

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 8월 3일 (03.08.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/131402 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) C12R 1/225 (2006.01)
A61K 35/744 (2014.01) C12R 1/23 (2006.01)
A61K 35/745 (2014.01) C12R 1/25 (2006.01)
A61K 35/747 (2014.01) C12R 1/46 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000792

(22) 국제출원일: 2017년 1월 24일 (24.01.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0010761 2016년 1월 28일 (28.01.2016) KR

(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김동현 (KIM, Dong Hyun); 02823 서울시 성북구 선잠로 92-24 (성북동), Seoul (KR). 한명주 (HAN, Myung Joo); 02823 서울시 성북구 선잠로 92-24 (성북동), Seoul (KR).

(74) 대리인: 고영갑 (KO, Young Kap); 13636 경기도 성남시 분당구 성남대로 69, 410 호(구미동,로드랜드 EZ 타워), Gyeonggi-do (KR).

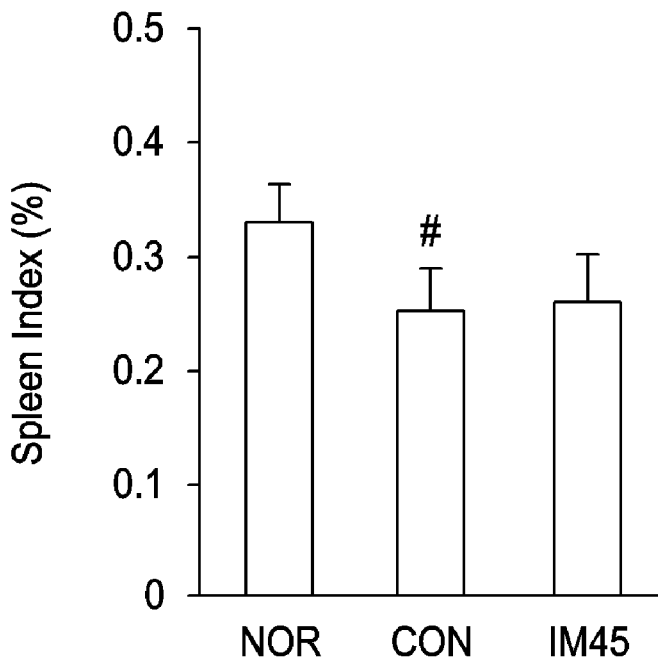
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL HUMAN GUT-DERIVED LACTIC ACID BACTERIA HAVING IMMUNE REGULATORY FUNCTION, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 면역조절 작용을 가는 사람 소화관 유래 신규 유산균 및 이의 용도



(57) Abstract: According to the present invention, a specific *Lactobacillus* sp. strain, a specific *Bifidobacterium* sp. strain, a specific *Streptococcus* sp. strain or a specific *Collinsella* sp. strain is isolated from human feces, and thus has high safety, and has various physiological activities such as an immune regulatory effect, an immune enhancement effect, an anti-allergic effect, an anti-inflammatory effect, a colitis alleviation effect, an arthritis alleviation effect, an anti-obesity effect, an anti-stress effect, an anti-anxiety effect, an anti-depression effect or an anti-schizophrenia effect. According to the present invention, the specific *Lactobacillus* sp. strain, the specific *Bifidobacterium* sp. strain, the specific *Streptococcus* sp. strain or the specific *Collinsella* sp. strain can be used as a material for immune regulation, immune enhancement, inflammatory response inhibition, and stress alleviation, and can also be used as a functional food and pharmaceutical material useful for preventing, alleviating or treating allergic diseases, inflammatory diseases, colitis, arthritis, obesity, anxiety disorders, depression, schizophrenia or the like.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/131402 A1

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주, 특정 비피도박테리움속 균주, 특정 스트렙토코커스속 균주 또는 특정 콜린셀라속 균주는 사람의 분변에서 분리되어 안전성이 높고 면역조절 효능, 면역증강 효능, 항알러지 효능, 항염증 효능, 대장염 개선 효능, 관절염 개선 효능, 항비만 효능, 항스트레스 효능, 항불안 효능, 항우울 효능 또는 항정신분열 효능과 같은 다양한 생리활성을 갖는다. 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주, 특정 비피도박테리움속 균주, 특정 스트렙토코커스속 균주 또는 특정 콜린셀라속 균주는 면역조절, 면역증강, 염증반응 억제, 스트레스 완화를 위한 소재로 사용될 수도 있고, 알러지 질환, 염증 질환, 대장염, 관절염, 비만, 불안 장애, 우울증 또는 정신분열증 등을 예방, 개선 또는 치료하는데에 유용한 기능성 식의약 소재로도 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 면역조절 작용을 가는 사람 소화관 유래 신규 유산균 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 신규 유산균 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 사람 소화관에서 유래되고, 면역조절 효능, 면역증강 효능, 항알러지 효능, 항염증 효능, 대장염 개선 효능, 관절염 개선 효능, 항비만 효능, 항스트레스 효능, 항불안 효능, 항우울 효능 또는 항정신분열 효능 등과 같은 다양한 생리활성을 가진 신규 유산균 및 신규 유산균의 다양한 식의약적 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 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 면역력 저하, 장내세균총의 교란, 대장염, 관절염, 알러지 질환, 비만 등이 급격하게 증가하고 있다.

[3]

- [4] 장내세균총의 교란과 면역세포

- [5] 우리 몸의 소화관에는 많은 세균들이 서식하고 있다. 우리 몸에는 정상세포가 약 10조 개가 있는 반면, 세균의 수는 그보다 10배쯤 더 많은 100조 개 정도이다. 이러한 세균의 대부분은 장내세균총을 이루고 있으며 장에 존재하는 다양한 면역세포와의 상호작용을 통해 인체의 면역조절에 영향을 미치고 있다. 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 대장균(*E. coli*), 베일로넬라(*Veillonella*), 웰치균(*Clostridium perfringens*) 등의 유해균보다 우세균으로 점하면서 다양한 소화관 서식 미생물들이 균형을 유지할 때 건강을 유지할 수 있다.

- [6] 우리 몸의 면역세포들은 외부에서 침입하는 항원(미생물 포함)과 내적으로 생기는 이상 세포를 제어하여 건강을 유지하도록 해준다. 이 면역세포의 70% 이상이 소화관에 위치하고 있으며, 소화관에 이미 서식하고 있는 미생물 또는 외부에서 침입하는 미생물들을 제어한다. 인체의 면역조절 작용에 문제가 생기는 경우 면역력 저하나 면역과민반응이 야기되고, 그로 인해 바이러스 감염, 암, 염증성 질환, 장염(궤양성 대장염, 크론병, 게실증 등), 알러지 질환, 아토피, 관절염, 비만, 당뇨병 등과 같은 질환이 유발될 수 있다. 따라서, 상기 질환들의 발생을 효율적으로 제거하기 위해서는 장내세균총의 교란을 제어하고,

소화관의 면역계를 정상적으로 잘 작동하도록 하는 것이 필요하다.

[7]

[8] 대장염

[9]

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 완화시키고, 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 살라조설파피리딘은 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.

[10]

[11] 알러지 질환

[12]

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 개선되지 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.

[13]

[14] 비만

[15] 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 영양장애일 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, 지방흡수억제제로 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.

[16]

[17] 프로바이오틱스(probiotics)와 유산균

[18] 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 기본적으로 내산성, 내담즙성 및 장 상피세포 부착능력이 우수하여야 한다. 유산균은 인체의 소화계에 공생하면서

섬유질 및 복합 단백질들을 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 faecium* 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, Stephen 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]. 이러한 유산균의 다양한 생리활성이 알려지면서, 최근 인체에 안전하면서도 기능이 우수한 유산균 균주를 개발하고 이를 의약품 또는 기능성 식품으로 적용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

- [19] 예를 들어, 대한민국 등록특허공보 제10-1486999호에는 장질환 및 면역 질환의 예방 치료에 유용한 락토바실러스 플란타룸 CJLP133(*Lactobacillus plantarum* CJLP133) KCTC 11403BP가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1500974호에는 항염증 및 비만, 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증, 지방간 및 심혈관질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 대사성 질환 개선 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HAC01 균주 (기탁번호: KCTC 12647BP)가 개시되어 있다. 또한, 유럽 공개특허공보 제01941892호에는 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) PM-A0002(기탁번호 : M 207038)를 유효성분으로 포함하는 알러지 치료용 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2005-0057259호에는 락토바실러스 퍼멘텀 변종(*Lactobacillus fermentum* variant) VRI003(기탁번호 NM02/31074)을 유효성분으로 포함하고, 과민성 대장증상(irritable bowel syndrome), 염증성 대장질환(inflammatory bowel disease) 등과 같은 위장 질환을 치료하는데에 사용되는 조성물이 개시되어 있다. 또한, 일본 등록특허공보 제5273695호에는 비피도박테리움 롱검 OLB6001(

Bifidobacterium longum OLB6001, 수탁 번호 : FERM P-13610), 비피도박테리움 롱검 OLB6290(*Bifidobacterium longum* OLB6290, 수탁 번호 : NITE P-75)을 유효성분으로 포함하는 알러지 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있다. 또한, 미국 공개특허공보 제20060177424호에는 스트렙토코커스 패칼리스(*Streptococcus faecalis*)를 투여하여 알러지 질환, 과민성 대장증상(irritable bowel syndrome) 등을 치료하는 방법이 개시되어 있다.

- [20] 그러나, 장내세균총의 교란을 제어하고 면역조절 이상의 정상화를 통해 현대인에게 발병이 증가하고 있는 염증성 질환, 대장염, 관절염, 알러지 질환, 아토피, 비만 등을 총체적으로 개선하거나 치료할 수 있는 유산균 관련 기술은 출현하지 않고 있는바 다양한 기능성을 가지면서 상업화 수준의 효능을 가진 새로운 균주의 스크리닝 및 이의 통한 의약품, 기능성 식품 등의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [21] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 일 목적은 면역조절 효능, 면역증강 효능, 염증반응 억제 효능, 대장염 개선 효능, 관절염 개선 효능, 항비만 효능 또는 항알러지 효능 등과 같이 장내세균총 교란의 제어 및 면역조절 이상의 정상화에 필요한 다양한 생리활성 또는 기능성을 가진 신규 유산균을 제공하는데에 있다. 또한, 본 발명의 목적은 항스트레스 효능, 항불안 효능, 항우울 효능 또는 항정신분열 효능을 갖는 신규 유산균을 제공하는데에 있다. 또한, 본 발명의 다른 목적은 신규 유산균의 다양한 식의약적 용도를 제공하는데에 있다.

과제 해결 수단

- [22] 본 발명의 발명자들은 사람 분변으로부터 무수한 유산균을 스크리닝하고, 이중 특정 락토바실러스속 균주, 특정 비피도박테리움속 균주, 특정 스트렙토코커스속 균주 또는 특정 콜린셀라속 균주가 우수한 면역조절 효능, 면역증강 효능, 항알러지 효능, 항염증 효능, 대장염 개선 효능, 관절염 개선 효능 또는 항비만 효능을 가진다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [23] 본 발명의 일 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2, 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26, 비피도박테리움 아도레스센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45 및 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50으로 이루어진 군에서 선택되는 유산균으로서, 면역조절 효능, 면역증강 효능, 항알러지 효능, 항염증 효능, 대장염 개선 효능, 관절염 개선 효능, 항비만 효능, 항스트레스 효능,

- 항불안 효능, 항우울 효능 또는 항정신분열 효능을 갖는 유산균을 제공한다.
- [24] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 비만 또는 대장염을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7 또는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26에서 선택되는 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 알러지 질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 알러지 질환, 대장염, 관절염 또는 비만을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역조절 또는 항염증용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 알러지 질환, 대장염, 관절염 또는 비만을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역조절 또는 항염증용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스 완화용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 불안 장애, 우울증 또는 정신분열증을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상; 및 비큐쿨린(bicuculine) 또는 N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide hydrochloride(WAY-100635 hydrochloride; CAS 등록번호 : 146714-97-8)에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 스트레스 완화용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상; 및 비큐쿨린(bicuculine) 또는

N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide hydrochloride(WAY-100635 hydrochloride; CAS 등록번호 : 146714-97-8)에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고, 불안 장애, 우울증 또는 정신분열증을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45, 이의 배양물, 이의 과쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50, 이의 배양물, 이의 과쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [25] 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주, 특정 비피도박테리움속 균주, 특정 스트렙토코커스속 균주 또는 특정 콜린셀라속 균주는 사람의 분변에서 분리되어 안전성이 높고 면역조절 효능, 면역증강 효능, 항알러지 효능, 항염증 효능, 대장염 개선 효능, 관절염 개선 효능, 항비만 효능, 항스트레스 효능, 항불안 효능, 항우울 효능 또는 항정신분열 효능과 같은 다양한 생리활성을 갖는다. 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주, 특정 비피도박테리움속 균주, 특정 스트렙토코커스속 균주 또는 특정 콜린셀라속 균주는 면역조절, 면역증강, 염증반응 억제, 스트레스 완화를 위한 소재로 사용될 수도 있고, 알러지 질환, 염증 질환, 대장염, 관절염, 비만, 불안 장애, 우울증 또는 정신분열증 등을 예방, 개선 또는 치료하는데에 유용한 기능성 식의약 소재로도 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 체중 증가량을 나타낸 것이고, 도 2는 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 비장 무게 변화를 나타낸 것이고, 도 3은 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 혈청 내 IFN- γ 의 양을 나타낸 것이고, 도 4는 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 혈청 내 IL-2의 양을 나타낸 것이고, 도 5는 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 혈청 내 TNF- α 의 양을 나타낸 것이다.
- [27] 도 6은 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여한 후 적출한 비장 내 NK 세포의 암세포에 대한 세포독성을 나타낸 것이고, 도 7은 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여한 후 적출한 비장 내 Cytotoxic T 세포의 암세포에 대한 세포독성을 나타낸 것이다.
- [28] 도 8은 콜라겐 면역원에 의해 관절염이 유도된 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 발의 부피 증가 또는 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성으로 나타낸 것이고, 도 9는

콜라겐 면역원에 의해 관절염이 유도된 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인으로 나타낸 것이고, 도 10은 콜라겐 면역원에 의해 관절염이 유도된 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 염증 반응 지표 물질로 나타낸 것이다.

- [29] 도 11은 비만 유도 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 체중 변화량 등으로 나타낸 것이고, 도 12는 비만 유도 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 대장의 외관 점수 및 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성으로 나타낸 것이고, 도 13은 비만 유도 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인으로 나타낸 것이다.
- [30] 도 14는 결박 스트레스에 의해 불안 증상이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38이 미치는 영향을 open arm에 머문 시간의 비율과 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율로 나타낸 것이다. 또한, 도 15는 결박 스트레스에 의해 불안 증상이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38이 미치는 영향을 코티코스테론(corticosterone), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)의 함량으로 나타낸 것이다.
- [31] 도 16은 결박 스트레스에 의해 불안 증상이 유도된 모델동물에서 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38의 항불안 활성에 대해 플루마제닐(Flumazenil), 비큐클린(Bicuculine) 또는 WAY-100635이 미치는 영향을 open arm에 머문 시간의 비율과 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율로 나타낸 것이다.
- [32] 도 17은 결박 스트레스에 의해 불안 증상이 유도된 모델동물에서 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38의 항불안 활성에 대해 플루마제닐(Flumazenil), 비큐클린(Bicuculine) 또는 WAY-100635이 미치는 영향을 코티코스테론(corticosterone), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)의 함량으로 나타낸 것이다.
- [33] 도 18은 결박 스트레스를 가하지 않은 모델동물의 불안 행동에 대해 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38 또는 박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38과 플루마제닐(Flumazenil)의 병용이 미치는 영향을 open arm에 머문 시간의 비율과 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율로 나타낸 것이다.
- [34] 도 19는 결박 스트레스를 가하지 않은 모델동물의 불안 행동에 대해 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38 또는 박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38과 플루마제닐(Flumazenil)의 병용이 미치는 영향을 코티코스테론(corticosterone), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)의 함량으로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [35] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [36] 본 발명에서 사용되는 용어 "배양물"이란 미생물을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하여, 미생물이 포함되는 개념이다.
- [37] 본 발명에서 "약학적으로 허용가능한" 및 "식품학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.
- [38] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [39] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [40] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소 또는 완화시키는 모든 행위를 의미한다.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [44] 본 발명의 일 측면은 다양한 생리활성을 갖는 신규 유산균에 관한 것이다.
- [45] 본 발명의 일 예에 따른 신규 유산균은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2, 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26, 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45 및 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50으로 이루어진 군에서 선택되고, 면역조절 효능, 면역증강 효능, 항알러지 효능, 항염증 효능, 대장염 개선 효능, 관절염 개선 효능, 항비만 효능, 항스트레스 효능, 항불안 효능, 항우울 효능 또는 항정신분열 효능을 갖는다.
- [46] 상기 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2는 바람직하게는 탄소원으로 D-리보스, D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, 만니톨, 솔비톨, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), 셀로바이오스,

말토스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 멜레지토스 및 D-투라노스를 이용한다. 상기 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7은 바람직하게는 탄소원으로 D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), 셀로바이오스, 말토스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 래피노스(raffinose) 및 젠티오바이오스를 이용한다. 상기 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P)는 바람직하게는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하고, 더 바람직하게는 에스쿨린(Esculin)을 이용한다. 상기 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26은 바람직하게는 탄소원으로 L-아라비노스, D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, 만니톨, 솔비톨, 에스쿨린(Esculin), 말토스, 락토스, 멜리바이오스(Melibiose), 멜레지토스, 래피노스(raffinose) 및 젠티오바이오스를 이용한다. 상기 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P)은 바람직하게는 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하고, 더 바람직하게는 탄소원으로 D-자일로스, D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, 말토스 및 멜리바이오스(Melibiose)를 이용한다. 상기 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45는 바람직하게는 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하고, 더 바람직하게는 탄소원으로 D-리보스, D-프럭토스, 덜시톨(Dulcitol), 솔비톨, 아미그달린, 멜레지토스, 전분, 글리코젠, 소듐피루베이트(Sodium pyruvate), 히푸르산(Hippuric acid) 및 에스쿨린 구연산철(Esculin ferric citrate)을 이용한다. 상기 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50은 바람직하게는 탄소원으로 D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, N-아세틸-글루코사민, 말토스, 락토스, 수크로스 및 D-타가토스를 이용한다.

[47]

[48]

본 발명의 다른 측면은 신규 유산균의 다양한 식의약적 용도에 관한 것이다. 신규 유산균의 용도로, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 비만 또는 대장염을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7 또는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26에서 선택되는 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 알러지 질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 알러지 질환, 대장염, 관절염 또는 비만을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P),

이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역조절 또는 항염증용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 알러지 질환, 대장염, 관절염 또는 비만을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역조절 또는 항염증용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스 완화용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 불안 장애, 우울증 또는 정신분열증을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상; 및 비큐쿨린(bicuculine) 또는 N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide hydrochloride(WAY-100635 hydrochloride; CAS 등록번호 : 146714-97-8)에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 스트레스 완화용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상; 및 비큐쿨린(bicuculine) 또는 N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide hydrochloride(WAY-100635 hydrochloride; CAS 등록번호 : 146714-97-8)에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고, 불안 장애, 우울증 또는 정신분열증을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에서 상기 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2, 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26, 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P),

스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45 및 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50의 기술적 특징은 전술한 바와 동일하므로 설명을 생략한다.

- [49] 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 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. 또한, 상기 관절염은 류머티스 관절염을 포함한다. 또한, 본 발명의 항염증용 조성물은 염증 반응을 억제하거나 염증 질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도로 사용될 수 있다. 상기 염증 질환은 염증 반응에 의해 유발되는 질환이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 세균 감염에 의한 염증성 질환, 바이러스 감염에 의한 염증성 질환을 모두 포함한다.
- [50] 본 발명에서 유산균의 배양물은 소정의 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.
- [51] 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 등의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.
- [52] 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분인 신규 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, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물 외에 면역조절 효과, 면역증강 효과, 항염증 효과, 항스트레스 효과, 알러지 질환, 염증 질환, 대장염, 관절염, 비만, 불안 장애, 우울증 또는 정신분열증의 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 충전제, 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 스테arate 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, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 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 적절한 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, 배설을 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 내지 2000 mg/kg이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

- [53] 또한, 본 발명에 따른 식품 조성물에서 유효성분인 신규 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, 스낵류, 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, 슈크로스와 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.

[54]

[55] 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.

[56]

[57] 1. 유산균의 분리 및 동정

[58] (1) 사람 분변으로부터 유산균의 분리

[59] 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 락토바실러스속 균주(*Lactobacillus* sp.), 비피도박테리움속(*Bifidobacterium* sp.) 균주, 스트렙토코커스속 균주(*Streptococcus* sp.), 콜린셀라속 균주(*Collinsella* sp.)들을 분리하였다.

[60]

[61] (2) 선별한 유산균의 동정

[62] 사람 분변으로부터 분리한 균주들의 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석하여 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다. 하기 표 1은 사람 분변에서 분리된 유산균의 관리번호 및 균주명을 나타낸 것이다.

[63] [표1]

관리번호	균주명
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM2
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM5
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM6
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM7
5	<i>Lactobacillus fermentum</i> IM12
6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IM15
7	<i>Lactobacillus johnsonii</i> IM18
8	<i>Lactobacillus johnsonii</i> IM20
9	<i>Bifidobacterium longum</i> IM23
10	<i>Bifidobacterium longum</i> IM26
11	<i>Bifidobacterium longum</i> IM27
12	<i>Bifidobacterium infantis</i> IM30
13	<i>Bifidobacterium infantis</i> IM32
14	<i>Bifidobacterium breve</i> IM33
15	<i>Bifidobacterium breve</i> IM36
16	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM38
17	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM39
18	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IM42
19	<i>Streptococcus faecium</i> IM45
20	<i>Streptococcus faecium</i> IM46
21	<i>Streptococcus faecium</i> IM49
22	<i>Collinsella aerofaciens</i> IM50

[64] 상기 표 1에 기재된 균주들 중 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12의 화학분류학적 특성으로 16S rDNA를 측정하였고, 그 결과 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12의 16S rDNA 염기서열을 Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 균주는 검색되지 않았고, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 균주 CIP 102980의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다.

- [65] 또한, 상기 표 1에 기재된 균주들 중 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38의 화학분류학적 특성으로 16S rDNA를 측정하였고, 그 결과 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38의 16S rDNA 염기서열을 Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) 균주는 검색되지 않았고, 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) 균주 BBMN23의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다.
- [66] 또한, 상기 표 1에 기재된 균주들 중 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45의 화학분류학적 특성으로 16S rDNA를 측정하였고, 그 결과 서열번호 3의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45의 16S rDNA 염기서열을 Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 엔테로코커스 파에시엄(*Enterococcus faecium*) 균주 Aus0004의 16S rDNA 서열과 99%의 상동성을 보였다.
- [67] 또한, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2, 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26, 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38, 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45 및 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50의 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 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이고, 하기 표 3은 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이고, 하기 표 4는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이고, 하기 표 5는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이고, 하기 표 6은 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이고, 하기 표 7은 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이고, 하기 표 8은 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50의 탄소원 이용성 결과를 나타낸 것이다. 하기 표 2 내지 표 8에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타내고, "±"는 탄소원 이용성 여부가 모호한 경우를 나타낸다. 하기 표 2 내지 표 8에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2, 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus*

fermentum) IM12, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26, 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38, 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45, 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50은 일부 탄소원에 대해서 동일 종의 균주와 다른 이용성을 보였다. 특히, 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45의 경우 만니톨을 탄소원으로 이용하지 못하고, 글리코젠 및 전분을 동시에 탄소원으로 이용하였다. 통상적인 엔테로코커스 파에시엄(*Enterococcus faecium*) 균주는 만니톨을 탄소원으로 이용하고, 글리코젠 및 전분을 동시에 탄소원으로 이용하지 못하는 것으로 알려져 있다.

[68] [표2]

탄소원	균주명	탄소원	균주명
	<i>Lactobacillus plantarum</i> IM2		<i>Lactobacillus plantarum</i> IM2
glycerol	-	cellobiose	+
erythritol	-	maltose	+
D-arabinose	-	lactose	+
L-arabinose	-	melibiose	-
D-ribose	+	sucrose	+
D-xylose	-	trehalose	+
L-xylose	-	inulin	-
D-adonitol	-	melezitose	+
methyl-β-D-xylopyrano side	-	raffinose	-
D-galactose	+	starch	-
D-glucose	+	glycogen	-
D-fructose	+	xylitol	-
D-mannose	+	gentiobiose	±
L-sorbose	-	D-turanose	+
L-rhamnose	-	D-lyxose	-
dulcitol	-	D-tagatose	-
inositol	-	D-fucose	-
mannitol	+	L-fucose	-
sorbitol	+	D-arabitol	-
α-methyl-D-mannoside	±	L-arabitol	-
α-methly-D-glucoside	-	glucoNaTe	±
N-acetyl-glucosamine	+	2-keto-gluconate	-
amygdalin	+	5-keto-gluconate	-
arbutin	+	sodium pyruvate	
esculin	+	hippuric acid	
salicin	+	esculin ferric	

		citrate	
--	--	---------	--

[69]

[70] [표3]

탄소원	균주명	탄소원	균주명
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM7		<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM7
glycerol	-	cellobiose	+
erythritol	-	maltose	+
D-arabinose	-	lactose	+
L-arabinose	-	melibiose	-
D-ribose	-	sucrose	+
D-xylose	-	trehalose	+
L-xylose	-	inulin	-
D-adonitol	-	melezitose	-
methyl-β-D-xylopyrano side	-	raffinose	+
D-galactose	+	starch	-
D-glucose	+	glycogen	-
D-fructose	+	xylitol	-
D-mannose	+	gentiobiose	+
L-sorbose	-	D-turanose	±
L-rhamnose	-	D-lyxose	-
dulcitol	-	D-tagatose	-
inositol	-	D-fucose	-
mannitol	-	L-fucose	-
sorbitol	-	D-arabitol	-
α-methyl-D-mannoside	-	L-arabitol	-
α-methly-D-glucoside	-	glucoNaTe	-
N-acetyl-glucosamine	+	2-keto-gluconate	-
amygdalin	+	5-keto-gluconate	-
arbutin	+	sodium pyruvate	
esculin	+	hippuric acid	
salicin	+	esculin ferric	

		citrate	
--	--	---------	--

[71]

[72] [표4]

탄소원	균주명	탄소원	균주명
	<i>Lactobacillus fermentum</i> IM12		<i>Lactobacillus fermentum</i> IM12
glycerol	-	cellobiose	-
erythritol	-	maltose	-
D-arabinose	-	lactose	-
L-arabinose	±	melibiose	±
D-ribose	±	sucrose	±
D-xylose	±	trehalose	-
L-xylose	-	inulin	±
D-adonitol	-	melezitose	-
methyl-β-D-xylopyrano side	-	raffinose	-
D-galactose	±	starch	-
D-glucose	±	glycogen	±
D-fructose	±	xylitol	-
D-mannose	±	gentiobiose	-
L-sorbose	-	D-turanose	-
L-rhamnose	-	D-lyxose	-
dulcitol	-	D-tagatose	-
inositol	-	D-fucose	-
mannitol	-	L-fucose	-
sorbitol	-	D-arabitol	-
α-methyl-D-mannoside	-	L-arabitol	±
α-methly-D-glucoside	±	glucoNaTe	-
N-acetyl-glucosamine	-	2-keto-gluconate	-
amygdalin	±	5-keto-gluconate	-
arbutin	-	sodium pyruvate	
esculin	+	hippuric acid	

salicin	-	esculin ferric citrate	
---------	---	---------------------------	--

[73]

[74] [표5]

탄소원	균주명	탄소원	균주명
	<i>Bifidobacterium</i> longum IM26		<i>Bifidobacterium</i> longum IM26
glycerol	-	cellobiose	-
erythritol	-	maltose	+
D-arabinose	-	lactose	+
L-arabinose	+	melibiose	+
D-ribose	-	sucrose	±
D-xylose	-	trehalose	±
L-xylose	-	inulin	-
D-adonitol	-	melezitose	+
methyl-β-D-xylopyran oside	-	raffinose	+
D-galactose	+	starch	-
D-glucose	+	glycogen	-
D-fructose	+	xylitol	-
D-mannose	-	gentiobiose	+
L-sorbose	-	D-turanose	±
L-rhamnose	-	D-lyxose	-
dulcitol	-	D-tagatose	-
inositol	-	D-fucose	-
mannitol	+	L-fucose	-
sorbitol	+	D-arabitol	-
α-methyl-D-mannosid e	-	L-arabitol	-
α-methly-D-glucoside	-	glucoNaTe	-
N-acetyl-glucosamine	-	2-keto-gluconate	-
amygdalin	-	5-keto-gluconate	-
arbutin	-	sodium pyruvate	
esculin	+	hippuric acid	

salicin	-	esculin ferric citrate	
---------	---	------------------------	--

[75]

[76] [표6]

탄소원	균주명	탄소원	균주명
	<i>Bifidobacterium</i> adolescentis IM38		<i>Bifidobacterium</i> adolescentis IM38
glycerol	-	cellobiose	-
erythritol	-	maltose	+
D-arabinose	-	lactose	-
L-arabinose	-	melibiose	+
D-ribose	±	sucrose	-
D-xylose	+	trehalose	-
L-xylose	-	inulin	-
D-adonitol	-	melezitose	-
methyl-β-D-xylopyran oside	-	raffinose	-
D-galactose	+	starch	-
D-glucose	+	glycogen	-
D-fructose	+	xylitol	-
D-mannose	+	gentiobiose	-
L-sorbose	-	D-turanose	-
L-rhamnose	-	D-lyxose	-
dulcitol	-	D-tagatose	-
inositol	-	D-fucose	-
mannitol	-	L-fucose	-
sorbitol	-	D-arabitol	-
α-methyl-D-mannoside	-	L-arabitol	-
α-methly-D-glucoside	-	glucoNaTe	±
N-acetyl-glucosamine	-	2-keto-gluconate	-
amygdalin	-	5-keto-gluconate	-
arbutin	-	sodium pyruvate	
esculin	-	hippuric acid	

salicin	-	esculin ferric citrate	
---------	---	---------------------------	--

[77]

[78] [표7]

탄소원	균주명	탄소원	균주명
	<i>Streptococcus faecium</i> IM45		<i>Streptococcus faecium</i> IM45
glycerol		cellobiose	
erythritol		maltose	
D-arabinose		lactose	
L-arabinose		melibiose	
D-ribose	+	sucrose	
D-xylose		trehalose	
L-xylose		inulin	
D-adonitol		melezitose	+
methyl-β-D-xylopyranoside		raffinose	
D-galactose		starch	+
D-glucose		glycogen	+
D-fructose	+	xylitol	
D-mannose		gentiobiose	
L-sorbose		D-turanose	
L-rhamnose		D-lyxose	
dulcitol	+	D-tagatose	
inositol		D-fucose	
mannitol	-	L-fucose	
sorbitol	+	D-arabitol	
α-methyl-D-mannoside		L-arabitol	
α-methyl-D-glucoside		glucoNaTe	
N-acetyl-glucosamine		2-keto-gluconate	
amygdalin	+	5-keto-gluconate	
arbutin		sodium pyruvate	+
esculin		hippuric acid	+

salicin		esculin ferric citrate	+
---------	--	---------------------------	---

[79]

[80] [표8]

탄소원	균주명	탄소원	균주명
	<i>Collinsella aerofaciens</i> IM50		<i>Collinsella aerofaciens</i> IM50
glycerol	-	cellobiose	-
erythritol	-	maltose	+
D-arabinose	-	lactose	+
L-arabinose	-	melibiose	-
D-ribose	-	sucrose	+
D-xylose	-	trehalose	-
L-xylose	-	inulin	-
D-adonitol	-	melezitose	-
methyl- β -D-xylopyranoside	-	raffinose	-
D-galactose	+	starch	-
D-glucose	+	glycogen	-
D-fructose	+	xylitol	-
D-mannose	+	gentiobiose	-
L-sorbose	-	D-turanose	-
L-rhamnose	-	D-lyxose	-
dulcitol	-	D-tagatose	+
inositol	-	D-fucose	-
mannitol	-	L-fucose	-
sorbitol	-	D-arabitol	-
α -methyl-D-mannoside	-	L-arabitol	-
α -methyl-D-glucoside	-	glucoNaTe	-
N-acetyl-glucosamine	+	2-keto-gluconate	-
amygdalin	-	5-keto-gluconate	-
arbutin	-	sodium pyruvate	
esculin	-	hippuric acid	

salicin	-	esculin ferric citrate	
---------	---	---------------------------	--

[81]

[82] (3) 유산균의 수탁 정보

[83] 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12를 2016년 1월 20일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11806P의 수탁번호를 부여받았다. 또한, 본 발명의 발명자들은 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 2016년 1월 20일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11807P의 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.

[84]

[85] 2. 유산균의 면역조절 효능 평가

[86] 분변으로부터 분리한 유산균의 면역조절 효능을 평가하기 위하여, 대식세포의 면역반응에 유산균이 미치는 영향 및 비장세포의 면역반응에 유산균이 미치는 영향을 측정하였다.

[87]

[88] 2-1. 대식세포 면역반응 실험

[89] (1) 대식세포의 분리

[90] 6주령 C57BL/6J 수컷 생쥐(20-23g)를 라운바이오(주)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, 24시간 동안 배양한 후 부착하지 않은 세포는 제거하고 사용하였다.

[91]

[92] (2) 유산균의 대식세포 면역반응 증강 효능

[93] (1)의 대식세포 배양액에 유산균을 1×10^4 CFU/ml의 양으로 넣고 24시간 동안 배양한 후, 상등액을 수득하였다. 수득한 상등액으로부터 TNF- α 의 발현량을 ELISA kit로 측정하였고, 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다. 이후의 표들에서 "IM2"는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2를 나타내고, "IM5"는 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM5를 나타내고, "IM6"은 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM6을 나타내고,

"IM7"은 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7을 나타내고, "IM12"는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12를 나타내고, "IM15"는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM15를 나타내고, "IM18"은 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) IM18을 나타내고, "IM20"은 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) IM20을 나타내고, "IM23"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM23을 나타내고, "IM26"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM26을 나타내고, "IM27"은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) IM27을 나타내고, "IM30"은 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*) IM30을 나타내고, "IM32"는 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*) IM32를 나타내고, "IM33"은 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*) IM33을 나타내고, "IM36"은 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*) IM36을 나타내고, "IM38"은 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 나타내고, "IM39"는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM39을 나타내고, "IM42"는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM42를 나타내고, "IM45"는 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45를 나타내고, "IM46"은 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM46을 나타내고, "IM49"는 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM49를 나타내고, "IM50"은 콜린셀라 에어로파시엔스(*Collinsella aerofaciens*) IM50을 나타낸다.

[94] [표9]

대식세포 처리 유산균	TNF- α 발현 증가율
무처리	-
IM2	+
IM5	+
IM6	+
IM7	+
IM12	+
IM15	++
IM18	+
IM20	+
IM23	+
IM26	-
IM27	-
IM30	-
IM32	-
IM33	+
IM36	-
IM38	+
IM39	+
IM42	+
IM45	+++
IM46	++
IM49	++
IM50	++

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

[96]

[97] (3) 유산균의 대식세포 염증반응 억제 효능

[98] (1)의 대식세포 배양액에 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 의 발현량을 ELISA kit로 측정하였다. 또한, 수득한 세포로부터 p65(NF-카파B), p-p65(phosphor-NF-카파B) 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 니트로셀룰로오스지에 100V, 400mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀룰로오스지를 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 측정하였고, 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

[99] [표10]

대식세포 처리 유산균	NF- κ B 활성화 억제율(p-p65/p65)	TNF- α 발현 억제율
무처리	-	-
IM2	++	++
IM5	++	++
IM6	++	++
IM7	+++	+++
IM12	+++	+++
IM15	+	+
IM18	+	++
IM20	+	+
IM23	+	+
IM26	++	++
IM27	+	+
IM30	+	++
IM32	++	++
IM33	++	++
IM36	++	++
IM38	+++	+++
IM39	+	+
IM42	++	+
IM45	-	-
IM46	+	-
IM49	-	-
IM50	+++	+++

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

[101]

[102] 2-2. 비장세포 면역반응 실험

[103] 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 웰 당 5×10^5 수로 분주하였다. 여기에 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, T 세포의 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 유산균을 웰 당 1×10^5 CFU/ml의 양으로 넣고 4일간 배양하였다.

- [104] 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 11에 나타내었다. 하기 표 11에서 T 세포의 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포로의 분화 억제율이 높고 T 세포의 Treg 세포로의 분화 증가율이 높은 유산균은 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있고 염증성 질환을 효과적으로 개선할 수 있다.

[105] [표11]

비장 T 세포 처리 유산균	분화 억제율			분화 증가율
	Th1 세포	Th2 세포	Th17 세포	Treg 세포
무처리	-	-	-	-
IM2	+	++	+	+
IM5	+	++	+	+
IM6	+	++	++	+
IM7	+++	+	+++	+++
IM12	+++	+	+++	+++
IM15	+	+	+++	+
IM18	+	+	+++	++
IM20	+	+	+++	+
IM23	+	+	+++	+
IM26	+	+++	++	++
IM27	++	++	+	+
IM30	-	+	+	-
IM32	+	++	++	+
IM33	++	+	+	++
IM36	++	+	+	+
IM38	+++	+++	+++	+
IM39	+	++	+	+
IM42	+	++	++	+
IM45	+	+	++	+
IM46	++	++	+	+
IM49	+	++	+	+
IM50	+++	+	+++	++

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

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

[108]

[109] 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 분석하였고, 그 결과를 하기 표 12에 나타내었다.

[110] [표12]

비장 T 세포 처리 유산균	발현 억제율						발현 증가율	
	T-bet	IFN- γ	GATA3	IL-5	ROR γ t	IL-17	FOXp3	IL-10
무처리	-	-	-	-	-	-	-	-
IM2	++	+	+	+	+	+	-	+
IM5	+	+	+	+	+	+	+	+
IM6	+	+	+	+	+	+	+	+
IM7	++	++	+	+	+++	+++	++	++
IM12	+++	+++	+	+	+	+	++	++
IM15	-	-	+	+	+	+	+	+
IM18	+	+	+	+	+	+	+	+
IM20	+	+	++	++	+	+	+	+
IM23	+	+	+	+	++	++	+	+
IM26	+	+	+++	+++	++	++	++	++
IM27	+	+	+	+	+	+++	++	+
IM30	+	+	+	+	+	++	+	++
IM32	+	+	+	+	+	+	+	+
IM33	++	+	+	+	+	+	+	+
IM36	+	+	+	+	++	++	++	++
IM38	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++
IM39	+	+	+	+	+	+	+	+
IM42	+	++	+	+	+	+	+	+
IM45	+	++	+	+	+	+	+	+
IM46	++	+	+	+	-	-	+	+
IM49	++	+	+	+	-	-	+	+
IM50	++	++	+	+	+++	+++	+	+

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

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

[113]

[114] 2-3. 유산균의 면역증강 활성 측정 실험

[115] (1) 실험동물 및 실험약물의 투여

[116] γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스를 이용하여 유산균의 면역증강 활성을 측정하였다. 구체적으로 5주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 라온바이오(주)로부터 공급받아 한국수력원자력 방사선보건연구원에서 7일간 사육 및 순화시켰다. 이후, 한 군을 8마리로 하여 마우스를 6개의 실험군으로 나누었다. 이후, 정상군(normal group)을 제외한 5개 군의 마우스에 2.5 Gy/2 min의 세기로 γ -radiation 처리하였다. 이후, 실험약물인 유산균을 2×10^9 CFU/mouse의 용량으로 또는 양성 대조약물인 Levamisole hydrochloride를 2.5 mg/kg의 용량으로 방사선 처리 익일부터 매일 6일간 지속적으로 경구 투여하였다. 또한, 정상군과 음성 대조군에 해당하는 마스에게는 생리식염수만을 경구투여하였다. 또한, 모든 실험군에게 먹이와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

[117]

[118] (2) 실험동물의 몸무게, 비장 무게 및 혈중 사이토카인 측정

[119] 실험약물인 유산균을 투여하기 전과 6일간 경구 투여한 후의 마우스의 몸무게를 측정하고, 희생시킨 후 비장을 분리하여 비장의 무게를 측정하였다. 또한, 혈액을 분리하고, IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-10의 양을 ELISA Kit를 이용하여 측정하였다.

[120] 도 1은 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 체중 증가량을 나타낸 것이고, 도 2는 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 비장 무게 변화를 나타낸 것이고, 도 3은 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 혈청 내 IFN- γ 의 양을 나타낸 것이고, 도 4는 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 혈청 내 IL-2의 양을 나타낸 것이고, 도 5는 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여하였을 때의 혈청 내 TNF- α 의 양을 나타낸 것이다. 도 1 내지 도 5에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "CON"은 음성 대조군을 나타내고, "IM45"는 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45 투여군을 나타낸다. 도 1 내지 도 5에서 보이는 바와 같이 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45는 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스의 체중 감소를 개선하였고, IFN- γ , IL-2, TNF- α 와 같은 면역 사이토카인의 발현량을 증가시켰으며, 상업적 면역 부스터인 Levamisole hydrochloride 보다 그 효과가 우수하였다.

[121]

- [122] (3) 실험동물의 비장으로부터 분리한 NK 세포 및 Cytotoxic T 세포의 YAC-1 세포에 대한 cytotoxicity 측정
- [123] 실험약물을 6일간 경구 투여한 후, 마우스를 희생시키고, 70% 에탄올 수용액으로 배부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하였다. 이후, 비장 세포로부터 NK cell Isolation Kit(MACS)를 이용하여 NK 세포를 분리하고 CD8+ T cell Isolation Kit(MACS)를 이용하여 Cytotoxic T 세포를 분리한 후, 각각의 세포 수를 Flow cytometer로 측정하였다. 그리고, 비장 세포로부터 분리한 NK 세포 또는 Cytotoxic T 세포와 YAC-1 lymphoma 세포(암세포)를 같이 배양하며면서 NK 세포 및 Cytotoxic T 세포의 암세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 구체적으로 Vybrant CFDA SE Cell Tracer kit를 이용하여 형광을 labeling한 YAC-1 세포를 96-well plate에 웰 당 0.4×10^5 세포 수로 분주하고 여기에 분리한 NK 세포 및 Cytotoxic T 세포를 웰 당 2×10^5 세포 수로 분주한 후 24시간 동안 배양하고 YAC-1 세포 수를 Flow cytometer로 측정하였다.
- [124] 도 6은 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여한 후 적출한 비장 내 NK 세포의 암세포에 대한 세포독성을 나타낸 것이고, 도 7은 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에게 유산균을 투여한 후 적출한 비장 내 Cytotoxic T 세포의 암세포에 대한 세포독성을 나타낸 것이다. 도 6 및 도 7에서 "NOR"은 정상균을 나타내고, "CON"은 음성 대조균을 나타내고, "IM45"는 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45 투여균을 나타낸다. 도 6 및 도 7에서 보이는 바와 같이 γ -radiation에 의해 면역력 저하가 유도된 마우스에 스트렙토코커스 파에시엄(*Streptococcus faecium*) IM45를 투여하는 경우 비장 내 NK 세포 및 Cytotoxic T 세포의 암세포 사멸 효과가 강하게 증가하였다.
- [125]
- [126] **3. 유산균의 알러지 개선 효능 평가**
- [127] (1) 유산균의 탈과립 저해율 측정
- [128] 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°C, 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 μ g/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°C에서 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 1 μ g/ml)으로 37°C에서 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-글루코스아미니다를 pH 4.5로 녹인 용액) 0.025 ml를 가한 후, 37°C에서 60분간 반응시켰다. 이후, 0.1M Na₂CO₃ /NaHCO₃ 0.2 ml를 반응액에 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 ELISA 분석기로 흡광도를 측정하였다.

[129]

[130] (2) 유산균의 소양 반응 저해율 측정

[131] BALB/c 마우스 5마리를 한 군으로 하여, 정상군과 대조군을 제외한 나머지 실험군에 시험약물인 유산균을 1 $\times$ 10⁹ 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 $\times$ 22cm $\times$ 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 μ g의 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.

[132]

[133] (3) 실험결과

[134] 하기 표 13은 유산균의 탈과립 저해율 및 소양 반응 저해율을 측정한 결과이다. 하기 표 13에서 보이는 바와 같이 본 발명에서 선별한 유산균은 호염구의 탈과립 및 소양 반응을 매우 강하게 저해하였기에 알러지로부터 유발되는 아토피, 천식, 인후염 또는 만성 피부염 등을 매우 효과적으로 개선할 수 있다.

[135] [표13]

처리 약물	저해율(%)	
	탈과립	소양 반응
없음	0	2
IM7	43	42
IM12	47	46
IM26	49	52
IM38	54	49
IM45	48	32
IM50	40	38
DSCG(disodium cromoglycate)	65	25
Azelastine	-	68

[136]

[137] 4. 유산균의 대장염 개선 효능 평가(In vivo)

[138] (1) 실험동물

[139] 5주령 C57BL/6 수컷 생쥐(24-27g)를 오리엔트바이오(주)로부터 구입하고, 습도 50±10%, 온도 25±2°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.

[140]

[141] (2) TNBS에 의한 대장염 유발 및 시료 투여

[142] 실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 2,4,6-트리니트로벤젠설폰산(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 0.1ml 씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1ml를 경구투여하였다. 이후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 시험시료인 유산균을 생리식염수에 현탁하여 1.5×10⁹ 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.

[143]

[144] (3) 대장의 외관 분석

[145] 적출한 대장의 길이와 외관을 관찰하고 하기 표 14의 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°C에서 냉동보관하면서 사용하였다.

[146] [표14]

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

[147]

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

[149] 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°C 및 10,000xg의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 50 μ l를 0.95 ml의 반응액(1.6mM tetramethyl benzidine과 0.1mM H₂O₂ 함유)에 넣고 37°C에서 반응시키면서 650 nm에서 경시적으로 흡광도를 측정하였다. 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성은 반응물로서 생긴 peroxide 1 μ mol/ml를 1 unit로 계산하였다.

[150]

[151] (5) 염증 지표 물질 측정

[152] 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정 실험과 동일한 방법으로 상등액을 얻었다. 이후, 상등액으로부터 ELISA kit를 이용하여 TNF- α , IL-17과 같은 염증 관련 사이토카인을 측정하였다.

[153]

[154] (6) 실험결과

[155] 하기 표 15는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 유산균을

투여하였을 때, 유산균이 체중 증가량, 대장의 길이, 대장의 외관 점수, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성, 염증 관련 사이토카인의 함량 변화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 하기 표 15에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) IM7, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12, 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38은 상업적인 대장염 치료제인 설과살라진(sulfasalazine)보다 대장염 개선 효능이 더 우수하였다.

[156] [표15]

실험군	Weight gain(g)	Colon length(cm)	Macroscopic score	MPO 활성(μ U/mg)	TNF- α (pg/mg)	IL-17(pg/mg)
정상군	0.6	5.5	0.14	0.36	22	9
음성 대조군	-2.5	4.3	2.32	1.79	185	52
IM7 투여군	-1.3	4.6	1.3	1.32	85	42
IM12 투여군	-0.3	4.8	1.08	0.78	68	38
IM38 투여군	0.2	5.0	0.5	0.48	59	28
양성 대조군	-0.54	4.7	1.43	0.98	75	42

[157]

[158] **5. 유산균의 관절염 개선 효능 평가(In vivo)**

[159] (1) 실험방법

[160] 유산균의 관절염 개선 효능을 평가하기 위해 8주령 수컷 DBA/1J 생쥐 총 42마리를 7마리씩 6개의 군(NOR, CIA, IM7, IM12, IM38, IB)으로 나누고, 정상군인 NOR군을 제외한 나머지 군인 CIA군, IM7군, IM12군, IM38군, IB군에 대해 보빈 제2형 콜라겐(bovine type II collagen)을 면역원으로 사용하여 관절염을 유발하였다. 구체적으로, 생쥐 꼬리 근위부에 콜라겐 면역원 100 μ g을 피내주사하여 1차 면역화시키고, 1차 면역화 후 21일째 되는 날, 동일한 방법으로 동일한 양의 콜라겐 면역원을 피내주사하여 2차 면역화시켰다. 이때, 콜라겐 면역원으로 보빈 제2형 콜라겐(bovine type II collagen)을 0.05M 아세트산에 용해시킨 후 동일한 양의 프로인트 완전 보조제(Freund Complete Adjuvant)를 첨가하여 에멀전화 시킨 것을 사용하였다.

[161] 2차 면역화 다음날부터, NOR군 및 CIA군에는 비히클(50mM sodium bicarbonate buffer containing 1% glucose)을 20일 동안 매일 경구투여 하였고, IM7군, IM12군, IM38군에는 해당 유산균을 2×10^9 CFU/mouse의 용량으로 20일 동안 매일 경구투여 하였고, IB군에는 이부프로펜(ibuprofen)을 50 mg/kg의 용량으로 20일 동안 매일 경구투여 하였으며, 최종 투여 익일에 실험을 종료하였다.

[162]

[163] (2) 분석방법

[164] 발의 관절염 심각도(arthritis severity) 및 관절염 발생도(arthritis incidence)는 관절염 유발 단계부터 측정하였다. 발의 관절염 심각도(arthritis severity)는 발 및 발의 주변을 육안으로 관찰하고 하기 표 16의 기준(Arii et al., 2008)에 따라 단계별로 거시 외관 점수(Macroscopic score)를 매겨 평가하였다. 각 생쥐에게 부여될 수 있는 최고 거시 외관 점수는 16이다.

[165] [표16]

단계	외관 정도
0	normal
1	focal slight swelling and/or redness in one digit
2	moderate swelling and erythema
3	marked swelling and erythema of the limb
4	maximal swelling, erythema, deformity, and/or ankylosis

[166]

[167] 또한, 실험 종료일에 실험동물의 발의 부피 증가를 측정한 후 실험동물을 희생시키고 발 관절 조직(paw joint tissue)을 수거하여 이를 즉시 -70°C에 냉동보관한 후 시료로 사용하였다. 발 관절 조직의 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성은 대장염 개선 효능 평가시 사용한 방법과 동일한 방법으로 측정하였다. 또한, 발 관절 조직으로부터 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정 실험과 동일한 방법을 사용하여 상등액을 얻고 ELISA kit를 이용하여 NO, PGE2와 같은 염증 반응 지표 물질과 TNF- α , IL-17와 같은 염증 관련 사이토카인을 측정하였다.

[168]

[169] (3) 실험결과

[170] 도 8은 콜라겐 면역원에 의해 관절염이 유도된 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 발의 부피 증가 또는 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성으로 나타낸 것이고, 도 9는 콜라겐 면역원에 의해 관절염이 유도된 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인으로 나타낸 것이고, 도 10은 콜라겐 면역원에 의해 관절염이 유도된 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 염증 반응 지표 물질로 나타낸 것이다. 도 8 내지 도 10에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12는 관절염을 효과적으로 개선하였다.

[171]

[172] 6. 유산균의 비만 개선 및 항염 효과 평가(In vivo)

[173] (1) 실험방법

[174] C57BL6/J 마우스를 라운바이오㈜에서 구입하고 총 45 마리를 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$, 12 hr light/12 hr dark cycle의 조건 아래 chow diet (Purina)로 1주일간 적응시켰다. 이후, 실험동물을 9마리씩 5개의 군(LFD, HFD, HFD+IM2, HFD+IM12, HFD+IM38)으로 나누어, LFD 군에는 4주간 정상식이(LFD, 10% of calories from fat; Research, NJ, USA)를 공급하였고 HFD 군, HFD+IM2 군, HFD+IM12 군 및 HFD+IM38 군에는 4주간 고지방식이(HFD, 60% of calories from; Research, NJ, USA)를 공급하였다. 그 다음 LFD 군에는 4주간 정상식이를 공급함과 동시에 PBS를 경구투여 하였다. 또한, HFD 군에는 4주간 고지방식이를 공급함과 동시에 PBS를 경구투여 하였다. 또한, HFD+IM2 군, HFD+IM12 군 및 HFD+IM38 군에는 4주간 고지방식이를 공급함과 동시에 해당 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 각각 PBS에 현탁하여 2×10^9 CFU의 양으로 경구투여 하였다.

[175]

[176] (2) 유산균의 항비만 효과 및 항염 효과 분석

[177] 유산균의 항비만 효과는 체중 변화를 통해 분석하였다. 또한, 유산균의 항염 효과는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험에서 측정한 방법과 동일한 방법을 사용하여 분석하였다.

[178]

[179] (3) 실험결과

[180] 도 11은 비만 유도 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 체중 변화량 등으로 나타낸 것이고, 도 12는 비만 유도 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 대장의 외관 점수 및 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성으로 나타낸 것이고, 도 13은 비만 유도 모델동물에 대해 소정의 유산균이 미치는 영향을 염증 관련 사이토카인으로 나타낸 것이다. 도 11 내지 도 13에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) IM2, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38은 고지방식이에 의한 비만이 유도된 모델동물의 증가한 체중, 증가한 대장염 지표, 증가한 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 크게 감소시켰고 대장염의 발생을 억제하였다. 또한, 해당 유산균들은 고지방식이에 의해 비만이 유도된 모델동물에 대해 염증성 사이토카인 생산을 크게 억제하고 항염증성 사이토카인인 IL-10의 생산을 증가시켰다.

[181]

[182] 7. 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38의 항스트레스, 항불안, 항우울 또는 항정신분열 효과 평가

- [183] 현대사회는 스트레스 등으로 인하여 불안 장애, 우울증, 정신분열증 등의 질환이 급격하게 증가하고 있다. 예를 들어, 사람이나 동물에게 결박(immobilization) 또는 강제 수영(forced swimming) 등과 같은 스트레스를 가하면 혈액 중에 코티코스테론(corticosterone), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), TNF- α (tumor necrosis factor- α) 등과 같은 사이토카인이 증가하고, 그로 인해 불안, 우울, 정신분열 등과 같은 증상을 보인다. 본 연구에서는 실험동물에서 스트레스를 유도하고 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test)을 통해 비피도박테리움 아도레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38의 항스트레스, 항불안, 항우울 또는 항정신분열 효과를 측정하였다.
- [184]
- [185] (1) 실험방법
- [186] C57BL/6 마우스(male, 19~22g)를 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 10\%$, 12 hr light/12 hr dark cycle의 조건 아래 chow diet (Purina)로 1주 일간 적응시켰다. 이후, 실험동물을 여러 개의 군으로 나누고, 정상군에는 3일 동안 매일 1회씩 생리식염수를 경구 투여하였고, 나머지 실험군에는 3일 동안 매일 1회씩 유산균, 항불안제인 부스피론(buspirone) 또는 코티코스테로이드제인 덱사메타손(dexamethasone)과 같은 약물을 투여하였다. 구체적으로 유산균의 경우 생리식염수에 소정의 양으로 현탁하여 경구 투여하였고, 항불안제인 부스피론(buspirone) 및 코티코스테로이드제인 덱사메타손(dexamethasone)의 경우 복강내 주사 투여하였다.
- [187] 또한, 정상군을 제외한 실험군의 마우스에게 결박 스트레스를 가하여 불안 증상 또는 우울 증상을 유도하였다. 구체적으로, 약물 투여 1시간 후에 마우스를 끝이 둥그렇게 뚫린 500ml 용량의 falcon 튜브에 넣고 마우스가 움직이지 못하도록 falcon 튜브의 좌, 우, 상, 하, 뒤에 숨을 집어넣은 후 마우스의 머리가 위로 가도록 falcon 튜브를 세우고 2시간 동안 방치하였다.
- [188] 또한, 필요한 경우 약물을 최종 투여하고 결박 스트레스를 가하기 30분 전에 benzodiazepine receptor의 antagonist인 플루마제닐(Flumazenil), GABAA receptor의 antagonist인 비큐쿨린(Bicuculine) 또는 5-HT_{1A} receptor의 antagonist인 WAY-100635(N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide hydrochloride; CAS 등록번호 : 146714-97-8)를 복강내 주사 투여하였다.
- [189] 마우스에게 최종 결박 스트레스를 가하고 2시간이 지난 후에 고가식 십자 미로(elevated plus-maze) 장치를 이용하여 약물의 항불안 효과 또는 항우울 효과를 측정하였다. 고가식 십자 미로(elevated plus-maze) 장치는 4개의 통로 가운데 마주보는 2개의 Open arm(길이 30cm, 폭 7cm)과 높이 20cm의 벽으로 둘러싸여 있는 2개의 Closed arm(길이 30cm, 폭 7cm)으로 구성되어 있고, 각각 중앙 platform으로부터 가로 7cm 및 세로 7cm씩 뻗어 있다. 미로는 검정색의 플렉시 유리(Plexiglas)로 제작되었고, 바닥에서 50cm 높이에 설치되었다. 미로의

중앙부 천장에 비디오카메라를 설치하여 동물의 행동을 기록하였으며 광도는 20 lux로 조정하였다. 마우스는 선천적으로 어두운 closed arm에 머무르기를 좋아한다. 그래서 open arm을 통과할 때에는 상당한 불안감을 나타낸다. 실험을 시작할 때 마우스를 머리가 정중앙에서 open arm 쪽으로 향하게 놓은 다음 미로를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 이후, 마우스의 행동을 5분간 관찰하였으며, arm entry는 4개의 발이 모두 들어간 것으로 하였다. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 지우기 위해 70% alcohol로 깨끗이 닦아 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다. 마우스가 open arm에 머문 시간의 비율과 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율을 하기의 식에 의해 계산하였다.

[190]
$$\text{Rate of time spent in open arms}(\%) = \frac{\text{time spent in open arms}}{\text{total time spent in open arms and closed arms}} \times 100$$

[191]
$$\text{Rate of entries into open arms}(\%) = \frac{\text{entries into open arms}}{\text{total entries into open arms and closed arms}} \times 100$$

[192] 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test)에서 불안감의 감소는 open arm에 머문 시간의 비율의 증가와 open arm으로의 출입 횟수 비율의 증가에 의해 표시된다.

[193] 또한, 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test)이 끝나고 1시간이 지난 후에 마우스의 혈액을 채취하고 혈청을 분리한 후 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay, enzyme-linked immunospecific assay)를 이용하여 코티코스테론(corticosterone), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)의 함량을 측정하였다.

[194]

[195] (2) 실험결과

[196] 도 14는 결박 스트레스에 의해 불안 증상이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38이 미치는 영향을 open arm에 머문 시간의 비율과 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율로 나타낸 것이다. 또한, 도 15는 결박 스트레스에 의해 불안 증상이 유도된 모델동물에 대해 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38이 미치는 영향을 코티코스테론(corticosterone), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)의 함량으로 나타낸 것이다. 도 14 및 도 15에서 "NC"는 결박 스트레스를 가하지 않고 약물로 생리식염수만을 투여한 정상군을 나타내고, "IS"는 결박 스트레스와 함께 약물로 생리식염수만을 투여한 실험군을 나타내고, "SB"는 결박 스트레스와 함께 약물로 부스피론(buspiron)을 3일 동안 매일 1회씩 1mg/kg mouse b.w.의 용량으로 투여한 실험군을 나타내고, "SD"는 결박 스트레스와 함께 약물로 덱사메타손(dexamethasone)을 3일 동안 매일 1회씩 1mg/kg mouse b.w.의 용량으로 투여한 실험군을 나타내고, "SIL"은 결박 스트레스와 함께 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 2×10^8 CFU/mouse의 용량으로 투여한

실험군을 나타내고, "SIM"은 결박 스트레스와 함께 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 1×10^9 CFU/mouse의 용량으로 투여한 실험군을 나타내고, "SIH"는 결박 스트레스와 함께 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 5×10^9 CFU/mouse의 용량으로 투여한 실험군을 나타낸다.

- [197] 도 16은 결박 스트레스에 의해 불안 증상이 유도된 모델동물에서 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38의 항불안 활성에 대해 플루마제닐(Flumazenil), 비큐클린(Bicuculine) 또는 WAY-100635이 미치는 영향을 open arm에 머문 시간의 비율과 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율로 나타낸 것이다. 또한, 도 17은 결박 스트레스에 의해 불안 증상이 유도된 모델동물에서 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38의 항불안 활성에 대해 플루마제닐(Flumazenil), 비큐클린(Bicuculine) 또는 WAY-100635이 미치는 영향을 코티코스테론(corticosterone), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)의 함량으로 나타낸 것이다. 도 16 및 도 17에서 "NC"는 결박 스트레스를 가하지 않고 약물로 생리식염수만을 투여한 정상군을 나타내고, "IS"는 결박 스트레스를 가하고 약물로 생리식염수만을 투여한 실험군을 나타내고, "SIM"은 결박 스트레스와 함께 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 1×10^9 CFU/mouse의 용량으로 투여한 실험군을 나타내고, "SIM+F"는 결박 스트레스와 함께 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 1×10^9 CFU/mouse의 용량으로 투여하고, 유산균의 최종 투여 후 플루마제닐(Flumazenil)을 3mg/kg mouse b.w.의 용량으로 투여한 실험군을 나타내고, "SIM+B"는 결박 스트레스와 함께 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 1×10^9 CFU/mouse의 용량으로 투여하고, 유산균의 최종 투여 후 비큐클린(Bicuculine)을 0.5mg/kg mouse b.w.의 용량으로 투여한 실험군을 나타내고, "SIM+W"는 결박 스트레스와 함께 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 1×10^9 CFU/mouse의 용량으로 투여하고, 유산균의 최종 투여 후 WAY-100635를 0.5mg/kg mouse b.w.의 용량으로 투여한 실험군을 나타낸다.

- [198] 도 18은 결박 스트레스를 가하지 않은 모델동물의 불안 행동에 대해 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38 또는 박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38과 플루마제닐(Flumazenil)의 병용이 미치는 영향을 open arm에 머문 시간의 비율과 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율로 나타낸 것이다. 또한, 도 19는 결박 스트레스를 가하지 않은 모델동물의 불안 행동에 대해 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38 또는 박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38과 플루마제닐(Flumazenil)의 병용이 미치는 영향을

코티코스테론(corticosterone), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), TNF- α (tumor necrosis factor- α)의 함량으로 나타낸 것이다. 도 18 및 도 19에서 "NC"는 결박 스트레스를 가하지 않고 약물로 생리식염수만을 투여한 정상군을 나타내고, "IL"은 결박 스트레스를 가하지 않고 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 2×10^8 CFU/mouse의 용량으로 투여한 실험군을 나타내고, "IM"은 결박 스트레스를 가하지 않고 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 1×10^9 CFU/mouse의 용량으로 투여한 실험군을 나타내고, "IH"는 결박 스트레스를 가하지 않고 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 5×10^9 CFU/mouse의 용량으로 투여한 실험군을 나타내고, "IM+F"는 결박 스트레스를 가하지 않고 약물로 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 3일 동안 매일 1회씩 1×10^9 CFU/mouse의 용량으로 투여하고, 유산균의 최종 투여 후 플루마제닐(Flumazenil)을 3mg/kg mouse b.w.의 용량으로 투여한 실험군을 나타낸다.

- [199] 도 15 내지 도 19에서 보이는 바와 같이 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38은 결박 스트레스의 유무와 관계없이 모델동물의 불안 증상 또는 우울 증상을 크게 완화시켰다. 또한, 모델동물에게 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38을 투여하고 추가적으로 GABAA receptor의 antagonist인 비큐쿨린(Bicuculine) 또는 5-HT1A receptor의 antagonist인 WAY-100635(N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide hydrochloride; CAS 등록번호 : 146714-97-8)를 투여한 경우 항불안 효과 또는 항우울 효과가 더 높아졌다.

[200]

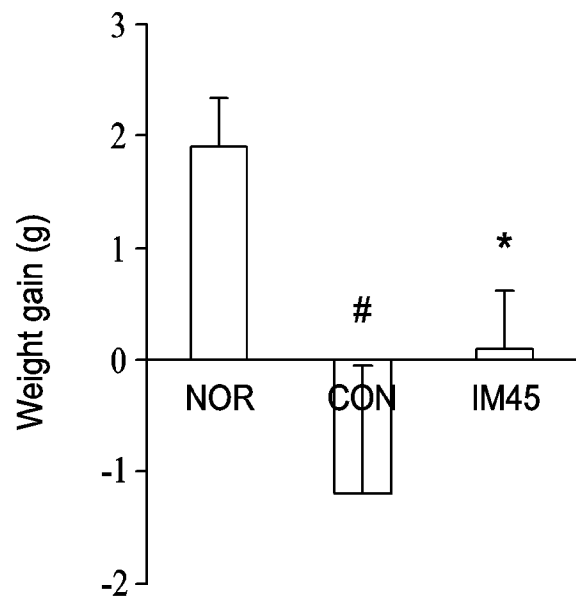
- [201] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

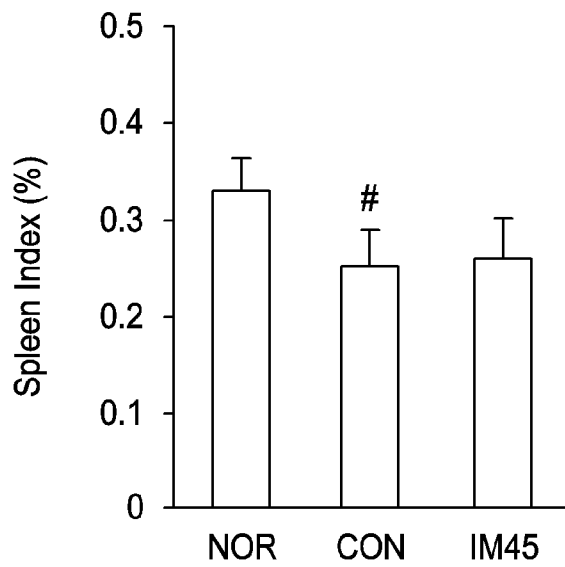
- [청구항 1] 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P) 또는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P)에서 선택되는 유산균으로서, 면역조절 효능, 면역증강 효능, 항알러지 효능, 항염증 효능, 대장염 개선 효능, 관절염 개선 효능, 항비만 효능, 항스트레스 효능, 항불안 효능, 항우울 효능 또는 항정신분열 효능을 갖는 유산균.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 유산균.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38은 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 유산균.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12는 탄소원으로 에스쿨린(Esculin)을 이용하는 것을 특징으로 하는 유산균.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38은 탄소원으로 D-자일로스, D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, 말토스 및 멜리바이오스(Melibiose)를 이용하는 것을 특징으로 하는 유산균.
- [청구항 6] 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 알러지 질환, 대장염, 관절염 또는 비만을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 알러지 질환은 아토피 피부염, 천식, 인후염 또는 만성 피부염에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) IM12(수탁번호 : KCCM 11806P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역조절 또는 항염증용 조성물.
- [청구항 9] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 알러지 질환, 대장염, 관절염 또는 비만을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 알러지 질환은 아토피 피부염, 천식, 인후염 또는 만성 피부염에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

- [청구항 11] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역조절 또는 항염증용 조성물.
- [청구항 12] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스 완화용 조성물.
- [청구항 13] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 불안 장애, 우울증 또는 정신분열증을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물.
- [청구항 14] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상; 및 비큐쿨린(bicuculine) 또는 N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide hydrochloride(WAY-100635 hydrochloride; CAS 등록번호 : 146714-97-8)에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 스트레스 완화용 조성물.
- [청구항 15] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호 : KCCM 11807P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상; 및 비큐쿨린(bicuculine) 또는 N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide hydrochloride(WAY-100635 hydrochloride; CAS 등록번호 : 146714-97-8)에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고, 불안 장애, 우울증 또는 정신분열증을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물.

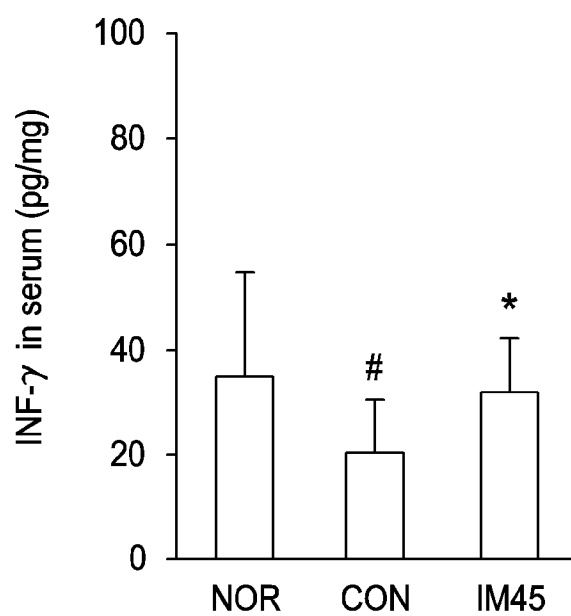
[도1]



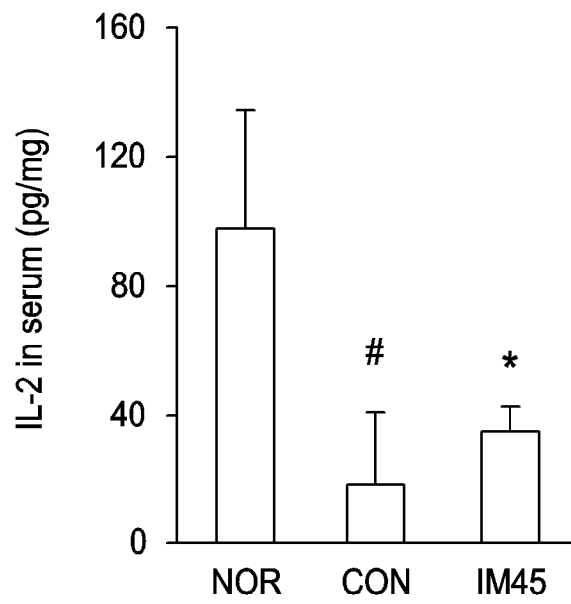
[도2]



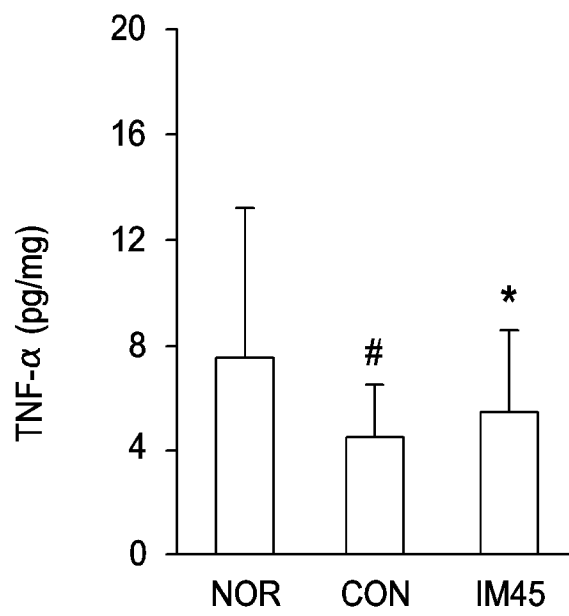
[도3]



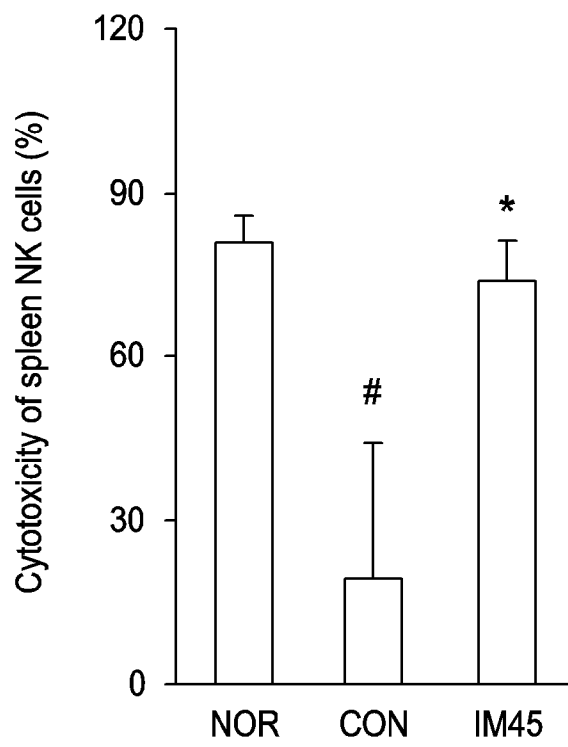
[도4]



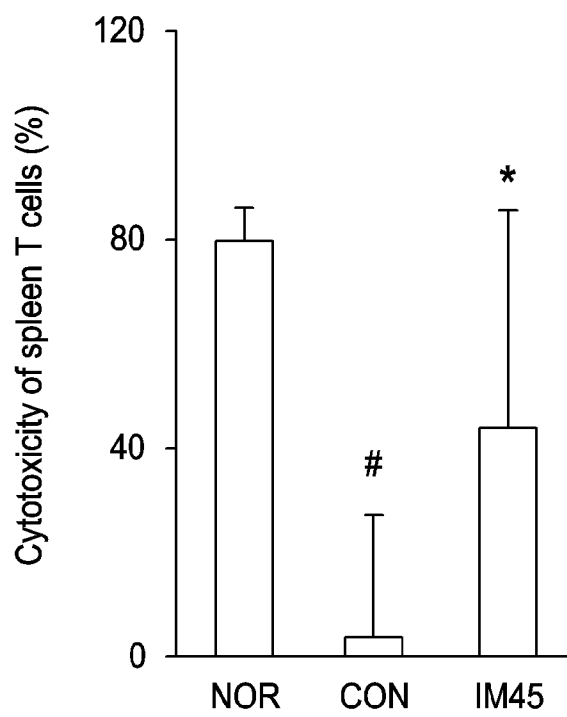
[도5]



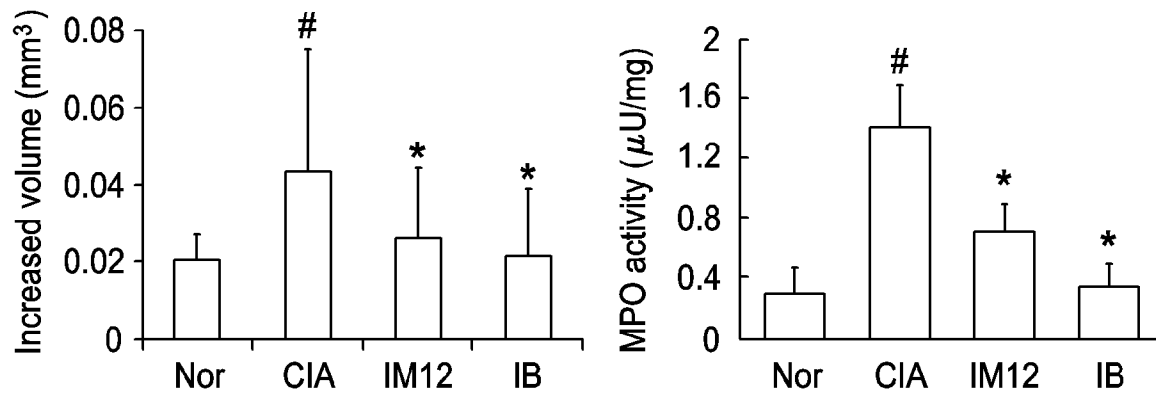
[도6]



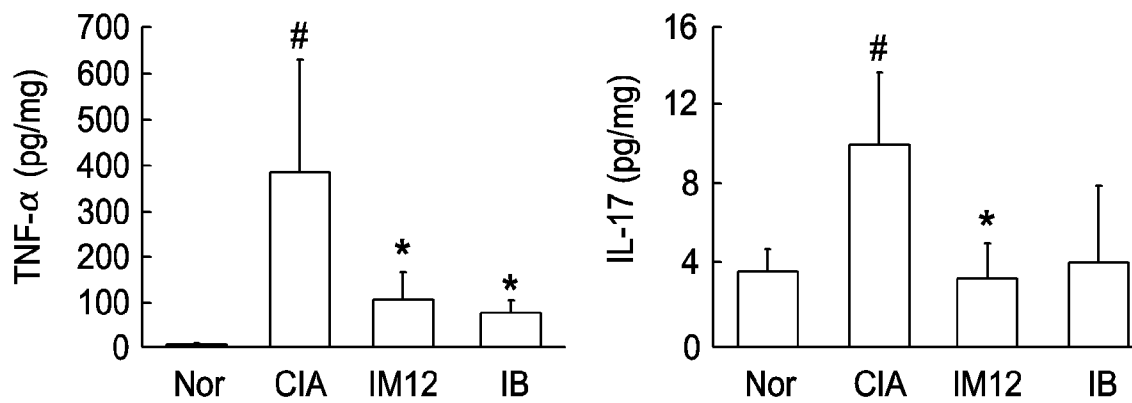
[도7]



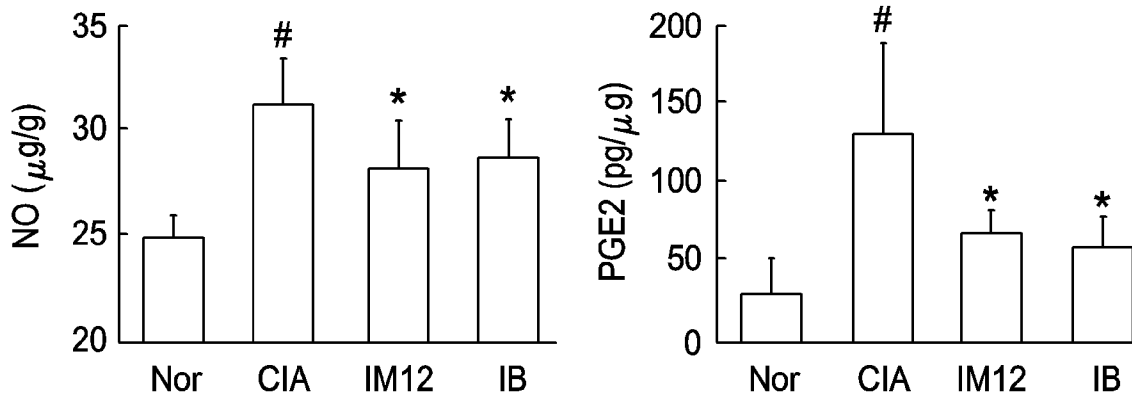
[도8]



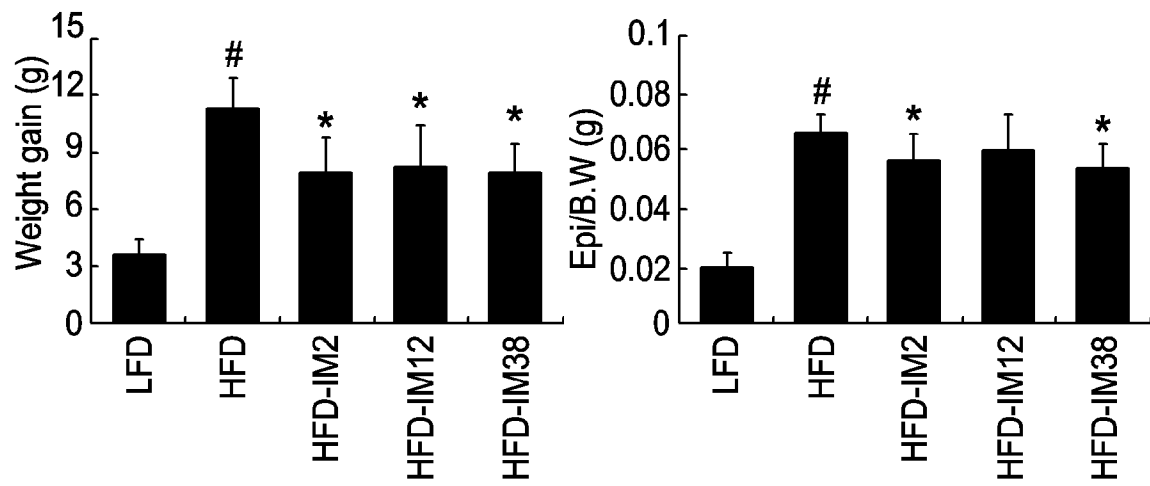
[도9]



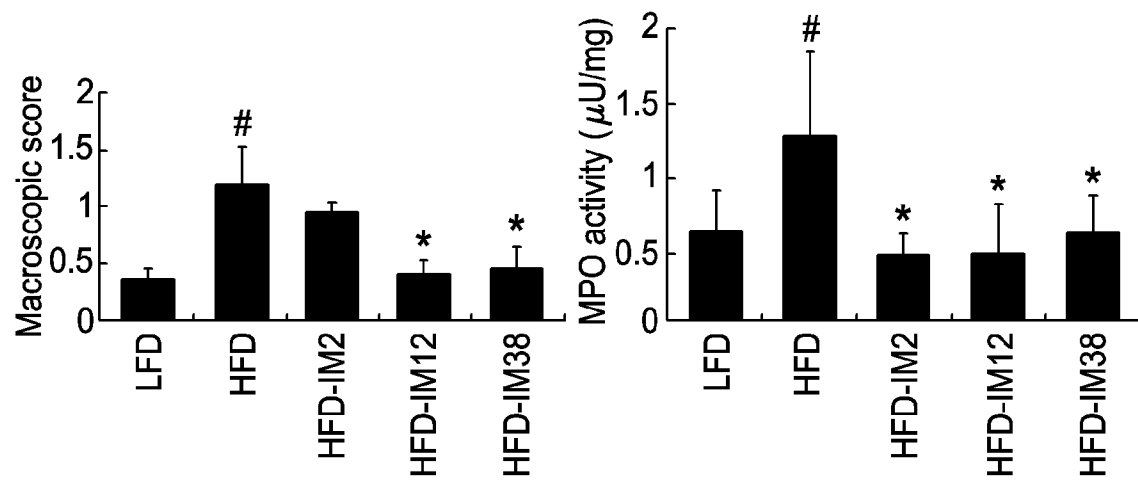
[도10]



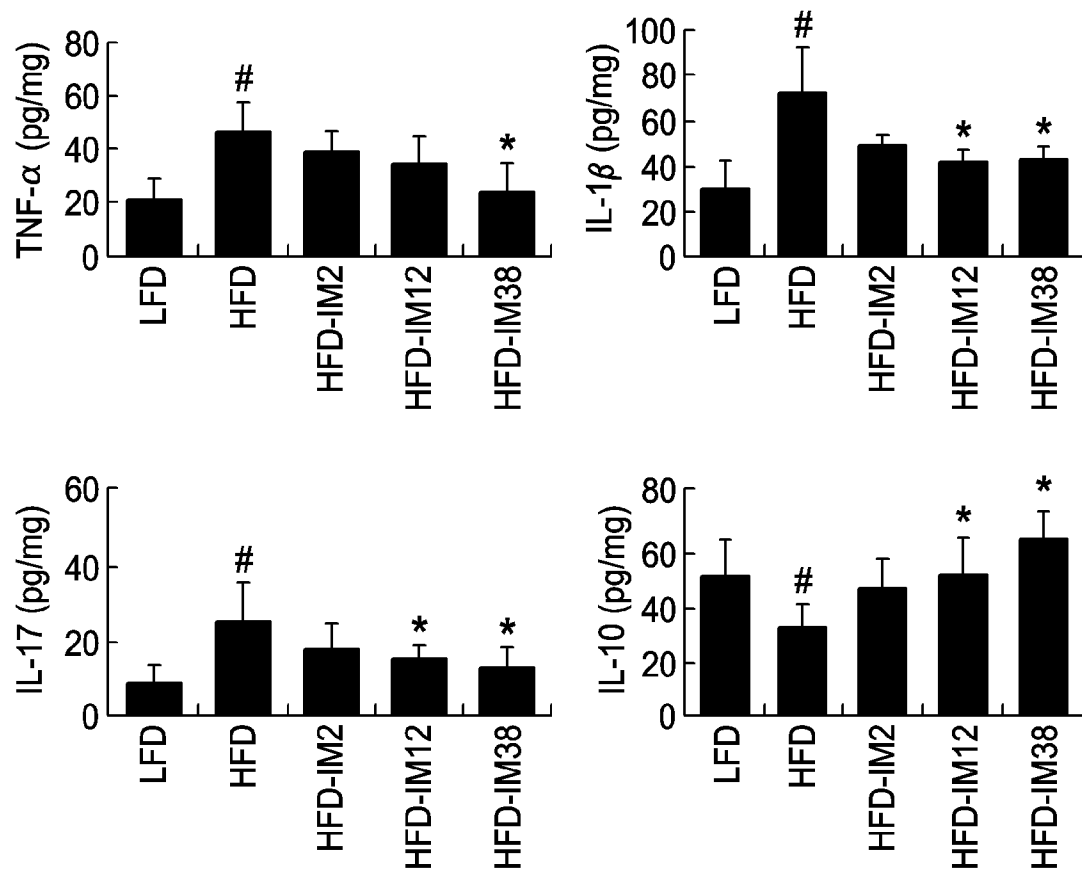
[도11]



[도12]

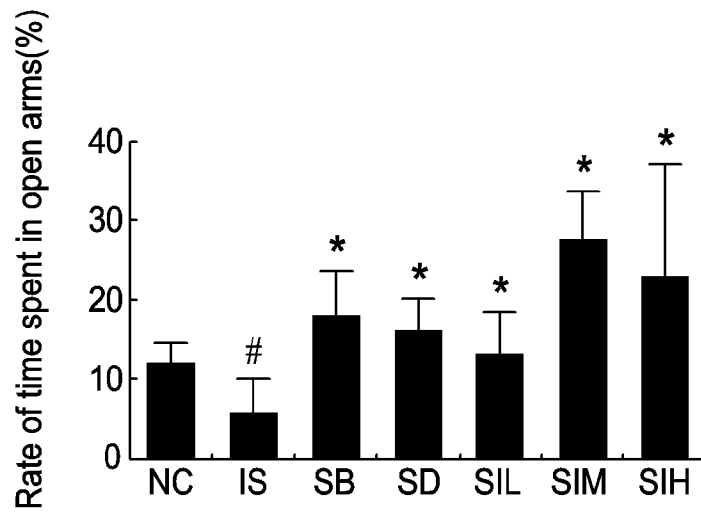


[도13]

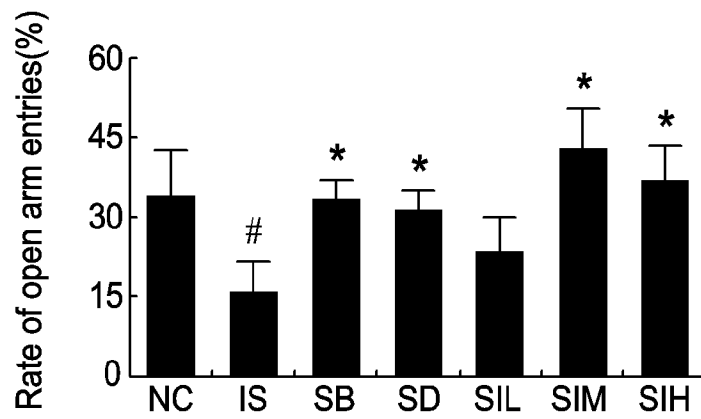


[도14]

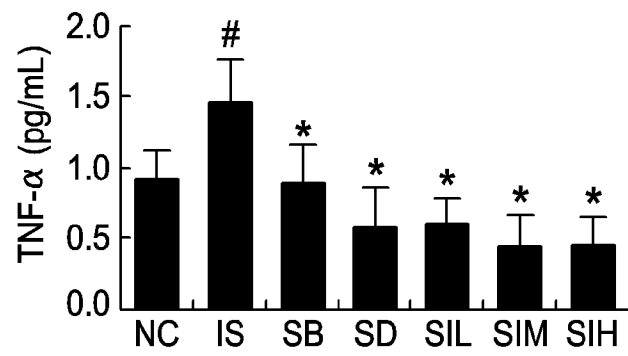
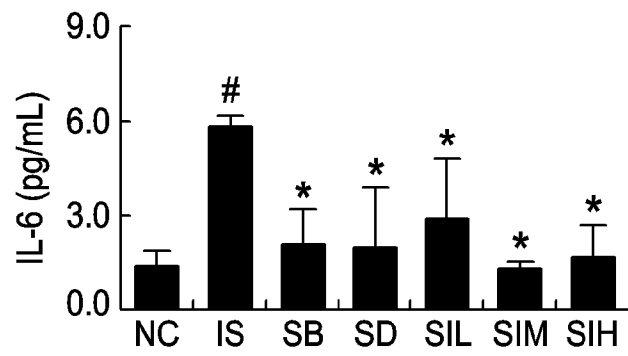
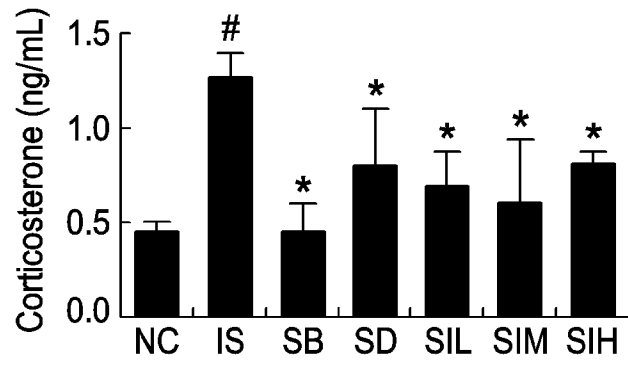
(A)



(B)

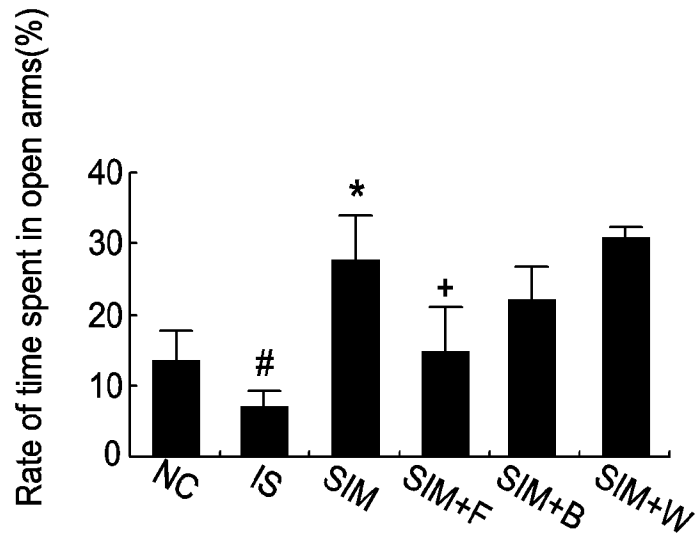


[도15]

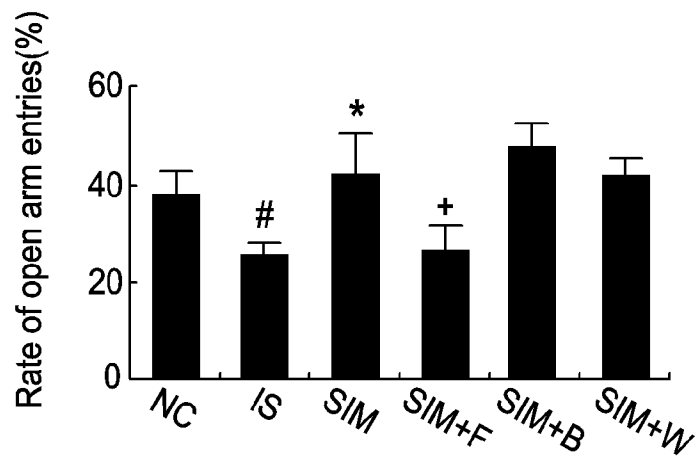


[도16]

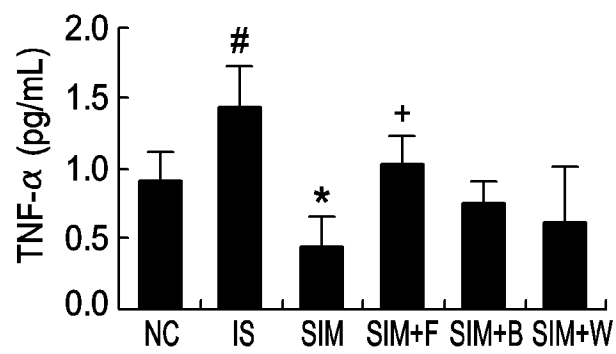
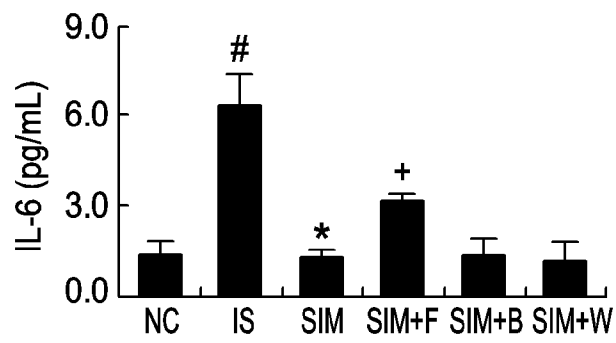
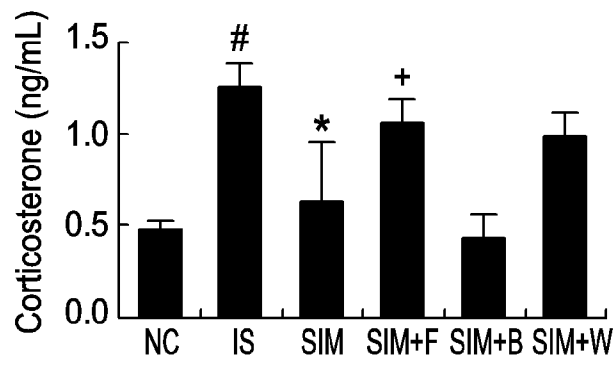
(A)



(B)

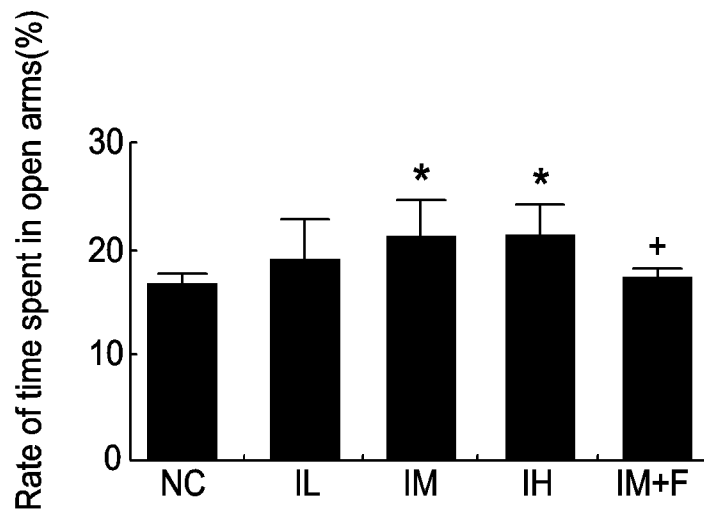


[도17]

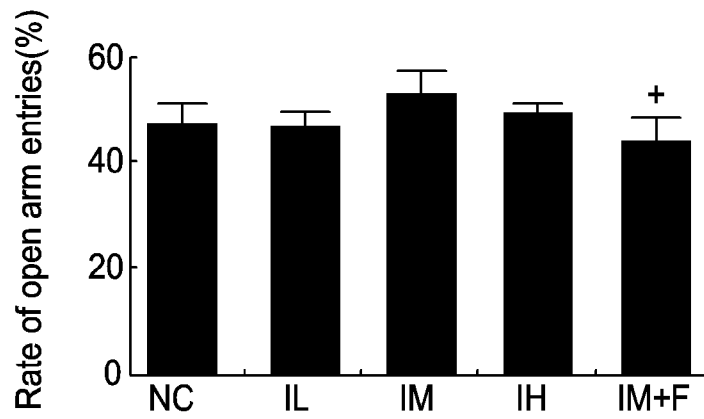


[도18]

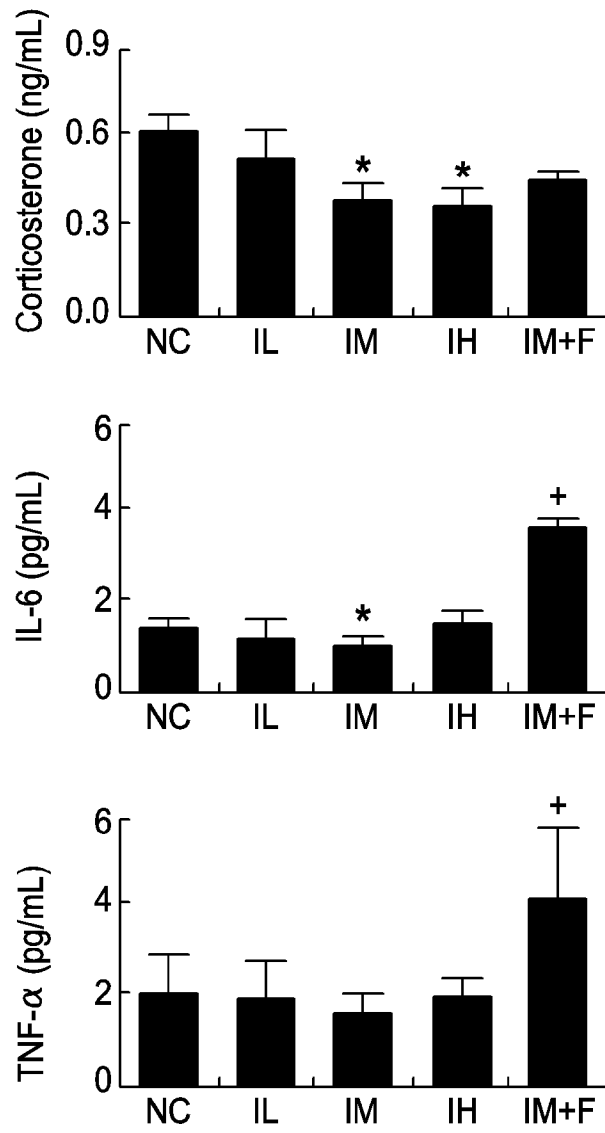
(A)



(B)



[도19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000792

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A61K 35/744(2014.01)i, A61K 35/745(2014.01)i, A61K 35/747(2014.01)i, C12R 1/01(2006.01)n, C12R 1/225(2006.01)n, C12R 1/23(2006.01)n, C12R 1/25(2006.01)n, C12R 1/46(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; A61K 35/744; A61K 38/00; A61P 35/00; A61K 35/74; A61P 25/20; A61P 1/00; A23L 33/135; A61K 35/745; A61K 35/747; C12R 1/01; C12R 1/225; C12R 1/23; C12R 1/25; C12R 1/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: lactobacillus fermentum, KCCM 11806P, bifidobacterium adolescentis, KCCM 11807P, immunity, anti-allergy, anti-stress, anti-depression, colitis, arthritis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2005-0057259 A (VRI BIOMEDICAL LTD.) 16 June 2005 See abstract; claims 1-5 and 18.	1-15
A	KR 10-2009-0114279 A (SAHMYOOK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 03 November 2009 See claim 5.	1-15
A	US 2011-0206650 A1 (DE HAEN, Christoph et al.) 25 August 2011 See claims 1 and 4-5.	1-15
A	US 2011-0206649 A1 (BERGONZELLI DEGONDA, Gabriela et al.) 25 August 2011 See claims 1 and 5; paragraph [0019].	1-15
A	KR 10-2015-0098202 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 27 August 2015 See claim 1.	1-15
A	WO 2014-132982 A1 (MEIJI CO., LTD.) 04 September 2014 See claim 1.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 APRIL 2017 (28.04.2017)

Date of mailing of the international search report

28 APRIL 2017 (28.04.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/000792

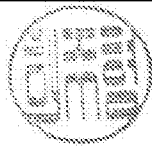
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2005-0057259 A	16/06/2005	AU 2003-258366 A1	29/03/2004
		AU 2003-258366 B2	25/01/2007
		CA 2497989 A1	18/03/2004
		CA 2497989 C	27/08/2013
		CN 100378214 C	02/04/2008
		CN 1701116 A	23/11/2005
		EP 1539927 A1	15/06/2005
		EP 1539927 B1	18/03/2009
		JP 2005-537791 A	15/12/2005
		JP 4455333 B2	21/04/2010
		US 2006-0067921 A1	30/03/2006
		US 2010-0074878 A1	25/03/2010
		WO 2004-022727 A1	18/03/2004
KR 10-2009-0114279 A	03/11/2009	KR 10-1050307 B1	19/07/2011
US 2011-0206650 A1	25/08/2011	CN 102256610 A	23/11/2011
		EP 2206506 A1	14/07/2010
		EP 2373322 A1	12/10/2011
		JP 2012-512828 A	07/06/2012
		WO 2010-069920 A1	24/06/2010
US 2011-0206649 A1	25/08/2011	AU 2009-319257 A1	03/06/2010
		AU 2009-319257 B2	09/10/2014
		BR P10921617 A2	18/08/2015
		CA 2742476 A1	03/06/2010
		CL 2012001950 A1	11/01/2013
		CN 102202527 A	28/09/2011
		CN 102202527 B	31/12/2014
		CN 102960447 A	13/03/2013
		EP 2352393 A1	10/08/2011
		EP 2438821 A1	11/04/2012
		MX 2011004142 A	25/05/2011
		PH 12014501749 A1	18/01/2016
		RU 2011122453 A	10/12/2012
		RU 2013137772 A	20/02/2015
		RU 2517616 C2	27/05/2014
		TW 201029583 A	16/08/2010
		US 2014-0212389 A1	31/07/2014
		US 2014-0242050 A1	28/08/2014
		US 9034314 B2	19/05/2015
		WO 2010-060722 A1	03/06/2010
KR 10-2015-0098202 A	27/08/2015	KR 10-2016-0097183 A	17/08/2016
		KR 10-2016-0098149 A	18/08/2016
		WO 2015-122717 A1	20/08/2015
WO 2014-132982 A1	04/09/2014	CN 105025909 A	04/11/2015
		HK 1215854 A1	23/09/2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/000792

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		SG 11201506640 A	29/09/2015
		WO 2014-132982 A1	02/02/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A61K 35/744(2014.01)i, A61K 35/745(2014.01)i, A61K 35/747(2014.01)i, C12R 1/01(2006.01)n, C12R 1/225(2006.01)n, C12R 1/23(2006.01)n, C12R 1/25(2006.01)n, C12R 1/46(2006.01)n																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20; A61K 35/744; A61K 38/00; A61P 35/00; A61K 35/74; A61P 25/20; A61P 1/00; A23L 33/135; A61K 35/745; A61K 35/747; C12R 1/01; C12R 1/225; C12R 1/23; C12R 1/25; C12R 1/46 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:락토바실러스 파넴, KCCM 11806P, 비피도박테리움 아돌레센티스, KCCM 11807P, 면역, 항알러지, 항스트레스, 항우울, 대장염, 관절염																							
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2005-0057259 A (브이알아이 바이오메디칼 리미티드) 2005.06.16 요약; 청구항 1-5 및 18 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2009-0114279 A (삼육대학교산학협력단) 2009.11.03 청구항 5 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2011-0206650 A1 (DE HAEN, CHRISTOPH 등) 2011.08.25 청구항 1 및 4-5 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2011-0206649 A1 (BERGONZELLI DEGONDA, GABRIELA 등) 2011.08.25 청구항 1 및 5; 단락 [0019] 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2015-0098202 A (경희대학교 산학협력단) 2015.08.27 청구항 1 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014-132982 A1 (MEIJI CO., LTD.) 2014.09.04 청구항 1 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	KR 10-2005-0057259 A (브이알아이 바이오메디칼 리미티드) 2005.06.16 요약; 청구항 1-5 및 18 참조.	1-15	A	KR 10-2009-0114279 A (삼육대학교산학협력단) 2009.11.03 청구항 5 참조.	1-15	A	US 2011-0206650 A1 (DE HAEN, CHRISTOPH 등) 2011.08.25 청구항 1 및 4-5 참조.	1-15	A	US 2011-0206649 A1 (BERGONZELLI DEGONDA, GABRIELA 등) 2011.08.25 청구항 1 및 5; 단락 [0019] 참조.	1-15	A	KR 10-2015-0098202 A (경희대학교 산학협력단) 2015.08.27 청구항 1 참조.	1-15	A	WO 2014-132982 A1 (MEIJI CO., LTD.) 2014.09.04 청구항 1 참조.	1-15
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
A	KR 10-2005-0057259 A (브이알아이 바이오메디칼 리미티드) 2005.06.16 요약; 청구항 1-5 및 18 참조.	1-15																					
A	KR 10-2009-0114279 A (삼육대학교산학협력단) 2009.11.03 청구항 5 참조.	1-15																					
A	US 2011-0206650 A1 (DE HAEN, CHRISTOPH 등) 2011.08.25 청구항 1 및 4-5 참조.	1-15																					
A	US 2011-0206649 A1 (BERGONZELLI DEGONDA, GABRIELA 등) 2011.08.25 청구항 1 및 5; 단락 [0019] 참조.	1-15																					
A	KR 10-2015-0098202 A (경희대학교 산학협력단) 2015.08.27 청구항 1 참조.	1-15																					
A	WO 2014-132982 A1 (MEIJI CO., LTD.) 2014.09.04 청구항 1 참조.	1-15																					
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																							
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2017년 04월 28일 (28.04.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 04월 28일 (28.04.2017)																					
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 																					

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2005-0057259 A	2005/06/16	AU 2003-258366 A1 AU 2003-258366 B2 CA 2497989 A1 CA 2497989 C CN 100378214 C CN 1701116 A EP 1539927 A1 EP 1539927 B1 JP 2005-537791 A JP 4455333 B2 US 2006-0067921 A1 US 2010-0074878 A1 WO 2004-022727 A1	2004/03/29 2007/01/25 2004/03/18 2013/08/27 2008/04/02 2005/11/23 2005/06/15 2009/03/18 2005/12/15 2010/04/21 2006/03/30 2010/03/25 2004/03/18
KR 10-2009-0114279 A	2009/11/03	KR 10-1050307 B1	2011/07/19
US 2011-0206650 A1	2011/08/25	CN 102256610 A EP 2206506 A1 EP 2373322 A1 JP 2012-512828 A WO 2010-069920 A1	2011/11/23 2010/07/14 2011/10/12 2012/06/07 2010/06/24
US 2011-0206649 A1	2011/08/25	AU 2009-319257 A1 AU 2009-319257 B2 BR PI0921617 A2 CA 2742476 A1 CL 2012001950 A1 CN 102202527 A CN 102202527 B CN 102960447 A EP 2352393 A1 EP 2438821 A1 MX 2011004142 A PH 12014501749 A1 RU 2011122453 A RU 2013137772 A RU 2517616 C2 TW 201029583 A US 2014-0212389 A1 US 2014-0242050 A1 US 9034314 B2 WO 2010-060722 A1	2010/06/03 2014/10/09 2015/08/18 2010/06/03 2013/01/11 2011/09/28 2014/12/31 2013/03/13 2011/08/10 2012/04/11 2011/05/25 2016/01/18 2012/12/10 2015/02/20 2014/05/27 2010/08/16 2014/07/31 2014/08/28 2015/05/19 2010/06/03
KR 10-2015-0098202 A	2015/08/27	KR 10-2016-0097183 A KR 10-2016-0098149 A WO 2015-122717 A1	2016/08/17 2016/08/18 2015/08/20
WO 2014-132982 A1	2014/09/04	CN 105025909 A HK 1215854 A1	2015/11/04 2016/09/23

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2017/000792

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

SG 11201506640 A
WO 2014-132982 A1

2015/09/29
2017/02/02