

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0160773
(43) 공개일자 2022년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/742 (2015.01) A61P 29/00 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/205 (2021.05)
A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0068826

(22) 출원일자 2021년05월28일

심사청구일자 2021년05월28일

(71) 출원인

주식회사 티엠에스헬스케어

충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40
,305호,306호(충북테크노파크스타기업관)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

(72) 발명자

최병윤

충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40 충
북테크노파크 스타기업관 305호

이상훈

충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40 충
북테크노파크 스타기업관 305호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태동

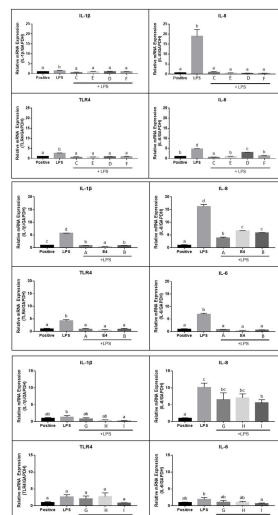
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 항염증 활성이 우수한 김치 유래 신균주 락토바실러스 퍼멘텀 및 이를 포함하는 염증성 질환
의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 한국의 전통 발효식품인 김치로부터 유래한 신균주 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 및 이 균주의 대량 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명의 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4는 내산성, 내담즙성, 젤라틴 액화반응, 유해 대사산물 생성 실험을 통해, 안전하고 유용한 프로바이오틱스 균주임을 확인할 수 있었다. 또한, 항산화능과 관련하여 높은 DPPH free radical scavenging(%) 효능과 염증반응과 관련된 사이토카인 Iinterleukin-1 β (IL-1 β), Iinterleukin-8 (IL-8), Iinterleukin-6 (IL-6), Toll-like receptor (TLR4)의 감소를 확인하였다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/742 (2013.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23Y 2220/00 (2013.01)
C12R 2001/225 (2021.05)

(72) 발명자

김미애

충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 40 층
 북테크노파크 스타기업관 305호

박영재

충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 40 층
 북테크노파크 스타기업관 305호

김하영

충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 40 층
 북테크노파크 스타기업관 305호

최수지

충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 40 층
 북테크노파크 스타기업관 305호

김세현

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 이과캠퍼스 생명과학관 서관 213호

김재영

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 이과캠퍼스 생명과학관 서관 213호

김규완

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 이과캠퍼스 생명과학관 서관 213호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0226001364
과제번호	B0080226001364
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술시험원
연구사업명	첨단 바이오 소재 사업화 지원 프로그램
연구과제명	단백질 기반 스마트 바이오 소재 제품화 및 양산화 지원
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)티엠에스헬스케어
연구기간	2020.04.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 E4 균주는,

항산화 활성 및 항염증 활성이 우수한 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP).

청구항 3

락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP) 또는 이의 배양액 또는 상기 배양액의 농축물 또는 상기 배양액의 건조분말을 포함하는 염증 개선용 식품 조성물.

청구항 4

락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP) 또는 이의 배양액 또는 상기 배양액의 농축물 또는 상기 배양액의 건조분말을 포함하는 노화 개선용 식품 조성물.

청구항 5

락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP) 또는 이의 배양액 또는 상기 배양액의 농축물 또는 상기 배양액의 건조분말을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP)를 탄소원으로 포도당을 사용한 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP)의 배양 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 배지는,

탄소원 2.00~2.50%(w/v), 질소원 2.80~3.20%(w/v), 무기염류 0.25~0.29%(w/v)을 함유하는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP)의 배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 한국의 전통 발효식품인 김치로부터 유래한 신균주 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 (KCTC 14570BP) 및 이 균주의 대량 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명의 균주는 염증질환과 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다.

배경 기술

[0003] 유산균은 젖산균으로도 불리우며 생육활동에 당을 사용하여 유산을 분비하는 균으로 알려져 있다. 유산균은 크게 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* 속으로 분류되며, 이 중에서 대표적인 유산균 속으로는 *Lactobacillus*속과 *Streptococcus* 속이 보고되어 있다. 유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 김치, 장류 및 소시지 등의 각종 발효식품과 의약품 및 가축의 사료 첨가제 등에 이르기까지 인류 생활에 광범위하게 활용되고 있는 것으로 알려져 있다.

[0004] 형태학적으로 유산균은 구균(coccus; *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*) 또는 간균(rod; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*)으로 분류되며, 통성혐기성 또는 혐기성 균으로 알려져 있다. 37℃에서 생육이 가장 활발하고 4℃ 이하와 45℃ 이상에서 생육이 정지되며, 60℃ 이상에서 사멸하는 것으로 알려져 있다. 또한, 유산균은 대부분 산에 대한 내성을 보이며, 생육활동에 필요한 영양요구성은 매우 복잡하고 당류 이외에 많은 종류의 아미노산이나 비타민을 요구하는 것으로 보고되어 있다.

[0005] 최근 김치에서 유래한 유산균은 의약품과 화장품 소재자원으로서 선행 논문·특허 등의 자료에서 입증되고 있다. 이는 유산균의 유용성이 장-피부과학이라 불리는 건강기능식품과 기능성화장품으로 개발하기에 기술적 가치가 높다는 것을 시사한다. 또한, 제품으로서의 인체에 대한 적용 및 안정성 확보, 시장 유통의 보관성 등에 대한 추가 연구도 필요할 것으로 판단된다.

[0006] 김치는 대한민국의 전통음식으로 배추, 무, 오이 등의 채소류를 소금에 절인 후 다양한 부재료와 향신료를 첨가하여, 유산균이 우점종으로서 자랄 수 있는 환경을 만들어 발효를 시킨 발효식품이다. 다양한 부재료는 김치에서 생육할 수 있는 유산균의 생육자원으로서 포함되어 김치의 종류에 따라 다양한 특징을 가진 유산균이 자란다고 보고되어 있다. 일정시간 숙성된 김치에서는 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속의 균이 주로 발견되며, 이는 절임과정과 산발효과정에 의해 삼투압 내성과 산 내성이 높은 *Lactobacillus* 속의 균이 주로 살아남은 것으로 확인된다.

[0007] 한편, 염증반응은 기계적 상해 작용, 온도, 방사선 등의 외부 물리적 인자, 강산을 비롯한 독극물 등의 화학적 인자, 병원 미생물 및 알레르기 등의 면역학적 자극에 대한 생체 조직의 면역체계 반응의 하나이며, 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다. 생체 내 조직 재생 기전에서 대식세포는 염증반응과 면역기능을 조절하는 매우 중요한 역할을 한다. 외부의 항원과 자극에 의해 활성화된 대식세포는 성장인자, cytokine, prostaglandin E2 (PGE2)와 lipid mediator 및 nitric oxide 를 다량 분비하게 되는데, 이 중 PGE2는 혈관의 확장과 혈관 벽의 투과성을 높이고 염증부위로 면역세포들이 모이게 할 뿐만 아니라 interleukin-6과 같은 염증성 cytokine의 분비를 촉진시킨다. 또한, 미생물이 침입하였을 때 대식세포는 침입한 미생물에 대해 독성 반응을 일으키는 reactive oxygen intermediates, hypochlorite, nitric oxide, myeloperoxidase, neutral protease 그리고 lysosomal hydroxylase 등을 미생물을 향해 방출하거나 생성하게 되는데, 이러한 분자들은 개체의 조직에도 직접적으로 손상을 주게된다.

[0008] 이러한 염증성 반응들은 시간 경과에 따라 급성과 만성으로 나뉘며 발명 요인, 발명 부위 및 염증의 양상에 따라 종기, 악창, 구강 염증, 연주창, 염증성 장질환, 위궤양, 방광염, 편도선염, 결막염 등으로 이어질 수 있는 위험성을 지니고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록번호 제 10-1960352 (2019.03.14.)에는, 유해 미생물에 대한 항균 활성, 항생제 내성, 항산화 활성, 효소 분비능, 내산성, 내담즙성, 내열성 및 프리바이오틱스 기질 이용능이 우수하고, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 베리류 발효물 유래의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SBB07 균주(KCCM12102P), 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 유해 미생물에 대한 항균용 조성물 및 프로바이오틱 조성물이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개번호 제 10-2010-0045758 (2010.05.04.)에는, 락토바실러스 펜토시스(*Lactobacillus pentosus*) PL-11 균주가 내담즙성 및 내산성 등의 생리활성, 그리고 항염증 효과와 효소분해능력을 가지고 있기 때문에 이를 어류용 프로바이오틱스(Probiotics)로 이용할 경우, 어류 양식에 유용하지 않은 세균들로부터 어류를 보호하여 생존율을 향상시킬 뿐만 아니라 어류의 증체율 및 사료의 효율을 개선시키는 신규 프로바이오틱스가 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 항산화 및 항염증 효과를 갖고 있으면서도 내산성, 내담즙성을 갖고 있으며, 젤라틴 액화반응과 유해 대사산물 생성 검사를 통해 프로바이오틱스로서의 안전성과 기능성을 확인된 김치 유래 신균주를 개발하여 제공하고자 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 선별된 균주를 대량 생산할 수 있는 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP)를 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 E4 균주 (KCTC 14570BP)는, 바람직하게 항산화 활성 및 항염증 활성이 우수한 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP) 또는 이의 배양액 또는 상기 배양액의 농축물 또는 상기 배양액의 건조분말을 포함하는 염증 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP) 또는 이의 배양액 또는 상기 배양액의 농축물 또는 상기 배양액의 건조분말을 포함하는 노화 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP) 또는 이의 배양액 또는 상기 배양액의 농축물 또는 상기 배양액의 건조분말을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP)를 탄소원으로 포도당을 사용한 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP)의 배양 방법을 제공한다. 이때, 상기 배지는, 바람직하게 탄소원 2.00~2.50%(w/v), 질소원 2.80~3.20%(w/v), 무기염류 0.25~0.29%(w/v)를 함유하는 것이 좋다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 김치 유래 신균주 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 (KCTC 14570BP)를 제공하는데, 이 균주는 내산성, 내담즙성, 젤라틴 액화반응, 유해 대사산물 생성 실험을 통해, 안전하고 유용한 프로바이오틱스 균주임을 확인할 수 있었다. 또한, 항산화능과 관련하여 높은 DPPH free radical scavenging(%) 효과와 염증반응과 관련된 사이토카인 Iinterleukin-1 β (IL-1 β), Iinterleukin-8 (IL-8), Iinterleukin-6 (IL-6), Toll-like receptor (TLR4)의 감소를 확인하였다.

[0022] 한편, 본 발명에서는 E4 균주 (KCTC 14570BP)의 산업적인 대량화 방안으로서, 생장 배지 조성을 달리하여 실험한 결과, 최적 배지 조성 조합을 개발하였다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명에서 선발된 균주 10종의 각 사이토카인별 발현량을 보여준다.

도 2는 본 발명에서 선발된 균주 E4 균주의 16S rRNA 분석 결과이다.

도 3은 본 발명에서 선발된 E4 균주의 최적 성장 배지를 찾기 위해 조성한 배지조성이다.

도 4는 도 3의 다양한 배지를 사용하여 본 발명 E4 균주를 배양한 결과이다.

도 5는 최적 배지조성으로 선택된 S-C배지에 탄소원1(포도당)을 조합한 배지를 이용하여 본 발명 E4 균주를 배양한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명에서는 프로바이오틱스로서의 유효 기능을 가지는 균주를 발굴하기 위해 200여종의 균주를 대상으로 스크리닝을 진행하였다. 내산, 내담즙성 실험과 젤라틴 액화 반응 검사, 유해 대사산물 생성 검사의 진행으로 안정성을 살펴보고, 이와 더불어 노화의 지표인 항산화 검증(DPPH assay)결과를 종합하여 후보 균주 10종을 선발하였다.

[0026] 선발된 후보 균주 10종을 대상으로 항염증 검증을 위해 HT-29 cell line을 이용하여 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-8, TLR4, IL-6의 분비량과 프라이머 서열 및 Tm 값을 확인하고, 각각의 사이토카인 발현량을 환산하여 평균 값으로 순위를 매겨, 항염증 효과가 우수한 균주 E4, B, E, F로 총 4가지 균주를 선발하였다.

[0027] 이들 중 전통적인 발효식품인 김치로부터 분리한 신균주 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4가 가장 최적의 균주임을 확인하고, 2021년 05월 18일자로 대한민국 특허 균주 기탁기관인 한국생물자원센터(KTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC 14570BP를 부여받았다.

[0028] 본 발명의 E4 균주는 하기에서 확인되는 바와 같이 우수한 항산화 활성이 있는 것으로 확인되어, 이를 지표로 하는 노화에 대해서도 개선능이 있음을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 본 발명의 E4균주는 노화 개선용 식품 조성물의 원료로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 E4 균주는 항염증 활성이 우수하여 염증 개선용 식품 조성물 또는 염증의 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물로도 사용될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물 또는 약학 조성물에는 본 발명의 E4 균주 또는 이의 배양액 또는 상기 배양액의 농축물 또는 상기 배양액의 건조분말이 첨가될 수 있다.

[0029] 최근 프로바이오틱스는 장건강능 개선 외에 다양한 기능들이 밝혀지면서 식품 또는 약품의 소재로서 각광받고 있는데, 본 발명의 E4 프로바이오틱스 균주도 건강기능식품의 소재 또는 약품의 소재로 활용될 수 있는 것이다.

[0030] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 식품 조성물은 특정 제형에 반드시 한정되는 것은 아니고, 일 예로, 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵류, 스낵류, 과자류, 사탕, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 유제품류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류중 선택되는 어느 하나 일수 있다. 더욱 바람직하게는 유산균 발효유, 두유, 분유, 요구르트, 음료, 과립 또는 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으며 반드시 이에 한정되는 것은 아니다

[0031] 한편, 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다. 또한, 치료 및 예방제가 약제인 경우 증진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등이 추가적으로 포함될 수 있다.

[0032] 한편, 본 발명의 약학 조성물의 제형은 사용 방법에 따라 바람직한 형태로 제조될 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제

형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니멘트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 안연고제(OPHTHALMIC OINTMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 전제(DECOCTIONS), 침제(INFUSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLASMA), 캡셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 톨크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0033] 한편, 본 발명의 약학조성물에 있어서, 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 균주를 기준으로 하였을 때 1일 0.00001 내지 100 mg/kg (체중)으로 1회 이상 경구 투여 가능하다. 다만, 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태와 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.

[0034] 한편, 본 발명에서는 본 발명 균주가 상업적으로 활용가능할 정도로 대량 생산이 가능한지 확인해 보았다. 다양한 조합의 배지를 조성하여 실험을 수행하였는데, 탄소원으로 포도당을 사용한 배지에서 생육이 우수한 것으로 확인되었다. 더욱 바람직하게는 바람직하게 탄소원 (바람직하게 포도당) 2.00~2.50%(w/v), 질소원 2.80~3.20%(w/v), 무기염류 0.25~0.29%(w/v)을 함유하는 배지를 사용하여 배양을 하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 또한, 37℃에서 9.5시간 배양하는 것이 최적인 것으로 확인되었다.

[0036] 이하, 본 발명의 내용에 대해 하기 실시예 또는 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0038] [실시예 1 : 프로바이오틱스 후보 균주의 안정성 평가 및 기능성 평가]

[0039] 1. 실험 목적

[0040] 본 실시예에서는 프로바이오틱스 후보 균주의 안정성 평가 및 기능성 평가를 수행하였다.

[0042] 2. 실험 방법

[0043] (1) 내산성 검증

[0044] 프로바이오틱스를 섭취하였을 때 위에서의 생존성을 확인하기 위해 내산성 실험을 진행하였으며, 준비된 프로바이오틱스 균주를 인공위액에 접종시키고 37℃에서 배양시키면서 0.3시간 간격으로 생존균 수를 측정하였다. 이때의 인공위액은 1N HCl을 사용하여 배지의 pH를 2.5로 조정하고 pepsin을 1000 unit/mL가 되도록 첨가 후 멸균시켜 사용하였으며, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, L-cystein, HCl, Tween80 등이 함유된 phosphate buffer (pH 6.8)로 희석하여 총 균수를 측정하며 대조군과 총 균 수 차이를 계산하였다. 대조군으로는 인공위액을 첨가하지 않은 액체배지에 위와 같은 방법으로 실험하였다.

[0046] (2) 내담즙성 검증

[0047] 프로바이오틱스를 섭취하였을 때 생균상태로 위를 거쳐 채장과 십이지장을 통과하여 장까지 도달해야 효과를 발휘할 수 있기 때문에, 위 과정 중 생성되는 담즙액에 대한 내성을 알아보기 위해 내담즙성을 평가하였다. 내담즙성을 평가하기 위해서는 실제 소화계와 비슷한 환경을 만들어주기 위해 인공위액을 거친 배양액을 0.3%의 oxgall 이 함유된 MRS 멸균 액체배지에 접종시킨 후 37℃에서 배양시키면서 0, 24시간 간격으로 생존균 수를 측정하여, 대조군과 총 균 수 차이를 계산하였다. 대조군으로는 인공 담즙액을 첨가하지 않은 액체배지에 위와 같은 방법으로 실험하였다.

[0049] (3) 젤라틴 액화 반응 검증(gelatin test)

[0050] 프로바이오틱스의 gelatinase의 생성여부를 확인하기 위하여, 젤라틴 영양 배지(beef extract 0.3%, peptone 0.5%, gelatin 12%)에 프로바이오틱스 균주들을 접종한 뒤 37℃에서 48시간 배양한 후 젤라틴 영양배지를 4℃에 약 4시간 동안 냉장 방치하여 배지의 응고 여부를 확인하였다. 이때, 배지가 응고되지 않으면 액화 반응 양성으로 판정하였다.

[0052] (4) 유해 대사산물 생성 검사(urease test)

[0053] Urea agar base 배지에 프로바이오틱스 균주들을 streaking한 다음 37℃에서 48시간 배양하였다. 대상 프로바이오틱스 균주가 urease를 생성하면 urea가 분해되어 배지의 pH가 높아져 지시약으로 사용되는 phenol red가 황색에서 적색으로 변화하였다.

[0055] (5) 항산화능 검증(DPPH free radical scavenging)

[0056] 프로바이오틱스 균주를 멸균된 MRS broth에 1% 접종하여 37℃에서 18시간 배양시킨 후, 10,000 rpm, 5 min, 4℃에서 원심분리하여 CFE(cell free extract)를 준비하였다. 준비된 CFE 500 μL에 3.0mL의 2,2-DiPhenyl-2-Picryl hydrazyl hydrate(DPPH)용액(5 mg/100 mL ethanol)을 섞어주었으며, 동일한 양의 ethanol, MRS용액, ascorbic acid(100 μg/mL)을 각각 대조군, blank, 비교군으로 사용하였다. 이후 DPPH용액과 섞은 후 암실에서 30분 배양하고, 517 nm 흡광도를 측정, 다음식을 사용하여 항산화능을 %로 환산하였으며, 계산식은 아래 수학적 1과 같았다.

[0057] [수학적 1]

$$DPPH\ free\ radical\ scavenging(\%) = \frac{Absorbance\ of\ control - Absorbance\ of\ sample}{Absorbance\ of\ control} \times 100$$

[0058]

[0060] 2. 실험 결과

[0061] 상기의 5가지 실험의 결과, 후보군으로부터 안전성과 안정성 및 기능성이 우수한 프로바이오틱스 균주 10종을 선발하였고, 표 1과 같았다.

표 1

[0062]

Strain	Acid tolerance (relativeto0h%)	Bile salts tolerance (relativeto0h%)	DPPH free radical scavenging(%)	Urease	Gelatinase
A	91	118	88.09		
E4	88	108	81	-	-
B	87	114	80	-	-
C	88	105	77	-	-
E	99	110	81	-	-
D	100	109	75	-	-
F	82	111	80	-	-
G	83	104	80	-	-
H	79.5996.2	86.38	80.87	-	-
I	84	103	91	-	-

[0064] [실시예 2: 선발 균주의 항염증 효능 검증]

[0065] 본 실험에서는 상기에서 선발된 프로바이오틱스 균주 10종의 항염증 기능성을 평가하고자 하였다.

[0066] 실험을 위해 HT-29 cell line을 Korea Culture Type Collection (KCTC, Korea)으로부터 분양받았으며, 10%

heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco), penicillin G (100 IU/ml), 그리고 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 medium (Gibco BRL, U.S.A.)을 이용하여 37℃, 5% CO₂의 대기 환경에서 배양하여 사용하였다.

[0067] HT-29 세포는 96 well plate에 1×10^5 cells/well의 조건으로 seeding하여 24시간 동안 배양 후, HT-29 세포에 열처리한 균주를 24시간 동안 사전 처리하였다. 이후 해당 media를 제거한 후, 염증반응을 유도하기 위해 Lipopolysaccharide (LPS)(1μg/mL)를 처리하여 24시간 동안 반응을 진행하였다. 이때의 그룹은 크게 Positive, Negative, 균주처리 그룹으로 설정하였으며, Positive 그룹은 blank, Negative 그룹은 LPS만 처리, 균주처리 그룹은 LPS와 함께 균주처리를 하였다.

[0068] RNA Extraction 및 cDNA 합성을 위해 LPS 처리가 완료된 plate well 내 media를 suction한 후, Trizol reagent (Invitrogen)을 1mL 처리하였다. 이후 Cell Scrapper로 세포를 완전히 떼어내고, chloroform 200μL를 넣고 교반하였으며, 5분간 incubation 후 원심분리를 12000 rpm으로 15분간, 4℃에서 진행하였다. 이후 생성된 상층액을 ep tube에 분주한 후, 해당 튜브에 isopropanol 200μL를 넣고 10분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 원심분리를 12000 rpm으로 15분간, 4℃에서 진행하고 상층액을 제거하였으며, 이때 튜브 내에 있는 pellet을 75% EtOH로 워싱하고 원심분리를 7500 rpm으로 5분간 4℃에서 진행하여 상층액을 제거하였다. 그리고 5분간 air dry를 진행하고, DEPC 20μL 분주 후 나노드랍을 찍어 RNA concentration을 측정하였으며, 농도값을 바탕으로 RNA를 100 ng/μL로 희석한 후 cDNA kit (Applied Biosystems)를 사용하여 PCR로 cDNA를 합성하였다. PCR은 25℃에서 10분, 37℃에서 2시간, 85℃에서 5분간 진행하였다.

[0069] 합성된 cDNA는 100 ng/μL로 희석 후, 염증성 사이토카인의 유전자적 표현량을 qRT-PCR을 이용해 측정하였고, 염증반응의 마커로는 IL-1β, IL-8, TLR4, IL-6을 측정하였고 사용한 프라이머 서열은 아래 표 2와 같았다.

표 2

[0070]

Gene	-	Gene Sequence	Tm (℃)
GAPDH	f	5' -CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3'	59.8
	r	5' -ATG ACC ACA GTC CAT GCC-3'	
IL-1β	f	5' -CCA GCT ACG AAT CTC GGA CCA CC-3'	63.0
	r	5' -TTA GGA AGA CAC AAA TTG CAT GGT GAA GTC AGT-3'	
IL-8	f	5' -GTT GTG AGG ACA TGT GGA AGC ACT-3'	56.5
	r	5' -CAC AGC TGG CAA TGA CAA GAC TGG-3'	
TLR4	f	5' -CAG AAC TGC AGG TGC TGG-3'	53.2
	r	5' -GTT CTC TAG AGA TGC TAG-3'	
IL-6	f	5' -CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3'	64.2
	r	5' -GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA-3'	

[0072] 각 염증성 사이토카인의 발현량 측정 결과는 도 1과 같았다. 도 1은 선발된 10종 균주의 각 사이토카인별 발현량을 보여준다.

[0073] 한편, 각 염증성 사이토카인의 발현량 측정 결과를 취합하여 평균(%)을 내기 위해 다음과 같은 환산식 (수학식 2)에 대입하여 계산하였다.

[0074] [수학식 2]

$$\text{염증성 사이토카인 발현량}(\%) = [1 - (\text{Fold}_{\text{sample}} - \text{Fold}_{\text{blank}}) / (\text{Fold}_{\text{control}} - \text{Fold}_{\text{blank}})] \times 100$$

[0075]

[0077] 계산 결과 중, 가장 우수하게 나온 E4, B, E, F에 대한 결과만 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

순위	strain	염증성 사이토카인 발현 억제능 평균(%)	ID 결과
1	E4	121	<i>L. fermentum</i>
2	B	110	<i>L. brevis</i>
3	E	105	<i>L. fermentum</i>
4	F	102	<i>L. brevis</i>

[0078]

[0080]

실험 균주의 사이토카인 발현 억제량은 E4가 121%, B는 110%, E는 105%, F는 102%로 나타났는데, Positive 그룹 (대조군) 이 100%인 점으로 보아 전부다 대조군 보다 우수하다고 판단하였다. 다만, E4 균주가 가장 우수한 것으로 나타났다.

[0081]

한편, MRS 배지에서 배양한 미생물의 동정(identification)을 위해 DNA sequencing을 진행하였으며, 배지에서 배양한 미생물 배양액으로부터 Genomic DNA prep. kit (17121, INTRON)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA를 universal primer (27F 5' -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R 5' -TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용해 16s rRNA gene 염기서열 부분을 증폭하여 동정하였다. 사용한 PCR 산물의 DNA 염기 서열을 확인하기 위해 PCR products를 PCR Purification Kit (28104, Qiagen)를 사용하여 정제한 후, DNA sequencing에 이용하였다. DNA 염기서열은 ABI PRISM 3700 DNA analyzer를 사용하여 염기서열을 결정하며, 이것을 NCBI의 BLAST를 이용하여 GenBank database와 비교하여 균을 동정하게되었다. 이 과정은 Macrogen에 의뢰하여 진행하였다.

[0082]

위 균주를 이용하여 16s rRNA sequencing을 수행하였는데, 수행 결과 E4, E는 *Lactobacillus fermentum*으로, B, F는 *Lactobacillus brevis*로 동정되었다. 도 2는 이중 E4 균주의 16S rRNA 분석 결과이다.

[실시예 3 : 프로바이오틱스의 균주의 대량 생산 공정 확립]

[0085]

상기에서 동정된 균주 중 *Lactobacillus fermentum* E4 (FT E4)의 small scale 최적화 공정을 확립하기 위해, 플라스크 실험을 수행하였다. 탄소원과 질소원, 그리고 무기염류의 종류 및 비율을 달리하였으며, 이에 대한 균주의 성장곡선을 확인하였다. 배지의 성장률을 비교하기 위해 사용한 배지조성은 도 3에 나타내었다. 도 3은 E4 균주의 성장률을 비교하기 위해 사용한 배지조성이다. 도 4는 다양한 배지를 사용하여 E4 균주를 배양한 결과이다.

[0086]

최종적으로 S-C배지에 탄소원1(포도당)을 조합한 배지에서 가장 좋은 성장률을 보였고, 이를 full growth를 통해 검증하여 5L Jar fermentor의 배지로 선정하여 대량화에 사용하였다. 최적 배지조성으로 선택된 S-C배지에 탄소원1(포도당)을 조합한 배지를 이용하여 총 9.5시간 동안 5L Jar fermentor를 이용하여 배양하였으며, 배양액을 취하여 10배로 희석하여 O.D 660nm에서 측정하였다. 도 5는 최적 배지조성으로 선택된 S-C배지에 탄소원1(포도당)을 조합한 배지를 이용하여 본 발명 E4 균주를 배양한 결과이다.

[0087]

한편, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주의 단위 공정별 수율 분석으로 배양 종료 (OB), mixed pellet 제조 (MXPE), 동결 건조 후 powder (원말)에서 각 공정별로 생균수를 측정하여 수율을 분석하였다 (표 4).

표 4

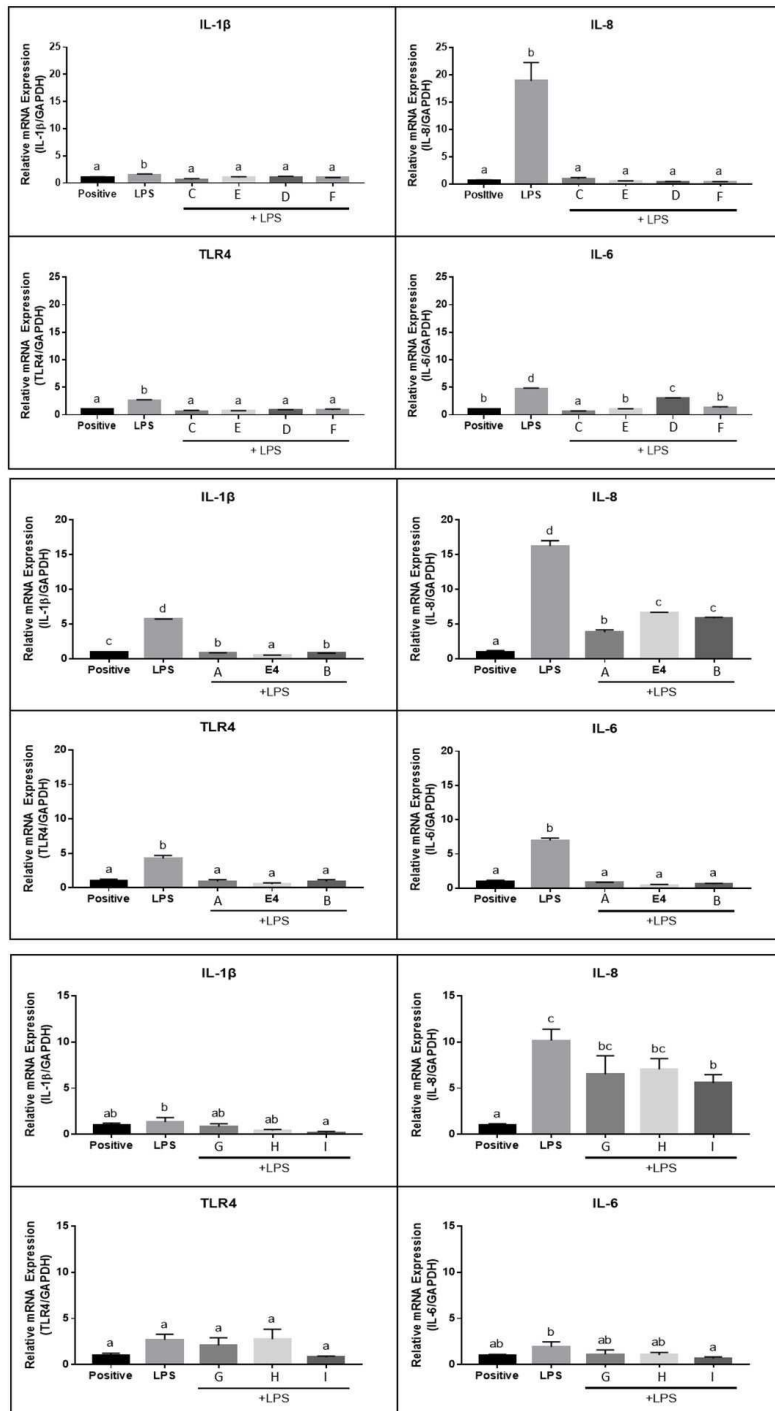
	OB			MXPE				원말		
	Vol (ml)	생균수 (CFU/ml)	총 생균수 (CFU)	Pellet (g)	MXPE (g)	생균수 (CFU/g)	총 생균수 (CFU)	원말량 (g)	생균수 (CFU/g)	총 생균수 (CFU)
수치	1400	1.07E+10	1.50E+13	15.87	31.74	1.17E+11	3.71E+12	6.46	4.35E+11	2.81E+12
수율 (%)			100.00				24.79			18.73

[0088]

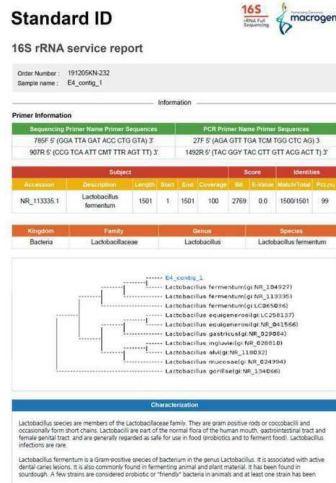
- [0090] 배양 종료 시점에서 배양액 중의 생균수는 1.07×10^{10} CFU/mL이었으며, 원심분리에 의해 농축되어 동결보호제에 혼합된 균의 생균수는 1.17×10^{11} CFU/mL, 동결건조되어 제조된 원말의 양은 6.46 g이며 이의 생균수는 4.35×10^{11} CFU/g임을 확인하였다. 배양 종료액에서 MXPE의 수율은 24.79%이며 원말의 수율은 18.73% 였다. 상기와 같은 5L Jar fermentor 결과를 분석을 기반으로 E4 균주가 양산화에 적합한 균주라고 판단되었다.
- [0091] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- [0092] 수탁번호 : KCTC14570BP
- [0093] 수탁일자 : 2021518

도면

도면1



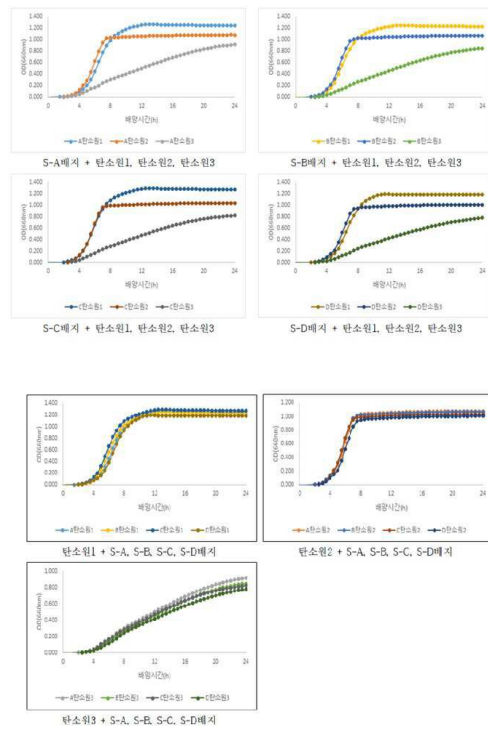
도면2



도면3

	S-A	S-B	S-C	S-D
탄소원 1 (포도당)	원료명	원료명	원료명	원료명
	%	%	%	%
	탄소원 1	탄소원 1	탄소원 1	탄소원 1
	2.20	2.20	2.20	2.20
	절소원	절소원	절소원	절소원
탄소원 2 (과당)	3.00	3.00	3.00	4.00
	무기염류	무기염류	무기염류	무기염류
	0.27	0.27	0.42	0.27
	기타	기타	기타	기타
	0.10	0.10	0.10	0.10
탄소원 3 (유당)	원료명	원료명	원료명	원료명
	%	%	%	%
	탄소원 2	탄소원 2	탄소원 2	탄소원 2
	2.00	2.00	2.00	2.00
	절소원	절소원	절소원	절소원
탄소원 4 (유산)	3.00	3.00	3.00	4.00
	무기염류	무기염류	무기염류	무기염류
	0.27	0.27	0.42	0.27
	기타	기타	기타	기타
	0.10	0.10	0.10	0.10

도면4



도면5

