



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0089324
(43) 공개일자 2018년08월08일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>A61K 31/722</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/732</i> (2006.01) <i>A61K 31/733</i> (2006.01)
 <i>A61K 35/745</i> (2014.01) <i>A61K 35/747</i> (2014.01)
 <i>C12R 1/01</i> (2006.01) <i>C12R 1/225</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 1/20</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/722</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0012186
 (22) 출원일자 2018년01월31일
 심사청구일자 2018년01월31일
 (30) 우선권주장 1020170013632 2017년01월31일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
 주식회사 네비팜
 경기도 수원시 장안구 장안로448번길 5 (이목동)</p> <p>(72) 발명자
 김동현
 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
 한명주
 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)</p> <p>(74) 대리인
 안소영</p> |
|--|---|

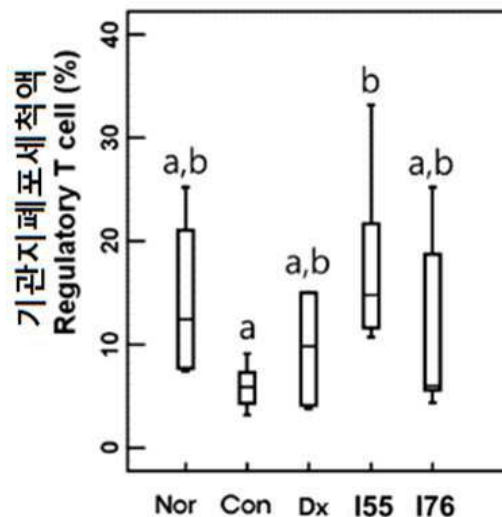
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 신규 유산균 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명에 따른 특정 비피도박테리움속 균주 또는 특정 락토바실러스속 균주는 사람의 분변 또는 배추 김치에서 분리되어 안전성이 높고 면역조절 효능, 염증반응 억제 효능과 같은 생리활성을 가진다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 비피도박테리움속 균주 또는 특정 락토바실러스속 균주는 면역조절, 염증반응 억제를 위한 소재로 사용될 수 있고, 알레르기 질환인 비염, 아토피, 천식 등을 예방, 개선 또는 치료하는데에 유용한 기능성 식의약 소재로도 사용될 수 있다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

A61K 31/732 (2013.01)

A61K 31/733 (2013.01)

A61K 35/745 (2013.01)

A61K 35/747 (2013.01)

C12R 1/01 (2013.01)

C12R 1/225 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 COMPA 2016K000104

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 경희대학교 산학협력단

연구사업명 연구성과사업화지원사업

연구과제명 면역조절 synbiotic의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국연구재단

연구기간 2016.05.04 ~ 2017.05.03

명세서

청구범위

청구항 1

비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P.

청구항 2

락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P는 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P는 탄소원으로 D-글루코스, D-만니톨, D-락토스, D-수크로스, D-말토스, 살리신, D-자일로스, L-아라비노스, 에스쿨린 페릭 사이트레이트(esculin ferric citrate), D-래피노스 및 D-솔비톨을 이용하는 것을 특징으로 하는, 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P는 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P는 탄소원으로 L-아라비노스, D-리보스, D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, 만니톨, 솔비톨, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린(esculin), 살리신, 셀로바이오스, 말토스, 락토스, 멜리바이오스, 수크로스, 트레할로스, 래피노스, 젠티오바이오스, D-투라노스 및 글루코네이트를 이용하는 것을 특징으로 하는, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P.

청구항 7

비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 약학 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 약학 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 알레르기 질환은 비염, 아토피, 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 중이염, 두드러기 및 아나필락시 쇼크를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 약학 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 약학 조성물은 키토산(chitosan), 이눌린(inulin) 및 감귤류 펙틴(citrus pectin)을 포함하는 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 12

비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 식품 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 식품 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 알레르기 질환은 비염, 아토피, 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 중이염, 두드러기 및 아나필락시 쇼크를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 식품 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 약학 조성물은 키토산(chitosan), 이눌린(inulin) 및 감귤류 펙틴(citrus pectin)을 포함하는 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것인, 식품 조성물.

청구항 17

비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 염증질환은 대장염인, 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 유산균에 관한 것으로서, 더 상세하게는 면역조절 효능, 염증반응 억제 효능 등과 같은 다양한 생리활성에 의해 알레르기 반응을 억제할 수 있는 신규 유산균 및 신규 유산균의 다양한 식의약적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 과민반응이란 인간의 생체에서 비병원체에 대해 면역관용이 아닌 과도한 면역반응을 일으켜 인체에 해를 주는 반응을 말한다. 과민반응은 효과 기전에 따라 크게 4가지의 유형으로 분류된다. 제1형 과민반응(Type 1 hypersensitivity reaction)은 주로 비만세포(master cell)의 Fc 수용체에 결합된 Ig에 특이적인 항원이 결합하여 발생하게 되며, 항원에 노출된 후 즉시 반응이 일어나기 때문에 즉시형 과민반응이라고도 한다. 제1형 과민반응(Type 1 hypersensitivity reaction)은 일반적으로 호흡을 통해 흡입된 미립자 항원에 의해 유발되며, 상기 미립자 항원으로는 식물 꽃가루 등이 있다. 제1형 과민반응(Type 1 hypersensitivity reaction)에 의해 나타나는 질환 또는 증상으로는 급성 두드러기, 아토피 피부염, 알레르기성 비염, 기관지 천식 등이 있다. 제2형 과민반응(Type 2 hypersensitivity reaction)은 인간 세포의 표면성분에 공유결합하여 면역계가 이종물질로 인지하

는 변형된 구조를 만드는 작은 분자에 의해 일어난다. 제2형 과민반응(Type 2 hypersensitivity reaction)에서 B세포는 새로운 Epitope에 대하여 IgG를 생성하고 IgG는 변형된 세포에 결합하여 보체 활성화와 포식 작용을 통해 세포의 파괴를 초래한다. 제3형 과민반응(Type 3 hypersensitivity reaction)은 수용성 단백질 항원과 이에 대해 만들어진 IgG와의 결합으로 형성된 수용성 면역복합체에 의해 일어난다. 제3형 과민반응(Type 3 hypersensitivity reaction)에서 면역복합체의 일부는 작은 혈관벽 또는 폐의 폐포에 부착해 보체를 활성화시키고 조직을 손상시키는 염증반응을 일으켜 조직의 생리학적 기능을 저하시킨다. 제4형 과민반응(Type 4 hypersensitivity reaction)은 항원 특이적인 효과 T세포의 산물에 의해 일어나며, 항원에 노출된 후 1~3일 만에 나타나기 때문에 지연성 과민반응이라고도 한다.

[0003] 제1형 과민반응(Type 1 hypersensitivity reaction)은 IgE에 의해서 매개되는 즉시형 반응이다. IgE 항체는 주로 호흡기와 소화기 점막에 존재하는 형질세포에 의해 생성되며, 이렇게 생성된 IgE 항체는 비만세포(master cell)와 호염구의 표면수용체에 대한 친화력이 매우 높아 대부분 이들 세포와 결합하게 된다. 비만세포(master cell)와 호염구의 표면수용체 대부분이 IgE 항체와 결합된 상태를 감작 상태라고 하며, 감작 상태에서 알레르겐에 노출되면 알레르겐이 IgE 항체와 결합하여 수용체 간에 반응이 일어나고 비만세포(master cell) 내의 과립이 세포막과 융합하여 히스타민, 시스테닐 류코트리엔, 프로스타글라딘 및 트롬복산과 같은 화학매체를 분비하게 된다. 이들 화학매체들은 혈관 투과성을 증가시키고 혈관을 확장시키고 평활근을 수축시키고 분비선 기능을 향진시켜 알레르기 조기반응을 일으킨다.

[0004] 상기 제1형 과민반응(Type 1 hypersensitivity reaction)에 의해 발생하는 질환 중 하나인 알레르기성 비염은 알레르기 유발 물질 노출(allergen exposure) 후에 IgE에 의한 중재로 염증(IgE-mediated inflammation)을 유도하여 코, 눈, 귀 그리고 인후 등에 증세를 야기시키는 증세성 질환(symptomatic disorder)이다. 이러한 알레르기성 비염은 Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma Working Group에 의해 증세 지속기간에 기반하여 간헐적(intermittent AR) 혹은 지속적 (persistent AR)으로 나누며, 이는 다시 경한(mild), 중등증(moderate), 중증(severe)으로 세분화(subdivision)된다. 유병율은 대개 성인에서 10-30 %, 소아에서 40 % 정도로 각 나라마다 보고자에 따라 약간의 차이는 있다. 알레르기성 비염에 대한 위험인자는 실내와 실외의 유발물질(indoor and outdoor allergens)과 6세 전에 혈청IgE가 100 IU/ml 이상인 경우이다. 알레르기성 비염은 합병증으로 부비동염(sinusitis), 중이염(otitis media), 결막염(conjunctivitis)을 야기할 수 있고 만성으로 진행되면 천식과 부비동염을 악화시켜 수면장애, 집중력 장애, 사회생활 부적응을 야기할 수 있다. 상기 제1형 과민반응(Type 1 hypersensitivity reaction)에 의해 발생하는 질환 중 하나인 천식은 호흡곤란, 기침, 거친 숨소리 등의 증상이 반복적, 발작적으로 나타나는 질환으로서, 유전적 요인과 환경적 요인이 합쳐져서 생기는 대표적인 알레르기 질환이다. 즉, 부모로부터 물려받은 알레르기 체질과 주위의 천식유발 인자들이 상호작용을 일으켜 면역체계에 혼란이 생기면서 천식이 발생하게 되며, 대부분 만성적이고 재발성이다.

[0005] 제1형 과민반응(Type 1 hypersensitivity reaction)에 의해 발생하는 알레르기 질환을 치료하기 위해서 다양한 치료법들이 연구되고 있다. 예를 들어, 항알레르기제, 히스타민 수용체 길항제(항히스타민제), 스테로이드제 등이 치료를 위해 사용되고 있다. 그러나 히스타민 수용체에 히스타민과 길항적으로 결합함으로써 말초 신경으로부터의 신호 전달을 저해하는 항히스타민제, 화학적 매개자 생산 세포의 활성을 약화시켜서 증상의 경감을 시도하는 항알레르기제, 면역 응답성을 약화시켜서 염증을 경감시키는 스테로이드제는 모두 상당한 부작용을 가지고 있음이 알려져 있을 뿐만 아니라 대부분 확실한 치료 효과를 보이지 않는다.

[0006] 한편, 유산균은 Metchnikoff에 의해 최초로 부패 균(putrefactive organisms)의 성장을 막기 위해 장 내용물을 산성화시킴으로써 치료 효과를 얻고자 시도되어 얻어진 산물이며, 대표적인 유산균으로 여겨지는 락토바실러스속(genus)은 지금까지 165종(species)이 넘게 발견되었다. 알레르기성 질환의 치료에 사용된 적이 있는 생균 형태의 프로바이오틱 유산균으로는, 예를 들어 일본에서 히말라야 삼목화분(cedar pollen)으로 인한 알레르기성 증상에 대한 락토바실러스 애시도필러스 L-92 균주(*Lactobacillus acidophilus* L-92)가 보고된 적이 있다.

[0007] 사람의 소화관에서 인체에 유익한 무수한 유산균이 서식하고 있으며, 사람의 소화관에서 분리된 유산균을 의약품 또는 기능성 식품으로 적용하려는 연구가 진행되고 있다. 특히, 알레르기 질환 치료제는 장기간 복용할 필요가 발생하므로 용이하게 섭취할 수 있고, 또한 안전성이 높은 특성이 요구되며, 유산균은 위와 같은 질환의 치료와 더불어 위 치료를 위한 요구조건에 매우 적합한 후보균이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 종래의 기술적 배경 하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 면역조절 효능, 염증반응 억제 효능을 갖는 신규 유산균을 제공하는 것에 있다.
- [0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 신규 유산균의 다양한 식의약적 용도를 제공하는 것에 있다.
- [0010] 구체적으로, 본 발명의 목적은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76)의 신규 유산균을 제공하는 것에 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55), 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55), 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [0013] 본 발명의 여전히 다른 목적은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55), 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [0014] 본 발명의 여전히 다른 목적은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55), 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) 또는 이들의 혼합물을 개체에 투여하는 것을 포함하는 알레르기 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것에 있다.
- [0015] 본 발명의 여전히 다른 목적은 알레르기 질환의 예방 또는 치료를 위한 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55), 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공하는 것에 있다.
- [0016] 본 발명의 여전히 다른 목적은 알레르기 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제를 생산하기 위한 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55), 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공하는 것에 있다.
- [0017] 본 발명의 여전히 다른 목적은 알레르기 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55)(기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2017.01.20, 수탁번호: KCCM11961P)을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 IM55는 인간의 분변으로부터 분리 및 동정된 비피도박테리움 롱검의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 IM55의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 1과 같다. 따라서, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P는 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 비피도박테리움 롱검 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 비피도박테리움 롱검과 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*)으로 동정하고, 비피도박테리움 롱검 IM55로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2017년 1월 20일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCCM11961P).
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 IM55는 탄소원으로 D-글루코스, D-만니톨, D-락토스, D-수크로스, D-말토스, 살리신(salicin), D-자일로스, L-아라비노스, 에스쿨린 페릭 사이트레이트(Esculin ferric citrate), D-래피노스 및 D-솔비톨을 이용할 수 있다.
- [0023] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76)(기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2017.01.20, 수탁번호: KCCM11962P)을 제공한다.

- [0024] 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 IM76은 전통 발효식품인 김치로부터 분리 및 동정된 락토바실러스 플란타럼의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 IM76의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 2와 같다. 따라서, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P는 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0026] 상기 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 락토바실러스 플란타럼 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 락토바실러스 플란타럼과 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 락토바실러스 플란타럼 (*Lactobacillus plantarum*)으로 동정하고, 락토바실러스 플란타럼 IM76으로 명명하였으며, 한국 미생물보존센터에 2017년 1월 20일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCCM11962P).
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 IM76은 탄소원으로 L-아라비노스, D-리보스, D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, 만니톨, 솔비톨, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린 (esculin), 살리신(salicin), 셀로바이오스, 말토스, 락토스, 멜리바이오스(melibiose), 수크로스, 트레할로스, 래피노스(raffinose), 젠티오바이오스, D-투라노스 및 글루코네이트(gluconate)를 이용할 수 있다.
- [0028] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명에서 용어, "알레르기 질환"은 인체의 특정 물질에 대한 과민증, 즉 외부로부터 유입된 물질에 대한 면역계의 과도한 반응을 일으켜서 유발되는 질환, 질병 또는 이상 상태를 의미한다. 상기 외부로부터 유입된 물질은 알레르기 질환의 원인이 되는 항원인 알레르겐일 수 있다. 상기 알레르기는 외부로부터 유입된 물질에 의해 히스타민과 같은 염증 매개물질이 유리되어 질병이 유발되는 과민반응을 의미할 수 있으며, 상기 과민반응은 제1형 과민반응, 제2형 과민반응, 제3형 과민반응 또는 제4형 과민반응일 수 있다. 본 발명에서 상기 알레르기 질환은 IgE에 의해 매개되는 제1형 과민반응에 의해 발생하는 질환일 수 있으며, 구체적으로 비염, 아토피, 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 중이염, 두드러기 및 아나필락시 쇼크로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에서 상기 알레르기 질환은 비염, 아토피 또는 천식일 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 조성물은 위와 같은 알레르기 질환에 대한 조절, 예방, 개선 및 치료 효과에 더하여 알레르기 질환으로 인하여 변화된 장내 미생물을 정상화시킴으로써 알레르기 질환 및 이로 인한 합병증의 조절, 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과를 나타낸다.
- [0031] 본 발명의 "비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55)"는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0032] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 비피도박테리움 롱검 IM55는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물일 수 있으나, 알레르기 질환의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 비피도박테리움 롱검 IM55의 형태라면 제한없이 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 "락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76)"은 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0034] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 락토바실러스 플란타럼 IM76은 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물일 수 있으나, 알레르기 질환의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 형태라면 제한없이 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 비피도박테리움 롱검 IM55 및 락토바실러스 플란타럼 IM76의 혼합물은 알레르기 질환의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 범위로 혼합될 수 있고, 상기 혼합비는 10:1 내지 1:10일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로 비피도박테리움 롱검 IM55 : 락토바실러스 플란타럼 IM76이 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10일 수 있다. 이들의 혼합물은 이들 유산균 간의 혼합에 따른 시너지 효과를 통해 알레르기 질환에 현저한 예방 또는 치료 효과를 나타낸다.
- [0036] 본 발명에서 용어, "생균체"는 본 발명의 신규한 유산균 그 자체를 의미하고, "사균체"는 가열, 가압 또는 약물 처리 등으로 살균 처리된 유산균을 의미하며, "파쇄물"은 유산균을 효소 처리, 균질화 또는 초음파 처리 등으로 파괴된 유산균을 의미한다. 또한, 본 발명에서 용어, "추출물"은 유산균을 공지의 추출용매로 추출하여 수득한 산물을 의미한다.

- [0037] 본 발명에서 용어, "배양물"은 유산균을 공지의 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하여, 상기 산물은 신규한 유산균을 포함할 수 있다. 상기 배지는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 MRS 액체 배지, GAM 액체 배지, MRS 한천 배지, GAM 한천 배지, BL 한천 배지일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명에서 용어 "예방"은 본 발명의 약학 조성물의 투여로 알레르기 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0039] 본 발명에서 용어 "치료"는 본 발명의 약학 조성물의 투여로 알레르기 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0040] 본 발명의 약학 조성물의 유효성분인 신규한 유산균 등의 함량은 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.01 내지 99 중량%, 구체적으로 0.1 내지 75 중량%, 보다 구체적으로 0.5 내지 50 중량%일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 약학 조성물은 면역조절 효과, 염증반응 억제 효과, 알레르기 질환(예를 들어, 천식, 비염, 아토피성 피부염 등)의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0042] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 키토산(chitosan), 이눌린(inulin) 및 감귤류 펙틴(citrus pectin)을 포함하는 군에서 선택되는 1종 이상을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 키토산, 이눌린, 감귤류 펙틴 또는 이들의 2 이상의 혼합물은 본 발명의 약학 조성물에 포함되어 신규 유산균이 알레르기 질환의 예방 및 치료 효과를 달성하는데 프리바이오틱스(prebiotics)로 작용할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분인 신규한 유산균 이외에 약학적으로 허용가능한 담체와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0045] 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 약학 조성물이 경구 투여를 위한 고형 제제로 제제화된 경우 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 포함할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함할 수 있으나 이에 국한되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 약학 조성물이 경구 투여를 위한 액상 제제로 제제화된 경우 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등을 포함하며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있으나 이에 국한되지 않는다.
- [0048] 본 발명의 약학 조성물이 비경구 투여를 위한 제제로 제제화된 경우 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제를 포함할 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 포함할 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로폴, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강 내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이라면 크게 제한되지 않으며, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으나, 구체적으로 유효성분을 기준으로 할 때 0.1 내지 3000 mg/kg이고, 보다 구체적으로 0.5 내지 2000 mg/kg이며, 하루 1회 또는 수회로

나누어 투여될 수 있다.

- [0050] 상기 "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.
- [0051] 상기 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 약학 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 신규한 유산균을 이용한 치료로 유의한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 개체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 개체들에는 알레르기 질환의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 개체들이 모두 포함될 수 있다.
- [0052] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0053] 본 발명에서 용어 "비피도박테리움 롱검 IM55", "락토바실러스 플란타럼 IM76" 및 "알레르기 질환"등은 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0054] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0055] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0056] 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0057] 본 발명의 식품 조성물은 조성물의 총 중량에 대하여 비피도박테리움 롱검 IM55, 락토바실러스 플란타럼 IM76 또는 이들의 혼합물을 0.01 내지 99 중량%, 구체적으로 0.1 내지 75 중량%, 보다 구체적으로 0.5 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 알레르기 질환의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0059] 예를 들어, 상기 정제 형태의 식품 조성물은 비피도박테리움 롱검 IM55, 락토바실러스 플란타럼 IM76 또는 이들의 혼합물과 부형제, 결합제, 봉해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0060] 캡슐 형태의 식품 조성물 중 경질캡슐제는 통상의 경질캡슐에 비피도박테리움 롱검 IM55, 락토바실러스 플란타럼 IM76 또는 이들의 혼합물, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡슐제는 비피도박테리움 롱검 IM55, 락토바실러스 플란타럼 IM76 또는 이들의 혼합물, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등과 함께 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0061] 환 형태의 식품 조성물은 비피도박테리움 롱검 IM55, 락토바실러스 플란타럼 IM76 또는 이들의 혼합물과 부형제, 결합제, 봉해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 진분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [0062] 과립 형태의 식품 조성물은 비피도박테리움 롱검 IM55, 락토바실러스 플란타럼 IM76 또는 이들의 혼합물과 부형제, 결합제, 봉해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μ m), 14호 (1410 μ m) 및 45호 (350 μ m) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것이 전체량의 5.0 %이하이고 또 45호체를

통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하일 수 있다.

- [0063] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- [0064] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 음료, 껌, 비타민 복합제, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품 조성물, 특히 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0065] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0066] 본 발명에서 "비피도박테리움 롱검 IM55", "락토바실러스 플란타럼 IM76"을 비롯하여 약학 조성물과 관련된 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0067] 본 발명에서 용어 "면역질환"은 특정 면역 반응이 일어날 경우 문제가 되는 질환을 의미하는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 자가면역질환, 이식 거부, 이식편대숙주병일 수 있으며, 자가면역질환은 크론씨병, 홍반병, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 또는 궤양성 대장염 등일 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 용어 "염증질환"은 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미이다. 발명의 염증질환은 관절염, 통풍, 간염, 비만, 각막염, 위염, 장염, 신장염, 대장염, 당뇨병, 결핵, 기관지염, 홍맥염, 복막염, 척추염, 체장염, 염증 통증, 요도염, 방광염, 질염, 동맥경화증, 폐혈증, 화상, 피부염, 치주염 및 치은염을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 구체적으로, 상기 염증질환은 대장염일 수 있다.
- [0069] 본 발명에 따른 조성물은 위와 같은 염증질환에 대한 조절, 예방, 개선 및 치료 효과에 더하여 염증질환으로 인하여 변화된 장내 미생물을 정상화시킴으로써 염증질환 및 이로 인한 합병증의 조절, 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과를 나타낸다.
- [0070] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0071] 본 발명에서 "비피도박테리움 롱검 IM55", "락토바실러스 플란타럼 IM76"을 비롯하여 식품 조성물과 관련된 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0072] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 개체에 투여하는 것을 포함하는 알레르기 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0073] 본 발명에 "비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55)", "락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76)", "투여", "개체" 및 "알레르기 질환" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0074] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 알레르기 질환의 예방 또는 치료를 위한 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- [0075] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 알레르기 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제를 생산하기 위한 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- [0076] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 알레르기 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

- [0077] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 개체에 투여하는 것을 포함하는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0078] 본 발명에 "비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55)", "락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76)", "투여", "개체", "면역질환" 및 "염증질환" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0079] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료를 위한 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- [0080] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료를 위한 약제를 생산하기 위한 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- [0081] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) KCCM11961P, 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) KCCM11962P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0082] 본 발명에 따른 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55) 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76)은 인체에서 독성이 없이 안전하고, 면역조절 효능, 염증반응 억제 효능과 같은 우수한 생리활성을 가지며, 장내 미생물의 정상화 효과를 가진다. 따라서, 비피도박테리움 롱검 IM55 (*Bifidobacterium longum* IM55), 락토바실러스 플란타럼 IM76 (*Lactobacillus plantarum* IM76) 또는 이들의 혼합물은 알레르기 질환 뿐만 아니라, 면역질환 및 염증질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0083] 도 1은 대식세포에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 처리시 IL-10 농도가 증가함을 확인한 그래프이다 (NOR, 정상대조군; LPS, 염증반응 유도군; I55, 염증반응 유도 + 비피도박테리움 롱검 IM55 1×10^5 CFU/ml투여군; 및 I76, 염증반응 유도 + 락토바실러스 플란타럼 IM76 1×10^5 CFU/ml투여군, 이하 도 2 내지 4 동일).
- 도 2는 대식세포에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 처리시 IL-12 농도가 감소함을 확인한 그래프이다.
- 도 3은 수지상세포에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 처리시 IL-10 농도가 증가함을 확인한 그래프이다.
- 도 4는 수지상세포에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 처리시 TNF- α 농도가 감소함을 확인한 그래프이다.
- 도 5는 T세포의 Th2 세포로의 분화 유도시 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76을 처리한 결과 GATA3의 발현 수준이 억제됨을 확인한 그래프이다 (NOR, 정상대조군; ThI, Th2 세포 분화 유도물질 투여군; I55, Th2 세포 분화 유도 + 비피도박테리움 롱검 IM55 1×10^5 CFU/ml투여군; 및 I76, Th2 세포 분화 유도 + 락토바실러스 플란타럼 IM76 1×10^5 CFU/ml투여군, 이하 도 6 동일).
- 도 6은 T세포의 Th2 세포로의 분화 유도시 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76을 처리한 결과 IL-5의 발현 수준이 억제됨을 확인한 그래프이다.
- 도 7은 T세포의 Treg 세포로의 분화 유도시 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76을 처리한 결과 FOXP3의 발현 수준이 증가함을 확인한 그래프이다 (NOR, 정상대조군; TrI, Treg 세포 분화 유도물질 투여군; I55, Treg 세포 분화 유도 + 비피도박테리움 롱검 IM55 1×10^5 CFU/ml투여군; 및 I76, Treg 세포 분화 유

도 + 락토바실러스 플란타럼 IM76 1×10^5 CFU/ml 투여군, 이하 도 8 동일).

도 8은 T세포의 Treg 세포로의 분화 유도시 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76을 처리한 결과 IL-10 발현 수준이 증가함을 확인한 그래프이다.

도 9는 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 모델동물에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 혈청의 IL-5 농도가 감소함을 확인한 그래프이다 (Nor, 정상대조군(PBS만 경구투여); Con 또는 AR, 질환 유발군; Dx, 질환 유발 + 텍사메타손(dexamethasone) 1mg/kg b.w. 복강 투여군; I55, 질환 유발 + 비피도박테리움 롱검 IM55 1×10^9 CFU/마우스 경구 투여군; 및 I76, 질환 유발 + 락토바실러스 플란타럼 IM76 1×10^9 CFU/마우스 경구 투여군, 이하 도 10 내지 도 17 동일).

도 10은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 모델동물에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 혈청의 IgE 농도가 감소함을 확인한 그래프이다.

도 11은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 모델동물에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 혈청의 IL-4 농도가 감소함을 확인한 그래프이다.

도 12는 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 모델동물에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)의 IL-5 농도가 감소함을 확인한 그래프이다.

도 13은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 모델동물에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)의 IL-4 농도가 감소함을 확인한 그래프이다.

도 14는 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 모델동물에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서 Th2 세포 분포율이 감소함을 확인한 그래프이다.

도 15는 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 모델동물에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서 호산구 세포 분포율이 감소함을 확인한 그래프이다.

도 16은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 모델동물에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)의 IL-10 농도가 증가함을 확인한 그래프이다.

도 17은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 모델동물에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서 Treg 세포 분포율이 증가함을 확인한 그래프이다.

도 18은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 비염 증상 점수(재채기 및 비강 문지름)가 감소함을 확인한 그래프이다.

(NOR, 정상대조군(PBS만 경구투여); AR, 질환 유발군; DX, 질환 유발 + 텍사메타손(dexamethasone) 1mg/kg b.w. 복강 투여군; I55, 질환 유발 + 비피도박테리움 롱검 IM55 1×10^9 CFU/마우스 경구 투여군; 및 I76, 질환 유발 + 락토바실러스 플란타럼 IM76 1×10^9 CFU/마우스 경구 투여군, 이하 도 19 내지 도 26 동일).

도 19는 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 비강의 IL-4 농도가 감소함을 확인한 그래프이다.

도 20은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 비강의 IL-5 농도가 감소함을 확인한 그래프이다.

도 21은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 비강의 파괴 및 비강 상피 세포의 팽창이 감소함을 확인한 도이다.

도 22는 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼

IM76의 투여시 폐 조직의 GATA3 발현 수준이 감소함을 확인한 그래프이다.

도 23은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 폐 조직의 IL-10 발현 수준이 증가함을 확인한 그래프이다.

도 24는 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 폐 조직의 FOXP3 발현 수준이 증가함을 확인한 그래프이다.

도 25는 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 폐 조직의 IL-5 발현 수준이 감소함을 확인한 그래프이다.

도 26은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 또는 락토바실러스 플란타럼 IM76의 투여시 폐 조직의 염증 및 부종 유발 정도가 감소함을 확인한 도이다.

도 27은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 및 락토바실러스 플란타럼 IM76의 혼합물(1:1, 1:3, 1:9)의 투여시 비염 증상 점수(재채기 및 비강 문지름) 및 비강의 IL-5 농도가 감소함을 확인한 그래프이다 (Nor, 정상대조군(PBS만 경구투여); AR, 질환 유발군; DX, 질환 유발 + 덱사메타손(dexamethasone) 1mg/kg b.w. 복강 투여군; 1:1, 비피도박테리움 롱검 IM55 : 락토바실러스 플란타럼 IM76 = 1:1 혼합비 (총 1×10^9 CFU/마우스) 경구 투여군; 1:3, 비피도박테리움 롱검 IM55 : 락토바실러스 플란타럼 IM76 = 1:3 혼합비 (총 1×10^9 CFU/마우스) 경구 투여군; 및 1:9, 비피도박테리움 롱검 IM55 : 락토바실러스 플란타럼 IM76 = 1:9 혼합비 (총 1×10^9 CFU/마우스) 경구 투여군, 이하 도 28 동일).

도 28은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55 및 락토바실러스 플란타럼 IM76의 혼합물(1:1, 1:3, 1:9)의 투여시 혈청의 IL-5의 발현 수준이 감소함을 확인한 그래프이다.

도 29는 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55, 락토바실러스 플란타럼 IM76 또는 이들의 혼합물의 투여시 대장의 IL-4 및 IL-5 농도가 감소하고, IL-10의 농도가 증가함을 확인한 그래프이다 (Nor, 정상대조군(PBS만 경구투여); AR, 질환 유발군; DX, 질환 유발 + 덱사메타손(dexamethasone) 1mg/kg b.w. 복강 투여군; I55, 질환 유발 + 비피도박테리움 롱검 IM55 1×10^9 CFU/마우스 경구 투여군; I76, 질환 유발 + 락토바실러스 플란타럼 IM76 1×10^9 CFU/마우스 경구 투여군; 및 PM, 질환 유발 + 비피도박테리움 롱검 IM55 및 락토바실러스 플란타럼 IM76을 각각 5×10^8 CFU/마우스 경구 투여군, 이하 도 30 동일).

도 30은 알레르기성 비염 및 천식이 유발된 동물모델에 비피도박테리움 롱검 IM55, 락토바실러스 플란타럼 IM76 또는 이들의 혼합물의 투여시 장내 미생물의 구성이 변화함을 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0084] 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.

[0085] 실시예 1. 유산균의 분리 및 동정

[0086] (1) 유산균의 분리

[0087] 서울에 거주하는 20대의 건강한 사람 또는 전라남도 구례에 거주하는 60대의 건강한 사람의 분변 또는 가정집에서 담근 배추 김치를 GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 MRS 한천 배지(MRS agar medium; Difco, USA) 또는 GAM 한천 배지(GAM agar medium; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 이식하였다. 37℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 락토바실러스속 균주(*Lactobacillus* sp.), 비피도박테리움속(*Bifidobacterium* sp.) 균주들을 분리하였다.

[0088] (2) 분리된 유산균의 동정

[0089] 사람 분변 또는 배추 김치로부터 분리한 균주들의 그람 염색, 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열 등을 통해 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다. 하기 표 1 및 표 2에 분리한 유산균의 관리번호 및 균주명을 나타내었다. 사람 분변으로부터 분리한 유산균은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 15종(표 1의 관리번호 51 내지 65), 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) 10종(표 1의 관리번호 66 내지 75) 및 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) 10종(표 2의 관리번호 90 내지 99) 이었고, 배추

김치로부터 분리한 유산균은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 14종 (표 2의 관리번호 76 내지 89) 이었다.

[표 1]

관리 번호	균주명	관리 번호	균주명
51	<i>Bifidobacterium longum</i> IM51	64	<i>Bifidobacterium longum</i> IM64
52	<i>Bifidobacterium longum</i> IM52	65	<i>Bifidobacterium longum</i> IM65
53	<i>Bifidobacterium longum</i> IM53	66	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM66
54	<i>Bifidobacterium longum</i> IM54	67	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM67
55	<i>Bifidobacterium longum</i> IM55	68	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM68
56	<i>Bifidobacterium longum</i> IM56	69	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM69
57	<i>Bifidobacterium longum</i> IM57	70	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM70
58	<i>Bifidobacterium longum</i> IM58	71	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM71
59	<i>Bifidobacterium longum</i> IM59	72	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM72
60	<i>Bifidobacterium longum</i> IM60	73	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM73
61	<i>Bifidobacterium longum</i> IM61	74	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM74
62	<i>Bifidobacterium longum</i> IM62	75	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM75
63	<i>Bifidobacterium longum</i> IM63		

[표 2]

관리 번호	균주명	관리 번호	균주명
76	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM76	88	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM88
77	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM77	89	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM89
78	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM78	90	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM90
79	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM79	91	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM91
80	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM80	92	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM92
81	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM81	93	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM93
82	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM82	94	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM94
83	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM83	95	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM95
84	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM84	96	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM96
85	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM85	97	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM97
86	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM86	98	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM98
87	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM87	99	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM99

상기 표 1에 기재된 균주들 중 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55는 그람양성 간균으로서, 카탈라제(catalase) 활성은 보이지 않았고 포자(spore)를 가지지 않는 것으로 확인되었다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55의 16S rDNA는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55의 16S rDNA 염기서열을 BLAST 검색으로 비교한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주는 검색되지 않았고, 공지된 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API Kit(모델명 : API 20 strep; 제조사 : BioMerieux's, USA)에 의한 당 발효 시험으로 분석하였고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다. 하기 표 3에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타낸다.

[표 3]

탄소원	균주명 <i>Bifidobacterium longum</i> IM55	탄소원	균주명 <i>Bifidobacterium longum</i> IM55
L-tryptophane	-	gelatin	-
urea	-	esculin ferric citrate	+
D-glucose	+	glycerol	-
D-mannitol	+	D-cellobiose	-
D-lactose	+	D-mannose	-
D-sucrose	+	D-melezitose	-
D-maltose	+	D-raffinose	+
salicin	+	D-sorbitol	+
D-xylose	+	D-rhamnose	-
L-arabinose	+	D-trehalose	-

상기 표 2에 기재된 균주들 중 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM76은 그람양성 간균인 것으로 확인되었다. 또한, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM76의 16S rDNA는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM76의 16S rDNA 염기서열을

BLAST 검색으로 비교한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주는 검색되지 않았고, 공지된 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다. 또한, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM76의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API Kit(모델명 : API 50 CHL; 제조사 : BioMerieux's, USA)에 의한 당 발효 시험으로 분석하였고 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다. 하기 표 4에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타낸다.

[표 4]

탄소원	균주명 <i>Lactobacillus plantarum</i> IM76	탄소원	균주명 <i>Lactobacillus plantarum</i> IM76
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	+		

실시예 2. 유산균의 염증반응 억제 효능 시험

(1) 유산균의 대식세포 염증반응 억제 효능 시험

6주령 C57BL/6J 수컷 생쥐(20-23g)를 라운바이오(㉸)로부터 구입하였다. 생쥐의 복강에 멸균된 4% thioglycolate 2 ml를 투여하고, 96시간이 지난 뒤에 생쥐를 마취시켰다. 생쥐 복강에 RPMI 1640 배지 8 ml를 투여하고, 5~10분이 지난 뒤에 복강 내의 RPMI 배지(대식세포를 포함)를 다시 뽑아낸 뒤, 1000 rpm의 조건에서 10분간 원심분리한 다음, RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 24-웰 플레이트에 대식세포를 각 웰당 0.5×10^6 개로 깔고, 24시간 동안 배양한 후 플레이트에 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 대식세포 배양액에 시험 물질인 유산균과 염증 반응 유도 물질인 LPS(lipopolysaccharide)를 90분 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 이때, 유산균 처리 농도는 1×10^4 CFU/ml 이었다. 또한, 유산균의 효능을 비교하기 위해 시험 물질로 다양한 프리바이오틱스를 사용하였다.

상기 수득한 상등액으로부터 TNF-α의 발현량을 ELISA kit로 측정하였다. 또한, 상기 수득한 세포로부터 p65(NF-κB), p-p65(phosphor-NF-κB) 및 β-actin의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. 구체적으로 상등액 50μg을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀로로시지에 100V, 400mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀로로시지를 5% skim milk로 30분간 blocking 한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율로 추가하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율로 추가하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하고, 발색밴드의 강도(Intensity)를 측정하였다. 유산균의 대식세포 염증반응 억제 효능 시험 결과를 하기 표 5 내지 표 7에 나타내었다.

[0104] [표 5]

대식세포 처리 시험 물질	NF-κB 활성화 억제율(p-p65/p65)	TNF-α 발현 억제율
무처리	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM51	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM52	++	++
<i>Bifidobacterium longum</i> IM53	++	++
<i>Bifidobacterium longum</i> IM54	++	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM55	+++	+++
<i>Bifidobacterium longum</i> IM56	++	++
<i>Bifidobacterium longum</i> IM57	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM58	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM59	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM60	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM61	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM62	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM53	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM64	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM65	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM66	+++	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM67	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM68	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM69	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM70	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM71	+	+

[0105]

[0106] [표 6]

대식세포 처리 시험 물질	NF-κB 활성화 억제율(p-p65/p65)	TNF-α 발현 억제율
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM72	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM73	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM74	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM75	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM76	+++	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM77	+	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM78	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM79	+	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM80	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM81	+++	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM82	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM83	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM84	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM85	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM86	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM87	++	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM88	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM89	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM90	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM91	+++	+++
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM92	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM93	+	+

[0107]

[0108] [표 7]

대식세포 처리 시험 물질	NF-κB 활성화 억제율(p-p65/p65)	TNF-α 발현 억제율
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM94	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM95	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM96	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM97	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM98	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM99	+	+
inulin	++	++
citrus pectin	++	+
carrageenan	+	-
trehalose	+	-
lactulose	+	-
cyclodextrin	+	-
carboxymethyl cellulose	+	+
gelatin	+	+
chitosan	++	++
alginic acid	+	+
fructo-oligosaccharide	+	+
defatted soybean protein	+	+
apple pectin	+	++
arabino-galactan	+	++
xylan	+	-

[0109]

[0110] * 억제율 : -, <10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, >60%

[0111] 표 5 내지 표 7의 시험 결과, 유산균의 종류마다 대식세포의 염증반응 억제 효능이 상이하게 나타남을 확인하였다. 구체적으로, 비피도박테리움 속 유산균과 락토바실러스 속 유산균의 경우, 종은 물론 동일한 종이라고 하더라도 strain에 따라서 염증반응 억제 효능이 달리 나타남을 확인하였다. 이 중에서, 비피도박테리움 룡검 IM55 및 락토바실러스 플란타럼 IM76의 경우 NF-κB 활성화 억제율과 TNF-α의 발현 억제율이 동시에 모두 높게 나타남을 확인하였다.

[0112] 또한, 프리바이오틱스로서 키토산(chitosan), 이눌린(inulin) 및 감귤류 펙틴(citrus pectin)이 다른 프리바이오틱스에 비해 NF-κB 활성화 억제율 및 TNF-α의 발현 억제율이 우수함을 확인하였다.

[0113] (2) 유산균의 수지상세포 염증반응 억제 효능 시험

[0114] 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 처리한 뒤, 세척하였다. 상기 세포들을 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 수지상세포로 사용하였다. 이후, 24-웰 플레이트에 수지상세포를 각 웰당 0.5×10^6 개로 깔고, 시험 물질인 유산균과 염증 반응 유도 물질인 LPS(lipopolysaccharide)를 90분 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 이때, 유산균 처리 농도는 1×10^4 CFU/ml 이었다. 또한, 유산균의 효능을 비교하기 위해 시험 물질로 다양한 프리바이오틱스를 사용하였다.

[0115] 상기 수득한 상등액으로부터 IL-10 및 IL-12의 발현량을 ELISA kit로 측정하였다. 또한, 시험 물질을 90분 동안 처리한 후 수득한 세포로부터 p65(NF-κB), p-p65(phosphor-NF-κB) 및 β-actin의 발현량을 상기 실시예 2.(1)과 동일하게 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. 유산균의 수지상세포 염증반응 억제 효능 시험 결과를 하기 표 8 내지 표 10에 나타내었다.

[0116] [표 8]

수지상세포 처리 시험 물질	NF-κB 활성화 억제율(p-p65/p65)	IL-12 발현 억제율	IL-10 발현 증가율
무처리	-	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM51	+	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM52	++	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM53	+	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM54	+	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM55	+++	++	+++
<i>Bifidobacterium longum</i> IM56	++	++	++
<i>Bifidobacterium longum</i> IM57	+	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM58	+	+	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM59	+	+	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM60	+	+	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM61	+	+	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM62	+	+	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM53	+	+	-
<i>Bifidobacterium longum</i> IM64	+	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> IM65	+	+	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM66	+++	++	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM67	+	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM68	+	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM69	+	+	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM70	+	+	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM71	+	+	-

[0117]

[0118] [표 9]

수지상세포 처리 시험 물질	NF-κB 활성화 억제율(p-p65/p65)	IL-12 발현 억제율	IL-10 발현 증가율
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM72	+	+	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM73	+	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM74	+	+	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM75	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM76	++	++	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM77	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM78	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM79	+	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM80	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM81	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM82	+	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM83	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM84	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM85	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM86	+	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM87	++	++	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM88	+	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM89	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM90	+	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM91	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM92	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM93	+	+	+

[0119]

[0120] [표 10]

수지상세포 처리 시험 물질	NF-κB 활성화 억제율(p-p65/p65)	IL-12 발현 억제율	IL-10 발현 증가율
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM94	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM95	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM96	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM97	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM98	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM99	+	+	+
inulin	++	+	+
citrus pectin	++	++	++
carrageenan	+	+	-
trehalose	+	+	+
lactulose	+	+	-
cyclodextrin	+	+	-
carboxymethyl cellulose	+	+	-
gelatin	+	+	+
chitosan	++	+	++
alginic acid	+	+	+
fructo-oligosaccharide	+	+	-
defatted soybean protein	+	+	+
apple pectin	+	+	-
arabino-galactan	+	+	+
xylan	+	+	++

[0121]

[0122] * 억제율 : -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~60%; +++, >60%

[0123] * 증가율 : -, <10%; +, 10~50%; ++, 50~100%; +++, >100%

[0124] 표 8 내지 표 10의 시험 결과, 유산균의 종류마다 수지상세포의 염증반응 억제 효능이 상이하게 나타남을 확인하였다. 구체적으로, 비피도박테리움 속 유산균과 락토바실러스 속 유산균의 경우, 종은 물론 동일한 종이라고 하더라도 strain에 따라서 염증반응 억제 효능이 달리 나타남을 확인하였다. 특히, 일부 strain은 IL-12 발현이 증가하였고, 대부분의 strain은 IL-10 발현이 감소하는 결과를 나타내기도 하였다. 이 중에서, 비피도박테리움 룡검 IM55 및 락토바실러스 플란타럼 IM76의 경우 NF-κB 활성화 억제율 및 IL-12 발현 억제율이 가장 높음과 동시에 IL-10 발현 증가율이 가장 높게 나타남을 확인하였다.

[0125] 또한, 프리바이오틱스로서 키토산(chitosan), 이눌린(inulin) 및 감귤류 펙틴(citrus pectin)이 다른 프리바이오틱스에 비해 NF-κB 활성화 억제율, IL-12 발현 억제율 및 IL-10 발현 증가율이 우수함을 확인하였다.

[0126] 상기 실시예 2를 통해, 다양한 유산균들 중에서도 비피도박테리움 룡검 IM55 및 락토바실러스 플란타럼 IM76의 염증반응 억제 효과가 가장 우수하였다. 또한, 다양한 프리바이오틱스들 중에서도 키토산, 이눌린 및 감귤류 펙틴의 염증반응 억제 효과가 우수함을 확인하였다.

[0127] **실시예 3. 유산균의 면역조절 효능 평가**

[0128] **(1) 세포 분화율**

[0129] 알레르기 질환, 구체적으로 제1형 과민반응(Type 1 hypersensitivity reaction)에 의해 발생하는 질환을 조절, 예방, 개선 또는 치료하기 위해서는 알레르겐에 대한 면역반응시 IgE 항체의 생성을 감소시키고 IL-10을 방출하는 Treg 세포(regulatory T cell)의 생성을 증가시키는 것이 중요하다. 알레르기 반응은 비만세포나 호염구 등이 만들어내는 매개물질뿐 아니라, 이들 세포에서 분비되는 사이토카인의 작용에 의하여 더욱더 복잡해지며, 알레르기 반응으로 나타나는 일부 증상은 이들 사이토카인의 작용에 기인하는 것으로 알려져있다. 비만세포에서는 TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 등의 사이토카인이 만들어지는데, 이들 사이토카인들은 호중구와 호산구를 모으는 역할을 한다. 또한, 비만세포에서 분비된 IL-4, IL-13은 B 세포를 활성화하여 IgE 항체를 만들게 하며, IL-5는 호산구를 모으고 활성화시키는 역할을 한다. IL-4, IL-5 같은 사이토카인들은 Th2 세포에서 많이 분비되기 때문에 일반적으로 Th2 사이토카인으로 분류되며, 비만세포와 Th2 세포에서 분비되는 이들 사이토카인은 각각의 수용체와 결합하여 세포 간의 상호작용을 유도하고 알레르기 반응을 증폭시키는 작용을 한다. 또한, 대표적인 proinflammatory 사이토카인인 TNF-α가 알레르기 상태에서 전신적으로 다량 생산되면 알레르기 쇼크 증상이 일어날 수 있다.

[0130] 따라서, 분변 또는 배추 김치로부터 분리한 유산균의 면역조절 효능을 평가하기 위하여, 상기 사이토카인들을 분비하는 세포로의 분화 억제율 및 Treg 세포로의 분화 증가율을 측정하여 비장세포의 면역반응에 유산균이 미

치는 영향을 측정하였다.

[0131] 구체적으로, C56BL/6J 생쥐의 비장을 분리하고, 분쇄한 뒤, 10% FCS 함유 RPMI 1640 배지에 현탁하고, CD4 T cell isolation kit(MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 사용하여 CD4 T 세포를 분리하였다. 분리한 CD4 T 세포를 12-웰 플레이트에 각 웰 당 5×10^5 개로 분주하였다. 이후, 각 웰에 T 세포의 Th1 세포로의 분화를 유도하기 위해 anti-CD3, anti-CD28, IL-2 및 IL-12를, T 세포의 Th2 세포로의 분화를 유도하기 위해 anti-CD3, anti-CD28, IL-2 및 IL-4를, T세포의 Th17 세포로의 분화를 유도하기 위해 anti-CD3, anti-CD28, IL-6 및 TGF- β 를, T 세포의 Treg 세포로의 분화를 유도하기 위해 anti-CD3 및 anti-CD28을 넣고 세포를 배양하면서 시험 물질인 유산균을 웰 당 1×10^5 CFU의 양으로 넣고 4일간 배양하였다. 또한, 유산균의 효능을 비교하기 위해 시험 물질로 다양한 프리바이오틱스를 사용하였다.

[0132] 이후, 비장으로부터 분리된 T 세포의 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포 및 Treg 세포로의 분화능을 측정하였다. 구체적으로, 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 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포 및 Treg 세포의 분포를 분석하였고, 그 결과를 하기 표 11 내지 표 13에 나타내었다. 하기 표 11 내지 표 13에서 유산균은 증명을 생략하고 본 발명의 발명자가 부여한 균주명을 사용하였다.

[표 11]

비장 T 세포 처리 시험 물질	분화 억제율			분화 증가율
	Th1 세포	Th2 세포	Th17 세포	Treg 세포
무처리	-	-	-	-
IM51	+	+	+	+
IM52	++	-	-	-
IM53	+	-	+	+
IM54	+	+	+	+
IM55	+++	+++	+++	+++
IM56	++	+	+	+
IM57	++	-	+	+
IM58	++	-	+	-
IM59	+	+	+	-
IM60	+	+	+	-
IM61	++	+	++	+
IM62	++	+	++	+
IM63	+	+	+	+
IM64	++	++	+	+
IM65	+	+	+	+
IM66	+++	+	++	+
IM67	++	+	++	+
IM68	++	+	++	+
IM69	+	+	+	+
IM70	++	+	++	+
IM71	++	+	++	+

[0134]

[0135] [표 12]

비장 T 세포 처리 시험 물질	분화 억제율			분화 증가율
	Th1 세포	Th2 세포	Th17 세포	Treg 세포
IM72	+	+	+	+
IM73	++	+	+	+
IM74	+	+	+	+
IM75	+++	+	+	++
IM76	++	+++	+++	+++
IM77	+	+	+	+
IM78	+	+	++	++
IM79	+	+	++	+
IM80	+	++	+	+
IM81	+	+	++	+
IM82	+	+	+	+
IM83	+	++	++	+
IM84	+	+	++	+
IM85	+	+	+	+
IM86	+	+	+	+
IM87	+	+	++	+
IM88	+	+	+	+
IM89	++	+	++	+
IM90	+	+	+	+
IM91	+	+	+	+
IM92	+	+	+	+
IM93	++	+	++	+

[0136]

[0137] [표 13]

비장 T 세포 처리 시험 물질	분화 억제율			분화 증가율
	Th1 세포	Th2 세포	Th17 세포	Treg 세포
IM94	+	+	+	+
IM95	+	+	+	+
IM96	++	++	++	+
IM97	+	+	+	+
IM98	+	+	+	-
IM99	+	+	+	+
P1	+	+	+	+
P2	+	+++	++	++
P3	+++	++	+	+
P4	+	+	+	+
P5	+	++	-	++
P6	++	+	++	+
P7	++	++	++	-
P8	+	++	+	+
P9	+	++	+	+
P10	+	+	++	+
P11	+	+	+	++
P12	+	+	+	+
P13	+	+	+	-
P14	+	+	+	-
P15	++	+	++	-

[0138]

[0139] * 억제율 : -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~60%; +++, >60%

[0140] * 증가율 : -, <10%; +, 10~50%; ++, 50~100%; +++, >100%

[0141] * P1 : inulin; P2 : citrus pectin; P3 : carrageenan; P4 : trehalose; P5 : lactulose; P6 : cyclodextrin; P7 : carboxymethyl cellulose; P8 : gelatin; P9 : chitosan; P10 : alginic acid; P11 : fructooligosaccharide; P12 : defatted soybean protein; P13 : apple pectin; P14 : arabino-galactan; P15 : xylan

[0142] 표 11 내지 표 13의 실험 결과, 유산균의 종류마다 T 세포의 분화율이 상이하게 나타남을 확인하였다. 구체적으로, 비피도박테리움 속 유산균의 경우, 유산균의 종류마다 Th1, Th2 및 Th17 세포 분화 억제율 및 Treg 세포 분화 증가율이 상이하고, 일부 유산균의 경우 Th2 세포 억제율 및 Treg 세포 증가율이 다른 유산균과 반대되는 결과를 나타내기도 하였다. 이 중에서, 비피도박테리움 룡검 IM55의 경우 Th1, Th2 및 Th17 세포 분화 억제율이 가장 높음과 동시에, Treg 세포 분화 증가율이 가장 높음을 확인하였다. 또한, 락토바실러스 속 유산균 역시 비피도박테리움 속 유산균과 유사하게, 유산균의 종류에 따라 세포 분화 억제율 및 증가율이 상이하였다. 이 중에서, 락토바실러스 플란타럼 IM76이 Th1, Th2 및 Th17 세포 분화 억제율 및 Treg 세포 분화 증가율이 가장 높음

을 확인하였다.

(2) 사이토카인 발현율

또한, 비장 T 세포로부터 분화된 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포 및 Treg 세포의 전사인자 및 사이토카인 발현율을 측정하였다. 구체적으로, qRT-PCR을 이용하여 Th1 세포 분화 유도 배양액으로부터 T-bet, IFN- γ 및 IL-12를, Th2 세포 분화 유도 배양액으로부터 GATA3 및 IL-5을, Th17 세포 분화 유도 배양액으로부터 ROR γ t 및 IL-17을, Treg 세포 분화 유도 배양액으로부터 FOXP3 및 IL-10의 발현량을 분석하였다. 하기 표 14는 qRT-PCR 수행 시 사용한 프라이머의 염기서열을 증폭 목적물과 대응시켜 나타낸 것이다. 비장 T 세포로부터 분화된 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포 및 Treg 세포의 전사인자 및 사이토카인 발현율 측정 결과를 하기 표 15 및 표 16에 나타내었다. 하기 표 15 및 표 16에서 유산균은 종명을 생략하고 본 발명의 발명자가 부여한 균주명을 사용하였다.

[표 14]

증폭 목적물	primer 종류	primer 염기서열
T-bet	Forward (서열번호 3)	5'-CCTCTTCTATCCAACCAGTATC-3'
	Reverse (서열번호 4)	5'-CTCCGCTTCATAACTGTGT-3'
FN- γ	Forward (서열번호 5)	5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3'
	Reverse (서열번호 6)	5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'
GATA3	Forward (서열번호 7)	5'-GAAGGCATCCAGACCCGAAAC-3'
	Reverse (서열번호 8)	5'-ACCCATGGCGGTGACCATGC-3'
IL-5	Forward (서열번호 9)	5'-AAAGAGAAGTGTGGCGAGGAGAGAC-3'
	Reverse (서열번호 10)	5'-CCTTCCATTGCCCACTCTGTACTCATC-3'
ROR γ t	Forward (서열번호 11)	5'-ACAGCCACTGCATTCCCAGTTT-3'
	Reverse (서열번호 12)	5'-TCTCGGAAGGACTTGCAGACAT-3'
IL-17	Forward (서열번호 13)	5'-TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA-3'
	Reverse (서열번호 14)	5'-CTTTCCCTCCGCATTGACAC-3'
FOXP3	Forward (서열번호 15)	5'-CCCATCCCCAGGAGTCTT-3'
	Reverse (서열번호 16)	5'-ACCATGACTAGGGGCACTGTA-3'
IL-10	Forward (서열번호 17)	5'-ATGCTGCCTGCTCTTACTGACTG-3'
	Reverse (서열번호 18)	5'-CCCAAGTAACCCCTTAAAGTCCTGC-3'
GAPDH	Forward (서열번호 19)	5'-TGCACTGGCAAAGTGGAGAT-3'
	Reverse (서열번호 20)	5'-TTTGCCGTGAGTGGAGTCAT-3'

[표 15]

비장 T 세포 처리 시험 물질	발현 억제율						발현 증가율	
	T-bet	IFN- γ	GATA3	IL-5	ROR γ t	IL-17	FOXP3	IL-10
무처리	-	-	-	-	-	-	-	-
IM51	+	++	+	+	+	+	+	+
IM52	++	+	-	+	-	+	-	-
IM53	+	+	-	+	+	++	+	-
IM54	+	+	+	++	+	+	++	+
IM55	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
IM56	++	+	+	++	+	++	+	++
IM57	++	++	-	+	+	+	+	+
IM58	++	++	-	++	+	+	-	-
IM59	+	+	+	+	+	+	-	+
IM60	+	++	+	++	+	+	-	-
IM61	++	+	+	++	++	++	+	-
IM62	++	+	+	++	++	++	+	+
IM63	+	++	+	+	+	+	+	-
IM64	++	+	++	++	+	+	+	+
IM65	+	+	+	+	+	+	+	-
IM66	++	+	+	+	++	++	+	+
IM67	+	+	+	+	++	+	+	+
IM68	++	++	+	+	++	++	+	+
IM69	+	+	+	+	+	+	+	-
IM70	++	+	+	+	++	++	+	+
IM71	++	+	+	+	++	++	+	+
IM72	+	++	+	+	+	+	+	+
IM73	++	+	+	+	+	+	+	+
IM74	+	+	+	+	+	+	+	+

[0149] [표 16]

비장 T 세포 처리 시험 물질	발현 억제율						발현 증가율	
	T-bet	IFN- γ	GATA3	IL-5	ROR γ t	IL-17	FOXP3	IL-10
IM75	++	+	+	+	+	+	++	+
IM76	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
IM77	+	+	+	++	+	+	+	+
IM78	+	+	+	+	++	++	++	+
IM79	+	+	+	++	++	++	+	-
IM80	+	+	++	+	+	+	+	+
IM81	+	+	+	+	++	++	+	+
IM82	+	+	+	+	+	+	+	+
IM83	+	++	++	++	++	++	+	+
IM84	+	+	+	+	++	++	+	+
IM85	+	++	+	++	+	+	+	+
IM86	+	+	+	+	+	+	+	-
IM87	+	+	+	+	++	++	+	+
IM88	+	++	+	+	+	++	+	-
IM89	++	+	+	+	++	+	+	-
IM90	+	+	+	++	+	+	+	+
IM91	+	+	+	++	+	+	+	-
IM92	+	+	+	+	+	+	+	-
IM93	++	+	+	++	++	+	+	+
IM94	+	+	+	+	+	+	+	+
IM95	+	+	+	+	+	+	+	-
IM96	++	+	++	++	++	++	+	-
IM97	+	+	+	+	+	+	+	+
IM98	+	+	+	+	+	+	-	-
IM99	+	+	+	+	+	+	+	+

[0150]

[0151] * 억제율 : -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~60%; +++, >60%

[0152] * 증가율 : -, <10%; +, 10~50%; ++, 50~100%; +++, >100%

[0153] 표 15 및 표 16의 측정 결과, 유산균의 종류마다 사이토카인 발현 변화율이 상이하게 나타남을 확인하였다. 구체적으로, 비피도박테리움 속 유산균의 경우, 일부 유산균에서는 GATA3 및 IL-5 발현 억제율이 다른 유산균과 반대되는 결과를 나타내기도 하였다. 이 중에서, 비피도박테리움 통검 IM55의 경우 T-bet, IFN- γ , GATA3, IL-5, ROR γ t 및 IL-17의 발현 억제율이 가장 높음과 동시에, FOXP3 및 IL-10 발현 증가율이 가장 높음을 확인하였다. 또한, 락토바실러스 속 유산균 역시 비피도박테리움 속 유산균과 유사하게, 일부 유산균에서 사이토카인 발현 변화율이 상이한 결과를 나타내기도 하였다. 이 중에서, 락토바실러스 플란타럼 IM76의 경우 T-bet, IFN- γ , GATA3, IL-5, ROR γ t 및 IL-17의 발현 억제율이 가장 높음과 동시에, FOXP3 및 IL-10 발현 증가율이 가장 높음을 확인하였다.

[0154] 실시예 4. IM55 또는 IM76의 염증반응 억제 효능 시험

[0155] 상기 실시예 1에서 분리된 유산균들 중 비피도박테리움 통검 IM55와 락토바실러스 플란타럼 IM76의 염증반응 억제 효능 시험을 실시하였다.

[0156] (1) IM55 또는 IM76의 대식세포 염증반응 억제 효능 시험

[0157] 7주령 BALB/c 암컷 생쥐(20~22g)를 라운바이오(주)로부터 구입하여 실험 전 7일동안 순화하였다. 생쥐의 복강에 4 % thioglycolate 2 ml를 투여하고, 96시간이 지난 뒤에 생쥐를 희생시켰다. 10 ml의 RPMI 1640으로 복막강(Peritoneal cavity fluids)을 수집하고 300×g의 조건에서 10분간 원심분리한 뒤, RPMI 1640로 세척하였다. 12-웰 마이크로 플레이트에 세포를 각 웰 당 0.5×10^6 개로 깔고, 1% antibiotic-antimycotic 및 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 37 °C에서 20시간 동안 배양하고, 3회 세척하였다. 부착된 세포를 대식세포로 사용하였다. 사이토카인 발현에서 IM55 또는 IM76의 효과를 측정하기 위해, 1×10^6 세포/웰의 대식세포에 1×10^5 CFU/ml의 유산균과 염증 반응 유도 물질인 LPS를 20시간 동안 처리하였다. 각 사이토카인의 발현량은 상기 실시예 2.(1)와 동일하게, ELISA kit로 측정하였다. 측정 결과, IM55 또는 IM76의 투여시 IL-10의 발현이 증가하고, IL-12의 발현이 억제됨을 확인하였다 (도 1 및 도 2).

[0158] (2) IM55 또는 IM76의 수지상세포 염증반응 억제 효능 시험

[0159] 7주령 BALB/c 암컷 생쥐(20~22g)로부터 공지된 방법(Immunopharmacol. Immunotoxicol., 2016, 38, 447-454)에

따라 RPMI1640으로 마우스 골수 세포를 수집하였다. 2×10^6 개의 수집된 세포를 12-웰 플레이트에 집중하고 20 ng/ml rGM-CSF, 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic 및 150 μ g/ml 겐타마이신(gentamycin)이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

[0160] 사이토카인 발현에서 IM55 또는 IM76의 효과를 측정하기 위해, 배양 3일 및 6일째에 상기 세포를 컨디셔닝된 배지로 교체하여 과립구를 제거하였고, 배양 8일째에 1×10^5 CFU/ml의 유산균과 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 각 사이토카인의 발현량은 상기 실시예 2.(2)와 동일하게, ELISA kit로 측정하였다. 측정 결과, IM55 또는 IM76의 투여시 IL-10의 발현이 증가하고, TNF- α 의 발현이 억제됨을 확인하였다 (도 3 및 도 4).

[0161] 상기 실시예 4의 결과들을 통해, 신규한 유산균인 비피도박테리움 롱검 IM55 및 락토바실러스 플란타럼 IM76이 우수한 염증반응 억제 효능을 나타내, 염증질환의 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0162] 실시예 5. IM55 또는 IM76의 면역조절 효능 평가

[0163] 상기 실시예 1에서 분리된 유산균들 중 비피도박테리움 롱검 IM55와 락토바실러스 플란타럼 IM76의 면역조절 효능을 평가하기 위해, 상기 실시예 3과 유사한 방법으로 T세포의 분화율을 분석하였다.

[0164] 구체적으로, 7주령 BALB/c 암컷 생쥐(20-22g)에서 무균적으로 비장을 분리하고, 적당히 분쇄하고, tris-buffered ammonium chloride로 처리하였다. 10 %의 FCS 함유 RPMI 1640 배지에 현탁하고, Pan T 세포 분리 키트 II(Pan T Cell Isolation Kit II)를 사용하여 세포 현탁액으로부터 T 세포를 분리하였다. 분리한 T 세포 (1×10^5 세포/웰)의 Th2 세포로의 분화를 유도하기 위해 anti-CD28 (1 μ g/ml), anti-CD3 (1 μ g/ml), rIL-4 (10 μ g/ml) 및 rIL-2 (10 μ g/ml)를, T 세포(1×10^5 세포/웰)의 Treg 세포로의 분화를 유도하기 위해 anti-CD28 (1 μ g/ml) 및 anti-CD3 (1 μ g/ml)를 넣고 세포를 배양하면서, IM55 또는 IM76을 웰 당 1×10^5 CFU/ml의 양으로 넣고 4일간 배양하였다. 이들 세포로부터 RNA를 분리하고 IL-10, GATA3, FOXP3 및 IL-5 발현 수준을 qRT-PCR을 수행하여 분석하였다. qRT-PCR은 상기 실시예 3과 동일하게 수행하였고, 상기 표 14와 동일한 프라이머를 사용하였다.

[0165] 분석 결과, IM55 또는 IM76의 처리시 GATA3 및 IL-5의 발현량이 감소하여 Th2 세포로의 분화가 억제되고 (도 5 및 도 6), FOXP3 및 IL-10의 발현량이 증가하여 Treg 세포로의 분화가 촉진됨을 확인하였다 (도 7 및 도 8).

[0166] 상기 실시예 5의 결과를 통해, 신규한 유산균인 비피도박테리움 롱검 IM55 및 락토바실러스 플란타럼 IM76은 우수한 면역조절 효능을 나타내, 면역질환의 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0167] 실시예 6. 유산균의 비염 및 천식 개선 효능 평가 (1)

[0168] 기관지폐포세척(Bronchoalveolar lavage, BAL)은 기관지 내시경과 함께 수행되는 것으로서 기도 및 폐포를 덮고 있는 상피 점액층으로부터 세포 및 다른 수용성 성분을 수집하기 위하여 널리 사용되어 왔다. 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)은 혈류 내의 다양한 단백질뿐만 아니라 상피세포 및 염증성 세포를 포함하는 다양한 세포 종류로부터 분비된 단백질들을 포함한다. 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)은 일반적으로 기관지 천식, 기관지염 또는 폐질환의 진단 또는 병리상태를 분석하는데에 이용된다. 따라서, 비염 및 천식 개선 효과를 확인하기 위하여, 기관지폐포세척액을 비롯한 혈청 및 폐 조직으로부터 항비염 및 항천식 효능 관련 지표들을 분석하였다.

[0169] (1) 실험방법

[0170] 7주령 BALB/C 암컷 마우스(21~23g)를 습도 $50 \pm 10\%$, 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 조명은 12시간 켜 후 12 시간 끄는 것을 반복하는 조절된 환경 조건에서 일주일 동안 순화하였다. 이후, 실험 0일째 및 14일째에 마우스 한 마리당 알레르기 유발하는 난알부민(ovalbumin, OVA) 20 μ g과 aluminum hydroxide(Alum) 2mg을 phosphate buffered saline (PBS: pH 7.4) 0.2ml에 현탁한 후 이를 복강으로 주사하였다. 이 후, 실험 26일째, 27일째 및 28일째에 마우스 한 마리당 난알부민(ovalbumin, OVA) 100 μ g을 증류수 10 μ l에 녹인 후, 이를 비강에 도말 투여하여 알레르기성 비염 및 천식을 유발하였다. 한편, 실험 26일째부터 30일째까지 총 5일 동안 매일 1회씩 시험 약물인 유산균을 경구 투여하였다. 또한, 유산균 대신 양성 대조 약물로 사용한 덱사메타손(dexamethasone)을 1 mg/kg b.w.의 용량으로 복강 투여하였다. 또한, 정상군에 해당하는 마우스에는 알레르기성 비염 및 천식을 유발하지 않고 난알부민 및 시험약물 대신에 phosphate buffered saline (PBS: pH 7.4)만을 경구투여하였다. 또한, 대조군에 해당하는 마우스에는 알레르기성 비염 및 천식을 유발하고 시험 약물로 phosphate buffered saline (PBS: pH 7.4)

만을 경구투여하였다. 실험 종료 후 마우스를 마취하고 혈액, 폐 조직 및 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 채취하였다. 원심분리를 통해 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하고, 이를 분석 시료로 사용하였다.

[0171] 다양한 분석방법을 사용하여 혈청, 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 및 폐 조직으로부터 항비염 효능 및 항천식 효능과 관련된 지표들을 분석하였다. 각 분석방법 및 이를 통해 분석한 지표들은 다음과 같다.

[0172] * enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) : IL-10, IL-5, IL-6, IL-4, IgE 등

[0173] * FACS(Fluorescence-activated cell sorting) : T 세포(Th1:CD4⁺/IFN- γ ⁺ ; Th2: CD4⁺/IL-4⁺ ; Treg: CD4⁺/FOXP3⁺ ; Th17: CD4⁺/IL-17⁺) 분포, 호산구(CD11b⁺, Siglec-F⁺) 분포

[0174] (2) 실험결과

[0175] 실험 결과, IM55 또는 IM76을 투여한 군의 혈청에서 비염 및 천식 관련 지표인 IL-5, IgE 및 IL-4의 발현이 현저히 억제됨을 확인하였다 (표 17 및 도 9 내지 11). 또한, 기관지폐포세척액에서도 비염 및 천식 관련 지표인 IL-5 및 IL-4의 양이 현저히 감소하였고, Th2 세포 및 호산구의 비율이 현저히 감소하였음을 확인하였다 (표 18 및 도 12 내지 15). 나아가, 기관지폐포세척액에서 비염 및 천식의 예방 및 치료 효과와 관련된 IL-10의 발현이 증가하고, Treg 세포의 비율이 증가하였음을 확인하였다 (표 18, 도 16 및 도 17).

[0176] [표 17]

실험군 구분	억제율		
	IL-5	IgE	IL-4
Con	-	-	-
IM55	+++	++	+++
IM76	++	+	++
Dx	++	+++	+++

[0178] [표 18]

실험군 구분	억제율				증가율	
	IL-5	IL-4	Th2 세포	호산구	IL-10	Treg 세포
Con	-	-	-	-	-	-
IM55	+++	+++	++	+++	+++	+++
IM76	++	+++	+++	+++	+++	+
Dx	+++	+++	+++	+++	++	-

[0180] * 억제율 : -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~60%; +++, >60%

[0181] * 증가율 : -, <10%; +, 10~50%; ++, 50~100%; +++, >100%

[0182] 실시예 7. 유산균의 비염 및 천식 개선 효능 평가 (2)

[0183] (1) 실험방법

[0184] 공지된 방법(Oh et al., Immunopharmacol. Immunotoxicol., 2013, 35, 678-686)을 참고하여 난알부민에 의해 유도된 알레르기 비염 모델을 제조하였다. 구체적으로, 마우스를 무작위로 6개의 그룹 (그룹당 n = 8)으로 나누었다. 5개의 군에 대해서는 실험 1일째 및 14일째에 알루미늄 칼륨 설페이트(aluminium potassim sulfate) 용액에 희석한 난알부민 (20 μ g)을 복강 내 주사하였다. 실험 26일째, 27일째 및 28일째에 상기 마우스 한 마리당 난알부민 100 μ g을 증류수 10 μ l에 녹인 후, 이를 비강에 도말 투여하여 알레르기성 비염 및 천식을 유발하였다. 한편, 실험 26일째부터 30일째까지 총 5일 동안 매일 1회씩 시험 물질 (IM55 [1×10^9 CFU/마우스], IM76 [1×10^9 CFU/마우스], 덱사메타손(dexamethasone) [1 mg/kg] 또는 식염수)을 투여하였다. 정상군에 해당하는 마우스에는 알레르기성 비염 및 천식을 유발하지 않고, 식염수만을 투여하였다. 실험 31일째, 마우스의 양측 비강 내로 난알부민(10 μ l/콧구멍, 식염수에 용해 10 mg/ml)을 투여하여 자극시킨 다음, 10 분 동안 재채기 및 비강 문지름 횟수(비염 증상 점수)를 계수하였다.

[0185] 조직 검사를 위해 폐와 비강 조직을 분리하고 4 % 중성 완충 포르말린(neutral buffered formalin)에 고정시키고 냉동시켰다. 저온 유지 장치를 사용하여 상기 냉동된 조직을 10- μ m 단면으로 절단하고, 헤마톡실린 및 에오

신(H&E)과 요오드산 시프반응(periodic acid Schiff reaction, PAS)으로 염색하였다.

[0186] 또한, 상기 실시예 3 등의 다양한 분석방법을 사용하여 비강, 혈청, 기관지폐포세척액 및 폐 조직으로부터 항비염 효능 및 항천식 효능과 관련된 지표들을 분석하였다. 구체적으로, 비강 및 혈청의 지표들은 ELISA kit로 측정하였고, 기관지폐포세척액 및 폐 조직의 비염 및 천식 관련 지표들은 상기 표 14의 프라이머들을 사용하여 qRT-PCR로 측정하였다.

[0187] (2) 실험결과

[0188] 마우스에 난알부민의 처리시 비염 증상 점수(재채기 및 비강 문지름 횟수)와 비강 내의 IL-4 및 IL-5 발현을 포함한 알레르기 비염 증상이 유의하게 증가하였다. 그러나 IM55 또는 IM76의 처리시 난알부민에 의한 알레르기 비염 증상과 비강 내 IL-4 및 IL-5 수치가 유의하게 감소하였다 (도 18 내지 도 20). 또한, IM55 또는 IM76을 처리한 경우, 난알부민에 의한 비강의 파괴가 개선되었고, 비강 상피 세포의 팽창이 완화되었다 (도 21).

[0189] 나아가, 조직학적 검사 결과, 비염 유도 동물모델은 폐 염증 및 부종을 유발하고, IL-5 및 GATA3 발현이 증가하였으며, IL-10 및 FOXP3 발현이 감소하였다. 그러나 IM55 또는 IM76을 처리한 경우, 난알부민에 의한 폐 조직의 파괴 및 상피 세포의 확장이 억제되고, GATA3와 IL-5의 발현이 억제되며, FOXP3 및 IL-10 발현이 증가하였다 (도 22 내지 26).

[0190] 실시예 8. 혼합 유산균의 비염 및 천식 개선 효능 평가 (3)

[0191] IM55 또는 IM76의 단독의 효과 뿐만 아니라, IM55 및 IM76의 혼합물의 비염 및 천식 개선 효능을 평가하였다. 구체적으로, 비염 증상 점수, 기관지폐포세척액의 호산구 세포 분포율(%) 및 혈액 내 사이토카인의 발현량을 상기 실시예 3 등과 동일한 방법으로 분석하였다.

[0192] 그 결과, IM55 : IM76을 1:1, 1:3 및 1:9로 혼합한 혼합물 투여군에서 재채기 및 비강 문지름 횟수를 확인한 염증 증상 점수가 감소하였고, 비강 내 IL-5의 발현량이 감소하였음을 확인하였다 (도 27). 또한, 혈청에서 IL-5의 발현량이 감소함을 확인하였다 (도 28).

[0193] 상기 실시예 6 내지 8의 비염 유도 모델의 실험을 통해, 비피도박테리움 롱검 IM55과 락토바실러스 플란타럼 IM76의 혼합물이 천식 및 비염의 예방, 개선 및 치료에 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0194] 실시예 9. 장내 미생물 정상화 및 대장염 개선 효과

[0195] 장내 미생물은 최근 알레르기 질환의 발생 및 악화에 영향을 미친다고 보고된 바 있는, 알레르기 질환의 발생에 중요한 요소에 해당한다. 따라서, 신규한 유산균의 투여에 따른 대장 내의 미생물 변화를 확인하기 위해, 상기 실시예 7의 알레르기 비염 모델을 대상으로 대장의 사이토카인 발현 및 장내 미생물의 변화를 분석하였다.

[0196] 구체적으로, Takara thermal cycler 및 SYBR 프리믹스를 사용하여 상기 동물모델의 대장 조직으로부터 2μg의 RNA를 분리하였다. 상기 RNA를 사용하여 qPCR을 수행하였으며, qPCR에 사용된 프라이머는 상기 표 14와 같다.

[0197] 분석 결과, 난알부민의 처리시 대장에서 IL-4 및 IL-5 발현이 증가하였고, IL-10 발현이 감소하였다. 그러나 IM55, IM76 또는 이들의 혼합물의 처리시 IL-4 및 IL-5의 발현이 감소하고, IL-10 발현이 증가함을 확인하였다 (도 29).

[0198] 또한, 상기 동물모델로부터 대장을 분리한 후, Takara thermal cycler 및 SYBER 프리믹스를 사용하여 상기 동물모델의 대장액으로부터 100 ng의 총 DNA를 분리하였다. 상기 DNA를 사용하여 qPCR을 수행하였으며, qPCR에 사용된 프라이머는 하기 표 19와 같다.

[0199] [표 19]

균의 종류	primer 종류	primer 서열 (5' -3')
Firmicutes	Forward (서열번호 21)	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA
	Reverse (서열번호 22)	AGCTGACGACAACCATGCAC
Bacteroidetes	Forward (서열번호 23)	AACGCGAAAAACCTTACCTACC
	Reverse (서열번호 24)	TGCCCTTTCGTAGCAACTAGTG
Actinobacteria	Forward (서열번호 25)	TGTAGCGGTGGAATGCGC
	Reverse (서열번호 26)	AATTAAGCCACATGCTCCGCT
δ/γ-proteobacteria	Forward (서열번호 27)	GCTAACGCATTAAGTRYCCCG
	Reverse (서열번호 28)	GCCATGCRGCACCTGTCT
TM7	Forward (서열번호 29)	GCAACTCTTTACGCCAGT
	Reverse (서열번호 30)	GAGAGGATGATCAGCCAG

[0200]

- [0201] 분석 결과, 난알부민의 처리시 피르미쿠테스(Firmicutes), 프로테오박테리아(Proteobacteria) 및 TM7의 개체군이 증가하였고, 박테리오테테스(Bacteroidetes)와 악티노박테리아(Actinobacteria)의 개체군이 감소하여, Firmicutes/Bacteroidetes (F / B) 및 Proteobacteria/Bacteroidetes (P / B)의 비율이 증가하였다. 그러나 IM55, IM76 또는 이들의 혼합물의 처리시 난알부민에 의해 증가된 프로테오박테리아의 집단을 유의하게 억제하였고, 비염발생에 의해 감소된 박테리오테테스(Bacteroidetes) 및 악티노박테리아(Actinobacteria) 집단이 회복됨을 확인하였다 (도 30).
- [0202] 이를 통해, IM55, IM76 및 이들의 혼합물은 변화된 장내 미생물을 정상화시킬 뿐만 아니라, 대장염의 조절, 예방, 개선 및 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다.
- [0203] **실시예 10. 유산균 등을 포함하는 약학 조성물의 제조**
- [0204] 하기의 약학 조성물 제조에서 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55 배양물은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55 균주 자체, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물로 대체가 가능하다. 또한, 하기의 약학 조성물 제조에서 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55 배양물은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM76 균주 자체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물로 대체가 가능하다. 또한, 하기의 약학 조성물은 키토산을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0205] <10-1> 산제의 제조
- [0206] *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 20 mg
- [0207] 유당 100 mg
- [0208] 탈크 10 mg
- [0209] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0210] <10-2> 정제의 제조
- [0211] *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 10 mg
- [0212] 옥수수전분 100 mg
- [0213] 유 당 100 mg
- [0214] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0215] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0216] <10-3> 캡슐제의 제조
- [0217] *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 10 mg
- [0218] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0219] 유 당 15 mg
- [0220] 스테아린산 마그네슘 0.2 mg
- [0221] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0222] <10-4> 환의 제조
- [0223] *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 10 mg
- [0224] 유당 150 mg
- [0225] 글리세린 100 mg
- [0226] 자일리톨 50 mg
- [0227] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [0228] <10-5> 과립의 제조
- [0229] *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 15 mg

- [0230] 대두추출물 50 mg
- [0231] 포도당 200 mg
- [0232] 전분 600 mg
- [0233] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [0234] <10-6> 주사제의 제조
- [0235] *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 10 mg
- [0236] 소듐 메타비설파이트 3.0 mg
- [0237] 메틸파라벤 0.8 mg
- [0238] 프로필파라벤 0.1 mg
- [0239] 주사용 멸균증류수 적량
- [0240] 상기의 성분을 혼합한 후, 이중 2ml를 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.
- [0241] **실시예 11. 유산균 등을 포함하는 건강기능식품의 제조**
- [0242] 하기의 건강기능식품 제조에서 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55 배양물은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55 균주 자체, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물로 대체가 가능하다. 또한, 하기의 건강기능식품 제조에서 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55 배양물은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM76 균주 자체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물로 대체가 가능하다. 또한, 하기의 건강기능식품은 키토산을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0243] <11-1> 밀가루 식품의 제조
- [0244] 밀가루 100 중량부에 *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 0.5 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [0245] <11-2> 유제품(dairy products)의 제조
- [0246] 우유 100 중량부에 *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 0.5 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0247] <11-3> 전식의 제조
- [0248] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0249] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0250] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 *Bifidobacterium longum* IM55 배양물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- [0251] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 17 중량부, 보리 20 중량부),
- [0252] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
- [0253] *Bifidobacterium longum* IM55 배양물(1 중량부),
- [0254] 영지(0.5 중량부),
- [0255] 지황(0.5 중량부)
- [0256] <11-4> 건강음료의 제조
- [0257] 액상과당(0.5 g), 올리고당(4 g), 설탕(2 g), 식염(0.5 g), 물(77 g)과 같은 부재료와 *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 1 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조

하였다.

- [0258] <11-5> 야채 주스의 제조
- [0259] *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 2 g을 토마토 또는 당근 주스
- [0260] 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

- [0261] <11-6> 과일 주스의 제조
- [0262] *Bifidobacterium longum* IM55 배양물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

[0263] **6. 유산균의 수탁 정보**

- [0264] 본 발명의 발명자들은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM55를 2017년 1월 20일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM11961P의 수탁번호를 부여받았다. 또한, 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM76을 2017년 1월 20일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM11962P의 수탁번호를 부여받았다. 상기 유산균의 기탁은 특허 절차상의 미생물기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganism for the Purposes of Patent Procedure)을 준수하여 이루어졌다.
- [0265] 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

- [0266] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
- 수탁번호 : KCCM11961P
- 수탁일자 : 20170120

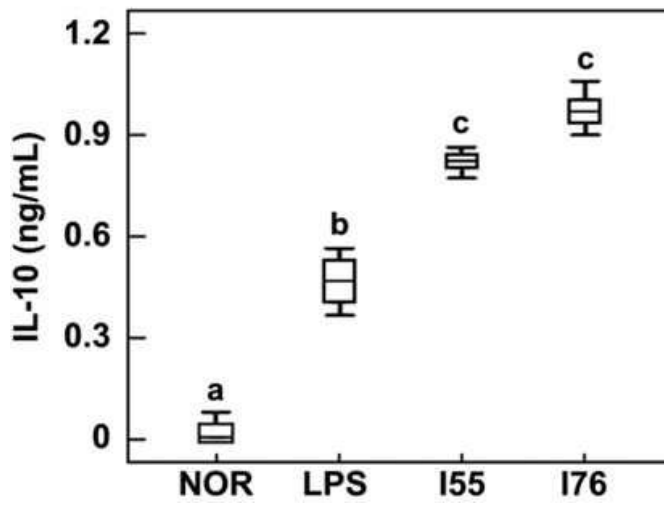
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11962P

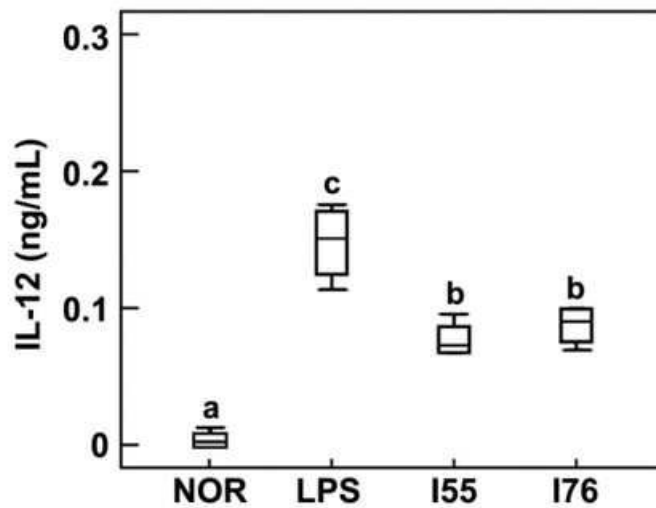
수탁일자 : 20170120

도면

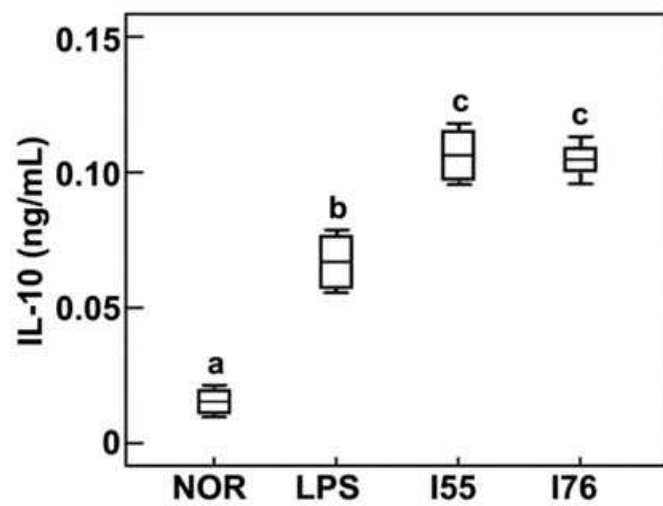
도면1



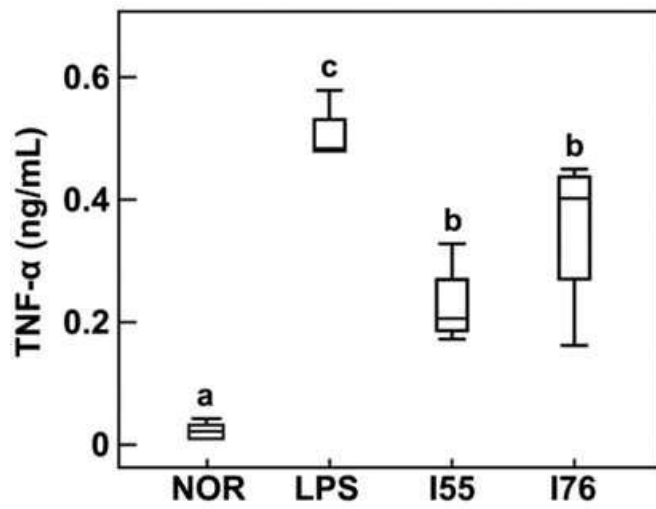
도면2



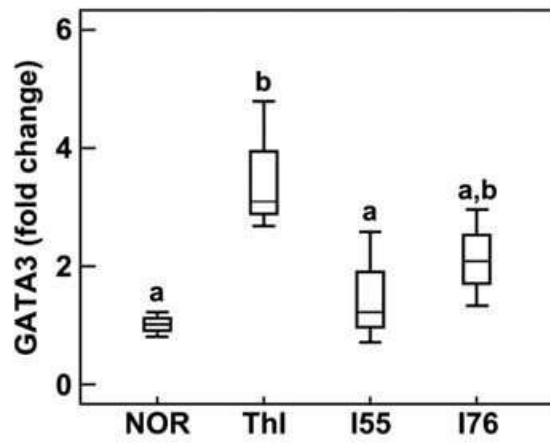
도면3



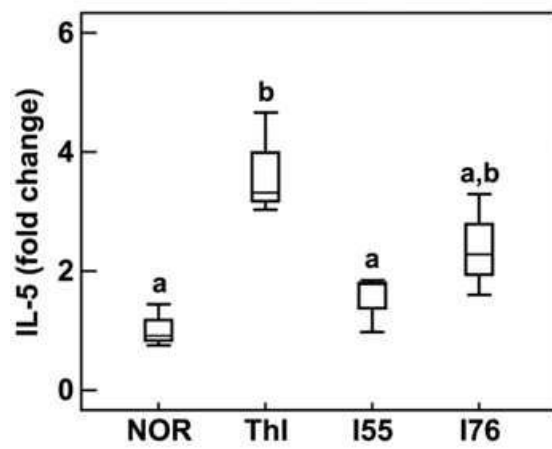
도면4



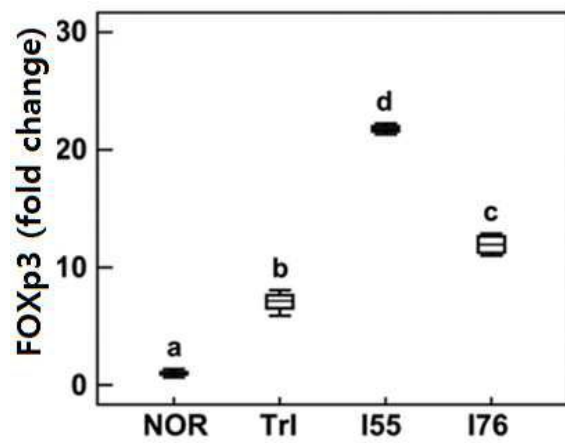
도면5



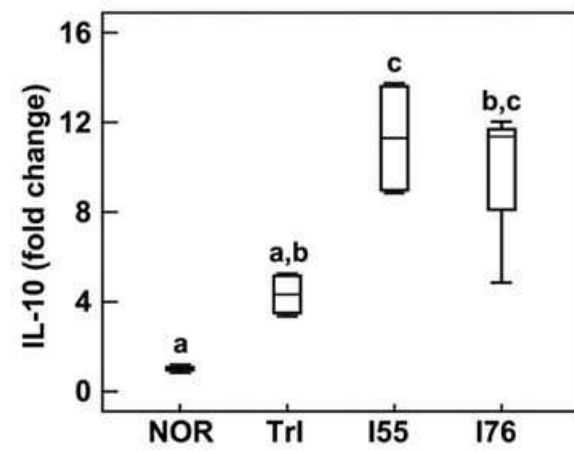
도면6



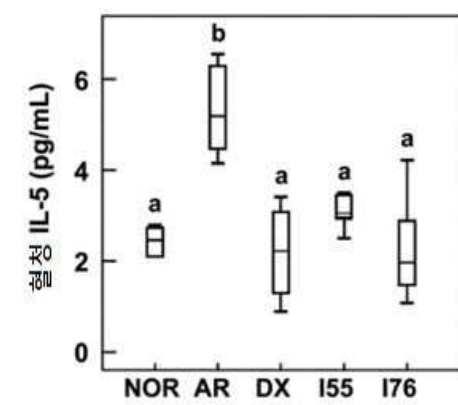
도면7



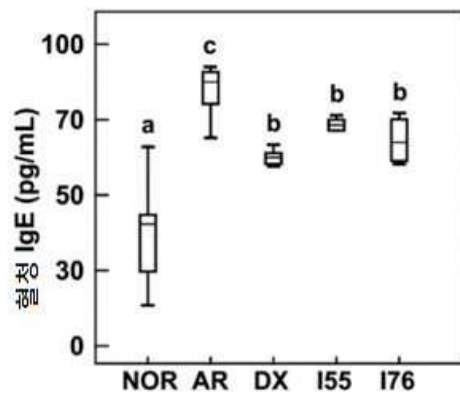
도면8



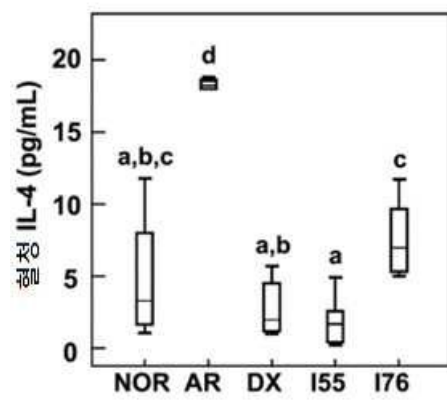
도면9



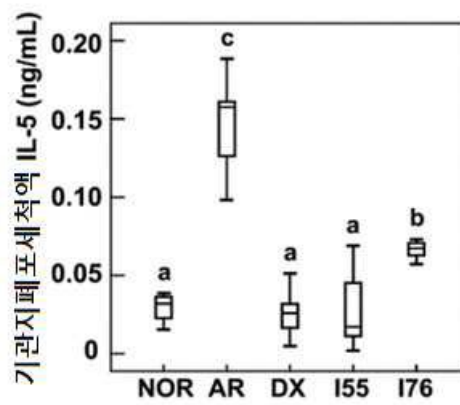
도면10



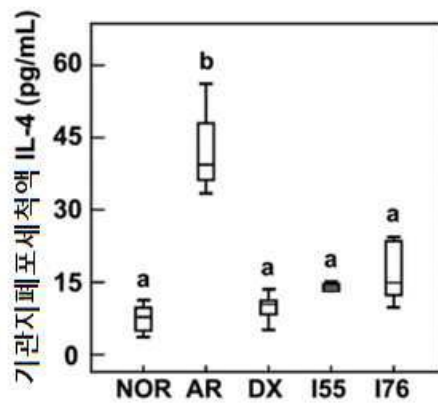
도면11



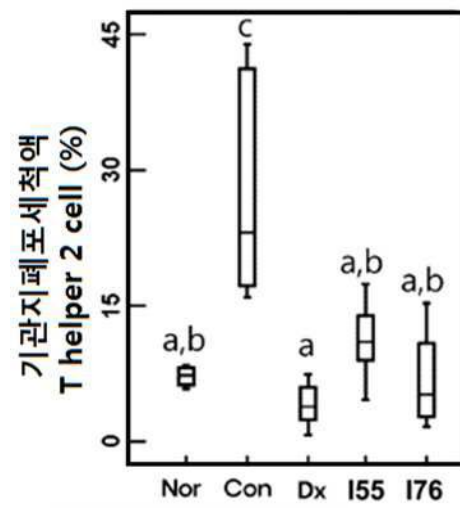
도면12



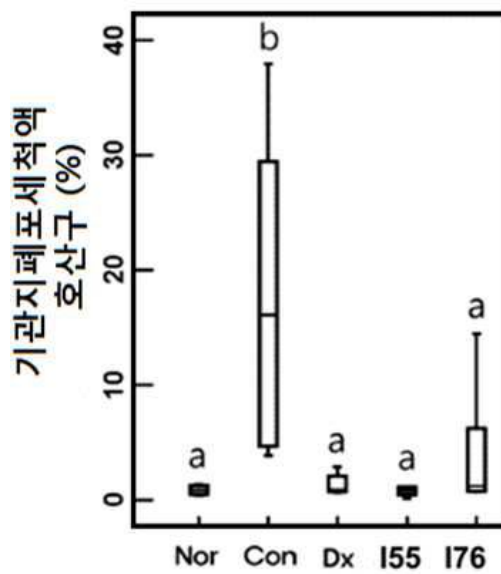
도면13



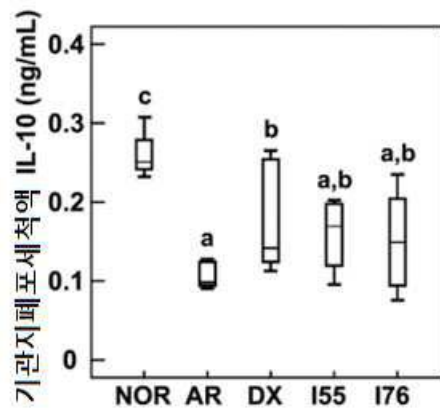
도면14



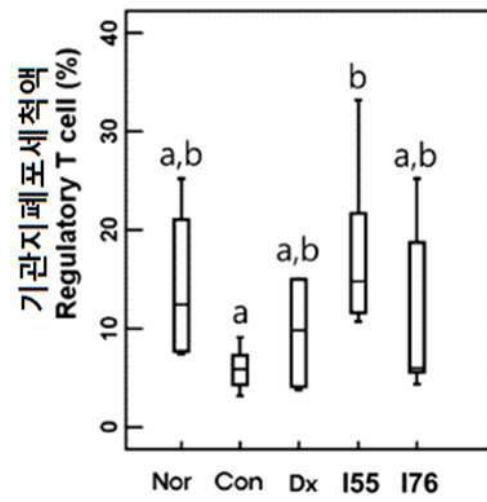
도면15



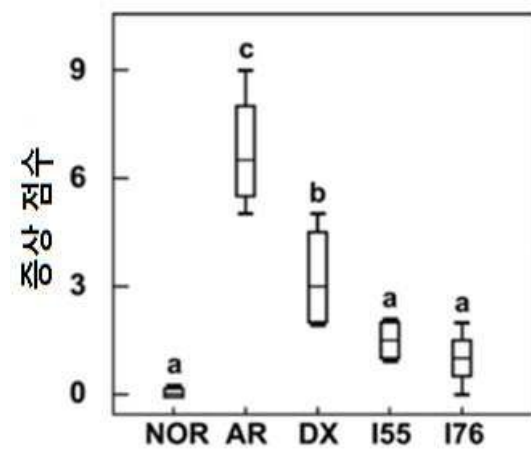
도면16



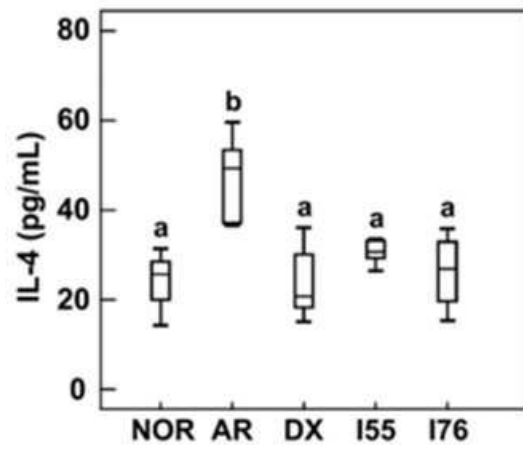
도면17



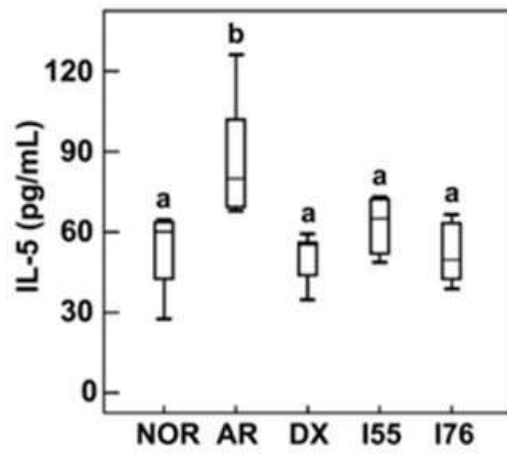
도면18



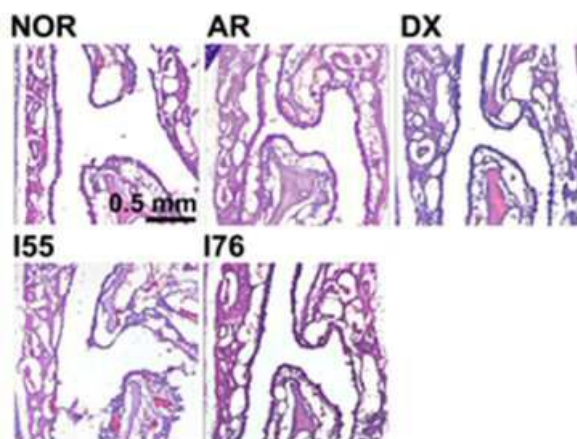
도면19



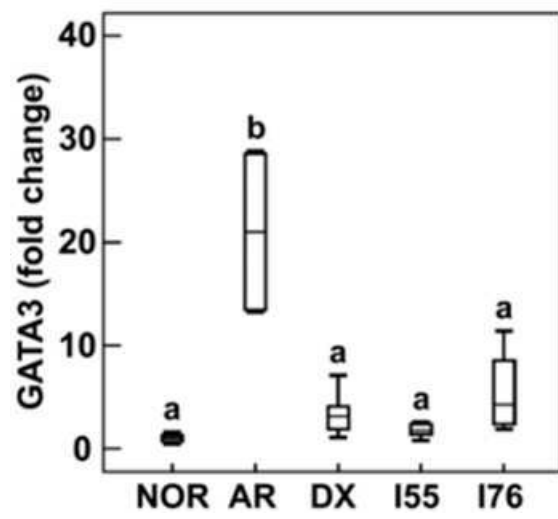
도면20



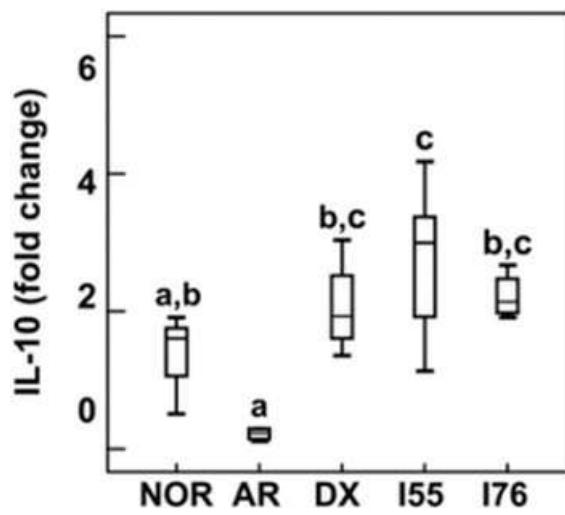
도면21



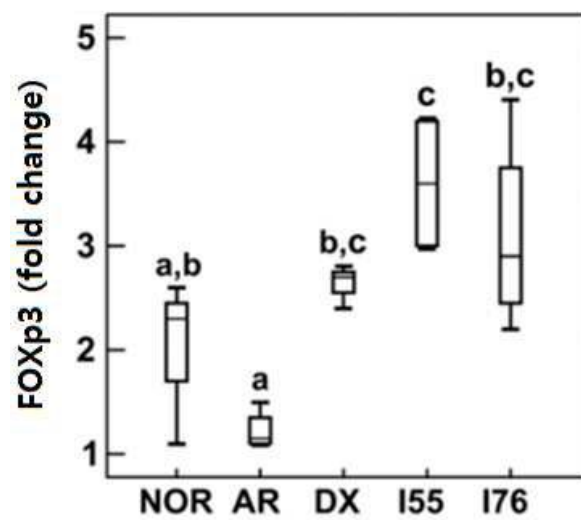
도면22



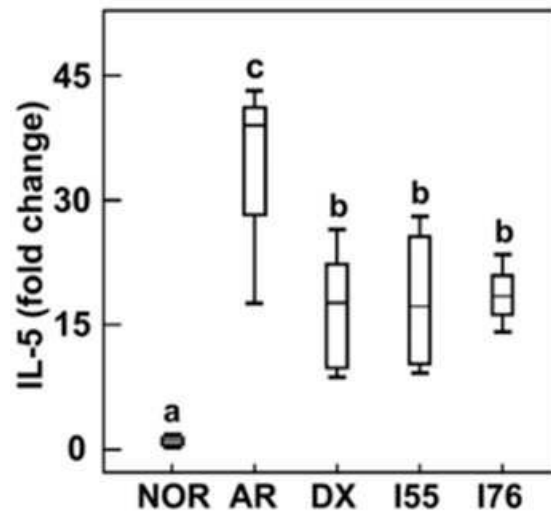
도면23



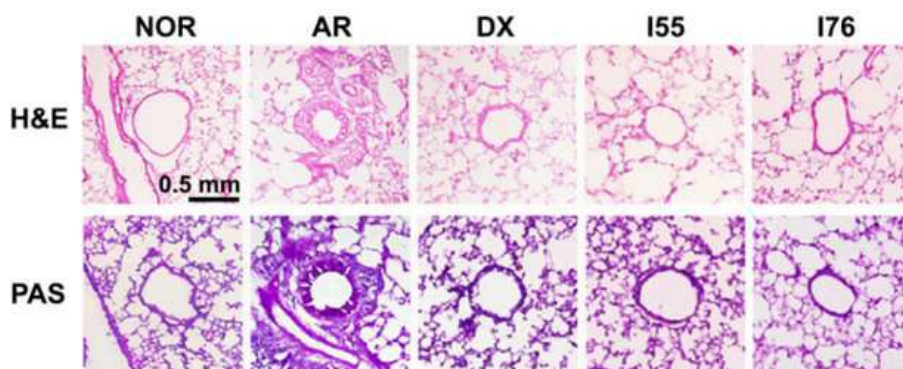
도면24



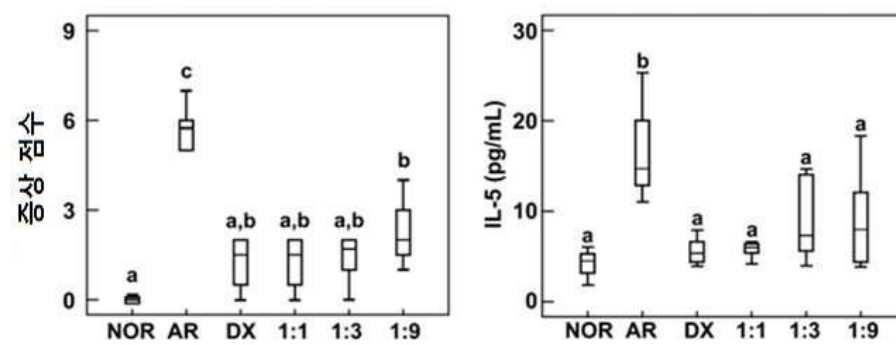
도면25



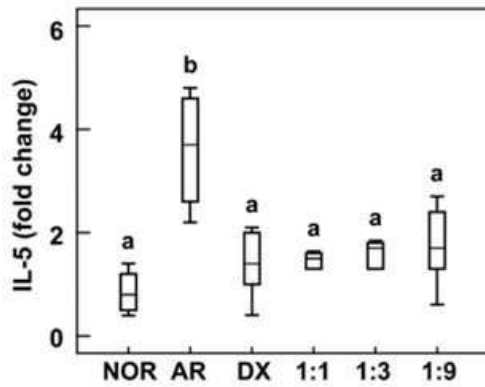
도면26



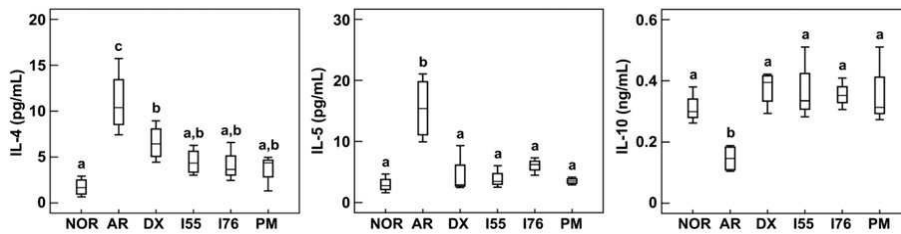
도면27



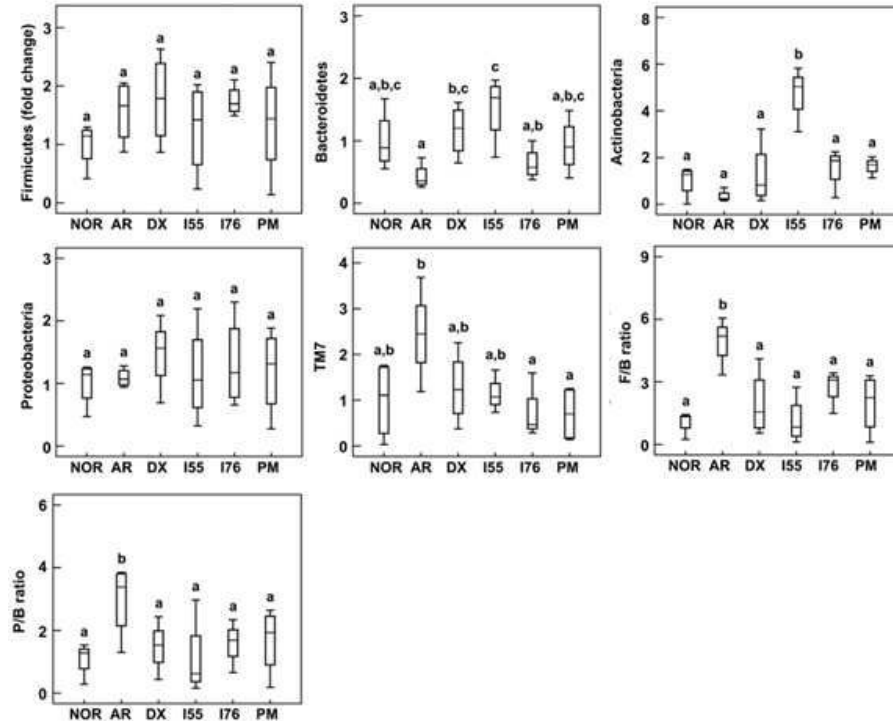
도면28



도면29



도면30



서열 목록

- <110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY
NAVIPHARM CO, LTD
- <120> Novel lactic acid bacteria and use thereof

<130> P17-215-REA-NVP
 <150> KR 10-2017-0013632
 <151> 2017-01-31
 <160> 30
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 1377
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 16S rDNA of Bifidobacterium longum IM55

<400> 1

gacttgacgg ggcggtgtgt acaaggcccg ggaaacgcat tcaccgcgac gttgctgatt	60
cgcgattact agcgactccg ccttcacgca gtcgagttgc agactgcgat ccgaactgag	120
accggttttc agggatccgc tccgcgtcgc cgcgtcgcat cccgttgtac cggccattgt	180
agcatgcgtg aagccctgga cgtaaggggc atgatgatct gacgtcatcc ccacattcct	240
ccgagttaac cccggcggtc ccccgtagt tcccggcata atccgttgge aacacggggc	300
gagggttgcg ctggttgagg gacttaacct aacatctcac gacacgagct gacgacgacc	360
atgcaccacc tgtaaccgg ccccgaggga aagccgtatc tctacgaccg tcgggaacat	420
gtcaagccca ggtaagggtc ttgcggttgc atcgaattaa tccgcatgct ccgccgttg	480
tgccggcccc cgtaatttc tttaggtttt agccttgagg ccgtactccc caggcgggat	540
gcttaacgcg ttagctccga cacggaacct gtggaacggg ccccatatcc agcatccacc	600
gtttacggcg tggactacca gggatatctaa tctgtttgc tccccacgt ttctgtctc	660
agcgtcagta acggcccgga gacctgcctt cgccattggt gttcttcccg atatctacac	720
attccaccgt tacaccggga attccagtct cccctaccgc actcaagccc gcccgtagcc	780
ggcgcggtac caccgttaag cgatggactt tcacaccgga cgcgacgaac cgcctacgag	840
ccctttacgc ccaataatc cggataacgc ttgcacccta cgtattaccg cggctgctgg	900
cacgtagtta gccggtgctt attcaacggg taaactcact ctgcttgct ccccgataaa	960
agaggtttac aacccgaagg cctccatccc tcacgcggcg tcgctgcac aggtttgcgc	1020
ccattgtgca atattcccca ctgctgcctc ccgtaggagt ctgggcccga tctcagtc	1080
aatgtggcgg gtcgacctct caggccggtt acccgtcgaa gccacggtgg gccgttacc	1140
cgccgtcaag ctgataggac gcgaccccat ccataccgc gaaagctttc ccagaagacc	1200
atgcgatcaa ctggagcatc cggcattacc acccgtttcc aggagctatt ccggtgtatg	1260

gggcaggctcg gtcacgcatt actcaccctg tcgccactct caccaccaag caaagcccgga 1320
 tggatcccgt tcgacttgca tgtgttaagc acgccgccag cgttcacct gagccat 1377

<210> 2
 <211> 1421
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 16S rDNA of Lactobacillus plantarum IM76
 <400> 2

ctggtattga ttggtgcttg catcatgatt tacatttgag tgagtggcga actggtgagt 60
 aacacgtggg aaacctgccc agaagcgggg gataacacct ggaaacagat gctaataccg 120
 cataacaact tggaccgcat ggtccgagct tgaaagatgg cttcggctat cacttttgga 180
 tggccccg cggtattagc tagatggtgg ggtaacggct caccatggca atgatacgta 240
 gccgacctga gagggtaatc ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg 300

aggcagcagt agggaatctt ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaac gccgcgtgag 360
 tgaagaaggg tticggctcg taaaactctg ttgttaaaga agaacatac tgagagtaac 420
 tgttcaggta ttacgggtat ttaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc 480
 ggtaatacgt aggtggcaag cgttgtccgg gatttattgg gcgtaaagcg agcgcaggcg 540
 gttttttaag tctgatgta aagccttcgg ctcaaccgaa gaagtgcac ggaaactggg 600
 aaacttgagt gcagaagagg acagtggaac tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagatat 660
 atggaagaac accagtggcg aaggcggctg tctggtctgt aactgacgt gaggtcga 720

agtatgggta gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca taccgtaaac gatgaatgct 780
 aagtgttgga gggtttccgc ctttcagtgc tgcagctaac gcattaagca ttccgcctgg 840
 ggagtacggc cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgac aagcggtgga 900
 gcatgtggtt taattcgaag ctacgcgaag aaccttacc ggtcttgaca tactatgcaa 960
 atctaagaga ttagacgttc ctttcgggga catggataca ggtggtgcat ggttgcgtc 1020
 agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgaacgag cgcaaccctt attatcagtt 1080
 gccagcatta agttgggcac tctggtgaga ctgccgtga caaacggag gaaggtggg 1140

atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cacgtgtac aatggatggt 1200
 acaacgagtt gcgaactgc gagagtaagc taatctctta aagccattct cagttcggat 1260
 tntaggtgc aactgccta catgaagtc gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc 1320
 gcggtgaata cgttcccggg cttgtacac accgccgctc acacatgag agtttgaac 1380

acccaaagtc ggtggggtaa ccttttagga accagccgcc t	1421
<210> 3	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> T-bet F primer	
<400> 3	
cctcttctat ccaaccagta tc	22
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> T-bet R primer	
<400> 4	
ctccgcttca taactgtgt	19
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FN-gamma F primer	
<400> 5	
tcaagtggca tagatgtgga agaa	24
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FN-gamma R primer	
<400> 6	
tggctctgca ggattttcat g	21
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	GATA3 F primer	
<400>	7	
	gaaggcatcc agacccgaaa c	21
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GATA3 R primer	
<400>	8	
	acccatggcg gtgaccatgc	20
<210>	9	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-5 F primer	
<400>	9	
	aaagagaagt gtggcgagga gagac	25
<210>	10	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-5 R primer	
<400>	10	
	ccttcattg cccactctgt actcatc	27
<210>	11	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ROR gamma t F primer	
<400>	11	
	acagccactg cattcccagt tt	22
<210>	12	
<211>	22	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ROR gamma t R primer	
<400>	12	
	tctcggaagg acttcagac at	22
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-17 F primer	
<400>	13	
	tttaactccc ttggcgcaaa a	21
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-17 R primer	
<400>	14	
	ctttccctcc gcattgacac	20
<210>	15	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FOXP3 F primer	
<400>	15	
	cccatcccca ggagtctt	18
<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FOXP3 R primer	
<400>	16	
	accatgacta ggggcactgt a	21
<210>	17	

<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-10 F primer	
<400>	17	
	atgctgcctg ctcttactga ctg	23
<210>	18	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-10 R primer	
<400>	18	
	cccaagtaac ccttaaagtc ctgc	24
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH F primer	
<400>	19	
	tgcagtggca aagtggagat	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH R primer	
<400>	20	
	tttgccgtga gtggagtcac	20
<210>	21	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Firmicutes F primer	
<400>	21	

ggagyatgtg gtttaattcg aagca	25
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Firmicutes R primer	
<400>	
> 22	
agctgacgac aaccatgcac	20
<210> 23	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bacteroidetes F primer	
<400> 23	
aacgcgaaaa accttaccta cc	22
<210> 24	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bacteroidetes R primer	
<400> 24	
tgccctttcg tagcaactag tg	22
<210> 25	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Actinobacteria F primer	
<400> 25	
tgtagcgggtg gaatgcgc	18
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	Actinobacteria R primer	
<400>	26	
aattaagcca catgctccgc t		21
<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	delta/gamma-proteobacteria F primer	
<400>	27	
gctaacgcat taagtryccc g		21
<210>	28	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	delta/gamma-proteobacteria R primer	
<400>	28	
gccatgcr gc acctgtct		18
<210>	29	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TM7 F primer	
<400>	29	
gcaactcttt acgcccagt		19
<210>		
30		
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TM7 R primer	
<400>	30	
gagaggatga tcagccag		18