



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년01월16일
(11) 등록번호 10-1104397
(24) 등록일자 2012년01월03일

(51) Int. Cl.

A61K 35/74 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0117375

(22) 출원일자 2008년11월25일

심사청구일자 2008년11월25일

(65) 공개번호 10-2010-0058823

(43) 공개일자 2010년06월04일

(56) 선행기술조사문헌

KR100808910 B1*

KR100763037 B1*

KR100585391 B1*

KR100508109 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동, 한국생명
공학연구원)

(72) 발명자

권두한

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 308동 204호 (전민동, 엑스포아파트)

최화정

대전광역시 서구 괴정로165번길 15, 401호 (용문동, 성배주택)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이학수, 백남훈, 한라특허법인

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김은희

(54) 유산균 발효유 필터액을 함유하는 바이러스 감염 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유산균 발효유 필터액을 함유하는 바이러스 감염 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 유산균으로 알려진 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유에 균체를 제거한 발효유 필터액이 호흡기 질환을 일으키는 바이러스인 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스, 심근염, 피부발진 등을 유발하는 코사키바이러스, 수족구병을 일으키는 엔테로바이러스에 대한 증식 억제 활성을 나타냄을 확인함으로써 상기 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 바이러스 감염 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

(72) 발명자

송재형

충청남도 공주시 한적1길 8-31, 102동 504호 74 (신관동, 신라아파트)

이형규

대전광역시 유성구 어은로 57, 111동 101호 (어은동, 한빛아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)를 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유에서 균이 제거된 상태의 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 또는 코사키바이러스 감염 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*)를 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유에서 균이 제거된 상태의 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 또는 코사키바이러스 감염 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*)을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유에서 균이 제거된 상태의 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 코사키바이러스 감염 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*)을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유에서 균이 제거된 상태의 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 인플루엔자바이러스 또는 코사키바이러스 감염 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

본 발명은 유산균 발효유 필터액을 함유하는 바이러스 감염 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 일반적으로 유산균은 락토스를 젖산으로 전환할 수 있는 능력을 가진 균을 말하며, 유산균의 종류에는 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 류코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.), 페디오코카스 속(*Pediococcus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 등이 있다.
- [0003] 유산균과 관련된 항바이러스능에 대해서는 선행기술들이 소개되어 있다.
- [0004] 이중화 등이 출원한 특허[출원 제2007-0115356호]에서는 김치의 숙성과정에서 나타나는 유산균을 PBS로 현탁한 후 초음파파쇄기로 균체를 파쇄하여 얻은 상등액을 인플루엔자 바이러스 억제 효과를 나타내고 있다고 하였다. 장동일 등이 발명한 한국 등록 특허[제552462호]에서는 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*), 류코노스톡 메첸테로이드 서브스피. 텍스트라니쿰(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. dextranicum), 류코노스톡 김치아이(*Leuconostoc kimchii*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 웨이셀라 코레엔시스(*Weissella koreensi*) 등의 김치 유산균을 MRS 배양액을 이용하여 제조되는 배양액 조성물이 바이러스의 감염 억제 효과가 있다고 서술하고 있다. 락토바실러스 람노스(*Lactobacillus rhamnosus*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*)의 항바이러스 활성은 미국 출원(2003/00911540 A1)에서 연고제로서의 항균, 항진균, 항바이러스제 용도가 이미 서술되어 있으나, 실시예에 항바이러스 활성에 대해서는 전혀 서술되어 있지 않으면서 특허청구범위에는 항바이러스제 용도가 포함되어 있다.
- [0005] 유산균의 배양에는 대부분 MRS 배양액을 사용한다. MRS 배양액에서는 발효유가 생성되지 않으며 우유를 기질로 가해야만 발효유가 생성된다. 식품공전[한국식품공업협회 2002. p189]에 따르면 발효유는 원유 또는 유가공품을 유산균, 효모로 발효시킨 것을 말한다. 발효유는 매우 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려졌다. 장내를 산성화하여 세균의 성장을 억제하고 독소생성효소를 억제하며 암을 억제하고 장염이나 기생충을 억제하고 당과 인슐린 량을 조절하며 미네랄 흡수를 도우며 염증질환을 억제한다[Schumann C. 2002. Eur J. Nutr 1:17-25]. 발효유의 특성에서 Prohoveanu E 등이 발표한 논문[Prohoveanu E 등 1986. Virologie 37(1):49-53]에서 끓인 우유, 젖산으로 산화시킨 우유, 끓인 발효유 상등액을 비교 시험한 결과에서 끓인 발효유 상등액이 인플루엔자바이러스 (A/PR/8/34)를 감염시킨 쥐의 폐 조직 분쇄물의 혈구응집반응을 억제하는 효과가 가장 나왔으며 비처리군에 비해 쥐의 생존기간을 증가시킨다고 하였다. 그러나, 혈액을 포함한 동물 생체조직 분쇄물은 혈액 내의 알파 2-마크로글루블린과 콘글루티닌(conglutinin)도 인플루엔자바이러스의 혈구응집반응을 억제하는 특성이 있어[Wakamiya N, Okuno Y, Sasao F, Ueda S, Yoshimatsu K, Kaiki M, Kurimura T. 1992. Biochem Biophys Res Commun 187(3): 1270-1278], 바이러스를 분리한 것이 아닌 생체조직 분쇄물의 혈구응집반응 시험결과 만으로는 항인플루엔자바이러스능이 있다고 보기 어렵고 생체 외의 단독 인플루엔자바이러스 감염실험에서 인플루엔자바이러스의 증식을 억제하는 시험이 수반되어야 한다.
- [0006] Isolauri 등 [Isolauri E, Juntunen ZM, Rautanen T, Sillanaukee P, Koivula T. 1991. pediatrics 88(1):90-97]은 락토바실러스 균주(*Lactobacillus casei* sp strain)가 설사를 일으킨 환자를 대상으로 효과가 있음을 확인하였으나 그 효능이 발효유보다는 균주 분쇄물이 더 높다고 하였다. Kaila 등이 발표한 논문[Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. 1992. Pediatr Res 32(2):141-144]과 Marteau PR 등이 발표한 논문[Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. 2001. Am J Clin Nutr 73: 430s-436s]에서도 로타바이러스 감염으로 인한 설사에 균주 분쇄물이 효능을 발휘하는 것을 보고한 바 있다.
- [0007] 한편, 바이러스 질환은 매우 다양한 질병을 유발하며 바이러스의 종류에 따라 그 증상도 각기 다르다. 호흡기질환을 일으키는 바이러스는 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스, 라이노바이러스 등이 있으며 설사 등 장염을 유발하는 바이러스는 로타바이러스, 엔테로바이러스이며, 면역질환은 레트로바이러스, 암을 유발하는 바이러스는 아데노바이러스, 파필로마바이러스 B형 및 C형 간염 바이러스 등이다. 또한, 헤르페스바이러스는 얼굴이나 생식기 피부에 포진을 일으키기도 한다.
- [0008] 엔테로바이러스에는 폴리오바이러스 그룹, 코사키바이러스 그룹, 엔테로바이러스 그룹으로 나뉘어지는데 엔테로바이러스 감염 환자는 전 세계적으로 5천만 명의 환자가 있을 것으로 추산된다[Morens DM 과 Pallansch MA 1995. In; Human enterovirus infections. Robalt HA (ed) Washington, DC, ASM Press, pp3-23]. 폴리오바이러스는 감기나 소아마비를 일으키고[Pallansch MA 2003. In :infectious diseases. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR (eds). Philadelphia:Lippincott, Williams and Wilkins, pp 2347-2057], 코사키바이러스는 무균 척수염이나 뇌염 [Chonmaitree T. 등, 1981. Pediatrics. 489-493], 급성 근육마비, 심근염[Fujioka S, 등.

2001. Biodrugs. 15(12):791-799], 타입 I형 당뇨[Green J 등. 2004. Diabet Med. 21(6):507-514], 피부발진 [Moreira RC 등, 1995. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 37(3):235-238], 엔테로바이러스는 수족구 병[Chang LY 등, 1998. Lancet 352: 367-368]의 원인이다.

[0009] 인플루엔자바이러스는 인플루엔자 A, B, C 형 바이러스가 있는데, 이 중 발병 빈도수가 높은 것은 인플루엔자 A 형 바이러스와 인플루엔자 B형 바이러스이다. 따라서, 매년 독감 예방 백신은 2종의 A형 바이러스와 1종의 B형 바이러스가 혼합된 형태로 제조된다. 인플루엔자는 매년 10억 명의 환자가 발생하며 심한 호흡기질환을 유발하며 사망하는 예도 발생한다. 특히, 유행성 인플루엔자의 경우는 사망률이 더 높아지는데 1918년 대유행 때에는 15~50백만 명의 사망자가 속출했으며, 1957년에는 2백만 명이 사망했고 1968년에는 1백만 명이 사망하였다. H5N1형의 조류 인플루엔자바이러스가 사람에게 감염된 사례가 보고되면서 최근 조류 인플루엔자바이러스에 감염되어 사망하는 사례가 증가되고 있어 조류 인플루엔자바이러스의 대유행 가능성이 점차 높아지고 있다[G Juckett. 2006. American Family Physician 74(5) 785-790].

[0010] 코로나바이러스는 숙주동물에 따라 각기 발병되는 증상이 다른데 사람에게는 호흡기질환(HCoV-229E), 생쥐에게는 간염증상(MHV-A59)을, 돼지에게는 심한 설사증상(TGE-Purdue 115, PED-CV777), 소에게는 호흡기질환(BCoV-ENT)을 유발하고 있으며 2003년에 나타난 사스바이러스는 중증 호흡기질환을 사람에게 유발한다.

[0011] 엔테로바이러스, 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스 등은 아직도 이들 바이러스 감염으로 인한 질병으로 인한 인명피해나 가축의 피해가 크나 아직 이들 바이러스 감염질환에 대해 효율적으로 예방 또는 치료할 수 있으면서 부작용이 적은 약제가 개발되어 있지 못한 실정이다.

[0012] 또한, 발효유는 오래전부터 식품으로서 여러 생리활성의 특성으로 여러 질병에 대한 예방 또는 치료의 목적으로 사용되어 왔으나, 바이러스 질병에 대하여 직접적으로 억제할 수 있는 효능에 대하여는 구체적으로 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0013] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 점을 감안하여 연구 노력한 결과, 유산균에서 엔테로바이러스, 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스에 대하여 우수한 항바이러스 활성을 갖는 활성을 나타낼 수 있는 발효유를 생산하는 균주를 선별하고, 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 후에 균체를 제거하고 가열처리를 하지 않은 발효유 필터액이 엔테로바이러스, 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스들이 각각의 숙주세포 내에서의 증식억제능을 직접적으로 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0014] 따라서 본 발명은 상기 유산균을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 후에 균체를 제거하고 가열처리를 하지 않은 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 바이러스 감염 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 항바이러스 건강식품, 사료 및 화장품을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제 해결수단

[0016] 본 발명은 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 바이러스 감염 질환 예방 및 치료용 조성물을 그 특징으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명은 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유 필터액을 유효성분으로

함유하는 항바이러스 건강식품을 제공하는데 또 다른 특징이 있다.

- [0018] 또한, 본 발명은 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 항바이러스 사료를 제공하는데 또 다른 특징이 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 항바이러스 화장품을 제공하는데 또 다른 특징이 있다.
- [0020] 이와 같은 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0021] 본 발명은 유산균으로 알려진 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균을 동물성 밀크에 접종하여 발효시킨 발효유에서 균체를 제거한 발효유 필터액이 호흡기 질환을 일으키는 바이러스인 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스, 심근염, 피부발진 등을 유발하는 코사키바이러스, 수족구병을 일으키는 엔테로바이러스에 대한 증식 억제 활성을 나타냄을 확인함으로써 상기 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 바이러스 감염 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명의 목적상 바이러스는 엔테로바이러스, 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스이다. 엔테로바이러스에는 폴리오바이러스, 코사키바이러스, 엔테로바이러스 등이 포함되어 있으며 인플루엔자바이러스에는 인플루엔자 A형, B형, C형 바이러스가 포함되어 있으며 코로나바이러스에는 사람코로나바이러스(HCoV-229E), 돼지 코로나바이러스, 소코로나바이러스, 사스코로나바이러스(SARS-CoV) 등이 포함되어 있다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "항바이러스[anti-virus] 활성"이란 상기 엔테로바이러스, 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스이며 보다 구체적으로 엔테로바이러스에 속하는 폴리오바이러스, 코사키바이러스, 엔테로바이러스의 다양한 아형과 변이형, 인플루엔자바이러스에 인플루엔자 A형, B형, C형 바이러스의 다양한 아형과 변이형, 코로나바이러스에 속하는 사람코로나바이러스, 돼지코로나바이러스, 사스코로나바이러스의 다양한 아형과 변이형을 포함하며 바이러스 입자 생성을 억제하는 능력, 즉 숙주세포에서 인플루엔자바이러스의 형성 및/또는 복제를 효과적으로 억제하는 능력을 의미한다. 본 발명에서 제공하는 조성물은 바이러스 복제 또는 증식 등에 필요한 기작을 방해하여 항바이러스 활성을 가진다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "발효유"는 동물성 밀크를 기질로 하여 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균을 첨가하였을 때 생성되는 조성물은 발효유 필터액의 건조 분말 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함한다. 상기 동물성 밀크는 동물의 젖, 구체적으로 사람의 젖, 소의 젖 또는 염소의 젖 등이 바람직하며, 탈지유로부터 환원된 우유 또는 분말 우유 등도 이에 포함될 수 있다.
- [0025] 엔테로바이러스, 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스에 대하여 유효한 억제능을 보이는 것으로 확인된 본 발명의 하나의 목적은 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균이 동물성 밀크를 기질로 하여 생성된 발효유 필터액을 단독 사용하거나 둘 이상의 성분을 배합하여 사용할 수 있다. 선택된 성분의 배합비는 다양하게 조절될 수 있다. 배합 사용할 경우에는 개개 성분들을 배합하여 추출하거나 개개 성분들로부터 각각 추출한 후 혼합할 수 있으며, 바람직하게는 최적의 조건에서 발효한 후 혼합할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균이 동물성 밀크를 기질로 하여 생성된 발효유 필터액 또는 이의 배합물을 포함하는 조성물은 약효를 증가시키지는 않으나 약제 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가성분을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 비타민B1, B2, B6, C, E, 니아신, 카르니틴, 베타인, 엽산 판토텐산, 비오틴, 아연, 철, 칼슘, 크롬, 마그네슘, 이들의 혼합물 등의 무기, 유기 첨가

물들을 추가로 포함할 수 있다.

- [0027] 본 발명의 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균이 동물성 밀크를 기질로 하여 생성된 발효유 필터액은 식품으로 사용하거나 필터액을 건조하여 사용할 수 있다.
- [0028] 바람직한 본 발명의 발효유 제조 과정은 MRS(de Man, Rogosa, & Sharpe) 배지에서 배양한 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균을 동물성 밀크에 접종하는 단계; 35 ~ 45 °C에서 1 ~ 3 일간 1차 발효시키는 단계; 다시 2 ~ 6 °C에서 12 ~ 36 시간 동안 2차 발효시켜서 발효유를 제조하는 단계를 포함한다
- [0029] 유산균을 밀크에 접종 시 밀크 100 ml당 유산균 $2 \sim 5 \times 10^7$ 개를 접종시키는 것이 적절한 유산균 발효유를 생성케 하는 이유로 바람직하다.
- [0030] 상기 발효유를 건조 시 건조방법으로는 동결건조, 진공건조, 열풍건조, 분무건조, 감압건조, 분무건조, 포말건조, 고주파건조, 적외선건조 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 건조공정을 통하여 수분함량을 10% 이하로 줄일 수 있으며, 또한 건조 전에 여과액을 농축기에 넣고 수분함량을 줄이는 공정을 추가할 수 있다. 경우에 따라, 최종 건조된 발효유를 분쇄하는 공정을 추가할 수도 있다.
- [0031] 상기 방법으로 제조된 본 발명의 조성물을 개체에 투여하여 바이러스에 감염된 개체를 치료 또는 예방할 수 있다. 본 발명의 조성물을 투여할 수 있는 개체는 바이러스에 감염될 수 있는 모든 숙주를 모두 포함한다. 다양한 개체에서의 바이러스 감염 질환의 예방 및 치료를 위하여 본 발명의 조성물은 약학적 조성물, 사료, 식품, 화장품 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [0032] 구체적인 양태로서, 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균이 동물성 밀크를 기질로 하여 생성된 발효유 필터액을 포함하는 항바이러스 조성물은 의약품, 식품, 사료 및 화장품으로 제공된다.
- [0033] 또한, 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균 배양액을 포함하는 항바이러스 조성물을 포함한다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 상기 유산균 발효유 필터액 또는 배양액 외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기체, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 발효유 필터액 또는 배양액의 투여량은 동물의 무게, 연령 상태 등에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 1일에 0.1 ~ 1000 mg/kg, 바람직하게는 1 ~ 100 mg/kg의 양이 투여되도록 하며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 수회, 바람직하기로는 1회 내지는 4회 분할 투여할 수 있다.
- [0036] 또 다른 구체적인 양태로서, 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균이 동물성 밀크를 기질로 하여 생성된 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 식품[또는 건강식품]으로 제공된다.
- [0037] 본 발명의 식품은 상기 유산균 발효유 필터액 외에 적절한 담체 및 부형제 또는 보조 유효성분 등과의 혼합에 의하여 분말제, 과립제, 정제, 캡슐제 또는 드링크제의 형태로 제형화될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물의 제형에 사용되기에 적합한 담체, 부형제 및 희석제에는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아검, 인산칼슘, 알긴산염, 트래거캔스 고무, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리

돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸셀룰로오스, 메틸 및 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아르산마그네슘 또는 광유 등이 포함된다. 본 발명의 식품을 제품화하기 위하여, 운활제, 습윤제, 유화제 및 현탁화제, 방부제, 감미제 또는 향미제를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0038] 또 다른 구체적인 양태로서, 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균이 동물성 밀크를 기질로 하여 생성된 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 사료로 제공된다.

[0039] 본 발명의 사료는 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 사료는 경구 투여 또는 경피 투여를 위해 고형 제제 또는 액체 제제로 사용하며, 상기 발효유에 전분, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등과 같은 부형제나 스테아린산 마그네슘(Magnesium stearate), 탈크(talc) 등과 같은 활택제를 추가로 포함하여 사용할 수도 있다. 투여단위는 예를 들어, 개별 투여량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있고, 개별 투여량은 바람직하기로는 가축 사료용 첨가제가 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

[0041] 또 다른 구체적인 양태로서, 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균이 동물성 밀크를 기질로 하여 생성된 발효유 필터액을 유효성분으로 함유하는 기능성 화장품으로 제공된다. 본 발명에 의한 유산균 발효유 필터액을 화장수, 크림, 로션, 에센스 등의 화장료 조성물에 첨가할 수 있으며, 그 양은 전체 화장료 조성물 중량에 대하여, 0.1 내지 100 중량%가 되도록 하는 것이 바람직하다.

[0042] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 바이러스의 감염이 의심되는 개체에게 투여하여 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명에서 용어, "바이러스 감염 질환"이란 바이러스의 감염으로 유발되는 질환을 일컬으며, 구체적으로는 엔테로바이러스, 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스 감염으로 인한 질환 등을 예시할 수 있다.

[0044] 본 발명에서 용어, "개체"란 바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고 본 발명의 유산균 발효유 필터액을 포함하는 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물로 다양한 바이러스 아형 또는 변이형의 바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물로 다양한 인플루엔자바이러스 아형 또는 변이형의 바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 다양한 바이러스 아형 또는 변이형의 바이러스로 감염된 닭, 돼지 등의 가축질환을 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물을 기존의 바이러스 감염 질환 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

효 과

[0046] 본 발명의 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상의 유산균이 동물성 밀크를 기질로 하여 생성된 발효유 필터액 또는 배양액은 바이러스 감염 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제공한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0048] **참조예 1: 유산균의 배양**

[0049] 본 발명에 사용된 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*)은 비전바이오사로부터 구입하였으며, MRS[de Man, Rogosa, & Sharpe] 배지에서 3×10^5 cfu/ml이 되도록 배양하였다. 세포배양액에는 MRS 배양액을 0.22 μ m 필터에 여과하여 유산균을 제거한 액을 항바이러스능 측정에 사용하였다.

[0050] **참조예 2 : 발효유 필터액의 제조**

[0051] MRS 배지에서 배양한 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*)들을 각각 100 ml의 일반우유에 3×10^5 cfu/ml이 되도록 넣고 40 °C에서 2 일간 1차 발효시킨 후에 다시 4 °C에서 24 시간동안 2차 발효시켜서 발효유를 제조하였다. 제조된 발효유는 동물세포 배양용 배지인 MEM과 동량으로 섞은 후에 0.22 μ m 필터에 여과하여 유산균을 제거한 액(발효유 필터액)을 항바이러스능 측정에 사용하였다.

[0052] **참조예 3: 바이러스의 배양**

[0053] 유산균의 항바이러스 활성 분석에 사용된 인플루엔자 A 형 바이러스[A/WS/33]와 인플루엔자 B형 바이러스[B/Lee/40], 엔테로바이러스로서는 코사키 A16 바이러스, 코사키 B3 바이러스, 코사키 B4 바이러스, 엔테로바이러스 71(EV71)은 ATCC로부터 구입하였으며, 돼지 유행성 설사 바이러스[PEDV-CV777]는 국립수의과학검역원으로부터 분양받았다. 인플루엔자 A형 바이러스와 인플루엔자 B형 바이러스는 MDCK 세포에서 증식 배양하였으며, 엔테로바이러스로서는 코사키 A16 바이러스, 코사키 B3 바이러스, 코사키 B4 바이러스, 엔테로바이러스 71, 돼지 유행성 설사 바이러스는 Vero 세포에서 증식 배양하고 각각의 바이러스 역가를 측정하여 TCID50에 해당하는 바이러스 용액을 산출하였다.

[0054]

[0055] **실시예 1: 코사키바이러스에 대한 발효유 필터액과 MRS 배양액의 항바이러스능 시험**

[0056] 발효유 필터액의 바이러스 증식 억제능을 측정하기 위해서, Vero 세포 2×10^4 개를 96 웰 플레이트의 각 웰에 넣고 24 시간 배양하였다. 24 시간 후에 각 웰의 배양 상등액을 제거하고, TCID 50이 되도록 희석한 1종의 코사키 A 바이러스(A16)와, 2 종의 코사키 B 바이러스(B3, B4) 바이러스 용액 90 μ l을 각 웰에 넣은 다음, 상기 참고예 2에서 제조한 발효유 필터액 배지 혼합액 10 μ l를 각 웰에 투여하였다(발효유 필터액의 최종 농도 5%).

[0057] 한편, 각 균주를 MRS 배지에서 배양한 MRS 배양액을 동량의 MEM 배지와 섞은 후에 0.22 μ m 필터에 여과시켜서 10 μ l를 각 웰에 투여하였다(MRS 배양액의 최종 농도 5%).

[0058] 각 발효유 필터액의 바이러스 증식 억제능 측정은 권두한 등이 발명한 등록 특허 제682069호에 제시된 방법에 따라 실시하였다. 바이러스 감염시험이 종료된 후에 각 웰에 10% TCA(trichloroacetic acid)를 100 μ l씩 첨가한 후 1 시간 동안 4 °C에 방치하고 증류수로 수회 세척하였다. 실온에서 건조시킨 후 1%(v/v) 아세트산에 녹인 0.4%(w/v) SRB(sulforhodamine B) 용액 100 μ l를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 세포와 결합하지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) 아세트산으로 수회 세척한 다음 다시 건조시켰다. 각 웰에 10 mM 트리스 용액(pH 10.5) 100 μ l를 각 웰에 가하여 세포와 결합되어 있는 염색제를 충분히 녹인 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 처리군은 바이러스를 처리하지 않은 군(A), 발효유 필터액만을 처리한 군[B], 바이러스만을 처리한 군[C], 바이러스와 발효유 필터액을 같이 처리한 군[D]으로 표기하였고 각각 발효유의 세포생존율(%)[수학식 1]과 발효유 필터액의 바이러스에 대한 증식억제능(%)[수학식 2]로 계산하였다. 결과에 대한 통계는 동일한 조건에서 수행한 3번의 실험결과 수치에 대한 평균값과 표준편차로 계산한 값을 제시하였다.

수학식 1

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

수학식 2

$$\text{바이러스 증식 억제능(\%)} = \frac{D - C}{B - C} \times 100$$

각 유산균 발효유 필터액 또는 MRS 배양액 5% 농도에서의 세포생존율(%) 및 바이러스 증식 억제능(%)을 구하여 다음 표 1(세포생존율)과 표 2 및 표 3(바이러스 증식 억제능)에 나타내었다.

표 1

발효유 필터액 및 MRS 배양액의 비처리군의 Vero 세포에 대한 세포생존율

구분(%)	Vero 세포		
	비처리군	발효유 필터액	MRS 배양액
락토바실러스 람노수스	104.00 ± 7.21	99.72 ± 1.87	100.56 ± 2.52
락토바실러스 플란타룸	97.00 ± 0.99	100.13 ± 2.12	97.05 ± 0.99
락토바실러스 에시도필러스	104.00 ± 8.23	99.09 ± 2.04	104.34 ± 8.23
비피도박테리움 비피디움	99.50 ± 2.15	104.14 ± 3.07	99.50 ± 2.15

상기 표 1에서 나타난 바와 같이, 락토바실러스 람노수스, 락토바실러스 에시도필러스, 락토바실러스 플란타룸, 비피도박테리움 비피디움 균들의 발효유 필터액이나 MRS 배양액은 5%의 농도조건에서 비피도박테리움 비피디움을 제외하고 대조군에 비하여 95 ~ 114%의 세포생존율을 보임으로써 세포 성장에 영향을 거의 미치지 않음을 알 수 있다.

표 2

코사키바이러스에 대한 발효유 필터액의 항바이러스능 분석

구분(%)	비감염군	감염군			
		비처리군	CA16	CB3	CB4
락토바실러스 람노수스 발효유 필터액	99.72 ± 1.87	0.00 ± 12.60	58.49 ± 4.76	87.98 ± 3.53	66.66 ± 1.89
락토바실러스 플란타룸 발효유 필터액	97.05 ± 0.99	0.00 ± 12.60	95.40 ± 2.95	25.79 ± 0.95	80.27 ± 6.58
락토바실러스 에시도필러스 발효유 필터액	99.09 ± 2.04	0.00 ± 12.60	56.63 ± 0.16	58.94 ± 1.42	42.96 ± 0.98
비피도박테리움 비피디움 발효유 필터액	104.14 ± 3.07	0.00 ± 12.60	109.44 ± 0.16	111.22 ± 1.23	118.53 ± 1.89

표 3

코사키바이러스에 대한 MRS 배양액의 항바이러스능 분석

구분(%)	비감염군	감염군			
		비처리군	CA16	CB3	CB4
락토바실러스 람노수스 배양액	100.56 ± 2.52	0.00 ± 12.60	-7.17 ± 0.65	1.68 ± 0.38	-28.53 ± 0.19
락토바실러스 플란타룸 배양액	97.05 ± 0.99	0.00 ± 12.60	18.32 ± 0.50	32.75 ± 3.51	9.90 ± 1.28
락토바실러스 에시도필러스 배양액	104.34 ± 8.23	0.00 ± 12.60	0.60 ± 2.34	26.44 ± 4.46	9.14 ± 2.55
비피도박테리움 비피디움 배양액	99.50 ± 2.15	0.00 ± 12.60	3.90 ± 1.77	47.18 ± 2.47	42.33 ± 4.47

[0066] 상기 표 2와 표 3에 나타난 바와 같이, 락토바실러스 람노수스를 접종한 발효유 필터액은 1/20(5%)의 농도에서 코사키바이러스 A16 형에서는 58.4% 이상의 억제능을, 코사키바이러스 B3 형에서는 87.9% 이상의 억제능을 보였으며, 코사키바이러스 B4 형에서는 66.6% 이상의 억제능을 보였으며, MRS 배양액은 코사키바이러스 A16 형에서 -7.17% 이상의 억제능을, 코사키바이러스 B3 형에서 1.68% 이상의 억제능을, 코사키바이러스 B4 형에서 -28.53% 이상의 억제능을 보여 발효유 필터액이 MRS 배양액 보다 2 ~ 50배 이상의 항바이러스능을 나타내었다. 락토바실러스 플란타룸을 접종한 발효유 필터액은 1/20(5%)의 저농도에서 코사키바이러스 A16 형에서는 95.4% 이상의 억제능을, 코사키바이러스 B3 형에서는 25.79% 이상의 억제능을 보였으며, 코사키바이러스 B4 형에서는 80.27% 이상의 억제능을 보였으며, MRS 배양액은 코사키바이러스 A16 형에서 18.32% 이상의 억제능을, 코사키바이러스 B3 형에서 32.75% 이상의 억제능을 보였으며, 코사키바이러스 B4 형에서 9.93% 이상의 억제능을 보여 CB3 형 바이러스를 제외하고는 발효유 필터액은 MRS 배양액보다 항바이러스능이 뛰어났다. 락토바실러스 에시도프루스를 접종한 발효유 필터액은 1/20(5%)의 저농도에서 코사키바이러스 A16 형에서는 56.6% 이상의 억제능을, 코사키바이러스 B3 형에서는 58.9% 이상의 억제능을 보였으며, 코사키바이러스 B4 형에서는 42.96% 이상의 억제능을 보였으며, MRS 배양액은 코사키바이러스 A16 형에서 0.6% 이상의 억제능을, 코사키바이러스 B3 형에서 25.44% 이상의 억제능을 보였으며, 코사키바이러스 B4 형에서 9.14% 이상의 억제능을 보여 발효유 필터액은 MRS 배양액 보다 2 ~ 90배 이상 항바이러스능이 뛰어났다. 비피도박테리움 비피디움을 접종한 발효유 필터액은 1/20(5%)의 저농도에서 코사키바이러스 A16 형에서는 109.4% 이상의 억제능을, 코사키바이러스 B3 형에서는 111.2% 이상의 억제능을 보였으며, 코사키바이러스 B4 형에서는 118.5% 이상의 억제능을 보였으며, MRS 배양액은 코사키바이러스 A16 형에서 3.9% 이상의 억제능을, 코사키바이러스 B3 형에서 47.18% 이상의 억제능을 보였으며, 코사키바이러스 B4 형에서 42.3% 이상의 억제능을 보여 발효유 필터액은 MRS 배양액 보다 2 ~ 27 배 이상 항바이러스능이 뛰어났다.

[0067] 실시예 2: 엔테로바이러스에 대한 발효유 필터액의 항바이러스능 시험

[0068] 발효유 필터액의 엔테로바이러스 71(EV71)에 대한 바이러스 증식 억제능을 측정하기 위해서, Vero 세포 2 × 10⁴ 개를 96 웰 플레이트(well plates)의 각 웰에 넣고 24시간 배양하였다. 24 시간 후에 각 웰의 배양 상등액을 제거하고 TCID₅₀이 되도록 희석한 EV71 바이러스 용액 90 μl을 각 웰에 넣은 다음, 상기 참고예 2에서 제조한 발효유 필터액 배지 혼합액 10 μl을 각 웰에 투여하였다(발효유 필터액의 최종 농도 5%). 각 발효유 필터액의 바이러스 증식 억제능 측정은 권두한 등이 발명한 특허 등록 제682069호에 제시된 방법에 따라 실시하였다. 감염시험이 종료된 후에 96 웰 플레이트의 각 웰에 10% TCA(trichloroacetic acid)를 100 μl씩 첨가한 후 1시간 동안 4 °C에 방치하고 증류수로 수회 세척하였다. 실온에서 건조시킨 후 1%(v/v) 아세트산에 녹인 0.4%(w/v) SRB(sulforhodamine B) 용액 100 μl를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 세포와 결합하지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) 아세트산으로 수회 세척한 다음 다시 건조시켰다. 각 웰에 10 mM 트리스 용액(pH 10.5) 100 μl를 각 웰에 가하여 세포와 결합되어 있는 염색제를 충분히 녹인 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 실시예 1과 같은 방법으로 세포생존율(%)과 바이러스 증식 억제능(%)을 구하여 상기 표 1(세포생존율)과 다음 표 4(바이러스 증식 억제능)에 나타내었다.

표 4

[0069] 엔테로바이러스에 대한 발효유 필터액과 MRS 배양액의 항바이러스능 비교

구분(%)	비감염군	EV71 감염군		
		비처리군	발효유 필터액	MRS 배양액
락토바실러스 람노수스	99.72 ± 1.87	0.00 ± 12.60	47.78 ± 4.73	26.64 ± 0.17
락토바실러스 플란타룸	97.05 ± 0.99	0.00 ± 12.60	92.74 ± 1.63	11.47 ± 1.25
락토바실러스 에시도프루스	104.00 ± 8.23	0.00 ± 12.60	57.09 ± 3.96	30.91 ± 0.06
비피도박테리움 비피디움	99.50 ± 2.15	0.00 ± 12.60	90.44 ± 2.64	21.85 ± 1.71

[0070] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 엔테로바이러스 EV71에 대한 항바이러스능 분석에서 1/20(5%)의 저농도에서 락토바실러스 람노수스를 접종한 발효유 필터액은 47.7% 이상의 억제능을, 락토바실러스 플란타룸을 접종한 발효유 필터액은 92.7% 이상의 억제능을, 락토바실러스 에시도프루스를 접종한 발효유 필터액은 57.0% 이상의 억

제능을, 비피도박테리움 비피디움을 접종한 발효유 필터액은 90.44% 이상의 억제능을 보인 반면, 1/20(5%)의 저농도에서 락토바실러스 람노수스의 MRS 배양액은 26.6% 이상의 억제능을, 락토바실러스 플란타룸의 MRS 배양액은 11.4% 이상의 억제능을, 락토바실러스 에시도필러스의 MRS 배양액은 30.9% 이상의 억제능을, 비피도박테리움 비피디움의 MRS 배양액은 1/20(5%)의 저농도에서 21.85% 이상의 억제능을 보여 모두 4종의 균주 모두 발효유 필터액이 MRS 배양액 보다 높은 항바이러스능을 나타내었다.

[0071] 실시예 3: 인플루엔자바이러스에 대한 발효유 필터액의 항바이러스능 시험

[0072] 발효유 필터액의 인플루엔자바이러스들에 대한 바이러스 증식 억제능을 측정하기 위해서, MDCK(Madin-Darby canine kidney) 세포 2×10^4 개를 96 웰 플레이트의 각 웰에 넣고 24 시간 배양하였다. 24시간 후에 각 웰의 배양 상등액을 제거하고 TCID 50이 되도록 희석한 2종의 인플루엔자 A 바이러스(A/WS/33, A/PR/8/34)와 1종의 인플루엔자 B 바이러스(B/Lee/40) 바이러스 용액을 90 μ l씩 각 웰에 넣은 다음, 상기 참고예 2에서 제조한 발효유 필터액 배지 혼합액 10 μ l를 각 웰에 투여하였다(발효유 필터액의 최종 농도 5%). 각 발효유 필터액의 바이러스 증식 억제능 측정은 권두한 등이 발명한 등록 특허 제682069호에 제시된 방법에 따라 실시하였다.

감염시험이 종료된 후에 96 웰 플레이트의 각 웰에 10% TCA(trichloroacetic acid)를 100 μ l씩 첨가한 후 1 시간 동안 4 $^{\circ}$ C에 방치하고 증류수로 수회 세척하였다. 실온에서 건조시킨 후 1%(v/v) 아세트산에 녹인 0.4%(w/v) SRB(sulforhodamine B) 용액 100 μ l를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 세포와 결합하지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) 아세트산으로 수회 세척한 다음 다시 건조시켰다. 각 웰에 10 mM 트리스 용액(pH 10.5) 100 μ l를 각 웰에 가하여 세포와 결합되어 있는 염색제를 충분히 녹인 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 실시예 1과 같은 방법으로 세포생존율(%)과 바이러스 증식 억제능(%)을 구하여 다음 표 5(세포생존율)와 표 6 및 표 7(바이러스 증식 억제능)에 나타내었다.

표 5

[0073] 발효유 필터액 및 MRS 배양액의 비처리군의 MDCK 세포에 대한 세포생존율

구분(%)	MDCK 세포		
	비처리군	발효유 필터액	MRS 배양액
락토바실러스 람노수스	100.0 \pm 8.28	113.77 \pm 8.15	115.16 \pm 8.60
락토바실러스 플란타룸	100.0 \pm 8.28	106.79 \pm 20.99	99.17 \pm 5.91
락토바실러스 에시도필러스	100.0 \pm 8.28	114.30 \pm 3.77	110.68 \pm 4.09
비피도박테리움 비피디움	100.0 \pm 8.28	69.94 \pm 6.98	96.56 \pm 5.88

[0074] 상기 표 5에서 나타낸 바와 같이, 락토바실러스 람노수스, 락토바실러스 플란타룸, 락토바실러스 에시도필러스의 발효유 필터액과 MRS 배양액은 비처리군에 비해 100% 이상의 세포성장율을 보였으나, 비피도박테리움 비피디움 균의 MRS 배양액과 발효유 필터액은 96%와 69%를 나타내어 다른 유산균주보다 낮은 MDCK 세포의 성장유도율을 나타내었다.

표 6

[0075] 인플루엔자바이러스에 대한 발효유 필터액의 항바이러스능 분석

구분(%)			발효유 필터액			
			락토바실러스 람노수스	락토바실러스 플란타룸	락토바실러스 에시도필러스	비피도박테리움 비피디움
비감염군			113.77 \pm 8.15	106.79 \pm 20.99	114.30 \pm 3.77	69.94 \pm 6.98
인플루엔자 바이러스 감염군	유형	비처리군	-	-	-	-
	A/PR/8/34	0.00 \pm 11.80	73.03 \pm 1.04	140.03 \pm 2.97	71.95 \pm 1.02	55.11 \pm 6.06
	A/WS/33	0.00 \pm 8.18	66.64 \pm 0.82	115.56 \pm 9.96	84.31 \pm 8.05	57.08 \pm 5.91
	B/Lee/40	0.00 \pm 13.0	72.42 \pm 12.53	136.12 \pm 9.37	83.49 \pm 4.16	70.22 \pm 4.49

표 7

[0076] 인플루엔자바이러스에 대한 MRS 배양액의 항바이러스능 분석

구분(%)			발효유 필터액			
			락토바실러스 람노수스	락토바실러스 플라타룸	락토바실러스 에시도필러스	비피도박테리움 비피디움
비감염군			115.16 ± 8.60	99.17 ± 5.919	110.68 ± 4.09	96.56 ± 5.88
인플루엔자 바이러스 감염군	유형	비치리균	-	-	-	-
	A/PR/8/34	0.00 ± 11.80	81.65 ± 2.40	76.59 ± 0.37	70.32 ± 1.71	77.67 ± 5.33
	A/WS/33	0.00 ± 8.18	66.71 ± 6.08	67.35 ± 5.94	77.48 ± 5.41	78.89 ± 20.87
	B/Lee/40	0.00 ± 13.0	91.54 ± 9.08	71.64 ± 6.33	83.47 ± 1.49	77.30 ± 2.31

[0077] 상기 표 6과 표 7에 나타난 바와 같이, 락토바실러스 람노수스를 접종한 발효유 필터액은 1/20(5%)의 저농도에서 인플루엔자 A/WS 바이러스에서는 66.6% 이상의 억제능을, 인플루엔자 A/PR/8/34 바이러스에서는 73.0% 이상의 억제능을 보였으며, 인플루엔자 B/Lee/40 바이러스에서는 72.4% 이상의 억제능을 보였으며, MRS 배양액은 인플루엔자 A/WS 바이러스에서는 66.7% 이상의 억제능을, 인플루엔자 A/PR 바이러스에서는 81.6% 이상의 억제능을 보였으며, 인플루엔자 B/Lee/40 바이러스에서는 91.5% 이상의 억제능을 보여, 인플루엔자바이러스의 종류에 따라 발효유 필터액 또는 MRS 배양액의 항바이러스능이 각기 다름을 나타내고 있다. 락토바실러스 플라타룸을 접종한 발효유 필터액은 1/20(5%)의 저농도에서 인플루엔자 A/WS 바이러스에서는 115.5% 이상의 억제능을, 인플루엔자 A/PR 바이러스에서는 140.0% 이상의 억제능을 보였으며, 인플루엔자 B/Lee/40 바이러스에서는 71.6% 이상의 억제능을 보였으며, MRS 배양액은 인플루엔자 A/WS 바이러스에서는 67.3% 이상의 억제능을, 인플루엔자 A/PR 바이러스에서는 76.5% 이상의 억제능을 보였으며, 인플루엔자 B/Lee/40 바이러스에서는 71.6% 이상의 억제능을 보여, 인플루엔자 A 바이러스에 대하여는 MRS 배양액 보다 발효유 필터액의 항바이러스능이 뛰어났으나, 인플루엔자 B 바이러스에 대하여는 발효유 필터액과 MRS 배양액의 항바이러스능이 비슷하게 나타났다. 락토바실러스 에시도필러스를 접종한 발효유 필터액은 1/20(5%)의 저농도에서 인플루엔자 A/WS 바이러스에서는 84.3% 이상의 억제능을, 인플루엔자 A/PR 바이러스에서는 71.9% 이상의 억제능을 보였으며, 인플루엔자 B/Lee/40 바이러스에서는 83.4% 이상의 억제능을 보였으며, MRS 배양액은 인플루엔자 A/WS 바이러스에서는 77.4% 이상의 억제능을, 인플루엔자 A/PR 바이러스에서는 70.3% 이상의 억제능을 보였으며, 인플루엔자 B/Lee/40 바이러스에서는 83.4% 이상의 억제능을 보여, 발효유 필터액이 MRS 배양액 보다 약간 항바이러스능이 높음을 나타냈다. 비피도박테리움 비피디움을 접종한 발효유 필터액은 1/20(5%)의 저농도에서 인플루엔자 A/WS 바이러스에서는 57.0% 이상의 억제능을, 인플루엔자 A/PR 바이러스에서는 55.1% 이상의 억제능을 보였으며, 인플루엔자 B/Lee/40 바이러스에서는 77.6% 이상의 억제능을 보였으며, MRS 배양액은 인플루엔자 A/WS 바이러스에서는 78.8% 이상의 억제능을, 인플루엔자 A/PR 바이러스에서는 77.7% 이상의 억제능을 보였으며, 인플루엔자 B/Lee/40 바이러스에서는 70.2% 이상의 억제능을 보여, 인플루엔자바이러스의 종류에 따라 비피도박테리움 비피디움을 접종한 발효유 필터액 또는 MRS 배양액의 항바이러스능이 각기 다름을 나타내고 있다.

[0078] 실시예 4: 코로나바이러스에 대한 발효유 필터액의 항바이러스능 시험

[0079] 발효유 필터액의 코로나바이러스들에 대한 바이러스 증식 억제능을 측정하기 위해서, Vero세포 2 × 10⁴ 개를 96 웰 플레이트의 각 웰에 넣고 24 시간 배양하였다. 24 시간 후에 각 웰의 배양 상등액을 제거하고 TCID₅₀이 되도록 희석한 PEDV 바이러스 용액을 90 μl씩 각 웰에 넣은 다음, 상기 참고예 2에서 제조한 발효유 필터액 배지 혼합액을 배양액으로 10 배 희석한 용액을 10 μl를 각 웰에 투여하였다(발효유 필터액의 최종 농도 1%). 각 발효유 필터액의 바이러스 증식 억제능 측정은 권두한 등이 발명한 등록 특허 제682069호에 제시된 방법에 따라 실시하였다. 감염 시험이 종료된 후에 96 웰 플레이트의 각 웰에 10% TCA(trichloroacetic acid)를 100 μl씩 첨가한 후 1 시간 동안 4 °C에 방치하고 증류수로 수회 세척하였다. 실온에서 건조시킨 후 1%(v/v) 아세트산에 녹인 0.4% (w/v) SRB(sulforhodamine B) 용액 100 μl를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 세포와 결합하지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) 아세트산으로 수회 세척한 다음 다시 건조시켰다. 각 웰에 10

mM 트리스 용액(pH 10.5) 100 μ l를 각 웰에 가하여 세포와 결합되어 있는 염색제를 충분히 녹인 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 실시예 1과 같은 방법으로 세포생존율(%)과 바이러스 증식 억제능(%)을 구하여 상기 표 1(세포생존율)과 다음 표 8(바이러스 증식 억제능)에 나타내었다.

표 8

[0080] 코로나바이러스에 대한 발효유 필터액의 항바이러스능 분석

구분(%)		락토바실러스 람노수스	락토바실러스 플란타룸	락토바실러스 에시도필러스	비피도박테리움 비피디움
비감염군		99.72 \pm 1.87	97.05 \pm 0.99	104.00 \pm 8.23	99.50 \pm 2.15
PEDV 감염군	비처리군	0.00 \pm 21.50	0.00 \pm 21.50	0.00 \pm 21.50	0.00 \pm 21.50
	MRS 배양액	58.70 \pm 4.61	35.90 \pm 0.05	11.80 \pm 12.00	69.80 \pm 9.41
	발효유 필터액	72.70 \pm 10.40	98.80 \pm 3.45	101.00 \pm 3.91	32.60 \pm 2.82

[0081] 상기 표 8에서 나타낸 바와 같이, 락토바실러스 람노수스, 락토바실러스 플란타룸, 락토바실러스 에시도필러스의 발효유 필터액은 돼지 유행성 설사바이러스(PEDV)에 대한 항바이러스능 분석에서 72.70, 98.80, 101.00%로 동량의 MRS 배양액을 처리했을 때의 58.70, 35.90, 11.80% 보다 훨씬 뛰어난 항바이러스능을 나타내었다. 다만, 비피도박테리움 비피디움을 접종한 발효유 필터액만이 MRS 배양액(69.80%) 보다 낮은 32.60%의 항바이러스능을 보였다.

[0082] **제조예 1: 분말 및 캡슐제의 제조**

[0083] 상기 참조예 2의 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상 발효유 필터액 또는 배양액 10 mg을 락토오스 14.8 mg, 결정성 셀룰로오스 3 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg과 함께 섞었다. 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 No.5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

[0084] 상기 분말 및 캡슐제의 구성성분은 다음과 같다.

- [0085] 유효성분 10 mg
- [0086] 락토오스 14.8 mg
- [0087] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0088] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0089] **제조예 2: 주사액제의 제조**

[0090] 상기 참조예 2의 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상 발효유 필터액 또는 배양액 10 mg을 함유하는 주사액제는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[0091] 유효성분 1 g, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르빈산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 ml을 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20 $^{\circ}$ C에서 30 분간 가열하여 멸균시켰다.

[0092] **제조예 3: 음료 제조**

[0093] 상기 참조예 2의 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상 발효유 필터액 500 mg을 적당량의 물에 용해시킨 후에 보조성분으로서 비타민

C, 교미제로서 구연산, 구연산나트륨, 올리고당을 적당량 가하고, 보존제로서 적당량의 나트륨벤조에이트를 가한 후에 물을 가하여 전량을 100 ml로 만들어 음료용 조성물을 제조하였다. 이때, 타우린이나 마이오 이노시톨, 엽산, 판토텐산 등을 단독으로 혹은 함께 첨가할 수 있다.

[0094] **제제예 4 : 화장수의 제조**

번호	원료명	처방예 1
1	정제수	잔량
2	1,3-부틸렌글리콜	4.0
3	디소듐 이디티에이	0.1
4	피피지-피피지 18/4 코폴리머	1.0
5	디-판테놀	0.1
6	메틸파라벤	0.2
7	에탄올	8.0
8	향	적량
9	피피지-26-부테스-26/피피지-40 경화피마자유	0.5
10	에탄올	4.0
11	유산균 발효유 필터액	0.01

[0096] <제조방법>

- [0097] 1) 번호 2, 3, 4의 원료를 칭량한 후 번호 1의 정제수를 첨가하여 실온에서 교반하여 용해하였다.
- [0098] 2) 번호 5, 6, 7, 8, 9의 원료를 칭량한 후 교반용해하고 상기 1)에 첨가하였다.
- [0099] 3) 번호 10과 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상 발효유 필터액을 첨가하여 용해한 후 상기 1)에 넣고 적절하게 교반하고 여과하여 화장수를 제조하였다.

[0100] **제제예 5: 에센스의 제조**

[0101] 상기 참고예 2의 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상 발효유 필터액을 이용하여 다음과 같은 조성으로 에센스를 제조하였다.

[0102] [조성]

[0103] 유효성분(발효유 필터액) 10.0 mg, 글리세린 3.0 mg, EDTA 0.05 mg, 벤조페논-9 0.04 mg, 카르복시비닐 폴리머 0.2 mg, 트리에탄올아민 0.18 mg, 옥시도테세스-25 0.6 mg, 글리세릴모노스테아레이트 1.0 mg, 방부제 0.01 mg, 향료 0.01 mg, 정제수 잔량

[0104] **제제예 6: 동물 사료 제조**

[0105] 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 비피도박테리움 비피디움(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 1종 이상 발효유 필터액 15 중량%, 수크로오스 15 중량%, 옥수수 20 중량%, 밀 10 중량%, 보리 10 중량%, 대두박 20 중량%, 석회석(가루) 2 중량%, 비타민 5 중량%, 합성아미노산 3 중량%를 분말상태로 골고루 섞어 분말상태의 사료를 제조하였다.

산업이용 가능성

[0106]

본 발명에서는 락토바실러스 람노수스, 락토바실러스 에시도필러스, 락토바실러스 플란타룸, 비피도박테리움 비피디움 균들의 발효유 필터액이 코사키바이러스, 엔테로바이러스, 인플루엔자바이러스, 코로나바이러스에 대하여 뛰어난 항바이러스능을 가지고 있음을 밝혀내었으며 이들 유산균을 접종하여 제조한 발효유 필터액이 산업적으로 유용한 가치를 가지고 있음을 확인하였다. 또한, 락토바실러스 람노수스, 락토바실러스 에시도필러스, 비피도박테리움 비피디움 균들의 MRS 배양액은 코사키바이러스나 엔테로바이러스에 대하여는 낮은 항바이러스능을 보이나 인플루엔자바이러스와 코로나바이러스에 대하여는 뛰어난 항바이러스능을 보임을 밝혀냄으로써 락토바실러스 람노수스, 락토바실러스 에시도필러스, 비피도박테리움 비피디움 균들의 MRS 배양액도 인플루엔자바이러스와 코로나바이러스 감염으로 일어나는 질병에 대하여는 산업적으로 유용한 가치를 가지고 있음을 확인하였다.