



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년12월23일
(11) 등록번호 10-1098241
(24) 등록일자 2011년12월19일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0107617

(22) 출원일자 2009년11월09일

심사청구일자 2009년11월09일

(65) 공개번호 10-2011-0050987

(43) 공개일자 2011년05월17일

(56) 선행기술조사문헌

KR101024950 B1

(73) 특허권자

주식회사한국야쿠르트

서울 서초구 잠원동 28-10

(72) 발명자

안영태

경기 수원시 권선구 세류동 1147 미영아파트 109동 312호

명길선

경상북도 포항시 북구 장성동 창포청구타운 105동 701호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최익하, 경일호

전체 청구항 수 : 총 16 항

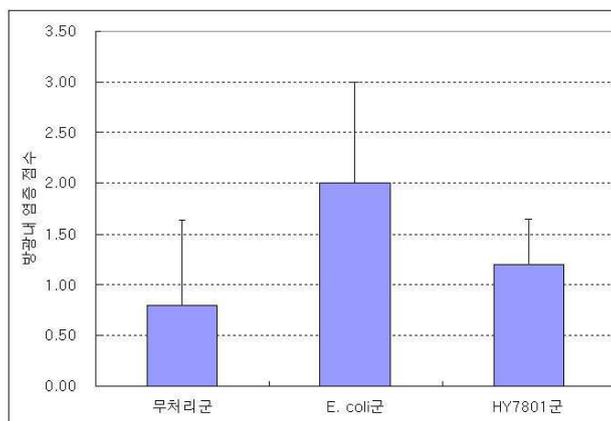
심사관 : 김민정

(54) **요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 에스피. 에이취와이 7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 제형**

(57) 요약

본 발명은 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품에 관한 것으로서, 락토바실러스 sp. HY7801은 요로감염균인 대장균(*E. coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*)을 억제하고, 요로감염균 *E. coli*의 방광상피세포에 부착을 억제하는 활성을 나타내며, *E. coli*를 감염시킨 요로감염 실험동물모델에서 방광염증을 억제하는 활성을 나타내고, 칸디다성 질염을 일으키는 카디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 억제하는 활성을 나타내며, 항균물질인 과산화수소 생성능이 우수하고, 질 상피세포에 부착 활성이 우수하여 요로감염과 칸디다성 질염의 치료 및/또는 예방을 목적으로 한 정장제, 발효식품 또는 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이정희

서울 광진구 자양3동 대동아파트 102동 1708호

허철성

충청남도 천안시 동남구 신부동 대림한들아파트
201-204호

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

요로감염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 요로감염 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 9

대장균(*E. coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*) 중 어느 하나 이상을 억제하거나 대장균(*E. coli*)의 방광상피세포에의 부착을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 요로감염 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 10

칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 칸디다성 질염 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 11

칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 억제하는 활성을 갖거나 질 상피세포 부착 활성이 우수한 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 칸디다성 질염 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 12

요로감염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 요로감염 예방용 발효유.

청구항 13

대장균(*E. coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*) 중 어느 하나 이상을 억제하거나 대장균(*E. coli*)의 방광상피세포에의 부착을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 요로감염 예방용 발효유.

청구항 14

칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 칸디다성 질염 예방용 발효유.

청구항 15

칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 억제하는 활성을 갖거나 질 상피세포 부착 활성이 우수한 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 칸디다성 질염 예방용 발효유.

청구항 16

요로감염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 요로감염 예방용 기능성 음료.

청구항 17

대장균(*E. coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*) 중 어느 하나 이상을 억제하거나 대장균(*E. coli*)의 방광상피세포에의 부착을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 요로감염 예방용 기능성 음료.

청구항 18

칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 칸디다성 질염 예방용 기능성 음료.

청구항 19

칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 억제하는 활성을 갖거나 질 상피세포 부착 활성이 우수한 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 칸디다성 질염 예방용 기능성 음료.

청구항 20

요로감염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 요로감염 예방용 건강기능식품.

청구항 21

대장균(*E. coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus*

fecalis), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*) 중 어느 하나 이상을 억제하거나 대장균(*E. coli*)의 방광상피세포에의 부착을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 요로감염 예방용 건강기능식품.

청구항 22

칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 칸디다성 질염 예방용 건강기능식품.

청구항 23

칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 억제하는 활성을 갖거나 질 상피세포 부착 활성이 우수한 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호: KCTC 11315BP)을 유효성분으로 함유하는 칸디다성 질염 예방용 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 요로감염균인 대장균(*E. coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus fecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*)을 억제하고, 요로감염균 대장균(*E. coli*)의 방광상피세포에 부착을 억제하는 활성을 나타내며, 칸디다성 질염을 일으키는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 억제하는 활성을 나타내고, 항균물질인 과산화수소 생성능이 우수하며, 질 상피세포에 부착 활성이 우수하여 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성 가지는 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 요로감염(Urinary tract infection, UTI)은 여성에서는 일생 동안 어느 시기에나 발병하고 남성에서는 유아기나 노령에서 자주 발생하며, 요로 감염증에는 방광염, 신우신염, 무증상 세균뇨, 그리고 신장결석과 도뇨관과 관련된 합병증으로서의 감염과 재발성 요로 감염증이 포함된다. 특히 소아 연령에서 가장 흔한 세균 감염성 질환 중 하나로서, 1세 이하 영아의 경우 발열원인의 약 5% 정도를 차지할 정도로 흔한 질환이다. 요로감염 원인 규명이 되지 않은 상태에서 반복될 경우 진행성 신 질환을 유발시켜 영구적 신장 장애를 초래할 수 있으므로, 요로감염의 조기 진단과 치료는 매우 중요하다. 소아 요로감염의 원인균은 *E. coli*, *Proteus* spp., *Klesielle* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, Group B streptococcus, *Salmonella* 등이 있으며, 이 중에서 대장균(*E. coli*)이 80% 이상을 차지하여 가장 중요한 원인균으로 알려져 있다. 대장균은 임상 및 유전적 정보에 따라 세 군으로 분류할 수 있다. 즉, 장내 상주균으로 숙주의 면역결함, 관 삽입 등의 환경적 변화에서만 병원성으로 전환 될 수 있는 상주 균주(commensal strains), 장염을 주로 일으키는 장 균주(intestinal strains, 6종의 병원성으로 분류)와 모든 연령과 모든 장기에 다양한 감염을 일으키며 특히 요로감염의 주된 병원성을 지닌 장외 균주(extarintestinal strains)로 분류된다.

[0003] 국외의 경우 최근 장외 병원성 대장균에 의한 요로감염에서 항생제에 대한 내성 문제가 심각히 대두되고 있다. 과거에 대장균은 아미노페니실린(aminopenicillin)계 베타 락탐계 항생제에 감수성이 높아 경구용 베타 락탐계 아미노페니실린 항생제인 암피실린(ampicillin), 아목시실린(amoxicillin) 등의 항생제가 일차 선택 약제이었으나 최근 여러 연구결과에서 이들 항생제에 대한 내성이 현저히 높아졌음을 보고하였고, 더불어 일부 세팔로스포

린제 및 퀴놀론 항생제와 설파 항생제에도 내성을 보이는 다제내성이 매우 큰 문제로 대두되고 있다. 그리고 요로감염을 일으키는 대장균 중에 최근 페니실린, 3세대 세팔로스포린제, 모노박탐 등의 항생제들도 가수분해하는 기질확장성 베타-락타메이즈{extended spectrum beta-lactamase(ESBL)} 생성균이 증가하는 문제점이 지적되고 있다.

[0004] 질염은 여성 인구의 약 3/4이 살아가면서 한번 이상은 걸리는 곰팡이균의 감염에 의한 질병으로서 크게 3가지 주요 원인으로 나뉘는데, 세균성 질염(Bacterial vaginosis, BV), 칸디다증 (Candida vaginitis, CV), 트리코모나스 질염(Trichomonas vaginalis)이다. 이 중에서 세균성 질염은 최근 가장 흔한 질염으로 인식되고 있으며, 세균성 질염 환자로부터 분리한 질 분비물에서는 *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* sp., *Gardnerella vaginalis*, *Eggerthella* sp., *Clostridium*-like sp., *Prevotella bivia* group, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella* sp. 등이 발견된 것으로 보고된 바 있으며, 특히 *Gardnerella vaginalis*는 주요 원인균으로 알려져 있다.

[0005] 최근에 프로바이오틱 유산간균(*Lactobacilli*)를 이용한 요로감염 예방에 관한 가능성이 보고 되었는데, 특히 동물실험에서 락토바실러스 카제이 시로타(*Lactobacillus casei shirota*)가 요로감염의 원인균인 대장균에 대한 항균활성을 나타내며, 요로감염에 대한 치료제로 활용 가능성이 있음이 보고되었다.

[0006] 한편, 여성의 질내에 우점하고 있는 유산간균이 세균성 질염과 요로감염의 위험을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 건강한 여성의 질은 다양한 종류의 유산간균이 군집하면서 질내 pH를 4.5이하로 유지하여 다른 병원성 미생물의 성장을 억제하는 가장 중요한 방어 수단으로 알려져 있다. 특히 세균성 질염 환자들에서는 *Staphylococcus* sp., *Clostridium* sp., *Prevotella* sp., *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* 등이 주로 분포한 반면 정상인에서는 *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus acidophilus* 등이 주로 분포하였으며, 칸디다증 환자에서는 *L. acidophilus*의 분포가 매우 낮은 것으로 보고되었다. 이러한 프로바이오틱 유산간균의 질염 또는 요로감염 억제효과의 기전은 원인균에 대한 adhesion receptors에 대한 경쟁, 영양소에 대한 경쟁, 그리고 유산간균이 생산하는 과산화수소(H₂O₂) 젖산, 박테리오신, 그리고 기타 항균물질에 의한 것으로 보고되었다. 항생제에 의한 질염의 치료는 재발 가능성이 매우 높기 때문에, 질내 유산간균이 우점하는 것을 유도함으로써 질염 치료를 병행하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 이러한 요로감염 및 질염의 예방과 치료에 관한 대표적인 유산균주로는 *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, *Lactobacillus fermentum* RC-14 등이 많이 연구되어 있으며, 현재 *L. rhamnosus* GG(Valio), *L. acidophilus* NCFM(Rhodia), *L. casei* DN-114(Actimel), *L. acidophilus* SIDU(SIDU Enterprises), *L. johnsonii* LJ1(Nestle), 그리고 *L. plantarum* 299V(Probi)가 urogenital 프로바이오틱 유산간균(*Lactobacilli*)으로 알려져 있으며, 최근에도 여성의 질에서 다양한 유산균을 분리하여 프로바이오틱 효과를 확인하는 연구가 진행되고 있다.

[0007] 한편, 유산균은 인간의 구강, 장, 질, 분변 등에 널리 분포한다. 따라서, 이들로부터 유산균을 분리하여 그 특성을 시험함으로써 원하는 성질을 갖는 유산균을 획득하는 방법이 행해지고 있으며, 특히 분변으로부터 유산균을 분리하는 방법이 유용하게 사용되고 있다. 이에 본 발명자들은 숙주 특이성의 관계에서 유산균의 유용한 효과의 극대화를 고려하여 한국인의 생리에 맞는 발효제품을 제조하는데 적합한 균주를 분리하고자 한국 성인 및 신생아의 분변으로부터 유산균을 분리하여 시험하던 중, 돌연변이 유발원 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*)의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4를 억제함으로써 대장내 돌연변이원 억제, 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능이 우수한 특성을 가진 신규 유산균인 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801을 발견하여 대한민국 특허출원 제10-2008-0057422호(발명의 명칭: 대장의 건강 증진 효능을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품)를 하였고, 이에 더하여 본 발명자들은 상기 미생물이 요로감염균과 칸디다 알비칸스를 억제하는 활성을 갖는 것을 새로이 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명은 요로감염균인 대장균(*E. coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*)을 억제하고, 요로감염균 *E. coli*의 방광상피세포에 부착을 억제하며, 항균물질인 과산화수소 생성능이 우수하여 요로감염을 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 칸디다성 질염을 일으키는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 억제하는 활성을 나타내며, 질 상피세포에 부착 활성이 우수하고, 항균물질인 과산화수소 생성능이 우수하여 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 요로감염균인 대장균(*E. coli*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*)을 억제하고, 요로감염균 *E. coli*의 방광상피세포에 부착을 억제하며, 항균물질인 과산화수소 생성능이 우수하여 요로감염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 칸디다성 질염을 일으키는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 억제하는 활성을 나타내며, 질 상피세포에 부착 활성이 우수하고, 항균물질인 과산화수소 생성능이 우수하여 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명에 따른 균주를 분리하기 위하여 건강한 한국인 성인 및 신생아의 분변을 0.02% 소듐 아지드(sodium azide)가 포함된 엠알에스(MRS) 액체 배지에 넣고 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양후 10μl 백균이를 사용하여 배양액을 취하여 다시 0.02% 소듐 아지드가 포함된 엠알에스 한천평판배지에 도말하고 37℃에서 2일간 배양하였다. 이렇게 형성된 균락 중에서 돌연변이 유발원 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*)의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4를 억제함으로써 대장내 돌연변이원 억제, 유해균 억제 및 염증발생 억제 활성을 시험하여 본 발명의 균주를 분리하였다.

[0014] 본 발명에 따른 유산균의 특성은 다음과 같다.

[0015] 1)균의 형태

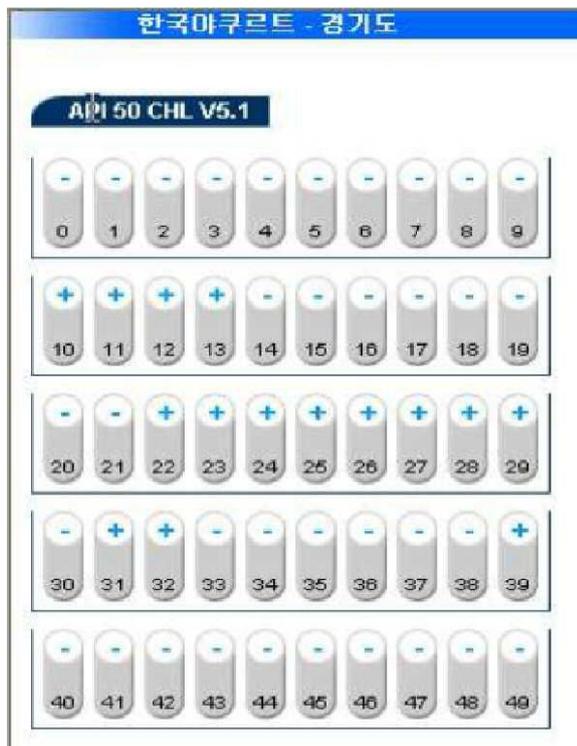
[0016] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성

[0017] ①세포의 형태: 간균

[0018] ②운동성: 없음

- [0019] ③포자형성능: 없음
- [0020] ④그람(Gram) 염색: 양성
- [0021] 2)균락의 형태
- [0022] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균락의 형태
- [0023] ①형상: 원형
- [0024] ②융기: 불록
- [0025] ③표면: 매끄러움(Smooth)
- [0026] 3)생리적 성질
- [0027] ①최적 생육온도: 36~38℃
- [0028] ②최적 생육 pH: 6.0~6.5
- [0029] ③산소에 대한 영향: 통성혐기성
- [0030] 4)카탈라제: -
- [0031] 5)가스형성여부: -
- [0032] 6)15℃에서 생육: -
- [0033] 7)45℃에서 생육: +
- [0034] 8)인돌생산: -
- [0035] 9)젖산생산: +
- [0036] 10)당이용성 검사
- [0037] Api 50CHL kit(BIOMERIEUX)을 이용하여 당이용성 검사를 하였다.
- [0038] 그 결과를 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1



[0039]

표 2

HY7801

GOOD IDENTIFICATION TO THE GENUS	
스트립	API 50 CHL V5.1
숫자화된 생화학적 패턴++++.....++++.....
참고 사항	

동정 결과	% ID	T Index	상반되는 생화학적 특성(Test against)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i> 2	52.3	0.94	GAL 20%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1	40.3	1.0	

[0040]

[0041]

11)16S rDNA 분석

[0042]

16S rDNA 분석을 통한 분자유전학적인 방법을 실시하여 본 발명의 신균주를 동정하였다.

[0043]

16S rDNA 염기 서열 분석 결과를 표 3에 나타내었다(<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>).

[0044]

표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 신균주의 16S rRNA 유전자는 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 선토리우스(*Lactobacillus suntoryeus*) 및 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*)의 16S rRNA 유전자와 100% 일치하는 것으로 확인되었다.

표 3

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident	Links
AY78490.1	Lactobacillus acidophilus strain UHS 16S ribosomal RNA gene, partial s	2610	2610	100%	0.0	100%	
AY675251.1	Lactobacillus sanitorreyus strain UHS 16S ribosomal RNA gene, complet	2610	2610	100%	0.0	100%	
AY644397.1	Lactobacillus sanitorreyus strain #4 16S ribosomal RNA gene, partial se	2604	2604	100%	0.0	99%	
AY029223.1	Lactobacillus sp. Y1.0 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	
AY445815.1	Lactobacillus sanitorreyus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	
AY675249.1	Lactobacillus sanitorreyus strain UH 16S ribosomal RNA gene, complete	2599	2599	100%	0.0	99%	
AY78491.1	Lactobacillus acidophilus strain UH4 16S ribosomal RNA gene, partial s	2593	2593	100%	0.0	99%	
AY675250.1	Lactobacillus sanitorreyus strain UH4 16S ribosomal RNA gene, complet	2593	2593	100%	0.0	99%	
EF531999.1	Lactobacillus sanitorreyus strain IDCC 3101 16S ribosomal RNA gene, c	2577	2577	100%	0.0	99%	
EU420177.1	Lactobacillus helveticus strain GMR558 16S ribosomal RNA gene, part	2571	2571	100%	0.0	99%	
A417737.1	Lactobacillus kalifornium partial 16S rRNA gene and internal transcribe	2571	2571	100%	0.0	99%	
EU493108.1	Lactobacillus helveticus strain LIB 16S ribosomal RNA gene, partial se	2566	2566	100%	0.0	99%	
EU419518.1	Lactobacillus helveticus strain KIDS 1.0614 16S ribosomal RNA gene,	2566	2566	100%	0.0	99%	
EU419517.1	Lactobacillus helveticus strain KIDS 1.0612 16S ribosomal RNA gene,	2566	2566	100%	0.0	99%	
EU377824.1	Lactobacillus helveticus strain CD9 16S ribosomal RNA gene, partial s	2566	2566	100%	0.0	99%	
EF531981.1	Lactobacillus helveticus strain ZL12-1 16S ribosomal RNA gene, partia	2566	2566	100%	0.0	99%	
EU419516.1	Lactobacillus helveticus strain KIDS 1.0603 16S ribosomal RNA gene,	2560	2560	100%	0.0	99%	
EU377823.1	Lactobacillus helveticus strain CD6 16S ribosomal RNA gene, partial s	2560	2560	100%	0.0	99%	
AB08210.1	Lactobacillus helveticus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: 1	2560	2560	100%	0.0	99%	
CP000517.1	Lactobacillus helveticus DPC 4571, complete genome	2560	1.024e+04	100%	0.0	99%	
EU18494.1	Lactobacillus helveticus strain D5401 16S ribosomal RNA gene, partial	2560	2560	100%	0.0	99%	
AB362629.1	Lactobacillus helveticus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: 1	2560	2560	100%	0.0	99%	
AY369116.1	Lactobacillus helveticus strain NCIMB 11971 16S ribosomal RNA gene	2560	2560	100%	0.0	99%	
AH113779.1	Lactobacillus helveticus partial 16S rRNA gene, strain type strain DSM	2560	2560	100%	0.0	99%	

[0045]

[0046]

이상에서 같은 본 발명의 신균주의 형태학적 특성, 생리적 및 성장 특성, Api 50CHL kit(BIOMERIEUX)의 당이용성 및 16S rDNA 분석을 통한 분자유전학적인 방법에 근거하여 동정한 결과, 본 발명의 신균주는 락토바실러스속(Genus of Lactobacillus)에 속하는 것으로 확인되었으나, 종(species)까지는 동정하지 못하였다.

[0047]

따라서 본 발명자들은 본 발명의 신균주를 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2008년 4월 17일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC 11315BP).

[0048]

한편, 본 발명의 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 요로감염과 칸디다성 질염 치료 및 예방용 약학적 조성물은 단독 또는 약제학적으로 사용되는 부형제들과 함께 약제학적으로 통상적으로 사용되는 방법에 따라 정제, 캡슐제 등과 같은 제제형태로 제제화하여 사용될 수 있다.

[0049]

사람의 경우, 통상적인 1일 투여량은 1~30mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 실제 투여량은 투여경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 건강상태 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다. 물론, 본 발명의 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 요로감염과 칸디다성 질염 치료 및 예방용 약학적 조성물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0050]

또한, 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 요로감염과 칸디다성 질염 예방용 발효유는 유산균배양액, 락토바실러스 sp. HY7801 및 혼합과즙시럽을 일정비율

로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 발효유를 제조한다.

[0051] 또한, 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 요로감염과 칸디다성 질염 예방용 음료는 혼합과즙시럽, 락토바실러스 sp. HY7801 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성 음료를 제조한다.

[0052] 또한, 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 요로감염과 칸디다성 질염 예방용 건강기능식품은 상기 락토바실러스 sp. HY7801을 포함하는 것 이외에 영양보조 성분으로서 비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아마이드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

효 과

[0053] 이상에서와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 요로감염균인 대장균, 프로테우스 불가리스, 프로테우스 미라빌리스, 크렙시엘라 옥시토카, 크렙시엘라 뉴모니아, 모르가넬라 모르가니, 사이트로박터 프렌디, 엔케로코쿠스 피칼리스, 엔테로박터 클로아카, 슈도모나스 애루기노사, 스트렙토코쿠스 아우레우스, 아시네토박터 반마니을 억제하고, 요로감염균 *E. coli*의 방광상피세포에 부착을 억제하는 활성을 나타내며, *E. coli*를 감염시킨 요로감염 실험동물모델에서 방광염증을 억제하는 활성을 나타내고, 칸디다성 질염을 일으키는 칸디다 알비칸스를 억제하는 활성을 나타내며, 항균물질인 과산화수소 생성능이 우수하고, 질 상피세포에 부착 활성을 통하여 요로감염과 칸디다성 질염 치료 및 예방을 목적으로 한 정장제, 발효식품 또는 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0054] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.

[0055] <실시예 1>

[0056] 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 제조

[0057] 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 식품원료용 Proteose peptone #3, Yeast Extract, Beef Extract, 그리고 포도당을 첨가한 액체배지를 제조하여 37℃에서 약 20시간 배양한 후 배양액을 원심분리하고 멸균된 생리식염수로 세척한 다음 멸균유에 분산하였다. 다시 동결 건조하여 동결건조 분말 그램(g)당 약 10¹¹cfu 균수를 얻었다. 이 동결건조 분말을 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 요로감염과 칸디다성 질염 치료 및 예방 소재로 사용하였다.

[0058] 한편 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 상기와 같이 동결건조된 분말 형태 또는 배양물 형태로 제공될 수 있다.

[0059] <실시예 2>

[0060] 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조

[0061] 본 발명의 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

- [0062] 정제의 제조
- [0063] 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 폴리비닐피롤리돈 97mg을 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 2mg을 가하여 혼합한 후 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.
- [0064] 캡슐제의 제조
- [0065] 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 100mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 완전히 혼합한 후 통상의 캡슐제의 제조 방법에 따라서 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0066] <실시예 3>
- [0067] 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0068] 유산균 배양액과 본 발명의 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801 및 혼합과즙시럽으로 구성된 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0069] 먼저, 유산균 배양액은 원유 95.36중량%와 탈지분유(또는 혼합분유) 4.6중량%를 교반하여 15℃에서의 비중은 1.0473~1.0475, 적정산도는 0.200~0.220%, pH는 6.65~6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix^o)는 16.3~16.5%정도가 되도록 혼합하였다. 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 40℃로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP 배지에서의 총 유산균수가 1.0×10^9 cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.
- [0070] 그 다음, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix^o 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0071] 그런 다음, 상기 유산균배양액 69.5중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.
- [0072] <실시예 4>
- [0073] 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0074] 본 발명의 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801과 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0075] 먼저, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix^o 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0076] 그리고 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 요로감염과 칸디다성 질염을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.

- [0077] <실시에 5>
- [0078] 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0079] 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아마이드) 및 올리고당을 상기의 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물에 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 40~50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12~14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.
- [0080] <시험예 1>
- [0081] 락토바실러스 sp. HY7801의 요로감염균 E. coli ATCC25922 억제활성 측정
- [0082] (1)락토바실러스 sp. HY7801은 엠알에스 액체배지(Difco, USA)를 이용하여 37℃에서 20시간 배양하여 시험에 사용하였으며, 요로감염의 주 원인균인 E. coli ATCC25922는 Tryptic Soy 액체배지(Difco, USA)에 접종하여 37℃에서 20시간 진탕배양하여 시험에 사용하였다.
- [0083] (2)락토바실러스 sp. HY7801의 E. coli ATCC25922 억제 활성 측정방법은 다음과 같다.
- [0084] 멸균된 페트리 접시에 멸균된 metal borer(지름 6mm)를 well을 만들 위치에 배열한 후 엠알에스 한천배지(Difco, USA)를 28ml씩 넣어 균형 well을 만들었다. 배지가 완전히 굳은 후, 상기 (1)의 20시간 배양된 E. coli를 Tryptic Soy soft 한천배지에 5 μ l/ml 접종한 다음 5ml씩 엠알에스 한천평판배지에 중층하여 굳혔다. Metal borer를 제거하고 엠알에스 한천배지를 각 well에 50 μ l씩 넣어 바닥을 막은 다음 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801 배양액 100 μ l을 멸균 증류수 100 μ l와 혼합한 후 각 well에 접종하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 생성된 억제환의 크기를 측정하였다.
- [0085] 락토바실러스 sp. HY7801에 의한 E. coli ATCC25922의 억제 활성은 생성된 억제환의 지름에서 metal borer의 지름을 빼고 길이(mm)로 나타내었다.
- [0086] (3)락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) BS-1, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) YS-I9, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. L260, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. L266, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. S3-6, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) LCW, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. 7-3wy1, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) J2-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM1-5, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM5-10, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM6-5R, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM7-3, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM8-21w, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) GR-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH1-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH7-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH9-2, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH10-1, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7211, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH16-2W2, 그리고 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KM5-5에 대하여도 상기 (2)의 락토바실러스 sp. HY7801의 E. coli ATCC25922의 억제 활성 측정방법과 동일한 방법으로 E. coli ATCC25922의 억제 활성을 시험하였다.
- [0087] 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0088] 도 1의 세로축은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) BS-1, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) YS-I9, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. L260, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. L266, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. S3-6, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) LCW, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. 7-3wy1, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) J2-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM1-5, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM5-10, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM6-5R, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM7-3, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp.

RM8-21w, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) GR-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH1-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH7-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH9-2, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH10-1, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7211, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH16-2W2, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KM5-5를 각각 'BS-1', 'YS-I9', 'L260', 'L266', 'S3-6', 'HY7801', 'LCW', '7-3wy1', 'J2-1', 'RM1-5', 'RM5-10', 'RM6-5R', 'RM7-3', 'RM8-21w', 'GR-1', 'CH1-1', 'CH7-1', 'CH9-2', 'CH10-1', 'HY7211', 'CH16-2W2' 및 'KM5-5'로 표시하였다.

[0089] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801의 *E. coli* ATCC25922의 억제환의 크기가 6.7mm로 가장 크게 나타나 시험한 유산균들 중에서 요로감염균 *E. coli* ATCC25922에 대한 억제활성이 가장 큰 것으로 확인되었다.

[0090] <시험예 2>

[0091] 락토바실러스 sp. HY7801의 기타 요로감염균들 억제활성 측정

[0092] (1) 락토바실러스 sp. HY7801은 엠알에스 액체배지를 이용하여 37°C에서 20시간 배양하여 시험에 사용하였으며, 국내 요로감염 환자에서 분리된 요로감염균인 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*)을 Tryptic Soy 액체배지에 접종하여 37°C에서 20시간 진탕배양하여 시험에 사용하였다.

[0093] (2) 락토바실러스 sp. HY7801의 기타 요로감염균들 억제 활성 측정방법은 다음과 같다.

[0094] 멸균된 페트리 접시에 멸균된 metal borer(지름 6mm)를 well을 만들 위치에 배열한 후 엠알에스 한천배지를 28ml씩 넣어 굳혀 well을 만들었다. 배지가 완전히 굳은 후 상기 (1)의 20시간 배양된 국내 요로감염 환자에서 분리된 요로감염균인 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*)을 Tryptic Soy soft 한천배지에 5μl/ml 접종한 다음 5ml씩 엠알에스 한천평판배지에 증충하여 굳혔다. Metal borer를 제거하고 엠알에스 한천배지를 각 well에 50μl씩 넣어 바닥을 막은 다음 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801 배양액 100μl을 멸균 증류수 100μl와 혼합한 후 각 well에 접종하였다. 37°C에서 24시간 배양하여 생성된 억제환의 크기를 측정하였다.

[0095] 락토바실러스 sp. HY7801에 의한 국내 요로감염 환자에서 분리된 요로감염균인 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*)의 억제 활성은 생성된 억제환의 지름에서 metal borer의 지름을 빼고 길이(mm)로 나타내었다.

[0096] (3) 상기 시험예 1에서 *E. coli* ATCC25922의 억제 활성 측정결과에서 억제환의 크기가 6.0mm이상인 균주들인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) BS-1, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) LCW, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) J2-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. RM1-5, 락토바실러스 람노서스

(*Lactobacillus rhamnosus*) GR-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. CH7-1, 그리고 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7211에 대하여도 상기 (2)의 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 상기 요로 감염균인 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus fecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*)의 억제 활성을 시험하였다.

[0097] 그 결과를 하기의 표 4에 나타내었다.

표 4

요로감염균	유산균 (단위: mm)							
	BS-1	HY7801	LCW	J2-1	RM1-5	GR-1	CH7-1	HY7211
<i>P. vulgaris</i>	8	9	7	6	7	8	8	7
<i>P. mirabilis</i>	5	7	5	5	5	5	5	5
<i>K. oxytoca</i>	9	10	10	8	8	10	8	9
<i>K. pneumonia</i>	7	10	7	9	9	7	8	7
<i>M. morganii</i>	4	7	4	6	4	4	5	4
<i>C. freundii</i>	6	9	5	6	5	6	7	6
<i>E. fecalis</i>	4	6	4	4	5	5	4	4
<i>E. cloaca</i>	4	9	7	7	7	7	4	7
<i>P. aeruginosa</i>	5	7	5	5	5	4	4	5
<i>S. aureus</i>	7	10	7	8	7	8	8	7
<i>A. baumannii</i>	5	7	4	5	5	5	4	5

[0098]

[0099] 상기 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801이 기타 요로감염균인 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 사이트로박터 프렌디(*Citrobacter freundii*), 엔케로코쿠스 피칼리스(*Enterococcus fecalis*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloaca*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 반마니(*Acinetobacter baumannii*)에 대해 가장 높은 억제활성을 갖고 있어 요로감염균에 대한 억제 효능이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0100] <시험예 3>

[0101] 락토바실러스 sp. HY7801에 의한 *E. coli*의 human bladder epithelial like cell 부착 억제 활성 측정

[0102] 락토바실러스 sp. HY7801의 human bladder epithelial like cell에 대한 *E. coli*의 부착 억제를 시험하였다.

[0103] (1)시험에 사용한 human bladder carcinoma 세포는 T24 세포를 시험에 사용하였다. 먼저 T24 세포를 6 well plate(혹은 24 well plate)에 2ml씩 넣고, 10% FBS를 첨가하고 항생제를 뺀 RPMI1640 배지(Gifco, USA)를 첨가하여 monolayer로 가득 채울 때까지 배양하였다.

[0104] (2)락토바실러스 sp. HY7801은 엠알에스 액체배지를 이용하여 37℃에서 20시간 배양하여 시험에 사용하였으며, *E. coli* ATCC25922는 Tryptic Soy 액체배지에 접종하여 37℃에서 20시간 진탕배양하여 시험에 사용하였다. 상기 *E. coli* ATCC25922 및 락토바실러스 sp. HY7801을 400rpm에서 10분간 원심분리하고 *E. coli*와 락토바실러스 sp. HY7801 균체를 새로운 RPMI1640 배지로 세척한 다음 T24 세포가 배양된 각 well에 100 μ l씩 접종하였다. 1시간 동안 37℃, CO₂ 배양기에서 배양하고 새로운 RPMI1640 배지로 3회 T24 세포가 배양된 각 well을 세척하여 T24세포에 부착하지 않은 *E. coli*와 락토바실러스 sp. HY7801를 제거하였다. 그리고 각 well에 10X trypsin-EDTA를 150 μ l씩 넣고 5분간 정치한 후 2ml의 RPMI1640 배지를 넣어 부착된 T24 세포를 수확한 후 희석액을 이용하여 희석한 후 다음의 선택배지를 이용하여 락토바실러스 sp. HY7801과 *E. coli* ATCC25922의 생균수를 측정하였다. 락토바실러스 sp. HY7801은 Rogosa SL 배지(Difco, USA)를, *E. coli*는 EMB 배지(Difco, USA)를 이용하여 생균수를 측정하였으며, Hemocytometer를 이용하여 수확된 T24 세포의 수를 측정한 후 T24 세포 당 부착된 락토바실러스 sp. HY7801 및 *E. coli*의 균수로 환산하여 락토바실러스 sp. HY7801에 의한 *E. coli*의 부착 억제율(%)로 나타내었다.

[0105] *E. coli*의 흡착억제율(%)= (100 - *E. coli*의 흡착율)

[0106] *E. coli*의 흡착율(%)= 100 X (A/B)

[0107] A: Log₁₀ [*E. coli* 수/T24 세포수(락토바실러스 sp. HY7801 처리)]

[0108] B: Log₁₀ [*E. coli* 수/T24 세포수(락토바실러스 sp. HY7801 무처리)]

[0109] (3)상기 시험에 2의 기타 요로감염균들의 억제 활성 측정결과에서 억제활성이 우수한 균주들인 락토바실러스 (*Lactobacillus*) sp. RM1-5, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) GR-1, 락토바실러스 (*Lactobacillus*) sp. CH7-1, 그리고 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7211도 상기 (2)의 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 *E. coli*의 T24 세포에 대한 부착 억제를 측정하였다. 그 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

	<i>E. coli</i> 단독처리	유산균				
		RM1-5	GR-1	CH7-1	HY7211	HY7801
Lactic acid bacteria (cfu/ml)	-	1.0 x 10 ⁷	2.1 x 10 ⁷	4.5 x 10 ⁷	6.4 x 10 ⁷	2.3 x 10 ⁷
<i>E. coli</i> (cfu/ml)	3.60 x 10 ⁹	2.44 x 10 ⁹	4.63 x 10 ⁹	3.29 x 10 ⁹	2.88 x 10 ⁹	2.0 x 10 ⁹
T24 (cells)	6.9 x 10 ⁵	5.8 x 10 ⁵	8.6 x 10 ⁵	8.8 x 10 ⁵	7.6 x 10 ⁵	9.9 x 10 ⁵
Lactic acid bacteria (cfu /T24 cell)	-	17.2	24.4	51.1	84.2	23.2
<i>E. coli</i> (cfu /T24 cell)	5217	420	538	373	378	202
Adhesion(%) of <i>E. coli</i>	100	70.6	73.5	69.2	69.4	62.0
Inhibition adhesion(%)	-	29.4	26.5	30.8	30.6	38

[0110]

- [0111] 상기 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, T24 세포에 요로감염균 *E. coli*와 유산균을 부착시켰을 때, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801이 *E. coli*의 부착을 크게 억제하는 것을 알 수 있었다.
- [0112] <시험예 4>
- [0113] 요로감염 실험동물에서 락토바실러스 sp. HY7801의 방광염증 억제
- [0114] 요로감염 동물모델을 이용하여 락토바실러스 sp. HY7801의 방광염증 억제 효능을 시험하였다.
- [0115] (1) 락토바실러스 sp. HY7801은 엠알에스 액체배지를 이용하여 37°C에서 20시간 배양하여 시험에 사용하였으며, 요로감염의 주 원인균인 *E. coli* ATCC25922는 Tryptic Soy 액체배지에 접종하여 37°C에서 20시간 진탕배양하여 시험에 사용하였다. 상기 각 균주를 4,000rpm에서 10분간 원심분리하고 PBS로 2회 세척한 후 시험에 사용하였다.
- [0116] (2) 시험에 사용한 SD rat은 중앙실험동물로부터 구입하였으며, 순화기간을 거쳐 시험에 사용하였다. 시험군은 시험 시작일로부터 1주일간 생리식염수 만을 투여하는 무처리군, 생리식염수 투여와 추후 *E. coli*를 감염시킨 *E. coli*군, 락토바실러스 sp. HY7801을 급여하고 추후 *E. coli*를 감염시킨 HY7801군으로 나누어 시험을 실시하였다.
- [0117] 먼저, HY7801군은 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 1.0×10^9 cfu/ml이 되도록 생리식염수에 분산한 후 1주일간 rat 한마리당 1ml을 경구투여하였다. 그런 다음 시험 1주일 후 rat에 케타민을 100g 당 100 μ l를 복강내 투여하여 마취를 한 후, *E. coli* 균수가 1.0×10^7 cfu/ml이 되도록 생리식염수에 분산한 *E. coli* 균액 2.4ml을 3회에 걸쳐 나누어 일정 시간 간격 및 압력으로 rat의 요도안으로 밀어 넣어 *E. coli* 감염을 시켰다. *E. coli* 감염 3일째 rat를 희생하여 방광을 절제하고, 절제한 방광은 10% formaldehyde 용액에 담귀 병리조직 분석을 실시하였다. 일정한 세척 및 통상적인 방법에 따라 알코올 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고 포매된 콜론(colon) 조직은 박절편기를 이용하여 5 μ m 두께의 연속절편을 작성하여 hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 시행한 다음 permount로 봉입하여 영구표본을 작성한 후 병리조직학적 분석을 수행하였다.
- [0118] 마찬가지로, *E. coli*군은 락토바실러스 sp. HY7801의 투여없이 생리식염수 만을 1주일 간 경구 투여하는 것을 제외하고 나머지는 상기 HY7801군의 방법과 동일한 방법으로 시험을 하였다.
- [0119] 마지막으로, 무처리군은 생리식염수 만을 1주일 간 경구투여한 후 *E. coli* 감염을 시키지 않은 것을 제외하고 나머지는 상기 HY7801군의 방법과 동일한 방법으로 시험을 하였다.
- [0120] 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0121] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, *E. coli*군에서와 같이 요로감염균 *E. coli*를 요도에 감염시켰을 때 방광내 염증이 증가하였으나, 락토바실러스 sp. HY7801을 급여한 HY7801군에서는 락토바실러스 sp. HY7801의 요로감염균 억제활성에 의하여 *E. coli*에 의한 방광내 염증이 크게 감소하는 것을 알 수 있었다.
- [0122] <시험예 5>
- [0123] 락토바실러스 sp. HY7801의 *Candida albicans* 억제활성
- [0124] (1) 락토바실러스 sp. HY7801은 엠알에스 액체배지를 이용하여 37°C에서 20시간 배양하여 시험에 사용하였으며, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)는 Sabouraud Dextrose 액체배지(Difco, USA)를 이용하여 25°C에서 20시간 진탕배양하여 시험에 사용하였다.
- [0125] (2) 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801의 배양액 10 μ l를 엠알에스 한천평판배지에 접종하고 2일간 37°C에서 혐기배양하였다. 그 다음 상기 (1)의 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 10^6 cfu/ml 수준으로 접종한 Sabouraud dextrose soft 한천배지(0.7% 한천) 5ml를 중층하였다. 그런 다음 37°C에서 24시간 동안 배양한 후

엠알에스 한천평판배지에 나타나는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 억제환의 크기를 측정하였다.

- [0126] 락토바실러스 sp. HY7801에 의한 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 억제 활성은 생성된 억제환의 지름에서 metal borer의 지름을 빼고 길이(mm)로 나타내었다.
- [0127] (3)락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) HLAB4-14, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L18, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) LB74, 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) LA04, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L141204, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L307, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) MBM4-4, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) LMB8-2, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) LMB5-5, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KM21-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KM5-5 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KY16-11에 대하여 상기 (2)의 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 억제 활성을 시험하였다.
- [0128] 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0129] 도 3의 세로축은 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) HLAB4-14, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L18, 락토바실러스 sp. HY7801, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) LB74, 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) LA04, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L141204, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L307, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) MBM4-4, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) LMB8-2, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) LMB5-5, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KM21-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KM5-5 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KY16-11을 각각 'HLAB4-14', 'L18', 'HY7801', 'LB74', 'LA04', 'L141204', 'L307', 'MBM4-4', 'LMB8-2', 'LMB5-5', 'KM21-1', 'KM5-5' 및 'KY16-11'로 표시하였다.
- [0130] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801의 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대한 억제환이 20mm으로서 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대한 억제활성이 가장 우수함을 알 수 있었다.
- [0131] <시험예 6>
- [0132] 락토바실러스 sp. HY7801의 과산화수소 생성활성
- [0133] (1)락토바실러스 sp. HY7801의 항균물질인 과산화수소 생성 활성을 알아보기 위하여 엠알에스-티엠비 한천배지를 하기 표 6과 같이 제조하였다. 락토바실러스 sp. HY7801를 엠알에스 액체배지를 이용하여 37℃에서 20시간 배양한 다음 엠알에스-티엠비 한천평판배지에 접종한 후 2일간 37℃에서 혐기배양하였다. 배양 후 엠알에스-티엠비 한천평판배지를 공기 중에 30분간 노출 시키고 엠알에스-티엠비 한천평판배지 상에 형성된 균락의 색깔 변화를 관찰하였다. 균락의 색깔이 푸른색으로 변하는 정도를 육안으로 관찰하여 3등급(+ < 2, 2 ≤ ++ < 4, 4 ≤ +++)으로 나누었다.

표 6

엠알에스-티엠비 한천배지: 1L 당 배지 조성

엠알에스 배지	55g
3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (3,3',5,5'-tetramethylenzidine)	250mg
0.05% 헤민	10mℓ
0.5% 비타민 K(95% EtOH에 용해)	0.2mℓ
1mg/mℓ 퍼록시다아제	10mℓ
한천	15g
증류수	1000mℓ

[0134]

[0135] (2)락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) HLAB4-14, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L18, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) LB74, 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) LA04, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L141204, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L307, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) MBM4-4, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) LMB8-2, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) LMB5-5, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KM21-1, 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KM5-5 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KY16-11 대하여도 상기 (1)에 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 과산화수소 생성 활성을 시험하였다.

[0136] 그 결과를 표 7에 나타내었다.

표 7

균주	과산화수소 생성능
HLAB4-14	++
L18	++
HY7801	+++
LB74	++
LA04	++
L141204	+
L307	+
MBM4-4	+
LMB8-2	+
LMB5-5	+
KM21-1	+
K5-5	+
KY16-11	++

[0137]

[0138] + < 2, 2 ≤ ++ < 4, 4 ≤ +++

[0139] 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801의 과산화수소 생성능이 가장 우수하였

다.

[0140] <시험예 7>

[0141] 혼합배양에 의한 락토바실러스 sp. HY7801의 *Candida albicans* 억제활성

[0142] (1) 락토바실러스 sp. HY7801은 엠알에스 액체배지를 이용하여 37℃에서 20시간 배양하여 시험에 사용하였으며, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)는 Sabouraud Dextrose 액체배지(Difco, USA)를 이용하여 25℃에서 20시간 진탕배양하여 시험에 사용하였다.

[0143] (2) 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801과 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 각각 10^7 cfu/ml 수준으로 엠알에스 액체배지에 접종하였다. 그리고 37℃에 50 rpm으로 20시간 동안 진탕 배양한 다음 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 균수를 측정하였다. 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 균수 측정은 시료를 희석액을 이용하여 십진희석한 다음 포테이토 텍스트로우즈 한천평판배지(Difco, USA)에 도달한 후 25℃에서 2일간 배양하였다. 배양이 완료된 후 한천평판배지 상에 형성된 균락을 계수하였다.

[0144] 한편, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)만을 10^7 cfu/ml 수준으로 엠알에스 액체배지에 접종한 후, 37℃에 50 rpm으로 20시간 동안 진탕 배양한 다음 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 균수를 측정하여 대조구로 하였다.

[0145] (3) 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) HLAB4-14, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L18, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) LB74, 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) LA04 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KY16-11에 대하여도 상기 (2)의 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 혼합배양에 의한 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 억제 활성을 시험하였다.

[0146] 그 결과는 표 8에 나타내었다.

표 8

유산균	<i>Candida albicans</i> 의 생균수(Log ₁₀ cfu/ml)	
	0시간	20시간
대조구	6.81	6.90
HLAB4-14		5.27
L18		6.41
HY7801		4.00
LB74		6.37
LA04		5.43
KY16-11		5.54

[0147]

[0148] 상기 표 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801과 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 혼합 배양하였을 경우에도 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 생균수가 가장 크게 억제됨을 알 수 있었다.

[0149] <시험예 8>

[0150] 락토바실러스 sp. HY7801의 질 상피세포 A431에 대한 부착 활성 측정

- [0151] 락토바실러스 sp. HY7801의 질 상피세포인 A431 세포에 대한 부착 활성을 시험하였다.
- [0152] (1)질 상피세포 A431은 24 well plate에 배지와 함께 well 당 500 μ l씩 넣어 배양하였다. 배지는 10% FBS와 항생제를 첨가한 DMEM 배지(Gifco, USA)를 이용 하였으며, monolayer로 10⁵ cells/well 수준으로 배양하였다.
- [0153] 락토바실러스 sp. HY7801은 엠알에스 액체배지를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 20시간 배양하여 시험에 사용하였다.
- [0154] (2)상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801을 10⁷ cfu/well 수준으로 질 상피세포 A431이 배양된 well에 접종하고 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 배양 후 PBS 500 μ l/well을 이용하여 3번 세척하여 부착하지 않은 락토바실러스 sp. HY7801을 제거하였다. 그리고 0.1% triton X-100 500 μ l을 넣고 10분간 반응하여 락토바실러스 sp. HY7801이 부착되어 있는 A431 세포를 탈착시켰다. 0.1% triton X-100 용액 내 락토바실러스 sp. HY7801의 균수를 측정하여 A431 세포에 부착한 락토바실러스 sp. HY7801의 균수로 하였다. 락토바실러스 sp. HY7801의 균수는 시료를 희석액을 이용하여 희석한 후 엠알에스 한천배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양한 후 형성된 균락을 계수하였다.
- [0155] (3)락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) HLAB4-14, 락토바실러스 게서리(*Lactobacillus gasseri*) L18, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) LB74, 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) LA04 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. KY16-11 대하여도 상기 (2)의 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 질 상피세포 A431에 대한 부착 활성을 측정하였다.
- [0156] 그 결과는 표 9에 나타내었다.

표 9

유산균	질 상피세포 부착 유산균수 (Log ₁₀ cfu/ml)
HLAB4-14	2.59 ± 0.16
L18	2.94 ± 0.34
HY7801	4.85 ± 0.11
LB74	2.85 ± 0.21
LA04	3.09 ± 0.12
KY16-11	3.29 ± 0.16

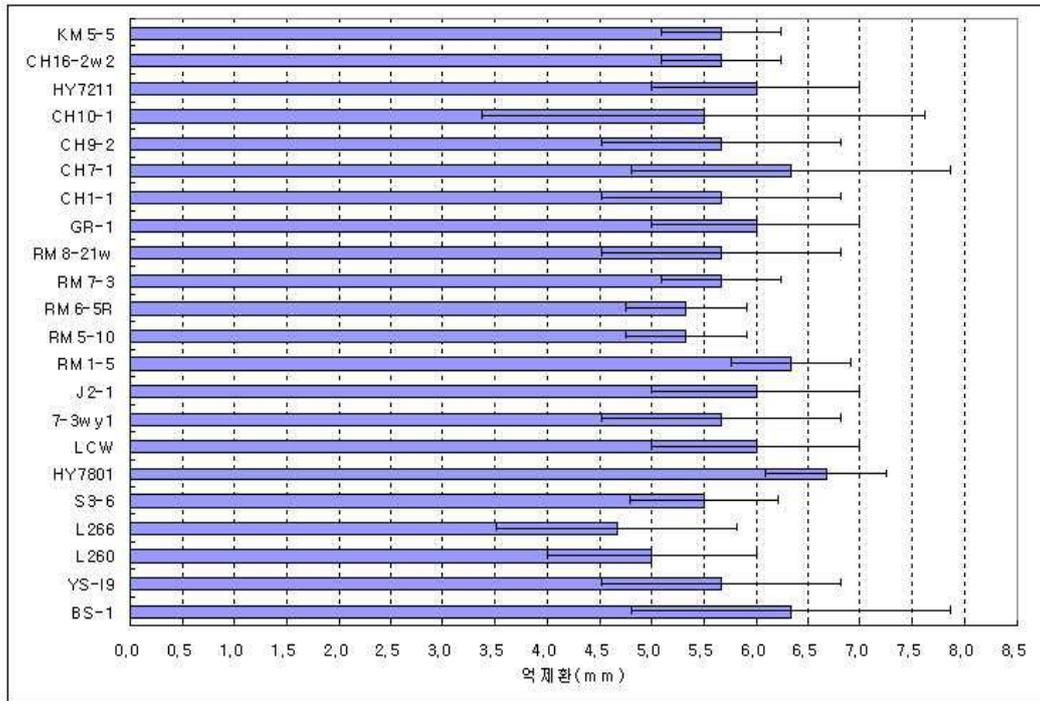
- [0157]
- [0158] 상기 표 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 sp. HY7801이 질 상피세포에 대한 부착능이 가장 우수하여 질내 정착 및 생존 가능성이 가장 높은 것으로 나타났다.

도면의 간단한 설명

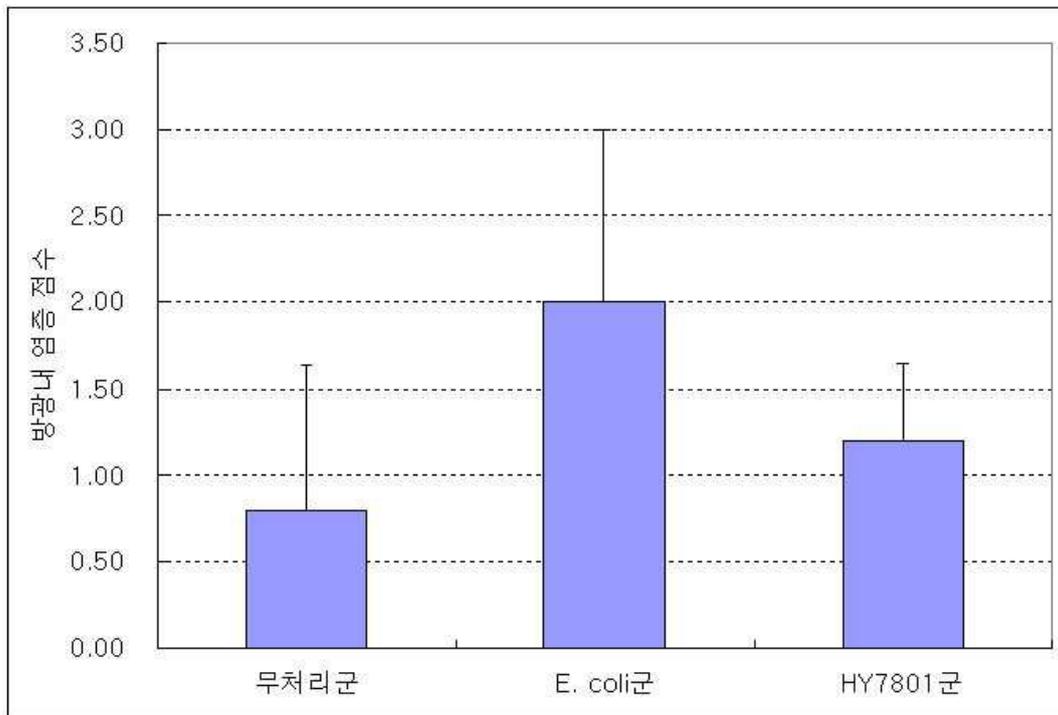
- [0159] 도 1은 락토바실러스 sp. HY7801의 요로감염균 *E. coli* ATCC25922 억제 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0160] 도 2는 *E. coli*의 요로감염 실험동물에서 락토바실러스 sp. HY7801 급여에 의한 방광염증 발생 억제 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0161] 도 3은 락토바실러스 sp. HY7801의 칸디다성 질염을 일으키는 칸디다 알비칸tm(*Candida albicans*) 억제 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도면

도면1



도면2



도면3

