



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0084366
(43) 공개일자 2025년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23K 10/16 (2017.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61K 35/747 (2015.01)
A61K 8/99 (2017.01) A61P 3/04 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01) C12R 1/23 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A23K 10/16 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0172811
(22) 출원일자 2023년12월01일
심사청구일자 2023년12월01일

(71) 출원인
순천향대학교 산학협력단
충청남도 아산시 신창면 순천향로 22, 순천향대학교내
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
김용식
충청남도 천안시 서북구 불당26로 80 402동 2302호
이유리
경기도 평택시 고덕중앙2로 100, 806동 1503호
(74) 대리인
서장찬, 박병석

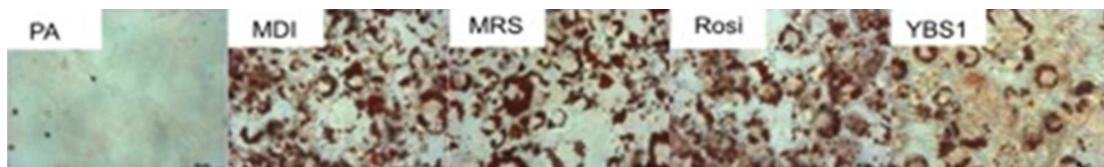
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 신규한 락토바실러스 애시도필러스 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) 균주 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 항비만 활성을 갖는 신규한 락토바실러스 애시도필러스 YBS1 균주 및 상기 균주의 배양물을 포함하는 항비만 용도의 약학 조성물, 건강 기능 식품, 화장료 조성물, 사료 조성물 및 시약 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스 YBS1 균주 배양물은 전-지방세포가 지방세포로 지방세포화되는 성숙화 과정을 억제하는 효과가 있으므로, 이를 항비만의 약학 조성물, 건강 기능 식품, 화장료 조성물, 사료 조성물 및 시약 조성물 등의 용도로 적용할 수 있으며, 나아가, 전-지방세포에 본 발명의 균주 배양물을 처리하는 경우 지방세포로의 성숙화를 억제할 수 있으므로 비만 등의 관련 치료제 개발 연구에도 적극 활용할 수 있을 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)

A61K 35/747 (2013.01)

A61K 8/99 (2013.01)

A61P 3/04 (2018.01)

C12N 5/0653 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/332 (2013.01)

A23V 2400/113 (2023.08)

C12R 2001/23 (2021.05)

(72) 발명자

박두상

대전광역시 유성구 과학로 125

장병천

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345362877
과제번호	2015R1A6A1A03032522
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	조직재생 연구소
기 여 율	70/100
과제수행기관명	순천향대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711195935
과제번호	2022M3H9A1084279
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	국가생명연구자원선진화사업(과기부)
연구과제명	인체유래 미생물자원 소재 확보 및 활용 협력센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	한국생명공학연구원
연구기간	2023.05.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주.

청구항 2

기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 유효 성분으로 함유하는 비만(obesity)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 비만(obesity)의 예방 또는 개선용 건강 기능 식품.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강 기능 식품.

청구항 6

기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 슬리밍(slimming)용 화장품 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 로션, 화장수, 크림, 에센스, 폼 및 팩으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 제형인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 9

기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 비만(obesity)의 예방 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 사료 조성물.

청구항 11

기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 전-지방세포(pre-adipocyte)의 지방세포(adipocyte)로의 성숙화 억제용 시약 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 시약 조성물.

청구항 13

분리된 전-지방세포(pre-adipocyte)에 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 처리하는 것을 포함하는 전-지방세포의 지방세포(adipocyte)로의 성숙화 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 신규한 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) 균주 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 항비만 활성을 갖는 신규한 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주 및 상기 균주의 배양물을 포함하는 항비만 용도의 약학 조성물, 건강 기능 식품, 화장품 조성물, 사료 조성물 및 시약 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 지방 조직(adipose tissue)은 전신 항상성(systemic homeostasis) 유지에 중심적 조직으로서, 백색 지방 조직(white adipose tissue)의 과도한 축적은 비만(obesity)을 유발한다. 미성숙 전-지방세포(pre-adipocyte)로부터 지방세포(adipocyte)로의 전환 과정을 지방형성과정(adipogenesis)이라 하고, 이러한 과정은 호르몬 신호 및 다양한 전사 인자(transcriptional factor)를 포함하는 여러 인자들에 의해 조절된다.
- [0003] 지방형성 초기 단계에서, 지방형성 호르몬 자극은 Wnt/ β -catenin 신호전달의 억제와 함께, CCAAT/enhancer-binding protein(C/EBP)- β 및 δ 와 같은 초기 전사 인자의 발현을 유도하는데 필요하다. 그 결과, 이러한 초기 유전자의 발현 후, 중기 지방형성 자극이 마스터 레귤레이터(master regulator)인 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 및 C/EBP α 를 자극하고, 최종적인 분화 및 지방세포 형성에 필요한 adiponectin 및 fatty acid-binding protein 4(FABP4)의 발현으로 이어진다.
- [0004] 한편, 대한민국 특허공개공보 제10-2019-0118985호에서는 비피도박테리움 롱검 균주의 항비만 효과로서 지방세포 분화억제 활성을 개시하고 있는데, 균주 배양물 처리에 의하여 베이지지방세포 및 갈색지방세포 특이적 유전자의 발현이 비처리 대조구에 비해 현저히 증가함을 제시하고 있으나, 이는 백색지방세포의 갈색지방화에 관한 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0118985 A

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 전-지방세포의 지방세포로의 성숙화를 억제하는 신규한 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) 균주를 제공하고자 하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명에서 해결하기 위한 과제는 상기 균주 배양물을 포함하는 항비만 용도의 약학 조성물, 건강 기능

식품, 화장품 조성물, 사료 조성물 및 시약 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 상기 균주 배양물을 분리된 전-지방세포에 처리하여 지방세포로의 성숙화를 억제하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 기탁번호 xxxxx인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0012] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

[0013] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0014] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 슬리밍(slimming)용 화장품 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0016] 상기 화장품 조성물은 로션, 화장수, 크림, 에센스, 폼 및 팩으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형인 것이 바람직하다.

[0017] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0019] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 전-지방세포의 지방세포로의 성숙화 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0021] 또한, 본 발명은 분리된 전-지방세포에 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 처리하는 것을 포함하는 전-지방세포의 지방세포로의 성숙화 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주 배양물은 전-지방세포가 지방세포로 지방세포화되는 성숙화 과정을 억제하는 효과가 있으므로, 이를 항비만의 약학 조성물, 건강 기능 식품, 화장품 조성물, 사료 조성물 및 시약 조성물 등의 용도로 적용할 수 있으며, 나아가, 전-지방세포에 본 발명의 균주 배양물을 처리하는 경우 지방세포로의 성숙화를 억제할 수 있으므로 비만 등의 관련 치료제 개발 연구에도 적극 활용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 다양한 농도(1 μ l/mL, 5 μ l/mL 및 10 μ l/mL)로 3T3-L1 전-지방세포에 24 및 48시간 동안 처리한 후 세포 독성을 평가한 결과를 나타낸 것이다(A). 또한, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주 배양물을 5 μ l/mL로 1~5일 동안 3T3-L1 전지방세포에 처리하여

분화를 유도하여도 세포 독성이 전혀 나타나지 않음을 보여준다(B).

도 2a 및 도 2b는 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물(5 μ l/mL)을 3T3-L1 전-지방세포에 처리한 후 세포 내 중성지방(triglyceride)의 축적을 ORO staining으로 평가한 결과이다. 결과는 평균 $\pm$ SEM(n=3)으로 표현되고, 중요한 차이는 (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$ 로 제시되었다. 여기에서, PA: Pre-adipocytes, MDI: Methylisobutylxanthine-Dexamethasone-Insulin, MRS: MRS medium, Rosi: Rosiglitazone, YBS1: *Lactobacillus acidophilus* YBS1의 배양상등액을 각각 나타낸다.

도 3은 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물(5 μ l/mL)을 3T3-L1 전-지방세포에 지방세포분화 단계의 초기(1~2일), 중기(3~4일) 및 후기(6일)로 나누어 처리한 후 세포 내 지질(lipid)의 축적을 ORO staining으로 평가한 결과이다. 결과는 평균 $\pm$ SEM(n=3)으로 표현되고, 중요한 차이는 (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$ 로 제시되었다. 여기에서, MDI: Methylisobutylxanthine-Dexamethasone-Insulin, YBS1: *Lactobacillus acidophilus* YBS1의 배양상등액을 각각 나타낸다.

도 4는 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물(5 μ l/mL)을 3T3-L1 전-지방세포에 6일 동안 처리한 후 전-지방세포의 지방형성과정에 관여하는 *Cebp/α*, *Cebp/β*, *Cebp/δ*, *Ppar γ*, *aP2* 및 *adiponectin*의 mRNA 발현 양상을 qRT-PCR로 측정된 결과를 보여준다. 여기에서, PA: Pre-adipocytes, MDI: Methylisobutylxanthine-Dexamethasone-Insulin, MRS: MRS medium, YBS1: *Lactobacillus acidophilus* YBS1의 배양상등액을 각각 나타낸다.

도 5a 및 도 5b는 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물(5 μ l/mL)을 3T3-L1 전-지방세포에 0~6일 동안 처리한 후 전-지방세포의 지방형성과정에 관여하는 *Ppar γ*, *aP2* 및 *adiponectin*의 단백질 발현 양상을 Western Blot으로 측정된 결과를 보여준다. 여기에서, MDI: Methylisobutylxanthine-Dexamethasone-Insulin, YBS1: *Lactobacillus acidophilus* YBS1의 배양상등액을 각각 나타낸다.

도 6은 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물(5 μ l/mL)을 3T3-L1 전-지방세포에 0~12시간 동안 처리한 후 p38 MAPK의 인산화를 Western Blot으로 측정된 결과를 보여준다(A 및 B). 또한, p38 MAPK 저해제인 SB203580를 처리한 후 YBS1에 의한 p38 MAPK의 인산화 및 *Ppar γ*, *Cebp/α*, *Cebp/β*의 단백질 발현 양상의 변화를 보여준다(C 내지 F). 여기에서, MDI: Methylisobutylxanthine-Dexamethasone-Insulin, YBS1: *Lactobacillus acidophilus* YBS1의 배양상등액, SB: SB203580를 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0025] 본 발명의 발명자들은 신규한 비만 치료제의 개발을 위하여 다양한 유산균 배양액으로부터 항비만 효과를 검정하였고, 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물에서 3T3-L1 전-지방세포의 지방세포로의 성숙화 억제 활성이 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0026] 따라서, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 상기 신규 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주는 2023년 7월 11일자 로 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)에 수탁번호 KCTC 15515BP로 기탁되었다.
- [0028] 본 발명의 상기 신규 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 16S rRNA 염기 서열은 서열번호 3으로 나타내었다.
- [0029] 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물은 3T3-L1 전-지방세포의 지방세포로의 성숙화 과정을 억제하는 효과가 있으므로 항비만의 용도로서 적용될 수 있다.
- [0030] 구체적으로, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1

균주의 배양물(5 μ l/ml)은 3T3-L1 전-지방세포에 24~48시간 동안 처리 및 1~5일 동안 분화를 유도하는 과정에서 세포 독성을 나타내지 않았다(도 1).

- [0031] 또한, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물(5 μ l/ml)을 MDI와 동시에 3T3-L1 전-지방세포에 처리하는 경우 세포 내 중성지방의 축적이 거의 나타나지 않음을 확인하였다(도 2a 및 도 2b).
- [0032] 또한, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물(5 μ l/ml)을 MDI와 동시에 3T3-L1 전-지방세포에 처리하는 경우 세포 내 지질의 축적이 거의 나타나지 않음을 확인하였다. 구체적으로, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물(5 μ l/ml)을 지방세포분화 초기(1~2일), 중기(3~4일) 및 후기(6일)에 각각 처리하면, 초기에 처리하는 경우에서 지방세포분화를 억제하는 것으로 나타났다(도 3).
- [0033] 또한, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 3T3-L1 전-지방세포에 처리하면 지방형성과정에 관여하는 유전자 *Cebp/a*, *Ppar γ* , *aP2* 및 *adiponectin*의 mRNA 발현이 감소함을 확인하였다(도 4).
- [0034] 또한, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 3T3-L1 전-지방세포에 처리하면 지방형성과정에 관여하는 *Ppar γ* , *aP2* 및 *adiponectin*의 단백질 발현도 감소함을 확인하였다(도 5a 및 도 5b).
- [0035] 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물은, 앞서 설명된 바와 같이, 전-지방세포의 지방세포분화 초기 단계에 주로 작용하여 전-지방세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 것으로 보이는데, 이는 지방세포분화 초기 단계에서 p38 MAPK의 인산화와 관련이 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 p38 MAPK 저해제인 SB203580를 처리하는 경우, p38 MAPK이 활성화되지 않아 *Ppar γ* 의 발현이 증가되는 실험 결과로부터 뒷받침되었다(도 6). 이와 같은 결과를 종합하면, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물은 3T3-L1 전-지방세포의 지방세포로의 분화 초기 단계에서 p38 MAPK의 인산화를 활성화시켜 *Ppar γ* 의 발현을 억제하는 메커니즘으로 작용하는 것으로 추측된다.
- [0036] 따라서, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0037] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0038] 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0039] 이러한 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.
- [0040] 바람직한 구체예로서, 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등과 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.
- [0041] 바람직한 구체예로서, 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

- [0042] 바람직한 구체예로서, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등을 예시할 수 있다. 비수성용제, 현탁제에는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 포함될 수 있다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0044] 바람직한 구체예로서, 본 발명의 약학적 조성물에서 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 5,000mg, 바람직하게는 100 내지 3,000mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1 일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.
- [0047] 본 발명에서 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0048] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.
- [0049] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0050] 본 발명의 건강 기능 식품은 비만의 예방 또는 개선에 효과적인 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 건강 기능 식품은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량% 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100ml를 기준으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 건강 기능 식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제, 예컨대, 천연 탄수화물 및 다양한 향미제 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0053] 상기 천연 탄수화물의 예로는 포도당, 과당 등의 단당류, 말토오스, 수크로오스 등의 이당류 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 다당류와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등의 당알코올이 있다.
- [0054] 상기 향미제로는 타우마틴, 레바우디오시드 A 또는 글리시르히진과 같은 스테비아 등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파르탐 등의 합성 향미제를 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강 기능 식품 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g을 사용한다. 상기 외에 본 발명의 건강 기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 그의

염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강 기능 식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 델피디닌 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 100 중량부 당 0.01 내지 약 20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

- [0055] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 슬리밍용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0056] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0057] 상기 "슬리밍"은 신체의 전체 또는 특정 부위의 체적이 감소되는 현상을 의미하며, 예를 들어, 신체의 전체 또는 특정 부위의 지방의 제거 또는 감소일 수 있다.
- [0058] 본 발명의 화장품 조성물의 유효성분은 조성물 총 중량에 대해 0.01 내지 50중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 20중량%, 더욱 바람직하게는 1 내지 10중량%이다. 이러한 함량 범위에서 적절한 제형 안정성을 확보할 수 있으며, 목적하는 슬리밍 효과를 기대할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 상기 조성물은 본 발명의 유효성분 외에도 본 발명의 유효 활성을 저해하지 않는 범위에서 항산화, 항노화, 보습, 피부 재생 촉진의 효과를 위한 공지의 천연물 추출물이나 기타 성분을 추가로 포함시켜 이용할 수 있다.
- [0060] 또한, 상기 조성물은 화장품 조성물에 통상적으로 첨가되는 성분들, 예를 들면, 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제와 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제나 담체를 포함하여 특정 제형으로 성형될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들면, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 팩, 비누, 계면활성제-함유 클린징, 오일 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로는, 로션, 화장수, 유연 화장수, 영양 화장수, 크림, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 클렌징 크림, 폼, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이, 파우더, 팩트, 립글로즈, 립스틱, 섀도우, 샴푸 및 린스 등의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히, 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0065] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에

탄올아미드, 식물성 유, 라놀린유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0068] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0069] 본 발명에서 용어 "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다. 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료, 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 포함하는 전-지방세포의 지방세포로의 성숙화 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0071] 상기 배양물은 배양액, 배양 농축액, 배양액 건조물, 배양액 추출물, 배양 상등액, 배양 상등 농축액, 배양 상등액 건조물 및 배양 상등액 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0072] 상기 시약 조성물은 예를 들어 연구용 시약 조성물로서 적용될 수 있다. 통상 실험실 조건하에서 본 발명의 시약 조성물을 세포 또는 실험 동물에 투여할 수 있으며, 구체적인 투여 방법과 안전 규칙 등은 실험자의 각 실험실의 내부 준수 규정에 따라 수행되는 것이 바람직하다.

[0073] 또한, 본 발명은 분리된 전-지방세포에 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 처리하는 것을 포함하는 전-지방세포의 지방세포로의 성숙화 억제 방법을 제공한다.

[0074] 상기 전-지방세포는 개체로부터 자연적 또는 인위적 방법으로 분리된 것을 대상으로 한다. 개체로부터 분리된 상기 세포는 적절한 배양 조건하에서 수일 내지 수주 동안 배양될 수 있으며, 경우에 따라서 동결보관될 수도 있다.

[0075] 분리된 상기 세포들에 본 발명의 유효성분을 투여하는 방법은 통상의 기술자에게 자명한 사항이며, 바람직하게는 본 명세서의 하기 실시예에 기재된 바를 따를 수 있을 것이다.

[0076] 이하에서는 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 일 구체예를 기재한 것이며, 하기 실시예에 기재된 사항에 의하여 본 발명의 권리범위가 한정되어 해석되는 것이 아님은 명백하다.

[실시예]

1. 재료 및 방법

1.1. 케미컬 및 시약

[0080] Dexamethasone, Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Insulin, Rosiglitazone (ROSI), Oil Red O dye, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 및 4% formaldehyde는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 및 newborn calf serum (NBCS)은 Gibco (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. Fetal bovine serum은 Atlas Biologicals (Fort Collins, CO, USA)로부터 구입하였다. Penicillin-streptomycin solution은 Hyclone Laboratories, Inc. (South Logan, NY, USA)로부터 구입하였다. C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , AP2, Adiponectin, p-p38 MAPK, p38 MAPK에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였다. β -actin에 대한 항체는 Abcam (Cambridge, MA, USA)으로부터 구입하였다. BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)으로부터 구입하였고, protein loading buffer는 Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)로부터 구입하였다. lipolysis assay kit는 Biovision (Milpitas, CA, USA)으로부터 구입하였다.

1.2. 세포 배양, 분화 및 처리

[0082] 3T3-L1 mouse embryo fibroblasts를 Korean Cell Line Bank (KCLB-10092.1)로부터 입수하고, 10 %(v/v) heat-

inactivated NCS 및 1 % (v/v) antibiotic/antimycotic solution (100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin)이 첨가된 high-glucose DMEM 배지에서, 5 % CO₂를 포함하는 humidified incubator에 37 °C에서 배양하였다. 3T3-L1 전-지방세포 분화는 10 % fetal bovine serum (FBS), 0.5 mM IBMX, 1 µM dexamethasone 및 10 µg/ml insulin을 포함하는 DMEM (MDI)으로 교체함으로써 유도하였다. 2일 후, MDI 배지는 10 % FBS 및 10 µg/ml insulin이 첨가된 DMEM으로 대체되었다. 분화 유도 5-7일 후, 약 90 %의 전-지방세포가 둥근 형태의 성숙한 지방세포로 전환되었다. insulin-공급 배지는 매 2일 마다 교환되었다.

[0083] 1.3. 세포 생존 평가(cell viability assay)

[0084] 3T3-L1 전-지방세포를 시딩(seeding)하고, 1×10^4 cells/well의 밀도로 96-well plate 상에 성장시킨 후, 지시된 시간 동안 다양한 농도의 군주 배양액을 처리하였다. 인큐베이션이 완료된 후, 20 µl의 5 mg/ml MTT solution을 첨가하고, 세포를 37°C에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 얻어진 formazan crystals을 150 µl의 DMSO에 용해시키고, Victor™ X3 multilabel reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 590nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0085] 1.4. 유산균 분리 및 동정

[0086] 다양한 유산균의 분리는 절대혐기적 조건에서 MRS 배지를 사용하였고, 혐기조건을 위해 N₂ 가스를 이용하여 배지 내에 존재하는 산소를 제거시킨 후 멸균하였다. 채취한 분변 시료 0.1 g을 10 ml MRS 배지에 현탁한 후 단계적으로 희석하여 MRS 평판배지 또는 혈액 아가 배지에 100 µl씩 도말하여 37 °C에서 2일간 혐기조건에서 배양하였다. 그 결과, 생성된 단일 콜로니를 계대배양하여 순수분리하고 장기보존하며 사용하였다.

[0087] 분리된 유산균의 분자생물학적 동정을 위하여 16S rRNA 유전자를 타겟으로 하는 유니버설 프라이머인 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC A-3': 서열번호 1)와 1492R(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3': 서열번호 2)를 사용하였고, 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 수행하였다. 분석하여 얻은 염기 서열들은 EZbiocloud (<http://www.ezbiocloud.net/>)에서 동정검색을 통해 염기서열을 확인하였다.

[0088] 1.5 항비만 활성 평가

[0089] 항비만 활성 조사를 위하여 3T3-L1 세포를 DMEM GlutaMax에 10 % NBCS와 1 % 페니실린-스트렙토마이신을 섞어 5 % CO₂ 배양기에 37 °C상태로 배양하였다. 3T3-L1 세포의 세포농도가 70-80 % 될 때, 48 웰 플레이트에 접종하고, 세포의 농도가 100 %로 될때, 지방세포 분화배지 MDI (Insulin, Dexamethasone, Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX))로 바꾸주었다. Day 2에는 인슐린, 인슐린과 ROSI, 인슐린과 시료(군주 배양액)를 처리하였고, Day 4에는 인슐린만 처리하였다. 그리고, day 6에는 시료 처리 없이 세포를 고정하였다. 이때, 유산균액의 항비만 효과를 위해 시료는 배지에 Day 0, 2에 5 µl/ml 첨가하였다. 이 MDI는 세포 분화동안 2일에 한 번씩 바꾸주는 방식으로 진행하였다. 세포 농도가 100 % 되는 날을 Day 0라고 지정하였으며, Day 0에는 MDI, ROSI와 MDI, 시료와 MDI 이렇게 구성하여 처리하였다. 본 실험은 각각의 시료에 대해 3번의 독립적 반복실험을 시행하였다.

[0090] 1.6. Oil Red O staining

[0091] 분화 6일 후, 세포를 1× PBS로 세척하고, 10 % formalin으로 최소 1시간 동안 고정하고, 0.3 % filtered Oil Red O solution으로 15분 동안 염색하였다. 염색된 세포를 증류수로 완전히 행구고, 완전히 분화된 세포의 표현형적 변화(phenotypic change)를 Axiovert-25 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany)로 촬영하였다. culture well 전체의 이미지를 Canon 6D digital camera를 사용하여 캡처하였다. Oil Red O의 양을 정량하기 위하여, 염색된 세포를 100 % isopropanol로 용출하고, 흡광도를 520 nm에서 Victor™ X3를 사용하여 측정하였다.

[0092] 1.7. 정량적 역전사-중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR) 분석

[0093] 총 RNA를 제조사의 지시에 따라 RNA extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 추출하고, 농도를 scandrop analytik jena AG spectrophotometer (Jena, Germany)를 사용하여 측정하였다. 총 RNA (1 µg)을 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 적용하기 위하여, Maxime RT PreMix kit (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)로 cDNA를 합성하고, Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore)에서 반응을 수행하였다. Quantitative real-time PCR은 CFX96™ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad, Singapore)에서 iQ™ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad, Singapore)를 사용하여

수행하였다. 본 연구에서 사용된 프라이머의 서열은 표 1에 나타내었다. 타겟 유전자 발현량은 *Tbp*로 표준화하였다.

표 1

[0094]

이름	프라이머 서열 (5'→3')	
	센스	안티센스
<i>C/ebp α</i>	GAGCCGAGATAAAGCCAAACA (서열번호 4)	CGGTCATTGTCACTGGTCAACT (서열번호 5)
<i>C/ebp β</i>	CAAGCTGAGCGACGAGTACA (서열번호 6)	CAGCTGCTCCACCTTCTTCT (서열번호 7)
<i>C/ebp δ</i>	ACGACGAGAGCGCCATC (서열번호 8)	TCGCCGTCGCCCCAGTC (서열번호 9)
<i>Ppar γ</i>	TTTGAAAGAAGCGGTGAACCAC (서열번호 10)	ACCATTGGGTCAGCTCTTGTC (서열번호 11)
<i>αP2</i>	GTGATGCCTTTGTGGAAACCTGGAAG (서열번호 12)	TCATAAACTCTTGTTGAAGTCACGCC (서열번호 13)
<i>Adiponectin</i>	GATGCAGGTCTTCTTGGTCCTAA (서열번호 14)	GGCCCTTCAGTCCTGTCTC (서열번호 15)

[0095]

1.8. 전체 세포 추출물의 제조 및 웨스턴 블랏 분석

[0096]

회수 전, 유산균 처리-처리 또는 비처리 세포를 ice cold 1× PBS로 2회 세척하고, protease inhibitor cocktail, 2 mM PMSF 및 1 mM sodium orthovanadate가 첨가된 RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 용해시켰다. 용해물을 스크래핑하여 회수하고, 세포를 아이스에서 15분 동안 인큐베이션하고, 상등액을 얻기 위하여 샘플을 10,000× g, 4℃에서 15분 동안 원심분리하였다. 단백질 농도를 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL)를 사용하여 결정하였다. 각 샘플당 동일량의 단백질을 로딩하고, 4-20 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gradient gel (Mini-PROTEAN Precast Gel, Bio-Rad)에서 분리하였다. 전기영동 후, 단백질을 semi-dry transfer cell (Bio-Rad)을 사용하여 13 V에서 약 1.5시간 동안 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Trans-Blot SD Semi-Dry Cell, Bio-Rad)에 트랜스퍼시켰다. 멤브레인을 0.1 % Tween 20 (TBST)을 포함하는 1× Tris-buffered saline (TBS)을 포함하는 5 % dried skim milk로 셰이커 상에서 실온에서 1시간 동안 블로킹시키고, 1차 항체를 4 ℃에서 오버나이트로 인큐베이션하였다. 1차 항체의 인큐베이션 후, 멤브레인을 1× TBST로 각 5분 동안 3회 세척하였다. 멤브레인을 특정 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody로 실온에서 1.5시간 동안 셰이커 상에서 인큐베이션하고, 약 5분 동안 3회 세척하였다. 모든 세척 단계는 1× TBST에서 수행하였다. 면역 반응 단백질 신호를 chemiluminescent ECL assay를 사용하여 검출하고, molecular imaging software (Bio-Rad)를 사용하여 측정하였다. 데이터의 우수한 시각화를 위하여 밝기와 대비를 약간 조절하였으나, 동일한 변화가 완전한 이미지 패널 전체에 적용되었고, 이미지로부터 손실된 부분이 없게 하였다. Anti-β-actin을 대조군으로 사용하였다. 웨스턴 블랏 데이터는 ImageJ software (National Institutes of Health, USA)를 사용하여 정량하였다.

[0097]

1.9. 통계 분석

[0098]

모든 데이터는 평균±표준편차(SD)로 표시하였다. 상이한 처리군 간의 의미있는 차이는 Student's t-test 및 two-way ANOVA, 이어서 post-hoc Bonferroni test를 사용하여 검출하였다. p 값 < 0.05는 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다.

[0099]

2. 결 과

[0100]

2.1. 유산균 배양액의 세포 독성 평가

[0101]

3T3-L1 전-지방세포의 지방세포로의 성숙화에서의 유산균 배양액의 기능을 밝히기 전에, 본 발명의 발명자들은 3T3-L1 전-지방세포 및 분화된 3T3-L1 세포에 사용하기 위한 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주 배양액의 적절한 용량을 cell viability assay를 통하여 결정하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, 유산균 배양액을 1 μl/ml 또는 5 μl/ml 농도로 24, 48 및 1~5일 동안 3T3-L1 전-지방세포에 처리하였을 경우 주목할 만한 세포 독성은 관찰되지 않았다.

[0102] **2.2. 유산균 배양액에 의한 세포 내 트리글리세라이드 축적 억제**

[0103] 유산균 배양액의 세포 내 트리글리세라이드 축적의 효과를 확인하기 위하여, post-confluent 3T3-L1 전-지방세포에 5 μ l/ml 농도로 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주 배양액의 존재 또는 부재하는 MDI 배지로 처리함으로써 지방세포로의 분화를 유도하였다. 6일째 Oil Red O staining 후 현미경 관찰은 유산균 배양액 처리가 MDI 배지 단독으로 노출된 대조군과 비교하여 세포 내 트리글리세라이드 축적 억제 효과가 있음을 보여주었다(도 2a 및 도 2b).

[0104] **2.3. 유산균 배양액에 의한 세포 내 지질 축적 억제**

[0105] 유산균 배양액의 세포 내 지질 축적의 효과를 확인하기 위하여, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물(5 μ l/mL)을 지방세포분화 초기(1~2일), 중기(3~4일) 및 후기(6일)에 각각 처리하면, 도 3의 A에서 #3, #4, #8에 해당하는 분화 초기에 처리하는 경우에서 지방세포분화를 억제하는 것으로 나타났다(도 3).

[0106] **2.4. 지방형성 과정에서 유산균 배양액에 의한 지방형성 전사 인자의 발현 조절 및 억제**

[0107] 전-지방세포의 지방세포로의 분화 및 성숙과정은 많은 전사조절인자에 의해 조절된다. 지방세포로의 초기 분화 과정에는 C/EBP β 가 중요하게 작용하고 후기 성숙과정에서는 PPAR γ 의 발현이 아주 중요하다. 그리고, C/EBP δ 와 C/EBP α 은 지방세포 분화에 있어 C/EBP β 과 PPAR γ 의 발현을 조절하는데 중요하게 작용한다. adiponectin 및 aP2는 PPAR γ 의 표적 유전자로서 지방세포의 성숙과정에서 많이 발현된다. 본 발명의 발명자들은, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주 배양액이 지방형성 과정에서 지방형성 전사 인자의 발현에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. 전-지방세포 분화를 유도하기 위하여, 3T3-L1 배양 배지를 MDI 배지로 교체하였다. 본 발명의 유산균 배양액을 6일 동안 처리한 경우, C/ebp α , PPAR γ , adiponectin 및 aP2의 mRNA의 발현은 현저히 감소하였다(도 4). 또한, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물을 3T3-L1 전-지방세포에 6일 동안 처리하면 지방형성과정에 관여하는 Ppar γ , aP2 및 adiponectin의 단백질 발현도 감소함을 확인하였다(도 5a 및 도 5b). 이러한 결과는, 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주 배양액이 중요한 지방형성 전사 인자를 효과적으로 저해할 수 있음을 암시한다.

[0108] **2.5. 지방형성 과정에서 유산균 배양액에 의한 p38 MAPK 인산화**

[0109] 본 발명의 기탁번호 KCTC 15515BP인 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) YBS1 균주의 배양물은 전-지방세포의 지방세포분화 초기 단계에 주로 작용하여 전-지방세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 것으로 보이는데, 이는 지방세포분화 초기 단계에서 p38 MAPK의 인산화와 관련이 있는 것으로 확인되었다(도 6의 A 및 B). 이러한 결과는 p38 MAPK 저해제인 SB203580를 동시에 처리하는 경우, p38 MAPK이 활성화되지 않고 Ppar γ 의 발현이 증가됨을 통하여도 확인된다(도 6의 C 내지 F).

[0110] **[연구개발과제 1]**

[0111] - 과제고유번호: 2015R1A6A103032522

[0112] - 과제주관부처: 교육부

[0113] - 연구관리전문기관: 한국연구재단

[0114] - 주관기관: 순천향대학교 산학협력단

[0115] - 연구사업명: 이공계중점연구소

[0116] - 연구과제명: 재생의학연구소

[0117] - 연구기간: 2015년~2024년 (9년)

[0118] - 기여율: 70%

[0119] **[연구개발과제 2]**

[0120] - 관련과제(계정코드): PRM2192312

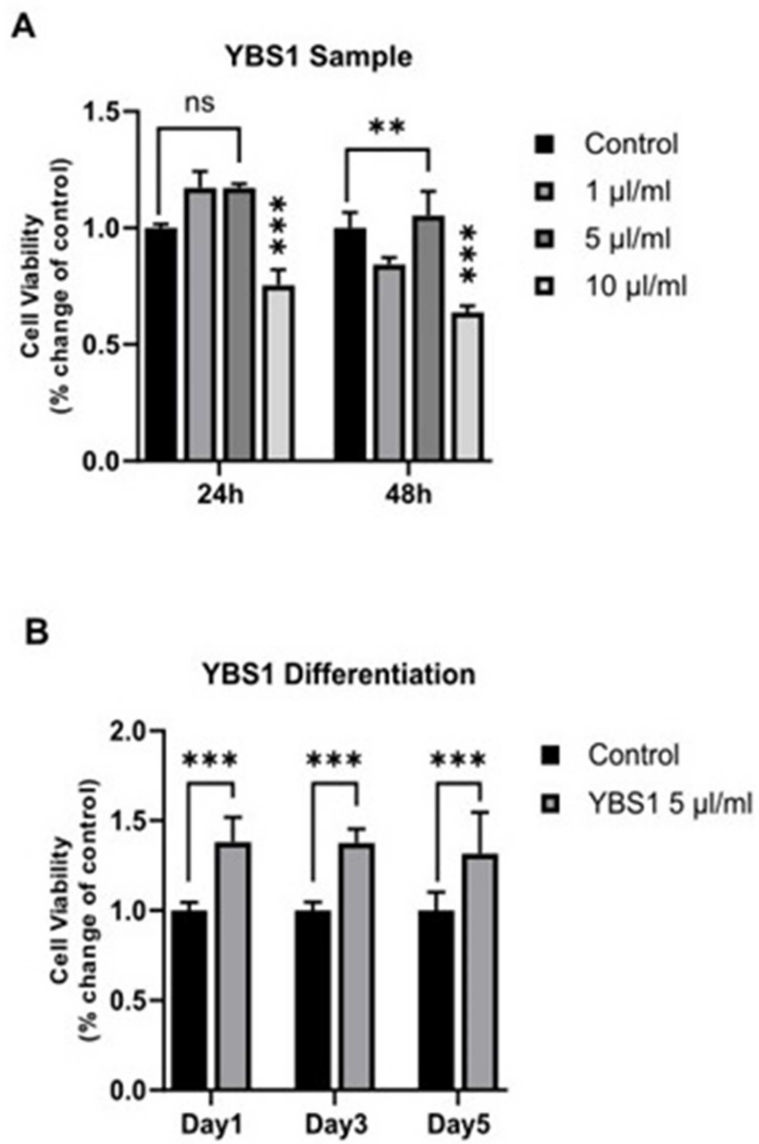
- [0121] - 과제고유번호: 2022M3H9A108427912
- [0122] - 시행부처: 과학기술정보통신부
- [0123] - 전문기관: 한국연구재단
- [0124] - 부처사업명: 원천기술개발사업
- [0125] - 연구과제명: 인체유래 미생물자원 소재 확보 및 활용 협력센터
- [0126] - 주관연구기관: 한국생명공학연구원
- [0127] - 연구기간: 2023.05.01~2023.12.31
- [0128] - 기여율: 30%

수탁번호

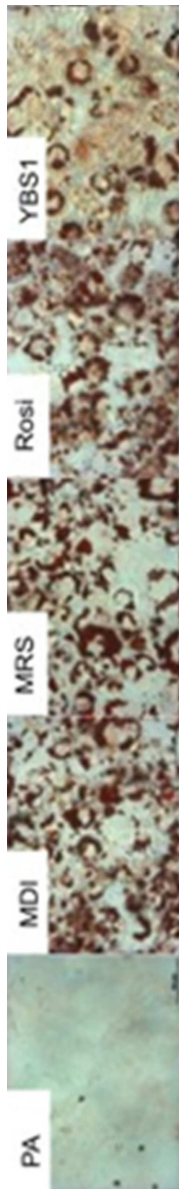
- [0129] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)
수탁번호 : KCTC15515BP
수탁일자 : 20230711

도면

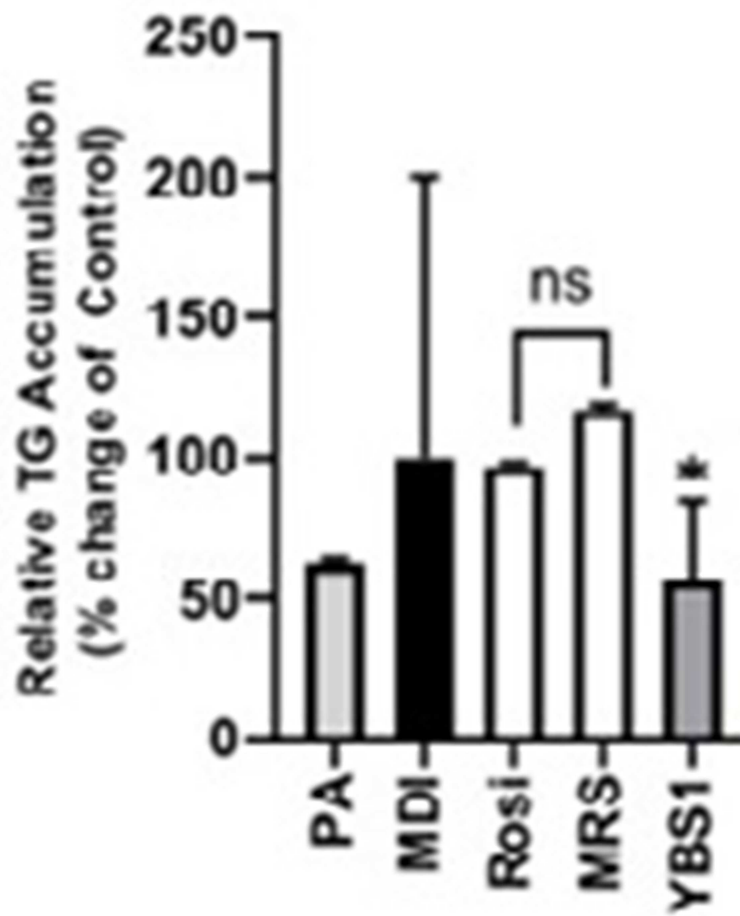
도면1



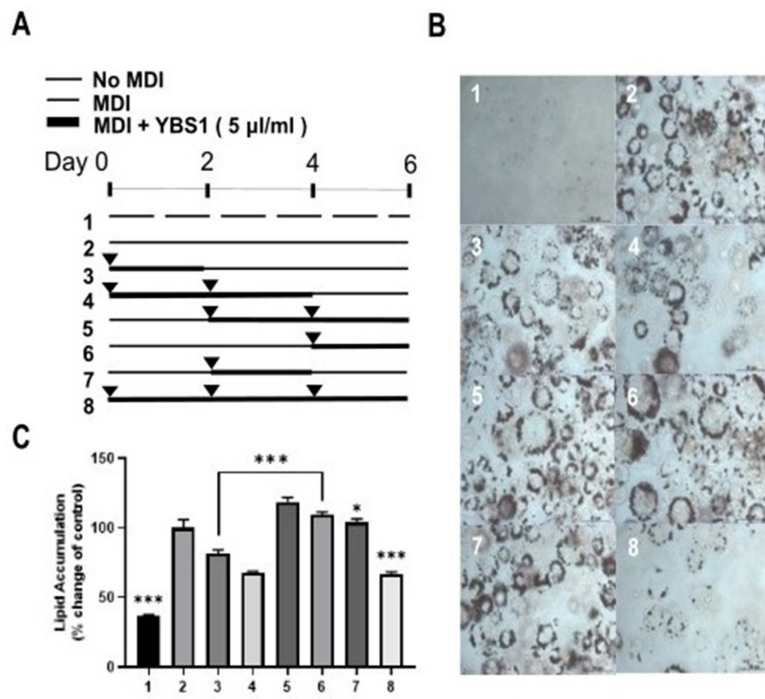
도면2a



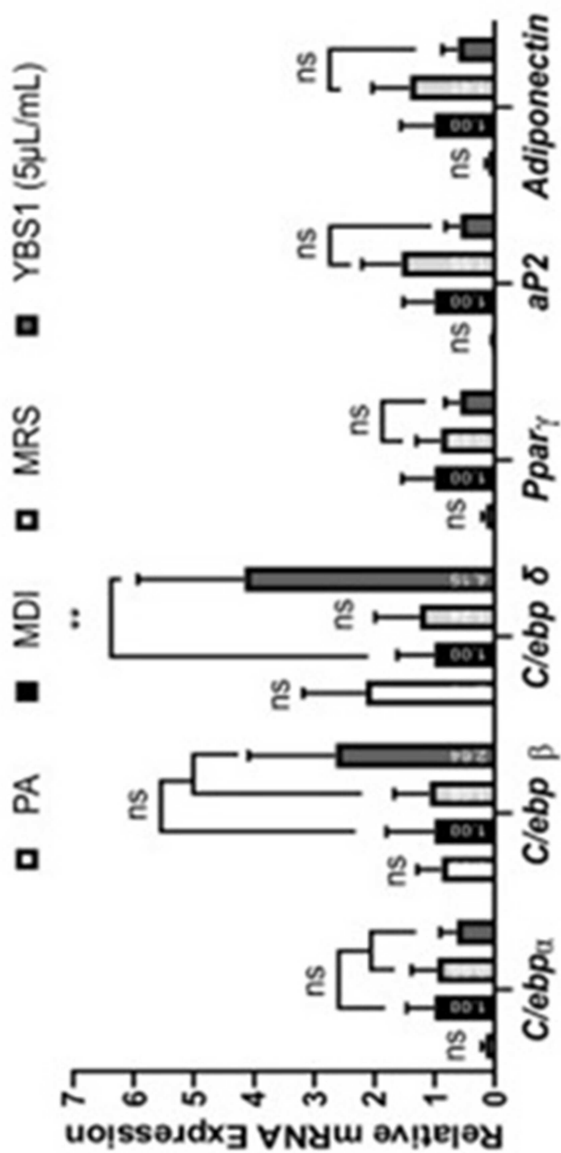
도면2b



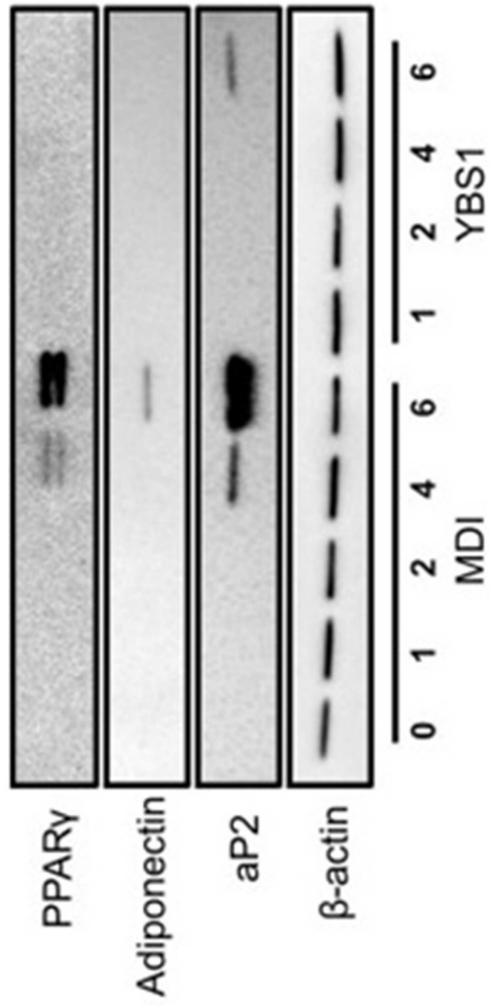
도면3



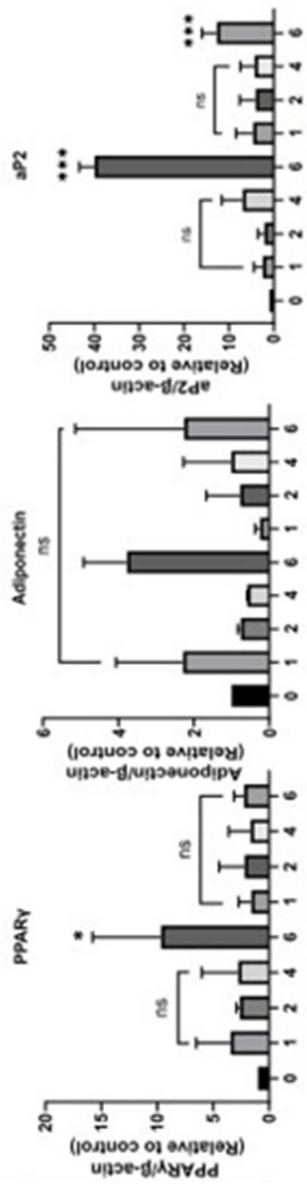
도면4



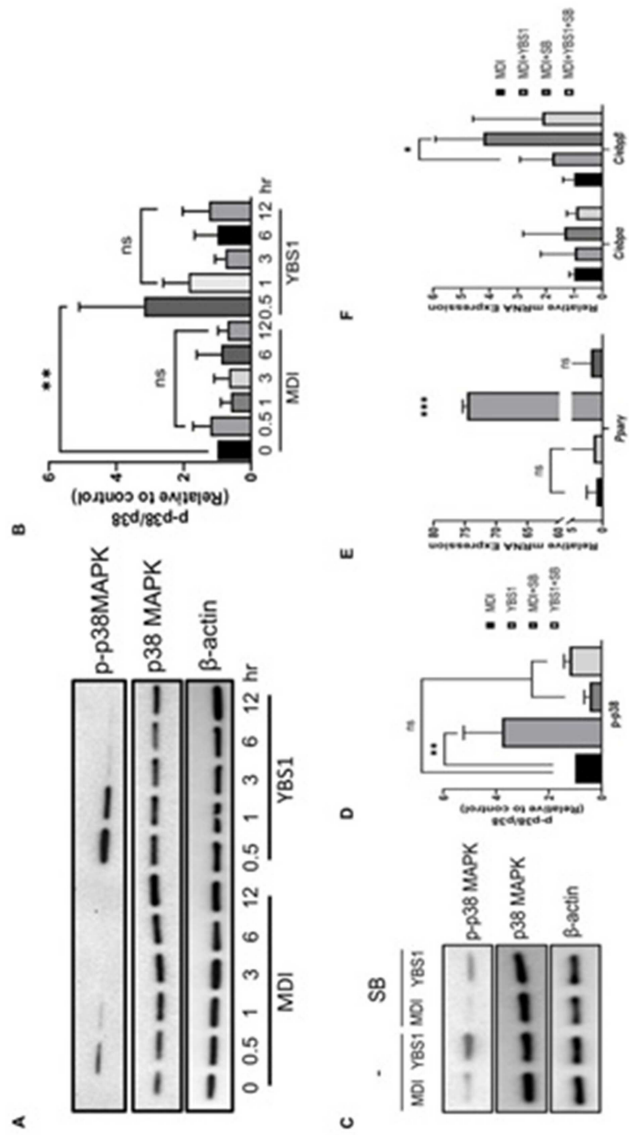
도면5a



도면5b



도면6



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.