(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년05월26일
(11) 등록번호 10-1037101
(24) 등록일자 2011년05월19일

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 1/29* (2006.01)
A23K 1/14 (2006.01) *C12R 1/125* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0072557
(22) 출원일자 2010년07월27일
심사청구일자 2010년07월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR100335996 B1
KR1020030034277 A
전체 청구항 수 : 총 6 항

(73) 특허권자
정우일
경기 부천시 원미구 중1동 포도마을아파트 830동 404호
(72) 발명자
정우일
경기 부천시 원미구 중1동 포도마을아파트 830동 404호
(74) 대리인
백경업

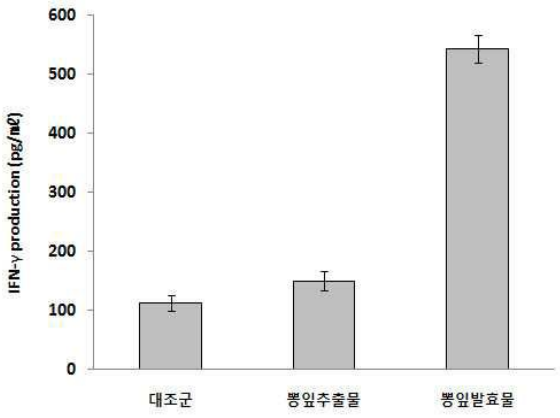
심사관 : 김민정

(54) 신규한 바실러스 균주 및 이를 이용한 뽕잎발효물

(57) 요 약

본 발명은 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주 및 이를 이용한 뽕잎발효물에 관한 기술로 본 발명의 미생물을 이용하여 제조된 뽕잎발효물은 뛰어난 면역증강효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한 본 발명의 뽕잎발효물은 발효재료 특유의 이취가 없으며, 첨가제나 방부제 없이 긴 유통기한을 가질 수 있고, 비가열 음료로서 영양분의 파괴가 최소화되어 고품질 및 고영양의 식품 및 음료를 제조할 수 있게 하였다.

대 표 도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P).

청구항 2

제 1항의 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주를 이용하여 발효한 뽕잎발효물을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주를 이용하여 발효한 뽕잎발효물을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역증강용 건강기능식품.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 건강기능식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스넥류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역증강용 건강기능식품.

청구항 6

바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주를 이용하여 발효한 뽕잎발효물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 면역력 증강을 위한 가축용 사료 조성물.

청구항 7

(1공정) 뽕잎을 채취하여 수세 후 절단하는 단계;

(2공정) 상기 1공정의 절단된 뽕잎을 완전히 건조하여 분쇄하는 단계;

(3공정) 상기 2공정의 뽕잎 분쇄물에 분쇄물 중량대비 1~20배의 20~40℃의 물을 첨가하는 단계;

(4공정) 상기 3공정의 뽕잎 분쇄물과 물의 혼합물 전체 중량을 100 중량부로 하였을 때, 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주를 0.001~1 중량부로 하여 첨가하는 단계;

(5공정) 상기 4공정의 뽕잎 분쇄물, 물 및 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주 혼합물을 20~40℃, 습도 40~90%에서 24~96시간 동안 발효하는 단계; 및

(6공정) 상기 5공정의 발효물에 대한 여과 여액을 수득하는 단계;

를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주를 이용하여 발효한 면역 증강 및 면역조절활성을 갖는 뽕잎 발효물의 제조 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 청국장에서 분리한 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주와 이를 이용한 면역증강효과가 있는 뽕잎발효물에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역기능이 여러 가지 질병요인(pathogen)으로부터 생체를 방어한다는 것은 이미 알려졌으며, 이러한 면역기능을 이용하여 질병을 예방하고 치료하는 방법으로 대표적으로 예방접종(vaccination), 항독소 이용방법 등이 이용되고 있다. 이 외에도 면역기능의 작용기작이 알려지면서 면역기능을 조절할 수 있는 면역조절물질을 직접 이용하려는 시도가 진행되고 있는데, 이러한 면역조절물질은 비특이적 또는 특이적으로 면역 세포들을 자극하여 생체의 면역기능을 억제 또는 증진시킴으로써, 질병요인으로부터 생체의 방어력을 증강시킬 수 있었다.

[0003] 그러나 상기의 면역조절물질의 대부분은 화학 합성물질로 부작용 또는 독성이 일부 발견되기도 하여 실제 생체에 적용하기에 일부 제한이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 노력으로, 최근에는 면역조절물질에 대한 연구가 독성이 없는 식품소재 또는 천연물로부터 추출한 유효성분, 기존의 한방제 등의 효능검증을 통해 수행되고 있다. 이처럼 천연물로부터 생체 조절 및 생체 방어계를 항진시키는 생리활성물질을 찾는 연구가 활발히 진행되면서, 천연물이 대체의학의 치료제 또는 건강보조식품으로서 실용화되는 단계로 접어들고 있다.

[0004] 이에 본 발명자는 면역조절효과를 나타낼 수 있는 물질을 탐색하는 과정에서, 천연물 또는 종래의 한방제에서 효능을 검증하면서, 청국장에서 분리한 신규한 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P)를 발견하였고, 이를 이용하여 발효한 뽕잎발효물이 면역증강효과가 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 신규한 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주와 이를 이용하여 발효한 면역증강효과가 있는 뽕잎발효물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 균주와 이를 이용한 면역증강효과가 있는 뽕잎발효물을 구성한다.

[0007] 먼저 청국장에서 균주를 분리하여, 면역증강효과가 있는 뽕잎 발효물을 제조할 수 있는 균주를 선택하였다. 이후에 형태적, 생리 생화학적 특성 및 DNA 프로파일(profiles) 비교 등을 통하여 균주를 동정하였고 상기 균주는 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P)로 동정되었다.

[0008] 본 발명은 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 균주의 배양조건을 제공한다. 산업적 사용을 위해서는 상기 균주를 단시간 내에 대량으로 배양할 수 있는 방법이 필수적이다. 본 발명의 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 균주는 배양 배지로서 NA(Nutrient agar) 배지 상에서 잘 자라며, 15~40℃ 온도범위에서 생육이 가능하다. 또한 생육 pH 범위는 5.0~7.5이고, 배양시간은 24~96시간에서 잘 자란다.

[0009] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 균주를 이용한 뽕잎발효물은,

[0010] 뽕잎을 채취하여 수세 후 2~4㎝ 정도로 절단하는 단계;

[0011] 상기 절단된 뽕잎을 완전히 건조하여 1~2㎜ 길이로 분쇄하는 단계;

[0012] 상기 뽕잎 분쇄물에 분쇄물 중량대비 1~20배의 20~40℃의 물을 첨가하는 단계;

[0013] 상기 뽕잎 분쇄물과 물의 혼합물 전체 중량을 100 중량부로 하였을 때, 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P)를 0.001~1 중량부로 하여 첨가하는 단계;

[0014] 상기 뽕잎 분쇄물, 물 및 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 혼합물을 20~40℃, 습도 40~90%에서

24~96시간 동안 발효하는 단계; 및

[0015] 상기 발효물에 대한 여과 여액을 수득하는 단계;

[0016] 를 포함하여 뽕잎발효물이 제조되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기뽕잎 발효물은 뽕잎을 물, 유기용매 또는 물과 유기용매의 혼합액으로 추출한 추출물을 발효해서도 제조할 수 있다. 상기 유기용매로는 통상적으로 사용되는 알코올, 핵산, 에틸아세테이트 또는 클로로포름 등을 사용할 수 있다.

[0018] 상기 방법으로 제조되는 본 발명의 뽕잎발효물은 면역증강 및 면역조절활성제로 사용될 수 있으며, 식품에 첨가되어 면역증강식품 및 면역조절활성식품으로 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명은 면역저하로 인한 세균 또는 바이러스 감염예방 및 면역증강이 요구되는 환자의 치료 또는 개선을 위해 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 조성물은 화학요법 및 방사선 요법과 같은 항암요법에 의해 면역기능이 저하된 환자, 에이즈, 및 암과 같은 질환에 의해 면역기능이 저하된 환자에게 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명은 상기 제조방법에 의해 수득된 뽕잎발효물의 약학적 또는 식품학적 유효량 및 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 첨가제를 포함하는 제조방법 또는 사용방법을 포함한다.

[0022] 본 발명에 따른 뽕잎발효물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 뽕잎발효물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0023] 상기 활성성분의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 뽕잎발효물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 뽕잎발효물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0024] 본 발명의 뽕잎발효물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 면역질환의 개선을 위한 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 뽕잎발효물을 첨가할 수 있는 건강기능식품으로는, 예를 들어, 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스넥류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다.

[0025] 또한 본 발명의 뽕잎발효물은 감염성 질환에 대한 면역력 증강을 위한 가축용 사료 조성물로서 동물사료 첨가제로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 신규 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P) 균주를 이용한 뽕잎발효물은 뛰어난 면역증강효과가 있어, 면역질환의 예방 및 치료제로 사용될 수 있으며, 면역질환을 개선할 수 있는 건강기능식품에 사용될 수 있다.

[0027] 또한 본 발명의 뽕잎발효물은 발효재료 특유의 이취가 없으며, 첨가제나 방부제 없이 긴 유통기한(유통기한을 확인 및 설정하는 통상적인 방법인 가속저장실험으로 3~6개월간 신선도가 유지됨을 확인)을 가질 수 있고, 비가열 음료로서 영양분의 파괴가 최소화되어 고품질 및 고영양의 식품 및 음료를 제조할 수 있게 하였다. 이 외에도 동물 사료에 첨가되어 동물 질병을 예방 및 개선할 수 있는 면역증강제로 사용될 가능성을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 균주를 NA(Nutrient Agar) 배지에 배양하였을 때의 콜로니 사진이다.

도 2는 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 균주의 16S rDNA gene의 염기서열이다.

도 3은 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스의 16S rDNA gene의 계통학적 위치를 나타내는 서식도이다.

도 4는 본 발명의 뽕잎발효물 처리군, 뽕잎추출물 처리군 및 대조군(물 처리군) 마우스의 체중변화를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 뽕잎발효물 처리군, 뽕잎추출물 처리군 및 대조군 마우스의 비장 내의 세포 수를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 뽕잎발효물 처리군, 뽕잎추출물 처리군 및 대조군 마우스의 오금쟁이 림프절의 세포 수를 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명의 뽕잎발효물 처리군, 뽕잎추출물 처리군 및 대조군 마우스의 오금쟁이 림프액에서 IFN-γ의 발현 정도를 나타내는 그래프이다.

도 8은 본 발명의 뽕잎발효물 처리군, 뽕잎추출물 처리군 및 대조군 마우스의 오금쟁이 림프액에서 IL-4의 발현 정도를 나타내는 그래프이다.

도 9는 본 발명의 뽕잎발효물 처리군, 뽕잎추출물 처리군 및 대조군 마우스의 혈청에서 IgG1 항체의 발현 정도를 각 농도별로 희석하여 나타내는 그래프이다.

도 10은 본 발명의 뽕잎발효물 처리군, 뽕잎추출물 처리군 및 대조군 마우스의 혈청에서 IgG2a 항체의 발현 정도를 각 농도별로 희석하여 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하에서는 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, 미생물기탁번호 KACC91554P)를 이용한 면역조절기능이 있는 뽕잎발효물에 대해 바람직한 실시예를 참고하여 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 구체적으로 설명하고자 하는 것으로, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0030] **<실시예 1 : 미생물의 분리 및 생리학적 특징 확인>**

[0031] 본 발명의 미생물은 청국장에서 분리하였다. 미생물의 분리를 위해 청국장 시료를 잘 혼합한 후 멸균수에 희석하여 NA(Nutrient agar, pH 7.0, Difco) 배지에 희석평판법으로 미생물을 분리하여 30℃에서 5일간 배양하였다. 이곳에서 분리된 균주를 새로운 NA 배지로 옮겨 순수분리하여 보관하였고(도 1 참조), 이를 이용하여 발효한 뽕잎발효물의 면역증가활성을 확인한 후, 활성이 가장 강한 발효물을 생성하는 균주를 선택하였다.

[0032] 이후, 상기 균주의 생리학적 특성, 배양온도, 당분해 정도 등을 확인하였다. 상기 균주는 그람염색법(Gram staining)으로 그람 양성균으로 확인되었으며, 형태는 간균으로 유백색을 띄며 콜로니(colony)는 둘레가 불규칙한 원형 타입으로 형성되었다. 또한 포자를 생성하는 균주이며, 0.7~0.8㎛의 폭과 1.3~2.3㎛의 길이를 가지는 것으로 확인되었다.

[0033] 적정 생장온도를 알아내기 위해 진탕 배양기(Shaking incubator, 진탕속도: 150rpm)에서 온도별(4~65℃)로 250 ㎖ NA 배지에서 배양한 결과, 15~40℃ 온도범위에서 배양 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 생육 pH 범위를 2.0~9.0까지 확인한 결과, pH 5.0~7.5에서 배양가능하며, 배양가능한 시간은 24~96시간이 적절함을 확인할 수 있었다. 효소 반응에 대해서는 카탈라아제와 옥시다아제에 양성반응을 나타내며, 또한, API 50 CH kit(Roche)를 이용하여 확인한 당분해 정도는 표 1과 같았다.

표 1

[0034]

당 종류	당분해 정도
control	-
glycerol	+
Erythritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	+
Ribose	+
D-Xylose	-
L-Xylose	-
Adonitol	-
β-Metyl-Xyloside	-
Galactose	+
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
L-Sorbose	-
Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	+
Mannitol	+
Sorbitol	+
α-Methyl-D-mannoside	-
α-Methyl-D-glucoside	+
N-Acetyl glucosamine	-
Amygdaline	+
Arbutine	+
Esculine	+
Salicine	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	+
Melibiose	+
Saccharose	+
Trehalose	+
Inuline	-
Melezitose	-
D-Raffinose	+
Amidon	+
Glycogene	+
Xylitol	+
β-Gentiobiose	+
D-Turanose	-
D-Lyxose	-
D-Tagatose	-
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Gluconate	-

2-ceto-gluconate	-
5-ceto-gluconate	-

[0035] 이 후, 균주의 장기 보관을 위해 상기 균주는 NB(Nutrient broth, pH 7.0, Difco) 배지에서 약 3일간 배양하여 배양액을 멸균된 20% 글리세롤(glycerol) 튜브에 넣고 잘 혼합하여 보존균주를 만들어 -70℃ 냉동고에 저장하였다.

[0036] **<실시예 2 : 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스의 16S ribosomal DNA (rDNA) gene 염기서열 분석>**

[0037] 분자생물학적 동정은 DNA를 분리(Benzyl chloride법을 변형한 방법 이용)하여 16S rDNA의 염기서열을 밝혀 계통분류학적 위치를 확인하였다. 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스의 16S rDNA를 증폭하기 위해 27F(5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′)와 1492r(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 프라이머를 사용하였다. 16S rDNA의 PCR 증폭산물은 PCR Product Purification Kit(Qiagen)를 사용하여 정제하였고, 16S rDNA 유전자의 염기서열은 Genetic analyzer 310A(Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였다. 염기서열은 NCBI/Genebank와 Ribosomal Database Project Ⅱ(RDP Ⅱ)의 데이터베이스에서 상동성 검색을 수행하고, CLUSTAL X 프로그램(Thompson et al., 1994) 및 PHYLIP 프로그램(Felsenstein, 1993)을 이용하여 계통학적 위치를 확인하였다. 16S rDNA의 염기서열(도 2 참조)에 기초한 분자계통학적 분석 결과, 바실러스(*Bacillus*)속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Bacillus subtils* DSM 10^{T}(AJ276351)와 100%의 유연관계를 나타내어 본 발명의 균주가 *Bacillus subtilis* 임이 확인되었다(도 3 참조).

[0038] 상기 결과에 따라, 본 발명의 균주는 바실러스 서브틸리스로 동정되었고 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*)로 명명하여 국립농업과학원 농업유전자원센터에 미생물기탁번호 KACC91554P로 기탁하였다.

[0039] **<실시예 3 : 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 균주를 이용한 뽕잎발효물 제조>**

[0040] 뽕잎을 채취하여 수세 후 2~4㎝ 정도로 절단한 후, 완전히 건조하여 1~2㎜ 길이로 분쇄한 분쇄물 1kg에 25℃의 물 10kg, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스를 1g을 첨가하여 25℃에서 72시간 동안 발효하였다. 이후, 고형분을 가라앉힌 여액만을 통상적으로 사용되는 한외여과막을 이용하여 여과하였고, 상기 액상을 최종적인 뽕잎발효물로 이용하였다.

[0041] **<비교예 1 : 뽕잎추출물 제조>**

[0042] 뽕잎을 채취하여 2~4㎝ 정도로 절단한 후, 완전히 건조하고 1~2㎜ 길이로 분쇄한 분쇄물 1kg에 90℃의 물 10kg을 첨가하여 4시간 동안 교반하여 식혔다. 이 후, 고형분을 가라앉힌 여액만을 통상적으로 사용되는 한외여과막을 이용하여 여과하였고 상기 액상을 최종적인 뽕잎추출물로 이용하였다.

[0043] **<실험예 1 : 뽕잎발효물의 면역독성 측정>**

[0044] 본 발명의 면역 반응에 사용되는 마우스는 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 각 그룹별로 7마리씩 사용하였다. 면역반응을 유도하기 위해 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 항원으로 면역시킨 후(20㎍, 피하주사) 본 발명의 실시예 3의 뽕잎발효물과 비교예 1의 뽕잎추출물을 10일간 매일 1㎖씩 경구투여하고, 대조군에는 물 1㎖을 경구투여하였다. 이 후 마우스의 무게 및 비장 내의 총 세포수를 측정하여 상기 결과를 도 4에 나타내었다. 비장세포의 수는, 세포를 추출하여 9초 동안 멸균 증류수에 노출시키는 저장액 충격(hypotonic shock) 방법으로 적혈구를 파괴시키고 PBS 완충용액으로 세척한 후 트리판블루(trypan blue) 염색 방법을 이용하여 생존 세포의 수를 측정하였다.

[0045] 면역 반응이 일어난 마우스의 체중의 무게는 도 4의 결과처럼 모든 마우스 군에서 거의 변화가 없었으며 비장 내의 세포 수도 증가하여 세포독성은 없는 것으로 확인되었다.

[0046] **<실험예 2 : 면역반응 측정>**

[0047] 2-1. 면역세포수 및 싸이토카인의 양적 변화

[0048] 상기 실험예 1에서 사용된 마우스의 오금쟁이 림프절의 세포를 주사침을 사용하여 추출하고, 9초 동안 멸균 증류수에 노출시키는 저장액 충격(hypotonic shock) 방법으로 적혈구를 파괴시키고 PBS 완충용액으로 세척한 후 트리판블루(trypan blue) 염색 방법을 이용하여 생존 세포의 수를 측정하였다.

[0049] 싸이토카인(cytokine)의 변화를 확인하기 위해서는, 상기 실험예 1에서 사용된 마우스의 오금쟁이 림프절에서 세포를 채취하여 APC(antigen presenting cell, 항원제시세포)와 1:1로 혼합하였고, 48웰-플레이트에 1×10^6개/㎖씩 넣어주었다. 여기에 KLH(50㎍/㎖)를 넣어 3일간 배양한 후 상등액을 수거하여 IFN-γ(interferon-γ), IL-4(interleukin-4)의 양을 측정하였다. 싸이토카인의 활성확인은 각각 마우스용 IL-4, IFN-γ ELISA kit를 사용하여 수행하였다. APC는 실험예 1에서 사용된 마우스의 비장세포를 플라스틱 배양접시를 이용하여 37℃에서 1시간 동안 배양한 후 약하게 부착되어 있는 세포를 취하여 이 세포에 마이토마이신 C(mitomycin C, 50㎍/㎖)를 가하여 37℃에서 20분간 처리한 후 3회 원심분리 및 세척한 후 사용하였다.

[0050] 도 6에서 보듯이, 뽕잎 발효물을 처리한 마우스의 오금쟁이 림프절의 세포수의 변화는 거의 없었으나, 도 7 및 도 8에서 보듯이, 뽕잎발효물을 처리한 마우스의 오금쟁이 림프절에서 IFN-γ, IL-4는 물 또는 뽕잎추출물을 처리한 마우스에 비해 현저하게 증가한 결과를 확인할 수 있었다. 따라서 면역 세포수의 변화는 없었지만, IL-4 분비가 증가되어 세포독성 T 임파구의 증가를 유도하고 IFN-γ의 증가를 일으켜 면역반응을 활성화한다고 알려져 있기에, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스 균주를 이용한 뽕잎발효물이 뛰어난 면역증강효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0051] 또한 비교예 1의 뽕잎 추출물에 본 발명의 바실러스 서브틸리스 서브에스피 서브틸리스를 추가하여 발효한 발효물의 면역반응효과도 확인한 바, 비교예 1의 뽕잎 추출물에 비해 1.5~2배의 면역증강효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0052] 2-3. 항체의 양적 변화

[0053] 상기 실험예 1에서 사용된 마우스의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후, KLH에 대한 항체(IgG1 및 IgG2a)의 변화를 확인하였다. 항체의 확인은 각각 마우스용 IgG1, IgG2a ELISA kit를 사용하여 수행하였고 도 9 및 도 10에 나타내었다.

[0054] 도 9 및 도 10에 나타난 바와 같이 뽕잎발효물을 투여한 마우스의 항체의 생산이 뽕잎추출물을 투여한 마우스에 비해 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0055] **<실험예 3 : 경구투여 독성 실험>**

[0056] 본 발명의 뽕잎발효물의 안전성을 평가하기 위한 일환으로 6주령의 SD 랫드에서 실시예 3의 뽕잎발효물을 단회 또는 14일 반복으로 경구투여하여 독성의 유무를 판단하였다.

[0057] 3-1. 단회투여 독성시험

[0058] 실시예 3의 뽕잎발효물을 SD 렛드 암수 각 5마리에 식약청 고시에 명시된 최고농도인 2,000㎎/10㎖/㎏ 용량으로 경구투여를 하였고 정상군은 동일한 양의 증류수만을 경구투여하였다. 상기 SD 렛드는 뽕잎발효물을 투여한 후 24시간이 경과될 때까지 아무런 독성 및 이상 등을 관찰할 수 없었다.

[0059] 3-2. 14일 반복투여 독성시험

[0060] 실시예 3의 뽕잎발효물을 최대투여 허용량인 2,000㎎/㎏을 투여한 단회투여 독성시험에서 독성 및 이상소견이 관찰되지 않았기 때문에 SD 랫드 암수 각 5마리에 2,000㎎/㎏/일을 고용량으로 하고 1,000㎎/㎏/일 및 500㎎/㎏/일을 중간용량과 저용량으로 설정하여 경구투여하였고 정상군은 동일한 양의 증류수만을 경구투여하였다. 상기 SD 렛드는 실시예 3의 뽕잎발효물을 투여한 후 14일이 지날 때까지 사망한 개체는 발견되지 않았으며 유의할 만한 독성 및 외관상의 이상 및 행동적인 변화도 관찰되지 않았다. 또한 체중의 변화도 비교하였는데 투여일로부터 실험종료시까지 모든 암수 렛드가 거의 동일하게 정상적인 체중증가를 보였다.

[0061] **<실험예 4 : 뽕잎발효물의 관능검사>**

[0062] 맛과 향에 대한 식품으로서의 전체적인 기호도를 측정하기 위해 본 발명의 실시예 3의 뽕잎발효물과 비교예 1의 뽕잎추출물에 대하여 패널 30명으로 5점 대비법을 사용하여 관능시험을 실시하였다. 각각의 결과는 아주좋음(5점), 좋음(4점), 보통(3점), 나쁨(2점) 및 아주나쁨(1점)으로 구분되어 매겨졌고, 평가한 점수는 30명에 대한 평균으로 소수점 1자리까지만 나타내었다. 개인적인 기호도, 이취저감, 향, 맛에 대한 가시적인 효과 등을 측정하여 결과를 표 2에 나타내었다. 표 2의 결과로 본 발명의 뽕잎발효물이 뽕잎추출물보다 이취가 적었고 별도의 첨가제가 없이도 향과 맛이 좋음을 확인할 수 있었다.

표 2

[0063]

조건	개인적인 기호도	이취 저감	향	맛
실시예 3	4.5	4.6	4.4	4.2
비교예 1	2.1	1.1	2.3	2.5

[0064] **<실험예 5. 뽕잎발효물의 보존능 확인>**

[0065] 본 발명의 뽕잎발효물의 보존능을 확인하기 위해 실시예 3의 뽕잎발효물 1ℓ와 비교예 1의 뽕잎추출물 1ℓ를 각각 멸균된 유리용기에 넣어 밀봉하여 3개월간 4℃의 냉장고에 보관한 뒤 상태를 확인하였다. 3개월 후 각각의 상태를 확인한 결과 실시예 3의 뽕잎발효물은 실험 시작 전과 동일한 상태로 보관 및 유지되고 있었으나, 비교예 1의 뽕잎추출물은 부패균의 증식으로 인해 심한 부패취를 내고 있었다. 이로 인해 본 발명의 뽕잎발효물이 별도의 방부제의 첨가가 없이도 장기간 보관이 가능한 식품임을 확인할 수 있었다.

[0066] **<사용예 1 : 약학적 제제예>**

[0067] **1-1. 정제의 제조**

[0068] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎발효물을 분무 건조한 분말 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0069] **1-2. 주사액제의 제조**

[0070] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎발효물을 분무 건조한 분말 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0071] **<사용예 2 : 식품 제조예>**

[0072] **2-1. 조리용 양념의 제조**

[0073] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎발효물을 분무 건조한 분말을 0.2~10 중량%로 하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0074] **2-2. 밀가루 식품의 제조**

[0075] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎발효물을 분무 건조한 분말을 0.1~5.0 중량%로 하여 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0076] **2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0077] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎발효물을 분무 건조한 분말을 0.1~1.0 중량%로 하여 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0078] **2-4. 유제품(dairy products)의 제조**

[0079] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎발효물을 분무 건조한 분말을 0.1~1.0 중량%로 하여 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0080] **<사용예 3 : 음료 제조예>**

[0081] **3-1. 건강기능음료**

[0082] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎발효물 1ℓ에 꿀 1g을 가하여 건강기능음료를 제조하였다.

[0083] **3-2. 야채쥬스 제조**

[0084] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎발효물을 분무 건조한 분말 0.5g을 토마토 또는 당근 쥬스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채쥬스를 제조하였다.

[0085] **3-3. 과일쥬스 제조**

[0086] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎발효물을 분무 건조한 분말 0.1g을 사과 또는 포도 쥬스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일쥬스를 제조하였다.

[0087] **<사용예 4 : 사료첨가제 제조예>**

[0088] 본 발명에 따른 실시예 3의 뽕잎 발효물을 분무 건조한 분말 10.0g을 사료용 부형제 50.0g에 섞어 사료첨가제를 제조하였다. 그러나, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 사료조성물 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조에 사용할 수 있다.

수탁번호

[0089]

기탁기관명 : 국립농업과학원

수탁번호 : KACC91554P

수탁일자 : 20100510

도면

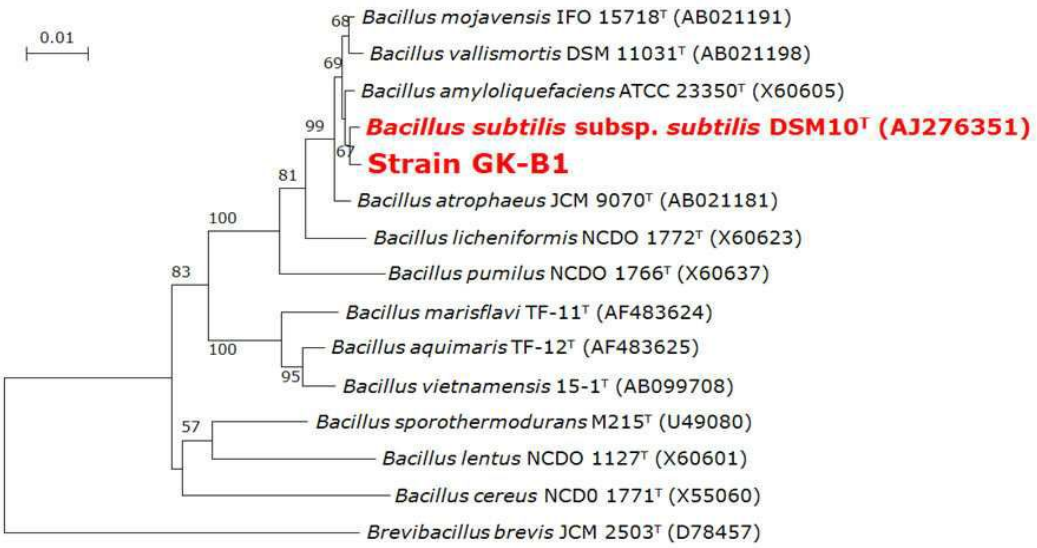
도면1



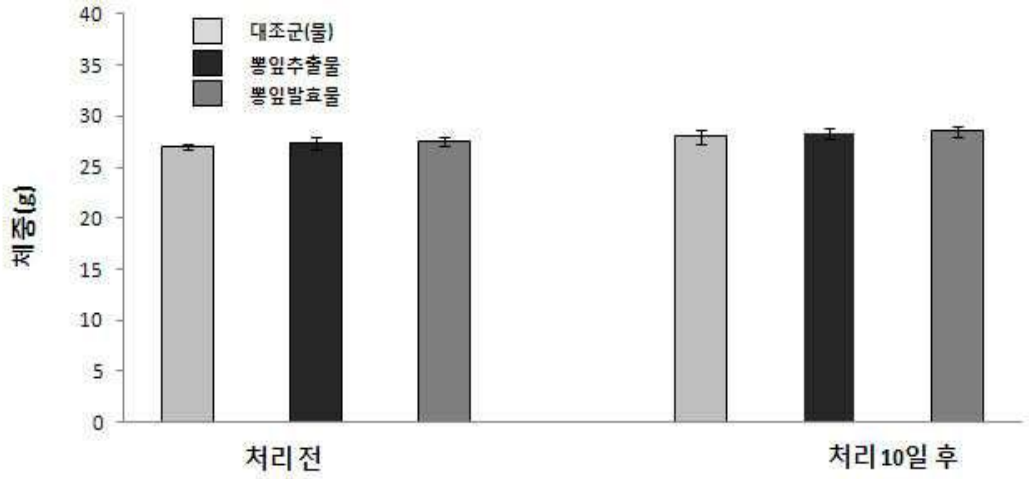
도면2

GTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA
TGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAG
ATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATG
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGG
AGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGG
TCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTG
CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCC
TTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGG
GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAG
CGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTG
CAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCG
AAGTCGGTGAGGTAACC

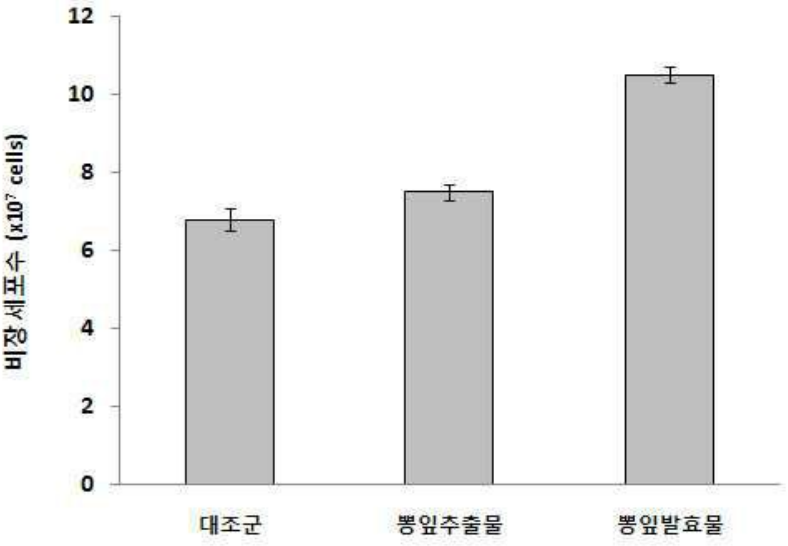
도면3



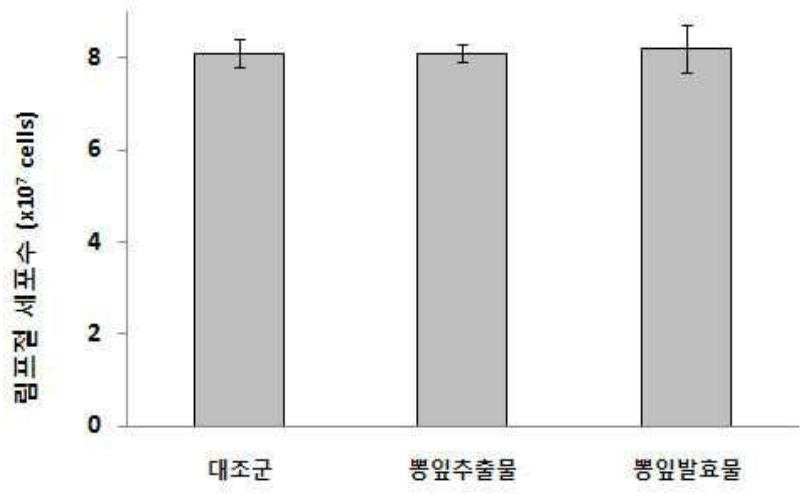
도면4


대조군(물)
뽕잎추출물
뽕잎발효물
체중(g)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
처리 전
처리 10일 후

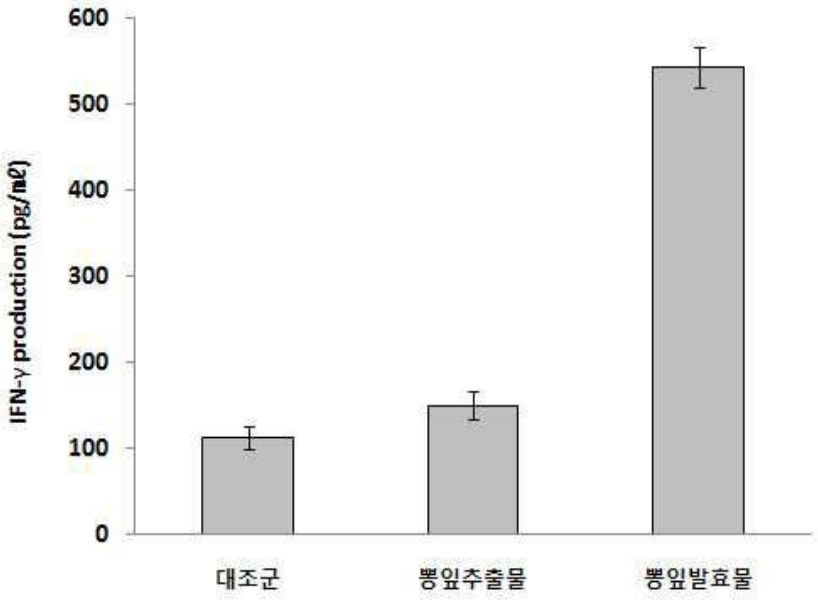
도면5


비장 세포수 (x10⁷ cells)
12
10
8
6
4
2
0
대조군
뽕잎추출물
뽕잎발효물

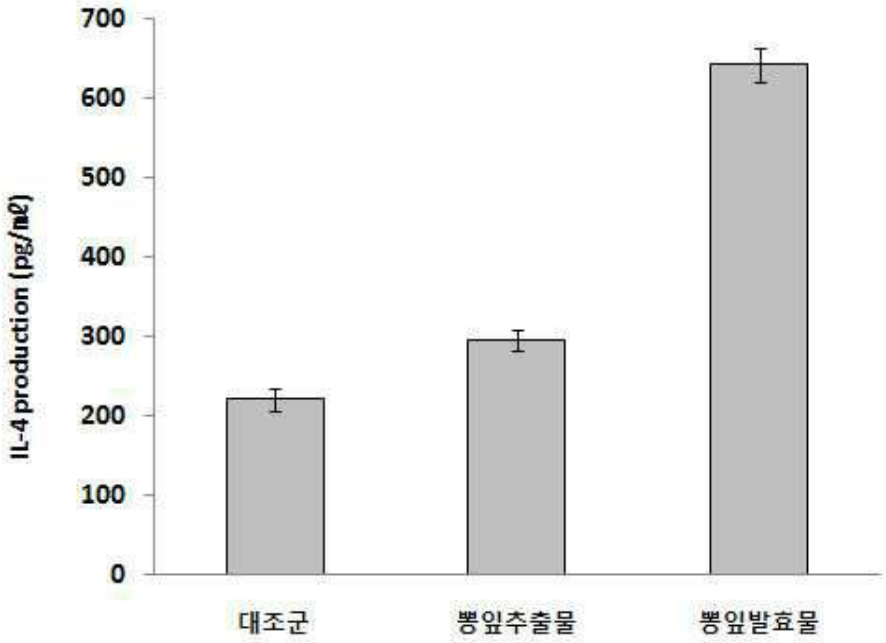
도면6


림프절 세포수 (x10⁷ cells)
8
6
4
2
0
대조군
뽕잎추출물
뽕잎발효물

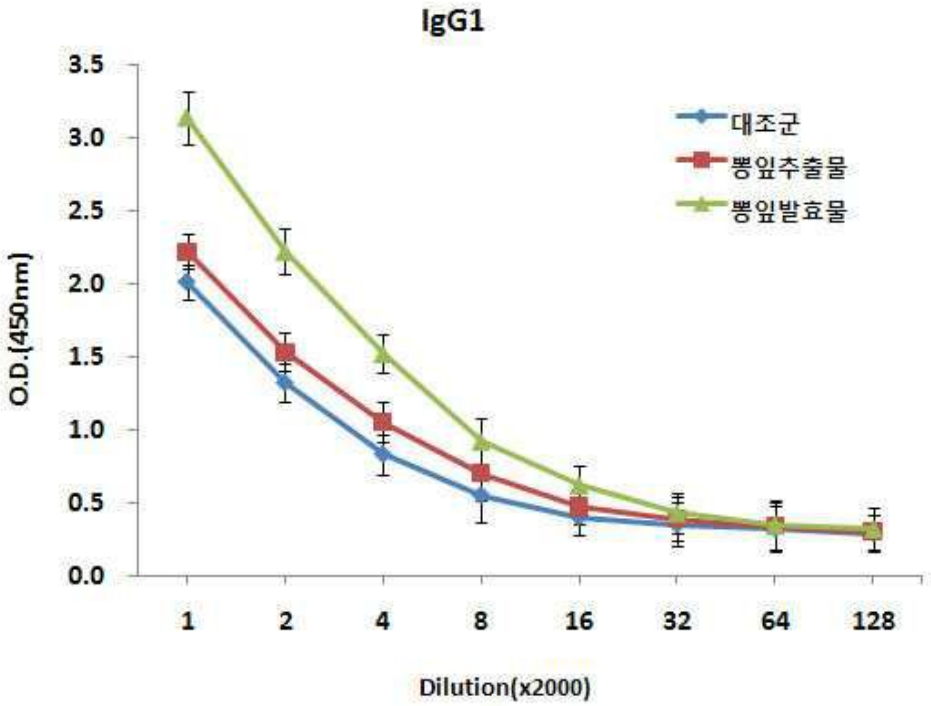
도면7


600
500
400
300
200
100
0
IFN-γ production (pg/㎖)
대조군
뽕잎추출물
뽕잎발효물

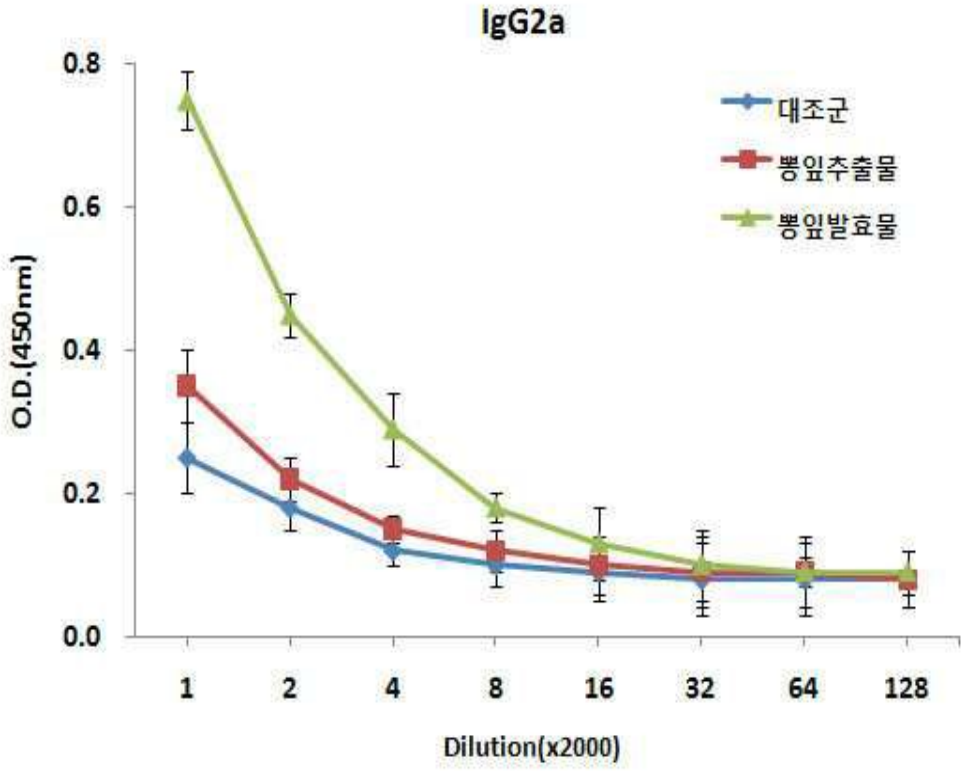
도면8


700
600
500
400
300
200
100
0
IL-4 production (pg/㎖)
대조군
뽕잎추출물
뽕잎발효물

도면9



도면10



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부