(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0113772
(43) 공개일자 2020년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A61K 31/12* (2006.01)
A61K 47/46 (2017.01) *A61K 9/50* (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A61K 31/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0034449
(22) 출원일자 2019년03월26일
심사청구일자 2019년03월26일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정대균
경기도 용인시 수지구 이종무로169번길 11-12(고기동)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **커큐민이 세포내에 축적되어 있는 미생물 제제 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 커큐민이 세포내에 축적되어 있는 미생물 제제 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 미생물 제제는 기존 약물이 갖는 단점들 (낮은 용해성, 낮은 안정성, 원치 않는 독성, 저조한 세포막 투과성 등)을 해결할 수 있는 미생물 제제를 제공하며, 사용된 미생물은 미생물 배양배지 내에서 커큐민을 흡수하여 세포에 추적 시킨 후, 전달 캐리어(delivery carrier)로 역할하여 장까지 안전하게 전달할 수 있다.

대 표 도 - 도2

samples	area	con.	ug/mg	총 함유량 (ug)	sum (ug)
K8_curcumin (EtoAC fr.)	777,096	2,000ppm	0.36	1.98	4.01
K8_curcumin (BuOH fr.)	240,376	2,000ppm	0.18	2.03	

(52) CPC특허분류
A61K 47/46 (2013.01)
A61K 9/5063 (2013.01)
C12N 1/16 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01317401
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대BG21_농생명바이오식의약소재개발사업
연구과제명 인삼 진세노사이드의 bioavailability 향상을 가능하게 하는 유산균 microcapsule를 활용한 nutra/cosmeceuticals 소재 및 제품개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

커큐민(Curcumin)이 축적된 미생물 또는 이의 파쇄물을 포함하는 미생물 제제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미생물은 락토바실러스(*lactobacillus* sp.), 스트렙토코커스(*Streptococcus* sp.), 비피도박테리아(Bifidobacteria sp.), 락토코커스(Lactococcus sp.), 류코노스톡스(Leuconostocs sp.), 이스트(Yeast) 또는 아스퍼질리(Aspergilli sp.) 속 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 미생물 제제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 미생물은 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum)인 것을 특징으로 하는 미생물 제제.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물 내 커큐민 축적량은 0.1 내지 1.0 ug/mg인 것을 특징으로 하는, 미생물 제제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 미생물 제제를 함유하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 사람 또는 동물에 대한 경구 투여를 목적으로 하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

커큐민(Curcumin)이 축적된 미생물을 제조하는 방법으로서,

a) 미생물 배양 배지에 커큐민이 포함된 강황 또는 울금 추출물을 추가로 투여하여 락토바실러스 플란타룸을 배양하는 1차 배양 단계; 및

b) 상기 a) 단계에서 배양된 락토바실러스 플란타룸을 회수하여, 커큐민이 포함된 강황 또는 울금 추출물을 함유하는 배지에서 추가 배양하는 2차 배양 단계;

를 포함하는 커큐민이 축적된 미생물의 배양 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 미생물은 락토바실러스(*lactobacillus* sp.), 스트렙토코커스(*Streptococcus* sp.), 비피도박테리아(Bifidobacteria sp.), 락토코커스(Lactococcus sp.), 류코노스톡스(Leuconostocs sp.), 이스트(Yeast) 또는 아스퍼질리(Aspergilli sp.)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 미생물은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)인 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 10

제7항에 있어서

상기 커큐민은 배양 배지 내에 0.01 내지 20 g/L의 함량으로 포함되는 것을 특징으로 하는, 미생물의 배양 방법.

청구항 11

제5항에 있어서, 상기 미생물은 배지에 포함된 커큐민이 장세포 내에 존재하는 대식세포에 의하여 흡수되거나, 식균작용을 통해 체내로 방출되는 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 커큐민이 세포내에 축적되어 있는 미생물 제제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로써 발효과정 중에 포도당 또는 유당과 같은 탄수화물을 분해하여 젖산을 생성하는 세균을 의미한다. 1858년 프랑스의 미생물학자인 루이 파스퇴르에 의하여 유산균의 실체가 밝혀졌고 러시아의 면역학자인 일리야 메치니코프가 1908년 노벨 생리의학상 수상 이후 말년에 "발효유에 의한 불로장생설"을 제창하고 불가리아 민족의 장수 원인이 유산균 발효유에 있음을 주장하면서부터 본격적인 연구가 시작되어, 지금까지 300여종의 유산균이 발견되었다. 유산균은 인간을 포함한 대부분의 포유류의 장내에 서식하는데 특히 인체의 장에는 건강에 유익한 균과 해로운 균을 합하여 100여 종에 달하는 세균이 100조 마리 이상 존재한다. 대사산물로 젖산을 만들어 장을 산성화 시켜주기 때문에 유해 세균의 증식을 억제하고 이상발효에 의한 암모니아나 발암물질의 생성을 줄여주는 역할, 즉 정장 작용을 하는 세균으로 알려져 있다.

[0003] 또한, 유산균의 생리 활성은 주로 유기산을 생산하여 장내의 pH를 저하시킴으로써 장내 유해세균의 증식을 억제하며 정상적인 장내 균총을 유지시켜 주는 기능을 하고 β-글루코시다아제를 생산하여 인체에 유용한 배당체를 체내에서 흡수가 용이한 비배당체로 전환하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 커큐민(curcumin)은 울금에 함유되어 있는 디아릴헵타노이드(diarylheptanoid) 화합물로, 커큐미노이드(curcuminoid)계열이며, 알칼로이드의 일종이다. 노란색의 색소 성분으로서 울금이나 강황과 같은 식물의 뿌리에 다량 함유되어 있고, 색소 또는 식품 첨가제로서 널리 사용되고 있다. 커큐민은 난소암, 췌장암, 대장암 등 다양한 종류의 암에 대한 항암 활성, 혈중 콜레스테롤 감소, 항염증, 지방세포 분화억제 그리고 간보호 활성을 가지며, 최근에는 커큐민의 항산화 효과가 알려지면서 당뇨, 비만, 치매 등 다양한 효능을 가질 수 있다는 점이 추가로 확인되었다.

[0005] 그러나, 위와 같은 커큐민의 다양한 효과에도 불구하고, 낮은 생체 이용률 (bioavaliability)로 인해 체내 흡수가 어렵다는 단점을 가진다. 이러한 이유로 본 발명자들은 미생물을 이용하여 이를 함유하는 미생물 또는 이의 파쇄물을 원료로 사용함으로써 생체 이용률을 높일 수 있다는 기존의 문제점을 개선할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2012-0040504호

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1683030호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 커큐민(curcumin)이 축적된 미생물 또는 이의 파쇄물을 포함하는 미생물 제제를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 커큐민이 축적된 미생물 제제의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 제조된 미생물 제제를 포함하는 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일실시예에서 커큐민(Curcumin)이 축적된 미생물 또는 이의 파쇄물을 포함하는 미생물 제제를 제공한다.

[0011] 여기서, 상기 미생물은 락토바실러스(*lactobacillus* sp.), 스트렙토코커스(*Streptococcus* sp.), 비피도박테리아(Bifidobacteria sp.), 락토코커스(Lactococcus sp.), 류코노스톡스(Leuconostocs sp.), 이스트(Yeast) 또는 아스퍼질리(Aspergilli sp.) 속 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0012] 여기서, 상기 미생물은 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum)일 수 있다.

[0013] 또한, 상기 미생물 내 커큐민 축적량은 0.1 내지 1.0 ug/mg인 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 다른 일실시예에서 상기 미생물 제제를 함유하는 조성물을 제공한다.

[0015] 여기서, 상기 조성물은 사람 또는 동물에 대한 경구 투여를 목적으로 하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 다른 일실시예에서 커큐민(Curcumin)이 축적된 미생물을 제조하는 방법으로서, a) 미생물 배양 배지에 커큐민을 추가로 투여하여 락토바실러스 플란타룸을 배양하는 1차 배양 단계; 및 b) 상기 a) 단계에서 배양된 락토바실러스 플란타룸을 회수하여, 커큐민이 함유된 배지에 추가 배양하는 2차 배양 단계; 를 포함하는 커큐민이 축적된 미생물의 배양 방법을 제공한다.

[0017] 여기서, 상기 미생물은 락토바실러스(*lactobacillus* sp.), 스트렙토코커스(*Streptococcus* sp.), 비피도박테리아(Bifidobacteria sp.), 락토코커스(Lactococcus sp.), 류코노스톡스(Leuconostocs sp.), 이스트(Yeast) 또는 아스퍼질리(Aspergilli sp.)으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0018] 또한, 상기 미생물은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)인 것을 특징으로 한다.

[0019] 또한, 상기 커큐민은 배양 배지 내에 0.01 내지 20 g/L의 함량으로 포함되는 것을 특징으로 한다.

[0020] 또한, 상기 미생물은 배지에 포함된 커큐민이 장세포 내에 존재하는 대식세포에 의하여 흡수되거나, 식균작용을 통해 체내로 방출되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0022] 전술한 바와 같은 본 발명에 따르면, 미생물의 유전자 조작없이 자연상태에서 커큐민을 미생물에 축적시킨 후 전달하여 체내로 방출시킬 수 있고, 기존 커큐민의 낮은 인체 이용률을 개선시켜 안정적이고 효율적으로 이용할 수 있다.

[0023] 이상에서의 본 발명에 따른 효과는 상기에 한정되는 것은 아니며, 기타 본 발명의 효과들은 후술할 실시예 및 청구범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따른 미생물 제제의 약물이 흡수되는 기작을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸 내 함유된 커큐민 함량을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸의 배양 조건별(condition 1 내지 6) 커큐민 함량을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0027] 본 발명은 커큐민이 세포내에 축적되어 있는 미생물 제제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0028] 본 발명에 따른 미생물 제제는 기존 약물이 갖는 단점들 (낮은 용해성, 낮은 안정성, 독성, 저조한 세포막 투과성 등)을 해결할 수 있는 미생물 제제를 제공한다. 본 발명에 따른 제제에 사용된 미생물은 미생물 배양 배지 내에 함유된 커큐민을 체내로 흡수하여 세포에 축적 시킨 후, 전달 캐리어(delivery carrier)의 역할을 수행하는 특성을 이용한 것이다. 이러한 효과로 인하여, 미생물 자체가 가지는 효능 뿐만 아니라, 기능성 성분인 커큐민의 효능까지 함께 가지게 되며, 특히 커큐민의 생체 이용률을 높일 수 있는 효과를 가지게 된다.

[0029] 즉, 본 발명의 미생물 제제는 유효성분인 커큐민이 미생물의 체내에 흡수되어 축적된 형태로 제제화될 수 있는 미생물을 포함하는 것을 의미하는 것이다.

[0030] 본 발명의 용어 “미생물 제제”는 본 발명에서 언급된 유산균을 포함하는 미생물이 포함된 제제로서, 약학적 조성물, 건강식품 조성물, 식품 조성물, 식품 첨가제, 음료, 화장품, 피부 외용제, 동물용 사료, 식물용 비료 등에 사용 가능한 모든 제제를 포함하는 개념이다. 특히 본 발명의 미생물 제제는, 미생물과 유효성분이 각각 개별적으로 혼합된 것이 아니며, 미생물 배양 시, 배양액(혹은 배지)에 상기 유효성분을 일정 농도 이상 포함하도록 하여 상기 미생물의 체내에 유효성분이 축적되도록 제조된 것을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미생물은 그 종류에 제한되는 것은 아니나, 유산균의 분류에 속하는 것이면 어느 것이든지 제한없이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 락토바실러스(*lactobacillus* sp.), 스트렙토코커스(*Streptococcus* sp.), 비피도박테리아(*Bifidobacteria sp.*), 락토코커스(*Lactococcus sp.*), 류코노스톡스(*Leuconostocs sp.*), 이스트(*Yeast*) 또는 아스퍼질리(*Aspergilli sp.*) 속에 속하는 유산균일 수 있고, 보다 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)일 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명에 따른 미생물 제제에 사용된 미생물은 생균 형태로 사용되고, 약물을 미생물에 축적 시킨 후 대장으로 전달하여 점막고유층 (laminar propria mucosae)에 존재하는 대식세포 (resident macrophages)에 의한 흡수 및 식균 작용을 통해, 약물이 체내로 방출되도록 하는 특징을 가진다.

[0033] 미생물에 의한 약물의 흡수(uptake)는 도 1에 나타낸 바와 같이 능동 수송 (active transport), 캐리어 매개 수송 (carrier-mediated transport), 확산 (diffusion)에 의해 발생될 수 있다. 구체적으로, 경구 투여시 미생물 제제가 대장 내에서 대식세포 또는 수지상세포에 의해 식균 또는 용균작용으로 인하여 혈액으로 약리학적 활성물질이 전달되거나, 대장 외피 세포 (epithelial cells)에 의해 미생물 제제가 흡수된 후 세포 내에서 미생물이 용균되고 약리학적 활성물질이 확산에 의해 체내로 흡수될 수 있다(프로바이오틱 캐리어 및 액티브 트랜스포트). 이러한 기작은 약리학적 활성물질의 구조적 특성에 따라 다른 방법을 사용함으로 하나로 특정지을 수는 없으나, 결국 본 발명에 따른 미생물 제제는 대식세포에 의해 흡수 (uptake)된 후 장 세포막을 통과하여 저조한 세포막 투과성을 높일 수 있고 (능동 수송 효능), 이 후 대식세포의 식균작용에 의해 미생물이 파괴되어 약물은 체내에 방출되는 효과를 발휘하게 된다.

[0034] 본 발명에 사용된 미생물에 의해 흡수된 약리학적 활성물질인 커큐민은 미생물의 생리활성에 사용되지 않으면서 세포에 축적되며, 상기 커큐민은 미생물이 다양한 방법에 의해 파괴 (물리적인 파쇄 및 식균작용 등)될 때까지 안정적으로 체내에 보존된다. 미생물에 의해 흡수되는 커큐민의 양은 수십~수백 마이크로그람 단위로, 일반적으로 섭취하는 약물 수백 밀리그람에 비해 현저하게 낮다. 반면, 환자의 체내에서의 약물의 효능을 보여주는 약동학 (pharmacokinetics)에 의하면 약물의 효능은 수백나노그람에서 수 마이크로그람의 약물이면 충분하므로, 본 발명의 미생물 제제를 이용한 약물인 커큐민의 체내 전달은 과도한 약물의 남용을 막음으로써 원치 않는 부작용 및 독성을 낮출 수 있다.

[0035] 따라서, 본 발명에 따르면 미생물의 유전자 조작 없이 자연상태에서 커큐민을 미생물에 축적시킨 후 전달하여 체내로 방출시킬 수 있고, 기존 커큐민의 낮은 인체 이용률을 개선시켜 안정적이고 효율적으로 이용할 수 있다.

[0036] 본 발명을 보다 구체적으로 설명하면, 일실시예에서 커큐민(curcumin)이 축적된 미생물 또는 이의 파쇄물을 포함하는 미생물 제제를 제공한다.

[0037] 본 발명에서 미생물 제제는 커큐민(curcumin)이 축적된 미생물 제제인 프로바이오틱스-마이크로캡슐(Probiotics-microcapsule, PM)로 제공될 수 있고, 유산균이 캡슐의 역할을 함으로써 위산에 의한 커큐민의 파괴를 방지하고 안전하게 장내로 전달시킬 수 있다.

[0038] 본 발명에서 프로바이오틱스-마이크로캡슐에 의해 유산균내 커큐민(curcumin)은 장 세포내에 존재하는 대식세포(tissue resident macro phage)에 의해 능동적으로 점막고유층(lamina propria) 또는 림프절(lymp node)로 이

동되어 혈관으로 배출됨으로써 생체 이용률(bioavaliability)이 높아지게 된다. 본 발명에서 상기 미생물 제제는 미생물 내에 축적된 커큐민이 장 세포내에 존재하는 대식세포에 의한 흡수 및 식균작용을 통해 체내로 방출될 수 있는 특징을 가진다.

[0039] 본 발명에서 사용되는 미생물은 유산균으로서, 락토바실러스(*lactobacillus sp.*), 스트렙토코커스(*Streptococcus sp.*), 비피도박테리아(*Bifidobacteria sp.*), 락토코커스(*Lactococcus sp.*), 류코노스톡스(*Leuconostocs sp.*), 이스트(*Yeast*) 또는 아스퍼질리(*Aspergilli sp.*) 속에 속하는 유산균일 수 있고, 보다 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 락토바실러스 플란타룸을 사용하여, 배양 시 커큐민 함유 배지에서 배양하였으며, 이러한 방식으로 배양된 상기 균주를 락토바실러스 플란타룸 K8로 명명하였다.

[0040] 또한, 본 발명에서 커큐민은 이에 제한되는 것은 아니나, 강황 또는 울금 중에 1 이상의 식물로부터 분리될 수 있다. 여기서 커큐민의 분리 방법은 당업계에 일반적으로 알려진 추출 방법 또는 분획방법으로서, 냉침, 열추출, 초음파 추출, 가압추출법 등을 제한 없이 이용할 수 있고, 극성용매 또는 비극성 용매로서, 물, 메탄올 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등 알코올, 아세트산, DMF(dimethylformamide) 또는 (v) DMSO(dimethyl sulfoxide) 등 극성용매 또는 아세톤, 아세토나이트릴, 에틸 아세테이트, 메틸 아세테이트, 플루오로알칸, 펜탄, 헥산, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, o-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 클로로포름, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르 또는 사염화탄소 등 비극성 용매 중에 하나 또는 그의 혼합 용매를 선택하여 사용할 수 있다.

[0041] 본 명세서에서 사용되는 파쇄물은 미생물을 세제(detergent)로 처리하는 화학적 방법 또는 물리적 방법 등으로 파쇄하여 얻은 세포 용해물을 의미하며, 예를 들어, 미생물을 비드 밀(bead mills), 프레스 (Presses), 소니케이터(Sonicator) 또는 마이크로플루다이저 (Microfluidizer)를 사용하여 파쇄물을 수득할 수 있다.

[0042] 본 발명의 다른 실시예에서 미생물을 커큐민이 함유된 배지에서 배양하여 상기 미생물 내에 커큐민 성분을 축적시킬 수 있으며, 구체적으로 미생물을 커큐민(Curcumin) 함유 배지에서 배양하거나, 커큐민 함유 반응물과 반응시켜, 상기 미생물 내에 커큐민을 축적시키는 단계를 포함한다.

[0043] 여기서 배양은 미생물 활성화를 위해 미생물을 1차 배양하는 단계 및, 배양된 미생물을 커큐민이 포함된 배지에서 2차 배양하는 단계를 포함할 수 있으며, 구체적으로는 미생물을 MRS 배지에서 1차적으로 배양한 후, 상기 배양된 세포를 커큐민(Curcumin)이 포함된 MRS 배지로 옮겨 2차 배양 할 수 있다. 배양된 세포는 세척 후 직접 사용하거나 또는 microfluidizer를 사용하여 세포를 파쇄하여 사용할 수 있다. 또한, 배양된 세포는 동결 건조 시켜 분쇄된 분말 형태로도 사용할 수 있다.

[0044] 미생물 제제를 제조하는 방법은 커큐민을 미생물 내에 축적하는 구성을 동일하게 포함하므로, 앞서 기재된 이에 설명은 미생물 제제를 제조하는 방법에도 동일하게 적용된다.

[0045] 또한, 배양에 이용되는 배지로는 미생물 배양에 사용되는 공지된 배지를 사용할 수 있으며, 미생물의 종류에 따라 임의의 배지 선택이 가능하다. 예를 들어, M9 최소배지, LB(Luria-Bertani) 배지, MRS (deMan Rogosa Sharpe) 고상 또는 브로스 배지, APT (All Purpose with Tween) 배지, BHI(Brain Heart Infusion) 배지 또는 YPD (효모 추출물 -펩톤 덱스트로즈) 고상 또는 액상 배지를 이용할 수 있다. 상기 배지는 본 발명의 미생물 배양 시 1차 또는 2차 배지로 사용될 수 있으며, 상기 2차 배지는 커큐민이 추가로 포함되는 것을 특징으로 한다.

[0046] 상기 2차 배지에 포함되는 커큐민은 이에 제한되는 것은 아니나, 0.01 내지 20 g/L의 농도로 포함될 수 있으며, 보다 바람직하게는 0.01 내지 10 g/L의 농도로 포함될 수 있고, 상기 농도는 배양하는 미생물의 종류 및 배양 배지의 조성에 따라 당업자의 기술 수준에 따라 적절하게 조절될 수 있다.

[0047] 본 발명에서 배양된 미생물은 커큐민의 체내 함량이 0.1 내지 1.0 ug/mg이며, 보다 바람직하게는 0.5 내지 1.0 ug/mg일 때, 커큐민이 축적된 미생물 제제로서 적합하다.

[0048] 본 발명의 일실시예에서 상기 미생물 제제를 함유하는 조성물로서 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 예를 들어, 상기 미생물 제제를 포함하는 약학적 조성물, 건강식품 조성물, 식품 조성물, 식품 첨가제, 음료, 화장품 또는 동물용 사료 조성물일 수 있으며, 특히 경구용으로 섭취되는 제제로서 사용되는 것일 경우, 본 발명의 미생물 제제의 장점을 극대화할 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 경구 투여용으로 제조될 수 있으며, 고상 혹은 액상, 젤상으로 제조될 수 있다.

즉, 상기 조성물은 통상적으로 사용하는 담체 및 향료와 혼합하여 정제 (tablet), 트로키 (troche), 캡슐 (capsule), 엘릭실 (elixir), 시럽 (syrup), 산제 (powder), 현탁제 (suspension) 또는 과립제 (granule) 등의 형태로 제조 및 투여될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 미생물 제제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있으며, 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀(liquid paraffin) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0050] 투여용량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성율 및 배설속도, 피투여자의 연령, 성별, 상태 등에 따라 적절히 선택할 수 있다. 바람직하게는 1일 10 mg~1,000 mg의 유효용량으로 투여할 수 있고, 조성물 내 적정 균수는 10^{8}~10^{12}CFU/일 수 있다.

[0052] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0054] <실시예 1> 커큐민 함유 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)의 제작

[0055] 1. 미생물 제제를 만들기 위한 유산균 배양

[0056] 초저온냉동고에 Stock 상태로 보관한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K8 (O.D. 1.0)을 상온에서 녹인 후 커큐민이 함유된 배지(broth)에 접종 한 후 36.5℃에서 5시간 이상(20시간 이하) 1차로 배양하였다. 1차 배양이 완료된 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K8 전량을 커큐민이 포함된 강황 또는 울금 추출물이 함유된 MRS broth에 접종하여 2차 배양하였다.

[0058] 2. 유산균 내 축적된 커큐민 함량의 분획별 분석

[0059] 상기 배양된 유산균 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K8에 대하여, 배양액, 균주 세척액(1~3회), 파쇄물, 및 실험에 사용된 커큐민을 에틸아세테이트(EtOAC) 또는 부탄올(BuOH)를 이용하여 각각 분획한 후, 각 분획물을 감압농축 하여 분획물을 획득하였고, 각 분획별 커큐민의 함량 분석을 진행하였다. 커큐민은 MeOH에 녹여 100ppm농도로 조제하여 분석하였다. 커큐민, washing1-3, 유산균 배양액, 유산균 파쇄물의 EtOAC 그리고 BuOH 분획은 10,000ppm 농도로 조제하여 분석하였다.

[0060] 분석 조건은 다음과 같다:

[0061] - Instrument: Agilent Technologies 6410 Triple Quad (LC-MS/MS)

[0062] - Column: C18 (2.1 mm X 150 mm, 2.7 μm)

[0063] - Solvent: A; 0.1% Formic acid in Water, B; 0.1% Formic acid in Acetonitrile

[0064] - Flow rate: 0.4 ml/min

표 1

[0065]

	time(min.)	B%
1	0	5
2	30	100
3	32	100

[0066] 농도 기울기

[0067] MS condition:

[0068] - Ionization Mode -ESI, scan mode

[0069] - Gas temp. 300℃

[0070] - Capillary volt. 4,000 V

[0071] - Nebulizer 40 psig

[0072] - Fragmentor 135 V

[0074] 본 실시예에서 제조된 락토바실러스 플란타룸 내에 함유된 커큐민 함량을 도 2에 나타내었다. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K8에 축적된 커큐민의 함량을 각 용매의 분획별로 측정하였고, 각각의 용매 분획에 포함된 커큐민 함량은 에틸아세테이트 분획의 경우 0.36ug/mg, 부탄올 분획의 경우 0.18 ug/mg이었고, 총 함유량을 각각의 분획을 모두 합하여 4.01ug인 것으로 확인되었다. 상기 결과로부터, 본 발명의 배양 방법에 의하여 배양된 미생물의 경우, 체내 커큐민을 축적할 수 있음을 확인하였다.

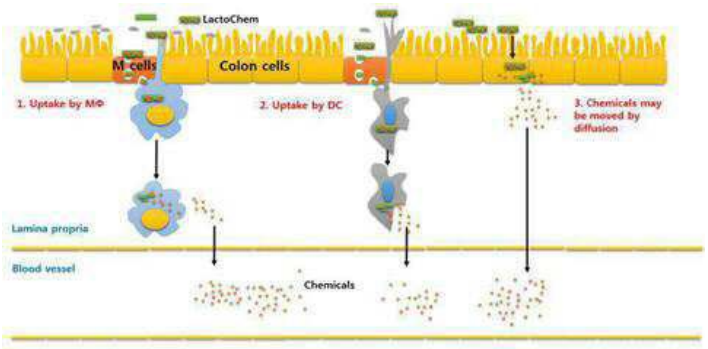
[0076] <실시예 2> 배양 조건에 따른 커큐민 함량 분석

[0077] 커큐민을 흡수한 락토바실러스 플란타룸 파쇄물을 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 이때, 배지에 포함된 커큐민 농도에 따라 6가지 조건으로 실험을 진행하였으며, 배양된 미생물 내의 커큐민 함량은 도 3과 같이 확인할 수 있었다. 즉, 커큐민을 분석한 결과 배양 조건에 따라 미생물 내의 커큐민의 함유량이 변화되는 것을 확인하였다.

[0079] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2

samples	area	con.	ug/mg	총 함유량 (ug)	sum (ug)
K8_curcumin (EtoAC fr.)	777,096	2,000ppm	0.36	1.98	4.01
K8_curcumin (BuOH fr.)	240,376	2,000ppm	0.18	2.03	

도면3

samples	area	ug/mg	총 함유량 (ug/500mL)
condition_1	2,301,121	0.54	2.05
condition_2	1,793,899	0.43	1.20
condition_3	6,552,125	0.54	4.01
condition_4	1,671,635	0.40	0.88
condition_5	2,527,264	0.60	1.68
condition_6	311,162	0.08	0.24