



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2020-0128887  
(43) 공개일자 2020년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/747 (2014.01) A23L 33/135 (2016.01)  
A61K 35/00 (2015.01) A61P 1/04 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 35/747 (2013.01)  
A23L 33/135 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2019-0052968  
(22) 출원일자 2019년05월07일  
심사청구일자 2019년05월07일

(71) 출원인  
바이오제닉스코리아 주식회사  
서울특별시 서초구 강남대로 315, 10층(서초동, 클리포드빌딩)  
(72) 발명자  
조문연  
서울특별시 송파구 풍성로 14, 1동 805호(풍납동, 미성아파트)  
강인영  
서울특별시 관악구 쑥고개로28길 14(봉천동)  
(뒀면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인(유한) 다래

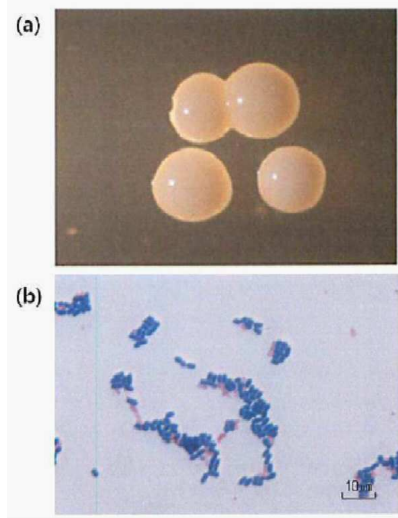
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방용 김치 유산균 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462) 또는 이의 배양액을 포함함으로써 우수한 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방효과를 갖는 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

*A61P 1/04* (2018.01)  
*A23V 2002/00* (2013.01)  
*A23V 2200/3204* (2013.01)  
*A61K 2035/115* (2013.01)

(72) 발명자

**채한정**

전라북도 전주시 완산구 새터로 63, 203동 304호(서신동, 동아2차아파트)

**박선아**

전라북도 전주시 덕진구 거북바우3길 15, 107동 202호(금암동, 중앙하이츠아파트)

**이금화**

전라북도 전주시 덕진구 세병로 131, 201동 801호(송천동2가, 에코시티자이2차)

**이화영**

전라북도 전주시 덕진구 거북바우3길 15, 106동 901호(금암동, 중앙하이츠아파트)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462) 또는 이의 배양액을 포함하는 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방용 김치 유산균 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 위장관 운동 장애 질환은 염증성 위장관 장애, 당뇨병성 위장운동장애, 화학요법으로 인한 위장운동장애, 수술 후 위장관 기능 장애 및 변비로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방용 김치 유산균 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462)는 배변량 또는 변의 수분 함량 향상 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방용 김치 유산균 조성물.

#### 청구항 4

김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462) 또는 이의 배양액을 포함하는 위장관 운동 장애 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 위장관 운동장애 질환은 염증성 위장관 장애, 당뇨병성 위장운동장애, 화학요법으로 인한 위장운동장애, 수술 후 위장관 기능 장애 및 변비로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 위장관 운동 장애 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

#### 청구항 6

제4항에 있어서,

상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462)는 배변량 또는 변의 수분 함량 향상 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 위장관 운동 장애 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

#### 청구항 7

김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462) 또는 이의 배양액을 포함하는 위장관 운동 장애 질환 개선 또는 예방용 건강기능식품.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 위장관 운동장애 질환은 염증성 위장관 장애, 당뇨병성 위장운동장애, 화학요법으로 인한 위장운동장애, 수술 후 위장관 기능 장애 및 변비로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 위장관 운동 장애 질환 개선

또는 예방용 건강기능식품.

**청구항 9**

제7항에 있어서,

상기 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462)는 배변량 또는 변의 수분 함량 향상 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 위장관 운동 장애 질환 개선 또는 예방용 건강기능식품.

**청구항 10**

김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462) 또는 이의 배양액을 포함하는 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

상기 위장관 운동장애 질환은 염증성 위장관 장애, 당뇨병성 위장운동장애, 화학요법으로 인한 위장운동장애, 수술 후 위장관 기능 장애 및 변비로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 12**

제10항에 있어서,

상기 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462)는 배변량 또는 변의 수분 함량 향상 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방 효과가 우수한 김치로부터 분리된 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) 유산균 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 위장관 운동 장애 질환은 위식도 역류성 질환, 기능성 소화불량, 대장염과 같은 염증성 질환, 위장관 마비, 구토, 당뇨병성 위장운동장애, 화학요법으로 인한 위장운동장애, 소화관 운동장애로 인한 장폐색, 수술 후 장폐색을 포함하는 수술후 위장관 기능 장애, 근긴장성 이영양증으로 인한 위장관 운동 장애 질환 및 변비 등과 같이 정상적인 위장관 운동이 장애, 저해, 손상되어 있는 상태를 의미한다.

[0003] 이러한 위장관 운동 장애 질환은 그 정확한 발병기전을 알기 어려운 경우도 많고, 세계적으로 상당히 높은 유병율을 보인다.

[0004] 그 중에서도 특히, 변비는 원활한 배변 활동을 하지 못하는 질환으로 일반적으로 1주일에 2회 이상 배출하지 못하면서 배변 시 굳은 변을 동반해 하부의 불편감, 팽만감, 구역질, 구토, 복통 등이 수반된다. 현대인의 식습관 변화(육류형 식습관 증가, 야채류 및 섬유질의 섭취 감소 등)에 따라 최근 유병률이 증가하고 있으며, 전체 인구의 20%에 달하는 인구가 변비 질환으로 고통받고 있다. 이러한 변비 치료를 위해서는 식생활 개선, 수분섭취 증대 등 일반적인 생활습관의 변화와 함께 심한 경우 다양한 변비치료제를 사용하게 되는데, 대표적으로는 자극성 하제 및 대변 연화제 등이 널리 사용되고 있다. 자극성 하제는 대장 내 수분 흡수를 막고 대장 운동을 자극하는 것으로, 센나(senna) 및 비사코딜(bisacodyl) 등이 널리 사용되고, 대변 연화제는 대변의 표면 장력을 낮추어 대변의 수분 흡수를 증가시키는 것으로, 대표적으로 듀코케이트 등이 있다.

[0005] 그러나, 이들 자극성 하제 및 대변 연화제는 효능이 일시적이고, 2차성 알도스테론증, 단백소실 위장염 등의 부작용을 나타내며, 내성이 발현될 수 있는 단점이 있어 장기간 사용이 불가하다. 따라서, 이러한 부작용이 없고 장기간 섭취가 가능하며 배변에 도움을 주는 물질에 대한 관심이 꾸준히 증가하고 있으며, 그 중에서도 유산균

(Lactic acid bacteria, Lactobacillus)에 대한 관심이 증가하고 있다.

- [0006] 유산균은 인체의 소화계에 공생하면서 섬유질 및 복합 단백질을 분해하여 중요한 영양 성분으로 만드는 역할을 담당한다. 또한, 유산균은 탄수화물을 분해하고, 이를 이용하여 유산을 만드는 세균으로서, 산소가 적은 곳에서 잘 증식하는 통성 혐기성균 또는 편성 혐기성균으로 그 종류는 크게 5개 속으로 구분할 수 있는데, 스트렙토코커스(Streptococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 류코노스톡(Leuconostoc), 비피도박테리아(Bifidobacteria) 그리고 페디오코커스(Pediococcus)로 분류된다.
- [0007] 그 중에서도 락토바실러스 속 미생물은 동형 또는 이형 발효를 하는 젖산 간균으로서 사람을 포함한 동물의 장관 및 유제품이나 채소의 발효 과정에서 흔히 볼 수 있으며, 장내 pH를 산성으로 유지시켜 대장균(E. coli)이나 클로스트리디움(Clostridium)과 같은 유해균의 번식을 억제하고 설사와 변비를 개선할 뿐만 아니라 비타민 합성, 항암 작용 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 이러한 락토바실러스 속 미생물은 다양한 방법으로 분류될 수 있으나, 그 중 한 예로서, 김치로부터 분류될 수 있다. 김치는 유산균에 의하여 발효되는 한국 전통 식품으로, 김치에서 분류된 유산균으로는 류코노스톡 메센테로이데스(Leuconostoc mesenteroides), 류코노스톡 텍스트라니쿰(Leuconostoc dextranicum), 락토바실러스 브레비스(Lactobacillus brevis), 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum), 페디오코커스 펜토사쿠스(Pediococcus pentosacues) 등이 있다.
- [0009] 이와 같이 김치에서 분리한 유산균에 관한 특허로는 항균 펩타이드 물질을 생산하는 유산균 락토코커스 락티스 BH5(대한민국 특허 제413335호), 항산화 활성이 우수한 락토바실러스 플란타룸 NC(대한민국 특허 제771209호), 박테이로신을 생산하는 유산균주(대한민국 특허 제1068531호) 등이 있다.
- [0010] 하지만, 종래 공개된 김치 유산균은 모두 생균제(Probiotics)에 관한 것으로서, 식품으로 섭취 시 장내 환경에서 생균수가 급격히 감소할 뿐만 아니라, 장내에서 흡수가 이뤄지지 않아 고유한 효과가 떨어지는 문제점을 갖고 있으며, 일정 부피의 배양액 내에서 생육할 수 있는 균주가 제한되어 있어, 1일 섭취량이 제한된다는 문제가 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0413335호(2003.12.17.)
- (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0771209호(2007.10.23.)
- (특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-1068531호(2011.09.22.)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위한 것으로서, 김치로부터 분리한 유산균 중 장내 환경 개선 효과가 가장 뛰어나고, 위장관 운동 장애 질환의 개선, 치료 또는 예방 효과가 우수한 유산균을 동정하여 위장관 운동 장애 질환의 개선, 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 위장관 운동 장애 질환 개선, 치료 또는 예방용 김치 유산균 조성물은 김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462) 또는 이의 배양액을 포함하는 것을 특징으로 한다.

### 발명의 효과

- [0014] 본 발명의 김치 유산균 조성물은 위장관 운동 장애 질환의 개선, 치료 또는 예방 효과가 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 김치 유산균 조성물은 식품 첨가제로서 식품 본연의 맛과 향을 전혀 해치지 않고, 유산균이 갖

는 효과를 그대로 제공할 수 있으며, 내열성이 강하여, 열을 가하는 식품에 첨가하여도 그 효과가 유지되는 이 점이 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0016]

도 1은 본 발명의 김치 유산균의 (a) 콜로니 관찰 이미지 및 (b) 그람 염색 결과 이미지이다.

도 2는 본 발명의 김치 유산균(SIID11558)의 16S rDNA 서열을 분석하여 나타낸 분자계통도이다(왼쪽 아래의 선은 스케일바, 계통기 분기에 위치하는 숫자는 부트스트랩 값, 주명 말미의 T는 그 종의 기준주(Type strain)를 나타낸다).

도 3은 본 발명의 나노형 김치 유산균 nF1의 제조 공정도이다.

도 4의 (a)는 각 실험군의 사료 섭취량 및 음수량의 변화를 나타낸 도이고, (b)는 각 실험군의 체중 변화를 나타낸 도이다. 이 때, 도 4의 (a)에서 \*는  $P < 0.05$ , paired t-test vs before를 의미하고, #은  $P < 0.05$  independent t-test vs Con을 의미하며, ##은  $P < 0.05$  independent vs Lop를 의미하며, 도 4의 (b)에서 \*은  $P < 0.05$  vs Con을 의미하고, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미한다.

도 5의 (a) 내지 (c)는 각 실험군의 배변량을 비교한 도이고, (d)는 각 변의 수분 함량을 비교한 도이며, \*는  $P < 0.05$  vs Con, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미한다.

도 6은 각 실험군의 대장 내 변의 펠렛수를 비교한 도이고, \*은  $P < 0.05$  vs Con, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미한다.

도 7은 (a) 대장 이동능의 비교도, (b) 대장의 무게 비교도, (c) 이동 길이의 비교도이고, \*은  $P < 0.05$  vs Con, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미한다.

도 8은 (a) 각 실험군의 장의 이동 길이 비교도, (b) 회장장력 비교도, (c) 아세틸콜린으로 유도된 장의 수축력 비교도, (d) PE로 인한 이완능 및 회복력 비교도이고, \*은  $P < 0.05$  vs Con, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미한다.

도 9는 각 실험군의 분변 내 calprotectin 수치를 비교한 도이고, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미한다.

도 10은 각 실험군의 혈액분석 결과이고, \*은  $P < 0.05$  vs Con, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미한다.

도 11은 혈액 내 염증관련 인자 비교도이며, \*은  $P < 0.05$  vs Con, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미하며, 스케일바의 크기는  $30\mu\text{m}$ 이다.

도 12는 장 점막의 길이를 측정된 비교도이고, \*은  $P < 0.05$  vs Con, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미하며, 스케일바의 크기는  $10\mu\text{m}$ 이다.

도 13은 염색된 세포의 수치 비교도이고, \*은  $P < 0.05$  vs Con, #은  $P < 0.05$  vs Lop를 의미하며, 스케일바의 크기는  $10\mu\text{m}$ 이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0017]

본 발명에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0019]

이하, 본 발명에 대하여 더욱 상세히 설명한다.

[0021]

본 발명의 한 양태에 따른 김치 유산균 조성물은 김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462, 이하 '김치 유산균'이라고도 함) 또는 그 배양액을 포함하는 것을 특징으로 함으로써, 위장관 운동 장애 질환의 개선, 치료 또는 예방의 효과가 있다. 이 때, 본 발명이 일 실시형태에 따르면, 상기 위장관 운동 장애 질환은 염증성 위장관 장애, 당뇨병성 위장 운동 장애, 수술 후 위장관 기능 장애 및 변비로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 의미할 수 있고, 배변량 또는 변의 수분 함량을 향상시킬 수 있다.

- [0023] 상기 김치 유산균이란 김치에서 유산균을 분리, 선별하고, 이를 동정하여 밝혀낸 그람 양성 및 간균 형태의 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum)을 의미한다. 상기 균주는 신균주로서 일본 독립 행정 법인 제품 평가 기술 기반 기구 특허 미생물 기탁 센터(National Institute of Technology and Evaluation, NITE; International Patent Organism Depository, IPOD)에 2012년 11월 8일자로 "nF1"으로 기탁하였다(NITE P-1462). 본 균주는 본 발명에서 위장관 운동 장애 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 효과가 있고, 특히 배변 활동을 원활하게 함으로써 변비의 개선, 치료 또는 예방 효과가 있음을 확인하였다.
- [0025] 전술한 김치 유산균의 균체의 형태는 생균 또는 사균 모두 가능하지만, 생균의 경우 제품 제조 이후의 배송 또는 진열 시에 형태변화를 일으킬 가능성이 있기 때문에, 그 이상 형태 변화를 일으키지 않는다는 점에서 상기 유산균을 열처리한 후 사멸시킨 사균의 형태로 사용하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0026] 상기 배양액이란 액체 배지에 균주를 접종하여 배양한 것을 의미하는 것으로, 상기 배양액에는 전술한 균주가 포함되어 있으며, 배양 상등액을 포함하고, 이 때 상기 균주는 생균 또는 사균 모두 가능하나 전술한 바와 동일한 이유로 사균인 것이 바람직할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸 nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 위장관 운동 장애 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다. 이 때, 상기 위장관 운동 장애에 대한 구체적인 내용은 전술한 바와 동일하게 적용될 수 있다.
- [0029] 상기 식품 조성물은 식품 첨가제를 포함하는 의미이며, 전술한 균주 또는 이의 배양액을 포함함으로써, 위장관 운동 장애 질환의 개선 또는 예방 효과가 있고, 특히 배변 활동이 개선되어 배변량 또는 변의 수분 함량이 향상되는 등 변비의 개선 또는 예방 효과가 있으며, 장내 염증 환경의 개선시킬 수 있음은 물론이고, 식품 본연의 맛과 향을 전혀 해치지 않고, 김치 유산균이 갖는 효과를 그대로 제공할 수 있으며, 내열성이 강하여 열을 가하는 식품에 첨가하여도 그 효과가 유지되는 이점이 있다.
- [0030] 이와 같이, 본 발명의 김치 유산균 또는 이의 배양액을 식품 조성물로 사용할 경우, 상기 김치 유산균을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 보존적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 상기 식품의 종류는 본 발명에서 특별히 한정되지 않으나, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 과자류, 스낵류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 유제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 건강음료, 알코올 음료 및 비타민 복합체 등을 들 수 있다.
- [0031] 상기 식품 조성물에는 풍미를 보다 향상시킬 수 있도록 각종 당질이나 유화제, 감미료, 산미료, 과즙 등을 들 수 있다. 보다 구체적으로는 글루코스, 수크로스, 프룩토스, 벌꿀 등의 당류; 소르비톨, 크실리톨, 에리트리톨, 락티톨, 파라티니트 등의 당 알코올; 수크로스 지방산 에스테르, 글리세린당 지방산 에스테르, 레시틴 등의 유화제 등을 들 수 있다. 그 밖에도, 비타민 A, 비타민 B류, 비타민 C, 비타민 E 등의 각종 비타민류나 허브 추출물, 곡물 성분, 야채 성분, 젓 성분 등이 더 포함될 수도 있다.
- [0032] 또한, 향미료로서는 요구르트계, 베리계, 오렌지계, 모과계, 자소계, 시트러스계, 애플계, 민트계, 그레이프계, 페어, 카스타드 크림, 피치, 멜론, 바나나, 트로피컬, 허브계, 홍차, 커피계 등의 향미료가 더 포함될 수도 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸 nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 위장관 운동 장애 질환의 개선 또는 예방용 건강기능식품을 제공한다. 이 때, 상기 위장관 운동 장애 질환이란 전술한 바와 동일하게 적용될 수 있다. 상기 건강기능식품은 전술한 균주 또는 이의 배양액을 포함함으로써, 위장관 운동 장애 질환의 개선 또는 예방 효과가 있고, 특히 배변 활동이 개선되어 배변량 또는 변의 수분 함량이 향상되는 등 변비의 개선 또는 예방 효과가 있으며, 장내 염증 환경의 개선시킬 수 있는 이점

이 있다.

- [0035] 상기 건강기능식품이란 통상의 식품보다도 적극적인 의미로, 보건, 건강유지 또는 증진 등을 목적으로 한 식품을 의미하며, 그 형태는 이에 한정되는 것은 아니나, 액체, 반고형 또는 고형일 수 있고, 예를 들면, 쿠키, 전병, 젤리, 양갱, 과자, 빵, 케익 등의 과자류; 요구르트, 청량음료, 영양음료, 식혜, 과일음료 등의 음료류; 스프, 아이스크림, 분유, 김치, 라면 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 또한, 본 발명은 김치로부터 분리되고, 그람 양성 간균 형태이며, 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플라타룸 nF1 균주(수탁번호 NITE P-1462) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 위장관 운동 장애 질환의 개선, 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함함으로써, 위장관 운동 장애 질환의 개선, 치료 또는 예방 효과가 있고, 특히 배변 활동이 개선되어 배변량 또는 변의 수분 함량이 향상되는 등 변비의 개선, 치료 또는 예방 효과가 있으며, 장내 염증 환경의 개선시킬 수 있는 이점이 있다.
- [0038] 상기 약학 조성물은 임상 투여 시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 주성분인 상기 락토바실러스 플라타룸 균주 또는 이의 배양액 유효량에 1종 또는 2종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 통상적인 담체 또는 첨가제를 선택하여 통상적인 약제학적 제형의 조성물로 제조할 수 있다.
- [0039] 상기 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고 이와 함께 투입될 수 있는 첨가제로는 예를 들어, 향료, 비타민류, 항산화제 등을 들 수 있다.
- [0040] 상기 희석제는 예를 들면, 유당, 옥수수 전분, 콩기름, 미결정 셀룰로오스 또는 만니톨이 좋고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘, 탈크 등을 들 수 있고, 상기 결합제로는 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈(PVP) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC) 등을 들 수 있다.
- [0041] 상기 붕해제로는 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘(Ca-CMC), 전분글리콜산나트륨, 폴라크릴린칼륨, 크로스포비돈 등을 들 수 있고, 상기 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨 또는 아스파탐 등을 들 수 있으며, 상기 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨(Ma-CMC), 베타-싸이크로덱스트린, 백납 또는 산탄검 등을 들 수 있다.
- [0042] 상기 방부제로는 파라옥시안식향산메칠, 파라옥시안식향산프로필, 소르빈산칼륨 등을 들 수 있다.
- [0043] 전술한 예시들은 전술한 내용으로 그 종류가 한정되는 것은 아니며, 각각 1종 또는 2종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0044] 상기 약학 조성물은 변비의 효율적인 개선, 치료 또는 예방을 목적으로 사용되는 것으로 그 제형에 있어서 본 발명에서는 특별히 한정하지 않으며, 예를 들면, 음료, 파우더, 캡슐, 연질캡슐, 정제, 껌, 점착 타입 액체 조성물로 사용될 수도 있고, 로션, 연고, 겔, 크림, 패치 또는 분무제와 같은 경피 투여형 제형으로 사용될 수도 있으며, 탕제, 환제, 산제, 과립제 등의 제제로 사용될 수도 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 주요성분 이외에 보조성분으로 비타민 B, C, E나 베타카로틴, Ca, Mg, Zn 등의 미네랄 함유 화합물이나 레시틴 등의 인지질 또는 말톨, 올리고당, 아미노산 등의 화합물을 더 포함할 수도 있으며, 이 중에서도 비타민 C, E, 베타카로틴, 말톨 중에서 2종 또는 3종의 성분을 혼합하여 사용할 경우 생체 활성 효과를 보강할 수 있다는 점에서 바람직할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 성분 이외에도 공지의 첨가제로서 미각을 돋구기 위해 매실, 레몬향, 파인애플향 또는 허브향 등의 천연향료나 천연과즙, 클로르필린(Chlorophyllin), 플라보노이드(Flavonoid) 등의 천연 색소 및 감미 성분인 과당, 벌꿀, 당알코올, 설탕 등과 구연산, 구연산나트륨 같은 산미제 등을 더 포함할 수도 있다.
- [0048] 본 발명은 상기 락토바실러스 플라타룸 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 위장관 운동 장애 질환의 개선, 치료 또는 예방용 김치 유산균 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0049] 본 발명에 따른 나노형 김치 유산균의 균체는 입도 분포에서의 최빈값(입도)이 1.0  $\mu\text{m}$  이하일 수 있으며, 바람직하게는 0.5 내지 1.0  $\mu\text{m}$ 일 수 있다.
- [0050] 본 발명에서, "입도 분포에서의 최빈값"은 균의 크기를 나타내는 지표가 되는 값으로, 균체의 입자직경을 측정

했을 때의 입도 분포에서의 상대빈도가 최대가 되는 입자직경을 말한다.

- [0051] 본 발명의 나노형 김치 유산균의 균체의 형태는 생균 또는 사균 모두 가능하지만, 생균의 경우 제품 제조 이후의 배송 또는 진열 시에 형태변화를 일으킬 가능성이 있기 때문에, 그 이상 형태 변화를 일으키지 않는 사균인 것이 바람직하다.
- [0052] 유산균은 배양시의 생육 환경이 열악해지면, 그 스트레스로 형태가 변화되는 것으로 알려져 있다. 그래서 본 발명의 김치 유산균 조성물에 포함되는 김치 유산균은 배양 및 가공조건을 제어함으로써 유산균의 형태가 일정하게 되도록 유지하면서 유산균을 증식시켜, 상기한 입도 분포에서의 최빈값을 갖도록 제조한다.
- [0053] 또한, 본 발명의 "나노형 김치 유산균의 균체"는 분산 처리된 것이 바람직하다.
- [0054] 분산 처리의 수법으로서는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 균의 배양액을 습식으로  $150\text{kgf/cm}^2$  (1.5 MPa) 정도의 고압 호모지나이저로 분산하는 방법을 들 수 있다.
- [0055] 이 경우, 미리 공지의 분산제 또는 부형제를 배양액에 첨가해 두는 것이 바람직하며, 이것에 의해, 균체의 재응집을 효율적으로 방지할 수 있다. 사용하는 분산제 및 부형제의 첨가량은 균체의 성상에 따라 변화되지만, 질량 환산으로 균체에 대하여 1 내지 100배량이 바람직할 수 있고, 2 내지 20배량이 보다 바람직할 수 있다. 적합한 분산제 및 부형제로서는 트레할로스, 텍스트린, 스킵 밀크 등을 들 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명의 "나노형 김치 유산균의 균체"를 최종적으로 분말로서 얻기 위해서는, 배양액에 공지의 분산제·부형제 등을 첨가하여 균체가 재응집하지 않도록 분산 처리한 후, 동결건조나 분무건조 하는 것이 바람직할 수 있다. 이에 따라 물에 대한 분산성이 우수한 균체 분말을 얻을 수 있다.
- [0057] 상기 나노형 김치 유산균 조성물에 포함되는 균체는, 입도가  $1.0\ \mu\text{m}$  이하의 나노미터(nm) 사이즈로까지 미세화된 것일 수 있다.
- [0058] 상기 균체는 상기 방법에 의해 건조분말로 제조되고, 당해 분말을 생리적 소화액에 재현탁한 경우에도 균체 입도가  $1.0\ \mu\text{m}$  이하를 유지할 수 있다. 생리적 소화액이란 공지의 방법으로 조제된 인공 위액 혹은 장액을 의미한다.
- [0059] 상기 나노형 김치 유산균 조성물의 제조 시 첨가되는 분산제 또는 부형제의 양에 따라 건조 분말 1 g 당 김치 유산균 락토바실러스 플란타룸 균주의 농도를 조절할 수 있다. 본 발명은 나노형 김치 유산균 조성물 분말 1 g 당 김치 유산균 균주가 1억 내지 5조 마리가 포함되는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 분말 1 g 당 균주 1조 내지 5조 마리를 포함할 수 있다.
- [0061] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변경 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다. 이하의 실시예 및 비교예에서 함량을 나타내는 "%" 및 "부"는 특별히 언급하지 않는 한 중량 기준이다.
- [0062] 하기 실험예에서 제시된 값은 평균(means)  $\pm$  표준편차(standard deviation, S.D.)로 표현되며, 각 처리 그룹 간의 차이의 통계적 유의성은 Graph Pad Prism 4.0(San Diego, CA)을 사용하는 일원 분산 분석(one-way ANOVA)에 의해 결정되었다.

[0064] **제조예. 김치 유산균의 동정**

- [0065] 김치 추출물을 회석하여 MRS 아가(Oxoid, Hampshire, 영국)배지에서  $30^\circ\text{C}$ , 호기조건으로 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 전형적인 유산균 형태로 광택이 흐르는 유백색의 콜로니를 선별하여 분리한 후, 선별된 콜로니를 3차에 걸쳐 새로운 배지에 옮겨 배양하는 방법으로 순수 분리하였다. 순수 배양된 유산균 중 장내 환경 개선 효과가 가장 뛰어난 균주(SIID11558)을 최종 선별하여 동정 분석하였다.
- [0066] 도 1에 나타난 바와 같이, SIID11558 균주는 유백색의 콜로니를 형성하며, 형태적으로 그람 양성이며,  $(0.8\sim 0.9) \times (1.2\sim 1.5)\ \mu\text{m}$  크기의 간균입을 확인하였다.
- [0067] 주식회사 테크노스루가랩(TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.)에서 분리된 균주의 16S rDNA 유전자 염기서열

결정 및 분석을 수행하였으며, 이를 통하여 분리된 균주는 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum)과 99.9%의 높은 상동성을 가지는 신규한 미생물로 동정되었다. 분리된 균주의 분석된 16S rDNA 염기서열은 서열번호 1과 같으며, 분자계통학적 위치를 나타내는 계통 발생적 분지도(phylogenetics tree)는 도 2와 같다. 16S rDNA의 PCR 증폭에는 정방향 프라이머(5'- gagtttgatcctggctcag - 3': 서열번호 2)와 역방향 프라이머(5'- tcgtaacaaggtagcc - 3': 서열번호 3)를 사용하였으며, PCR 증폭으로부터 사이클시퀀스까지의 조작은 하기 각 프로토콜에 근거하였다.

- [0068] - DNA 추출 : 아크로모벵티다아제 (와코준야쿠, 오사카)
- [0069] - PCR : PrimeSTAR HS DNA Polymerase (다카라바이오, 시가)
- [0070] - 사이클시퀀싱 : BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, CA, USA)
- [0071] - 시퀀싱 : ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer System (Life Technologies, CA, USA)
- [0072] - 염기서열결정 : Chromas Pro 1.5 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, AUS)
- [0073] - BLAST 상동성 검색 및 간이분자계통 해석 : 아폴론 2.0 소프트웨어 (테크노스루가랩, 시즈오카)
- [0074] - 데이터베이스 : 아폴론 DB-BA 7.0 데이터베이스 (테크노스루가·랩, 시즈오카), 국제염기서열 데이터베이스 (GeneBank/DDBJ/EMBL)
  
- [0076] 상기와 같은 방법으로 동정된 본 발명의 신규 미생물은 일본 독립 행정 법인 제품 평가 기술 기반 기구 특허 미생물 기탁 센터(National Institute of Technology and Evaluation, NITE; International Patent Organism Depository, IPOD)에 2012년 11월 8일자로 "nF1"으로 기탁하였다 (NITE P-1462).

[0078] **실시에. 나노형 김치 유산균 nF1 분말의 제조**

- [0079] 상기 제조예에서 분리 및 동정한 nF1 균주를 5 질량% 포도당을 첨가한 공지의 영양 배지에서, 20 질량% 수산화 나트륨 수용액으로 배양하되 pH가 중성이고, 온도가 36.5℃인 조건에서 배양하였으며, 포도당이 소비된 시점을 배양 종점으로 하였다. 본 발명의 나노형 김치 유산균 분말 제조시 pH의 범위는 pH 5~7의 약산성 내지 중성 영역인 것이 바람직하며, pH 6.5인 것이 가장 좋다.
- [0080] 배양 종료 후, 배양액을 80℃에서 10분 간 가열 멸균 처리한 후, 균체를 인산완충식염수(PBS)로 세정하고, 균체 중량에 대하여 9배의 텍스트린을 부형제로서 첨가한 후 믹서로 분산하였다. 다음으로 이를 동결 분무건조하여 분말 시료를 조제하였으며, 제조한 분말 1 g 당 본 발명의 김치 유산균 nF1 균주가 1조 마리 이상 포함되어 있음을 확인하였다. 나노화 김치 유산균 제조 공정을 도 3에 간략히 나타내었다.
- [0081] 상기 nF1 분말을 다시 균체 농도로 10 mg/ml가 되도록 조정하면서 PBS에 현탁하였다. 가공 공정 시의 pH는 6.5로 유지하였다. 김치에서 추출한 nF1 균주는 나노화 처리 전 막대모양의 간균이었으나, 나노화 처리 후는 구균에 가까운 형태를 나타냄으로써 균체끼리 재응집하지 않는 성질을 갖는다. 나노화 처리된 nF1 균주는 입도 분포의 최빈값이 0.5 ~ 1.0 μm이고, 재응집하지 않는 성질이 있어 물 또는 기타 용매에 대한 분산성이 뛰어난 유산균을 얻을 수 있다.
- [0082] 한편, 본 발명의 나노형 김치 유산균 분말을 제조함에 있어서, 균체 배양액에 첨가되는 부형제의 양에 따라 분말에 포함되는 유산균의 농도를 조절할 수 있다. 균체 중량과 동일한 양의 텍스트린을 부형제로 첨가하여 제조한 경우, 제조된 분말 1 g 당 김치 유산균 5조 마리가 포함되며, 균체 중량에 대하여 4배의 텍스트린을 첨가하여 제조한 경우 1 g 당 2조 마리 이상의 균주가 포함되는 것을 확인하였다.

[0084] **실험예 1. 실험 동물 사육 및 시험물질**

- [0085] 실험동물은 SD(Sprague Dawley) 래트 7주령 수컷을 사용하였으며, 온도 20±2℃, 습도 55±5%, 12시간 명암조건에서 사육하였다.
- [0086] 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 총 8군으로 실험 군을 분류하였다. 정상대조군(Con), 단독 고농도 유산균 투여군(High), 양성대조군(Dul), 로페라마이드(loperamide) 투여군(Lop), 로페라마이드와 상기 실시예의

유산균 분말의 농도별로 투여군(저농도 - Lop+Low, 중농도 - Lop+Mid, 고농도 - Lop+High) 및 로페라마이드와 돌코락스에스 투여군(Lop+Dul)으로 나누었다. 양성대조군으로는 돌코락스에스(0.75mg/kg, Dulcolax-S Tablets, Boehringer Ingelheim, Dul)를 이용하였다.

[0087] 각 시료들을 4주일 동안 투여한 후, 정상 대조군, 단독 고농도 투여군, 양성대조군을 제외한 모든 군에서 2.5mg/kg의 용량의 로페라마이드(Loperamide, Simga, St.Louis, Mo, USA)를 6일간 피하투여하여 변비를 유도하고, 7일째에 희생하였다.

[0088] 5일째까지의 분변을 모아 수분량 측정을 위해 분변을 분리하여 분석하였다. 유산균 분말은 경구투여를 실시하였으며, 변비유도를 위한 로페라마이드 투여는 복강내투여(IP)를 실시하였다.

[0089] 이 때, 각 군의 해당하는 시험물질의 처리 농도는 하기 표 1과 같다.

표 1

시험군	시험물질 및 투여 농도		
	돌코락스에스(mg/kg)	로페라마이드(mg/kg)	김치 유산균 nF1 (cells/ml/day)
정상대조군(Con)	-	-	-
단독 고농도 유산균 투여군(High)	-	-	$1.6 \times 10^{11}$
양성대조군(Dul)	0.75	-	-
로페라마이드 단독 투여군(Lop)	-	2.5	-
Lop + 저농도 유산균 투여군(Lop+Low)	-	2.5	$3.2 \times 10^{10}$
Lop + 중농도 유산균 투여군(Lop+Mid)	-	2.5	$8 \times 10^{10}$
Lop + 고농도 유산균 투여군(Lop+High)	-	2.5	$1.6 \times 10^{11}$
Lop + 돌코락스에스 투여군(Lop+Dul)	0.75	2.5	-

[0092] **실험예 2.**

[0093] 상기 실험예 1의 각 군별 실험용 쥐의 사료 섭취량 및 음수량의 변화는 도 4와 같다.

[0094] 도 4a를 참고하면, 정상대조군(Con)과 비교할 때, 로페라마이드 단독 투여군(Lop)과 로페라마이드와 상기 실시예의 유산균 분말의 저농도 투여군(Lop+Low)에서 사료 섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였으나, 최종 체중의 변화에 영향을 미치는 정도는 아니었으며, 도 4b와 같이 각 실험군 간의 유의적인 차이를 보이지 않는 것을 확인하였다.

[0095] 변비 유도 후(로페라마이드 투여 후) 사료의 섭취는 로페라마이드 투여군(Lop)에 비해 로페라마이드 + 유산균 분말의 중농도 투여군(Lop+Mid)에서 유의적으로 증가하였으며, 음수섭취량은 로페라마이드와 유산균 분말의 농도별 투여군(저농도 - Lop+Low, 중농도 - Lop+Mid, 고농도 - Lop+High) 및 양성대조군(Dul)에서 음수량이 증가하는 것을 확인하였다.

[0097] **실험예 3. 변의 개수, 중량 및 수분 함량 측정**

[0098] 상기 실험예 1의 각 군별 실험용 쥐를 사육하는 동안 5일째까지 매일 24시간 동안 배설된 쥐의 분변을 수집하여 총 개수와 무게를 측정하였다. 무게 측정이 완료된 후 각 변의 수분 함량 측정을 위해 70℃ 드라이오븐에서 24시간 동안 건조시켜 중량을 측정하였으며, 건조 전 중량과 건조 후의 중량차를 이용해 하기 수학적 식 1과 같이 수분 함량을 계산하였다.

[0099] [수학적 식 1]

[0100] 수분 함량(%) = {(건조 전 중량 - 건조 후 중량)/건조 전 중량} × 100

[0102] 도 5의 (a) 내지 (c)를 참고하면, 로페라마이드 단독 투여(Lop)한 군에서 변의 개수가 감소하는 경향을 보임으로서 변비가 유발된 것을 확인할 수 있었고, 돌코락스와 Lop를 함께 투여한 경우(Lop+Dul) Lop를 단독 투여했을 때와 비교하여 배변량이 증가한 것으로 보아 Lop에 의한 변비 유도가 억제된 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 관점으로 Lop와 함께 본 발명의 김치 유산균을 농도별로 투여한 경우(Lop+Low, Lop+Mid, Lop+High), 배변량이 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 김치 유산균의 농도가 높아질수록 그 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0103] 도 5의 (d)를 참고하면, 변의 수분 함량 역시 정상대조군(Con)과 비교했을 때, 변비유도군(Lop)의 경우 변의 수분 함량이 크게 감소되는 것을 확인할 수 있었는데, Lop와 본 발명의 김치 유산균을 농도별로 투여한 경우(Lop+Low, Lop+Mid, Lop+High) 변의 수분 함량이 점차 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 김치 유산균의 농도가 높아질수록 그 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 즉, 본 발명의 김치 유산균이 배변량 및 변의 수분 함량을 크게 개선시킴으로써 변비 개선에 효과적이라는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] **실험예 4. 대장 내 배설물 측정**

[0107] 상기 실험예 1의 각 군의 실험쥐를 희생하기 전 16시간 동안 절식시키고 난 후, 쥐를 희생시키고 대장 내 존재하는 배설물의 펠릿수를 측정하였다.

[0108] 도 6을 참고하면, Lop 단독 투여한 경우(Lop)에서는 대장 내 남아있는 변의 펠릿 양이 증가한 반면, Lop와 본 발명의 김치 유산균을 농도별로 투여한 경우(Lop+Low, Lop+Mid, Lop+High) 대장 내 잔존하는 변의 펠릿 수가 감소한 것을 확인할 수 있었고, 농도가 높을수록 그 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0110] **실험예 5. 변의 대장(소화관) 이동능 평가**

[0111] 상기 실험예 1의 각 군의 실험쥐를 16시간 동안 절식시키고 소화관 운동능을 측정하였다. 25% 황산바륨(barium sulfate)이 함유된 소화관 운동능 용액을 경구투여하고 70분 후, 실험쥐를 희생하여 소화관 전체를 적출하였으며, 유문부에서 바륨용액 말단 사이의 길이(A)와 유문부에서 말단회장까지의 길이(B)를 측정하여 하기 수학적 2를 통해 소화관 운동능을 산출하였다.

[0112] [수학적식 2]

[0113] 
$$\text{소화관 운동능(\%)} = (A/B) \times 100$$

[0115] 도 7을 참고하면, Lop 단독 투여한 경우(Lop)에 비해, Lop와 본 발명의 김치 유산균을 농도별로 투여한 경우:(Lop+Low, Lop+Mid, Lop+High) 장 기능이 활성화되어 장 통과 시간이 단축되는 것을 확인할 수 있었고, 그만큼 소화관 이동률이 향상되는 효과가 있음을 확인하였다. 특히, 김치 유산균의 농도가 높을 수록 그 효과가 보다 향상되는 것을 확인하였다.

[0117] **실험예 6. 장의 수축이완능 평가**

[0118] 상기 실험예 1의 각 군의 실험쥐를 희생시킨 후, 회장을 분리하여 수축이완능을 측정하였다. 상기 분리된 회장을 절개 후, 변형된 Krebs-Ringer 용액(118mM NaCl, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 4.7mM KCl, 11.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM glucose, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.4)으로 채워진 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 챔버에 2mm 길이의 고리에서 절개된 회장을 장착하였다. 수축 전에 회장 내피에 2.0g의 장력을 30분간 가했다. 이 기간 동안 Krebs-Ringer 용액을 매 15분마다 교체하였다. 상기 회장을 세척한 후 30분 평형 기간 후에 수축 반응은 Ach(아세틸콜린, 1 μM)에 의해 유도되었다. 수축이 최고점에 도달했을 때 측정된 PE(10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup>M)를 bath에 첨가하여 이완을 유도하였다.

[0120] 도 8을 참고하면, 변비유도군인 Lop의 경우 Ach로 유도된 회장의 수축 작용을 현저히 감소시키는 것을 확인하였으며, 이에 비해 Lop와 돌코락스를 함께 포함하는 경우(Lop+Dul) 및 Lop와 본 발명의 김치 유산균을 함께 포함하는 경우(Lop+Mid), 회장 장력이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, PE로 인한 이완능이 변비유도군인 Lop에서는 감소한 반면, Lop+Dul 및 Lop+Mid에서는 증가됨을 확인하였다. 수축이완능의 평가는 PE를 처리하여 이완이 평형을 이루게 한 뒤, 대장의 수축이 시작되고 수축이 평형을 이루는 지점을 계산하여 계산하는데, 변비유도군인 Lop의 경우 PE처리로 인한 이완이 감소하고 회복되지 않는 반면, Lop+Dul 및 Lop+Mid의 경우 이완과 회복력이 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0122] **실험예 7. 염증 관련 인자 분석**

[0123] **실험예 7-1. 분변에서의 calprotectin 검출 실험**

[0124] 칼프로텍틴(calprotectin)은 중성구(neutrophil) 세포질에 존재하는 칼슘결합 단백질로 알려져 있으며, 장관에 염증으로 인해 중성구의 과다가 일어나면 장관 내로 분비되어 대변으로 배설되고, 대변 내에서 칼프로텍틴은 장내 세균에 의해 잘 분해되지 않기 때문에 장관의 염증 정도를 대변하는 표시자로서 염증성 장질환을 진단하기 위한 바이오마커로 이용된다.

[0125] 상기 실험예 1의 각 군별 실험용 쥐를 사육하는 동안 5일째까지 매일 24시간 동안 배설된 쥐의 분변을 수집하여 실온에서 30분간 방치한 후, DPBS를 이용하여 균질화하고 1,500x g에서 20분간 원심분리하여 균질액을 얻어 분석하였다. 분변 내 칼프로텍틴은 commercial enzymatic assay kits(MyBioSource, USA)를 사용하였으며, 그 매뉴얼에 따라 진행하였다.

[0127] 도 9를 참고하면, 염증성 장질환의 바이오마커인 칼프로텍틴의 수치가 변비 유도군인 Lop군에 비해, Lop와 본 발명의 김치 유산균을 농도별로 투입한 경우(Lop+Low, Lop+Mid, Lop+High) 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 본 발명의 김치 유산균을 통해 장관 내 염증성 장질환이 개선되는 것을 확인하였다.

[0129] **실험예 7-2. 염증반응 관련 인자 분석**

[0130] 상기 실험예 1의 각 실험군별 실험용 쥐에서 혈액을 채취하여 분석하였다.

[0131] 염증과 관련된 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-10과 Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)를 확인하였다. 이 때, 상기 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 PGE<sub>2</sub>는 변비로 인해 소화관의 운동기능의 저하나 장 내용물들의 이동시간이 길어지게 되는 과정에서 장내 점막 장벽을 손상시켜 세균의 침입으로 인한 대장 내의 면역시스템이 활성화됨으로써 분비가 증가되는 물질이고, IL-10은 항염증성 사이토카인으로 생성이 증가하게 되면 염증 반응을 억제하고 장상피세포층을 유지시키는 역할을 하는 물질로 항염증 효과에 의한 장 손상 개선 효과를 판단하는 기준이 되는 물질이다.

[0132] 구체적으로, 상기 실험예 1의 각 군별 실험용 쥐에서 채취한 혈청에서 싸이토카인을 측정하고 장의 균질액을 분리하여 웨스턴 블로팅을 실시하였다. 이 때, 웨스턴 블로팅은 장세포 균질액을 SDS-PAGE로 분리하고 PVDF 막으로 옮긴 후, 5% skim milk로 블로킹하여, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, COX-2 등으로(Santa cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 확인하였다.

[0133] 도 11을 참고하면, 변비유도군인 Lop에서는 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> 및 COX-2의 발현이 증가된 반면, Lop와 본 발명의 김치 유산균을 투입한 경우(Lop+Lacto)에서는 그 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0134] 즉, 본 발명의 김치 유산균이 염증 관련 인자의 수치를 낮추는 효과가 있으며, 이로 인해 장기 염증 환경을 개선하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0136] **실험예 8. 대장관내 조직학적 변화 비교**

[0137] 변비가 유도된 경우 장 점막내의 점액 분비의 기능이 감소한다고 보고된 바 있으며, 로페라마이드 투여 시 대장

운동 저하뿐만 아니라, 대장관 내 점액 분비가 감소함으로 대장 내용물의 이동이 저하된다.

[0138] 장내 조직을 관찰하기 위하여 상기 실험에 1의 각 군별 실험용 쥐를 8주째에 희생하여, 장내 조직을 채취한 후 파라핀 임베딩(paraffin embedding)하여 5  $\mu\text{m}$ 로 절편하고, 상기 절편한 조직을 자일렌(xylene)으로 탈파라핀한 후, 에탄올 농도별(100, 90, 80 및 70%)로 각 5분씩 가수한 후, 헤마톡실린 용액(Sigma)에 3분 동안 염색하였다. 염색된 조직은 수세한 뒤 에오신 용액을 이용해 3분 동안 다시 염색시켰다. 염색이 완료된 후 흐르는 물에 잘 씻은 조직은 다시 에탄올을 이용하여 농도별(70, 80, 90 및 100%)로 각각 5분씩 탈수시키고, 자일렌을 이용하여 씻은 후 봉입하였다. 이렇게 염색된 장 점막 세포는 광학현미경(ZEISS, Axiovert S100, Jena, Germany)을 관찰하였다.

[0139] 도 12를 참고하면, 변비유도군인 Lop에 비해, Lop와 본 발명의 김치 유산균을 농도별로 투입한 경우(Lop+Low, Lop+Mid, Lop+High)의 장 점막 길이가 증가되는 것을 확인하였으며, 특히 고농도의 김치 유산균을 포함할수록 그 효과가 보다 향상되는 것을 확인하였다.

[0141] 또한, 점액질의 변화를 확인하기 위하여, 상기 실험에 1의 각 군별 실험용 쥐를 8주째에 희생하여, 장내 조직을 채취한 후 파라핀 임베딩하여 5  $\mu\text{m}$ 로 절편하고, 상기 절편한 조직을 자일렌으로 탈파라핀한 후, 에탄올 농도별(100, 90, 80 및 70%)로 각 5분씩 가수한 후, alcian blue(pH 2.5)으로 1시간 염색하였다. 이렇게 염색된 조직은 수세한 뒤 에오신 용액을 이용해 3분 동안 다시 염색시켰다. 염색이 완료된 후 흐르는 물에 잘 씻은 조직은 다시 에탄올을 이용하여 농도별(70, 80, 90 및 100%)로 각각 5분씩 탈수시키고, 자일렌을 이용하여 씻은 후 봉입하였다. 염색된 장 점막 세포는 광학현미경(ZEISS, Axiovert S100, Jena, Germany)으로 관찰하였다.

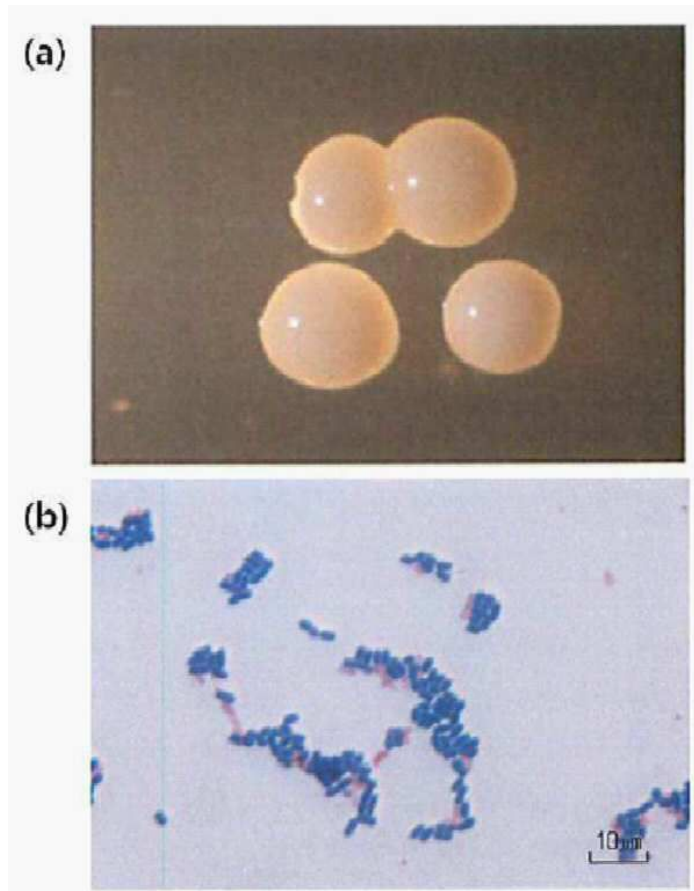
[0142] 도 13을 참고하면, 변비유도군인 Lop군은 점액질이 감소되는 경향을 보이는 것을 확인하였으며, 이에 비해 Lop와 본 발명의 김치 유산균을 농도별로 투입한 경우(Lop+Low, Lop+Mid, Lop+High)는 점액질의 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 김치 유산균의 농도가 향상될수록 그 효과가 보다 우수한 것을 확인하였다.

### 수탁번호

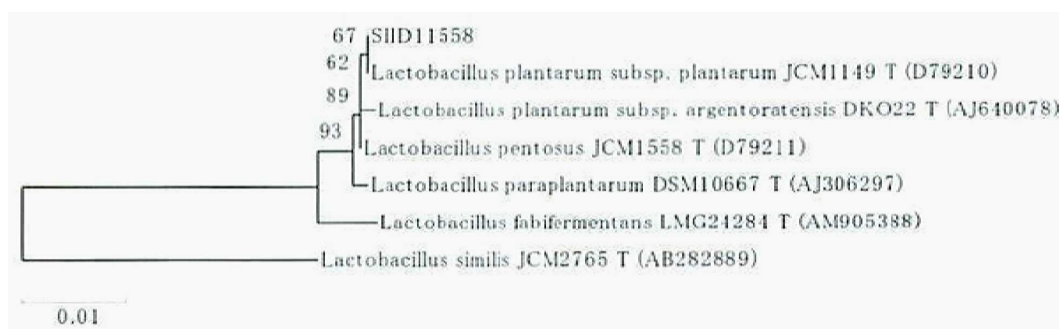
[0144] 기탁기관명 : 독립행정법인제품평가기술기반기구특허미생물기탁센터  
 수탁번호 : NITEP-1462  
 수탁일자 : 20121108

도면

도면1



도면2



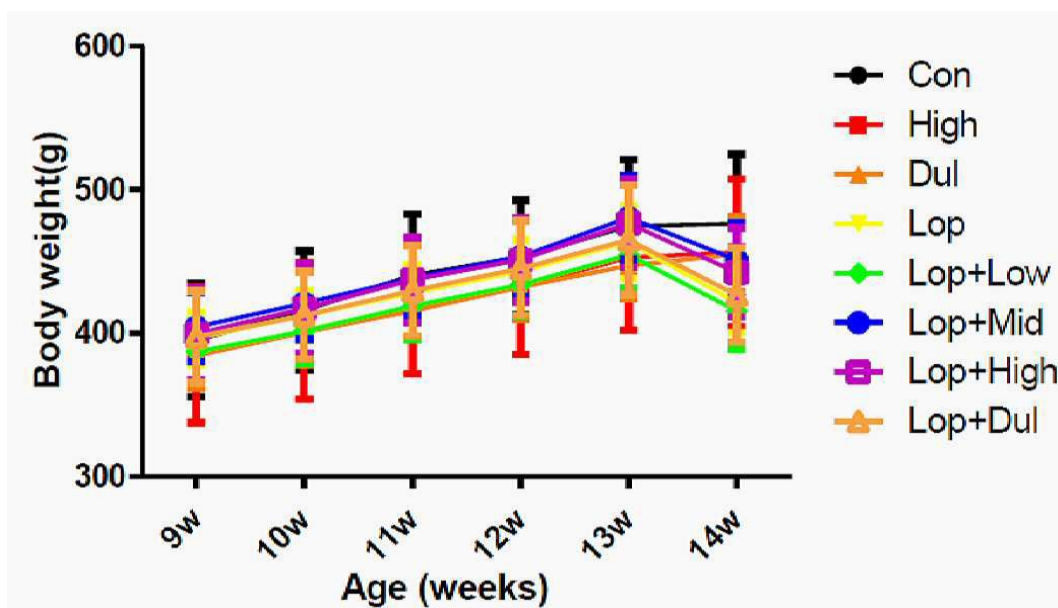
도면3



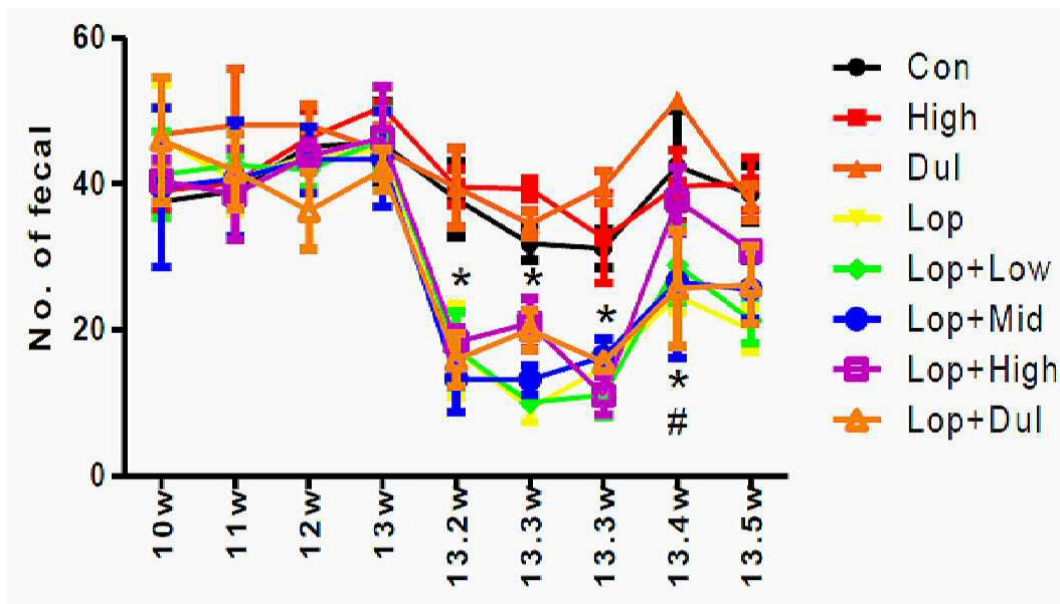
도면4a

	Food intake (g/day)		Water intake (ml/day)	
	Before constipation	After constipation	Before constipation	After constipation
Con	36.88±1.93	36.61±1.99	37.30±2.90	40.00±3.46
High	35.00±5.83	36.43±3.13	36.31±2.46	39.02±2.59*
Dul	37.00±2.70	35.94±2.95	35.48±1.40	38.33±2.07*
Lop	37.02±0.85	27.17±2.40**	40.64±5.98	28.54±0.39**
Lop+Low	35.08±1.59	28.00±1.11*	37.27±0.69	30.29±1.67**
Lop+Mid	38.75±0.81	30.49±3.20	40.52±3.00	33.62±2.50**
Lop+High	37.62±3.76	32.06±0.76**	36.15±3.05	34.86±0.93**
Lop+Dul	36.52±3.22	31.99±1.85	36.79±1.73	35.29±1.32**

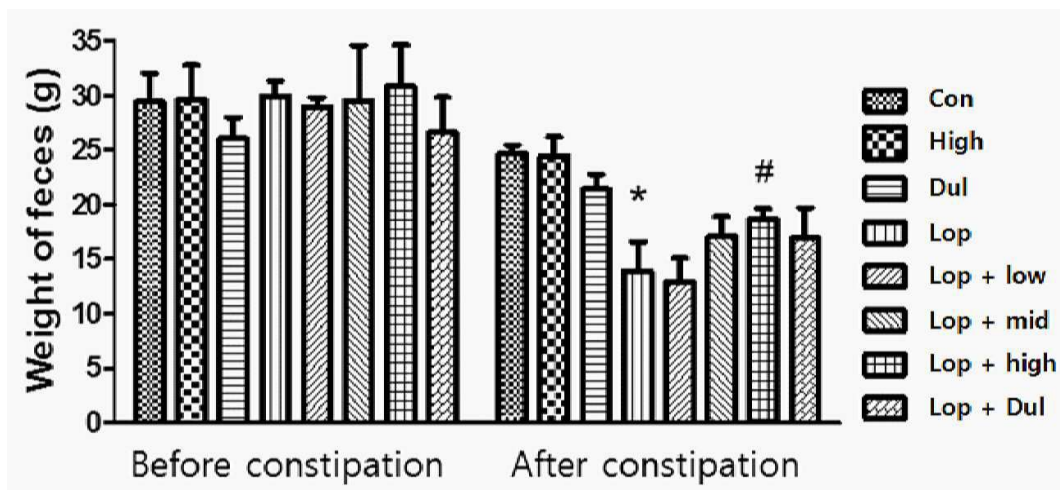
도면4b



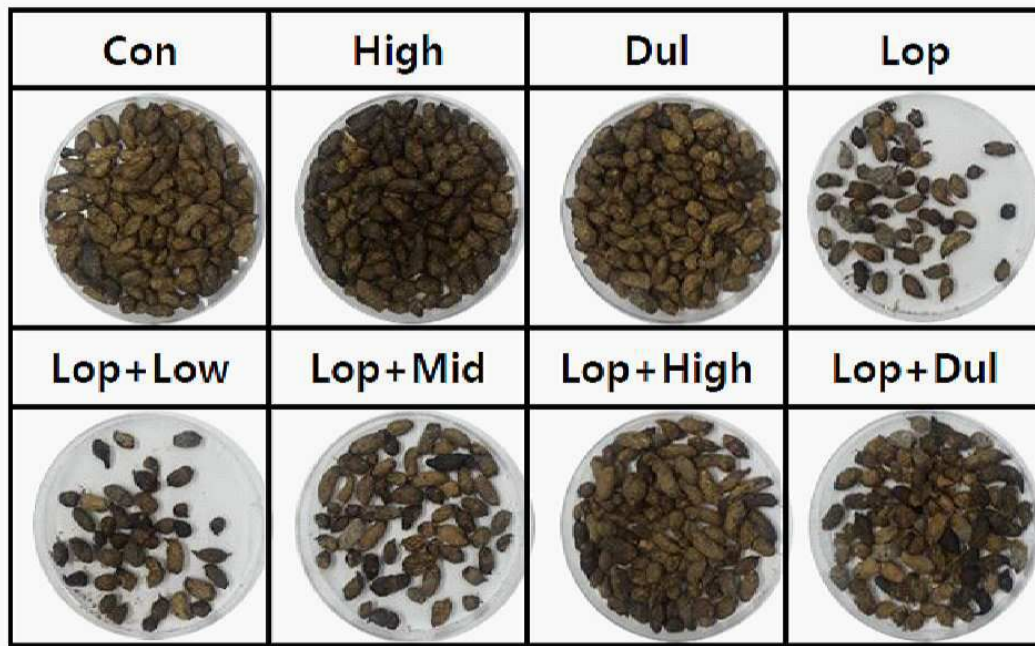
도면5a



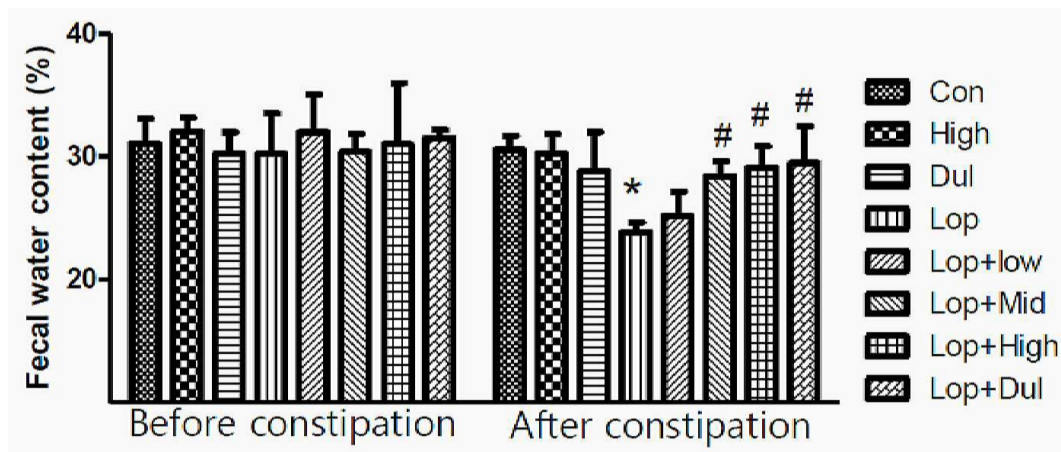
도면5b



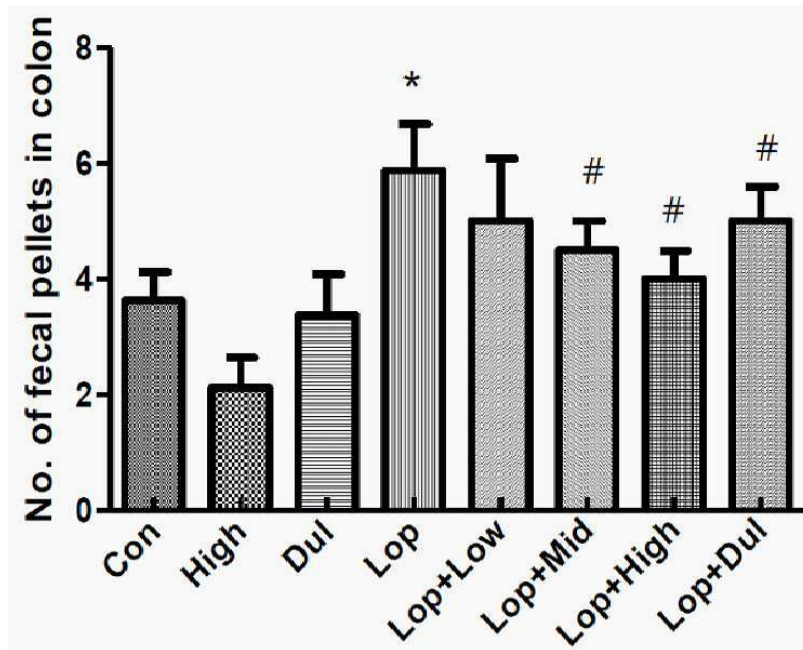
도면5c



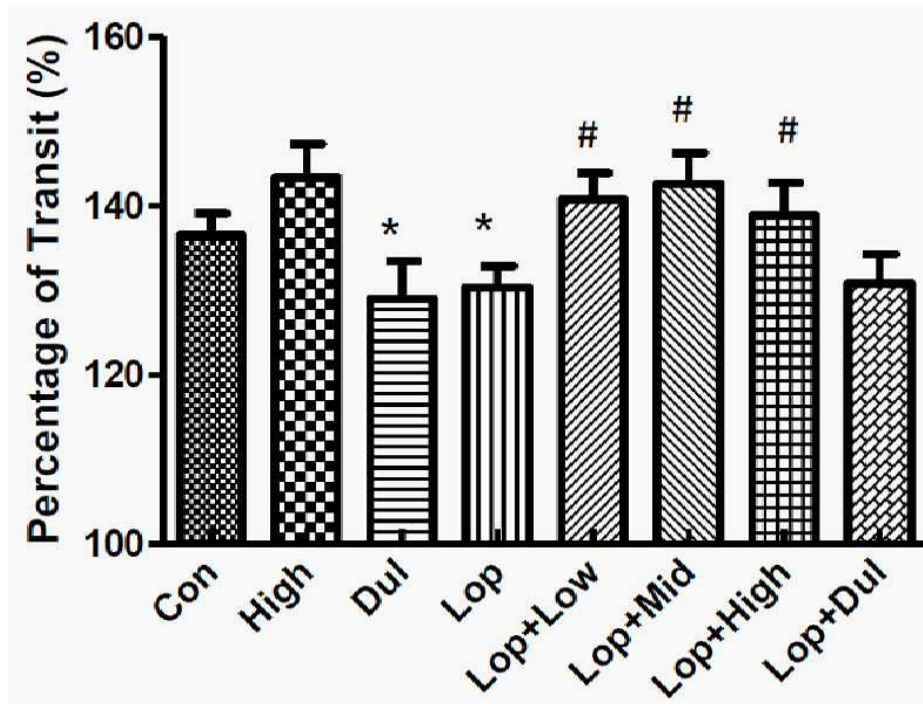
도면5d



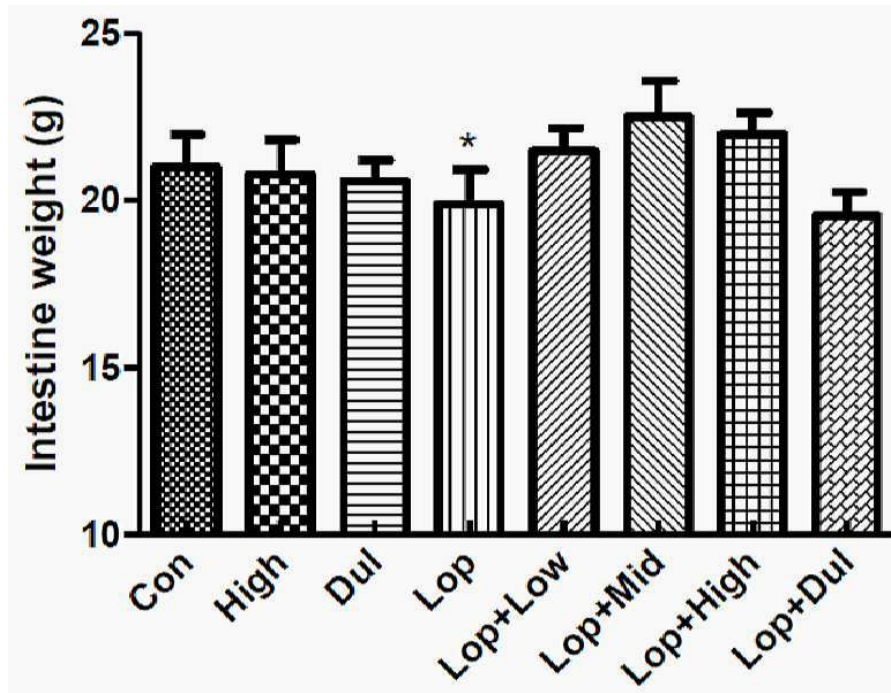
도면6



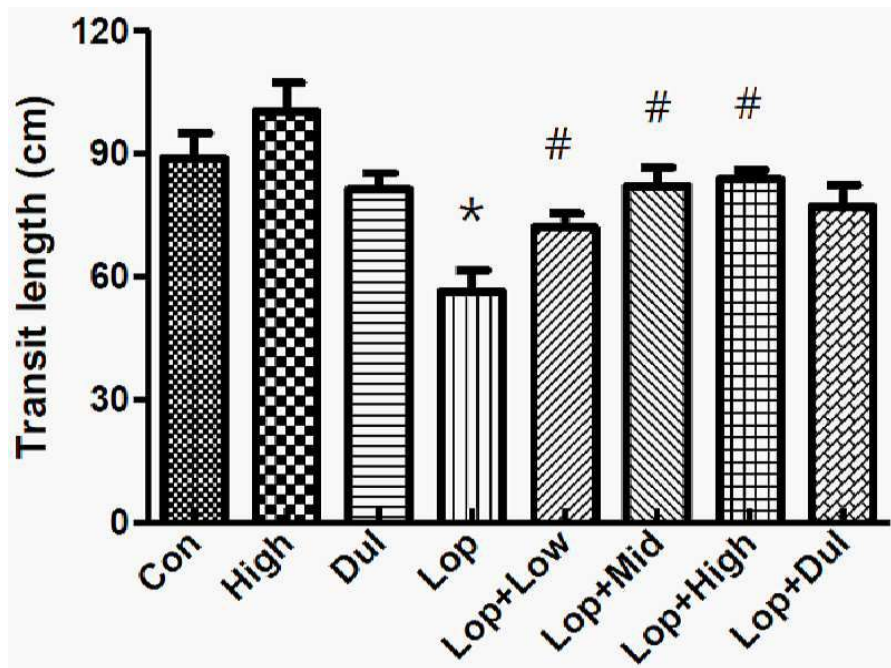
도면7a



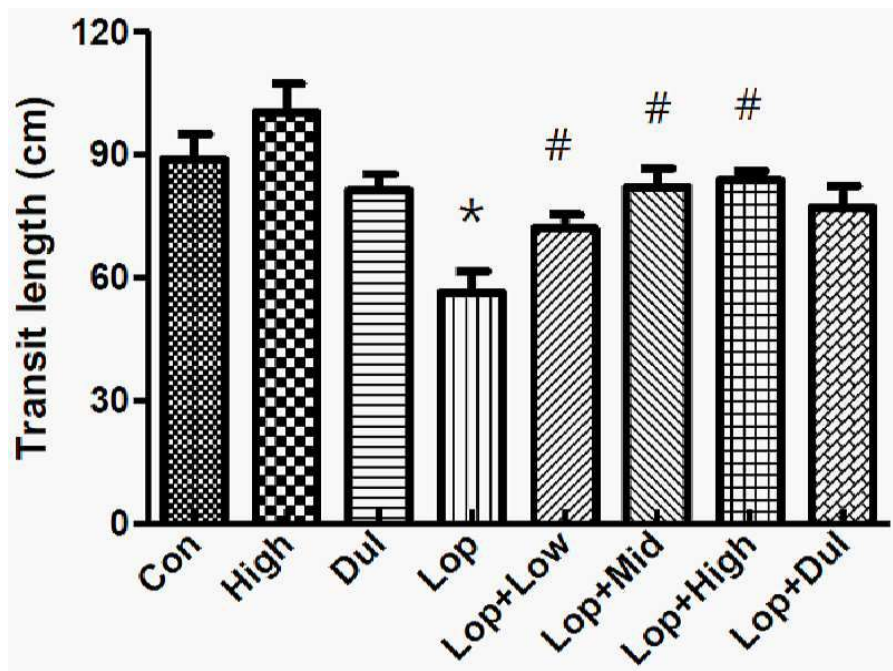
도면7b



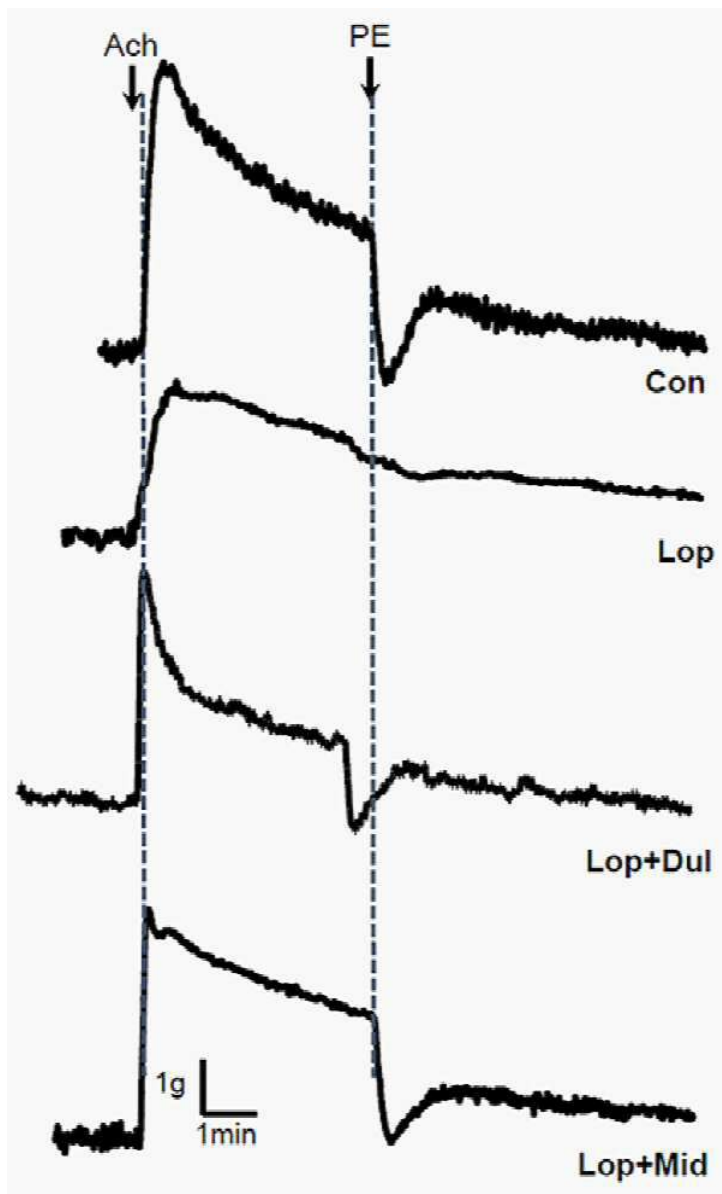
도면7c



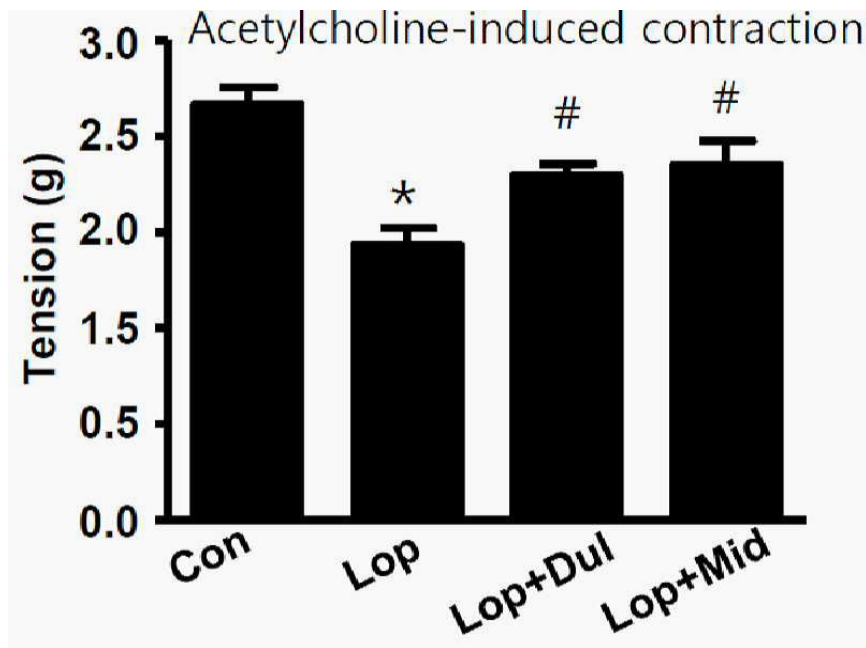
도면8a



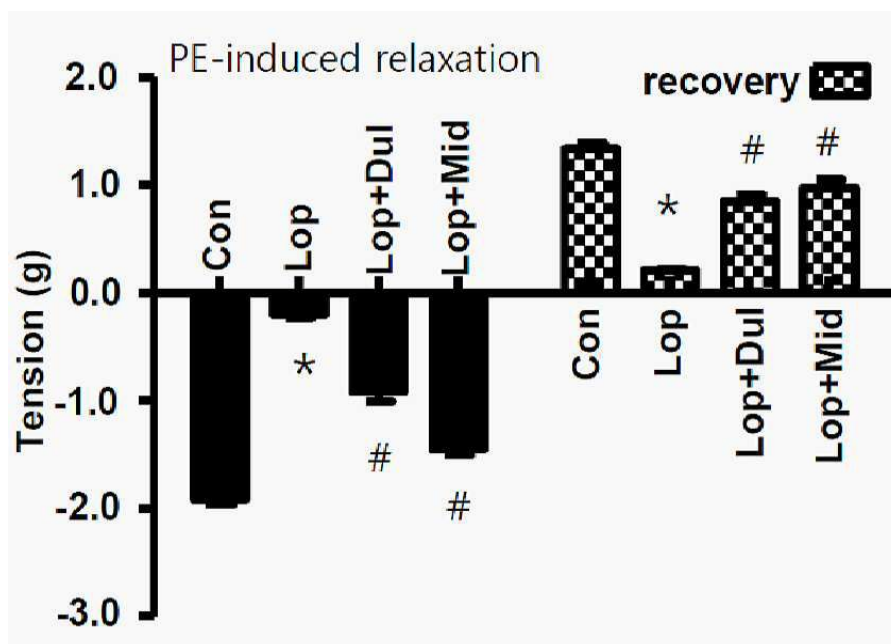
도면 8b



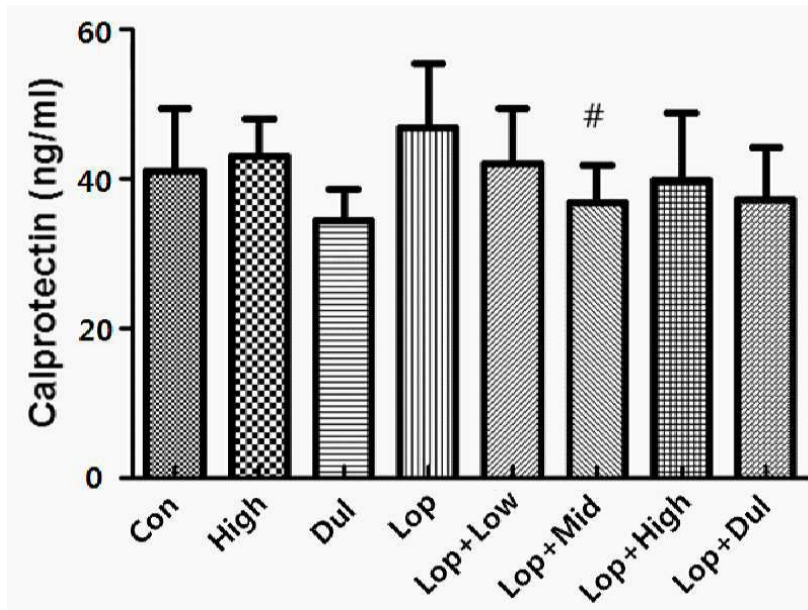
도면8c



도면8d



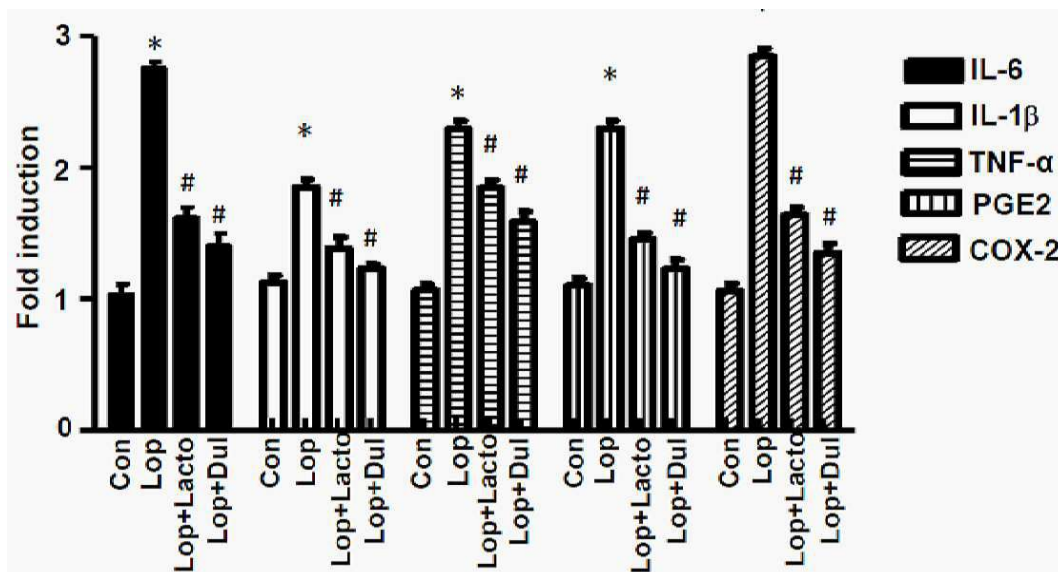
도면9



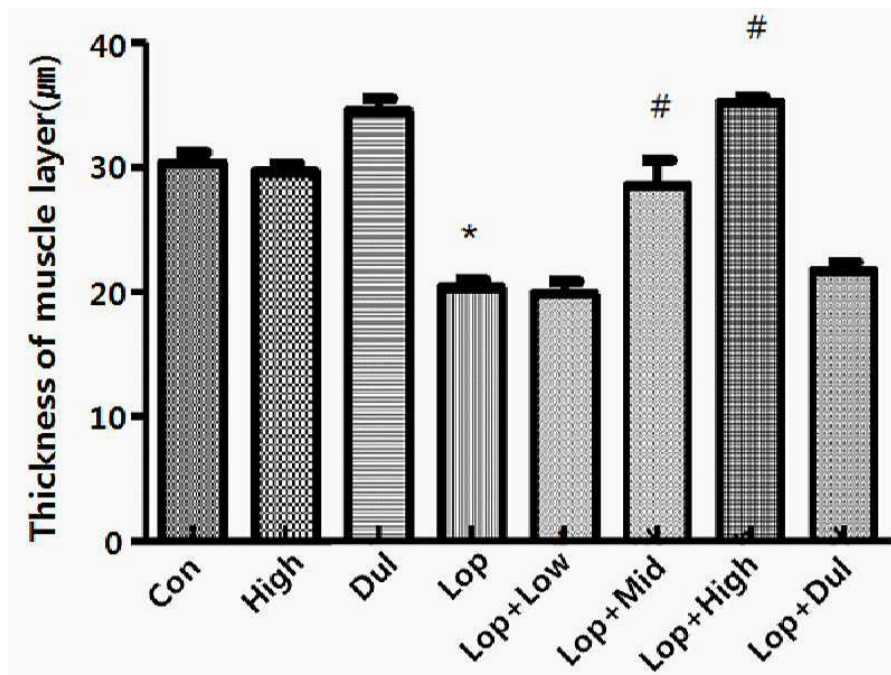
도면10

	Group							
	Con	High	Dul	Lop	Lop+Low	Lop+Mid	Lop+High	Lop+Dul
TNF $\alpha$	18.04 $\pm$ 3.58	19.73 $\pm$ 4.04	16.52 $\pm$ 2.43	21.61 $\pm$ 7.34 <sup>*</sup>	15.98 $\pm$ 2.19 <sup>*</sup>	17.45 $\pm$ 2.57	18.30 $\pm$ 4.66	16.96 $\pm$ 2.95
IFN $\gamma$	2.67 $\pm$ 0.46	3.04 $\pm$ 0.72	2.67 $\pm$ 0.53	3.71 $\pm$ 0.85 <sup>*</sup>	3.25 $\pm$ 0.72	3.17 $\pm$ 1.16 <sup>*</sup>	3.50 $\pm$ 0.26	3.50 $\pm$ 1.31
IL1 $\beta$	14.79 $\pm$ 1.92	14.21 $\pm$ 3.36	12.52 $\pm$ 2.21	15.67 $\pm$ 3.69 <sup>*</sup>	13.50 $\pm$ 2.31	12.31 $\pm$ 3.09 <sup>*</sup>	13.60 $\pm$ 2.42	13.94 $\pm$ 2.59
IL6	32.33 $\pm$ 1.51	32.67 $\pm$ 5.01	36.33 $\pm$ 2.94	51.67 $\pm$ 8.89 <sup>*</sup>	40.33 $\pm$ 6.74 <sup>*</sup>	42.33 $\pm$ 7.31	44.33 $\pm$ 4.97	36.57 $\pm$ 7.00
IL12	421 $\pm$ 77.47	407.86 $\pm$ 101.19	506.90 $\pm$ 195.58	256.07 $\pm$ 107.89 <sup>*</sup>	262.86 $\pm$ 50.90	293.37 $\pm$ 42.75	315.83 $\pm$ 42.85 <sup>*</sup>	214.11 $\pm$ 63.83
IL10	37.13 $\pm$ 5.59	39.50 $\pm$ 4.02	44.00 $\pm$ 11.51	20.63 $\pm$ 11.87 <sup>*</sup>	22.13 $\pm$ 9.04	31.75 $\pm$ 16.62	35.00 $\pm$ 15.44 <sup>*</sup>	73.75 $\pm$ 22.34
Prostaglandin E2	5.25 $\pm$ 3.89	4.49 $\pm$ 5.10	11.95 $\pm$ 4.57	17.20 $\pm$ 6.52	12.75 $\pm$ 4.64	8.81 $\pm$ 3.26	9.24 $\pm$ 3.66	16.91 $\pm$ 7.24

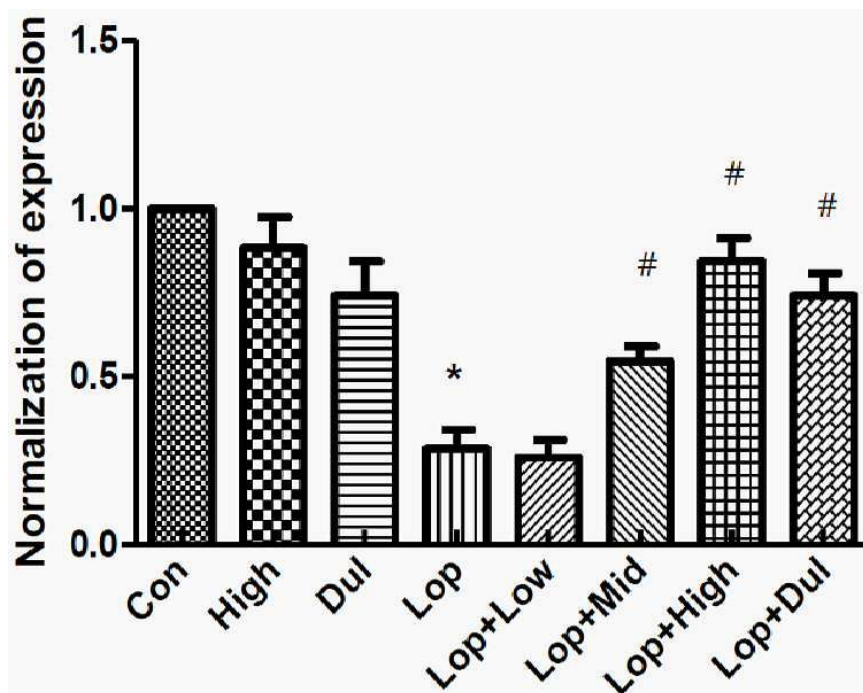
도면11



도면12



도면13



서열목록

- <110> BIOGENICS KOREA CO., LTD
- <120> Nano-Sized Lactic Acid Bacteria from Kimchi
- <130> 13P1169
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1  
 <211> 1492  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 16S rRNA of Lactobacillus plantarum gene : nF1  
 <400> 1

```

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac gaactctggt attgattggt      60
gcttgcatca tgatttcatc ttgagtgagt ggcgaactgg tgagtaacac gtgggaaacc      120
tgcccagaag cgggggataa cacctggaaa cagatgctaa taccgataa caacttgac      180

cgcatggtcc gagcttgaaa gatggcttcg gctatcactt ttggatggtc ccgcggcgta      240
ttagctagat ggtggggtaa cggctcacca tggcaatgat acgtagccga cctgagaggg      300
taatcgcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga      360
atcttcaca atggacgaaa gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aagggtttcg      420
gctcgtaaaa ctctgttgtt aaagaagaac atatctgaga gtaactgttc aggtattgac      480
ggtatttaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gcccggttaa tacgtaggtg      540
gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggttttt taagtctgat      600

gtgaaagcct tcggctcaac cgaagaagtg catcggaaac tgggaaactt gagtgcagaa      660
gaggacagtg gaactccatg tgtagcggtg aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt      720
ggcgaaggcg gctgtctggt ctgtaactga cgtgaggct cgaagatag gtagcaaac      780
aggattagat accctggtag tccataccgt aaacgatgaa tgctaagtgt tggagggttt      840
ccgcccttea gtgctgcagc taacgatta agcattccgc ctggggagta cggcccgaag      900
gctgaaacte aaaggaatg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc      960
gaagctacgc gaagaacctt accaggtctt gacatactat gcaaatctaa gagattagac     1020

gttccttcg gggacatgga tacagtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga     1080
tgttgggta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattatc agttgccagc attaagtgg     1140
gcactctggt gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc     1200
atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga tggtaacaac agttgcgaac     1260
tcgcgagagt aagctaactc cttaaagcca ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg     1320
cctacatgaa gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgcccggtg aatacgttcc     1380
cgggccttgt acacaccgcc cgteacacca tgagagtttg taacacccaa agtcggtggg     1440

gtaacctttt aggaaccagc cgcctaaggt gggacagatg attagggtga ag     1492
    
```

<210> 2  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> forward primer  
<400> 2  
gagtttgatc ctggctcag 19  
<210> 3  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> reverse primer  
<400> 3  
tcgtaacaag gtagcc 16