



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월12일  
(11) 등록번호 10-2310175  
(24) 등록일자 2021년09월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/747 (2014.01) A23L 33/105 (2016.01)  
A23L 33/135 (2016.01) A61K 35/00 (2015.01)  
A61K 35/745 (2014.01) A61K 36/28 (2006.01)  
A61K 36/31 (2006.01) A61K 36/732 (2006.01)  
A61K 36/752 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 35/747 (2013.01)  
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2020-0004805
- (22) 출원일자 2020년01월14일  
심사청구일자 2020년01월14일
- (65) 공개번호 10-2021-0091855
- (43) 공개일자 2021년07월23일
- (56) 선행기술조사문헌  
네이버 블로그: “장케어프로젝트 mpro3 강소라 유산균 리얼후기”,  
<https://blog.naver.com/sje4003/221490851297>  
(2019.03.18.)\*  
등록특허공보 제10-1932955호 (2018.06.14.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
주식회사 에치와이  
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
- (72) 발명자  
이하예라  
서울특별시 관악구 관악로 304, 104동 1501호  
홍동기  
경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 17  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 9 항

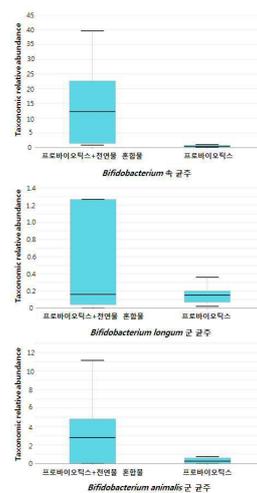
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 프로바이오틱스 및 천연물 혼합물을 포함하는 대장 기능 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 프로바이오틱스 및 천연물 혼합물을 포함하는 포함하는 대장 기능 개선용 조성물 및 이를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물에 관한 것으로, 프로바이오틱스 및 천연물 혼합물이 혼합된 조성물은 장내 유익균의 증식 및 성장을 촉진시킬 뿐만 아니라 장내 면역을 활성화시켜 대장 기능을 개선시키는데 활용가능하다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

*A23L 33/135* (2016.08)  
*A61K 35/745* (2013.01)  
*A61K 36/28* (2013.01)  
*A61K 36/31* (2013.01)  
*A61K 36/732* (2013.01)  
*A61K 36/752* (2013.01)  
*A61P 1/00* (2018.01)  
*A23V 2002/00* (2013.01)  
*A61K 2035/115* (2013.01)

(72) 발명자

**정혁진**

서울특별시 동작구 상도로 346-1

**정성은**

서울특별시 송파구 송이로15길 31, 102동 603호

**최일동**

경기도 용인시 기흥구 금화로58번길 10, 405동  
1704호

**허 건**

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85

**이정열**

경기도 양평군 서종면 통점길 63

**심재현**

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152, 213동 901호

**잭 길버트**

대한민국, 06530, 서울특별시 서초구 강남대로 577

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

i) 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종, 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002)를 포함하는 프로바이오틱스; 및

ii) 락추로스, 우엉 추출물, 모과 추출물, 난소화성 올리고당, 시트러스 추출물 및 양배추 추출물을 포함하는 천연물 혼합물

을 포함하는 대장 기능 개선용 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 프로바이오틱스는 락토바실러스 플란타룸 HY7712 : 락토바실러스 카제이 HY2782 : 비피도박테리움 애니멀리스 아종, 락티스 HY8002 = 1 : 0.5 내지 5 : 0.1 내지 10의 비율로 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 프로바이오틱스는 총 균수  $1 \times 10^7$  내지  $5 \times 10^{11}$  CFU를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 천연물 혼합물은 천연물 혼합물 100 중량 당 락추로스 0.1 내지 10 중량%, 우엉 추출물 0.01 내지 1 중량%, 모과 추출물 0.05 내지 5 중량%, 난소화성 올리고당 0.05 내지 5 중량%, 시트러스 추출물 0.001 내지 0.1 중량%, 양배추 추출물 0.005 내지 0.5 중량% 및 나머지 물을 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 천연물 혼합물 전체 중량에 대하여, 프로바이오틱스를 0.1 내지 10 중량%를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)속 및 락토바실러스(*Lactobacillus*)속 균주의 성장을 촉진시키는 것인 조성물.

**청구항 7**

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 장내 미생물로부터 아세트산 및 뷰티르산 생산을 향상시키는 것인 조성물.

**청구항 8**

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 장내 면역세포의 활성을 향상시키는 것인 조성물.

**청구항 9**

청구항 1의 조성물을 유효성분으로 포함하는 대장 기능 개선용 식품 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 프로바이오틱스 및 천연물 혼합물을 포함하는 포함하는 대장 기능 개선용 조성물 및 이를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 프로바이오틱스(probiotics)는 인간, 동물 등 숙주의 장 건강에 유익한 효과를 나타내는 미생물들로, 대부분의 프로바이오틱스는 유산균들이며 일부 바실러스속(genus) 균주, 비피도박테리움속 균주 등을 포함한다. 유산균을 비롯한 균들은 장내 정착하여 증식되고 활성화되면서 한편으로는 해로운 미생물의 성장과 활동을 억제하여 장내 미생물 균총(intestinal microbial flora)의 균형을 유지하는 작용을 한다. 장내 미생물 균총은 주로 숙주의 생리적 조건, 섭취하는 음식물 및 약물, 육체적 및 정신적 스트레스 등 다양한 요인에 의해 변화되며, 이들의 균형이 무너질 경우에는 장내 혐기화, 장 운동 감소, 대장 배설기능 저하, 면역력 저하 등이 나타날 수 있다.

[0004] 최근 불규칙한 생활, 서구화된 식문화 노출로 인해, 현대인들에게서 복부팽만감, 하복부통증, 배변 후 잔변감(tenesmus, 시원치 않음), 설사 등의 증상이 빈번하게 발생되고 있다. 이러한 증상이 지속되어 악화되면 대장 기능이 저하되어 만성변비, 과민성 대장 증후군으로 발전하고, 염증까지 나타나 통증과 함께 일상생활에 큰 불편함을 느끼게 된다. 따라서, 대장 기능을 향상 또는 개선시키기 위해 프로바이오틱스를 이용한 식품, 건강기능 식품 등의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 본 발명은 i) 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002)를 포함하는 프로바이오틱스; 및 ii) 락추로스, 우영 추출물, 모과 추출물, 난 소화성 올리고당, 시트러스 추출물 및 양배추 추출물을 포함하는 천연물 혼합물을 포함하는 대장 기능 개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 유효성분으로 포함하는 대장 기능 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 일 구체예에 따르면, 본 발명은 i) 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712)

(기탁번호: KCTC11874BP), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782) (기탁번호: KFCC-10813) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002) (기탁번호: KCTC13279BP)를 포함하는 프로바이오틱스; 및 ii) 락투로스, 우영 추출물, 모과 추출물, 난소화성 올리고당, 시트러스 추출물 및 양배추 추출물을 포함하는 천연물 혼합물을 포함하는 대장 기능 개선용 조성물을 제공한다.

- [0010] 프로바이오틱스는 프로(pro)와 바이오틱스(biotics)의 합성어로, 세계보건기구(WHO)에서 '충분한 양을 섭취했을 때 건강에 이로운 효과를 줄 수 있는 살아있는 미생물'로 정의된 것을 의미한다. 현재까지 알려진 대부분의 프로바이오틱스는 락토바실러스(*Lactobacillus*)속 등의 유산균(lactic acid bacteria)을 포함하며, 이외에 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)속, 엔테로코커스(*Enterococcus*)속 일부 균주도 해당되어, 장에 도달한 후 장내 증식하고 정착하여 음식물을 분해하고, 비타민을 합성하는 등 유익한 작용을 한다.
- [0011] 상기 프로바이오틱스는 락토바실러스속 균주 및 락토바실러스속 균주로 이루어진 혼합물의 형태로, 락토바실러스 플란타룸 HY7712 : 락토바실러스 카제이 HY2782 : 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002 = 1 : 0.5 내지 5 : 0.1 내지 10의 비율로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸 HY7712 : 락토바실러스 카제이 HY2782 : 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002 = 1 : 0.8 내지 2 : 0.5 내지 5의 비율로 포함할 수 있다.
- [0012] 이때, 프로바이오틱스는 생균을 기준으로 총 균수  $1 \times 10^7$  내지  $1 \times 10^{11}$  CFU를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 총 균수  $1 \times 10^8$  내지  $5 \times 10^{10}$  CFU를 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 총 균수  $1 \times 10^9$  내지  $1 \times 10^{10}$  CFU를 포함할 수 있다.
- [0013] 상기 천연물 혼합물은 프로바이오틱스가 장내 정착하여 증식되는 것을 도우며, 장에 이로운 균을 활성화시키는 역할을 하는 프리바이오틱스(prebiotics)의 역할을 한다.
- [0014] 상기 천연물 혼합물은 천연물 혼합물 100 중량 당 락투로스 0.1 내지 10 중량%, 우영 추출물 0.01 내지 1 중량%, 모과 추출물 0.05 내지 5 중량%, 난소화성 올리고당 0.05 내지 5 중량%, 시트러스 추출물 0.001 내지 0.1 중량%, 양배추 추출물 0.005 내지 0.5 중량% 및 나머지 물을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 천연물 혼합물 100 중량 당 락투로스 0.5 내지 5 중량%, 우영 추출물 0.05 내지 0.5 중량%, 모과 추출물 0.1 내지 1 중량%, 난소화성 올리고당 0.1 내지 1 중량%, 시트러스 추출물 0.005 내지 0.05 중량%, 양배추 추출물 0.01 내지 0.1 중량% 및 나머지 물을 포함할 수 있다.
- [0015] 여기서, 락투로스(lactulose)는 장내 유익균을 증식하고 유해균 억제에 도움을 주는 프리바이오틱스로 인정받은 물질이다.
- [0016] 난소화성 올리고당은 체내에 흡수되지 않은 당류로, 소장에서 흡수되지 않고 그대로 장까지 이동하여 미생물의 먹이로 이용된다. 이러한 난소화성 올리고당은 당연계에 알려진 물질이 제한 없이 사용될 수 있으며, 일례로는 프락토올리고당(fructooligosaccharide), 말토올리고당(maltooligosaccharide), 이소말토올리고당(isomaltooligosaccharide), 갈락토올리고당(galactooligosaccharide), 자이로올리고당(xylooligosaccharide), 대두올리고당(soy-oligosaccharide) 등일 수 있다.
- [0017] 시트러스 추출물은 오렌지, 레몬, 라임, 자몽 등의 감귤류에서 추출된 추출물로, 모과 추출물과 함께 프로바이오틱스의 성장 및 증식에 필요한 비타민, 무기염류 등의 영양분을 공급하는데 이용된다.
- [0018] 우영 추출물 및 양배추 추출물은 식이섬유를 공급하는 역할을 하며, 프로바이오틱스의 먹이로 이용된다.
- [0019] 이러한 프로바이오틱스와 함께 천연물 혼합물을 포함하는 조성물은 프로바이오틱스가 성장하기 좋은 대장 환경을 마련하여 장내 유익균의 정착을 도와 장내 유익균인 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)속 및 락토바실러스(*Lactobacillus*)속 균주의 성장을 촉진시킬 수 있다. 또한, 프로바이오틱스가 올리고당을 먹이로 하여 단쇄지방산(Short Chain Fatty Acids; SCFAs)을 생성하는데, 상기 조성물은 장내 미생물로부터 아세트산 및 뷰티르산 생성을 현저하게 향상시켜 비피도박테리움속 균주의 증식을 돕고, 면역반응에 중요한 역할을 하는 사이토카인(cytokine) 생성을 자극할 뿐만 아니라 장내 면역세포의 활성을 향상시켜 장내 면역활성을 증진시킨다.
- [0021] 또한, 다른 일 구체예에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 대장 기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 식품 조성물은 식품 첨가제 또는 기능성 식품에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있으며, 일례로 용액, 유

탁액, 점성형 혼합물, 분말, 과립, 정제, 캡슐 등일 수 있다. 이때, 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종 기제 및/또는 첨가물을 포함할 수 있으며, 그 효과를 떨어뜨리지 않는 범위 내에서 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 무기염류, 유화제 등의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 이러한 첨가제들의 배합량은 제형 또는 사용 목적에 따라 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택될 수 있다. 예를 들면, 식품 조성물의 전체 중량을 기준으로, 첨가제 0.01 ~ 5 중량%, 보다 구체적으로는 0.1 ~ 3 중량%일 수 있다.

[0023] 이러한 식품 조성물이 음료로 사용되는 경우, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 조성물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 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 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

**발명의 효과**

[0025] 본 발명에 따르면, 프로바이오틱스 및 천연물 혼합물이 혼합된 조성물은 장내 유익균의 증식 및 성장을 촉진시킬 뿐만 아니라 장내 면역을 활성화시켜 대장 기능을 개선시키는데 활용가능하다.

**도면의 간단한 설명**

[0027] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 사용된 연속식 대장모사 시스템을 나타낸다.

도 2는 연속식 대장모사 시스템에서 배양된 배양물 내 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)속, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 군 및 비피도박테리움 애니멀리스(*Bifidobacterium animalis*) 군 균주의 수를 측정된 값에 대한 그래프이다.

도 3은 연속식 대장모사 시스템에서 배양된 배양물 내 락토바실러스(*Lactobacillus*)속, 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) 군 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 군 균주의 수를 측정된 값에 대한 그래프이다.

도 4는 연속식 대장모사 시스템에서 배양된 배양물 내 아세트산의 생성량을 측정된 값에 대한 그래프이다.

도 5는 연속식 대장모사 시스템에서 배양된 배양물 내 뷰티르산의 생성량을 측정된 값에 대한 그래프이다.

도 6은 연속식 대장모사 시스템에서 배양된 배양물의 TNF- $\alpha$  발현능을 측정된 값에 대한 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0028] 이하, 첨부된 도면을 참조하며 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

**1. 재료 및 방법**

**1-1. 프로바이오틱스 및 천연물 혼합물 준비**

[0032] 프로바이오틱스로는 *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HY8002, *Lactobacillus casei* HY2782, *Lactobacillus plantarum* HY7712를 2:1:1의 비율로 혼합하여 총 생균수가 100억 CFU인 것으로 준비하였다.

[0033] 천연물 혼합물로는 전체 100 중량 당 락투로스파우더 3 중량%, 우유 농축액 0.1 중량%, 모과 농축액 0.5 중량%, 자일로올리고당 0.6 중량%, 자몽 추출물 0.01 중량%, 양배추 분말 0.05 중량% 및 나머지로 정제수를 포함하도록 준비하였다.

**1-2. 연속식 대장모사 시스템을 이용한 배양**

[0036] 체내 대장 환경을 모사하기 위해 대장의 주요 3부위인 상행결장(ascending colon; V1), 횡행결장(transverse colon; V2), 하행결장(descending colon; V3)에 각각 해당하는 환경을 만들어주었다. 모든 반응기의 온도는 37 ℃로 설정하였으며, 각 반응기의 볼륨은 300 mL (pH 5.5), 400 mL (pH 6.2), 325 mL (pH 6.8)로 맞춰주었다. pH 조절은 1N HCl과 1N NaOH로 자동적으로 조절되게 하였다. 또한 각 반응기 사이의 feeding은 연동식 펌프를

사용하여 12.5 mL/hr의 유속으로 일정하게 in/out이 될 수 있도록 조절하였다. 그리고 혐기 조건을 유지하기 위하여 질소(N<sub>2</sub>)를 10 mL/min의 유속으로 일정하게 주입하였다.

[0037] 3개월 동안 항생제를 섭취하지 않은 건강한 남성 5명으로부터 채취한 대변을 혐기 챔버 안에서 혐기 PBS (대변 1 g 당 5 mL)를 이용하여 균질화하였고, 30분 이내에 대변시료를 각각의 반응기에 최종 2% 접종하였다.

[0038] 대변시료 접종 후 약 2 ~ 3주 정도 장내 미생물 군총 안정화를 유도하고서 총 14일간 매일 오후 3시에 준비된 프로바이오틱스 및/또는 천연물 혼합물을 V1 반응기에 주입하였다. 시스템 1에는 프로바이오틱스를 주입하고, 시스템 2에는 프로바이오틱스+천연물 혼합물 (5 mL)을 주입하였다. 배양물 내 대사체 및 장내 미생물 군총 분석을 위해, 약 4주간 매일 오후 3시에 각 반응기에서 5 ~ 10 mL 가량의 분석시료를 회수하여 -80℃에서 보관하였다.

표 1

성분	함량 (g/L)
펩톤(peptone)	1.0
효모 추출물(yeast extract)	3.0
뮤신(mucin)	4.0
D-글루코스(D-glucose)	0.4
L-시스테인-HCl(L-cystein-HCl)	0.5
펙틴(pectin)	2.0
자일란(xylan)	1.0
아라비노갈락탄(arabinogalactan)	1.0
이눌린(inulin)	0.5
전분(starch)	3.0
담즙산염(bile salt)	0.4
레조아주린(resazurin)	0.0025

[0041] 1-3. NGS 분석

[0042] 분석시료에 대해 차세대 시퀀싱(Next Generation Sequencing; NGS) 분석을 수행하기 위해, 천랩(Chunlab, Inc., Korea; [www.chunlab.com](http://www.chunlab.com))에 의뢰하였다. 천랩에서는 MP Bio사의 FastDNA® Spin Kit for soil를 이용하여 분석시료에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 통해 분석을 수행하였다.

[0044] 1-4. 단쇄지방산(short chain fatty acid; SCFA) 분석

[0045] 분석시료를 차가운 상태로 해동하여 끓는 물(100℃)에서 15분간 끓였다. 이후, 13,000 rpm, 4℃에서 15 분간 원심분리하고 상등액을 회수하여 filter (0.45 μm) 처리하였다. 여과액을 증류수로 희석하여 HPLC 분석을 통해 아세트산(acetic acid) 및 뷰티르산(butyric acid) 생성량을 측정하였다.

[0046] 구체적으로, HPLC(high performance liquid chromatography) (Agilent Technologies, CA, USA) 장치를 사용하였다. 검출기로 UV Detector를, 칼럼으로 Aminex HPX 87-H column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. 용매로 0.01N 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)를 사용하였으며, 분석 조건은 30분까지 0.01N 황산 100%로 하였다. 파장을 215 nm로, 유속을 0.6 mL/min으로 설정하였고, 주입량을 10 μl로 하였다.

[0048] 1-5. 면역세포에서의 TNF-α 발현능 측정

[0049] TNF-α는 면역제어와 염증반응에 핵심적 조절자 역할을 담당하는 사이토카인(cytokine)으로, 세균의 세포막에 있는 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 활성화된 림프구에서 생성되고, 많은 종류의 사이토카인 분비를 조절하는 면역반응에 있어서 가장 초기에 일차적인 매개체로 작용한다. 또한, TNF-α는 염증반응에서 백혈구들이 혈관 내피세포에 부착하는 것을 촉진하여 염증세포들의 미생물 살해능력을 증가시키며, 단핵 식균세포(mononuclear phagocytes)에 작용하여 여러 가지 염증반응에 관여하는 사이토카인을 생산하게 하여 염증반응을 촉진한다. 프로바이오틱스+천연물 혼합물이 면역세포인 단핵구에 미치는 영향을 확인하기 위해, THP-1 (인간 단핵구 세포주)를 대식세포(macrophage)로 분화시킨 후 분석시료를 처리하여 면역세포의 TNF-α 분비를 측정하였다.

[0050] 구체적으로, 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지를 배양배지로 사용하여 THP-1를 주 1회 계대배양하였다. 96웰-플레이트에 배양된 세포 THP-1를 2 X 10<sup>4</sup> cells/well로 로딩한 후 RPMI 1640 배지에 phorbol 12-myristate 13-

acetate(PMA)가 100 ng/mL이 되도록 첨가하여 48시간 동안 분화시켰다.

[0051] 배양이 완전히 종료된 후 얻은 분석시료를 차가운 상태로 해동하여 13,000 rpm, 4℃에서 15 분간 원심분리 후 상등액만을 회수하여 준비하였다.

[0052] 분화된 세포에는 음성대조군(negative control)을 제외한 양성대조군(positive control), 실험군에 LPS (100 ng/mL)를 처리한 후 실험군에 준비된 상등액 10 μl를 처리하여 18 ~ 24시간 동안 배양 후 배양액의 상등액만을 취하여 Human TNF ELISA Set (BD biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 TNF-α ELISA를 수행하였다.

[0054] **2. 결과**

[0055] **2-1. 장내 미생물 균총 변화**

[0056] 연속식 대장모사 시스템을 통해 회수된 배양물에서 장내미생물 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)속, 락토바실러스(*Lactobacillus*)속 균주의 수 변화를 확인하였다. 이때, 각 반응기에서 배양물을 회수하여 균주의 수를 측정하고 이들 값을 평균으로 나타냈다.

[0057] 그 결과, 프로바이오틱스+천연물 혼합물을 혼합 배양한 경우에는 프로바이오틱스만을 배양한 경우에 비해 비피도박테리움속 균주, 락토바실러스속 균주가 현저하게 증가한 것으로 확인되었다. 특히, 대장시료에 존재하는 장내 유익균인 *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* 균의 균주 수가 증가한 것으로 확인되었다 (도 2 및 3). 이 결과를 통해 프로바이오틱스+천연물 혼합물은 장내 유익균을 성장 및 증식을 향상시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0059] **2-2. 단쇄지방산 생성량 변화**

[0060] 장내 미생물에 의해 생성된 아세트산(acetic acid), 뷰티르산(butyric acid)의 생성량 변화를 확인하였다.

[0061] 그 결과, 프로바이오틱스+천연물 혼합물을 혼합 배양한 경우에는 프로바이오틱스만을 배양한 경우에 비해 배양 시간이 지날수록 상행결장, 횡행결장, 하행결장 모두에서 아세트산 및 뷰티르산의 생성량이 증가하는 것으로 확인되었다. 특히, 5일 이상 배양을 지속할수록 프로바이오틱스+천연물 혼합물을 배양하기 전에 비해 아세트산 및 뷰티르산의 생성량이 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다 (도 4 및 5).

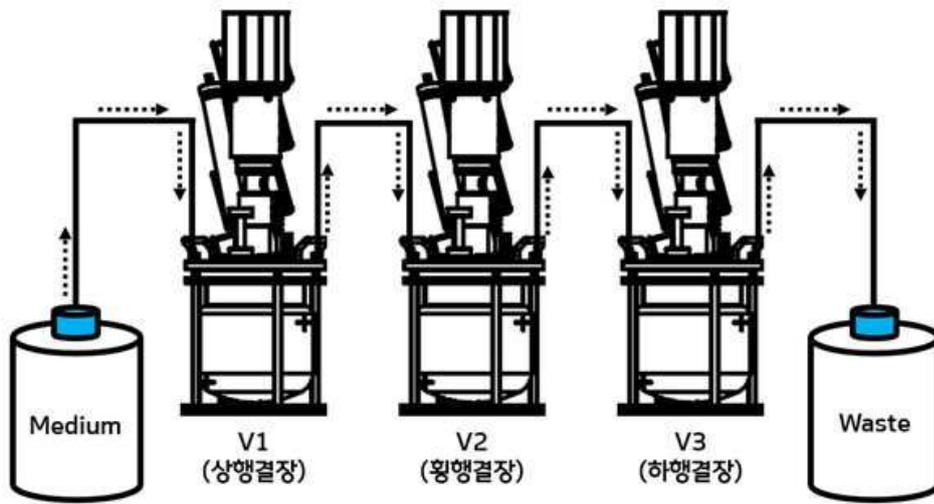
[0063] **2-3. TNF-α 발현능 변화**

[0064] 대장 내 면역세포에 프로바이오틱스가 미치는 영향을 확인하기 위해 LPS에 의해 활성화된 단핵구에서의 TNF-α 발현능을 확인하였다.

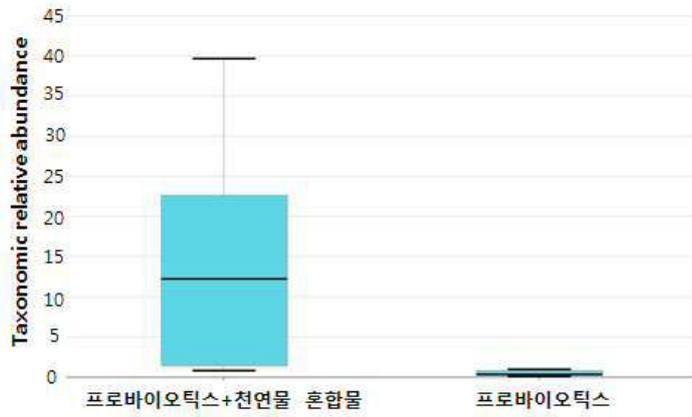
[0065] 그 결과, 상행결장의 배양물에서, 프로바이오틱스+천연물 혼합물을 혼합 배양한 경우가 프로바이오틱스만을 배양한 경우에 비해 LPS에 의한 TNF-α 발현을 현저하게 감소시킨 것으로 확인되었다. 반면, 횡행결장 및 하행결장의 배양물에서는 프로바이오틱스 및/또는 천연물 혼합물이 TNF-α 발현에 미치는 영향이 적은 것으로 확인되었다 (도 6).

도면

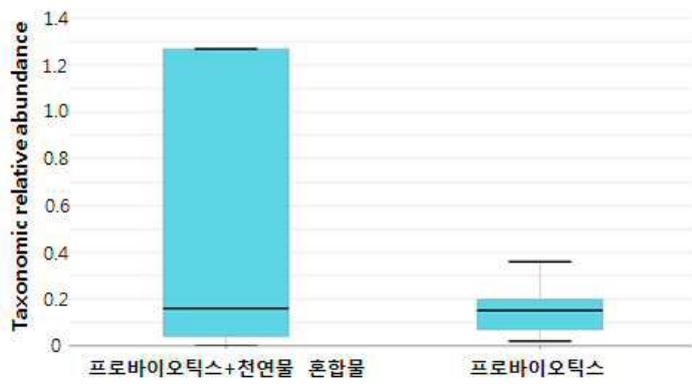
도면1



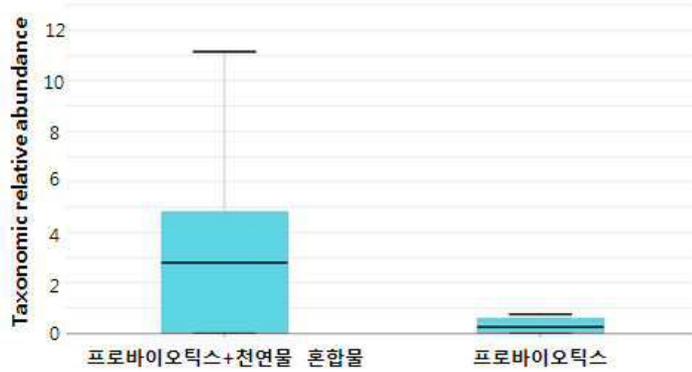
도면2



*Bifidobacterium* 속 균주

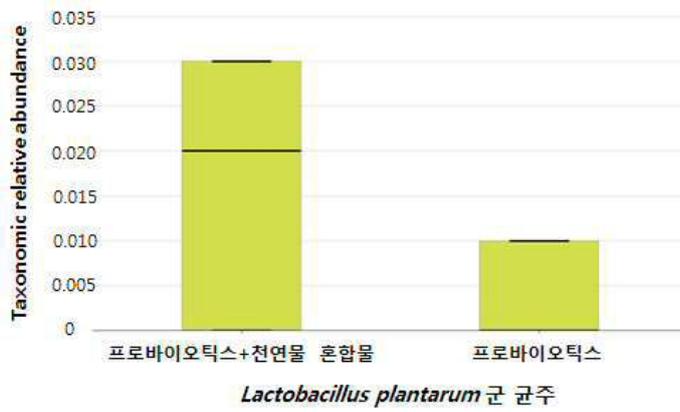
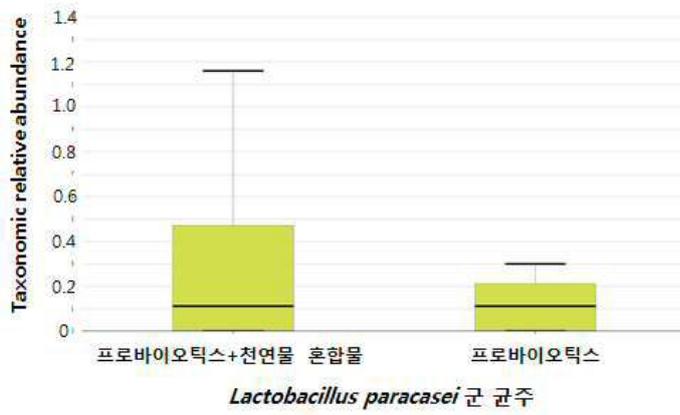
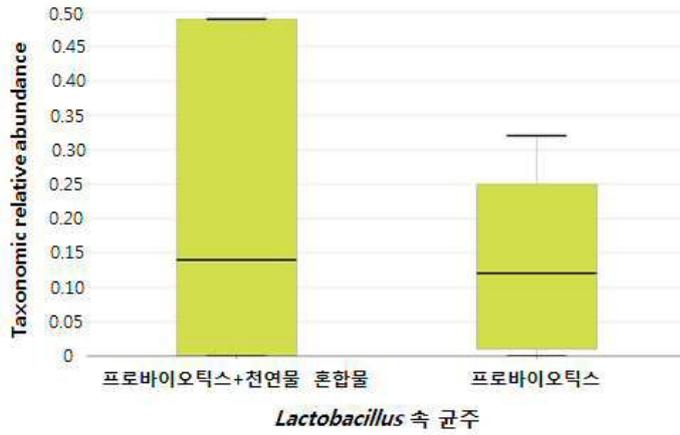


*Bifidobacterium longum* 균 균주

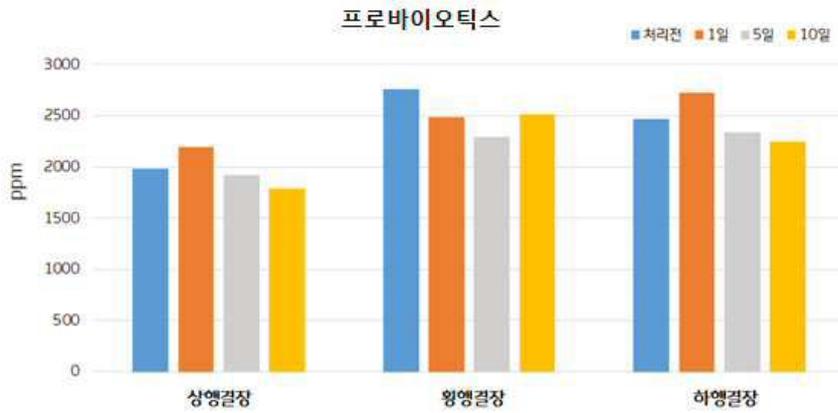


*Bifidobacterium animalis* 균 균주

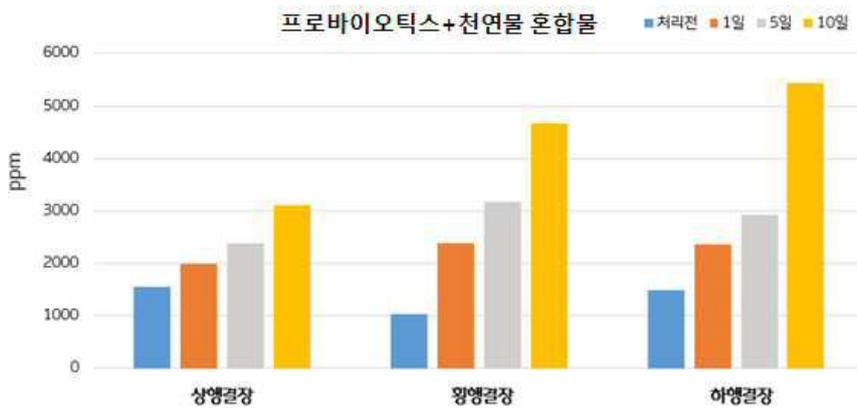
도면3



도면4

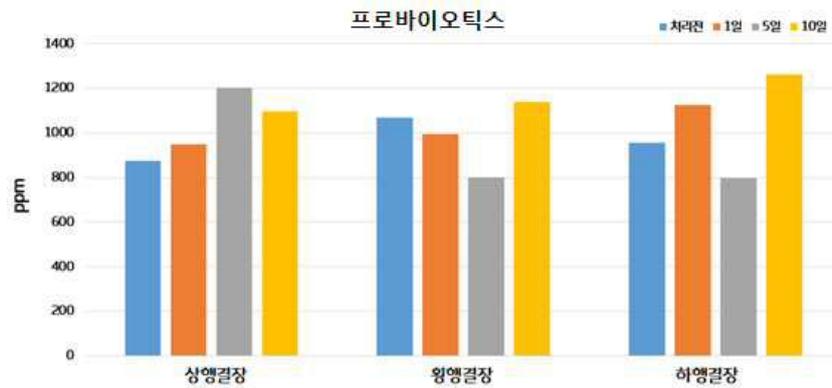


아세트산	상행결장	횡행결장	하행결장
처리전	1982.88	2763.84	2465.15
1일	2193.87	2490.02	2722.73
5일	1920.66	2288.81	2334.69
10일	1786.87	2512.19	2243.99

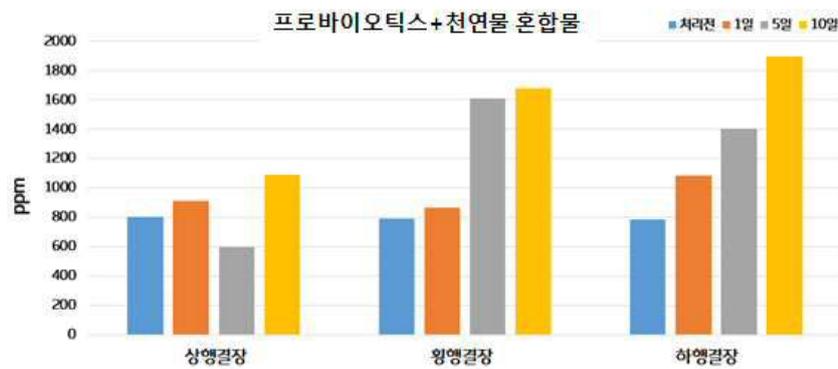


아세트산	상행결장	횡행결장	하행결장
처리전	1549.54	1031.13	1497.20
1일	1978.46	2373.02	2371.61
5일	2386.71	3181.81	2930.07
10일	3120.00	4667.66	5443.14

도면5

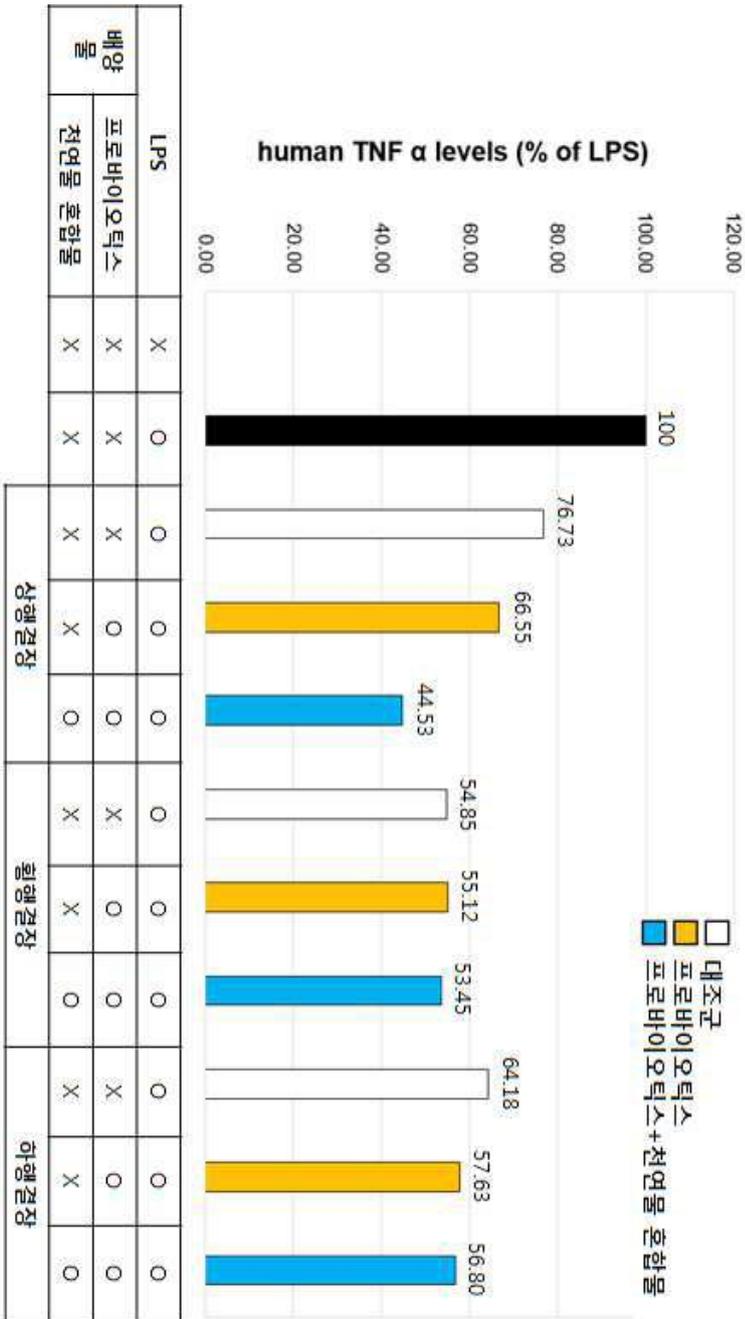


뷰티르산	상행결장	횡행결장	하행결장
처리전	875.30	1068.37	954.52
1일	950.15	995.54	1123.87
5일	1201.43	801.53	797.86
10일	1095.92	1138.13	1260.96



뷰티르산	상행결장	횡행결장	하행결장
처리전	805.06	788.57	785.91
1일	913.57	865.62	1083.22
5일	596.56	1610.40	1402.76
10일	1087.12	1676.99	1894.74

도면6



배양 물	LPS		상행결장				하행결장		아행결장	
	프로바이오틱스	천연물 혼합물	X	O	O	O	O	O	O	O
	X	X	X	X	O	O	X	X	X	O
	X	X	X	O	O	O	X	X	X	O