



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0033993  
(43) 공개일자 2025년03월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 35/747* (2015.01) *A23K 10/18* (2017.01)  
*A23L 33/135* (2016.01) *A61P 1/16* (2006.01)  
*A61P 3/00* (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01) *A61P 9/12* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01) *C12R 1/25* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 35/747* (2013.01)  
*A23K 10/18* (2016.05)
- (21) 출원번호 10-2024-0117937
- (22) 출원일자 2024년08월30일  
 심사청구일자 2024년08월30일
- (30) 우선권주장  
 1020230115572 2023년08월31일 대한민국(KR)  
 (뒷면에 계속)

- (71) 출원인  
**주식회사 지아이바이옴**  
 경기도 성남시 중원구 갈마치로288번길 14, 비동 1567호(상대원동, 성남에스케이브이1타워)
- (72) 발명자  
**양보기**  
 서울특별시 송파구 위례광장로 230, 201동 1502호(장지동 위례2차아이파크)
- 장명호**  
 서울특별시 송파구 위례광장로 230, 201동 1502호(장지동 위례2차아이파크)
- 김진욱**  
 경기도 성남시 중원구 광명로 89 성남센트럴푸르지오시티 A동 1034호
- (74) 대리인  
**정일영**

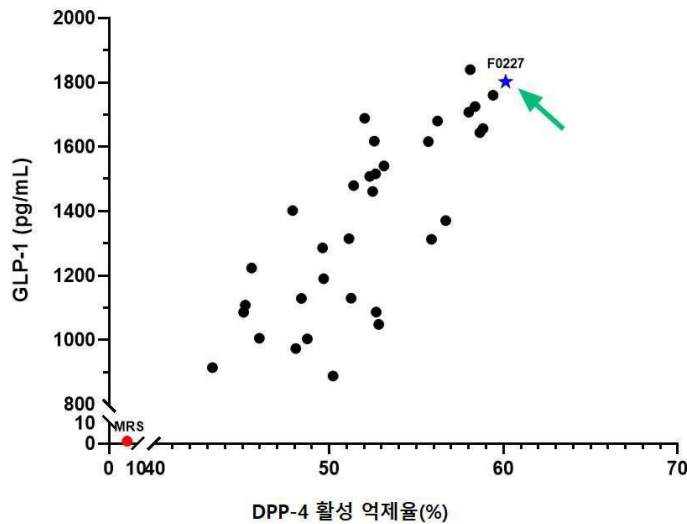
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **락티플란티바실러스 플란타룸 균주 및 이를 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

GLP-1 분비를 자극하면서 DPP-4 활성 저해 효과와 유익한 대사 산물의 분비 효과도 갖춘 신규한 락티플란티바실러스 플란타룸 균주를 개시한다. 아울러 이 균주 또는 그 배양물을 포함하는 대사 질환 치료 또는 억제용 약학 조성물을 제공한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

*A23L 33/135* (2016.08)  
*A61P 1/16* (2018.01)  
*A61P 3/00* (2018.01)  
*A61P 3/04* (2018.01)  
*A61P 9/10* (2018.01)  
*A61P 9/12* (2018.01)  
*C12N 1/205* (2021.05)  
*A23V 2002/00* (2023.08)  
*A23V 2200/332* (2013.01)

(30) 우선권주장

1020230177308 2023년12월08일 대한민국(KR)  
 1020240026979 2024년02월26일 대한민국(KR)  
 1020240045777 2024년04월04일 대한민국(KR)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465039000
과제번호	HR18C0012060023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성
연구과제명	$\mu$ + Therapy 플랫폼 기반 혁신적인 항비만(대사질환)병용 치료제 개발
과제수행기관명	(주)지아이바이옴
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

락티플란티바실루스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*) 종의 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물과 상기 균주의 무세포 배양 상등액 중에서 선택하는 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하며, 숙주의 GLP-1 분비를 증가시키거나 식욕을 억제하는 대사 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서 상기 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 숙주의 체중 증가 억제, 숙주의 체지방 감소와 숙주의 식욕 억제 중 어느 하나 이상의 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 대사 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

#### 청구항 3

락티플란티바실루스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*) GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP).

#### 청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주는 *recA* 유전자 서열이 서열번호 2에 기재한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 락티플란티바실루스 플란타룸 균주.

#### 청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주는 자연적으로 발생하는 락티플란티바실루스 플란타룸의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 락티플란티바실루스 플란타룸 균주.

#### 청구항 6

락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP), 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물과 상기 균주의 무세포 배양 상등액 중에서 선택하는 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 대사 질환은 비만, 비만성 식욕 억제, 대사 증후군, 고혈압, 동맥경화증, 고혈당증, 고지혈증, 고중성지방혈증, 지방간, 비알콜성 지방간 질환, 고인슐린혈증, 당뇨병, 내당능 장애, 고콜레스테롤혈증, 심혈관 질환 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군에서 선택하는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물 및 상기 배양물의 추출물이 DPP-4 효소 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 숙주의 GLP-1 분비를 자극하는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 10**

제 6항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 숙주의 GLP-1 수용체 발현을 촉진하는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 11**

제 6항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 숙주의 식욕 억제성 신경세포를 자극하는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 12**

제 12항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 숙주의 프로오피오멜라노코르틴 또는 CART(cocaine- and amphetamine-regulated transcript)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 13**

제 6항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 숙주의 체중 증가 억제, 숙주의 체지방 감소와 숙주의 식욕 억제 중 어느 하나 이상의 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 14**

제 9항 또는 제 10항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 DPP-4 효소 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 15**

제 6항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 비만에 동반하는 숙주의 골격근 근육량 감소 및/또는 골격근 근력 감소를 경감하는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 16**

제 6항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 숙주의 내장 지방 축적을 경감하는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 17**

제 16항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 숙주의 간 지방 축적을 경감하는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 18**

제 6항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이 숙주의 혈중 중성지방을 경감하는 것을 특징으로 하는, 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 19**

제 6항에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은  $\alpha$ -케토글루타르산, 3-페닐락트산, 시스타티오닌, 1-모노팔미틴, 모노스테아르산글리세롤과 2-히드록시-3-메틸부티르산으로 이루어지는 군에서 선택하는 어느 하나 이상을 함유하는 것을 특징으로 하는 대사 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 20**

락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 그 배양물을 포함하는 식품 조성물.

**청구항 21**

락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 그 배양물을 포함하는 건강 기능 식품.

**청구항 22**

락티플란티바실루스 플란타룸 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 그 배양물을 포함하는 사료 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 락티플란티바실루스 플란타룸 균주에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 균주를 포함하는 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 프로바이오틱스(probiotics)는 장내 미생물 균형에 도움을 주는 항균 활성과 효소 활성을 가진 미생물을 말한다. 아울러 프로바이오틱스는 건조 세포나 발효 산물 형태로 사람이나 동물에 공급되어, 장내 균총을 개선하는 단일 또는 복합 균주 형태의 생균으로 정의되고 있다. 프로바이오틱스가 갖추어야 할 특성은 인간의 장내를 서식지로 하고, 비병원성, 무독성의 특성을 가지며, 장으로 가는 동안 살아 남아야 한다. 더 나아가 전달되는 식품 안에서 소비되기 전에 생존율과 활성을 유지하고, 감염 예방용으로 사용되는 항생제에 대해 민감해야 하며, 항생제 내성을 갖는 플라스미드를 보유하지 않아야 한다. 또한, 장내 환경에서 산, 효소, 담즙에 대한 내성을 갖추어야 한다. 최근 프로바이오틱스는 장 건강 개선을 비롯한 다양한 건강 기능 개선 효과가 보고되면서 기존 화합물에 기초한 치료제를 대체할 수 있는 주요한 치료 물질로 각광받고 있다.

[0003] 한편 유산균을 비롯한 체내 공생 미생물이 생활 과정에서 미생물 세포 외로 분비하는 여러가지 대사 산물 중에는 숙주 세포에 대사적으로 유익한 영향을 줄 수 있는 것들이 알려져 있다. 예를 들어 3-페닐락트산(3-phenyllactic acid)은 장내 지질 대사를 조절하여 숙주의 비만 또는 제2형 당뇨병을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 크랩스 회로의 중간체이기도 한  $\alpha$ -케토글루타르산은 장내 미생물 중 후벽(厚壁)균 문(Firmicutes)에 속하는 세균의 점유율을 줄이고 의간균(擬桿菌) 문(Bacteroidetes)에 속하는 세균의 점유율을 높이는 장내 균총 조절 기능을 통하여 숙주의 체중 증가를 제한하고, 염증을 억제하며 지방 세포의 갈색화를 촉진하는 등의 지질 대사 개선 효과를 나타내는 것으로 보고되었다.

[0004] 이러한 비만 예방 및 치료 효과와 관련된 프로바이오틱스 유산균과 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-1494279호에는 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락티플란티바실루스 플란타룸 KY1032 균주(기탁 번호: KCCM-10430)가 개시되어 있고, 대한민국 등록 특허 제 10-0996577호에는 비만 억제 효능을 갖는 락토바실루스 커베터스 HY7601(기탁 번호: KCTC 11456BP)가 개시되어 있으며, 대한민국 등록특허 제10-1394348호에는 지방 세포 분화 억제 효능을 갖는 락티플란티바실루스 플란타룸 DSR920 균주(기탁 번호: KCCM 11210P)가 개시되어 있으나, 그 효과가 상업적으로 성공할 만큼의 수준에 이르지 못하고 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0005] (특허문헌 0001) 등록 특허 공보 제 1494279호

**비특허문헌**

[0006] (비특허문헌 0001) 나가오카 外, Liver Research 통권 4(2020), 94-100쪽

(비특허문헌 0002) <The metabolite, alpha-ketoglutarate inhibits non-alcoholic fatty liver disease progression by targeting lipid metabolism>

(비특허문헌 0003) 셸턴 外, Cell Host & Microbe 통권 31(2023), 1604-1619쪽

(비특허문헌 0004) <An early-life microbiota metabolite protects against obesity by regulating intestinal lipid metabolism>

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명의 기술적 과제는 대사 질환의 예방과 치료 효과가 우수한 새로운 유산균 균주를 개발하는데 있다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 일 측면은, 락티플란티바실루스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*) 균주 GBCC\_F0227(기탁 번호: KCTC 15450BP)을 제공한다.

[0009] 본 발명의 다른 측면은, 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 이의 배양물을 유효 성분으로 포함하는 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 측면은, 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 이의 배양물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 하나의 또 다른 측면에서는 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 이의 배양물을 포함하는 건강 기능 식품을 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 측면은, 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 이의 배양물을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 다른 또 하나의 측면에서는 락티플란티바실루스 플란타룸 종의 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물과 상기 균주의 무세포 배양 상등액 중에서 선택하는 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는 조성물로서, 숙주의 GLP-1 분비를 증가시키거나 식욕을 억제하는 대사 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0014] 본 발명의 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP)는 숙주의 GLP-1 분비 자극에 효과가 있는 대사 산물을 세포외로 다량 분비할 수 있는 등 GLP-1 분비 자극 효능이 우수하며, 나아가 DPP-4 효소 활성을 효과적으로 억제할 수 있고, GLP-1 수용체의 발현도 촉진할 수 있기 때문에 GLP-1 작용에 따른 유리한 효과를 배가할 수 있다. 본 발명의 GBCC\_F0227균주는 지방 대사 개선에 효과가 있다. 특히 간 등의 내장 지방 조직에서 비만에 동반할 수 있는 백색 지방 축적을 저감하고 아디포넥틴 분비를 회복시키는 효과가 있으며, CD36, PPAR $\gamma$  등 내장 중성지방 축적에 기여하는 유전자 발현도 억제할 수 있다. 이 때문에 GBCC\_F0227 균주와 이를 포함하는 조성물은 지방간, 비알콜성 지방간 질환의 예방과 치료에 기여할 수 있다. 또한 본 발명의 GBCC\_F0227 균주는 또한 우수한 혈당 개선 효과를 나타내며, 특히 공복 혈당 수치를 감소시킬 수 있기 때문에 내당능을 개선하고 인슐린 감수성을 증가시켜 인슐린 저항성을 효과적으로 개선시킬 수 있다. 나아가 본 발명의 GBCC\_F0227 균주는 식이성 비만에 동반하는 혈중 중성지방과 혈중 콜레스테롤의 증가를 막아 주는 효능을 지닌다. 아울러 본 발명의 GBCC\_F0227 균주는 체중 증가를 억제하는 대사 산물을 다량으로 분비할 수 있고, GLP-1 분비 향상 효과에 더하여 비만 조건 하에서 식욕을 억제하는데 기여하는 GLP-1 수용체, POMC와 CART 유전

자의 발현도 촉진할 수 있기 때문에 체중 증가를 억제하고 체지방 구성을 개선하는 항비만 효과가 우수하다. 따라서 본 발명의 GBCC\_F0227 균주와 이를 포함하는 조성물은 비만, 대사 증후군 등 대사 질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0015]

도 1a는 발효 식품에서 분리한 유산균 균주들 중 락티플란티바실루스 플란타룸 종 균주에 관하여 그 배양 상등액이 NCI-H716 세포주의 GLP-1 분비를 자극하는 정도를 평가하는 그래프이다. 그래프에서 NS는 NCI-H716 세포주에 아무런 시료를 가하지 않은 경우, MRS는 유산균 균주를 배양하지 않은 무처리 배양을 가한 실험을 나타낸다.

도 1b는 발효 식품에서 분리한 유산균 균주들 중 락티플란티바실루스 파라카세이 종 균주에 관하여 그 배양 상등액이 NCI-H716 세포주의 GLP-1 분비를 자극하는 정도를 평가하는 그래프이다. 그래프에서 NS는 NCI-H716 세포주에 아무런 시료를 가하지 않은 경우, MRS는 유산균 균주를 배양하지 않은 무처리 배양을 가한 실험을 나타낸다.

도 1c는 발효 식품에서 분리한 유산균 균주들 중 락티플란티바실루스 코리니포르미스 종 균주에 관하여 그 배양 상등액이 NCI-H716 세포주의 GLP-1 분비를 자극하는 정도를 평가하는 그래프이다. 그래프에서 NS는 NCI-H716 세포주에 아무런 시료를 가하지 않은 경우, MRS는 유산균 균주를 배양하지 않은 무처리 배양을 가한 실험을 나타낸다.

도 1d는 발효 식품에서 분리한 유산균 균주들 중 락티플란티바실루스 사케이 종 균주에 관하여 그 배양 상등액이 NCI-H716 세포주의 GLP-1 분비를 자극하는 정도를 평가하는 그래프이다. 그래프에서 NS는 NCI-H716 세포주에 아무런 시료를 가하지 않은 경우, MRS는 유산균 균주를 배양하지 않은 무처리 배양을 가한 실험을 나타낸다.

도 1e는 발효 식품에서 분리한 유산균 균주들 중 락티플란티바실루스 퍼멘툼 종 균주에 관하여 그 배양 상등액이 NCI-H716 세포주의 GLP-1 분비를 자극하는 정도를 평가하는 그래프이다. 그래프에서 NS는 NCI-H716 세포주에 아무런 시료를 가하지 않은 경우, MRS는 유산균 균주를 배양하지 않은 무처리 배양을 가한 실험을 나타낸다.

도 1f는 분리한 유산균 균주들 중에서 전술한 종들이 아닌, 구 분류의 락토바실루스 속 다른 균주들인 기타 분리 균주에 관하여 그 배양 상등액이 NCI-H716 세포주의 GLP-1 분비를 자극하는 정도를 평가하는 그래프이다. 그래프에서 NS는 NCI-H716 세포주에 아무런 시료를 가하지 않은 경우, MRS는 유산균 균주를 배양하지 않은 무처리 배양을 가한 실험을 나타낸다.

도 1h는 GBCC\_F0227 유전체 서열을 다른 락티플란티바실루스 플란타룸 균주들의 유전체와 락티플란티바실루스 아르켄토라텐시스(*Lactiplantibacillus argentoratensis*) 유전체 서열과 비교하여 작성한 유전 계통도이다.

도 1g는 발효 식품에서 분리한 유산균 균주들 중 비피도박테리움 속의 균주들에 관하여 그 배양 상등액이 NCI-H716 세포주의 GLP-1 분비를 자극하는 정도를 평가하는 그래프이다. 그래프에서 NS는 NCI-H716 세포주에 아무런 시료를 가하지 않은 경우, MRS는 유산균 균주를 배양하지 않은 무처리 배양을 가한 실험을 나타낸다.

도 2a는 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주의 GLP-1 분비 자극 효능이 이 균주에 특이적인지 여부를 살펴 보기 위하여 동종의 공지 분양 균주와 발효 식품으로부터 얻은 동종의 다른 분리 균주들과 GLP-1 분비 자극 효능을 비교한 그래프이다. 그래프에서 NS는 NCI-H716 세포주에 아무런 시료를 가하지 않은 경우, MRS는 유산균 균주를 배양하지 않은 무처리 배양을 가한 실험을 나타낸다.

도 2b는 GBCC\_F0227을 비롯한 락티플란티바실루스 플란타룸 분리 균주들의 GLP-1 분비 자극 효능을 공지 플란타룸 균주인 GB104와 비교한 그래프이다.

도 3은 마우스 내에서 GBCC\_F0227 균주 투여와 혈중 GLP-1 농도 사이의 관계를 나타내는 그래프이다.

도 4a는 선별한 락티플란티바실루스 플란타룸 균주들의 DPP-4 효소 활성 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 선별한 락티플란티바실루스 플란타룸 균주들의 DPP-4 효소 활성 억제 효과를 공지의 락티플란티바실루스 플란타룸 균주와 비교한 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4c는 GBCC\_F0227 균주와 락티플란티바실루스 속 다른 종의 균주들의 DPP-4 효소 활성 억제 효과를 비교한 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 선별 분리 균주별로 GLP-1 분비 자극 활성과 DPP-4 활성 억제 효능 사이의 상관 관계를 나타

낸 그래프이다.

도 6a는 GBCC\_F0227 균주가 고지방 식이 마우스에서 체중 증가를 억제하는 정도를 나타내는 그래프이다.

도 6b는 GBCC\_F0227 균주를 투여하면 고지방 식이 비만 유도 마우스에서 체지방과 제지방 조성이 어떻게 달라지는지를 나타내는 그래프이다.

도 7a는 GBCC\_F0227 균주를 투여한 마우스에서 경구 포도당 부하 시험이고, 도 7b는 공복 혈당 측정치를 나타내며, 도 7c는 혈당과 시간 사이 그래프의 그래프하 면적 값을 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 *L. platanrum* 균주(F0227로 표시)와 다른 유산균 균주들(*L. platanrum* 균주들(GBCC\_F0053(F0053으로 표시), GBCC\_F0058(F0058로 표시), KCTC3108), *Limosilactobacillus fermentum* 균주들(GB102, KCTC3112)과 *Lactobacillus paragasseri* 균주들(H0213, KCTC3163))에 대하여 MRS 배지 배양 후 분비하는 대사 산물들을 정량분석한 결과를 나타낸 표이다.

도 9a는 7종의 유산균 대사 산물이 농도 의존적으로 NCI-H716 세포의 GLP-1 분비를 자극하는 효능을 평가한 생체외(*in vitro*) 실험 결과의 그래프이다.

도 9b는 25 mM 농도 하에서 7종의 유산균 대사 산물이 NCI-H716 세포로 하여금 분비하게 한 GLP-1을 정량한 그래프이다.

도 10a는 8주 동안 매일 정상 식이와 동결 보호제를 투여한 비만 음성 대조군 마우스(G1) 또는 고지방 식이와 동결 보호제를 투여한 비만 양성 대조군 마우스(G2) 또는 고지방 식이와 락토플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227를 병행 투여한 실험군 마우스(G3)에서 간 좌측엽과 부고환 지방의 단편을 관찰한 현미경 사진이다. 축척 막대는 가장 윗줄 사진에서 1000  $\mu\text{m}$ , 아랫줄 사진에서 500  $\mu\text{m}$ , 그 아랫줄 사진에서 100  $\mu\text{m}$ 를 가리킨다.

도 10b는 도 10a의 G1, G2, G3군 마우스에 대하여 간 좌측엽 조직내 지방 세포의 지방 액적의 면적 분율(%) 또는 부고환 지방내 지방 액적의 평균 크기( $\mu\text{m}^2$ )를 나타낸 그래프이다.

도 10c는 도 10a의 G1, G2, G3군 마우스에 대하여 간 좌측엽의 조직 절편을 오일 레드오로 염색한 현미경 사진이다. 사진에서 축척 막대는 100  $\mu\text{m}$ 를 가리킨다.

도 10d는 도 10c의 실험에서 측정된 오일 레드오 염색 강도를 대조군(G1) 염색 결과에 대한 백분율로 하여 나타낸 그래프이다. 그래프에서 \* 표시는 해당 측정값에 대하여 일원 분산 분석(One way-ANOVA Tukey) 검정을 하여 계산한  $p$  값에 대한 유의성을 나타낸다( $p < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$ ,  $p^{***} < 0.001$ ). 도 10e는 GBCC\_F0227 균주가 마우스 모형에서 고지방 식이로 발생하는 혈중 중성지방과 콜레스테롤의 증가를 억제함을 나타내는 그래프이다.

도 11은 락토플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227을 비롯한 프로바이오틱 균주 31가지에 대하여 배양 전과 배양 후의 배양 상등액 중 트리글리세라이드 농도를 측정된 그래프이다.

도 12는 락토플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227을 비롯한 *L. plantarum* 종의 균주 5가지에 대하여 600 nm에서의 흡광도 OD<sub>600</sub>이 3 또는 6에 이를 때까지 배양하여 얻은 상등액 속의 트리글리세라이드 농도를 균주마다 측정된 그래프(도 12a)와 이를 흡광도 값을 중심으로 정리한 그래프(도 12b)이다. 도 12의 그래프에서 \*\*\* 표시는 해당 트리글리세라이드 측정값에 대하여 일원 분산 분석 검정을 하여 계산한  $p$  값이 0.001보다 작다는 것을 가리킨다.

도 13은 락토플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227과 락토플란티바실루스 플란타룸 WCFS1 균주를 600 nm에서의 흡광도 OD<sub>600</sub>이 3(도 13a) 또는 6(도 13b)에 이를 때까지 배양하였을 때  $\alpha/\beta$  가수분해 효소 유전자군 소속 유전자의 상대 발현율을 측정된 그래프이다. 도 13의 그래프에서 \*\* 표시는 해당 유전자 상대 발현율 측정값에 대하여 독립 표본(unpaired) 스튜던트  $t$  검정을 하여 계산한  $p$  값이 0.01보다 작다는 것을 가리키며, \*\*\* 표시는 계산한  $p$  값이 0.001보다 작다는 것을 가리킨다.

도 14는 8주 동안 매일 정상 식이와 동결 보호제를 투여한 비만 음성 대조군 마우스(G1) 또는 고지방 식이와 동결 보호제를 투여한 비만 양성 대조군 마우스(G2) 또는 고지방 식이와 GBCC\_F0227 투여를 병행한 실험군 마우스(G3)의 세 군에서, 혹은 도 14e 내지 도 14g의 경우 고지방 식이와 KCTC 3108 균주를 G3과 같은 양으로 투여한 대조군 마우스(G4)의 네 군에서 지방 대사와 비만에 관련된 유전자의 발현율을 측정된 실험 결과를 나타낸다. 도 14의 그래프에서 \* 표시는 해당 측정값에 대하여 비교 대상 측정값과 일원 분산 분석 검정을 하여 계산한  $p$  값이 0.05보다 작다는 것을, \*\* 표시는  $p$  값이 0.01보다 작다는 것을, \*\*\* 표시는  $p$  값이 0.001보다 작다는 것

을 각각 가리킨다.

도 14a는 마우스 부고환에서 아디포넥틴 유전자, 도 14b는 마우스 부고환에서 렘틴 유전자, 도 14c는 간 좌측엽에서 CD36의 유전자, 도 14d는 간 좌측엽에서 PPAR $\gamma$ 의 유전자, 도 14e는 시상하부에서 GLP-1 수용체 유전자, 도 14f는 시상하부에서 POMC 유전자, 도 14g는 시상하부에서 CART 유전자의 발현을 변화를 각각 나타낸다.

도 15는 8주 동안 매일 정상 식이와 동결 보호제를 투여한 비만 음성 대조군 마우스(G1) 또는 고지방 식이와 동결 보호제를 투여한 비만 양성 대조군 마우스(G2) 또는 고지방 식이와 락토플란티바실루스 플란타륨 GBCC\_F0227 투여를 병행한 실험군 마우스(G3)의 세 군에서 마우스 뒷다리 골격근량의 변화를 나타낸 그래프이다. 도 15의 그래프에서 \* 표시는 해당 측정값에 대하여 비교 대상 측정값과 일원 분산 분석 검정을 하여 계산한  $p$  값이 0.05보다 작다는 것을, \*\* 표시는  $p$  값이 0.01보다 작다는 것을, \*\*\* 표시는  $p$  값이 0.001보다 작다는 것을 각각 가리키며, ns는 통계적으로 유의하지 않은 차이라는 것을 가리킨다. 도 15a는 뒷다리 앞정강근(TA), 도 15b는 장지신근(EDL), 도 15c는 가자미근(Sol1), 도 15d는 비복근(GA)의 근육량을 각각 나타내는 그래프이다.

도 16은 도 15의 8주 급여를 한 마우스에 대하여 악력 측정 시험을 한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 16의 그래프에서 \*\* 표시는 해당 측정값에 대하여 비교 대상 측정값과 일원 분산 분석 검정을 하여 계산한  $p$  값이 0.01보다 작다는 것을, \*\*\* 표시는  $p$  값이 0.001보다 작다는 것을 각각 가리킨다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하 본 발명의 구현예를 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구 범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0017] 따라서 본 명세서에 기재된 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 목적으로 제시한 하나의 예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 모든 기술 용어는 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 기재된 수치는 명시하지 않아도 "약"의 의미를 포함하는 것으로 간주한다. 본 명세서에서 용어 "내지"를 이용하여 표시된 수치 범위는 용어 "내지" 전과 후에 기재되는 수치를 각각 하한 및 상한으로서 포함하는 범위를 포함한다.

[0019] 본 명세서에서 "대사 증후군"이라고 함은 복부 비만, 인슐린 저항성 또는 당 과민증, 죽상경화성 이상지혈증, 프로트롬보틱 상태(prothrombotic state), 전(前)염증 상태 및 고혈압을 포함하는 대사적 위험 요인들에 의해 특징지어지는 병태로서, 성인 치료 패널(Adult Treatment Panel)은 환자가 적어도 하기의 증상들 중 3가지를 나타내면 대사 증후군이라고 정의한다:

[0020] 허리 치수가 남자는 40인치, 여자는 35인치 이상;

[0021] 혈청 트리글리세라이드 수치가 150 mg/dL 이상;

[0022] HDL 콜레스테롤 수치가 남자는 40 mg/dL, 여자는 50 mg/dL 이하;

[0023] 혈압이 135/80 mmHg 이상 및 혈당이 110 mg/dL 이상.

[0024] 미국의 경우 인구의 25% 이상이 대사증후군을 앓고 있는 것으로 추정된다. 대사 증후군의 한가지 원인은 혈액으로부터 당을 흡수하는 인슐린의 능력이 약화된 인슐린 내성이라고 생각된다. 이것은 인슐린을 분비하는 역할을 하는 이자에서 식후에 당수치를 상승시키는 원인이 된다. 만일 치료되지 않은 채로 두면, 대사증후군은 제2형 당뇨병, 심혈관 질환 및 동맥벽의 혈반 축적과 관련된 다른 질병의 위험도를 현저히 증가시킨다.

[0025] 본 명세서에서 "당뇨병"이라고 함은 포도당-비관용성(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성 질환이다. 상기 당뇨병은 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 및 유전성 당뇨병일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 제1형 당뇨병은 인슐린 의존성 당뇨병으로서, 주로  $\beta$ -세포의 파괴에 의해 초래된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "제2형 당뇨병"은 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 인슐린 저항성에 의해 초래된다. 근육과 지방조직에서 인슐린의 증가를 감지하지 못하거나 감지하더라도

인슐린의 작용이 효과적으로 일어나지 않아 발병한다.

- [0026] 본 명세서에서 "인슐린 저항성"이라고 함은 혈당을 낮추는 인슐린에 대해 개체의 대사계가 반응하지 않아 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 상태를 의미한다. 인슐린 저항성이 높을 경우, 적절한 인슐린 반응성을 갖추었을 때보다 과다한 양으로 인슐린을 생산하게 되고, 이로 인해 고인슐린혈증, 고혈압 또는 이상지방혈증 등을 비롯하여 심장병, 당뇨병 등을 일으킨다.
- [0027] 본 명세서에서 "인슐린 저항성 증후군"이라고 함은 전술한 인슐린 저항성에 의하여 유발된 질환을 총칭한다. 인슐린 저항성 증후군은 인슐린 작용에 대한 세포의 저항성, 고인슐린혈증 및 초저밀도 지단백(very low density lipoprotein, VLDL)과 중성지방의 증가, 고밀도 지단백(high density lipoprotein, HDL)의 감소 및 고혈압 등을 특징으로 하며, 심혈관계 질환과 제2형 당뇨병의 위험 인자로 인식되고 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "배양물"은 유산균을 공지의 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하여, 상기 산물은 유산균을 포함할 수 있다. 상기 배지는 공지의 액체 배지 또는 고체 지배에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 MRS 액체 배지, GAM 액체 배지, MRS 한천 배지, GAM 한천 배지, BL 한천 배지일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 "무세포 배양 상등액"이란 유산균 균주를 일정 기간 배양하여 얻는 배양물로부터 균체를 제거한 액상의 혼합물로서, 균주의 배양 과정에서 나온 대사 산물, 여분의 영양분 등을 포함하는 액상의 혼합물을 일컫는다. 아울러 본 발명에서 "무세포 배양 상등액"에는 이러한 유산균 균주 배양 후 직후 얻은 무세포 배양 상등액의 농축액이나, 그 추출물 또는 그 분획물까지 모두 망라하는 의미이다. 무세포 배양 상등액으로는 배양액을 일정시간 가만히 두어 하층에 가라앉은 부분을 제외한 상층의 액체만을 취한 것, 여과를 통해 균체를 제거한 것, 배양액을 원심분리하여 하부의 침전을 제거하고 상부의 액체만을 취하여 획득한 것 등을 사용할 수 있다. 본 발명에서 용어, "과쇄물"은 유산균을 효소 처리, 균질화 또는 초음파 처리 등으로 파괴된 유산균을 의미한다. 또한, 본 발명에서 용어, "추출물"은 유산균을 공지의 추출 용매로 추출하여 수득한 산물을 의미한다. 또한 본 발명에서 용어, "생균체"는 본 발명의 신규한 유산균 그 자체를 의미하고, "사균체"는 가열, 가압 또는 약물처리 등으로 살균 처리된 유산균을 의미한다.
- [0029] 본 발명에서 용어 "예방"은 본 발명의 약학 조성물을 투여받은 숙주의 질환, 예컨대 대사 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 용어 "치료"는 본 발명의 약학 조성물을 투여받은 숙주의 질환, 예컨대 대사 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0031] 본 발명에서 락티플란티바실루스 플란타룸과 관련한 경우 용어 "분비"는 락티플란티바실루스 플란타룸 균주가 대사 산물이나 신호 전달 물질 등의 물질을 그 세포 밖으로, 예컨대 배지나 숙주 체내로 배출하는 현상을 일컫는다.
- [0032] 본 발명에서 락티플란티바실루스 플란타룸이 세포 외로 물질을 분비하는 맥락 하의 "3-페닐락트산(3-phenyllactic acid)"은 특별히 달리 표시하지 않는 한, 그 해리하지 않은 중성 분자 형태(즉, IUPAC 명칭으로 2-히드록시-3-페닐프로판산(2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid))는 물론 그 해리한 음이온이나 염 형태(즉 2-히드록시-3-페닐프로판산 음이온이나 그 음이온의 염)까지 모두 망라하여 가리키는 범위의 용어이다.
- [0033] 본 발명에서 락티플란티바실루스 플란타룸이 세포 외로 물질을 분비하는 맥락 하의 "α-케토글루타르산(α-ketoglutaric acid)"은 특별히 달리 표시하지 않는 한, 그 해리하지 않은 중성 분자 형태(즉, IUPAC 명칭으로 2-옥소펜탄이산(2-oxopentanedioic acid)은 물론 그 해리한 음이온이나 염 형태(즉 2-옥소펜탄이산 음이온이나 그 음이온의 염)까지 모두 망라하여 가리키는 범위의 용어이다.
- [0034] 본 발명에서 "숙주(host)"란 본 발명에서 개시하는 락티플란티바실루스 플란타룸 균주, 상기 균주의 과쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물 또는 상기 배양물의 추출물을 약학적으로 유효한 양으로 투여받은 사람을 가리킨다.
- [0035] 본 발명에서 락티플란티바실루스 플란타룸이 세포 외로 물질을 분비하는 맥락 하의 "2-히드록시-3-메틸부티르산(2-hydroxy-3-methylbutyric acid)"은 특별히 달리 표시하지 않는 한, 그 해리하지 않은 중성 분자 형태(즉, IUPAC 명칭으로 2-히드록시-3-메틸부탄산의 중성 분자)는 물론 그 해리한 음이온이나 염 형태(즉 2-히드록시-3-메틸부티르산화 음이온이나 그 음이온의 염)까지 모두 망라하여 가리키는 범위의 용어이다.
- [0036] 본 발명의 일 측면에서는 락티플란티바실루스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*) GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP)를 제공한다. 락티플란티바실루스(*Lactiplantibacillus*) 속 세균은 자연계에 널리 분포하는

산소 내성 혐기성 미생물(oxygen-tolerant anaerobe)인 그람 양성 간균으로서 유산균의 일종이다. 락티플란티바실루스 속은 이전에는 명칭이 락토바실루스(*Lactobacillus*)로 널리 알려져 있었다. 락티플란티바실루스 속에 속하는 미생물에는 락티플란티바실루스 플란타룸, 락티플란티바실루스 사케이 등이 있다. 본 발명자들은 GLP-1 분비 자극 활성과 DPP-4 효소 억제 효능이 동시에 우수한 신규한 락티플란티바실루스 플란타룸 균주를 선별하여 이를 "*Lactiplantibacillus plantarum* GBCC\_F0227"로 명명하였다. 상기 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2023년 5월 22일자로 기탁 번호 KCTC 15450BP로 기탁되었다. 또한, 상기 균주는 프로바이오틱스 균주에 해당하며, 인체에 무해하며, 부작용 없이 사용될 수 있다. 본 발명에서 "*Lactiplantibacillus plantarum* GBCC\_F0227" 균주는 *L. plantarum* GBCC\_F0227 또는 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 세균 종의 명칭 없이 간단히 GBCC\_F0227만으로 약칭될 수 있으며, 명세서에 첨부하는 도면과 그래프에서는 F0227이나 f0227와 같이 더 간략히 표시할 수도 있다.

- [0037] 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액에는 숙주에서 에너지 소모를 늘리고 식욕을 억제하는 기능의 글루카곤 유사 펩티드-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)의 분비를 자극하는 효과가 있다.
- [0038] 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액에는 숙주의 글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1) 수용체 유전자의 발현을 촉진하는 효과가 있다. 더욱 구체적으로 본 발명의 GBCC\_F0227 균주에는 식이 유도 비만 조건 하에서 숙주의 GLP-1 수용체 유전자의 발현을 촉진하는 효과가 있다.
- [0039] 디펩티드 펩티드 분해 효소-4(dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 효소는 장내분비 세포(L 세포)에서 분비된 체내 GLP-1을 5분 이내로 분해하는 것으로 알려져 있어, 이 효소를 억제하면 GLP-1의 생체내 유지와 작용에 유익하다. 본 발명의 GBCC\_F0227 균주는 GLP-1 분비를 촉진하고, GLP-1 수용체의 발현을 촉진할 수 있으면서 DPP-4 활성을 억제하는 능력을 갖추었기 때문에 분비된 GLP-1의 파괴를 막고 GLP-1의 활성을 오래 유지하도록 할 수 있어 숙주에 대한 강한 GLP-1 작용 효과를 기대할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액에는 숙주의 식욕 억제성 신경세포를 자극하는 효과가 있다. 더욱 구체적으로, 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액에는 식욕을 억제하는 작용을 할 수 있는 유전자, 특히 프로오피오멜라노코르틴(POMC) 유전자와 CART(cocaine- and amphetamine-regulated transcript) 유전자의 발현을 식이 유도 비만 조건 하에서 향상시키는 효과가 있다.
- [0041] 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액에는 식이 유도 비만 조건 하에서 간의 지방 축적에 대하여 보호 효과가 있는 아디포넥틴 유전자의 발현을 촉진하는 효과가 있다. 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액에는 아울러 식이 유도 비만 조건 하에서 내장 중성지방 축적에 기여하는 유전자인 CD36과 PPAR  $\gamma$ 의 발현을 억제하는 효과가 있다.
- [0042] 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액에는 숙주의 혈중 중성지방을 경감하는 효과가 있다. 더욱 구체적으로 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액에는 식이 유도 비만 조건 하에서 발생하는 숙주의 혈중 중성지방 상승을 경감하는 효과가 있다.
- [0043] 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액에는 숙주의 내장지방 축적을 경감하는 효과가 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 GBCC\_F0227 균주는 고지방 식이로 발생하는 백색 내장지방에서 지방 축적을 억제할 수 있다. 더욱 구체적으로 본 발명의 GBCC\_F0227 균주는 고지방 식이에 의한 백색 내장지방 조직에서 지방 분획의 분율과 크기 증가를 억제할 수 있다. 가장 구체적으로 GBCC\_F0227 균주는 간의 지방 축적, 특히 백색 지방 축적을 억제할 수 있어서, 지방간, 비알콜성 지방간 질환의 예방과 치료에 기여할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 균주는 혈당 수치를 감소시킬 수 있다. 바람직하게는 공복 혈당 수치를 감

소시키고, 내당능을 개선시킬 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서 고지방식을 섭취시킨 마우스 모델에 상기 균주를 경구투여한 결과, 상기 마우스 모델의 공복 혈당 및 포도당 투여 후 혈당 수치가 감소되었다. 반면, 고지방식을 섭취시킨 마우스 모델에 일반 유산균을 경구 투여한 경우, 상기 마우스 모델의 공복 혈당 및 포도당 투여 후 혈당 수치가 감소하지 않았다. 이를 통해, 상기 균주가 공복 혈당 수치를 감소시키고, 내당능을 개선시키는 것을 확인하였다(도 7a 내지 도 7c). 이러한 효과는 인슐린 저항성 개선으로 이어질 수 있다.

[0045] 본 발명의 GBCC\_F0227 균주에는 비만에 동반하는 숙주의 골격근 감소를 경감하는 효과가 있다. 특히 본 발명의 GBCC\_F0227 균주에는 비만에 동반하는 숙주의 골격근 근육량 감소 및/또는 골격근 근력 감소를 경감하는 효과가 있다.

[0046] 본 발명의 GBCC\_F0227 균주에는 지방 대사와 장내 균총을 조절하여 제 2형 당뇨병 예방에 도움이 될 수 있고, 체중 증가를 억제하는 기능이 있는 대사 산물인  $\alpha$ -케토글루타르산과 3-페닐락트산(3-phenyllactic acid)을 세포 외로 다량으로, 예컨대 락티플란티바실루스 플란타룸 표준 균주(type strain)보다 같은 조건의 배양 하에서 더 많은 양으로 분비하는 유리한 효과가 있다. 한 실시 형태에서 본 발명의 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주는 MRS배지에서 배양시 락티플란티바실루스 플란타룸 표준 균주인 KCTC 3108보다  $\alpha$ -케토글루타르산과 3-페닐락트산을 1.5배~2.5배 더 분비한다. 한 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주는 MRS 배지 속에서 12~16시간 배양하였을 때  $\alpha$ -케토글루타르산과 3-페닐락트산의 분비량이 동일한 조건으로 접종하고 배양한 락티플란티바실루스 플란타룸 KCTC 3108 균주의 해당 분비량과 비교하여 양자 각각이 1.5 내지 2.5배 범위에 있다. 더욱 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주는 600 nm 흡광도가 0.01 내지 0.02가 되는 양으로 MRS 배지에 접종하고 16시간 배양하였을 때  $\alpha$ -케토글루타르산과 3-페닐락트산의 분비량이 동일한 조건으로 접종하고 배양한 락티플란티바실루스 플란타룸 KCTC 3108 균주의 해당 분비량과 비교하여 양자 모두 1.5 내지 2.5배 범위에 있다. 가장 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주는 600 nm 흡광도가 0.01 내지 0.02가 되는 양으로 MRS 배지에 접종하고 16시간 배양하였을 때  $\alpha$ -케토글루타르산과 3-페닐락트산의 분비량이 동일한 조건으로 접종하고 배양한 락티플란티바실루스 플란타룸 KCTC 3108 균주의 해당 분비량과 비교하여 양자 모두 1.95 내지 2.05배 범위에 있다. 더욱 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주는 전술한 분비 특징에 더하여, 600 nm 흡광도가 0.01 내지 0.02가 되는 양으로 MRS 배지에 접종하고 16시간 배양하였을 때 2-히드록시-3-메틸부티르산의 분비량이 동일한 조건으로 접종하고 배양한 락티플란티바실루스 플란타룸 KCTC 3108 균주의 해당 분비량과 비교하여 2.0 내지 3.0배 범위에 있다.

[0047] 본 발명의 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 숙주의 체중 증가 억제, 숙주의 체지방 감소와 숙주의 식욕 억제 중 어느 하나 이상의 효과를 지닌다.

[0048] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 GBCC\_F0227 균주는 자연적으로 발생하는 락티플란티바실루스 플란타룸의 돌연변이를 포함하는 락티플란티바실루스 플란타룸 균주이다.

[0049] 본 발명의 다른 측면에서는 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액 중에서 선택하는 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0050] 본 발명의 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에서 대사 질환은 비만, 비만성 식욕 억제, 대사 증후군, 고혈압, 동맥경화증, 고지혈증, 지방간, 비알콜성 지방간 질환, 고인슐린혈증, 당뇨병, 내당능 장애, 고콜레스테롤증, 고중성지방혈증, 심혈관 질환 및 인슐린 저항성 증후군 중의 어느 하나이다. 더욱 구체적으로 대사 질환은 비만, 비만성 식욕 억제, 대사 증후군, 당뇨병, 내당능 장애, 비알콜성 지방간 질환, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증 및 인슐린 저항성 증후군 중의 어느 하나이다. 가장 구체적인 실시 형태에서 대사 질환은 비만, 대사 증후군 내당능 장애 또는 당뇨병이다.

[0051] 상기 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP)는 상술한 바와 동일하다. 이때, 상기 균주는 생균 또는 사균일 수 있으며, 바람직하게는 생균일 수 있다. 또한, 상기 균주의 배양물은 균주가 포함되거나 포함되지 않은 것일 수 있으며, 바람직하게는 포함된 것일 수 있다.

[0052] 한 실시 형태에서 본 발명의 GBCC\_F0227 균주는 *recA* 유전자 서열이 서열번호 2에 기재한 서열을 포함한다.

[0053] 본 발명의 약학 조성물은 유효 성분 외에 보존제, 염료, 유화제, 감미료, 안정화제, 향미 증진제, 향미제 및 산

미제로 이루어진 균에서 선택하는 한 종 이상의 첨가제를 더 포함할 수 있다.

- [0054] 본 발명의 약학 조성물은 적어도 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 동결 건조제를 더 포함할 수 있다.
- [0055] "약학적으로 허용 가능한"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 극심한 위장 장애, 현기증, 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다.
- [0056] 본 발명에 따른 약학 조성물은 신규한 유산균 이외에 적어도 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 부형제로는 락토오스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아르산마그네슘 및 팜물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 동결보호제 등을 사용하여 조제될 수 있다.
- [0057] 예를 들어, 수크로스, 말토오스, 말토덱스트린, 트레할로스, 만니톨, 소르비톨, 이눌린, 글리세롤, DMSO, 에틸렌글리콜, 프로필렌 글리콜, 2-메틸-2,4-펜탄디올, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알코올, 폴리글리세롤, 탈지유, 우유 단백질, 유청 단백질, 베타인, 아도니톨, 락토오스 또는 이의 어떤 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 동결 보호제가 이용될 수 있다.
- [0058] 바람직하게, 동결 보호제로 수크로스, 탈지유 및 소르비톨로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 보다 바람직하게, 수크로스, 탈지유 및 소르비톨을 포함할 수 있으며, 구체적으로 조성물 총 중량에 대하여 수크로스 2 내지 20 중량 %, 소르비톨 2 내지 20 중량 % 및 탈지유 5 내지 30 중량 %를 포함할 수 있다. 동결 보호제의 첨가에 의하여 동결건조된 유산균은 현저히 증가한 생존율, 저장안정성, 내산성 및 내담즙성을 나타낼 수 있다. 또한, 동결 건조시킨 본 발명에 따른 조성물에, 리보플라빈(riboflavin), 인산리보플라빈(riboflavin phosphate) 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염, 글루타티온(glutathion), 아스코르브산염(ascorbate) 및 시스테인과 같은 항산화제의 첨가는 보관 동안 균주의 생존율을 더 증가시킬 수 있다.
- [0059] 본 발명의 조성물이 경구 투여를 위한 고형 제제로 제제화된 경우 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형 제제는 유효 성분은 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스 또는 젤라틴 등을 포함할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아르산마그네슘, 활석 같은 윤활제 등을 포함할 수 있으나 이에 국한되지 않는다.
- [0060] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이어야 한다. "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 신경계 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 제제화 방법, 환자의 상태 및 체중, 환자의 성별, 연령, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간, 배설 속도, 반응 감응성 등과 같은 요인들에 따라 당업자에 의해 다양하게 선택될 수 있다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 처리의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.001 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg/kg으로 투여할 수 있다.
- [0061] 상기와 같이 투여제를 투여할 경우, 본 발명의 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주를 1일  $1 \times 10^3$  콜로니 형성 단위(CFU)/g 내지  $1 \times 10^{16}$  CFU/g으로 투여할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 균주를  $10^3$  내지  $10^{16}$  CFU/g,  $10^3$  내지  $10^{15}$  CFU/g,  $10^3$  내지  $10^{14}$  CFU/g,  $10^3$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^3$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{16}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{15}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{14}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{16}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{15}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{14}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^6$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^6$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^7$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^7$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^8$  내지  $10^{13}$  CFU/g 또는  $10^8$  내지  $10^{12}$  CFU/g의 투여량으로 투여할 수 있다. 하루 투여 분량은 한번에 투여할 수도 있고, 수회로 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명의 조성물이 경구 투여를 위한 액상 제제로 제제화된 경우 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등을 포함하며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제,

방향제, 보존제, 등을 포함할 수 있으나 이에 국한되지 않는다. 본 발명의 조성물이 비경구 투여를 위한 제제로 제제화된 경우 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 좌제를 포함할 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 포함할 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 좌제의 기재로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로포 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분인 신구한 유산균 등의 함량은 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총중량을 기준으로 0.01 내지 99 중량%, 구체적으로 0.1 내지 75 중량%, 보다 구체적으로 0.5 내지 50 중량%일 수 있다. 본 발명에서 이용되는 동결보호제는 동결건조 동안 프로바이오틱 제형을 보존하고, 품질 수명(shelf-life)을 향상시키기 위해 이용된다. 본 발명에서 사용된 동결 보호제는 일반적인 당류를 포함할 수 있다. 당류는 단당류, 이당류, 올리고당류, 다당류 또는 적어도 2 개 이상의 당류의 혼합물일 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 약학 조성물은 사람과 포유동물 및 가축, 구체적으로 원숭이, 마우스, 랫트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등에 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있으나 경구 투여가 바람직하다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제 등이 포함될 수 있다.

[0064] 본 발명의 약학 조성물은 특히, 경구용 단위 제형으로서 장용 피복된 장용성 제제로서 제공될 수 있다. 본 명세서에서의 "장용 피복"은 위산에 의해서는 분해되지 아니하여 피복이 유지되나, 소장에서는 충분히 분해되어 활성 성분이 소장내에 방출될 수 있도록 하는, 약제학상 허용 가능한 모든 종류의 공지의 피복을 포함한다. 본 발명의 "장용 피복"은 pH 1의 HCl 용액과 같은 인공 위액을 36° C 내지 38° C에서 접촉시킬 때, 2시간 이상 동안 그대로 유지되며, 바람직하게는 이후에 pH 6.8의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 완충 용액과 같은 인공 장액에서 30분 이내에 분해되는 피복을 지칭한다.

[0065] 본 발명의 약학 조성물의 한 실시 형태에 있어서, 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 α-케토글루타르산, 3-페닐락트산, 시스타티오닌, 1-모노팜피틴, 모노스테아르산글리세롤과 2-히드록시-3-메틸부티르산으로 이루어지는 군에서 선택하는 어느 하나 이상을 함유한다.

[0066] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 DPP-4 효소 활성을 억제하는 효과가 있다.

[0067] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 숙주의 GLP-1 분비를 자극하는 효과가 있다. 이러한 본 발명의 약학적 조성물에는 DPP-4 효소 활성을 억제하는 효과가 있다.

[0068] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 숙주의 GLP-1 수용체 발현을 촉진하는 효과가 있다. 이러한 본 발명의 약학적 조성물에는 DPP-4 효소 활성을 억제하는 효과가 있다.

[0069] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 비만에 동반하는 숙주의 골격근 감소를 경감하는 효과가 있다.

[0070] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 숙주의 내장 지방 축적을 경감하는 효과가 있다. 특히 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 숙주의 간 지방 축적을 경감하는 효과가 있다.

[0071] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 GBCC\_F0227 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 숙주의 혈중 중성지방을 경감하는 효과가 있다.

[0072] 본 발명의 다른 또 하나의 측면에서는 락티플란티바실루스 플란타룸 종의 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주

의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물과 상기 균주의 무세포 배양 상등액 중에서 선택하는 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는 조성물로서, 숙주의 GLP-1 분비를 증가시키거나 식욕을 억제하는 대사 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0073] 상기 대사 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물의 한 실시 형태에서 상기 락티플란티바실루스 플란타룸 종의 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액은 숙주의 체중 증가 억제, 숙주의 체지방 감소와 숙주의 식욕 억제 중 어느 하나 이상의 효과를 나타낸다.

[0074] 상기 대사 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물의 한 구체적인 실시 형태에서 상기 락티플란티바실루스 플란타룸 종의 균주로는 그 유전체의 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227(기탁 번호: KCTC 15450BP)의 유전체에 대한 평균 뉴클레오타이드 동일성(average nucleotide identity, ANI)이 69% 이상 내지 100% 미만 범위에 있는 균주를 사용할 수 있다. 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 유전체에 대한 유전체의 ANI 값이 69% 이상 내지 100% 미만인 락티플란티바실루스 플란타룸 종 균주는 숙주 GLP-1 분비를 GBCC-F0227과 유사한 수준으로 유도할 수 있어서 숙주의 GLP-1 작용 강화에 유리하다. 상기 대사 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물의 더 구체적인 실시 형태에서는 상기 락티플란티바실루스 플란타룸 종의 균주가 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 유전체에 대하여 69% 이상 100% 미만의 ANI 범위의 유전체를 보유한 균주이며, 이 락티플란티바실루스 플란타룸 종의 균주, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 균주의 무세포 배양 상등액이  $\alpha$ -케토글루타르산, 3-페닐락트산, 시스타티오닌, 1-모노팔미틴, 모노스테아르산글리세롤과 2-히드록시-3-메틸부티르산으로 이루어지는 군에서 선택하는 어느 하나 이상을 함유한다.

[0075] 본 발명의 또 다른 측면에서는, 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 이의 배양물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 상기 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227은 상술한 바와 동일하다. 상기 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강 식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives)등의 모든 형태를 포함하여, 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에서 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 아울러 본 발명에서 "식품 조성물"은 전술한 식품 조성물의 예로 든 식품 자체뿐만 아니라, 이러한 식품에 첨가되는 "식품 첨가제" 또는 "식품 첨가제 조성물"까지 망라하는 의미로 사용된다. 상기 균주를 식품 첨가물로 사용할 경우, 균주를 그대로 첨가하거나 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 제조 시에 상기 균주를 포함하는 원료 조성물 중 0.0001 중량% 내지 1 중량%, 구체적으로는 0.001 중량% 내지 0.1 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 대사 질환의 예방 또는 억제 용도일 수 있다.

[0076] 본 발명의 다른 또 하나의 측면에서는 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP), 상기 균주의 파쇄물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 사균체, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 무세포 배양 상등액 중에서 선택하는 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는 건강 기능 식품을 제공한다. 상기 건강 기능 식품은 비만 예방 또는 개선용 건강 기능 식품일 수 있다.

[0077] 본 명세서에서 "건강 기능 식품"이란 건강 보조의 목적으로 특정 성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어 있는 특정 성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체 방어, 생체 리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 질병의 예방 또는 건강의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있는 것을 말한다.

[0078] 본 발명에 따른 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주를 건강 기능 식품으로 사용하는 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 이는 필요에 따라 선택하여 적절하게 사용될 수 있다. 또한, 첨가되는 GBCC\_F0227 균주의 혼합량은 그 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주를 포함하는 건강 기능 식품의 제형은 특별히 제한되지 않으며, 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다. 이러한 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각

종 스프, 음료 수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 망라한다.

[0079] 전술한 바와 같이, 상기 식품 조성물의 GBCC\_F0227 균주 또는 그 배양물에 사용되는 GBCC\_F0227 균주는 MRS 배지 속에서 12~16시간 배양하였을 때  $\alpha$ -케토글루타르산과 3-페닐락트산의 분비량이 동일한 조건으로 접종하고 배양한 락티플란티바실루스 플란타룸 KCTC 3108 균주의 해당 분비량과 비교하여 양자 각각이 1.5 내지 2.5배 범위에 있는 균주이다. 더욱 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 식품 조성물의 GBCC\_F0227 균주 또는 그 배양물에 사용되는 GBCC\_F0227 균주는 600 nm 흡광도가 0.01 내지 0.02가 되는 양으로 MRS 배지에 접종하고 16시간 배양하였을 때  $\alpha$ -케토글루타르산과 3-페닐락트산의 분비량이 동일한 조건으로 접종하고 배양한 락티플란티바실루스 플란타룸 KCTC 3108 균주의 해당 분비량과 비교하여 양자 모두 1.5 내지 2.5배 범위에 있는 균주이다. 가장 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 식품 조성물의 GBCC\_F0227 균주 또는 그 배양물에 사용되는 GBCC\_F0227 균주는 600 nm 흡광도가 0.01 내지 0.02가 되는 양으로 MRS 배지에 접종하고 16시간 배양하였을 때  $\alpha$ -케토글루타르산과 3-페닐락트산의 분비량이 동일한 조건으로 접종하고 배양한 락티플란티바실루스 플란타룸 KCTC 3108 균주의 해당 분비량과 비교하여 양자 모두 1.95 내지 2.05배 범위에 있는 것이다. 더욱 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 식품 조성물의 GBCC\_F0227 균주 또는 그 배양물에 사용되는 GBCC\_F0227 균주는 전술한 분비 특징에 더하여, 600 nm 흡광도가 0.01 내지 0.02가 되는 양으로 MRS 배지에 접종하고 16시간 배양하였을 때 2-히드록시-3-메틸부티르산의 분비량이 동일한 조건으로 접종하고 배양한 락티플란티바실루스 플란타룸 KCTC 3108 균주의 해당 분비량과 비교하여 2.0 내지 3.0배 범위에 있는 것이다.

[0080] 본 발명의 또 다른 측면은, 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 이의 배양물을 포함하는 사료 조성물을 제공한다. 상기 락티플란티바실루스 플란타룸 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP)는 상술한 바와 동일하다. 본 발명에 있어서, 사료 조성물은 사료 그 자체 외에 사료 첨가제(사료 첨가제 조성물)까지 망라하는 의미이다. 상기 대사질환의 예방 또는 개선을 위한 사료 조성물은 당업계에 공지된 다양한 사료 제조 방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 GBCC\_F0227 균주를 첨가하여 제조 가능하다. 본 발명의 사료 조성물은 가축의 대사 질환의 예방 또는 억제 용도일 수 있다.

[0081] 본 발명의 또 다른 측면은, 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 이의 배양물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대사 질환을 예방 및 치료하는 방법을 제공한다. 상기 개체는 대사 질환을 가지고 있는 개체일 수 있다. 또한 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 이때, 상기 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP)는 상술한 바와 동일하다. 또한, 상기 균주 또는 이의 배양물의 투여 경로, 투여량 및 투여 횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의 투여 방법, 투여량 및 투여 횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 대사 질환의 종류는 상술한 바와 같다.

[0082] 본 발명의 또 다른 측면에서는 락티플란티바실루스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*) GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP) 또는 이의 배양물의 대사 질환 치료 용도를 제공한다. 이때, 상기 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주(기탁 번호: KCTC 15450BP)는 상술한 바와 동일하다. 또한, 대사 질환의 종류는 상술한 바와 같다.

[0083] **[실시예]**

[0084] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다. 본 실시예에 대하여 다양한 변경 및 수정을 할 수 있으며 이러한 변경 및 수정 역시 첨부하는 특허 청구 범위에 속한다.

[0085] 제조예: 균원으로부터 유산균주의 분리와 동정

[0086] 인체 분변 시료와 발효 식품으로부터 후보 유산균 균주들을 선별하였다. 균원으로 사용한 발효 식품은 독일식 양배추 절임인 자우어크라우트, 배추 김치, 과김치, 열무 김치, 열갈이 배추 김치와 백김치이었다. 담근 뒤 소정의 시간이 지난 자우어크라우트(9일, 12일과 13일째), 배추 김치(3일째), 열무 김치(1일, 2일, 10일, 23일째), 백김치(5일째), 열갈이 배추 김치(3일째)로부터 시료를 채취하였다. 인체 분변과 발효 식품에서 채취한 시료를 인산 완충액(PBS) 속에서 분쇄한 다음 연속으로 십분의 일씩 단계 회석하여 유산균 배양 배지인 MRS(deMan, Rogosa, Sharpe) 평판 배지에 도말하였다. 이러한 배지들을 이들 이상 37° C 혐기 체임버 내에서 배양하여 세균의 집락(콜로니)을 관찰하였으며, 이로부터 순수 분리를 위해 단일 집락을 새로운 MRS 평판 배지에

계대 배양을 하였다. 순수 분리한 균주는 16S rRNA 유전자의 PCR 및 시퀀싱 방법을 통해 동정하였다. 균주의 장기 보관을 위하여 지수 성장기 말기에 도달한 배양액에 글리세롤 30%(v/v)를 첨가하여 -70° C 초저온 냉동고에 보관하였다. 순수 분리 및 동정 이후의 배양도 MRS 평판 배지 및 액체 배지에서 수행하였다.

[0087] 균주의 동정은 16S rRNA 유전자 및 *recA* 유전자 서열 유사성을 기반으로 진행하였다. 세균 배양체로부터 FastDNA® SPIN Kit for soil (MP Bio, 6560200)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 이 세균의 동정을 위한 유전자 정보를 얻기 위하여 추출한 DNA에 대하여 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 수행하였는데, 16S rDNA PCR에는 순방향 프라이머 27F(5'-AGAGT TTGAT CMTGG CTCAG-3')와 역방향 프라이머 1492R(5'-TACGG YTACC TTGTT ACGAC TT-3')를, *recA* PCR에는 순방향 프라이머 L. p\_*recA*\_F(5'-CTGAT GCACG GAAAG CAGC-3')와 역방향 프라이머 L. p\_*recA*\_R(5'-CGCTT AAATG GYGGY GCMAC C-3')를 이용하였다.

[0088] 이와 같이 얻은 세균 유전 정보를 통하여 균주의 종을 분석한 결과 락티플란티바실루스 속과 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*) 속의 균주를 324주 동정하였다. 구체적으로는 *Lactiplantibacillus plantarum* 205개 균주, *Lactiplantibacillus paracasei* 37개 균주, 락티플란티바실루스 속 기타 균주 45개와 비피도박테리움 속 45개 균주를 분리하였다.

[0089] 이러한 분리 균주(isolate)주들에 대하여 GLP-1 분비 효과와 DPP-4 활성 억제 효과를 측정하여 우수한 균주를 선별하였다.

### 실시예 1

[0090] 글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1) 분비 자극 효과

[0091] 전술한 유산균 분리 균주들 중 장내 GLP-1 분비를 자극시키는 균주를 선별하기 위해 분리 균주의 배양 상등액 (上澄液)에 대한 GLP-1 분비 자극 특성을 평가하였다. 분리 균주 중 114개 균주를 MRS broth 배지에서 24 시간 37° C에서 혐기 배양한 후 원심분리로 균주를 침전시켜 상등액만 취한 뒤 0.22 μm 시린지 필터로 여과하여 세포를 제거한 배양 상등액을 수득하여 실험에 사용하였다.

[0092] GLP-1을 분비한다고 알려진 사람 장내 분비 세포주(enteroendocrine cell-line) 인 NCI-H716 세포주(한국세포주은행(KCLB) 번호 10251)를 96 웰 플레이트 웰 당 세포 4 × 10<sup>4</sup>개로 접종하여 밤새 배양 후, 세포간 GLP-1 분비 수준을 맞추기 위해 0.2% 소혈청 알부민(BSA)이 첨가된 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)으로 3 회 세척하여 배지 성분을 없애고 2시간 배양하였다. 이후 다양한 분리 균주의 배양 상등액을 0.2% BSA가 첨가된 DPBS에 20% v/v 농도로 희석한 뒤 세포에 2 시간 동안 처리하였다. 반응이 끝나고 채취한 상등액에 대하여 GLP-1 ELISA 키트(Human GLP-1 EIA, Raybiotech사)를 이용하여 균주별 GLP-1 농도를 측정하였다.

[0093] 이렇게 분리한 유산균 114주에 대하여 GLP-1 분비 자극 성능을 조사한 결과는 도 1a 내지 도 1g에 나타내었다. 도 1a 내지 도 1g에서 뚜렷이 볼 수 있듯이 유산균 분리 균주들 중 *L. plantarum* 균주의 배양 상등액내 GLP-1 농도(도 1a) *L. paracasei*(도 1b)와 *Bifidobacterium* 속 균주들(도 1g)의 GLP-1 농도보다 월등히 높았다. 그리고 *L. plantarum* 균주 중 자우어크라우트에서 분리한 GBCC\_F0227 균주가 GLP-1 분비 자극 효능이 가장 높다는 것을 확인하였다.

### 실시예 2

[0094] 균주 특이적 GLP-1 분비 자극 효과 비교

[0095] 자우어크라우트에서 분리한 *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주의 장내 GLP-1 분비 자극 효능이 균주에 특이적인지 여부를 확인하기 위해 생물자원센터(KCTC)에서 분양 받은 동종의 *L. plantarum*의 표준 균주(type strain)인 KCTC3108 균주와, 열무김치에서 분리한 *L. plantarum* GBCC\_F0053, 열무 김치에서 분리한 *L. plantarum* GBCC\_F0058 균주의 배양 상등액에 대하여 실시예 1과 동일한 방법으로 GLP-1 분비 자극 효과를 GBCC\_F0227과 비교하였다.

[0096] 도 2a에 나타내었듯이 *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주와 동일한 플란타룸 종의 표준 균주 KCTC3108이나 자우어크라우트가 아닌 다른 균원으로부터 분리된 플란타룸 분리 균주들인 GBCC\_F0053과 GBCC\_F0058은 GBCC\_F0227 수준에 현저하게 못 미치는 GLP-1 분비 자극 효능을 나타내었다. 이로부터 GBCC\_F0227 균주가 지닌 뛰어난 GLP-1 분비 자극 효능은 이 균주에 특이적인 것이며, 플란타룸 종에 공통된 것이 아님을 확인할 수 있었다.

[0097] F0227 균주를 비롯한 플란타룸 종 분리 균주들의 GLP-1 분비 자극 효능을 공지의 플란타룸 균주와 비교하여 보

기 위하여 특허 공개 공보 제 2021-0086540호에 게시된 공지 락티플란티바실루스 플란타룸 균주 GB104(한국생명공학연구원 기탁 번호 KCTC15450BP)와 실시예 1과 동일한 방식으로 비교 실험하였다. 실험 결과는 도 2b에 나타내었다. 시험한 분리 균주들 중 GBCC\_F0227을 포함한 9종의 균주가 공지의 플란타룸 균주 GB104보다 나은 GLP-1 분비 자극 효능을 나타내었다.

### 실시예 3

[0098] F0227의 개체 수준의 GLP-1 분비 자극 효과 비교

[0099] F0227 균주가 개체 수준에서도 GLP-1 분비 자극 효능을 지니는지 평가하였다. C57BL/6 마우스(오리엔트바이오)를 각각 균주 투여 없이 정상 식이를 한 양성 대조군, 균주 투여 없이 지방 구성이 칼로리 중 60%인 고지방 식이를 한 음성 대조군, 고지방 식이와 함께 매일  $5 \times 10^9$  콜로니 형성 단위(CFU)의 GBCC\_F0227 균주를 투여한 실험군의 세 군으로 나누어 8주 동안 실험을 진행한 다음 마우스를 부검하여 혈액 중 GLP-1 농도를 살폈다. 이 때 고지방 식이군 마우스의 경우는 부검 5시간 전에  $5 \times 10^9$  콜로니 형성 단위(CFU)의 *L. plantarum* GBCC\_F0227을 경구 투여 하였다. 혈액은 심채혈을 통해 수득하였고, 획득한 혈액은 GLP-1의 생분해를 방지하기 위해 EDTA가 포함된 collection tube에 500 KIU의 아프로티닌(aprotinin), 1  $\mu$ g/mL의 디프로틴 A(diprotin A)를 미리 넣어 두고, 얼음에 보관한 튜브에 즉시 옮겨 두었다. 수득한 혈액은 원심분리를 진행하여 혈장을 분리하였고, 균주의 GLP-1 농도 증가 효능을 확인하기 위해 GLP-1 ELISA 키트(GLP-1 EIA, Raybiotech사)를 이용하여 혈장 내의 GLP-1 수준을 측정하였다. 그 결과, 고지방 식이와 함께 GBCC\_F0227을 투여한 실험군(도 3의 G3\_F0227)은 양성 대조군(도 3에서 G1\_NCD)과 음성 대조군(도 3에서 G2\_HFD)에 비해 월등한 수준으로 혈중 GLP-1 농도를 증가시킨 것을 확인하였다.

### 실시예 4

[0100] 분리 균주들의 디펩티딜펩티다아제-4(DPP-4) 활성 억제 효과

[0101] DPP-4 효소는 장내분비 세포(L 세포)에서 분비된 체내 GLP-1을 5분 이내로 분해 시키는 것으로 알려져 있어, 이 효소의 억제를 나타내는 경우 GLP-1의 유지와 작용에 유익한 것으로 간주된다. 상기에서 분리된 균주들의 배양 상등액에서 DPP-4 활성 억제능이 있는지 여부를 확인하기 위해 효소 억제능 실험을 다음과 같이 진행하였다. DPP-4 효소의 기질인 Gly-Pro-p-nitroanilide(0.8 mM)를 인산 완충액으로 희석한 유산균 분리 균주의 배양 상등액(5% v/v) 또는 배양액 대조군인 MRS 배지(5%) 속에서 37° C에서 10분간 배양한 후, 여기에 DPP-4 효소(0.001 효소 단위)를 가하여 37° C에서 60분 동안 효소와 기질을 반응시켰다. 아세트산나트륨 완충액(1 M, pH 4.0)을 추가하여 반응을 종결시킨 후 마이크로플레이트 판독기(Microplate reader)를 이용하여 405 nm 파장에서 기질 분해에 따른 흡광도 감소를 측정했다. 분리 유산균 배양 상등액의 DPP-4 효소 억제 정도를 평가하여 비교한 결과를 도 4a에 나타내었다. 도 4a에 나타난 실험에서 락티플란티바실루스 플란타룸 GBCC\_F0227 균주는 DPP-4 효소의 억제능 또한 분리 균주들 중에서 가장 높았다.

[0102] 도 4b는 선별한 락티플란티바실루스 플란타룸 균주들의 DPP-4 활성 억제 효능을 공지 플란타룸 균주인 GB104와 비교한 그래프이다. 도 4b에 나타난 비교 실험은 도 4a와 동일하게 수행하였다. GB104의 DPP-4 활성 억제 효능을 100%로 잡아 상대 비교한 분석에서도 GBCC\_F0227은 117.92%의 억제 효능을 보임으로써 분리 균주들 중에서 가장 높은 억제력을 나타내었다.

[0103] 다른 유산균 종과의 억제 효능 비교

[0104] F0227의 DPP-4 억제 효능을 유산균 분리 균주들 플란타룸이 아닌 종과 공지의 플란타룸 유산균 균주들과 비교하였다. 시험한 균주는 *L. plantarum* GBCC\_F0227를 포함하여, 특허 공개 공보 제 2021-0086537호에서 개시하는 *Limosilactobacillus fermentum*(GB102), 공지의 *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG(LGG), 본 출원인이 식품에서 분리한 *Latilactobacillus curvatus*(GBCC\_F0007), *Ligilactobacillus acidipiscis*(GBCC\_F0023), *Latilactobacillus sakei*(GBCC\_F0025), *Lactiplantibacillus mudanjiangensis*(GBCC\_F0172), *Lacticaseibacillus porcinae*(GBCC\_F0339), *Lentilactobacillus kefir*(GBCC\_F0351), *Loigolactobacillus coryniformis*(GBCC\_F0257), *Schleiferilactobacillus harbinensis*(GBCC\_F0372)를 비교하였다. DPP-4 활성 억제 시험은 모든 균주를 동일한 조건에서 16시간 혐기 배양하여 얻은 배양 상등액을 인산 완충액(PBS)에 5%로 희석하여 전술한 바와 같이 DPP-4 활성 억제 효능을 시험하였다. 도 4b에 나타난 실험 결과, GBCC\_F0227이 약 60%의 절대 활성 억제율로 가장 효과가 좋았으며, LGG는 약 40%, 다른 균주들은 모두 30% 내외의 저해율을 나타내

어 *L. plantarum* GBCC\_F0227의 DPP4 활성 억제 효능이 가장 뛰어난 것을 확인하였다.

[0105] 플란타룸 분리 균주들의 GLP-1 분비 자극과 DPP-4 억제 효능 정리

[0106] 도 5는 GBCC\_F0227과 선별한 다른 플란타룸 분리 균주들의 GLP-1 분비 자극 효능과 DPP-4 활성 억제 효능의 상관 관계를 보여주는 그래프이다. 도 5를 통하여 GBCC\_F0227이 선별한 유산균 분리 균주들 중 GLP-1과 DPP-4를 종합한 효능 평가에서 발군임을 확인하였다.

**실시예 5**

[0107] GBCC\_F0227의 유전자와 유전체 분석

[0108] GBCC\_F0227의 전장 16S rDNA와 *recA* 유전자 서열은 각각 서열번호 1과 서열번호 2의 염기 서열로 나타내었다. GBCC\_F0227는 16S rRNA 서열 기준으로 *Lactiplantibacillus plantarum*을 비롯한 *Lactiplantibacillus* 속의 총 11개의 표준 균주와 98.5% 이상의 서열 유사도를 보임으로써, GBCC\_F0227이 이들 11 종 균주 중 하나에 해당함을 확인하였다. 16S rDNA 유사도 계산 결과는 표 1에 정리하였다.

**표 1**

종 이름	표준 균주명	서열 유사도 (%)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	ATCC 14917(T)	99.86
<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	DSM 16365(T)	99.86
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	DSM 20314(T)	99.79
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	99.58
<i>Lactiplantibacillus daoliensis</i>	116-1A(T)	98.94
<i>Lactiplantibacillus pingfangensis</i>	382-1(T)	98.94
<i>Lactiplantibacillus daowaiensis</i>	203-3(T)	98.87
<i>Lactiplantibacillus nangangensis</i>	381-7(T)	98.87
<i>Lactiplantibacillus garii</i>	FI11369(T)	98.8
<i>Lactiplantibacillus herbarum</i>	TCF032-E4(T)	98.67
<i>Lactiplantibacillus plajomi</i>	NB53(T)	98.67

[0109]

[0110] 좀 더 정확한 종의 동정을 위하여 구 *Lactobacillus*속 세균의 분류학 바이오마커로 널리 쓰이는 *recA* 유전자의 서열을 토대로도 유사도를 분석한 결과에서도 GBCC\_F0227는 *Lactiplantibacillus plantarum*에 가장 가까운 균주임을 확인하였다. GBCC\_F0227 균주의 락티플란티바실루스 플란타룸 종 확인은 유전체의 평균 뉴클레오티드 동일성(ANI, average nucleotide identity) 값 비교를 통해서도 뒷받침되었다(배제 기준값(cutoff threshold)은 95로 하였고, 락티플란티바실루스 플란타룸 종들 사이에서는 ANI가 98.78이었음).

**표 2**

종	표준 균주명	<i>recA</i> 서열 유사도
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	ATCC 14917	100.00%
<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	DSM 16365	94.01%
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	DSM 10667	87.94%

[0111]

[0112] GBCC\_F0227의 종내 위치 확인을 위한 유전체 기반 계통 분석

[0113] GBCC\_F0227이 속하는 락티플란티바실루스 플란타룸 종 내에서 GBCC\_F0227이 차지하는 진화적 친연 관계를 확인하기 위하여 유전체 기반 계통 분석을 수행하였다. GenBank에 공개된 락티플란티바실루스 플란타룸 종 82개 균주 및 이와 근연 관계에 있는 락티플란티바실루스 아르겐토라텐시스(*Lactiplantibacillus argentoratensis*) 1개 균주의 완전 해독 유전체 서열과 GBCC\_F0227 유전체 서열을 비교하였다. 유전체 기반 계통수를 그리기 위한

아웃-그룹(Outgroup)으로는 락티플란티바실루스 파라플란타륨(*Lactiplantibacillus paraplantarum*) DSM 10667<sup>T</sup> 균주의 완전 해독 유전체를 사용하였다. orthoMCL 프로그램을 사용하여 균주들의 유전체에 존재하는 단백질 암호화 유전자들의 오르토로그(ortholog) 클러스터링을 진행하였다. 아웃-그룹을 포함한 85개 균주 유전체에 모두 존재하며, 각 균주의 유전체 내에 한 개씩만 존재하는 1,714개의 유전자들을 선정하였다. 선정된 유전자들의 아미노산 서열들은 MUSCLE alignment 알고리즘을 사용하여 정렬 수행하였으며, 정렬된 아미노산 서열을 바탕으로 RAxML 프로그램을 활용하여 계통도를 작성하였다. 작성된 계통도를 도 1h에 나타내었다. 이 계통도는 GBCC\_F0227 균주가 락티플란티바실루스 플란타륨 표준 균주 DSM 20174<sup>T</sup> 또는 기존 특허 균주들인 ATG-K2, ATG-K6, ATG-K8 균주와 다른 혈통(lineage) 유래의 균주임을 나타낸다.

### 실시예 6

[0114] F0227의 항비만 효과

[0115] 고지방식이 마우스 모델을 이용하여 *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주의 항비만 효능을 확인하였다. 구체적으로, C57BL/6 마우스에 60% 고지방식(high Fat Diet, HFD)을 공급함과 동시에 GBCC\_F0227과 *L. plantarum* 표준 균주인 KCTC3108을 매일 경구 투여하였으며, 이를 실험군으로 설정하였다. 또한 60% 고지방식만 섭취한 마우스를 음성 대조군으로 설정하였고, 정상 식이(normal chow diet, NCD)를 공급한 마우스를 양성 대조군으로 설정하였다. 이때, GBCC\_F0227과 KCTC3108 유산균을 마우스 한 마리당  $5 \times 10^9$  CFU로 8주간 매일 경구 투여하였으며 음성 대조군과 실험군의 체중 증가량을 비교하여 항비만 효과를 확인하였다. 도 6a에 나타낸 실험 결과, 8주차의 체중 증가량을 비교했을 때, *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주를 투여한 마우스군(도 6a에서 HFD+F0227)이 KCTC3108 투여군(도 6a에서 HFD+KCTC3108) 및 고지방 식이만 공급한 음성 대조군(도 6a에서 HFD)에 비해 매우 유의적으로 체중 증가량이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[0116] 또한 실험 8주차에 체성분 분석기(LF50 Body composition mice analyzer)를 이용하여 마우스의 체지방량(fat mass)과 체지방량(lean mass)을 측정하고, 체지방에 대한 체지방의 비율(Fat/Lean)을 비교하였다. 도 6b에 나타낸 바와 같이 GBCC\_F0227 유산균을 투여한 마우스(도 6b에서 G3 GBCC\_F0227)는 음성 대조군 마우스(도 6b에서 G2 HFD)에 비해 매우 유의적으로 체지방 축적이 감소한 것을 확인하였다.

### 실시예 7

[0117] F0227의 혈당 조절능 개선 효과

[0118] 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델을 이용하여 *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주의 포도당 내성 개선 효과를 경구 포도당 부하 시험(oral glucose tolerance test, OGTT)을 통해 확인하였다. C57BL/6 마우스(오리엔트바이오)에 8주 동안 60% 고지방 식이를 지급하였다. 동물 모형 실험 종료 1주일 전에 실험 마우스를 12시간 금식 시키고, 체중을 측정한 뒤 투여 직전의 공복 상태와 포도당을 2 g/kg 용량으로 경구 투여 후 30분, 60분, 90분, 120분 경과 시점의 혈액을 마우스 꼬리 정맥에서 채취하여 혈당을 측정하였다. 또한 측정값을 대상으로 가로축을 시간(분)으로 혈당 변화 추이 그래프를 그리고, 그래프상 혈당값과 시간의 곱을 산출하여 그래프 아래 면적(area under the OGTT curve, AUC) 값을 산출하였다.

[0119] 경구 포도당 부하 시험 결과는 도 7a에 나타내었다. 고지방 식이와 함께 *L. plantarum* GBCC\_F0227을 투여한 마우스군(도 7a에서 HFD+F0227)은 포도당을 2 g/kg 용량으로 경구 투여하였을 때 투여 후 30분 후의 혈당의 최대값이 고지방 식이의 음성 대조군(도 7a에서 HFD)에 비해 유의적으로 낮았다. 도 7b에 나타낸 공복 혈당 측정값에서도 GBCC\_F0227 투여군(도 7b에서 G3 GBCC\_F0227)은 음성 대조군인 고지방 식이군(도 7b에서 HFD)에 비해 공복 혈당이 유의적으로 낮다는 것을 확인하였다. 도 7c에 나타낸 AUC 거동에서도 GBCC\_F0227 투여군 마우스는 음성 대조군에 비해 통계적으로 유의한 AUC값 감소를 보여주었다. 이를 통해 *L. plantarum* GBCC\_F0227은 공복 혈당을 감소시켜 주고 포도당 내성의 개선에도 긍정적인 효능이 있는 것을 확인하였다.

[0120] 이상과 같이 본 발명을 한정된 실시예를 들어 설명하였으나, 본 발명의 기술적 사상과 본 발명의 범위는 이들 전술한 실시예로만 한정되지 않으며 아래에 기재하는 특허 청구 범위의 발명은 물론 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한, 상기 특허 청구 범위 기재 발명에 대한 다양한 수정 또는 변형물도 특허 청구 범위 기재 발명의 균등 한 범위 내에서 본 발명의 범위에 포함된다.

### 실시예 8

- [0121] F0227의 대사 산물 분석
- [0122] 본 실시예에서는 *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주가 세포 외로 분비하는 대사 산물을 다른 유산균 균주와 비교 분석하였다. 대사 산물의 비교를 위한 다른 유산균 균주로서 *L. plantarum* 균주들(파김치에서 분리한 F0053, 시판 프로바이오틱스 유산균인 KCTC 3108), *Limosilactobacillus fermentum* 균주들(시판 프로바이오틱스 유산균인 MG901와 KCTC 3112), *Lactobacillus gasserii* 균주(시판 프로바이오틱스 유산균인 KCTC 3163)와 *Lactobacillus paragasserii* 균주(본 명세서에서 분리한 균주 M0213)의 대사 산물들을 기체 크로마토그래피-질량 분석(GC-MS)법으로 정량하였다.
- [0123] 구체적으로, 유산균 균주를 MRS 한천 배지에서 배양하여 얻은 각 균주의 단일 콜로니를 MRS 배지에 접종하여 24 시간 동안 종균 배양(seed culture)한 후, 이 종균 배양액을 새로운 MRS 배지 50 mL 속에 흡광도(600 nm) 값 0.01 또는 0.02가 되는 양으로 접종하여 37° C에서 16시간 동안 배양하였다. 그리고, 배양액을 8,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 배양 상등액을 얻은 다음, 0.22 μm 주사기 필터로 여과하여 시험 분석 전까지 냉장 보관하였다.
- [0124] 이렇게 하여 얻은 각각의 균주 배양 상등액 200 μL를 30 Hz의 주파수의 믹서밀(독일 Retch사 MM400)에서 차가운 메탄올에 의한 10분간의 추출 후 10분간 초음파 처리를 하였다. 그리고, 12,000 rpm, 4° C 조건에서 10분 동안 원심분리기(독일 Eppendorf사 원심분리기 5427R)로 층 분리한 후, 그 상등액을 0.2 μm 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE) 필터(한국 크롭디스크사제)로 여과한 다음 고속 진공 농축기(한국 라백스사제)를 사용하여 증발시켰다. 이어서 건조된 각각의 시료를 80% 메탄올에 재용해하여 최종 농도 20,000 ppm의 메탄올 재용해액으로 만들었다. 이러한 각 시료의 메탄올 재용해액 100 μL씩을 고속 진공 농축기로 건조하고, 아래와 같은 방법으로 유도체화 하였다. 먼저, 건조된 샘플에 50 μL 메톡시아민 염산염(용매 피리딘에서 20 mg/mL)를 첨가하여 30° C에서의 열혼합기에 90분간 두었다. 그런 다음, *N*-메틸-*N*-(트리메틸실릴)트리플루오로아세트아미드(MSTFA) 50 μL를 넣고 37° C에서 30분간 배양하여 실릴화 유도체로 변환하였다. 각 시료의 실릴화 유도체 1 μL씩을 L-PAL3 자동 시료 주입기 시스템과 YL9600 질량 스캔 스펙트럼이 장착된 CHroZen GC 시스템(한국 안양 소재 영인크로마스사)에 주입하였다. 대사체들은 분당 1.0 mL의 속도의 헬륨을 운반 기체로 사용하여 DB-5MS 컬럼(길이 30 m × 안지름 0.25 mm × 입도 0.25 μm; 미국 산타클라라 소재 Agilent사)으로 분리하였다. GC 오븐 온도는 60° C에서 3분 유지한 다음 분당 10° C씩 증가시켜 320° C가 되게 하고, 이 최종 온도를 3분간 더 유지하였다. 질량 분석 데이터 수집 속도는 50-600 amu의 스캔 범위에 대해 2750 amu/s로 설정한 다음 -70 eV의 전자 이온화(EI) 모드로 설정하였다. 이온 소스와 이송 라인 온도는 각각 230° C 및 250° C로 설정하였다.
- [0125] 도 8은 이렇게 하여 GC-MS로 얻은 균주별 대사 산물의 양을 상대적 수치 비율과 함께 색깔로 분류한 히트맵(heatmap)을 정리한 표이다. 도 8에서 표시한 수치는 대사 산물마다 시험한 모든 균주 시료의 분비량(크로마토그램의 피크 면적) 평균을 구한 뒤 이 평균값에 대한 해당 분비량의 비를 가리킨다.
- [0126] *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주는 대사 산물로서 α-케토글루타르산과 3-페닐락트산과 같은 유기산, 아미노산 시스타티오닌, 지질과 지방산 중에서는 1-모노팔미틴, 모노스테아르산글리세롤 및 단쇄 지방산(short chain fatty acid)인 2-히드록시-3-메틸부티르산을 다량 분비하는 균학적 특징을 나타내었다. 이중에서 숙주의 체중 증가 방지와 지방 대사에 유익한 역할을 할 수 있는 대사 산물인 α-케토글루타르산과 3-페닐락트산의 분비가 두드러졌는데, 이들 대사 산물의 분비량은 *L. plantarum*의 표준 균주인 KCTC 3108에 대하여 1.95배 내지 2.05배에 달하였다. 또한 2-히드록시-3-메틸부티르산의 분비는 KCTC 3108에 대하여 2.0배 내지 3.0배 범위에 이르렀다.

### 실시예 9

- [0127] F0227의 대사 산물의 GLP-1 분비 자극 효능
- [0128] 본 실시예에서는 *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주가 세포 외로 분비하는 특징적 대사 산물이 그 자체로 GLP-1 분비를 자극하는 효능을 지니는지 인비트로 실험으로 확인하였다. *L. plantarum*의 표준 균주인 KCTC 3108을 포함한 다른 유산균주의 대사 산물과 GBCC\_F0227 대사 산물의 자극 효과를 비교하기 위하여 *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주가 다량 분비하는 α-케토글루타르산과 3-페닐락트산, 2-히드록시-3-메틸부티르산과 GLP-1 분비를 자극한다고 알려진 단쇄 지방산(short chain fatty acids, SCFA)들인 아세트산, 프로피온산, 부티르산 및 락트산의 7종 대사 산물의 효과를 살폈다.
- [0129] 실시예 1과 유사하게, NCI-H716 세포주(KCLB 번호 10251)를 96 웰플레이트 웰 당 세포 4×10<sup>4</sup>개로 접종하여 밤새 배양 후, 세포간 GLP-1 분비 수준을 맞추기 위해 0.2% 소혈청 알부민이 첨가된 DPBS로 3회 세척하여 배지 성

분을 없애고 2시간 동안 배양하였다. 이후 0.2% BSA가 첨가된 DPBS에 전술한 7종의 물질을 각각 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM 또는 25 mM의 농도로 희석한 뒤 이를 NCI-H716 세포에 2 시간 동안 처리하였다. 반응이 끝나고 채취한 상등액에 대하여 GLP-1 ELISA 키트(Human GLP-1 EIA, Raybiotech사)를 이용하여 상등액내 GLP-1 농도를 측정하였다.

[0130] 도 9a와 도 9b는 이러한 GLP-1 분비 자극 성능 실험 결과를 나타내었다. 도 9a에서 보는 것처럼 상기 7종의 대사 산물 모두는 농도 의존적으로 NCI-H716의 GLP-1 분비를 자극하는 효능을 갖추고 있었다. GBCC\_F0227의 다량 분비 대사 산물인  $\alpha$ -케토글루타르산과 3-페닐락트산의 경우는 그 분비 효능이 단쇄 지방산들보다 압도적으로 우월하였고, 단쇄 지방산 중에서 가장 분비 효능이 뛰어난 락트산도 GBCC\_F0227의 대사 산물인 2-히드록시-3-메틸부티르산보다 분비 효능이 상당히 뒤떨어지는 것을 볼 수 있었다. 예컨대 도 9b에 나타낸 대사 산물 농도 25 mM 자극 결과에서,  $\alpha$ -케토글루타르산은 부티르산의 약 46배, 3-페닐락트산은 부티르산의 약 36배, 2-히드록시-3-메틸부티르산은 부티르산의 약 12배 가량 우월한 GLP-1 분비 자극 효과를 지닌 것을 확인하였다. 또한 유산균의 일반적인 대사 산물인 락트산에 비해 3-페닐락트산은 약 5배, 부티르산에 비하여 2-히드록시-3-메틸부티르산은 약 12배 가량 우월한 GLP-1 분비 자극 효과를 지닌 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명 F0227 균주가 지니는 뛰어난 사람 GLP-1 분비 자극 효과는 GBCC\_F0227의 대사 산물들로부터 뒷받침을 받은 것이라는 점을 가리킨다.

### 실시예 10

[0131] F0227의 내장 지방과 혈중 지방 감소 효과

[0132] 본 실시예에서는 *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주가 고지방 식이로 비만 유도된 마우스 모형에서 백색 내장 지방 분획과 혈중 중성 지방 및 콜레스테롤량을 감소시키는 효능을 지닌다는 것을 확인하였다. 구체적으로, 5주령 C57BL/6 마우스(한국 오리엔트바이오 사제)를 1주 순화(馴化)시킨 후, 이들을 세 군으로 나누어 8주 동안 매일 이하 기재한 사료 등을 경구 투여하였다: 영양소 중 지방 비중이 60 kcal%인 고지방 식이(미국 Research Diets 사 D12492)와 함께 마리 당 매일  $5 \times 10^9$  CFU의 *L. plantarum* GBCC\_F0227 균주를 병행 투여한 실험군(G3), 같은 고지방 식이와 함께 G3에서 투여한 균주와 같은 질량으로 동결 보호제를 투여한 비만 양성 대조군(G2)과 일반 사료 식이(미국 Inotiv사 TEKLAD 2018S)와 함께 동결 보호제를 투여한 비만 음성 대조군(G1).

[0133] 8주 후에 부검을 통해 실험한 마우스의 간 좌측엽(left lateral lobe)과 부고환지방(epididymal fat)을 적출하여 10% 중성 완충 포르말린 속에 3일간 고정한 후, 조직 처리기를 통해 에탄올 탈수, 자일렌, 파라핀 침투 처리하여 파라핀 포매를 하였다. 5  $\mu$ m 두께로 파라핀 박절하여 슬라이드에 올린 후, 헤마톡실린-에오신 염색을 수행하여 시각화하였다. 간과 부고환지방에서 지방 분획의 조직학적 정량화는 ImageJ 프로그램을 사용했다. 간 좌측엽에 대해서는 조직내에서 지방 액적(lipid droplet)이 차지하는 면적 분율(Area fraction %)을, 부고환지방에 대해서는 지방 세포에 축적된 지방 액적의 크기( $\mu$ m<sup>2</sup>)를 정량하였으며, 개체 당 3개의 다른 부위로부터 얻어진 값의 평균을 사용하여 그래프로 도시했다.

[0134] 마우스의 혈액 분석은 부검시 혈액을 심체혈을 통해 수득하고, 원심분리를 통해 혈청을 분리한 뒤, 자동 생화학 측정기(clinical chemistry analyzer, 일본 후지필름사 DRI-CHEM NX700)로 혈중 총 콜레스테롤 수치와 트리글리세라이드(중성지방) 함량을 측정하였다.

[0135] 도 10a에 나타내었듯이 *L. plantarum* GBCC\_F0227을 투여받은 고지방 식이 마우스(G3)의 간 좌측엽 조직 단편은 형상과 염색 양상에서 관찰되는 백색 지방이 비만 음성 대조군(G1)의 단편과 거의 차이가 없었으나, 균주 투여 없이 고지방 식이로 비만 유도된 비만 양성 대조군(G2)과는 관찰 백색 지방의 차이가 두드러졌다. 균주 투여군(G3)은 부고환 지방 조직에서도 비만 양성 대조군(G2)보다 지방 축적이 개선된 모습을 나타내었다.

[0136] 간 조직 지방세포내 지방 액적이 차지하는 면적 분율과 부고환지방 조직 지방 액적의 평균 크기(면적)도 이러한 현미경 관찰 결과를 뒷받침하였다. 도 10b에 드러나 있듯이 면적 분율과 지방 세포 크기에서 GBCC\_F0227 투여는 고지방 식이에 의한 지방 분획 증가를 유의하게 억제하였다.

[0137] 내장 지방 조직내 지방량을 관찰하는 다른 방법으로서 중성 지방과 지방산에 특이적인 시약인 오일 레드오(oil red O)를 이용하여 상기 세 군에서 채취한 간 좌측엽 조직 절편에 대하여 조직내 지방을 염색하여 시각화하였다. 지방은 오일 레드오 염색에서 붉은색으로 나타나는데, 도 10c에 G1, G2와 G3의 조직 염색 사진을 나타내었다. 도 10c의 염색 결과를 보면 정상 식이군(G1)의 간은 보라색에 가깝게 염색되었지만, 고지방 식이군(G2)의 간은 선명한 붉은색으로 염색되어, 고지방 식이에 따른 간 조직의 지방 축적을 가리킨다. 고지방 식이와

균주 투여를 병행한 군(G3)에서는 간 조직이 고지방 식이군보다 연한 붉은색으로 염색된 것을 볼 수 있다. 간 조직 지방 축적에 관한 이러한 경향은 염색 결과를 정량화하여 비교하면 더 잘 알 수 있는데, 도 10c의 염색 강도를 대조군(G1)의 염색 강도 값을 기준으로 하여 상대 비교한 도 10d의 그래프에서 균주 투여군(G3)의 염색 강도는 고지방 식이군(G2)보다 통계적으로 유의하게 줄어들었다.

[0138] 이러한 결과는 간 좌측엽에서 고지방 식이로 일어나는 지방 축적을 고지방 식이와 GBCC\_F0227 균주 투여를 병행할 경우 완화할 수 있음을 가리킨다.

[0139] 또한 혈중 총 콜레스테롤과 중성 지방 수치를 비교했을 때, 본 발명의 GBCC\_F0227 균주는 총콜레스테롤에 대해서는 고지방 식이에 따른 증가의 폭을 줄여주는 효과(G3)가 있었다. 또한 GBCC\_F0227 균주와 고지방 식이를 병행하면 고지방 식이만 하였을 때(G2) 나타나는 혈중 중성 지방 증가를 통계적으로 유의하게 낮추어 주는 효과를 보였는데, 병행 투여군(G3)의 혈중 중성 지방 함량은 정상 식이군의 수준 이하까지 낮아졌다(도 10e).

[0140] 따라서 고지방 식이 유도 비만 마우스 모형에 본 발명의 GBCC\_F0227 균주를 투여했을 때, 체중을 줄이는 항비만 효능뿐만 아니라, 혈중 중성지방과 콜레스테롤 수치를 낮추는 효능이 있음을 확인함으로써 GBCC\_F0227 균주가 비만을 포함하여 다양한 대사성 질환의 지표에도 긍정적인 효과를 지닌다는 것을 확인할 수 있었다.

### 실시예 11

[0141] GBCC\_F0227의 균주 특이적 중성지방 이화 작용

[0142] 본 실시예에서는 중성지방, 즉 트리글리세라이드 형태의 지방 흡수를 저해할 수 있는 효능 균주를 선별하고 그 지방 흡수 특성을 살폈다. 지방 흡수 저해능을 선별 기준으로서 다양한 종류의 프로바이오틱 세균에 대하여 배양액내 존재하는 트리글리세라이드를 얼마나 효과적으로 이화하는지 배양 전후의 트리글리세라이드 소모율을 측정하였다. 시험한 균주들은 본 발명의 GBCC\_F0227, *L. plantarum*의 참고 균주인 WCFS1과 표준 균주인 KCTC3108, *L. fermentum*의 표준 균주인 KCTC3112, *L. gasseri*의 표준 균주인 KCTC3163 등을 포함하여 총 10개 종의 31 가지 균주를 대상으로 하였다. 소모율 시험은 자동 생화학 측정기(Clinical chemistry analyzer, DRICHEM NX700)로 배양 전의 배양액 속 트리글리세라이드 양 측정치와, 이 시험 균주들을 37° C의 MRS 배양액 속에서 16 시간 동안 혐기 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양 상등액을 0.22 μm 시린지 필터로 여과한 시료내 트리글리세라이드 측정치를 비교하여 이루어졌다. 도 11에 시험 균주별로 배양 후의 트리글리세라이드 측정값을 나타내었다. 대부분의 시험 균주의 배양 상등액에서 중성지방은 배양 후 감소(배양 전 MRS 배양액 속 중성지방의 측정값은 약 100 mg/dL, 도 11의 가장 왼쪽의 회색 막대 참조)하였지만 특히 본 발명의 GBCC\_F0227과 WCFS1 균주가 다른 균주들보다 중성지방 소모가 우수하여 배지내의 모든 중성지방을 이화하여 소비한 것을 확인할 수 있었다.

[0143] 균주마다 성장 속도 등이 달라 물질 대사 정도의 차이가 생기고 이것이 중성지방 소모율 측정값에 영향을 줄 수 있으므로 변수를 통제하기 위해 세포 밀도의 대용물로 600 nm에서의 흡광도(Optical density, 이하 OD<sub>600</sub>)를 사용하여 중성지방 측정 실험을 다시 진행하였다. 이 실험에서는 GBCC\_F0227과 동일한 *L. plantarum* 종의 다른 균주 4가지(GBCC\_F0053, GBCC\_F0001, GBCC\_F0404와 WCFS1)를 대상으로 OD<sub>600</sub>이 3 또는 6에 이를 때까지 같은 조건으로 시험 균주 중 하나를 배양한 상등액에 대해서 트리글리세라이드 농도를 측정하였다. 그 결과에서도 도 11의 실험에서와 마찬가지로 GBCC\_F0227이 가장 뛰어난 중성지방 이화작용을 나타내었는데, 특히 OD<sub>600</sub> 6 배양에서는 나머지 플란타룸 균주들보다 현저하게 더 빠른 중성지방 소모 속도를 나타내면서 중성지방을 거의 전부 소모하는 것을 볼 수 있었다(도 12a와 12b).

### 실시예 12

[0144] GBCC\_F0227의 중성지방 이화 유전자 활성화

[0145] 본 실시예에서는 본 발명의 GBCC\_F0227의 중성지방 이화가 뛰어나다는 것을 유전자 수준에서 검증하였다. GBCC\_F0227과 같은 락티플란티바실루스 플란타룸 균주인 WCFS1에 대하여 지방 분해효소(lipase)를 포함하는 α/β 가수분해 효소(hydrolase) 유전자군(gene family) 유전자들의 발현을 같은 배양 수준에서 비교 분석하였다. 구체적으로 GBCC\_F0227과 WCFS1 두 균주를 MRS 배양액에서 OD<sub>600</sub> 3 또는 6의 수준까지 37° C에서 혐기 배양한 후 원심분리로 침전시킨 침전물(펠렛)로부터 RNA를 추출하고, 무작위 육량체(random hexamer) 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 유전체 분석을 통해 두 균주가 공유하는 α/β 가수분해 유전자들을 선별하여 그 발현 정도를 역전사 정량적 중합효소 연쇄 반응(RT-qPCR)으로 정량하였다. 유전자 발현 정도 비교 기준으로 RNA 중합효소

서브유닛 베타 유전자( $rpo\beta$ )를 하우스키핑 유전자로 선택하였고, 두 균주가 공유하는  $\alpha/\beta$  가수분해 효소 유전자들로는 Moraxella lipase 2-like(기호 abH04),  $\alpha/\beta$  hydrolase(기호 abH08\_1),  $\alpha/\beta$  fold hydrolase(기호 abH08\_2), Proline iminopeptidase(기호 abH11\_1와 abH11\_2)를 선정하여 그 프라이머들을 제작함으로써 발현을 정량하였다. 이렇게 정량한  $\alpha/\beta$  가수분해 효소 유전자군 유전자(abH)의 상대적 발현율을 도 13a(OD<sub>600</sub> 3)와 도 13b(OD<sub>600</sub> 6)에 나타내었다. GBCC\_F0227은 WCFS1에 건주어 OD<sub>600</sub> 3 세포 농도에서는 abH08\_1, abH08\_2와 abH11\_2의 유전자 발현이 매우 유의하게 높았고(도 13a), OD<sub>600</sub> 6 조건에서는 abH04, abH08\_1, abH08\_2, abH11\_1의 발현이 매우 유의하게 높았다(도 13b). 또한 abH08 유전자는 두 배양 조건 모두에서 WCFS1에 비해 월등히 높은 발현량을 나타내었고, abH04와 abH11은 배양 수준 조건에 따라 발현량의 증감이 다른 것을 확인할 수 있었다. 종합적으로, GBCC\_F0227이 WCFS1에 비해 OD<sub>600</sub> 3과 6 조건 양쪽에서 대부분의  $\alpha/\beta$  가수분해 효소 유전자군의 발현이 월등히 높아 중성지방을 더 빠르게 이화하여 소비할 수 있는 것을 확인하였다.

### 실시예 13

[0146] F0227의 지방 대사와 비만 관련 유전자의 활성 조절 효과

[0147] 본 실시예에서는 GBCC\_F0227 균주가 고지방 식이로 비만 유도된 마우스 모형에서 지방 대사와 비만에 관련된 단백질인 아디포넥틴, 렙틴, PPAR $\gamma$ , CD36, GLP-1 수용체, POMC와 CART의 유전자 활성을 항비만 쪽으로 조절하는 효능을 지닌다는 것을 확인하였다.

[0148] 아디포넥틴은 혈중 중성지방을 낮추고 고밀도 지단백질(HDL)을 상승시키며 간에서 지방 축적을 억제하는 효과가 있는 에너지 대사 조절에 관여하는 호르몬이며, 렙틴은 지방 세포에서 분비하는 음식 섭취와 에너지 소모를 조절하는 아디포카인으로서 비만시에는 혈중 렙틴 농도가 커지며, 비알코올성 지방간 질환(NAFLD) 환자에서 특히 혈중 렙틴 농도가 높을수록 NAFLD의 중증도가 심해지는 것으로 알려져 있다. 분화 클러스터 36(CD36, cluster of differentiation 36)은 산화된 저밀도 지단백질(LDL)이나 장쇄 지방산과 결합하는 세포 표면 수용체로서, 유리 지방산을 세포 내로 받아들여 중성지방 축적을 촉진하는 것으로 알려져 있다. PPAR $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)는 전사 인자 기능이 있는 핵 수용체로서, 주로 지방 조직에서 존재하며, CD36을 비롯한 지방산 흡수 관련 단백질의 전사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 프로오피오멜라노코르틴(pro-opiomelanocortin, POMC)은 뇌하수체에서 합성되는 호르몬 전구체로서, 절단되어 ACTH와 MSH를 비롯한 에너지 대사 항상성과 식욕 조절에 관여하는 호르몬을 생성한다. CART(cocaine- and amphetamine-regulated transcript)는 도파민 방출에 의하여 분비되는 신경 펩티드로서 에너지 항상성을 조절하고 시상하부의 식욕 조절 신경회로와 상호작용한다. GLP-1 수용체는 그 리간드인 GLP-1와 결합하면 식욕을 억제하는 기능을 하는 G 단백질 결합 수용체이다.

[0149] 마우스를 실시예 10과 동일한 방식으로 세 개 군(*L. plantarum* GBCC\_F0227 균주를 병행 투여한 실험군(G3), 같은 고지방 식이와 함께 G3에서 투여한 균주와 같은 질량으로 동결 보호제를 투여한 비만 양성 대조군(G2)과 일반 사료 식이(미국 Inotiv사 TEKLAD 2018S)와 함께 동결 보호제를 투여한 비만 음성 대조군(G1))으로 나누거나, 일부 유전자에 대해서는 추가 대조군으로서 G3의 균주 투여 대신 고지방 식이와 *L. plantarum* 표준 균주 KCTC 3108을 같은 양으로 투여한 대조군(G4)을 더하여 8주 동안 급여하였다. 급여 기간이 지난 후에 마우스를 부검하고 부고환 백색 지방 조직(epididymal white adipose tissue; eWAT), 간의 좌내엽(left medial lobe)과 뇌의 시상하부(hypothalamus) 조직을 수득하여 여기서 각각 총RNA를 추출하였다. G4 대조군으로부터 시상하부 조직만을 채취하였다. 이 RNA로부터 올리고디옥시티미딘(Oligo dT)을 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 아디포넥틴과 렙틴의 유전자(부고환), PPAR $\gamma$ 와 CD36의 유전자(간 좌내엽)와 POMC와 CART의 유전자(시상하부) 발현을 RT-qPCR로 정량하였다. 발현율 정량의 내부 표준으로 하우스키핑 유전자인 글리세르알데히드 3-인산 탈수소효소(GADPH) 유전자를 선택하였고, 미국 국립 생명 공학 정보 센터(NCBI)의 유전자 데이터베이스로부터 아디포넥틴을 비롯한 유전자의 염기 서열을 참조하여 제작한 프라이머를 이용하여 RT-qPCR를 수행하였다. 도 14a 내지 도 14g에 발현율 측정 결과를 정리하였다.

[0150] 내장 백색지방 조직인 부고환에서 아디포넥틴 유전자는 고지방 식이를 통해 비만을 유도한 비만 유도군(G2)에서 정상 체중인 정상 식이군(G1)에 비해 절반 수준으로 발현량이 크게 감소했지만, 고지방 식이와 더불어 본 발명의 GBCC\_F0227 균주를 병행 투여한 실험군(G3)에서는 아디포넥틴의 발현이 정상 식이군 수준에 근접하는 수준으로 유의적으로 증가하였다(도 14a). 비만 유도군(G2)에서 크게 크게 증가했던 렙틴의 발현율도 GBCC\_F0227 균주 투여시 통계적으로 유의하게 감소하였다(도 14b). 간 지방증과 간 지방 축적을 악화시키는 CD36(도 14c)과 PPAR $\gamma$ (도 14d)의 간 좌측엽내 발현율도 비만 유도군(G2)에서 정상 식이군(G1)보다 증가하였지만 GBCC\_F0227의 투여

로 발현율을 통계적으로 유의하게 감소시키면서 정상 식이군(G1) 값의 복원을 넘어 그보다 낮은 수준으로 떨어뜨렸다.

[0151] GBCC\_F0227의 투여는 식욕을 억제하는 작용을 하는 GLP-1 수용체(도 14e), POMC(도 14f)와 CART(도 14g)의 시상하부내 발현율도 고지방 식이 비만 유도군(G2)이나 정상 식이군(G1)보다 통계적으로 유의하게 높였다. 아울러 이러한 GBCC\_F0227의 발현율 향상 효과는 같은 종의 표준 균주인 KCTC 3108보다 GLP-1 수용체의 경우처럼 통계적으로 유의하게 우수하거나 POMC나 CD36 통계적으로 대등하면서 평균값이 더 높았다.

[0152] 따라서 고지방 식이 유도 비만 마우스 모형에 본 발명의 GBCC\_F0227 균주를 투여했을 때, 체중을 줄이는 항비만 효능뿐만 아니라, 지방 축적, 에너지 대사나 식욕에 관련된 비만 유전자들의 발현을 항비만 방향으로 조절하는 효과를 지닌다는 것을 확인할 수 있었다.

### 실시예 14

[0153] F0227의 근육량 감소 방지 효과

[0154] 본 실시예에서는 GBCC\_F0227이 식이 유도된 비만의 동물 모형에서 나타나는 근육량 감소를 되돌리는 효능을 지니는지 살펴 보았다.

[0155] 마우스를 실시예 10과 동일한 방식으로 세 개 군(G1, G2, G3)으로 나누어 8주 동안 급여하였다. 급여 기간이 지난 후에 마우스 뒷다리에 있는 골격근들인 앞정강근(tibialis anterior, TA), 장지신근(extensor digitorum longus, EDL), 가자미근(soleus, Sol)과 비복근(gastrocnemius, GA)을 적출하여 무게를 측정하였다. 측정된 골격근 무게를 마우스 체중에 대한 비율(mg/g)로 정규화(normalization)하여 실험군별 무게 차이를 비교하였다. 또한 골격근별로 고지방 식이군(G2)의 근육량을 기준으로 한 백분율을 산출하였다.

[0156] 실험 결과 고지방 식이로 비만 유도한 마우스(G2)는 네 종류의 골격근 모두에서 정상 식이군(G1)과 비교하여 통계적으로 유의한 근육량 감소를 드러내었다. GBCC\_F0227 유산균 투여는 G2와 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 근육량을 되돌리는 효능이 있었다. 구체적으로 GBCC\_F0227 투여는 G2와 비교하여 골격근 근육량을 앞정강근(도 15a)은 1.24배, 장지신근(도 15b)은 1.05배, 가자미근(도 15c)은 1.18배, 비복근(도 15d)은 1.24배 늘려주는 효과가 있었다.

### 실시예 15

[0157] F0227의 근력 감소 방지 효과

[0158] 본 실시예에서는 GBCC\_F0227이 식이 유도된 비만의 동물 모형에서 나타나는 근력 감소를 되돌리는 효능을 지니는지 살펴 보았다.

[0159] 실시예 14과 동일한 방식으로 8주 급여한 마우스의 해부 전에 마우스의 네 발에서 악력(Grip strength) 시험을 수행하였다. 악력 시험은 시험 수행자가 어떤 실험군의 마우스인지 알 수 없는 암맹으로 수행하였으며, 시험하는 마우스가 탈진하지 않도록 시간 간격을 두어 개체 당 3회 반복 측정된 악력(g중 단위)의 평균값을 마우스 체중(g 단위)으로 나눈 값(g/g)으로 정규화하여 나타내었다.

[0160] 실험 결과 고지방 식이로 비만 유도한 마우스(G2)는 정상 식이군(G1)과 비교하여 악력 감소가 두드러졌는데( $p < 0.001$ ), GBCC\_F0227 유산균을 투여하면 G2와 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 악력이 회복되었다. 구체적으로 GBCC\_F0227 투여는 G2와 비교하여 마우스 네 발의 악력을 1.13배 늘려주는 효과가 있었고, 이는 통계적으로 유의한 회복이었다( $p < 0.01$ ).

### 수탁번호

[0161]

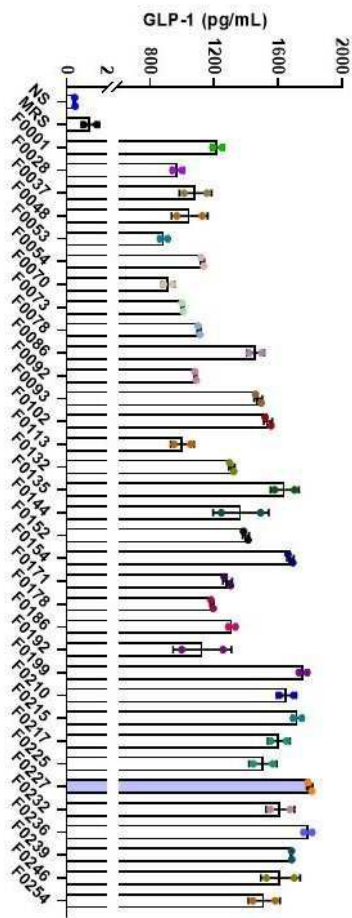
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15450BP

수탁일자 : 20230522

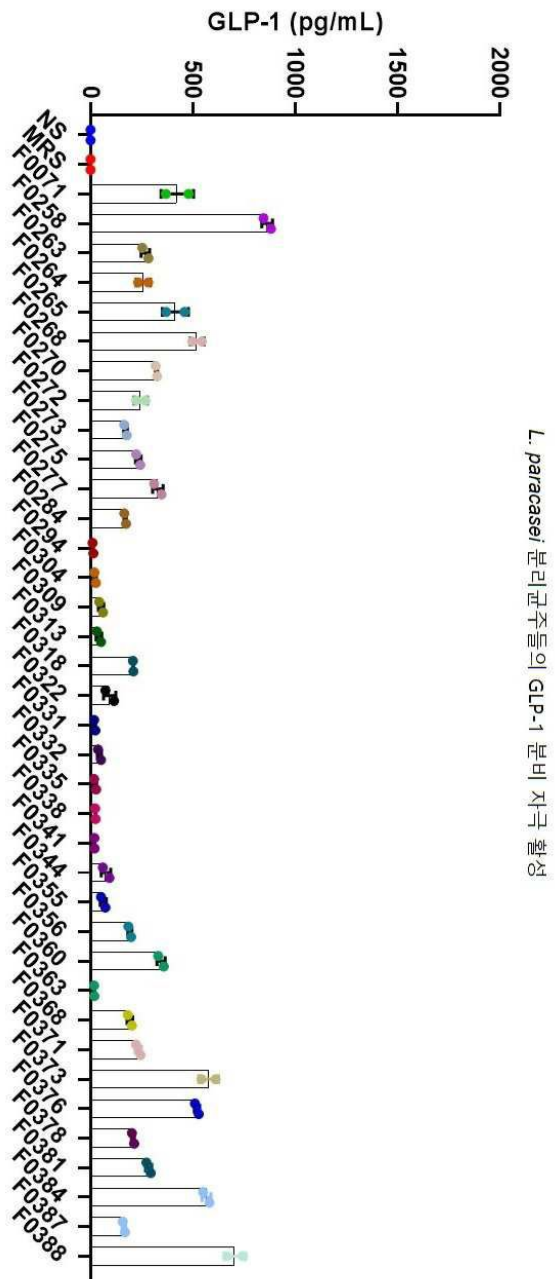
도면

도면1a



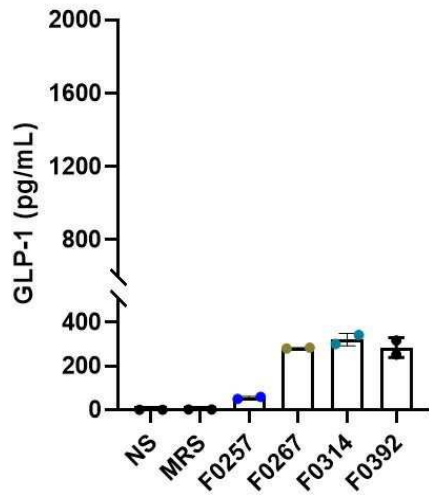
L. plantarum 분리 균주들의 GLP-1 분비 자극 활성

도면1b



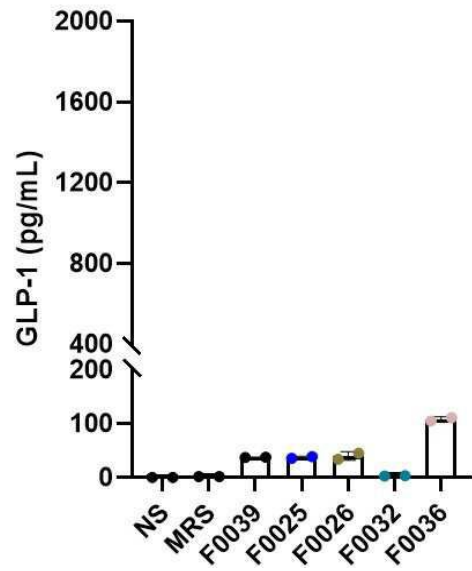
도면1c

*L. coryniformis* 분리균주들의 GLP-1 자극 활성

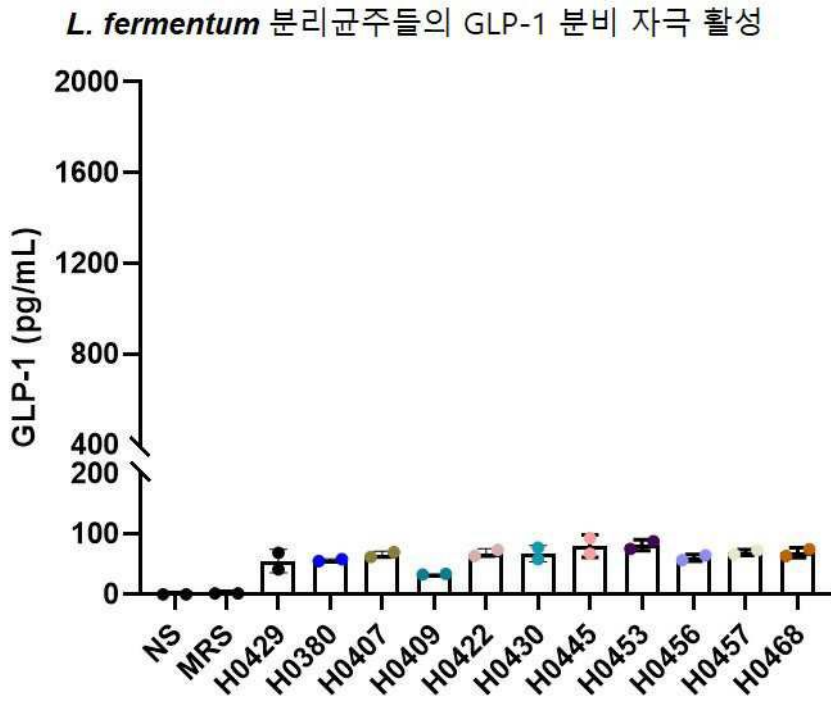


도면1d

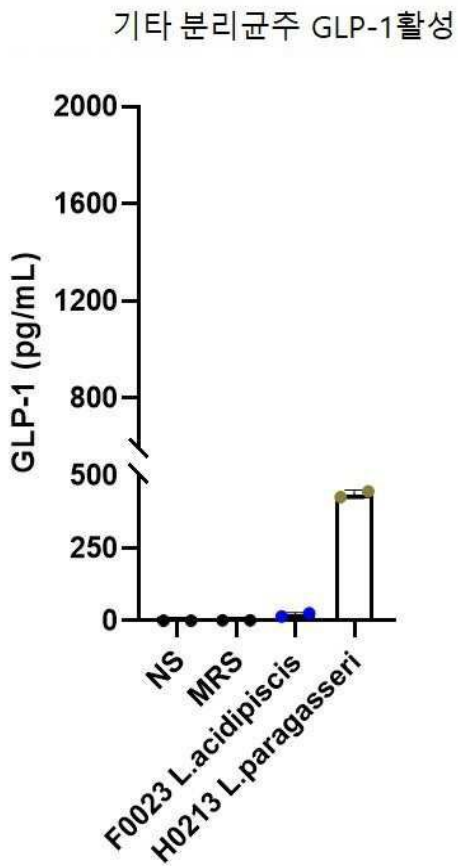
*L. sakei* 분리균주들의 GLP-1 분비 자극활성



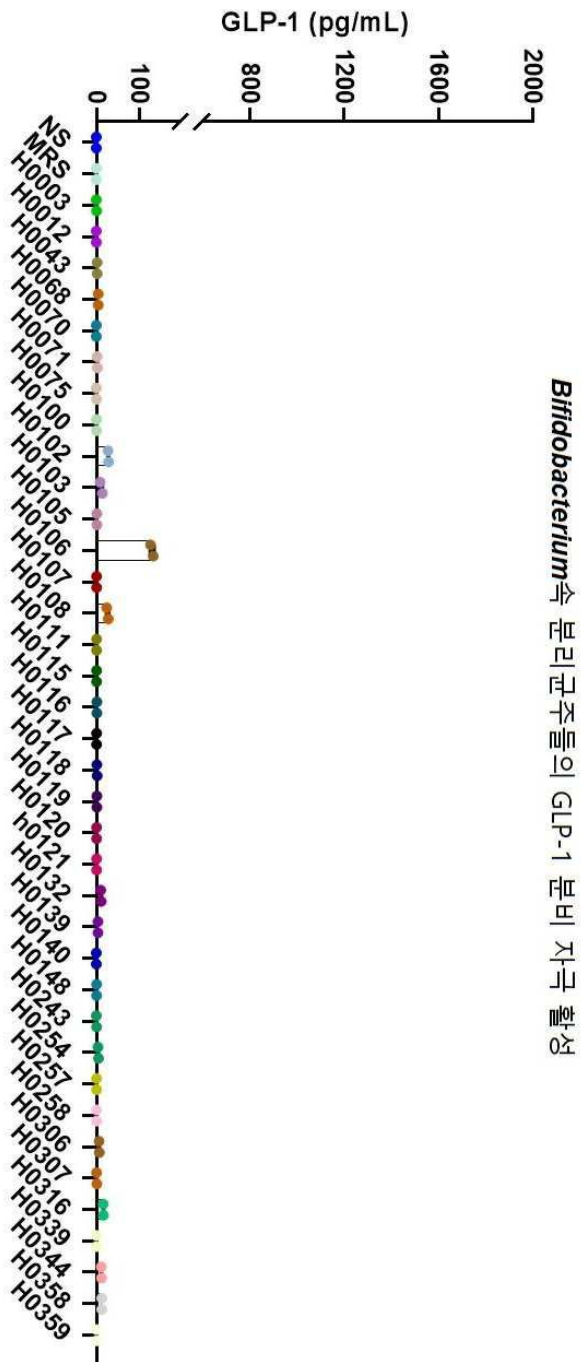
도면1e



도면1f



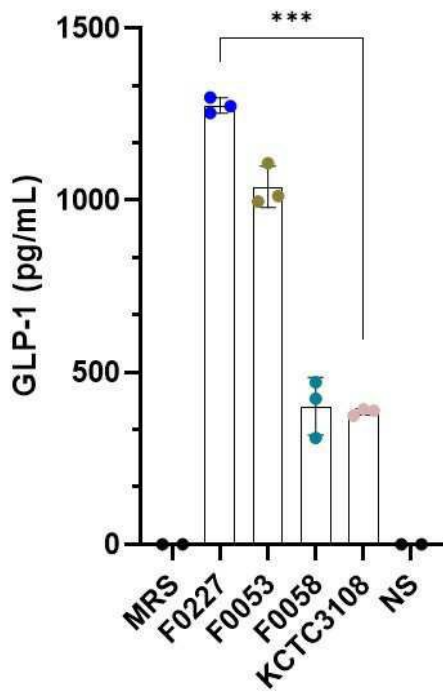
도면1g



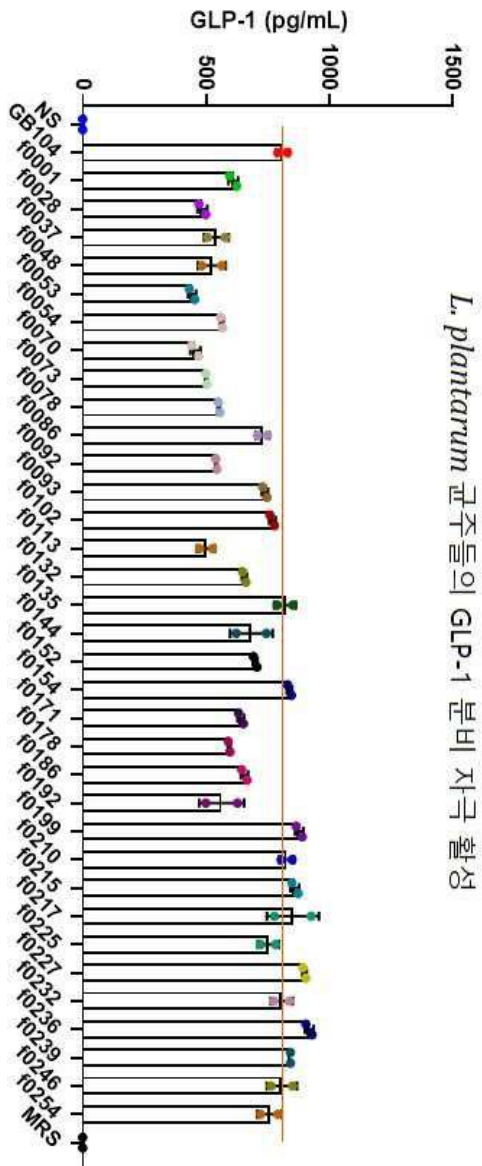
도면 1h



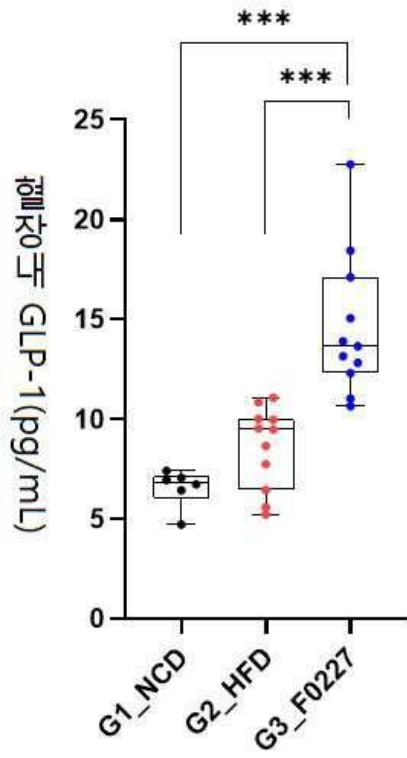
도면2a



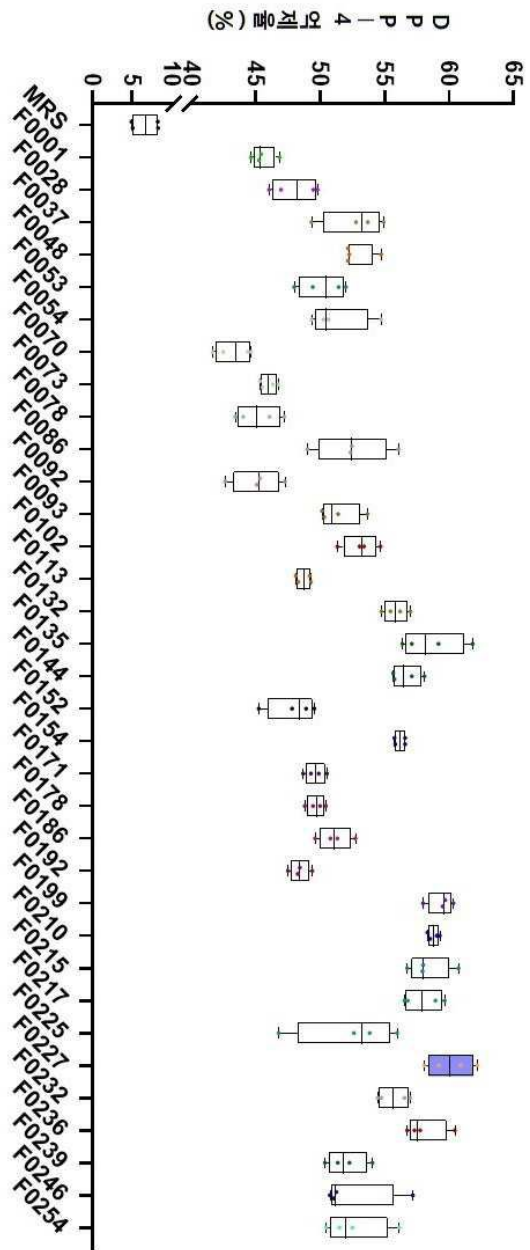
도면2b



도면3

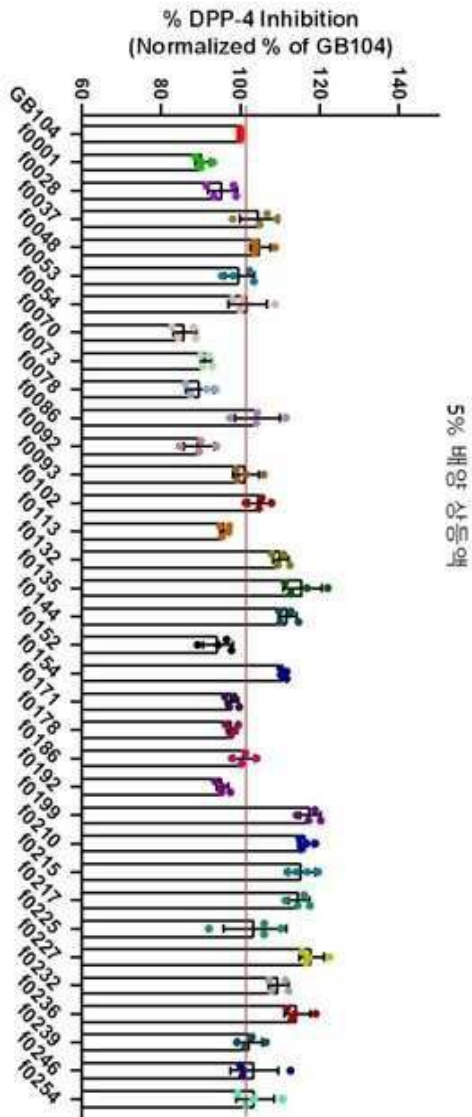


도면4a

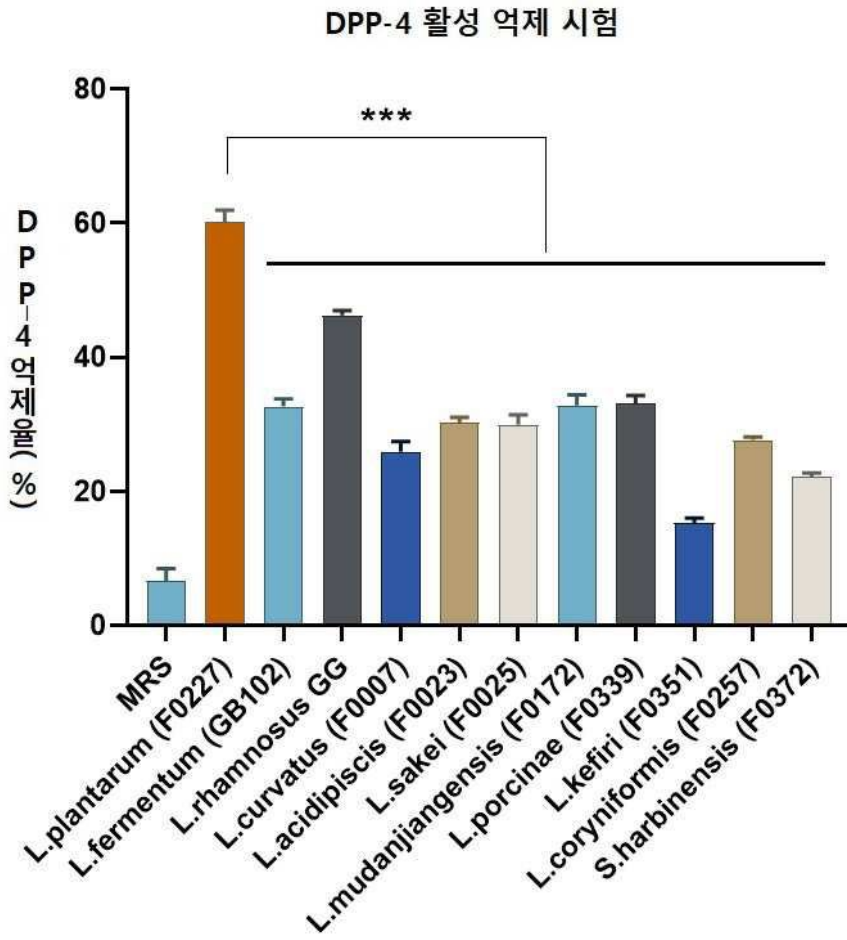


락티플란티비실루스 플란타룸 DPP-4 억제 활성

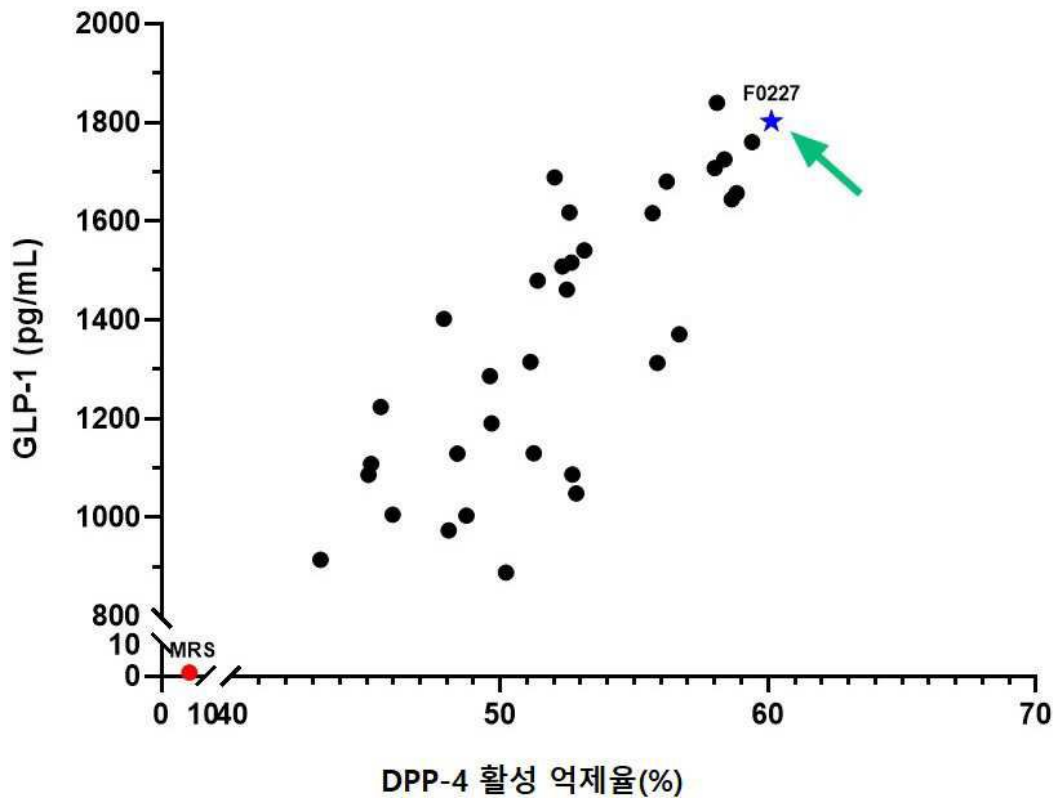
도면4b



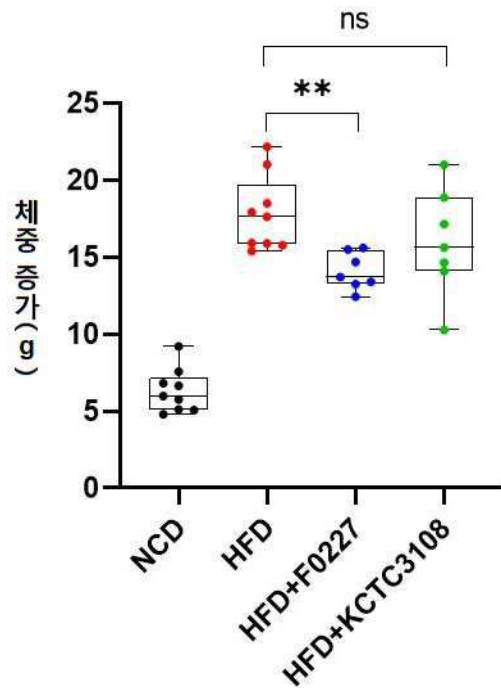
도면4c



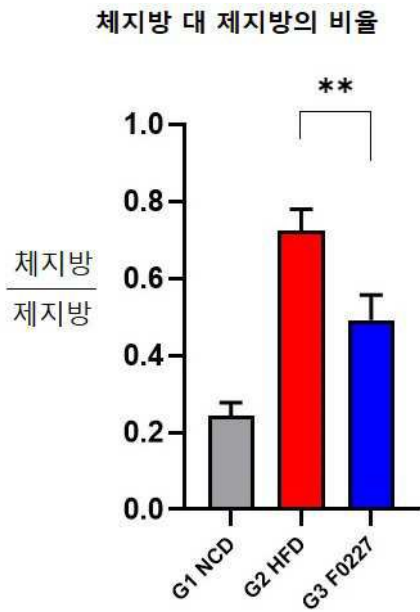
도면5



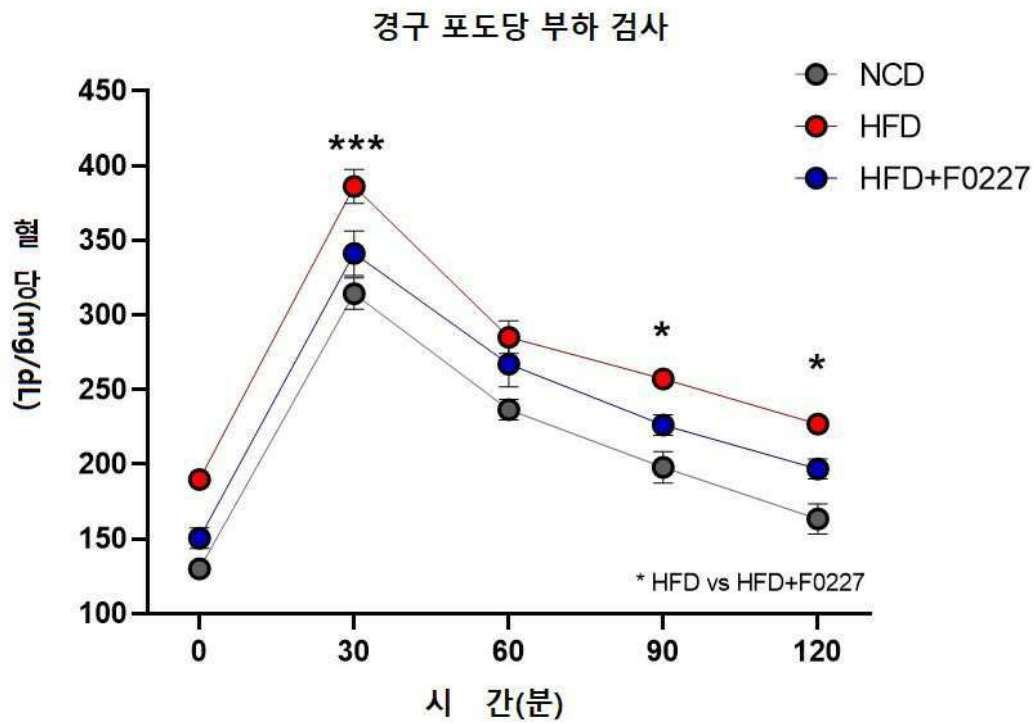
도면6a



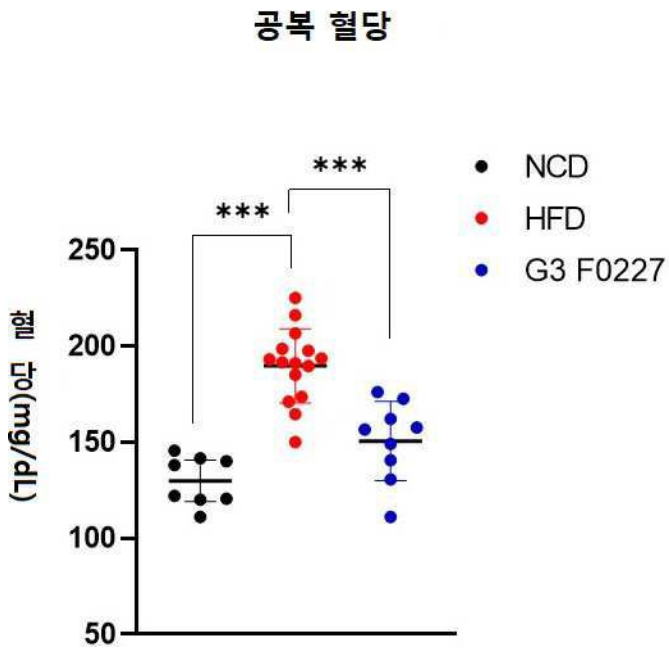
도면6b



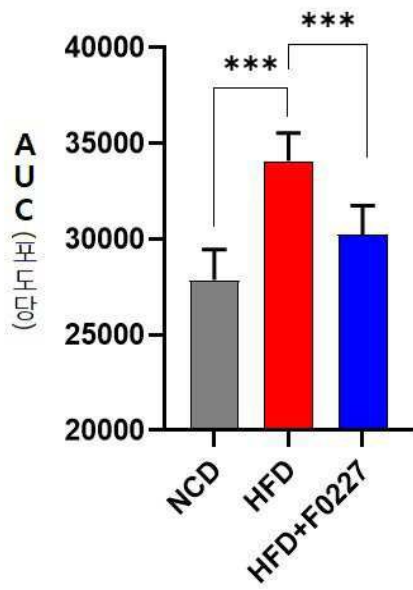
도면7a



도면7b



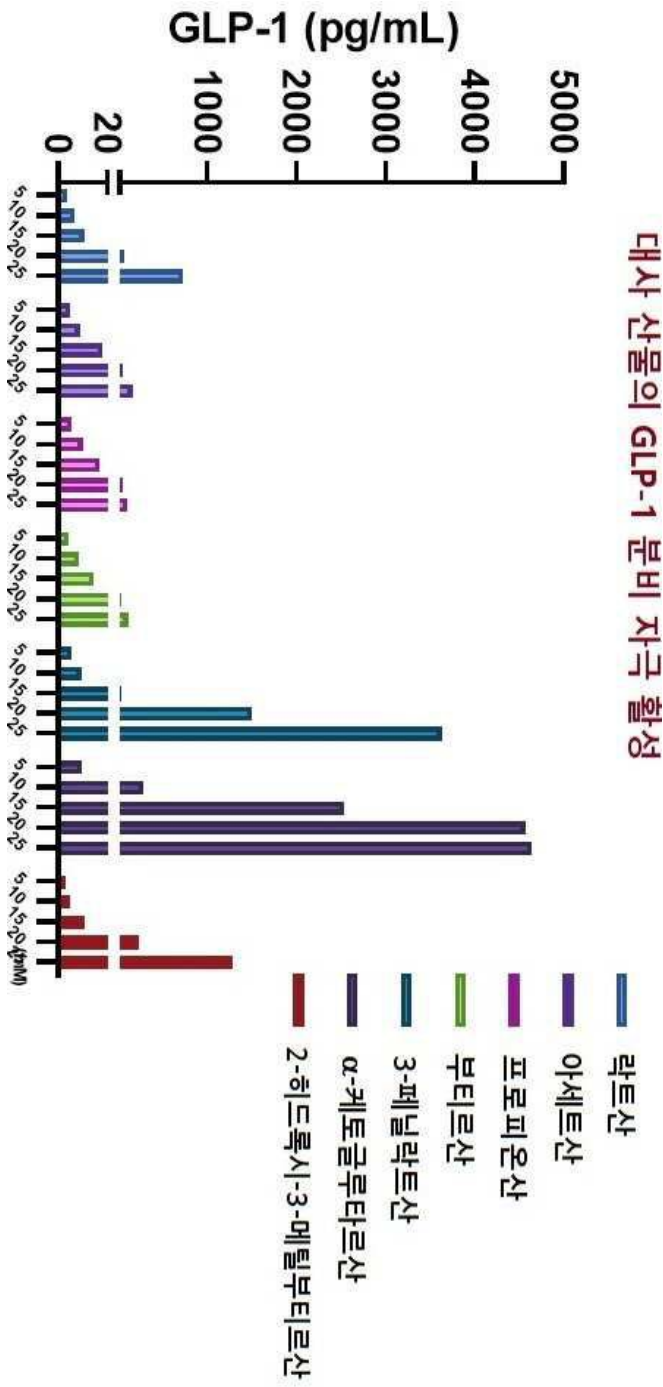
도면7c



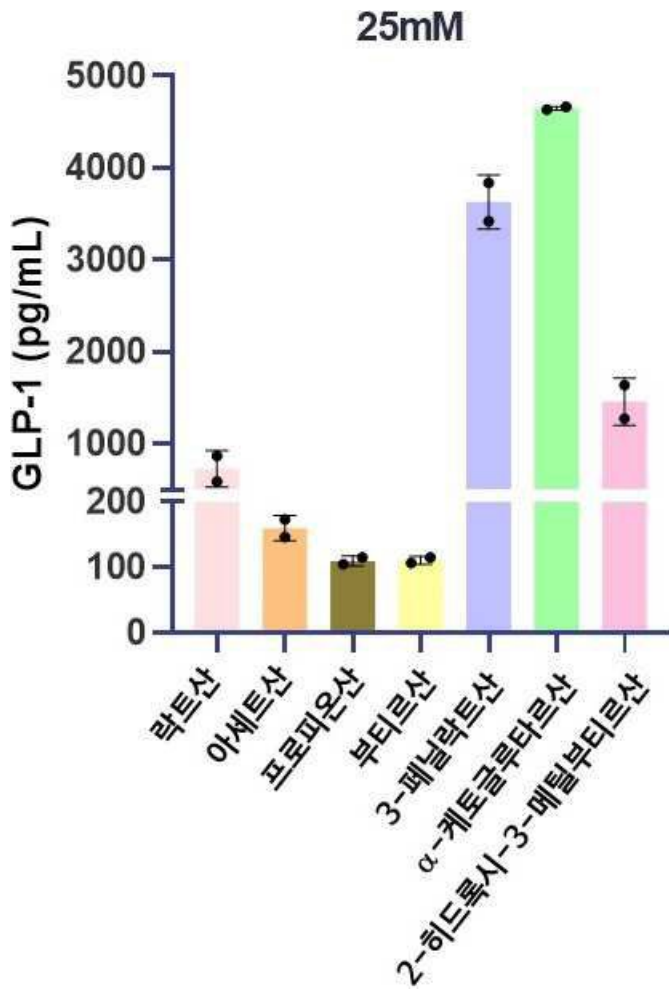
도면8

MRS	F0083	F0227	GB102	H0213	KCTC 3108	KCTC 3112	KCTC 3163	대사체	분류
0.17	1.16	1.11	1.15	0.94	1.09	1.15	1.23	락트산	유기산
0.35	1.65	1.28	1.33	0.95	1.21	0.66	0.56	피루브산	
0.12	0.55	0.39	5.88	0.52	0.29	0.33	0.14	숙신산	
0.46	1.27	1.45	1.75	0.95	0.90	0.90	0.33	푸마르산	
0.11	1.30	1.45	1.30	0.45	0.65	2.56	0.18	2-히드록시글루타르산	
0.06	1.27	3.92	0.06	0.40	1.90	0.33	0.18	α-케토글루타르산	
0.01	2.13	2.32	0.82	0.75	1.19	0.55	0.24	3-페닐락트산	
1.32	1.12	1.08	0.01	0.93	1.11	1.21	1.22	시트르산	
0.85	0.62	1.13	1.28	1.10	1.07	1.23	0.73	알라닌	아미노산
0.59	0.63	1.14	1.35	1.23	1.07	1.17	0.82	발린	
0.41	0.83	1.02	1.63	1.18	1.16	1.17	0.59	류신	
0.20	0.70	1.10	1.83	1.51	1.18	1.06	0.43	이소류신	
0.62	1.04	1.15	1.15	1.04	1.03	0.99	0.99	글리신	
0.22	0.09	0.22	3.00	2.95	0.17	0.78	0.67	세린	
0.28	0.25	1.14	2.07	1.99	1.01	0.69	0.58	트레오닌	
0.00	2.37	2.22	1.05	0.87	0.78	0.28	0.42	시스타티오닌	
0.01	0.09	0.56	5.20	1.20	0.39	0.23	0.33	메티오닌	
0.30	0.93	1.07	1.39	1.16	1.07	1.23	0.83	글루탐산	
0.08	0.27	0.67	3.29	1.57	0.80	0.82	0.51	페닐알라닌	
0.13	0.30	0.38	3.29	0.42	0.33	2.91	0.24	오르니틴	
0.74	0.52	0.94	1.98	1.14	1.00	1.11	0.57	리신	
0.60	0.71	1.12	1.60	1.13	1.11	1.13	0.61	티로신	
0.28	1.30	1.55	1.29	1.15	0.90	0.95	0.59	N-α-아세틸-L-리신	
0.43	1.15	1.23	1.56	0.96	1.09	0.87	0.72	트립토판	
0.86	1.28	1.25	1.27	0.93	1.01	0.85	0.54	글리콜산	
0.21	1.74	0.99	2.19	0.40	0.84	1.39	0.23	2-히드록시부티르산	
0.88	1.41	1.32	1.30	0.87	0.91	0.78	0.54	히드라아크릴산	
0.10	2.43	3.01	0.74	0.22	1.05	0.33	0.13	2-히드록시-3-메틸부티르산	
0.49	1.39	1.33	1.54	1.00	0.97	0.81	0.46	2,4-디히드록시부탄산	
0.51	1.38	1.34	1.31	1.01	0.98	0.91	0.55	3,4-디히드록시부탄산	
0.33	1.23	1.42	1.57	1.21	1.07	0.82	0.36	글리세롤-3-인산	
0.51	1.17	1.48	1.35	1.12	0.95	1.05	0.37	팔미트산	
0.21	0.41	0.39	2.83	0.34	1.83	1.83	0.16	올레산	
0.48	1.24	1.57	1.33	1.20	0.93	0.91	0.34	스테아르산	
0.97	0.27	0.72	2.74	0.62	1.25	1.34	0.09	올레아미드	
0.68	1.25	1.38	1.22	1.13	0.99	0.85	0.50	1-모노팔미틴	
0.60	1.23	1.45	1.26	1.20	0.98	0.83	0.46	모노스테아르산글리세롤	
0.92	1.14	0.84	1.14	0.87	1.01	1.14	0.95	글리세롤	탄수화물
1.97	0.70	0.66	0.30	2.70	0.74	0.26	0.67	글리세린산	
0.03	0.12	0.11	4.35	0.05	0.07	3.25	0.03	에리트리톨	
0.45	1.42	1.28	1.81	0.93	0.87	0.74	0.50	피니톨	
1.96	0.34	0.33	0.12	1.45	2.69	0.54	0.57	글루루산	
0.55	1.27	1.44	1.22	1.12	1.03	0.90	0.46	갈락타르산	
2.31	0.68	0.84	0.03	0.99	1.36	0.54	1.23	탄수화물 1	
0.65	1.26	1.24	1.28	0.92	1.06	0.91	0.68	마이오-이노시톨	
1.27	1.41	1.19	0.46	0.74	2.05	0.54	0.35	인산 핵소오스 1	
0.33	1.41	1.53	0.51	0.98	1.88	0.82	0.54	인산 핵소오스 2	
2.51	0.40	0.33	0.31	0.47	2.65	0.27	0.86	탄수화물 2	
1.30	1.34	1.04	0.59	0.91	1.67	0.74	0.41	탄수화물 3	
0.54	2.39	1.76	0.17	1.43	1.02	0.17	0.51	탄수화물 4	
1.27	1.13	1.08	0.73	0.99	1.15	0.40	1.25	락토오스 1	
1.18	1.25	1.17	0.51	1.11	1.26	0.27	1.24	락토오스 2	
1.65	0.13	0.02	1.66	1.25	0.09	1.65	1.54	트레할로스	
1.69	0.74	0.73	0.13	2.16	0.50	0.36	1.68	탄수화물 5	
0.58	1.18	1.34	1.38	1.18	0.92	0.94	0.49	히드록시아민	기타
0.33	1.05	1.34	1.98	1.17	0.83	0.88	0.43	에탄올아민	
1.14	0.98	0.96	1.00	0.81	0.97	1.06	1.08	인산	미지물질
0.50	1.50	1.49	1.18	1.12	0.99	0.73	0.49	미지물질 1	
0.67	1.32	1.26	1.31	0.93	0.97	0.87	0.67	미지물질 2	
0.33	1.37	1.31	1.64	0.99	0.93	0.95	0.49	미지물질 3	
0.41	1.24	1.41	1.41	1.12	0.88	1.04	0.48	미지물질 4	
0.48	1.14	1.45	1.20	1.10	0.92	0.98	0.72	미지물질 5	
0.78	1.45	1.42	0.65	1.12	1.77	0.49	0.30	미지물질 6	
0.48	0.99	1.52	1.54	1.19	0.93	0.93	0.43	미지물질 7	
0.64	1.24	1.61	1.15	1.20	0.94	0.76	0.45	미지물질 8	
1.21	1.13	1.21	0.88	1.01	1.13	0.81	0.62	미지물질 9	
0.88	1.27	1.53	0.81	1.19	1.10	0.72	0.49	미지물질 10	
	1.33	1.34	0.67	1.11	1.19	0.64	0.43	미지물질 11	

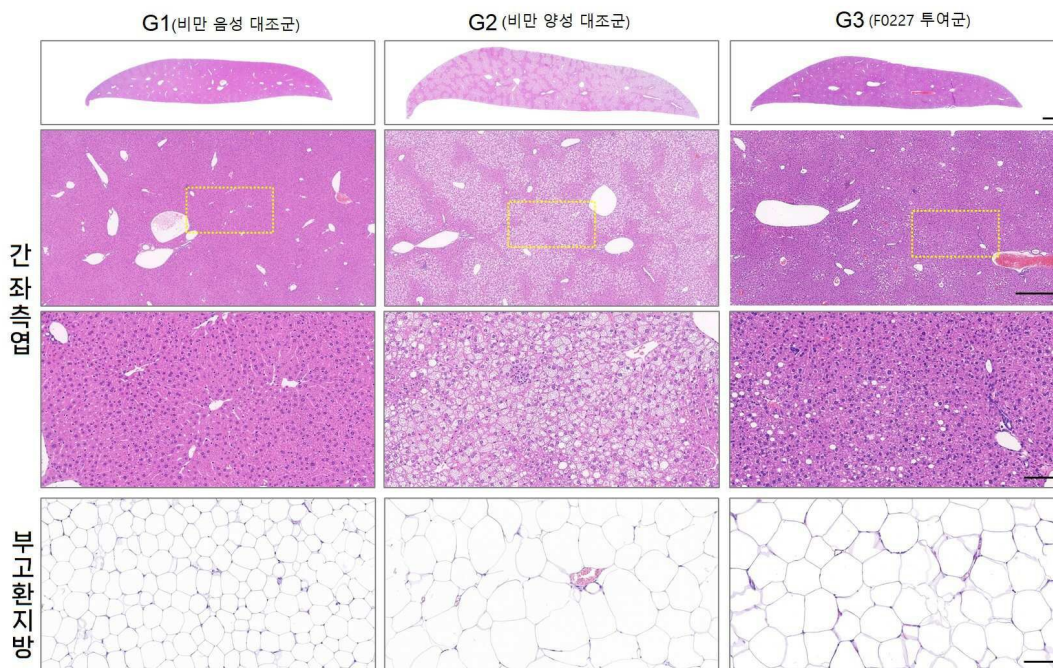
도면9a



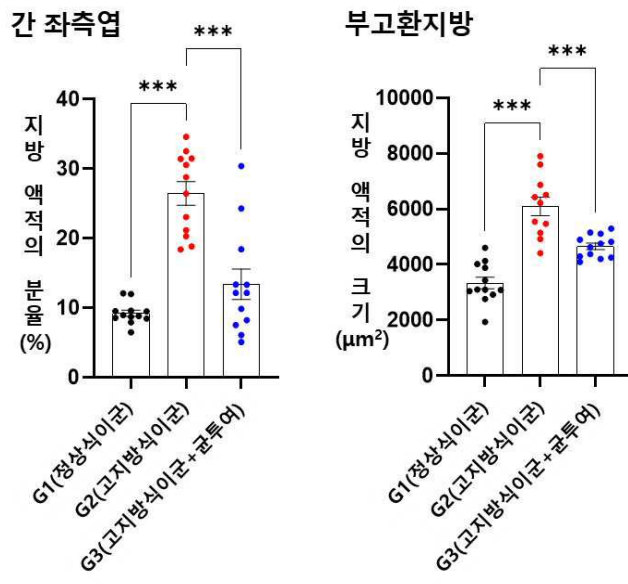
도면9b



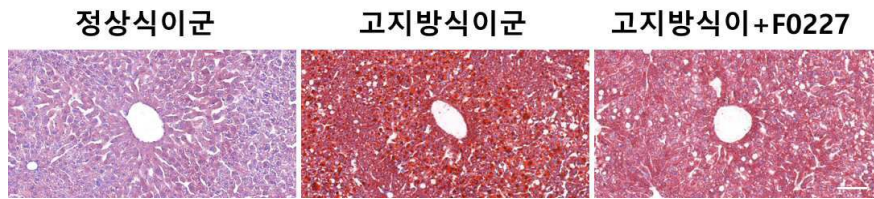
도면10a



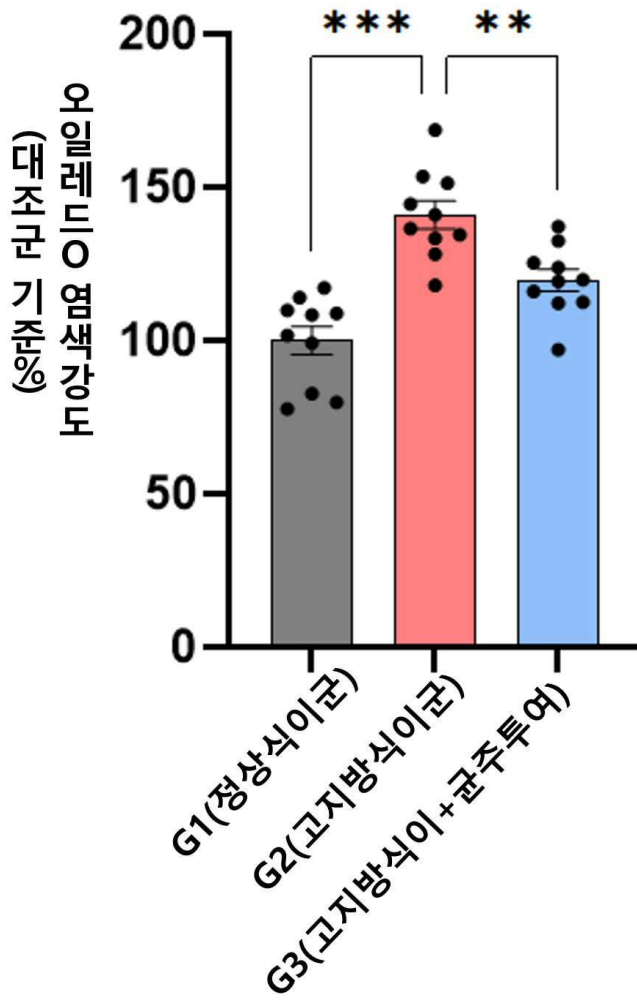
도면10b



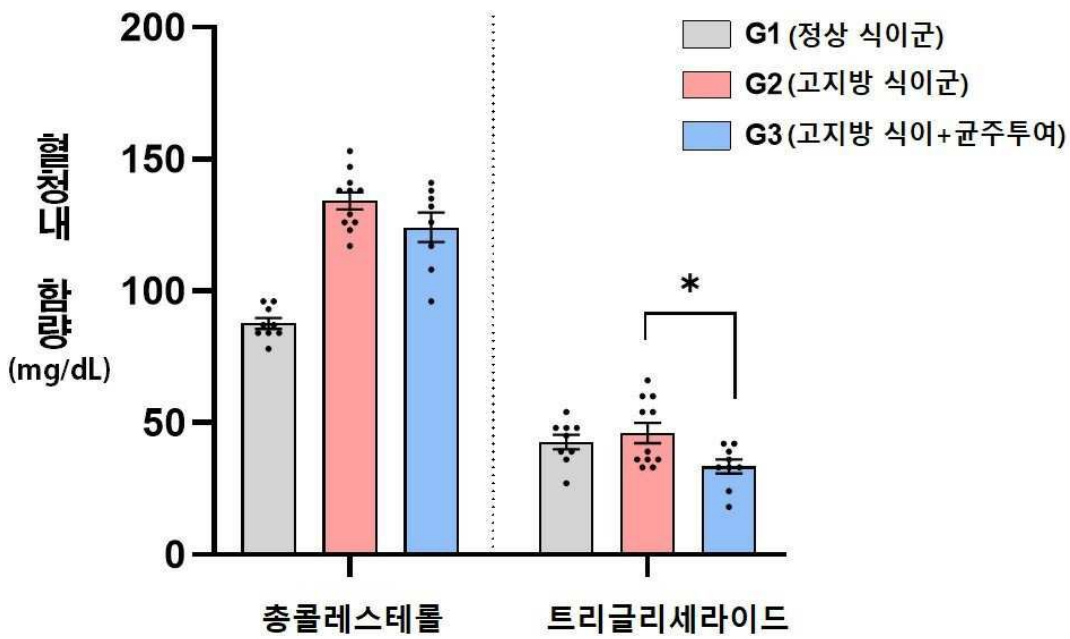
도면10c



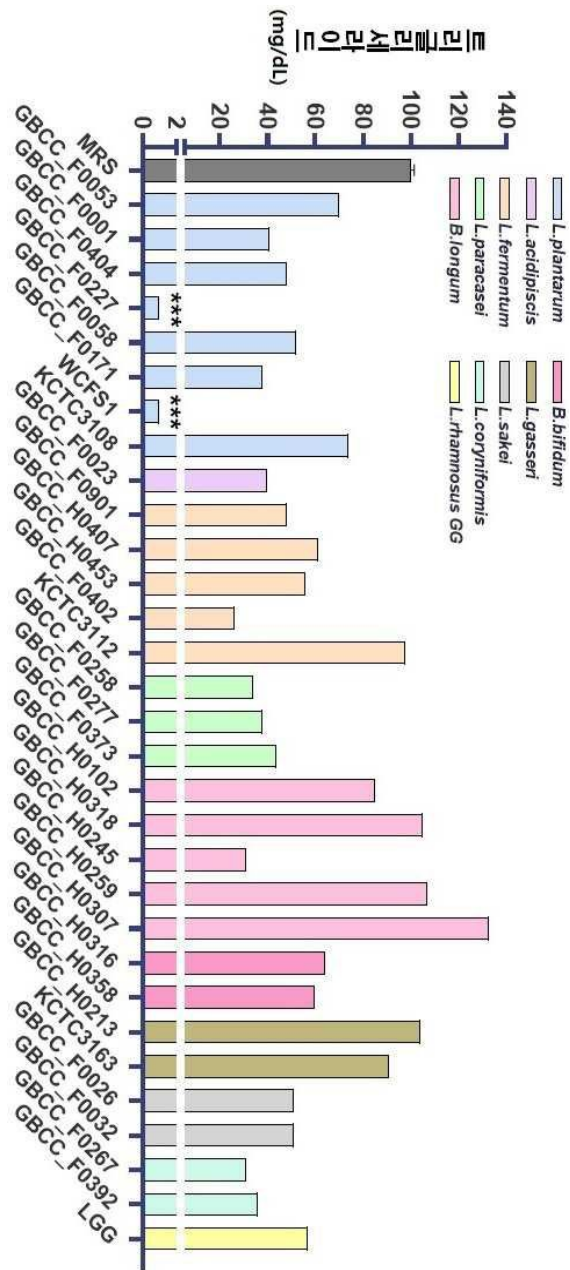
도면10d



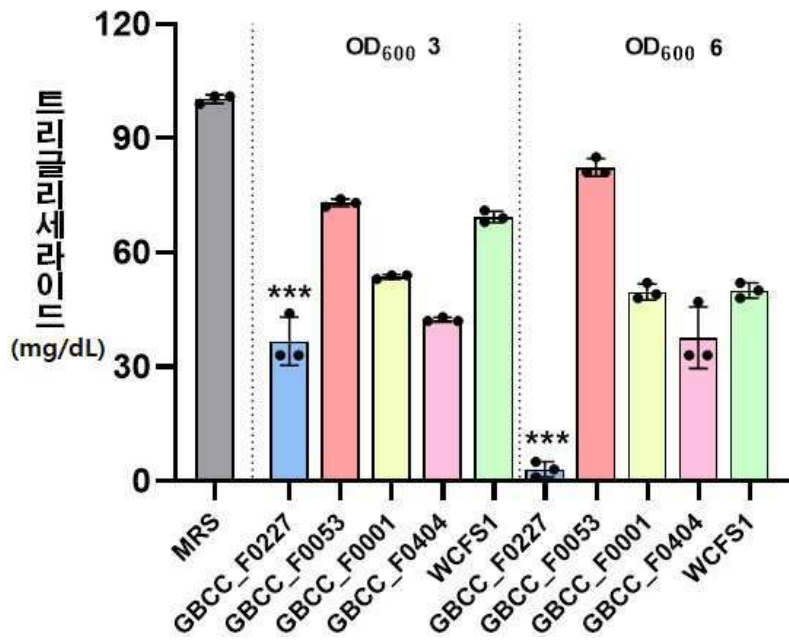
도면10e



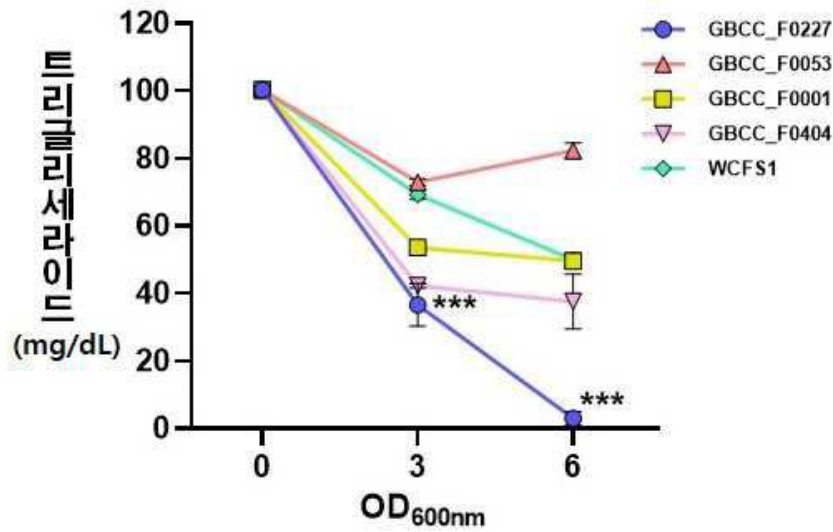
도면11



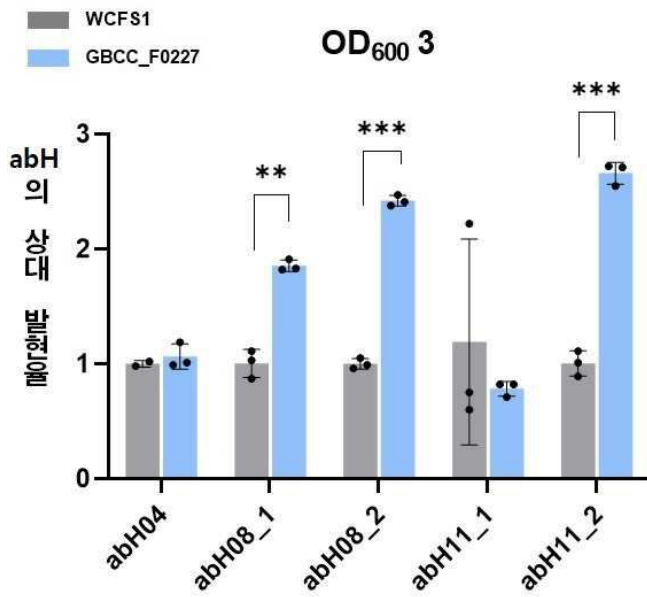
도면12a



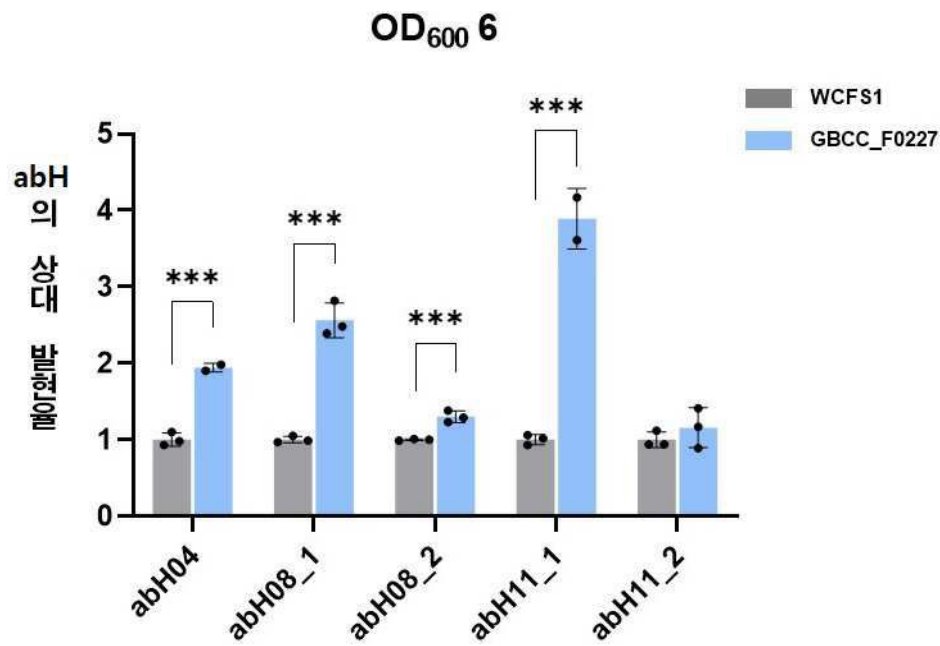
도면12b



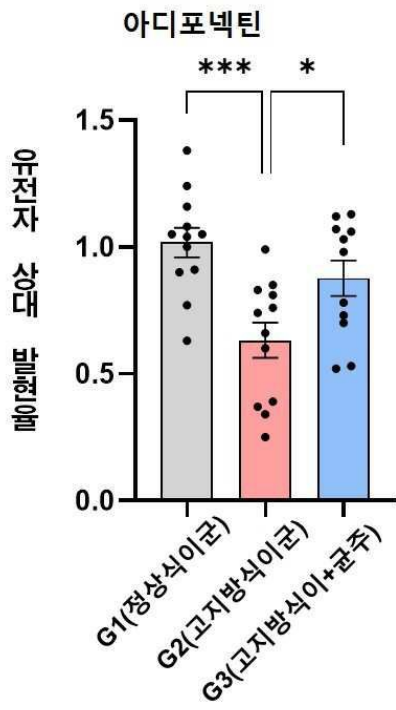
도면13a



도면13b

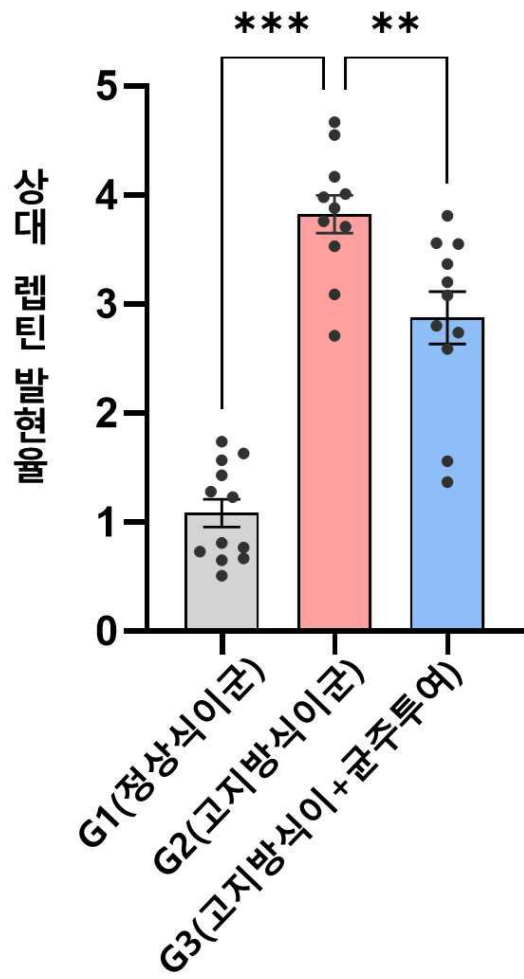


도면14a

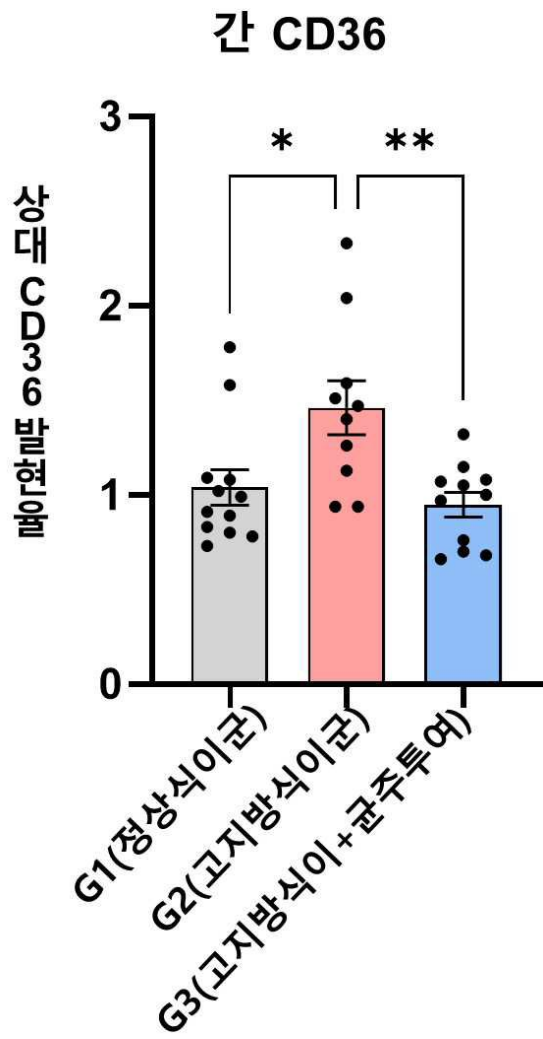


도면14b

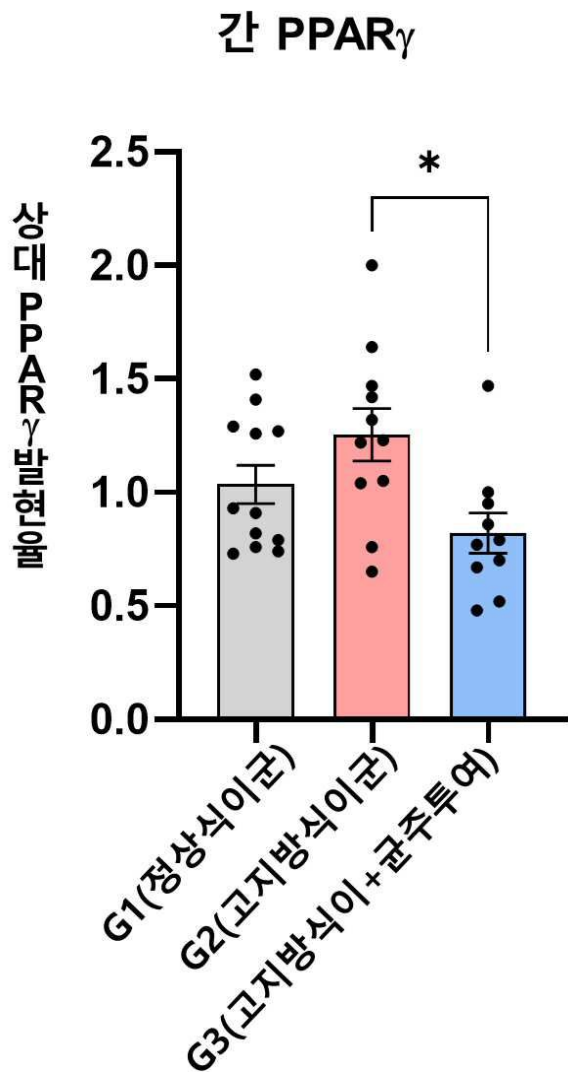
### 부고환 백색지방조직 렘틴



도면14c

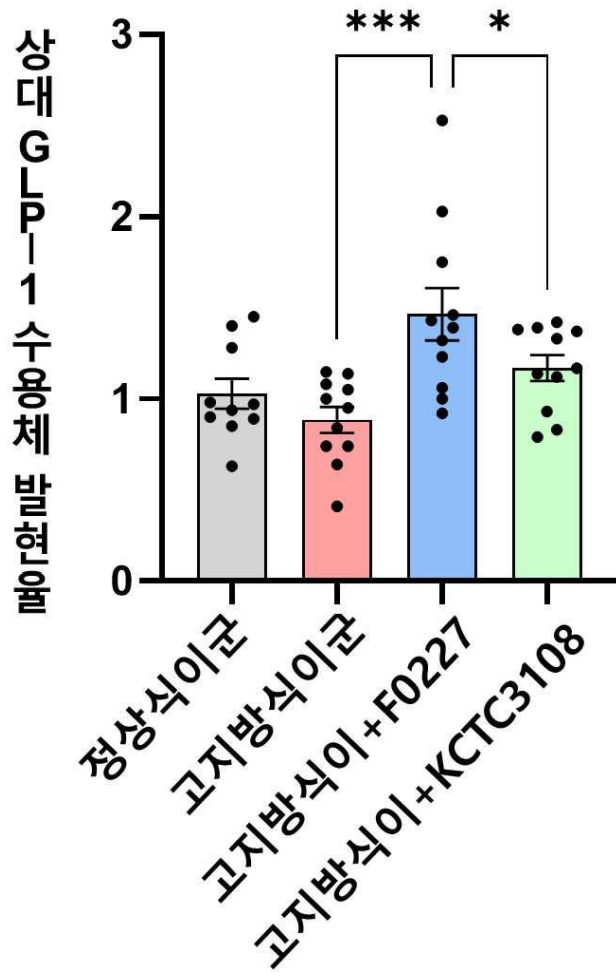


도면14d



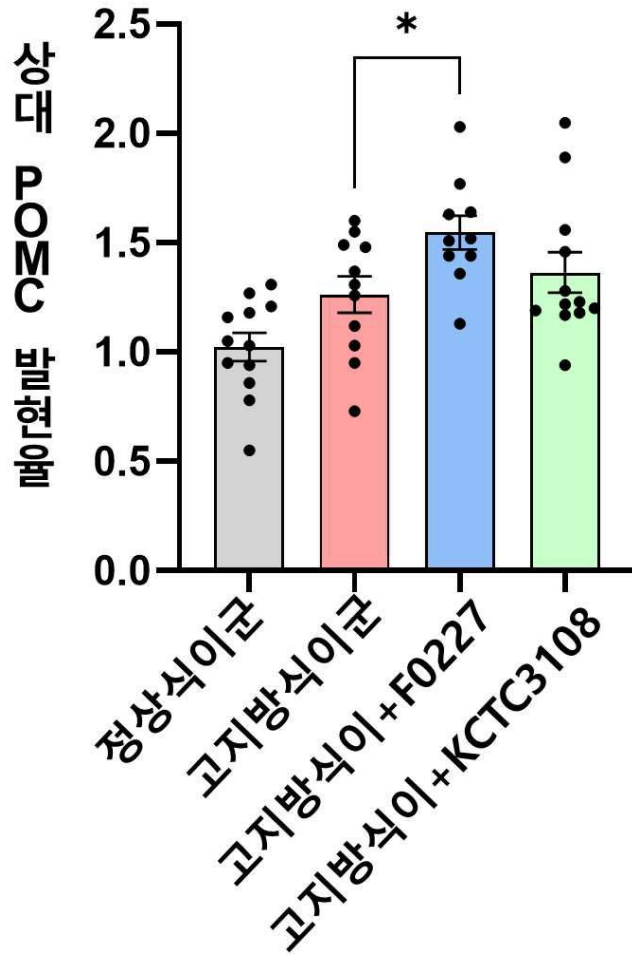
도면14e

### 시상하부 GLP-1수용체



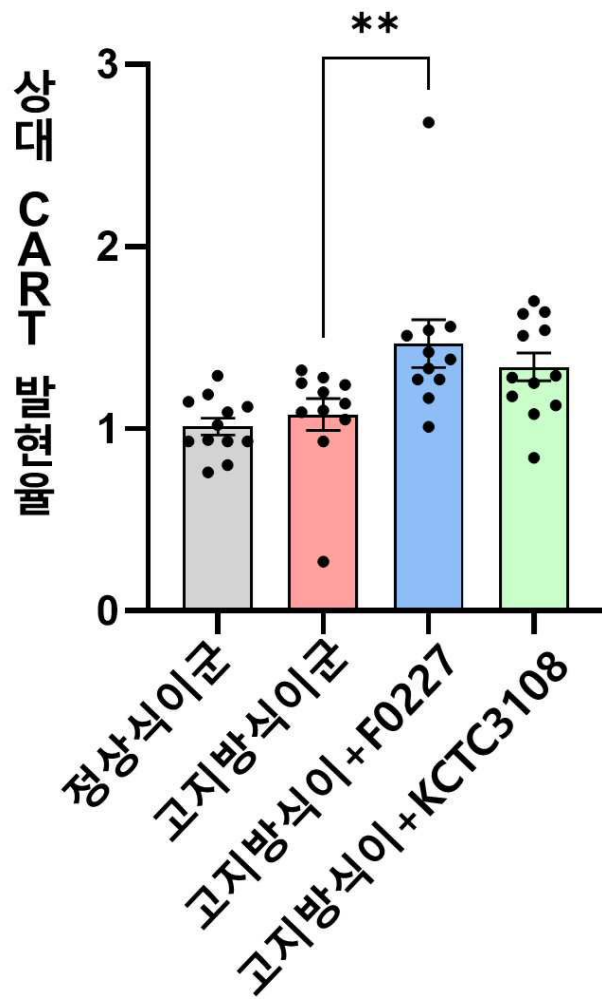
도면14f

### 시상하부 POMC

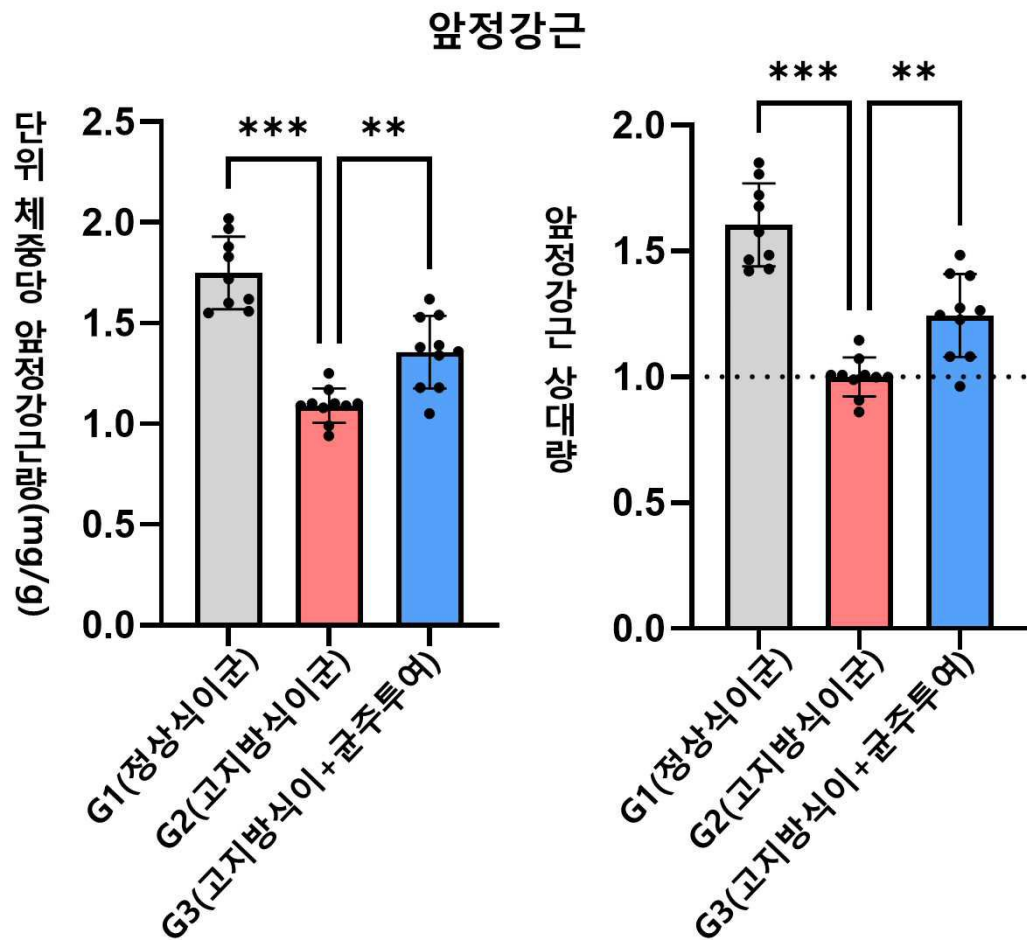


도면14g

### 시상하부 CART

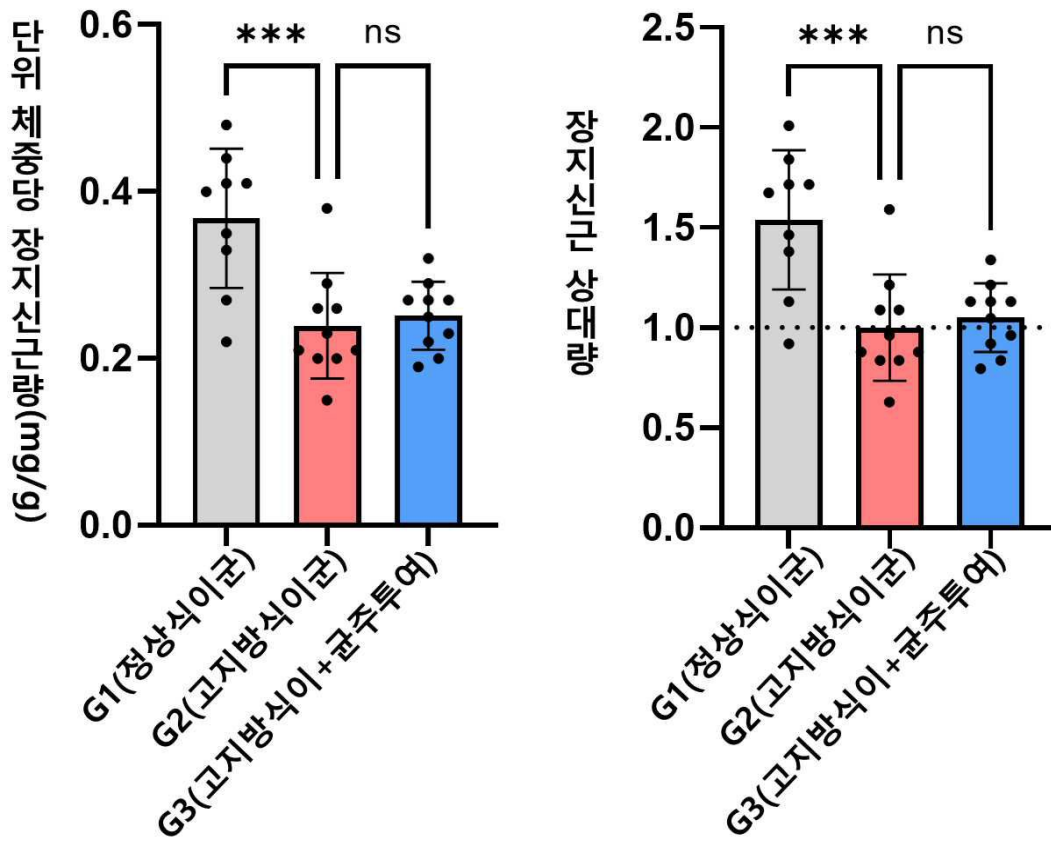


도면15a

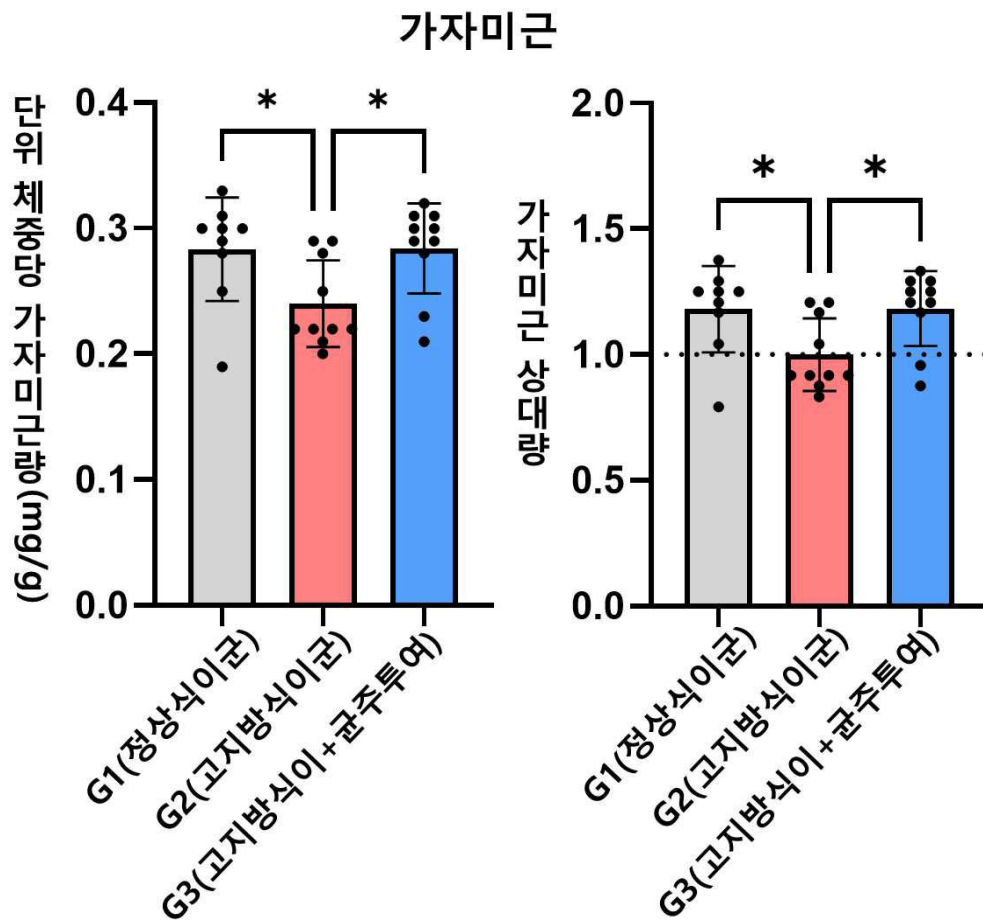


도면15b

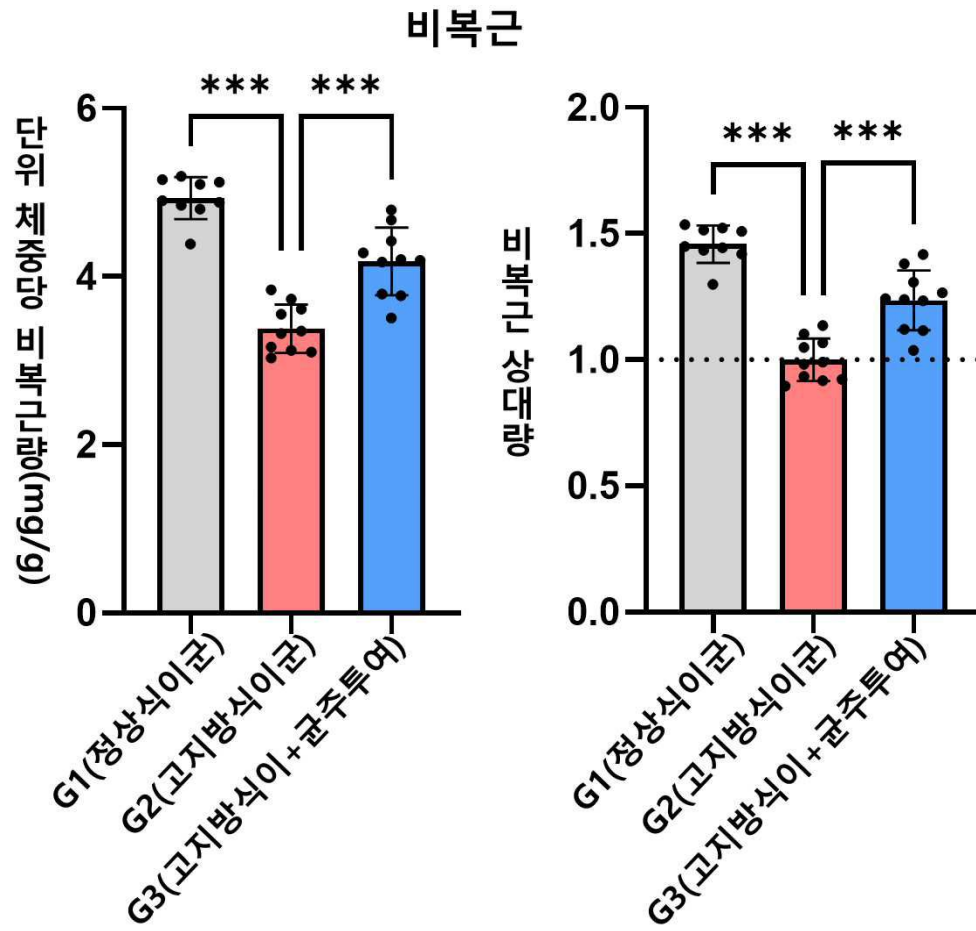
### 장지신근



도면15c

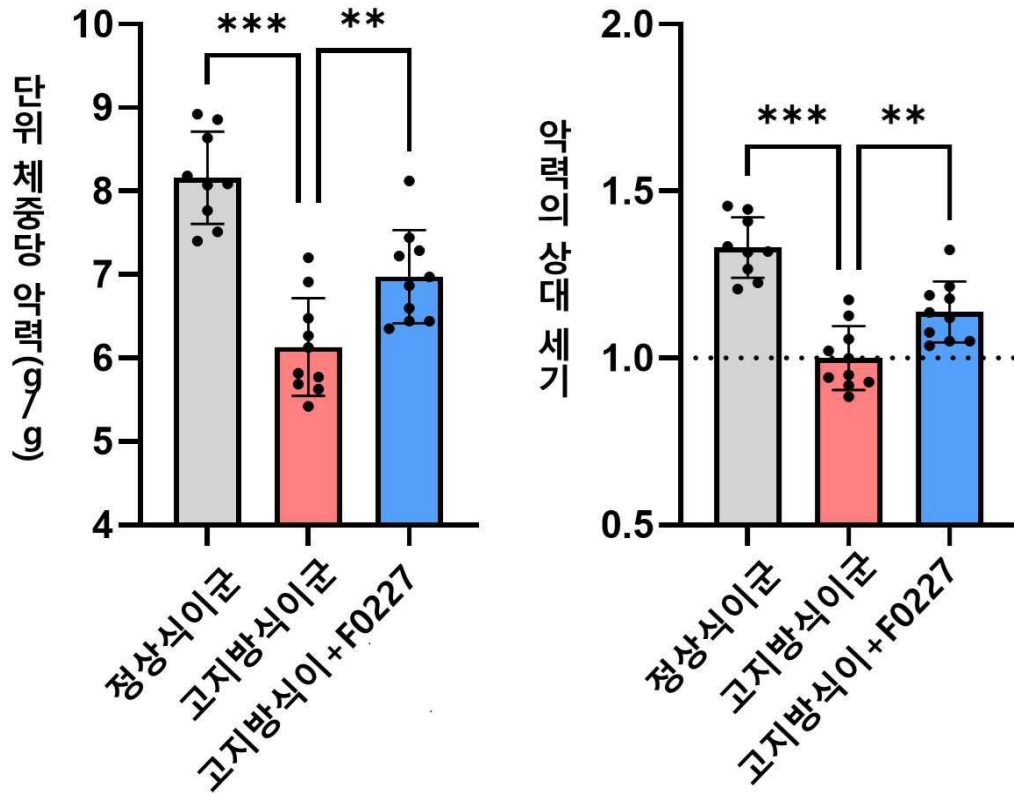


도면15d



도면16

(네 발)악력 세기 시험



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.