



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월15일
 (11) 등록번호 10-1968894
 (24) 등록일자 2019년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/744 (2014.01) *A61K 8/99* (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
 (21) 출원번호 10-2017-0055762
 (22) 출원일자 2017년04월28일
 심사청구일자 2018년11월20일
 (65) 공개번호 10-2018-0121269
 (43) 공개일자 2018년11월07일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020150023125 A*
 JP2010143885 A
 JP5374675 B2
 NCBI, GenBank Accession No. KX661223
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
코스맥스 주식회사
 경기도 화성시 향남읍 제약공단2길 46
 (72) 발명자
이동걸
 경기도 안양시 동안구 동안로159번길 14, 503동
 1007호(비산동, 은하수한양아파트)
남진주
 경기도 성남시 분당구 판교역로241번길 22, 817
 호(삼평동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
리엔특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

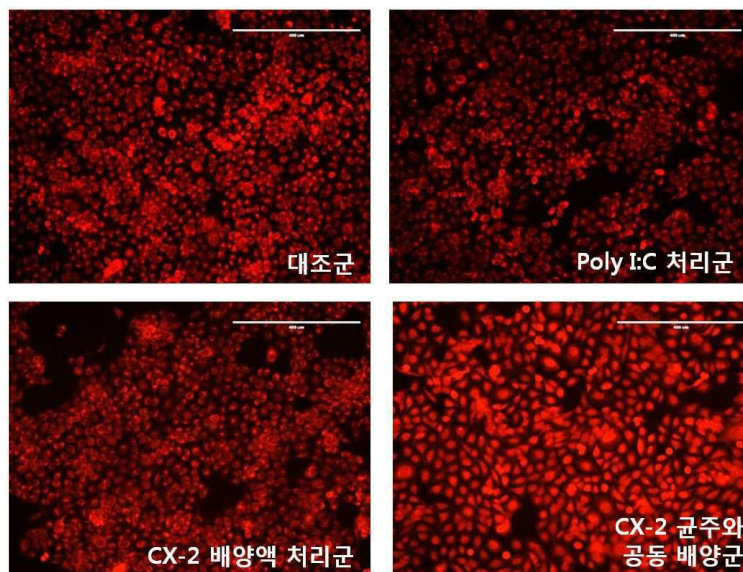
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **스트렙토코커스 뉴모니아 균주 및 이의 배양액을 포함하는 조성물**

(57) 요약

신규한 스트렙토코커스 속 균주 및 이의 배양액을 포함하는 피부 개선용 조성물에 관한 것이다. 일 양상에 따른 스트렙토코커스 속 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물에 의하면, 상기 균주 또는 이의 배양액은 피부각질 형성세포의 활성 증가, 지질 생성을 촉진하며 피부 장벽 강화 기능이 탁월하므로 피부 개선용 화장료 조성물, 피부외용제용 조성물, 약학적 조성물, 및 건강기능식품 등에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/744 (2013.01)

A61K 8/99 (2013.01)

A61Q 19/004 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

A23Y 2240/00 (2013.01)

C12R 1/46 (2013.01)

(72) 발명자

강승현

서울특별시 강남구 영동대로 230, 1동 1205호(대치동, 우성1차아파트)

김연준

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 7동 1409호 (서초동, 삼풍아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 것인, 균주,

청구항 3

스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 배양액은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주를 배양하여 수득된 배양액 자체, 또는 이로부터 균주를 제거하여 수득된 배양 상층액의 농축물 또는 동결건조물인 것인, 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 배양액은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주를 트립톤을 처리한 대두 배지(Tryptic Soy media), 또는 MRS 배지에서 20 내지 42℃의 온도 조건 하에 45 내지 50 시간 동안 배양하여 수득된 것인, 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피부장벽 강화용, 자외선에 의한 피부 노화 예방 또는 개선용, 또는 염증 예방 또는 개선용인, 화장료 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

청구항 3에 있어서, 상기 균주 또는 이의 배양액은 조성물 총 중량에 대하여 0.01 중량% 내지 10 중량%로 포함되는 것인, 화장료 조성물.

청구항 9

청구항 3에 있어서, 상기 균주 또는 이의 배양액은 세포 활성을 증가시키는 것인, 화장료 조성물.

청구항 10

청구항 3에 있어서, 상기 균주 또는 이의 배양액은 지질 생성을 촉진시키는 것인, 화장료 조성물.

청구항 11

청구항 3에 있어서, 상기 균주 또는 이의 배양액은 ABCA12(ATP binding cassette subfamily A member 12) 발현을 증가시키는 것인, 화장료 조성물.

청구항 12

청구항 3에 있어서, 상기 균주 또는 이의 배양액은 TGase-1(Transglutaminase-1) 발현을 증가시키는 것인, 화장

료 조성물.

청구항 13

스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 피부 상태 개선용 피부외용제 조성물로, 상기 피부 상태 개선용은 피부장벽 강화용, 자외선에 의한 피부 노화 예방 또는 개선용, 또는 염증 예방 또는 개선용인 것인 피부외용제 조성물.

청구항 14

스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 약학적 조성물로, 피부장벽 강화용, 자외선에 의한 피부 노화 예방 또는 개선용, 또는 염증 예방 또는 개선용인 약학적 조성물.

청구항 15

스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 신규한 스트렙토코커스 속 균주 및 이의 배양액을 포함하는 피부 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부의 생태계는 미생물에게 다양한 형태의 서식처를 제공하며, 광범위한 미생물들이 살고 있다. 숙주인 인간은 이들과 공생관계를 이루고 있으며, 숙주에 많은 긍정적인 영향을 미친다고 알려져 있다. 피부는 함입부, 특화되어 있는 틈새 등 다양한 형태의 서식처를 구성하고 있으며, 넓은 분포의 미생물이 자랄 수 있도록 돕는다. 기본적으로 피부는 물리적인 막을 형성하며, 외부로부터 잠재적인 위험요소 및 독성물질들로부터 방어를 하도록 도와준다. 피부는 외부환경과의 접촉지점이 되며, 다양한 미생물들(진균, 세균, 바이러스 및 작은 유충)의 집합소이기도 하다. 물리적, 화학적 기능의 선택에 맞게 미생물들은 특화된 틈새에 적응하여 서식처를 마련한다. 일반적으로 피부는 차갑고, 산성 성질을 나타내며, 건조된 상태로 유지된다. 구조적으로 표피(epidermis)는 피부장벽을 이루고 있으며, 미생물과 독소가 침투하는 것을 차단하고, 수분을 유지하는 중요한 역할을 한다. 표피의 최상위층은 각질층(stratum corneum)으로 구성되어 있다. 표피는 일명 ‘벽돌과 몰탈 구조’라고 불리는 형태를 띠고 있는데, 피부 조직은 지속적인 자가 회복 과정을 거치고, 분화과정의 마지막을 거친 squames는 끊임없이 피부조직에서 탈락되는 과정을 반복하게 된다.

[0003] 프로바이오틱스(Probiotics)는 인체에 유익한 작용을 하는 미생물을 총칭하는 말로 우리 몸에 유익(benefit)을 주는 미생물을 말한다. 현재까지 알려진 대부분의 프로바이오틱스는 유산균으로 알려져 있다. 프로바이오틱스는 인체에 여러 가지 유익작용을 통해 효과적인 효능이 발생하는 것으로 보고되었지만, 피부상재균과 피부의 상호관계에 대한 연구는 미비한 실정이다.

[0004] 피부장벽은 죽은 각질세포와 세포간 지질로 구성되어 있고, 외부 자극으로부터 피부를 보호하며 피부에서 수분이 증발하는 것을 막아주는 피부 보호막으로서 피부건강에 핵심적인 기능을 담당한다. 즉, 체내에서 지나친 수분 방출을 막고 화학물질이나 미생물처럼 해로운 물질이 우리 몸 안으로 들어오는 것을 막아준다. 죽은 각질세포의 표면을 구성하는 각질세포 외피에는 세포간 지질의 안정성에 중요한 역할을 한다. 각질형성세포는 분화를 통해 각질화 과정을 통해 피부 장벽을 만든다. 피부장벽 기능은 노화가 진행되거나 외부 요소들에 의해 파괴될 수 있으며, 피부 장벽의 손상은 피부 수분량 감소와 주름을 일으킬 수 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 성인의 피부로부터 신규한 스트렙토코커스 속 균주를 분리 및 동정하고 이의 피부 개선 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) 대한민국특허청 등록특허공보 10-1698200

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 일 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주를 제공하는 것이다.
- [0007] 다른 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 다른 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 피부외용제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 다른 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 다른 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 일 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 균주는 서열번호 1에 기재된 염기서열을 갖는 16s rRNA 유전자를 포함할 수 있다.
- [0013] 또한, 다른 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 명세서에서 사용된 용어 "배양액"은 균주를 배양하여 수득된 배양액 자체, 또는 이로부터 균주를 제거하여 수득된 배양 상층액의 농축물 또는 동결건조물을 지칭하며, "배양 상층액", "조건 배양액" 또는 "조정 배지"와 호환적으로 사용될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 배양액은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주를 트립톤을 처리한 대두 배지(Tryptic Soy media) 또는 MRS 배지에서 20 내지 42°C의 온도 조건 하에 45 내지 50시간 동안 배양하여 수득될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에서, 균주의 배양 상층액은 균주 배양액을 원심분리나 여과시켜 균주를 제거하는 단계에 의해 수득될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에서, 농축물은 상기 균주 배양액 자체, 또는 상기 배양액을 원심분리나 필터를 이용하여 여과한 후 수득된 상층액을 농축하는 단계에 의해 수득될 수 있다.
- [0018] 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 균주를 배양하기 위한 배양용 배지 및 배양 조건은 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 통상의 지식을 가진 자가 적절하게 선택하거나 변형하여 이용할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 균주 또는 균주를 배양하여 수득된 배양액은 정상 각질형성세포 또는 자극에 의해 노화된 각질형성세포의 활성을 증가시키거나 지질 생성을 촉진하는 기능 및 장벽강화 기능을 갖는다.
- [0020] 일 구체예에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피부장벽을 강화시키고, 노화를 예방, 개선 또는 억제하며, 염증을 예방 또는 개선시킬 수 있다. 상기 피부장벽 강화는 ABCA12(ATP binding cassette subfamily A member 12) 발현을 증가시키거나 TGase-1(Transglutaminase-1) 발현을 증가시키는 것일 수 있다. 또한, 상기 노화의 예방, 개선 또는 억제는 세포의 활성을 증가시키거나 지질 생성을 촉진하는 것일 수 있다. 본 명세서에서 용어 "피부 노화"란 나이가 들어가면서 피부에 나타나게 되는 유형과 무형상의 변화를 통틀어 말하는 것으로, 예컨대 표피 두께가 얇아지는 현상, 진피의 세포 수나 혈관 수, DNA 손상복구 능력, 세포교체주기, 상처회복, 피부장벽기능, 표피의 수분 유지, 땀분비, 피지분비, 비타민D 생산, 물리적 손상방어, 화학물질 제거능력, 면역반응, 감각 기능, 체온조절의 감소를 말한다. 상기 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또

는 이의 배양액은 외인성 요인 또는 내인성 요인에 의해 유발되는 피부 노화 개선용일 수 있다. 상기 외인성 요인은 여러 가지 외부 요인, 예컨대 자외선(광)을 말하고 내인성 요인은 연대기적 요인이라고도 지칭되며 주로 시간의 흐름에 의해 발생하는 요인을 말한다. 즉, 상기 피부 노화는 구체적으로는 자외선, 공해, 담배연기, 화학물질 등에 의한 외부 자극에 의해 유도되는 조기 노화 증상 뿐만 아니라, 나이가 들어감에 의해 피부세포의 증식이 감소함에 따라 발생하는 자연노화 현상을 포함하며 주름, 탄력 감소, 피부 처짐 및 건조 현상 등을 모두 포함하는 개념이다. 또한 주름은 내·외부 요인의 변화에 의한 자극이 피부조직을 구성하고 있는 성분을 변화시켜 주름을 유발하는 것을 포함한다.

[0021] 따라서, 상기 조성물은 상기의 효과를 가짐으로써, 피부 개선, 예컨대 피부 보습, 피부 노화 억제, 피부장벽 강화, 피부 염증 억제에 유용하게 사용될 수 있다.

[0022] 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 80 중량%, 예를 들면, 0.01 중량% 내지 60 중량%, 0.01 중량% 내지 40 중량%, 0.01 중량% 내지 30 중량%, 0.01 중량% 내지 20 중량%, 0.01 중량% 내지 10 중량%, 0.01 중량% 내지 5 중량%, 0.05 중량% 내지 60 중량%, 0.05 중량% 내지 40 중량%, 0.05 중량% 내지 30 중량%, 0.05 중량% 내지 20 중량%, 0.05 중량% 내지 10 중량%, 0.05 중량% 내지 5 중량%, 0.1 중량% 내지 60 중량%, 0.1 중량% 내지 40 중량%, 0.1 중량% 내지 30 중량%, 0.1 중량% 내지 20 중량%, 0.1 중량% 내지 10 중량%, 또는 0.1 중량% 내지 5 중량%의 균주 또는 이의 배양액을 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에서, 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 영양화장수, 마사지크림, 영양크림, 에센스, 팩, 젤, 앰플 또는 피부 점착 타입의 화장료 제형을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0024] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 조성물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다.

[0025] 또한, 다른 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 피부외용제용 조성물을 제공한다.

[0026] 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액에 대하여는 상기 기재한 바와 같다.

[0027] 본 발명에서, 상기 피부외용제는 크림, 젤, 연고, 피부 유효제, 피부 현탁액, 경피전달성 패치, 약물 함유 붕대, 로션, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 피부외용제는 통상 화장품이나 의약품 등의 피부외용제에 사용되는 성분, 예를 들면 수성성분, 유성성분, 분말성분, 알코올류, 보습제, 증점제, 자외선흡수제, 미백제, 방부제, 산화방지제, 계면활성제, 향료, 색제, 각종 피부 영양제, 또는 이들의 조합과 필요에 따라서 적절하게 배합될 수 있다. 상기 피부외용제는, 에데트산이나트륨, 에데트산삼나트륨, 시트르산나트륨, 폴리인산나트륨, 메타인산나트륨, 글루콘산 등의 금속붕쇄제, 카페인, 탄닌, 벨라파밀, 감초추출물, 글라블리딘, 칼린의 과실의 열수추출물, 각종생약, 아세트산도코페롤, 글리틸리틴산, 트라넥삼산 및 그 유도체 또는 그 염등의 약제, 비타민 C, 아스코르브산인산마그네슘, 아스코르브산글루코시드, 알부틴, 코지산, 글루코스, 프룩토스, 트레할로스 등의 당류등도 적절하게 배합할 수 있다.

[0028] 또한, 다른 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0029] 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액에 대하여는 상기 기재한 바와 같다.

[0030] 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 희석제는 유당, 옥수수 전분, 대두유, 미정질 셀룰로오스, 또는 만니톨, 활택제로는 스테아린산 마그네슘, 탈크, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 담체는 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 부형제는 미결정 셀룰로오스, 유당, 저치환도 히드록시셀룰로오스, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 붕해제는 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 전분글리콜산 나트륨, 무수인산일수소 칼슘, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 결합제는 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 활택제는 스테아린산 마그네슘, 이산화규소, 탈크, 또는 그 조합일 수 있다.

[0031] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여 제형으로 제형화될 수 있다. 경구 투여 제형은 과립제, 산제, 액제, 정제, 캡셀제, 건조시럽제, 또는 그 조합일 수 있다. 비경구 투여 제형은 주사제일 수 있다.

- [0032] 또한, 다른 양상은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0033] 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액에 대하여는 상기 기재한 바와 같다.
- [0034] 상기 건강기능식품 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) KCCM12005P 균주 또는 이의 배양액 단독 또는 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 명세서의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 건강기능식품의 종류 중 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 건강식품 조성물은 또한 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제, 또는 그 조합을 함유할 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물은 또한, 천연 과일주스, 과일주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육, 또는 그 조합을 함유할 수 있다.
- [0035] 또한, 다른 양상은 유효한 양의 상기한 조성물을 개체에 처리하는 단계를 포함하는 개체의 피부장벽 기능 강화, 또는 노화의 예방 또는 개선하는 방법을 제공한다. 상기 조성물에 대해서는 상술한 바와 동일하다.
- [0036] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다.

발명의 효과

- [0037] 일 양상에 따른 스트렙토코커스 속 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물에 의하면, 상기 균주 또는 이의 배양액은 피부각질형성세포의 활성 증가, 지질 생성을 촉진하며 피부 장벽 강화 기능이 탁월하므로 피부 개선용 화장료 조성물, 피부외용제용 조성물, 약학적 조성물, 및 건강기능식품 등에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 HaCaT 세포주에 Poly I:C 를 처리한 후 자극에 의해 노화된 세포에 CX-2 균주의 배양액을 처리하거나 상기 세포를 CX-2 균주와 공동배양하고, 세포 활성 및 세포로부터 분비되는 지질을 분석한 사진이다(스케일바: 400 μm).
- 도 2는 HaCaT 세포주에 Poly I:C를 처리한 후 자극에 의해 노화된 세포에 CX-2 균주의 배양액을 처리하거나 상기 세포를 CX-2 균주와 공동배양하고, ABCA12(ATP binding cassette subfamily A member 12) 유전자의 상대적 발현량을 확인한 그래프이다(##p < 0.01, **p < 0.01).
- 도 3은 HaCaT 세포주에 Poly I:C)를 처리한 후 자극에 의해 노화된 세포에 CX-2 균주의 배양액을 처리하거나 상기 세포를 CX-2 균주와 공동배양하고, TGase-1 유전자의 상대적 발현량을 확인한 그래프이다(##p < 0.01, **p < 0.01).
- 도 4는 HaCaT 세포주에 UV를 처리한 후 자극에 의해 노화된 세포에 CX-2 균주의 배양액을 처리하거나 상기 세포를 CX-2 균주와 공동배양하고, 세포 활성 및 세포로부터 분비되는 지질 및 세포의 활성을 분석한 사진이다(스케일바: 400 μm).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] **실시예 1. 균주의 분리**
- [0041] 건강한 여성의 피부를 멸균 증류수로 세척하여 확보된 샘플을 R2A 배지에 접종하였다. 접종 후 48시간 동안 28℃ 인큐베이터에서 배양한 뒤 형성된 집락 100개를 순수 분리 배양하여, 48시간 동안 28℃ 인큐베이터에서 재배

양 하였다. 배양이 완료된 집락은 16s rRNA 유전자 서열 동정을 실시하였다. 이때 사용된 프라이머는 박테리아에만 반응하여 증폭하도록 고안되었으며, 염기서열의 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

정방향 프라이머	5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
역방향 프라이머	5' -TACGGYTACCTTGTACACTT-3'

[0042]

[0043]

PCR 증폭은 95℃ 1분, 55℃ 1분, 75℃ 1분30초씩 30 사이클로 실시 하였으며, 마지막으로 72℃에서 8분간 처리한 후 4℃에서 보관하였다. PCR 반응이 끝난 뒤 분리 배양된 종들의 DNA 서열은 ABI-3730XL(ABI, USA)를 이용하여 결정하였다. 분리 배양된 미생물 집락 중 결정된 16s rRNA부위의 염기서열을 NCBI 홈페이지에서 제공되는 BLAST 프로그램으로 등록된 다른 균주들과 비교한 결과, 상동성이 98%인 것으로 확인하고 분리된 미생물을 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)로 동정하였다.

[0044]

상기와 같은 방법으로 선별한 스트렙토코커스 뉴모니아 균주를 CX-2로 명명하고, 부다페스트 조약 하에 2017년 04월 03일자로 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하여 기탁번호 KCCM12005P를 부여받았다.

[0045]

실시예 2. 최적 배양 조건 분석

[0046]

상기 실시예 1에서 분리한 균주의 배양 조건을 확인하기 위해 트립톤을 처리한 대두 배지(Tryptic Soy media), MRS 배지에서 배양하여 확인하였다. 구체적으로, 균주의 최적 배양 조건을 확인하기 위해서 API 50 CH 키트(biomérieux, France)를 사용하였다. 사용 방법은 제조사에서 제공되는 매뉴얼에 따라 실시하였다. 각 큐브에 배양 균체를 접종 후 37℃에서 최대 48시간 배양 후 색의 변화를 확인하였다. 시험에 사용되는 균체는 트립톤을 처리한 대두 아가 배지에서 배양 후 생성된 콜로니를 취하여 사용하였다. 발색의 경우 각 시험군마다 다른 색이 발색이 되며, 시험군의 대표표와 비교하여 정확한 판정을 실시하였다. 그리고 분리된 미생물의 G+C contents, Fatty acids, Quinone, Polar lipids 등은 KCCM (한국미생물 보존센터)에 위탁의뢰하여 분석을 실시하였다. 최적 생장온도는 5℃에서부터 40℃까지 (5℃ 간격) 설정하여 최적배양온도를 확인하였으며, 최적 염농도의 경우 0 ~ 20% 까지(1% 간격)배지에 소금을 추가하여 25℃에서 배양 확인하였다. pH는 4-8 구간을 설정하여(0.5 간격) 확인하였고, 마지막으로 최적 배양 배지조건은 상업적으로 판매되는 배지를 기본으로 하여 약간씩 변형하여 테스트하였으며, 배양은 25℃에서 실시하였다.

[0047]

그 결과, 트립톤을 처리한 대두 배지(Tryptic Soy media), MRS 배지에서 20℃ 내지 42℃의 범위인 37℃에서 48시간 동안 배양하였을 때 최적의 배양이 가능함을 확인하였다.

[0048]

실시예 3. 균주의 물질 이용능 분석

[0049]

상기 실시예 1에서 분리한 균주의 물질 이용능을 분석하기 위해서 하기와 같이 수행하였다.

[0050]

BioLOG GP2, API 50 를 사용하여 확인하였으며, 시험 방법은 Omnilog, Biomeriuse 에서 제공되는 시험방법을 참고하여 사용하였다. 배양온도 및 배양 배지는 해당 균주에 맞는 온도를 사용하여 배양하였으며, 48시간 배양된 집락 콜로니 5개를 취하여 시약에 현탁하여 사용하였다. 접종량은 150 μl 접종하였다. 현탁액은 각 제조사에서 제공되는 키트의 구성품을 사용하였다. 균주를 접종하지 않았을 때는 투명한 액체상태이다. 접종된 플레이트 및 스트립은 37℃에서 48시간 배양하여 확인하였으며, 최대 72시간까지 배양된 결과를 확인하였다. 접종 당시 투명한 액체였지만 보라색 또는 붉은색으로 변환된 웰은 양성으로 판단하였다. 상기와 같이 실험한 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0051]

특징	이용능
락토오스(Lactose)	-
글리코겐(Glycogen)	+
이눌린(Inulin)	+
멜리비오스(Melibiose)	+
라피노오스(Raffinose)	-
리보오스(Ribose)	+
녹말(Starch)	+
트레할로스(Trehalose)	-
아르기닌의 가수분해(Hydrolysis of arginine)	+

N-아세틸-β-글루코사미니다제(N-Acetyl-β -glucosaminidase)	-
알칼리포스파타제(Alkaline phosphatase)	-
α -D-갈락토시다제(α -D-Galactosidase)	+
β -D-갈락토시다제(β -D-Galactosidase)	+
글리실-트립토판 아릴아미다제(Glycyl-tryptophan arylamidase)	+

[0052] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 균주는 글리코젠, 이눌린, 멜리비오스, 리보오스, 녹말, 아르기닌, α-D-갈락토시다제, β -D-갈락토시다제와 글리실-트립토판 아릴아미다제의 이용능이 있음을 확인하였다.

[0053] **실시예 4. 균주에 의한 각질형성세포의 지질분비 효능 및 세포 활성 분석**

[0054] 상기 실시예 1에서 분리한 균주가 각질형성세포의 지질분비 효능과 세포 활성에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여, 하기와 같이 수행하였다.

[0055] 인간 각질형성세포주인 HaCaT 세포주에 인터페론 생산을 촉진하는 합성 리보핵산인 폴리 IC(polyinosinic:polycytidylic acid: Poly I:C)를 처리한 후 24시간 동안 배양하여 HaCaT 세포주를 자극하였다. 배양 후, 자극에 의해 노화된 세포에 CX-2 균주의 배양액을 처리하거나 상기 세포를 CX-2 균주와 공동배양하였다.

[0056] 상기와 같이 처리한 세포로부터 분비되는 지질 및 세포 활성을 오일 레드 O 염색(Oil red O staining)으로 확인하였다. 구체적으로, 오일 레드 O 스타크 용액을 만들기 위해서, 0.7g 오일 레드 O(이하 "ORO"라 한다)와 99% 이소프로필 알코올 200ml을 혼합하였다. 워킹(working) 용액은 상기 오일 레드 O 스타크 용액:증류수를 6:4로 혼합하여 제조한 후 여과하였다. 4 웰 챔버 슬라이드의 각 웰 당 상기와 같이 처리한 HaCaT 세포주를 1×10^4 개로 접종한 후 1-2일 동안 배양하였다. 70-80%정도 자란 세포주에 분화 유도를 위해 약물용 배지에 2×10^{-8} M 테스토스테론과 1×10^{-4} M 리놀레산을 혼합하여 24시간 동안 처리하였다. 배지를 교환한 후 텍사메타손 1 μM과 시료를 함께 처리하고 24시간 후에 오일 레드 O 염색을 수행하였다. 염색한 세포주를 광학현미경을 통해 관찰한 결과를 도 1에 나타내었다. HaCaT 세포주에 폴리 IC를 처리하지 않은 균을 대조군, 폴리 IC만 처리한 균을 Poly I:C 처리군, CX-2 배양액을 처리한 균을 CX-2 배양액 처리군, CX-2 균주와 공동 배양한 균을 CX-2 균주와 공동 배양군으로 표시하였다.

[0057] 도 1에 나타난 바와 같이, 세포에 자극을 유도한 후 CX-2 균주의 배양액을 처리하였을 때, HaCaT 세포주의 세포 활성이 높아지며 지질 생성이 유의적으로 촉진됨을 확인하였다. 또한, HaCaT 세포주와 CX-2 균주를 공동 배양한 경우에도 마찬가지로 HaCaT 세포주의 세포 활성과 지질 생성능이 증가함을 확인하였다.

[0058] **실시예 5. 균주에 의한 각질형성세포의 장벽 기능 정상화 효능 분석**

[0059] 상기 실시예 1에서 분리한 균주가 각질형성세포의 장벽 기능 강화에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여, 하기와 같이 수행하였다.

[0060] 인간 각질형성세포주인 HaCaT 세포주에 인터페론 생산을 촉진하는 합성 리보핵산인 폴리 IC(polyinosinic:polycytidylic acid: Poly I:C)를 처리한 후 24시간 동안 배양하여 HaCaT 세포주를 자극하였다. 배양 후, 자극에 의해 노화된 세포에 CX-2 균주의 배양액을 처리하거나 상기 세포를 CX-2 균주와 공동배양하고, 실시간 RT-PCR(real time RT-PCR)로 ABCA12(ATP binding cassette subfamily A member 12) 유전자와 TGase-1 유전자의 상대적 발현량을 확인하였다. 상기와 같이 처리한 HaCaT 세포주로부터 RNA를 추출하고, RNA를 정량(nano drop)하였다. RNA 16 μl를 정량하여 70℃에서 5분 동안 처리한 후, PCR premix에 넣고 약하게 볼텍싱하였다. 이후 42℃에서 55분 처리한 후, 70℃에서 15분 처리하고 4℃에 보관하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 PCR를 이용하여 증폭하였다. cDNA 2 μl, 각각의 유전자를 타겟으로 하는 정방향 프라이머 1 μl, 역방향 프라이머 1 μl, 증류수 6 μl, 프리믹스(premix) 시료 10 μl를 혼합한 후, 95℃ 3분, {95℃ 30초, 49 내지 53℃ 30초, 72℃ 1분} 40 사이클을 처리하여 증폭하였다. 상기와 같이 실험하여 ABCA12 유전자에 대한 결과를 도 2에, TGase-1 유전자에 대한 결과를 도 3에 나타내었다. HaCaT 세포주에 폴리 IC를 처리하지 않은 균을 대조군, 폴리 IC만 처리한 균을 Poly I:C 처리군, CX-2 배양액을 처리한 균을 CX-2 배양액 처리군, CX-2 균주와 공동 배양한 균을 CX-2 균주와 공동 배양군으로 표시하였다.

[0061] 도 2에 나타난 바와 같이, 세포에 자극을 유도한 후 CX-2 균주의 배양액을 처리하거나 HaCaT 세포주와 CX-2 균주를 공동 배양한 경우, 자극에 의해 감소하였던 ABCA12의 상대적 양이 유의적으로 증가함을 확인하였다.

[0062] 도 3에 나타난 바와 같이, 세포에 자극을 유도한 후 CX-2 균주의 배양액을 처리하거나 HaCaT 세포주와 CX-2 균주를 공동 배양한 경우, 자극에 의해 감소하였던 TGase-1의 상대적 양이 유의적으로 증가함을 확인하였다.

[0063] 따라서, 본 발명의 CX-2 균주의 배양액 처리 또는 CX-2 균주와의 공동 배양 결과 ABCA12 및 TGase-1의 상대적 양이 증가하였으므로 상기 CX-2 균주의 배양액 또는 공동 배양에 의해서 장벽 기능이 회복되는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0064] **실시에 6. 균주에 의한 각질형성세포의 지질분비 효능 및 세포 활성 분석**

[0065] 상기 실시예 1에서 분리한 균주가 각질형성세포의 지질분비 효능과 세포 활성화에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여, 하기와 같이 수행하였다.

[0066] 인간 각질형성세포주인 HaCaT 세포주에 자외선을 처리한 후 24시간 동안 배양하여 HaCaT 세포주를 자극하였다. 배양 후, 자극에 의해 노화된 세포에 CX-2 균주의 배양액을 처리하거나 상기 세포를 CX-2 균주와 공동배양하였다. 상기와 같이 처리한 세포로부터 분비되는 지질 및 세포 활성을 오일 레드 0 염색(Oil red 0 staining)으로 확인하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0067] HaCaT 세포주에 자외선을 처리하지 않은 균을 대조군, 자외선만 처리한 균을 UV 처리군, CX-2 배양액을 처리한 균을 CX-2 배양액 처리군, CX-2 균주와 공동 배양한 균을 CX-2 균주와 공동 배양군으로 표시하였다.

[0068] 도 4에 나타난 바와 같이, 세포에 자극을 유도한 후 CX-2 균주의 배양액을 처리하였을 때, HaCaT 세포주의 세포 활성이 높아지며 지질 생성이 유의적으로 촉진됨을 확인하였다. 또한, HaCaT 세포주와 CX-2 균주를 공동 배양한 경우에도 마찬가지로 HaCaT 세포주의 세포 활성화와 지질 생성능이 증가함을 확인하였다.

수탁번호

[0069]

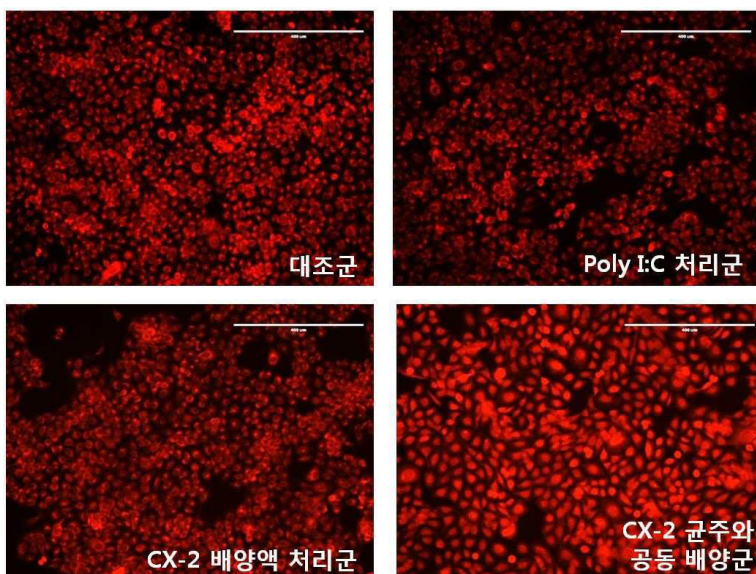
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12005P

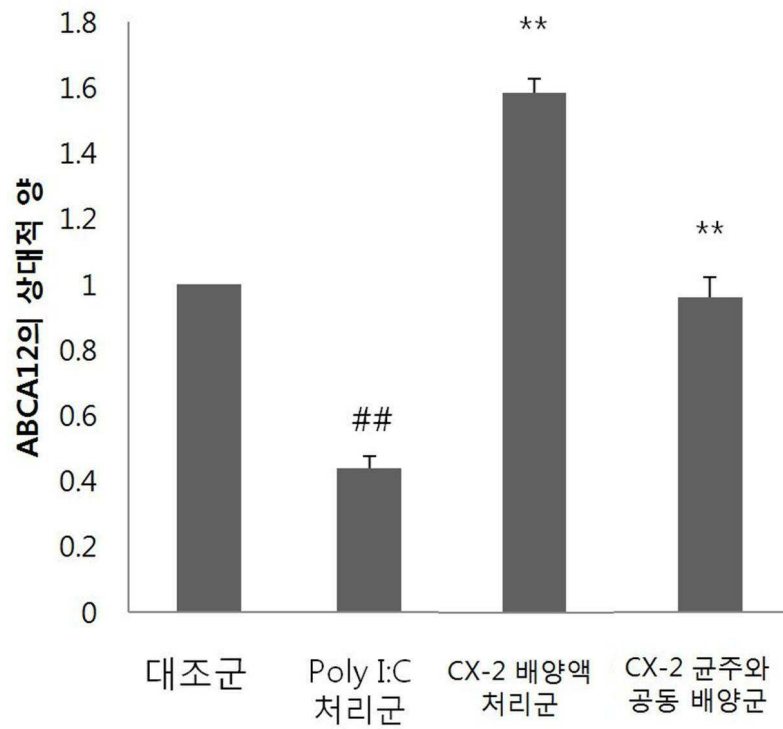
수탁일자 : 20170403

도면

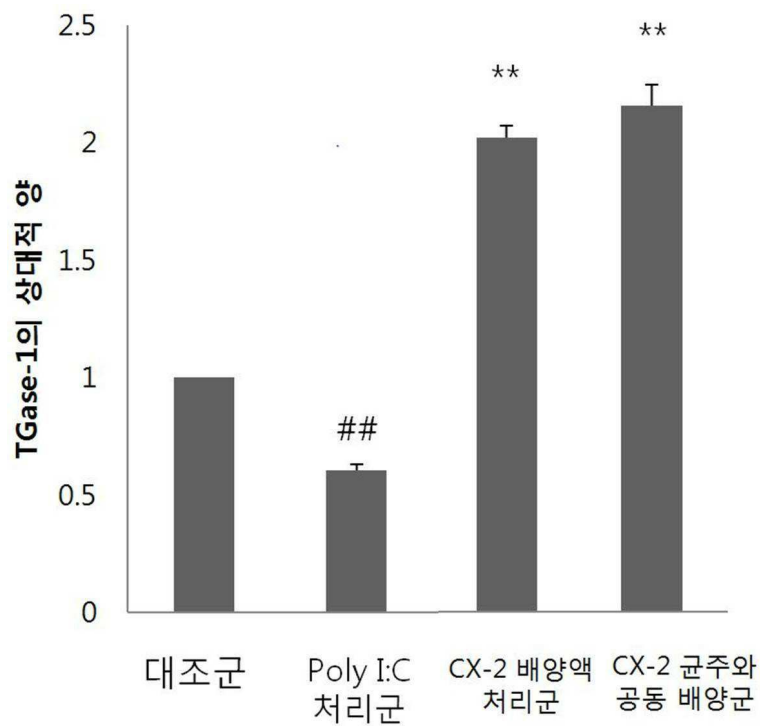
도면1



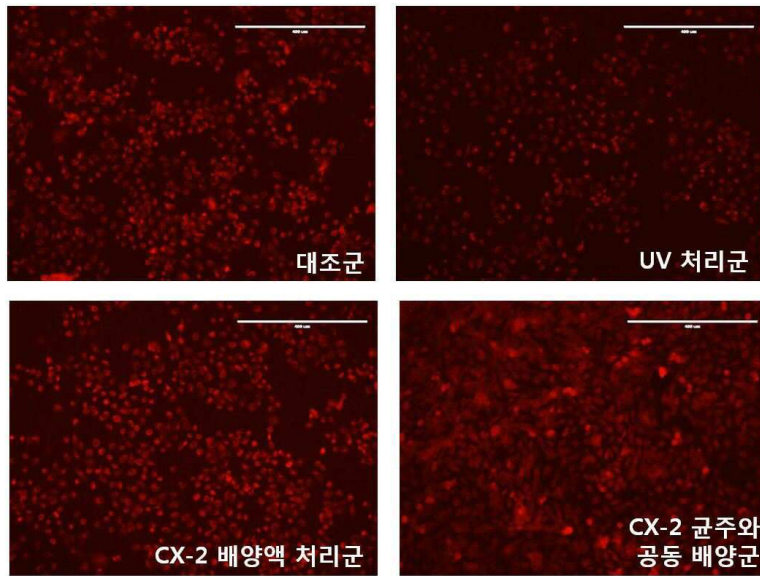
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110>	COSMAXBTI, INC.	
<120>	Composition comprising Streptococcus pneumoniae strain and culture medium thereof	
<130>	117762	
<160>	1	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	1260	
<212>	RNA	
<213>	Streptococcus pneumoniae	
<400>	1	
	gagttgcgaa cgggtgagta acgcgtaggt aacctgcctg gtagcggggg ataactattg	60
	gaaacgatag ctaataccgc ataagagtag atgttgcatt acatttgctt aaaaggtgca	120
	cttgcattcac taccagatgg acctgcgttg tattagctag ttggtggggg aacggctcac	180
	caaggcgacg atacatagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg	240
	gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcgg caatggacgg aagtctgacc	300
	gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg taagagaaga	360
	acgagtgtga gattggaag ttcacactgt gacggtatct taccagaaag ggacggctaa	420
	ctactgcca gcagccgagg taatacgtag gtcccagcgg ttgtccgat ttattgggag	480
	taaagcgagc gcaggcggtt agataagtct gaagttaaag gctgtggctt aaccatagta	540

ggctttgga acigttaaac ttgagtcaa gaggggagag tggaattcca tgtgtagcgg	600
tgaaatgcgt agatatafgg aggaacaccg gtggcgaag cggtctctg gcttgtaact	660
gacgctgagg ctcgaaagcg tggggagcaa acaggattag atacctggt agtccacgt	720
gtaaacgatg agtgctaggt gttagacct ttccggggt tagtgccgta gtaacgcat	780
taagcactcc gcctggggag tacgaccgca agtttgaac tcaaaggaat tgacgggggc	840
ccgcacaage ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc	900
ttgacatccc tctgaccgct ctagagatag agttttcctt cgggacagag gtgacaggtg	960
gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca	1020
accctattg ttagttgcca tcatttagtt gggcactcta gcgagactgc cgtaataaa	1080
ccggaggaag gtggggaifga cgtcaaatca tcatgccct tatgacctgg gctacacag	1140
tgctacaatg gctggtacaa cgagtcgcaa gccggtgacg gcaagctaat ctcttaagc	1200
cagtctcagt tcggattgta ggctgcaact cgctacatg aagtcggaat catccgatcc	1260
	1260