(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0079258
(43) 공개일자 2022년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/10 (2022.01) *A23L 29/00* (2016.01)
A23L 31/10 (2016.01) *A23L 35/00* (2016.01)
A61K 8/98 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2022.01)
A23L 29/065 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0168852
(22) 출원일자 2020년12월04일
심사청구일자 2020년12월04일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김연주
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 508호 (서천동)
최한솔
인천광역시 남동구 논고개로68번길 49, 103동 704호 (논현동, 힐스테이트아파트)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 7 항

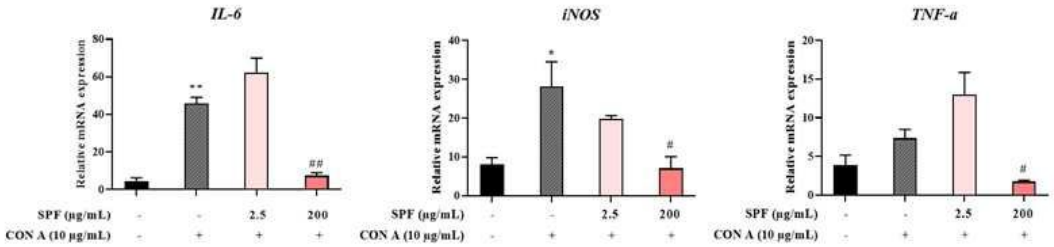
(54) 발명의 명칭 **양태반 발효물을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 면역 조절능을 가지는 세포 독성이 감소된 양태반 발효 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주를 이용하여 발효시킨 양태반 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주로 발효시키는 최적의 공정을 통해 양태반의 이취를 제거하고 면역을 증진시킬 수 있다는 사실을 확인하였다.

따라서 본 발명에 따라 제조된 양태반 발효물은 식품 또는 건강기능성 식품 원료, 화장품 원료, 사료 원료 등으로 다양하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도11a



(52) CPC특허분류
A23L 31/10 (2020.05)
A23L 35/00 (2016.08)
A61K 8/981 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711110161
과제번호 2019R1A2C1010428
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구
연구과제명 신장 및 간세포에서 uric acid 축적을 억제하는 신규 희귀사포닌 금나노 곤충 펩타이드 결합체 대량생산 및 작용메카니즘 규명
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395063006
과제번호 PJ013173012020
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21/시스템합성농생명공학사업
연구과제명 시스템생물학 기반 유용신소재 생산을 위한 식물세포기능 향상 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

양태반 발효물을 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 양태반 발효물은 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주(기탁번호: KCTC 14262BP)로 발효한 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 IL-10, IL-4, CREB 및 ARG-1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 mRNA의 발현을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 2.5 내지 400㎍/mL의 농도인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 일산화 질소(Nitric oxide)의 분비를 증진시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

하기의 단계를 포함하는, 제 1항의 조성물의 제조방법:

(a) 양태반을 준비하는 단계;

(b) 상기 양태반에 효모 균주를 첨가하고 발효시키는 단계; 및

(c) 상기 발효물을 수득하는 단계.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 효모 균주는 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주(기탁번호: KCTC 14262BP)인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 양태반 발효 조성물의 면역 조절 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 효모 균주를 이용하여 발효시킨 양태반 발효 조성물의 면역 조절 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 건강에 대한 관심이 증대되고 사람들의 기호가 다양해지면서 기능성은 좋으나 물질 자체의 이취 등으로 인하여 사용에 제한이 있는 물질에 대하여 사용상 한계를 극복하기 위한 다양한 시도가 행해지고 있다.

[0003] 그 예로, 양의 태반인 양태반은 사람의 태반과 분자 구조가 유사해 인체에 부담이 가거나 유해하지 않으며, 피부미용 및 노화방지 등의 효과로 주목 받고 있어 건강기능성 식품 원료, 화장품 원료 등으로 그 이용이 점차 늘고 있다. 구체적으로, 양태반은 85%가 단백질 성분으로 구성되어 있는데, 이는 닭 가슴살의 약 3배, 두부의 약 6배, 우유의 약 18배이며, 양태반에는 17종의 아미노산이 함유되어 있고 특히 이 중 40%가 체내에서 합성할 수 없어 음식으로 섭취해야 하는 필수 아미노산으로 구성되어 있다. 또한, 양태반에는 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산, 비타민 등 피부 미용에 유용한 성분들이 다량 함유되어 있으며, UVB에 의한 콜라겐, 엘라스틴, 피브릴린-1(fibrillin-1)의 발현 감소를 유의적으로 억제하고 피부의 수분 함량을 증가시킨다고 보고되어 있는 등 피부 세포를 건강하게 유지해주는 기능이 있어 최근 화장품 소재로 각광받고 있다(한국식품영양과학회, Vol 48 No.1, 2019, 18-23). 더욱이, 양태반에는 면역력을 조절하고 상처 치료와 세포 재생에 필요한 성장인자가 풍부하며, 인터루킨(Interleukin)이 포함되어 있어 면역기능을 향상시키는 효과가 있다.

[0004] 이러한 다양한 효과가 있는 양태반은 현재 호주에서 생산되어 국외에서 식품 원료로 사용되고 있으며, 국내에서는 기능성 식품의 원료로 사용되고 있다. 그러나 양태반은 상기와 같은 효과에도 불구하고 세포독성이 있고 과도한 면역조절 반응을 보이기에 활용에 어려움이 따른다. 따라서 상기와 같이 양태반의 세포독성을 낮추고 면역조절 효능을 활용 가능한 범위까지 조절할 수 있는 공정의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 상기와 같은 배경하에, 본 발명자들은 양태반을 면역반응을 조절할 수 있는 조성물을 개발하기 위해 연구 노력한 결과, 양태반을 발효시키는 과정을 통해 세포독성이 낮추고, 면역을 증진시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 이에, 본 발명은 양태반 발효물을 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 상기 조성물의 제조방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0008] (a) 양태반을 준비하는 단계; (b) 상기 양태반에 효모 균주를 첨가하고 발효시키는 단계; 및 (c) 상기 발효물을 수득하는 단계.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 양태반 발효물을 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일구현예로, 상기 양태반 발효물은 데케라 디아민(Dekkera deamine) 효모 균주(기탁번호: KCTC 14262BP)로 발효한 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예로,상기 조성물은 IL-10, IL-4, CREB 및 ARG-1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 mRNA의 발현을 증진시키는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 2.5 내지 400㎍/mL의 농도일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 일산화 질소(Nitric oxide)의 분비를 증진시키는 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 상기 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0017] (a) 양태반을 준비하는 단계; (b) 상기 양태반에 효모 균주를 첨가하고 발효시키는 단계; 및 (c) 상기 발효물을 수득하는 단계.

[0018] 본 발명의 일구현예로, 상기 효모 균주는 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주(기탁번호: KCTC 14262BP)일 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따르면 양태반을 효모 균주를 활용하여 발효하는 경우, 기존의 양태반에 비해 세포독성이 낮고 적절한 면역증진 효과를 가지는 발효 조성물을 제조할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 양태반 발효물은 식품 또는 건강기능성 식품 원료, 화장품 원료, 사료 원료 등으로 다양하게 이용될 수 있으며, 면역 관련 치료제 분야 등에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0021] 단, 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 양태반의 이취를 억제하기 위한 최적의 제조 조건을 찾기 위해 관능평가를 수행한 결과이다.

도 2는 본 발명의 양태반 발효 조성물(SPF)을 Raw264.7 세포에 처리했을 때, 일산화 질소(NO)의 분비능을 확인하기 위해 SPF 처리시의 NO 분비 수준을 양태반(SP) 및 LPS와 비교 분석한 결과로서, 도 2a는 2.5 내지 50㎍/mL의 SP 및 SPF를 처리했을 때 NO 분비 수준 대조군 및 양성 대조군(LPS 처리군)과 비교하여 나타낸 것이고, 도 2b는 50 내지 400㎍/mL의 SP 및 SPF를 처리했을 때 NO 분비 수준을 대조군 및 양성 대조군(LPS 처리군)과 비교하여 나타낸 것이며, 도 2c는 2.5 내지 500㎍/mL에서 SPF를 처리했을 때 NO 분비 수준을 대조군 및 양성 대조군(LPS 처리군)과 비교하여 나타낸 것이다.

도 3은 무처리 대조군, 양성 대조군(LPS 처리군)과 본 발명의 양태반 발효 조성물(SPF)의 시간에 따른 일산화 질소(NO)의 분비능을 확인한 것으로서, SPF의 농도를 2.5, 40, 400㎍/mL으로 처리하면서 시간에 흐름에 따른 NO의 분비를 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 양태반 발효 조성물(SPF)을 Raw264.7 세포에 처리했을 때, 세포 생존율을 비교분석하기 위해 무처리 대조군, LPS(1㎍/mL) 처리한 양성 대조군과 농도를 달리한 양태반 처리군(Sheep placenta) 및 본 발명의 양태반 발효 조성물(SPF)을 처리하면서 MTT assay를 수행한 결과로서, 도 4a는 2.5 내지 50㎍/mL의 농도에서, 도 4b는 50 내지 400㎍/mL의 농도에서, 4c는 2.5 내지 500㎍/mL의 농도에서 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 5는 Raw264.7 세포에 무처리 대조군, 양성 대조군(LPS 처리군) 및 본 발명의 양태반 발효 조성물(SPF)(200, 400㎍/mL)을 처리한 다음, Live/Dead Staining을 수행한 결과이다.

도 6은 본 발명의 양태반 발효 조성물(SPF)을 Raw264.7 세포에 처리했을 때, 시간의 흐름에 따른 세포 생존율을 비교분석하기 위해 무처리 대조군, LPS(1㎍/mL) 처리한 양성 대조군 및 본 발명의 양태반 발효 조성물(SPF)를 처리하면서 시간의 흐름에 따른 세포 생존율을 확인한 것으로서, SPF를 2.5, 40, 400㎍/mL의 농도로 처리한 다음 30시간 및 48시간이 경과한 다음 세포 사진을 촬영한 결과이다.

도 7은 Raw264.7 세포에 1㎍/mL 농도의 LPS 및 2.5, 40, 400㎍/mL 농도의 SPF를 처리했을 때, 대식세포로의 분화 여부를 관찰한 결과이다.

도 8은 Raw264.7 세포에 1㎍/mL 농도의 LPS 및 2.5, 40, 400㎍/mL 농도의 SPF를 처리한 다음 면역과 관련한 사이토 카인의 발현 변화를 확인한 결과로서, 도 8a는 M1 phase와 관련된 사이토카인(iNOS, IL-6, TNF-α, IL-1

β)의 발현을 확인한 결과이고, 도 8b는 M2 phase와 관련된 사이토카인(IL-4, IL-10, CREB)의 발현을 확인한 결과이다.

도 9는 balb/C 마우스의 비장세포에 10㎍/mL 농도의 Con A와 17.5, 25, 50, 100, 200, 400㎍/mL 농도의 본 발명의 양태반 발효물(SPF)을 처리한 다음 WST-1 assay를 통해 세포증식능을 확인한 결과이다.

도 10은 balb/C 마우스의 비장세포에 10㎍/mL 농도의 Con A를 처리한 뒤 사이토 카인의 발현 변화를 확인한 결과로서, 도 10a는 M1 phase와 관련되어 있는 IL-6 및 iNOS의 발현을 확인한 결과이며, 도 10b는 M2 phase와 관련되어 있는 IL-10, ARG-1, CREB 및 IL-4의 발현을 확인한 결과이다.

도 11은 balb/C 마우스의 비장세포에 10㎍/mL 농도의 Con A 및 본 발명의 양태반 발효물(SPF)을 2.5 및 200㎍/mL 농도로 처리한 다음 사이토카인의 발현 변화를 확인한 결과로서, 도 11a는 M1 phase와 관련되어 있는 IL-6, iNOS 및 TNF-α의 발현을 확인한 결과이며, 도 11b는 M2 phase와 관련되어 있는 IL-10, ARG-1, CREB 및 IL-4의 발현을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명자들은 상기와 같은 배경하에, 본 발명자들은 양태반을 면역반응을 조절할 수 있는 조성물을 개발하기 위해 연구 노력한 결과, 양태반을 효모 균주로 발효시키는 과정을 통해 세포독성이 낮추고, 면역을 증진시킬 수 있음을 확인하였는바, 이로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0025] 이에, 본 발명은 양태반 발효물을 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어, "효모"는 곰팡이나 버섯 무리이지만 균사가 없고, 광합성능 및 운동성을 가지지 않은 단세포 생물의 총칭을 말한다. 효모 자체는 지방 및 단백질원으로 사료 등에 사용되며, 식품이나 사료의 발효에도 사용될 수 있다. 효모는 올리고당을 분해할 수 있는 효소를 분비하며 효모의 세포벽은 동물에게 유용한 성분으로 작용할 수 있으므로, 이를 이용해 제조된 발효 조성물은 동물성 원료의 성분 및 기능성을 개선할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "효소(enzyme)"란 반응물인 기질과 결합하여 효소-기질 복합체를 형성하는 방법으로 화학 반응의 활성화 에너지를 낮추는 작용을 하는 것으로, 본 발명의 효소는 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 또는 RNA일 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 양태반 발효물은 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주(기탁번호: KCTC 14262BP)로 발효한 것일 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주는 흰색의 막대 형태이며 염에 내성을 갖는 균주로 전통 발효 사과식초에서 분리된 것이다. pH 6.8(최적 pH 7.0) 및 7.0% 염 농도하에 10~40℃(최적 온도 30℃)의 환경에서 성장한다. 상기 균주는 26S rRNA 유전자 D1/D2 및 ITS(internal transcribed spacer) 영역의 서열에 대한 계통발생학적 분석 결과 데케라 브루셀렌시스(*Dekkera bruxellensis*)와 유전적으로 가장 유사하다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주는 2020년 8월 6일에 한국 생명공학연구원의 생물자원센터에 *Dekkera deamine* kh3라는 이름으로 기탁되어, 기탁번호 KCTC 14262BP를 부여 받았다.

[0031] 본 발명에서 사용되는 용어, "발효(fermentation)"란 효소 작용에 의하여 유기물에서 화학적 변화가 일어나는 대사 과정을 말한다. 식품을 생산하는 관점에서는 유기물이 화학적 반응으로 생활에 유용한 음식이나 음료를 만드는 미생물의 활동으로 넓게 정의한다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 단백질은 식품 유래 단백질, 동물성 단백질 및 식물성 단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 예컨대, 식품 유래 단백질은 바람직하게 육류, 생선, 해조류 또는 난류 등의 식품 유래 단백질을 포함할 수 있고, 동물성 단백질은 바람직하게 가축 부산물을 포함할 수 있고 더욱 바람직하게는 양태반을 포함할 수 있으며, 식물성 단백질은 바람직하게는 콩 또는 곡물류 유래 단백질을 포함할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 용어, "사이토카인"은 세포 신호전달의 역할을 하는 단백질 (5-20 kDa)을 의미할 수 있다. 사이토카인은 세포에 의해 방출되고 사이토카인을 방출하는 세포들 및/또는 다른 세포들의 거동에 영향을 준다. 사이토카인의 비-제한적 예들에는 케모카인, 인터페론, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 모노카인 및 콜로니 자극 인자들이 포함된다. 사이토카인은 면역 세포들, 가령, 대식세포, B 림프구들, T 림프구들, 비만 세포 및 단핵구, 내피 세포, 섬유모세포 및 간질 세포들을 비롯한(그러나 이에 제한되는 것은 아님) 광범위한

세포들에 의해 생성될 수 있다. 사이토카인은 하나 이상의 유형의 세포에 의해 생성될 수 있다. 사이토카인은 수용체들을 통해 작용하며 면역계에서 특히 중요하고, 체액성 및 세포계 면역 반응들 사이의 균형을 조절하며, 세포 집단의 성숙, 성장 및 반응성(responsiveness)을 조절한다. 본 명세서의 사이토카인은 자연 발생 사이토카인일 수 있거나 또는 자연 발생 사이토카인의 돌연변이 버전일 수 있다. 본 출원에서 사용되는, "자연 발생" 은 또한 야생형으로도 지칭될 수 있으며, 대립유전자 변종들을 포함한다. 자연 발생 사이토카인의 돌연변이된 버전 또는 "돌연변이"는 사이토카인의 기능, 활성 및/또는 특이성을 변화시키기 위하여 자연 발생 서열에 대해 이루어진 특정 돌연변이들을 지칭한다. 한 구체예에서, 돌연변이들은 사이토카인의 기능, 활성 및/또는 특이성을 향상시킬 수 있다. 또 다른 구체예에서, 돌연변이들은 사이토카인의 기능, 활성 및/또는 특이성을 감소시킬 수 있다. 돌연변이는 사이토카인의 하나 이상의 아미노산 잔기들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 본 발명의 양태반 발효 조성물은 상기 사이토카인의 발현을 조절하는 것일 수 있으며, 본 발명에 있어서 사이토카인은 M1 phase 및 M2 phase와 관련이 있는 사이토카인일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, iNOS, IL-6, TNF-α, IL-1β, iNOS, IL-4, IL-10, CREB 및 ARG-1일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 IL-10, IL-4, CREB 및 ARG-1의 발현을 증진시킬 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 일산화 질소(nitric oxide, NO)는 유전자 활성을 개시/중단 시키는 신호 조절 분자로서, 면역과 관련된 작용으로 감염에 대항하고 종양세포를 파괴할 수 있으며 상처 치유 기능을 강화시킬 수 있다. 본 발명의 양태반 발효 조성물은 NO의 분비를 증가시킬 수 있으나, 양태반 자체를 사용한 경우보다는 NO의 분비가 낮아 과면역 반응을 유도하지 않으면서 적절한 수준의 면역에 활용될 수 있다.

[0036] 본 발명에서는 구체적인 실시예를 통해 양태반에 상기 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주를 첨가하여 발효시킨 양태반 발효물이 기존의 양태반에 비해 세포 독성이 감소하고, 적합한 면역 조절능을 가진다는 사실을 확인하였다.

[0037] 본 발명의 일실시예에서는, 양태반을 데케라 디아민 효모 균주로 발효시키는 경우 기존에 과발현 되었던 면역활성이 조절되는 것을 NO의 분비 감소를 통해 확인할 수 있었고, 세포 생존율 또한 양태반에 비해 증가된 것을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0038] 상기와 같은 결과를 통해 양태반을 데케라 디아민 효모 균주로 발효시키는 경우 세포 독성이 감소하고 과발현되었던 면역 증진능이 유효한 수준으로 유지되는 것을 확인하였기에, 본 발명의 양태반 발효 조성물이 면역 증진용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0039] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 하기의 단계를 포함하는, 상기 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0040] (a) 양태반을 준비하는 단계; (b) 상기 양태반에 효모 균주를 첨가하고 발효시키는 단계; 및 (c) 상기 발효물을 수득하는 단계.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 효모 균주는 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주(기탁번호: KCTC 14262BP)일 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0045] **[실시예]**

[0046] **실시예 1. 양태반 발효물의 발효 조건 최적화**

[0047] 양태반 발효물을 면역조절을 위한 조성물로 사용하기 위해서는 우선 악취에 가까운 냄새가 나는 양태반의 악취를 제거할 필요가 있기에, 본 발명자들은 본 발명의 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 균주를 활용하여 양태반의 악취를 제거하는 최적의 조건을 찾기위한 연구를 수행하였다.

[0048] 증류수(distilled water)로 세척한 다음 현탁한 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 균주를 2%의 양태반 4mL 용액에 접종하였다. 최적의 조건을 탐색하기 위해 글리세롤은 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5% 농도로 첨가하였고, 데케라 디아민(*Dekkera deamine*) 효모 균주는 OD_{600}값을 1로 맞춘 후 0.25, 0.5, 1, 2, 3 또는 4ml을 첨가하여 1 내지 4일 동안 발효를 진행하였고, 사람 10명에 대해서 가장 향이 좋은 조건에 가장 높은 점수를 부여하고 향이 좋지

않은 조건에 낮은 점수를 부여하는 관능평가를 수행하였다. 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 아무런 처리하지 않은 양태반이 가장 낮은 점수를 받았으며, 2% 글리세롤 첨가, OD_{600}=1의 효모 균주 2ml 첨가 및 3일 동안의 발효 기간이 이취를 제거하기 위한 최적의 조건인 것을 확인할 수 있었다.

[0050] **실시예 2. 본 발명의 발효 조성물 처리에 의한 Raw264.7 세포의 생존율 및 일산화 질소(NO) 분비능 변화 확인**

[0051] 2-1. 본 발명의 발효 조성물 처리 농도에 따른 NO 분비능 확인

[0052] 처리 농도에 따른 NO 분비 수준 및 세포 생존율을 측정하기 위해 무처리 대조군, LPS(Lipopolysaccharide)를 처리한 양성 대조군, 양태반 처리군(Sheep placenta, SP) 및 양태반 발효물 처리군(Sheep placenta formation with *Dekkera deamin*e, SPF)으로 그룹을 나눈 다음, LPS 그룹은 1㎍/mL의 농도로 처리하고, 양태반 처리군(SP) 및 양태반 발효물 처리군(SPF)은 2.5, 5, 10, 20, 40, 50, 100, 200, 300, 400㎍/mL의 농도로 처리하였다. 처리 후 24시간이 경과한 다음, 상층액의 NO 분비량을 Griess reagent assay를 통해 확인하였다. 결과 값은 평균±SD(n=3)로 나타내었고, 양측검정(two tails t-test)으로 검증되었으며, 유효값은 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001로 나타내었다.

[0053] 그 결과, 2.5 내지 50㎍/mL 범위에서는 도 2a에 나타낸 바와 같이, 무처리 대조군의 경우 2.5μM, LPS 처리군이 22.367±1.186μM의 NO 분비를 보여주었고, 더 높은 NO 분비 유도능을 보여주었고, 50 내지 400㎍/mL 범위에서는 도 2b에 나타낸 바와 같이, 무처리 대조군의 경우 2.5 μM, LPS 처리군이 21.606±0.459μM의 NO 분비를 보여주었다. 도 2a 및 2b에 나타낸 바와 같이, 양태반 처리군(SP)은 2.5 내지 400㎍/mL 범위에서 양성 대조군인 LPS 처리군과 유사하거나 높은 NO 분비를 보여주는 것을 확인할 수 있었으며, 양태반 발효물 처리군(SPF)은 무처리 대조군에 비해 NO 분비능이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으나 양성 대조군 및 양태반 처리군에 비해 낮은 NO 분비를 보여주었다. 상기 양태반 처리군 및 양태반 발효물 처리군의 NO 분비는 100㎍/mL 농도까지는 농도에 따라 증가하는 추세를 보였지만 200㎍/mL 농도 이후로는 급격하게 감소하여 400㎍/mL에서는 2.492±0.209μM로 확인되었다.

[0054] 상기와 같은 결과를 재확인하기 위해 무처리 대조군, 양성 대조군 및 양태반 발효물 처리군(SPF)을 더 넓은 농도 범위(2.5 내지 500㎍/mL)에서 처리하여 NO 분비를 확인하였다. 그 결과, 도 2c에 나타낸 바와 같이 모든 그룹에서 기존과 유사한 수준의 NO 분비를 보여줌을 재확인할 수 있었다.

[0055] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 데케라 디아민(*Dekkera deamine*)을 통해 발효시킨 본 발명의 양태반 발효물이 양태반 처리군보다 낮은 NO 분비를 보여주기에, 면역을 조절할 수 있지만 기존처럼 과도한 면역반응을 유도하지 않는다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0057] 2-2. 본 발명의 발효 조성물 처리 후 시간 경과에 따른 NO 분비능 확인

[0058] 시간 경과에 따른 NO 분비 수준을 측정하기 위해 무처리 대조군, LPS를 처리한 양성 대조군 및 양태반 발효물 처리군(SPF)으로 그룹을 나눈 다음, LPS 그룹은 1㎍/mL의 농도로, 양태반 발효물 처리군(SPF)은 2.5, 40, 400㎍/mL의 농도로 처리하고, 0, 1, 3, 6, 12, 24, 30, 36, 48시간마다 Griess reagent assay를 통해 NO 분비능이 유지되는지 여부를 확인하였다. 상기 실험의 결과 값은 평균±SD(n=3)로 나타내었고, 양측검정(two tails t-test)으로 검증되었으며, 유효값은 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001로 나타내었다.

[0059] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 12시간이 경과할 때까지는 대조군 1.457±0.625μM, LPS 처리군 1.645±0.221μM, SPF 2.5 ㎍/mL 처리군 1.061±0.104μM, SPF 40㎍/mL 처리군 1.576±0.161μM, SPF 400 ㎍/mL 처리군 2.141±0.038 μM로 비슷한 양의 NO 형성능을 보여 주었으나, 24시간 이후부터는 대조군 2.226±0.131μM LPS 처리군 15.135±1.001μM, SPF 2.5㎍/mL 처리군 10.505±0.631μM, SPF 40㎍/mL 처리군 11.717±0.029μM, SPF 400㎍/mL 처리군 6.106±0.347μM을 보여주어 대조군과 유의한 정도의 NO 분비능의 차이가 발생함을 확인할 수 있었다. SPF 처리 농도에 따라 구체적으로 NO 분비 수준을 확인했을 때 400㎍/mL의 SPF 처리군은 완만한 수준을 보이며 NO 분비가 증가하였으나, 2.5, 40㎍/mL의 농도로 SPF를 처리한 경우에는 LPS 처리군과 유사한 수준의 NO 분비 수준을 보여주었다.

[0061] 2-3. 본 발명의 발효 조성물 처리 농도에 따른 세포 생존율 확인

[0062] 처리 농도에 따른 세포 생존율을 측정하기 위해 무처리 대조군, LPS(Lipopolysaccharide)를 처리한 양성 대조군, 양태반 처리군(Sheep placenta, SP) 및 양태반 발효물 처리군(Sheep placenta formation with *Dekkera deamine*, SPF)으로 그룹을 나눈 다음, LPS 그룹은 1㎍/mL의 농도로 처리하고, 양태반 처리군(SP) 및 양태반 발효물 처리군(SPF)은 2.5, 5, 10, 20, 40, 50, 100, 200, 300, 400㎍/mL의 농도로 처리하였다. 처리 후 24시간이 경과한 다음, MTT assay를 수행하여 세포 생존율을 확인하였다. 상기 실험의 결과 값은 평균±SD(n=3)로 나타내었고, 양측검정(two tails t-test)으로 검증되었으며, 유효값은 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001로 나타내었다.

[0063] 그 결과, 2.5 내지 50㎍/mL 범위에서 생존율을 확인한 도 4a 및 50 내지 400㎍/mL의 범위에서 생존율을 확인한 도 4b의 범위 모두에서 본 발명 양태반 발효물 처리군(SPF)의 생존율이 80% 이상으로 나타났으며, 모든 농도 범위에서 양태반 처리군(SP) 및 양성 대조군 보다 높은 생존율을 보여주었다.

[0064] 상기와 같은 결과를 재확인하기 위해 무처리 대조군, 양성 대조군 및 양태반 발효물 처리군(SPF)의 전체 농도 범위에서 생존율을 더 넓은 농도 범위(2.5 내지 500㎍/mL)에서 확인하였다. 그 결과, 도 4c에 나타낸 바와 같이 기존 실험과 유사한 정도의 생존율을 보임을 재확인 할 수 있었다.

[0065] 또한, 세포 생존 여부를 이미징을 통해 관찰하기 위해 Raw264.7 세포를 $3x10^4$세포/접시의 밀도로하여 60mm 배양접시에 시딩(seeding)한 다음날, 배양한 세포들에 LPS(1μg/mL)와 본 발명 양태반 발효물(200, 400μg/mL)을 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 세포에 초록색(생존 세포), 빨간색(사멸 세포)으로 염색을 수행한 Live/Dead staining의 결과에서도, 도 5에 나타낸 바와 같이 LPS를 처리한 세포에 비해 본 발명의 양태반 발효물을 처리한 경우(200, 400㎍/mL)의 생존율이 유의하게 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0067] 2-4. 본 발명의 발효 조성물 처리 후 시간 경과에 따른 세포 생존율 확인

[0068] 시간 경과에 따른 세포 생존율을 측정하기 위해 무처리 대조군, LPS를 처리한 양성 대조군 및 양태반 발효물 처리군(SPF)으로 그룹을 나눈 다음, LPS 그룹은 1㎍/mL의 농도로, 양태반 발효물 처리군(SPF)은 2.5, 40, 400㎍/mL의 농도로 처리하고, 30, 48시간에 세포 사진을 촬영하여 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 LPS처리군에 비해 SPF 처리군에서 다수의 세포를 확인할 수 있어 높은 생존율을 보여줌을 확인할 수 있었다.

[0070] 상기와 같은 결과를 통해 본 발명자들은 데케라 디아민(*Dekkera deamine*)을 이용해 양태반을 발효했을 때 세포 독성이 완화되고, 과도한 NO의 분비가 아닌, 유의한 수준의 NO 분비 유도능을 보여줌을 확인할 수 있었다.

[0072] **실시예 3. 양태반 발효물 처리에 의한 Raw264.7 세포의 분화 확인**

[0073] Raw264.7은 LPS의 처리에 의해 대식세포(macrophage)로의 분화가 일어난다고 알려져 있기에, 본 발명의 발효 조성물을 처리하는 경우 같은 결과를 보여주는지 여부 확인하기 위해, 무처리 대조군, LPS를 처리한 양성 대조군 및 양태반 발효물 처리군(SPF)으로 그룹을 나눈 다음, LPS 그룹은 1㎍/mL의 농도로, 양태반 발효물 처리군(SPF)은 2.5, 40, 400㎍/mL의 농도로 처리했다. 처리 후 30 시간이 경과한 다음, 현미경에 부착된 카메라로 사진을 촬영하여 Raw264.7 세포의 표면을 관찰하였다.

[0074] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 SPF를 처리한 경우에도 LPS를 처리한 경우와 동일하게 대식세포로의 분화가 일어남을 확인할 수 있었다(하얀 화살표).

[0076] **실시예 4. 양태반 발효물 처리에 의한 Raw264.7 세포의 사이토카인 분비능 변화 확인**

[0077] 면역세포에서 분비하는 사이토카인이 면역반응의 조절에서 중요한 역할을 차지하고 있기에, 본 발명의 발효 조성물 처리하는 경우 사이토카인의 발현 변화를 확인하기 위해, 무처리 대조군, LPS를 처리한 양성 대조군 및 양태반 발효물 처리군(SPF)으로 그룹을 나눈 다음, LPS 그룹은 1㎍/mL의 농도로, 양태반 발효물 처리군(SPF)은 2.5, 40, 400㎍/mL의 농도로 처리했다. 처리 후 6, 12, 24시간 마다 세포의 상대적 M1 phase 및 M2 phase와 관련되어 있는 mRNA의 발현(iNOS, IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-10, CREB)을 qRT-PCR로 측정하였다. 상기 실

험의 결과 값은 평균±SD(n=3)로 나타내었고, 양측검정(two tails t-test)으로 검증되었으며, 유효값은 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001로 나타내었다.

[0078] 그 결과, M1 phase와 관련된 사이토카인의 발현을 나타낸 도 8a(iNOS, IL-6, TNF-α, IL-1β)에서 확인할 수 있는 바와 같이, SPF 처리군은 모두 대조군에 비해 유의적으로 높은 mRNA 발현을 확인할 수 있었으며, TNF-α와 IL-1β은 12시간이 경과했을 때 가장 높은 발현을 보여주고, 24시간이 경과한 경우 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었으나, 이 경우에도 여전히 대조군에 비해 유의하게 높은 발현을 보여주는 것을 확인하였고, M2 phase와 관련된 사이토카인의 발현을 나타낸 도 8b(IL-4, IL-10, CREB)에서도 SPF 처리군은 모두 대조군에 비해 유의적으로 높은 mRNA 발현을 보여주었다. IL-4와 CREB는 24시간이 경과했을 때 가장 증가된 발현양을 보여주었고, IL-10은 12시간이 경과했을 때 가장 증가된 발현양을 보여줌을 확인할 수 있었다.

[0079] 상기와 같은 결과를 토대로 본 발명자들은 본 발명의 발효 조성물을 처리하는 경우 면역반응에 주요한 역할을 하는 사이토카인의 분비를 증진시켜 면역을 증진시킬 수 있다는 사실을 확인하였다.

[0081] **실시예 5. 양태반 발효물 처리에 의한 마우스 비장세포의 증식율 및 사이토카인 분비능의 변화 확인**

[0082] 5-1. 비장세포의 증식율 변화 확인

[0083] Raw264.7외의 다른 세포에서도 본 발명의 발효 조성물이 유사한 면역 증진 효과를 가지고 있는지 여부를 확인하기 위해 4주령 Balb/C male 마우스의 비장에서 유리시킨 비장세포에 대한 실험을 수행하였다. 실험을 위해 무처리 대조군, Concanavalin A(Con A) 처리군(양성 대조군) 및 양태반 발효물 처리군(SPF)으로 그룹을 나누어, 양태반 발효물은 17.5, 25, 50, 100, 200, 400㎍/mL의 농도로 처리하였고, Con A는 10㎍/mL의 농도로 처리하였다. 처리 후 36시간이 경과한 다음, WST-1 시약으로 세포 증식을 확인하였다. 상기 실험의 결과 값은 평균±SD(n=3)로 나타내었고, 양측검정(two tails t-test)으로 검증되었으며, 유효값은 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001로 나타내었다.

[0084] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, CON A 처리군 및 SPF 처리군 모두 비장세포의 증식능을 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였으며, 농도를 달리하여 처리한 SPF 처리군의 경우 처리 농도에 따라 세포증식능이 증가하는 결과를 확인할 수 있었는데, 200㎍/mL 처리군에서 최대로 증가한 후 400㎍/mL 농도에서는 다시 감소하는 결과를 확인할 수 있었다.

[0086] 5-2. 비장세포의 사이토카인 분비능 변화 확인

[0087] ① 상기 실시예 5-1의 결과에 따라 SPF의 농도를 비장세포의 증식능이 가장 높게 증가한 200㎍/mL 및 비교를 위한 낮은 농도로 2.5㎍/mL로 선정하였다. 본 발명의 발효 조성물에 대한 실험을 진행하기 전에, 먼저 면역 T 세포의 마이토젠인 CON A를 비장세포에 10㎍/mL의 농도로 처리한 다음, 2, 24, 36 및 48 시간마다 비장세포의 M1 phase 및 M2 phase와 관련된 사이토카인(IL-6, iNOS, IL-4, IL-10, CREB, ARG-1)의 mRNA 발현 수준을 확인하였다. 상기 실험의 결과 값은 평균±SD(n=3)로 나타내었고, 양측검정(two tails t-test)으로 검증되었으며, 유효값은 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001로 나타내었다.

[0088] 그 결과, 도 10a에 나타낸 바와 같이 M1 phase와 관련된 사이토카인인 IL-6 및 iNOS는 12시간이 경과한 다음 무처리 대조군에 비해 유의하게 발현 수준이 증가했다가 차이가 점차 감소하고 있음을 확인할 수 있었으며, 도 10b에 나타낸 바와 같이 M2 phase와 관련되어 있는 사이토카인인 IL-10, ARG-1, CREB 및 IL-4는 시간의 경과에 따라 발현양이 증가하여 36 시간이 경과했을 때 가장 높은 발현을 보여줌을 확인할 수 있었다.

[0089] ② CON A을 1㎍/mL 농도로 단독 처리한 그룹과 CON A를 동일한 농도로 처리한 다음, SPF를 2.5 및 200㎍/mL의 농도로 추가로 처리한 그룹으로 나누어 M1 phase 및 M2 phase와 관련된 사이토카인(IL-6, iNOS, TNF-α, IL-4, IL-10, CREB, ARG-1)의 mRNA 발현 수준을 확인하였다. 상기 실험의 결과 값은 평균±SD(n=3)로 나타내었고, 양측검정(two tails t-test)으로 검증되었으며, 유효값은 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001로 나타내었다.

[0090] 그 결과 도 11a에 나타낸 바와 같이, 2.5 및 200㎍/mL의 SPF를 처리하는 경우 M1 phase와 관련되어 있는 사이토카인인 IL-6, iNOS, TNF-α의 발현이 대조군에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인하였으며, 2.5㎍/mL의 SPF를 처리하는 경우 IL-6 및 TNF-α의 발현은 CON A만 단독으로 처리했을 때보다 더 발현이 증가하는 것을 확인할

수 있었으나, 200㎍/mL의 농도로 처리한 경우 M1 phase와 관련된 모든 사이토카인의 mRNA 발현이 CON A 단독 처리한 경우보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

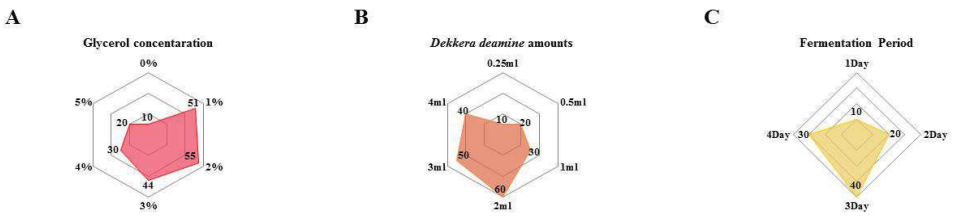
[0091] M2 phase와 관련된 사이토카인(IL-4, IL-10, CREB, ARG-1)의 발현을 확인했을 때, 도 11b에 나타낸 바와 같이, 2.5 및 200㎍/mL의 SPF를 처리한 경우 모두에서 CON A를 처리한 경우 보다 발현 수준이 더 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0092] 상기와 같은 결과를 통해 본 발명의 발명자들은 양태반 발효물인 SPF가 CON A에 의해 과발현된 M1 phase관련 사이토카인인 IL-6, iNOS 및 TNF-α 발현량을 유의미하게 줄여주면서 항염증 및 세포 치유에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 M2 phase 관련 사이토카인인 IL-10, IL-4, CREB 및 ARG-1의 발현 수준을 증진 시킨다는 사실을 확인할 수 있었다.

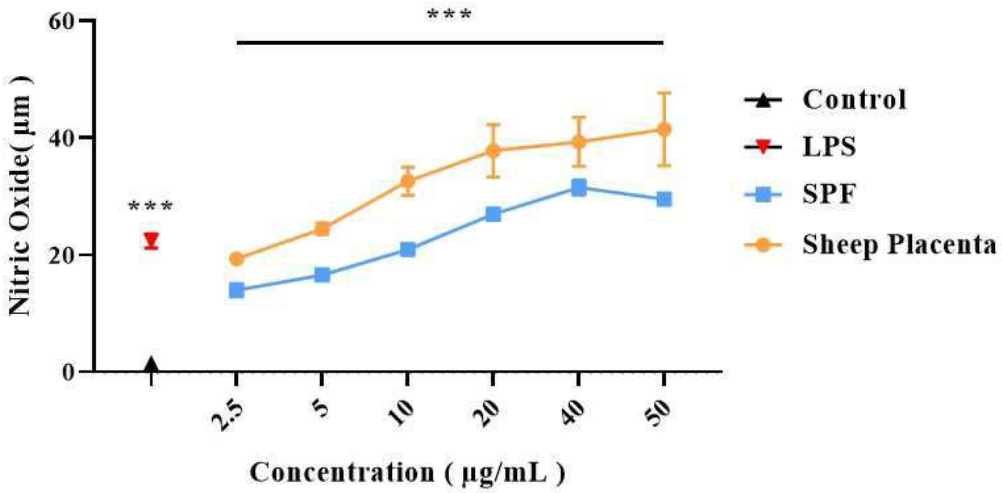
[0094] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

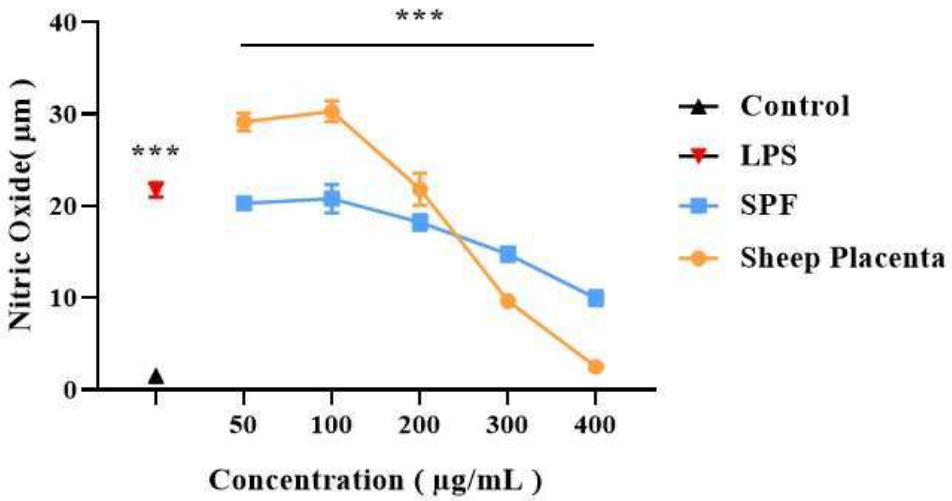
도면1



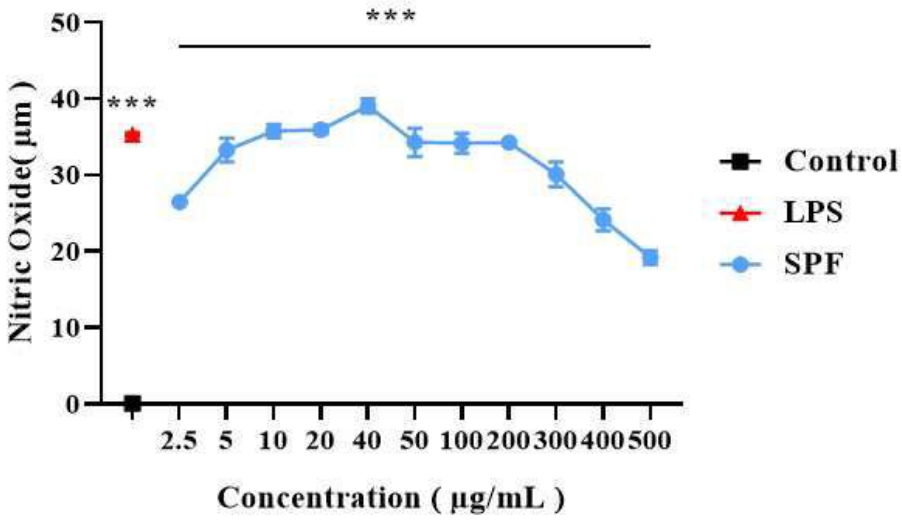
도면2a



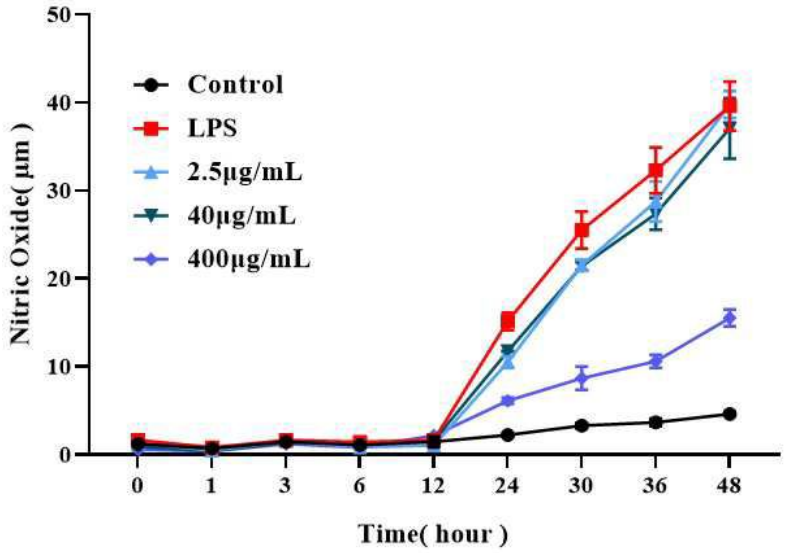
도면2b


***
***
40
30
20
10
0
Nitric Oxide(μm)
50
100
200
300
400
Concentration (μg/mL)
Control
LPS
SPF
Sheep Placenta

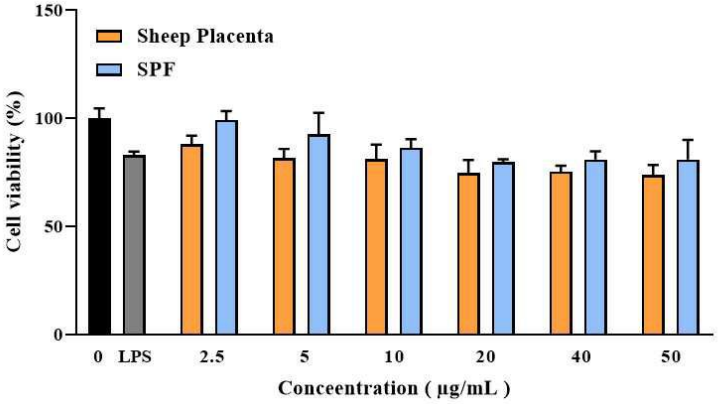
도면2c


***
***
50
40
30
20
10
0
Nitric Oxide(μm)
2.5
5
10
20
40
50
100
200
300
400
500
Concentration (μg/mL)
Control
LPS
SPF

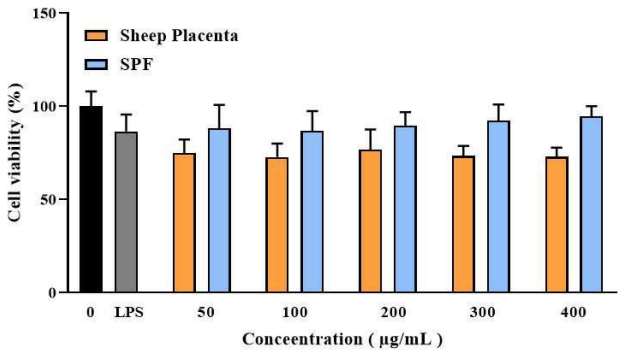
도면3



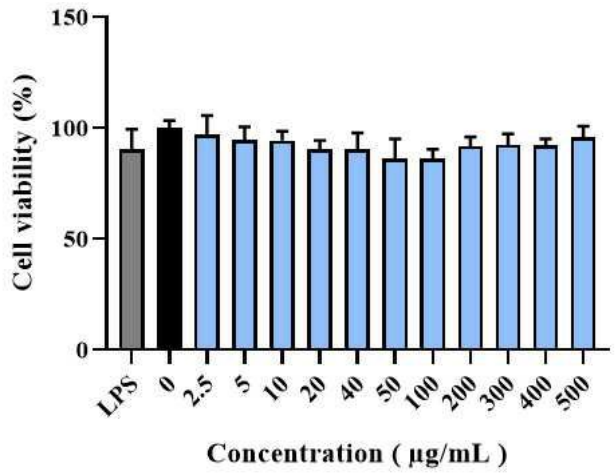
도면4a



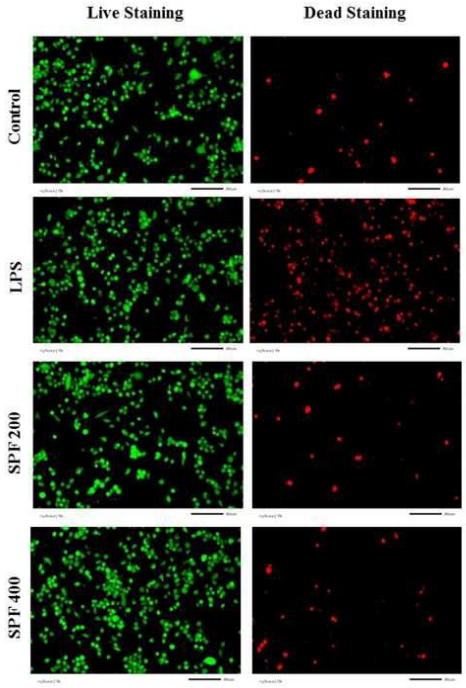
도면4b



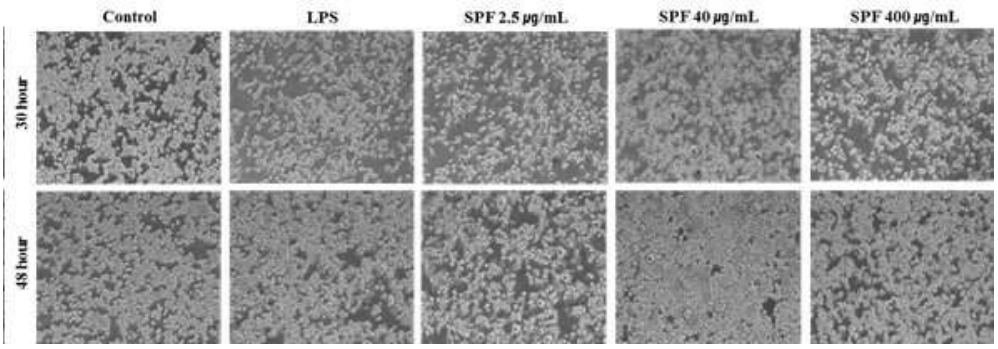
도면4c


150
100
50
0
Cell viability (%)
LPS
0
2.5
5
10
20
40
50
100
200
300
400
500
Concentration (μg/mL)

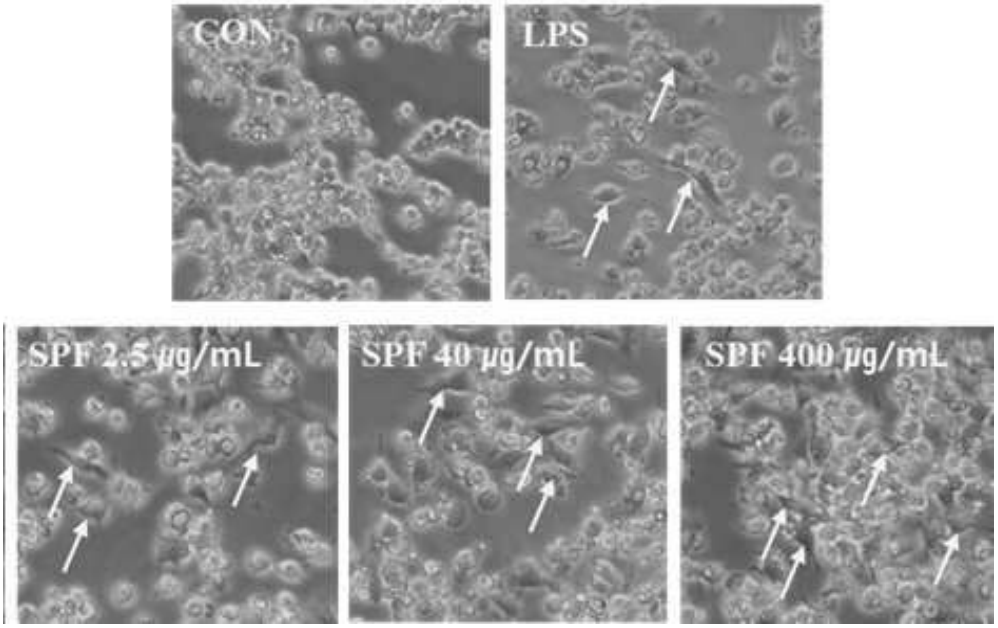
도면5


Live Staining
Dead Staining
Control
LPS
SPF 200
SPF 400

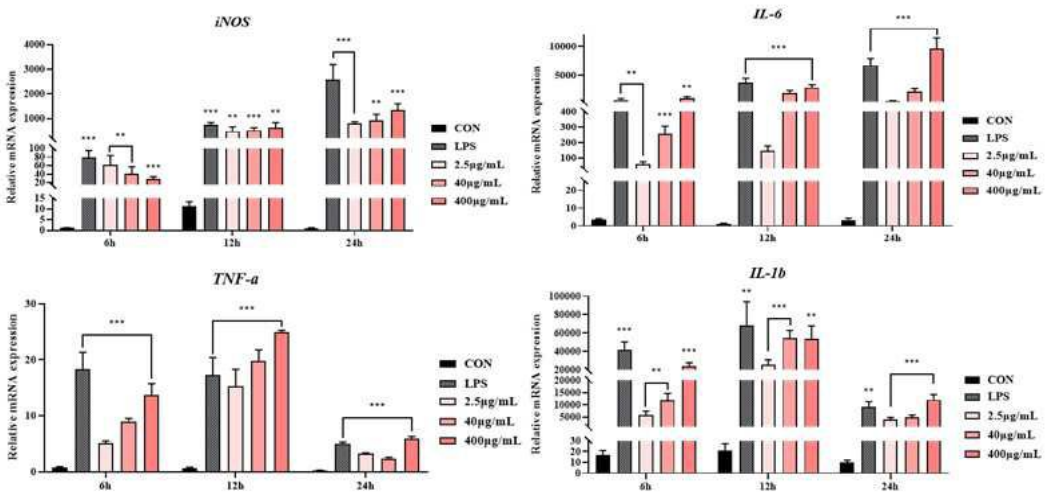
도면6


Control
LPS
SPF 2.5 μg/mL
SPF 40 μg/mL
SPF 400 μg/mL
30 hour
48 hour

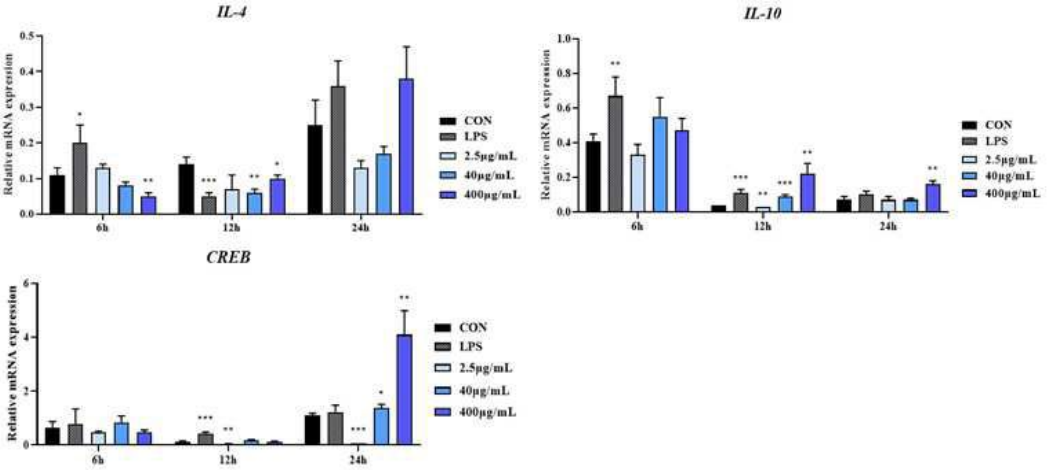
도면7


CON
LPS
SPF 2.5 μg/mL
SPF 40 μg/mL
SPF 400 μg/mL

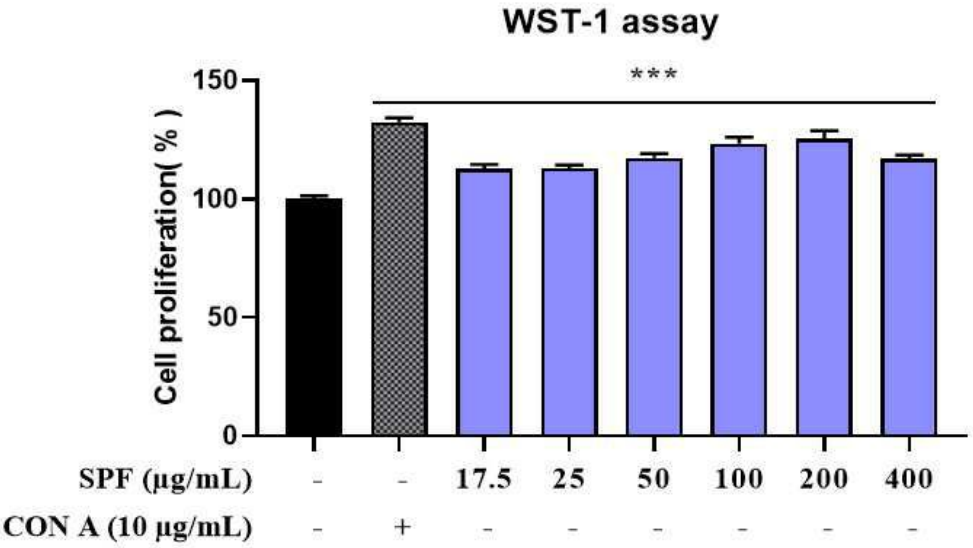
도면8a


iNOS
IL-6
TNF-a
IL-1b
Relative mRNA expression
6h
12h
24h
CON
LPS
2.5μg/mL
40μg/mL
400μg/mL

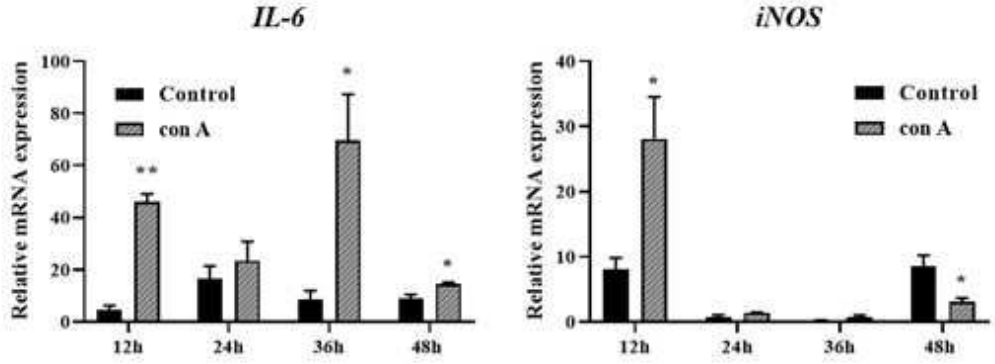
도면8b



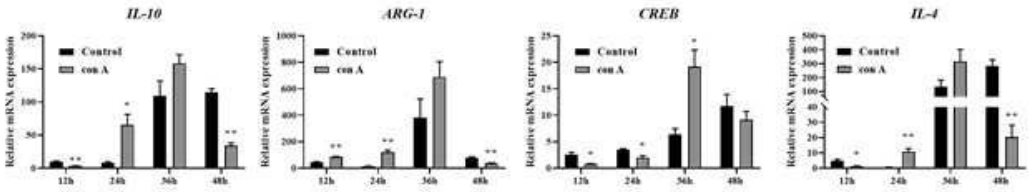
도면9



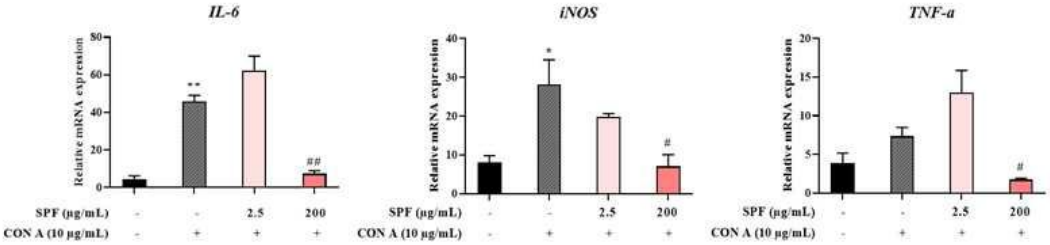
도면10a



도면10b



도면11a



도면11b

