



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월23일

(11) 등록번호 10-2503163

(24) 등록일자 2023년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/744 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/744 (2013.01)

A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0133618

(22) 출원일자 2017년10월13일

심사청구일자 2020년10월13일

(65) 공개번호 10-2019-0041864

(43) 공개일자 2019년04월23일

(56) 선행기술조사문헌

JP5031249 B2*

KR1020060114481 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

베름 주식회사

강원도 원주시 문막읍 반산1로 32

니혼 베루무 가부시기가이샤

일본국 100-0014 도쿄 치요다구 나가타초 2-14-3

아카사카 도쿄 빌딩 9층

(72) 발명자

김택중

강원도 원주시 흥업면 분지동1길 46-11

김완재

서울특별시 강남구 봉은사로84길 6, 402호 (로프트빌딩)

(74) 대리인

김보정

전체 청구항 수 : 총 3 항

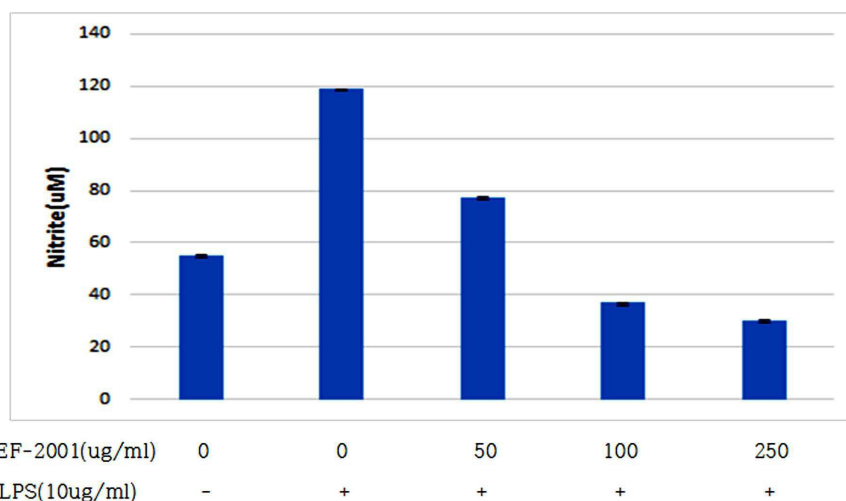
심사관 : 양용철

(54) 발명의 명칭 엔테로코커스 패칼리스를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 대식세포에 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체를 처리하고 염증 반응을 유도한 결과 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체에 의해 산화질소(NO)의 생성이 억제되고, iNOS 및 COX-2 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 염증 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|-------------|--|
| 과제고유번호 | R0006434 |
| 부처명 | 산업통상자원부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국산업기술진흥원 |
| 연구사업명 | 지역산업기술개발사업 |
| 연구과제명 | 유산균 사균제 EF-2001을 활용한 근육감소 예방 및 개선 노인성 웰니스 식품개발 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 연세대학교 원주산학협력단 |
| 연구기간 | 2017.06.01 ~ 2017.12.31 |

명세서

청구범위

청구항 1

엔테로코커스 패칼리스 EF-2001(*Enterococcus faecalis* EF-2001)의 사균체를 유효성분으로 포함하는 항염증용 약학적 조성물로서,

상기 항염증은 산화질소의 생성을 억제하고, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 사균체는 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001을 70 ~ 130℃ 온도에서 5 ~ 30분간 열처리하여 사균화되는 것을 특징으로 하는, 항염증용 약학적 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

엔테로코커스 패칼리스 EF-2001의 사균체를 유효성분으로 포함하는 항염증용 건강기능식품으로서,

상기 항염증은 산화질소의 생성을 억제하고, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하는 것인, 건강기능식품.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근 들어 유산균의 다양한 역할이 연구되고 있으며, 장질환(enteropathy), 아토피 피부염(atopic dermatitis) 등과 같은 염증성(inflammation) 질환들의 치료 효능이 밝혀지고 있다.
- [0003] 유산균은 탄수화물을 분해하고, 이를 이용하여 유산을 만드는 세균으로서, 엔테로코커스 속(Enterococcus), 스트렙토코커스 속(Streptococcus), 락토바실러스 속(Lactobacillus), 루코노스탁 속(Leuconostoc), 비피도박테리아 속(Bifidobacteria), 페디오코커스 속(Pediococcus) 등이 있다.
- [0004] 그 중에서도 엔테로코커스 속은 자연계에 널리 존재하며 탄수화물을 호기적으로 이용한다. 일반적으로 엔테로코커스 속은 생체 내 길항작용이나 분비 항균성 물질에 의해 병원성 미생물에 의한 피해를 예방하는 것으로 알려져 있다.
- [0005] 한편, 면역의 70%는 장에서 결정된다. 장에 있는 세균은 우리가 먹은 음식을 분해하고 소화할 수 있도록 만들어 주며 면역계를 훈련하는 역할도 한다. 반면에 암이나 설사 등을 유발하기도 한다. 따라서, 장내세균 균형이 잘 맞아야 장이 건강하고 신체가 건강하다. 최근 연구를 통해서도 비만과 각종 난치병들이 이들 장내세균 및 장관 면역과 관계가 깊다는 것이 속속 밝혀지고 있다.
- [0006] 염증은 유해한 요소를 제거하고 세포 및 조직을 회복시킴으로써, 손상 또는 감염으로부터 보호하는 중요한 면역 반응이다. 하지만, 과도한 급성 또는 만성 염증은 관절염, 천식, 대장염, 파킨슨병, 알츠하이머병, 및 패혈증과 같은 심각한 장애를 일으킬 수 있다. 이러한 질병 과정에서, 염증의 제어는 치료에 필수적이다. 리포다당류(LPS)로 알려진 그람음성균의 외막은 강력한 전염증 내독소이다. LPS 자극은 대식세포 및 미세아교세포에서, 유도형 산화질소 합성효소(iNOS)-유래 산화질소(NO) 및 시클로옥시게나아제-2(COX-2)-유래 프로스타글란딘 E2(PGE2)를 포함하는 전염증성 매개체의 생성을 유도할 수 있다.
- [0007] 산화질소(NO)는 유도성 산화질소 합성효소(iNOS)에 의해 생성되는 염증성 분자로, 과도한 iNOS의 활성화 증가는 산화질소의 생성은 다양한 염증성 질환의 병인이다. 또한, 시클로옥시게나아제-2(COX-2) 효소에 의해 합성되는 프로스타글란딘 E2(PGE2)는 발열과 통증 같은 염증 증상의 중요한 매개체이므로, 이들 염증성 매개체의 생산 억제는 다양한 염증성 질환의 치료에 유용하다.
- [0008] 일례로 산화질소의 생성 및 iNOS 발현을 억제하는 것으로 잘 알려진 덱사메타손(dexamethasone)은 강력한 항염증제로 이용되고 있으나, 스테로이드계 약물로 많은 부작용을 가지고 있어 효과 대비 부작용이 크다는 문제가 있다.
- [0009] 이에, 본 발명자들은 부작용이 적은 항염증제를 개발하기 위해 노력한 결과, 유산균으로 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*) EF-2001 사균체를 처리하고 염증 반응을 유도한 대식세포에서 산화질소(NO)의 생성이 억제되고, iNOS 및 COX-2 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인하여, 본 발명의 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 염증 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 일본 특허공보 제3151442호

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Kurt Lucas & Michael Maes (2013) Role of the Toll Like Receptor (TLR) Radical Cycle in Chronic Inflammation: Possible Treatments Targeting the TLR4 Pathway. Mol Neurobiol 48(1): 190-204.
- (비특허문헌 0002) McCartney-Francis, Janice B. Allen, Diane E. Mizel, Jorge E. Albina, Qiao-Wen Xie, Carl F. Nathan, Sharon M. Wahl (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide

synthase. J Exp Med 178(2): 749-754.

(비특허문헌 0003) Samuelsson B, Morgenstern F, Jakobsson PJ (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. Pharmacol Rev 59(3): 207-224.

(비특허문헌 0004) Daniel L. Simmons, Regina M. Botting, Timothy Hla (2004) Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. Pharmacol Rev 56(3): 387-437.

(비특허문헌 0005) Ozaki T, Habara K, Matsui K, Kaibori M, Kwon AH, Ito S, Nishizawa M, Okumura T (2010) Dexamethasone inhibits the induction of iNOS gene expression through destabilization of its mRNA in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes. Shock 33(1): 64-69.

(비특허문헌 0006) Eun-Ju Choi, Masahiro Iwasa, Kwon-Il Han, Wan-Jae Kim, Yujiao Tang, Young Joung Hwang, Jeong Ryong Chae, Weon Cheol Han, Yu-Su Shin, Eun-Kyung Kim (2016) Heat-Killed Enterococcus faecalis EF-2001 Ameliorates Atopic Dermatitis in a Murine Model. Nutrients 8, 146.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 대식세포에 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*) EF-2001 사균체를 처리하고 염증 반응을 유도한 결과 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체에 의해 산화질소(NO)의 생성이 억제되고, iNOS 및 COX-2 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 LPS(Lipopolysaccharide) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 또는 무처리 조건에서, 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*) EF-2001 사균체의 농도에 따라 대식세포주 RAW264.7 내의 산화질소(NO) 생성량을 확인한 도이다.

도 2는 LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 또는 무처리 조건에서, 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체의 농도에 따라 대식세포주 RAW264.7 내의 iNOS 단백질 발현량을 확인한 도이다.

도 3은 LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 또는 무처리 조건에서, 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체의 농도에 따라 대식세포주 RAW264.7 내의 COX-2 단백질 발현량을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명은 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명에서, 상기 엔테로코커스 패칼리스는 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 또한, 상기 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001은 일본 베룸(Nihon Berumu) 주식회사의 BRM 연구소에서 개발한 유산균으로서, 산화질소의 생성을 억제하는 것이 바람직하고, iNOS 또는 COX-2의 발현을 억제하는 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명에서, 상기 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체는 시판되는 것, 또는 공지된 사균체 제조법으로 제조된 것 중 어느 것을 이용하여도 무방하며, 독성을 나타내지 않고, 인체에 무해하다.
- [0023] 또한, 상기 배양액은 엔테로코커스 패칼리스를 배양 배지에서 배양하여 수용한 배양액, 농축 배양액, 배양액 건조물, 배양 여과액, 농축 배양 여과액 또는 배양 여과액의 건조물을 의미하는 것으로, 상기 균주를 포함하는 것, 배양한 후 균주를 제거한 배양액일 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 사균체는 상응한 생균체를 열처리하거나 포르말린 또는 기타 살균제와 함께 처리하여 제조할 수 있으며 사균체는 실질적으로 죽어 있는 것이어도 사용가능하다. 또한, 상기 사균체는 통상의 방법에 의해 배양하여 수득한 균주를 세정하고, 원심 탈수하고, 필요에 따라 세정·탈수를 반복한 후, 증류수, 생리식염수 등에 현탁하고, 그 현탁액을, 예를 들면 80~115℃에서 30분~3초간 가열함으로써 얻어지는 사균체 현탁액이나 그 건조물, 또는 상기 사균체 현탁액에 감마선 혹은 중성자선을 조사함으로써 얻어지는 사균체 현탁액이나 그 건조물을 들 수 있다. 상기 사균체 현탁액의 건조 수단으로서는 공지된 건조 수단이면 특별히 제한되지 않지만, 분무 건조, 동결 건조 등을 예시할 수 있다. 경우에 따라서는, 가열 등에 의한 살균 처리의 전후, 또는, 건조 처리의 전후에, 효소 처리, 계면활성제 처리, 마쇄·분쇄 처리를 실행할 수 있고, 이러한 처리에 의해 얻어지는 것도 본 발명의 사균체에 포함된다. 아울러, 상기 사균체는 하기와 같은 방법으로 제조될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:
- [0025] 1) 엔테로코커스 패칼리스를 종균배양한 후, pH 5.0 ~ 8.0, 20 ~ 40℃ 온도에서 본배양하는 단계;
- [0026] 2) 상기 단계 1)에서 본배양한 엔테로코커스 패칼리스를 70 ~ 130℃ 온도에서 5 ~ 30분간 열처리 후 건조 및 분말화하는 단계.
- [0027] 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 관절염, 비염, 간염, 각막염, 위염, 장염, 신장염, 기관지염, 흉막염, 복막염, 척추염, 췌장염, 염증성 통증, 요도염, 방광염, 화상 염증, 치주염, 치은염 또는 퇴행성 신경염증일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체를 제작하였고, 상기 사균체의 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도한 대식세포에 상기 사균체를 처리한 결과, 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체에 의해 산화질소(NO)의 생성이 억제되고, i-NOS 및 COX-2 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 염증 예방 또는 치료용 조성물, 또는 건강기능식품의 유효성분으로 이용할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물은 조성물 총 중량에 대해, 유효성분으로서 균주를 10^6 내지 10^{13} cfu/g의 함량으로 포함하거나, 동등한 수의 생균을 가진 배양물 또는 사균체를 포함할 수 있다. 또한, 주성분인 본 발명의 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체의 유효량에 1종 또는 2종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 통상적인 담체 또는 1종 또는 2종 이상의 첨가제를 선택하여 통상적인 제형의 조성물로 제조할 수 있다.
- [0030] 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 항산화제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 사용이 가능하며, 구체적으로는 희석제로는 유당(lactose monohydrate), 트레할로스(Trehalose), 옥수수 전분(cornstarch), 콩기름(soybean

oil), 미결정 셀룰로오스(microcrystalline cellulose) 또는 만니톨(D-mannitol)이 좋고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate) 또는 탈크(talc)가 바람직하며, 결합제로는 폴리비닐 피롤리돈(PVP: polyvinyl pyrrolidone) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC: hydroxypropylcellulose) 중에서 선택함이 바람직하다. 또한, 봉해제로는 카르복시메틸셀룰로오스칼슘(Ca-CMC: carboxymethylcellulose calcium), 전분글리콜산나트륨(sodium starchglycolate), 폴라크릴린칼륨(polacrylin potassium) 또는 크로스포비돈(cross-linked polyvinylpyrrolidone)중에서 선택함이 바람직하고, 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨(sorbitol) 또는 아스파탐(aspartame) 중에서 선택되고, 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨(Na-CMC: carboxymethylcellulose sodium), 베타-싸이클로덱스트린(β -cyclodextrin), 백납(white bee's wax) 또는 잔탄검(xanthan gum) 중에서 선택되며, 방부제로는 파라옥시안식향산메틸(methyl p-hydroxy benzoate, methylparaben), 파라옥시안식향산프로필(propyl p-hydroxybenzoate, propylparaben), 또는 소르빈산칼륨(potassium sorbate) 중에서 선택하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기에서 '약학적으로 유효한 양'이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 염증성 질환의 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 말한다. 또한, 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등과 같은 여러 인자에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물은 상기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성 성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 본 발명의 조성물은 상기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 투여 경로로는 이에 한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0035] 본 발명에서, 상기 엔테로코커스 패칼리스는 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 또한, 상기 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001은 산화질소의 생성을 억제하는 것이 바람직하고, iNOS 또는 COX-2의 발현을 억제하는 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 관절염, 비염, 간염, 각막염, 위염, 장염, 신장염, 기관지염, 흉막염, 복막염, 척추염, 채장염, 염증성 통증, 요도염, 방광염, 화상 염증, 치주염, 치은염 또는 퇴행성 신경염증일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 건강기능식품으로는 예를 들어, 차, 젤리, 츄, 액기스, 음료 등의 장 기능 개선을 목적으로 하는 민간요법제를 들 수 있다. 이와 같이 다양한 형태로 가공된 본 발명의 건강기능식품은 인체에 부작용이 없으면서 복용이 용이하고 장기간 보관이 가능하다.

[0039] 본 발명의 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 균주, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 상기 균주, 이의 배양액 또는 이의 사균체 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없으므로 유효성분은 상기범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0040] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 상기 균주, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 첨가할 수

있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 얼음과자, 아이스크림류, 우유, 우유 대용품, 크림, 버터, 버터 밀크, 요구르트, 요거트, 치즈를 포함하는 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0041] 본 발명의 건강 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 슈크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 상기 균주, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 100 ml당 일반적으로 0.001 내지 1.0 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 1.0 g이다.

[0042] 상기 외의 본 발명의 균주, 이의 배양액 또는 이의 사균체는 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 균주, 이의 배양액 또는 이의 사균체는 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하지 않지만 본 발명의 균주 또는 이의 배양액은 100 중량부 당 0.001 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0044] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] <실시예 1> 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*) EF-2001 사균체 제조

[0046] 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*) EF-2001 사균체는 다음과 같이 제조하였다.

[0047] 구체적으로, 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 생균(Nihon BRM Co. Ltd, 일본)을 일반적인 유산균 배양에 사용하는 배지에서 호기 또는 혐기 배양하여 전배양을 거친 후 pH 5.0 ~ 8.0, 20 ~ 40℃를 유지하면서 1~3일간 배양하여 건물중량기준(Dry weight, DW) 7.5×10^{12} cfu/g 이상의 균체 수에 이르도록 본배양을 수행하였다. 그 다음, 70 ~ 130℃에서 5 ~ 30분간 열처리하여 사균화하였다. 열처리 후, 연속 원심기로 균체를 분리, 회수한 후 동결건조 및 분말화하였다.

[0048] <실험예 1> 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체에 의한 산화질소 생성 억제 확인

[0049] 산화질소(Nitric oxide; NO)는 정상적인 생리 상태에서 혈관의 항상성, 세포사멸(apoptosis) 유도 작용 등 중요한 생리적인 기능을 매개하지만, 다량의 산화질소는 정상세포를 죽이고 염증을 유도하여 급성 또는 만성 염증질환의 원인이 되는 물질로 작용하게 된다. 따라서, 산화질소의 생성을 억제시키는 작용은 항염증 작용으로 판단할 수 있다.

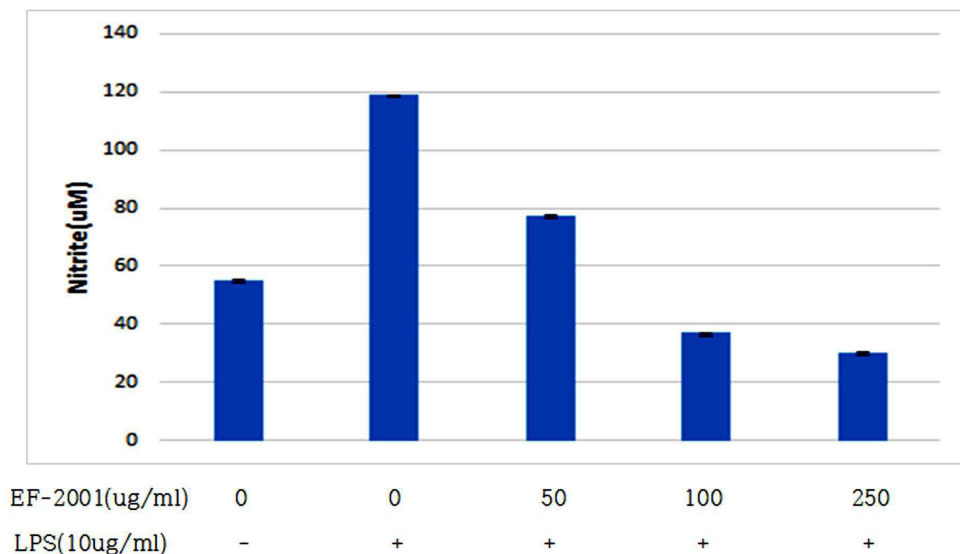
[0050] 이에, 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체의 항염증 효과를 알아보기 위하여, 대식세포주에 상기 <실시예 1>에서 제조한 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체를 처리하고 염증 반응을 유도한 후 산화질소의 생성 변화를 ELISA로 확인하였다.

[0051] 구체적으로, 대식세포주 RAW264.7 5×10^4 개를 24웰-플레이트(well-plate)에 분주한 후, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 37℃, 5% CO₂ 하에서 24시간 동안 배양하였다. 또한, 상기 <실시예 1>에서 제조한 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체의 농도가 50, 100, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 DMEM 배지로 희석하였다. 그 다음, 상기 24시간 동안 배양한 세포에 상기 각 농도별로 희석한 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체를 처리하고, 30분 후 LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 다음 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 37℃, 5% CO₂ 하에서 18시간 동안 배양하였다. 그 다음, NO ELISA kit(invitrogen, US)를 이용해 제조사의 절차에 따라 ELISA를 수행하여 산화질소 생성 정도를 측정하였다.

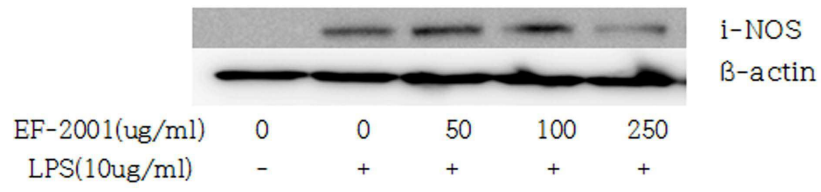
- [0052] 대조군으로 LPS 및 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체를 모두 처리하지 않고 배양한 RAW264.7를 이용하였다.
- [0053] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, LPS만 처리한 대식세포의 경우 LPS에 의해 산화질소 생성이 증가하는 반면, LPS와 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체를 모두 처리한 대식세포의 경우 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체 농도에 따라 산화질소의 생성이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.
- [0054] <실험예 2> 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체에 의한 염증 관련 인자의 단백질 발현 억제 확인
- [0055] 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체의 항염증 효과를 알아보기 위하여, 대식세포주에 상기 <실시예 1>에서 제조한 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체 처리하고 염증 반응을 유도한 후 염증 관련 인자인 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현 변화를 웨스턴 블롯팅을 수행하여 확인하였다.
- [0056] 구체적으로, 상기 <실험예 1>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 대조군 대식세포주, LPS 및 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체를 처리한 대식세포주 각각을 회수하였다. 그 다음, 프로테아제 억제제(Protease inhibitor, Sigma) 및 포스파타아제 억제제 콕테일(Phosphatase inhibitor cocktail 2,3, Sigma)이 풍부한 RIPA 완충액을 사용하여 상기 회수한 세포를 용해하여 단백질을 분리하였다. 상기 세포의 단백질 용해물(30 μ g)을 SDS-PAGE로 전기영동한 후, PVDF 막(Immobilon-P)으로 전달시켰다. 그 다음, iNOS 및 COX-2 단백질의 발현 변화를 확인하기 위하여 일차 항체로 항-iNOS 항체, 항 COX-2 항체를 처리하여 반응시킨 후, 상기 막에 붙은 일차 항체에 HRP-접합 이차 항체를 붙이고, 이를 ECL(GE Healthcare-Life Sciences)을 이용하여 확인하였다. 이미지는 SRX-101A Medical Film Processor(Konica Minolta)를 이용하였다.
- [0057] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이, LPS 처리에 의해 증가한 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현량이 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다.
- [0058] 따라서, 상기 결과를 통해 본 발명의 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001 사균체는 산화질소(NO)의 생성을 억제하고, i-NOS 및 COX-2 단백질의 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인하였으므로, 본 발명의 엔테로코커스 패칼리스 EF-2001, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 염증 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

