



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월24일

(11) 등록번호 10-2080720

(24) 등록일자 2020년02월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/48 (2006.01) *A23L 29/00* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61P 37/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/48 (2013.01)
A23L 29/065 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2019-0086631
- (22) 출원일자 2019년07월17일
 심사청구일자 2019년07월17일
- (65) 공개번호 10-2020-0008978
- (43) 공개일자 2020년01월29일
- (30) 우선권주장
 1020180083145 2018년07월17일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR101166907 B1
 KR1020050011992 A
 임선영 외 3명, 김정콩 된장의 사이토카인 생성 및 종양전이 억제에 미치는 영향. *Journal of Life Science* Vol.19, No.2. pp.264~270 (2009)
- (73) 특허권자
 서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
 광동제약 주식회사
 서울특별시 서초구 서초중앙로 85 (서초동)
- (72) 발명자
 김재환
 강원도 춘천시 행촌로 14, 208동 308호(퇴계동, 현대2차아파트)
 정민주
 부산광역시 사하구 다대로 473, 110동 1105호(다대동, 다대포현대아파트)
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항

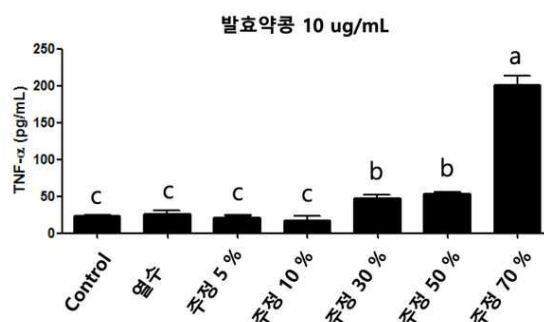
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 약콩 발효물을 함유하는 면역기능증진용 조성물

(57) 요약

일 양상에 따른 조성물은 한국인 영유아 유산균으로 발효한 약콩 발효물을 포함하고 있는 것으로, 면역 세포의 사이토카인 생성을 증가시킴으로써 면역 기능을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 면역력을 강화시킬 수 있다.

대표도 - 도4a



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61P 37/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A61K 2236/19 (2013.01)

(72) 발명자

이태경

경기도 의정부시 동일로466번길 3, 101동 401호(신곡동, 서해아파트)

양희

서울특별시 송파구 송이로15길 31(가락동, 가락2차 쌍용아파트)

허철성

경기도 용인시 기흥구 용구대로2394번길 27, 106동 901호(마북동, 삼성래미안1차아파트)

변상균

서울특별시 서초구 서초대로23길 74, 204호(방배동, 방배씨티아파트)

이기원

서울특별시 관악구 난곡로 66, 107동 1504호(신림동, 대우신림2차푸르지오아파트)

구영태

경기도 의왕시 내손로 57, 1401동 1202호(내손동, 의왕내손이편한세상)

김진수

경기도 용인시 수지구 진산로 90, 511동 403호(풍덕천동, 진산마을삼성래미안5차아파트)

이선주

서울특별시 영등포구 문래로26길 6, 105동 1502호(문래동3가, 문래동메가트리움)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A10053567

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 서울대학교

연구사업명 도약연구지원사업(전략)

연구과제명 한국 유아 장내 유래 유산균을 이용한 고기능성 식품소재 개발

기 여 율 1/2

주관기관 서울대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A2A1A05078707

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 서울대학교

연구사업명 도약연구지원사업(전략)

연구과제명 한국 유아 장내 유래 유산균 발효 기술 기반 고기능성 발효 식품소재 개발

기 여 율 1/2

주관기관 서울대학교

연구기간 2018.09.01 ~ 2021.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 면역기능증진용 식품 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 발효물은 발효 여과물 또는 발효 추출물을 포함하는 것인 식품 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 염증성 사이토카인의 발현을 증진시키는 것인 식품 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 비장세포의 증식을 증진시키는 것인 식품 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 약콩은 전처리된 것인 식품 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 전처리는 로스팅(roasting) 또는 분쇄를 수행하여 처리된 것인 식품 조성물.

청구항 8

약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 면역기능증진용 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시키는 단계를 포함하는 약콩 발효물을 제조하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 발효시키는 단계 전, 약콩을 100 내지 300℃에서 5 내지 30분 동안 로스팅하는 단계를 포함하는 것인 약콩 발효물을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 약콩 발효물을 함유하는 면역기능 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역반응이란, 외부에서 우리 몸으로 들어오는 모든 물질에 대해서 나타나는 반응으로서 특히 살아있는 생명체인 미생물들이 질병의 발생과 직접적으로 또는 간접적으로 관련되어 있기 때문에, 이들에 대한 면역반응이 숙주에게 매우 중요하다.

[0003] 현대 사회가 복잡해지고 발전된 산업으로 인한 여러 돌연변이가 발암 원인이 생활공간 가까이 접근되어 있고, 그러한 돌연변이가 발암 원인으로 인해 인체의 정상 유전자나 바이러스 등의 유전자의 변형이 더욱 가속화되었다. 결국 약품은 발전하였지만 면역세포는 유전자의 변형으로 인하여 그 기능이 약화되고 바이러스는 더욱 강해져 더욱더 많은 문제를 발생시키고 있다. 이와 같이 현대인의 식습관이나 환경의 오염으로 인한 면역력 저하는 더 강해진 바이러스, 외부의 미생물 등의 침입에 의해 야기되는 홍역 및 독감과 같은 전염성 질환, 암, 선천성기형, 면역계 결함 및 많은 치명적 질병에 쉽게 노출되는 결과를 초래한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 일 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0005] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 면역기능증진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시키는 단계를 포함하는 약콩 발효물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 명세서 내 용어, "약콩"은 껍질이 까맣고 크기는 보통 검은콩보다 작은 소립 검정콩을 말하며, 쥐눈이콩, 소청자, 약선콩, 다원콩, 소청 2호 등이 있으며 보통 검은콩보다 훨씬 작지만, 이소플라본 계열 유효성분인 제니스테인(genistein)과 다이드제인(daidzein)이 다른 검은 콩 보다 월등히 많이 포함되어 있다.

[0010] 본 명세서 내 용어, "비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주"는 한국인 영유아의 분변으로부터 분리된 것으로서, 베타-글루코시다아제(β -glucosidase)의 생산 능력이 우수한 바, 쌀, 보리, 우유, 콩, 인삼 등과 해조류, 목걸게 등을 포함하는 바이오매스 천연물에 대해 미생물 대사를 통해 유용물질로 생물 전환하는데 효과적으로 이용될 수 있다.

[0011] 본 명세서 내 용어, "발효물"은 유산균을 이용하여 원재료를 물리적, 화학적인 방법으로 변성 또는 변형시키는 것을 의미하며, 자연 하에서는 몇 만년이 걸려야 바뀔 수 있는 것을 단 며칠 또는 몇 개월 만에 원하는 결과물을 얻을 수 있는 분해 과정을 의미한다. 구체적으로, 상기 발효물은 약콩을 유산균 배양배지에 혼합하고 유산균을 접종 및 발효시켜 생산된 발효산물로서, 상기 유산균은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주인 것일 수 있다. 또한, 상기 발효물은 상기 유산균에 의해 발효된 산물을 의미할 뿐만 아니라 약콩을 유산균으로 발효시킨 후 여과한 발효 여과물 또는 발효물을 용매로 추출한 발효 추출물을 포함하는 것일 수 있다.

[0012] 상기 약콩은 발효 전, 전처리된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 약콩은 로스팅(roasting), 분쇄를 수행하여 전

처리된 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 전처리가 로스팅인 경우, 상기 로스팅은 100 내지 300℃의 온도 조건에서, 5 내지 30 분 동안 수행된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 로스팅은 100 내지 300℃, 100 내지 250℃, 100 내지 200℃, 100 내지 150℃, 150 내지 300℃, 150 내지 250℃, 150 내지 200℃, 200 내지 300℃, 160 내지 300℃ 또는 160 내지 250℃의 조건에서 수행된 것일 수 있다. 또한, 상기 로스팅은 5 내지 30 분, 5 내지 25 분, 5 내지 20 분, 5 내지 15 분, 5 내지 10 분, 7 내지 30 분, 7 내지 20 분, 또는 10 내지 30 분 동안 수행된 것일 수 있다. 이때, 로스팅 온도가 상기 범위 미만인 경우, 약콩의 향미가 유지되지 못하고, 면역 질환의 예방 또는 치료 효능 또는 면역기능 향상 효능을 발휘하지 못하는 문제점이 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 약콩의 쓴맛이 강해지는 바, 소비자 선호도가 감소하는 문제점이 있다. 또한, 로스팅 시간이 상기 범위 미만인 경우, 식품조성물로 적용할 때 맛의 안정성이 유지되지 못하는 문제점이 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 약콩이 탄화되는 문제점이 있다.

[0013] 상기 추출은 상기 균주로 발효된 약콩을 물, C1 내지 C4 저급알코올 또는 이들의 혼합물로 추출한 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 약콩의 추출에 사용되는 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것일 수 있다. 추출시 약콩을 세절한 후 물, 알코올 또는 이의 혼합물을 약콩 무게의 2배 내지 20배를 첨가하여 추출하는 것일 수 있다. 예를 들어, 3배 내지 10배를 첨가하여 추출하는 것일 수 있다. 추출온도는 30℃ 내지 100℃, 60℃ 내지 100℃, 30℃ 내지 90℃, 30℃ 내지 80℃, 60℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃인 것일 수 있다. 추출시간은 1시간 내지 10시간, 2시간 내지 8시간, 2 내지 5시간, 3 내지 7시간 또는 4 내지 6시간인 것일 수 있다. 추출방법은 냉침, 초음파 추출 또는 환류 냉각 추출방법이 모두 이용가능하다. 추출 횟수는 1회 내지 5회, 2회 내지 4회, 3 내지 5회 반복 추출하는 것일 수 있다.

[0014] 일 구체예에서, 상기 발효물의 용량은 10 내지 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 발효물의 용량은 예를 들어, 10 내지 150 $\mu\text{g/mL}$, 10 내지 130 $\mu\text{g/mL}$, 10 내지 100 $\mu\text{g/mL}$, 10 내지 80 $\mu\text{g/mL}$, 30 내지 150 $\mu\text{g/mL}$, 30 내지 120 $\mu\text{g/mL}$, 40 내지 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 내지 100 $\mu\text{g/mL}$, 또는 10 내지 $\mu\text{g/mL}$ 로 포함되는 것일 수 있다. 이때, 약콩 발효물이 상기 농도 미만인 경우, 사이토카인의 발현 및/또는 비장세포의 증식 활성이 저하되어, 면역질환의 예방 또는 치료 효과를 발휘하기 어려운 문제점이 있고, 약콩 발효물이 상기 농도를 초과하는 경우, 신체 내 독성 등의 문제점이 있을 수 있다.

[0015] 상기 조성물은 면역기능을 증진시키거나 또는 면역질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다. 상기 면역질환은 예를 들어, 암, 또는 바이러스 감염인 것일 수 있다. 또한, 상기 조성물은 면역력 저하로 인해 발생할 수 있는 질병의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다. 상기 면역력 저하로 인해 발생할 수 있는 질병은 예를 들어, 류마티스 관절염, 대상포진, 감기, 결막염, 만성피로 등이 있다.

[0016] 일 구체예에 따른 면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구제 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되어 사용할 수 있고, 제형화를 위하여 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0017] 상기 담체 또는, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.

[0018] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.

[0019] 경구 투여를 위한 고형제제는 상기 약콩 발효물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 제조할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다.

[0020] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용하는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0021] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등을 사용할 수 있다.

- [0022] 일 구체예에 따른 면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.0001 내지 2,000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 2,000 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어서 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량에 의해서 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0023] 일 구체예에 따른 면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유 동물에 다양한 경로로 투여할 수 있다. 투여의 모든 방식은 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해서 투여할 수 있다.
- [0025] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 면역기능증진용 식품 조성물을 제공한다. 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 면역자극제 또는 면역조절제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 또 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 조성물의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [0027] 일 구체예에 따른 면역기능증진용 또는 면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 약콩 발효물을 식품 조성물의 첨가물로 사용하는 경우 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.
- [0028] 식품 조성물의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.
- [0029] 상기 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.
- [0030] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 상기 약콩 발효물은 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 또한 본 발명은 천연물로부터의 분획물을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.
- [0031] 일 구체예에 따른 식품 조성물 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르트마과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명에 따른 음료 100 mL당 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g일 수 있다.
- [0032] 상기 외에 일 구체예에 따른 면역기능개선용 또는 면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 수면 개선용 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 상기 식품 조성물 100 중량부 대비 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0033] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시키는 단계를 포함하는 약콩 발효물을 제조하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 방법은 발효시키는 단계 전, 약콩을 100 내지 300℃에서 5 내지 30분 동안 로스팅하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 로스팅 온도 및 시간에 대한 구체적인 내용은 전술한 바와 같다. 상기 제조된 약콩 발효물은 물, C1 내지 C4 저급알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하여 추출물을 제조하는 단계를 추가

로 포함할 수 있다. 상기 추출물을 제조하는 단계에 대한 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[0034] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 조성물은 영유아, 구체적으로 한국인의 영유아로부터 유래된 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주로 발효시킨 약콩의 발효물을 포함하는 바, 발효 단계를 거치지 않은 약콩 추출물과 비교하여 면역 세포에서의 사이토카인 생성을 증진시키고 비장세포의 세포 증식을 촉진하는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 발효물을 포함하는 조성물은 인체의 면역기능을 증진시키거나 면역 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0035] 일 양상에 따른 조성물은 면역 세포에서 사이토카인의 생성을 증가시킴으로써 면역기능을 증진시킬 수 있다. 또한, 상기 조성물은 약콩을 포함하고 있어 인체에 무해하며 정상세포에 부작용을 유발하지 않아 장기간 사용하는 데 인체에 무리가 없을 뿐만 아니라, 가격경쟁력이 뛰어나 수급이 용이한 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 실시예 1 및 비교예 1~5를 처리하여 배양한 면역세포에서의 TNF- α 발현량을 확인한 그래프이다.
 도 2는 실시예 1 및 비교예 1~5를 처리하여 배양한 면역세포에서의 IL-6 발현량을 확인한 그래프이다.
 도 3은 실시예 1 및 비교예 1~5를 처리하여 배양한 면역세포에서의 IL-1 β 발현량을 영향을 확인한 그래프이다.
 도 4a는 추출 조건에 따른 실시예 1을 10 μ g/mL 농도로 처리하여 배양한 면역세포에서의 TNF- α 발현량을 확인한 그래프이다.
 도 4b는 추출 조건에 따른 실시예 1을 20 μ g/mL 농도로 처리하여 배양한 면역세포에서의 TNF- α 발현량을 확인한 그래프이다.
 도 5는 실시예 1 및 비교예 1~5를 처리한 비장세포의 세포증식능을 확인한 그래프이다.
 도 6은 실시예 1을 처리하여 배양한 면역세포에서의 단백질 발현을 확인한 사진이다.
 도 7은 실시예 1 및 실시예 2를 10 μ g/mL 농도로 처리하여 배양한 면역세포에서의 TNF- α 발현량을 확인한 그래프이다.
 도 8은 실시예 1 및 비교예 1을 농도별로 처리하여 배양한 1차 배양세포에서의 TNF- α 발현량을 확인한 그래프이다.
 도 9는 실시예 1의 LPS 오염도를 확인한 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0039] [실시예]

[0040] 실시예 1. 약콩 발효물의 제조

[0041] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주로 발효된 약콩 발효물을 제조하였다. 구체적으로, 글리세롤과 혼합하여 -80℃에서 냉동보관한 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 LDTM 8102 (KCTC13392BP) 보존액을 MRS 또는 MRSC 배지에 접종하여 37℃, 혐기 조건에서 20 내지 24 시간 동안 정치하는 전배양 과정을 수행하였다. 이후, 50 g/L 약콩가루액에 두 차례 전배양 과정을 통하여 활성을 높인 균주 배양액을 접종한 후 37℃로 유지된 혐기 조건에서 진탕 배양 하였다. 발효 중 수집된 시료들은 열처리 공정을 거쳐 동결건조 하였다. 동결건조된 시료는 0.5 g 당 10 mL의 비율로 0, 5, 10, 30, 50 및 70% 발효 주정(식물성에탄올)을 각각 첨가하여 75℃에서 증탕한 후, 2시간 동안 각각 추출하였다. 이후, 1시간 정도 상온 방치하여 식힌 뒤, 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액을 0.2 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후, 40℃ 감압농축기에서 주정을 모두 제거하고, 동결건조하여 분말화하였다. 이후, 상기 분말을 50% DMSO에 용해하였다.

[0043] 실시예 2. 전처리를 거친 약콩 발효물의 제조

- [0044] 160 내지 230℃에서 15 내지 25분 로스팅한 50 내지 100 g/L의 약콩 분말에 전 배양 과정을 수행하여 활성을 높은 상기 균주 배양액을 접종한 후, 37℃로 유지된 혐기 조건에서 진탕배양 하였다는 점을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 약콩 발효물을 제조하였다.
- [0046] **[비교예]**
- [0047] **비교예 1. 균주 배양액을 접종하지 않은 약콩 추출물의 제조**
- [0048] 50 g/L 약콩 가루액에 상기 실시예 1과 동량의 멸균수를 첨가하여 혼합한 후 열처리 공정을 거쳐 동결건조 하였다. 이후, 동결건조된 시료에 0.5g 당 10 ml 의 70% 발효 주정을 첨가하여 75℃에서 중탕하여 2시간 동안 추출하였다. 이후, 1시간 정도 상온 방치하여 식힌 뒤, 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액을 0.2 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후, 40℃ 감압농축기에서 주정을 모두 제거하고 동결건조하여 분말화하였다. 이후, 상기 분말을 50% DMSO에 용해하였다.
- [0050] **비교예 2. 발효 단계를 거친 약콩 발효물의 제조**
- [0051] 50 g/L 약콩 가루액에 상기 실시예 1과 동량의 멸균수를 첨가하여 혼합한 후 37℃, 혐기 조건에서 24 시간 동안 진탕배양 하였다. 이후, 발효과정에서 수집된 시료들을 열처리 공정을 거쳐 동결건조하였다. 동결건조된 시료에 0.5 g 당 10 ml의 70% 발효주정을 첨가하여 75℃에서 중탕하여 2시간 동안 추출하였다. 이후, 1시간 정도 상온 방치하여 식힌 뒤, 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액을 0.2 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후, 40℃ 감압농축기에서 주정을 모두 제거하고 동결건조하여 분말화하였다. 이후, 상기 분말을 50% DMSO에 용해하였다.
- [0053] **비교예 3. 사균체를 포함하는 약콩 발효물의 제조**
- [0054] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP)로 발효된 약콩 발효물을 제조하였다. 구체적으로, 글리세롤과 혼합하여 -80℃에서 냉동보관한 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 LDTM 8102 (KCTC13392BP) 보존액을 L-cysteine hydrochloride를 함유한 MRSC 배지(de MAN, ROGOSA 및 SHARPE broth)에 접종하여 37℃ 혐기 조건에서 24 시간 동안 정치하는 전 배양 과정을 수행하였다. 이후, 50 g/L 약콩 가루액에 전배양 과정을 통하여 활성을 높은 균주 배양액을 접종한 후 열처리 공정을 거쳐 동결건조 하였다. 동결건조된 시료에 0.5 g 당 10 ml의 70% 발효주정을 첨가하여 75℃에서 2시간 동안 중탕한 후 추출하였다. 이후, 1시간 정도 상온에서 방치하여 식힌 뒤, 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액을 0.2 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후, 40℃ 감압농축기에서 주정을 모두 제거하고, 동결건조하여 분말화하였다. 이후, 상기 분말을 50% DMSO에 용해하였다.
- [0056] **비교예 4. KCTC5854 균주로 발효 및 사균체를 포함하는 약콩 발효물의 제조**
- [0057] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) (KCTC5854) 균주를 사용하였다는 점을 제외하고는 상기 비교예 3과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [0059] **비교예 5. KCTC5854 균주로 발효된 약콩 발효물의 제조**
- [0060] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) (KCTC5854) 균주를 사용하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [0062] **실험예]**
- [0063] **사이토카인 발현 확인**
- [0064] 상기 실시예 1 및 비교예 1~5에서 제조한 발효물이 면역세포의 사이토카인 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 식품의약품안전처의 건강기능성 평가 가이드에서 제시하는 바이오마커인 TNF- α , IL-6 및 IL- β 의 발현을 확인하였다. 구체적으로, 면역세포주인 Raw 264.7 세포(입수처: 한국세포주은행)를 12-웰 플레이트(well plate)에 분주(seeding)하고, 10 % 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)와 1 % 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)사용하여 37℃, 10% CO₂ 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 실시예 1 및 비교예 1~5의 발효물을 각각 25 및 100 μ g/mL 농도로 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 배지를 프랩(prepare)하여 4℃에서 13000 rpm로, 2분 동안 원심분리한 후 상층액을 획득하였다. 획득한 배지를 각각 mouse TNF- α DuoSet ELISA kit (R&D system), mouse IL-6 DuoSet ELISA kit (R&D system) 및 mouse IL-1 β DuoSet ELISA kit (R&D system)를 활용

하여 TNF- α , IL-6 및 IL- β 의 생성 여부를 확인하였다.

[0065] 도 1은 실시예 1 및 비교예 1~5의 발효물에서 배양한 면역세포에서의 TNF- α 발현량을 확인한 그래프이다.

[0066] 도 2는 실시예 1 및 비교예 1~5의 발효물에서 배양한 면역세포에서의 IL-6 발현량을 확인한 그래프이다.

[0067] 도 3은 실시예 1 및 비교예 1~5의 발효물에서 배양한 면역세포에서의 IL-1 β 발현량을 영향을 확인한 그래프이다.

[0068] 도 1~3에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 경우 비교예 1~5과 비교하여 면역세포에서 발현하는 사이토카인의 양이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있다. 즉, 일 양상에 따른 조성물은 면역세포에서 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 발현을 증진시키는 바, 면역질환의 예방 또는 치료용 또는 면역기능증진용 조성물로서 사용될 수 있다.

[0069] **추출 조건에 따른 사이토카인의 발현 확인**

[0070] 실시예 1에서 제조한 발효물의 추출 조건에 따른 최적의 면역기능 증진 효능을 분석하기 위하여 식품의약품안전처의 건강기능성 평가 가이드에서 제시하는 바이오마커인 TNF- α 의 발현을 확인하였다. 실시예 1에서 제조한 발효물에 대하여 면역세포주인 Raw 264.7 세포(입수처:한국세포주은행)를 12-웰 플레이트(well plate)에 분주(seeding)하고, 10 % 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)와 1 % 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)사용하여 37℃, 10% CO₂ 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 실시예 1의 발효물을 각각 10 및 20 μ g/mL 농도로 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 배지를 프랩(prepare)하여 4℃에서 13000 rpm으로, 2 분 동안 원심 분리 후 상층액을 획득하였다. 획득한 배지를 mouse TNF- α DuoSet ELISA kit (R&D system)을 활용하여 TNF- α 생성을 확인하였다.

[0071] 도 4a는 추출 조건에 따른 실시예 1의 조성물을 10 μ g/mL 농도로 처리하여 배양한 면역세포에서의 TNF- α 발현량을 확인한 그래프이다.

[0072] 도 4b는 추출 조건에 따른 실시예 1의 조성물을 20 μ g/mL 농도로 처리하여 배양한 면역세포에서의 TNF- α 발현량을 확인한 그래프이다.

[0073] 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, 70%의 에탄올로 추출한 약콩 발효물에서 TNF- α 의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 즉, 일 양상에 따른 조성물은 비피도박테리움 에니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) (KCTC5854) 균주를 사용하여 발효된 약콩 발효물을 포함하는 것으로 대조 균주로 발효된 약콩 발효물에 비하여 면역기능증진 효과를 가지며, 특히 상기 발효물을 70% 에탄올로 추출하였을 때, 그 효과가 탁월함을 알 수 있다.

[0074] **비장세포 증식능 확인**

[0075] 상기 실시예 1 및 비교예 1~5에서 제조한 제조한 발효물이 면역세포의 사이토카인 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 식품의약품안전처의 건강기능성 평가 가이드에서 제시하는 바이오마커인 비장세포 증식능을 확인하였다. 구체적으로, 6주령 C57/BL6 마우스(암컷)의 비장(Spleen)을 적출하였다. 적출한 비장을 40 μ m 스트레이너(strainer)로 갈아준 뒤, ACK(Ammonium-Chloride-Potassium) 버퍼로 세척하였다 이후, 원심분리하여 적혈구를 용해 및 제거하였다. 분리된 비장세포(Splenocyte)는 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)와 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 PMI1640(Roswell Park Memorial Institute medium)사용하여 96-웰 화이트 플레이트에 분주하였다. 이후, 상기 실시예 1 및 비교예 1~5의 발효물을 각각 25 및 100 μ g/mL의 농도로 처리하고 48시간 동안 37℃, 10% CO₂ 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 배양하였다. 이후, 각각의 플레이트에 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 시약을 처리하여 10분간 추가로 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 발광량(Luminescence)를 측정하여 비장세포의 ATP를 측정하였다.

[0076] 도 5는 실시예 1 및 비교예 1~5의 발효물을 처리한 비장세포의 세포증식능을 확인한 그래프이다.

[0077] 도 5에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 경우 비교예 1~5과 비교하여 비장세포의 증식이 활성이 현저한 것을 확인할 수 있다. 즉, 일 양상에 따른 조성물은 비장세포의 증식을 활성화시킴으로써 면역질환의 예방 또는 치료용 또는 면역기능증진용 조성물로서 사용될 수 있다.

[0078] **NF- κ B, MAPKs 관련 단백질의 활성화 확인**

[0079] 실시예 1에서 제조한 발효물의 추출 조건에 따른 면역기능 증진 작용기전을 분석하기 위하여 면역세포주인 Raw

264.7 세포(입수처:한국세포주은행)에서 대식세포 활성화 관련 단백질 발현을 확인하였다. 60 mm dish에 상기 면역세포주를 분주(seeding)하고, 10 % 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)와 1 % 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)사용하여 37℃, 10% CO₂ 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 실시예 1의 발효물을 각각 10 및 20 µg/mL 농도로 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 세포의 단백질을 프랩(prepare)하여 Western Blot 실험법을 통해 Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB), Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 단백질을 발현을 확인하였다.

[0080] 도 6은 실시예 1을 처리하여 배양한 면역세포에서의 단백질 발현을 확인한 사진이다.

[0081] 도 6에 나타난 바와 같이, 실시예 1을 처리한 대식세포는 농도의존적으로 MAPKs 및 NF-κB를 활성화시키는 것을 확인할 수 있다. 즉, 일 양상에 따른 조성물은 면역세포의 활성을 증진시킴으로써 면역질환의 예방 또는 치료용 또는 면역기능증진용 조성물로서 사용될 수 있다.

[0082] 전처리에 따른 사이토카인의 발현 확인

[0083] 전처리된 약콩 발효물(70% 주정 발효 추출물)의 증진 효능을 분석하기 위하여 식품의약품안전처의 건강기능성 평가 가이드에서 제시하는 바이오마커인 TNF-α의 발현을 확인하였다. 면역세포주인 Raw 264.7 세포(입수처:한국세포주은행)를 12-웰 플레이트(well plate)에 분주(seeding)하고, 10 % 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)와 1 % 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)사용하여 37℃, 10% CO₂ 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 실시예 1 및 실시예 2를 각각 10 및 20 µg/mL 농도로 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 배지를 프랩(prepare)하여 4℃에서 13000 rpm으로, 2 분 동안 원심분리 후 상층액을 획득하였다. 획득한 배지를 mouse TNF-α DuoSet ELISA kit (R&D system)을 활용하여 TNF-α 생성을 확인하였다.

[0084] 도 7은 실시예 1 및 실시예 2를 10 µg/mL 농도로 처리하여 배양한 면역세포에서의 TNF-α 발현량을 확인한 그래프이다.

[0085] 도 7에 나타난 바와 같이, 전처리를 수행한 실시예 2에서 TNF-α의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0086] 1차 배양세포(BMDM)에서 사이토카인 발현 확인

[0087] 1차 배양세포인 Bone-marrow-derived macrophage (BMDM)에서의 약콩 발효물에 의한 면역기능 증진 효능을 분석하기 위하여 식품의약품안전처의 건강기능성 평가 가이드에서 제시하는 바이오마커인 TNF-α의 발현을 확인하였다. 구체적으로, 6주령 C57/BL6 마우스(암컷)의 BMDM을 분리하여 24-웰 플레이트 (well plate)에 분주(seeding)하였다. 1주일간 10 % 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)와 1 % 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM/F-12 (Dulbecco-modified Eagle medium/F-12) 배지에 m-CSF (40 ng/mL)가 첨가된 배지로 분화시킨 후, 실시예 1 발효물 및 비교예 1 추출물을 각각 10, 20, 40 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지를 프랩(prepare)하여 4℃에서 13000 rpm로, 2분 동안 원심분리한 후 상층액을 획득하였다. 획득한 배지를 각 mouse TNF-α DuoSet ELISA kit (R&D system)를 활용하여 TNF-α의 생성 비교를 확인하였다.

[0088] 도 8은 실시예 1 및 비교예 1을 농도별로 처리하여 배양한 1차 배양세포에서의 TNF-α 발현량을 확인한 그래프이다.

[0089] 도 8에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 경우 비교예 1과 비교하여 동물 유래 1차 배양 면역세포인 BMDM에서 TNF-α 발현량이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0090] Endotoxin test를 활용한 LPS 오염도 확인

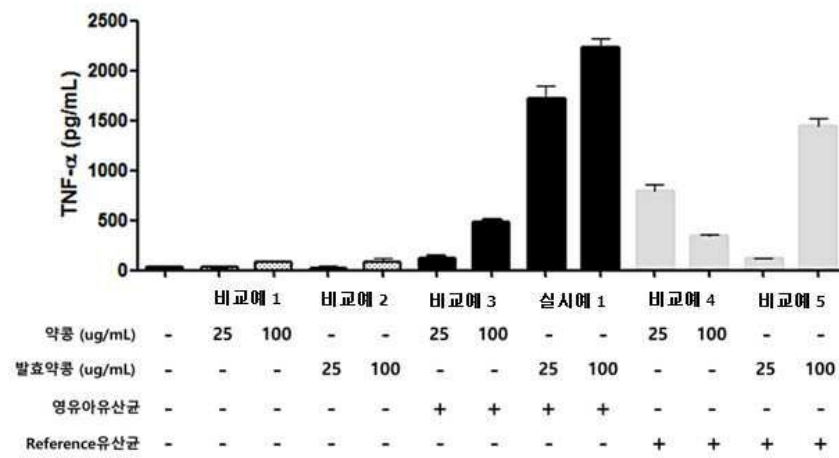
[0091] 실시예 1에서 제조한 발효물의 LPS 오염도를 확인하기 위하여 Endotoxin test를 확인하였다. 구체적으로, LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE PYROSTAR ES - F/PLATE (Wako, Japan) 키트를 사용하여 메뉴얼에 따라 측정하였다.

[0092] 도 9는 실시예 1의 LPS 오염도를 확인한 표이다.

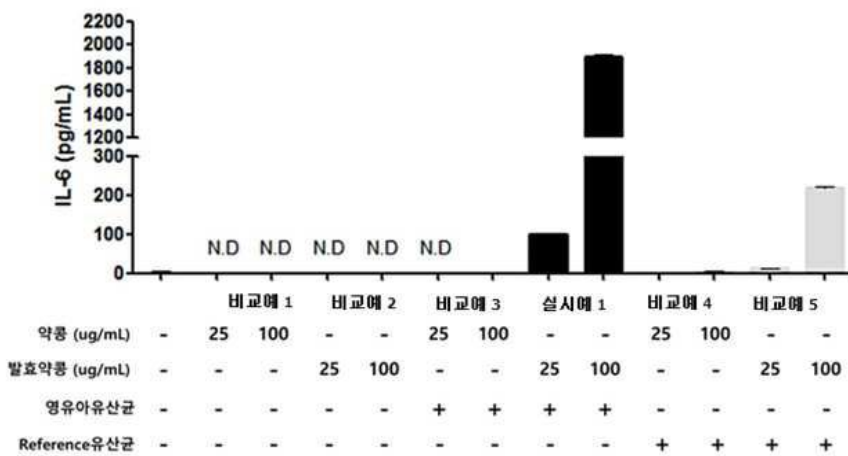
[0093] 도 9에 나타난 바와 같이 실시예 1의 LPS 오염도는 없는 것으로 보이는 바, 일 양상에 따른 발효물 자체에 의한 면역반응이 일어나지 않는 것을 알 수 있다.

도면

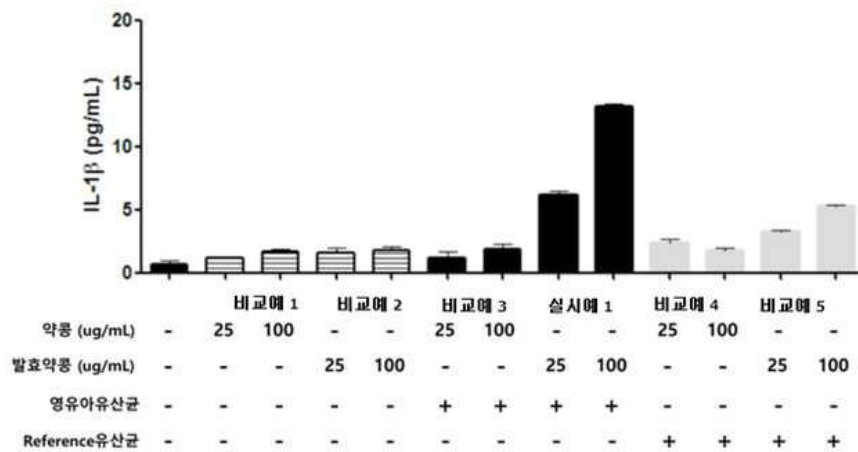
도면1



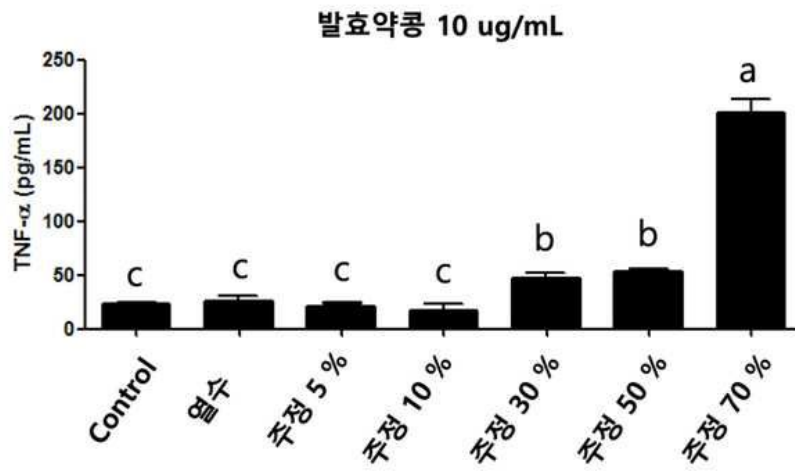
도면2



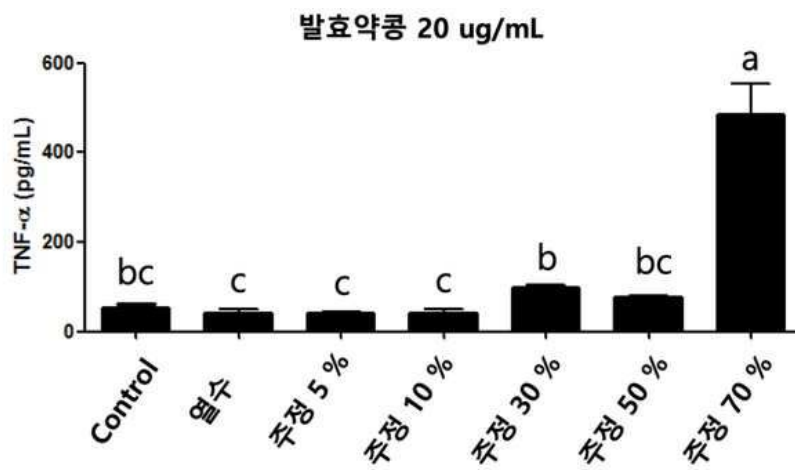
도면3



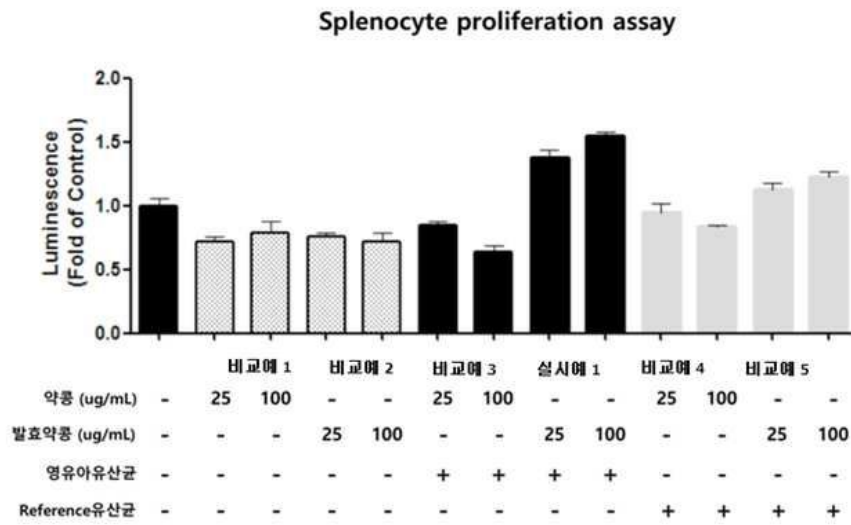
도면4a



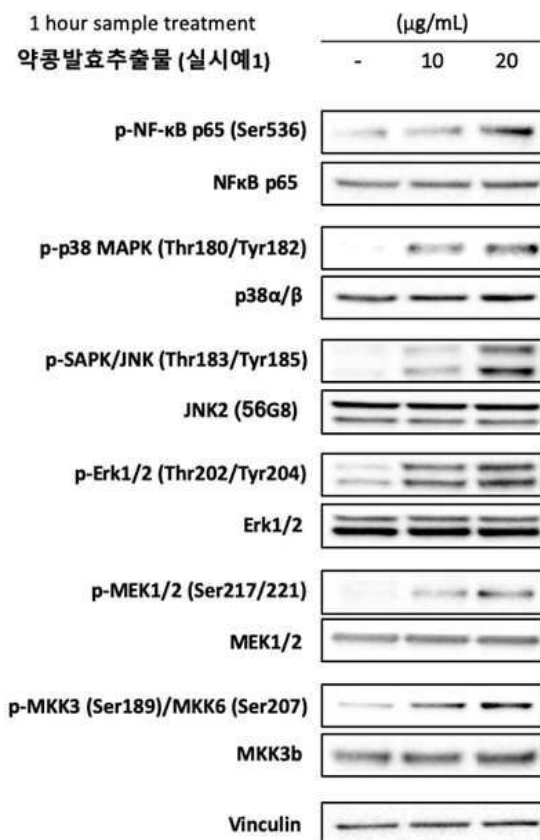
도면4b



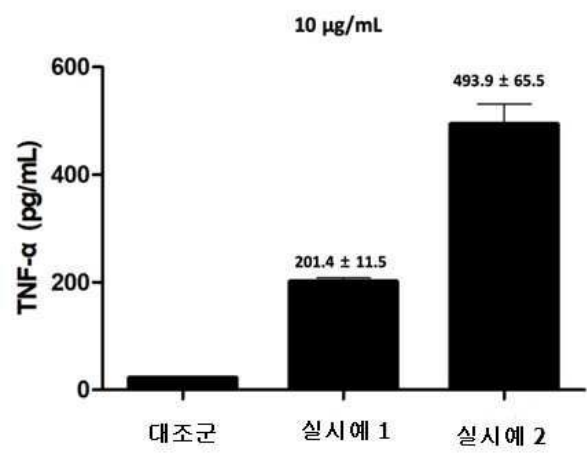
도면5



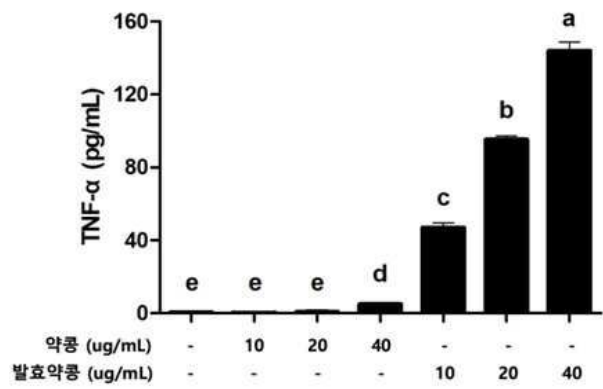
도면6



도면7



도면8



도면9

Standard Endotoxin concentration (EU/mL)	Absorbance (405nm)
100	0.140
10	0.128
1	0.121
0.1	0.058
0.01	0.051
0	0.050

Sample	Endotoxin concentration (EU/mL)
실시예 1	N.D ¹

¹N.D, Not detected