

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 10월 24일 (24.10.2024)



WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/219797 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

서울특별시 동대문구 천장산로7길 58-14, 501, Seoul (KR).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/005107

(74) 대리인: 특허법인 정진 (JUNGJIN IP LAW FIRM);

(22) 국제출원일:

2024년 4월 17일 (17.04.2024)

08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, Seoul (KR).

(25) 출원언어:

한국어

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의

(26) 공개언어:

한국어

국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(30) 우선권정보:

10-2023-0050002 2023년 4월 17일 (17.04.2023) KR

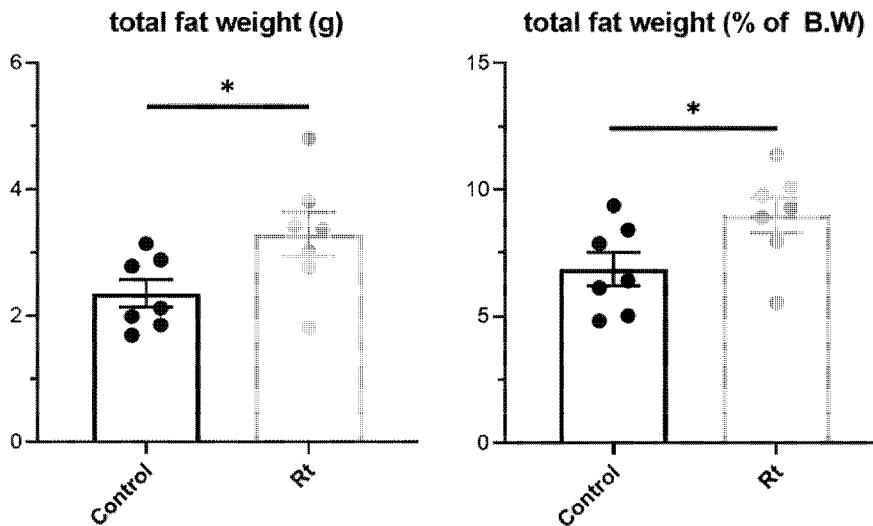
(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNGHEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김현식 (KIM, Hyun Sik); 05698 서울특별시 송파구 송파대로 345, 107-304, Seoul (KR). 성호준 (SUNG, Ho Jun); 02447 서울특별시 동대문구 경희대로 26, Seoul (KR). 정윤석 (JEONG, Yun Seok); 02447 서울특별시 동대문구 경희대로 26, Seoul (KR). 탁은정 (TAK, Euon Jung); 02447 서울특별시 동대문구 경희대로 26, Seoul (KR). 배진우 (BAE, Jin Woo); 02449

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING ROMBOUTSIA SP. U2U2A18 FOR WEIGHT OR FAT GAIN, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: ROMBOUTSIA SP. U2U2A18을 포함하는 체중 또는 지방 증가용 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising *Romboutsia* sp. U2U2A18 for weight or fat gain, and use thereof and the like. It has been identified that a *Romboutsia* sp. U2U2A18 strain of the present invention has an excellent effect of increasing fat and weight in animals. In addition, a strain of the present invention is expected to have excellent intestinal adherence in animals, and thus the productivity of stock farms can be expected to increase through the production of high-quality economic animals.

(57) 요약서: 본 발명은 *Romboutsia* sp. U2U2A18 을 포함하는 체중 또는 지방 증가용 조성물 및 이의 용도 등에 관한 것이다. 본 발명의 *Romboutsia* sp. U2U2A18 균주는 동물의 지방 및 체중을 증가시키는 효과가 우수함을 확인하였다. 또한, 본 발명의 균주는 동물의 장내 정착성이 우수할 것으로 기대되는 바, 고품질 경제동물 생산을 통한 축산 농가의 생산성 증대를 기대할 수 있을 것이다.

[다음 쪽 계속]



TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된
생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i)
및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: ROMBOUTSIA SP. U2U2A18을 포함하는 체중 또는 지방 증가용 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 *Romboutsia* sp. U2U2A18을 포함하는 체중 또는 지방 증가용 조성물 및 이의 용도 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 프로바이오틱스는 섭취시 기본적인 영양을 넘어 건강상 이점을 제공하는 살아있는 미생물이며, 살아있는 미생물 사료 보충제로서 장내 미생물 균형을 개선하는 등의 유익한 효과를 준다. 유럽 등 일부 지역의 축산업에서는 질병예방을 위한 항생제 및 성장증진을 위한 보조제를 사료에 첨가하는 것을 금지하고 있으며, 해당 문제를 극복하기 위한 대안책으로 프로바이오틱 박테리아(probiotic bacteria)를 사용하고 있다. 프로바이오틱스 제품은 박테리아의 단일 또는 다수의 균주의 조합이 가능하며, 균주의 수가 많을수록 소화 계통에 적용되는 효과가 커지는 경향이 있다. 주로 영양소 및 소화 효소의 추가 공급원으로 작용하는 효과, 및 병원성 미생물에 대한 면역력을 강화시키는 효과를 기대할 수 있다. 동물 영양에 활용되는 프로바이오틱스는 유산균(lactic acid bacteria), 바실러스포자(*Bacillus* spores) 및 효모(yeasts)를 포함하는 세 개의 주요 그룹으로 분류되며, 일부 제품에는 박테리아 외 효모 및 기타 진균류가 포함되어 있다.
- [3] 양돈 또는 양계에 대한 생균제의 사용효과에 있어서 생균제를 돼지 또는 닭에 급여한 경우, 개체의 성장율과 사료효율의 개선효과가 있다는 보고가 있다. 그동안 생균제의 작용기전을 규명하기 위한 많은 연구가 진행되었지만, 생균제의 사용효과를 규명하는 과학적인 연구 보고의 부족으로 그 작용기전이 명확하게 밝혀지지 않았다. 다른 동물모델을 이용한 간접적인 연구 결과들을 통해 작용기전을 추측하는 수준에 머물러 있다: 정상적인 미생물이 소화기관 내를 우점적으로 점유하면 유해균으로부터 유해한 효소나 독소생산을 억제하여 질병에 노출되는 위험을 낮추고, 우점된 미생물은 다양한 소화효소, 비타민을 생산하여 숙주동물에 공급하게 된다. 또한, 미생물을 구성하는 펩티도글리칸(peptidoglycan), 글루칸(glucan), 만난(mannan) 등의 성분은 용모세포를 자극하여 면역기능을 향상시키는 특징이 있다. 이와 같이 바람직한 생균의 꾸준한 공급은 장내점막에 유익균의 우점을 유지함으로써, 장내 정착저항성을 부여하여 외부 병원균의 집락형성을 억제하고 유해세균의 기능을 저지할 수 있다. 한편, 시중에 판매되는 사료첨가용 미생물 제제의 경우, 동물모델에서 출하율, 증체율 및 사료 요구율 증가 효과를 이끌어내는 과정의 작용기전이 명확하게 알려진 제품은 없는 실정이다.
- [4] 이에, 본 발명자들은 본 발명의 균주가 마우스에서 체중, 체지방량 및 체지방률을 증가시키고, 부고환지방, 장간막지방 및 후복막지방 조직의 체지방률을 증가

시키는 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였는 바, 이를 체중 또는 지방 증가용 건강기능식품 조성물, 사료 조성물, 사료 첨가제 등으로 널리 사용하여 고품질 경제동물 생산을 통한 축산 농가의 생산성 증대를 기대할 수 있을 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 체중 또는 지방증가 효과를 갖는 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주를 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 다른 목적은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 저체중증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 사료첨가제를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 사료 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 하기 특징으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 조건을 만족하는 배지에서 균주를 배양하는 단계; 를 포함하는, *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 배양 방법을 제공하는 것이다:
- [11] (a) Columbia broth 배지;
- [12] (b) 농축 배수 1.25 내지 1.75배; 및
- [13] (c) pH 6.5 내지 7.5.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계; 를 포함하는, 동물의 체중 또는 지방 증가 방법을 제공하는 것이다.
- [15] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [16] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [17] 본 발명은 체중 또는 지방증가 효과를 갖는 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주를 제공한다.
- [18] 본 발명은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

- [19] 본 발명은 *Romboutsia* sp. U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 저체중증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [20] 본 발명은 *Romboutsia* sp. U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 사료첨가제를 제공한다.
- [21] 본 발명은 *Romboutsia* sp. U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 사료 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명은 하기 특징으로 이루어지는 균주로부터 선택되는 조건을 만족하는 배지에서 균주를 배양하는 단계; 를 포함하는, *Romboutsia* sp. U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 배양 방법을 제공한다:
- [23] (a) Columbia broth 배지;
- [24] (b) 농축 배수 1.25 내지 1.75배; 및
- [25] (c) pH 6.5 내지 7.5.
- [26] 본 발명은 *Romboutsia* sp. U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계; 를 포함하는, 동물의 체중 또는 지방 증가 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [27] 본 발명의 *Romboutsia* sp. U2U2A18 균주는 마우스에서 체중을 증가시켰고, 체지방량 및 체지방률을 증가시켰으며, 부고환지방, 장간막지방 및 후복막지방 조직의 체지방률을 증가시켰는 바, 동물의 지방 및 체중을 증가시키는 효과가 우수함을 확인하였다. 또한, 본 발명의 균주는 한우 소장 내에서 분리한 것으로 동물의 장내 정착성이 우수할 것으로 기대되는 바, 이를 체중 또는 지방 증가용 건강 기능식품 조성물, 사료 조성물, 사료 첨가제 등으로 널리 사용하여 고품질 경제 동물 생산을 통한 축산 농가의 생산성 증대를 기대할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 16S rRNA 유전자 염기서열 기반 계통수를 나타낸 것이다.
- [29] 도 2는 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 유전체 데이터를 나타낸 것이다.
- [30] 도 3은 *Romboutsia* 속의 종간 유전체 염기서열 유사도를 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 4는 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 유전체 염기서열 기반 계통수를 나타낸 것이다.
- [32] 도 5는 콜롬비아 한천(Columbia agar)에서 *Romboutsia* sp. U2U2A18을 48 시간 배양 후, 콜로니 형태와 세포 형태 및 크기를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [33] 도 6은 절대 혐기성 균주 배양에 흔히 사용되는 상업적 배지 4 종(RCM, Reinforced Clostridial Medium; CB, Columbia broth; GAM, Gifu Anaerobic Medium; BHI, Brain Heart Infusion broth)에 대하여 배지별 혼탁도(optical density, 600nm)를 비교하여 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 생장을 평가한 결과를 나타낸 것이다.

- [34] 도 7은 액체 배지 4종(BR, CB+bile acid+rumen fluid; Carb, CB+carbon source; CB, Columbia broth; PY, CB+Peptone+Yeast extract)에 대하여 배지별 혼탁도 (optical density, 600nm)를 비교하여 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 생장을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [35] 도 8은 Columbia broth 배지의 농축 배수 별 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 생장률을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- [36] 도 9는 columbia broth 배지의 pH별 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 생장률을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- [37] 도 10은 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 체중 및 체지방량 증가 효과를 확인하기 위한 군주 투여 실험 모식도를 나타낸 것이다.
- [38] 도 11a는 대조군(PBS 처리군)과 실험군(*Romboutsia* sp. U2U2A18 급여군)의 군주 투여 전 초기 체중을 나타낸 것이다.
- [39] 도 11b는 대조군과 실험군의 *Romboutsia* sp. U2U2A18 투여 기간 내 식이 섭취량을 나타낸 것이다.
- [40] 도 12는 대조군과 실험군의 *Romboutsia* sp. U2U2A18 투여 기간 별 초기 체중 대비 체중 증가율(%)을 나타낸 것이다.
- [41] 도 13은 *Romboutsia* sp. U2U2A18 투여 10주차 경과 시점에 대조군과 실험군의 체지방량, 및 체중 대비 체지방률(%)을 나타낸 것이다.
- [42] 도 14는 *Romboutsia* sp. U2U2A18 투여 10주 경과 시점에 대조군과 실험군의 복부피하지방(posterior subcutaneous fat), 부고환지방(epididymal fat), 장간막지방(mesenteric fat), 및 후복막지방(retroperitoneal fat)의 체지방률(%)을 나타낸 것이다.
- [43] 도 15a는 *Romboutsia* sp. U2U2A18 투여 10주 경과 시점에 대조군과 실험군의 복막 포도당 부하검사 (intraperitoneal Glucose tolerance test) 결과를 비교한 것이다.
- [44] 도 15b는 *Romboutsia* sp. U2U2A18 투여 10주 경과 시점에 대조군과 실험군의 공복 혈당을 비교한 것이다.
- [45] 도 16은 *Romboutsia* sp. U2U2A18 투여 10주 경과 시점에 대조군과 실험군의 혈중 콜레스테롤 수치를 비교한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [46] 본 발명은 체중 또는 지방증가 효과를 갖는 *Romboutsia* sp. U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 군주를 제공한다.
- [47] 본 발명에서 상기 군주는 한우 소장에서 유래하고, 혐기성일 수 있으며, 서열번호 1로 표시되는 16s rRNA 유전자의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [48] 본 발명에서, 상기 지방은 복부피하지방(posterior subcutaneous fat), 부고환지방(epididymal fat) 또는 장간막지방(mesenteric fat)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

다. 상기 체중 또는 지방 증가는 체지방률 또는 체지방량의 증가를 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[49]

[50] 본 발명은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[51] 본 발명에서 용어 "배양"이란 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육시키기 위하여 수행하는 모든 행위를 의미한다.

[52] 본 발명에서, 상기 *Romboutsia sp.* U2U2A18의 균체는 배양 배지로부터 수득된 생균 그 자체뿐만 아니라, 당업자에게 알려진 임의의 가공형태를 포함하는 것으로 예를 들어 균체 파쇄물, 건조물, 동결물 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[53] 본 발명에서, 용어 "배양액"은 발효액을 포함하는 의미이며, 액체배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리 하여 균주를 제거한 여액(원심분리한 상등액) 등의 배양액 자체로부터 파생되는 가공물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[54] 본 발명에 있어서, "식품"이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제 등을 모두 포함하는 의미이다.

[55] 본 발명에 있어서, 상기 "건강기능식품(functional food)"이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하며, 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 분말, 액제, 편상(flake), 페이스트, 시럽제, 젤, 젤리, 바(bar), 또는 필름 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "기능"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.

[56] 본 발명의 *Romboutsia sp.* U2U2A18을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 *Romboutsia sp.* U2U2A18은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[57] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜

음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

- [58] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[59]

- [60] 본 발명은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 저체중증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [61] 본 발명에서 상기 저체중증은 기준 또는 표준 체중에 비해서 10% 내지 20% 적게 나가는 상태를 의미하며, 일반적으로 체질량 지수(BMI)가 18.5 미만인 것을 의미한다. 상기 저체중증은 갑상선 호르몬 분비의 이상, 바제도병, 호르몬 수치 불균형, 거식증, 소화기관 장애, 섭식장애 등에 의해서 발생할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [62] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [63] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

- [64] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

- [65] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

- [66] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수 전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무 (Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜 4000, 폴리에칠렌글리콜 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubriwax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macroglol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.
- [67] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에칠렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.
- [68] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.
- [69] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

- [70] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [71] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠 아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3), 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비셀파이드 0.1%, 소듐 포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비셀파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.
- [72] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buetyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.
- [73] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

- [74] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 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 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [75] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [76] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [77] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [78] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [79] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [80] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [81] 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하고, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [82]

- [83] 본 발명은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 사료첨가제를 제공한다.
- [84] 본 발명은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 사료 조성물을 제공한다.
- [85] 본 발명의 용어 "사료"란, 동물이 먹는 임의의 천연 또는 인공 구정식, 한끼 식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미하며, 본 발명에 따른 *Romboutsia sp.* U2U2A18을 포함하는 사료 조성물은 당업계에 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 바람직하게는 농후 사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [86] 본 발명에서 용어, "사료 조성물"은 "사료 첨가용 조성물", "사료첨가제"를 포함하는 의미이고, 이는 동물에 있어 질병 증상의 완화, 영양소 보충 및 체중감소 예방, 체중 및 지방 증가, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질개선, 번식장애 예방 또는 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함한다.
- [87] 본 발명의 사료 조성물은 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 A D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 라이신 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [88] 상기 사료 중 농후사료로는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머지로인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물(liquid mixture)을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분(Meat meal), 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류가 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [89] 상기 사료 중 조사료로는 야초, 목초, 풋베기 등의 생초(生草)사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋베기작물, 곡실(穀實) 등을 사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용(種畜用) 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 특수사료에는 굴껍데기, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제가 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [90] 본 발명에 따른 상기 사료 조성물은 당업계에 공지된 다양한 사료 제조방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 *Romboutsia sp.* U2U2A18을 첨가하여 제조 가능하다.
- [91] 본 발명에 따른 사료 조성물은 체중 또는 지방 증가를 목적으로 하는 개체이면 제한없이 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간 동물, 조류 및 어류 등 어느 개체에도 적용이 가능하며, 바람직하게는 소, 돼지, 닭, 오리, 거위, 꿩, 및 염소로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [92]
- [93] 본 발명은 하기 특징으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 조건을 만족하는 배지에서 균주를 배양하는 단계; 를 포함하는, *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 배양 방법을 제공한다:
- [94] (a) Columbia broth 배지;
- [95] (b) 농축 배수 1.25 내지 1.75배; 및
- [96] (c) pH 6.5 내지 7.5.
- [97] 본 발명에서, 상기 균주는 Colombia broth; Colombia agar + 담즙산(bile acid) + 반추위액(rumen fluid); Colombia agar + 펩톤(peptone) + 효모(yeast); 또는 Colombia agar + 탄소원(Carbon source) 배지에서 생장할 수 있으며, 바람직하게는 Columbia broth 배지에서 생장할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 탄소원은 포도당, 셀로비오스, 엿당, 또는 녹말일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [98] 본 발명에서, 상기 균주는 농축 배수가 1.25 내지 1.75배, 1.25 내지 1.7배, 1.25 내지 1.65배, 1.25 내지 1.6배, 1.25 내지 1.55배, 1.3 내지 1.75배, 1.3 내지 1.7배, 1.3 내지 1.65배, 1.3 내지 1.6배, 1.3 내지 1.55배, 1.35 내지 1.75배, 1.35 내지 1.7배, 1.35 내지 1.65배, 1.35 내지 1.6배, 1.35 내지 1.55배, 1.4 내지 1.75배, 1.4 내지 1.7배, 1.4 내지 1.65배, 1.4 내지 1.6배, 1.4 내지 1.55배, 1.45 내지 1.75배, 1.45 내지 1.7배, 1.45 내지 1.65배, 1.45 내지 1.6배, 1.45 내지 1.55배, 또는 1.5배인 배지에서 배양될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [99] 본 발명에서, 상기 균주는 pH가 pH 6.5 내지 7.5, pH 6.5 내지 7.4, pH 6.5 내지 7.3, pH 6.5 내지 7.2, pH 6.5 내지 7.1, pH 6.7 내지 7.5, pH 6.7 내지 7.4, pH 6.7 내지 7.3, pH 6.7 내지 7.2, pH 6.7 내지 7.1, pH 6.9 내지 7.5, pH 6.9 내지 7.4, pH 6.9 내지 7.3, pH 6.9 내지 7.2, pH 6.9 내지 7.1, 또는 pH 7인 조건에서 배양될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100]
- [101] 본 발명은 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계; 를 포함하는, 동물의 체중 또는 지방 증가 방법을 제공한다.
- [102] 본 발명에서, 상기 투여는 *Romboutsia sp.* U2U2A18 균주를 포함하는 현탁액을 동물에게 투여할 수 있으며, 상기 현탁액의 개체 당 1회 투여량은 100 내지 300 μ l,

100 내지 250 μ l, 100 내지 230 μ l, 100 내지 210 μ l, 150 내지 300 μ l, 150 내지 250 μ l, 150 내지 230 μ l, 150 내지 210 μ l, 170 내지 300 μ l, 170 내지 250 μ l, 170 내지 230 μ l, 170 내지 210 μ l, 190 내지 300 μ l, 190 내지 250 μ l, 190 내지 230 μ l, 190 내지 210 μ l, 또는 200 μ l일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 균주의 역가는 1 ml 당 1×10^5 내지 1×10^6 CFU/ml, 1×10^5 내지 9×10^5 CFU/ml, 1×10^5 내지 8×10^5 CFU/ml, 1×10^5 내지 7×10^5 CFU/ml, 1×10^5 내지 6×10^5 CFU/ml, 3×10^5 내지 9×10^5 CFU/ml, 3×10^5 내지 8×10^5 CFU/ml, 3×10^5 내지 7×10^5 CFU/ml, 3×10^5 내지 6×10^5 CFU/ml, 4×10^5 내지 6×10^5 CFU/ml, 또는 5×10^5 CFU/ml일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[104]

[105] [실시예]

[106] 실시예 1. 한우 소장 유래 혐기성 균주 분리

[107] 1.1. 분리용 배지 선정

[108] 첫번째 배지인 Modified Eggerth-Gagnon (ATCC medium 2840) agar + 5% 양의 피(sheep blood) 배지는 10g 펩톤(Peptone), 4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (인산수소이나트륨), 2g 정제 돼지 위장 무신 단백질(Porcine gastric mucin), 50mL 정제한 양의 피, 950mL 3차 증류수, 0.4g 시스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 및 15g 한천(Agar)을 혼합하여 pH 8로 제조하였다. 두번째 배지인 콜롬비아 한천(Colombia agar) + 5% 양의 피 배지는 35g Colombia broth (DifcoTM), 50mL 양의 피, 950mL 3차 증류수, 0.4g 시스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 및 15g 한천을 혼합하여 pH 8로 제조하였다. 세번째 배지인 R2A agar + Urea + S source 배지는 18.2g R2A 한천(DifcoTM), 12.012g 정제 요소(Urea), 2g 아황산수소나트륨(sodium bisulfite), 2g 황산나트륨(sodium sulfate), 1000mL 3차 증류수, 0.4g 시스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 및 15g 한천을 혼합하여 pH 8로 제조하였다. 네번째 배지인 R2A agar + His + Gly 배지는 18.2g R2A 한천(DifcoTM), 2g 히스티딘(L-Histidine), 2g 글리신(Glycine), 1000mL 3차 증류수, 0.4g 시스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 및 15g 한천을 혼합하여 pH 8로 제조하였다. 구체적으로, pH 적정은 3M KOH를 사용하였다. 또한, 각각 배지의 상기된 구성 성분을 모두 배합한 후 121°C에서 15분간 고온멸균을 진행하였다. 이 후, 상온에서 냉각시킨 다음, 무균 실험대(clean bench)에서 페트리 접시(petri dish)에 분주하고 굳혀서 제작하였다. 구체적으로, 분리 목표 균주와 근연 관계에 있는 균주의 유전체(공공 데이터베이스에서 제공) 분석을 통해, 균주가 가지는 대사과정과 레퍼런스 자료 조사를 하였고, 목표 균주의 생장 시에 필요할 것이라 예상되는 영양

소를 1차적으로 검색하였다. 그 결과, 균주 생장에 쓰이는 무기 호흡(anaerobic respiration); 산화환원 반응; 및 균주가 가지는 효소(enzyme), 특히 요소 가수분해 효소(Urease);를 고려하여 질소(N)와 황(S)을 포함하는 영양소 중 정제 요소(Urea), 아황산수소나트륨(sodium bisulfite), 황산나트륨(sodium sulfate)을 선택하였다. 또한, 균주의 유전체에 존재하고 있는 효소 중, 필수 아미노산인 히스티딘; 및 조건부 필수아미노산인 글리신;을 가수분해하는 효소가 많은 유전자 반복(gene copy) 수를 보인다는 것을 확인하였다. 따라서, 히스티딘과 글리신이 균주의 생장에 중요할 것이라 판단하여 선별하였다. 시스테인(L-Cysteine)은 무산소(anaerobic) 환경인 한우 소장을 모방하여, 배지 내 잔존 산소의 제거를 보조하기 위하여 선별하였다. 양의 피(Sheep blood)는 불특정 다수의 균 생장에 필요한 헴(heme)과 같은 X인자(X factor)로써 사용되는 주요성분을 제공함은 물론, 균주의 용혈 반응(haemolytic reaction) 여부를 확인하는 목적으로 선별되었다. 이는 영양소가 풍부한 배지를 만들 때 주로 사용된다. pH 조건의 경우, 한우 소장 환경이 약염기성을 보이는 것을 감안하여 배지를 pH 8 수준으로 맞춰 제작하였다.

[109] 결과적으로, 최소 배지인 R2A agar에 위에서 선별한 영양소를 선택적으로 배합한 타겟 배지 2 가지와 함께 레퍼런스 조사 시 근연 균주의 분리 및 배양에 사용되었던 영양분이 풍부한 배지조성 2 가지(Modified Eggerth-Gagnon(ATCC medium 2840) agar + 5% 양의 피 배지, 콜롬비아 한천 + 5% 양의 피 배지)를 최종 선택하였다.

[110]

[111] 1.2. 분리 방법

[112] 목표 균주의 서식환경인 한우의 소장은 혐기성(anaerobic)인 바, 혐기 배양 챔버(anaerobic chamber)에서 미생물 분리를 진행하였다. 사전에 선택된 4종의 배지를 제작하여 온전히 균히고, 잔여 용존산소에 의해 혐기성 미생물의 생장이 저해되지 않게, 혐기 배양 챔버에서 배지의 산소를 하루 동안 미리 환원시켰다. 그 후, -80°C에 냉동 보관되어 있던 한우 소장 샘플을 상온에서 1시간 정도 녹였다. 그런 다음, 소장 샘플의 일부를 덜고 고온멸균한 3차 증류수를 사용해서, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 및 10^{-4} 로 희석시킨 샘플을 준비하였다. 혐기 배양 챔버 내에서 희석된 샘플들을 각각 준비된 4종의 배지에 도말(spreading)하는 방식으로 접종하였다. 샘플 접종 배지에 균주 군체(colony)들이 자라기 시작하면, 각 콜로니를 새 배지에 3차 선상도말(streaking)하는 방식으로 옮겨서 배양하였다. 이 배지에서 보이는 단일 군체(single colony)를 같은 방식으로 새 배지에서 배양함으로써, 총 3번의 계대 배양을 진행하여 순수 분리 배양(pure culture)하였다. 순수 분리 배양이 완료된 균의 군체를 확보하여 16s rRNA 유전자 전체서열 특이적인 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 수행하였다. 증폭 산물(PCR product) 염기서열 분석을 통해 16s rRNA 유전자 염기서열 확보하였다. 약 1400bp 이상의 전체 16s rRNA 유전자 염기서열을 공공 데이터베이스(ex; Ezbiocloud, NCBI blastn 등)에 등록된 염기서열들과 유사도 분

석하였고, 이를 통해 동정(identification)하였다. *Romboutsia* sp. U2U2A18의 16S rRNA 유전자 서열(서열번호 1)은 하기에 표시하였다.

[113]

[114] *Romboutsia* sp. U2U2A18의 16S rRNA 유전자 서열(서열번호 1):
 CTTGCCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGG
 GACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
 AAATCATCATGCCCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCT
 ACAATGGGTGGTACAGAGGGCAGCCAAGTCGTGAGGCGGA
 GCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT
 GAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCA
 GATCAGAATGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTGGGGGCGCCCGAAG
 CCGGATTGCTAACCTTTTGAAGCGTCCGTCGAAGGTGAA
 ATCAATAACTGGGGTGAA-3'

[115]

[116] *Romboutsia* sp. U2U2A18 와 16S rRNA 유전자 서열 유사도 상 가장 근연 관계에 있는 종은 *Romboutsia ilealis* CRIB^T 로, 16S rRNA 유전자 서열 유사도는 98.28 %이다. 또한, 두 번째로 가까운 종은 *Romboutsia hominis* FRIF^T 로, 16S rRNA 유전자 서열 유사도는 97.85 % 이다. 이는 도 1에 나타내었다. *Romboutsia* 속(genus)은 분류학상으로는 *Firmicutes*(현재, *Bacillota* 로 명칭 변경) 문(phylum)에 속하며 *Clostridia* 강(class), *Clostridiales* 목(order), *Peptostreptococcaceae* 과(family)로 세 부적으로 분류된다.

[117]

Romboutsia sp. U2U2A18 가 가진 유전적 특성과 기능을 규명하기 위해 유전체(genome) 데이터를 확보하였다. 구체적으로, *Romboutsia* sp. U2U2A18를 배양한 후 균주를 확보하고, 확보한 세포 생물량(cell biomass)으로부터 DNA를 추출하였다. DNA QC(quality control/check)를 통과한 샘플을 g-TUBE(Covaris Inc.) 장치를 이용해 6-20Kb 범위로 DNA를 파편화 한 다음, AMPure PB magnetic bead(Beckman Coulter Inc.)를 이용해 정제하였다. 그 후, NanoDrop 분광광도계(spectrophotometer, Thermo ScientificTM)를 이용해 DNA의 농도를 정량하였다. 그런 다음, PacBio DNA Template Prep 키트(Pacific Biosciences Inc.; PacBio[®])와 PacBio DNA/중합효소 결합 키트 P6를 사용해 SMRTbell 템플릿 라이브러리를 제작하였다. 그 후, PacBio RS II 플랫폼을 이용해 시퀀싱을 진행하였다. 또한, RS HGAP 어셈블러(assembler)를 이용하여 De novo 어셈블리 작업을 진행함으로써, 시퀀싱을 통해 확보된 가공되지 않은 서열파편(raw read)들을 연결하여 상대적으로 긴 DNA 파편인 콘티그(contigs)를 생산하였다. 동일한 DNA 샘플을 Illumina Hiseq 4000 플랫폼(Illumina Inc.)을 이용해 시퀀싱을 수행하였고, Pilon 어셈블러를 이용하여 PacBio 플랫폼으로 생산된 콘티크들에 Illumina 시퀀싱으로 합성된

리드(read)를 비교대조하였다. 상호보완적인 부분을 검색하여 PacBio 시퀀싱 시 발생한 오류를 찾고, 최종 공통 서열(consensus sequence)을 제작하였다. 이를 오류 수정 과정(error correction)이라 하는데, 시퀀싱 과정에서 발생하는 잘못된 리드(read) 합성 오류를 찾아 고품질의 유전체 데이터를 생산해낼 수 있다(DNA 추출 이후부터는 Macrogen Inc.에서 진행함).

[118] 결과적으로 콘티크(contig)는 총 9개이고, 전체 유전체 길이는 2,922,474 bp이며, 시퀀싱 깊이(sequencing depth)는 295.33 배 수준인 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 유전체 데이터를 확보하였다. 이는 도 2에 나타내었다.

[119] 확보한 *Romboutsia* sp. U2U2A18의 유전체 서열과 이미 공공 데이터베이스에 업로드 되어있는 *Romboutsia ilealis* CRIB^T의 유전체 서열을 비교하였다. 유전체 염기서열 비교 결과, 유사도(ANI, average nucleotide identity)는 92.62%였고, *Romboutsia* 속에 속하는 다른 종과 비교 결과 78.23-78.93%로 확인되었다. 이는 도 3에 나타내었다. 또한, 유전체 염기서열 기반 계통수는 도 4에 나타내었다.

[120]

[121] **실시예 2. *Romboutsia* sp. U2U2A18 균주의 형태학적 특성 및 성장조건**

[122] **2.1. 세포의 형태 및 크기**

[123] 콜롬비아 한천(Columbia agar)에서 48 시간 배양 후, 콜로니 형태와 세포 형태 및 크기를 관찰하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[124] 도 5에 나타낸 바와 같이, 콜로니 형태는 원형 또는 불규칙한 모양이며, 색깔은 크림색 또는 흰색이다. 또한, 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 균주는 간균(rod-shaped)이며, 길이는 약 1.16 μm , 너비는 약 0.385 μm 이었다.

[125]

[126] **2.2. 성장조건(배지, pH)**

[127] *Romboutsia* sp. U2U2A18 균주의 분리에 성공한 배지(R2A agar + Urea + S source)는 상대적으로 영양이 적어 지속배양에 어려움이 있으므로 배양 효율이 높은 배지를 탐색하였다. 그 결과, 혐기성미생물(fastidious anaerobe) 전용 고영양 배지들을 선정하여 배양 효율을 시험하였다.

[128] 구체적으로, 절대 혐기성 균주 배양에 흔히 사용되는 상업적 배지 4 종(RCM, Reinforced Clostridial Medium; CB, Columbia broth; GAM, Gifu Anaerobic Medium; BHI, Brain Heart Infusion broth)에 대하여 균주 생장을 평가하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[129] 도 6에 나타낸 바와 같이, 각 액체 배지에 48 시간 배양 후 혼탁도를 비교한 결과, Columbia broth(Difco)가 상대적으로 가장 우수하였다.

[130] 또한, 하기 표 1의 액체 배지에서 균주를 24 내지 48시간 동안 배양 후, 배양액의 혼탁도(optical density, 600nm)를 분광 광도계를 이용해 측정하였다. 배양 효율은 음성 대조군의 혼탁도로 보정된 값을 비교함으로써 평가하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다. 참고로, 5% 양의 피 첨가 배지는 혼탁도 비교에 적합하지 않아, 한천 배지 배양 후 집락수 형성 단위(Colony forming unit, CFU)로 비교했으나 유

의한 차이 관찰되지 않았다. 또한, 정제 요소 첨가 배지 및 CRIB 배지는 균주 생장이 관찰되지 않아 비교에서 제외하였다.

[131] 도 7에 나타낸 바와 같이, 혼탁도를 기준으로 탄소원(Carbon source) 첨가 배지(Carb)의 배양 효율이 높은 것으로 관찰되었다. 그러나, 콜롬비아 한천과 비교하여, 콜롬비아 한천에 특정 영양소를 추가한 배지에서 균주를 배양한 결과, 양의 피(sheep blood), 담즙산(bile acid), 반추위액(rumen fluid), 펩톤(peptone), 효모 추출물(yeast extract), 요소(urea), 포도당(D-glucose), 셀로비오스(cellobiose), 엿당(maltose), 및 녹말(starch)의 첨가는 유의미한 집락수 형성 단위 증가 효과가 없는 것으로 확인되었다. 또한, 탄소원 추가 배지에 포함된 포도당, 녹말 등의 성분이 균주懸탁액에 첨가되어 균주 자체의 체중 또는 지방 증가효과를 평가하는데 교란 변수(Confounding factor)로 작용할 수 있기 때문에, *Romboutsia* sp. U2U2A18 배양에 Columbia broth(Bacto, BD)를 사용하였다.

[132]

[133] [표1]

배지 이름	구성성분
Colombia agar(modified)	35g Colombia broth(Difco™), 1L 3차 증류수, 0.4g 시스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 15g A 한천, pH 8
Colombia agar + 5% sheep blood	35g Colombia broth(Difco™), 50mL 양의 피, 950mL 3차 증류수, 0.4g 시스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 15g 한천, pH 8
Colombia agar + bile acid + rumen fluid	35g Colombia broth (Difco™), 0.4g 담즙산(bile acid), 50mL 멸균 반추위액(sterile rumen fluid), 950mL 3차 증류수, 0.4g 시스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 15g 한천, pH 8
Colombia agar + peptone + yeast	35g Colombia broth (Difco™), 20g 펩톤(peptone), 5g 효모 추출물(yeast extract), 1L 3차 증류수, 0.4g 시스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 15g 한천, pH 8
Colombia agar + Urea	35g Colombia broth (Difco™), 24.024g 정제 요소(Urea), 1L 3차 증류수, 0.4g 시스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 15g 한천, pH 8
Colombia agar + Carbon source	35g Colombia broth (Difco™), 4g 포도당(D-glucose), 1g 셀로비오스(cellobiose), 1g 엿당(maltose), 1g 녹말(starch), 1L 3차 증류수, 0.4g 시스

	테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 15g 한천, pH 8
CRIB media (modified)	basal bicarbonate medium(modified) ¹⁾ 1L, 30 g b acteriological peptone, 5 g 효모 추출물, 5 g 소 고기 추출물, 4 g 포도당, 1 g 셀로비오스, 1 g 엿당, 1 g 가용성 녹말(soluble starch), 0.5 g 시 스테인 염산염(L-Cysteine hydrochloride), 0.4 g 담즙산염(bile salts), 0.5% (v/v) 멸균 반추위액 , 15g 한천, pH 7
¹⁾ basal bicarbonate medium (modified): 3차 증류수 1L, 0.53g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O(이 인산나트륨이수화물), 0.41g KH ₂ PO ₄ (인산칼륨), 0.3g NH ₄ Cl(염화암모늄), 0.11 g CaCl ₂ ·2H ₂ O(염화칼슘), 0.1g MgCl ₂ ·6H ₂ O(염화마그네슘), 0.3g NaCl(염화나트 륨), 4g NaHCO ₃ (탄산수소나트륨), 0.48g Na ₂ S·9H ₂ O(황화나트륨 9수화물), 0.2 mL 비타민 용액 ²⁾ 의 혼합 배지. ²⁾ 비타민 용액: 3차 증류수 1L 0.02g biotin (비타민 B7), 0.2g 나이아신(niacin, 비타민 B3), 0.5g 피리독신(pyridoxine, 비타민 B6), 0.1g 리보플라빈(riboflavin, 비타민 B2), 0.2g 티아민(thiamine, 비타민 B1), 0.1g 시아노코발라민(cyanocob alamin, 비타민 B12), 0.1g 아미노벤조산(p-aminobenzoic acid, 비타민 H1), 0.1g 판토텐산(pantothenic acid, 비타민 B5)이 혼합된 용액.	

- [134] 아울러, 제조사 권장량을 초과하거나 적게 배지를 제조한 경우, 균주 생장에 차
이가 있는지 평가하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.
- [135] 도 8에 나타낸 바와 같이, 권장량의 1.5배로 제조한 배지에서 균주를 배양한 경
우, 성장률이 가장 높았다.
- [136] 균주를 columbia broth (Difco, REF294420) 배지에서 pH 4.0 내지 9.0으로 pH를
달리하여, 37°C, 90% N₂, 5% CO₂, 5% H₂ 조건에서 혐기 배양하였다. 24시간, 48시
간, 또는 72시간 배양 후에 배양액의 혼탁도를 비교하였다. 그 결과는 도 9에 나
타내었다.
- [137] 도 9에 나타낸 바와 같이, pH 7.0 조건에서 가장 빠르게 성장하는 것으로 확인되
었다.

[138]

[139] **실시예 3. *Romboutsia sp.* U2U2A18의 체중 및 체지방량 증가 효과 확인**

- [140] 생후 7주령 수컷 마우스를 대상으로 *Romboutsia sp.* U2U2A18 균주의 증체 및
체지방량 증대 효과를 확인하였다. 실험 모식도는 도 10에 나타내었다. 사용한
마우스의 유전적 배경은 C57BL/6로 모두 동일하며, 실험 과정 동안 멸균된 사
료와 식수를 급여하였다. 모든 실험동물은 각각의 케이지에 개별환기 사육장치
(Individual Ventilated Cage Rack)가 적용되어 외래 미생물 감염을 방지하였다. 구
체적으로, 생후 4주령 수컷 마우스를 구매하여 2주간 실험실 환경에 순치시킨 후

실험에 사용하였다. 군주의 장내 정착을 촉진하기 위해 군주 처리 전, 1 주일 간 암피실린(1 g/L), 네오마이신(1 g/L), 메트로니다졸(1 g/L), 및 반코마이신(0.5 g/L)이 혼합되어 있는 항생제 카테일을 식수에 섞어 급여함으로써 장내 미생물량을 줄였다. 또한, 장내에 남아있는 항생제가 급여 군주의 장내 정착을 저해할 수 있는 바, 하루 동안 일반 물을 급여하여 항생제가 배출될 수 있도록 하였다. 2주간의 순치 기간 및 항생제 처리 기간에는 일반 식이(품번: 2918S, 제조사: ENVIGO)를 급여하였고, 군주 투여 기간에는 고지방 식이(45%kcal from fat, 품번: D12451, 제조사: Research Diets)를 급여하였다. 실험 그룹은 총 두 그룹으로, 음성대조군 그룹인 PBS(Phosphated buffered saline) 처리군과 군주 처리군(*Romboutsia sp.* U2U2A18(약어표기, Rt) 처리군)으로 구성되었다. 각 실험군의 개체는 무작위적으로 선정되었다. 모든 군주는 동일한 한천 배지(Columbia broth (BD Difco), 1.5 % agar(BD difco), pH 8)에 도말하여 접종하고 48시간 동안 배양하였다. 회수한 균체는 4 ml PBS에 현탁한 뒤, 혈청 바이알(serum vial)에 주입하여 4°C에서 냉장 보관하였다. 군주 현탁액은 보관 기간이 일주일 이내인 것을 사용하고, 마우스는 급여 전 30분 이상 실온에 노출시킨 후 사용하였다. 생균은 1일 1회, 주 5회 주기로 총 8주 동안 위관영양(oral gavage) 방식으로 투여하였다. 1회 투여량은 개체당 200 μ l로 군주 역가는 1 ml 당 5×10^5 CFU(cell forming unit; 집락수)였다.

- [141] 군주 투여로 인한 체중 증가 효과임을 증명하기 위해, 군주 투여 전 그룹 별 마우스의 체중을 비교하였고, 이는 도 11a에 나타내었다. 그 결과, 두 그룹사이에 통계적으로 유의미한 체중 차이가 관찰되지 않았다.
- [142] 또한, 군주 투여 기간 동안 식이 섭취량을 비교하였고, 이는 도 11b에 나타내었다. 그 결과, 군주 투여군과 대조군의 식이 섭취량의 유의미한 차이가 관찰되지 않았다.
- [143] 군주 투여군과 대조군 간 체중 증가율(%)을 비교하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.
- [144] 도 12에 나타낸 바와 같이, 군주 급여 후 8주, 10주가 지난 시점에서 *Romboutsia sp.* U2U2A18 급여군은 PBS 처리 대조군(Control)에 비해 통계적으로 유의미한 체중 증가가 관찰되었다.
- [145] 또한, 군주 투여 10주 경과 시점에 복부피하지방(posterior subcutaneous fat), 부고환지방(epididymal fat), 장간막지방(mesenteric fat), 및 후복막지방(retroperitoneal fat)를 포함하는 총 체지방량, 및 체중 대비 체지방률(%)을 군주 투여군과 대조군에서 비교하였다. 그 결과는 도 13에 나타내었다.
- [146] 도 13에 나타낸 결과, *Romboutsia sp.* U2U2A18 급여군이 PBS 처리 대조군에 비해 총 체지방량, 및 체중 대비 체지방률(%)이 통계적으로 유의하게 높았다.
- [147] 군주 투여 10 주 경과 후, 마우스 지방 조직 별 체지방률을 비교하였다. 그 결과는 도 14에 나타내었다.

- [148] 도 14에 나타난 바와 같이, *Romboutsia sp.* U2U2A18 급여균이 PBS 처리 대조군에 비해 부고환지방, 장간막지방, 및 후복막지방 조직의 체지방률(%)이 통계적으로 유의하게 높았다.
- [149]
- [150] 실시예 4. *Romboutsia sp.* U2U2A18의 내당능장애 유발 및 혈중 콜레스테롤 증가 여부 확인
- [151] 군주 투여에 따른 내당능장애 유발 여부를 확인하기 위해, 군주 투여 10주 경과 후 복막 포도당 부하검사 (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test, IpGTT)를 실시하였다. 그 결과는 도 15a에 나타내었다.
- [152] 도 15a에 나타난 바와 같이, 복막 포도당 부하검사를 통해 내당능 유무를 평가한 결과 *Romboutsia sp.* U2U2A18 급여균과 PBS 처리 대조군 간에 통계적으로 유의미한 차이가 관찰되지 않았다.
- [153] 또한 군주 투여 10주 경과 후 공복 혈당 수치를 비교하였고, 그 결과를 도 15b에 나타내었다.
- [154] 도 15b에 나타난 바와 같이, 공복 혈당 수치 비교 결과 통계적으로 유의미한 차이가 관찰되지 않았다.
- [155] 즉 군주 급여가 체중 및 체지방률은 증가시켰으나 내당능장애를 유발하지는 않는다는 것을 확인할 수 있었다.
- [156] 군주 투여에 따른 혈중 콜레스테롤 증가 여부를 확인하기 위해, 군주 투여 10주 경과 후 혈중 콜레스테롤 수치를 비교하였다. 그 결과는 도 16에 나타내었다.
- [157] 도 16에 나타난 바와 같이, 콜레스테롤 수치 비교 결과 통계적으로 유의미한 차이가 관찰되지 않았다.
- [158] 즉 도 16을 통해 군주 급여가 체중 및 체지방률은 증가시켰으나 혈중 콜레스테롤 증가를 유발하지는 않는다는 것을 확인할 수 있었다.
- [159]
- [160]
- [161] 한편, 상기 마우스 체중 및 지방 증가 효과가 있는 *Romboutsia sp.* U2U2A18 군주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2022년 1월 14일에 수탁번호 KCTC14855BP로 기탁하였다.
- [162]
- [163] 따라서, 본 발명의 *Romboutsia sp.* U2U2A18 군주는 마우스에서 체중을 증가시켰고, 체지방량 및 체지방률을 증가시켰으며, 부고환지방, 장간막지방 및 후복막지방 조직의 체지방률을 증가시켰는 바, 동물의 지방 및 체중을 증가시키는 효과가 우수함을 확인하였다.
- [164]
- [165] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이

다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

[166] [수탁번호]

[167] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

[168] 수탁번호 : KCTC14855BP

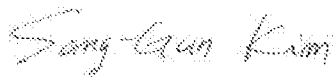
[169] 수탁일자 : 20220114

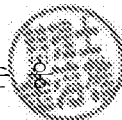
[170]

국 제 양 식

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명
국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 배진우
서울특별시 동대문구 경희대로 26
대한민국

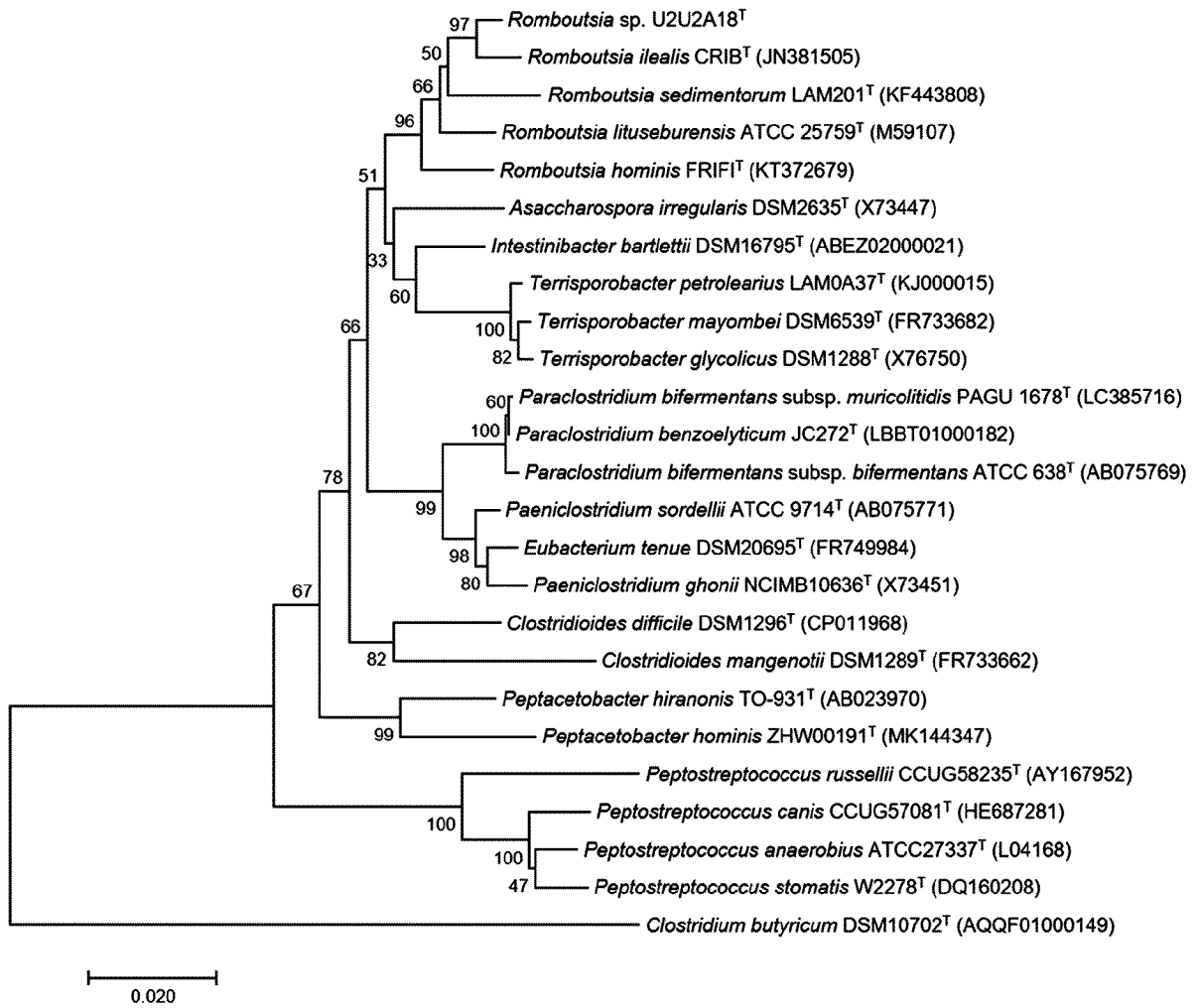
I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Romboutsia</i> sp. U2U2A18	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 14855BP
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 ☒ 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2022년 01월 14일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 2022년 01월 14일에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구원 생물자원센터 주소: (56212) 전라북도 정읍시 입신길 181, 한국생명공학연구원 생물자원센터	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명:  김성건, 생물자원센터 총괄 서명일: 2022. 01. 14



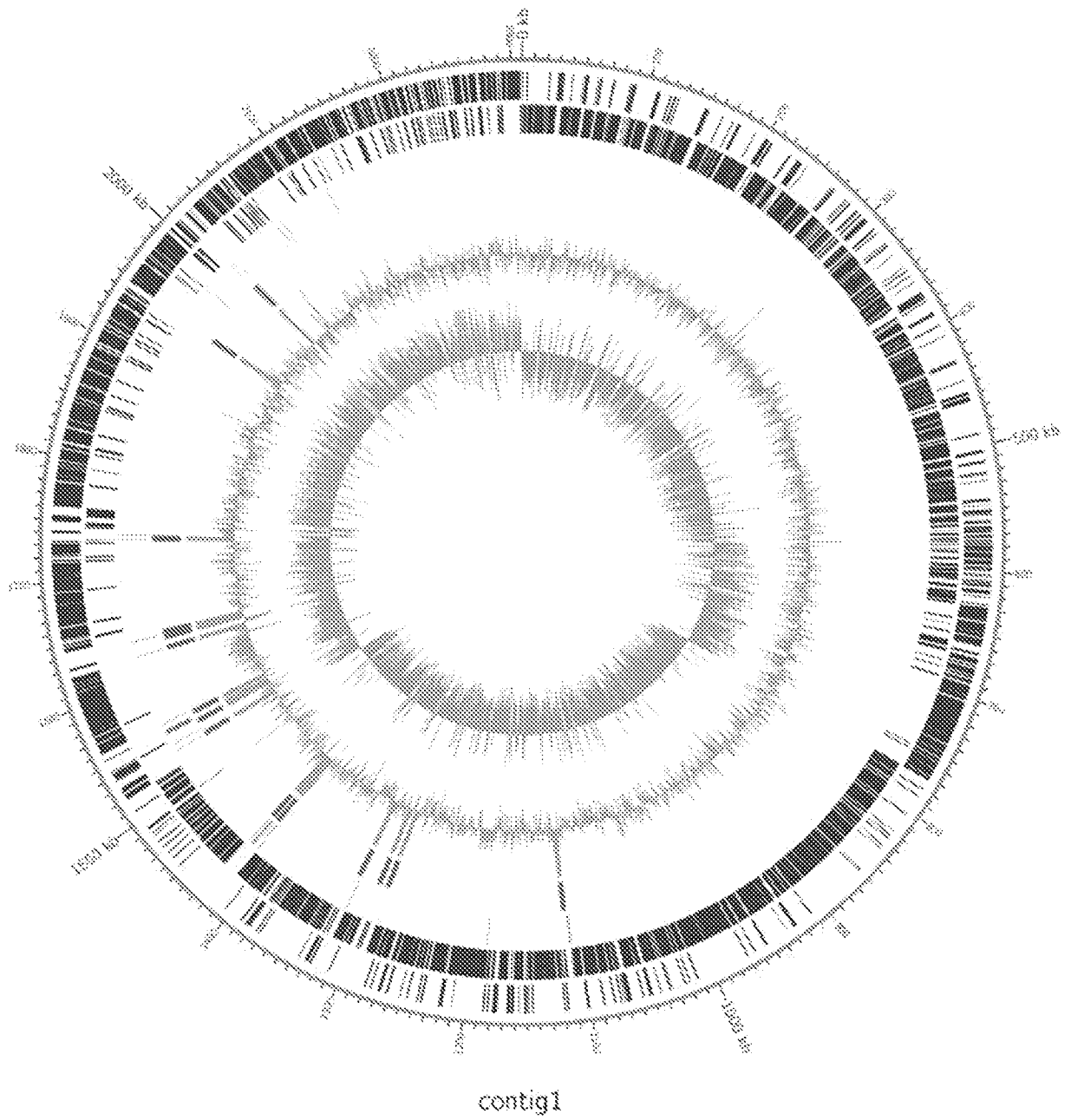
청구범위

- [청구항 1] 체중 또는 지방증가 효과를 갖는 *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 균주는 한우 소장에서 유래한 것인, *Romboutsia sp.* U2U2A18 균주.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 균주는 서열번호 1로 표시되는 16s rRNA 유전자의 염기서열을 포함하는 것인, *Romboutsia sp.* U2U2A18 균주.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 균주는 혐기성인, *Romboutsia sp.* U2U2A18 균주.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 지방은 복부피하지방(posterior subcutaneous fat), 부고환지방(epididymal fat) 또는 장간막지방(mesenteric fat)인, *Romboutsia sp.* U2U2A18 균주.
- [청구항 6] *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 7] *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 저체중증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 사료첨가제.
- [청구항 9] *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는, 체중 또는 지방 증가용 사료 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 사료의 대상이 되는 동물은 소, 돼지, 닭, 오리, 거위, 꿩, 및 염소로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 체중 또는 지방 증가용 사료 조성물.
- [청구항 11] 하기 특징으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 조건을 만족하는 배지에서 균주를 배양하는 단계; 를 포함하는, *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 배양 방법:
(a) Columbia broth 배지;
(b) 농축 배수 1.25 내지 1.75배; 및
(c) pH 6.5 내지 7.5.
- [청구항 12] *Romboutsia sp.* U2U2A18(기탁번호: KCTC 14855BP) 균주 또는 이의 배양액을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계; 를 포함하는, 동물의 체중 또는 지방 증가 방법.

[도 1]



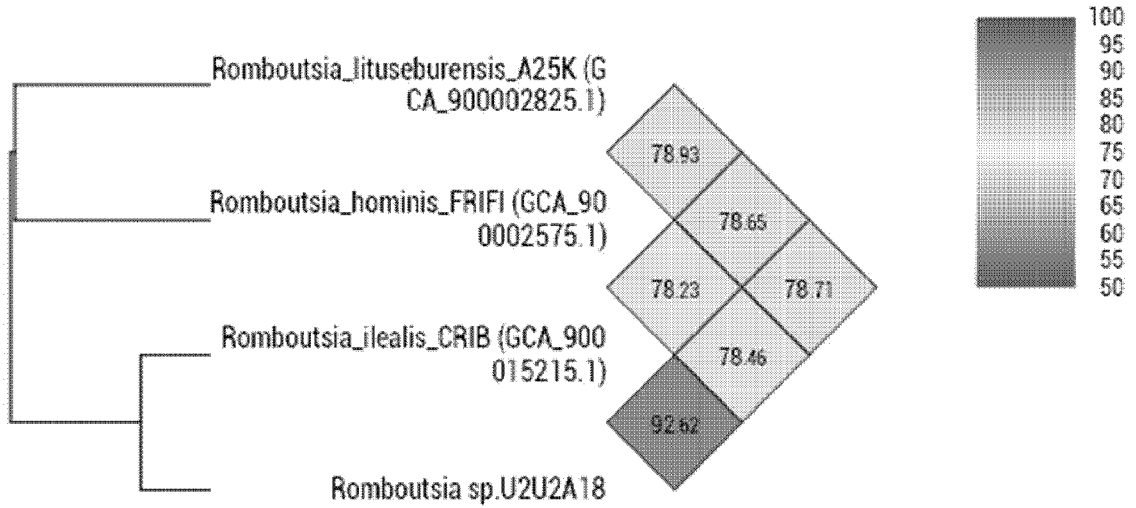
[도 2]



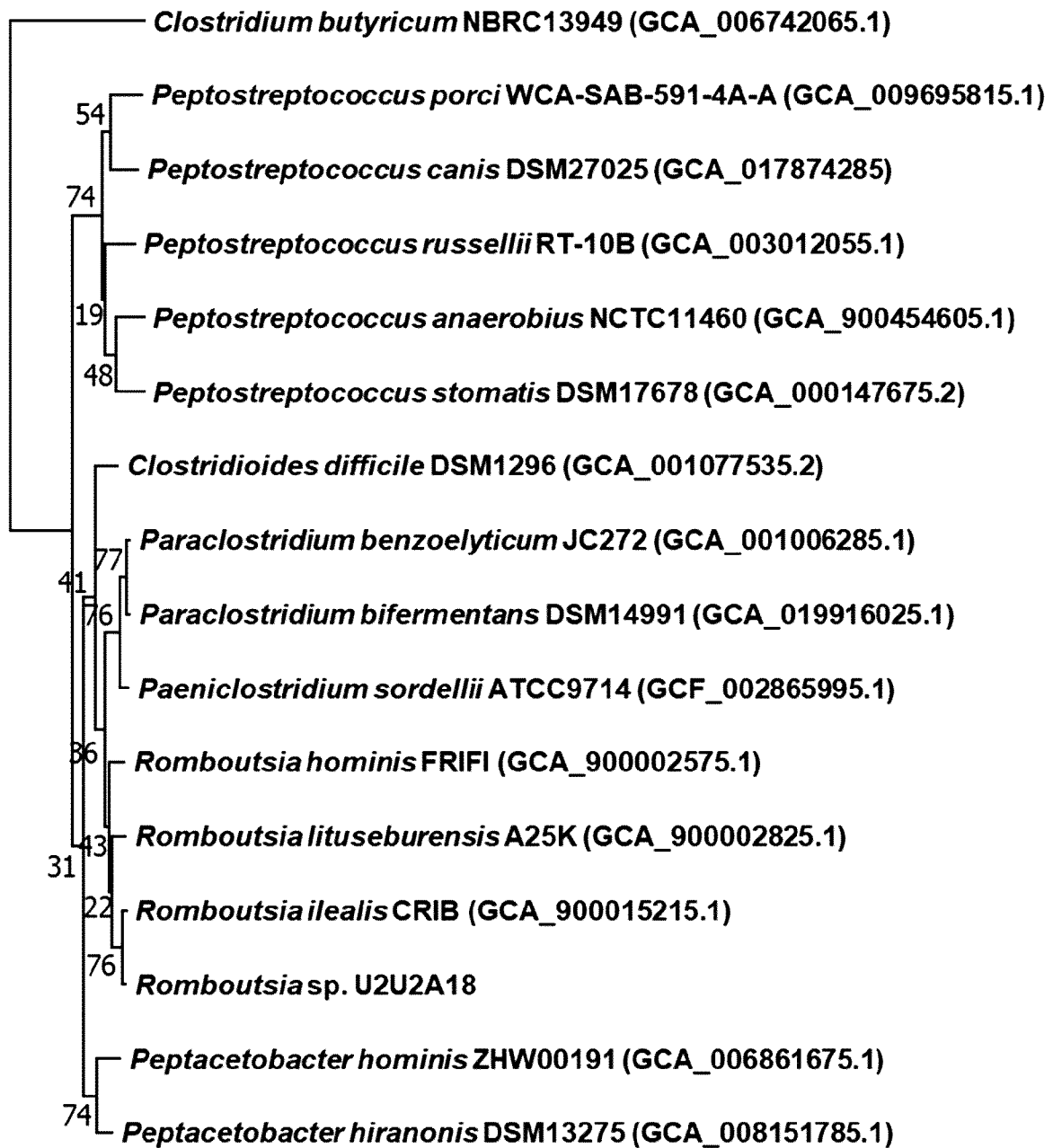
[도3]



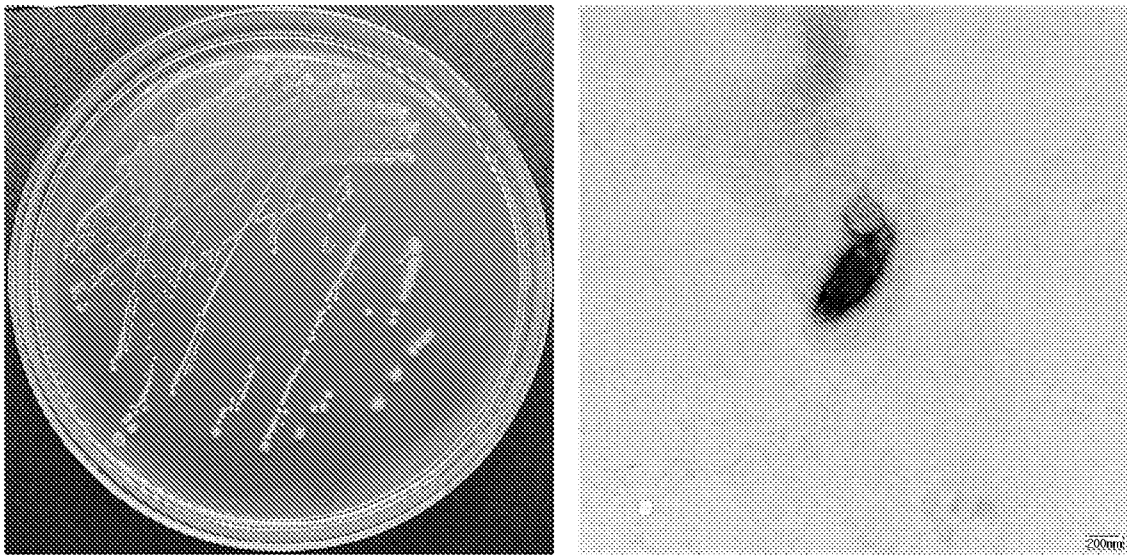
Heatmap generated with OrthoANI values
calculated from the OAT software.
Please cite Lee *et al.* 2015.



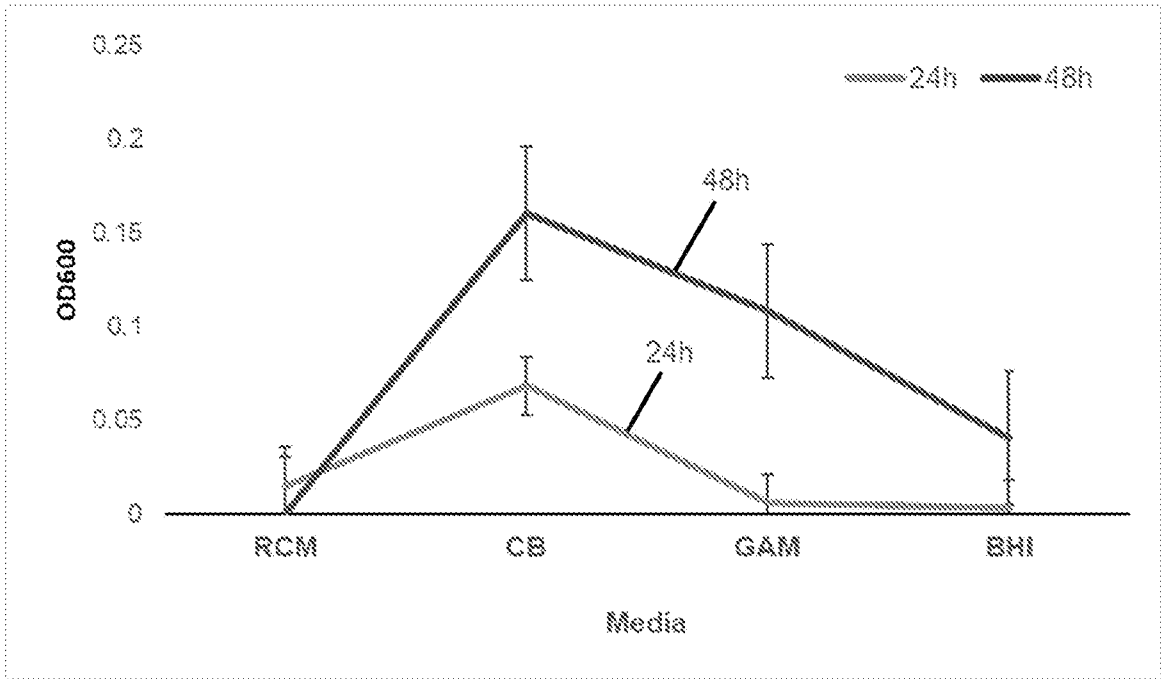
[도4]



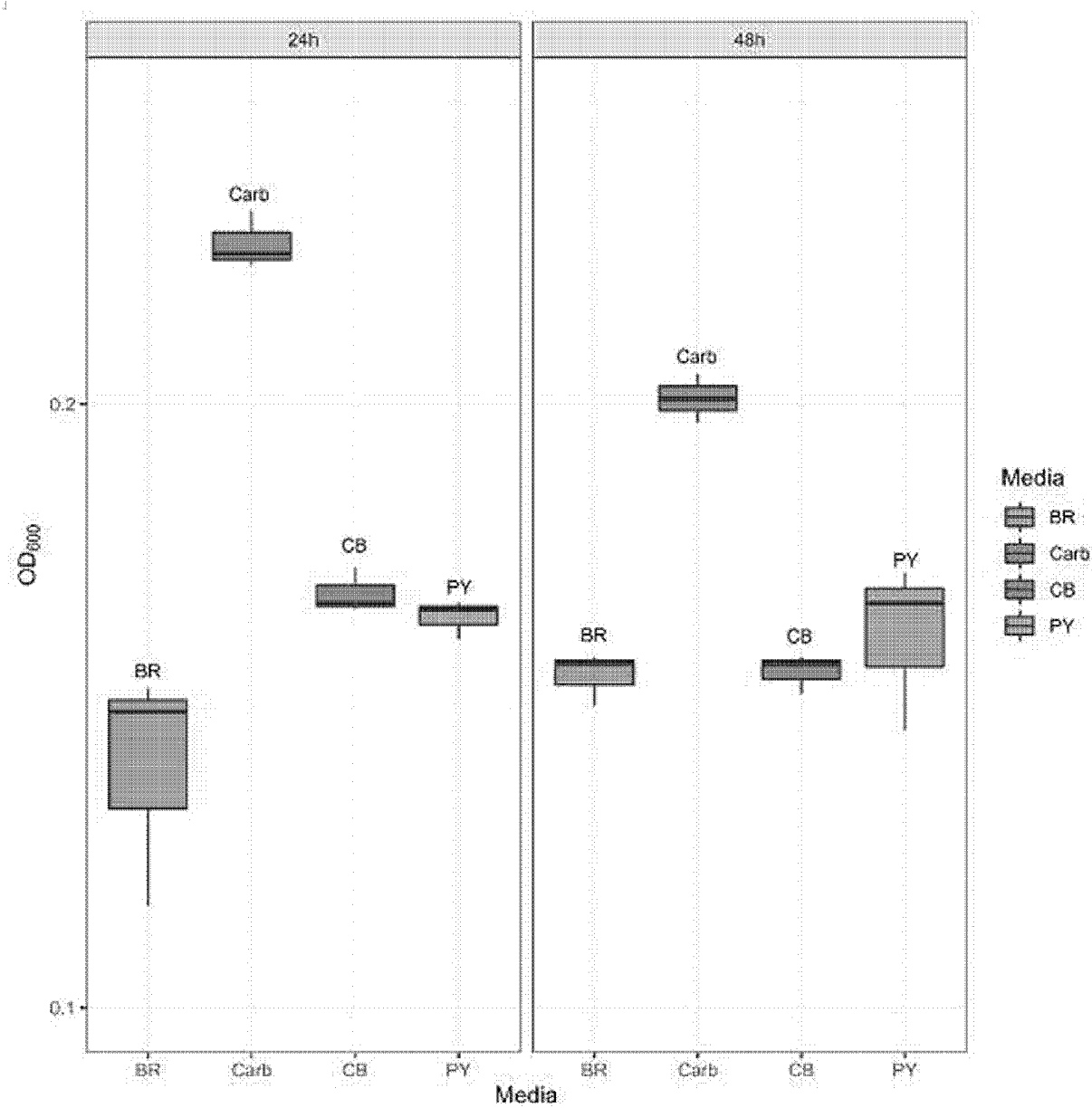
[도 5]



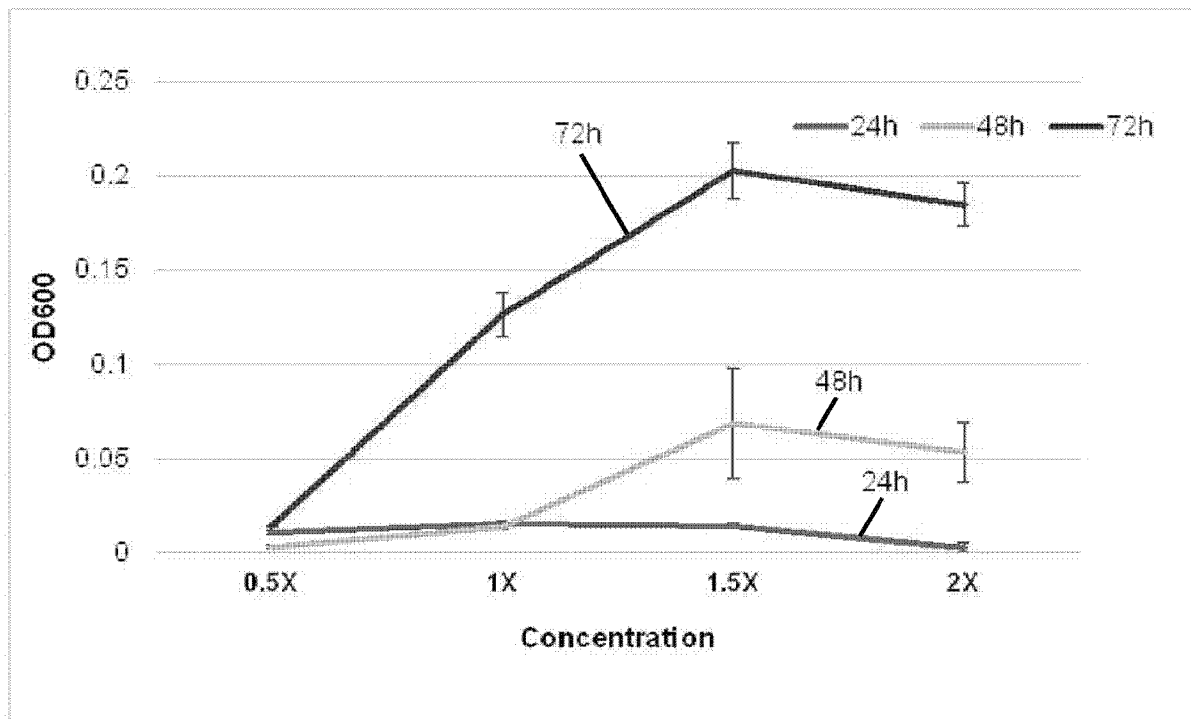
[도 6]



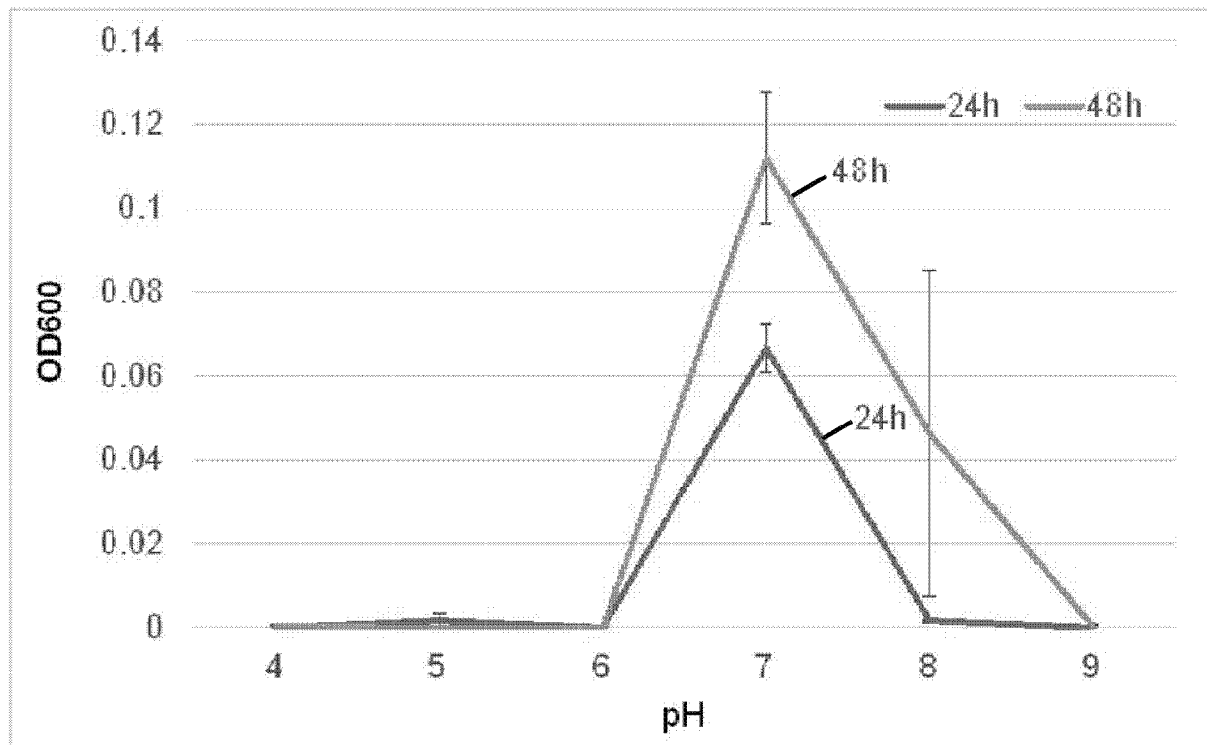
[도7]



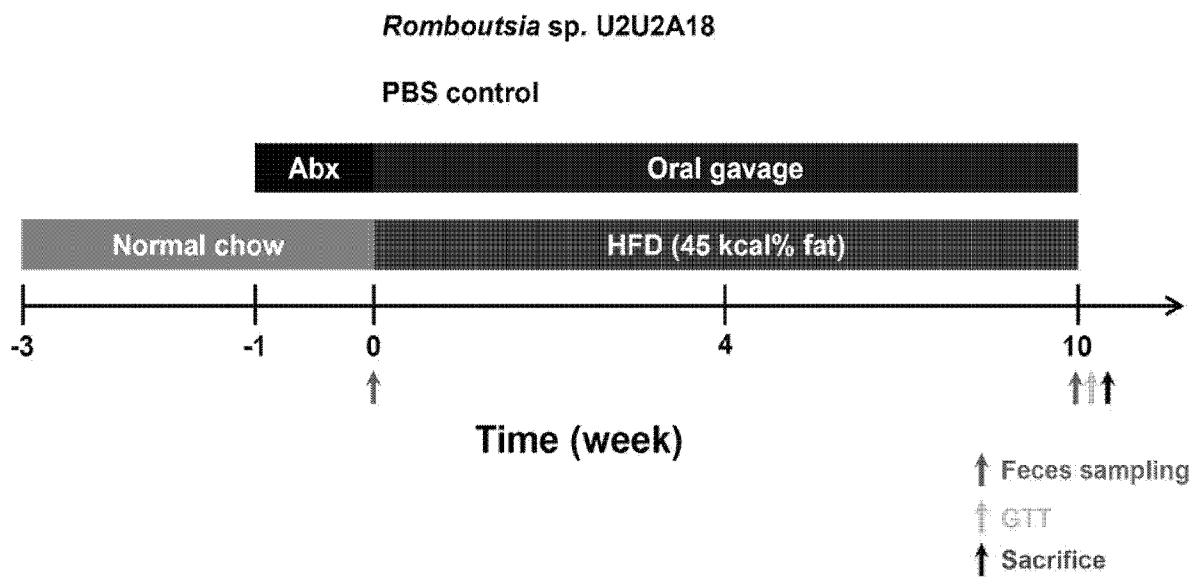
[도8]



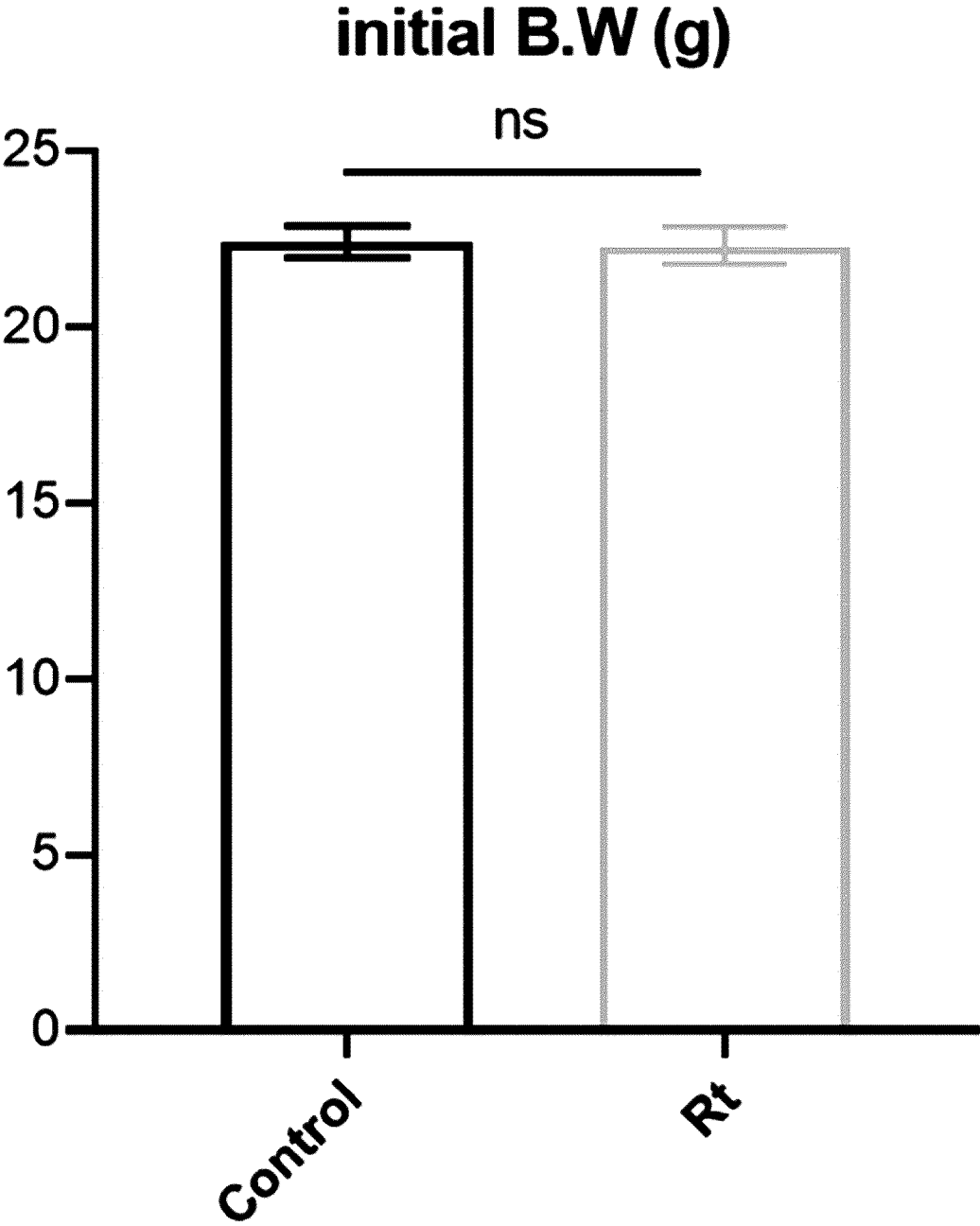
[도9]



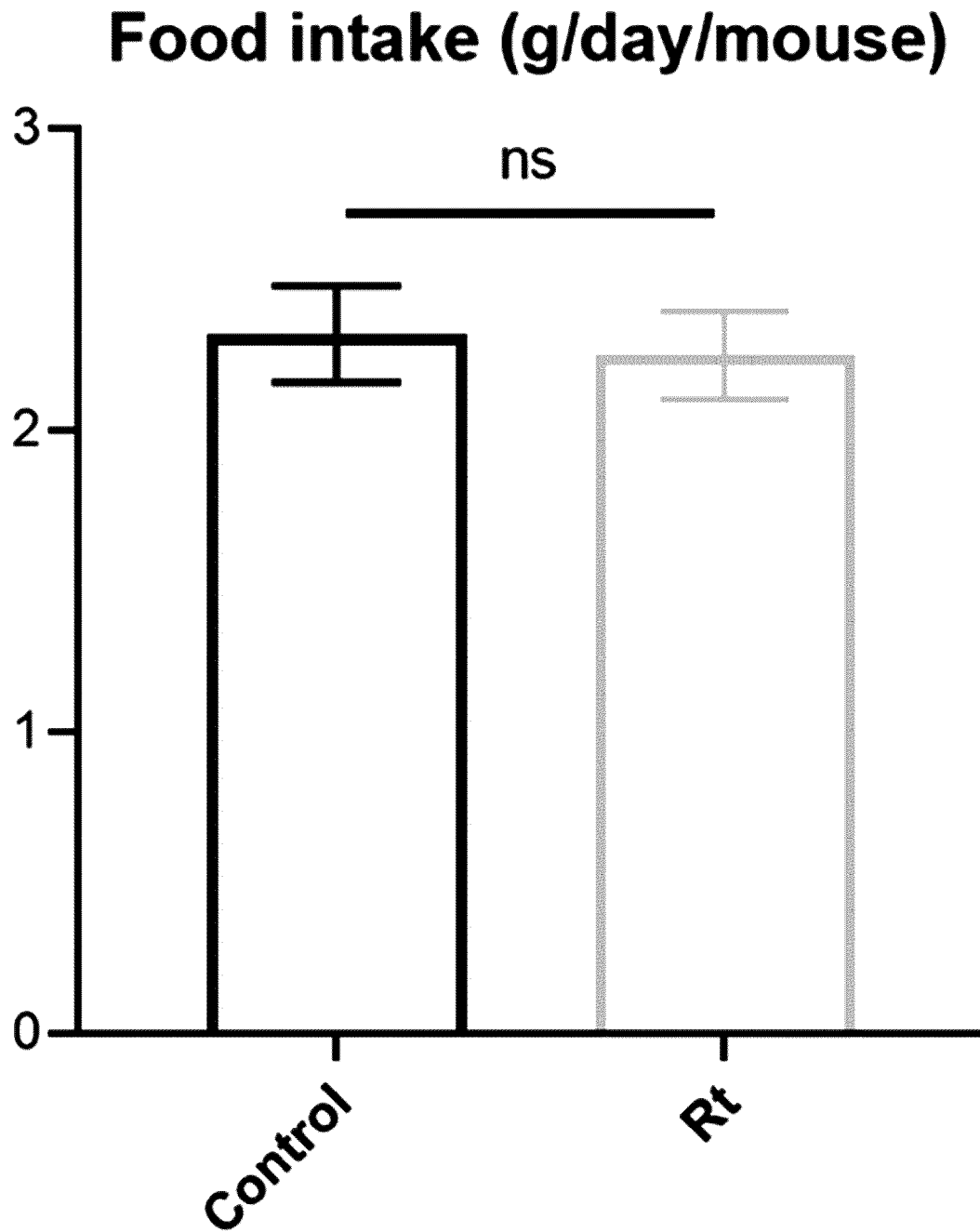
[도10]



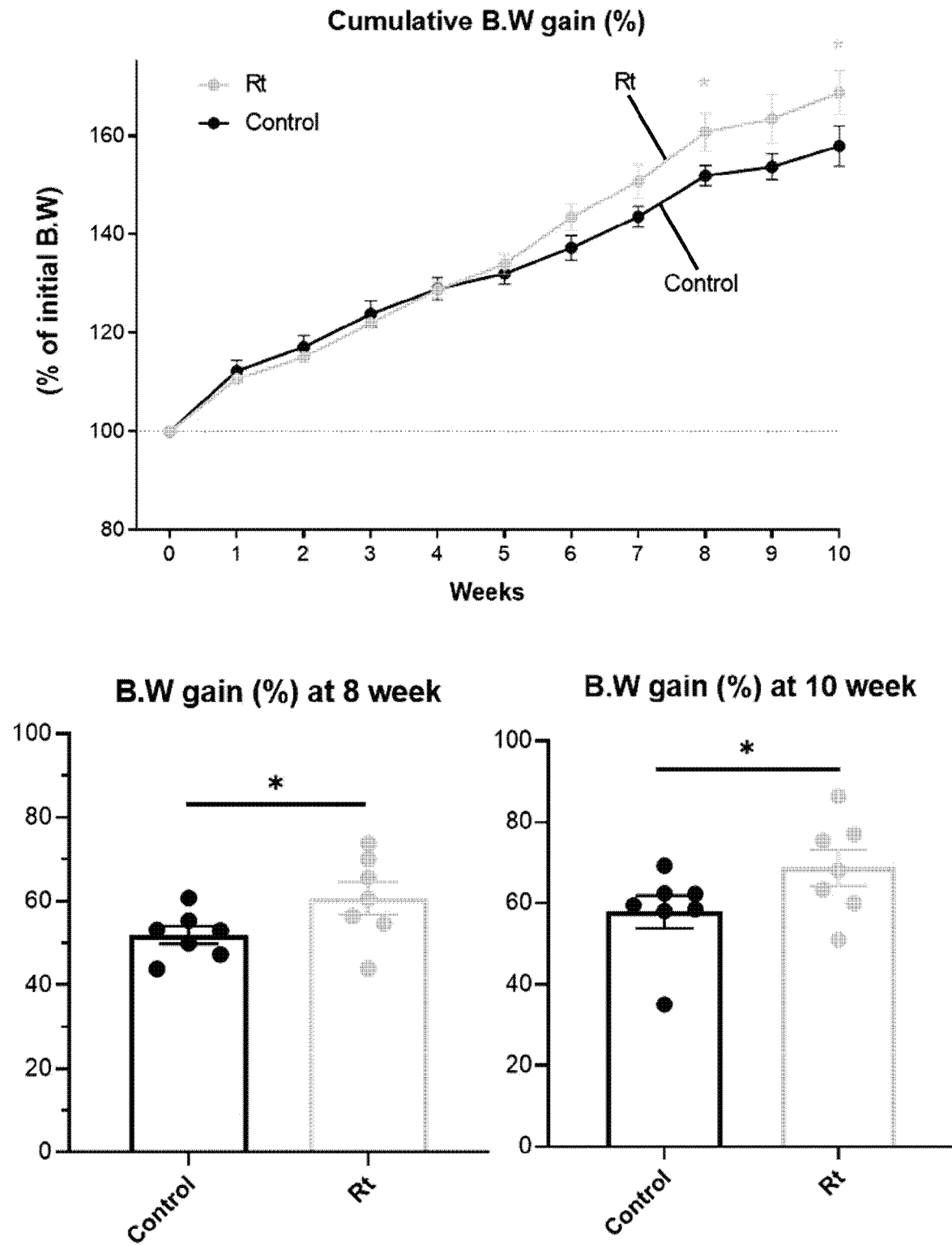
[도11a]



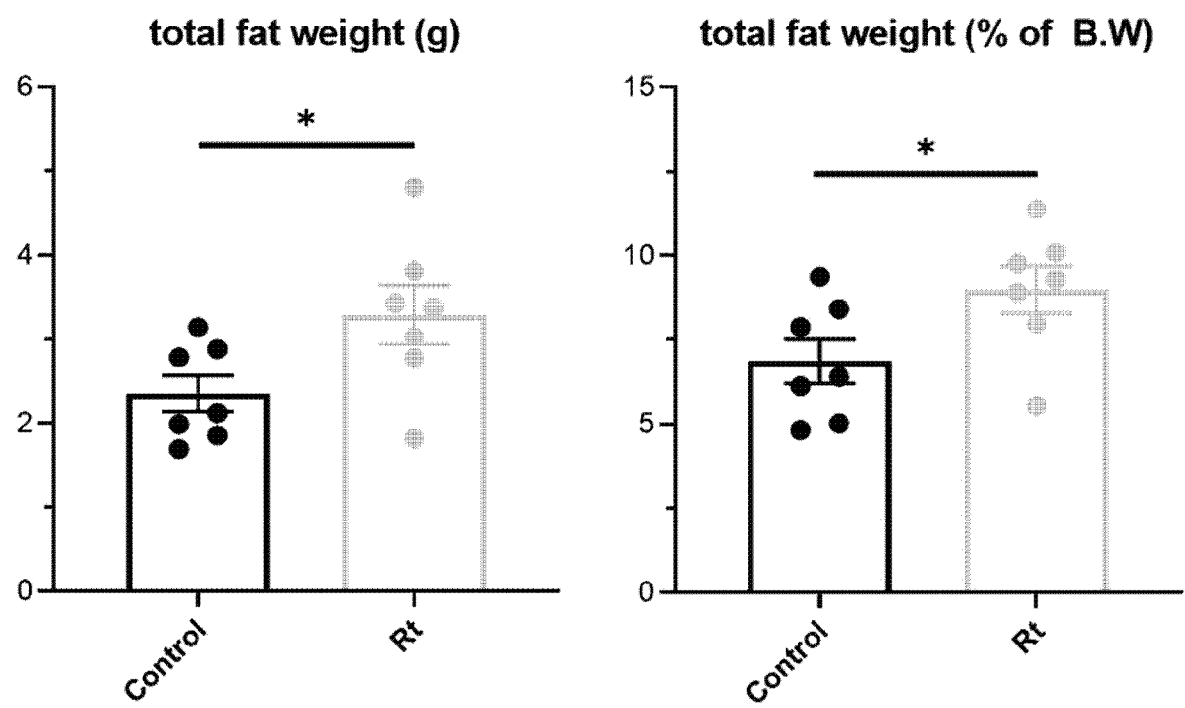
[도11b]



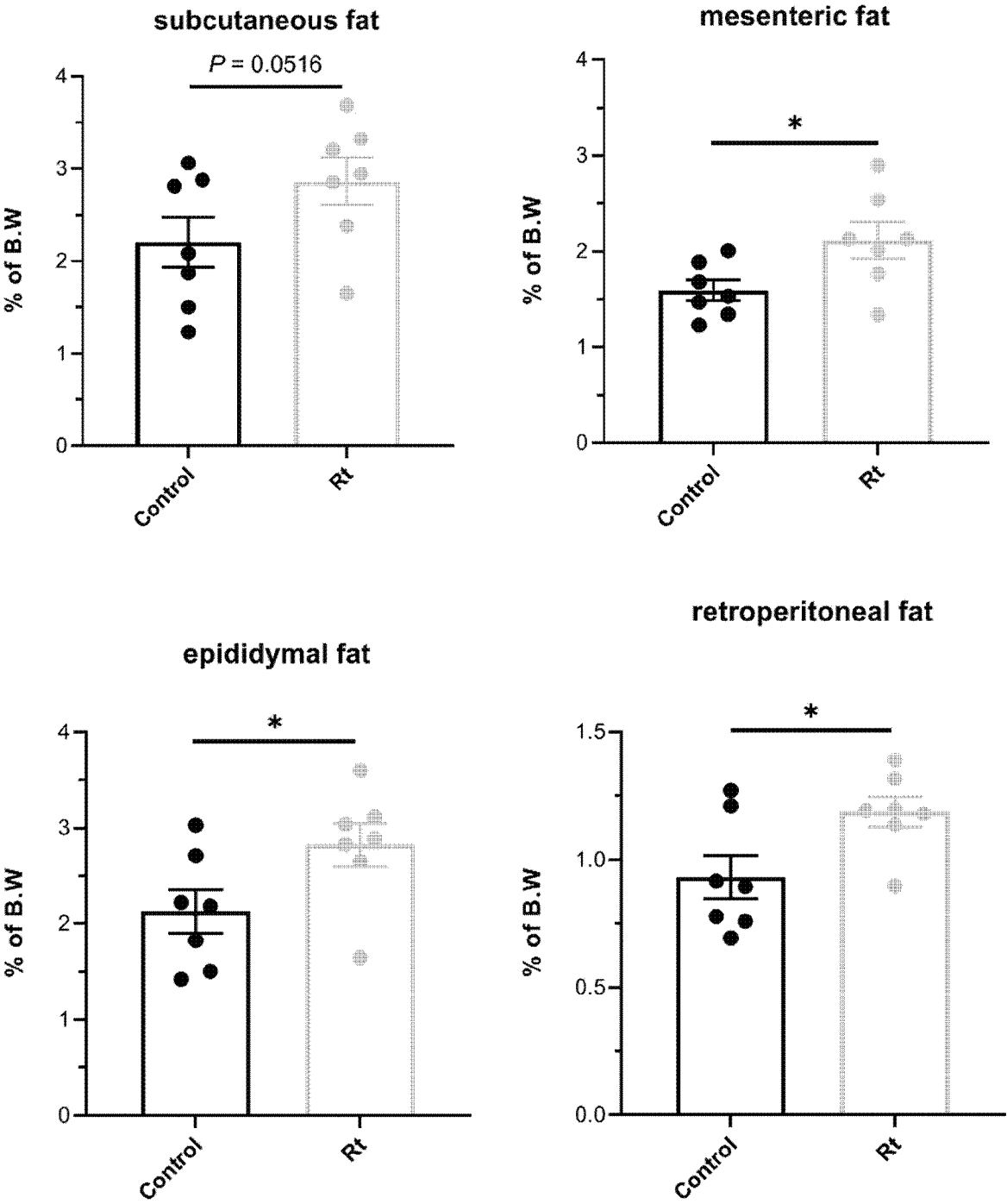
[도12]



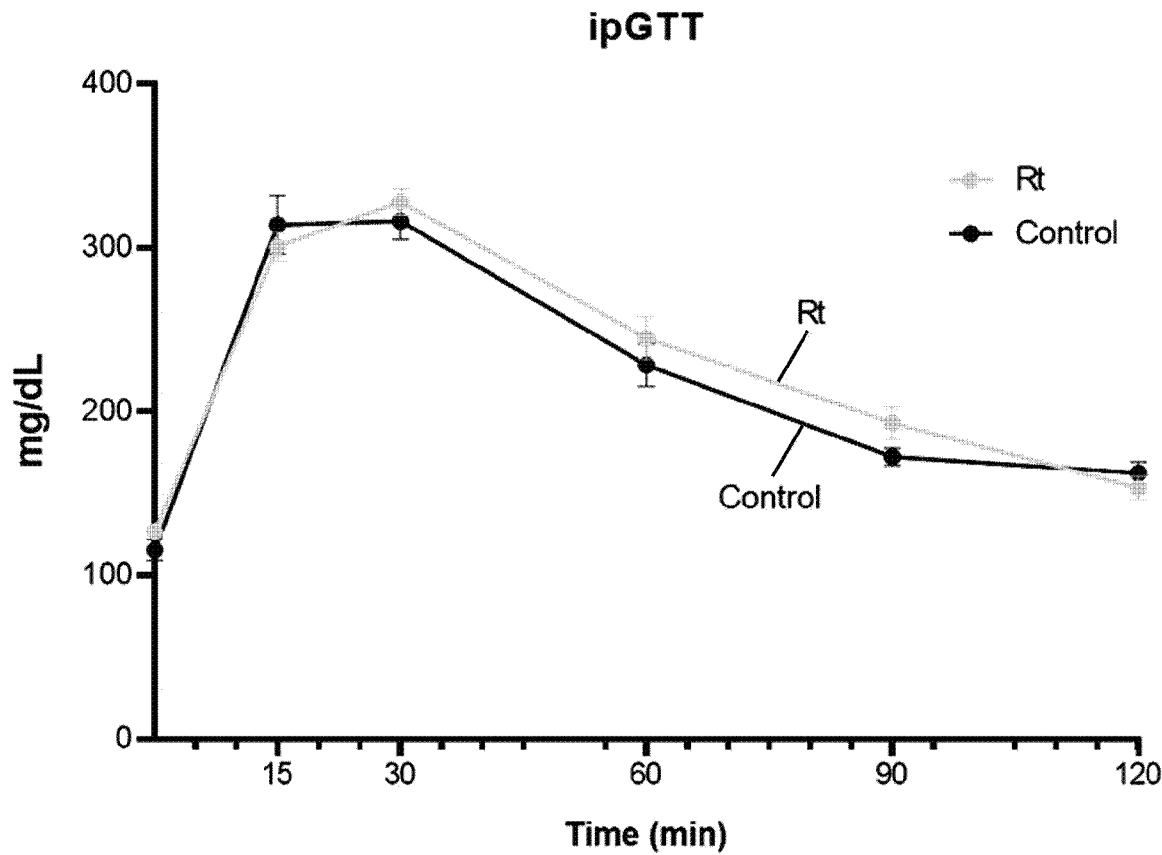
[도13]



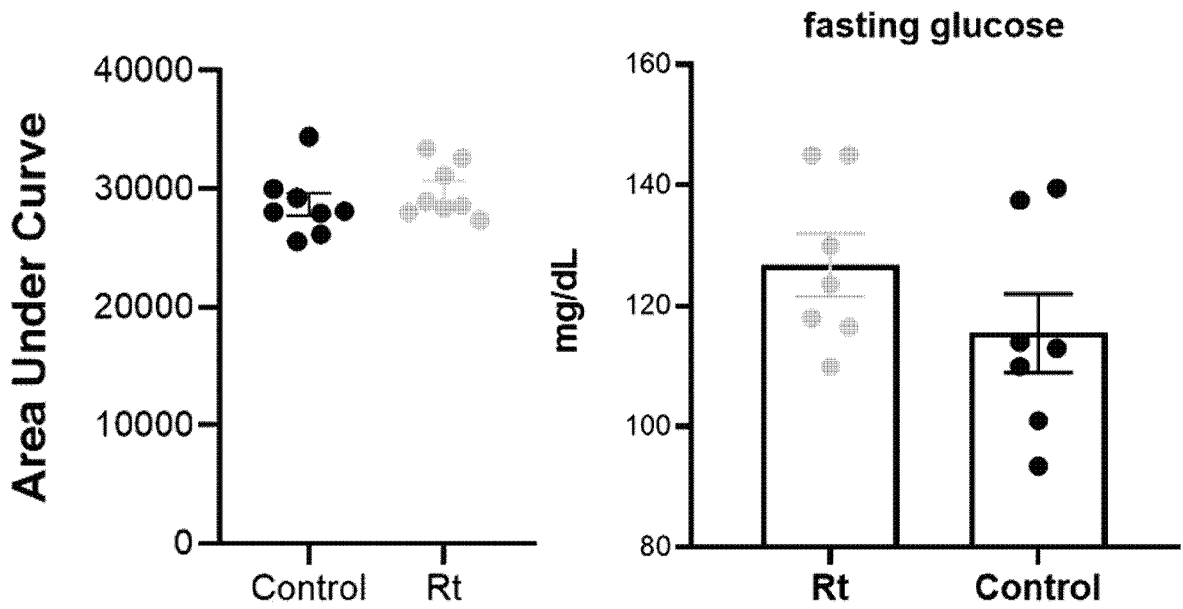
[도14]



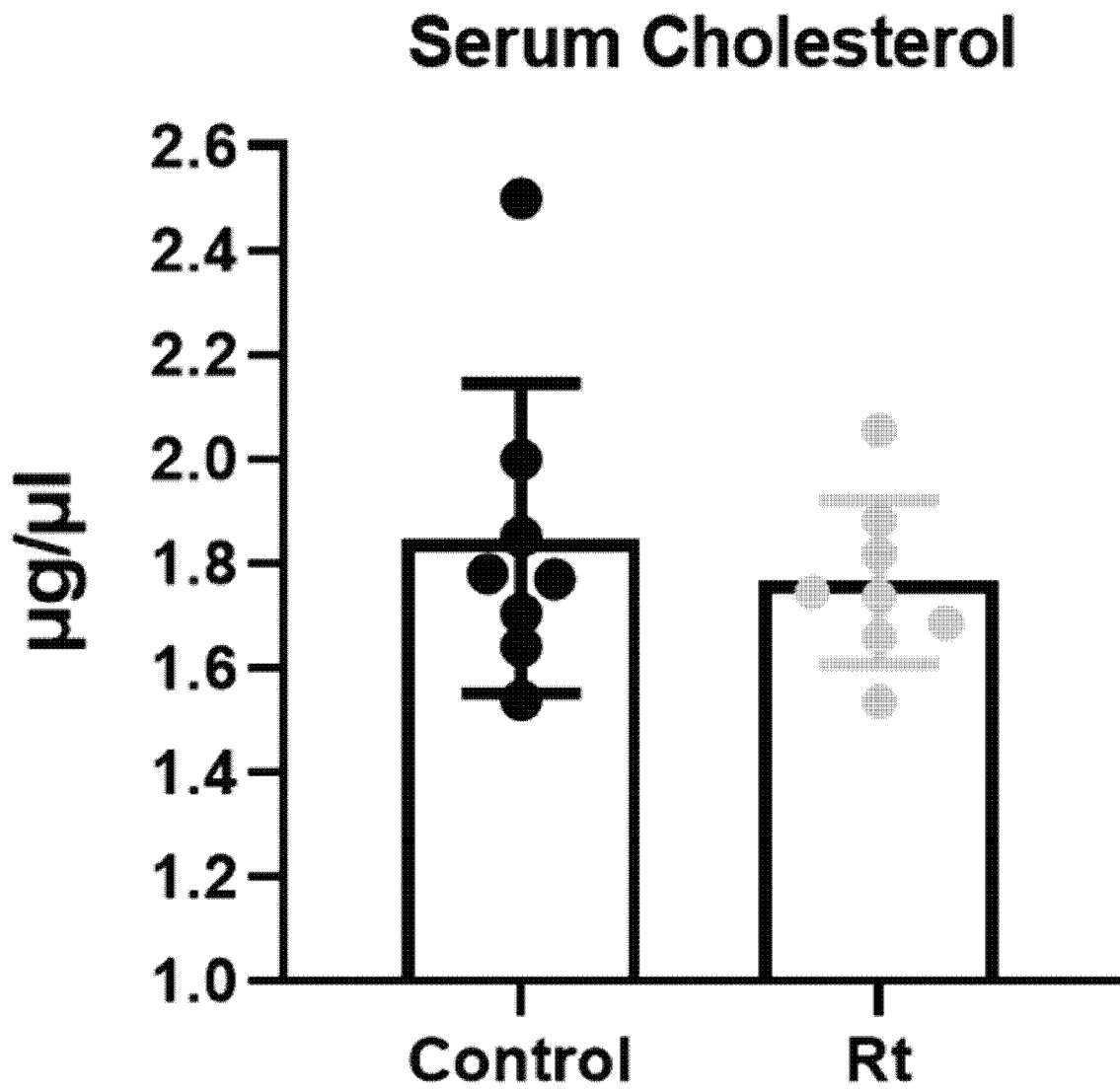
[도 15a]



[도 15b]



[도16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A23L 33/105(2016.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: Romboutsia sp., U2U2A18, KCTC 14855BP, 체중(weight), 지방(fat), 증가(increase), 사료(feed)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GERRITSEN, J. et al. Characterization of Romboutsia ilealis gen. nov., sp. nov., isolated from the gastrointestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus Clostridium into the genera Romboutsia gen. nov., Intestinibacter gen. nov., Terrisporobacter gen. nov. and Asaccharospora gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014, vol. 64, pp. 1600–1616. See entire document.	1-12
A	GERRITSEN, J. et al. Genomic and functional analysis of Romboutsia ilealis CRIBT reveals adaptation to the small intestine. PeerJ. 2017, vol. 5, document e3698, pp. 1-28. See entire document.	1-12
A	NCBI. Reference Sequence: NR_144740.1 (12 March 2019). See entire document.	1-12
A	RICABONI, D. et al. Romboutsia timonensis, a new species isolated from human gut. New Microbe and New Infect. 2016, vol. 12, pp. 6–7. See entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2024

Date of mailing of the international search report

22 July 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005107

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1949023 B1 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION OF GWANGJU UNIVERSITY et al.) 29 April 2019 (2019-04-29) See entire document.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005107

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/005107

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1949023	B1	29 April 2019	KR	20190001437	A	04 January 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A23L 33/105(2016.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Romboutsia sp. U2U2A18, KCTC 14855BP, 체중(weight), 지방(fat), 증가(increase), 사료(feed)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	GERRITSEN, J. 등, 'Characterization of Romboutsia ilealis gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus Clostridium into the genera Romboutsia gen. nov., Intestinibacter gen. nov., Terrisporobacter gen. nov. and Asaccharospora gen. nov.', International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64권, 페이지 1600-1616 전체 문헌	1-12
A	GERRITSEN, J. 등, 'Genomic and functional analysis of Romboutsia ilealis CRIBT reveals adaptation to the small intestine', PeerJ, 2017, 5권, 문헌 e3698, 페이지 1-28 전체 문헌	1-12
A	NCBI Reference Sequence: NR_144740.1 (2019.03.12) 전체 문헌	1-12
A	RICABONI, D. 등, 'Romboutsia timonensis, a new species isolated from human gut', New Microbe and New Infect, 2016, 12권, 페이지 6-7 전체 문헌	1-12
A	KR 10-1949023 B1 (광주대학교산학협력단 등) 2019.04.29 전체 문헌	1-12
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년07월19일(19.07.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년07월22일(22.07.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제출원번호

PCT/KR2024/005107