



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월04일
(11) 등록번호 10-1238836
(24) 등록일자 2013년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/74 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0046092
(22) 출원일자 2011년05월17일
심사청구일자 2011년05월17일
(65) 공개번호 10-2012-0128260
(43) 공개일자 2012년11월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR100934747 B1
US20040120936 A1

(73) 특허권자
삼육대학교산학협력단
서울특별시 노원구 화랑로 815, 산학협력단 (공릉동, 삼육대학교)
(72) 발명자
하남주
서울특별시 중랑구 봉화산로48길 62, 104동 501호 (상봉동, 건영1차아파트)
최경순
서울특별시 광진구 뚝섬로34길 67, 트라펠리스 A동 202호 (자양동)
(74) 대리인
김태선

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 신동환

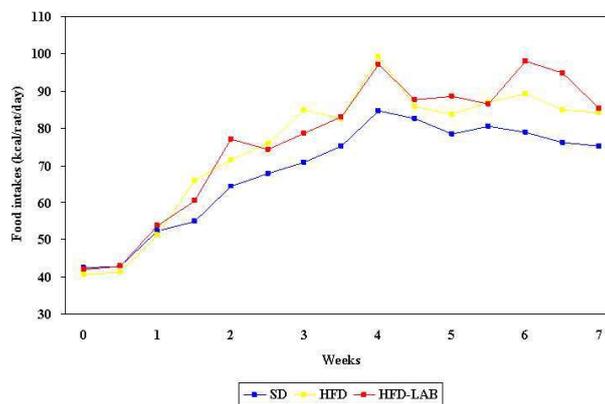
(54) 발명의 명칭 **혼합 유산균을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물 또는 식품 조성물**

(57) 요약

본 발명은 혼합 유산균을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 혼합유산균 배양액을 포함하는 비만 관련 질환의 조성물은 각각 다른 기능과 특성을 나타내는 유산균들을 혼합한 것으로, 체중 감소, 혈중 지질 성분의 수치 저하, 간 기능 수치 호전 및 장내 유해 효소 활성의 저해로 인한 장내 총 유산균 수를 증가시키는 효과를 나타내고, 체중을 감소시키면서도 장기능, 간기능을 활성화할 뿐만 아니라, 아밀라아제 활성을 감소시켜 식욕을 억제하면서, 리파아제 활성을 증가시켜 지방 분해를 촉진시켜 비만 관련 질환의 치료 및 예방용 약제학적 조성물 및 기능성 식품으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PA090767

부처명 서울특별시

연구사업명 서울시 산학연 협력사업(2009년도 특허기술상품화 기술개발 지원사업)

연구과제명 기능성 유산균 두유 요구르트 개발

주관기관 삼육대학교 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

비피도박테리움 슈도카테놀라툼 SPM 1204(수탁번호 KCTC 10616BP), 비피도박테리움 롱검 SPM 1205(수탁번호 KCTC 10630BP), 및 비피도박테리움 롱검 SPM 1207(수탁번호 KCTC 11506 BP)으로 구성되는 것인 혼합 유산균을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 혼합 유산균은 비피도박테리움 슈도카테놀라툼 SPM 1204(수탁번호 KCTC 10616BP), 비피도박테리움 롱검 SPM 1205(수탁번호 KCTC 10630BP), 및 비피도박테리움 롱검 SPM 1207(수탁번호 KCTC 11506 BP)을 10^8 내지 10^9 cfu/ml 포함하는 각각의 배양액을 동일 부피비로 혼합한 것을 특징으로 하는 혼합 유산균을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 혼합 유산균을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물은 혈액 내의 아미노트랜스퍼라아제(AST)와 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제(ALT)의 수치를 감소시키는 것을 특징으로 하는 혼합 유산균을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 혼합 유산균을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물은 알파 아밀라아제의 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 혼합 유산균을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 혼합 유산균을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물은 리파아제의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 혼합 유산균을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 7

제 1 항 또는 제 3 항 내지 제 6 항 중 어느 하나의 약제학적 조성물을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 혼합 유산균을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 현대인들은 고열량의 식사가 주를 이루는 식생활로의 변화 및 운동 부족, 스트레스의 증가에 의해 인체의 항상성이 교란되고 있으며, 이에 따라 각종 비만 및 관련 대사성 질환이 급증하고 있다. 관련 대사성 질환은 2형 당뇨병 및 고혈압뿐 아니라, 뇌졸중, 동맥경화 등 심혈관 질환과 각종 암에 이르기까지 인류의 건강 및 생명을 위협하는 심각한 질환을 포함한다. 20세기 후반에 비하면 비만율은 5~10배 증가하였다. 특히 중·장년층의 복부비만은 만성 대사 증후군의 직접적인 원인이 될 수 있어 항상 주의가 필요하다. 팔, 다리에 축적된 지방은 잘 분해·흡수되지 않아 용모는 보기 싫게 하여도 건강에는 큰 지장이 없지만, 복부 비만의 경우는 지방이 쉽게 용해되어 혈액 속에 흡수되므로 대사 증후군의 원인이 될 수 있다.

[0003] 세계보건기구(WHO)에서는 1996년도에 비만을 질병으로 분류하고, 이를 예방 내지 치료해야 할 대상으로 명시하였다.

[0004] 현재까지 알려진 비만치료제로는 제니칼(Xenical, 로슈제약회사, 스위스), 리덕틸(Reductil, 에보트사, 미국), 엑소리제(Exolise, 아토파마, 프랑스) 등으로 크게 식욕억제제, 에너지소비 촉진제, 지방흡수억제제로 분류되며, 대부분의 비만치료제는 시상하부와 관련된 신경전달물질을 조절함으로써 식욕을 억제하는 식욕억제제이다. 그러나, 종래의 치료제들은 심장질환, 호흡기질환, 신경계질환 등의 부작용과 함께 그 효능의 지속성도 낮아, 더욱 개선된 비만치료제의 개발이 필요하고 또한 현재 개발되고 있는 제품도 부작용 없이 만족할 만한 치료효과를 가지는 치료제는 없어 새로운 비만치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 그러나, 자료에 의하면, 기존까지 비만에 대한 약학적 치료는 장기간 체중 감량을 유지시키는 데에는 효과적으로 나타나지 않으므로, 향후 연구는 비만의 유행을 감소시키기 위해 새로운 약물 요법의 발견이 필수적이다.

[0006] 한편, 생균제(probiotic)라는 용어는 Lilly 와 Stillwell(Lilly D. M. et al., Science, 'Probiotics: growth promoting factors produced by microorganism', 147; 747, 1996)에 의해서 최초로 사용되었으며, 살아있는 미생물 제제를 의미한다. Parker(Parker R. B., An Nutr & Health, 29; 4-8, 1974)는 생균제에 대해 '장내 미생물 균형에 영향을 주는 살아있는 미생물을 의미'하는 것으로 정의한 바 있다.

[0007] 생균제는 장내 균총이 잘 발달되게 함으로써 'Nurmi concept'라고 불리는 경쟁적 배제의 개념으로 장내 유익한 미생물 군집이 성숙하게 하는 결과 그 후에는 살모넬라와 같은 병원성 미생물의 근접을 막을 수 있고(Nurmi E. et al., Nature, 241; 210, 1973), 면역 질환의 치료 및 예방의 잠재적 효과 때문에 주목을 끌고 있다(Borchers, 2009).

[0008] 게다가, 최근 실험 연구에서는 비만에서의 몇몇 박테리아 균주의 예방적 효과를 나타내었다. 이들 중에서, 비피도박테리아는 유산균의 일종에 속하는 공생균 중에서 포유류 소화관내에 가장 많은 생균제의 하나이다. 한 연구에서는 비피도박테리움 룡검의 균주가 *Streptococcus thermophilus* 및 *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* (SL)의 혼합 배양액보다 총 콜레스테롤과 관련하여 랫트와 쥐에서 현저한 효과를 나타내었다.

[0009] 다른 연구에서는 생균제를 처리한 마우스에서 비피도박테리움 균주가 포도당 내성, 인슐린 분비가 유도된 글루코스 및 정상화 염증도(감소된 내독소혈증, 플라즈마 및 지방 세포 친염증 사이토카인)와 양성적으로 연관되어 있다(Cani et al., 2007).

[0010] 결과적으로, 동결건조된 비피도박테리아, 락토바실리 및 스트렙토코커스 서모필러스의 혼합물은 식이유도비만을 향상시켰고, 간 자연 살해 T-세포의 증가 및 마우스에서의 염증 신호를 감소시키는 지방간 및 인슐린 저항과 관

련이 있다 (Ma et al., 2008).

- [0011] 이러한 연구 결과들을 통해 비피도박테리아 제제는 안전하고, 다양하게 사용되어질 수 있다는 것을 알 수 있으나, 비만과 관련하여서는 비피도박테리아 균주가 지방 대사 및 체중과 관련이 있고, 비만 관리를 위한 잠재적 치료제로 제안되고 있을 뿐, 구체적이고 다양한 용도로의 활용이 결여되어 있는 실정이다.
- [0012] 이에 따라 종래의 비피도박테리아를 이용한 생균제로서의 활성 확인을 통한 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 제제의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 상기한 문제점을 해결하기 위하여 혼합유산균 배양액을 고지방 식이로 유도된 군에 투여할 경우 체중 감소 효과를 나타냄은 물론 장내 세균에 대한 우수한 유해 효소 활성 저해 효과를 나타냄을 확인하고, 상기 혼합유산균을 포함하는 비만 관련 질환의 치료 및 예방용 약학 조성물 및 기능성 식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 상기한 목적을 위하여, 혼합 유산균을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 혼합 유산균은 비피도박테리움 슈도카테놀라툼 SPM 1204(수탁번호 KCTC 10616BP), 비피도박테리움 롱검 SPM 1205(수탁번호 KCTC 10630BP), 및 비피도박테리움 롱검 SPM 1207(수탁번호 KCTC 11506BP)으로 구성되는 것인 혼합 유산균을 포함한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 혼합 유산균은 비피도박테리움 슈도카테놀라툼 SPM 1204(수탁번호 KCTC 10616BP), 비피도박테리움 롱검 SPM 1205(수탁번호 KCTC 10630BP), 및 비피도박테리움 롱검 SPM 1207(수탁번호 KCTC 11506BP)을 10^8 내지 10^9 cfu/ml 포함하는 각각의 배양액을 동일 부피비로 혼합한 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 혼합 유산균을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물은 혈액 내의 아미노트랜스퍼라아제 (AST), 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제 (ALT) 의 수치를 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 혼합 유산균을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물은 알파 아밀라아제의 활성을 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 혼합 유산균을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물은 리파아제의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 본 발명에 의한 혼합 유산균을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 혼합유산균 중에 하나인 비피도박테리움 슈도카테놀라툼 SPM 1204은 인분으로부터 분리한 신규한 비피도박테리움 속 미생물로서, 상기 미생물이 외인성 항원에 대한 수치상 세포의 교차-제시를 증진시키고, NO 및 TNF- α 생산을 유도하며 대식세포를 활성화시키는 면역 증강 활성을 가지고 있으며, 본 발명자에 의해 2004년 3월 31일자로 기탁되었다(기탁번호: KCTC 10616BP).
- [0022] 본 발명의 혼합유산균인 비피도박테리움 롱검 SPM 1205은 인간의 분변으로부터 새로운 비피도박테리움 균주로서, 장기능을 활성화함과 동시에 면역기능을 강화하는 기능을 가지고 있으며, 본 발명자에 의해 2004년 5

월 10 일자로 기탁되었다(기탁번호: KCTC 10630BP).

- [0023] 본 발명의 혼합유산균인 비피도박테리움 롱검 SPM 1207은 고밀도 지단백질(HDL : High Density Lipoprotein) 수치는 상승시키며, 총 콜레스테롤 수치 및 저밀도 지단백질 (LDL : Low Density Lipoprotein) 수치는 저하시키는 신규한 비피도박테리움 롱검 균주로서, 본 발명자에 의해 2009년 5월 12일 자로 한국미생물보존센터에 기탁되었다(기탁번호 : KCTC 11506BP).
- [0024] 본 발명은 이와 같이 개별적으로는 면역 증강 활성, 장기능 활성 및 콜레스테롤 수치 저하 활성을 가지는 것으로 것으로 알려진 유산균들을 혼합하여 비만 관련 질환의 치료 및 예방용 조성물로의 용도를 제공하는 것이며, 상기 조성물은 음식물 섭취 억제, 체지방 감소용으로도 적용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물에 포함되는 혼합유산균은 아밀라아제 활성을 감소시켜 식욕을 억제하고, 지속적인 음식물 섭취 억제 효과를 일으키며, 리파아제 활성을 증가시켜 지방을 분해하여 흡수되도록 함으로써, 비만 관련 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 또한 이러한 음식물 섭취 억제 효과로 인해 콜레스테롤 혹은 지방세포와 같은 체지방을 감소시키는 데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0026] 일반적으로 비만 및 이의 관련 질환의 치료 및 예방시, 체지방의 감소는 필요하지만 체지방의 감소, 즉 단백질의 감소는 바람직하지 못하다. 본 발명에 따른 혼합유산균을 포함하는 조성물은 지방 세포와 같은 체지방의 감소, 장내 유해 효소 저해 활성을 통해 비만 관련 질환 치료제로 우수한 성분으로 작용할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물에 포함되는 혼합유산균은 혈액 내의 아미노트랜스퍼라아제 (AST)와 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제 (ALT) 의 수치를 감소시켜 체지방을 감소시켜 비만 억제 효과를 나타내면서도 간 기능을 활성화시키므로 체지방 감소에 따른 부작용이 전혀 없는 우수한 비만 관련 치료 또는 예방 효과를 나타낸다.
- [0027] 본 발명의 비만 관련 질환은 비만, 고지혈증, 인슐린 내성 증후군, 비만 관련 위식도역류, 지방간염, 심혈관질환 및 대사 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 혼합유산균 배양액을 포함하는 비만 관련 질환 치료용 조성물은 약제학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 화합물 또는 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 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, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 혼합유산균의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 혼합유산균은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명

의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0031] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 혼합 유산균을 식품으로 사용할 경우, 상기 혼합 유산균을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 본 발명의 혼합유산균 배양액을 포함하는 비만 관련 질환의 예방용 기능성 식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 형태일 수 있고, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 균주를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있고, 발효유, 요구르트, 치즈, 우유 음료 또는 분유로 제조하는 것이 바람직하고, 발효유, 요구르트, 음료수, 분유, 식품첨가물, 또는 건강보조식품인 것이 더욱 바람직하다.
- [0034] 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0035] 일반적으로, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 균주를 식품 또는 음료의 제조시에 상기 특정식품 소재 1 g(또는 ml) 당 본 발명의 균을 1×10^7 내지 10×10^8 개(균수) 첨가하고, 바람직하게는 1×10^8 내지 5×10^8 개의 양으로 첨가한다.
- [0036] 본 발명의 균주의 유효용량은 상기 억제학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0037] 본 발명의 식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 혼합유산균을 함유하는 것 외에는 특별히 제한이 없으며, 통상의 식품과 같이 여러 가지 향미제 등을 추가성분으로서 함유할 수 있다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명에 따른 혼합유산균 배양액을 포함하는 비만 관련 질환의 조성물은 각각 다른 기능과 특성을 나타내는 유산균들을 혼합한 것으로, 체중 감소, 혈중 지질 성분의 수치 저하, 간 기능 수치 호전 및 장내 유해 효소 활성의 저해로 인한 장내 총 유산균 수를 증가시키는 효과를 나타내고, 체중을 감소시키면서도 장기능, 간기능을 활성화할 뿐만 아니라, 아밀라아제 활성을 감소시켜 식욕을 억제하면서, 리파아제 활성을 증가시켜 지방 분해를 촉진시켜 비만 관련 질환의 치료 및 예방용 억제학적 조성물 및 기능성 식품으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 실험 기간 동안의 식품 섭취량의 변화를 나타낸 도이고,
 도 2는 실험 기간 동안의 총 유산균 수 변화를 나타낸 도이며,
 도 3은 본 발명의 혼합유산균을 섭취한 경우 장내 유해 효소 활성 저해를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] <실시예 1. 혼합 유산균의 제조>

[0042] 본 발명의 혼합 유산균은 한국인의 장에 존재하는 20세 내지 30세의 건강한 어른의 분변으로부터 동정된 비피도박테리움 슈도카테놀라툼 SPM 1204, 비피도박테리움 롱검 SPM 1205 및 비피도박테리움 롱검 SPM 1207이고, 하기 표 1에 나타난 배지를 이용하여 배양하였다.

표 1

Media	Main enumerated microorganisms	Incubation time (day)
BL agar medium ^b	Predominant anaerobes	3
GAM agar medium ^c	<i>Bifidobacterium</i> spp.	1-2

[0044] ^bBL, Blood Liver (Nissui Pharm. Co. Ltd., Japan).

[0045] ^cGAM, General Anaerobic Medium (Nissui Pharm. Co. Ltd., Japan).

[0046] 상기 유산균들을 각각 GAM agar medium에 접종하여 37℃에서 종균 배양한 후, 이 종균 배양액을 각각 1% 씩 혼합 접종하여 멸균된 GAM(General anaerobic medium) (Nissui Pharm. Co. Ltd., Japan) broth에서 N₂(90%), H₂(5%) 및 CO₂ (5%)로 구성되는 혼합 가스로 채워진 혐기적 시스템(Bactron Anaerobic Chamber, Sheldon Manufacturing Inc., USA)하에 37℃에서 18시간 동안 배양하였다. 이후 배양액을 4000rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체만 회수하였다.

[0047] 상기 3 가지 균주를 배양하여 얻어진 각각의 균체를 1.0 x 10⁸ cfu/ml의 농도로 하여 혼합한 후, 혼합 배양물을 하기의 실험예에서 실험 대상용 랫트에 경구 투여하였다.

[0048] <참고예 1. 실험 동물의 준비 및 투여균 설정>

[0049] 실험 동물은 중앙 실험 동물에서 구입한 3 주령의 수컷 SD (스프라그-다우리) 랫트 36 마리를 구입하였고, 신진 대사 상태를 안정화시키기 위해 1주 동안 표준 식이 (AIN-76A #100000, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)를 급여하였다.

[0050] 케이지 당 2 마리씩 넣었고, 물과 사료는 임의로 공급하였다. 랫트는 12 시간 주기로 빛과 어둠에 노출시켰고, 온도는 22 ± 2℃ 및 습도는 55 ± 5%를 유지시켰으며, 모든 동물 실험은 삼육대학교에서 승인한 실험 동물 사육 지침서에 따라 수행되었다.

[0051] 랫트는 임의로 선택하여 한 그룹당 12마리씩 3 그룹(실시예(HFD-LAB), 비교예 1(SD), 비교예 2(HFD))으로 설정하였다.

[0052] <실시예 2. 식이 조절에 따른 체중 변화 측정>

[0053] 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 비교예 1(SD) 그룹은 대조군으로써 표준 식이 및 PBS를 급여하였고, 비교예 2(HFD) 그룹은 고지방식이 (40% beef tallow modified AIN-76A purified rodent diet #101556, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA) 및 PBS를 급여하였으며, 실시예(HFD-LAB) 그룹은 고지방 식이 및 본 발명의 상기 실시예 1에서 제조된 혼합유산균을 0.2 ml 급여하였다.

표 2

[0054]

Groups	Rats(n)	Food	Treatment (oral administration for 5 weeks)
비교예 1 (SD) 그룹	12	Standard Diet	0.2 ml of sterilized PBS
비교예 2 (HFD) 그룹	12	40% High Fat Diet	0.2 ml of sterilized PBS
실시에 (HFD-LAB) 그룹	12	40% High Fat Diet	0.2 ml of LAB in sterilized PBS

[0055]

상기 표준 식이 및 고지방 식이의 조성물은 하기 표 3에 나타내었다. 모든 랫트는 실험 시작 전 일주일 동안 각각의 식이에 적응되었다. 그 후, 랫트에 5주 동안 1일 1회에 0.2ml의 PBS 또는 실시예 1의 혼합유산균 (1×10^8 CFU/ml)을 경구 투여하였고, 체중 및 식이 섭취량을 매일 측정하였다.

표 3

[0056]

Ingredients	Standard Diet		High Fat Diet	
	(AIN-76A diet #100000)		(AIN-76A diet #101556)	
	g	kcal	g	kcal
Casein	200	720	200	720
Beef tallow	0	0	400	3600
Methionine	3	12	3	12
Starch	150	540	150	540
Sucrose	500	2000	150	600
Cellulose	50	0	50	0
Corn oil	50	450	0	0
Salt mixture	35	30.8	35	30.8
Vitamine mixture	10	39	10	39
Choline bitartrate	2	0	2	0
Total	1000	3791.8	1000	5541.8

[0057]

<참고예 2. 통계학적 분석>

[0058]

모든 측정값은 평균±표준편차로 나타내었다. 일원 배치 또는 이원 배치 분석법을 통해 검정하였으며, 데이터 분석은 StatView for Macintosh (version 5.0; SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0059]

<실험예 1. 체중 측정>

[0060]

7주의 실험 기간 동안 3일 간격으로 각각의 그룹에 대한 체중 변화를 측정하였으며 그 결과인 실험 기간 동안의 체중 변화 및 증가량을 아래 표 4에 나타내었다.

[0061]

하기 표 4 에서 비교예 1(SD) 그룹은 315.86 ± 12.42 g, 고지방 식이만을 먹인 비교예 2(HFD) 그룹은 349.14 ± 29.14 g, HFD-혼합유산균을 먹인 실시예(HFD-LAB) 그룹은 339.70 ± 26.75 g 으로 나타나, 고지방 식이만을 먹인 비교예 2(HFD) 그룹의 체중 증가가 가장 높게 나타나는데 비해, 본 발명의 실시예에 따른 HFD-혼합유산균을 먹인 실시예(HFD-LAB) 그룹은 고지방 식이만을 먹인 비교예 2(HFD) 보다 체중 증가가 감소하였음을 확인할 수 있다.

표 4

[0062]

	Body weight (g)		
	비교예 1(SD) 그룹	비교예 2(HFD) 그룹	실시에(HFD-LAB) 그룹
0 day	60.38 ± 3.07^d	60.14 ± 3.72	59.70 ± 3.40

3 day	81.88 ±3.09	80.64 ±4.48	81.58 ±4.56
6 day	106.42 ±3.40	105.44 ±5.98	105.83 ±5.51
9 day	125.86 ±3.58	123.30 ±7.89	124.83 ±6.56
13 day	157.13 ±4.64	156.36 ±11.94	158.08 ±8.97
16 day	178.13 ±4.58	180.00 ±14.20	180.75 ±11.24
20 day	208.00 ±5.69	215.11 ±16.56	215.60 ±13.13
23 day	228.29 ±4.99	235.20 ±20.21	236.00 ±16.92
27 day	259.38 ±7.19	273.00 ±21.56	272.36 ±19.05
30 day	281.86 ±6.31	296.67 ±24.02	293.17 ±24.43
34 day	311.50 ±8.30	327.88 ±28.64	323.25 ±29.19
37 day	325.22 ±9.67	340.22 ±29.44	334.91 ±27.91
41 day	348.38 ±12.19	364.11 ±30.64	359.27 ±29.02
44 day	358.57 ±11.49	380.00 ±31.63	371.40 ±28.91
48 day	376.14 ±11.20 ^B	409.29 ±29.77 ^A	399.40 ±28.28 ^{AB}
Weight gain	315.86 ±12.42 ^B	349.14 ±29.14 ^A	339.70 ±26.75 ^{AB}

[0063] 또한, 각각의 그룹에 대한 평균 식품 섭취율을 측정하여 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에서 나타난 바와 같이, 비교예 2(HFD) 그룹의 평균 식품 섭취량은 비교예 1(SD) 그룹보다 높게 나타났으나, 비교예 2(HFD) 그룹과 실시예(HFD-LAB) 그룹에서의 차이는 나타나지 않았다.

[0064] <실험예 2. 혈청 분석 및 간기능 활성화 여부 측정>

[0065] 7주의 실험 기간 종료 후, 3 그룹(실시예(HFD-LAB), 비교예 1(SD), 비교예 2(HFD))의 각각의 랫트에서 채취한 혈액 샘플을 튜브에 수집하였고, 원심 분리하여 혈청을 분리하였다 (3500rpm/10min).

[0066] 분리한 혈청에서 총 콜레스테롤 (TC), 고밀도 리포단백질 콜레스테롤 (HDL-C), 저밀도 리포단백질 콜레스테롤 (LDL-C), 트리글리세리드, 글루코스, 랩틴, 알라닌, 아미노트랜스퍼라아제 (AST), 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제 (ALT) 수치는 한국 수의학 협회에서 분석하였으며, 그 결과를 아래 표 5에 나타내었다.

[0067] 표 5에서 보는 바와 같이 HFD-혼합유산균을 먹인 실시예(HFD-LAB)은 고지방 식이만을 먹인 비교예 2(HFD) 그룹과 비교했을때, 고밀도 리포단백질 콜레스테롤 (HDL-C) 수치는 증가하면서도, 총 콜레스테롤 (TC), 저밀도 리포단백질 콜레스테롤 (LDL-C), 트리글리세리드, 글루코스, 랩틴, 알라닌, 아미노트랜스퍼라아제 (AST), 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제 (ALT) 의 수치가 감소하여 체중이 감소하면서도 간기능을 향상시키는 효과를 나타낼 수 있었다.

[0068] 특히 아미노트랜스퍼라아제 (AST)의 경우 비교예 1 및 비교예 2에 비하여 20% 이상 감소함을 확인할 수 있다.

표 5

	비교예 1(SD)	비교예 2(HFD)	실시예(HFD-LAB)
TC (mg/dl)	82.50 ±13.03 ^{d,B}	99.00 ±8.51 ^A	85.13 ±16.33 ^{AB}
HDL-C (mg/dl)	55.36 ±9.34 ^A	45.33 ±8.40 ^B	48.64 ±7.49 ^{AB}
LDL-C (mg/dl)	20.27 ±2.50 ^A	15.58 ±4.19 ^B	15.22 ±4.40 ^B
Triglyceride (mg/dl)	146.18 ±33.76 ^B	278.33 ±104.61 ^A	246.70 ±74.18 ^A
Glucose (mg/dl)	238.18 ±46.92 ^A	228.50 ±37.20 ^A	191.70 ±24.72 ^B
AST (U/L)	113.70 ±47.11 ^A	107.58 ±14.51 ^{AB}	82.50 ±12.81 ^B
ALT (U/L)	38.00 ±5.25 ^B	63.08 ±8.64 ^A	62.70 ±4.35 ^A

[0069]

[0070] <실험예 3. 장기 무게 측정>

[0071] 7 주의 실험 기간 종료 후 3 그룹(실시에(HFD-LAB), 비교예 1(SD), 비교예 2(HFD))의 각각의 랫트를 희생시킨 후의 지방 (부고환 및 후복막), 간, 비장 및 췌장들은 즉시 제거하였고, 각각의 무게를 측정하였다.

[0072] 하기 표 6에서 나타난 바와 같이, 고지방 식이의 비교예 2의 경우 지방의 양을 포함하는 체지방의 형태의 에너지 축적을 유도하는 부정소 및 후복막의 무게를 증가하였으나, 고지방 식이와 본 발명에 따른 실시예의 유산균 조성물을 함께 섭취한 실시예 그룹의 경우 비교예 2 보다 현저히 무게 증가량이 감소함을 알 수 있다.

표 6

[0073]

	비교예 1 (SD)	비교예 2 (HFD)	실시에 (HFD-LAB)
Body weight (g)	381.00 ±11.95 ^{d,B}	413.86 ±30.28 ^A	402.20 ±29.23 ^{AB}
Fat weight (g) (epididymal retroperitoneal)	13.94 ±2.66 ^B	20.94 ±4.08 ^A	18.47 ±2.02 ^A
Fat pad weight (g/100 g body weight)	3.63 ±0.65 ^B	5.11 ±0.60 ^A	4.83 ±0.40 ^A
Spleen (g)	0.66 ±0.03	0.60 ±0.07	0.64 ±0.10
Kidney (g)	2.59 ±0.15	2.60 ±0.18	2.61 ±0.08
Liver (g)	18.47 ±1.95 ^{AB}	20.04 ±2.27 ^A	17.59 ±2.33 ^B

[0074] <실험예 4. 알파-아밀라아제 및 리파아제 활성 측정>

[0075] 알파-아밀라아제 및 리파아제 활성은 알파-아밀라아제 분석 키트(BioAssay Systems, USA) 및 리파아제 분석 키트 (BioAssay Systems, USA)를 각각 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 아래 표 7 에 나타내었다.

[0076] 아래 표 7 에서 보는 바와 같이 본 발명의 혼합 유산균을 투여한 군의 경우 표준 식이를 한 비교예 1 그룹에 비해 아밀라아제의 활성은 감소하고, 리파아제의 활성은 증가하였다.

표 7

[0077]

	비교예 1(SD)	실시에(HFD-LAB)
알파-아밀라아제 (U/L)	193.33 ±9.77 ^d	181.17 ±11.89
리파아제 (U/L)	121.67 ±12.44	208.50 ±15.18

[0078] d : 각각의 표준편차를 나타냄.

[0079] 알파 아밀라아제는 다당류를 가수분해하는 소화효소 중의 하나이고, 사람의 췌장(이자)액과 타액에 포함되어 있다. 따라서, α-아밀라아제 활성의 저해는 식욕을 적절하게 만족시켜서 비만을 억제하는 효과와 또한 당뇨병 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 실시예에서 혼합 유산균을 투여한 군의 경우 α-아밀라아제의 활성을 감소시켜 비만 억제, 당뇨병 치료에 효과가 있음을 알 수 있다.

[0080] 리파아제는 췌장 효소중 하나로서 장에서 지방을 분해하여 흡수하는 역할을 한다. 혈액 속의 지방을 분리하여 세포로 이동시킨 후 세포에서 지방을 분해하여 미토콘드리아에서 에너지 활용을 하도록 유도하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 리파아제를 활성화시키는 기전에 비만 약물 중 하나로 알려져 있다. 본 발명의 실시예에 의한 혼합 유산균을 투여한 경우 상기 표 7에서 보는 바와 같이 비교예 1의 경우에 비하여 리파아제의 활성을 급격히 증가시켜 비만 억제, 당뇨병 치료에 효과가 있음을 알 수 있다.

[0081] <실험예 5. 장 기능 활성화 여부 측정>

[0082] 5-1. 장내 총 유산균수 측정

[0083] 장내 총 유산균 수 및 유해 효소 측정을 위해 분변 시료를 수집하였다. 분변 시료는 직장 자극에 의한 직장으로부터 채취하였고, 즉시 살균 튜브에 옮겨 4℃에서 보관하였다. 분변 시료 (0.1g)는 볼텍스를 이용하여 0.1 M의 인산염 버퍼 0.9ml과 혼합하였고, 0.1ml은 10^{-1} to 10^{-7} 부터 10배의 농도로 희석하였다. 1ml은 선택적 GAM (General Anaerobic Medium) agar medium에 첨가하였고, 혐기성 조건에서 48시간 배양 후에, 비피도박테리움의 균수를 측정하였다 (Choi et al., 2005).

[0084] 총 균수에 대한 유산균수는 도 2에 나타내었다. 총균수에 대한 혼합유산균수는 실시예(HFD-LAB) 그룹과 비교예 2(HFD) 그룹이 비교예 1(SD) 그룹보다 낮게 나타났으나, HFD-LAB 그룹은 HFD 그룹보다 현저하게 증가함을 알 수 있었다.

[0085] **5-2. β -글루코시다아제 활성 측정**

[0086] 2mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 0.8 ml와 현탁된 효소액 (현탁된 분변 샘플) 0.2 ml로 구성된 반응액 1 ml를 37℃에서 30분간 반응시킨 후 0.5N NaOH 1 ml를 가해 반응을 종료시킨다. 그 뒤 이 반응 용액을 원심분리(3,000 rpm/10min)한 후 상등액을 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0087] **5-3. β -글루쿠로니다제 활성 측정**

[0088] 2 mM p-nitrophenyl- β -D-glucuronide 0.8 ml와 현탁한 효소액 0.2 ml로 구성된 반응액 1 ml를 37℃에서 30분간 반응시키고 0.5N NaOH 1 ml를 가해 반응을 종료시킨다. 그 뒤 이 반응 용액을 원심분리(3,000 rpm/10min)한 후 상등액을 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0089] **5-4. 트립토판아아제 활성 측정**

[0090] Complete reagent solution(0.05 M potassium phosphate buffer 100 ml에 2.75 mg of pyridoxal phosphate, 19.6 mg of disodium EDTA dihydrate, 10 mg of bovine serum albumin이 포함되고 pH 7.5) 0.2 ml 및 20 mM 트립토판 0.2 ml와 현탁한 효소액 0.1 ml로 구성된 반응 용액을 37℃에서 한 시간 동안 반응시키고 color reagent(p-디메틸아미노베즈알데히드 14.7 g, 95% 에탄올 948 ml, H₂SO₄ 52 ml) 2 ml를 가하여 반응을 종료시킨 후 원심분리(3,000 rpm/10min)하고 상등액을 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0091] **5-5. 우레아제 활성 측정**

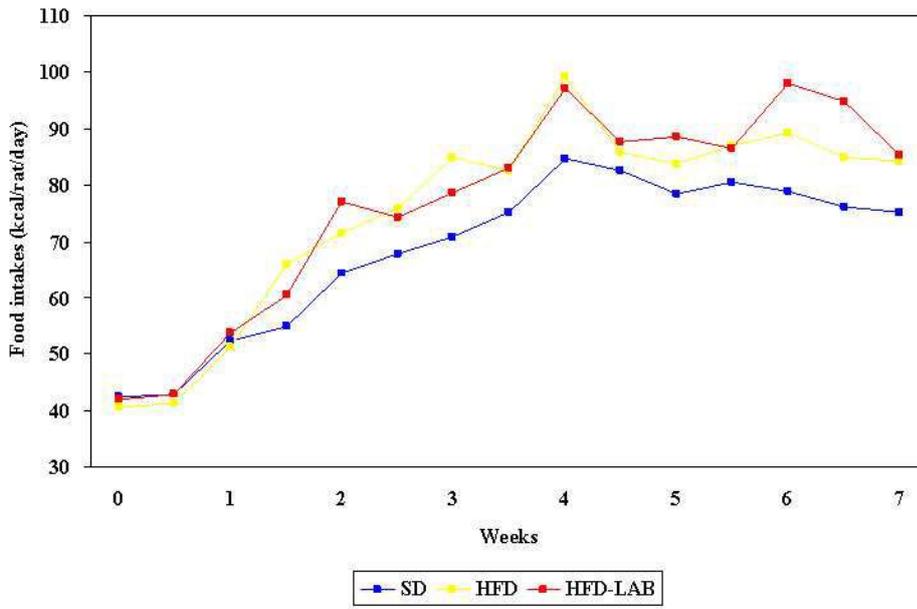
[0092] Urea substrate solution(20 mM sodium phosphate buffer에 4 mM urea를 녹인 용액) 0.3 ml와 현탁된 효소액 0.5 ml로 구성된 반응 용액을 37℃에서 30분간 반응하고, 1 N (NH₄)₂SO₄ 0.1 ml를 첨가하여 반응을 종료시켰다.

[0093] 그 뒤 이 반응액에 페놀니트로프루시드 시약(Phenolnitroprusside reagent) 1 ml와 알칼리 하이포클로라이트 시약(alkaline hypochlorite reagent (NaClO)) 1 ml를 첨가하여 65℃에서 20분간 반응시켰다. 이 반응 용액을 3,000 rpm 에서 10분간 원심 분리시키고, 상등액을 603 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 3에 나타내었다.

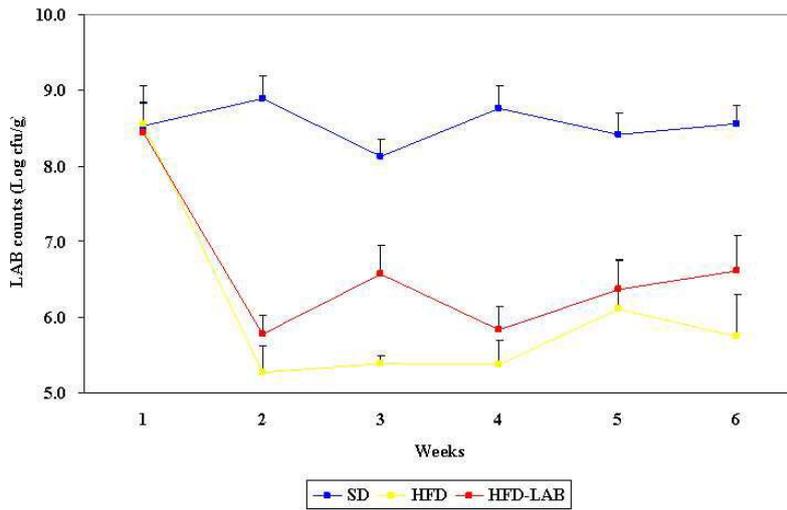
[0094] 도 3에서 보는 바와 같이 본 발명의 혼합 유산균을 섭취한 실시예(HFD-LAB) 그룹에서의 우레아제를 제외한 β -글루코시다아제, β -글루쿠로니다제, 트립토판아아제의 장내 유해 활성은 각각 36%, 30% 및 13%로 감소함을 확인하였다.

도면

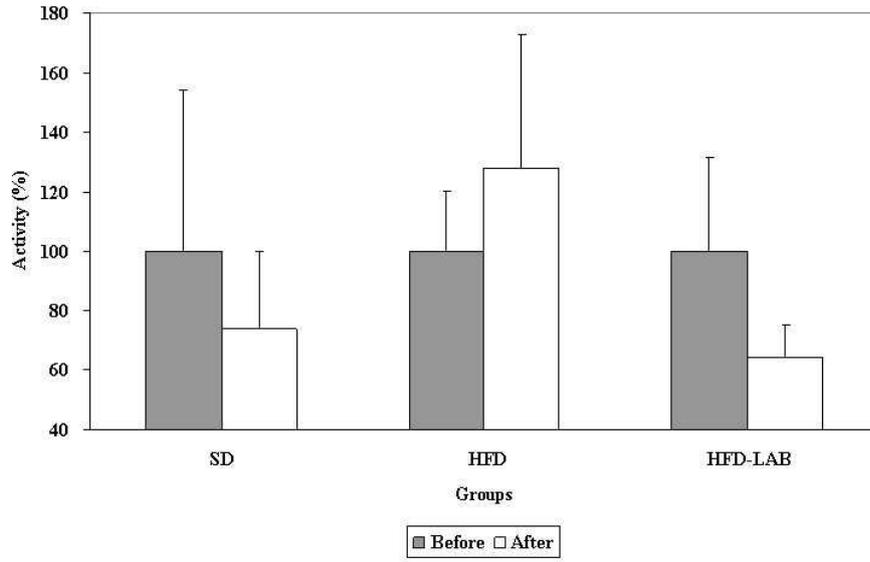
도면1



도면2



도면3a



도면3b

