



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월31일
(11) 등록번호 10-2072059
(24) 등록일자 2020년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23C 9/12 (2017.01)
A23K 10/16 (2017.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23C 9/1203 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0024255

(22) 출원일자 2019년02월28일

심사청구일자 2019년02월28일

(56) 선행기술조사문헌

- KR101873193 B1*
- KR1020100037310 A
- KR1020170000510 A
- KR1020110081672 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국식품연구원
전라북도 완주군 이서면 농생명로 245

(72) 발명자
최학중
광주광역시 서구 풍암순환로 54, 107동 1204호(풍암동, 풍암지구신암마을새한센시빌)

임슬기
광주광역시 서구 풍암2로 36, 101동 1802호(풍암동, 주은모아아파트)

(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 9 항

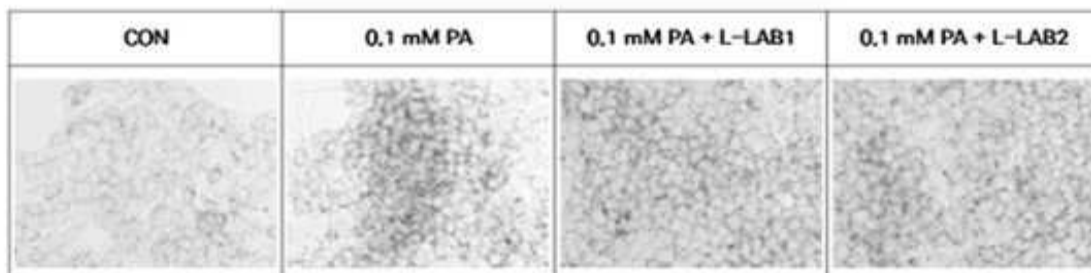
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 와이셀라 헬레니카 WiKim0103를 포함하는 비만 또는 지방간 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 김치로부터 분리된 신규한 와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103) 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 와이셀라 헬레니카 WiKim0103은 간세포 내 지방 축적을 저해하고 지방간 관련 유전자의 발현을 감소시킴으로써 지방간 생성 저해 효과를 나타내므로, 비만 또는 지방간 질환의 예방, 개선, 및 치료 용도를 위해 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



L-LAB1, *W. hellenica* WiKim0103; L-LAB2, *W. koreensis*.

(52) CPC특허분류

- A23K 10/16 (2016.05)
- A23L 29/065 (2016.08)
- A23L 33/135 (2016.08)
- A61K 35/74 (2013.01)
- A61P 1/16 (2018.01)
- A61P 3/04 (2018.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711073848
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	세계김치연구소
연구사업명	세계김치연구소운영경비
연구과제명	장내미생물군집 기반 김치 및 김치 유산균의 생리대사 불균형 개선 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	세계김치연구소
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCCM12419P의 와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103).

청구항 2

와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103; 수탁번호 KCCM12419P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 지방간 질환은 단순 지방간, 비알코올성 지방간염, 간섬유화 및 간경화를 포함하는 것인 식품 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 식품은 건강기능식품인 식품 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 식품은 음료, 바 또는 발효유인 식품 조성물.

청구항 6

와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103; 수탁번호 KCCM12419P) 또는 이의 배양물로 이루어지는 것인 식품 발효용 유산균 스타터.

청구항 7

와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103; 수탁번호 KCCM12419P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 사료 또는 사료 첨가제 조성물.

청구항 8

와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103; 수탁번호 KCCM12419P), 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 지방간 질환은 단순 지방간, 비알코올성 지방간염, 간섬유화 및 간경화를 포함하는 것인 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 김치로부터 분리한 신규한 와이셀라 헬레니카 균주 및 이를 포함하는 비만 또는 지방간 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0003] 지방간(fatty liver)은 지방의 과도한 섭취와 간 내의 축적 및 합성의 증가, 배출 감소 등의 원인으로 정상적인 지방대사가 이루어지지 못해 간세포 내에 중성지방이 축적되는 질환으로, 지방이 전체 간 무게의 5% 이상을 차지하게 될 때, 지방간이라고 분류한다.
- [0004] 또한, 최근 서구화된 고지방, 고열량의 서구화된 식생활과 문명의 발달로 인한 운동부족 등으로 인하여 지방간 환자가 급증하고 있으며, 연령 또한 10대부터 60대 이후까지 발병되고 있다. 지속적으로 간에 지방이 축적되면 염증을 수반하는 지방간성 간염으로 진행되며, 만성 염증으로 인한 간 조직 괴사, 간의 섬유화로 인해 간경화가 발생할 수 있다. 더욱 증상이 악화되는 경우, 간암으로 발전할 가능성이 있다. 따라서 지방간은 간염, 간경화 및 간암에 가장 큰 원인이다.
- [0005] 현재 시중에 이용되고 있는 약물은 비만 치료를 통한 지방간 개선을 나타내는 오르리스타트(orlistat)를 주원료로 하는 제니칼™(Roche), 시부트라민(sibutramin)을 주원료로 하는 리덕틸™(Abbott) 등이 있으나 설사, 복통, 불면증 등의 부작용을 보이며, 지방간의 치료제로는 클로피브레이트(clofibrate)로 대표되는 피브레이트계 약제 등이 임상에서 사용되고 있으나, 간기능 장애 등의 부작용이 보고되고 있다.
- [0006] 한편, 하기의 특허문헌 1에서의 다양한 유산균이 지방간 개선 효과를 나타내고 있기는 하지만 지방간의 근본적인 예방 또는 개선 효과를 가지며 전술한 부작용이 나타나지 않는 지방간 치료제의 개발이 절실히 필요하다.
- [0007] 한편, 특허문헌 1에서는 비피도박테리움 속, 락토바실러스 속 등의 다양한 유산균의 지방간 개선 효과를 개시하고 있으나, 아직까지 지방간에 대한 근본적인 치료 효과를 가지면서도 전술한 부작용이 나타나지 않는 치료제는 개발되지 않은 실정이다. 따라서, 지방간의 근본적인 치료가 가능하면서도 부작용이 없는 치료제의 개발이 절실히 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) KR 특허출원 제10-1937365호(2018.08.08.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 지방간 질환의 예방 또는 개선 효과가 우수한 신규한 와이셀라 헬레니카 속 유산균을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 이에, 본 발명자들은 전통발효식품으로부터 지방간 질환의 예방 또는 개선 효과를 나타내는 유산균 균주를 찾고자 노력한 결과, 신규한 와이셀라 속 유산균 균주인 와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103)을 분리, 동정하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 본 발명은 와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103)을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103)은 김치 유래의 와이셀라 헬레니카 신규 균주이다. 비록 본 발명에서의 와이셀라 헬레니카 WiKim0103을 김치에서 분리, 동정하기는 했으나, 이의 입수 경로가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명에의 실시예를 통해 분리된 유산균 균주는 미생물의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열 분석 결과, SEQ ID NO: 1의 핵산서열을 갖는 것으로 나타났다.
- [0016] 따라서, SEQ ID NO: 1의 16S rDNA 염기서열을 갖는 본 발명의 미생물을 와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103)로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2018년 12월 14일자로 기탁하였다(수탁번호 KCCM12419P).
- [0017] 본 발명의 와이셀라 헬레니카 WiKim0103은 그람양성균이고 호기적 조건과 혐기적 조건에서 모두 성장이 가능한 통성 혐기성(facultative anaerobe)이며, 포자를 형성하지 않고 운동성이 없으며 세포는 간균의 형태를 취하고

있다.

- [0018] 하기 실시예에서는, 본 발명의 와이셀라 헬레니카 WiKim0103이 간세포(HepG2 cells)에서 SREBP-1c(Sterol regulatory element-binding protein-1c), FAS(fatty acid synthase), SCD(lipogenic-related gene), COX-2(cyclooxygenase-2), TNF- α (Tumor necrosis factor-alpha) 및 NF- κ (inflammatory related gene)의 발현을 저해하는 것을 확인하였다. 이는 와이셀라 헬레니카 WiKim0103(*Weissella hellenica* WiKim0103) 균주가 HepG2 세포의 지방간 생성을 약 28 내지 35% 저해함으로써 지방간을 예방 또는 개선할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 와이셀라 헬레니카 WiKim0103은 사람 또는 동물의 지방간 질환의 예방, 치료 또는 개선 용도를 위해 다양하게 활용될 수 있다.
- [0019] 또한, 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 와이셀라 헬레니카 WiKim0103을 유효성분으로 포함하는 조성물은 간세포(HepG2 cells) 내 지방 축적 및 염증을 저해하고, 체중 감소 효능 및 혈중 간 기능 수치를 개선하며, 간 조직 내 지방대사, 염증 및 간 섬유화 관련 인자 유전자의 발현을 감소시키는 것으로 확인되었다. 따라서 상기 조성물은 비만, 또는 단순 지방간, 비알코올성 지방간염, 간섬유화 및 간경화 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지방간 질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물의 유효 성분으로 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명은 와이셀라 헬레니카 WiKim0103, 이의 배양물, 이의 파쇄물, 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 와이셀라 헬레니카 WiKim0103은 생균체 또는 사균체로서 존재할 수 있으며, 또한 건조 또는 동결건조된 형태로 존재할 수도 있다. 다양한 조성물 내에 포함시키기 적합한 유산균의 형태 및 제제화 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 와이셀라 헬레니카 WiKim0103은 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 배양물이거나, 상기 균주와 추가의 성분을 함께 배양하여 수득한 발효물이거나, 상기 균주를 유기용매로 추출한 추출물, 상기 균주의 세포막을 용해시키거나, 파쇄 또는 균질화 처리한 용해물(또는 파쇄물) 등의 형태로 제제화할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 한 구체예에서, 상기 조성물은 생균 또는 사균으로 존재하는 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 균주를 포함하는 조성물일 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 지방간 질환은 단순 지방간, 비알코올성 지방간염, 간섬유화 및 간경화를 포함할 수 있다.
- [0024] 또한 상기 지방간 질환은 알코올성 지방간과 비알코올성 지방간을 모두 포함할 수 있으며, 예컨대 고지방 식이에 의해 유도되는 비알코올성 지방간일 수 있다. 상기 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 원발성과 속발성에 따른 비알코올성 지방간을 모두 포함할 수 있으며, 예컨대 원발성 고지혈증, 당뇨 또는 비만으로부터 발생하는 비알코올성 지방간일 수 있다.
- [0025] 한 구체예에서, 상기 조성물은 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 균주의 배양물, 파쇄물, 발효물 또는 추출물을 포함하는 비만 또는 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 조성물이 약제학적 조성물로 활용될 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 균주 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0027] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0028] 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연당, 옥수수감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐아세테이트, 소듐 클로라이드등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄검등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액,

정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

- [0029] 나아가 해당 분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0030] 한 구체예에서, 본 발명은 와이셀라 헬레니카 WiKim0103, 이의 배양물, 이의 파쇄물, 이의 발효물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 건강기능식품 또는 음료, 바 등의 형태를 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 발효유 등의 음료를 포함할 수 있다. 이에, 본 발명은 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 또는 이의 배양물로 이루어지는 발효용 유산균 스타터를 제공한다.
- [0032] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 비타민복합제, 건강보조식품류 등이 있다.
- [0033] 본 발명의 식품 조성물은 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아추출물 (예를 들어 레바우디오시드A, 글리시르히진 등)] 및 합성향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0034] 상기 본 발명에 따른 조성물은 사료첨가제 또는 사료로서 이용될 수 있다.
- [0035] 사료 첨가제로서 이용될 경우, 상기 조성물은 20 내지 90% 고농축액이거나 분말 또는 과립 형태로 제조될 수 있다. 상기 사료첨가제는 구연산, 후말산, 아디픽산, 젯산, 사과산등의 유기산이나 인산 나트륨, 인산 칼륨, 산성 피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 사료로서 이용될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화 될 수 있으며, 통상의 사료성분을 함께 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 사료첨가제 및 사료는 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 펄기, 콩, 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 사료첨가제는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료첨가제는 탑드레싱으로서 또는 이들을 동물사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료첨가제를 동물사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 약제학적으로 허용가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수전분, 락토오스, 슈크로오스, 콩플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 사료첨가제는 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탑 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 사료첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀전제, 또는 용액제의 제형일 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 사료첨가제 및 사료는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액촉진제 등을 함유할 수 있다. 상기 사료첨가제는 침주, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 사료 또는 사료첨가제는 포유류, 가금 및 어류를 포함하는 다수의 동물식이에 적용할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서 동물을 포유류를 포함하고 포유류로서 돼지, 소, 양, 염소, 실험용 설치동물, 및 실험용 설치동물뿐만 아니라, 애완동물(예: 개, 고양이) 등에게 사용할 수 있으며, 상기 가금류로서 닭, 칠면조, 오리, 거위, 꿩, 및 메추라기 등에도 사용할 수 있고, 상기 어류로서 송어 등에 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은

아니다.

[0041] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 균주의 양은 1회를 기준으로 약 10^6 내지 10^{12} cfu/g일 수 있으며, 예컨대 10^7 내지 10^{11} cfu/g, 10^8 내지 10^{10} cfu/g일 수 있다. 균주를 투여할 경우에는 생균 상태로 투여하는 것이 바람직하며, 섭취 전에 사멸시키거나 감쇄(attenuation) 상태로 투여할 수 있다. 또한, 배양 상등액 등을 사용하여 제조할 경우에는 열처리 과정을 통한 멸균화 과정을 추가적으로 거칠 수 있다. 최소의 효능을 가지는데 필요한 균주량 및 일일 섭취 정도는 섭취자의 신체 또는 건강상태에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 약 10^6 내지 10^{12} cfu/g일 수 있으며, 예컨대 10^7 내지 10^{11} cfu/g, 10^8 내지 10^{10} cfu/g일 수 있다.

[0042] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따른 와이셀라 헬레니카 WiKim0103은 김치로부터 분리된 유산균으로서, 세포 내 지방 축적 저해 및 지방간 관련 유전자의 발현 감소를 통한 지방간 생성 저해효과를 나타내므로, 비만 또는 지방간 질환의 예방, 개선, 및 치료 용도를 위해 다양하게 활용될 수 있다. 나아가, 발효용 스타터로서 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 본 발명에 따른 WiKim0103 균주 처리에 따른 HepG2 세포 내 지방 축적 저해 효과를 육안으로 관찰한 사진이다.

도 2은 본 발명에 따른 WiKim0103 균주 처리에 따른 HepG2 세포 관련 유전자 발현 정도를 측정한 그래프이다.

도 3는 본 발명에 따른 WiKim0103 균주 처리에 따른 HT-29 세포 관련 유전자 발현 정도를 측정한 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 WiKim0103 균주 섭취에 따른 지방간 마우스 모델의 체중, 혈중 간기능 수치(GPT, GOT)를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 WiKim0103 균주 섭취에 따른 지방간 마우스 모델의 간조직 관련 유전자 발현 정도를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **[실시예]**

[0050] **실시예 1: 와이셀라 헬레니카 WiKim0103의 동정**

[0051] 김치 추출물의 원액을 MRS 배지에 도말하여 얻은 균단일집락을 루프로 수거하여 MRS broth에 배양하였다. DNA 추출은 QIAamp DNA Mini Kit(QIAgen, Germany)를 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 1% 아가로스 겔을 이용하여 확인하였으며, 16S rDNA gene을 증폭하기 위하여 추출된 유전체(genomic) DNA를 주형으로 하여 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 진행하였고, PCR 조건은 변성(denaturation) 95℃1분, 결합(annealing) 45℃1 분, 신장(extension) 72℃1 분 30초로 30 사이클을 수행하였다. 얻어진 PCR 산물은 마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 서열을 분석하였다. 세균의 동정은 16S rDNA 서열을 National Center for Biotechnology Information(NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov)의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) 검색 엔진의 유사도 분석을 통해 수행하였다.

[0053] 본 발명의 실시예를 통해 분리된 균주는 미생물의 동정을 위한 16S rDNA 염기서열 분석 결과, SEQ ID NO: 1의 핵산서열을 갖는 것으로 나타났다.

- [0054] 이에, 본 발명의 미생물을 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 (*Weissella hellenica* WiKim0103)으로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2018년 12월 14일자로 기탁하였다(KCCM12419P).
- [0056] **실시예 2: 와이셀라 헬레니카 WiKim0103의 간세포(HepG2 cells) 내 지방 축적 및 염증 저해 효능 확인**
- [0057] 인체 장-간 축(gut-liver axis)에 유사하도록 트랜스웰(transwell)을 이용하여 *in vitro* 실험법을 고안하였다.
- [0059] 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 유산균은 MRS 배지에서 30℃, 24시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 시점에서 균체를 회수하기 위해 6,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, PBS로 헹궈 남아있는 배지 성분을 모두 제거하여 준비하였다.
- [0060] 장세포(HT-29 cells)와 간세포(HepG2 cells) 배양을 위해 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin), 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하였으며, 6-웰(6-well) 플레이트 트랜스웰을 이용하여 공배양을 준비하였다. 공배양 전에 트랜스웰 멤브레인 막(membrane)에 장세포를 분주하고, 6-웰(6-well) 플레이트에는 간세포를 분주하여 각각 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하여 준비하였다.
- [0062] 배양 디쉬(dish) 내에서 장세포(HT-29 cells)와 간세포(HepG2 cells)가 80% 정도 자랐을 때, 배양액은 FBS free 배지로 교체하여 16시간 배양하였다. 배양 후 준비된 유산균 1×10⁷ CFU를 장세포에 처리하고, 트랜스웰을 조립하여 유산균, 장세포, 간세포의 공배양을 수행하였으며, 0.1 mM 팔미트산(palmitic acid)을 48시간 처리하여 간세포 내 지방 생성을 유도하였다. 0.1 mM 팔미트산과 48시간 배양한 뒤, 장세포와 간세포를 각각 회수하였다. 간세포 내 지방 생성은 오일 레드-O 염색, 지방 대사 및 염증 관련 유전자의 발현을 통해 확인하였으며, 장세포의 투과성은 장세포 내 밀착연접(tight junction) 관련 유전자의 발현을 통해 확인하였다.
- [0064] 1) 오일 레드-O 스테인(Oil red-O stain)을 통한 지방 축적량 확인
- [0065] 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 다음 10% 포르말데히드로 10분간 고정시켰다. 10% 포르말데히드를 제거하고 다시 포화된 포르말데히드를 넣어 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 그 후 60% 이소프로판올을 넣고 바로 제거한 후 증류수로 세척하고, 오일 레드-O 용액으로 30분간 지방구를 염색한 후 증류수로 세척하였다. 오일 레드-O 용액에 의해 축적된 지방은 빨간색을 나타낸다(도 1).
- [0066] 그 결과, 0.1 mM 팔미트산을 처리한 간세포(대조군)에 비해 0.1 mM 팔미트산과 와이셀라 헬레니카 WiKim0103를 공배양한 간세포(HepG2 cells)에서 지질 축적이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0068] 2) 간세포(HepG2 cells) 지방 분화 및 염증 관련 유전자 발현 수준 확인
- [0069] 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 균주 처리에 따른 간세포 내 지방대사, 염증 관련 유전자의 발현 수준을 알아보기 위해, 실시간 중합 효소 연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)을 실시하였다.
- [0071] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, 0.1 mM 팔미트산을 처리한 간세포(대조군)에 비해 0.1 mM 팔미트산과 와이셀라 헬레니카 WiKim0103를 공배양한 간세포에서 지방대사 관련 인자 SREBP-1c(Sterol regulatory element-binding protein-1c), 지방산 합성효소(Fatty acid synthase, FAS), 불포화지방산 생합성 효소(Stearoyl-CoA desaturase, SCD)와 염증 관련 인자 COX-2(Cyclooxygenase-2), TNF-α(Tumor necrosis factor-α), NF-κB(Nuclear factor-kappa B) 유전자 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0073] 3) 장세포(HT-29 cells) 내 밀착연접(tight junction) 관련 유전자 발현 수준 확인
- [0074] 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 균주 처리에 따른 장세포 내 밀착연접 관련 유전자의 발현 수준을 알아보기 위해, 실시간 중합 효소 연쇄반응(qPCR)을 실시하였다.
- [0076] 그 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, 0.1 mM 팔미트산을 처리한 장세포(대조군)에 비해 0.1 mM 팔미트산과 와이셀라 헬레니카 WiKim0103를 공배양한 장세포에서 밀착연접 관련 ZO-1(Zonula occludens-1), 오클루딘(Occludin) 유전자의 발현이 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0078] **실시예 3: 체중 감소 효능 및 혈중 간 기능 수치 개선 확인**
- [0079] 5주령 수컷 생쥐(C57BL/6J)를 온도 20±2℃, 습도 50±5% 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위인 조건의 사육실 환경 하에서 차우 식이요법(chow diet)(CD; Purina, Korea)로 1주간 적응시켰다. 실험동물은 정상식이(D12450B, Research Diets, New Brunswick, NJ) 또는 총 칼로리의 45%가 지방인 고지방식이(D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ)를 섭취하도록 하였으며, 1주 동안 식이에 적응시킨 후 실험을

수행하였다. 실험군은 정상 식이 섭취군(ND), 고지방 식이 섭취군(HFD), 고지방 식이와 함께 와이셀라 헬레니카 WiKim0103을 2×10^9 CFU/200 μ l 농도로 매일 경구 투여한 섭취군(HFD+L-LAB1), 고지방 식이와 함께 와이셀라 코리엔시스를 2×10^9 CFU/200 μ l 농도로 매일 경구 투여한 섭취군(HFD+L-LAB2) 총 4개의 그룹으로 구성하였으며, 20주 동안 식이공급을 통해 지방간을 유도하였다. 정상 식이 섭취군(ND)와 고지방 식이 섭취군(HFD)은 이와 동일한 양의 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)을 매일 경구 투여하였다. 실험 수행 20주 후, 각 실험군의 체중을 측정하였다(도 4). 또한, 실험군의 혈중 간 기능 수치(serum GOT, serum GPT)를 측정하기 위해, 실험 종료 16시간 전부터 절식시키고 복강대정맥에서 채혈 한 후, 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. 혈청 내 GOT, GPT는 자동 생화학 측정기(FUJI DRI-CHEM 7000i, Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 도 3에 혈중 글루타메이트-옥살로아세트레이트 트랜스아미네아제 (GLUTAMATE-OXALOACETATE TRANSAMINASE, GOT), 글루타메이트-파이루베이트트랜스 아미네아제 (GLUTAMATE-PYRUVATE TRANSAMINASE, GPT)를 그래프로 나타내었다.

[0080] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 고지방 식이와 와이셀라 헬레니카 WiKim0103을 함께 섭취한 경우(HFD+L-LAB1), 고지방 식이 섭취 마우스(HFD)와 비교하여 체중과 혈중 간 기능 수치가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0082] **실시예 4: 간 조직 내 지방대사, 염증 및 간 섬유화 관련 유전자 발현 수준 확인**

[0083] 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 균주 섭취에 따른 간 조직 내 지방대사, 염증, 간 섬유화 관련 유전자의 발현 수준을 알아보기 위해, 실험 종료 후 적출한 간 조직을 이용하여 qPCR(quantitative real time polymerase chain reaction)을 실시하였다.

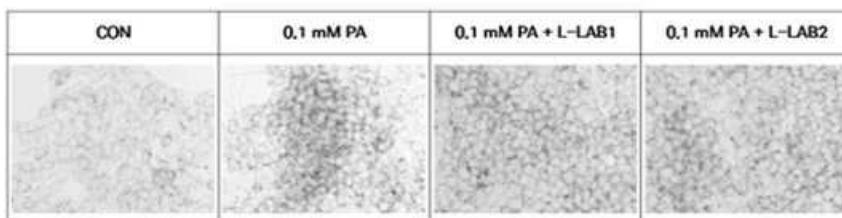
[0085] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 와이셀라 헬레니카 WiKim0103 균주 섭취에 따라 지방대사 관련 인자 SREBP-1c(Sterol regulatory element-binding protein-1c), 염증 관련 인자 NF- κ B(Nuclear factor-kappa B), 간 섬유화 관련 인자 Colla1(Collagen type I alpha 1) 유전자의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0087] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
 수탁번호 : KCCM12419P
 수탁일자 : 20181214

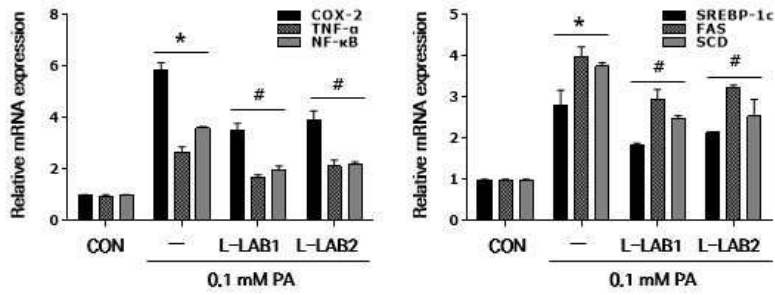
도면

도면1



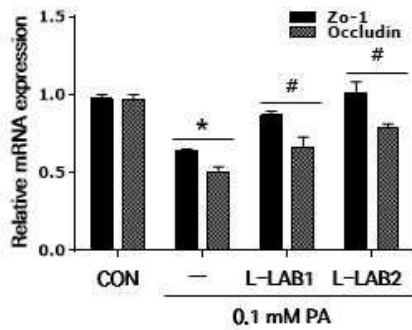
L-LAB1, *W. hellenica* WiKim0103; L-LAB2, *W. koreensis*.

도면2



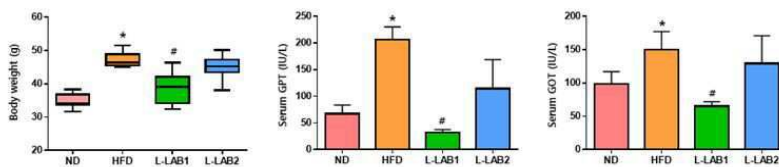
*P<0.05, compare to the CON; #P<0.05, compare to the PA; PA, palmitic acid. L-LAB1, *W. hellenica* Wikim0103; L-LAB2, *W. koreensis*.

도면3



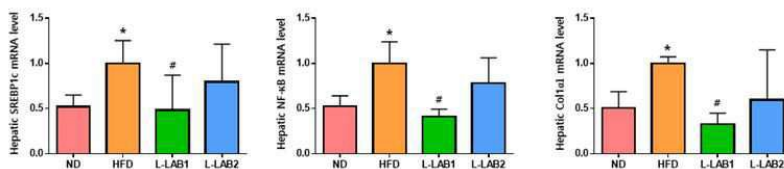
*P<0.05, compare to the CON; #P<0.05, compare to the PA; PA, palmitic acid. L-LAB1, *W. hellenica* Wikim0103; L-LAB2, *W. koreensis*.

도면4



*P<0.05, compare to the ND; #P<0.05, compare to the HFD. L-LAB1, *W. hellenica* Wikim0103; L-LAB2, *W. koreensis*.

도면5



*P<0.05, compare to the ND; #P<0.05, compare to the HFD. L-LAB1, *W. hellenica* Wikim0103; L-LAB2, *W. koreensis*.

서열목록

- <110> Korea Food Research Institute
- <120> Composition for preventing, improving or treating obesity or

fatty liver disease comprising the *Weissella hellenica* WiKim0103

<130> P18R10C1581

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1444

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> *Weissella hellenica* WiKim0103

<400> 1

gatgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac gctttgtgct taattgatat 60

gacgagcttg ctctgatttg attttttgat ttcaaagagt ggccaacggg tgagtaacac 120

gtgggtaacc tacctcttag caggggataa cttttgaaa caagtgctaa taccgtataa 180

taccaacaac cgcattggtg ttggttgaaa gatggttctg ctatcactaa gagatggacc 240

cgcggtgcat tagctagttag gtaaggtaat ggcttaccaa ggcaatgatg catagccgag 300

ttgagagact gatcggccac aatgggactg agacacggcc catactccta cgggaggcag 360

cagtagggaa tcttccaca tgggcgcaag cctgatggag caacgccggt tgtgtgatga 420

agggtttcgg ctctgaaaac actgttataa gagaagaacg gcactgagag taactgttca 480

gtgtgtgacg gtatcttacc agaaaggaac ggctaaatac gtgccagcag ccgcggtaat 540

acgtatgttc caagcgttat ccggatttat tgggcgtaaa gcgagcgcag acggttattt 600

aagtctgaag tgaagccct cagctcaact gaggaattgc tttggaaact ggatgacttg 660

agtgcagtag aggaaagtgg aactccatgt gtagcgtgga aatgcgtaga tatatggaag 720

aacaccagtg gcgaaggcgg ctttctggac tgtaactgac gttgaggctc gaaagtgtgg 780

gtagcaaaaca ggattagata ccctggtagt ccacaccgta aacgatgagt gctagatggt 840

cgagggtttc cgccttgag tgtcgcagct aacgcattaa gcactccgcc tggggagtac 900

gaccgcaagg ttgaaactca aaggaattga cggggacccg cacaagcggg ggagcatgtg 960

gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatcccttg acaacgctag 1020

aaatagcgcg ttcccttcgg ggacaagggtg acaggtggtg catggttgct gtcagctcgt 1080

gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcgaacc cttattatta gttgccagca 1140

ttcagttggg cactctagtg agactgccgg tgataaacgg gaggaagggtg gggatgacgt 1200

caaatcatca tgccccctat gacctgggct acacacgtgc tacaatggca tatacaacga 1260

gtcgttaacc cgcgagggta cgctaatttc ttaaagtatg tctcagttcg gattgtaggc 1320

tgcaactcgc ctacatgaag tcggaatcgc tagtaatcgc ggatcagaac gccgcggtga 1380

atacgttccc gggctttgta cacaccgcc gtcacacat gagagtttgt aacacccaaa 1440

gccg 1444