



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월08일
(11) 등록번호 10-1955276
(24) 등록일자 2019년02월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/746 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2018-0142888
- (22) 출원일자 2018년11월19일
심사청구일자 2018년11월19일
- (56) 선행기술조사문헌
Journal of Nutritional Biochemistry. 24 pp.
531-538, 2013*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
주식회사한국야쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
- (72) 발명자
남우
서울특별시 영등포구 대림3동 754-51호 3층
박수동
경기도 용인시 기흥구 고매동 우림홀인원 아파트
205-1003
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
경일호

전체 청구항 수 : 총 3 항

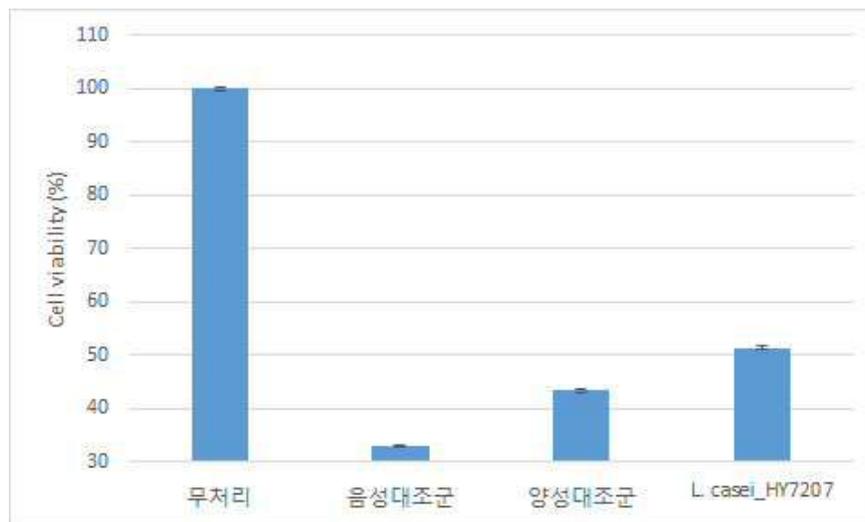
심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 비알코올성 지방간 개선 효능을 갖는 락토바실러스 카제이 HY7207 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품

(57) 요약

본 발명은 비알코올성 지방간 개선 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207 및 이를 유효 성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207은 지방산에 의한 간세포의 사멸과 지방축적의 억제와 지방 합성 관련 유전자의 발현을 억제함과 동시에 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 지방세포의 활성을 억제하여 체중 증가를 억제하고, 혈중 중성지방의 생성을 저해하는 효능을 가지므로 비알코올성 지방간 개선을 위한 발효유, 기능성 음료, 건강기능식품 등 식품조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/4702 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
C12N 9/1029 (2013.01)
C12Y 101/01034 (2013.01)
C12Y 101/01088 (2013.01)
C12Y 203/01085 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23Y 2220/17 (2013.01)

(72) 발명자

김주연

경기도 수원시 영통구 덕영대로1555번길 20 롯데캐슬 945동 515호

남보라

서울특별시 강남구 도곡동 955-12번지 201호

정운희

경기도 용인시 기흥구 공세로 226 청구아파트 103동 903호

김현지

서울특별시 서초구 효령로77길 34, 1413호(서초동)

장성식

경기도 의정부시 부용로 49, 102동 806호

이정열

경기도 양평군 서종면 통점길 63 404-1

심재현

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 213-901호

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

지방 합성 관련 유전자인 FAS(fatty acid synthase), SREBP-1(sterol regulatory element binding protein-1), SREBP-2(sterol regulatory element binding protein-2) 및 HM GCR(hydroxymethylglutaryl-CoA reductase) 유전자의 발현을 억제함으로써 비알코올성 지방간 개선 효능을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207(수탁번호: KCTC13691BP).

청구항 3

청구항 2의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207(수탁번호: KCTC13691BP)을 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 개선을 위한 식품조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 식품조성물은 발효유, 건강기능식품, 기능성 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 식품조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비알코올성 지방간 개선 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 지방산에 의한 간세포의 사멸과 지방축적의 억제와 지방 합성 관련 유전자의 발현을 억제함과 동시에 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 지방세포의 활성을 억제하여 체중 증가를 억제하고, 혈중 중성지방의 생성을 저해함으로써 비알코올성 지방간 개선 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지방간(fatty liver)이란, 지방의 과도한 섭취와 간 내의 축적 및 합성 증가, 배출 감소 등의 원인이 되어 정상적인 지방대사가 이루어지지 못함으로써, 지질 특히 중성지방(triglyceride)이 과도하게 축적되어 간세포에서 지방공포가 과도하게 관찰되는 질환을 말한다. 간에 지방이 과다하게 끼서 생기는 질병으로, 지방질 특히 중성지방이 간 무게의 5% 이상일 때를 말한다. 임상적으로는 간세포의 5% 이상에서 지방이 관찰되거나 간 100mg 당 지방이 5mg 이상일 때 즉, 지방이 전체간 무게의 5% 이상을 차지하게 될 때 지방간으로 분류한다. 보통 음주로 인한 지방간과 그렇지 않은 쪽으로 나뉘는데, 대개 전자가 더 위험하다. 전자는 알코올성 지방간(alcoholic fatty liver)이라고 부르고, 후자처럼 알코올에 의하지 않은 지방간을 통틀어 비알코올성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)이라고 부른다. 대한 간학회의 정의에 따르면 비알코올성 지방간이란 술을 전혀 안 마시거나 소량을 마실 뿐인데도(여성의 경우 1주일에 소주 1병, 남성의 경우 1주일에 소주 2병 이하), 술을 많이 마시는 사람들과 비슷하게 간에 지방이 많이 끼어있는 질환을 의미한다. 비알코올성 지방간의 원인으로는 항부정맥제, 항바이러스제, 스테로이드, 세포독성약물 등의 부작용이나 과다한 탄수화물 등의 칼로리 섭취, 비만, 당뇨, 그리고 일부 유전적인 원인 등이 존재한다. 아주 드물게 임신에 의해서도 지방간이 발생할 수 있다. 임신

중 지방간은 위험하지만, 출산을 한 이후에는 대개 거의 정상으로 회복된다. 비알코올성 지방간이 심각하게 진행되면 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)이 된다. 이 단계는 단순 지방간에 비해 위험한 단계이다. 증상이 아닌 이상 대부분 지방간 상태를 벗어나지 않지만 B형 간염 혹은 기타 건강상 문제와 결합한 경우에는 간경변, 간암으로 발전하기도 한다. 이와 같이 비알코올성 지방간은 한가지 병이라기보다 염증을 동반하지 않는 단순 지방간에서부터 만성 간염, 간경변증에 이르는 다양한 형태의 간질환을 포함한다. 즉 단순히 지방만 끼어 있고 간세포 손상은 없는 가벼운 지방간, 간세포 손상이 심하고 지속되는 지방간염, 심지어서는 복수나 황달 등을 동반하는 간경변증(간경화)이 생기는 경우까지 병의 정도는 매우 다양하다. 비알코올성 지방간의 유병률은 인구집단의 특성에 따라 다양하게 보고되는데 일반인의 10~24%, 비만인의 58~74%까지 보고되고 있다. 대부분의 비알코올성 지방간은 가벼운 병이지만, 심한 지방간 환자 4명 중에 한 명은 치료를 하지 않고 방치되었을 경우 서서히 시간이 지남에 따라 심각한 간질환인 간경변증으로 진행되므로 적극적으로 관리하도록 노력하여야 한다.

[0003] 이에 본 발명자들은 막걸리에서 분리된 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207가 지방산에 의한 간세포의 사멸과 지방축적의 억제와 지방 합성 관련 유전자의 발현을 억제함과 동시에 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 지방세포의 활성을 억제하여 체중 증가를 억제하고, 혈중 중성지방의 생성을 저해함으로써 비알코올성 지방간 개선 효능을 갖는다는 사실을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0009709호(2017.01.25)

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) *Lactobacillus casei* strain Shirota protects against nonalcoholic steatohepatitis development in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Dec;305(12):G911-8

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 지방산에 의한 간세포의 사멸과 지방축적의 억제와 지방 합성 관련 유전자의 발현을 억제함과 동시에 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 지방세포의 활성을 억제하여 체중 증가를 억제하고, 혈중 중성지방의 생성을 저해함으로써 비알코올성 지방간 개선 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207 및 이를 유효성분으로 함유하는 발효유, 기능성 음료, 건강기능식품 등 식품조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지방산에 의한 간세포의 사멸과 지방축적의 억제와 지방 합성 관련 유전자의 발현을 억제함과 동시에 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 지방세포의 활성을 억제하여 체중 증가를 억제하고, 혈중 중성지방의 생성을 저해함으로써 비알코올성 지방간 개선 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 개선을 위한 발효유, 기능성 음료, 건강기능식품 등 식품조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0009] 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 개선을 위한 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.

[0010] 특히, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 개선을 위한 발효유는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207 유산균 배양액 및 혼합과즙시럽을 일정비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 발효유를 제조한다.

[0011] 또한, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 개선을 위한 기능성 음료는 혼합과즙시럽, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성 음료를 제조한다.

[0012] 또한, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 개선을 위한 건강기능식품은 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 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

[0013] 본 발명은 지방산에 의한 간세포의 사멸과 지방축적의 억제와 지방 합성 관련 유전자의 발현을 억제함과 동시에 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 지방세포의 활성을 억제하여 체중 증가를 억제하고, 혈중 중성지질의 생성을 저해함으로써 비알코올성 지방간 개선 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 개선을 위한 발효유, 기능성 음료, 건강기능식품 등 식품조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207의 처리에 의한 지방산에 의한 간세포의 사멸 저해 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207의 처리에 의한 간세포내 지방 축적 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3는 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207의 처리에 의한 간세포내 지방 합성 관련 유전자의 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207의 처리에 의한 10주 동안의 체중변화량을 나타낸 그래프이다.

도 5는 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207의 처리에 의한 10주 후의 체중증가량을 나타낸 그래프이다.

도 6은 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207의 처리에 의한 간 무게를 나타낸 그래프이다.

도 7은 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207의 처리에 의한 부고환지방 무게를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 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.

[0016] <실시예 1>

[0017] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207의 분리 및 동정

[0018] 1-1. 균주의 분리

[0019] 본 발명에 따른 신규 유산균주를 분리하기 위하여 전국 각지에서 수집한 막걸리를 PBS buffer에 십진 희석한 후 1/10⁵ 만큼 희석된 샘플을 MRS 배지(Oxoid)에 접종하였다. 혐기 조건에서 자라는 유산균을 배양하기 위해 BBL anaerobic GasPak(BD)을 넣은 혐기박스를 사용하여 37℃에서 36시간 동안 혐기 배양하였다. 상기 배양 후 배지

에서 모양이 다른 각각의 콜로니(colony)를 새로운 MRS 배지에 접종하여 순수 분리하였다. 그 결과 총 260종의 유산균을 분리하였다.

[0020] 1-2. 지방산에 의한 간세포의 사멸을 저해하는 유산균 선발

[0021] 상기 분리된 260종의 유산균의 고농도의 지방산(팔미트산)처리에 의한 간세포 독성 억제 효과를 확인하기 위하여 간세포인 HepG2세포를 96 웰 플레이트(well plate)에 1×10^4 cells/well로 배양한 뒤, 5mM 팔미트산과 260종의 유산균 각각을 1×10^6 CFU/mL 농도로 처리한 뒤 Cell counting kit-8(Dondjindo Mol. Tech.)을 통해서 세포독성을 측정하였다.

[0022] 한편, 양성대조군으로서 상기 유산균 대신에 알파 토코페롤(α tocopherol)를 사용한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0023] 또한, 음성대조군으로서 5mM 팔미트산만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0024] 또한, 간세포인 HepG2세포에 아무것도 처리하지 않은 것을 무처리군으로 하여 상기 동일한 방법으로 시험하였다.

[0025] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0026] 도 1에서 확인할 수 있는 바와같이, 양성대조군과 같이 지방산에 대한 세포독성을 저해하는 효능이 가장 우수한 L.casei_HY7207 균주를 최종 선발하였다.

[0027] 1-3. 신규주 'L.casei_HY7207'의 동정

[0028] 상기 실시예 1-2의 L.casei_HY7207 균주의 동정을 위하여 신규주 L.casei_HY7207로부터 분리한 유전체 DNA를 주형으로 하여 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R(5'-TACGGYTACCTGTACGACTT-3') 프라이머(primer)를 사용하여 PCR 반응[(95°C, 3분), 30cycles(95°C, 30초; 50°C, 30초; 72°C, 90초), 72°C, 10분]을 수행하여 1.4kbp의 증폭산물을 얻은 후 정제하여 시퀀싱(sequencing) 반응을 통해 염기서열을 분석한 결과를 토대로 BLAST 검색결과(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)와 비교하였다.

[0029] 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Lactobacillus casei strain NBRC 15893 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1323	1323	100%	0.0	100%	NR_113333.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus casei strain ATCC 393 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1317	1317	100%	0.0	99%	NR_041893.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus casei strain BCRC10697 16S ribosomal RNA, partial sequence	1312	1312	100%	0.0	99%	NR_115322.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus casei strain JCM 1134 16S ribosomal RNA, partial sequence	1308	1308	100%	0.0	99%	NR_115534.1

[0030]

[0031] 또한, Api 50CHL kit(BIOMERIEUX)을 이용하여 당이용성 검사를 하여 하기의 표 2에 나타내었다.

표 2

[0032]

당 0-24	사용여부	당 25-49	사용여부
0 Control	-	25 에스쿨린	+
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	-

- [0056] 7)45℃에서 생육: +
- [0057] 8)인돌생산: -
- [0058] 9)젖산생산: +
- [0059] <실시에 2>
- [0060] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207 농축균의 제조
- [0061] 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207를 순수 배양한 콜로니를 각각 MRS 액체배지에 접종하고, 37℃ 배양기에서 24시간 동안 정지배양(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 2.5~5% 멸균탈지유(Skim milk)를 보호제로 사용하여 펠렛을 풀어주었다. 이렇게 제조한 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207 농축균의 생균수는 10^{10} CFU/ml 이상으로 나왔다. 상기 농축균 제조에 사용하는 보호제는 멸균탈지유 이외에 텍스트린, 유당, 올리고당, 포도당 및 트레할로스 중 어느 하나이거나 이의 혼합물일 수 있다.
- [0062] 한편, 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207 농축균은 상기와 같은 액상농축균 형태 외에 동결 건조된 분말형태로 제공될 수도 있다.
- [0063] <실시에 3>
- [0064] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0065] 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0066] 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 적정온도로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP배지에서의 총 유산균 수가 1.0×10^9 cfu/ml 이상, 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 2의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207 농축균 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.
- [0067] <실시에 4>
- [0068] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0069] 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0070] 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 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0071] 그리고, 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 2의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207 농축균 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0072] <실시에 5>

- [0073] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0074] 상기 실시예 2의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207 농축균 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B₁, B₂, B₅, B₆, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기의 실시예 2의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207 농축균 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물에 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 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.
- [0075] <시험예 1>
- [0076] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207의 지방산에 의한 간세포 내 지방축적 억제 효과
- [0077] 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207의 지방산에 의한 간세포 내 지방축적을 억제하는 효과를 확인하기 위하여 간세포인 HepG2세포를 96 웰 플레이트(well plate)에 1x10⁴ cells/well로 배양한 뒤, 1mM 팔미트산과 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 1x10⁶ CFU/mL 농도로 처리한 후에 PBS로 2회 세척한 후, 10% Formalin을 처리하여 세포를 고정하였다. 그런 다음, Oil-red-O 염색을 통해 지방구를 염색한 후에 600nm에서 흡광도를 측정하였다
- [0078] 한편, 양성대조군으로서 상기 유산균 대신에 100 μM 알파 토크페롤(α tocopherol)을 사용한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0079] 또한, 음성대조군으로서 1mM 팔미트산만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0080] 또한, 간세포인 HepG2세포에 아무것도 처리하지 않은 것을 무처리군으로 하여 상기 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0081] 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0082] 도 2에서 확인할 수 있는 바와같이, 아무것도 처리하지 않은 무처리군의 간세포 내 지방축적 100%를 기준으로 알파토크페롤을 처리한 양성대조군에서는 지방축적량이 약 40배 증가한 반면, 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 처리한 시험군(L.casei_HY7207)에서는 약 30배 증가한데 불과하여 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207가 양성대조군에 비해 약 10배 정도 간세포내에 지방축적을 억제하는 효능이 우수한 것을 알 수 있었다.
- [0083] <시험예 2>
- [0084] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207의 지방 합성 관련 유전자의 발현 억제
- [0085] 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207의 지방 합성 관련 유전자인 FAS(fatty acid synthase), SREBP-1(sterol regulatory element binding protein-1), SREBP-2(sterol regulatory element binding protein-2) 및 HM GCR(hydroxymethylglutaryl-CoA reductase)의 발현 억제여부를 확인하기 위하여 간세포인 HepG2세포를 96 웰 플레이트(well plate)에 1x10⁵ cells/well로 배양한 뒤, 1mM 팔미트산과 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY7207을 1x10⁶ CFU/mL 농도로 처리하였다. 그런 다음, 배양 세포의 총 RNA를 추출한 후 Reverse transcription kit(Qiagen)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Taqman gene expression master-mix(Applied Biosystems)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.
- [0086] 한편, 양성대조군으로서 상기 유산균 대신에 100 μM 알파 토크페롤(α tocopherol)을 사용한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0087] 또한, 음성대조군으로서 1mM 팔미트산만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0088] 또한, 간세포인 HepG2세포에 아무것도 처리하지 않은 것을 무처리군으로 하여 상기 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0089] 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0090] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 무처리군의 지방 합성 관련 유전자인 FAS, SREBP-

1, SREBP-2 및 HM GCR 유전자의 상대적 발현량 1을 기준으로 상기 지방 합성 관련 유전자인 FAS, SREBP-1, SREBP-2 및 HM GCR 유전자의 발현량이 알파 토크페롤을 처리한 양성대조군 보다 본 발명의 락토바실러스 카제이 (*Lactobacillus casei*) HY7207을 처리한 시험군(L.casei_HY7207)에서 모두 감소하였음을 알 수 있었다.

[0091] <시험예 3>

[0092] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207의 고지방식이에 의해 지방간이 유도된 마우스에서 비알콜성 지방간 개선 효과

[0093] 3-1. 체중변화량 측정

[0094] 6주령 C57BL/6 수컷 마우스를 이용하여 일반식이, 고지방식이(Research diet, D12490), 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207 포함된 유산균식이 시료에 의한 지방간 개선 동물 효능 평가를 실시하였다.

[0095] 일반식이는 단백질, 탄수화물, 식이섬유, 미네랄 등을 포함하는 기본 사료로 20% 단백질과 68%의 탄수화물, 12% 지방으로 구성되며 약 3.92kcal의 열량을 가지고 있는 반면에, 고지방 식이는 20% 단백질과 20% 탄수화물, 60% 지방으로 구성되어 있으며 g당 5.2kcal의 고열량을 가진다. 한편, 유산균 식이는 상기 고지방 식이에 하루에 마우스 한 마리당 1×10^8 CFU의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 첨가하여 제공한 것이다.

[0096] 먼저, 6주령 C57BL/6 수컷 마우스에 10주 간 상기 유산균 식이를 매일 일정량을 급여한 뒤, 남아있는 사료의 양을 측정하여 섭취량을 확인하였고, 체중 변화를 측정하였다.

[0097] 한편, 양성대조군으로서 상기 유산균식이 대신에 100 μM 알파 토크페롤(α tocopherol)이 함유된 식이를 사용한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0098] 또한, 음성대조군으로서 상기 유산균식이 대신에 고지방식이를 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0099] 또한, 6주령 C57BL/6 수컷 마우스에 일반식이를 한 것을 무처리군으로 하여 상기 동일한 방법으로 시험하였다.

[0100] 그 결과를 표 4(섭취효율), 도 4(체중변화량) 및 도 5(체중증가량)에 나타내었다.

[0101] 표 4, 도 4 및 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 식이한 시험군(L.casei_HY7207)은 사료 섭취량이나 섭취 효율에서 무처리 군이나 양성 대조군과 비교하였을 때 큰 차이를 나타내지는 않았으나 10주간 유도된 체중변화량 및 체중증가량에서 양성대조군에 비하여 매우 낮은 폭으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

표 4

[0102]

	사료 섭취량 (g)	Food Efficiency Ratio(%) (FER, Body weight gain/Food intake)
무처리	3.07 ± 0.30	2.63 ± 0.40
음성대조군	2.73 ± 0.67	13.48 ± 0.520
양성대조군	2.77 ± 0.49	12.91 ± 1.31
<i>L. casei</i> _HY7207	2.85 ± 0.76	11.72 ± 0.95

[0103] 3-2. 간 및 부고환지방의 무게 측정

[0104] 상기 시험예 3-1의 10주간 식이를 마친 마우스를 희생하여 간과 부고환지방을 적출 한 뒤 무게를 측정하였다.

[0105] 그 결과를 도 6(간 무게) 및 도 7(부고환지방 무게)에 나타내었다.

[0106] 도 6 및 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 고지방식으로 인하여 음성 대조군은 큰 폭으로 간 및 부고환지방의 무게가 증가한데 반하여, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 식이한 시험군(L.casei_HY7207)은 간의 무게는 일반식이를 한 무처리군과 차이가 적어 정상치에 가까운 지방축적 저하효과를 나타내었고, 부고환지방의 무게는 알파 토크페롤(비타민 E)이 함유된 식이를 한 양성 대조군 보다 상당히 감소하였음을 알 수 있었다.

[0107] 3-3. 혈액 분석

[0108] 상기 시험에 3-1의 10주간 식이를 마친 마우스를 희생한 후 혈액을 채취하여 (주)한국실험병리에 의뢰하여 혈액을 분석하였다.

[0109] 그 결과를 표 5(간 손상지표 변화) 및 표 6(혈당, 중성지방, 콜레스테롤 변화)에 나타내었다.

[0110] 하기의 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 주요 간기능 효소인 GOT와 간기능에 관련된 주요 지표인 총 빌리루빈 함량에서도 알파 토코페롤을 처리한 양성대조군 보다 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 처리한 시험군(L.*casei*_HY7207)에서 모두 감소하여 지방간에 의한 간세포기능 저하에 대해 효과적인 개선효과를 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.

[0111] 하기의 표 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 혈중 중성지방의 함량에서도 알파 토코페롤을 처리한 양성대조군 보다 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207을 처리한 시험군(L.*casei*_HY7207)에서 감소하여 혈중 중성지방의 효율적인 저하를 통해 간에서의 추가적인 지방 축적을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

표 5

	Total bilirubin (mg/dL)	Direct bilirubin (mg/dL)	GOT (Unit/L)	GPT (Unit/L)
무처리	0.46 ± 0.03	0.49 ± 0.04	51.67 ± 2.31	34.67 ± 2.52
음성대조군	1.06 ± 0.18	1.48 ± 0.27	75.82 ± 3.30	57.50 ± 15.29
양성대조군	1.04 ± 0.25	1.48 ± 0.23	81.40 ± 18.60	55.60 ± 29.70
<i>L. casei</i> _HY7207	0.64 ± 0.17	0.74 ± 0.25	71.25 ± 12.09	54.25 ± 15.26

표 6

	Glucose (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Total Cholesterol (mg/dL)	HDL Cholesterol (mg/dL)	LDL Cholesterol (mg/dL)
무처리	294.80 ± 25.49	108.67 ± 12.86	113.00 ± 2.00	89.67 ± 3.21	22.33 ± 1.53
음성대조군	424.25 ± 19.60	153.00 ± 7.83	230.00 ± 26.50	134.75 ± 7.46	58.75 ± 12.12
양성대조군	388.00 ± 18.29	152.00 ± 5.61	228.00 ± 31.39	131.00 ± 12.86	56.00 ± 9.30
<i>L. casei</i> _HY7207	385.40 ± 40.30	119.60 ± 15.63	180.00 ± 27.83	119.00 ± 7.71	41.60 ± 6.27

[0114] 이상의 시험결과를 종합하여 보면, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY7207는 고지방식이에 의해 유도된 지방간에 대하여 지방세포의 활성을 억제하여 체중 증가를 억제하고, 혈중 중성지방의 생성을 저해함으로써 간세포의 기능 회복을 유도하고 효율적인 지방간 억제효과를 나타내는 것으로 확인 되었다.

수탁번호

[0115]

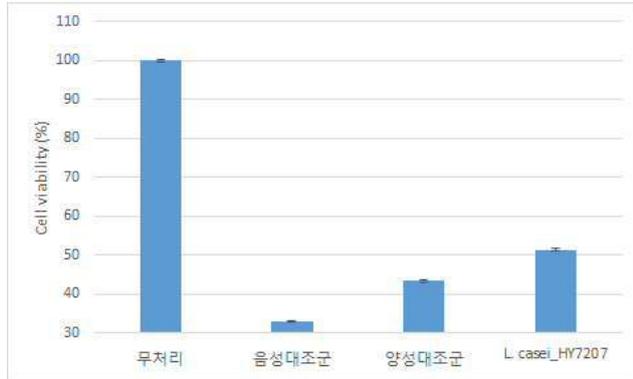
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13691BP

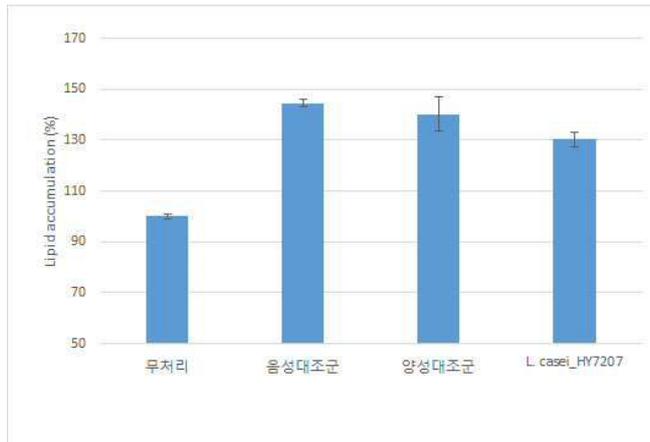
수탁일자 : 20181026

도면

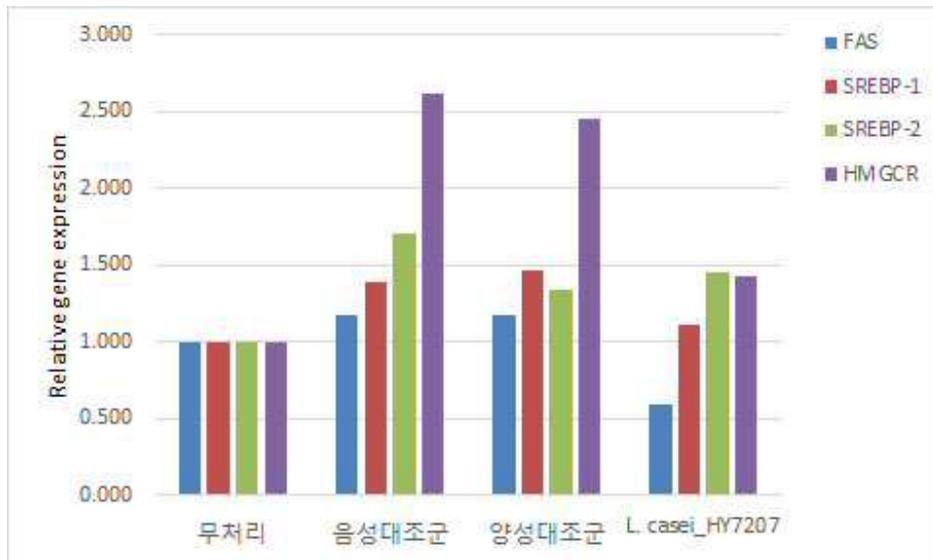
도면1



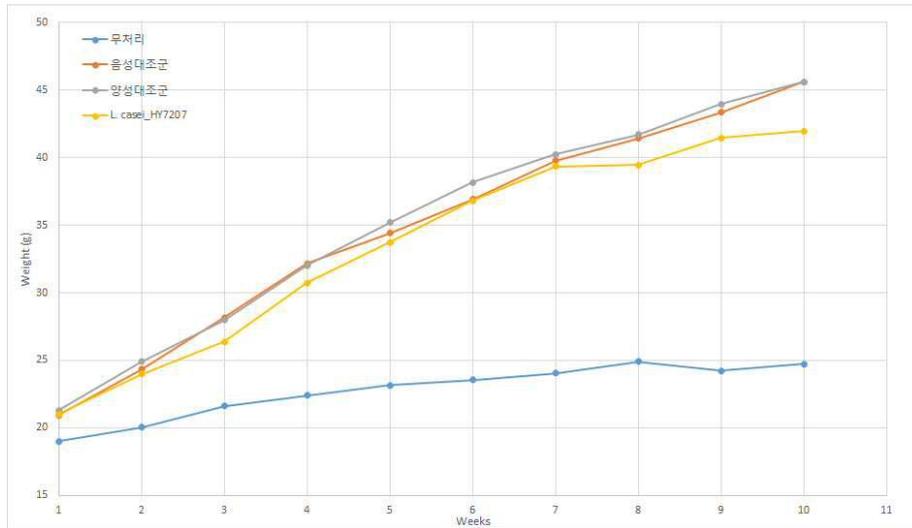
도면2



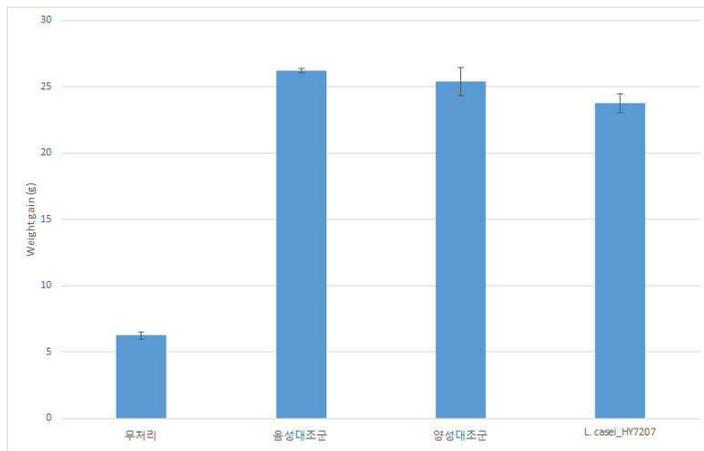
도면3



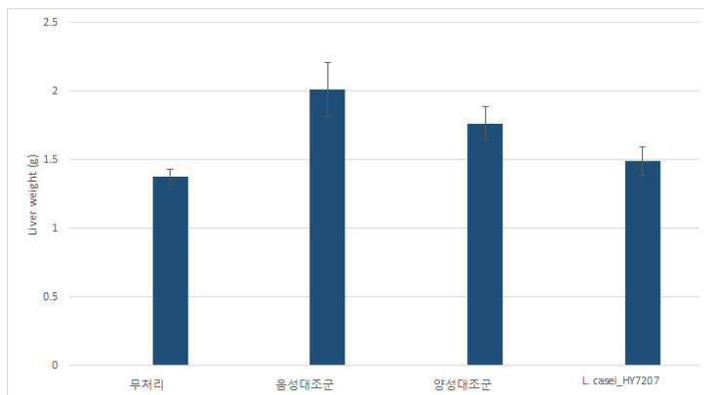
도면4



도면5



도면6



도면7

