



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0094239
(43) 공개일자 2024년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/135 (2016.01) A23K 10/16 (2017.01)
A61K 35/745 (2015.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)
A23K 10/16 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2022-0176072

(22) 출원일자 2022년12월15일

심사청구일자 2022년12월15일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

주식회사 종근당바이오

서울특별시 서대문구 충정로 8 (충정로3가)

(72) 발명자

석기태

강원도 원주시 늘품로 199, 109동 1032호(반곡동,
원주반곡아이파크)

신창훈

경기도 화성시 수노을1로 192, 704동 1503호(새솔
동, 금강펜테리움센트럴파크충산)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인본

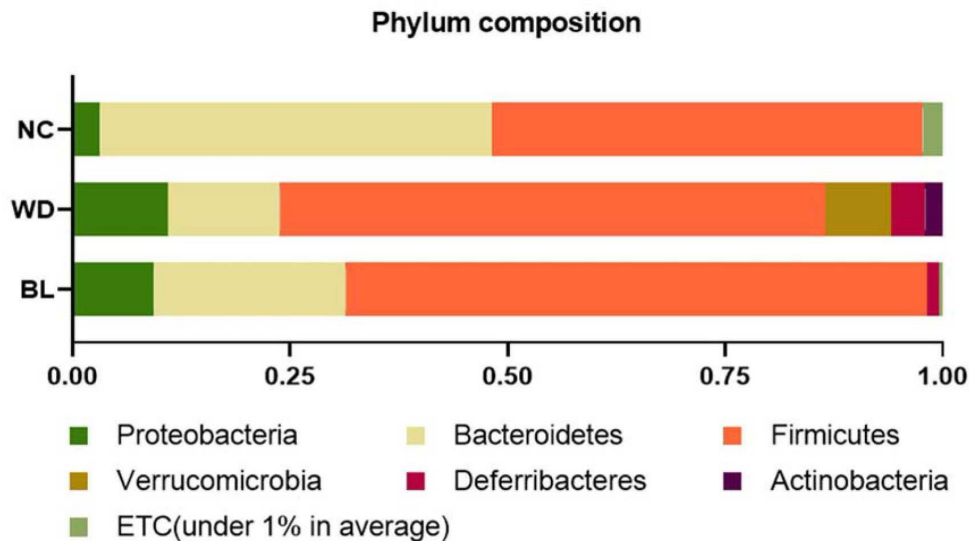
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*) CKDB004 균주를 포함하는 염증성 질환의 예방, 치료 및 개선용 조성물에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/745 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 31/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

(72) 발명자

김병국

서울특별시 양천구 신정로7길 76, 202동 1207호(신정동, 푸른마을2단지아파트)

김정환

서울특별시 노원구 노원로 428, 202동 1006호(상계동, 상계2차중앙하이츠아파트)

정현채

경기도 군포시 대야1로22번길 8-1, 201동 509호(대야미동, 건양타워1차아파트)

윤상준

강원도 춘천시 전원안길33번길 11, 401호 (교동)

최미란

강원도 춘천시 동면 소양강로 104, 102동 604호 (춘천장학사랑으로부영아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345349551
과제번호	2020R1A6A1A03043026
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	소화기연구소
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2029.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711159001
과제번호	2018M3A9F3020956
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	장내 마이크로바이옴을 활용한 만성간질환 치료용 파마바이오틱스 후보제 발굴 및 효능검증
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2018.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 비만, 암, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 아토피, 습진, 화상, 상처, 관절염, 다발성 경화증, 강직성 척추염, 천식 및 이식편대숙주병 중 어느 하나 이상에 의해 발생한 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 박테리아 감염은 녹농균에 의한 감염인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 위, 소장, 대장, 맹장, 치주조직, 관절, 신장 및 간 중 어느 하나 이상에서 발생한 것인, 조성물.

청구항 6

수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 7

수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 염증성 질환은 비만, 암, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 아토피, 습진, 화상, 상처, 관절염, 다발성 경화증, 강직성 척추염, 천식 및 이식편대숙주병 중 어느 하나 이상에 의해 발생한 것인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 박테리아 감염은 녹농균에 의한 감염인, 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 염증성 질환은 위, 소장, 대장, 맹장, 치주조직, 관절, 신장 및 간 중 어느 하나 이상에서 발생한 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*) CKDB004 균주를 포함하는 염증성 질환의 예방, 치료 및 개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 상기 균주를 유효성분으로 포함하여 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) 과 같은 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증성 질환은 서구화된 식습관 및 환경오염 등으로 인해 발병률이 급속히 증가하고 있다. 아직까지 대다수의 염증성 질환의 명확한 발병기전은 밝혀지지 않았으며, 유전적, 면역학적 이상 및 스트레스나 약물 등과 같은 환경적 요인 등이 관련된 것으로 알려져 있다.

[0003] 그 중 간 질환, 특히 비알코올성 지방간질환 (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)은 대사증후군이 간 대사에 미치는 영향으로 인해 전 세계 모든 연령층에서 급격히 증가하였다. 특히 상기 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)은 특히 선진국에서 많이 발생하는데, 비만, 대사증후군, 제2형 당뇨병 및 만성 간질환 등이 주요원인으로 알려져 있다. 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)은 간에 지방에 쌓이는 특징을 가진다. 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)이 지속될 경우 간의 해독 기능이 저하되고 활성 산소가 생성되어 간세포의 손상이 나타난다. 이로 인해 간염 (hepatitis) 또는 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH)으로 진행되면 결국 간경변, 간암 및 간기능 장애 등의 합병증이 발생할 수 있다.

[0004] 한편, 우리 몸에 존재하는 수십억 개의 세균을 미생물총 내지 마이크로바이옴 (microbiome)이라고 한다. 상기 미생물총은 약 1kg 내지 2kg의 총 질량을 가진 다양한 박테리아로 구성된 복잡한 생태계로, 특히 장내 미생물총은 숙주와 긴밀한 관계를 유지하며 비타민 생산, 장 점막 면역계 및 박테리아 전위 (bacterial translocation)에 중요한 역할을 한다. 최근 인간의 장내 미생물총에 대한 지식과 기술의 발전은 인간의 질병과 치료에 대한 우리의 관점을 변화시켰다.

[0005] 미생물 중 우리 몸이 건강을 유지하도록 돕는 미생물을 프로바이오틱스 (probiotics)라고 하며, 대사질환, 장관계 질환, 알러지성 질환, 호흡기 감염증, 간 질환, 기타 질환 등을 개선하는 효능을 가지고 있다. 특히, 상기 프로바이오틱스는 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)에 인슐린 저항성을 개선시키고 지방증을 감소시킨다고 알려져 있으나 현재까지 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)에서 프로바이오틱스의 효능은 미미하게 알려져 있으며 이를 통해 발생하는 메커니즘을 완전히 규명하기 위해서는 광범위한 연구가 요구된다.

[0006] 여기서 장과 간의 관계를 살펴보면, 장은 간문맥을 통하여 간과 직접 연결되어 있고, 간은 중요한 식이 영양소와 미생물-관련 구성 요소로 구성된 장 생산물 (gut products)의 주요 대사기관으로, 두 장기는 통칭하여 장-간

축 (gut-liver axis)이라는 용어로도 불리고 있다. 따라서, 장내 미생물의 교란은 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)을 포함한 간 질환으로 이어질 수 있는데, 기존 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)에 대한 치료법은 낮은 순응도, 효능 부족 또는 식이 요법 및 생활 습관의 변화로 인해 종종 비효율적인 문제가 있다.

[0007] 한편, 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*)은 비피도박테리움 속의 한 종으로, 사람의 위장관에 존재하는 그람 양성 유산균이다. 비피도박테리움 롱검은 정상적인 소화관을 유지하고 유해한 박테리아 성장을 억제 및 면역 체계를 향상시킨다는 연구결과가 있으나 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)의 예방 및 치료에 대한 연구가 부족하다. 이에 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)의 개선이나 치료에 필요한 상기 균주의 효능 및 기능성 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명에서는 *Bifidobacterium longum* CKDB004 (이하, *B. longum* CKDB004) 균주를 신생아 분변에서 분리하였고, 비알코올성 지방간질환 (NAFLD) 유도 마우스 모델에서 상기 *B. longum* CKDB004 균주 섭취로 인해 장내 미생물총이 조절되어 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)을 개선시킴을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 상기 *B. longum* CKDB004 균주의 비알코올성 지방간질환 (NAFLD)을 개선하는 효과, 장내 미생물총 조절로 인한 지방 생성 인자 감소 및 면역 증진 효과를 이용하여 비알코올성 지방간질환 (NAFLD) 치료제로 제안함에 있다.

[0010] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따르면, 수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명에서, 상기 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것일 수 있다.

[0013] 또한 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 비만, 암, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 아토피, 습진, 화상, 상처, 관절염, 다발성 경화증, 강직성 척추염, 천식 및 이식편대숙주병 중 어느 하나 이상에 의해 발생한 것일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명에서, 상기 박테리아 감염은 녹농균에 의한 감염일 수 있다.

[0015] 또한 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 위, 소장, 대장, 맹장, 치주조직, 관절, 신장 및 간 중 어느 하나 이상에서 발생한 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0018] 또한 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 비만, 암, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 아토피, 습진, 화상, 상처, 관절염, 다발성 경화증, 강직성 척추염, 천식 및 이식편대숙주병 중 어느 하나 이상에 의해 발생한 것일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명에서, 상기 박테리아 감염은 녹농균에 의한 감염일 수 있다.

[0020] 또한 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 위, 소장, 대장, 맹장, 치주조직, 관절, 신장 및 간 중 어느 하나 이상에서 발생한 것일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 서양 식이 (Western diet) 섭취로 유도한 비알코올성 지방간질환 마우스 모델의 수립 과정을 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 장내 미생물총 불균형 모델에서 *B. longum* CKDB004 균주 섭취 시 간 조직의 병리학적 비교도를 나타낸 것이다.

도 3은 장내 미생물총 불균형 모델에서 *B. longum* CKDB004 균주 섭취로 인한 장내미생물총 다양성을 비교한 것을 나타낸 것이다.

도 4는 장내 미생물총 불균형 모델에서 *B. longum* CKDB004 균주 섭취로 인한 장내미생물총 다양성을 비교한 것을 나타낸 것이다.

도 5는 장내 미생물총 불균형 모델에서 *B. longum* CKDB004 균주 섭취로 인한 장내미생물총 비율 및 기능적 바이오마커를 분석하여 나타낸 것이다.

도 6은 장내 미생물총 불균형 모델에서 *B. longum* CKDB004 균주 섭취로 인한 장내미생물총 변화 및 분포 비교도를 나타낸 것이다.

도 7은 장내 미생물총 불균형 모델에서 *B. longum* CKDB004 균주 섭취로 인한 기능적 바이오마커를 분석하여 나타낸 것이다.

도 8은 장내 미생물총 불균형 모델에서 *B. longum* CKDB004 균주 섭취로 인한 장내미생물총 대사체를 분석한 것이다.

도 9는 장내 미생물총 불균형 모델에서 *B. longum* CKDB004 균주 섭취로 인한 장내미생물총 대사체를 분석 및 비교한 것이다.

도 10은 장내 미생물총 불균형 모델에서 *B. longum* CKDB004 균주 섭취로 인한 장내미생물총 대사체를 비교한 것이다.

도 11은 대사체 분석 중 간 내 주요 기능을 하는 단쇄지방산(SCFAs)을 분석 및 비교한 것이다.

도 12는 대사체 분석 중 간 내 주요 기능을 하는 단쇄지방산(SCFAs)을 분석 및 비교한 것이다.

도 13은 대사체 분석 중 간 내 주요 기능을 하는 인돌 대사체(Indole compound metabolites)를 분석 및 비교한 것이다.

도 14는 대사체 분석 중 간 내 주요 기능을 하는 인돌 대사체(Indole compound metabolites)를 분석 및 비교한 것이다.

도 15는 대사체 분석 중 간 내 주요 기능을 하는 인돌 대사체(Indole compound metabolites)를 분석 및 비교한 것이다.

도 16은 대사체 분석 중 간 내 주요 기능을 하는 인돌 대사체(Indole compound metabolites)를 분석 및 비교한 것이다.

도 17은 대사체 분석 중 간 내 주요 기능을 하는 인돌 대사체(Indole compound metabolites)를 분석 및 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0023] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0025] 본 발명의 구성물이 포함하는 균주인 “비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*)”은 그람 양성, 카탈라

아제 음성 간균으로, 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*) 속에 속하여 미세호기성 혐기성 세균으로 알려져 있으며, 신생아 분변에서 분리될 수 있다.

- [0026] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*) CKDB004 균주는 "한국생명공학연구원 미생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture; KCTC)"에 수탁번호 KCTC 13671BP로 기탁된 것이고, 서열번호 1로 표시되는 16s rRNA 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물이 포함하는 균주인 "비피도박테리움 브레베 (*Bifidobacterium breve*)"는 혐기성이고 운동성이 없는 그람 양성 간균으로, 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*) 속에 속하는 것으로 알려져 있으며, 신생아 분변에서 분리될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 비피도박테리움 브레베 (*Bifidobacterium breve*) CKDB002 균주는 "한국생명공학연구원 미생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture; KCTC)"에 수탁번호 KCTC 13893BP로 기탁된 것이고, 서열번호 2로 표시되는 16s rRNA 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물이 예방, 치료 또는 개선하고자 하는 염증성 질환은, 비만, 암, 박테리아 감염, 진균 감염 바이러스 감염, 아토피, 습진, 화상, 상처, 관절염, 다발성 경화증, 강직성 척추염, 천식 및 이식편대숙주병 중 어느 하나 이상에 의해 발생한 것일 수 있고, 바람직하게는 비만 또는 박테리아 감염에 의한 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명에서, 상기 박테리아 감염은 녹농균에 의한 감염일 수 있다. 상기 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*)은 화농증에서 볼 수 있는 녹색농의 원인인 파이오시아닌 (pyocyanin)을 산생하며, 병원감염의 중요한 균종으로 심내막염, 폐렴, 수막염 등 여러 가지 인간의 질환의 원인이다.
- [0031] 본 발명에서, 개의 만성간염 (canine chronic hepatitis)은 면역계에서 활동하는 다양한 백혈구가 간에 침윤되어 염증 및 괴사가 발생하는 것으로, 다양한 질병 과정에서 발생할 수 있는 난치성 증후군이다.
- [0032] 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 위, 소장, 대장, 맹장, 치주조직, 관절, 신장 및 간 중 어느 하나 이상에서 발생한 것일 수 있고, 바람직하게는 소장, 대장, 맹장 및 간 중 어느 하나 이상에서 발생한 것일 수 있다. 특히 본 발명의 상기 간에서 발생한 염증은 간경변 (cirrhosis), 비알코올성 지방간질환 (NAFLD), 비알코올성 지방간염 (NASH), C형 간염, 알코올성 간질환, 진행성 섬유증으로 인한 간 손상, 간 섬유증, 원발성 담즙성 간경변 (PBC) 및 원발성 경화성 담관염 (PSC)에서 선택된 어느 하나 이상이 질환을 동반한 간 염증이 포함될 수 있고, 간 염증의 예방, 치료 또는 개선으로 인한 빌리루빈, 및/또는 간 효소, 예컨대 알칼리성 포스포타제 (ALP, AP, 또는 Alk Phos), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 아스파르트이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 감마-글루타밀 트랜스펩티다제 (GGT), 락테이트 데하이드로게나제 (LDH) 및 5' 뉴클레오티다제의 감소를 기대할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서, 용어 "예방"은 본 발명의 조성물을 투여 또는 섭취하여 간 질환을 차단하거나, 간 질환으로 인한 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서, 용어 "치료" 또는 "개선"은 본 발명의 조성물을 투여 또는 섭취하여 간 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 구현예에 따라, 수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물이 제공된다.
- [0038] 본 발명에서, 상기 조성물은 유효성분으로 프리보텔라 속 균주, 피칼리박테리움 속 및 락토바실러스 속 균주에서 선택된 어느 하나 이상을 더 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 프리보텔라 속 균주, 피칼리박테리움 속 및 락토바실러스 속 균주를 모두 포함하는 것일 수 있다. 여기서 상기 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주, 상기 프리보텔라 속 균주, 상기 피칼리박테리움 속 균주 및 락토바실러스 속 균주의 혼합량 또는 혼합 비율은 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 개선 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0039] 본 발명에서, 상기 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 균주의 농도는 10^8 CFU/ml 이상인 것일 수 있고, 바람직하게는 10^9 CFU/ml인 것일 수 있다. 상기 조성물이 10^8 CFU/ml 이상의 균주를 포함한 경우, 식품으로 섭취하였을 때 체내에서 미생물 생태계가 형성되기에 충분할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 유효성분인 상기 균주는, 상기 균주를 분리 및/또는 정제한 균체 외에 균체를 포함하는 배양물, 균체

의 추출물, 배양물 상층액, 이들의 농축액, 농축물, 건조물 또한 필요에 따라서 회석액, 회석물 등이며, 배양액, 배양물을 처리하여 얻어지는 모든 상태의 것을 포함할 수 있다.

- [0041] 본 발명에서, 상기 균주의 균체에 대한 배양법, 추출법, 분리법, 농축법, 건조법, 회석법 등은 특별히 한정되지 않는다. 상기 균체를 배양하기 위한 배지로는 EG 배지; LB 배지; RCM 배지; 및/또는 혈소판 (blood plate), 말토오스 (maltose), 수크로오스 (sucrose), 글루코오스 (glucose), 녹말 (starch), 만니톨 (mannitol), 젤라틴 (gelatin), 카제인 (casein), 스킴밀크 (skim milk), 그 밖의 당류 및 효모 엑기스에서 선택된 어느 하나 이상의 성분을 포함하는 배지;일 수 있으며, 배양 방법으로는 일반적인 각종 호기적 또는 혐기적인 방법을 사용할 수 있고, 상기 균주의 배양 온도로는 30℃ 내지 40℃를 설정하고, 배양 중에는 수산화나트륨 등의 알칼리를 사용하여 배지의 pH를 중성으로부터 산성, 예를 들어 pH가 5 내지 6 정도가 되도록 유지하는 중화배양법을 사용할 수도 있다. 이와 같은 중화배양법 외에 회분배양법 등의 임의의 배양 방법을 사용할 수 있으며, 배양한 후에는 필요에 따라서 배양물이나 그 상층액을 농축, 건조, 회석 등을 할 수도 있다. 또한 원심분리법이나 막분리법을 사용하여 배양물의 상층액과 균체를 분리하여 균체를 농축한 상태로 회수할 수도 있다. 그리고 균체에 초음파 처리나 효소 처리 등을 행하여 균체 내의 성분을 추출하거나, 배양물이나 그 상층액, 균체나 그 추출물 등을 건조할 수도 있다. 이들은 본 발명의 상기 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 비만, 암, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 아토피, 습진, 화상, 상처, 관절염, 다발성 경화증, 강직성 척추염, 천식 및 이식편대숙주병 중 어느 하나 이상에 의해 발생한 것일 수 있고, 상기 박테리아 감염은 녹농균에 의한 감염일 수 있다.
- [0043] 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 위, 소장, 대장, 맹장, 치주조직, 관절, 신장 및 간 중 어느 하나 이상에서 발생한 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서, 상기 식품은 건강기능식품, 건강식품 또는 식품 첨가제 일 수 있고, 이 경우 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 파자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 정제, 캡슐, 환제 또는 액제 형태 등 통상적인 의미에서의 건강기능식품 및 건강식품 조성물을 모두 포함한다.
- [0045] 본 발명에 따른 상기 균주를 포함하는 건강기능식품, 건강식품 및 식품 첨가제 조성물은 식품 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명에서, 상기 건강기능식품, 건강식품 또는 식품 첨가제 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양의 범위 이하일 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 상기 균주를 함유하는 것 외에 추가되는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제인 타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품, 건강식품 또는 식품 첨가제 조성물 100g 당 일반적으로 약 1g 내지 20g, 바람직하게는 약 5g 내지 12g일 수 있다.
- [0048] 본 발명에서, 상기 균주를 함유하는 건강기능식품, 건강식품 또는 식품 첨가제 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 다른 실시예에 따라, 수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물이 제공될 수 있다. 상기 사료 조성물은 동물에게 식이를 급여하기 위한 사료 또는 사료 첨가제를 포함하는 것일 수 있다.

- [0051] 본 발명의 상기 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주가 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물에 함유되어 이용될 경우, 상기 조성물은 20 내지 90% 고농축액이거나 분말 또는 과립형태로 제조될 수 있다. 상기 사료 첨가제는 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성 피로인산염 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피탄산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서, 상기 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주가 사료로 이용될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화될 수 있으며, 통상의 사료 성분을 함께 포함할 수 있다. 상기 사료 첨가제 및 사료는 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 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 건조 성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서, 상기 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주가 상기 사료 첨가제로 사용될 경우에는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑드레싱으로서 또는 이들을 동물 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료 첨가제를 동물 사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 약제학적으로 허용 가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수 전분, 락토오스, 수크로오스, 콩 플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탑드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀전제, 또는 용액제의 제형일 수 있다. 상기 사료는 동물의 식이 욕구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기 곡분을 포함할 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로 옥수수, 콩 곡분, 또는 옥수수/콩 곡분 믹스로 구성되어 있다. 또한 사료 조성물은 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제 등을 함유할 수 있다. 또한 사료 첨가제 조성물은 침지, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 사료 또는 사료 첨가제 급여의 대상은 염증성 질환의 예방 또는 개선이 필요한 개체로, 상기 개체는 상기 염증성 질환이 발생하였거나 발생할 수 있는 인간을 제외한 모든 동물을 포함할 수 있고, 상기 동물은 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 종; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 래트, 마우스 또는 기니아 피그; 비-포유동물, 예를 들어 조류 또는 어류 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에서, 상기 조성물은 유효성분으로 수탁번호 KCTC 13893BP인 비피도박테리움 브레베 CKDB002 균주를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 일 예시에서, 상기 조성물은 글리시리진을 더 포함하고; 옥수수 전분, 수크로오스, 셀룰로오스 및 귀리를 더 포함하며; 상기 옥수수 전분 100 중량부에 대하여 상기 수크로오스는 5 내지 15 중량부, 상기 셀룰로오스는 10 내지 20 중량부 및 상기 귀리는 10 내지 25 중량부;인 것일 수 있다.
- [0057] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 식품 조성물의 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 실시예에 따라, 수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 유효성분으로 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공될 수 있다.
- [0060] 본 발명에서, 상기 조성물은 유효성분으로 프리보텔라 속 균주, 피칼리박테리움 속 및 락토바실러스 속 균주에서 선택된 어느 하나 이상을 더 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 프리보텔라 속 균주, 피칼리박테리움 속 및 락토바실러스 속 균주를 모두 포함하는 것일 수 있다. 여기서 상기 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주, 상기 프리보텔라 속 균주, 상기 피칼리박테리움 속 균주 및 락토바실러스 속 균주의 혼합량 또는 혼합 비율은 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 치료 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0061] 본 발명에서, 상기 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 균주의 농도는 10^8 CFU/ml 이상인 것일 수 있고, 바람직하게는 10^9 CFU/ml인 것일 수 있다. 상기 조성물이 10^8 CFU/ml 이상의 균주를 포함한 경우, 약학적 조성물로 투여하였을 때 체내에서 미생물 생태계가 형성되기에 충분할 수 있다.

- [0062] 본 발명의 유효성분인 상기 균주는, 상기 균주를 분리 및/또는 정제한 균체 외에 균체를 포함하는 배양물, 균체의 추출물, 배양물 상층액, 이들의 농축액, 농축물, 건조물 또한 필요에 따라서 희석액, 희석물 등이며, 배양액, 배양물을 처리하여 얻어지는 모든 상태의 것을 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 운활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서 (elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있고, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있으며, 기타 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로도 제형할 수 있다.
- [0064] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 운활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0066] 본 발명에서, 상기 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001mg/kg 내지 50mg/kg 또는 0.001mg/kg 내지 50mg/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.
- [0068] 본 발명에서, 투여의 대상은 간 질환의 예방 또는 치료가 필요한 개체로, 상기 개체는 상기 간 질환이 발생하였거나 발생할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 포함할 수 있고, 상기 동물은 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 종; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 래트, 마우스 또는 기니아 피그; 비-포유동물, 예를 들어 조류 또는 어류 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 식품 조성물 및 사료 조성물의 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 실시예에 따라, 개체에 수탁번호 KCTC 13671BP인 비피도박테리움 롱검 CKDB004 균주를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법이 제공될 수 있다.
- [0072] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 식품 조성물, 사료 조성물 및 약학적 조성물의 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.
- [0074] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자

에게 있어서 자명할 것이다.

[0076] 1. *Bifidobacterium longum* CKDB004 균주 준비

[0077] 본 발명에 따른 조성물을 준비하기 위하여, *Bifidobacterium longum* CKDB004 균주를 (주)종근당바이오에서 공급받았다. 정제된 *Bifidobacterium longum* CKDB004 균주는 동결건조 시킨 미세분말 형태로 전달받았으며, *Bifidobacterium longum* CKDB004는 1×10^9 CFU/g의 농도로 증류수에 현탁 하여 주 2회 공급하였다.

[0079] 2. *Bifidobacterium breve* CKDB002 균주 준비

[0080] 본 발명에 따른 조성물을 준비하기 위하여, *Bifidobacterium breve* CKDB002 균주를 (주)종근당바이오에서 공급받았다. 정제된 *Bifidobacterium breve* CKDB002 균주는 동결건조 시킨 미세분말 형태로 전달받았으며, *Bifidobacterium breve* CKDB002는 1×10^9 CFU/g의 농도로 증류수에 현탁 하여 주 2회 공급하였다.

[0082] 3. 비알코올성 지방간질환 유도 마우스 모델 유도 및 간 조직 분석

[0083] 도 1을 참조하여 마우스 모델을 유도하였다. 동물모델 평가를 위해 특정 병원체가 없는 6주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 두얼바이오텍 (서울, 한국)에서 구매하였다. 모든 마우스들은 12/12시간 명/암 주기로 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 온도에서 전용 케이지에 개별적으로 수용하였다. 실험 진행동안 모든 마우스들은 물과 음식에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다. 실험은 모든 그룹에 대한 적응기간을 포함하였고 이 기간 동안에는 1주일 동안 정상적인 사료를 제공하였다. 실험동물들은 인도주의적 치료를 받았으며 모든 절차는 실험실 동물의 관리 및 사용을 위한 국립보건원 지침을 따랐으며 한림대학교 의과대학 동물실험 및 위원회의 승인을 받았다.

[0084] 비알코올성 지방간질환 (NAFLD) 모델 마우스는 정상 대조군 (NC, n=5), 비알코올성 지방간질환 (NAFLD) 유도 식이군 (WD, n=5), 그리고 비알코올성 지방간질환 (NAFLD) 유도 식이와 함께 *B. longum* CKDB004 균주를 섭취한 균주 섭취군 (BL, n=5)의 세 집단으로 분류하였다.

[0085] 다음으로 상기 NC에 정상 식이를, 상기 WD 및 상기 BL에 상기 서양 식이 (western diet)를 8주 동안 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 서양 식이 (western diet)는 비알코올성 지방간질환 (NAFLD) 모델을 유도하기 위한 것이고, 두얼바이오텍에서 제조한 것을 사용하였다.

[0086] 이후 흡입 마취제 (에어라인엑, 미국)를 투여하여 모델을 희생시켰다. 상기 희생된 모델의 체중과 간 무게를 측정하고 혈액 및 간 조직을 분리했다. 전혈 샘플을 19,000g에서 5분 동안 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 다음으로 간 조직을 빠르게 분리하여 -80°C 에 보관했다.

[0087] 분리된 간조직을 10% 포르말린으로 고정시킨 후 파라핀으로 블록을 제작하였고, 조직 섹션을 헤마톡실린에오신 (H&E) 염색을 하였다. 비알코올성 지방간염의 병리학적 분석은 지방증 (Steatosis, 지방증에 의한 실질 조직 침범 정도 평가[등급0: <5%, 1: 5~33%, 2: >33~66%, 3: >66%]), 염증 (Inflammation, 모든 염증 병소 (foci)의 전반적 평가 [등급0: <No foci, 1: <2 foci per 200x field, 2: 2~4 foci per 200x field, 3: >4 foci per 200x field]), 풍선변형 (ballooning, 팽윤이 발생한 세포 비율 [등급0: None, 1: Few ballooning cells, 2: Many cells/prominent])로 점수화 하여 산출하였고, 이를 표 1로 나타내었다.

표 1

Item	Score	Definition
Steatosis	0	<5%
	1	5-33%
	2	>33%-66%
	3	>66%
Hepatocyte Ballooning	0	None
	1	Few balloon cells
	2	Many cells/prominent ballooning
Lobular Inflammation	0	No foci
	1	<2 foci/x200 field
	2	2-4 foci/x200 field
	3	>4 foci/x200 field

[0089]

[0091]

다음으로 NAS 점수를 비알코올성 지방간염 임상 연구 네트워크 (Non-alcoholic steatohepatitis Clinical Research Network; NASH CRN)에서 비알코올성 지방간염의 병리소견에 따른 점수 체계 (scoring system)를 고안하여 사용하는데, 이에 따라 지방증 정도에 따라 0~3점, 소엽 내 염증 정도에 따라 0~2점, 간세포 풍선 변형 정도에 따라 0~2점씩 주어 평가 [등급 0~2: Not NASH, 3~4: Borderline, 5~8: NASH] 방법으로 분석하여, 도 2 및 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

집단	지방증 (Steatosis)	염증 (Inflammation)	풍선변형 (Ballooning)	NAS 점수
NC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
WD	2 (0)	1.33 (0.58)	1.67 (0.58)	5 (0.1)
BL	1 (0)	0.4 (0.52)	0.5 (0.53)	1.9 (0.99)

[0093]

[0094]

도 2 및 상기 표 2에 나타난 것처럼, 정상 식이를 섭취한 정상 대조군 (NC)에 비해 서양 식이 (western diet)를 섭취한 유도 식이군 (WD)에서 지방증, 염증 및 풍선변형이 발생하였으나, 본 발명의 *B. longum* CKDB004 균주를 섭취한 군주 섭취군 (BL)에서 지방증, 염증 및 풍선변형이 감소한 바, 본 발명의 *B. longum* CKDB004 균주 섭취에 의해 간 질환에 대한 효과가 있는 것을 확인하였다.

[0096]

4. 장내 미생물 구성 및 다양성 분석

[0097]

장내 미생물 군집 분석은 특정 샘플 및 환경의 미생물의 군집을 16S rRNA을 NGS로 sequencing한 뒤, 전체 미생물의 분포를 살펴보는 분석이다. 장내 미생물 군집 분석은 장내 미생물의 분포 및 상태에 따라 비만 및 아토피, 대장염 및 대장암 등 다양한 질병과 관련이 있다는 연구가 보고됨에 따라 활발히 연구가 이루어지고 있는 추세이다.

[0098]

대변으로부터의 DNA 분리는 QIAamp fast stool kit (큐아젠, 미국)를 사용하여 수행했다. 추출한 DNA는 미생물 군유전체 프로파일링을 위해 천랩에 의뢰하여 16S rRNA 기반의 Microbial Taxonomic Profiling 플랫폼을 사용하였고, 유전자 증폭 및 서열분석 및 장내 미생물을 분석하였으며, 이를 통해 장내 미생물의 분포 및 구성, Firmicutes to Bacteroidetes ratio, CHAO, Shannon 등의 알파-다양성 지수와 PCoA clustering을 포함한 베타-

다양성 비교 등을 평가하여, 도 3 내지 도 6에 나타내었다.

[0099] 군집 분포 분석에서 장내 미생물 불균형의 지표로 이용되는 Firmicutes 와 Bacteroidetes 비율(F/B ratio)에서도 *B. longum* CKDB004 섭취 시 장내 미생물 균형 회복의 유의미한 결과를 보였으며, 그 외 다양성 분석 등에서도 차이를 확인하며 *B. longum* CKDB004의 장내 미생물 불균형 복구를 확인하였다.

[0100] 구체적으로는, 도 6에서 나타난 것처럼, 유도 식이군 (WD)의 분변에서는 전체 장내 미생물총에서 의간균문 (phylum Bacteroidetes)의 비율이 낮아 F/B 비율이 정상 식이군 (NC)의 분변에 비해 높았으나, 균주 식이군 (BL)의 분변에서는 F/B 비율이 정상 식이군 (NC)의 분변 수준으로 회복한 것을 확인하였다.

[0101] 또한, 도 7에서 나타난 것처럼, 유도 식이군 (WD)의 분변에서는 전체 장내 미생물총에서 종 (Genus) 다양성이 감소하였으나, 균주 식이군 (BL)의 분변에서는 종 (Genus) 다양성이 정상 식이군 (NC)의 분변 수준에 근접하게 회복한 것을 확인한 바, 본 발명의 *B. longum* CKDB004 균주를 섭취할 경우 장내 미생물총 균형의 회복을 통하여 염증성 장 질환 및 비만에 대한 개선, 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0103] 5. 장내 미생물총에 대한 바이오마커 분석

[0104] 상기 미생물총에 대한 바이오마커 분석을 수행하였다. 상기 미생물총에 대하여 스핑고지질 신호전달 경로 (sphingolipid signaling pathway), 담즙 분비 (bile secretion), 페니실린과 세팔로스포린 생합성 (penicillin and cephalosporin biosynthesis), 글루코시놀레이트 생합성 (glucosinolate biosynthesis), TGF-베타 신호전달 경로 (TGF-beta signaling pathway), 리슈마니아증 (Leishmaniasis), 단백질 배출 (protein export), 유형 II 폴리케타이드 골격의 생합성 (Biosynthesis of type II polyketide backbone), 암 전사 조절 장애 (Transcriptional misregulation in cancer), 크실렌 분해 (Xylene degradation) 및 녹농균 바이오필름 형성 (biofilm formation - *Pseudomonas aeruginosa*) 수준을 측정하여 그 결과를 도 7 내지 도 10에 나타내었다.

[0105] 도 7 내지 도 10에 나타난 것처럼, 유도 식이군 (WD)의 분변에서는 스핑고지질 신호전달 경로 (sphingolipid signaling pathway), 페니실린과 세팔로스포린 생합성 (penicillin and cephalosporin biosynthesis), 글루코시놀레이트 생합성 (glucosinolate biosynthesis), TGF-베타 신호전달 경로 (TGF-beta signaling pathway) 및 리슈마니아증 (Leishmaniasis)이 감소하였고, 단백질 배출 (protein export), 유형 II 폴리케타이드 골격의 생합성 (Biosynthesis of type II polyketide backbone), 암 전사 조절 장애 (Transcriptional misregulation in cancer), 크실렌 분해 (Xylene degradation) 및 녹농균 바이오필름 형성 (biofilm formation - *Pseudomonas aeruginosa*)이 증가하였으나, 균주 식이군 (BL)의 분변에서는 상기 바이오마커가 정상 식이군 (NC)의 분변 수준에 근접하게 회복한 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 *B. longum* CKDB004 균주를 섭취할 경우 장내 미생물총 균형의 회복을 통하여 비만의 개선, 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0107] 6. 대변 대사산물 SCFAs 검출

[0108] 탄소수가 6개 이하로 적은 지방산인 단쇄 지방산 (Short chain fatty acids; SCFAs)은 장내 미생물의 주요 대사산물로, 상기 SCFAs은 소장까지 소화, 흡수되지 않은 탄수화물을 대사하는 과정 중에 생성된다. 이에, 본 발명의 균주가 장내 미생물총에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실험 모델 마우스의 맹장 속 대변을 이용한 대사산물 분석을 수행하였다. 먼저, 실험동물의 결장에서 대변을 얻어내어 약 100mg을 서울대학교로 보내어 대변 대사체 분석을 의뢰 진행하였다. 다음으로, 대변의 대사체를 분석함으로써 장내 미생물이 생산하는 대사체의 종류와 특징 등을 확인하였다.

[0109] 그 결과 도 11 내지 도 12에서 나타난 것처럼, 대변에서 확인한 SCFAs 중 Acetic acid, Butyric acid, Valeric acid, Propionic acid, Iso-butyric acid, Iso-valeric acid를 확인한 결과, 상기 대사체들은 WD 섭취군에서 NC 대조군보다 감소하였으며, *B. longum* CKDB004 섭취 실험군에서는 SCFAs의 양이 유의적으로 증가함을 보였다.

[0111] 7. 인돌 (indole) 대사산물 검출

[0112] 장내 미생물은 트립토판 (tryptophan)대사에 유익한 효과를 제공하며 트립토판을 분해하여 인돌 (indole)대사산물을 포함하는 다양한 대사산물 변화에 영향을 미친다는 연구가 있다. 대변 인돌 관련 대사체 분석을 수행한 결

과 도 13 내지 도 17에서 나타난 것처럼, WD를 먹인 NAFLD 유도군에서 감소된 인돌 대사체들이 *B. longum* CKDB004 섭취에 의해 증가함을 확인하였다.

[0114] 8. 데이터 분석

[0115] 연속 변수는 평균 및 표준편차로 분석하였다. 조직학 분석과 간기능 분석 및 분류학적 바이오마커 발견을 위해 One-way ANOVA, the Kruskal-Wallis test, 그리고 independent sample T-test를 수행했다. 유의확률 P값 <0.05는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다. 모든 통계 분석은 SPSS 소프트웨어 (ver. 19, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다.

[0117] 이로써 장내 미생물의 대사산물이 장내 집합 회복의 유도를 확인하였고, 장내 미생물총의 불균형으로 나타나는 장내 집합의 손상 및 이로 인하여 LPS 및 내독소 등이 전위하여 간 및 뇌 등으로 전달되며 손상 및 염증 반응, 질환을 유도하는 메커니즘을 억제할 수 있는 방안을 모색할 수 있음을 제시한다.

[0119] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0120]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13671BP

수탁일자 : 20181023

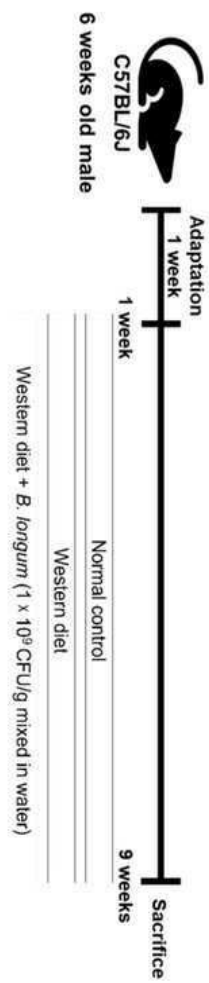
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13893BP

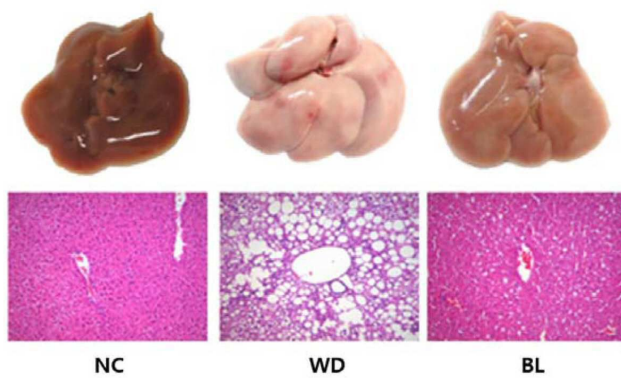
수탁일자 : 20190719

도면

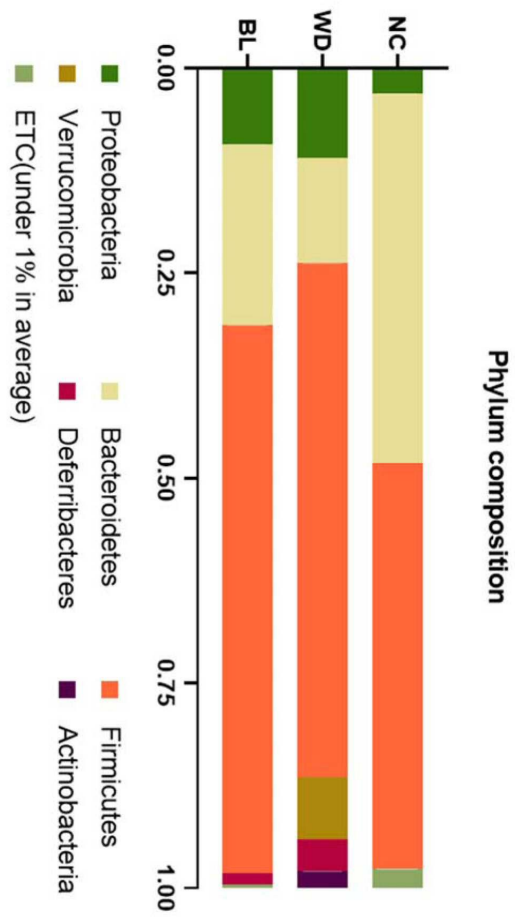
도면1



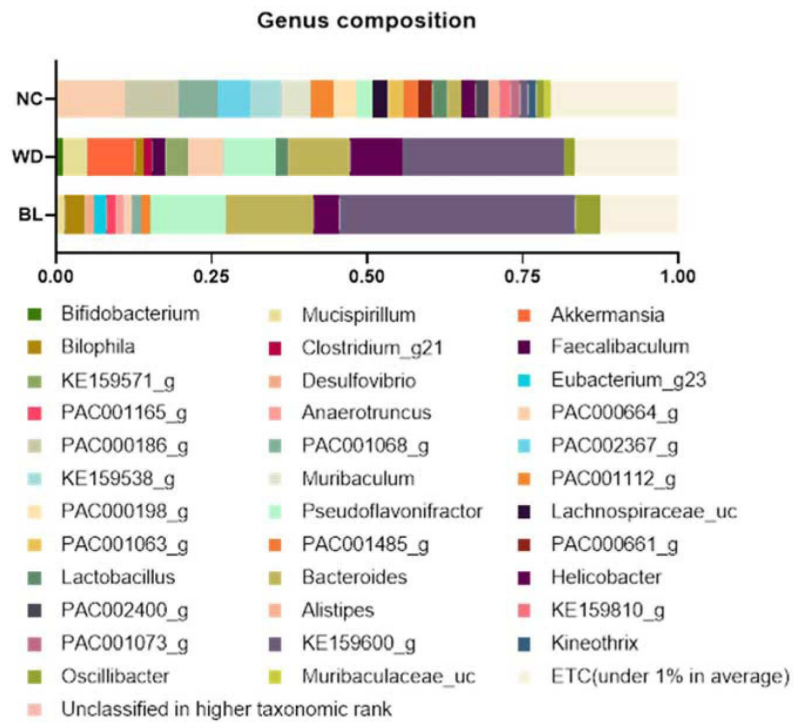
도면2



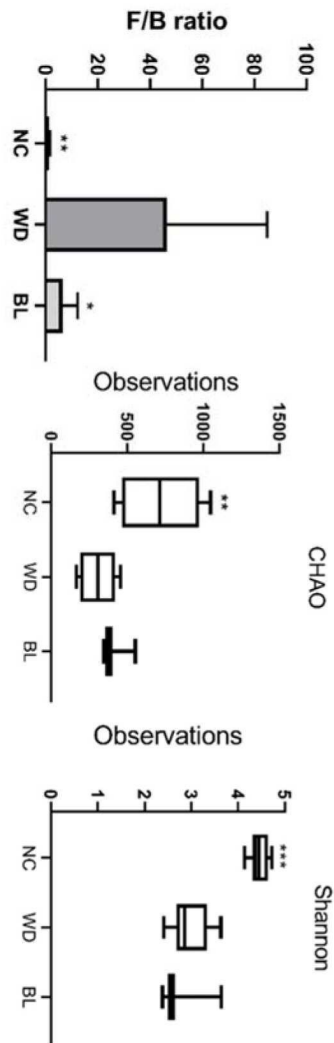
도면3



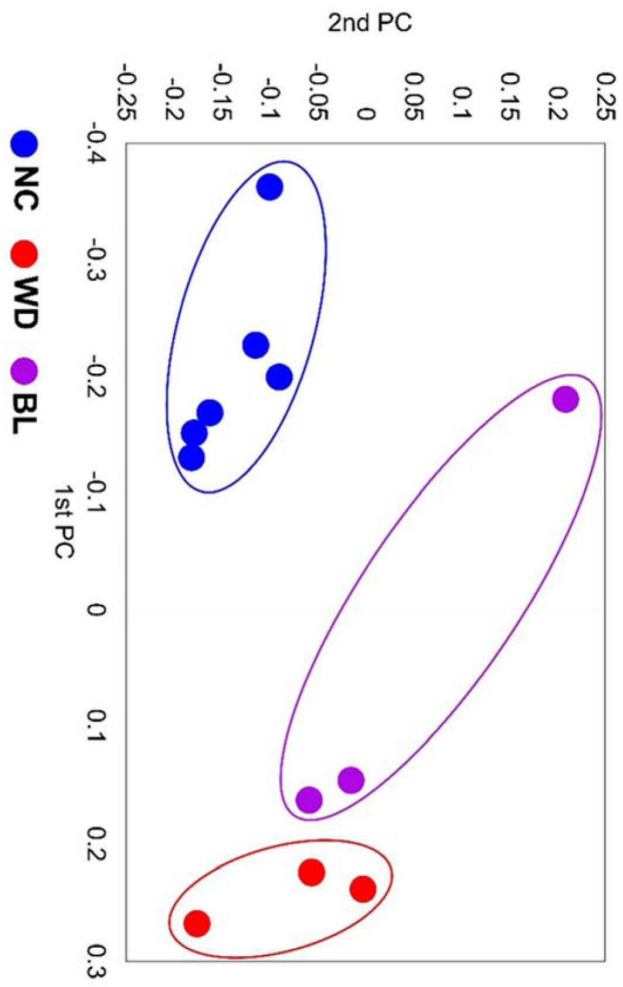
도면4



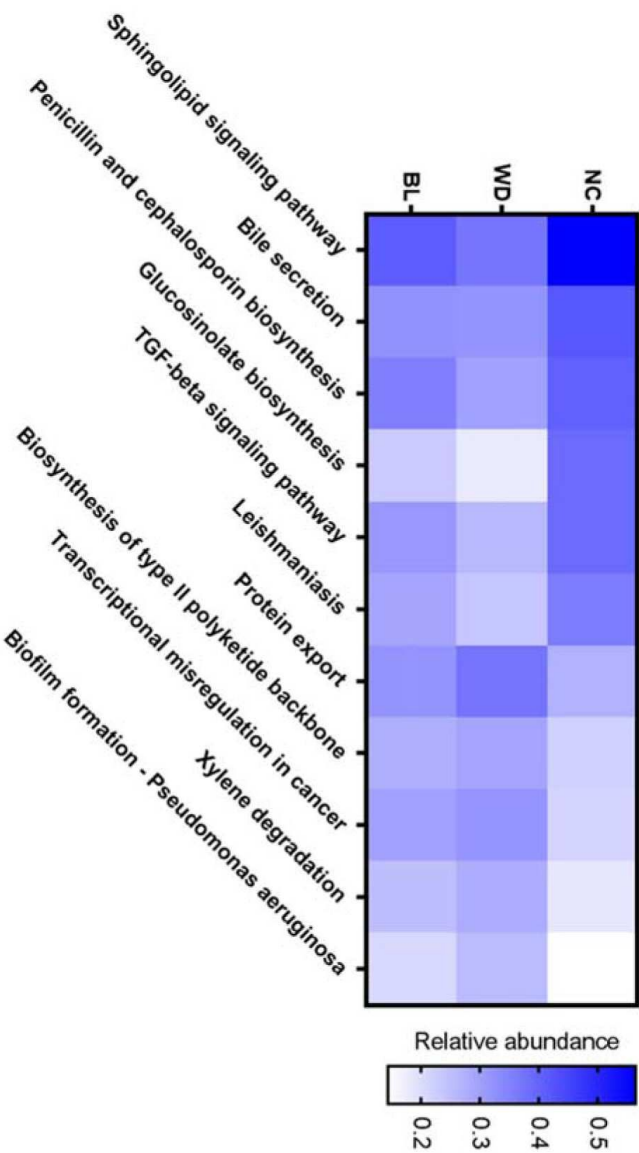
도면5



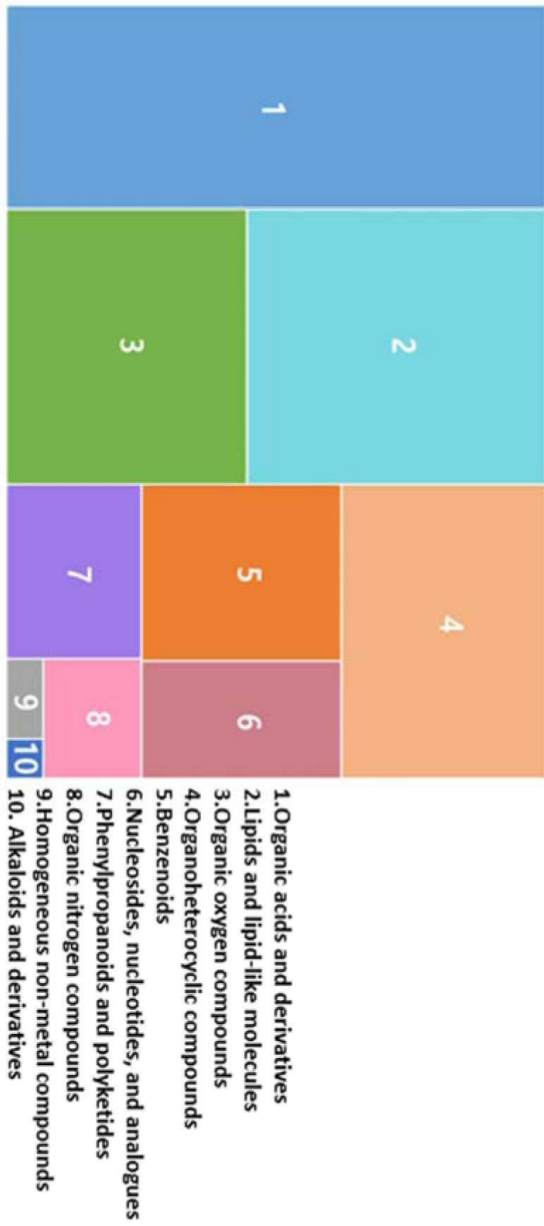
도면6



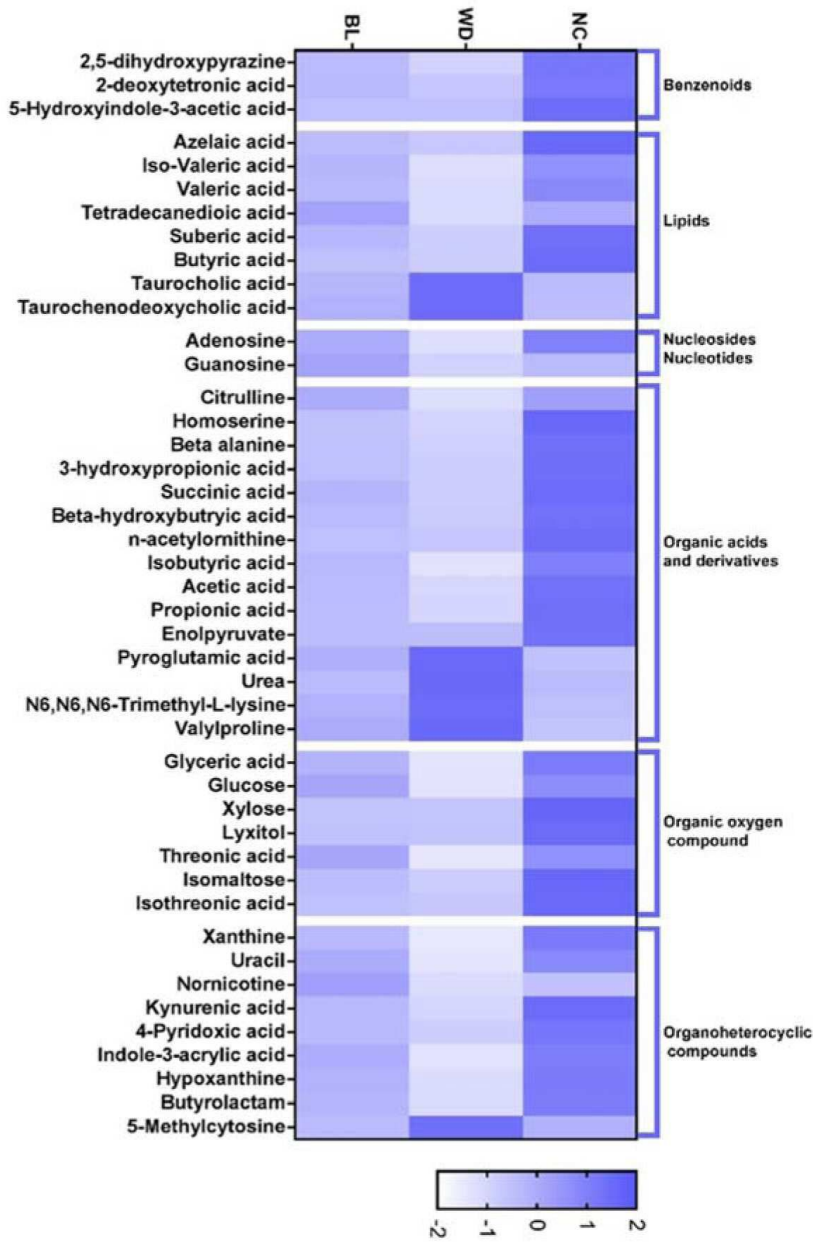
도면7



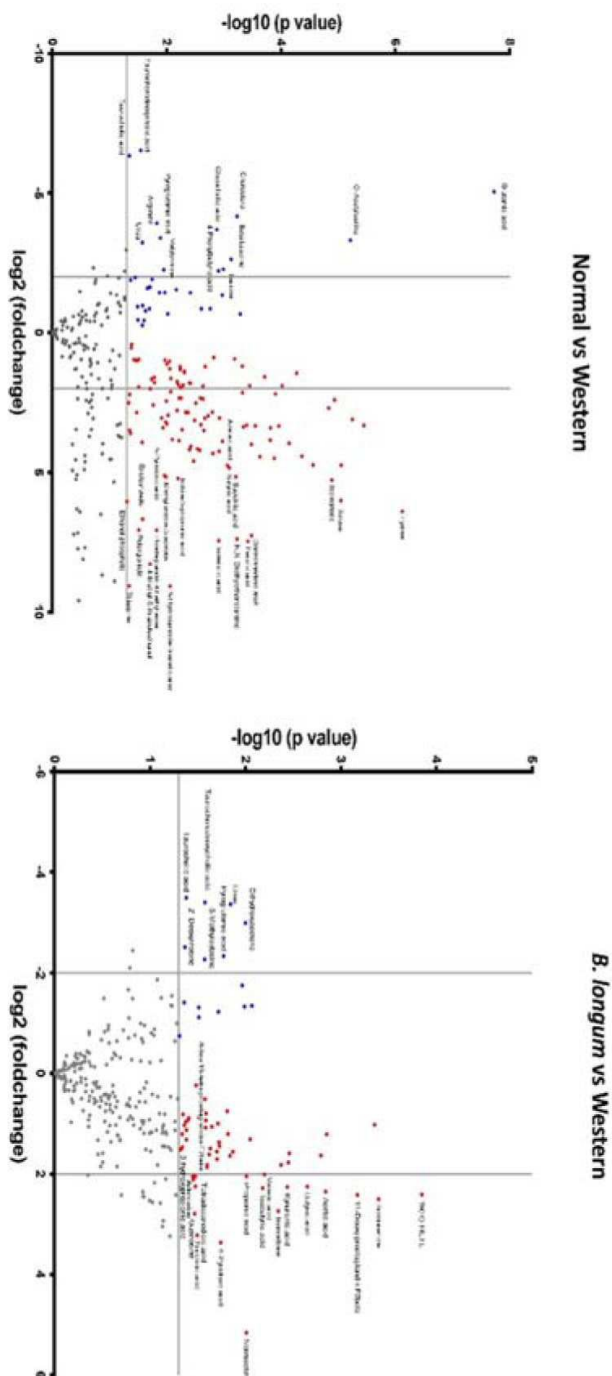
도면8



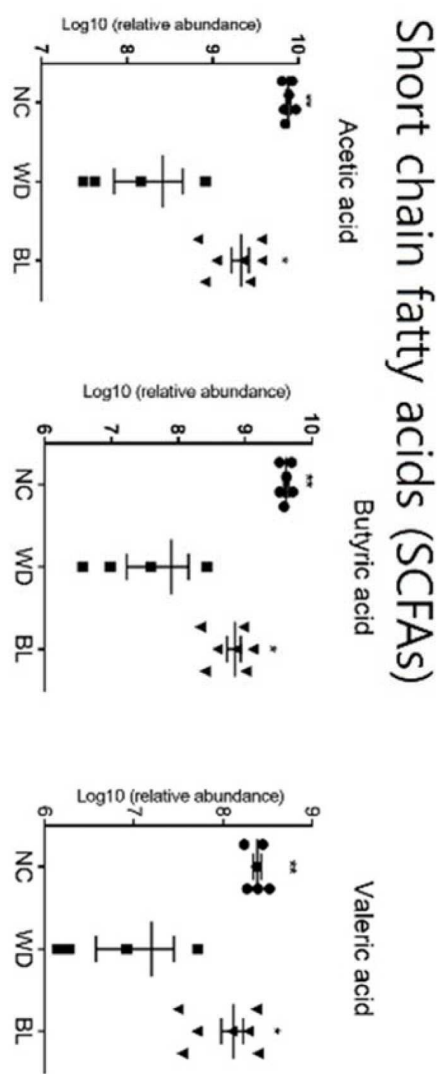
도면9



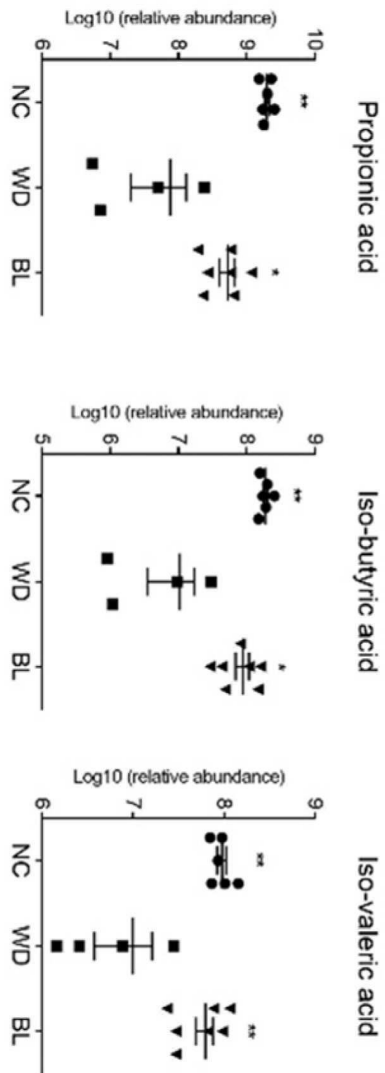
도면10



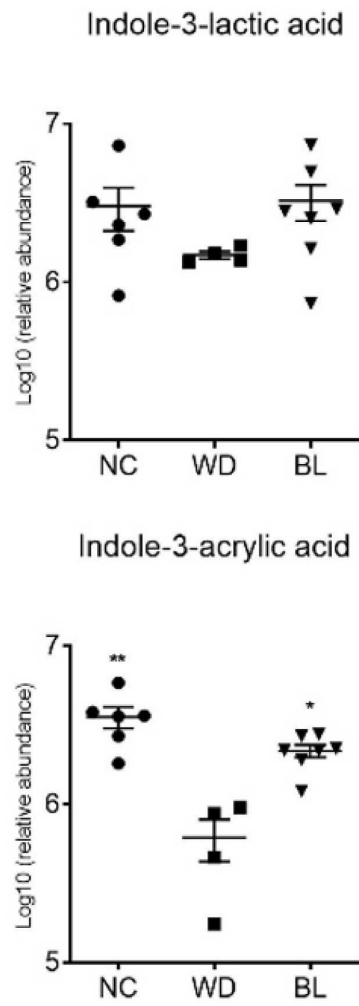
도면11



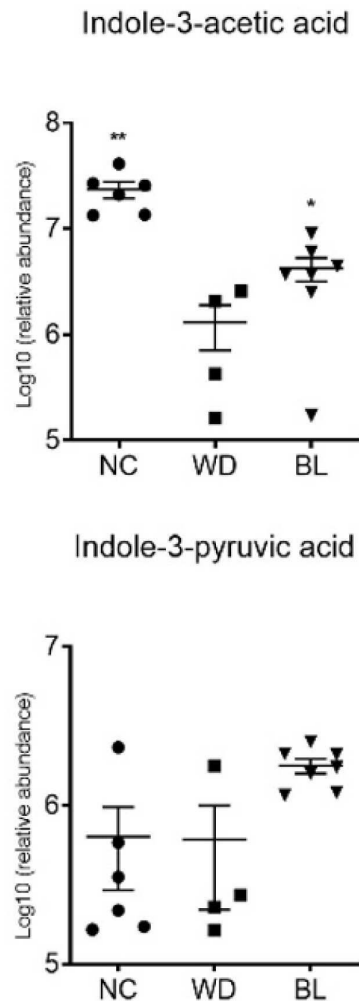
도면12



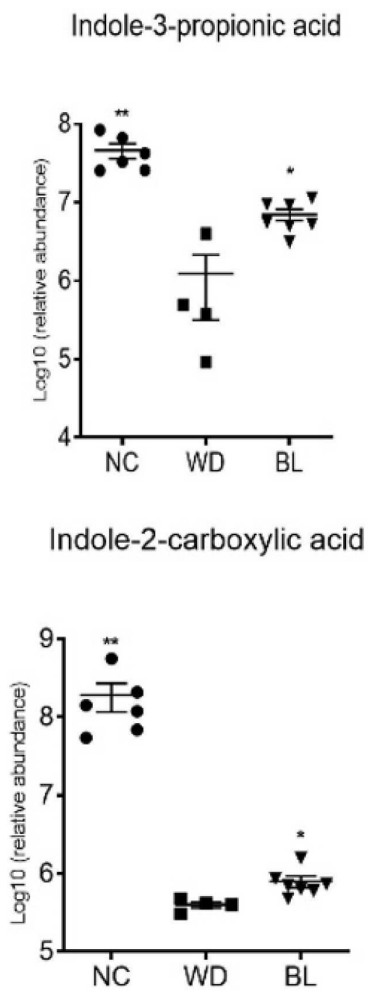
도면13



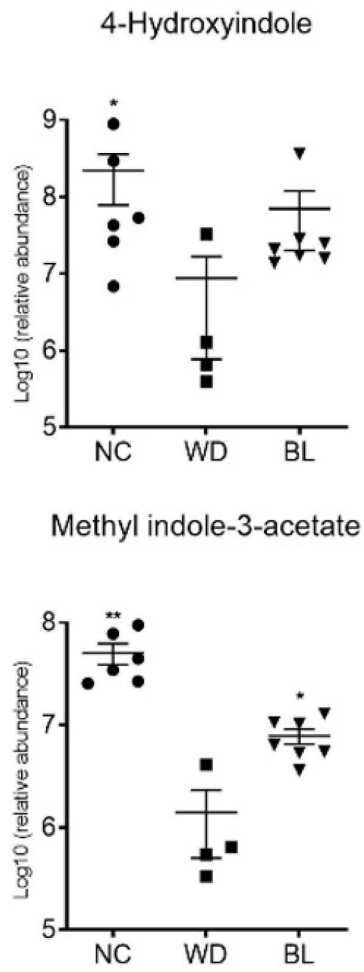
도면14



도면15

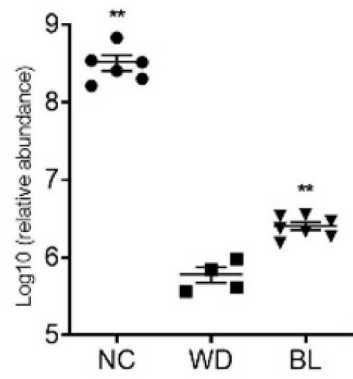


도면16

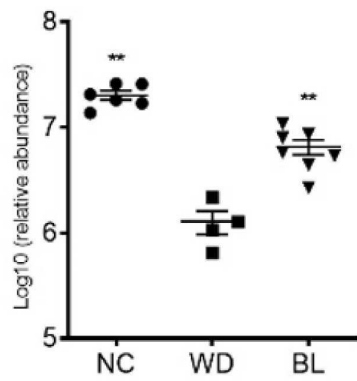


도면17

5-Hydroxyindole-3-acetic acid



Kynurenic acid



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.