(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 6 월 25 일 (25.06.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/130471 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) *A61P 3/06* (2006.01)
A61K 35/747 (2014.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) *A61P 25/18* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/017441

(22) 국제출원일: 2019 년 12 월 11 일 (11.12.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0164469 2018 년 12 월 18 일 (18.12.2018) KR

(71) 출원인: **동화약품주식회사 (DONG WHA PHARM. CO., LTD.)** [KR/KR]; 04522 서울시 중구 남대문로 9길 24, 6-8층 (다동), Seoul (KR). **경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY)** [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제컴퍼스내), Gyeonggi-do (KR).

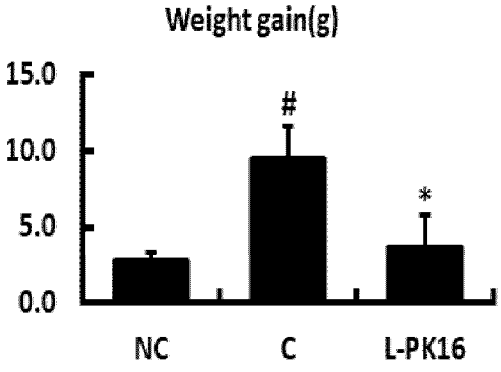
(72) 발명자: **나규흠 (NA, Kyu Heum)**; 16707 경기도 수원시 영통구 영통로 460, 314동 1303호 (영통동, 대우 동신아파트), Gyeonggi-do (KR). **장환봉 (CHANG, Hwan Bong)**; 17079 경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 10, 115동 803호 (보라동, 민속마을 쌍용아파트), Gyeonggi-do (KR). **오성준 (OH, Seong Jun)**; 16875 경기도 용인시 수지구 현암로125번길 11, 714동 901호 (죽전동, 새터마을죽전힐스테이트), Gyeonggi-do (KR). **한명주 (HAN, Myung Joo)**; 02823 서울시 성북구 선잠로 92-24 (성북동), Seoul (KR). **김동현 (KIM, Dong Hyun)**; 02823 서울시 성북구 선잠로 92-24 (성북동), Seoul (KR).

(74) 대리인: **임상엽 (LIM, Sang Yeob)**; 04788 서울시 성동구 광나루로 130, 7층 704호 (성수동1가, 서울숲IT캐슬), Seoul (KR).

WO 2020/130471 A1

(54) **Title:** NOVEL LACTOBACILLUS HAVING EFFECT OF REDUCING BODY WEIGHT OR BODY FAT AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 체중 또는 체지방 감소 효능을 갖는 신규 유산균 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention provides a novel Lactobacillus strain isolated from kimchi. The particular Lactobacillus strain, according to the present invention, is isolated from kimchi and thus, has high safety and various functions such as excellent anti-obesity activity, body fat reducing activity, blood glucose control activity, blood glucose lowering activity, blood cholesterol lowering activity, blood neutral lipid lowering activity, endotoxin production inhibitory activity of intestinal microbiota, arteriosclerosis inhibitory activity, anti-inflammatory activity, stress relieving activity, anti-anxiety activity, cognitive function improving activity, etc. Also, the particular Lactobacillus strain according to the present invention has excellent thermal stability. Therefore, the particular Lactobacillus strain according to the present invention can be used as a material for medicine or functional health food to prevent, improve, or treat obesity, diabetes, fatty liver, dyslipidemia, arteriosclerosis, metabolic syndrome, endotoxemia, inflammatory disease, stress, anxiety disorder, cognitive dysfunction, etc.

(57) **요약서:** 본 발명은 김치에서 분리된 신규 락토바실러스속 균주를 제공한다. 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주는 김치에서 분리되어 안전성이 높고, 우수한 항비만 활성, 체지방 감소 활성, 혈당 조절 활성, 혈당 강하 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지질 저하 활성, 장내 미생물의 내독소 생산 억제 활성, 동맥경화 억제 활성, 염증 억제 활성, 스트레스 완화 활성, 항불안 활성, 인지기능 개선 활성 등과 같은 다양한 기능성을 갖는다. 또한, 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주는 우수한 열안정성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주는 비만, 당뇨병, 지방간, 이상지질혈증, 동맥경화증, 대사증후군, 내독소혈증, 염증질환, 스트레스, 불안 장애, 인지기능 장애 등을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 의약품 또는 건강기능식품의 소재로 사용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 체중 또는 체지방 감소 효능을 갖는 신규 유산균 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 신규 유산균에 관한 것으로서, 더 상세하게는 김치에서 분리되고, 비만 억제 효능, 체지방 감소 효능, 혈당 조절 효능, 혈중 콜레스테롤 강하 효능, 혈중 중성지질 강하 효능, 내독소 강하 효능, 동맥경화 억제 효능, 염증 억제 효능 등과 같은 다양한 기능성을 가진 신규 유산균에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 신규 유산균의 다양한 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 신규 유산균의 비만, 지방간, 당뇨, 이상지질혈증, 내독소혈증, 대사 증후군, 지질 관련 대사성 질환 또는 대장염을 포함한 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 인류가 풍요로운 사회로 점점 발전해 감에 따라 생활습관이 급속하게 서구화되면서 질병의 양상도 크게 변하고 있다. 특히, 현대인에게 복부 비만, 고지혈증, 당뇨병, 고혈압 등이 증가하고 있는데, 이러한 질병은 생활습관의 변화에 따른 질병이란 의미로 생활습관병(lifestyle-related disease)이라고도 한다. 생활습관병 중 비만, 고지혈증, 당뇨병, 고혈압은 심뇌혈관 질환의 중요한 위험인자로 알려져 있고, 이러한 심뇌혈관 위험인자를 동시 다발적으로 갖고 있는 경우를 대사증후군이라고 한다. 즉, 대사증후군이란 인슐린 저항성이 심하며, 당뇨병과 심혈관질환의 위험성이 매우 높은 상태를 말하고, 대사증후군이 있는 경우에는 심혈관질환의 발생위험이 두 배 이상 높으며, 당뇨병이 발생할 확률은 10배 이상 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한, 생활습관병의 증가로 인해 관절염, 암 등과 같은 각종 만성 질병의 유병율도 높아지고 있는 실정이다.

[3] 생활습관병의 증가는 서구화된 식생활과 운동부족에서 크게 기인하는데, 특히, 식생활의 변화는 사람의 소화관 미생물총에 변화를 가져오고, 이로 인해 소화관 내에 소화관 미생물총이 생산하는 내독소가 증가하게 된다. 소화관 내에 내독소가 증가하는 경우 소화관 염증이 유발되고 내독소의 체내로의 흡수가 높아지며 대식세포의 지방조직 등으로의 이동을 촉진하여 비만 또는 고혈당을 유발하게 된다. 따라서, 소화관 미생물총이 생산하는 내독소를 제어하는 경우 체지방 감소, 콜레스테롤 저하, 혈당을 제어할 수 있고 궁극적으로 비만 또는 당뇨병을 개선하거나 치료할 수 있다.

[4] 비만은 에너지의 섭취와 소비가 불균형으로 인하여 체내에 에너지가 과잉으로 축적되어 상태를 말하며 일반적으로 표준체중의 20 %를 넘으면 비만으로 정의한다. 비만은 성인병을 유발시키는 촉진제가 되며 대사 장애로서 제2형

당뇨병, 동맥경화증의 발현 위험을 증가시키며, 심장의 혈액공급에 부담을 주게 되어 심장병에 걸리게 되며, 남은 지방은 간에 부담을 주어 지방간, 담석증, 간경변에 걸리게 된다. 또한, 몸무게가 뼈와 관절에 부담을 주어 골격이상이 생기며 행동이 둔화됨에 따라 활동력이 제한되므로 운동부족이 되어 비만이 더욱 심화되며, 특히 여성 비만은 내분비이상을 가져와 월경불순, 성욕감퇴, 출산 시 합병증, 피부 습진, 땀을 많이 흘리게 된다. 이와 같이 비만으로 인해 사회적 장애와 함께 과다한 지방으로 생기는 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 당뇨병, 지방간, 관절 이상의 발생비율이 현저하게 증가하고 있는 추세이다.

[5] 이에 발맞추어, 최근 유산균을 이용하여 복부 비만, 고지혈증, 당뇨병, 고혈압 등을 예방하거나 치료하는 연구가 계속 진행되고 있다. 예를 들어, 대한민국 등록특허공보 제10-1108428호에는 락토바실러스속 미생물(*Lactobacillus* sp.) BNR17을 이용한 비만의 예방 및 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-0686557호에는 락토바실러스속 미생물(*Lactobacillus* sp.) PL60을 이용한 비만의 예방 및 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1061219호에는 락토바실러스속 미생물(*Lactobacillus sp.*)로 발효시킨 돼지감자 발효 추출물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 및 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1010914호에는 체중과 지방 감소, 혈장 및 간 지질과 카르니틴 개선, 혈중 렙틴, 인슐린 농도 감소, 및 기억력 증진으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용도에 사용되기 위한 락토바실러스 플란타룸 엔유씨 엘지 42 균주(기탁번호: KCCM 10940P)가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1407980호에는 혈중 인슐린(insulin), 리지스틴(resistin), 포도당(glucose), C-펩티드(C-peptide) 및 중성지방(triglyceride)의 수치를 감소시키는 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601(기탁번호: KCTC 11456BP)과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032(기탁번호: KCCM10430)를 유효성분으로 함유하는 고인슐린혈증, 고혈당증 및 고중성지방혈증 개선용 건강기능식품이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1708173호에는 락토바실러스 사케이(Lactobacillus sakei) OK67(수탁번호 : KCCM11670P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 대사증후군, 염증 질환 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명은 이러한 종래의 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 장내 미생물의 내독소 생산을 억제하고 장내세균 군집을 변화시키고 CD11b+ 대식세포 및 CD11c+ 수지상세포를 억제하여 체중, 체지방, 혈당 또는 염증 반응

등을 조절하는 수 있는 다기능성 신규 유산균을 제공하는데에 있다. 또한, 본 발명의 목적은 신규 유산균의 다양한 용도를 제공하는데에 있다.

과제 해결 수단

[7] 본 발명의 발명자들은 합성 화학물질에 비해 안전성이 높은 항비만, 항당뇨 또는 항염증 소재를 개발하기 위하여, 김치로부터 무수한 유산균을 스크리닝하고, 이중 특정 락토바실러스속 균주들이 장내 미생물의 내독소 생산을 억제하고 장내세균 군집을 변화시키고 장내 CD11b+ 세포, CD11c+ 세포 및 CD11b+/CD11c+ 세포를 억제하여 체중, 체지방, 혈당 또는 염증 반응 등을 조절할 수 있다는 점을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[8] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 신규 유산균으로서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P)을 제공한다.

[9] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 체지방 감소용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고, 비만, 당뇨병, 지방간, 이상지질혈증, 동맥경화증 또는 상기 질환들 중 적어도 2개 이상이 동시다발적으로 발생하는 대사증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위해 사용되는 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 내독소혈증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 스트레스 완화용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 불안 장애 또는 인지기능 장애 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 예에

따른 조성물들은 의약품 또는 건강기능식품 등의 형태로 구현될 수 있다.

발명의 효과

[10] 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주는 김치에서 분리되어 안전성이 높고, 우수한 항비만 활성, 체지방 감소 활성, 혈당 조절 활성, 혈당 강하 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지질 저하 활성, 장내 미생물의 내독소 생산 억제 활성, 동맥경화 억제 활성, 염증 억제 활성, 스트레스 완화 활성, 항불안 활성, 인지기능 개선 활성 등과 같은 다양한 기능성을 갖는다. 또한, 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주는 우수한 열안정성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 특정 락토바실러스속 균주는 비만, 당뇨병, 지방간, 이상지질혈증, 동맥경화증, 대사증후군, 내독소혈증, 염증 질환, 스트레스, 불안 장애, 인지기능 장애 등을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 의약품 또는 건강기능식품의 소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[11] 도 1은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 2는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 증가량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[12] 도 3은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 부고환 지방조직 무게 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고 도 4는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 간장(liver) 무게 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[13] 도 5는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 총 콜레스테롤 함량 에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 6은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 중성지질에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[14] 도 7은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 내독소 함량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 8은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 분변 내독소 함량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[15] 도 9는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 공복 혈당(Fasting glucose) 수준에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[16] 도 10은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 경구 글루코오스

부하시험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 혈당 변화에 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 11은 도 10의 경구 글루코오스 부하시험 결과를 AUC(area under the glucose-time curve)로 나타낸 그래프이다.

[17] 도 12는 고지방 식이에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 대장 길이에 대해 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[18] 도 13은 고지방 식이에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 장내 CD11b+ 세포 및 장내 CD11b+/CD11c+ 세포에 대해 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 사진이다.

[19] 도 14는 고지방 식이에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 대장 조직의 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성에 대해 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[20] 도 15는 고지방 식이에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 장내세균 군집에 대해 미치는 영향을 실험군별로 분석한 결과이다.

[21] 도 16은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물을 대상으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 항불안 효능을 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test) 결과 중 마우스가 open arm에 머문 시간의 비율(OT, %)로 나타낸 것이다.

[22] 도 17은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물을 대상으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 항불안 효능을 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test) 결과 중 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율(OE, %)로 나타낸 것이다.

[23] 도 18은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물을 대상으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 인지기능 개선 효능을 Y-미로 시험(Y-maze test) 결과로 나타낸 것이다.

[24] 도 19는 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물을 대상으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 인지기능 개선 효능을 물체인지 시험(Novel object recognition test) 결과로 나타낸 것이다.

[25] 도 20은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물의 코티코스테론(corticosterone) 발현에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[26] 도 21은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물의 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6) 발현에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[27] 도 22는 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물의 BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 발현량 및 NF-kB 활성화(p-p65)에 대해

락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 웨스턴블로팅으로 측정한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[28] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

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

[30] 본 발명에서 사용되는 용어 "조성물"은 2가지 이상의 성분이 균일하게 혼합되어 있는 상태의 물질을 의미하며, 완제품뿐만 아니라 완제품 제조를 위한 중간 소재를 포함하는 개념이다.

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

[32] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[33] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[34] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소 또는 완화시키는 모든 행위를 의미한다.

[35] 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.

[36] 본 발명에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[37]

[38] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[39] 본 발명의 일 측면은 항비만 활성, 체지방 감소 활성, 혈당 조절 활성, 혈당 강하 활성 등과 같은 다양한 기능성을 갖는 신규 유산균에 관한 것이다.

[40] 본 발명의 일 예에 따른 신규 유산균은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P)이다. 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P)은 김치에서 분리되어 안전성이 높고, 서열번호 1에 기재된 염기서열로 이루어진 16S rDNA를 갖는다. 또한, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P)은 그람 염색시 양성을 나타내는 간균이고, 탄소원으로

L-아라비노스(L-arabinose), 리보스(Ribose), 갈락토오스(Galactose), 글루코오스(Glucose), 프럭토스(Fructose), 만노스(Mannose), 람노스(Rhamonse), N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), 셀로바이오스(Cellobiose), 락토스(Lactose), 멜리바이오스(Melibiose), 수크로오스(Sucrose), 트레할로스(Trehalose) 및 글루코네이트(Gluconate)를 이용한다.

[41] 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P)은 장내 미생물의 내독소 생산을 억제하고 장내세균 군집을 변화시키고 CD11b+ 대식세포, CD11c+ 수지상세포 및 CD11b+/CD11c+ 수지상세포를 억제하여 체중, 체지방, 혈당 또는 염증 반응 등을 조절할 수 있다. 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P)은 항비만 활성, 체지방 감소 활성, 혈당 조절 활성, 혈당 강하 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지질 저하 활성, 장내 미생물의 내독소 생산 억제 활성, 동맥경화 억제 활성 염증 억제 활성, 스트레스 완화 활성, 항불안 활성 또는 인지기능 개선 활성에서 선택되는 적어도 2개 이상의 활성을 가지며 바람직하게는 적어도 3개 이상의 활성을 갖는다. 구체적으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P)은 장내세균 군집 중에서 박테로이데테스(Bacteroidetes)를 증가시키고 피르미쿠테스(Firmicutes) 및 프로테오박테리아(Proteobacteria)를 감소시킨다. 장내 미생물 중 하나인 피르미쿠테스(Firmicutes)는 장내에서 당 발효를 증진시키고 지방산을 생성해 비만을 유도하는 균이다. 미국 워싱턴 대학 게놈과학센터의 제프리 고든 박사가 영국의 의학전문지 '네이처'지에서 발표한 연구논문에서는 '살찐 사람은 날씬한 사람에 비해 장에 서식하는 박테리아 가운데 박테로이데테스(bacteroidetes) 계열의 박테리아가 적은 반면, 피르미쿠테스(firmicutes)계열의 박테리아가 많다는 사실이 쥐 실험과 비만인 임상시험에서 확인되었다'고 보고하였다. 사람과 동물의 위장관에는 50가지 이상의 다른 문(phylum), 1000개 이상의 다른 종(species)의 세균이 있다. 이 중 5종의 문이 주를 이루는 데, 그중에서도 후벽균류(피르미쿠테스, Firmicutes)와 의간균류(박테로이데테스, Bacteroidetes)가 정상 장내미생물총의 80% 이상을 차지한다. 후벽균류가 많을수록 살이 더 잘 찌고 비만이 많으며, 의간균류가 많을수록 살이 빠지고 당뇨에 잘 걸리지 않는 것으로 알려져, 두 문(phylum)의 비율이 건강에 중요한 지표로 알려져 있다. 한편, 프로테오박테리아(Proteobacteria)는 염증을 유발하는 세균으로서 천식 및 만성폐쇄성폐질환(COPD)의 발병과 밀접한 관련이 알려져 있다. 또한, CD11b+ 대식세포, CD11c+ 수지상세포 및 CD11b+/CD11c+ 수지상세포는 염증 반응을 매개하는 것으로 알려져 있다.

[42] 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P)은 우수한 열안정성을 갖는다. 일반적으로 유산균을 제품화하는

경우 동결건조 또는 분무건조 등을 통해 분말화되고, 분말화된 유산균은 부형제와의 혼합, 마이크로캡슐화 등과 같은 다양한 가공을 거치게 된다. 유산균은 제품화 과정의 다양한 가공에 의해 소정의 열에 노출되고, 나아가 제품의 유통이나 보관 과정에서도 소정의 열에 노출될 수 있다. 따라서, 유산균의 제품화 측면에서 유산균의 열안정성은 매우 중요한 요소라 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16은 제품화 및 제품의 유통/보관 관점에서 매우 유리한 것으로 평가된다.

[43]

[44] 본 발명의 다른 측면은 신규 유산균의 다양한 용도에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 일 예는 신규 유산균의 용도로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 체지방 감소용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고, 비만, 당뇨병, 지방간, 이상지질혈증, 동맥경화증 또는 상기 질환들 중 적어도 2개 이상이 동시다발적으로 발생하는 대사증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위해 사용되는 조성물을 제공한다. 상기 대사증후군은 당뇨병, 비만 등 여러 가지 대사성 질환이 한 사람에게 동시에 나타나는 질환을 의미하며, 좁게는 지질 관련 대사증후군을 의미한다. 상기 이상지질혈증(dyslipidemia)은 혈중에 총콜레스테롤, LDL콜레스테롤, 중성지방이 증가된 상태거나 HDL콜레스테롤이 감소된 상태를 말하며, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 및 고중성지방혈증으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 이상지질혈증은 대부분 비만, 당뇨병, 음주와 같은 원인에 의해서 발생한다. 상기 고지혈증란 혈중에 콜레스테롤과 중성지방을 포함한 지질이 증가된 상태를 말한다. 고지혈증은 비록 증상을 나타내지 않을지라도 동맥경화나 심근경색과 같은 관상동맥질환의 위험을 증가시킬 수가 있다. 상기 고콜레스테롤혈증이란 혈중에 콜레스테롤이 증가된 상태로 총콜레스테롤과 LDL콜레스테롤이 높게 나타난다. 상기 고중성지방혈증이란 혈중에 중성지방이 증가된 상태를 말한다.

[45] 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 내독소혈증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 내독소혈증(endotoxemia)은 그람음성균의 세포벽 구성성분인 내독소(endotoxin)이 혈중에 유입되어 일어나는 병태를 말하며 원인별로는 감염성 내독소혈증과 비감염성 내독소혈증이 있다. 이 중 비감염성

내독소혈증은 자기의 소화관내 세균 유래라고 알려져 있다. 본 발명의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주는 내독소를 분비하는 장내 미생물의 증식을 억제하거나 장내 미생물의 내독소 생산을 억제할 수 있기 때문에 내독소혈증의 예방, 개선 또는 치료를 위한 유효성분으로 사용될 수 있다.

[46] 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 염증 질환은 염증 반응에 의해 유발되는 질환이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 아토피 피부염, 관절염 또는 대장염 등에서 선택된다. 본 발명의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주는 염증을 유발하는 장내세균 군집을 감소시키고 염증 반응을 매개하는 CD11b+ 대식세포 및 CD11c+ 수지상세포를 억제하기 때문에 염증 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 유효성분으로 사용될 수 있다.

[47] 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 스트레스 완화용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 불안 장애 또는 인지기능 장애 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명에서 사용되는 용어인 "인지기능 장애"는 기억 처리, 지각 또는 문제해결과 같은 인지기능을 정상적으로 발휘하지 못하는 증상이나 질환을 의미하며, 구체적으로 작업 기억, 주의력 및 경계(vigilance), 언어 학습 및 기억, 시각 학습 및 기억, 추론 (reasoning) 및 문제해결 예컨대 실행 기능, 처리속도 또는 사회 인지의 저하가 포함된다. 본 발명에서 상기 인지기능 장애는 주로 기억력 손상에 의해 유발된다.

[48] 본 발명에서 배양물은 락토바실러스속 균주를 배지에서 배양시켜 수득한 산물로서, 상기 배지는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 MRS 액체 배지, MRS 한천 배지, BL 한천 배지일 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 첨가제, 식품 조성물(특히 건강기능식품), 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있고, 조성물 내에서 유효성분인 특정 락토바실러스속 균주 등의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[49] 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분인 신규 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~99 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수

있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 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 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 신규 유산균, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물 외에 비만, 당뇨병, 지방간, 고지혈증, 심혈관 질환, 고혈압, 동맥경화증 또는 대사증후군의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 유효성분으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상 외에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67(수탁번호 : KCCM11670P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 더 포함할 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 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 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, 동결건조제제, 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이라면 크게 제한되지 않으며, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이,

투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으나 바람직하게는 유효성분을 기준으로 할 때 0.01 내지 2000 ㎎/㎏(body weight)이고, 더 바람직하게는 0.1 내지 1000 ㎎/㎏㎏(body weight)이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

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

[51]

[52] 본 발명에서 신규 유산균의 용도는 조성물 외에 다른 형태로 구현될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 예는 필요로 하는 개체에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주 또는 조성물을 투여하여 체지방을 감소시키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 필요로 하는 개체에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주 또는 조성물을 투여하여 혈당을 조절하거나 혈당을 강하시키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 필요로 하는 개체에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주 또는 조성물을 투여하여 비만, 당뇨병, 지방간, 이상지질혈증, 동맥경화증 또는 상기 질환들 중 적어도 2개 이상이 동시다발적으로 발생하는 대사증후군을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는

락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주 또는 조성물을 투여하여 내독소혈증을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주 또는 조성물을 투여하여 염증 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 조성물은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고, 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 식품학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으나 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주를 기준으로 할 때 바람직하게는 1×10^{9} 내지 1×10^{12} CFU/kg(body weight)이고, 더 바람직하게는 1×10^{10} 내지 1×10^{11} CFU/kg(body weight)이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[53]

[54] 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.

[55]

[56] **1. 유산균의 분리 및 동정**

[57] (1) 김치로부터 유산균의 분리

[58] 배추 김치를 파쇄하고, 파쇄액을 MRS 액체 배지(MRS Broth; Difco, USA)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 MRS 한천 배지(MRS agar medium; Difco, USA)에 이식하고 37℃에서 약 48 hr 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

[59]

[60] (2) 선별한 유산균의 동정

[61] 김치로부터 분리한 균주들의 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석하여 균주의 종을 확정하고, 이 중 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)에 해당하는 종만을 선별한 후 균주명을 부여하였다. 하기 표 1에 선별한 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)의 균주명, 그람 염색 특성 및 16S rDNA 서열 분석에 따른 상동성(Homology) 비교 결과 등을 정리하였다

[62]

[표1]

관리 번호	균주명	그람 염색 특성	*Lactobacillus sakei* 공시균과의 16S rDNA 상동성 비교(%)
1	*Lactobacillus sakei* PK1	+	98
2	*Lactobacillus sakei* PK2	+	99
3	*Lactobacillus sakei* PK3	+	100
4	*Lactobacillus sakei* PK4	+	99
5	*Lactobacillus sakei* PK5	+	99
6	*Lactobacillus sakei* PK6	+	99
7	*Lactobacillus sakei* PK7	+	99
8	*Lactobacillus sakei* PK8	+	99
9	*Lactobacillus sakei* PK9	+	99
10	*Lactobacillus sakei* PK10	+	98
11	*Lactobacillus sakei* PK11	+	99
12	*Lactobacillus sakei* PK12	+	99
13	*Lactobacillus sakei* PK13	+	99
14	*Lactobacillus sakei* PK14	+	99
15	*Lactobacillus sakei* PK15	+	99
16	*Lactobacillus sakei* PK16	+	99
17	*Lactobacillus sakei* PK17	+	98
18	*Lactobacillus sakei* PK18	+	99
19	*Lactobacillus sakei* PK19	+	100
20	*Lactobacillus sakei* OK67	+	99

[63] * *Lactobacillus sakei* OK67 : 본 발명의 발명자가 이전에 특허기탁(수탁번호 : KCCM11670P) 및 특허출원한 유산균으로서, 자세한 내용은 대한민국 등록특허공보 제10-1708173호에 개시되어 있음

[64]

[65] 상기 표 1에 기재된 균주들 중 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16은 그람 염색시 양성을 나타내는 혐기성 간균으로서, 생리학적 특성 중 탄소원 이용성은 하기 표 2와 같다. 하기 표 2에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 탄소원 이용성은 API Kit(모델명 : API 50 CHL;

제조사 : BioMerieux's, USA)에 의한 당 발효 시험으로 분석하였다. 또한, 하기 표에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타내고, "±"는 탄소원 이용성 여부가 모호한 경우를 나타내고, 공란은 미측정을 나타낸다.

[66]

[표2]

탄소원	균주 명			
	Lactobacillus sakei PK16	*Lactobacillus sakei* OK67	DSM20017 (ATCC15521) [a]	K-7 [b]
glycerol	-	-		
erythritol	-	±		
D-arabinose	-	±		
L-arabinose	+	-	+	-
D-ribose	+	+	+	
D-xylose	-	-		
L-xylose	-	-	-	
adonitol	-	-		
methyl-BD-xylopyranosicle	-	-		
D-galactose	+	+	+	-
D-glucose	+	+	+	
D-fructose	+	+	+	
D-mannose	+	+	+	
L-sorbose	-	-		
rhamnose	±	-	-	
dulcitol	-	-		
inositol	-	-		
mannitol	-	+		
sorbitol	-	+		
α-methyl-D-mannoside	-	+		
α-methyl-D-glucoside	-	-	-	
N-acetyl-glucosamine	+	+	+	
amygdalin	-	+		
arbutin	-	+	-	
esculin	+	+	+	

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

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

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

[69] 상기 표 2에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67과 매우 상이한 탄소원 이용성을 나타냈다.

[70]

[71] 또한, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 화학분류학적 특성으로 16S rDNA을 측정하였고, 그 결과 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 16S rDNA 염기서열을 Genebank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)의 BLAST 검색으로 동정한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) 균주는 검색되지 않았고, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) NBRC 15893(NCBI ACCESSION : NR_113821)의 16S rDNA 부분 서열과 99%의 상동성을 보였고 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67과도 99%의 상동성을 보였다.

[72]

[73] **2. 대장균의 내독소(endotoxin) 생산을 억제하고 열안정성을 갖는 유산균의 선별**

[74] (1) 실험방법

[75] 배추 김치에서 분리된 유산균들을 GAM(general anaerobic medium) 액체배지에 미리 배양하여 유산균 시료를 준비하였다. 또한, 대장균을 TSB(tryptic soy broth) 배지에서 미리 배양하여 대장균 시료를 준비하였다. 이후, 대장균과, 배추 김치에서 분리된 유산균들에서 선택된 어느 하나를 각각 1×10^5 CFU 및 1×10^5 CFU의 양으로 10㎖의 GAM(general anaerobic medium) 액체배지에 함께 이식하고 37℃에서 약 24 hr 동안 배양하였다. 이후, 배양액을 약 1 hr 동안 초음파로 처리하여 균의 세포 외막을 파괴하고, 5000×g의 조건으로 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 상등액에 존재하는 대표적인 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)의 함량을 LAL(Limulus Amoebocyte Lysate) assay kit(제조사 : Cape Cod Inc., USA)로 측정하였다. 또한, 배추 김치에서 분리된 유산균들의 열안정성을 평가하기 위하여 배양한 유산균을 동결건조하고 50℃에서 24 hr 동안 저장한 후, MRS 한천배지에 이식하여 혐기적 상태에서 배양하여 생존하고 있는 균수를 계수하여 생존율을 계산하였다.

[76] (2) 측정결과

[77] 하기 표 3은 배추 김치에서 분리된 유산균들의 대장균 내독소 생산 억제능 및 열안정성 측정 결과를 나타낸 것이다.

[78]

[표3]

관리 번호	균주명	대장균 내독소 생산 억제능	열안정성
1	*Lactobacillus sakei* PK1	+	-
2	*Lactobacillus sakei* PK2	+	-
3	*Lactobacillus sakei* PK3	+	+
4	*Lactobacillus sakei* PK4	+	+
5	*Lactobacillus sakei* PK5	-	-
6	*Lactobacillus sakei* PK6	+	+++(43%)
7	*Lactobacillus sakei* PK7	+	-
8	*Lactobacillus sakei* PK8	+	-
9	*Lactobacillus sakei* PK9	+	-
10	*Lactobacillus sakei* PK10	++	-
11	*Lactobacillus sakei* PK11	+	-
12	*Lactobacillus sakei* PK12	+	-
13	*Lactobacillus sakei* PK13	-	-
14	*Lactobacillus sakei* PK14	+	++
15	*Lactobacillus sakei* PK15	+	-
16	*Lactobacillus sakei* PK16	+++(55%)	+++(42%)
17	*Lactobacillus sakei* PK17	+	-
18	*Lactobacillus sakei* PK18	++	-
19	*Lactobacillus sakei* PK19	+	+
20	*Lactobacillus sakei* OK67	+++(63%)	-

[79] * 대장균 내독소 생산 억제능 : -, 1% 미만; +, 1% 이상 내지 10% 이하; ++, 10% 초과 내지 50% 이하; +++, 50% 초과

[80] * 열안정성 : -, 1% 미만; +, 1% 이상 내지 10% 이하; ++, 10% 초과 내지 30% 이하; +++, 30% 초과

[81]

[82] 상기 표 3에서 보이는 바와 같이 대장균 내독소 생산 억제능의 경우 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67이 가장 우수하였고, 그 다음으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이었다. 또한, 열안정성의 경우

락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK6과 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 가장 우수하였다. 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67의 경우 열안정성이 매우 떨어지는 것으로 나타났다.

[83] 일반적으로 유산균을 제품화하는 경우 동결건조 또는 분무건조 등을 통해 분말화되고, 분말화된 유산균은 부형제와의 혼합, 마이크로캡슐화 등과 같은 다양한 가공을 거치게 된다. 유산균은 제품화 과정의 다양한 가공에 의해 소정의 열에 노출되고, 나아가 제품의 유통이나 보관 과정에서도 소정의 열에 노출될 수 있다. 따라서, 유산균의 제품화 측면에서 유산균의 열안정성은 매우 중요한 요소라 할 수 있다. 본 발명의 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16은 대장균 내독소 생산 억제능 및 열안정성이 모두 우수하기 때문에 제품화 관점에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) OK67에 비해 매우 유리한 것으로 평가된다.

[84]

[85] **3. 유산균의 항비만 효능, 혈당 감소 효능 등에 대한 in-vivo 실험**

[86] (1) 실험방법

[87] 5주령 수컷 C57BL/6J 생쥐(체중 약 19~22g) 총 24마리를 2개의 그룹으로 나누어 저지방 식이군(n=8)에는 총 칼로리의 10%가 지방인 저지방 식이(제품 모델명 : D12450B; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 4주간 투여하였다. 또한, 고지방 식이군(n=16)에는 총 칼로리의 60%가 지방인 고지방 식이(제품 모델명 : D12492; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 4주간 투여하여 비만을 유도하였다. 이후, 저지방 식이군(NC군)에는 저지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 4주간 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다. 또한, 고지방 식이군을 8마리씩 2개의 그룹(C, L-PK16)으로 나눈 후 C군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 4주간 경구투여하고, L-PK16군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주를 1일 1회 1×10^{9} CFU/mouse의 용량으로 4주간 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다. 한편, 실험 종료 5일 전에 경구 글루코오스 부하시험을 진행하였다. 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주를 포함한 시험 시료의 경구투여 횟수는 1주일을 기준으로 6일이었다. 실험기간 동안 생쥐는 온도 20±2℃, 습도 50±5% 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 사육되었다. 실험 종료일에 실험동물의 체중 후, 부고환 지방조직(epididymal fat, EF) 무게, 간(liver) 무게, 혈장 총 콜레스테롤 함량, 혈장 중성지질 함량, 혈장 내독소, 분변 내독소, 혈당 등을 측정하였다.

[88]

[89] (2) 체중 변화, 지방조직 및 간의 무게 변화

[90] 도 1은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 2는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중

증가량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 또한, 도 3은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 부고환 지방조직 무게 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고 도 4는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 간장(liver) 무게 변화에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[91] 도 1 내지 도 4에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(Lactobacillus sakei) PK16 균주를 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 체중이 유의적으로 감소하였고, 지방조직의 무게도 더 낮게 나타났다.

[92]

[93] (3) 혈장 총 콜레스테롤, 혈장 중성지질, 혈장 내독소 및 분변 내독소 함량 측정

[94] 비만을 유도하고 4주간 유산균을 투여한 실험동물의 혈장 총 콜레스테롤(plasma cholesterol), 혈장 중성지질(plasma trigLyceride), 혈장 내독소 및 분변 내독소 함량을 다음과 같이 측정하였다.

[95] 시험 종료일에 실험동물의 심장으로부터 채혈하여 혈장을 분리하였다. 혈장 총 콜레스테롤은 총 콜레스테롤 측정용 키트(ASAN PHARM. CO. LTD, 대한민국)를 사용하여 측정하였다. 시험관에 효소용액 1.5㎖와 혈장 10㎕를 넣은 뒤 교반하였다. 이후, 총 콜레스테롤의 함량이 각각 0, 75, 150, 225, 300 ㎎/㎗인 표준 용액과 함께 시료를 37℃의 수욕(water bath)에서 10분간 가온하고, 500㎚에서의 흡광도를 측정하여 비색 정량하였다. 또한, 혈장 중성지질은 중성지질 측정용 키트(ASAN PHARM. CO. LTD, 대한민국)를 사용하여 측정하였다. 시험관에 효소용액 1.5㎖와 혈장 10㎕를 넣은 뒤 교반하였다. 이후, 중성지질의 함량이 각각 0, 75, 150, 225, 300 ㎎/㎗인 표준 용액과 함께 시료를 37℃의 수욕(water bath)에서 10분간 가온하고, 550㎚에서의 흡광도를 측정하여 비색 정량하였다.

[96] 도 5는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 총 콜레스테롤 함량 에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 6은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 중성지질에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 5 및 도 6에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주를 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 혈장 총 콜레스테롤 및 혈장 중성지질의 함량이 유의적으로 감소하였다.

[97] 혈장 내독소(Plasma Endotoxin) 및 분변 내독소(Fecal Endotoxin) 함량은 Limulus amoebocyte lysate (LAL) Assay Kit (Cape Cod Inc., E. Falmouth, MA, USA)을

사용하여 측정하였다. 도 7은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 혈장 내독소 함량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 8은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 분변 내독소 함량에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 7 및 도 8에서 보이는 바와 같이 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주를 투여한 군의 혈장 내독소 함량 및 분변 내독소 함량은 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 내독소는 다당류와 지질 부분을 포함하는 화학구조를 가지고 있고, 화학적으로 지질다당류(Lipopolysaccharide, 이하 'LPS'라 칭함)라고 불리우기도 한다. 세균의 내독소에 노출되게 되면 우리 몸은 즉시 면역반응을 개시한다. 면역반응 결과 신체는 여러 가지 염증(inflammation)과 관련된 세포들을 감염된 조직으로 모으고 면역매개 물질(Cytokine)들을 분비한다. 이러한 염증의 대표적 증상 중의 하나가 발열이므로 내독소도 발열물질(Pyrogen)로 간주된다. 하지만 이러한 염증반응이 과도하게 일어날 경우에는 신체보호를 위한 기전이 오히려 해가 되어 내독소혈증(Endotoxemia)을 유발하여 죽음에 이르게 할 수도 있다. 또한, 생활환경에서 내독소와 관련된 대표적인 질환이 천식이다. 천식은 과도한 면역반응에 따라 발생하는 알레르기성 질환으로, 호흡기를 통한 지속적인 내독소 노출이 만성 염증을 유발하고, 최종 천식으로 발전하게 된다. 더욱이 내독소 노출에 의해 천식 증상 등이 악화되는 것으로 알려져 있다.

[98]

[99] (4) 경구 글루코오스 부하시험(oral glucose tolerance test,OGTT)

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

[101] $AUC = 0.5\times(0.5\times C0+C15+C30+C60+C90+0.5\times C120)$

[102] 상기 식에서 C0, C15, C30, C60, C90 및 C120은 각각 순서대로 0분, 15분, 30분, 60분, 90분 및 120분 경과시에 측정한 글루코오스 농도이다.

[103] 도 9는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 공복 혈당(Fasting glucose) 수준에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

[104] 도 10은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 경구 글루코오스 부하시험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 혈당 변화에 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 11은 도 10의 경구 글루코오스 부하시험 결과를 AUC(area under the glucose-time curve)로 나타낸 그래프이다. 도

9 내지 도 11에서 보이는 바와 같이 고지방 식이 급여와 함께 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주를 투여한 군의 공복 혈당 및 AUC는 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다.

[105]

[106] **4. 유산균의 대장염 개선 효능에 대한 in-vivo 실험**

[107] (1) 실험방법

[108] 5주령 수컷 C57BL/6J 생쥐(체중 약 19~22g) 총 24마리를 2개의 그룹으로 나누어 저지방 식이군(n=8)에는 총 칼로리의 10%가 지방인 저지방 식이(제품 모델명 : D12450B; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 4주간 투여하였다. 또한, 고지방 식이군(n=16)에는 총 칼로리의 60%가 지방인 고지방 식이(제품 모델명 : D12492; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 4주간 투여하여 대장염을 유도하였다. 이후, 저지방 식이군(NC군)에는 저지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 4주간 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다. 또한, 고지방 식이군을 8마리씩 2개의 그룹(C, L-PK16)으로 나눈 후 C군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 4주간 경구투여하고, L-PK16군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주를 1일 1회 1×10^{9} CFU/mouse의 용량으로 4주간 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다.

[109] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주를 포함한 시험 시료의 경구투여 횟수는 1주일을 기준으로 6일이었다. 실험기간 동안 생쥐는 온도 20±2℃, 습도 50±5% 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 사육되었다. 실험 종료 후 실험동물을 이산화탄소로 질식시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하여 사용하였다.

[110]

[111] (2) 분석방법

[112] CD11b+ 대식세포 및 CD11c+ 수지상세포는 면역염색법으로 측정하였다.

[113] 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 측정하기 위하여 대장조직 100㎎에 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide 함유 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 200㎕를 넣고 균질화(homogenization) 하였다. 이후, 4℃ 및 10,000×g의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 50 ㎕를 0.95 ㎖ 의 반응액(1.6mM tetramethyl benzidine과 0.1mM H_2O_2 함유)에 넣고 37℃에서 반응시키면서 650 ㎚에서 경시적으로 흡광도를 측정하였다. 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성은 반응물로서 생긴 peroxide 1 μmol/㎖를 1 unit로 계산하였다.

[114] 장내세균 군집은 qPCR(Quantitative PCR) 방법을 이용하여 측정하여다. 구체적으로, PCR thermal cycler(Takara) 및 SYBR premix agent를 이용하여 배변으로부터 분리된 100 ng의 DNA을 가지고 장내 미생물총에 대한

qPCR(Quantitative PCR)을 수행하였다(Lee, Jeong, Han & Kim, 2018 참조). PCR을 위한 열 사이클(thermal cycle) 조건은 다음과 같다.

[115] * DNA 중합효소의 활성화(95℃, 5분) 후 변성(95℃, 10초), 프라이머 어닐링(60℃, 30초) 및 신장(72℃, 30초)로 구성되는 사이클을 총 40번 수행함

[116] 장내세균별 유전자 증폭을 위해 사용된 프라이머를 하기 표 4에 나타내었다.

[117] [표4]

증폭 유전자	프라이머 종류	프라이머 염기 서열(5'→3')
Firmicutes	Forward	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA
	Reverse	AGCTGACGACAACCATGCAC
Bacteroidetes	Forward	GTTTAATTCGATGATACGCGAG
	Reverse	TTAASCCGACACCTCACGG
δ/γ-Proteobacteria	Forward	GCTAACGCATTAAGTRYCCCG
	Reverse	GCCATGCRGCACCTGTCT
bacterial 16S rRNA	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG ACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
	Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGA GACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT

[118]

[119] (3) 실험결과

[120] 도 12는 고지방 식이에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 대장 길이에 대해 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 13은 고지방 식이에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 장내 CD11b+ 세포 및 장내 CD11b+/CD11c+ 세포에 대해 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 사진이다. 도 13에서 'DAPI'는 DAPI(4′,6-diamidino-2-phenylindol)로 형광 염색한 결과이고, 'Merge'는 'CD11b' 결과와 'CD11c' 결과를 합한 후 DAPI(4′,6-diamidino-2-phenylindol)로 형광 염색한 결과이다.

[121] 도 14는 고지방 식이에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 대장 조직의 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성에 대해 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 15는 고지방 식이에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 장내세균 군집에 대해 미치는 영향을 실험군별로 분석한 결과이다.

[122] 도 12 내지 도 15에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus*

sakei) PK16 균주는 고지방 식이에 의해 대장 길이가 축소되는 것을 억제하였고, 고지방 식이에 의해 증가한 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 감소시켰고, 고지방 식이에 의해 증가한 CD11b+ 세포(대식세포) 및 CD11b+/CD11c+ 세포(수지상세포)를 억제하였다. 또한, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주는 장내세균 군집 중에서 고지방 식이에 의해 감소한 박테로이데테스(Bacteroidetes)를 증가시키고 고지방 식이에 의해 증가한 피르미쿠테스(Firmicutes) 및 프로테오박테리아(Proteobacteria)를 감소시켰다. 따라서, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주는 높은 항염증 효능을 가지며 대장염의 개선 또는 치료 효과가 우수한 것으로 나타났다.

[123]

[124] **5. 유산균의 불안 및 인지기능 개선 효능에 대한 in-vivo 실험**

[125] (1) 고지방 식이를 통한 스트레스 유도 실험

[126] 5주령 수컷 C57BL/6J 생쥐(체중 약 19~22g) 총 24마리를 2개의 그룹으로 나누어 저지방 식이군(n=8)에는 총 칼로리의 10%가 지방인 저지방 식이(제품 모델명 : D12450B; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 4주간 투여하였다. 또한, 고지방 식이군(n=16)에는 총 칼로리의 60%가 지방인 고지방 식이(제품 모델명 : D12492; 공급사 : Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)를 4주간 투여하여 스트레스를 유도하였다. 이후, 저지방 식이군(NC군)에는 저지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 4주간 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다. 또한, 고지방 식이군을 10마리씩 2개의 그룹(C, L-PK16)으로 나눈 후 C군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 생리식염수를 4주간 경구투여하고, L-PK16군에는 고지방 식이를 투여함과 동시에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주를 1일 1회 1×10^{9} CFU/mouse의 용량으로 4주간 경구투여한 후 다음날 실험을 종료하였다.

[127] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주를 포함한 시험 시료의 경구투여 횟수는 1주일을 기준으로 6일이었다. 실험기간 동안 생쥐는 온도 20±2℃, 습도 50±5% 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 사육되었다.

[128] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주의 불안 개선 효능을 평가하기 위하여 고지방 식이에 의한 스트레스 유도 실험 종료 후 실험동물을 대상으로 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test)을 진행하였다. 또한, 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주의 인지 기능 개선 효능을 평가하기 위하여 고지방 식이에 의한 스트레스 유도 실험 종료 후 실험동물을 대상으로 Y-미로 실험(Y-maze test) 및 물체인지 시험(Novel object recognition test)을 진행하였다. 또한, 고지방 식이에 의한 스트레스 유도 실험 종료 후 마우스의 혈액을 채취하고 혈청을 분리한 후 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay, enzyme-linked immunospecific assay)를 이용하여 코티코스테론(corticosterone) 및 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6)의 함량을

측정하였다. 또한, 고지방 식이에 의한 스트레스 유도 실험 종료 후 웨스턴블로팅(western blotting)을 이용하여 신경성장촉진인자로 알려진 해마(hippocampus) BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 발현량 및 해마(hippocampus) NF-kB 활성화(p-p65)를 측정하였다.

[129]

[130] (2) 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test)

[131] 실험 종료 후 2시간이 지난 후에 고가식 십자 미로(elevated plus-maze) 장치를 이용하여 약물의 항불안 효과를 측정하였다. 고가식 십자 미로(elevated plus maze) 장치는 4개의 통로 가운데 마주보는 2개의 Open arm(길이 30㎝, 폭 7㎝)과 높이 20㎝의 벽으로 둘러싸여 있는 2개의 Closed arm(길이 30㎝, 폭 7㎝)으로 구성되어 있고, 각각 중앙 platform으로부터 가로 7㎝ 및 세로 7㎝씩 뻗어 있다. 미로는 검정색의 플렉시 유리(Plexiglas)로 제작되었고, 바닥에서 50㎝ 높이에 설치되었다. 미로의 중앙부 천장에 비디오카메라를 설치하여 동물의 행동을 기록하였으며 광도는 20 lux로 조정하였다. 마우스는 선천적으로 어두운 closed arm에 머무르기를 좋아한다. 그래서 open arm을 통과할 때에는 상당한 불안감을 나타낸다. 실험을 시작할 때 마우스를 머리가 정중앙에서 open arm 쪽으로 향하게 놓은 다음 미로를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 이후, 마우스의 행동을 5분간 관찰하였으며, arm entry는 4개의 발이 모두 들어간 것으로 하였다. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 지우기 위해 70% alcohol로 깨끗이 닦아 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다. 마우스가 open arm에 머문 시간의 비율(OT, %)과 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율(OE, %)을 하기의 식에 의해 계산하였다.

[132] $$OT(\%)=\frac{time\ spent\ in\ open\ arms}{total\ time\ spent\ in\ open\ arms\ \text{and}\ closed\ arms}\times 100$$

[133] $$OE(\%)=\frac{entries\ into\ open\ arms}{total\ entries\ into\ open\ arms\ \text{and}\ closed\ arms}\times 100$$

[134] 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test)에서 불안감의 감소는 open arm에 머문 시간의 비율의 증가와 open arm으로의 출입 횟수 비율의 증가에 의해 표시된다.

[135]

[136] (3) Y-미로 시험(Y-maze test)

[137] 실험 종료 후 1시간이 지난 후에, Y-미로(Y-maze) 장치를 이용하여 약물의 인지 기능 개선 효과를 측정하였다. Y-미로(Y-maze) 장치는 각각 A, B, C로 구분된 3개의 암(arm)(가로 8㎝, 세로 30㎝, 높이 14㎝)으로 구성되어 있으며, 각각의 암은 서로 120°의 일정한 각도로 배치되어 있다. 마우스를 한쪽 암(arm) 끝에 위치시킨 다음 8분 동안 Y-미로를 자유롭게 움직이게 한 다음, 마우스가 각 암(arm)에 들어간 횟수 및 순서를 측정하고 자발적 변경(spontaneous alteration, %)를 다음과 같은 수식으로 계산하였다.

[138] $$Spontaneous\ alteration(\%) = \frac{\text{총 변경 수}}{\text{암}(arm)\text{에 들어간 총 회수 -2}} \times 100$$

[139]

[140] (4) 물체인지 시험(Novel object recognition test)

[141] 물체인지 시험(Novel object recognition test) 장치는 내부에서 외부가 보이지 않도록 제작된 상자(가로 40㎝, 세로 40㎝, 높이 40㎝)를 이용하여 실시하였다. 모양과 크기가 같은 2개의 물체 A 및 A'를 상자 안에 고정시킨 후 마우스를 상자의 중심에서 출발시켜 10분 동안 마우그가 2개의 물체를 만지는 횟수를 측정하였다. 이후, 24 hr가 지났을 때 2개의 물체 중 하나를 새로운 물체(B)로 바꾼 후 원래 있던 물체와 새로운 물체를 만지는 횟수를 측정하였다. 측정한 결과를 선호 지수(Preference index, %)로 수치화하였다.

[142]

[143] (5) 실험 결과

[144] 도 16은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물을 대상으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 항불안 효능을 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test) 결과 중 마우스가 open arm에 머문 시간의 비율(OT, %)로 나타낸 것이다. 또한, 도 17은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물을 대상으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 항불안 효능을 고가식 십자 미로 시험(elevated plus-maze test) 결과 중 마우스의 open arm으로의 출입 횟수 비율(OE, %)로 나타낸 것이다. 도 18은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물을 대상으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 인지기능 개선 효능을 Y-미로 시험(Y-maze test) 결과로 나타낸 것이다. 도 19는 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물을 대상으로 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16의 인지기능 개선 효능을 물체인지 시험(Novel object recognition test) 결과로 나타낸 것이다. 도 20은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물의 코티코스테론(corticosterone) 발현에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 21은 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물의 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6) 발현에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 22는 고지방 식이에 의해 스트레스가 유발된 실험동물의 BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 발현량 및 NF-kB 활성화(p-p65)에 대해 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16이 미치는 영향을 웨스턴블로팅으로 측정한 결과이다.

[145] 도 16 및 도 17에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주는 고지방 식이에 의해 생긴 불안을 유의적으로 억제하였다. 또한, 도 18 및 도 19에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주는 고지방 식이에 의해 생긴 인지기능 손상을 유의적으로 개선하였다.

또한, 도 20 및 도 21에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주는 고지방 식이에 의해 증가한 혈중 코티코스테론(corticosterone) 및 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6)의 함량을 억제하였다. 또한, 도 22에서 보이는 바와 같이 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주는 고지방 식이에 의해 증가한 해마(hippocampus) NF-kB 활성화(p-p65)를 억제하였고 반면 고지방 식이에 의해 억제된 해마(hippocampus) BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 발현량을 증가시켰다.

[146]

[147] **7. 유산균 등을 포함하는 식품 조성물의 제조**

[148] 하기의 식품 조성물 제조에서 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 배양물은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16 균주 자체, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물로 대체가 가능하다.

[149]

[150] <7-1> 밀가루 식품의 제조

[151] 밀가루 100 중량부에 *Lactobacillus sakei* PK16 배양물 0.5 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[152]

[153] <7-2> 유제품(dairy products)의 제조

[154] 우유 100 중량부에 *Lactobacillus sakei* PK16 배양물 0.5 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[155]

[156] <7-3> 선식의 제조

[157] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[158] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[159] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 *Lactobacillus sakei* PK16 배양물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[160] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 17 중량부, 보리 20 중량부),

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

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

[163] 영지(0.5 중량부),

[164] 지황(0.5 중량부)

[165]

[166] <7-4> 건강음료의 제조

[167] 액상과당(0.5 g), 올리고당(4 g), 설탕(2 g), 식염(0.5 g), 물(77 g)과 같은 부재료와 *Lactobacillus sakei* PK16 배양물 1 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를

유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[168]

[169] <7-5> 야채 주스의 제조

[170] *Lactobacillus sakei* PK16 배양물 2 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[171]

[172] <7-6> 과일 주스의 제조

[173] *Lactobacillus sakei* PK16 배양물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖ 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

[174]

[175] **8. 유산균의 수탁 정보**

[176] 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16을 2018년 8월 03일에 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(대한민국 서울특별시 서대문구 홍제내2가길 45 유림빌딩 3F)에 특허기탁 하여 KCCM12296P의 수탁번호를 부여받았다.

[177] 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.

[178]

[179] [수탁번호]

[180] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

[181] 수탁번호 : KCCM12296P

[182] 수탁일자 : 20180803

[183]

[184]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 김동현
(02447) 대한민국 서울 동대문구 경희대로 26

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: *Lactobacillus sakei* PK16	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12296P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치 항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: □ 과학적 성질의 설명 □ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 ■ 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 08월 03일 (원기탁일)[1]에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: Korean Culture Center of Microorganisms 주소: (03641) 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 날짜: 2018. 08. 03

[1] 규칙 6.4(d)가 적용되어 원기탁일이 국제기탁기관의 법적 지위를 획득한 날짜이다.

BP/4 형식 (단일 페이지)

[185]

청구범위

[청구항 1] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P).

[청구항 2] 제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 염기서열로 이루어진 16S rDNA를 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P).

[청구항 3] 제1항에 있어서, 그람 염색시 양성을 나타내는 간균이고, 탄소원으로 L-아라비노스(L-arabinose), 리보스(Ribose), 갈락토오스(Galactose), 글루코오스(Glucose), 프럭토스(Fructose), 만노스(Mannose), 람노스(Rhamonse), N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 에스큘린(Esculin), 살리신(Salicin), 셀로바이오스(Cellobiose), 락토스(Lactose), 멜리바이오스(Melibiose), 수크로오스(Sucrose), 트레할로스(Trehalose) 및 글루코네이트(Gluconate)를 이용하는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P).

[청구항 4] 제1항에 있어서, 항비만 활성, 체지방 감소 활성, 혈당 조절 활성, 혈당 강하 활성, 혈중 콜레스테롤 저하 활성, 혈중 중성지질 저하 활성, 장내 미생물의 내독소 생산 억제 활성, 동맥경화 억제 활성, 염증 억제 활성, 스트레스 완화 활성, 항불안 활성 또는 인지기능 개선 활성에서 선택되는 적어도 2개 이상의 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P).

[청구항 5] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 체지방 감소용 조성물.

[청구항 6] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물.

[청구항 7] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고,
비만, 당뇨병, 지방간, 이상지질혈증, 동맥경화증 또는 상기 질환들 중 적어도 2개 이상이 동시다발적으로 발생하는 대사증후군의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 약학 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 이상지질혈증은 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[청구항 9] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P)

균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고,
비만, 당뇨병, 지방간, 이상지질혈증, 동맥경화증 또는 상기 질환들 중 적어도 2개 이상이 동시다발적으로 발생하는 대사증후군의 예방 또는 개선을 위해 사용되는 식품 조성물.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 이상지질혈증은 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

[청구항 11] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 내독소혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 12] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 내독소혈증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 13] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 14] 제14항에 있어서, 상기 염증 질환은 대장염인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

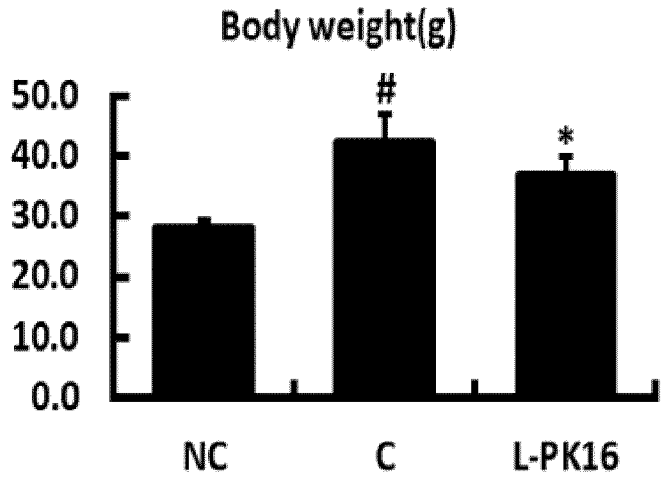
[청구항 15] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 염증 질환은 대장염인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

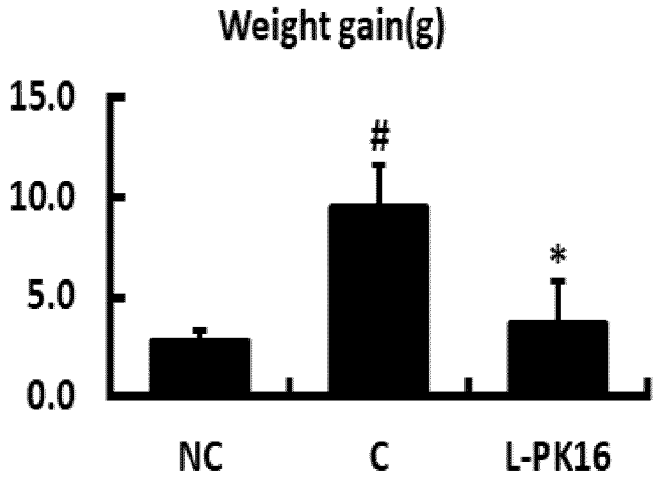
[청구항 17] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고,
스트레스를 완화하거나 불안 장애 또는 인지기능 장애를 예방 또는 치료하기 위한 용도의 약학 조성물.

[청구항 18] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) PK16(수탁번호 : KCCM12296P) 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하고,
스트레스를 완화하거나 불안 장애 또는 인지기능 장애를 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물.

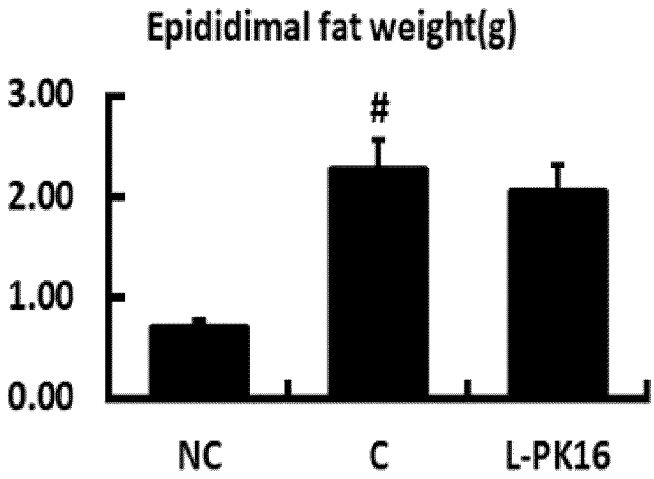
[도1]


Body weight(g)
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
#
*
NC
C
L-PK16

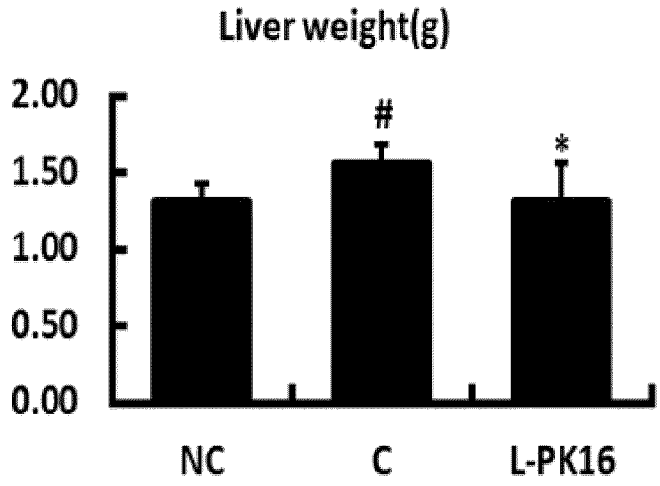
[도2]


Weight gain(g)
15.0
10.0
5.0
0.0
#
*
NC
C
L-PK16

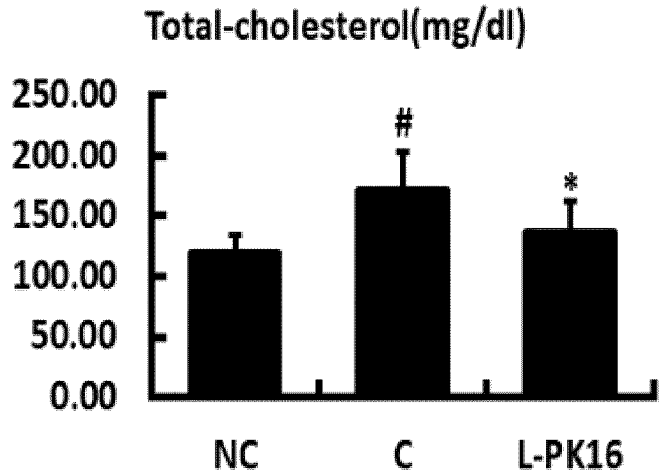
[도3]


Epididimal fat weight(g)
3.00
2.00
1.00
0.00
#
NC
C
L-PK16

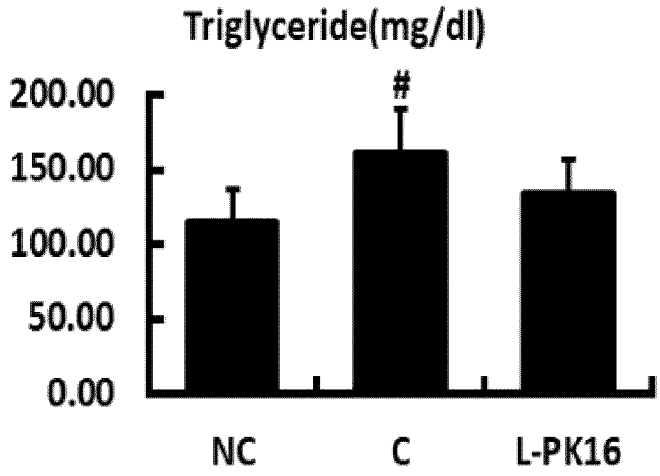
[도4]


Liver weight(g)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
#
*
NC
C
L-PK16

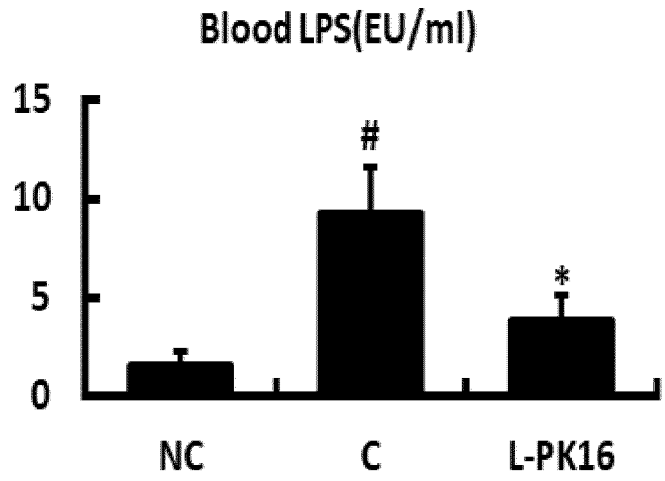
[도5]


Total-cholesterol(mg/dl)
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
#
*
NC
C
L-PK16

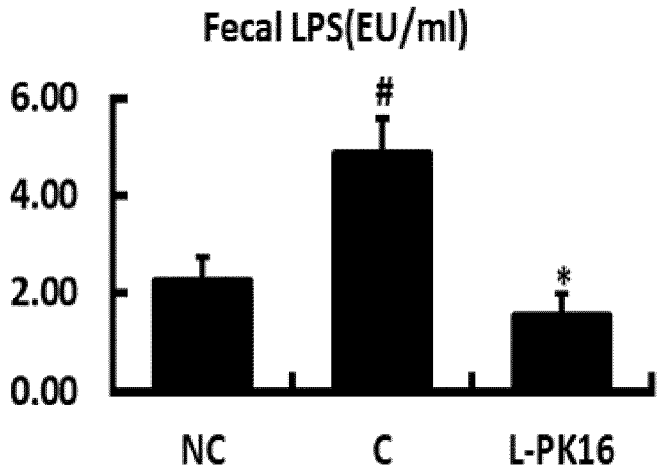
[도6]


Triglyceride(mg/dl)
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
#
NC
C
L-PK16

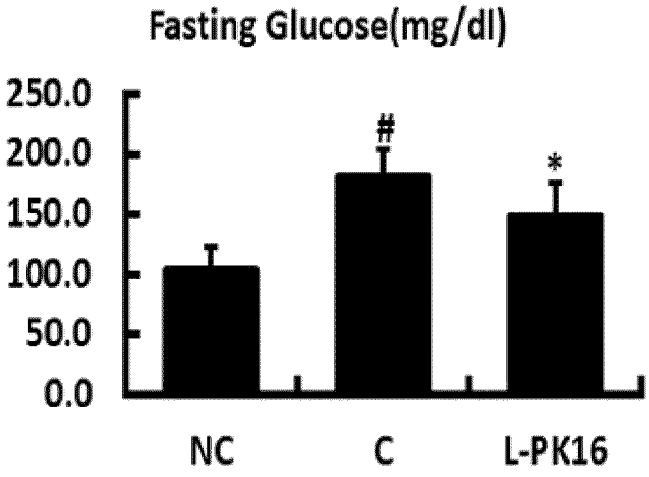
[도7]


Blood LPS(EU/ml)
15
10
5
0
#
*
NC
C
L-PK16

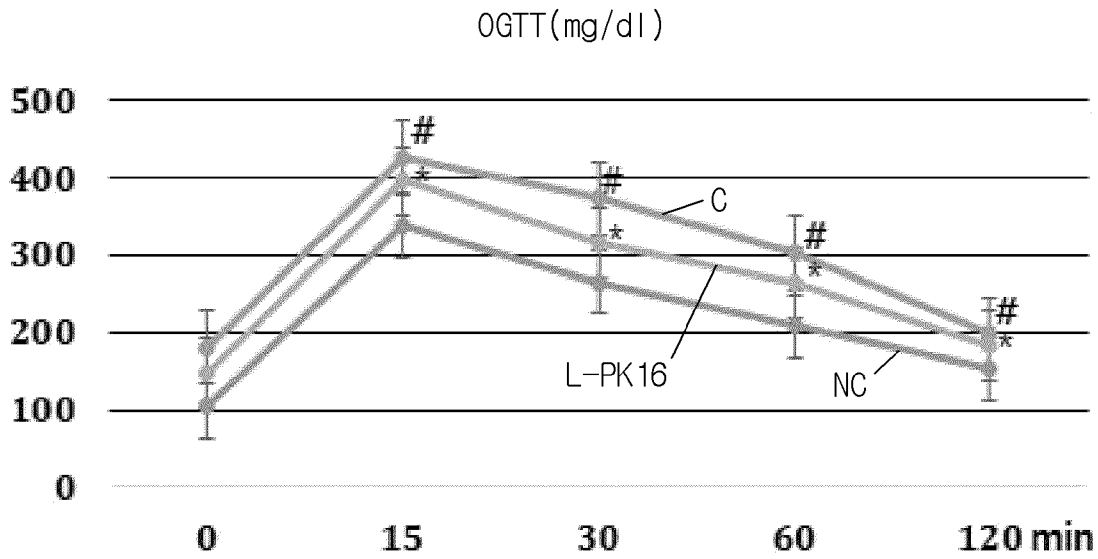
[도8]


Fecal LPS(EU/ml)
6.00
4.00
2.00
0.00
#
*
NC
C
L-PK16

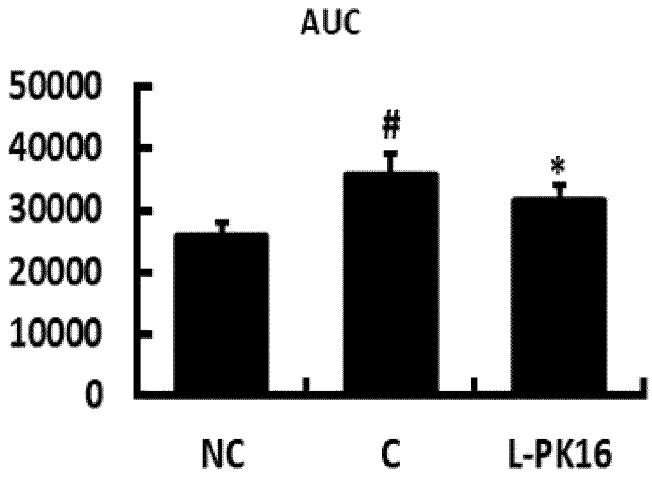
[도9]


Fasting Glucose(mg/dl)
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
#
*
NC
C
L-PK16

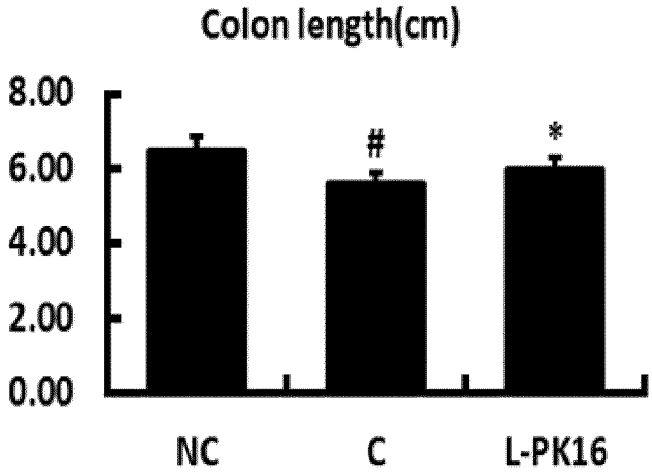
[도10]


OGTT(mg/dl)
500
400
300
200
100
0
0
15
30
60
120 min
C
L-PK16
NC

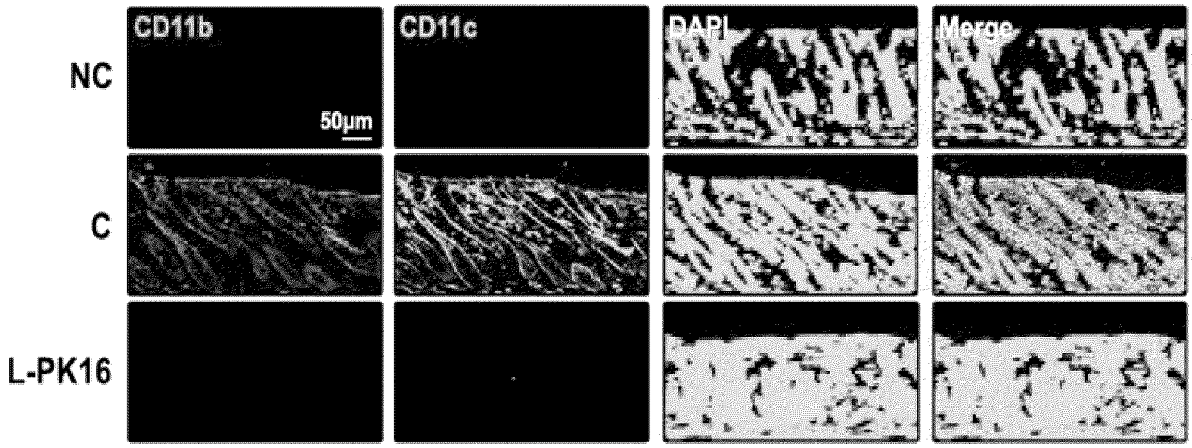
[도11]


AUC
50000
40000
30000
20000
10000
0
NC
C
L-PK16

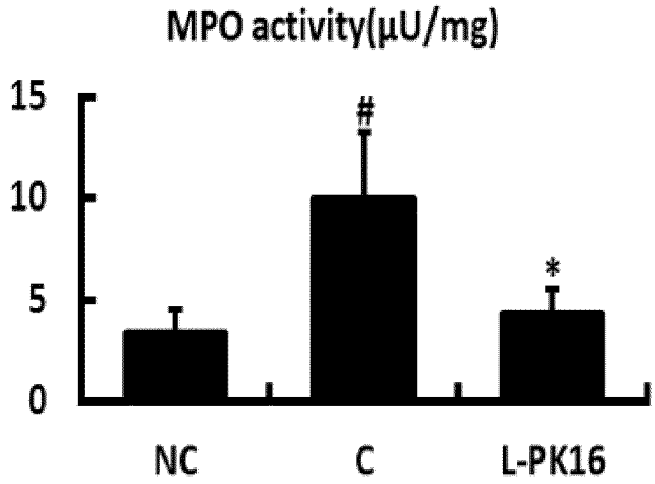
[도12]


Colon length(cm)
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
NC
C
L-PK16

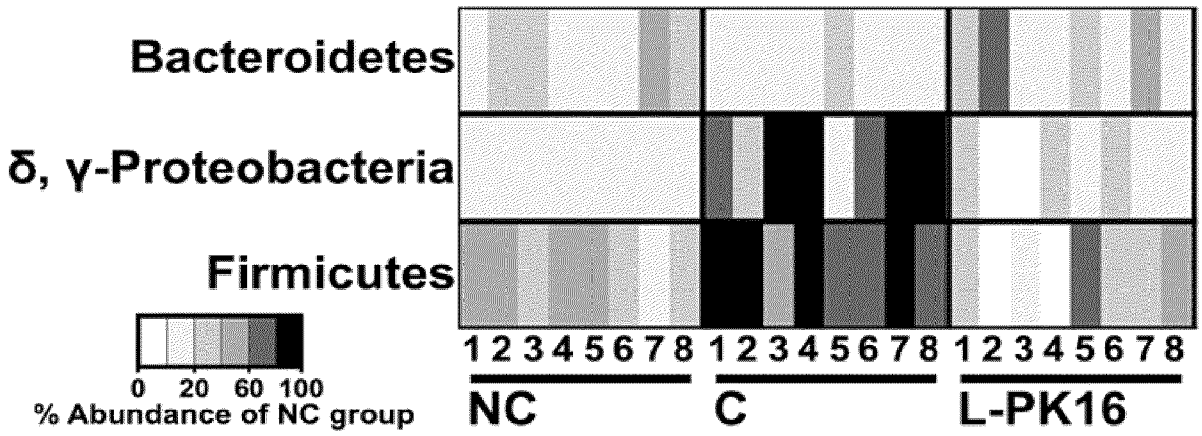
[도13]


CD11b
CD11c
DAPI
Merge
50μm
NC
C
L-PK16

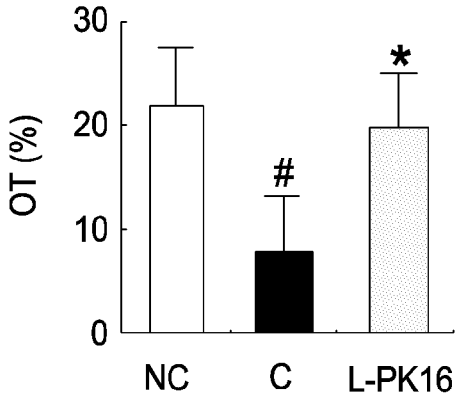
[도14]


MPO activity(μU/mg)
15
10
5
0
#
*
NC
C
L-PK16

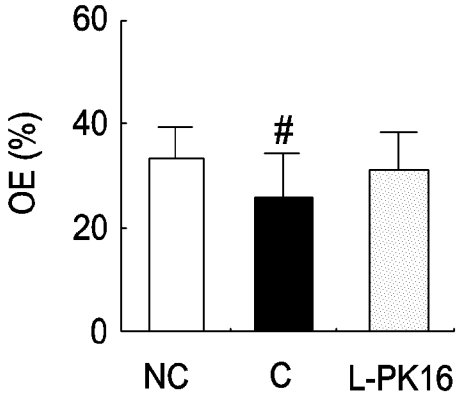
[도15]


Bacteroidetes
δ, γ-Proteobacteria
Firmicutes
0 20 60 100
% Abundance of NC group
1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8
NC
C
L-PK16

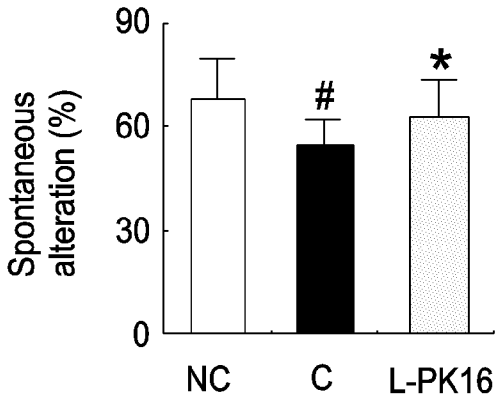
[도16]


30
20
10
0
OT (%)
#
*
NC
C
L-PK16

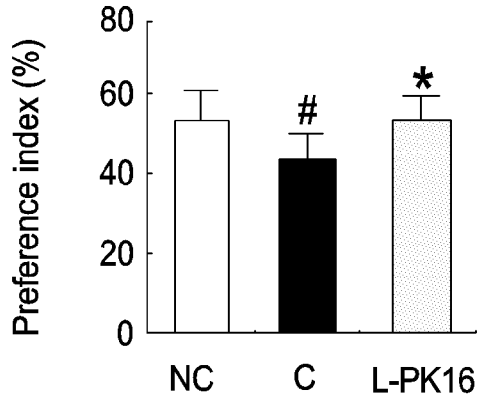
[도17]


60
40
20
0
OE (%)
#
NC
C
L-PK16

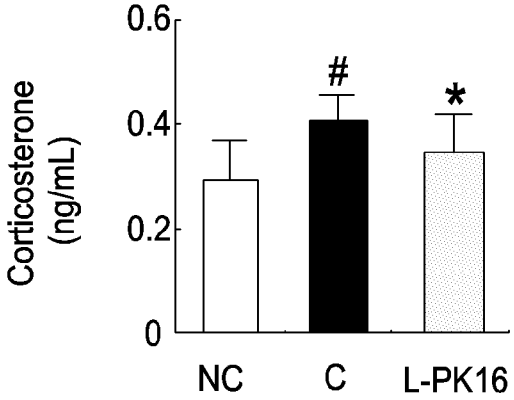
[도18]


90
60
30
0
Spontaneous alteration (%)
#
*
NC
C
L-PK16

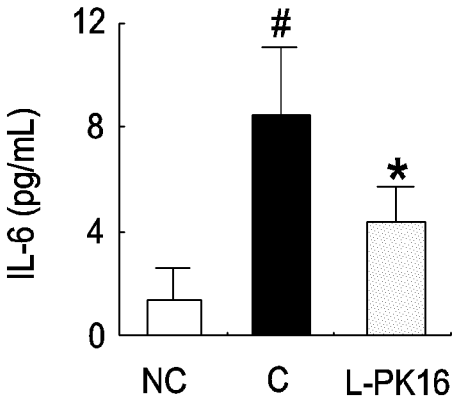
[도19]


Preference index (%)
80
60
40
20
0
#
*
NC
C
L-PK16

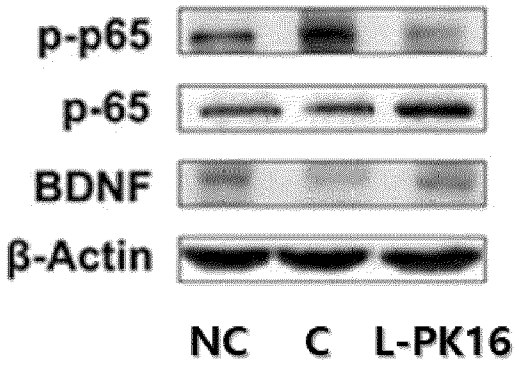
[도20]


Corticosterone (ng/mL)
0.6
0.4
0.2
0
#
*
NC
C
L-PK16

[도21]


IL-6 (pg/mL)
12
8
4
0
#
*
NC
C
L-PK16

[도22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/017441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A61K 35/747(2014.01)i, A61P 1/16(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/06(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 25/18(2006.01)i

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; A23K 10/16; A23L 33/135; A61K 35/744; A61K 35/745; A61K 35/747; A61K 8/99; A61P 1/16; A61P 3/00; A61P 3/04; A61P 3/06; A61P 3/10; A61P 9/10; A61P 25/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: lactobacillus sakei, obesity, diabetes, anxiety disorder, cognitive impairment

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DX	KR 10-1708173 B1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 21 February 2017 See claims 1-8; paragraph [0008].	1-16
DA		17,18
X	KR 10-2017-0032815 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 23 March 2017 See paragraph [0088]; table 5.	11,12,17,18
X	KR 10-2016-0097183 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 17 August 2016 See claims 1, 3, 4, paragraphs [0018], [0019].	1-10,13-16
X	KR 10-2018-0036592 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 09 April 2018 See claims 1, 6, 13-15.	1-10
X	KR 10-1736033 B1 (KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE) 17 May 2017 See claims 1-3, 6.	1-10
PX	JANG, H.-M. et al. Lactobacillus sakei alleviates high-fat-diet-induced obesity and anxiety in mice by inducing AMPK activation and SIRT1 expression and inhibiting gut microbiota-mediated NF-κB activation. Molecular Nutrition & Food Research. (Electronic publication)11 February 2019, vol. 63, thesis no. 1800978, pages 1-13 See abstract; pages 2-12.	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 MARCH 2020 (24.03.2020)	**24 MARCH 2020 (24.03.2020)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/017441

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1708173 B1	21/02/2017	KR 10-2016-0108751 A	20/09/2016
KR 10-2017-0032815 A	23/03/2017	AU 2016-322617 A1	19/04/2018
		AU 2016-322617 B2	16/01/2020
		AU 2016-324846 A1	19/04/2018
		AU 2016-324846 B2	27/02/2020
		BR 112018005195 A2	16/10/2018
		CA 2998841 A1	23/03/2017
		CA 2998877 A1	23/03/2017
		CN 108473944 A	31/08/2018
		CN 108603162 A	28/09/2018
		EP 3351616 A1	25/07/2018
		EP 3351617 A1	25/07/2018
		JP 2018-531595 A	01/11/2018
		JP 2018-536385 A	13/12/2018
		JP 6608047 B2	20/11/2019
		JP 6626569 B2	25/12/2019
		KR 10-1851196 B1	25/04/2018
		KR 10-1889281 B1	21/08/2018
		KR 10-1937365 B1	11/01/2019
		KR 10-2017-0032816 A	23/03/2017
		KR 10-2017-0032845 A	23/03/2017
		KR 10-2017-0032848 A	23/03/2017
		KR 10-2018-0091802 A	16/08/2018
		MX 2018003230 A	01/08/2018
		NZ 741028 A	30/08/2019
		PH 12018500566 A1	01/10/2018
		SG 11201802144 A	27/04/2018
		SG 11201802145 A	27/04/2018
		US 10471111 B2	12/11/2019
		US 2018-0355445 A1	13/12/2018
		US 2019-0030097 A1	31/01/2019
		WO 2017-047962 A1	23/03/2017
		WO 2017-047968 A1	23/03/2017
KR 10-2016-0097183 A	17/08/2016	KR 10-1740583 B1	29/05/2017
		KR 10-2015-0098202 A	27/08/2015
		KR 10-2016-0098149 A	18/08/2016
		WO 2015-122717 A1	20/08/2015
KR 10-2018-0036592 A	09/04/2018	AU 2017-337936 A1	18/04/2019
		CA 3038793 A1	05/04/2018
		CN 110023487 A	16/07/2019
		EP 3521415 A1	07/08/2019
		JP 2019-528763 A	17/10/2019
		KR 10-1992537 B1	25/06/2019
		US 2019-0262409 A1	29/08/2019
		WO 2018-062914 A1	05/04/2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/017441

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1736033 B1	17/05/2017	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/017441

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/20(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A61K 35/747(2014.01)i, A61P 1/16(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/06(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 25/18(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 1/20; A23K 10/16; A23L 33/135; A61K 35/744; A61K 35/745; A61K 35/747; A61K 8/99; A61P 1/16; A61P 3/00; A61P 3/04; A61P 3/06; A61P 3/10; A61P 9/10; A61P 25/18

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:락토바실러스 사케이(lactobacillus sakei), 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 불안장애(anxiety disorder), 인지기능장애(cognitive impairment)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DX	KR 10-1708173 B1 (경희대학교 산학협력단) 2017.02.21 청구항 1-8; 단락 [0008]	1-16
DA		17,18
X	KR 10-2017-0032815 A (경희대학교 산학협력단) 2017.03.23 단락 [0088]; 표 5	11,12,17,18
X	KR 10-2016-0097183 A (경희대학교 산학협력단) 2016.08.17 청구항 1, 3, 4; 단락 [0018], [0019]	1-10,13-16
X	KR 10-2018-0036592 A (씨제이제일제당 (주)) 2018.04.09 청구항 1, 6, 13-15	1-10
X	KR 10-1736033 B1 (한국식품연구원) 2017.05.17 청구항 1-3, 6	1-10
PX	JANG, H.-M. 등, 'Lactobacillus sakei alleviates high-fat-diet-induced obesity and anxiety in mice by inducing AMPK activation and SIRT1 expression and inhibiting gut microbiota-mediated NF-κB activation', Molecular Nutrition & Food Research, (전자공개)2019.02.11, 63권, 논문 번호 1800978, 1-13 페이지 초록; 페이지 2-12	1-18

☐ 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

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 신규성 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	국제조사보고서 발송일
2020년 03월 24일 (24.03.2020)	2020년 03월 24일 (24.03.2020)

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

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/017441

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1708173 B1	2017/02/21	KR 10-2016-0108751 A	2016/09/20
KR 10-2017-0032815 A	2017/03/23	AU 2016-322617 A1	2018/04/19
		AU 2016-322617 B2	2020/01/16
		AU 2016-324846 A1	2018/04/19
		AU 2016-324846 B2	2020/02/27
		BR 112018005195 A2	2018/10/16
		CA 2998841 A1	2017/03/23
		CA 2998877 A1	2017/03/23
		CN 108473944 A	2018/08/31
		CN 108603162 A	2018/09/28
		EP 3351616 A1	2018/07/25
		EP 3351617 A1	2018/07/25
		JP 2018-531595 A	2018/11/01
		JP 2018-536385 A	2018/12/13
		JP 6608047 B2	2019/11/20
		JP 6626569 B2	2019/12/25
		KR 10-1851196 B1	2018/04/25
		KR 10-1889281 B1	2018/08/21
		KR 10-1937365 B1	2019/01/11
		KR 10-2017-0032816 A	2017/03/23
		KR 10-2017-0032845 A	2017/03/23
		KR 10-2017-0032848 A	2017/03/23
		KR 10-2018-0091802 A	2018/08/16
		MX 2018003230 A	2018/08/01
		NZ 741028 A	2019/08/30
		PH 12018500566 A1	2018/10/01
		SG 11201802144 A	2018/04/27
		SG 11201802145 A	2018/04/27
		US 10471111 B2	2019/11/12
		US 2018-0355445 A1	2018/12/13
		US 2019-0030097 A1	2019/01/31
		WO 2017-047962 A1	2017/03/23
		WO 2017-047968 A1	2017/03/23
KR 10-2016-0097183 A	2016/08/17	KR 10-1740583 B1	2017/05/29
		KR 10-2015-0098202 A	2015/08/27
		KR 10-2016-0098149 A	2016/08/18
		WO 2015-122717 A1	2015/08/20
KR 10-2018-0036592 A	2018/04/09	AU 2017-337936 A1	2019/04/18
		CA 3038793 A1	2018/04/05
		CN 110023487 A	2019/07/16
		EP 3521415 A1	2019/08/07
		JP 2019-528763 A	2019/10/17
		KR 10-1992537 B1	2019/06/25
		US 2019-0262409 A1	2019/08/29
		WO 2018-062914 A1	2018/04/05

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/017441

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1736033 B1	2017/05/17	없음	