



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0098149
(43) 공개일자 2016년08월18일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 35/744 (2014.01) A61K 35/747 (2014.01)
C12R 1/225 (2006.01) C12R 1/24 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0100730(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2016년08월08일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2015-0022323
원출원일자 2015년02월13일
심사청구일자 2015년02월13일</p> <p>(30) 우선권주장
1020140018105 2014년02월17일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
한명주
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
김동현
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)</p> <p>(74) 대리인
고영갑, 이성원, 권정기, 임상엽</p> |
|--|--|

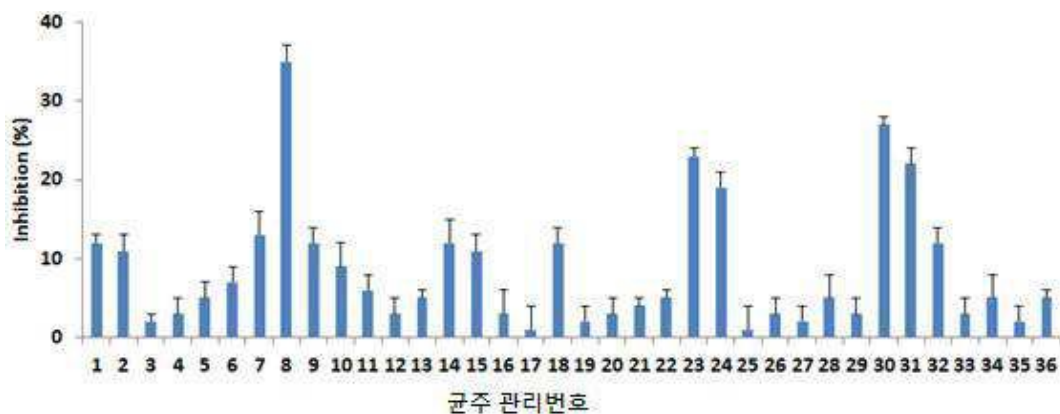
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 비만 억제 효능을 갖는 신규 락토바실러스 플란타룸 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 김치에서 분리된 신규 락토바실러스속 균주를 제공한다. 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주는 김치에서 분리되어 안전성이 높고, 우수한 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성 또는 항산화 활성 등과 같은 다양한 기능성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주는 비만, 지방간, 제2형 당뇨, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 및 지질 관련 대사증후군과 같은 질환을 예방, 개선 또는 치료하는데 유용한 식의약 소재로 사용될 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주로 대두, 더덕, 인삼 및 산수유씨를 발효시킨 산물 또는 이의 추출물도 비만 또는 비만 관련 질환을 예방, 개선 또는 치료하는데 유용한 식의약 소재로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 1/3014 (2013.01)

A61K 35/744 (2013.01)

A61K 35/747 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

A23Y 2220/13 (2013.01)

C12R 1/225 (2013.01)

C12R 1/24 (2013.01)

C12R 1/25 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169(수탁번호 : KCCM 11663P).

청구항 2

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169(수탁번호 : KCCM 11663P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물.

청구항 3

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169(수탁번호 : KCCM 11663P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

비만, 지방간, 제2형 당뇨병, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 이상지질혈증, 동맥경화증 또는 상기 질환들 중 적어도 2개 이상이 동시다발적으로 발생하는 대사증후군의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 약학 조성물.

청구항 4

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169(수탁번호 : KCCM 11663P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하고,

비만, 지방간, 제2형 당뇨병, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 이상지질혈증, 동맥경화증 또는 상기 질환들 중 적어도 2개 이상이 동시다발적으로 발생하는 대사증후군의 예방 또는 개선을 위해 사용되는 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비만 억제 효능을 갖는 신규 유산균 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 김치에서 분리되고, 비만 억제 효능, 혈중 콜레스테롤 강하 효능, 혈중 중성지질 강하 효능, 항산화 효능 등과 같은 다양한 기능성을 가진 신규 유산균 및 이의 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인류가 풍요로운 사회로 점점 발전해 감에 따라 비만이 심각한 질병 중의 하나로 등장하게 되었고 이에 세계보건기구(WHO)는 비만을 치료해야 할 질병의 대상이라고 선언하였다. 비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환이며, 형태학적으로 볼 때 체내 지방 세포의 크기 증가(hypertrophy) 또는 수의 증가(hyperplasia)에 의해 초래된다. 비만은 서구사회에서 가장 흔한 영양장애일 뿐만 아니라, 최근 우리나라에서도 경제발전에 의한 식생활의 향상과 생활 방식의 서구화로 비만의 빈도가 급속히 증가하는 추세에 있어서 그 치료와 예방에 대한 중요성이 크게 부각되고 있다. 비만은 심리적으로 개인을 위축시킬 뿐만 아니라 사회적으로도 여러 가지 성인병의 발병 위험을 증가시키는 중요한 요인이다. 비만이 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심질환 등 여러 가지 성인병의 유병율 증가와 직접적인 관련이 있다고 알려져 있으며(Cell 87:377, 1999), 비만과 관련된 질환들을 함께 묶어서 대사증후군(metabolic syndrome) 또는 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)이라고 하며, 이들이 동맥경화증 및 심혈관질환의 원인으로 밝혀지고 있다. 이처럼 비만이 다양한 대

사성 질환의 발병률을 증가시키고 실제 체중감소가 이러한 질환의 발병률을 현격히 감소시킨다는 사실로부터 지방을 많이 함유하는 지방세포가 이러한 현상을 매개할 것이라고 유추해 볼 수 있다.

[0003]

과거에는 지방 조직은 과다한 에너지를 트리글리세롤(triacylglycerol)의 형태로 저장하고 필요할 때 방출하는 에너지 저장 기관으로만 생각되었으나, 최근에는 지방 조직이 아디포넥틴(adiponectin), 렙틴(leptin) 및 레지스틴(resistin) 등 여러 가지 아디포카인(adipokine)들을 분비하여 에너지의 항상성(homeostasis)을 조절하는 중요한 내분비 기관으로 받아들여지고 있다(Trends Endocrinol Metab 13:18, 2002). 따라서 지방 세포의 증식과 지방세포에서 분비되는 물질들에 대한 이해와 그 생체 내 조절 메카니즘에 대한 규명이 비만 및 그로 인한 여러 가지 질병들을 이해하고 효과적인 치료제를 개발할 수 있는 밑거름이 될 것으로 여겨지고 있고 이에 따라 지방세포 분화 조절에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 비만 환자에서의 증가한 지방세포의 유래와 관련하여 체내의 전구지방세포(preadipocytes)로부터 분화된다는 것이 가장 주된 기전으로 받아들여지고 있다. 전구지방세포의 지방세포로의 분화 과정은 3T3-L1과 같은 세포를 이용하여 연구되어 왔으며, 여러 종류의 전사인자(transcription factor)들, 특히 지방화에 관여하는 것으로 알려진 전사인자, C/EBPs(CAAT enhancer binding proteins), PPARs(Peroxisome Proliferator Activated receptor)와 ADD/SREBPs(Adipocyte determination and differentiation dependent factor1/sterol response element binding proteins) 등이 시간의 차이에 따라 발현하며 그 과정을 조절한다는 것이 알려져 있다(Bart A Jessen et al., Gene, 299, pp95-100, 2002; Darlington et al., J. Biol. Chem., 273, pp30057-30060, 1998; Brun R.P et al., Curr. Opin.Cell. Biol., 8, pp826-832, 1996). MDI(isobutylmethylxanthin, dexamethasone and insulin)와 같은 호르몬의 자극이 주어질 때, C/EBP β 와 δ 가 가장 먼저, 일시적으로 발현되며, 지방세포로의 분화를 개시하게 한다(Reusch J. E et al., Mol. Cell. Biol., 20, pp1008-1020, 2000). 이는 계속해서 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현증가를 유도하게 된다(James M.N. et al., J. Nutr., 130, pp3122S-3126S, 2000). PPAR γ 는 특히 지방세포 분화에 중요한 전사인자로 알려져 있으며, 레티논산 X 수용체(retinoic acid X receptor) 단백질(RXR)과 이합체(dimer)를 형성한 뒤, 다양한 지방세포 유전자의 프로모터(promoter)에 존재하는 PPRE(peroxisome proliferator response elements)에 결합한다 (Tontonoz P.E et al., Genes Dev., 8, pp1224-1234, 1994 ; Hwang, C. S et al., Cell Dev. Biol., 13, pp873-877). PPAR γ 와 C/EBP α 의 상호 작용이 성숙한 지방세포로의 분화에 매우 결정적인데, 이러한 전사인자들 및 지방세포 조절 인자들에 의해 지방세포로의 분화가 촉진되고, aP2(adipocyte fatty acid-binding protein 2)와 같은 지방세포 특이적 단백질 및 Fas(fatty acid synthase)와 같은 지방 대사 효소의 발현량이 증가한다. 더불어 ADD1/SREBPs는 지방 대사에도 중요한 역할을 하지만, 또한 분화과정에도 관여하는 것으로 알려졌다. 미성숙 지방세포에서 ADD1/SREBP1c가 발현되는 것은 PPAR γ 의 활성화에 기여하는 것으로 여겨진다(Rosen E.D. et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 16, pp145-171, 2000; Osborn T.F., J. Biol. Chem., 275, pp32379-32382, 2000). 분화과정을 마친 지방세포만이 지방산(fatty acid)을 합성하고 중성지질(triglycerides)을 저장하게 된다. 따라서, 현재 연구 동향은 비만 및 지질 관련 대사성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 지방세포 분화에 관한 대사과정을 저해할 수 있는 물질을 탐색하는데 초점이 맞추어져 있다. 즉, 비만의 발생 기전에 의거하여 지방세포 조절을 통해 비만을 치료하려는 시도가 이루어지고 있으며, 이것은 지방 합성을 억제하거나 지방 분해 및 산화를 촉진하여 지방 양을 감소시키려는 것과 지방세포 분화를 억제하여 지방세포 수를 감소시키려는 것으로, 이들 과정을 매개하거나 조절하는 것으로 알려진 전사인자들이나 단백질 그리고 지방세포 분비 물질들(adipokines)을 새로운 비만치료제 개발의 표적으로 떠오르게 하였다. 실제로 지방세포 분화 전사인자인 PPAR(Peroxisome proliferator-activated receptor) 패밀리, 지방세포 분비 물질인 렙틴(leptin) 및 아디포넥틴(adiponectin) 등은 많은 새로운 약제 개발의 표적이 되고 있다.

[0004]

현재까지 알려진 비만치료제로는 제니칼(Xenical, 로슈제약회사, 스위스), 리덕틸(Reductil, 에보트사, 미국), 엑소리제(Exolise, 아토파마, 프랑스) 등으로 크게 식욕억제제, 에너지소비 촉진제, 지방흡수억제제로 분류되며, 대부분의 비만치료제는 시상하부와 관련된 신경전달물질을 조절함으로써 식욕을 억제하는 식욕억제제이다. 그러나 종래의 치료제들은 심장질환, 호흡기질환, 신경계질환 등의 부작용과 함께 그 효능의 지속성도 낮아, 더욱 개선된 비만치료제의 개발이 필요하고 또한, 현재 개발되고 있는 제품도 부작용없이 만족할 만한 치료효과를 가지는 치료제는 거의 없어 새로운 비만치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0005]

이에 반해 안전한 미생물로 여겨져 온 유산균을 이용하여 혈중 콜레스테롤 수준을 감소시키고자 하는 노력 역시 많이 이루어졌다. 유산균은 장내 정상균총의 유지, 장내 균총의 개선, 항당뇨 및 항고지혈증 효과, 발암 억제, 대장염 억제, 그리고 숙주의 면역체계의 비특이적 활성화 등의 효과를 나타낸다고 보고되고 있다. 그 중에서도 락토바실러스 속 균주는 인체의 장내에 서식하는 정상 미생물 군집의 주요 구성원으로서, 건강한 소화기관과 장내 환경을 유지하는 데 있어서 중요한 것으로 오래 전부터 알려져 왔고 미국의 공중건강 가이드라인(U.S. Public Health Service guidelines)에 의하면, 현재 미국 균주 기탁기관(ATCC)에 기탁된 락토바실러스 균주 모

두 인체나 동물에 질병을 유발할 잠재적 위험에 대해서는 알려진 것이 없다고 인정되는 '안전수준(Bio-safety Level) 1'로 분류되어 있다.

- [0006] 한편, 김치 유산균은 김치 발효에 관여하는 유산균으로서 면역증강, 항 미생물, 항산화, 항암 효과, 항비만 효과, 고혈압 예방 또는 변비 예방 효과 등이 있는 것으로 보고되고 있다[Hivak P, Odrska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z. : One-year application of Probiotic strain *Enterococcus facium* M-74 decreases Serum cholesterol levels. : Bratisl lek Listy 2005; 106(2); 67-72; Agerholm-Larsen L. Bell ML. Grunwald GK. Astrup A. : The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol : a metaanalysis of short-term intervention studies ; Eur J Clin Nutr. 2000; 54(11) 856-860; Renato Sousa, Jaroslava Helper, Jian Zhang, Strephen J Lewis and Wani O Li ; Effect of *Lactobacillus acidophilus* supernants on body weight and leptin expression in rats ; BMC complementary and alternative medicine. 2008; 8(5)1-8]. 예를 들어, 대한민국공개특허공보 제10-2012-0034482호에는 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032(기탁번호 : KCCM-10430)이 개시되어 있고, 대한민국등록특허공보 제10-0996577호에는 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베티스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601(기탁번호 : KCTC 11456BP)이 개시되어 있고, 대한민국공개특허공보 제10-2013-0046896호에는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) DSR920(기탁번호 : KCCM 11210P)을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국공개특허공보 제10-2010-0010015호에는 혈중 콜레스테롤 저하 및 항비만 활성을 갖는 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) HF1 108 균주(KCTC 11356BP)가 개시되어 있다. 그러나, 상업적으로 성공할 만큼 항비만 효과가 우수한 유산균 관련 기술은 출현하지 않고 있는바, 항비만 효과가 우수한 새로운 균주의 스크리닝 및 이의 다양한 기능을 규명할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 이러한 종래 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 일 목적은 항비만 활성 등의 다양한 기능성을 갖는 신규 유산균을 제공하는데에 있다.
- [0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 신규 유산균의 다양한 용도를 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 발명자들은 합성 화학물질에 비해 안전성이 높은 항비만 소재를 개발하기 위하여, 김치 또는 사람 분변으로부터 무수한 유산균을 스크리닝하고, 이중 특정 락토바실러스속 균주들이 비만 유도 모델동물에 대해 우수한 비만 예방 또는 치료 효과를 가진다는 점을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 본 발명의 일 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) 및 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 락토바실러스속 유산균으로서, 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성 또는 항산화 활성을 갖는 유산균을 제공한다. 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 바람직하게는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56(수탁번호 : KCCM 11516P)다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101(수탁번호 : KCCM 11664P)이다. 또한, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169(수탁번호 : KCCM 11663P)이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) 및 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 락토바실러스속 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 바람직하게는 약학 조성물 또는 식품 조성물이다. 또한, 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 바람직하게는

락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56(수탁번호 : KCCM 11516P)다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101(수탁번호 : KCCM 11664P)이다. 또한, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169(수탁번호 : KCCM 11663P)이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 예는 대두, 더덕, 인삼 및 산수유씨로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) 및 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 락토바실러스속 유산균으로 발효시켜 수득한 발효물 또는 상기 발효물의 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 바람직하게는 약학 조성물 또는 식품 조성물이다. 또한, 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 바람직하게는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56(수탁번호 : KCCM 11516P)다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 바람직하게는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101(수탁번호 : KCCM 11664P)이다. 또한, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169(수탁번호 : KCCM 11663P)이다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주는 김치에서 분리되어 안전성이 높고, 우수한 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성 또는 항산화 활성 등과 같은 다양한 기능성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주는 비만, 지방간, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 및 지질 관련 대사증후군과 같은 질환을 예방, 개선 또는 치료하는데에 유용한 식의약 소재로 사용될 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 특정 바실러스속 균주로 대두, 더덕, 인삼 및 산수유씨를 발효시킨 산물 또는 이의 추출물도 비만 또는 비만 관련 질환을 예방, 개선 또는 치료하는데에 유용한 식의약 소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 유산균이 분화 억제에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 2는 유산균의 항산화 효능을 50% 저해농도(50% Scavenging Concentration)로 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 용어 "배양물"이란 미생물을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하여, 미생물이 포함되는 개념이다.

[0017] 본 발명에서 "약학적으로 허용가능한" 및 "식품학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환(예를 들어, 대장염)의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환(예를 들어, 대장염)의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0021] 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.

[0022] 본 발명에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환

을 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.

[0023] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0024] 본 발명의 일 측면은 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성 또는 항산화 활성 등과 같은 다양한 기능성을 갖는 신규 유산균에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규 유산균은 16S rDNA로 서열번호 1에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 16S rDNA로 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) 및 16S rDNA로 서열번호 4에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 락토바실러스속 균주이다. 이때, 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)는 그람 염색시 양성을 나타내는 간균이고, 탄소원으로 글루코오스(Glucose), 아미그달린(Amygdalin), 아라비노스(Arabinose), 에스쿨린(Esculin), 프럭토스(Fructose), 갈락토오스(Galactose), 락토오스(Lactose), 만노스(Mannose), 라피노스(Raffinose), 람노스(Rhamnose), 솔비톨(Sorbitol), 수크로오스(Sucrose) 및 자일로스(Xylose)를 이용하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 수탁번호가 KCCM 11516P인 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56이다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)는 그람 염색시 양성을 나타내는 간균이고, 탄소원으로 글루코오스(Glucose), 아미그달린(Amygdalin), 아라비노스(Arabinose), 에스쿨린(Esculin), 프럭토스(Fructose), 갈락토오스(Galactose), 글리세롤(Glycerol), 락토오스(Lactose), 만노스(Mannose), 멜리비오스(Melibiose), 라피노스(Raffinose), 솔비톨(Sorbitol), 수크로오스(Sucrose) 및 자일로스(Xylose)를 이용하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 수탁번호가 KCCM 11664P인 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101이다. 또한, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 그람 염색시 양성을 나타내는 간균이고, 탄소원으로 글루코오스(Glucose), 아미그달린(Amygdalin), 아라비노스(Arabinose), 에스쿨린(Esculin), 프럭토스(Fructose), 갈락토오스(Galactose), 글리세롤(Glycerol), 락토오스(Lactose), 만노스(Mannose), 멜레지토스(Melezitose), 멜리비오스(Melibiose), 라피노스(Raffinose), 람노스(Rhamnose), 솔비톨(Sorbitol), 수크로오스(Sucrose) 및 자일로스(Xylose)를 이용하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 수탁번호가 KCCM 11663P인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169이다.

[0025] 또한, 본 발명에 따른 신규 유산균은 16S rDNA로 서열번호 3에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156 또는 16S rDNA로 서열번호 5에 기재된 염기서열을 포함하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215을 더 포함할 수 있다. 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156은 그람 염색시 양성을 나타내는 간균이고, 탄소원으로 글루코오스(Glucose), 아미그달린(Amygdalin), 아라비노스(Arabinose), 에스쿨린(Esculin), 프럭토스(Fructose), 갈락토오스(Galactose), 글리세롤(Glycerol), 락토오스(Lactose), 만노스(Mannose), 멜리비오스(Melibiose), 라피노스(Raffinose), 솔비톨(Sorbitol) 및 수크로오스(Sucrose)를 이용하는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215은 그람 염색시 양성을 나타내는 간균이고, 탄소원으로 글루코오스(Glucose), 아미그달린(Amygdalin), 아라비노스(Arabinose), 에스쿨린(Esculin), 프럭토스(Fructose), 갈락토오스(Galactose), 락토오스(Lactose), 만노스(Mannose), 멜레지토스(Melezitose), 멜리비오스(Melibiose), 라피노스(Raffinose), 람노스(Rhamnose), 솔비톨(Sorbitol) 및 수크로오스(Sucrose)를 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명의 락토바실러스속 균주는 바람직하게는 배추김치 또는 갓김치와 같은 김치에서 분리된다.

[0027] 본 발명의 다른 측면은 신규 유산균의 다양한 용도에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명은 신규 유산균의 일 용도로 전술한 1종 이상의 락토바실러스속 균주로 이루어진 유산균, 이의 배양물, 이의 과채물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 유산균의 배양물은 락토바실러스속 배지에서 배양시켜 수득한 산물로서, 상기 배지는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 MRS 액체 배지, MRS 한천 배지일 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 신규 유산균의 다른 용도로 대두, 더덕, 인삼 및 산수유씨로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 전술한 1종 이상의 락토바실러스속 균주로 이루어진 유산균으로 발효시켜 수득한 발효물 또는 상기 발효물의 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 발효물의 추출물은 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 대두, 더덕, 인삼 및 산수유씨에서 선택되는 재료를 본 발명의 신규 유산균으로 발효시킨 산물로부터 추출물을 얻는 방법 또는 대두, 더덕, 인삼 및 산수유씨에서 선택되는 재료의 추출물을 본 발명의 신규 유산균으로 발효시키는 방법 등이 있다. 한편, 발효물의

추출물을 얻기 위해서는 추출 과정이 필요한데, 이때 추출 방법으로는 당업계에서 공지된 통상의 추출 방법, 예를 들어 용매 추출법을 사용할 수 있다. 용매 추출법을 이용하여 발효물의 추출물을 제조할 때 사용될 수 있는 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올(예를 들면, 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올) 또는 이들의 혼합물인 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 디에틸에테르, 에틸 아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 이중 물, 알코올 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것이 바람직하다. 추출 용매로 물을 사용하는 경우 물은 열수인 것이 바람직하다. 또한, 추출 용매로 알코올을 사용하는 경우 알코올은 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올인 것이 바람직하고, 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올에서 선택되는 것이 더 바람직하다. 또한, 추출 용매로 함수 알코올을 사용하는 경우 알코올 함량은 50~90%인 것이 바람직하다. 한편, 발효물의 추출물은 상기 추출 용매뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다. 예를 들어, 이산화탄소를 이용한 초임계 유체 추출법(supercritical fluid extraction)에 의한 추출, 초음파를 이용한 추출법에 의한 추출, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리 또는 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 및 추출방법을 통해 얻어진 활성 분획도 본 발명의 추출물에 포함된다. 일반적으로 초임계 유체는 기체가 고온 고압 조건에서 임계점에 도달하였을 때 갖는 액체 및 기체의 성질을 지니고 있으며, 화학적으로 비극성 용매와 유사한 극성을 지니고 있으며 이러한 특성으로 인해 초임계 유체는 지용성 물질의 추출에 사용되고 있다(J. Chromatogr. A. 1998;479:200-205). 이산화탄소는 초임계 유체기기의 작동으로 압력 및 온도가 임계점까지 이르는 과정을 거치면서 액체 및 기체 성질을 동시에 지닌 초임계 유체가 되고 그 결과 지용성 용질에 대한 용해도가 증가한다. 초임계 이산화탄소가 일정량의 시료를 함유한 추출 용기를 통과하게 되면 시료에 함유된 지용성 물질은 초임계 이산화탄소에 추출되어 나온다. 지용성 물질을 추출한 후 추출 용기에 남아있는 시료에 다시 소량의 공용매가 함유된 초임계 이산화탄소를 흘려 통과시키면 순수한 초임계 이산화탄소만으로는 추출되지 않았던 성분들이 추출되어 나오게 할 수 있다. 본 발명의 초임계 추출법에 사용되는 초임계 유체는 초임계 이산화탄소 또는 이산화탄소에 추가적으로 공용매를 혼합한 혼합유체를 사용함으로써 효과적으로 유효 성분을 추출할 수 있다. 이러한 공용매로 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 대부분 이산화탄소를 함유하고 있는데 이산화탄소는 실온에서 공기 중으로 휘발되고, 공용매는 감압증발기로 제거할 수 있다. 또한, 상기 초음파 추출법은 초음파 진동에 의해 발생하는 에너지를 이용하는 추출방법으로, 초음파가 수용성 용매 속에서 시료에 포함된 불용성인 용매를 파괴시킬 수 있으며, 이때 발생하는 높은 국부온도로 인하여 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하기 때문에 반응에 필요한 충분한 에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격효과로 높은 압력을 유도하여 시료에 함유된 물질과 용매의 혼합 효과를 높여주어 추출효율을 증가시키게 된다. 초음파 추출법에 사용할 수 있는 추출용매는 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸 에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 진공 여과하여 여과액을 회수한 후 감압증발기로 제거하고, 동결 건조하는 통상의 추출물 제조방법을 통해 추출물을 얻을 수 있다.

[0029] 본 발명의 특정 락토바실러스속 균주 또는 특정 락토바실러스속 균주로 발효시킨 발효물은 항비만 활성, 혈중 콜레스테롤을 저하 활성, 혈중 중성지방 저하 활성 등과 같은 다양한 기능성을 가지기 때문에 비만 또는 비만 관련 질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 유효성분으로 사용할 수 있다. 상기 비만 관련 질환은 비만에 의해 유발되거나 비만과 상관 관계가 높은 질환이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 지방간, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 및 지질 관련 대사증후군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 지질 관련 대사증후군은 당뇨병, 비만 등 여러 가지 대사성 질환이 한 사람에게 동시에 나타나는 질환을 의미한다. 또한, 본 발명의 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 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 또는 특정 락토바실러스속 균주로 발효시킨 발효물의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 비만 또는 비만 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에서 유효성분인 신규 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물; 또는 대두, 더덕, 인삼 및 산수유씨로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 신규 유산균으로 발효시켜 수득한 발효물 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 락토

즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 비만 또는 비만 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 신규 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물; 또는 대두, 더덕, 인삼 및 산수유씨로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 신규 유산균으로 발효시켜 수득한 발효물 또는 이의 추출물 외에 비만 또는 비만 관련 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, 봉해제, 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 스테레이트 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 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 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, 배설율 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.

[0031] 또한, 본 발명의 비만 또는 비만 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에서 유효성분인 신규 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물; 또는 대두, 더덕, 인삼 및 산수유씨로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 신규 유산균으로 발효시켜 수득한 발효물 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, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 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 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, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 솔비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0032] 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.

[0033] 1. 유산균의 분리 및 동정

[0034] (1) 김치로부터 유산균의 분리

[0035] 배추김치 및 갓김치를 MRS 액체 배지(MRS Broth; Difco, USA)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 MRS 한천 배지(MRS agar medium; Difco, USA)에 이식하고 37℃에서 약 24시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니

(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

(2) 사람 분변으로부터 유산균의 분리

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℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

(3) 선별한 유산균의 동정

김치 또는 사람 분변으로부터 분리한 균주들의 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석하여 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다. 하기 표 1에 배추김치 및 갓김치에서 분리된 유산균의 관리번호 및 균주명을 나타내었고, 하기 표 2에 사람 분변에서 분리한 유산균의 관리번호 및 균주명을 나타내었다.

표 1

관리 번호	균주명	관리 번호	균주명
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> C1	17	<i>Lactobacillus pentosus</i> C15
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> C2	18	<i>Lactobacillus pentosus</i> C27
3	<i>Lactobacillus mesenteroides</i> OK2	19	<i>Lactobacillus sakei</i> C14
4	<i>Lactobacillus curvatus</i> C3	20	<i>Lactobacillus sakei</i> C21
5	<i>Lactobacillus brevis</i> C4	21	<i>Lactobacillus sakei</i> C22
6	<i>Lactobacillus brevis</i> C5	22	<i>Lactobacillus sakei</i> C23
7	<i>Lactobacillus brevis</i> OK55	23	<i>Lactobacillus sakei</i> OK101
8	<i>Lactobacillus brevis</i> OK56	24	<i>Lactobacillus sakei</i> OK156
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> C9	25	<i>Lactobacillus plantarum</i> C12
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i> C20	26	<i>Lactobacillus plantarum</i> C24
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> OK75	27	<i>Lactobacillus plantarum</i> C25
12	<i>Lactobacillus lactis</i> C10	28	<i>Lactobacillus plantarum</i> C26
13	<i>Lactobacillus lactis</i> OK78	29	<i>Lactobacillus plantarum</i> C27
14	<i>Lactobacillus helveticus</i> C11	30	<i>Lactobacillus plantarum</i> OK169
15	<i>Lactobacillus helveticus</i> OK95	31	<i>Lactobacillus plantarum</i> OK215
16	<i>Lactobacillus casei</i> C13	32	<i>Lactobacillus plantarum</i> OK216

표 2

관리 번호	균주명	관리 번호	균주명
33	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> OK1	35	<i>Bifidobacterium breve</i> OK6
34	<i>Bifidobacterium longum</i> OK11	36	<i>Bifidobacterium bifidum</i> OK22

상기 표 1 및 표 2에 기재된 균주들 중 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215의 생리학적 특성 및 화학분류학적 특성은 하기 표 3과 같다.

표 3

시험 항목	균주 명				
	<i>Lactobacillus brevis</i> OK56	<i>Lactobacillus sakei</i> OK101	<i>Lactobacillus sakei</i> OK156	<i>Lactobacillus plantarum</i> OK169	<i>Lactobacillus plantarum</i> OK215
균의 형태	간균	간균	간균	간균	간균
그람 염색	+	+	+	+	+
카탈라제 활성	-	-	-	-	-
생육 온도	15℃	+	+	+	+
	35℃	+	+	+	+
생육 pH	4	+	+	+	+

	7	+	+	+	+	+
내열성(50℃)		+	+	+	+	+
API	Glucose	+	+	+	+	+
50CH	Amygdalin	+	+	+	+	+
Kit 당	Arabinose	+	+	+	+	+
발효	Esculin	+	+	+	+	+
시험	Fructose	+	+	+	+	+
	Galactose	+	+	+	+	+
	Glycerol	-	+	+	+	-
	Lactose	+	+	+	+	+
	Mannose	+	+	+	+	+
	Melezitose	-	-	-	+	+
	Melibiose	-	+	+	+	+
	Raffinose	+	+	+	+	+
	Rhamnose	+	-	-	+	+
	Sorbitol	+	+	+	+	+
	Sucrose	+	+	+	+	+
	Xylose	+	+	-	+	-
16S rDNA	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	서열번호 4	서열번호 5	

[0044] 각 균주의 16S rDNA 염기서열을 Genebank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56의 16S rDNA(서열번호 1 참조)는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) ATCC 367(NCBI ACCESSION : NR_075024)의 16S rDNA와 99%의 상동성을 보였고, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101의 16S rDNA(서열번호 2 참조)는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) NBRC 15893(NCBI ACCESSION : NR_113821)의 16S rDNA 부분 서열과 98%의 상동성을 보였고, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156의 16S rDNA(서열번호 3 참조)는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) NBRC 15893(NCBI ACCESSION : NR_113821)의 16S rDNA 부분 서열과 100%의 상동성을 보였고, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169의 16S rDNA(서열번호 4 참조)는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CIP 103151(NCBI ACCESSION : NR_104573)의 16S rDNA 부분 서열과 97%의 상동성을 보였고, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215의 16S rDNA(서열번호 5 참조)는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) JCM 1149(NCBI ACCESSION : NR_115605)의 16S rDNA 부분 서열과 99%의 상동성을 보였다.

[0045] 2. 유산균의 항비만 효능에 대한 in-vitro 실험

[0046] 마우스 전구지방세포인 3T3-L1을 12 well plate에 2×10^4 /ml의 농도로 분주한 후 37℃, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 이때, 배지로 100% confluency 시점이 될 때까지 3T3-L1 complete media[DMEM/high glucose (Thermo scientific, USA), newborn calf serum (Thermo scientific), 1% penicillin-streptomycin solution (Thermo scientific)]를 사용하였다. 100% confluency 시점이 되자 2일 동안 더 유지시켰다. 이후, MDI media(DMEM/high glucose, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin solution, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1μM dexamethazone, 5 μg/ml insulin)로 2일간 배양하여 전구지방세포의 지방세포로의 분화를 2일 동안 유도하였고, 분화를 유도한 날부터 2일 후 유산균과 함께 differentiation media(DMEM/high glucose, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin solution, 5 μg/ml insulin)를 첨가하고 2일 동안 배양하였다. 이때, 유산균은 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 현탁하여 첨가하였고, 첨가량은 1×10^4 CFU/well 이었다. 그 후, 2일 마다 4일 동안 growth media(DMEM/high glucose, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin solution)로 교체하여 지방세포로의 분화를 완료하였다.

[0047] 전구지방세포의 지방세포로의 분화를 8일 동안 유도한 후, 전구지방세포 배양액을 PBS로 3번 세척하여 배양액을 제거하고, 10% 포르말린으로 1시간 동안 처리하여 세포를 고정시켰다. 이후, 암실에서 오일 레드 O (Oil red O) 용액으로 세포를 30분 동안 처리하고 증류수로 세척하여 지방구를 염색하였다. 이후, 이소프로판올을 첨가하여 오일 레드 O (Oil red O) 용액으로 염색된 지방구 시료를 녹여내고, 스펙트로포토미터(Spectrophotometer)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 유산균의 지방세포 분화 억제율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$Inhibition(\%) = \frac{Control\ O.D. - Sample\ O.D.}{Control\ O.D.} \times 100$$

[0048]

[0049]

상기 식에서 Control O.D.는 시료 대신 에탄올을 가한 시험액의 흡광도이고, Sample O.D.는 시료를 가한 시험액의 흡광도이다.

[0050]

도 1은 3T3-L1 전지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 유산균이 분화 억제에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 1에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56의 분화 억제능이 가장 우수하였고, 그 다음으로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215 및 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156의 순이었다.

[0051]

3. 유산균의 항산화 효능에 대한 in-vitro 실험

[0052]

유산균을 10 mM 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 현탁하여 유산균의 농도가 각각 10, 1, 0.1, 0.01 mg/ml인 시료를 조제하고, 여기에 동량의 0.1 mM DPPH 용액(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 39.4mg을 에탄올에 용해시켜 1000ml가 되도록 조제한 용액)을 넣은 후 10초간 교반하고 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이후, 반응물에 대해 스펙트로포토미터(Spectrophotometer)를 이용하여 515 nm에서 측정하였다. 한편, 대조구로 시료 대신 에탄올을 가한 시험액을 사용하였다. 또한, 항산화 효능의 비교를 위해 레퍼런스로 Vitamin C를 사용하였다. 각 유산균의 저해율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$Inhibition(\%) = \frac{Control\ O.D. - Sample\ O.D.}{Control\ O.D.} \times 100$$

[0053]

[0054]

상기 식에서 Control O.D.는 시료 대신 에탄올을 가한 대조구의 흡광도이고, Sample O.D.는 시료를 가한 시험액의 흡광도이다.

[0055]

도 2는 유산균의 항산화 효능을 50% 저해농도(50% Scavenging Concentration)로 나타낸 그래프이다. 50% 저해농도(50% Scavenging Concentration)는 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 유산균 농도, 즉 저해율이 50%인 시료의 유산균 농도를 의미하며, 50% 저해농도가 작을수록 유산균의 항산화 효능이 크다는 것을 의미한다. 도 2에서 보이는 바와 같이 항산화 효능도 항비만 효능과 마찬가지로 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56이 가장 우수하였고, 그 다음으로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215 및 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156의 순이었다.

[0056]

4. 유산균의 항비만 효능에 대한 in-vivo 실험

[0057]

(1) 실험 방법

[0058]

4주령 수컷 C57BL/6J mice 총 42 마리를 온도 20±2℃, 습도 50±5% 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 chow diet(CD; Purina, Korea)로 1주간 적응시켰다. 이후, 실험동물을 2개의 그룹으로 나누어 정상 식이군(CON, n=6)에는 총 칼로리의 4.5%가 지방인 일반 식이를 5주간 공급하였고, 고지방 식이군(n=36)에는 총 칼로리의 45%가 지방인 고지방 식이(D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ)를 5주간 공급하여 비만을 유도하였다. 이후, 비만이 유도된 고지방 식이군을 6마리씩 6개의 그룹(HF, HF+OK56, HF+OK169, HF+OK101, HF+OK215, HF+OK156)으로 나눈 후, HF군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 5주간 경구투여하였고, HF+OK56군, HF+OK169군, HF+OK101군, HF+OK215군 및 HF+OK156군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 서로 다른 유산균을 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 현탁하여 5주간 경구투여하였다. 또한, 정상 식이군에는 일반 식이를 공급함과 동시에 HF군과 동일한 양의 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 5주간 경구투여하였다.

[0059]

(2) 체중 변화 및 식이 섭취량 측정

[0060]

전 실험기간 동안 매일 일정한 시각에 실험동물의 체중 및 식이 섭취량을 측정하였고, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

측정 항목	실험군						
	CON	HF	HF+OK56	HF+OK169	HF+OK101	HF+OK215	HF+OK156
초기 체중(g)	24.2	26.8	27.0	26.9	26.8	26.7	26.6
최종 체중(g)	27.2	38.5	33.5	34.3	34.5	35.1	35.2
체중 증가량(g)	4.0	11.5	6.5	7.4	7.7	8.4	8.6
체중 증가율(%)	16.5	42.9	24.0	27.5	28.7	31.4	32.8
식이 섭취량(g)	4.1	2.9	3.1	2.9	2.9	2.9	2.9

* CON : 일반 식이 급여군

* HF : 고지방 식이 급여군

* HF+OK56 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56 투여군

* HF+OK169 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169 투여군

* HF+OK101 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101 투여군

* HF+OK215 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215 투여군

* HF+OK156 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156 투여군

상기 표 4에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 유산균을 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 식이 섭취량은 큰 차이가 없었으나 체중이 유의적으로 감소하는 결과를 보였다. 이로부터 김치로부터 분리한 특정 유산균은 우수한 항비만 효능을 가짐을 알 수 있다.

(3) 간 및 지방조직의 무게 변화 측정

비만을 유도하고 5주간 유산균을 투여한 실험 동물을 심장천자(cardiac puncture)에 의해 희생시킨 후, 피하 지방조직(subcutaneous fat, SF), 부고환 지방조직(epididymal fat, EF), 신장주변 지방조직(perirenal fat, PF), 장간막 지방조직(mesenteric fat, MF), 갈색 지방조직(brown adipose tissue, BAT) 및 간을 적출하여 무게를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

측정 항목	실험군						
	CON	HF	HF+OK56	HF+OK169	HF+OK101	HF+OK215	HF+OK156
간(g)	1.11	1.12	1.11	1.03	1.12	1.15	1.09
부고환 지방조직(g)	0.38	2.11	1.50	1.55	1.65	1.75	1.85
신장주변 지방조직(g)	0.11	0.91	0.71	0.76	0.76	0.81	0.87
피하 지방조직(g)	0.41	2.01	1.67	1.73	1.73	1.75	1.85
장간막 지방조직(g)	0.20	0.72	0.57	0.58	0.68	0.61	0.62
갈색 지방조직(g)	0.07	0.17	0.16	0.16	0.16	0.17	0.17

* CON : 일반 식이 급여군

* HF : 고지방 식이 급여군

* HF+OK56 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)

OK56 투여군

[0076] * HF+OK169 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169 투여군

[0077] * HF+OK101 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101 투여군

[0078] * HF+OK215 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215 투여군

[0079] * HF+OK156 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156 투여군

[0080] 상기 표 5에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 유산균을 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 지방조직의 무게가 낮게 나타났다.

[0081] (4) 혈장 중성지질, 혈장 총 콜레스테롤 및 혈장 HDL 콜레스테롤 함량 측정

[0082] 비만을 유도하고 5주간 유산균을 투여한 실험 동물의 혈장 중성지질(plasma triglyceride), 혈장 총 콜레스테롤(plasma cholesterol) 및 혈장 HDL 콜레스테롤(plasma HDL) 함량을 다음과 같이 측정하였다.

[0083] 혈장 중성지질은 중성지질 측정용 키트(ASAN PHARM. CO. LTD, 대한민국)를 사용하여 측정하였다. 시험관에 효소 용액 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℃의 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℃의 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 10 분간 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℃의 수욕(water bath)에서 5분간 가온하고, 500nm에서의 흡광도를 측정하여 비색 정량하였다.

[0084] 하기 표 6에 실험군 별 혈장 총 중성지질, 총 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤 함량 측정 결과를 나타내었다.

표 6

측정 항목	실험군						
	CON	HF	HF+OK56	HF+OK169	HF+OK101	HF+OK215	HF+OK156
Plasma TG(mg/dl)	65.5	87.7	70.5	71.5	73.2	73.2	73.2
Plasma cholesterol(mg/dl)	93.3	184.5	149.5	156.5	158.9	161.2	166.5
Plasma HDL(mg/dl)	55.2	95.2	89.5	95.4	93.2	97.3	92.6

[0086] * CON : 일반 식이 급여군

[0087] * HF : 고지방 식이 급여군

[0088] * HF+OK56 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56 투여군

[0089] * HF+OK169 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169 투여군

[0090] * HF+OK101 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101 투여군

- [0091] * HF+OK215 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215 투여군
- [0092] * HF+OK156 : 고지방 식이 급여 및 1×10^9 CFU/mouse 용량의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156 투여군
- [0093] 상기 표 6에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 유산균을 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 혈장 중성지방 및 혈장 총 콜레스테롤의 함량이 유의적으로 감소하였다.
- [0094] **5. 유산균 발효물 등의 항비만 효능에 대한 in-vivo 실험**
- [0095] (1) 유산균 발효물 또는 이의 추출물의 제조
- [0096] * 유산균 발효 대두의 제조
- [0097] MRS 액체 배지(MRS Broth; Difco, USA) 10ml에 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56을 접종하고 약 24시간 동안 배양하였다. 이후, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56 배양액을 원심분리하여 배지를 제거하고 균체를 수득하였다. 이후, 탈지 대두 분말 10g을 물 90ml에 현탁하고 멸균시킨 후, 여기에 균체를 1×10^9 /ml 농도가 되도록 접종하고 약 3일 동안 배양하였다. 이후, 대두 및 유산균의 혼합 배양액을 동결 건조하여 유산균 발효 대두 분말을 수득하였다.
- [0098] * 유산균 발효 더덕 및 이의 추출물 제조
- [0099] MRS 액체 배지(MRS Broth; Difco, USA) 10ml에 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56을 접종하고 약 24시간 동안 배양하였다. 이후, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56 배양액을 원심분리하여 배지를 제거하고 균체를 수득하였다. 이후, 더덕 분말 10g을 물 90ml에 현탁하고 멸균시킨 후, 여기에 균체를 1×10^9 /ml 농도가 되도록 접종하고 약 3일 동안 배양하였다. 이후, 더덕 및 유산균의 혼합 배양액을 동결건조하여 유산균 발효 더덕 분말을 수득하였다. 또한, 더덕 및 유산균의 혼합 배양액에 배양액 대비 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 추출하고, 추출액을 감압 농축 후 동결건조하여 유산균 발효 더덕의 추출물을 수득하였다.
- [0100] * 유산균 발효 인삼 및 이의 추출물 제조
- [0101] MRS 액체 배지(MRS Broth; Difco, USA) 10ml에 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56을 접종하고 약 24시간 동안 배양하였다. 이후, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56 배양액을 원심분리하여 배지를 제거하고 균체를 수득하였다. 이후, 인삼 분말 10g을 물 90ml에 현탁하고 멸균시킨 후, 여기에 균체를 1×10^9 /ml 농도가 되도록 접종하고 약 3일 동안 배양하였다. 이후, 인삼 및 유산균의 혼합 배양액을 동결건조하여 유산균 발효 인삼 분말을 수득하였다. 또한, 인삼 및 유산균의 혼합 배양액에 배양액 대비 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 추출하고, 추출액을 감압 농축 후 동결건조하여 유산균 발효 인삼의 추출물을 수득하였다.
- [0102] * 유산균 발효 산수유씨 및 이의 추출물 제조
- [0103] MRS 액체 배지(MRS Broth; Difco, USA) 10ml에 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56을 접종하고 약 24시간 동안 배양하였다. 이후, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56 배양액을 원심분리하여 배지를 제거하고 균체를 수득하였다. 이후, 탈지 산수유씨 분말 10g을 물 90ml에 현탁하고 멸균시킨 후, 여기에 균체를 1×10^9 /ml 농도가 되도록 접종하고 약 3일 동안 배양하였다. 이후, 산수유씨 및 유산균의 혼합 배양액을 동결건조하여 유산균 발효 산수유씨 분말을 수득하였다. 또한, 산수유씨 및 유산균의 혼합 배양액에 배양액 대비 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 추출하고, 추출액을 감압 농축 후 동결건조하여 유산균 발효 산수유씨의 추출물을 수득하였다.
- [0104] (2) 동물실험 방법
- [0105] 4주령 수컷 C57BL/6J mice 총 36 마리를 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 chow diet(CD; Purina, Korea)로 1주간 적응시켰다. 이후, 실험동물을 2개의 그룹으로 나누어 정상 식이군(CON, n=6)에는 총 칼로리의 4.5%가 지방인 일반 식이를 5주간 공급하였고, 고지방 식이군(n=30)에는 총 칼로리의 45%가 지방인 고지방 식이(D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ)를 5주간 공급하여 비만을 유도하였다. 이후, 비만이 유도된 고지방 식이군을 6마리씩 5개의 그룹(HF, HF+SOK56, HF+COK56,

HF+POK56, HF+OOK56)으로 나눈 후, HF군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 5주간 경구투여하였고, HF+SOK56군, HF+COK56군, HF+POK56군 및 HF+OOK56군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 서로 다른 발효물 또는 이의 추출물을 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 현탁하여 5주간 경구투여하였다. 또한, 정상 식이군에는 일반 식이를 공급함과 동시에 HF군과 동일한 양의 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 5주간 경구투여하였다.

(3) 체중 변화 및 식이 섭취량 측정

전 실험기간 동안 매일 일정한 시각에 실험동물의 체중 및 식이 섭취량을 측정하였고, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

측정 항목	실험군					
	CON	HF	HF+SOK56	HF+COK56	HF+POK56	HF+OOK56
초기 체중(g)	25.2	27.0	26.8	26.9	26.8	27.8
최종 체중(g)	28.2	38.1	33.1	33.1	33.3	34.5
체중 증가량(g)	4.0	11.1	6.3	6.2	6.5	5.7
체중 증가율(%)	16.6	42.7	27.0	26.5	26.5	20.5
식이 섭취량(g)	4.1	2.9	3.1	2.9	2.9	3.1

* CON : 일반 식이 급여군

* HF : 고지방 식이 급여군

* HF+SOK56 : 고지방 식이 급여 및 100mg/kg체중 용량의 유산균 발효 대두 분말 투여군

* HF+COK56 : 고지방 식이 급여 및 50mg/kg체중 용량의 유산균 발효 더덕 추출물 투여군

* HF+POK56 : 고지방 식이 급여 및 50mg/kg체중 용량의 유산균 발효 인삼 추출물 투여군

* HF+OOK56 : 고지방 식이 급여 및 50mg/kg체중 용량의 유산균 발효 산수유씨 추출물 투여군

상기 표 7에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 유산균 발효물 또는 이의 추출물을 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 식이 섭취량은 큰 차이가 없었으나 체중이 유의적으로 감소하였다. 이로부터 특정 유산균으로 발효된 대두, 더덕, 인삼, 산수유씨 또는 이의 추출물은 우수한 항비만 효능을 가짐을 알 수 있다.

(3) 간 및 지방조직의 무게 변화 측정

비만을 유도하고 5주간 유산균 발효물 또는 이의 추출물을 투여한 실험 동물을 심장천자(cardiac puncture)에 의해 희생시킨 후, 피하 지방조직(subcutaneous fat, SF), 부고환 지방조직(epididymal fat, EF), 신장주변 지방조직(perirenal fat, PF), 장간막 지방조직(mesenteric fat, MF), 갈색 지방조직(brown adipose tissue, BAT) 및 간을 적출하여 무게를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

측정 항목	실험군					
	CON	HF	HF+SOK56	HF+COK56	HF+POK56	HF+OOK56
간(g)	1.07	1.12	1.08	1.05	1.08	1.10
부고환 지방조직(g)	0.38	2.10	1.20	1.35	1.40	1.54
신장주변 지방조직(g)	0.11	0.92	0.61	0.66	0.68	0.77
피하 지방조직(g)	0.41	2.11	1.65	1.63	1.65	1.63
장간막 지방조직(g)	0.21	0.71	0.58	0.58	0.57	0.56
갈색 지방조직(g)	0.08	0.17	0.15	0.15	0.15	0.17

- [0119] * CON : 일반 식이 급여군
- [0120] * HF : 고지방 식이 급여군
- [0121] * HF+SOK56 : 고지방 식이 급여 및 100mg/kg체중 용량의 유산균 발효 대두 투여군
- [0122] * HF+COK56 : 고지방 식이 급여 및 50mg/kg체중 용량의 유산균 발효 더덕 추출물 투여군
- [0123] * HF+POK56 : 고지방 식이 급여 및 50mg/kg체중 용량의 유산균 발효 인삼 추출물 투여군
- [0124] * HF+OOK56 : 고지방 식이 급여 및 50mg/kg체중 용량의 유산균 발효 산수유씨 추출물 투여군
- [0125] 상기 표 8에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 유산균 발효물 또는 이의 추출물을 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 지방조직의 무게가 낮게 나타났다.
- [0126] **6. 유산균 등을 포함하는 약학 조성물의 제조**
- [0127] 하기의 약학 조성물 제조에서 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56 배양물은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215 등과 같은 유산균의 배양물 또는 상기 유산균들로 대두, 더덕, 인삼, 산수유씨 등을 발효시켜 제조한 발효물 또는 상기 발효물의 추출물로 대체가 가능하다.
- [0128] <6-1> 산제의 제조
- [0129] *Lactobacillus brevis* OK56 배양물 20 mg
- [0130] 유당 100 mg
- [0131] 탈크 10 mg
- [0132] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0133] <6-2> 정제의 제조
- [0134] 제조예 2의 발효 더덕 추출물 10 mg
- [0135] 옥수수전분 100 mg
- [0136] 유 당 100 mg
- [0137] 스테아린산 마그네 2 mg
- [0138] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0139] <6-3> 캡슐제의 제조
- [0140] 제조예 2의 발효 더덕 추출물 10 mg
- [0141] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0142] 유 당 15 mg
- [0143] 스테아린산 마그네슘 0.2 mg
- [0144] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0145] <6-4> 환의 제조
- [0146] 제조예 2의 발효 더덕 추출물 10 mg
- [0147] 유당 150 mg
- [0148] 글리세린 100 mg
- [0149] 자일리톨 50 mg

- [0150] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [0151] <6-5> 과립의 제조
- [0152] 제조예 2의 발효 더덕 추출물 15 mg
- [0153] 대두추출물 50 mg
- [0154] 포도당 200 mg
- [0155] 전분 600 mg
- [0156] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섞씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [0157] <6-6> 주사제의 제조
- [0158] 제조예 2의 발효 더덕 추출물 10 mg
- [0159] 소듐 메타비설파이트 3.0 mg
- [0160] 메틸파라벤 0.8 mg
- [0161] 프로필파라벤 0.1 mg
- [0162] 주사용 멸균증류수 적량
- [0163] 상기의 성분을 혼합한 후, 이중 2ml를 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.
- [0164] **7. 유산균 등을 포함하는 식품 조성물의 제조**
- [0165] 하기의 식품 조성물 제조에서 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56 배양물은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK156, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK215 등과 같은 유산균의 배양물 또는 상기 유산균들로 대두, 더덕, 인삼, 산수유씨 등을 발효시켜 제조한 발효물 또는 상기 발효물의 추출물로 대체가 가능하다.
- [0166] <7-1> 밀가루 식품의 제조
- [0167] 밀가루 100 중량부에 제조예 2의 발효 더덕 추출물 0.5 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [0168] <7-2> 유제품(dairy products)의 제조
- [0169] 우유 100 중량부에 제조예 2의 발효 더덕 추출물 0.5 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0170] <7-3> 전식의 제조
- [0171] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0172] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0173] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 제조예 2의 발효 더덕 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- [0174] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 17 중량부, 보리 20 중량부),
- [0175] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
- [0176] 제조예 2의 발효 더덕 추출물(1 중량부),
- [0177] 영지(0.5 중량부),
- [0178] 지황(0.5 중량부)

- [0179] <7-4> 건강음료의 제조
- [0180] 액상과당(0.5 g), 올리고당(4 g), 설탕(2 g), 식염(0.5 g), 물(77 g)과 같은 부재료와 제조예 2의 발효 더덕 추출물 1 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.
- [0181] <7-5> 야채 주스의 제조
- [0182] 제조예 2의 발효 더덕 추출물 2 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.
- [0183] <7-6> 과일 주스의 제조
- [0184] 제조예 2의 발효 더덕 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.
- [0185] **8. 유산균의 수탁 정보**
- [0186] 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) OK56을 2014년 2월 5일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터에 특허기탁 하여 KCCM 11516P의 수탁번호를 부여받았다. 또한, 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK101을 2014년 2월 5일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터에 안전기탁 하여 KCCM 80070의 수탁번호를 부여받았고, 2015년 1월 28일자에 특허기탁으로 변경하여 KCCM 11664P의 수탁번호를 부여받았다. 또한, 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) OK169를 2014년 2월 5일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터에 안전기탁 하여 KCCM 80069의 수탁번호를 부여받았고, 2015년 1월 28일자에 특허기탁으로 변경하여 KCCM 11663P의 수탁번호를 부여받았다.
- [0187] 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.

수탁번호

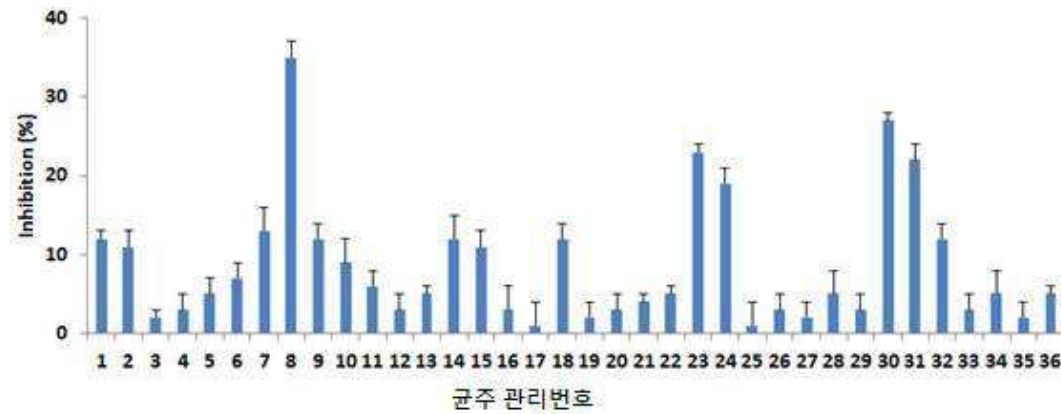
- [0188]
- 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
- 수탁번호 : KCCM11516P
- 수탁일자 : 20140205
- 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
- 수탁번호 : KCCM11664P
- 수탁일자 : 20150128
- 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
- 수탁번호 : KCCM11663P
- 수탁일자 : 20150128
- 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
- 수탁번호 : KCCM80070
- 수탁일자 : 20140205
- 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM80069

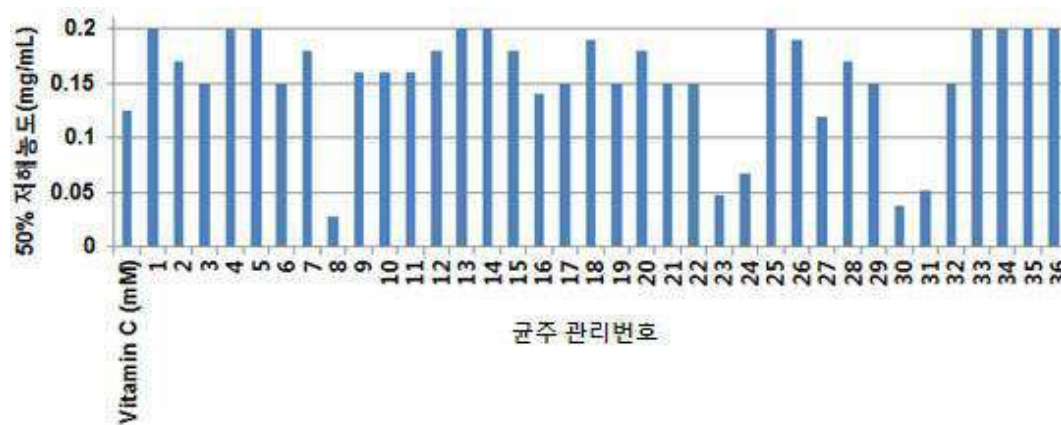
수탁일자 : 20140205

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Novel Lactobacillus plantarum having anti-obesity effect and use thereof
- <130> DP-16-612
- <150> 10-2014-0018105
- <151> 2014-02-17
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 1392

<212> DNA

<213> 16S rDNA of *Lactobacillus brevis* OK56

<400> 1

agtcgaacga gcttccgttg aatgacgtgc ttgactgat ttcaacaatg aagcgagtgg 60

cgaactggtg agtaacacgt ggggaatctg cccagaagca ggggataaca ctitggaaca 120

ggtgctaata ccgtataaca acaaaatccg catggatttt gtttgaaagg tggcttcggc 180

tatcacttct ggatgatccc gcggcgattt agttagttag tgaggtaaag gccaccaag 240

acgatgatac gtagccgacc tgagagggtt atcgccaca ttgggactga gacacggccc 300

aaactcctac gggaggcagc agtagggaat ctccacaat ggacgaaagt ctgatggagc 360

aatgccgctg gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact ctgttgttaa agaagaacac 420

ctttgagagt aactgttcaa gggttgacgg tatttaacca gaaagccacg gctaactacg 480

tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttgc cggattttatt gggcgtaaag 540

cgagcgcagg cggtttttta agtctgatgt gaaagccttc ggcttaaccg gagaagtga 600

tcggaaactg ggagacttga gtgcagaaga ggacagtga actccatgtg tagcgttga 660

atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc tgtctagtct gtaactgacg 720

ctgaggctcg aaagcatggg tagcgaacag gattagatac cctggtagtc catgccgtaa 780

acgatgagtg ctaagtgtg gaggtttcc gcccttcagt gctgcagcta acgcattaag 840

cactccgctt ggggagtagc accgcaaggt tgaactcaa aggaattgac gggggccccg 900

acaagcgggt gagcatgtgg tttaattcga agctacgca agaaccttac caggtcttga 960

catcttctgc caatcttaga gataagacgt tcccttcggg gacagaatga caggtggtgc 1020

atggttctgc tcagctctg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgaacg agcgcaaccc 1080

ttattatcag ttgccagcat tcagttgggc actctggtga gactgccggt gacaaaccgg 1140

aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg acctgggcta cacacgtgct 1200

acaatggacg gtacaacgag tcgcgaagtc gtgaggctaa gctaattctt taaagccgtt 1260

ctcagttcgg attgtaggct gcaactcgcc tacatgaagt tggaatcgct agtaatcgcg 1320

gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag acaccgcccg tcacaccatg 1380

agagtttga ac 1392

<210> 2

<211> 1308

<212> DNA

<213> 16S rDNA of *Lactobacillus sakei* OK101

<400> 2

tgggggataa catttgaaa ctgatgctaa taccgcataa aacctaacac cgcattggtgt 60
agggttgaaa gatggtttcc gctatcactt taggatggac ccgcgggtgca ttacttagtt 120
ggtgaggtaa aggtcacca agaccgtgat gcatagccga cctgataggg taatcggcca 180
ccctgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcaataggga atcttccaca 240
atggacgaaa gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aaggttttcg gatcgtaaaa 300

ctctgttgtt ggagaagaat gtatctgata gtaactgac aggtagtac ggtatccaac 360
cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtatgtg gcaagcgttg 420
tccggattta ttggcgtaa agcagcgcga ggccggttct taagtctgat gtgaaacct 480
tcggctcaac cgaagaagt catcggaac tgggaaactt gattgcagaa gaggacagt 540
gaactccatg ttagcgggtg aaatgcgtag atatattgaa gaacaccagt ggcaaggcg 600
gctgtctggt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagcatg ggtagcaaac aggattagat 660
accctggtag tccatgccgt aaacgatgag cgctaggtgt tggagggttt ccgcccttca 720

gtgccgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc 780
aaaggaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc 840
gaagaacctt accaggtctt gacatccttt gaccacttta gagatagagc ttccctttg 900
gggacaaagt gacaggtggt gcatggttgt tgtcagctcg tgttgtgaga tgttgggtta 960
agtcccgcaa cgagcgcaac cttattact agttgccagc atttagttgg gcactttagt 1020
gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggaagacg tcaaatcatt atgccctta 1080
tgacctgggc tacacacgtg gtacaatgga tggtaaacg agttgcgaga ccgcgaggtt 1140

tagctaattt tttaaaacca ttttcagttt ggattgtagg ttgcaacttg cctacatgaa 1200
gctggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcgggtg aatacgttcc cgggctttgt 1260
acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agccggtg 1308

<210> 3

<211> 1393

<212> DNA

<213> 16S rDNA of *Lactobacillus sakei* OK156

<400> 3

ttaagattga aggagcttgc tctgattga taaacatttg agtgagtggc ggacgggtga 60
gtaacacgtg ggtaacctgc cctaaagtgg gggataacat ttggaacag atgctaatac 120

cgcataaaac ctaacaccgc atgggttagg gttgaaagat ggtttcggct atcacttttag 180

gatggacccg cggatgcatta gttagttagt gaggtaaagg ctacccaaga ccgtgatgca 240

tagccgacct gagagggtaa tcggccacac tgggactgag acacggccca gactcctacg 300

ggaggcagca gtagggaatc ttccacaatg gacgaaagtc tgatggagca acgccgcgtg 360

agtgaagaag gttttcggat cgtaaaactc tgttgttga gaagaatgta tctgatagta 420

actgatcagg tagtgacggt atccaaccag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc 480

gcggtataac gtaggtggca agcgttgtcc ggattttattg ggctlaaagc gagcgcaggc 540

ggtttcttaa gtctgatgtg aaagccttcg gctcaaccga agaagtgcac cggaaactgg 600

gaaacttagg tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcggtgaaa tgcgtagata 660

tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct gtctggctctg taactgacgc tgaggctcga 720

aagcatgggt agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc atgccgtaaa cgatgagtgc 780

taggtgttgg agggtttccg ccttcagtg ccgcagctaa cgcattaagc actccgcctg 840

gggagtacga ccgcaaggtt gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgc caagcggtagg 900

agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac atcctttgac 960

cactctagag atagagcttt ccttcggggg acaaagtac aggtggtgca tggttgtcgt 1020

cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tattactagt 1080

tgccagcatt tagttgggca ctctagttag actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg 1140

gacgagctca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta caatggatgg 1200

tacaacgagt tgcgagaccg cgaggttttag ctaatctctt aaaaccattc tcagttcgga 1260

ttgtaggctg caactcgctt acatgaagcc ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgc 1320

cgcggtgaat acgttcccgg gccttgata caccgcccgt cacacatga gagttttgaa 1380

cacccaaagc cgg 1393

<210> 4

<211> 245

<212> DNA

<213> 16S rDNA of Lactobacillus plantarum OK169

<400> 4

ttccgcctgg ggagtacggc cgcaagggtt aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac 60

aagcgggtgga gcatgtggtt taattcgaag ctacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca 120

tcctatgaaa atttaagaga tgagacgttc ccttcgggga catggataca ggtgggtgcat 180

ggttgtcgtc agctcgtgtt gtgaaatgtt ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt 240

atcct 245

<210> 5

<211> 1378

<212> DNA

<213> 16S rDNA of Lactobacillus plantarum OK215

<400> 5

ggtgcttgca tcatgattta catttgagtg agtggcgaac tggtagtaa cacgtgggaa 60

acctgcccag aagcggggga taacacctgg aaacagatgc taataccgca taacaacttg 120

gaccgcatgg tccgagcttg aaagatggct ttggctatca cttttggatg gtcccgcggc 180

gtattagcta gatgggtggg taacggctca ccatggcaat gatacgtagc cgacctgaga 240

gggtaatcgg ccacattggg actgagacac ggcccaaact catacgggag gcagcagtag 300

ggaatcttcc acaatggacg aaagtctgat ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaagggtt 360

tcggctcgta aaactctgtt gttaaagaag aacatatctg agagtaactg ttcaggtatt 420

gacggtattt aaccagaaa ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag 480

gtggcaagcg ttgtccggat ttattgggcg taaagcgagc gcagcggtt ttttaagtct 540

gatgtgaaag ctttcggctc aaccgaagaa gtgcatcgga aactgggaaa cttgagtga 600

gaagaggaca gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatatg gaagaacacc 660

agtggcgaag gcggtgtct ggtctgtaac tgacgtgag gctcgaaagt atgggtagca 720

aacaggatta gataccctgg tagtccatac cgtaaacgat gaatgctaag tgttggaggg 780

tttccgccct tcagtgtgc agctaacgca ttaagcattc cgcctgggga gtacggccgc 840

aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cgggtggagca tgtggtttaa 900

ttcgaagcta cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatac tatgcaaac taagagatta 960

gacgttcctt tcggggacat ggatacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg 1020

agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aaccttatt atcagttgcc agcattaagt 1080

tgggcactct ggtgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaac 1140

atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggatggtaca acgagttgcg 1200

aactcgcgag agtaagctaa tctcttaaag ccattctcag ttcggattgt aggctgcaac 1260

tcgcctacat gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatcgt 1320

tcccggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagt ttgtaacacc caaagtcg 1378