



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년11월24일  
(11) 등록번호 10-0996577  
(24) 등록일자 2010년11월18일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)  
A61P 3/04 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0028025

(22) 출원일자 2009년04월01일

심사청구일자 2009년04월01일

(65) 공개번호 10-2010-0109661

(43) 공개일자 2010년10월11일

(56) 선행기술조사문헌

US07001756 B1

US20040071680 A1

US20080057044 A1

전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자

주식회사한국야쿠르트

서울 서초구 잠원동 28-10

(72) 발명자

박도영

서울특별시 동작구 상도1동 505번지 평화그린 401호

이정희

서울 광진구 자양3동 대동아파트 102동 1708호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최익하, 경일호

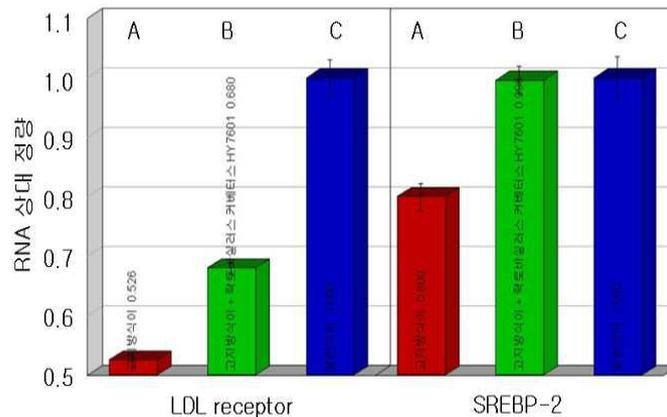
심사관 : 김민정

(54) 혈중 콜레스테롤 강하와 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베터스 에이취와이7601 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품

(57) 요약

본 발명은 저밀도 지단백 수용체(LDL-receptor) 증가를 통해 콜레스테롤의 세포 내 유입을 증가시킴으로써 궁극적으로 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료, 건강기능식품에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 신규의 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601은 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 양을 감소시키는 물론 비만 억제 효과가 매우 뛰어나므로 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601을 이용한 지질대사에 영향을 미치는 기능성 식품 및 약학 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

**안영태**

경기 수원시 권선구 세류동 1147 미영아파트 109동  
312호

**허철성**

충남 천안시 신부동 대림한숲아파트 304동 505호

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601(기탁번호: KCTC 11456BP).

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601은 간조직 세포의 LDL-receptor의 발현량을 증가 시킴으로써 과도한 혈중 콜레스테롤을 세포 내로 유입시킴으로써 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601은 중성지방 감소 및 비만억제 효능을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601.

### 청구항 4

상기 제1항의 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제용 약학적 조성물.

### 청구항 5

상기 제1항의 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만억제용 발효유.

### 청구항 6

상기 제1항의 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만억제용 음료.

### 청구항 7

상기 제1항의 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만억제용 건강기능식품.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

### 기술분야

[0001] 본 발명은 혈중 콜레스테롤 강하와 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베티스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료, 건강기능식품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 저밀도 지단백 수용체(LDL-receptor) 증가를 통해 콜레스테롤의 세포 내 유입을 증가시킴으로써 궁극적으로 혈중 콜레스테롤의 양을 저하 시키는 효능 및 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베티스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료, 건강기능식품에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 최근 한국인의 혈중 콜레스테롤 농도가 높아진 결과 뇌혈관장애, 심질환, 고혈압 등의 질병 발생 역시 매년 증가하고 있다. 이러한 변화는 동물성 지방과 단백질 섭취량이 현저히 증가한 한국인의 식생활 변화에서 그 원인을 찾을 수 있다.

[0003] 혈중 콜레스테롤의 대부분은 저밀도 지단백(low-density lipoprotein, 이하 'LDL'이라 함) 형태로 존재하고 이는 세포막의 저밀도 지단백 수용체(low-density lipoprotein receptor, 이하 'LDL-receptor'라 함)를 통해 세포 내로 이동된다. 세포 내 콜레스테롤의 농도가 높을 경우 LDL-receptor의 합성속도는 감소되며 혈액으로부터 세포 내로의 콜레스테롤의 흡수가 느려지고 그 결과 혈중 콜레스테롤이 축적된다.

[0004] 현재 혈중 콜레스테롤의 수준을 낮추는 약물로서 니아신(niacin), 콜레스티라민(cholestyramine), 스타틴(statins) 등이 널리 사용되고 있다. 니아신은 간에서 초저밀도 지단백(very low-density lipoprotein)의 분비를 억제시키는 작용을 하며, 콜레스티라민과 같은 담즙산 격리제는 배출된 담즙산이 간으로 재흡수 되는 것을 막음으로써 자연스럽게 담즙산 생합성 원료인 콜레스테롤의 소모를 증가시킨다. 컴팩틴(compactin) 유도체인 로바스타틴(lovastatin), 프로바스타틴(pravastatin), 심바스타틴(simvastatin) 등은 가장 높은 시장 점유율을 확보하고 있는 약물로서 콜레스테롤 생합성 조절효소인 HMG-CoA 환원효소(3-hydroxy-methyl-glutaryl coenzyme A reductase)의 활성을 저해한다. 그 결과 LDL-receptor의 발현량이 증가되고 LDL의 세포 내 유입이 증가됨에 따라 혈중 콜레스테롤 양이 감소된다. 이외에도 콜레스테롤 전달효소인 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase(ACAT)의 활성을 저해하거나 고밀도 지단백(high-density lipoprotein)에 있는 콜레스테롤을 LDL로 전달하는 효소인 콜레스테롤 에스테르 전이 단백질(cholesterol ester transfer protein; CETP)을 저해하는 등 혈중 콜레스테롤을 억제하고자 하는 시도가 많이 진행되고 있다.

[0005] 하지만 이러한 약제는 간독성, 위장장애, 발암성 등의 부작용이 있기 때문에 약물요법 보다도 지질 섭취량을 적정 범위로 제한하는 식사요법이 더욱 중시된다. 그러나 식사 제한 또한 정신적 고통을 수반함과 동시에 식생활의 즐거움을 빼앗기 때문에 엄격한 실시는 곤란하고 효과에 한계가 있는 것이 많다.

[0006] 이에 반해 안전한 미생물로 여겨져 온 유산균을 이용하여 혈중 콜레스테롤 수준을 감소시키고자 하는 노력 역시 많이 이루어졌다. 유산균은 장내 정상균총의 유지, 장내 균총의 개선, 항당뇨 및 항고지혈증 효과, 발암 억제, 대장염 억제, 그리고 숙주의 면역체계의 비특이적 활성화 등의 효과를 나타낸다고 보고 되고 있다. 그 중에서도 락토바실러스 속 균주는 인체의 장내에 서식하는 정상 미생물 군집의 주요 구성원으로서, 건강한 소화기관과 질내 환경을 유지하는 데 있어서 중요한 것으로 오래 전부터 알려져 왔고 미국의 공중건강 가이드라인(U.S. Public Health Service guidelines)에 의하면, 현재 미국 균주 기탁기관(ATCC)에 기탁된 락토바실러스 균주 모두 인체나 동물에 질병을 유발할 잠재적 위험에 대해서는 알려진 것이 없다고 인정되는 '안전수준(Bio-safety Level) 1'로 분류되어 있다.

[0007] 락토바실러스 균주의 콜레스테롤 저하 기작으로서 잘 알려진 것은 콜레스티라민(cholestyramine)의 것과 동일하다. 즉, 배출된 담즙산이 락토바실러스 균주에 의해 탈접합(deconjugation)된 결과 간으로 재흡수 되지 못하게 되어, 결국 담즙산 생합성 원료인 콜레스테롤의 소모가 증가되고 자연스럽게 콜레스테롤의 양이 감소하게 되는 것이다. 하지만 이외의 기작에 대해서는 아직 잘 알려지지 않고 있다.

[0008] 이에 본 발명자들은 락토바실러스 커베티스(*Lactobacillus curvatus*)에 의해 세포막의 LDL-receptor 발현량이

증가하고 콜레스테롤의 세포 내 유입이 증가함에 따라 궁극적으로 혈중 콜레스테롤의 감소와 비만 억제 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

[0009] 따라서, 본 발명은 혈중 콜레스테롤 강하와 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베터스 (*Lactobacillus curvatus*) 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료, 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제 해결수단**

[0010] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포막의 LDL-receptor 발현량과 세포 내 콜레스테롤 유입을 증가시킴으로써 혈중 콜레스테롤 수준을 저하 시키는 동시에 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베터스 (*Lactobacillus curvatus*) HY7601을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0012] 본 발명에 따른 균주를 분리하기 위하여 국내 가정에서 제조한 김치를 0.02% 소듐 아지드(sodium azide)가 포함된 엠알에스(MRS) 액체 배지에 넣고 37℃에서 24시간 배양한 후, 10 $\mu$ l 백금이를 사용하여 배양액을 취하여 다시 0.02% 소듐 아지드가 포함된 엠알에스 한천 평판배지에 도말하고 37%에서 48시간 동안 배양하였다. 이렇게 형성된 균락 중에서 Sterol regulatory element-binding protein 2(이하 'SREBP-2'라 함)의 활성을 시험하여 본 발명의 균주를 분리하였다.

[0013] 즉, 지질 대사 관련 유전자(HMGCR, LDL-receptor 등)들의 전사인자(transcriptional factor)인 SREBP-2는 세포 내 콜레스테롤 항상성에 기여하는 중요한 유전자로서 세포 내 콜레스테롤 양이 감소하면 SREBP-2의 활성이 증가하게 되어 SREBP-2의 하위 유전자인 LDL-receptor의 발현량 역시 증가함에 따라 혈액 내의 콜레스테롤이 세포 내로 유입됨으로써 혈중 콜레스테롤의 양이 줄어들게 되는 효과가 나타난다는 사실을 근거로 상기 균락 중에 있는 여러 유산균 중에서HepG2 세포 내에서 SREBP-2의 활성을 증가 시키는 활성을 갖는 균주를 분리하였다.

[0014] 이렇게 분리한 균주의 관찰은 MRS 한천평판배지에서 37℃로 48시간 배양한 후 그람염색(Cowan, 1974)을 통하여 분리 균주의 크기와 형태를 광학 현미경(SAMWON, CSB-FEI)으로 관찰하였으며, 분리한 균주의 생화학적 특성은 Cowan과 Steel(1984) 그리고 Macfaddin(1984)의 방법에 따라 균주의 특성을 조사한 후 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 준하여 분류 및 동정하였다. 카탈라제(Catalase) 테스트는 3% 과산화수소를 첨가한 후 산소 발생유무를 관찰하였고, 옥시다제(Oxydase)테스트는 1% dimethyl-p-phenylenediamine hydrochloride를 넣고 변색 여부를 관찰하였다.

[0015] 따라서, 본 발명에 따른 신규의 유산균의 특성은 다음과 같다.

- [0016] 1)균의 형태
- [0017] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성
- [0018] ①세포의 형태: 간균
- [0019] ②운동성: 없음
- [0020] ③포자형성능: 없음
- [0021] ④그람(Gram) 염색: 양성

- [0022] 2)균락의 형태
- [0023] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균락의 형태
- [0024] ①형상: 원형
- [0025] ②용기: 불록
- [0026] ③표면: 매끄러움(Smooth)
  
- [0027] 3)생리적 성질
- [0028] ①생육온도: 성장가능 생육온도: 15~40℃
- [0029] 최적 생장온도: 36~38℃
- [0030] ②생육 pH: 성장가능 생육 pH: 5.0~7.5
- [0031] 최적 pH: 6.0~6.5
- [0032] ③산소에 대한 영향: 통성혐기성
  
- [0033] 4)카탈라제: -
- [0034] 5)가스형성여부: -
- [0035] 6)15℃에서 생육: +
- [0036] 7)45℃에서 생육: -
- [0037] 8)인돌생산: -
- [0038] 9)젖산생산: +
- [0039] 10)당 발효 실험 및 동정
- [0040] Biomerieux 사의 api 50 CH kit를 이용하여 당 발효 실험을 한 결과를 표 1과 도 1에 나타내었다.

표 1

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 람노스	-	40 D 투라노스	-
16 돌시톨	-	41 D 라이소스	-
17 시노시톨	-	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-글루코시드	+	46 L 아라비톨	-
22 N-아세틸-글루코사민	+	47 글루코나테	-
23 아미그달린	-	48 2-케토-글루코나테	-
24 아르부틴	-	49 5-케토-글루코나테	-

[0041]

[0042]

위와 같은 균의 형태학적, 생리적 및 성장 특성에 근거하여 본 발명의 균주는 락토바실러스 커베티스 (*Lactobacillus curvatus*)로 동정하였고, 본 발명자들은 이를 락토바실러스 커베티스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601로 명명하고, 2009.01.22.자로 국제기탁기관인 한국생명공학연구원(기탁번호: KCTC 11456BP)에 기탁하였다.

[0043]

한편, 본 발명의 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베티스 HY7601을 유효 성분으로 함유하는 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제용 약학적 조성물은 단독 또는 약제학적으로 사용되는 부형제들과 함께 약제학적으로 통상적으로 사용되는 방법에 따라 정제, 캡슐제 등과 같은 제제형태로 제제화하여 사용될 수 있다.

[0044]

사람의 경우, 통상적인 1일 투여량은 1~30mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 실제 투여량은 투여경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다.

[0045]

물론, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0046]

또한, 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베티스 HY7601을 유효성분으로 함유하는 발효유는 유산균 배양액, 락토바실러스 커베티스 HY7601 및 혼합과즙시럽을 일정비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 제조한다.

[0047] 또한, 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베터스 HY7601을 유효성분으로 함유하는 음료는 혼합과즙시럽, 락토바실러스 커베터스 HY7601 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조한다.

[0048] 또한, 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베터스 HY7601을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 상기 락토바실러스 커베터스 HY7601을 포함하는 것 이외에 영양보조성분으로서 비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

**효 과**

[0049] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601은 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 양을 감소시키는 물론 비만 억제 효과가 매우 뛰어나므로 락토바실러스 커베터스(*Lactobacillus curvatus*) HY7601을 이용한 지질대사에 영향을 미치는 기능성 식품 및 약학 조성물 등으로 이용될 수 있다.

**발명의 실시를 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 커베터스 HY7601을 포함한 동결건조 분말 제조

[0053] 본 발명의 락토바실러스 커베터스 HY7601은 식품원료용 Proteose peptone #3, Yeast Extract, Beef Extract, 그리고 포도당을 첨가한 액체배지를 제조하여 37℃에서 약 16시간 배양한 후 배양액을 원심분리하고 멸균된 생리식염수로 세척한 다음 멸균유에 분산하였다. 다시 동결 건조하여 동결건조 분말 1그램(g)당 약 10<sup>11</sup> cfu 균수를 얻었다. 이 동결건조 분말을 혈중 콜레스테롤 강하 소재로 사용하였다.

[0054] 한편 본 발명의 락토바실러스 커베터스 HY7601은 상기와 같이 동결건조된 분말 형태 또는 배양물 형태로 제공될 수 있다.

[0055] <실시예 2>

[0056] 락토바실러스 커베터스 HY7601을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조

[0057] 본 발명의 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 커베터스 HY7601을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제제 예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0058] 정제의 제조

[0059] 상기 실시예 1의 락토바실러스 커베터스 HY7601을 포함한 동결건조분말 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 폴리비닐피롤리돈 97mg을 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 2mg을 가하여 혼합한 후 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.

- [0060] 캡슐제의 제조
- [0061] 상기 실시예 1의 락토바실러스 커베터스 HY7601을 포함한 동결건조분말 100mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 완전히 혼합한 후 통상의 캡슐제의 제조 방법에 따라서 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0062] <실시예 3>
- [0063] 락토바실러스 커베터스 HY7601을 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0064] 유산균 배양액과 본 발명의 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 락토바실러스 커베터스 HY7601 및 혼합과즙시럽으로 구성된 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0065] 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 6.65~6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix<sup>o</sup>)는 16.3~16.5% 정도가 되도록 혼합하였다. 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 40℃로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간동안 배양하여 BCP 배지에서의 총 유산균수가  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.
- [0066] 그 다음, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>o</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0067] 그런 다음, 상기 유산균배양액 69.5중량%와 실시예 1의 락토바실러스 커베터스 HY7601을 포함한 동결건조분말 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 락토바실러스 커베터스 HY7601을 유효성분으로 함유한 발효유를 제조하였다.
- [0068] <실시예 4>
- [0069] 락토바실러스 커베터스 HY7601을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0070] 상기의 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 락토바실러스 커베터스 HY7601과 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0071] 먼저, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>o</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0072] 그리고 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 실시예 1의 락토바실러스 커베터스 HY7601을 포함한 동결건조분말 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 혈중 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 효능을 갖는 락토바실러스 커베터스 HY7601을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0073] <실시예 5>
- [0074] 락토바실러스 커베터스 HY7601을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0075] 상기 실시예 1의 락토바실러스 커베터스 HY7601을 포함한 동결건조분말 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아마이드) 및 올리고당을 상기 실시예 1의 락토바실러스 커베터스 HY7601을 포함한 동결건조분말 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였

다. 상기 혼합물 100중량부에 대하여 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 40~50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12~14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.

[0076] <시험예 1>

[0077] 락토바실러스 커베터스 HY7601에 의한 SREBP-2 활성증가 능력측정

[0078] 1-1. pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드 제작

[0079] Genomic DNA 상에서 SREBP-2가 결합하여 전사를 개시하는 부위인 sterol-response element, 이하 'SRE'라 한다)를 pGL3 루시퍼라제 플라스미드(Promega, E1751)에 삽입하여 pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드를 제작하였다. SRE를 포함하는 부위로서 HMG-CoA 합성효소 1(Homo sapiens 3 hydroxy 3 methylglutaryl Coenzyme A synthase 1) 유전자 상위 -488~+37 부분을 선택하고 증합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 'PCR'이라 함)을 통해 이를 증폭하였다. PCR을 위한 주형(template)으로 HeLa 세포의 genomic DNA를 이용하고 프라이머(primer)는 표 2와 같이 고안하였다. 프라이머 염기 서열에서 밑줄 친 부분은 제한 효소 염기 서열을 나타낸 것이다.

**표 2**

증폭 방향	프라이머 염기 서열	제한 효소 자리
5' → 3' 방향	ccg <u>ctc gag gcc</u> tag ttc tgg ttg cta gg	Xho I
3' → 5' 방향	ccc <u>aag ctt gag</u> gaa agg gag tga gcc ac	Hind III

[0080]

[0081] 증폭된 SRE 부위를 pGL3 루시퍼라제 플라스미드 내의 Xho I / HindIII 제한 효소 자리에 삽입하여 pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드(luciferase plasmid)를 획득한 후 최종적으로 Solgent 사에 염기 서열 분석을 의뢰하여 정확하게 삽입되었는지를 확인하였다. 도 2에서 붉은 색으로 표기된 부분이 삽입된 염기서열이다.

[0082] 1-2. HepG2 세포 배양

[0083] HepG2 세포는 한국세포주은행에서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum과 L-글루타민(glutamine)이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 배양하였다. 그리고 일주일에 2~3번 정도 계대하였다.

[0084] 1-3. 트랜스펙션(transfection)

[0085] pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드를 HepG2 세포에 트랜스펙션(transfection)하면 세포 내에 존재하는 SREBP-2가 플라스미드 상의 SRE 부위에 결합하여 전사를 개시함에 따라 SRE 부위 뒤에 연결되어 있는 루시퍼라제 발광 유전자도 함께 발현된다. 이 발광 세기를 검출기(Synergy 2, BIO-TEK)로 측정하여 SREBP-2의 활성 정도를 판단하였다.

[0086] 트랜스펙션(transfection)을 하기 위해 우선 EndoFree 플라스미드 Maxi Kit(Qiagen, 12362)을 이용해서 pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드를 1μg/μl 농도로 대량 생산하였다. 75cm<sup>2</sup> 플라스크 기준으로 할 때 Opti-MEM I Reduced serum 배지 1.2ml에 pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드 24μg을 희석하고 동일한 배지 1.2ml에 48μl의 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000; invitrogen, 11668-027)을 희석한 후 이 두 희석 액을 섞어 20분간 방치하였다. 75cm<sup>2</sup> 플라스크에서 70~80% 정도 자란 HepG2 세포를 트립신(trypsin)으로 떼어낸 후 상기 혼합물과 함께 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 배양시켰다.

- [0087] 1-4. HepG2 세포 내에서 락토바실러스 커베터스 HY7601에 의한 SREBP-2 활성화증가 능력측정
- [0088] 락토바실러스 커베터스 HY7601에 의한 SREBP-2 활성화증가 능력을 측정하기에 앞서 먼저 제작된 pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드가 SREBP-2의 활성을 측정하기에 적당한지 여부를 확인하였다.
- [0089] 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0090] 도 3에서 A는 무(none)처리, B는 25-하이드록시콜레스테롤(25-Hydroxycholesterol; Sigma, H1015) 1 $\mu$ g/ml와 콜레스테롤(Sigma C8667) 10 $\mu$ g/ml, C는 팔미토일글리세로포스포콜린(Rac-1-Palmitoyl-glycerol-3-phosphocholine, 이하'LPC'라함; Fluka, 76186) 20  $\mu$ M, D는 U18666A(Sigma, U3633) 2 $\mu$ g/ml를 처리한 군으로서 A에 대한 B, C, D 각각의 상대적인 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기를 나타낸다.
- [0091] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, B의 경우는 상기 시약들에 의해 세포 내 콜레스테롤 양이 증가되어 그 결과 SREBP-2의 활성이 줄어들었기 때문에 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기가 줄어들었음을 나타내고, C는 상기 시약에 의해 세포 내 콜레스테롤이 세포 밖으로 배출된 결과 세포 내 콜레스테롤의 양이 적어짐에 따라 SREBP-2의 활성이 증가하기 때문에 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기가 증가하였음을 나타내며, D는 상기 시약에 의해 콜레스테롤 합성이 저해됨에 따라 세포 내 콜레스테롤 양이 줄어든 결과 SREBP-2의 활성이 증가됨으로써 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기가 증가하였음을 나타낸다. 이상의 결과를 종합하여 보면 상기의 pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드가 SREBP-2의 활성을 측정하기에 적합하다고 결론을 내릴 수 있었다.
- [0092] 상기와 같이, pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드가 SREBP-2의 활성을 측정하기에 적합하므로, 락토바실러스 커베터스 HY7601에 의한 SREBP-2 활성화증가 능력을 측정하였다.
- [0093] 먼저, 국내 가정에서 제조한 김치를 0.02% 소듐 아지드(sodium azide)가 포함된 엠알에스(MRS) 액체 배지에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후, 10 $\mu$ l 백균이를 사용하여 배양액을 취하여 다시 0.02% 소듐 아지드가 포함된 엠알에스 한천 평판배지에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 배양하였다. 이렇게 형성된 균락 중의 여러 유산균을 HepG2 세포에 처리한 후 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기 변화를 측정한 결과 본 발명의 락토바실러스 커베터스 HY7601에 의해 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기가 증가됨을 발견하였다.
- [0094] 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0095] 도 4에서 A는 무(none)처리, B는 LPC 20  $\mu$ M, C는 락토바실러스 커베터스 H7601 10<sup>4</sup>개(HepG2 세포 개수와 동일함)를 처리한 군으로서 A에 대한 B, C 각각의 상대적인 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기를 나타낸다.
- [0096] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 커베터스 HY7601에 의해서 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기가 A에 비하여 30% 이상 증가하는 것을 발견하였다. 이 결과로 미루어 보아 락토바실러스 커베터스 HY7601에 의해 HepG2 세포 내 콜레스테롤의 양이 감소하는 것을 알 수 있었다.
- [0097] <시험예 2>
- [0098] 락토바실러스 커베터스 HY7601에 의한 콜레스테롤 강하 및 비만 억제 능력 측정
- [0099] 2-1. 비만 억제 능력 측정
- [0100] 실험동물은 (주)중앙실험동물에서 ICR 3주령 수컷 마우스를 구입하여 1주일 동안 고지방 식이를 공급하면서 적응시킨 후 이용하였다. 모든 실험군의 마우스는 10마리씩 임의로 배치하였다. 하기 표 3과 같이 실험군은 일반식이군, 고지방식이군, 락토바실러스 커베터스 HY7601군(고지방식이 + 락토바실러스 커베터스 HY7601)의 세 군으로 하였고 일반식이와 고지방 식이는 Research diets사에서 각각 D12450B(10% 지방)와 D12451(45% 지방)을 구입하여 이용하였다. 락토바실러스 커베터스 HY7601 균주는 엠알에스 액체배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 20시간 배양하였다. 이 배양액을 3,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심 분리하여 얻은 균체를 식이와 혼합하여 마우스에 투여하였다.

[0101] 총 8주 동안 실험 식이를 공급하며 1주일에 2회 간격으로 체중과 사료 섭취량을 측정하였다.

[0102] 그 결과를 도 5 및 표 4에 나타내었다.

[0103] 도 5에서 확인 할 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 커베터스 HY7601을 섭취한 군은 고지방 식이만 섭취한 군과 비교하여 체중 증가가 현저히 억제되었음을 알 수 있었다. 또한, 하기의 표 4에 나타난 바와 같이 8주간의 체중 증가량을 보면, 락토바실러스 커베터스 HY7601군은  $9.42 \pm 1.65$ 이고, 고지방식이군은  $16.58 \pm 3.94$ 로서 락토바실러스 커베터스 HY7601에 의해 체중 증가가 대략 45% 정도 억제되었음을 확인하였다.

표 3

실험군	개체수	사료 조성
일반 식이군	10	일반 식이(10% 지방)
고지방 식이군	10	고지방 식이(45% 지방)
락토바실러스 커베터스 HY7601군	10	고지방 식이(45% 지방) + 락토바실러스 커베터스 HY7601

[0104]

표 4

실험군	8주간 체중 증가량 (g)
일반 식이군	$9.41 \pm 2.2$
고지방 식이군	$16.58 \pm 3.94$
락토바실러스 커베터스 HY7601군	$9.42 \pm 1.65$ (**P<0.001)

[0105]

[0106] 2-2. 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 측정

[0107] 혈중 생화학 지표의 측정을 위해 상기 각군의 마우스를 12시간 절식시키고 심장채혈을 한 후 혈장을 분리하였다. 아산제약으로부터 구입한 kit를 이용하여 혈중 콜레스테롤 및 중성지방의 농도를 측정하였다.

[0108] 효소시약 1병과 완충액 1병을 섞어 효소시액을 만들고 효소시액 1.5ml와 혈청 10 $\mu$ l 또는 표준액 10 $\mu$ l와 섞어 반응을 비교하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 샘플(sample)의 콜레스테롤 및 중성지방 농도는 다음과 같이 계산하였다.

[0109] 
$$\text{샘플의 농도(mg/dl)} = \frac{\text{샘플의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times \text{표준액의 농도}$$

[0110] 그 결과를 표 5에 나타내었다.

[0111] 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 커베터스 HY7601군의 혈중 콜레스테롤과 중성지방 농도 모두 고지방식이만 섭취한 군(고지방식이군)에 비해 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 콜레스테롤의 경우 17% 정도 감소하였고, 중성지방의 경우 32% 정도로 상당한 감소 효과를 관찰할 수 있었다.

표 5

실험군	혈중 콜레스테롤	중성지방
일반 식이군	125.35 ± 13.7	59.85 ± 15.4
고지방 식이군	168.9 ± 19.8	96.6 ± 21.4
락토바실러스 커베티스 HY7601군	139.8 ± 15.2*	65.52 ± 18.1**

(\*P<0.05, \*\*P<0.01)

<시험예 3>

마우스 간조직에서 락토바실러스 커베티스 HY7601에 의한 마커 유전자 유의적 발현 차이 입증

상기 시험예 2의 마우스로부터 적출한 간조직의 SREBP-2, LDL-receptor, GAPDH(실험결과를 보정하기 위한 house-keeping 유전자) 유전자들의 발현 차이를 리얼타임 PCR을 통해 측정하였다. 우선 RNA queous kit(Ambion, AM1912)를 이용하여 간조직으로부터 RNA를 추출하고 High Capacity RNA-to-cDNA kit(Applied Biosystems, 4387406)를 이용하여 RNA에 대한 상보적인 DNA(complimentary DNA, 이하 'cDNA'라 함)를 확보하였다. 하기의 표 6과 같이 구입한 택맨프로브(Taqman probes, Applied Biosystems 사에서 구입)와 상기 cDNA를 이용하여 리얼타임 RCR(Applied Biosystems, 7500 Real time PCR)을 시행하였다.

그 결과를 도 6에 나타내었다.

도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이 SREBP-2와 LDL-receptor 발현 양상이 일반 식이군(C)보다 고지방 식이군(A)에서 예상대로 더 낮게 관찰되었다. 하지만 락토바실러스 커베티스 HY7601군(B)에서는 이들 유전자의 발현 정도가 다시 회복되는 것을 관찰하였다. 즉 락토바실러스 커베티스 HY7601에 의해 세포막의 LDL-receptor 발현이 증가됨으로써 콜레스테롤 유입이 증가되어 혈중 콜레스테롤 양이 감소된 것으로 해석할 수 있다.

표 6

유전자 이름	제품번호
SREBP-2	Mm01306294_m1
LDL-receptor	Mm00440169_m1
GAPDH	Mm99999915_g1

도면의 간단한 설명

도 1은 Biomerieux 사의 api 50 CH kit를 이용하여 락토바실러스 커베티스 HY7601의 당 발효 실험을 한 결과를 나타낸 그림이다.

도 2는 pGL3-SRE 루시퍼라제 플라스미드에 삽입되어 있는 HMG-CoA 합성효소 1 유전자 상위 -488~+37 부분을 나타낸 그림이다.

도 3은 HepG2 세포 내에서 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

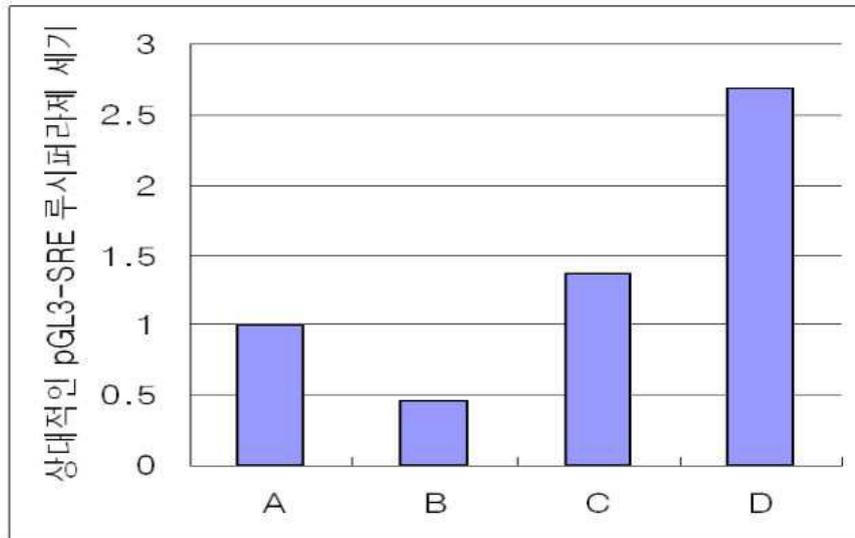
도 4는 HepG2 세포 내에서 락토바실러스 커베티스 HY7601에 의한 pGL3-SRE 루시퍼라제 세기를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 마우스의 8주간 평균 체중변화를 나타낸 그래프이다.

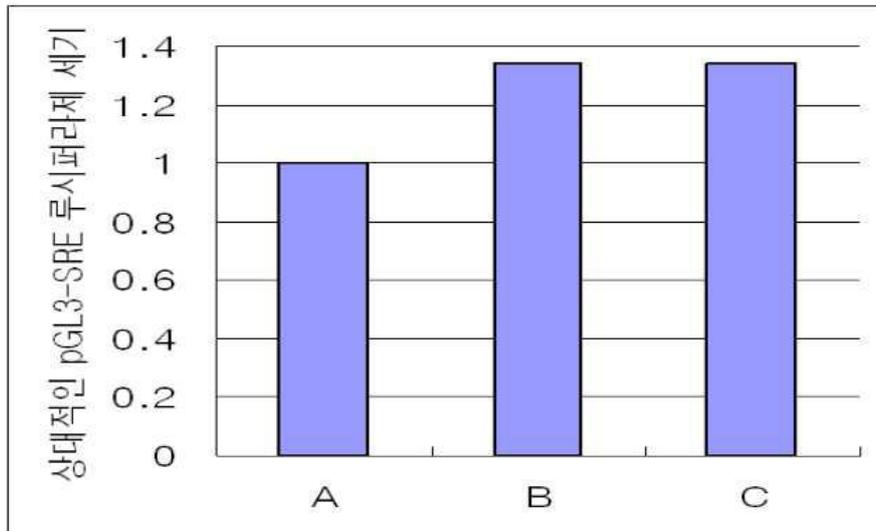
도 6은 리얼타임 PCR을 이용하여 마우스 간조직 내 SREBP-2와 LDL-receptor 유전자의 상대적인 RNA 양을 조사한



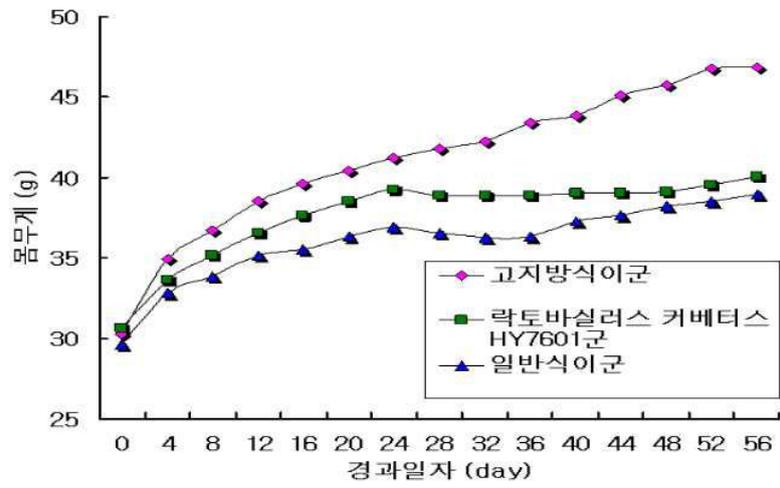
도면3



도면4



도면5



도면6

