



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년03월14일
(11) 등록번호 10-0813637
(24) 등록일자 2008년03월07일

(51) Int. Cl.

C12P 21/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-0056173

(22) 출원일자 2002년09월16일

심사청구일자 2006년09월22일

(65) 공개번호 10-2004-0024740

(43) 공개일자 2004년03월22일

(56) 선행기술조사문헌

US5902578 A

경희대학교 대학원 석사학위논문(저자 송미정, 1997.02)

(73) 특허권자

매일유업주식회사

서울특별시 종로구 운니동 98-5 삼환빌딩

(72) 발명자

전호남

서울특별시 광진구 자양2동 691-6 1차 자양한양빌라 106호

전석락

서울특별시송파구문정동혜밀리아파트305동302호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

백남훈, 이학수

전체 청구항 수 : 총 4 항

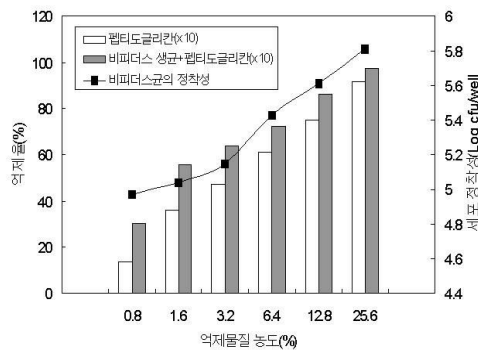
심사관 : 정재철

(54) 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물 및 이를 함유하는 로타바이러스 감염성 설사증의 예방용 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물 및 이를 함유하는 로타바이러스 감염성 설사증의 예방용 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물은 장 정착 촉진 인자로서 작용하여 비피더스균의 장 정착능을 강화시킴으로써, 장내에서 상기 로타바이러스보다 비피더스균의 군집이 더욱 우월하게 형성하게 함으로써, 상기 로타바이러스의 정착 및 증식을 억제하여 로타바이러스 감염성 설사증을 예방 또는 치료할 수 있음을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정후길

서울특별시 송파구 가락본동 70-20 대림아파트 5동
1101호

유제현

서울특별시 광진구 중곡4동84-15

김응률

경기도안성시당왕동534대우아파트104동401호

특허청구의 범위

청구항 1

비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 균주를 라이소자임 또는 단백질분해효소로 처리하는 것을 포함하는 방법에 의해서 추출됨을 특징으로 하는 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 균주(KCTC 10294BP) 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 효소 처리 전에 물리적 파쇄 또는 초음파 파쇄로 처리하는 것을 더 포함하는 방법에 의해서 추출됨을 특징으로 하는 펩티도글리칸 함유 추출물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항의 펩티도글리칸 함유 추출물을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 로타바이러스 감염성 설사증의 예방용 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 조성물은 장 정착능을 갖는 비피더스균을 더 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <5> 본 발명은 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물 및 이를 함유하는 로타바이러스 감염성 설사증의 치료용 또는 예방용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물은 장 정착 촉진 인자로서 작용하여 비피더스균의 장 정착능을 강화시킴으로써, 장내에서 상기 로타바이러스보다 비피더스균의 군집이 더욱 우월하게 형성하게 함으로써, 상기 로타바이러스의 정착 및 증식을 억제하여 로타바이러스 감염성 설사증을 억제할 수 있다.
- <6> 병원성 세균과 마찬가지로 일부 바이러스는 장내 세포에 감염되어 설사와 같은 질환을 유발한다. 특히, 급성설사는 개발도상국의 대부분의 유아에서 발생하는 주요 증상으로서, 유아 급성 설사증의 가장 주요한 원인은 로타바이러스로 알려져 있다. 이러한 로타바이러스 감염성 장염으로 사망하는 유아의 수는 개발도상국에서 매년 1만명 이상에 이르고, 전세계적으로 매년 150만명의 어린이가 로타바이러스 감염성 설사와 구토로 인하여 고통을 받는다고 보고되어 있다. 과거에는 여름철에 발생하는 설사 중에서 세균성 설사가 80% 정도로 매우 높았으나, 오늘날에는 바이러스 감염성 설사가 70-80%를 차지하여 오히려 바이러스 감염에 의한 설사 비율이 훨씬 높은 실정이다. 로타바이러스 감염시 어린이는 구토와 설사를 주로 하는 장염 증상 이외에 발열과 호흡기도염의 증상도 나타내며, 때로는 탈수 증상을 일으키기 때문에 수혈을 필요로 하기도 한다. 이러한 로타바이러스 감염성 장염은 세균성 장염에 의한 질병보다 그 증상이 약한 것으로 나타나지만, 더 심한 설사증을 일으킬 수도 있다.
- <7> 한편, 유아의 설사를 유발하는 로타바이러스의 감염은 중화항체를 생산하는 2개의 외각 단백질인 VP7과 VP4에 의해서 유발되며, 바이러스 표면의 당단백질인 VP7과 단백질 분해효소에 의해서 분해되어 응집되는 물질로서 단백질분해효소(일례로 프로티아제)에 의해서 절단된 헴어글루타민(protease-cleaved hemagglutinin)인 VP4는 바이러스의 중화와 보호에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 장내에서 감염된 세포의 전자현미경 연구에 의하면, 로타바이러스 입자는 세포내 봉해(endocytosis)와 직접적인 세포막 침투에 의해서 세포 내부로 들어가는 것으로 밝혀졌다. 이러한 로타바이러스의 감염은 유아의 면역기구를 약화시키며, 장내균총의 조성 변화에 관여하기 때문에 건강에 유해한 역할을 한다.
- <8> 급성 로타바이러스 감염성 설사증의 개선과 로타바이러스 감염의 억제에 관한 노력이 계속되고 있지만, 현재까

지 어떠한 새로운 의약품도 이러한 급성 설사증 치료에 용이하지 않으며, 단지 일부 억제 물질의 경구투여에 의한 최소한의 개선 효과만이 인정되고 있다.

- <9> 예를 들어, 로타바이러스 감염성 설사의 치료방법으로서, Guarino 등(Guarino,A., A.Casola, E.Bruzzese, M.Saini, L.Nitsch, and A.Rubino. 1996. Human serum immunoglobulin counteracts rotaviral infection on Caco-2 cells. *Pediatr.Res.* 40(6):881-887)은 사람의 장 상피세포인 Caco-2 세포에 로타바이러스를 감염시킨 연구모델에서 항체 등의 면역단백질의 억제 효과를 연구한 결과, 면역단백질이 로타바이러스에 의한 Caco-2 세포의 감염에 대해서 억제 효과가 있는 것으로 보고하였다. 그러나, 이러한 결과는 억제물질인 면역단백질의 투여시기와 함량에 따라서 차이가 있고, 면역단백질을 정제된 형태로서 얻기 위해 많은 비용이 소요되며, 이의 투여는 염증 등의 면역 부작용을 일으킬 수 있다.
- <10> 한편, 로타바이러스의 감염을 막기 위한 백신이 개발되기도 하였다. 그러나, 로타바이러스의 다양한 혈청형으로 인해서 질병을 충분하고도 광범위하게 방어하는데 어려움이 있다. 또한, 로타바이러스 감염 치료에 초유, 난황, 녹차추출물, 락토페린 등의 식품 성분에 의한 민간치료방법도 있으나, 효과의 재현성 측면에서 문제점이 있을 수 있다.
- <11> 따라서, 보다 효과적인 로타바이러스의 감염 억제 및 로타바이러스 감염성 설사증의 예방 또는 치료 방법에 대한 개발이 당업계에서 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <12> 이에 본 발명자들 또한 로타바이러스의 감염을 억제하여 로타바이러스 감염성 설사증을 개선하기 위한 방법을 찾고자 많은 연구를 수행한 결과, 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 균주 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물이 장 정착 촉진 인자로 작용하여 비피더스균의 장 정착능을 강화시킴으로써, 장내에서 상기 로타바이러스보다 비피더스균의 군집이 더욱 우월하게 형성하게 함으로써, 상기 로타바이러스의 정착 및 증식을 억제하여 로타바이러스 감염성 설사증을 억제할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- <13> 따라서, 본 발명의 목적은 상기 조성물의 유효성분으로서 함유되는 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 균주 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물을 제공하는 것이다.
- <14> 또한, 본 발명의 다른 목적은 로타바이러스 감염성 설사증 치료용 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <15> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 따른 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 균주 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물은 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 균주를 라이소자임 또는 단백질분해효소로 처리하고, 선택적으로 상기 효소 처리 전에 물리적 파쇄 또는 초음파 파쇄로 처리하는 것에 의해서 추출된 것임을 특징으로 한다.
- <16> 또한, 본 발명에 따른 로타바이러스 감염성 설사증의 치료용 또는 예방용 조성물은 유효성분으로서 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 균주 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물을 함유함을 특징으로 한다.
- <17> 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.
- <18> 최근, 지난 수년동안 장점막 면역성에 대한 지식이 증가하면서, 경구면역에 의해서 인간 또는 동물의 장 점막 및 호흡기에서 바이러스 및 세균의 감염을 억제하여 유아의 급성 로타바이러스 감염성 설사증을 개선하는 방법이 제안되었다. 즉, 로타바이러스 감염성 설사에 대한 예방과 치료를 위해서 감염 억제물질 및 프로바이오틱 유산균, 바람직하게는 유산간균과 비피더스 유산균을 섭취하는 방법의 치료 효과가 일부 밝혀졌다. 예를 들어, Saavedra 등(Saavedra,J.M., N.A.Bauman, I.Oung, J.A.Perman, and R.H.Yolken. 1994. Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet.* 344:1046-1049)은 치료중인 로타바이러스 감염성 설사증 유아에게 비피도박테리움 비피덤과 스트렙토코커스 써모필러스를 경구투여한 결과, 급성 설사증의 기간이 단축되었다고 보고하였다. 이러한 락토바실러스 GG 유산균의 기능은 국부적으로 로타바이러스에 대한 장 면역력을 강화시키며, 거대분자에 대한 장 투과성을 안정화시켜, 로타바이러스에 의한 유아의 감염증 및 설사증을 감소시키는 것으로 보고되었다.
- <19> 또한, Yasui 등(Yasui,H., J.Kiyoshima, and H.Ushijima. 1995. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea of mouse pups born to and nursed by dams fed Bifidobacterium breve YIT4064.

J. Infect. Dis. 172:403-409)은 쥐에 비피도박테리움 브레베 YIT4064를 경구투여할 경우, 항-로타바이러스 감염성 특이 IgA의 분비량이 월등히 증가되어 로타바이러스 감염에 대한 방어 효과를 가지며, 이러한 면역단백질의 로타바이러스 억제 효과는 상기 비피더스균의 농도와 반응시기에 의존한다고 보고하였다.

- <20> 그러나, 현재까지 프로바이오틱 균주의 섭취를 통해서 바이러스성 설사가 예방되는 기작은 명확히 알려진 바 없진 바는 없지만, 당업계의 연구결과들을 종합해보면, 프로바이오틱 유산균의 장내 병원성 세균 및 로타바이러스 감염성 설사증의 개선 및 억제 효과는, 상기 프로바이오틱 유산균이 ① 장관내의 유기산 증가에 의한 방어 효과; ② 장 상피세포 정착에 의한 병원성 세균의 정착 억제 및 거대분자의 투과 억제에 의한 보호 효과; ③ 유산균 유래의 억제인자에 의한 병원성 세균과 로타바이러스의 생육 억제효과; ④ 유산균에 의한 대식세포 (macrophage)의 식균작용 증강, 면역호르몬 증가, 면역단백질의 이소타이프 전환(isotype switching)에 의한 특이 IgA의 증가 등과 같은 면역 증강효과에 의한 억제 효과 등에 관여하는 것에 기인하는 것으로 보여진다.
- <21> 하지만, 상기와 같이 프로바이오틱 미생물 자체를 섭취하는 것은 섭취전에 미생물을 보관하기 위한 문제점이 있을 수 있으며, 또한 상기 미생물을 장내까지 도달시킬 때 위 등의 조건하에서 상기 비피더스균이 죽게됨으로, 그 활성이 감소되는 등의 문제가 있을 수 있다.
- <22> 한편, 본 발명자들은, 비피더스 유산균에 의한 상기 바이러스성 설사의 예방이 상기 비피도박테리움 인펜티스 MAEIL-K9 균주 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물에 의해 얻어질 수 있음을 확인하였다.
- <23> 비피도박테리움 인펜티스 MAEIL-K9 균주(KCTC 10294BP)는 본원 발명자에 의해 발견된 균주로서, 장 정착능이 우수하면서도 프로바이오틱 유산균의 기본 활성이 종합적으로 우수한 신규 균주로서, 이에 대해서는 본 출원인에 의해서 본원과 동일자로 출원된 "비피도박테리움 인펜티스 MAEIL-K9 비피더스 유산균 및 그를 함유하는 건강기능성 식품"에 개시되어 있다.
- <24> 본 발명에 따르면, 비피도박테리움 인펜티스 MAEIL-K9 균주 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물은 비피더스 유산균 균주의 장 정착능을 향상시키는 장 정착 촉진 인자로서 작용할 수 있다. 상술한 바와 같이, 로타바이러스가 체내에서 작용하기 위해서는 장 상피세포에 정착한 후 침입해야 하는 선결조건이 필요하다. 한편, 장내에서는 비피더스균과 이러한 병원성 미생물이 장내균총을 형성하고 있으며, 서로간에 억제활성을 갖고 있다. 따라서, 비피더스균이 장내에 정착하여 장내균총을 우월하게 형성한다면, 대장균 및 로타바이러스와 같은 병원성 미생물은 장에서 우월하게 정착한 비피더스균에 의해서 장에서의 군집 형성능이 감소되고, 따라서 이들 병원성 미생물들에 의한 감염증의 발현율을 현저하게 감소시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 따른 펩티도글리칸 함유 추출물은 비피더스균의 장 정착 촉진 인자로서 작용하여, 이에 의해서 상대적으로 로타바이러스의 장 정착이 억제되어 로타바이러스 감염성 설사증을 억제할 수 있다.
- <25> 한편, 당업자는 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물을 상기한 로타바이러스 감염성 설사증에 사용하는 것 이외에도, 장내에서 정착하여 감염증을 일으키는 어떠한 미생물들(예컨대, 대장균 O157:H7)의 장 정착을 억제하여, 이들 미생물의 감염에 의해서 발생하는 질환을 예방 또는 치료하기 위해서도 사용될 수 있다는 것을 용이하게 인식할 수 있다.
- <26> 본 발명에 따르면, 본 발명의 펩티도글리칸 함유 추출물의 첨가량이 높을수록 비피더스균의 정착능을 증가시키지만, 이러한 효과는 장 정착능을 갖고 있는 비피더스균에 더욱 증가된 정착능을 제공하지만, 정착능이 낮은 비피더스 균주에는 아무런 증강 효과를 나타내지 못한다. 따라서, 종래에 장 정착능이 우수한 것으로 공지된 비피더스균과 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물을 동시에 경구투여하는 경우, 로타바이러스 감염성 설사증을 더욱 현저하게 억제할 수 있다.
- <27> 한편, 펩티도글리칸(peptidoglycan)은 세포벽의 중요한 구성 성분의 일종으로서, 뮤라민산(muramic acid), 글루코스아민(glucosamine), 알라닌(alanine), 글루타민산(glutamic acid), 오르니틴(ornithine), 또는 라이신(lysine)으로 구성되어 있다. 또한, 세포벽을 구성하는 당류로는 글루코스(glucose), 갈락토스(galactose), 람노스(rhamnose) 등이 있다. 비피더스균의 세포벽을 구성하고 있는 펩티도글리칸의 조성은 비피더스균의 아종(subspecies)에 따라서 다소의 차이를 나타내고 있다. 예를 들면, 비피도박테리움 비피덤은 L-알라닌(alanine), D-글루타민산아마이드(glutamic acid-amide), L-오르니틴(ornithine), D-알라닌(alanine)으로 구성된 4중체 펩타이드(tetrapeptide)를 함유하고 있으며, 비피도박테리움 애돌센티스는 4중체 펩타이드(tetrapeptide) 중에서 라이신(lysine) 또는 오르니틴(ornithine)을 함유하고 있다. 또한, 비피도박테리움 인펜티스와 비피도박테리움 브레베는 4중체 펩타이드(tetrapeptide) 중에서 라이신(lysine)을 가지고 있고, 비피도박테리움 롱검은 4중체 펩타이드(tetrapeptide) 중에서 오르니틴(ornithine)을 함유하고 있다.

- <28> 본 발명에 의하면, 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물은 상기한 특성을 가지므로, 적당한 단백질분해효소 또는 라이소자임으로 효소처리하는 것에 의해서 얻어질 수 있다. 또한, 상기 펩티도글리칸 함유 추출물은 상기 효소 처리전에 선택적으로 물리적 파쇄(일례로 "Polytron"이나 "French press"로 세포벽을 파괴하여 세포 내부물질을 빼 버리는 방법) 또는 초음파 파쇄를 수행할 수 있다. 본 발명은 균주를 효소처리와 선택적으로 물리적 힘을 가하여 처리한 경우, 추출된 펩티도글리칸 함유 추출물은 활성이 매우 우수하다는 것을 보여졌다. 그러나, 본 발명에 따르면, 물리적인 파쇄만을 수행하여 추출된 펩티도글리칸 함유 추출물은 장 정착 촉진 인자로 어떠한 활성도 갖지 않았다. 또한, 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물의 저장을 보다 용이하게 하기 위하여 동결건조를 수행할 수 있다.
- <29> 한편, 본 발명은 유효성분으로서 비피도박테리움 인펜티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물을 함유하는 로타바이러스 감염성 설사증의 예방용 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- <30> 본 발명의 로타바이러스 감염성 설사증의 예방용 또는 치료용 조성물에서, 유효성분인 비피도박테리움 인펜티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물은 경구투여시키는 것이 바람직하다.
- <31> 또한, 본 발명에 따른 조성물은 장 정착능이 우수한 것으로 통상적으로 알려진 비피더스 유산균을 더 포함할 수 있을 것이다.
- <32> 한편, 상기한 범위 내로 본 발명의 펩티도글리칸 함유 추출물을 투여하기 위한 제제는 통상적인 형태를 가질 수 있으며, 예를 들면 알약, 캡슐 형태나 드링크제, 의약품 등의 형태로 사용할 수 있다.
- <33> 한편, Henriksson 등(Henriksson,A., R.Szewzyk, and P.L.Conway. 1991. Characteristics of the adhesive determinants of Lactobacillus fermentum 104. Appl.Environ.Microbiol. 57:499-502)은 균체의 세포벽에 정착 촉진 인자가 존재하며, 그것이 탄수화물로 구성된 성분일 것으로 예상하였으며, Greene과 Klaenhammer(Greene,J.D. and T.R.Klaenhammer. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. Appl.Environ.Microbiol. 60(12):4487-4494)는 유산균 균체를 단백질 분해효소로 처리했을 때, 분해효소의 종류에 따라 정착능에 상이한 영향을 나타냈다고 보고하였다. 이러한 사실은, 미생물의 장 상피세포에 대한 정착에 있어서 세포벽 구성성분의 일종인 펩티도글리칸 함유 추출물이 정착 촉진 인자로 작용한다는 것을 의미한다. 따라서, 비피더스균의 펩티도글리칸 함유 추출물은 인체의 장내에서 일차적인 보호 장벽의 역할을 수행할 수 있으며, 어떠한 백신 및 여러 화학약품에 비해 부작용이 없으므로, 설사증의 예방 및 치료 이외에도 천연의 건강보조제로서 충분한 기능성을 발휘할 수 있음을 알 수 있다.
- <34> 또한, 그람 양성(Gram positive) 미생물의 세포벽으로부터 유래되는 펩티도글리칸 함유 추출물이 면역 증강인자라는 사실은 잘 알려져 있으며, 펩티도글리칸 함유 추출물은 대개 사람의 다양한 면역 결핍증을 치료하는데 이용되고 있다. Namioka 등(Namioka,S., T.Sasaki, and Y.Maede. 1991. Immunopotential of the small intestine of weaning piglets by peptidoglycan derived from Bifidobacterium thermophilum. Bifidobacteria Microflora. 10(1):1-9)은 비피도박테리움 써모필럼 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물에 의한 포유 쥐의 소장 면역 증강 효과를 조사한 결과, 대장균과 비피더스 유산균 등에 의해서 야기되는 포유 후 설사증의 치료에 펩티도글리칸 함유 추출물이 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.
- <35> 또한, Namba 등(Namba,Y., Y.Hidaka, K.Taki, and T.Morimoto. 1981. Effect of oral administration of lysozyme or digested bacterial cell walls on immunostimulation in guinea pigs. Infect.Immun. 31(2):580-583)은 미생물 분해효소와 미생물 세포벽 분해물의 경구투여에 따른 기니아 피그(guinea pig)의 면역 증강에 대해서 연구하였다. 그 결과, 라이소자임(lysozyme)과 단백질 분해효소(pronase)를 함께 경구투여한 처리군이 개별적으로 처리한 군에 비해서 세포 면역능이 증가되며, 비피도박테리움 룡검 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물을 포함하는 세포벽 분해물의 경구투여에 의해서, 체액내 면역반응이 증가한다는 것이 밝혀졌다. Sasaki 등(Sasaki,T., S.Fukami, and S.Namioka. 1994. Enhanced resistance of mice to Escherichia coli infection induced by administration of peptidoglycan derived from Bifidobacterium thermophilum. J.Vet.Med.Sci. 56(3):433-437)은 쥐에 비피도박테리움 써모필럼 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물을 500 μ g 급여했을 때 대장균에 대한 생존률이 저하되었으며, 이러한 결과는 대장균 감염에 대한 쥐의 방어활성이 펩티도글리칸 함유 추출물 급여에 의해서 증강된다고 하였다.
- <36> 이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 이해를 보다 용이하게 하기 위하여 제공되는 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- <37> 실시예 1 : 실험균주와 펩티도글리칸 함유 추출물의 조제

- <38> 본 실시예에서 이용한 비피더스 유산균은 비피도박테리움 비피덤 MAEIL-M3, 한국인 유래의 분리균주인 비피도박테리움 롱검 MAEIL-M8, 임상현장에서 분리해 낸 비피도박테리움 애돌센티스 MAEIL-K8 및 비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9를 사용하였다. 한편, 로타바이러스는 건국대학교 축산대학 유가공실험실에서 보관중인 인체 유래의 1종(S2)과 소 유래의 2종(NCDV, JBR)을 실험에 사용하였다.
- <39> 비피더스 유산균 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물의 분리 방법은 다음과 같다. 비피더스균 100ml(비피더스균 액을 0.1% 접종) 를 mRS broth에 접종하여, 37℃에서 24시간동안 혐기배양한 후, 원심분리(3,500rpm/15min)하여 균체만을 분리한 다음, PBS(pH 6.6)를 첨가하여 5ml로 조정하였다. 폴리트론(Polytron; PT3000, Swiss)을 이용하여 12,000rpm/5분으로 분쇄하고, 원심분리(3,500rpm/15분)한 후, 침전물을 2회 세척하고, 부피를 2ml로 재조정하였다(재조정 완충액은 일례로 PBS(pH 6.6)이다). 2ml의 균액에 0.1% 라이소자임 및 0.2% 단백질 분해 효소(pronase)를 첨가하고, 37℃에서 48시간동안 배양한 후 동결건조하여 보관하였다. 이후의 실험에서, 보관 중인 동결건조된 펩티도글리칸 함유 추출물을 PBS로 일정농도 희석하고 30분동안 교반한 후, 15분동안 초음파 처리한 다음 실험에 사용하였다.
- <40> 실시예 2 : 비피더스균 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물의 정착 증강 효과
- <41> 본 실시예의 구체적인 실험 방법을 설명하면, Caco-2 세포를 배양하여 단일층(monolayer)이 형성된 24 well plate에 균 현탁액(OD 1.0)을 100ml(1×10^7 cfu/well) 접종하여 5% CO2 인큐베이터에 1시간 30분 반응시킨 후 정착능 실험방법 중 평판법(Konishi 등, 1996)으로 정착능을 측정하였다. 비피더스균과 E. coli O157:H7은 활력을 최대로 한 균주를 PBS로 현탁하여 OD 1.0으로 보정한 균 현탁액을 이용하였으며, 균수의 측정은 BLHB agar(5% horse blood 함유)를 이용하였다.
- <42> 비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물의 농도에 따른 비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9 균주와 E. coli O157:H7 균주의 단독 또는 혼합 정착 균수의 차이는 표 1에 나타났다.

표 1

<43>

반응 방법	실험균주	반응균수 (cfu/well)	Non-PGN ^a		PGN500 ^b	
			장착균수 (cfu/well)	정착율 (%)	정착균수 (cfu/well)	정착율 (%)
A	비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9	1.1×10^7	1.9×10^5	1.73	5.4×10^5	4.91
	대장균 O157:H7	3.7×10^7	9.8×10^5	2.65	9.9×10^5	2.68
B	비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9	1.1×10^7	1.8×10^5	1.64	6.1×10^5	5.55
	대장균 O157:H7	3.7×10^7	6.9×10^5	1.86	6.1×10^5	1.65
C	비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9	1.1×10^7	1.6×10^5	1.45	5.9×10^5	5.36
	대장균 O157:H7	3.7×10^7	1.7×10^5	0.46	3.2×10^5	0.86

A : 비피더스균과 대장균을 Caco-2 세포에 동시에 반응
 B : 비피더스균을 2시간 동안 반응 후 대장균 반응
 C : 대장균을 2시간 동안 반응 후 비피더스균 반응

^a 펩티도글리칸 함유 추출물 무첨가
^b 펩티도글리칸 함유 추출물 첨가(500µg/well)

- <44> 단독 또는 혼합 정착실험에서, 비피더스 균수는 펩티도글리칸 함유 추출물 농도가 100µg/well 까지 급속히 증가 되는 것으로 나타났다. 이는, 비피더스균의 세포막 성분 중에서 올리고당 함유 부분인 당단백질과 당지질이 미생물 정착 수용체가 될 수 있다고 보고한 Bock 등(Bock, K., M.E.Breimer, A.Brignole, G.C.Hansson, K.A.Karlss, G.Larson, H.Leffler, B.C.Samuelsson, C.Stromberg Svanborg-Eden, and J.Thurin. 1985. Specificity of binding of strain of uropathogenic E. coli to aGal(1,4)Gal containing glycosphingolipids. J.Biol.Chem. 260:8545-8551), Chadee 등(Chadee, K., M.L.Johnson, E.Orozco, W.A.Petri, and J.Ravdin. 1988. Binding and internalization of rat colonic mucins by the galactose/N-

acetyl-D-galactosamine adherence lectin of Entamoeba histolytica. J.Infect.Dis. 158:398-406), Krivan 등(Krivan,H.C., G.F.Clark, D.F.Smith, and T.D.Wilkins. 1986. Cell surface binding site for Clostridium difficile enterotoxin : Evidence for a glycoconjugate containing the sequence α Gal(1,3) β Gal(1,4)GlcNAc. Infect.Immun. 53:573-581)의 결과와 일치하는 것으로 판단된다. 한편, 비피더스 균수가 상당히 증가하는 동안 대장균 균수는 급격히 감소되는 현상이 나타났다. 특히, 1,000 μ g/well에서의 균수 감소는 펩티도글리칸 함유 추출물의 농도가 높아짐에 따라서, Caco-2 세포에서의 단일층(monolayer)이 삼투압에 의해서 약간의 피해를 받았기 때문인 것으로 보여진다.

<45> 이러한 결과로부터, 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물이 E. coli O157:H7의 정착에 영향을 미치지 않는지의 여부는 명확히 알수는 없지만, 비피더스균의 정착에는 확실한 정착 촉진 인자로서 작용한다는 것을 알 수 있다.

<46> 한편, 유산균이 장내에 미리 정착되어 서식할 때 병원성 세균에 대한 방어효과는 더욱 커지게 되며, 또한 장내에서 많은 수의 비피더스균이 외래 병원균의 증식을 억제하는 장벽으로 작용한다는 Gibson과 Wang(Gibson,G.R. and X.Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. J.Appl.Bacteriol. 77:412-420)의 결과를 감안하면, 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물의 첨가에 따른 비피더스균의 정착 증강 효과는 장 내벽의 일차적인 방어벽을 제공하여, 병원성 세균의 정착 억제를 증가시킬 수 있다는 것을 알 수 있다.

<47> 또한, 펩티도글리칸 함유 추출물 급여에 의해서 대장균 감염에 대한 쥐의 방어 활성이 증강된다는 Sasaki 등(Sasaki,T., S.Fukami, and S.Namioka. 1994. Enhanced resistance of mice to Escherichia coli infection induced by administration of peptidoglycan derived from Bifidobacterium thermophilum. J.Vet.Med.Sci. 56(3):433-437)의 결과와, 생체내 실험으로, E. coli O157:H7의 성장을 억제하는 유산균을 선발하여 E. coli O157:H7 감염 전에 송아지에 투여하면, E. coli O157:H7의 감염이 억제될 수 있다고 보고한 Zhao 등(Zhao,T., M.P.Doyle, B.G.Harmon, C.A.Brown, P.O.E.Mueller, and A.H.Parks. 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. J.Clin.Microbiol. 36(3):641-647)의 결과를 감안하면, 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물이 비피더스균의 정착 증강 효과 및 숙주의 면역증강 효과를 동시에 가지고 있는 것을 알 수 있다.

<48> 실시예 3 : 펩티도글리칸 함유 추출물의 비피더스 균종에 따른 정착능 변화

<49> 본 실시예의 구체적인 실험 방법은 상기 실시예 2와 동일하며, 추가적으로 균 현탁액 집중시에 동량의 0.1% 펩티도글리칸 함유 추출물을 100 μ g/well 농도로 첨가하여 반응시켰다.

<50> 상기에서 보여진 바와 같이, 펩티도글리칸 함유 추출물은 비피더스균의 정착 촉진 인자로 유효하다는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 실시예에서는 비피더스 균종의 기원에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물의 정착 촉진 정도를 규명하고자 수행되었다.

<51> 비피도박테리움 룡검 MAEIL-M8, 비피도박테리움 애돌센티스 MAEIL-K8, 비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9로부터 상기 실시예 1의 방법에 따라서 추출된 각각의 펩티도글리칸 함유 추출물을 정착 촉진 인자로 이용하여 비피도박테리움 룡검 MAEIL-M8, 비피도박테리움 애돌센티스 MAEIL-K8, 비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9 균주와 정착 촉진 교차실험을 수행하였다. 그 결과는 하기 표 2에 나타났다.

표 2

Sources	비피도박테리움 룡검 MAEIL-M8		비피도박테리움 애돌센티스 MAEIL-K8		비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9	
	cfu/well	%*	cfu/well	%	cfu/well	%
Non-PGN ^a	9.5×10 ³	0.04	4.5×10 ⁵	2.50	4.1×10 ⁵	3.72
M8-PGN100 ^b	7.5×10 ³	0.03	9.6×10 ⁵	5.33	1.8×10 ⁶	16.36
K8-PGN100 ^c	5.0×10 ³	0.02	1.0×10 ⁶	5.55	1.4×10 ⁶	12.72
K9-PGN100 ^d	5.0×10 ³	0.02	8.6×10 ⁵	4.77	1.3×10 ⁶	11.81

<52>

*정착율
^a 펩티도글리칸 함유 추출물 무첨가
^b 비피도박테리움 룡검 MAEIL-M8 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물(100 μ g/well)
^c 비피도박테리움 애들센티스 MAEIL-K8 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물(100 μ g/well)
^d 비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물(100 μ g/well)

<53> 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 비피도박테리움 룡검 MAEIL-M8 균주를 제외하고는 모든 균주에서 정착 증가 현상을 나타냈으며, 정착능이 낮은 비피도박테리움 룡검 MAEIL-M8 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물도 비피도박테리움 룡검 MAEIL-M8을 제외한 모든 균주에서 정착 증가 현상을 나타냈다. 상기 결과에서 보는 바와 같이, 비피더스 균주에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물의 활성 차이는 없는 것으로 나타났지만, 정착능이 낮은 균주에 대해서는 장 정착 증강 기능을 나타내지 않는 것으로 밝혀졌다. 또한, 비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9 균주는, 펩티도글리칸 함유 추출물 첨가균이 무첨가균에 비해서 월등히 장 정착율이 높은 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과로부터, 비피더스균 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물은 비피도박테리움 룡검 MAEIL-M8 균주의 정착 촉진 인자로서는 작용하지 않지만, 그외의 정착능이 우수한 균주에는 더욱 확실한 정착 촉진 인자 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

<54> 실시예 4 : 비피더스균 유래 물질의 농도에 따른 로타바이러스 억제 효과

<55> 본 실시예의 구체적인 실험 방법을 설명하면, MA-104 세포를 접종 배양하여 단일층(monolayer)이 형성된 96 well plate에 비피더스균의 사균체와 PGN을 첨가한 Kaljot 등(Kaljot, K.T., R.D.Shaw, D.H.Rubin, and H.B.Greenberg, 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. J. Virol. 62(4):1136-1144)의 방법을 응용하여 AEC 염색하여 측정하였다.

<56> 비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물과 사균체 성분(DCM, dead cell mass)의 농도에 따른 로타바이러스 억제 효과를 도 3에 나타냈으며, 로타바이러스 종류에 따른 비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물의 억제 효과는 도 2에 나타내었다. 사균체에 대해서 실험을 수행한 이유는 죽은 사균체도 장 상피세포에 정착하여 로타바이러스 감염 방어 역할을 수행할 수 있으므로, 확인하기 위하여 수행하였다.

<57> 본 발명의 펩티도글리칸 함유 추출물과 사균체 성분 현탁액이 전체 M199 배지에 25.6% 첨가되었을 때, 로타바이러스 억제 효과는 각각 99.1%와 85.4%로 나타났다. 또한, 0.2% 첨가되었을 때의 억제 효과는 각각 41.8%와 35.8%이었다. 이러한 결과로부터, 두 검사물질 모두에서 로타바이러스 억제 효과가 확연히 나타났지만, 펩티도글리칸 함유 추출물이 사균체 성분에 비해서 로타바이러스에 대한 억제 효과가 우수한 것으로 밝혀졌다.

<58> 이러한 현상은 Matsumoto 등(Matsumoto,S., H.Ogawa, T.Kusama, O.Nagase, N.Sawaki, M.Inabe, S.Kusumoto, and T.Shiba. 1981. Stimulation of nonspecific resistance to infection induced by 6-o-acyl muramyl dipeptide analogs in mice. Infect.Immun. 32:748-758)이 펩티도글리칸 함유 추출물은 생체내 실험에서 면역 증강에 따른 치료 효과가 있다고 보고한 결과를 볼 때, 비피더스균 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물에 의한 로타바이러스 억제효과는 생체내 실험상에서는 더욱 가증될 것으로 추정된다.

<59> 한편, 사균체 성분에 의한 로타바이러스 감염 억제 효과는 유산균의 사균체 성분과 생균체 모두에서 정착능이 유사하게 인정된다는 것은 하기 표 3의 결과로부터 알 수 있다.

표 3

실험균주	평판법	직접검경법	
	LCM ^a (cfu/well)	LCM(/100세포수 [*])	DCM ^b (/100세포수)
비피도박테리움 비피덤 MAEIL-M3	1.6 \times 10 ⁴	71	35
비피도박테리움 룡검 MAEIL-M8	1.0 \times 10 ³	19	4
비피도박테리움 애들센티스 MAEIL-K8	1.8 \times 10 ⁵	114	57
비피도박테리움 인팬티스 MAEIL-K9	2.4 \times 10 ⁵	188	79

^a비피더스균 생균체
^b가열처리한 비피더스 균체
^{*}100개의 MA-104 세포당 정착 세균수

<61> 도 3으로부터, 인체 유래의 로타바이러스인 S2와 동물 유래의 로타바이러스인 JBR과 NCDV에 대한 억제 효과는 펩티도글리칸 함유 추출물 농도 25.6%일 때 각각 99.0%, 99.0%, 99.1%로 우수하였으며, 펩티도글리칸 함유 추출물 농도 0.2%일 때에는 각각 21.1%, 22.0%, 41.8%로서 로타바이러스의 종류에 따라서 차이는 있지만 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

<62> 실시예 5 : 비피더스균의 정착에 따른 로타바이러스 감염 억제 효과

<63> 본 실시예의 구체적인 실험 방법을 설명하면, MA-104 세포를 접종 배양하여 단일층(monolayer)이 형성된 96 well plate에 비피더스균의 생균 세포를 접종하여 정착시킨 다음, 2시간 후에 무혈청 M199 배지로 3회 세척하여 AEC 염색하였다. 또한, cPGN과 비피더스균의 생균 세포를 첨가하여 로타바이러스에 대한 감염 억제 효과를 관찰하였다.

<64> 비피더스균에 의한 다양한 로타바이러스 감염 억제 효과는 도 3에 나타났다. 실험에 이용된 모든 로타바이러스에서 비피더스균 생균체의 효과가 인정되었으나, NCDV는 농도 변화에 따른 억제폭이 낮은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 로타바이러스 자체의 특성인 것으로 보여진다. 또한, 비피더스균 생균체의 정착균수에 따른 로타바이러스 억제 효과와 억제물질로서 펩티도글리칸 함유 추출물의 혼합시의 상승 효과는 도 1과 같다.

<65> 상기 도 1에서 보는 바와 같이, 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 균주의 정착균수가 높아질수록 로타바이러스에 대한 억제 효과가 커지는 것을 알 수 있다. 또한, 펩티도글리칸 함유 추출물 및 비피더스균 생균체의 혼합 사용은 더욱 우수한 로타바이러스 억제 효과를 갖는 것으로 보여졌다.

<66> 이러한 결과로부터, 감염성 바이러스나 세균은 프로바이오틱 유산균과 상피세포의 정착 부위에 경쟁적으로 결합한다는 것을 나타내며, 본 발명에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물이 프로바이오틱 유산균의 정착 촉진 작용하기 때문에 상기 감염성 바이러스나 세균의 감염을 방지한다는 것을 알 수 있다.

<67> 실시예 6 : 펩티도글리칸 함유 추출물의 추출 방법에 따른 비피더스균의 정착 증강 변화

<68> 본 실시예의 구체적인 실험 방법은 상기 실시예 4와 동일하다.

<69> 본 실시예에서는, 펩티도글리칸 함유 추출물의 추출 조건이 비피더스균의 정착 증강 효과와 관계가 있는지를 확인하기 위하여, 하기 표 4와 같은 조건으로 7가지의 시료를 추출하였다. 여기서 PGN-1은 대조구, PGN-2는 초음파 처리만을, PGN-3은 물리적 파괴와 초음파 처리, PGN-4와 5는 효소처리만을, PGN-6과 7은 물리적 파괴와 효소 처리 및 초음파 처리를 한 균을 의미한다.

표 4

		PGN-1	PGN-2	PGN-3	PGN-4	PGN-5	PGN-6	PGN-7
물리적 파쇄		-	-	+	-	-	+	+
효소 처리	라이소자임	-	-	-	0.05%	0.01%	0.05%	0.01%
	단백분해효소	-	-	-	0.15%	0.05%	0.15%	0.05%
초음파 파쇄		-	+	+	-	-	+	+

+ : 처리, - : 무처리

<71> 상기 추출된 펩티도글리칸 함유 추출물의 추출방법과 pH에 따른 입도 변화를 도 4에 나타냈다. 효소를 처리하지 않은 균(PGN-1, 2, 3)은 pH 변화에 따라서 용해성의 변화가 거의 없었으나, 효소를 처리한 시료(PGN-4, 5, 6, 7)는 pH 7 이상일 때에 입도가 낮아지면서 용해성이 높아지는 것으로 나타났다.

<72> 이러한 입도와 용해성의 차이를 갖는 균 간의 비피도박테리움 인판티스 MAEIL-K9 균주의 정착 증강에 미치는 영향을 확인한 결과를 하기 표 5에 나타냈다.

표 5

<73>

시료	pH 6.0		pH 7.2	
	정착율(%)	정착증강율(%)	정착율(%)	정착증강율(%)
Non-PGN	1.00	0	1.31	0
PGN-01	1.05	+5	1.17	-11
PGN-02	0.97	-3	1.09	-17
PGN-03	0.99	-1	1.11	-15
PGN-04	3.54	+354	7.08	+540
PGN-05	3.54	+354	6.08	+464
PGN-06	3.23	+323	3.62	+276
PGN-07	3.54	+354	3.46	+264

Non-PGN : 펩티도글리칸 함유 추출물 무첨가
 PGN-01 ~ 07 : 다양한 추출방법에 따른 펩티도글리칸 함유 추출물 첨가 시료

<74>

상기 표 5의 결과로부터, 효소 비처리군에 비해서 효소 처리군에서 정착 증강 효과가 높은 것으로 나타났으며, 또한 pH 7.0 이상의 조건하에서는 펩티도글리칸 함유 추출물의 용해성이 높아지고, 그러한 조건하에서 효소만을 처리한 펩티도글리칸 함유 추출물(PGN-4와 5)을 사용할 때, 정착 증강율이 가장 높게 나타나는 것을 알 수 있다.

<75>

이러한 조건들을 비교해 볼 때, 미생물 세포로부터 펩티도글리칸 함유 추출물을 생산하는데 필요한 처리조건으로서 여기서는 효소법이 물리적 충격법에 비해 그 효과가 우수하므로, 대량생산시에 효소법을 채택하는 것이 바람직하며, 상기 대량생산시의 조건이 설정된 것으로 판단된다.

발명의 효과

<76>

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 비피도박테리움 인펜티스 MAEIL-K9 유래의 펩티도글리칸 함유 추출물은 장 정착 촉진 인자로서 작용하여, 비피도박테리움의 장 정착능을 강화시킴으로써 장내에서 상기 로타바이러스보다 비피도박테리움의 군집이 더욱 우월하게 형성하여, 로타바이러스의 감염을 억제함을 알 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물은 로타바이러스 감염성 설사증을 예방 또는 치료하는데에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1>

도 1은 본 발명의 펩티도글리칸 함유 추출물 및 비피더스 생균의 동시처리에 따른 인간 유래의 로타바이러스(S2)의 정착능 변화를 나타내는 도면이다(도 1에서 억제물질은 펩티도글리칸 함유 추출물을 의미함).

<2>

도 2는 비피더스균 유래 물질의 농도에 따른 로타바이러스 억제 효과를 나타내는 도면이다(도 2에서, DCM은 열처리된 비피더스 균체(OD 1.0)를 나타내고, PGN은 펩티도글리칸 함유 추출물(0.1% 용액)을 나타냄).

<3>

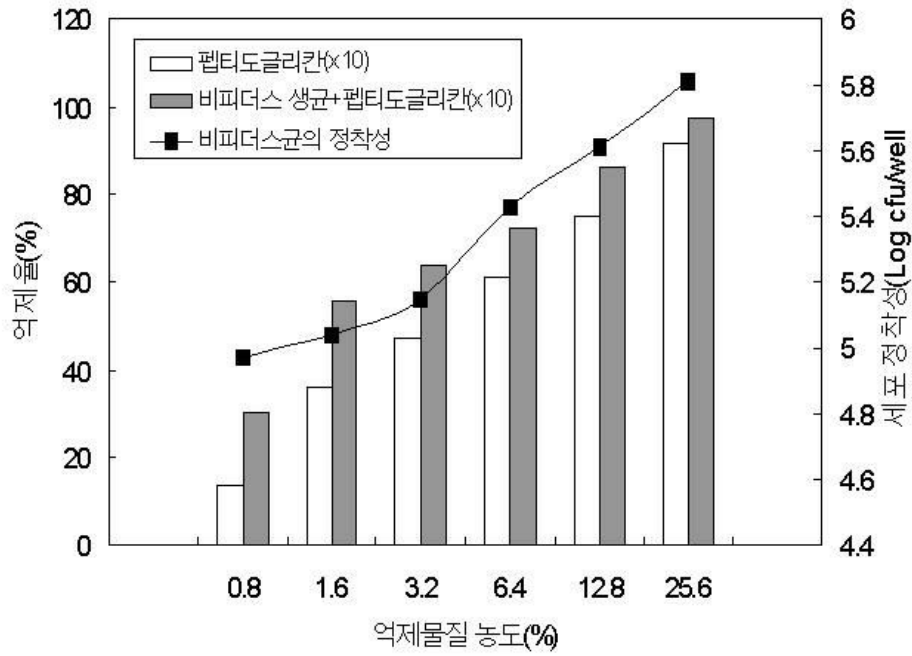
도 3은 다양한 로타바이러스에 대한 펩티도글리칸 함유 추출물의 억제 효과를 나타내는 도면이다(도 3에서, PGN은 펩티도글리칸 함유 추출물(0.1% 용액)을 나타내고, JBR 및 NCDV는 소 유래의 로타바이러스를 나타내며, S2는 인간 유래의 로타바이러스를 나타냄).

<4>

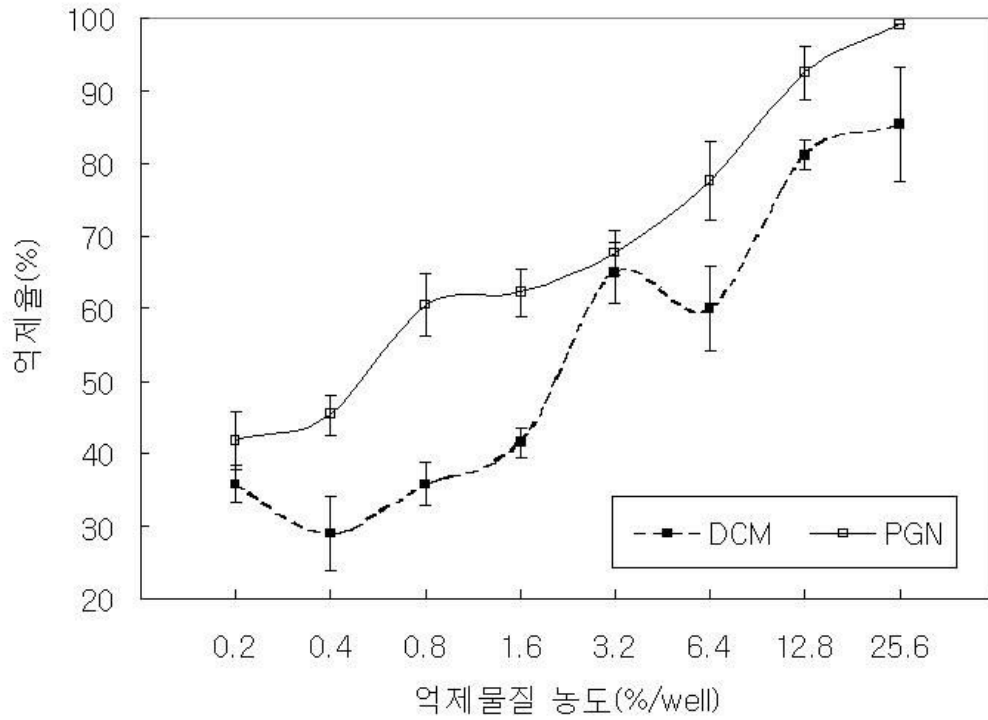
도 4는 펩티도글리칸 함유 추출물의 추출방법과 pH에 따른 입도 분포를 나타내는 도면이다.

도면

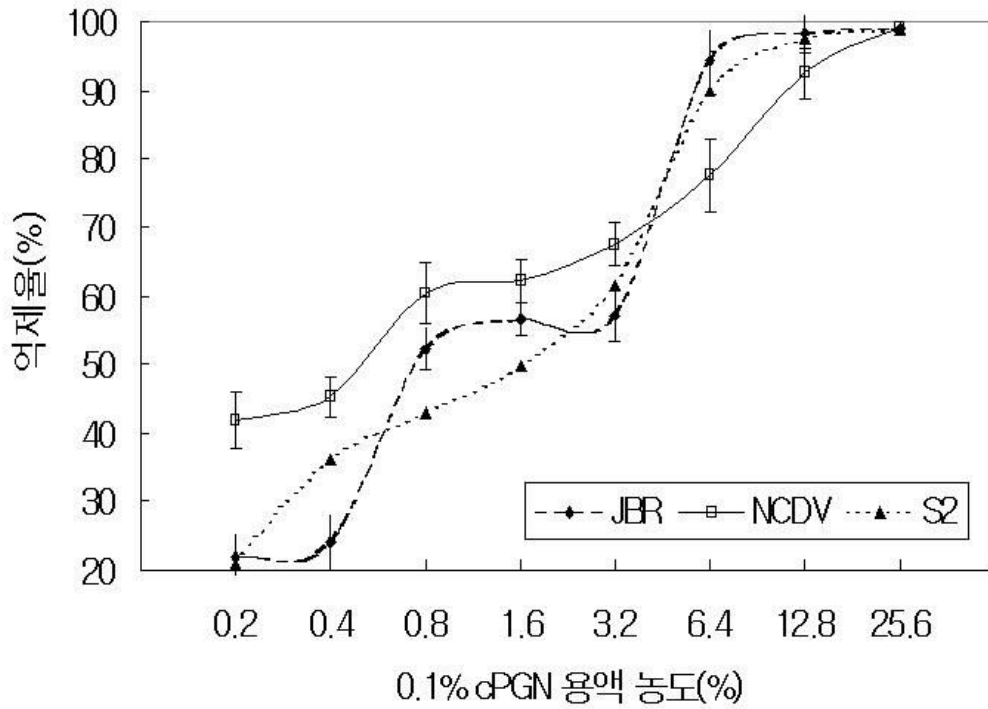
도면1



도면2



도면3



도면4

