(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0095039
(43) 공개일자 2023년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/744 (2015.01) *A61K 35/747* (2015.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
C12R 1/225 (2006.01) *C12R 1/46* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0071859(분할)
(22) 출원일자 2023년06월02일
심사청구일자 2023년06월02일
(62) 원출원 특허 10-2022-0124993
원출원일자 2022년09월30일
심사청구일자 2022년11월09일
(30) 우선권주장
1020210130539 2021년10월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 엔비피헬스케어
경기도 수원시 장안구 장안로448번길 5 (이목동)
피비엘바이오랩 주식회사
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
(72) 발명자
김동현
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
(74) 대리인
김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 13 항

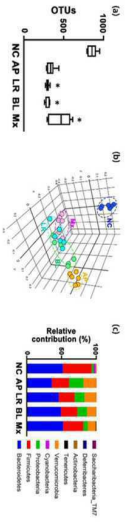
(54) 발명의 명칭 **신규 프로바이오틱스 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 유산균인 락토바실러스 람노서스, 비피도박테리움 롱검, 그리고 락토코쿠스 락티스에 관한 것이다.

본 발명에 따른 균주는 우수한 항산화 효과, 염증 개선 효과, 신경 개선 효과, 인지 개선효과, 장내 마이크로바이오타의 불균형 개선 효과 등을 통해 의약품 및 식품으로 활용 가치가 높고, 특히 염증성 질환 및 신경계통 질환의 예방, 치료 또는 개선에 이용될 수 있다. 또한, 면역 기능 개선 및 면역 증진 효과를 통하여 면역 체계의 활성을 높임으로써 면역 조절 및 증진에 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 35/744 (2013.01)
A61K 35/747 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A23Y 2220/73 (2013.01)
A23Y 2240/41 (2013.01)
C12R 2001/225 (2021.05)
C12R 2001/46 (2021.05)

명 세 서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 람노서스 NK210 (*Lactobacillus rhamnosus NK210*) KCCM13049P.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 락토바실러스 람노서스 NK210은 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열을 포함하는 것인 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus NK210*) KCCM13049P.

청구항 3

락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus NK210*) KCCM13049P를 포함하는 염증성 질환 또는 인지 기능 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 염증성 질환은 염증성 장질환, 관절염, 통풍, 간염, 천식, 각막염, 위염, 신장염, 대장염, 기관지염, 흉막염, 복막염, 척추염, 췌장염, 요도염, 방광염, 질염, 패혈증, 피부염, 치주염 및 치은염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이고,

상기 인지 기능 장애는 불안, 우울증, 편두통, 스트레스, 알츠하이머병, 헌팅턴 병, 혈관성 치매증, 픽병, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야코프병 및 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) KCCM13048P를 더 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) KCCM13048P 및 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus NK210*) KCCM13049P를 균의 수(CFU) 기초로 9:1 내지 1:1로 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 콜라겐성 대장염, 림프구성 대장염, 허혈성 대장염, 전환 대장염, 베체트병, 불확정 대장염, 항생제 유발 대장염 및 항암제 유발 대장염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학 조성물.

청구항 7

락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus NK210*) KCCM13049P를 포함하는 염증성 질환 또는 인지 기능 장애 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

상기 염증성 질환은 염증성 장질환, 관절염, 통풍, 간염, 천식, 각막염, 위염, 신장염, 대장염, 기관지염, 흉막염, 복막염, 척추염, 췌장염, 요도염, 방광염, 질염, 패혈증, 피부염, 치주염 및 치은염로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이고,

상기 인지 기능 장애는 불안, 우울증, 편두통, 스트레스, 알츠하이머병, 헌팅턴 병, 혈관성 치매증, 픽병, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야코프병 및 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) KCCM13048P를 더 포함하는 것인 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) KCCM13048P 및 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus NK210*) KCCM13049P를 균의 수(CFU) 기초로 9:1 내지 1:1로 포함하는 것인 식품 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 콜라겐성 대장염, 림프구성 대장염, 허혈성 대장염, 전환 대장염, 베체트병, 불확정 대장염, 항생제 유발 대장염 및 항암제 유발 대장염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 식품 조성물.

청구항 11

락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus NK210*) KCCM13049P를 포함하는 면역 증진용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) KCCM13048P를 더 포함하는 것인 면역 증진용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) KCCM13048P 및 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus NK210*) KCCM13049P를 균의 수(CFU) 기초로 9:1 내지 1:1로 포함하는 것인 면역 증진용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 프로바이오틱스인 락토바실러스 람노서스, 비피도박테리움 롱검, 그리고 락토코쿠스 락티스에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 프로바이오틱스(probiotics)란 다양한 미생물이 존재하는 사람의 장내에서 우세균으로 분포하고 체내 유익균의 성장을 촉진하는 생균활성제로써, 인체의 소화계에 공생하면서 섬유질 및 복합 단백질을 분해하여 중요한 영양 성분으로 만드는 역할을 담당한다. 또한 대장균이나 *Clostridium difficile*과 같은 유해균의 번식을 억제하고 설사와 변비를 개선하며 비타민 합성, 혈중 콜레스테롤 저하 등의 역할을 한다. 이러한 프로바이오틱스 중 유산균은 당류를 발효하여 에너지를 획득하고 다량의 락트산을 생성하는 세균이다. 이는 농산물이나 식품, 사람이나 동물의 체내 등 자연계에 널리 분포하고 있다. 치즈, 발효유, 김치, 제빵 등의 발효에 많이 이용된다. 일반적으로 유산균을 섭취하면, 장내 미생물들 중 유해균이 억제될 뿐 아니라, 음식물의 소화, 흡수, 분해하는 것을 돕는 유익균이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 유산균을 섭취하면, 혈중 콜레스테롤 감소, 면역력 증진, 내인성 감염 억제, 간경화 개선, 항암 효과 등의 다양한 효능이 있다는 점이 보고되어 있다. 그뿐 아니라, 최근 유산균으로 발효된 천연물의 효능 증대에 대한 연구도 이루어지고 있다.

[0003] 마이크로바이옴이란 '미생물(microbe)'과 '생태계(biome)'를 합친 말이다. 학자들은 마이크로바이옴을 '제2의 게놈(genome · 유전정보)'이라 지칭하기도 한다. 사람들은 손가락 지문처럼 각기 다른 마이크로바이옴을 지녔기 때문이다. 이 차이에 의해 알레르기, 아토피, 비만부터 장염, 심장 질환에 이르기까지 각종 질환의 발병률이 좌우된다. 그런데 마이크로바이옴은 95% 이상이 장에 살고 있어, 장내 세균에 더 큰 관심이 쏠린다.

[0004] 장내 세균총 내 유익균과 유해균의 건강한 비율이 깨지면 면역력이 크게 떨어진다. 장내 유익균이 면역세포 활성화를 유도하기 때문이다. 또한 유해균 비율이 많아지면 장내 방어벽 기능이 약해지고 장 점막이 손상된다. 이로 인해 장관 내에 존재하던 병원균, 독소 등이 혈류로 유입돼 감염성 질환이나 자가면역질환이 생길 수 있다. 또한, 장내 세균이 치매 유발 위험을 높인다는 주장도 있다.

[0005] 이에 따라, 이러한 장내 미생물 총에 변화를 주어 목적하는 유익균의 수준을 높이는 것은 복합적 건강 기능의 개선에 매우 중요한 사항이다. 이를 위해서는 셀 수 없이 수많은 균주로부터 적절 균주를 도출하는 것이 반드시 필요한데, 이러한 특정 균주를 찾아내는 것은 매우 어려운 일이다.

[0006] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 염증성 질환, 신경계 질환에서 예방, 개선, 및 치료 효과를 나타낼 수 있는 신규 균주를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 신규한 프로바이오틱스로 락토바실러스 람노서스, 비피도박테리움 롱검, 그리고 락토코쿠스 락티스를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 프로바이오틱스의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus* NK210) (기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2021년 9월 15일 수탁번호: KCCM13049P)을 제공한다.

[0010] 본 발명의 락토바실러스 람노서스 NK210은 인간의 분변으로부터 분리 및 동정된 락토바실러스 람노서스의 신규한 프로바이오틱스임을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 락토바실러스 람노서스 NK210의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 1과 같다. 따라서, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus* NK210)은 서열번호 1의 16S rDNA를 포함할 수 있다.

[0012] 상기 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 락토바실러스 람노서스 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 락토바실러스 람노서스와 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 락토바실러스 람노서스 (*Lactobacillus rhamnosus*)로 동정하고, 락토바실러스 람노서스 NK210로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2021년 9월 15일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCCM13049P).

[0013] 본 발명의 락토바실러스 람노서스 NK210은 그람양성균이고, 세포의 형태는 간균이다. 보다 구체적인 락토바실러스 람노서스 NK210의 생리학적 특성은 당해 기술분야의 통상의 방법에 따라 분석할 수 있고, 그 결과는 하기 표 3과 같은 것으로 나타났다. 구체적으로, 락토바실러스 람노서스 NK210은 탄소원으로 D-갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, 둘시톨, 만니톨, 솔비톨, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스큘린, 살리신, 셀로비오스, 말토오스, 락토오스, 트레할로오스, 멜리지토오스, 겐티오비오스, D-타가토오스, 글루코네이트 및 L-푸코오스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 이용할 수 있다.

[0014] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 NK219(*Bifidobacterium longum* NK219) (기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2021년 9월 15일 수탁번호: KCCM13050P)을 제공한다.

[0015] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK219는 인간의 분변으로부터 분리 및 동정된 비피도박테리움 롱검의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK219의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 2와 같다. 따라서, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK219(*Bifidobacterium longum* NK219)은 서열번호 2의 16S rDNA를 포함할 수 있다.

[0017] 상기 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 비피도박테리움 롱검 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 비피도박테리움 롱검과 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*)으로 동정하고, 비피도박테리움 롱검 NK219로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2021년 9월 15일 자로 기탁하였다 (수탁번호 KCCM13050P).

[0018] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK219는 그람양성균이고, 세포의 형태는 간균이다. 보다 구체적인 비피도박테리움 롱검 NK219의 생리학적 특성은 당해 기술분야의 통상의 방법에 따라 분석할 수 있고, 그 결과는 하기 표 4와 같은 것으로 나타났다. 구체적으로, 비피도박테리움 롱검 NK219는 탄소원으로 D-글루코오스, D-락토오스, D-사카로즈, D-말토오스, 살리신, D-자일로스, L-아라비노스, 젤라틴, D-만노오스, D-라피노오스, 및 D-트레할로스

로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 이용할 수 있다.

[0019] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) (기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2021년 9월 15일 수탁번호: KCCM13048P)을 제공한다.

[0020] 본 발명의 락토코쿠스 락티스 NK209는 인간의 분변으로부터 분리 및 동정된 락토코쿠스 락티스의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 락토코쿠스 락티스 NK209의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 3과 같다. 따라서, 본 발명의 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) 은 서열번호 3의 16S rDNA를 포함할 수 있다.

[0022] 상기 서열번호 3의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 락토코쿠스 락티스 균주들과 98%의 상동성을 나타내어 락토코쿠스 락티스와 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*)으로 동정하고, 락토코쿠스 락티스 NK209으로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2021년 9월 15일 자로 기탁하였다 (수탁번호 KCCM13048P).

[0023] 본 발명의 락토코쿠스 락티스 NK209는 그람양성균이고, 세포의 형태는 간균이다. 보다 구체적인 락토코쿠스 락티스 NK209의 생리학적 특성은 당해 기술분야의 통상의 방법에 따라 분석할 수 있고, 그 결과는 하기 표 5와 같은 것으로 나타났다. 구체적으로, 락토코쿠스 락티스 NK209는 탄소원으로 D-리보오스, D-갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, 만니톨, 에스큘린, 살리신, 셀로비오스, 말토오스, 멜리비오스, 수크로오스, 트레할로오스, 라피노오스, 전분, 겐티오비오스, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린 및 알부틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 이용할 수 있다.

[0024] 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 면역 조절용 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 면역 증진용 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 면역 기능 개선용 조성물을 제공한다.

[0029] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명에서 상기 약학 조성물은 위 언급된 어느 하나, 둘 또는 세개의 프로바이오틱스를 포함하는 약학 조성물일 수 있다.

[0031] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0032] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0033] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 면역 조절용 약학 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 면역 증진용 약학 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 면역 기능 개선용 약학 조성물을 제공한다.

[0037] 구체적으로, 면역 증진 및/또는 기능 개선용 조성물은 인체나 동물의 건강을 증진시키기 위한 것으로, 건강한 인체나 동물에 투여되는 것일 수 있다.

[0038] 또한, 면역 증진 및/또는 기능 개선용 조성물은 면역력이 저하된 인체나 동물, 예를 들어, 방사선 노출, 항생제 또는 항암제 투여로 인해 저하된 인체나 동물의 면역력의 증진 및/또는 개선시키기 위한 것으로, 위 언급된 임의의 면역력 저하된 인체나 동물에 투여되는 것일 수 있다.

[0039] 본 발명에서 염증성 질환이란, 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미로서 염증성 장질환, 관절염, 통풍, 간염, 천식, 비만, 각막염, 위염, 신장염, 대장염, 당뇨, 결핵, 기관지염, 흉막염, 복막염, 척추염, 췌장염, 요도염, 방광염, 질염, 동맥경화증, 패혈증, 화상, 피부염, 치주염 및 치은염을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0040] 염증성 장 질환 (IBD)이라는 용어는 결장 및 위장관의 염증 상태의 한 부류를 가리킨다. IBD의 주요 유형은 궤양성 대장염 (UC) 및 크론병이다. UC와 크론병의 주요 차이점은 염증 변화의 위치와 특성이다. 크론병은 입에서 항문까지 위장관의 어느 부분에도 영향을 줄 수 있는 반면, UC는 결장과 직장으로 제한된다. 발현(presentation)의 특질성으로 인해 크론병 또는 UC의 최종적인 진단이 이루어질 수 없다. 이러한 경우 불확정 대장염 진단이 이루어질 수 있다. 다른 형태의 IBD는 콜라겐성 대장염, 림프구성 대장염, 허혈성 대장염, 전환 대장염, 베체트병, 불확정 대장염, 항생제 유발 대장염 및 항암제 유발 대장염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 즉, 본 발명에 따른 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 콜라겐성 대장염, 림프구성 대장염, 허혈성 대장염, 전환 대장염, 베체트병, 불확정 대장염, 항생제 유발 대장염 및 항암제 유발 대장염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0042] 항생제 유발 대장염은 항생제 투여 후 대장염이 발생하는 것으로 항생제 노출 후 장내에 존재하는 정상 세균총의 파괴에 의해 발생한다. 정상 세균총은 장관내에서 비흡수 탄수화물을 발효시켜 단쇄지방산(short chain fatty acid)을 생성하는데 항생제로 인하여 정상 세균총이 줄어들어 탄수화물 발효에 이상이 생기면 장관 내 삼투압과 산도가 변해 설사가 유발되고 장에 염증이 발생된다. 항생제 유발 대장염의 약 20%는 *C. difficile* 이상증식에 의하며, 소수이지만 *C. perfringens, S. aureus, E. coli, Candida albicans* 등도 원인균이 될 수 있다. 이러한 항생제의 예시로는 클린다마이신, 암피실린, 아목시실린, 세팔로스포린, 클로람페니콜, 에리트로마이신 등을 들 수 있다.

[0043] 항암제 유발 대장염은 항암제의 투여에 의해 발생하는 대장에서의 부작용으로 발생하는 염증 증상이다. 예를 들어, 5-플루오로우라실, 시클로포스파미드, 카페시타빈, 옥살리플라틴, 이리노데칸, 세툭시맙, 베바시주맙 등의 항암제에 의해 유발될 수 있다.

[0044] 본 발명에서 인지기능 장애란 인지손상 및 행동 변화를 나타내는 장애로, 기억력, 공간지각력, 판단력, 집행기능, 언어능력 등의 기능 저하로부터 발생되는 질환을 일컫는다. 상기 인지기능 장애는 예를 들면, 불안, 우울증, 편두통, 스트레스, 알츠하이머병, 헌팅턴 병, 혈관성 치매증, 픽병, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야코프병, 치매 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에서의 "신경 염증(neuroinflammation)"이란, 뇌에서 발생한 염증을 의미하며, 인지기능 장애 관련 질환을 일으키는 중요한 요인이다. 뇌에서 염증세포가 과하게 활성화되면 염증 유발성 사이토카인의 분비가 많아지고 이러한 뇌염증 반응의 과활성화에 의해 뇌세포 손상에 따라 인지기능 장애가 유발되는 것으로 알려져 있다.

[0046] 본 발명에서 면역 기능 개선은 면역 조절 작용이 활성화되는 것을 의미한다.

[0047] 여기서 면역 조절은 인체 내 면역 불균형을 해소하고 면역 항상성을 유지하는 것을 의미한다. 면역 항상성의 유지는 면역을 억제시키는 면역 관용(tolerance)과 면역을 상승시키는 면역반응(immunity)간의 균형을 이루는 상태를 일컫는 것이다. 이러한 면역 조절은 면역 기능을 개선하는 것일 수 있으며, 바람직하게 면역 증진 용도에 해당할 수 있다. 예를 들어, 숙주의 장내 미생물상(gut microflora)에 대한 보충제 역할을 하며, 장 장벽 기능을 개선하고 숙주의 면역체계를 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0048] 보다 구체적으로, 본 명세서 내 면역 기능 개선은 또한 면역 증진을 의미하는 것일 수 있고, 이는 사전적 의미 외에도 면역 조절 효과를 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 즉, 본원 발명 내에서 면역 기능 개선과 면역 증진

은 동등하게 사용 가능하다.

[0049] 면역 기능 개선 및/또는 면역 증진은 면역 조절 인자의 활성을 높이거나 조절하여 면역 체계의 활성을 높이는 것일 수 있다.

[0050] 구체적으로, 신생 혈관 생성 억제, 병원균에 대한 생육 억제력 증가 등을 통해 면역 저하에 대한 예방 및 개선, 면역 관련 기능 장애 혹은 관련 질병에 대해 예방, 개선 및 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0051] 구체적으로, 항원에 대한 생체 방어능을 증진시키는 것으로 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역능을 상승시켜 면역 저하에 대한 예방 및 개선, 면역 관련 기능 장애 혹은 관련 질병에 대해 예방, 개선 및 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0052] 면역 기능 개선 및/또는 면역 증진의 기작은 제한되지 않으나, 예를 들면 대식세포 등 항원 제공 세포의 활성을 촉진하거나, 림프구에 대한 특이적인 활성을 촉진하거나, 사멸 세포를 제거하거나, 면역 매개체의 분비능을 조절하는 것 등을 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 면역력 증진은 이에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어

[0054] 건강을 증진시키기 위하여 일반적인 면역력을 가진 대상체에서 면역력의 증진을 위한 것일 수 있다. 또한, 방사선 치료 또는 노출, 항생제 치료, 항암제 치료 등에 의해 저하된 면역력의 증진을 위한 것일 수 있다.

[0055] 구체적으로, 항생제 또는 항암제 투여로 인해 면역결핍, 면역저하 또는 면역계 손상의 발생에 대한 개선 및/또는 회복을 목적하는 것일 수 있다.

[0056] 항암제는 암 퇴행을 촉진하거나 또는 추가로 종양 성장을 방지하는 화합물, 단백질 등의 약물일 수 있으며, 또한 다른 항암 요법, 방사선 치료, 약물 요법 이외의 기타 항암 요법 등을 모두 포함한다. 상기 다른 치료제는 면역관문억제제, 화학항암제, 표적항암제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 항생제는 항생물질로된 임의의 물질을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니나 예를 들어 클린다마이신, 암피실린, 아목시실린, 세팔로스포린, 클로람페니콜, 에리트로마이신 등을 들 수 있다.

[0058] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물은 우수한 항산화 활성을 나타내어, 염증성 질환, 인지기능 장애, 면역 기능 개선에 우수한 효과를 나타낸다.

[0059] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물은 사이토카인, 예를 들어, TNF-α, IL-10의 발현을 조절하여 염증 개선에서 우수한 효과를 나타낸다.

[0060] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물은 염증성 사이토카인, 예를 들어, TNF-α의 발현을 조절하고, 항염증성 사이토카인, 예를 들어, IL-10의 발현을 증가시키는 것과 같이 사이토카인의 발현량을 조절하여 염증 개선에서 우수한 효과를 나타낸다.

[0061] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물은 뇌유도성 신경 영양인자(BDNF)의 발현을 증진시키고 스트레스, 불안, 우울, 인지 장애능 등과 관련이 높은 Neuropeptide Y의 발현을 증진시킴으로써 인지기능장애 예방 및 치료에 우수한 효과를 나타낸다.

[0062] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물은 장내 마이크로바이오타의 조절을 통해 염증성 질환을 억제하고, 면역기능을 조절하며, 신경계 및 인지 기능을 조절한다. 구체적으로, 장염과 관련이 높고 장내 클로스트듐 디피실리 (*Clostridium difficile*)을 억제를 포함하여 장내 마이크로바이오타를 조절하고, 장에서의 LPS 수준을 감소시킨다. 또한 장내 유익균을 증진시키고 유해균을 감소시켜 장의 건강을 개선하고 이에 따라 장뇌축(Gut-Brain Axis)을 통해 신경, 특히 인지 기능 개선에 효과를 나타낸다.

[0063] 본 발명의 일실시 양태에 따르면, LPS 유도 인지능 손상 동물에 본 발명에 따른 균주를 투여하여, 장의 기능을 개선하고, 전신에서의 염증 반응을 개선하며, 인지 기능손상을 개선하며, 신경에서의 염증 수준을 감소시켰다. 구체적으로, 대장균 기원 LPS에 의해 유발된 염증성 장질환에 대하여 장의 길이 감소를 회복시키고, MPO의 활성

을 감소시키고, 염증성 사이토카인의 수준을 감소시키고 항염증성 사이토카인의 수준을 증가시켰다. 또한, 비장을 통해 확인되는 전신적인 염증 반응에서는 대식세포의 탐식능, NK 세포의 세포 살상능을 조절하여 염증성 사이토카인의 수준을 감소시키고 항염증성 사이토카인의 수준을 증가시켰다. 또한, 신경계, 특히 인지기능 장애에 대하여 기억력 개선에 관한 행동학적 특성을 나타내며, 또한 신경 염증에 대한 우수한 개선 효과를 나타낸다.

[0064] 본 발명의 일실시 양태에 따르면, 항암제 유도 면역 손상(억제) 동물 모델에 본 발명에 따른 균주를 투여하여, 장의 기능을 개선하고, 전신에서의 염증 반응을 개선하며, 면역 기능을 개선하고, 인지 기능손상을 개선하며, 신경에서의 염증 수준을 감소시켰다. 구체적으로, 항암제 투여에 의해 면역 기능이 손상된 동물 모델에서 장의 길이 감소를 회복시키고, MPO의 활성을 감소시키고, 염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인의 발현 비율을 정상화하여 조절한다. 또한, 비장을 통해 확인되는 전신적인 염증 반응에서는 대식세포의 탐식능, NK 세포의 살상능이 증가시키고, 염증성 사이토카인 대비 항염증성 사이토카인의 수준을 증가시켰다. 또한, 신경계, 특히 인지기능 장애에 대하여 기억력 개선에 관한 행동학적 특성을 나타내며, 또한 신경 염증에 대한 우수한 개선 효과를 나타낸다.

[0065] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 항생제로 유도된 장내 마이크로바이오타 불균형을 가지는 동물 모델에 대하여 본 발명에 따른 균주를 투여하여, 장의 기능을 개선하고, 전신에서의 염증 반응을 개선하며, 면역 기능을 개선하고, 인지 기능손상을 개선하며, 신경에서의 염증 수준을 감소시켰다. 구체적으로, 암피실린 등 항생제 투여에 의해 장내 마이크로바이오타의 불균형이 발생한 동물 모델에서 장의 길이 감소를 회복시키고, MPO의 활성을 감소시키고, 염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인의 발현 비율을 정상화하여 조절한다. 또한, 비장을 통해 확인되는 전신적인 염증 반응에서는 대식세포의 탐식능, NK 세포의 살상능을 조절하여 염증성 사이토카인의 수준을 감소시키고 항염증성 사이토카인의 수준을 증가시켰다. 또한, 신경계, 특히 인지기능 장애에 대하여 기억력 개선에 관한 행동학적 특성을 나타내며, 또한 신경 염증에 대한 우수한 개선 효과를 나타낸다.

[0066] 본 발명의 일실시 양태에 따르면, 건강한 동물 모델에 대하여 본 발명에 따른 균주를 투여하여, 장의 기능을 개선하고, 전신에서의 염증 반응을 개선하며, 면역 기능을 개선하고, 인지 기능손상을 개선하는, 예방, 또는 개선적 효과를 확인하였다.

[0067] 본 발명의 일실시 양태에 따르면, TNBS로 유도된 장질환 및 인지기능 장애 질환을 가지는 동물 모델 대하여 본 발명에 따른 균주를 투여하여, 장의 기능을 개선하고, 전신에서의 염증 반응을 개선하며, 면역 기능을 개선하고, 인지 기능손상을 개선하며, 신경에서의 염증 수준을 감소시켰다. 구체적으로, TNBS 투여에 의해 장질환 및 인지 기능 장애를 가지게 된 동물 모델에서 장의 길이 감소를 회복시키고, MPO의 활성을 감소시키고, 염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인의 발현 비율을 정상화하여 조절한다. 또한, 신경계, 특히 인지기능 장애에 대하여 기억력 개선에 관한 행동학적 특성을 나타내며, 또한 신경 염증에 대한 우수한 개선 효과를 나타낸다.

[0068] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 균주는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물과 같이 다양한 형태로 이용될 수 있다.

[0069] 생균체는 그대로 살아있는 균을 의미한다.

[0070] 사균체는 일정한 조건에서 배양한 생균을 집균하고, 열 건조, 가압, 약물 처리 등의 방법으로 균의 성장이 더 이상 일어나지 못하도록 한 형태이다.

[0071] 배양물은 유산균을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 사물을 의미하며, 본 발명에 따른 균주를 포함하는 개념이다. 상기 산물은 유산균을 포함할 수 있다. 상기 배지는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 MRS 액체 배지, GAM 액체 배지, MRS 한천 배지, GAM 한천 배지, BL 한천 배지일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 파쇄물은 생균체, 사균체 또는 이의 배양물을 기계적, 화학적 방법들을 통해 분리 가공하여 파쇄된 형태를 가지는 것을 의미한다. 예를 들어, 비드 밀(bead mills), 프레스(Presses), 소니케이터(Sonicator) 또는 마이크로플루다이저 (Microfluidizer), 효소 처리 등을 통해 파쇄 형태를 제조할 수 있다.

[0073] 추출물은 생균체, 사균체를 포함하여 통상에 알려진 추출 방식에 따라 이의 추출을 한 번 더 진행한 것 “물(액체)” 형태를 의미한다. 예를 들어 생균체, 사균체 및/또는 파쇄물을 통상에 알려진 추출 방식(공지의 추출용매(예를 들어, 물, C1 내지 C4의 알코올(메탄올, 에탄올 등)로 추출하여 수득)한 것을 의미한다.

[0074] 본 발명에 따르면, 상기 언급된 균주는 균주 단독으로 이용될 수 있다.

[0075] 또한 균주의 병용에 의해 시너지 효과를 나타낼 수 있는바, 1 이상의 균주의 병용된 형태로 이용될 수 있다.

[0076] 이러한 병용 형태는 예를 들어,

[0077] 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P 및 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P;

[0078] 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P 및 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P;

[0079] 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P 및 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P; 또는

[0080] 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P 및 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P일 수 있다.

[0081] 바람직하게, 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P 및 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P이거나, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P 및 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P이거나, 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P 및 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P의 병용형태일 수 있다.

[0082] 일예시로, 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P 및 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P 균주의 병용은 예를 들어 균의 수(CFU) 기초로 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10일 수 있다. 바람직하게, 9:1 내지 1:1, 보다 바람직하게 4:1 내지 1:1, 보다 구체적으로 4:1로 사용할 수 있다.

[0083] 일예시로, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 및 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P 균주의 병용은 예를 들어 균의 수(CFU) 기초로 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10일 수 있다. 바람직하게, 9:1 내지 1:1, 보다 바람직하게 4:1 내지 1:1, 보다 구체적으로 4:1로 사용할 수 있다.

[0084] 일예시로, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 및 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P 균주의 병용은 예를 들어 균의 수(CFU) 기초로 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10일 수 있다. 바람직하게, 9:1 내지 1:1, 보다 바람직하게 4:1 내지 1:1로 사용할 수 있다.

[0085] 일예시로, 3종 병용의 경우, 병용은 예를 들어 균의 수(CFU) 기초로 4-8: 4-8: 1-2, (NK209:NK210:NK219) 일 수 있다. 바람직하게, 2:2:1로 사용할 수 있다.

[0086] 본 발명에 따른 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 신규한 유산균의 활성을 저해하지 않는 범위 내에서 추가적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.

[0087] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 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 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함할 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 약제학적으로 유효한 양이어야 한다. "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 상기 언급된 질환 또는 상태의 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 제제화 방법, 환자의 상태 및 체중, 환자의 성별, 연령, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간, 배설 속도, 반응 감응성 등과 같은 요인들에 따라 당업자에 의해 다양하게 선택될 수 있다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 처리의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어

떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0089] 본 발명의 약학 조성물은 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있으나 경구 투여가 바람직하다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제 등이 포함될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 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 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀젼, 점안제, 안연고제, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 안연고제, 점안제, 파스타제 또는 카타플 라스마제의 약제학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 국소 투여를 위한 제제는 임상적 처방에 따라 무수형 또는 수성형일 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0090] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 인지 기능 장애의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0091] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0092] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 면역 조절 방법을 제공한다.

[0093] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 면역 기능 개선 방법을 제공한다.

[0094] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 면역 증진 방법을 제공한다.

[0095] 본 발명에서 상기 언급된 균주들, 질환, 투여 등에 대한 설명들은 위 언급된 내용들이 적절히 반영될 수 있다.

[0096] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 신규한 프로바이오틱스를 이용한 치료로 유익한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 대상체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다.

[0097] 본 발명은 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 제공한다.

[0098] 본 발명은 인지 기능 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 제공한다.

[0099] 본 발명은 면역 조절에 사용하기 위한 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 제공한다.

[0100] 본 발명은 면역 기능 개선에 사용하기 위한 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 제공한다.

[0101] 본 발명은 면역 증진에 사용하기 위한 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 제공한다.

[0102] 본 발명은 염증성 질환의 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물의 용도를 제공한다.

[0103] 본 발명은 인지 기능 장애의 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물의 용도를 제공한다.

[0104] 본 발명은 면역 조절에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물의 용도를 제공한다.

[0105] 본 발명은 면역 기능 개선에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물의 용도를 제공한다.

[0106] 본 발명은 면역 증진에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물의 용도를 제공한다.

[0107] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0108] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 인지 기능 장애의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0109] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 면역 조절용 식품 조성물을 제공한다.

[0110] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 면역 기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0111] 본 발명은 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P, 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함하는 면역 증진용 식품 조성물을 제공한다.

[0113] 건강기능 식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가가치를 부여한 식품이다. 본 발명의 식품 조성물은 건강 기능 식품으로 이용될 수 있다. 이러한 건강기능 식품의 성분은 생체 방어와 신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다.

[0114] 본 발명의 균주들을 건강기능 식품(또는 건강기능 음료 첨가물)으로 사용할 경우, 상기 신규한 균주를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 균주들의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0115] 바람직하게, 본 발명에 따른 균주는 단독, 2종 또는 3종 혼합 형태일 수 있다. 앞서 언급된 범위 내에서 시너지 효과를 고려하여 혼합 균주의 사용을 고려할 수 있다.

[0116] 상기 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능 식품은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0117] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 균주들을 첨가할 수 있는 식품은 소세지, 육류, 빵, 초콜릿류, 스넥류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 신규한 유산균 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이에 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을

추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올일 수 있다.

[0118] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0119] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0120] 본 발명에 따른 신규 프로바이오틱스는 우수한 항산화 효과, 염증 개선 효과, 신경 개선 효과, 인지 개선효과, 장내 마이크로바이오타의 불균형 개선 효과, 면역 조절 효과 등을 통해 의약품 및 식품으로 활용 가치가 높고, 특히 염증성 질환, 면역기능 개선, 인지 기능 장애의 예방, 치료 또는 개선에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0121] 도 1은 암피실린에 의해 발생한 장내마이크로바이오타 불균형이 본 발명에 따른 균주 처리에 의해 개선된 것을 확인한 결과를 나타낸다 (AP: 암피실린, LR: 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus* NK210), BL: 비피도박테리움 롱검 NK219(*Bifidobacterium longum* NK219), Mx: NK210+NK219)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0122] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0123] **실시예 1: 유산균의 분리 및 동정**

[0124] **(1) 사람 분변에서 유산균의 분리**

[0125] 사람 분변을 GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 넣고 현탁하고, 10분간 4 ℃에 방치하고, 그 상등액을 취해 MRS 한천 배지(BD, USA)에 이식하고 37 ℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양하고 자라난 콜로니(colony)를 분리하였다.

[0126] **(2) 선별한 유산균의 동정**

[0127] 분리한 균주들의 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석, 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API Kit(모델명 : API 50 CHL; 제조사 : BioMerieuxs, USA)로 분석하여 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다.

[0128] 위 절차를 거쳐 동정된 균주들을 아래 표 1에 나열하였다.

표 1

[0129]

관리 번호	학명	관리 번호	학명
1	*Lactobacillus plantarum* NK181	26	*Lactococcus graminis* NK206
2	*Lactobacillus plantarum* NK182	27	*Lactococcus graminis* NK207
3	*Lactobacillus plantarum* NK183	28	*Lactococcus lactis* NK208
4	*Lactobacillus plantarum* NK184	29	*Lactococcus lactis* NK209
5	*Lactobacillus gasseri* NK185	30	*Lactobacillus rhamnosus* NK210
6	*Lactobacillus gasseri* NK186	31	*Lactobacillus rhamnosus* NK211
7	*Lactobacillus gasseri* NK187	32	*Lactobacillus rhamnosus* NK212
8	*Lactobacillus gasseri* NK188	33	*Bifidobacterium infantis* NK213
9	*Lactobacillus paracasei* NK189	34	*Bifidobacterium infantis* NK214
10	*Lactobacillus paracasei* NK190	35	*Bifidobacterium infantis* NK215
11	*Lactobacillus paracasei* NK191	36	*Bifidobacterium longum* NK216
12	*Lactobacillus paracasei* NK192	37	*Bifidobacterium longum* NK217
13	*Lactobacillus casei* NK193	38	*Bifidobacterium longum* NK218
14	*Lactobacillus casei* NK194	39	*Bifidobacterium longum* NK219
15	*Lactobacillus casei* NK195	40	*Bifidobacterium adolescentis* NK220

16	*Lactobacillus casei* NK196	41	*Bifidobacterium adolescentis* NK221
17	*Lactobacillus sakei* NK197	42	*Bifidobacterium adolescentis* NK222
18	*Lactobacillus sakei* NK198	43	*Bifidobacterium bifidum* NK223
19	*Lactobacillus sakei* NK199	44	*Bifidobacterium bifidum* NK224
20	*Lactobacillus reuteri* NK200	45	*Bifidobacterium catenulatum* NK225
21	*Lactobacillus reuteri* NK201	46	*Bifidobacterium catenulatum* NK226
22	*Lactobacillus johnsonii* NK202	47	*Bifidobacterium catenulatum* NK227
23	*Lactobacillus johnsonii* NK203	48	*Bifidobacterium pseudocatenulatum* NK228
24	*Lactobacillus mucosae* NK204	49	*Bifidobacterium pseudocatenulatum* NK229
25	*Lactobacillus mucosae* NK205	50	*Bifidobacterium pseudocatenulatum* NK230

[0130] **실시예 2: 균주의 특성 분석**

[0131] 상기 실시예 1에서 분리된 총 50종의 균주에 대하여 항산화 활성, 대식세포에서의 사이토카인 발현 변화, BDNF 발현 변화, NPY 발현 변화, Gut microbiota의 *Clostridium difficile* (디피실균) 증식과 LPS 생산량에 미치는 효과를 확인함으로써 특성이 우수한 균주를 선별하였다. 구체적 실험 방법 및 측정 결과는 아래와 같다.

[0132] **(1) 항산화활성 (in vitro)에 미치는 효과**

[0133] DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 에탄올에 0.2 mM 농도가 되도록 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 상기 DPPH 용액 0.1 ㎖에 유산균 현탁액(1×10^8 CFU/㎖) 또는 비타민 C 용액(1 g/㎖)을 넣고 20분간 37 ℃에서 배양하였다. 배양액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 그리고 나서, 상등액의 흡광도를 517 nm에서 측정하고 유산균의 항산화 활성을 계산하였다.

[0134] **(2) 대식세포의 분리와 염증 지표 TNF-α와 IL-10 발현양에 미치는 효과**

[0135] C57BL/6 생쥐(male, 6주령 20-23 g)의 복강에 멸균된 4% thioglycolate 2 ㎖를 투여하고, 96시간이 지난 뒤에 생쥐를 마취시키고, 생쥐 복강에 RPMI 1640 배지 8 ㎖를 투여하고 5~10분 후에 생쥐 복강 내의 RPMI 배지(대식세포)를 뽑아, 1000 g에서 10분간 원심분리하고 다시 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 대식세포를 각 well당 0.5×10^6의 수로 24-well 플레이트에 깔고, 유산균과 염증 반응 유도 물질인 LPS를 24시간 동안 처리하였다. 그리고 나서, 배양 상등액에서 TNF-α와 IL-10 사이토카인 발현량을 ELISA Kit로 측정하였다.

[0136] **(3) SH-SY5Y 세포의 BDNF 발현에 미치는 효과**

[0137] 한국 세포주 은행에서 분양받은 SH-SY5Y 세포를 10% FBS 및 1% 항생제가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하고, 12-well 플레이트에 웰 당 2×10^6 세포수로 분주하였다. 이후, 각 웰에 유산균 (1×10^4 CFU/㎖)과 함께 LPS (200 ng/㎖의 농도로 첨가하고 24시간 배양하고, 세포 및 상등액을 모아서 초음파처리하고 원심분리하여 상등액의 BDNF 양을 ELISA kit로 측정하였다.

[0138] **(4) PC12 phaeochromocytoma 세포의 neuropeptide Y (NPY) 발현에 미치는 효과**

[0139] 한국 세포주 은행에서 분양받은 PC12 세포를 10% FBS 및 1% 항생제가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하고, 12-well 플레이트에 웰 당 1×10^6 세포수로 분주하였다. 이후, 각 웰에 유산균 (1×10^4 CFU/㎖)과 함께 LPS (200 ng/㎖의 농도로 첨가하고 24시간 배양하고, 세포 및 상등액을 모아서 초음파처리하고 원심분리하여 상등액의 NPY 양을 ELISA kit로 측정하였다.

[0140] **(5) Gut microbiota의 *Clostridium difficile* (디피실균) 증식과 LPS 생산량에 미치는 효과**

[0141] 신선한 사람의 분변을 혐기성 배지(GAM, 일본 니스이제약사)에 현탁하고, 10분간 방치하고 그 상등액을 10,000배 혐기성 배지로 희석하고, 새로 만든 혐기성 배지 5 mL에 0.05 mL 이식하고, 유산균 ($1x10^6$ CFU/mL)을 이식하고 24시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 이 배양액을 2개로 나누어 한 개는 원심분리(5000 rpm, 20분 동안)하고 침전을 QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Germany)로 DNA를 분리하고, qPCR로 Clostridium difficile (primer: forward, 5′ -GGG AGC TTC CCA TAC GGG TTG-3′ (서열 번호 4); reverse, 5′ -TTG ACT GCC TCA ATG CTT GGG C-3′ (서열번호 5)을 정량하였다. 반응은 먼저 95° C에서 30 s 처리하고, 이어서 95° C에서 5 s, 72° C에서 30 s 에서 42회 반복 반응시켜 분석하였다. 또한 1개의 배양액은 초음파처리하고, 원심분리하고, 여과멸균하여 얻은 상등에서 LPS 양을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다.

[0142] 상기 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

[0143]

	항산화활성	대식세포		SHSY5Y세포	PC12세포	장내마이크로바이오타	
		TNF-α 발현 저해	IL-10 발현 유도	BDNF 발현유도	NPY 발현유도	디피실균 증식억제	LPS 생산억제
NK181	+	+	-	-	+	+	-
NK182	++	-	-	-	-	++	-
NK183	+	+	-	-	-	+	+
NK184	++	+	+	-	-	+	+
NK185	++	+	+	-	+	+	-
NK186	+	+	+	-	-	+	+
NK187	+	+	-	+	-	+	+
NK188	+	+	+	-	-	+	-
NK189	+	+	-	-	-	+	+
NK190	+	-	-	-	+	+	-
NK191	+	-	+	+	+	-	-
NK192	++	-	-	-	-	-	-
NK193	+	+	+	+	-	-	+
NK194	++	-	+	+	+	+	+
NK195	+	+	+	-	-	+	-
NK196	++	-	-	-	+	+	+
NK197	++	+	+	-	+	+	+
NK198	++	-	-	-	+	-	++
NK199	+	+		-	-	-	-
NK200	+	-	-	+	+	+	+
NK201	+	+	+	+	+	+	+
NK202	+	+	+	+	+	+	+
NK203	+	+	+	-	-	-	-
NK204	+	-	-	-	-	+	-
NK205	+	-	-	_	+	_	_
NK206	+	_	_		+		
NK207	-			-	-	+	+
NK208	-	-	-	+	+	+	+
NK209	+	+	+	+	+	+++	+
NK210	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
NK211	+	+	+	-	-	+	-
NK212	++	-	-	-	-	-	+
NK213	+	+	+	-	-	+	-
NK214	++	-	-	-	+	+	+
NK215	++	+	+	-	+	+	+
NK216	++	-	-	-	+	-	++
NK217	+	+		-	-	-	-
NK218	+	-	-	+	+	+	+
NK219	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
NK220	+	+	+	+	-	+	-
NK221	+	-	-	-	+	+	+
NK222	+	+	+	-	+	+	+
NK223	+	+	+	+	-	-	-
NK224	+	-	-	-	+	+	+
NK225	+	+	+	-	-	+	-
NK226	+	-	-	+	-	+	-
NK227	+	+	+	-	+	+	+
NK228	+	-	-	+	+	-	++
NK229	+	+		+	-	-	-
NK230	+	-	-	+	+	+	+

[0144] * very strongly (+++; >90%); strongly (++; >60-90%); weakly (+; >20-60%); not or less than 20%(-; <20%)

[0145] 상기 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus* NK210)과 비피도박테리움 롱검 NK219(*Bifidobacterium longum* NK219)가 측정된 항산화 활성, 염증 억제 활성, 신경 개선, 장내 *Clostridium difficile* (디피실균) 증식 및 LPS 생산량 측면에서의 개선 효과 등을 모두 우수하게 나타내는 것으로 확인되었다.

[0146] 또한, 상기 균주 이외에도 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) 균주가 일정 수준 이상의 활성을 나타내며, 특히 장내 *Clostridium difficile* (디피실균) 증식 억제에 현저한 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0147] 이에 따라, 위 결과를 기초로 하여, 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus* NK210)과 비피도박테리움 롱검 NK219(*Bifidobacterium longum* NK219), 그리고 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209) 균주를 중심으로 추가적인 실험을 진행하였다.

[0148] 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus* NK210)의 16s rDNA 서열은 서열번호 1에 구체적으로 기재하였으며, 비피도박테리움 롱검 NK219(*Bifidobacterium longum* NK219)의 16s rDNA 서열은 서열번호 2에 구체적으로 기재하였으며, 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209)의 16s rDNA 서열은 서열번호 3에 구체적으로 기재하였다. 또한, 이들 균주가 모두 신규 균주에 해당함을 Phylogenetic Tree 작성하여 또한 확인하였다.

[0149] 이에 본 발명자들은 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus* NK210), 비피도박테리움 롱검 NK219(*Bifidobacterium longum* NK219), 그리고 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209)를 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소 : 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 2021년 09월 15일자로 각각 KCCM13049P, KCCM13050P, 및 KCCM13048P의 수탁번호로 부여받았다.

[0150] **실시예 3: 균주의 생리학적 특성 확인**

[0151] 상기 기탁이 진행된 균주들에 대하여, 이의 생리학적 특성을 확인하였다.

[0152] 구체적으로, 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API 50 CHL 키트(API 50 CHL; 제조사 : BioMerieux, USA) 또는 API 20A 키트(API 20A, BioMerieux's, USA))를 사용하여 당 발효 시험으로 분석하였다. 그 결과는 하기 표 3(*Lactobacillus rhamnosus* NK210), 4(*Bifidobacterium longum* NK219), 5(*Lactococcus lactis* NK209)와 같다. 하기 표 3-5에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타낸다.

표 3

[0153]

탄소원	NK210	탄소원	NK210
CONTROL	-	에스큘린	+
글리세롤	-	살리신	+
에리쓰리톨	-	셀로비오스	+
D-아라비노오스	-	말토오스	+
L-아라비노오스	-	락토오스	+
D-리보오스	-	멜리비오스	-
D-자일로오스	-	수크로오스	-
L-자일로오스	-	트레할로오스	+
D-아도니톨	-	이눌린	-
메틸- β-D-자일로피라노사이드	-	멜리지토오스	+
D-갈락토오스	+	라피노오스	-
D-글루코오스	+	전분(Starch)	-
D-프럭토오스	+	글리코겐	-
D-만노오스	+	자일리톨	-
L-소르보오스	-	겐티오비오스	+
람노서스	-	D-투라노오스	-
둘시톨	+	D-릭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	+
만니톨	+	D-푸코오스	-
솔비톨	+	L-푸코오스	+

α-메틸-D-만노사이드	-	D-아라비톨	-
α-메틸-D-글루코사이드	-	L-아라비톨	-
N-아세틸-글루코사민	+	글루코네이트	+
아미그달린	+	2-케토-글루코네이트	-
알부틴	+	5-케토-글루코네이트	-

표 4

[0154]

탄소원	반응/효소	NK219
L- 트립토판	indole formation	-
요소	urease	-
D-글루코오스	acidification(glucose)	+
D-만니톨	acidification(mannitol)	-
D-락토오스	acidification(lactose)	+
D-사카로즈	acidification(saccharose)	+
D-말토오스	acidification(maltose)	+
살리신	acidification(salicin)	+
D-자일로스	acidification(xylose)	+
L-아라비노스	acidification(arabinose)	+
젤라틴	hydrolysis(protease)	+
에스쿨린 구연산철	hydrolysis(β-glucosidase)	-
글리세롤	acidification(glycerol)	-
D-셀로비오스	acidification(cellobiose)	-
D-만노오스	acidification(mannose)	+
D-멜레치토스	acidification(melezitose)	-
D-라피노오스	acidification(raffinose)	+
D-솔비톨	acidification(sorbitol)	-
L-람노오스	acidification(rhamnose)	-
D-트레할로스	acidification(trehalose)	+
	Catalase	-
	Spores	-
	Gram reaction	-
	Morphology	-

표 5

[0155]

탄소원	NK209	탄소원	NK209
CONTROL	-	에스쿨린	+
글리세롤	-	살리신	+
에리쓰리톨	-	셀로비오스	+
D-아라비노오스	-	말토오스	+
L-아라비노오스	-	락토오스	-
D-리보오스	+	멜리비오스	+
D-자일로오스	-	수크로오스	+
L-자일로오스	-	트레할로오스	+
D-아도니톨	-	이눌린	-
메틸- β-D-자일로피라노사이드	-	멜리지토오스	-
D-갈락토오스	+	라피노오스	+
D-글루코오스	+	전분(Starch)	+
D-프럭토오스	+	글리코겐	-
D-만노오스	+	자일리톨	-
L-소르보오스	-	겐티오비오스	+
람노서스	-	D-투라노오스	-
둘시톨	-	D-릭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	-
만니톨	+	D-푸코오스	-

솔비톨	-	L-푸코오스	-
α-메틸-D-만노사이드	-	D-아라비톨	-
α-메틸-D-글루코사이드	-	L-아라비톨	-
N-아세틸-글루코사민	+	글루코네이트	-
아미그달린	+	2-케토-글루코네이트	-
알부틴	+	5-케토-글루코네이트	-

[0156] **실시예 4: 사균체, 파쇄물의 제조**

[0157] 실시예 4-1. 사균체의 제조

[0158] 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P 또는 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P를 열처리 조건으로 90℃에서 10분간 3회 열처리를 수행하여 사균체를 제조하였다.

[0159] 실시예 4-2. 파쇄물(가용물 및 불용물)의 제조

[0160] 락토바실러스 람노서스 NK210 KCCM13049P, 비피도박테리움 롱검 NK219 KCCM13050P 또는 락토코쿠스 락티스 NK209 KCCM13048P를 원심분리하여 얻은 생균을 $1x10^6$ CFU/mL이 되도록 멸균 증류에 현탁하고, 4°C에서 초음파처리(1분처리 하고, 1분 휴식을 5회 반복)하고, 원심분리 (10,000 g, 4°C, 15분)하여 상등액(가용물)과 침전물(불용물)을 얻었다. 이를 동결 건조하여 사용하였다.

[0161] **실시예 5. 사균체 및 파쇄물의 활성 확인**

[0162] 상기 실시예 4에서 제조된 사균체 및 파쇄물을 이용하여 실시예 2에서와 같이 대식세포에서의 항염증 활성을 확인하였다.

[0163] 그 결과, 열 처리(90℃, 10분, 3회 처리)를 통해 제조된 사균체 및 초음파처리(1분처리 하고, 1분 휴식을 5회 반복)하여 파쇄된 파쇄물 모두 TNF-α 발현 대비 IL-10의 발현 유도활성이 생균을 처리했을 때와 비슷하게 나타남을 확인하였다.

[0164] **시험예**

[0165] 이하 진행되는 시험에서의 측정 방법은 아래 시험방법의 기준 하에 수행되었다.

[0166] **(1) 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정**

[0167] 대장조직 100mg에 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide 함유 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 200㎕를 넣고 균질화(homogenization)한다. 이후, 4℃ 및 10,000 g의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 50 ㎕를 0.95 ㎖ 의 반응액(1.6mM tetramethyl benzidine과 0.1mM H_2O_2 함유)에 넣고 37℃에서 반응시키면서 650 nm에서 경시적으로 흡광도를 측정였다.

[0168] **(2) IFN(intereferon)-ɣ, TNF-α, IL-10의 지표 측정**

[0169] 히포캠퍼스, 대장 조직, 비장 조직을 protease inhibitor cocktail이 함유된 1㎖의 RIPA buffer(Gibco사)를 첨가하여 균질화하고, 4℃, 13000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 상등액의 지표들을 ELISA kit(Ebioscience)를 사용하여 측정하였다.

[0170] **(3) 기억력 실험**

[0171] 1) Y자형 미로 실험(Y-maze task) 실험방법:

[0172] Y자형 미로 측정장치는 3개의 통로 (arm)를 뻗어 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25 cm, 높이 14 cm, 폭 5 cm 이고 동일한 각도로 위치한다. Y자형 미로의 한 통로의 끝에 실험동물의 머리 부분이 향하도록 두고 8 분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 하였다. 동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것 (arm entry)으로 보고, 동물의 움직임을 교차횟수 (alternation)로 나타내는데, 교차횟수란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의하였다. 자발적인 교차행동량은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수 (즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비로 표시하였다.

[0173] 2) 물체 인지 실험 :

[0174] 내부에서 외부가 보이지 않도록 제작된 박스(40×40×40 cm)에서 실시하였다. 두 개의 모양과 크기가 같은 물체(A, A')를 상자 안에 고정시킨 후 mouse를 상자의 중심에서 출발시켰다. 그리고 10분간 mouse가 두 물체를 만지는 횟수를 기록하였다. 24시간이 지난 다음 두 개의 물체 중 하나를 새로운 물체로 바꾼 후(A, B) 원래 있던 물체 1개와 새롭게 대치된 물체 1개를 준비해 놓고, 동물이 탐색하는 시간을 측정하였다.

[0175] **(4) qPCR (Quantitative real time polymerase chain reaction)**

[0176] 비장 조직에서 RNA Isolation Kit: RNeasy Mini Kit(QIAGEN)으로 mRNA를 분리하고, cDNA로 전환하여, qPCR를 수행하여 Tbet, Foxp3, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 발현율을 측정하였다. 반응은 먼저 95° C에서 30 s 처리하고, 이어서 95° C에서 5 s, 72° C에서 30 s동안 38회 반복 반응시켜 분석하였다.

[0177] **Primers for qPCR**

표 6

[0178]

Foxp3	Forward	5'-AGAAGCTGGGAGCTATGCAG-3' (서열번호 6)
	Reverse	5'-GCTACGATGCAGCAAGCGC-3' (서열번호 7)
Tbet	Forward	5'-TGCCCGAACTACAGTCACGAAC-3' (서열번호 8)
	Reverse	5'-AGTGACCTCGCCTGGTGAAATG-3' (서열번호 9)
GAPDH	Forward	5'-TGCAGTGGCAAAGTGGAGAT-3' (서열번호 10)
	Reverse	5'-TTTGCCGTGAGTGGAGTCATA-3' (서열번호 11)

[0179] **(5) 장내마이크로바이오타 분석**

[0180] 먼저 분변의 DNA는 QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 분리하고, pyrosequencing은 barcoded primers (V4 region of the bacterial 16S rRNA gene)를 증폭하여 amplicon을 제작하고, Illumina iSeq 100 (San Diego, CA)로 16S rDNA를 분석하여 점유율을 분석하였다.

[0181] **실시예 6: LPS 유도 인지능 손상 동물에서 균주 투여의 효능 분석**

[0182] C57BL/6 수컷 생쥐 (5주령 19-21 g)를 한 군에 6마리씩으로 하여 1주간 실험실에 적응시켰다. 장질환과 뇌질환의 유도를 위해 대장균 기원 LPS (10 μg/kg)을 매일 1회씩 5일간 복강 투여하였다. 익일부터 유산균을 $1x10^9$ CFU/마우스 농도(NK210 단독: $1x10^9$ CFU/마우스, NK219 단독: $1x10^9$ CFU/마우스, 병용(210+219): 210, $8x10^8$ CFU/마우스 및 219, $2x10^8$ CFU/마우스), sulfasalazine 50 mg/kg(마우스)의 농도로 각각 5일간 매일 1회씩 투여하였다. 정상군의 실험동물에는 유산균를 현탁하기 위해 사용한 생리식염수를 경구투여하였다. 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 희생시키고, 뇌의 히포캠퍼스, 대장, 비장을 얻었다. 히포캠퍼스에서는 염증지표인 IFN-γ, TNF-α, IL-10을 ELISA로 측정하였고, 대장에서는 장길이, 염증지표인 IFN-γ, TNF-α, IL-10을 측정하였고, 비장에서는 Th1 세포와 Treg 세포를 팩스로 측정하였다.

[0183] **(1) 대장염 개선 효과 확인**

표 7

[0184]

대장의 파라미터	투여군					
	NC	LPS	LPS+NK210	LPS+NK219	LPS+Mx(4:1) (NK210+NK219)	LPS+Sulfasalazine
Colon (cm)	5.2	4.7	5.0	4.8	5.1	5.0
MPO 활성 (μUnit/mg)	4.15	7.24	4.55	4.30	4.89	4.75
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	34.49	55.05	44.24	44.72	39.24	45.4
TNF-α (pg/mg)	16.59	24.82	20.76	18.59	19.68	20.1
IL-10 (pg/mg)	19.14	13.55	21.10	19.56	22.65	15.91
IFN-γ/IL-10	1.86	4.12	2.50	2.35	1.80	2.85
TNF-α/IL-10	1.02	1.53	0.98	0.96	1.01	1.26

[0185] 상기 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 단독 균주 및 병용 균주의 투여로 대장염을 개선하는 효과를 보이는 것을 장의 길이, 염증 인자의 발현 변화, MPO 활성 변화 등을 통해 확인하였다. 구체적으로, 장의 길이의 감소가 개선되었고, MPO 활성이 감소되었으며, 인터페론-감마 및 TNF-α의 발현 수준이 감소되고, 항염증성 사이토카인인 IL-10의 발현 수준이 증가하였다. 즉, 내독소에 의해 증가한 IFN-γ, TNF-α을 억제하고, 내독소에 의해 감소한 IL-10 발현을 증가시켰으며, 특히 IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 증가시켜 대장염의 증상을 크게 개선하였다. 이러한 작용은 병용 균주에서 시너지로 작용하는 것이 확인되었으며, 특히 NK210과 NK219를 4:1 혼합비로 투여한 경우 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0186] **(2) 비장에서의 개선 효과 확인**

표 8

[0187]

비장의 파라미터	투여군					
	NC	LPS	LPS+NK210	LPS+NK219	LPS+Mx (NK210+NK219)	LPS+ Sulfasalazine
Phagocytosis (%)	37.44	56.63	36.01	34.55	36.74	39.59
NK cell cytoxicity (%)	6.22	9.73	7.78	6.93	7.05	7.92
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	10.10	15.02	11.92	11.29	12.18	13.55
TNF-α (pg/mg)	3.81	4.80	4.00	4.00	4.06	4.51
IL-10 (pg/mg)	10.15	8.23	10.49	8.71	9.98	9.78
IFN-γ/IL-10	1.02	1.85	1.15	1.32	1.33	1.39
TNF-α/IL-10	0.39	0.58	0.38	0.47	0.41	0.13
Tbet (fold change)	1.12	2.94	1.58	1.27	1.41	1.82
Foxp3 (fold change)	1.28	0.80	1.07	1.32	1.34	1.02
Tbet/Foxp3	0.91	3.77	1.55	1.05	1.12	1.78

[0188] 상기 표 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 자연면역세포인 대식세포의 탐식능, NK세포의 세포 사멸효과가 개선된 것을 확인하였다. 또한, 내독소에 의해 증가한 IFN-γ, TNF-α를 억제하고, 내독소에 의해 감소한 IL-10 발현을 증가시켰으며, 특히 IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 증가시키는 결과(즉, IFN-γ/IL-10, TNF-α/IL-10 비의 감소를 의미함, 이하 상동)를 함께 나타내었다. 이러한 전신적으로 염증 반응에 관여하는 비장에서의 작용은 본 발명에 따른 균주의 우수한 염증 개선 효과를 나타낸다. 더욱이, 이러한 작용은 단독뿐만 아니라 병용에서도 시너지 효과를 나타내며 크게 우수하게 나타났으며, 특히 NK210과 NK219를 4:1 혼합비로 투여한 경우 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0189] **(3) 인지능의 개선 효과 확인**

표 9

[0190]

파라미터	투여군					
	NC	LPS	LPS+NK210	LPS+NK219	LPS+Mx (NK210+NK219)	LPS+ Sulfasalazine
Spontaneous alteration (%) (in Y-maze task)	75.85	61.37	69.36	71.06	75.45	69.21
Exoporation (%)(in NOR task)	79.18	69.95	76.00	76.97	81.07	72.02
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	24.04	31.20	23.04	24.09	26.95	27.35
TNF-α (pg/mg)	11.07	12.61	10.44	10.72	10.68	10.98
IL-10 (pg/mg)	48.62	40.43	46.94	47.71	50.18	45.79

IFN-γ/IL-10	0.50	0.74	0.52	0.50	0.54	0.60
TNF-α/IL-10	0.23	0.31	0.23	0.24	0.21	0.24

[0191] 상기 표 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 균주의 투여는 Y-maze 실험 및 NOR task에서 모두 우수한 개선 효과를 나타내었다. 특히 이러한 개선 효과는 균주를 병용하였을 때, 크게 시너지 효과를 나타내었다. 또한, 히포캠퍼스의 염증지표들을 개선하였으며, 특히 내독소에 의해 증가한 IFN-γ, TNF-α을 낮추고, IL-10 발현을 증가시켰으며, IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 증가시켜 신경염에 대한 개선 효과가 있음을 함께 확인하였다.

[0192] **실시예 7: 항암제(cyclophosphamide)로 유도한 면역억제 동물에서 균주 투여의 효능 분석**

[0193] C57BL/6 수컷 생쥐(5주령 19-21g)를 한 군에 6마리씩으로 하여 1주간 실험실에 적응시켰다. 장질환과 뇌질환의 유도를 위해 cyclophosphamide(CP, 150mg/kg, 생리식염수에 녹인)을 1일 투여하고, 하루 쉬고, 익일에 복강투여하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1㎖를 복강투여하였다. 항암제 최종 투여하고, 익일부터 매일 1회씩 5일간 시험시료인 유산균을 생리식염수에 현탁하여 한마리당 1×10^9 CFU(NK210 단독: $1x10^9$ CFU/마우스, NK219 단독: $1x10^9$ CFU/마우스, 병용(210+219): 210, $8x10^8$ CFU/마우스 및 219, $2x10^8$ CFU/마우스), sulfasalazine 50 mg/kg(마우스)의 양으로 경구투여하였다. 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을희생시키고, 뇌의 히포캠퍼스, 대장, 비장을 얻었다. 히포캠퍼스에서는 염증지표인 IFN-γ, TNF-α, IL-10을 ELISA로 측정하고, 대장에서는 장길이, 염증지표인 IFN-γ, TNF-α, IL-10을 측정하고, 비장에서는 Th1 세포와 Treg 세포를 팩스로 측정하였다.

[0194] **(1) 대장염 개선 효과 확인**

표 10

[0195]

대장의 파라미터	투여군				
	NC	CP	CP+NK210	CP+NK219	CP+Mx (NK210+NK219)
Colon (cm)	5.30	4.87	4.98	4.95	5.15
MPO 활성 (μUnit/mg)	4.41	7.19	4.79	4.62	4.18
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	24.74	16.21	28.79	38.64	26.50
TNF-α (pg/mg)	18.79	12.34	20.60	26.73	18.75
IL-10 (pg/mg)	9.93	5.09	9.65	13.00	10.26
IFN-γ/IL-10	2.50	3.83	3.05	3.32	2.65
TNF-α/IL-10	1.93	2.70	2.19	2.12	1.89

[0196] 상기 표 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, 단독 균주 및 병용 균주의 투여로 대장염을 개선하는 효과를 보이는 것을 장의 길이, 염증 인자의 발현 변화, MPO 활성 변화 등을 통해 확인하였다. 구체적으로, 장의 길이의 감소가 개선되었고, MPO 활성이 감소되었으며, 항암제에 의해 억제된 IFN-γ, TNF-α, IL-10 모두의 발현이 증가하였다. 특히, IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 증가시켜 대장염을 개선하였다. 이러한 작용은 병용 균주에서 시너지로 작용하는 것이 확인되었으며, 특히 NK210과 NK219를 4:1 혼합비로 투여한 경우 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0197] **(2) 비장에서의 개선 효과 확인**

표 11

[0198]

비장의 파라미터	투여군				
	NC	CP	CP+NK210	CP+NK219	CP+Mx (NK210+NK219)
Phagocytosis (%)	34.20	17.14	58.65	50.36	49.95
NK cell cytoxicity (%)	8.08	6.60	8.26	8.90	8.23
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	12.60	3.26	7.39	5.56	6.41

TNF-α (pg/mg)	4.01	1.86	3.20	2.45	3.07
IL-10 (pg/mg)	8.07	1.43	3.31	2.90	3.54
IFN-γ/IL-10	1.58	2.83	2.31	2.11	1.85
TNF-α/IL-10	0.50	1.67	1.04	0.87	0.90
Tbet (fold change)	1.08	0.68	0.75	0.95	0.95
Foxp3 (fold change)	0.84	0.25	0.37	0.36	0.53
Tbet/Foxp3	1.35	2.66	2.05	2.49	1.89

[0199] 상기 표 11에서 확인할 수 있는 바와 같이, 자연면역세포인 대식세포의 탐식능, NK세포의 세포 사멸효과가 개선된 것을 확인하였다. 항암제에 의해 억제된 IFN-γ, TNF-α, IL-10 모두의 발현이 증가하였다. 특히, IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 증가시켜 우수한 치료 효과를 나타내었다. 더욱이, 이러한 작용은 단독뿐만 아니라 병용에서도 시너지 효과를 나타내며 크게 우수하게 나타났으며, 특히 NK210과 NK219를 4:1 혼합비로 투여한 경우 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0200] **(3) 인지능의 개선 효과 확인**

표 12

[0201]

파라미터	투여군				
	NC	CP	CP+NK210	CP+NK219	CP+Mx (NK210+NK219)
Spontaneous alteration (%) (in Y-maze task)	78.95	58.95	70.94	71.26	71.39
Exoporation (%)(in NOR task)	80.55	62.40	78.71	78.34	80.48
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	27.21	23.15	25.30	23.48	27.84
TNF-α (pg/mg)	11.55	10.60	10.44	10.91	12.00
IL-10 (pg/mg)	52.19	40.07	43.29	53.74	59.15
IFN-γ/IL-10	0.52	0.58	0.59	0.44	0.47
TNF-α/IL-10	0.22	0.27	0.24	0.20	0.20

[0202] 상기 표 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 균주의 투여는 Y-maze 실험 및 NOR task에서 모두 우수한 개선 효과를 나타내었다. 특히 이러한 개선 효과는 균주를 병용하였을 때, 크게 시너지 효과를 나타내었다. 또한, 항암제에 의해 억제된 IFN-γ, TNF-α, IL-10 모두의 발현을 증가시키고, 특히, IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 증가시켜 치료 효과(면역 조절 효과)를 나타내었다.

[0204] **실시예 8: 항생제로 유도한 장내 마이크로 바이오타 불균형 동물에서 균주 처리에 의한 효능 분석**

[0205] C57BL/6 수컷 생쥐(5주령 19-21g)를 한 군에 6마리씩으로 하여 1주간 실험실에 적응시켰다. 장질환과 뇌질환의 유도를 위해 암피실린(AP, 100mg/kg, 생리식염수에 녹인)을 3일간 경구투여하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1mℓ를 경구투여하였다. 항생제 최종 투여 익일부터 매일 1회씩 5일간 시험시료인 유산균을 생리식염수에 현탁하여 한마리당 1×10^{9} CFU(NK210 단독: $1x10^{9}$ CFU/마우스, NK219 단독: $1x10^{9}$ CFU/마우스, 병용(210+219) : 210, $8x10^{8}$ CFU/마우스 및 219, $2x10^{8}$ CFU/마우스), sulfasalazine 50 mg/kg(마우스)의 양으로 경구투여하였다. 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 희생시키고, 뇌의 히포캠퍼스, 대장, 비장을 얻었다. 히포캠퍼스에서는 염증지표인 IFN-γ, TNF-α, IL-10을 ELISA로 측정하고, 대장에서는 장길이, 염증지표인 IFN-γ, TNF-α, IL-10을 측정하고, 비장에서는 Th1 세포와 Treg 세포를 팩스로 측정하고, 분변에서는 내독소(LPS)와 장내미생물군집을 측정하였다.

[0206] **(1) 대장염 개선 효과 확인**

표 13

[0207]

대장의 파라미터	투여군				
	NC	AP	AP+NK210	AP+NK219	AP+Mx (NK210+NK219)

Colon (cm)	5.12	4.53	5.28	5.45	5.48
MPO 활성 (μUnit/mg)	10.96	20.14	11.60	14.76	11.05
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	6.52	9.87	5.94	5.84	6.42
TNF-α (pg/mg)	23.08	33.10	22.86	28.27	19.62
IL-10 (pg/mg)	19.91	13.05	21.31	26.75	20.40
IFN-γ/IL-10	0.32	0.55	0.31	0.26	0.36
TNF-α/IL-10	1.14	2.64	1.43	1.16	1.05

[0208] 상기 표 13에서 확인할 수 있는 바와 같이, 단독 균주 및 병용 균주의 투여로 대장염을 개선하는 효과를 보이는 것을 장의 길이, 염증 인자의 발현 변화, MPO 활성 변화 등을 통해 확인하였다. 구체적으로, 장의 길이의 감소가 개선되었고, MPO 활성이 감소되었으며, 인터페론-감마 및 TNF-α의 발현 수준이 감소되고, 항염증성 사이토카인인 IL-10의 발현 수준이 증가하였다. 즉, 내독소에 의해 증가한 IFN-γ, TNF-α을 억제하고, 내독소에 의해 감소한 IL-10 발현을 증가시켰으며, 특히 IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 증가시켜 대장염의 증상을 크게 개선하였다. 이러한 작용은 병용 균주에서 시너지로 작용하는 것이 확인되었으며, 특히 NK210과 NK219를 4:1 혼합비로 투여한 경우 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0209] **(2) 비장에서의 개선 효과 확인**

표 14

[0210]

비장의 파라미터	투여군				
	NC	AP	AP+NK210	AP+NK219	AP+Mx (NK210+NK219)
Phagocytosis (%)	42.46	21.26	74.02	69.91	72.79
NK cell cytoxicity (%)	9.04	5.14	7.34	6.47	9.46
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	7.82	7.91	7.03	9.12	10.29
TNF-α (pg/mg)	3.41	3.96	3.57	4.32	5.01
IL-10 (pg/mg)	9.56	7.78	8.25	11.35	13.43
IFN-γ/IL-10	0.82	1.03	0.87	0.81	0.77
TNF-α/IL-10	0.36	0.52	0.45	0.40	0.41
Tbet (fold change)	0.86	1.42	1.07	1.03	0.98
Foxp3 (fold change)	1.27	0.62	0.69	1.66	1.39
Tbet/Foxp3	0.76	2.39	1.66	0.74	0.87

[0211] 상기 표 14에서 확인할 수 있는 바와 같이, 자연면역세포인 대식세포의 탐식능, NK세포의 세포 사멸효과가 개선된 것을 확인하였다. 또한, 내독소에 의해 증가한 IFN-γ, TNF-α을 억제하고, 내독소에 의해 감소한 IL-10 발현을 증가시켰으며, 특히 IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 증가시키는 결과를 함께 나타내었다. 이러한 전신적으로 염증 반응에 관여하는 비장에서의 작용은 본 발명에 따른 균주의 우수한 염증 개선 효과를 나타낸다. 더욱이, 이러한 작용은 단독뿐만 아니라 병용에서도 시너지 효과를 나타내며 크게 우수하게 나타났으며, 특히 NK210과 NK219를 4:1 혼합비로 투여한 경우 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0212] **(3) 인지능의 개선 효과 확인**

표 15

[0213]

파라미터	**투여군**				
	NC	**AP**	**AP+NK210**	**AP+NK219**	**AP+Mx (NK210+NK219)**
Spontaneous alteration (%)(in Y-maze task)	72.97	57.36	73.01	70.54	70.90
Exoporation (%)(in NOR task)	80.26	71.32	76.25	83.21	82.45
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	25.45	29.39	23.18	24.33	24.79
TNF-α (pg/mg)	12.41	16.51	13.37	12.43	14.09

IL-10 (pg/mg)	47.34	16.52	48.89	50.29	46.29
IFN-γ/IL-10	0.54	1.78	0.47	0.48	0.54
TNF-α/IL-10	0.27	0.41	0.26	0.28	0.31

[0214] 상기 표 15에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 균주의 투여는 Y-maze 실험 및 NOR task에서 모두 우수한 개선 효과를 나타내었다. 특히 이러한 개선 효과는 균주를 병용하였을 때, 크게 시너지 효과를 나타내었다. 또한, 히포캠퍼스의 염증지표들을 개선하였으며, 특히 내독소에 의해 증가한 IFN-γ, TNF-α을 낮추고, IL-10 발현을 증가시켰으며, IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 증가시켜 신경염에 대한 개선 효과가 있음을 함께 확인하였다

[0215] **(4) 장내마이크로바이오타 불균형 개선**

[0216] 장내마이크로바이오타 불균형을 개선한 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1을 통해 확인할 수 있는 바와 같이, 항생제 암피실린을 투여로 장내마이크로바이오타의 베타다양성, 프로테오박테리아, 박테로이데테스가 감소한 불균형이 LR(NK210), BL(NK219), 이의 혼합물(Mx) 투여로 장내 마이크로바이오타가 균형을 갖춘 형태로 개선하였음을 확인하였다.

[0217] **실시예 9: 건강한 동물에서 균주 투여의 효능 분석**

[0218] C57BL/6 수컷 생쥐(5주령 19-21g)를 한군에 6마리씩으로 하여 1주간 실험실에 적응시켰다. 매일 1회씩 5일간 시험시료인 유산균을 생리식염수에 현탁하여 한마리당 1×10^{9} CFU(NK210 단독(LR): $1x10^{9}$ CFU/마우스, NK219 단독(BL): $1x10^{9}$ CFU/마우스, 병용(MX, 210+219): 210, $8x10^{8}$ CFU/마우스 및 219, $2x10^{8}$ CFU/마우스)의 양으로 경구투여하였다. 양성 대조군의 실험동물에는 유산균 대신 대장염 치료 약물인 설파살라진(sulfasalazine)을 50 mg/kg으로, 정상군의 실험동물에는 유산균를 현탁하기 위해 사용한 생리식염수를 경구투여하였다. 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 희생시키고, 뇌의 히포캠퍼스, 대장, 비장을 얻는다. 히포캠퍼스에서는 염증지표인 IFN-γ, TNF-α, IL-10을 ELISA로 측정하고, 대장에서는 장길이, 염증지표인 IFN-γ, TNF-α, IL-10을 측정하고, 비장에서는 Th1 세포와 Treg 세포를 팩스로 측정하였다.

[0219] **(1) 대장염 개선 효과 확인**

표 16

[0220]

대장의 파라미터	투여군			
	NC	LR	BL	Mx
Colon (cm)	5.28	5.12	5.03	4.97
MPO 활성 (μUnit/mg)	4.15	4.18	3.53	5.01
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	55.49	55.75	64.83	68.59
TNF-α (pg/mg)	13.78	13.40	15.73	14.34
IL-10 (pg/mg)	42.12	39.95	42.89	40.13
IFN-γ/IL-10	1.32	1.40	1.52	1.73
TNF-α/IL-10	0.33	0.34	0.37	0.36

[0221] 상기 표 16에서 확인할 수 있는 바와 같이, 건강한 동물에서 단독 균주의 투여는 인터페론 감마의 발현을 증가시켰고, 병용시에 이의 발현을 매우 현저하게 증가시키는 것이 확인되었다. 특히 NK210과 NK219를 4:1 혼합비로 투여한 경우 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0222] **(2) 비장에서의 개선 효과 확인**

표 17

[0223]

비장의 파라미터	투여군			
	NC	LR	BL	Mx
Phagocytosis (%)	37.44	50.03	64.57	65.45
NK cell cytoxicity (%)	6.22	6.65	8.52	9.31
Interferon (IFN)-γ (pg/mg)	10.10	13.02	12.56	12.32
TNF-α (pg/mg)	3.81	3.48	3.49	3.96

IL-10 (pg/mg)	8.66	9.45	9.29	9.68
IFN-γ/IL-10	1.17	1.38	1.35	1.27
TNF-α/IL-10	0.44	0.37	0.38	0.41
Tbet (fold change)	1.49	1.41	1.80	1.88
Foxp3 (fold change)	1.05	1.05	1.05	1.60
Tbet/Foxp3	1.27	1.45	1.86	1.48

[0224] 상기 표 17에서 확인할 수 있는 바와 같이, 자연면역세포인 대식세포의 탐식능, NK세포의 세포 사멸효과가 개선된 것을 확인하였다. 또한, 인터페론 감마의 발현을 증가시켰다. 더욱이, 이러한 작용은 병용하였을 때 IFN-γ 발현에 대하여 더욱 유의적으로 증가하였다. 특히, IFN-γ 대비 IL-10, TNF-α 대비 IL-10의 발현을 개선하였다. 상기 결과를 통해서 본 발명에 따른 균주들이 면역 증진 효능이 우수함을 확인하였다.

[0225] **실시예 10: TNBS로 유도한 장질환 및 뇌질환 동물 제작과 이에 균주 투여에 의한 효능 확인**

[0226] C57BL/6 수컷 생쥐(5주령 19-21g)를 한군에 6마리씩으로 하여 1주간 실험실에 적응시켰다. 장질환과 뇌질환의 유도를 위해 5% 2,4,6-트리니트로벤젠술폰산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS, 미국 Sigma)용액을 50% 에탄올로 1:1 희석하여 끝이 둥근 1㎖ 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1㎖ 씩 투여하고, 수직으로 들어 30초간 유지하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1㎖를 경구투여하였다. 익일부터 매일 1회씩 5일간 시험시료인 유산균을 생리식염수에 현탁하여 한마리당 1×10^9 CFU(NK210 단독(LR): $1x10^9$ CFU/마우스, NK219 단독(BL): $1x10^9$ CFU/마우스, NK209 단독(LL): $1x10^9$ CFU/마우스, 병용(MX, 210+219) : NK210, $8x10^8$ CFU/마우스 및 NK219, $2x10^8$ CFU/마우스, 병용(MX, 209+219) : NK210, $8x10^8$ CFU/마우스 및 NK219, $2x10^8$ CFU/마우스, LR+BL+LL: NK210, $4x10^8$ CFU/마우스, 및 NK219, $2x10^8$ CFU/마우스 및 NK209, $4x10^8$ CFU/마우스, 열처리(H-) 각각: $1x10^9$ CFU/마우스)의 양으로 경구투여하였다. 양성 대조군의 실험동물에는 유산균 대신 대장염 치료 약물인 설파살라진(sulfasalazine)을 50 mg/kg으로, 정상군의 실험동물에는 유산균를 현탁하기 위해 사용한 생리식염수를 경구투여하였다. 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 희생시키고, 뇌의 히포캠퍼스, 대장, 비장을 얻었다. 히포캠퍼스에서는 염증지표인 TNF-α, IL-10을 ELISA로 측정하고, 대장에서는 장길이, 염증지표인 TNF-α, IL-10을 측정하고, 비장에서는 Th1 세포와 Treg 세포를 팩스로 측정하였다.

[0227] **(1) 인지기능 개선 효과 확인**

표 18

[0228]

뇌의 파라미터	Cognitive function		Concentration in the hippocampus		
	Spont. alteration (%)	Exploration (%)	IFN-γ (pg/mg)	TNF-α (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)
NC	69.31	78.27	20.73	9.39	45.51
TNBS	52.12	66.84	34.15	15.23	30.62
TNBS+LR(NK210)	62.45	74.25	26.28	12.14	38.64
TNBS+BL(NK219)	65.32	75.37	25.02	11.93	40.26
TNBS+LL(NK209)	58.8	70.20	30.81	13.54	35.53
TNBS+Mx(LR+BL=4:1)	68.48	77.44	24.34	11.53	40.97
TNBS+Mx(LL+BL=4:1)	67.82	76.35	25.38	11.89	41.04
TNBS+LR+BL+LL*	69.14	77.89	31.25	10.54	41.53
TNBS+H(열처리)-LR	60.24	72.34	28.25	12.76	35.71
TNBS+H-BL	62.45	73.32	26.27	12.13	38.65
TNBS+H-LL	58..22	72.34	28.25	12.76	35.71
TNBS+Sulfasal.	59.64	57.69	30.28	13.45	35.21

[0229] 상기 표 18에서 확인할 수 있는 바와 같이, NK210, NK219 모두 TNBS에 의해 손상된 인지기능손상을 개선하였다. 특히, TNBS에 의해 증가한 히포캠퍼스의 염증지표 IFN-gamma, TNF-alpha을 억제하고, IL-10을 증가시켰다. 또한, 이는 생균뿐만 아니라 열처리한 사균에서도 등등한 효과를 나타낸 것이었다. 또한, 단독뿐만 아니라, 2종의 병용(NK210 및 NK219), 특히 3종 병용(NK210, NK219와 NK209)인 경우에 이의 시너지 효과가 가장 우수한 것으로 확인되었다.

[0230] 위 효과는 모두, 현재 의약품으로 사용하는 설파살라진보다 우수한 결과로 확인되었다.

[0231] **(2) 대장에서의 개선 효과 확인**

표 19

[0232]

장의 파라미터	Colon				
	length (cm)	MPO (μUnit/mg)	IFN-γ (pg/mg)	TNF-α (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)
NC	5.22	10.19	4.86	14.54	20.91
TNBS	4.22	25.55	12.51	32.36	9.56
TNBS+LR(NK210)	4.63	18.43	8.42	23.84	15.31
TNBS+BL(NK219)	4.82	16.24	7.79	20.57	17.20
TNBS+LL(NK209)	4.89	15.65	7.89	20.12	17.10
TNBS+Mx(LR+BL=4:1)	4.98	15.26	7.56	19.23	17.92
TNBS+Mx(LL+BL=4:1)	4.98	15.26	7.56	19.23	17.92
TNBS+LR+BL+LL*	5.11	14.94	7.12	18.54	17.89
TNBS+H(열처리)-LR	4.58	19.21	9.83	25.82	14.69
TNBS+H-BL	4.75	17.48	8.54	23.19	15.98
TNBS+H-LL	4.66	18.51	9.01	25.82	15.09
TNBS+Sulfasal.	4.52	19.38	9.89	26.09	13.87

[0233] 상기 표 19에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS에 의해 손상된 대장염의상기 표 19에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS에 의해 손상된 대장염의 경우, 본 발명에 따른 균주 처리에 따라 개선된 효과가 나타났다. 특히, TNBS에 의해 증가한 히포캠퍼스의 염증지표 myeloperoxidase (MPO) 활성, IFN-gamma, TNF-alpha을 억제하고, IL-10을 증가시키는 결과를 가져왔으며, 이러한 작용은 생균뿐만 아니라 사균에서도 동일하게 확인되었다. 특히, 병용 중, NK210, NK219와 NK209의 3종 병용의 효과가 가장 우수하였으며, 각각 뿐만 아니라 병용 모두, 현재 의약품으로 사용하는 설파살라진보다 우수한 결과를 나타내었다.

[0234] **<유산균의 수탁 정보>**

[0235] 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 람노서스 NK210(*Lactobacillus rhamnosus* NK210)을 2021년 9월 15일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM13049P의 수탁번호를 부여받았다.

[0236] 본 발명의 발명자들은 비피도박테리움 롱검 NK219(*Bifidobacterium longum* NK219)을 2021년 9월 15일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM13050P의 수탁번호를 부여받았다.

[0237] 본 발명의 발명자들은 락토코쿠스 락티스 NK209(*Lactococcus lactis* NK209)을 2021년 9월 15일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM13048P의 수탁번호를 부여받았다.

수탁번호

[0238]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

수탁번호 : KCCM13048P

수탁일자 : 20210915

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

수탁번호 : KCCM13049P

수탁일자 : 20210915

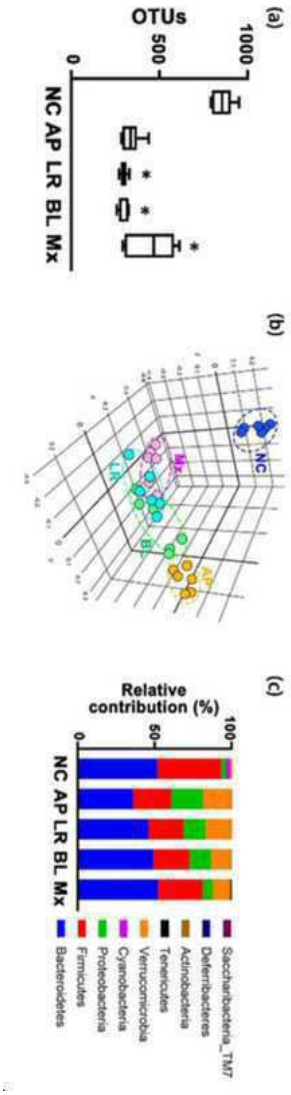
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

수탁번호 : KCCM13050P

수탁일자 : 20210915

도면

도면1



서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.