



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0032816
(43) 공개일자 2017년03월23일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>A23L 1/30</i> (2006.01)
 <i>A61K 35/745</i> (2014.01) <i>A61K 35/747</i> (2014.01)
 <i>C12R 1/225</i> (2006.01) <i>C12R 1/24</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 1/20</i> (2013.01)
 <i>A23L 33/135</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0005018
 (22) 출원일자 2016년01월15일
 심사청구일자 2016년01월15일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020150130124 2015년09월15일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 한명주
 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
 김동현
 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)</p> <p>(74) 대리인
 고영갑, 이성원, 권정기, 임상엽</p> |
|--|---|

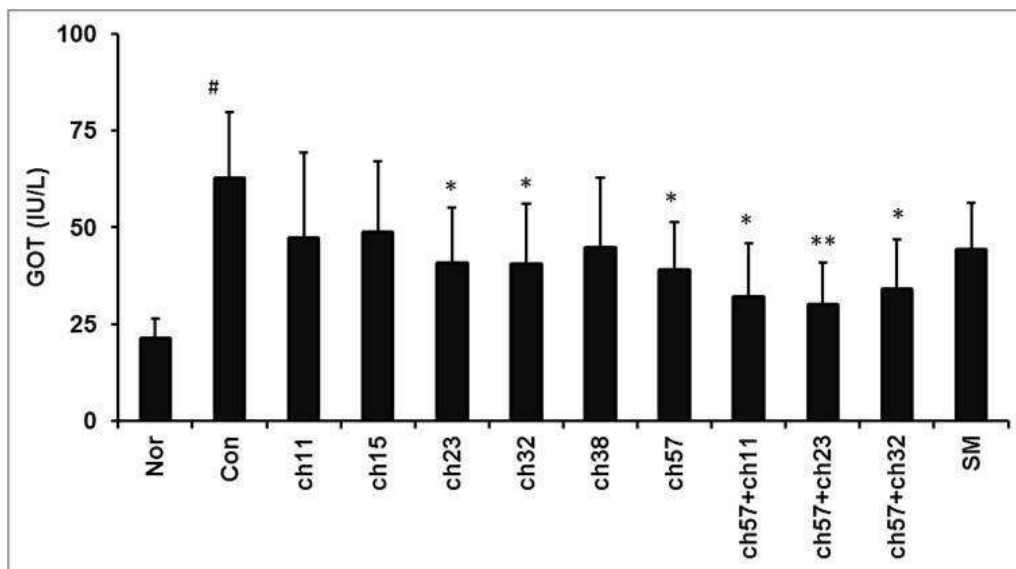
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **다양한 기능성을 가진 신규 유산균 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 김치 또는 사람의 분변에서 분리된 신규 락토바실러스속 균주, 신규 비피도박테리움속 균주 또는 이들의 혼합 유산균을 제공한다. 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주 또는 특정 비피도박테리움속 균주는 김치 또는 사람의 분변에서 분리되어 안전성이 높고 항산화 활성, 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성 등과 같은 다양한 생리활성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주, 특정 비피도박테리움속 균주 또는 이들의 혼합 유산균은 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만 등을 예방, 개선 또는 치료하는데에 유용한 기능성 식의약 소재로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/745 (2013.01)

A61K 35/747 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2200/304 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

C12R 1/225 (2013.01)

C12R 1/24 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)에서 선택되는 유산균으로서,

항산화 활성, 베타-글루쿠로니다제 저해 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성을 갖는 유산균.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23(수탁번호 : KCCM 11762P)이고, 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57(수탁번호 : KCCM 11764P)이고, 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5(수탁번호 : KCCM 11800P)이고, 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27(수탁번호 : KCCM 11801P)이고, 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67(수탁번호 : KCCM 11802P)인 것을 특징으로 하는 유산균.

청구항 3

16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 이루어진 군에서 2종 이상 선택되는 혼합 유산균으로서,

항산화 활성, 베타-글루쿠로니다제 저해 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성을 갖는 혼합 유산균.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23(수탁번호 : KCCM 11762P)이고, 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57(수탁번호 : KCCM 11764P)이고, 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5(수탁번호 : KCCM 11800P)이고, 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실

러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27(수탁번호 : KCCM 11801P)이고, 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67(수탁번호 : KCCM 11802P)인 것을 특징으로 하는 혼합 유산균.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항의 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방 또는 치료하기 위한 용도의 약학 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 장 손상은 장 누수 증후군인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 간 손상은 간염, 지방간 또는 간 경변증에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 알러지 질환은 아토피 피부염, 천식, 인후염 또는 만성 피부염에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

제 5항에 있어서, 상기 염증 질환은 대장염 또는 관절염에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 10

제 1항 또는 제 2항의 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물.

청구항 11

제 3항 또는 제 4항의 혼합 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방 또는 치료하기 위한 용도의 약학 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 장 손상은 장 누수 증후군인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 간 손상은 간염, 지방간 또는 간 경변증에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학

조성물.

청구항 14

제 11항에 있어서, 상기 알러지 질환은 아토피 피부염, 천식, 인후염 또는 만성 피부염에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 15

제 11항에 있어서, 상기 염증 질환은 대장염 또는 관절염에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 16

제 3항 또는 제 4항의 혼합 유산균, 이의 배양물, 이의 과채물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 유산균 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 김치 또는 사람의 분변에서 분리되고, 항산화 활성, 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성 등과 같은 다양한 생리활성을 가진 신규 유산균 또는 신규 혼합 유산균에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 신규 유산균 또는 신규 혼합 유산균의 다양한 식의약적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인류가 풍요로운 사회로 점점 발전해 감에 따라 생활습관이 급속하게 서구화되면서 질병의 양상도 크게 변하고 있다. 특히, 현대인에게는 육식 및 지방 위주의 서구화된 식생활, 불규칙한 식사, 과음, 운동 부족, 과도한 스트레스, 유해 환경에의 노출 등으로 인해 장내세균총의 교란, 장 누수 증후군, 대장염, 간질환, 알러지 질환, 비만 등이 급격하게 증가하고 있다.

[0004] 장내세균총의 교란

[0005] 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 등과 같은 질환을 유발할 수 있다.

[0007] 장 누수 증후군(Intestinal Permeability Syndrome)

[0008] 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

연접단백질(tight junction proteins들)의 발현이 억제된다. 밀착연접단백질(tight junction proteins들)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 궤양성 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.

[0010] 대장염

[0011] 종래, 궤양성 대장염 및 크론병의 발생율은 서양인에게 높다고 알려져 있었지만, 최근, 식습관 등의 생활습관의 변화로 인해 우리나라 등 동양에서도 환자수가 급증하고 있다. 그렇지만, 원인이 불분명한 이유도 있어 근본적 치료법은 확립되어 있지 않다. 이 때문에 완전한 치료를 목표로 하는 것이 아니라, 증상을 완해시키고, 이러한 상태를 가능한 한 장기간 유지하는 약제가 사용되고 있는 실정이다. 이러한 대증요법을 위한 약제로서, 주로 아미노살리실산제제, 부신피질 스테로이드제, 면역억제제 등이 사용되지만, 다양한 부작용이 보고되고 있다. 예를 들어, 아미노살리실산제제로서 자주 사용되는 살라조실파피리딘은 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통, 간장해, 백혈구 감소, 이상 적혈구, 단백뇨, 설사 등의 부작용이 보고되고 있다. 또한 부신피질스테로이드제는 일반적으로는 프레드니솔론의 경구투여, 관장, 좌약, 정맥 주사 등으로 사용되지만, 위궤양이나 장기사용에 의한 대퇴골두 괴사 등 부작용이 강하다. 그러나 투약의 중단은 증상을 재발시키기 때문에, 이들 약제는 계속적으로 사용하지 않을 수 없다. 따라서, 효과가 우수하면서도, 안전하고 부작용을 일으키지 않는 궤양성 대장염, 크론병 등의 장질환 치료제의 개발이 요구되고 있다. 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)도 마찬가지로 그 원인이 명확하지 않은 만성 복부 질환이다. 현재, IBS의 근본적인 치료제는 존재하지 않으며, 각 타입의 증상 경감을 목적으로 한 대증요법이 행해지고 있다. 예를 들어, 하리형 IBS에 대해서는 평활근의 수축을 억제하는 진경작용을 갖는 항콜린제가 사용되며, 변비형 IBS에는 염류 하제, 대체형 IBS에는 약제로 조절하기 곤란하고, 기본적으로 소화관 운동기능 개선제가 사용되고 있다.

[0013] 간질환

[0014] 간은 우리 몸에서 에너지 대사(영양분의 처리, 저장 및 노폐물 배설), 독소의 해독, 혈청 단백질의 합성, 담즙 배설을 통한 장에서의 지방의 원활한 흡수와 같은 역할을 하며, 면역유지(신체방어작용) 및 비타민의 대사에도 중요하다. 그러나, 간염 바이러스의 감염, 알코올이나 고지질식의 과다 섭취에 의해 간염, 지방간 또는 간경변증 등과 같은 간질환이 발생한다. 또한, 약물(결핵약, 아스피린, 항생제, 마취제, 고혈압 치료제, 경구피임제 등), 선천적 대사이상, 심부전, 쇼크 등으로도 간질환이 유발될 수 있다. 간질환이 발생하면 피로감, 구토, 설사, 식욕부진, 황달, 우상복부통, 발열, 근육통이 나타나는 급성 간염으로 시작해서 만성 간염으로 발전할 수 있다.

[0016] 알러지 질환

[0017] 사회가 복잡해지고 산업과 문명의 발달로 인해 환경오염, 스트레스가 증가하고, 식생활이 변화되면서 알러지 질환 환자들이 매년 증가하고 있다. 1980년에 아토피, 아나필락시스, 천식 등과 같은 알러지 질환 환자는 1% 미만이었으나, 2000년대에는 5% 이상으로 급증하고 있으며 잠재적인 환자까지 포함하면 10%가 넘는 것으로 추정되고 있다. 알러지 질환의 발생원인은 항원항체반응의 결과로 나타나는 생체의 과도한 면역반응이며, 알러지 질환은 반응시간 및 보체 관여의 유무에 따라 일반적으로 1~4형 과민반응으로 분류된다. 제1형 과민반응에는 아토피, 아나필락시스 쇼크, 기관지 천식, 두드러기, 화분증 등이 있고, 제2형 과민반응에는 부적합수혈, 자가 면역성 용혈성 빈혈, 약제에 의한 용혈성 빈혈, 과립구 감소증, 혈소판감소성 자반병 등이 있고, 제3형 과민반응에는 홍반, 림프선종창, 관절통, 관절염, 신염, 연쇄구균감염 뒤의 급성사구체신염 등이 있고, 제4형 과민 반응에는 만성 염증 등이 있다. 알러지 질환을 개선하기 위해 1차적으로는 샤워나 목욕 등을 하여 피부에 묻은 있는 알레르겐(집 먼지, 진드기 등)을 제거하고, 알레르겐의 섭취를 하지 않는 것이 좋다. 그러나, 알러지 질환이 개선되

지 않는 경우 스테로이드, 항히스타민제, 면역억제제 등과 같은 약물을 사용하게 되는데, 이 약물들은 피부위축, 혈관확장, 탈색, 자반(스테로이드 제제), 졸림(항히스타민제), 신부전(면역억제제) 등과 같은 부작용이 발생하기 쉽다. 지금까지 개발된 약물 중에 알레르기를 완치할 수 있는 약물은 없으며 증상개선을 기대하고 있으나 부작용이 크다는 문제점이 있다.

[0019] 비만

[0020] 비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환이며, 형태학적으로 볼 때 체내 지방 세포의 크기 증가(hypertrophy) 또는 수의 증가(hyperplasia)에 의해 초래된다. 비만은 서구사회에서 가장 흔한 영양장애 일 뿐만 아니라, 최근 우리나라에서도 경제발전으로 인한 식생활의 향상과 생활 방식의 서구화로 비만의 빈도가 급속히 증가하는 추세에 있어서 그 치료와 예방에 대한 중요성이 크게 부각되고 있다. 비만은 심리적으로 개인을 위축시킬 뿐만 아니라 사회적으로도 여러 가지 성인병의 발병 위험을 증가시키는 중요한 요인이다. 비만이 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심질환 등 여러 가지 성인병의 유병률 증가와 직접적인 관련이 있다고 알려져 있으며(Cell 87:377, 1999), 비만과 관련된 질환들을 함께 묶어서 대사증후군(metabolic syndrome) 또는 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)이라고 하며, 이들이 동맥경화증 및 심혈관질환의 원인으로 밝혀지고 있다. 현재까지 알려진 비만치료제로는 제니칼(Xenical, 로슈제약회사, 스위스), 리덕틸(Reductil, 에보트사, 미국), 엑소리제(Exolise, 아토파마, 프랑스) 등으로 크게 식욕억제제, 에너지소비 촉진제, 지방흡수 억제제로 분류되며, 대부분의 비만치료제는 시상하부와 관련된 신경전달물질을 조절함으로써 식욕을 억제하는 식욕억제제이다. 그러나 종래의 치료제들은 심장질환, 호흡기질환, 신경계질환 등의 부작용과 함께 그 효능의 지속성도 낮아, 더욱 개선된 비만치료제의 개발이 필요하고 또한, 현재 개발되고 있는 제품도 부작용없이 만족할 만한 치료 효과를 가지는 치료제는 거의 없어 새로운 비만치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0022] 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 탄백질들을 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].

[0023] 이러한 유산균의 다양한 생리활성이 알려지면서, 최근 인체에 안전하면서도 기능이 우수한 유산균 균주를 개발하고 이를 의약품 또는 기능성 식품으로 적용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 예를 들어, 대한민국 공개특허공보 제10-2009-0116051호에는 대장염 치료 및 예방 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) HY7401이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2006-0119045호에는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) KACC91035, 류코노스톡 메센테로이데스 아종 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*) KCTC 3100 및 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) KCTC 3498로 이루어진 군으로부터 선택된 아토피성 피부염 치료 또는 예방용 유산균이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2013-0092182호에는 알코올 분해능이 우수한 락토바실러스 브레비스

(*Lactobacillus brevis*) HD-01[기탁번호: KACC91701P]을 함유하는 알코올성 간질환 예방용 또는 숙취해소용 건강기능식품이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0010015호에는 혈중 콜레스테롤 농도 저하 및 항 비만 활성을 갖는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) HFI 108 균주(KCTC 11356BP)가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0006509호에는 공액리놀레산(Conjugated Linoleic acid)을 생산하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CGB-C11(수탁번호 KCTC 11979BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있다.

[0024] 그러나, 현대인에게 발병이 증가하고 있는 장내세균총의 교란, 장 누수 증후군, 대장염, 간질환, 알러지 질환, 비만 등을 총체적으로 개선하거나 치료할 수 있는 유산균 관련 기술은 출현하지 않고 있는바 다양한 기능성을 가진 새로운 균주의 스크리닝 및 이의 통한 의약품, 기능성 식품 등의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0025] 본 발명은 이러한 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 일 목적은 프로바이오틱스로서 요구되는 다양한 생리활성 또는 기능성을 가진 신규 유산균 및 이의 식의약적 용도를 제공하는데에 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 다른 목적은 다양한 생리활성 또는 기능성을 극대화할 수 있는 신규 유산균 혼합물 및 이의 식의약적 용도를 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0027] 본 발명의 발명자들은 김치 또는 사람 분변으로부터 무수한 유산균을 스크리닝하고, 이중 특정 락토바실러스속 균주, 특정 비피도박테리움속 균주 또는 이들의 혼합 유산균이 장 누수 증후군 등과 같은 장 손상, 지방간 등과 같은 간 손상, 아토피 피부염 등과 같은 알러지 질환, 대장염 등과 같은 염증 질환, 또는 비만 등에 우수한 개선 효과를 가진다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0028] 본 발명의 일 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)에서 선택되는 유산균을 제공한다. 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 항산화 활성, 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성을 갖는다. 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)에서 선택되는 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방 또는 치료하기 위한 용도의 약학 조성물을 제공한다. 또한 본 발명의 일예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)에서 선택되는 유산균, 상기 유산균의 배양물, 상기 유산균의 파쇄물 또는 상기 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비

피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 이루어진 군에서 2종 이상 선택되는 혼합 유산균 을 제공한다. 상기 혼합 유산균은 항산화 활성, 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성을 갖는다. 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 이루어진 군에서 2종 이상 선택되는 혼합 유산균, 상기 혼합 유산균의 배양물, 상기 혼합 유산균의 파쇄물 또는 상기 혼합 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 이루어진 군에서 2종 이상 선택되는 혼합 유산균, 상기 혼합 유산균의 배양물, 상기 혼합 유산균의 파쇄물 또는 상기 혼합 유산균의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0030]

본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주 또는 특정 비피도박테리움속 균주는 김치 또는 사람의 분변에서 분리되어 안전성이 높고 항산화 활성, 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성 등과 같은 다양한 생리활성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주, 특정 비피도박테리움속 균주 또는 이들의 혼합 유산균은 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만 등을 예방, 개선 또는 치료하는데에 유용한 기능성 식의약 소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1은 본 발명의 1차 실험에서, D-갈락토스아민(D-Galactosamine)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 GOT 값의 변화를 나타낸 그래프이고, 도 2는 본 발명의 1차 실험에서, D-갈락토스아민(D-Galactosamine)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 GPT 값의 변화를 나타낸 그래프이고, 도 3은 본 발명의 1차 실험에서, D-갈락토스아민(D-Galactosamine)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 MDA 값의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 1차 실험에서 선별한 유산균들이 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 수지상 세포의 염증 반응에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 4에서 왼쪽의 그래프는 LPS(lipopolysaccharide)를 처리하지 않은 세포에 유산균들이 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 오른쪽의 그래프는 LPS(lipopolysaccharide)를 처리한 세포에 유산균들이 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 1차 실험에서, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57이 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 대식세포(macrophage)의 염증 반응에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 1차 실험에서, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 비장에서 분리된 T 세포의 Th17 세포 또는 Treg 세포로의 분화에 미치는 영향을 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 장치로 분석한 결과이다.

도 7은 본 발명의 1차 실험에서, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57 또는 이들의 혼합 유산균이 CaCO2 세포의 ZO-1 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 8은 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57이 미치는 영향을 대장의 외관 또는 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 등으로 나타낸 것이고, 도 9는 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57이 미치는 영향을 대장의 조직학적 사진으로 나타낸 것이며, 도 10은 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인 등으로 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 미치는 영향을 대장의 외관 또는 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 등으로 나타낸 것이고, 도 12는 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 미치는 영향을 대장의 조직학적 사진으로 나타낸 것이며, 도 13은 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 미치는 영향을 T 세포의 분화 양상으로 나타낸 것이고, 도 14는 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인 등으로 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 대장의 외관 또는 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 등으로 나타낸 것이고, 도 16은 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 대장의 조직학적 사진으로 나타낸 것이며, 도 17은 본 발명의 1차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인 등으로 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 1차 실험에서, 비만 유도 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 체중 변화량 등으로 나타낸 것이고, 도 19는 본 발명의 1차 실험에서, 비만 유도 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 대장의 외관, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성, 대장의 조직학적 사진 등으로 나타낸 것이고, 도 20은 본 발명의 1차 실험에서, 비만 유도 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인 등으로 나타낸 것이고, 도 21은 본 발명의 1차 실험에서, 비만 유도 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 염증 반응 지표 물질 등으로 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명의 2차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 유산균이 미치는 영향을 T 세포의 Th17 세포로의 분화 양상으로 나타낸 것이고, 도 23은 본 발명의 2차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 유산균이 미치는 영향을 T 세포의 Treg 세포로의 분화 양상으로 나타낸 것이다.

도 24는 본 발명의 2차 실험에서, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 유산균이 미치는 영향을 염증 반응 지표 물질 등으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어 "배양물"이란 미생물을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하여, 미생물이 포함되는 개념이다.
- [0034] 본 발명에서 "약학적으로 허용가능한" 및 "식품학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시

키는 모든 행위를 의미한다.

- [0037] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0038] 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.
- [0039] 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.
- [0041] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0042] 본 발명의 일 측면은 다양한 생리활성을 갖는 신규 유산균 또는 생리활성을 상승시킬 수 있는 신규 혼합 유산균에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명의 일 예에 따른 신규 유산균은 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)에서 선택되고, 향산화 활성, 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성을 갖는다. 상기 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 김치에서 분리된 혐기성 간균으로서, 그람 염색시 양성을 나타내고, 넓은 온도 범위, 낮은 pH, 높은 염 농도에 환경에서 생존할 수 있으며, 글루코시다제를 생산한다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 탄소원으로 D-리보스, D-자일로스, D-글루코스, D-프럭토스, 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), 말토스, 멜리바이오스(Melibiose), 5-케토-글루코네이트(5-keto-gluconate) 등을 이용한다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 바람직하게는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23(수탁번호 : KCCM 11762P)이다. 상기 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 사람의 분변에서 분리된 혐기성 간균으로서, 그람 염색시 양성을 나타내고, 글루코시다제를 생산한다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 탄소원으로 D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스 등을 이용한다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 바람직하게는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57(수탁번호 : KCCM 11764P)이다. 상기 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 김치에서 분리된 혐기성 간균으로서, 그람 염색시 양성을 나타낸다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 탄소원으로 D-리보스, D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, 만니톨, 솔비톨, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), 셀로바이오스, 말토스, 멜리바이오스(Melibiose), 수크로스, 트레할로스, 멜레지토스 등을 이용한다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5(수탁번호 : KCCM 11800P)이다. 상기 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 김치에서 분리된 혐기성 간균으로서, 그람 염색시 양성을 나타낸다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 탄소원으로 L-아라비노스, D-리보스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, 만니톨, 솔비톨, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), 셀로바이오스, 말토스, 락토스, 멜리바이오스(Melibiose), 수크로스, 트레할로스, 멜레지토스 등을 이용한다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 바람

직하게는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27(수탁번호 : KCCM 11801P)이다. 상기 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 사람의 분변에서 분리된 혐기성 간균으로서, 그람 염색시 양성을 나타낸다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 탄소원으로 L-아라비노스, D-자일로스, D-글루코스, D-프럭토스, 에스쿨린(Esculin), 말토스, 락토스, 멜리바이오스, 수크로스 등을 이용한다. 또한, 상기 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 바람직하게는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67(수탁번호 : KCCM 11802P)이다.

[0045]

본 발명의 일 예에 따른 혼합 유산균은 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 이루어진 군에서 2종 이상 선택된다. 본 발명의 일 예에 따른 혼합 유산균은 유산균들의 상승 작용을 고려할 때, 바람직하게는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 및 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)의 조합으로 이루어진다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 혼합 유산균은 유산균들의 상승 작용을 고려할 때, 바람직하게는 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)에서 선택되는 하나 이상의 락토바실러스속 균; 및 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)의 조합으로 이루어진다. 상기 혼합 유산균은 특정 락토바실러스속 균주와 특정 비피도박테리움속 균주의 상승 작용에 의해 단일 유산균보다 높은 항산화 활성, 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성 또는 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성을 가지며, 기능성 식의약품 소재 측면에서 보다 유용하다. 본 발명의 일 예에 따른 혼합 유산균에서 상기 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23(수탁번호 : KCCM 11762P)이고, 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57(수탁번호 : KCCM 11764P)이고, 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5(수탁번호 : KCCM 11800P)이고, 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27(수탁번호 : KCCM 11801P)이고, 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67(수탁번호 : KCCM 11802P)인 것이 바람직하다.

[0047]

본 발명의 다른 측면은 신규 유산균 또는 신규 혼합 유산균의 다양한 용도에 관한 것이다. 신규 유산균의 용도로, 본 발명은 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)에서 선택되는 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 신규 혼합 유산균의 용도로, 본 발명은 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 16S rDNA로 서열번호 7에 기재된 염기서열을 포함하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 이루어진 군에서 2종 이상 선택되는 혼합 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또

는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환, 또는 비만을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에서 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)의 기술적 특징은 전술한 바와 동일하므로 설명을 생략한다. 상기 장 손상은 장내세균총의 교란 등에 의해 장(특히 소장 또는 대장)의 기능이 정상적이지 않은 상태를 말하며, 바람직하게는 장 누수 증후군이다. 또한, 상기 간 손상은 외부적 요인이나 내부적 요인 등에 의해 간의 기능이 정상적이지 않은 상태를 말하며, 바람직하게는 간염, 지방간 또는 간 경변증에서 선택된다. 또한, 상기 지방간은 비알코올성 지방간 및 알코올성 지방간을 모두 포함한다. 또한, 상기 알러지 질환은 생체의 과도한 면역반응에 의해 발생하는 질환이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 아토피 피부염, 천식, 인후염 또는 만성 피부염에서 선택된다. 또한, 상기 염증 질환은 염증 반응에 의해 유발되는 질환이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 관절염 또는 대장염에서 선택된다. 또한, 상기 관절염은 류머티스 관절염을 포함한다. 또한, 상기 대장염은 세균 감염이나 장 내용물의 병적 발효 등으로 인해 대장에 염증이 발생한 상태를 말하며, 감염성 대장염과 비감염성 대장염을 포함하는 개념이다. 대장염의 구체적인 예로는 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군 등이 있다. 또한, 염증성 대장 질환은 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 또는 크론병(Crohn's disease) 등을 포함한다.

[0048] 본 발명에서 유산균의 배양물 또는 혼합 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.

[0049] 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 또는 혼합 유산균의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분인 신규 유산균, 신규 혼합 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물의 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, 덱스트로즈, 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 신규 유산균, 신규 혼합 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물 외에 장 손상, 간 손상, 알러지 질환, 염증 질환 또는 비만의 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 충진제, 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, 비수용성제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수용성제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 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, 배설물 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 내

지 2000 mg/kg이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명에 따른 식품 조성물에서 유효성분인 신규 유산균, 신규 혼합 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물의 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, 스넥류, 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, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0053] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0055] I. 유산균 선별 및 효능 확인을 위한 1차 실험

[0056] 1. 유산균의 분리 및 동정

[0057] (1) 김치로부터 유산균의 분리

[0058] 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.

[0060] (2) 사람 분변으로부터 유산균의 분리

[0061] 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.

[0063] (3) 선별한 유산균의 동정

[0064] 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 gasserii</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 gasserii</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

[0066] 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.

[0067] 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 45℃까지 안정적으로 생존하였고, H 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.

[0068] 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 롱

검(*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.

[0069] 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

[0070]

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	+	+			

[0071] 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

[0072]

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	-	-			

- [0073] 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

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 -methly-D-glucoside	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetyl-glucosamine	$\pm$	-	glucoNaTe	$\pm$	-
amygdalin	-	-	2-keto-gluconate	-	-
arbutin	$\pm$	-	5-keto-gluconate	-	-
esculin	-	-			

[0076] 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.

[0078] (4) 유산균의 수탁 정보

[0079] 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 2015년 9월 1일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 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 홍제내 2가길 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 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11764P의 수탁번호를 부여받았다.

[0081] 2. 유산균의 장 손상 또는 장 누수 개선 효능 평가

[0082] 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 및 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성을 측정하였다.

[0083] (1) 실험방법

[0084] * 항산화 활성

[0085] 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℃에서 배양하였다. 배양액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 517 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하고, 유산균의 항산화 활성을 계산하였다.

[0087] * 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성

[0088] 사람의 신선한 분변 0.1 g을 0.9 ml의 멸균 생리식염수에 현탁하고, 일반 혐기성 배지로 10배 희석하여 분변 현탁액을 제조하였다. 멸균 일반혐기성배지(일본 Nissui 제약) 9.8 ml에 상기 분변 현탁액 0.1 ml 및 유산균(1×10^4 또는 1×10^5 CFU) 0.1 ml를 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 대장균수를 측정하였다.

[0090] * 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성

[0091] 0.1 mM 농도의 p-니트로페닐- β -D-글루쿠로나이드(p-nitrophenyl- β -D-glucuronide) 용액 0.1 ml, 50 mM 농도

의 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.

* 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성

한국 세포주 은행에서 분양받은 Caco2 세포를 RPMI 1640 배지에서 48시간 동안 배양한 후, Caco2 세포 배양액을 12-well 플레이트에 웰 당 2×10^6 cells의 양이 되도록 분주하였다. 이후, 각 웰에 LPS(lipopolysaccharide) 1 μ g을 단독으로 처리하거나 LPS(lipopolysaccharide) 1 μ g과 유산균 1×10^3 CFU를 같이 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰로부터 배양된 세포들을 긁어 모으고 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 밀착연접단백질(tight junction protein) ZO-1의 발현량을 측정하였다.

(2) 실험결과

김치 또는 사람 분변으로부터 분리한 유산균의 향산화 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 및 표 6에 나타내었다. 하기 표 5 및 표 6에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) CH5, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32, 비피도박테리움 슈도카테날라툼(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) CH38 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57 유산균은 향산화 활성이 우수하고, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 및 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 활성을 강하게 저해하였고, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현을 강하게 유도하였다. 상기 유산균들은 향산화 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 개선시킬 수 있다.

표 5

관 리 번호	균주명	향산화 활성	베타-글루쿠 로니다제 저 해 활성	LPS 생성 억 제 활성	밀착연접단백 질 발현 유도 활성
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH1	+	+	-	-
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH2	+	+	+	-
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	+	+	+	-
4	<i>Lactobacillus brevis</i> CH4	+	+	-	-
5	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH5	+++	+	+++	++
6	<i>Lactobacillus brevis</i> CH6	+	+	-	-
7	<i>Lactobacillus casei</i> CH7	+	+	-	-
8	<i>Lactobacillus planantrum</i> CH8	+	+	-	-
9	<i>Lactobacillus sakei</i> CH9	-	+	-	-
10	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH10	-	+	-	-
11	<i>Lactobacillus sakei</i> CH11	+++	+	+++	++
12	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH12	-	+	-	+
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH13	-	+	-	-
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH14	-	+	-	-
15	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH15	+++	+	++	-
16	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH16	+	+	-	-
17	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH17	+	+	-	-
18	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH18	+	+	-	-
19	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH19	+	+	-	-
20	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH20	+	+	-	+
21	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	+	+	-	+

22	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH22	+	+	-	+
23	<i>Lactobacillus brevis</i> CH23	+++	+	++	++
24	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH24	+	+	-	-
25	<i>Lactobacillus kimchi</i> CH25	+	+	-	-
26	<i>Lactobacillus gasserii</i> CH26	+	+	-	-
27	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH27	+	+	-	+
28	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH28	+	+	-	-
29	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH29	+	+	-	-
30	<i>Lactobacillus reuteri</i> CH30	+	-	-	-

표 6

[0100]

호명 관리 번호	균주명	항산화 활성	베타-글루쿠 로니다제 저 해 활성	LPS 생성 억 제 활성	밀착연접단백 질 발현 유도 활성
31	<i>Lactobacillus sakei</i> CH31	-	+	-	+
32	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32	+++	+	++	++
33	<i>Lactobacillus sakei</i> CH33	+	+	-	+
34	<i>Lactobacillus sakei</i> CH34	+	+	-	+
35	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH35	+	+	+	+
36	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CH36	+	+	+	+
37	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH37	-	+	-	+
38	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38	+++	+	++	++
39	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH39	-	+	-	+
40	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH40	-	+	+++	+
41	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41	+	+	-	+
42	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH42	+	+	-	-
43	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH43	+	+	-	-
44	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH44	+	+	-	-
45	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH45	+	+	-	-
46	<i>Bifidobacterium breve</i> CH46	+	-	-	-
47	<i>Bifidobacterium breve</i> CH47	+	+	-	+
48	<i>Bifidobacterium breve</i> CH48	+	+	-	+
49	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH49	+	+	-	++
50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH50	-	+	-	-
51	<i>Bifidobacterium dentium</i> CH51	+	-	-	-
52	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH52	-	+	-	-
53	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH53	-	+	-	-
54	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH54	+	+	-	-
55	<i>Bifidobacterium longum</i> CH55	+	+	-	+
56	<i>Bifidobacterium longum</i> CH56	+++	+	++	+
57	<i>Bifidobacterium longum</i> CH57	+++	+	+++	++
58	<i>Bifidobacterium longum</i> CH58	+	+	+	+
59	<i>Bifidobacterium longum</i> CH59	+	+	+	+
60	<i>Bifidobacterium longum</i> CH60	+	-	+	+

[0101]

* 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

[0102]

* 유산균의 다양한 활성 측정시 기준 : very strongly (+++; >90%); strongly (++; >60-90%); weakly (+; >20-

60%); not or less than 20%(-; <20%)

[0104] 3. 유산균의 간 손상 개선 효과 평가

[0105] 유산균의 장 손상 또는 장 누수 개선 효능 평가를 통해 총 7개의 균주인 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) CH5, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11, 락토바실러스 페르멘툼(*Lactobacillus fermentum*) CH15, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32, 비피도박테리움 슈도카테눌라툼(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) CH38 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57을 선별하고, 이들 단독 또는 혼합 유산균의 간 손상 개선 효과를 다양한 간 손상 모델동물을 이용하여 평가하였다.

[0107] (1) D-갈락토스아민(D-Galactosamine)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물 실험을 통한 유산균의 간 손상 개선 효과 측정

[0108] 1) 실험방법

[0109] 생쥐(C57BL/6, 웅성) 6마리를 한 군으로 하여, 정상군을 제외한 나머지 군의 실험동물에 D-갈락토스아민(D-Galactosamine)을 800 mg/kg의 용량으로 복강투여 하여 간 손상을 유발하였다. D-갈락토스아민(D-Galactosamine)을 복강투여하고 2시간 후부터 정상군과 음성 대조군을 제외한 나머지 군의 실험동물에 유산균을 1×10^9 CFU의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 유산균 대신 실리마린(silymarin)을 100 mg/kg의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여하였다. 약물을 마지막으로 투여하고 6시간 후에 심장채혈 하였다. 채취한 혈액을 상온에서 60분간 방치하고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청의 GPT(glutamic pyruvate transaminase)와 GOT(glutamic oxalacetic transaminase)를 혈액분석 키트(ALT & AST 측정 키트; Asan Pharm. Co., 대한민국)를 이용하여 측정하였다.

[0110] 또한, 실험동물의 간 조직을 적출하고 간 조직 내에 존재하는 말론다이알데하이드(malondialdehyde, MDA)의 양을 측정하였다. 말론다이알데하이드(malondialdehyde)는 지질과산화의 지표 물질이다. 구체적으로, 적출한 간 조직 0.5 g에 16배 용량의 RIPA 용액(0.21M Mannitol, 0.1M EDTA-2Na, 0.07M Sucrose, 0.01M Trizma base)을 가한 다음 호모게나이저(homogenizer)를 사용하여 균질화 하였다. 균질액을 다시 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 간 호모게네이트(liver homogenate)를 수득하였다. 간 호모게네이트(liver homogenate) 0.5 ml에 10% SDS 0.4 ml를 가하고 30분간 37℃에서 배양하고, 식힌 다음, 1% phosphate buffer 3 ml와 0.6% TBA 1 ml를 가하고 100℃의 수욕 상에서 45분간 가열하여 발색시켰다. 발색된 시료액에 n-butanol 4 ml를 가하고 혼합한 뒤, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 수득한 상등액의 흡광도를 535 nm에서 측정하여 MDA를 정량하였다. 또한, MDA 측정을 위한 검량선은 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 작성하였다.

[0112] 2) 실험결과

[0113] 도 1은 D-갈락토스아민(D-Galactosamine)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 GOT 값의 변화를 나타낸 그래프이고, 도 2는 D-갈락토스아민(D-Galactosamine)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 GPT 값의 변화를 나타낸 그래프이고, 도 3은 D-갈락토스아민(D-Galactosamine)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 MDA 값의 변화를 나타낸 그래프이다. 도 1 내지 도 3에서 X축의 "Nor"은 정상군을 나타내고, "Con"은 D-갈락토스아민(D-Galactosamine)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물에 별도의 약물을 투여하지 않은 음성 대조군을 나타내고, "ch11"은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11 투여군을 나타내고, "ch15"는 락토바실러스 페르멘툼(*Lactobacillus fermentum*) CH15 투여군을 나타내고, "ch23"은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23 투여군을 나타내고, "ch32"는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32 투여군을 나타내고, "ch38"은 비피도박테리움 슈도카테눌라툼(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) CH38 투여군을 나타내고, "ch57"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57 투여군을 나타내고, "ch57+ch11"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균의 투여군을 나타내고, "ch57+ch23"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균의 투여군을 나타내고, "ch57+ch32"는

비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32를 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균의 투여군을 나타내고, "SM"은 유산균 대신 실리마린(silymarin)을 투여한 양성 대조군을 나타낸다.

[0114] 도 1 내지 도 3에서 보이는 바와 같이 간 손상에 의해 GOT, GPT, MAD 값이 상승한 모델동물에 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57을 투여하는 경우 간 손상이 개선되었고, 특히, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균 또는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32의 혼합 유산균을 투여하는 경우 간 손상이 크게 개선되었다. 또한, 특정 유산균들 또는 이들에서 선택된 혼합 유산균은 간 손상 치료 약물로 사용되는 실리마린(silymarin)보다 간 손상 개선 효과가 더 우수하였다. 상기 결과로부터 특정 유산균들 또는 이들에서 선택된 혼합 유산균이 알코올 및 고지방식에 의해 유도되는 지방간을 개선하거나 산화적 스트레스로부터 오는 간 질환을 개선하는데에 유용한 소재임을 알 수 있다.

[0116] (2) Tert-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물 실험을 통한 유산균의 간 손상 개선 효과 측정

[0117] 1) 실험방법

[0118] 생쥐(C57BL/6, 웅성) 6마리를 한 군으로 하여, 정상군을 제외한 나머지 군의 실험동물에 Tert-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)를 2.5 mmol/kg의 용량으로 복강투여 하여 간 손상을 유발하였다. Tert-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)를 투여하고 2시간 후부터 정상군과 음성 대조군을 제외한 나머지 군의 실험동물에 유산균을 2×10^9 CFU의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 유산균 대신 실리마린(silymarin)을 100 mg/kg의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여하였다. 약물을 마지막으로 투여하고 6시간 후에 심장채혈 하였다. 채취한 혈액을 상온에서 60분간 방치하고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청의 GPT(glutamic pyruvate transaminase)와 GOT(glutamic oxalacetic transaminase)를 혈액분석 키트(ALT & AST 측정 키트; Asan Pharm. Co., 대한민국)를 이용하여 측정하였다.

[0120] 2) 실험결과

[0121] 하기 표 7은 Tert-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 GOT, GPT 값의 변화를 나타낸 것이다. 하기 표 7에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 실리마린(silymarin)보다 우수한 간 손상 개선 효과를 보였고, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균 또는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32의 혼합 유산균은 간 손상 개선 효과가 더 우수하였다.

표 7

실험군	GOT(IU/L)	GPT(IU/L)
정상군	36.1	26.3
음성 대조군	84.1	96.1
CH23 투여군	58.0	74.2
CH32 투여군	53.0	70.5
CH57 투여군	57.6	71.2
CH57+CH23 투여군	48.6	64.3
CH57+CH32 투여군	51.2	68.4
실리마린(silymarin) 투여군	61.7	69.1

[0123] 상기 표 7에서 "CH23"은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 나타내고, "CH32"는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32를 나타내고 "CH57"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)

CH57을 나타내고, "CH57+CH23"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타내고, "CH57+CH32"는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32를 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타낸다.

4. 유산균의 알러지 개선 효과 평가

(1) 유산균의 탈과립 저해율 측정

RBL-2H3 세포주(rat mast cell line, 한국세포주은행, Cat. No.22256)를 10% FBS(fetal bovine serum)과 L-글루타민을 포함하는 DMEM(Dulbeccos' modified Eagle's medium, Sigma사, 22256)을 이용하여 37℃, 가습화된(humidified) 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액에 포함된 세포들을 트립신-EDTA 용액을 사용하여 부유시키고, 분리 및 회수하여 실험에 사용하였다. 회수된 RBL-2H3 세포들을 24-웰 플레이트에 웰 당 5×10^5 cells의 양이 되도록 분주한 후, 마우스 단클론성 IgE 0.5 µg/ml를 넣고 12시간 동안 배양시키며 감작화(sensitization)시켰다. 감작화된 세포들을 0.5 ml의 시라가니안 완충액(siraganian buffer; 119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM MgCl₂, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH 7.2)으로 세척한 후에 다시 0.16 ml의 시라가니안 완충액(5.6mM 포도당, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA를 첨가)을 넣고 37℃에서 10분간 배양하였다. 이후, 세포 배양액에 시험약물인 유산균을 1×10^4 CFU/ml의 농도가 되도록 첨가하거나 대조약물인 DSCG(disodium cromoglycate) 0.04 ml를 첨가한 다음 20분이 경과되었을 때 0.02 ml의 항원(DNP-BSA 1µg/ml)으로 37℃에서 10분간 세포들을 활성화시켰다. 이후, 세포 배양액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 수득한 상등액 0.025 ml를 96-웰 플레이트로 옮기고, 기질액인 1mM p-NAG(0.1M 시트레이트 완충액에 p-니트로페닐-N-아세틸-β-D-글루코사아미니드를 pH 4.5로 녹인 용액) 0.025 ml를 가한 후, 37℃에서 60분간 반응시켰다. 이후, 0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.2 ml를 반응액에 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 ELISA 분석기로 흡광도를 측정하였다.

(2) 유산균의 소양 반응 저해율 측정

BALB/c 마우스 5마리를 한 군으로 하여, 정상군과 대조군을 제외한 나머지 실험군에 시험약물인 유산균을 1×10^9 CFU의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여하거나 대조약물인 DSCG(disodium cromoglycate) 또는 Azelastine을 0.2 mg/mouse의 양으로 1회씩 3일간 경구투여하였다. 약물을 마지막으로 경구투여하고 1시간이 지난 후에 마우스를 관찰상자(24cm×22cm×24cm)에 10분간 방치하여 환경에 순화시킨 뒤 머리뒷부분(경부배면)의 털을 제거하였다. 이후, 정상군 마우스에는 생리식염수를 주사하고, 다른 실험군 마우스에는 29 게이지 바늘을 이용하여 소양 유도제(50 µg의 compound 48/80; 시그마사, 미국)를 주사하였다. 이후, 마우스를 즉시 관찰상자에 한 마리씩 격리시킨 뒤 무인조건 하에서 8-mm 비디오 카메라(SV-K80, Samsung)로 1시간 녹화하여 소양행동을 관찰하였다. 소양행동은 뒷발로 주사부위를 긁는 행위를 인정하였으며, 그 이외 부분은 인정하지 않았다.

(3) 유산균의 모세혈관 투과성 저해율 측정

소양 유발 부위에서는 모세혈관 투과성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 다양한 화합물에 의해서 유발되는 모세혈관 투과성을 본 발명에 따른 유산균이 효율적으로 저해할 수 있는지를 알아보기 위해 수행되었다. 앞의 소양 반응 억제 활성 측정 실험과 같은 방법으로 동일한 마우스에 같은 방법으로 약물을 투여하였다. 이후, 정상군 마우스의 경부배면 부위에는 생리식염수를 피하주사하고, 다른 실험군 마우스의 경부배면 부위에는 소양 유도제(50 µg의 compound 48/80; 시그마사, 미국)를 피하주사 하였다. 이후, 1% Evans blue 용액(시그마사, 미국) 0.2 ml를 미정맥으로 투여하고 1 시간 후에 마우스를 치사시켰다. 이후, 피하주사 부위의 피부를 절개하여 1N KOH 1 ml에 넣은 뒤, 37℃에서 익일 반응시킨 다음, 0.6N 인산-아세트(5:13) 혼합용액 4 ml를 첨가하여 혼합한 뒤, 3000 rpm에서 15 분간 원심분리한 다음, 상등액을 취하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모세혈관 투과성 저해율(%)은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

저해율 (%) = $\{1 - [\text{약물 및 소양 유도제 처리한 부위의 흡광도} - \text{소양 유도제 처리하지 않은 부위의 흡광도}] / [\text{소양 유도제 처리한 부위의 흡광도} - \text{소양 유도제 처리하지 않은 부위의 흡광도}]\} \times 100$

[0136] (4) 실험결과

[0137] 하기 표 8은 유산균의 탈과립 저해율, 소양 반응 저해율 및 모세혈관 투과성 저해율을 측정한 결과이다. 하기 표 8에서 "CH5"는 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) CH5를 나타내고, "CH11"은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11을 나타내고, "CH15"는 락토바실러스 페르멘툼(*Lactobacillus fermentum*) CH15를 나타내고, "CH23"은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 나타내고, "CH32"는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32를 나타내고, "CH38"은 비피도박테리움 슈도카테눌라툼(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) CH38을 나타내고, "CH57"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57을 나타내고, "CH57+CH11"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타내고, "CH57+CH23"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타내고, "CH57+CH32"는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32를 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타낸다.

[0138] 표 8에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) CH5, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 호염구의 탈과립을 효과적으로 억제하였고, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 소양 반응과 모세혈관 투과성을 매우 강하게 저해하였다. 또한, 단독 유산균 보다는 이들의 혼합 유산균, 특히 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균 또는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32의 혼합 유산균에서 더 높은 탈과립 저해율, 소양 반응 저해율 및 모세혈관 투과성 저해율을 보였다. 따라서, 상기 유산균 또는 유산균 혼합물은 알러지로부터 유발되는 아토피, 천식, 인후염 또는 만성 피부염 등을 매우 효과적으로 개선할 수 있다.

표 8

[0139]

처리 약물	저해율(%)		
	탈과립	소양 반응	모세혈관 투과성
없음	0	2	1
CH5	53	46	45
CH11	47	46	45
CH15	48	42	42
CH23	54	47	47
CH32	52	45	46
CH38	44	45	42
CH57	55	55	52
CH57+CH11	59	56	54
CH57+CH23	63	62	61
CH57+CH32	61	58	56
DSCG(disodium cromoglycate)	62	25	37
Azelastine	-	65	68

[0141] 5. 유산균의 항염 및 장 누수 억제 효과 평가(in vitro)

[0142] (1) 수지상 세포의 분리 및 염증 지표 측정

[0143] C57BL/6 생쥐(male, 20-23 g)의 골수에서 10% FBS, 1% antibiotics, 1% glutamax, 0.1% mercaptoethanol을 함유한 RPMI 1640을 이용하여 면역세포들을 분리하고, RBC lysis buffer를 처리하고, 세척한 후, 24웰-플레이트의 각 웰에 분주하고 GM-CSF 및 IL-4를 1:1000의 비율로 처리하고 배양하였다. 배양 5일째 되는 날에 새로운 배지로 교환해주고, 8일째 되는 날에 수거하여 수지상 세포로 사용하였다. 이후, 24-well 플레이트에 수지상 세포를 각 well당 0.5×10^6 의 수로 깔고, 시험 물질인 유산균과 염증 반응 유도 물질인 LPS(lipopolysaccharide)를 2시

간 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 수득한 상등액으로부터 IL-10, IL-12의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다.

[0144] 도 4는 본 발명에서 선별한 유산균들이 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 수지상 세포의 염증 반응에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 4에서 왼쪽의 그래프는 LPS(lipopolysaccharide)를 처리하지 않은 세포에 유산균들이 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 오른쪽의 그래프는 LPS(lipopolysaccharide)를 처리한 세포에 유산균들이 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 또한, 도 4에서 X축의 "Nor"은 시험 물질인 유산균 및 염증 반응 유도 물질인 LPS(lipopolysaccharide)를 처리하지 않은 경우를 나타내고, "LPS"는 염증 반응 유도 물질인 LPS(lipopolysaccharide)를 처리한 경우를 나타내고, "ch11"은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11 처리군을 나타내고, "ch15"는 락토바실러스 페르멘툼(*Lactobacillus fermentum*) CH15 처리군을 나타내고, "ch23"은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23 처리군을 나타내고, "ch32"는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32 처리군을 나타내고, "ch38"은 비피도박테리움 슈도카테눌라툼(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) CH38 처리군을 나타내고, "ch57"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57 처리군을 나타내고, "ch57+ch11"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균의 처리군을 나타내고, "ch57+ch23"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균의 처리군을 나타내고, "ch57+ch32"는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32를 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균의 처리군을 나타낸다.

[0145] 도 4에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CH11, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23 및 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32는 골수에서 분리하여 분화시킨 수지상 세포의 IL-10 생산을 유도하고, LPS(lipopolysaccharide)에 의해 유도된 IL-12의 생산을 효과적으로 억제하였으며, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과의 병용에 의해 그 효과는 증가하였다. 특히, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균은 염증 반응 억제 효과가 가장 우수하였다. 수지상 세포를 제어하는 경우 Treg 세포(Regulatory T cell)를 효율적으로 제어할 수 있기 때문에, 본 발명에서 선별한 유산균들은 대장염과 같은 만성염증 질환, 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환 등을 효과적으로 개선할 수 있다.

[0147] (2) 대식세포의 분리와 염증 지표 측정

[0148] 6주령 C57BL/6J 수컷 생쥐(20-23g)를 라운바이오(㉔)로부터 구입하였다. 생쥐의 복강에 멸균된 4% thioglycolate 2 ml를 투여하고, 96시간이 지난 뒤에 생쥐를 마취시키고, 다시 생쥐 복강에 RPMI 1640 배지 8 ml를 투여하고 5-10분이 지난 뒤에 생쥐 복강 내의 RPMI 배지(대식세포를 포함)를 다시 뽑아내고 1000 rpm의 조건에서 10분간 원심분리하고 다시 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 24-well 플레이트에 대식세포를 각 well당 0.5×10^6 의 수로 깔고, 시험 물질인 유산균과 염증 반응 유도 물질인 LPS(lipopolysaccharide)를 2시간 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 buffer(Gibco사)에 넣고 균질화 하였다. 수득한 상등액으로부터 TNF- α , IL-1 β 와 같은 사이토카인의 발현량을 ELISA kit로 측정하였다. 또한, 수득한 세포로부터 p65(NF- κ B), p-p65(phosphor-NF- κ B) 및 β -actin의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. 구체적으로 상등액 50 μ g을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀로로스지에 100V, 400mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀로로스지를 5% skim milk로 30분간 blocking 한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율로 하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율로 하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하였다.

[0149] 도 5는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57이 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 대식세포(macrophage)의 염증 반응에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 5에서 보이는 바와 같이 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 염증 반응을 효과적으로 억제하였다.

[0151] (3) 비장으로부터 T 세포의 분리와 Th17 세포 또는 Treg 세포로의 분화능 측정

- [0152] C56BL/6J 생쥐의 비장을 분리하고, 적당하고 분쇄하고, 10% FCS 함유 RPMI 1640 배제에 현탁하고 CD4 T cell isolation kit(MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 사용하여 CD4 T 세포를 분리하였다. 분리한 CD4 T 세포를 12-웰 플레이트에 각 웰당 5×10^5 수로 분주하고, 여기에 anti-CD3($1 \mu\text{g}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일) 및 anti-CD28($1 \mu\text{g}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)을 넣거나, anti-CD3($1 \mu\text{g}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일), anti-CD28($1 \mu\text{g}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일), recombinant IL-6($20 \text{ ng}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일) 및 recombinant transforming growth factor beta($1 \text{ ng}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 넣고 세포를 배양하면서 유산균을 웰당 1×10^3 또는 1×10^5 CFU의 양으로 넣고 4일간 배양하였다. 이후, 배양액의 세포를 anti-FoxP3 또는 anti-IL-17A 항체로 염색하고 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 장치(C6 Flow Cytometer® System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 Th17, Treg의 분포를 분석하였다.
- [0153] 도 6은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 비장에서 분리된 T 세포의 Th17 세포 또는 Treg 세포로의 분화에 미치는 영향을 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 장치로 분석한 결과이다. 도 6에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23은 T 세포의 Th17 세포(T helper 17 cell)로의 분화를 저해하고 Treg 세포로의 분화를 촉진하였다. 상기 결과에 의할 때 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23은 대장염, 관절염과 같은 염증 질환을 효과적으로 개선할 수 있다.
- [0155] (4) CaCO2 세포의 ZO-1 단백질 발현에 대한 유산균의 효과 측정
- [0156] 한국 세포주 은행에서 분양받은 Caco2 세포를 RPMI 1640 배지에서 48시간 동안 배양한 후, Caco2 세포 배양액을 12-well 플레이트에 웰 당 2×10^6 cells의 양이 되도록 분주하였다. 이후, 각 웰에 LPS(lipopolysaccharide) $1 \mu\text{g}$ 를 단독으로 처리하거나 LPS(lipopolysaccharide) $1 \mu\text{g}$ 와 유산균 1×10^3 CFU 또는 1×10^5 CFU를 같이 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰로부터 배양된 세포들을 긁어 모으고 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 밀착연접단백질(tight junction protein) ZO-1의 발현량을 측정하였다.
- [0157] 도 7은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57 또는 이들의 혼합 유산균이 CaCO2 세포의 ZO-1 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다. 도 7에서 "CH23"은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 나타내고, "CH57"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57을 나타내고, "mix"는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32를 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타낸다. 도 7에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57을 처리하는 경우 밀착연접단백질(tight junction protein) ZO-1의 발현이 증가하였고, 피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) CH32의 혼합 유산균을 처리하는 경우 밀착연접단백질(tight junction protein) ZO-1의 발현이 상승적으로 증가하였다. 밀착연접단백질의 발현이 증가하는 경우 독성물질이 체내로 유입되는 것을 차단하여 대장염, 관절염, 간 손상의 악화를 막을 수 있다.
- [0159] **6. 유산균의 항염 및 대장염 개선 효과 평가(in vivo)**
- [0160] (1) 실험동물
- [0161] 5주령 C57BL/6 수컷 생쥐(24-27g)를 오리엔트바이오(주)로부터 구입하고, 습도 $50 \pm 10\%$, 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 조명은 12시간 켜고 12시간 끄는 것을 반복하는 조절된 환경 조건에서 일주일 동안 사육한 후 실험에 사용하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험에서 한 군은 6마리로 하였다.
- [0163] (2) TNBS에 의한 대장염 유발 및 치료 투여
- [0164] 실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 2,4,6-트리니트로벤젠술포산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)으로 급성 대장염을 유발하였다. 구체적으로 실험동물을 가볍게 에테르로

마취한 후 TNBS(2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) 용액 2.5g을 50% 에탄올 100ml에 혼합한 용액을 끝이 둥근 1ml 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1ml씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1ml를 경구투여하였다. 이후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 시험시료인 유산균 또는 혼합 유산균을 생리식염수에 현탁하여 2.0×10^9 CFU의 양으로 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식사시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하여 사용하였다. 또한, 정상군의 실험동물에는 유산균 대신 생리식염수만을 경구투여하였다. 또한, 음성 대조군의 실험동물에도 TNBS에 의한 대장염 유발 후 유산균 대신 생리식염수만을 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 유산균 대신 대장염 치료 약물인 설파살라진(sulfasalazine)을 50 mg/kg의 양으로 경구투여하였다.

[0166] (3) 대장의 외관 분석

[0167] 적출한 대장의 길이와 외관을 관찰하고 하기 표 9의 기준(Hollenbach 등, 2005 대장염 정도에 대한 기준)에 따라 점수로 매겨 외관 분석을 하였다. 대장 조직은 대장 내용물을 모두 제거하고, 생리 식염수에 세척한 후 일부는 병리조직용 샘플로 사용하기 위해 4% 포름알데히드 고정액으로 고정하였으며, 나머지는 분자생물학적 분석을 위해 영하 80℃에서 냉동보관하면서 사용하였다.

표 9

외관 점수(Macroscopic Score)	기준
0	어떠한 궤양과 염증도 발견되지 않음
1	출혈이 없는 충혈이 발견됨
2	충혈이 있는 궤양이 발견됨
3	한 곳에서만 궤양과 염증이 발견됨
4	궤양과 염증이 2곳 이상에서 발견됨
5	궤양이 2cm 이상으로 확대되어 있음

[0170] (4) 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[0171] 대장조직 100mg에 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide 함유 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 200 μ l를 넣고 균질화(homogenization) 하였다. 이후, 4℃ 및 10,000 $\times$ g의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 50 μ l를 0.95 ml의 반응액(1.6mM tetramethyl benzidine과 0.1mM H₂O₂ 함유)에 넣고 37℃에서 반응시키면서 650 nm에서 경시적으로 흡광도를 측정하였다. 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성은 반응물로서 생긴 peroxide 1 μ mol/ml를 1 unit로 계산하였다.

[0173] (5) 염증 지표 측정

[0174] 웨스턴블롯팅 방법을 이용하여 p-p65, p65, iNOS, COX-2, β -actin 과 같은 염증 반응 지표 물질을 측정하였다. 구체적으로, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정 실험과 동일한 방법으로 상등액을 얻었다. 이후, 상등액 50 μ g을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀룰로소지에 100V, 400mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀룰로소지를 5% skim milk로 30분간 blocking 한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율로 하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율로 하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하였다.

[0175] 또한, ELISA kit를 이용하여 TNF- α , IL-1 β 등과 같은 염증 관련 사이토카인을 측정하였다.

[0177] (6) 실험결과

[0178] 도 8은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57이 미치는 영향을 대장의 외관 또는 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 등으로 나타낸 것이고, 도 9는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57이 미치는 영향을 대장의 조직학적 사진으로 나타낸 것이며, 도 10은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인 등으로 나타낸 것이다. 도 8 내지 도 10에서 보이는 바와 같이 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물의 체중, 대장염 지표, 대장 길이, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 등에 기초할 때 대장염을 효과적으로 개선하는 것으로 나타났고, 설파살라진보다 개선 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 염증성 사이토카인 생산을 억제하고 항염증성 사이토카인인 IL-10의 생산을 증가시켰다.

[0179] 도 11은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 미치는 영향을 대장의 외관 또는 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 등으로 나타낸 것이고, 도 12는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 미치는 영향을 대장의 조직학적 사진으로 나타낸 것이며, 도 13은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 미치는 영향을 T 세포의 분화 양상으로 나타낸 것이고, 도 14는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인 등으로 나타낸 것이다. 도 11 내지 도 14에서 "N"은 정상군을 나타내고, "TNBS"는 음성 대조군을 나타내고, "CH23"은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23 투여군을 나타내고, "SS"는 설파살라진(sulfasalazine) 투여군을 나타낸다. 도 11 내지 도 14에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물의 체중, 대장염 지표, 대장 길이, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 등에 기초할 때 대장염을 효과적으로 개선하는 것으로 나타났고, 설파살라진보다 개선 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 또한, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 T 세포의 Th17 세포로의 분화를 억제하고 Treg 세포로의 분화를 유도하였다. 또한, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 염증성 사이토카인 생산을 억제하고 항염증성 사이토카인인 IL-10의 생산을 증가시켰다.

[0180] 도 15는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 대장의 외관 또는 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 등으로 나타낸 것이고, 도 16은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 대장의 조직학적 사진으로 나타낸 것이며, 도 17은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인 등으로 나타낸 것이다. 도 15 내지 도 17에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "TNBS"는 음성 대조군을 나타내고, "BL"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균의 투여군을 나타내고, "SS50"은 설파살라진(sulfasalazine) 투여군을 나타낸다. 도 15 내지 도 17에서 보이는 바와 같이 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물의 감소된 체중, 증가한 대장염 지표, 짧아진 대장 길이, 증가한 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 크게 개선하였고 설파살라진보다 대장염 개선 효과가 훨씬 우수한 것으로 나타났다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 염증성 사이토카인 생산을 크게 억제하고 항염증성 사이토카인인 IL-10의 생산을 극적으로 증가시켰다.

[0182] 7. 유산균의 비만 개선 및 항염 효과 평가(in vivo)

- [0183] (1) 실험방법
- [0184] C57BL6/J 마우스를 라운바이오(㈜에서 구입하고 총 24 마리를 온도 20 ± 2 °C, 습도 50 ± 10 %, 12 hr light/12 hr dark cycle의 조건 아래 chow diet (Purina)로 1 주일간 적응시켰다. 이후, 실험동물을 8마리씩 3개의 군 (LFD, HFD, HFD+BL)으로 나누어, LFD 군에는 4 주간 정상식이(LFD, 10% of calories from fat; Research, NJ, USA)를 공급하였고 HFD 군 및 HFD+BL 군에는 4주간 고지방식이(HFD, 60% of calories from; Research, NJ, USA)를 공급하였다. 그 다음 LFD 군에는 4주간 정상식을 공급함과 동시에 PBS를 경구투여 하였다. 또한, HFD 군에는 4주간 고지방식을 공급함과 동시에 PBS를 경구투여 하였다. 또한, HFD+BL 군에는 4주간 고지방식을 공급함과 동시에 혼합 유산균을 PBS에 현탁하여 2×10^9 CFU의 양으로 경구투여 하였다. 혼합 유산균은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23을 동량으로 혼합하여 제조한 것이다.
- [0186] (2) 혼합 유산균의 항비만 효과 및 항염 효과 분석
- [0187] 혼합 유산균의 항비만 효과는 체중 변화를 통해 분석하였다. 또한, 혼합 유산균의 항염 효과는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험에서 측정된 방법과 동일한 방법을 사용하여 분석하였다.
- [0189] (3) 실험결과
- [0190] 도 18은 비만 유도 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 체중 변화량 등으로 나타낸 것이고, 도 19는 비만 유도 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 대장의 외관, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성, 대장의 조직학적 사진 등으로 나타낸 것이고, 도 20은 비만 유도 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인 등으로 나타낸 것이고, 도 21은 비만 유도 모델동물에 대해 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균이 미치는 영향을 염증 반응 지표 물질 등으로 나타낸 것이다. 도 18 내지 도 21에서 보이는 바와 같이 고지방식에 의한 비만이 유도된 모델동물의 증가한 체중, 증가한 대장염 지표, 증가한 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 크게 감소시켰고 대장염의 발생을 억제하였다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) CH57과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) CH23의 혼합 유산균은 고지방식에 의해 비만이 유도된 모델동물에 대해 염증성 사이토카인 생산을 크게 억제하고 항염증성 사이토카인인 IL-10의 생산을 증가시켰다.
- [0192] II. 유산균 선별 및 효능 확인을 위한 2차 실험
- [0193] 1. 유산균의 분리 및 동정
- [0194] (1) 김치로부터 유산균의 분리
- [0195] 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°C에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 모양에 따라 분리하였다.
- [0197] (2) 사람 분변으로부터 유산균의 분리
- [0198] 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°C에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주들을 분리하였다.

[0200] (3) 선별한 유산균의 동정

[0201] 김치 또는 사람 분변으로부터 분리한 균주들의 그람 염색, 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석하여 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다. 하기 표 11은 배추 김치, 무 김치 및 파 김치에서 분리된 유산균의 관리번호 및 균주명을 나타낸 것이고, 하기 표 12는 분변에서 분리된 유산균의 관리번호 및 균주명을 나타낸 것이다.

표 11

[0202]

관 리 번호	균주명	관 리 번호	균주명
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC1	26	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC26
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC2	27	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC27
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC3	28	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC28
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC4	29	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC29
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC5	30	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC30
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC6	31	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC31
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC7	32	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC32
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC8	33	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC33
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC9	34	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC34
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC10	35	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC35
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC11	36	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC36
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC12	37	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC37
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC13	38	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC38
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC14	39	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC39
15	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC15	40	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC40
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC16	41	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC41
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC17	42	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC42
18	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC18	43	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC43
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC19	44	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC44
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC20	45	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC45
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC21	46	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC46
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC22	47	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC47
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC23	48	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC48
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC24	49	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC49
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC25	50	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC50

표 12

[0204]

관 리 번호	균주명	관 리 번호	균주명
51	<i>Bifidobacterium longum</i> LC51	76	<i>Bifidobacterium longum</i> LC76
52	<i>Bifidobacterium longum</i> LC52	77	<i>Bifidobacterium longum</i> LC77
53	<i>Bifidobacterium longum</i> LC53	78	<i>Bifidobacterium longum</i> LC78
54	<i>Bifidobacterium longum</i> LC54	79	<i>Bifidobacterium longum</i> LC79
55	<i>Bifidobacterium longum</i> LC55	80	<i>Bifidobacterium longum</i> LC80
56	<i>Bifidobacterium longum</i> LC56	81	<i>Bifidobacterium longum</i> LC81
57	<i>Bifidobacterium longum</i> LC57	82	<i>Bifidobacterium longum</i> LC82
58	<i>Bifidobacterium longum</i> LC58	83	<i>Bifidobacterium longum</i> LC83
59	<i>Bifidobacterium longum</i> LC59	84	<i>Bifidobacterium longum</i> LC84
60	<i>Bifidobacterium longum</i> LC60	85	<i>Bifidobacterium longum</i> LC85
61	<i>Bifidobacterium longum</i> LC61	86	<i>Bifidobacterium longum</i> LC86
62	<i>Bifidobacterium longum</i> LC62	87	<i>Bifidobacterium longum</i> LC87
63	<i>Bifidobacterium longum</i> LC63	88	<i>Bifidobacterium longum</i> LC88
64	<i>Bifidobacterium longum</i> LC64	89	<i>Bifidobacterium longum</i> LC89

65	<i>Bifidobacterium longum</i> LC65	90	<i>Bifidobacterium longum</i> LC90
66	<i>Bifidobacterium longum</i> LC66	91	<i>Bifidobacterium longum</i> LC91
67	<i>Bifidobacterium longum</i> LC67	92	<i>Bifidobacterium longum</i> LC92
68	<i>Bifidobacterium longum</i> LC68	93	<i>Bifidobacterium longum</i> LC93
69	<i>Bifidobacterium longum</i> LC69	94	<i>Bifidobacterium longum</i> LC94
70	<i>Bifidobacterium longum</i> LC70	95	<i>Bifidobacterium longum</i> LC95
71	<i>Bifidobacterium longum</i> LC71	96	<i>Bifidobacterium longum</i> LC96
72	<i>Bifidobacterium longum</i> LC72	97	<i>Bifidobacterium longum</i> LC97
73	<i>Bifidobacterium longum</i> LC73	98	<i>Bifidobacterium longum</i> LC98
74	<i>Bifidobacterium longum</i> LC74	99	<i>Bifidobacterium longum</i> LC99
75	<i>Bifidobacterium longum</i> LC75	100	<i>Bifidobacterium longum</i> LC100

[0206] 표 11에 표시된 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5는 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 이의 16S rDNA는 서열번호 4의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5의 16S rDNA 염기서열을 Genebank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주는 검색되지 않았고, *Lactobacillus plantarum* strain KF9의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다. 또한, 표 11에 표시된 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27은 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 이의 16S rDNA는 서열번호 5의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27의 16S rDNA 염기서열을 Genebank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주는 검색되지 않았고, *Lactobacillus plantarum* strain JL18의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다. 또한, 표 11에 표시된 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28은 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 이의 16S rDNA는 서열번호 6의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28의 16S rDNA 염기서열을 Genebank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주는 검색되지 않았고, *Lactobacillus plantarum* strain USIM01의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다.

[0207] 표 12에 표시된 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67은 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 이의 16S rDNA는 서열번호 7의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67의 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, *Bifidobacterium longum* strain CBT-6의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다. 또한, 표 12에 표시된 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68은 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 이의 16S rDNA는 서열번호 8의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68의 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, *Bifidobacterium longum* strain IMAUFB067의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다.

[0208] 또한, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API Kit(모델명 : API 50 CHL; 제조사 : BioMerieux's, USA)에 의한 당 발효 시험으로 분석하였다. 하기 표 13은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이고, 하기 표 14는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이다. 하기 표 13 및 표 14에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타내고, "±"는 탄소원 이용성 여부가 모호한 경우를 나타낸다. 하기 표 13 및 14에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68은 일부 탄소원에 대해서 동일 종의 공지된 균주와 다른 이용성을 보였다.

표 13

[0209]

탄소원	균주명		탄소원	균주명	
	<i>L. plantarum</i> LC5	<i>L. plantarum</i> LC27		<i>L. plantarum</i> LC5	<i>L. plantarum</i> LC27
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	+	+			

표 14

[0211]

탄소원	균주명		탄소원	균주명	
	<i>B. longum</i> LC67	<i>B. longum</i> LC68		<i>B. longum</i> LC67	<i>B. longum</i> LC68
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	+	+			

[0213] (4) 유산균의 수탁 정보

[0214] 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5를 2016년 1월 11일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11800P의 수탁번호를 부여받았다. 또한, 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27을 2016년 1월 11일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11801P의 수탁번호를 부여받았다. 또한, 본 발명의 발명자들은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 2016년 1월 11일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11802P의 수탁번호를 부여받았다.

[0216] 2. 유산균의 장 손상 또는 장 누수 개선 효능 평가

[0217] 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-글루루로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성 및 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성을 측정하였다.

[0218] (1) 실험방법

[0219] * 항산화 활성

[0220] 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.

[0222] * 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 억제 활성

[0223] 사람의 신선한 분변 0.1 g을 0.9 ml의 멸균 생리식염수에 현탁하고, 일반 혐기성 배지로 100배 희석하여 분변 현탁액을 제조하였다. 멸균 일반혐기성배지(일본 Nissui 제약) 9.8 ml에 상기 분변 현탁액 0.1 ml 및 유산균(1×10^4 또는 1×10^5 CFU) 0.1 ml를 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 대장균수를 측정하였다.

[0225] * 베타-글루루로니다제(β -glucuronidase) 저해 활성

[0226] 0.1 mM 농도의 p-니트로페닐- β -D-글루루로나이드(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-글루루로니다제(β -glucuronidase) 효소반응을 진행하고, 0.1 mM 농도

의 NaOH 용액 0.5 ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 이후, 반응액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 405 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다.

* 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성화

한국 세포주 은행에서 분양받은 Caco2 세포를 RPMI 1640 배지에서 48시간 동안 배양한 후, Caco2 세포 배양액을 12-well 플레이트에 웰 당 2×10^6 cells의 양이 되도록 분주하였다. 이후, 각 웰에 LPS(lipopolysaccharide) 1 μ g을 단독으로 처리하거나 LPS(lipopolysaccharide) 1 μ g과 유산균 1×10^3 CFU를 같이 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰로부터 배양된 세포들을 긁어 모으고 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 밀착연접단백질(tight junction protein) ZO-1의 발현량을 측정하였다.

(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 15 내지 표 17에 나타내었다. 하기 표 15 내지 표 17에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC15, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC17, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC25, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC55, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC65, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68 유산균은 항산화 활성이 우수하고, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 생성 및 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 활성을 강하게 저해하였고, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현을 강하게 유도하였다. 특히, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67은 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성이 가장 우수하였다. 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 개선시킬 수 있다.

표 15

관 리 번호	균주명	항산화 활성	베타-글루쿠 로니다제 저 해 활성	LPS 생성 억 제 활성	밀착연접단백 질 발현 유도 활성
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC1	++	+	+	-
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC2	++	++	+	-
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC3	+++	++	+	-
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC4	+++	++	+	+
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC5	+++	+++	++	++
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC6	++	+++	+	-
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC7	+++	++	+	-
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC8	++	+++	+	-
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC9	++	++	+	+
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC10	++	+++	+	+
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC11	++	++	+	-
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC12	++	+++	+	+
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC13	++	++	+	+
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC14	++	++	+	-
15	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC15	+++	+++	++	++
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC16	+	+++	+	-
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC17	+++	+++	++	++
18	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC18	++	++	+	+
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC19	++	+++	+	+
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC20	++	++	+	-

21	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC21	++	++	+	-
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC22	++	+++	-	-
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC23	+++	++	-	-
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC24	+++	+	-	-
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC25	+++	+++	++	++
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC26	++	+	+	+
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC27	+++	+++	++	++
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC28	+++	+++	++	++
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC29	++	+	-	-
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC30	++	+	+	-
31	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC31	+++	++	+	-
32	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC32	+++	++	+	-
33	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC33	+++	++	+	-
34	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC34	++	++	+	+
35	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC35	++	++	+	+

표 16

[0235]

관 리 번호	균주명	항산화 활성	베타-글루쿠 로니다제 저 해 활성	LPS 생성 억 제 활성	밀착연접단백 질 발현 유도 활성
36	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC36	++	++	++	-
37	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC37	+++	++	+	+
38	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC38	++	++	+	-
39	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC39	++	+	+	-
40	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC40	+++	+	-	-
41	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC41	++	++	-	+
42	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC42	+++	+	-	+
43	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC43	++	+	-	+
44	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC44	++	+	-	+
45	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC45	++	++	-	+
46	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC46	++	+	-	+
47	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC47	+++	+	-	+
48	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC48	++	++	-	+
49	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC49	++	+++	+	+
50	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC50	+++	++	+	-
51	<i>Bifidobacterium longum</i> LC51	++	++	+	-
52	<i>Bifidobacterium longum</i> LC52	+++	+++	+	-
53	<i>Bifidobacterium longum</i> LC53	++	+++	-	+
54	<i>Bifidobacterium longum</i> LC54	+++	++	+	+
55	<i>Bifidobacterium longum</i> LC55	+++	+++	++	++
56	<i>Bifidobacterium longum</i> LC56	+++	++	+	+
57	<i>Bifidobacterium longum</i> LC57	++	+	-	+
58	<i>Bifidobacterium longum</i> LC58	+++	+	-	+
59	<i>Bifidobacterium longum</i> LC59	++	+	-	-
60	<i>Bifidobacterium longum</i> LC60	+++	+	-	-
61	<i>Bifidobacterium longum</i> LC61	++	+	+	-
62	<i>Bifidobacterium longum</i> LC62	+++	+	+	-
63	<i>Bifidobacterium longum</i> LC63	++	++	++	-
64	<i>Bifidobacterium longum</i> LC64	+++	+	-	-
65	<i>Bifidobacterium longum</i> LC65	+++	+++	++	++
66	<i>Bifidobacterium longum</i> LC66	++	+	+	+
67	<i>Bifidobacterium longum</i> LC67	+++	+++	++	+++
68	<i>Bifidobacterium longum</i> LC68	+++	+++	++	++
69	<i>Bifidobacterium longum</i> LC69	+++	+	-	-
70	<i>Bifidobacterium longum</i> LC70	++	+	-	+

표 17

관 리 번호	균주명	항산화 활성	베타-글루쿠 로니다제 저 해 활성	LPS 생성 억 제 활성	밀착연접단백 질 발현 유도 활성
71	<i>Bifidobacterium longum</i> LC71	++	+	-	+
72	<i>Bifidobacterium longum</i> LC72	+++	++	-	+
73	<i>Bifidobacterium longum</i> LC73	++	++	+	-
74	<i>Bifidobacterium longum</i> LC74	++	+++	+	-
75	<i>Bifidobacterium longum</i> LC75	+++	+	-	+
76	<i>Bifidobacterium longum</i> LC76	++	+	-	+
77	<i>Bifidobacterium longum</i> LC77	++	++	+	+
78	<i>Bifidobacterium longum</i> LC78	++	+	+	+
79	<i>Bifidobacterium longum</i> LC79	+++	+	+	+
80	<i>Bifidobacterium longum</i> LC80	++	+	+	+
81	<i>Bifidobacterium longum</i> LC81	++	+	+	+
82	<i>Bifidobacterium longum</i> LC82	++	++	-	+
83	<i>Bifidobacterium longum</i> LC83	+++	+	-	+
84	<i>Bifidobacterium longum</i> LC84	++	++	-	-
85	<i>Bifidobacterium longum</i> LC85	+++	++	-	+
86	<i>Bifidobacterium longum</i> LC86	++	+	+	-
87	<i>Bifidobacterium longum</i> LC87	++	++	+	-
88	<i>Bifidobacterium longum</i> LC88	++	+++	+	+
89	<i>Bifidobacterium longum</i> LC89	++	++	+	+
90	<i>Bifidobacterium longum</i> LC90	++	++	+	+
91	<i>Bifidobacterium longum</i> LC91	+++	+++	+	+
92	<i>Bifidobacterium longum</i> LC92	+++	++	+	+
93	<i>Bifidobacterium longum</i> LC93	++	++	+	+
94	<i>Bifidobacterium longum</i> LC94	++	++	-	+
95	<i>Bifidobacterium longum</i> LC95	++	+++	-	-
96	<i>Bifidobacterium longum</i> LC96	++	+	-	-
97	<i>Bifidobacterium longum</i> LC97	++	+	-	-
98	<i>Bifidobacterium longum</i> LC98	++	++	-	-
99	<i>Bifidobacterium longum</i> LC99	++	++	-	-
100	<i>Bifidobacterium longum</i> LC100	++	++	-	+

* 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

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

3. 유산균의 간 손상 개선 효과 평가

유산균의 장 손상 또는 장 누수 개선 효능 평가를 통해 총 10개의 균주인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC15, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC17, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC25, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC55, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC65, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68을 선별하였다. 이후,

선별한 유산균 단독 또는 혼합 유산균의 간 손상 개선 효과를 Tert-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물을 이용하여 평가하였다.

(1) 실험방법

생쥐(C57BL/6, 웅성) 6마리를 한 군으로 하여, 정상군을 제외한 나머지 군의 실험동물에 Tert-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)를 2.5 mmol/kg의 용량으로 복강투여 하여 간 손상을 유발하였다. Tert-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)를 투여하고 2시간 후부터 정상군과 음성 대조군을 제외한 나머지 군의 실험동물에 유산균을 2×10^9 CFU의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 유산균 대신 실리마린(silymarin)을 100 mg/kg의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여하였다. 약물을 마지막으로 투여하고 6시간 후에 심장채혈 하였다. 채취한 혈액을 상온에서 60분간 방치하고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청의 GPT(glutamic pyruvate transaminase)와 GOT(glutamic oxalacetic transaminase)를 혈액분석 키트(ALT & AST 측정 키트; Asan Pharm. Co., 대한민국)를 이용하여 측정하였다. 또한, 실험동물로부터 적출한 간 조직 1g을 생리식염수에 넣고 호모게나이저를 이용하여 균질화한 후 상등액을 ELISA kit로 분석하여 TNF- α 의 양을 측정하였다.

(2) 실험결과

하기 표 18은 Tert-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)에 의해 간 손상이 유발된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 GOT, GPT, TNF- α 값의 변화를 나타낸 것이다. 하기 표 18에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68은 실리마린(silymarin)보다 우수한 간 손상 개선 효과를 보였고, 이들의 혼합 유산균은 간 손상 개선 효과가 더 우수하였다.

표 18

실험군	GOT(IU/L)	GPT(IU/L)	TNF- α (pg/g)
정상군	42.4	6.2	140.4
음성 대조군	103.1	28.0	298.0
LC5 투여군	36.9	5.4	115.7
LC15 투여군	60.3	6.2	154.3
LC17 투여군	65.8	6.8	136.7
LC25 투여군	64.6	11.3	132.4
LC27 투여군	35.3	3.3	157.1
LC28 투여군	42.0	1.0	185.7
LC55 투여군	55.6	17.6	251.4
LC65 투여군	61.4	17.3	127.6
LC67 투여군	50.8	3.8	150.5
LC68 투여군	40.8	5.7	82.4
LC5+LC67 투여군	32.7	3.1	115.9
LC5+LC68 투여군	36.8	5.6	105.4
LC27+LC67 투여군	30.5	2.3	121.2
LC27+LC68 투여군	35.4	3.2	112.8
LC28+LC67 투여군	32.5	2.8	128.2
실리마린(silymarin) 투여군	52.9	5.9	93.8

상기 표 18에서 "LC5"는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5를 나타내고, "LC15"는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC15를 나타내고, "LC17"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC17을 나타내고, "LC25"는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC25를 나타내고, "LC27"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27을 나타내고, "LC28"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28을 나타내고, "LC55"는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC55를 나타내고, "LC65"는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC65를 나타내고, "LC67"은 비피도박테리움

롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 나타내고, "LC68"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68를 나타내고, "LC5+LC67"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5와 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타내고, "LC5+LC68"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5와 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타내고, "LC27+LC67"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27과 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타내고, "LC27+LC68"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27과 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타내고, "LC28+LC67"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28과 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균을 나타낸다. 이하의 실험 결과를 나타낸 표들에서 단독 유산균 또는 혼합 유산균에 대해 동일한 기호를 사용하였다.

4. 유산균의 알러지 개선 효과 평가

(1) 유산균의 탈과립 저해율 측정

RBL-2H3 세포주(rat mast cell line, 한국세포주은행, Cat. No.22256)를 10% FBS(fetal bovine serum)과 L-글루타민을 포함하는 DMEM(Dulbeccos' modified Eagle's medium, Sigma사, 22256)을 이용하여 37℃, 가습화된(humidified) 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액에 포함된 세포들을 트립신-EDTA 용액을 사용하여 부유시키고, 분리 및 회수하여 실험에 사용하였다. 회수된 RBL-2H3 세포들을 24-웰 플레이트에 웰 당 5×10^5 cells의 양이 되도록 분주한 후, 마우스 단클론성 IgE 0.5 µg/ml를 넣고 12시간 동안 배양시키며 감작화(sensitization)시켰다. 감작화된 세포들을 0.5 ml의 시라가니안 완충액(siraganian buffer; 119mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM MgCl₂, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH 7.2)으로 세척한 후에 다시 0.16 ml의 시라가니안 완충액(5.6mM 포도당, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA를 첨가)을 넣고 37℃에서 10분간 배양하였다. 이후, 세포 배양액에 시험약물인 유산균을 1×10^4 CFU/ml의 농도가 되도록 첨가하거나 대조약물인 DSCG(disodium cromoglycate) 0.04 ml를 첨가한 다음 20분이 경과되었을 때 0.02 ml의 항원(DNP-BSA 1µg/ml)으로 37℃에서 10분간 세포들을 활성화시켰다. 이후, 세포 배양액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 수득한 상등액 0.025 ml를 96-웰 플레이트로 옮기고, 기질액인 1mM p-NAG(0.1M 시트레이트 완충액에 p-니트로페닐-N-아세틸-β-D-글루코사아미니드를 pH 4.5로 녹인 용액) 0.025 ml를 가한 후, 37℃에서 60분간 반응시켰다. 이후, 0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.2 ml를 반응액에 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 ELISA 분석기로 흡광도를 측정하였다.

(2) 실험결과

하기 표 19는 유산균의 탈과립 저해율을 측정한 결과이다. 표 19에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68 및 이들의 혼합 유산균은 호염구의 탈과립을 효과적으로 억제하였다. 따라서, 상기 유산균 또는 유산균 혼합물은 알러지로부터 유발되는 아토피, 천식, 인후염 또는 만성 피부염 등을 매우 효과적으로 개선할 수 있다.

표 19

처리 약물	탈과립 저해율(%)
없음	0
LC5	65
LC15	45
LC17	43
LC25	48
LC27	52
LC28	54
LC55	38

LC65	42
LC67	65
LC68	61
LC5+LC67	65
LC5+LC68	60
LC27+LC67	65
LC27+LC68	59
LC28+LC67	62
DSCG(disodium cromoglycate)	62

5. 유산균의 항염 및 면역조절 효과 평가(in vitro)

(1) 대식세포의 분리와 염증 지표 측정

6주령 C57BL/6J 수컷 생쥐(20-23g)를 라운바이오㈜로부터 구입하였다. 생쥐의 복강에 멸균된 4% thioglycolate 2 ml를 투여하고, 96시간이 지난 뒤에 생쥐를 마취시키고, 다시 생쥐 복강에 RPMI 1640 배지 8 ml를 투여하고 5~10분이 지난 뒤에 생쥐 복강 내의 RPMI 배지(대식세포를 포함)를 다시 뽑아내고 1000 rpm의 조건에서 10분간 원심분리하고 다시 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 24-well 플레이트에 대식세포를 각 well당 0.5×10^6 의 수로 깔고, 시험 물질인 유산균과 염증 반응 유도 물질인 LPS(lipopolysaccharide)를 2시간 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 이때, 유산균 처리 농도는 1×10^4 CFU/ml 이었다. 수득한 세포를 buffer(Gibco사)에 넣고 균질화 하였다. 수득한 상등액으로부터 TNF- α 와 같은 사이토카인의 발현량을 ELISA kit로 측정하였다. 또한, 수득한 세포로부터 p65(NF- κ B), p-p65(phosphor-NF- κ B) 및 β -actin의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. 구체적으로 상등액 50 μ g을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀룰로소지에 100V, 400mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀룰로소지를 5% skim milk로 30분간 blocking 한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율로 하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율로 하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하고, 발색밴드의 강도(Intensity)를 측정한 후, 저해율을 아래와 같은 식으로 계산하였다. 하기 식에서 정상군은 대식세포에 생리식염수만 처리한 군을 나타내고, LPS 처리군은 대식세포에 LPS만 처리한 군을 나타내고, 유산균 처리군은 대식세포에 LPS 및 유산균을 모두 처리한 군을 나타낸다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(\frac{\text{LPS 처리군 발현량} - \text{유산균 처리군 발현량}}{\text{LPS 처리군 발현량} - \text{정상군 발현량}} \right) \times 100$$

하기 표 20은 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 염증 반응이 유도된 대식세포에 유산균을 처리하였을 때 NF- κ B 활성화 저해 수준과 TNF- α 발현 저해 수준을 영향을 나타낸 것이다. 하기 표 20에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68 및 이들의 혼합 유산균은 LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 염증 반응을 효과적으로 억제하였다.

표 20

처리 유산균	TNF- α 발현 저해율(%)	p-p65/p65 활성화 저해율(%)
LC5	71	73
LC15	54	55
LC17	61	55
LC25	52	65
LC27	70	72
LC28	74	71
LC55	63	62
LC65	65	68

LC67	76	77
LC68	75	71
LC5+LC67	78	72
LC5+LC68	76	72
LC27+LC67	81	75
LC27+LC68	77	73
LC28+LC67	77	73

[0267] (2) 비장으로부터 T 세포의 분리와 Th17 세포 또는 Treg 세포로의 분화능 측정

[0268] C56BL/6J 생쥐의 비장을 분리하고, 적당하고 분쇄하고, 10% FCS 함유 RPMI 1640 배제에 현탁하고 CD4 T cell isolation kit(MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 사용하여 CD4 T 세포를 분리하였다. 분리한 CD4 T 세포를 12-웰 플레이트에 각 웰당 5×10^5 수로 분주하고, 여기에 anti-CD3($1 \mu\text{g}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일) 및 anti-CD28($1 \mu\text{g}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)을 넣거나, anti-CD3($1 \mu\text{g}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일), anti-CD28($1 \mu\text{g}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일), recombinant IL-6($20 \text{ ng}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일) 및 recombinant transforming growth factor beta($1 \text{ ng}/\text{mL}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 넣고 세포를 배양하면서 유산균을 웰당 1×10^3 또는 1×10^5 CFU의 양으로 넣고 4일간 배양하였다. 이후, 배양액의 세포를 anti-FoxP3 또는 anti-IL-17A 항체로 염색하고 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 장치(C6 Flow Cytometer® System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 Th17 세포 및 Treg 세포의 분포를 분석하였다.

[0269] 하기 표 21은 비장에서 분리된 T 세포에 anti-CD3, anti-CD28, IL-6 및 TGF- β 를 처리한 후 유산균을 처리하였을 때 Th17 세포로의 분화 수준을 나타낸 것이고, 하기 표 22는 비장에서 분리된 T 세포에 anti-CD3 및 anti-CD28을 처리한 후 유산균을 처리하였을 때 Treg 세포로의 분화 수준을 나타낸 것이다. 하기 표 21 및 22에서 보이는 바와 같이, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC28, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68 및 이들의 혼합 유산균은 T 세포의 Th17 세포(T helper 17 cell)로의 분화를 저해하고 Treg 세포로의 분화를 촉진하였다. 상기 결과에 의할 때 상기 유산균 또는 유산균 혼합물은 대장염, 관절염과 같은 염증 질환을 효과적으로 개선할 수 있다.

표 21

T 세포 처리 방법		Th17 세포로의 분화율(%)
anti-CD3, anti-CD28, IL-6 및 TGF- β 를 처리 여부	유산균 처리 여부	
무처리	무처리	12.2
처리	무처리	25.6
처리	LC5 처리	14.2
처리	LC15 처리	19.6
처리	LC17 처리	17.9
처리	LC25 처리	18.2
처리	LC27 처리	15.1
처리	LC28 처리	14.9
처리	LC55 처리	18.8
처리	LC65 처리	17.9
처리	LC67 처리	15.9
처리	LC68 처리	15.7
처리	LC5+LC67 처리	14.2
처리	LC5+LC68 처리	14.5
처리	LC27+LC67 처리	13.9
처리	LC27+LC68 처리	14.4
처리	LC28+LC67 처리	14.1

표 22

T 세포 처리 방법		Treg 세포로의 분화율(%)
anti-CD3 및 anti-CD28 처리 여부	유산균 처리 여부	
무처리	무처리	9.1
처리	무처리	11.4
처리	LC5 처리	22.9
처리	LC15 처리	15.8
처리	LC17 처리	16.9
처리	LC25 처리	18.4
처리	LC27 처리	21.8
처리	LC28 처리	21.4
처리	LC55 처리	19.5
처리	LC65 처리	19.2
처리	LC67 처리	21.6
처리	LC68 처리	20.5
처리	LC5+LC67 처리	21.8
처리	LC5+LC68 처리	21.8
처리	LC27+LC67 처리	22.0
처리	LC27+LC68 처리	21.5
처리	LC28+LC67 처리	21.9

6. 유산균의 항염 및 대장염 개선 효과 평가(in vivo)

(1) 실험동물

5주령 C57BL/6 수컷 생쥐(24-27g)를 오리엔트바이오(주)로부터 구입하고, 습도 $50 \pm 10\%$, 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 조명은 12 시간 켜고 12 시간 끄는 것을 반복하는 조절된 환경 조건에서 일주일 동안 사육한 후 실험에 사용하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험에서 한 군은 6마리로 하였다.

(2) TNBS에 의한 대장염 유발 및 시료 투여

실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 2,4,6-트리니트로벤젠술포산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)으로 급성 대장염을 유발하였다. 구체적으로 실험동물을 가볍게 에테르로 마취한 후 TNBS(2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) 용액 2.5g을 50% 에탄올 100ml에 혼합한 용액을 끝이 둥근 1ml 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1ml씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1ml를 경구투여하였다. 이후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 시험시료인 유산균 또는 혼합 유산균을 생리식염수에 현탁하여 2.0×10^9 CFU의 양으로 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식사시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하여 사용하였다. 또한, 정상군의 실험동물에는 유산균 대신 생리식염수만을 경구투여하였다. 또한, 음성 대조군의 실험동물에도 TNBS에 의한 대장염 유발 후 유산균 대신 생리식염수만을 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 유산균 대신 대장염 치료 약물인 설파살라진(sulfasalazine)을 50 mg/kg의 양으로 경구투여하였다.

(3) 대장의 외관 분석

적출한 대장의 길이와 외관을 관찰하고 하기 표 23의 기준(Hollenbach 등, 2005 대장염 정도에 대한 기준)에 따라 점수로 매겨 외관 분석을 하였다. 대장 조직은 대장 내용물을 모두 제거하고, 생리 식염수에 세척한 후 일부

는 병리조직용 샘플로 사용하기 위해 4% 포름알데히드 고정액으로 고정하였으며, 나머지는 분자생물학적 분석을 위해 영하 80℃에서 냉동보관하면서 사용하였다.

표 23

외관 점수(Macroscopic Score)	기준
0	어떠한 궤양과 염증도 발견되지 않음
1	출혈이 없는 충혈이 발견됨
2	충혈이 있는 궤양이 발견됨
3	한 곳에서만 궤양과 염증이 발견됨
4	궤양과 염증이 2곳 이상에서 발견됨
5	궤양이 2cm 이상으로 확대되어 있음

(4) 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

대장조직 100mg에 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide 함유 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 200 μ l를 넣고 균질화(homogenization) 하였다. 이후, 4℃ 및 10,000 $\times$ g의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 50 μ l를 0.95 ml의 반응액(1.6mM tetramethyl benzidine과 0.1mM H₂O₂ 함유)에 넣고 37℃에서 반응시키면서 650 nm에서 경시적으로 흡광도를 측정하였다. 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성은 반응물로서 생긴 peroxide 1 μ mol/ml를 1 unit로 계산하였다.

(5) 염증 지표 측정

웨스턴블롯팅 방법을 이용하여 p-p65, p65, iNOS, COX-2, β -actin 과 같은 염증 반응 지표 물질을 측정하였다. 구체적으로, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정 실험과 동일한 방법으로 상등액을 얻었다. 이후, 상등액 50 μ g을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀룰로소지에 100V, 400mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀룰로소지를 5% skim milk로 30분간 blocking 한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율로 하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율로 하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하였다.

또한, ELISA kit를 이용하여 TNF- α , IL-17, IL-10 등과 같은 염증 관련 사이토카인을 측정하였다.

(6) 면역조절 지표 분석

적출한 대장을 2.5 mM EDTA 용액으로 2회 세척하였다. 이후, 1 mg/ml 농도로 collagenase type VIII(Sigma)가 함유된 RPMI 배지에 세척한 대장을 넣고 30℃에서 20분간 흔들며 처리하고, 여과하여 Lamina propria를 분리하였다. 이후, Lamina propria를 30-100% 퍼콜액으로 처리하고 원심분리하여 T 세포를 분리하였다. 이후, 분리한 T 세포를 anti-FoxP3 또는 anti-IL-17A 항체로 염색하고 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 장치(C6 Flow Cytometer® System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 Th17, Treg의 분포를 분석하였다.

(7) 실험결과

하기 표 24는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때, 유산균이 대장의 무게, 대장의 외관, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성, 염증 관련 사이토카인의 함량 변화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 하기 표 24에서 보이는 바와 같이 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물의 경우 몸무게, 대장염의 외관 지수, 대장 길이가 감소하고 MPO 활성이 증가하였다. 그러나, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 상기 지표들이 모두 개선되었다. 특히, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 단독으로 투여하거나 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5의 혼합 유산균을 투여하는 경우 대장염 개선 효과가 매우

우수하였다. 또한, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물의 경우 TNF- α , IL-17가 증가하고 IL-10이 감소하였다. 그러나, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 상기 지표들이 모두 개선되었다. 특히, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 단독으로 투여하거나 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5의 혼합 유산균을 투여하는 경우 TNF- α , IL-17의 양이 크게 감소하고 IL-10의 양이 크게 증가하였다.

표 24

[0297]

실험군	Weight gain(g)	Macroscopic score	Colon length(cm)	MPO 활성 (μ U/mg)	TNF- α (pg/mg)	IL-17 (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)
정상군	0.64	5.9	0.14	0.42	35.1	18.4	61.2
음성 대조군	-2.46	4.2	2.32	1.54	95.5	65.2	30.7
LC5 투여군	-1.90	4.65	1.30	0.91	75.5	52.8	43.9
LC27 투여군	-1.0	4.56	1.08	0.82	67.2	50.4	44.0
LC67 투여군	-0.28	4.92	0.50	0.43	48.5	38.5	54.6
LC 68 투여군	-1.02	4.5	1.34	1.04	54.4	50.5	48.1
LC5+LC67 투여군	-0.3	5.08	0.84	0.42	45.1	37.3	55.3
LC27+LC68 투여군	-1.15	4.8	1.17	0.78	59.8	45.0	50.0
양성 대조군	-0.91	4.58	1.43	0.95	58.2	48.5	45.5

[0298]

도 22는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 유산균이 미치는 영향을 T 세포의 Th17 세포로의 분화 양상으로 나타낸 것이고, 도 23은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 유산균이 미치는 영향을 T 세포의 Treg 세포로의 분화 양상으로 나타낸 것이다. 도 22 및 도 23에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "TNBS"는 음성 대조군을 나타내고, "LC5"는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5 투여군을 나타내고, "LC27"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27 투여군을 나타내고, "LC67"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67 투여군을 나타내고, "LC68"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68 투여군을 나타내고, "LC5+LC67"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5와 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균 투여군을 나타내고, "LC27+LC68"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27과 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균 투여군을 나타내고, "SS"는 설파살라진(sulfasalazine) 투여군을 나타낸다. 도 22 및 도 23에서 보이는 바와 같이 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물의 경우 T 세포의 Th17 세포로의 분화가 촉진되고 T 세포의 Treg 세포로의 분화가 억제되었다. 그러나, TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 유산균을 투여하였을 때 T 세포의 Th17 세포로의 분화가 억제되고 T 세포의 Treg 세포로의 분화가 촉진되었다. 특히, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 단독으로 투여하거나 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5의 혼합 유산균을 투여하는 경우 T 세포의 Th17 세포로의 분화가 크게 억제되고 T 세포의 Treg 세포로의 분화가 크게 촉진되었다.

[0299]

도 24는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 대해 유산균이 미치는 영향을 염증 반응 지표 물질 등으로 나타낸 것이다. 도 24에서 "Nor"은 정상군을 나타내고, "T"는 음성 대조군을 나타내고, "LC5"는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5 투여군을 나타내고, "LC27"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27 투여군을 나타내고, "LC67"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67 투여군을 나타내고, "LC68"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68 투여군을 나타내고, "LC5+LC67"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5와 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균 투여군을 나타내고, "LC27+LC68"은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC27과 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC68을 동량으로 혼합하여 제조한 혼합 유산균 투여군을 나타내고, "SS"는 설파살라진(sulfasalazine) 투여군을 나타낸다. 도 24에서 보이는 바와 같이 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물의 경우 NF- κ B가 활성화(p-p65)되고 COX-2 및 iNOS의 발현량이 증가하였으나, 유산균 투여에 의해 NF- κ B가 활성화(p-p65)가 억제되고 COX-2 및 iNOS의 발현량의 증

가도 감소하였다. 특히, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67을 단독으로 투여하거나 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) LC67과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LC5의 혼합 유산균을 투여하는 경우 NF- κ B가 활성화(p-p65) 억제 효과 및 COX-2 및 iNOS의 발현 증가 억제 효과가 우수하였다.

[0301] 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

[0303]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11762P

수탁일자 : 20150901

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11763P

수탁일자 : 20150901

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11764P

수탁일자 : 20150901

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11800P

수탁일자 : 20160111

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11801P

수탁일자 : 20160111

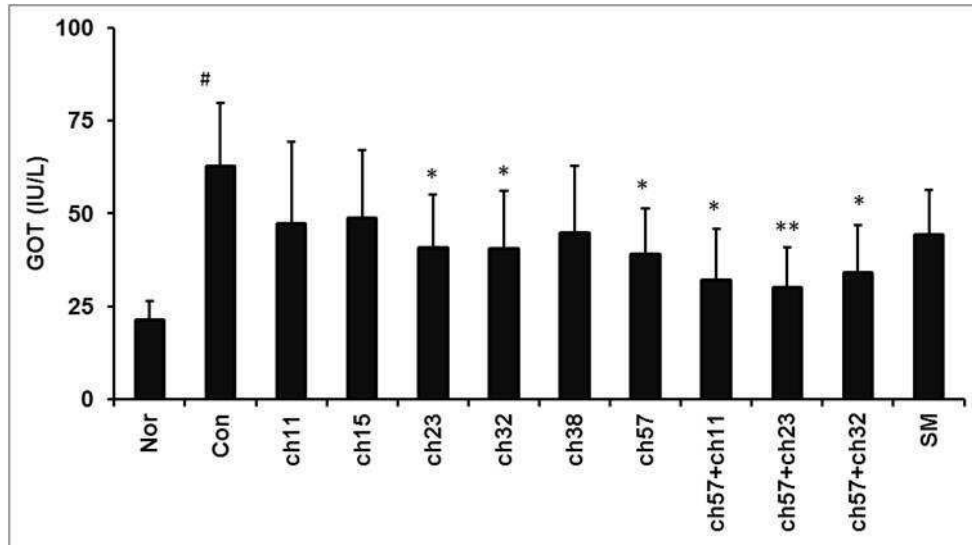
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11801P

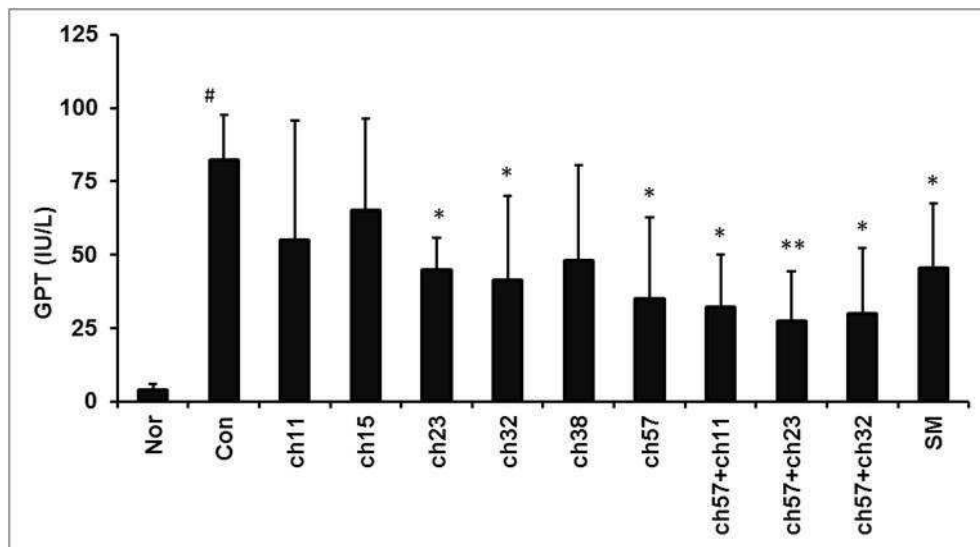
수탁일자 : 20160111

도면

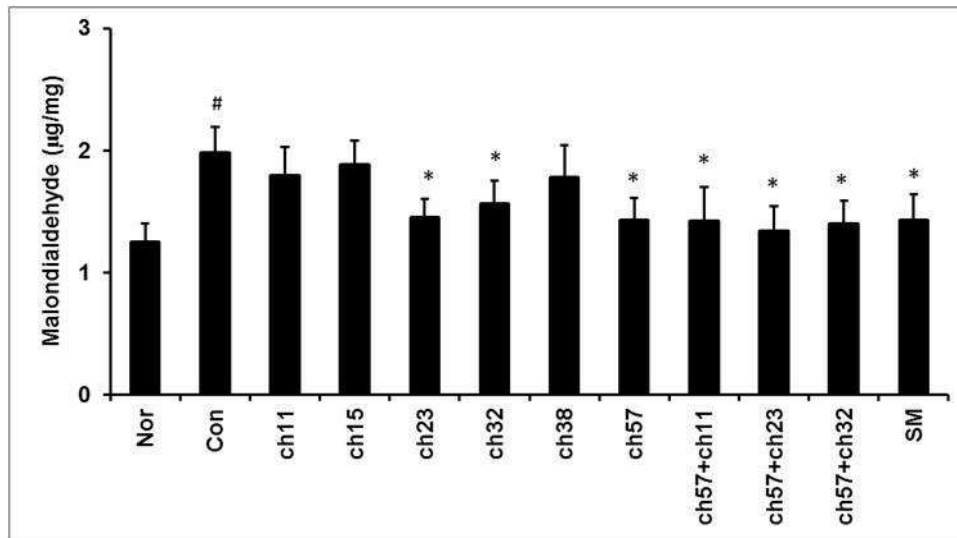
도면1



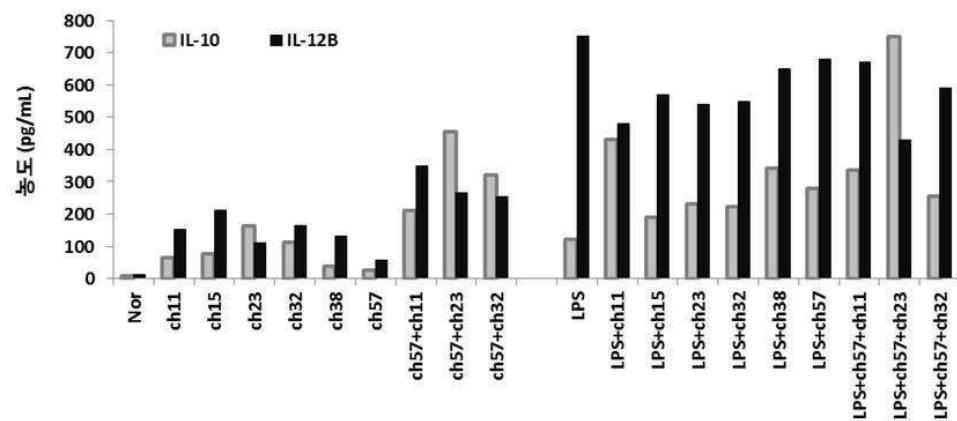
도면2



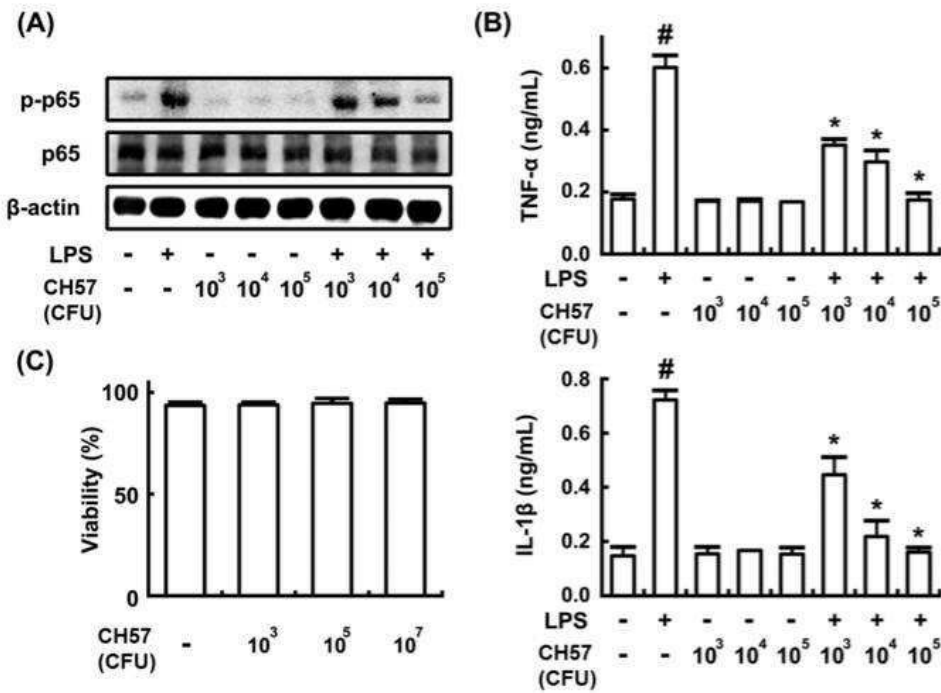
도면3



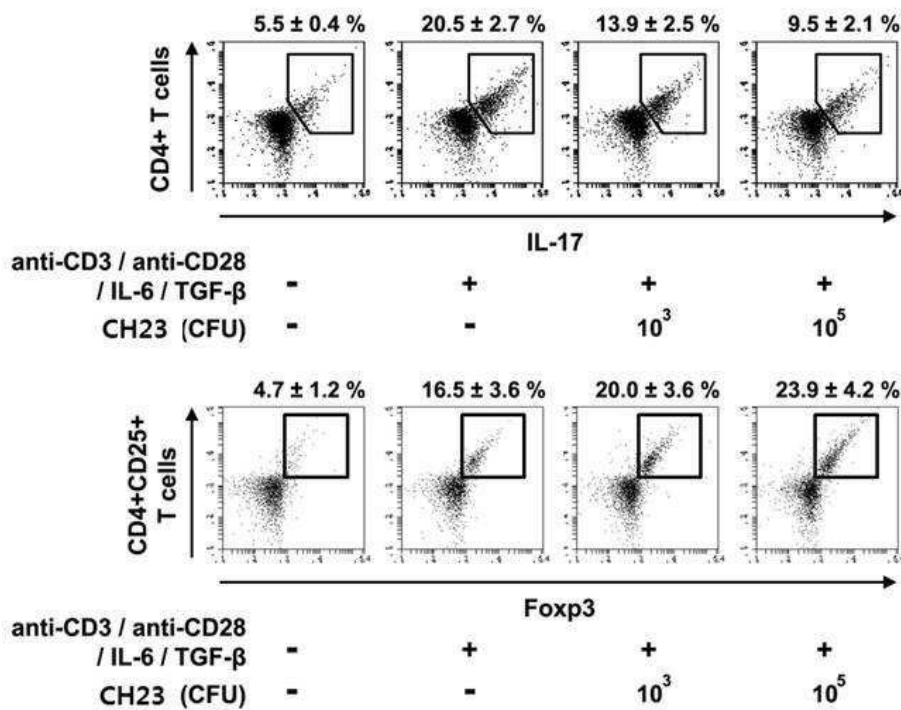
도면4



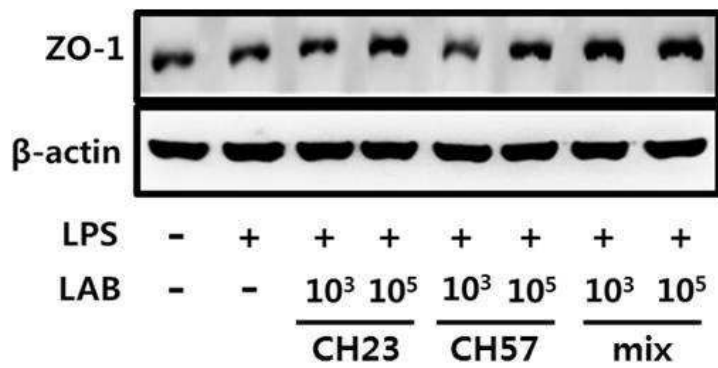
도면5



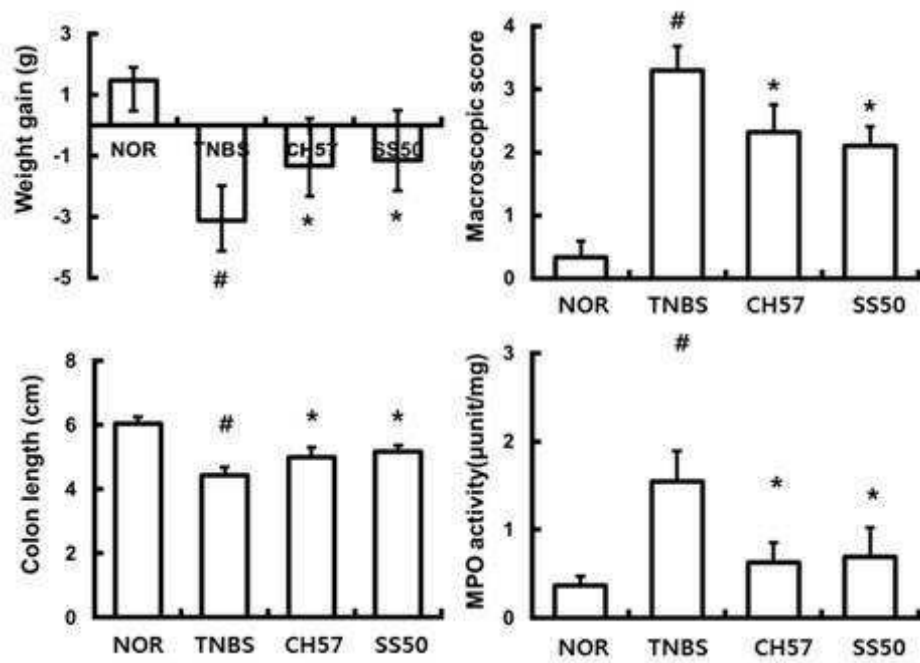
도면6



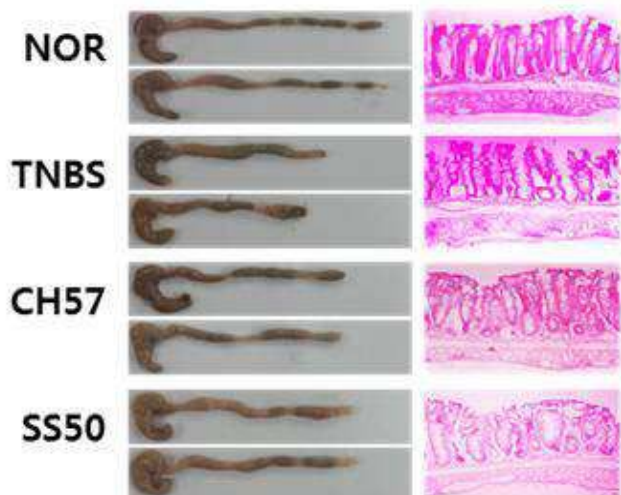
도면7



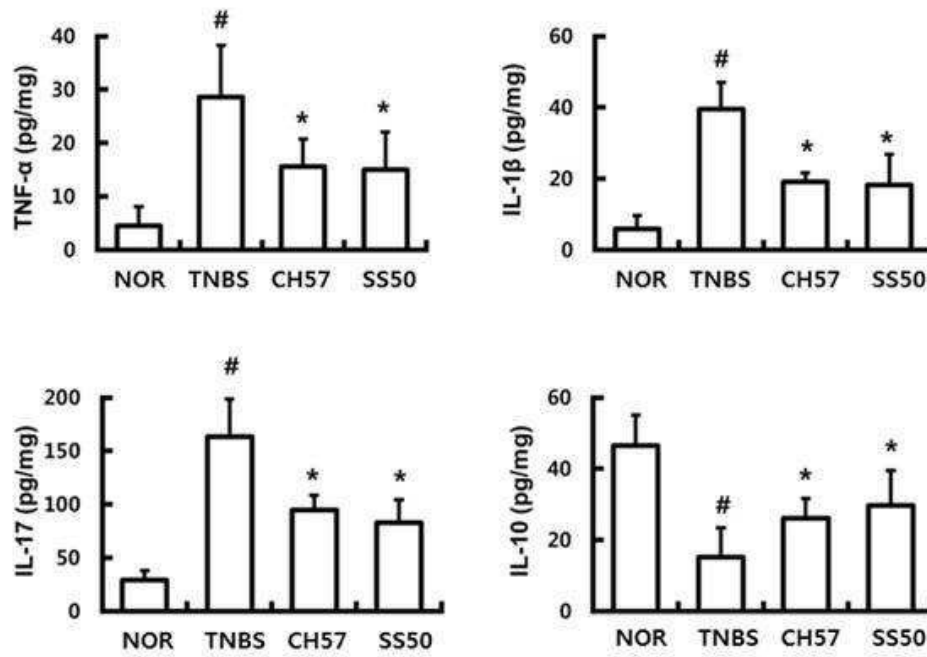
도면8



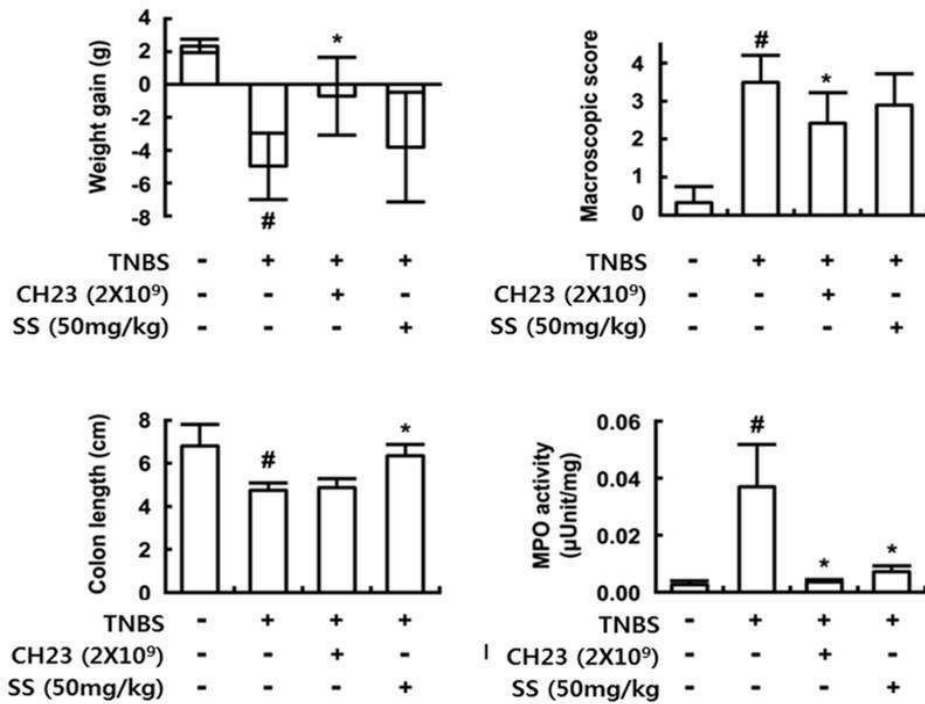
도면9



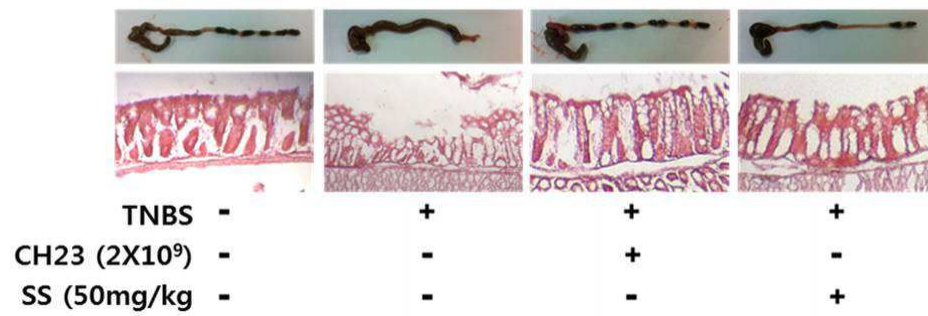
도면10



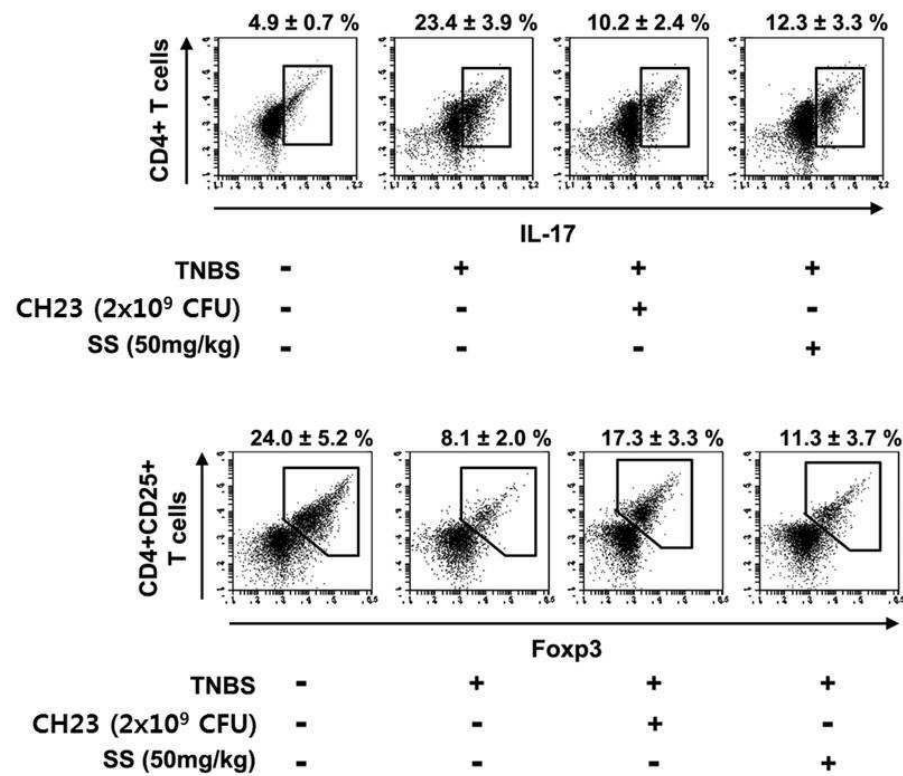
도면11



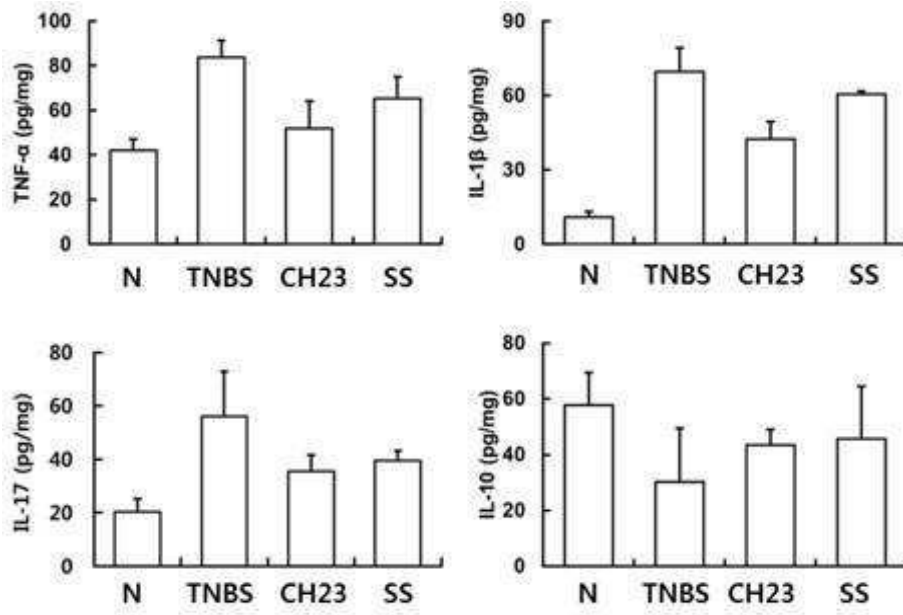
도면12



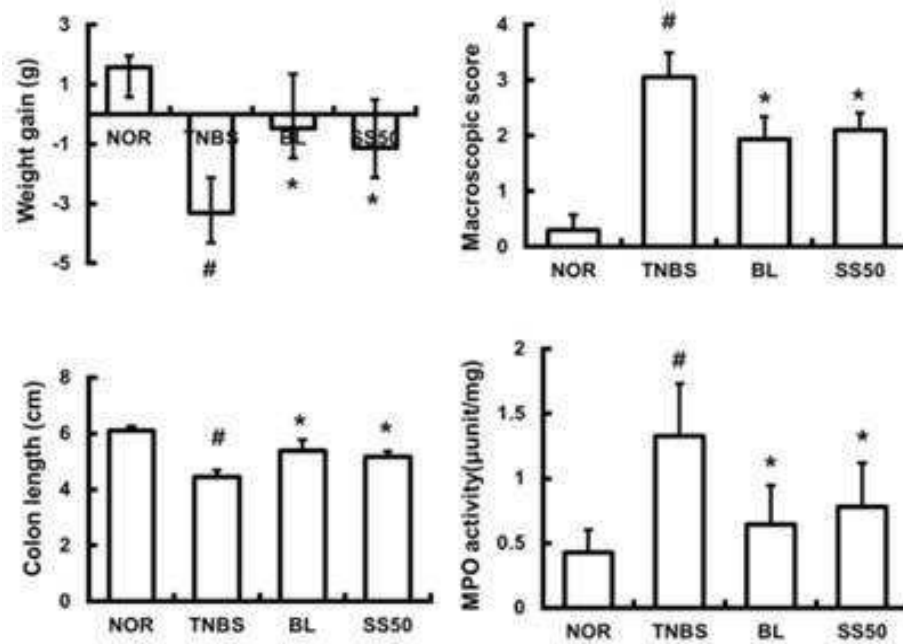
도면13



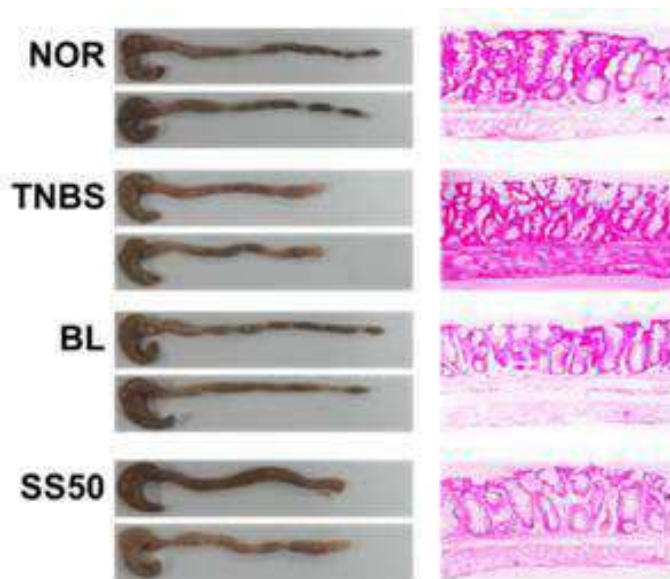
도면14



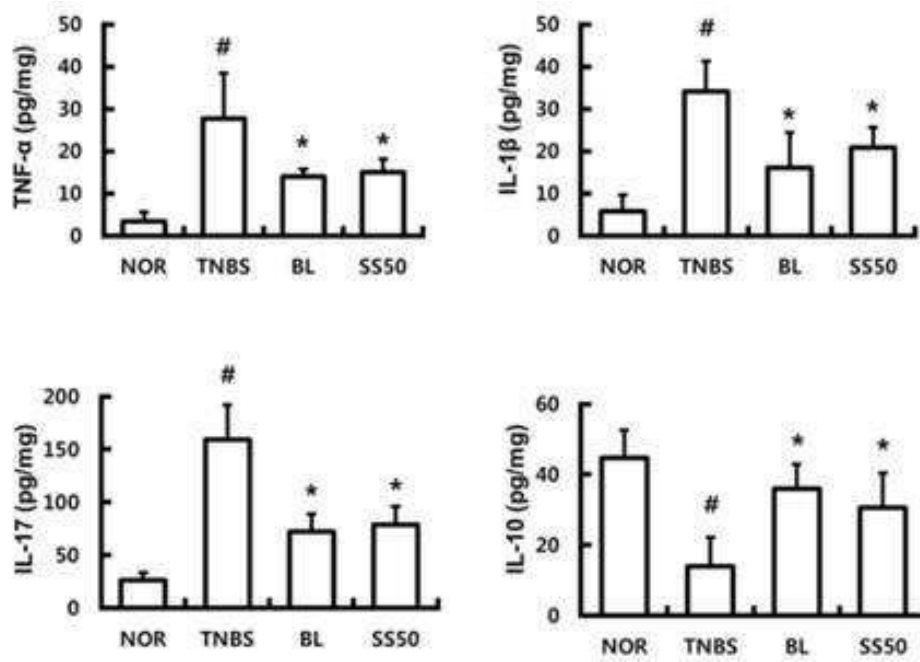
도면15



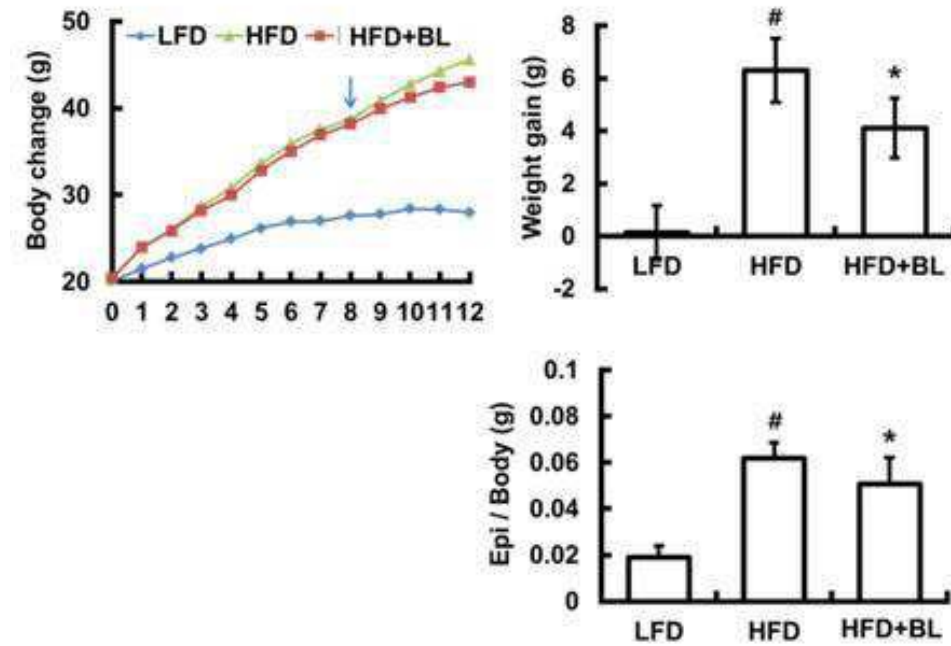
도면16



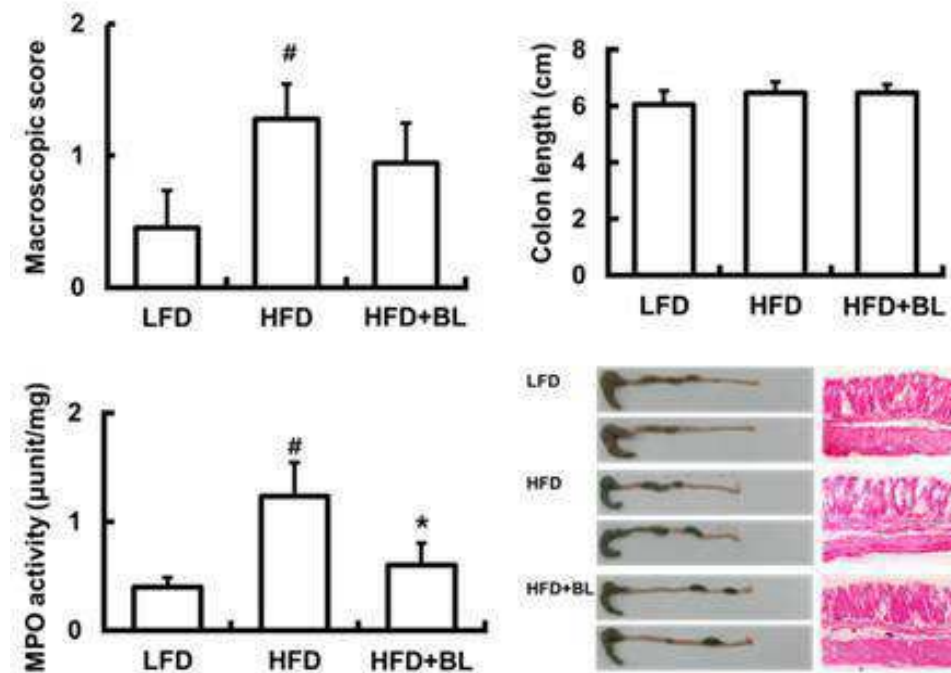
도면17



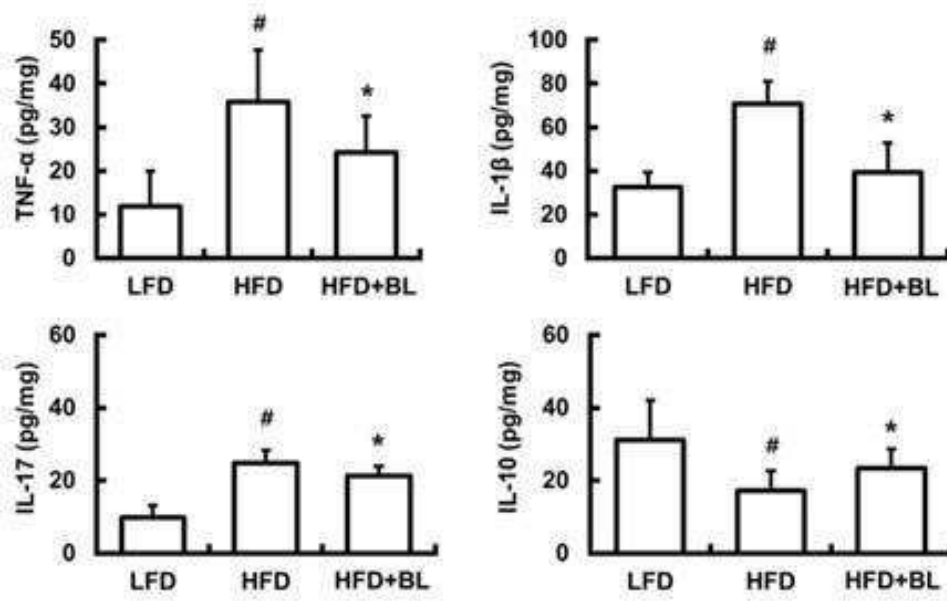
도면18



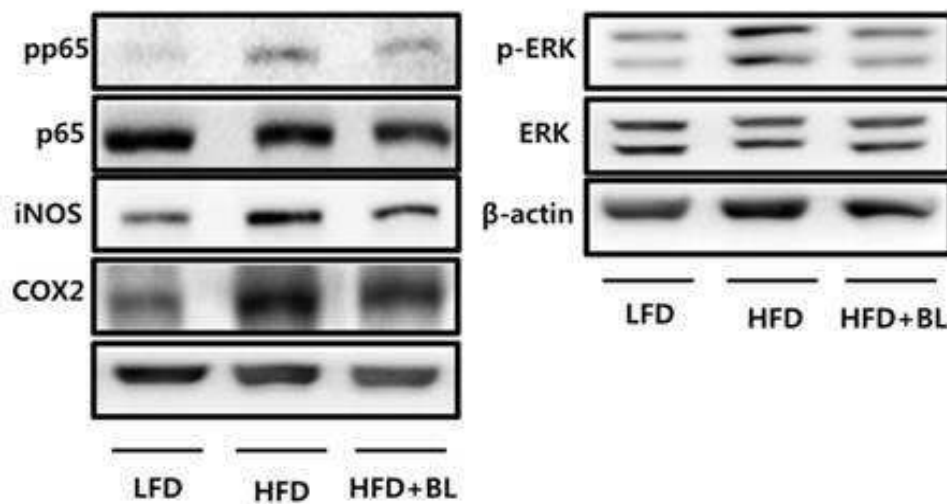
도면19



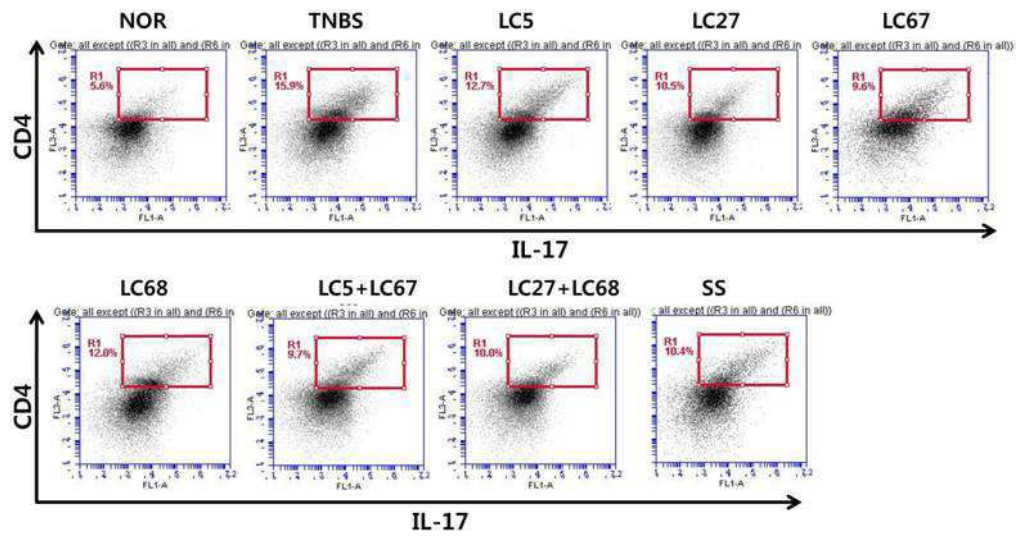
도면20



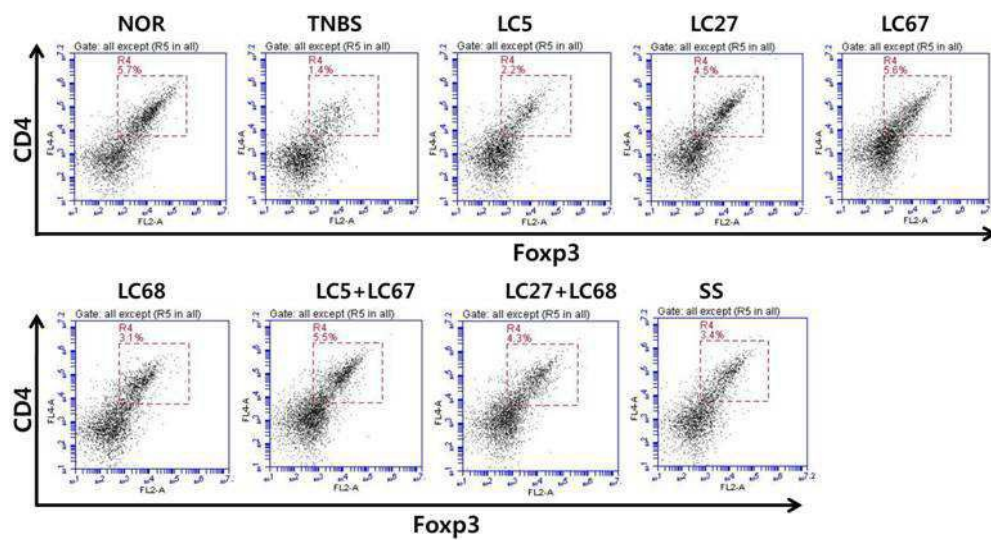
도면21



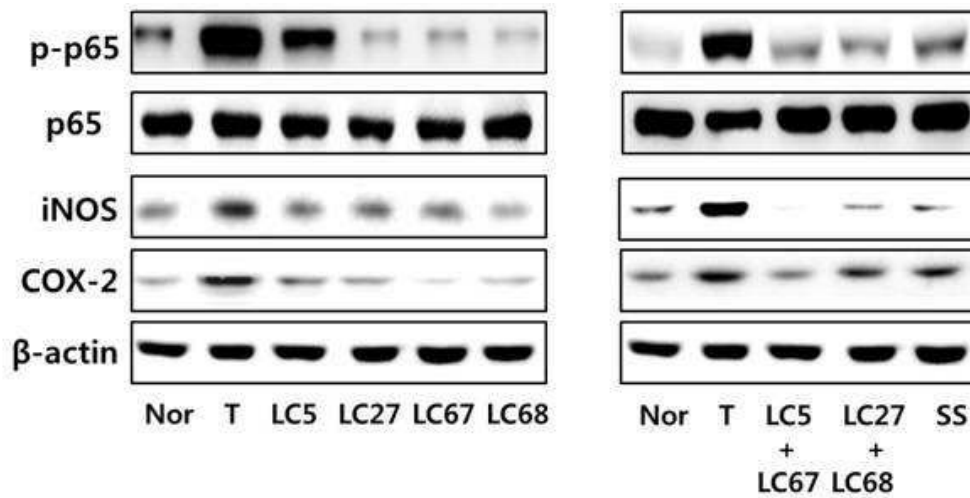
도면22



도면23



도면24



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Novel lactic acid bacteria with various functionality and use thereof
- <130> DP-16-110
- <150> KR 10-2015-0130124
- <151> 2015-09-15
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1132
- <212> DNA
- <213> Unknown

<220><223> 16S rDNA of Lactobacillus brevis CH23

<400> 1

```

agggataaca cttggaaaca ggtgctaata ccgtataaca acaaaatccg catggatfff      60
gtttgaaagg tggcttcggc tatcacttct ggatgatccc gcggcgtatt agttagtgg      120

tgaggtaaag gccaccaag acgatgatac gtagccgacc tgagagggta atcggccaca      180
ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat      240
ggacgaaagt ctgatggagc aatgccgcgt gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact      300
ctgttgtaa agaagaacac ctttgagagt aactgttcaa gggttgacgg tatttaacca      360
gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttgc      420
cggatttatt gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttttta agtctgatgt gaaagccttc      480

```

ggcttaaccg gagaagtgca tcggaaactg ggagacttga gtgcagaaga ggacagtgga 540

actccatgtg tagcgggtga atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc 600

tgtctagtct gtaactgacg ctgaggctcg aaagcatggg tagcgaacag gattagatac 660

cctgstagtc catgccgtaa acgatgagtg ctaagtgttg gagggtttcc gcccttcagt 720

gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtagc accgcaaggt tgaaactcaa 780

aggaattgac gggggcccg cacaagcgtg gagcatgtgg ttttaattcga agctacgcga 840

agaaccttac caggtcttga catcttctgc caatcttaga gataagacgt tcccttcggg 900

gacagaatga caggtggtgc atggttctgc tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 960

tcccgaacg agcgcaacc ttattatcag ttgccagcat tcagttgggc actctggtga 1020

gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg gtagtagctc aaatcatcat gcccttatg 1080

acctgggcta cacacgtgct acaatggacg gtacaacgag tcgcaagtc gt 1132

<210> 2

<211> 1258

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> 16S rDNA of Lactobacillus johnsonii CH32

<400> 2

glaacttgcc caagagactg ggataacacc tggaacaga tgctaatacc ggataacaac 60

actagacgca tgtctagagt ttgaaagatg gttctgctat cactcttgga tggacctgcg 120

gtgcattagc tagttggtaa ggtaacggct taccaaggca atgatgcata gccgagttga 180

gagactgacg ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt 240

agggaatctt ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggg 300

tttcggctcg taaagctctg ttggtagtga agaaagatag aggtagtaac tggccttgat 360

ttgacggtaa ttccccagaa agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt 420

aggtggcaag cgttgtccgg atttatggg cgtaaagcga gtgcaggcgg ttcaataagt 480

ctgatgtgaa agccttcggc tcaaccggag aattgcatca gaaactgttg aacttgagtg 540

cagaagagga gagtggaaact ccatgtgtag cgttggaatg cgtagatata tggaagaaca 600

ccagtggcga aggcggctct ctggctctga actgacgtg aggcctgaaa gcatgggtag 660

cgaacaggat tagataccct ggtagtccat gccgtaaacg atgagtgcta agtgttgga 720

ggtttcgcc tctcagtgtc gcagctaacg cattaagcac tccgcctggg gagtacgacc 780

gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggccccgaca agcgggtggag catgtggttt 840

aattcgaagc aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat ccagtgcaaa cctaagagat	900
taggtgttcc cttcggggac gctgagacag gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg	960
tgagatgttg ggtaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg tcattagtgt ccatcattaa	1020
gttgggcact ctaatgagac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaag	1080
tcacatgcc cttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggacggtg caacgagaag	1140
cgaacctgcg aaggcaagcg gatctcttaa agccgttctc agttcggact gtaggctgca	1200
actcgctac acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgga cagtacgccg cggatgaat	1258
<210> 3	
<211> 1348	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> 16S rDNA of Bifidobacterium longum CH57	
<400> 3	
cgggctttgc ttggtggtga gagtggcgaa cgggtgagta atgcgtgacc gacctgcccc	60
atacaccgga atagctcctg gaaacgggtg gtaatgccgg atgctccagt tgatcgcatg	120
gtcttctggg aaagctttcg cggatatgga tggggtcgcg tcctatcagc ttgacggcgg	180
ggtaacggcc caccgtggct tcgacgggta gccggcctga gagggcgacc ggccacattg	240
ggactgagat acggcccaga 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 ttctgtcgtt ccggtgtgaa agtccatcgc ttaacggtgg atccgcgccg	540
ggtagggcgg ggcttgagtg cggtagggga gactggaatt cccggtgtaa cggatggaatg	600
tgtagatata gggaagaaca ccaatggcga aggcaggtct ctgggccgtt actgacgtg	660
aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtcac gccgtaaacg	720
gtggatgctg gatgtggggc ccgttcacg ggttccgtgt cggagctaac gcgttaagca	780
tcccgcctgg gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa gaaattgacg gggggcccga	840
caagcggcgg agcatgcgga ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc tgggcttcac	900
atgttcccga cggtcgtaga gatacggctt cccttcgggg cgggttcaca ggtggtgcat	960
ggtcgtgtgc agtcgtgtc gtgagatgtt gggtaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc	1020
gccccgtgtt gccagcggat tatgccggga actcacgggg gaccgccggg gttactcgg	1080

aggaaggtgg ggaatgacgtc agatcatcat gccccttacg tccagggctt cacgcatgct 1140
 acaatggccg gtacaacggg atgcgacgcg gcgacgcgga gcggatccct gaaaaccggt 1200
 ctacgttcgg atcgacgtct gcaactcgac tgcgtgaagg cggagtcgct agtaatcgcg 1260

 aatcagcaac gtcgcggtga atgcgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcaagtcac 1320
 gaaagtgggc agcaccgaa gccggtgg 1348

 <210> 4
 <211> 1421
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> 16S rDNA of Lactobacillus plantarum LC5
 <400> 4

 ctggtattga ttgtgcttg catcatgatt tacatttgag tgagtggcga actggtgagt 60
 aacacgtggg aaacctgccc agaagcgggg gataacacct ggaacagat gctaataccg 120
 cataacaact tggaccgcat ggtccgagct tgaagatgg cttcggctat cacttttgga 180

 tgggtccgcg gcgtattagc tagatgggtg ggtaacggct caccatggca atgatacgtg 240
 gccgacctga gagggtaatc ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg 300
 aggcagcagt aggaatctt ccacaatgga cgaagtctg atggagcaac gccgcgtgag 360
 tgaagaaggg ttctggctcg taaactctg ttgttaaaga agaacatc tgagagtaac 420
 tgttcaggta ttacgggtat ttaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc 480
 ggtaatacgt aggtggcaag cgttgcggg gatttattgg gcgtaaagcg agcgaggcg 540
 gttttttaag tctgatgtga aagccttcgg ctcaaccgaa gaagtgcac ggaaactggg 600

 aaacttgagt gcagaagagg acagtggaac tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagatat 660
 atggaagaac accagtggcg aaggcggctg tctggtctgt aactgacgt gaggctcgaa 720
 agtatgggta gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca tacgtaaac gatgaatgct 780
 aagtgttgga gggtttcgc cttcagtc tgcagctaac gcattaagca ttccgcctgg 840
 ggagtacggc cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgac aagcgttgga 900
 gcatgtggtt taattcgaag ctacgcgaag aaccttacc ggtcttgaca tactatgcaa 960
 atctaagaga ttagacgttc cttcgggga catggataca ggtggtgcat ggttgcgtc 1020

 agctcgtgtc gtgagatgtt gggtaagtc cgcaacgag cgcaaccctt attatcagtt 1080
 gccagcatta agttgggca cctggtgaga ctgccgtga caaacggag gaaggtggg 1140
 atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cagtgctac aatggatggt 1200

acaacgagtt gcgaactcgc gagagtaagc taatctctta aagccattct cagttcggat 1260
tgtaggctgc aactcgccta catgaagtcg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc 1320
gcggtgaata cgttccccggg ccttgtaac accgcccgtc acaccatgag agttttgtaac 1380
accctaaagtc ggtaggggtaa ccttttagga accagccgcc t 1421

<210> 5

<211> 1356

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> 16S rDNA of Lactobacillus plantarum LC27

<400> 5

tttacatttg attgagtggc gaactgggtga gtaacacgtg ggaaacctgc ccagaagcgg 60
gggataaacac ctggaaacag atgctaatac cgcataacaa cttggaccgc atggccgag 120
tttgaaagat ggcttcggct atcacttttg gatgggtccc cgcgctatta gctagatgg 180
ggggtaacgg ctccatgg caatgatacg tagccgacct gagagggtaa tcggccacat 240
tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttccacaatg 300

gacgaaagtc tgatggagca acgcccgtg agtgaagaag ggtttcggct cgtaaaactc 360
tgtttgtaaa gaagaacata tctgagagta actgttcagg tattgacggt atttaaccag 420
aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtatac gtaggtggca agcgttgtcc 480
ggatttattg ggcgtaaagc gagcgcaggc ggttttttaa gtctgatgtg aaagccttcg 540
gtcaaccga agaagtgc atcgaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gacagtggaa 600
ctccatgtgt agcgggtgaaa tgcgtagata tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct 660
gtctggtctg taactgacgc tgaggctcga aagtatgggt agcaaacagg attagatacc 720

ctggtagtcc ataccgtaaa cgatgaatgc taagtgttg agggtttccg cccttcagtg 780
ctgcagctaa cgcattaagc attccgcctg gggagtacgg ccgcaaggct gaaactcaaa 840
ggaattgacg ggggcccgc caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gctacgcgaa 900
gaaccttacc aggtcttgac atactatgca aatctaagag attagacgtt cccttcgggg 960
acatggatgc aggttggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1020
cccgaacga gcgcaacct tattatcagt tgccagcatt aagttgggca ctctggtgag 1080
actgccgggtg acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga 1140

cctgggctac acacgtgcta caatggatgg tacaacgagt tgcgaactcg cgagagtaag 1200
ctaactctctt aaagccattc tcagttcgga ttgtaggctg caactcgctt acatgaagtc 1260

ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgc cgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaca 1320
cacgcccgt cacacatga gaggttgtaa caccca 1356
<210> 6
<211> 1325
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> 16S rDNA of Lactobacillus plantarum LC28
<400> 6
catcatgatt tacatttgag tgagtggcga actggtgagt aacacgtggg aaacctgccc 60

agaagcgggg gataaacctt ggaaacagat gctaataccg cataacaact tggaccgcat 120
ggtccgagtt tgaagatgg cttcggtat cacttttga tgggtccgcg gcgtattagc 180
tagatggtgg ggtaacggct caccatggca atgatacgt gccgacctga gagggtaatc 240
ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt agggaaatctt 300
ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggg tticggctcg 360
taaaactctg ttgttaaaga agaacatac tgagagtaac tgttcaggta ttgacggtat 420
ttaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag 480

cgttgtccgg atttattggg cgtaaagcga gcgcaggcgg tttttaagt ctgatgtgaa 540
agccttcggc tcaaccgaag aagtgcacgc gaaactggga aacttgatg cagaagagga 600
cagtggaaat ccatgtgtag cggtgaaatg cgtagatata tggagaaca ccagtggcga 660
aggcggctgt ctggtctgta actgacgctg aggcctgaaa gtatgggtag caaacaggat 720
tagataccct ggtagtccat accgtaaacg atgaatgcta agtgttgag ggtttccgcc 780
cttcagtgtc gcagctaacg cattaagcat tccgcctggg gactacggcc gcaaggctga 840
aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggttt aattcgaagc 900

tacgcgaaga accttaccag gtcttgacat actatgaaa tctaagagat tagacgttcc 960
cttcggggac atggatacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg 1020
ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta ttatcagttg ccagcattaa gttgggcact 1080
ctggtgagac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaa tcatcatgcc 1140
ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggatggt caacgagttg cgaactcgcg 1200
agagtaagct aatctcttaa agccattctc agttcggatt gtaggctgca actcgctac 1260
atgaagtcgg aatcgctagt aatcgcgat cagcattccg cggtaatac gttcccgggc 1320

cttgt 1325

<210> 7

<211> 1342

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> 16S rDNA of Bifidobacterium longum LC67

<400> 7

ggctttgctt ggigggtgaga gtggcgaacg ggtgagtaat gcgtgaccga cctgccccat	60
acaccggaat agctcctgga aacgggtggt aatgccgat gctccagtgt atcgcatggt	120
cttctgggaa agctttcgcg gtatgggatg gggtcgcgtc ctatcagctt gacggcgggg	180
taacggccca ccgtggcttc gacgggtagc cggcctgaga gggcgaccgg ccacattggg	240
actgagatac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgc acaatgggcg	300
caagcctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg atggaggcct tcgggttgta aacctctttt	360
atcggggagc aagcgagagt gaggttaccg gttgaataag caccggctaa ctacgtgcca	420
gcagccgagg taatacgtag ggtgcaagcg ttatcccgga attattgggc gtaaagggct	480
cgtaggcggg tcgtcgcgtc cgggtgtgaa gtccatcgct taacgggtgga tccgcgccgg	540
gtacgggcgg gcttgagtgc ggtaggggag actggaattc ccggtgtaac ggtggaatgt	600
gtagatatcg ggaagaacac caatggcgaa ggcagggtctc tgggccgtta ctgacgtga	660
ggagcgaaag cgtgggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacgg	720
tggatgctgg atgtggggcc cgttcacagg gttccgtgtc ggagctaacg cgttaagcat	780
cccgctggg ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag aaattgacgg gggcccgcac	840
aagcggcgga gcatgcgatg taattcgatg caacgcgaag aaccttacct gggcttgaca	900
tgttcccgac ggtcgtagag atacggcttc cttcggggc gggttcacag gtggtgcatg	960
gtcgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg	1020
ccccgtgttg ccagcggatt atgccgggaa ctacggggg accgccgggg ttaactcgga	1080
ggaaggtggg gatgacgtca gatcatcatg ccccttacgt ccagggttc acgcatgcta	1140
caatggccgg tacaacggga tgcgacgcgg cgacgcggag cggatccctg aaaaccggtc	1200
tcagttcgga tcgcagtctg caactcgact gcgtgaaggc ggagtgccta gtaatcgga	1260
atcagcaacg tcgcggtgaa tgcgttcccg ggccttgtag acaccgccg tcaagtcatg	1320
aaagtgggca gcacccgaag cg	1342

<210> 8

<211> 1343

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> 16S rDNA of Bifidobacterium longum LC68

<400> 8

cggcttcggg tgctgccac ttcatgact tgacggcggt tgtgtacaag gcccggaac	60
gcattcaccg cgacgttgct gattcgcat tactagcgac tccgccttca cgcagtcgag	120
ttgcagactg cgatccgaac tgagaccggt ttccaggat ccgctccggt tcgcccgtc	180
gcatcccggt gtaccggcca ttgtagcatg cgtgaagccc tggacgtaag gggcatgatg	240
atctgacgtc atccccacct tctccgagt taaccccggt ggtccccgt gagttcccg	300
cataatccgc tggcaacacg gggcgagggt tgcgtcgtt gcgggactta acccaacatc	360
tcacgacacg agctgacgac gaccatgcac cacctgtgaa cccgccccga agggaagccg	420
catctctacg accgtcgga acatgtcaag ccaggtgaa gttcttcggt ttgcatcga	480
ttaatccga tgctccggt cttgtcggt ccccgctca tttctttgag ttttagcctt	540
gcggccgtac tccccagggt ggatgcttaa cgcgttagct ccgacacgga acccgaggaa	600
cgggccccac atccagcatc caccgtttac gggtggact accagggtat ctaatcctgt	660
tcgtcccca cgctttcgt cctcagcgtc agtaacggcc cagagacgt ccttcgcat	720
tgggtgtctt cccgatatct acacattcca ccgttacacc gggaattcca gtctcccta	780
ccgactcaa gcccgccgt acccgccgt gatccaccgt taagcgatgg actttcacac	840
cggacgcgac gaaccgccta cgagccctt acgccaata attccgata acgcttgac	900
cctacgtatt acccggtgt ctggcacgta gttagccgt gcttattcaa cgggtaact	960
cactctcgt tgctccccga taaaagaggt ttacaaccg aaggcctcca tccctcacgc	1020
ggcgtcgtg catcaggctt gcgccattg tgcaatatt cccactgtg cctccgtag	1080
gagtcgggc cgtatctcag tccaatgtg gccggtcgcc ctctcaggcc ggctaccgt	1140
cgaagccacg gtgggccgtt acccgccgt caagtgata ggacgcgacc ccatccata	1200
ccgcgaaagc tttccagaa gaccatgca tcaactggag catccgcat taccaccgt	1260
ttccaggagc tattccggtg tatggggcag gtcggtcacg cattactcac ccgttcgcca	1320
ctctcaccac caagcaaagt ctc	1343