유산균 수가 1.0 x 10⁹ CFU/ml 이상, 적정산도가 0.89 내지 0.91%, pH는 4.55 내지 4.65가 되도록 하였다. 그 후에 액상과당 13 중량%, 백설탕 5 중량%, 혼합과즙농축액 56 Brix 0 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.

[0132] 상기의 유산균 배양액 69.5 중량%와 실시예 1 배양 혼합물을 동결건조시킨 동결건조 분말 0.1 중량% 및 상기의 혼합과즙시럽 30.4 중량%를 조합하여 150 bar 에서 균질화한 후 10℃이하로 냉각하여 발효유를 제조하였다.

[0134] **실시예 3. 약학적 조성물의 제조**

[0135] **실시예 3-1. 액제의 제조**

[0136] 실시예 1의 배양 혼합물, 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.

[0138] **실시예 3-2. 캡슐제의 제조**

[0139] 실시예 1의 배양혼합물을 동결건조한 동결건조분말에 옥수수전분, 유당 및 스테아린산 마그네슘을 완전히 혼합한 후 약전 제제충직 중 캡슐제 제조방법에 따라 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0141] 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 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0143] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0144] 수탁번호 : KCTC13438BP

[0145] 수탁일자 : 20171219

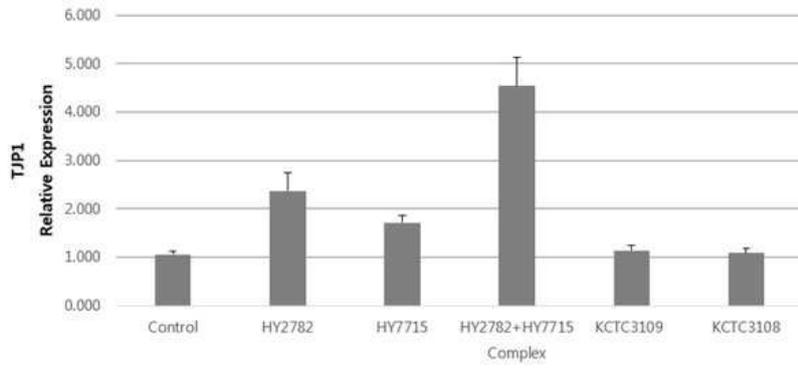
[0147] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0148] 수탁번호 : KCTC13101BP

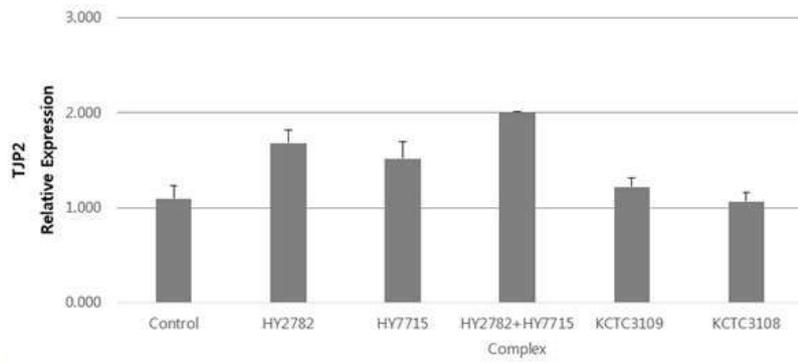
[0149] 수탁일자 : 20160908

도면

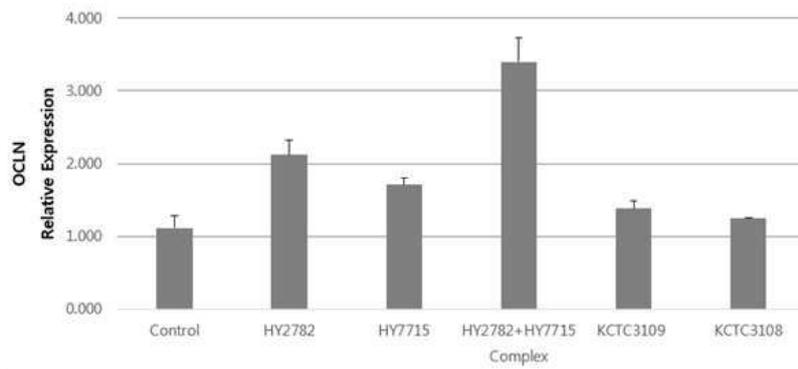
도면1



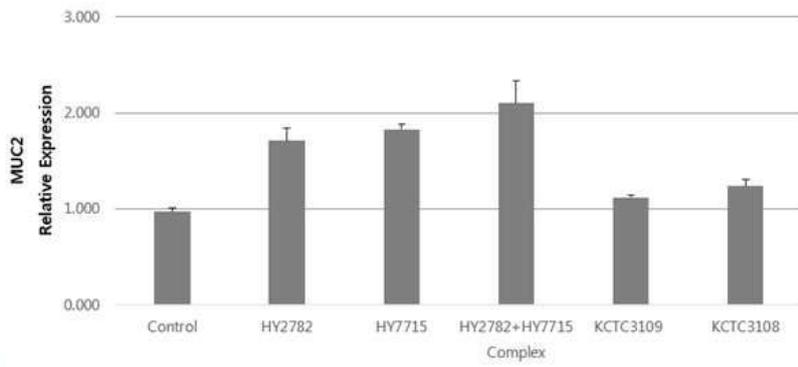
도면2



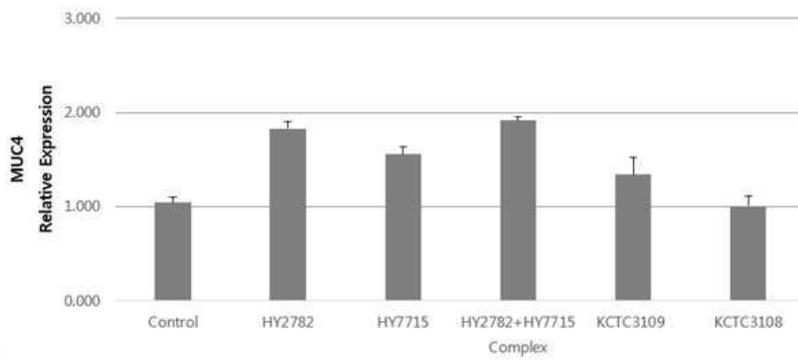
도면3



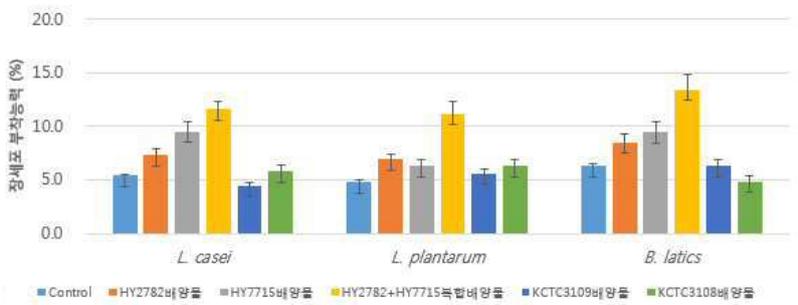
도면4



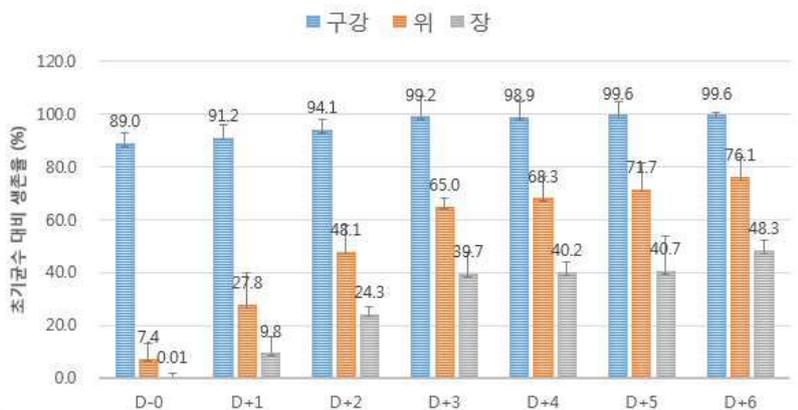
도면5



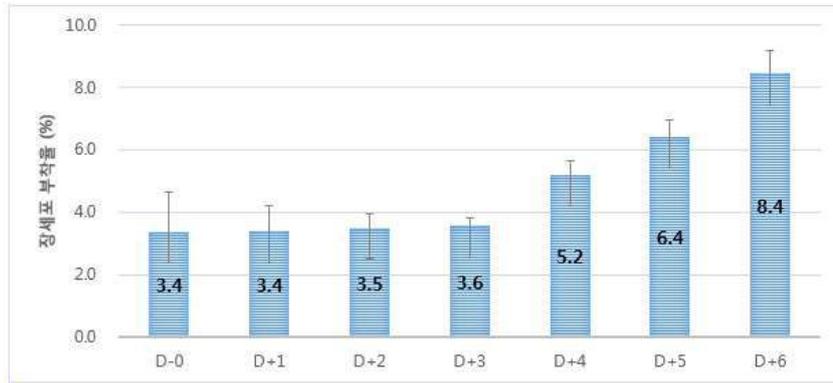
도면6



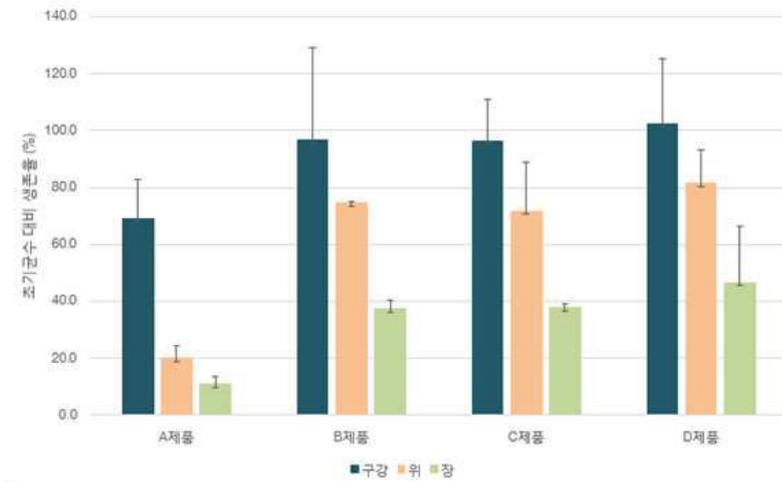
도면7



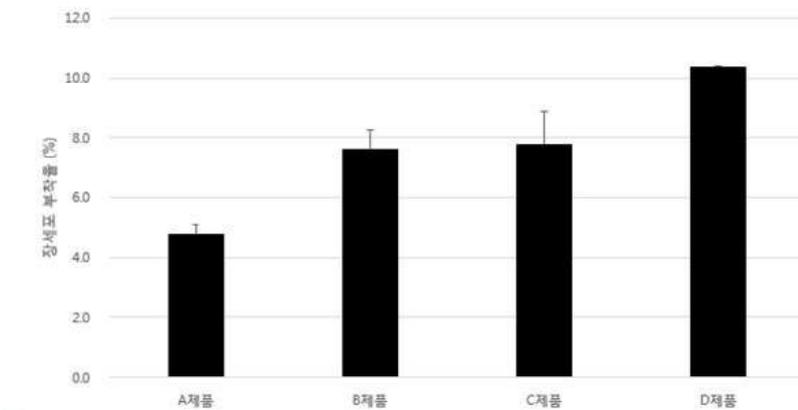
도면8



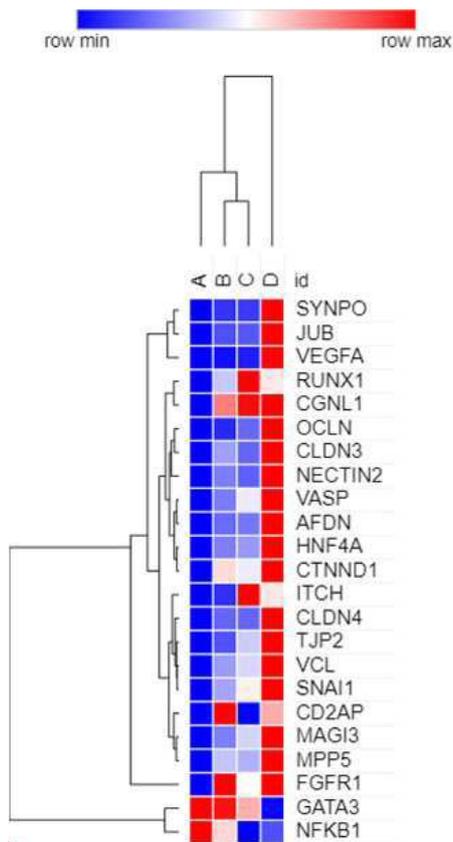
도면9



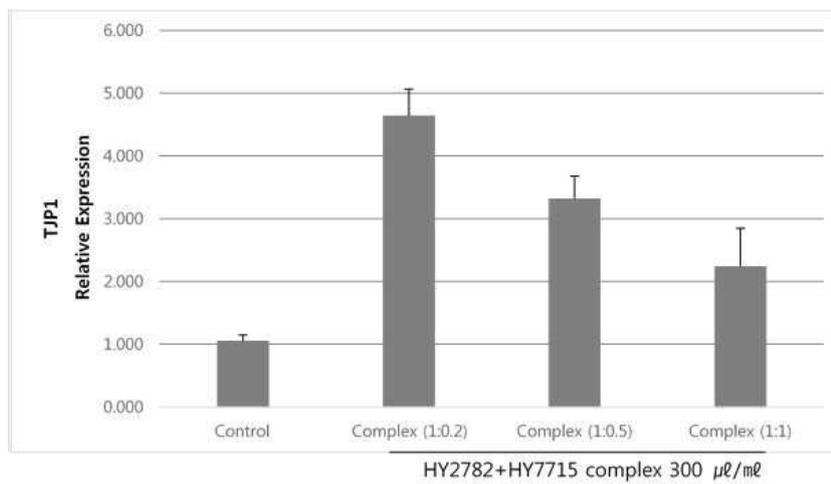
도면10



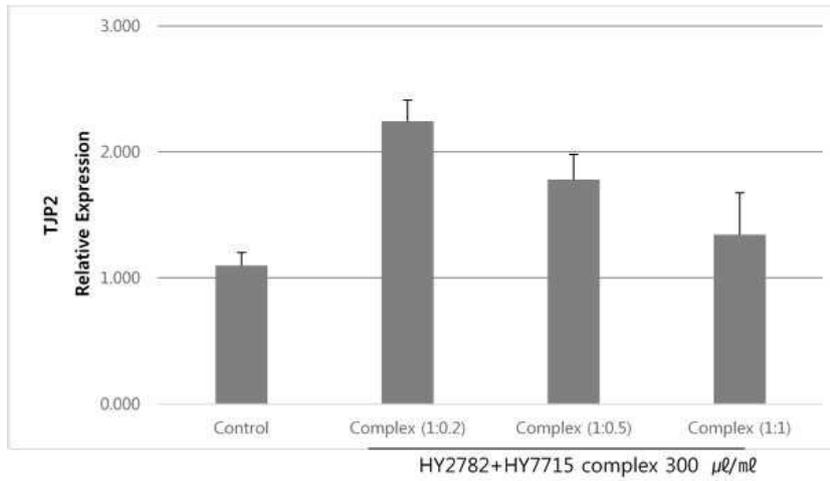
도면11



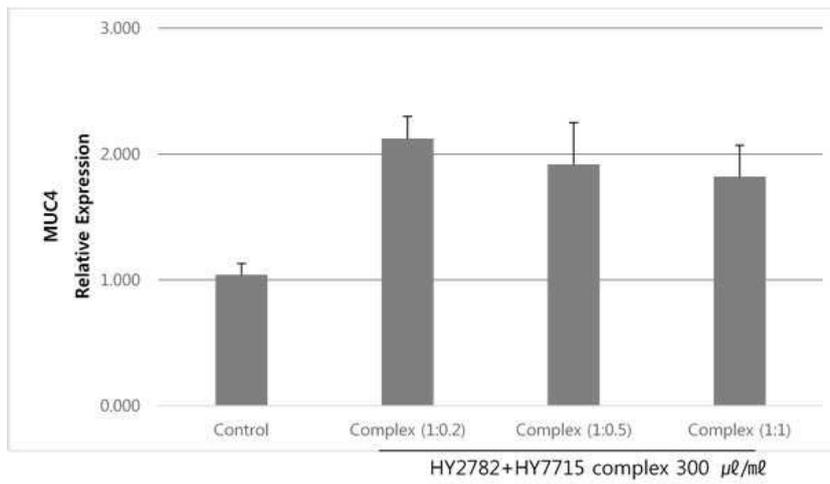
도면12



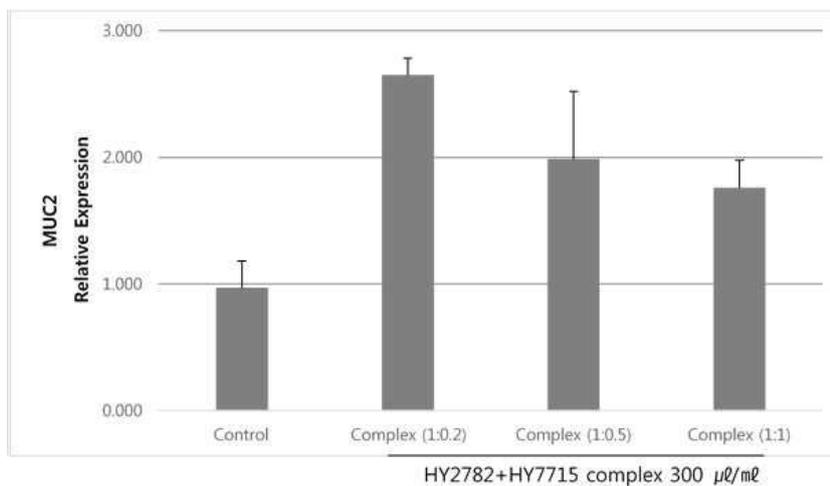
도면13



도면14



도면15



도면16

