

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2023년 1월 5일 (05.01.2023)

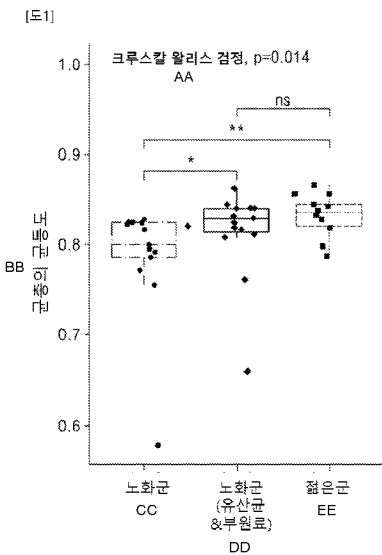


(10) 국제공개번호  
WO 2023/277638 A1

- (51) 국제특허분류: A23L 33/135 (2016.01) A61P 25/28 (2006.01)  
A61K 35/747 (2015.01) A61P 9/00 (2006.01)  
A61P 43/00 (2006.01) A23K 10/16 (2016.01)  
A61P 21/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/009479
- (22) 국제출원일: 2022년 6월 30일 (30.06.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2021-0086148 2021년 6월 30일 (30.06.2021) KR  
10-2022-0080568 2022년 6월 30일 (30.06.2022) KR
- (71) 출원인: 주식회사 지아이바이옴 (GI BIOME INC.) [KR/KR]; 13201 경기도 성남시 중원구 갈마치로288번길 14, 비동 1567호, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 양보기 (YANG, Bo Gie); 05849 서울특별시 송파구 위례광장로 230, 201동 1502호, Seoul (KR). 장명호 (JANG, Myung Ho); 05849 서울특별시 송파구 위례광장로 230, 201동 1502호, Seoul (KR). 이한성 (LEE, Han Sung); 13201 경기도 성남시 중원구 갈마치로288번길 14, 1508호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인더웨이브 (THEWAVE IP LAW FIRM); 06097 서울특별시 강남구 선릉로 602 6층, Seoul (KR).
- (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, IQ, IR, IS, IT, JM, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING THREE LACTOBACILLUS SP. STRAINS, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 락토바실러스 속 균주 3종을 포함하는 조성물 및 이의 용도



AA ... Kruskal-Wallis test  
 BB ... Evenness of microbiota  
 CC ... Aged group  
 DD ... Aged group (lactobacillus and subsidiary material)  
 EE ... Young group

(57) Abstract: The present invention relates to a mixture of three including lactobacillus fermentum strains and a lactobacillus plantarum strain, and the use thereof. A composition according to one aspect comprising a mixture of lactobacillus fermentum GB102 and GB103 strains and lactobacillus plantarum GB104 strain, a melt thereof, and a culture medium or a culture medium extract as active ingredients relieves muscle strength loss induced by aging, reduces changes in the intestinal microbiome environment induced by aging, or the like, and thus can be utilized for preventing or treating muscle-related diseases or obesity.

(57) 요약서: 락토바실러스 퍼멘텀 균주 및 락토바실러스 플라타룸 균주 3종의 혼합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 일 양상에 따른 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) GB102, GB103 균주 및 락토바실러스 플라타룸(Lactobacillus plantarum) GB104 균주의 혼합물; 이의 용해물, 배양액 또는 배양액의 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 노화로 인해 유도되는 근력 감소 증상을 완화시키거나 노화로 인해 유도되는 장내 미생물 환경의 변화를 감소시키는 등 근육 관련 질환 또는 비만의 예방 또는 치료용으로 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2023/277638 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

# 발명의 명칭: 락토바실러스 속 균주 3종을 포함하는 조성물 및 이의 용도

### 기술분야

- [1] 락토바실러스 속 균주 3종을 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 마이크로바이옴(microbiome)은 특정 환경에 존재하고 있는 미생물들과 이들의 바이오정보 전체를 말하는 것으로, 해당 환경 내 미생물총(microbiota)의 유전정보 및 그에 파생되는 산물 전체 집합체(genome, transcriptome, proteome, metabolome)를 의미한다. 따라서 인체 마이크로바이옴(human microbiome)은 인간 몸체 안팎에 서식하고 있는 미생물들과 그들의 바이오정보 전체를 의미한다.
- [3] 인간의 몸은 많은 미생물과 공생관계를 이루며 살아가며 특히 장내에는 미생물이 영양분을 섭취하고 체계적인 군집을 형성하기에 최적의 환경으로 가장 많은 미생물이 존재한다. 장내 미생물은 숙주가 지닌 효소만으로는 생성할 수 없는 영양분을 공급하고 숙주의 대사 및 면역 체계와 깊은 연관을 지니는 한편 과민성대장증후군, 비만, 아토피, 우울증, 류마티스 관절염, 자폐 스펙트럼 장애, 치매 등 다양한 질병의 발생과 관련되어 있다고 보고되고 있다.
- [4]
- [5] 최근에는 서구적인 식습관과 무분별한 항생제 사용으로 장내 미생물총의 불균형이 일어나 장 건강이 악화되고 있으며, 장내미생물과 다양한 질병에 대한 연구로 인해 장내 미생물에 대한 중요성이 부각되고 관심이 대두되고 있다.
- [6] 아울러, 인류의 평균 수명 연장으로 인해 노령화 사회의 출현으로 인류는 전에 겪지 못한 다양한 숙제에 당면해 있다. 사회·경제적으로는 노령 인구의 증가 및 생산연령층의 감소로 인한 1인당 노인인구 부양비의 증가가 예상되며, 또한 노인들의 삶의 질 향상에 대한 관심 역시 증가되는 추세이다. 이와 같이 건강하고 행복한 노년의 삶에 대한 사회적 요구가 증가하면서, 노령화에 따른 질병 양태의 변화 및 노화 관련 질환들의 예방에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.
- [7] 이와 같이 최근 유산균에 대한 관심이 높아지면서 노화 관련 질환 예방 및 치료 효과에 대한 유산균의 이용가치를 확인하는 연구 결과들이 보고되고 있다. 한국등록특허 제10-2049700호는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) ATG-F4 균주의 근육질환 예방 또는 치료 활성을 개시한 특허가 있지만, 각 단일 균주를 유효성분으로 하는 발명이고 혼합 균주를 유효성분으로 하는 발명은 아직 개시된 발명이 없는 실정이다. 따라서, 본 발명자들은 식품 및 의약품으로 응용이 가능한 조성물의 용도로서 균주를 발굴하고자 하였다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [8] 일 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 항노화 또는 항산화 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 또 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 노화 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 또 다른 양상은 유효량의 상기 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 노화를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [12] 또 다른 양상은 항노화 조성물의 제조를 위한 상기 조성물의 용도를 제공하는

것이다.

- [13] 또 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 관련 질환 또는 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [14] 또 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 관련 질환 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 또 다른 양상은 유효량의 상기 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근육 관련 질환을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [16] 또 다른 양상은 근육 관련 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품의 제조를 위한 상기 조성물의 용도를 제공하는 것이다.
- [17] 또 다른 양상은 유효량의 상기 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 또 다른 양상은 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품의 제조를 위한 상기 조성물의 용도를 제공하는 것이다.
- [19] 또 다른 양상은 근육 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 제제의 제조를 위한 상기 조성물의 용도를 제공하는 것이다.
- [20] 또 다른 양상은 비만 예방 또는 치료용 약학적 제제의 제조를 위한 상기 조성물의 용도를 제공하는 것이다.
- [21] 또 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102

균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 사료 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [22] 일 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [23] 일 구체예에 있어서, 상기 균주는 생균 또는 사균인 것인 조성물일 수 있다.
- [24] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 혼합 균주는  $10^3$  내지  $10^{16}$  CFU/g의 양으로 포함되는 것일 수 있다.
- [25] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 경구 투여되는 것일 수 있다.
- [26] 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물은 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물, 항산화 조성물 또는 노화 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [27] 일 구체예에 있어서, 상기 항노화는 근육 세포의 항노화, 신경 세포의 항노화,

피부 세포의 항노화 및 장내 미생물 환경의 항노화로 이루어진 균으로부터 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.

- [28] 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물은 유효성분으로 포함하는 근육 관련 질환 또는 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [29] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 관절 경직, 근육 손실, 힘 손실, 속도 손실, 균형 손실, 지구력 손실 및 민첩성 손실로 이루어진 균에서 적어도 하나 이상을 감소시키는 것일 수 있다.
- [30] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 운동 수행능력을 증가시키고, 근육 조정력, 이동성 및 보행을 회복시키고, 근육량 및 약력을 증가시키는 것으로 이루어진 균에서 적어도 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.
- [31] 일 구체예에 있어서, 상기 근육 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 조성물은 운동 수행능력을 증가시키고, 근육 조정력, 이동성 및 보행을 회복시키고, 근육량 및 약력을 증가시키고, 또는 고령대상 성인의 근력 손실을 억제하는 것일 수 있다.
- [32] 일 구체예에 있어서, 상기 근육 관련 질환은 근감소증(sarcopenia), 노인성 근감소증, 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 폐용성 근위축증(disuse muscle atrophy), 동작 뉴런 질병(motor neuron disease), 염증성 근병증, 신경근 접합부 질병, 내분비성 근병증, 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 근염, 근육 석회화, 근육 골화, 근육약화 관련 질환 및 악액질(cachexia)으로 이루어진 균에서 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.
- [33] 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘

또는 셋 이상을 포함하는 조성물은 유효성분으로 포함하는 근육 관련 질환 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [34] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 관절 경직, 근육 손실, 힘 손실, 속도 손실, 균형 손실, 지구력 손실 및 민첩성 손실로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상을 감소시키는 것일 수 있다.
- [35] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 운동 수행능력을 증가시키고, 근육 조정력, 이동성 및 보행을 회복시키고, 근육량 및 약력을 증가시키는 것으로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.
- [36] 일 구체예에 있어서, 상기 근육 관련 질환은 근감소증(sarcopenia), 노인성 근감소증, 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 폐용성 근위축증(disuse muscle atrophy), 동작 뉴런 질병(motor neuron disease), 염증성 근병증, 신경근 접합부 질병, 내분비성 근병증, 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 근염, 근육 석회화, 근육 골화, 근육약화 관련 질환 및 악액질(cachexia)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.

### 발명의 효과

- [37] 일 양상에 따른 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102, GB103 균주 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주의 혼합물; 이의 용해물, 배양액 또는 배양액의 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 노화로 인해 유도되는 근력 감소 증상을 완화시키거나 노화로 인해 유도되는 장내 미생물 환경의 변화를 감소시키는 등 근육 관련 질환 또는 비만의 예방 또는 치료용으로 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [38] 도 1은 일 구체예에 따른 혼합 균주 및 한약재 병용 투여에 따른 균총의 균등도(evenness) 변화를 나타낸 그래프이다.
- [39] 도 2는 일 구체예에 따른 혼합 균주 및 한약재 병용 투여에 따른 장내 균총 주좌표 분석(PCoA) 결과를 나타낸 그래프이다.
- [40] 도 3은 일 구체예에 따른 혼합 균주 및 한약재 병용 투여에 따른 퍼미큐테스(*Firmicutes*) 문내 주요 계통들의 그룹간 빈도 차이를 나타낸 그래프이다.
- [41] 도 4는 일 구체예에 따른 혼합 균주 및 한약재 병용 투여에 따른 박테로이데테스(*Bacteroidetes*) 문내 주요 계통들의 그룹간 빈도 차이를 나타낸 그래프이다.
- [42] 도 5는 일 구체예에 따른 혼합 균주 조성물의 투여에 따른 퍼미큐테스/박테로이데테스(*Firmicutes/Bacteroidetes*) 비율 변화를 나타낸 그래프이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 일 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의

용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

- [44] 일 구체예에 있어서, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주는 생균(살아있는 균)이거나 사균(죽어있는 균)일 수 있다. 더욱 상세하게는 상기 사균은 열처리에 의한 사균일 수 있다.
- [45] 본 명세서에서 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)은 락티플란티바실러스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*)과 리모시락토바실러스 퍼멘텀(*Limosilactobacillus fermentum*)을 포함하는 명칭의 변경 이전의 구 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)을 의미한다.
- [46] 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 리모시락토바실러스 (*Limosilactobacillus*) 또는 락티플란티바실러스(*Lactiplantibacillus*)로 명칭이 변경되었으며, 본 명세서에서 변경된 균주명을 상호 호환적으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)은 리모시락토바실러스 퍼멘텀(*Limosilactobacillus fermentum*)로 균주명이 변경되었고, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 락티플란티바실러스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*)으로 균주명이 변경되었다.
- [47] 본 명세서에서 용어 "배양물"은 "배양 상층액", "조건 배양액" 또는 "조정 배지"와 호환적으로 사용될 수 있고, 락토바실러스 속 균주가 시험관 내에서 성장 및 생존할 수 있도록 영양분을 공급할 수 있는 배지에 상기 균주를 일정기간 배양하여 얻는 상기 균주, 이의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 전체 배지를 의미할 수 있다. 또한, 상기 배양액은 균주를 배양하여 얻은 균체 배양액에서 균체를 제거한 배양액을 의미할 수 있다. 상기 배지는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 MRS 액체 배지, GAM 액체 배지, MRS 한천 배지, GAM 한천 배지, BL 한천 배지일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [48] 본 명세서에서 용어 "용해물(lysate)"은 깨진 락토바실러스 퍼멘텀 또는 락토바실러스 플란타룸과 같은 미생물의 세포의 수성 배지 내의 용액 또는 현탁액을 의미한다. 세포 용해물은, 예를 들어 DNA, RNA, 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 지질 등과 같은 거대 분자 및/또는, 아미노산, 당, 지방산 등과 같은 미소분자, 또는 그의 분획을 포함한다. 또한, 상기 용해물은 매끈하거나 과립

구조일 수 있는 세포 잔해를 포함한다.

- [49] 상기 미생물의 세포 용해를 달성할 수 있는 방법은 공지의 다양한 방법을 사용할 수 있으며, 미생물의 세포 용해를 달성할 수 있는 임의의 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어 세포 개방/파괴는 효소에 의해, 화학적으로 또는 물리적으로 수행될 수 있다. 효소 및 효소 혼합물의 비제한적 예는 프로테이나아제 K와 같은 프로테아제, 리파아제 또는 글리코시다아제이고; 화학물질의 비제한적 예는 이온투과담체, 황산 도데실 나트륨과 같은 세제, 산 또는 염기이고; 물리적 수단의 비제한적 예는 프렌치 프레스링과 같은 고압, 삼투압, 열 또는 추위와 같은 온도이다. 또한, 단백질 분해 효소 이외의 효소, 산, 염기 등의 적절한 조합을 사용하는 방법 또한 사용될 수 있다.
- [50] 상기 배양액은 균주를 배양하여 수득된 배양액 자체, 그의 농축물, 또는 동결건조물 또는 배양액로부터 균주를 제거하여 수득된 배양 상층액, 그의 농축물 또는 동결건조물을 포함할 수 있다.
- [51] 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 항노화 또는 항산화 조성물을 제공하는 것이다.
- [52] 본 명세서에서 용어 "유효성분으로 포함"은 락토바실러스 속 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이의 배양액의 추출물이 첨가되는 것을 의미하고, 약물전달 및 안정화 등을 위하여 다양한 성분을 부성분으로 첨가하여 다양한 형태로 포블레이션(formulation) 되는 것을 포함하는 의미이다.
- [53] 본 명세서에서 용어 "치료적 유효량"은 연구자, 의사 또는 기타 임상가가 얻고자 하는 환자에서의 생물학적 또는 의학적 반응 또는 원하는 치료 효과를 도출하게 되는 본 발명의 방법 및 용도를 위한 혼합 균주 조성물 또는 본 발명의 방법 및 용도를 위한 혼합 균주를 포함하는 제약 조성물의 양을 의미한다. 혼합 균주 조성물의 치료적 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성 및 체중과 같은 인자들에 따라 가변적일 수 있다. 치료적 유효량은 치료적으로 유의한 효과가 어떠한 독성이거나 유해한 효과도 능가하는 양이기도 하다.
- [54] 또 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102

균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 노화 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

- [55] 일 구체예에 있어서, 락토바실러스 속 혼합 균주 또는 혼합 균주 조성물은 항산화 활성을 갖는 것일 수 있다. 특정 이론에 제한됨이 없이, 노화의 자연적인 과정은 신체가 산화적 손상에 더 취약하게 만든다. 노화 방지 효과는 대부분 항산화 특성과 자유 라디칼 소거 능력과 관련이 있다. 또한, 특정 이론에 제한됨이 없이, 산화적 손상은 노화와 함께 발생하는 골격근 감소의 주요 원인 중 하나로 제안되었다. 노화 과정의 촉진제로서 자유 라디칼의 식별은 그들의 억제가 유기체(특히 골격근)에 가하는 해로운 변형을 제한할 수 있음을 의미할 수 있다. 즉, 항산화 능력을 가진 분자가 산화적 손상에 대응할 수 있다면, 이것은 무력화 과정을 포함하여 노화 관련 상태의 발병을 예방하는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 산화적 손상이 근감소증(및 기타 노인성 질환)을 유발하는 병태생리학적 기전의 기초이며, 내인성 항산화 방어를 강화하기 위한 개입(예를 들면, 항산화제의 투여)이 노화 억제를 일으킨다. 예를 들면, 적포도주에 함유된 폴리페놀 화합물인 레스베라트롤은 미토콘드리아 호흡 감소로 인해 엘레강스 캐노라피티스의 노화를 늦출 수 있다고 보고된 바 있다. (Wood et al., 2004). 또한, 산화 스트레스는 골 형성과 흡수를 담당하는 세포 사이의 불균형을 일으켜 골 회전율을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 항산화제는 산화 스트레스의 영향을 억제 및/또는 개선하는 것으로 알려져 있으므로, 항산화 활성을 나타내는 일 구체예에 따른 락토바실러스 속 혼합 균주는 항노화 또는 노화 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

- [56] 일 구체예에 있어서, 락토바실러스 속 혼합 균주 조성물의 투여는 노화로 인해 감소한 근력을 개선시킬 수 있다. 구체적으로 본 발명의 일 실시예에서 노화 마우스에 상기 락토바실러스 속 혼합 균주 조성물을 투여한 군에서 근력(grip strength)이 증가하는 결과를 확인하였다.

- [57] 일 구체예에 있어서, 락토바실러스 속 혼합 균주 조성물의 투여는 노화로 인한 장내 미생물 환경의 변화를 완화시킬 수 있다. 구체적인 실시예에서, 락토바실러스 속 혼합 균주 조성물의 투여는 노화 마우스 장내의 균총을 젊은 마우스의 균총과 유사하게 바꾸어, 노화 마우스의 장내 균총에 의해 유발되는 비만 등 노화 관련 질병을 예방하거나 치료하는데 도움을 줄 수 있는 것을 확인하였다. 최근 논문에서 노화 마우스의 장내 균총은 비만을 유발할 수

있으며, 노화 마우스에서 퍼미큐테스/박테로이데테스 비율이 증가됨이 보고되었다 (Binyamin et al., Genome Medicine, 2020). 이는 일 구체에에 따른 유산균 혼합 균주 조성물의 투여가 노화 마우스에서 일어나는 비만 등의 질병 예방 및 치료에 긍정적인 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

[58]

[59] 본 명세서에서 용어 "항노화"는 세포 또는 개체의 노화를 지연 또는 방지하거나, 노화된 세포(senescent cell)를 그보다 젊은 세포(young cell)로 전환시키는 것을 포함한다.

[60] 일 구체에에 있어서, 상기 항노화는 골격근세포의 항노화, 신경 세포의 항노화, 피부 세포의 항노화, 면역 세포의 항노화 및 장내 미생물 환경의 항노화로 이루어진 균으로부터 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.

[61] 본 명세서에서 노화 관련 질환은 근육 노화 관련 질환(예를 들면, 근감소증) 또는 비만일 수 있다.

[62] 노화는 몸 속의 세포 하나부터 신체의 모든 조직과 기관을 변화시킨다. 노화에 따라 피부의 주름이 늘고 허리는 구부러질 뿐만 아니라 신체 구성비가 변화된다. 체내 수분, 근육을 이루는 단백질, 지방, 뼈 골격을 이루는 무기 질의 구성비가 변화된다. 25세 청년과 70세 노인을 비교해 보면 수분, 근육량, 무기질은 모두 감소하나 지방은 2배 이상 증가했다. 나이에 따른 체지방의 변화는 성인병과 직접 관련이 있다. 지방은 비율만 늘어나는 것이 아니라 분포가 바뀌어 피하지방은 줄고 복부 내장지방이 늘어난다. 아직 이유는 명확하게 규명하지 못하고 있지만 내장 지방은 당뇨병, 고혈압 등 성인병을 유발하는 TNF- $\alpha$ , IL-6 같은 유해한 사이토카인(cytokine)을 더 많이 분비해 많은 생리적 기능을 감퇴킨다.

[63] 또한, 근육량은 30대 이후 감소되며 성장호르몬이나 남성호르몬 감소가 영향을 미친다. 일반적으로 50세가 지나면 매년 근육량은 1~2% 감소하는 것으로 알려져 있고, 근력은 1.5~3% 까지도 감소한다.

[64]

[65] 본 명세서에서 용어 "예방"은 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 질환 상태를 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[66] 본 명세서에서 용어 "치료"는 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 질환 상태에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[67] 본 발명에서 사용한 용어 "근육 노화"는 노화에 의해 근섬유 내의 미토콘드리아가 그 활성을 잃거나 미토콘드리아의 수가 감소됨에 따라 근육의 밀도와 기능이 점차적으로 약화되는 것을 의미하는 것으로서, 근감소증(sarcopenia)을 포함하는 의미이다.

[68] 본 발명에서 사용한 용어 "근육 노화"는 노화에 수반하여 생기는 근육의 쇠퇴,

예를 들어 근기능(근력, 근지구력, 근순발력 등) 저하나 근위축 등을 포괄하는 의미로서, 상기 근위축이란 근세포의 감소나 축소에 의해 근량이 저하되는 것을 의미한다. 근 노화로 인해 30세 이후로 근육의 밀도와 기능이 점차적으로 약화되는 현상이 나타날 수 있으며, 낙상 및 골절이 쉽게 일어날 수 있다. 근노화의 원인은 성장호르몬 및 남성호르몬 감소, 체내 단백질 합성능력 저하, 근밀도 유지와 관련된 단백질 또는 칼로리 흡수능력 약화 등일 수 있다.

- [69] 본 발명에서 사용한 용어 "근감소증"은 영양 부족, 운동량 감소, 노화 등으로 인해 정상적인 근육의 양과 근력 및 근 기능이 감소하는 질환으로, 대개 30대부터 근육이 감소하기 시작하며, 60대 이상은 30%, 80대 정도가 되면 근육의 절반까지 감소하게 된다.
- [70] 근감소증은 당뇨병, 고지혈증, 비만 등과 같은 합병증을 유발하며 신체 전반의 기능을 떨어뜨리고 뼈를 약화시키는 것과도 관련이 있으며, 특히 고령층일수록 근감소증에 척추 노화까지 맞물려 허리디스크 발생할 확률이 매우 높다.
- [71] 본 명세서에서 용어 "근육 노화 관련 질환"은 노화에 의한 상기와 같은 근육의 상태 변화 및 이상으로 유발되는 질환을 의미하는데, 특히, 노화로 인한 근육 감소를 노화성 근육감소증(age-related sarcopenia)이라고도 한다.
- [72] 일 구체예에 있어서, 상기 근육 관련 질환은 근감소증(sarcopenia), 노인성 근감소증, 긴장감퇴증(atrophy), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 폐용성 근위축증(disuse muscle atrophy), 동작 뉴런 질병(motor neuron disease), 염증성 근병증, 신경근 접합부 질병, 내분비성 근병증, 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 근염, 근육 석회화, 근육 골화, 근육약화 관련 질환 및 악액질(cachexia)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [73] 상기 근육 노화 관련 질환들은 외상으로 인한 근육 염증을 수반할 수 있으며, 본 발명의 조성물은 근육 염증을 완화 내지 개선시킬 수 있는 효과를 가진다.
- [74]
- [75] 본 명세서에서 용어 "비만"은 체지방이 과도한 상태를 말한다. 상기 비만은 임상적으로 체질량지수(BMI)가 한국의 경우 25, 세계보건기구(WHO)에 의하면 30 이상인 경우일 수 있다. 일반적으로 비만은 체중이 정상치보다 높은 경우를 의미하지만 체중이 많이 나가지 않더라도 몸의 구성성분 중 체지방의 비율이 높은 경우 비만일 수 있다. 상기 비만은 성인과 어린이 모두에서 발병할 수 있다. 상기 비만은 체중의 증가뿐만 아니라 과식, 과음 및 과식증, 고혈압, 당뇨, 증가된 혈장 인슐린 농도, 인슐린 내성, 고지혈증, 대사 증후군, 인슐린 내성 증후군, 비만관련 위식도 역류, 동맥경화증, 과콜레스테롤혈증, 요산과다혈증, 심장비대 및 좌심실 비대, 지방이영양증, 비알콜성 지방간염, 심혈관 질환 또는 다낭성 난소 증후군과 같은 비만 관련 질환을 유발할 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 비만뿐만 아니라 상기 비만 관련 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 비만이 아니더라도 체중을 줄이려는 욕구가 있는 개체에 사용될 수 있다.

- [76] 상기 비만은 다양한 원인에 의한 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 원인은 고지방 식이, 운동량 감소, 유전, 심리적인 요인, 내분비계 이상, 대사 이상, 사회 및 환경적 요인일 수 있다. 특히, 상기 비만은 고지방식으로 유도된 것일 수 있다.
- [77] 일 구체예에 따른 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 80 중량%의 락토바실러스 속 혼합 균주를 포함할 수 있다. 또한, 락토바실러스 속 혼합 균주의 투여 용량은 0.01mg 내지 10,000mg, 0.1mg 내지 1000mg, 1mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 1000mg, 0.01mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 10mg, 또는 0.01mg 내지 1mg일 수 있다. 상기 균주는 치료적 유효량 또는 영양적으로 유효한 농도로 조성물에 포함되는데, 예를 들면, 1개의 균주, 2개의 혼합 균주, 3개의 혼합 균주가  $10^3$  내지  $10^{16}$  CFU/g,  $10^3$  내지  $10^{15}$  CFU/g,  $10^3$  내지  $10^{14}$  CFU/g,  $10^3$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^3$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{16}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{15}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{14}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^4$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{16}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{15}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{14}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^5$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^6$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^6$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^7$  내지  $10^{13}$  CFU/g,  $10^7$  내지  $10^{12}$  CFU/g,  $10^8$  내지  $10^{13}$  CFU/g 또는  $10^8$  내지  $10^{12}$  CFU/g의 함량으로 포함되거나, 동등한 수의 생균 또는 사균의 배양물로 조성물에 포함될 수 있다. 구체적으로 성인 환자의 경우  $1 \times 10^3$  내지  $1 \times 10^{16}$  CFU/g의 생균 또는 사균이 한 번 또는 여러 번에 걸쳐서 나누어 투여될 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg(체중)당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 가능한 투여 경로에는 경구, 설하, 비경구(예를 들어, 피하, 근육내, 동맥내, 복강내, 경막내, 또는 정맥내), 직장, 국소(경피 포함), 흡입, 및 주사, 또는 이식성 장치 또는 물질의 삽입을 포함할 수 있다. 일 구체예에 따른 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 예로 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다. 일 실시예에 따르면 상기 조성물은 사멸화 건조 균주를 포함하며, 1회 1g 내지 10g, 0.5g 내지 1.5g, 2.5g 내지 3.5g, 또는 4.5g 내지 5.5g 투여 가능하고, 1일 1회 내지 3회 투여될 수 있다.
- [78] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 첨가물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 멸균수, 생리식염수, 관용의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제(아스코르브산 등), 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함할 수 있다. 국소 투여를 위해, 생체고분자(biopolymer) 등의 유기물, 하이드록시아파타이트 등의 무기물,

구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 중합체 또는 공중합체, 폴리에틸렌글리콜 중합체 또는 공중합체 및 그의 화학적 유도체 등과 조합시키는 것도 포함할 수 있다. 일 구체예에 따른 약학적 조성물이 주사에 적당한 제형으로 조제되는 경우에는, 락토바실러스 속 균체가 약학적으로 허용가능한 담체 중에 용해 또는 분산되어 있거나 또는 용해 또는 분산되어 있는 용액 상태로 동결된 것일 수 있다.

[79] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 환원제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995]에 상세히 기재되어 있다. 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.

[80] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 명세서에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학 적 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 발명의 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.

[81]

[82] 또 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도

하나, 둘 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 관련 질환 또는 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

- [83] 일 구체예에 있어서, 상기 건강기능식품은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [84] 본 명세서에서 용어 "식품학적으로 허용 가능한"은 상기 화합물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.
- [85] 본 명세서에서 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다. 이때, 상기 건강기능식품은 암의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.
- [86] 상기 건강기능식품에서, 유효성분은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 상기 건강기능식품은 원료에 대하여 구체적으로 약 15 중량% 이하, 보다 구체적으로 약 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.
- [87] 상기 건강기능식품은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형될 수 있다. 일 양상에 따른 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다.
- [88] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.
- [89] 상기 건강기능식품은 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 특별한 제한없이 다른 성분들을 필수 성분으로서 함유할 수 있다. 예를 들어, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 다당류, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올일 수 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐

등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

- [90] 상기 외에도, 일 양상에 따른 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 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. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [91] 상기 건강기능식품은 종래에 알려져 있는 근육 관련 질환 또는 대사질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 또는 기존의 다른 건강기능식품과 혼합되어 제공될 수 있고, 상기 다른 근육 관련 질환 또는 대사질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품은 종래에 알려져 있는 대사질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품, 기존의 건강기능식품 또는 새롭게 개발되는 건강기능식품일 수 있다.
- [92] 상기 건강기능식품이 근육 관련 질환 또는 대사질환의 예방 또는 개선 효과를 가지는 다른 건강기능식품을 포함하는 경우, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양이 혼합되는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [93] 상기 근육 관련 질환 및 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강 식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives)등의 모든 형태를 포함하여, 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [94] 본 명세서의 조성물은 식품 보조제(food supplements)로 간주될 수 있다. 식이 보충제(dietary supplement) 또는 영양 보충제(nutritional supplement)로도 알려진 식품 보조제는 또 다른 특정 의약품(pharmaceutical product)으로 간주될 수 있다. 이것은 식단을 보충하기 위한 용도로 준비된 것이며, 정상적인 식단에서 섭취가 되지 않거나 충분한 양으로 섭취되지 않을 수 있는 영양소(nutrients) 또는 유익한 성분(beneficial ingredients)을 제공하기 위한 것이다. 대부분 식품 보조제는 식품으로 간주되지만 때로는 약물(drugs), 천연건강제품(natural health products) 또는 건강기능식품 (nutraceutical products)으로 간주된다. 본 발명의 의미에서, 식품 보조제는 건강기능식품을 포함한다. 식품 보조제는 일반적으로 처방전 없이(without prescription) 카운터에서 판매된다. 식품 보조제가 알약(pill) 또는 캡슐(capsule) 형태를 채택하는 경우, 의약품에 사용되는 동일한 첨가제(excipients)를 포함한다. 그러나 식품 보조제는 일부 영양소로 강화된 식품형태(예: 유아용 조제분유)를 채택할 수도 있다. 따라서, 특정실시에에서, 본 발명의 조성물은 식품 보조제(food supplement)이다.
- [95] 본 발명에 따른 조성물은 그대로 투여되거나 또는 적절한 식용 액체 또는 고체와 혼합되어 투여되거나 또는 정제(tablets), 알약(pills), 캡슐(capsules),

로젠지(lozenges), 과립(granules), 분말 (powders), 현탁액(suspensions), 사켓(sachets), 시럽(syrups)의 형태 또는 단위용량(unit dose)의 형태로 동결 건조(freeze-dried)될 수 있다. 또한 투여 전 함께 제공된 별도의 액체 용기(separate liquid container)에 혼합되어지는 동결 건조된 조성물의 단일용량(monodoses)의 형태일 수 있다.

- [96] 본 발명의 조성물은 유아의 경우 우유제품과 같은 다양한 식용식품 및 식품에 포함될 수도 있다. 본 문서에서 사용된 "식용식품(edible product)"이라는 용어는 광범위한 의미에서 어떠한 형태로든, 동물에 의해 섭취될 수 있는 임의의 형태의 제품을 포함한다(예를 들어, 제품은 감각기관에 의해 받아들여질 수 있는 제품). "식품(food product)"이라는 용어는 체내에 영양지원(nutritional support)을 공급하는 식용제품으로 이해된다. 특히, 흥미로운 식품은 식품보조제(food supplements)와 유아용 조제분유(infant formulas)이다. 식품은 바람직하게는, 귀리가루죽(oatmeal gruel), 젖산발효식품(lactic acid fermented foods), 저항성 전분(resistant starch), 식이섬유(dietary fibers), 탄수화물(carbohydrates), 단백질(proteins) 그리고 당화단백질(glycosylated proteins)과 같은 담체 물질(carrier material)을 포함한다. 특정 실시예에서, 본 발명의 박테리아 세포는 유아용 제조분유를 구성하기 위해 곡물(cereals) 또는 분유(powdered milk)와 같은 다른 성분과 균질화된다.

[97]

- [98] 또 다른 양상은 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물, 배양액 및 배양액의 추출물로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 배양액 및 배양액의 추출물로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 배양액 및 배양액의 추출물로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘, 또는 셋 이상을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 관련 질환 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

- [99] 상기 노화 관련 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물은 당업계에 공지된 다양한 사료 제조방법에 따라 적절한 유효 농도범위에서 상기 혼합 균주 조성물을 첨가하여 제조 가능하며, 노화 관련 질환 예방 또는 개선을 목적으로 사료 첨가제 조성물로 사용될 수 있다.

- [100] 상기 "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다. 사료의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 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, 무지질류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다.

[101]

## 발명의 실시를 위한 형태

[102] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다. 실시예들은 다양한 변환을 가할 수 있는 바, 실시예들은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 다양한 형태로 구현될 수 있다.

[103]

[104] 실시예 1. 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주의 분리 및 동정

[105] 1.1. 균주의 분리

[106] 본 발명의 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 균주 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주는 건강검진을 목적으로 병원에 방문한 건강한 여성의 질 샘플로부터 분리하였다. 구체적으로, 질 내부 샘플을 면봉으로 채취하여 Rogosa SL(MRS) 평판 배지에 선조접종하여 37°C의 혐기 챔버에서 48시간동안 배양하였다. 박테리아의 집락이 자라면 순수분리를 위해 단일 집락들을 새로운 MRS 평판배지에 계대배양을 하였다. 순수 분리된 후, MRS 배지를 이용하여 균주 배양을 하였다.

[107]

[108] 1.2. 지방축적 억제 활성 균주 선별

[109] 지방축적 억제 활성을 갖는 균주를 선별하고자, 췌장 지방분해 효소(lipase) 활성 억제 및 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로 분화 억제능을 확인하였다.

[110] 구체적으로, 췌장 지방 분해 효소의 활성 억제능은 상기 1-1의 균주를 0.1 mg/mL의 농도로 희석한 후에 0.167 mM p-nitrophenylpalmitate (PNP; Sigma, USA)용액, 0.061 M Tris-HCl buffer (pH 8.5), 0.3 mg/mL lipase 용액과 함께 plate에 넣어 25°C에서 10분간 반응시킨후 405 nm에서 흡광도 측정을 통해 확인하였다.

[111] 또한, 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로 분화 억제능 확인은 세포 내 생성된 지방구와 특이적으로 반응하는 Oil Red O (Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다. 지방분화가 끝난 후, 배지를 제거한 뒤에 PBS로 2번 세척하고, 10% formalin으로 40°C에서 1시간 동안 고정 한 후 60% isopropanol로 2번 세척하고 0.5% Oil Red O 용액으로 30분 동안 실온에서 염색하였다. 염색 후, 염색액을 제거하고 증류수를 이용하여 2번 세척하였다. 그리고 증류수 완전히 마르면 isopropyl alcohol을

첨가한 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[112] 마지막으로, 상기 1-1에서 수득된 균주에 대하여 3T3-L1 세포 생존율을 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법을 사용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포는  $16 \times 10^4$  cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하고, 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 DMEM배지 100  $\mu$ L에 농도별로 희석한 유산균시료 (100, 1,000  $\mu$ g/mL)를 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 그 후, 5 mg/mL로 제조한 MTT (Sigma, USA) 용액 20  $\mu$ L를 첨가하고, 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고, 200  $\mu$ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가한 후, 546 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[113] 상기 결과로부터 각각의 균주의 지방축적 억제 효과를 확인할 수 있었으며, 준비한 균주들 중에서 지방 세포의 축적 억제 효과 및 세포 독성이 낮은 락토바실러스 퍼멘텀 GB102(이하 'GB102'라 함), 락토바실러스 퍼멘텀GB103(이하 'GB103'이라 함) 및 락토바실러스 플란타륨 GB104(이하 'GB104'라 함) 균주를 최종 선별하였다. 또한, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)은 리모시락토바실러스 퍼멘텀(*Limosilactobacillus fermentum*)로 균주명이 변경되었고, 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*)은 락티플란티바실러스 플란타륨(*Lactiplantibacillus plantarum*)으로 균주명이 변경되었다. 이하의 실시예에서는 기존의 균주의 변경된 균주명을 상호 호환적으로 기재하였다.

[114]

[115] **1.3. 선별한 균주의 분자생물학적 동정**

[116] 상기 최종 선별한 락토바실러스 퍼멘텀 GB102, GB103 및 락토바실러스 플란타륨 GB104 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 서열을 이용하여 분석하였다. 박테리아의 16S rRNA 유전자를 타겟하는 27F와 1492R Primer를 이용한 PCR을 통해 얻은 16S rRNA 유전자 서열을 Sanger 서열분석 방법으로 분석하였고, 락토바실러스 퍼멘텀 GB102, GB103 및 락토바실러스 플란타륨 GB104의 16s rRNA 서열을 각각 서열목록 1, 2 및 3으로 나타내었다.

[117] 또한, 이에 대한 상동성 분석을 실시하였고, 그 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, GB102 및 GB103 균주는 리모시락토바실러스 퍼멘텀(*Limosilactobacillus fermentum*)의 표준 균주(type strain)와 가장 높은 서열 유사도를 보였으며, 그 다음으로는 리모시락토바실러스 고릴라(*Limosilactobacillus gorilla*)와 높은 서열 유사도를 나타내었다. GB104는 16S rRNA 서열로는 락티플란티바실러스 플란타륨(*Lactiplantibacillus plantarum*)의 표준 균주를 포함하여 18 종의 리모락토바실러스(*Limosilactobacillus*) 속의 종과 98% 이상의 서열 유사도를 보임으로써, 16S rRNA 유전자 서열로는 종 구분을 할 수 없다. 이에, GB104는 유전체 해독 후 유전체 염기서열 평균 유사도(Average Nucleotide Identity, ANI) 값 비교를 통해 락티플란티바실러스 플란타륨(*Lactiplantibacillus plantarum*)에 속하는 균주인 것을 확인하였다. 결론적으로, 상기 2개의 균주가

리모시락토바실러스 퍼멘텀(*Limosilactobacillus fermentum*)에 해당하는 균주임을 확인하였고, 1개의 균주는 락티플란티바실러스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*)에 해당하는 균주임을 확인하였다.

[118] [표1]

균주	종 (Species)	표준 균주명	서열 유사도 (%)
GB10 2	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	CECT 562(T)	99.79
	<i>Limosilactobacillus gorillae</i>	KZ01(T)	98.26
GB10 3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	CECT 562(T)	99.93
	<i>Limosilactobacillus gorillae</i>	KZ01(T)	98.13
GB10 4	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	DSM 20314(T)	99.93
	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	DSM 16365(T)	99.87
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	ATCC 14917(T)	99.87
	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	99.73
	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	99.66
	<i>Lactiplantibacillus herbarum</i>	TCF032-E4(T)	98.92
	<i>Lactiplantibacillus daoliensis</i>	116-1A(T)	98.82
	<i>Lactiplantibacillus pingfangensis</i>	382-1(T)	98.81
	<i>Lactiplantibacillus daowaiensis</i>	203-3(T)	98.75
	<i>Lactiplantibacillus nangangensis</i>	381-7(T)	98.74
	<i>Lactiplantibacillus plajomi</i>	NB53(T)	98.72
	<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	DSM 21115(T)	98.72
	<i>Lactiplantibacillus garii</i>	FI11369(T)	98.61
	<i>Lactiplantibacillus xiangfangensis</i>	LMG 26013(T)	98.59
<i>Lactiplantibacillus modestisalitolerans</i>	NB466(T)	98.52	
<i>Lactiplantibacillus mudanjiangensis</i>	11050(T)	98.2	
<i>Lactiplantibacillus songbeiensis</i>	398-2(T)	98.19	
<i>Lactiplantibacillus dongliensis</i>	218-3(T)	98.12	

[119] 실시예 2. 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 균주의 유전체 및 비교유전체 분석

[120] GB102 및 GB103 균주의 유전체 기반 종(species) 동정 및 특성을 조사하기

위하여 차세대 염기서열 분석 기술(Next-generation sequencing technology, NGS) 및 생물정보학 기술을 활용하여 균주의 유전체 서열을 완전해독하고 유전체에 포함된 유전자들의 기능을 유추하였다. 또한, 동 종의 완전 해독된 유전체 서열과 비교분석을 통하여 균주의 특이성을 확인하였다. 본 균주는 MRS 액체배지 37°C의 혐기 조건에서 4 시간동안 배양하였으며, 배양체로부터 MG Genomic DNA purification 키트(MGMED, Inc., Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 평균 길이 10 kb 이상의 긴 리드 데이터(long read data)를 얻기 위하여 PacBio RS II 장비를 이용하여 서열 분석을 진행하였으며, 정확도가 떨어지는 긴 리드 데이터를 보완하기 위한 정확도가 높은 500 bp 미만의 서열 길이를 지니는 단편서열데이터(short read data)를 생산하기 위하여 NovaSeq 6000 장비를 이용하여 서열 분석을 진행하였다. 긴 리드 데이터는 SMRT Analysis server의 HGAP2 파이프라인을 활용하여 완성도 높은 GB102, GB103 유전체 초안으로 조립되었다. 조립된 유전체 초안 서열 내에 존재할 수 있는 SNP 및 InDel error들은 긴 리드 데이터와 단편서열데이터를 통하여 보정하였다. 완성된 유전체 서열로부터 Prodigal 프로그램을 사용하여 CDS(coding sequences)들을 예측하였으며, RFAM tool을 활용하여 rRNA, tRNA들을 예측하였다. 예측된 CDS들은 공개된 UniProt database, GenBank nr database, Subsystem database, PFAM database, COG database를 기반으로 상동성 검색 (BLAST 알고리즘 적용)을 수행하여 기능을 예측하였다. GenBank에 공개된 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 종의 표준 균주 B1 28<sup>T</sup> (= ATCC 14931<sup>T</sup>) 및 락토바실러스 고릴라(*Lactobacillus gorillae*) 표준 균주 KZ01<sup>T</sup>, 락토바실러스 가스트리커스(*Lactobacillus gastricus*) 표준 균주 DSM 16045<sup>T</sup> 유전체 서열과 GB102 및 GB103 균주의 유전체 서열로부터 Jspecies 프로그램을 활용하여 유전체 평균 염기 동일성(Average Nucleotide Identity)을 계산하였다. 분석 결과, GB102 및 GB103 두 균주는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 표준 균주와 95%이상의 ANI 값을 보여 락토바실러스 퍼멘텀 종(species)에 속함이 증명되었다(표 2). 또한, GB102 및 GB103 균주가 표준 균주와 100% 일치하지 않아 기존에 분리 및 보고되지 않은 신규한 종임을 알 수 있다. 아울러, GB102와 GB103 균주 역시 유전체 거리가 멀어 서로 각기 다른 균주로 확인되었다. 본 발명자들은 GB102 및 GB103 균주를 “락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102” (기탁번호: KCTC 14105BP) 및 “락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103” (기탁번호: KCTC 14106BP)으로 명명하고 이를 한국생명공학연구원 소재 한국세포주은행 (Korean collection for type cultures, KCTC)에 2020년 1월 14일자에 각각 기탁하였다.

[121] [표2]

Strain name	Genome size (bp)	GC ratio	ANI values				
			GB102	GB103	B1 28	KZ01	DSM 16045
GB102	2,039,432	51.88	---	<b>98.43</b>	<b>99.14</b>	79.31	68.77
GB103	2,260,513	51.25	<b>98.51</b>	---	<b>98.42</b>	79.72	69.23
B128	1,905,587	52.30	<b>99.09</b>	<b>98.51</b>	---	79.42	68.66
KZ01	1,641,621	48.11	79.05	79.37	79.11	---	68.07
DSM 16045	1,848,461	41.64	68.22	68.38	68.02	68.18	---

[122] 실시예 3. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주의 유전체 및 비교유전체 분석

[123] GB104 균주의 유전체 기반 종(species) 동정 및 특성을 조사하기 위하여 차세대 염기서열 분석 기술(Next-generation sequencing technology, NGS) 및 생물정보학 기술을 활용하여 균주의 유전체 서열을 완전해독하고 유전체에 포함된 유전자들의 기능을 유추하였다. 또한, 동 종의 완전 해독된 유전체 서열과 비교분석을 통하여 균주의 특이성을 확인하였다. 본 균주는 MRS 액체배지 37°C의 혐기 조건에서 4 시간동안 배양하였으며, 배양체로부터 MG Genomic DNA purification 키트(MGMED, Inc., Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 평균 길이 10 kb 이상의 긴 리드 데이터를 얻기 위하여 PacBio RS II 장비를 이용하여 서열 분석을 진행하였으며, 정확도가 떨어지는 긴 리드 데이터를 보완하기 위한 정확도가 높은 500 bp 미만의 서열 길이를 지니는 단편서열데이터를 생산하기 위하여 NovaSeq 6000 장비를 이용하여 서열 분석을 진행하였다. 긴 리드 데이터는 SMRT Analysis server의 HGAP2 파이프라인을 활용하여 완성도 높은 GB104 유전체 초안으로 조립되었다. 조립된 유전체 초안 서열 내에 존재할 수 있는 SNP 및 InDel error들은 긴 리드 데이터와 단편서열데이터를 통하여 보정하였다. 완성된 유전체 서열로부터 Prodigal 프로그램을 사용하여 CDS 들을 예측하였으며, RFAM tool을 활용하여 rRNA, tRNA들을 예측하였다. 예측된 CDS들은 공개된 UniProt database, GenBank nr database, Subsystem database, PFAM database, COG database를 기반으로 상동성 검색 (BLAST 알고리즘 적용)을 수행하여 기능을 예측하였다. GB104의

유전체를 요약하여 표 3에 나타내었다.

[124] [표3]

Features	Values	%
Genome size (bp)	3,247,930	100.00
DNA coding (bp)	2,742,575	84.44
DNA G+C (bp)	1,445,117	44.49
Total genes	3,087	100.00
Protein coding genes	2,990	96.86
Genes with function prediction	2,517	81.54
RNA genes	87	2.82
rRNA genes	16	0.52
tRNA genes	68	2.20
Pseudo genes	10	0.32

[125] 유전체 분석 결과, 본 균주는 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*)에서 발견되는 항균능 관련 박테리오신 생합성 유전자 군인 플란타리신(Plantaricin) 유전자 군을 보유하고 있었다. 하지만, 표준 균주 및 참조 균주와 100% 일치하지 않아 기존에 분리 및 보고되지 않은 신규한 종임을 알 수 있다.

[126] 본 발명자들은 GB104균을 "락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*) GB104" (기탁번호: KCTC 14107BP)로 명명하고 이를 한국생명공학연구원 소재 한국세포주은행 (Korean collection for type cultures, KCTC)에 2020년 1월 14일자에 기탁하였다.

[127] 실험예 1. 락토바실러스 속 균주로 이루어진 혼합 균주 (GB102 + GB103 + GB104)에 대한 항산화 효능 확인 검증

[128] GB102, GB103 및 GB104 균주를 유효성분으로 포함 또는 균주 및 부원료(비타민 B2 및 홍삼)를 포함하는 물질에 대한 항산화능을 확인하기 위해 DPPH 자유 라디칼 소거능 평가를 하였다.

[129] 구체적으로, DPPH 용액은 100% methanol에 0.2mM 용액이 되도록 준비했다. 또한, GB102, GB103, GB104 균주와 락티카세이바실러스 람노서스 GG(*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, 구 *Lactobacillus rhamnosus* GG, 양성대조군) 균주를 MRS 액체배지에 접종하여 37 °C에서 16시간 간격으로 배양했다. 이후 균주 배양액을 원심분리(3600 rpm, 15 분)하여 배양한 유산균을 얻은 후 1X PBS로 2회 세척하고 따라 GB102, GB103, GB104의 3개 유산균 혼합 5x10<sup>9</sup> CFU/mL 농도 시료를 준비했다. 이와 동일하게 락티카세이바실러스 람노서스 GG(*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG) 비교 균주도 5x10<sup>9</sup> CFU/ml 농도로 준비하였다.

[130] 부원료는 비타민 B2 및 홍삼 캡슐의 내용물을 625 ug/mL 농도로 시료를 준비했으며, L-아스코르브산(L-ascorbic acid, 양성대조군)은 12.5 ug/mL 농도로 시료를 준비했다.

[131] 부원료 125 ug (200 uL), GB102, GB103, GB104 세 유산균 혼합 1x10<sup>9</sup> CFU (200 uL), GB102, GB103, GB104 세 유산균 혼합 1x10<sup>9</sup> CFU + 부원료 125 ug (200 uL) 각각에 대하여 0.2mM DPPH 용액 200 uL와 혼합한 후 30분간 상온 암실에서 반응시켰다. 이후 원심분리 (12700 rpm, 5분) 하여 상등액 200 uL를 얻은 후 96 immunoflat plate에 넣고 Spectramax iD3 (Molecular devices)를 사용하여 515 nm 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로서 L-아스코르브산(L-ascorbic acid) 2.5 ug (200 uL), 락티카세이바실러스 람노서스 GG(*Lactocaseibacillus rhamnosus* GG) 1x10<sup>9</sup> CFU (200 uL)를 사용했으며, 음성 대조군으로 PBS (200 uL)를 사용했다. 결과는 표 4에 나타내었다.

[132] 다음의 방법으로 DPPH radical 소거 활성 능력에 대해 계산하였다.

[133]  $DPPH\ radical\ scavenging\ activity\ (\%) = (OD_{control} - OD_{sample}) / (OD_{control}) \times 100$

[134] OD<sub>control</sub>: Absorbance of PBS, OD<sub>sample</sub>: Absorbance of sample

[135]

[136] [표4]

	L-ascorbic acid	LGG	홍삼+비타민B2	유산균 3종	유산균 3종+홍삼+비타민B2
DPPH radical scavenging activity(%)	53.0±0.37	26.2±0.0	14.0±0.26	44.4±0.26	56.2±1.53

[137] 표 4에 나타낸 바와 같이, 락티카세이바실러스 람노서스 GG (*Lactocaseibacillus rhamnosus* GG) 1x10<sup>9</sup> CFU는 약 26.2%, L-아스코르브산(L-ascorbic acid) 2.5 ug는 약 53 %의 DPPH radical 소거 활성 효력을 확인할 수 있었다. 이와 비교하여 부원료 125 ug은 약 14 %, GB102, GB103, GB104 세 유산균 혼합 1x10<sup>9</sup> CFU는 약 44.4 %, GB102, GB103, GB104 세 유산균 혼합 1x10<sup>9</sup> CFU + 부원료 125 ug는 약 56.2 %의 효력을 확인할 수 있었다. 이를 통해 GB102, GB103, GB104 세 유산균 혼합은 양성 대조 유산균인 락티카세이바실러스 람노서스 GG (*Lactocaseibacillus rhamnosus* GG) 대비 우수한 항산화 효능을 확인할 수 있었다.

[138]

[139] 노화의 자연적인 과정은 신체가 산화적 손상에 더 취약하게 만든다. 또한, 노화 방지 효과는 대부분 항산화 특성과 자유 라디칼 소거 능력과 관련이 있다. 또한, 산화적 손상은 노화와 함께 발생하는 골격근 감소의 주요 원인 중 하나로 제안되었다. 노화 과정의 촉진제로서 자유 라디칼의 식별은 그들의 억제자

유기체(특히 골격근)에 가하는 해로운 변형을 제한할 수 있음을 의미할 수 있다. 즉, 항산화 능력을 가진 분자가 산화적 손상에 대응할 수 있다면, 이것은 무력화 과정을 포함하여 노화 관련 상태의 발병을 예방하는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 산화적 손상이 근감소증(및 기타 노인성 질환)을 유발하는 병태생리학적 기전의 기초이며, 내인성 항산화 방어를 강화하기 위한 개입(예를 들면, 항산화제의 투여)이 노화 억제를 일으킨다. 예를 들면, 적포도주에 함유된 폴리페놀 화합물인 레스베라트롤은 미토콘드리아 호흡 감소로 인해 엘레강스 캐노라피티스의 노화를 늦출 수 있다고 보고된 바 있다. (Wood et al., 2004). 또한, 산화 스트레스는 골 형성과 흡수를 담당하는 세포 사이의 불균형을 일으켜 골 회전을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 항산화제는 산화 스트레스의 영향을 억제 및/또는 개선하는 것으로 알려져 있으므로, 항산화 활성을 나타내는 일 구체에 따른 락토바실러스 속 혼합 균주는 항노화 또는 노화 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[140]

[141] 실험예 2. 락토바실러스 속 균주 GB102, GB103 및 GB104 개별 항산화 효력 확인

[142] GB102, GB103 및 GB104 각각의 균주에 대한 항산화능을 확인하기 위해 DPPH 자유 라디칼 소거능 평가를 하였다.

[143] 구체적으로, 100% methanol에 DPPH (Alfa Aesar) 시약을 이용하여 DPPH 0.2 mM 용액을 준비했다. GB102, GB103, GB104 균주와 락티카세이바실러스 람노서스 GG (*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, 양성대조군) 균주를 MRS 액체배지에 접종하여 37 °C에서 16시간 배양했다. 이후 균주 배양액을 원심분리(3600 rpm, 15 분)하여 배양한 유산균을 얻은 후 1X PBS로 2회 세척하고 GB102, GB103, GB104 세 유산균 혼합 5x10<sup>9</sup> CFU/ml 농도의 시료를 준비했다. 이와 동일하게 락티카세이바실러스 람노서스 GG(*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG) 비교 균주도 5x10<sup>9</sup> CFU/ml 농도로 준비했다. GB102, GB103, GB104 유산균 각각 1x10<sup>9</sup> CFU (200 ul), 세 유산균 혼합 1x10<sup>9</sup> CFU (200 ul)에 대하여 0.2 mM DPPH 용액 200 ul와 혼합한 후 30분간 상온 암실에서 반응시켰다. 이후 원심분리 (12700 rpm, 5분) 하여 상등액 200 ul를 얻은 후 96 well immunoplate에 넣고 Spectramax iD3 (Molecular devices)를 사용하여 515 nm 흡광도를 측정하였다. 상기 실험예1.과 같은 방법으로 DPPH radical 소거 활성 능력에 대해 계산하였다.

[144] [표5]

	GB102	GB103	GB104	LGG	GB102+ GB103+ GB104
DPPH radical scavenging activity(%)	64.1±1.48	41.0±0.28	34.5±1.79	38.1±0.03	53.0±0.20

[145] 표 5에 나타낸 바와 같이, GB102 64.1%, GB103 41.0%, GB104 34.5%, 락티카세이바실러스 람노서스 GG(*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG) 38.1%, 및 GB102+103+104 약 53 %의 DPPH radical 소거 활성 효력을 확인할 수 있었다. 이를 통해 GB102, GB103, GB104 균주 각각 항산화 효력이 있음을 확인할 수 있었다.

[146]

[147] 실험예 3. 근력 개선에 대한 혼합 균주 및/또는 한약재 병용 투여 요법의 효과 검증

[148] 락토바실러스 속 균주로 이루어진 혼합 균주 및/또는 한약재의 병용투여시 노화로 인해 저하된 근력 개선 효과를 확인하기 위해, 고주령의 마우스를 이용하여 GB102, GB103, 및 GB104 3 종의 유산균을 혼합한 혼합 균주(이하에서 '#7 유산균' 또는 '혼합 균주'라고 함)와 4종의 한약재 혼합물에 이눌린 및 비타민B2가 추가로 함유된 부원료를 각각 단독 투여하거나 병용 투여하여 노화 마우스의 근력 개선 변화를 확인하였다.

[149] 혼합 균주와 병용 투여되는 부원료는 한약재와 이눌린 및 비타민 B2를 포함하고, 한약재는 안동참마, 율무, 홍삼분말, 영지를 사용하였다. 한약재(안동참마, 율무, 홍삼분말, 영지)와 이눌린, 비타민 B2의 총 함량은 70.20mg이고, 동결보존제 30.30mg을 포함하여 각 마우스마다 부원료가 총 100.5 mg의 용량으로 투여되었다.

[150] [표6]

	안동참마	율무	이눌린	비타민B2	홍삼분말	영지	합계
용량	12.51mg	10.10mg	18.20mg	0.60mg	16.28mg	12.51mg	70.20mg

[151] 구체적으로, 실험군은 16 개월령의 C57BL/6 마우스를 총 4군으로 나누었다. 실험군1(G1)은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102, GB103 균주(기탁번호 KTCT 14105BP, KCTC 14106BP), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주(기탁번호 KCTC 14107BP) 균주로 구성된 혼합 균주(#7 유산균)를 경구 투여하였다. 혼합 균주(#7 유산균)는 마우스당

5X10<sup>8</sup> CFU의 용량으로 투여하였으며, 보장 균수 유지를 위해 (주)메디오젠에서 입수한 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis* sub sp. *Lactis*) 균주와 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)와 함께 투여하였다. 실험군2(G2)는 안동참마, 울무, 홍삼분말, 영지로 구성된 한약재 혼합물과 이눌린 및 비타민B2를 포함하는 부원료를 경구 투여하였다. 부원료는 상기 표 6와 같이 마우스당 100.5 mg의 용량으로 투여하였다. 실험군3(G3)은 혼합 균주 및 부원료를 경구를 통해 병용 투여하였다. 일반식(normal chow diet, NCD)을 섭취시킨 마우스를 대조군(control)으로 설정하였다. 각 대조군 및 실험군은 15마리의 마우스를 사용하였다. 위 실험군과 대조군의 실험조건을 아래 표 7에 정리하였다.

[152] [표7]

Group	Experimental group	투여물질	투여량	투여액량(ml/kg g)	N
G1	Control	PBS	-	10 ml/kg	15
G2	혼합 균주	혼합 균주	5X10 <sup>8</sup> CFU/head	10 ml/kg	15
G3	부원료	부원료	100.5mg/head	10 ml/kg	15
G4	혼합 균주 + 부원료	혼합 균주 + 부원료	5X10 <sup>8</sup> CFU/head + 100.5mg/head	10 ml/kg	15

[153] 각 실험군은 13주간 투여한 후, 근력개선을 확인하기 위해 Grip Strength 기기를 이용하여, 마우스 앞쪽 두 다리로 Grip Strength 기기의 wire부분을 잡게 하여 당기는 힘(Grip Strength)을 측정하였고, 그 결과를 표 8에 나타내었다.

[154] [표8]

Mean Grip strength (%)	Week 0	Week 11	Week 13	Week 16	Week 21	Week 26
PBS	100	77.7	72.3	82.4	84.9	85.5
혼합 균주	100	82.5	82.1	91.3	94.6	95.4
부원료	100	81	75.7	86.3	85.8	88.7
혼합 균주 + 부원료	100	102.1	104.8	114.5	116.4	122.4

[155] 표 8에 나타낸 바와 같이, 대조군, 실험군1(G1), 실험군2(G2)에 비해 혼합 균주 및 부원료를 병용투여한 실험군3(G3)에서 유의미하게 Grip Strength가 증가하는 경향성을 확인하였다.

[156] 이상의 결과를 통해, 락토바실러스 속 혼합 균주(#7 유산균) 및 한약재 혼합물의 병용 투여 시 노화로 인해 저하된 근력이 개선이 되는 효과를 확인하였다.

[157] 실험예 4. 혈청내에서 Myostatin 측정 효과 검증

[158] 노화 마우스 대조군 (PBS), 혼합 군주, 부원료, 혼합 군주+부원료를 섭취한 노화 마우스 실험 부검 종료 후 얻은 혈청 샘플에 대해, Myostatin ELISA 분석을 수행했다

[159] 혈청 분석은, DGF-8/myostatin DuoSet (R&D systems) ELISA를 사용했으며, 세부 실험 방법은 제조사에서 제공한 프로토콜 기반으로 수행했다. 분석 방법의 공통적 간략하게 설명하면, 제품의 Capture antibody를 96-Well flat immunoplate (SPL)에 전날 4 °C overnight incubation 후 다음날 0.05% Tween 20 in PBS wash buffer를 사용하여 3회 washing 진행했다. 이후 1% BSA in PBS sample diluent를 이용하여 1시간 상온에서 blocking 하고 wash buffer를 사용하여 3회 washing 진행한다. myostatin standard range 안에 들어오는 희석 배수에 맞게 샘플을 희석하여 100 uL씩 sample loading 후 2시간 상온에서 incubation 한 후 wash buffer를 이용하여 3회 washing 한다. Detection antibody를 1시간 room temperature에서 incubation 한 후 wash buffer를 이용해 3회 washing 하고, 이어서 streptavidin-HRP를 20분간 room temperature에서 incubation 한 후 wash buffer를 이용해 3회 washing 한다. 마지막으로 TMB-substrate solution을 넣은 후 20분 room temperature에서 incubation 한 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 넣고 반응을 중지시킨 후 SpectraMax iD3 (Molecular devices) 장비를 이용하여 450 nm 흡광도를 측정했다.

[160]

[161] [표9]

Group	PBS	혼합 군주	부원료	혼합 군주 + 부원료
Mean myostatin(ng/mL)	4689.8±364.7	4439.7±251.2	4363.2±200.6	3721.8±173.2

[162] 표 9에 나타낸 바와 같이, 노화 마우스로부터 얻은 혈청에서 혈중 myostatin 분석 결과 대조군(PBS)은 4689.8±364.7 ng/mL, 혼합 군주 단독 투여시 4439.7±251.2 ng/mL, 부원료 단독 투여시 4363.2±200.6 ng/mL로 측정되었다. 혼합 군주와 부원료를 병용으로 섭취한 그룹은 3721.8±173.2 ng/mL으로 측정되어 단독으로 섭취한 그룹 대비 혼합 군주와 부원료를 병용으로 섭취한 그룹에서 통계적으로 유의한 myostatin의 감소를 확인할 수 있었다.

[163]

[164] 실험예 5. 유산균 혼합 군주 및/또는 한약재 병용 투여에 의한 동물 모델에서의 장내 균총 변화, 항노화 및 항비만 활성 검증

[165] 노화 마우스에서 유산균 혼합 군주 및/또는 한약재 병용 투여가 유도하는 장내 균총 변화, 항노화 및 항비만 활성을 분석하기 위하여 총 3개의 군을 구성하여 진행하였다. 16 개월령의 C57BL/6 노화 마우스에 32주간 인산완충생식염수

(phosphate-buffered saline, PBS)를 경구 투여한 군(15마리)과 10 주령의 C57BL/6 젊은 마우스 군(10마리)을 대조군으로 설정하였다. 그리고, 16 개월령의 C57BL/6 노화 마우스에 32주간 실험예 2에서 사용한 혼합 균주와 부원료를 함께 경구 투여한 마우스 군(15마리)을 실험군으로 설정하였다. 실험 종료 후, 각 마우스를 부검하였고, 맹장 시료(cecum)를 절제하여 -80°C에 냉동 보관하였다. 냉동 보관된 시료로부터 FastDNA@SPIN Kit for soil (MP Bio)을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 각 DNA 시료로부터 바코드서열이 융합된 341F 및 805R 프라이머 (표 10, 서열번호 4 및 5)를 이용한 PCR 방법을 통하여 미생물 군총의 16S rRNA 유전자의 V3/V4 영역을 증폭하였다.

[166] [표10]

프라이머	염기서열(5' → 3')	서열번호
341F	CCT ACG GGN GGC WGC AG	4
805R	GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	5

[167]

[168] 증폭된 산물은 AMPure XP beads (Beckman)를 사용하여 정제하였다. 이후, MiSeq (Illumina) 플랫폼을 사용하여 정제산물로부터 대용량 염기서열 데이터를 생산하였다. DADA2 프로그램을 활용하여 생산된 대용량 염기서열의 denoising 및 paired 서열 조립을 수행하였다. 공개된 Mothur 파이프라인(Schloss PD et al. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 75:7537-7541)을 활용하여 서열 조립된 서열 데이터들의 OTUs 클러스터링 및 군총 다양성 분석을 진행하였다. 상기 결과는 도 1 내지 5에 나타내었다.

[169] 도 1에 나타낸 바와 같이, 16S rRNA 유전자 서열에 기반한 군총 알파-다양성 분석 결과, 노화 마우스군의 경우, 군총의 균등도(evenness, Shannon evenness index)가 젊은 마우스군에 비하여 유의하게 낮음을 확인하였다. 일 구체예에 따른 유산균 혼합 균주 및 한약재 병용 투여를 진행한 노화 마우스군의 경우, 젊은 마우스군과 유의한 차이를 보이지 않았으며, 오히려 노화 마우스군보다 군총의 고른 정도가 유의하게 높은 것으로 평가되었다. 이는 일 구체예에 따른 유산균 혼합 균주 및 한약재 병용 투여가 노화된 동물 장내의 군총의 고른 정도를 회복시키거나 낮아짐을 방지함으로써 장 건강에 긍정적인 영향을 미칠 수 있음을 의미한다.

[170] 도 2에 나타낸 바와 같이, Weighted-UniFrac distance를 기반한 장내 군총의 군집 구조의 주좌표분석 (Principal coordinate analysis, PCoA) 결과, 노화 마우스의 장내 군총 군집은 젊은 마우스의 군총 군집 구조와 다름을 확인하였다. 이에 반하여, 유산균 혼합 균주 및 한약재 병용 투여 노화 마우스들의 장내 군총의 군집

구조는 일반 노화 마우스의 장내 균총 균집보다는 젊은 마우스의 장내 균총 균집 구조와 유사한 것으로 확인되었다. 이는 일 구체에 따른 유산균 혼합 균주 및 한약재 병용 투여가 노화된 동물의 장내 균총 균집 구조를 젊은 동물의 장내 균총 균집 구조와 유사하게 조절하고 있음을 의미한다.

[171] 도 3 및 도4에 나타낸 바와 같이, 일 구체에 따른 혼합 균주 및 한약재 병용 투여는 노화 마우스 장내에 서식하는 주요 계통인 퍼미큐테스(*Firmicutes*)문의 라크노스피로세(*Lachnospiraceae*), 루미노코카세(*Ruminococcaceae*) 및 박테로이데테스(*Bacteroidetes*)문의 무리바쿨라세(*Muribaculaceae*), 리케넬라세(*Rikenellaceae*), 프레보텔라세(*Prevotellaceae*)의 빈도에 유의한 차이를 유발하는 것으로 확인되었다.

[172] 계속해서, 도 5에 나타낸 바와 같이, 이로 인하여 장내 균총의 비만 관련 지표로 알려진 퍼미큐테스/박테로이데테스(*Firmicutes/Bacteroidetes*)비율이 노화 마우스와 젊은 마우스 간 유의한 차이를 나타내었다. 이는 일 구체에 따른 유산균 혼합 균주 및 한약재 병용 투여가 노화 마우스 장내의 균총을 젊은 마우스의 균총과 유사하게 바꾸어, 노화 마우스의 장내 균총에 의해 유발되는 비만 등 노화 관련 질병을 예방하거나 치료하는데 도움을 줄 수 있는 것을 의미한다. 또한, 노화 마우스에 유산균 혼합 균주 및 한약재 병용 투여된 경우, 노화 마우스 대조군이 보이는 비율 보다 낮아지는 경향이 있는 것으로 나타났다. 최근 논문에서 노화 마우스의 장내 균총은 비만을 유발할 수 있으며, 노화 마우스에서 퍼미큐테스/박테로이데테스 비율이 증가됨이 보고되었다 (Binyamin et al., *Genome medicine*, 2020). 이는 일 구체에 따른 유산균 혼합 균주 및 한약재 병용 투여가 노화 마우스에서 일어나는 비만 등의 질병 예방 및 치료에 긍정적인 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

[173]

[174] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[175] [수탁번호]

[176] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[177] 수탁번호 : KTCT14105BP

[178] 수탁일자 : 2020114

[179]

[180] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[181] 수탁번호 : KTCT14106BP

[182] 수탁일자 : 2020114

[183]

- [184] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- [185] 수탁번호 : KTCT14107BP
- [186] 수탁일자 : 2020114
- [187]
- [188]

특허 출원을 위한 미생물 기탁의  
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약  
국제적 양식  
규칙 7.1 에 의거 발행된  
원기탁에 대한 수탁증 원본

To. 지아이바이옴  
지아이바이옴  
167, 송파대로, 송파구, 서울특별시  
대한민국

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시: <i>Lactobacillus fermentum</i> GB102	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호: KCTC 14105BP
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 I 에 표시된 미생물은 다음이 첨부된다: <input type="checkbox"/> 과학적 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학적 명명 (적용되는 부분에 x 표시한다)	
III. 수탁 및 수령	
본 국제 기탁 기관은 상기 I 에 표시된 미생물을 수령하며, 그것은 2020. 01. 14 에 수탁되었다.	
IV. 전환에 대한 요청의 수탁	
I 로 특정된 미생물은 국제기탁기관에 수탁되었고, 동 미생물에 대한 원기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로의 전환 청구가 접수되었다.	
V. 국제 기탁 기관	
명칭: 한국 생물자원센터(KCTC)  주소: 한국생명공학연구원(KRIBB), 181, 입신길, 정읍시, 전라북도 56212 대한민국	국제 기탁 기관을 대표할 권한이 있는 자의 서명 담당자: 김성건 일자: 2020. 01. 14.

[189]

[190]

특허 출원을 위한 미생물 기탁의  
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약  
국제적 양식  
규칙 7.1 에 의거 발행된  
원기탁에 대한 수탁증 원본

To. 지아이바이옴  
지아이바이옴  
167, 송파대로, 송파구, 서울특별시  
대한민국

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시: <i>Lactobacillus fermentum</i> GB103	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호: KCTC 14106BP
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 I 에 표시된 미생물은 다음이 첨부된다: <input type="checkbox"/> 과학적 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학적 명명 (적용되는 부분에 x 표시한다)	
III. 수탁 및 수령	
본 국제 기탁 기관은 상기 I 에 표시된 미생물을 수령하며, 그것은 2020. 01. 14 에 수탁되었다.	
IV. 전환에 대한 요청의 수탁	
I 로 지정된 미생물은 국제기탁기관에 수탁되었고, 동 미생물에 대한 원기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로의 전환 청구가 접수되었다.	
V. 국제 기탁 기관	
명칭: 한국 생물자원센터(KCTC)  주소: 한국생명공학연구원(KRIBB), 181, 입신길, 정읍시, 전라북도 56212 대한민국	국제 기탁 기관을 대표할 권한이 있는 자의 서명 담당자: 김성건 일자: 2020. 01. 14.

[191]

[192]

특허 출원을 위한 미생물 기탁의  
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약  
국제적 양식  
규칙 7.1 에 의거 발행된  
원기탁에 대한 수탁증 원본

To. 지아이바이움  
지아이바이움  
167, 송파대로, 송파구, 서울특별시  
대한민국

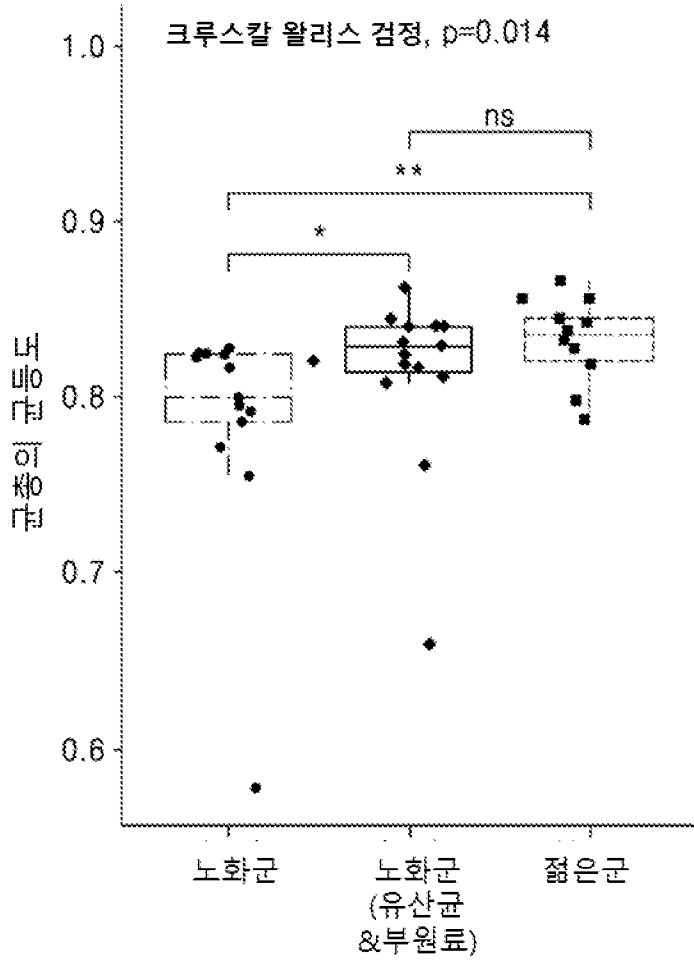
I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시: <i>Lactobacillus plantarum</i> GB104	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호: KCTC 14107BP
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 I 에 표시된 미생물은 다음이 첨부된다: <input type="checkbox"/> 과학적 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학적 명명 (적용되는 부분에 x 표시한다)	
III. 수탁 및 수령	
본 국제 기탁 기관은 상기 I 에 표시된 미생물을 수령하며, 그것은 2020. 01. 14 에 수탁되었다.	
IV. 전환에 대한 요청의 수탁	
I 로 지정된 미생물은 국제기탁기관에 수탁되었고, 동 미생물에 대한 원기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로의 전환 청구가 접수되었다.	
V. 국제 기탁 기관	
명칭: 한국 생물자원센터(KCTC)  주소: 한국생명공학연구원(KRIBB), 181, 입신길, 정읍시, 전라북도 56212 대한민국	국제 기탁 기관을 대표할 권한이 있는 자의 서명 담당자: 김성건 일자: 2020. 01. 14.

## 청구범위

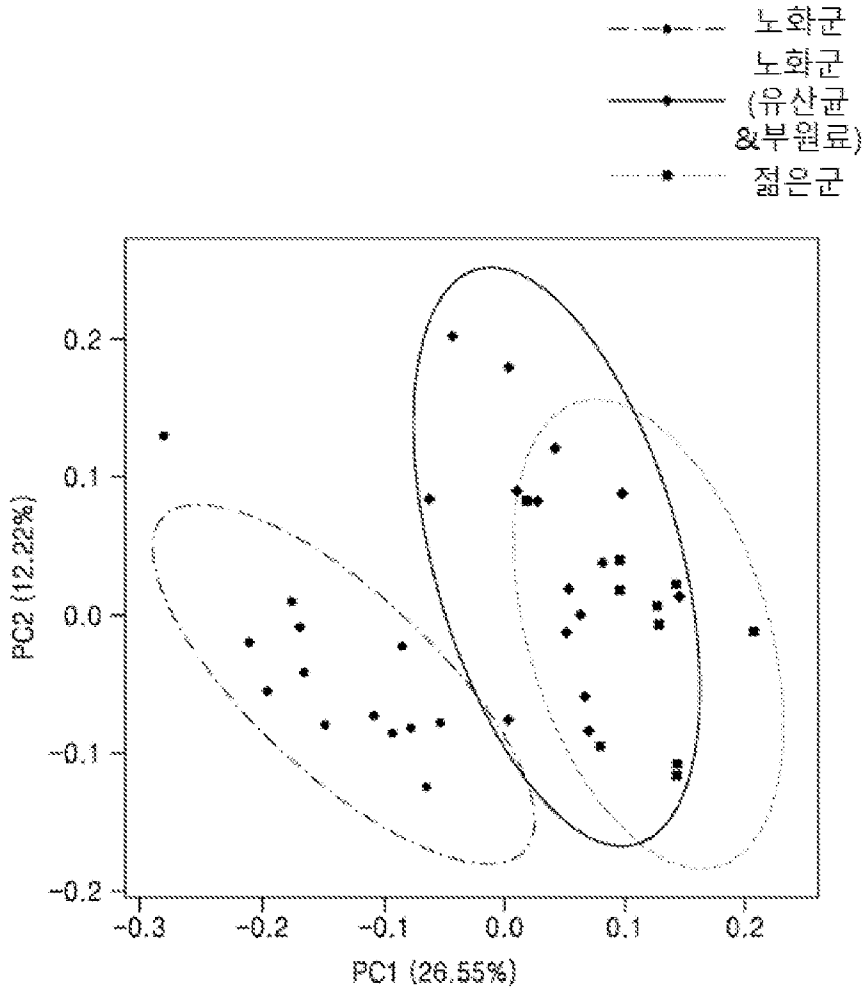
- [청구항 1] 기탁번호 KCTC 14105BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB102 균주, 이의 용해물(lysate), 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 기탁번호 KCTC 14106BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) GB103 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나; 및 기탁번호 KCTC 14107BP로 기탁된 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.)에 속하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GB104 균주, 이의 용해물, 및 배양액으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나, 둘, 또는 셋 이상을 포함하는 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 균주는 생균 또는 사균인 것인 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 혼합 균주는  $10^3$  내지  $10^{16}$  CFU/g의 양으로 포함되는 것인 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 경구 투여되는 것인 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 항노화용인 것인 조성물.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 항노화는 근육 세포의 항노화, 신경 세포의 항노화, 피부 세포의 항노화 및 장내 미생물 환경의 항노화로 이루어진 균으로부터 하나 이상 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 7] 유효량의 청구항 1의 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 노화를 억제하는 방법.
- [청구항 8] 항노화 조성물의 제조를 위한 청구항 1의 조성물의 용도.
- [청구항 9] 청구항 1의 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 관련 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 조성물은 관절 경직, 근육 손실, 힘 손실, 속도 손실, 균형 손실, 지구력 손실 및 민첩성 손실로 이루어진 균에서 적어도 하나 이상을 감소시키는 것인 건강기능식품.
- [청구항 11] 청구항 9에 있어서, 상기 조성물은 운동 수행능력을 증가시키고, 근육 조정력, 이동성 및 보행을 회복시키고, 근육량 및 약력을 증가시키는 것으로 이루어진 균에서 적어도 하나 이상 선택되는 것인 건강기능식품.
- [청구항 12] 청구항 9에 있어서, 상기 근육 관련 질환은 근감소증(sarcopenia), 노인성 근감소증, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 폐용성 근위축증(disuse muscle atrophy), 동작 뉴런 질병(motor neuron disease), 염증성 근병증, 신경근 접합부 질병, 내분비성 근병증, 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 근염, 근육 석회화, 근육 골화, 근육악화 관련 질환 및

- 악액질(cachexia)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것인  
건강기능식품.
- [청구항 13] 유효량의 청구항 1의 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근육 관련 질환을 예방하거나 치료하는 방법.
- [청구항 14] 근육 관련 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품의 제조를 위한 청구항 1 조성물의 용도.
- [청구항 15] 청구항 1의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 16] 유효량의 청구항 1의 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만을 예방하거나 치료하는 방법.
- [청구항 17] 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품의 제조를 위한 청구항 1의 조성물의 용도.
- [청구항 18] 청구항 1의 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 19] 청구항 18에 있어서, 상기 조성물은 관절 경직, 근육 손실, 힘 손실, 속도 손실, 균형 손실, 지구력 손실 및 민첩성 손실로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상을 감소시키는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 20] 청구항 18에 있어서, 상기 조성물은 운동 수행능력을 증가시키고, 근육 조정력, 이동성 및 보행을 회복시키고, 근육량 및 약력을 증가시키는 것으로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 21] 청구항 18에 있어서, 상기 근육 관련 질환은 근감소증(sarcopenia), 노인성 근감소증, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 폐용성 근위축증(disuse muscle atrophy), 동작 뉴런 질병(motor neuron disease), 염증성 근병증, 신경근 접합부 질병, 내분비성 근병증, 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 근염, 근육 석회화, 근육 골화, 근육약화 관련 질환 및 악액질(cachexia)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 22] 근육 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 제제의 제조를 위한 청구항 1의 조성물의 용도.
- [청구항 23] 청구항 1의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 24] 비만 예방 또는 치료용 약학적 제제의 제조를 위한 청구항 1의 조성물의 용도.
- [청구항 25] 청구항 1의 조성물을 유효성분으로 포함하는 사료 조성물.

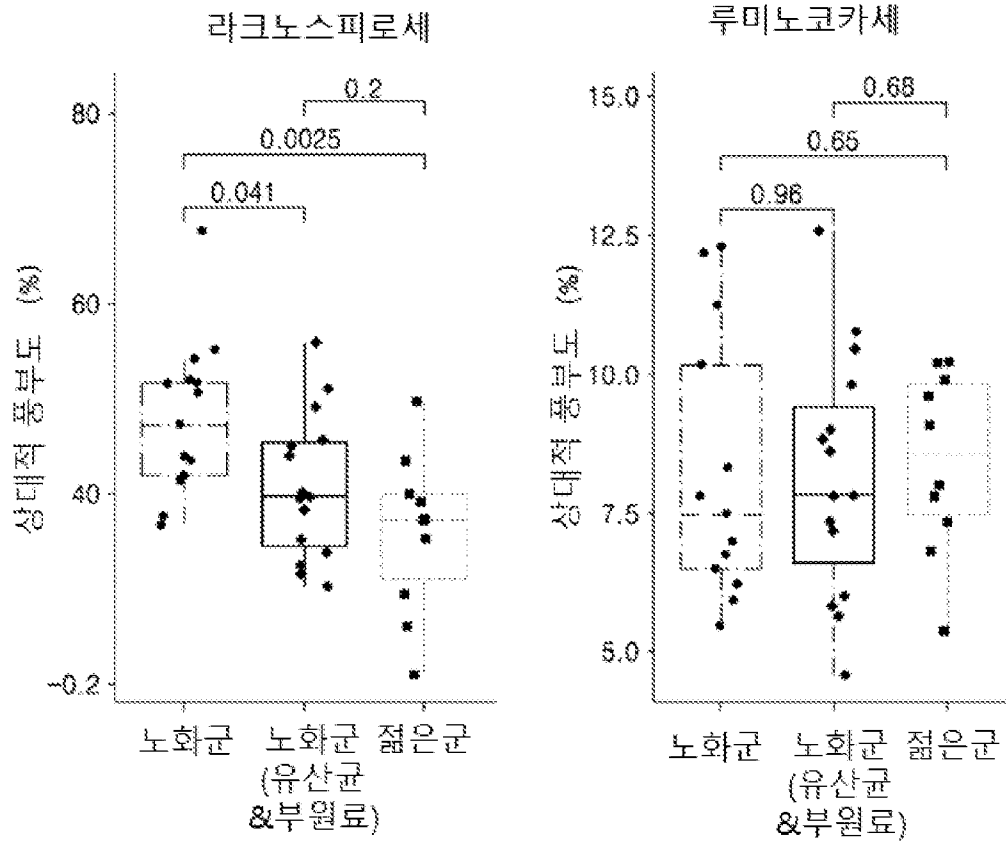
[도1]



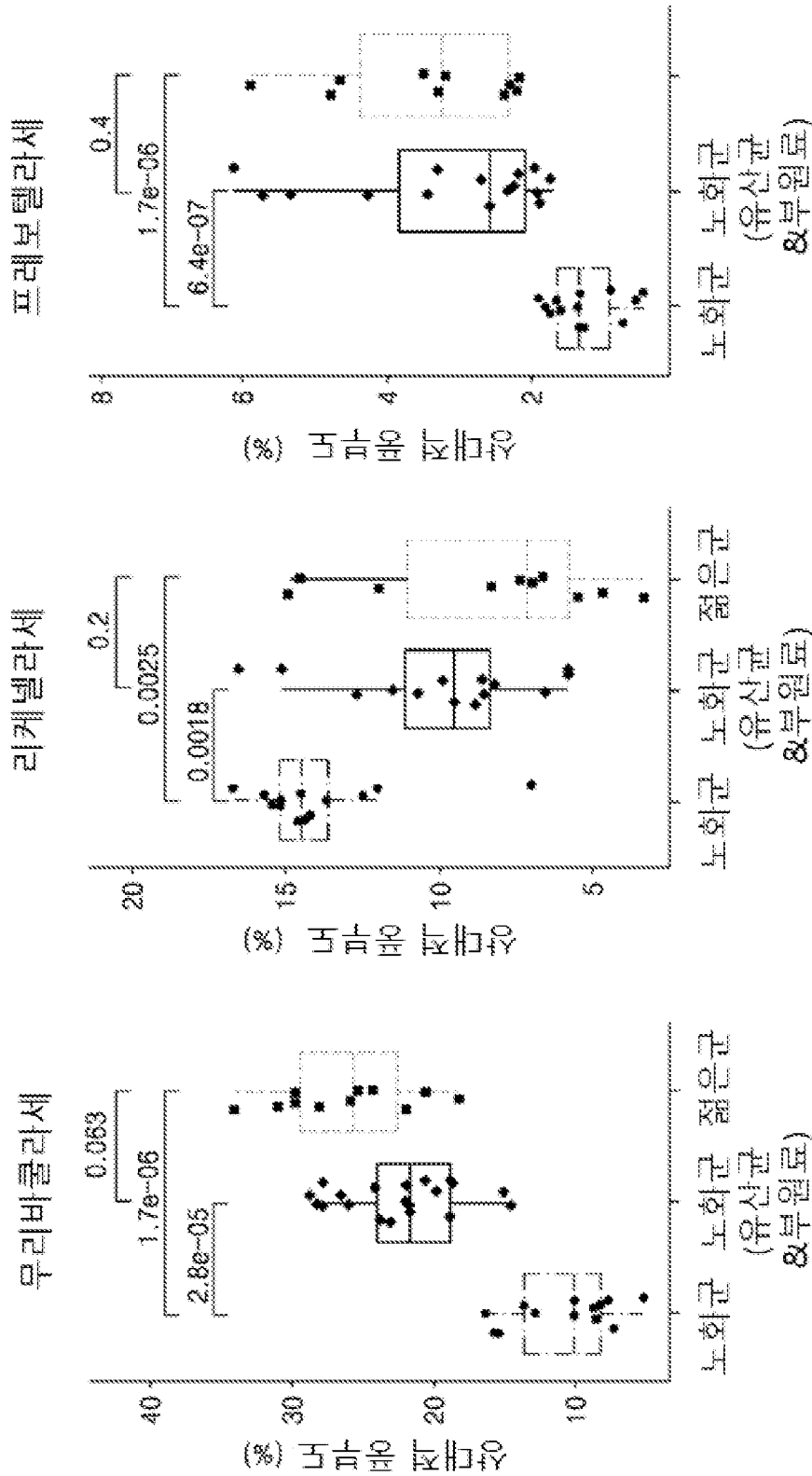
[도2]



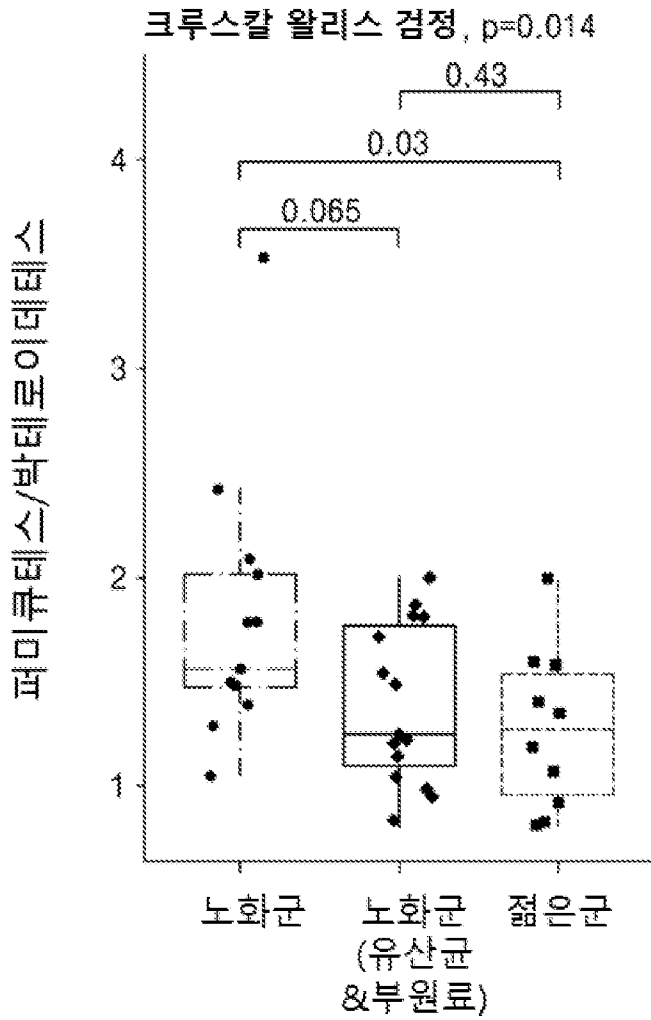
[도3]



[도4]



[도5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2022/009479**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A23L 33/135(2016.01)i; A61K 35/747(2014.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A23K 10/16(2016.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A23L 33/135(2016.01); A23K 10/16(2016.01); A23K 10/18(2016.01); A61K 35/74(2006.01); A61K 35/744(2014.01); A61K 35/747(2014.01); A61K 47/10(2006.01); A61P 21/00(2006.01)		
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: 락토바실러스 속(lactobacillus sp.), 락토바실러스 퍼멘텀(lactobacillus fermentum), 락토바실러스 플란타룸(lactobacillus plantarum), KCTC 14105BP, KCTC 14106BP, KCTC 14107BP, GB102, GB103, GB104, 균주(strain), 혼합(combination), 노화(aging), 근육 관련 질환(muscle-related disease), 비만(obesity), 예방(prevention), 치료(treatment), 제약(drug), 식품(food), 사료(feed)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2021-0058729 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 24 May 2021 (2021-05-24) See abstract, claims 1-2, 6 and 9, and paragraphs [0006]-[0009], [0011], [0014]-[0015], [0024], [0035] and [0037].	1-4,9,12,14,18,21-22,25
Y		5-6,8,10-11,15,17,19-20,23-24
Y	KR 10-2020-0034169 A (INDUSTRIAL COOPERATION FOUNDATION CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY et al.) 31 March 2020 (2020-03-31) See abstract, claim 1, and paragraphs [0006]-[0007] and [0011].	5-6,8
Y	WO 2020-260958 A1 (SYNBIO TECH INC.) 30 December 2020 (2020-12-30) See abstract, and claims 9-10.	10-11,19-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 <b>17 October 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>17 October 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/KR <b>Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208</b> Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2022/009479**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2016-0098955 A (JINIS CO., LTD.) 19 August 2016 (2016-08-19) See abstract, claims 1-12, and paragraph [0001].	15,17,23-24
A	KR 10-1981333 B1 (MEDIODEN CO., LTD. et al.) 23 May 2019 (2019-05-23) See entire document.	1-6,8-12,14-15,17-25
A	KR 10-2016-0098149 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 18 August 2016 (2016-08-18) See entire document.	1-6,8-12,14-15,17-25
PX	KR 10-2021-0086537 A (GI BIOME) 08 July 2021 (2021-07-08) See abstract, claims 1-3 and 13-14, and paragraphs [0021]-[0022], [0034] and [0037].	1-4,15,23
PX	KR 10-2021-0086539 A (GI BIOME) 08 July 2021 (2021-07-08) See abstract, claims 1-3 and 10-11, and paragraphs [0021]-[0022], [0034] and [0037].	1-4,15,23
PX	KR 10-2021-0086540 A (GI BIOME) 08 July 2021 (2021-07-08) See abstract, claims 1-3 and 11-12, and paragraphs [0021]-[0022] and [0033]-[0034].	1-4,15,23

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **7,13,16**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claims 7, 13 and 16 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2022/009479**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2021-0058729 A	24 May 2021	None	
KR 10-2020-0034169 A	31 March 2020	KR 10-2166596 B1	16 October 2020
WO 2020-260958 A1	30 December 2020	EP 3989993 A1	04 May 2022
		JP 2022-501307 A	06 January 2022
		KR 10-2022-0024668 A	03 March 2022
		US 2021-0008131 A1	14 January 2021
		US 2022-0072070 A1	10 March 2022
KR 10-2016-0098955 A	19 August 2016	EP 3375448 A1	19 September 2018
		EP 3375448 B1	30 September 2020
		KR 10-2018-0088353 A	03 August 2018
		KR 10-2125548 B1	24 June 2020
		US 11273188 B2	15 March 2022
		US 2020-0061132 A1	27 February 2020
		WO 2017-082611 A1	18 May 2017
KR 10-1981333 B1	23 May 2019	KR 10-1985792 B1	05 June 2019
		US 2020-0069748 A1	05 March 2020
		US 2021-0322493 A1	21 October 2021
		WO 2020-045971 A1	05 March 2020
		WO 2020-045972 A1	05 March 2020
KR 10-2016-0098149 A	18 August 2016	KR 10-1740583 B1	29 May 2017
		KR 10-2015-0098202 A	27 August 2015
		KR 10-2016-0097183 A	17 August 2016
		KR 10-2121461 B1	10 June 2020
		KR 10-2121463 B1	10 June 2020
		WO 2015-122717 A1	20 August 2015
KR 10-2021-0086537 A	08 July 2021	WO 2021-137600 A1	08 July 2021
KR 10-2021-0086539 A	08 July 2021	WO 2021-137602 A1	08 July 2021
KR 10-2021-0086540 A	08 July 2021	WO 2021-137603 A1	08 July 2021

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> A23L 33/135(2016.01)i; A61K 35/747(2014.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A23K 10/16(2016.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A23L 33/135(2016.01); A23K 10/16(2016.01); A23K 10/18(2016.01); A61K 35/74(2006.01); A61K 35/744(2014.01); A61K 35/747(2014.01); A61K 47/10(2006.01); A61P 21/00(2006.01)		
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: 락토바실러스 속(lactobacillus sp.), 락토바실러스 퍼멘텀(lactobacillus fermentum), 락토바실러스 플란타룸(lactobacillus plantarum), KCTC 14105BP, KCTC 14106BP, KCTC 14107BP, GB102, GB103, GB104, 균주(strain), 혼합(combination), 노화(aging), 근육 관련 질환(muscle-related disease), 비만(obesity), 예방(prevention), 치료(treatment), 제약(drug), 식품(food), 사료(feed)		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2021-0058729 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2021.05.24 요약, 청구항 1-2, 6, 9, 단락 [0006]-[0009], [0011], [0014]-[0015], [0024], [0035], [0037]	1-4,9,12,14,18,21-22,25
Y		5-6,8,10-11,15, 17,19-20,23-24
Y	KR 10-2020-0034169 A (전북대학교 산학협력단 등) 2020.03.31 요약, 청구항 1, 단락 [0006]-[0007], [0011]	5-6,8
Y	WO 2020-260958 A1 (SYNBIO TECH INC.) 2020.12.30 요약, 청구항 9-10	10-11,19-20
Y	KR 10-2016-0098955 A (주식회사 지니스) 2016.08.19 요약, 청구항 1-12, 단락 [0001]	15,17,23-24
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2022년10월17일 (17.10.2022)	2022년10월17일 (17.10.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1981333 B1 (주식회사 메디오젠 등) 2019.05.23 전체 문헌	1-6,8-12,14-15,17-25
A	KR 10-2016-0098149 A (경희대학교 산학협력단) 2016.08.18 전체 문헌	1-6,8-12,14-15,17-25
PX	KR 10-2021-0086537 A (주식회사 지아이바이옴) 2021.07.08 요약, 청구항 1-3, 13-14, 단락 [0021]-[0022], [0034], [0037]	1-4,15,23
PX	KR 10-2021-0086539 A (주식회사 지아이바이옴) 2021.07.08 요약, 청구항 1-3, 10-11, 단락 [0021]-[0022], [0034], [0037]	1-4,15,23
PX	KR 10-2021-0086540 A (주식회사 지아이바이옴) 2021.07.08 요약, 청구항 1-3, 11-12, 단락 [0021]-[0022], [0033]-[0034]	1-4,15,23

제1기재란      핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
  - a.  아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
    - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
    - 서면 혹은 이미지 파일
  - b.  PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
  - c.  국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
    - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
    - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
  
2.  추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
  
3. 추가 의견:

제2기재란      일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1.  청구항: **7,13,16**  
 이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
 청구항 7, 13, 16은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 17조 (2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
  
2.  청구항:  
 이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
  
3.  청구항:  
 이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2021-0058729 A	2021/05/24	없음	
KR 10-2020-0034169 A	2020/03/31	KR 10-2166596 B1	2020/10/16
WO 2020-260958 A1	2020/12/30	EP 3989993 A1	2022/05/04
		JP 2022-501307 A	2022/01/06
		KR 10-2022-0024668 A	2022/03/03
		US 2021-0008131 A1	2021/01/14
		US 2022-0072070 A1	2022/03/10
KR 10-2016-0098955 A	2016/08/19	EP 3375448 A1	2018/09/19
		EP 3375448 B1	2020/09/30
		KR 10-2018-0088353 A	2018/08/03
		KR 10-2125548 B1	2020/06/24
		US 11273188 B2	2022/03/15
		US 2020-0061132 A1	2020/02/27
		WO 2017-082611 A1	2017/05/18
KR 10-1981333 B1	2019/05/23	KR 10-1985792 B1	2019/06/05
		US 2020-0069748 A1	2020/03/05
		US 2021-0322493 A1	2021/10/21
		WO 2020-045971 A1	2020/03/05
		WO 2020-045972 A1	2020/03/05
KR 10-2016-0098149 A	2016/08/18	KR 10-1740583 B1	2017/05/29
		KR 10-2015-0098202 A	2015/08/27
		KR 10-2016-0097183 A	2016/08/17
		KR 10-2121461 B1	2020/06/10
		KR 10-2121463 B1	2020/06/10
		WO 2015-122717 A1	2015/08/20
KR 10-2021-0086537 A	2021/07/08	WO 2021-137600 A1	2021/07/08
KR 10-2021-0086539 A	2021/07/08	WO 2021-137602 A1	2021/07/08
KR 10-2021-0086540 A	2021/07/08	WO 2021-137603 A1	2021/07/08