



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월29일  
(11) 등록번호 10-1494279  
(24) 등록일자 2015년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/21 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)  
A61P 3/04 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2010-0096077  
(22) 출원일자 2010년10월01일  
심사청구일자 2010년10월01일  
(65) 공개번호 10-2012-0034482  
(43) 공개일자 2012년04월12일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020040049534 A\*  
WO2008120712 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
주식회사한국아쿠르트  
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)  
(72) 발명자  
박도영  
서울특별시 동작구 매봉로2길 1, 평화그린 401호 (상도1동)  
안영태  
경기도 수원시 권선구 정조로 432, 109동 312호 (세류동, 미영아파트)  
허철성  
충청남도 천안시 동남구 터미널9길 59, 201동 204호 (신부동, 대림한들아파트)

(74) 대리인  
경일호  
심판번호 거절결정불복 심판청구일 2013년07월26일  
심판관함의체 심판장 주영식, 심판관 이충호, 심판관 김희승

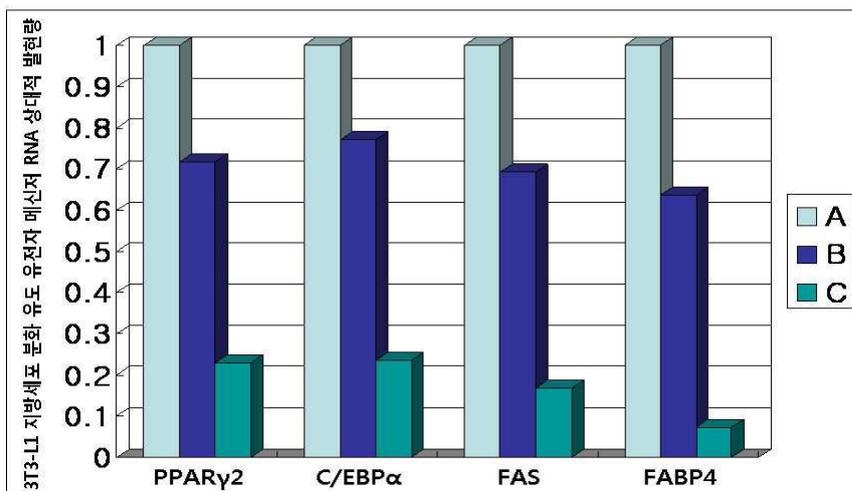
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸 케이와이1032 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품

(57) 요약

본 발명은 3T3-L1 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자들의 mRNA 및 단백질 발현을 억제함으로써 궁극적으로 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료, 건강기능식품에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032는 3T3-L1 지방 세포 분화 억제 효과가 매우 뛰어나므로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032를 이용한 지방 대사에 영향을 미치는 기능성 식품 및 약학 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도3



**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

3T3-L1 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자인 PPAR $\gamma$ 2(peroxisome proliferator activated receptor gamma 2), C/EBP $\alpha$ (CCAAT/enhancer binding protein-alpha), FAS(fatty acid synthase) 및 FABP4(fatty acid binding protein 4)의 발현을 억제함으로써 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032(기탁번호: KCCM-10430) 세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 억제용 발효유.

**청구항 5**

3T3-L1 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자인 PPAR $\gamma$ 2(peroxisome proliferator activated receptor gamma 2), C/EBP $\alpha$ (CCAAT/enhancer binding protein-alpha), FAS(fatty acid synthase) 및 FABP4(fatty acid binding protein 4)의 발현을 억제함으로써 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032(기탁번호: KCCM-10430) 세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 억제용 음료.

**청구항 6**

3T3-L1 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자인 PPAR $\gamma$ 2(peroxisome proliferator activated receptor gamma 2), C/EBP $\alpha$ (CCAAT/enhancer binding protein-alpha), FAS(fatty acid synthase) 및 FABP4(fatty acid binding protein 4)의 발현을 억제함으로써 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032(기탁번호: KCCM-10430) 세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 억제용 건강기능식품.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료, 건강기능식품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 3T3-L1 지방세포 분화 유도에 관여하는 대표적인 유전자인 PPAR $\gamma$ 2(peroxisome proliferator activated receptor gamma 2), C/EBP $\alpha$ (CCAAT/enhancer binding protein-alpha), FAS(fatty acid synthase), FABP4(fatty acid binding protein 4)의 mRNA 및 단백질 발현을 억제함으로써 궁극적으로 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료, 건강기능식품에 관한 것이다.

[0001]

**배경 기술**

- [0002] 3T3-L1 세포는 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast)로서 지방 조직의 생물학적 연구에 많이 사용되는 세포 주(cell line)이다. 3T3-L1 마우스 배아 섬유아세포에 인슐린과 같은 호르몬을 처리하면 지방 합성 신호 경로가 활성화되면서 세포 내 지방량이 증가하고 세포의 모양이 원형으로 변한다. 이처럼 세포 내 신호 경로와 세포의 모양이 변하는 과정을 분화(differentiation)라고 하고 분화가 진행 중인 3T3-L1 세포를 '성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte)', 분화가 완료된 3T3-L1 세포를 '성숙된 3T3-L1 지방 세포(mature 3T3-L1 adipocyte)'라고 한다.
- [0003] 이러한 3T3-L1 세포의 지방분화를 억제하는 물질을 탐색하는 연구가 각국에서 진행되고 있다. 예를 들어, 녹차 폴리페놀 성분인 epigallocatechin gallate (Obesity res. 2005;13:982-90), 적포도주 성분인 resveratrol(Phytother Res. 2008;22:1367-71), 마늘 성분인 ajoene(Phytother Res. 2009;23:513-8) 등이 3T3-L1 세포의 지방분화 억제 효능을 가지고 있다는 연구결과가 보고된 바 있다. 3T3-L1 세포의 지방분화를 억제하는 물질은 항비만 효능을 가진다고 볼 수 있기 때문에 식품, 의약 등의 분야에서 활용도가 매우 크다.
- [0004] 비만은 아직도 원인이 명확히 밝혀지지 않은 여러 가지 요인들에 의해서 복합적으로 발생하는 만성적인 질환으로 알려져 있다. 비만은 고혈압, 당뇨, 심혈관 질환, 담석, 골관절염, 수면 무호흡증(sleep apnea), 호흡장애, 자궁내막, 전립선, 유방 또는 대장암등을 유발하는 요인이 되고 있다.
- [0005] 비만의 치료방법은 크게 식이-운동요법, 수술 요법 및 약물 요법이 있다. 식이-운동 요법은 저칼로리-저지방 섭취와 산소를 소비하는 육체의 활동을 통한 치료 방법인데, 이는 인내심을 가지고 반복적, 지속적으로 수행되어야 하기 때문에 대중적인 효과를 보기는 어려운 것으로 인식되고 있다. 수술요법은 외과적 수술을 통해 체지방을 물리적으로 제거하는 방법으로서 단기간에 효과를 볼 수 있는 장점이 있지만, 수술을 해야 하는 점, 효과의 지속성이 없다는 점, 비용이 많이 든다는 점 등 때문에 제한적으로 활용되고 있다. 약물 요법은 식욕 감소를 유발하거나 지방 흡수를 억제하는 약제들을 이용해서 비만을 치료 또는 예방하고자 하는 방법이다. 현재까지 개발된 비만 예방 및 치료를 위한 약제는 다양한 생리학적 메카니즘을 가지고 있다.
- [0006] 지방의 흡수 억제 약물로서는 췌장 지방 분해 효소 방해제(Orlistat)가 알려져 있는데, 췌장 지방분해 효소의 작용을 억제함으로써 지방의 흡수를 감소시키는 약제이나 지용성 비타민의 흡수를 방해하며, 유방암 유발의 가능성이 있다.
- [0007] 식욕을 저해하는 약제는 주로 뇌에 존재하는 신경전달물질(catecholamines)에 작용하여 식욕을 저하시킨다. 그러나 텍스펜플루르아민, 펜플루르아민은 신경독성, 판막성 심장질환의 부작용이 있고, 시부트라민은 심박수와 혈압을 상승시키는 부작용이 있다.
- [0008] 이에 반해 안전한 미생물로 여겨져 온 유산균을 이용하여 비만을 예방 또는 치료하고자 하는 노력 역시 많이 이루어지고 있다. 유산균은 장내 정상균총의 유지, 장내 균총의 개선, 항당뇨 및 항고지혈증 효과, 발암 억제, 대장염 억제, 그리고 숙주의 면역체계의 비특이적 활성화 등의 효과를 나타낸다고 보고되고 있다. 그 중에서도 락토 바실러스 속 균주는 인체의 장내에 서식하는 정상 미생물 군집의 주요 구성원으로서, 건강한 소화기관과 질내 환경을 유지하는 데 있어서 중요한 것으로 오래 전부터 알려져 왔고 미국의 공중건강 가이드라인(U.S. Public Health Service guidelines)에 의하면, 현재 미국 균주 기탁기관(ATCC)에 기탁된 락토바실러스 균주 모두 인체나 동물에 질병을 유발할 잠재적 위험에 대해서는 알려진 것이 없다고 인정되는 '안전수준(Bio-safety Level) 1'로 분류되어 있다.
- [0009] 락토바실러스 균주의 항비만 효능 기전으로서 adiponectin 분비 촉진, 교감신경 자극에 의한 에너지 소비 촉진, 포만감 유발 등이 지금까지 알려져 있다. 하지만 락토바실러스 균주가 3T3-L1 지방 세포 내 지방 대사 관련 유전자들의 발현을 어떻게 조절하는지에 대한 연구는 미비한 실정이다.
- [0010] 이에 본 발명자들은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032가 3T3-L1 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자들의 mRNA 및 단백질 발현을 억제함으로써 궁극적으로 3T3-L1 지방세포 분화를 억제한다는 사실을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0011] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 지방세포 분화 유도 유전자 발현을 억제함으로써 궁극적으로 지방세포 분화를 억제하는 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료, 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0012] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3T3-L1 지방세포 분화 유도에 관여하는 대표적인 유전자인 PPAR $\gamma$  2(peroxisome proliferator activated receptor gamma 2), C/EBP $\alpha$ (CCAAT/enhancer binding protein-alpha), FAS(fatty acid synthase), FABP4(fatty acid binding protein 4)의 mRNA 및 단백질 발현을 억제함으로써 궁극적으로 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032를 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0014] 본 발명에 따른 균주를 분리하기 위하여 국내 가정에서 제조한 김치를 0.02% 소듐 아지드(sodium azide)가 포함된 엠알에스(MRS) 액체 배지에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후, 10 $\mu$ l 백금이를 사용하여 배양액을 취하여 다시 0.02% 소듐 아지드가 포함된 엠알에스 한천 평판배지에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 배양하였다. 이렇게 형성된 균락 중에서 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효능을 가지는 균주를 분리하였다.

[0015] 이렇게 분리한 균주의 관찰은 MRS 한천평판배지에서 37 $^{\circ}$ C로 48시간 배양한 후 그람염색(Cowan, 1974)을 통하여 분리 균주의 크기와 형태를 광학 현미경(SAMWON, CSB-FEI)으로 관찰하였으며, 분리한 균주의 생화학적 특성은 Cowan과 Steel(1984) 그리고 Macfaddin(1984)의 방법에 따라 균주의 특성을 조사한 후 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 준하여 분류 및 동정하였다.

[0016] 따라서, 본 발명에 따른 신규의 유산균의 특성은 다음과 같다.

- [0017] 1)균의 형태: 간균
- [0018] 2)집락 색깔: 우유빛의 둥근 환 모양
- [0019] 3)생육 최적 온도: 37 $^{\circ}$ C
- [0020] 4)운동성: 없음
- [0021] 5)그람(Gram) 염색: 양성
- [0022] 6)카탈라제: 음성
- [0023] 7)산소 영향: 내기혐기성
- [0024] 8)당 발효 실험 및 동정

[0025] Biomerieux 사의 API 50CHL kit를 이용하여 당 발효 실험을 한 결과를 표 1에 나타내었다.

**표 1**

당 0-24	사용 여부	당 25-49	사용 여부
0 Control	-	25 에스쿨린	+
1 글리세롤	-	26 살리신	+

2 Erythritol	-	27 셀로비오스	+
3 D 아라비노스	-	28 말토스	+
4 L 아라비노스	+	29 유당	+
5 리보스	+	30 멜리비오스	+
6 D 크실로스	-	31 자당	+
7 L 크실로스	-	32 트레할로스	+
8 아도니톨	-	33 이눌린	-
9 β 메틸-D-크실로시드	-	34 멜레지토스	+
10 갈락토스	+	35 라피노스	+
11 포도당	+	36 전분	-
12 과당	+	37 글리코겐	-
13 만노스	+	38 크실리톨	-
14 소르보스	-	39 젠티오비오스	+
15 람노스	+	40 D 투라노스	+
16 들시톨	-	41 D 라이소스	-
17 시노시톨	-	42 D 타가토스	-
18 만니톨	+	43 D 푸코스	-
19 소르비톨	+	44 L 푸코스	-
20 α-메틸-D-만노시드	+	45 D 아라비톨	+
21 α-메틸-D-글루코시드	+	46 L 아라비톨	-
22 N-아세틸-글루코사민	+	47 글루코나테	+
23 아미그달린	+	48 2-케토-글루코나테	-
24 아르부틴	+	49 5-케토-글루코나테	-

[0027] 위와 같은 균의 형태학적, 생리적 및 성장 특성에 근거하여 본 발명의 균주를 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) KY1032(기탁번호: 한국미생물보존센터, 기탁일자: 2002년 10월 2일, 수탁번호: KCCM-10430)라고 명명하였고 이 균주는 대한민국 특허등록 제0464642호(발명의 명칭: 락토바실러스 플란타룸 케이와이 1032)로 이미 특허 등록된 바 있다.

[0028] 한편, 본 발명의 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 단독 또는 약제학적으로 사용되는 부형제들과 함께 약제학적으로 통상적으로 사용되는 방법에 따라 정제, 캡슐제 등과 같은 제제형태로 제제화하여 사용될 수 있다.

[0029] 사람의 경우, 통상적인 1일 투여량은 1~30mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 실제 투여량은 투여경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다.

[0030] 물론, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0031] 또한, 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 발효유는 유산균 배양액, 락토바실러스 플란타룸 KY1032 및 혼합과즙시럽을 일정비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 제조한다.

[0032] 또한, 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 음료는 혼합과즙시럽, 락토바실러스 플란타룸 KY1032 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조한다.

[0033] 또한, 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실

러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 상기 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 포함하는 것 이외에 영양보조성분으로서 비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

**발명의 효과**

[0034] 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032는 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 억제 효능이 매우 뛰어나므로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KY1032를 이용한 지방 대사에 영향을 미치는 기능성 식품 및 약학 조성물 등으로 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0035] 도 1은 락토바실러스 플란타룸 KY1032에 의한 3T3-L1 세포 지방 축적 억제 효과를 AdipoRed assay 방법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 락토바실러스 플란타룸 KY1032에 의한 3T3-L1 세포 지방 축적 억제 효과를 Oil-red-O staining 방법으로 관찰한 결과를 나타낸 그림이다.

도 3은 리얼타임 PCR 방법을 이용하여 3T3-L1 세포 내 PPAR $\gamma$ 2, C/EBP $\alpha$ , FAS, FABP4 유전자의 상대적인 mRNA 발현량을 조사한 그래프이다.

도 4는 웨스턴 블랏팅 방법을 이용하여 3T3-L1 세포 내 PPAR $\gamma$ 2, C/EBP $\alpha$ , FAS, FABP4 유전자의 단백질 발현량을 조사한 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0036] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.

[0037] <실시예 1>

[0038] 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 포함한 동결건조 분말 제조

[0039] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 KY1032는 식품원료용 Proteose peptone #3, Yeast Extract, Beef Extract, 그리고 포도당을 첨가한 액체배지를 제조하여 37℃에서 약 16시간 배양한 후 배양액을 원심분리하고 멸균된 생리식염수로 세척한 다음 멸균유에 분산하였다. 다시 동결 건조하여 동결건조 분말 1그램(g)당 약 10<sup>11</sup>cfu 균수를 얻었다. 이 동결건조 분말을 지방세포 분화 유도 유전자 발현 억제 및 지방세포 분화 억제 소재로 사용하였다.

[0040] 한편 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 KY1032는 상기와 같이 동결건조된 분말 형태 또는 배양물 형태로 제공될 수 있다.

[0041] <실시예 2>

[0042] 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조

[0043] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제제 예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0044] 정제의 제조

[0045] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 포함한 동결건조분말 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 폴리비닐피롤리돈 97mg을 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 2mg을 가하여

혼합한 후 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.

[0046]

캡슐제의 제조

[0047]

상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 포함한 동결건조분말 100mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 완전히 혼합한 후 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0048]

<실시예 3>

[0049]

락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조

[0050]

유산균 배양액과 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 KY1032 및 혼합과즙시럽으로 구성된 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[0051]

먼저, 유산균 배양액은 원유 95.36중량%와 탈지분유(또는 혼합분유) 4.6중량%를 교반하여 15℃에서의 비중은 1.0473~1.0475, 적정산도는 0.200~0.220%, pH는 6.65~6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix<sup>o</sup>)는 16.3~16.5% 정도가 되도록 혼합하였다. 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 40℃로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP 배지에서의 총 유산균수가  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.

[0052]

그 다음, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>o</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.

[0053]

그런 다음, 상기 유산균배양액 69.5중량%와 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 포함한 동결건조분말 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유한 발효유를 제조하였다.

[0054]

<실시예 4>

[0055]

락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조

[0056]

본 발명의 락토바실러스 플란타룸 KY1032과 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[0057]

먼저, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>o</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.

[0058]

그리고 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 포함한 동결건조분말 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 지방세포 분화 유도에 관여하는 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 억제 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.

[0059]

<실시예 5>

[0060]

락토바실러스 플란타룸 KY1032를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조

- [0061] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플라타룸 KY1032를 포함한 동결건조분말 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아마이드) 및 올리고당을 상기 실시예 1의 락토바실러스 플라타룸 KY1032를 포함한 동결건조분말 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물 100중량부에 대하여 평균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 40~50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12~14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.
- [0062] <시험예 1>
- [0063] 3T3-L1 지방세포 분화 유도 및 락토바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물 확보
- [0064] 1-1. 3T3-L1 지방세포 분화 유도
- [0065] American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입한 3T3-L1 mouse embryonic fibroblast를 10% fetal bovine serum(FBS)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양하였다. 3T3-L1 mouse embryonic fibroblast를 지방 세포로 분화시키기 위한 절차를 나열하면 다음과 같다. 3T3-L1 mouse embryonic fibroblast가 confluent하게 자란 시점(day 0)으로부터 2일 후에 배양 배지를 10% FBS, 1μg/ml insulin, 0.5mM isobutylmethylxanthine(IBMx) 및 1μM dexamethasone가 포함된 DMEM 배지(분화 배지)로 교환하여 배양하였다. 이로부터 2일 후(day 2)에 10% FBS와 1μg/ml 인슐린이 포함된 DMEM 배지로 교환하여 배양하였다. 이로부터 2일 후(day 4)에 10% FBS만 포함된 배지로 교환하여 배양하였다. 이로부터 4일 후(day 8)에 3T3-L1 세포의 90% 이상이 지방 세포로 완전히 분화되었다고 볼 수 있다. 3T3-L1 mouse embryonic fibroblast가 지방세포로 완전히 분화되기 전(day 0 ~ day 8)까지를 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte)라고 명명하고 지방세포로 완전히 분화된 후(day 8 이후)에는 성숙된 3T3-L1 지방세포(mature 3T3-L1 adipocyte)라고 명명한다. 세포 배양 조건은 5% CO<sub>2</sub>, 37℃이다.
- [0066] 1-2. 락토바실러스 플라타룸 KY1032의 세포 추출물 확보
- [0067] 락토바실러스 플라타룸 KY1032를 MRS 배지에서 37℃, 24 시간 동안 배양하였다. 균체를 원심분리한 후 Phosphate Buffered Saline(PBS)로 행귀서 남아있는 배지 성분을 제거하였다. 락토바실러스 플라타룸 KY1032 균체를 동결건조해서 분말화 시킨 후 serial dilution 과정을 거쳐 균수를 측정하였다. 균체의 농도가 10<sup>10</sup> cfu/ml 이 되도록 PBS에 resuspension한 후 sonication하여 균체를 lysis 하였다. 이를 원심분리한 후 상층액을 락토바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물로 시험에 사용하였다.
- [0068] <시험예 2>
- [0069] 락토바실러스 플라타룸 KY1032에 의한 3T3-L1 지방세포 분화 억제 능력 측정
- [0070] 2-1. 3T3-L1 AdipoRed assay
- [0071] 96-well plate에서 배양한 3T3-L1 세포에 분화 배지를 처리하는 시점(day 0)에 상기 시험예 1-2의 락토바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물을 1%(v/v)로 함께 처리하였다. 추가적으로 락토바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물을 1/10, 1/100, 1/1000로 각각 희석한 후 1%(v/v)로 처리하였다. 이로부터 6일 후(day 6) 생성된 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte)를 PBS로 행귀서 배지 성분을 제거하고 200μl PBS와 5μl AdipoRed Assay Reagent(Lonza)를 처리하였다. AdipoRed 시약은 지방 덩어리에 끼어 들어가서 형광을 나타내기 때문에 세포의 지방량을 측정하기에 매우 유용하다. 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 형광검출기로 형광을 측정(excitation 485nm, emission 572nm)하였다.
- [0072] 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0073] 도 1의 A는 PBS 처리한 군, B는 락토바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물 1/1000 희석 처리한 군, C는 락토바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물 1/100 희석 처리한 군, D는 락토바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물

1/10 희석 처리한 군, E는 락토바실러스 플란타룸 KY1032 세포 추출물 그대로 처리한 군으로서 A에 대한 B, C, D, E 각각의 상대적인 지방 축적 정도를 나타낸다.

[0074] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, A에 비하여 B는 4% 가량, C는 10% 가량, D는 33% 가량, E는 36% 가량 3T3-L1 세포의 지방 축적 정도가 감소하였다. 이로써 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 KY1032의 세포 추출물의 농도가 높아질수록 3T3-L1 세포가 분화됨에 따라 축적되는 지방의 양이 더욱 줄어든다는 결론을 내릴 수 있었다.

[0075] 2-2. 3T3-L1 Oil-red-O staining

[0076] Cover glass에서 배양한 3T3-L1 세포에 분화 배지를 처리하는 시점(day 0)에 상기 시험예 1-2의 락토바실러스 플란타룸 KY1032 세포 추출물을 1%(vo/vo)로 함께 처리하였다. 이로부터 6일 후(day 6) 생성된 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte)를 PBS로 헹군 후 10% formalin을 30분 동안 처리해서 고정하였다. Oil-red-O 시약을 isopropanol에 3g/L의 농도로 녹인 후 filtering하고 이를 증류수와 6:4의 비로 혼합하여 세포에 처리하여 1시간 동안 반응시켰다. 세포를 증류수로 헹군 후 hematoxylin을 처리해서 5분 동안 반응시키고 다시 증류수로 헹궜다. 다음으로 2% glacial acetic acid에 10분 담근 후 증류수로 헹궜다. 다음으로 30% NH<sup>4</sup>OH 1.5ml과 70% ethanol 98.5ml 혼합 용액에 10분 담근 후 증류수에 10분 담근다. 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte)에 축적되어 있던 지방이 이 과정에서 적색으로 염색되었고 이를 현미경(AxioObserver Z1, Carl Zeiss)으로 관찰하였다.

[0077] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0078] 도 2의 A는 미분화 3T3-L1 세포, B는 분화 배지에서 배양한 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte), C는 락토바실러스 플란타룸 KY1032 세포 추출물을 함유한 분화 배지에서 배양한 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte)로서 각각 Oil-red-O 염색된 지방을 현미경으로 관찰한 것이다.

[0079] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, A의 경우에는 지방 세포로 분화되지 않았으므로 지방이 거의 없고, B의 경우에는 분화 배지를 처리하여 지방 세포로 분화를 유도하였기에 상당량의 지방이 축적되었다. 그러나, C의 경우에는 분화 배지에 함유되어 있는 락토바실러스 플란타룸 KY1032 세포 추출물에 의해 3T3-L1 세포 내 지방 축적 정도가 B에 비해 상당히 저해되었음을 확인할 수 있었다.

[0080] <시험예 3>

[0081] 락토바실러스 플란타룸 KY1032에 의한 3T3-L1 세포 내 비만 관련 바이오마커 유전자 발현의 유의적 차이 측정

[0082] 3-1. 리얼타임 PCR 분석

[0083] 3T3-L1 세포가 지방세포로 분화되는 과정에 관여하는 대표적인 유전자들로서 PPAR $\gamma$ 2, C/EBP $\alpha$ , FAS, FABP4 등이 있다. 상기 시험예 2의 락토바실러스 플란타룸 KY1032의 3T3-L1 지방 세포 분화 억제 효능이 상기 유전자의 mRNA 발현을 억제함으로써 나타나는 것인지 확인하기 위하여 리얼타임 PCR을 시행하였다.

[0084] 6-well plate에서 배양한 3T3-L1 세포에 분화 배지를 처리하는 시점(day 0)에 상기 시험예 1-2의 락토바실러스 플란타룸 KY1032 세포 추출물을 1%(vo/vo)로 함께 처리하였다. 이로부터 6일 후(day 6) 생성된 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte)로부터 RNA를 추출하고 High Capacity RNA-to-cDNA kit(Applied Biosystems, 4387406)를 이용하여 RNA에 대한 상보적인 DNA(complimentary DNA, 이하 'cDNA'라 함)를 확보하였다. 하기의 표 2와 같이 구입한 택맨프로브(Taqman probes, Applied Biosystems 사에서 구입)와 상기 cDNA를 이용하여 리얼타임 RCR(Applied Biosystems, 7500 Real time PCR)을 시행하였다.

[0085] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0086] 도 3의 A는 분화 배지에서 배양한 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte), B는 락토

바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물을 함유한 분화 배지에서 배양한 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포 (maturing 3T3-L1 pre-adipocyte), C는 미분화 3T3-L1 세포로서 A에 대한 B, C 각각의 상대적인 유전자 mRNA 발현 정도를 나타낸다.

[0087] 표 2의 GAPDH mRNA 발현은 internal control로 사용하였다.

[0088] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 3T3-L1 지방세포 분화 과정에 관여하는 C/EBP α, FABP4, FAS, PPAR γ2 유전자들의 mRNA 발현량이 C에 비해 A에서 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다. PPAR γ2와 C/EBP α는 전사인자로서 3T3-L1 세포의 지방 분화를 유도하고 FAS와 FABP4는 불포화 지방산 합성 및 지방산 유입을 증가시킨다. 그러나, B의 경우에는 PPAR γ2, C/EBP α, FAS, FABP4의 mRNA 발현량이 A에 비해 각각 28%, 23%, 30%, 36% 가량 저해되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과를 통해 락토바실러스 플라타룸 KY1032에 의해 지방 세포 분화를 유발하는 유전자의 mRNA 발현이 억제된 결과 3T3-L1 지방 세포 분화가 억제되는 것을 알 수 있었다.

표 2

유전자 이름	제품번호
peroxisome proliferator activated receptor gamma 2(PPAR γ2)	Mm00440945_m1
CCAAT/enhancer binding protein alpha(C/EBP α)	Mm00514283_s1
fatty acid binding protein 4(FABP4)	Mm00445880_m1
fatty acid synthase(FAS)	Mm00662319_m1
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)	Mm9999915_g1

[0090] 3-2. 웨스턴 블랏팅 분석

[0091] 상기 시험에 3-1의 지방 세포 분화 관련 유전자들의 mRNA 발현이 본 발명의 락토바실러스 플라타룸 KY1032에 의해 억제된다는 사실과 더불어 이들 유전자들의 단백질 발현 역시 본 발명의 락토바실러스 플라타룸 KY1032에 의해 저해되는지 확인하기 위해 웨스턴 블랏팅 분석을 실시하였다.

[0092] 6-well plate에서 배양한 3T3-L1 세포에 분화 배지를 처리하는 시점(day 0)에 상기 시험에 1-2의 락토바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물을 1%(vo/vo)로 함께 처리하였다. 이로부터 6일 후(day 6) 생성된 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte)로부터 단백질을 추출한 후 추출한 단백질들을 아크릴아마이드 겔 상에서 전기영동 하였다. 겔 상에서 분자량에 따라 분리된 단백질들을 니트로셀룰로오즈 필름에 transfer하고 웨스턴 블랏팅 자동화기기(Benchpro 4100, Invitrogen)를 이용하여 표 3과 같이 구입한 항체들을 각각 반응시켰다.

[0093] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0094] 도 4의 A는 미분화 3T3-L1 세포, B는 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포(maturing 3T3-L1 pre-adipocyte), C는 락토바실러스 플라타룸 KY1032 세포 추출물을 함유한 분화 배지에서 배양한 성숙 중인 3T3-L1 지방전구세포 (maturing 3T3-L1 pre-adipocyte)로서 밴드 면적을 통해 단백질 발현량을 미루어 판단할 수 있다.

[0095] 표 3의 GAPDH mRNA 발현은 internal control로 사용하였다.

[0096] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 3T3-L1 지방세포 분화 과정에 관여하는 PPAR γ2, C/EBP α, FAS, FABP4 유전자들의 단백질 발현량이 A에 비해 B에서 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그러나, C의 경우에는 PPAR γ2, C/EBP α, FAS, FABP4의 단백질 발현량이 B에 비해 모두 상당량 저해되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과를 통해 락토바실러스 플라타룸 KY1032에 의해 지방 세포 분화를 유발하는 유전자의 단백질 발현이 억제된 결과 3T3-L1 지방 세포 분화가 억제되는 것을 알 수 있었다.

표 3

[0097]

항체 이름	제품번호
anti-PPAR $\gamma$ 2 antibody	abcam ab45036
anti-C/EBP $\alpha$ antibody	Cell signaling sc-2295
anti-FABP4 antibody	Santa cruz sc-18661
anti-FAS antibody	Cell signaling 3189
anti-GAPDH antibody	Santa cruz sc-137179

수탁번호

[0098]

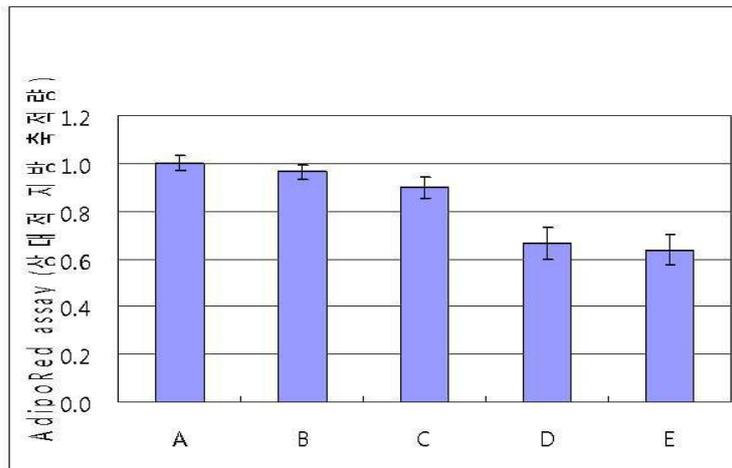
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM10430

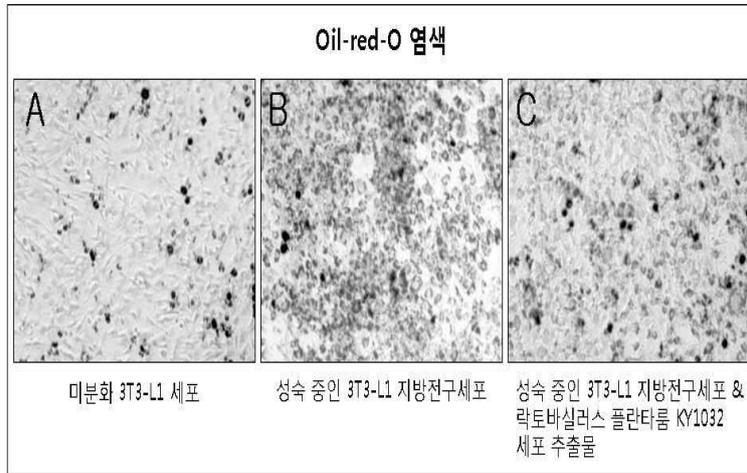
수탁일자 : 20021002

도면

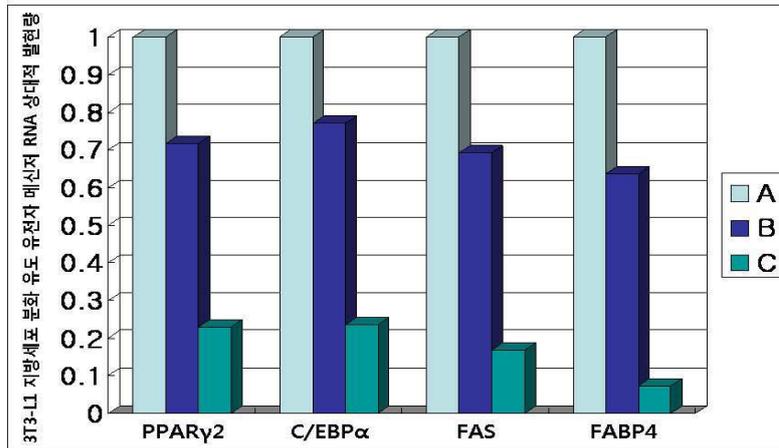
도면1



도면2



도면3



도면4

