

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2017년 11월 30일 (30.11.2017) WIPO | PCT



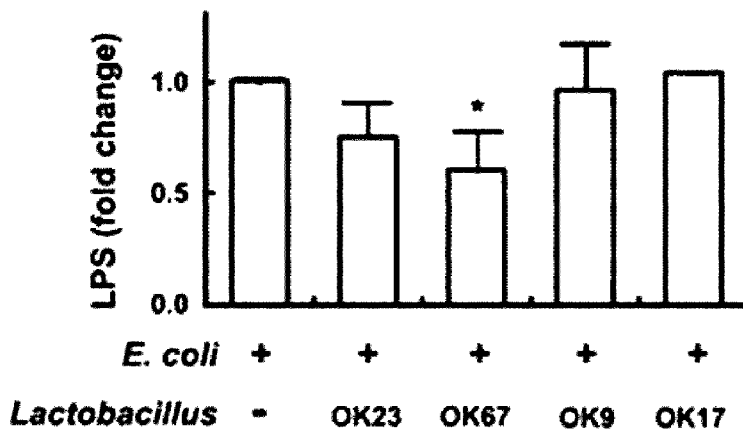
(10) 국제공개번호

WO 2017/204374 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 35/742 (2015.01) C12R 1/225 (2006.01)
- (74) 대리인: 교영갑 (KO, Young Kap); 13636 경기도 성남시 분당구 성남대로 69, 410호 (구미동,로드랜드EZ타워), Gyeonggi-do (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005493
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (22) 국제출원일: 2016년 5월 24일 (24.05.2016)
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김동현 (KIM, Dong Hyun); 02823 서울시 성북구 선잠로 92-24 (성북동), Seoul (KR). 한명주 (HAN, Myung Joo); 02823 서울시 성북구 선잠로 92-24 (성북동), Seoul (KR). 임수민 (LIM, Su Min); 02447 서울시 동대문구 경희대로 26 (회기동, 나노약학과학부), Seoul (KR). 이상윤 (LEE, Sang Yun); 02447 서울시 동대문구 경희대로 26 (회기동, 나노약학과학부), Seoul (KR).

(54) Title: NOVEL LACTIC ACID BACTERIA CAPABLE OF CONTROLLING BLOOD SUGAR AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 혈당 조절 효능을 갖는 신규 유산균 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention provides a novel Lactobacillus species strain isolated from kimchi or human feces. The particular Bacillus species strain according to the present invention is highly safe by being isolated from kimchi or human feces and has various functionalities, such as excellent blood sugar control activity, antiobesity activity, blood cholesterol-lowering activity, blood neutral lipid-lowering activity, arteriosclerosis-inhibiting activity or inflammation-inhibiting activity. Accordingly, the particular Bacillus species strain according to the present invention can be used as a useful food and drug material for preventing, alleviating or treating diabetes, a metabolic syndrome including obesity, fatty liver, glycosuria, hyperlipidemia, cardiovascular disease, hypertension, arteriosclerosis and/or diabetes, an inflammatory disease, and so forth.



WO 2017/204374 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 김치 또는 사람의 분변에서 분리된 신규 락토바실러스속 균주를 제공한다. 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주는 김치 또는 사람의 분변에서 분리되어 안전성이 높고, 우수한 혈당 조절 활성, 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성, 동맥경화 억제 활성 또는 염증 억제 활성 등과 같은 다양한 기능성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주는 당뇨병, 비만, 지방간, 당뇨, 고지혈증, 심혈관 질환, 고혈압, 동맥경화증, 당뇨병을 포함하는 대사증후군, 염증 질환 등을 예방, 개선 또는 치료하는데에 유용한 식의약 소재로 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 혈당 조절 효능을 갖는 신규 유산균 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 신규 유산균에 관한 것으로서, 더 상세하게는 김치 또는 사람의 분변에서 분리되고, 혈당 조절 효능, 비만 억제 효능, 혈중 콜레스테롤 강하 효능, 혈중 중성지방 강하 효능, 동맥경화 억제 효능, 면역조절 효능, 면역증강 효능, 염증 억제 효능 등과 같은 다양한 기능성을 가진 신규 유산균에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 신규 유산균의 다양한 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 신규 유산균의 당뇨, 비만, 대사 증후군, 염증 질환 등의 예방, 개선 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인류가 풍요로운 사회로 점점 발전해 감에 따라 생활습관이 급속하게 서구화되면서 질병의 양상도 크게 변하고 있다. 특히, 현대인에게 복부 비만, 고지혈증, 당뇨병, 고혈압 등이 증가하고 있는데, 이러한 질병은 생활습관의 변화에 따른 질병이란 의미로 생활습관병(lifestyle-related disease)이라고도 한다. 생활습관병 중 비만, 고지혈증, 당뇨병, 고혈압은 심뇌혈관 질환의 중요한 위험인자로 알려져 있고, 이러한 심뇌혈관 위험인자를 동시 다발적으로 갖고 있는 경우를 대사증후군이라고 한다. 즉, 대사증후군이란 인슐린 저항성이 심하며, 당뇨병과 심혈관질환의 위험성이 매우 높은 상태를 말하고, 대사증후군이 있는 경우에는 심혈관질환의 발생위험이 두 배 이상 높으며, 당뇨병이 발생할 확률은 10배 이상 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한, 생활습관병의 증가로 인해 관절염, 암 등과 같은 각종 만성 질병의 유병율도 높아지고 있는 실정이다.
- [3] 생활습관병의 증가는 서구화된 식생활과 운동부족에서 크게 기인하는데, 특히, 식생활의 변화는 사람의 소화관 미생물총에 변화를 가져오고, 이로 인해 소화관 내에 소화관 미생물총이 생산하는 내독소가 증가하게 된다. 소화관 내에 내독소가 증가하는 경우 소화관 염증이 유발되고 내독소의 체내로의 흡수가 높아지며 대식세포의 지방조직 등으로의 이동을 촉진하여 비만 또는 고혈당을 유발하게 된다. 따라서, 소화관 미생물총이 생산하는 내독소를 제어하는 경우 혈당을 제어할 수 있고, 궁극적으로 당뇨병을 개선하거나 치료할 수 있다.
- [4] 당뇨병은 대표적인 만성질환으로 포도당을 비롯한 여러 대사 장애로 망막, 신장 및 신경 등의 미세혈관 합병증과 중풍, 협심증, 심근경색증 및 말초 혈관 질환 등의 대혈관 합병증을 초래하는 만성적인 질병이다. 당뇨병의 치료법은 약물요법, 운동요법 및 식이요법이 있으며 환자의 증상에 따라 인슐린 약제와 각종 혈당 조절제가 사용되고 있다. 그러나 당뇨병은 간에서의 당 생성 과다, 인슐린 저항성, 근육과 지방 세포 등에서 당 처리 능력 감소 등의 특징을

나타내는 복합적인 질병이므로 특정 치료법만으로는 여러 가지 부작용의 유발을 막을 수 없다. 이 중 약물요법은 인슐린 및 화학물질을 사용하고 있어 약물 복용에 따른 부작용과 환자의 내성에 끊임없는 문제가 되고 있기 때문에, 최근에는 당뇨병 치료에 있어 식이가 가능하며 부작용이 적은 천연물을 이용하여 당뇨병을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 연구가 필요한 실정이다.

- [5] 이에 발맞추어, 최근 유산균을 이용하여 복부 비만, 고지혈증, 당뇨병, 고혈압 등을 예방하거나 치료하는 연구가 계속 진행되고 있다. 예를 들어, 대한민국 등록특허공보 제10-1061219호에는 락토바실러스속 미생물(*Lactobacillus* sp.)로 발효시킨 돼지감자 발효 추출물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 및 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1010914호에는 체중과 지방 감소, 혈장 및 간 지질과 카르니틴 개선, 혈중 렙틴, 인슐린 농도 감소, 및 기억력 증진으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용도에 사용되기 위한 락토바실러스 플란타룸 엔유씨 엘지 42 균주(기탁번호: KCCM 10940P)가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1407980호에는 혈중 인슐린(insulin), 리지스틴(resistin), 포도당(glucose), C-펩티드(C-peptide) 및 중성지방(triglyceride)의 수치를 감소시키는 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 커베투스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601(기탁번호: KCTC 11456BP)과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032(기탁번호: KCCM10430)를 유효성분으로 함유하는 고인슐린혈증, 고혈당증 및 고중성지방혈증 개선용 건강기능식품이 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 이러한 종래 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 일 목적은 내독소를 분비하는 장내 미생물의 증식을 억제하거나 장내 미생물의 내독소 생산을 억제하여 혈당을 조절할 수 있는 신규 유산균을 제공하는데에 있다.
- [7] 또한, 본 발명의 다른 목적은 신규 유산균의 다양한 용도를 제공하는데에 있다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 발명자들은 합성 화학물질에 비해 안전성이 높은 향당노 소재를 개발하기 위하여, 김치 또는 사람 분변으로부터 무수한 유산균을 스크리닝하고, 이 중 특정 락토바실러스속 균주들이 내독소를 분비하는 장내 미생물의 증식을 억제하거나 장내 미생물의 내독소 생산을 억제하여 혈당을 조절할 수 있다는 점을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.
- [9] 본 발명의 일 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)로서, 혈당 조절 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 유산균을 제공한다. 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 그람 염색시 양성을

나타내는 간균이고, 탄소원으로 리보스(Ribose), 갈락토오스(Galactose), 글루코오스(Glucose), 프럭토스(Fructose), 만노스(Mannose), 만니톨(Mannitol), 솔비톨(Sorbitol), α -메틸-D-만노사이드(α -methyl-D mannoside), N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 아미그달린(Amygdalin), 아르부틴(Arbutin), 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), 셀로바이오스(Cellobiose), 말토스(Maltose), 락토스(Lactose), 멜리바이오스(Melibiose), 수크로오스(Sucrose), 트레할로스(Trehalose), 멜레지토스(Melezitose), 젠티오바이오스(Gentiobiose) 및 투라노스(Turanose)를 이용한다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 혈당 조절 활성 외에 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성, 동맥경화 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성, 면역조절 활성, 면역증강 활성 또는 염증 억제 활성에서 선택된 하나 이상의 활성을 더 갖는다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67(수탁번호 : KCCM 11670P)이다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 내독소를 분비하는 장내 미생물의 증식을 억제하거나 장내 미생물의 내독소 생산을 억제하여 혈당을 강하시킨다.

[10]

[11]

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 당뇨병, 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용되는 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 당뇨병, 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 개선에 사용되는 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 대사증후군은 당뇨병, 비만, 지방간, 고지혈증, 심혈관 질환, 고혈압 또는 동맥경화증에서 선택되는 2종 이상의 질환이 동시에 발생하는 경우를 나타내며, 바람직하게는 당뇨병 또는 비만에서 선택되는 1종 이상의 질환과 지방간, 고지혈증, 심혈관 질환, 고혈압 또는 동맥경화증에서 선택되는 1종 이상의 질환이 동시에 발생하는 경우를 나타낸다.

[12]

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus*

sakei), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 조절 또는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

- [13] 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 염증 질환은 바람직하게는 관절염 또는 대장염에서 선택된다.

발명의 효과

- [14] 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주는 김치 또는 사람의 분변에서 분리되어 안전성이 높고, 우수한 혈당 조절 활성, 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성, 동맥경화 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성, 면역조절 활성, 면역증강 활성, 염증 억제 활성 등과 같은 다양한 기능을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주는 당뇨병, 비만, 지방간, 당뇨, 고지혈증, 심혈관 질환, 고혈압, 동맥경화증, 당뇨병 또는 비만을 포함하는 대사증후군, 염증 질환 등을 예방, 개선 또는 치료하거나 면역조절, 면역증강, 또는 염증반응 억제를 위한 식의약 소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 배추 김치, 무 김치, 파 김치 및 사람 분변에서 분리된 유산균들이 대장균의 증식에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [16] 도 2는 대장균 증식 억제능이 우수한 것으로 나타난 유산균[락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK23, 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) OK9, 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*) OK17]들이 장내세균총의 내독소 생산에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [17] 도 3은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈당 수준에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.
- [18] 도 4는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 인슐린 수준에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.
- [19] 도 5는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 내독소 함량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 6은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 분변 내독소 함량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는

영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

- [20] 도 7은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 경구 글루코오스 부하시험에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 8은 도 7의 글루코오스 부하시험 결과를 AUC(area under the glucose-time curve)로 나타낸 그래프이다.
- [21] 도 9는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 10은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 증가량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.
- [22] 도 11은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 부고환 지방조직 무게 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.
- [23] 도 12는 실험군 별 혈장 총 중성지방 함량 측정 결과를 나타낸 것이고, 도 13은 실험군 별 총 콜레스테롤 함량 측정 결과를 나타낸 것이고, 도 14는 실험군 별 HDL 콜레스테롤 함량 측정 결과를 나타낸 것이고, 도 15는 실험군 별 동맥경화지수 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [24] 도 16은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 지질 대사 관련 단백질 수준 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.
- [25] 도 17은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 대장 내 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 분석한 결과이다.
- [26] 도 3 내지 도 17에서 "LFD"는 저지방 식이 급여군을 나타내고, "LFD-67"는 저지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 투여군을 나타내고, "HFD"는 고지방 식이 급여군을 나타내고, "HFD-OK67"는 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 투여군을 나타낸다.
- [27] 도 18은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 군주가 관절염 심각도(arthritis severity)에 대해 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [28] 도 19는 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 군주가 관절염 발생도(arthritis incidence)에 대해 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [29] 도 18 및 도 19에서 "NOR"은 콜라겐에 의해 관절염이 유발되지 않고 비이클을 투여한 군을 나타내고, "AC"는 콜라겐에 의해 관절염이 유발되고 비이클을 투여한 군을 나타내고, "AO"는 콜라겐에 의해 관절염이 유발되고 비이클과 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 군주가 투여된 군을 나타낸다.

- [30] 도 20은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발의 부피 증가에 대해 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [31] 도 21은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발 관절 조직의 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성화에 대해 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [32] 도 22는 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발 관절 조직(paw joint tissue)의 미시외관에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.
- [33] 도 20 내지 도 22에서 "CIA"는 콜라겐에 의해 유발된 관절염(Collagen-induced arthritis)을 나타내고, "OK 67"은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 나타낸다.
- [34] 도 23은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발 관절 조직 내 iNOS 및 COX-2의 발현과 NF- κ B 및 MAPKs와 같은 신호전달 경로 요소의 발현에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.
- [35] 도 24는 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발 관절 조직 내 염증 유발 사이토카인 및 함유염증 사이토카인의 발현과, prostaglandin E2(PGE₂) 및 NO의 생성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [36] 도 25는 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 비장 내 T 세포 분화에 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- [37] 도 26은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 비장 내 T 세포 분화 마커에 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- [38] 도 23 내지 도 26에서 "CIA"는 콜라겐에 의해 유발된 관절염(Collagen-induced arthritis)을 나타내고, "OK 67"은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 나타내고, "IP"는 이부프로펜을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [39] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [40] 본 발명에서 사용되는 용어 "배양물"이란 미생물을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하여, 미생물이 포함되는 개념이다.
- [41] 본 발명에서 "약학적으로 허용가능한" 및 "식품학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.

- [42] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [43] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [44] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [45] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [46] 본 발명에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [47]
- [48] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [49] 본 발명의 일 측면은 혈당 조절 활성(예를 들어, 혈당 강하 활성)을 갖는 신규 유산균에 관한 것이다.
- [50] 본 발명의 일 예에 따른 신규 유산균은 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하고, 혈당 조절 활성을 갖는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)이다. 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 그람 염색시 양성을 나타내는 간균이고, 탄소원으로 리보스(Ribose), 갈락토오스(Galactose), 글루코오스(Glucose), 프럭토스(Fructose), 만노스(Mannose), 만니톨(Mannitol), 솔비톨(Sorbitol), α -메틸-D-만노사이드(α -methyl-D mannoside), N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 아미그달린(Amygdalin), 아르부틴(Arbutin), 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), 셀로바이오스(Cellobiose), 말토스(Maltose), 락토스(Lactose), 멜리바이오스(Melibiose), 수크로오스(Sucrose), 트레할로스(Trehalose), 멜레지토스(Melezitose), 젠티오바이오스(Gentiobiose) 및 투라노스(Turanose)를 이용한다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 혈당 조절 활성 외에 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성, 동맥경화 억제 활성 또는 염증 억제 활성에서 선택된 하나 이상의 활성을 더 갖는다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67(수탁번호 : KCCM 11670P)이다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 내독소를 분비하는 장내 미생물의 증식을 억제하거나 장내 미생물의 내독소 생산을 억제하여 혈당을 강하시킨다. 또한, 본

발명의 락토바실러스속 균주는 김치에서 분리될 수 있다. 예를 들어, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67은 무 김치에서 분리된 것이다.

[51]

[52]

본 발명의 다른 측면은 신규 유산균의 다양한 용도에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명은 신규 유산균의 일 용도로 전술한 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 신규 유산균의 일 용도로 전술한 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 신규 유산균의 일 용도로 전술한 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 당뇨병, 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용되는 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 신규 유산균의 일 용도로 전술한 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 당뇨병, 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 개선에 사용되는 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 대사증후군은 당뇨병, 비만 등 여러 가지 대사성 질환이 한 사람에게 동시에 나타나는 질환을 의미하며, 좁게는 지질 관련 대사증후군을 의미한다. 본 발명에서 상기 대사증후군은 바람직하게는 당뇨병 또는 비만에서 선택되는 1종 이상의 질환과 지방간, 고지혈증, 심혈관 질환, 고혈압 또는 동맥경화증에서 선택되는 1종 이상의 질환이 동시에 발생하는 질환이다. 또한, 본 발명은 신규 유산균의 일 용도로 전술한 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 조절 또는 면역 증강용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 Th17/Treg 세포의 균형을 회복시켜 면역을 조절하기 때문에 류마티스 관절염과 같은 자가 면역 질환, 아토피 피부염 등과 같은 알러지 질환을 개선할 수 있고, 약화된 면역력을 증강시킬 수도 있다. 또한, 본 발명은 신규 유산균의 일 용도로 전술한 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 이때, 상기 염증 질환은 염증 반응에 의해 유발되는 질환이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 관절염 또는 대장염에서 선택된다. 본 발명에서 유산균의 배양물은 락토바실러스속 균주를 배지에서 배양시켜 수득한 산물로서, 상기 배지는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 MRS 액체

배지, MRS 한천 배지, BL 한천 배지일 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 첨가제, 식품 조성물(특히 기능성 식품 조성물), 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있고, 조성물 내에서 유효성분인 특정 락토바실러스속 균주 등의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

- [53] 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분인 신규 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~99 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 신규 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물 외에 당뇨병, 비만, 지방간, 고지혈증, 심혈관 질환, 고혈압, 동맥경화증, 대사증후군, 염증 질환 또는 면역 이상 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 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, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수

있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이라면 크게 제한되지 않으며, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으나 바람직하게는 유효성분을 기준으로 할 때 0.1 내지 3000 mg/kg이고, 더 바람직하게는 1 내지 2000 mg/kg이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

- [54] 또한, 본 발명에 따른 식품 조성물에서 유효성분인 신규 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~25 중량%, 더 바람직하게는 0.5~10 중량%이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 칩제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 식품 조성물은 유효성분 외에 식품학적으로 허용 가능한 담체, 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분들은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[55]

- [56] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[57]

[58] **1. 유산균의 분리 및 동정**

[59] (1) 김치로부터 유산균의 분리

[60] 배추 김치, 무 김치 및 파김치를 각각 파쇄하고, 파쇄액을 MRS 액체 배지(MRS

Broth; Difco, USA)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 MRS 한천 배지(MRS agar medium; Difco, USA)에 이식하고 37°C에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

[61]

[62] (2) 사람 분변으로부터 유산균의 분리

[63] 사람 분변을 GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 BL 한천 배지(BL agar medium; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 이식하고 37°C에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

[64]

[65] (3) 선별한 유산균의 동정

[66] 김치 또는 사람 분변으로부터 분리한 균주들의 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석하여 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다. 하기 표 1에 배추 김치, 무 김치, 파 김치 및 사람 분변서 분리된 유산균의 관리번호 및 균주명을 나타내었다. 하기 표 1에서 관리번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17, 20, 22, 25의 유산균은 배추 김치에서 분리된 것이고, 관리번호 2, 4, 6, 8, 10, 14, 19, 21의 유산균은 무 김치에서 분리된 것이고, 관리번호 12, 15, 18의 유산균은 파 김치에서 분리된 것이고, 관리번호 24, 26, 27, 28, 29, 30의 유산균은 사람 분변에서 분리된 것이다.

[67] [표1]

관 리 번 호	균주명	관 리 번 호	균주명
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> OK1	16	<i>Lactobacillus plantarum</i> OK37
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> OK15	17	<i>Lactobacillus sakei</i> OK26
3	<i>Lactobacillus curvatus</i> OK21	18	<i>Lactobacillus sakei</i> OK45
4	<i>Lactobacillus curvatus</i> OK25	19	<i>Lactobacillus sakei</i> OK67
5	<i>Lactobacillus brevis</i> OK11	20	<i>Lactobacillus fermentum</i> OK19
6	<i>Lactobacillus brevis</i> OK12	21	<i>Lactobacillus fermentum</i> OK21
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> OK1	22	<i>Lactobacillus gasseri</i> OK1
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i> OK7	23	<i>Lactobacillus gasseri</i> OK2
9	<i>Lactobacillus lactis</i> OK1	24	<i>Lactobacillus johnsonii</i> OK1
10	<i>Lactobacillus lactis</i> OK2	25	<i>Lactobacillus johnsonii</i> OK2
11	<i>Lactobacillus helveticus</i> OK1	26	<i>Lactobacillus paracasei</i> OK2
12	<i>Lactobacillus helveticus</i> OK2	27	<i>Lactobacillus paracasei</i> OK9
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> OK23	28	<i>Lactobacillus reuteri</i> OK1
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> OK32	29	<i>Lactobacillus ruminis</i> OK1
15	<i>Lactobacillus plantarum</i> OK36	30	<i>Lactobacillus ruminis</i> OK17

[68]

[69] 상기 표 1에 기재된 균주들 중 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67은 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 생리학적 특성 중 탄소원 이용성은 하기 표 2와 같다. 하기 표 2에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67의 탄소원 이용성은 API Kit(모델명 : API 50 CHL; 제조사 : BioMerieux's, USA)에 의한 당 발효 시험으로 분석하였다. 또한, 하기 표에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타내고, "±"는 탄소원 이용성 여부가 모호한 경우를 나타내고, 공란은 미측정을 나타낸다.

[70] [표2]

탄소원	균주 명		
	<i>Lactobacillus sakei</i> OK67	DSM20017 (ATCC15521)) ^a	<i>Lactobacillus sakei</i> K-7 ^b
glycerol	-		
erythritol	±		
D-arabinose	±		
L-arabinose	-	+	-
D-ribose	+	+	
D-xylose	-		
L-xylose	-	-	
adonitol	-		
methyl-BD-xylopyranoside	-		
D-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	+	+	
amygdalin	+		
arbutin	+	-	
esculin	+	+	

salicin	+	+	
cellobiose	+	-	
maltose	+	+	±
lactose	+	-	
melibiose	+	+	
sucrose	+	+	+
trehalose	+	+	
inulin	-		
melezitose	+		
raffinose	-		
starch	-		
glycogen	-		
xylitol	-	±	
gentiobiose	+		
D-turanose	+		
D-lyxose	-		
D-tagatose	-		
D-fucose	-		
L-fucose	-		
D-arabitol	-		
L-arabitol	-		
gluconate	±	±	
2-keto-gluconate	-		
5-keto-gluconate	-		

[71] ^{a)}McLeod et al., Diversity of Lactobacillus strains investigated by phenotypic and genotypic methods. Systematic and applied microbiology 2008;31: 393-403.

[72] ^{b)}Moon et al., Anticariogenic activities of Lactobacillus sakei K-7 isolated from kimchi. Korean society for biotechnology and bioengineering journal 2011; 26:513-516.

[73]

[74] 또한, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67의 화학분류학적 특성으로 16S rDNA을 측정하였고, 그 결과 서열번호 1의 염기서열을 갖는

것으로 나타났다. 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67의 16S rDNA 염기서열을 Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) 균주는 검색되지 않았고, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) NBRC 15893(NCBI ACCESSION : NR_113821)의 16S rDNA 부분 서열과 99%의 상동성을 보였다.

[75]

[76] **2. 내독소(endotoxin) 생산 대장균의 증식을 억제하는 유산균의 선별**

[77] (1) 실험방법

[78] TSB(tryptic soy broth) 배지에서 미리 배양한 대장균과, 배추 김치, 무 김치, 파 김치 및 사람 분변에서 분리된 유산균들에서 선택된 어느 하나를 각각 1×10^5 CFU 및 1×10^5 CFU의 양으로 TSB(tryptic soy broth) 배지에 함께 이식하고 37°C에서 약 24시간 동안 배양하였다. 이후, 대장균과 유산균의 혼합 균 배양액을 10^6 배로 희석하고, 희석한 배양액 0.1ml를 DHL 배지에 이식하고 37°C에서 약 24시간 동안 배양하였다. 이후, 최종 배양액에 존재하는 대장균 수를 측정하였다. 또한, 대조군으로 대장균과 유산균의 혼합 균 대신 대장균만 1×10^5 CFU의 양으로 TSB(tryptic soy broth) 배지에 이식하고 배양한 후, 동일한 과정을 거쳐 최종 배양액에 존재하는 대장균 수를 측정하였다.

[79] (2) 측정결과

[80] 도 1은 배추 김치, 무 김치, 파 김치 및 사람 분변에서 분리된 유산균들이 대장균의 증식에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 1에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67의 대장균 증식 억제능이 가장 우수하였고, 그 다음으로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK23, 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) OK9, 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*) OK17의 순이었다.

[81]

[82] **3. 소화관 미생물총의 내독소(endotoxin) 생산을 억제하는 유산균의 선별**

[83] (1) 실험방법

[84] GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에서 미리 배양한 장내세균총과, 대장균 증식 억제능이 우수한 것으로 나타난 유산균[락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK23, 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) OK9, 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*) OK17]들에서 선택된 어느 하나를 각각 1×10^8 CFU 및 1×10^5 CFU의 양으로 혐기성 배지인 GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 함께 이식하고 37°C에서 약 24시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 이후, 배양액을 약 1시간 동안 초음파로 처리하여 균의 세포 외막을 파괴하고, 5000×g의 조건으로 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 상등액에 존재하는 대표적인 내독소인

LPS(lipopolysaccharide)의 함량을 LAL(Limulus Amoebocyte Lysate) assay kit(제조사 : Cape Cod Inc., USA)로 측정하였다. 또한, 대조군으로 장내세균총과 유산균의 혼합 균 대신 장내세균총을 1×10^8 CFU의 양으로 혐기성 배지인 GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 이식하고 배양한 후, 동일한 과정을 거쳐 상등액에 존재하는 LPS(lipopolysaccharide)의 함량을 측정하였다.

[85]

[86] (2) 측정결과

[87] 도 2는 대장균 증식 억제능이 우수한 것으로 나타난 유산균[락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK23, 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) OK9, 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*) OK17]들이 장내세균총의 내독소 생산에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 2에서 LPS(lipopolysaccharide)의 함량은 대조군에 대한 상대적인 배수로 나타내었다. 도 2에서 보이는 바와 같이 장내세균총의 내독소 생산 억제능도 대장균 증식 억제능의 결과와 마찬가지로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 가장 우수하였고, 그 다음으로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK23, 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) OK9, 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*) OK17의 순이었다.

[88]

[89] 4. 유산균의 혈당 강하 효능에 대한 in-vivo 실험

[90] (1) 실험방법

[91] 5주령 수컷 C57BL/6J 생쥐 총 28마리를 2개의 그룹으로 나누어 저지방식이군(n=14)에는 총 칼로리의 10%가 지방인 저지방식이(제품 모델명 : D12450B; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 4주간 투여하였고, 고지방식이군(n=14)에는 총 칼로리의 60%가 지방인 고지방식이(제품 모델명 : D12492; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 4주간 투여하였다. 이후, 저지방식이군을 7마리씩 2개의 그룹(LFD, LFD-67)으로 나눈 후 LFD군에는 저지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 4.5주(31일)간 매일 경구투여하고, LFD-67군에는 저지방 식이를 투여함과 동시에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 1×10^9 CFU의 양으로 4.5주(31일)간 매일 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다. 또한, 고지방식이군도 7마리씩 2개의 그룹(HFD, HFD-67)으로 나눈 후 HFD군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 4.5주(31일)간 매일 경구투여하고, HFD-67군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 1×10^9 CFU의 양으로 4.5주(31일)간 매일 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다. 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주의 경구투여 횟수는 1주일을 기준으로 6일이었다. 실험기간 동안 생쥐는 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 및 명암

주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 사육되었다. 실험 종료일에 혈당, 혈장 인슐린, 혈장 내독소 및 분변 내독소의 함량을 측정하였고, 실험 종료 5일 전에 경구 글루코오스 부하시험을 진행하였다.

[92]

[93] (2) 혈당, 혈장 인슐린, 혈장 내독소 및 분변 내독소의 함량 측정

[94] 혈당은 생쥐 꼬리 끝에서 약 $0.5\mu\text{l}$ 의 혈액을 채혈한 후 글루코오스 측정용 키트(제조사 : ASAN PHARM. CO. LTD, 대한민국)를 이용하여 측정하였다. 도 3은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈당 수준에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 3에서 보이는 바와 같이 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 투여한 군의 혈당 수준은 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 유의적으로 감소하였다.

[95] 혈장 인슐린은 mouse insulin ELISA kit(LINCO Research, St.Charles, MO)를 사용하여 측정하였다. 도 4는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 인슐린 수준에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 4에서 보이는 바와 같이 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 투여한 군의 혈장 인슐린 함량은 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다.

[96] 도 5는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 내독소 함량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 6은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 분변 내독소 함량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 5 및 도 6에서 보이는 바와 같이 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 투여한 군의 혈장 내독소 함량 및 분변 내독소 함량은 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다.

[97]

[98] (3) 경구 글루코오스 부하시험(oral glucose tolerance test, OGTT)

[99] 실험 종료 5일 전에 실험동물을 6시간 동안 금식시키고, 글루코오스를 2g/kg 체중 용량으로 경구투여한 후 0분, 15분, 30분, 60분, 90분 및 120분 경과시에 꼬리로부터 채혈하고 글루코오스 농도를 측정하였다. 경구 글루코오스 부하시험을 하는 동안 실험동물에게 안정된 환경을 제공하였고, 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 또한, 하기 공식을 이용하여 AUC(area under the glucose-time curve)를 구하였다.

[100]

[101]
$$\text{AUC} = 0.5 \times (0.5 \times C_0 + C_{15} + C_{30} + C_{60} + C_{90} + 0.5 \times C_{120})$$
[102] 상기 식에서 C_0 , C_{15} , C_{30} , C_{60} , C_{90} 및 C_{120} 은 각각 순서대로 0분, 15분, 30분,

60분, 90분 및 120분 경과시에 측정된 글루코오스 농도이다.

[103]

[104] 도 7은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 경구 글루코오스 부하시험에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 8은 도 7의 글루코오스 부하시험 결과를 AUC(area under the glucose-time curve)로 나타낸 그래프이다. 도 7 내지 도 8에서 보이는 바와 같이 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 투여한 군의 AUC는 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다.

[105]

[106] **5. 유산균의 항비만 효능 등에 대한 in-vivo 실험**

[107] (1) 실험방법

[108] 5주령 수컷 C57BL/6J 생쥐 총 28마리를 2개의 그룹으로 나누어 저지방 식이군(n=14)에는 총 칼로리의 10%가 지방인 저지방 식이(제품 모델명 : D12450B; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 28일간 투여하였고, 고지방 식이군(n=14)에는 총 칼로리의 60%가 지방인 고지방 식이(제품 모델명 : D12492; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 28일간 투여하였다. 이후, 저지방 식이군을 7마리씩 2개의 그룹(LFD, LFD-67)으로 나눈 후 LFD군에는 저지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 31일간 매일 경구투여하고, LFD-67군에는 저지방 식이를 투여함과 동시에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 1×10^9 CFU의 양으로 31일간 매일 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다. 또한, 고지방 식이군도 7마리씩 2개의 그룹(HFD, HFD-67)으로 나눈 후 HFD군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 31일간 매일 경구투여하고, HFD-67군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 1×10^9 CFU의 양으로 31일간 매일 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다. 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주의 경구투여 횟수는 7일을 기준으로 6일이었다. 실험기간 동안 생쥐는 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 사육되었다. 실험 종료 후, 실험동물을 심장천자(cardiac puncture)에 의해 희생시킨 후 대장, 부고환 지방조직(epididymal fat, EF) 등을 적출하여 추가로 분석하였다.

[109]

[110] (2) 체중 변화 및 지방조직의 무게 변화

[111] 도 9는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 10은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 증가량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 9에서 아래 방향의 화살표는 락토바실러스

사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67을 경구투여한 시점을 나타낸다. 또한, 도 11은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 부고환 지방조직 무게 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 9 내지 도 11에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주를 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 체중이 유의적으로 감소하였고, 지방조직의 무게도 더 낮게 나타났다.

[112]

[113] (3) 혈장 중성지질, 혈장 총 콜레스테롤 및 혈장 HDL 콜레스테롤 함량 측정

[114] 비만을 유도하고 35일간 유산균을 투여한 실험동물의 혈장 중성지질(plasma triglyceride), 혈장 총 콜레스테롤(plasma cholesterol) 및 혈장 HDL 콜레스테롤(plasma HDL) 함량을 다음과 같이 측정하였다.

[115] 혈장 중성지질은 중성지질 측정용 키트(ASAN PHARM. CO. LTD, 대한민국)를 사용하여 측정하였다. 시험관에 효소용액 1.5ml와 혈장 10 μ l를 넣은 뒤 교반하였다. 이후, 중성지질의 함량이 각각 0, 75, 150, 225, 300 mg/dl인 표준 용액과 함께 시료를 37°C의 수욕(water bath)에서 10분간 가온하고, 550nm에서의 흡광도를 측정하여 비색 정량하였다. 또한, 혈장 총 콜레스테롤은 총 콜레스테롤 측정용 키트(ASAN PHARM. CO. LTD, 대한민국)를 사용하여 측정하였다. 시험관에 효소용액 1.5ml와 혈장 10 μ l를 넣은 뒤 교반하였다. 이후, 총 콜레스테롤의 함량이 각각 0, 75, 150, 225, 300 mg/dl인 표준 용액과 함께 시료를 37°C의 수욕(water bath)에서 10분간 가온하고, 500nm에서의 흡광도를 측정하여 비색 정량하였다. 또한, 혈장 HDL 콜레스테롤은 HDL 콜레스테롤 측정용 키트(ASAN PHARM. CO. LTD, 대한민국)를 사용하여 측정하였다. 혈장 50 μ l에 침상시약 50 μ l를 넣은 뒤 교반하고 실온에서 10분간 방치한 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 25 μ l를 취하였다. 이후, 상층액에 효소용액 750 μ l를 넣고 교반하였다. 이후, HDL 콜레스테롤의 함량이 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/dl인 표준 용액과 함께 시료를 37°C의 수욕(water bath)에서 5분간 가온하고, 500nm에서의 흡광도를 측정하여 비색 정량하였다.

[116] 또한, 혈장의 동맥경화지수(atherogenic index)을 하기의 식을 통해 계산하였다.

[117] 동맥경화지수 = (총 콜레스테롤 - HDL 콜레스테롤) / HDL 콜레스테롤

[118] 도 12는 실험군 별 혈장 총 중성지질 함량 측정 결과를 나타낸 것이고, 도 13은 실험군 별 총 콜레스테롤 함량 측정 결과를 나타낸 것이고, 도 14는 실험군 별 HDL 콜레스테롤 함량 측정 결과를 나타낸 것이고, 도 15는 실험군 별 동맥경화지수 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 12 내지 도 15에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67을 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 혈장 중성지질, 혈장 총 콜레스테롤의 함량 및 동맥경화지수가 유의적으로 감소하였고, HDL 콜레스테롤 함량은 증가하는 결과를 보였다.

[119]

[120] (4) 지질 대사 관련 단백질 수준 변화 분석

[121] 고지방 식이 급여 및 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67의 투여가 지질 대사 관련 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 실험동물의 부고환 지방조직에서 지방세포 분화 인자인 PPAR γ , C/EBP α , FAS, α FABP의 수준과 대식세포 마커인 TNF- α , IL-1 β , F4/80, CD68의 수준을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정하였다.

[122] 구체적으로 실험동물의 부고환 지방조직을 protease inhibitor tablet(Roche, USA), phosphatase inhibitor(Roche) 및 phenylmethanesulfonylfluoride(PMSF)가 첨가된 RIPA buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 % NP-40, 0.25 % Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)를 이용하여 균질화한 후, 14,000 rpm의 조건에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액에 대해 10 % SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질 샘플을 PVDF membrane(Millipore, USA)에 트랜스퍼(transfer) 하였다. 이 후, 샘플이 트랜스퍼된 PVDF membrane을 TBS-T buffer 상에서 5% skim milk(Difco, france)로 1시간 30분간 blocking 한 후, PPAR γ (peroxisome proliferator- activated receptor- γ), C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein- α), FAS(fatty acid synthase), α FABP, TNF- α , IL-1 β , F4/80, CD68에 대한 1차 항체(primary antibody; 이상 Cell signaling)를 첨가하고 셰이킹(shaking) 상태를 유지한 채 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, TBS-T buffer로 충분히 세척한 후 2차 항체(secondary antibody)인 goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate(BIORAD)를 1:5000의 비율로 희석하여 1시간 30분간 반응시켰다. 이후, TBS-T buffer로 충분히 세척하고, ECL 용액(Clarify western ECL substrate, BIORAD)과 반응시킨 뒤, 화학발광법(chemiluminescence; CLINX science instruments, USA)으로 단백질을 검출하였다. 각 밴드의 밀도를 정량하였고, 저지방 식이만을 급여한 군의 단백질 발현량을 기준으로 다른 실험군의 단백질 발현량을 상대적으로 계산하였다. 도 16은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 지질 대사 관련 단백질 수준 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 16에서 보이는 바와 같이 고지방 식이에 의해 실험동물의 부고환 지방조직에서 지방세포 분화 인자 및 대식세포 마커가 유의적으로 증가했으나, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67의 투여에 의해 유의적으로 감소하였다.

[123]

[124] (6) 대장 내 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 수준 분석

[125] 희생된 실험동물의 대장 조직 내 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 수준을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 분석하였다. 구체적으로 희생된 실험동물의 대장 조직을 라이시스 버퍼(lysis buffer) 안에서 균질화한 후 SDS

10%(w/v) polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 전체 단백질 샘플을 분리하였다. 이후, 전체 단백질 샘플을 폴리비닐리덴다이플로라이드(polyvinylidenedifluoride) 멤브레인에 트랜스퍼(transfer) 하였다. 이후, 멤브레인에 트랜스퍼된 전체 단백질 샘플을 ZO-1, occludin, claudin-1 및 β -actin 1차 항체(1:1000의 비율로 희석됨)와 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 전체 단백질 샘플을 항-마우스 면역글로블린 G 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국; 1:2000의 비율로 희석됨)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 샘플을 0.1% Tween 20 함유 PBS로 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하였다. 도 17은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 대장 내 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 미치는 영향을 분석한 결과이다. 도 17에서 보이는 바와 같이 고지방 식이는 밀착연접단백질(tight junction protein)인 ZO-1, occludin, claudin-1의 발현 감소를 야기하였다. 반면, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67은 고지방 식이에 의해 야기되는 밀착연접단백질의 발현 감소를 효과적으로 억제하였다.

[126] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 장내 미생물의 내독소 생산을 억제하고 대장 내 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현을 유도하여 고지방 식이로 유도된 포도당 불내성(glucose intolerance) 및 비만을 개선할 수 있다.

[127]

[128] **6. 유산균의 항염증 효능에 대한 in-vivo 실험**

[129] (1) 실험방법

[130] 관절염이 유발된 모델 동물에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 미치는 영향을 알아보기 위해 8주령 수컷 DBA/1J 생쥐 총 28마리를 7마리씩 4개의 그룹(NOR, AC, AO, AI)으로 나누고, 정상균인 NOR균을 제외한 나머지 군인 AC군, AO군 및 AI군에 대해 보빈 제2형 콜라겐(bovine type II collagen)을 면역원으로 사용하여 관절염을 유발하였다. 구체적으로, 생쥐 꼬리 근위부에 콜라겐 면역원 100 μ g을 피내주사하여 1차 면역화시키고, 1차 면역화 후 21일째 되는 날, 동일한 방법으로 동일한 양의 콜라겐 면역원을 피내주사하여 2차 면역화시켰다. 이때, 콜라겐 면역원으로 보빈 제2형 콜라겐(bovine type II collagen)을 0.05M 아세트산에 용해시킨 후 동일한 양의 프로인트 완전 보조제(Freund Complete Adjuvant)를 첨가하여 에멀전화 시킨 것을 사용하였다.

[131] 2차 면역화 다음날부터, NOR군 및 AC군에는 비히클(50mM sodium bicarbonate buffer containing 1% glucose)을 20일 동안 매일 경구투여 하였고, AO군에는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주 1 \times 10⁹ CFU를 비히클(50mM sodium bicarbonate buffer containing 1% glucose) 0.1ml에 현탁하여 20일 동안 매일 경구투여하고, AI군에는 이부프로펜을 비히클(50mM sodium bicarbonate buffer

containing 1% glucose)에 현탁하여 50mg/kg weight의 용량으로 매일 경구투여한 후, 다음날 실험을 종료하였다.

[132]

[133] (2) 분석방법

[134] 발의 관절염 심각도(arthritis severity) 및 관절염 발생도(arthritis incidence)는 관절염 유발 단계부터 측정하였다.

[135] 발의 관절염 심각도(arthritis severity)는 발 및 발의 주변을 육안으로 관찰하고 하기 표 3의 기준(Arii et al., 2008)에 따라 단계별로 거시 외관 점수(Macroscopic score)를 매겨 평가하였다. 각 생쥐에게 부여될 수 있는 최고 거시 외관 점수는 16이다.

[136] [표3]

단계	외관 정도
0	normal
1	focal slight swelling and/or redness in one digit
2	moderate swelling and erythema
3	marked swelling and erythema of the limb
4	maximal swelling, erythema, deformity, and/or ankylosis

[137]

[138] 발의 부피 증가, 발 관절 조직의 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성, 조직 미시 외관 분석은 실험 종료 후에 수행하였다.

[139] 실험 종료일에 실험동물을 희생시키고 발 관절 조직(paw joint tissue)을 수거하고 이를 즉시 -70°C에 냉동보관한 후 시료로 사용하였다. 발 관절 조직의 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성은 Mouse MPO assay ELISA kit(Hbt HK210, USA)을 사용하여 측정하였다. 또한, 조직 미시 외관 분석을 위해 발 관절 조직(paw joint tissue)을 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하고, 건조하고, 파라핀으로 포매하고, 20 μm의 두께로 절단한 후, 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin), 톨루이딘 블루(toluidine blue) 또는 사프란인 오(safranin O) 중 어느 하나로 염색한 후, 조직의 외관을 미시적으로 평가하였다.

[140]

또한, 발 관절 조직(paw joint tissue)을 RIPA(radio immunoprecipitation assay) 라이시스 버퍼(lysis buffer) 안에서 균질화한 후 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 전체 단백질 샘플을 분리하였다. 이후, 전체 단백질 샘플을 폴리비닐리덴다이플로라이드(polyvinylidenedifluoride) 멤브레인에 트랜스퍼(transfer) 하였다. 이후, 멤브레인에 트랜스퍼된 전체 단백질 샘플을 COX-2, iNOS, p65, p-p65, p38, p-p38, JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, TAK1, p-TAK1 및 β-actin 1차 항체(1:1000의 비율로 희석됨)와 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다.

이후, 전체 단백질 샘플을 항-마우스 면역글로블린 G 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국; 1:2000의 비율로 희석됨)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 샘플을 0.1% Tween 20 함유 PBS로 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하였다.

[141] 또한, 실험 종료일에 실험동물을 희생시키고 비장을 무균적으로 수거하였다. 이후, 비장을 분쇄하여 단일 세포 현탁액을 제조하고, Tris-buffered ammonium chloride로 세포를 용해시킨 후 RPMI 1640 medium에 현탁시킨 후 Pan T cell isolation kit II(MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 사용하여 T 세포를 분리하였다. 분리한 T 세포를 anti-FoxP3 또는 anti-IL-17A 항체로 염색하고 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 장치(C6 Flow Cytometer® System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 Th17 세포 및 Treg 세포의 분포를 분석하였다. 또한, 비장 내 T 세포 분화 마커를 qRT-PCR을 이용하여 분석하였다.

[142] 또한, ELISA kit를 이용하여 발 관절 조직 내 염증 유발 사이토카인, 항염증 사이토카인, prostaglandin E2(PGE₂), NO 등의 발현 수준을 분석하였다. 구체적으로 발 관절 조직(paw joint tissue)을 0.1% protease inhibitor cocktail 및 1% phosphatase inhibitor cocktail이 함유된 RIPA(radio immunoprecipitation assay) 라이시스 버퍼(lysis buffer) 안에서 균질화하였다. 이후, 조직 균질액을 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 수득한 상등액을 96-웰 플레이트로 옮기고, ELISA kit를 이용하여 TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-17 및 PGE2 등의 농도를 측정하였다.

[143]

[144] (3) 실험결과

[145] 도 18은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 관절염 심각도(arthritis severity)에 대해 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 또한, 도 19는 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 관절염 발생도(arthritis incidence)에 대해 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 또한, 도 20은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발의 부피 증가에 대해 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 또한, 도 21은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발 관절 조직의 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성에 대해 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 또한, 도 22는 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발 관절 조직(paw joint tissue)의 미시 외관에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.

[146] 도 18 내지 도 22에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 높은 항염증 효능을 보였고, 관절염의 개선 또는 치료 효과가

매우 우수한 것으로 나타났다.

- [147] 도 23은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발 관절 조직 내 iNOS 및 COX-2의 발현과 NF- κ B 및 MAPKs와 같은 신호전달 경로 요소의 발현에 미치는 영향을 나타낸 사진이다. 도 23에서 보이는 바와 같이 콜라겐의 처리는 iNOS 및 COX-2의 발현, 그리고 IRAK1, TAK1 및 I κ B- α 의 인산화, 그리고 NF- κ B 및 MAPKs(ERK, JNK, and p38)의 활성화를 크게 증가시켰다. 반면, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 iNOS 및 COX-2의 발현, 그리고 IRAK1, TAK1 및 I κ B- α 의 인산화, 그리고 NF- κ B 및 MAPKs(ERK, JNK, and p38)의 활성화를 모두 억제하였다.
- [148] 도 24는 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 발 관절 조직 내 염증 유발 사이토카인 및 항염증 사이토카인의 발현과, prostaglandin E2(PGE₂) 및 NO의 생성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 24에서 보이는 바와 같이 콜라겐의 처리는 NO 및 PGE2 생성을 크게 증가시킨 반면, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 NO 및 PGE2 생성을 각각 89% 및 86% 수준으로 억제하였다. 또한, 콜라겐의 처리는 염증 유발 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-17a)의 발현을 증가시키고 항염증 사이토카인(IL-10)의 발현을 억제한 반면, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 염증 유발 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-17a)의 발현을 억제하고 항염증 사이토카인(IL-10)의 발현을 유도하였다.
- [149] 도 25는 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 비장 내 T 세포 분화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 또한, 도 26은 콜라겐에 의해 관절염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주가 비장 내 T 세포 분화 마커에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 도 25에서 보이는 바와 같이 콜라겐의 처리는 T 세포의 Th17 세포(T helper 17 cell)로의 분화를 크게 증가시키고 Treg 세포로의 분화를 억제하였다. 반면, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 T 세포의 Th17 세포(T helper 17 cell)로의 분화를 저해하고 Treg 세포로의 분화를 촉진하였다. 또한, 도 26에서 보이는 바와 같이 콜라겐의 처리는 IL-17 및 IL-23의 발현을 크게 유도하고 Foxp3 발현을 억제하였다. 반면, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 IL-17의 발현을 억제하고 Foxp3 발현을 증가시켰다.
- [150] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 콜라겐에 의해 유도된 T 세포의 Th17 세포(T helper 17 cell)로의 분화를 억제하고 콜라겐에 의해 억제된 T 세포의 Treg 세포로의 분화를 증가시켰다. 또한, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 콜라겐에 의해 유도된 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL-17의 발현과 NF- κ B 및 MAPKs (p38, JNK, ERK)의 활성화를 억제하였다. 반면 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 IL-10의 발현을

유도하였다. 이러한 결과에 기초할 때, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 NF- κ B의 활성화를 억제하고 Th17/Treg 세포의 균형을 회복시켜 대장염, 관절염 등과 같은 염증 질환 또는 면역 질환을 개선할 수 있다. 또한, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주는 Th17/Treg 세포의 균형을 회복시켜 면역을 조절하기 때문에 류마티스 관절염, 알러지와 같은 면역 이상 질환을 개선할 수 있고, 약화된 면역력을 증강시킬 수도 있다.

[151]

[152] 7. 유산균 등을 포함하는 약학 조성물의 제조

[153] 하기의 약학 조성물 제조에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 배양물은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주 자체, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물로 대체가 가능하다.

[154]

[155] <7-1> 산제의 제조

[156] *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 20 mg

[157] 유당 100 mg

[158] 탈크 10 mg

[159] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[160]

[161] <7-2> 정제의 제조

[162] *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 10 mg

[163] 옥수수전분 100 mg

[164] 유당 100 mg

[165] 스테아린산 마그네 2 mg

[166] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[167]

[168] <7-3> 캡슐제의 제조

[169] *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 10 mg

[170] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[171] 유당 15 mg

[172] 스테아린산 마그네슘 0.2 mg

[173] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[174]

[175] <7-4> 환의 제조

[176] *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 10 mg

[177] 유당 150 mg

[178] 글리세린 100 mg

- [179] 자일리톨 50 mg
- [180] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [181]
- [182] <7-5> 과립의 제조
- [183] *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 15 mg
- [184] 대두추출물 50 mg
- [185] 포도당 200 mg
- [186] 전분 600 mg
- [187] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 °C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [188]
- [189] <7-6> 주사제의 제조
- [190] *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 10 mg
- [191] 소듐 메타비설파이트 3.0 mg
- [192] 메틸파라벤 0.8 mg
- [193] 프로필파라벤 0.1 mg
- [194] 주사용 멸균증류수 적량
- [195] 상기의 성분을 혼합한 후, 이중 2ml를 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.
- [196]
- [197] **8. 유산균 등을 포함하는 식품 조성물의 제조**
- [198] 하기의 식품 조성물 제조에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 배양물은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67 균주 자체, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물로 대체가 가능하다.
- [199]
- [200] <8-1> 밀가루 식품의 제조
- [201] 밀가루 100 중량부에 *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 0.5 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [202]
- [203] <8-2> 유제품(dairy products)의 제조
- [204] 우유 100 중량부에 *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 0.5 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [205]
- [206] <8-3> 선식의 제조
- [207] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [208] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후

분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[209] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 *Lactobacillus sakei* OK67 배양물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[210] 곡물류(현미 30 중량부, 울무 17 중량부, 보리 20 중량부),

[211] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[212] *Lactobacillus sakei* OK67 배양물(1 중량부),

[213] 영지(0.5 중량부),

[214] 지황(0.5 중량부)

[215]

[216] <8-4> 건강음료의 제조

[217] 액상과당(0.5 g), 올리고당(4 g), 설탕(2 g), 식염(0.5 g), 물(77 g)과 같은 부재료와 *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 1 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[218]

[219] <8-5> 야채 주스의 제조

[220] 제조에 2의 발효 더덕 추출물 2 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[221]

[222] <8-6> 과일 주스의 제조

[223] *Lactobacillus sakei* OK67 배양물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

[224]

[225] **9. 유산균의 수탁 정보**

[226] 본 발명의 발명자들은 부다페스트 조약에 의거하여 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67을 2015년 2월 23일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM 11670P의 수탁번호를 부여받았다. 아래에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67의 기탁증을 첨부한다.

[227]

국 제 양 식

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명
국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수탁: 김동현
대한민국 서울 성북구 성암로 92-24

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Lactobacillus sakei</i> OK67	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM 11670P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학상의 위치 (적용시 <input checked="" type="checkbox"/> 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2015년 02월 23일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: Korean Culture Center of Microorganisms 주소: (120-861) 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2015. 02. 23

BP/4 형식

판결 페이지

(원본과 상위 없음을 확인함) 대리인 : 변리사 권정기

[228]

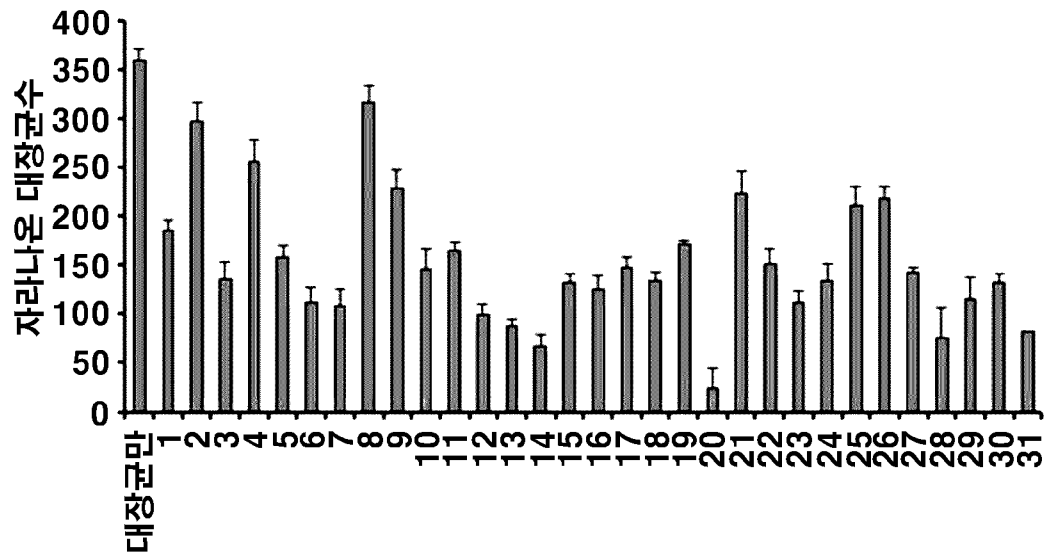
[229] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

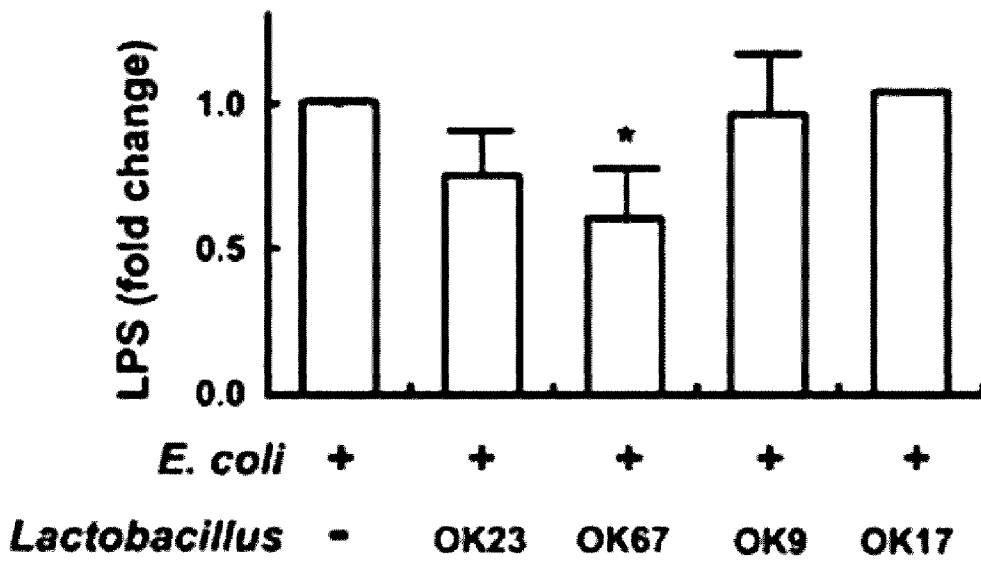
- [청구항 1] 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)로서, 혈당 조절 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 유산균.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 그람 염색시 양성을 나타내는 간균이고, 탄소원으로 리보스(Ribose), 갈락토오스(Galactose), 글루코오스(Glucose), 프럭토스(Fructose), 만노스(Mannose), 만니톨(Mannitol), 솔비톨(Sorbitol), α -메틸-D-만노사이드(α -methyl-D mannoside), N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 아미그달린(Amygdalin), 아르부틴(Arbutin), 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), 셀로바이오스(Cellobiose), 말토스(Maltose), 락토스(Lactose), 멜리바이오스(Melibiose), 수크로오스(Sucrose), 트레할로스(Trehalose), 멜레지토스(Melezitose), 젠티오바이오스(Gentiobiose) 및 투라노스(Turanose)를 이용하는 것을 특징으로 하는 유산균.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67(수탁번호 : KCCM 11670P)인 것을 특징으로 하는 유산균.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 혈당 조절 활성 외에 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성, 동맥경화 억제 활성, 밀착연접단백질(tight junction protein) 발현 유도 활성 또는 염증 억제 활성에서 선택된 하나 이상의 활성을 더 갖는 것을 특징으로 하는 유산균.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 내독소를 분비하는 장내 미생물의 증식을 억제하거나 장내 미생물의 내독소 생산을 억제하여 혈당을 강하시키는 것을 특징으로 하는 유산균.
- [청구항 6] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물.
- [청구항 8] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 당뇨병, 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 치료에 사용되는 약학 조성물.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 대사증후군은 당뇨병 또는 비만에서 선택되는 1종 이상의 질환과 지방간, 고지혈증, 심혈관 질환, 고혈압 또는 동맥경화증에서 선택되는 1종 이상의 질환이 동시에 발생하는 것인, 약학 조성물.

- [청구항 10] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고, 당뇨병, 비만 또는 대사증후군의 예방 또는 개선에 사용되는 식품 조성물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 대사증후군은 당뇨병 또는 비만에서 선택되는 1종 이상의 질환과 지방간, 고지혈증, 심혈관 질환, 고혈압 또는 동맥경화증에서 선택되는 1종 이상의 질환이 동시에 발생하는 것인, 식품 조성물.
- [청구항 12] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 조절 또는 면역 증강용 조성물.
- [청구항 13] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서, 상기 염증 질환은 관절염 또는 대장염인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 15] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

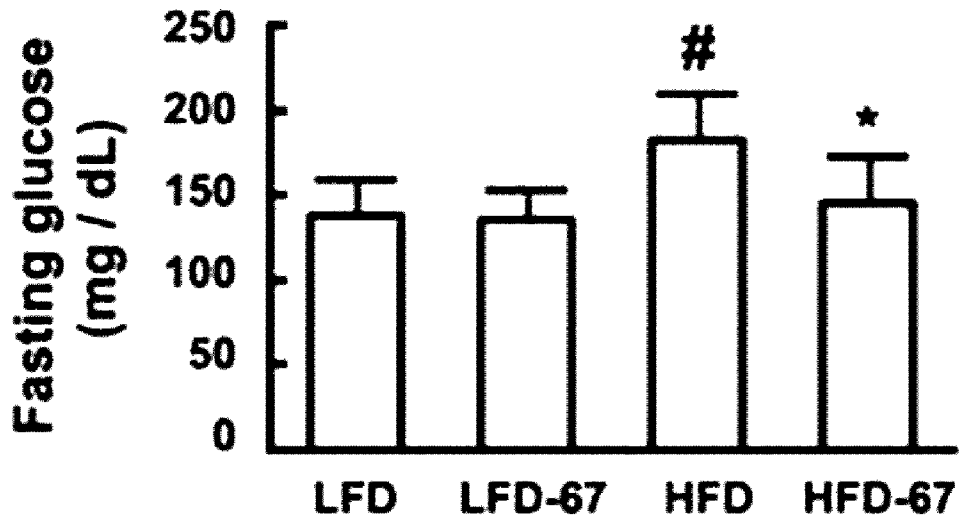
[도1]



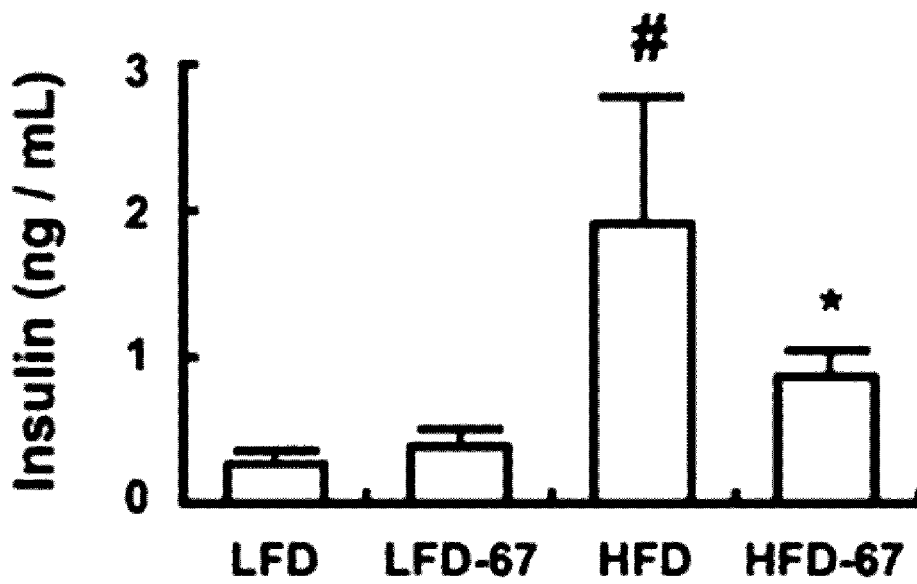
[도2]



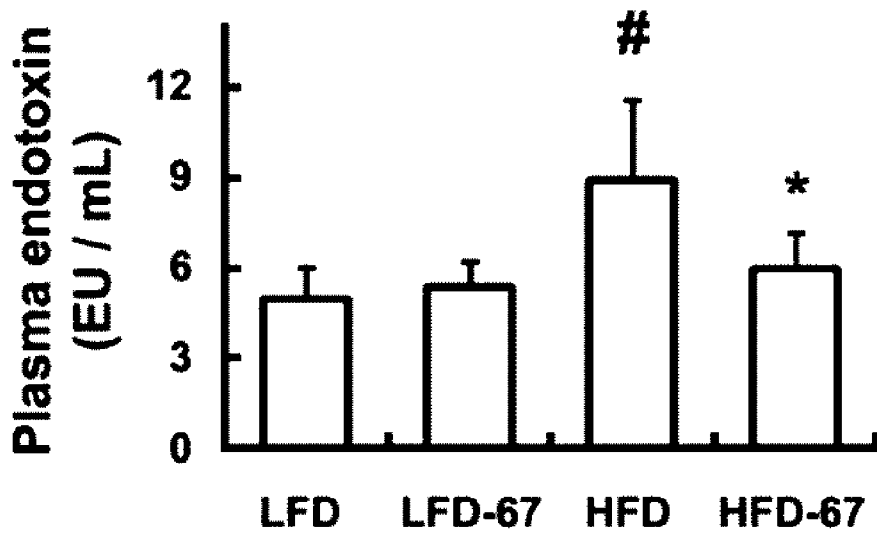
[도3]



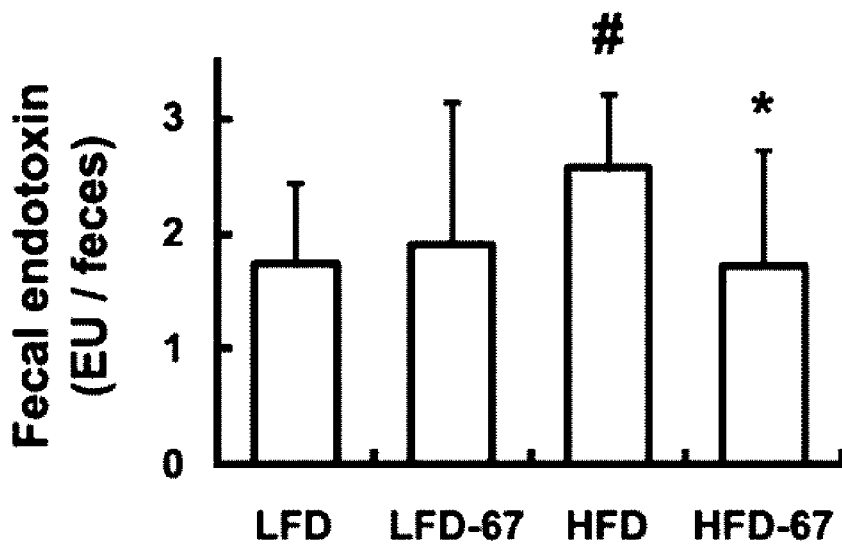
[도4]



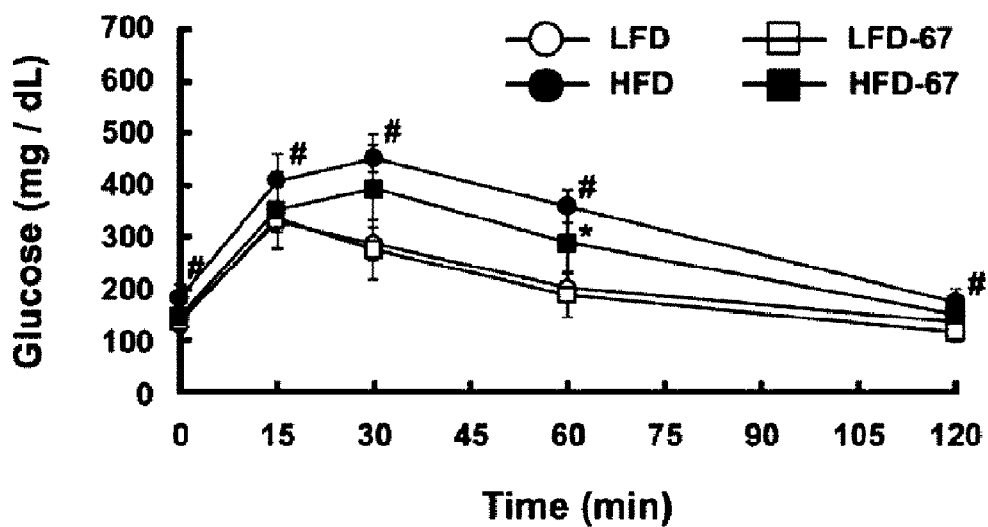
[도5]



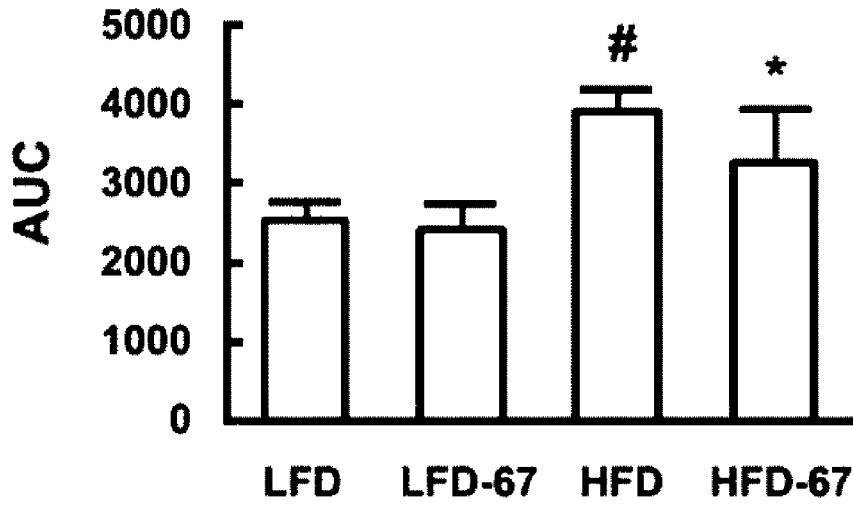
[도6]



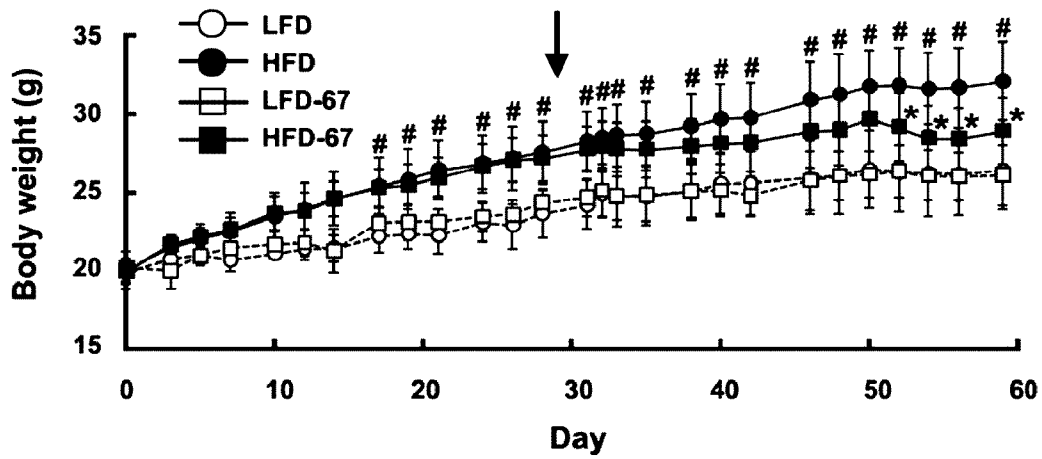
[도7]



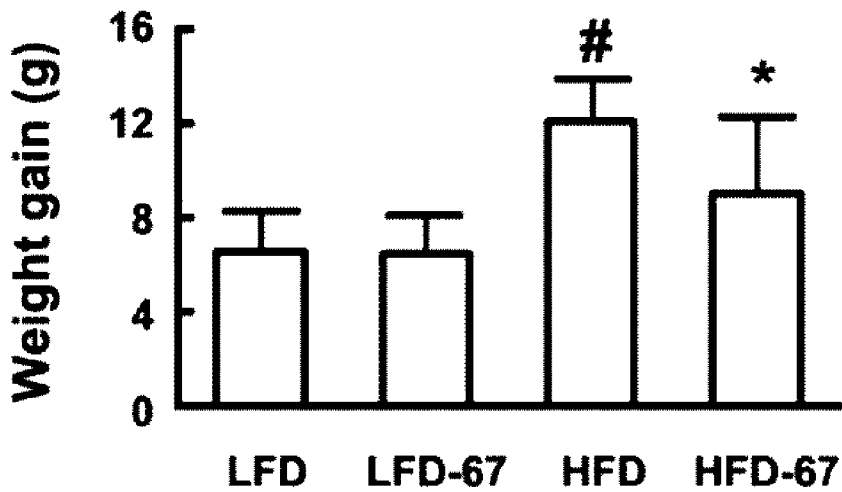
[도8]



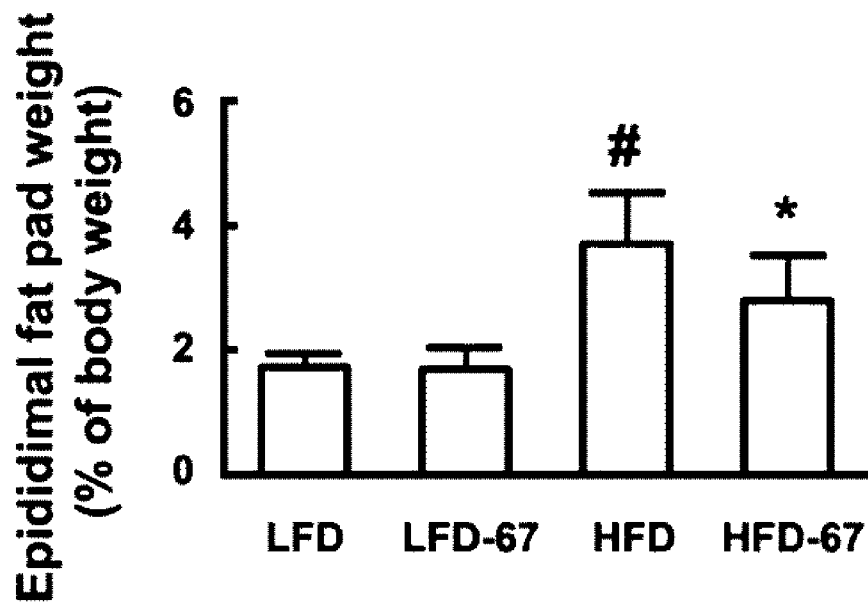
[도9]



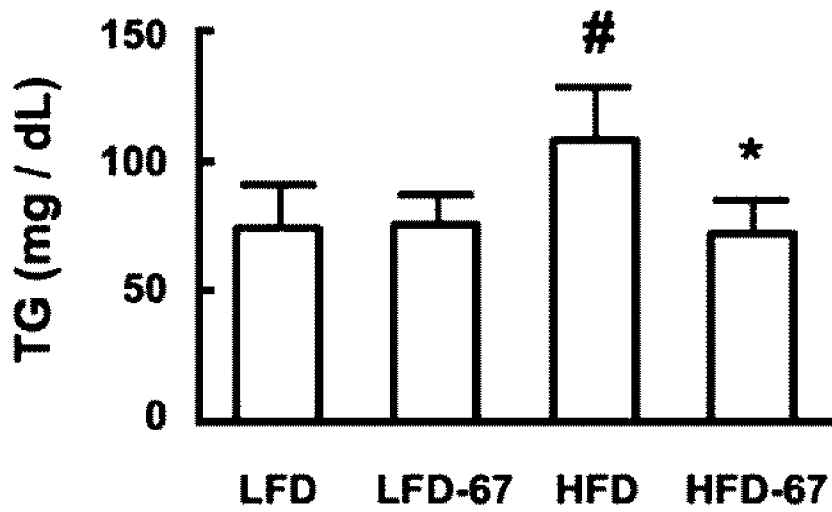
[도10]



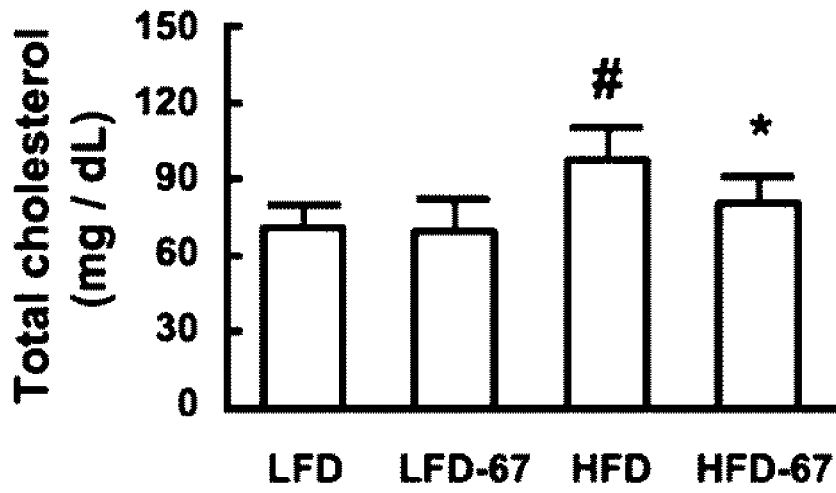
[도11]



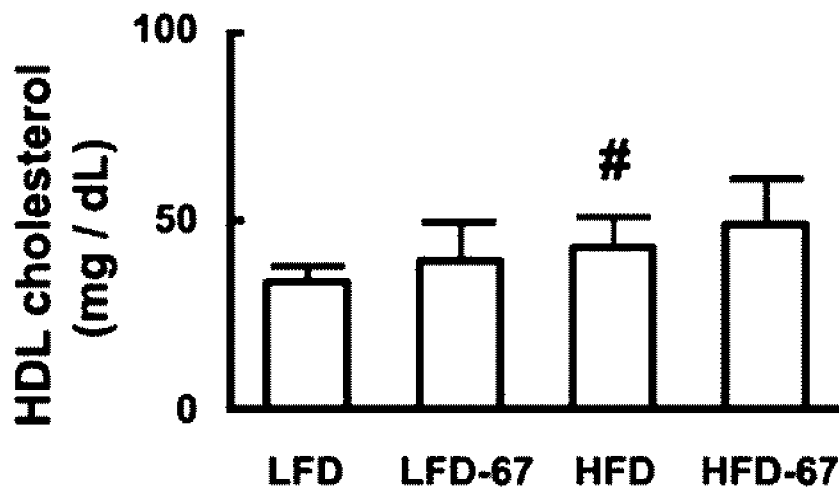
[도12]



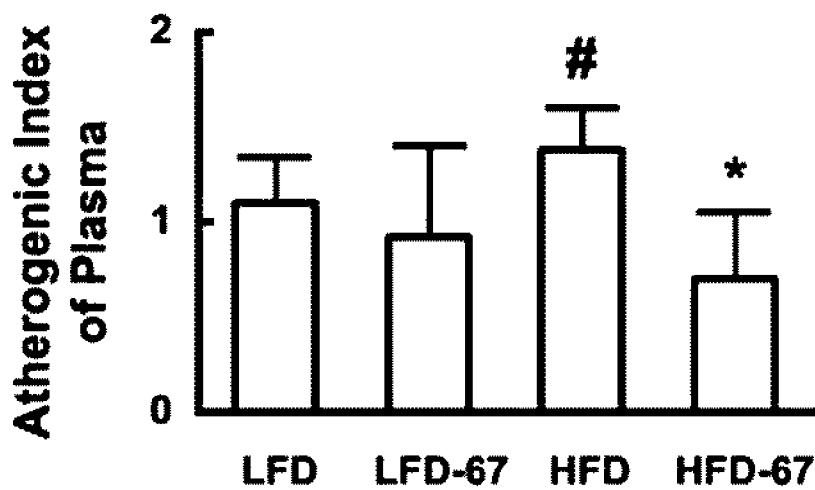
[도13]



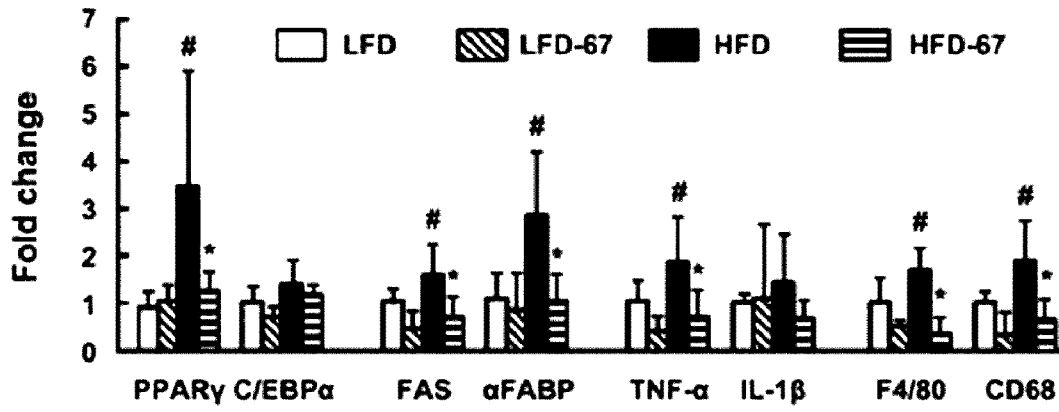
[도14]



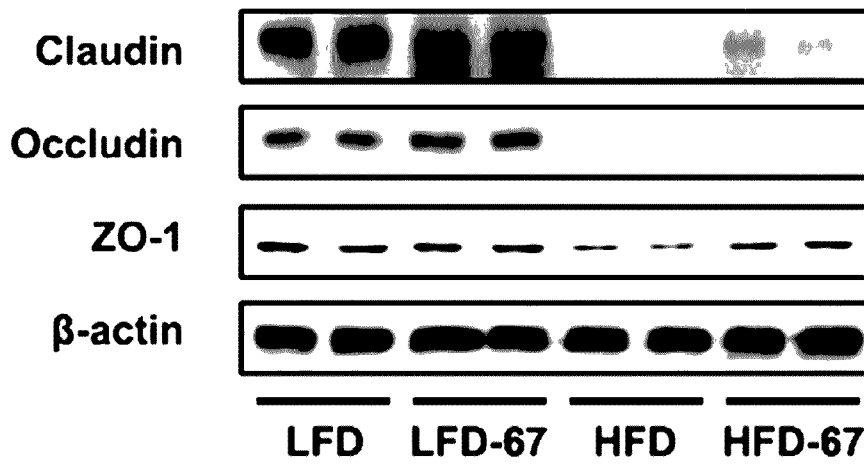
[도15]



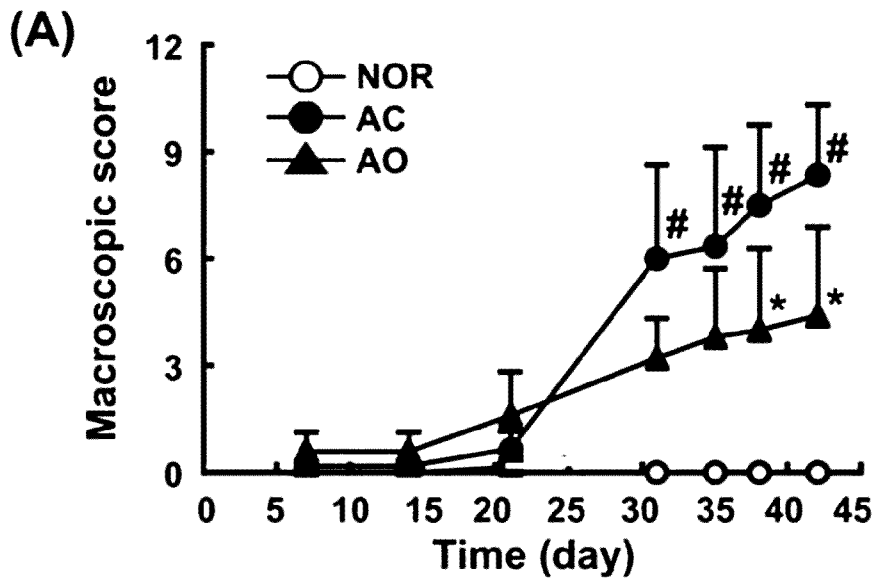
[도16]



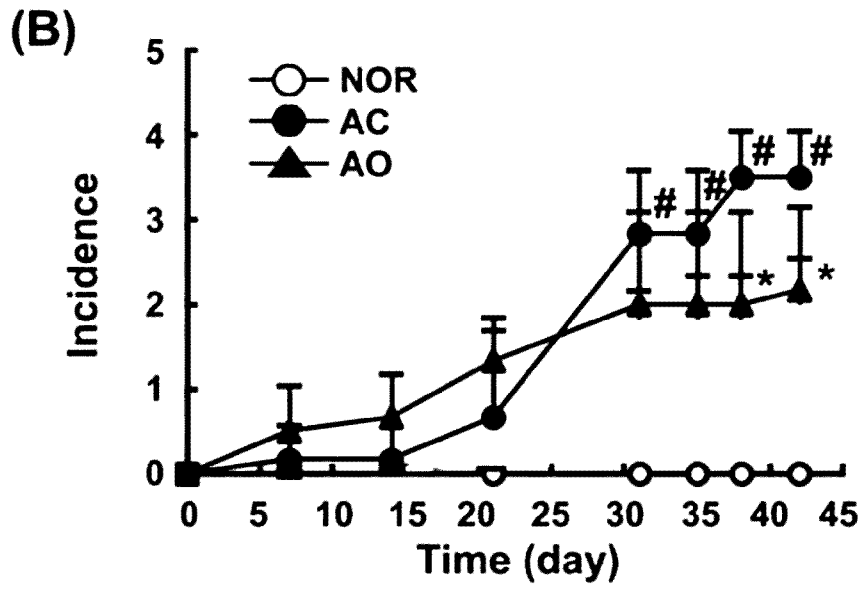
[도17]



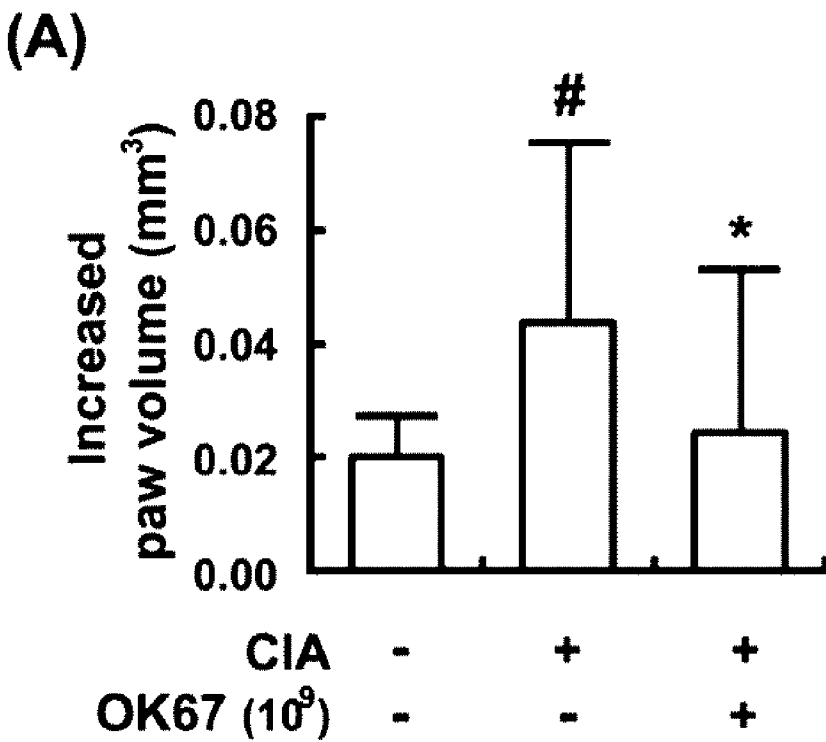
[도18]



[도19]

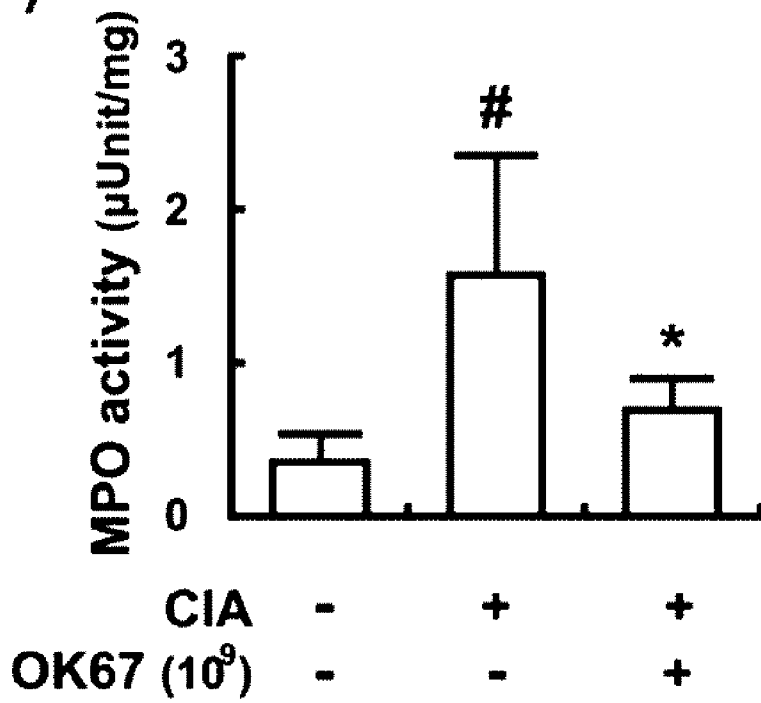


[도20]



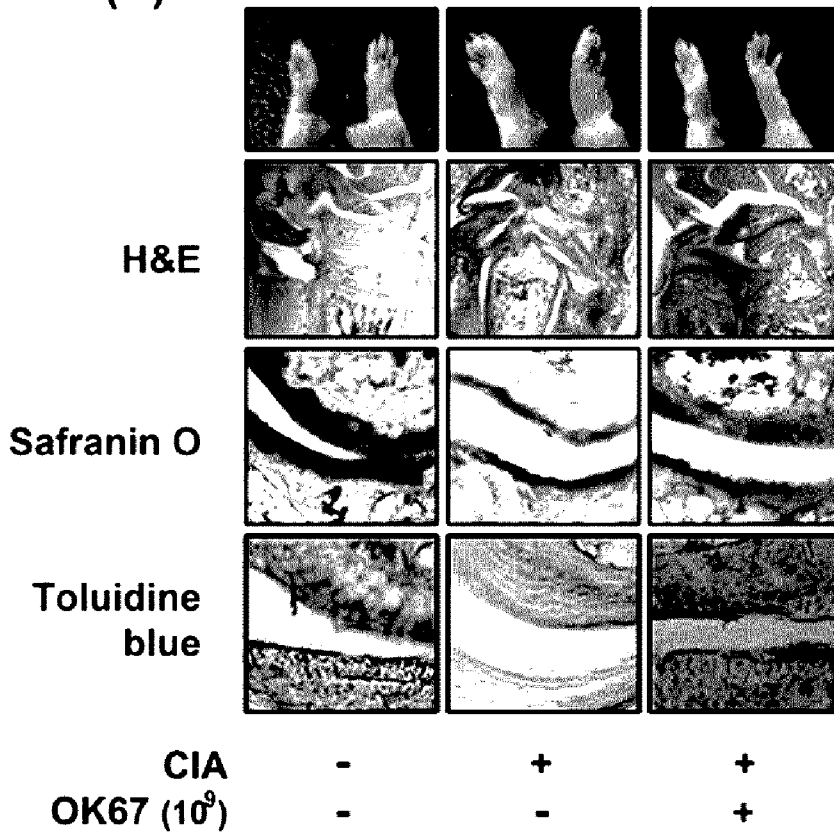
[도21]

(B)



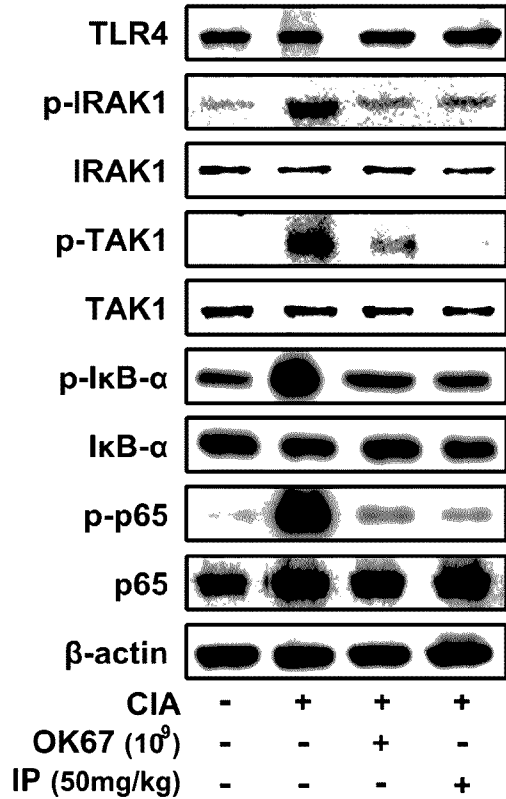
[도22]

(C)

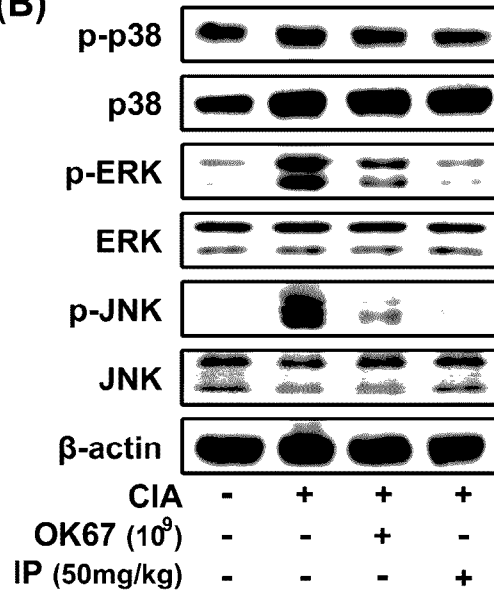


[도23]

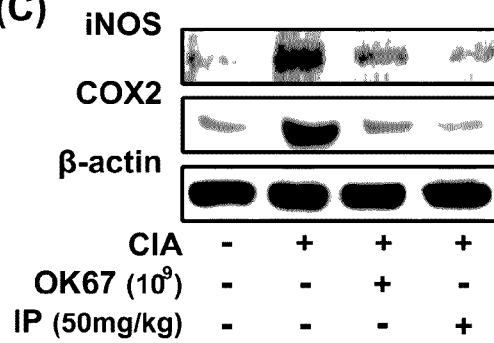
(A)



(B)

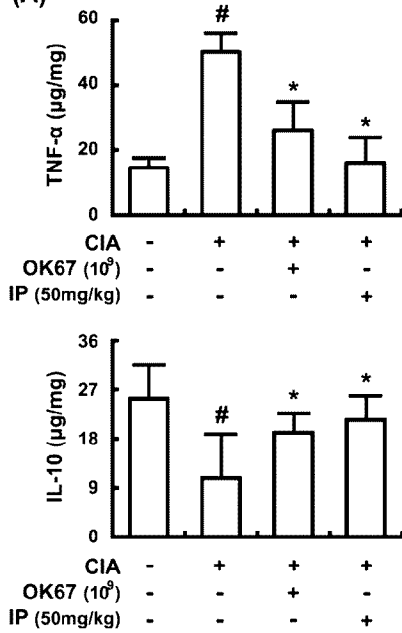


(C)

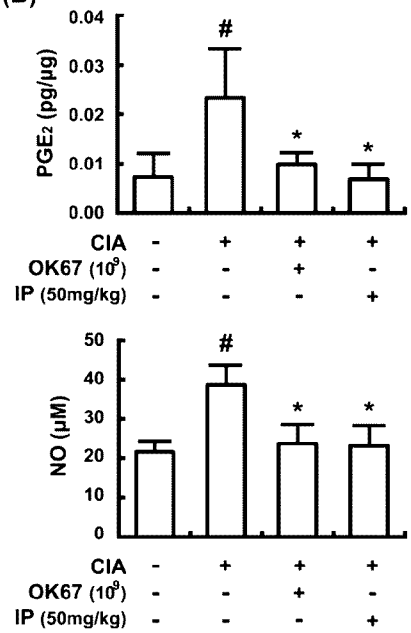


[도24]

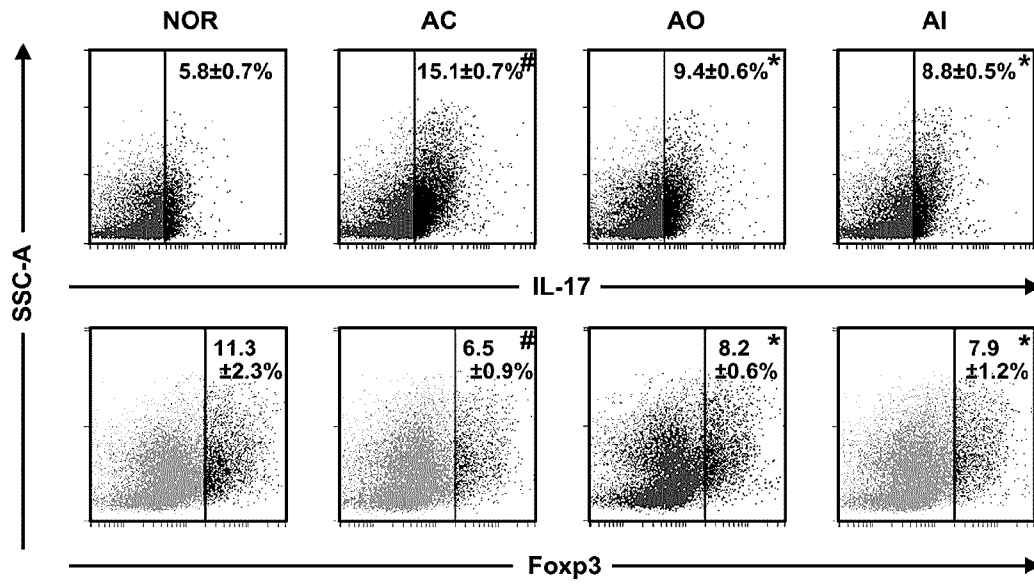
(A)



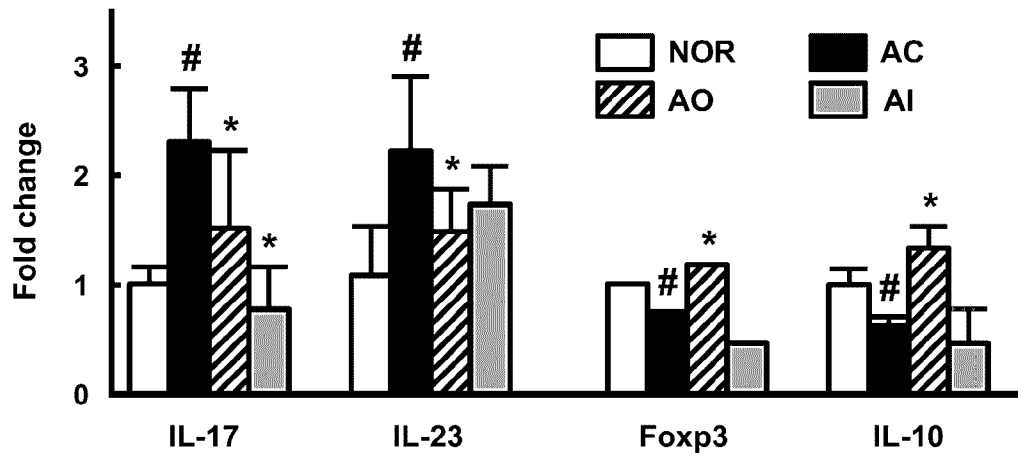
(B)



[도25]



[도26]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, A61K 35/742(2014.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, C12R 1/225(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; A61K 35/744; A23L 33/135; A61K 35/74; A61K 35/742; A23L 1/30; C12R 1/225

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Lactobacillus sakei, regulation of blood glucose, endotoxin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIM, Su-Min et al., "Lactobacillus Sakei OK67 Ameliorates High-fat Diet-induced Blood Glucose Intolerance and Obesity in Mice by Inhibiting Gut Microbiota Lipopolysaccharide Production and Inducing Colon Tight Junction Protein Exeression", Nutrition Research, April 2016, vol. 36, pages 337-348 See abstract; figures 2, 3, 6, 7; page 338, right column, lines 7-14; page 338, left column, lines 35-36; page 339, left column, lines 1-6; page 340, right column, lines 18-26; page 341, left column, lines 1-3, 14-17, 20-24; page 342, right column, lines 4-6; page 343, left column, lines 1-28; page 343, right column, lines 1-12; page 345, right column, lines 43-47.	1-15
A	KR 10-2015-0098202 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 27 August 2015 See the entire document.	1-15
A	NCBI, NCBI Reference Sequence no. KC416998.1 (10 September 2013) See sequence.	1-15
A	KR 10-2012-0100608 A (RNA INC.) 12 September 2012 See the entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 FEBRUARY 2017 (20.02.2017)

Date of mailing of the international search report

20 FEBRUARY 2017 (20.02.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005493

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOOK, Moo-Chang et al., "Effect of Gamma-aminobutyric Acid Produced by Lactobacillus Sakei B2-16 on Diet and Exercise in High Fat Diet-induced Obese Rats", Food Science and Biotechnology, 2014, vol. 23, no. 6, pages 1965-1970 See the entire document.	1-15
E	KR 10-2016-0108751 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 20 September 2016 See claims 1-19.	1-11,13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/005493

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0098202 A	27/08/2015	KR 10-2016-0097183 A KR 10-2016-0098149 A WO 2015-122717 A1	17/08/2016 18/08/2016 20/08/2015
KR 10-2012-0100608 A	12/09/2012	NONE	
KR 10-2016-0108751 A	20/09/2016	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i, A61K 35/742(2014.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, C12R 1/225(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20; A61K 35/744; A23L 33/135; A61K 35/74; A61K 35/742; A23L 1/30; C12R 1/225 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 락토바실러스 사케이, 혈당 조절, 내독소		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LIM, SU-MIN 등, 'Lactobacillus sakei OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction protein exeresion', Nutrition Research, 2016년 4월, 36권, 페이지 337-348 요약; 도면 2, 3, 6, 7; 페이지 338, 오른쪽 컬럼, 라인 7-14; 페이지 338, 왼쪽 컬럼, 라인 35-36; 페이지 339, 왼쪽 컬럼, 라인 1-6; 페이지 340, 오른쪽 컬럼, 라인 18-26; 페이지 341, 왼쪽 컬럼, 라인 1-3, 14-17, 20-24; 페이지 342, 오른쪽 컬럼, 라인 4-6; 페이지 343, 왼쪽 컬럼, 라인 1-28; 페이지 343, 오른쪽 컬럼, 라인 1-12; 페이지 345, 오른쪽 컬럼, 라인 43-47 참조.	1-15
A	KR 10-2015-0098202 A (경희대학교 산학협력단) 2015.08.27 전체 문헌 참조.	1-15
A	NCBI, NCBI Reference Sequence no. KC416998.1 (2013.09.10) 서열 참조.	1-15
A	KR 10-2012-0100608 A (주식회사 알엔에이) 2012.09.12 전체 문헌 참조.	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌, 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌, 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2017년 02월 20일 (20.02.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 02월 20일 (20.02.2017)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150	

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KOOK, MOO-CHANG 등, 'Effect of gamma-aminobutyric acid produced by Lactobacillus sakei B2-16 on diet and exercise in high fat diet-induced Obese rats', Food Science and Biotechnology, 2014, 23권, 6호, 페이지 1965-1970 전체 문헌 참조.	1-15
E	KR 10-2016-0108751 A (경희대학교 산학협력단) 2016.09.20 청구항 1-19 참조.	1-11, 13-15

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2016/005493

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0098202 A	2015/08/27	KR 10-2016-0097183 A KR 10-2016-0098149 A WO 2015-122717 A1	2016/08/17 2016/08/18 2015/08/20
KR 10-2012-0100608 A	2012/09/12	없음	
KR 10-2016-0108751 A	2016/09/20	없음	