

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 10월 17일 (17.10.2019) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2019/199094 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 35/744 (2014.01) A23L 33/135 (2016.01)

A61K 35/745 (2014.01) A23K 10/16 (2016.01)

A61K 35/747 (2014.01) A61P 3/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/004395

(22) 국제출원일: 2019년 4월 11일 (11.04.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0041917 2018년 4월 11일 (11.04.2018) KR

(71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 순천향대학교 산학협력단 (SOONCHUN-HYANG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY CO-OPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 31538 충청

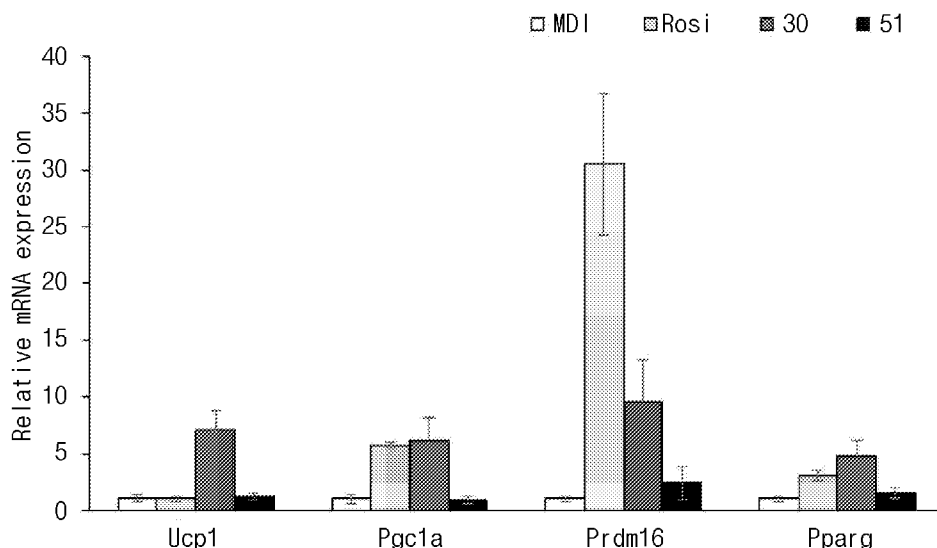
남도 아산시 신창면 순천향로 22, Chungcheongnam-do (KR).

(72) 발명자: 김용식 (KIM, Yong Sik); 31156 충청남도 천안시 서북구 불당26로 80, 402동 2302호, Chungcheongnam-do (KR). 박두상 (PARK, Doo Sang); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 손미영 (SON, Mi Young); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 기수진 (KI, Soo Jin); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김지선 (KIM, Ji Sun); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 오현우 (OH, Hyun Woo); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이유리 (LEE, Yu Ri); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 전준형 (JEON, Jun Hyoung); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정선아 (JEONG, Seon A); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP GROUP); 06626 서울시 서초구 강남대로 343, 11층, Seoul (KR).

(54) Title: NOVEL BIFIDOBACTERIUM LONGUM OR LACTOBACILLUS RHAMNOSUS STRAIN HAVING EFFECT OF PREVENTING OR TREATING OBESITY, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 비만의 예방 또는 치료 효과를 가지는 신규 비피도박테리움 롱검 균주 또는 락토바실러스 람노스스 균주 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a novel Bifidobacterium longum or Lactobacillus rhamnosus strain having an effect of preventing or treating obesity, and a use thereof. Treatment of each of the lactic acid bacteria strains of Bifidobacterium longum and Lactobacillus rhamnosus, of the present invention, causes browning of white adipocytes and, particularly, it has been confirmed that beige adipocyte- and brown adipocyte-specific gene expression significantly increases over that of an untreated control group. In addition, as a result of experimentation on high fat diet-induced obese mice is carried out, each strain exhibits a weight gain inhibitory effect more significant than that of a negative control group, and an effect of increased expression of a thermogenesis-specific gene, in the white adipocytes of the mice, has been confirmed. Therefore, each of the lactic acid bacteria strains of Bifidobacterium longum and Lactobacillus rhamnosus exhibits an anti-obesity effect so as to be effectively usable as a food, a drug or a feed for preventing or treating obesity, thereby being very useful in related industries.

[다음 쪽 계속]



WO 2019/199094 A1

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 비만의 예방 또는 치료 효과를 가지는 신규 비피도박테리움 롱검 균주 또는 락토바실러스 람노서스 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 유산균 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 균주 각각의 처리는 백색지방세포의 갈색지방화를 야기하였으며, 특히, 베이징 지방세포 및 갈색 지방세포 특이적인 유전자의 발현이 비처리 대조구에 비해 현저히 증가하는 효과를 확인하였다. 또한 고지방식이 비만마우스 실험 결과 각 균주는 음성대조군 대비 현저한 체중 증가 억제 효과를 나타내었으며 마우스의 백색지방세포에서 발열 특이 유전자의 발현 증가 효과를 확인하였다. 따라서, 유산균 비피도박테리움 롱검 균주 및 락토바실러스 람노서스 균주 각각은 항비만 효과를 나타내므로, 비만의 예방이나 치료를 위한 식품, 의약품 또는 사료로 유용하게 사용될 수 있어, 관련 산업에 매우 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 비만의 예방 또는 치료 효과를 가지는 신규 비피도박테리움 통검 균주 또는 락토바실러스 람노시스 균주 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 비만의 예방 또는 치료 효과를 가지는 신규 비피도박테리움 통검 균주 또는 락토바실러스 람노시스 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 경제의 현대화에 따른 생활수준의 향상으로 지방과 당분의 섭취는 늘고 섬유질의 섭취는 줄어드는 새로운 식사 문화, 특히 외식 문화의 정착으로 고단백 위주의 식단 선호 현상이 두드러지고 있으며, 이에 반하여 육체적인 활동이 거의 없는 현대인의 생활 습관으로 비만 인구가 급속히 늘고 있는 것이 현실이다. 고열량 식품의 섭취가 증가하고 섬유질 섭취가 줄어들면서 비만, 특히 복부 비만이 사회적으로 심각한 문제로 떠오르고 있다. 비만은 지방조직이 과잉 증가한 상태를 말하며 비만에 의한 체중의 증가는 대부분 지방의 증가에 기인하는 것이다. 비만에 달하는 메카니즘은 당질을 과잉 섭취함으로써 음식물 중에 함유되어 있는 당질이 소화되어 단당이 되고 소장을 통해 체내로 흡수되며, 혈당이 상승하여 그 자극으로 분비되는 인슐린이 지방세포에 작용해서 혈액 중의 단당을 지방세포가 받아들여지게 되어 지방으로 바꾸는 것이다.
- [3] 비만의 유해성은 비만 그 자체로 지방조직에 의한 복부의 압박으로 인하여 변비와 소화불량, 위장장애 등을 일으키는 경우가 많을 뿐만 아니라, 이로 인해 많은 성인병들의 위험요소가 된다는데 문제가 있다. 비만은 당뇨, 고혈압, 관상동맥질환 및 암과의 직접적인 연관성이 알려져 있으며 WHO에서는 21세기 만성질환으로 규정하고 있다. 국내 성인의 유병률은 2030년에 50% 이상까지 급증하리라 예상하고 있으며 따라서 국가 및 개인적 경제부담이 크게 증가할 것으로 분석된다. 이에 국내외에서 비만을 예방하고 치료하는 연구에 많은 관심과 투자가 이루어지고 있다.
- [4] 마우스 지방세포 3T3-L1은 백색지방세포로만 성숙되도록 이미 분화가 다 일어난 세포로서 비만연구에 가장 많이 이용되고 있는 세포주이다. 본 발명에서는 상기 지방 세포주를 이용하여 유산균 배양액의 갈색지방화(Browning: 에너지를 저장하는 백색지방세포가 에너지를 소비하여 발열반응, 열 항상성을 유지하는 갈색지방세포로 변화하는 과정)에 미치는 영향을 조사하였으며, 또한 마우스 중간엽 줄기세포인 C3H10T1/2 세포에서 갈색지방세포인자 및 베이지 지방세포인자 특이적 유전자 발현 양상 분석을 통하여 새로운 패러다임의 비만의 예방 및 치료용 조성물을 밝힌 것이다.
- [5] 한편, 한국등록특허 제1778734호에서는 '비피도박테리움 통검 KACC

91563으로부터 분리된 ESBP 및 이를 이용한 항알레르기 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1401530호에서는 '공액리놀레산을 생산하는 비피도박테리움 롱검 균주 및 그 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '베이지색 지방세포 및 갈색 지방세포의 형성을 유도하여 비만의 예방 또는 치료 효과를 가지는 비피도박테리움 롱검 균주 또는 락토바실러스 람노서스 균주 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 백색 지방세포의 수를 줄이는 측면에서 항비만 효과를 확인하는 일반적인 방법과는 달리, 본 발명에서는 이미 분화가 다 일어난 비만연구에 가장 많이 이용되고 있는 백색 지방세포로 성숙되는 전구지방세포 3T3-L1을 이용하여 비피도박테리움 롱검 DS0956 균주 및 락토바실러스 람노서스 DS0508 균주 배양액 각각의 처리에 의해 지방세포 3T3-L1의 갈색지방화(Browning: 에너지를 저장하는 백색지방세포가 에너지를 소비하여 발열반응, 열 항상성을 유지하는 갈색지방세포로 변화하는 과정)에 미치는 효과를 확인하였다.
- [7] 그 결과, 본 발명에 따른 유산균 비피도박테리움 롱검 DS0956 균주 및 락토바실러스 람노서스 DS0508 균주 배양액 각각의 처리는 백색지방세포 3T3-L1의 베이지 지방세포 및 갈색지방세포 특이 유전자 발현을 촉진시켰다. 또한, 마우스 중간엽 줄기세포인 C3H10T1/2 세포의 베이지 지방세포 특이 유전자들의 발현 및 갈색지방세포 특이 유전자의 발현을 촉진시키는 것을 확인하였다.
- [8] 또한, 본 발명의 상기 비피도박테리움 롱검, 락토바실러스 람노서스의 균주 또는 배양액을, 고지방식을 통해 유도한 비만 마우스에 투여하여 비만의 억제 또는 개선 효과를 확인한 결과, 음성대조군 대비 현저한 체중 증가의 억제 효과, 마우스 백색지방세포에서 발열 특이적 유전자 또는 갈색지방세포/베이지색 지방세포 특이적 유전자의 발현량 유도, 증가 효과를 확인하였으며, 총 콜레스테롤 및 저밀도 지방단백질(LDL)의 저하 효과를 확인하여, 이는 비만 마우스의 지질대사 프로파일을 개선하는 효과가 있는 것임을 확인하였다.
- [9] 상기 사실을 통하여 비피도박테리움 롱검 균주 및 락토바실러스 람노서스 균주는 체내 지방을 산화시키고 또한 체내 지방세포 산화와 관련된 유전자 발현의 활성을 통하여 지방 대사 및 체내 지방 축적 감소효과가 뛰어날 뿐만 아니라, 상기 균주를 투여한 동물에서 지질대사 프로파일이 개선되는 효과가 뛰어나다는 점을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 신규 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주 또는 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus*

rhamnosus) 균주를 제공한다.

- [11] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명의 유산균 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 균주 각각의 처리는 백색 지방세포만으로 성숙되어야 하는 3T3-L1의 갈색지방화를 야기하였으며, 특히, 백색 지방세포 3T3-L1 및 마우스 중간엽 줄기세포인 C3H10T1/2 세포의 배이지 지방세포 및 갈색 지방세포 특이적인 유전자의 발현이 비처리 대조구에 비해 현저히 증가하는 효과를 확인하였다.
- [15] 또한, 본 발명의 유산균 비피도박테리움 롱검과 락토바실러스 람노서스 균주 또는 배양액을 개체에 투여하는 경우, 고지방식이의 섭취에 따른 체중 증가가 억제되고 발열 관련 유전자, 갈색지방/배이지색 지방세포 특이적 유전자의 발현량이 증가하며, 콜레스테롤, LDL 등 지질 성분의 양이 감소하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [16] 따라서, 유산균 비피도박테리움 롱검 균주 및 락토바실러스 람노서스 균주 각각은 항비만 효과를 나타내므로, 비만의 예방이나 치료, 지질대사의 개선을 위한 식품, 의약품 또는 사료로 유용하게 사용될 수 있어, 관련 산업에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1a는 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 이용하여 55종의 유산균으로부터 항비만 효능이 있는 균주를 선별해내기 위한 선택 흐름도를 나타낸 것이다.
- [18] 도 1b는 TG (Triglyceride)의 정량화를 이용한 유산균 배양액의 1차 1, 5, 10 μ l로 처리 후의 선별 결과이다. A, 유산균 배양액 1 μ l 처리군; B, 유산균 배양액 5 μ l 처리군; C, 유산균 배양액 10 μ l 처리군; t, 세포독성(cytotoxicity)으로 2차 선별에서 배제함. PA; Pre-adipocyte로써 MDI 분화배지를 처리하지 않은 음성 대조군; MDI (M: methyl-isobutyl-xanthine D: dexamethasone, I: insulin) 지방세포 분화 배지 처리 대조군; 양성 대조군, Rosi(Rosiglitazone) 처리. Rosi는 PPAR 감마 작용자(agonist)임.

- [19] 도 2a는 선별된 군주 배양액(30번, 51번 군주)의 대조군 대비 트리글리세라이드(TG)의 상대적인 축적량을 비교하여 나타낸 그래프이다. PA, MDI 및 Rosi는 도 1b에서 설명한 바와 동일하다.
- [20] 도 2b는 3T3-L1 세포에 선별된 군주 배양액을 처리하여 TEM을 통해 관찰한 세포의 현미경 사진이다(5,000X magnification). 흰색 화살표는 지질 방울(LD, lipid droplets)를 가리킨다.
- [21] 도 2c는 선별된 군주 배양액(30번, 51번 군주)의 ORO 염색(Oil Red O dye)을 나타낸다. 1st, 유산균 배양액 1 μ l 처리군; 2nd, 유산균 배양액 5 μ l 처리군; 3rd, 유산균 배양액 10 μ l 처리군; (-), MDI 분화배지를 처리하지 않은 음성 대조군; (+), MDI 분화배지를 처리한 군; 양성 대조군, Rosi(Rosiglitazone) 처리. Rosi는 PPAR 감마 작용자(agonist)임. 30 및 51은 선별된 유산균의 배양액 처리.
- [22] 도 3a는 선별된 유산균 배양액(30번, 51번 군주)이 마우스의 지방전구세포인 3T3-L1에서의 갈색지방세포 특이 유전자 발현에 미치는 영향을 나타낸 것으로, 상기 유전자의 상대적인 mRNA의 발현량을 비교하여 나타낸 그래프이고, 도 3b는 선별된 유산균 배양액(30번, 51번 군주)이 마우스 중간엽 줄기세포인 C3H10T1/2 세포에서의 갈색지방세포 특이 발현 유전자들에 미치는 영향을 나타낸 것으로, 상기 유전자의 상대적인 mRNA의 발현량을 비교하여 나타낸 그래프이다. MDI (M: methyl-isobutyl-xanthine, D: dexamethasone, I: insulin) 지방세포 분화 배지 처리 음성 대조군; 양성 대조군, Rosi(Rosiglitazone) 처리. Rosi는 PPAR 감마 작용자(agonist)임. 30 및 51은 선별된 유산균의 배양액 처리.
- [23] 도 4a는 선별된 유산균 배양액(30번, 51번 군주)이 마우스의 지방전구세포인 3T3-L1에서의 베이지색 지방세포 특이 유전자 발현에 미치는 영향을 나타낸 것으로, 상기 유전자의 상대적인 mRNA의 발현량을 비교하여 나타낸 그래프이고, 도 4b는 선별된 유산균 배양액(30번, 51번 군주)이 마우스 중간엽 줄기세포인 C3H10T1/2 세포에서의 베이지 지방세포 특이 발현 유전자들에 미치는 영향을 나타낸 것으로, 상기 유전자의 상대적인 mRNA의 발현량을 비교하여 나타낸 그래프이다. MDI (M: methyl-isobutyl-xanthine, D: dexamethasone, I: insulin) 지방세포 분화 배지 처리 음성 대조군; 양성 대조군, Rosi(Rosiglitazone) 처리. Rosi는 PPAR 감마 작용자(agonist)임. 30 및 51은 선별된 유산균의 배양액 처리.
- [24] 도 5a는 3T3-L1 세포에서 선별된 유산균 배양액(30번, 51번 군주)을 처리하였을 때, 지방분해 관련 유전자의 발현량을 상대적인 mRNA의 양으로 측정하여 비교한 그래프이고, 도 5b는 지질의 β -산화(β -oxidation) 관련 유전자의 발현량을 상대적인 mRNA의 양으로 측정하여 비교한 그래프이다.
- [25] 도 6은 3T3-L1 세포에 30번, 51번 군주의 유산균 배양액을 처리하였을 때의 PKA 신호전달의 활성화 여부에 대해 확인한 것이다. A는 PKA의 인산화 여부를 확인한 것이고, B는 PKA 인산화 저해제인 H89를 처리한 경우의 결과를 나타낸 것이다. C는 H89 처리에 의한 발열 관련 유전자의 발현량을 상대적인 mRNA의

양으로 측정한 그래프이고, D 내지 F는 siPKA cat a1을 이용하여 발열 관련 유전자 및 지방세포의 분화 관련 유전자의 발현량을 mRNA의 양과 단백질의 양으로 측정하여 비교한 그래프이다.

- [26] 도 7은 3T3-L1 세포에 30번, 51번 유산균 배양액을 처리하여, 지방분해효소와 관련된 유전자의 발현 변화를 확인하고(왼쪽 그림, HSL S-660과 HSL S-563은 각각 HSL의 Ser⁵⁶³, Ser⁶⁶⁰에 인산화된 것), AMPK의 인산화 및 전사조절인자 CREB의 활성화 여부를 확인하고(가운데 그림), PKA 저해제인 H89 처리에 따른 상기 지방분해효소 관련 유전자 및 CREB 인산화 여부의 변화를 확인한 것(오른쪽 그림)이다.
- [27] 도 8은 고지방식이를 통해 비만을 유도한 마우스를 대상으로, 상기 유산균 균주 또는 배양액을 12주간 투여 후, 측정한 마우스의 체중 변화를 나타낸다. (G1, 고지방식이 무처리군; G2, 고지방식이 투여군; G3, 고지방식이와 미생물배지 투여군; G4, 고지방식이와 락토바실러스 람노서스 GG 균체 투여군; G5, 고지방식이와 30 균주 배양액 투여군; G6, 고지방식이와 51 균주 배양액 투여군; G7, 고지방식이와 30 균체 투여군; G8, 고지방식이와 51 균체 투여군. 이하, 동일)
- [28] 도 9는 고지방식이를 통해 비만을 유도한 마우스를 대상으로, 상기 유산균 균주 또는 배양액을 12주간 투여 후, 측정한 마우스의 백색지방의 H&E (Hematoxylin and Eosin) 염색 결과를 나타낸다.
- [29] 도 10은 고지방식이를 통해 비만을 유도한 마우스를 대상으로, 상기 유산균 균주 또는 배양액을 12주간 투여 후, 측정한 마우스의 혈액 내 포도당(Glucose), 총 콜레스테롤(T-chol), 고밀도 지방단백질(HDL) 및 저밀도 지방단백질(LDL)의 수치 변화를 나타낸다.
- [30] 도 11은 고지방식이를 통해 비만을 유도한 마우스를 대상으로, 상기 유산균 균주 또는 배양액을 12주간 투여 후 마우스의 백색지방세포(WAT), 생식샘 백색지방세포(Gonadal WAT), 복막 백색지방세포(Peritoneal WAT) 및 장간막 백색지방세포(Mesenteric WAT)에서 발열특이 유전자의 발현 변화를 나타낸다.
- [31] 도 12a는 고지방식이를 통해 비만을 유도한 마우스를 대상으로, 상기 유산균 균주 또는 배양액을 12주간 투여 후 마우스의 M1 마크로파지 염증 관련 사이토카인을 포함한 유전자의 상대적인 mRNA 발현량을 측정하여 비교한 그래프이다.
- [32] 도 12b는 고지방식이를 통해 비만을 유도한 마우스를 대상으로, 상기 유산균 균주 또는 배양액을 12주간 투여 후 마우스의 M2 마크로파지 특이 유전자의 상대적인 mRNA 발현량을 측정하여 비교한 그래프이다.
- [33] **발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [34] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [35]

- [36] **1.비피도박테리움 롱검 균주 및 락토바실러스 람노서스 균주**
- [37] 본 발명의 일 측면은, 신규 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주 또는 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 균주를 제공한다.
- [38] 상기 비피도박테리움 롱검 균주는 비피도박테리움 롱검 DS0956일 수 있고, 바람직하게는 기탁번호가 KCTC13505BP인 비피도박테리움 롱검 DS0956 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 비피도박테리움 롱검 DS0956 균주는 한국생명공학연구원에 기탁번호가 KCTC13505BP로 2018년 03월 26일자로 기탁하였다.
- [39] 상기 락토바실러스 람노서스 균주는 락토바실러스 람노서스 DS0508일 수 있고, 바람직하게는 기탁번호가 KCTC13504BP인 락토바실러스 람노서스 DS0508 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 락토바실러스 람노서스 DS0508 균주는 한국생명공학연구원에 기탁번호가 KCTC13504BP로 2018년 03월 26일자로 기탁하였다.
- [40] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 비피도박테리움 롱검 균주 또는 락토바실러스 람노서스 균주는 베이지색 지방세포(beige adipocyte) 및 갈색 지방세포의 형성을 유도하여 항비만 효과를 유발하는 것이다. 바람직하게는, 상기 비피도박테리움 롱검 균주 또는 락토바실러스 람노서스 균주는 3T3-L1 지방세포와 마우스 중간엽 줄기세포 C3H10T1/2에서 특이적으로 열발생 관련 유전자와 갈색지방세포와 관련된 유전자 발현을 증가시켜 베이지색 지방세포(beige adipocyte) 및 갈색 지방세포의 형성을 유도하는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 *Ucp1*(uncoupling protein 1), *Pgc1a*(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), *Prdm16*(PR/SET domain 16), *Pparg*(peroxisome proliferator activated receptor gamma), *CD137*, *Fgf21* (fibroblast growth factor 21), *P2RX5*(purinergic receptor P2X 5) 및 *Tbx1*(T-box 1) 유전자의 발현을 증가시켜 베이지색 지방세포(beige adipocyte) 및 갈색 지방세포의 형성을 유도하는 것일 수 있다. 가장 바람직하게는, 3T3-L1 지방세포와 마우스 중간엽 줄기세포 C3H10T1/2에서 특이적으로 열발생 관련 유전자 *Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*와 갈색지방세포와 관련된 *CD137*, *Fgf21*의 유전자 발현을 증가시켜 베이지색 지방세포(beige adipocyte) 및 갈색 지방세포의 형성을 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 *CD137* 유전자는 *TNFRSF9* (TNF receptor superfamily member 9)라고도 불려진다. 또한, 본 발명의 상기 비피도박테리움 롱검 균주 또는 락토바실러스 람노서스 균주를 처리함에 따라, 백색지방세포에서 특이적으로 발현되는 유전자인 *Past1*, *Resistin* 또는 *Sarpina3k* 유전자의 발현량이 감소될 수 있다.
- [41] 본 발명의 상기 균주는 이미 분화되어 만들어진 백색지방세포에서 갈색지방세포 또는 베이지색 지방세포 특이적 유전자의 발현을 증가시켜, 상기 백색지방세포를 갈색지방세포 또는 베이지색 지방세포로 변화시킬 수 있다. 갈색지방세포 및 베이지색 지방세포는 에너지 생성을 위해 지방의 분해하는

작용을 촉진하는 특징이 있으므로, 본 발명의 상기 균주는 비만을 억제 또는 개선하는 효과가 있다.

- [42] 또한, 상기 비피도박테리움 통검 균주 또는 락토바실러스 람노서스 균주는 지방의 분해 작용에 관련된 유전자인 *Atgl*, *HSL*, *Plin1* 또는 *Plin5* 유전자의 발현량을 증가시키거나, 지질의 β -산화(β -oxidation)와 관련된 유전자인 *LCAD*, *MCAD*, *LCPT* 또는 *Abhd5* 유전자의 발현량을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 지방 분해 관련 유전자나 β -산화 관련 유전자는 축적된 지방을 분해하여 제거하는 작용을 촉진할 수 있으므로, 본 발명의 상기 균주는 지방의 축적량을 감소시키고 체중의 증가를 저제하여 비만을 억제 또는 개선하는 효과가 있다.
- [43] 나아가, 상기 비피도박테리움 통검 균주 또는 락토바실러스 람노서스 균주는 PKA 신호전달을 활성화하는 것일 수 있다. 상기 PKA 신호전달 과정을 활성화시켜 인산화된 PKA, 인산화된 AMPK, 인산화된 전사조절인자 CREB의 양을 증가시키고, 이에 따라 발열 관련 유전자나 지방세포의 분화와 관련된 유전자인 *Ucp1*, *Pgc1a*, *Pparg* 또는 *Ceba* 유전자의 발현을 증가시킴으로써, 백색지방세포의 갈색지방화 유도를 통해 비만을 억제 또는 개선하는 효과가 있다.
- [44] 본 발명의 상기 비피도박테리움 통검 균주 또는 락토바실러스 람노서스 균주는 비만인 상태의 개체에 투여하였을 때 지질대사의 프로파일을 개선하여 비만을 개선 또는 치료하는 효과가 있다. 본 발명의 상기 지질대사의 프로파일 개선 효과를 확인하기 위하여, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 비피도박테리움 통검 또는 락토바실러스 람노서스의 균주 또는 배양액을 고지방식이를 통해 비만을 유도한 마우스에 투여하여 변화를 확인한 결과, 본 발명의 상기 균주 및 배양액은 체중의 증가가 억제되는 효과가 있으며, 상기 마우스의 백색지방세포에서 발열 관련 유전자나 갈색지방세포, 베이지색 지방세포 특이적 유전자의 발현량이 증가함을 확인하였다. 상기와 같은 유전자의 발현량 증가를 통해 개체의 백색지방세포를 갈색지방세포 또는 베이지색 지방세포로 분화시키는 과정을 촉진하여 비만을 억제 또는 개선할 수 있으며, 상기 균주 또는 배양액을 투여한 개체의 콜레스테롤, LDL 등 지질 성분의 양을 감소시켜 지질대사를 개선할 수 있다.
- [45] 또한, 본 발명의 다른 구체적인 실시예에서는 상기 비피도박테리움 통검 또는 락토바실러스 람노서스의 균주 또는 배양액을 비만인 상태의 개체에 투여하여 유전자의 발현량을 확인한 결과, 상기 개체의 백색지방세포에서 염증-촉진 M1 마크로파지 마커인 *CD11c*, *CD68*, *IL-1b*, *Mcp1*, *TNF-a* 유전자의 발현량을 감소시키고, 항-염증 M2 마크로파지 마커인 *Arg1*, *CD206* 유전자의 발현량을 증가시킨다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 상기 균주 또는 그 배양액을 비만인 개체에 투여하는 경우, M1 마크로파지의 양이 감소하고 M2 마크로파지의 양은 증가하는 방향으로 전환이 이루어지므로, 상기 균주 또는 배양액을 비만인 개체에 투여하는 경우 비만이 억제되거나 개선되는 효과가

있음을 확인할 수 있다.

[46]

[47] **2.유산균을 포함하는 조성물**

[48] 본 발명의 또 다른 측면은 유산균을 포함하는 조성물을 제공한다.

[49] 상기 유산균은 상기 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주 또는 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 균주를 포함한다.

[50] 상기 유산균을 포함하는 조성물은 상기 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[51] 본 발명의 상기 유산균을 포함하는 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 담체, 부형제 및/또는 첨가제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때, 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캡슐제, 젤(예컨대, 하이드로젤) 또는 동결건조제의 형태일 수도 있으며, 상기 첨가제로 분산제, 안정화제 또는 동결 보호제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[52] 구체적으로, 상기 동결건조제의 경우, 상기 균주를 동결 보호제와 함께 동결건조하여 분말의 형태로 사용하는 것을 포함하며, 상기 동결 보호제는 탈지분유, 말토덱스트린, 덱스트린, 트레할로스, 말토오스, 유당, 만니톨, 사이클로덱스트린, 글리세롤 및/또는 꿀일 수 있다. 또한, 보존 담체와 혼합하여 흡착시킨 후 건조시켜 고체화하여 사용하는 것을 포함하며, 상기 보존 담체는 규조토, 활성탄 및/또는 탈지강일 수 있다.

[53] 본 발명의 상기 유산균을 포함하는 조성물은 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 상기 담체, 부형제 또는 첨가제 중 어느 하나와 혼합하는 단계를 거쳐 제조될 수 있다.

[54] 상기 균주, 담체, 부형제 및 첨가제에 대한 설명은 전술한 바와 같다. 상기 첨가제로 동결 보호제를 이용하는 경우, 상기 유산균을 포함하는 조성물은 상기 균주와 동결 보호제를 혼합하고, 상기 혼합물을 -45 °C 내지 -30 °C에서 동결하는 과정을 거친 후, 30 °C 내지 40 °C에서 건조하여 믹서기로 갈아 동결건조된 분말 형태로 제조되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 동결하는 과정은 -45 °C 내지 -30 °C의 온도 조건, 5 내지 50 mTorr의 압력 조건에서 65 내지 75 시간 동안 진공동결하는 과정일 수 있다.

[55]

[56] **3.유산균을 포함하는 조성물의 비만의 예방, 치료 또는 개선 용도**

[57] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 유산균을 포함하는 조성물의 비만 예방, 치료 또는 개선 용도를 제공한다.

[58] 상기 유산균을 포함하는 조성물은 의약품, 식품 또는 사료일 수 있다. 상기

유산균을 포함하는 조성물은 상기 조성물이 의약품일 경우, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물일 수 있고, 상기 조성물이 식품일 경우, 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품일 수 있으며, 상기 조성물이 사료일 경우, 비만 예방 또는 개선용 사료 조성물일 수 있다.

[59] 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[60] 상기 균주에 대해서는 전술한 바와 같으며, 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 약학 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때, 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캡슐제 또는 젤(예컨대, 하이드로젤) 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[61] 또한, 상기 약학 조성물이 포함하는 상기 균주는 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포솜, 미소구체(microspheres), 또는 나노 구형입자와 같은 약학적으로 허용될 수 있는 담체에 운반될 수 있다. 이들은 운반 수단과 복합체를 형성하거나 관련될 수 있고, 지질, 리포솜, 미세입자, 금, 나노입자, 폴리머, 축합 반응제, 다당류, 폴리아미노산, 텐드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 생체 내 운반될 수 있다.

[62] 이 외에도, 약학적으로 허용되는 담체는 제제시 통상적으로 이용되는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아, 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 레밍턴의 약학적 과학(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[63] 본 발명에 따른 약학 조성물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학 조성물은 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 생약 추출물 또는 생약 발효물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를

들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [64] 본 발명의 약학 조성물은 비만의 억제 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선치료, 호르몬치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [65] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 '약학으로 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, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나, 다른 오염물질에 의해 유발되는 질환의 치료제 또는 피부 노화 개선을 위한 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [66] 구체적으로 본 발명의 약학 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성율, 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라 증감될 수 있으며, 일례로 본 발명의 펩타이드를 1일당 환자 체중 1 kg 당 약 0.0001 μg 내지 500 mg, 예컨대 0.01 μg 내지 100 mg 투여할 수 있다. 또한, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간 간격으로 1일 수회, 예컨대 하루 2회 내지 3회 분할 투여될 수 있다.
- [67]
- [68] 본 발명은 상기 약학 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 비만 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [69] 상기 대상은 사람 또는 사람을 제외한 동물일 수 있으며, 비만이 아닌 상태이거나 비만인 상태일 수 있다. 상기 대상이 비만이 아닌 상태인 경우, 상기

약학 조성물을 대상에게 약학적으로 유효한 양만큼 투여하여 비만을 예방할 수 있고, 상기 대상이 비만인 상태인 경우, 상기 약학 조성물을 대상에게 약학적으로 유효한 양만큼 투여하여 비만을 치료할 수 있다.

[70] 상기 약학 조성물의 제형, 투여 방법, 투여량 및 조성물에 함유되는 유효성분의 농도는 전술한 바와 같다.

[71]

[72] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[73] 본 발명의 일 구현 예에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 건강기능식품 조성물은 체중의 증가 또는 지방의 축적을 억제할 수 있다.

[74] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능식품 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 장기간 섭취하는 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.

[75] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[76] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[77] 상기 건강기능식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제,

pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[78]

[79] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[80] 상기 균주에 대해서는 전술한 바와 같으며, 비만 예방 또는 개선을 목적으로 사료첨가제 조성물로 첨가할 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다.

[81] 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.

[82]

[83] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[84]

[85] 재료 및 방법

[86] 사용 시약

[87] 덱사메타손(Dexamethasone), IBMX(isobutyl-1-methylxanthine), 인슐린(insulin), 로지글리타존(Rosiglitazone, Rosi), Oil Red O dye, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 및 4% 포르말데히드(formaldehyde)는 시그마 알드리치(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

[88] DMEM(Dulbecco Modified Eagle's Media), 신생 송아지 혈청 (NBCS) 및 재조합 인간 BMP4를 Gibco사(Grand Island, NY, USA)로부터 구매하였다. 소 태아 혈청을 아틀라스 바이오로직컬사(Fort Collins, CO, USA)로부터 구매하였다. 페니실린-스트렙토마이신 용액을 Hyclone Laboratories, Inc.사(South Logan, NY, USA)로부터 구매하였다.

[89]

[90] 유산균 분리

[91] 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 그램을 10 ml MRS 배지에 현탁한 후 단계적으로 희석하여 MRS 평판배지 또는 혈액 아가 배지에 100 μ l씩 도말하여 37°C에서 2일간 혐기조건에서 배양하였다. 그 결과 생성된 단일 콜로니를 계대배양하여 순수분리하고 장기보존하며 사용하였다.

[92]

[93] 분리된 유산균의 동정

[94] 분리된 유산균의 분자생물학적 동정을 위하여 16S rRNA 유전자를 타겟으로 하는 유니버설 프라이머인 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC A-3': 서열번호 3)와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3': 서열번호 4)을 사용하였고, 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 수행하였다. 분석하여 얻은 염기 서열들은 EZbiocloud (<http://www.ezbiocloud.net/>)에서 동정검색을 통해 염기서열을 확인하였다.

[95]

[96] 항비만 활성조사

[97] 항비만 활성 조사를 위하여 3T3-L1 세포를 DMEM 글루타맥스에 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% 될 때, 지방세포 분화배지 MDI (Insulin, Dexamethasone, Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX))로 바꿔주었다. Day 2에는 인슐린, 인슐린과 ROSI, 인슐린과 시료(균주 배양액)를 처리하였고, Day 4에는 인슐린만 처리하였다. 그리고 day 6에는 시료 처리 없이 세포를 고정하였다. 이때 유산균 액의 항비만 효과를 위해 시료는 배지에 Day 0, 2에 각각 1, 5, 그리고 10 μ l 첨가하였다. 이 MDI는 세포 분화동안 2일에 한 번씩 바꿔주는 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. 세포의 관찰을 위하여 3T3-L1 세포를 24 웰 플레이트에 6일 동안 배양한 후 고정, Oil Red O(ORO) 염색시약을 이용하여 염색을 진행하였다. 간단하게 본 실험방법을 설명하면 먼저, 1X PBS로 세포를 한번 세척한 후, 10% 포르말린으로 1시간 동안 세포를 상온에서 고정시켜 주었다. 그리고 0.3% ORO 용액을 사용하여 상온에서 20분 동안 염색하고 증류수로 4번 세척하였다. 세척 후 Axiovert-25 microscope을 통해 변화된 표현형을 현미경으로 관찰하고 사진을 찍었다. 이 후, 염색된 세포를 100% 이소프로판올에 녹여 Victor™X3에서 520 nm의 흡광도로 ORO의 양을 측정하였다.

[98] 또한, C3H10T1/2 마우스 중간엽 줄기 세포를 한국 세포주 은행 (Korean Cell

Line Bank) (KCLB-10226)으로부터 구입하여, 10% NBCS와 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 고농도 글루코스 DMEM 배지에서 5% CO₂ 배양기에 37°C 상태로 배양하였다. 분화 유도(commitment)하기 위하여, 세포농도 20~30%의 C3H10T1/2 세포를 접종하였다. 지방세포로의 분화를 위해 세포의 농도가 100% 될 때까지 50 ng/mL의 인간 재조합 BMP4를 세포에 처리하였다. 이후 배지를 2 ~ 3일에 새로운 배지로 교환하였다. 세포의 농도가 100%된 48시간 후를 0일이라 하고 지정된 농도의 로시글리타존(Rosi) 또는 유산균 배양액을 처리한 조건에서 배지를 10% FBS, 0.5mM IBMX, 1μM 덱사메타손(Dexamethasone) 및 10μg/ml 인슐린 (MDI)을 포함하는 DMEM으로 변경함으로써 분화를 유도하였다. 열 발생 프로그램을 자극하기 위하여 분화된 세포들을 4시간 동안 500μM dibutyryl-cAMP에 노출시켰다.

[99]

[100] **qRT-PCR 분석**

[101] 유산균 배양액이 처리된 세포로부터 유전자의 발현을 알아보기 위해 총 RNA를 RNA 추출 키트 (Valencia, CA, USA, Qiagen사)를 제조자 설명서에 따라 사용하여 추출하고, Scandrop Analytik jena AG 분광계 (Jena, Germany)를 이용하여 농도를 측정하였다. 1μg의 RNA를 Maxime RT PreMix 키트 (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)로 cDNA를 합성하고, PCR 반응을 Veriti 96-웰 열 사이클러(thermal cycler) Applied Biosystems, Singapore)에서 수행하였다. 정량적 실시간 PCR을 iQTM SYBR Green Supermix 키트 (Bio-Rad, Singapore)를 이용하여 CFX96TM 실시간 PCR 검출 시스템 (Bio-Rad, Singapore) 상에서 수행하였다. 프라이머에 대한 서열을 표 1에 열거하였다. 발현 양을 Gapdh(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)로 정량하였다(Yoon D, Imran KM, Kim YS. 2018 Toxicol Appl Pharmacol. Feb 1;340:9-20).

[102] [표1]

본 실험에서 사용된 프라이머 세트

Gene Name	Forward (5' → 3')(서열번호)	Reverse (5' → 3')(서열번호)
Ucp1	GGCATTTCAGAGGCAAATCAGCT(5)	CAATGAACACTGCCACACCTC(6)
Pgc1a	ACAGCTTTCTGGGTGGATT(7)	TGAGGACCGCTAGCAAGTTT(8)
Prdm16	CAGCACGGTGAAGCCATTC(9)	GCGTGCATCCGCTTGTG(10)
Tbx1	GGCAGGCAGACGAATGTTC(11)	TTGTCATCTACGGGCACA AAG(12)
Fgf21	AGATCAGGGAGGATGGAACA(13)	TCAAAGTGAGGCGATCCATA(14)
CD137	CGTGCAGAACTCCTGTGATAAC(15)	GTCCACCTATGCTGGAG AAGG(16)
Cox2	GACTGGGCCATGGAGTGG(17)	CACCTCTCCACCAATGACC(18)
P2RX5	CTGCAGCTCACCATCCTGT(19)	CACTCTGCAGGGAAGTG TCA(20)
Gapdh	GACATGCCGCCTGGAGAAAC(21)	AGCCCAGGATGCCCTTTA GT(22)

[103]

[104] 고지방식이 유도 비만마우스 투여에 의한 항비만 효능 조사

[105] 마우스에게 고지방식을 섭취시켜 비만모델을 유도시키면서, 장내 미생물 배양액 또는 균체를 12주간 마우스에게 투여하여 효능을 비교하였다. 본 연구에 사용된 마우스는 C57BL/6, SPF 수컷마우스로서 3주령을 입수하여 사용하였으며 입수 후 7일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 고지방식은 45% kcal high fat diet, D12451 (Research Diet)를 이용하여 12주간 급이시켜 Diets induced obesity (DIO) 비만 모델을 확립하였다. 실험에 사용된 군 구성은 하기 표 2에서 예시하였으며 투여한 유산균은 10^9 cell/kg으로 하였고 배양액은 마리당 1 ml 배양액을 동결건조 한 다음 150 μ l의 증류수로 녹여서 매일 1회 투여하였다.

[106] [표2]

Group	Animal number	Sex	Treat Dose concent. (Vol)
G1 (Saline, Non-45% kcal HFD)	6	male	150 μ l/Head
G2 (Saline, 45%kcal HFD)	6		150 μ l/Head
G3 (MRS broth, 45%kcal HFD)	6		150 μ l/Head
G4 (LGG, 45%kcal HFD)	6		150 μ l/Head
G5 (30번 균주 배양액, 45%kcal HFD)	6		150 μ l/Head
G6 (51번 균주 배양액, 45%kcal HFD)	6		150 μ l/Head
G7 (30번 균주 cell, 45%kcal HFD)	6		150 μ l/Head
G8 (51번 균주 cell, 45%kcal HFD)	6		150 μ l/Head

[107] 모든 동물에 대하여 부검일까지 매일 1회 일반증상을 관찰하고 체중특정과 식이량은 시검기간 중 주 5회 측정하였다. 시험기간 종료 후 호흡마취를 이용하여 마취하고 심장채혈을 통하여 혈액을 채집하고, 군당 2수씩 지방부위를 적출하여 4% Paraformaldehyde 용액에 담거나 RNA Storage solution (ThermoFisher)에 보관하였다. 혈구분석은 혈구분석장비(Beckman coulter)를 이용하였으며 혈구분석을 마친 검체는 원심분리 후 혈장을 이용하여 총 콜레스테롤, HDL, LDL, glucose 분석을 수행하였다. 4% PFA 용액에 담긴 지방조직은 파라핀 블록 제조에 이용하였다.

[108]

[109] 통계 분석

[110] 이 실험의 모든 데이터는 3회 이상의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준 편차(SD)로 표현되었다. 달리 명시하지 않는 한, MDI 처리된 시료 군을 사용하여, 대조군에 비해 변화가 어느 정도 이루어졌는지를 확인하였다. 대조군과 다른 처리군들 간의 유의한 차이는 스튜던트 t-검정(Student's t-test)를 사용하여 계산하였다. *P = 0.05, **P $\leq$ 0.01, ***P $\leq$ 0.001. 0.05 미만의 P 값을 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

[111]

[112] 실시예 1. 항비만 활성 균주의 탐색

[113] 55종의 유산균을 이용하여 3T3-L1 지방전구세포에서의 배이지 및 갈색지방세포로의 전환 가능성 관찰을 위해 각 유산균 균주를 MRS 배지에서 48시간 배양한 후 원심분리하여 상등액을 확보하였다. 확보된 상등액은 동결건조한 다음 최초 부피의 1/10 부피의 멸균 증류수를 첨가하여 농축액을

제조하였으며, 이를 각 1, 5, 10 μ l로 3T3-L1 세포에 처리하여 Oil Red O 염색을 통해 트리글리세라이드의 축적 양을 정량화하였다. 이에 따라 유산균 배양액의 갈색지방세포화 및 베이지 지방세포화를 활성화하는 활성 후보군(사선으로 채워진 막대)을 선별하였다. 또한 지방세포의 형성을 억제하는 후보군을 선별하였다(점으로 채워진 막대)(도 1b).

[114] 갈색지방세포화를 위해서는 대조군인 Rosi를 처리한 것과 같이 유산균 농축액을 개별적으로 1, 5, 10 μ l로 처리한 지방세포에서 증식을 10 ~ 20% 증가시키는 것들 중에서 상대적으로 고농도인 10 μ l 처리한 군에서 1차적으로 선별하였다. 지방세포 형성의 억제효과를 보이는 51번의 경우에도 3번의 개별 농도 실험에서 상대적으로 고농도인 10 μ l 처리한 군에서 선별하였다. 상기와 같이 트리글리세라이드의 축적량으로 1차 선별한 이후, 선별된 후보군들을 다시 갈색지방세포 특이적 유전자 중 하나인 *ucp1*의 발현 여부의 확인 실험을 통해 2 ~ 3차 선별 과정을 거쳐 4개 선별하였고 이중에 30, 51번 유산균 균주를 최종적으로 선별하였다.

[115] 최종 선별된 30, 51번에 대해 개별적으로 1, 5, 10 μ l 처리하여 지방세포생성에 영향을 알아보기 위하여 트리글리세라이드의 양을 Oil red O 염색을 통해 조사하고, 지방세포 내에 존재하는 지질 방울(LD, lipid droplets)을 확인하였다(도 2a 내지 도 2c). 그 결과, 30, 51번 유산균 균주를 처리하는 경우 트리글리세라이드의 축적량이 증가하여 나타나고, 지질 방울이 합쳐지지 않은 형태로 더 작게 형성되어 있음을 확인하여, 선별된 30, 51은 3T3-L1 세포의 백색지방세포로의 성숙을 저해하고 갈색지방세포로의 전환을 높이는 효과가 있을 것으로 예상되는 균주인 것으로 나타났다.

[116]

[117] 실시예 2. 유산균 배양액이 마우스 지방세포인 갈색지방세포 및 베이지 지방세포 특이 유전자 발현에 미치는 영향

[118] 백색지방조직에서 발현이 되지 않는 *UCPI*(Uncoupling protein 1) 유전자를 발현하는 것을 베이지 지방세포라고 한다. 이 유전자가 백색지방세포에서 발현한다는 것은 백색지방세포가 베이지 지방세포 또는 갈색지방세포로의 이형변화(Transdifferentiation)가 일어났음을 시사하고 이러한 세포의 이형변화는 섭식이나 외부환경에 따라서 가역적으로 이루어질 수 있다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 선별균주 배양액이 베이지 지방세포 및 갈색지방세포 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

[119] 유산균 배양액이 마우스 지방세포인 갈색지방세포 및 베이지 지방세포 특이 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 도 3a와 같이, 30번 유산균 배양액을 처리한 3T3-L1 지방세포에서 열발생(thermogenesis) 관련 유전자 및 갈색지방세포 특이 유전자로 알려진 *Ucp1*(Uncoupling protein 1) 유전자의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였고, 다른 갈색지방 특이 유전자인 *Pgc1a* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)과 *Prdm16*

(PR/SET domain 16)의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 또한 일반적인 지방세포 분화에 중요한 *Pparg*(peroxisome proliferator activated receptor gamma)의 발현이 증가함을 확인하였다. 51번 유산균 배양액을 처리한 경우에는 갈색지방세포 특이 유전자의 발현을 현저히 증가시키지는 않았으나 *Prdm16* 유전자의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다.

[120] 또한, 상기 유산균 배양액의 효과를 다시 한번 검증하기 위해 군주배양액을 마우스 중간엽 줄기세포인 C3H10T1/2 세포에서 처리하여 열발생 및 특이 갈색지방세포 인자인 *Ucp1*, *Pgc1a*, 그리고 *Prdm16* 발현량을 확인한 결과, 본 발명의 30번, 51번 유산균의 배양액을 처리하는 경우 상기 갈색지방세포 특이적 유전자들의 발현량이 증가함을 확인할 수 있었다(도 3b).

[121] 이어 30번의 백색지방세포에서 베이지색 지방세포로의 이형전환의 효과를 확인하기 위해 유산균 배양액을 처리한 3T3-L1 지방세포에서 섬유아세포 성장인자 21(*Fgf21*), *Tbx1*, *P2RX5*, *CD137*, 시트크롬 c 산화 효소 서브 유닛 II(*Cox2*)와 같은 여러 베이지 지방 세포의 특이 마커들의 발현이 현저하게 증가하는 것이 특징적으로 관찰되었다. 또한, 51번 군주 배양액을 처리한 세포에서도 베이지 지방세포의 발현에 중요한 유전자인 *CD137*과 *Fgf21*의 발현이 현저히 증가되는 것으로 확인되었다(도 4a).

[122] 이번에도 선별된 유산균 군주배양액의 효과를 다시 한번 검증하기 위해 군주배양액을 마우스 중간엽 줄기세포인 C3H10T1/2 세포에서 처리하여 베이지색 지방세포 특이 유전자인 *Fgf21*, *P2RX5*, *CD137* 및 *Tbx1*(T-box 1)의 발현량을 확인한 결과, 본 발명의 30번, 51번 유산균 배양액을 처리하는 경우 상기 베이지색 지방세포 특이적 유전자의 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 4b).

[123]

[124] 실시예 3. 유산균 배양액이 지방 분해, β -산화(β -oxidation) 관련 유전자 발현에 미치는 영향 및 PKA 신호전달 과정의 활성화에 미치는 영향

[125] 본 발명의 유산균 배양액의 효과를 추가로 확인하기 위하여, 3T3-L1 세포를 대상으로 하여 유산균 배양액을 처리하여 지방분해와 관련된 유전자인 *Atgl*, *HSL*, *Plin1*, *Plin5*의 발현량을 확인하고, 지질의 β -산화(β -oxidation)와 관련된 유전자인 *LCAD*, *MCAD*, *LCPT*, *Abhd5* 유전자의 발현량을 확인하였다.

[126] 그 결과, 본 발명의 30번 51번 유산균 배양액을 처리한 3T3-L1 세포에서는 *Atgl*, *HSL*, *Plin1*, *Plin5* 유전자와 *LCAD*, *MCAD*, *LCPT*, *Abhd5* 유전자의 발현량이 대조군에 비해 대체로 높게 측정되었으므로(도 5a 및 도5b), 지방을 분해하거나 지질 성분을 산화시킬 수 있는 작용을 유도함으로써 지방의 축적과 체중 증가를 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[127] 또한, 본 발명의 유산균 배양액을 3T3-L1 세포에 처리한 다음 PKA 신호전달의 활성화 정도를 측정하였다. 인산화된 PKA의 증가 여부를 웨스턴 블랏팅을 통해 확인하였고(도 6의 A), PKA 저해제인 H89를 10 mM 처리하여 인산화된 PKA를

다시 확인하여(도 6의 B), 본 발명의 30번, 51번 유산균 배양액을 처리하는 경우 인산화된 PKA가 증가함을 관찰하여 PKA 신호전달 과정을 활성화시키는 효과가 있음을 확인하였다. 상기 PKA 저해제인 H89를 처리한 이후 발열 관련 유전자인 *Ucp1*과 *Pgc1a* 유전자의 발현량 변화를 확인한 결과(도 6의 C), H89 처리시에 *Ucp1*과 *Pgc1a* 유전자의 발현량이 감소함을 추가적으로 확인하여, PKA 활성화를 통해 본 발명의 유산균 배양액이 발열 관련 유전자의 발현량 증가를 유도한다는 점에 대해 다시 한번 확인할 수 있었다. 그리고 si-PKA cat a1을 이용하여 발열 유전자, 지방세포분화 관련 유전자의 발현과 이들 단백질의 발현량 변화를 확인한 결과, *Ucp1*, *Pgc1a*, *Pparg*, *Ceba* 유전자의 발현이 억제되고 *Ucp1*, *Pparg*, *Pgc1a* 단백질의 양 역시 감소됨을 확인하여, PKA 활성화를 통해 본 발명의 유산균 배양액이 발열 관련 유전자의 발현량 증가를 유도한다는 점에 대해 다시 한번 확인할 수 있었다(도 6의 D 내지 F).

- [128] 나아가, 본 발명의 30번, 51번 유산균을 3T3-L1 세포에 처리함에 따라 지방분해효소, AMPK 인산화 및 전자조절인자인 CREB의 인산화가 증가함을 확인할 수 있었고, PKA 저해제인 H89 처리에 따라 상기와 같은 지방분해효소 및 CREB 인산화가 억제됨을 통해 본 발명의 효과를 다시 한번 확인할 수 있었다(도 7 참고).

[129]

[130] 실시예 4. 고지방식이 유도 비만마우스 투여에 의한 항비만 효능 조사

- [131] 시험기간 동안 모든 군에서 일반적인 이상증상은 관찰되지 않았지만 정상군 대비 고지방식이 마우스에서는 체중이 34.0% 유의하게 증가하였다. 특히 30번 균주 배양액의 투여군(G5)과 51번 균주 세포의 투여군(G8)의 경우 음성대조군(G2)과 비교하여 평균 체중의 차이가 각각 10.8%, 5.7% 감소로 나타나 두 개의 실험군에서 평균 체중의 감소가 발생하였다(도 8). 또한, 각 지방세포 조직의 H&E 병리를 분석한 결과 (면적 측정) 음성대조군(G2) 대비 G5와 G8 투여군에서 Gonadal fat (각각 19.6%, 18.9%), Peritoneal fat (각각 21.2%, 22.4%), Mesenteric fat (각각 33.9%, 24.4%), White adipose tissue (26.2%, 23.4%)의 차이를 나타내어(도 9), 본 발명의 30번, 51번 균주나 그 배양액은 지방의 축적량을 감소시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

- [132] 또한, 생화학적 분석을 수행한 결과 G5, G8군은 음성대조군과 비교하여 총콜레스테롤과 LDL의 수치가 유의하게 감소함을 확인하여(도 10), 본 발명의 균주와 배양액을 함께 동물에 투여할 경우 콜레스테롤과 LDL 성분이 감소되는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 각 지방조직에서 발열 또는 지방분해효소 관련 유전자인 *Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16* 유전자의 발현량을 확인한 결과, 마우스의 4개 지방조직들에서 본 발명 균주나 배양액을 투여한 군에서 발현량이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다(도 11).

- [133] 나아가, 본 발명의 유산균 균주 또는 그 배양액을 투여시킨 군의 마우스에서 백색지방의 염증관련 마크로파지 극성(macrophage polarization)에 미치는 영향을

확인하였다. 염증-촉진(pro-inflammatory) M1 마크로파지 마커인 *CD11c*, *CD68*, *IL-1b*, *Mcp1*, *TNF-a* 유전자의 발현량 변화를 확인하고(도 12a), 항-염증 M2 마크로파지 마커인 *Arg1*, *CD206* 유전자의 발현량 변화를 확인하였다(도 12b). 비만 상태인 개체의 지방세포에서는 염증반응이 촉진되고 M2 마크로파지로부터 M1 마크로파지로의 전환이 이루어져 마크로파지의 극성의 변화를 확인함으로써 비만의 억제 또는 개선 효과를 확인할 수 있다. 그 결과, 본 발명의 유산균 균주 또는 그 배양액을 투여시킨 마우스의 경우, M1 마크로파지 마커 유전자의 발현량은 감소되고, M2 마크로파지 마커 유전자의 발현량은 증가된 것으로 확인되어, 본 발명의 30번, 51번 균주나 그 배양액이 비만을 억제하거나 개선할 수 있는 효과를 가진다는 점을 확인할 수 있었다.

[134]

[135] 실시예 5. 선별 균주의 동정

[136] 1차 스크리닝 결과 우수한 항 비만 활성을 나타내는 2개의 균주(30번, 51번)를 선별하여 16S rRNA 유전자 분석(서열번호 1 및 2)을 실시한 결과 각각 비피도박테리움 롱검 아종 롱검(*Bifidobacterium longum* spp. *longum*)과 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)로 동정이 되었으며, 각 균주는 비피도박테리움 롱검 DS0956 (*B. longum* JCM1217T와 99.86% 16S rRNA 상동성)와 락토바실러스 람노서스 DS0508(*L. rhamnosus* JCM 1136T와 100% 상동성)로 명명하였다. 각 균주는 각각 기탁번호 KCTC13505BP 및 KCTC13504BP로 특허 기탁되었다. 유전체 분석 결과 비피도박테리움 롱검 DS0956과 락토바실러스 람노서스 DS0508은 각각 하나의 염색체에 2.43Mbp, 3.01 Mbp의 유전체 크기를 나타내었으며 플라스미드는 가지지 않는 것으로 조사되었다.

[137]

[138] 이상에서 본 발명은 기재된 실시예에 대해서만 상세히 설명되었지만 본 발명의 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 청구범위에 속함은 당연한 것이다.

[139]

[140] [수탁번호]

[141] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[142] 수탁번호 : KCTC13505BP

[143] 수탁일자 : 20180326

[144]

[145] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[146] 수탁번호 : KCTC13504BP

[147] 수탁일자 : 20180326

[148]

번역문

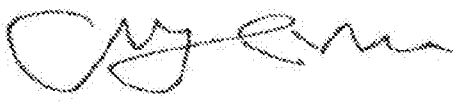
특허전차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한
부다페스트 조약

국제 서식
규칙 7.1에 의한

원기탁에 대한 수탁증

TO : 박두상

한국생명공학연구원, 181, 임선길, 정읍시, 전라북도 56212, 대한민국

I. 미생물의 특징	
기탁자가 부여한 특정표시 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DS0508	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 KCTC 13504BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학적 위치	
I 로 특정된 미생물은 [] 과학적 성질 [] 분류학적 위치로 기재하였다 (적용되는 부분에 표시한다).	
III. 수탁	
국제기탁기관은 I 로 특정되는 미생물을 2018년 3월 26일자로 수탁하였다.	
IV. 수탁전환의 청구	
I 로 특정된 미생물은 국제기탁기관에 의해 _____자로 수탁되었고, _____자로 동 미생물에 대한 원기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로의 전환 청구가 접수되었다.	
V. 국제기탁기관	
명칭 : 생물자원센터 주소 : 한국생명공학연구원(KRIBB), 181, 임선길, 정읍시, 전라북도 56212, 대한민국	국제 기탁 기관을 대표할 권한이 있는 자의 서명  김 차 영 날짜 : 2018년 3월 26일

BP/4 형식 (KCTC 17 형식)

[149]

[150]

번역문

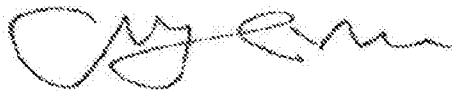
특허청차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한
부다페스트 조약

국제 서식
규칙 7.1에 의한

원기탁에 대한 수탁증

TO : 박두상

한국생명공학연구원, 181, 업선길, 정읍시, 전라북도 56212, 대한민국

I. 미생물의 특징	
기탁자가 부여한 특정표지 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DS0956	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 KCTC 13505BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
I 로 특정된 미생물은 [] 과학적 성질 [] 분류학상 위치로 기재하였다 (적용되는 부분에 표시한다).	
III. 수탁	
국제기탁기관은 I 로 특정되는 미생물을 2018년 3월 26일자로 수탁하였다.	
IV. 수탁전환의 청구	
I 로 특정된 미생물은 국제기탁기관에 의해 _____자로 수탁되었고, _____자로 동 미생물에 대한 원기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로의 전환 청구가 접수되었다.	
V. 국제기탁기관	
명칭 : 생물자원센터 주소 : 한국생명공학연구원(KRIBB), 181, 업선길, 정읍시, 전라북도 56212, 대한민국	국제 기탁 기관을 대표할 권한이 있는 자의 서명  김 자 영 날짜 : 2018년 3월 26일

BP/4 형식 (KCTC I7 형식)

[151]

청구범위

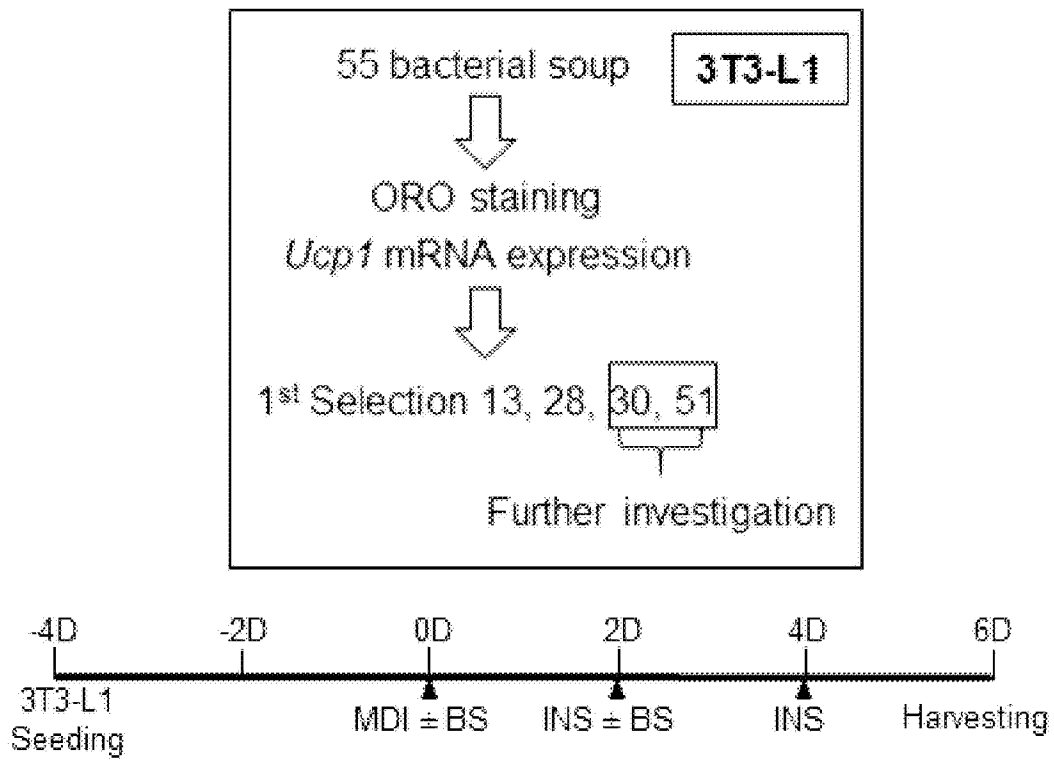
- [청구항 1] 기탁번호 KCTC13505BP로 기탁된비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) DS0956 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) DS0956균주는 백색지방세포로부터 베이지색 지방세포(beige adipocyte) 또는 갈색 지방세포의 형성을 유도하는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 균주는 지방세포에서 *Ucp1*(uncoupling protein 1), *Pgc1a*(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), *Prdm16*(PR/SET domain 16), *Pparg*(peroxisome proliferator activated receptor gamma), *CD137*, *Fgf21*(fibroblast growth factor 21), *P2RX5*(purinergic receptor P2X 5) 및 *Tbx1*(T-box 1)의 발현을 증가시켜 베이지색 지방세포(beige adipocyte) 또는 갈색 지방세포의 형성을 유도하는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 균주는 지방세포에서 지방의 분해 또는 지질의 β -산화(β -oxidation)를 촉진하는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 균주는 비만인 개체에서 콜레스테롤 또는 저밀도 지방단백질(LDL)의 축적량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 6] 기탁번호 KCTC13504BP로 기탁된, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) DS0508 균주.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 균주는 베이지색 지방세포(beige adipocyte) 또는 갈색 지방세포의 형성을 유도하는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 균주는 지방세포에서 *Ucp1*(uncoupling protein 1), *Pgc1a*(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), *Prdm16*(PR/SET domain 16), *Pparg*(peroxisome proliferator activated receptor gamma), *CD137*, *Fgf21*(fibroblast growth factor 21), *P2RX5*(purinergic receptor P2X 5) 및 *Tbx1*(T-box 1) 발현을 증가시켜 베이지색 지방세포(beige adipocyte) 또는 갈색 지방세포의 형성을 유도하는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 9] 제 6항에 있어서, 상기 균주는 지방세포에서 지방의 분해 또는 지질의 β -산화(β -oxidation)를 촉진하는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 10] 제 6항에 있어서, 상기 균주는 비만인 개체에서 콜레스테롤 또는 저밀도 지방단백질(LDL)의 축적량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 약학 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제

또는 동결건조제로 구성되는 균으로부터 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

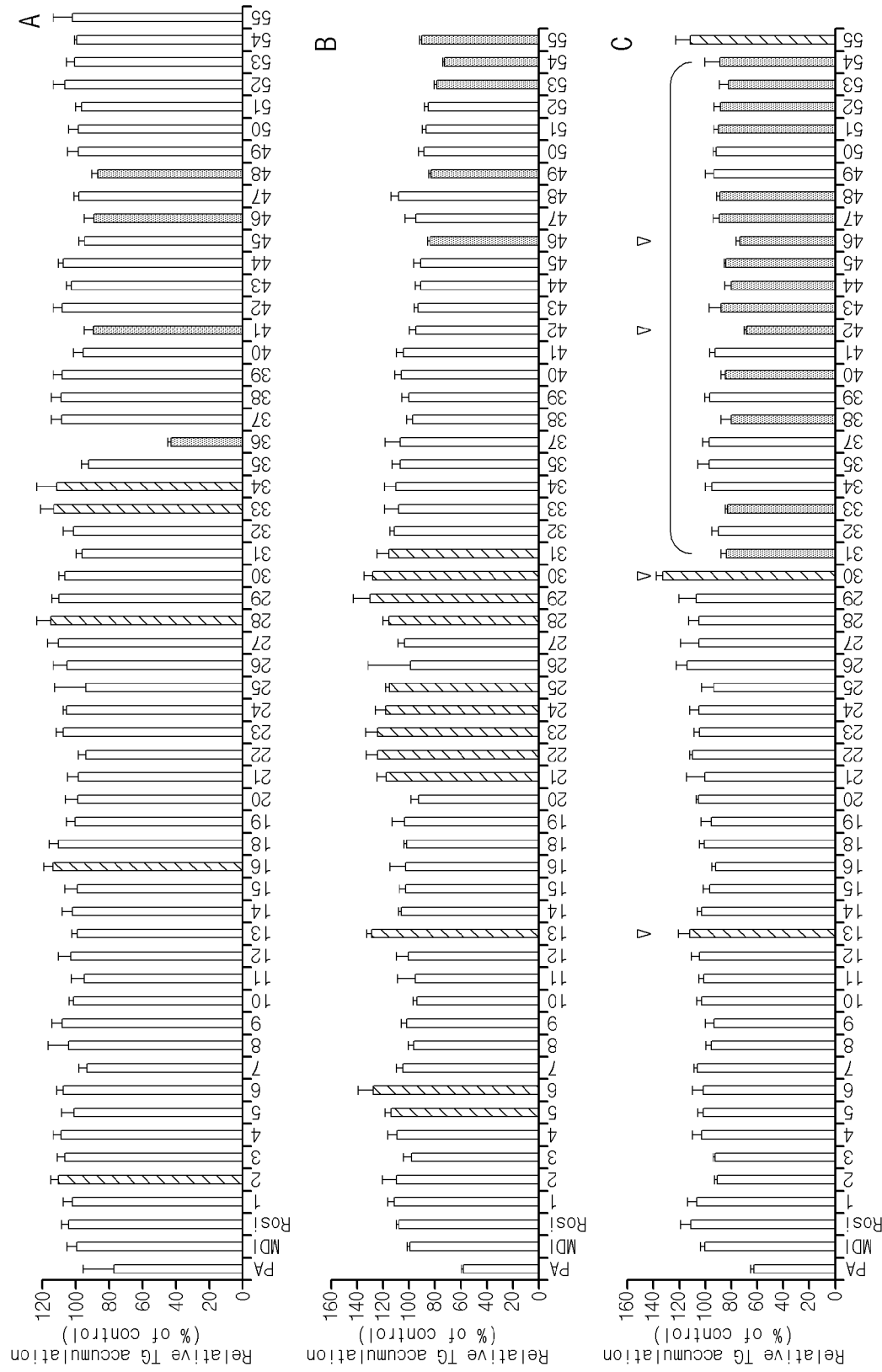
[청구항 13] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[청구항 14] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 추출물로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 사료 조성물.

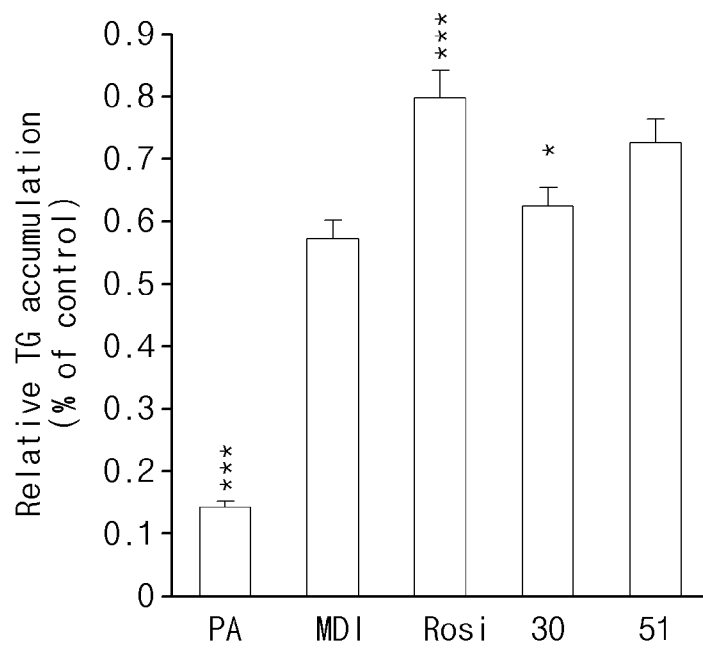
[도 1a]



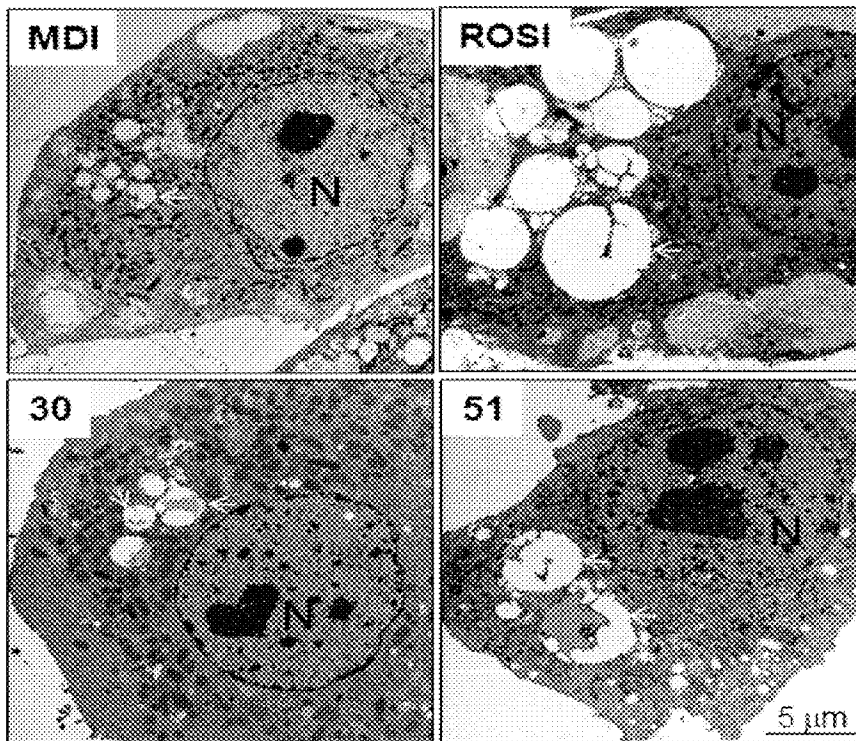
[도1b]



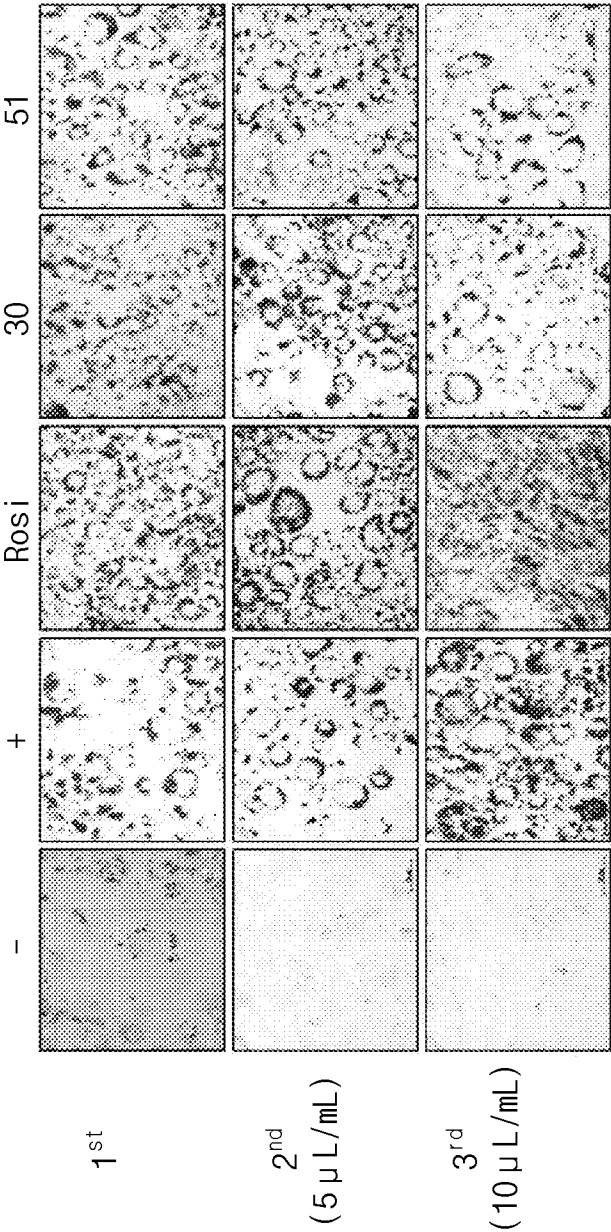
[도2a]



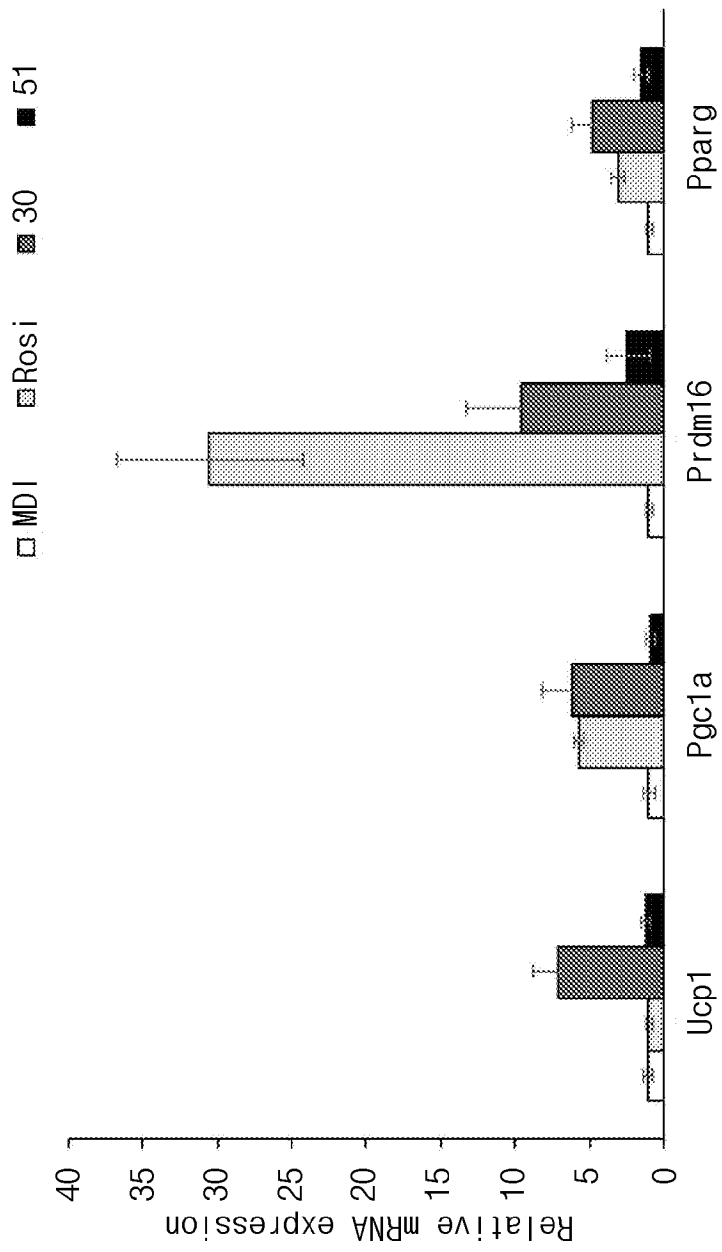
[도2b]



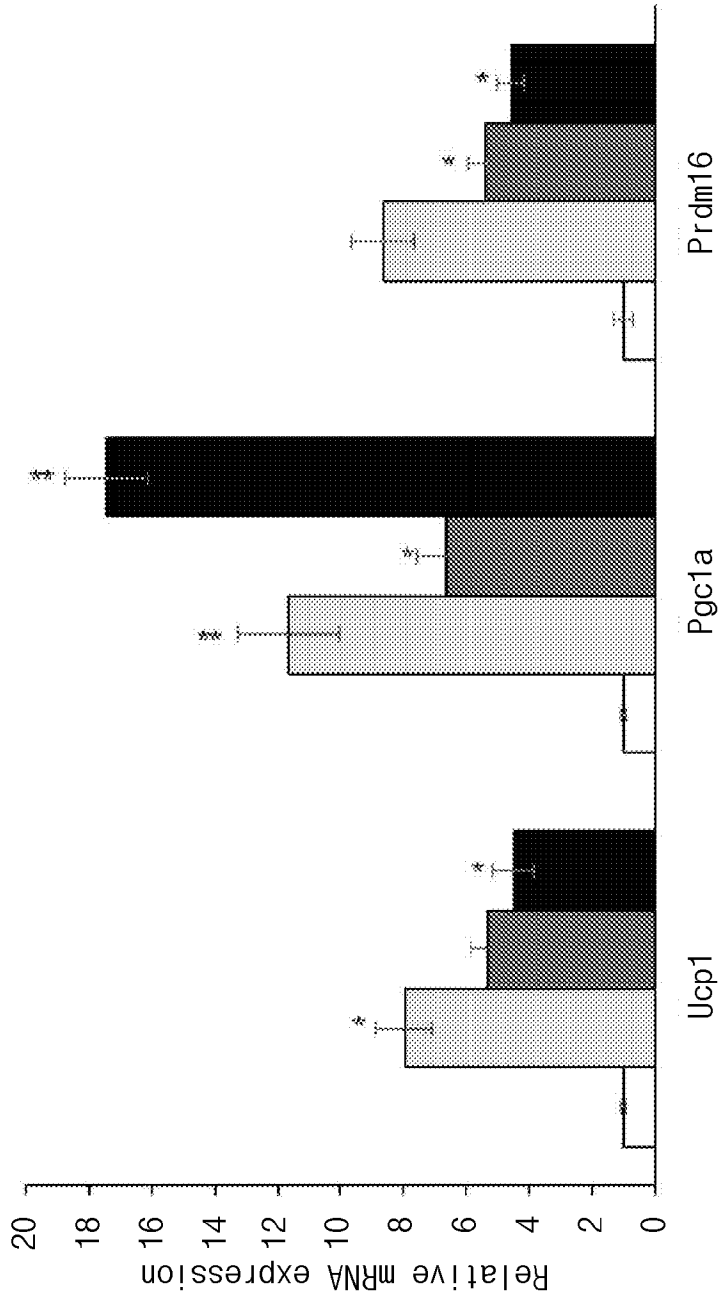
[도2c]



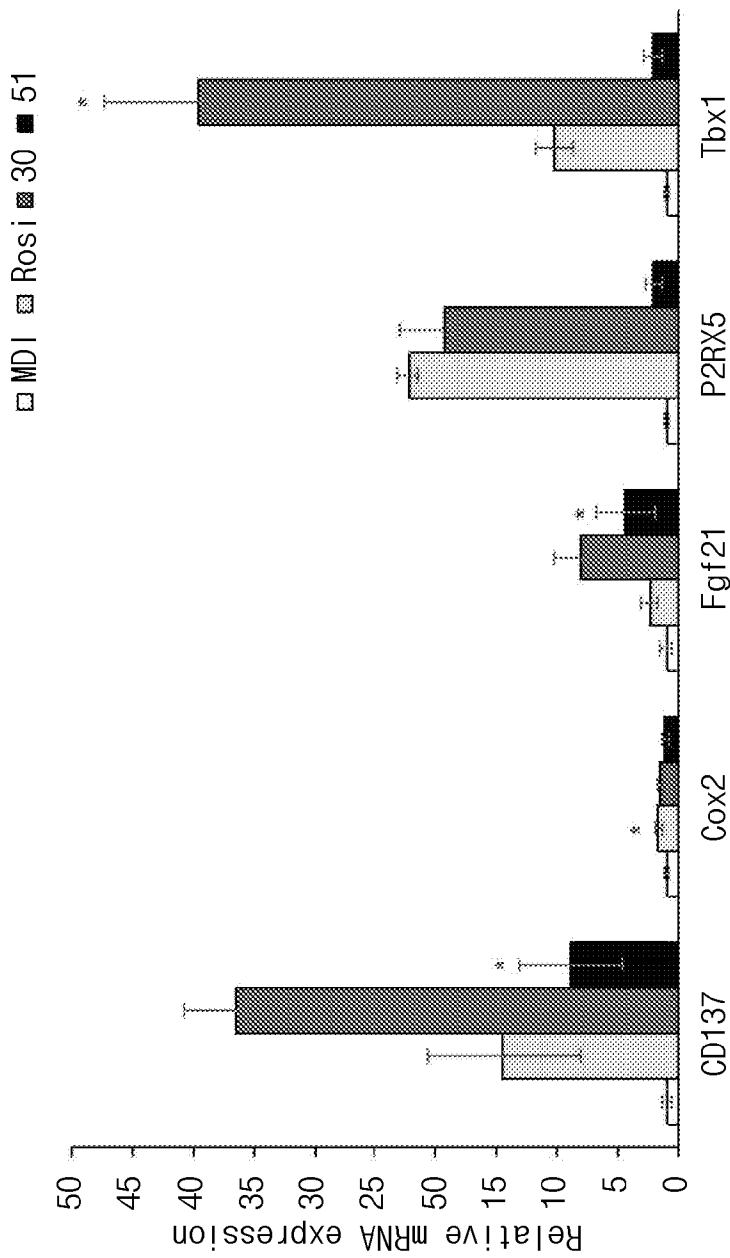
[도3a]



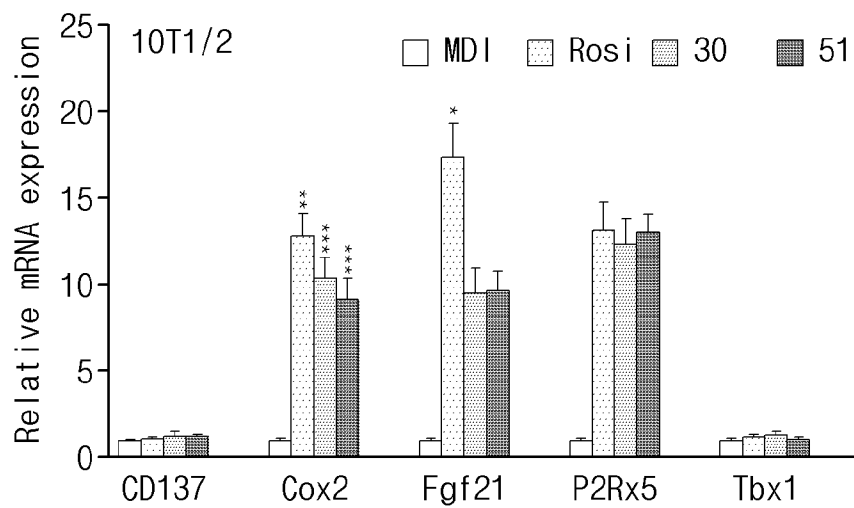
[도3b]



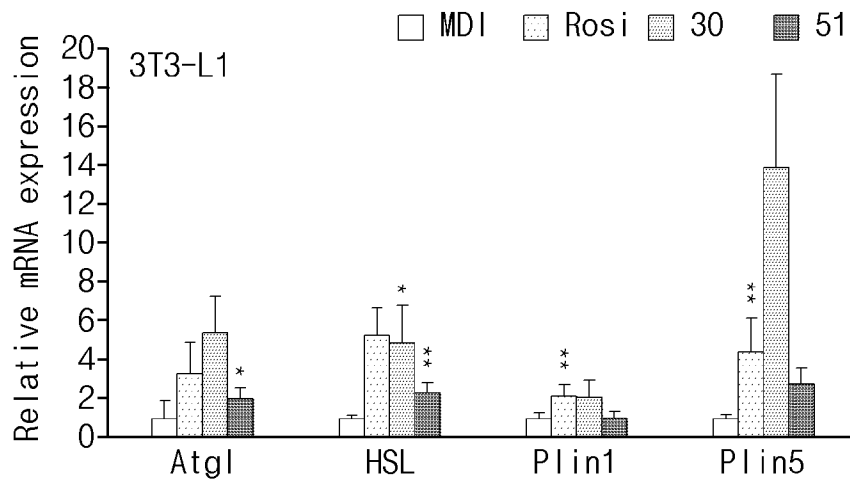
[도4a]



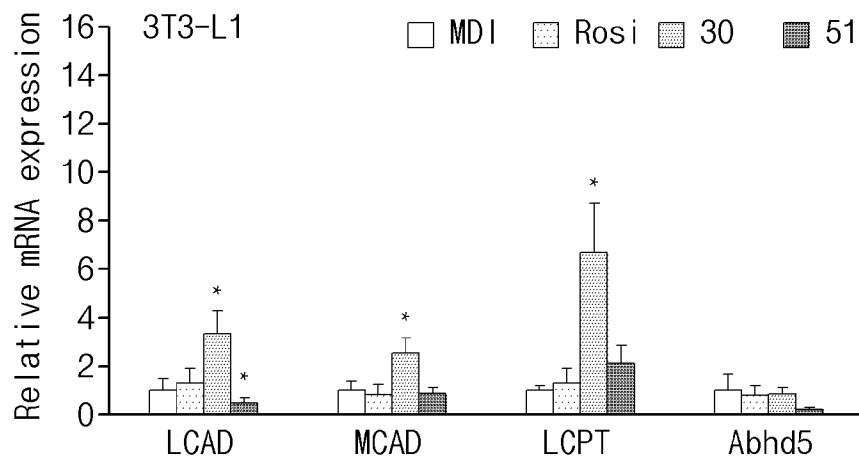
[도4b]



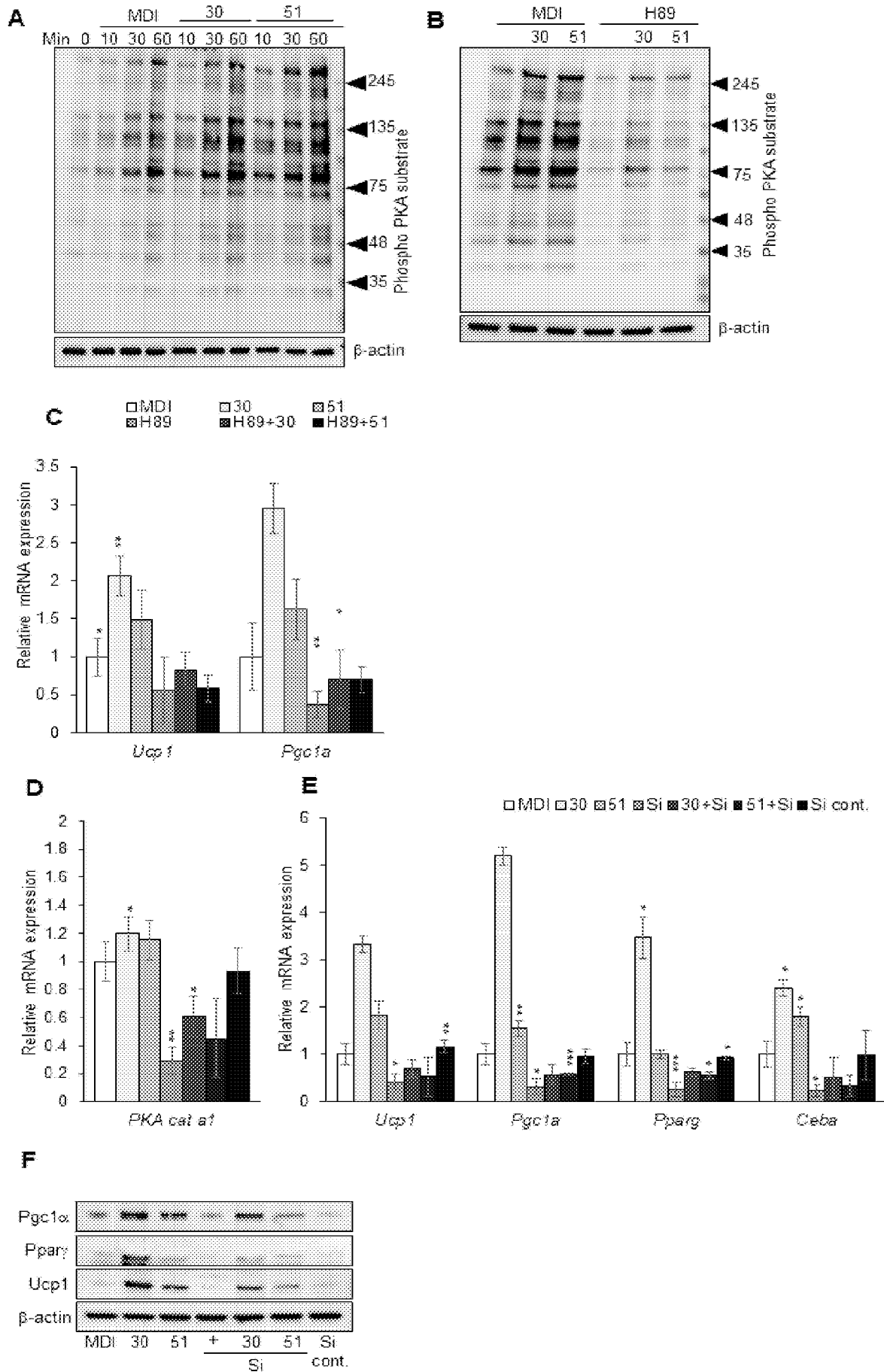
[도5a]



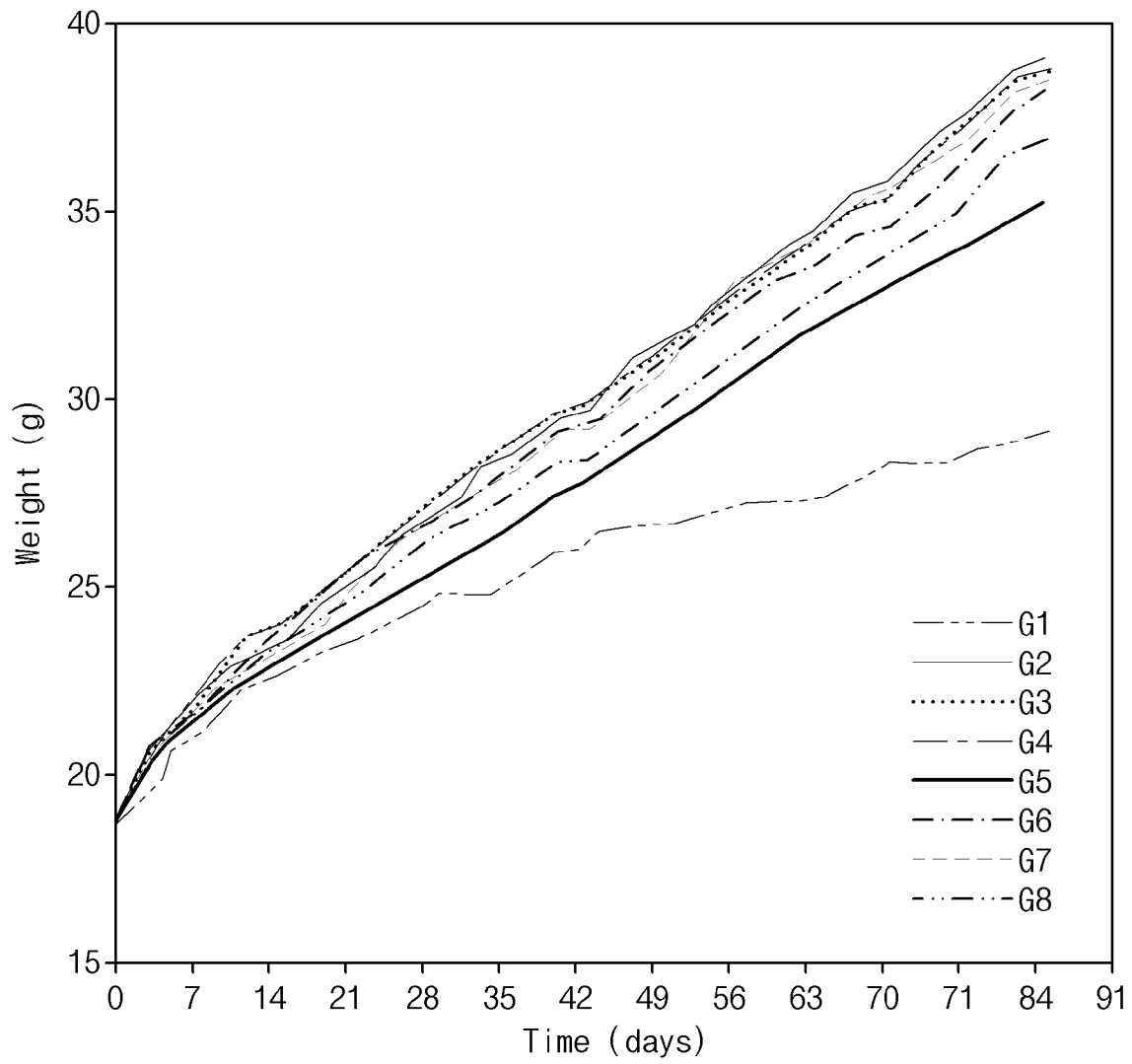
[도5b]



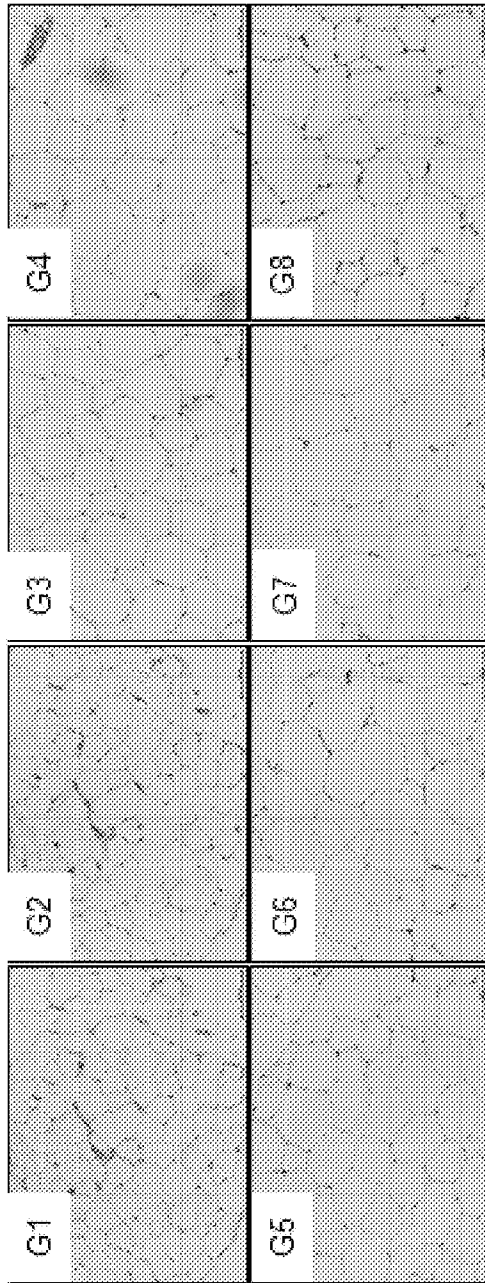
[도6]



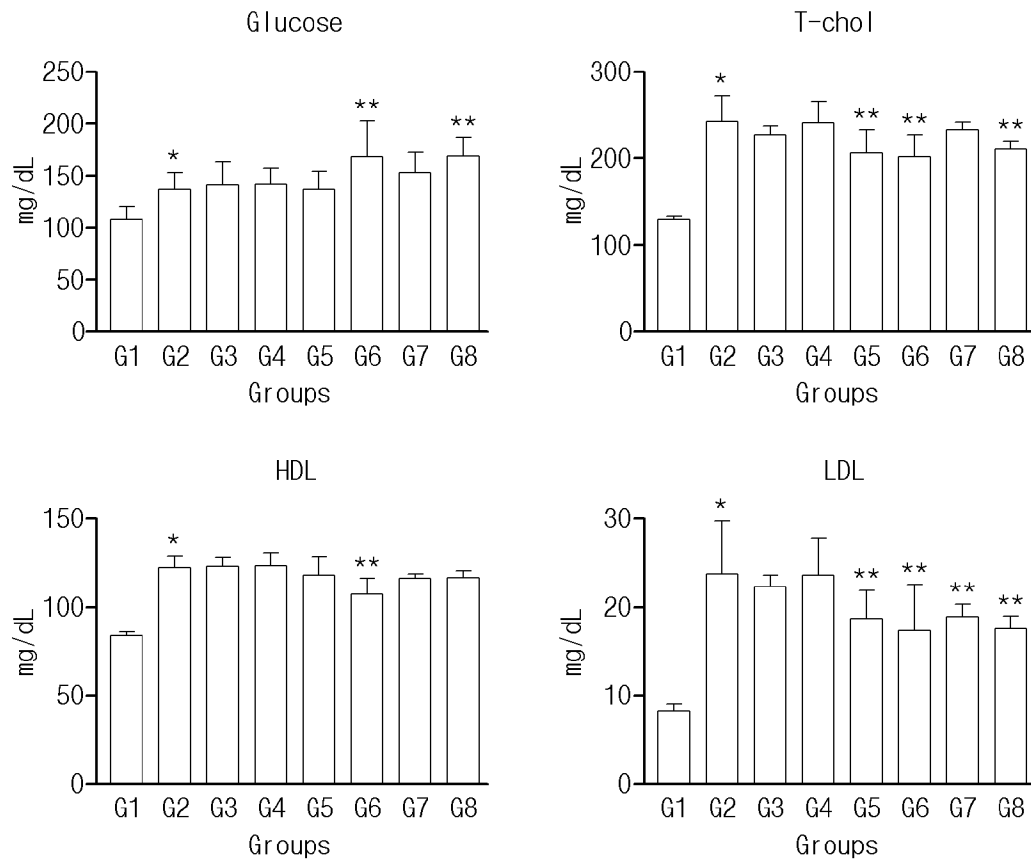
Western blot analysis showing the expression of lipid droplet-associated proteins (HSL, Plin1, ATGL, and β-actin) in S660 and HSL cells. The blot is divided into two main sections: S660 and HSL. Each section contains lanes for MDI (0, 13, 28, 30, 51) and Rosi (0, 13, 28, 30, 51). The proteins detected are HSL, Plin1, ATGL, and β-actin. β-actin serves as a loading control.



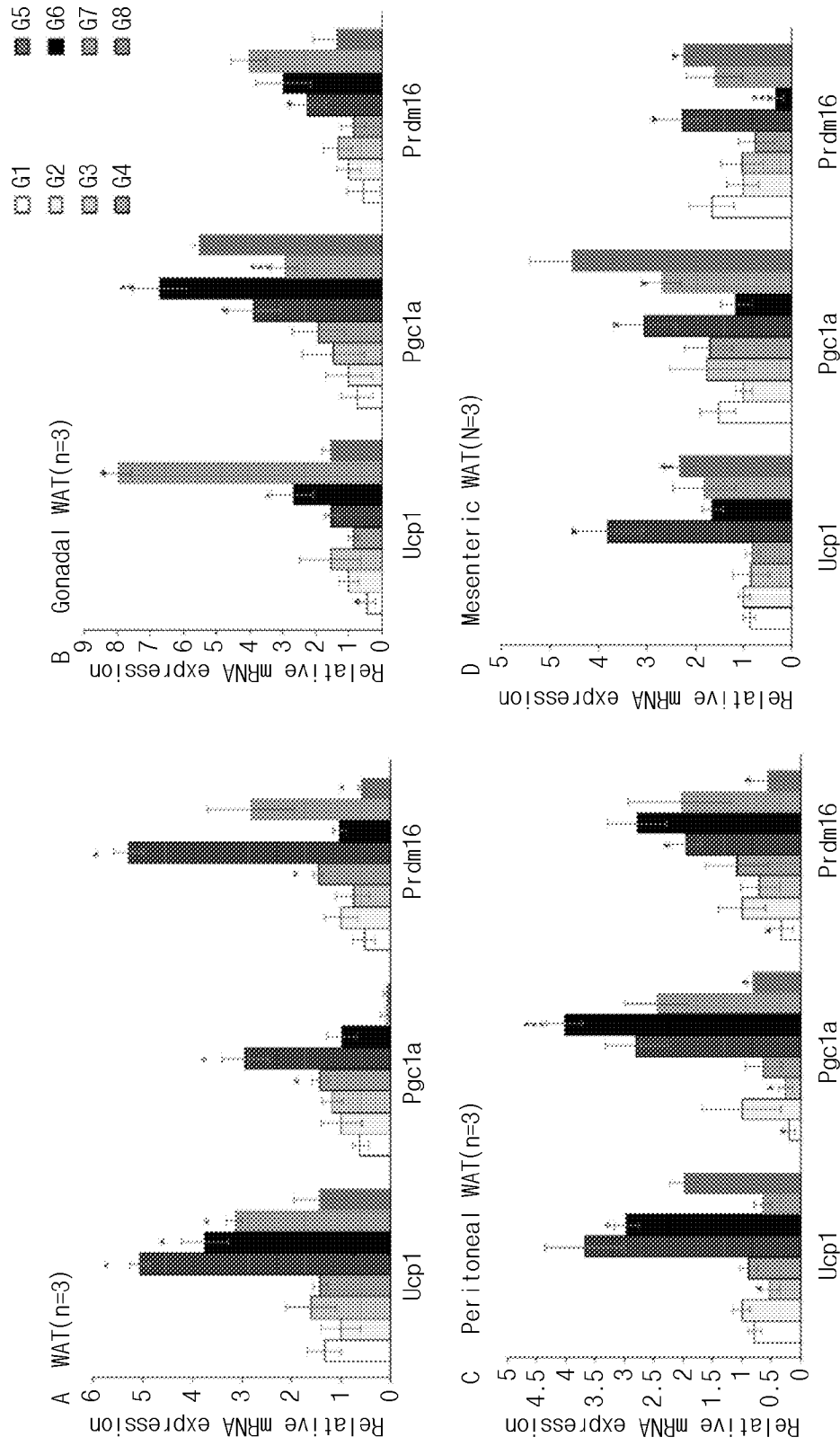
[도9]



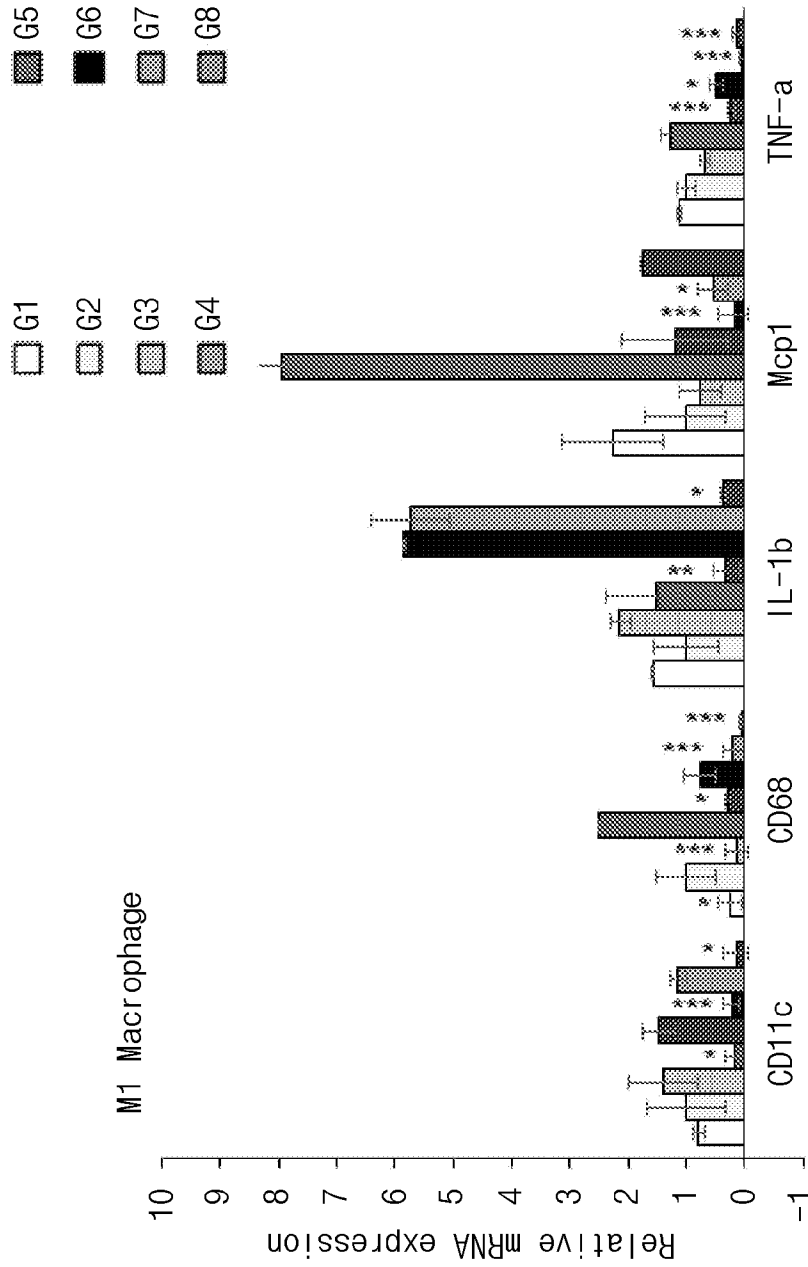
[도10]



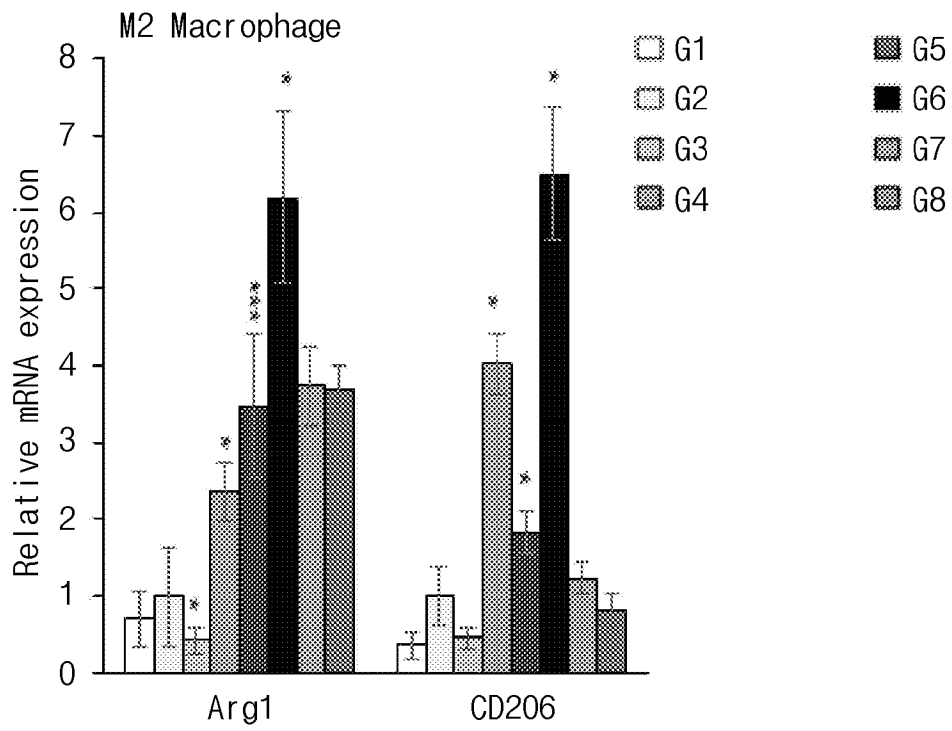
[도11]



[도 12a]



[도12b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/004395

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/744(2014.01)i, A61K 35/745(2014.01)i, A61K 35/747(2014.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A23K 10/16(2016.01)i, A61P 3/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/744; A23L 33/15; A61K 35/74; A61K 35/747; A61P 3/04; A61K 35/745; A23L 33/135; A23K 10/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: obesity, Bifidobacterium longum DS0956, Lactobacillus rhamnosus DS0508, white adipose tissue, beige adipose tissue, brown adipose tissue, induction

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008-116700 A1 (NESTEC S.A.) 02 October 2008 See abstract; and claims 1-5.	1-14
A	KR 10-1709246 B1 (ILDONG FOODIS CO., LTD.) 22 February 2017 See the entire document.	1-14
A	KR 10-2015-0118084 A (PROTHERA INC.) 21 October 2015 See the entire document.	1-14
A	BORGERAAS, H. et al. Effects of probiotics on body weight, body mass index, fat mass and fat percentage in subjects with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Obesity Reviews. February 2018, vol. 19, pages 219-232 See the entire document.	1-14
A	KOBYLIAK, N. et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. Nutrition & Metabolism. 2016, vol. 13, Article number 14, pages 1-13 See the entire document.	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 JULY 2019 (11.07.2019)

Date of mailing of the international search report

11 JULY 2019 (11.07.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/004395

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	HOSSAIN, M. et al. The effect of Bifidobacterium longum DS0956 in the browning through activation of thermogenic genes' expression. KMB 2018. 27 June 2018, Yeosu EXPO Convention Center. Korea. Poster D-22. See poster D-22.	1-5,11-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/004395

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2008-116700 A1	02/10/2008	AU 2008-231922 A1	02/10/2008
		AU 2008-231922 B2	01/08/2013
		BR P10809624 A2	23/09/2014
		CA 2677636 A1	02/10/2008
		CN 101646445 A	10/02/2010
		CN 101646445 B	08/01/2014
		EP 1974734 A1	01/10/2008
		EP 2129386 A1	09/12/2009
		EP 2129386 B1	16/04/2014
		ES 2462747 T3	26/05/2014
		MX 2009008782 A	24/08/2009
		MY 158816 A	15/11/2016
		PT 2129386 E	29/04/2014
		RU 2009139665 A	10/05/2011
		RU 2464994 C2	27/10/2012
		TW 200906427 A	16/02/2009
		UA 96795 C2	12/12/2011
		US 2010-0111915 A1	06/05/2010
KR 10-1709246 B1	22/02/2017	KR 10-2015-0137647 A	09/12/2015
KR 10-2015-0118084 A	21/10/2015	AU 2013-318513 A1	09/04/2015
		CA 2885537 A1	27/03/2014
		CN 104968780 A	07/10/2015
		EP 2898061 A1	29/07/2015
		JP 2015-530406 A	15/10/2015
		JP 6286434 B2	28/02/2018
		US 2014-0079676 A1	20/03/2014
		US 2019-0083551 A1	21/03/2019
		WO 2014-046804 A1	27/03/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/744(2014.01)i, A61K 35/745(2014.01)i, A61K 35/747(2014.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A23K 10/16(2016.01)i, A61P 3/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/744; A23L 33/15; A61K 35/74; A61K 35/747; A61P 3/04; A61K 35/745; A23L 33/135; A23K 10/16

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 비만, 비피도박테리움 롱검 DS0956, 락토바실러스 람노시스 DS0508, 백색 지방, 베이지색 지방, 갈색지방, 유도

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2008-116700 A1 (NESTEC S.A.) 2008.10.02 요약; 및 청구항 1-5 참조.	1-14
A	KR 10-1709246 B1 (일동후디스 주식회사) 2017.02.22 전체 문헌 참조.	1-14
A	KR 10-2015-0118084 A (프로테라 인코포레이티드) 2015.10.21 전체 문헌 참조.	1-14
A	BORGERAAS, H. 등, `Effects of probiotics on body weight, body mass index, fat mass and fat percentage in subjects with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials`, Obesity reviews, 2018.02., 19권, 페이지 219-232 전체 문헌 참조.	1-14
A	KOBYLIAK, N. 등, `Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view`, Nutrition & Metabolism, 2016, 13권, 문헌 14, 페이지 1-13 전체 문헌 참조.	1-14

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 07월 11일 (11.07.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 07월 11일 (11.07.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김진호

전화번호 +82-42-481-8699



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	HOSSAIN, M. 등, `The effect of Bifidobacterium longum DS0956 in the browning through activation of thermogenic genes' expression`, KMB2018, 2018.06.27, Yeosu EXPO Convention Center, Korea, 포스터 D-22 포스터 D-22 참조.	1-5,11-14

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2008-116700 A1

2008/10/02

AU 2008-231922 A1

2008/10/02

AU 2008-231922 B2

2013/08/01

BR PI0809624 A2

2014/09/23

CA 2677636 A1

2008/10/02

CN 101646445 A

2010/02/10

CN 101646445 B

2014/01/08

EP 1974734 A1

2008/10/01

EP 2129386 A1

2009/12/09

EP 2129386 B1

2014/04/16

ES 2462747 T3

2014/05/26

MX 2009008782 A

2009/08/24

MY 158816 A

2016/11/15

PT 2129386 E

2014/04/29

RU 2009139665 A

2011/05/10

RU 2464994 C2

2012/10/27

TW 200906427 A

2009/02/16

UA 96795 C2

2011/12/12

US 2010-0111915 A1

2010/05/06

KR 10-1709246 B1

2017/02/22

KR 10-2015-0137647 A

2015/12/09

KR 10-2015-0118084 A

2015/10/21

AU 2013-318513 A1

2015/04/09

CA 2885537 A1

2014/03/27

CN 104968780 A

2015/10/07

EP 2898061 A1

2015/07/29

JP 2015-530406 A

2015/10/15

JP 6286434 B2

2018/02/28

US 2014-0079676 A1

2014/03/20

US 2019-0083551 A1

2019/03/21

WO 2014-046804 A1

2014/03/27