

명세서

발명의 명칭: 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 예방 또는 치료용 김치

기술분야

- [1] 본 출원은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 연관 질환에 대한 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 유산균을 함유하는 김치에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 1983년 호주의 미생물학자인 마샬(Marchall)과 와렌(Warren)은 최초로 B 형 위염 환자의 위점막 생검 조직에서 만곡성 세균을 발견하고, 상기 세균을 배양하여 캄필로박터 종(*Campylobacter* genus)과 연관된 새로운 종의 세균임을 규명한 이래, 헬리코박터 파일로리와 위염 및 소화성 궤양 등의 상부위장관 질환 간의 연관성에 대한 활발한 연구가 이루어져 왔다. 헬리코박터 파일로리는 그람 음성의 간균으로서 얇은 막으로 둘러싸인 편모가 있으며, 다량의 유레아제(urease)를 방출하고, 대변-구강 경로를 통해 전파되는 것으로 알려져 있으며, 1994년에는 세계보건기구(WHO)가 확실한 발암 인자라고 밝혀 세계적으로 주목을 받고 있는 병원균이다.
- [3] 현재 헬리코박터 파일로리에 의한 질병의 발병 기전은 음식물과 함께 위 내강에 들어온 세균이 강한 운동성을 가진 편모를 이용하여 위 점액층을 뚫고 들어가서 위 점액층 내 위 상피세포층 상부와 세포 간 접합부에 서식하면서 다량의 유레아제를 분비해 점액층을 알칼리성으로 변화시킴으로써 가스트린에 의한 위산 분비 축진을 비정상적으로 과다하게 유도하고, 결국 염증 및 궤양을 초래하는 것으로 알려져 있다. 또한, 헬리코박터 파일로리가 위 선암(gastric adenocarcinoma) 발병의 중요한 위험 요소임을 규명한 최근의 연구 보도에 따라 국제보건기구에서는 헬리코박터 파일로리를 제1군 발암 물질로 지정하였다.
- [4] 특히, 헬리코박터 파일로리에 의한 감염은 한국을 비롯한 개발도상국에서 많이 발생하는 것으로 보고되어 있으며, 상부위장관 증상이 없는 사람 5,732명을 대상으로 시행한 전국 역학조사 결과에 따르면, 헬리코박터 파일로리 감염률은 전 국민에서 46.6%였고, 16세 이상의 성인에서 69.4%, 특히 40대에서 78.5%라는 높은 감염률을 보이는 것으로 확인되었다. 또한, 소화성 궤양 환자 1,031명을 대상으로 헬리코박터 파일로리 감염률을 조사한 결과, 위궤양 환자의 66% 및 십이지장궤양 환자의 79%가 헬리코박터 파일로리에 감염된 것으로 확인되었고, 위 및 십이지장 동반 궤양 환자의 71%가 헬리코박터 파일로리에 감염된 것으로 보고되었다.
- [5] 상기와 같은 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 질병을 치료하기 위한 방법으로서 현재 항생제를 이용한 화학 요법이 주로 실시되고 있다. 그러나, 이 방법의 광범위한 사용은 단기적인 측면에서는 효과적일 수 있으나, 항생제의

지속적인 사용으로 인한 항생제 내성 균주의 출현 등의 위험이 있다는 문제점이 있다. 또한, 항균 요법의 지속적인 사용으로 인해 설사, 역류성 식도염 발생, 장내 정상적인 균총의 억제, 내성 균주의 출현 등과 같은 다양한 부작용이 발생하는 것으로 보고되고 있다.

- [6] 따라서, 상기와 같은 인체 내 부작용과 내성의 원인이 되는 약물 치료제를 대신하면서 헬리코박터 파일로리를 억제할 수 있는 적절한 항균 물질 또는 식품에 대한 개발이 요구되고 있다.
- [7] 한편, 전통 발효식품인 김치의 발효 유산균은 오랜 시간 동안 인류가 발효 식품과 함께 섭취한 GRAS(Generally Recognized As Safe) 등급의 세균으로서, 이러한 유산균의 기능성과 안전성에 관한 장점으로 인해, 상기 유산균을 이용한 기능성 식품이나 약품의 개발에 대한 관심이 집중되고 있다. 예컨대, 본 출원인은 가스 발생량이 낮은 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 균주 및 이를 이용한 김치의 제조 방법과, 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주, 및 이를 포함하는 조성물을 포함하는 장질환 치료 및 면역 증강용 조성물에 대해 보고한 바 있다(특허문헌 1 내지 특허문헌 3). 그러나, 김치와 같이 자주 섭취하는 발효 식품을 통하여 헬리코박터 파일로리 감염에 의해 발병되는 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 방법에 대한 연구는 완전하지 못하며, 여전히 진행 중에 있는 실정이다.

[8] 선행기술문헌

[9] 특허문헌

[10] (특허문헌 1) 한국 등록특허공보 제1,807,995호

[11] (특허문헌 2) 한국 등록특허공보 제1,486,999호

[12] (특허문헌 3) 한국 등록특허공보 제1,406,168호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 출원은 헬리코박터 파일로리에 대한 억제 효과가 있는 유산균을 유효성분으로 함유하는 김치, 및 상기 김치 또는 이의 추출물을 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 대한 예방 및 치료에 사용하는 용도에 관한 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 출원의 일 측면은 김치 유래의 유산균인 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 포함하는 김치 및 이의 제조 방법을 제공한다.
- [15] 본 출원의 다른 측면은 상기 김치 또는 이의 추출물을 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 개선용 조성물을 제공한다.
- [16] 본 출원의 다른 측면은 상기 김치 또는 이의 추출물을 이용한 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 예방, 치료 또는 개선 방법을 제공한다.

발명의 효과

[17] 본 출원에 따른 김치 유래의 유산균인 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 포함하는 김치 또는 이의 추출물은 헬리코박터 파일로리에 대한 억제 활성이 있으며, 장기간 투여시 헬리코박터 파일로리에 의한 위축성 위염 및 위궤양의 진행을 예방, 치료, 또는 지연시킬 수 있고, 헬리코박터 파일로리로 인해 발생하는 위암의 예방 또는 치료에도 유용하게 사용될 수 있다.

[18] 다만, 본 출원의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되는 것은 아니며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 본 기술분야의 통상의 기술자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 본 출원의 김치의 헬리코박터 파일로리 군에 대한 억제 효과를 보여주는 그래프이다.

[20] 도 2는 본 출원의 김치가 다양한 혈관 성장 인자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이다.

[21] 도 3은 본 출원의 김치가 다양한 염증 인자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이다.

[22] 도 4는 본 출원의 김치가 헬리코박터 파일로리 감염 모델에서 세포의 밀착 연결(Tight Junction)에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

[23] 도 5는 본 출원의 김치가 위암 세포주의 성장에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

[24] 도 6은 본 출원의 김치가 위암 세포주의 세포사멸(apoptosis)에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

[25] 도 7은 본 출원의 김치가 위암 세포주의 다양한 세포사멸 인자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이다.

[26] 도 8은 본 출원의 김치가 위암 세포주의 세포주기 연관 인자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이다.

[27] 도 9는 본 출원의 김치가 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 미치는 영향을 확인하기 위한 동물 실험의 설계를 나타낸 것이다.

[28] 도 10은 본 출원의 김치가 헬리코박터 파일로리가 감염된 동물 모델에서 전체 총 병변 점수(Gross Lesion Index Score)에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

[29] 도 11은 본 출원의 김치가 헬리코박터 파일로리가 감염된 동물 모델에서 위암의 발생에 미치는 영향을 보여주는 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[30] 이하, 본 출원을 내용을 구체적으로 설명한다.

[31]

[32] 1. 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 포함하는 김치 및 이의 제조 방법

- [33] 본 출원은 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 포함하는 김치 및 이의 제조 방법을 제공한다.
- [34] 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119는 한국생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KCTC 13043BP로 기탁된 미생물 균주로서, 상기 균주의 분리 및 동정 방법에 대해서는 한국 등록특허공보 제1,807,995호에 구체적으로 개시되어 있다. 또한, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP133은 한국생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KCTC 11403BP로 기탁된 미생물 균주로서, 상기 균주의 분리 및 동정 방법에 대해서는 한국 등록특허공보 제1,486,999호에 구체적으로 개시되어 있다.
- [35] 본 출원에 있어서, "김치"는 채소를 소금에 절인 후 양념을 혼합하여 발효시킨 식품을 제한없이 포함하는 의미로 사용된다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 채소는 배추, 무, 파, 갓, 오이 등이 사용될 수 있고, 구체적으로 배추가 사용될 수 있으나, 이들 외의 임의의 채소가 모두 본 출원의 대상이 되는 김치의 원료로서 사용될 수 있다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 채소는 라이코펜의 함량이 높은 채소일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 출원의 다른 구현예에서, 상기 라이코펜은 채소 100 g 당 0.05 내지 5 mg, 예컨대 0.1 내지 3 mg, 0.2 내지 2 mg, 0.3 내지 1 mg, 0.5 내지 0.8 mg의 함량으로 포함될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [36] 상기 라이코펜의 함량이 높은 채소는 배추, 구체적으로 더 한1호(품종출원 공개 번호 2015-688, 2015.12.15 공개)의 배추 품종을 이용한 배추일 수 있다. 상기 라이코펜의 함량이 높은 채소를 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133를 이용하여 발효하는 경우 라이코펜 함량 감소가 방지되어 라이코펜의 암예방 기능을 유지할 수 있다.
- [37] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 양념은 고춧가루, 마늘, 생강, 젓갈 등의 재료를 혼합하여 제조되는 것으로서, 양념을 구성하는 재료들은 이들 외에도 개인의 기호도, 발효 방식, 발효 기간 등에 따라 필요시 다른 임의의 재료들이 적절히 추가 또는 제외될 수 있다.
- [38] 본 출원의 한 구현예에서, 본 출원의 김치는 통상의 김치의 제조 방법에 의해 소금에 절인 채소, 예컨대 소금에 절인 배추에 양념을 버무린 후 발효시키는 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 채소로는 라이코펜 함량이 높은 채소를 사용하는 것이 보다 적절할 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니며, 통상의 채소가 본 출원의 김치의 제조에 비제한적으로 사용될 수 있다.
- [39] 본 출원의 다른 구현예에서, 본 출원의 김치는 식품으로 허용가능한 공지의 첨가제를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 첨가제로는 매실향, 레몬향, 파인애플향, 허브향 등의 각종 천연향료; 천연과즙, 클로로필린, 플라보노이드 등의 각종 천연색소; 과당, 벌꿀, 당알코올, 설탕과 같은 감미 성분; 또는 구연산, 구연산 나트륨과 같은 산미제; 등이 본 출원의 김치에 비제한적으로 포함될 수 있다.

- [40] 본 출원의 한 구현예에서, 본 출원의 김치는 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119를 김치 전체 중량 기준으로 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.02 내지 3 중량%, 더욱 구체적으로 0.05 내지 2.0 중량%를 포함할 수 있다.
- [41] 본 출원의 다른 구현예에서, 본 출원의 김치는 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 김치 전체 중량 기준으로 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.02 내지 3 중량%, 더욱 구체적으로 0.05 내지 2.0 중량%를 포함할 수 있다.
- [42] 본 출원의 한 구현예에서, 본 출원의 김치는 소금에 절인 채소, 예컨대 라이코펜 함량이 높은 소금에 절인 채소에 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119를 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.02 내지 3 중량%, 더욱 구체적으로 0.05 내지 2.0 중량%를 첨가하고, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.02 내지 3 중량%, 더욱 구체적으로 0.05 내지 2.0 중량%를 첨가한 후, 소정의 온도에서 소정의 기간 동안 발효시킴으로써 제조될 수 있다.
- [43] 상기 발효시의 온도는 특별히 한정되는 것은 아니나, 예컨대 1°C 내지 30°C, 구체적으로 3°C 내지 15°C, 또는 5°C 내지 10°C에서 발효를 실시할 수 있다.
- [44] 상기 발효 기간은 특별히 한정되는 것은 아니나, 예컨대 1일 내지 365일, 구체적으로 5일 내지 180일, 10일 내지 90일, 15일 내지 60일, 또는 20일 내지 40일 동안 수행될 수 있다.
- [45] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133은 균주 자체로 이용될 수 있지만, 상기 균주를 포함하는 배양물로서 이용될 수도 있다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주는 생균, 사균, 또는 이들의 혼합물로서 사용될 수 있다.
- [46] 본 출원에 있어서, "배양물"이란 용어는 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주를 배지에 접종하여 배양한 결과물을 의미한다. 예컨대, 상기 배양물은 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주를 배지에서 배양한 배양물 자체(즉, 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주, 배지 또는 균주의 대사물을 포함할 수 있음), 상기 배양물을 여과 또는 원심분리하여 균주를 제거한 여액(예컨대, 원심분리한 상등액) 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 출원의 배양액은 이를 건조(예컨대, 동결 건조)한 후 분말화한 형태도 비제한적으로 포함할 수 있다.
- [47] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 균주의 배양은 10°C 내지 30°C에서 6시간 내지 48시간 동안, 구체적으로 20°C 내지 30°C에서 12시간 내지 36시간 또는 18시간 내지 30시간 동안 실시할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [48] 상기 배지는 공지의 유산균용 배지라면 제한없이 사용될 수 있다. 상기 배지는 탄소원 및 질소원을 포함할 수 있으며, 상기 탄소원은 수크로오스, 글루코오스, 과당 등을 하나 이상 포함할 수 있고, 상기 질소원은 효모 추출물, 펩톤, 쇠고기 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 구연산암모늄, 황산암모늄, 염화암모늄,

인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등을 하나 이상 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 배지는 트윈 80, 구연산나트륨, 인산칼륨, 초산나트륨, 황산망간, 황산마그네슘, 증류수 등을 하나 이상 추가로 포함할 수 있다.

- [49] 2. 본 출원의 김치 또는 이의 추출물을 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 개선용 조성물
- [50] 본 출원은 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 포함하는 김치 또는 이의 추출물을 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 개선용 조성물을 제공한다.
- [51] 본 출원의 김치 및 이의 제조 방법은 상기 "1. 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 포함하는 김치 및 이의 제조 방법"에서 언급한 것과 동일하므로 그 기재를 생략한다.
- [52] 본 출원에 있어서, 상기 헬리코박터 파일로리 연관 질환으로는 위염, 위궤양, 위암 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [53] 본 출원에 있어서, "김치 추출물"은 원료인 김치로부터 임의의 방법으로 추출된 물질을 나타내는 것으로서, 이렇게 추출된 추출물, 이로부터 얻을 수 있는 농축액, 상기 농축액의 건조물 및 분말 등을 제한없이 모두 포함하는 의미로 사용된다.
- [54] 상기 추출물을 원료인 김치로부터 추출하여 수득할 때, 추출 방법으로는 용매 추출법, 초음파 추출법, 여과법 및 환류 추출법 등과 같이 종래 알려진 통상적인 추출 방법을 비제한적으로 사용할 수 있고, 구체적으로 용매 추출법이나 환류 추출법을 이용함으로써 제조할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 과정은 수회 반복할 수 있으며, 이후에 농축 또는 동결건조 등의 단계를 추가적으로 거칠 수 있다. 구체적으로, 수득한 김치 추출물을 감압 농축하여 농축액을 얻고, 상기 농축액을 동결건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 고농도의 김치 추출물 분말을 제조할 수 있다.
- [55] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 김치 추출물은 김치를 물, 유기용매 또는 이들의 혼합 용매를 이용해 추출한 추출물, 상기 추출물의 농축물 또는 분말 등을 제한없이 포함하는 의미로 사용된다. 상기 유기용매는 알코올, 구체적으로 C₁-C₄의 저급 알코올, 에킨대 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올, 헥산(n-헥산), 에테르, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 에틸아세테이트, 메틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 벤젠 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 구체적으로 추출 용매는 물, C₁-C₄의 알코올, 및 상기 C₁-C₄의 알코올과 물의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 에킨대 메탄올 수용액 또는 에탄올 수용액일 수 있다. 상기 메탄올 또는 에탄올의 수용액은 10%(v/v) 내지 99%(v/v)의 수용액일 수 있고, 구체적으로 20%(v/v) 내지 70%(v/v)의 수용액일 수 있으며, 더욱 구체적으로 30%(v/v) 내지 60%(v/v)의 수용액일 수 있으나 이에

한정되는 것은 아니다.

- [56] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 추출은 5°C 내지 100°C의 온도에서 실시될 수 있고, 구체적으로 20°C 내지 95°C에서 실시될 수 있으며, 더욱 구체적으로 50°C 내지 90°C에서 실시될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 추출은 1시간 내지 20시간 동안 실시될 수 있고, 구체적으로 2시간 내지 16시간 동안 실시될 수 있으며, 더욱 구체적으로 3시간 내지 12시간 동안 실시될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [57] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 추출은 1회 내지 8회 실시될 수 있고, 구체적으로 1회 내지 6회 실시될 수 있으며, 더욱 구체적으로 1회 내지 5회 실시될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출물은 각 추출에서 얻어진 단독 추출물 또는 각 추출에서 얻어진 추출물들의 혼합 추출물일 수 있고, 구체적으로 각 추출에서 얻어진 추출물들의 혼합 추출물일 수 있다.
- [58] 본 출원에 있어서, "개선"이란 용어는 본 출원의 김치 또는 이의 추출물의 투여로 인하여 치료와 연관된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 제한없이 나타내는 의미로 사용된다. 본 출원의 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 개선은 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 자체의 효과일 수 있으며, 상기 균주의 체소 발효에 의한 효과일 수 있으나 기작은 이에 제한되지 않는다.
- [59] 본 출원에 있어서, 상기 조성물은 건강 기능식품 조성물일 수 있다.
- [60] 상기 건강 기능식품(Functional Food)이란, 특정 보건용 식품(Food for Special Health Use, FoSHU)과 동일한 용어로서, 영양 공급 외에도 생체조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학적, 의료적 효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 '기능'이란 용어는 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [61] 상기 건강식품 조성물은 본 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가 가능하며, 상기 제조시에는 본 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 건강식품 조성물의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 건강식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나므로, 상기 건강식품 조성물은 헬리코박터 파일로리 연관 질환 증상의 개선 효과를 증진시키기 위한 보조제로서 섭취가 가능하다.
- [62] 상기 건강식품(Health Food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(Health Supplement Food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.
- [63] 본 출원에 있어서, 본 출원의 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 본

기술분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 제한없이 사용될 수 있다. 또한, 본 출원의 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(Niacin), 비오틴(Biotin), 폴레이트(Folate), 판토텐산(Panthenic Acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

- [64] 또한, 본 출원의 조성물은 방부제, 살균제, 산화방지제, 착색제, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 향료, 팽창제, 강화제, 유화제, 증점제, 피막제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 출원의 조성물 100 중량부당 0.01 내지 5 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [65] 본 출원의 조성물에 함유되는 김치 또는 이의 추출물의 함량은 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 본 출원의 한 구현예에서, 본 출원의 조성물에 함유되는 김치 또는 이의 추출물의 함량은 조성물 총 중량에 대해, 예컨대, 0.0001 내지 20.0 중량%일 수 있고, 구체적으로 0.001 내지 1.0 중량%일 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 김치 또는 이의 추출물의 함량이 상기 함량일 경우 경제적인 양으로 헬리코박터 파일로리 연관 질환 증상에 대한 개선 효과를 얻을 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 김치 또는 이의 추출물은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [66] 본 출원의 조성물은 본 출원의 김치 또는 이의 추출물 이외에도 식품 제조시 통상적으로 첨가되는 성분을 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제, 향미제 등을 포함할 수 있다. 상기 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토오스, 수크로오스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올을 들 수 있다. 상기 향미제로는 천연 향미제 타우마틴, 스테비아 추출물 및 합성 향미제를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 출원의 건강식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 출원의 김치 추출물 이외에도 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 천연 추출액 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [67] 상기 조성물의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 출원의 김치 또는 이의 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이

있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다.

- [68] 본 출원의 김치 또는 이의 추출물에는 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119과 락토바실러스 플란타럼 CJLP133이 포함되어 있고, 이들 두 유산균은 헬리코박터 파일로리의 활성을 높은 수준으로 억제하는 특징이 있는바, 본 출원의 김치 또는 이의 추출물을 포함하는 조성물은 헬리코박터 파일로리으로 인해 발생하는 연관 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [69] 3. 본 출원의 김치 또는 이의 추출물을 이용한 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 예방, 치료 또는 개선 방법
- [70] 본 출원은 상기 김치 또는 이의 추출물을 헬리코박터 파일로리 연관 질환이 발병되거나 또는 발병될 가능성이 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 예방, 치료 또는 개선 방법을 제공한다.
- [71] 본 출원은 상기 김치 또는 이의 추출물을 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 예방, 치료, 또는 개선 용도를 제공한다.
- [72] 본 출원은 상기 김치 또는 이의 추출물을 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 예방, 치료, 또는 개선을 위한 조성물을 제조하는 용도를 제공한다.
- [73] 본 출원의 김치 또는 이의 추출물 및 이의 제조 방법은 상기 "1. 김치 유래의 유산균인 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 포함하는 김치 및 이의 제조 방법" 및 "2. 본 출원의 김치 또는 이의 추출물을 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 개선용 조성물"에서 언급한 것과 동일하므로 그 기재 생략한다.
- [74] 본 출원에 있어서, "예방"이란 용어는 본 출원의 김치 또는 이의 추출물의 투여에 의해 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 증상을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 포함하는 의미로 사용된다.
- [75] 또한, 본 출원에 있어서, "치료"란 용어는 본 출원의 김치 또는 이의 추출물의 투여에 의해 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 제한없이 포함하는 의미로 사용된다.
- [76] 또한, 본 출원에 있어서, "투여"란 용어는 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 의미로 사용된다.
- [77] 또한, 본 출원에 있어서, "개체"란 용어는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 나타내는 의미로 사용된다. 구체적인 예로, 상기 개체는 인간을 포함한 포유동물일 수 있다. 다른 일례로 상기 개체는 헬리코박터 파일로리 연관 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 개체일 수 있다.
- [78] 본 출원의 방법에 있어서, 본 출원의 김치 또는 이의 추출물의 투여 경로 및 투여 방식은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 해당 부위에 본 출원의 김치 또는 이의 추출물을 포함하는 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 구체적으로, 상기 김치 또는 이의 추출물은 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으나, 경구로 투여되는 것이 일반적이다.

- [79] 본 출원의 한 구현예에서, 헬리코박터 파일로리의 감염에 대한 식이 조정용 식품 조성물로서 암예방 김치의 조성을 새롭게 연구하였다. 본 출원의 다른 구현예에서, 쥐 모델을 이용한 암예방 김치의 식이 조정을 통해 대표적으로 위염, 위궤양, 위암 등과 같은 헬리코박터 파일로리 연관 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다는 가설을 세웠다. 상기 암예방 김치는 통상의 김치의 제조 방법에 있어서 라이코펜 함량이 높은 채소; 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 균주; 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주;를 추가하여 제조될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 출원의 한 구현예에서, 본 출원에 따른 김치 또는 이의 추출물은 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 대하여 우수한 예방 및 치료 효과를 보이고, 특히 위염, 위궤양 및 위암에서 우수한 효과를 나타낸다.
- [80] 본 출원의 한 구현예에 따르면, 본 출원의 김치의 제조에 사용되는 유산균인 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주는 동일한 종에 속하는 다른 균주와 비교하여 헬리코박터 파일로리에 대한 현저한 억제 활성을 나타낸다.
- [81] 본 출원의 다른 구현예에 따르면, 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주를 포함하는 김치는 소정의 농도에서 헬리코박터 파일로리에 대한 억제 효과를 나타낸다(도 1 참조).
- [82] 본 출원의 다른 구현예에 따르면, 본 출원의 김치는 정상 위 세포에서 혈관 성장 인자 및 염증 인자의 발현을 현저하게 억제하고, 세포의 밀착 연결을 회복시킬 수 있다(도 2 내지 도 4 참조).
- [83] 본 출원의 다른 구현예에 따르면, 본 출원의 김치는 위암 세포의 성장을 현저하게 억제시키고, 위암 세포의 세포사멸을 유도하며(도 5 및 도 6 참조), 헬리코박터 파일로리 감염 동물 모델에서 위암의 형성을 억제시킬 수 있다(도 10 참조).
- [84] 이와 같이, 본 출원의 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주를 포함하는 김치는 헬리코박터 파일로리에 대한 현저한 억제 활성을 나타내며, 이를 통해 헬리코박터 파일로리로부터 유발될 수 있는 다양한 질환들, 예컨대 위염, 위궤양 및 위암의 예방, 치료, 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있다.
- [85]
- [86] 이하, 본 출원을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [87] 단, 하기 실시예는 본 출원을 구체적으로 예시하는 것일 뿐으로서, 본 출원의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [88]
- [89] 먼저, 본 출원의 김치의 제조 과정, 시험 방법 및 통계 등에 대해 설명한다. 통계 분석은 GraphPad Prism(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)과 SPSS 소프트웨어(Version 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용해 수행하였고, 그룹들 사이의 통계적 유의성은 맨-휘트니 유 검정(Mann-Whitney U test)에 의해

결정하였으며, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 에서 인정되었다.

- [90] 실시예 1: 헬리코박터 파일로리 균 생육 억제능이 높은 균주 분리
- [91] <1-1> 균주 분리 및 동정
- [92] 본 출원의 김치의 제조에 사용되는 김치 유래의 유산균인 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119는 한국생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KCTC 13043BP로 기탁된 미생물 균주로서, 상기 균주의 분리 및 동정 방법에 대해서는 등록특허공보 제10-1807995호에 구체적으로 개시되어 있다. 또한, 본 출원의 김치의 제조에 사용되는 김치 유래의 유산균인 락토바실러스 플란타럼 CJLP133은 한국생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KCTC 11403BP로 기탁된 미생물 균주로서, 상기 균주의 분리 및 동정 방법에 대해서는 등록특허공보 제10-1486999호에 구체적으로 개시되어 있으므로, 그 구체적인 기재를 생략한다.
- [93] 본 출원에서는 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주를 이용하여 통상의 제조 방법에 따라 김치를 제조하였다.
- [94] <1-2> 헬리코박터 파일로리 균에 대한 억제능이 높은 균주 선별
- [95] 상기 실시예 <1-1>에서 분리 및 동정된 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주와, 대조균으로 사용된 류코노스톡 메센테로이드 KCTC3100 / KCTC3722, 락토바실러스 플란타럼 KCTC3108 / DSM17853을 이용하여 헬리코박터 파일로리 억제 활성을 측정하였다.
- [96] 그 결과, 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133 균주는 대조균으로 사용된 동일한 종의 다른 균주들과 비교하여 헬리코박터 파일로리 균에 대한 현저한 억제 활성을 나타내었다.
- [97] 실시예 2: 김치의 제조
- [98] 대조균이 되는 일반 김치(이하, 'sKimchi' 또는 'SK'로 나타내는 경우가 있음)와 본 출원에 따른 암예방 김치(이하, 'CpKimchi' 또는 'CPK'로 나타내는 경우가 있음)는 아래와 같이 제조하였다.
- [99] <2-1> 일반 김치의 제조(sKimchi)
- [100] 일반 김치는 세계김치연구소의 일반화된 김치 조리법에 기초하여 소금에 절인 배추에 고춧가루, 마늘, 생강, 멸치액젓, 무즙, 파, 찹쌀풀, 설탕을 포함하는 양념을 버무린 후, 저온에서 발효시켜 제조하였다.
- [101] <2-2> 암예방 김치의 제조(CpKimchi)
- [102] 암예방 김치는 라이코펜 함량이 높은 배추를 주원료로 하며, 일반 배추에서는 없는 라이코펜 함량이 높은 배추 품종인 "더 한1호"(품종출원 공개 번호 2015-688, 2015.12.15 공개) 종자를 구매하여, 배추 재배 농가와 계약재배를 통해 배추를 확보하였고, 수확된 배추를 김치 제조 공정에 맞춰 절인 후 사용하였다. 배추로서 상기 라이코펜 함량이 높은 배추를 사용하고 실시예 <1-1>에서 분리 및 동정된 김치 유래의 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119, 락토바실러스

플란타럼 CJLP133의 2종의 유산균을 추가한 것을 제외하고는 상기 일반 김치의 제조와 동일한 방식으로 암예방 김치를 제조하였다.

[103] <2-3> 김치 추출물의 농축액의 제조

[104] 상기 실시예 <2-1> 및 <2-2>에서 제조된 김치를 동결 건조한 후 분쇄하여 분말로 준비하였다. 여기에 20배 중량의 메탄올을 가한 후, 교반기를 이용하여 12시간 동안 추출하였다. 추출된 상등액을 여과지로 여과하였고, 남은 침전물은 다시 메탄올을 추가하여 12시간 동안 추출하였다. 상기 추출물을 농축기로 약 40°C의 온도에서 가온농축한 농축물을 제조한 후, 이를 4°C에서 저장하여 추가적인 실험에 사용하였다.

[105] 실시예 3: 헬리코박터 파일로리 생육 억제 효과 확인

[106] <3-1> 헬리코박터 파일로리 균주의 배양

[107] 헬리코박터 파일로리 균주 ATCC 43504(American Type Culture Collection, cagA+와 vacA s1-m1 유형의 균주)는 5%의 양 혈액과 함께 BBL의 Trypticase soy(TS) 한천 배지(TSAII; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)에서 미호기성 조건(BD GasPaK EZ Gas Generating Systems, BD Biosciences)으로 37°C에서 3일 동안 배양하였다. 상기 헬리코박터 파일로리 균주를 TS 배지에서 채취하여 3000 X g에서 5분 동안 원심분리하였고, 마지막 농도가 10⁹ 콜로니-형성 단위(Colony-Forming Unit, CFU)/ml가 되도록 배지에 재부유시켰다. 모든 실험은 TS 한천 배지에서 72시간 동안 성장된 배양균을 사용하였다.

[108] <3-2> 헬리코박터 파일로리 억제능 확인

[109] 본 출원의 김치의 헬리코박터 파일로리 억제 효과를 확인하기 위하여, 실시예 <3-1>의 헬리코박터 파일로리 균주가 도말된 배지에 상기 실시예 <2-3>에서 제조된 김치 추출물의 농축액을 농도 별로 처리하여 배양한 후 억제환의 크기를 측정하였다.

[110] 그 결과, 본 출원의 김치 추출물의 농축액은 농도가 500 mg/ml 이상에서 헬리코박터 파일로리 균에 대한 억제 효과가 있음을 확인하였다(도 1).

[111] 실시예 4: 일반 위 세포주(RGM1; Normal gastric mucosa cell)에서의 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 대한 효과 확인

[112] <4-1> 혈관신생인자 억제능 확인

[113] 본 출원의 김치가 혈관 성장인자에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 일반 위 세포주인 RGM1 세포에 헬리코박터 파일로리를 50 MOI로 처리한 후, 실시예 <2-3>에서 제조한 김치 추출물의 농축액을 5 mg/ml의 농도로 6시간 동안 처리하였다. 처리 후 배지 성분을 제거하고, 세포를 PBS(Dulbecco) 용액으로 2회 세척하였다. 이후 RT-PCR을 수행하기 위해 RiboEX(500 μ l, GeneAll, Seoul, Korea)를 4°C에서 10 분간 배양한 플레이트에 첨가하였다. RiboEX를 수거하여 1.5 ml 튜브에 넣은 후, 100 μ l의 클로로포름을 넣고 천천히 혼합하였다. 얼음에서 10 분간 인큐베이션한 후, 샘플을 10,000g에서 30 분간 원심 분리하였다. 상등액을 추출하고 200 μ l의 이소프로판올과 혼합하였으며,

혼합물을 4°C에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 13,000g에서 30 분간 원심 분리한 후, 침전물을 70% (vol/vol) 에탄올로 세척하였다. 에탄올을 완전히 증발시킨 후, 펠렛을 100 μ l DEPC 처리된 물(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)에 용해시켰고, 이후 PCR을 수행하여 관련 유전자들의 변화를 확인하였다.

[114] 그 결과, 헬리코박터 파일로리의 처리에 의하여 증가된 혈관신생인자의 지표인 VEGF 및 bFGF의 발현이 암예방 김치 처리구(CPK)에서 감소함을 확인하였다(도 2).

[115] <4-2> 항염증 효과 비교

[116] 본 출원의 김치의 항염증 효과를 확인하기 위하여, RGM1 세포에 헬리코박터 파일로리를 50 MOI로 처리한 후, 실시예 <2-3>에서 제조한 김치 추출물의 농축액을 5 mg/ml의 농도로 처리 한 뒤 실시예 <4-1>의 RT-PCR 방법에 따라 관련 유전자들의 변화를 확인하였다.

[117] 그 결과, 헬리코박터 파일로리 처리에 의하여 증가된 염증의 지표인 COX-2 및 iNOS의 발현이 암예방 김치 처리구(CPK)에서 감소 확인함을 확인하였다(도 3).

[118] <4-3> 세포 연결 효과 비교

[119] 본 출원의 김치가 세포의 밀착 연결 지표에 미치는 영향을 확인하기 위하여, RGM1 세포에 헬리코박터 파일로리를 100 MOI로 처리한 후, 실시예 <2-3>에서 제조한 김치 추출물의 농축액을 5 g/ml 및 10 g/ml의 농도로 6시간 동안 처리하였다. 이때 세포의 증식으로 인하여 합류(confluent) 상태가 된 단세포층 상층부를 차가운 D-PBS(-) 0.5 ml로 3회 세척한 후 차가운 HBSS 0.5 ml를 채우고 1.5 ml의 차가운 HBSS를 넣어둔 새로운 웰에 옮긴 후, 30분간 방치 후 상층부와 하층부간의 전기저항도(Transepithelial Electrical Resistance, TERR%)를 측정하였다.

[120] 그 결과, 헬리코박터 파일로리 감염 모델에서 본 출원의 암예방 김치를 고농도로 처리 시 세포의 밀착 연결이 회복됨을 확인하였다(도 4).

[121] 실시예 5: 위암 세포주(MKN28; Gastric cancer cell)에서의 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 대한 효과 확인

[122] <5-1> 위암 세포주 성장 억제 효과 확인

[123] 본 출원의 김치의 위암 세포주 성장 억제 효과를 확인하기 위하여, MKN28 세포에 일반 김치 및 암예방 김치를 실시예 <2-3>에서 제조한 김치 추출 방법으로 제조한 농축액으로 10, 20, 50 mg/ml의 농도로 각각 6시간 동안 처리한 뒤, 각 처리군의 세포 생존율을 비교 분석하였다.

[124] 그 결과, 본 출원의 암예방 김치는 일반 김치와 비교하여 위암 세포주의 성장을 농도 의존적으로 보다 현저하게 억제시킬 수 있음을 확인하였다(도 5).

[125] <5-2> 위암 세포주 세포사멸 유도 효과 확인

[126] 세포자살이 없는 특성을 가진 암세포를 대상으로 암예방 김치 처리시 세포사멸 유도 효과를 확인하기 위하여, 일반 김치 및 암예방 김치를 상기 실시예 <2-3>의

방법으로 제조한 김치 추출물의 농축액을 각 세포에 적절한 농도로 48시간 처리한 다음 1% FBS가 첨가된 1X PBS로 회수하였다. 농도별로 회수된 각 세포에 AnnexinV & Dead Cell Reagent를 1:1로 분주한 후 상온에서 어두운 조건으로 20분간 반응시키고 세포사멸이 유발된 세포비율을 측정 및 분석하였다

[127] 그 결과, MKN28 위암 세포주에 본 출원의 암예방 김치 처리 시에는 세포의 70% 이상에서 세포자살이 유도됨을 확인하였다(도 6).

[128] <5-3> 위암 세포주 세포사멸 조절 인자 확인

[129] 본 출원의 김치가 위암 세포주의 사멸 조절 인자에 미치는 영향을 확인하기 위하여, MKN28 위암 세포주에 상기 실시예 <2-3>에서 제조한 김치 추출물의 농축액을 20 mg/ml의 농도로 처리한 후 배지 성분을 제거하고, 세포를 PBS(Dulbecco) 용액으로 2회 세척하였다. 세포를 1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma Aldrich, St Louis, MO)를 함유하는 얼음 - 차가운 세포 용해 완충액(Cell Signaling Technology, Denver, MA)으로 용해하였다. 반응 20 분 후, 각 샘플을 10,000 × g에서 10 분간 원심 분리하였다. 이어서, 상등액을 획득하였다. 용해물의 단백질을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하였고, PVDF(polyvinylidene fluoride) 막으로 옮겨 1차 항체와 함께 반응시킨 후 세척하였으며, 퍼옥시다아제-컨쥬게이션된 2차 항체와 반응시킨 후 재세척하고, ECL 시스템(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 확인하였다.

[130] 그 결과, 세포의 사멸에 관여하는 절단된 카스파아제 3(Cleaved caspase 3), 절단된 카스파아제 8 및 절단된 PARP의 발현이 본 출원의 암예방 김치 처리구(CPK)에서 일반 김치 처리구(SK)와 비교하여 현저하게 증가된 것을 확인하였다(도 7).

[131] <5-4> 위암 세포주 세포주기 연관 인자 확인

[132] 본 출원의 김치가 위암 세포주의 세포주기 연관 인자에 미치는 영향을 확인하기 위하여, MKN28 세포주에 상기 실시예 <2-3>에서 제조한 김치 추출물의 농축액을 20 mg/ml의 농도로 처리한 후 배지 성분을 제거하고, 세포를 PBS(Dulbecco) 용액으로 2회 세척하였다. 세포를 1 mM PMSF(Sigma Aldrich, St Louis, MO)를 함유하는 얼음 - 차가운 세포 용해 완충액(Cell Signaling Technology, Denver, MA)으로 용해하였다. 반응 20 분 후, 각 샘플을 10,000 × g에서 10 분간 원심 분리하였다. 이어서, 상등액을 획득하였다. 용해물의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하였고, PVDF 막으로 옮겨 1차 항체와 함께 반응시킨 후 세척하였으며, 퍼옥시다아제-컨쥬게이션된 2차 항체와 반응시킨 후 재세척하였고, ECL 시스템(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 세포 주기 관련 단백질의 발현 변화를 확인하였다.

[133] 그 결과, 세포 주기에 관여하는 사이클린(cyclin) D1, CDK4, CDK2, 사이클린 E 및 사이클린 A의 발현이 본 출원의 암예방 김치 처리구(CPK)에서 일반 김치

처리구(SK)와 비교하여 현저하게 감소되었고, 이를 통해 위암 세포주의 사멸 메커니즘이 세포주기 조절에 의한 것임을 확인하였다(도 8).

- [134] 실시예 6: 헬리코박터 파일로리 감염 장기 동물 모델에서의 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 대한 효과 확인
- [135] 본 출원의 김치가 헬리코박터 파일로리에 감염된 장기 동물 모델에서 병리학적 지표를 억제하는 효과를 확인하기 위하여, 생후 5 주된 암컷 C57BL/6 마우스(Charles River Japan)에 멸균된 상업용 펠릿 다이어트(Biogenomics, South Korea)와 무균 생수를 자유 섭취하게 하면서 24°C 온도로 조절되는 방에 보관하였다. 1 주간의 적응 후, 20 mg/kg의 판토프라졸(pantoprazole)을 3 회 주사하여 위의 산도를 낮춰 헬리코박터 파일로리의 군집을 촉진시켰다. 그 다음 각 동물에게 위장 삽관 바늘을 사용하여 깨끗한 TS 브로스(broth) 및 헬리코박터 파일로리 현탁액(10^9 CFU/ml 함유)을 각각 0.3 ml 씩 위장 내 주사하였다. 대조군은 TS 브로스를 주사하였고, 모든 실험군은 1 주일 이내에 총 4 회 헬리코박터 파일로리 주사를 맞았다. 쥐에게 7.5% NaCl을 함유하는 AIN76에 기초한 특별한 펠릿 사료를 공급하여 4 주 동안 위염을 유발하였다.
- [136] 이후, 헬리코박터 파일로리 양성 마우스를 무작위로 4 군으로 나누었다($n = 10$). 7.5% NaCl을 함유하는 펠릿 사료 AIN76을 24 주간 투여하여 감염된 모든 동물에서 헬리코박터 파일로리에 의한 발암 과정을 촉진시켰다. 대조군 및 실험군을 각각 도 9에 설명하였다. 그룹 1: 대조군, 그룹 2: 헬리코박터 파일로리 감염군, 그룹 3: 헬리코박터 파일로리 감염 및 암예방 김치 저농도 식이군, 그룹 4: 헬리코박터 파일로리 감염 및 암예방 김치 고농도 식이군, 그룹 5: 헬리코박터 파일로리 감염 및 일반 김치 식이군으로 각각 실험하였다.
- [137] 그 결과, 대조군인 G2에서는 전체 총 병변 점수(gross lesion index)가 상당히 증가하였으나, 암예방 김치 처리구인 G3 및 G4에서는 유의미한 감소를 보였다($p < 0.01$). 또한, 헬리코박터 감염 대조군인 G2에서는 상당한 크기의 위암이 형성되었으나, 암예방 김치 처리구인 G3 및 G4에서는 위암의 형성이 감소됨을 확인하였다(도 10 및 도 11).
- [138]
- [139] 상기에서는 본 출원의 바람직한 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 출원의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 채소를 소금에 절인 후 양념을 혼합하여 유산균으로 발효시킨 김치로서, 상기 유산균은 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119(수탁번호: KCTC 11403BP) 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133(수탁번호: KCTC 13043BP)을 포함하는 김치.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 채소는 배추, 무, 파, 갓, 오이 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 김치.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 채소는 배추인 김치.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 배추는 라이코펜 함량이 높은 배추인 김치.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 라이코펜은 배추 100 g 당 0.05 내지 5 mg의 함량으로 포함되는 김치.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119는 김치 전체 중량 기준으로 0.01 내지 5 중량% 포함되고, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP133은 김치 전체 중량 기준으로 0.01 내지 5 중량% 포함되는 김치.
- [청구항 7] 청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 김치 또는 이의 추출물을 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 개선용 조성물.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 김치 추출물은 김치를 물, 유기용매 또는 이들의 혼합 용매를 이용해 추출한 추출물인 조성물.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 유기용매는 알코올, 헥산, 에테르, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 에틸아세테이트, 메틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 벤젠 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [청구항 10] 청구항 8에 있어서, 상기 혼합 용매는 물, C₁-C₄의 알코올 및 상기 C₁-C₄의 알코올과 물의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 혼합 용매는 메탄올 수용액 또는 에탄올 수용액인 조성물.
- [청구항 12] 청구항 7에 있어서, 상기 김치 추출물은 추출물, 상기 추출물의 농축액, 상기 농축액의 건조물 및 분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.