



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월02일
 (11) 등록번호 10-1860552
 (24) 등록일자 2018년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
 A61K 35/747 (2014.01) C11D 9/04 (2006.01)
 C12R 1/225 (2006.01)

(52) CPC특허분류
 C12N 1/20 (2013.01)
 A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0022840
 (22) 출원일자 2016년02월25일
 심사청구일자 2016년02월25일
 (65) 공개번호 10-2016-0123983
 (43) 공개일자 2016년10월26일
 (30) 우선권주장
 1020150053702 2015년04월16일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
 KR1019990083612 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 고바이오랩
 서울특별시 관악구 관악로 1, 220동 628호 (신림동, 서울대학교 종합연구동)

(72) 발명자
고광표
 서울특별시 서초구 효령로 391, 6동 508호(서초동, 무지개아파트)

유현주
 인천광역시 남동구 석산로169번길 25, 102호 (간석동, 인향아파트)

권보미
 서울특별시 서초구 신반포로 270, 109동 1203호 (반포동, 반포자이아파트)

(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

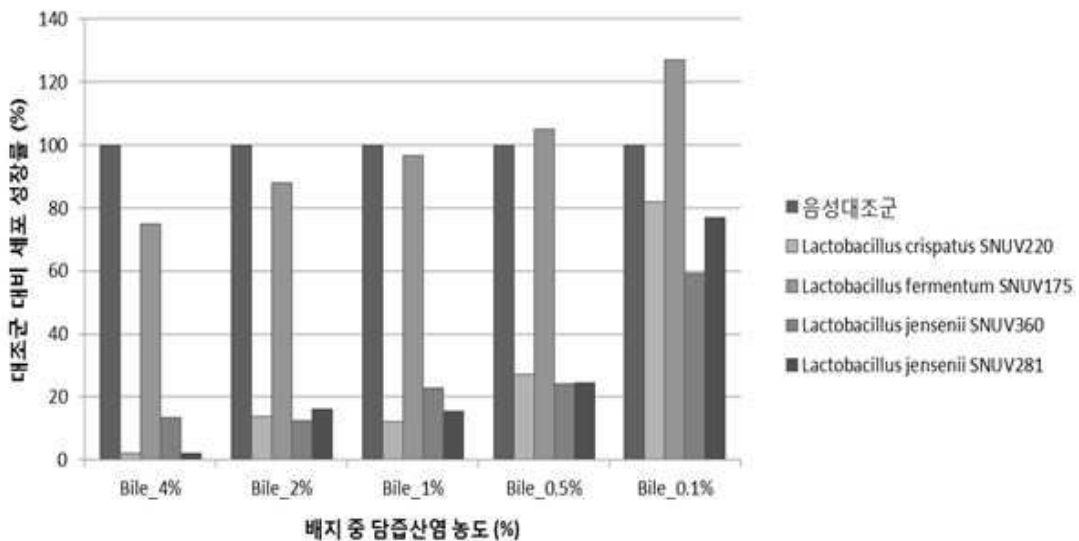
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 질 내 병원성 미생물에 대한 증식억제활성을 갖는 락토바실러스 속 균주

(57) 요약

본 발명은 질염 병원균 증식 억제 활성을 지닌 신규의 락토바실러스 속 분리균주, 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품, 및 세정제에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 인유두종 바이러스(HPV) 감염 및 세균성 질염의 발병과 관련된 스니치아 속(*Sneathia* spp.) 병원균, 질염 병원균인 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*), 칸디다성 질염의 원인균인 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대한 증식 억제 효과 및 질 내 균총의 회복과 유지 효과를 나타내어 여성 질염의 예방과 치료에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/747 (2013.01)

C11D 9/04 (2013.01)

A23Y 2220/00 (2013.01)

C12R 1/225 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0534-20140016

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업/중견연구자지원사업

연구과제명 한국인 마이크로비옴 다양성 확보 및 관리기술 연구

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01~2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

질 내 병원성 미생물의 증식을 억제하는 활성을 가지는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주로서,
상기 락토바실러스 속 균주는 기탁번호 KCTC18374P로 기탁된 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*)이며,

상기 균주는 0.1%(w/v) 담즙산염 농도에서 50%이상의 생존율을 나타내고,

상기 질 내 병원성 미생물은 스니치아 암니(*Sneathia amnii*), 스니치아 생귀네젠스(*Sneathia sanguinegens*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 및 가드너렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인 것인, 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) 균주.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 따른 질 내 병원성 미생물의 증식을 억제하는 활성을 가지는 락토바실러스 속 균주를 유효성분으로 함유하는 질염 치료 또는 예방용 약학적 조성물로서,

상기 질염은 스니치아 암니(*Sneathia amnii*), 스니치아 생귀네젠스(*Sneathia sanguinegens*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 및 가드너렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상에 의해 유발된 질염인, 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 크리스파투스이고, 상기 질염은 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 의해 유발된 질염인, 질염의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 조성물은 기탁번호 KCTC18372P로 기탁된 락토바실러스 젠세니(Lactobacillus jensenii) SNUV360를 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 크리스파투스 및 락토바실러스 젠세니이고, 상기 질염은 스니치아 암니(Sneathia amnii) 및 스니치아 생귀네젠스(Sneathia sanguinegens)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상에 의해 유발된 질염인, 질염의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항에 따른 질 내 병원성 미생물의 증식을 억제하는 활성을 가지는 락토바실러스 속 균주를 유효성분으로 함유하는 질염 개선, 또는 예방용 건강기능식품으로서,

상기 질염은 스니치아 암니(Sneathia amnii), 스니치아 생귀네젠스(Sneathia sanguinegens), 칸디다 알비칸스(Candida albicans), 및 가드너렐라 바지날리스(Gardnerella vaginalis)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상에 의해 유발된 질염인, 질염 개선 또는 예방용 건강기능식품.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 크리스파투스이고, 상기 질염은 칸디다 알비칸스(Candida albicans)에 의해 유발된 질염인, 질염 개선, 또는 예방용 건강기능식품.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 건강기능식품은 기탁번호 KCTC18372P로 기탁된 락토바실러스 젠세니(Lactobacillus jensenii) SNUV360를 추가로 포함하는 것인, 질염 개선 또는 예방용 건강기능식품.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 크리스파투스 및 락토바실러스 젠세니이고, 상기 질염은 스니치아 암니(Sneathia amnii) 및 스니치아 생귀네젠스(Sneathia sanguinegens)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상에 의해 유발된 질염인, 개선, 또는 예방용 건강기능식품.

청구항 18

삭제

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 건강기능식품은 음료, 발효유, 또는 식품 첨가제인 것인, 질염 개선, 또는 예방용 건강기능식품.

청구항 20

제1항에 따른, 질 내 병원성 미생물의 증식을 억제하는 활성을 가지는 락토바실러스 속 균주를 유효성분으로 함유하는 질염 개선 또는 예방용 세정제품으로서,

상기 질염은 스니치아 암니(Sneathia amnii), 스니치아 생귀네젠스(Sneathia sanguinegens), 칸디다 알비칸스(Candida albicans), 및 가드너렐라 바지날리스(Gardnerella vaginalis)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상에 의해 유발된 질염인, 질염 개선 또는 예방용 세정제품.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 크리스파투스이고, 상기 질염은 칸디다 알비칸스(Candida albicans)에 의해 유발된 질염인, 질염 개선 또는 예방용 세정제품.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 세정제품은 기탁번호 KCTC18372P로 기탁된 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360를 추가로 포함하는 것인, 질염 개선 또는 예방용 세정제품.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 크리스파투스 및 락토바실러스 젠세니이고, 상기 질염은 스니치아 암니(*Sneathia amnii*) 및 스니치아 생귀네젠스(*Sneathia sanguinegens*)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상에 의해 유발된 질염인, 질염 개선, 또는 예방용 세정제품.

청구항 24

삭제

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 세정제품은 고체화장비누, 손 세정제, 액체샴푸, 액체비누, 액체린스, 바디 세정제, 또는 크림상 비누인 것인, 질염 개선, 또는 예방용 세정제품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 질 내 병원성 미생물의 증식을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주, 이를 유효성분으로 함유하는 질 내 병원성 미생물의 증식 억제제, 및 상기 억제제를 포함하는 질염의 개선, 예방 또는 치료 제품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 상기 질 내 병원성 미생물은 곰팡이, 세균 및 바이러스를 포함하며, 구체적인 예로는 칸디다(*Candidia*) 속 균주, 가드너렐라(*Gardnerella*) 속 균주, 또는 스니치아(*Sneathia*) 속 균주 등에 대한 증식 억제 효과를 갖는 신규한 락토바실러스 속 균주, 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품 또는 세정제품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계적으로 여성 인구의 3/4이 살아가면서 세균성 질염을 포함한 염증성 여성 질환의 감염을 겪으며, 이 중 50%는 재발을 경험하는 것으로 보고된다. 또한, 여성 질염의 60% 이상이 무증상 감염에 해당하며, 항생제, 스테로이드, 폐경기 이후의 호르몬 변화 등을 겪으며 질염에 대한 감수성이 크게 증가하게 된다.

[0003] 감염에 의한 질염은 크게 3가지 주요 원인으로 나뉘는데, 세균성 질염(Bacterial vaginosis, BV), 칸디다증(*Candida vaginitis*, CV), 트리코모나스 질염(*Trichomonas vaginalis*)이다. 이 중 세균성 질염은 최근 가장 흔한 질염으로 인식되고 있으며, 세균성 질염 환자로부터 분리한 질 분비물에서는 *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* 속, *Gardnerella vaginalis*, *Eggerthella* 속, *Clostridium*-like 속, *Prevotella bivia*, *Peptostreptococcus micros* 등이 발견된 것으로 보고된 바 있으며, 특히 가드너렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)는 세균성 질염의 주요 원인균으로 알려져 있다.

[0004] 여성의 질 내 미생물 군집은 질 내 건강을 유지시키는 주요한 요인으로, 다양한 세균, 효모 및 기타 미생물이 균형을 이루며 공존하고 있다. 건강한 질 내 균총의 우점종은 락토바실러스 유산균으로 질 내 산성도 유지와 과산화수소 생성, 점막 면역계의 활성화 등의 기능을 수행함으로써, 질염을 비롯한 여성 질환을 일으키는 다양한 병원균을 억제하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 항생제를 통한 기존의 질염 치료는 재발률의 증가, 락토바실러스 균총의 동반 감소, 가드너렐라 및 칸디다 이외의 기타 항생제 내성 균주로 인한 염증의 발생 등 다양한 부작용을 수반하므로 프로바이오틱 락토바실러스 유산균을 활용한 질염 병원균의 증식 억제 및 질 내 균총 회복의 중요성이 부각되었다.

[0006] 현재까지 보고된 질염의 원인균으로 대표적인 것은 가드너렐라 바지날리스와 칸디다 알비칸스 등이 대표적이거나, 최근 스니치아 속 균주가 인유두종 바이러스의 감염에 밀접한 연관이 있으며 더불어 교란된 질 내 균총에서 질염의 병원균으로도 작용할 수 있음이 보고되었다. 이에 기존에 알려진 질염 병원균 외에 스니치아 속 병원균의 성장 억제능을 가진 락토바실러스 유산균의 발굴이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 건강한 여성에서 분리된 락토바실러스 균주 190종을 대상으로 질 내 병원성 미생물의 억제 활성을 스크리닝하였으며, 인유두종 바이러스 감염의 미생물학적 마커 및 질염 유발 원인균으로 보고된 스니치아 속 균주에 대한 억제 활성을 가진 락토바실러스 균주의 탐색을 통해 신규 활성을 지닌 프로바이오틱 락토바실러스 균주를 발굴하고 질염 발생에 대한 포괄적인 저해 효과를 확인하였다.
- [0008] 이에, 본 발명의 목적은 질 내 병원성 미생물의 증식을 억제하는 활성을 갖는 락토바실러스 속 균주를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 속 균주를 유효성분으로 함유하는 질 내 병원성 미생물의 증식과 관련된 질환, 예컨대 질염 치료 및/또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 속 균주를 이용하여, 질 내 병원성 미생물의 증식과 관련된 질환을 갖는 환자에 투여하여, 질 내 병원성 미생물의 증식과 관련된 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 속 균주를 유효성분으로 함유하는 질 내 병원성 미생물의 증식과 관련된 질환, 예컨대 질염 개선, 치료 및/또는 예방용 건강기능식품 또는 세정제품 등을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 질 내 병원성 미생물 증식 억제 활성을 지닌 신규의 락토바실러스 속 균주 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품 또는 세정제품 등을 제공하고자 한다.
- [0013] 본 발명의 일 예는 질 내 병원성 미생물의 증식을 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 속 균주에 관한 것이다.
- [0014] 상기 락토바실러스 속 균주는 건강한 여성의 질 내 균총에서 분리된 것이며, 예를 들면, 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) SNUV220, 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175, 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360, 및 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) SNUV281로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 락토바실러스 균주일 수 있다.
- [0015] 상기 질 내 병원성 미생물은 곰팡이, 세균 및 바이러스로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 칸디다성 질염의 원인균인 칸디다(*Candidia*) 속 균주, 세균성 질염의 발병과 관련된 스니치아 (*Sneathia*) 속 균주, 질염 병원균인 가드너렐라(*Gardnerella*) 속 균주, 및 인유두종 바이러스(HPV) 감염질환과 관련된 인유두종 바이러스로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 락토바실러스 속 균주는 이들에 대하여 각각 또는 동시에 증식 억제 효과를 나타내어 여성 질염의 예방 및/또는 치료에 활용될 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 칸디다 속 균주는 칸디다 알비칸스(*Candidia albicans*)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0017] 상기 가드너렐라 속 균주는 가드너렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0018] 상기 스니치아 속 균주는 스니치아 암니(*Sneathia amnii*) 또는 스니치아 생귀네젠스(*Sneathia sanguinegens*)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0019] 또한, 상기 락토바실러스 속 균주는 과산화수소 생성이 활발한 것일 수 있으며, 또한 내산성 및 내담즙성을 가진 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 과산화수소 활성은 락토바실러스 배양용 MRS 한천배지에 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (250 mg/L), hemin (5 mg/L), vitamin K (0.5 ug/L)를 첨가한 TMB배지에서 배양 시 암녹색의 색깔 변화를 유도하는 균주를 대상으로 정성적 판별이 가능하다.
- [0021] 균주의 내산성은 pH 2와 pH 3의 산성 액체 배지에서 24시간 동안 배양 시 성장율의 변화를 바탕으로 판별하였으며, 내담즙성은 0.1% 내지 4%(w/v) 에 이르는 담즙산염을 첨가한 액체 배지에서 24시간 동안 배양 시 성장률의

변화를 바탕으로 판별할 수 있다.

- [0022] 상기 락토바실러스 속 균주는 0.1%(w/v) 담즙산염 농도에서 50%이상의 생존율을 나타낸 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 일 예는 락토바실러스 속 균주를 유효성분으로 함유하는 질염 병원균의 증식 억제제, 상기 억제제를 포함하는 질염 치료 및/또는 예방용 약학적 조성물, 질염 개선, 치료 및/또는 예방용 식품 조성물 또는 세정제에 관한 것이다.
- [0024] 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*), 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 젠сени(*Lactobacillus jensenii*), 및 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*)일 수 있다.
- [0025] 구체적으로, 상기 균주는 기탁번호 KCTC18374P를 갖는 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) SNUV220, 기탁번호 KCTC18371P를 갖는 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175, 기탁번호 KCTC18372P를 갖는 락토바실러스 젠сени(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360, 및 기탁번호 KCTC18375P를 갖는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) SNUV281로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 락토바실러스 균주일 수 있다.
- [0026] 상기 균주들은 대전광역시 유성구에 소재한 미생물자원센터에 2015년 4월 7일과 4월 9일자로 기탁하여 기탁번호를 수여 받았다.
- [0027] 본 발명에 따른 락토바실러스 속 균주를 유효성분으로 함유하는 질염 병원균의 증식 억제제는 항바이러스 활성, 진균성 병원균에 대한 항진균 활성, 및 세균에 대한 항세균 활성을 나타내는 것으로서, 상기 질염 병원균은 칸디다(*Candida*) 속 균주, 가드너렐라(*Gardnerella*) 속 균주 및 스니치아(*Sneathia*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 균주에 의한 것일 수 있다.
- [0028] 예를 들어, 상기 칸디다 속 균주는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 또한, 상기 가드너렐라 속 균주는 가드너렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 또한, 상기 스니치아 속 균주는 스니치아 암니(*Sneathia amnii*) 또는 스니치아 생귀네젠스(*Sneathia sanguinogens*)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 피부, 정맥, 근육, 피하 등의 경로로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연고제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 경피제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제 등의 보조제를 추가로 함유하는 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 질염의 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 비경구용으로 제공하는 경우, 일 예로 액제, 겔(gel)제, 세정 조성물, 질 내 삽입용 정제, 좌제 형태, 크림, 연고, 드레싱 용액, 분무제, 기타 도포제등의 국소 투여제, 용액형, 현탁형, 유제형 등의 액상 제형일 수 있으며, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제, 크림, 연고, 젤리, 거품, 세척제 또는 질 삽입물, 바람직하게는 액제, 겔(gel)제, 세정 조성물, 질 내 삽입용 정제 등의 피부 외용제가 포함될 수 있다. 상기 제형은 일 예로 멸균수에 용해보조제, 유화제, pH 조절을 위한 완충제 등을 첨가하여 제조할 수 있다.

- [0036] 상기 비수성용제 또는 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물을 인간에게 적용하는 구체예에 있어서, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 투여될 수 있으나, 일반적으로 투여방식과 표준 약제학적 관행(standard pharmaceutical practice)을 고려하여 선택된 약제학적 담체와 혼합되어 투여될 수 있다.
- [0038] 예를 들면, 본 발명의 락토바실러스 속 균주 함유 조성물은 전분 또는 락토오스를 함유하는 정제 형태로, 또는 단독 또는 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강 내 또는 혀 밑 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 락토바실러스 속 균주 함유 약학적 조성물의 투여 용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다. 예컨대, 유효성분 함량을 기준으로 1일 투여량이 0.1 내지 500 mg/kg, 바람직하게는 0.5 내지 300 mg/kg일 수 있다. 상기한 투여량은 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다. 본 발명의 혼합 추출물 함유 조성물의 1일 투여량이 상기 투여 용량 미만이면 유의성 있는 효과를 얻을 수 없으며, 그 이상을 초과하는 경우 비경제적일 뿐만 아니라 상용량의 범위를 벗어나므로 바람직하지 않은 부작용이 나타날 우려가 발생할 수 있으므로, 상기 범위로 하는 것이 좋다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 일 예는 락토바실러스 속 균주를 유효성분으로 함유하는 질염 개선, 치료 및/또는 예방용 건강기능식품을 제공한다. 상기 건강 기능성 식품은 각종 음료, 발효유, 식품 첨가제 등일 수 있다.
- [0041] 상기 락토바실러스 속 균주는 상술한 바와 같다.
- [0042] 상기 건강 기능성 식품에 함유된 유효성분으로서의 락토바실러스 속 균주의 함량은 식품의 형태, 소망하는 용도 등에 따라 적절하게 특별한 제한이 없으며, 예컨대, 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 건강기능식품 중 음료에는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 락토바실러스 균주를 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한은 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0044] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히딘) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0045] 상기 외에 본 발명의 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, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0046] 그밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 일 예는 락토바실러스 속 균주를 유효성분으로 함유하는 질염 개선, 치료 및/또는 예방용 세정제품을 제공한다. 상기 세정제품은 고체화장비누, 손 세정제, 액체샴푸, 액체비누, 액체린스, 바디 세정제, 크림상 비누 등 일 수 있다.
- [0048] 상기 락토바실러스 속 균주는 상술한 바와 같다.
- [0049] 상기 세정제품은 이를 제형화하기 위한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 결합제, 활탁제, 현탁용제, 가용화제, 완충제, 보존제, 윤활제, 등장제, 부형제, 안정화제, 분산제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0050] 본 발명은 질 내 병원성 미생물 증식 억제 활성을 지닌 신규의 락토바실러스 속 균주, 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품, 및 세정제에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 인유두종 바이러스(HPV) 감염 및 세균성 질염의 발병과 관련된 스니치아 속(*Sneathia* spp.) 병원균에 대한 증식 억제능, 질염 병원균인 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*), 칸디다성 질염의 원인균인 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 등에 대한 증식 억제 효과를 나타내어 여성 질염의 예방과 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 0.1% 내지 4%(w/v)의 담즙산염이 포함된 배지에서 24시간 배양 후 성장물을 확인하여 내담즙성 측정된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) SNUV220 균주의 16S rDNA 동정 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175 균주의 16S rDNA 동정 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360 균주의 16S rDNA 동정 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) SNUV281 균주의 16S rDNA 동정 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175 균주와 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360 균주의 9종의 항생제에 대한 항생제 저항성 측정 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 4종의 락토바실러스 균주를 *Gardnerella vaginalis* 를 감염시킨 생쥐 동물 모델에 질 내 투여한 후 마이크로비움 분석을 실시한 결과로, *Gardnerella vaginalis* 의 상대 함량(relative abundance)을 투여 그룹별로 나타낸 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 4종의 락토바실러스 균주를 *Gardnerella vaginalis*를 감염시킨 생쥐 동물 모델에 질 내 투여한 후 마이크로비움 분석을 실시한 결과로, 투여 후 2일째의 질 내 균총 군집 구조의 변화를 나타낸 주성분 분석(PCoA) 그래프이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 4종의 락토바실러스 균주를 *Gardnerella vaginalis*를 감염시킨 생쥐 동물 모델에 질 내 투여한 후 마이크로비움 분석을 실시한 결과로, 각 그룹별 유의적으로 변화된 미생물군을 단변량 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0053] 실시예 1. 균주의 분리 및 동정

[0054] 건강한 여성의 질 내 균총에서 190여 개의 서로 다른 락토바실러스 균주를 분리하였다. 구체적으로, 질 내 균총 분리용 시료는 한국인 쌍둥이-가족 코호트 연구에 참여한 대상자 중 실험에 동의한 3쌍의 일란성 쌍둥이와 어머니를 포함한 9명의 대상자에서 수득하였으며, mid-vaginal의 질 내 swab 시료의 형태로 삼성병원에서 제공받았다 (IRB 번호, 144-2011-07-11).

[0055] Swab 시료는 modified Liquid Amies solution에 담긴 형태로 수득 후 4시간 안에 냉장 보관의 형태로 본 연구실에 운송되어 즉시 균주 분리에 사용하였다. 시료는 10⁻¹에서 10⁻⁸배까지 순차 희석하여 Chocolate agar, Rogosa agar, Columbia agar 세 종류의 배지에 도말한 후, 37, 혐기조건에서 48시간 동안 배양하였다.

[0056] 배양 후 순수 분리된 집락을 무작위적으로 선발하여 5%의 human serum을 포함한 Brain heart infusion(BHI) 액체 배지에서 진탕배양 하였고, 균체에서 genomic DNA를 추출하여 16S ribosomal RNA 유전자 타이핑을 위해 UnivFwd (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') primer와 UnivRev (5'- GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer

를 이용해 PCR반응을 실시하였다. PCR 반응물은 QIAquick PCR purification kit를 사용해 정제한 후, ABI3711 automatic sequencer를 이용해 염기서열 분석을 실시하였다.

[0057] 그 결과는 하기 표 1 및 2의 서열과 같으며, 이 서열정보를 이용하여 종전 결과보고서의 동정자료와 함께 Genbank의 BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)으로 다중 비교하여 최종적으로 균주의 동정을 완료하였다.

표 1

[0058]

균주명	명명	서열목록	서열번호
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SNUV220	TTACTTCGGCAATGACGTTAGGAAAGCGAGCGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTG CCCATAGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCAT GATCAGCTTTTAAAAGGGCGGCTAAGCTGTCGCTATGGGATGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAG TTGGTAAGGTAAGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCAC ATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAATGG ACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT GTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACCTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCA CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTATTG GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGA ACTGCATCGGAAACTGTTTTCTTGTAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGT GGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACG CTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTTAAACG ATGAGTGTCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC GCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGT GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTAGTGCC	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	SNUV175	CTGCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCG CATGAACAACGCTTAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAG CTTGTGGTGGGTTAAGCGCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGG CCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA ATGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAAGCTC TGTGTTAAAGAAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACAGAAA GTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTT ATTGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCG GAGAAGTGCATCGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAG CGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACT GACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTA AACGATGAGTGTAGTGTGG	2

표 2

[0059]

균주명	명명	서열목록	서열번호
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SNUV360	AAAAGCTACTTTCGCATGAAAGAAGTTTAAAAGGCGCGTAAAGCTGTCGCTAAAGGATGGACC TGCATGATCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACCGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTG AGAGACTGATCGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCG GATCGTAAAGCTCTGTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGT AATCAACCAGAAAGTCAAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGC GTTGTCCGATTTATTTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGATTGATAAGTCTGATGTGAAAGCC TTCGGCTCAACCGAAGAACTGCATCAGAAACTGTCAATCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA ACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCT CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGT AGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGGTTTCCGCTCTCAGTGTGCAGCT AACGCATTAAGCACTCCGCTGGGG	3
<i>Lactobacillus gasserii</i>	SNUV281	CGGATAACAACACTAGACGATGTCTAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTTCTGGATG GACCTGCGGTGCATTAGTGTGGTAAGGCAACCGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGA GTTGAGAGACTGATCGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTT TTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTTGA CGGTAATTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGT AAGCGTTGTCCGATTTATTTGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAA AGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTGAGTGCAGAAGAGGAGAG TGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGGTTTCCGCTCTCAGTGTGC AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGG	4

[0060] 그 결과는 표 1 내지 2 및 도 2 내지 5에서 보듯이 각각 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*), 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 종류로 확인되었다. 따라서, 이들을 각각 SNUV220, SNUV175, SNUV360, SNUV281로 명명하고, 대전광역시 유성구에 소재한 미생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC18374P(SNUV220, 4월 9일 기탁), KCTC18371P(SNUV175, 4월 7일 기탁), KCTC18372P(SNUV360, 4월 7일 기탁) 및 KCTC18375P(SNUV281, 4월 9일 기탁)를 부여 받았다.

[0061] 순수 분리 및 동정된 균주의 장기 보관을 위해서는 지수기에 도달한 배양액에 글리세롤(16% v/v)을 첨가하여 스탁을 만들어 -80에 보관하였다.

[0062] 각 균주의 질염 병원균 억제 활성 평가를 위한 세포 배양액 제조를 위해 혐기성 MRS 배지에 1%씩 접종하여 37에서 24시간 동안 배양한 후 미생물 세포를 13000Xg, 10분간 원심분리하여 제거하고, 상등액을 0.22um의 공극 크기를 갖는 멤브레인 필터에 통과시킨 후 실험 사용 전까지 -80에 보관하였다.

[0063] **실시에 2. 억제환 테스트(disk inhibition assay)**

[0064] 실시예 1에서 분리한 각각의 락토바실러스 균주를 MRS 액상배지 (Difco, USA)를 이용하여 37℃에서 20시간 배양하여 시험에 사용하였으며, 스니치아 속 균주와 가드네렐라 바지날리스 균주는 NYCIII 액체배지에 접종한 후 37℃에서 각각 48시간 또는 24시간 동안 혐기배양하여 시험에 사용하였다.

[0065] 실험에 사용된 스니치아 속 균주로는 미국 버지니아 커먼웰스 의과대학 (Virginia Commonwealth University School of Medicine) 에서 분리하여 논문으로 보고된 스니치아 앰니 (*Sneathia amnii*) 균주와, 본 연구진이 한국인 여성에서 분리한 스니치아 생귀네젠스 (*Sneathia sanguinegens*) 2종을 사용하였다. 실험에 사용된 가드네렐라 바지날리스 균주는 KCTC 미생물 자원센터에서 분양받은 KCTC5096 균주를 사용하였다.

[0066] 15ml MRS 한천배지를 플레이트에 분주하고 균한 후, 위에 스니치아 속 균주와 가드네렐라 바지날리스 균주를 5 X 10⁶ CFU/mL 수준으로 접종한 NYCIII soft 한천배지(0.75% 한천) 7ml를 중층하였다. 위층의 soft 한천배지가 굳으면 배지 위에 diffusion paper disk(직경 8mm)를 올려놓고 각각의 락토바실러스 균주의 배양물 약 20μl를 흡수시킨 후, anaerobic jar에 플레이트를 넣어 37℃에서 48시간 동안 혐기배양하였다. 배양 후 disk를 중심으로 나타나는 스니치아 속 균주와 가드네렐라 바지날리스 균주의 성장억제환의 크기를 측정하였다. 억제 활성은 disk를 중심으로 균주의 성장이 저해된 투명한환의 직경(mm)으로 나타내었다.

[0067] 분리된 락토바실러스 세포 배양액의 스니치아 속 균주와 가드네렐라 바지날리스 균주에 대해 억제환 테스트 (disk inhibition assay)를 실시하여 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

Species	Isolates_No	억제환 크기(disk inhibition, diameter, mm)		
		<i>Sn. Amnii</i>	<i>Sn. Sanguinegens</i>	<i>G. vaginalis</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SNUV220	23	46	19
<i>Lactobacillus fermentum</i>	SNUV175	-	19	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SNUV360	60	60	25
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SNUV281	-	23	19
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SNUV215	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	SNUV110	-	-	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SNUV212	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SNUV445	-	-	-

[0069] 상기 표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 배양액의 억제환 크기는 저해균주의 종류에 대해 약간의 차이를 보였으나, 스니치아와 가드네렐라 균주의 성장을 동시에 억제하는 4종의 락토바실러스 분리 균주, 즉 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) SNUV220, 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175, 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) SNUV281를 선발하였다. 특히, 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360

균주의 경우 스니치아와 가드네텔라 모두에 높은 저해능을 나타내었다.

실시예 3. 락토바실러스 분리균주의 Candida albicans 억제활성

상기 실시예 2에서 스크리닝한 4종류의 락토바실러스의 칸디다성 질염의 원인균인 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 균주에 대한 억제활성을 확인하기 위하여, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 균주 중 동물 실험 등에서 질염의 유발이 검증된 균주인 ATCC44858 균주(American Type Culture Collection)와 MYA4788 균주(American Type Culture Collection)를 억제 기능성 균주 선발을 위한 대상 균주로 선정하여 실험을 실시하였다.

구체적으로, 칸디다 균주의 경우, 96웰 디퓨전 테스트(96well diffusion test)를 이용해 평가하였다. 실험을 위해 96웰에 100ul의 YM배지, 100ul의 락토바실러스 세포 배양액을 넣고 희석한 칸디다 알비칸스 ATCC44858 균주(혹은 칸디다 알비칸스 M4788) 배양액 50ul를 넣은 후, 37에서 24시간 배양 후, 저해된 칸디다균의 증식을 600nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

Species	Isolates_No	24시간 배양 후 흡광도 (O.D. at 600nm)	
		Candida 44858 (co-culture)	Candida MYA4788 (co-culture)
음성 대조균		1	1
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SNUV220	0.028	0.007
<i>Lactobacillus fermentum</i>	SNUV175	-	0.003
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SNUV360	-	0.007
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SNUV281	0.012	0.010

상기 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 선발된 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) SNUV220, 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175, 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360, 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus gasseri*) SNUV281 모두 칸디다균에 대해서도 100%에 가까운 사멸능을 가지는 것을 확인하였으며, 따라서 상기 4가지 분리 균주 모두 질염 예방에 큰 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

실시예 4. 락토바실러스의 과산화수소 생성활성

과산화수소 생성 정도를 살피기 위하여 TMB배지를 하기 표 5와 같이 제조하였다 (1L 당 배지 조성).

표 5

Difco Lactobacilli MRS 배지	55 g
TMB	250 mg
Starch, soluble	100 g
Hemin solution	10 mL
Vitamin K solution	0.2 mL
Peroxidase solution (1 mg/mL)	10 mL

그 다음 상기 실시예 2에서 스크리닝한 4종류의 락토바실러스인 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) SNUV220, 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175, 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360, 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus gasseri*) SNUV281 각각을 MRS 역상배지를 사용하여 37℃에서 20시간 배양한 다음 TMB배지에 접종한 후 2일간 37℃에서 혐기 배양하였다. 배양 후 배지를 공기 중에 30분간 노출 시키고 균락이 푸른색으로 변화되는 정성 실험으로 평가하였다. 균락의 색깔이 푸른색으로 변하는 정도를 육안으로 관찰하여 그 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6

Species	Isolates_No	H ₂ O ₂ production
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SNUV220	-

<i>Lactobacillus fermentum</i>	SNUV175	+++
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SNUV360	+++
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SNUV281	++

[0080] 상기 표 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 각 균주의 과산화수소 생성능은 다른 패턴을 보였으며, 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175, 락토바실러스 쟈센니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) SNUV281은 과산화수소 생성이 활발하게 일어남을 확인할 수 있었다. 따라서, 선발 균주의 in vivo 억제능에 대해서는 작용기작 상의 차이가 나타날 것으로 사료된다.

[0081] **실시예 5. 락토바실러스의 내산성 평가**

[0082] 균주의 내산성은 MRS 액체 배지(pH 6.7)를 pH 2와 pH 3으로 적정하여 만든 산성 액체 배지에서 24시간 동안 37℃에서 배양 시 성장률과 pH 6.7의 기본 액체 배지 조건에서의 성장률을 비교하여 상대적으로 판별하여, 그 결과를 표 7에 나타내었다.

표 7

[0083]

Species	Isolates_No	pH 6.7	pH 3	pH 2
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SNUV220	+++	+	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	SNUV175	+++	+++	+
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SNUV360	+++	+	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SNUV281	++	+	+

[0084] 상기 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 4개 균주 모두 pH 3의 배양 조건에서 성장을 확인하였고, 특히 SNUV175 균주와 SNUV281 균주의 경우 pH2의 조건에서도 성장을 보여 강한 내산성을 가지고 있는 것을 확인하였다.

[0085] **실시예 6. 락토바실러스의 내담즙성 평가**

[0086] 내담즙성에 대해서는 0.1%에서 4%의 담즙산염이 포함된 배지에 24시간 이상 배양 후 성장률을 측정하여 그 결과를 표 8 및 도 1에 나타내었다.

표 8

[0087]

균주명	담즙산염 4%	담즙산염 2%	담즙산염 1%	담즙산염 0.5%	담즙산염 0.1%
음성대조군	100	100	100	100	100
<i>Lactobacillus crispatus</i> SNUV220	2.1	13.7	12.1	27.0	81.8
<i>Lactobacillus fermentum</i> SNUV175	75.1	88.0	96.5	104.9	127.1
<i>Lactobacillus jensenii</i> SNUV360	13.5	12.6	22.8	24.1	59.3
<i>Lactobacillus gasseri</i> SNUV281	2.2	16.2	15.3	24.4	76.9

[0088] 상기 표 8 및 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 전체적으로 0.1% 담즙산염 농도에 대해서, 4개 균주 모두 50% 이상의 성장률을 나타냈으며, 특히 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175 균주의 경우 0.5%에서 4%의 이르는 담즙산염 농도에서 비처리군 대비 104.9% 내지 75.1%의 성장률을 유지하여, 담즙산에 대한 매우 큰 저항성을 나타내었다. 따라서, 경구 섭취 시에도 높은 생존율을 유지할 것으로 기대된다.

[0089] **실시예 7. 락토바실러스의 항생제 저항성 평가**

[0090] 기능성 식품 소재 등으로 활용시의 안전성을 확인하기 위해 질 내 병원성 미생물 증식 억제 활성을 지닌 신규의 락토바실러스 속 분리균주의 항생제 저항성을 평가하였다. 현재 락토바실러스 계열 유산균의 식품 활용시의 항

생제 저항성에 관한 규격기준은 설정되어 있지 않아, 동물성 사료에 첨가되는 미생물의 항생제 저항성에 관한 국제 기준인 EFSA 기준을 바탕으로 평가하였다.

[0091] 구체적으로, 락토바실러스 균주의 항생제 저항성 평가는 국제 기준인 EFSA(European Food Safety Authority) 지침에 의거하여, ampicillin(AMP), chloramphenicol(CHR), clindamycin(CLM), erythromycin(ERY), gentamycin(GEN), kanamycin(KAN), streptomycin(STR), tetracycline(TET), vancomycin(VAN) 등 9종의 항생제를 대상으로 실시하였으며, 항생제 저항성 평가 시에 사용된 시험방법은 유산균의 항생제 저항성 시험을 위한 SOP 기준인 ISO 10932:2010 (IDF 223:2010)에 따라 실시하였으며, LSM-broth(90% IsoSensitest- and 10% MRS-broth; Oxoid)에 $\sim 6 \times 10^6$ cfu/ml로 각 락토바실러스 균주를 접종한 후, 각 항생제 별 MIC test strip (Liofilchem, Italy)을 올려놓고 37°C에서 48시간 동안 혐기배양 후 억제 정도 및 MIC를 평가하고, 그 결과를 표 9 및 도 6에 나타내었다.

표 9

항생제	<i>L. jensenii</i> SNUV360	EFSA guideline	<i>L. fermentum</i> SNUV175	EFSA guideline
AMP	0.094	1	0.125	2
CHL	3	4	2	4
CLM	0.38	1	0.064	1
ERY	0.19	1	0.38	1
GEN	2	16	1	16
KAN	4	16	24	32
STR	3	16	12	64
TET	0.75	4	2	8
VAN	0.5	2	64	Not required

[0093] 상기 표 9 및 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 4개의 분리 균주 중 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360 균주와 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175 균주의 경우 사용된 9종의 항생제에 대하여 모두 EFSA의 기준(상기 표 8에서 EFSA guideline)을 만족하는 항생제 감수성을 나타내어, 경구 섭취를 통한 건강기능식품으로의 활용가능성이 기대된다.

[0094] 실시예 8. 락토바실러스의 *Gardmerella vaginalis* 감염 억제능 평가

[0095] 암컷 생쥐(BALB/c mice)에 0.5mg의 베타 에스트라디올(beta-esteradiol 3-benzonate)을 복강 투여하여 호르몬 조절 및 estrous cycle을 유도하고, 3일 후에 병원균인 가드너렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)를 1×10^7 cfu 농도로 질 내로 직접 감염시켜 질염 동물 모델을 수립하였다.

[0096] 이후 10^8 내지 10^9 cfu에 해당하는 4종의 락토바실러스 분리 균주를 질 내 투여하고 (각 그룹당 7마리). 2일째에 질 내를 0.1 mL의 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 씻어낸 질 가검물에서 total DNA를 추출하여 마이크로비옴 군집분석 및 가드너렐라 바지날리스의 relative abundance를 측정하였다. 질 가검물에서의 DNA 추출은 Mobio PowerSoil DNA extraction kit를 사용하였고, 군집 분석을 위해 16S rDNA의 V4 영역에 해당하는 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하고, Illumina Miseq 장비를 이용해 차세대유전체염기서열 분석을 실시하였다.

[0097] 분석된 염기서열은 Qiime 분석 파이프라인을 통해 taxonomy 분석, α -diversity 및 그룹 간의 군집(community) 구조 차이를 나타내는 β -diversity 분석을 실시하였고, 락토바실러스 투여 시 Gardnerella vaginalis 수의 변화는 relative abundance(/%GV투여그룹)으로 평가하였다. 그 결과를 표 10 및 도 7 내지 도 9에 나타내었다.

[0098] 가드네렐라 바지날리스 투여군, 가드네렐라 감염 후 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) SNUV220 투여군, 가드네렐라 감염 후 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360 투여군, 가드네렐라 감염 후 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175 투여군, 가드네렐라 감염 후 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) SNUV281 투여군, 가드네렐라 감염 후 양성 대조군으로 메트로니다졸 (0.75%) 항생제 투여군을 각각 'GV', 'SNUV220', 'SNUV360', 'SNUV175', 'SNUV281' 및 'MTZ'로 표시하였다.

표 10

[0099]

	Relative abundance (/%GV group)
GV	100
SNUV220	18.0
<i>L. jensenii</i> SNUV360	5.3
<i>L. fermentum</i> SNUV175	2.6
SNUV281	6.9
MTZ	74.9

[0100]

표 10 및 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) SNUV220, 락토바실러스 젠сени(*Lactobacillus jensenii*) SNUV360, 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) SNUV175, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) SNUV281 균주는 가드넬라 바지날리스균을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

[0101]

도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 4종의 균주를 투여하였을 때 가드넬라 바지날리스 감염 후의 질 내 균총의 군집 구조가 모두 변화하였음을 알 수 있었다. 가드넬라 및 락토바실러스 투여 후 군집 구조의 변화는 Unweighted UniFrac distance를 이용해 측정하였으며, 도 8의 범례에 표기된 것처럼 가드넬라 감염균은 오렌지색, 가드넬라 감염 후 락토바실러스 SNUV220 투여균은 녹색, 가드넬라 감염 후 락토바실러스 SNUV360 투여균은 보라색, 가드넬라 감염 후 락토바실러스 SNUV175 투여균은 노란색, 가드넬라 감염 후 락토바실러스 SNUV281 투여균은 하늘색 및 가드넬라 감염 후 양성대조군인 메트로니다졸 투여균은 분홍색의 점으로 각각 표시하였다. 현재 질염 질환의 치료제로 사용되는 양성 대조군인 메트로니다졸의 질 내 투여 시에는 락토바실러스 균주의 투여균에서 보여진 군집구조의 변화는 나타나지 않았다.

[0102]

가드넬라 감염 후 락토바실러스를 투여하면 질 내 미생물의 군집 구조가 변화하는 것을 확인함과 더불어, 각 투여균에서 유의적으로 변화된 미생물의 종(species)이 무엇인지를 LefSe 프로그램을 통해 분석하였다.

[0103]

그 결과는 도 9의 cladogram과 같다. 위 분석을 통해 가드넬라만을 감염시킨 그룹(C)에서 유의적으로 *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus* spp.가 증가하였고, 본 발명의 락토바실러스 균주를 가드넬라 감염 후에 1회 투여한 그룹(D, E, G)에서는 유의적으로 락토바실러스 균주가 증가함을 확인함으로써 락토바실러스의 투여가 질 내 군집 구조를 바꾸고 질 내 균총에 영향을 미치고 있음을 확인하였다.

수탁번호

[0104]

기탁기관명 : 미생물자원센터

수탁번호 : KCTC18374P

수탁일자 : 20150409

기탁기관명 : 미생물자원센터

수탁번호 : KCTC18371P

수탁일자 : 20150407

기탁기관명 : 미생물자원센터

수탁번호 : KCTC18372P

수탁일자 : 20150407

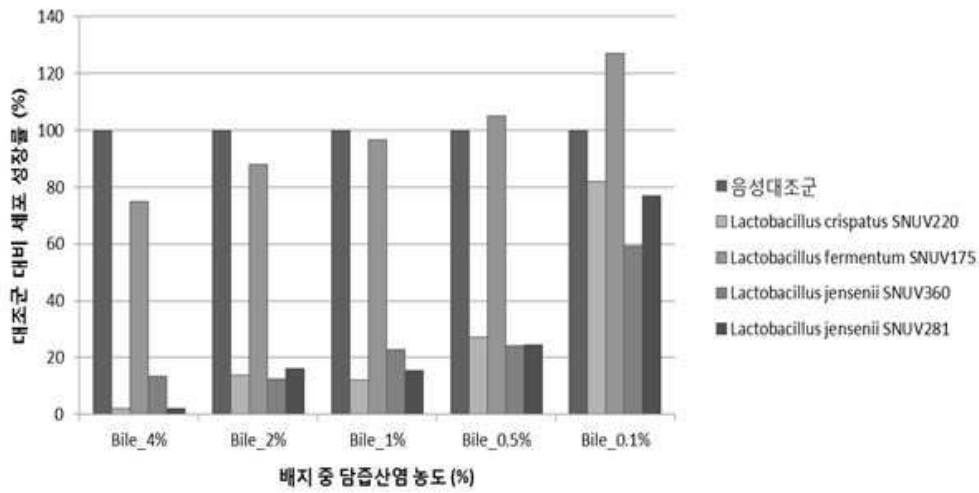
기탁기관명 : 미생물자원센터

수탁번호 : KCTC18375P

수탁일자 : 20150409

도면

도면1



도면2

Results of Identify Analysis

Tasks Icon

- View hit sequence
- Perform CompGen Analysis against the genus
- View pairwise alignment
- Link to J.P. Euzéby's site
- Taxonomic group information

Columns for display

Taxonomy Accession Pairwise Similarity Diff/Total nt Completeness

Hide all Show all

Functions

CSV file Excel file FASTA(.gz) Publish Editor file

Identification of SNUV220 [Edit](#)

Length of sequence : 650bp [View query sequence](#)

Completeness : 43.7% (167 - 917)

Tasks	Rank	Name	Strain	Authors
	1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSM 20504(T)	(Brygoo and Aladame 1953) Moore and Holdeman 1970

Taxonomy	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt	Completeness (%)
Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Lactobacillales: Lactobacillaceae: Lactobacillus: Lactobacillus crispatus:	Y17362	100.00	0/650	100

도면3

Results of Identify Analysis

Tasks Icon

- View hit sequence
- Perform CompGen Analysis against the genus
- View pairwise alignment
- Link to J.P. Euzéby's site
- Taxonomic group information

Columns for display

Taxonomy Accession Pairwise Similarity Diff/Total nt Completeness


Hide all Show all

Functions

[CSV file](#) [Excel file](#) [FASTA\[2\]](#) [Publish](#) [Edit/Star file](#)

Identification of SNUV175 [Edit](#)

Length of sequence :715bp [View query sequence](#)

Completeness :47.7%  (128 - 843)

Tasks	Rank	Name	Strain	Authors
	1	Lactobacillus fermentum	NBRC 3956	Bejerinck 1901
	2	Lactobacillus fermentum	CECT 562(T)	Bejerinck 1901

Taxonomy	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt	Completeness (%)
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus; Lactobacillus fermentum	AP008937	99.86	1/715	100
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus; Lactobacillus fermentum	AJ575812	99.86	1/715	100

도면4

Results of Identify Analysis

Tasks Icon

- View hit sequence
- Perform CompGen Analysis against the genus
- View pairwise alignment
- Link to J.P. Euzéby's site
- Taxonomic group information

Columns for display

Taxonomy Accession Pairwise Similarity Diff/Total nt Completeness


Hide all Show all

Functions

[CSV file](#) [Excel file](#) [FASTA\[2\]](#) [Publish](#) [Edit/Star file](#)

Identification of SNUV360 [Edit](#)

Length of sequence :718bp [View query sequence](#)

Completeness :48.4%  (167 - 885)

Tasks	Rank	Name	Strain	Authors
	1	Lactobacillus formicis	TV1018(T)	Dicks et al. 2000
	2	Lactobacillus jensenii	ATCC 25258(T)	Gasser et al. 1970

Taxonomy	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt	Completeness (%)
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus; Lactobacillus formicis	Y18654	99.86	1/718	95.5
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus; Lactobacillus jensenii	AF243176	99.86	1/717	98.9

도면5

Results of Identify Analysis

Tasks Icon

- View hit sequence
- Perform CompGen Analysis against the genus
- View pairwise alignment
- Link to J.P. Euzéby's site
- Taxonomic group information

Columns for display

Taxonomy Accession Pairwise Similarity Diff/Total nt Completeness

Hide all Show all

Functions

[CSV file](#) [Excel file](#) [FASTA\[22\]](#) [Publish](#) [Edit/Show file](#)

Identification of SNUV281 [Edit](#)

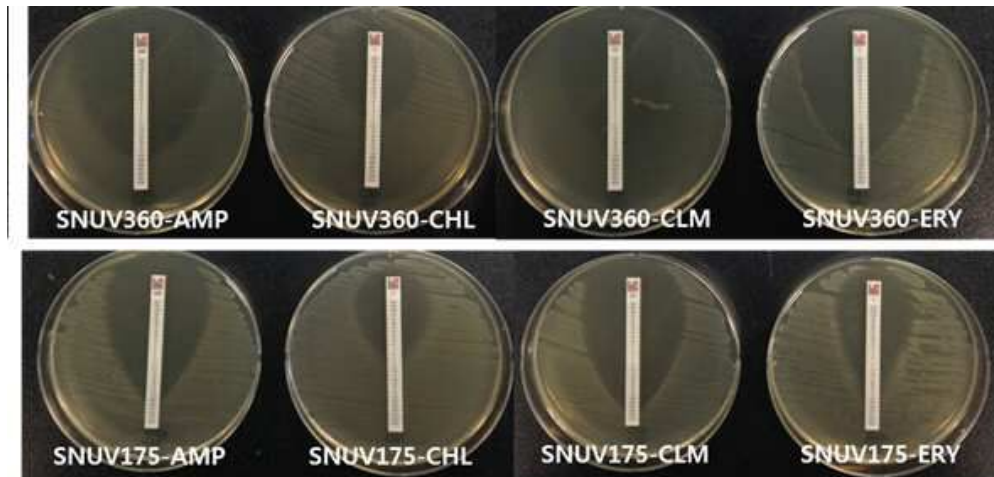
Length of sequence :722bp [View query sequence](#)

Completeness :48.3% (1170 - 892)

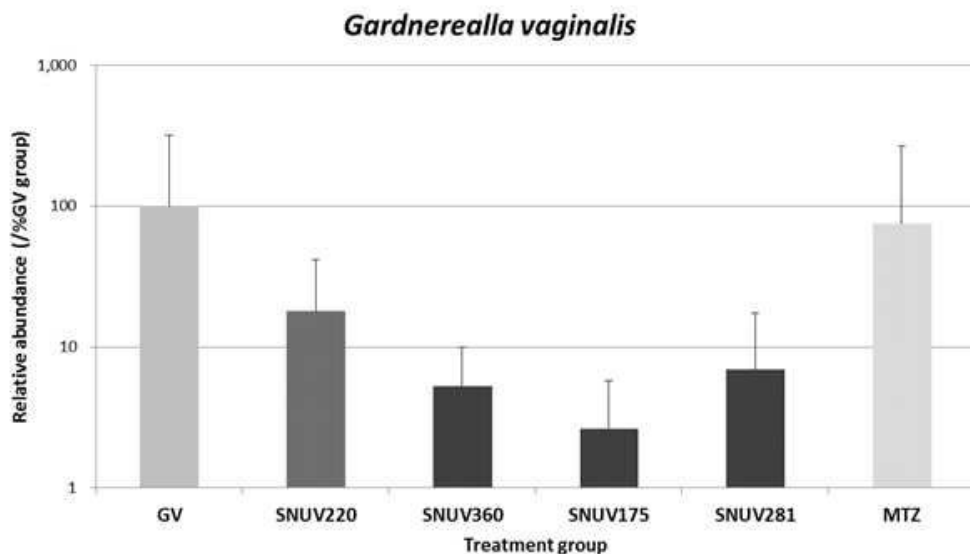
Tasks	Rank	Name	Strain	Authors
	1	Lactobacillus gasseri	ATCC 33223(T)	Lauer and Kandler 1980

Taxonomy	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt	Completeness (%)
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus; Lactobacillus gasseri;	CP000413	99.86	1/722	100

도면6



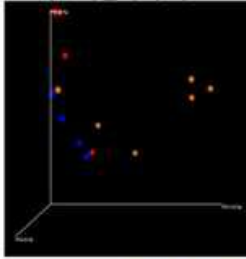
도면7



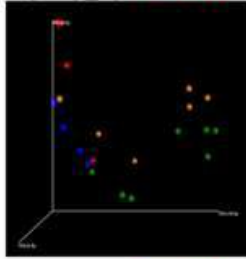
도면8

Unweighted UniFrac

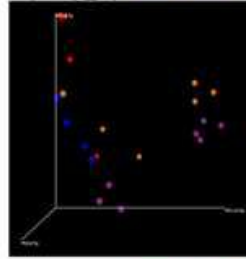
가드네텔라 투여



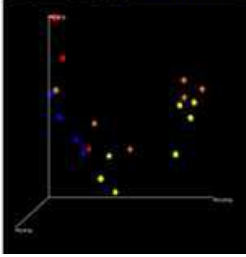
가드네텔라+SNUV220



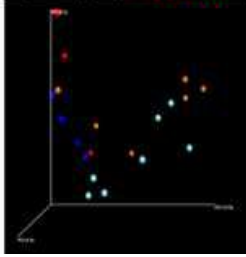
가드네텔라+SNUV360



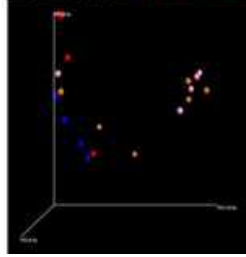
가드네텔라+SNUV175



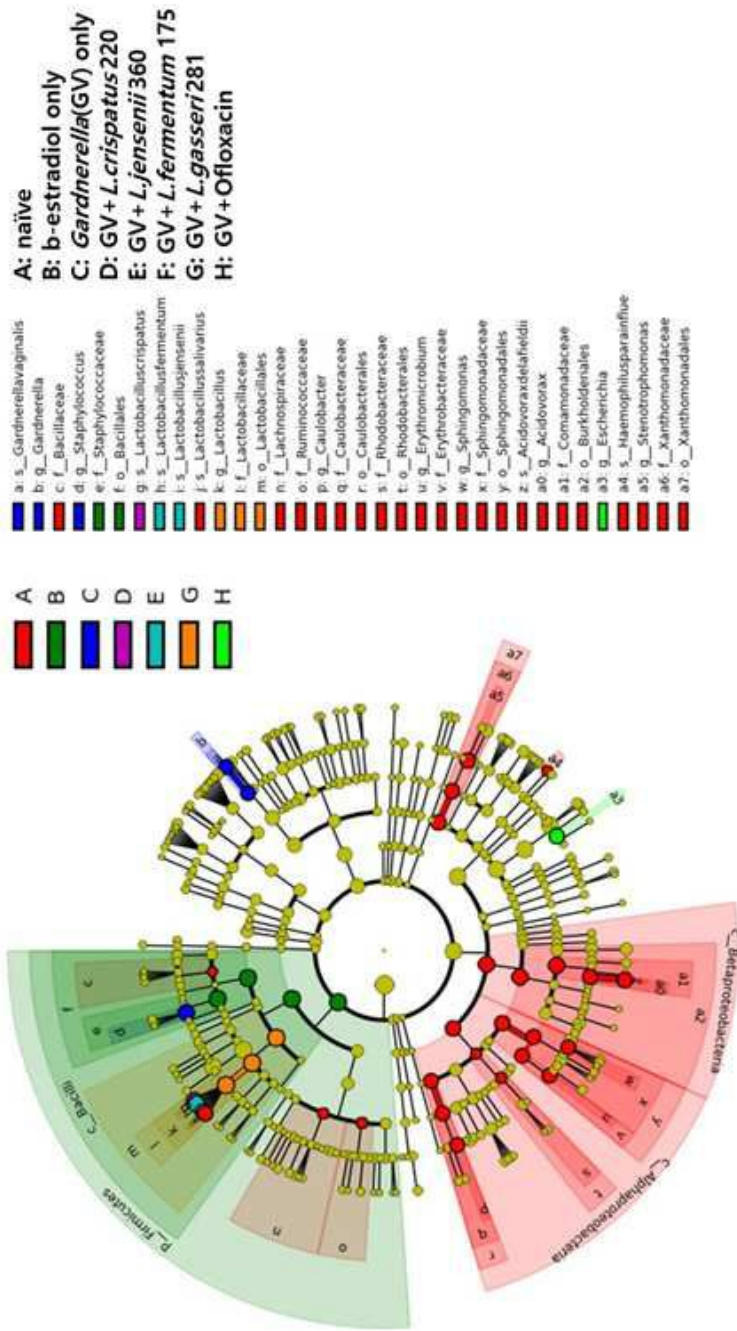
가드네텔라+SNUV220



가드네텔라+메트로니다졸



도면9



서열목록

- <110> KoBioLabs, Inc.
- <120> Lactobacilli having inhibitory effect against pathogenic microorganisms in vagina
- <130> DPP20160261KR
- <160> 4
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 944
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus crispatus
 <400> 1

ttacttcggc aatgacgta gaaagcgag cggcggatgg gtgagtaaca cgtggggaac 60
 ctgccccata gtctgggata ccacttggaa acaggtgcta ataccggata agaaagcaga 120
 tcgcatgatc agcttttaaa aggcggcgta agctgtcgct atgggatggc cccgcggtgc 180

attagctagt tgtaaggta aagccttacc aaggcgatga tgcatagccg agttgagaga 240
 ctgatcggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc agcagtaggg 300
 aatcttccac aatggacgca agtctgatgg agcaacgccg cgtgagtga gaaggttttc 360
 ggatcgtaaa gctctgttgt tggatgaaga gtagtagggt agtaactggc ctttatttga 420
 cggaatcaa ccagaaagtc acggctaact acgtgccagc agccgcgta atacgtaggt 480
 ggcaagcgtt gtccgattt attgggcgta aagcgagcgc aggcggaaga ataagtctga 540
 tgtgaaagcc ctccgcttaa ccgaggaact gcatcggaaa ctgtttttct tgagtgcaga 600

agaggagagt ggaactccat gtgtagcggg ggaatgcgta gatatatgga agaacaccag 660
 tggcgaagge ggtctctggt tctgcaactg acgtgagge tcgaaagcat gggtagcgaa 720
 caggattaga taccttgta gtccatgccg taaacgatga gtgctaagtg ttgggaggtt 780
 tccgcctctc agtctgcag ctaacgatt aagcactccg cctggggagt acgaccgcaa 840
 ggttgaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt 900
 cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatctag tgcc 944

<210> 2
 <211> 715
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus fermentum
 <400> 2

ctgcccagaa gcgggggaca acatttggaa acagatgcta ataccgata acaacgttgt 60
 tcgcatgaac aacgcttaaa agatggcttc tcgctatcac ttctggatgg acctgcggtg 120
 cattagcttg ttggatgggt aacgcctac caaggcgatg atgcatagcc gagttgagag 180
 actgatcggc cacaatggga ctgagacacg gccatactc ctacgggagg cagcagtagg 240
 gaatcttcca caatgggcgc aagcctgatg gagcaacacc gcgtgagtga agaagggttt 300
 cggctcgtaa agctctgttg ttaaagaaga acacgtatga gagtaactgt tcatacgttg 360

acggtattta accagaaagt cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg 420
 tggcaagcgt tatccggatt tattgggcgt aaagagagtg caggcggttt tctaagtctg 480
 atgtgaaagc cttcggctta accggagaag tgcacgga actggataac ttgagtgcag 540
 aagagggtag tggaactcca tgtgtagcgg tggaatgcgt agatataatg aagaacacca 600
 gtggcgaagg cggctacctg gtctgcaact gacgctgaga ctgaaagca tggtagcga 660
 acaggattag ataccctggt agtccatgcc gtaaaccgat agtgctaggt gttgg 715

<210> 3
 <211> 718
 <212> DNA

<213> *Lactobacillus jensenii*

<400> 3
 aaaagctact ttcgatgaa agaagtttaa aaggcgcggt aagctgtcgc taaaggatgg 60
 acctgcgatg cattagctag ttgtaaggt aacggcttac caaggcgatg atgcatagcc 120
 gaggttgagag actgatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaacctc ctacgggagg 180
 cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc gcgtgagtga 240
 agaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg ttggtgaaga aggatagagg tagtaactgg 300
 cctttatttg acggtaatca accagaaagt cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt 360

aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg caggcggatt 420
 gataagtctg atgtgaaagc cttcggctca accgaagaac tgcacgaa actgtcaatc 480
 ttgagtgcag aagaggagag tggaactcca tgtgtagcgg tggaatgcgt agatataatg 540
 aagaacacca gtggcgaagg cggctctctg gtctgtaact gacgctgagg ctgaaagca 600
 tggtagcga acaggattag ataccctggt agtccatgcc gtaaaccgat agtgctaagt 660
 gttggagggt ttccgcctct cagtgtgca gctaacgcat taagcactcc gcctgggg 718

<210> 4
 <211> 722
 <212> DNA

<213> *Lactobacillus gasseri*

<400> 4
 cggataaaa cactagacgc atgtctagag tttaaaagat ggttctgcta tcaactcttg 60
 atggacctgc ggtgcattag ctagtgtgta aggcaacggc ttaccaaggc aatgatgcat 120
 agccgagttg agagactgat cggccacatt gggactgaga cacggcccaa actcctacgg 180
 gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg acgcaagtct gatggagcaa cgccgcgtga 240

gtgaagaagg gtttcggctc gtaaagctct gttggtagtg aagaaagata gaggtagtaa	300
ctggccttta ttgacggta attacttaga aagtcacggc taactacgtg ccagcagccg	360
cggtaatacg taggtggcaa gcgttgteccg gatttattgg gcgtaaagcg agtgcagggc	420
gttcaataag tcigatgtga aagccttcgg ctcaaccgga gaattgcatc agaaactgtt	480
gaacttgagt gcagaagagg agagtggaac tccatgtgta gcggtggaat gcgtagatat	540
atggaagaac accagtggcg aagcggctc tctggtctgc aactgacgct gaggctcgaa	600
agcatgggta gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca tgccgtaaac gatgagtgct	660
aagtgttggg aggtttccgc ctctcagtgc tgcagctaac gcattaagca ctccgctgg	720
gg	722

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

상기 락토바실러스 균주

【변경후】

상기 락토바실러스 속 균주