

명세서

발명의 명칭: 라이코펜 함량이 높은 기능성 발효식품

기술분야

- [1] 본 출원은 라이코펜 함량이 높은 기능성 발효식품에 관한 것이다.
[2]

배경기술

- [3] 발효식품은 유산균에 의해 발효되어, 대상 채소 내의 영양분의 변화가 생기는 것을 의미한다. 미생물의 발효 작용을 이용하여 만든 식품의 일 예로 김치는 미생물의 작용으로 식품의 성분이 분해되고 새로운 성분이 합성되어 영양가, 기호성 및 저장성이 향상될 수 있다.
[4] 종래에 라이코펜이 대장암에 효과가 있음을 나타내는 보고가 있으나, 김치와 같은 발효식품에서는 발효시에 라이코펜 함량이 유지되지 않거나 감소되는 문제점이 있었다.
[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 라이코펜 함량이 감소되지 않는 발효식품을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 특정 품종의 채소와 특정 류코노스톡 속 (*Leuconostoc sp.*) 또는 락토바실러스 속(*Lactobacillus sp.*) 균주를 이용하여 김치를 제조하는 경우, 라이코펜 함량이 감소되지 않음을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.
[7]

과제 해결 수단

- [8] 본 출원의 하나의 목적은 라이코펜을 포함하는 채소 및 유산균을 포함하는 발효 식품을 제공하는 것이다.
[9] 본 출원의 다른 목적은 라이코펜을 포함하는 절임채소 및 유산균을 포함하는 양념을 준비하는 단계; 및 상기 양념을 상기 절임채소와 혼합하는 단계를 포함하는 발효식품의 제조방법을 제공하는 것이다.
[10] 본 출원의 또 다른 목적은 라이코펜을 포함하는 채소에 유산균을 혼합하여 발효식품을 제조하는 단계를 포함하는, 라이코펜 함량 감소 방지방법을 제공하는 것이다.
[11]

발명의 효과

- [12] 본 출원은 일반 배추와 달리 기능성 성분인 라이코펜을 함유하는 '더韓1호' 배추 품종을 주원료 하며, 김치에서 분리한 유산균인 류코노스톡 메센테로이드 (*Leuconostoc mesenteroides*) CJLM119, 락토바실러스 플란타럼 (*Lactobacillus*

plantarum) CJLP133을 유산균 스타터로 첨가하는 김치로, 대장염 및 대장암 예방에 도움을 주는 효과를 가진다.

[13]

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 암예방 김치의 제조공정도를 나타낸 것이다.

[15] 도 2a 및 도 2b는 암예방 김치의 제조공정 표준서를 나타낸 것이다.

[16] 도 3은 암예방 김치 유통중 이화학 품질 변화를 나타낸 그래프이다.

[17] 도 4는 암예방 김치 유통중 미생물 품질 변화를 나타낸 그래프이다.

[18] 도 5는 배추 품종별 라이코펜(lycopene) 함량 비교를 나타낸 그래프이다(NC, 일반배추; NK, 일반배추 적용 김치; OC, 더한1호 배추; OK, 더한1호 배추 적용 김치).

[19] 도 6은 저장기간에 따른 암예방 김치의 라이코펜 함량 비교를 나타낸 그래프이다(A, 저장7일; B, 저장 6개월).

[20] 도 7은 암예방 김치를 포함한 대장염 동물 모델을 그룹화한 것이다.

[21] 도 8, 9 및 10은 동물모델 연구 결과를 나타낸 것이다.

[22] 도 11는 암예방 김치를 포함한 장기2단계 대장암 동물 모델을 나타낸 것이다.

[23] 도 12, 및 13은 동물모델 연구 결과를 나타낸 것이다.

[24]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[25] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[26]

[27] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는, 라이코펜을 포함하는 채소 및 유산균을 포함하는 발효 식품을 제공하는 것이다.

[28] 구체적으로, 상기 라이코펜을 포함하는 채소는 배추일 수 있으며, 상기 배추는 더 한1호 배추일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 더 한1호 배추는 한국공개특허 제10-2015-0161731호에 기재된 내용을 모두 반영한다.

[29] 또한, 상기 유산균은 류코노스톡 속 (*Leuconostoc sp.*), 락토바실러스 속(*Lactobacillus sp.*) 또는 이들의 조합일 수 있으며, 구체적으로 상기 류코노스톡 속 유산균은 류코노스톡 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*)이고, 상기 락토바실러스 속 유산균은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 상기 류코노스톡 메센테로이드는 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119이고, 상기 락토바실러스 플란타럼은 락토바실러스 플란타럼 CJLP133일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 CJLP133 균주는 한국공개특허 제10-2009-0067015호에 기재된 내용을 모두 반영한다.

- [30]
- [31] 본 출원의 목적상 상기 발효식품은 라이코펜의 함량 감소가 방지된 것일 수 있다. 라이코펜 함량의 감소 방지는 라이코펜의 함량이 발효 전 또는 발효 초기의 채소에 함유된 라이코펜의 함량 대비 라이코펜 함량이 감소하거나 유지되는 것을 모두 포함할 수 있다. 상기 감소방지란 라이코펜이 발효 전 또는 발효 초기에 비해 0% 내지 30%, 1% 내지 25%, 3% 내지 25%, 5% 내지 20%, 1% 내지 30%, 5% 내지 25%, 3% 내지 20%, 또는 5% 내지 15%로 감소된 것 역시, 감소방지의 범주에 속하는 것일 수 있다.
- [32] 구체적으로, 상기 발효식품의 라이코펜 함량은 상기 채소의 라이코펜 함량 대비 50% 내지 99%일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 50%, 60%, 70% 이상 및/또는 75%, 80%, 90%, 99%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 발효식품의 라이코펜 함량(농도)은 0.6 mg/g 내지 0.98 mg/g일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [33] 또한, 상기 발효식품의 저장 6개월째 라이코펜 함량은 저장 7일째 라이코펜 함량 대비 50% 내지 99%일 수 있으며, 구체적으로는 50%, 60%, 70% 이상 및/또는 75%, 80%, 90%, 99%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [34]
- [35] 상기 발효 식품은 암, 고혈압, 염증, 피부노화, 또는 홍반의 예방 또는 치료에 효과가 있는 것을 특징으로 한다. 상기 암은 대장암 또는 위암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [36]
- [37] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 다른 하나의 양태는, 라이코펜을 포함하는 절임채소 및 유산균을 포함하는 양념을 준비하는 단계; 및 상기 양념을 상기 절임채소와 혼합하는 단계를 포함하는 발효식품의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [38] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 다른 하나의 양태는, 라이코펜을 포함하는 채소에 유산균을 혼합하여 발효식품을 제조하는 단계를 포함하는, 라이코펜 함량 감소 방지방법을 제공하는 것이다.

[39]

발명의 실시를 위한 형태

- [40] 이하, 본 출원을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[41]

[42] 실시예 1: 암예방 김치의 제조공정

[43]

- [44] - 암예방 김치의 시생산을 통하여 제조공정을 검증하였다.

- [45]
- [46] **1-1. 암예방 김치의 시생산**
- [47] 암예방 김치의 산업화를 위한 대량생산 공정을 개발하고자 실제 김치 제조시설에서 Scale-up 시생산을 진행하였다. 시생산을 통해 설계 공정을 검증하고, 보완하여 최종 대량생산 공정을 설정하였다.
- [48] 시생산에 사용된 더한1호 배추는 계약재배를 통해 봄(하우스)작기에 맞춰 2월 파종 및 정식 후 4월 수확하였다. 수확된 더한1호 배추를 CJ제일제당 김치공장으로 입고 후, 입고검사를 통해 김치 원료에 적합 여부를 판단하였고, CJ제일제당 김치공장에서 대량생산 공정으로 시생산을 진행하였다.
- [49] 시생산 결과 더한1호 배추를 적용한 암예방 김치의 제조공정은 기존 김치 공정과 동일하게 진행 가능하였다. 다만, 더한1호 배추의 장기보관 시 겉마름으로 인하여, 절임과정에서 과절임될 우려가 있어, 저장상태에 따라 절임염수의 염도를 조절할 필요가 있으며, 대량생산 공정중 유산균 스타터의 현장 노출로 활성이 저해될 우려가 있어, 생산량에 따라 유산균 스타터의 포장 단량을 조절할 필요가 있음을 확인하였다.
- [50]
- [51] - 암예방 김치의 제조공정을 단계별로 구분하여 작업표준서를 제작하였다.
- [52]
- [53] **1-2. 예방김치의 제조공정도**
- [54] 도 1에 암예방 김치의 제조공정도를 나타내었다.
- [55]
- [56] **1-3. 암예방 김치의 제조공정 표준설정**
- [57] 도 2a 및 도 2b에 암예방김치의 제조공정 표준서를 나타내었다.
- [58]
- [59] **실시예 2: 유통중 김치 품질 변화 분석(이화학 및 미생물 분석)**
- [60]
- [61] - 일반적인 김치 유통온도 조건에서 품질 변화를 모니터링하였다.
- [62]
- [63] **2-1. 유통중 이화학 품질 모니터링**
- [64] 시생산을 통해 제조된 암예방 김치를 김치 유통온도인 7°C에서 항온 보관하며, 유통중 품질 변화를 모니터링하였다. 이화학 품질은 제조 직후 pH 5.65에서 저장 7일차에 pH 4.06으로 발효가 진행되었으며, 이후에는 완만하게 감소하며 일반적인 유통김치 품질과 유사한 경향을 나타내는 것을 확인하였다.
- [65] 김치의 숙성 품질 지표인 총산도의 경우도 제조 직후 0.31%에서 저장 7일차에 0.83%의 적숙상태에 도달하였으며, 이후 완만하게 증가하였고, 일반적인 유통김치 숙성 품질과 유사한 경향을 나타내는 것을 확인하였다.
- [66]
- [67] **2-2. 유통중 미생물 품질 모니터링**

[68] 총 유산균수의 변화를 측정한 결과, 제조 직후 10^7 CFU/g으로 초기 스타터의 역할을 발휘할 수 있는 생균수를 확보하였고, 이후 저장 5일차에 10^9 CFU/g으로 증가하였다. 이는, 스타터가 초기 김치 발효에서 정상적인 역할을 한 것으로 판단되며, 이후 저장 30일차까지 10^9 CFU/g을 유지함으로 기능성 암예방 김치에 긍정적인 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[69] 효모는 제조 직후 10^2 CFU/g에서 감소하여 저장 19일차까지 발현이 억제되었으나, 이후 10^3 CFU/g으로 증가하였다.

[70]

[71] - 암예방 김치의 주요유효성분인 라이코펜의 함량의 저장중 변화를 측정하였다.

[72]

[73] **2-3. 암예방 김치의 라이코펜 함량 분석**

[74] 더한1호 배추는 일반 배추 품종과 달리 특이적으로 라이코펜을 함유하고 있으며, 더한1호 배추의 유효성분인 라이코펜은 소금 절임 및 김치 제조과정에서 유효성분이 유지되었다. 이에 따라 암예방 김치에서는 일반 김치에는 없는 기능성 유효성분인 라이코펜을 함유하고 있으며, 더한1호 배추에는 0.99 mg/g, 암예방 김치에는 0.72 mg/g 의 라이코펜이 검출되었다.

[75] 암예방 김치의 저장 중 유효성분인 라이코펜은 저장 6개월 동안 계속 유지되어 암예방치의 유효성분으로 기능성을 소구하기에 적합하였다.

[76]

[77] **실시예 3: 염증 유발물질인 DSS 섭취를 통한 염증성 장질환 (3주) 발생 동물 모델 이용 암예방 김치 투여하여 염증성 장질환 예방 효능 비교 및 평가**

[78]

[79] - 동결건조 시킨 암예방 김치를 사료로 제작하여 이를 염증성 장질환 모델에 적용시킨 후 그 발생 정도를 비교하고, 그에 따른 병리학적 마커의 분석 및 분자생물학적 작용 기전 등을 분석 진행하였다.

[80]

[81] **3-1. 암예방 김치를 포함한 대장염 동물 모델**

[82] 도 7에 동물모델을 구체적으로 나타내었다.

[83]

[84] **3-2. 동물모델 연구 결과**

[85] 일반적으로 DSS를 투여하여 대장염을 유발하였을 때, 정상대조군과 비교하여 몸무게가 현저하게 저하됨을 확인할 수 있으며, 이때의 각 실험군을 투여받은 그룹들 사이에 몸무게 차이를 확인하였으나, DSS 단독 투여군과 비교하여 별다른 차이를 확인할 수 없었다. 다만, 이 때에 임상적인 증상 (설사, 혈변, 탈장 등)을 육안으로 확인하는 DAI Score를 확인해보면, DSS 단독투여그룹과 비교하여 암예방 김치 투여 그룹에서 점수가 현저하게 감소함을 확인하였다. 또한, 대장염이 유도되면 급성염증에 의하여 대장이 부어오르면서 대장의

길이가 현저하게 짧아지는 것을 확인할 수 있었으나, 이 때에 암예방 김치를 투여한 그룹에서 유의적으로 대장길이가 증가되어 있음을 확인할 수 있었다(도 8).

[86]

[87] **3-3. 동물모델 연구 결과**

[88] 실험 후 얻어진 대장조직을 이용하여 mRNA를 추출한 후 inflammatory cytokines과 anti-oxidant와 관련된 유전자들을 분석해 보았을 때, 일반적으로 DSS를 투여 받은 그룹에서는 대부분의 염증 사이토카인의 발현이 증가되어 있었으며, 특히 이때 암예방 김치를 투여한 그룹에서 그 증가한 발현들이 현저하게 감소되어 있음을 보여주었고, 이 결과는 표준레시피의 김치를 투여받은 그룹과도 유의적인 차이를 확인할 수 있었다. 또한, anti-oxidant와 관련한 유전자들을 확인하였을 때는 각 그룹 별로 별다른 차이를 확인하기 어려웠다(도 9).

[89]

[90] **3-4. 동물모델 연구 결과**

[91] 실험 후 얻어진 대장조직을 이용하여 protein을 추출한 후 염증과 항산화에 관련된 유전자들을 분석해 보았을 때, 일반적으로 DSS를 투여 받은 그룹에서는 대부분의 염증관련 인자들의 발현이 증가되어 있었으며, 특히 이 때 암예방 김치를 투여한 그룹에서 그 증가한 발현들이 현저하게 감소되어 있음을 보여주었고, 이 결과는 표준레시피의 김치를 투여받은 그룹과도 유의적인 차이를 확인할 수 있었다. 또한, anti-oxidant와 관련한 유전자들을 확인하였을 때는 각 그룹 별로 별다른 차이를 확인하기 어려웠다.

[92]

[93] **실시예 4: 대장암 동물 모델에서 대장암 발생 정도 비교**

[94]

[95] **4-1. 암예방 김치를 포함한 장기2단계 대장암 동물 모델**

[96] 도 9에 동물모델을 구체적으로 나타내었다.

[97]

[98] **4-2. 동물 모델 연구 결과**

[99] AOM을 투여(1단계)한 후 DSS로 염증을 유도(2단계)하면 10주 이상의 시간이 경과한 뒤 대장암으로 발전하였다. 이 때, 보통 대장암의 영향으로 survival rate이 감소함을 보여주었다. 실험 결과, AomDSS를 단독으로 투여받은 그룹에서의 생존율은 약 65% 정도를 유지하는 반면, 암예방 김치의 고농도를 투여받은 그룹에서는 생존율이 약 85% 정도로 유지됨을 확인할 수 있었으며, 이 때에 표준레시피의 김치를 투여받은 그룹이나 일본김치를 투여받은 그룹에서의 생존율보다 높음을 확인하였다. 또한, AomDSS를 단독으로 투여받은 그룹의 대장을 살펴보면 gross lesion에서 상당한 대장암이 발생됨을 확인할 수 있었지만, 암예방 김치를 투여받은 그룹에서는 대장암의 발생정도가 현저하게

적어짐을 확인할 수 있었다. 이 때, 표준레시피의 김치 또는 일본김치의 경우에도 대장암의 발생정도가 줄어든 것을 확인할 수 있었지만, 암예방 김치와 비교하였을 때는 유의적으로 그 감소폭이 적음을 확인하였다(도 12).

[100]

[101] **4-3. 동물 모델 연구 결과**

[102] 이상의 동물 모델에서 그룹별로 tumor의 크기와 부위별로 tumor의 개수에 대한 결과를 아래의 표 1 및 도 13에 나타내었다.

[103] [표1]

	Proximal		Middle		Distal		Total tumor number		Total tumor number
	2mm 이하	2mm 이상	2mm 이하	2mm 이상	2mm 이하	2mm 이상	2mm 이하	2mm 이상	
Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AD	2.6	2.1	0.9	3.9	0.9	6.9	4.3	12.9	17.1
AD+CI(저)	2.0	0.8	1.3	1.5	2.0	3.8	5.3	6.0	11.3
AD+CI(고)	0.1	0.9	0.4	1.0	0.5	2.3	1.0	4.1	5.1
AD+표준	3.0	1.5	1.5	2.7	1.3	5.0	5.8	9.2	15.0
AD+기무치	0.7	0.3	2.3	2.3	2.7	3.7	5.7	6.3	12.0
CI 단독	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[104]

[105] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[106]

[107] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[108] 수탁번호 : KCTC13043BP

[109] 수탁일자 : 20160610

[110]

[111]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 최승혜
 대한민국 경기도 수원시 영통구 광교로 42번 길 55
 우편번호 16495

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CILM119	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: ECTC 13043BP
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☒ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 X 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2016년 6월 10일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구원 생물자원센터 주소: 대한민국 전라북도 정읍시 임실길 181 한국생명공학연구원 우편번호 56212	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 김차영: 서명일: 2016. 6. 14.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 균등을 증명함.

2017 년 11 월 18

변리사 손 민



청구범위

- [청구항 1] 라이코펜을 포함하는 채소 및 유산균을 포함하는 발효 식품.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 라이코펜을 포함하는 채소는 배추인, 발효 식품.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 배추는 더 한1호인, 발효 식품.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 유산균은 류코노스톡 속 (*Leuconostoc sp.*), 락토바실러스 속(*Lactobacillus sp.*) 또는 이들의 조합인, 발효 식품.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 류코노스톡 속 유산균은 류코노스톡 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*)이고, 상기 락토바실러스 속 유산균은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)인, 발효 식품.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 류코노스톡 메센테로이드는 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119이고, 상기 락토바실러스 플란타럼은 락토바실러스 플란타럼 CJLP133인, 발효 식품.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 발효식품은 상기 채소의 라이코펜 함량 감소가 방지된 것인, 발효 식품.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 발효식품의 라이코펜 함량은 상기 채소의 라이코펜 함량 대비 50% 내지 99%인, 발효식품.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 발효식품의 라이코펜 함량(농도)은 0.6 mg/g 내지 0.98 mg/g인, 발효식품.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 발효식품의 저장 6개월 제 라이코펜 함량은 저장 7일째 라이코펜 함량 대비 50% 내지 99%인, 발효식품.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 발효식품은 암, 고혈압, 염증, 피부노화, 또는 홍반의 예방 또는 치료에 효과가 있는, 발효 식품.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 암은 대장암 또는 위암인, 발효식품.
- [청구항 13] 라이코펜을 포함하는 절임채소 및 유산균을 포함하는 양념을 준비하는 단계; 및 상기 양념을 상기 절임채소와 혼합하는 단계를 포함하는 발효식품의 제조방법.
- [청구항 14] 라이코펜을 포함하는 채소에 유산균을 혼합하여 발효식품을 제조하는 단계를 포함하는, 라이코펜 함량 감소 방지방법.