



## (51) 국제특허분류:

A61K 35/747 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)  
A61K 35/745 (2015.01) A61K 8/99 (2006.01)  
A61K 35/744 (2015.01) A61Q 19/00 (2006.01)  
A61P 39/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/000863

(22) 국제출원일: 2023년 1월 18일 (18.01.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

## (30) 우선권정보:

10-2022-0007383 2022년 1월 18일 (18.01.2022) KR

(71) 출원인: 주식회사 셀바이오텍 (CELL BIOTECH CO., LTD.) [KR/KR]; 10003 경기도 김포시 월곶면 애기봉로 409번길 50, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 정명준 (CHUNG, Myung Jun); 06622 서울특별시 서초구 신반포로 270, 113-2001, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 정안 (HONESTY & JR PARTNERS INTELLECTUAL PROPERTY LAW GROUP); 06103 서울특별시 강남구 선릉로 615, 5층, Seoul (KR).

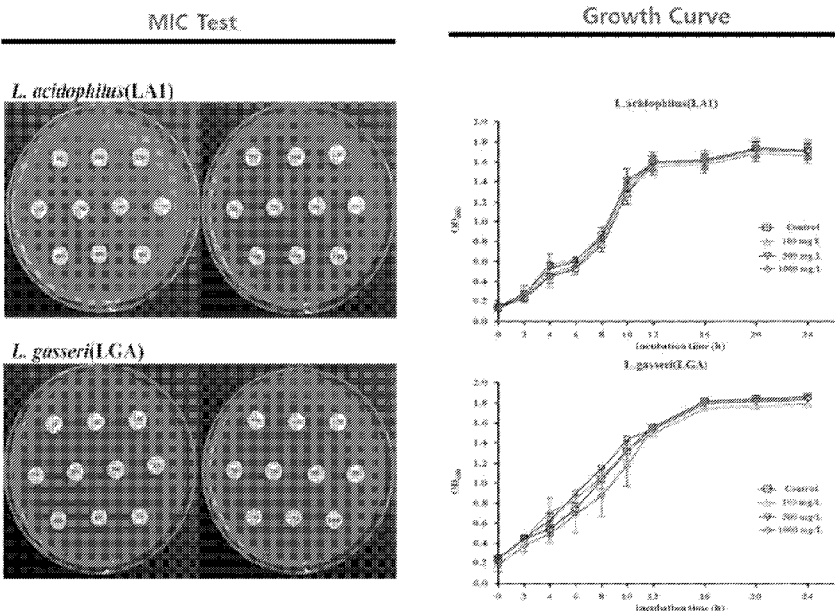
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING PROBIOTICS FOR REMOVAL OF HEAVY METALS

(54) 발명의 명칭: 프로바이오틱스를 포함하는 중금속 제거용 조성물

Fig 1a



(57) Abstract: The present invention relates to a heavy metal-removing composition, a pharmaceutical composition, a food composition, or a pharmaceutical composition, each containing one or more lactic acid bacteria selected from the group consisting of bacteria of the genera Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, Pediococcus, and Streptococcus. Being superb in terms of resistance to heavy metals, antibacterial effect, and heavy metal excretion, the heavy metal-removing composition according to the present invention induced excretion of heavy metals from the body and thus is advantageously used for removing heavy metals.





KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM),  
유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME,  
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

**(57) 요약서:** 본 발명은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 중금속 제거용 조성물, 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 중금속 제거용 조성물은 중금속에 대한 내성, 항균 효과 및 중금속 배출에 탁월하여 생체내에서 중금속을 배출시켜 중금속 제거에 효과적으로 사용되는 이점이 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 프로바이오틱스를 포함하는 중금속 제거용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 프로바이오틱스를 포함하는 중금속 제거용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 사회 및 기술의 발전 그리고 문명에 발달에 따라 환경오염의 심각성은 여러 가지 원인에 의해서 야기되었다. 이 중 생산활동의 과정속에서 배출되는 중금속은 인체에 노출되어 높은 위험성을 지니고 있고 동시에 생태계에 위협을 주고 있다. 이런 위험에 쉽게 노출될 수 있는 우리의 인체는 음식물이나 물, 공기, 토양과 같은 주변 환경에 노출되어 사람마다 어느 정도의 차이는 있겠지만 중금속을 항상 섭취하게 된다.
- [3] 특히 한국인이 식품을 통해 섭취하게 되는 유해적인 중금속의 섭취량이 인체 허용 1일 섭취량인 ADI (acceptable daily intake)에 근접해 있고, 이런 중금속이 인체내에 들어가면 쉽게 배출되지가 않고 이 중 유독성 중금속의 경우, 다소 낮은 농도로도 인체조직과 반응하여 천천히 독성을 띄게 되므로 일정수준을 넘어 중독이 되면 차후 회복하여 완치가 불가능하기 때문에 현대 식품사회에 큰 문제가 되고 있는 실정이다.
- [4] 인체에 독성을 주는 중금속 중 카드뮴(Cadmium, Cd)은 자연계에서는 상대적으로 적은 농도로 존재하지만, 매우 유해하며 각종 공장과 산업장에서 이용이 증가하고 있어서 인체에 미치는 건강영향 평가결과 급성, 만성중독을 일으킴에 따라 환경오염물질로서 관심이 높아지게 되었다. 이처럼 인체에 심각한 피해를 주는 카드뮴에 대하여 프로바이오틱스(Probiotics)가 체내 카드뮴 흡수율을 낮춰 준다는 연구결과가 보고되고 있다.
- [5] 미생물에 의한 중금속의 흡수는 보편적으로는 두가지 방법에 의하여 일어난다고 알려져 있다. 먼저 세포표면에 존재하는 음이온 그룹에 대한 양이온의 결합에 의해 세포표면에 흡착되는 방법이고 두번째로는 대사작용에 의하여 세포내에 축적되는 과정인 것으로 알려져 있으며, 현재는 세포표면흡착에 관한 연구가 주로 이루어지고 있는 실정이다.
- [6] 유산균의 중금속 배출효과에 대한 연구는 현재 미비한 실정으로, 이에 본 발명자들은 프로바이오틱스에 대한 내산성 및 내담즙산에 대한 기능성을 바탕으로 중금속 배출에 탁월한 균주를 선별하며, 본 발명을 완성하게 되었다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 중금속 흡착 또는 제거에 적용할 수 있는 프로바이오틱스 균주를 개발하기 위해 연구 노력하였다.
- [8] 본 발명의 목적은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속

균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 포함하는 중금속 제거용 조성물을 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 중금속 제거용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 중금속 제거용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 중금속 제거용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 다른 목적 및 기술적 특징은 이하의 발명의 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 구체적으로 제시된다.

### 과제 해결 수단

[13] 본 발명의 일 측면은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 중금속 제거용 조성물에 관한 것이다.

[14] 본 발명에서 유산균은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균일 수 있다.

[15] 본 발명의 유산균은 체내에 투여되는 경우 장내에 정착하여 장내 미생물군(gut microbiota)과 함께 유익한 상승적 작용을 한다는 의미에서 프로바이오틱스(probiotics) 유산균일 수 있다.

[16] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 락토바실러스 속 유산균은 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasser*), 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*), 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)으로 이루어진 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균일 수 있다.

[17] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비피도박테리움 속 유산균은 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테리움

비피둠(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 및 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 유산균일 수 있다.

- [18] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 엔테로코커스 속 균은 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*) 및 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유산균일 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 페디오코커스 속 균은 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*)인 유산균일 수 있다.
- [20] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 스트렙토코커스 속 균은 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*)인 유산균일 수 있다.
- [21] 본 발명에서의 중금속 제거용 조성물은 중금속에 내성을 갖는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 내성은 Minimum inhibitory concentrations(MICs), Bacterial growth, 및 heavy metal removal 또는 binding capacity 중 선택되는 하나 이상의 성질을 갖는 것일 수 있다.
- [22] 본 발명에서의 중금속 제거용 조성물은 중금속 배출을 촉진하는 역할을 한다. 따라서 본 발명에서의 중금속 제거용 조성물은 혈액 및 조직에 누적되는 중금속을 체외로 배출하는 역할을 한다.
- [23] 본 발명에서의 중금속은 양이온 중금속 또는 음이온 중금속일 수 있다. 예컨대, 상기 양이온 중금속은 카드뮴(Cd), 구리(Cu) 및 납(Pb) 또는 아연(Zn)일 수 있고, 음이온 중금속은 비소(As), 크롬(Cr), 셀레늄(Se) 또는 안티모니(Sb)일 수 있다.
- [24] 본 발명에서의 양이온 중금속은 카드뮴이며, 상기 균은 카드뮴 100mg/L 용액에서 22% 이상의 카드뮴 제거능을 갖는 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 균은 카드뮴 50mg/L 용액에서 29% 이상의 카드뮴 제거능을 갖는 것일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 균은 카드뮴 5mg/L 용액에서 51% 이상의 카드뮴 제거능을 갖는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명에서의 양이온 중금속은 납이며, 상기 균은 납 100mg/L 용액에서 22% 이상의 납 제거능을 갖는 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 균은 납 50mg/L 용액에서 41% 이상의 납 제거능을 갖는 것일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 균은 납 5mg/L 용액에서 76% 이상의 납 제거능을 갖는 것일 수 있다.
- [26] 본 발명의 다른 측면은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 중금속 중독의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [27] 본 발명의 약학적 조성물에서 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균에 대한 내용은 상기 설명된 본 발명의 다른 측면인 “중금속 제거용 조성물”에서 설명된 내용과 동일하므로 이들을 원용하며 중복하여 설명하지는 아니한다.

- [28] 본 발명에서 용어 “예방”은 질환, 질병, 또는 질환으로 인한 증상을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환, 질병, 또는 증상에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물에서 질환, 질병 또는 증상의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [29] 본 발명에서 용어 “치료”는 (i) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제, (ii) 질환, 질병 또는 증상의 경감, 또는 (iii) 질환, 질병 또는 증상의 제거를 의미한다.
- [30] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물 (예: 락토스, 아밀로스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스, 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염 용액, 알코올, 아라비아 고무, 식물성 기름 (예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [31] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [32] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001 - 1000 mg/kg (체중)이다.
- [33] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명의 또 다른 측면은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [35] 본 발명의 식품 조성물에서 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균에 대한 내용은 상기 설명된 본 발명의 다른 측면인 “중금속 제거용 조성물”에서 설명된 내용과 동일하므로 이들을 원용하며 중복하여 설명하지는 아니한다.
- [36] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional

supplement), 건강 식품(health food) 또는 식품 첨가제(food additives)로 제조될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [37] 본 발명의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있으며, 예를 들어, 발효유와 같은 음료, 또는 분말 형태로도 제조될 수 있다.
- [38] 본 발명의 식품 조성물은 상술한 본 발명의 유효성분 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [39] 본 발명의 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출물, 대추 추출물, 감초 추출물 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [40] 본 발명의 또 다른 측면은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [41] 본 발명의 화장료 조성물에서 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균에 대한 내용은 상기 설명된 본 발명의 다른 측면인 “중금속 제거용 조성물”에서 설명된 내용과 동일하므로 이들을 원용하며 중복하여 설명하지는 아니한다.
- [42] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서 상기 유효 성분 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [43] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 팩, 마사지크림 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [44] 본 발명의 화장료 조성물 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연

등이 이용될 수 있다.

- [45] 본 발명의 화장료 조성물 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [46] 본 발명의 화장료 조성물 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [47] 본 발명의 화장료 조성물 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [48] 본 발명의 화장료 조성물 제형이 계면활성제가 함유된 클렌징의 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [49] 본 발명의 화장료 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 제형 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비 함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 한정되는 것은 아니다.

### 발명의 효과

- [50] 본 발명은 락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균으로 이루어지는 균에서 선택되는 1종 이상의 유산균을 포함하는 중금속 제거용 조성물, 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 중금속 제거용 조성물은 중금속에 대한 내성, 항균 효과 및 중금속 배출에 탁월하여 생체내에서 중금속을 배출시켜 중금속 제거에 효과적으로 사용될 수 있다.



## 도면의 간단한 설명

- [51] 도 1a는 LA1 및 LGA의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [52] 도 1b는 EF4 및 EFL2의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [53] 도 1c는 SL6 및 LPC5의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [54] 도 1d는 LH5 및 LU4의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [55] 도 1e는 LR5 및 LC5의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [56] 도 1f는 PP1,SL4 및 LF2의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [57] 도 1g는 LP3 및 BT1의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [58] 도 1h는 BF3 및 BL3의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [59] 도 1i는 BG7 및 BR3의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [60] 도 1j는 ST3의 카드뮴(Cd) MIC test 및 Growth curve에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [61] 도 2는 카드뮴 용액(cadmium solution) 50 mg/L 에서의 각 개별 균주의 카드뮴(Cd)에 대한 제거능(%) 및 p-value를 나타낸 것이다.
- [62] 도 3은 카드뮴 용액(cadmium solution) 5 mg/L 에서의 각 개별 균주의 카드뮴(Cd)에 대한 제거능(%) 및 p-value를 나타낸 것이다.
- [63] 도 4는 카드뮴 용액(cadmium solution) 100 mg/L 에서의 각 개별 균주의 카드뮴(Cd)에 대한 제거능(%) 및 p-value를 나타낸 것이다.
- [64] 도 5a는 LA1 외 11 종 균주에 대한 납(Pb) MIC test 및 Growth에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [65] 도 5b는 LP3 외 6 종 균주에 대한 납(Pb) MIC test 및 Growth에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [66] 도 5c는 LA1 외 10 종 균주에 대한 납(Pb) 농도 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [67] 도 5d는 BL3 외 7 종 균주에 대한 납(Pb) 농도 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [68] 도 6은 납 용액(Lead solution) 50 mg/L 에서의 각 개별 균주의 납(Pb)에 대한 제거능(%)을 나타낸 것이다.
- [69] 도 7은 납 용액(Lead solution) 5 mg/L 에서의 각 개별 균주의 납(Pb)에 대한 제거능(%)을 나타낸 것이다.

- [70] 도 8은 납 용액(Lead solution) 100 mg/L 에서의 각 개별 균주의 납(Pb)에 대한 제거능(%)을 나타낸 것이다.
- [71] 도 9는 카드뮴 용액(cadmium solution) 100 mg/L 및 납 용액(cadmium solution) 100 mg/L에 *Lactobacillus plantarum* 및 *Lactobacillus acidophilus* 투여한 샘플에 대한 SEM 이미징을 나타낸 것이다.
- [72] 도 10은 카드뮴에 대한 제거능이 우수한 균주를 선별하는 과정을 나타내는 모식도이다.
- [73] 도 11은 본 발명의 프로바이오틱스에 의한 체중 및 간 중량 변화를 나타낸 것이다.
- [74] 도 12는 본 발명의 프로바이오틱스에 의한 카드뮴(Cd) 및 납(Pb)의 분변(feces)으로의 배출 변화를 나타낸 것이다.
- [75] 도 13은 본 발명의 프로바이오틱스에 의한 카드뮴(Cd) 및 납(Pb)의 혈액 및 조직(간, 신장)내 함량 변화를 나타낸 것이다.
- [76] 도 14는 본 발명의 프로바이오틱스에 의한 카드뮴(Cd) 및 납(Pb)의 혈액학적 변화를 나타낸 것이다.

[77]

### 발명의 실시를 위한 형태

- [78] 본 발명의 바람직한 실시형태들을 설명한다. 그러나, 본 발명의 실시형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 실시형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다.

[79]

### [80] 실험 방법

[81]

### [82] 실험예 1. 중금속 제거능을 가진 프로바이오틱스의 선별

[83]

- [84] 중금속 흡착 또는 제거 능력을 가진 프로바이오틱스 균주를 선별하기 위하여, 스크리닝(In vitro)을 진행하였다.

[85]

락토바실러스 속 균, 비피도박테리움 속 균, 엔테로코커스 속 균, 페디오코커스 속 균 및 스트렙토코커스 속 균을 프로바이오틱스 균주로서 설정하고, 락토바실러스 속 균으로서 락토바실러스 아시도필러스(*lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 가세리(*latobacillus gasser*), 락토바실러스 락티스(*lactobacillus lactis*), 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 및

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 비피도박테리움 속 균으로서 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 및 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*), 엔테로코커스 속 균으로서 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*) 및 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*), 페디오코커스 속 균으로서 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 스트렙토코커스 속 균으로서 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*)를 설정하여 테스트 하였다.

[86]

[87]     **실험예 2. 항균 효과 측정(MIC Test)**

[88]

[89]     실험예 1에서 선별된 각 개별 균주를 중금속에 대한 항균 활성 실험(MIC test)을 이용하여 균주 선별 및 효능 평가(In vitro)를 수행하였다.

[90]     먼저, MRS or BL agar plate에 멸균된 paper disk를 이용하여 상기 균주를 접종(seeding)하였다. 항균 활성 실험을 위하여 중금속 중 카드뮴(Cd, 농도 range: 50mg/L ~ 1000mg/L, 50 µl/disk)과 납(Pb, 농도 range: 50mg/L ~ 5000mg/L, 50 µl/disk)을 이용하여 각 카드뮴 또는 납에 저항성을 갖는 균주 선별하고자 하였다. 또한, Binding capacity assay를 이용하여 카드뮴 또는 납에 부착성을 갖는 균주 선별하고자 하였다.

[91]

[92]     **실험예 3. 세균증식 측정(Bacterial growth test)**

[93]

[94]     실험예 1에서 선별된 각 개별 균주를 중금속에 대한 세균증식 실험(Bacterial growth test)을 이용하여 균주 선별 및 효능 평가(In vitro)를 수행하였다. 각 개별 균주의 카드뮴 및 납을 투여하고, 카드뮴 및 납의 농도에 따른 증식(growth) 변화를 측정하였다(도 10 참조).

[95]     실험예 1의 항균 효과 평가(MIC test) 결과에 의한 농도인 0 mg/L, 100mg/L, 500mg/L, 1000mg/L를 카드뮴 농도 범위로 설정하고, 설정된 카드뮴 농도에 따른 각 개별 균주의 MRS or BL broth 상의 growth pattern을 분석하였다. 실험예 1의 항균 효과 평가(MIC test) 결과에 의한 농도인 0 mg/L, 50mg/L, 100mg/L, 500mg/L, 1000 mg/L, 2000mg/L, 3000mg/L, 4000mg/L, 5000 mg/L를 카드뮴 농도 범위로 설정하였다.

[96]     상기 카드뮴 및 납에 대한 평가값은 실험예 2의 항균 효과 평가(MIC test) 결과에 대한 MRS or BL broth 상의 각 개별 균주의 growth 재확인한 것을 의미한다.

[97]

[98]     **실험예 4. 중금속 제거능(heavy metal removal) 및 결합 용량 분석(binding**

**capacity assay) 측정**

[99]

[100] 실험예 1에서 선별된 각 개별 균주에 대한 중금속 제거능을 수행하였다. 먼저, 각 개별 균주 18시간 배양하고, pellet을 1mg/L(1ppm)의 카드뮴 용액(Cd solution media)에서 37°C에서 2시간 배양하였다. 이 후, 카드뮴 용액(Cd solution media)에 있는 카드뮴 농도를 측정하고 MRE(Metal removal efficiency) 또는 Cd uptake를 아래 수식을 사용하여 측정하였다.

[101]  $MRE = (C_i - C_f) / (t_f - t_i) M$  ( $C_i$  = initial Cd concentration,  $C_f$  = final Cd concentration,  $t_i$  = initial time,  $t_f$  = final time,  $M$  = mass of cell,  $\mu g \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$ )

[102]  $Cd \text{ uptake} = (C_0 - C_1) V / m$  ( $C_0$  (mg/L) = initial Cd concentration,  $C_1$  (mg/L) = Cd concentration after adsorption,  $V$  (L) = volume of the solution,  $m$  (g) = amount of biomass)

[103]

[104] 또한, 상기 각 개별 균주에 대한 카드뮴 결합 특성(Cd binding characterization) 및 납 결합 특성(Pb binding characterization)을 분석하였다.

[105] 카드뮴 결합 특성 분석을 위하여, 각 개별 균주를 18 시간 배양 후 pellet을 50mg/L의 카드뮴 용액(Cd solution)으로 용해(resuspension) 후, NaOH or HNO<sub>3</sub> 용액(solution)으로 pH 6으로 조정하였다. 이 후, 37 °C에서 1시간 배양(incubation)하고, 상청액(Supernatant)의 카드뮴 농도를 측정하여, 카드뮴에 대한 제거 및 결합력이 우수한 균주를 선별하였다. 납 결합 특성 분석은 상기 카드뮴 결합 특성 분석의 경우와 동일한 방법으로 수행하여 납 농도를 측정 및 평가하였다.

[106] 카드뮴 및 납에 대한 정량적 분석은 원자흡광광도계(Atomic absorption spectrometer)를 사용하여 측정하고, 최종 선별된 균주의 표면에 부착된 카드뮴 및 납을 SEM(scanning electron microscope) 전자현미경을 사용하여 측정하였다.

[107]

[108] 실험예 5. 동물 실험 측정 (In vivo test)

[109]

[110] 실험예 1의 프로바이오틱스 균주에 대해 동물모델(In vivo)에서의 평가를 수행하였다. 실험동물은 SD rat Male를 6 랫트/그룹으로 사용하였다. 상기 랫트에 CdCl<sub>2</sub> (Cadmium chlorid, Cd), Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (Lead acetate, Pb), probiotics(LA+LP, Pro)를 Cadmium 10 mg/kg, Lead 10 mg/kg, probiotics(LA+LP) 1 X 10<sup>9</sup> CFU/rat의 농도로 4주의 기간 동안 투여하였으며, 구체적인 동물 실험 계획표는 아래와 같다.

[111]

[112] [표1]

| 실험군           | -1~0주                | 0주             | 1주 | 2주 | 3주 | 4주 |
|---------------|----------------------|----------------|----|----|----|----|
| Normal        | 적응기<br>(Acclimation) |                |    |    |    |    |
| Normal+Pro    |                      | Pro 4주 투여      |    |    |    |    |
| Normal+Cd     |                      | Cd 4주 투여       |    |    |    |    |
| Normal+Pb     |                      | Pb 4주 투여       |    |    |    |    |
| Normal+Pro+Cd |                      | Pro + Cd 4주 투여 |    |    |    |    |
| Normal+Pro+Cd |                      | Pro + Pb 4주 투여 |    |    |    |    |

[113]

[114] 각 실험군의 Body weight를 각 주차마다, 측정하고, 투여 후 각 개체의 liver 및 kidney weight 측정하였다. 투여기간 동안 매주 각 개체의 분변을 수집하여 분변 내 카드뮴 및 납 농도 측정하고, 투여 완료 후 각 개체의 혈액 및 조직 (liver, kidney)에서 혈액 및 조직 내 카드뮴 및 납 농도 측정하였다. 이를 측정하기 위하여 원자흡광광도계(Atomic absorption spectrometer)를 사용하였다. 또한, 4 주 투여 후, 각 개체의 지질학적 수치 및 간 수치 관련 분석을 위하여 혈액학적 분석을 수행하였다.

[115]

[116] 실험 결과

[117]

[118] 실시예 1. 카드뮴(Cd)의 프로바이오틱스에 의한 항균 활성 실험(MIC test) 및 세균증식(Bacterial growth) 평가(In vitro)

[119]

[120] 실험예 1에서 선별된 각 개별 균주에 대한 중금속 항균 활성 실험(MIC test) 및 세균증식(Bacterial growth) 분석하고, 내성(tolerance ability)을 평가하여 아래 표 2에 나타내었다.

[121] [표2]

| Type of resistant | Strains                         | Cd MIC (mg/L) |
|-------------------|---------------------------------|---------------|
| Cd-resistant      | <i>L. acidophilus</i> (LA1)     | > 1000 mg/L   |
|                   | <i>L. gasseri</i> (LGA)         | > 1000 mg/L   |
|                   | <i>E. faecium</i> (EF4)         | > 1000 mg/L   |
|                   | <i>E. faecalis</i> (EFL2)       | > 1000 mg/L   |
|                   | <i>L. lactis</i> (SL6)          | > 1000 mg/L   |
|                   | <i>L. paracasei</i> (LPC5)      | < 600 mg/L    |
|                   | <i>L. helveticus</i> (LH5)      | < 500 mg/L    |
|                   | <i>L. reureri</i> (LU4)         | < 300 mg/L    |
|                   | <i>B. Infantis</i> (BT1)        | < 300 mg/L    |
|                   | <i>L. rhamnosus</i> (LR5)       | < 250 mg/L    |
|                   | <i>B. bifidum</i> (BF3)         | < 250 mg/L    |
|                   | <i>L. casei</i> (LC5)           | < 150 mg/L    |
|                   | <i>P. pentosaceus</i> (PP1,SL4) | < 100 mg/L    |
|                   | <i>L. fermentum</i> (LF2)       | < 50 mg/L     |
|                   | <i>L. plantarum</i> (LP3)       | < 50 mg/L     |
|                   | <i>B. lactis</i> (BL3)          | < 50 mg/L     |
|                   | <i>B. longum</i> (BG7)          | < 50 mg/L     |
|                   | <i>B. breve</i> (BR3)           | < 50 mg/L     |
|                   | <i>S. thermophilus</i> (ST3)    | < 50 mg/L     |

[122]

[123] 상기 표 2는 각 개별 균주의 Cd 에 대한 tolerance ability를 나타낸 것으로, 총 19종의 항균 활성 실험(MIC Test)을 통한 Cadmium tolerance ability 수행 결과, LA1, LGA, EF4, EFL2, SL6 > LPC5 > LH5 > LU4, BT1 > LR5, BF3 > LC5 > PP1 (SL4) > LF2, LP3, BL3, BG7, BR3, ST3 순으로 카드뮴에 대한 내성(tolerance)를 나타내었으며 (Table. 1), 각 균주의 growth curve 패턴 또한 항균 활성 실험 (MIC Test)에서 보인 카드뮴 농도와 유사한 양상을 나타내었다(도 1a 내지 도 1j 참조).

[124]

[125] 실시예 2. 카드뮴(Cd)의 프로바이오틱스에 의한 중금속 제거능(removal capacity) 평가 결과(In vitro)

[126]

- [127] 카드뮴 용액(cadmium solution) 50 mg/L 에 각 균주를 1시간 반응 후 잔여 카드뮴 농도를 측정하였다. 각 균주 모두 카드뮴 제거에 효과가 있으나 LF2, SL6, LP3, LH5, LA1, ST3 균주에서 전평균(Total average) 수치인 28.8 % 보다 높은 제거능을 나타내었다.
- [128] 상기 카드뮴 용액(cadmium solution) 50 mg/L 에서 선별된 6 개 균주 (LF2, SL6, LP3, LH5, LA1, ST3)에 대하여 카드뮴 용액(cadmium solution) 5 mg/L 및 카드뮴 용액(cadmium solution) 100 mg/L에서 추가적인 제거능(removal capacity)을 수행하였다.
- [129] 카드뮴 용액(cadmium solution) 5 mg/L 에서 제거능의 평균은 51% 이며, 이 중 LP3, LA1, LH5 균주의 제거능은 90% 이상을 나타내었다. 카드뮴 용액(cadmium solution) 100 mg/L 에서 제거능의 평균은 21.6%이며, 이 중 LP3, LA1, LH5 균주의 제거능은 21.6% 이상을 나타냄을 확인하였다(도 2 내지 도 4 참조).
- [130]
- [131] 실시예 3. 납(Pb)의 프로바이오틱스에 의한 항균 활성 실험(MIC test) 및 세균증식(Bacterial growth) 평가 결과(In vitro)
- [132]
- [133] 실험예 1에서 선별된 각 개별 균주에 대한 중금속 항균 활성 실험(MIC test) 및 세균증식(Bacterial growth) 분석하고, 내성(tolerance ability)을 평가하여 아래 표 3에 나타내었다.
- [134]

[135] [표3]

| Type of resistant | Strains                         | Cd MIC (mg/L) |
|-------------------|---------------------------------|---------------|
| Lead-resistant    | <i>L. acidophilus</i> (LA1)     | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>L. gasseri</i> (LGA)         | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>E. faecium</i> (EF4)         | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>E. faecalis</i> (EFL2)       | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>L. lactis</i> (SL6)          | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>L. paracasei</i> (LPC5)      | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>L. helveticus</i> (LH5)      | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>L. reureri</i> (LU4)         | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>B. Infantis</i> (BT1)        | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>L. rhamnosus</i> (LR5)       | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>B. bifidum</i> (BF3)         | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>L. casei</i> (LC5)           | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>P. pentosaceus</i> (PP1,SL4) | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>L. fermentum</i> (LF2)       | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>L. plantarum</i> (LP3)       | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>B. lactis</i> (BL3)          | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>B. longum</i> (BG7)          | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>B. breve</i> (BR3)           | > 2000 mg/L   |
|                   | <i>S. thermophilus</i> (ST3)    | > 2000 mg/L   |

[136]

[137] 상기 표 3은 각 개별 균주의 Pb에 대한 tolerance ability를 나타낸 것으로, 총 19종의 항균 활성 실험(MIC Test)을 통한 Cadmium tolerance ability 수행 결과와 상이한 양상을 나타낼 수 있었다. MRS or BL broth에서 24시간 배양 이후의 측정된 OD 값은 Pb 농도와 관련 없이 Control group과 유사한 경향을 나타낼 수 있었다(도 5a 내지 도 5d 참조).

[138]

[139] 실시예 4. 납(Pb)의 프로바이오틱스에 의한 중금속 제거능(removal capacity) 평가 결과(In vitro)

[140]

[141] 납 용액(cadmium solution) 50 mg/L에 각 균주를 1시간 반응 후 잔여 납 농도를



측정하였다. 각 군주 전반적으로 납 제거에 효과가 있으나 각 개별 군주간의 그 효능 정도가 구분됨을 알 수 있었다. 전체적으로 군주의 전평균(Total average) 약 53%의 제거 효능이 있으나, 이 중 LF2, LP3, LR3, LA1, BL3, BR3, BT1, BG7, EFL2 군주가 평균 이상이며, 특히 LP3, BL3에서 약 95% 높은 제거능을 나타내었다.

[142] 상기 납 용액(cadmium solution) 50 mg/L 에서 선별된 9 개 군주(LF2, LP3, LR5, LA1, BL3, BR3, BT1, BG7, EFL2)에 대하여 납 용액(cadmium solution) 5 mg/L 및 납 용액(cadmium solution) 100 mg/L에서 추가적인 제거능(removal capacity)을 수행하였다.

[143] 납 용액(cadmium solution) 5 mg/L 에서 제거능의 평균은 75.7%이며, 이 중 LP3, BL3, BR3 군주의 제거능은 평균 이상을 나타내었다. 납 용액(cadmium solution) 100 mg/L 에서 제거능의 평균은 40.2%이며, 이 중 LP3, LA1에서 가장 높은 제거능을 나타냄을 확인하였다(도 6 내지 도8 참조).

[144]

[145] 실시예 5. 납(Pb)의 프로바이오틱스에 의한 중금속 제거능(removal capacity) 평가 결과(In vitro)

[146]

[147] 카드뮴 용액(cadmium solution) 100 mg/L 및 납 용액(cadmium solution) 100 mg/L에 Lactobacillus plantarum 및 Lactobacillus acidophilus 투여한 샘플에 대해 SEM(Scanning electron microscopy)이미징을 통하여 형태학적으로 관찰하였다.

[148] SEM 관찰 결과, 각 샘플 시편에서 세포 표면의 밝은 영역을 통하여 카드뮴 또는 납 입자의 침전 및 형성한 것을 확인할 수 있었다(도 9 참조).

[149]

[150] 실시예 6. 체중 및 간 중량을 통한 프로바이오틱스에 의한 중금속 제거능(removal capacity) 평가(In vivo)

[151]

[152] 프로바이오틱스에 의한 체중 및 간 중량을 동물실험을 통하여 평가하였다. Cd 투여군의 body weight 와 Liver weight 는 다른 투여군보다 유의적으로 적게 측정되나, Probiotics (LA1+LP3) 투여는 Normal 실험군과 유사한 weight 가 측정됨을 확인하였다. Pb의 투여군 역시 body weight 가 유의적으로 적게 측정되며, Probiotics (LA1+LP3)의 투여로 Normal 실험군과 유사한 weight가 측정되나 조직의 weight 는 유의적 차이가 없었다.

[153] [표4]

| Group           | Weeks       |                             |                            |                            |                            |
|-----------------|-------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                 | 0 week      | 1 week                      | 2 week                     | 3 week                     | 4 week                     |
| Normal          | 242.2 ± 7.3 | 318.3 ± 15.3                | 343.3 ± 12.5               | 372.3 ± 12.9               | 401.3 ± 15.3               |
| Probiotics      | 246.3 ± 6.5 | 333.8 ± 7.5                 | 343.5 ± 7.1                | 383.5 ± 8.6                | 413.6 ± 7.8                |
| Cd              | 242.7 ± 5.4 | 269.5 ± 9.6 <sup>b,d</sup>  | 311.2 ± 8.2 <sup>b,d</sup> | 352.8 ± 6.0 <sup>a,d</sup> | 370.8 ± 6.2 <sup>b,d</sup> |
| Pb              | 244.8 ± 7.9 | 319.2 ± 7.9                 | 334.3 ± 7.0                | 364.7 ± 6.8 <sup>d</sup>   | 385.6 ± 15.1 <sup>e</sup>  |
| Cd + Probiotics | 245.2 ± 5.7 | 285.7 ± 12.2 <sup>a,d</sup> | 334.0 ± 4.7 <sup>f</sup>   | 375.8 ± 6.4                | 393.1 ± 6.7 <sup>c,f</sup> |
| Pb + Probiotics | 242.3 ± 6.4 | 324.3 ± 7.1                 | 341.7 ± 12.4               | 380.2 ± 10.0               | 412.0 ± 8.3 <sup>g</sup>   |

[154]

[155] 실시예 7. 분변(feces)으로의 배출을 통한 프로바이오틱스에 의한 중금속 제거능(removal capacity) 평가(In vivo)

[156]

[157] Cd 투여 1주차 분변에서의 Cd 농도는 Probiotics(LA1+LP3)를 같이 투여한 실험군에서 유의적으로 높게 측정되었다. Cd 단독 투여 실험군의 분변에서는 4주 투여동안 Cd 함량이 65~89 µg/g fecal 이었으나, Probiotics(LA1+LP3)를 같이 투여한 실험군에서는 85.3~156.4 µg/g fecal 로 4주차에는 약 2 배 차이남을 알 수 있었다.

[158] 투여 2 주차부터 Probiotics (LA1+LP3)의 투여로 인해 분변내 Cd 의 함량은 Cd 단독 투여보다 약 2 배 배출 효능을 나타내었다. 이는 Probiotics(LA1+LP3)로 인하여 체내 축적되는 Cd가 분변으로의 배출함에 따른 것으로 Probiotics(LA1+LP3)가 Cd의 체내 축적량을 줄일 수 있을 것임을 알 수 있다.

[159]

[160] 한편, Pb 투여 1 주차 분변에서의 Pb 농도는 Probiotics(LA1+LP3)를 같이 투여한 실험군에서 유의적으로 높게 측정되었다. Pb 단독 투여 실험군의 분변에서는 4주 투여동안 Pb 함량이 34~44 µg/g fecal 이었으나, Probiotics (LA1+LP3)를 같이 투여한 실험군에서는 48~186 µg/g fecal 로 4주차에는 약 4.5 배 차이남을 알 수 있었다.

[161] 투여 2 주차부터 Probiotics (LA1+LP3)의 투여로 인해 분변내 Pb 의 함량은 Pb 단독 투여보다 약 2.5 배 배출 효능을 나타내었다. 이는 Probiotics(LA1+LP3)로 인하여 체내 축적되는 Pb가 분변으로의 배출함에 따른 것으로 Probiotics(LA1+LP3)가 체내 축적량을 줄일 수 있을 것임을 알 수 있다.

[162] 또한, Probiotics (LA1+L3P)의 투여는 그 배출 효과는 Cd 와 대비하여 Pb 에 서 더욱 효과적임을 확인하였다(도 12 참조).

[163]

[164] [표5]

| Group           | Pb concentration ( $\mu\text{g} / \text{g}$ fecal) |                    |                    |                    |
|-----------------|----------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                 | 1 week                                             | 2 week             | 3 week             | 4 week             |
| Normal          | $0.38 \pm 0.01$                                    | $0.36 \pm 0.05$    | $0.38 \pm 0.02$    | $0.37 \pm 0.03$    |
| Probiotics      | $0.44 \pm 0.03$                                    | $0.40 \pm 0.08$    | $0.41 \pm 0.07$    | $0.45 \pm 0.06$    |
| Cd              | $0.46 \pm 0.01$                                    | $0.41 \pm 0.07$    | $0.40 \pm 0.06$    | $0.39 \pm 0.06$    |
| Pb              | $33.99 \pm 2.52$                                   | $40.88 \pm 1.77$   | $40.27 \pm 5.32$   | $43.51 \pm 8.55$   |
| Cd + Probiotics | $0.38 \pm 0.01$                                    | $0.37 \pm 0.04$    | $0.37 \pm 0.01$    | $0.38 \pm 0.04$    |
| Pb + Probiotics | $48.13 \pm 4.33$                                   | $105.12 \pm 17.03$ | $144.50 \pm 15.09$ | $186.52 \pm 11.57$ |

[165]

[166] 실시예 8. 혈액 및 조직(간, 신장)내 함량 측정을 통한 프로바이오틱스에 의한 중금속 제거능(removal capacity) 평가(In vivo)

[167]

[168] Cd, Pb의 투여는 혈액, 간 및 신장에 축적되어 유의적으로 증가된 수치를 나타내었다. 수치적으로 보면 혈액 보다는 조직에 많은 양이 누적되어 있음을 알 수 있다,

[169] Probiotics(LA1+LP3)의 투여로 인해 혈액 및 조직에 누적되는 중금속 양이 유의적으로 적어지는 것을 알 수 있다. 구체적으로, 혈액, 간, 신장에서의 Cd는 68%, 56%, 58%, 58%, Pb는 73%, 70%, 76% 감소되었다.

[170] 이는 분변에서 측정된 결과에서 볼 수 있듯이 투여한 Probiotics (LA1+LP3)에 중금속 부착 및 체외 배출로 인해 상대적으로 체내 흡수가 줄어드는 것을 알 수 있다(도 13 참조).

[171]

[172] [표6]

| Group           | Cd concentration                    |                                    |                                     | Pb concentration                    |                                    |                                     |
|-----------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
|                 | Serum ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) | Liver ( $\mu\text{g} / \text{g}$ ) | Kidney ( $\mu\text{g} / \text{g}$ ) | Serum ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) | Liver ( $\mu\text{g} / \text{g}$ ) | Kidney ( $\mu\text{g} / \text{g}$ ) |
| Normal          | $0.114 \pm 0.003$                   | $0.214 \pm 0.026$                  | $0.205 \pm 0.022$                   | $0.078 \pm 0.003$                   | $0.148 \pm 0.019$                  | $0.140 \pm 0.016$                   |
| Probiotics      | $0.115 \pm 0.003$                   | $0.272 \pm 0.060$                  | $0.226 \pm 0.032$                   | $0.078 \pm 0.003$                   | $0.188 \pm 0.041$                  | $0.154 \pm 0.023$                   |
| Cd              | $1.507 \pm 0.207^{bd}$              | $23.452 \pm 4.470^{bd}$            | $18.864 \pm 4.254^{bd}$             | $0.078 \pm 0.003$                   | $0.143 \pm 0.021$                  | $0.139 \pm 0.023$                   |
| Pb              | $0.113 \pm 0.002$                   | $0.218 \pm 0.032$                  | $0.231 \pm 0.035$                   | $1.708 \pm 0.200^{bd}$              | $19.754 \pm 3.980^{bd}$            | $24.967 \pm 5.953^{bd}$             |
| Cd + Probiotics | $0.475 \pm 0.170^{bdf}$             | $10.323 \pm 4.307^{bdf}$           | $7.859 \pm 1.857^{bdf}$             | $0.078 \pm 0.002$                   | $0.140 \pm 0.021$                  | $0.155 \pm 0.036$                   |
| Pb + Probiotics | $0.113 \pm 0.002$                   | $0.216 \pm 0.039$                  | $0.196 \pm 0.027$                   | $0.445 \pm 0.250^{bda}$             | $6.010 \pm 1.494^{bdh}$            | $5.984 \pm 1.076^{bdh}$             |

[173]

[174] 실시예 9. 혈액학적 변화 측정을 통한 프로바이오틱스에 의한 중금속 제거능(removal capacity) 평가(In vivo)

[175]

[176] [표 7]

| Parameters               | Group         |                         |                              |                             |                               |                               |
|--------------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                          | Normal        | Probiotics              | Cd                           | Pb                          | Cd + Probiotics               | Pb + Probiotics               |
| Albumin (g/dL)           | 2.45 ± 0.07   | 2.49 ± 0.06             | 1.32 ± 0.21 <sup>bc</sup>    | 1.54 ± 0.10 <sup>cd</sup>   | 2.45 ± 0.05                   | 2.44 ± 0.05                   |
| Total bilirubin (mg/dL)  | 0.042 ± 0.007 | 0.037 ± 0.008           | 0.082 ± 0.007 <sup>bd</sup>  | 0.067 ± 0.008 <sup>bd</sup> | 0.031 ± 0.012 <sup>bc,f</sup> | 0.037 ± 0.009 <sup>b</sup>    |
| Direct bilirubin (mg/dL) | 0.037 ± 0.008 | 0.045 ± 0.010           | 0.075 ± 0.010 <sup>bd</sup>  | 0.071 ± 0.007 <sup>bc</sup> | 0.043 ± 0.013 <sup>f</sup>    | 0.031 ± 0.007 <sup>b</sup>    |
| Triglycerides (mg/dL)    | 62.3 ± 8.4    | 59.5 ± 4.6              | 93.2 ± 8.6 <sup>bd</sup>     | 88.3 ± 5.4 <sup>bc,f</sup>  | 64.3 ± 15.3 <sup>f</sup>      | 69.5 ± 5.91 <sup>b</sup>      |
| Cholesterol (mg/dL)      | 49.5 ± 3.1    | 51.5 ± 5.4              | 63.0 ± 5.9 <sup>bd</sup>     | 63.0 ± 4.8 <sup>bd</sup>    | 48.8 ± 5.5 <sup>f</sup>       | 55.0 ± 2.6 <sup>b</sup>       |
| HDL (mg/dL)              | 36.3 ± 2.4    | 47.1 ± 5.7 <sup>b</sup> | 36.3 ± 1.9 <sup>bd</sup>     | 31.1 ± 1.8 <sup>cd</sup>    | 39.6 ± 2.3 <sup>f</sup>       | 44.7 ± 4.2 <sup>b</sup>       |
| LDL (mg/dL)              | 21.0 ± 3.3    | 29.2 ± 1.9              | 30.0 ± 3.3 <sup>bd</sup>     | 26.7 ± 2.4 <sup>bd</sup>    | 19.4 ± 4.2 <sup>f</sup>       | 21.9 ± 1.7 <sup>b</sup>       |
| Glucose (mg/dL)          | 86.1 ± 6.1    | 82.0 ± 7.5              | 114.9 ± 7.5 <sup>bd</sup>    | 117.8 ± 6.3 <sup>bd</sup>   | 92.9 ± 3.7 <sup>f</sup>       | 91.0 ± 5.0 <sup>b</sup>       |
| ALP (IU/L)               | 170.67 ± 8.14 | 168.50 ± 7.61           | 240.67 ± 10.00 <sup>bd</sup> | 221.0 ± 8.79 <sup>bd</sup>  | 189.34 ± 6.98 <sup>bc,f</sup> | 193.33 ± 8.11 <sup>bd,a</sup> |
| AST (IU/L)               | 87.2 ± 7.4    | 83.1 ± 5.5              | 157.9 ± 18.6 <sup>bd</sup>   | 140.1 ± 9.6 <sup>bc</sup>   | 111.4 ± 14.0 <sup>f</sup>     | 112.1 ± 9.0 <sup>b</sup>      |
| ALT (IU/L)               | 36.1 ± 2.8    | 37.6 ± 1.2              | 66.0 ± 5.6 <sup>bd</sup>     | 52.8 ± 5.4 <sup>bc</sup>    | 50.7 ± 3.4 <sup>bd,f</sup>    | 40.6 ± 1.7 <sup>b</sup>       |
| Total protein (g/dL)     | 5.34 ± 0.16   | 5.35 ± 0.19             | 5.94 ± 0.14 <sup>bd</sup>    | 5.66 ± 0.18 <sup>bd</sup>   | 5.17 ± 0.23 <sup>bc,f</sup>   | 5.23 ± 0.20 <sup>b</sup>      |
| Creatine (mg/dL)         | 0.315 ± 0.057 | 0.400 ± 0.049           | 0.748 ± 0.045 <sup>bd</sup>  | 0.648 ± 0.076 <sup>bd</sup> | 0.565 ± 0.049 <sup>bc,f</sup> | 0.512 ± 0.049 <sup>bc,b</sup> |
| BUN (mg/dL)              | 21.2 ± 1.2    | 20.4 ± 1.4              | 35.4 ± 0.8 <sup>bd</sup>     | 34.9 ± 1.0 <sup>bd</sup>    | 19.3 ± 1.4 <sup>f</sup>       | 18.6 ± 0.8 <sup>b</sup>       |

[177]

[178] 상기 표 7에 따라 각 실험 조건에 맞게 4 주 투여 후, 측정된 14 가지 parameter 를 분석하였다. 분석 결과, Cd 또는 Pb 투여로 인해 간, 신장의 상태(Toxicity) 및 지질대사에 변화가 있으나, 이는 LA1+LP3 투여로 인해 Cd 또는 Pb 의 배출 증가에 의한 체내 흡수도가 줄어들어 상대적으로 Normal군(대조군)과 가까운 parameter 측정값을 나타냄을 알 수 있었으며, LA1+LP3의 투여만으로 HDL 수치가 유의적으로 증가함을 알 수 있었다.

[179]

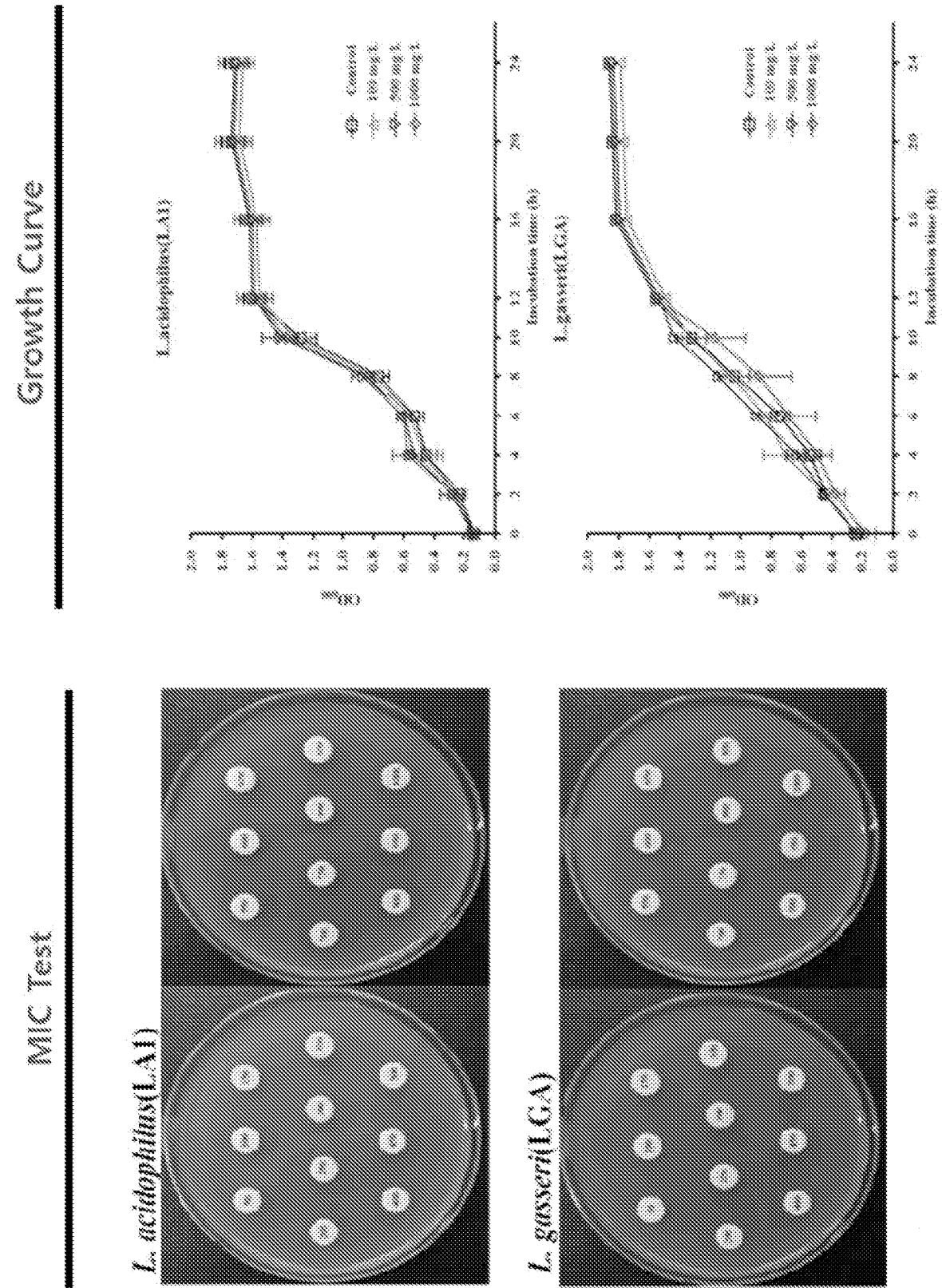
[180] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 청구범위

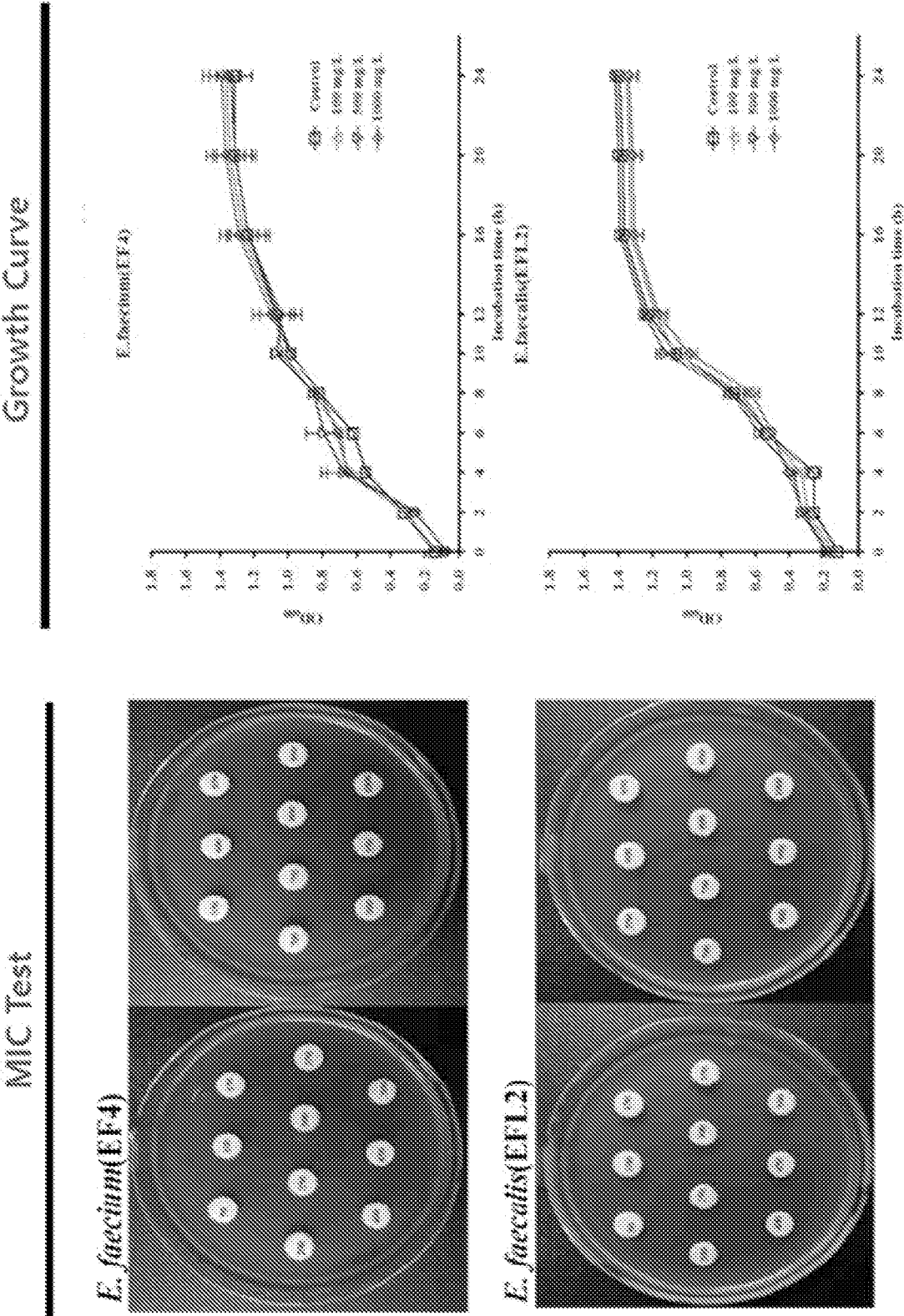
- [청구항 1] 락토바실러스 속, 비피도박테리움 속, 엔테로코커스 속, 페디오코커스 속 및 스트렙토코커스 속으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 균을 포함하는 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 락토바실러스 속 균은 락토바실러스 아시도필러스, 락토바실러스 가세리, 락토바실러스 락티스, 락토바실러스 파라카제이, 락토바실러스 헬베티쿠스, 락토바실러스 헬베티쿠스 루테리, 락토바실러스 람노서스, 락토바실러스 카제이, 락토바실러스 퍼멘텀 및 락토바실러스 플란타륨으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균인 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,  
상기 비피도박테리움 속 균은 비피도박테리움 인판티스, 비피도박테리움 비피덤, 비피도박테리움 락티스, 비피도박테리움 룡검 및 비피도박테리움 브레브로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균인 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,  
상기 엔테로코커스 속 균은 엔테로코커스 패시움 및 엔테로코커스 페칼리스로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균인 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,  
상기 페디오코커스 속 균은 페디오코커스 펜토사시우스인 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,  
상기 스트렙토코커스 속 균은 스트렙토코커스 써모필러스인 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,  
상기 조성물은 중금속에 내성을 갖는 것인 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,  
상기 내성은 Minimum inhibitory concentrations(MICs), Bacterial growth, 및 heavy metal removal 또는 binding capacity 중 선택되는 하나 이상의 성질을 갖는 것을 특징으로 하는 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,  
상기 중금속은 양이온 중금속인 것인 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,  
상기 양이온 중금속은 카드뮴이며, 상기 균은 카드뮴 100mg/L 용액에서 22% 이상의 카드뮴 제거능을 갖는 것을 특징으로 하는 중금속 제거용

- 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,  
상기 양이온 중금속은 납이며, 상기 군은 납 100mg/L 용액에서 22% 이상의 납 제거능을 갖는 것을 특징으로 하는 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,  
상기 조성물은 양이온 중금속 배출을 촉진하는 작용을 가지며,  
상기 락토바실러스 속 군은 락토바실러스 아시도필러스 및 락토바실러스 플란타룸로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균인 중금속 제거용 조성물.
- [청구항 13] 제1항의 조성물을 포함하는 중금속 중독의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제1항의 조성물을 포함하는 식품 조성물.
- [청구항 15] 제1항의 조성물을 포함하는 화장료 조성물.

[도 1a]



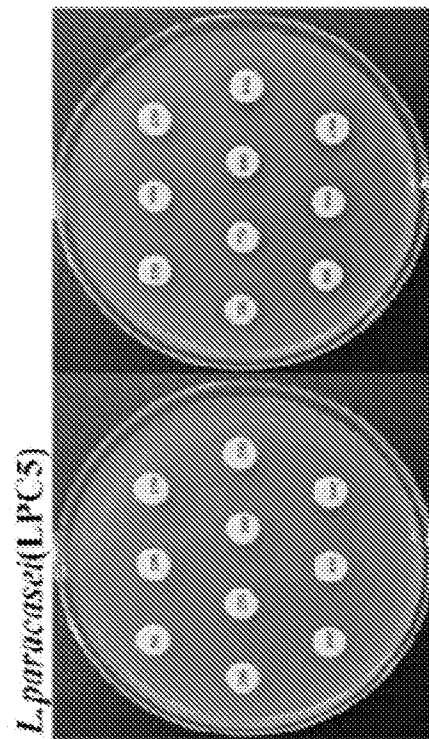
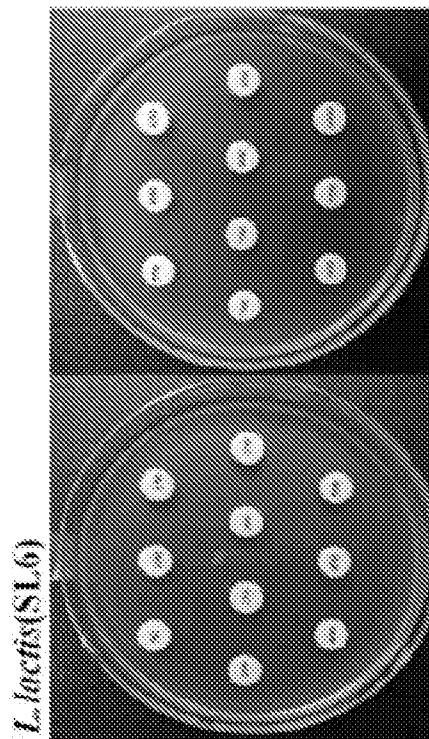
[도 1b]



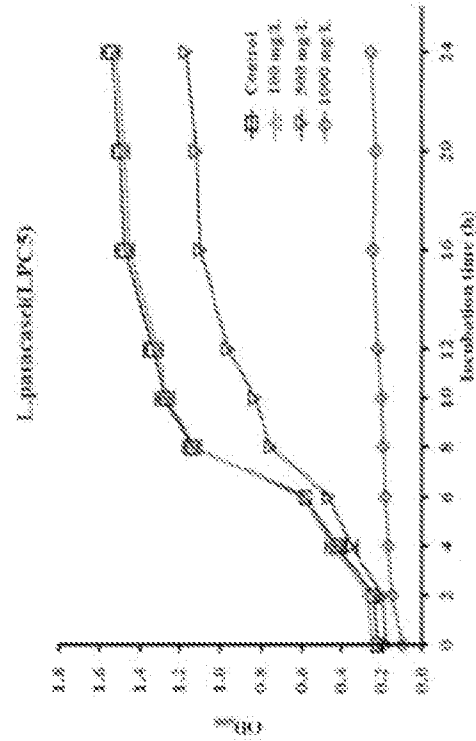
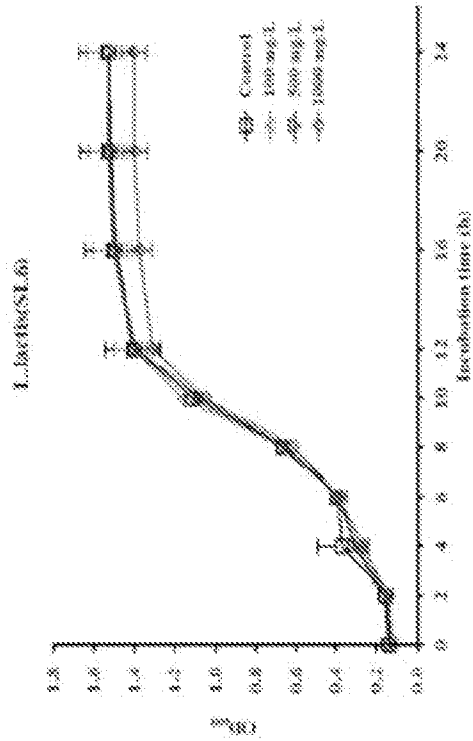


[도 1c]

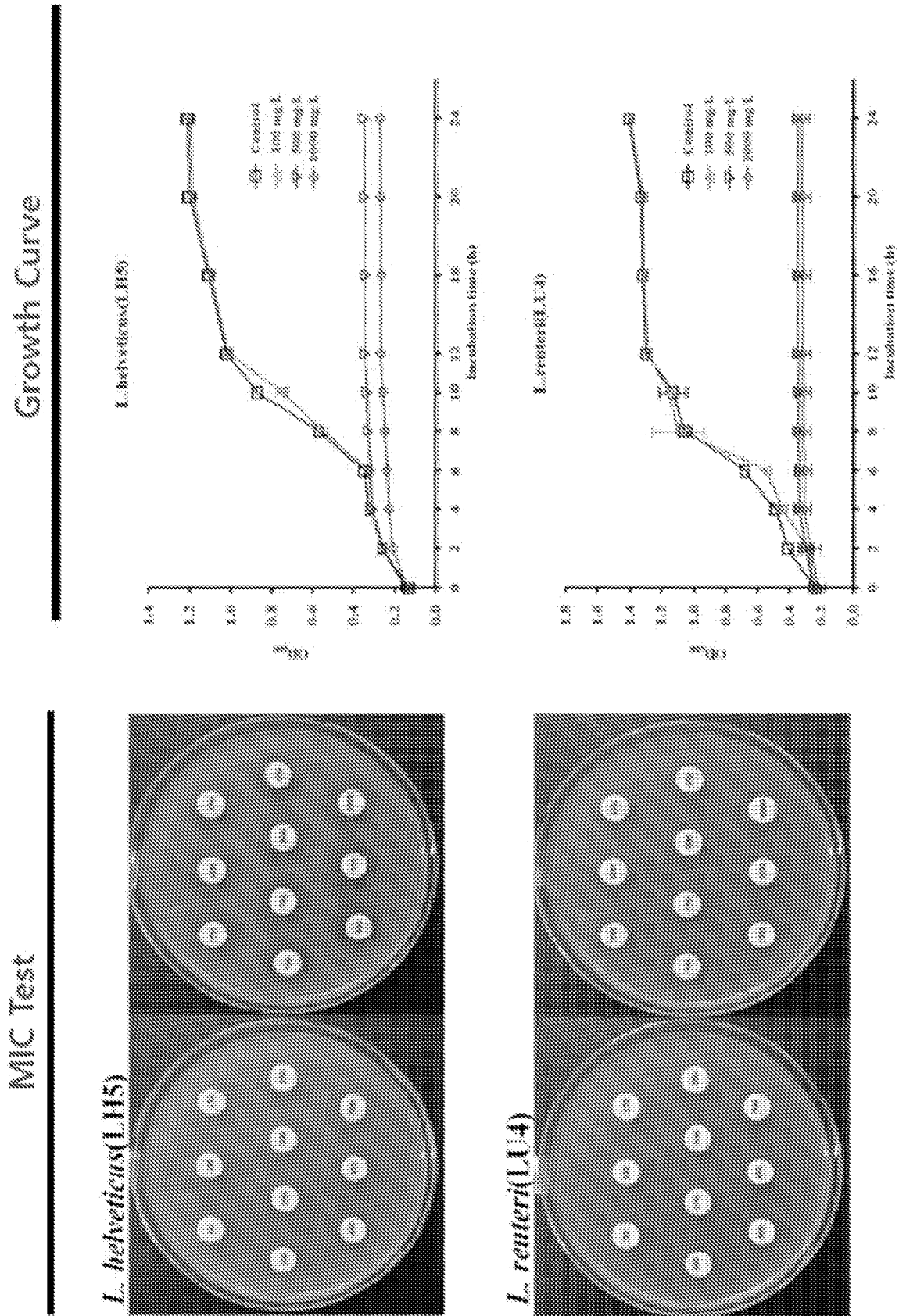
# MIC Test



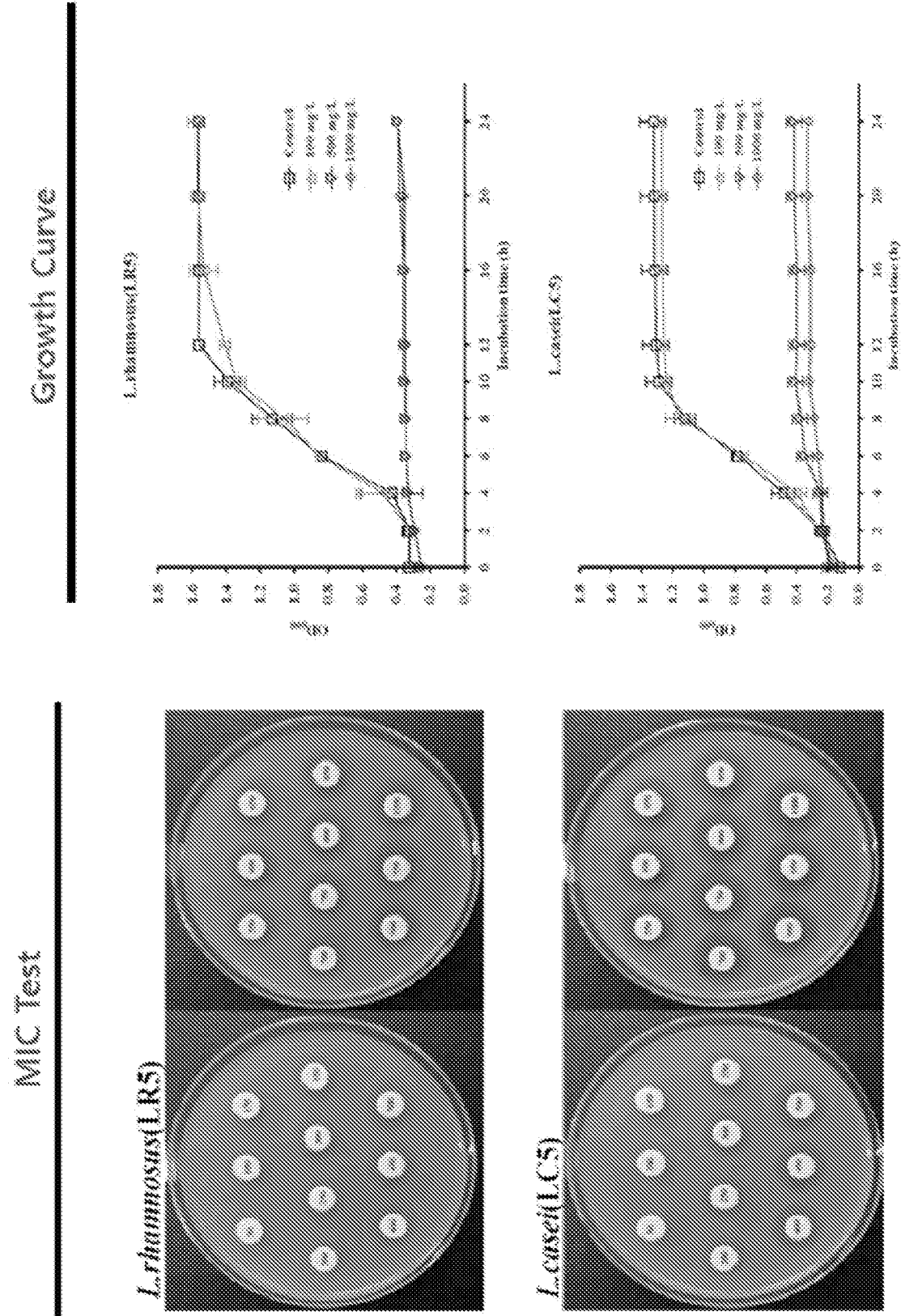
# Growth Curve



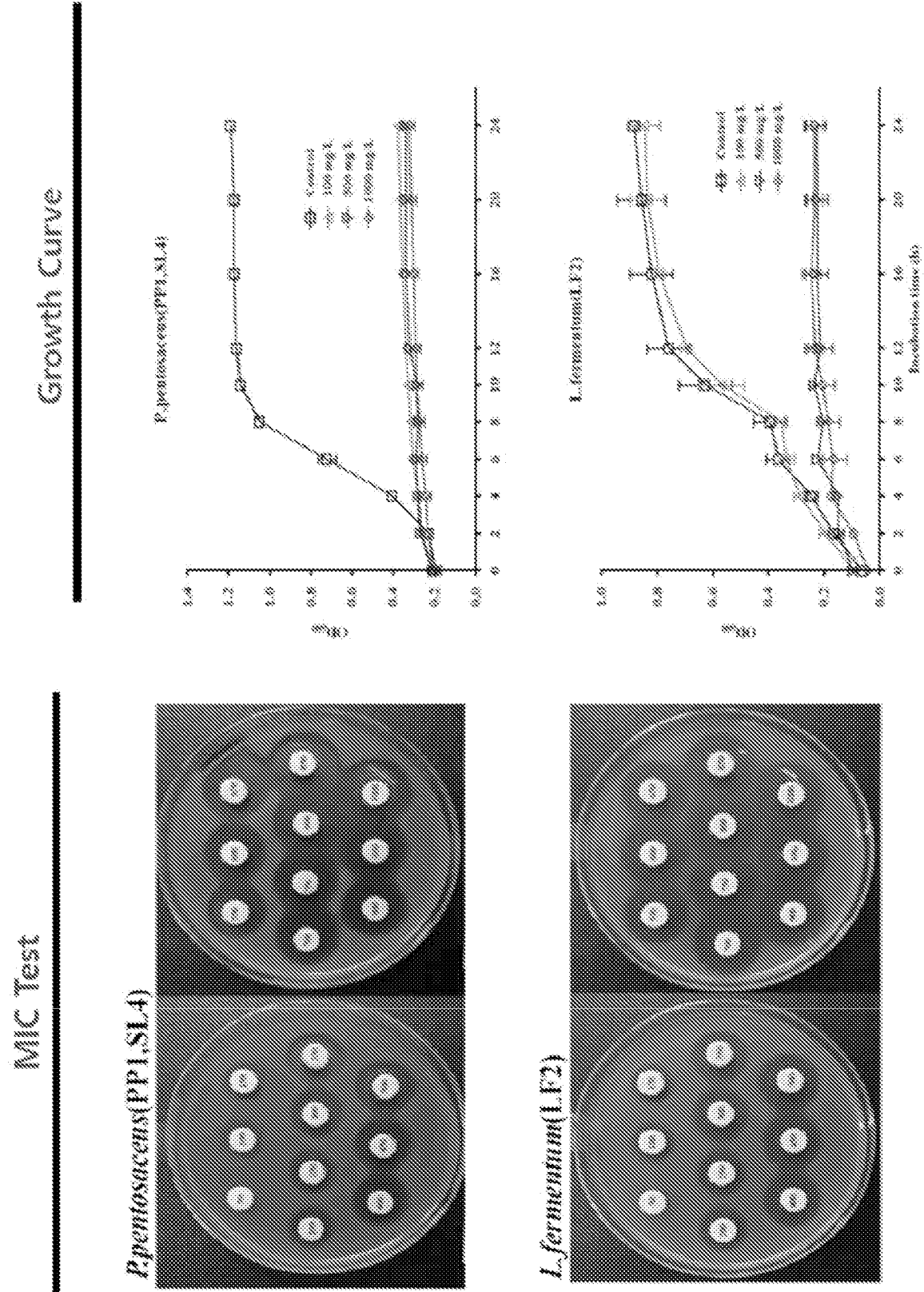
[도 1d]



[도 1e]



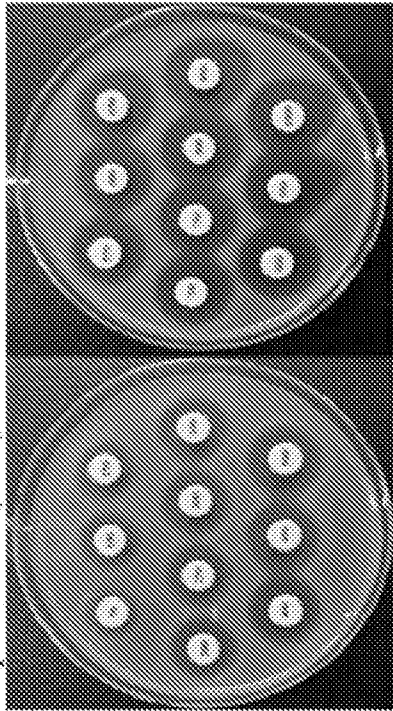
[도 1f]



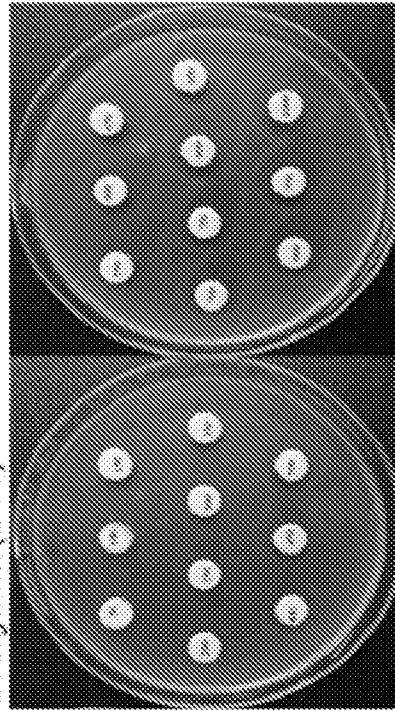
[도 1g]

# MIC Test

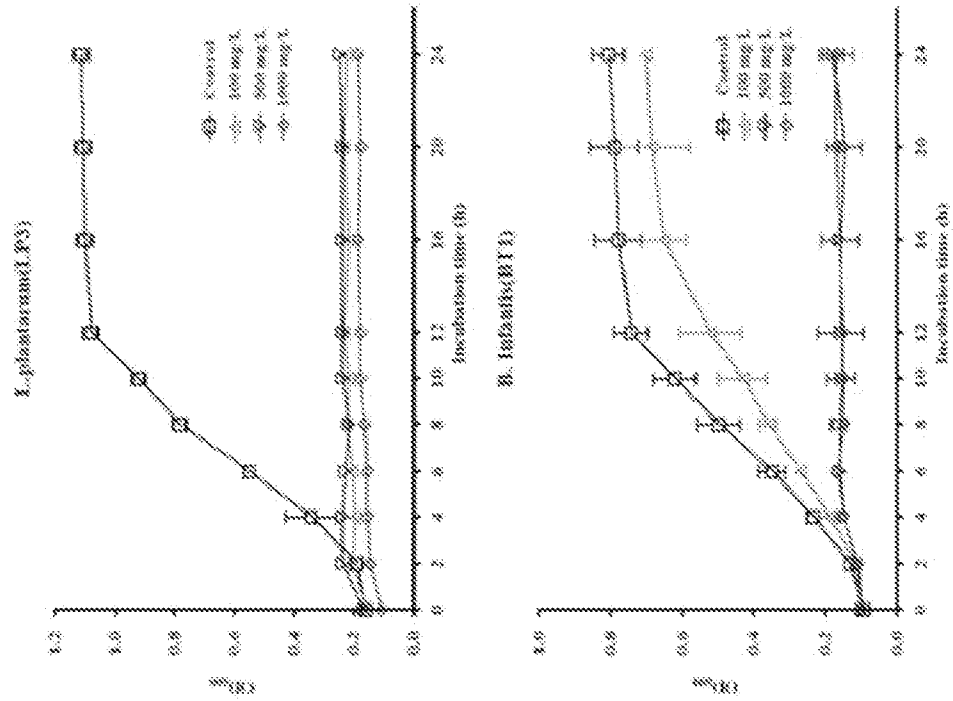
*L. plantarum*(LP3)



*B. infantis*(BIT)

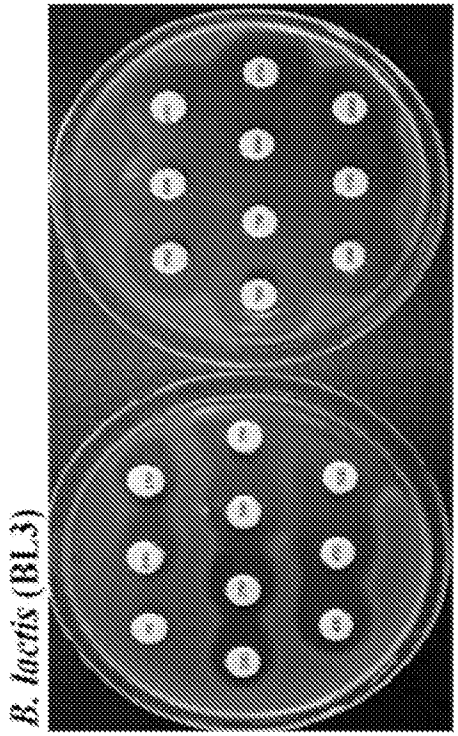
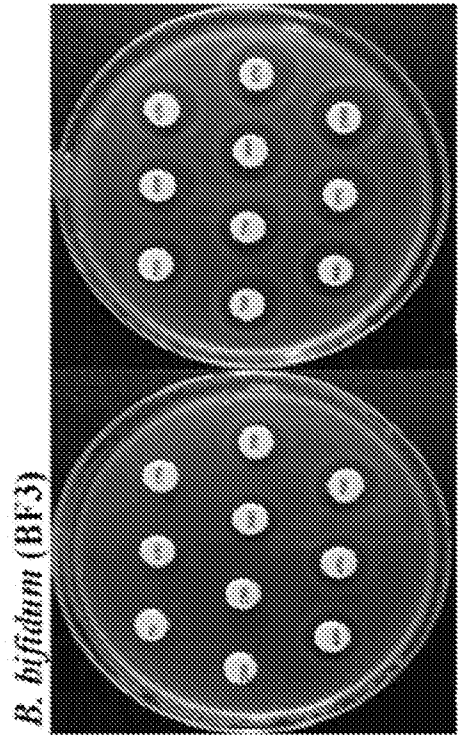


# Growth Curve

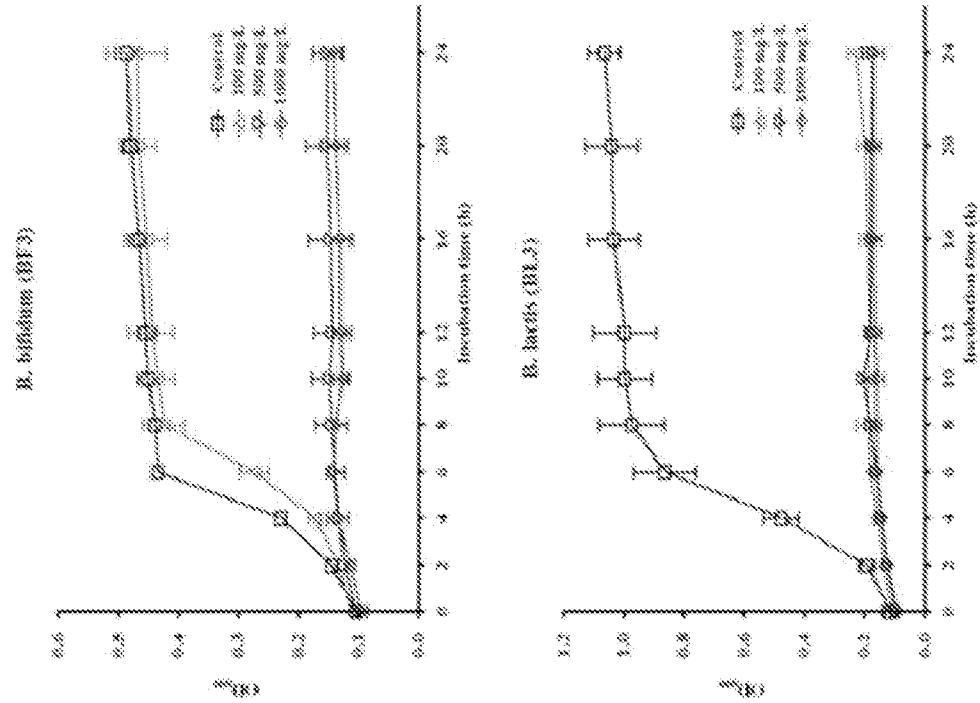


[도 1h]

MIC Test



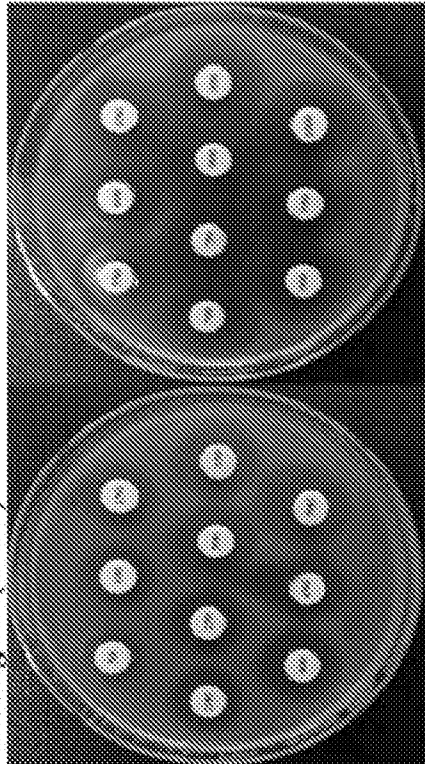
Growth Curve



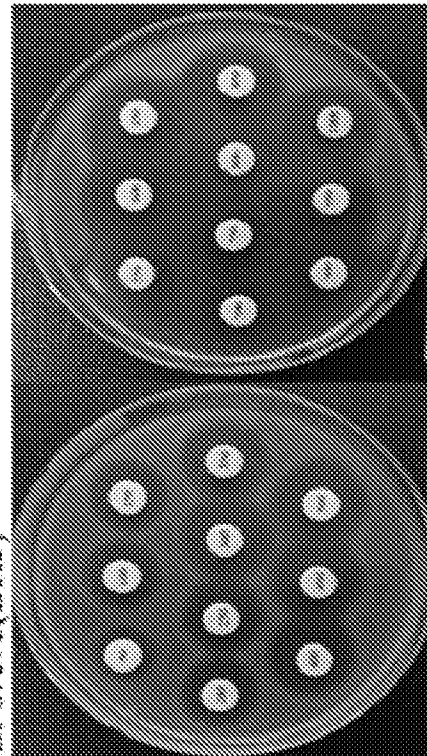
[도 1i]

# MIC Test

*B. longum*(BG7)

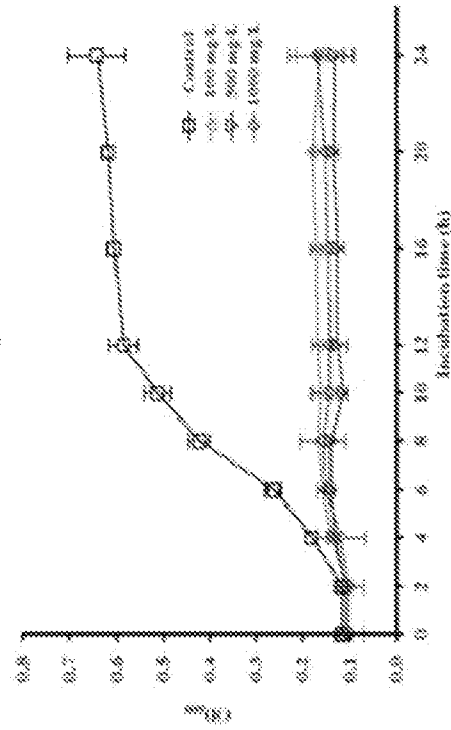


*B. breve*(BR3)

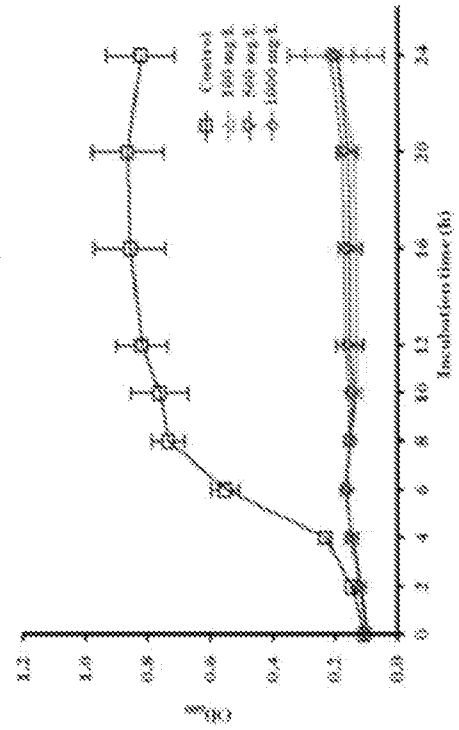


# Growth Curve

*B. longum*(BG7)



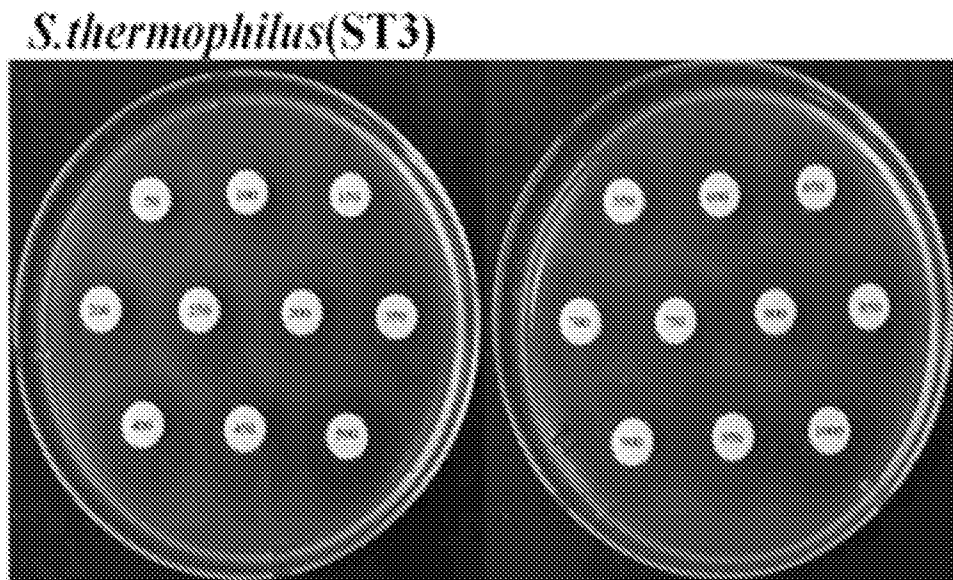
*B. breve*(BR3)



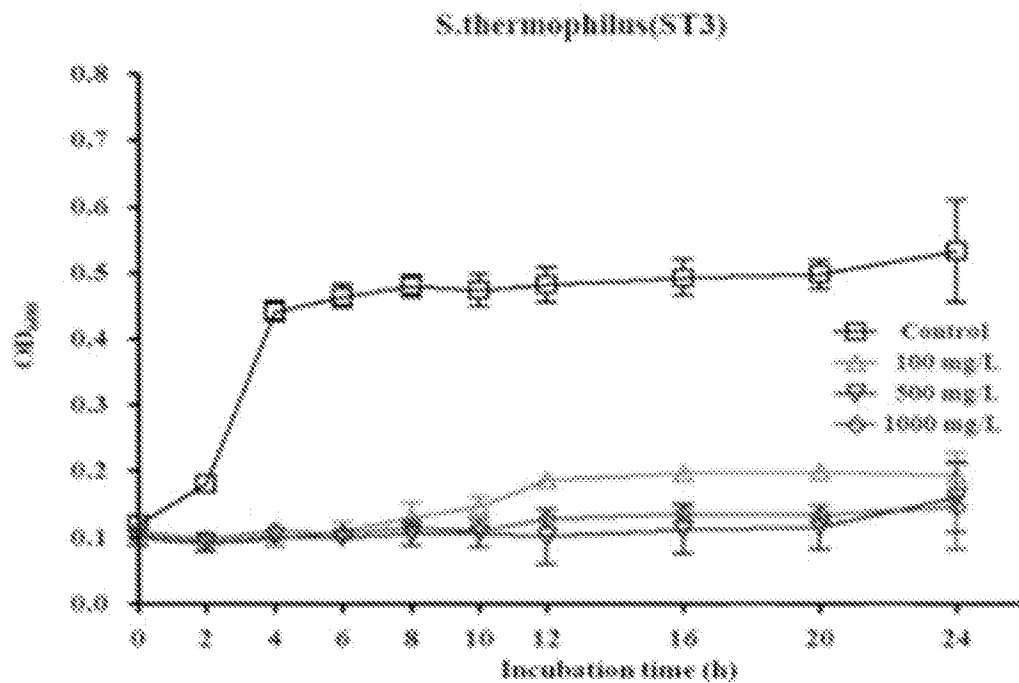


[도 1j]

## MIC Test

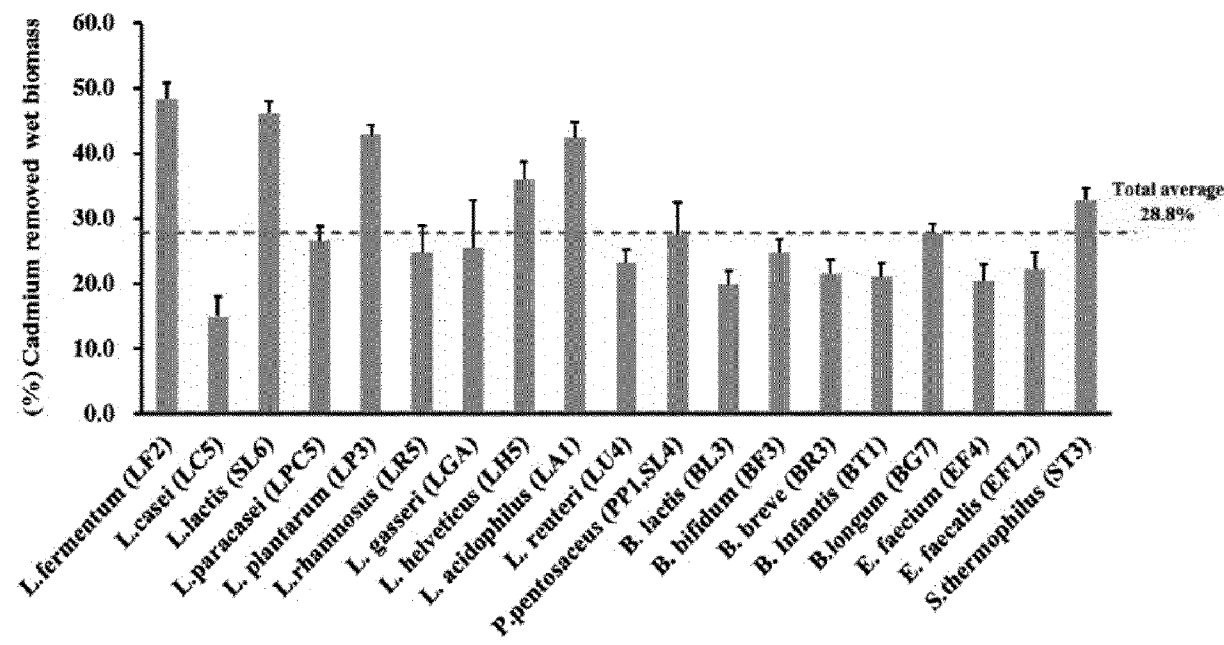


## Growth Curve





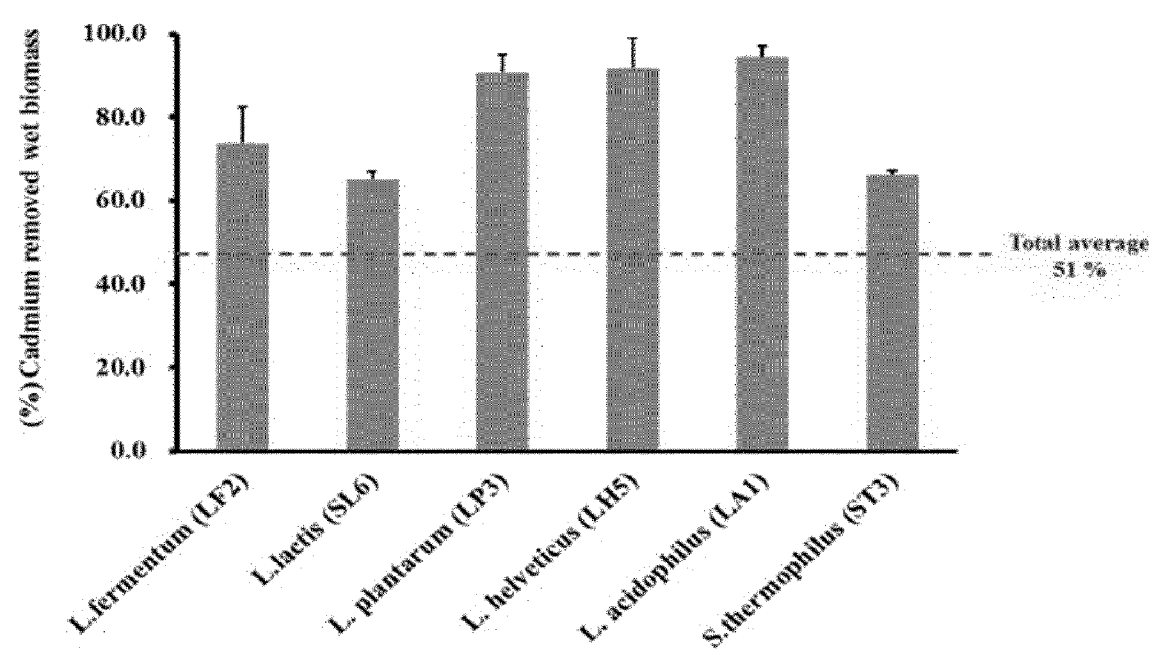
[도2]



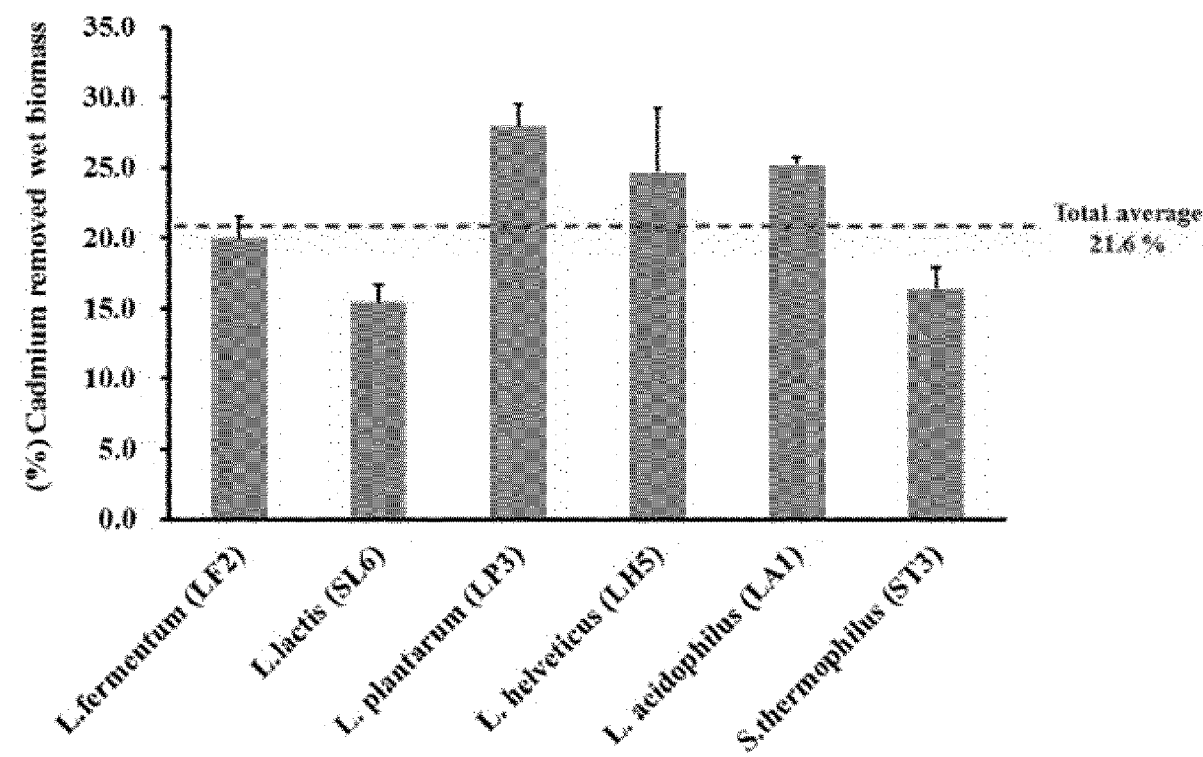
Removal (%) =  $100\% \times [(C_0 - C_1)/C_0]$

where  $C_0$  and  $C_1$  are the initial Cd concentration and the residual Cd concentration after removal

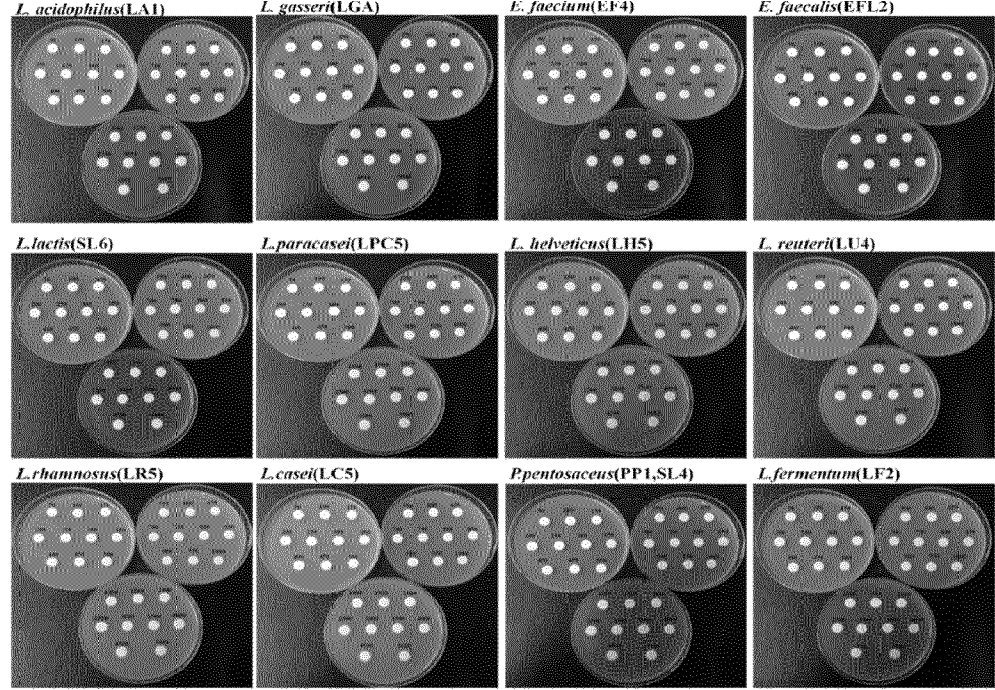
[도3]



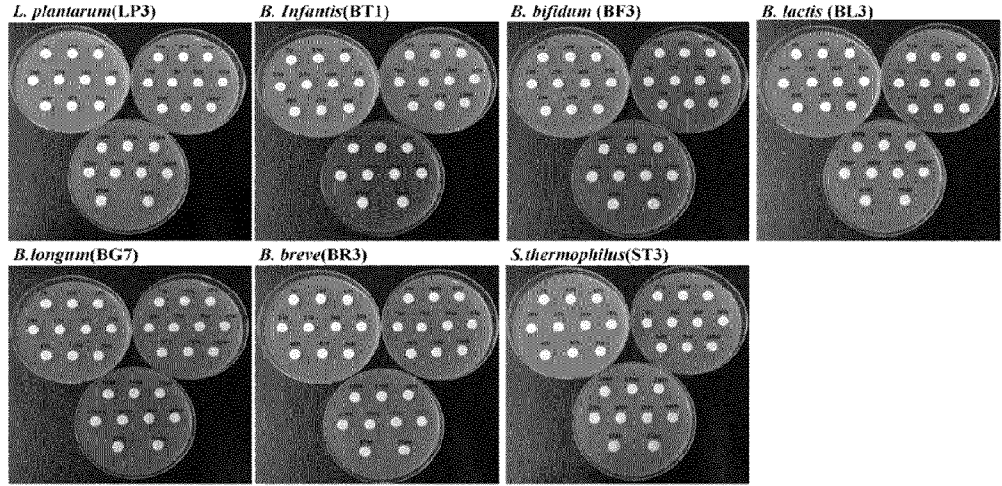
[도4]



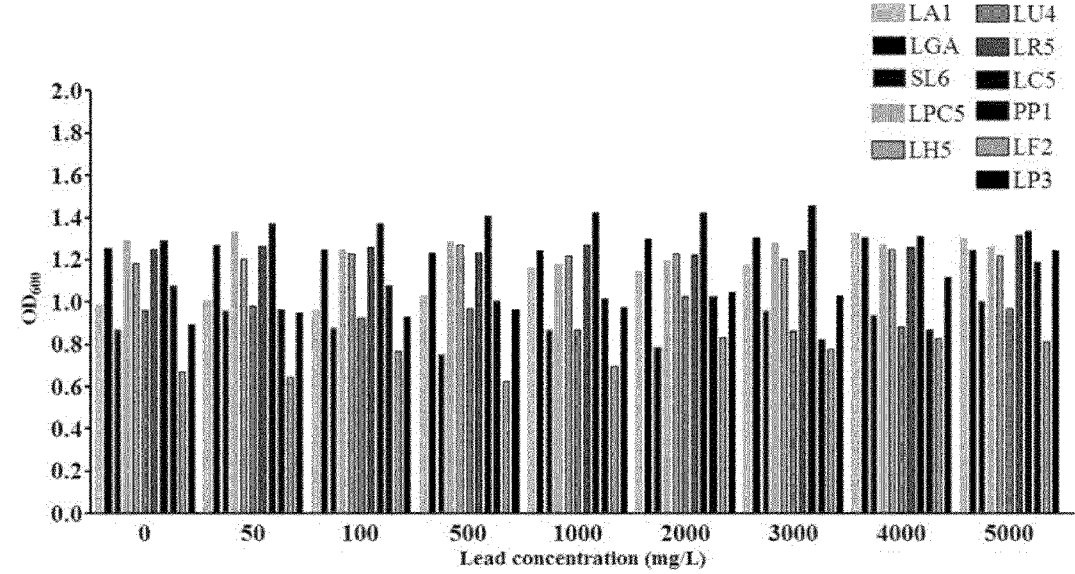
[도5a]



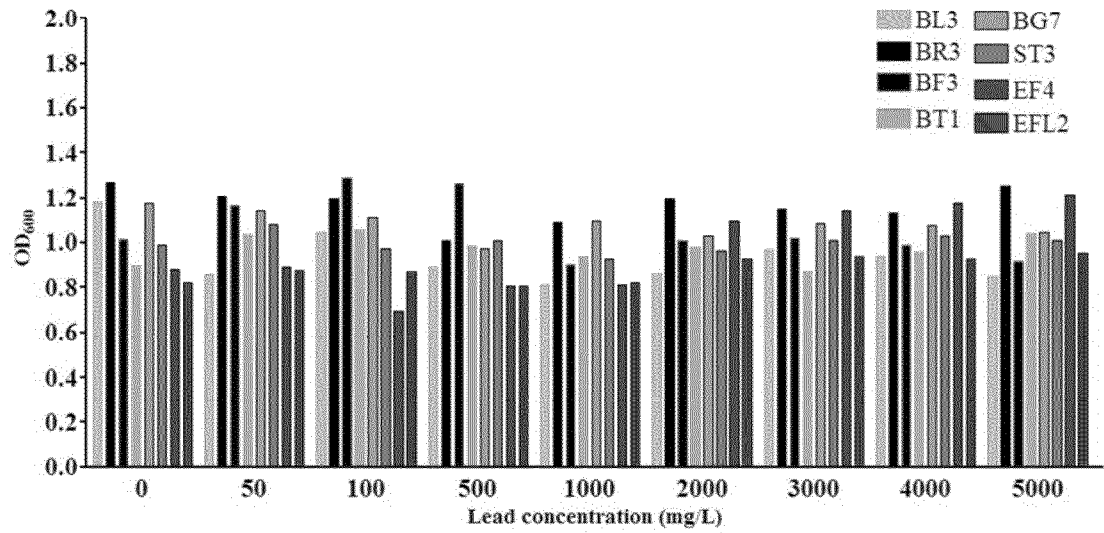
[도5b]



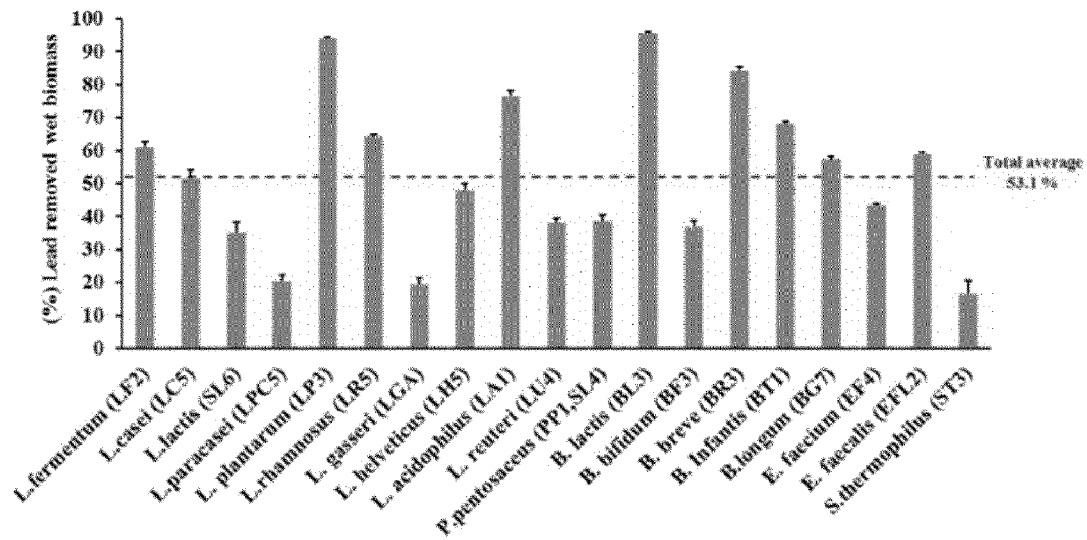
[도5c]



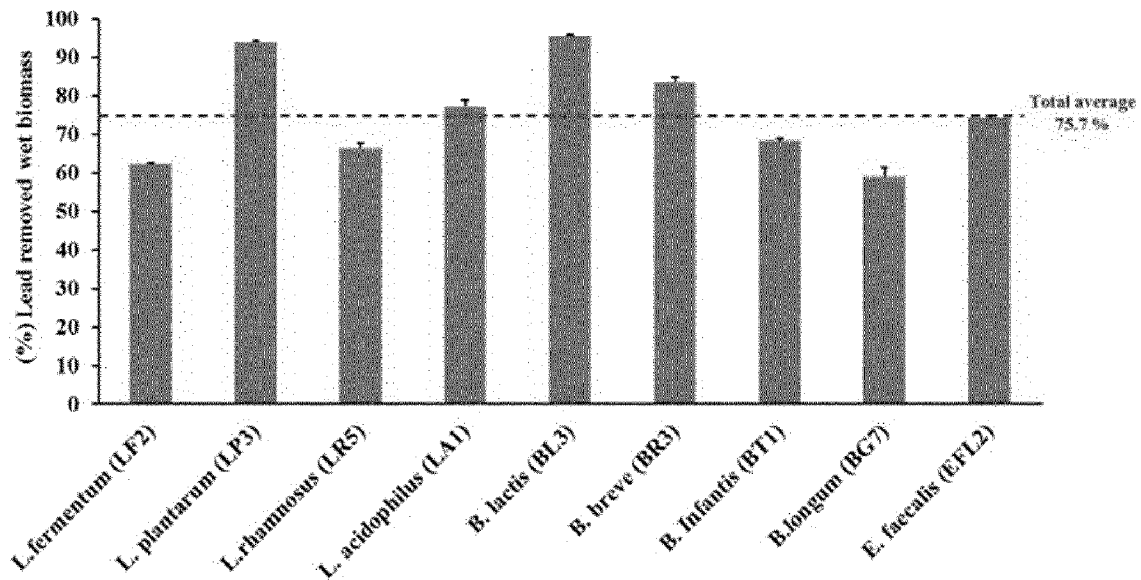
[도5d]



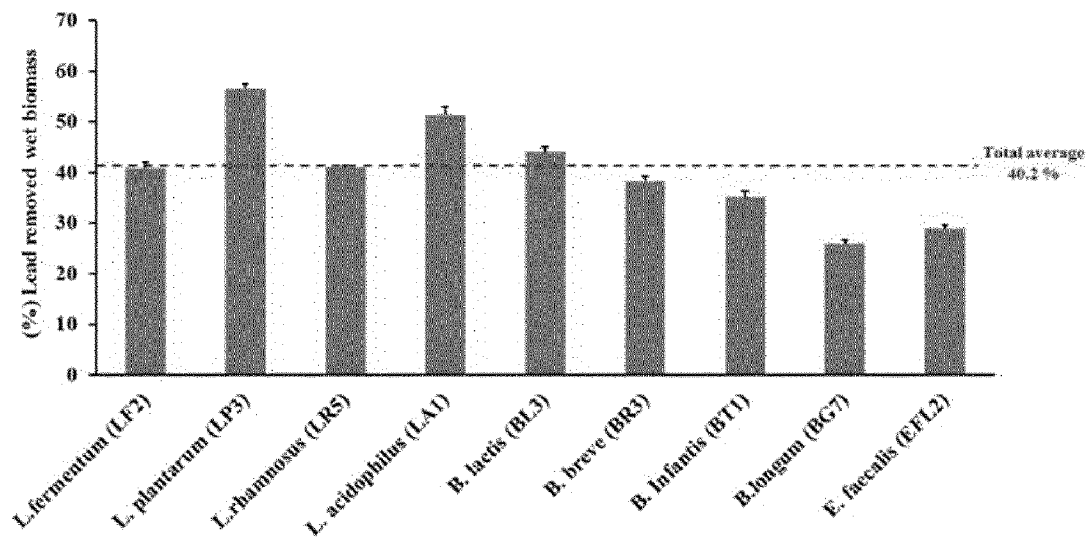
[도6]



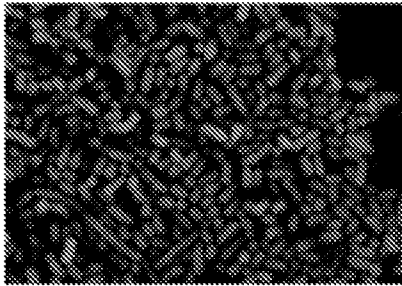
[도7]



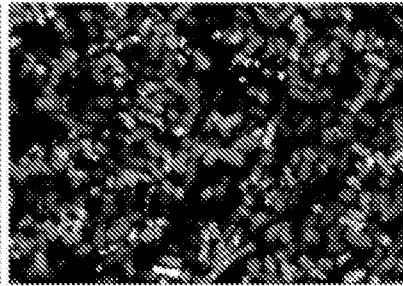
[도8]



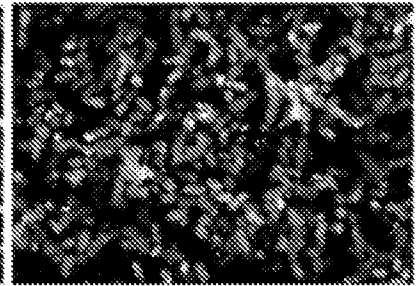
[도 9]

*Lactobacillus acidophilus*

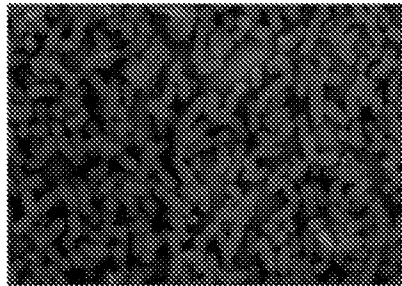
Control



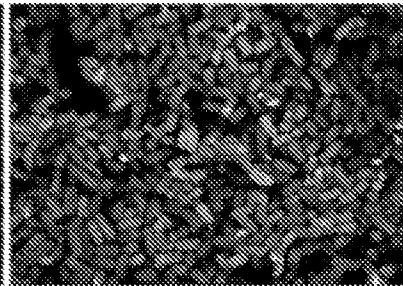
Cadmium 100mg/L



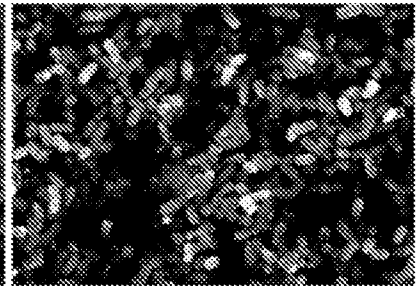
Lead 100mg/L

*Lactobacillus plantarum*

Control

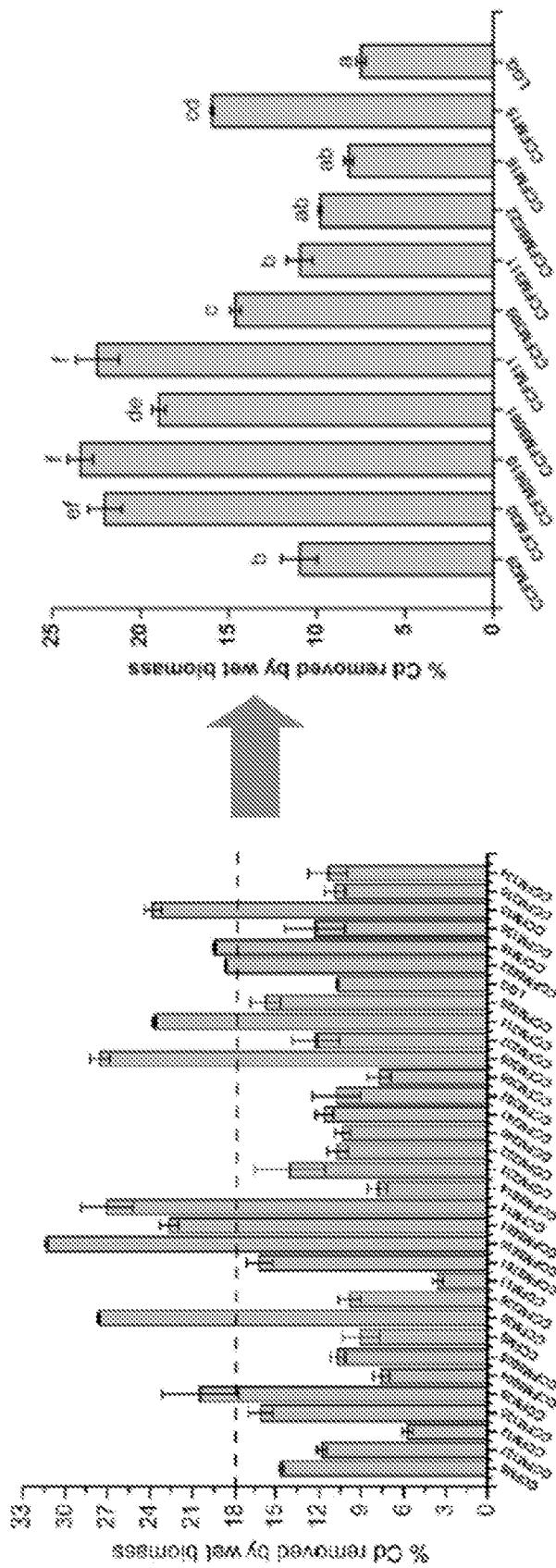


Cadmium 100mg/L

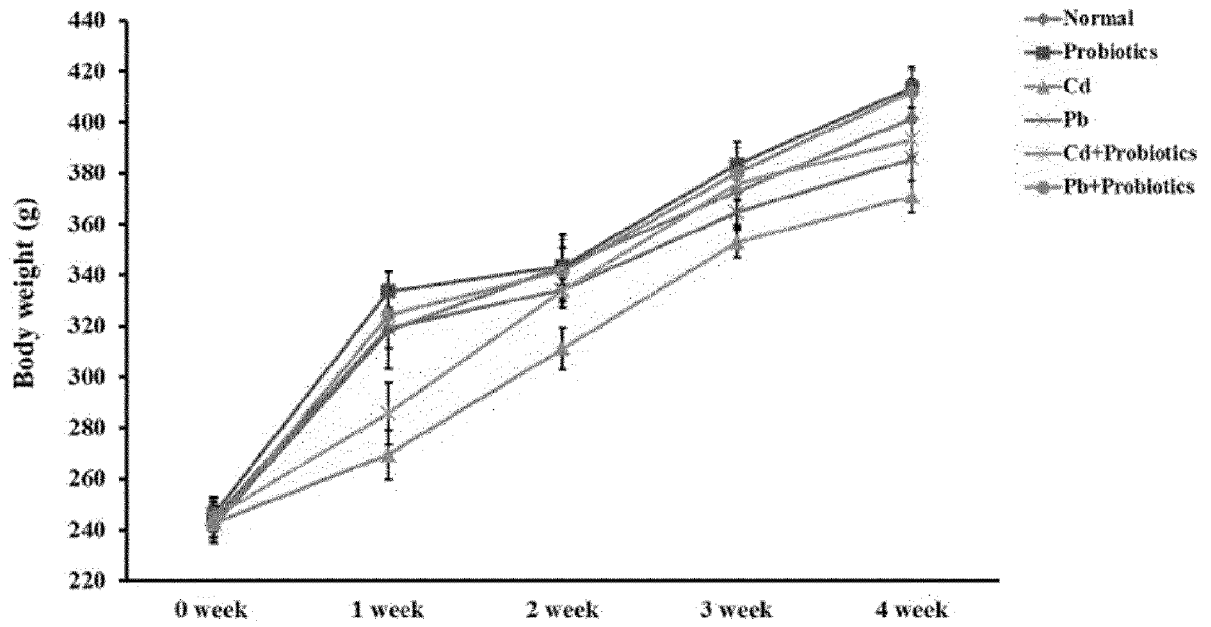


Lead 100mg/L

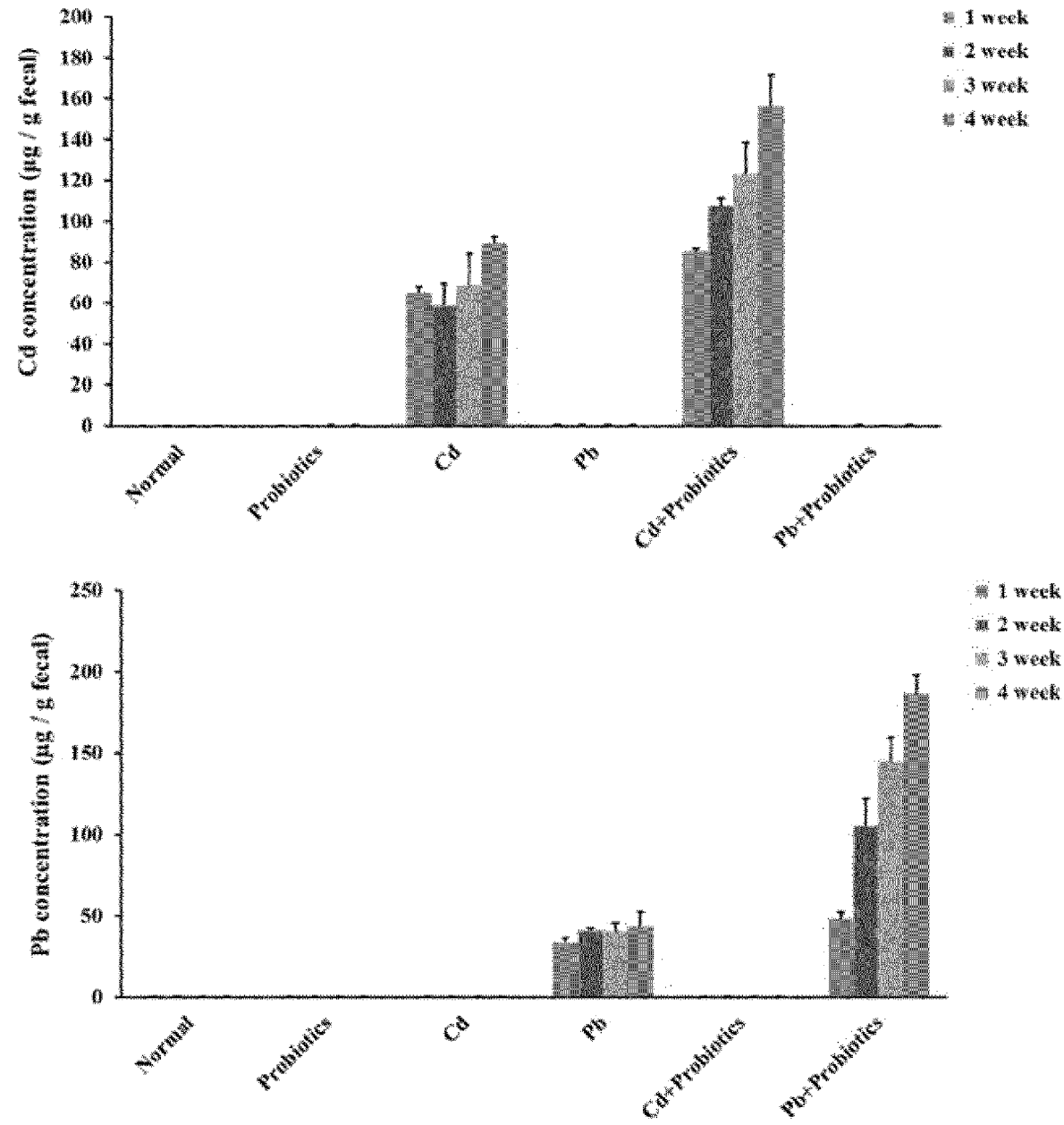
[도 10]



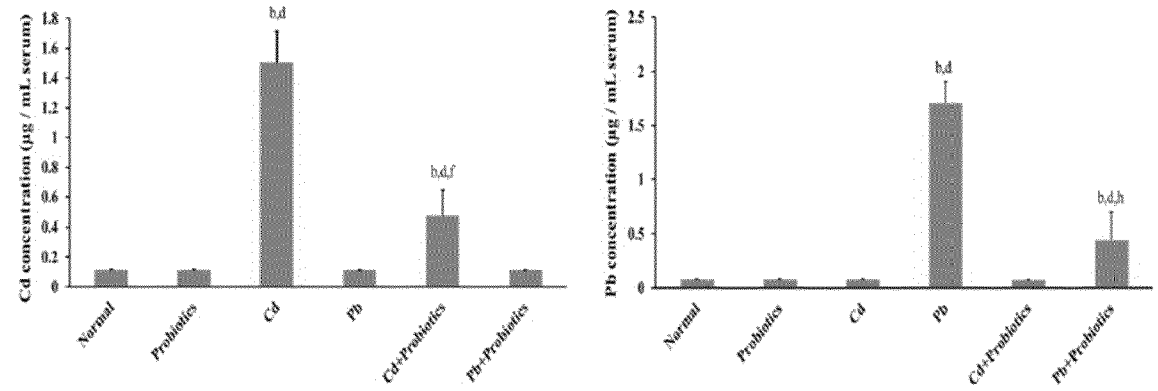
[도11]



[도12]

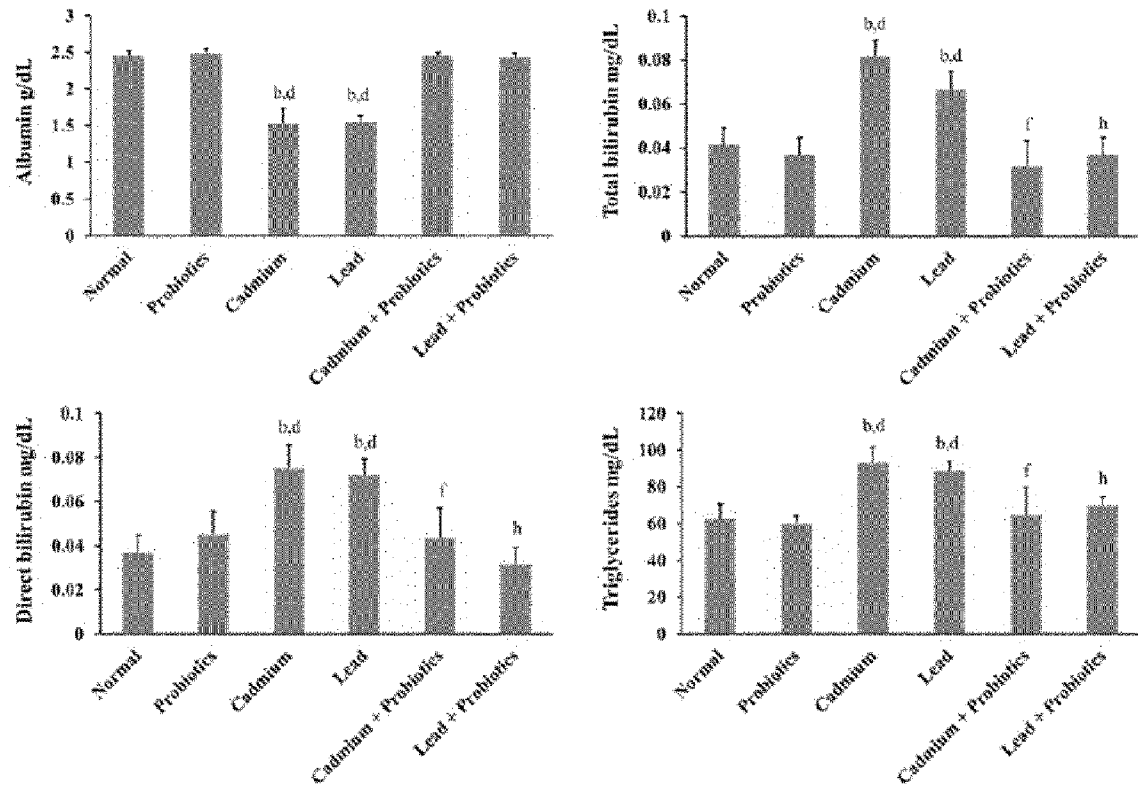


[도13]





[도 14]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/000863

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 35/747(2015.01)i; A61K 35/745(2015.01)i; A61K 35/744(2015.01)i; A61P 39/02(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61K 8/99(2006.01)i; A61Q 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/747(2015.01); A23K 10/16(2016.01); A23L 19/00(2016.01); A61K 35/745(2015.01); A61P 39/02(2006.01); C12N 1/00(2006.01); C12N 1/20(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above  
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 중금속(heavy metal), 카드뮴(cadmium), 납(lead), 락토바실러스(lactobacillus), 비피도박테리움(bifidobacterium), 엔테로코커스(enterococcus), 페디오코커스(pediococcus), 스트렙토코커스(streptococcus)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X<br>A    | KR 10-0407663 B1 (KYONGSANGBUK-DO) 03 December 2003 (2003-12-03)<br>See abstract; claims 1 and 2; and tables 1, 3, 5 and 7.                          | 1-2,4,6-15<br>3,5     |
| X         | CN 113262242 A (SHANDONG ZHONGKE-JIAYI BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.) 17 August 2021 (2021-08-17)<br>See claims 1-3.                              | 1,3,7-9,13-15         |
| X         | KR 10-2020-0107384 A (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 16 September 2020 (2020-09-16)<br>See example 1; and claims 1, 4 and 6-10. | 1,5,7-10,13-15        |
| X         | KR 10-0760987 B1 (PURIMED CO., LTD.) 09 October 2007 (2007-10-09)<br>See examples 1-4; and claims 1 and 3.                                           | 1-2,7-9,11-15         |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
“D” document cited by the applicant in the international application  
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date  
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 April 2023

Date of mailing of the international search report

26 April 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2023/000863**

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                         | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | KR 10-2015-0040386 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 14 April 2015 (2015-04-14)<br>See examples 1-5; and claims 1-4. | 1-2,7-10,12-15        |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2023/000863**

| Patent document<br>cited in search report |                 |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |                 |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------------|----|--------------------------------------|-------------------------|-----------------|----|--------------------------------------|
| KR                                        | 10-0407663      | B1 | 03 December 2003                     | KR                      | 10-0407662      | B1 | 01 December 2003                     |
|                                           |                 |    |                                      | KR                      | 10-2003-0082510 | A  | 22 October 2003                      |
| CN                                        | 113262242       | A  | 17 August 2021                       | CN                      | 113262242       | B  | 05 November 2021                     |
| KR                                        | 10-2020-0107384 | A  | 16 September 2020                    | None                    |                 |    |                                      |
| KR                                        | 10-0760987      | B1 | 09 October 2007                      | None                    |                 |    |                                      |
| KR                                        | 10-2015-0040386 | A  | 14 April 2015                        | AU                      | 2012-388509     | A1 | 26 February 2015                     |
|                                           |                 |    |                                      | AU                      | 2012-388509     | B2 | 08 December 2016                     |
|                                           |                 |    |                                      | CA                      | 2881715         | A1 | 06 March 2014                        |
|                                           |                 |    |                                      | CA                      | 2881715         | C  | 21 August 2018                       |
|                                           |                 |    |                                      | CN                      | 102827796       | A  | 19 December 2012                     |
|                                           |                 |    |                                      | CN                      | 102827796       | B  | 30 October 2013                      |
|                                           |                 |    |                                      | KR                      | 10-1557266      | B1 | 02 October 2015                      |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2014-0341873    | A1 | 20 November 2014                     |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 9451781         | B2 | 27 September 2016                    |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2014-032375     | A1 | 06 March 2014                        |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                   |                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b><br><b>A61K 35/747(2015.01)i; A61K 35/745(2015.01)i; A61K 35/744(2015.01)i; A61P 39/02(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61K 8/99(2006.01)i; A61Q 19/00(2006.01)i</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                   |                                               |
| <b>B. 조사된 분야</b><br>조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)<br>A61K 35/747(2015.01); A23K 10/16(2016.01); A23L 19/00(2016.01); A61K 35/745(2015.01); A61P 39/02(2006.01); C12N 1/00(2006.01); C12N 1/20(2006.01)<br>조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌<br>한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))<br>eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 중금속(heavy metal), 카드뮴(cadmium), 납(lead), 락토바실러스(lactobacillus), 비피도박테리움(bifidobacterium), 엔테로코커스(enterococcus), 페디오코커스(pediococcus), 스트렙토코커스(streptococcus)                            |                                                                                                   |                                               |
| <b>C. 관련 문헌</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                   |                                               |
| 카테고리*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                        | 관련 청구항                                        |
| X<br>A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | KR 10-0407663 B1 (경상북도) 2003.12.03<br>요약; 청구항 1, 2; 표 1, 3, 5, 7                                  | 1-2,4,6-15<br>3,5                             |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CN 113262242 A (SHANDONG ZHONGKE-JIAYI BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.)<br>2021.08.17<br>청구항 1-3 | 1,3,7-9,13-15                                 |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | KR 10-2020-0107384 A (전남대학교산학협력단) 2020.09.16<br>실시예 1; 청구항 1, 4, 6-10                             | 1,5,7-10,13-15                                |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | KR 10-0760987 B1 (퓨리메드 주식회사) 2007.10.09<br>실시예 1-4; 청구항 1, 3                                      | 1-2,7-9,11-15                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                   |                                               |
| * 인용된 문헌의 특별 카테고리:<br>“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌<br>“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌<br>“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌<br>“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌<br>“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌<br>“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌<br>“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌<br>“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.<br>“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.<br>“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌 |                                                                                                   |                                               |
| 국제조사의 실제 완료일<br><b>2023년04월25일(25.04.2023)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                   | 국제조사보고서 발송일<br><b>2023년04월26일(26.04.2023)</b> |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소<br>대한민국 특허청<br>(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)<br>팩스 번호 +82-42-481-8578                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                   | 심사관<br>허주형<br>전화번호 +82-42-481-5373            |

### C. 관련 문헌

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                   | 관련 청구항         |
|-------|--------------------------------------------------------------|----------------|
| X     | KR 10-2015-0040386 A (지양난대학교) 2015.04.14<br>실시예 1-5; 청구항 1-4 | 1-2,7-10,12-15 |

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌               | 공개일        |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|
| KR 10-0407663 B1      | 2003/12/03 | KR 10-0407662 B1     | 2003/12/01 |
|                       |            | KR 10-2003-0082510 A | 2003/10/22 |
| CN 113262242 A        | 2021/08/17 | CN 113262242 B       | 2021/11/05 |
| KR 10-2020-0107384 A  | 2020/09/16 | 없음                   |            |
| KR 10-0760987 B1      | 2007/10/09 | 없음                   |            |
| KR 10-2015-0040386 A  | 2015/04/14 | AU 2012-388509 A1    | 2015/02/26 |
|                       |            | AU 2012-388509 B2    | 2016/12/08 |
|                       |            | CA 2881715 A1        | 2014/03/06 |
|                       |            | CA 2881715 C         | 2018/08/21 |
|                       |            | CN 102827796 A       | 2012/12/19 |
|                       |            | CN 102827796 B       | 2013/10/30 |
|                       |            | KR 10-1557266 B1     | 2015/10/02 |
|                       |            | US 2014-0341873 A1   | 2014/11/20 |
|                       |            | US 9451781 B2        | 2016/09/27 |
|                       |            | WO 2014-032375 A1    | 2014/03/06 |