(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0050294
(43) 공개일자 2019년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/745 (2014.01) *A61K 35/747* (2014.01)
C12R 1/01 (2006.01) *C12R 1/25* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0132834
(22) 출원일자 2018년11월01일
심사청구일자 2018년11월01일
(30) 우선권주장
1020170145420 2017년11월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김동현
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
한명주
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
(74) 대리인
특허법인 하나

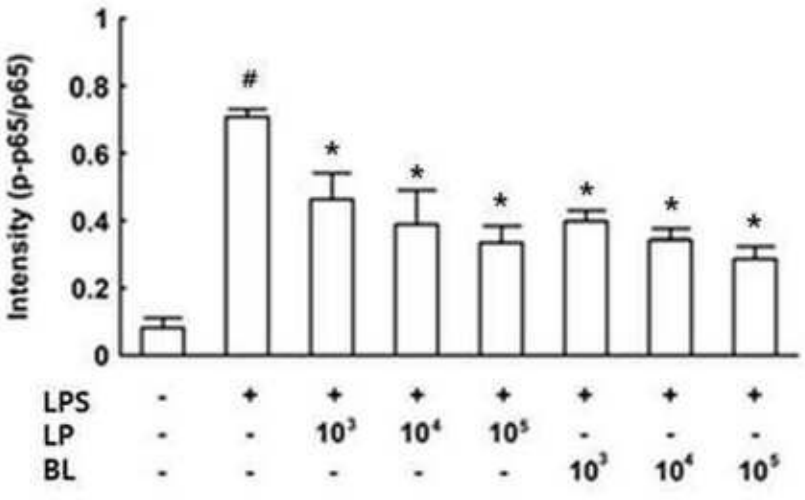
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **신규 유산균 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼 NK3 및 비피도박테리움 롱검 NK49에 관한 것으로, 구체적으로 여성 갱년기 질환의 예방 및 치료에 유용한 신규한 유산균을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 35/745 (2013.01)
A61K 35/747 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
C12R 1/01 (2013.01)
C12R 1/25 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A5A2014768
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업
연구과제명 뉴로바이오타 연구센터
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P, 비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 여성 갱년기 질환은 염증 질환, 골다공증 또는 비만인 것인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 염증 질환은 관절염, 통풍, 간염, 천식, 비만, 각막염, 위염, 장염, 신장염, 대장염, 당뇨, 결핵, 기관지염, 흉막염, 복막염, 척추염, 췌장염, 염증 통증, 요도염, 방광염, 질염, 동맥경화증, 패혈증, 화상, 피부염, 치주염 및 치은염을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 염증 질환은 질염 또는 대장염인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 혼합물은 락토바실러스 플란타럼 NK3 KCCM12089P 및 비피도박테리움 롱검 NK49 KCCM12088P 가 1 : 1 내지 4 : 1의 집락형성단위 (CFU,Colony Forming Unit) 비로 혼합된 것인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 KCCM12089P 및 비피도박테리움 롱검 NK49 KCCM12088P은 각각 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

락토바실러스 플란타럼 NK3 KCCM12089P, 비피도박테리움 롱검 NK49 KCCM12088P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 여성 갱년기 질환은 염증 질환, 골다공증 또는 비만인 것인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 염증 질환은 관절염, 통풍, 간염, 천식, 비만, 각막염, 위염, 장염, 신장염, 대장염, 당뇨, 결핵, 기관지염, 흉막염, 복막염, 척추염, 췌장염, 염증 통증, 요도염, 방광염, 질염, 동맥경화증, 패혈증, 화상, 피부염, 치주염 및 치은염을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 염증 질환은 질염 또는 대장염인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 혼합물은 락토바실러스 플란타럼 NK3 KCCM12089P 및 비피도박테리움 롱검 NK49 KCCM12088P 균주가 1 : 1 내지 4 : 1의 집락형성단위 (CFU,Colony Forming Unit) 비로 혼합된 것인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 KCCM12089P 및 비피도박테리움 롱검 NK49 KCCM12088P은 각각 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품.

청구항 13

락토바실러스 플란타럼 NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P.

청구항 14

비피도박테리움 롱검 NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P는 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 락토바실러스 플란타럼 NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P은 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 비피도박테리움 롱검 NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼 NK3 및 비피도박테리움 롱검 NK49에 관한 것으로, 구체적으로 여성 갱년기 질환의 예방 및 치료에 유용한 신규한 유산균을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생체가 가지고 있는 장내 미생물체는 개인별로 분류가 가능하며, 이들 미생물체는 장관 내에서 여러 대사(metabolism)에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 비만과 관련한 장내미생물체는 잘 알려져 있는 분야 중의 하나이며 비만인 사람의 경우 탄수화물, 지방 및 아미노산 등의 대사에 풍부하게 관련된 장내미생물체를 가지고 있는 것으로 보고되었다. 또한, 장내미생물의 대사에 의해 생산되는 부티르산(butyrate)이나 아세테이트(acetate)와 같은 물질들은 장관 면역의 중요 인자로서 helper T cell의 생산 조절이나 G-protein receptor43(GPR43) 등과의 반응을 통해 병원균 감염으로부터 생체를 보호하는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 장내 미생물은 장염(inflammatory bowel disease)이나 대장암(colon cancer)과 같은 대장 내의 각종 질병 외에도 다양한 질환에 대한 원인으로 지목되고 있다.

[0003] 최근 인체를 대상으로 한 연구에서 폐경 전과 폐경 후 여성들의 호르몬 수치와 장내미생물의 상관성을 규명하고자 하는 연구가 시도되었으나, 구체적인 미생물 변화를 찾기보다는 전체적인 미생물 수의 감소 정도만을 확인하는 수준에 그쳤다. 그러나, 이러한 연구는 호르몬의 변화가 장내 미생물의 변화를 야기함을 나타내는 것으로, 장내 미생물이 장간순환(enterohepatic circulation)을 통해 생체의 에스트로겐을 조절하는데 영향을 미치는 것이 보고되기도 하였다.

[0004] 생체 내에서 높은 수준의 에스트로겐은 유방암의 발병률을 높이며, 낮은 레벨의 에스트로겐은 골다공증의 발병률을 높이는 것으로 알려져 있어 체내에 적정량의 에스트로겐 수치를 조절하는 것이 중요하게 생각되고 있으나, 여성의 갱년기에는 이러한 조절이 어려운 문제가 있다.

[0005] 이에 따라, 생체와 장내 미생물의 상호작용을 통해 여성 호르몬의 일종인 에스트로겐을 조절하고, 나아가 여성

의 갱년기 질환을 치료하고 갱년기 증상을 개선하기 위한 연구가 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Sexually Transmitted Diseases, November 2006, vol 33, No. 11, 663-665.

(비특허문헌 0002) Bacteria and the Fate of Estrogen in the Environment 2017, vol 24, Issue 6

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 신규한 락토바실러스 플란타럼 및 비피도박테리움 롱검 유산균을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 신규한 유산균을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 유산균을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)(기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2017.08.04, 수탁번호: KCCM12089P)을 제공한다.

[0011] 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK3은 전통 발효식품인 김치로부터 분리 및 동정된 락토바실러스 플란타럼의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK3의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 1과 같다. 따라서, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)은 서열번호 1의 16S rDNA을 포함할 수 있다.

[0013] 상기 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 락토바실러스 플란타럼 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 락토바실러스 플란타럼과 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)으로 동정하고, 락토바실러스 플란타럼 NK3으로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2017년 8월 4일자로 기탁하였다(수탁번호 KCCM12089P).

[0014] 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK3은 그람양성균이고, 세포의 형태는 간균이다. 보다 구체적인 락토바실러스 플란타럼 NK3의 생리학적 특성은 당해 기술분야의 통상의 방법에 따라 분석할 수 있고, 그 결과는 하기 표 2와 같은 것으로 나타났다. 구체적으로, 락토바실러스 플란타럼 NK3은 탄소원으로 L-아라비노오스, D-리보오스, D-갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, 만니톨, 솔비톨, α-메틸-D-만노사이드, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스큘린, 살리신, 셀로비오스, 말토오스, 락토오스, 멜리비오스, 수크로오스, 트레할로오스, 멜리지토오스, 겐티오비오스, D-투라노오스 및 글루코네이트를 이용할 수 있다.

[0015] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49)(기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2017.08.04, 수탁번호: KCCM12088P)을 제공한다.

[0016] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK49은 인간의 분변으로부터 분리 및 동정된 비피도박테리움 롱검의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK49의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 2와 같다. 따라서, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49)는 서열번호 2의 16S rDNA을 포함할 수 있다.

[0018] 상기 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 비피도박테리움 롱검 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 비피도박테리움 롱검과 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*)으로 동정하고, 비피도박테리움 롱검 NK49로 명명하였으며, 한국미생물보존센

터에 2017년 8월 4일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCCM12088P).

[0019] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK49는 그람양성균이고, 세포의 형태는 간균이다. 보다 구체적인 비피도박테리움 롱검 NK49의 생리학적 특성은 당해 기술분야의 통상의 방법에 따라 분석할 수 있고, 그 결과는 하기 표 3와 같은 것으로 나타났다. 구체적으로, 비피도박테리움 롱검 NK49은 탄소원으로 L-아라비노오스, D-리보오스, D-자일로오스, D-갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, 만니톨, 솔비톨, α-메틸-D-글루코사이드, 에스큘린, 살리신, 말토오스, 락토오스, 멜리비오스, 수크로오스, 라피노오스 및 D-투라노오스를 이용할 수 있다.

[0020] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P, 비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에서, “여성 갱년기 질환” 이란, 여성의 생식기능이 소실하는 징후로 나타나는 월경폐지의 시기에 나타나는 모든 질환을 말한다. 갱년기가 되면 난소 기능의 실조로 월경의 양이나 주기가 불규칙하게 되고, 수개월에서 3년에 걸친 여포호르몬(에스트로겐)의 분비저하로 월경이 폐지되며, 간뇌의 자율신경중추에 작용하여 자율신경계의 실조를 일으켜 갱년기장애의 원인이 된다. 또한 뇌하수체 전엽의 기능실조로 부신피질 기능을 항진시켜 남성화를 보이며, 갑상선호르몬의 영향으로 갑상선 기능에 이상을 가져와 비만을 초래하는 등 갱년기 특유의 기능실조가 나타난다. 예컨대, 일과성열감(一過性熱感), 동계(動悸:심장의 고동이 보통 때보다 심하여 가슴이 울렁거리는 일), 현기, 이명(耳鳴), 고혈압, 소화기장애, 두통, 기억력감퇴, 우울증 등의 증세가 나타날 수 있으며, 체중증가, 비만, 염증, 골다공증 등이 나타난다.

[0022] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 락토바실러스 플란타럼 NK3 및 비피도박테리움 롱검 NK49 균주는 1 : 1 내지 4 : 1의 집락형성단위(CFU, Colony Forming Unit) 비로 혼합된 것일 수 있다.

[0023] 본 발명 일 실시예에서는 락토바실러스 플란타럼 NK3 및 비피도박테리움 롱검 NK49 균주 각각 뿐 아니라 상기 균주들의 혼합물 역시 여성 갱년기 질환에 대해 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 특히 락토바실러스 플란타럼 NK3 및 비피도박테리움 롱검 NK49 균주는 1 : 1 내지 4 : 1의 집락형성단위(CFU, Colony Forming Unit) 비로 혼합된 혼합물 역시 에스트로겐과 유사한 에스트라디올(estradiol)을 투여한 양성 대조군과 유사한 수준의 골다공증 지표 개선효과가 나타났으며(도 11 내지 도 13, 표 8), 비만 지표가 개선되도록 하는 효과를 나타냄을 확인하였다(도 14 내지 도 16, 표 9).

[0024] 본 발명의 "락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)"은 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0025] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 락토바실러스 플란타럼 NK3 및 비피도박테리움 롱검 NK49 KCCM12088P은 각각 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물일 수 있으나, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 락토바실러스 플란타럼 NK3의 형태라면 제한없이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명에서 용어, "배양물"은 유산균을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 사물을 의미하며, 본 발명에서는 신규한 유산균을 포함하는 개념이다.

[0027] 본 발명의 "비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49)"은 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0028] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 비피도박테리움 롱검 NK49는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물일 수 있으나, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 락토바실러스 플란타럼 NK3의 형태라면 제한없이 사용될 수 있다.

[0029] 또한, 구체적으로, 본 발명에서 여성 갱년기 질환은 염증 질환, 골다공증 또는 비만일 수 있다.

[0030] 본 발명의 염증 질환은 관절염, 통풍, 간염, 천식, 비만, 각막염, 위염, 장염, 신장염, 대장염, 당뇨, 결핵, 기관지염, 흉막염, 복막염, 척추염, 췌장염, 염증 통증, 요도염, 방광염, 질염, 동맥경화증, 패혈증, 화상, 피부염, 치주염 및 치은염을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 특히 질염 또는 대장염일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에서는 생쥐로부터 분리된 대식세포에 염증 반응 유도물질인 리포폴리사카라이드와 함께 락토바실러스 플란타럼 NK3 또는 비피도박테리움 롱검 NK49의 처리시 염증반응이 현저히 억제됨을 확인하였다(도 1 및 2). 이를 통해, 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 및 비피도박테리움 롱검 NK49을 포함하는 약학 조성물이 염증 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에서는 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물이 질염 유발 세균인 가드네렐라 바지날리스 및 아토포비움 바지내에 대하여 성장 억제 효과를 나타내고, 상기 가드네렐라 바지날리스의 감염을 억제하는 효과가 우수함을 확인하였다(도 3 내지 5). 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 질염이 유도된 동물모델에 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 투여한 결과, 질염 세균에 의해 발생한 부종을 동반한 염증 및 질염 세균의 수가 감소하고, 질의 대표적인 염증 지표인 미엘로페록시다아제의 활성이 감소하고, 질 점막에서TNF-α 의 발현이 증가하며, IL-10의 발현이 증가함을 확인하였다(도 6 내지 10). 이를 통해, 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 포함하는 약학 조성물이 구체적인 염증 질환인 질염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0033] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 대장염이 유도된 동물모델에 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 투여한 결과, 대장의 길이가 회복하고, 미엘로퍼옥시다아제의 활성이 감소하며, 염증 지표인 사이토카인들의 발현량 및 활성이 억제됨을 확인하였다(표 6). 이를 통해, 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 포함하는 약학 조성물이 구체적인 염증 질환인 대장염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0034] 또한, 본 발명 일 실시예에서는 골다공증이 유도된 동물모델에 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 투여한 결과, 에스트로겐과 유사한 에스트라디올(estradiol)을 투여한 군과 유사한 수준으로 자궁 및 대퇴골의 무게가 증가하고(도 11 및 도 12), 대퇴골의 길이가 감소되어 있음을 확인하였다(도 13). 또한, 에스트라디올을 투여한 군과 유사한 수준의 AP 효소(alkaline phosphatase) 활성이 나타났으며, 난소가 제거된 동물모델 대조군에 비해 AP 효소 활성이 감소됨을 확인하였다. 나아가, 오스테오칼신 및 인의 농도 역시 감소되고, 칼슘의 농도가 증가된 것을 확인하였다.

[0035] 또 다른 본 발명 일 실시예에서는 비만이 유도된 동물모델에 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 투여한 결과, 에스트라디올을 투여한 군과 유사한 수준의 체중 감소가 나타났으며, AMPK의 활성과 함께(도 15), 난소가 제거된 동물모델 대조군에 비해 SREBP-1c를 발현이 억제되며 PGC-1α 발현이 유도되는 것을 확인함으로써 비만이 억제됨을 확인하였다(표 9).

[0036] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 신규한 유산균 및 이들의 혼합물이 에스트로겐과 유사한 수준으로 여성 갱년기 질환에 대한 치료 및 개선효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

[0037] 본 발명에 따른 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 신규한 유산균의 활성을 저해하지 않는 범위 내에서 추가적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.

[0038] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 약제학적으로 유효한 양이어야 한다. "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 염증 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효용량 수준은 제제화 방법, 환자의 상태 및 체중, 환자의 성별, 연령, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간, 배설 속도, 반응 감응성 등과 같은 요인들에 따라 당업자에 의해 다양하게 선택될 수 있다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 처리의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 ㎎/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 ㎎/kg으로 투여할 수 있다. 상기와 같이 투여제를 투여할 경우, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 1일 $1x10^{2}$ CFU/kg 내지 $1x10^{11}$ CFU/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물은 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있으나 경구 투여가 바람직하다. 질염의 예방 및 치료를 위해서는 질 내로 투여할 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제 등이 포함될 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀젼, 점안제, 안연고제, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 안연고제, 점안제, 파스타제 또는 카타플 라스마제의 약제학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 국소 투여를 위한 제제는 임상적 처방에 따라 무수형 또는 수성형일 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3), 비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49) 또는 이들의 혼합물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0042] 본 발명에 "락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)","비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49)", "투여", “상기 신규 균주들의 혼합비율” 및 " 여성 갱년기 질환" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0043] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 신규한 유산균을 이용한 치료로 유익한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 대상체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 대상체들에는 염증 질환의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 대상체들이 모두 포함될 수 있다.

[0044] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 플란타럼 NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P, 비피도박테리움 롱검 NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공한다.

[0045] 본 발명의 "락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)","비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49)", “상기 신규 균주들의 혼합비율” 및 " 여성 갱년기 질환" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0046] 상기 건강기능 식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가가치를 부여한 식품이다. 이러한 건강기능 식품의 성분은 생체 방어와 신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다.

[0047] 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK3 또는 비피도박테리움 롱검 NK49를 건강기능 식품(또는 건강기능 음료 첨가물)으로 사용할 경우, 상기 신규한 유산균을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 또는 비피도박테리움 롱검 NK49의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0048] 상기 건강기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능 식품은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0049] 상기 건강기능 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 또는 비피도박테리움 롱검 NK49를 첨가할 수 있는 식품은 소세지, 육류, 빵, 초콜릿류, 스넥류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 신규한 유산균 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이에 한정되지는

않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올일 수 있다.

[0050] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0051] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0052] 본 발명에 따른 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물은 염증 치료, 골다공증 치료, 비만 개선 등 여성 갱년기 질환에 대한 치료 효과가 있다. 따라서, 본 발명에 따른 신규한 유산균은 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도면 내 LP는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3의 결과를, BP는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 결과를 나타내는 것이다.

도 1은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 대식세포에 대한 NF-kB의 활성(p-p65/p65) 억제능을 나타낸 그래프이다.

도 2는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 대식세포에 대한 TNF-α의 발현량 억제능을 나타낸 그래프이다.

도 3은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)에 대한 항균 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 아토포비움 바지내(*Atopobium vaginae*)에 대한 항균 효과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)에 대한 감염 억제능을 나타낸 그래프이다.

G: 가드네렐라 바지날리스만을 처리한 군; GL5, GL6, GL7: 가드네렐라 바지날리스를 처리하고, 락토바실러스 플란타럼을 각각 $1x10^6$ CFU/mL, $1x10^7$ CFU/mL, $1x10^8$ CFU/mL 처리한 군; GB5, GB6, GB7: 가드네렐라 바지날리스를 처리하고, 비피도박테리움 롱검을 각각 $1x10^6$ CFU/mL, $1x10^7$ CFU/mL, $1x10^8$ CFU/mL 처리한 군.

도 6은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 질과 자궁의 염증 억제 효과를 확인한 도이다.

N: 정상군; GC: 가드네렐라 바지날리스만을 감염시킨 군; oGL, oGB, oGM: 가드네렐라 바지날리스를 감염시킨 실험동물에 각각 락토바실러스 플란타럼, 비피도박테리움 롱검 또는 이들의 혼합물을 경구로 투여한 군; vGL, vGB, vGM: 가드네렐라 바지날리스를 감염시킨 실험동물에 각각 락토바실러스 플란타럼, 비피도박테리움 롱검 또는 이들의 혼합물을 질 내로 투여한 군.

도 7은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 감염된 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)에 대한 억제능을 나타낸 그래프이다.

도 8은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 미엘로페록시다아제 활성 억제능을 나타낸 그래프이다.

도 9는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 TNF-α 발현 억제능을 나타낸 그래프이다.

도 10은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 IL-10 발현 증가능을 나타낸 그래프이다.

도 11은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 자궁의 무게 증가 효과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 대퇴골의 무게 증가 효과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 대퇴골의 길이 감소 효과를 나타낸 그래프이다.

도 14는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 비만 억제능을 나타낸 그래프이다.

도 15는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 AMPK 활성 증가효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0055] **실시예 1: 유산균의 분리 및 동정**

[0056] **(1) 사람의 분변으로부터 유산균의 분리**

[0057] 사람의 분변을 GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 BL 한천 배지(BL agar medium; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 이식하고 37℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

[0058] **(2) 김치로부터 유산균의 분리**

[0059] 배추 김치, 무 김치 또는 파김치를 각각 파쇄하고, 파쇄 상등액을 취해 MRS 한천 배지(MRS agar medium; Difco, USA)에 이식하고 37℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양하여 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

[0060] **(3) 분리된 유산균의 동정**

[0061] 사람의 분변 또는 김치로부터 분리된 균주들의 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석하여 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다. 부여된 유산균의 균주명은 하기 표 1과 같다. 구체적으로, 김치로부터 분리된 유산균은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 5종(표 1의 관리번호 1 내지 5), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 5종(표 1의 관리번호 6 내지 10), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) 5종(표 1의 관리번호 11 내지 15) 및 락토바실러스 커바터스(*Lactocacillus curvatus*) 5종(표 1의 관리번호 16 내지 20)이었다. 사람의 분변으로부터 분리된 유산균은 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 5종(표 1의 관리번호 21 내지 25), 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 5종(표 1의 관리번호 26 내지 30), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 5종(표 1의 관리번호 31 내지 35), 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) 4종(표 1의 관리번호 36 내지 39), 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) 3종(표 1의 관리번호 40 내지 42), 비피도박테리움 아돌레센티스(Bifidobacterium adolescentis) 3종(표 1의 관리번호 43 내지 45), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 5종(표 1의 관리번호 46 내지 50) 이었다.

표 1

관리 번호	균주명	관리 번호	균주명
1	*Lactobacillus plantarum* NK1	26	*Lactobacillus plantarum* NK26
2	*Lactobacillus plantarum* NK2	27	*Lactobacillus plantarum* NK27
3	*Lactobacillus plantarum* NK3	28	*Lactobacillus plantarum* NK28
4	*Lactobacillus plantarum* NK4	29	*Lactobacillus plantarum* NK29
5	*Lactobacillus plantarum* NK5	30	*Lactobacillus plantarum* NK30
6	*Lactobacillus brevis* NK6	31	*Lactobacillus reuteri* NK31
7	*Lactobacillus brevis* NK7	32	*Lactobacillus reuteri* NK32
8	*Lactobacillus brevis* NK8	33	*Lactobacillus reuteri* NK33
9	*Lactobacillus brevis* NK9	34	*Lactobacillus reuteri* NK34
10	*Lactobacillus brevis* NK10	35	*Lactobacillus reuteri* NK35
11	*Lactobacillus sakei* NK11	36	*Lactobacillus johnsonii* NK36
12	*Lactobacillus sakei* NK12	37	*Lactobacillus johnsonii* NK37
13	*Lactobacillus sakei* NK13	38	*Lactobacillus johnsonii* NK38
14	*Lactobacillus sakei* NK14	39	*Lactobacillus johnsonii* NK39
15	*Lactobacillus sakei* NK15	40	*Lactobacillus mucosae* NK40
16	*Lactobacillus curvatus* NK16	41	*Lactobacillus mucosae* NK41
17	*Lactobacillus curvatus* NK17	42	*Lactobacillus mucosae* NK42
18	*Lactobacillus curvatus* NK18	43	*Bifidobacterium adolescentis* NK43
19	*Lactobacillus curvatus* NK19	44	*Bifidobacterium adolescentis* NK44
20	*Lactobacillus curvatus* NK20	45	*Bifidobacterium adolescentis* NK45
21	*Lactobacillus rhamnosus* NK21	46	*Bifidobacterium longum* NK46
22	*Lactobacillus rhamnosus* NK22	47	*Bifidobacterium longum* NK47
23	*Lactobacillus rhamnosus* NK23	48	*Bifidobacterium longum* NK48
24	*Lactobacillus rhamnosus* NK24	49	*Bifidobacterium longum* NK49
25	*Lactobacillus rhamnosus* NK25	50	*Bifidobacterium longum* NK50

[0062]

[0063] **(4) 신규 유산균 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3의 생리학적 특성**

[0064] 상기 표 1에 기재된 균주들 중 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3(수탁번호 KCCM12089P)은 그람양성 간균인 것으로 확인되었다. 또한, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3의 16S rDNA는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3의 16S rDNA 염기서열을 BLAST 검색으로 비교한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주는 검색되지 않았고, 공지된 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주의 16S rDNA 서열과 99% 상동성을 보임을 확인하였다.

[0065] 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API 50 CHL 키트를 사용하여 당 발효 시험으로 분석하였다. 그 결과는 하기 표 2와 같다. 하기 표 2에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타낸다.

표 2

[0066]

탄소원	NK3	탄소원	NK3
CONTROL	-	에스큘린	+
글리세롤	-	살리신	+
에리쓰리톨	-	셀로비오스	+
D-아라비노오스	-	말토오스	+
L-아라비노오스	+	락토오스	+
D-리보오스	+	멜리비오스	+
D-자일로오스	-	수크로오스	+
L-자일로오스	-	트레할로오스	+
D-아도니톨	-	이눌린	-
메틸-BD-자일로피라노사이드 Methyl-BD-Xylopyranoside	-	멜리지토오스	+
D-갈락토오스	+	라피노오스	-
D-글루코오스	+	전분(Starch)	-
D-프럭토오스	+	글리코겐	-
D-만노오스	+	자일리톨	-
L-소르보오스	-	겐티오비오스	+
람노서스	-	D-투라노오스	+
둘시톨	-	D-럭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	-
만니톨	+	D-푸코오스	-
솔비톨	+	L-푸코오스	-
α-메틸-D-만노사이드	±	D-아라비톨	-
α-메틸-D-글루코사이드	-	L-아라비톨	-
N-아세틸-글루코사민	+	글루코네이트	±
아미그달린	+	2-케토-글루코네이트	-
알부틴	+	5-케토-글루코네이트	-

[0067] **(5) 신규 유산균 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 생리학적 특성**

[0068] 상기 표 1에 기재된 균주들 중 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 (수탁번호 KCCM12088P)는 그람양성 간균인 것으로 확인되었다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 16S rDNA는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 16S rDNA 염기서열을 BLAST 검색으로 비교한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주는 검색되지 않았고, 공지된 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주의 16S rDNA 서열과 99% 상동성을 보임을 확인하였다.

[0069] 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API 50 CHL 키트를 사용하여 당 발효 시험으로 분석하였다. 그 결과는 하기 표 3과 같다. 하기 표 3에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타낸다.

표 3

[0070]

탄소원	NK49	탄소원	NK49
CONTROL	-	에스큘린	+
글리세롤	-	살리신	+
에리쓰리톨	-	셀로비오스	-
D-아라비노오스	-	말토오스	+
L-아라비노오스	+	락토오스	+
D-리보오스	+	멜리비오스	+
D-자일로오스	±	수크로오스	+
L-자일로오스	-	트레할로오스	-
D-아도니톨	-	이눌린	-
메틸-BD-자일로피라노사이드 Methyl-BD-Xylopyranoside	-	멜리지토오스	-
D-갈락토오스	+	라피노오스	+
D-글루코오스	+	전분(Starch)	-
D-프럭토오스	+	글리코겐	-
D-만노오스	-	자일리톨	-
L-소르보오스	-	겐티오비오스	-
람노서스	-	D-투라노오스	±
둘시톨	-	D-럭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	-
만니톨	+	D-푸코오스	-
솔비톨	+	L-푸코오스	-
α-메틸-D-만노사이드	-	D-아라비톨	-
α-메틸-D-글루코사이드	±	L-아라비톨	-
N-아세틸-글루코사민	-	글루코네이트	-
아미그달린	-	2-케토-글루코네이트	-
알부틴	-	5-케토-글루코네이트	-

[0071] **실시예 2: 분리된 유산균들의 활성 비교**

[0072] **(1) 항산화 활성(in vitro)**

[0073] DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 0.2 mM 농도가 되도록 에탄올에 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 상기 DPPH 용액 0.1 ㎖에 유산균의 현탁액(1×10^6 CFU/㎖) 또는 비타민 C 용액(1 g/㎖)을 넣고 20분간 37℃에서 배양하였다. 배양액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 517 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하여 분리된 유산균들의 항산화 활성을 계산하였다. 각 유산균 별 항산화 활성은 하기 표 4와 같다.

[0074] **(2) 대식세포에서의 염증 지표 측정**

[0075] C57BL/6 생쥐(male, 6주령 20-23 g)의 복강에 멸균된 4% 티오글라이콜레이트(thioglycolate) 2 ㎖를 투여하였다. 96시간이 지난 뒤에 생쥐를 마취시키고, 생쥐의 복강에 RPMI 1640 배지 8 ㎖를 투여하였다. 5~10분 후에 생쥐의 복강 내의 RPMI 배지(대식세포)를 뽑아, 1000 g에서 10분간 원심분리하고 다시 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 상기 대식세포를 각 웰 당 0.5×10^6의 수로 24-웰 플레이트에 깔고, 분리된 유산균(최종 처리 농도: $1x10^4$ cfu/ml, 이하 동일)과 염증 반응 유도 물질인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 2시간 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 RIPA 버퍼(Gibco사)에 넣고 균질화하였다. 24시간 처리한 배양 상등액에서 TNF-α, IL-10 등의 사이토카인 발현량을, 2시간 동안 처리하여 수득한 세포로부터 p65(NF-kB), p-p65(phosphor-NF-kB) 및 β의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. 각 유산균 별 염증 지표의 발현 수준은 하기 표 4와 같다.

[0076] (표 4의 활성 측정시 기준: +++, >90%, 매우 강함; ++, >60-90%, 강함; +, >20-60%, 약함; -, <20%, 효과 미비, 표 5 동일)

표 4

관리 번호	균주명	항산화 활성	TNF-α 억제능	IL-10 발현증가	NF-kB 억제능
1	*Lactobacillus plantarum* NK1	+	+	+	+
2	*Lactobacillus plantarum* NK2	+	++	+	+
3	*Lactobacillus plantarum* NK3	+++	+++	+++	+++
4	*Lactobacillus plantarum* NK4	+	+	+	++
5	*Lactobacillus plantarum* NK5	++	++	++	++
6	*Lactobacillus brevis* NK6	+	+	+	+
7	*Lactobacillus brevis* NK7	+	+	+	+
8	*Lactobacillus brevis* NK8	+	+	+	+
9	*Lactobacillus brevis* NK9	+	+	+	+
10	*Lactobacillus brevis* NK10	-	+	+	+
11	*Lactobacillus sakei* NK11	+	+	+	+
12	*Lactobacillus sakei* NK12	-	++	+	+
13	*Lactobacillus sakei* NK13	-	++	++	+
14	*Lactobacillus sakei* NK14	-	+	+	+
15	*Lactobacillus sakei* NK15	+	+	+	+
16	*Lactobacillus curvatus* NK16	+	+	+	+
17	*Lactobacillus curvatus* NK17	+	+	+	+
18	*Lactobacillus curvatus* NK18	+	+	+	+
19	*Lactobacillus curvatus* NK19	+	+	+	+
20	*Lactobacillus curvatus* NK20	+	+	+	+
21	*Lactobacillus rhamnosus* NK21	+	+	+	+
22	*Lactobacillus rhamnosus* NK22	+	+	+	+
23	*Lactobacillus rhamnosus* NK23	+	+	+	+
24	*Lactobacillus rhamnosus* NK24	++	+	+	+
25	*Lactobacillus rhamnosus* NK25	++	++	++	++
26	*Lactobacillus plantarum* NK26	+	+	+	+
27	*Lactobacillus plantarum* NK27	+	+	+	+
28	*Lactobacillus plantarum* NK28	+	+	+	+
29	*Lactobacillus plantarum* NK29	+	+	+	+
30	*Lactobacillus plantarum* NK30	+	+	+	+
31	*Lactobacillus reuteri* NK31	+	+	+	+
32	*Lactobacillus reuteri* NK32	++	++	++	++
33	*Lactobacillus reuteri* NK33	+++	++	++	++
34	*Lactobacillus reuteri* NK34	+	+	+	+
35	*Lactobacillus reuteri* NK35	+	+	+	+
36	*Lactobacillus johnsonii* NK36	++	++	++	+
37	*Lactobacillus johnsonii* NK37	++	++	++	++
38	*Lactobacillus johnsonii* NK38	+	+	+	+
39	*Lactobacillus johnsonii* NK39	+	+	+	+
40	*Lactobacillus mucosae* NK40	++	++	++	++
41	*Lactobacillus mucosae* NK41	++	++	+++	+++
42	*Lactobacillus mucosae* NK42	+	+	+	+
43	*Bifidobacterium adolescentis* NK43	+	+	+	+
44	*Bifidobacterium adolescentis* NK44	++	++	++	++
45	*Bifidobacterium adolescentis* NK45	+	+	+	+
46	*Bifidobacterium longum* NK46	+++	++	+++	+++
47	*Bifidobacterium longum* NK47	++	++	++	++
48	*Bifidobacterium longum* NK48	+	+	+	+
49	*Bifidobacterium longum* NK49	+++	+++	+++	+++
50	*Bifidobacterium longum* NK50	+	+	+	+

[0077]

[0078] **(3) Caco2 세포의 ZO-1 단백질 발현 효과**

[0079] 대장암 세포인 Caco2 세포를 한국 세포주 은행에서 분양하여 RPMI 1640 배지에서 48시간 동안 배양한 후, Caco2 세포를 웰 당 2×10^6 의 양이 되도록 12-웰 플레이트에 분주하였다. 각 웰에 LPS 1 ㎍을 단독으로 처리하거나 LPS 1 ㎍과 유산균 1×10^4 CFU를 같이 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 각 웰로부터 배양된 세포들을 모으고, 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 밀착연접단백질(tight junction protein)인 ZO-1의 발현량을 측정하였다. 각 유산균 별 ZO-1의 발현량은 하기 표 5와 같다.

표 5

관리번호	균주명	ZO-1 발현증가
1	*Lactobacillus plantarum* NK1	+
2	*Lactobacillus plantarum* NK2	+
3	*Lactobacillus plantarum* NK3	++
4	*Lactobacillus plantarum* NK4	+
5	*Lactobacillus plantarum* NK5	++
6	*Lactobacillus brevis* NK6	+
7	*Lactobacillus brevis* NK7	+
8	*Lactobacillus brevis* NK8	+
9	*Lactobacillus brevis* NK9	+
10	*Lactobacillus brevis* NK10	-
11	*Lactobacillus sakei* NK11	+
12	*Lactobacillus sakei* NK12	-
13	*Lactobacillus sakei* NK13	+
14	*Lactobacillus sakei* NK14	+
15	*Lactobacillus sakei* NK15	+
16	*Lactobacillus curvatus* NK16	+
17	*Lactobacillus curvatus* NK17	+
18	*Lactobacillus curvatus* NK18	+
19	*Lactobacillus curvatus* NK19	+
20	*Lactobacillus curvatus* NK20	+
21	*Lactobacillus rhamnosus* NK21	+
22	*Lactobacillus rhamnosus* NK22	+
23	*Lactobacillus rhamnosus* NK23	+
24	*Lactobacillus rhamnosus* NK24	++
25	*Lactobacillus rhamnosus* NK25	+
26	*Lactobacillus plantarum* NK26	+
27	*Lactobacillus plantarum* NK27	+
28	*Lactobacillus plantarum* NK28	+
29	*Lactobacillus plantarum* NK29	+
30	*Lactobacillus plantarum* NK30	+
31	*Lactobacillus reuteri* NK31	+
32	*Lactobacillus reuteri* NK32	++
33	*Lactobacillus reuteri* NK33	++
34	*Lactobacillus reuteri* NK34	+
35	*Lactobacillus reuteri* NK35	+
36	*Lactobacillus johnsonii* NK36	+
37	*Lactobacillus johnsonii* NK37	++
38	*Lactobacillus johnsonii* NK38	+
39	*Lactobacillus johnsonii* NK39	+
40	*Lactobacillus mucosae* NK40	++
41	*Lactobacillus mucosae* NK41	++
42	*Lactobacillus mucosae* NK42	+
43	*Bifidobacterium adolescentis* NK43	+
44	*Bifidobacterium adolescentis* NK44	++
45	*Bifidobacterium adolescentis* NK45	+
46	*Bifidobacterium longum* NK46	++
47	*Bifidobacterium longum* NK47	+
48	*Bifidobacterium longum* NK48	+
49	*Bifidobacterium longum* NK49	+
50	*Bifidobacterium longum* NK50	+

[0080]

[0081] **(5) 실험 결과**

[0082] 분리된 유산균들의 활성을 평가한 결과, 분리된 유산균들 중에서 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49가 밀착연접단백질인 ZO-1의 발현량을 증가시키면서 항산화 활성 및 염증반응 억제 효과를 우수하게 나타냄을 확인하였다(표 4 및 표 5).

[0083] **실시예 3: 대식세포에 대한 염증반응 억제능 측정**

[0084] 상기 실시예 2에서 항산화 활성 및 염증반응의 억제 효과가 우수한 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49에 대하여 투여 농도에 따른 염증반응 억제 효과를 확인하였다.

[0085] 구체적으로, C57BL/6 생쥐(수컷, 20-23 g)의 복강에 멸균된 4% 티오글라이콜레이트(thioglycolate) 2 ㎖를 투여하였다. 96시간이 지난 뒤에 생쥐를 마취시키고, 생쥐의 복강에 RPMI 1640 배지 8 ㎖를 투여하였다. 5~10분이

지난 뒤에 생쥐 복강 내의 RPMI 배지(대식세포)를 뽑아, 1000 g에서 10분간 원심분리하고 다시 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 24-웰 플레이트에서 5시간 배양하여 부착된 세포를 대식세포로 사용하였다. 상기 대식세포를 각 웰당 0.5×10^6의 수로 깔고, 10^3, 10^4 및 10^5 CFU/mL의 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49와 염증 반응 유도 물질인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 90 분 또는 24 시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 RIPA 버퍼(Gibco사)에 넣고 균질화하였다. 90분 동안 처리하여 수득한 세포로부터 p65(NF-kB), p-p65(phosphor-NF-kB) 및 β의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. 24시간 처리한 후 수득한 배양 상등액에서는 TNF-α의 사이토카인의 발현량을 ELISA kit(Ebioscience, San Diego, CA, USA)로 측정하였다.

[0086] 그 결과, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 또는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49를 처리한 모든 군에서 NF-kB의 활성이 억제되고, TNF-α의 발현량이 억제됨을 확인하였다(도 1 및 도 2).

[0087] **실시예 4: 질염 원인균에 대한 항균력**

[0088] **(1) 유산균의 항균시험**

[0089] GAM 배지에 분리된 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 ($1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ CFU/mL)와 함께 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*) 또는 아토포비움 바지내(*Atopobium vaginae*) ($1x10^6$ CFU/mL)를 이식하였다. 37 ℃혐기적 조건으로 BHI broth에 효모 추출물(yeast extract) (1%), 말토오스(maltose) (0.1%), 글루코스(glucose) (0.1%) 및 말혈청(horse serum) (10%)을 첨가한 BHIS 배지에서 24시간 배양하여 항균력을 측정하였다.

[0090] 그 결과, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 모두 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*) 및 아토포비움 바지내(*Atopobium vaginae*)에 대해 95% 이상의 성장 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(도 3 및 도 4).

[0091] **(2) 유산균의 감염 억제능**

[0092] 인간 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포를 37 ℃, 5% CO_2 및 95% 공기 조건에서 RPMI 1640 배지(10% 열 비활성화 신생우아혈청(heat-inactivated fetal calf serum) 함유)에서 배양하면서 분리된 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 ($1x10^4$, $1x10^6$ CFU/mL)만 또는 상기 유산균 ($1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$ CFU/mL)과 함께 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*) ($1x10^5$ CFU/mL)를 이식하여 24시간 후에 HeLa 세포에 부착된 세균수를 qPCR로 측정하였다.

[0093] 그 결과, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3 또는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49을 함께 이식한 HeLa 세포에는 부착된 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*) 수가 현저히 감소됨을 확인하였다(도 5).

[0094] 위 실험 결과들을 통해, 신규한 유산균들은 질염 유발 세균의 성장 억제 효과를 나타낼 뿐만 아니라 세균의 감염을 억제시키는 효과도 나타냄을 알 수 있었다.

[0095] **실시예 5: 동물모델에서 유산균의 질염 치료 효과**

[0096] **(1) 질염 동물모델의 제조 및 유산균 투여**

[0097] C57BL/6 생쥐(암컷, 19-22 g, 6주령)를 한군 당 6마리씩 사용하여 실험을 진행하였다. 상기 생쥐에 β17-benzoate(Sigma 사, MO, 미국) 0.125 mg 을 올리브 오일에 녹여 피하 주사하였다. 3일 후, 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*) ($1x\ 10^8$ CFU/mouse)를 생쥐의 질 내로 이식하였다. 이식 후 8일째부터 14일간 매일 1회씩 $1x10^9$ CFU/mouse의 분리된 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 또는 이들의 1:1 혼합물을 경구 또는 질 내로 직접 투여하였다. 유산균 투여 7일 째(이식 후 14일째) 마지막으로 투여하고, 24 시간 후에 동물모델을 희생시켜 실험을 수행하였다.

[0098] **(2) 질 내 염증 발생 여부 확인**

[0099] 상기와 같이 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)를 생쥐의 질에 이식한 결과 질과 자궁에 부종을 동반한 염증이 발생하였다. 그러나, 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 또는 이들의 혼합물을 경구 또는 질 내로 투여한 결과 질과 자궁의 외관상 염증이 유의적으로 감소됨을 확인하였다(도 6).

[0100] **(3) 유산균 및 가드네렐라 바지날리스 균주의 정량**

[0101] 신규한 유산균을 상기와 같이 투여한 후 24 시간 및 48 시간에 멸균한 생리식염수 0.5 ml로 질 내를 씻어 내었다. 씻어낸 질 세척액을 Qaigen DNA purification kit로 분리한 뒤, PCR로 유산균 및 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*) 균주를 정량하였다.

[0102] 그 결과, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 또는 이들의 혼합물을 경구 또는 질 내로 투여한 군에서 감염된 가드네렐라 바지날리스의 균수가 99% 이상 감소됨을 확인하였다(도 7).

[0103] **(4) 미엘로페록시다아제 활성 측정**

[0104] 50 mM 인산 완충액(phosphate buffer, pH 6.0) 1 mL에 상기와 같이 씻어낸 질 세척액을 가하여 초음파 처리하였다. 녹이고 얼리는 과정을 3회 실시한 후 원심 분리하였다. 상층액 100 μL에 o-디아니시딘(o-dianisidine, 0.129 mg/mL) 398 μL를 가하였다. H_2O_2의 최종 농도를 0.0005% 로 맞춘 뒤, 25 ℃ 및 492 nm 조건에서 경시적(time course)으로 미엘로페록시다아제(myeloperoxidase, MPO)의 활성을 측정하였다.

[0105] 그 결과, 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)로 감염시킨 군의 경우 질의 대표적인 염증 지표인 미엘로페록시다아제의 활성이 유의하게 증가하였다. 그러나, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 또는 이들의 혼합물을 경구 또는 질 내로 투여한 군에서는 미엘로페록시다아제의 활성이 현저히 감소됨을 확인하였다(도 8).

[0106] **(5) 질 점막에서 전사인자 및 사이토카인의 분석**

[0107] 상기 희생시킨 동물모델의 대장 또는 질점막 조직에 lysis buffer (20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl2, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiotheitol, 0.5 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 20 μg/mL 트립신 억제제, 1% nonidet p-40, 20% 글리세롤)를 넣어 균질화(homogenize)하였다. Bradford assay로 단백질을 정량하여 단백질이 50 μg/μL이 포함되도록 검체를 제조하였다. 상기 검체에 전기영동 샘플 버퍼 (Laemmli sample buffer 950 μL+ β50 μL) 10 μg/μL를 가한 뒤 100 ℃에서 3분간 변성(denaturation)시켜, 전기영동 (150V, 30mA)을 수행하였다. 전기영동한 젤을 30V에서 2시간 동안 멤브레인에 트랜스퍼(transfer)하였다. 상기 멤브레인을 5% skim milk/PBS-T (0.05% tween 20/PBS)에 15ml 넣고 1시간 동안 흔들었다. 1차 항체 10 μg/μL에 1% skim milk/PBS-T 10 mL을 넣고 12시간 반응시킨 후 PBS-T 용액으로 5분간 3회 세척하였다. 그리고 각 사이토카인및 전사인자에 대한 2차 항체 10 μg/μL에 1% skim milk/PBS-T 20 mL을 넣고 1시간 동안 흔들어 반응시켰다. PBS-T 용액으로 5분간 3회 세척한 뒤, 마지막으로 ECL용액으로 발광시켰다.

[0108] 그 결과, 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)로 감염시킨 군의 경우 질 조직에서의 TNF-α 발현이 증가하고, IL-10의 발현이 감소하였다. 그러나, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 또는 이들의 혼합물을 경구 또는 질 내로 투여한 군에서는 TNF-α 발현이 억제되고, IL-10의 발현이 증가함을 확인하였다(도 9 및 도 10).

[0109] 상기 실험 결과들을 통해, 이를 통해, 신규한 유산균은 질염의 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0110] **실시예 6: 동물모델에서 유산균의 대장염 치료 효과**

[0111] **(1) 대장염 동물 모델의 제조 및 유산균 투여**

[0112] C57BL/6 생쥐(수컷, 21-23g, 6주령)를 한 군당 6마리씩 사용하여 1주간 실험실에 적응시킨 뒤 실험을 진행하였다. 한 군을 정상군으로 하였고, 나머지 군의 생쥐는 2,4,6-트리니트로벤젠술폰산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)으로 대장염을 유발하였다. 구체적으로 실험동물을 에테르로 마취한 후 50% 에탄올에 혼합한 TNBS 용액을 끝이 둥근 1㎖ 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1㎖ 씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다. 한편, 정상군에는 생리식염수 0.1㎖를 경구투여하였

다. 투여 후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 또는 이들의 1:1 혼합물을 생리식염수에 현탁하여 $1x10^9$ CFU의 양으로 경구투여하였다. 유산균 투여가 종료된 다음날 실험동물을 희생시킨 다음 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하여 길이를 측정하였다. 그 후, 이로부터 하기의 각종 지표를 확인하였다. 한편, 정상군의 실험동물에는 신규한 유산균 대신 유산균 현탁액인 1% 덱스트로스 용액을 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 신규한 유산균 대신 대장염 치료 약물인 설파살라진(sulfasalazine)을 50 mg/kg의 양으로 경구투여하였다.

[0113] **(2) 미엘로퍼옥시다아제 활성 측정**

[0114] 대장조직 100mg에 0.5% 헥사데실 트리메틸 암모늄 브롬화물(hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 함유 10 mM 인산칼슘 완충액(potassium phosphate buffer, pH 7.0) 200㎕를 넣고 균질화(homogenization)하였다. 4℃및 10,000 g의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 50 ㎕를 0.95 ㎖ 의 반응액(1.6mM 테트라메틸 벤지딘(tetramethyl benzidine)과 0.1mM H_2O_2 함유)에 넣고 37℃에서 반응시키면서 650 ㎚에서 경시적으로 흡광도를 측정하였다. 상기 미엘로퍼옥시다아제 활성은 반응물로서 생긴 H_2O_2 1㎛ol/ml을 1 유닛으로 계산하였다.

[0115] **(3) 염증 지표의 측정**

[0116] 웨스턴블롯팅 방법을 이용하여 p-p65, p65, COX-2 및 β과 같은 염증 반응 지표 물질을 측정하였다. 구체적으로, 상기 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정 실험과 동일한 방법으로 얻은 상등액 50㎍을 취해 면역블롯팅을 수행하였다. 또한, 사이토카인(IL-17, TNF-α)의 발현량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

[0117] **(4) 실험 결과**

[0118] 상기에서 수행한 실험 결과는 하기 표 6과 같다.

표 6

[0119]

실험군	체중변화 g	대장길이 cm	MPO 활성 μU/mg	TNF-α pg/mg	IL-17 pg/mg	NF-kB활성 p-p65/p65	COX-2활성
정상군	0.9	6.5	0.21	35	17	0.12	0.23
유도군	-1.9	4.4	1.86	265	89	0.32	0.52
LP NK3	-0.9	5.2	1.12	89	45	0.23	0.35
BL NK49	-0.7	5.4	0.87	95	38	0.22	0.36
혼합물	-0.7	5.5	0.82	88	35	0.19	0.29
양성대조군	-1.0	5.1	1.26	105	47	0.25	0.42

[0120] 구체적으로, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 또는 이들의 혼합물을 투여한 군에서의 체중 변화가 크지 않아 독성이 없음을 확인하였다. 또한, 대장염의 유도시 대장이 길이가 짧아졌으나, 유산균을 투여한 군에서는 대장 길이의 회복 효과를 나타냄을 확인하였다. 나아가, 유산균을 투여한 군에서는 대장염의 유도에 따라 증가된 미엘로퍼옥시다아제 활성이 감소되고, TNF-α 및 IL-17의 사이토카인의 발현량이 억제되며 NF-kB의 활성 및 COX-2 의 활성이 억제됨을 확인하였다.

[0121] 이를 통해, 신규한 유산균은 독성을 나타내지 않으면서 대장염의 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0122] **실시예 7: 동물모델에서 유산균의 골다공증 치료 효과**

[0123] **(1) 골다공증 동물 모델의 제조 및 유산균 투여**

[0124] C57BL/6 생쥐(암컷, 21-23g, 6주령)를 한 군당 6마리씩 사용하여 1주간 실험실에 적응시킨 뒤 실험을 진행하였다. 이소플루란(isoflurane)으로 마취 후 난소를 제거하여 골다공증 동물모델을 만들었다. 난소 제거 1주 후부터 1주에 6 일씩 5주 동안 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49, 이들의 1:1 혼합물 또는 이들의 4:1 혼합물을 일일 $1x10^9$ CFU의 양으로 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 17β을 10㎍/kg/day로 복강투여하였으며, sham군, 난소

제거실험군은 약물대신 생리식염수를 경구투여하였다.

[0125] 유산균 투여가 종료된 다음날 실험동물을 희생시킨 다음 혈액, 대퇴골, 대장, 자궁, 간을 분리하여 골다공증 지표들을 측정하였다.

[0126] **(2) 골다공증 지표의 측정**

[0127] 혈액에서 오스테오칼신(Osteocalcin)은 R&D system ELISA Kit (Minneapolis, MN, USA)., USA)로, Ca과 P은 각각 아산제약의 ASAN Ca-Lq Reagents와 ASAN Pi-Lq Reagents으로, 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, AP)활성은 Alkaline phosphatase activity colorimetric assay kit (Sigma, USA)로 측정하였다.

[0128] **(3) 실험 결과**

[0129] 상기와 같이 난소를 적출한 동물모델을 6주간 사육한 결과, 해당 동물모델에서는 자궁의 무게감소(도 11), 대퇴골의 무게 감소(도 12) 및 대퇴골의 길이 감소(도 13)을 나타내었다. 그러나, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK43(LP), 비피도박테리움 롱검 NK49(BL), 상기 유산균들의 1:1 혼합물(M1:1) 및 4:1 혼합물(M4:1)을 투여한 군에서는 에스트로겐과 유사한 에스트라디올(estradiol)을 투여한 군과 유사한 수준으로 자궁 및 대퇴골의 무게가 증가하고(도 11 및 도 12), 대퇴골의 길이가 감소되어 있음을 확인하였다(도 13).

[0130] 또한, 하기 표 7에 나타난 바와 같이 난소를 적출한 동물모델을 6주간 사육한 결과, 해당 동물모델에서 혈액 중의 AP 효소(alkaline phosphatase) 활성 증가와 함께 인(P) 및 오스테오칼신(osteocalcin)의 농도가 증가하였고, 칼슘(Ca)은 감소하는 경향을 나타내었다. 반면, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK43(LP), 비피도박테리움 롱검 NK49(BL), 상기 유산균들의 1:1 혼합물(M1:1) 및 4:1 혼합물(M4:1)을 투여한 군에서는 에스트라디올을 투여한 군과 유사한 수준의 AP 효소(alkaline phosphatase) 활성이 나타났으며, 난소가 제거된 동물모델 대조군에 비해 AP 효소 활성이 감소됨을 확인하였다. 나아가, 오스테오칼신 및 인의 농도 역시 감소되고, 칼슘의 농도가 증가된 것을 확인하였다.

표 7

[0131]

	정상군 (Nor)	유도군 (Sham)	대조군 (Con)	LP NK3	BL NK49	유산균혼합 (M1:1)	유산균혼합 (M4:1)	양성대조군 (PC)
AP (IU/L)	171.0±3.4	174.4±5.1	282.2±10.3	217.2±8.6	218.9±5.1	215.5±6.8	213.8±8.6	220.6±10.3
Ca (mg/dL)	6.6±0.2	6.4±0.3	6.0±0.4	6.3±0.3	6.3±0.3	6.3±0.2	6.2±0.2	6.2±0.2
P (mg/dL)	11.2±.2	11.8±0.9	12.5±1.5	12.1±1.4	11.5±1.2	11.9±1.1	11.8±0.9	12.1±1.1
오스테오칼신 (μg/L)	0.89±0.2	0.98±0.21	1.85±0.32	1.46±0.25	1.38±0.15	1.41±0.22	1.42±0.19	1.53±0.15

[0132] 상기와 같은 결과는 본 발명의 신규한 유산균 및 이들의 혼합물이 에스트로겐과 유사한 수준으로 여성 갱년기 질환의 증상 중 하나인 골다공증에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

[0133] **실시예 8: 동물모델에서 유산균의 비만 개선 효과**

[0134] **(1) 비만 유도 동물 모델의 제조 및 유산균 투여**

[0135] 상기 실시예 7의 (1)에서와 같이 C57BL/6 생쥐(암컷, 21-23g, 6주령)를 한 군당 6마리씩 사용하여 1주간 실험실에 적응시킨 뒤 실험을 진행하였다. 이소플루란(isoflurane)으로 마취 후 난소를 제거하고, 6주 동안 사육하여 체중이 유의하게 증가되도록 한 비만 모델을 만들었다. 난소 제거 1주 후부터 1주에 6 일씩 5주 동안 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49, 이들의 1:1 혼합물 또는 이들의 4:1 혼합물을 일일 $1x10^9$ CFU의 양으로 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 17β을 10μg/kg/day로 복강투여하였으며, sham군, 난소제거실험군은 약물대신 생리식염수를 경구투여하였다.

[0136] 유산균 투여가 종료된 다음날 실험동물을 희생시킨 다음 혈액, 대퇴골, 대장, 자궁, 간을 분리하여 비만 지표들을 측정하였다. 몸무게는 매주 1회씩 측정하였다.

[0137] **(2) AMPK 활성 측정**

[0138] 면역블롯팅 방법을 이용하여 간에서의 AMPK 활성을 측정하였다. 구체적으로, 분리한 간을 RIPA 버퍼(radio immunoprecipitation assay lysis buffer; Pierce, Rockford, IL, USA)에 넣고 분쇄한 후 10,000 g에서 10

min 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 10% SDS-PAGE 젤 전기영동을 하고, 멤브레인에 트랜스퍼 하였다. 이후 4℃ 에서 밤새 AMPK, p-AMPK, β의 항체와 반응시키고, 이어서 2차 항체로 반응시킨 후 세척하였다. 이후 ECL(enhanced chemiluminescence reagent) 시약으로 발색시켜 확인하였다.

[0139] **(3) SREBP-1c 및 PGC-1α 발현 측정**

[0140] qPCR(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)을 이용하여 SREBP-1c(Sterol regulatory element-binding transcription factor 1c) 및 PGC-1α(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)의 발현을 측정하였다.

[0141] 구체적으로, 상기 동물모델에서 분리한 간으로부터 Qiagen mRNA extract kit를 이용하여 mRNA를 추출한 후, Takara thermal cycler로 SYBER premix agents를 이용하여 qPCR을 수행하였다. Thermal cycling은 하기 표 8의 프라이머들을 사용하여 다음과 같은 조건으로 수행했다: 95℃에서 30초 동안 DNA polymerase activation, 이어서 95℃에서 15 초, 60℃에서 30 초 간격으로 반응을 시키면서 40 회 반복하여 증복하였다. 최종 발현된 유전자 양은 β과 비교하여 계산하였다.

표 8

[0142]

서열번호	프라이머	서열
3	SREBP-1c forward	5'-AGC TGT CGG GGT AGC GTC TG-3'
4	SREBP-1c reverse	5'-GAG AGT TGG CAC CTG GGC TG-3'
5	PGC-1α forward	5'-CCG CCA CCT TCA ATC CAG AG-3'
6	PGC-1α reverse	5'-CAA GTT CTC GAT TTC TCG ACG G-3'
7	β-actin forward	5'-TGT CCA CCT TCC AGC AGA TGT-3'
8	β-actin reverse	5'-AGC TCA GTA ACA GTC CGC CTA GA-3'

[0143] **(4) 실험 결과**

[0144] 상기와 같이 난소를 적출한 동물모델을 6주간 사육한 결과, 해당 동물모델에서는 유의적인 체중 증가를 나타내었다. 반면, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK43(LP), 비피도박테리움 롱검 NK49(BL), 상기 유산균들의 1:1 혼합물(M1:1) 및 4:1 혼합물(M4:1)을 투여한 군에서는 에스트라디올을 투여한 군과 유사한 수준의 체중 감소가 나타났으며, 특히 난소를 적출하지 않은 정상 동물의 체중 증가량 보다 더 적은 것을 확인하였다(도 14).

[0145] 또한, 난소를 적출한 동물모델을 6주간 사육한 결과, AMPK의 활성이 감소하였으며(도 15), 하기 표 9에 나타난 바와 같이 SREBP-1c의 발현이 유도되고, PGC-1α의 발현이 억제되었다. 그러나, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK43(LP), 비피도박테리움 롱검 NK49(BL), 상기 유산균들의 1:1 혼합물(M1:1) 및 4:1 혼합물(M4:1)을 투여한 군에서는 에스트라디올을 투여한 군과 유사한 수준의 AMPK의 활성이 나타났으며(도 15), 이는 난소가 제거된 대조군에 비해 높은 활성을 나타내었다. 또한, 하기 표 9에 나타난 바와 같이 난소가 제거된 동물모델 대조군에 비해 SREBP-1c를 발현이 억제되며 PGC-1α 발현이 유도되는 것을 확인함으로써 비만이 억제됨을 확인하였다.

표 9

[0146]

	정상군 (Nor)	유도군 (Sham)	대조군 (Con)	LP NK3	BL NK49	유산균혼합 (M1:1)	유산균혼합 (M4:1)	양성대조군 (PC)
SREBP-1c	1.0±0.1	1.2±0.2	4.5±0.5	2.5±0.6	2.2±0.5	2.3±0.3	2.4±0.4	2.7±0.3
PGC-1α	1.0±0.1	1.1±0.1	0.6±0.2	0.8±0.2	0.9±0.2	0.8±0.1	0.9±0.2	0.8±0.2

[0147] 상기와 같은 결과는 본 발명의 신규한 유산균 및 이들의 혼합물이 에스트로겐과 유사한 수준으로 여성 갱년기 질환의 증상 중 하나인 비만 또는 체중 증가에 대한 개선 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

[0148] **<유산균의 수탁 정보>**

[0149] 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3을 2017년 8월 4일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM12089P의 수탁번호를 부여받았다.

[0150] 또한, 본 발명의 발명자들은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49를 2017년 8월 4일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM12088P의 수탁번호를 부여받았다.

수탁번호

[0151]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12088P

수탁일자 : 20170804

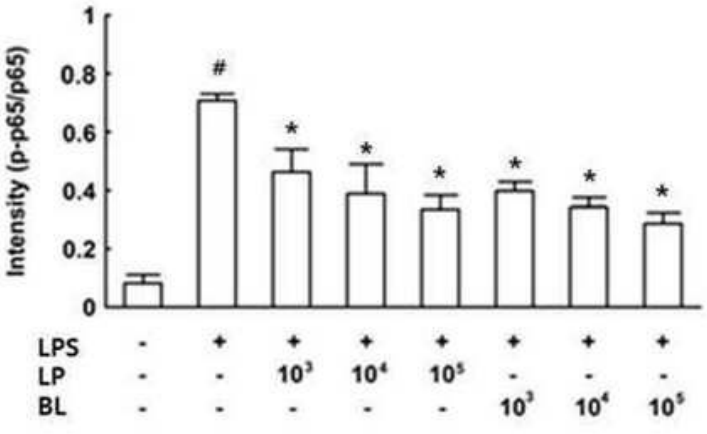
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12089P

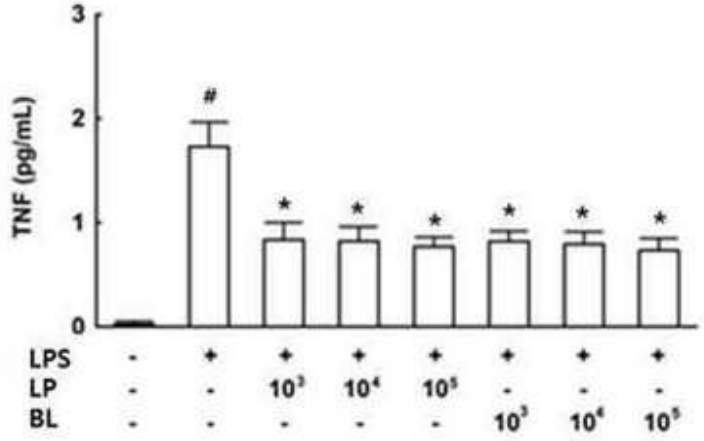
수탁일자 : 20170804

도면

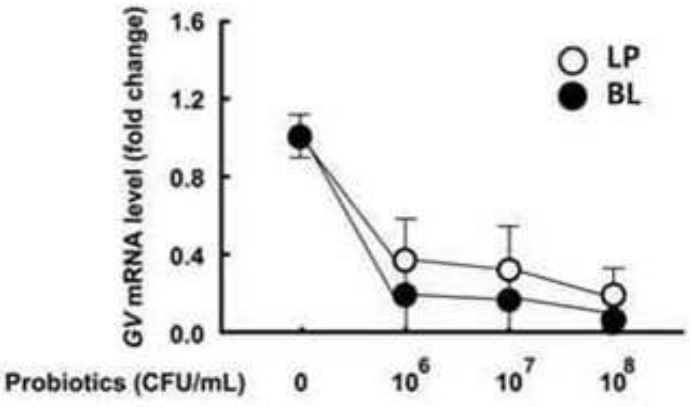
도면1



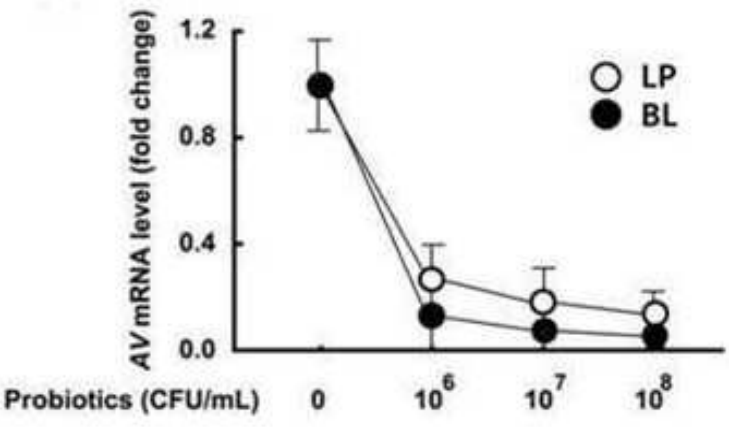
도면2


TNF (pg/mL)
3
2
1
0
#
*
LPS - + + + + + + +
LP - - 10³ 10⁴ 10⁵ - - -
BL - - - - - 10³ 10⁴ 10⁵

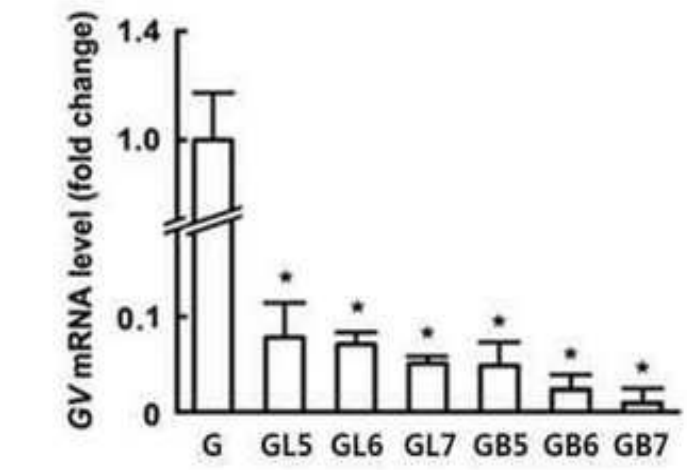
도면3


GV mRNA level (fold change)
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
LP
BL
Probiotics (CFU/mL) 0 10⁶ 10⁷ 10⁸

도면4


AV mRNA level (fold change)
1.2
0.8
0.4
0.0
LP
BL
Probiotics (CFU/mL) 0 10⁶ 10⁷ 10⁸

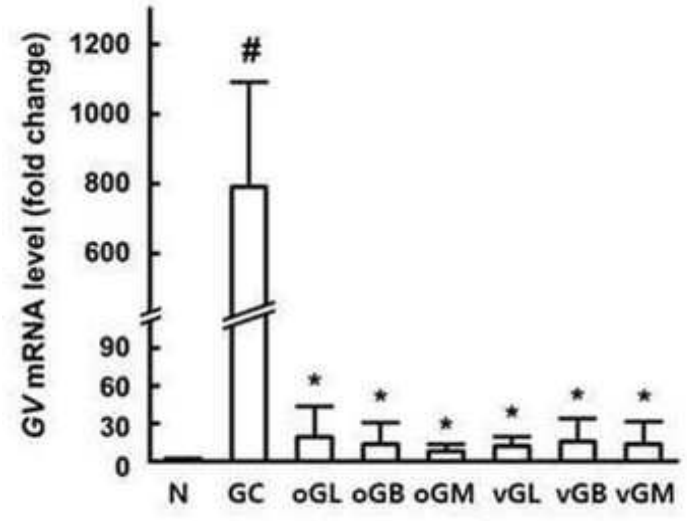
도면5


GV mRNA level (fold change)
1.4
1.0
0.1
0
G
GL5
GL6
GL7
GB5
GB6
GB7

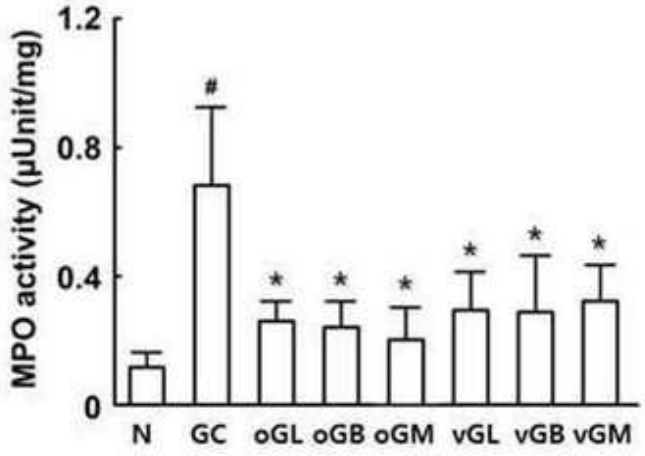
도면6


N
GC
oGL
oGB
oGM
vGL
vGB
vGM

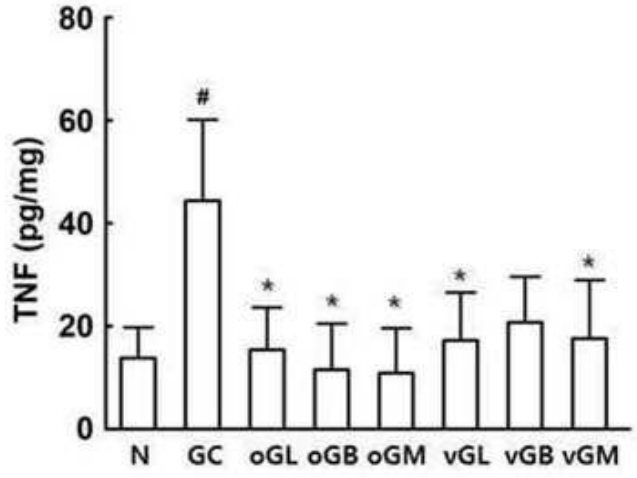
도면7


GV mRNA level (fold change)
1200
1000
800
600
90
60
30
0
#
N
GC
oGL
oGB
oGM
vGL
vGB
vGM

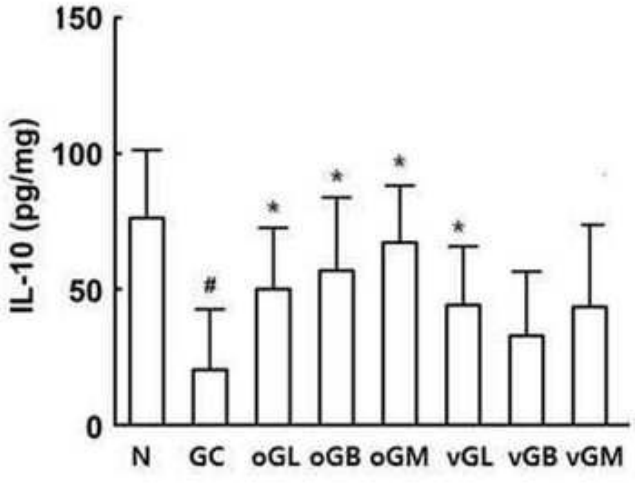
도면8


MPO activity (μUnit/mg)
1.2
0.8
0.4
0
#
*
N
GC
oGL
oGB
oGM
vGL
vGB
vGM

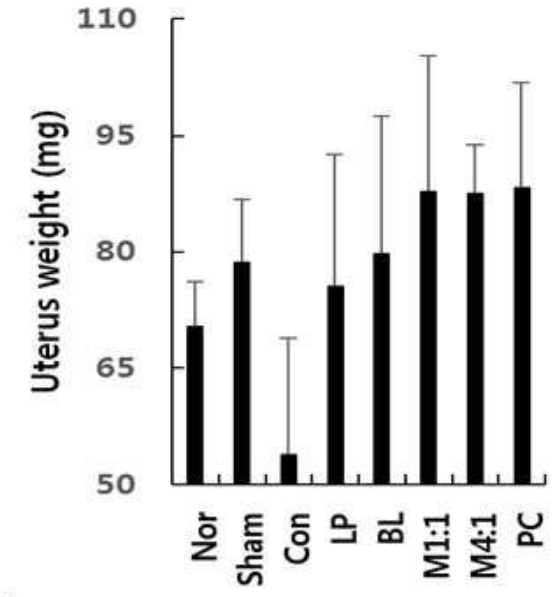
도면9


TNF (pg/mg)
80
60
40
20
0
#
*
N
GC
oGL
oGB
oGM
vGL
vGB
vGM

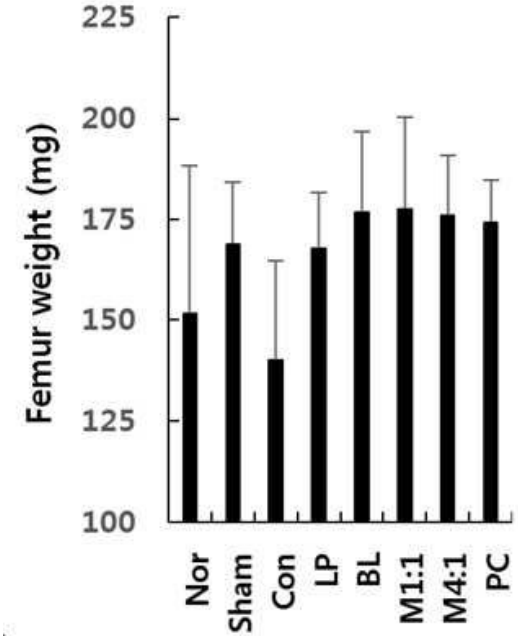
도면10


IL-10 (pg/mg)
150
100
50
0
#
*
N
GC
oGL
oGB
oGM
vGL
vGB
vGM

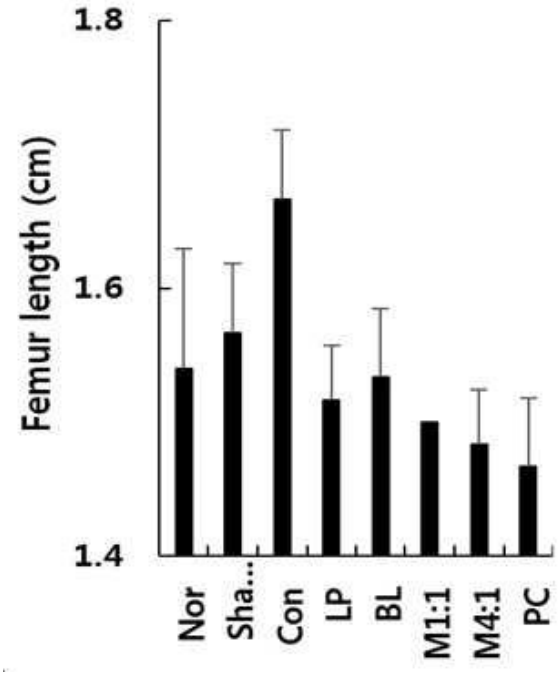
도면11


Uterus weight (mg)
110
95
80
65
50
Nor
Sham
Con
LP
BL
M1:1
M4:1
PC

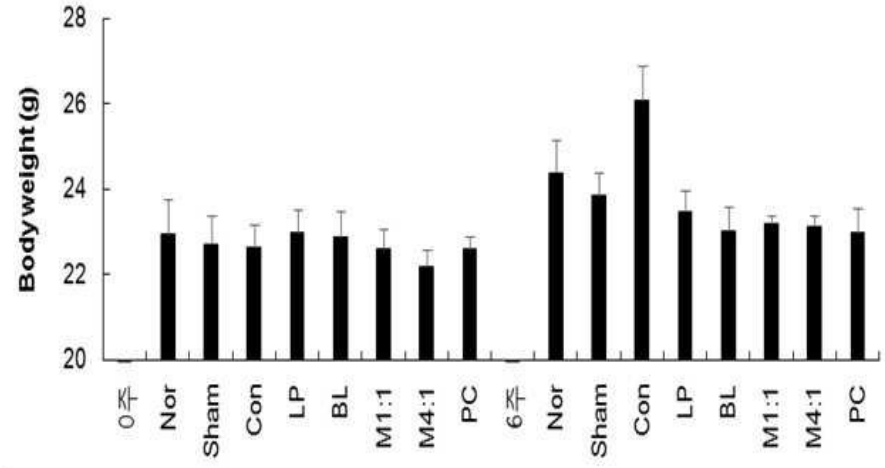
도면12


Femur weight (mg)
225
200
175
150
125
100
Nor
Sham
Con
LP
BL
M1:1
M4:1
PC

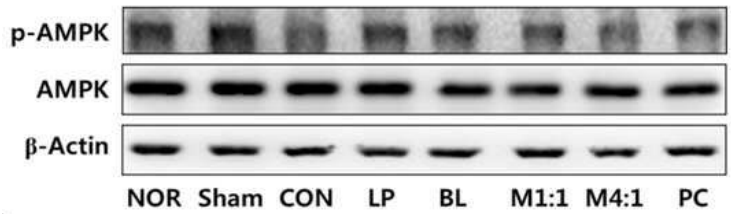
도면13



도면14



도면15



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

NAVIPHARM CO, LTD

<120> Novel lactic acid bacteria and use thereof

<130> 18PP31004

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1436

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NK3 16s rDNA

<400> 1

gcaagtcgaa cgaactctgg tattgattgg tgcttgcatc atgatttaca tttgagtgag 60

tggcgaactg gtgagtaaca cgtgggaaac ctgcccagaa gcgggggata acacctggaa 120

acagatgcta ataccgcata acaacttgga ccgcatggtc cgagcttgaa agatggcttc 180

ggctatcact tttggatggt cccgcggcgt attagctaga tggtggggta atggctcacc 240

atggcaatga tacgtagccg acctgagagg gtaatcggcc acattgggac tgagacacgg 300

cccaaactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa agtctgatgg 360

agcaacgccg cgtgagtgaa gaagggtttc ggctcgtaaa actctgttgt taaagaagaa 420

catatctgag agtaactgtt caggtattga cggtatttaa ccagaaagcc acggctaact 480

acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta 540

aagcgagcgc aggcggtttt ttaagtctga tgtgaaagcc tttcggctca accgaagaag 600

tgcatcggaa actgggaaac ttgagtgcag aagaggacag tggaactcca tgtgtagcgg 660

tgaaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg cggctgtctg gtctgtaact 720

gacgctgagg ctcgaaagta tgggtagcaa acaggattag ataccctggt agtccatacc 780

gtaaacgatg aatgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgctgca gctaacgcat 840

taagcattcc gcctggggag tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat tgacgggggc 900

ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagctac gcgaagaacc ttaccaggtc 960

ttgacatact atgcaaatct aagagattag acgttccctt cggggacatg gatacaggtg 1020

gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca 1080

acccttatta tcagttgcca gcattaagtt gggcactctg gtgagactgc cggtgacaaa 1140

ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg 1200

tgctacaatg gatggtacaa cgagttgcga actcgcgaga gtaagctaat ctcttaaagc 1260

cattctcagt tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagtcggaat cgctagtaat 1320

cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac 1380

catgagagtt tgtaacaccc aaagtcggtg gggtaacctt ttaggaacca gccgcc 1436

<210> 2

<211> 1342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NK49 16s rDNA

<400> 2

ggctttgctt ggtggtgaga gtggcgaacg ggtgagtaat gcgtgaccga cctgccccat 60

acaccggaat agctcctgga aacgggtggt aatgccggat gctccagttg atcgcatggt 120

cttctgggaa agctttcgcg gtatgggatg gggtcgcgtc ctatcagctt gacggcgggg 180

taacggccca ccgtggcttc gacgggtagc cggcctgaga gggcgaccgg ccacattggg 240

actgagatac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgc acaatgggcg 300

caagcctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg atggaggcct tcgggttgta aacctctttt 360

atcggggagc aagcgagagt gagtttaccc gttgaataag caccggctaa ctacgtgcca 420

gcagccgcgg taatacgtag ggtgcaagcg ttatcccgga attattgggc gtaaagggct 480

cgtaggcggt tcgtcgcgtc cggtgtgaaa gtccatcgct taacggtgga tccgcgccgg 540

gtacgggcgg gcttgagtgc ggtaggggag actggaattc ccggtgtaac ggtggaatgt 600

gtagatatcg ggaagaacac caatggcgaa ggcaggtctc tgggccgtta ctgacgctga 660

ggagcgaaag cgtggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacgg 720

tggatgctgg atgtggggcc cgttccacgg gttccgtgtc ggagctaacg cgttaagcat 780

cccgcctggg ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag aaattgacgg gggcccgcac 840

aagcggcgga gcatgcggat taattcgatg caacgcgaag aaccttacct gggcttgaca 900

tgttcccgac ggtcgtagag atacggcttc ccttcggggc gggttcacag gtggtgcatg 960

gtcgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg 1020

ccccgtgttg ccagcggatt atgccgggaa ctcacggggg accgccgggg ttaactcgga 1080

ggaaggtggg gatgacgtca gatcatcatg ccccttacgt ccagggcttc acgcatgcta 1140

caatggccgg tacaacggga tgcgacgcgg cgacgcggag cggatccctg aaaaccggtc 1200

tcagttcgga tcgcagtctg caactcgact gcgtgaaggc ggagtcgcta gtaatcgcga 1260

atcagcaacg tcgcggtgaa tgcgttcccg ggccttgtac acaccgcccg tcaagtcatg 1320

aaagtgggca gcacccgaag cc 1342

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SREBP-1c forward primer

<400> 3

agctgtcggg gtagcgtctg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SREBP-1c reverse primer

<400> 4

gagagttggc acctgggctg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PGC-1a forward primer

<400> 5

ccgccacctt caatccagag 20

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PGC-1a reverse primer

<400> 6

caagttctcg atttctcgac gg 22

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin forward primer

<400> 7

tgtccacctt ccagcagatg t 21

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin reverse primer

<400> 8

agctcagtaa cagtccgcct aga 23