



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월15일
(11) 등록번호 10-2122194
(24) 등록일자 2020년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0005882
(22) 출원일자 2019년01월16일
심사청구일자 2019년01월16일
(56) 선행기술조사문헌
KR101729478 B1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
에스피씨 주식회사
경기도 성남시 중원구 사기막골로31번길 18 (상대원동)
(72) 발명자
이기원
서울특별시 관악구 난곡로 66, 107동 1504호(신림동, 대우신림2차푸르지오아파트)
양희
서울특별시 송파구 송이로15길 31, 103동 1401호(가락동, 가락2차쌍용아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 4 항

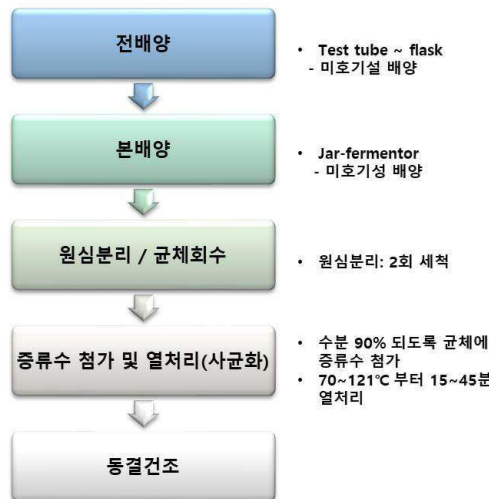
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **면역기능 증진 효능을 갖는 유산균 사균체 및 이의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 면역 기능 증진 효능을 갖는 유산균 사균체 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 본 발명의 유산균 사균체는 면역세포에서 사이토카인 생성을 증가시켜 면역기능을 증진시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 유산균 사균체는 홍삼 대비 뛰어난 가격경쟁력을 가져 소비자의 부담을 줄일 수 있으며, 무향 무색으로 식품, 약품 및 화장품에 적용이 용이하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23Y 2220/67 (2013.01)

(72) 발명자

김재환

인천광역시 연수구 송도과학로27번길 55 201동
1218호 (송도동, 송도롯데캐슬캠퍼스타운오피스텔)

정민주

경기도 과천시 별양로 163, 705동 802호(과천래미
안센트럴스위트)

변상균

서울시 서초구 서초대로23길 74, 204호(방배씨티아
파트)

강신달

서울특별시 광진구 자양번영로 59, 111동 307호(자
양동, 우성4차아파트)

심상민

경기도 안양시 동안구 임곡로80번길 33, 116동
1401호 (비산동, 그린빌주공아파트)

정문영

서울특별시 관악구 보라매로 62 107동 1306호 (봉
천동, 보라매삼성아파트)

(56) 선행기술조사문헌

J. Microbiol. Biotechnol., Vol.23,
pp.118-124(2013.)
Journal of Applied Microbiology, Vol.118,
pp.506-514(2014.)*

KR1020110110381 A

KR101551836 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)에 증류수를 첨가하고 100℃의 조건에서 30분간 열처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP) 사균체를 포함하는 비장세포 증식에 따른 면역 활성 증강용 식품조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)는, 25~30℃, pH 6.5±0.2의 조건에서 배양된 것을 특징으로 하는 식품조성물.

청구항 3

락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)에 증류수를 첨가하고 100℃의 조건에서 30분간 열처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP) 사균체를 포함하는 비장세포 증식에 따른 면역 활성 증강용 식품첨가제.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 식품은,

육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료 및 술 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 식품조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 면역 기능 증진 효능을 갖는 유산균 사균체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 면역반응은 외부에서 우리 몸으로 들어오는 모든 물질에 대하여 나타나는 반응으로, 특히, 미생물이 질병의 발생과 직접적으로 또는 간접적으로 관련되어 있기 때문에, 이에 관한 면역반응이 숙주에게 매우 중요하다. 인체 내의 면역체계가 외부에서 침투한 미생물들을 효과적으로 제거하거나 억제하지 못하게 되면, 침투한 미생물은 증식하여 질병을 유발할 수 있기 때문이다.

[0004] 사람의 면역기전은 피부와 같이 외부의 침입을 저지하는 역할을 하는 1차 방어선이 있으며, 자연면역체계(선천적 면역)와 획득면역체계(후천적 면역)로 분류되는 2차 방어선이 존재한다. 자연면역체계의 화학적 방어는 침입당한 세포가 침입한 미생물을 죽이거나 히스타민(histamine), 키닌(kinin), 보완제(complement), 인터페론

(interferon)과 같은 화학물질을 분비하여 방어하고 면역세포 등을 유도하는 등 침입 속도를 줄이는 작용을 한다. 세포적 방어는 백혈구의 종류인 식세포(산성백혈구, 중성백혈구, 단핵구)와 림프구 중의 하나인 자연살해 세포(NK cell) 등이 침입한 미생물을 공격한다. 이 중 단핵구는 상처부위에 도달하면 커다란 대식세포(macrophage)로 성장하게 되는데 자연살해 세포와 함께 방어기전의 가장 중추적인 역할을 담당한다.

[0005] 산업의 발전으로 인한 여러 발암원이 생활 곳곳에 산재해있고, 그로 인해 면역력의 저하, 인체 내 정상 유전자 또는 바이러스 등의 유전자 변형이 더욱 가속화되고 있다. 의약산업의 꾸준한 발전에 불구하고, 특정 질병을 완벽히 치료한다는 것이 현실적으로 불가능에 가까워진 것이다. 이와 같이 더 강해진 바이러스 및 외부 미생물의 침입에 의해 야기되는 전염성 질환, 암, 선천성 기형, 면역계 결함 및 많은 치명적 질병에 쉽게 노출되는 결과를 초래한다. 이에 따라 면역력에 관한 관심이 점차 높아지면서, 면역력을 증진하고자 하는 소비자의 요구를 맞추고자 여러 기업이 관련 연구를 활발히 진행하고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 제10-1729478호(2017.04.18)에는, 면역조절 기능의 유산균 사균체 및 이의 제조방법에 관하여 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 부작용이 적고, 면역기능 증진 효과를 갖는 면역강화제로써 유산균 사균체를 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)에 증류수를 첨가하여 70~121℃의 조건에서 15~45분간 열처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP) 사균체를 제공한다.

[0011] 본 발명의 사균체에 있어, 상기 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)는, 바람직하게 25~30℃, pH 6.5±0.2의 조건에서 배양된 것이 좋다.

[0012] 본 발명은 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)에 증류수를 첨가하여 70~121℃의 조건에서 15~45분간 열처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP) 사균체를 함유하는 식품 첨가제를 제공한다.

[0013] 본 발명은 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)에 증류수를 첨가하여 70~121℃의 조건에서 15~45분간 열처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP) 사균체를 함유하는 식품을 제공한다.

[0014] 본 발명에서 상기 식품은, 바람직하게 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료 및 술 중 선택되는 어느 하나인 것이 좋다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 유산균 사균체는 면역세포에서 사이토카인 생성을 증가시켜 면역기능을 증진시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 유산균 사균체는 홍삼 대비 뛰어난 가격경쟁력을 가져 소비자의 부담을 줄일 수 있으며, 무향 무색으로 식품, 약품 및 화장품에 적용이 용이하다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2의 사균화 공정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명 사균체가 TNF- α 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 3은 2.09×10^7 CFU/ml 농도에서 본 발명 사균체와 공시균주(*Lactobacillus brevis* KACC 11433)가 TNF- α 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 4는 4.18×10^7 CFU/ml 농도에서 본 발명 사균체와 공시균주(*Lactobacillus brevis* KACC 11433)가 TNF- α 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명 사균체의 비장세포 증식효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)에 증류수를 첨가하여 70~121℃의 조건에서 15~45분간 열처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP) 사균체를 제공한다. 이때, 상기 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)는, 바람직하게 25~30℃, pH 6.5±0.2의 조건에서 배양된 것이 좋다.
- [0020] 유산균 사균체는 생균의 반대되는 개념으로서 발효를 통해 얻어진 생균과 대사산물들을 열처리 등의 공정을 통해 성장을 억제한 형태이다. 사균체는 세포질, 세포벽, 박테리옌 등의 항균활성 물질, 다당류, 유기산 등을 포함하는 것을 특징으로 한다. 유산균 사균체제품은 생균제품과 비교하여 높은 안정성을 가진다. 특히 내열성이 우수하며, 외부 환경에 대한 안정성이 높아 기존 유산균 제품보다 보관이 용이하고, 유통기간을 늘릴 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 본 발명의 사균체는 건강기능식품, 의약품, 동물사료 등과 같은 기존의 유산균 생균이 적용되어온 분야 외에도 항생제, 화장품 원료로도 사용될 수 있다.
- [0021] 사이토카인(cytokine)은 세포에서 분비되는 단백질로서 세포에서 분비되는 단백질로서 면역 세포의 여러 기능을 조절한다. 사이토카인은 적응면역반응의 활성화 단계에서 림프구의 성장과 분화를 자극하고, 선천 면역과 적응 면역의 작동 단계에서 여러 종류의 작동세포들을 활성화시켜 미생물과 항원을 제거한다. 그 중 TNF(Tumor necrosis factor)는 그람 음성 세균과 그 외의 감염균에 의한 급성 염증반응의 주된 매개자 역할을 하는 사이토카인이다. 본 발명에서는 상기와 같은 조건으로 제조된 본 발명의 유산균 사균체가 선천 면역계에서 중요한 역할을 하는 TNF- α 의 생성을 세포 내에서 크게 증가시키는 것을 확인하였다.
- [0022] 한편, 본 발명은 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)에 증류수를 첨가하여 70~121℃의 조건에서 15~45분간 열처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP) 사균체를 함유하는 식품 첨가제를 제공한다.
- [0023] 한편, 본 발명은 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP)에 증류수를 첨가하여 70~121℃의 조건에서 15~45분간 열처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 (KCTC 12777BP) 사균체를 함유하는 식품을 제공한다.
- [0024] 본 발명에서 상기 식품은, 바람직하게 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료 및 술 중 선택되는 어느 하나인 것이 좋다.
- [0025] 본 발명의 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2 사균체는 바람직하게 식품 또는 식품 첨가제 대비 0.1중량%~20중량% 포함되는 것이 좋다. 0.1중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 50중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.
- [0027] 이하, 본 발명의 구성을 하기 실시예 및 실험예를 통해 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0029] **[실시예 1: 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2의 사균화]**
- [0030] 락토바실러스 브레비스 SPC-SNU 70-2 균주의 사균화를 위하여, 도 1의 공정을 수행하였다. 더욱 구체적으로 10 ml mMRS (2% Maltose가 첨가된 MRS) 배지에서 30℃ 온도 조건으로 24시간 동안 배양한 뒤, 200ml mMRS (2% Maltose가 첨가된 MRS) 배지로 옮겨 30℃ 온도 조건으로 24시간 동안 전배양하였다. 이후, 5l의 배양기에 옮겨 30℃ 온도 조건으로 24시간 동안 본배양한 후, 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체에 수분 90%가 되도록 증류수를 첨가한뒤, 열처리하여 사균화하였다. 도 1은 본 발명 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2의 사균화 공정을 나타낸 모식도이다.

표 1

mMRS 배지 조성

Enzyme Digest of Animal Tissue	10g
Beef Extract	10g
Yeast Extract	5g
Glucose	20g
Maltose	20g
Sodium Acetate	5g
Polysorbate	1g
Potassium Phosphate	2g
Ammonium Citrate	2g
Magnesium Sulfate	0.1g
Manganese Sulfate	0.05g
water	up to 1000g

[0031] (25℃, pH 6.5±0.2)

[0034] **[실험예 1: 본 발명 사균체의 면역강화 조건 확정]**

[0035] 본 발명 락토바실러스 브레비스 SPC-SNU 70-2 사균체 (LBB)의 면역기능 강화 조건을 확정하기 위하여, 식품의약품안전처의 건강기능식품 기능성 평가 가이드에서 제시하는 바이오마커인 TNF-α 분석을 수행하였다.

[0036] LBB 사균체가 면역세포의 싸이토카인 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 면역세포주인 Raw 264.7 세포 (입수처: 한국세포주은행)를 12-웰 플레이트(well plate)에 씨딩(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 배양시켰다.

[0037] 24시간 동안 배양 후, LBB 사균체 샘플을 4.18 X 10⁷ CFU/ml 농도로 처리하여 6시간 동안 배양한 뒤, 배지를 프랩(prepare)하여 13000 rpm, 2분, 4℃에서 원심분리 후 상층액을 획득하였다. 획득한 배지를 mouse TNF-α DuoSet ELISA kit (R&D system)를 활용하여 TNF-α 생성을 확인한 결과, 전반적인 온도에서 높은 TNF-α 생성량을 보였고, 100℃ 45분 조건에서 가장 높은 TNF-α 생성량을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (도 2). 도 2는 본 발명 사균체가 TNF-α 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

[0039] **[실험예 2: 본 발명 사균체와 공시균주의 면역 효과 확인]**

[0040] 본 발명 락토바실러스 브레비스 SPC SNU 70-2 사균체 (LBB)와 공시균주의 면역 효과를 분석하기 위하여, 면역세포주인 Raw 264.7 세포 (입수처: 한국세포주은행)를 12-웰 플레이트(well plate)에 씨딩(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 배양시켰다.

[0041] 24시간 동안 배양 후, LBB 사균체 샘플과 대조균인 공시(*Lactobacillus brevis* KACC 11433) 샘플을 2.09 X 10⁷ CFU/ml, 4.18 X 10⁷ CFU/ml 농도로 처리하여 6시간 동안 배양한 뒤, 배지를 프랩(prepare)하여 13000 rpm, 2분, 4℃에서 원심분리 후 상층액을 획득하였다. 획득한 배지를 mouse TNF-α DuoSet ELISA kit (R&D system)를 활용하여 TNF-α 생성을 확인한 결과, LBB 사균체가 대조균인 공시(*Lactobacillus brevis* KACC 11433) 사균체에 비하여 100℃, 30분 또는 45분 사멸조건에서 높은 TNF-α 생성량을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (도 3 내지 4). 도 3은 2.09 X 10⁷ CFU/ml 농도에서 본 발명 사균체와 공시균주(*Lactobacillus brevis* KACC 11433)가 TNF-α 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이고, 도 4는 4.18 X 10⁷ CFU/ml 농도에서 본 발명 사균체와 공시균주(*Lactobacillus brevis* KACC 11433)가 TNF-α 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

[0043] **[실험예 3: 본 발명 사균체의 비장세포 증식능 확인]**

[0044] 본 발명 락토바실러스 브레비스 SPC SNU 70-2 사균체 (LBB, 100℃ 30분)의 면역기능 증진 효능을 분석하기 위하여 식품의약품안전처의 건강기능식품 기능성 평가 가이드에서 제시하는 바이오마커인 비장세포 증식능을 수행하였다. 이를 위하여, 6주령 C57/BL6 쥐 (Female)의 비장(Spleen)을 적출하였다. 적출한 비장을 40 μ m 스트레이너 (strainer)로 갈아준 뒤, ACK(Ammonium-Chloride-Potassium) 버퍼로 워싱한 후 원심분리하여 적혈구를 용해 및 제거하였다.

[0045] 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 씨딩하였다. 씨딩한 후, *Lactobacillus brevis* SPC SNU 70-2 사균체 (LBB)를 3.9 X 10⁷ FU/ml 농도로 처리하고 48시간 동안 37℃, 10% CO₂ 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 배양시켰다. 배양 후, 각각에 CellTiter-Glo®Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 시약을 처리하여 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 발광량(Luminescence)를 측정하여 비장세포의 ATP를 측정한 결과, 락토바실러스 브레비스 SPC SNU 70-2 사균체 (LBB)를 처리한 비장세포는 일반 비장세포에 비해 약 1.5배 증식된 것을 확인할 수 있었다 (도 5). 도 5는 본 발명 사균체의 비장세포 증식효과를 확인한 결과이다.

[0046] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12777BP

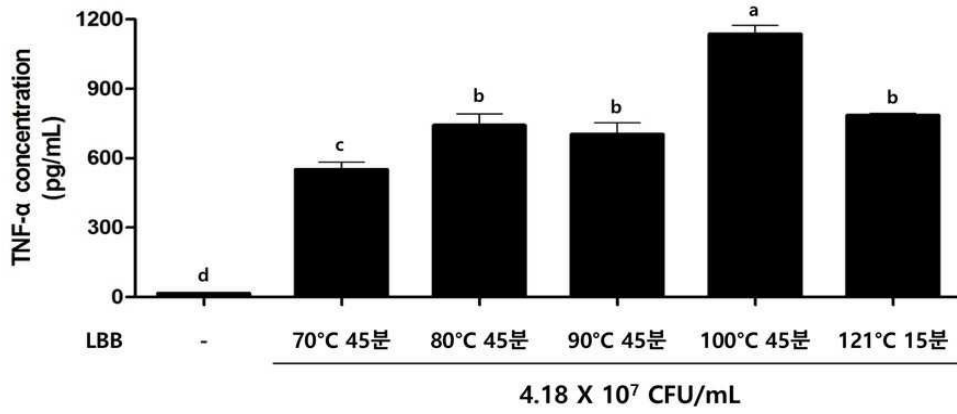
수탁일자 : 20150327

도면

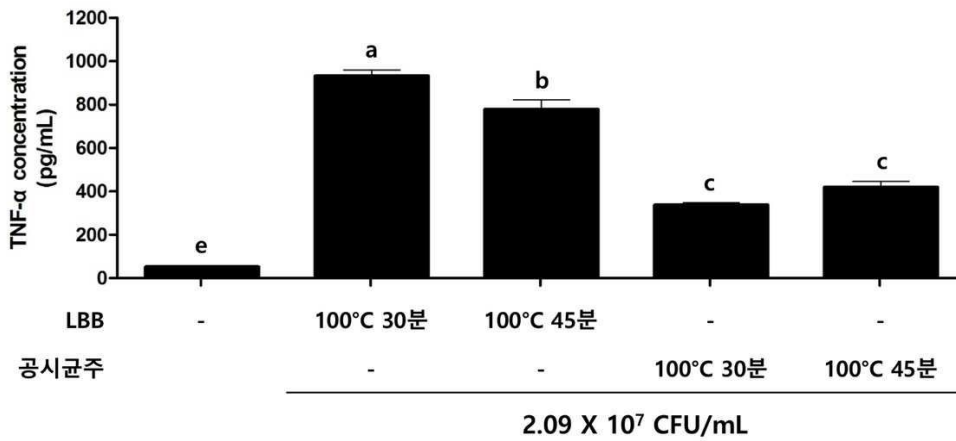
도면1



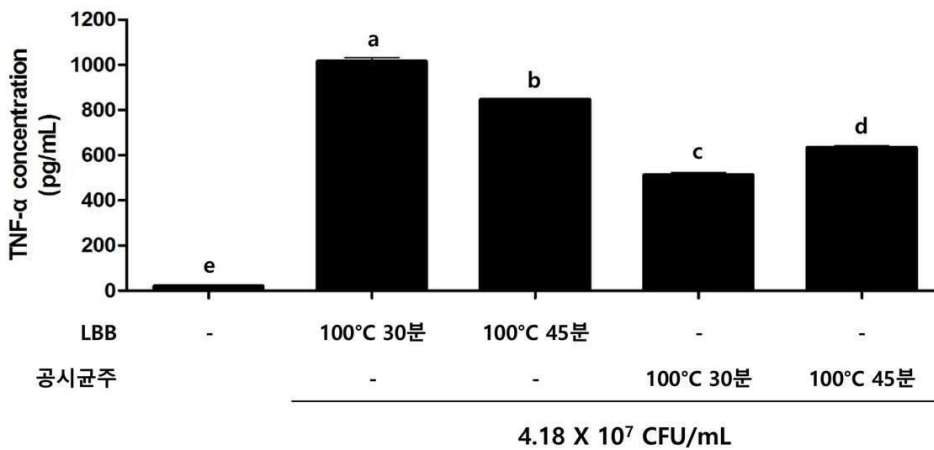
도면2



도면3



도면4



도면5

