(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0142934
(43) 공개일자 2023년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 35/747* (2015.01)
A61K 36/40 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 35/747 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0041586
(22) 출원일자 2022년04월04일
심사청구일자 2022년04월04일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
허호진
경상남도 진주시 초장로 120, 504동 501호
이효림
경상남도 진주시 진주대로500번길 28, 301호
(74) 대리인
위병갑

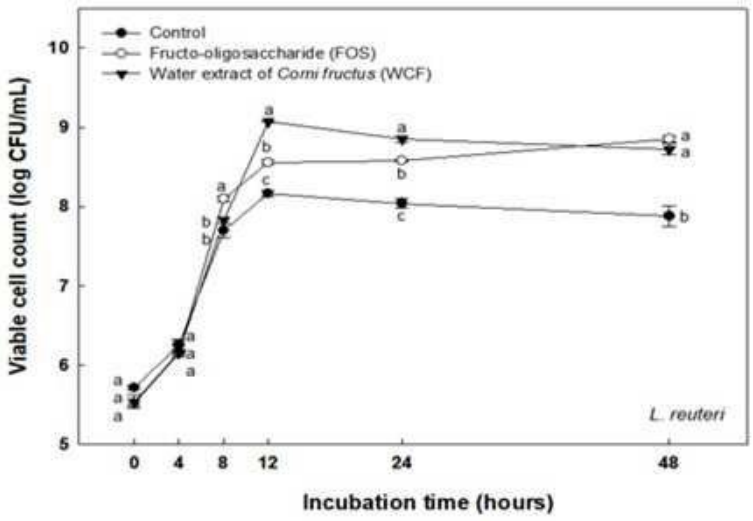
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 장기능 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 장 상피세포 독성에 대한 산수유 물 추출물의 보호 효과를 확인하고, 덱스트란황산나트륨(dextran sulfate sodium, DSS)로 유도된 대장염 마우스에서 장 투과성 및 장염증에 대한 산수유 물 추출물과 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)의 조합(synbiotics)이 가지는 개선 효과에 관한 것으로, 본 발명의 산수유 물 추출물과 락토바실러스 루테리 및 이들의 조합이 DSS로 유도된 대장염으로 인한 장 장벽 손상과 장 염증을 개선하고, 대변에서의 단쇄지방산 함량 및 장내 균총의 불균형을 조절함으로써 대장염 증상을 완화시키는 것으로 판단된다. 따라서, 산수유 물 추출물과 *Limosilactobacillus reuteri* 및 이들의 조합은 대장염으로 인한 장 손상에 대한 건강기능식품 소재로써 활용될 가능성이 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 36/40 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A23V 2400/173 (2023.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345282522
과제번호 2018R1D1A3B07043398
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 (초)미세먼지 유도성 염증 발생과 뇌신경세포 기능저하와의 연계기전 및 개선 기작 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)를 더 포함하는 것인, 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 장세포 보호 효과 및 산화적스트레스 함량을 감소시키는 것인, 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TLR4 및 NF-κB의 수준을 감소시키는 것인, 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 occludin 및 claudin-1 수준을 증가시키는 것인, 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 장 투과성을 회복시키는 것인, 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 골수과산화효소(MPO) 활성을 감소시키는 것인, 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 p-IκB, p-NF-κB 및 iNOS 수준을 감소시키는 것인, 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 조성물은 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)를 더 포함하는 것인, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 산수유(*Corni fructus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 장기능 개선용 조성물에 관한 것으로, 이는 건강기능식품 또는 약학 조성물에 이용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)과 크론병(Chron's disease, CD)을 포함한 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 장에 염증을 일으키는 만성적인 질환으로 복통, 대변 출혈, 묽은 변, 체중 감소 등을 특징으로 하며 전 세계적으로 발병률이 증가하고 있다. IBD의 정확한 발병기전은 아직 알려지지 않았지만 관련된 연구들에 따르면 비정상적인 점막 면역반응, 장 장벽파괴, 장내 균총의 불균형(dysbiosis) 등과 관련이 있다고 보고되어 진다.

[0003] 장의 장벽은 물리적 및 화학방어를 통해 장을 보호하는 역할을 한다. 하지만, 다양한 원인으로 인해 장 점막 장벽이 손상되면, 병원균 및 독소들의 침입으로 인하여 장 손상을 불러일으킨다. 밀착연접은 장 세포 간의 틈새를 조절함으로써 물질의 투과성에 영향을 주는데, 장 내 자극이나 손상으로 인해 밀착연접이 느슨해지면 유해한 산화 촉진 마커의 과잉 생산 및 염증 촉진 매개체들로 인해 장의 염증이 심화된다. 이로 인해 다량의 독소들과 항원들이 장 상피를 투과하여 혈중으로 유입되면 면역체계가 과다하게 반응하여 전염증성 사이토카인의 분비가 증가하게 된다.

[0004] 염증반응의 대표적인 경로인 NF-κB 활성화 경로는 전염증성 사이토카인, 케모카인, 성장인자 또는 COX-2와 iNOS와 같은 유도효소 등을 조절하는 유전자를 조절함으로써 염증반응에 중요한 역할을 수행한다. 따라서, NF-κB 활성화를 억제함으로써 염증반응 매개 인자의 발현을 억제하여 장 손상을 개선할 수 있다.

[0005] 과도한 염증반응은 장 내 미생물 불균형과 동반되어 나타나는데, 이전 연구들에 따르면, 건강한 사람에 비하여 염증성 장 질환 환자들은 *Lactobacillus*, *Lactococcus* 및 *Bifidobacterium* 등과 같은 유산균의 비율이 감소하고, 유해 세균은 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한, 장내 미생물이 장에 공급된 섬유질을 발효 및 분해함으로써 생성되는 단쇄지방산은 장내 pH를 감소시켜 유해균 성장을 억제하고 유해 효소의 활성을 저해함으로써 건강에 유익한 장내 균총 환경을 형성하는 역할을 한다. 이러한 영향으로 단쇄지방산은 과민성 대장 증후군, 염증성 장 질환 발병을 낮추고, 퇴행성질환, 심혈관질환, 비만 등의 위험을 감소시킨다고 알려져 있다.

[0006] 현재 가장 일반적으로 사용되는 IBD의 치료 방법에는 약리학적 치료, 위장관의 환부를 제거하는 수술 등이 있으나, 잠재적인 부작용이 있는 내과적인 치료 방법 대신에 예방 및 교정 차원에서의 식이요법이 대두되고 있다. 식품 속에 존재하는 기능 성분이 장내 유익균 증식 및 IBD 예방에 도움을 줄 수 있다는 연구 결과들이 보고됨에 따라, 프리바이오틱스(prebiotics), 프로바이오틱스(probiotics) 및 신바이오틱스(synbiotics)는 학계, 산업계 및 소비자에게 관심을 받고 있다. 하지만, 이에 대한 연구는 섬유질 성분에 국한되어 있으며, 생리활성물질들을 포함하는 천연물에서의 장 건강 개선 식품의 연구는 부족한 실정이다.

[0007] *Lactobacillus* 속과 같은 장내 유익균은 다양한 신호 경로를 통하여 발생 되는 NF-κB 경로 및 염증성 cytokine 생성을 감소시킴으로 염증반응을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 단쇄지방산의 함량을 증가시키고 장 상피 장벽기능을 강화시켜 유해균 및 독소의 침투를 제어하여 장을 보호한다고 보고된다. 그 중, 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri; L. reuteri*)는 위장관에 존재하는 혐기성 유산균의 일종으로 유기산과 항균 화합물로 알려진 류테린(reuterin)을 생성하여 장내 병원균의 증식을 억제한다고 알려져 있다. 또한, 비만, 신경 발달 장애, 스트레스 및 장 염증과 같은 질병을 약화시키는 것으로 보고되고 있다. 락토바실루스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*; *L. brevis*)는 GABA를 생산해낸다고 알려진 그람 양성의 유산균으로 인간의 장, 질 및 대변에서 발견된다. *L. brevis*는 마우스에서 염증을 조절하여 대장염을 완화시키고, 항비만 및 항당뇨 효과가 있다고 알려져 있다.

[0008] 한편, 산수유 열매(*Corni fructus*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽활엽소교목인 산수유 나무의 성숙한 과실을 건조한 것으로 약용 소재로 사용되고 있다. 산수유는 식이섬유와 비타민 유기산 성분이 다량 함유되어 있어 신장 건강, 피부미용, 비만 및 당뇨 개선 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 하지만 산수유의 다양한 생리활성이 보고됨에도 불구하고 궤양성 대장염에서 산수유가 프리바이오틱스 및 신바이오틱스로서 가지는 활성에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro* lipopolysaccharide로 유도된 장 상피세

포(HT-29 세포) 손상 및 dextran sulfate sodium(DSS)으로 유도되는 궤양성 대장염 동물 모델에서 산수유 물 추출물이 가지는 잠재적인 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 활성을 평가하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 10-2021-0081895

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 장기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 장기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)를 더 포함하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 장세포 보호 효과 및 산화적스트레스 함량을 감소시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 TLR4 및 NF-κB의 수준을 감소시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 occludin 및 claudin-1 수준을 증가시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 장 투과성을 회복시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 골수과산화효소(MPO) 활성을 감소시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 p-IκB, p-NF-κB 및 iNOS 수준을 감소시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 이어서, 본 발명은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)를 더 포함하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 장 상피세포 독성에 대한 산수유 추출물의 보호 효과를 확인하고, 덱스트란황산나트륨(dextran sulfate sodium, DSS)로 유도된 대장염 마우스에서 장 투과성 및 장 염증에 대한 산수유 물 추출물과 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*)의 조합(synbiotics)이 가지는 개선 효과에 관한 것으로, 본 발명의 산수유 추출물과 락토바실러스 루테리 및 이들의 조합이 DSS로 유도된 대장염으로 인한 장 장벽 손상과 장 염증을 개선하고, 대변에서의 단쇄지방산 함량 및 장내 균총의 불균형을

조절함으로써 대장염 증상을 완화시킨다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 산수유 물 추출물(WCF)이 *Limosilactobacillus reuteri* 및 *Levilactobacillus brevis* 균주의 생존 세포 수(a), (b) 및 적정 산도 측정(c), (d)에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, LPS로 유도된 HT-29 세포에서 산수유 물 추출물(WCF)이 세포 생존율(a) 및 세포 내 활성 산소 종 생산(b)에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, LPS로 유도된 HT-29 세포에서 산수유 물 추출물(WCF)이 NF-κB 경로에 미치는 영향. 밴드 이미지(a) TLR4(b), NF-κB(c)의 발현 수준을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, LPS로 유도된 HT-29 세포에서 TJ(밀착연접) 단백질에 대한 산수유 물 추출물(WCF)의 효과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, DSS 유발 대장염 마우스의 병리학적 증상에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DSS 유발 대장염 마우스의 장 투과성에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DSS에 의해 유발된 대장염 마우스의 결장 조직에서의 밀착연접 단백질에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, PRE, PRO 및 SYN이 DSS로 유발된 대장염 마우스의 결장 조직에서 골수과산화효소(MPO) 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서, DSS로 유도된 대장염 마우스의 결장 조직에서 염증 반응에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DSS 유발 대장염 마우스의 대변에서 단쇄 지방산(SCFA) 농도에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DSS 유도 대장균에서 장내 미생물군집에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 효과를 나타낸 도이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 있어서, *Corni fructus*의 에틸 아세테이트 분획에 대한 UPLC-Q-TOF/MS2 크로마토그램을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0025] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0028] 일 측면에서, 본 발명은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 환자의 인지기능 개선용 건강기

능식품 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 산수유로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 산수유로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.

[0030] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0031] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 산수유를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0032] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨,소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0033] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제,캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 "건강기능식품 조성물"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캅셀 형태의 건강

기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0036] 일 측면에서, 본 발명은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 환자의 퇴행성 뇌 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0040] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 ㎍/ml의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 ㎍/ml 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 ㎍/ml를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0043] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0044] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/ 또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조

될 수 있다.

[0045] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0046] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0050] **<재료 및 실험방법>**

[0051] **<준비예 1> 재료 및 추출물의 제조**

[0052] 본 실험에 사용된 산수유 열매(*Corni fructus*)는 전남 구례군에서 재배되어 50℃에서 열풍 건조된 제품을 2020년 7월 22일에 구입하여 분말화하여 사용하였다. 산수유 20 g과 증류수 1 L를 혼합하여 40℃에서 2시간 동안 환류 냉각장치를 이용하여 추출하였고, 이 추출물을 No. 2 여과지(Whatman Inc, Kent, UK)를 통해 여과하였다. 추출된 산수유 물 추출물(water extract of *Corni fructus*, WCF)은 진공농축 후 동결건조하였다. WCF의 수율은 49.61%로 나타났으며, -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

[0054] **<준비예 2> probiotic 균주 배양조건**

[0055] 실험에 사용된 유산균 균주는 성인의 대변 유래의 락토바실러스 루테리(*Limosilactobacillus reuteri*; *L. reuteri*) KCTC 3594와 락토바실루스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*; *L. brevis*) KCTC 3498를 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Jeongeup, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 균주는 MRS-agar에 도말하여 생성된 단일 colony를 MRS 액체 배지에 접종하였고, 37℃에서 48시간 배양하였다.

[0057] **<준비예 3> 생균수 측정**

[0058] 균주 배양액은 12,000×g에서 원심분리하고, pellet을 0.85% NaCl에 재현탁시켰다. 현탁된 균주는 microplate reader(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 660 nm에서 0.2의 흡광도 값을 나타내도록 희석하여 실험에 사용하였다. *L. reuteri*와 *L. brevis*의 성장곡선은 각각 glucose가 없는 MRS 액체 배지에서 pH 6.3~6.5로 조정한 뒤 WCF와 fructo-oligosacccharide(FOS)을 양성대조군으로 사용하였고, 배지에 각각 2%(w/v)를 첨가하였다. 그런 다음 대수기 성장기의 균주를 접종(1%, v/v)하여 37℃에서 48시간 동안 배양하여 측정하였다. 이후 0, 4, 8, 12, 24, 48시간 되는 배양액을 0.85% NaCl 용액으로 연속적으로 희석하여 평판배지에 0.1 mL을 분주하여 도말하였다. 그 후 혐기조건에서 최적온도로 배양하고 콜로니 형성 단위(colony forming unit)를 측정하여 계산하였다.

[0060] **<준비예 4> 적정산도 측정**

[0061] *L. reuteri*와 *L. brevis*의 적정산도를 측정하기 위하여 앞서 언급한 방법으로 0, 4, 8, 12, 24, 48시간 동안 배양한 배양액 1mL에 1%(v/v) 페놀프탈레인(phenolphthalein) 시약을 지시약으로 하여 10초간 지속되는 연한 홍색을 나타낼 때까지 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 적정에 소비되는 0.1 N 수산화나트륨 용액의 소모량을 젖산 함량(%)으로 환산하여 아래 수학식 1로 계산하였다.

[0063] [수학식 1]

$$산도(젖산\%) = \frac{a \times f \times 0.009}{시료의양(mL)} \times 100$$

a : 0.1 N 수산화나트륨액의소비량(mL)
f : 0.1 N 수산화나트륨액의역가
0.009 : 유산계수(0.1 N수산화나트륨1mL)

[0064]

[0066] **<준비예 5> 세포배양**

[0067] 인체에서 기원한, 성숙한 장 상피세포의 특성이 있는 HT-29 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였으며 25 mM 탄산수소나트륨, 25 mM HEPES, 10% 소태아혈청, 50 units/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 세포 배양은 37℃, 5% CO_2 조건을 유지하여 배양하였다.

[0069] **<준비예 6> 장 상피세포 보호효과 및 산화스트레스 함량 측정**

[0070] LPS로 유도된 HT-29 세포사멸에 대한 WCF의 세포 생존율을 측정하기 위하여, MTT reduction assay를 실시하였다. 세포를 96 well plate에 1×10^4/well로 분주하여 하루 동안 성장시켰다. WCF 5, 10, 20 μg/mL 농도와 양성대조군으로 사용된 FOS 50 μg/mL 농도로 처리한 뒤 30분 후에 LPS를 증류수에 희석하여 1 μg/mL 농도로 만든 후 24시간 동안 세포를 전처리하였다. 배양 후 MTT stock 용액(5 mg/mL) 10 μL을 처리하여 37℃에서 3시간 동안 배양시키고 배양물을 제거한 뒤 DMSO를 첨가하여 반응을 종결시켜 570 nm(determination wave)와 690 nm(reference wave)에서 microplate reader(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc.)로 측정하였다.

[0071] 세포 내 ROS 함량을 측정은 dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA) 방법에 의하여 측정하였다(Karlsson 등, 2010). Black 96 well plate에 전처리된 세포는 50 μM DCF-DA 용액을 혼합하여, 37℃에서 50분 동안 배양하였다. 이후, 배양액을 제거하고 멸균생리식염수(PBS) 100 μL를 첨가하였다. 이후 형광 마이크로플레이트 판독기(Infinite 200, Tecan Co., SanJose, CA, USA)를 사용하여 들뜸 파장(excitation filter, 485 nm) 및 방출 파장(emission filter, 535 nm)에서 형광강도를 측정하였다.

[0073] **<준비예 7> 대장염 동물 모델 디자인**

[0074] 본 연구에 사용된 C57BL/6(male, 6 weeks) 마우스는 Samtako (Osan, Korea)로부터 구입하여 사용하였으며 경상대학교 동물실험 윤리위원회(IACUC 승인번호: GNU-210216-M0020)의 승인 하에 수행되었고, 온도 22±2° C, 상대습도 50±5%를 유지하는 환경에서 사육되었다. 마우스는 반입 후 1주일 동안 적응 기간을 거친 후, 정상 대조군(CON), DSS 처리군(DSS), DSS+WCF 처리군(PRE), DSS+*L. reuteri* 처리군(PRO), DSS+WCF+*L. reuteri* 처리군(SYN)으로 무작위로 나누어 샘플을 3주간 식이하고 DSS를 6일간 멸균된 식수에 녹여 공급하였다.

[0075] WCF는 300 mg/kg of body weight으로 PBS에 녹여 마우스에 공급하였으며, *L. reuteri*는 MRS 배지에서 37℃에서 24시간 배양한 것을 13,000×g에 원심분리한 후 PBS로 두 번 워싱하고, 660 nm 흡광도(EEpoch 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)에서 1×109/CFU/mL로 희석하였다. 스톡 용액을 -80℃에서 보관 후 실험에 사용하였으며, 실험 동물에게 하루 200 μL를 식이하였다.

[0077] **<준비예 8> 장 투과도 실험**

[0078] 장 투과도는 FITC-dextran 투과성 분석법을 사용하여 평가되었다. 마우스에 FITC-dextran(4 kDa)(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 용액을 마우스에게 0.4 mg/g body weight으로 위관영양법으로 공급하였고 4시간 후에 혈액을 수집하였다. PBS로 FITC-dextran의 희석액을 사용하여 표준곡선을 작성하였으며, 형광 마이크로플레이트 판독기(Infinite 200, Tecan Co., San Jose, CA, USA)로 excitation wave 485 nm 및 emission wave 535 nm에서 측정하였다.

[0080] **<준비예 9> 혈청 알부민 농도 측정**

[0081] 장 투과도 실험을 진행한 4시간 뒤에 CO_2로 질식시켜 희생시킨 뒤 복대 동맥에서 채혈하였다. 이후 혈액을 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리한 뒤 혈청 분석기(Fujidri-chem 4000i, Fuji film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 혈청 알부민(albumin)을 분석하였다.

[0083] **<준비예 10> 대장 조직에서 골수과산화효소(myeloperoxidase, MPO) 활성 측정**

[0084] 대장 조직을 0.5% 세트리모늄브로마이드(Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA)가 포함된 50 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.0)으로 균질화 하고 4℃에서 15,000×g로 15분 동안 원심분리하였다. 상등액을 16.7 mg *o*-디아시닌디히드로클로로라이드(TCI, Tokyo, Japan) 및 0.0005% 과산화수소를 함유하는 50 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.0)과 혼합하여 반응시킨 뒤, 마이크로플레이트 판독기(Epoch 2, BioTek Instruments, Inc.)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. MPO 활성은 MPO/mg 조직의 단위(U)로 측정되며, 1 unit은 1 μmol의 과산화물/분을 분해하는데 필요한 양으로 정의된다.

[0086] **<준비예 11> 장 상피세포 및 대장 조직에서의 western blot assay**

[0087] HT-29 세포를 1×10^4 cells/well 농도로 seeding 하여 24시간 동안 배양한 뒤 시료와 양성대조군인 FOS를 처리한다. 시료 처리 24시간 후 lipopolysaccharide(LPS)를 1 μM로 최종농도로 하여 처리하여 3시간 동안 반응시켜 배양한 후, 원심 분리하여 모은 세포를 PBS로 2회 세척하고 1%의 protease inhibitor cocktails가 포함된 cell lysis buffer로 HT-29 세포를 harvest하고 대장 조직은 bullet blender로 균질화하여, 얼음에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 다시 원심 분리하여 상등액으로 동일한 양의 단백질로 정량하였다.

[0088] 샘플링이 끝나면 SDS-PAGE에 전기영동한 후에, polyvinylidene difluoride 막(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 옮겨졌으며, 다른 단백질의 혼입을 막기 위해 5% 탈지유로 1시간 동안 blocking 하였다. 그런 다음 1차 항체를 밤새 배양시키고 0.1% tween 20이 함유된 트리스 완충 식염수(TBST)에서 세척한 후, 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 배양한다. Western blot 이미지는 iBright imager를 사용하여 감지하며 발현 밀도는 이미지 감지 소프트웨어(image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 계산하였다.

[0090] **<준비예 12> 균주 배양액 및 마우스 분변에서의 단쇄지방산 함량 측정**

[0091] *L. reuteri*와 *L. brevis*에서 단쇄지방산(아세트산, 프로피온산 및 뷰티르산)을 측정하기 위한 GC/MS 분석의 전처리 과정은 다음과 같다. 내부표준물질(2-ethyl butyric acid)을 함유하는 *L. reuteri*와 *L. brevis* 상등액에 propanol/pyridine 혼합 용매(v/v=3:2)와 propyl chloroformate를 첨가하였다. 반응 혼합물에 hexane을 첨가하고 13,000×g에서 15분간 원심분리하고 hexane층을 분석에 사용하였다.

[0092] 마우스의 대변에서 단쇄지방산을 측정하기 위한 전 처리 과정은 다음과 같다. 마우스의 대변을 30 mg 무게를 재고 5 mM NaOH 용액과 비즈를 넣고 균질화한다. 상등액을 새로운 튜브에 옮겨 담아 13,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액을 가지고 위의 분석과정과 동일하게 실험하였다.

[0093] 기기는 gas chromatography(GC 2010 plus, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였고, column은 DB-5ms(thickness: 0.25 μm, length: 30 m, diameter: 0.25 mm, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. Carrier gas로 He을 사용하였고, column oven temperature 40° C, injection temperature 260° C, total flow 54.0 mL/min, total program time 16.50 min으로 설정하여 분석하였다.

[0095] **<준비예 13> NGS 분석**

[0096] 장내 미생물 분석을 위해 마우스의 대변에서 DNA를 추출하였으며, Qubit 3.0 Fluorometer(ThermoFisher, Waltham, MA, USA)를 이용하여 고품질의 DNA가 추출되었는지 확인하였다. 16S rRNA V3-V4 영역을 타겟으로 하는 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 증폭하였으며, 증폭하여 정

량이 끝난 시료는 MiSeq(Illumina, CA, USA) 장비를 이용하여 시퀀싱을 수행하였다. Paired-end MiSeq Illumina reads(2x300 bp)는 QIIME2(version 2020.08)을 사용하여 처리되었으며, FastQC(version 0.11.8)을 사용하여 raw data의 품질을 확인하였다. 품질 검사 후 어댑터와 프라이머와 같은 인공 시퀀스 제거 및 노이즈 제거 작업을 수행한 뒤, library prep 과정에서 PCR 과정에서 끼어드는 chimeric sequence를 제거하여 고품질의 시퀀스를 얻었다. 이후 시퀀스 데이터는 Sliva 16S rRNA database를 사용하여 종(species) 수준까지 분류되었다.

[0098] **<준비예 14> 생리활성물질 분석**

[0099] 산수유 물 추출물의 주요 페놀 화합물 분석을 위해 초고성능 액체 크로마토그래피 사중극자 비행 시간 질량 분석기(UPLC-Q-TOF/MS)를 사용하여 분석하였다. UPLC 시스템(Vion, Waters Corp., Milford, MA, USA)을 사용하고, 컬럼은 Acquity UPLC BEH C18 컬럼(100mm x 2.1mm x 1.7㎛)(Waters)을 사용하였다. 샘플은 0.1% 포름산을 포함하는 증류수와 0.1% 포름산을 포함하는 ACN을 0.6mL/min의 유속으로 12분 동안 분석하였으며, 컬럼에서 분리된 화합물은 음이온화 모드에서 분석되었으며, 측정된 데이터는 UNIFI 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.

[0101] **<준비예 15> 통계처리**

[0102] 모든 실험은 반복 실행하여 평균±표준편차로 나타내었고, 각 평균값은 SAS software(version 9.4, SAS institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, Ducan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 시료 간의 유의성을 5% 수준 내에서 검증하였다.

[0104] **<실시예 1> 생균수 및 적정산도 측정**

[0105] 산수유 물 추출물(WCF)이 유익균(*L. reuteri* 및 *L. brevis*) 증식에 도움을 줄 수 있는지 확인하기 위하여 생균수 및 적정산도를 측정한 결과는 도 1과 같다. WCF가 첨가된 배지에서 *L. reutri*는 배양 12시간 후에 양성대조군(FOS) 처리 균주(8.16×10^8 CFU/mL)에 비해 유의적으로 더 높은 생존 수(9.07×10^8 CFU/mL)를 보였으며, *L. brevis*는 배양 24시간 후에 FOS 처리 균주(8.10×10^8 CFU/mL)에 비해 유의적으로 더 높은 생존 수(8.89×10^8 CFU/mL)를 보였다. 적정산도는 두 균주 사이에 값은 다소 차이가 있지만, 8시간 이후 산도가 증가하였으며, 12시간 이후로는 증가 양상이 둔화되었다. FOS처리 군은 배양 24시간 이후로 대조군(control)과 유의적인 차이를 나타내지 않은 반면, WCF 처리 시 *L. reuteri*은 1.125, *L. brevis*는 0.477로, 배양 24시간에 가장 높은 산도를 보여주었다. 이러한 결과는 WCF가 *L. reuteri*와 *L. brevis*의 생육과 생육조건에 긍정적인 영향을 유도하고 유기산을 생성하는데 도움을 준 것으로 판단되며, 이는 prebiotics로서 산업화 가능성이 있다고 사료된다.

[0107] **<실시예 2> 배양액에서의 단쇄지방산 함량**

[0108] 배양 48시간 단쇄지방산 함량을 측정한 결과는 표 1에 나타냈다. 단쇄지방산 표준용액과의 retention time 비교 및 library search를 통해 단쇄지방산을 검출하고 정량하였다. *L. reuteri*에서 아세트산 함량은 control(3.79 mM), FOS(7.63 mM), WCF(12.36 mM)로 WCF가 처리된 배양액에서 가장 높은 함량을 보여주었고, 프로피온산은 WCF가 처리된 배양액에서만 검출(1.01 mM)되었다. *L. brevis* 배양액에서는 아세트산이 검출이 되었으며, control(6.65 mM), FOS(6.24 mM), WCF(6.83 mM)로 유의적인 차이가 나타나지는 않았다.

표 1

[0110]

		Control	2% FOS	2% WCF
L. reuteri	Acetic acid	3.79 ± 1.00^{c}	7.63 ± 0.06^{b}	12.36 ± 0.62^{a}
	Propionic acid	-	-	0.10 ± 0.09^{a}

L. brevis	Acetic acid	6.65 ± 0.45[a]	6.24± 0.38[a]	6.83± 0.85[a]
	Propionic acid	-	-	-

[0112] **<실시예 3> 장 상피세포 보호 효과 및 산화적스트레스 함량 측정**

[0113] WCF가 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정한 결과는 도 2a에 나타내었다. 대조군(100.00%)과 비교하였을 때, LPS 처리 군은 82.54%로 세포독성으로 인하여 비교적 낮은 세포 생존율을 나타냈다. 반면, WCF를 각각 5, 10, 20 μg/mL 농도로 처리하였을 때, 106.22%, 116.17%, 130.07%로 양성대조군인 FOS(93.46%)보다 유의적으로 높은 세포 생존율을 보여주었다.

[0114] DCF-DA assay는 DCF-DA 시약이 세포 내로 들어가면, oxygen radical에 의해 산화되어 DCF로 탈 아세틸화되면서 형광을 발생하는 물질로 전환되는데, 이를 측정함으로써 활성산소(ROS) 생성 정도를 파악할 수 있다. WCF가 LPS로 유도된 산화적스트레스에 미치는 영향을 확인한 결과는 도 2b에 나타냈다. control(100.00%)과 비교하였을 때, LPS 처리 군은 116.43%로 세포 내 활성산소(ROS)가 증가한 것을 볼 수 있었으며 FOS는 112.69%로 다소 감소하는 경향은 보였으나 LPS 처리 군과 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 WCF가 처리된 세포에서는 각각 110.19%, 108.80%, 101.88%의 산화스트레스 발생 수준을 보였고 LPS 처리 군과 비교하여 산수유 물 추출물이 세포 내 ROS 함량을 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0116] **<실시예 4> 장 상피세포에서의 NF-κB 신호 경로 확인**

[0117] Toll-like receptors(TLRs)는 병원균들이 가지고 있는 독특한 구조를 인식하고 이러한 병원균들에 대항하여 염증반응 및 선천성 면역반응을 유도한다고 알려져 있다. 그 중 TLR4는 LPS 수용체이며 세포를 자극하여 NF-κB를 활성화시키고, TNF-α, IL-1, monocyte chemotactic protein-1 등의 염증 매개 물질의 생산을 유도한다. NF-κB는 염증 발생 과정에 중요한 신호전달 물질로 LPS에 의해 활성화되어 핵 내의 target gene에 결합하고, 염증성 cytokine을 분비하게 된다. LPS로 유도된 HT-29 세포에서의 염증반응 기작을 확인하기 위하여, LPS receptor로 알려진 TLR4와 염증반응을 조절하는 단백질인 NF-κB의 발현 정도를 측정하였다(도 3). TLR4와 NF-κB를 측정한 결과, LPS 처리 세포(각각 1.58, 2.76)는 대조군(각각 1.02, 0.61) 대비 단백질 발현량이 증가한 결과를 나타냈다(도 3). 그와 반대로 WCF를 농도별로 처리한 세포에서는 TLR4 및 NF-κB의 발현이 유의적으로 감소되었으며, 대조군과 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다(각각 WCF 5; 1.26, 2.14, WCF 10; 0.93, 1.95, WCF 20; 0.83, 1.48).

[0119] **<실시예 5> 장 상피세포에서의 밀착연접 단백질 변화 측정**

[0120] 장 상피세포의 투과성에 영향을 주는 것이 세포의 사이에 존재하는 밀착연접(tight junction, TJ) 단백질이다. TJ는 인접하는 표피 세포 사이를 서로 연결 및 접합하여 전해질과 수분의 이동을 조절할 뿐만 아니라 세포 내 신호를 전달하고 세포분열을 조절하는 등 다양한 기능을 한다. 이는 claudin과 occludin 단백질이 사슬 형태로 배열되어 두 세포 사이를 밀봉함으로써 연결된다. 하지만 병원성 세균이 상피세포와 상호작용을 하면서 밀착연접을 손상하게 되면 비정상적인 전해질 및 수분 이동, 조직 염증 등을 일으켜 위장질환을 일으키고, LPS가 세포 내 메커니즘을 통해 장 투과성을 증가시킨다는 연구 결과가 보고되고 있다.

[0121] HT-29 세포에 LPS를 단독처리하였을 때와 WCF와 병행처리 하였을 때 밀착연접 단백질인 occludin과 claudin-1의 발현 정도를 측정한 결과는 도 4와 같다. 도 4a와 4b에 나타난 바와 같이, WCF를 처리한 세포(WCF5; 0.95; WCF10; 1.00, WCF20; 1.21)는 LPS 처리 세포(0.74)에 반해 occludin의 발현 정도가 증가되었으며 control(0.96)과 유의적인 결과를 나타냈다. 반면, FOS를 처리한 세포(0.89)에서는 LPS 단독처리 군과 비교하여 occludin의 발현에 영향을 미치지 못하였다. Claudin-1의 발현량을 측정한 결과는 도 4a와 4c에 나타냈다. LPS를 처리한 세포(1.50)와 FOS, WCF 5, 10 μg/mL 농도(각각 1.68, 1.73 1.77)에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, WCF 20 μg/mL 농도(2.38)에서는 control(2.42)과 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0123] **<실시예 6> DSS로 유도된 대장염 마우스에서 체중 변화, 대장길이, 혈청 알부민 함량에 대한 PRE, PRO 및 SYN의**

영향

[0124] DSS 궤양성 대장염 모델은 체중 감소, 대장 길이 감소, 혈변 등을 특징으로 하는 임상 증후가 나타난다. 이러한 임상 증상에 미치는 샘플의 영향을 확인하기 위하여 체중 변화율, 대장길이 및 혈청 알부민 함량에 대한 결과를 측정하여, 도 5에 나타내었다. DSS 유도 첫째 날부터 6일 차까지 마우스의 몸무게 변화율을 측정한 그래프는 도 5a에 나타내었으며, DSS 유도 마지막 날 DSS 군에서 급격한 체중 감소율(70.00%)을 보여주었고 PRE, PRO, SYN 군에서는 유의적으로 개선되는 경향을 보여주었다(83.00%, 83.00%, 87.00%). 마우스의 영양상태를 확인하기 위해 혈청에서의 알부민 농도를 측정한 결과 DSS 군(1.62 mg/dL)에서 CON 군(2.86 mg/dL)과 비교하였을 때 유의적으로 낮은 알부민 값을 보여주었고 PRE, PRO, SYN 군에서는 각각 2.2 mg/dL, 2.14 mg/dL, 1.96 mg/dL으로 DSS 군 보다 유의적으로 높은 함량을 나타내었다(도 5b). 또한, 맹장의 밑에서 항문 위까지 길이 즉, 대장의 길이는 CON 군에서 6.57 cm로 측정되었지만, DSS 군에서는 4.00 cm로 측정되었다(도 5c). 하지만 PRE, PRO, SYN 군에서는 각각 4.68 cm, 4.61 cm, 4.72 cm로 측정되어 DSS 군과 비교하였을 때 대장의 길이가 각각 15.57%, 16.88%, 22.04% 증가하였다.

[0126] **<실시예 7> DSS로 유도된 대장염 마우스의 대장 조직에서 장 투과성에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0127] 마우스의 장 투과성의 평가는 FITC-dextran 방법을 통하여 측정되었으며 결과는 도 6에 나타내었다. DSS 처리 마우스의 혈청 FITC-dextran(509.19 μg/mL)은 CON 군(47.24 μg/mL)보다 높았으며 PRE, PRO 및 SYN 군에서는 각각 384.48 μg/mL, 200.28 μg/mL, 204.50 μg/mL로 검출되어 DSS 군보다 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 특히, 샘플 그룹에서는 SYN 군에서 가장 낮은 혈청 FITC-dextran이 검출되어 마우스의 장 투과성을 회복시키는 데 도움을 준 것으로 보인다.

[0129] **<실시예 8> DSS로 유도된 대장염 마우스의 대장 조직에서 TJ(tight junction) 단백질 발현량에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0130] 마우스의 장 장벽의 무결성에 대한 평가는 TJ 단백질 발현량을 웨스턴 블롯을 수행함으로써 평가되었으며 결과는 도 7에 나타내었다. Occludin과 claudin-1 발현량을 측정한 결과, CON군 대비(1.00) DSS 군(각각 0.43, 0.51)에서 각각 2.34배, 1.96배 감소하였으며, PRE, PRO 및 SYN 군은 occludin(각각 0.64, 0.61, 0.67)과 claudin-1(각각 0.76, 0.74, 0.86)의 단백질 발현량을 CON 군 수준까지 회복시키지는 못하였지만, DSS 군과 비교하였을 때 유의적으로 증가하는 경향을 보였다.

[0132] **<실시예 9> DSS로 유도된 대장염 마우스의 대장 조직에서 MPO 활성에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0133] 염증 활성에 대한 지표로 알려진 MPO 활성을 마우스의 대장 조직에서 측정하였으며 그 결과는 도 8과 같다. MPO는 CON 군(0.24 U/mg)과 비교하여 DSS 군(9.79 U/mg)에서 증가하였으며, PRE, PRO 및 SYN 군은 DSS 군과 비교하여 대장에서 MPO 활성을 감소시켰다(각각 6.01 U/mg, 5.07 U/mg, 3.66 U/mg).

[0135] **<실시예 10> DSS로 유도된 대장염 마우스의 대장 조직에서 염증 유발 인자들에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0136] 마우스의 대장 조직에서 면역세포에서 염증 기전에 관여하는 중요한 NF-κB 신호 전달 경로 인자들인 TLR4, p-IκBα, p-NF-κB, TNF-α, caspase 1, IL-1β, iNOS, COX-2를 측정한 결과는 도 9에 나타내었다. 그 결과 DSS 군은 CON 군(1.00) 대비 모든 염증 유발 인자들에서 발현량이 각각 1.65, 1.90, 2.93, 2.18, 1.31, 1.37, 2.22, 1.88로 증가하는 경향을 보여주었다. 하지만, PRE, PRO 및 SYN 군은 유의적으로 감소하는 경향을 보여주었다(각각 TLR4; 1.25, 1.15, 1.14, p-IκBα; 1.63, 1.35, 1.13, p-NF-κB; 2.08, 2.37, 1.73, TNF-α; 1.82, 1.79, 1.66, Caspase 1; 1.02, 0.99, 0.85, IL-1β; 1.06, 1.05, 0.94, iNOS; 1.63, 1.79, 0.83, COX-2; 1.08, 1.15, 1.08). 특히, SYN 군은 p-IκB, p-NF-κB, iNOS(DSS 대비 각각 0.59, 0.59배, 0.37배 감소) 인자에서 PRE와 PRO 군보다 유의적으로 더 감소하는 경향을 보였다.

[0138] **<실시예 11> DSS로 유도된 대장염 마우스의 대변에서 단쇄지방산 함량에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0139] DSS 처리 마우스의 대변에서 단쇄지방산 함량을 측정한 결과는 도 10에 나타내었다. 아세트산, 프로피온산 및 뷰티르산 함량은 CON 군(82.93 mM, 18.44 mM, 39.47 mM)과 비교하였을 때 DSS 군에서 각각 81.76 mM, 8.85 mM, 7.28 mM이 검출되어 감소되는 경향을 보여주었다. 하지만, PRE(각각 216.39 mM, 28.04 mM, 23.20 mM), PRO(각각 200.44 mM, 25.79 mM, 24.82 mM) 및 SYN 군(254.22 mM, 30.12 mM, 38.18 mM) 에서는 유의적으로 개선됨을 보여주었다. 특히, SYN 군에서는 DSS 군과 비교하여 아세트산, 프로피온산 및 뷰티르산 함량이 각각 3.11배, 3.40배, 5.24배 증가하여, 다른 샘플 대조군들 보다 단쇄지방산 함량이 증가함을 보여주었다.

[0141] **<실시예 12> DSS로 유도된 대장염 마우스의 장내 균총에 대한 PRE, PRO 및 SYN의 영향**

[0142] 마우스의 분변에서 NGS 분석으로 장내 균총을 분석한 결과는 도 11와 같다. 각 그룹에서의 장 내 균총을 문(phylum), 과(family), 속(genus), 종(species)(도 11a-d) 계통에서 분석한 결과이며, 문 수준에서 *Firmicutes* 문과 *Bacteroidota* 문이 약 90%를 차지하였으며 그 비율에는 유의적인 차이가 없었다. 특이하게도, *Verrucomicrobiota* 문은 PRO 군에서 가장 높은 비율을 차지하였다. 과 수준에서 가장 많은 비율을 차지한 계통은 *Lachnospiraceae* 과와 *Muribaculaceae* 과였으며, 유산균이 속해있는 *Lactobacillaceaes* 과는 CON 군과 PRO 군에서 가장 높은 분포를 나타냈다. 속 수준에서는 유해균으로 알려진 *Bacillus* 속과 *Prevotellaceae* UCG-001 속은 DSS 군에서 가장 많았으며(각각 6.14% and 2.31%), PRE, PRO, SYN 그룹에서는 유의적으로 감소하는 경향을 보여주었다(각각 *Bacillus*: 3.46%, 4.74%, 3.19%, *Prevotellaceae* UCG-001: 0.81%, 0.00%, 0.65%)(도 11e-f). 특히, PRO 군에서는 *Prevotellaceae* UCG-001 속이 검출되지 않았다. 또한, 프로바이오틱스로 알려진 *Lactobacillus* 속은 DSS 군(0.70%)에서 CON 군(8.89%)과 비교하여 낮은 분포를 보여주었으며, PRO 군(7.41%)에서 CON 수준으로 회복되는 경향을 보여주었다(도 11g). 단쇄지방산 생성균으로 알려진 *Anaerotruncu* 속, *Lachnospiraceae* NK4A136 group 속은 DSS 군(각각 0.06% and 1.42%)에서 CON 군(각각 0.66% and 2.90%)과 비교하여 낮은 수준을 보였다(도 11h-i). *Odoribacter* 속은 단쇄지방산의 일종인 butyrate를 생성하여 장 점막 기능을 강화시키는 것으로 알려져 있는 균주로, DSS군에서(0.04%) CON군(0.32%)과 비교하여 낮은 수준을 보여주었고 특히, PRE 군(0.10%)에서 CON 군과 유사한 수준을 보여주었다(도 11j). *Akkermansia muciniphila*는 대장염 동물 모델에서 장 장벽기능을 보호하고 염증성 사이토카인 수준을 감소시킨다는 연구 결과가 보고된 바 있는 미생물로, 본 연구에서 DSS 군(0.30%)에서 CON 군(0.45%)과 비교하였을 때 정량적 수준이 감소하였으며, 특히 SYN 군(3.35%)에서 CON 군보다 더 유의적으로 증가시켰다(도 11k). 이전 연구에 따르면 DSS 유발 대장염이 있는 마우스에서 *Alistipes onderdonkii*의 감소가 보고되었다. *Alisipes* 속은 위장관이 건강한 사람에게서 발견되며 대장염 완화 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 *Alistipes onderdonkii*는 DSS 군(0.02%)에서 가장 낮은 수준을 보여주었으나, PRE, PRO, SYN 군에서 개선되는 경향을 보여주었다(각각 0.34%, 0.19%, 0.28%)(도 11l).

[0144] **<실시예 13> 생리활성물질 분석**

[0145] 장 염증 개선 효과를 가지는 것으로 판단되는 산수유 물 추출물의 주요 생리활성 물질은 음이온 모드의 UPLC/MS^2에 의해 분석되었다(도 12, 표 2). 검출된 주요 화합물은 MS^2 주요 단편을 이전에 보고된 문헌과 Massbank 데이터베이스를 비교하여 식별되었다. 총 4개의 화합물이 MS 단편화에 의해 잠정적으로 확인되었으며, qunic acid(RT: 0.81분, m/z: 191; 85, 93, 109 및 127), morroniside(RT: 4.49분, m/z: 451; 101, 123, 141, 155 및 243), loganin(RT: 4.69분, m/z: 435, 101, 127, 209 및 227) 및 cornuside(RT: 5.30 min, m/z: 541; 125, 169 및 347)가 주요 화합물로 확인되었다.

표 2

[0147]

Compound	RT(min)	Formular	$[M-H]^-$ (m/z)	Product ion(m/z)
Quinic acid	0.81	$C_7H_{12}O_6$	191	85, 93, 109, 127, 191
Morroniside	4.49	$C_{17}H_{26}O_{11}$	451	101, 123, 141, 155, 243
Loganin	4.69	$C_{17}H_{26}O_{10}$	435	101, 127, 209, 227

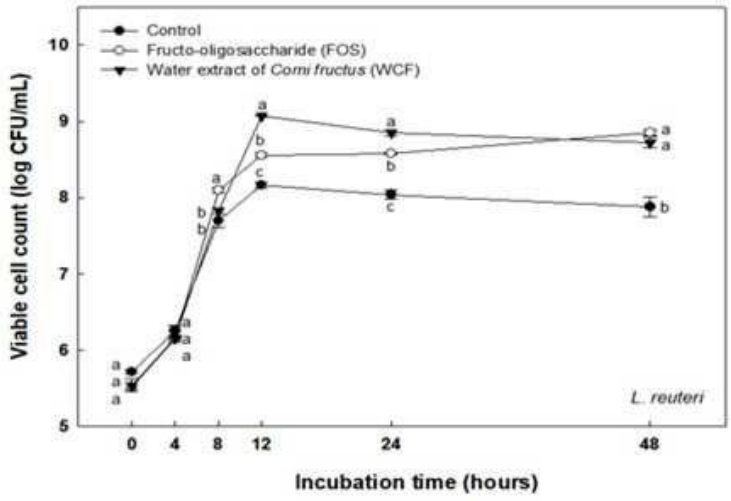
Cornuside	5.3	$C_{24}H_{30}O_{14}$	541	125, 169, 347

[0149] 따라서, 상기 실시예들에 의해 본 발명의 산수유 추출물이 장기능 개선용 건강기능식품 조성물 또는 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

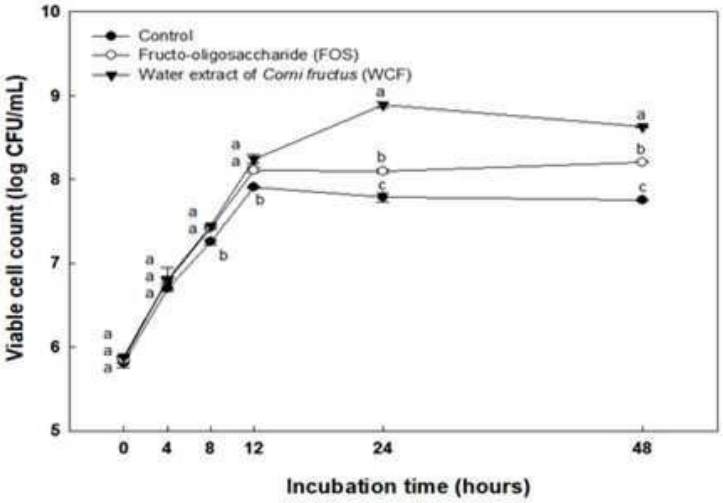
[0151] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 본 발명 분야의 통상의 기술자들은 동일한 기술적 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

도면

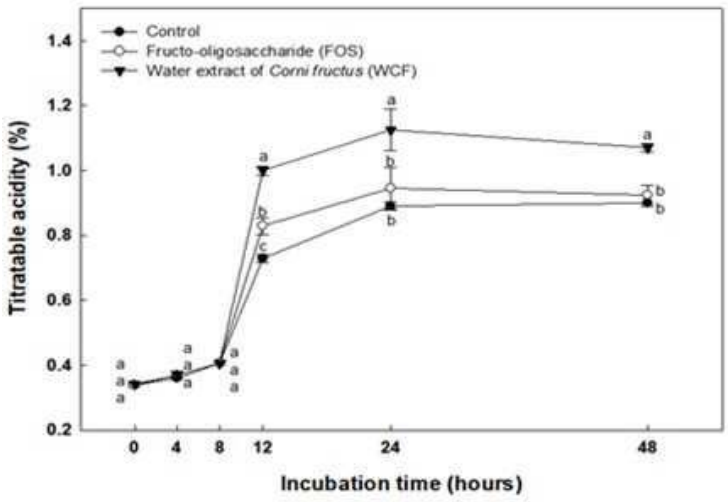
도면1a



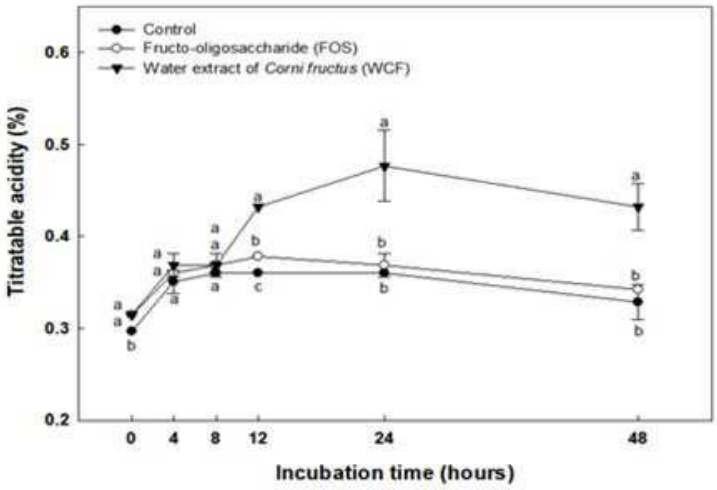
도면1b



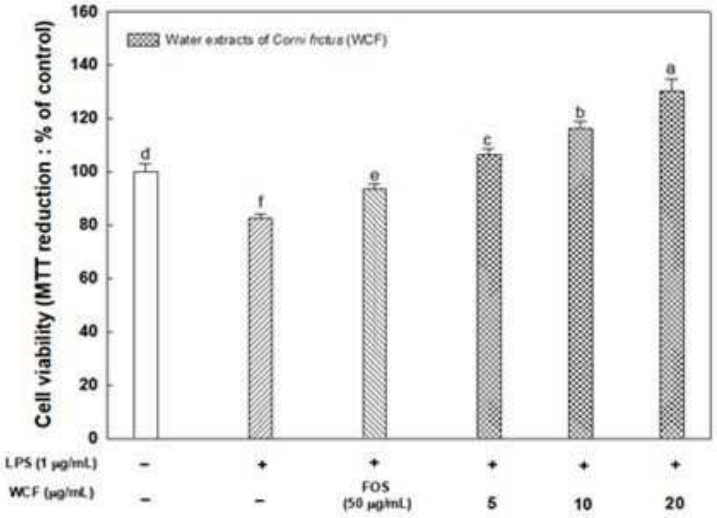
도면1c



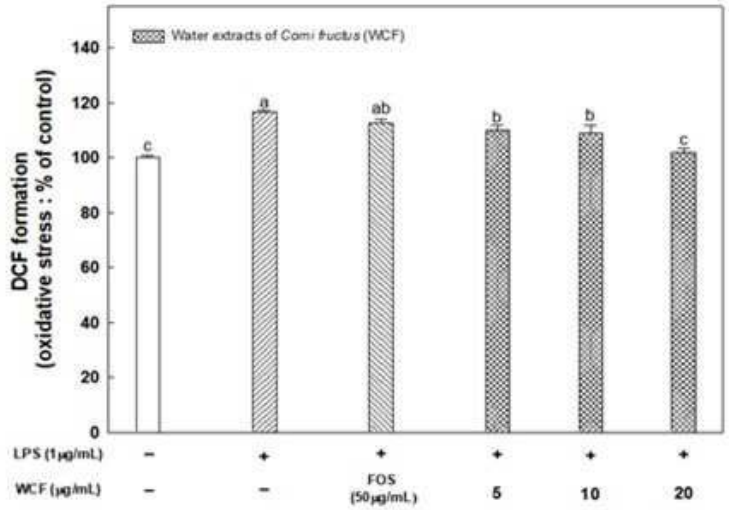
도면1d



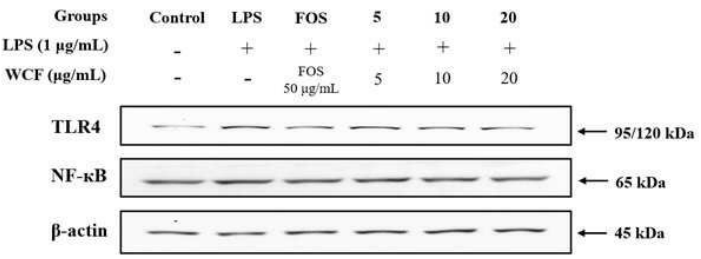
도면2a



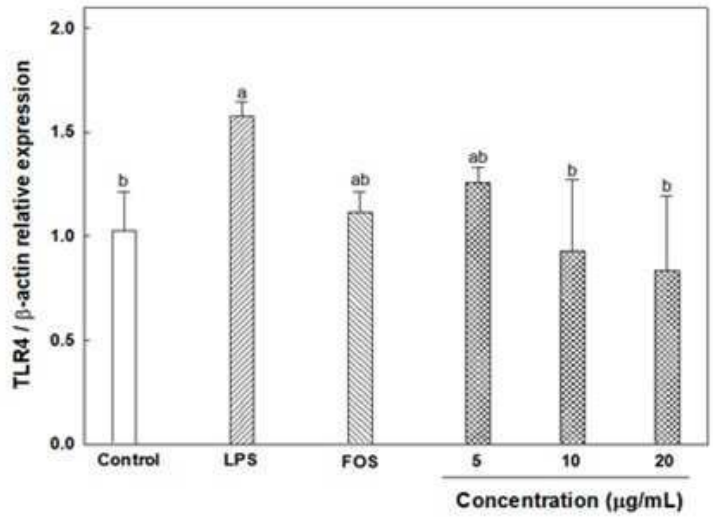
도면2b



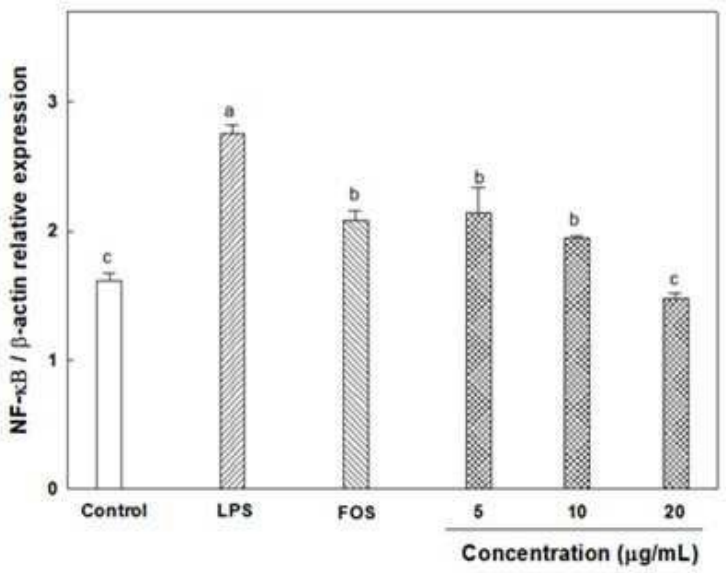
도면3a



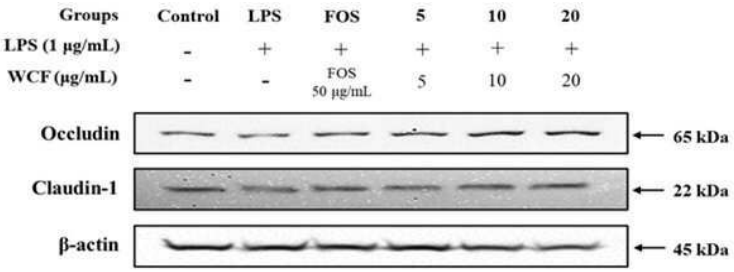
도면3b



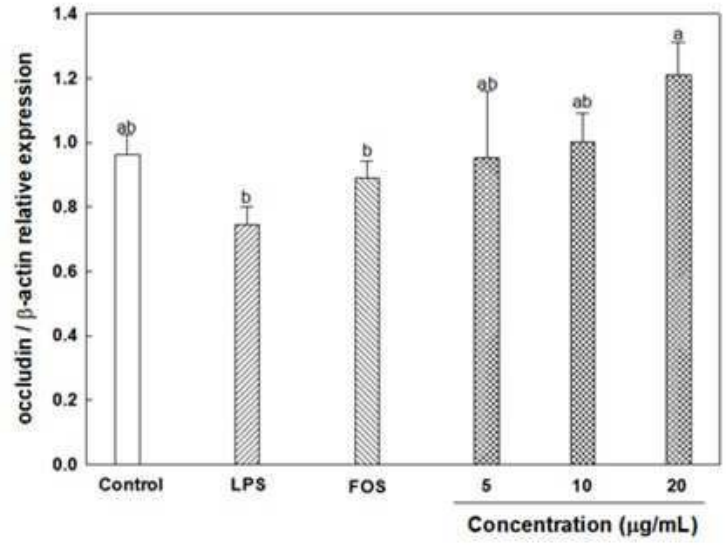
도면3c



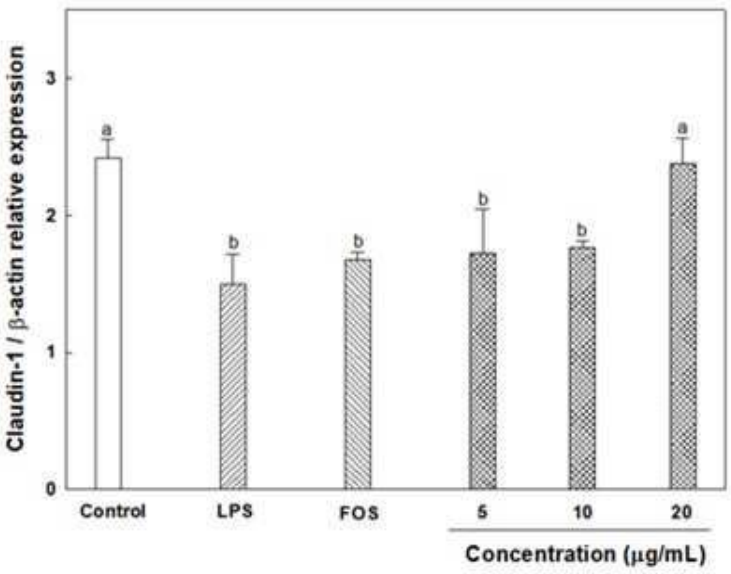
도면4a



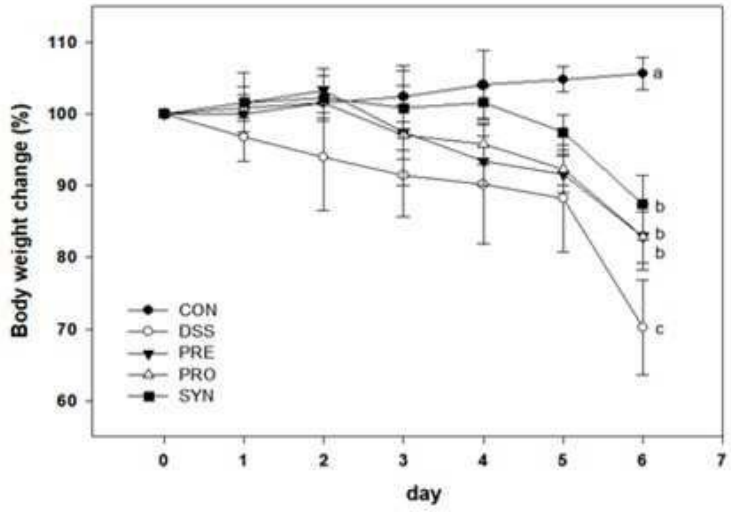
도면4b



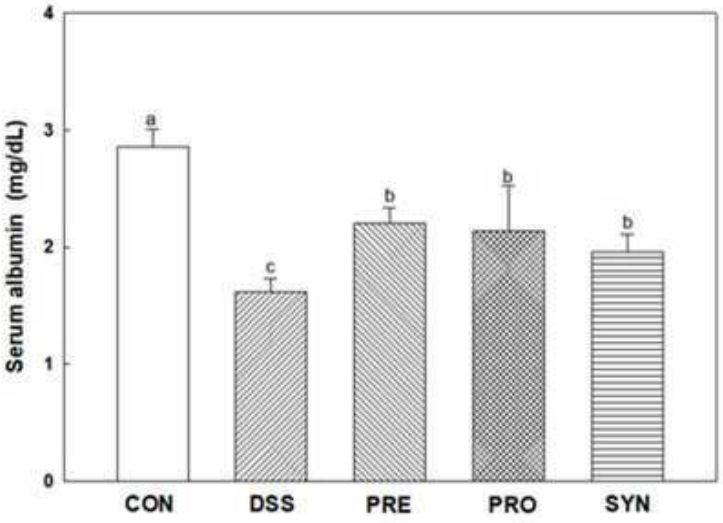
도면4c


Claudin-1 / β-actin relative expression
0
1
2
3
a
b
b
b
b
a
Control
LPS
FOS
5
10
20
Concentration (μg/mL)

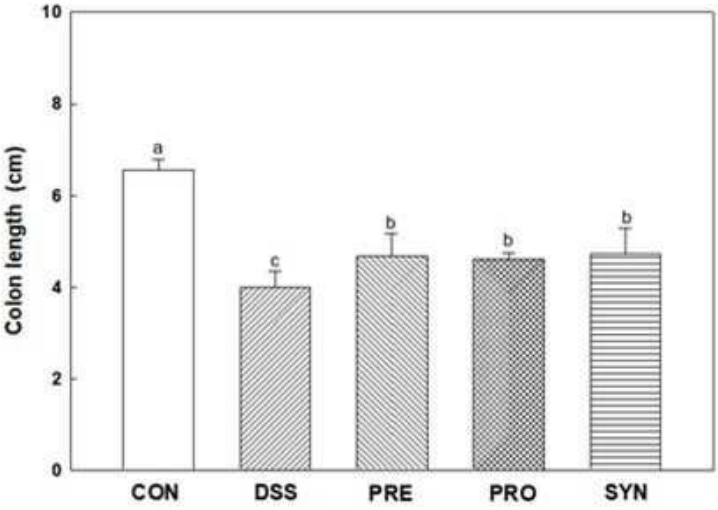
도면5a


Body weight change (%)
60
70
80
90
100
110
CON
DSS
PRE
PRO
SYN
a
b
b
b
c
0
1
2
3
4
5
6
7
day

도면5b



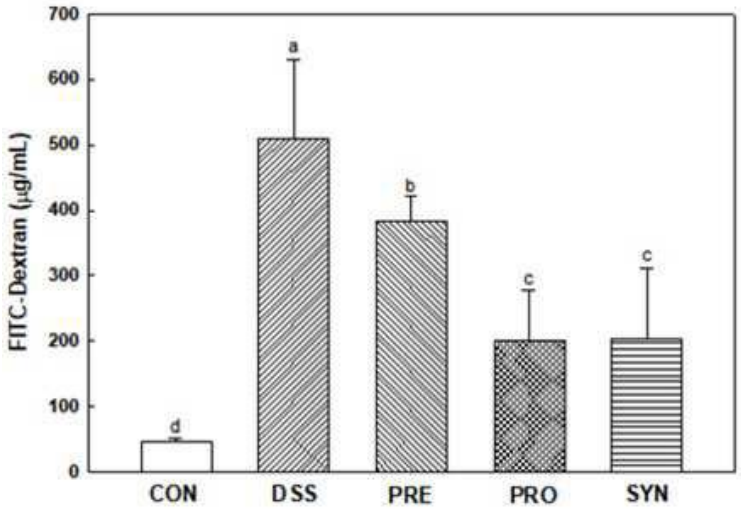
도면5c



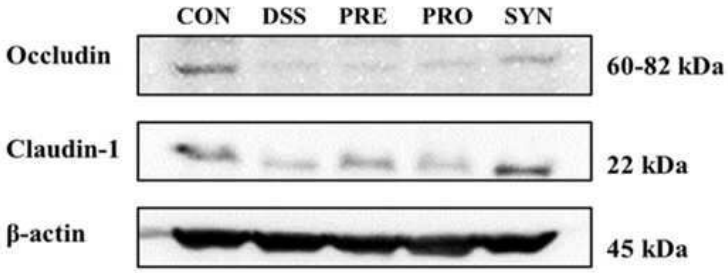
도면5d



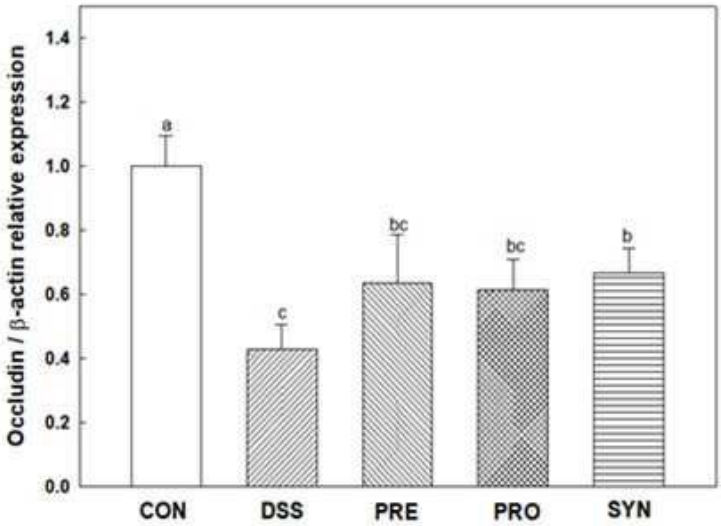
도면6



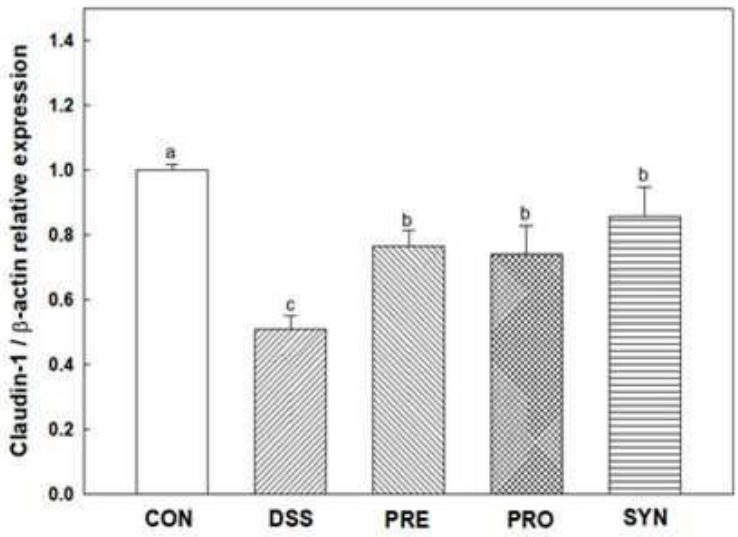
도면7a



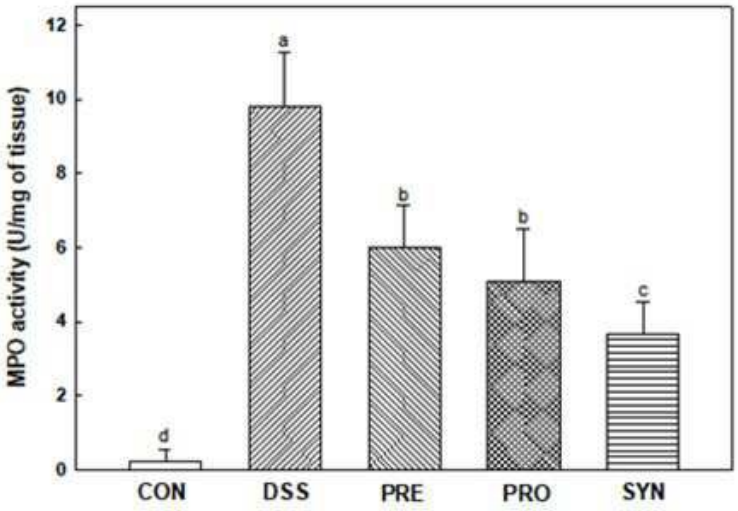
도면7b



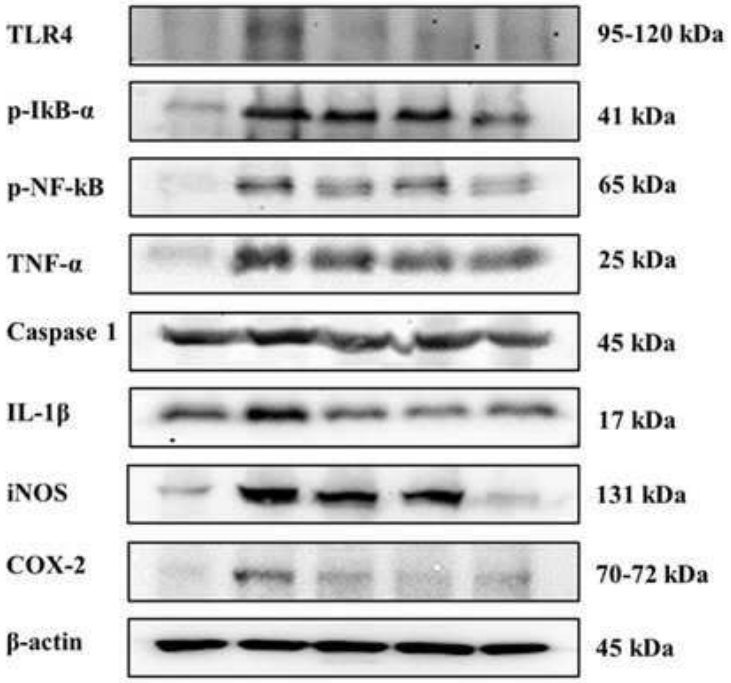
도면7c


Claudin-1 / β-actin relative expression
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a
c
b
b
b
CON
DSS
PRE
PRO
SYN

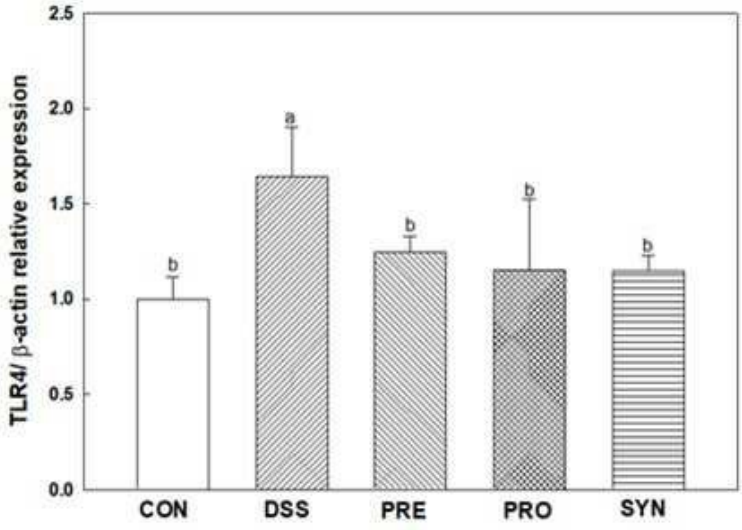
도면8


MPO activity (U/mg of tissue)
12
10
8
6
4
2
0
d
a
b
b
c
CON
DSS
PRE
PRO
SYN

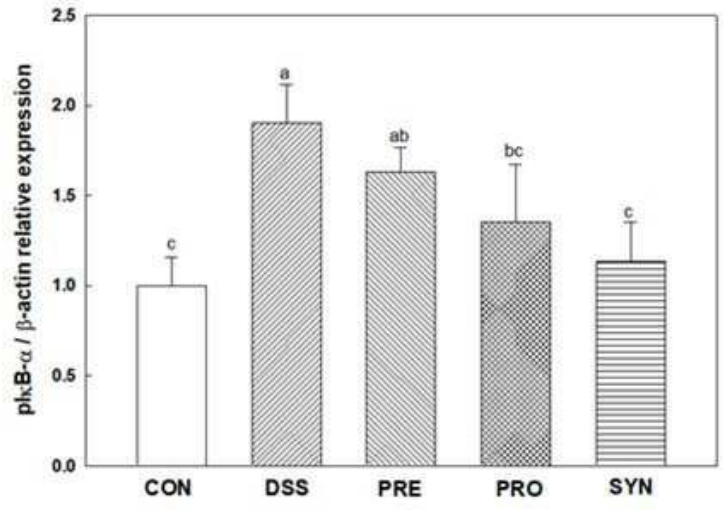
도면9a


TLR4
95-120 kDa
p-IkB-α
41 kDa
p-NF-kB
65 kDa
TNF-α
25 kDa
Caspase 1
45 kDa
IL-1β
17 kDa
iNOS
131 kDa
COX-2
70-72 kDa
β-actin
45 kDa

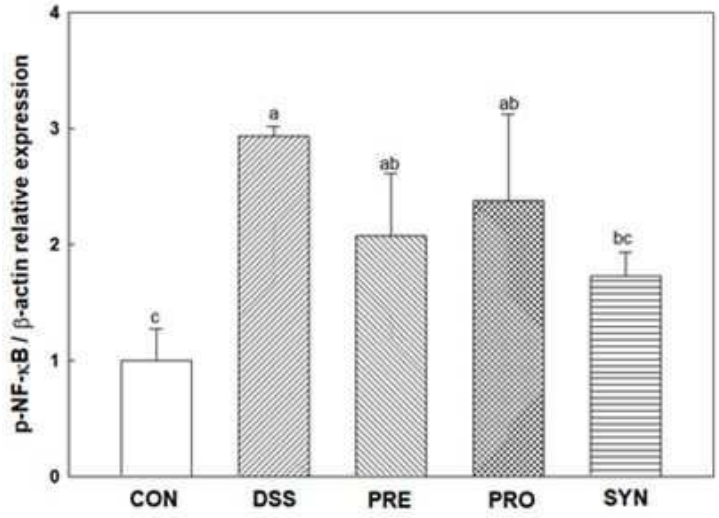
도면9b


TLR4/ β-actin relative expression
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
b
b
b
CON
DSS
PRE
PRO
SYN

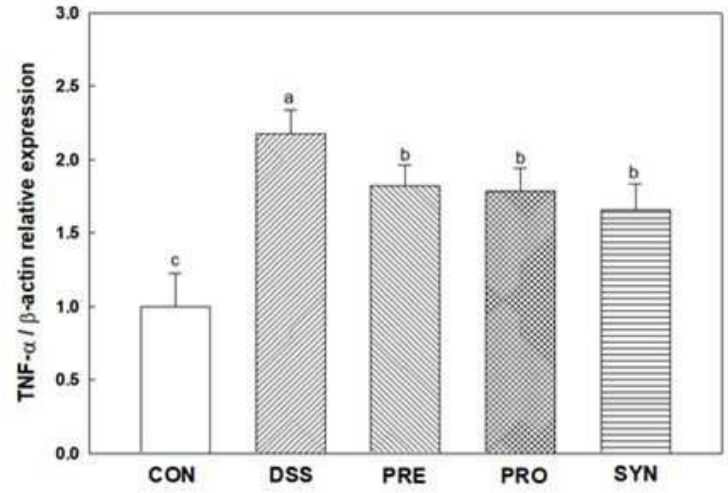
도면9c



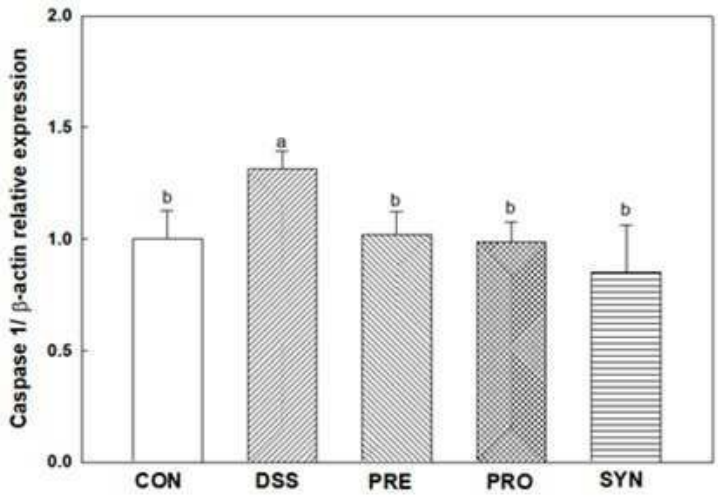
도면9d



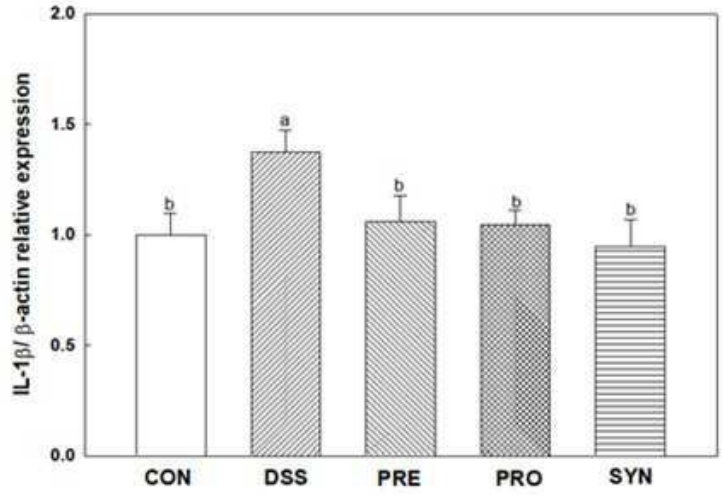
도면9e



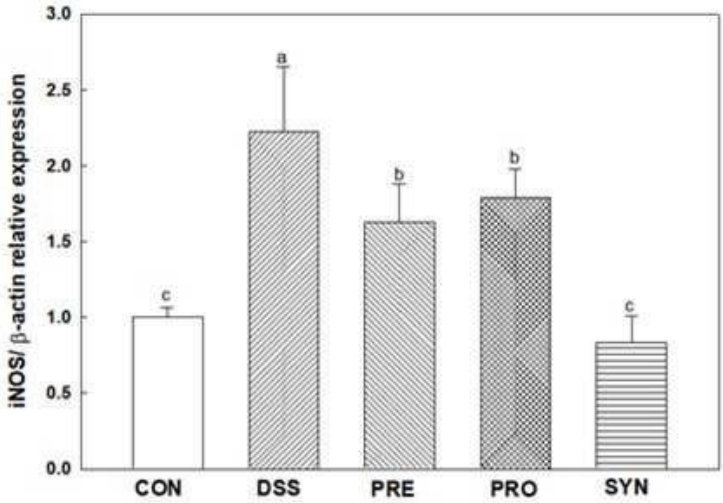
도면9f



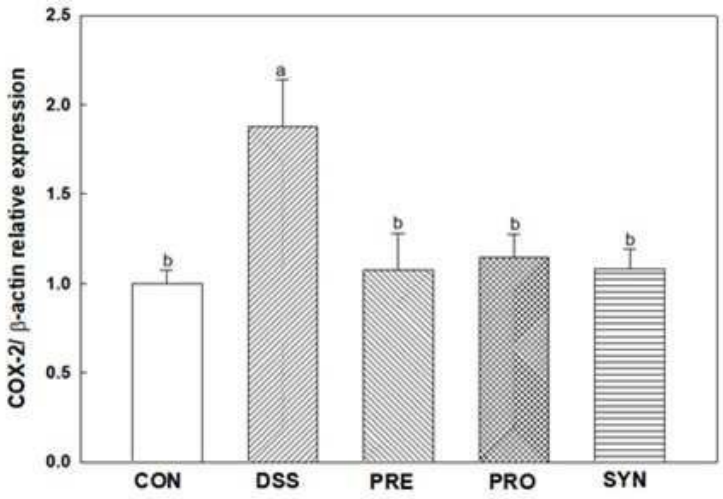
도면9g



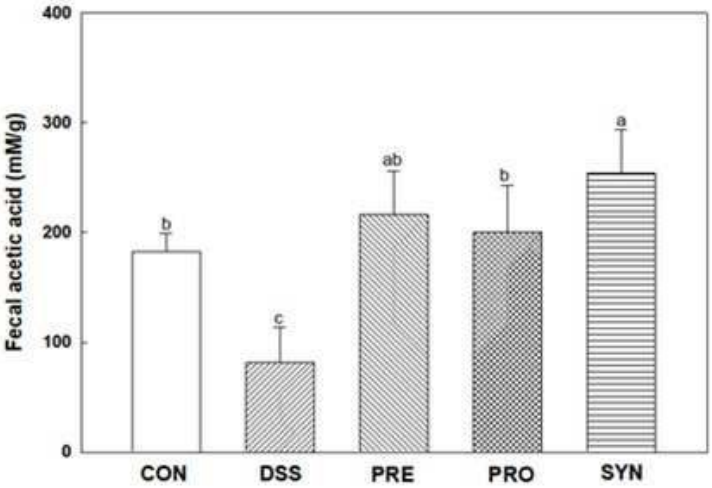
도면9h



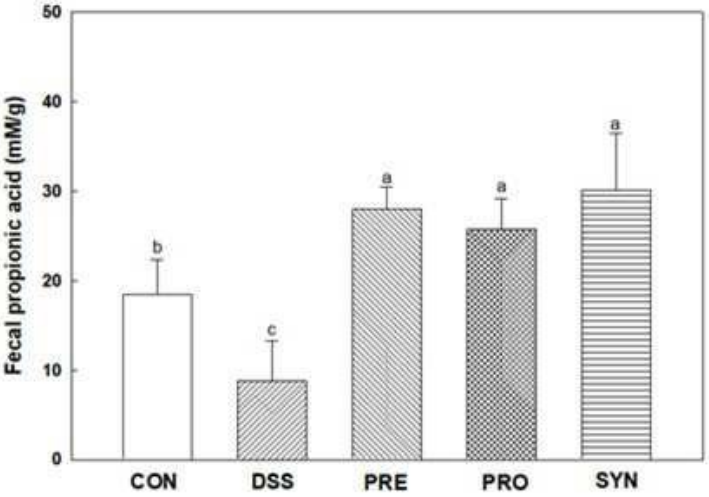
도면9i



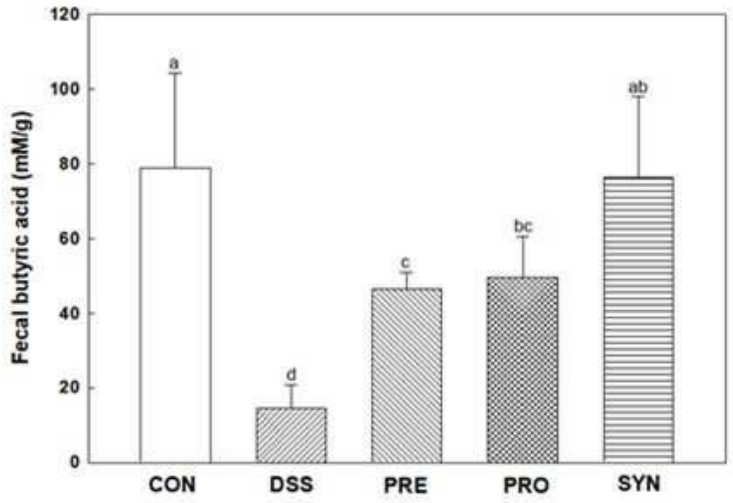
도면10a



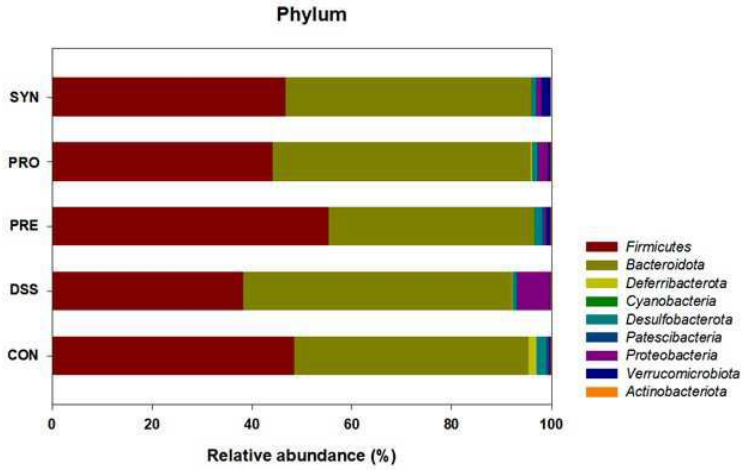
도면10b



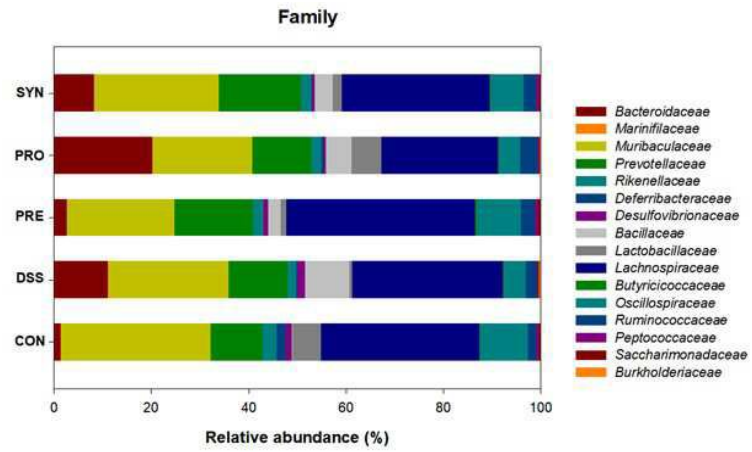
도면10c



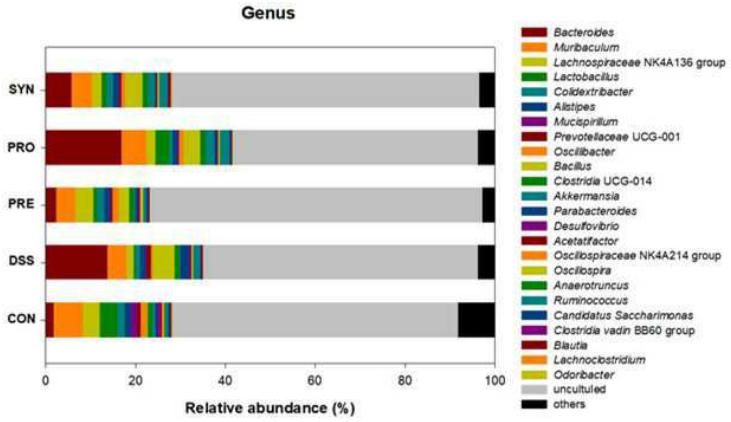
도면11a



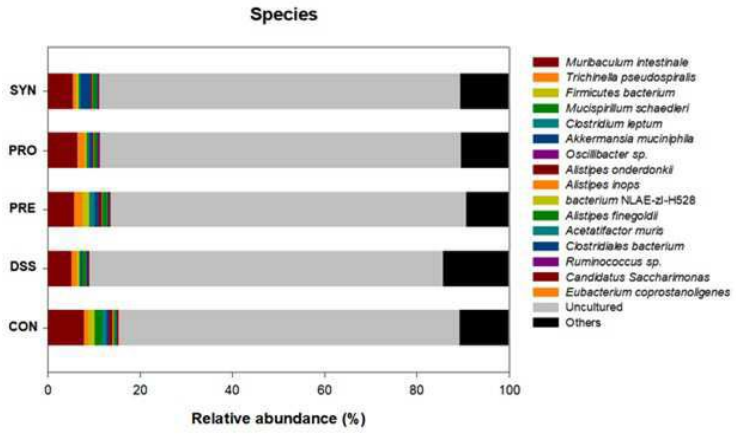
도면11b



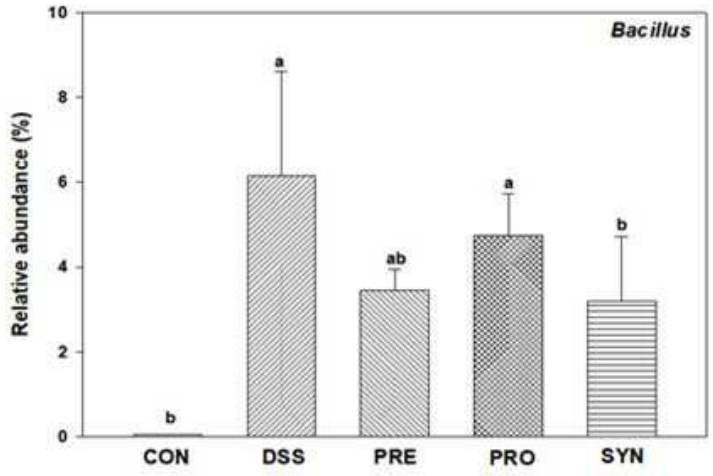
도면11c



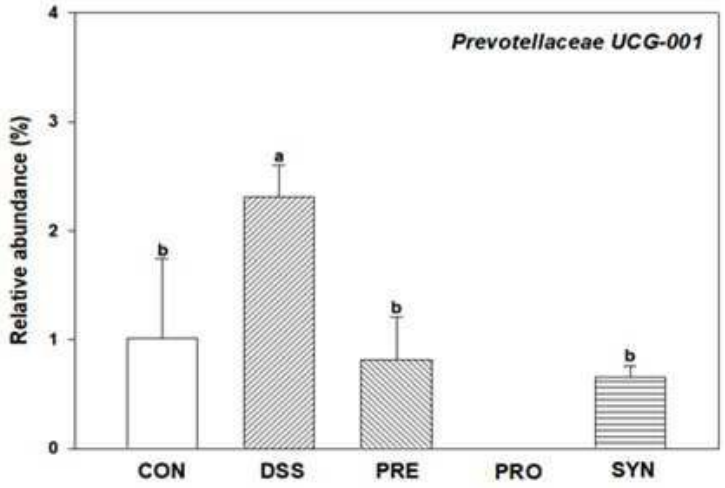
도면11d



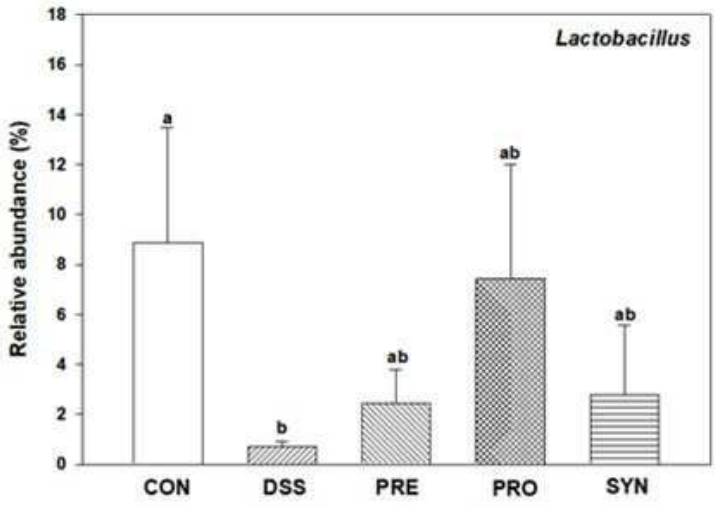
도면11e



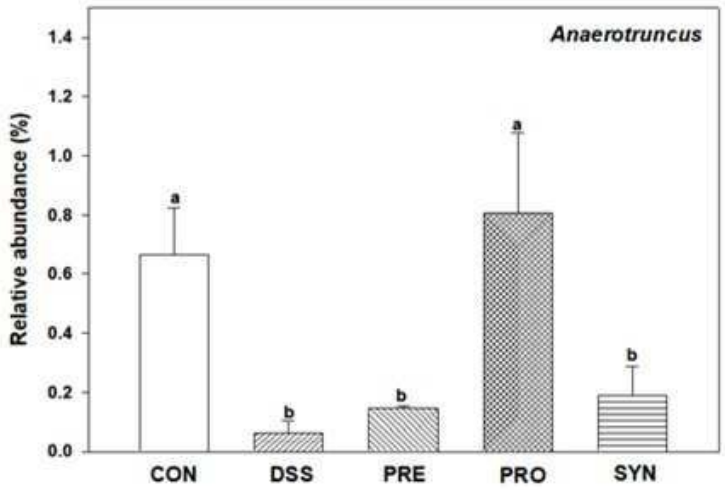
도면11f



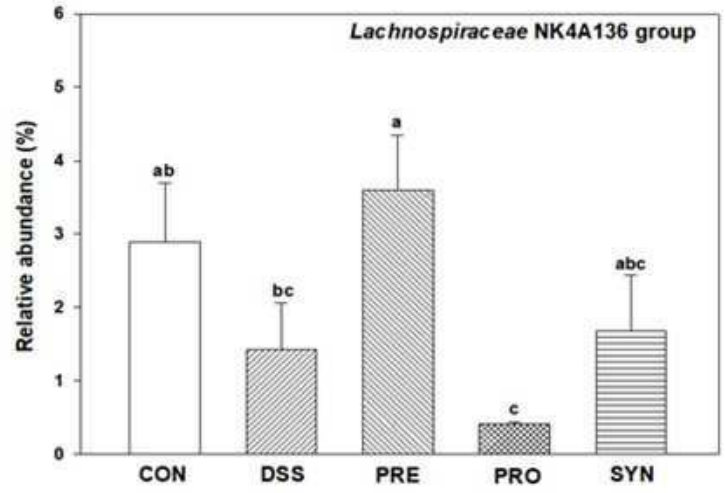
도면11g



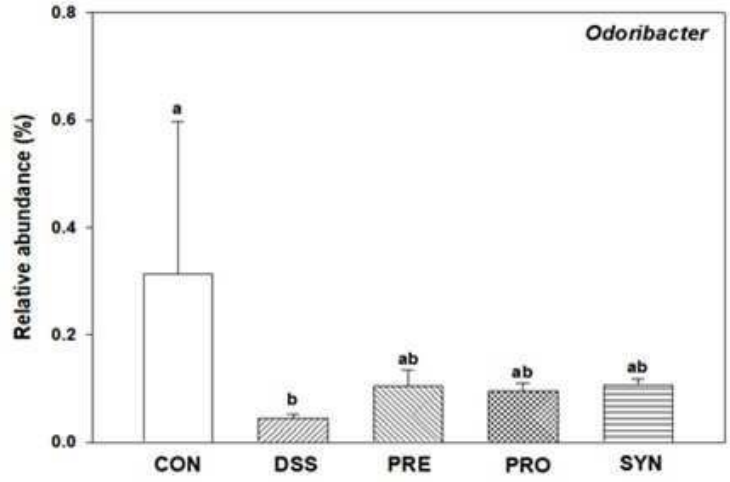
도면11h



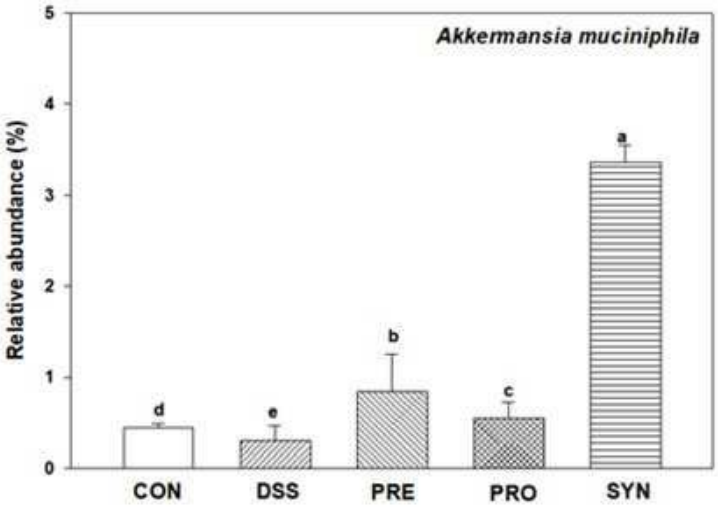
도면11i



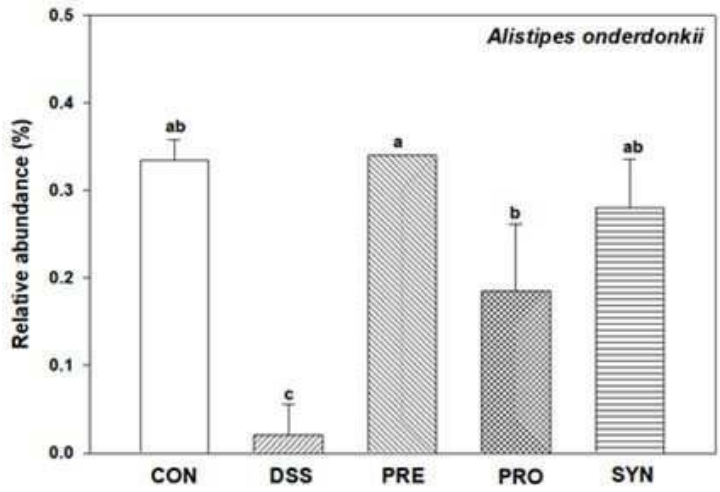
도면11j



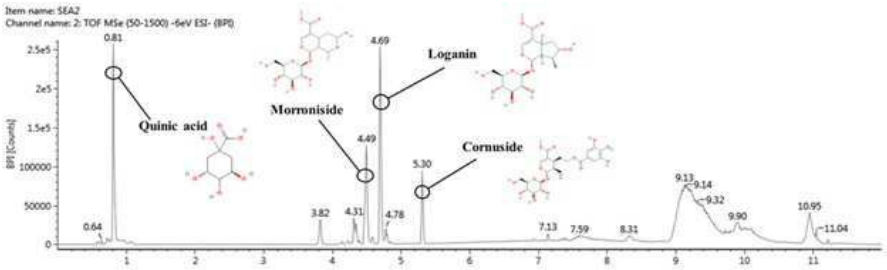
도면11k



도면111


Alistipes onderdonkii
Relative abundance (%)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
ab
c
a
b
ab
CON
DSS
PRE
PRO
SYN

도면12


Quinic acid
Morroniside
Loganin
Cornuside
0.81
4.69
4.49
5.30
0.64
3.82
4.31
4.78
7.13
7.59
8.31
9.13
9.14
9.32
9.90
10.95
11.04