(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0128443
(43) 공개일자 2010년12월08일

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 1/105* (2006.01)
A61K 35/66 (2006.01) *C12R 1/25* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0046831
(22) 출원일자 2009년05월28일
심사청구일자 2009년05월28일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
주식회사한국야쿠르트
서울 서초구 잠원동 28-10
(72) 발명자
이정민
경기도 성남시 중원구 하대원동 101-14 501호
정대균
경기도 수원시 팔달구 우만동 월드메르디앙 APT 112-2703
(뒷면에 계속)

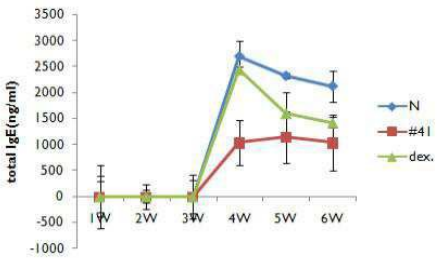
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 인터루킨 12 분비를 유도하는 락토바실러스 플랜타럼 에스비씨41 및 이의 알레르기 예방 용도

(57) 요 약

환경오염 및 생활수준의 향상 등으로 인하여 알레르기 질환의 유병률이 증가하고 있다. 증상을 완화하는 대증적인 치료약이 있을 뿐 근본적인 대책은 없다. Th2 면역 편향에 의하여 면역글로블린 E의 과다 생산에 의하여 매개되는 알레르기 질환의 예방 및 개선을 위하여 Th1 싸이토카인 IL-12 분비를 유도하여 면역글로블린 E의 생산 억제를 통하여 알레르기에 대한 예방 효과를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

고미연

경기도 수원시 영통구 매탄동 553 B-601

허철성

충청남도 천안시 동남구 신부동 대림아파트 203-1303

이정희

서울특별시 광진구 자양3동 금강KCC 아파트 101-102

이철호

경기도 고양시 덕양구 화정1동 은빛마을11단지아파트 1111-604

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 RIC07-06-04

부처명 지식경제부

연구관리전문기관

연구사업명 지역혁신센터사업

연구과제명 피부생명공학지역혁신센터

기여율

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2008년07월01일~2009년04년 30일

특허청구의 범위

청구항 1

IL-12 분비를 유도하는 락토바실러스 플랜타럼 SBC 41 (KCTC 11512BP)

청구항 2

락토바실러스 플랜타럼 SBC 41을 발효균주로 사용하여 제조하는 것을 특징으로 하는 발효제품

청구항 3

락토바실러스 플랜타럼 SBC 41의 균체를 함유하는 것을 특징으로 유아용 식품 및 건강기능성 식품을 포함하는 식품

청구항 4

락토바실러스 플랜타럼 SBC 41의 균체를 함유하는 것을 특징으로 하는 정장제

청구항 5

락토바실러스 플랜타럼 SBC 41의 균체를 함유하는 것을 특징으로 하는 동물사료 첨가제

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 IL-12 분비를 유도하는 유산균주 및 알레르기 예방 용도를 제공하고자 한다.

배 경 기 술

[0002] 무해한 물질 (알러젠)에 의하여 가려움, 기침, 숨 헐떡임, 재채기, 눈물 흘림, 염증 등의 증상을 나타내는 기관지 천식, 비염, 두드러기, 위장관 알레르기, 아나필락시스 (anaphylaxis)와 특정 알러젠에 의해 유발되는 아토피성 알레르기, 알레르기성 비염, 알레르기성 천식, 습진 등의 질환을 포함하는 면역과민반응이다. 알러젠은 대식세포 및 항원제시세포에 의해 탐식되고 작은 펩티드로 분해되어 세포 표면에 제시된다. 이렇게 제시된 항원은 B 임파구를 형질세포로 전환하고 면역글로블린 E (IgE)를 분비하게 한다. 분비된 IgE는 비만세포와 호염기세포의 고친화성 수용체 (Fc ε RI)에 결합하고 침투한 알러젠과 결합하여 초기 알레르기 증상을 유발하는 히스타민, 루코트리엔, 프로스타글란디과 염증세포들을 유인하는 염증성 싸이토카인을 분비하여 알레르기 후기 단계를 매개한다.

[0003] 알레르기는 환경오염, 유전적 결함 등의 여러 요인에 의하여 발병하는 것으로 알려져 있다. 위생가설 (hygiene hypothesis)에 의하면 출산 직후의 우세한 Th2 면역반응이 적절한 미생물의 자극에 의하여 조절되지 않음으로써 알레르기가 발병한다. 실제로 Th2 싸이토카인 IL-4는 B 임파구가 분비하는 면역글로블린의 형태를 IgE로 전환하는 데 기여하고 Th1 싸이토카인 IL-12는 이러한 IL-4의 분비를 억제하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 프로바이틱스 유산균주들은 (Fujiwara, D. et. al, The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance, Int. Arch. Allergy Immunol., 2004, 135:205-215) 면역조절 기능이 있는 것들이 보고되었으며 이러한 유산균주를 산모나 출산 직후의 영아가 섭취 시 알레르기 질환 발병이 낮아지는 것으로 보고되었다 (Rautava, S. et. al., Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant, J. Allergy Clin. Immunol., 2002, 109:119-121).

[0005] 프로바이오틱 효과는 유산균주 (strain)에 따라 다른 것으로 알려져 있으며 이에 따라 DNA/DNA hybridization, 16S rDNA 염기서열, 유전자형 분류장치 (pulsed-field gel electrophoresisi) 등의 분자역학적 분석 (genetic typing)을 수행할 것을 권장하고 있다 (Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid

bacteria, 2001). 염색체 상에 반복적으로 존재하는 염기서열을 primer로 이용하는 PCR 방법은 간편하고 빠른 분자역학적 방법이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 알레르기의 증상의 치료를 위해 히스타민-수용체 길항제들 (항-히스타민제들)과 같은 항-알레르기제들이 사용되고 있다. 히스타민 길항제들은 알레르기 항원의 존재에 반응하여 비만 세포들로부터 분비된 히스타민의 활성을 중화시키기 위해서 투여되나 항원 침투 초기에 투여해야 하며 근원적인 치료방법은 아니다. 알러젠에 대한 탈감작요법이 근원적인 치유책이 될 수 있으나 알러젠 확인, 오랜 기간 및 비용, 안전성 등의 문제가 있다. 따라서, 안전하고 간편한 알레르기 예방 방법을 제시하고자 한다.

과제 해결수단

[0007] Th1 면역을 유도하는, IL-12 분비를 유도하는, 유산균주를 선발하고 이의 섭취를 통해 알레르기 증상을 매개하는 면역글로블린 E의 생산을 억제함으로써 Th2 면역이 우세한 알레르기 질환을 예방할 수 있다.

효 과

[0008] 선발한 유산균주는 식품에서 유래하였으며 안전한 속 (genus) 및 종 (species)에 속하는 유산균주로 간편하게 섭취함으로써 알레르기 질환을 예방할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 김치로부터 분리한 IL-12 분비를 유도하는 락토바실러스 플랜타럼 SBC 41에 관한 것이다 (기탁기관 :한국과학기술연구원부설 생명공학연구소, 수탁일 : , 수탁번호 :). 락토바실러스 플랜타럼 SBC 41의 섭취는 알레르기를 매개하는 IgE의 생성을 억제하는 것으로 나타나 알레르기 질환의 예방에 도움를 줄 수 있다.

[0010] 실시예 1. 락토바실러스 플랜타럼 SBC 41의 분리 및 동정

[0011] (i). 시중에 판매하는 김치의 국물을 희석하여 bromocresol purple 지시약과 유당이 첨가된 고체 배지에 도말하고 유당을 대사하여 락트산을 생산하여 배지의 pH를 낮추는 황색의 환이 생기는 집락을 유산균으로 우선 선별하였다.

[0012] (ii). 선발한 집락의 속 (genus) 결정을 위하여 표 1의 속 특이 primers를 사용하여 연쇄중합반응을 통하여 증폭산물을 얻고 전기영동하여 증폭산물의 크기로 속을 결정하였다. 250 base paris (bps), 락토바실러스; 976 bps, 류코노스탁; 745 bps, 웨셀라 (Weissella).

표 1

[0013]

Genus	Primer set		PCR product (bps)
Lactobacillus	R16-1(16S)	CTTGTACACACCGCCCGTCA	250
	LbLMA1-rev (ITS)	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	
Leuconostoc	LeuF	CGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAG	976
	LeuR	TTTGTCTCCGAAGAGAACA	
Weissella	S-G-Wei-0121-a-S-20	CGTGGGAAACCTACCTCTTA	725
	S-G-Wei-0823-a-A-18	CCCTCAAACATCTAGCAC	
16s rRNA generic primer	8F	AGTTGATCCTGGCTC	1,484
	1492R	ACCTTGTTACGACTT	
16s-23s IGS primer	pHr	TGCGGCTGGATCACCTCCTT	586
	p23S uni322anti	GGTTCTTTTCACCTTTCCCTC	

[0014] (iii). 선발한 균주는 MRS 배지에서 초기 정지기까지 배양하고 원심분리한 후, 생리식염수로 세척하고 흡광도 (600 nm) 1이 되도록 조정하였다.

[0015] (iv). IL-12 분비를 유도하는 유산균주의 선발을 위해 BALB/c 마우스에 항원으로 달걀 오발부민 (ovalbumin) 50 ug과 면역보조제로 알루미늄 하이드록사이드 2 mg을 0일과 14일에 복강주사하여 Th2 면역 편향을 유도하였

다. 21일째에 마우스으로부터 비장을 분리하여 공지의 방법으로 비장세포를 획득하였다. 비장세포를 5×10^5/96 well이 되도록 분주하고 항원 오발부민 50 ug/ml과 유산균 10 ul을 첨가하고 3일간 배양하였다. 배양 상징액을 회수하고 배지 중에 분비된 IL-12의 양을 ELISA kit (R&D Systems)를 이용하여 정량하였다 (표2).

표 2

[0016]

Strains	IL-12	Genus	Strains	IL-12	Genus
1	**640**	**Weissella cibaria**	31	54	Lactobacillus
2	69	Weissella	32	35	Leuconostoc
3	45	Lactobacillus	33	14	Lactobacillus
4	26	Lactobacillus	34	21	Lactobacillus
5	103	Weissella	35	57	Leuconostoc
6	6	Undefined	**36**	**244**	**Leuconostoc pseudomesenteroides**
7	24	Lactobacillus	37	28	Lactobacillus
8	21	Lactobacillus	38	52	Undefined
9	**188**	**Leuconostoc citreum IH22**	39	21	Lactobacillus
10	66	Lactobacillus	40	40	Undefined
11	**198**	**Leuconostoc citreum IH22**	**41**	**216**	**Lactobacillus plantarum**
12	**610**	**Weissella cibaria**	42	21	Lactobacillus
13	33	Lactobacillus	43	24	Lactobacillus
14	47	Lactobacillus curvatus	44	33	Undefined
15	17	Leuconostoc	45	74	Lactobacillus
16	26	Lactobacillus curvatus	46	45	Lactobacillus
17	15	Lactobacillus	47	74	Leuconostoc
18	33	Lactobacillus	48	24	Lactobacillus
19	35	Lactobacillus sakei	49	33	Lactobacillus
20	35	Lactobacillus plantarum	**50**	**118**	**Lactobacillus plantarum**
21	66	Undefined	51	26	Lactobacillus
22	54	Lactobacillus	52	12	Undefined
23	17	Lactobacillus	53	17	Undefined
24	17	Lactobacillus	54	12	Undefined
25	31	Lactobacillus	55	45	Lactobacillus plantarum
26	19	Lactobacillus sakei	56	28	Undefined
27	78	Lactobacillus	57	40	Undefined
28	19	Undefined	58	57	Lactobacillus
29	81	Undefined	59	38	Lactobacillus plantarum
30	98	Undefined	60	71	Lactobacillus

[0017] (v). IL-12 분비를 유도하는 균주는 표 1의 프라이머를 이용하여 증폭된 16S rDNA 염기서열 또는 16S와 23S rDNA 사이의 염기서열을 결정하여 Blast 프로그램 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)을 이용하여 상동성을 비교하여 동정하였다.

[0018] (vi). 41번 균주는 당이용성을 이용한 API 50 CH (Biomerieux)도 락토바실러스 플랜타럼으로 동정하였다.

[0019] (vii) 상기 균주를 Lactobacillus plantarum SBC41로 명명하였으며 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁 보관하였다 (KCTC 11512BP).

[0020] 실시예 2. 오발부민 감작 마우스 모델에서 락토바실러스 플랜타럼 SBC 41의 IgE 감소효과

[0021] 락토바실러스 플랜타럼 SBC 41을 배양하고 회수한 후, 10% 탈지분유에 현탁하여 동결건조하였다. 건조된 분말의 생균수는 MRS 한천배지에 도말하여 측정하였다. 건조 유산균 분말을 사료에 1×10^9 cfu/g이 되도록 GF2005 (곡물사료, 피드랩, 한국)에 첨가하여 제조하였다. Dexamethasone은 0.4 ug/ml의 농도로 물에 녹여 자유롭게 먹게 하였다. BALB/c 마우스는 1주일 간 적응기간을 거친 후, 유산균주 첨가 사료를 공급하였으며 사육 2주, 3주째에 앞서와 같이 감작하였다. 사육기간 동안 1주마다 혈액을 채취하고 혈장을 분리한 후, IgE 수치를 측정

하였다. 총 IgE는 BD OptEIA mouse ELISA kit (BD Bioscience)을 이용하였으며, 오발부민 특이 IgE는 오발부민을 플레이트에 코팅하여 결합된 IgE의 양을 상기의 키트를 이용하여 측정하였다. 도 1에서와 같이 혈액 중 총 IgE가 감소하였으며 오발부민 특이 IgE도 감소함을 확인하였다 (도2).

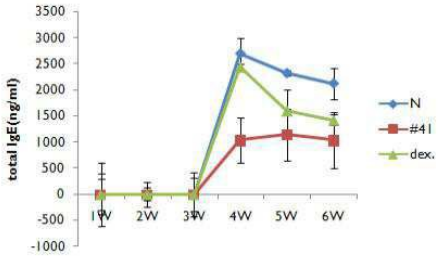
도면의 간단한 설명

[0022] 도1은 락토바실러스 플랜타럼 SBC 41이 오발부민 감작 마우스 모델에서 알레르기를 매개하는 총 IgE의 생성을 억제하는 것을 보여주는 결과이다.

[0023] 도2는 오발부민 특이 IgE의 생성을 억제하는 것을 보여주는 결과이다.

도면

도면1



도면2

