



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년09월10일
(11) 등록번호 10-2857633
(24) 등록일자 2025년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/135 (2016.01) A61K 35/14 (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A61K 35/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0161108
(22) 출원일자 2024년11월13일
심사청구일자 2024년11월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020190129014 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
주식회사 에치와이
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
정지웅
서울특별시 영등포구 양평로22라길 1, 104동 902호
이대협
경기도 수원시 영통구 광교로 116, 1011호 (이의동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박혁

전체 청구항 수 : 총 5 항

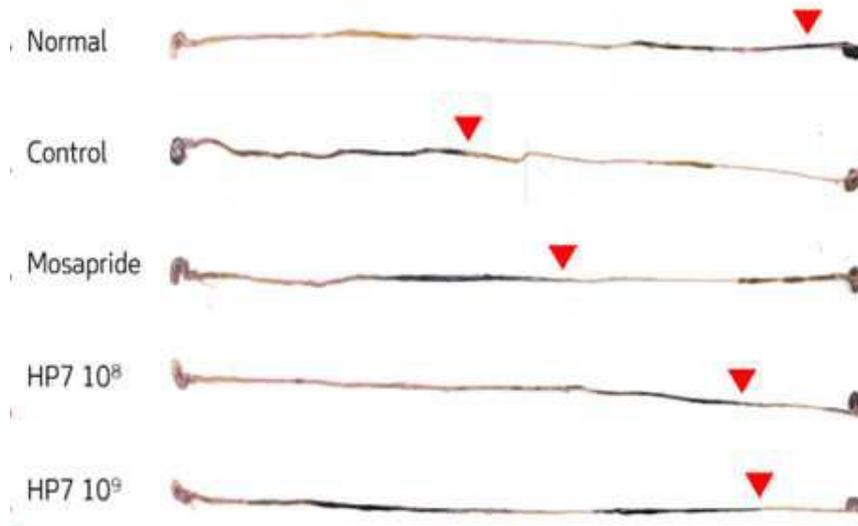
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 기능성 소화불량 예방 또는 개선 효능으로 위장관 건강에 도움을 주는 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 기능성 소화불량 예방 또는 개선 효능을 갖는 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 조성물은 장 세포 밀착 연결 유전자 발현을 높여주고, 소화기 연동운동 및 위 배출 효과를 개선시키고, 위 배출과 관련된 위 무게 및 위 비움 수준도 개선되었으며, 소화 활성화와 관련된 혈액 내 호르몬도 유의적으로 증가하는 것을 확인하여 소화불량을 개선시킬 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)

C12N 1/20 (2021.05)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/32 (2013.01)

(72) 발명자

김주연

경기도 용인시 기흥구 탑실로 15 (공세동, 탑실마을 대주피오레1단지) 101동 302호

심재중

경기도 용인시 수지구 성복2로 86, 116동 802호

이재환

경기도 수원시 영통구 태장로 45, 201동 101호

(56) 선행기술조사문헌

NUTRIENTS 2023, 15, 839

KR1020230085279 A

CN116162570 A

CN111705012 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 기능성 소화불량 개선용 식품 조성물로서

상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7는 GASTRIN 발현의 증가, GIP 발현의 억제 및 Peptide YY 발현의 억제 중 어느 하나 이상을 나타내고,

5-HT4R, ANO1, RYR3 및 smMLCK 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것인 기능성 소화불량 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7는 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 생균체, 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 사균체, 이의 파쇄물, 이의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 추출물, 상기 파쇄물의 추출물 및 상기 배양액의 추출물 중 어느 하나 이상인 기능성 소화불량 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7는 밀착 연결 단백질인 ZO-1, OCLN 및 CLDN1 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것인 기능성 소화불량 개선용 식품 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 기능성 소화불량은 상복부의 통증, 불쾌감, 상복부 쓰림, 가슴쓰림, 조기만복감, 식후포만감, 상복부 압박감, 상복부 팽만감 중 어느 하나 이상을 억제하는 것인 기능성 소화불량 개선용 식품 조성물.

청구항 6

락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 기능성 소화불량 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 기능성 소화불량 예방 또는 개선 효능을 갖는 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 기능성 소화불량은 병리적, 기질적 병변이 아닌 기능적인 소화불량으로 지속적이거나 반복적으로 상복부에 국한된 불편감이나 통증 등에 따르는 제반증상을 소화불량이라고 하며 상복부 통증, 쓰림, 포만감, 팽만감, 조기 만복감, 오심, 구토, 트림 등의 상복부를 중심으로 일어나는 여러 증상이 포함된 질환이다.

[0004] 김치로부터 분리된 락티카제이바실러스 파라카제이 (락토바실러스 파라카제이) HP7은 헬리코박터 파일로리에 대한 응집활성 및 위 세포 부착을 억제하는 효과에 대한 특허는 개시되어 있으나, 기능성 소화불량을 예방 또는 개선하는 효과는 알려지지 않았다.

[0005] 이에 본 발명의 발명자들은 기능성 소화불량을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있는 소재를 찾던 중 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7가 기능성 소화불량을 개선하는 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-2079731 호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 목적은 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lacticaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 소화불량 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lacticaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 소화불량 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양상은 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lacticaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 소화불량 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 일 구체예로 상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lacticaseibacillus paracasei*) HP7는 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 생균체, 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 사균체, 이의 파쇄물, 이의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 추출물, 상기 파쇄물의 추출물 및 상기 배양액의 추출물 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 구체예로 상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lacticaseibacillus paracasei*) HP7는 밀착 연접 단백질인 ZO-1, OCLN 및 CLDN1 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구체예로 상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lacticaseibacillus paracasei*) HP7는 GASTRIN 발현의 증가, GIP 발현의 억제 및 Peptide YY 발현의 억제 중 어느 하나 이상을 나타내고, 5-HT4R, ANO1, RYR3 및 smMLCK 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구체예로 상기 소화불량은 병리적, 기질적 병변이 아닌 기능적인 소화불량으로 지속적이거나 반복적으로 상복부에 국한된 불편감이나 통증 등에 따르는 제반증상을 의미 하며 상복부 통증, 쓰림, 포만감, 팽만감, 조기 만복감, 오심, 구토, 트림 등의 상복부를 중심으로 일어나는 여러 증상이 포함된 질환일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 일 양상은 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lacticaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 소화불량 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 조성물들은 장 세포 밀착 연결 유전자 발현을 높여주고, 소화기 연동운동 및 위 배출 효과를 개선시키고, 위 배출과 관련된 위 무게 및 위 비움 수준도 개선되었으며, 소화 활성화와 관련된 혈액 내 호르몬도 유의적으로 증가하는 것을 확인하여 소화불량을 개선시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 실험에 1의 결과를 나타낸 것으로 HP7 균주 처리시의 장 세포 생존율 확인 결과를 나타낸 것이다.
 도 2는 실험에 2의 결과를 나타낸 것으로 HP7 균주의 밀착 연결(tight junction) 관련 유전자 발현 분석 결과를 나타낸 것이다.
 도 3은 실험에 3의 결과를 나타낸 것으로, 시험군별 체중 차이를 나타낸 것이다.
 도 4 및 5는 실험에 4의 결과를 나타낸 것으로, 소화기 (장) 연동운동에 의한 음식물 이동거리를 확인한 결과이다.
 도 6 및 7은 실시예 5의 결과를 나타낸 것으로, 위 무게 변화와 위 비움 효과를 확인한 결과이다.
 도 8은 실시예 6의 결과를 나타낸 것으로, 혈액 내 소화 활성화 관련 지표의 변화를 확인한 결과이다.
 도 9는 실시예 7의 결과를 나타낸 것으로, 혈액 내 위장관 관련 지표 변화 확인 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하에서는 본 발명을 도면과 함께 설명한다.

[0022] 도 1은 실험에 1의 결과를 나타낸 것으로 HP7 균주 처리시의 장 세포 생존율 확인 결과를 나타낸 것이며, 도 2는 실험에 2의 결과를 나타낸 것으로 HP7 균주의 밀착 연결(tight junction) 관련 유전자 발현 분석 결과를 나타낸 것이다. 이러한 실험 결과들을 통해 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 균주는 장 세포 밀착 연결 유전자 발현을 높여주어 장 누수와 높은 상관관계가 있다고 알려져 있는 기능성 소화불량의 개선능을 알 수 있다.

[0023] 그리고, 도 3은 실험에 3의 결과를 나타낸 것으로, 시험군별 체중 차이를 나타낸 것이고, 도 4 및 5는 실험에 4의 결과를 나타낸 것으로, 소화기 (장) 연동운동에 의한 음식물 이동거리를 확인한 결과이며, 도 6 및 7은 실시예 5의 결과를 나타낸 것으로, 위 무게 변화와 위 비움 효과를 확인한 결과이다. 그리고, 도 8은 실시예 6의 결과를 나타낸 것으로, 혈액 내 소화 활성화 관련 지표의 변화를 확인한 결과이고, 도 9는 실시예 7의 결과를 나타낸 것으로, 혈액 내 위장관 관련 지표 변화 확인 결과를 나타낸 것이다. 이러한 결과들을 통해 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 균주는 소화기 연동운동 및 위 배출 효과를 개선시키고, 위 배출과 관련된 위 무게 및 위 비움 수준도 개선시킬 수 있으며, 소화 활성화와 관련된 혈액 내 호르몬도 유의적으로 증가시켜 기능성 소화불량을 예방 및 개선하여 위장관 건강에 도움을 줄 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 양상은 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 소화불량 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0026] 본 발명에 있어서, "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 이때 상기 균주는 혈관 건강의 개선을 위하여 관련 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로 사용될 수 있다.

[0027] 상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 균주는 김치로부터 분리된 균주 중 헬리코박터 파이로리 억제 활성이 우수한 균주를 선별한 것으로 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 로서 2016년 10월 31일 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korea Collection for Type Culture; KCTC)에 기탁번호 KCTC 13143BP로 기탁되었으나, 2024년 1월 1일부로 락토바실러스 속 학명을 전장유전체 정보를 기반으로 재분류함에 따라 균주의 분류가 변경되어(식품의약품안전처 공고 제2021-168호, 건강기능식품 공전 제 3. 개별기준 및 규격, 2. 기능성 원료, 2-51 프로바이오틱스) 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7로 변경되었다.

[0028] 본 발명의 일 구체예로 상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7는 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 생균체, 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 사균체, 이의 파쇄물, 이의 배양액, 상기

균주의 추출물, 상기 균주의 추출물, 상기 과쇄물의 추출물 및 상기 배양액의 추출물 중 어느 하나 이상일 수 있다.

- [0029] 상기 균주를 배양하기 위한 배지의 종류로는 크게 제한되지 않으며, 최적의 공지의 배지를 사용할 수 있다. 구체적으로 MRS 배지, TGY 배지, BHI 배지, M17 배지 등이 있다. 또한 배지의 pH 는 균주가 배양될 수 있는 범위라면 크게 제한되지 않으며, 일 예로 약 pH 4.5~7.0이다. 본 발명에 따른 균주를 배양하기 위한 배양 온도 또한 크게 제한되지 않으며, 일 예로 약 25~45℃이다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예로 상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7는 밀착 연결 단백질인 ZO-1, OCLN 및 CLDN1 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것일 수 있다. 기능성 소화불량은 장 누수와 높은 상관관계가 있다고 알려져 있는데, 본 발명의 HP7은 밀착 연결 단백질인 ZO-1, OCLN 및 CLDN1 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시켜 장 누수뿐 만 아니라 장 누수와 높은 상관관계가 있다고 알려진 기능성 소화불량도 개선시킬 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구체예로 상기 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7는 GASTRIN 발현의 증가, GIP 발현의 억제 및 Peptide YY 발현의 억제 중 어느 하나 이상을 나타내고, 5-HT4R, ANO1, RYR3 및 smMLCK 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것일 수 있다. 본 발명의 HP7는 음식물의 이동거리 측면에서 소화불량을 유도한 군에 비해 유의적으로 증가시켜 소화기 연동운동 및 위 배출을 개선시키고, 위 배출과 관련된 위 무게 및 위 비움 비율도 개선시키며 소화 활성화와 관련된 혈액 내 호르몬도 유의적으로 증가시켜 기능성 소화불량을 개선시킬 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예로 상기 소화불량은 병리적, 기질적 병변이 아닌 기능적인 소화불량으로 지속적이거나 반복적으로 상복부에 국한된 불편감이나 통증 등에 따르는 제반증상을 의미하며 상복부 통증, 쓰림, 포만감, 팽만감, 조기만복감, 오심, 구토, 트림 등의 상복부를 중심으로 일어나는 여러 증상이 포함된 질환일 수 있고, 일 예시로, 지속적이거나 반복적인 상복부의 통증, 불쾌감, 상복부 쓰림, 가슴쓰림, 조기만복감, 식후포만감, 상복부 압박감, 상복부 팽만감 중 어느 하나 이상을 의미할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로써 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 균주 외에, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 향미제로서 천연 향미제[타우 마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르트름 등)를 사용할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0035] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0 초과 20 중량부 이하의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 식품 조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 등으로 사용될 수 있다. 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 또는 건강기능식품으로 사용되는 경우, 각종 식품류, 발효유, 육류, 음료수, 초콜릿, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료, 비타민 복합제, 주류 또는 그 밖의 건강기능식품 제형으로 제공될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 다른 일 양상은 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 (기탁번호: KCTC 13143BP) 균주를 유효성분으로 포함하는 소화불량 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0039] 전술한 바와 같이 본 발명의 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7 균주는 장 세포 밀착 연결 유전자 발현을 높여주고, 소화기 연동운동 및 위 배출 효과를 개선시키고, 위 배출과 관련된 위 무게 및 위 비움 수준도 개선되었으며, 소화 활성화와 관련된 혈액 내 호르몬도 유의적으로 증가하는 것을 확인하여 소화불량을 개선시킬 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, '치료'란 상기 조성물의 투여에 의해 혈관 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는

모든 행위를 의미한다.

- [0041] 본 발명에 있어서, "예방"이란 상기 조성물의 투여로 혈관 질환 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0042] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lacticaseibacillus paracasei*) HP7 를 유효 성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 약학적으로 유효한 양은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0045] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성물 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0047] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] **실험예 1: HP7 균주 처리시 장 세포 생존율 확인**
- [0050] HP7 균주 처리시 장 세포의 독성을 확인하기 위하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 실험을 진행하였다. 인간 결장 세포주인 Caco-2 세포를 96구 플레이트에 1×10^5 cells/well로 24시간 배양 후, 비교군인 락티카제이바실러스 파라카제이 ATCC 25302 1×10^7 CFU/well, 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 1×10^7 CFU/well 및 1×10^8 CFU/well 처리 후 24시간 배양하였다. 이후 0.5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 제조하여 배지 부피의 10%를 투입하여 4시간 배양하였다. 배양 후 5분간 1,500 rpm에서 원심 분리 한 후에, 상등액을 제거하고 포르마잔(formazan) 결정을 용해하기 위해 DMSO 150 μ L를 넣은 후 흡광도를 측정하였다.
- [0051] 측정 결과 도 1에서 확인되는 바와 같이 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 및 락티카제이바실러스 파라카제이 ATCC 25302 균주에서는 인간 결장 세포주인 Caco-2 세포주에서 세포 생존율의 변화를 관찰할 수 없었으며 배양 특성에도 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.
- [0053] **실험예 2: HP7 균주의 밀착 연결(tight junction) 관련 유전자 발현 확인**
- [0054] 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7의 장 세포주에서의 밀착 연결 관련 유전자인 ZO-1(Tight junction protein 1), OCLN(Occludin), CLDN(Claudin-1)의 발현을 분석하기 위해 Caco-2 세포를 12구 플레이트에 1×10^5 cells/well에 배양하였다. 세포 분화를 위해 21일간 배양을 진행하였고 배지는 2 ~ 3일 간격으로 교체하였다.

분화가 완료된 세포에 비교군인 락티카제이바실러스 파라카제이 ATCC 25302 1×10^7 CFU/well, 락티카제이바실러스 파라카제이 HP7 1×10^7 CFU/well 및 1×10^8 CFU/well을 처리하여 2시간 동안 배양하였고 TNF- α 용액을 100 ng/mL 농도가 되도록 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

[0055] 배양이 완료된 세포의 총 RNA를 추출하여 Qiagen Omniscript Reverse Transcription Kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Taqman Gene Expression Assay를 사용하여 RT-PCR 분석하였고 유전자의 발현 정도는 GAPDH를 이용하여 정규화하였다.

[0056] 그 결과 도 2에서 확인되는 바와 같이 대조군 및 ATCC 25302 균주 대비 본 발명의 HP7 균주는 동일농도에서도 밀착 연접 관련 유전자들의 발현이 회복, 증가되었다. 기능성 소화불량은 장 누수와 높은 상관관계를 가진 것으로 알려져 있어 밀착 연접 관련 유전자의 발현 증가 시 기능성 소화불량 완화 및 개선에 도움을 줄 것이라 생각하고 기능성 소화불량 동물실험을 진행하였다.

[0058] **실험예 3: In vivo 시험군 별 체중 변화 확인**

[0059] 본 발명에서는 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7의 섭취에 따른 기능성 소화불량 예방 또는 개선 효과를 확인하였다.

[0060] 마우스는 듀얼바이오텍(주)에서 구입하였으며, 6주령의 웅성 Balb/c 마우스를 사용하였다. 사육실 환경 온도는 22 ± 1 ℃ 습도는 55 ± 10 %, 조명 시간 12시간으로 설정하였다. 마우스는 일반 고형사료와 물을 자유롭게 공급하면서 1주일간 순화시켰다.

[0061] 동물 모델은 로페라마이드(Loperamide)로 유도된 기능성 소화불량 모델을 사용하였다. 로페라마이드를 통해 위 배출이 지연되는 기능성 소화장애 병리모델에서 로페라마이드 투여 전 락티카제이바실러스 파라카제이 (*Lactocaseibacillus paracasei*) HP7의 전처리로 기능성 소화장애가 완화되는 것을 확인하였다. 동물실험은 각각 음식물의 이동거리를 측정하는 실험과 위 비움/배출 실험으로 각각 나누어 실시하였다.

[0062] 실험군은 정상군, 기능성 소화 장애 유도군(대조군), 양성대조군, 유산균 투여군(HP7)으로 조성하였다. 이때 기능성 소화 장애 유도군, 양성대조군, 유산균 투여군은 실험 당일 10 mg/kg의 용량으로 로페라마이드를 복강에 투여하였고, 정상군은 식염수를 동일하게 투여하였다. 양성대조군은 기능성 소화 장애의 주요한 치료제인 위 운동 촉진제로 알려져 있는 모사프리드(Mosapride)를 사용하였다. HP7 실험군은 로페라마이드 투여 전 2주간 1×10^8 , 1×10^9 CFU/200ul/day로 경구 투여하였으며, 양성대조군인 모사프리드도 동일하게 3 mg/kg을 동일한 용량으로 경구 투여하였다.

[0063] 그 결과 표 1 및 도 3에서 확인되는 바와 같이 시험군 간 체중의 유의적인 차이를 확인할 수 없었고 식이 섭취량에서도 유의적 차이를 확인하지 못하였다.

표 1

[0064]

| Mouse weight (g) | | | | |
|------------------|---------|-----------|-----------|--------|
| Normal | Control | Mosapride | HP7 (CFU) | |
| | | | 10^8 | 10^9 |
| 24.32 | 23.91 | 23.45 | 24.16 | 23.06 |
| 25.71 | 24.05 | 23.96 | 24.50 | 22.73 |
| 25.38 | 22.65 | 24.96 | 23.95 | 25.00 |
| 23.35 | 25.28 | 25.18 | 27.73 | 24.62 |
| 23.75 | 23.71 | 24.05 | 25.73 | 24.62 |
| 23.49 | 24.74 | 25.82 | 22.96 | 25.10 |

[0066] **실험예 4: 소화기 (장) 연동운동에 의한 음식물 이동거리 확인**

[0067] 실험 당일 로페라마이드 (10 mg/kg, 기능성 소화불량 유도)를 복강 투여하였다. 30분 후, 마우스에 10% 아라비아검에 녹인 5% 활성탄을 200 μ L 경구 투여하였다. 그로부터 30분 후, 마우스를 시간별로 희생하여 유문 (pylorus)부터 맹장 (cecum)까지 활성탄의 이동거리를 측정하였다. 이동 비율은 유문부터 맹장까지 전체 길이에서 활성탄의 이동거리로 측정하였다.

[0068] 그 결과 도 4 및 5에서 확인되는 바와 같이 로페라미드를 투여한 마우스 (Control) 대비 Mosapride를 투여한 마우스에서 개선된 장 연동운동을 확인하였고, 본 발명의 HP7 균주를 투여한 마우스는 Mosapride를 투여한 마우스 대비 더욱 우수한 음식물 이동거리 및 이동 비율을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 HP7 균주는 기능성 소화불량에서 위장 연동운동을 개선시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0070] **실험예 5: 위 무게 변화와 위 비움 효과 확인**

[0071] 전술한 실험과 동일한 방법으로 실험 당일 로페라미드 (10 mg/kg, 기능성 소화불량 유도)를 복강 투여하였다. 30분 후, 마우스에 페놀레드 용액(지시약)을 500 μ L 경구 투여하였다. 페놀레드 용액은 증류수에 카르복시메틸 셀룰로스 1.5% (w/v) 되도록 제조 하였으며, 0.05% (w/v) 농도의 페놀레드를 첨가하여 만들었다. 페놀레드 용액 투여 30분 후, 마우스를 시간별 순차적으로 희생시킨 후 위 조직을 적출하여 0.1N 수산화나트륨 5 mL와 20% (w/v) 트리클로로 아세트산 0.5 mL로 균질화하였다. 균질액을 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 다음, 상층액 1 mL를 0.5N 수산화나트륨 4mL에 첨가하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 혈액을 채취하여 혈청을 분리 하였으며, 일부 위와 십이지장 조직과 함께 사용 전까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0072] 흡광도를 측정한 뒤 아래와 같은 공식으로 위 비움율을 계산하였다.

[0074] Gastric emptying (%) = (1-X)/Y * 100

[0075] X: Absorbance of phenol red solution remaining in the stomach

[0076] Y: Absorbance of naive phenol red mixed with sodium hydroxide solution.

[0078] 그 결과 도 6에서 확인되는 바와 같이 섭취된 페놀레드 용액(지시약)이 함유된 유동 식이가 소화불량을 유도한 군에서는 잔존하여 위 무게가 증가하지만 양성대조군(mosapride) 및 HP7 섭취군에서는 위 연동 운동이 회복되어 위 무게가 감소하였음을 확인하였다.

[0079] 또한, 도 7에서 확인되는 바와 같이 페놀레드 용액(지시약)이 함유된 유동식이를 섭취하고 30분 뒤에 희생 및 개복 후 위를 적출하여 위 조직 균질액으로부터 위에 잔존하는 지시약의 흡광도를 측정하여 위 비움 효과를 측정하였으며 HP7의 섭취군에서 유의적으로 위 비움 및 위 배출 효과를 확인하였다.

[0080] 이러한 결과들을 통해 본 발명의 HP7 균주는 위 무게가 감소, 위 비움 및 위 배출 효과를 가지고 있어 기능성 소화 장애 개선에 도움을 줄 수 있다.

[0082] **실험예 6: 혈액 내 소화 활성 관련 지표의 변화 확인 결과**

[0083] 전술한 바와 같이 분리된 혈청에서 소화 활성과 관련된 호르몬 지표를 측정하였다. 가스트린은 단백질에 의한 자극으로 생성되며 위 운동을 증진시키고 위 점막 구조를 유지하는 것으로 알려져 있다. HP7 균주의 섭취는 로페라미드를 투여한 대조군에 비해 유의적으로 가스트린의 생성을 증가하였다. 이로부터 위장 운동을 증진시켜 위 비움 및 배출에 기여할 수 있다.

[0084] GIP는 gastric inhibitory polypeptide로 위 억제성 폴리펩티드로 위 운동 및 위산 분비를 억제하고 인슐린 분비를 촉진한다. 또한 가스트린의 생성을 억제하고 위산 분비 및 위 운동을 억제한다고 알려져 있다. PYY는 peptide YY로 인슐린 분비 조절, 위산 분비 억제, 위 배출 억제 기능을 하며 음식물이 경구에서 맹장으로 이행하는데 걸리는 시간을 지연시켜 식후 포만감을 느끼게 한다. 도 8에서 확인된 바와 같이 HP7 균주의 섭취는 로페라미드를 투여한 대조군에 비해 위 운동을 억제하거나 위 배출 억제 기능을 갖는 GIP와 PYY를 유의적으로 감소시키는 것으로 확인되었다. 이것은 가스트린의 생성을 증진시키는 것과 마찬가지로 위장 운동을 개선함으로써 위 비움 및 배출에 기여할 수 있다.

[0086] **실험예 7: 혈액 내 위장관 관련 지표의 변화 확인 결과**

[0087] 위장관의 배출은 자율신경을 통한 위장 운동에 의해 수행되는데 loperamide를 투여 받은 대조군에서는 기능성 소화장애가 유도된다. 5-HT와 그 수용체(5-HT4R)유전자는 평활근 운동에 관여하는데 양성대조군으로 사용한 mosapride는 위 운동 촉진제로 5-HT4R에 직접 관여한다고 알려져 있다.

[0088] 위 유문부 (pylorus) 조직을 이용하여 평활근 수축 관련 유전자 5HT4R (5-hydroxytryptamine(serotonin) receptor 4), ANO1(anoctamin-1), RYR3(ryanodine receptor 3), smMLCK(smooth muscle cell myosin light chain kinase)을 분석하였다. 희생된 마우스의 위 유문부 일부 조직에서 총 RNA를 추출하여 Qiagen Omniscript Reverse Transcription Kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Taqman Gene Expression Assay를 사

용하여 RT-PCR 분석하였고 유전자의 발현 정도는 GAPDH를 이용하여 정규화하였다.

[0089] 그 결과 도 9에서 확인되는 바와 같이, HP7 투여군에서도 양성대조군과 마찬가지로 5-HT4R의 유전자 발현을 회복하여 소화 기능 개선에 기여할 수 있음을 확인하였으며, 평활근 수축 관련과 관련된 ANO1, RYR3 및 smMLCK 유전자 발현 또한 유의하게 증가시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 본 발명의 HP7 균주는 평활근 운동 개선 작용으로 위장 운동을 증진시켜 소화 기능을 개선시킬 수 있다.

[0091] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0093]

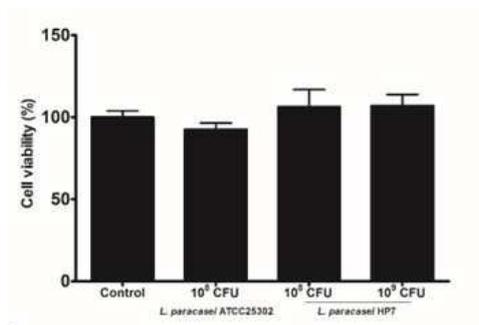
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC13143BP

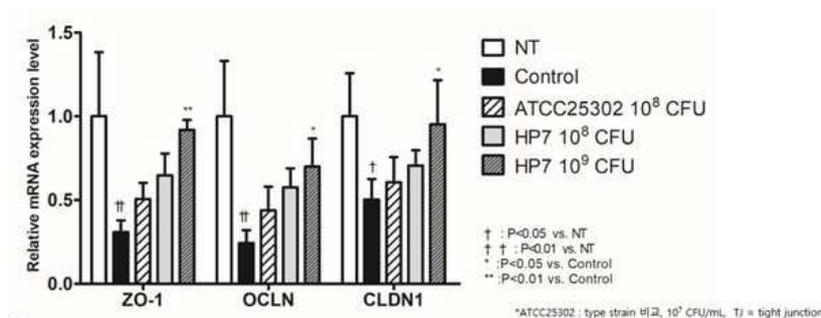
수탁일자 : 20161031

도면

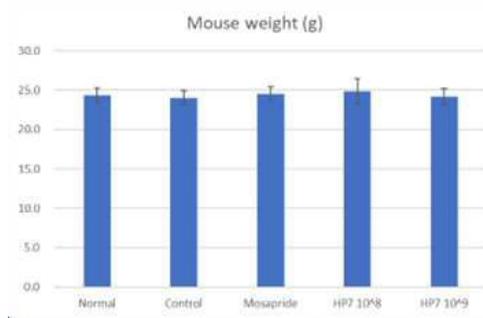
도면1



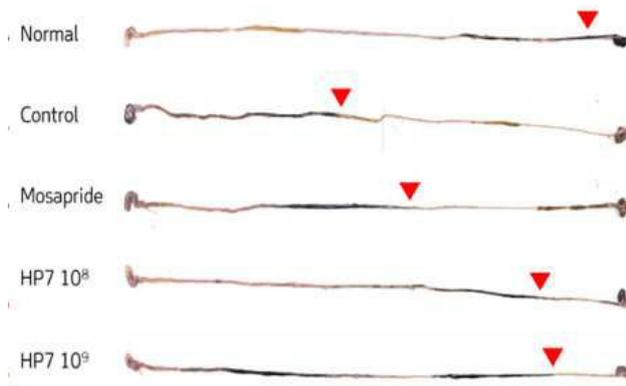
도면2



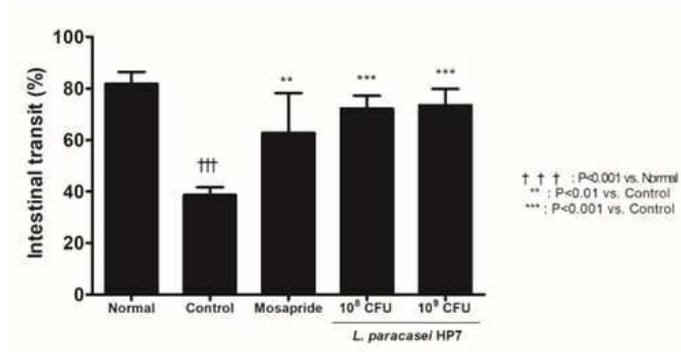
도면3



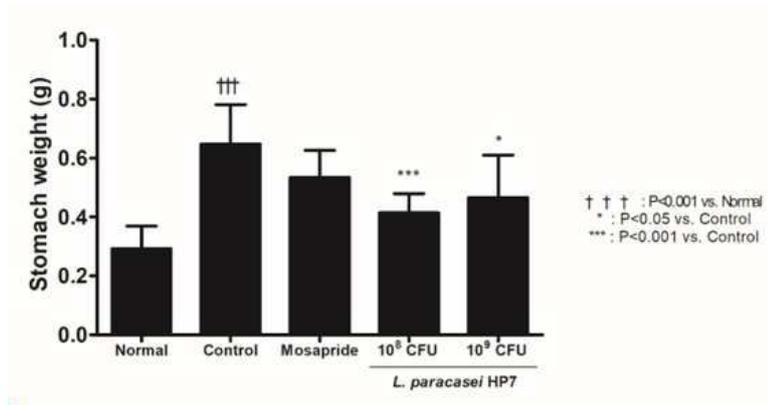
도면4



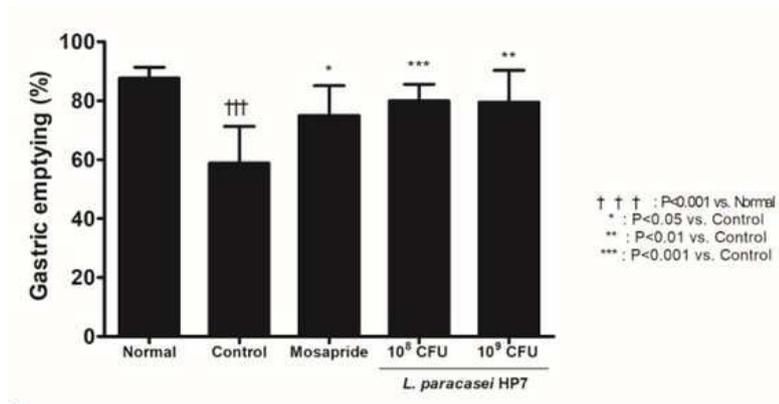
도면5



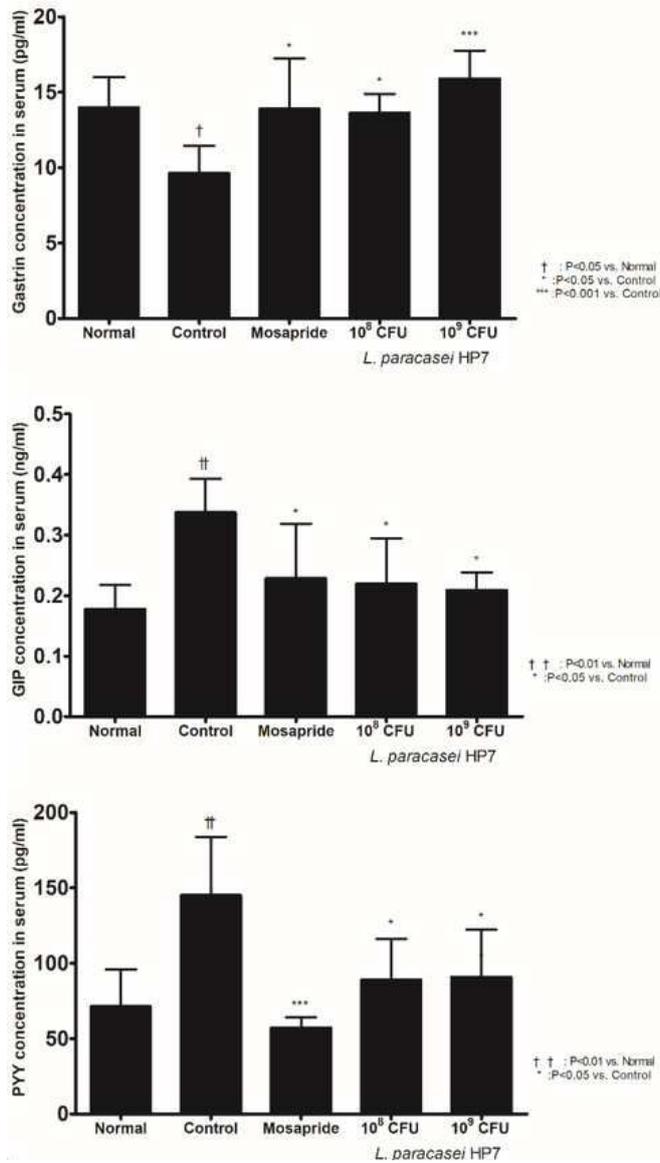
도면6



도면7



도면8



도면9

