

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 등록특허공보 (B1)

(51) 。 Int. Cl. 6
C12N
1/20

(45) 공고일자 2003년01월14일
(11) 등록번호 10-0367553
(24) 등록일자 2002년12월26일

(21) 출원번호	10-1999-7009137	(65) 공개번호	특2001-0006059
(22) 출원일자	1999년10월05일	(43) 공개일자	2001년01월15일
번역문 제출일자	1999년10월05일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP1999/00480	(87) 국제공개번호	WO 1999/40178
(86) 국제출원출원일자	1999년02월04일	(87) 국제공개일자	1999년08월12일

(81) 지정국
국내특허 : 중국, 대한민국, 미국,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

(30) 우선권주장 10-24892 1998년02월05일 일본 (JP)

(73) 특허권자 리켄
일본국 사이타마현 와코시 히로사와 2-1
가부시카이가이샤 에이.엘.에이
일본국 도쿄도 시부야구 요요기 3-28-6
미주타니 타케오
일본국 도쿄도 타나시시 니시하라쵸 1-6-19

(72) 발명자 미주타니타케오
일본국도쿄도타나시시니시하라쵸1-6-19
신료우이치
일본국도쿄도시부야쿠요요기3-28-6
스즈키모모요
일본국도쿄도시부야쿠요요기3-28-6
미우라카즈시
일본국도쿄도시부야쿠요요기3-28-6

심사관 : 안미정

(54) 기능성 배양물의 제조방법

요약

락토바실러스 델브루엑기(Lactobacillus delbrueckii), 락토바실러스 에시도필러스(Lactobacillus acidophilus), 락토바실러스 플랜타룸(Lactobacillus plantarum), 락토바실러스 페르멘텀(Lactobacillus fermentum), 락토바실러스 카세이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus), 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis) 및 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 적어도 3종류의 유산균과, 사카로마이세스 세레비시에(Saccharomyces cerevisiae)와의 혼합 미생물의 배양물, 또는 그의 처리물을 포함하는 조성물, 및 전기 조성물을 포함하는 기능성 식품.

명세서

기술분야

본 발명은 유산균과 효모의 혼합 미생물의 배양물 또는 그의 처리물을 포함하는 조성물 및 전기 조성물을 함유하는 기능성 식품에 관한 것이다.

배경기술

유산균을 이용하는 발효식품은 성인병의 예방 및 건강증진 효과를 가지고 있는 것으로 기대되고 있다. 이러한 식품으로서는 발효유(요구르트)가 대표적이며, 그밖에도 유산균 음료, 산유(酸乳) 등이 널리 보급되고 있다. 유산균 및 발효식품의 생리활성작용에 대하여서는, 다수가 보고되어 있으므로, 유산균 및 발효식품은 건강식품으로서의 이용가치가 기대되고 있다.

그런데, 종래부터 청주, 된장, 간장을 비롯하여 양조식품의 대부분은 배양기때에 수종의 미생물을 혼합하여 배양하면, 이러한 미생물간의 공생 또는 길항작용 등으로 인한 독특한 향과 맛, 성분을 생성하는 것으로 알려져 있다.

그러나, 유산균 또는 유산균 발효식품에는 이러한 공생배양의 개념을 이용하여 만든 것은 소수이며, 그의 생리활성작용에 대해서도 알려져 있지 않다.

발명의 상세한 설명

발명의 개시

본 발명은 유산균과 효모를 혼합한 미생물의 배양물 또는 그의 처리물을 함유하는 조성물 및 전기 조성물을 함유하는 기능성 식품을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

본 발명자는 상기 과제를 해결하기 위해서 예의(銳意) 연구를 행한 결과, 유산균과 효모의 혼합 미생물의 배양물 또는 그의 처리물이 각종 기능을 발휘하는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

예를 들면, 본 발명은 락토바실러스 델브루엑기(Lactobacillus delbrueckii), 락토바실러스 에시도필러스(Lactobacillus acidophilus), 락토바실러스 플랜타룸(Lactobacillus plantarum), 락토바실러스 페르멘텀(Lactobacillus fermentum), 락토바실러스 카세이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus), 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis) 및 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 최소한 3종류의 유산균과 사카로마이세스 세레비시에(Saccharomyces cerevisiae)와의 혼합 미생물의 배양물 또는 그의 처리물을 함유하는 조성물을 제공한다. 혼합 미생물로서는 락토바실러스 델브루엑기, 락토바실러스 카세이, 락토코커스 락티스 및 사카로마이세스 세레비시에를 포함하는 그룹, 락토바실러스 에시도필러스, 락토바실러스 람노서스, 락토코커스 락티스 및 사카로마이세스 세레비시에를 포함하는 그룹, 락토바실러스 플랜타룸, 락토바실러스 카세이, 스트렙토코커스 써모필러스 및 사카로마이세스 세레비시에를 포함하는 그룹 및 락토바실러스 페르멘텀, 락토바실러스 람노서스, 스트렙토코커스 써모필러스 및 사카로마이세스 세레비시에를 포함하는 그룹의 4그룹으로부터 선택되

는 적어도 1그룹을 열거할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 기능성 식품을 제공한다. 본 명세서에는 본원의 우선권인 일본특허출원 (평)10-24892호의 명세서 및/또는 도면에 기재된 내용을 포함한다.

이하에서는, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

본 발명의 조성물은 유산균과 효모의 혼합 미생물을 배양(공서배양)해서 얻은 배양물 또는 그의 처리물을 함유한다.

유산균으로서는, 락토바실러스속, 락토코커스속 또는 스트렙토코커스속에 속하는 균주, 예를 들면, 락토바실러스 델브루엑기, 락토바실러스 에시도필러스, 락토바실러스 플랜타룸, 락토바실러스 페르멘텀, 락토바실러스 카세이, 락토바실러스 람노서스, 락토코커스 락티스 및 스트렙토코커스 써모필러스를 열거할 수 있다. 효모로서는 사카로마이세스 세레비시에를 열거할 수 있다.

상기 미생물은 일반적으로 시판되는 것을 이용할 수가 있지만, 이러한 미생물의 공서배양물 또는 그의 처리물이 기능성 식품으로서 이용하는 것이 당해 미생물의 특성의 주(株)에 한정된 것은 아니다. 예를 들면, 락토바실러스속에 속하는

유산균으로서는 락토바실러스 델브루엑기(*Lactobacillus delbrueckii*) ALAL007주, 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) ALAL005주, 락토바실러스 플랜타룸(*Lactobacillus plantarum*) ALAL006주, 락토바실러스 페르멘텀(*Lactobacillus fermentum*) ALAL001주, JCM 1173주, 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), ALAL002주, ALAL003주, JCM1053주, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) ALAL004주, ALAL010주, JCM1136주 등을 열거할 수 있으며, 락토코커스속에 속하는 유산균으로서는 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) subsp. *hordniae* ALAL008주, ALAL009주 등을 열거할 수 있으며, 스트렙토코커스속에 속하는 유산균으로서는 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) ALAL011주, ALAL012주 등을 열거할 수 있으며,

효모균으로서는 예를 들면, 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) JCM1499주, ALAY001주, ALAY002, ALAY003주, ALAY004주를 열거할 수 있다.

또한, 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) ALAY001주, 락토바실러스 페르멘텀(*Lactobacillus fermentum*) ALAL001주, 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) ALAL003주 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) ALAL004주는 공업기술원 생명공학공업기술연구소(츠쿠바현 츠쿠바시 동 1-1-3)에平成 9년(1997년) 11월 28일에, 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) ALAY001주에 대해서는 FERM BP-6626, 락토바실러스 페르멘텀(*Lactobacillus fermentum*) ALAL001주에 대해서는 FERM BP-6627, 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) ALAL003주에 대해서는 FERM BP-6628, 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) ALAL004주에 대해서는 FERM BP-6629로서, 부다페스트의 조약에 기초하여 각각 기탁되어 있다.

본 발명에서는 유산균으로부터 적어도 3종류를 임의로 선택해서, 그것과 효모 1종류를 조합해서 조합 미생물로 하였다. 혼합 미생물의 조합으로서는, 예를 들면, 하기 표 1의 A로부터 D그룹에 기재된 것을 이용할 수 있다.

그룹	유산균			효모
	(1)	(2)	(3)	
A	<i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i>	<i>L. casei</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. hordniae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
B	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. hordniae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
C	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
D	<i>L. fermentum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	<i>S. cerevisiae</i>

상기 A-D그룹의 미생물은 각각의 단독그룹(미생물 4주)으로서 사용해도 좋으며, 2그룹 이상을 임의로 조합하여 사용해도 좋다. 단, 2그룹 이상을 조합하는 경우, 동종의 미생물이 중복될 때(예를 들면, A그룹과 C그룹을 조합할 경우인 *L.casei*와 *S.cerevisiae*가 중복될 때)는 각각의 다른 주를 이용하는 것으로 한다.

본 발명의 조성물은 유산균과 효모의 혼합 미생물을 콩의 열수추출액을 함유한 배지로 배양, 발효시켜 수득할 수 있다.

배지는 콩의 열수추출액을 사용한다. 그리고, 유산균 1종이 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 개/ml, 효모 1종이 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 개/ml를 각각 혼합한 상기 배지에 접종하고, 20 ~ 37℃에서 4 내지 10일간 배양한다.

복수의 미생물그룹을 조합하는 경우 각각의 그룹에 상기 배양조건에서 배양한 후, 각각의그룹을 혼합하고, 상기 배양조건에서 배양하는 방법이 채용된다. 배양 종료 후, 자비살균(80℃)하여, 배양물을 회수한다.

본 발명의 조성물은 배양후의 배양물 그 자체를 동결건조 또는 분무건조하여 얻을 수 있다. 또한, 여과 또는 원심분리 등의 처리에 의해 배양상등액과 균체를 분리시켜도 좋다. 이런 경우, 배양상등액 및 균체에 대해서는 냉동건조 또는 분무건조시켜, 본 발명의 조성물으로서 조제할 수 있다.

본 발명의 조성물의 형태는 임의로 설정하는 것이 가능하며, 액체, 고체, 과립 등으로 가공하는 것이 가능하지만, 과립상의 것이 취급상 편리하므로 바람직하다.

과립상으로 가공하는 경우, 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 등의 다당체와의 포섭물로 한다.

이상과 같이 얻을 수 있는 본 발명의 조성물은 각종의 작용을 가지는 것부터 기능성을 가지는 건강식품(기능성 식품)으로 이용할 수 있다. 이러한 작용으로서, 예를 들어, 간 및 신장 기능개선작용, 항변이원성 작용, 종양세포증식 억제작용 및 장내세균 개선작용 등을 들 수가 있다.

본 발명의 조성물은 통상 과립상으로 가공하기 때문에, 기능성 식품으로서 이용하는 경우, 그 자체로 먹어도 좋으며, 적정량을 식품에 첨가해도 좋다.

식품으로서 예를 들면, 젤리, 사탕 등의 과자류, 주스, 홍차, 영양 드링크제 등과 같은 음료, 밥 등을 들 수가 있으나, 이들에 한정되지는 않는다.

또한, 본 발명의 조성물의 식품에의 혼합량 및 혼합비율은 식품에 대하여 0.1 ~ 1중량%이지만, 기호에 따라서 적당하게 조절할 수가 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 조성물의 간 기능 개선작용을 나타낸 그림이다.

도 2는 본 발명의 조성물의 신장기능 개선작용을 나타낸 그림이다.

도 3은 본 발명의 조성물의 신장기능 개선작용을 나타낸 그림이다.

도 4는 본 발명의 조성물의 신장기능 개선작용을 나타낸 그림이다.

도 5는 본 발명의 조성물의 간 기능 개선작용을 나타낸 그림이다.

도 6은 시험용 마우스의 체중변화를 나타낸 그림이다.

도 7은 본 발명의 조성물의 발암억제작용을 나타낸 그림이다.

도 8은 본 발명의 조성물의 항변이원성 작용을 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 최량의 형태

이하, 실시예로서 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명한다. 단, 본 발명은 이들 실시예에 그 기술적 범위가 한정되는 것은 아니다.

실시예

실시예 1: 조성물의 조제

표 2에 기재된 것과 같이, 유산균 8종, 12주 및 효모 1종, 4주의 미생물(합계 16주)을 유산균 3주와 효모 1주를 조합한 하나의 그룹으로 해서 A-D그룹으로 나누었다.

그룹	유산균			효모
	(1)	(2)	(3)	
A	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ALAL007	<i>L. casei</i> ALAL003	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> ALAL008	<i>S. cerevisiae</i> ALAY003
B	<i>L. acidophilus</i> ALAL005	<i>L. rhamnosus</i> ALAL004	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> ALAL009	<i>S. cerevisiae</i> ALAY004
C	<i>L. plantarum</i> ALAL006	<i>L. casei</i> ALAL002	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> ALAL011	<i>S. cerevisiae</i> ALAY001
D	<i>L. fermentum</i> ALAL001	<i>L. rhamnosus</i> ALAL010	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> ALAL012	<i>S. cerevisiae</i> ALAY002

각각의 그룹에 콩 열수(熱水)추출액에 4주를 포함하는 각각의 전배양액을 접종(유산균 1주당 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /ml, 효모 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ /ml)하여, 20 ~ 37℃에서 5 ~ 10일간 배양하였다. 그런 다음, 새로운 배양배지 안에 각 그룹마다의 배양액을 혼합하고, 20 ~ 37℃에서, 2 ~ 5일간 배양하였다. 배양 후 가열살균하며, 냉동건조함으로써 1리터당 90그램의 건조물을 얻었다. 또한, 배양액을 여과하여 상등액을 얻고, 동결건조로 하여 1리터당 40그램의 건조물을 수득하였다. 이렇게 해서 얻을 수 있는 조성물에 배양물 그 자체로부터 얻은 것을 RS-II, 배양상등액으로부터 얻은 것을 RS-I로 하였다.

실시예 2: 간 기능 개선작용시험(담즙산부하 간 장애를 가진 랫트에 대한 영향)

디옥시콜린산(deoxycholic acid, 이하, 'DCA'라 함)은 콜린산(cholic acid)으로부터 장내세균으로 인해 배설되어지는 대표적인 2차 담즙 산이며, 독성이 강하고, 실험동물에 있어서 담즙분비정지성의 간 장애(cholestatic hepatopathy)를 유발하는 것이 알려져 있고, 급성 췌장염(acute pancreatitis), 대장암의 원인이 되는 것도 보고되어 있다. 혈중 및 담즙의 담즙산의 량과 그의 조성은 식생활이나 생리적 상태에 따라 변화하며, 예를 들면, 당뇨병 환자나 실험적 당뇨병의 모델 동물에서는 담즙에 DCA량이 현저하게 증가하는 것은 알려져 있어, 생체에 미치는 영향은 중요하다.

따라서, 간 장애(障害)의 유발에 DCA를 사용하여, 본 발명의 조성물의 간 장애에 대한 영향을 조사하였다.

(1) 방법

Wistar 수컷 5주령 랫트(rat)를 Charles River로부터 구입하고, 공조가 되는 사육실(실온 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 조명시간 오전 8시 ~ 오후 8시)에서 일주일간 예비사육하였다. 6주령이 되면 체중의 평균과 분포가 균등하도록 1군을 6마리로 해서 2군으로 나누고, 1군을 본 발명의 조성물 투여군, 다른 군은 대조군으로 하였다. 투여군은 0.5% DCA와 5% RS-I를 섞은 MF분말사료(오리엔탈 효모공업사)를, 대조군은 0.5% DCA만을 섞은 MF분말사료를 투여하고, 6주간 수돗물과 함께 자유롭게 섭취하도록 하였다.

투여를 시작할 때, 2, 4 및 6주째에 꼬리의 정맥으로부터 혈액을 채취하고, 혈청을 분리해서 글루타민-옥살로아세트산 전환효소(glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT), 글루타민-피루브산 전환효소(glutamic-pyruvic transaminase, GPT), 혈중요소 질소(blood urea nitrogen, BUN), 요산(uric acid, UA), 콜레스테롤(cholesterol, CHL)치를 측정하였다. 투여 5주째에는 대사 케이지(cage)를 사용하여 뇨량을 측정함과 동시에, 뇨 중의 전해질 농도를 측정하였다. 투여 종료 후, 해부를 해서 장기의 중량을 측정하고, 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하여, 혈청생화학적 성상을 분석하였다.

(2) 결과

DCA를 부하함에 따라서, 랫트의 혈청 GOT활성이 급속하게 상승하여, 대조군은 2주째에 1366 ± 467 (Karmen), 4주째에 5122 ± 1848 (Karmen)까지 상승하였다(참조: 도 1a). 이에 대하여, RS-I 투여군은 2주째에 406 ± 88 (Karmen)이고, 유의적으로($p < 0.05$) GOT활성의 상승이 억제되었다. 또한, 4주째에도 1636 ± 630 (Karmen)이고, GOT활성의 상승이 억제되어지는 경향을 확인할 수 있었다(참조: 도 1a). 한편, 혈청 GPT활성에 대해서도 GOT활성과 마찬가지로 형태로 상승억제 작용이 확인되었다(참조: 도 1b).

아울러, BUN치에 대해서는, RS-I 투여군은, 4 및 6주째에 있어서 대조군과 비교해서 유의할 만큼($p < 0.01$) 낮은 값을 나타내었다(참조: 도 2). 또한, UA 및 CHL치에 RS-I투여의 영향은 확인되지 않았다. 5주째에 있어서 뇨배설량은 RS-I 투여군으로서 높은 경향을 보였고(참조: 도 3a), 물의 섭취량에 대한 배설의 비율도 큰 경향을 보였다(참조: 도 3b). 뇨속의 전해질 농도는 RS-I투여군과 대조군 사이에 차가 없었으나, 투여군의 뇨량이 많았으므로, 전해질 배설량은 투여군에서 큰 경향이 있었다(참조: 도 4).

또한, DCA의 투여 종료 후에 있어서, 혈청의 생화학분석으로 총단백질(total protein, TP), 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, ALP), γ -글루타민 트랜스펩티다제(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GTP), 루신 아미노펩티다제(leucine aminopeptidase, LAP), 글루코스(glucose, GLU), 총콜레스테롤(total cholesterol, T-CHL), 지질 과산화물(lipid peroxide, LPO), β -지단백질(β -lipoprotein, β -LP), 빌리루빈치(bilirubin, BUN)에 RS-I투여의 영향이라고 여겨지는 변화는 확인되어지지 않았지만, 혈청 총담즙산 농도는 대조군 81 ± 36 (nmol/ml)에 대하여, RS-I투여군은 46 ± 34 (nmol/ml)이며, RS-I투여군은 대조군과 비교하여 혈청 총담즙산 농도가 낮은 경향을 볼 수 있었다.

DCA부하에 의한 혈청 GOT, GPT활성의 상승이 RS-I의 투여에 의해 억제되어지는 경향을 볼 수 있었고, 이로 부터 RS-I는 간 기능 장애의 개선에 유용하다는 것을 알 수 있었다.

또한, RS-I투여에 의해 혈청 BUN치가 저하되는 것, 그리고 뇨의 배설량이 증가하는 것으로부터, RS-I는 신장기능장애에도 개선작용이 있는 것을 알았다.

실시에 3: 갈락토사민(galactosamine) 간 장애의 랫트에 대한 영향

본 실시예에서는, 실시예 1에 있어서 DCA유발 모델과는 다른 작용 기작에 의한 간 장애에 대해서, RS-I투여의 영향을 조사하였다.

(1) 방법

Wister 수컷 5주령 랫트를 Charles River로부터 구입하고, 공조가 되는 사육실(온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 조명시간 오전 8시 ~ 오후 8시)에서 일주일간 예비사육하였다. 6주령이 되면 체중의 평균과 분포가 균등하도록 1군을 6마리씩 2군으로 나누고, 1군을 본 발명의 조성물 투여군, 다른 하나의 군은 대조군으로 하였다. 투여군에 대해서는 5% RS-I를 혼합한 MF 분말사료를, 대조군은 MF분말사료만을 투여하고, 3주간 수돗물과 함께 자유롭게 섭취하도록 하였다. RS-I 사료투여 3주째에 D-갈락토사민 염산염을 랫트의 체중 1kg당 500mg 투여할 만큼 조제한 수용액 약 1ml를 복강 내에 주사하였다. 갈락토사민 투여 후 1일, 2일, 3일 및 6일째에 꼬리의 정맥으로부터 혈액을 채취하고, 혈청 GOT, CHL, GLU, BUN치를 각각 측정하였다.

(2) 결과

갈락토사민 투여 후, 랫트의 혈청 GOT는 급속히 상승하고, 1일째의 대조군 혈청 GOT치는 5148 ± 1711 (Karmen)까지 상승하였다(참조: 도 5). 그러나, RS-I투여군에 1일째의 혈청 GOT치는 2244 ± 1241 (Karmen)이었다. 따라서, RS-I를 섭취하게 한 것보다 갈락토사민 투여에 의해서 GOT활성의 상승이 유의할 만큼 ($p < 0.05$)억제 되었다(참조: 도 5). 또한, 혈청 CHL, GLU, BUN치에 대해서는 RS-I투여에 의한 영향은 확인할 수가 없었다.

실시에 4: DMH대장발암 마우스에 대한 영향

본 실시예에서는 디메틸하이드라진(dimethylhydrazine, DMH) 유발 대장발암 마우스를 이용하여, 본 발명의 조성물의 발암억제 효과에 대하여 다음과 같은 실험을 행하였다.

(1) 방법

CF#1마우스(이화학연구소의 계통을 유지)를 교배하고, 수컷만 60마리를 사육하였다. 전기 계통의 마우스는 DMH에 고감수성이고, 특이적으로 대장폴립(polyp)이 유발되었다. 사육은 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 조명시간 오전 8시 ~ 오후 8시의 조건하에서 실시하고, 사육사료로서는 (주)오리엔탈 효모공업사제의 특수계 번식용 사료(CMF)를 수돗물

과 함께 자유롭게 투여하였다. 5주령이 될 때, 체중의 평균과 분포가 균등도록 1군에 각 20마리의 마우스를 사용하여 (참조: 도 6), 표 3에 기재된 3군(RS-II투여군, RS-I투여군 및 대조군)으로 나누고, 표 3에 표시한 투여량으로 섭취하게 함과 동시에, DMH용액을 마우스의 복강 내에 체중당 20mg을 주 1회, 10주에 걸쳐서 투여하였다. 또한, 대조군에 대해서는 CMF만을 투여하였다.

군명	투여량 (%)	마리수
대조군	-	20
RS-II 군	3	20
RS-I 군	5	20

상기 3군의 마우스에 대해서, DMH 투여 후 35주째(40주령)에 대장폴립의 발병을 관찰하였다.

(2) 결과

폴립의 발병률은 대조군에서 94%임에 비하여, RS-II를 투여한 군은 65%이었고, 투여군은 대조군과 비교할 때 유의할 만큼 ($p < 0.05$) 낮았다(참조: 도 7a). 그러나, RS-I 투여군으로는 폴립의 발병률이 94%이고, 대조군과의 차가 보여지지 않았다.

마우스당의 폴립 개수는 대조군으로 4.0 ± 2.7 개(평균 \pm 표준편차)임에 반해, RS-II 투여군으로 1.4 ± 1.5 개이고, RS-II 투여군은 대조군과 비교할 때 유의할 만큼 ($p < 0.01$) 적은 개수였다(참조: 도 7b). 또한, RS-I 투여군에서도 2.7 ± 1.9 개로서, 대조군과 비교하여 유의적으로 ($p < 0.05$) 적었다(참조: 도 7b). 중앙크기에 있어서는 대조군이 3.1 ± 1.8 mm인 것에 대해서, RS-II 투여군이 2.5 ± 1.3 mm로서, RS-II 투여군은 대조군과 비교할 때 유의할 만큼 ($p < 0.05$) 작은 중앙크기를 나타내었다(참조: 도 7c).

이상의 결과로부터, 본 발명의 조성물이 발암억제효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 5: 유산균생산물질의 항변이원성시험

변이원성이 있는 물질의 다수가 발암성이 있는 것으로 알려져 있다. 실시예 4의 결과로부터, 본 발명의 조성물이 대장암의 발생을 억제하는 것을 확인할 수 있었으므로, 본 발명의 조성물이 변이원형에 대해서도 억제효과가 있는 것을 시사되었다. 이하에서는, 본 발명의 조성물의 다음의 변이원성 물질에 대한 영향을 살펴보았다.

(1) 실험방법

① 변이원성 물질

4-니트로퀴놀린-1-옥사이드(4-nitroquinoline-1-oxide, 4NQO: $0.25 \mu\text{g}/\text{plate}$), N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG: $0.05 \mu\text{g}/\text{plate}$), 3-아미노-1-메틸-5H-피리도(4,3-b)인돌아세테이트(3-amino-1-methyl-5H-pyrido(4,3-b) indolacetate, Trp-P-2: $5 \mu\text{g}/\text{plate}$)를 각각 DMSO에 용해하였다.

또한, Trp-P-2는 생선의 구이와 같이 단백질과 아미노산을 태울 때 생성되는 물질이며, MNNG는 위암을 발생시키는 물질이다.

② 항변이원성시험

항변이원성시험은 에임스법(Ames method)을 채용하였다. 시험균주로 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) TA100(his+)주를 사용하였다. TA100주를 영양배지에 하룻밤 배양 후, Na-K 완충용액으로 세정하고, 균부유액의 최종농도가 2×10^9 /ml이 되도록 조제하였다. 그리고, RS-I건조물은 각 농도로 멸균수에 용해시켰다. 시험관에 각 농도의 RS-I 용액, 변이원 물질을 $100\mu\text{l}$, S9 믹스(mix) 또는 Na-K 완충용액을 0.5ml , 공시균액을 0.5ml 의 순으로 첨가하여, 37°C 에서 30분간 반응시킨 후, 원심분리하여 상등액을 덜어내고, 히스티딘(histidine) $1\mu\text{M}$ 과 바이오틴(biotin) $1\mu\text{M}$ 을 함유하는 연한 한천을 첨가하고, 최소의 글루코오스 한천배지에서 번식시켰다. 이를 37°C 에서 배양하고, 2 ~ 3일 후 콜론(colony)의 개수를 계측하였다.

(2) 결과

4NQO는 RS-I 농도 0.06mg/plate 에서 64%, MNNG는 같은 0.25mg/plate 에서 86%, Trp-P-2는 같은 0.5mg/plate 에서 72%의 돌연변이 억제율을 나타내었다(참조: 도 8). DMH, 벤조피렌(BP), DCA는 각각 $20\mu\text{g/plate}$, $20\mu\text{g/plate}$, $0.5\mu\text{g/plate}$ 의 농도까지 시험을 하였다. 이러한 물질에 의한 TA100주에서의 돌연변이 유발은 일어나지 않았고, RS-I의 억제력에 관계하는 것은 검출되지 않았다.

이상의 결과로, 본 발명의 조성물은 4NQO, MNNG 및 Trp-P-2에 대하여 항변이원 활성을 가지는 것을 알게 되었다.

실시에 6: 장내세균총 개선작용

본 실시예는 사람의 장내균의 균총(flora)을 개선, 즉, 장내의 비피더스균, 유산균 등의 유용한 균의 증가시켜, 대장균 등의 유해한 균의 증식을 억제함으로써, 인간의 건강증진에 기여하는 본 발명의 조성물의 장내균총 개선작용을 시험한 것이다.

(1) 실험방법

① 액체배지에 의한 항균성의 검사

호기성 균에 대해서는 Brain-Heart infusion 배지(Difco) 및 ABCM배지를 포함하는 배지(Eiken)를, 혐기성 균에 대해서는 GAM 배지(일수제약) 또는 헤민-메나디온(hemine-menadione)을 가한 GAM배지 및 ABCM 배지를 소형시험관에 각각 2ml 씩 분주하고, 같은 배지에 용해한 RS-I를 1%(w/v) 농도가 되도록 첨가하였다.

전배양한 소정의 균(표 4)을 포함하는 균액을 종(終)농도 1×10^5 개/ml이 되도록 희석하여 상기 배지에 첨가하고, 37°C 에서 18 ~ 24시간동안 배양하였다. 탁도는 마이크로플레이트 판독기(Bio-Rad사, 모델 3550)을 사용하고, 655nm 에서의 흡광도를 측정하고, 증식의 비율을 대조의 탁도를 100으로 했을 때의 상대치로 표시하였다.

(2) 결과

표 4의 결과로부터, 본 발명의 조성물은 1%농도에 있어서, 비피더스균, 유산간균 등의 유용균에 대해 증식촉진작용을 나타내었다(참조: 표 4의 상단). 대장균과 박테로이드(Bacteroides) 등의 유해균에 대한 증식을 억제하는 작용이 확인되었다(참조: 표 4의 하단).

균주	증식비 (%)
<i>Bifidobacterium longum</i> E1946	206
<i>Bifidobacterium infantis</i> 12	187
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 560	132
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1149	360
<i>Lactobacillus acidophilus</i> I-65	118
<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM1112	302
<i>Escherichia coli</i> 123	58
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM2413	31
<i>Streptococcus pyogenes</i> JCM5674	53
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	44
<i>Streptococcus mutans</i> JCM5705	49
<i>Clostridium perfringens</i> JCM3816	72
<i>Bacteroides coagulans</i> ATCC 29798	38
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 381	53

본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허출원을 그 자체 참고로 하여서 본 명세서에 도입하였다

산업상 이용 가능성

본 발명에 의해, 유산균과 효모의 혼합 미생물의 배양물, 또는 그의 처리물을 포함하는 조성물 및 전기 조성물을 포함하는 기능성 식품이 제공된다. 본 발명의 조성물은 인간의 장내에 있는 비피더스균, 유산균 등의 유용한 균에 대해 증식을 촉진하고, 대장균 등의 유해한 균에 대하여 증식억제효과를 기대할 수 있으므로, 인간의 건강증진에 공헌하는 바가 대단히 크다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

(i) 콩 열수추출액에 락토바실러스 델브루에키(*Lactobacillus delbrueckii*) subsp. *bulgaricus* ALAL007, 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) ALAL003, 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) subsp. *hordniae* ALAL008을 각각 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /ml로, 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) ALAY003을 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ /ml로 접종하고, 각각 20 ~ 37℃에서 2 ~ 5일간 배양하는 단계;

(ii) 전기 4주의 미생물이 각각 배양된 배양액을 새로운 콩 열수추출액에 혼합하고, 다시 20 ~ 37℃에서 2 ~ 5일간 배양하는 단계;

(iii) 전기 혼합배양액을 가열살균하고, 냉동건조시켜 배양물을 수득하는 단계를 포함하는 기능성 배양물의 제조방법.

청구항 11.

(i) 콩 열수추출액에 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) ALAL005, 락토바실러스 람노스(*Lactobacillus rhamnosus*) ALAL004, 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) subsp. *hordniae* ALAL009를 각각

$1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /ml로, 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) ALAY004를 $14 \sim 1 \times 10^5$ /ml로 접종하고, 각각 20 ~ 37℃에서 2 ~ 5일간 배양하는 단계;

(ii) 전기 4주의 미생물이 각각 배양된 배양액을 새로운 콩 열수추출액에 혼합하고, 다시 20 ~ 37℃에서 2 ~ 5일간 배양하는 단계;

(iii) 전기 혼합배양액을 가열살균하고, 냉동건조시켜 배양물을 수득하는 단계를 포함하는 기능성 배양물의 제조방법.

청구항 12.

(i) 콩 열수추출액에 락토바실러스 플랜타룸(*Lactobacillus plantarum*) ALAL006, 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) ALAL002, 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) ALAL011을 각각 $1 \times 10^5 \sim 1$

$\times 10^6$ /ml로, 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) ALAY001을 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ /ml로 접종하고, 각각 20 ~ 37℃에서 2 ~ 5일간 배양하는 단계;

(ii) 전기 4주의 미생물이 각각 배양된 배양액을 새로운 콩 열수추출액에 혼합하고, 다시 20 ~ 37°C에서 2 ~ 5일간 배양하는 단계;

(iii) 전기 혼합배양액을 가열살균하고, 냉동건조시켜 배양물을 수득하는 단계를 포함하는 기능성 배양물의 제조방법.

청구항 13.

(i) 콩 열수추출액에 락토바실러스 페르멘텀(Lactobacillus fermentum) ALAL001, 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus) ALAL010, 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus) ALAL012를 각각 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /ml로, 사카로마이세스 세레비시에(Saccharomyces cerevisiae) ALAY002를 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ /ml로 접종하고, 20 ~ 37°C에서 2 ~ 5일간 배양하는 단계;

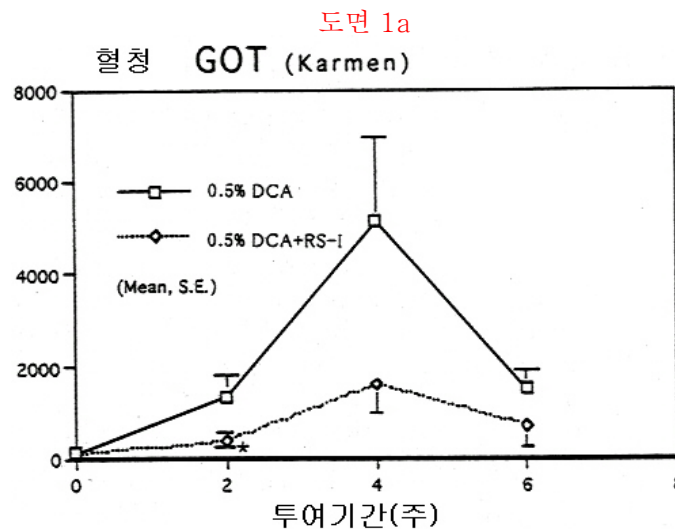
(ii) 전기 4주의 미생물이 각각 배양된 배양액을 새로운 콩 열수추출액에 혼합하고, 다시 20 ~ 37°C에서 2 ~ 5일간 배양하는 단계;

(iii) 전기 혼합배양액을 가열살균하고, 냉동건조시켜 배양물을 수득하는 단계를 포함하는 기능성 배양물의 제조방법.

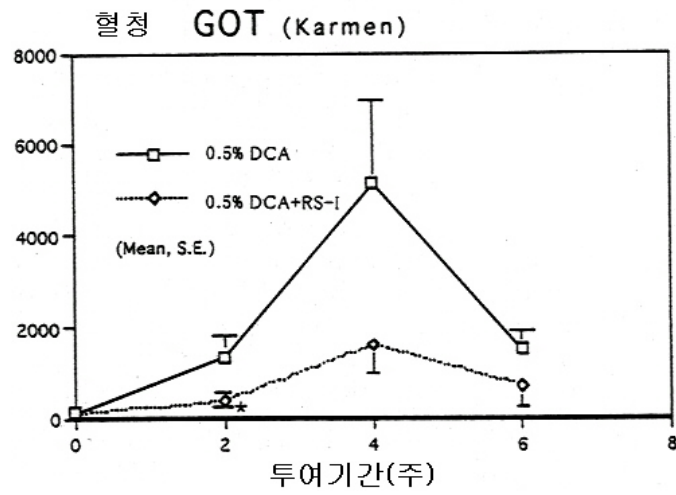
청구항 14.

제 10항 내지 13항의 어느 한 항에 기재된 제조방법에 의하여 제조된 배양물을 식품에 대하여 0.1 내지 1중량%로 첨가하는 단계를 포함하는 기능성 식품의 제조방법.

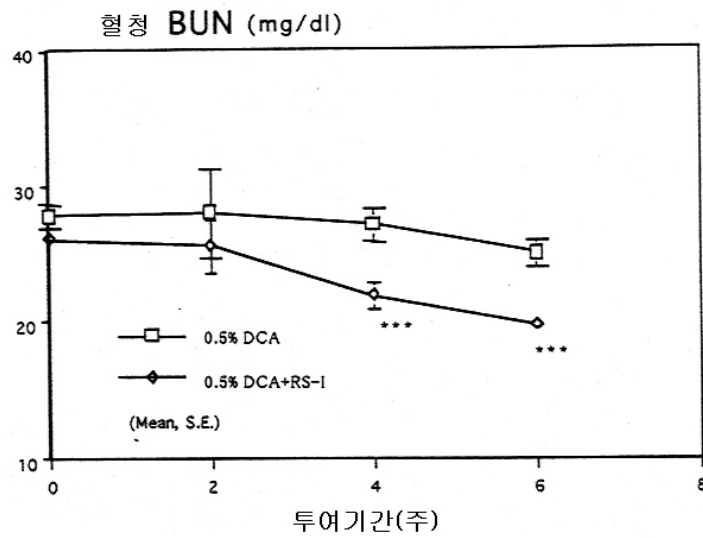
도면



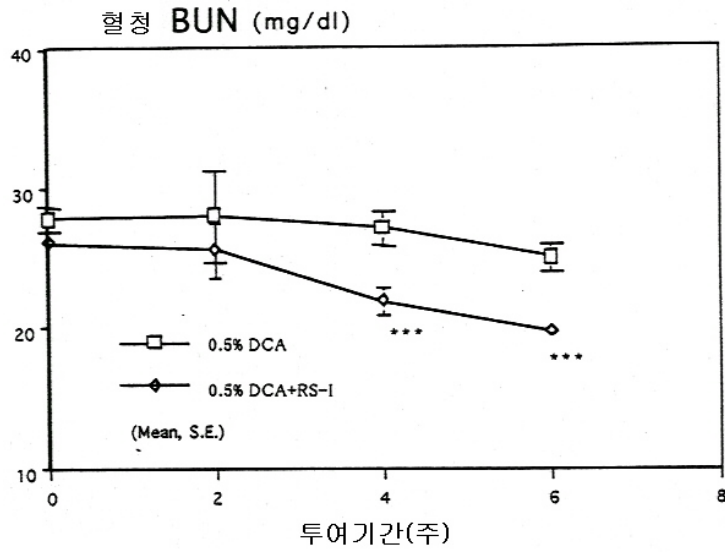
도면 1b



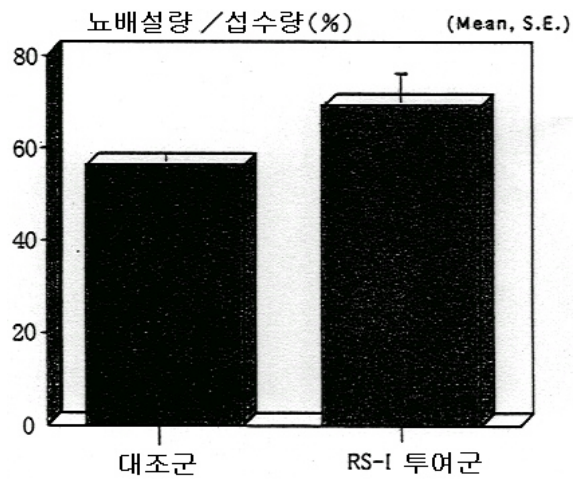
도면 2



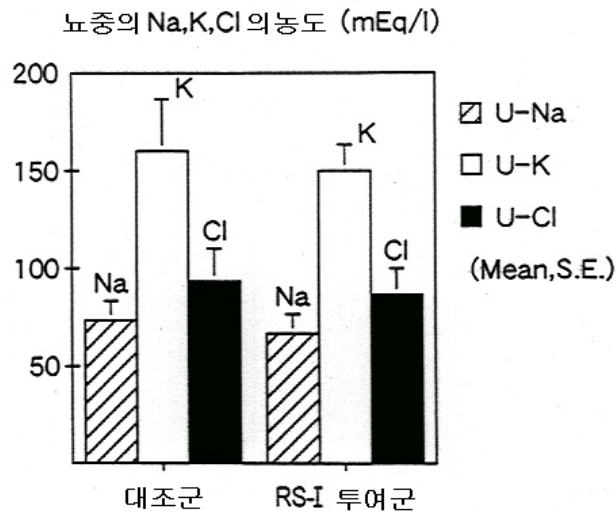
도면 3a



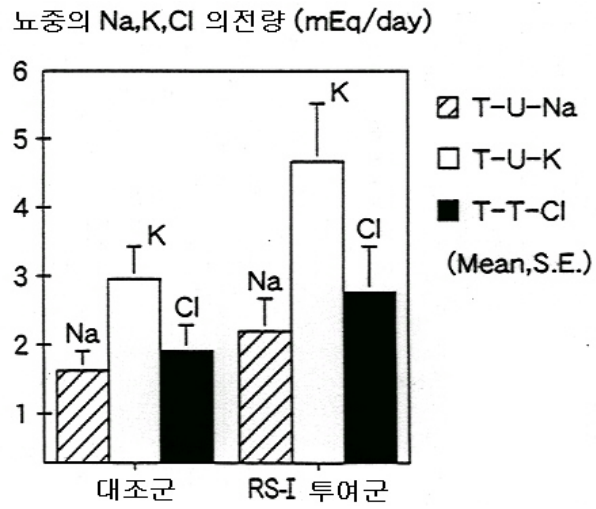
도면 3b



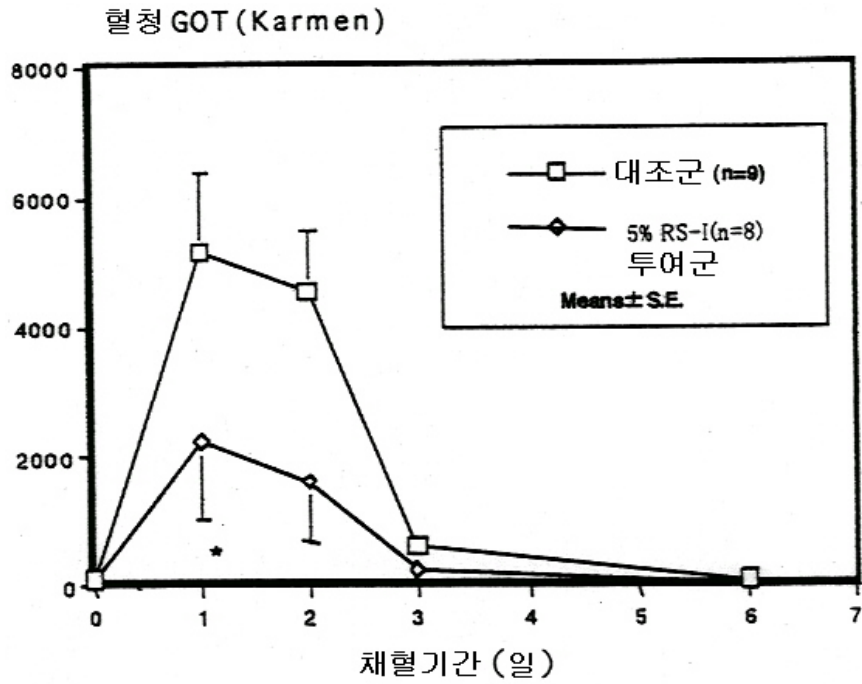
도면 4a



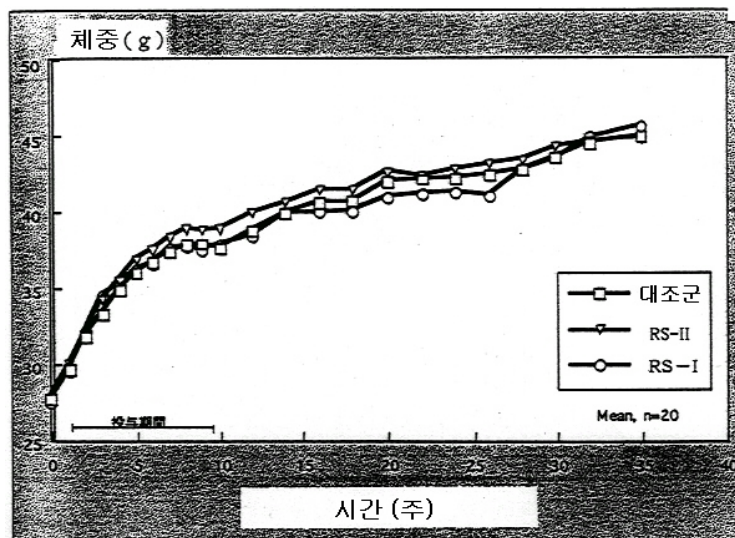
도면 4b



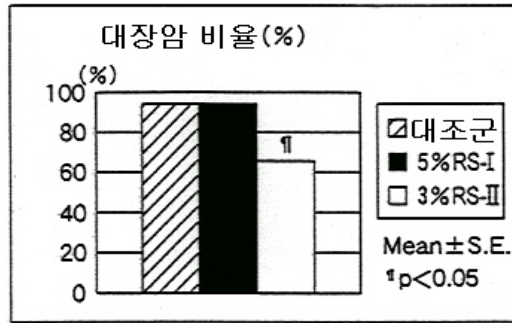
도면 5



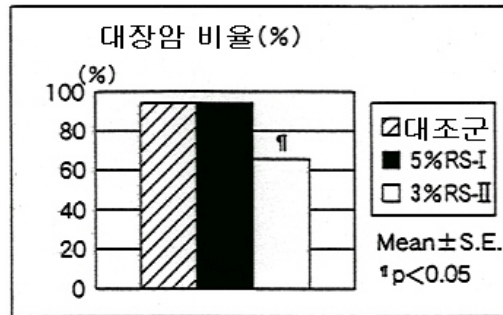
도면 6



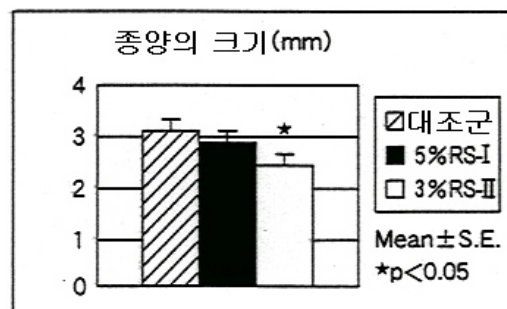
도면 7a



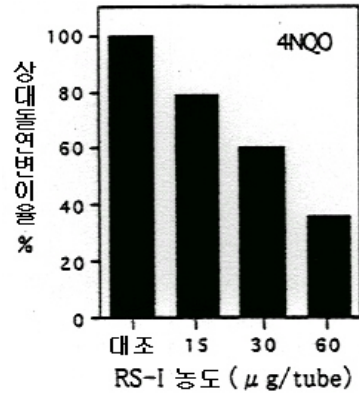
도면 7b



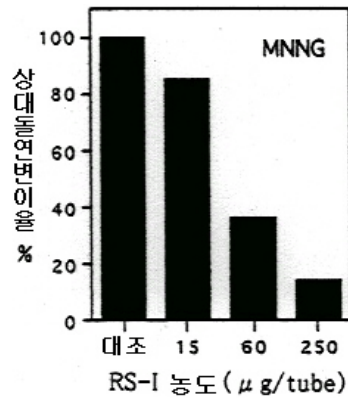
도면 7c



도면 8a



도면 8b



도면 8c

