



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월31일
(11) 등록번호 10-1823459
(24) 등록일자 2018년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/747 (2014.01) C12R 1/225 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0152746
(22) 출원일자 2016년11월16일
심사청구일자 2016년11월16일

(56) 선행기술조사문헌
박영식. Helicobacter pylori를 저해하는 유산균의 분리 및 저해물질의 특성. 2002, 강원대학교 대학원 석사학위논문.*
Korean journal of biotechnology and bioengineering. 2005, v. 20, no. 2, pp. 76-83.
Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 2014, v. 57, no. 5, pp. 621-630.
JP2004516842 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사한국야쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)

(72) 발명자
김주연
경기도 수원시 영통구 덕영대로1555번길 20 945동 515호 (영통동, 벽적골9단지아파트)
정운희
경기도 용인시 기흥구 공세로 226 청구아파트 10 3동 903호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
경일호

전체 청구항 수 : 총 3 항

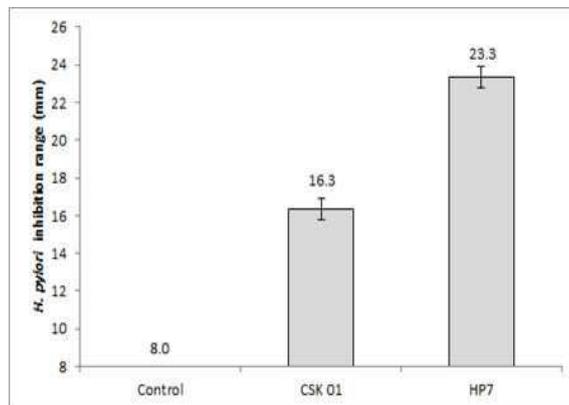
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 헬리코박터 파이로리에 대한 항균활성과 응집력을 갖는 락토바실러스 파라카제이 HP7 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7은 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori)에 대한 우수한 항균활성과 강력한 응집활성을 가지므로 이를 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori) 감염에 의한 위염 또는 위궤양 등 위장장애 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori)감염에 의한 위염 또는 위궤양 등 위장장애 개선용 건강기능식품, 기능성 음료, 발효제품 등 헬리코박터 파이로리 감염증 개선효과를 갖는 제품에 응용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 35/747 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23Y 2220/63 (2013.01)
C12R 1/225 (2013.01)

(72) 발명자

김성환

서울특별시 중랑구 중랑천로 20 9동 1005호 (면목동, 면목한신아파트)

심재중

서울특별시 관악구 관악로30길 27, 121동 1303호

이정열

경기도 양평군 서종면 통점길 63 (서후리)

심재현

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 213동 901호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 항균활성과 응집력을 가지는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7(기탁번호: KCTC 13143BP).

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7(기탁번호: KCTC 13143BP)을 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위장장애 개선용 식품조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 식품조성물은 발효유, 기능성 음료, 건강기능식품 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위장장애 개선용 식품조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 김치에서 분리되며, 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 항균활성을 가지고, 인체 소화관, 특히, 위(胃)의 배양 조건 하에서 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)를 응집시켜 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염을 예방 및 치료할 수 있는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 헬리코박터균은 위장 점막에 주로 감염되어 급성 위염, 만성 위염, 위궤양, 십이지장궤양, 위림프종의 직접적인 원인이 되며, 헬리코박터균에 의한 만성 위염이 지속되면 위장 점막에 위축성 변화가 발생하고, 이후 여러 가지 환경적 요인과 유전적 요인이 작용하여 위선암의 발생률이 높아진다고 알려져 있다. 따라서, 헬리코박터균은 1994년 세계보건기구(WHO)에서 1급암 유발 인자로 경고된 바 있다.

[0003] 우리나라 국민들에게서 헬리코박터균 감염은 무척 흔해서, 전 국민의 46.6%와 성인에서 69.4%의 감염률을 보이고 있다. 이런 높은 헬리코박터균의 보균 비율은 우리나라 국민의 높은 위선암 발생률의 원인이 된다고 추측되고 있다. 헬리코박터균의 치료는 항생제를 이용한다. 일반적으로 이용하는 헬리코박터 1차 치료제는 항생제 2종류와 위산 억제제 한 종류를 포함해서 총 세 종류의 약으로 구성되어 있다. 이를 7~14일 복용하면 70~80% 정도의 확률로 헬리코박터균이 치료 된다. 하지만 최근 헬리코박터균의 항생제 내성이 높아져 치료를 받아도 균이 없어지지 않는 경우가 점차 많아 문제가 되고 있고, 어떤 환자에게서 제균을 해야만 하는가에 대한 권고지침이 명확치 않다는 점 등의 이유에서 약물에 의한 제균치료 이외에 식품이나 천연물 추출물 등의 개발에 관심이 증가되고 있다. 특히, 2007년 Maastricht III consensus보고에 의하면 프로바이오틱스가 헬리코박터균 감염을 치

료하기 위한 한 가지 도구가 될 수도 있음이 언급된 바 있다. 또한 항생제와 PPI를 이용한 헬리코박터균의 1차
 제균 치료 시 유산균을 병용투여하면 제균율을 향상시키고 제균 치료제 사용으로 인한 합병증을 감소시킬 수 있
 음이 보고되었다[Sun Hee Roh, 2011. The Effect of Probiotics for Helicobacter pylori. The Korean
 Journal of Helicobacter and Upper Gastrointestinal Research. 11(1); 26-36].

[0004] 이에 본 발명자들은 김치로부터 분리된 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7의 헬리코박터
 파이로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 강력한 응집활성으로 인하여 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter
 pylori*)의 위세포 부착을 제거하며, 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)에 감염된 마우스에서 락토바실
 러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7의 경구투여가 항생제의 투여 없이도 효과적으로 헬리코박터 파
 이로리(*Helicobacter pylori*)를 제균함을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 출원공개번호 제10-2002-0055958호(발명의 명칭: 위·장 점막 부착성과 증식성, 내산
 성, 내담즙성 및헬리코박터 파일로리, 대장균 0157:H7에 대한 항균성이 우수한 락토바실러스 파라카제이 서브
 스페시스 파라카제이 C S K 01, 출원공개일: 2002.07.10)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 항균활성과 응집력을 갖는 락토바실러스 파라카제
 이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 기능성 음료, 발효유, 건강기
 능식품 등을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 항균활성과
 응집력을 갖는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적
 조성물, 기능성 음료, 발효유, 건강기능식품 등을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0008] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0009] 본 발명에 따른 신균주를 분리하기 위하여 전국 배추김치 및 백김치를 수집한 후 분쇄하여 호기희석액 5ml에 희
 석하여 김치 분쇄액을 제조하였다. 상기 김치 분쇄액을 0.1% CaCO₃를 함유하는 MRS 고체배지에 도말한 후
 AnaeroGen™ gas pack(Oxoid Inc.) 을 사용하여 혐기적인 조건에서 37℃에서 48시간 배양한 후 젖산 생성에 의
 해 투명환을 형성한 콜로니를(colony)를 백금이(loop)로 취하여 BCP 고체배지에 접종하고 24시간 후 노란색 환
 을 형성한 콜로니를 유산균으로 1차로 순수 분리하였다. 이렇게 분리된 유산균 집락을 MRS 배지에 접종하여 24
 시간 배양 후 배양액을 중성으로 조정후 희석하여 희석 배양액을 헬리코박터 파이로리 SS1(*H. pylori* SS1)을
 lawn으로 한 한천 배지에 도말하였다. 이때, 헬리코박터 파이로리를 저해하는 halo를 형성하는 균주 31종을 2차
 로 분리하였다.

[0010] 헬리코박터 파이로리 응집(coaggregation)활성이 강한 균주를 선별하기 위하여 위에서 분리된 31종의 균주를 사
 용하여 헬리코박터 파이로리 응집활성 시험을 진행하였다. 상기 31종의 균주는 MRS 배지에 접종하여 24시간 배
 양 후 원심분리를 통해 균체를 회수하여 인산완충용액(PBS, pH 7.0)으로 세척 후 0.1D600값이 4가 되도록 PBS에
 현탁하고 헬리코박터 파이로리 SS1(*H. pylori* SS1)은 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천배지에 접종하여
 10% CO₂, 37℃ 및 microaerobic 조건에서 3일간 배양한 후 균체를 회수하여 인공위액(0.3% pepsin, 0.5% NaCl,
 pH 4)에 0.1D600 값이 2가 되도록 현탁하였다. 이렇게 제조된 유산균과 헬리코박터 파이로리 현탁액을 1:1 중량
 비율이 되도록 섞은 후 15분 간 방치하여 응집체 형성이 우수한 균주를 최종적으로 선별하였다.

[0011] 이렇게 분리한 신규 균주의 16S rDNA 유전자 분석과 Biomerieux 사의 API 50 CHL kit 동정 결과를 하기의 표 1
 에 나타내었다.

- [0030] 최적 pH 5.0~6.0
- [0031] ③산소에 대한 영향: 통성혐기성
- [0032] 4)카탈라제: -
- [0033] 5)가스형성여부: -
- [0034] 6)15℃에서 생육: -
- [0035] 7)45℃에서 생육: +
- [0036] 8)인돌생산: -
- [0037] 9)젖산생산: +
- [0038] 10)당 분해 이용성
- [0039] Biomerieux 사의 API 50 CH kit를 이용하여 당 발효 실험을 한 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

표 2

당 0-24	사용 여부	당 25-49	사용 여부
0 Control	-	25 에스콜린	-
1 글리세롤	-	26 살리신	+
2 Erythritol	-	27 셀로비오스	+
3 D 아라비노스	-	28 말토스	+
4 L 아라비노스	-	29 유당	+
5 리보스	+	30 멜리비오스	-
6 D 크실로스	-	31 자당	+
7 L 크실로스	-	32 트레할로스	+
8 아도니톨	+	33 이눌린	+
9 β-메틸-D-크실로시드	-	34 멜레지토스	+
10 갈락토스	+	35 라피노스	-
11 포도당	+	36 전분	-
12 과당	+	37 글리코겐	-
13 만노스	+	38 크실리톨	-
14 소르보스	+	39 겐티오비오스	+
15 램노스	-	40 D 투라노스	+
16 돌시톨	-	41 D 라이소스	-
17 이노시톨	-	42 D 타가토스	+
18 만니톨	+	43 D 푸코스	+
19 소르비톨	+	44 L 푸코스	-
20 α-메틸-D-만노시드	-	45 D 아라비톨	-
21 α-메틸-D-클루코시드	-	46 L 아라비톨	-
22 N-아세틸-글루코사민	+	47 글루코나테	+
23 아미그달린	+	48 2-케토-글루코나테	-
24 아르부틴	+	49 5-케토-글루코나테	-

- [0040]
- [0041] 한편, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7을 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위염, 위궤양 등을 포함한 위장장애 치료 또는 예방용 약학적 조성물은 단독 또는 약제학적으로 사용되는 부형제들과 함께 약제학적으로 통상으로 사용되는 방법에 따라 정제, 캡슐제 등과 같은 제제형태로 제제화하여 사용될 수 있다.
- [0042] 사람의 경우, 통상적인 1일 투여량은 성인기준 기준 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^{10}$ CFU 일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 실제 투여량은 투여경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 건강상태 및 질환의 중증도

등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다.

[0043] 물론, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7을 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위염, 위궤양 등을 포함한 위장장애 치료 또는 예방용 약학적 조성물은 독성 및 부작용은 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0044] 또한, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7을 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위염, 위궤양 등을 포함한 위장장애 개선용 식품조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 등으로 사용될 수 있다. 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 또는 건강기능식품으로 사용되는 경우, 각종 식품류, 발효유, 육류, 음료수, 초콜렛, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료, 비타민 복합제, 주류 및 그 밖의 건강기능식품일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 특히, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7을 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위염, 위궤양 등을 포함한 위장장애 개선용 발효유는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 유산균 배양액 및 혼합과즙시럽을 일정비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 발효유를 제조한다.

[0046] 또한, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7을 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위염, 위궤양 등을 포함한 위장장애 개선용 기능성 음료는 혼합과즙시럽, 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성 음료를 제조한다.

[0047] 또한, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7을 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위염, 위궤양 등을 포함한 위장장애 개선용 건강기능식품은 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7을 포함하는 것 이외에 영양보조 성분으로 비타민 B₁, B₂, B₅, B₆, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7은 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 우수한 항균활성과 강력한 응집활성을 가지므로 이를 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위염, 위궤양 등을 포함한 위장장애의 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의한 위염, 위궤양 등을 포함한 위장장애 개선용 건강기능식품, 기능성 음료, 발효제품 등 헬리코박터 파이로리 감염증 개선효과를 갖는 제품에 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7에 의한 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 사멸을 well diffuse 방법으로 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 2는 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7에 의한 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 사멸환의 크기를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7과 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 현탁액이 위장 환경내에서 큰 응집체를 형성함을 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 4는 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7이 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)와 응집체를 형성하는 비율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7이 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)가 감염된 마우스의 위 점막에서 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)를 제거함을 CLO test를 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7이 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)가 감염된 마우스의 위 점막에서 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)를 제거함을

PCR을 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.
- [0051] <실시예 1>
- [0052] 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 농축균의 제조
- [0053] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7의 순수 배양한 콜로니를 MRS 액체배지에 접종하고, 37℃ 배양기에서 24시간 동안 정치배양(batch culture)하였다. 이것을 4,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)를 이용하여 4,000rpm에서 다시 원심분리하여 세척한 뒤 상등액을 제거하고 50% 멸균탈지유(Skim milk)를 보호제로 사용하여 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 펠렛을 풀어주었다. 이렇게 제조한 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 농축균의 생균수는 10^{10} CFU/ml가 나왔다. 상기 농축균 제조에 사용하는 보호제는 멸균탈지유 이외에 텍스트린, 유당, 올리고당, 포도당 및 트레할로스 중 어느 하나이거나 이의 혼합물일 수 있다.
- [0054] 한편, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 농축균은 상기와 같은 액상농축균 형태 외에 동결 건조된 분말 형태로 제공될 수도 있다.
- [0055] <실시예 2>
- [0056] 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조
- [0057] 액제의 제조
- [0058] 상기 실시예 1의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 농축균 분말 100mg, 이성화당 10g, 만니톨 5g을 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음, 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.
- [0059] 캡슐제의 제조
- [0060] 상기 실시예 1의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 농축균 분말 100mg에 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 완전히 혼합한 후 약전 제제충척 중 캡슐제 제조방법에 따라 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0061] <실시예 3>
- [0062] 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7을 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0063] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7을 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0064] 먼저, 유산균 배양액은 원유 95.36중량%와 탈지분유(또는 혼합분유) 4.6중량%를 교반하여 15℃에서의 비중은 1.0473~1.0475, 적정산도는 0.200~0.220%, pH는 6.55~6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix⁰)는 16.3~16.5% 정도가 되도록 혼합하였다. 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 적정온도 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP 배지에서의 총 유산균 수가 1.0×10^9 cfu/ml이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다. 그런 다음, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix⁰ 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다. 그런 다음, 상기 유산균 배양액 69.5중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 농축균 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7을 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.
- [0065] <실시예 4>

- [0066] 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0067] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0068] 먼저, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix⁰ 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0069] 그리고, 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 농축균 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량% 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0070] <실시예 5>
- [0071] 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0072] 상기 실시예 1의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 농축균 분말 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B₁, B₂, B₅, B₆, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기의 실시예 1의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물에 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된과립은 40~50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12~14메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.
- [0073] <시험예 1>
- [0074] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7의 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori) 항균효과
- [0075] 1-1. 사용 균주의 배양
- [0076] 본 시험에 사용된 헬리코박터 파이로리 SS1(Helicobacter pylori SS1)은 한국헬리코박터은행에서 분양받아 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천배지(Difco Laboratory, Detroit, MI, US)에 접종하여 10% CO₂, 37℃ 및 microaerobic 항온배양기(Sanyo, Osaka, Japan)에서 48~72시간 동안 배양하여 사용하였다.
- [0077] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7과 대조균주 락토바실러스 파라카제이 서브스페이스 파라카제이(Lactobacillus paracasei subsp. paracasei)CSK01은 0.05% L-시스테인을 첨가하여 만든 Lactobacilli MRS broth 또는 MRS agar(Difco Laboratory, Detroit, MI, US)에서 37℃, 24시간 동안 배양하였다.
- [0078] 1-2. 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori)에 대한 사멸환 측정
- [0079] 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori)에 대한 유산균의 항균활성을 확인하기 위해 well diffuse 방법을 사용하여 헬리코박터 파이로리의 사멸환을 측정하였다. 10% calf serum을 포함한 브루셀라 배지에 1% 한천을 사용하여 bottom agar를 만들고 0.7% 한천을 사용하여 top agar를 만들었다. 페트리디쉬에 metal borer를 올려놓고 1% agar 배지를 25ml 넣고 굳힌 뒤 borer를 제거한 후, top agar 100ml에 헬리코박터 파이로리를 10⁷CFU/ml이 되도록 접종하여 5ml을 덜어 사멸환 측정용 배지를 만들었다. 그리고, 상기 실시예 1-1의 MRS 배지에서 배양된 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7과 대조균주 락토바실러스 파라카제이 서브스페이스 파라카제이(Lactobacillus paracasei subsp. paracasei)CSK01을 원심분리하고 상등액을 1N NaOH를 이용하여 pH 6.5으로 조정된 후 0.22µm Syringe filter(Millipore, Billerica, MA)를 이용하여 제균하였다. 사멸환 측정용 배지의 Borer가 있던 구멍에 상기 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei) HP7 제균액과 대조균주 락토바실러스 파라카제이 서브스페이스 파라카제이CSK01 제균액을 각각 140µl씩 첨가하여 10% CO₂, microaerobic 조건에서 배양하고, 48시간 후 형성된 사멸환의 크기를 측정하였다.
- [0080] 상기 대조균주는 대한민국 출원공개번호 제10-2002-0055958호의 락토바실러스 파라카제이 서브스페이스 파라카

제이(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) C S K 01(기탁번호: KCTC 0907BP)을 사용하였다.

- [0081] 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.
- [0082] 도 1 및 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조균주 락토바실러스 파라카제이 서브스페시즈 파라카제이 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*)CSK01의 헬리코박터 파이로리에 대한 사멸환의 지름은 16.3mm인 반면에 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7의 헬리코박터 파이로리에 대한 사멸 환의 지름은 23.3mm으로서 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7가 대조균주 락토 바실러스 파라카제이 서브스페시즈 파라카제이(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*)CSK01 보다 약 30% 이상 매우 우수한 헬리코박터 파이로리 항균력을 가짐을 알 수 있었다.
- [0083] <시험예 2>
- [0084] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7의 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 응집체 형성
- [0085] 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)는 위 점막에 부착 후 점막 안으로 침투하여 위 상피세포와 접촉하여 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8와 TNF- α 등 여러 염증 사이토카인 생산을 유도하고, 이는 위염, 위궤양 및 위 암의 발병 원인이 된다. 따라서, 위장 환경에서 헬리코박터 파이로리를 응집한다면 헬리코박터 파이로리가 위 점막에 부착하는 것을 억제할 수 있다. 나아가 위 점막에 부착하였지만 침투하지 못한 헬리코박터 파이로리의 경우 응집체에 결합하여 점막으로부터 분리될 수 있다. 이렇게 분리된 헬리코박터 파이로리 응집체는 연동운동 에 의해 위로부터 제거되고 결국 몸 밖으로 배출될 수 있다.
- [0086] 따라서, 본 시험에서는 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7이 위장 환경에서 헬 리코박터 파이로리와 응집체를 형성하는지 알아 보았다.
- [0087] 먼저, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7은 MRS 배지에 접종하여 24시간 배양 후 원심분리를 통해 균체를 회수하여 PBS로 세척 후 흡광도가 4(A600=4)가 되도록 PBS에 현탁하고, 헬리코박터 파이로리 SS1(*H. pylori* SS1)은 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천배지에 접종하여 10% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 및 microaerobic 조건에서 3일간 배양한 후 균체를 회수하여 인공위액(0.3% pepsin, 0.5% NaCl, pH 4)에 흡광도가 2(A600=2)가 되도록 현탁하였다. 상기 제조된 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 현탁액과 헬리코박터 파이로리 SS1 현탁액을 1:1 중량비율로 섞은 후 15분에서 1시간 동안 방치하여 응집체 형성을 관찰하였다.
- [0088] 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0089] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 단독 또는 헬리코 박터 파이로리 단독의 대조군에서는 헬리코박터 파이로리와 응집체가 형성되지 않은 반면, 본 발명의 락토바실 러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7은 위장 환경과 유사한 인공위액 상에서 헬리코박터 파이로리와 강한 응집체를 형성하는 것을 알 수 있었다.
- [0090] <시험예 3>
- [0091] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7의 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 응집체 형성 비율 측정
- [0092] 상기 시험예 2에서와 같이 위(胃)에서 유산균과 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)의 응집체가 형성되 면 헬리코박터 파이로리는 위 점막 안으로 침투하지 못하여 체외로 배출될 수 있다. 이에 본 시험에서는 위장에 서 음식물이 머무르는 시간인 4시간 동안 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7이 얼마 만큼의 헬리코박터 응집체를 형성하는지 알아보았다.
- [0093] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7과 대조균주 락토바실러스 파라카제이 서브스 페시즈 파라카제이(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*)CSK01 각각을 MRS 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양 후 원심분리를 통해 균체를 회수하여 PBS로 세척 후 흡광도 4(A600=4)가 되도록 준비하였다. 헬리 코박터 파이로리 SS1(*H. pylori* SS1)은 시험예 2와 같은 방법으로 인공위액에 현탁하여 준비하였다.
- [0094] 상기 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 현탁액과 대조균주 락토바실러스 파라 카제이 서브스페시즈 파라카제이(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*)CSK01 현탁액을 상기 헬리코박 터 파이로리 SS1(*H. pylori* SS1) 현탁액과 각각 1:1 중량비율로 혼합 후 round bottom tube에 분주 후 37 $^{\circ}$ C에

서 4시간 동안 반응시킨 후 조심스럽게 상층액을 취하여 흡광도를 측정하였다. 응집체 형성 비율(Coaggregation rate)은 측정된 흡광도(A600)를 Coaggregation(%) = $\frac{\{(Ax + Ay) - 2 \times Amix\}}{(Ax + Ay)} \times 100$ 의 계산식[X. Chen. 2010. In vitro screening of lactobacilli with antagonistic activity against Helicobacter pylori from traditionally fermented foods. J. Dairy Sci. 93 :5627-5634]에 대입하여 구하였다.

- [0095] 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0096] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조군주 락토바실러스 파라카제이 서브스페시즈 파라카제이 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) CSK01은 18%로 비교적 낮은 헬리코박터 파이로리 응집체를 형성한 반면, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7은 4시간 동안 위장 환경에서 50% 이상 헬리코박터 파이로리 응집체를 형성하였다.
- [0097] <시험예 4>
- [0098] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7의 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 치료 동물효능평가
- [0099] 4-1. 실험동물 및 감염균주 선정
- [0100] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7가 헬리코박터 파이로리에 대한 항균효과와 헬리코박터 파이로리 응집체 유도 효과를 통해 실제로 헬리코박터 파이로리를 제거하여 헬리코박터 감염증을 치료할 수 있는지 알아보기 위하여 동물효능평가를 시행하였다.
- [0101] 본 시험에 사용된 동물은 57BL/6 마우스를 사용하였으며 이는 C57BL/6 마우스가 헬리코박터 파이로리의 감염을 유지하며 다수의 연구자들이 헬리코박터 파이로리 마우스 감염 모델로 사용하여 본 시험에 선택하게 되었다. 감염에 사용된 헬리코박터 파이로리는 헬리코박터 파이로리 SS1(*H. pylori* SS1)을 사용하였으며 이는 헬리코박터 파이로리 SS1이 마우스 위점막에 adaptation이 되는 균주로 다수의 연구자들이 마우스 시험에서 헬리코박터 파이로리 SS1(*H. pylori* SS1) 균주를 사용하여, 과학적 근거를 가지고 선정하였다.
- [0102] 4-2. 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염유도
- [0103] 헬리코박터 파이로리 SS1(*H. pylori* SS1) 한국헬리코박터은행에서 분양받아 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천배지에 접종하여 10% CO₂, 37°C 및 microaerobic 조건에서 48시간 배양하였다. 배양된 헬리코박터 파이로리 SS1(*H. pylori* SS1)는 2.0×10^9 /mL colony-forming unit(CFU)의 균수로 맞추어 순화 사육을 마친 5주령의 C57BL/6J 마우스를 12시간 절식시킨 존데(sonde)를 이용하여 0.5mL씩 2일 간격으로 3회 경구투여 하여 감염을 유도하였다. 이때, 비감염군(Normal) 마우스에는 헬리코박터 파이로리 대신 증류수를 투여하였다. 감염 1주 후 모든 마우스의 혈액을 안와정맥총에서 채취하여 혈청을 분리한 후 혈청 중 헬리코박터 항체 IgG 역가를 헬리코박터 파이로리 비감염군과 비교를 통하여 감염에 의해 항체가 상승이 확인된 개체들만 선발하여 시험에 사용하였다.
- [0104] 4-3. 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 치료효과 확인
- [0105] 최종적으로 감염이 확인된 마우스 중 10마리에는 증류수를 100 μ l씩 매일 4주간 경구투여하여 양성대조군으로 하였으며, 다른 10마리에는 상기 실시예 1의 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 농축균을 증류수 100 μ l 에 희석하여 1일 투여 균수가 2.0×10^7 CFU/kg이 되도록 매일 4주간 경구투여 하여 실험군으로 하였다. 투여기간 동안 체중을 매일 측정하여 투여되는 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7의 양은 항상 일정하도록 적절히 조절하였다. 투여기간이 완료된 후 본 시험에 사용된 마우스는 이산화탄소를 사용해 안락사 하였다. 안락사 한 마우스에서 위장 조직을 취한 후 헬리코박터 파이로리 검출을 위한 CL0 test 및 헬리코박터 파이로리 특이 프라이머를 이용한 PCR을 시행하였다. 실험 결과의 통계적 유의성은 MiniTab statistic software program을 통해 분석하였다.
- [0106] 한편, 헬리코박터 파이로리에 감염되지 않은 마우스 10마리에는 증류수를 100 μ l씩 매일 4주간 경구투여하여 음성대조군으로 하였다.
- [0107] 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.
- [0108] 도 5 및 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7을 투여하지 않은 양성대조군에서는 헬리코박터 파이로리가 위 점막에서 전혀 제거되지 않은 것에 반하여,

본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7을 투여한 실험군에서는 위(胃) 점막의 헬리코박터 파이로리가 50~60% 제거된 것을 알 수 있었다.

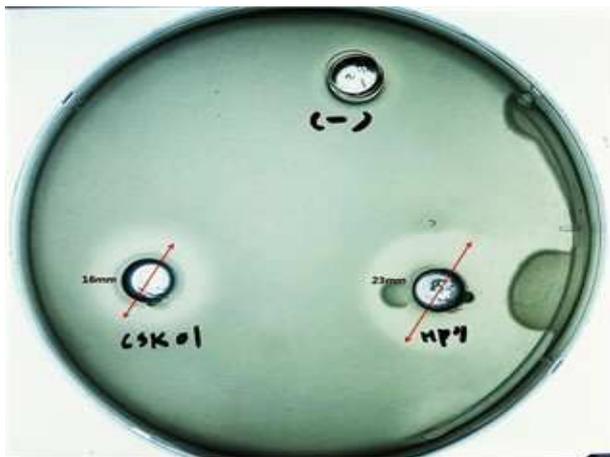
[0109] 이는 마우스에 투여한 본 발명의 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) HP7 2.0×10^7 CFU/kg을 인체적용 농도 환산공식 [Human Dose = Mouse Dose \times (Mouse Km = 3 / Human Km = 37)]에 적용하여 60kg 성인 기준으로 환산시 1.0×10^8 CFU/day로 발효유(액상발효유=유산균수 1.0×10^7 CFU/ml 이상, 농후발효유=유산균수 1.0×10^8 CFU/ml 이상), 유산균 음료(유산균수 1.0×10^6 CFU/ml 이상)를 통해 쉽게 섭취할 수 있는 유산균 농도임을 감안할 때 매우 효과적임을 알 수 있다.

수탁번호

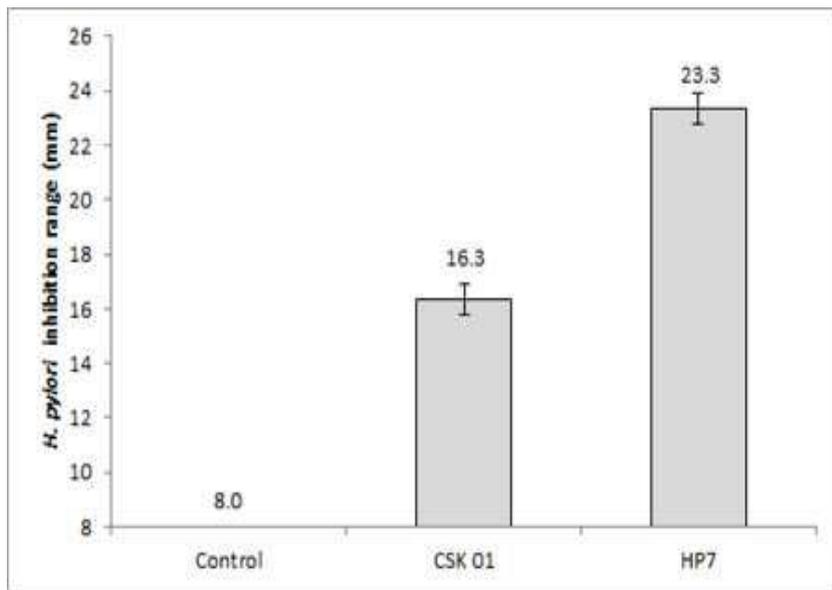
[0110] 기탁기관명 : 생물자원센터
 수탁번호 : KCTC13143BP
 수탁일자 : 20161031

도면

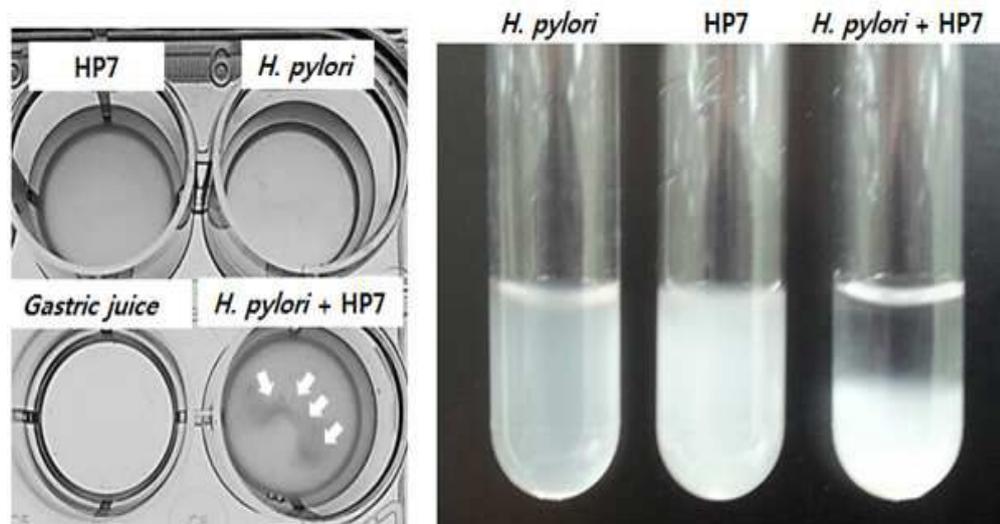
도면1



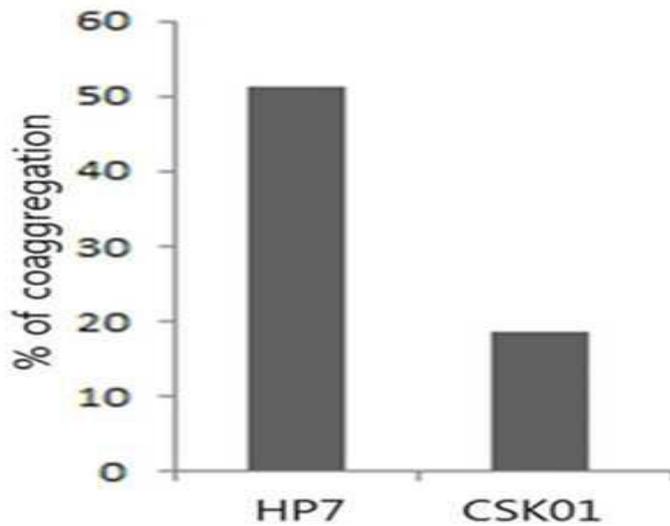
도면2



도면3



도면4



도면5

Group	Inoculation		Animal No.										헬리코박터 파이로리 음성 개체수 (제균률 %)	
	HP	Treatment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
음성대조군	X	중류수	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10 (100%)
양성대조군	○	중류수	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0 (0)
실험군	○	<i>L. paracasei</i> HP7 (2X 10 ⁷ CFU/kg)	●	●	○	●	○	●	●	○	○	○	○	5* (50%)

● : 헬리코박터 파이로리 양성, ○ : H. 헬리코박터 파이로리 음성
 - 위 침막 조직을 CLO test기¹⁾와 반응하여 CLO test기의 색이 노란색에서 붉은 색으로 변환된 것을 헬리코박터 파이로리 양성으로 함
 * 양성대조군과 대비하여 95% 이상의 신뢰 구간에서 통계적 유의성을 보임 (P<0.05).

도면6

Group	Inoculation		개체수	헬리코박터 파이로리 양성 개체수 (감염률 %)	헬리코박터 파이로리 음성 개체수 (제균률 %)
	<i>H. pylori</i>	Treatment			
음성대조군	No	중류수	10	0 (0%)	10 (100%)
양성대조군	Yes	중류수	10	10 (100%)	0 (0%)
실험군	Yes	<i>L. paracasei</i> HP7 (2X 10 ⁷ CFU/kg)	10	5 (50%)	7* (70%)

- 위 침막 조직에서 헬리코박터 특이 프라이머로 PCR을 진행하여 밴드가 관찰된 개체를 헬리코박터 파이로리 양성으로 함
 * 양성대조군과 대비하여 95% 이상의 신뢰 구간에서 통계적 유의성을 보임 (P<0.05).