

명세서

발명의 명칭: 신규 유산균 및 이의 용도

기술분야

- [1] 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.

배경기술

- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 그러나, 이러한 연구는 호르몬의 변화가 장내 미생물의 변화를 야기함을 나타내는 것으로, 장내 미생물이 장간순환(enterohepatic circulation)을 통해 생체의 에스트로젠을 조절하는데 영향을 미치는 것이 보고되기도 하였다.
- [5] 생체 내에서 높은 수준의 에스트로젠은 유방암의 발병률을 높이며, 낮은 레벨의 에스트로젠은 골다공증의 발병률을 높이는 것으로 알려져 있어 체내에 적정량의 에스트로젠 수치를 조절하는 것이 중요하게 생각되고 있으나, 여성의 갱년기에는 이러한 조절이 어려운 문제가 있다. 이에 따라, 생체와 장내 미생물의 상호작용을 통해 여성 호르몬의 일종인 에스트로젠을 조절하고, 나아가 여성의 갱년기 질환을 치료하고 갱년기 증상을 개선 하기 위한 연구가 요구되고 있다.
- [6] [선행기술문헌]
- [7] [비특허문헌]
- [8] (비특허문헌 1) Sexually Transmitted Diseases, November 2006, vol 33, No. 11, 663-665.

- [9] (비특허문헌 2) Bacteria and the Fate of Estrogen in the Environment 2017, vol 24, Issue 6

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명의 목적은 신규한 락토바실러스 플란타럼 및 비피도박테리움 롱검 유산균을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 신규한 유산균을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 유산균을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)(기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2017.08.04, 수탁번호: KCCM12089P)을 제공한다.
- [14] 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK3은 전통 발효식품인 김치로부터 분리 및 동정된 락토바실러스 플란타럼의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.
- [15] 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 rDNA를 포함할 수 있다.
- [16] 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 명명 하였으며, 한국미생물보존센터에 2017년 8월 4일자로 기탁하였다(수탁번호 KCCM12089P).
- [17] 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, 에스쿨린, 살리신, 셀로비오스, 말토오스, 락토오스, 펠리비오스, 수크로오스, 트레할로오스, 펠리지토오스, 젠티오비오스, D-투라노오스 및 글루코네이트를 이용할 수 있다.
- [18] 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.
- [19] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK49은 인간의 분변으로부터 분리 및 동정된 비피도박테리움 롱검의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.
- [20] 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.
- [21] 상기 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 비피도박테리움 롱검 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 비피도박테리움 롱검과 가장 높은 분자계 통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 동정하고, 비피도박테리움 롱검 NK49로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2017년 8월 4일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCCM12088P).
- [22] 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, 에스쿨린, 살리신, 말토오스, 락토오스, 멜리비오스, 수크로오스, 라피노오스 및 D-투라노오스를 이용할 수 있다.
- [23] 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.
- [24] 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, 골다공증 등이 나타난다.
- [25] 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 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [26] 본 발명의 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 균주가 1 : 1 내지 4 : 1의 집락형성단위(CFU, Colony Forming Unit) 비로 혼합된 혼합물에서 에스트로겐과 유사한 에스트라디올(estradiol)을 투여한 양성 대조군과 유사한 수준의 골다공증 지표 개선효과가 나타났으며(도 1 내지 도 3, 표 4), 비만 지표가 개선되도록 하는 효과를 나타냄을 확인하였다(도 4 내지 도 5, 표 6).
- [27] 본 발명의 "락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)"은 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [28] 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.
- [29] 본 발명에서 용어, "생균체"는 살아있는 균체를 지칭하며, "사균체"는 가열, 가압, 약물처리 등으로 살균 처리된 균체를 의미한다.
- [30] 또한, 본 발명에서 용어, "배양물"은 유산균을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 사물을 의미하며, 본 발명에서는 신규한 유산균을 포함하는 개념이다.
- [31] 또한, 본 발명에서 용어, "파쇄물"은 상기 생균체 또는 사균체를 효소 처리한 가수분해물, 균질화(Homogenize), 초음파 처리 등으로 화학적 또는 물리적 힘에 의하여 파쇄하여 얻은 산물을 의미한다.
- [32] 또한, 본 발명에서 용어, "추출물"이란 생균체, 사균체, 이들의 파쇄물, 이들의 배양물 또는 이들의 혼합물을 당업계에 공지된 다양한 추출방법을 통해 추출하여 얻어진 산물을 의미할 수 있으며, 추출 후 다른 방법으로 가공 또는 처리하여 얻어질 수 있는 물질을 모두 포함하는 개념이다.
- [33] 본 발명의 "비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49)"은 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [34] 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 제한 없이 사용될 수 있다.
- [35] 본 발명에서 여성 갱년기 질환은 발한 및 안면홍조 등의 혈관운동증상, 우울 및 불안 등의 정신질환, 질건조, 질위축 및 요실금 등의 비뇨기질환, 비만, 고혈압 및 당뇨 등의 대사성 질환, 피부노화 및 골다공증 일 수 있으며, 구체적으로 골다공증, 비만 또는 우울증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [36] 본 발명의 일 실시예에서는 골다공증이 유도된 동물모델에 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 투여한 결과, 에스트로젠과 유사한 에스트라디올(estradiol)을 투여한 군과 유사한 수준으로 자궁 및 대퇴골의 무게가 증가하고(도 1 및 도 2), 대퇴골의 길이가 정상군과 유사하게 회복 되었음을 확인하였다(도 3). 또한, 에스트라디올을 투여한 군과 유사한 수준의 AP 효소(alkaline phosphatase) 활성이 나타났으며, 난소가 제거된 동물모델 대조군에 비해 AP 효소 활성, 오스테오칼신, 인, 칼슘의 농도가 정상군과 유사하게 회복되는 것을 확인하였다.
- [37] 또한, 본 발명의 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 5), 난소가 제거된 동물모델 대조군에 비해 SREBP-1c를 발현이 억제되며 PGC-1 α 발현이 유도되는 것을 확인함으로써 비만이 억제됨을 확인하였다(표 6).
- [38] 또한, 본 발명 일 실시예에서는 구속 스트레스 유발 우울증 동물모델에 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 투여한 결과, 스트레스로 유발되는 호르몬인 코르티코스테론 농도가 감소되고(도 6) 우울증상 행동 지표가 개선되는 등 (도 7 내지 도 9) 우울증에 효과적임을 확인하였다.
- [39] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 신규한 유산균 및 이들의 혼합물이 에스트로젠과 유사한 수준으로 여성 갱년기 질환에 대한 치료 및 개선효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.
- [40] 본 발명에 따른 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지 속 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.
- [41] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 텍스트로즈, 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 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함할 수 있다.
- [42] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 약제학적으로 유효한 양이어야 한다. "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 여성 갱년기 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효

용량 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.

- [43] 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여할 수 있다. 상기와 같이 투여제를 투여할 경우, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물을 1일 1×10^2 CFU/kg 내지 1×10^{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.
- [44] 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. 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제 등이 포함될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 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, 에멀전, 점안제, 안연고제, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 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 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [45] 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.
- [46] 본 발명의 "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.

- [47] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 신규한 유산균을 이용한 치료로 유의한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 대상체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 대상체들에는 여성 갱년기 질환의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 대상체들이 모두 포함될 수 있다.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 상기 건강기능 식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적 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.
- [51] 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 적절하게 결정될 수 있다.
- [52] 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.
- [53] 상기 건강기능 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 또는 비피도박테리움 롱검 NK49를 첨가할 수 있는 식품으로는 소세지, 육류, 빵, 초콜릿류, 스낵류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스 크림류를 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, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올일 수 있다.

- [54] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 여성 갱년기 질환의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P, 비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- [55] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 여성 갱년기 질환의 치료에 사용하기 위한 락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P, 비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [56] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 여성 갱년기 질환의 치료를 위한 락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P, 비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- [57] 본 발명의 "락토바실러스 플란타럼 NK3(*Lactobacillus plantarum* NK3)", "비피도박테리움 롱검 NK49(*Bifidobacterium longum* NK49)", "상기 균주들의 생균체, 사균체, 배양물, 파쇄물, 추출물", "상기 균주들의 혼합비율" 및 "여성 갱년기 질환" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [58] 이상 본 명세서에 기재된 수치 값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

발명의 효과

- [59] 본 발명에 따른 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물은 여성 갱년기 질환에 대한 우수한 치료 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 신규한 유산균은 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [60] 도면 내 LP는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3의 결과를, BP는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의 결과를 나타내는 것이다.
- [61] 도 1은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 자궁의 무게 증가 효과를 나타낸 그래프이다.
- [62] 도 2는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3,

- 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 대퇴골의 무게 증가 효과를 나타낸 그래프이다.
- [63] 도 3은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 대퇴골의 길이 회복 효과를 나타낸 그래프이다.
- [64] 도 4는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 비만 억제능을 나타낸 그래프이다.
- [65] 도 5는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 AMPK 활성 증가효과를 나타낸 도이다.
- [66] 도 6은 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 코르티코스테론(corticosterone) 농도에 미치는 효과를 나타낸 도이다.
- [67] 도 7은 고가플러스미로(elevated plus maze, EPM) 실험을 통한, 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 우울증 완화 효과를 나타낸 도이다.
- [68] 도 8은 강제수영 실험(Forced Swimming Test, FST)을 통한, 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 우울증 완화 효과를 나타낸 도이다.
- [69] 도 9는 꼬리 매달기 실험(Tail Suspension Test, TST)을 통한, 신규 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49 및 이들의 혼합물의 우울증 완화 효과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [70] 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.
- [71] **실시예 1: 유산균의 분리 및 동정**
- [72] **(1) 사람의 분변으로부터 유산균의 분리**
- [73] 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°C에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.
- [74] **(2) 김치로부터 유산균의 분리**

- [75] 배추 김치, 무 김치 또는 파김치를 각각 파쇄하고, 파쇄 상등액을 취해 MRS 한천 배지(MRS agar medium; Difco, USA)에 이식하고 37°C에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양하여 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.
- [76] (3) 분리된 유산균의 동정
- [77] 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 뮈코세(*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.
- [78]

[표1]

관 리 번 호	균주명	관 리 번 호	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

[79] (4) 신규 유산균 락토바실러스 플란타럼 (*Lactobacillus plantarum*) NK3의

생리학적 특성

- [80] 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 서열번호1의 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. 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.

[81]

[표2]

탄소원	NK3	탄소원	NK3
CONTROL	-	에스쿨린	+
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	+	글리코젠	-
D-만노오스	+	자일리톨	-
L-소르보오스	-	젠티오비오스	+
람노서스	-	D-투라노오스	+
둘시톨	-	D-릭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	-
만니톨	+	D-푸코오스	-
솔비톨	+	L-푸코오스	-
α -메틸-D-만노사이드	$\pm$	D-아라비톨	-
α -메틸-D-글루코사이드	-	L-아라비톨	-
N-아세틸-글루코사민	+	글루코네이트	$\pm$
아미그달린	+	2-케토-글루코네이트	-
알부틴	+	5-케토-글루코네이트	-

[82] (5) 신규 유산균 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49의

생리학적 특성

- [83] 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. 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.

[84]

[표3]

탄소원	NK49	탄소원	NK49
CONTROL	-	에스쿨린	+
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	+	글리코젠	-
D-만노오스	-	자일리톨	-
L-소르보오스	-	겐티오비오스	-
람노서스	-	D-투라노오스	±
둘시톨	-	D-릭소오스	-
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-글루코네이 트	-
알부틴	-	5-케토-글루코네이 트	-

[85] 실시예 2: 동물모델에서 유산균의 골다공증 치료 효과

- [86] (1) 골다공증 동물 모델의 제조 및 유산균 투여
- [87] C57BL/6 생쥐(암컷, 21-23 g, 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 6일씩 5주 동안 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49, 이들의 1:1 혼합물 또는 이들의 4:1 혼합물(LP:BL의 비가 4:1이며 이하 동일함)을 일일 1×10^9 CFU의 양으로 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험 동물에는 17 β -estradiol(PC)을 10 μ g/kg/day로 복강투여하였으며, sham군, 난소제거실험군은 약물대신 생리식염수를 경구투여하였다.
- [88] 유산균 투여가 종료된 다음날 실험동물을 희생시킨 다음 혈액, 대퇴골, 대장, 자궁, 간을 분리하여 골다공증 지표들을 측정하였다.
- [89] (2) 골다공증 지표의 측정
- [90] 혈액에서 오스테오칼신(Osteocalcin)은 R&D system ELISA Kit (Minneapolis, MN, USA), USA로, 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.
- [91] (3) 실험 결과
- [92] 상기와 같이 난소를 적출한 동물모델을 6주간 사육한 결과, 해당 동물모델에서는 자궁의 무게감소(도 1), 대퇴골의 무게 감소(도 2) 및 대퇴골의 길이 증가(도 3)을 나타내었다. 그러나, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼 NK43(LP), 비피도박테리움 롱검 NK49(BL), 상기 유산균들의 1:1 혼합물(M1:1) 및 혼합물(LP:BL = 4:1, M4:1)을 투여한 군에서는 에스트로젠과 유사한 에스트라디올(estradiol)을 투여한 군과 유사한 수준으로 자궁 및 대퇴골의 무게가 증가하고(도 1 및 도 2), 대퇴골의 길이가 회복됨을 확인하였다(도 3).
- [93] 또한, 하기 표 4에 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) 활성, 오스테오칼신, 인 및 칼슘의 농도로 회복되는 것을 확인하였다.
- [94]

[표4]

	정상군(Nor)	유도군(Sham)	대조군(Con)	LP NK3	BL NK49	유산균 혼합(M 1:1)	유산균 혼합(M 4:1)	양성대조군(P C)
AP (IU/L)	170.0±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	6.4±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±0.2	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($\mu\text{g/L}$)	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

- [95] 상기와 같은 결과는 본 발명의 신규한 유산균 및 이들의 혼합물이 에스트로젠과 유사한 수준으로 여성 갱년기 질환의 증상 중 하나인 골다공증에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.
- [96] 실시예 3: 동물모델에서 유산균의 비만 개선 효과
- [97] (1) 비만 유도 동물 모델의 제조 및 유산균 투여
- [98] 상기 실시예 2의 (1)에서와 같이 C57BL/6 생쥐(암컷, 21-23 g, 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 6일씩 5주 동안 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) NK3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK49, 이들의 1:1 혼합물 또는 이들의 4:1 혼합물을 일일 1×10^9 CFU의 양으로 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 17 β -estradiol(PC)을 10 $\mu\text{g/kg/day}$ 로 복강투여하였으며, sham군, 난소제거실험군은 약물대신 생리식염수를 경구투여하였다.
- [99] 유산균 투여가 종료된 다음날 실험동물을 희생시킨 다음 혈액, 대퇴골, 대장, 자궁, 간을 분리하여 비만 지표들을 측정하였다. 몸무게는 매주 1회씩 측정하였다.
- [100] (2) AMPK 활성 측정
- [101] 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 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 10% SDS-PAGE 젤 전기영동을 하고, 멤브레인에 트랜스퍼 하였다. 이후 4°C 에서 밤새 AMPK, p-AMPK, β -actin의 항체와

반응시키고, 이어서 2차 항체로 반응시킨 후 세척하였다. 이후 ECL(enhanced chemiluminescence reagent) 시약으로 발색시켜 확인하였다.

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

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

[104] 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 5의 프라이머들을 사용하여 다음과 같은 조건으로 수행했다: 95°C에서 30초 동안 DNA polymerase activation, 이어서 95°C에서 15초, 60°C에서 30초 간격으로 반응을 시키면서 40회 반복하여 증폭하였다. 최종 발현된 유전자 양은 β -actin과 비교하여 계산하였다.

[105] [표5]

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-1 α forward	5'-CCG CCA CCT TCA ATC CAG AG-3'
6	PGC-1 α 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'

[106] **(4) 실험 결과**

[107] 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 4).

[108] 또한, 난소를 적출한 동물모델을 6주간 사육한 결과, AMPK의 활성이 감소하였으며(도 5), 하기 표 6에 나타난 바와 같이 SREBP-1c의 발현이 유도되고, PGC-1 α 의 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 5), 이는 난소가 제거된 대조군에 비해 높은 활성을 나타내었다. 또한, 하기 표 6에 나타난 바와 같이 난소가 제거된 동물모델 대조군에 비해 SREBP-1c를 발현이 억제되며 PGC-1 α 발현이 유도되는 것을 확인함으로써 비만이 억제됨을 확인하였다.

[109] [표6]

	정상군(Nor)	유도군(Sham)	대조군(Con)	LP NK3	BL NK49	유산균 혼합(M 1:1)	유산균 혼합(M 4:1)	양성대조군(P C)
SREBP-1c	1.0 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.3
PGC-1 α	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2

[110]

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

[112] 실시예 4: 동물모델에서 유산균의 우울증 치료 효과

[113] (1) 구속 스트레스 유발 우울 생쥐 모델 제작

[114] 우울 생쥐모델은 3 x 10 cm의 원통모양의 구속 스트레스 기구에 생쥐를 움직일 수 없도록 고정된 다음 하루에 12시간씩 2일 동안 연속하여 구속스트레스를 주었다. 그 다음 익일부터 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49, 또는 이들의 혼합물을 5일간 투여하여(NK3, NK49, MIX: 1X10⁹ CFU/mouse) 최종 투여 익일에 우울행동 지표를 측정하였다.

[115] (2) 혈장 코르티코스테론 농도 측정

[116] 상기와 같이 제작한 구속 스트레스 유발 우울 생쥐 모델의 경우 스트레스 호르몬인 코르티코스테론(corticosterone)의 혈장 농도가 대조군 보다 유의하게 높게 나타나 본 실험에 적합하게 동물 모델이 제작되었음을 확인하였으며, 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 상기 두 균주의 병용투여(MIX)의 경우 모두 혈장 코르티코스테론 농도가 낮아짐을 확인하였다(도 6).

[117] (3) 고가플러스미로(elevated plus maze, EPM) 실험

[118] 고가플러스미로 실험 장치는 두 개의 개방 통로(Open arm (30 x 7 cm))와 20 cm 높이의 벽을 가진 두 개의 폐쇄 통로(Enclosed arm (30 x 7 cm))가 바닥으로부터 50 cm 높이 및 중앙 플랫폼으로부터 7 cm 씩 뻗어 있는 검정색 플렉시 유리 장치이고, 20 루스의 밝기에 비디오 카메라가 위에 설치되어 있는 방에서 고가플러스미로에 놓인 쥐의 움직임을 기록하였다.

- [119] 구체적으로, C57BL/6 생쥐(수컷, 19-22 g)를 고가플러스미로의 정중앙에 두고, 머리는 개방 통로를 향하게 한 다음, 5분 동안 개방 통로와 폐쇄 통로에서 보낸 시간과 횡수를 측정하였다. 전체 시험 시간 중 개방 통로에서 보낸 시간(Time spent in open arms, OT)은 [개방 통로에서 보낸 시간/(개방 통로에서 보낸 시간+폐쇄 통로에서 보낸 시간)]x100으로 계산하였으며, 개방 통로 진입(open arm entries, OE)는 [개방 통로 입장/(개방 통로 입장+폐쇄 통로 입장)]x100으로 계산하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [120] 도 7에서 확인되는 바와 같이, 생쥐의 개방 통로에서 보낸 시간(Time spent in open arms, OT) 및 개방 통로 진입(open arm entries, OE) 비율을 측정한 결과, 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 상기 두 균주의 병용투여군(MIX)의 경우 비투여군 구속 스트레스 유발 생쥐에 비해 유의하게 높은 수치를 나타내고 있어 상기 균주들의 투여 시 생쥐의 불안 증상이 완화됨을 확인하였다.
- [121] **(4) 강제수영 실험(Forced Swimming Test, FST)**
- [122] 종래 알려진 Porsolt 등 (1997)의 방법에 따라 높이 40 cm, 직경 20 cm인 수조에 온도 25±1°C의 물을 30 cm 채운 다음, 실험용 생쥐를 한 마리씩 수조에 넣고 총 6분 중 최초 2분은 적응시간으로 측정하지 않고, 마지막 4분 동안 실험동물의 부동상태 (immobility) 시간을 측정하였다(부동상태는 머리만을 물 위로 드러내기 위한 최소한의 움직임만 하면서 똑바로 서서 움직이지 않고 떠있는 상태를 의미함). 측정 결과를 도 8에 나타내었다.
- [123] 도 8에서 확인되는 바와 같이, 부동상태 생쥐 비율을 측정한 결과, 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 상기 두 균주의 병용투여군(MIX)의 경우 비투여군 구속 스트레스 유발 생쥐에 비해 유의하게 낮은 수치를 나타내고 있어, 상기 균주들의 투여시 생쥐의 생존 포기에 따른 급격한 우울 상태가 완화됨을 확인하였다.
- [124] **(5) 꼬리 매달기 실험(Tail Suspension Test, TST)**
- [125] 종래 알려진 Steru 등 (1985)의 방법에 따라 생쥐의 꼬리 끝 1cm 정도에 고정 장치를 장착한 다음, 지면에서 50 cm 떨어진 위치에 매달고, 총 6분 동안 실험동물의 부동상태 (immobility) 시간을 측정하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [126] 도 9에서 확인되는 바와 같이, 부동상태 생쥐 비율을 측정한 결과, 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 상기 두 균주의 병용투여(MIX) 군의 경우 비투여군 구속 스트레스 유발 우울 생쥐에 비해 유의하게 낮은 수치를 나타내고 있어 상기 균주들의 투여시 생쥐의 우울 상태가 완화됨을 확인하였다.
- [127] 상기의 결과들은 본 발명의 신규한 유산균 및 이들의 혼합물이 여성 갱년기 질환의 증상 중 하나인 우울증에 대한 개선 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

[128] <유산균의 수탁 정보>

[129] 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.

[130] 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.

산업상 이용가능성

[131] 본 발명에 따른 신규한 유산균인 락토바실러스 플란타럼 NK3, 비피도박테리움 롱검 NK49 또는 이들의 혼합물은 골다공증 치료, 비만 개선, 우울증 완화 등 여성 갱년기 질환에 대한 치료 효과가 있으므로 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있으며 관련된 의약 및 식품 산업분야에서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[132]

번역문

**특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한
부다페스트 조약**

국제 서식

TO : 김 동 현
26. 경희대로,
동대문구,
서울 02447,
대한민국

이 페이지 하단에 명시된 국제기탁기관이
규칙 7.1에 따라 발행한 원기탁에 대한
수탁증

I. 미생물의 특징	
기탁자가 부여한 특정표시 <i>Bifidobacterium longum</i> NK49	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 KCCM 12088P
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
I 로 특정된 미생물은 ☐ 과학적 성질 ☐ 분류학상 위치로 기재하였다 (적용되는 부분에 표시한다).	
III. 수탁	
국제기탁기관은 I 로 특정되는 미생물을 2017년 8월 4일에 수탁하였다 (최초 기탁일) ¹ .	
V. 국제기탁기관	
명칭 : 한국미생물보존센터 주소 : 유림 빌딩 46. 홍제내2가길 서대문구 서울 120-861 대한민국	국제 기탁 기관을 대표할 권한이 있는 자의 서명:  날 짜 : 2017년 8월 4일

¹ 규칙 6.4 (d)이 적용되는 경우 상기 일자는 국제 기탁 기관의 자격이 획득된 일자이다.

BP/4 형식

번 역 문

**특허질차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한
부다페스트 조약**

국제 서식

TO : 김 동 현
26, 경희대로,
동대문구,
서울 02447,
대한민국

이 페이지 하단에 명시된 국제기탁기관이
규칙 7.1에 따라 발행한 원기탁에 대한
수탁증

I. 미생물의 특징	
기탁자가 부여한 특징표시 <i>Bifidobacterium longum</i> NK3	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 KCCM 12089P
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
I 로 특징된 미생물은 [] 과학적 성질 [] 분류학상 위치로 기재하였다 (적용되는 부분에 표시한다).	
III. 수탁	
국제기탁기관은 I 로 특징되는 미생물을 2017년 8월 4일에 수탁하였다 (최초 기탁일) ¹ .	
V. 국제기탁기관	
명칭 : 한국미생물보존센터 주소 : 유림 빌딩 46, 홍재내2가길 서대문구 서울 120-861 대한민국	국제 기탁 기관을 대표할 권한이 있는 자의 서명:  날 짜 : 2017년 8월 4일

¹ 규칙 6.4 (d)이 적용되는 경우 상기 일자는 국제 기탁 기관의 자격이 획득된 일자이다.

BF/4 형식

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 골다공증, 비만 또는 우울증인 것인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 KCCM12089P 및 비피도박테리움 롱검 NK49 KCCM12088P는 각각 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 락토바실러스 플란타럼 NK3 KCCM12089P, 비피도박테리움 롱검 NK49 KCCM12088P 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 여성 갱년기 질환은 골다공증, 비만 또는 우울증인 것인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 KCCM12089P 및 비피도박테리움 롱검 NK49 KCCM12088P는 각각 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품.
- [청구항 7] 락토바실러스 플란타럼 NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P.
- [청구항 8] 비피도박테리움 롱검 NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P는 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 락토바실러스 플란타럼 NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P는 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 비피도박테리움 롱검 NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P.
- [청구항 11] 락토바실러스 플란타럼 NK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P, 비피도박테리움 롱검 NK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 약학 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료방법.