



(51) 국제특허분류:

C12N 1/20 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) C12R 1/225 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/007088

(22) 국제출원일: 2021 년 6 월 7 일 (07.06.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보: 10-2021-0068826 2021 년 5 월 28 일 (28.05.2021) KR

(71) 출원인: 주식회사 티엠에스헬스케어 (TOTAL MEDICAL SOLUTIONS HEALTHCARE CO., LTD.) [KR/KR]; 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40, 305호, 306호 (충북테크노파크스타기업관), Chungcheongbuk-do (KR). 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교, Seoul (KR).

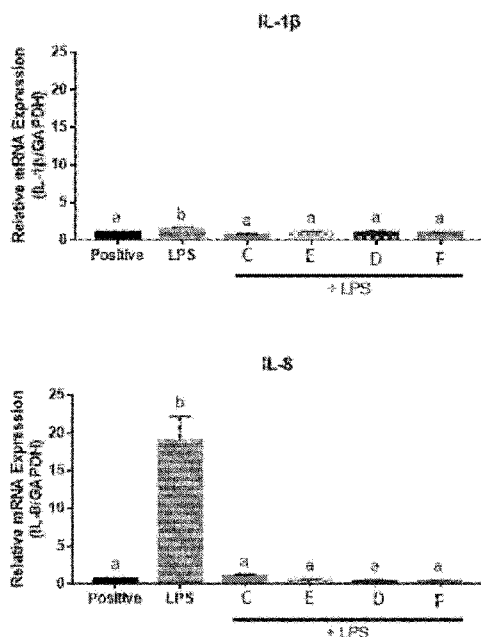
(72) 발명자: 최병윤 (CHOI, Byung Youn); 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40 충북테크노

파크 스타기업관 305호, Chungcheongbuk-do (KR). 이상훈 (LEE, Sang Hoon); 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40 충북테크노파크 스타기업관 305호, Chungcheongbuk-do (KR). 김미애 (KIM, Mee Ae); 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40 충북테크노파크 스타기업관 305호, Chungcheongbuk-do (KR). 박영재 (PARK, Young Jae); 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40 충북테크노파크 스타기업관 305호, Chungcheongbuk-do (KR). 김하영 (KIM, Ha Young); 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40 충북테크노파크 스타기업관 305호, Chungcheongbuk-do (KR). 최수지 (CHOI, Su Ji); 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40 충북테크노파크 스타기업관 305호, Chungcheongbuk-do (KR). 김세현 (KIM, Sae Hun); 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 이과캠퍼스 생명과학관 서관 213호, Seoul (KR). 김재영 (KIM, Jae Young); 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 이과캠퍼스 생명과학관 서관 213호, Seoul (KR). 김규완 (KIM, Gyu Wan); 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 이과캠퍼스 생명과학관 서관 213호, Seoul (KR).

(54) Title: NOVEL STRAIN LACTOBACILLUS FERMENTUM DERIVED FROM KIMCHI WITH EXCELLENT ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY AND COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES COMPRISING SAME

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

[도 1]



(57) Abstract: The present invention relates to novel strain *Lactobacillus fermentum* E4 derived from kimchi, which is a Korean traditional fermented food, and a method for mass-producing the strain. The *Lactobacillus fermentum* E4 of the present invention was confirmed to be a safe and useful probiotic strain, through acid resistance, bile resistance, gelatin liquefaction and harmful metabolite production experiments. The strain was also confirmed to have high DPPH free radical scavenging(%) efficacy in relation to antioxidative activity and reduce cytokines involved in inflammatory responses, i.e., interleukin-1β (IL-1β), interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), and toll-like receptor (TLR4).

(57) 요약서: 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(%) 효과와 염증반응과 관련된 사이토카인 Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-6 (IL-6), Toll-like receptor (TLR4)의 감소를 확인하였다.



(74) 대리인: 특허법인태동 (TAEDONG PATENT & LAW FIRM); 08302 서울시 구로구 가마산로 282,302호(구로동, 대림오피스텔리), Seoul (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, BY, 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, IT, JO, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

명세서

발명의 명칭: 항염증 활성이 우수한 김치 유래 신균주 락토바실러스 퍼멘텀 및 이를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 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.

배경기술

- [2] 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.
- [3] 형태학적으로 유산균은 구균(coccus; *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*) 또는 간균(rod; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*)으로 분류되며, 통성혐기성 또는 혐기성 균으로 알려져 있다. 37°C에서 생육이 가장 활발하고 4°C 이하와 45°C 이상에서 생육이 정지되며, 60°C 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.
- [4] 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.
- [5] 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.

- [6] 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.

- [7] 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.

- [8] 선행기술문헌 대한민국 특허등록번호 제10-1960352호(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.

- [9] 또한, 선행기술문헌 대한민국 특허공개번호 제10-2010-0045758호 (2010.05.04.)에는, 락토바실러스 펜토서스(*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 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 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.

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

기술적 해결방법

- [12] 본 발명은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP)를 제공한다.
- [13] 본 발명에 있어서, 상기 E4 균주 (KCTC 14570BP)는, 바람직하게 항산화 활성 및 항염증 활성이 우수한 것을 특징으로 한다.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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)을 함유하는 것이 좋다.

발명의 효과

- [18] 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(%) 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.
- [19] 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

- [20] 도 1은 본 발명에서 선별된 균주 10종의 각 사이토카인별 발현량을 보여준다.
- [21] 도 2는 본 발명에서 선별된 균주 E4 균주의 16S rRNA 분석 결과이다.
- [22] 도 3은 본 발명에서 선별된 E4 균주의 최적 성장 배지를 찾기 위해 조성한

배지조성이다.

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

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

발명의 실시를 위한 형태

[25] 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.

[26] 선별된 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 평균값으로 순위를 매겨, 항염증 효과가 우수한 균주 E4, B, E, F로 총 4가지 균주를 선발하였다.

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

[28] 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.

[29] 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.

[30] 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 하나일 수 있다. 더욱 바람직하게는 유산균 발효유, 두유, 분유, 요구르트, 음료, 과일 또는 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으며 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[31] 한편, 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는

부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 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 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등이 추가적으로 포함될 수 있다.

- [32] 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 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니먼트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 안연고제(OPHTALMIC 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), 톤크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

- [33] 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 의사의처방에 의해 변화될 수 있다.

- [34] 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°C에서 9.5시간 배양하는 것이 최적인 것으로 확인되었다.

[35]

- [36] 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.

[37]

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

[39] **1. 실험 목적**

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

[41]

[42] **2. 실험 방법**

[43] **(1) 내산성 검증**

[44] 프로바이오틱스를 섭취하였을 때 위에서의 생존성을 확인하기 위해 내산성 실험을 진행하였으며, 준비된 프로바이오틱스 균주를 인공위액에 접종시키고 37°C에서 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.

[45]

[46] **(2) 내담즙성 검증**

[47] 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°C에서 배양시키면서 0, 24시간 간격으로 생존균 수를 측정하여, 대조군과 총 균 수 차이를 계산하였다. 대조군으로는 인공 담즙액을 첨가하지 않은 액체배지에 위와 같은 방법으로 실험하였다.

[48]

[49] **(3) 젤라틴 액화 반응 검증(gelatin test)**

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

[51]

[52] **(4) 유해 대사산물 생성 검사(urease test)**

[53] Urea agar base 배지에 프로바이오틱스 균주들을 streaking한 다음 37°C에서 48시간 배양하였다. 대상 프로바이오틱스 균주가 urease를 생성하면 urea가

분해되어 배지의 pH가 높아져 지시약으로 사용되는 phenol red가 황색에서 적색으로 변하였다.

[54]

[55] **(5) 항산화능 검증(DPPH free radical scavenging)**

[56] 프로바이오틱스 균주를 멸균된 MRS broth에 1% 접종하여 37°C에서 18시간 배양시킨 후, 10,000 rpm, 5 min, 4°C에서 원심분리하여 CFE(cell free extract)를 준비하였다. 준비된 CFE 500μL에 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 식 1과 같았다.

[57] [수학적 식 1]

[58]
$$DPPH \text{ free radical scavenging}(\%) = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

[59]

[60] **2. 실험 결과**

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

[62] [표1]

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	-	-

[63]

[64] [실시예 2: 선발 균주의 항염증 효능 검증]

- [65] 본 실험에서는 상기에서 선발된 프로바이오틱스 균주 10종의 항염증 기능성을 평가하고자 하였다.
- [66] 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°C, 5% CO₂의 대기 환경에서 배양하여 사용하였다.
- [67] 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)(1 μ g/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.
- [68] RNA Extraction 및 cDNA 합성을 위해 LPS 처리가 완료된 plate well 내 media를 suction한 후, Trizol reagent (Invitrogen)을 1mL 처리하였다. 이후 Cell Scraper로 세포를 완전히 떼어내고, chloroform 200 μ L를 넣고 교반하였으며, 5분간 incubation 후 원심분리를 12000 rpm으로 15분간, 4°C에서 진행하였다. 이후 생성된 상층액을 ep tube에 분주한 후, 해당 튜브에 isopropanol 200 μ L를 넣고 10분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 원심분리를 12000 rpm으로 15분간, 4°C에서 진행하고 상층액을 제거하였으며, 이때 튜브 내에 있는 pellet을 75% EtOH로 워싱하고 원심분리를 7500 rpm으로 5분간 4°C에서 진행하여 상층액을 제거하였다. 그리고 5분간 air dry를 진행하고, DEPC 20 μ L 분주 후 나노드랍을 찍어 RNA concentration을 측정하였으며, 농도값을 바탕으로 RNA를 100 ng/ μ L로 희석한 후 cDNA kit (Applied Biosystems)를 사용하여 PCR로 cDNA를 합성하였다. PCR은 25°C에서 10분, 37°C에서 2시간, 85°C에서 5분간 진행하였다.
- [69] 합성된 cDNA는 100 ng/ μ L로 희석 후, 염증성 사이토카인의 유전자적 표현량을 qRT-PCR을 이용해 측정하였고, 염증반응의 마커로는 IL-1 β , IL-8, TLR4, IL-6을 측정하였고 사용한 프라이머 서열은 아래 표 2와 같았다.

[70] [표2]

Gene	-	Gene Sequence	Tm (°C)
GAPDH	f	5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3'	59.8
	r	5'-ATG ACC ACA GTC CAT GCC-3'	
IL-1 β	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'	

[71]

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

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

[74] [수학식 2]

[75]

$$\text{염증성 사이토카인 발현량(\%)} = \left[1 - \frac{(Fold_{sample} - Fold_{blank})}{(Fold_{control} - Fold_{blank})} \right] \times 100$$

[76]

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

[78] [표3]

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>

- [79] 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.
- [80] 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 염기서열을 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.
- [81] 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.
- [82]
- [83] [실시예 3 : 프로바이오틱스의 균주의 대량 생산 공정 확립]
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] 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).

[87] [표4]

	OB			MXPE				원말		
	Vol (ml)	생균수 (CFU/ml)	총 생균 수 (CFU)	Pellet (g)	MXPE (g)	생균수 (CFU/g)	총 생균 수 (CFU)	원말 량 (g)	생균수 (CFU/g)	총 생균 수 (CFU)
수 치	140 0	1.07E+1 0	1.50E +13	15.87	31.74	1.17E+1 1	3.71E +12	6.46	4.35E+11	2.81E+ 12
수 율 (%)			100.0 0				24.79			18.73

[88] 배양 종료 시점에서 배양액 중의 생균수는 1.07E+10 CFU/mL이었으며, 원심분리에 의해 농축되어 동결보호제에 혼합된 균의 생균수는 1.17E+11 CFU/mL, 동결건조되어 제조된 원말의 양은 6.46 g이며 이의 생균수는 4.35E+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.

[89]

[90] 본 발명의 일 실시예에 따른 균주는 염증질환과 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물로 사용 가능하다.

[91]

[92] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[93] 수탁번호 : KCTC14570BP

[94] 수탁일자 : 2021년 05월 18일

[95]

[96]

0-1	Form PCT/RO/134 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시사항(PCT 규칙 13의 2) 우측에 기재된 바와 같이 작성되었다.	ePCT-Filing Version 4.8.003 MT/FOP 20210602/0.20.5.24
0-1-1		
0-2	국제출원번호	PCT/KR2021/007088
0-3	출원인 또는 대리인의 서류참조기호	SPW-21-002

1	아래 표시된 사항은 발명의 설명 내의 아래 부분에서 언급된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것이다.	96
1-1	단락번호	
1-3	기탁표시	KCTC 한국생명공학연구원 생물자원센터 대한민국 한국생명공학연구원 생물자원센터 56212 전라북도 정읍시 입신길 181(신정동) 2021년 05월 18일 (18.05.2021) KCTC 14570BP
1-3-1	기탁기관명	
1-3-2	기탁기관 주소	
1-3-3	기탁 일자	
1-3-4	기탁 번호	
1-4	추가 표시 사항	
1-5	표시사항은 다음 지정국을 위한 것이다.	모든 지정국
1-6	추가 표시 사항 이러한 표시는 추후 국제 사무국(IB)에 제출된다.	

수리관청 전용

0-4	국제 출원서와 함께 이 서식을 수리하였다. 네 또는 아니오	
0-4-1	승인 사무관	

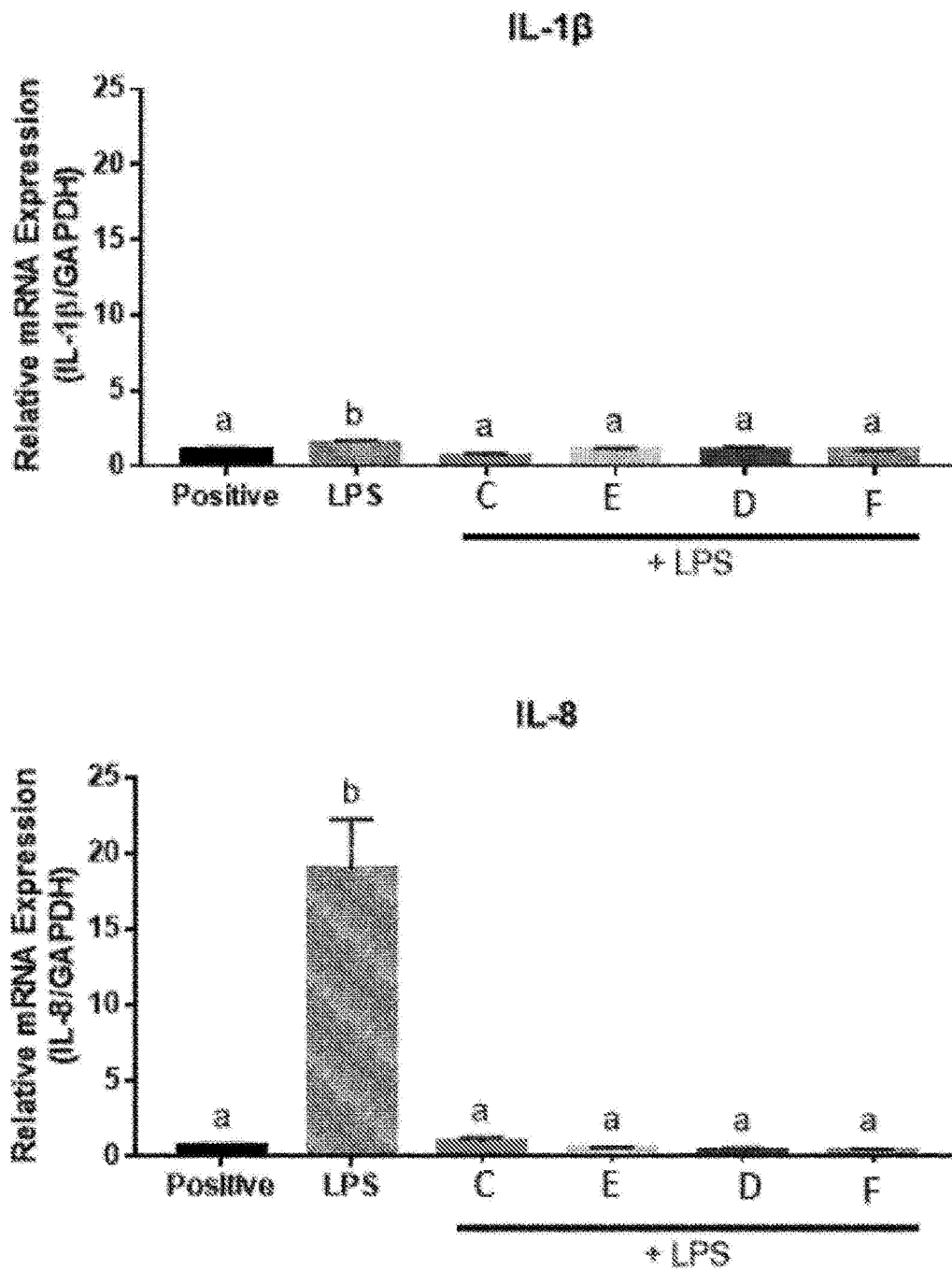
국제 사무국 전용

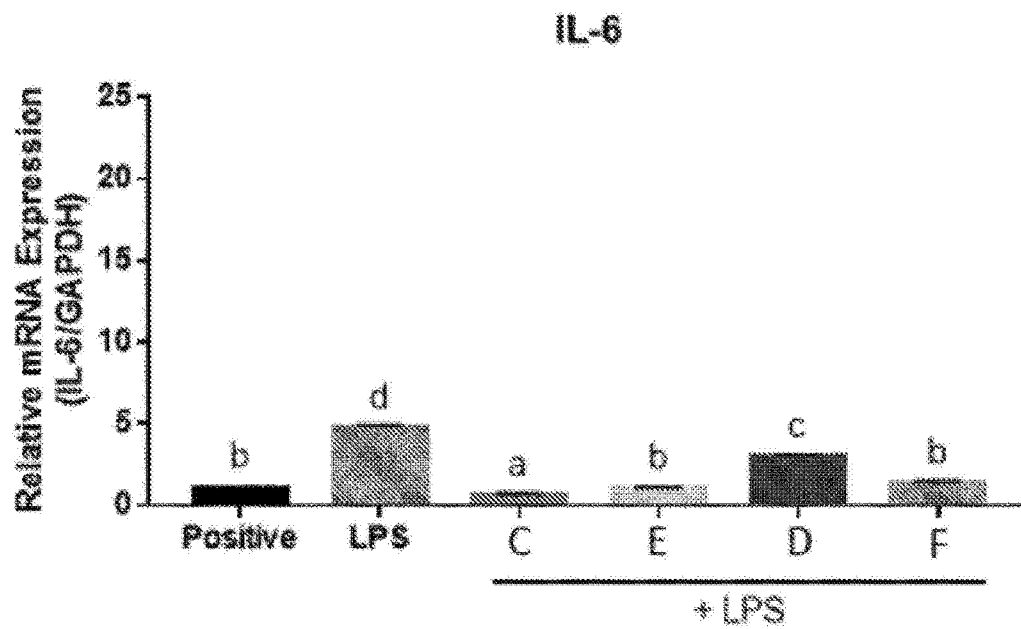
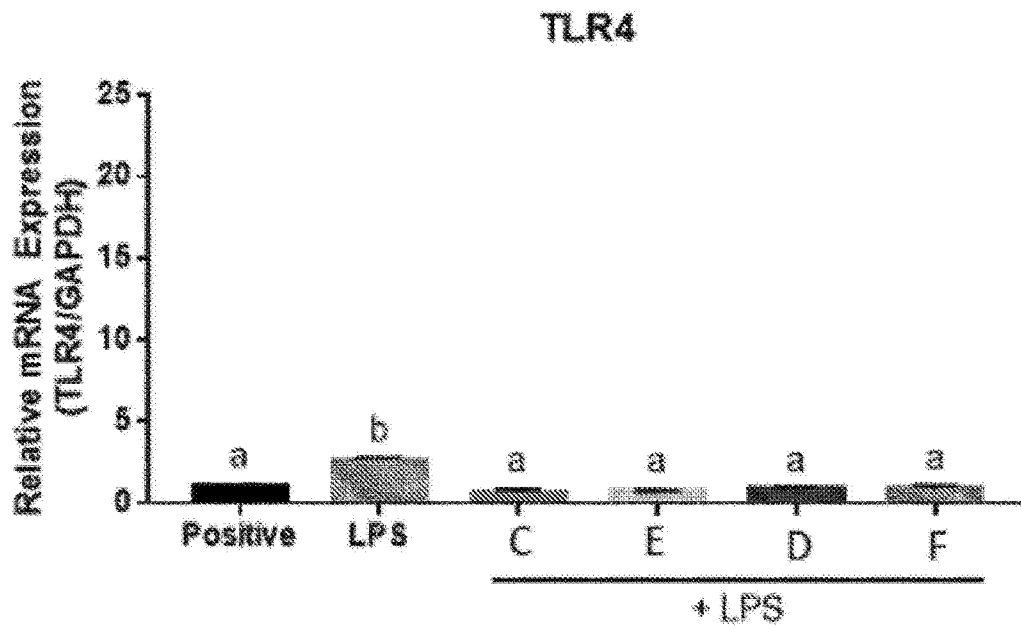
0-5	국제 사무국(IB)이 이 서식을 수리하였다.	
0-5-1	승인 사무관	

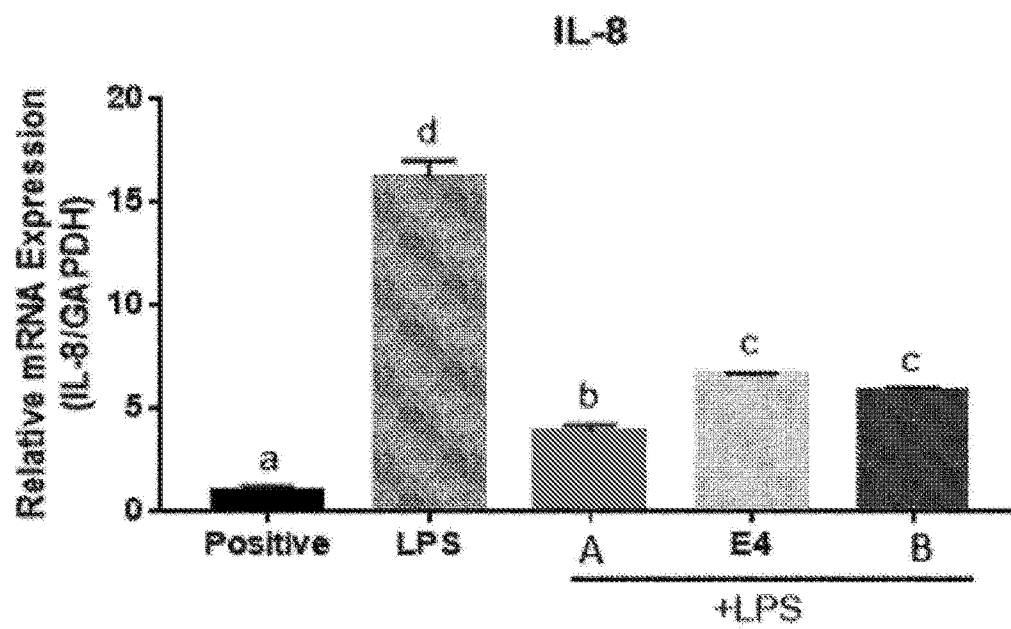
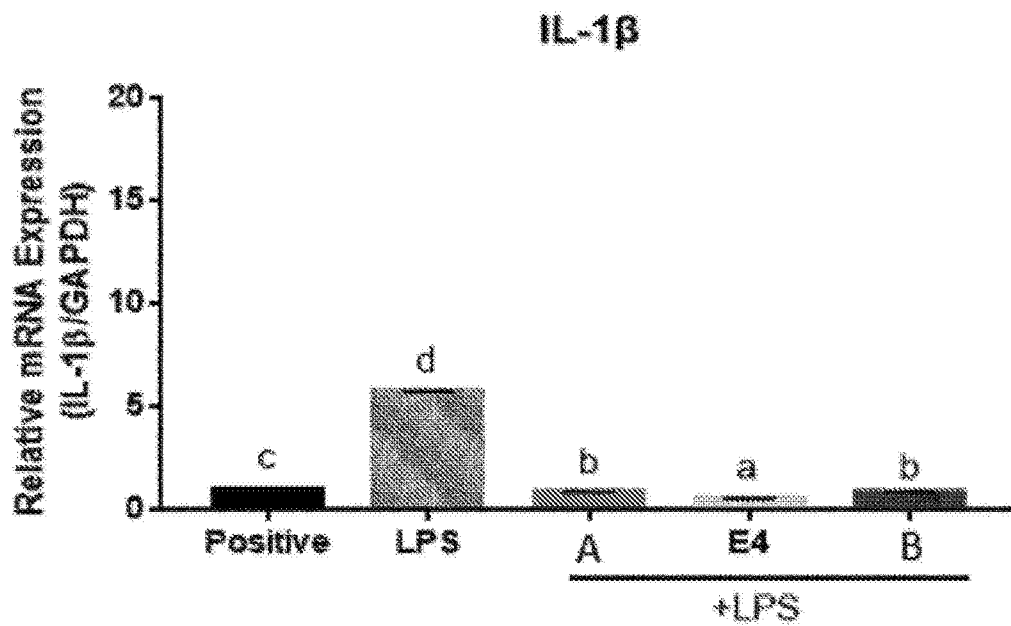
청구범위

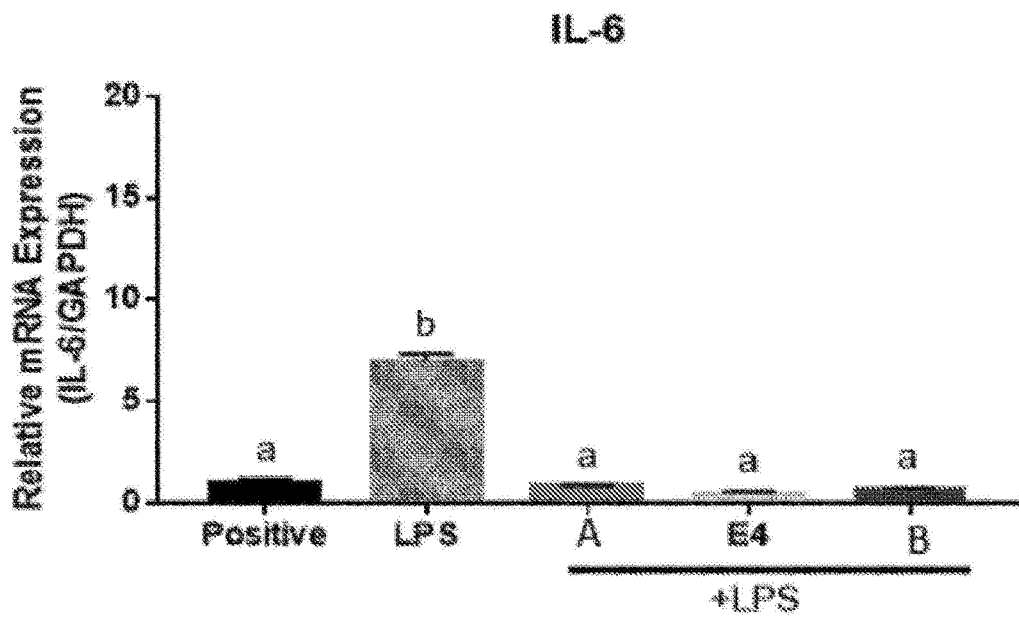
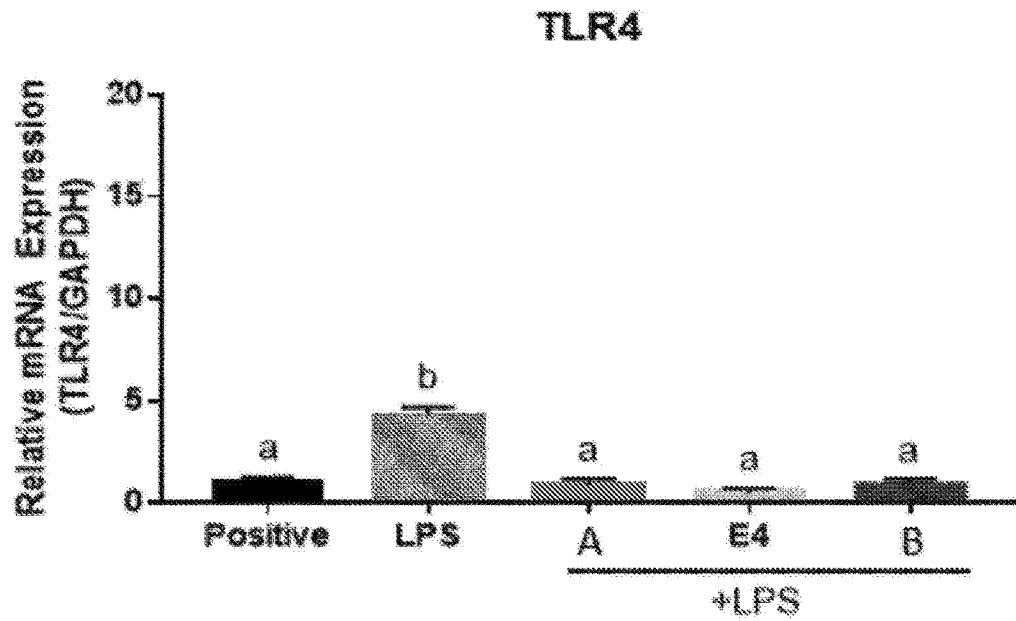
- [청구항 1] 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP).
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 E4 균주는,
항산화 활성 및 항염증 활성이 우수한 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP).
- [청구항 3] 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) E4 균주 (KCTC 14570BP)
또는 이의 배양액 또는 상기 배양액의 농축물 또는 상기 배양액의
건조분말을 포함하는 염증 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.

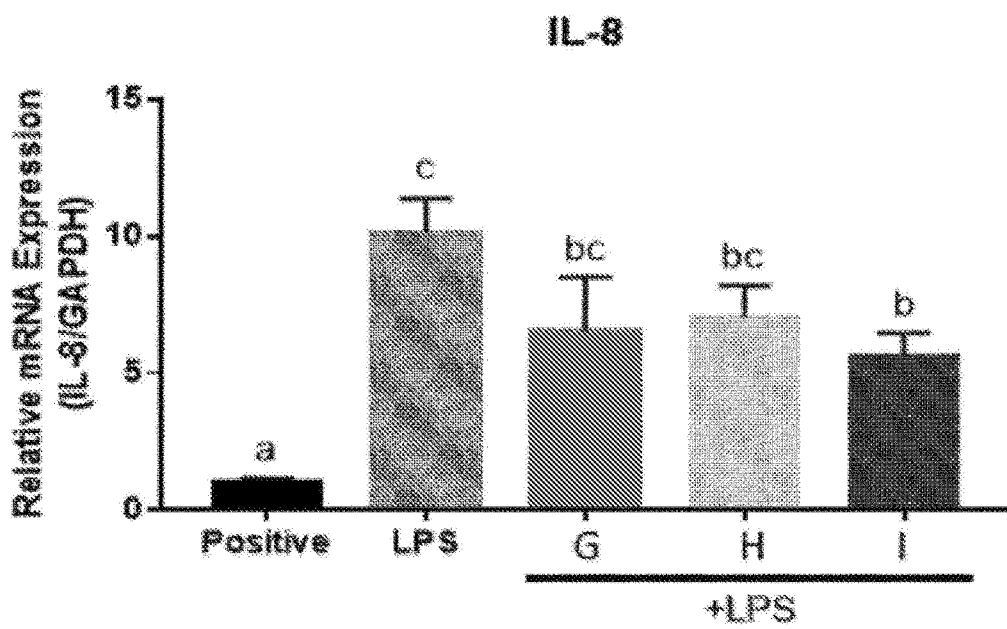
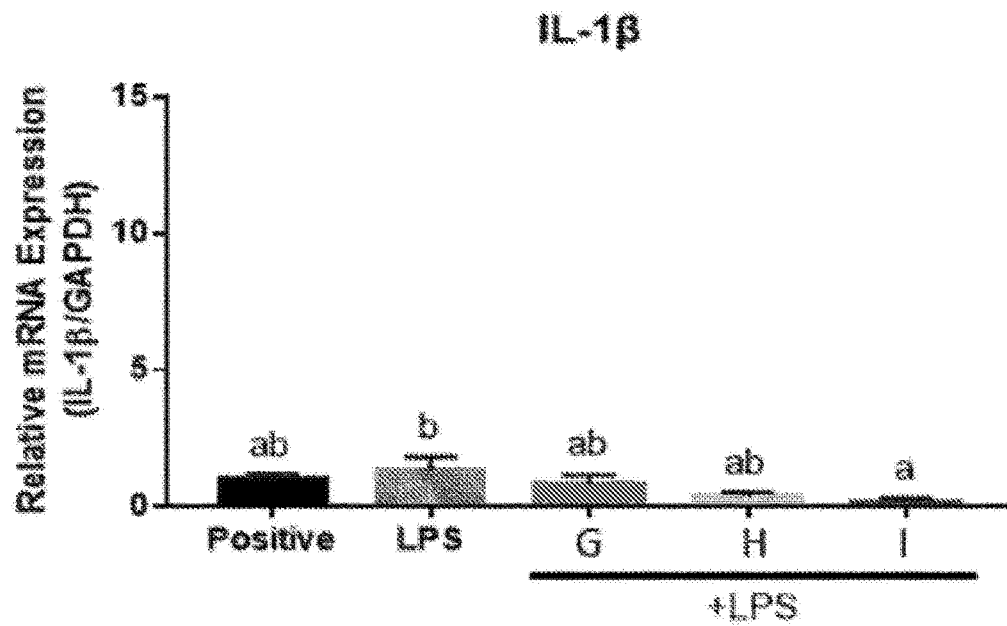
[도 1]

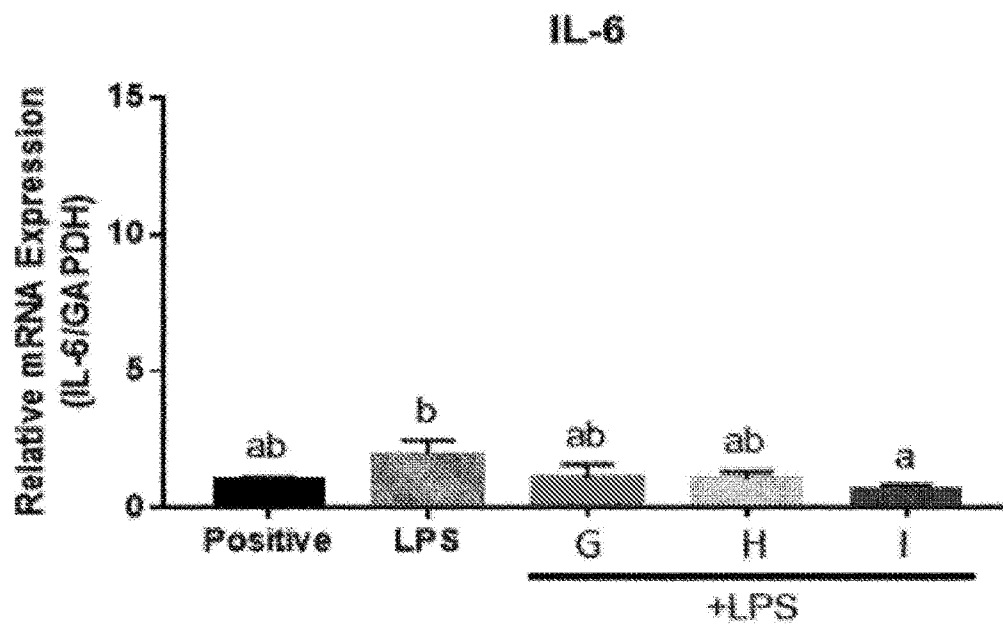
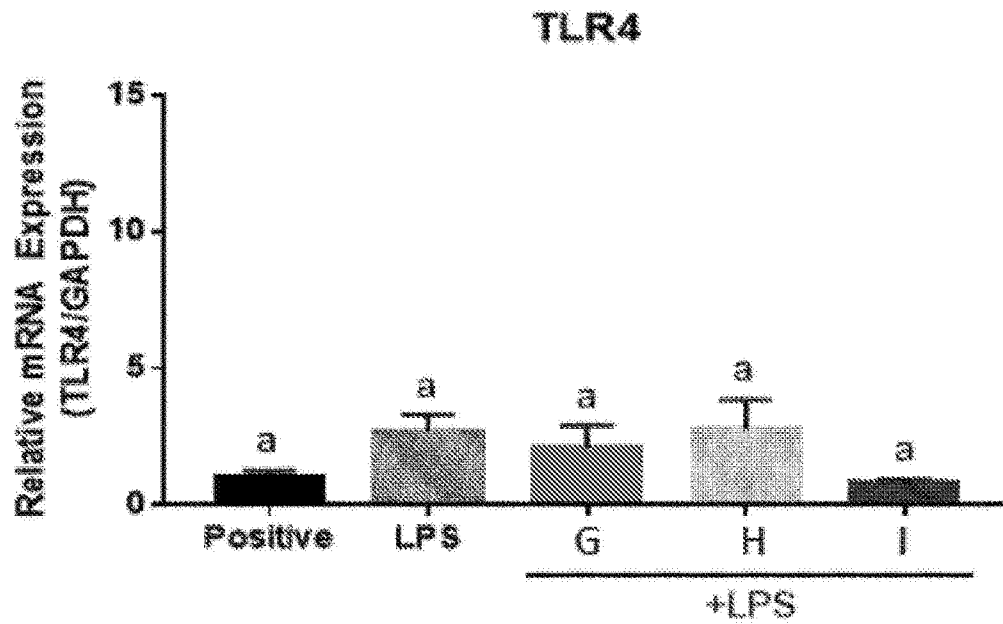












[도2]

Standard ID



16S rRNA service report

Order Number : 191205KN-232
Sample name : E4_contig_1

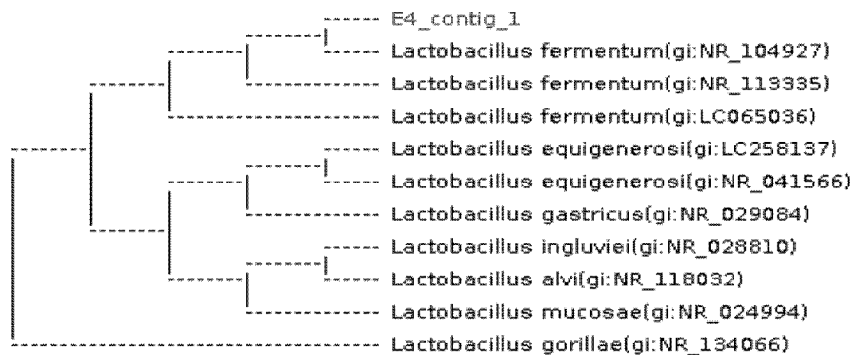
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
NR_113335.1	Lactobacillus fermentum	1501	1	1501	100	2769	0.0	1500/1501	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus fermentum



Characterization

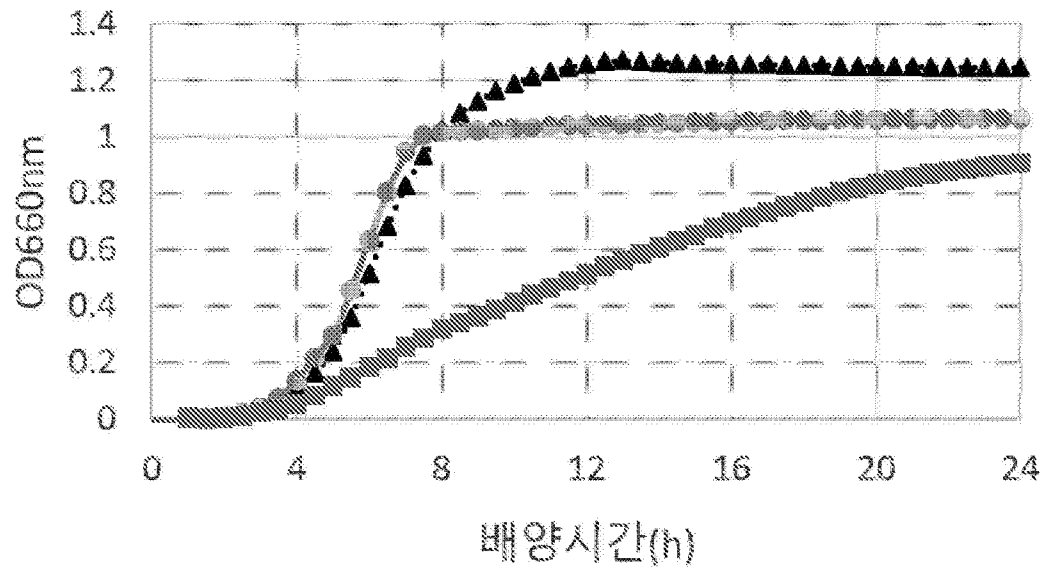
Lactobacillus species are members of the Lactobacillaceae family. They are gram positive rods or coccobacilli and occasionally form short chains. Lactobacilli are part of the normal flora of the human mouth, gastrointestinal tract and female genital tract and are generally regarded as safe for use in food (probiotics and to ferment food). Lactobacillus infections are rare.

Lactobacillus fermentum is a Gram-positive species of bacterium in the genus Lactobacillus. It is associated with active dental caries lesions. It is also commonly found in fermenting animal and plant material. It has been found in sourdough. A few strains are considered probiotic or "friendly" bacteria in animals and at least one strain has been

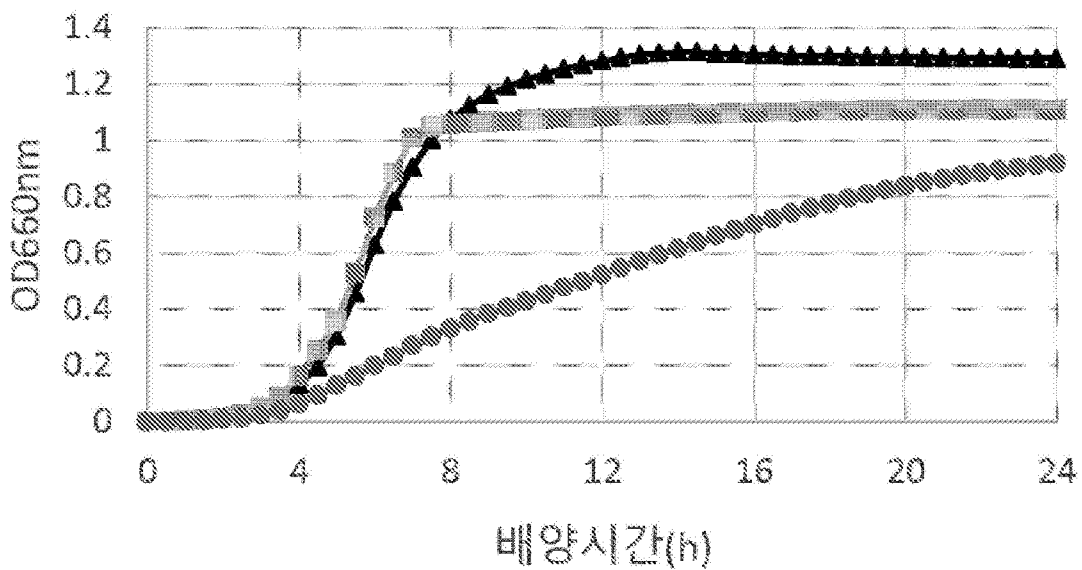
[도3]

	S-A	S-B	S-C	S-D																																								
탄소원1 (포도당)	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원1</td><td>2.20</td></tr><tr><td>질소원</td><td>3.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.27</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원1	2.20	질소원	3.00	무기염류	0.27	기타	0.10	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원1</td><td>2.20</td></tr><tr><td>질소원</td><td>3.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.27</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원1	2.20	질소원	3.00	무기염류	0.27	기타	0.10	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원1</td><td>2.20</td></tr><tr><td>질소원</td><td>3.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.42</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원1	2.20	질소원	3.00	무기염류	0.42	기타	0.10	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원1</td><td>2.20</td></tr><tr><td>질소원</td><td>4.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.27</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원1	2.20	질소원	4.00	무기염류	0.27	기타	0.10
	원료명	%																																										
	탄소원1	2.20																																										
	질소원	3.00																																										
	무기염류	0.27																																										
기타	0.10																																											
원료명	%																																											
탄소원1	2.20																																											
질소원	3.00																																											
무기염류	0.27																																											
기타	0.10																																											
원료명	%																																											
탄소원1	2.20																																											
질소원	3.00																																											
무기염류	0.42																																											
기타	0.10																																											
원료명	%																																											
탄소원1	2.20																																											
질소원	4.00																																											
무기염류	0.27																																											
기타	0.10																																											
탄소원2 (과당)	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원2</td><td>2.00</td></tr><tr><td>질소원</td><td>3.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.27</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원2	2.00	질소원	3.00	무기염류	0.27	기타	0.10	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원2</td><td>2.00</td></tr><tr><td>질소원</td><td>3.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.27</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원2	2.00	질소원	3.00	무기염류	0.27	기타	0.10	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원2</td><td>2.00</td></tr><tr><td>질소원</td><td>3.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.42</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원2	2.00	질소원	3.00	무기염류	0.42	기타	0.10	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원2</td><td>2.00</td></tr><tr><td>질소원</td><td>4.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.27</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원2	2.00	질소원	4.00	무기염류	0.27	기타	0.10
	원료명	%																																										
	탄소원2	2.00																																										
	질소원	3.00																																										
	무기염류	0.27																																										
기타	0.10																																											
원료명	%																																											
탄소원2	2.00																																											
질소원	3.00																																											
무기염류	0.27																																											
기타	0.10																																											
원료명	%																																											
탄소원2	2.00																																											
질소원	3.00																																											
무기염류	0.42																																											
기타	0.10																																											
원료명	%																																											
탄소원2	2.00																																											
질소원	4.00																																											
무기염류	0.27																																											
기타	0.10																																											
탄소원3 (유당)	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원3</td><td>1.00</td></tr><tr><td>질소원</td><td>3.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.27</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원3	1.00	질소원	3.00	무기염류	0.27	기타	0.10	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원3</td><td>1.00</td></tr><tr><td>질소원</td><td>3.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.27</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원3	1.00	질소원	3.00	무기염류	0.27	기타	0.10	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원3</td><td>1.00</td></tr><tr><td>질소원</td><td>3.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.42</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원3	1.00	질소원	3.00	무기염류	0.42	기타	0.10	<table><tr><th>원료명</th><th>%</th></tr><tr><td>탄소원3</td><td>1.00</td></tr><tr><td>질소원</td><td>4.00</td></tr><tr><td>무기염류</td><td>0.27</td></tr><tr><td>기타</td><td>0.10</td></tr></table>	원료명	%	탄소원3	1.00	질소원	4.00	무기염류	0.27	기타	0.10
	원료명	%																																										
	탄소원3	1.00																																										
	질소원	3.00																																										
	무기염류	0.27																																										
기타	0.10																																											
원료명	%																																											
탄소원3	1.00																																											
질소원	3.00																																											
무기염류	0.27																																											
기타	0.10																																											
원료명	%																																											
탄소원3	1.00																																											
질소원	3.00																																											
무기염류	0.42																																											
기타	0.10																																											
원료명	%																																											
탄소원3	1.00																																											
질소원	4.00																																											
무기염류	0.27																																											
기타	0.10																																											

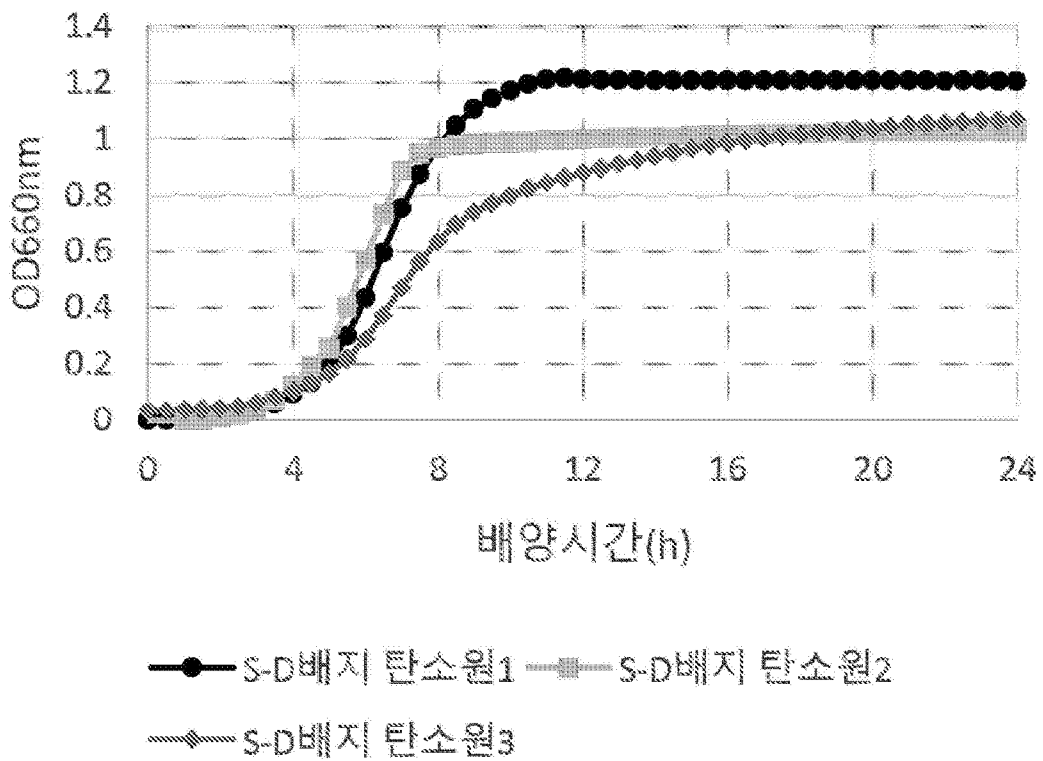
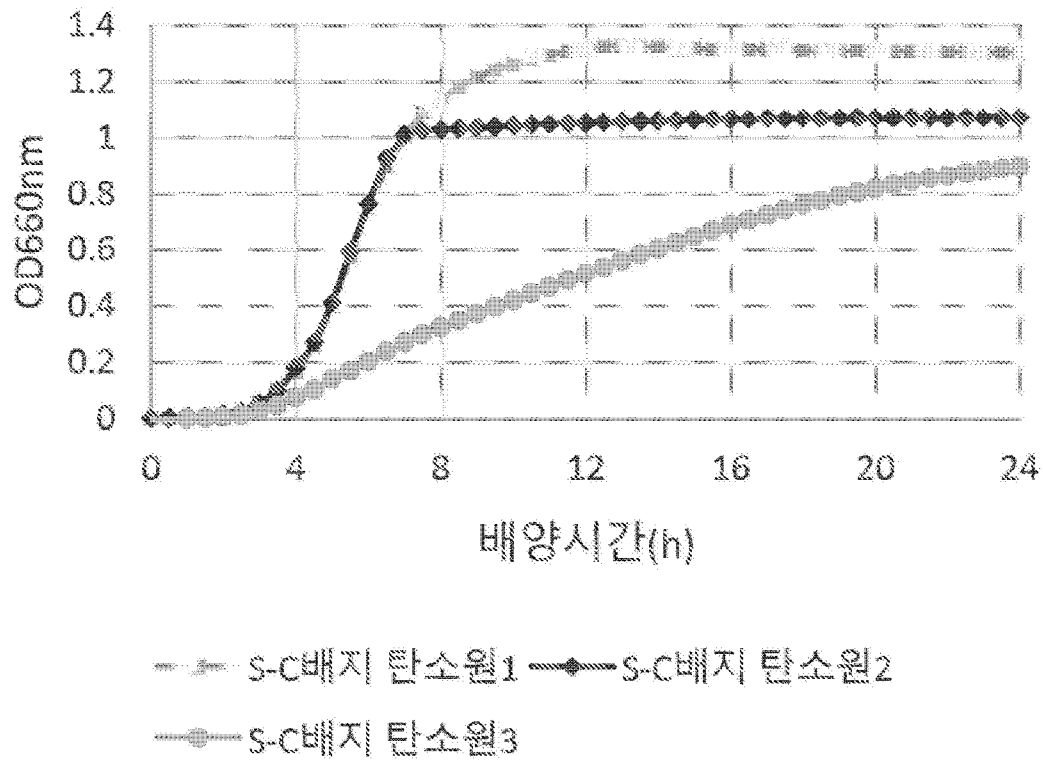
[도4]

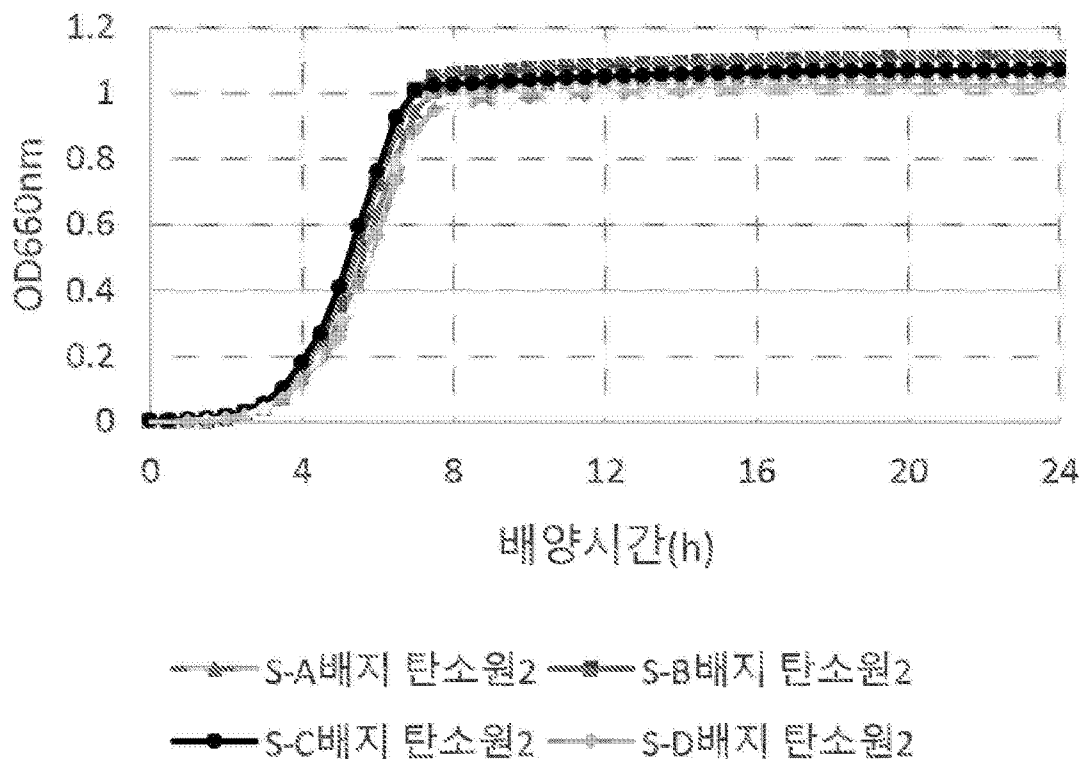
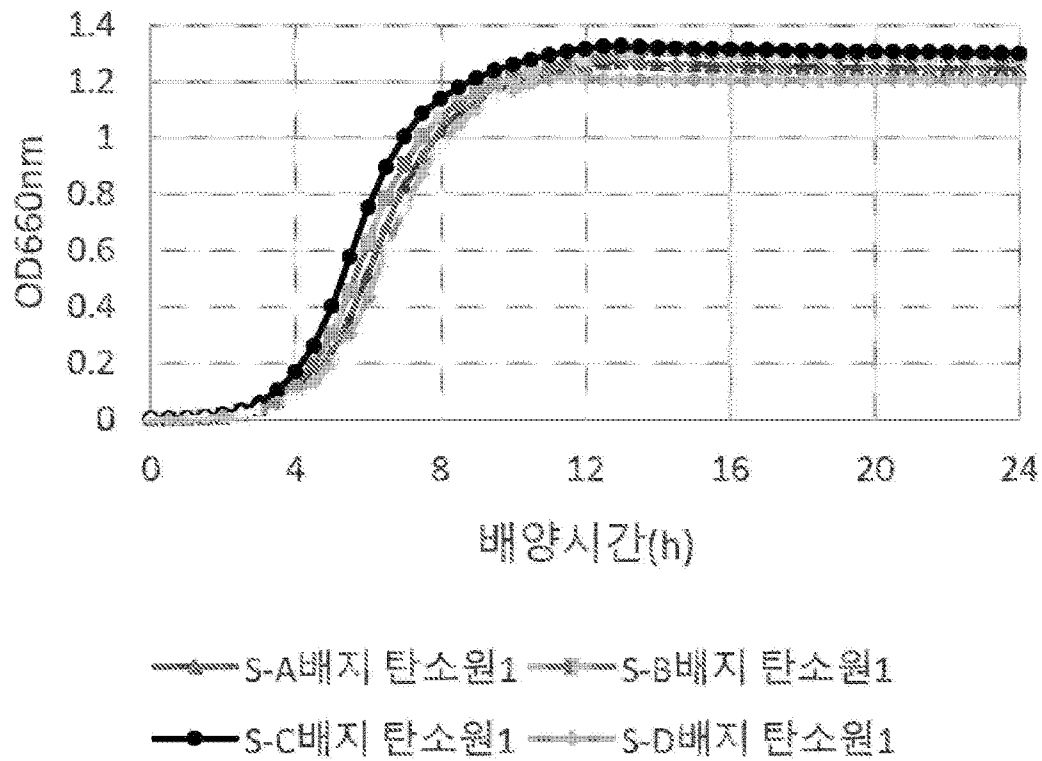


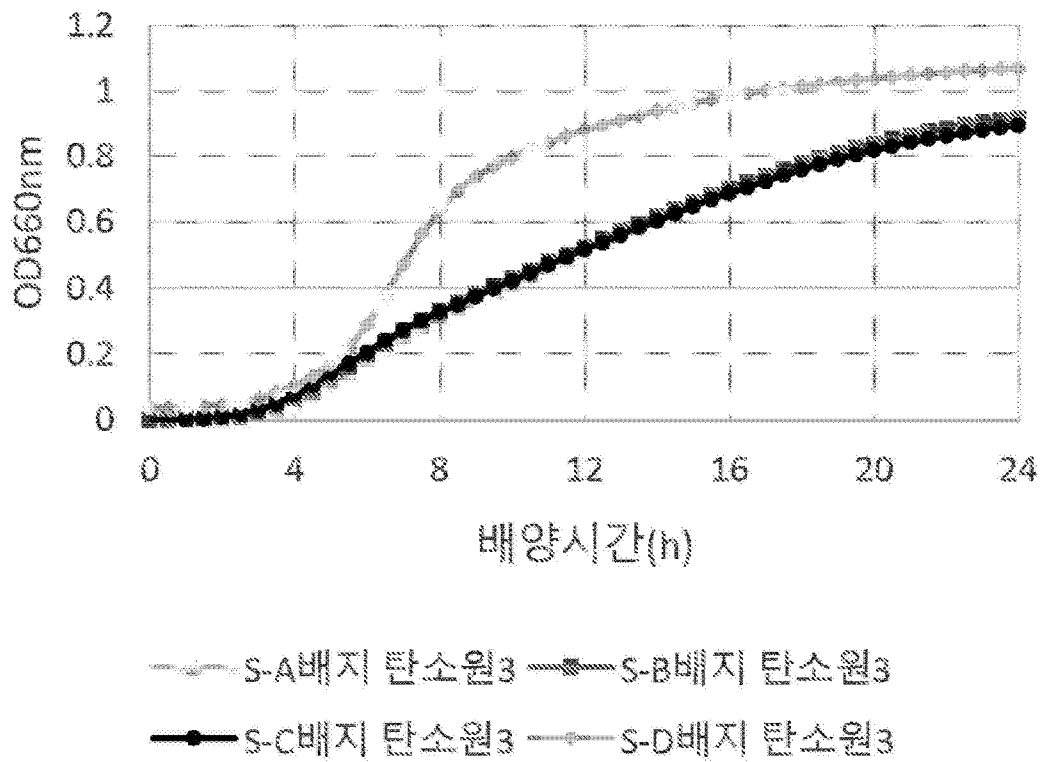
·····▲····· S-A배지 탄소원1 —●— S-A배지 탄소원2
 —■— S-A배지 탄소원3



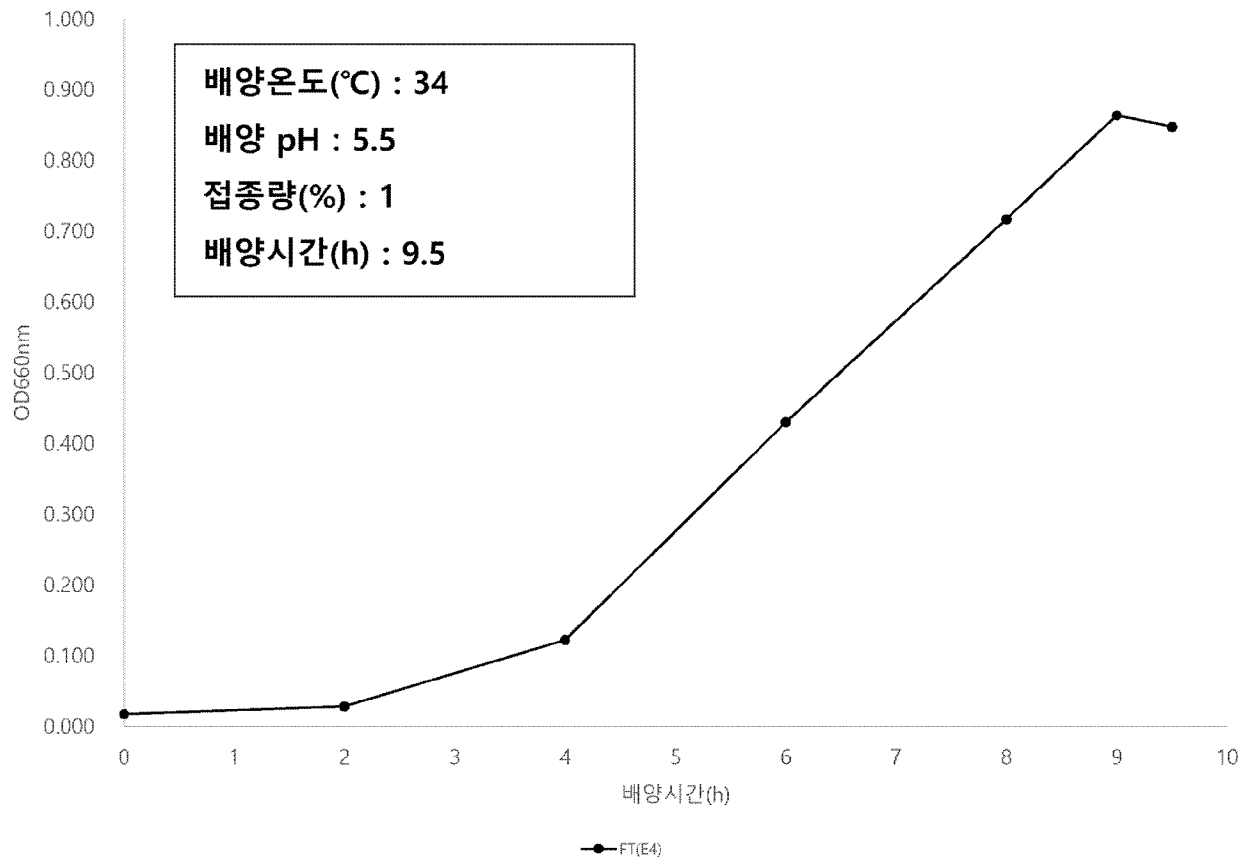
—▲— S-B배지 탄소원1 —■— S-B배지 탄소원2
 —●— S-B배지 탄소원3







[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/007088

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61K 35/747(2014.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; C12R 1/225(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(2006.01); A23L 33/135(2016.01)

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: 락토바실러스 퍼멘텀 (Lactobacillus fermentum), 항산화 (antioxidant), 항염증 (anti-inflammatory), 유산균 (probiotic), 탄소원 (carbon source), 전염증 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	HOR, Yan-Yan et al. Lactobacillus sp. improved microbiota and metabolite profiles of aging rats. Pharmacological Research. 2019, vol. 146, article no. 104312, inner pp. 1-15. See inner pages 2-14 and figures 12 and 13.	1-5 6,7
X	HAYEK, S. et al. Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. Journal of Dairy Research. 2019, vol. 86, pp. 490-502. See page 491, left column and page 495, right column; and table 1.	6,7
X	HUANG, Y. et al. The effect of Lactobacillus fermentum DALI02 in reducing the oxidative stress and inflammatory response induced by high-fat diet of rats. RSC Advances. 2020, vol. 10, pp. 34396-34402. See abstract, pages 34398-34400; and figures 1-4.	1-3,5
X	WANG, R. et al. Pretreatment with Lactobacillus fermentum XY18 Relieves Gastric Injury Induced by HCl/Ethanol in Mice via Antioxidant and Anti-Inflammatory Mechanisms. Drug Design, Development and Therapy. 2020, vol. 14, pp. 5721-5734. See abstract, page 5727, right column; and tables 5 and 6.	1-3,5



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

25 February 2022

Date of mailing of the international search report

25 February 2022

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/007088

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1937758 B1 (MICROBIO CO., LTD. et al.) 11 January 2019 (2019-01-11) See claims 8 and 14; and paragraph [0177].	1-3,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/007088

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR	10-1937758	B1	11 January 2019	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61K 35/747(2014.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; C12R 1/225(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20(2006.01); A23L 33/135(2016.01) 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 퍼멘텀 (Lactobacillus fermentum), 항산화 (antioxidant), 항염증 (anti-inflammatory), 유산균 (probiotic), 탄소원 (carbon source), 전염증 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	HOR, YAN-YAN 등, Lactobacillus sp. improved microbiota and metabolite profiles of aging rats, Pharmacological Research, 2019년, 146권, 기사번호 104312, 내부페이지 1-15 내부페이지 2-14 및 그림 12, 13	1-5 6,7
X	HAYEK, S. 등, Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products, Journal of Dairy Research, 2019년, 86권, 페이지 490-502 페이지 491, 왼쪽 컬럼, 페이지 495, 오른쪽 컬럼; 및 표 1	6,7
X	HUANG, Y. 등, The effect of Lactobacillus fermentum DALI02 in reducing the oxidative stress and inflammatory response induced by high-fat diet of rats, RSC Advances, 2020년, 10권, 페이지 34396-34402 요약, 페이지 34398-34400; 및 그림 1-4	1-3,5
X	WANG, R. 등, Pretreatment with Lactobacillus fermentum XY18 Relieves Gastric Injury Induced by HCl /Ethanol in Mice via Antioxidant and Anti-Inflammatory Mechanisms, Drug Design, Development and Therapy, 2020년, 14권, 페이지 5721-5734 요약, 페이지 5727, 오른쪽 컬럼; 및 표 5, 6	1-3,5
☒ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 신규성 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 2022년02월25일(25.02.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년02월25일(25.02.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-1937758 B1 (마이크로바이오주식회사 등) 2019.01.11 청구항 8, 14; 및 단락 [0177]	1-3,5

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1937758 B1	2019/01/11	없음	