



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0105751
(43) 공개일자 2025년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/125 (2016.01) A23K 10/18 (2017.01)
A23K 20/163 (2016.01) A23L 33/00 (2016.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61K 31/7016 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01) A61K 35/744 (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/125 (2020.05)
A23K 10/18 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2023-0196445

(22) 출원일자 2023년12월29일

심사청구일자 2023년12월29일

(71) 출원인

매일유업 주식회사

서울특별시 종로구 종로1길 50 (중학동, 더케이타워에이동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김용기

경기도 용인시 기흥구 서천동로21번길 11-22, 605동 1304호(서천동, 서천2차 아이파크)

권정일

경기도 오산시 운암로 14, 104동 1904호(원동, 운암청구아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

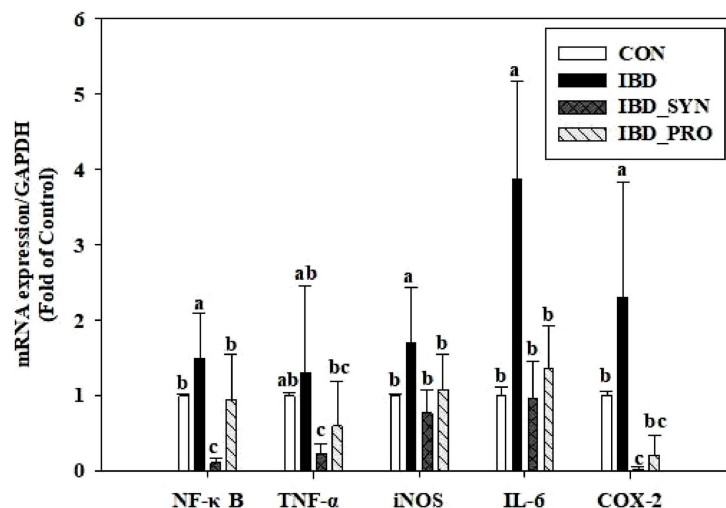
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **모유 올리고당 혼합물 및 프로바이오틱 균주를 유효성분으로 포함하는 신바이오틱 조성물**

(57) 요약

본 발명은 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스를 포함하는 모유 올리고당 혼합물인 프리바이오틱 조성물; 및 프로바이오틱 균주;를 포함하는 신바이오틱 조성물, 영유아용 식품 조성물, 모유 보충제 조성물, 사료 조성물, 또는 염증성 장질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스를 포함하는 모유 올리고당 혼합물; 및 프로바이오틱 균주; 포함하는 신바이오틱 조성물은 장내 단쇄 지방산의 함량을 증가시키고, 산화질소의 분비를 억제하며, 장내 염증성 사이토카인 NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6 및 COX-2 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 염증성 사이토카인의 발현을 억제함으로써 장 건강, 장 기능 또는 장관 면역력을 개선하고, 장내 균총을 개선하며, 배변기능을 개선하며, 장 염증을 개선하고 나아가 염증성 장질환을 치료 또는 개선할 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A23K 20/163 (2016.05)
A23L 33/135 (2016.08)
A23L 33/40 (2016.08)
A61K 31/7016 (2013.01)
A61K 31/702 (2013.01)
A61K 35/744 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/3204 (2013.01)

(72) 발명자

오준구

경기도 군포시 금산로 91, 124동 1803호(산본동, 래미안 하이어스)

양지연

경기도 화성시

이광원

서울특별시 종로구 평창20길 49(평창동)

정유진

서울특별시 노원구 노원로22길 34, 101동 407호(중계동, 롯데우성아파트)

박윤희

서울특별시 도봉구 해동로 50, 315동 303호(창동, 주공3단지아파트)

박세원

경기도 용인시 수지구 풍덕천로 33, 613동 1703호(풍덕천동, 신정마을6단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545023279
과제번호	821055033SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	기술사업화지원(R&D)
연구과제명	조제분유 및 영유아와 임산부 대상 신바이오텍스 식이보충제에의 모유 혼합을리고당
조성물 적용	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	매일유업(주)
연구기간	2021.04.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스를 포함하는 모유 올리고당 혼합물로서, 상기 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스는 60:40 내지 85:15 중량비이며, 상기 갈락토올리고당은 총 갈락토올리고당 중에서 4'-갈락토실락토오스 10-20 중량% 및 6'-갈락토실락토오스 0.05-0.5 중량%를 포함하는 프리바이오틱 조성물; 및 프로바이오틱 균주;를 포함하는 신바이오틱 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프로바이오틱 균주는 비피도박테리움 애니말리스 서브스피시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) CBS118529인 것을 특징으로 하는 신바이오틱 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

장관 면역 개선용, 장 염증 예방 또는 개선용인 것을 특징으로 하는 신바이오틱 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 모유 올리고당 혼합물은 시알릴락토오스를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장관 면역 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 시알릴락토오스는 상기 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스의 합 100 중량부에 대하여 1-10 중량부 포함하는 것을 특징으로 하는 신바이오틱 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신바이오틱 조성물은 장내 단쇄 지방산(short chain fatty acid)의 함량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 신바이오틱 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 단쇄 지방산은 아세트산, 부티르산 및 프로피온산 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 신바이오틱 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신바이오틱 조성물은 장내 유익균의 증식 또는 생장을 촉진하고, 장내 유해균의 증식 또는 생장을 억제하는 것을 특징으로 하는 신바이오틱 조성물..

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신바이오틱 조성물은 배변 기능을 개선하는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 신바이오틱 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신바이오틱 조성물은 NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6 및 COX-2 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 신바이오틱 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신바이오틱 조성물은 식품 또는 식품첨가제인 것을 특징으로 하는 신바이오틱 조성물.

청구항 12

청구항 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 신바이오틱 조성물을 포함하는 영유아용 식품 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 영유아용 식품 조성물은 조제유, 영아용 조제식, 성장기용 조제식 또는 영유아용 이유식인 것을 특징으로 하는 영유아용 식품 조성물.

청구항 14

청구항 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 신바이오틱 조성물을 포함하는 모유 보충제 조성물.

청구항 15

청구항 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 신바이오틱 조성물을 포함하는 사료 조성물.

청구항 16

청구항 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 신바이오틱 조성물을 포함하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모유 올리고당 혼합물 및 프로바이오틱 균주를 유효성분으로 포함하는 신바이오틱 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 장내미생물이 감염병 예방, 면역과정 조절, 장내 영양흡수 등에 결정적인 역할을 한다는 사실이 새롭게 규명되어진 후, 장내미생물에 관한 연구가 전 세계적으로 폭발적으로 증가하고 있다.

[0003] 특히, 장내미생물은 체내에서 인간(숙주)의 정상적인 생리적 기능을 유지하는데 중요한 역할을 하며, 이러한 장내미생물의 분포 변화는 비만이나 당뇨병, 고지혈증 등과 같은 대사증후군 이외에도 장염, 아토피와 같은 면역 관련 질병 등의 유발과 밀접한 관련성을 갖는다는 사실이 밝혀지면서 장내미생물은 체내 대사를 조절하는데 매우 중요한 역할을 한다는 연구결과가 지속적으로 발표되고 있다.

[0004] 이러한 장내미생물은 노화, 염증반응, 항생제, 프로바이오틱스,식이,식이패턴 그리고 스트레스 등의 다양한 인자들에 의해서 변화되는 것으로 알려져 있으며, 그 중 특히 식품의 섭취와 식습관이 장내미생물 변화에 미치는 영향이 가장 큰 것으로 다수의 논문에서 보고되어지고 있다.

[0005] 장내미생물의 균형을 위해 가장 많이 섭취하는 것은 유산균 등의 프로바이오틱스로 이들 유익균을 섭취하여 장내미생물 균형을 개선함으로써 인체 좋은 영향을 준다고 알려져 있으나, 실제로 대장까지 도달하는데 어려움이

많은 것으로 알려져 있다.

- [0006] 이에 프리바이오틱스(prebiotics)는 이미 장 속에 존재하는 미생물들의 성장과 증식에 도움을 주는 비소화성 식품 성분들을 이르는 것으로 이를 섭취하였을 때에 더욱 효과적으로 장내미생물의 변화를 양질화 할 수 있다고 보고되고 있다.
- [0007] 한편 인간의 모유에는 200~300여 종류에 이르는 모유 올리고당 (Human Milk Oligosaccharides, HMOs)이 고농도 10~20 g/L로 존재하며, 모유 올리고당 중에서도 푸코실올리고당, 그 중에서도 2'-푸코실락토오스가 높은 함량으로 존재하는 것으로 알려져 있고, 2'푸코실락토오스는 프리바이오틱스 효과, 병원균 및 이들이 분비하는 장내독소가 장내상피에 달라붙는 것을 막아줌으로써 감염을 방지하는 효과가 알려졌으며, 인간의 건강에 도움을 주는 장내 미생물총의 형성에 기여하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 본 발명의 발명자들은 장 건강, 장 기능 또는 장관 면역 개선을 갖는 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스를 포함하는 모유 올리고당 혼합물을 발명하여 한국특허출원 제2022-0170405호로 출원하여 특허 등록받은 바 있다.
- [0009] 한편, 프리바이오틱스에 더하여, 프로바이오틱 균주를 함께 조합한 신바이오틱 조성물을 포함하는 식품 및 사료 시장이 증가하고 있고, 예를 들어, 동물용 사료 첨가제로서, 주로 항생제에 대한 가능한 대체물로서 프로바이오틱 균주의 사용에 대한 관심이 증가하고 있다. 프로바이오틱 균주는 건강한 인간 또는 동물의 장내 군총에 존재하는 공생 균주로서 락토바실러스 및 비피도박테리아가 포함된다.
- [0010] 그러나, 본 발명의 발명자들이 특허받은 장 건강, 장 기능 또는 장관 면역 개선을 갖는 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스를 포함하는 모유 올리고당 혼합물과 프로바이오틱 균주가 조합되었을 때, 모든 균주가 신바이오틱 조성물로서 프로바이오틱 균주가 가진 효과 이상의 상승 효과를 나타내지 않는다는 것을 확인하였고, 본 발명의 발명자들이 특허받은 모유 올리고당 혼합물과 조합하여 상승효과를 나타내는 프로바이오틱 균주를 선별하고, 그 신바이오틱 효과를 입증함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2013-0102541호
(특허문헌 0002) 한국특허 제1953844호
(특허문헌 0003) 한국공개특허 제2023-0098618호
(특허문헌 0004) 한국공개특허 제2023-0104518호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스를 포함하는 모유 올리고당 혼합물인 프리바이오틱 조성물; 및 프로바이오틱 균주;를 포함하는 신바이오틱 조성물, 영유아용 식품 조성물, 모유 보충제 조성물, 사료 조성물, 또는 염증성 장질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스를 포함하는 모유 올리고당 혼합물로서, 상기 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스는 60:40 내지 85:15 중량비이며, 상기 갈락토올리고당은 총 갈락토올리고당 중에서 4'-갈락토실락토오스 10~20 중량% 및 6'-갈락토실락토오스 0.05~0.5 중량%를 포함하는 프리바이오틱 조성물; 및 프로바이오틱 균주;를 포함하는 신바이오틱 조성물을 제공한다.
- [0014] 상기 프로바이오틱 균주는 비피도박테리움 애니말리스 서브스피시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) CBS118529인 것이 바람직하다.
- [0015] 상기 신바이오틱 조성물은 장관 면역 개선용, 장 염증 예방 또는 개선용일 수 있다.

- [0016] 상기 모유 올리고당 혼합물은 시알릴락토오스를 추가로 포함할 수 있다.
- [0017] 상기 시알릴락토오스는 상기 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스의 합 100 중량부에 대하여 1-10 중량부 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 신바이오틱 조성물은 장내 단쇄 지방산(short chain fatty acid)의 함량을 증가시킬 수 있다.
- [0019] 상기 단쇄 지방산은 아세트산, 부티르산 및 프로피온산 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0020] 상기 신바이오틱 조성물은 장내 유익균의 증식 또는 생장을 촉진하고, 장내 유해균의 증식 또는 생장을 억제하는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 신바이오틱 조성물은 배변 기능을 개선하는 것일 수 있다.
- [0022] 상기 신바이오틱 조성물은 NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6 및 COX-2 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 면역조절인자의 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [0023] 상기 신바이오틱 조성물은 식품 또는 식품첨가제일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 신바이오틱 조성물을 포함하는 영유아용 식품 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 영유아용 식품 조성물은 조제유, 영아용 조제식, 성장기용 조제식 또는 영유아용 이유식일 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 신바이오틱 조성물을 포함하는 모유 보충제 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 신바이오틱 조성물을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 신바이오틱 조성물을 포함하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스를 포함하는 모유 올리고당 혼합물인 프리바이오틱 조성물; 및 프로바이오틱 균주;를 포함하는 신바이오틱 조성물, 영유아용 식품 조성물, 모유 보충제 조성물, 사료 조성물, 또는 염증성 장질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물은, 장내 단쇄 지방산의 함량을 증가시키고, 산화질소의 분비를 억제하며, 장내 염증성 사이토카인 NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6 및 COX-2 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 염증성 사이토카인의 발현을 억제함으로써 장 건강, 장 기능 또는 장관 면역을 개선하고, 장내 균총을 개선하며, 배변기능을 개선하며, 장 염증을 개선하고 나아가 염증성 장질환을 치료 또는 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 실험에 2에서 5 종의 프로바이오틱 균주 단독, 그리고 상기 5종의 프로바이오틱 균주에 본 발명의 모유 올리고당 혼합물을 인간 분변시스템에서 처리했을 때의 아세트산 생성량을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 실험에 2에서 5 종의 프로바이오틱 균주 단독, 그리고 상기 5종의 프로바이오틱 균주에 본 발명의 모유 올리고당 혼합물을 인간 분변시스템에서 처리했을 때의 프로피온산 생성량을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 실험에 2에서 5 종의 프로바이오틱 균주 단독, 그리고 상기 5종의 프로바이오틱 균주에 본 발명의 모유 올리고당 혼합물을 인간 분변시스템에서 처리했을 때의 부티르산 생성량을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 실험에 3에서 리포폴리사카라이드(LPS)를 이용하여 염증을 유도시킨 인간 유래 장관상피세포(caco-2)에서 3 종의 프로바이오틱 균주를 글루코오스와 조합했을 때와 본 발명의 모유 올리고당 혼합물과 조합했을 때의 항염증 효과를 확인하기 위해 산화질소 생성 억제 정도를 비교한 그래프이다.
- 도 5는 실험에 3에서 리포폴리사카라이드(LPS)를 이용하여 염증을 유도시킨 인간 유래 장관상피세포(caco-2)에서 3 종의 프로바이오틱 균주를 글루코오스와 조합했을 때와 본 발명의 모유 올리고당 혼합물과 조합했을 때의 항염증 효과를 확인하기 위해 염증 인자인 NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6 및 COX-2의 mRNA 발현 수준을 비교한 그래프이다.
- 도 6은 실험에 4에서 DSS 투여로 장 상피세포 손상을 유도한 염증성 장질환 동물모델 마우스에 본 발명의 프로바이오틱 균주 단독 및 신바이오틱 조성물을 투여했을 때의 FITC-텍스트란 농도를 확인하여 장 투과성을 비교한 그래프이다.
- 도 7은 실험에 4에서 본 발명의 프로바이오틱 균주 단독 및 신바이오틱 조성물을 투여했을 때의 동물모델의 대

장조직에서 MPO 활성을 측정하여 비교한 그래프이다.

도 8은 실험예 4에서 본 발명의 프로바이오틱 균주 단독 및 신바이오틱 조성물을 투여했을 때의 맹장 분변 내 단쇄 지방산 중 아세트산의 농도를 측정하여 비교한 그래프이다.

도 9는 실험예 4에서 본 발명의 프로바이오틱 균주 단독 및 신바이오틱 조성물을 투여했을 때의 맹장 분변 내 단쇄 지방산 중 프로피온산의 농도를 측정하여 비교한 그래프이다.

도 10은 실험예 4에서 본 발명의 프로바이오틱 균주 단독 및 신바이오틱 조성물을 투여했을 때의 맹장 분변 내 단쇄 지방산 중 부티르산의 농도를 측정하여 비교한 그래프이다.

도 11은 실험예 4에서 본 발명의 프로바이오틱 균주 단독 및 신바이오틱 조성물을 투여했을 때의 결장 조직 내 NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6 및 COX-2의 mRNA 발현 수준을 비교한 그래프이다.

도 12는 실험예 4에서 본 발명의 프로바이오틱 균주 단독 및 신바이오틱 조성물을 투여했을 때의 결장 조직 내 NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6 및 COX-2의 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏으로 비교한 그래프이다.

도 13a는 실험예 4에서 본 발명의 프로바이오틱 균주 단독 및 신바이오틱 조성물을 투여했을 때의 장내 균총을 문(phylum) 수준에서 상대 분포를 확인한 그래프이고, 도 13b는 도 13b에서 퍼미큐테스/박테로이데테스 비율을 나타낸 그래프이다.

도 14a는 실험예 4에서 본 발명의 프로바이오틱 균주 단독 및 신바이오틱 조성물을 투여했을 때의 장내 균총을 속(genus) 수준에서 상대 분포를 확인한 그래프이고, 도 14b는 비피도박테리움의 상대 비율, 도 14c는 락토바실러스의 상대 비율을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명은 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스를 포함하는 모유 올리고당 혼합물로서, 상기 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스는 60:40 내지 85:15 중량비이며, 상기 갈락토올리고당은 총 갈락토올리고당 중에서 4'-갈락토실락토오스 10-20 중량% 및 6'-갈락토실락토오스 0.05-0.5 중량%를 포함하는 프리바이오틱 조성물; 및 프로바이오틱 균주;를 포함하는 신바이오틱 조성물에 관한 것이다.
- [0032] 상기 모유 올리고당 혼합물에서 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스는 60:40 내지 85:15 중량비, 바람직하게는 65:35 내지 80:20 중량비, 더욱 바람직하게는 70:30 내지 75:25 중량비일 수 있다. 갈락토올리고당의 비율이 상기 하한치 미만이거나 2'-푸코실락토오스의 비율이 상기 상한치 초과하는 경우 염증성 사이토카인 TNF- α 의 분비 억제 효과가 충분치 않고, 갈락토올리고당의 비율이 상기 상한치 초과하거나 2'-푸코실락토오스의 비율이 상기 하한치 미만인 경우 장내 단쇄 지방산, 특히 프로피온산 및 부티르산 생성량 증대 효과가 충분치 않다.
- [0033] 상기 갈락토올리고당은 총 갈락토올리고당 중에서 4'-갈락토실락토오스 10-20 중량%, 바람직하게는 12-18 중량% 및 6'-갈락토실락토오스 0.05-0.5 중량%, 바람직하게는 0.1-0.3 중량%를 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 프로바이오틱 균주는 비피도박테리움 애니말리스 서브스피시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) CBS118529인 것이 바람직하다. 상기 균주는 Lallemend사 균주로서 *B. lactis* LAFTI[®] B94라는 상업명으로 판매되고 있다.
- [0035] 상기 신바이오틱 조성물은 장관 면역 개선용, 장 염증 예방 또는 개선용일 수 있다.
- [0036] 상기 장관 면역 개선이란 장관에 존재하는 면역세포의 초기활성화 과정에서 비특이적으로 항원에 대해 면역반응을 촉진하는 기능 또는 면역계의 세포의 활성을 증대시킴으로써 장관의 면역을 강화하는 기능을 의미한다. 장관 면역 기능저하로 인한 질환은 병원성 미생물에 의한 감염성 질환, 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 장관 면역 개선용이란 사람의 환절기 독감 개선 또는 예방, 세균성 설사 개선 또는 예방, 세균성 감염 개선 또는 예방, 상처 후 치료 효과 강화의 응용효과를 갖는다.
- [0037] 장 염증 예방 또는 개선이란 염증성 장질환의 예방 또는 개선을 의미한다. 상기 염증성 장질환은 크론병, 궤양성 대장염, 장형 베체트병, 감염성 장염, 허혈성 장질환, 방사선 장염 및 장누수증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 질환일 수 있다.
- [0038] 상기 장누수증후군(leaky gut syndrome; LGS)이란, 장점막세포는 일정한 세포 사이의 간극을 유지하다가 소화 흡수 과정이 일어나는 동안 어떠한 자극이나 손상이 가해지면서 세포 사이의 틈으로 고분자 물질이 왕복할 수

있는 장점막 투과성이 증가되는 현상을 나타내는 것으로, 장벽의 기능을 제대로 하지 못하여 혈액 내 고분자 물질이 장관내 관강으로 누수되거나 장관 내의 고분자 물질이 직접 혈액으로 들어가는 현상으로 인해 유발되는 증상을 총괄하여 의미한다. 상기 증상들은 노화, 알레르기, 다발성 외상, 류마티스 관절염, 염증성 대장질환, 만성피로 증후군, 과민성 증후군 등의 다양한 임상적 상태로 나타난다. 또한 장점막 투과성의 증가나 장점막의 손상으로 인해 병원체, 항원, 부패물질 등이 장점막 내로 유입되어 염증반응이 일어나고 내독소가 혈류로 유입되어 장내세균 전위(bacterial translocation), 장관내독소혈증(intestinal endotoxemia) 등을 야기하여 각종 염증반응 및 면역 반응이 나타나게 된다. 이러한, 장누수증후군은, 특이한 증상 없이 다양하고 광범위하며 모호한 증상을 호소하게 된다. 구체적으로 여러 가지 질환에서 공통적으로 호소하는 증상을 갖고 있다는 점에서 특이점이 있다.

- [0039] 상기 모유 올리고당 혼합물은 시알릴락토오스를 추가로 포함할 수 있다. 시알릴락토오스는 3'-시알릴락토오스, 6'-시알릴락토오스 또는 이들의 혼합물일 수 있고, 시알릴락토오스를 추가로 포함할 경우 모유 올리고당 혼합물의 장내 단쇄 지방산 생성 효과 또는 염증성 사이토카인의 분비 억제 효과가 증대된다.
- [0040] 상기 시알릴락토오스는 상기 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스의 합 100 중량부에 대하여 1-10 중량부 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 신바이오틱 조성물은 장내 단쇄 지방산(short chain fatty acid)의 함량을 증가시킬 수 있고, 상기 단쇄 지방산은 아세트산, 부티르산 및 프로피온산 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0042] 상기 신바이오틱 조성물은 장내 유익균의 증식 또는 생장을 촉진하고, 장내 유해균의 증식 또는 생장을 억제하는 것일 수 있다.
- [0043] 상기 신바이오틱 조성물은 장내 단쇄 지방산 함량을 증가시키고, 장내 유익균의 증식 및 생장을 촉진함으로써, 배변 기능을 개선하는 것일 수 있다.
- [0044] 상기 신바이오틱 조성물은 NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6 및 COX-2 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 면역조절인자의 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [0045] 상기 신바이오틱 조성물은 식품 또는 식품첨가제일 수 있다. 상기 식품은 예를 들어, 음료, 과자, 다이어트바, 유제품, 육류, 초코렛, 피자, 라면, 기타 면류, 껌, 아이스크림, 비타민 복합제, 건강보조식품일 수 있고, 그 제형은 액상, 분말, 과립, 정제, 캡슐 제형일 수 있다.
- [0046] 상기 신바이오틱 조성물이 식품일 경우 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 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, 사이클로덱스트린 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. 예컨대, 본 발명의 신바이오틱 조성물이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 본 발명의 모유 올리고당 혼합물 및 프로바이오틱 균주 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0047] 상기 신바이오틱 조성물은 또한 건강기능식품일 수 있고, 상기 건강기능식품이란, 모유 올리고당 혼합물 및 프로바이오틱 균주를 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 이와 같은 건강기능식품에 있어서의 모유 올리고당 혼합물 및 프로바이오틱 균주의 첨가량은, 대상인 건강기능식품의 종류에 따라 달라질 수 있지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 환제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태의 건강기능식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량% 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다. 한 구체예에서, 본 발명의 건강기능식품은 환제, 정제, 캡슐제 또는 음료의 형태일 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 상기 신바이오틱 조성물을 포함하는 영유아용 식품 조성물에 관한 것으로, 상기 영유아용 식품 조성물은 조제유, 영아용 조제식, 성장기용 조제식 또는 영유아용 이유식일 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명은 상기 신바이오틱 조성물을 포함하는 모유 보충제 조성물에 관한 것이다.

- [0050] 또한, 본 발명은 상기 신바이오틱 조성물을 포함하는 사료 조성물에 관한 것이다.
- [0051] 또한, 본 발명은 상기 신바이오틱 조성물을 포함하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0052] 유효성분인 신바이오틱 조성물 외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0053] 상기 약학 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0054] 상기 약학 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다.
- [0055] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0056] 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 약학 조성물은 경구 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 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 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학 조성물의 1일 투여량은 0.001-10 g/kg이다.
- [0058] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0059] 또한, 본 발명은 포유동물에게 유효량의 모유 올리고당 혼합물 및 프로바이오틱 균주를 투여하는 것을 포함하는 염증성 장질환 또는 장누수증후군의 개선, 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0060] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0061] 여기에서 사용된 용어 "유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상가에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 해당 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효성분에 대한 유효량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 수 있다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 염증성 장질환의 증상 정도, 장누수증후군에 대한 장투과성 정도, 면역세포 활성화 정도, 항원에 대한 면역반응 정도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 예방, 치료 또는 개선 방법에 있어서, 성인의 경우, 모유 올리고당 혼합물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.001 g/kg 내지 10 g/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0062] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세하게 설명하나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] [제조예 1]

[0064] 이하에서 사용될 모유 올리고당 혼합물(이하 'H5'라고도 함)은, 본 발명자들의 선출원인 한국특허출원 제2022-0170405호의 제조예의 GF2 또는 GF3와 유사한 조성으로, 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스가 75:25 중량비로 혼합된 것이다. 상기 갈락토올리고당은 갈락토올리고당 75 중량%, 유당, 포도당 및 갈락토오스 20 중량% 및 수분 5 중량%인 분말로서, 총 갈락토올리고당 중에서 4'-갈락토실락토오스는 13.5 중량%, 6'-갈락토실락토오스는 0.15 중량%를 포함하는 것이고, 상기 2'-푸코실락토오스는 2'-푸코실락토오스를 95 중량% 포함하는 수분 5 중량%의 분말을 사용하였다. 표 1의 혼합 중량비는 각각 갈락토올리고당 및 2'-푸코실락토오스의 고형분의 혼합 비율이다.

[0065] [실험예 1: 모유 올리고당을 활용하여 생육하는 프로바이오틱 균주 확인]

[0066] 상기 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물(H5)과 조합에 의해 신바이오틱 조성물로서 상승 효과를 나타낼 수 있는 프로바이오틱 균주를 탐색하기 위하여, 종래 프로바이오틱 활성을 갖는 균주 중에서 영유아용식품으로 사용되고 있는 아래 표 1의 상용 균주를 이하 실험에 이용하였다.

표 1

[0067]

구분	균주명
SYN1	<i>B. breve</i> M-16V
SYN2	<i>B. infantis</i> M-63
SYN3	<i>L. fermentum</i> LC40
SYN4	<i>B. bifidum</i> R0071
SYN5	<i>B. lactis</i> B94
SYN6	<i>L. rhamnosus</i> R0011

[0068] 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물을 포함하는 신바이오틱 조성물이 되기 위해서는, 그 프로바이오틱 균주가 모유 올리고당 혼합물을 활용하여 생육할 수 있어야 한다.

[0069] 표 1의 6종의 프로바이오틱 균주에 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물을 배양 단계에 첨가하였으며, 대조군으로는 일반적으로 유산균이 생육 시 사용하는 당인 포도당을 사용하여, 배양 및 생육시 포도당보다 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물(H5)을 우선 활용하는 균주를 선별하였다.

[0070] 이를 위해 MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) broth media를 제조하여 9 mL씩 test tube에 분주하고 CO₂팩을 넣어 24시간 동안 방치하여 배지를 혐기 상태로 유지할 수 있도록 준비하였다. 이후 혐기 상태의 배지에 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물 및 포도당을 각각 5%(w/v), 그리고 표 1의 균주를 2 X 10⁵ CFU/mL가 되도록 첨가한 샘플을 1 mL씩 분주하여 각각 48시간 배양하였다. 배양액을 펩톤수에 10배씩 10구간으로 희석하고 3 구간을 선정하여 글래스 스프레더로 MRS 아가 플레이트에 도말하여 24시간 배양 후 균수를 확인하여 표 2에 나타내었다.

표 2

[0071]

구분	균주명	당	균수(CFU/mL)	초기균수 대비 증가배수	포도당 첨가와 비교
Glu1	<i>B. breve</i> M-16V	포도당	6.07×10^8	3,035배 증가	-
Glu2	<i>B. infantis</i> M-63	포도당	4.26×10^8	2,130배 증가	-
Glu3	<i>L. fermentum</i> LC40	포도당	9.8×10^7	490배 증가	-
Glu4	<i>B. bifidum</i> R0071	포도당	3.97×10^7	198.5배 증가	-
Glu5	<i>B. lactis</i> B94	포도당	8.8×10^7	440배 증가	-
Glu6	<i>L. rhamnosus</i> R0011	포도당	2.1×10^7	105배 증가	-
SYN1	<i>B. breve</i> M-16V	H5	2.1×10^9	10,500배 증가	3.46배 증가

SYN2	<i>B. infantis</i> M-63	H5	3.65×10^8	1,825배 증가	1.16배 감소
SYN3	<i>L. fermentum</i> LC40	H5	3.64×10^8	1,820배 증가	3.71배 증가
SYN4	<i>B. bifidum</i> R0071	H5	1.4×10^9	7,000배 증가	35.26배 증가
SYN5	<i>B. lactis</i> B94	H5	8.0×10^9	40,000배 증가	90.9배 증가
SYN6	<i>L. rhamnosus</i> R0011	H5	1.9×10^9	9,500배 증가	90.47배 증가

[0072] 초기 균수 2×10^5 CFU/mL와 비교했을 때 모든 실험군에서 증가하였고, *B. infantis* M-63를 제외한 5 가지 균종은 모두 포도당과 함께 배양했을 때보다 제조에 1의 모유 올리고당 혼합물과 배양했을 때 균수가 더 크게 증가하였다. 그 중에서도 SYN5, SYN6, SYN4 순으로 포도당 배양 그룹에 비해 가장 크게 증가하였다.

[0073] 상기 결과로부터 표 1의 6종의 균주 중 포도당보다 제조에 1의 모유 올리고당 혼합물을 더 잘 사용하여 생육할 수 있는 균주는 *B. bifidum* R0071, *B. lactis* B94, *L. rhamnosus* R0011 임을 확인하였다.

[0074] [실험예 2: 인간분변시스템에서의 장내 단쇄 지방산 생성량 확인]

[0075] 평균 3 개월령의 유아 5명으로부터 얻은 분변 각 1 g씩을 혼합한 혼합 분변 5g을 pH7.7의 PBS 완충액 50 mL과 혼합하여 분변 슬러리를 제조하였다. 상기 분변 슬러리에 제조에 1의 모유 올리고당 혼합물(H5) 5 %(w/v) 첨가하고, 표 2의 균주를 2×10^5 CFU/mL가 되도록 처리된 분변 슬러리 1 mL을 BHI broth 배지(Brain Heart Infusion, 조성(g/L): Brain Heart Infusion 37 g, Hemin solution (1%) 0.5 mL, L-Cysteine.HCL 0.5 g, Resazurin (0.1%) 0.5 mL, Distilled water 1 L) 7.2 mL에 접종한 후 혼합한 후, 37℃, 혐기적 조건에서 48 시간 배양하였다.

[0076] 상기 배양액을 12,100 x g, 4 ℃에서 20분간 원심분리하고, 원심분리 된 상등액 900 μL를 2 mL EP튜브에 옮긴 후, 내부 표준품으로 농도 400 mM의 아세트산을 첨가하고, 0.5 mL 헥산을 첨가하고 상온에서 10분간 혼합한 후, 1,932 x g, 4 ℃에서 10분간 원심분리하여 헥산층을 수집하는 과정을 2회 반복하여 얻은 헥산층을 180 μL를 인서트 바이알에 넣어준 후 유도체시약인 MTBSTFA(+1% t-BDMCS)를 각 바이알에 6 μL씩 첨가하고, 각 vial을 볼텍싱 해주고 건조 오븐에서 70 ℃, 45분간 인큐베이션 후 GC-MS로 단쇄 지방산 3종, 즉 아세트산, 프로피온산 및 부티르산을 분석하여 그 결과를 도 1 내지 3 및 표 3 내지 5에 나타내었다.

표 3

[0077]

구분	1	2	3	평균	표준편차
CON	39.217	42.266	45.304	42.262 ^b	2.485
H5	42.492	43.068	45.484	43.681 ^b	1.296
1	40.182	61.619	46.377	49.393 ^{ab}	9.008
2	39.518	42.684	46.322	42.841 ^b	2.780
3	40.453	48.595	45.938	44.995 ^b	3.390
4	39.851	43.869	45.597	43.106 ^b	2.407
5	39.952	38.303	47.079	41.778 ^b	3.809
6	40.372	42.127	45.430	42.643 ^b	2.097
SYN1	44.872	46.054	47.804	46.243 ^b	1.205
SYN2	39.678	45.520	40.307	41.835 ^b	2.618
SYN3	45.323	45.338	45.822	45.495 ^b	0.232
SYN4	41.813	44.829	41.962	42.868 ^b	1.388
SYN5	47.669	111.004	49.406	69.360 ^a	29.455

SYN6	50.990	53.089	51.436	51.839 ^{ab}	0.903
------	--------	--------	--------	----------------------	-------

표 4

구분	1	2	3	평균	표준편차
CON	2.621	2.755	2.987	2.788 ^{ab}	0.151
H5	2.549	2.558	2.574	2.560 ^b	0.011
1	2.640	3.787	2.943	3.123 ^a	0.485
2	2.656	2.822	2.928	2.802 ^{ab}	0.112
3	2.637	2.860	2.871	2.789 ^{ab}	0.108
4	2.633	2.858	2.962	2.818 ^{ab}	0.137
5	2.656	2.651	3.074	2.794 ^{ab}	0.198
6	2.637	2.782	2.883	2.768 ^{ab}	0.101
SYN1	2.555	2.565	2.578	2.566 ^b	0.010
SYN2	2.559	2.646	2.558	2.588 ^b	0.041
SYN3	2.578	2.586	2.592	2.585 ^b	0.006
SYN4	2.554	2.609	2.559	2.574 ^b	0.025
SYN5	2.563	3.178	2.561	2.767 ^{ab}	0.290
SYN6	2.576	2.605	2.576	2.586 ^b	0.014

표 5

구분	1	2	3	평균	표준편차
CON	0.031	0.032	0.036	0.033 ^c	0.002
H5	0.036	0.039	0.038	0.038 ^{abc}	0.001
1	0.031	0.037	0.035	0.034 ^{bc}	0.002
2	0.035	0.034	0.035	0.035 ^{bc}	0.001
3	0.031	0.033	0.031	0.032 ^c	0.001
4	0.031	0.032	0.032	0.031 ^c	0.001
5	0.032	0.032	0.039	0.034 ^{bc}	0.003
6	0.032	0.032	0.031	0.032 ^c	0.000
SYN1	0.036	0.037	0.040	0.038 ^{abc}	0.002
SYN2	0.039	0.057	0.037	0.044 ^{abc}	0.009
SYN3	0.057	0.045	0.048	0.050 ^a	0.005
SYN4	0.040	0.044	0.038	0.041 ^{abc}	0.002
SYN5	0.036	0.064	0.039	0.046 ^{ab}	0.013
SYN6	0.039	0.053	0.040	0.044 ^{abc}	0.006

- [0080] 표 3 내지 표 5에서 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물 및 표 1의 균주를 처리하지 않고 분변 슬러리만 배양한 음성대조군은 CON으로 표시하고, 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물만 처리한 그룹은 H5로 표시하며, 표 2의 균주만 단독으로 처리한 프로바이오틱 그룹은 각각 숫자 1 내지 6으로 표시하고, 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물 및 표 2의 균주를 조합하여 처리한 신바이오틱 그룹은 SYN1 내지 SYN6로 표시하였다.
- [0081] 도 1 및 표 3에서 아세트산은 음성대조군인 CON 그룹에서 42.262 ± 2.485 mM이 검출되었고, 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물만 처리한 H5 그룹은 43.681 ± 1.296 mM로 CON 그룹과 유의차가 없었고, CON 그룹 대비 *B. lactis* B94와 제조예 1의 모유 올리고당을 조합한 신바이오틱 그룹인 SYN5 그룹에서만 아세트산 생성이 유의적으로 증가하였다.
- [0082] 프로바이오틱 그룹에 비해 각각 동일 균주를 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물과 조합한 신바이오틱 그룹의 아세트산 생성 증가율은 SYN5(66.02%), SYN6(21.56%), SYN3(1.11%) 순으로 높았다(도 1 참조).
- [0083] 도 2 및 표 4에서 프로피온산은 CON 그룹에서 2.788 ± 0.151 mM 검출되었고 CON 그룹 대비 H5 그룹, 모든 프로바이오틱 그룹, 및 모든 신바이오틱 그룹에서 프로피온산 생성은 증가하지 않았다.
- [0084] 도 3 및 표 5 부티르산은 CON 그룹에서 0.033 ± 0.002 mM가 검출되었고 CON 그룹 대비 모든 신바이오틱 그룹에서 부티르산 생성이 증가하였다.
- [0085] 프로바이오틱 그룹과 신바이오틱 그룹을 비교했을 때 신바이오틱 그룹은 모두 프로바이오틱 그룹보다 부티르산 생성이 증가하였고, 그 중에서도 부티르산 생성 증가율은 SYN3(56.95%), SYN6(38.84%), SYN5(35.54%)순으로 높았다(도 3 참조).
- [0086] 도 1 내지 도 3, 및 표 3 내지 표 5의 결과를 종합하면, 신바이오틱 그룹 그 중에서도 SYN4, SYN5 및 SYN6 그룹은, 부티르산 생성능이 음성대조군으로 사용된 CON 그룹과 균주만 처리한 프로바이오틱 그룹 대비 모두 증가하는 것으로 나타나, 제조예 1의 모유 올리고당 혼합물과 균주의 신바이오틱 조합의 시너지 효과를 통해 부티르산 생성량이 증가함을 확인하였다. 특히 신바이오틱 그룹 중에서 *B. lactis* B94를 사용하는 SYN5는 부티르산은 물론 아세트산 생성에 가장 적합한 신바이오틱 조합으로 판단되었다.
- [0087] [실험예 3: 대식세포에서의 염증 억제 효과 확인]
- [0088] 실험예 2의 프로바이오틱 그룹 및 신바이오틱 그룹 중에서 단쇄지방산 생성에 상승 효과를 나타낸 SYN4, SYN5 및 SYN6 그룹을 선택하고, 실험예 1의 표 2의 실험군을 각각 48 시간 배양하여 얻은 배양액에서 얻은 상등액을 동결건조하여 이하 실험에 사용하였다.
- [0089] 1. 대식세포에서의 산화질소 생성 억제 효과 확인
- [0090] 리포폴리사카라이드(LPS)를 이용하여 염증을 유도시킨 마우스유래 대식세포(RAW 264.7) 모델에서 실험예 1의 표 2의 Glu4, Glu5, Glu6, SYN4, SYN5 및 SYN6 그룹의 배양 상등액 동결건조 분말 $1 \mu\text{g/mL}$, $0.4 \mu\text{g/mL}$ LPS와 24 시간 공동처리한 후 상등액 $50 \mu\text{L}$ 를 취하여 1% Sulfanilamide/5% phosphoric acid 용액을 $50 \mu\text{L}$ 를 넣고, 0.1% NEAD $50 \mu\text{L}$ 를 넣어 준 후, 540 nm 에서 흡광도를 측정하여 상등액 내의 산화질소 농도를 측정하여 도 4 및 표 6에 나타내었다.

표 6

구분	1	2	3	평균	표준편차
CON	138.05	85.90	76.05	100.00^c	27.21
LPS	4174.19	3441.85	3586.25	3734.10^a	316.73
H5	3441.93	3551.15	3464.26	3485.78^{ab}	47.11
GLU4	3302.29	3435.19	3762.91	3500.13^{ab}	193.57
GLU5	3469.12	3254.58	3244.37	3322.69^{ab}	103.63
GLU6	3183.75	3540.02	3329.04	3350.93^{ab}	146.27
SYN4	3514.36	3462.95	3298.26	3425.19^{ab}	92.17
SYN5	3113.41	3181.37	3005.35	3100.05^a	72.48

SYN6	3315.19	3040.86	2965.90	3107.32 ^a	150.14
------	---------	---------	---------	----------------------	--------

- [0092] CON과 LPS의 경우 아무것도 처리하지 않고 배양한 MRS 배지의 상등액을 동결 건조하여 사용했으며, H5는 H5만 처리하여 배양한 MRS 상등액을 사용하고. GLU4, GLU5, GLU6 그룹은 프로바이오틱 균주 4, 5, 6과 포도당 조합을 함께 배양한 MRS 배지의 상등액을 처리한 그룹으로 신바이오틱 그룹과 비교를 위해 함께 실험하였다.
- [0093] 도 4 및 표 6에 따르면, 대조군인 CON 그룹 대비 LPS 단독 처리군인 'LPS' 그룹에서 측정값이 유의적($p<0.05$)으로 증가하였고, 반면 SYN5, SYN6은 모두 LPS 그룹 대비 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다.
- [0094] 한편 LPS 및 신바이오틱 그룹을 24 시간 공동처리한 RAW264.7 처리 모델에서 iNOS, COX-2, TNF- α , NF- κ B 및 IL-6 5개의 염증성 사이토카인의 발현을 mRNA 수준에서 PCR을 이용하여 확인한 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0095] 이를 위해, 트리졸(trizol)을 이용하여 세포막을 용해 후 mRNA를 추출함. 이후 추출된 mRNA양을 nanodrop을 이용하여 동량으로 정량한 후 LeGene premium express first-strand cDNA synthesis system을 이용해 cDNA를 합성함. cDNA를 HiPi real-time PCR 2x master mix SYBR green mix와 섞어 PCR reaction solution을 만든 후 iQ5 thermal cycler를 이용해 인자 발현을 확인하였다.
- [0096] Glu4, Glu5 및 Glu6 그룹 및 H5 그룹과 신바이오틱 그룹을 비교했을 때, SYN4는 GLU4에 비해 NF- κ B를 제외한 모든 인자들이 오히려 증가하였고, SYN5는 GLU5에 비해 모든 인자들이 감소하였으며, 특히 IL-6는 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다. 또한 SYN6과 GLU6를 비교 시 iNOS와 NF- κ B를 제외한 모든 인자들이 감소하는 경향을 나타내었다.
- [0097] 5개의 염증성 사이토카인 모두에서 공통적으로 LPS그룹 대비 발현 감소를 보인 처리군은 SYN5이었다.
- [0098] 따라서 신바이오틱 그룹 중에서 SYN5가 단쇄지방산 생성능이 우수함은 물론 염증성 사이토카인의 mRNA 발현을 감소시켜, 제조에 1의 모유 올리고당 혼합물(H5)에 비해 항염증 효과가 현저히 우수함을 확인하였다.
- [0099] [실험예 4: 염증성 장질환 동물모델에서의 장 염증 개선 효과 확인]
- [0100] 실험예 2 내지 3에서 제조에 1의 모유 올리고당 혼합물(H5)만 투여하거나 *B. lactis* B94 균주만 투여한 그룹에 비해 단쇄지방산 생성 효과가 뛰어나고, 항염증 효과가 뛰어난 SYN5 그룹을 선택하여 염증성 장질환 동물모델에서 장염증 개선 효과를 비교하였다.
- [0101] 1. 장 투과도 억제 효과 및 장 내 염증 확인
- [0102] 마우스에 Dextran Sulfate Sodium(DSS)을 투여할 경우 장 상피세포에 손상을 유도하여 장 염증을 유도하고 장 누수를 유발한다. 250~300 g의 수컷 C57BL/6 마우스(6주령)을 충분한 사료와 물이 공급되며 적절한 인공조도로 12시간의 낮, 밤을 조절하였다(am 8:00부터 낮). 그리고 일정한 온도(20~24℃) 및 습도(45~65%)를 유지시켜 주었다. 바뀐 환경에 적응하도록 일주일간 살펴보며 수면주기를 유지하고, 이상행동을 확인하였다.
- [0103] 상기와 같이 1주일간 적응 기간을 거친 후, 정상군 CON 그룹, 장 염증만 유도한 IBD 그룹, SYN5를 급여하고 장 염증을 유도한 IBD_SYN 그룹, *B. lactis* B94 균주만 급여하고 장 염증을 유도한 IDB_PRO 그룹, 제조에 1의 모유 올리고당 혼합물만 급여하고 장 염증을 유도한 IDB_PRE 그룹으로 분류하고, 각 그룹의 9마리는 3마리씩 한 케이지에서 사육하였으며, 정상군 CON 그룹을 제외한 나머지 그룹은 모두 희생 전 7일간 식수 대신 2% DSS를 자율적으로 급수하였다.
- [0104] 각 그룹에서 모유 올리고당 혼합물은 20 mg/mouse, *Bifidobacterium lactis* B94 균주는 1×10^9 CFU/mouse가 급여되도록 0.1M PBS(pH 7.4)에 녹여 각 200 μ L씩 2 주간 (1일 1회) 경구투여함. 2주의 투여 기간 동안 사료 및 식수의 공급은 자율적으로 이뤄지며(희생전날 저녁까지 공급), 희생 12시간 전 사료 공급을 중단하고, 희생 4시간 전에는 FITC-dextran을 200 μ g/g 경구투여하였다. 희생 시에는 CO₂를 이용해 마취하며, 이후 복대정맥에서 혈액을 채취하였다.
- [0105] 희생 4시간 전 경구투여한 FITC의 장 투과성을 확인하기 위하여 상기 채취한 혈액을 15℃, 2000 rpm 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 혈청 내 FITC 농도를 측정하기 위하여 96 black well에 옮겨 excitation 490 nm, emission 520 nm으로 형광도를 측정하여 도 6에 나타내었다.
- [0106] 도 6에 따르면, IBD_SYN그룹은 IBD 그룹 대비 FITC-텍스트란 농도가 유의적으로 감소하였고, 이는 본 발명의

신바이오틱 조성물이 장벽의 염증 완화하고, 장 누수를 억제한다는 것을 보여준다.

[0107] 또한 상기 마우스의 대장조직에서 MPO 활성을 측정하여 장 내 염증을 수치화하여 도 7에 나타내었다. MPO 활성은 25 mg의 대장조직을 덜어 HTAB buffer(6.8 g/L monobasic potassium phosphate에 8.7 g/L dibasic potassium phosphate를 넣어 pH 6.0을 맞춘 후, 5 g의 hexadecyltrimethylammonium bromide(HTAB)를 1 L의 potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0)에 녹여 준비한 반응용액)를 25 mg/mL이 되도록 하고, 대장조직을 균질화한 후 4℃, 13400 xg, 6 min의 조건으로 원심분리하여 상등액을 채취하고, 채취한 상등액을 96 well plate에 7 μ L씩 3반복으로 분주하고 O-dinisidine solution을 200 μ L 혼합하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0108] 도 7에 따르면, IBD 그룹 대비 신바이오틱 그룹인 IBD_SYN의 MPO 값이 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). 또한 도면에 나타내지는 않았으나 IBD_PRE 그룹과 비교했을 때 IBD_SYN그룹의 MPO 값이 크게 감소한 것을 확인하였고, 이에 따라 IBD_SYN 그룹의 결장 내 면역 세포의 침윤 정도가 적고, 장 염증 억제 효과가 현저히 뛰어난 것을 알 수 있었다.

[0109] 2. 분변 내 단쇄지방산 생성량 확인

[0110] 상기 각 실험군의 맹장분변을 10 mg 채취한 후 internal standard(Acetic acid-d4), hydrochloric acid, ether를 2:1:4 비율로 넣은 extraction solution을 350 μ L씩 분주한 후 균질화하여 준비하고, 이후 4℃, 1000 g, 10 min의 조건으로 원심분리하여 얻은 상등액 80 μ L을 insert vial에 넣고 유도체 시약 - 인 MTBSTFA(+1% t-BDMCS)를 각 vial에 16 μ L을 첨가하였다. 상기 상등액과 유도체시약을 첨가한 vial을 80℃에서 20분간 반응 후 48 시간 동안 실온에서 배양하여 GC-MS로 아세트산, 프로피온산 및 부티르산 농도를 분석하여 각각 도 8 내지 도 11에 나타내었다.

[0111] 아세트산은 CON 그룹에서 17.96 ± 0.58 mM 검출되었고, IBD 그룹은 17.10 ± 0.49 mM로 아세트산의 생성이 감소하였으며, IBD 그룹 대비 IBD_SYN(17.97 ± 0.84 mM), IBD_PRO(17.44 ± 0.64 mM) 그룹에서 아세트산 생성 증가를 확인하였다. 특히 IBD_SYN 그룹에서만 IBD 그룹대비 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). (도 8 참조).

[0112] 프로피온산은 CON 그룹에서 4.103 ± 0.581 mM 검출되었고, IBD 그룹은 2.487 ± 0.177 mM로 프로피온산 생성이 감소하였으며, IBD 그룹 대비 IBD_SYN(3.929 ± 1.159 mM), IBD_PRO(3.217 ± 0.202 mM) 그룹에서 프로피온산 생성이 증가했고, 특히 IBD_SYN 그룹이 IBD 그룹 대비 유의적 증가하면서($p<0.05$) CON 그룹과 비슷한 수준으로 증가하였다(도 9 참조).

[0113] 부티르산 생성이 IBD군(0.082 ± 0.023 mM) 대비 IBD_SYN(0.48 ± 0.00 mM), IBD_PRO(0.122 ± 0.053) 그룹에서 모두 증가하였다. 특히 IBD_SYN 그룹에서 IBD 그룹 대비 유의적 증가하면서($p<0.05$) CON 그룹과 유사한 농도까지 증가하였다(도 10 참조).

[0114] 3. 장 조직 내 염증인자의 발현량 확인

[0115] 상기 각 실험군의 장 조직을 이용한 NF- κ B pathway 관련 인자 (NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6, COX-2 발현을 mRNA와 단백질 수준에서 확인하여 도 11 및 도 12에 각각 나타내었다.

[0116] 도 11에서 동물모델의 결장조직을 이용한 PCR을 통해 염증 유발 및 조절의 대표 경로인 NF- κ B pathway 관련 인자 발현을 확인하여 장 염증 완화 효과를 관찰한 결과, NF- κ B, TNF- α , iNOS, IL-6, COX-2의 mRNA 발현이 IBD 그룹 대비 IBD_SYN에서 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

[0117] 또한, 도 17에서 동물모델의 결장 조직을 이용한 Western blot을 통해 염증 유발 및 조절의 대표 경로인 NF- κ B pathway 관련 인자 발현을 확인하여 장 염증 완화 효과를 관찰한 결과, IBD 그룹 대비 IBD_SYN, IBD_PRO에서 유의적으로 감소하였다.

[0118] 4. 장내 균총 변화 확인

[0119] 위 실험들을 통해 확인한 신바이오틱 조성물의 단쇄지방산 생성능 및 항염증 효과 효과가 장내 균총의 변화로 인한 것인지 확인하기 위해 다음 실험을 실시하였다. 동물모델의 희생 직후 -80℃에 보관되어 있던 맹장 내 분변을 이용하여 16s rRNA 분석을 진행함. 16s rRNA 유전자의 hypervariable region인 V1-V3 region을 타겟으로 증폭 후 장비를 이용하여 분변 내 균총 분석을 함. Bacteria, phylum, class, order, family, genus와 species에 따라 분류하여 데이터 분석을 진행하였다.

[0120] 도 13a에 각 균을 목(phylum) 수준에서 상대 분포(relative abundance)를 확인하여 나타내었고, 그에 따른 비만

및 염증 지표로 활용되고 있는 퍼미큐테스/박테로이데테스 비율(F/B ratio)을 도 13b에 나타내었다. IBD 그룹의 경우 *Firmicutes*(*Bacillota*)가 감소하고 *Bacteroidetes*(*Bacteroidota*)가 증가하여 F/B ratio가 감소하는 경향을 보이며, IBD_SYN 그룹은 *Firmicutes*가 증가하고 *Bacteroidetes*가 감소하여 F/B ratio가 증가하는 것을 확인하였다.

[0121] 도 14a에는 속(genus) 수준에서 상대 분포를 확인하여 나타내었고, 도 14b는 비피도박테리움의 상대 비율, 도 14c는 락토바실러스의 상대 비율을 나타내었다. 유익균으로 알려진 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*가 IBD_SYN 그룹에서 증가함을 확인하였다.

[0122] 상기 실험예들의 통계처리는 students t-test ($p < 0.05$) 방법으로 수행하였고, 실험결과에서 a, b, c, d, e는 각각 p value < 0.05 에서 유의적 차이가 있음을 의미한다.

[0123] 아래 본 발명의 신바이오틱 조성물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0124] 제제예 1. 산제의 제조

[0125]	실험예 1의 SYN5	500 mg
[0126]	유당	100 mg
[0127]	탈크	10 mg

[0128] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0129] 제제예 2. 정제의 제조

[0130]	실험예 1의 SYN5	300 mg
[0131]	옥수수전분	100 mg
[0132]	유당	100 mg
[0133]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0134] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0135] 제제예 3. 캡슐제의 제조

[0136]	실험예 1의 SYN5	200 mg
[0137]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0138]	락토오스	14.8 mg
[0139]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

[0140] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0141] 제제예 4. 액제의 제조

[0142]	실험예 1의 SYN5	4 g
[0143]	이성화당	10 g
[0144]	만니톨	5 g
[0145]	정제수	적량

[0146] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100g으로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

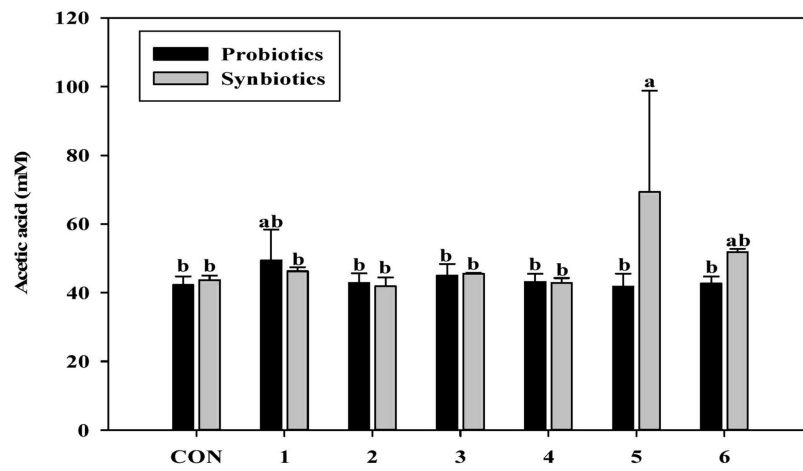
[0147] 제제예 5. 과립제의 제조

[0148]	실험예 1의 SYN5	1,000 mg
--------	-------------	----------

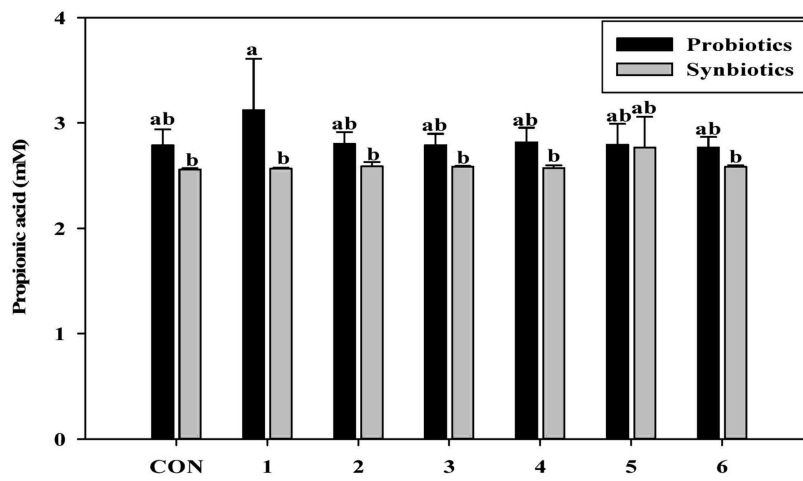
[0149]	비타민 혼합물	적량
[0150]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0151]	비타민 E	1.0 mg
[0152]	비타민 B1	0.13 mg
[0153]	비타민 B2	0.15 mg
[0154]	비타민 B6	0.5 mg
[0155]	비타민 B12	0.2 μg
[0156]	비타민 C	10 mg
[0157]	비오틴	10 μg
[0158]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0159]	엽산	50 μg
[0160]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0161]	무기질 혼합물	적량
[0162]	황산제1철	1.75 mg
[0163]	산화아연	0.82 mg
[0164]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0165]	제1인산칼륨	15 mg
[0166]	제2인산칼슘	55 mg
[0167]	구연산칼륨	90 mg
[0168]	탄산칼슘	100 mg
[0169]	염화마그네슘	24.8 mg
[0170]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 과립제에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 과립제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0171]	<u>제제예 6. 기능성 음료의 제조</u>	
[0172]	실험예 1의 SYN5	1,000 mg
[0173]	구연산	1,000 mg
[0174]	올리고당	100 g
[0175]	매실농축액	2 g
[0176]	타우린	1 g
[0177]	정제수를 가하여	전체 900 ml
[0178]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0179]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

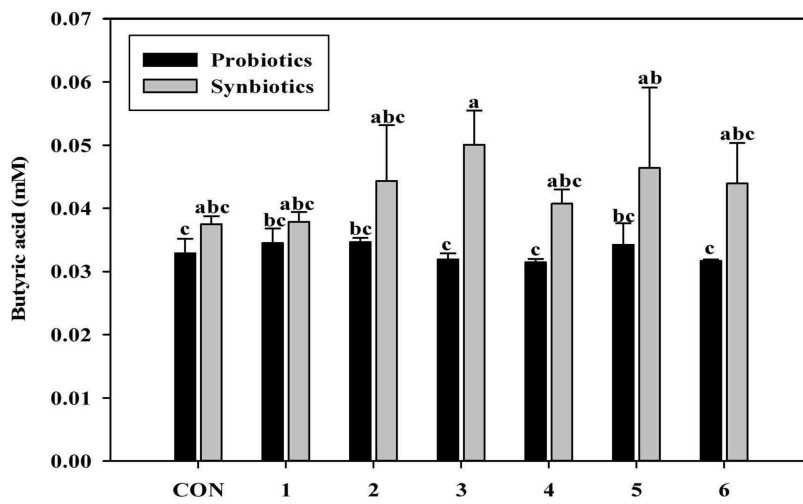
도면1



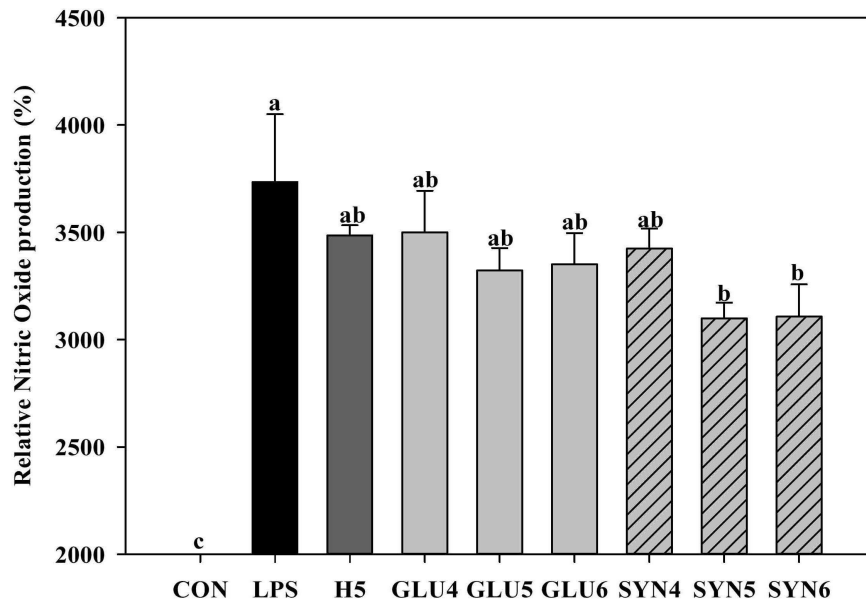
도면2



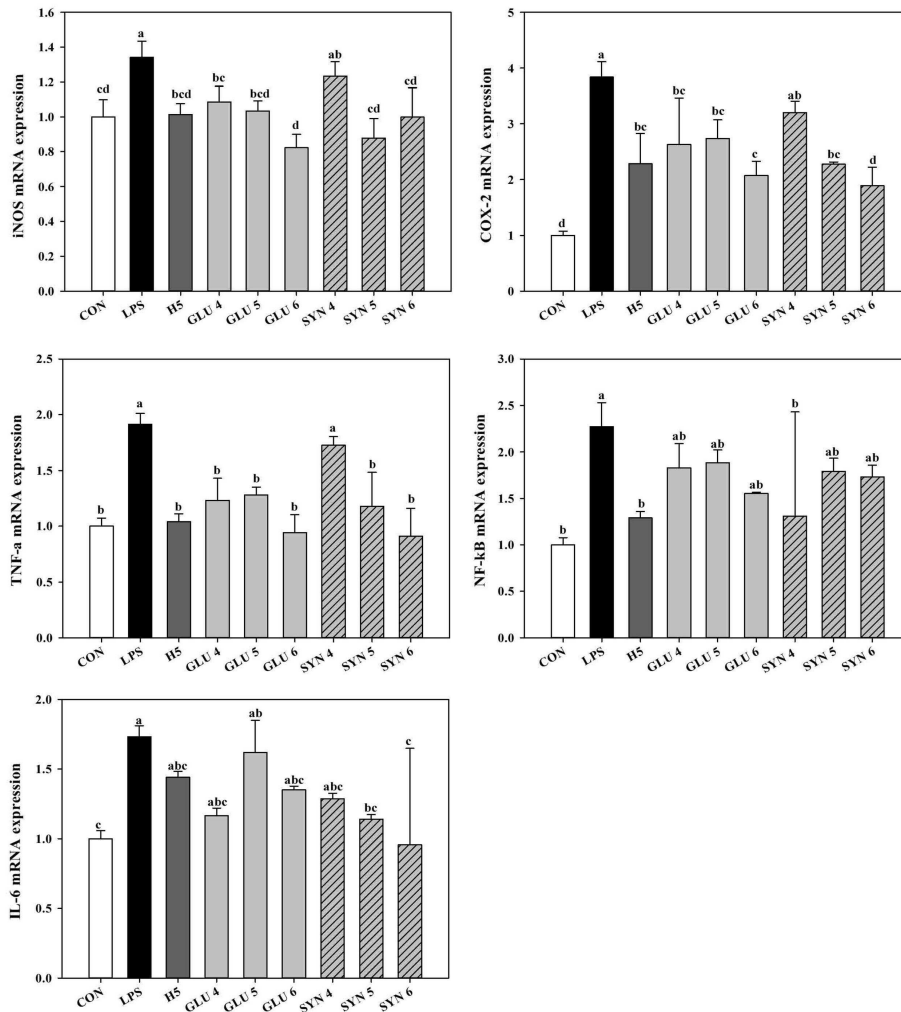
도면3



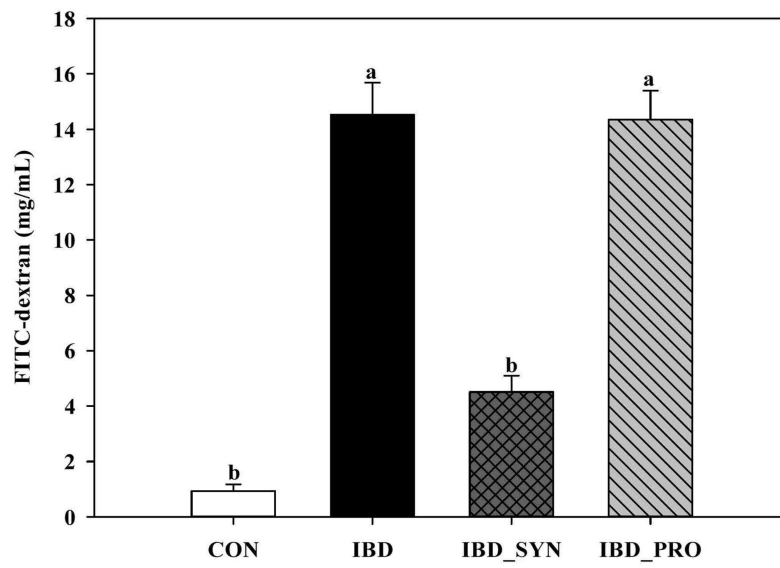
도면4



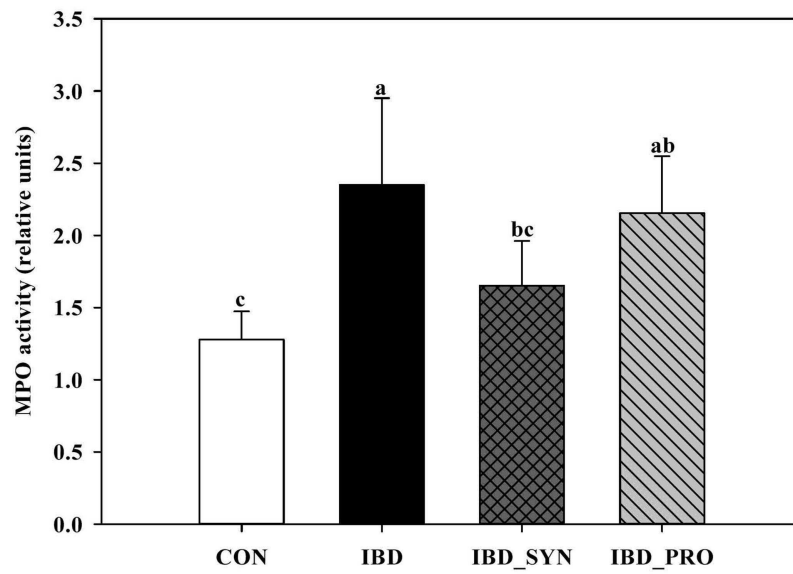
도면5



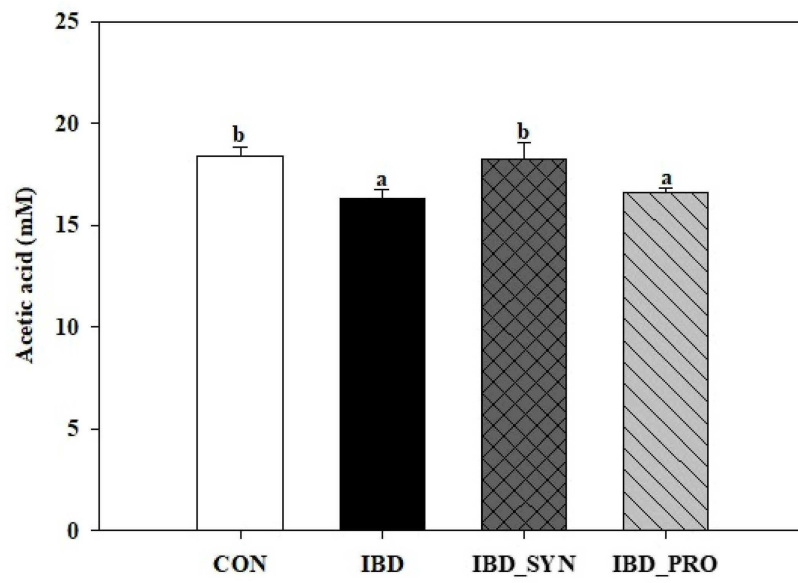
도면6



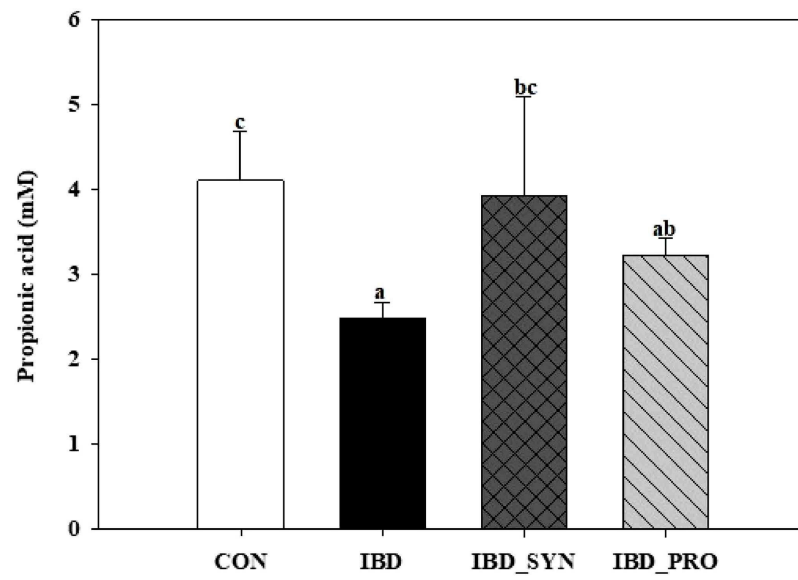
도면7



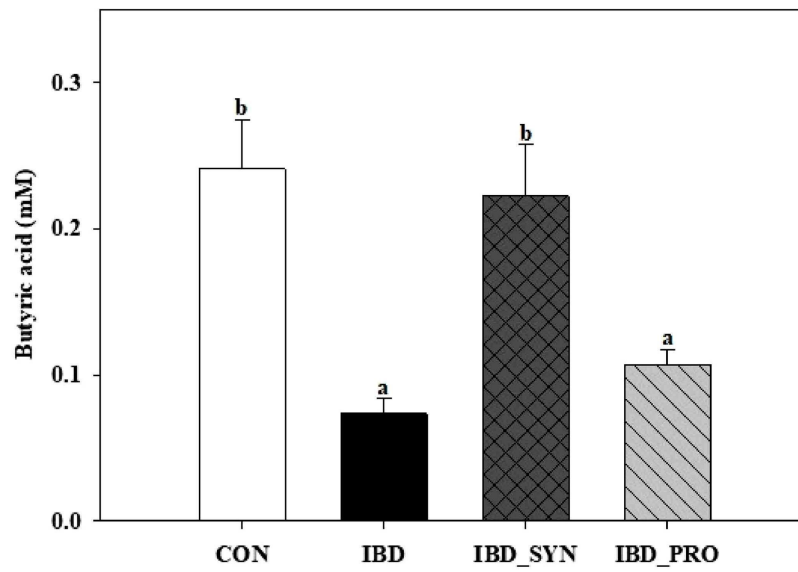
도면8



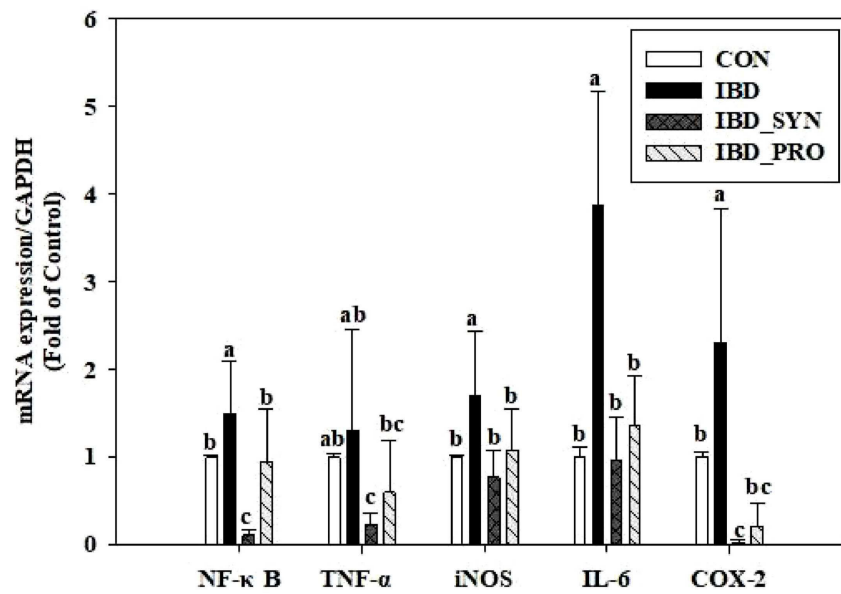
도면9



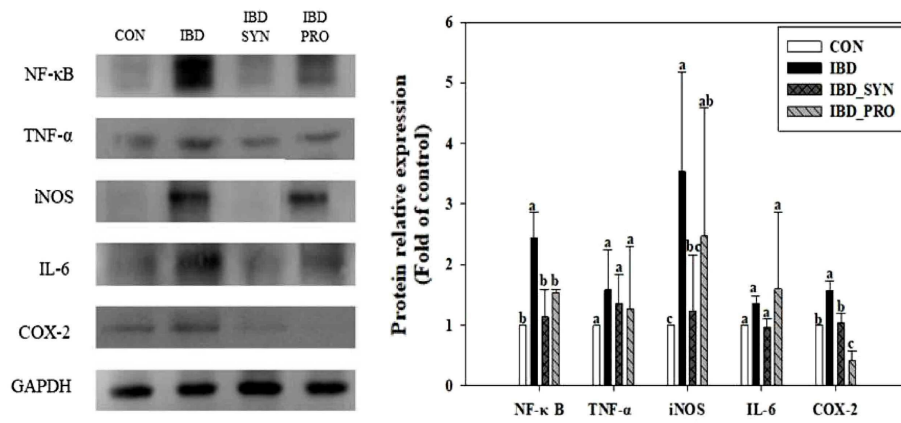
도면10



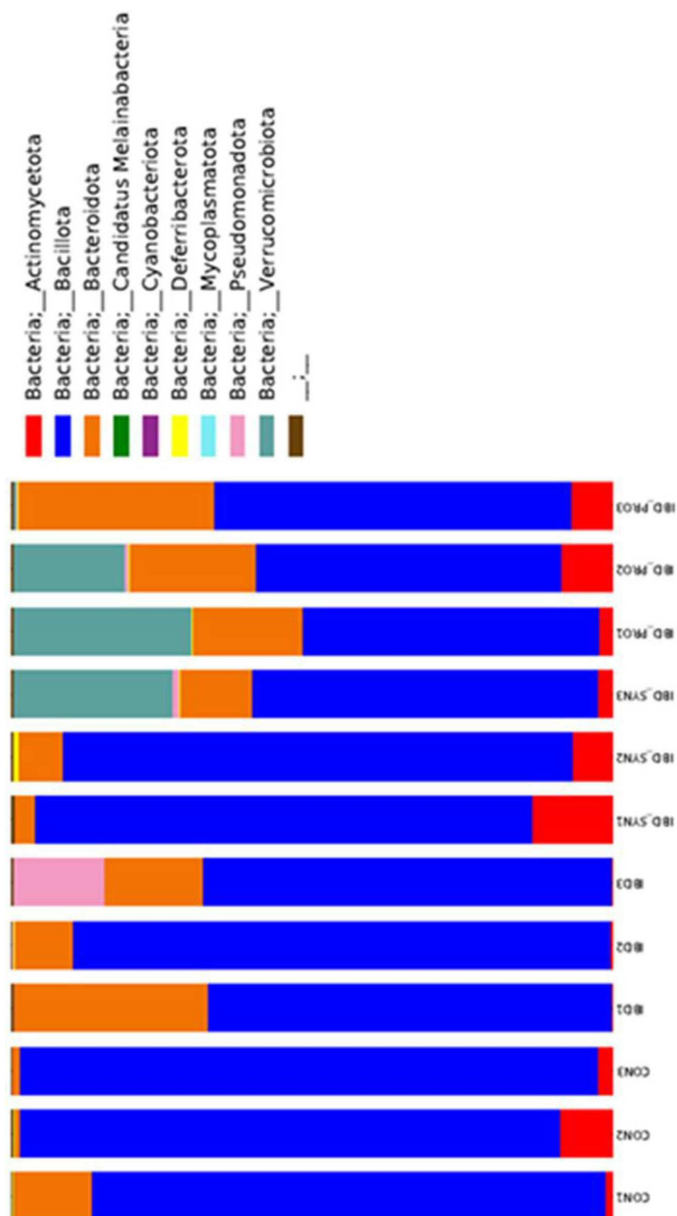
도면11



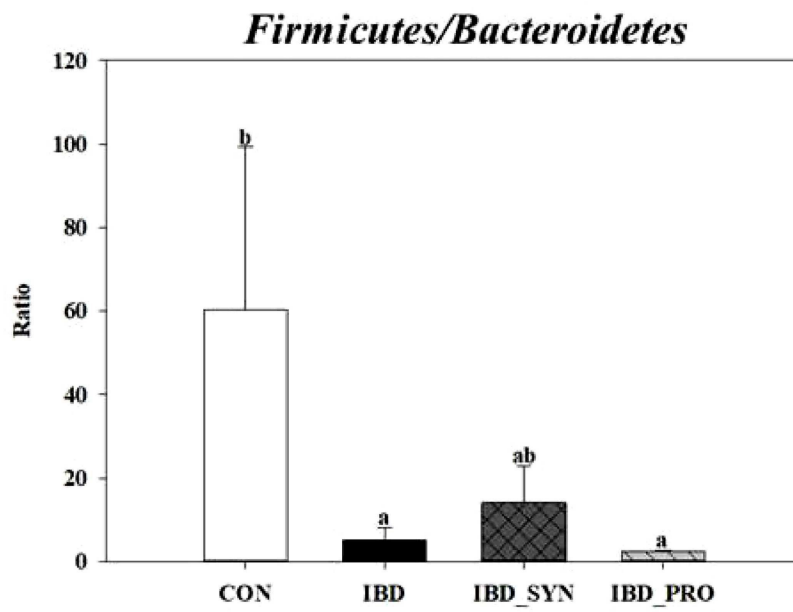
도면12



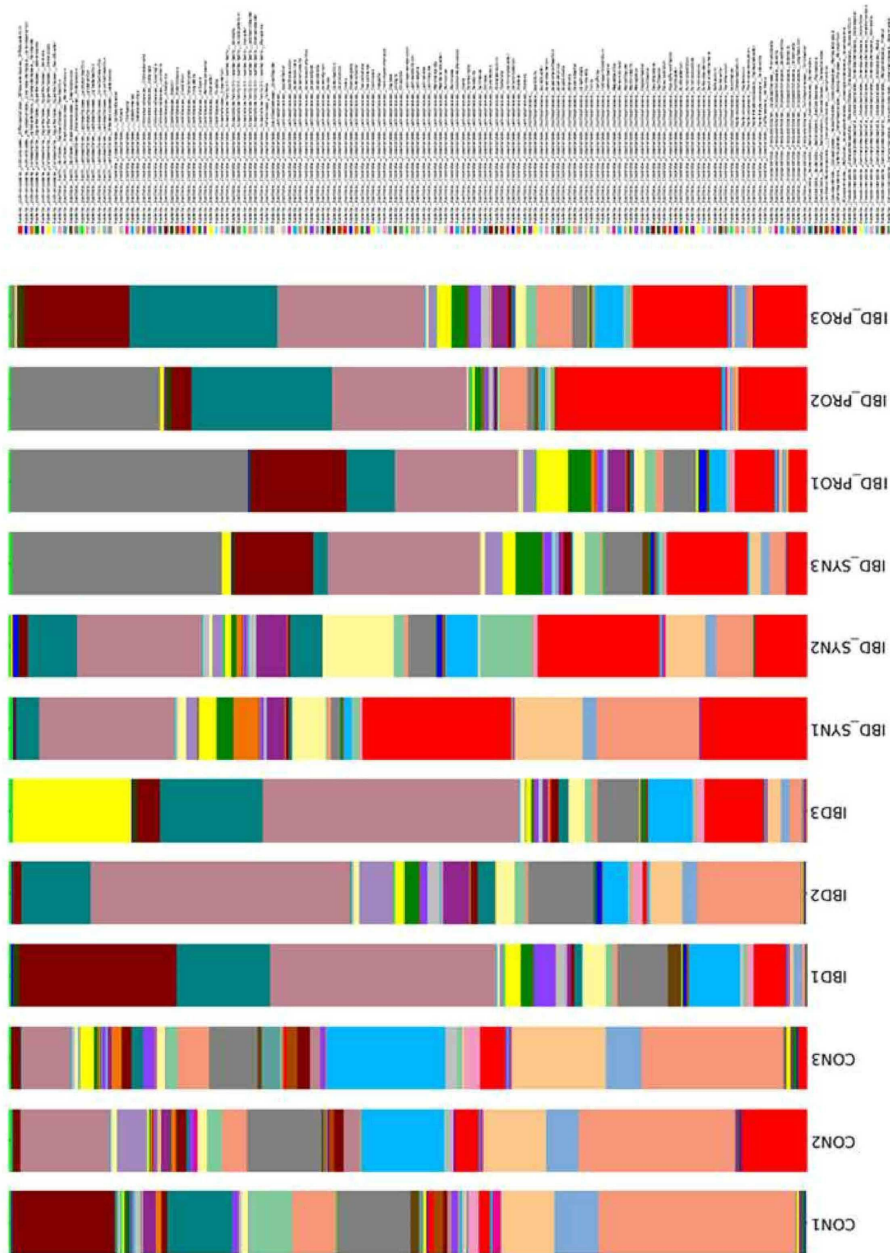
도면13a



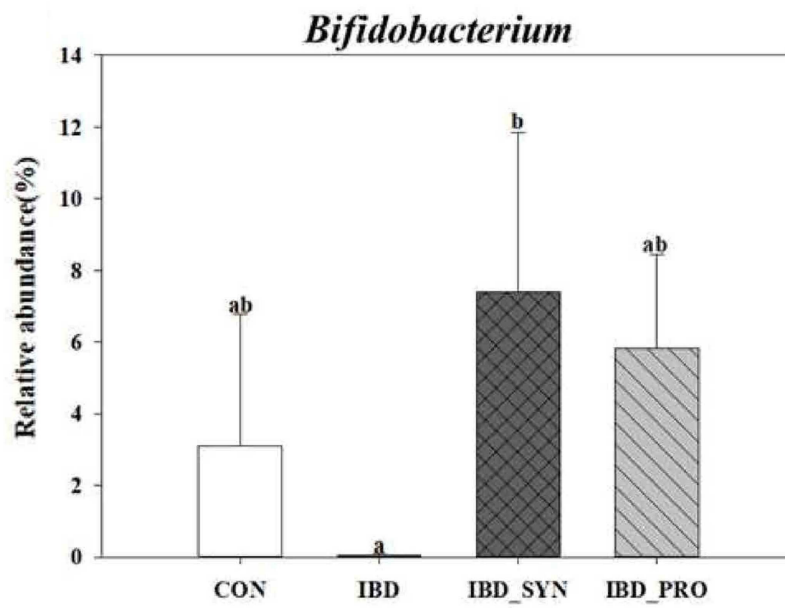
도면13b



도면14a



도면14b



도면14c

