



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월23일
(11) 등록번호 10-2823529
(24) 등록일자 2025년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/99 (2017.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/99 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2024-0142357
(22) 출원일자 2024년10월17일
심사청구일자 2024년10월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020220033010 A*
Y. Lee et al., J. Microbiol. Biotechnol.
2024, 34, 1401-1409(2024.05.04.) 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 제이투케이바이오
충청북도 청주시 청원구 오창읍 두릉유리로 50-3
(72) 발명자
배준태
충청북도 청주시 청원구 오창읍 두릉유리로 50-3
장준환
충청북도 청주시 청원구 오창읍 두릉유리로 50-3
(뒀면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

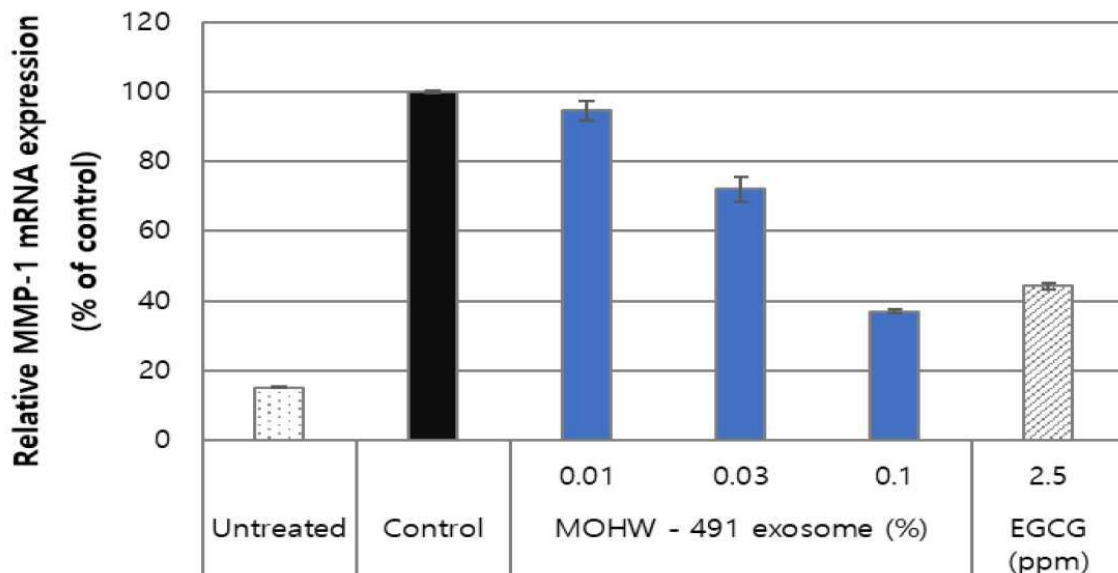
심사관 : 윤경원

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 브레비스 MOHW-491을 포함하는 주름 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 브레비스 MOHW-491을 포함하는 주름 개선용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 피부 주름 및 피부 탄력을 개선하는 효능이 우수하여, 피부 주름 또는 피부 탄력 개선에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2400/121 (2023.08)
A61K 2800/74 (2013.01)

문소현

충청북도 청주시 청원구 오창읍 두릉유리로 50-3

김미정

충청북도 청주시 청원구 오창읍 두릉유리로 50-3

(72) 발명자

김희식

충청북도 청주시 청원구 오창읍 두릉유리로 50-3

조용한

충청북도 청주시 청원구 오창읍 두릉유리로 50-3

박상현

충청북도 청주시 청원구 오창읍 두릉유리로 50-3

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2460000711
과제번호	HP23C006100
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	혁신성장피부건강기반기술개발사업
연구과제명	미생물 엑소좀을 이용한 피부 마이크로바이옴: 피부노화에 대한 혁신적 개선 전략
과제수행기관명	한림대학교산학협력단
연구기간	2023.07.01 ~ 2025.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 (기탁번호: KCTC 15969BP) 균주 유래의 엑소솜을 포함하는 피부 주름 또는 피부 탄력 개선용 화장품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 (기탁번호: KCTC 15969BP) 균주 유래의 엑소솜을 포함하는 피부 주름 또는 피부 탄력 개선용 건강기능식품.

청구항 4

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 브레비스 MOHW-491을 포함하는 주름 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 과생산은 UVB 노출 환경에서 보고된 바 있고, UVB 노출과 연관된 신호전달 체계는 MAPKs(mitogen activated protein kinases), ERK(extracellular signal-regulated kinase), p38 카이나아제, 및 JNK(c-Jun amino-terminal kinase) 등의 단백질과 관련되어 있는데, NF-κB 및 AP-1 전사 인자의 발현증가를 유도한다. 또한, AP-1 단백질은 MMP(matrix metalloproteinase) 유전자의 활성화와 관련되어 있고, NF-κB 단백질은 인터루킨과 같은 전염증 사이토카인(proinflammatory cytokines)의 발현에 영향을 미친다.

[0004] 노화된 피부에서 콜라겐 및 엘라스틴의 붕괴는 주로 MMP 단백질과 같은 그 분해 효소의 증가된 발현에 의해 야기된다. 또한, 전염증 사이토카인은 콜라겐의 합성을 방해하고, 콜라겐의 붕괴를 촉진시킨다. 타입 I 콜라겐은 연결 조직의 세포외 기질에서 가장 풍부한 단백질이다. 세포외 기질에는 타입 III, V, 및 VII 콜라겐, 엘라스틴, 프로테오글라이칸, 파이브로넥틴과 같은 다른 유형의 단백질을 포함한다.

[0005] 타입 I 콜라겐 단백질의 발현 수준을 조절하는 것은 피부 광노화를 예방하는데 있어서 가장 중요한 인자이다. UVB의 조사는 TGF-β/Smad 신호전달 체계의 억제체를 통해 피부 섬유아세포에서 콜라겐 전구체인 프로콜라겐(procollagen)의 발현을 감소시키게 된다. 또한, TGF-β1 신호전달 체계는 인간 피부 섬유아세포에서 세포외 기질의 합성을 조절하는 중요한 인자의 하나이다. [0008] 따라서, AP-1 및 MAPKs 인자에 의해 조절되는 활성산소종(ROS)의 생성, 및 MMPs, ILs, TGF-β, 및 타입 I 프로 콜라겐의 발현은 피부 광노화 연구에 있어서 유용한 마커로 작용한다.

[0006] 이와 같이 콜라겐 감소를 저해하여 피부 탄력 및 주름의 개선에 효과가 있는 천연물질을 탐색하고자 하는 여러 다양한 시도가 있었다. 콜라겐의 피부 탄력 및 주름 개선 효과를 이용하기 위하여 화장품 또는 연고 등과 같은 피부외용제 조성물에 콜라겐을 배합한 제품들이 출시되었으나, 이들 제품들은 콜라겐 자체를 피부 표면에 도포하는 것으로 고분자 물질인 콜라겐의 경피 흡수가 어려워 본질적인 주름개선 효과를 나타낼 수 없었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 콜라겐 합성 촉진물질에 대한 관심이 높아졌으며, 종래 알려진 콜라겐합성 촉진물질로는 비타민C, 레티노익산, 형질전환성장인자(transforming growth factor, TGF), 동물태반 유래의 단백질(JP8-

231370), 베틀린산(betulinic acid, JP8-208424), 클로렐라 추출물 등이 있다. 그러나 상기 물질은 피부 적용 시 자극과 발적 등 안전성 문제로 사용량에 제한이 있거나 그 효과가 미미하여 실질적으로 피부 탄력 및 주름 개선 효과를 기대할 수 없다는 문제점이 있었다.

[0007] 이에, 피부 주름 및 탄력 저하를 포함하는 피부 노화를 개선하는 효능이 뛰어나면서 인체에 유해하지 않은 소재를 개발하는 것이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2606937호 (2023.11.23.)에는 락토바실러스 브레비스 GFC0707P 균주 및 이를 이용하여 제조된 분홍바늘꽃 발효 추출물의 항염, 항산화 및 주름 개선 효능에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-2544792호 (2023.06.13.)에는 락토바실러스 브레비스 균주로 발효한 해조류 복합 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 탄력 또는 피부 주름 개선, 항산화 및 피부 보습용 조성물에 관하여 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491을 포함하는 조성물의 피부 주름 또는 피부 탄력 개선 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 (기탁번호: KCTC 15969BP) 균주를 포함하는 피부 주름 또는 피부 탄력 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에 따른 화장료 조성물에 있어, 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 균주는, 일 예로 이의 생균 이의 파쇄물, 이의 배양액, 이의 배양물, 이의 사균체 및 이로부터 분리된 엑소솜(exosome) 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0014] 본 발명은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 (기탁번호: KCTC 15969BP) 균주를 포함하는 피부 주름 또는 피부 탄력 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0015] 본 발명에 따른 건강기능식품에 있어, 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 균주는, 일 예로 이의 생균 이의 파쇄물, 이의 배양액, 이의 배양물, 이의 사균체 및 이로부터 분리된 엑소솜(exosome) 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 조성물은 피부 주름 및 피부 탄력을 개선하는 효능이 우수하여, 피부 주름 또는 피부 탄력 개선에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 균주의 16S rRNA 서열 검증결과를 나타낸 도이다.

도 2는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 유래 엑소솜의 농도별 세포독성을 평가한 결과이다.

도 3은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 유래 엑소솜의 농도별 주름 개선 효능을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 하기에서는 중복되는 내용의 혼잡을 방지하기 위하여, 중복되는 내용의 기재를 생략하고자 하였다. 즉, 하기의 내용만으로 발명의 내용이 한정되는 것은 아니고, 전체적인 발명의 내용에 따라 발명의 내용이 해석되어야 할 것이다.
- [0022] 본 발명은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 (기탁번호: KCTC 15969BP) 균주를 포함하는 피부염증 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명에 따른 화장품 조성물에 있어, 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 균주는, 일 예로 이의 생균 이의 파쇄물, 이의 배양액, 이의 배양물, 이의 사균체 및 이로부터 분리된 엑소좀(exosome) 중 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직한 일 예로는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491로부터 분리된 엑소좀(exosome)일 수 있다.
- [0024] 세포와 세포간의 신호전달 물질로 알려진 엑소좀(exosome)은 지질이중막으로 둘러 쌓인 물질로써 내부에는 DNA, RNA, 효소 등 활성 성분들을 함유하고 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 여성의 피부에서 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491를 분리하여 배양 및 정제 공정을 거쳐 엑소좀을 회수하였고, 이의 우수한 항염 효능을 확인한 바 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에서는 자극원으로써 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*) J2K-739 (KCTC 14920BP)를 이용한 바 있다. 해당 균주를 자극원으로 처리하는 신규한 항주를 평가 방법과 관련해서는 그 평가 방법을 인정받아 특허청으로부터 등록받은바 있다.
- [0027] 상기 방법은 UV 조사를 이용한 주름 유발이 아닌, 피부 상재균으로부터 유래된 엔테로박터 에어로게네스 J2K-739 균주 또는 이의 배양물을 이용하여 주름을 유발시키는 신규한 항주를 평가 방법이다. 이에 대한 구체적 내용은 한국등록특허 제10- 2544440호 (2023.06.13.)의 기재를 참고한다.
- [0028] 본 발명에 있어, 상기 균주는, 바람직하게 화장품 전체 중량에 대하여 0.00001~30.0중량%가 함유되는 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 화장품 전체 중량에 대해서 0.01~10중량% 함유되는 것이 좋다. 균주의 함량이 0.00001중량% 미만인 경우에는 피부 주름 또는 피부 탄력 개선 효과가 나타나지 않고, 30.0중량% 초과할 경우 함유량 증가에 따른 뚜렷한 효과의 증가가 나타나지 않는다.
- [0029] 한편, 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 본 발명의 균주 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0030] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 팩, 마사지크림 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0033] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 화장품 조성물의 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.

- [0035] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설표숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 화장료 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 제형 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형 비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비 함유 클렌징 제형은 클렌징 크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 또한, 본 발명은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 (기탁번호: KCTC 15969BP) 균주를 포함하는 피부 주름 또는 피부 탄력 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0039] 본 발명에 따른 건강기능식품에 있어, 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 균주는, 일 예로 이의 생균 이의 파쇄물, 이의 배양액, 이의 배양물, 이의 사균체 및 이로부터 분리된 엑소좀(exosome) 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 용어, "개선"이란, 본 발명에 따른 조성물 투여로 피부 주름 및 피부 탄력 저하가 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0041] 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0042] 본 발명에 따른 건강기능식품에 있어, 본 발명에 따른 균주의 함량은 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 식품의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 건강기능식품에 있어, 상기 본 발명에 따른 균주는 바람직하게 건강기능식품 대비 0.00001~50 중량%가 포함되는 것이 좋다. 0.00001 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 50 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.
- [0044] 본 발명에 따른 건강기능식품은 일 예로, 프로바이오틱스, 신바이오틱스, 포스트바이오틱스 조성물일 수 있다. 또한 면류, 껌류, 유제품류, 아이스크림류, 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵류, 스낵류, 과자류, 사탕, 피자, 젤리, 소스, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나의 형태로 제조될 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명에 따른 건강기능식품을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 건강기능식품은 통상 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid), 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin) 등을 포함할 수 있다. 또한, 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 시스테인, 발린, 라이신, 트립토판 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 디히드로초산나트륨 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 산화방지제[부틸히드록시안니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등], 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(돌신, 사이클라메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0048] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험의 예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 또는 실험의 예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지도 포함한다.

[0050] [실시예 1: 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 유래 엑소좀(exosome)의 분리]

[0051] 1. 균주의 분리 및 동정

[0052] 젊은 여성 피부의 표면을 채취한 멸균봉을 균주 분리 시료로써 사용하였다. 상기 시료를 멸균 생리식염수에 현탁 및 희석하고, 이를 0.1 ml씩 취해 MRS 아가 배지(De Man-Rogosa-Sharpe agar)가 첨가된 플레이트에 도말하였다.

[0053] 이후, 플레이트를 35℃의 항온배양기에서 1일 동안 배양하였다. 생성된 각각의 콜로니를 MRS 플레이트에 희석 접종하였고, 35℃에서 1일 동안 배양하여 미색의 집락을 보이는 콜로니를 취함으로써 균주를 분리하였다.

[0054] 분리된 균주의 시퀀싱 분석을 수행하여 해당 균주가 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)와 99.79%의 상동성을 가지는 것을 확인하여, 해당 균주를 '락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491'이라 명명하였다 (도 1). 도 1은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 균주의 16S rRNA 서열 검출 결과를 나타낸 도이다.

[0056] 2. 엑소좀(exosome)의 정제

[0057] 상기에서 분리한 균주 스톡(stock)을 5 ml MRS 배지에 5% 접종하여 150 rpm, 35℃의 조건으로 1일 동안 종균 배양하였다. 이후, 100 ml MRS 배지에 5% 접종하여 150 rpm, 35℃의 조건으로 1일 동안 전배양하였다. 이후, 1 L MRS 배지에 5% 접종하여 150 rpm, 35℃의 조건으로 1일 동안 본배양하였다.

[0058] 배양이 종료된 배양액을 10,000 rpm, 10분 및 4℃의 조건에서 원심분리하여 균체를 제거하였다. 균체가 제거된 상층액을 0.45 μm의 여과 필터를 이용하여 여과한 후, Ultrafiltration(300 kDa)를 이용하여 5회 여과를 진행하였다. 이후, 여과액을 0.1 μm의 여과 필터를 이용하여 5회 여과함으로써 50~200 nm 크기의 엑소좀을 회수하였다.

[0060] [실험예 1: 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 유래 엑소좀(exosome)의 세포독성 평가]

[0061] HDF(Human dermal fibroblast) 세포를 96웰 플레이트에 1×10^4 cells/well로 분주하여 5% CO₂ 가 공급되는 37℃ 인큐베이터에서 18시간 동안 안정화시켰다.

[0062] 이후, 시료를 20 μl씩 처리한 뒤 5% CO₂ 가 공급되는 37℃ 인큐베이터에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후, 96 웰 플레이트에 웰당 0.5 mg/ml의 MTT 용액을 처리하고 약 2시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 상층액을 제거하고 DMSO로 포르마잔(formazan)을 완전히 녹인 뒤 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0063] 실험 결과, 모든 엑소좀 처리 농도에서 세포독성이 나타나지 않아, 본 발명에 따른 엑소좀은 매우 안전한 것으로 판단하였다 (도 2). 도 2는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 유래 엑소좀의 농도별 세포독성을 평가한 결과이다.

[0065] [실험예 2: 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 유래 엑소좀(exosome)의 주름 개선 효능 평가]

[0066] HDF(Human dermal fibroblast) 세포는 세포바이오에서 구매하여 사용하였으며, 10% FBS 및 1% 항생제가 함유된 DMEM/F12 배지를 이용해 37℃, 5% CO₂의 습윤배양기에서 배양하였다. 3일 마다 배지를 교환해 주었으며, 세포가 plate의 80% 정도 차면 계대배양을 진행하였다.

[0067] HDF(Human dermal fibroblast) 세포를 $2.0 \times 10^6/60$ mm culture dish에 분주하고, 37℃, 5% CO₂ 습윤 배양기에서 18시간 동안 안정화시켰다.

[0068] 이후, DMEM/F12 serum free 배지로 교체한 뒤 시료를 계열 희석하여 처리하고, 2시간 뒤에 자극원으로써 엔테로박터 에어로게네스 J2K-739 균주 100 μg/ml를 처리하여 24시간 동안 37℃, 5% CO₂의 습윤배양기에서 반응시켰다. 반응 후 세포를 NucleoZOLysis buffer(MN, 740404)를 이용하여 수확한 뒤, MN사에서 제공하는 프로토콜을 이용하여 RNA 추출을 진행하였으며, 분리된 RNA를 분광광도계 (SpectraMax ABS Plus, Molecular devices)를 이용하여 정량하였다.

[0069] 분리된 RNA는 HiSenScript™ RH(-) RT PreMixKit(Intron, 25087)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA와 2X Real-Time PCR Master Mix & Premix(BioFACT)를 이용하여 real-time PCR (QuantStudio 3 Real-Time PCR Instrument, Thermo Fisher Scientific) 수행 후 증폭 산물을 정량 분석하였다.

[0070] 본 실험에 이용된 구체적인 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0071]

Gene		Primer sequence
MMP-1	Forward	5' -ATGAAGCAGCCCAGATGTGGAG-3'
	Reverse	5' -TGGTCCACATCTGCTCTTGGCA-3'
GAPDH	Forward	5' -GTCTCCTCTGACTCAACAGCG-3'
	Reverse	5' -ACCACCCTGTGCTGTAGCCAA-3'

[0073]

실험 결과, 본 발명에 따른 엑소좀은 엔테로박터 에어로게네스 J2K-739 균주의 처리에 의해 증가한 MMP-1 유전자의 발현을 농도 의존적으로 감소시켜 이의 우수한 주름 개선 효능을 확인할 수 있었다. 특히, 본 발명에 따른 엑소좀은 0.1% 농도에서 MMP-1을 약 74.21% 감소시켰다 (도 3). 도 3은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) MOHW-491 유래 엑소좀의 농도별 주름 개선 효능을 평가한 결과이다.

수탁번호

[0075]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15969BP

수탁일자 : 20240719

도면

도면1

Standard ID



16S rRNA service report

Order Number : HC00811800
 Sample name : MOHW-491_contig_1

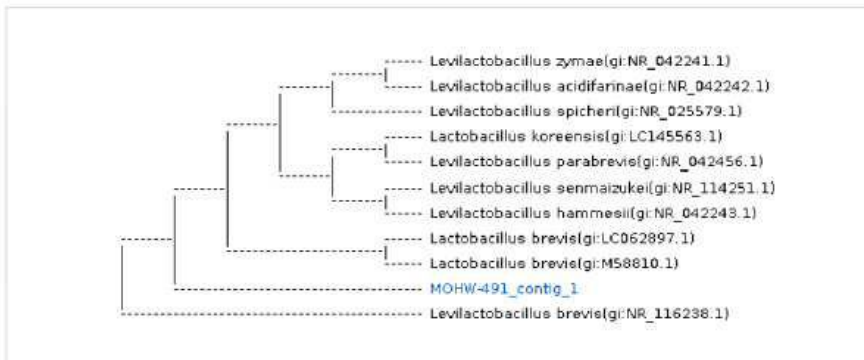
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
LC062897.1	Lactobacillus brevis	1527	26	1524	98	2750	0.0	1496/1499	99.79

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Lactobacillaceae	Levilactobacillus	Lactobacillus brevis

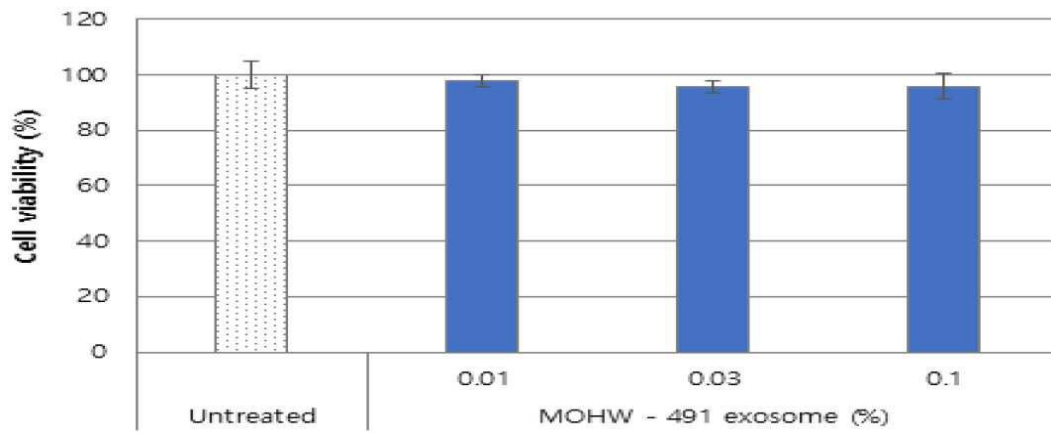


Characterization

Lactobacillus species are members of the Lactobacillaceae family. They are gram positive rods or coccobacilli and occasionally form short chains. Lactobacilli are part of the normal flora of the human mouth, gastrointestinal tract and female genital tract, and are generally regarded as safe for use in food (probiotics and to ferment food). Lactobacillus infections are rare.

Lactobacillus brevis is a gram-positive, rod-shaped species of lactic acid bacteria which is heterofermentative, creating CO₂ and lactic acid during fermentation. There are approximately 16 different strains. It can be found in many different environments, such as fermented foods, and as normal microbiota. L. brevis is found in food such as sauerkraut and pickles. It is also one of the most common causes of beer spoilage. Ingestion has been shown to improve human immune functions, and it has been patented several times. Normal gut microbiota L.brevis is found in human intestines, vagina and feces.

도면2



도면3

