

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 10월 31일 (31.10.2019) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2019/209086 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/005145

(22) 국제출원일:

2019년 4월 29일 (29.04.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0049234 2018년 4월 27일 (27.04.2018) KR

10-2019-0046715 2019년 4월 22일 (22.04.2019) KR

(71) 출원인: 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
(DANKOOK UNIVERSITY CHEONAN CAMPUS
INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUN-
DATION) [KR/KR]; 31116 충청남도 천안시 동
남구 단대로 119, 단국대학교천안캠퍼스내(안서동),
Chungcheongnam-do (KR).

(72) 발명자: 김미숙 (KIM, Misook); 16873 경기도 용인시
수지구 달빛이로 13, 102동 1001호, Gyeonggi-do (KR).
이새롬 (LEE, Sae Rom); 50897 경상남도 김해시 가야
로 60, 302동 203호, Gyeongsangnam-do (KR). 정윤화
(JEONG, Yoonhwa); 13616 경기도 성남시 분당구 정자
일로 1, 씨-3407, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL
PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산
디지털로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,
ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 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), 유
럽 (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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된
생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i)
및 48.2(a)(viii))

(54) Title: LEUCONOSTOC MESENTEROIDES STRAIN AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 류코노스톡 메센테로이드 균주 및 이의 용도

MKSR	
Shape (Microscopy 1000X)	
Gram stain	+
Endospore formation	-
Catalase activity	-

(57) Abstract: The present invention relates to a strain of *Leuconostoc mesenteroides* MKSR deposited as Accession No. KCTC13842BP and a use thereof. Specifically, the present invention relates to a novel *Leuconostoc mesenteroides* strain, a health functional food for preventing or improving diabetes containing the strain, a health functional food for improving cholesterol containing the strain, a pharmaceutical composition for preventing or treating diabetes containing the strain, a pharmaceutical composition for preventing or treating hyperlipidemia containing the strain, and a food additive.

(57) 요약서: 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메센테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 신규한 류코노스톡 메센테로이드 균주, 상기 균주를 함유하는 당뇨 예방 또는 개선용 건강 기능 식품, 상기 균주를 함유하는 콜레스테롤 개선용 건강 기능 식품, 상기 균주를 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 균주를 함유하는 고지혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물, 및 식품첨가제에 관한 것이다.



WO 2019/209086 A1

명세서

발명의 명칭: 류코노스톡 메센테로이드 균주 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메센테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR)균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 신규한 류코노스톡 메센테로이드 균주, 상기 균주를 함유하는 당뇨 예방 또는 개선용 건강 기능 식품, 상기 균주를 함유하는 콜레스테롤 개선용 건강 기능 식품, 상기 균주를 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 균주를 함유하는 고지혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물, 및 식품첨가제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 영양상태가 좋아지고 성인병이 늘어감에 따라 전세계적으로 비만, 당뇨, 고지혈증 환자가 늘어나는 추세에 있으며, 질병부담감도 높아지고 있는 실정이다.
- [3] 이중 고지혈증은 높은 농도의 콜레스테롤이 혈액에서 유지되는 현상이다. 혈청 내 콜레스테롤 및 중성지질의 증가가 고지혈증의 가장 일반적인 원인으로 취급되고 있는데 과다한 지방질의 축적으로 혈액순환장애 및 미세순환부전을 일으키는 것이다. 콜레스테롤은 동물의 지질 중에서 중요한 종류의 분자로서 스테로이드 호르몬, 담즙산 및 비타민 D의 전구체이다. 콜레스테롤은 물에 녹지 않기 때문에 혈장에서 단백질과 복합체(lipoprotein)를 이루어 전송된다. 이 복합체는 지질단백질인데 밀도에 따라 VLDL(very low density lipoprotein), IDL(intermediate density lipoprotein), LDL(low density lipoprotein) 및 HDL(high density lipoprotein)로 구분된다. LDL-콜레스테롤의 농도가 증가하면 동맥경화나 관상동맥 심장질환의 위험이 높아진다. 반대로 HDL 콜레스테롤의 농도가 증가하면 동맥경화나 관상동맥 심장질환의 위험이 낮아진다. HDL이 아닌 콜레스테롤과 LDL의 농도가 증가하는 이유는, 섭취 식품, 비만, 유전적 요인(예를 들어, LDL 수용체 변이로 인한 유전적 고지혈증 환자), 당뇨병 및 갑상선 기능부진 등의 결과로 보인다.
- [4] 또한, 당뇨병은 인슐린의 작용이 정상적으로 이루어지지 않아서 일어나는 내분비 장애의 가장 대표적인 질병이다. 전 세계적으로 당뇨병 환자는 세계 인구의 약 5%에 해당하는 3억 4700만 명으로 추정되고 있으며, 약 340만 명이 공복 시 고혈당으로 사망하는 추세이다. 더욱이, 당뇨병은 동맥경화증, 고혈압, 뇌혈관 경색증, 당뇨병성 신증, 당뇨병성 망막증, 농피증, 습진, 괴저, 구강질환 등 장기 합병증을 수반하고 있으며, WHO의 보고에 따르면 당뇨 유병률은 꾸준히 증가하여 2030년에는 사망률 7위에 해당될 것이라고 예측되고 있다. 미국 당뇨협회에 따르면 연간 당뇨병 환자의 건강관리비용이

1,320억불(2002년)에 달하고 있다고 하며, 당뇨병 환자의 90%를 차지하고 있는 2형 당뇨병 환자는 체중 증가와 운동 부족으로 인해 빠르게 증가하고 있는 추세이다. 우리나라도 사회 경제적인 발전으로 과식, 운동부족 등으로 인하여 당뇨병 인구가 증가 추세에 있어 2010년도 350만 명 정도가 당뇨병 환자인 것으로 추정되고 있다. 또한, 우리나라는 현재 인슐린-비 의존 당뇨병이 경제 사회 보건학적으로 중대한 문제점으로 대두되고 있다. 2013년 통계에 따르면 당뇨병은 65세 이상 노인의 다빈도 상병 10위권 내에 해당되고 있으며 연간 보고된 건강관리비용은 2,192억 8000만원에 달한다. 당뇨병 치료약물은 혈당관리와 합병증 지연을 주목적으로 하고 있으며, 인슐린제제, 설폰요소제, 비구아니드제, 알파-글루코시다아제 저해제 등의 경구혈당강화제 등을 사용하고 있는데, 장기 투여시 각종 장기에 대한 부작용 및 치료의 한계점 등의 문제가 있다. 또한, 최근 연구에 따르면 활성산소들로 인한 특정 세포의 손상으로 각종 당뇨 합병증을 유발한다고 하여 효율적인 당뇨병 관리를 위해서는 활성산소를 제거할 수 있는 항산화 활성 물질 섭취의 중요성이 대두되고 있는 추세이다. 하지만, 대부분의 당뇨 환자들은 식이요법에 대한 목적은 인지하고 있어도 실천에 어려움을 호소하고 있어 간편하게 섭취할 수 있는 항당뇨 식품에 대한 선호도가 높은 실정이다. 혈당 조절 기능성 원료에 대한 제품 개발은 활발히 진행되고 있으나, 다양한 기전에 의해 발병되는 질병임에도 불구하고, 단일 효능에 초점을 맞추고 있다.

- [5] 이와 관련하여, 프로바이오틱은 적당량 섭취하였을 때, 숙주에 건강과 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물로서, 프로바이오틱 섭취는 장내 세균총의 안정화에 도움이 되어, 장내 균들 간에 균형을 유지함과 동시에 신체의 건강유지에도 도움이 되는 것으로 알려져 있다. 프로바이오틱은 면역반응에 도움을 주며, 이는 프로바이오틱균주들의 세포벽 성분에 의하여 높은 대식세포 활성과 항 염증성 사이토카인 전사조절인자의 증가하여, 면역반응이 일어나 감염성 유해 미생물 같은 외부 물질을 제거하기 때문이다. 그러나, 식이 탄수화물 소화효소에 대한 활성 억제 효과를 가지며, 동시에 콜레스테롤 개선 효과, 및 항산화와 프로바이오틱 활성을 보유한 식물 유래 멀티형 프로바이오틱스에 대한 균주에 대한 보고는 전무한 실정이다.

- [6] 따라서, 본 발명자는 발효 식품으로부터 프로바이오틱스로서 사용될 수 있으며, 종래 당뇨병 및 고지혈증을 예방 및/또는 개선하기 위한 제품에 대한 문제를 해결 가능한 균주를 발견하기 위해 노력하였으며, 이 결과 알파아밀라아제에 대한 저해 효과 없이도 알파글루코시다아제에 대해 우수한 저해효과를 갖고, 콜레스테롤 동화능 및 콜레스테롤 저감 효과를 가지며, 항산화 효과를 보이고, 프로바이오틱스로서 사용될 수 있는 균주를 확인함으로써 본 발명을 완성 하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR 균주는 높은 농도의 인공장액에 대하여 높은 생존율을 가져 프로바이오틱스로서 기능이 가능하며, 기존 당의 체내 흡수를 지연시키는 용도로 사용된 아카보오스의 부작용인 복부 팽만감을 해결할 수 있도록 알파아밀라아제의 저해 작용은 없고, 이당류인 맥아당을 포도당으로 전환하는 효소인 알파 글루코시다제에 대한 우수한 억제활성 효과를 가지며, BSH(Bile salt hydrolase) 활성 효과와 콜레스테롤을 동화시키는 능력을 가짐으로써 혈중 콜레스테롤 수치를 유의적으로 낮추고, 우수한 항산화효과, 식중독 균에 대한 항균 활성, 당뇨병 및 고지혈증 예방 및 개선 효과를 제공한다.
- [8] 또한, 상기 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 건강 기능식품의 경우 우수한 당뇨병 예방 및 개선 효과, 콜레스테롤 개선 효과, 항균 효과 및 항산화효과를 제공한다.
- [9] 또한, 상기 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은 당뇨병 및 고지혈증 예방 또는 치료 효과를 제공한다.
- [10] 또한, 상기 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 식품 첨가제는 복합탄수화물이나 올리고당 생산 능력이 우수한 효과를 제공한다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 당뇨 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 콜레스테롤 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

- [16] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메센테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 식품 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

- [17] 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메센테로이드 MKSR균주는 높은 농도의 인공장액에 대하여 높은 생존율을 가져 프로바이오틱스로서 기능 가능하며, 기존 당의 체내 흡수를 지연시키는 용도로 사용된 아카보오스의 부작용인 복부 팽만감을 해결할 수 있도록 알파아밀라아제의 저해 작용은 없고, 이당류인 맥아당을 포도당으로 전환하는 효소인 알파 글루코시다제에 대한 우수한 억제활성 효과를 가지며, BSH(Bile salt hydrolase)를 활성화시키는 효과와 콜레스테롤을 동화시키는 능력을 가짐으로써 혈중 콜레스테롤 수치를 유의적으로 낮추고, 우수한 항산화효과, 식중독 균에 대한 항균 활성, 당뇨병 및 고지혈증 예방 및 개선 효과를 제공한다.
- [18] 또한, 상기 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 건강 기능 식품의 경우 우수한 당뇨병 예방 및 개선 효과, 콜레스테롤 개선 효과, 항균효과 및 항산화효과를 제공한다.
- [19] 또한, 상기 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 당뇨병 및 고지혈증 예방 또는 치료 효과를 제공한다.
- [20] 또한, 상기 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 식품 첨가제는 복합탄수화물이나 올리고당 생산 능력이 우수한 효과를 제공한다.

[21]

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 류코노스톡 메센테로이드 MKSR의 형태학에 관한 도이다.
- [23] 도 2는 류코노스톡 메센테로이드 MKSR의 16s rRNA 분석 결과로 서열번호 1에 관한 것이다. 16s rRNA 동정 결과 *Leuconostoc mesenteroides* strain ATCC 8293과 99% 유사하였다.
- [24] 도 3은 *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 계통수 (Phylogenetic tree)에 관한 도이다.
- [25] 도 4 및 도 5는 각기 다른 *Leuconostoc mesenteroides* 종의 배지에 첨가한 당에 따른 당의 이용 능력, 올리고사카라이드 및 덱스트란 생성여부와 관련한 도이다. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 발효를 통해 각기 다른 탄수화물을 이용하여 올리고사카라이드(oligosaccharides) 및 덱스트란(dextran)의 생산에 관한 도로서, M, 1% maltose; G, 1% glucose, S, 1% Sucrose; F, 1% Fructose; O, 1% Oligosaccharide; LMG, LM 배지 + 1% Glucose; LMM, LM 배지 + 1% Maltose; LMS, LM 배지 + 5% Sucrose; LMF, LM 배지 + 1% Fructose; LMGS, LM 배지 + 1% Glucose + 5% Sucrose; LMMS, LM 배지+1% Maltose + 5% Sucrose; LMFS, LM

배지 + 1% Fructose + 5% Sucrose을 의미한다.

[26] 도 6은 *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 알파글루코시다아제의 저해 효과에 관한 도이다.

[27] 도 7은 용혈반응 테스트 결과와 관련된 사진으로, (A)는 *Leuconostoc mesenteroides* MKSR, (B)는 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (이하LM)(C)는 *Leuconostoc citreum*(이하 LC) (D)는 *Staphylococcus aureus*에 대하여 진행한 것이다.

[28]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[29] 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메센테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주를 제공한다. 상기 균주는 알파글루코시다제 억제 활성을 갖는 프로바이오틱 균주인 것으로, 알파아밀라아제의 저해 작용이 없어, 기존 당뇨병 치료제로서 쓰이는 아카보오스의 부작용인 복부 팽만감문제를 개선할 수 있다. 또한, 상기 균주는 BSH(Bile salt hydrolase)를 활성시키는 효과와 콜레스테롤을 동화(Cholesterol assimilation)시키는 능력을 가짐으로써 혈중 콜레스테롤 수치를 유의적으로 낮추는 효과를 갖기에 혈중 콜레스테롤을 개선할 수 있다. 상기 BSH(Bile salt hydrolase) 효소는 담즙염의 감소시켜 간에서 콜레스테롤의 담즙산으로의 전환을 증가시켜 체내의 항상성을 유지하고 궁극적으로 혈중 콜레스테롤 수치를 낮출 수 있으며, 콜레스테롤 동화(Cholesterol assimilation)는 콜레스테롤을 동화시켜 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮출 수 있다.

[30] 또한, 상기 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메센테로이드 MKSR 프로바이오틱스로 사용가능 하며, 항산화 효과를 갖는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 균주는 식중독 균에 대한 항균 효과를 갖는 것을 특징으로 한다. 프로바이오틱스는 유산균의 β -glucan이 구조적, 화학적 특성에 의해 콜레스테롤을 조절 및 억제하여 콜레스테롤 흡수를 저하 가능하게 한다. 따라서, 프로바이오틱스를 장기적으로 섭취하였을 때, 동맥경화나 고지혈증을 예방가능한 효과를 가질 수 있다. 프로바이오틱스로 사용가능한 균주에는 *Leuconostoc* 속, *Enterococcus* 속, *Streptococcus* 속 *Bacillus* 속 등이 있을 수 있으며, 본 발명은 *Leuconostoc* 속을 이용하는 것이 보다 바람직하다. 프로바이오틱스 균주의 기능과 관련되어서는 소화액에 대한 생존능력, 병원성균에 대한 항균효과, 면역기능 강화, 콜레스테롤 수치 정상화, 장 건강 개선 등 다양한 효과를 발휘 가능하다. 뿐만 아니라, 프로바이오틱스 섭취로 인한 미백개선 기능도 얻을 수 있다. 프로바이오틱스는 활성 산소 생성을 억제하여 높은 항산화활성을 가짐으로써 멜라닌 세포 형성 억제를 통한 미백개선에 도움을 줄 수 있다. 따라서, 본원발명의 균주는 당뇨 예방 또는 개선용, 또는 콜레스테롤 개선용 프로바이오틱스 균주일 수 있다.

- [31] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 당뇨 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다. 상기 균주는 알파아밀라아제의 저해 작용이 없이 알파글루코시다제 억제 활성을 가짐으로써 기존 당뇨병 치료제인 아카보오스의 부작용인 복부 팽만감문제를 개선할 수 있다. 또한, 프로바이오틱스로서 사용 가능함으로 당뇨병 치료를 위하여 알파-글루코시다아제 저해제 등의 장기에 대한 부작용 및 치료 한계를 개선하여, 지속적으로 투여함에도 장기에 대한 부작용을 완화 하면서, 우수하게 당뇨 예방 및/또는 개선 효과를 제공 할 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 균주는 항산화효과를 가짐으로써 활성산소에 의한 세포 손상에 의한 당뇨 합병증을 완화하여 효율적으로 당뇨 예방 및/또는 개선 효과에 기여할 수 있다.
- [32] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 콜레스테롤 개선용 건강 기능 식품을 제공한다. 상기 균주는 BSH(Bile salt hydrolase) 활성 효과와 콜레스테롤 동화능(Cholesterol assimilation)을 가짐으로써 혈중 콜레스테롤 수치를 유의적으로 낮추는 효과를 갖기에 고지혈증 예방 및/또는 개선 효과에 기여할 수 있다.
- [33] 상기 건강 기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 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.
- [34] 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [35] 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [36] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.
- [37] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 프라바스타틴 및

항혈소판제는 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[38] 또한, 본 발명은 상기 군주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 알파-글로코시다아제 저해제 등의 장기에 대한 부작용 및 치료 한계를 개선하여, 지속적으로 투여함에도 장기에 대한 부작용을 완화 하면서, 우수하게 당뇨 예방 및/또는 개선 효과를 제공 할 수 있다. 또한, 항산화효과를 가짐으로써 활성산소에 의한 세포 손상에 의한 당뇨 합병증을 완화하여 효율적으로 당뇨 예방 및/또는 개선 효과에 기여할 수 있다.

[39] 그리고, 본 발명은 상기 군주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 BSH(Bile salt hydrolase) 활성 효과와 콜레스테롤 동화능(Cholesterol assimilation)을 가짐으로써 혈중 콜레스테롤 수치를 유의적으로 낮추는 효과를 갖기에 고지혈증 예방 및/또는 개선 효과에 기여할 수 있다.

[40] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 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 또는 광물유 등을 들 수 있다.

[41] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[42] 제제화할 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 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.

[43] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[44] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.4 mg/m²/day 내지 10.0 mg/m²/day의 양을 주 2회 1 내지 4주기로 투여할 수 있다.

- [45] 또한, 이러한 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [46] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [47] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메센테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 식품 첨가제를 제공한다. 상기 균주는 만니톨, 과당, 올리고사카라이드 및 덱스트란으로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상을 생산가능 하며, 식중독 균 등에 대한 항균 활성을 가짐으로, 식품첨가제로서 역할을 우수히 수행 가능하다. 또한, 상기 균주는 항산화 효과를 갖는 프로바이오틱스로서 사용 가능하여 미백 효과 또한 얻을 수 있다.

[48]

발명의 실시를 위한 형태

- [49] 이하, 본 발명에 따른 실시예 및 이의 도면을 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[50]

- [51] 실시예 1. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 미생물학적 특성 특정

- [52] *Leuconostoc mesenteroides* MKSR은 MRS 배지를 사용하여 25-40°C, 보다 바람직하게는 25-38°C에서 배양하였다. 상기 온도 범위에서 미생물의 배양이 가능하며, 상기 온도범위를 벗어날 경우 미생물의 배양이 어렵다는 문제가 있다. MKSR의 미생물학적 특성을 위하여 현미경 관찰, Gram staining, endospore formation, catalase activity를 측정하였다. 탄수화물 이용 능력과 효소 생산능을 조사하기 위하여 API 50CHL와 API zym (API bioMerieux, France)을 이용하였다. 또한, MKSR의 16s rRNA의 염기 서열을 Solgent (Daejeon, Korea)에 의뢰하였다. 배양된 하나의 colony를 회석시키고, genomic DNA prep kit를 이용하여 genomic DNA의 추출을 하였다. Primer set의 forward primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AB-3')와 reverse primer인 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하여 세균의 genomic DNA에 특이적으로 부착하였고, template 1μl, 2X Taq PCR premix(Solgent) 10 μl, forward primer 2 μl(10 pmole/ μl), 증류수 5 μl를 섞어 PCR reaction mixture을 만들어 PCR(Biosystems, Life Technologies, Marsiling, Singapore)을 수행하였다. PCR reaction은 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분 동안 수행하였고, 총 30번 반복하였다. PCR이 끝난 후 Solgent PCR purification kit를 이용하여 깨끗하게 정제하고, 1% agarose gel을 이용하여 PCR 결과를 확인하였다. 균주의 동정을 위해 정제된 DNA를 ABI 3730XL DNA

analyzer(Applide Biosystems, Foster, USA)를 이용하여 sequencing 한 뒤, BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 분석하였다. MEGA7 program으로 균주의 16s rRNA와 MKSR과 가까운 유연 관계에 있는 species들을 선별하여 Phylogenetic tree를 작성하였다.

[53] 그 결과 *Leuconostoc mesenteroides* MKSR (이하 MKSR)은 그람양성의 쌍구균으로 포자를 형성하지 않으며, catalase activity은 음성이었다(도 1참조).

[54] 실시예 2. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 당전이 반응

[55] MKSR은 0.5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) peptone, 2% (w/v) K_2HPO_4 0.02% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% (w/v) NaCl, 0.001% (w/v) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% (w/v) $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.013% (w/v) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 로 구성된 배지에 추가적으로 1% Maltose, 1% Fructose, 1% Glucose, 5% Sucrose, 1% Maltose와 5% Sucrose의 혼합물, 1% Fructose와 5% Sucrose의 혼합물, 1% Glucose와 5% Sucrose 혼합물 등 각기 다른 당을 첨가하여 18시간 배양한 후, 10000 rpm에서 5분간 원심분리 후 당전이 반응을 하였다. 반응 산물은 TLC silica gel 60 (EMD Millipore Co., USA)판에 점액한 후 전개를 한 후 발색하였다.

[56] MKSR, LM, LC를 배양하는 배지에 첨가한 당에 따른 당의 이용능력 및 oligosaccharide와 Dextran생성여부를 알아보았다(도 4, 5 및 표 1 참조). 전통 발효식품인 김치발효에 관여하는 젖산균에 의해서 생산되는 dextran은 식품 첨가물로써의 사용이 허가된 바 있다. 이는 젖산균이 균체 밖에서 생산하는 다당류 중에서 구성 당인 glucose가 주로 α -(1 $\rightarrow$ 6)결합에 의해 연결되어 있는 다당류로서 sucrose 제품의 결정방지, 유체식품의 물성 조절 등 식품 공업에서 활발히 이용되고 있다. Dextran을 생산하는 대표적인 *Leuconostoc mesenteroides*는 이상젖산 발효균주로서 발효성 당인 sucrose를 기질로 하여 dextran을 생성하는 젖산균으로서 자연발효 식품에 널리 존재한다. Maltose를 첨가한 배지에서 배양한 MKSR은 oligosaccharide와 함께 dextran을 생성하였다. *Leuconostoc* 균주는 세포의 효소로서 dextransucrase를 분비하면서 포도당의 중합체로서 고분자 dextran을 생합성하며, 점착성, 흡습성 및 열안정성의 물리화학적 성질을 가지면서 식품의 물성조절에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 또한 *Leuconostoc* 젖산균은 설탕으로부터 당 알코올인 만니톨, 과당 등을 생산하면서 발효제품에 단맛과 상큼한 맛을 부여하는 역할을 한다. 젖산균에 의해서 생산되는 당알코올은 화학적으로 고온 고압조건에서 수소첨가에 의한 생산방법에 비해서 장점이 있어 미생물에 의한 만니톨 생산에 관하여서 많은 연구들이 진행되고 있다.

[57] 하기 표 1은 각기 다른 탄수화물을 이용하여 *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 발효 작용에 의해 생산되는 올리고사카라이드 및 텍스트란 형성 여부에 관한 결과를 기재한 것이다.

[58] [표 1]

[59]

	Carbohydrate in media (%)				Production	
	Maltose	Glucose	Sucrose	Fructose	Oligosaccharide	Dextran
LM 배지*	0	0	0	0	-	-
LMG 배지	0	1	0	0	-	-
LMM 배지	1	0	0	0	+	-
LMS 배지	0	0	1	0	-	+
LMF 배지	0	0	0	1	-	-
LMGS 배지	0	1	1	0	-	+
LMMS 배지	1	0	1	0	+	+
LMFS 배지	0	0	1	1	-	+

[60] *M, 1% maltose; G, 1% glucose, S, 1% sucrose; F, 1% fructose; O, 1% oligosaccharide; LMG, LM 배지 + 1% glucose; LMM, LM 배지 + 1% maltose; LMS, LM 배지 + 5% sucrose; LMF, LM 배지 + 1% fructose; LMGS, LM 배지 + 1% glucose + 5% sucrose; LMMS, LM 배지+1% maltose + 5% sucrose; LMFS, LM 배지 + 1% fructose + 5% sucrose

[61] 또한, 하기 표 2는 MKSR의 탄수화물 발효 능력을 실험한 결과이다. MKSR은 *L. mesenteroides sp. mesenteroides* (이하 LM)와 98.8% 유사하였고, Xylose, D-lactose, Potassium gluconate 등 당 이용능력에 차이가 있었다.

[62] [표 2]

[63]

Carbohydrate	MKSR ¹	LM	LC	Carbohydrate	MKSR	LM	LC
control	- ²	-	-	esculin ferric citrate	+	+	+
Glycerol	-	-	-	salicin	+	+	+
Erythritol	-	-	-	D-cellobiose	+	+	+
D-arabinose	-	-	-	D-maltose	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	D-lactose	-	+	-
D-ribose	+	+	-	D-melibiose	+	+	-
D-xylose	-	+	-	sucrose	+	+	+
L-xylose	-	-	-	D-trehalose	+	+	+
D-adonitol	-	-	-	inulin	-	-	-
Methyl-p	-	-	-	d-melezitose	-	-	-
D-xylopyranoside	-	-	-	D-rafinoose	+	+	-
D-galactose	+	+	-	starch	-	-	-
D-glucose	+	+	+	glycogen	-	-	-
D-fructose	+	+	+	xylitol	-	-	-
D-mannose	+	+	+	gentiobiose	+	+	+
L-sorbose	-	-	-	D-turanose	+	+	+
L-rhamnose	-	-	-	D-lyxose	-	-	-
dulcitol	-	-	-	D-tagatose	-	-	-
inositol	-	-	-	D-fucose	-	-	-
D-mannitol	-	-	-	l-fucose	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	D-arabitol	-	-	-
methyl-a	-	-	-	l-arabitol	-	-	-
d-mannopyranoside	-	-	-	potassium gluconate	+	-	+
methyl-a	-	-	-	potassium	-	-	-
D-glucopyranoside	+	+	+	2-ketogluconate	-	-	-
n-acetylglucosamine	+	+	+	potassium	-	-	-
amygdalin	+	+	+	5-ketogluconate	-	-	-
arbutin	+	+	+				

[64] ¹ MKSR, *Leuconostoc mesenteroides* MKSR; LM, *Leuconostoc mesenteroides*; LC, *Leuconostoc citreum*

[65] ² +, positive reaction; -, negative reaction

[66] 실시예 3. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 내산성과 내담즙성 및 생존력

[67] 30°C에서 18시간 동안 배양한 균 액을 0.1% pepsin solution (pH 2.0; (Sigma-Aldrich Co.)에 접종한 후 37°C에서 3시간 동안 배양한다. 연속적 배양을 하기 위해 3시간 동안 배양한 solution을 3% bile salt (pH 6~7; Sigma-Aldrich Co.)에 접종하였다. 각 시간별로 MRS agar에 도말하고, 30°C 배양기에서 24시간 배양 후 균 수를 측정한다.

[68] 유산균이 프로바이오틱으로서 인체에서 정장작용 및 여러 생리적 기능을 발휘하기 위해서는 위산과 담즙이 존재하는 환경에서의 생존이 요구된다. 담즙산은 지질로 구성된 미생물의 세포막에 영향을 주어 미생물의 성장을 억제하는데, *Lactobacillus*를 포함한 많은 종의 유산균에서는 담즙산염 가수분해효소를 생성하여 담즙산을 가수분해하고 이 같은 억제작용을 감소시킨다(이경희 외, 2016). MKSR의 위산에 대한 내성과 내담즙성을 측정하기 위해 균주를 접종하여 시간별로 생균수를 측정하였다(표 3 참조). 하기 표 3에 *Leuconostoc mesenteroides* MKSR을 펩신 (pH 2) 및 3% bile salt 용액 조건을 통과시켰을 때 생존한 MKSR 수에 대하여 기재하였다. MKSR은 0.1% pepsin 용액에서 3시간을 통과시키고, 3% bile salt 액에서 4시간 동안 통과하였을 때 100% 생존하여 장내환경에 생존하기 적합한 균주로 프로바이오틱으로써

이용이 가능할 것으로 보인다.

[69] 하기 표 3은 펩신 (pH 2) 및 3%의 담즙산을 통과시켰을때 생존 가능한 *euconostoc mesenteroides* MKSR 세포의 수에 관한 표이다.

[70] [표 3]

[71]

MKSR (log CFU/g)	
Initial	9.21 log CFU/g
pepsin 1h	9.33 log CFU/g
pepsin 2h	9.14 log CFU/g
pepsin 3h	9.35 log CFU/g
bile salt 1h	9.25 log CFU/g
bile salt 2h	9.43 log CFU/g
bile salt 3h	8.14 log CFU/g
bile salt 4h	9.33 log CFU/g

[72] 실시예 4. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 항균활성

[73] 18시간 동안 MRS 액체배지에서 배양한 균액을 10000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 채취한다. 상등액 중의 일부는 1N NaOH로 pH를 5.5-6.5로 맞추고, 일부는 pH를 조정하지 않는다. pH를 조정한 상등액과 조정하지 않은 상등액을 0.2 μ m filter로 filtration 하였다. 18시간 동안 37°C에서 배양한 병원균을 고체 배지[BHI(Brain Heart Infusion, MB cell Co., Korea), TSA(Tryptic Soy agar, Difco Co., USA), NA(Nutrient Agar, Difco Co., USA)에 spreading 한 후 Disc를 올린 다음, 균 상등액을 20 μ l 씩 접종하여 14시간, 24시간, 48시간 때에 Disc 주변에 균이 자라지 않는 size를 mm로 측정하였다.

[74] MKSR의 항균력은 그람음성 세균인 *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*과 그람양성 세균인 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*에 각각 노출시킨 후 14, 24, 48시간 동안 배양하여 disc 주위에 형성되는 투명대의 형성유무를 통해 항균활성을 조사하였다. 그 결과 MKSR은 14시간 *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*, 24시간은 *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *Bacillus cereus*, *L. innocua* 48시간 배양했을 때는 *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *L. innocua* 균주에 대해 투명대를 형성하므로써 항균활성을 가진 것으로 관찰되었다(Table 6). 새우양식장에서 분리한 *Lactobacillus* 종의 새우 질병유발 병원균들에 대한 항균활성에 관한 연구에서 배양중 생성된 유기산에 의한 항균활성과 배양상등액을 중화시켰을 경우에 항균활성이 나타나지 않았다는 것을 보고하였고(Ma et al. 2009), Choi et al. (2014)의 연구에서도 pH를 중성으로

조절한 배양 상등액에서는 항균활성이 나타나지 않았으나, pH를 조절하지 않은 상등액에서는 항균활성이 나타났다고 하였다. MKSR은 pH를 중성으로 조절하였을 때 일부 균주에 대해서 항균활성을 보유했다(표 4 참조). 본원 *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 병원성 박테리아에 대항하는 활성 억제 구역에 대한 구체적인 기재는 하기 표 4와 같다.

[75] [표 4]

[76] (단위:mm)

[77]

	Positive control		pH 3-4		pH 5.5-6.5		
	Lysocyme	MKSR	LM	LC	MKSR	LM	LC
24 h Incubation							
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	11.67±1.15	13.00±1.00	12.33±0.58	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	11.00±0.00	10.67±0.58	11.33±0.58	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	8.00±0.00	9.67±0.58	9.67±0.58	10.67±1.15	10.00±0.00	9.67±0.58	10.67±0.58
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	12.00±0.00	11.67±0.58	11.00±0.00	12.00±0.00	12.00±0.00	11.00±1.00
<i>Listeria monocytogenes</i>	11.00±1.00	11.33±1.15	10.67±0.58	11.33±0.58	10.67±1.15	10.33±0.58	11.67±0.58
<i>Listeria innocuus</i>	10.00±0.00	10.67±1.15	10.33±0.58	10.33±0.58	11.33±0.58	10.67±0.58	11.00±1.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	11.33±1.15	9.67±0.58	10.33±0.58	10.00±0.00	10.00±0.00	10.33±0.58
24 h Incubation							
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	10.33±0.58	11.33±0.58	12.33±0.58	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	9.67±0.58	10.67±0.58	10.67±0.58	11.33±0.58	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	8.00±0.00	9.33±0.58	9.33±0.00	10.00±0.58	9.33±0.58	9.33±0.58	10.00±0.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9.67±0.58	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	10.67±1.15	11.67±0.58	11.67±0.58	11.00±1.00	11.67±0.58	10.67±1.15	10.67±0.58
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Listeria innocuus</i>	10.33±0.58	11.00±0.00	10.33±0.58	10.00±1.00	11.00±1.00	10.67±0.58	10.67±1.15
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	11.00±1.00	10.33±0.58	10.50±0.71	10.33±0.58	10.33±0.58	11.00±0.00
48 h Incubation							
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.33±1.04	10.33±0.58	12.00±1.00	10.67±0.58	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	9.67±0.58	10.33±0.58	10.33±0.58	10.67±0.58	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	8.00±0.00	9.33±0.58	10.00±0.00	10.67±1.15	10.00±0.00	9.67±0.58	10.67±0.58
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11.00±1.00	12.00±0.58	12.67±0.58	12.33±0.58	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	10.00±1.00	11.33±0.58	11.33±0.58	11.33±0.58	11.33±0.58	11.33±0.58	11.33±1.15
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Listeria innocuus</i>	10.33±0.58	10.00±0.00	10.33±0.00	10.67±1.15	11.33±0.00	11.00±0.58	11.33±0.58
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	10.67±0.58	10.33±1.73	10.50±1.53	10.67±0.00	10.33±0.71	10.33±0.71

[78] 실시예 5. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 항산화 활성

[79] DPPH 라디칼 소거 활성(radical scavenging activity)

[80] 0.2mM DPPH(1-1 diphenyl-2-picrylhydrazyl)(Sigma-Aldrich Co.) 1.2ml에 cell free supernatant 또는 intact Cell 100 μ l을 첨가하였다. 암실에서 30분간 반응 시킨 후 색의 변화를 분광광도계(Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. (zero methanol)

[81] Ferric reducing antioxidant power (FRAP) -

[82] FRAP reagent[10mM TPTZ(2,4,6-tripyridyl triazine)(Sigma-Aldrich Co.) : 20mM FeCl₃·6H₂O : 0.3M Sodium acetate buffer (1:1:10)]을 10분 동안 water bath 37°C에서 preheating 시킨 후 Cell free supernatant 또는 Intact Cell을 50 μ l 첨가한 후 30분

동안 암실에서 반응시켰다. 색 변화를 알아보기 위해 분광광도계를 사용하여 593nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시료로는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하였다.

[83] **SOD- 유사 활성(like activity)**

[84] Cell free supernatant 또는 Intact Cell 0.1ml에 Tris-HCl buffer(50mM tris [hydroxymethyl] amino-methane + 10mM EDTA)(pH8.0) 1.3ml 첨가하고 7.2mM pyrogallol(Sigma Aldrich Co.) 0.1ml를 넣고 10분 동안 실온에서 방치하였다. 1N HCl 50 μl 를 첨가해 반응을 정지하고, 분광광도계를 이용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

[85] 상기 내용에 따라 실험한 후, *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 항산화 활성에 대한 구체적인 결과는 표 5에 기재하였다.

[86] 최근 연구에 따르면 활성산소들로 인한 특정 세포의 손상으로 각종 당뇨병 합병증을 유발한다고 하여 효율적인 당뇨병 관리를 위해서는 활성산소를 제거할 수 있는 항산화 활성 물질 섭취의 중요성을 강조하고 있다(Dembinska-Kiec et al. 2008). DPPH는 free radical을 가지고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 반응하게 되면 전자를 내어주면서 radical이 소멸되고 그 특유의 보라색이 투명하고 노란빛을 띠게 되며, radical을 환원시키는 능력, 즉 radical scavenging 활성이 클수록 항산화 활성이 높다고 할 수 있다. DPPH radical 소거 효과를 측정한 결과 MKSR의 소거 효과가 높았다. Lee et al.(2016) 연구에서 대조군으로 이용한 *Lactobacillus rhamnosus* GG (7 log CFU/ml)의 DPPH radical 소거능은 약 64%로 MKSR 보다 다소 낮았다. 또한, MKSR은 Chen et al. (2014)이 연구한 12가지 균주의 radical 소거능(8~30%)보다 더 우수하였다.

[87] 환원력은 항산화 능력과 관련이 있는 중요한 인자로서, FRAP 측정법은 항산화제와 같이 환원력을 가진 물질은 Fe^{3+} -ferricyanide 복합체를 Fe^{2+} 형태로 환원시켜 청색을 띠게 하여 환원하는 능력을 측정하는 방법이다(Jeon et al. 2013). MKSR의 환원력은 3.36-3.44 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ eq mM이었으며, 이때 대조군으로 사용한 1 mg/ml ascorbic acid의 환원력은 4.06 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ eq mM이었다.

[88] SOD는 체내에 존재하는 활성산소를 과산화수소로 전환시켜 자유 라디칼을 근본적으로 제거할 뿐만 아니라 SOD에 의해 생성된 SOD에 의해 생성된 H_2O_2 는 peroxidase나 catalase에 의해 물분자와 산소분자로 전환되는 효소로 생체를 보호하는 중요한 역할을 한다, MKSR의 유사활성은 cell free supernatant에서만 관찰되었다 (표 5 참조). 하기 표 5는 *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 항산화 활성과 관련된 표이다.

[89] [표 5]

[90]

	라티컬 소거비율 (Scavenging rate of DPPH) (%)		FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (FeSO ₄ 7H ₂ Oeq ml)		SOD-유사활성 (SOD - like activity) (%)	
	Intact cell	Cell - free supernatant	Intact cell	Cell - free supernatant	Intact cell	Cell - free supernatant
MKSR	70.21±10.24	82.95±2.56	3.4471±0.14	3.3650±0.21	-32.07±11.21	29.78±3.36
Ascorbic acid	96.03±0.01		4.0626±0.29		102.87±1.29	

[91] 실시예 6. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 탄수화물 소화효소 저해활성

[92] α-glucosidase inhibition -

[93] 0.02M sodium phosphate buffer(pH6.8) 50 μ l에 MRS 배지에 배양한 MKSR 균주의 Cell free supernatant 또는 Intact Cell 또는 MRS배지[Dextrose 2%(w/v), Peptone 1%(w/v), Beef extract 1%(w/v), Yeast 0.5%(w/v), Polysorbate 80 0.1%(w/v), Ammonium citrate 0.2%(w/v), Sodium acetate 0.5%(w/v), Magnesium sulfate 0.01%(w/v), Manganese phosphate 0.005%(w/v), Dipotassium phosphate 0.2%(w/v)] 조성을 각각 다르게 제조한 배지에서 배양한 Intact Cell을 50 μ l 첨가한다. 2mM pNPG(Sigma-Aldrich Co.) 200 μ l를 첨가한 후, α-glucosidase(Sigma-Aldrich Co.) 50 μ l를 넣고 37°C water bath에서 40분간 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위해 0.1M Na₂CO₃ 1.5ml를 넣은 후 반응하여 나타내는 색의 변화를 분광광도계를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시료로는 0.5mM pNP를 사용하였다.

[94] α-amylase inhibition -

[95] 0.02M sodium phosphate buffer (pH6.8) 50 μ l에 Cell free supernatant 또는 Intact Cell 50 μ l를 첨가한다. 1% starch를 첨가한 후, α-amylase(Sigma-Aldrich Co.) 50 μ l를 넣고 37°C water bath에서 20분간 반응시킨다. DNS(Dinitrosalicylic acid) 250 μ l를 첨가 후 95°C에서 5min 간 반응시키고 증류수 2ml를 넣은 후 색 변화를 분광광도계를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 시료로 10 mg/ml maltose를 사용하였다.

[96] 표 6은 MKSR의 효소 활성을 나타낸다. MKSR은 acid phosphatase, Naphtaol-AS-BI-phosphohydrolase, α-galactosidase, β-galactosidase, α-glucosidase, β-glucosidase 활성을 나타내었다. 특히 α-galactosidase는 대두와 같은 곡류에 많이 존재하여 대장내 가스 발생을 유발하는 raffinose나 stachyose와 같은 당류를 분해시키는 효소이므로, 사람이나 동물에 있어서 정장효과를 기대할 수 있다.

[97] [표 6]

Enzyme	MKSR	Enzyme	MKSR
control	-	Acid phosphatase	+
Alkaline phosphatase	-	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+
Esterase	-	α -galactosidase	+
Esterase Lipase	-	β -galactosidase	+
Lipase	-	β -glucuronidase	-
Leucine arylamidase	-	α -glucosidase	+
Valine arylamidase	-	β -glucosidase	+
Cystine arylamidase	-	N-acetyl-b-glucosaminidase	-
Trypsin	-	α -mannosidase	-
α -chymotrypsin	-	α -fucosidase	-

[99] 상기 표 6은 펙신 (pH 2) 및 3% 담즙산 용액을 통과시켰을 때 생존가능한 MKSR 세포의 수에 관한 것이다. 2형 당뇨병의 치료방법인 경구 혈당 강하제는 당 분해에 관여하는 효소들을 저해하는 물질을 이용한 것으로, 당의 분해에 관여하는 효소 중에서 α -glucosidase와 α -amylase가 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있고, 전자는 이당류를 단당류로, 후자는 다당류를 소당류로 분해한다. 이러한 당 효소의 저해제는 당의 분해를 억제하여 결국엔 복합 탄수화물의 흡수를 억제하므로 소장 전체에 포도당이 흡수되도록 하여 식후 혈당 상승이 완만해지는 장점이 있다. 현재 당 효소의 저해제로 acarbose가 사용되고 있지만, α -glucosidase와 α -amylase 모두의 저해활성이 높은 acarbose는 부작용으로 복부팽만, 설사 등 위장 관련 증상이 나타나도 있다.

[100] MKSR의 α -glucosidase inhibition은 높았으나, α -amylase 저해활성은 없었다(표 7). 같은 실험 조건에서 acarbose의 α -glucosidase inhibition은 약 111%로 매우 높은 저해활성도를 보였고, α -amylase 저해활성은 없었다. Chen et al.(2014)의 연구에서는 probiotic중 하나인 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)의 intact cell과 cell-free supernatant의 α -glucosidase inhibition 활성이 각각 11.4%와 29.57%이었다고 보고하였다. LGG의 α -glucosidase inhibition은 MKSR보다 낮았음에도 불구하고, α -amylase의 inhibition도 함께 관찰되었다. 위의 결과로 보아 MKSR은 acarbose의 부작용을 해결할 수 있는 좋은 대안이라고 할 수 있을 것이다.

[101] [표 7]

Strain	α -glucosidase inhibition		α -amylase inhibition	
	Intact cell	Cell - free supernatant	Intact cell	Cell - free supernatant
MKSR	87.62 $\pm$ 1.43	62.58 $\pm$ 1.67	0	0
acarbose	111.11 $\pm$ 0.56		68.19 $\pm$ 0.60	

[103] 표 7은 *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 α -Glucosidase 및 α -amylase 억제 활성에 대한 표 이다(단위:%)

[104] 하기 표 8은 α -Glucosidase 에 대한 억제제 생산을 위한 MKSR의 배지 조성물에 관한 것이다.

[105] [표 8]

[106] (단위: g/L)

[107]

Media number	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dextrose	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Peptone	0	10	10	10	10	10	10	10	10
Beef extract	10	0	10	10	10	10	10	10	10
Yeast	5	5	0	5	5	5	5	5	5
Polysorbate 80	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Ammonium citrate	2	2	2	2	0	2	2	2	2
Sodium acetate	5	5	5	5	5	0	5	5	5
Magnesium sulfate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0.1
Manganese phosphate	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0	0.05
Dipotassium phosphate	2	2	2	2	2	2	2	2	0

[108] α -Glucosidase 저해활성은 #1, #2, #5, #7, #9, #4 배지에서 배양하였을 때 높았다(도 6참조). Brenda (BRaunschweig Enzyme Database)에 따르면, α -glucosidase의 inhibitor에는 Mg^{2+} , Mn^{2+} 등이 있다고 한다. 하지만, 도 6에서 Mg^{2+} , Mn^{2+} 를 첨가하지 않은 #7, #8을 보면 Mg^{2+} , Mn^{2+} 첨가하지 않은 배지 조성에서도 α -glucosidase 저해활성이 있는 것으로 보아, MKSR 균 자체가 α -glucosidase 저해작용이 있는 것으로 확인된다.

[109] 실시예 7. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 콜레스테롤 저감 효과

[110] BSH(bile salt hydrolase) 활성 측정

[111] 분리된 *Leuconostoc* 균주를 0.5%(w/v) 소듐 타우로데옥시콜산(TDCA; Sigma Aldrich Co. LLC., St. Louis) 및 $0.37g \cdot L^{-1}$ $CaCl_2$ 를 보충한 MRS 한천 플레이트에 10 μ l의 세포를 첨가하여 담즙염 가수분해효소(Bile salt hydrolase; BSH) 활성 측정을 위해 스크리닝하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 혐기성 용기에서 배양하였다. 이때, 콜로니 주위 침전된 담즙산의 존재 또는 은빛 불투명한 과립모양의 흰색 콜로니의 형성은 양성 반응으로 간주된다.

[112] 콜레스테롤 동화능(Cholesterol assimilation) 측정

[113] 콜레스테롤 동화능(Cholesterol assimilation)을 측정하기 위해, 37°C에서 Sodium thioglycolate(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 0.2%(w/v), 필터로 멸균된

콜레스테롤(Sigma Aldrich Co., 222 LLC., 미국 세인트 루이스 소재) $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (최종농도) 및 0.3%(w/v) 담즙산염을 보충한 MRS 배지에서 세포를 증식시켰다. 배양 후, 세포를 원심분리(10,000rpm, 4°C, 10분)하여 수집하고, 상등액과 un-inoculated MRS broth(대조군)의 콜레스테롤 함량을 분석하였다(Rudel and Morris(1973), Gilliland et al.(1985)). 이때, 프로바이오틱 박테리아로 널리 사용되는 *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주를 대조군으로 사용하였다.

- [114] 표 9는 MKSR 균주와 *Rambnosus* GG 균주의 BSH 활성 및 콜레스테롤 동화능의 측정 결과이다. 여기서, BSH(Bile salt hydrolase)는 결합된 담즙산(conjugated bile acid)을 탈결합된 담즙산(deconjugated bile acid)으로 전환시켜, 담즙염(bile salt)의 흡수를 감소시키고 이의 배설을 증가시킨다(Choi et al., 2014). 여기서 담즙염의 감소는 간에서 콜레스테롤의 담즙산 전환을 증가시켜 체내의 항상성을 유지시키고, 궁극적으로 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추게 한다(Choi et al., 2014).

[115] [표 9]

Strain	BSH activity	Cholesterol assimilation
MKSR	+ ¹⁾	59.76±7.48 ²⁾
<i>L. rhamnosus</i> GG	N.D. ³⁾	44.26±2.88

[117] ¹⁾ +, positive reaction; -, negative reaction

[118] ²⁾ Values are mean±SD(n=3)

[119] ³⁾ N.D: not determined

- [120] 표 9를 살펴보면, BSH 활성 측정을 통해 본 발명에 따른 MKSR 균주가 배양 시 담즙산을 탈결합시키는 것을 확인할 수 있으며, 콜레스테롤을 59.76% 까지 흡수하여 콜레스테롤을 저감시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 대조군으로서 *Rambnosus* GG 균주는 배지에서 44.26% 콜레스테롤을 흡수시켰는데, 본 발명에 따른 MKSR 균주와 대비하여 약 15% 이상 낮은 수치이다. 또한, Lee et al.(2011)의 연구에서 *plantarum* NR74 균주 및 *Lact. rhamnosus* GG 균주가 배지에서 약 48% 콜레스테롤을 저감시키는 것으로 나타났는데, 본 발명에 따른 MKSR 균주와 대비하여 약 10% 이상 낮은 수치이다.

[121] 따라서, 상기 결과를 통해 본원발명에 따른 MKSR 균주는 다른 균주와 대비하여 BSH 활성 효과 및 우수한 콜레스테롤 동화능을 갖는 바, 혈중 내 콜레스테롤을 유의적으로 감소시킬 수 있어 고지혈증 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있다.

[122] 실시예 8. *Leuconostoc mesenteroides* MKSR의 용혈성 검사

[123] 18시간 동안 30°C에서 배양한 균을 Tryptic soy + 5% Sheep blood(Kisan Bio Co., Korea) 고체 배지에 백금이를 이용하여 4회 streaking 한 후, 37°C 배양기에서 배양하였다. Positive control로 *Staphylococcus aureus*를 이용하였다.

[124] 용혈은 적혈구가 파괴되는 정상적인 작용과 적혈구의 유전적인 결함이나 화학물질, 뱀 등의 독액, 미생물이 생성하는 독성물질에 의해서 형성되는

비정상적인 작용이다. 세포내에서 용혈 현상이 일어나면 적혈구의 산소 운반 기능이 없어져 생체 내에 치명적인 결과를 가져온다(윤혜주 외, 2013). 선발된 유산균의 안전성을 증명하기 위해 용혈성 유무를 평가하여 도 7과 같은 결과를 얻었다. 대조균인 *S. aureus*의 균체 주위에 적혈구가 파괴되어 투명환이 생긴 것을 볼 수 있으며, 본 연구에 사용한 3종류의 유산균 모두 용혈성 검사에서 균체 주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 투명환이 나타나지 않아 안전성이 확인되었다(도 7 참조).

[125]

(빈 역 문)

원기탁에 의한 수탁증

수탁자: 김 미 숙

대한민국 충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MKSR	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 13842BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학적 위치	
상기 I에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. ☐ 과학적 성질 ☐ 분류학적 위치 (해당 부분에 표시하시기 바랍니다)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I.에 표시된 미생물을 2019년 4월 25일에 수탁받았다.	
IV. 변경요청 수령	
본 국제기탁기관은 상기 I.에 표시된 미생물을 에 수령하였고, 원기탁의 부나페스트 조약에 의거한 기탁으로 변경요청을 에 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
영1장 : 생물자원센터 주 소 : 전라북도 정읍시 임선길 181 56212 한국생명공학연구원	대표자 서명 : 대표: 김 성 건 2019년 4 월 25 일

위 번역본 원본과 상위없음

[126]

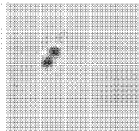
청구범위

- [청구항 1] 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 균주는 알파글루코시다제 억제 활성을 갖는 프로바이오틱 균주인 것인, 균주.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 균주는 알파아밀라아제의 저해 작용이 없는 프로바이오틱 균주인 것인, 균주.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 균주는 당뇨 예방 또는 개선용 프로바이오틱 균주인 것인, 균주.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 균주는 콜레스테롤 개선용 프로바이오틱 균주인 것인, 균주.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 균주는 항산화 활성을 갖는 프로바이오틱 균주인 것인, 균주.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 균주는 BSH(Bile salt hydrolase) 활성 효과 및 콜레스테롤 동화능을 갖는 프로바이오틱 균주인 것인, 균주.
- [청구항 8] 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 당뇨 예방 또는 개선용 건강 기능 식품.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 균주는 알파글루코시다제 억제 활성을 갖는 프로바이오틱 균주인 것인, 당뇨 예방 또는 개선용 건강 기능 식품.
- [청구항 10] 청구항 8에 있어서, 상기 균주는 알파아밀라아제의 저해 작용이 없는 프로바이오틱 균주인 것인, 당뇨 예방 또는 개선용 건강 기능 식품.
- [청구항 11] 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 콜레스테롤 개선용 건강 기능 식품.
- [청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 균주는 BSH(Bile salt hydrolase) 활성 효과 및 콜레스테롤 동화능을 갖는 프로바이오틱 균주인 것인, 콜레스테롤 개선용 건강 기능 식품.
- [청구항 13] 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 14] 청구항 13에 있어서, 상기 균주는 알파글루코시다제 억제 활성을 갖는 프로바이오틱 균주인 것인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 15] 청구항 13에 있어서, 상기 균주는 알파아밀라아제의 저해 작용이 없는 프로바이오틱 균주인 것인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 16] 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의

혼합물을 유효성분으로 함유하는, 고지혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

- [청구항 17] 청구항 16에 있어서, 상기 균주는 BSH(Bile salt hydrolase) 활성 효과 및 콜레스테롤 동화능을 갖는 프로바이오틱 균주인 것인, 고지혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 18] 기탁번호 KCTC13842BP로 기탁된 류코노스톡 메젠테로이드 MKSR(*Leuconostoc mesenteroides* MKSR) 균주, 이의 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 식품 첨가제.
- [청구항 19] 청구항 18에 있어서, 상기 균주는 만니톨, 과당, 올리고사카라이드 및 덱스트란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 생산하는 것인, 식품 첨가제.

[도1]

MKSR	
Shape (Microscopy 1000X)	
Gram stain	+
Endospore formation	-
Catalase activity	-

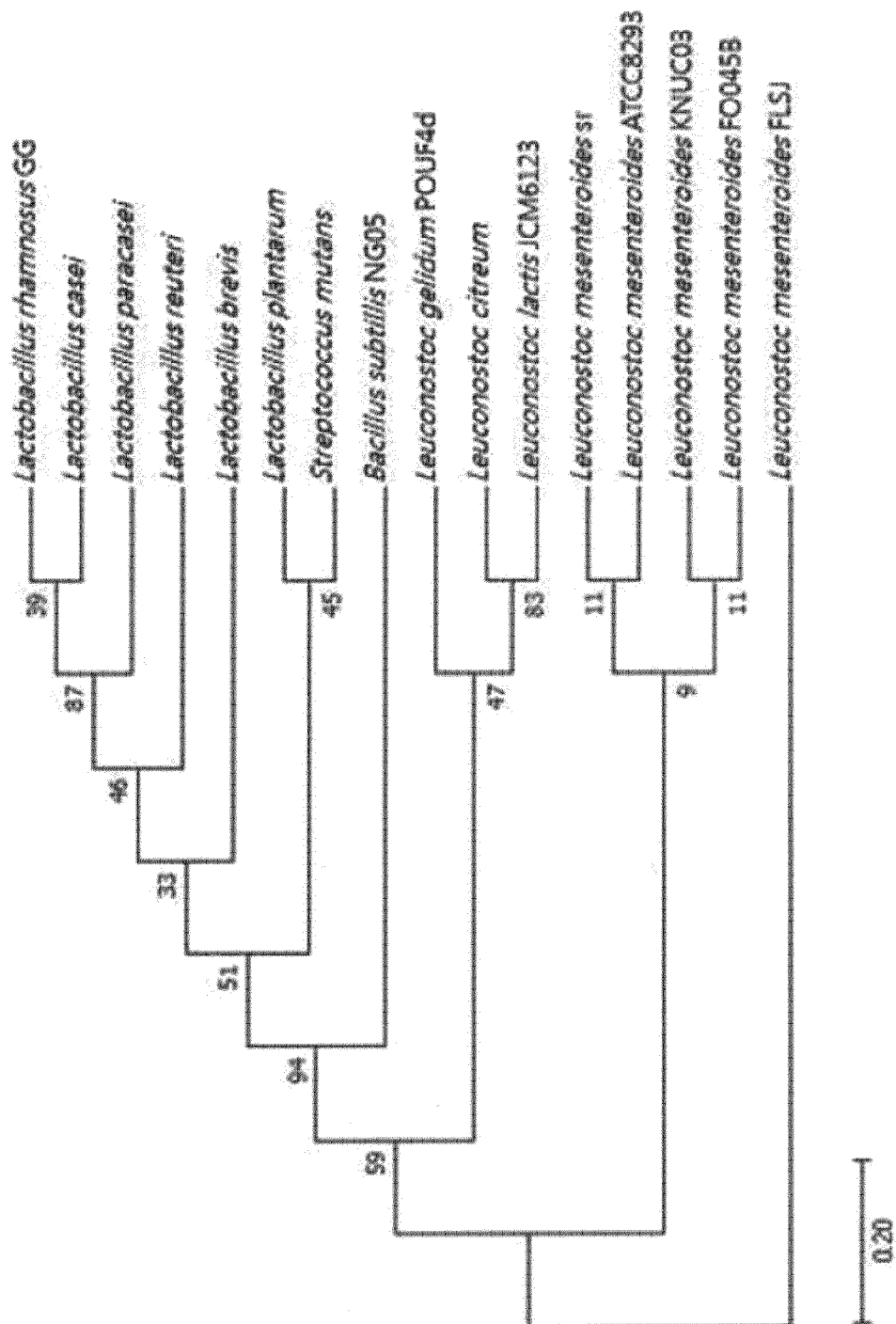
[도2]

```

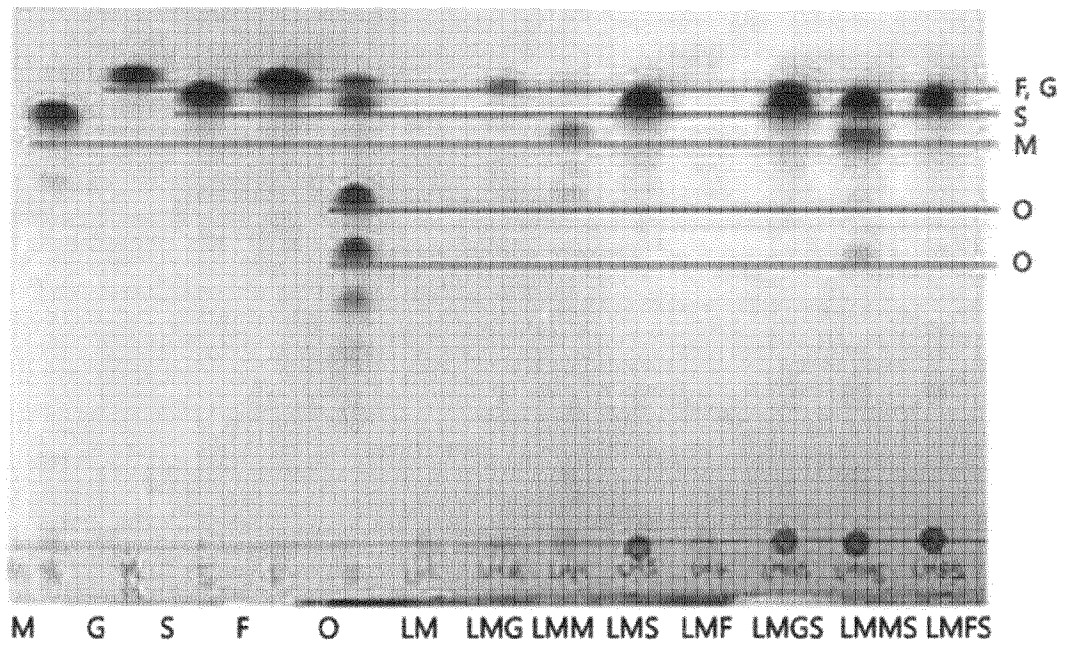
1  TGC-AGTGGAACGACAGGSAAGGTGCTTGACCTTCAAGTGAGTGGGSAAGGGTGA 59
60  GTAACAGGTGGCAACCTGCTCAAGGCTGGGATAACATTTGAAAGAGATGCTAATAC 119
120  CGAATAAACTTAGTGTGCAATGACAAAAGTTAAAGGCTTCCGGGTCACTAGAGA 179
180  TGGATCGGCGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGCTAAAGGCTACCAAGACAATGATGATA 239
240  GCGGAGTTGAGAGACTGATCGGCACTTGGCACTGAGACAGGCGCAACTCTTAAGGG 299
300  AGGCTGCAGTAGGAATCTTCCACATGGGCGAAGGCTGATGGAGCAAGCGGCGGTGTG 359
360  TGATGAAGGCTTTCGGTGGTAAAGCACTGTGTATGGGAAGAACAGCTAGAAATGSA 419
420  TGATTTTAGTTTGAAGGTACCATACAGAAAGGAGGGCTAAATAGGTGCCAGCAGGCG 479
480  GGTAAAGGTATGTCCGAGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGGCGAGCG 539
540  TTTATTAGTCTGATGTGAAGCGGAGGCTCAACTCGGAATGGCAATGGAACTGGTT 599
600  AACTTGAGTGCAGTAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGSAATGGTAGATATA 659
660  TGGAGAACAACAGTGGGAAAGGCGCTTACTGGACTGCAACTGAGCTTGAAGCTGAAA 719
720  GTGTGGTAGCAAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACAGGCTAAAGCATGAACATA 779
780  GGTGTTAGGAGGTTTCCGCTCTTAGTGGGAAAGCTAACGCATTAAAGTGTCCGCTGG 839
840  GAGTACGACCGCAAGGTTGAAGCTCAAGGAATTGAAGGAGACCGGCAAGCGGTGGAG 899
900  CATGTGGTTTAAATTCGAAGCAAGGSAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCTTGAAGC 959
960  TTTAGAGATAGAGTGTCTCTTGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGCTCCTCCTC 1019
1020  AGCTGCTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAGCCTTATTGTTAGTT 1079
1080  GCGAGCATTGAGTGGCACTCTAGCGAGACTGCGGTTGACAAACGGAGGAGGCGGG 1139
1140  AGCAGGTGAGTATCATGCGCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGGATAT 1199
1200  ACAAGAGTTTGGCAACCGCGAGGGTGAAGTAATCTCTTAAAGTADGTGTGAGTTGAGT 1259
1260  TGTAGTCTGCACTGACTACATGAGTCSGAATGCTAGTAATCGCGGATGAGCAAGCC 1319
1320  GCGGTGAATAGTTTCCGGTCTTGTACACAGCGCGCTCACACCATGGGAGTTTGTAAAT 1379
1380  GCGCAAGCGGTTGGCTAAAGCTTT 1404

```

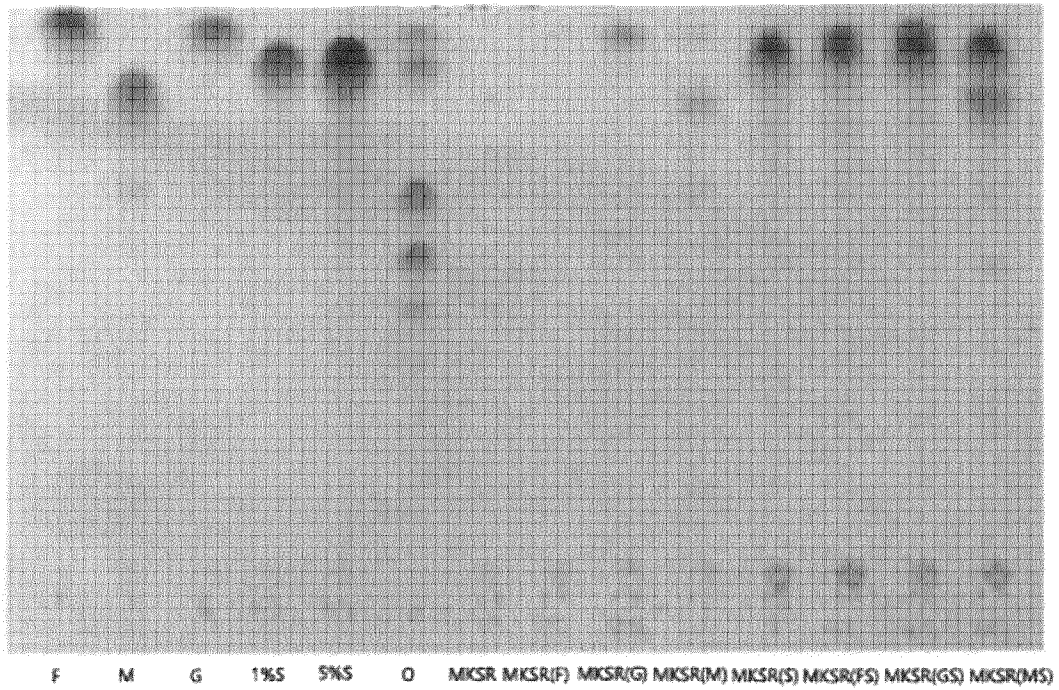
[도 3]



[도 4]

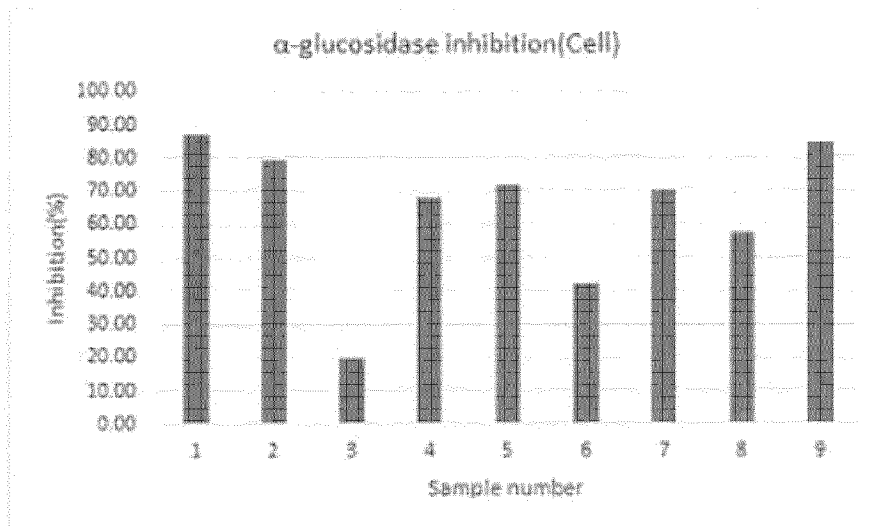


[도 5]

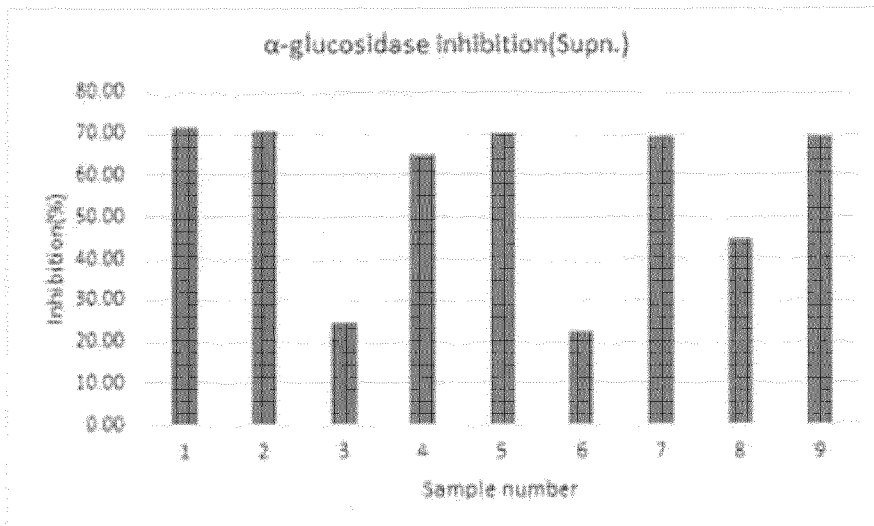


[도 6]

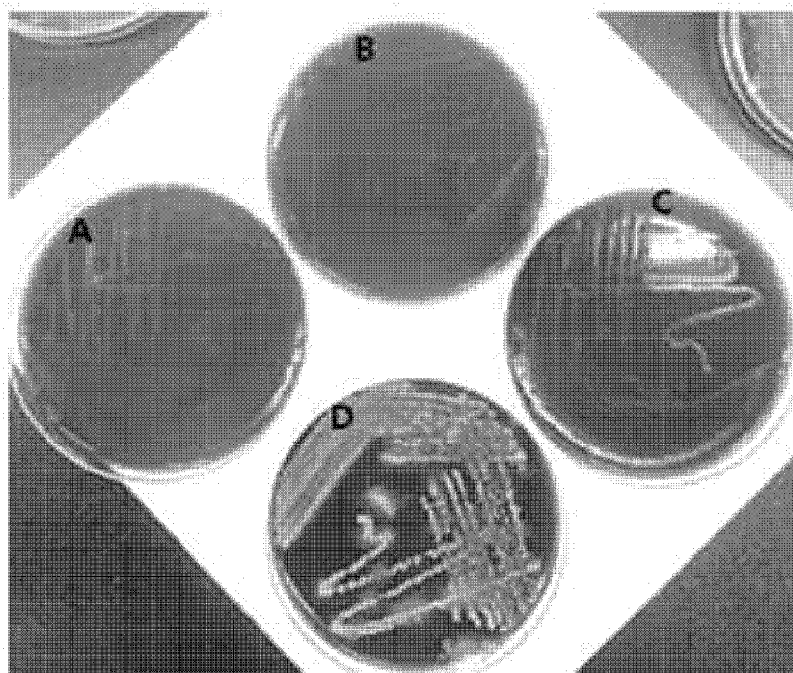
(a)



(b)



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/005145

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, C12R 1/01(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; A23L 33/135; A61K 31/715; A61K 35/744; A61K 35/747; A61P 1/16; A61P 43/00; C12N 1/00; C12R 1/01

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: Leuconostoc mesenteroides MKSR, alpha-glucosidase, inhibition, diabetes, cholesterol, antioxidant

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0064657 A1 (DAY, D. F. et al.) 13 March 2008 See paragraph [0020].	1-19
A	KR 10-1790548 B1 (COENBIO CO., LTD.) 27 October 2017 See the entire document.	1-19
A	KR 10-2015-0118084 A (PROTHERA INC.) 21 October 2015 See the entire document.	1-19
A	WO 2017-146213 A1 (NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) 31 August 2017 See the entire document.	1-19
A	KR 10-2008-0077390 A (DAESANG FNF CORPORATION) 22 August 2008 See the entire document.	1-19
PX	LEE, Saerom. Probiotic Leuconostoc mesenteroides MKSR isolated from Kimchi possessing alpha-glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity, and cholesterol lowering effect. Thesis, Graduate School of Dankook University. February 2019. Retrieved from [URL: http://lib.dankook.ac.kr/search/detail/CAT000001368059]. See References.	1,2,5,6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 19 AUGUST 2019 (19.08.2019)	Date of mailing of the international search report 19 AUGUST 2019 (19.08.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/005145

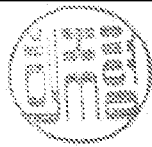
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	LEE, Sacrom et al. Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity and L-Asparaginase Activity of Probiotic <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MKSR. Proceedings of KFN International Symposium and Annual Meeting. October 2018, Poster No. P05-18, page 364 See page 364, P05-18.	1-4,6,8-10,13-15 ,18,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/005145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2008-0064657 A1	13/03/2008	CA 2467695 A1	20/11/2004
		CA 2467695 C	16/03/2010
		US 2004-0235789 A1	25/11/2004
		US 2008-0063692 A1	13/03/2008
		US 2008-0064658 A1	13/03/2008
		US 7291607 B2	06/11/2007
		US 7772212 B2	10/08/2010
KR 10-1790548 B1	27/10/2017	EP 3508208 A1	10/07/2019
		EP 3508568 A1	10/07/2019
		JP 2018-035136 A	08/03/2018
		KR 10-1734960 B1	12/05/2017
		KR 10-1882303 B1	27/07/2018
		KR 10-2018-0085667 A	27/07/2018
		US 2019-0183943 A1	20/06/2019
		WO 2018-043864 A1	08/03/2018
		WO 2018-043874 A1	08/03/2018
KR 10-2015-0118084 A	21/10/2015	AU 2013-318513 A1	09/04/2015
		CA 2885537 A1	27/03/2014
		CN 104968780 A	07/10/2015
		EP 2898061 A1	29/07/2015
		JP 2015-530406 A	15/10/2015
		JP 6286434 B2	28/02/2018
		US 2014-0079676 A1	20/03/2014
		US 2019-0083551 A1	21/03/2019
		WO 2014-046804 A1	27/03/2014
WO 2017-146213 A1	31/08/2017	CN 108778292 A	09/11/2018
		EP 3421041 A1	02/01/2019
		JP WO2017-146213 A1	27/12/2018
		US 2019-0099438 A1	04/04/2019
KR 10-2008-0077390 A	22/08/2008	JP 2009-518031 A	07/05/2009
		JP 4672776 B2	20/04/2011
		US 2009-0022850 A1	22/01/2009
		WO 2007-074951 A1	05/07/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, C12R 1/01(2006.01)n																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20; A23L 33/135; A61K 31/715; A61K 35/744; A61K 35/747; A61P 1/16; A61P 43/00; C12N 1/00; C12R 1/01 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: 류코노스톡 메센테로이드 MKSR(<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MKSR), 알파글루코시다제(alpha-glucosidase), 억제(inhibition), 당뇨(diabetes), 콜레스테롤(cholesterol), 항산화(antioxidant)																							
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>US 2008-0064657 A1 (DAY, D. F. 등) 2008.03.13 단락 [0020] 참조.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-1790548 B1 ((주)코엔바이오) 2017.10.27 전체 문헌 참조.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2015-0118084 A (프로테라 인코포레이티드) 2015.10.21 전체 문헌 참조.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017-146213 A1 (NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) 2017.08.31 전체 문헌 참조.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2008-0077390 A (대상에프엔에프 주식회사) 2008.08.22 전체 문헌 참조.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>이재롬, 'Probiotic <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MKSR isolated from Kimchi possessing alpha-glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity, and cholesterol lowering effect', 학위논문, 단국대학교 대학원, 2019.02. [URL: http://lib.dankook.ac.kr/search/detail/CAT000001368059] 서명 참조.</td> <td>1,2,5,6</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	US 2008-0064657 A1 (DAY, D. F. 등) 2008.03.13 단락 [0020] 참조.	1-19	A	KR 10-1790548 B1 ((주)코엔바이오) 2017.10.27 전체 문헌 참조.	1-19	A	KR 10-2015-0118084 A (프로테라 인코포레이티드) 2015.10.21 전체 문헌 참조.	1-19	A	WO 2017-146213 A1 (NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) 2017.08.31 전체 문헌 참조.	1-19	A	KR 10-2008-0077390 A (대상에프엔에프 주식회사) 2008.08.22 전체 문헌 참조.	1-19	PX	이재롬, 'Probiotic <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MKSR isolated from Kimchi possessing alpha-glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity, and cholesterol lowering effect', 학위논문, 단국대학교 대학원, 2019.02. [URL: http://lib.dankook.ac.kr/search/detail/CAT000001368059] 서명 참조.	1,2,5,6
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
A	US 2008-0064657 A1 (DAY, D. F. 등) 2008.03.13 단락 [0020] 참조.	1-19																					
A	KR 10-1790548 B1 ((주)코엔바이오) 2017.10.27 전체 문헌 참조.	1-19																					
A	KR 10-2015-0118084 A (프로테라 인코포레이티드) 2015.10.21 전체 문헌 참조.	1-19																					
A	WO 2017-146213 A1 (NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) 2017.08.31 전체 문헌 참조.	1-19																					
A	KR 10-2008-0077390 A (대상에프엔에프 주식회사) 2008.08.22 전체 문헌 참조.	1-19																					
PX	이재롬, 'Probiotic <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MKSR isolated from Kimchi possessing alpha-glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity, and cholesterol lowering effect', 학위논문, 단국대학교 대학원, 2019.02. [URL: http://lib.dankook.ac.kr/search/detail/CAT000001368059] 서명 참조.	1,2,5,6																					
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 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 2019년 08월 19일 (19.08.2019)		국제조사보고서 발송일 2019년 08월 19일 (19.08.2019)																					
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
PX	LEE, SAEROM 등 "Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity and L-Asparaginase Activity of Probiotic <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MKSR", 한국식품영양과학회 학술대회발표집, 2018.10., Poster No., P05-18, 페이지 364 페이지 364, P05-18 참조.	1-4, 6, 8-10, 13-15, 18, 19

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2008-0064657 A1	2008/03/13	CA 2467695 A1 CA 2467695 C US 2004-0235789 A1 US 2008-0063692 A1 US 2008-0064658 A1 US 7291607 B2 US 7772212 B2	2004/11/20 2010/03/16 2004/11/25 2008/03/13 2008/03/13 2007/11/06 2010/08/10
KR 10-1790548 B1	2017/10/27	EP 3508208 A1 EP 3508568 A1 JP 2018-035136 A KR 10-1734960 B1 KR 10-1882303 B1 KR 10-2018-0085667 A US 2019-0183943 A1 WO 2018-043864 A1 WO 2018-043874 A1	2019/07/10 2019/07/10 2018/03/08 2017/05/12 2018/07/27 2018/07/27 2019/06/20 2018/03/08 2018/03/08
KR 10-2015-0118084 A	2015/10/21	AU 2013-318513 A1 CA 2885537 A1 CN 104968780 A EP 2898061 A1 JP 2015-530406 A JP 6286434 B2 US 2014-0079676 A1 US 2019-0083551 A1 WO 2014-046804 A1	2015/04/09 2014/03/27 2015/10/07 2015/07/29 2015/10/15 2018/02/28 2014/03/20 2019/03/21 2014/03/27
WO 2017-146213 A1	2017/08/31	CN 108778292 A EP 3421041 A1 JP WO2017-146213 A1 US 2019-0099438 A1	2018/11/09 2019/01/02 2018/12/27 2019/04/04
KR 10-2008-0077390 A	2008/08/22	JP 2009-518031 A JP 4672776 B2 US 2009-0022850 A1 WO 2007-074951 A1	2009/05/07 2011/04/20 2009/01/22 2007/07/05