

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0032815 (43) 공개일자 2017년03월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) A61K 35/745 (2014.01) A61K 35/747 (2014.01) C12R 1/225 (2006.01)		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(52) CPC특허분류 C12N 1/20 (2013.01) A23L 33/135 (2016.08)		(72) 발명자 김동현 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동) 한명주 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
(21) 출원번호 10-2016-0001312 (22) 출원일자 2016년01월06일 심사청구일자 2016년01월06일		(74) 대리인 고영갑, 이성원, 권정기, 임상엽
(30) 우선권주장 1020150130124 2015년09월15일 대한민국(KR)		

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **신규 유산균 및 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 김치에서 분리되어 안전성이 높고 신경변성 유발 물질의 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성, 항산화 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성 등과 같은 다양한 생리활성을 갖는 신규 유산균 및 이의 용도를 제공한다. 본 발명에 따른 신규 유산균은 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료를 위한 기능성 식의약 소재로 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 35/745 (2013.01)

A61K 35/747 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23Y 2220/43 (2013.01)

C12R 1/225 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)로서, 신경변성 유발 물질의 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성, 항산화 활성, 지질 다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성을 갖는 유산균.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32(수탁번호 : KCCM 11763P)인 것을 특징으로 하는 유산균.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)는 탄소원으로 D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, N-아세틸-글루코스아민(N-acetyl-glucosamine), 말토스, 락토스, 수크로스(Sucrose) 또는 겐티오바이오스(Gentiobiose)를 이용하는 것을 특징으로 하는 유산균.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)는 김치에서 분리되고, 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균인 것을 특징으로 하는 유산균.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방 또는 치료하기 위한 용도의 약학 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease) 또는 치매인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 치매는 노인성 치매, 혈관성 치매(Vascular dementia), 루이체 치매(Lewy body dementia), 전측두엽 치매, 파킨슨병(Parkinson's disease)형 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)형 치매, 헌팅턴병(Huntington's disease)형 치매, 크루츠펬트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease)형 치매 및 픽스병(Pick's disease)형 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매 및 두부 외상으로 인한 치매로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease) 또는 치매인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 치매는 노인성 치매, 혈관성 치매(Vascular dementia), 루이체 치매(Lewy body dementia), 전측두엽 치매, 파킨슨병(Parkinson's disease)형 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)형 치매, 헌팅턴병(Huntington's disease)형 치매, 크루츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease)형 치매 및 픽스 병(Pick's disease)형 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매 및 두부 외상으로 인한 치매로 이루어진 군에서 선택 되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

기억력 또는 학습능력 증진을 위한 용도의 식품 조성물.

청구항 12

팔 발효물 또는 상기 팔 발효물의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

상기 팔 발효물은 팔을 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 유산균으로 발효시킨 산물인 것을 특징으로 하는,

퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방 또는 치료하기 위한 용도의 약학 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease) 또는 치매인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 치매는 노인성 치매, 혈관성 치매(Vascular dementia), 루이체 치매(Lewy body dementia), 전측두엽 치매, 파킨슨병(Parkinson's disease)형 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)형 치매, 헌팅턴병(Huntington's disease)형 치매, 크루츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease)형 치매 및 픽스 병(Pick's disease)형 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매 및 두부 외상으로 인한 치매로 이루어진 군에서 선택 되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 15

팔 발효물 또는 상기 팔 발효물의 추출물을 유효성분으로 포함하고,
상기 팔 발효물은 팔을 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 유산균으로 발효시킨 산물인 것을 특징으로 하는,
퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease) 또는 치매인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 치매는 노인성 치매, 혈관성 치매(Vascular dementia), 루이체 치매(Lewy body dementia), 전측두엽 치매, 파킨슨병(Parkinson's disease)형 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)형 치매, 헌팅턴병(Huntington's disease)형 치매, 크루츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease)형 치매 및 픽스 병(Pick's disease)형 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매 및 두부 외상으로 인한 치매로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 18

팔 발효물 또는 상기 팔 발효물의 추출물을 유효성분으로 포함하고,
상기 팔 발효물은 팔을 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 유산균으로 발효시킨 산물인 것을 특징으로 하는,
기억력 또는 학습능력 증진을 위한 용도의 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 유산균 및 이의 용도 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 김치에서 분리되고, 신경변성 유발 물질의 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성, 항산화 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성 등과 같은 다양한 생리활성을 가진 신규 유산균 및 이의 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료 등과 같은 식의약적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 고령화 사회의 도래와 함께, 알츠하이머병, 파킨슨병, 치매 등과 같은 퇴행성 뇌질환을 가진 환자가 급격하게 증가하고 있다. 알츠하이머병은 치매를 일으키는 가장 흔한 퇴행성 뇌질환으로 서서히 발병하여 기억력을 포함한 인지기능의 악화가 점진적으로 진행되는 병이다. 알츠하이머병은 아직까지 발병 원인이 정확하게 밝혀지지 않았지만 노화와 밀접한 관계가 있고, 노인 인구가 증가함에 따라가 증가하고 있다. 파킨슨병은 도파민 신경세포의 소실로 인해 발생하는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환으로서 근육 경련, 운동완만(운동느림) 및 자세 불안정성 등과 같은 증상이 나타난다. 알츠하이머병 환자들은 언어 장애, 실행 불능 등과 같은 치매 증상을 보이지만 파킨슨병 환자들은 집중력 저하, 시각/공간 판단력 저하, 실행 장애, 생각하는 속도의 느려짐 등과 같은 치매 증상을 보인다. 치매는 정상적으로 생활해오던 사람이 다양한 원인에 의해 뇌기능이 손상되면서 이전에 비해 인지 기능이 지속적으로 저하되어 일상생활에 상당한 지장이 나타나고 있는 상태이다. 여기서 인지 기능이란 기억력, 언어 능력, 시공간 파악 능력, 판단력 및 추상적 사고력 등 다양한 지적 능력을 가르키는 것으로 각 인지기능은 특정 뇌 부위와 밀접한 관련이 있다. 치매의 약 50% 정도는 알츠하이머병형 치매, 20-30%는 혈관성 치매이고, 그 외에도 알코올성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 퇴행, 파킨슨병 치매 등이 있다. 최근에는 치매 등과 같은 다양한 퇴행성 뇌질환이 장 누수 증후군 또는 장내세균총의 교란과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 장 누수 증후군(Intestinal Permeability Syndrome)과 치매

[0005] 우리 몸의 소화관은 점액질과 용모로 구성되어 있어서, 영양성분을 효율적으로 흡수하면서도 분자량이 큰 병원 미생물이나 이들이 생산하는 독소들이 흡수되지 못하도록 관리한다. 또한, 우리 몸은 분자량이 큰 외부항원들이 체내로 침입하면 이를 방어할 수 있는 면역체계를 갖추고 있다. 그러나, 많은 병원미생물 또는 독소의 감염, 과다한 스트레스, 소화관 서식 유해세균을 증식시킬 수 있는 고지방식과 같은 음식물 섭취, 과다한 알코올 섭취, 약물(예를 들어, 항생물질) 남용 등에 의해 장내세균총이 교란되고 소화관의 면역체계에 이상이 발생하며, 밀착 연결단백질(tight junction proteins)의 발현이 억제된다. 밀착연접단백질(tight junction proteins)의 발현이 억제되는 경우 장점막의 치밀도 결합이 느슨해지고, 이 느슨해진 틈과 면역체계의 이상으로 병원미생물 등과 같은 거대분자의 체내 침입이 쉬워진다. 장 누수 증후군(Intestinal Permeability Syndrome)은 새는 장 증후군(Leaky Gut Syndrome)이라고 하며, 위장관을 구성하는 상피세포의 밀착연접 방어체계가 원활히 작동되지 않아 소화가 덜된 음식물, 병원미생물, 독소 등과 같이 외부 물질이 혈액으로 계속 유입되는 상태를 말한다. 장 누수 증후군이 생기면 일반적으로 체내로 흡수되지않는 외부항원들이 체내로 들어오기 때문에 췌장성 대장염, 크론병, 간장해, 간기능 장애, 알러지 질환(천식 포함), 아토피, 자가면역질환, 지방변증, 소화흡수 장애, 여드름, 노화 촉진, 내독소혈증, 장 감염, 습진, 과민성장증후군, 만성피로증후군, 건선, 류머티스 관절염, 췌장기능 부전, 염증성 관절 질환 등이 발생한다. 최근에는 장 누수 증후군이 파킨슨병, 노화에 의한 치매와도 관련이 있음이 보고되고 있다.

[0007] 장내세균총의 교란과 치매

[0008] 우리 몸의 소화관에는 많은 세균들이 서식하고 있다. 우리 몸에는 정상세포가 약 10조 개가 있는 반면, 세균의 수는 그보다 10배쯤 더 많은 100조 개 정도이다. 그리고 이 세균들은 우리 장의 건강에 도움을 주는 유익균과 건강에 해로운 유해균으로 나눌 수 있다. 우리 몸은 락토바실러스(*Lactobacillus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 류코노스톡(*Leuconostoc*), 페디오코쿠스(*Pediococcus*), 스포로락토바실러스(*Sporolactobacillus*) 등과 같은 유익균이 유해균보다 우세균으로 소화관에 서식하고 있을 때 건강을 유지할 수 있다. 그렇지 않으며, 비만, 장 누수 증후군, 간질환, 노화촉진, 장염, 노화 촉진, 치매 등과 같은 질환을 유발할 수 있다. 특히, 파킨슨병, 알츠하이머병이 발생하면 장내세균총에 유해한 미생물(예들 들어, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* 등)이 증가하고, 유해 미생물이 증가하면 장관세포에서 알파시누클레인(α -synuclein)이 과다 발현되고 NF- κ B가 활성화되어 파킨슨병, 알츠하이머병의 진행이 빨라지고 치매를 동반할 가능성이 훨씬 높아지는 것으로 알려져 있다.

[0010] 사람을 포함한 동물의 위장관 내에서 숙주의 장내 미생물 환경을 개선하여 숙주의 건강에 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물을 통칭하여 프로바이오틱스(probiotics)라고 한다. 프로바이오틱스로서 효과가 있기 위해서는 경구로 섭취될 때, 대부분이 소장에도달해서 장 표면에 부착되어야 하므로, 기본적으로 내산성, 내담즙성 및 장 상피세포 부착능력이 우수하여야 한다. 유산균은 인체의 소화계에 공생하면서 섬유질 및 복합 단백질을 분해하여 중요한 영양성분으로 만드는 역할을 담당하기 때문에 프로바이오틱스로 사용된다. 유산균은 장내 정상균총의 유지, 장내 균총의 개선, 항당뇨 및 항고지혈증 효과, 발암 억제, 대장염 억제, 그리고 숙주의 면역체계의 비특이적 활성화 등의 효과를 나타낸다고 보고되고 있다. 그 중에서도 락토바실러스 속 균주는 인체의 장내에 서식하는 정상 미생물 군집의 주요 구성원으로서, 건강한 소화기관과 질 내 환경을 유지하는 데 있어서 중요한 것으로 오래전부터 알려져 왔고 미국의 공중건강 가이드라인(U.S. Public Health Service guidelines)에 의하면, 현재 미국 균주 기탁기관(ATCC)에 기탁된 락토바실러스 균주 모두 인체나 동물에 질병을 유발할 잠재적 위험에 대해서는 알려진 것이 없다고 인정되는 '안전수준(Bio-safety Level) 1'로 분류되어 있다. 한편, 김치 유산균은 김치 발효에 관여하는 유산균으로서 면역증강, 항 미생물, 항산화, 항암 효과, 항비만 효과, 고혈압 예방 또는 변비 예방 효과 등이 있는 것으로 보고되고 있다[Hivak P, Odrska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z. : One-year application of Probiotic strain *Enterococcus facium* M-74 decreases Serum cholesterol levels. : Bratisl lek Listy 2005; 106(2); 67-72; Agerholm-Larsen L, Bell ML, Grunwald GK, Astrup A. : The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol : a metaanalysis of short-term intervention studies ; Eur J Clin Nutr. 2000; 54(11) 856-860; Renato Sousa, Jaroslava Helper, Jian Zhang, Strephen J Lewis and Wani O Li ; Effect of *Lactobacillus acidophilus* supernants on body

weight and leptin expression in rats ; BMC complementary and alternative medicine. 2008; 8(5)1-8].

[0011] 이러한 유산균의 다양한 생리활성이 알려지면서, 최근 인체에 안전하면서도 기능이 우수한 유산균 균주 등을 개발하고 이를 의약품 또는 기능성 식품의 소재로 적용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 예를 들어, 대한민국 등록특허공보 10-1476236호에는 락토바실러스 펜토시스 변종 플란타룸 C29 KCCM11291P 균주를 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1087972호에는 (a) 밀크 포함 배지에 락토바실러스 속 유산균, 엔테로코커스 속 유산균 및 비피도박테리움 속 유산균으로 이루어진 군에서 선택된 유산균을 접종, 배양하여 발효시키는 단계; (b) 상기 발효물에서 유산균을 제거하는 단계; 및 (c) 유산균이 제거된 발효물을 아세트, 탄소수 1 내지 6의 알코올로 이루어진 군에서 선택된 용매를 가하여 활성성분을 침전, 분리하는 단계를 포함하는 치매 예방 및 치료 효과를 가지는 유산균 발효물의 제조 방법이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1424547호에는 십전대보탕의 락토바실러스 퍼멘텀 KFR164(*Lactobacillus fermentum* KFR164) 유산균 발효물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2015-0047687호에는 원지, 백복령 및 석창포를 열수추출한 식물추출물 100 중량%에 대하여 0.1 내지 10 중량% 글루코즈(glucose) 및 0.1 내지 5 중량% 효모추출물(yeast extract)을 첨가하고, 배양된 락토바실러스 플랜타룸(*Lactobacillus plantarum*)를 접종하여 발효시킨 발효 식물 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 또는 건망증 예방 또는 개선용 조성물이 개시되어 있다. 그러나, 선행기술에 개시된 유산균 또는 유산균에 의해 발효된 산물들은 치매 등과 같은 퇴행성 뇌질환의 치료 효과가 높지 않아 상업적으로 적용하는데에 한계가 있다. 따라서, 또한, 뇌질환의 치료 효과가 상업적인 치료제와 비슷하고 장내세균총의 교란, 장 누수 증후군을 개선할 수 있는 유산균의 스크리닝 및 이를 통한 의약품, 기능성 식품 등의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 이러한 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 프로바이오틱스로서 요구되는 다양한 생리활성 또는 기능성을 가진 신규 유산균을 제공하는데에 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 목적은 신규 유산균 또는 이의 발효 산물을 포함하고, 퇴행성 뇌질환 등의 개선, 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있는 조성물을 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)로서, 신경변성 유발 물질의 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성, 항산화 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성을 갖는 유산균을 제공한다.

[0015] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하고 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)에 해당하는 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방 또는 치료하기 위한 용도의 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하고 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)에 해당하는 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하고 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)에 해당하는 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 기억력 또는 학습능력 증진을 위한 용도의 식품 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 다른 예는 팔 발효물 또는 상기 팔 발효물의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방 또는 치료하기 위한 용도의 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 다른 예는 팔 발효물 또는 상기 팔 발효물의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 다른 예는 팔 발효물 또는 상기 팔 발효물의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 기억력 또는 학습능력 증진을 위한 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 다른 예에 따른 조성물에서 상기 팔 발효물은 팔을 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된

염기서열을 포함하고 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)에 해당하는 유산균으로 발효시킨 산물이다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주는 김치에서 분리되어 안전성이 높고 신경변성 유발 물질의 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성, 항산화 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 베타-글루루코니다제(β -glucuronidase) 저해 활성 등과 같은 다양한 생리활성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주는 장 누수 개선이라는 1차적인 효과 및 학습 능력 증진 또는 기억력 증진이라는 2차적인 효과의 조화를 통해 다양한 질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 의약품 또는 건강기능식품 소재로 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0019] 본 발명에서 사용되는 용어 "인지기능 장애"는 기억 처리, 지각 또는 문제해결과 같은 인지기능을 정상적으로 발휘하지 못하는 증상이나 질환을 의미하며, 구체적으로 작업 기억, 주의력 및 경계(vigilance), 언어 학습 및 기억, 시각 학습 및 기억, 추론(reasoning) 및 문제해결 예컨대 실행 기능, 처리속도 또는 사회 인지의 저하가 포함된다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 용어 "뇌질환"은 뇌신경 세포가 파괴됨으로써 뇌에 발생하는 모든 질환들을 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "배양물"이란 미생물을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하여, 미생물이 포함되는 개념이다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "발효물"은 발효 대상인 원료를 소정의 미생물로 발효시켜 수득한 산물을 의미하며, 미생물이 포함되는 개념이다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "유산균 등"은 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 지칭한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "팔 발효물 등"은 팔 발효물 또는 상기 팔 발효물의 추출물을 지칭한다.
- [0025] 본 발명에서 "약학적으로 허용가능한" 및 "식품학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0032] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0033] 본 발명의 일 측면은 다양한 생리활성을 갖는 신규 유산균에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 유산균은 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)로서, 신

경변성 유발 물질의 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성, 항산화 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성을 갖는다. 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)는 김치에서 분리된 혐기성 간균으로서, 그람 염색시 양성을 나타내고, 넓은 온도 범위, 낮은 pH 환경에서 생존할 수 있으며, 글루코시다제를 생산한다. 또한, 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)는 탄소원으로 D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 말토스, 락토스, 수크로스(Sucrose), 젠티오바이오스(Gentiobiose) 등을 이용한다. 또한, 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)는 바람직하게는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32(수탁번호 : KCCM 11763P)이다.

[0035] 본 발명의 일 측면은 특정 유산균 등을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 조성물은 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하고 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)에 해당하는 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함한다. 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)는 김치에서 분리된 혐기성 간균으로서, 그람 염색시 양성을 나타내고, 넓은 온도 범위, 낮은 pH 환경에서 생존할 수 있으며, 글루코시다제를 생산한다. 또한, 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)는 탄소원으로 D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 말토스, 락토스, 수크로스(Sucrose), 젠티오바이오스(Gentiobiose) 등을 이용한다. 또한, 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)는 바람직하게는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32(수탁번호 : KCCM 11763P)이다.

[0036] 본 발명에서 유산균의 배양물은 소정의 균주 또는 혼합 균주를 배지에서 배양시켜 수득한 산물로서, 상기 배지는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 MRS 액체 배지, MRS 한천 배지, BL 한천 배지일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 예에 따른 조성물은 유효성분인 유산균 등이 신경변성 유발 물질의 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성, 항산화 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성 등과 같은 다양한 생리활성을 갖기 때문에 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도로 사용될 수 있다. 상기 퇴행성 뇌질환은 구체적으로 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease) 또는 치매일 수 있다. 또한, 상기 치매는 노인성 치매, 혈관성 치매(Vascular dementia), 루이체 치매(Lewy body dementia), 전측두엽 치매, 파킨슨병(Parkinson's disease)형 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)형 치매, 헌팅턴병(Huntington's disease)형 치매, 크루츠펬트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease)형 치매 및 픽스병(Pick's disease)형 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매 및 두부 외상으로 인한 치매로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 조성물은 기억력 또는 학습능력 증진을 위한 용도로도 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 측면은 유산균에 의해 발효된 산물 등을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 다른 예에 따른 조성물은 팔 발효물 또는 상기 팔 발효물의 추출물을 유효성분으로 포함한다. 본 발명의 다른 예에 따른 조성물에서 상기 팔 발효물은 팔을 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하고 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)에 해당하는 유산균으로 발효시킨 산물이다. 본 발명의 다른 예에 따른 조성물에서 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)의 기술적 특징은 전술한 바와 동일하므로 설명을 생략한다.

[0040] 본 발명의 다른 예에 따른 조성물의 유효성분인 팔 발효물은 팔 발효에 의해 생성되는 2차 대사산물과 팔 발효시 사용되는 유산균이 모두 포함하고 있기 때문에 유산균보다 높은 생리활성을 가지며 기능성 식의약적 소재 측면에서 보다 유용하다. 본 발명의 다른 예에 따른 조성물은 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애를 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도로 사용될 수 있다. 상기 퇴행성 뇌질환은 구체적으로 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease) 또는 치매일 수 있다. 또한, 상기 치매는 노인성 치매, 혈관성 치매(Vascular dementia), 루이체 치매(Lewy body dementia), 전측두엽 치매, 파킨슨병(Parkinson's disease)형 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)형 치매, 헌팅턴병(Huntington's disease)형 치매, 크루츠펬트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease)형 치매 및 픽스병(Pick's disease)형 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매 및 두부 외상으로 인한 치매로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의

다른 예에 따른 조성물은 기억력 또는 학습능력 증진을 위한 용도로도 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명에서 상기 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 첨가제, 식품 조성물(특히 기능성 식품 조성물) 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있다. 또한, 유효성분인 유산균 등 또는 팔 발효물 등의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분인 유산균 등 또는 팔 발효물 등의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~99 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 유산균 등 또는 팔 발효물 등 외에 퇴행성 뇌질환 또는 인지기능 장애의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이라면 크게 제한되지 않으며, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으나 바람직하게는 유효성분을 기준으로 할 때 0.1 내지 3000 mg/kg이고, 더 바람직하게는 1 내지 2000 mg/kg이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명에 따른 식품 조성물에서 유효성분인 유산균 등 또는 팔 발효물 등의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~99 중량%, 바람직하게는 0.1~50 중량%, 더 바람직하게는 0.5~25 중량%이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 식품 조성물은 유효성분 외에 식품학적으로 허용 가능한 담체, 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분들은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로 텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명

확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

1. 유산균의 분리 및 동정

(1) 김치로부터 유산균의 분리

배추 김치, 무 김치 및 파김치를 각각 파쇄하고, 파쇄액을 MRS 액체 배지(MRS Broth; Difco, USA)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 MRS 한천 배지(MRS agar medium; Difco, USA)에 이식하고 37℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

(2) 사람 분변으로부터 유산균의 분리

사람 분변을 GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 BL 한천 배지(BL agar medium; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 이식하고 37℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 비피도박테리움속(*Bifidobacterium* sp.) 균주들을 분리하였다.

(3) 선별한 유산균의 동정

김치 또는 사람 분변으로부터 분리한 균주들의 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석하여 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다. 하기 표 1은 배추 김치, 무 김치, 파 김치 및 사람 분변에서 분리된 유산균의 관리번호 및 균주명을 나타낸 것이다.

표 1

관 리 번호	균주명	관 리 번호	균주명
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH1	31	<i>Lactobacillus sakei</i> CH31
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH2	32	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	33	<i>Lactobacillus sakei</i> CH33
4	<i>Lactobacillus brevis</i> CH4	34	<i>Lactobacillus sakei</i> CH34
5	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH5	35	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH35
6	<i>Lactobacillus brevis</i> CH6	36	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CH36
7	<i>Lactobacillus casei</i> CH7	37	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH37
8	<i>Lactobacillus planantrum</i> CH8	38	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38
9	<i>Lactobacillus sakei</i> CH9	39	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH39
10	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH10	40	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH40
11	<i>Lactobacillus sakei</i> CH11	41	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41
12	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH12	42	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH42
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH13	43	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH43
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH14	44	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH44
15	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH15	45	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH45
16	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH16	46	<i>Bifidobacterium breve</i> CH46
17	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH17	47	<i>Bifidobacterium breve</i> CH47
18	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH18	48	<i>Bifidobacterium breve</i> CH48
19	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH19	49	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH49
20	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH20	50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH50
21	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	51	<i>Bifidobacterium dentium</i> CH51
22	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH22	52	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH52
23	<i>Lactobacillus brevis</i> CH23	53	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH53
24	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH24	54	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH54
25	<i>Lactobacillus kimchi</i> CH25	55	<i>Bifidobacterium longum</i> CH55
26	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH26	56	<i>Bifidobacterium longum</i> CH56
27	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH27	57	<i>Bifidobacterium longum</i> CH57
28	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH28	58	<i>Bifidobacterium longum</i> CH58
29	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH29	59	<i>Bifidobacterium longum</i> CH59

30	<i>Lactobacillus reuteri</i> CH30	60	<i>Bifidobacterium longum</i> CH60
----	-----------------------------------	----	------------------------------------

[0057] 상기 표 1에 기재된 균주들 중 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23은 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 포자를 형성하지 않고 호기적 조건에서도 생존성을 보였다. 또한, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23은 10~42℃에서 생존하였고, pH 2에서 2시간 동안 안정한 내산성 균주였다. 또한, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23은 2% 염화나트륨 용액에서도 생존하였고, 글루코시다제(glucosidase)를 활발하게 생산하였다. 또한, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 화학분류학적 특성으로 16S rDNA를 측정하였고, 그 결과 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 16S rDNA 염기서열을 Genebank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 균주는 검색되지 않았고, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 균주 FJ004의 16S rDNA 부분 서열과 99%의 상동성을 보였다.

[0058] 상기 표 1에 기재된 균주들 중 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32는 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 포자를 형성하지 않고 호기적 조건에서도 생존성을 보였다. 또한, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32는 10℃에서 45℃까지 안정적으로 생존하였고, pH 2에서 2시간 동안 안정한 내산성 균주였다. 또한, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32는 글루코시다제(glucosidase)를 활발하게 생산하였으나, 베타-글루루로니다제(β -glucuronidase)는 생산하지 않았다. 또한, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32의 화학분류학적 특성으로 16S rDNA를 측정하였고, 그 결과 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32의 16S rDNA 염기서열을 Genebank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) 균주는 검색되지 않았고, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) 균주 JCM 2012의 16S rDNA 부분 서열과 99%의 상동성을 보였다.

[0059] 상기 표 1에 기재된 균주들 중 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 포자를 형성하지 않고 호기적 조건에서 생존성이 매우 낮았다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 열에 불안정하였다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 글루코시다제(glucosidase)를 활발하게 생산하였으나, 베타-글루루로니다제(β -glucuronidase)는 생산하지 않았다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57의 화학분류학적 특성으로 16S rDNA를 측정하였고, 그 결과 서열번호 3의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57의 16S rDNA 염기서열을 Genebank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주는 검색되지 않았고, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주 CBT-6의 16S rDNA 부분 서열과 99%의 상동성을 보였다.

[0060] 또한, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API Kit(모델명 : API 50 CHL; 제조사 : BioMerieux's, USA)에 의한 당 발효 시험으로 분석하였다. 하기 표 2는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이고, 하기 표 3은 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이고, 하기 표 4는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이다. 하기 표 2, 표 3 및 표 4에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타내고, "±"는 탄소원 이용성 여부가 모호한 경우를 나타낸다. 하기 표 2, 표 3 및 표 4에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 일부 탄소원에 대해서 동일 종의 균주와 다른 이용성을 보였다.

표 2

탄소원	균주명		탄소원	균주명	
	<i>L. brevis</i> ¹⁾	<i>L. brevis</i> CH23		<i>L. brevis</i> ¹⁾	<i>L. brevis</i> CH23
glycerol	-	-	salicin	+	+
erythritol	-	-	cellobiose	+	-
D-arabinose	-	-	maltose	+	+

L-arabinose	+	-	lactose	+	-
D-ribose	+	+	melibiose	-	+
D-xylose	+	+	sucrose	+	-
L-xylose	-	-	trehalose	+	-
D-adonitol	-	-	inulin	+	-
methyl- β-D-xylopyranoside	-	-	melezitose	+	-
D-galactose	+	-	raffinose	-	-
D-glucose	+	+	starch	-	-
D-fructose	+	+	glycogen	-	-
D-mannose	+	-	xylitol	-	-
L-sorbose	-	-	gentiobiose	+	-
L-rhamnose	-	-	D-turanose	+	-
dulcitol	+	-	D-lyxose	-	-
inositol	-	-	D-tagatose	+	-
mannitol	+	-	D-fucose	-	-
sorbitol	+	-	L-fucose	-	-
α-methyl-D-mannoside	-	-	D-arabitol	-	-
α-methyl-D-glucoside	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetyl-glucosamine	+	±	glucoNaTe	+	±
amygdalin	+	-	2-keto-gluconate	-	-
arbutin	+	-	5-keto-gluconate	-	+
esculin	+	+			

- [0062] 1) Suriasih K., Aryanta WR, MahardikaG, Astawa NM. Microbiological and Chemical Properties of Kefir Made of Bali Cattle Milk. Food Science and Quality Management 2012;6:112-22.

표 3

[0063]

탄소원	균주명		탄소원	균주명	
	<i>L. johnsonii</i> ²⁾	<i>L. johnsonii</i> CH32		<i>L. johnsonii</i> ²⁾	<i>L. johnsonii</i> CH32
glycerol	-	-	salicin	-	-
erythritol	-	-	cellobiose	+	-
D-arabinose	-	-	maltose	-	+
L-arabinose	-	-	lactose	-	+
D-ribose	-	-	melibiose	+	-
D-xylose	-	-	sucrose	+	+
L-xylose	-	-	trehalose	+	-
D-adonitol	-	-	inulin	-	-
methyl- β-D-xylopyranoside	-	-	melezitose	-	-
D-galactose	-	-	raffinose	+	-
D-glucose	-	+	starch	-	-
D-fructose	-	+	glycogen	-	-
D-mannose	+	+	xylitol	-	-
L-sorbose	-	-	gentiobiose	-	+
L-rhamnose	-	-	D-turanose	-	-
dulcitol	-	-	D-lyxose	-	-
inositol	-	-	D-tagatose	-	-
mannitol	-	-	D-fucose	-	-
sorbitol	-	-	L-fucose	-	-
α-methyl-D-mannoside	-	-	D-arabitol	-	-
α-methyl-D-glucoside	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetyl-glucosamine	+	+	glucoNaTe	-	-
amygdalin	-	-	2-keto-gluconate	-	-
arbutin	-	-	5-keto-gluconate	-	-

esculin	-	-			
---------	---	---	--	--	--

[0064]

2) Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 24;101(8):2512-7

표 4

[0066]

탄소원	균주명		탄소원	균주명	
	<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57		<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57
glycerol	±	-	salicin	±	-
erythritol	-	-	cellobiose	±	±
D-arabinose	-	-	maltose	-	-
L-arabinose	-	-	lactose	-	-
D-ribose	±	-	melibiose	-	-
D-xylose	-	-	sucrose	+	±
L-xylose	-	-	trehalose	±	-
D-adonitol	-	-	inulin	-	-
methyl-β-D-xylopyranoside	-	-	melezitose	-	-
D-galactose	+	+	raffinose	-	-
D-glucose	+	+	starch	-	-
D-fructose	+	+	glycogen	-	-
D-mannose	-	-	xylitol	-	-
L-sorbose	-	-	gentiobiose	-	-
L-rhamnose	-	-	D-turanose	-	-
dulcitol	-	-	D-lyxose	-	-
inositol	-	-	D-tagatose	-	-
mannitol	+	-	D-fucose	-	-
sorbitol	-	-	L-fucose	-	-
α-methyl-D-mannoside	-	-	D-arabitol	-	-
α-methyl-D-glucoside	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetyl-glucosamine	±	-	glucoNaTe	±	-
amygdalin	-	-	2-keto-gluconate	-	-
arbutin	±	-	5-keto-gluconate	-	-
esculin	-	-			

[0067]

3) Lukacova D, Karovucova J, Greifova M, Greif G, Sovcikova A, Kohhajdova Z. In vitro testing of selected probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Food and Nutrition Research* 2006; 45: 77-83.

[0069]

(4) 유산균의 수탁 정보

[0070]

본 발명의 발명자들은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 2015년 9월 1일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11762P의 수탁번호를 부여받았다. 또한, 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32를 2015년 9월 1일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11763P의 수탁번호를 부여받았다. 또한, 본 발명의 발명자들은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57을 2015년 9월 1일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11764P의 수탁번호를 부여받았다.

[0072] **2. 유산균의 장 손상 또는 장 누수 개선 효능 평가**

[0073] 김치 또는 사람 분변으로부터 분리한 유산균의 장 손상 또는 장 누수 개선 효능을 평가하기 위하여 유산균의 항산화 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성, 장내 유해 효소인 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성 및 신경변성 유발 물질의 억제 활성을 측정하였다.

[0074] (1) 실험방법

[0075] * 항산화 활성

[0076] DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 에탄올에 0.2 mM 농도가 되도록 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 상기 DPPH 용액 0.1 ml에 유산균 현탁액(1×10^8 CFU/ml) 또는 비타민 C 용액(1 g/ml)을 넣고 20분간 37°C에서 배양하였다. 배양액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 517 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하고, 유산균의 항산화 활성을 계산하였다.

[0078] * 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성

[0079] 노인으로부터 대장균(*Escherichia coli*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*)과 같은 병원균을 분리하고 배양하였다. 이후, 멸균 일반혐기성배지(GAM 배지, 일본 Nissui 제약) 10 ml에 병원균(각각 1×10^5 CFU) 및 유산균(1×10^5 CFU)을 이식하고 24시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 이후, 배양액을 약 1시간 동안 초음파로 처리하여 균의 세포 외막을 파괴하고, 5000×g의 조건으로 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 상등액에 존재하는 대표적인 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)의 함량을 LAL(Limulus Amoebocyte Lysate) assay kit(제조사 : Cape Cod Inc., USA)로 측정하였다. 또한, 유산균의 대장균 증식 억제 활성을 평가하기 위해 동일한 실험을 통해 얻은 배양액을 천배 및 십만배로 희석하고, DHL 배지에 배양한 후 대장균, 크렙시엘라 뉴모니아 및 프로테우스 미라빌리스의 수를 각각 측정하였다.

[0081] * 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성

[0082] 0.1 mM 농도의 p-니트로페닐- β -D-글루쿠로나이드(p-nitrophenyl- β -D-glucuronide) 용액 0.1 ml, 50 mM 농도의 인산완충용액 0.2 ml 및 유산균 현탁액(유산균 배양액 5 ml를 집균한 후, 생리식염수 5 ml에 현탁하여 제조함) 0.1 ml를 반응기에 넣고 15분간 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 효소반응을 진행하고, 0.1 mM 농도의 NaOH 용액 0.5 ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 이후, 반응액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 405 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다.

[0084] * 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성

[0085] 한국 세포주 은행에서 분양받은 Caco2 세포를 RPMI 1640 배지에서 48시간 동안 배양한 후, Caco2 세포 배양액을 12-well 플레이트에 웰 당 2×10^6 세포수가 되도록 분주하였다. 이후, 각 웰에 LPS(lipopolysaccharide) 1 μ g을 단독으로 처리하거나 LPS(lipopolysaccharide) 1 μ g과 유산균(1×10^4 CFU/ml)을 같이 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰로부터 배양된 세포들을 긁어 모으고 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 밀착연접단백질(tight junction protein) ZO-1의 발현량을 측정하였다.

[0087] * 신경변성 유발 물질의 억제 활성

[0088] 한국 세포주 은행에서 분양받은 SH-SY5Y 세포를 10% FBS 및 1% 항생제가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하고, 12-well 플레이트에 웰 당 2×10^6 세포수가 되도록 분주하였다. 이후, 각 웰에 유산균(1×10^4 CFU/ml)과 함께 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*)로부터 분리한 LPS(lipopolysaccharide)를 0.2 mg/ml의 농도로 첨가하고 배양한 후, NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 활성화 억제 수준 및

알파-시누클레인(α -synuclein)의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. NF- κ B는 염증 반응에 의한 조직의 손상과 알츠하이머병과 같은 노화관련 질환을 유발하는 물질로 알려져 있고, 알파-시누클레인 은 파킨슨병을 유발하는 물질로 알려져 있다.

(2) 실험결과

김치 또는 사람 분변으로부터 분리한 유산균의 항산화 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성, 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성 및 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성을 측정하고, 그 결과를 하기 표 5, 표 6 및 표 7에 나타내었다. 하기 표 5, 표 6 및 표 7에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) CH5, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32, 비피도박테리움 슈도카테눌라툼(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) CH38 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57 유산균은 항산화 활성이 우수하고, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 및 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 활성을 강하게 저해하였고, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현을 강하게 유도하였고, NF- κ B의 활성화를 강하게 억제하였으며 알파-시누클레인(α -synuclein)의 발현을 강하게 억제하였다. 상기 유산균들은 항산화 효과, 염증발현 및 발암과 관련있는 장내세균총의 유해균 효소활성 억제 효과가 우수하고, 장내세균총의 유해균이 생산하는 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)의 생성을 억제할 뿐만 아니라, 밀착연접단백질(tight junction protein)의 발현을 유도하므로 장 누수 증후군(Intestinal permeability)을 개선할 수 있다. 또한, 상기 유산균들은 알츠하이머병 또는 파킨슨병과 관련된 장내미생물(*K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*)의 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)의 생성을 억제할 뿐만 아니라 신경 변성 유발 물질의 활성화나 생성을 억제하므로 알츠하이머병, 파킨슨병 등을 개선할 수 있다. 특히, 상기 유산균들은 장 누수 증후군의 개선, 내독소의 생성 억제, 신경변성 유발 물질의 활성화나 생성 억제와 같은 다양한 작용을 통해 상승적인 효과를 보일 것으로 기대된다.

표 5

관리	균주명	항산화 활성	베타-글루 쿠로니다제 저해 활성	밀착연 접단백질 발현 유 도 활성	SH-SY5Y	세포 실험	LPS 생성 억제 활성		
					NF- κ B 활성화 억제 수 준	알파-시 누클레인 발 현 억제 활성	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
1	<i>L. acidophilus</i> CH1	+	+	-	-	-	-	-	-
2	<i>L. acidophilus</i> CH2	+	+	-	-	-	+	+	+
3	<i>L. acidophilus</i> CH3	+	+	-	-	-	+	+	+
4	<i>L. brevis</i> CH4	+	+	-	++	+	-	+	+
5	<i>L. curvatus</i> CH5	+++	+	++	++	+	+	+	+
6	<i>L. brevis</i> CH6	+	+	-	+	-	-	-	-
7	<i>L. casei</i> CH7	+	+	-	-	-	-	-	-
8	<i>L. planantrum</i> CH8	+	+	-	+	-	+	+	+
9	<i>L. sakei</i> CH9	-	+	-	-	-	-	-	-
10	<i>L. curvatus</i> CH10	-	+	-	+	-	-	-	-
11	<i>L. sakei</i> CH11	+++	+	++	++	++	++	+	+
12	<i>L. CH12</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
13	<i>L. plantarum</i> CH13	-	+	-	+	-	-	-	-
14	<i>L. fermentum</i> CH14	-	+	-	-	+	-	-	-
15	<i>L. fermentum</i> CH15	+++	+	-	-	-	+	+	+
16	<i>L. gasseri</i> CH16	+	+	-	-	-	+	+	+
17	<i>L. paracasei</i> CH17	+	+	-	+	-	-	-	-
18	<i>L. helveticus</i> CH18	+	+	-	-	-	-	-	-
19	<i>L. helveticus</i> CH19	+	+	-	-	-	-	-	-
20	<i>L. johnsonii</i> CH20	+	+	+	+	+	-	-	-

표 6

[0094]

관리	균주명	항산화 활성	베타-글루 쿠로니다제 저해 활성	밀착연 접단백질 발현 유 도 활성	SH-SY5Y		세포 실험		LPS 생성 억제 활성		
					NF- κ B 활성화 억제 수 준		알파-시누 클레인 발 현 억제 활성		<i>K. pneumon iae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabi lis</i>
21	<i>L. johnsonii</i> CH21	+	+	+	+		++		+	+	+
22	<i>L. johnsonii</i> CH22	+	+	+	+		+		-	-	-
23	<i>L. brevis</i> CH23	+++	+	++	++		+		++	++	++
24	<i>L. paracasei</i> CH24	+	+	-	-		-		-	-	-
25	<i>L. kimchi</i> CH25	+	+	-	-		-		-	-	-
26	<i>L. gasserii</i> CH26	+	+	-	-		-		-	-	-
27	<i>L. paracasei</i> CH27	+	+	+	+		-		-	-	-
28	<i>L. pentosus</i> CH28	+	+	-	+		+		-	-	-
29	<i>L. pentosus</i> CH29	+	+	-	-		-		-	-	-
30	<i>L. reuteri</i> CH30	+	-	-	-		-		-	-	-
31	<i>L. sakei</i> CH31	-	+	+	+		+		-	-	-
32	<i>L.</i> CH32	+++	+	++	++		+++		++	++	+++
33	<i>L. sakei</i> CH33	+	+	+	-		+		-	-	-
34	<i>L. sakei</i> CH34	+	+	+	-		+		+	+	+
35	<i>L. plantarum</i> CH35	+	+	+	+		+		+	+	+
36	<i>L. sanfranciscensis</i> CH36	+	+	+	+		+		+	-	-
37	<i>B. pseudocatenulatum</i> CH37	-	+	+	+		+		-	-	-
38	<i>B. pseudocatenulatum</i> CH38	+++	+	++	+		++		+	+	+
39	<i>B. adolescentis</i> CH39	-	+	+	+		+		-	-	-
40	<i>B. adolescentis</i> CH40	-	+	+	+		+		+	+	+

표 7

[0096]

관리	균주명	항산화 활성	베타-글루 쿠로니다제 저해 활성	밀착연 접단백질 발현 유 도 활성	SH-SY5Y		세포 실험		LPS 생성 억제 활성		
					NF- κ B 활성화 억제 수 준		알파-시누 클레인 발 현 억제 활성		<i>K. pneumon iae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabi lis</i>
41	<i>B. adolescentis</i> CH41	+	+	+	+		+		+	+	+
42	<i>B. animalis</i> CH42	+	+	-	+		-		-	-	-
43	<i>B. animalis</i> CH43	+	+	-	+		-		-	-	-
44	<i>B. bifidum</i> CH44	+	+	-	+		-		-	-	-
45	<i>B. bifidum</i> CH45	+	+	-	+		-		-	-	-
46	<i>B. breve</i> CH46	+	-	-	-		-		-	+	+
47	<i>B. breve</i> CH47	+	+	+	++		+		-	-	-
48	<i>B. breve</i> CH48	+	+	+	+		+		-	-	-
49	<i>B. catenulatum</i> CH49	+	+	++	+		++		-	-	-

50	<i>B. catenulatum</i> CH50	-	+	-	+	-	-	-	-
51	<i>B. dentium</i> CH51	+	-	-	-	-	-	-	-
52	<i>B. infantis</i> CH52	-	+	-	-	-	-	-	-
53	<i>B. infantis</i> CH53	-	+	-	+	-	-	-	-
54	<i>B. infantis</i> CH54	+	+	-	-	-	-	-	-
55	<i>B. longum</i> CH55	+	+	+	+	+	-	-	-
56	<i>B. longum</i> CH56	+++	+	+	+	+	++	-	-
57	<i>B. longum</i> CH57	+++	+	++	+	++	+++	+	++
58	<i>B. longum</i> CH58	+	+	+	+	+	+	+	+
59	<i>B. longum</i> CH59	+	+	+	+	+	+	+	+
60	<i>B. longum</i> CH60	+	-	+	-	+	-	-	-

[0097] * 항산화 활성 측정시 유산균의 최종 농도 : 1×10^4 CFU/ml; 베타-글루쿠로니다제 저해 활성 및 지질다당류 (lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 측정시 유산균의 이식 농도 : 1×10^4 CFU/ml; 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성 측정시 유산균 농도 : 1×10^4 CFU/ml

[0098] * 유산균의 다양한 활성 측정시 기준 : very strongly (+++; >90%); strongly (++; >60-90%); weakly (+; >20-60%); not or less than 20%(-; <20%)

[0100] 3. 기억력 손상 유발 모델 동물을 이용한 유산균의 인지능력 개선 효과 측정

[0101] (1) 인지능력 개선 효과 측정 실험을 위한 유산균의 선별

[0102] 김치 또는 사람 분변으로부터 분리한 총 60개의 유산균 중 인지능력 개선 효과 실험을 위한 유산균으로 다음과 같이 총 13개의 유산균을 선별하였다.

[0103] * *Lactobacillus acidophilus* CH3, *Lactobacillus curvatus* CH5, *Lactobacillus sakei* CH11, *Lactobacillus fermentum* CH15, *Lactobacillus johnsonii* CH21, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32, *Lactobacillus plantarum* CH35, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38, *Bifidobacterium adolescentis* CH41, *Bifidobacterium longum* CH56, *Bifidobacterium longum* CH57, *Bifidobacterium longum* CH59

[0105] (2) 수동회피실험(Passive avoidance test) 및 결과

[0106] 수동회피실험 장치는 제1 공간 및 제2 공간이 두 개의 공간으로 분획되며, 두 공간 사이에 길로틴 형태의 출입구가 형성되어 있고 상기 출입구를 통해 상기 제1 공간 및 제2 공간이 연결된다. 상기 제1 공간은 조명을 사용하여 밝게 유지하고 상기 제2 공간은 어둡게 유지하였다. 어둡게 유지되는 제2 공간의 바닥은 격자가 설치되어 있으며 실험동물이 어두운 공간으로 이동할 경우 바닥의 격자를 통해 0.5mA의 전기 충격이 3초 동안 흐르도록 하였다.

[0107] 선별한 유산균 13개를 각각 생리식염수에 2×10^{10} CFU/ml의 농도로 현탁한 후, 이를 실험동물인 마우스(숫컷 ICR mice, 5주령, Raonbio에서 구입)에게 매일 0.1ml(유산균 2×10^9 CFU에 해당함)씩 3일 동안 투여하였다. 또한, 정상균 및 기억력 손상균에 해당하는 마우스에게는 생리식염수를 매일 0.1ml씩 3일 동안 투여하였다. 또한, 양성 대조군에 해당하는 마우스에게는 매일 양성대조약물인 도네페질(donepezil; 알츠하이머병 및 알츠하이머형 치매 치료제)을 5 mg/kg(body weight)의 용량으로 3일 동안 투여하였다. 한 실험군 당 마우스의 수는 9마리로 하였다.

[0108] 약물 투여 2일째에 상기 마우스들을 밝게 유지되는 제1 공간에 위치시킨 후, 약 20초의 탐색시간이 경과한 후에, 길로틴 형태의 출입구를 개방하여 상기 마우스가 어둡게 유지되는 제2 공간으로 들어갈 수 있게 하였다. 이때, 길로틴 형태의 출입구 개방 후 60초가 경과할 때까지 어둡게 유지되는 제2 공간으로 이동하지 않은 마우스는 실험에서 제외하였다. 일단 마우스가 어둡게 유지되는 제2 공간으로 들어가면 길로틴 형태의 출입구가 닫히고, 0.5mA의 전기 충격이 3초 동안 바닥의 격자를 통해 흐르게 되고, 마우스는 이러한 전기 충격을 기억하게

된다.

[0109] 약물 투여 3일째에 유산균 또는 양성대조약물을 투여하고 1시간이 경과한 후에 증류수에 용해시킨 스코폴라민(scopolamine; 인지능력 장애 또는 기억력 손상을 유도하는 콜린성 차단제)을 1 mg/kg(body weight)의 용량으로 복강 투여하고, 정상군에는 생리식염수를 복강 투여하였다. 스코폴라민 투여 30분 경과 후 수동회피실험 장치를 이용하여 본 실험을 수행하였다. 각 실험군의 마우스들이 10초의 탐색시간 후 길로턴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 지연시간)을 300초까지 측정하였고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다. 하기 표 8에서 지연시간(latency time)이 길수록 수동회피의 학습과 단기 기억력 회복이 좋음을 나타낸다.

표 8

실험군 구분	지연시간(latency time; 단위 : 초)
정상군	240.2
스코폴라민만 처리한 기억력 손상군	22.6
스코폴라민 및 도네페질을 처리한 양성 대조군	66.4
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3 처리군	33.5
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus curvatus</i> CH5 처리군	57.4
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus sakei</i> CH11 처리군	45.0
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus fermentum</i> CH15 처리군	56.7
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21 처리군	22.4
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus brevis</i> CH23 처리군	61.2
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32 처리군	71.0
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus plantarum</i> CH35 처리군	44.6
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38 처리군	49.6
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41 처리군	35.6
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium longum</i> CH56 처리군	54.9
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium longum</i> CH57 처리군	62.1
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium longum</i> CH59 처리군	48.5

[0111] 상기 표 8에서 보이는 바와 같이 스코폴라민에 의해 인지능력 장애 또는 기억력 손상이 유도된 모델동물에게 *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 또는 *Bifidobacterium longum* CH57을 투여하는 경우 스코폴라민만을 투여한 기억력 손상군에 비해 지연시간이 현저하게 증가하였고, 특히 *Lactobacillus johnsonii* CH32를 투여하는 경우 상업적 치료제로 사용하고 있는 도네페질(donepezil)을 투여하는 경우보다 더 우수한 효과를 보였다.

[0113] (3) Y-미로 실험(Y-maze test) 및 결과

[0114] Y-미로 시험에 이용되는 기구는 3개의 가지로 구성되어 있으며, 각 가지는 길이 42cm, 폭 3cm 및 높이 12cm이고, 각 가지가 이루는 각도는 120°이며, 검정색의 폴리비닐수지로 제조되었다.

[0115] 선별한 유산균 13개를 각각 생리식염수에 2×10^{10} CFU/ml의 농도로 현탁한 후, 이를 실험동물인 마우스(숫컷 ICR mice, 5주령, Raonbio에서 구입)에게 매일 0.1ml(유산균 2×10^9 CFU에 해당함)씩 3일 동안 투여하였다. 또한, 정상군 및 기억력 손상군에 해당하는 마우스에게는 생리식염수를 매일 0.1ml씩 3일 동안 투여하였다. 또한, 양성 대조군에 해당하는 마우스에게는 매일 양성대조약물인 도네페질(donepezil; 알츠하이머병 및 알츠하이머형 치매 치료제)을 5 mg/kg(body weight)의 용량으로 3일 동안 투여하였다. 한 실험군 당 마우스의 수는 9마리로 하였다.

[0116] 유산균 또는 양성대조약물을 최종 투여하고 1시간이 경과한 후에 증류수에 용해시킨 스코폴라민(scopolamine; 인지능력 장애 또는 기억력 손상을 유도하는 콜린성 차단제)을 1 mg/kg(body weight)의 용량으로 복강 투여하고, 정상군에는 생리식염수를 복강 투여하였다. 스코폴라민 투여 30분 경과 후 각각 A, B, C로 구분된 Y-maze 3개 중 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음, 마우스가 들어간 가지를 기록하였다. 이때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하여 실험 동물이 들어간 가지로 기록하였으며, 갓

던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 3개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alteration)씩 부여하였다. 변경 행동력(alteration behavior)은 3개의 가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 하기 수식에 의해 계산하였고(Sarter, M. et al., Psychopharmacology., 94, pp491-495, 1998), 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

$$\text{변경 행동력(\%)} = \frac{\text{실제변경(actual alteration)}}{\text{최고변경(maximum alteration)}} \times 100$$

(최고변경 : 총 입장 횟수 -2)

하기 표 9에서 변경 행동력(alteration behavior; 단위 : %)이 클수록 학습 및 공간 기억력 회복이 좋음을 나타낸다.

표 9

실험군 구분	변경 행동력(alteration behavior; 단위 : %)
정상군	74.5
스코폴라민만 처리한 기억력 손상군	49.9
스코폴라민 및 도네페질을 처리한 양성 대조군	65.8
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3 처리군	53.7
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus curvatus</i> CH5 처리군	51.3
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus sakei</i> CH11 처리군	49.0
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus fermentum</i> CH15 처리군	56.2
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21 처리군	53.5
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus brevis</i> CH23 처리군	59.2
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32 처리군	63.9
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus plantarum</i> CH35 처리군	52.4
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38 처리군	52.5
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41 처리군	54.1
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium longum</i> CH56 처리군	55.2
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium longum</i> CH57 처리군	60.3
스코폴라민 및 <i>Bifidobacterium longum</i> CH59 처리군	55.5

상기 표 9에서 보이는 바와 같이 스코폴라민에 의해 인지능력 장애 또는 기억력 손상이 유도된 모델동물에게 *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 또는 *Bifidobacterium longum* CH57을 투여하는 경우 스코폴라민만을 투여한 기억력 손상군에 비해 변경 행동력이 현저하게 증가하였고, 특히 *Lactobacillus johnsonii* CH32를 투여하는 경우 상업적 치료제로 사용하고 있는 도네페질(donepezil)을 투여하는 경우와 동등한 수준의 우수한 효과를 보였다.

4. 유산균을 이용한 팔 발효물의 제조 및 팔 발효물의 인지능력 개선 효과 측정

(1) 팔 발효물의 제조

Lactobacillus johnsonii CH32를 식용 TS 배지에 배양한 후 원심분리(10,000g_f, 20분)하여 *Lactobacillus johnsonii* CH32 균체를 수득하였다. 수득한 *Lactobacillus johnsonii* CH32 균체를 생리식염수로 2회 세척하고, 100ml에 현탁하여 *Lactobacillus johnsonii* CH32 균체 현탁액을 제조하였다. 이후, 급게 분쇄한 팔 10g을 *Lactobacillus johnsonii* CH32 균체 현탁액 90ml에 첨가하고 24시간 동안 배양하여 팔을 발효시켰다. 이후, 팔 발효액을 동결건조하여 팔 발효물을 수득하였다.

(2) 수동회피실험 및 결과

수동회피실험은 투여한 약물 및 투여량을 달리한 것을 제외하고는 앞에서 기술한 내용과 동일한 방법으로 수행

하였고, 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다. 하기 표 10에서 보이는 바와 같이 마우스에 팔 현탁물 또는 *Lactobacillus johnsonii* CH32(1일 투여량 : 2×10^8 CFU/마우스)를 투여하는 경우 손상된 기억력을 크게 개선하지 못하였으나, 팔 발효물을 투여하는 경우 손상된 기억력을 현저하게 개선하였다.

표 10

실험군 구분	지연시간(latency time; 단위 : 초)
정상군	232.5
스코폴라민만 처리한 기억력 손상군	23.8
스코폴라민 및 도네페질을 처리한 양성 대조군	65.7
스코폴라민 및 팔 현탁물 ¹⁾ 을 처리한 군	48.5
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32 처리군 ²⁾	48.0
스코폴라민 및 팔 발효물 ³⁾ 처리군	64.2

1) 팔 현탁물은 팔 분말을 생리식염수에 현탁하여 제조한 것이며, 1일 투여량은 팔 분말 기준으로 마우스 당 0.2g임

2) *Lactobacillus johnsonii* CH32는 생리식염수에 현탁하여 투여하였고, 1일 투여량은 *Lactobacillus johnsonii* CH32 기준으로 마우스 당 2×10^8 CFU임

3) 팔 발효물은 생리식염수에 현탁하여 투여하였고, 1일 투여량은 팔 발효물 기준으로 마우스 당 0.2g이며, 팔 발효물 0.2g에는 *Lactobacillus johnsonii* CH32가 약 2×10^8 CFU 정도 함유되어 있음

(3) Y-미로 실험 및 결과

Y-미로 실험은 투여한 약물 및 투여량을 달리한 것을 제외하고는 앞에서 기술한 내용과 동일한 방법으로 수행하였고, 그 결과를 하기 표 11에 나타내었다. 하기 표 11에서 보이는 바와 같이 마우스에 팔 현탁물 또는 *Lactobacillus johnsonii* CH32(1일 투여량 : 2×10^8 CFU/마우스)를 투여하는 경우 손상된 기억력을 크게 개선하지 못하였으나, 팔 발효물을 투여하는 경우 손상된 기억력을 현저하게 개선하였다.

표 11

실험군 구분	변경 행동력(alternation behavior; 단위 : %)
정상군	75.2
스코폴라민만 처리한 기억력 손상군	45.4
스코폴라민과 및 도네페질을 처리한 양성 대조군	63.2
스코폴라민 및 팔 현탁물 ¹⁾ 을 처리한 군	52.4
스코폴라민 및 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32 처리군 ²⁾	57.6
스코폴라민 및 팔 발효물 ³⁾ 처리군	63.3

1) 팔 현탁물은 팔 분말을 생리식염수에 현탁하여 제조한 것이며, 1일 투여량은 팔 분말 기준으로 마우스 당 0.2g임

2) *Lactobacillus johnsonii* CH32는 생리식염수에 현탁하여 투여하였고, 1일 투여량은 *Lactobacillus johnsonii* CH32 기준으로 마우스 당 2×10^8 CFU임

3) 팔 발효물은 생리식염수에 현탁하여 투여하였고, 1일 투여량은 팔 발효물 기준으로 마우스 당 0.2g이며, 팔 발효물 0.2g에는 *Lactobacillus johnsonii* CH32가 약 2×10^8 CFU 정도 함유되어 있음

[0142] 5. 파킨슨병 유도 모델 동물을 이용한 유산균의 인지능력 개선 효과 측정

[0143] 파킨슨병에 의해 기억력이 손상된 동물로부터 분리된 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) K21 균주를 마우스에 투여하여 파킨슨병을 유도하고, Y-미로 실험(Y-maze test)을 통해 유산균의 인지능력 개선 효과를 측정하였다.

[0144] 구체적으로, 동물 실험실에서 1주일 동안 적응시킨 생쥐(숫컷 ICR mice, 20-21 g, 5주령, Raonbio에서 구입)에 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) K21 균주를 5일 동안 매일 1회 1×10^9 CFU의 양으로 투여하여 파킨슨병을 유도하였다. 한편, 정상군에는 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) K21 균주 대신 생리식염수를 투여하였다. 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) K21 균주를 최종 투여한 날의 익일부터 파킨슨병이 유도된 마우스(숫컷 ICR mice, 5주령, Raonbio에서 구입)에게 유산균 현탁액(유산균을 생리식염수에 2×10^{10} CFU/ml의 농도로 현탁한 것)을 매일 0.1ml(유산균 2×10^9 CFU에 해당함)씩 5일 동안 투여하였다. 또한, 정상군 및 파킨슨병 유도군에 해당하는 마우스에게는 생리식염수를 매일 0.1ml씩 5일 동안 투여하였다. 또한, 양성 대조군에 해당하는 마우스에게는 매일 양성대조약물인 도네페질(donepezil; 알츠하이머병 및 알츠하이머형 치매 치료제)을 5 mg/kg(body weight)의 용량으로 5일 동안 투여하였다. 한 실험군 당 마우스의 수는 9마리로 하였다.

[0145] 약물을 최종 투여하고 1시간 경과 후, 각각 A, B, C로 구분된 Y-maze 3개 중 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음, 마우스가 들어간 가지를 기록하였다. 이때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하여 실험 동물이 들어간 가지로 기록하였으며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 3개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alteration)씩 부여하였다. 변경 행동력(alteration behavior)은 3개의 가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 하기 수식에 의해 계산하였고(Sarter, M. et al., Psychopharmacology., 94, pp491-495, 1998), 그 결과를 하기 표 12에 나타내었다.

[0146]
$$\text{변경 행동력(\%)} = \frac{\text{실제변경(actual alteration)}}{\text{최고변경(maximum alteration)}} \times 100$$

[0147] (최고변경 : 총 입장 횟수 -2)

[0149] 하기 표 12에서 변경 행동력(alternation behavior; 단위 : %)이 클수록 학습 및 공간 기억력 회복이 좋음을 나타낸다.

표 12

실험군 구분	변경 행동력(alternation behavior; 단위 : %)
정상군	73.8
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주만 처리한 파킨슨병 유도군	46.4
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 도네페질을 처리한 양성 대조군	58.6
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3 처리군	52.5
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Lactobacillus curvatus</i> CH5 처리군	50.2
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Lactobacillus sakei</i> CH11 처리군	50.7
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Lactobacillus fermentum</i> CH15 처리군	55.5
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21 처리군	54.7
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Lactobacillus brevis</i> CH23 처리군	53.3
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32 처리군	62.8
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Lactobacillus plantarum</i> CH35 처리군	54.1
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38 처리군	51.2
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41 처리군	55.3
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Bifidobacterium longum</i> CH56 처리군	54.8
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Bifidobacterium longum</i> CH57 처리군	57.3
<i>Proteus mirabilis</i> K21 균주 및 <i>Bifidobacterium longum</i> CH59 처리군	54.9

[0151] 상기 표 12에서 보이는 바와 같이 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) K21 균주에 의해 파킨슨병이 유도

된 모델동물에게 *Lactobacillus johnsonii* CH32를 투여하는 경우 상업적 치료제로 사용하고 있는 도네페질(donepezil)을 투여하는 경우보다 더 우수한 효과를 보였다.

[0153] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0154]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11762P

수탁일자 : 20150901

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11763P

수탁일자 : 20150901

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11764P

수탁일자 : 20150901

서열목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Novel lactic acid bacteria and composition for preventing,
improving or treating neurodegenerative diseases or cognitive
dysfunction

<130> DP-15-1081

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1132

<212> DNA

<213> 16S rDNA of *Lactobacillus brevis* CH23

<400> 1

agggataaca cttggaaaca ggtgctaata ccgtataaca acaaaatccg catggatttt

60

gtttgaaagg tggcttcggc tatcacttct ggatgatccc gcggcgtatt agttagttag 120

tgaggtaaag gcccaccaag acgatgatac gtagccgacc tgagagggtg atcgccacaca 180

ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtagggaat ctccacaat 240

ggacgaaagt ctgatggagc aatgccgcgt gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact 300

ctgttgtaa agaagaacac ctttgagagt aactgttcaa gggttgacgg tatttaacca 360

gaaagccacg gctaaactac tgccagcagc cgcggtaata cgtagggtggc aagcgttgct 420

cggatttatt gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttttta agtctgatgt gaaagccttc 480

ggcttaaccg gagaagtgca tcggaaactg ggagacttga gtgcagaaga ggacagtgga 540

actccatgtg tagcgggtga atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc 600

tgtctagtct gtaactgacg ctgaggtcgc aaagcatggg tagcgaacag gattagatac 660

cctgstagtc catgccgtaa acgatgagtg ctaagtgttg gagggtttcc gcccttcagt 720

gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtagc accgcaaggt tgaaactcaa 780

aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaatcga agctacgcga 840

agaaccttac caggctctga catcttctgc caatcttaga gataagacgt tcccttcggg 900

gacagaatga cagggtgtgc atggtgtcgc tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 960

tcccgaacg agcgcaacc ttattatcag ttgccagcat tcagtgggc actctggtga 1020

gactgccgtg gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gcccttatg 1080

acctgggcta cacacgtgct acaatggacg gtacaacgag tcgcgaagtc gt 1132

<210> 2

<211> 1258

<212> DNA

<213> 16S rDNA of Lactobacillus johnsonii CH32

<400> 2

gtaactgcc caagagactg ggataacacc tgaaaacaga tgctaatacc ggataacaac 60

actagacgca tgcttagagt ttgaaagatg gttctgctat cactcttgga tggacctgcg 120

gtgcattagc tagttggtaa ggtaacggct taccaaggca atgatgcata gccgagtga 180

gagactgac ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt 240

aggaatctt ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggg 300

tttcggctcg taaagctctg ttggtagtga agaaagatag aggtagtaac tggccttgat 360

ttgacggtaa ttccccagaa agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt 420

aggtggcaag cgttgtccgg atttattggg cgtaaagcga gtgcaggcgg ttcaataagt 480

ctgatgtgaa agccttcggc tcaaccggag aattgcatca gaaactgttg aacttgagtg 540
cagaagagga gagtgggaact ccatgtgtag cgggtggaatg cgtagatata tggaagaaca 600

ccagtggcga aggcggctct ctggctcgca actgacgctg aggcctgaaa gcatgggtag 660
cgaacaggat tagataccct ggtagtccat gccgtaaacg atgagtgcta agtgttggga 720
ggtttccgcc tctcagtgtc gcagctaacg cattaagcac tccgcctggg gactacgacc 780
gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggcccgacac agcgggtggag catgtggttt 840
aattcgaagc aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat ccagtgcata cctaagagat 900
taggtgttcc cttcggggac gctgagacag gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg 960
tgagtgttg ggtaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg tcattagttg ccatcattaa 1020

gttgggcaact ctaatgagac tgccggtagc aaaccggagg aagggtggga tgacgtcaag 1080
tcatcatgcc ctttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggacggta caacgagaag 1140
cgaacctgac aaggcaagcg gatctcttaa agccgttctc agttcggact gtaggctgca 1200
actcgctac acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgga cagtacgccg cgggtgaat 1258

<210> 3
<211> 1348
<212> DNA
<213> 16S rDNA of Bifidobacterium longum CH57
<400> 3

cggtgttgc ttggtgtga gactggcgaa cgggtgagta atgcgtgacc gacctcccc 60
atacaccgga atagctcctg gaaacgggtg gtaatgccgg atgctccagt tgatcgcattg 120

gtcttctggg aaagctttcg cggatatgga tgggttcgag tcctatcagc ttgacggcgg 180
ggtaacggcc caccgtggct tcgacgggta gccggcctga gagggcgacc ggccacattg 240
ggactgagat acggcccgca ctctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg 300
cgcaagcctg atgcagcgac gccgcgtgag ggatggaggc cttcgggttg taaacctctt 360
ttatcgggga gcaagcgaga gtgagtttac ccgttgaata agcaccggct aactacgtgc 420
cagcagccgc ggtaatacgt aggggtgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagggc 480
tcgtaggcgg ttcgtcgcgt ccggtgtgaa agtccatcgc ttaacggtgg atccgcgccg 540

ggtagggcgc ggcttgagtg cggtagggga gactggaatt cccggtgtaa cggtagaatg 600
ttagatatac gggaagaaca ccaatggcga aggcaggtct ctgggccgtt actgacgctg 660
aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg 720
gtggatgctg gatgtggggc ccgttccacg ggttccgtgt cggagctaac gcgttaagca 780

tccgcctgg gggagtagg ccgcaaggct aaaactcaaa gaaattgacg ggggcccgca	840
caagcggcgg agcatgcgga ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc tgggttcac	900
atgttcccga cggtcgtaga gatacggctt cccttcgggg cgggttcaca ggtggtgcat	960
ggtcgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc	1020
gccccgtgtt gccagcggat tatgccggga actcacgggg gaccgccggg gtttaactcg	1080
aggaaggtag ggatgacgtc agatcatcat gccccttacg tccagggtt cacgcatgt	1140
acaatggcgg gtacaacggg atgcgacgcg gcgacgcgga gcggatccct gaaaaccggt	1200
ctcagttcgg atcgagctt gcaactcgac tgcgtgaagg cggagtcgt agtaatcgcg	1260
aatcagcaac gtcgcggtga atgcgttccc gggccttgta cacaccgcc gtcaagtc	1320
gaaagtgggc agcaccgga gccggtgg	1348