



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0057272
(43) 공개일자 2020년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23K 10/16 (2017.01)
A23L 33/135 (2016.01) C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23K 10/16 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2018-0141396
(22) 출원일자 2018년11월16일
심사청구일자 2018년11월16일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박천석
경기도 남양주시 와부읍 덕소로116번길 49, 106동 1303호(현대홈타운아파트)
정동현
경기도 수원시 영통구 덕영대로1681번길 13, 203호(영통동)
(74) 대리인
위병갑

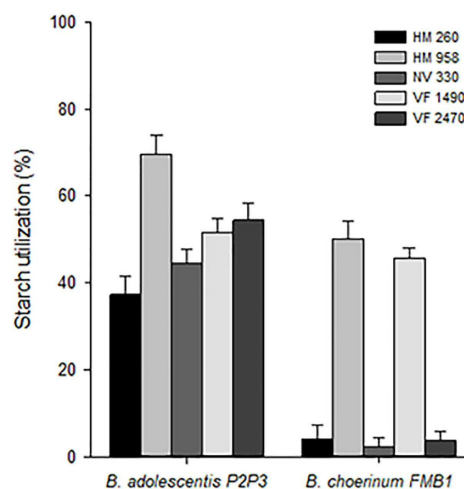
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 저항 전분 분해능을 가진 신규한 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 저항 전분 분해능을 가진 신규한 균주인 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P)에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 인간 분변으로부터 분리한 본 발명의 신규한 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P)는 RS2, RS3, RS4 유형의 저항 전분 모두를 종래의 동종 및 이종의 균주들보다 현저히 분해할 수 있는 효과가 있으므로, 이를 프로바이오틱스, 식품 조성물 및 사료 첨가제 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/3204 (2013.01)

A23Y 2300/19 (2013.01)

C12R 1/01 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B4004218

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 경희대학교

연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업

연구과제명 사람 장내에 존재하는 복합탄수화물 분해 미생물의 연구를 통한 기능성 프로바이오틱균의
탐색

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

저항 전분에 대해 분해능이 있는 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P).

청구항 2

제 1항에 있어서, 저항 전분은 RS2 유형 저항 전분, RS3 유형 저항 전분 및 RS4 유형 저항 전분으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P).

청구항 3

제 1항의 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제.

청구항 4

제 1항의 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물.

청구항 5

제 3항의 프로바이오틱스 제제를 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제 조성물.

청구항 6

제 3항의 프로바이오틱스 제제 및, 조사료, 농후사료 또는 품미사료로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 사료를 포함하는 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저항 전분 분해능을 가진 신규한 균주인 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프로바이오틱스(probiotics)는 건강에 도움이 되는 장내 세균총 즉, 숙주의 건강에 이로운 효과를 제공하는 살아있는 미생물 즉 생균류를 의미한다. 일반적으로 프로바이오틱스는 요거트 등의 발효식품의 일부 또는 식이보충제로서 소비된다. 프로바이오틱스로 알려진 미생물에는 락트산 박테리아(lactic acid bacteria; LAB), 비피도박테리아(bifidobacteria), 바실러스 등이 있다. 프로바이오틱스와 유사한 개념으로, 프리바이오틱스(prebiotics)는 장내 유익한 박테리아의 성장을 돕는 탄소화성 성분으로서 프로바이오틱스(probiotics)의 영양원이 되어 장내 환경을 개선하는 데 도움을 주는 물질을 말한다. 어떠한 식품 성분이, 대장 내 유용 미생물에 의해 이용되어 미생물의 생육이나 활성을 촉진함으로써 숙주 건강에 좋은 효과를 나타내게 하는 프리바이오틱스로 활용되기 위해서는, 위장관의 상부에서 소화 또는 흡수되지 않아야 하고 대장 내 미생물 중 유용 세균을 선택적으로 활성화시키고 병원균 등의 유해균을 억제할 수 있어야 한다.

[0003] 전분은 탄수화물이며 인간 및 동물 식이의 주요 성분이다. 일반적으로, 대부분의 전분은 젤라틴화된 전분으로 섭취되고 소화 효소에 의해 쉽게 분해되어 인체 에너지원으로 사용된다 (Salys et al. 1983). 그러나, 가공되지 않은 (조리되지 않은) 전분은 위장관을 통과하는 동안 위 및 소장에서 잘 소화되지 않고 대장에 도달한다 (Fuentes-Zaragoza et al. 2011). 상대적으로 온전한 형태로 대장에 도착한 전분 분자는 장내 박테리아에 의해 분해되고 대사되어 아세트산 (acetate), 프로피온산 (propionate) 및 뷰티산 (butyrate) 등의 인간 건강에 긍정적인 영향을 주는 단쇄 지방산 (short chain fatty acids, SCFAs)으로 전환시킨다 (Bird et al. 2010). 이들 탄소화성(non-digestible) 전분은 인체의 전분 분해 효소에 대한 저항성으로 인해 잘 소화되지 않으며, 저항 전

분 (RS)으로 불린다. 이들은 물리적으로 효소의 접근이 어려운 RS1, 입자 구조를 갖는 천연 전분 RS2, 노화된 아밀로오스의 결정을 가지는(retrogradation) RS3, 화학적으로 변형된 RS4, 및 아밀로오스-지질 복합체 RS5의 5 가지 유형으로 분류된다 (Raigond et al. 2015). RS 소화율 감소는 전분 저장 조건, 가공, 조리, 원산지, 및 수분 함량과 같은 많은 인자들에 의해 영향을 받는다. 아밀로오스 및 아밀로펙틴 복합체로 구성된 전분은 다양한 크기의 과립 형태로 대부분의 식물에 존재하며 (Ellis et al. 1998; Singh et al. 2003) 불용성 및 단단히 포장되는 방식으로 저장된다 (Imberty et al. 1991). 전분 입자의 특성은 두 주요 성분 (아밀로오스 및 아밀로펙틴)이 어떻게 과립에 조직화되는가에 다르다 (Bello-Perez and Paredes-Lopez 2009). 따라서, RS 소화율은 아밀로오스 및 아밀로펙틴의 비율에 의해 크게 영향을 받으며, 일반적으로 소화 저항성은 과립 내 아밀로오스 수준과 양의 상관관계가 있다 (Benmoussa et al. 2007; Sang et al. 2008; Themeier et al. 2005). 전분 과립 구조는 결정 구조, 균열, 및 기공으로 인해 단단하며 아밀로오스 분지 사슬 크기 및 아밀로오스 함량 증가에 의해 강화될 수 있다 (Heitmann et al. 1997; Kong et al. 2003; Tester et al. 2004). 천연 전분 과립들 (RS2) 중, 감자 전분 및 고 아밀로오스 옥수수 전분 (high amylose corn starch, HACS)은 각각 긴 아밀로오스 분지 사슬을 가진 상대적으로 큰 과립 크기 (감자) 및 고 아밀로오스 함량으로 인한 입자의 강도 때문에 다른 전분 과립들보다 소화 효소에 더 저항성을 가진다 (Raigond et al. 2015).

[0004] 이와 관련된 연구에서, 소의 반추위 액에서 미생물들이 HACS 과립을 분해하고 HACS 과립 분해 동안 과립 클러스터를 형성하는 것이 관찰되었다. 세포-매개 과립 클러스터링이 전분 및 전분-관련 거대 분자에 α -1,4- 및/또는 α -1, 6-글루코시드 결합으로 결합할 수 있는 전분 결합 도메인 (starch binding domains, SBDs)에 의한 것으로 추정되었다. 그러나, HACS 과립-분해 박테리아에 대한 연구가 부족한 실정이다. 이에, 본 발명자들은 인간 배설물을 RS 함유 배지와 함께 배양하면서 생성된 과립 클러스터를 상등액으로부터 분리하여, 과립에 붙어있는 장내 미생물을 분리하고 동정하여, 이들의 RS 분해 능력을 측정함으로써 RS 분해능을 가진 미생물을 분리하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 신규한 저항 전분에 대해 분해능이 있는 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P)를 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명의 목적은 본 발명의 신규한 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효 성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제를 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 본 발명의 신규한 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효 성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 본 발명의 신규한 균주를 포함하는 프로바이오틱스 제제를 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 아울러, 본 발명의 목적은 본 발명의 신규한 균주를 포함하는 프로바이오틱스 제제 및, 조사료, 농후사료 또는 품미사료로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 사료를 포함하는 사료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 신규한 저항 전분에 대해 분해능이 있는 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P)를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 본 발명의 신규한 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 본 발명의 신규한 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 본 발명의 신규한 균주를 포함하는 프로바이오틱스 제제를 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제 조성물을 제공한다.
- [0014] 아울러, 본 발명은 본 발명의 신규한 균주를 포함하는 프로바이오틱스 제제 및, 조사료, 농후사료 또는 품미사료로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 사료를 포함하는 사료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따르면, 인간 분변으로부터 분리한 본 발명의 신규한 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P)는 RS2, RS3, RS4 유형의 저항 전분 모두를 종래의 동종 및 이종의 균주들보다 현저히 분해할 수 있는 효과가 있으므로, 이를 프로바이오틱스, 식품 조성물 및 사료 첨가제 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 인간 분변에서 저항 전분 분해능을 가진 균주를 분리하기 위한 과정을 나타낸 도이다.
- 도 2는 분리한 분변 내의 미생물에 의한 저항 전분 분해능을 저항 전분 (S4180)의 소모 정도 및 환원당의 총량을 통해 확인한 도이다:
- Residual starch: 잔류 전분 (●); 및
- Reducing sugars: 환원당 (□).
- 도 3은 RS 과립의 응집에 의해 형성된 백색 클러스터 (a) 및 클러스터된 과립에 부착된 박테리아 균주 (b)를 확인한 도이다.
- 도 4는 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3와 다른 비피도박테리움 종들인 비피도박테리움 아돌센티스 DSM 20083, DSM 20086, DSM 20087, DSM 24849 및 비피도박테리움 아돌센티스 L2-32의 RS 분해능을 비교한 도이다.
- 도 5는 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3와 저항 전분 분해능을 가진 것으로 알려진 비피도박테리움 코에리눔 FMB-1의 저항 전분 (S4180, HM 260, HM 958, NV 330, VF 1490 및 VF 2470) 분해능을 비교한 도이다.
- 도 6은 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3와 전분 분해 활성이 우수한 것으로 밝혀진 박테리오히테스 세타이오타 오미크론 ATCC 29148를 공배양하여 각 균주의 수준 및 잔류 전분을 확인한 도이다:
- B-12h: 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 단독 12 시간 배양;
- B-24h: 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 단독 24 시간 배양;
- B-36h: 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 단독 36 시간 배양;
- C-12h: 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 및 박테리오히테스 세타이오타오미크론 ATCC 29148 12 시간 공배양;
- C-24h: 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 및 박테리오히테스 세타이오타오미크론 ATCC 29148 24 시간 공배양; 및
- C-36h: 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 및 박테리오히테스 세타이오타오미크론 ATCC 29148 36 시간 공배양.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0018] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0019] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.
- [0021] 일 측면에서, 본 발명은 저항 전분에 대해 분해능이 있는 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P)에 관한 것이다.

- [0022] 일 구현예에서, 저항 전분은 RS2 유형 저항 전분, RS3 유형 저항 전분 및 RS4 유형 저항 전분으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0023] 일 측면에서, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P) 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에서 “프로바이오틱스(probiotics)”란, 섭취되어 장에 도달하였을 때에 장내 환경에 유익한 작용을 하는 균주를 의미한다.
- [0025] 일 구현예에서, 우수한 프로바이오틱 활성을 가지면서 면역활성 증강 및 항암작용이 뛰어난 프로바이오틱 미생물 혼합균을 추가로 포함하여 본 발명의 프로바이오틱스 제제의 효과를 더욱 증진시킬 수도 있다.
- [0026] 일 구현예에서, 본 발명의 프로바이오틱스 제제와 함께 생균제로 이용 가능한 미생물 종균은 사람이나 동물이 섭취하기에 적합하고 섭취시 유해 병원성 유해세균을 억제하거나 포유동물 장관 내의 미생물 균형을 개선시킬 수 있는 프로바이오틱 활성을 갖는 것들이 바람직하다. 그러한 프로바이오틱 미생물의 예로는 사카로마이세스(Saccharomyces), 캔디다(Candida), 피치아(Pichia) 및 토루롭시스(Torulopsis)를 포함하는 효모(yeasts), 아스퍼질러스(Aspergillus), 라이조푸스(Rhizopus), 무코(Mucor), 페니실리움(Penicillium) 등과 같은 곰팡이 및 락토바실러스(Lactobacillus), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 클로스트리디움(Clostridium), 류코노스톡(Leuconostoc), 박테로이드(Bacteroides), 스태필로코커스(Staphylococcus), 락토코커스(Lactococcus), 바실러스(Bacillus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 푸소박테리움(Fusobacterium), 프로피오니박테리움(Propionibacterium), 엔테로코커스(Enterococcus), 페디오코커스(Pediococcus) 및 마이크로코커스(Micrococcus) 속 세균들이 있다.
- [0027] 상기 프로바이오틱스 조성물은 장 기능 개선을 위한 다양한 용도에서 활용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 프로바이오틱스 조성물은 정장 작용을 가지므로 '정장용' 조성물로서 사용 가능하다. '정장용'이란 사람이나 동물의 장내 세균총의 이상 발효에 의하여 야기되는 제반증상을 치료 및/또는 개선하는 용도를 말한다. 상기 증상으로는 이에 한정되지는 않으나, 예를 들어, 설사, 위장염, 염증성 장질환, 신경성 장염 증후군, 소장 미생물 과성장증 등이 포함된다.
- [0028] 상기 프로바이오틱스 조성물은 당업계에 공지된 방법에 따라 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 프로바이오틱스 제제는 식품/의약 분야에서 통상적으로 사용되는 담체와 혼합하여 건강기능식품 또는 약학 조성물로서 활용될 수 있다.
- [0029] 일 구현예에서, 본 발명의 프로바이오틱스 제제는 사람 또는 동물에 투여될 수 있으며, 식품, 의약품, 동물약품, 사료 또는 건강보조식품과 함께 투여될 수 있다.
- [0030] 일 측면에서, 본 발명은 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P) 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 일 구현예에서, 식품 조성물은 장 기능 개선용 건강기능식품일 수 있다.
- [0032] 상기 건강기능식품은 발효식품인 것이 바람직하지만, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 건강기능식품은 음료, 잼, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류일 수 있으며, 더욱 자세히는, 유제품, 제과물, 조미료, 음료 및 드링크제, 스낵, 캔디류, 젤리류, 아이스크림 및 냉동용 디저트, 아침 곡물류, 영양바, 스낵 바 초콜렛 제품, 가공 식품, 곡물 제품 및 파스타, 스프, 소스 및 드레싱, 과자 제품, 오일 및 지방 제품, 유제품 음료(dairy drink) 및 우유 음료, 차, 두유 및 콩 유제품(soy dairy-like product), 냉동식품, 조리 음식 및 대체 음식, 육류 제품, 치즈, 요구르트, 빵 및 롤빵, 케이크, 쿠키 및 크래커로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 건강기능식품은 본 발명은 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P) 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 포함하는 캡슐, 정제, 분말, 액상 현탁액, 환제 및 과립제 등의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 건강기능식품은 유효성분으로서 본 발명은 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 (KACC92235P) 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 건강기능식품은 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 과일 주스나 야채 음료 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0036] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 프로바이오틱스 제제를 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제 조성물에 관한 것이다.

[0037] 일 구현예에서, 사료첨가제는 사료 총 중량 기준 0.1~0.3%로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 프로바이오틱스 제제에, 조사료, 농후사료 또는 품미사료로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 사료를 추가로 포함하는 사료 조성물에 관한 것이다.

[0039] 본 발명에서 “조사료”는 비교적 구조 탄수화물의 함량이 높고 부피가 큰 사료로서, 조섬유의 함량이 높고 거칠며 부피가 많은 반면에 값이 싼 편이고 가소화양분이 적게 들어 있는 사료를 말한다. 벣짚, 목초의 생·건초, 산야초의 생·건초, 목초를 포함한 꽃베기 작물로 만든 엔실리지와 콩깍지 등의 거친 먹이가 이에 속한다. 건조 상태에서의 조사료는 18% 이상의 조섬유를 함유하고 있으며 소화율이 낮은 편이지만 각종 영양소의 공급원으로서 뿐만 아니라 소화기관의 정상적인 기능 유지를 위해서도 중요하다. 본 발명에서는 사료조성물에 첨가되는 조사료로 벣짚, 티모시, 사일리지를 사용할 수 있으며, 이러한 조사료는 전체 사료조성물에 대하여 30 ~ 65 중량% 범위에서 첨가될 수 있다.

[0040] 본 발명에서 “농후사료”는 부피가 작고 섬유소의 함량은 낮은 반면, 가용무질소물 등의 가소화양분의 함량이 많아서 가축의 성장이나 축산물의 생산효율을 높일 수 있는 사료를 총칭한다. 통상적으로 옥수수·수수·밀·보리 등의 곡식류, 식물성 기름을 짜고 남은 깻묵류나 쌀겨·보릿겨·밀기울 등과 같은 강피류, 어분 또는 이들을 일정한 비율로 섞어 만든 배합사료 등이 이에 속한다. 본 발명에서 농후사료는 바람직하게 옥수수, 소맥, 단백피, 대두박, 비타민, 광물질 등의 성분들을 포함할 수 있으며, 이러한 성분으로 한정되는 것은 아니며 반추동물의 사육 시 통상적으로 사용하는 농후사료라면 모두 사용할 수 있다. 이러한 농후사료는 전체 사료조성물에 대하여 35~70 중량% 범위에서 첨가될 수 있다.

[0042] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1. 인간 분변 유래 저항 전분 분해능을 가진 균주 분리

[0045] 인간 분변에서 저항 전분 분해능을 가진 균주를 분리하기 위해, 도 1과 같은 방법으로 실험을 진행하였다. 구체적으로, 인간 분변은 항생제를 복용하지 않고 소화기 질환이 없는 29세의 건강한 남성으로부터 얻었다. 분변 샘플은 혐기 조건으로 운반되어 무균 팩에서 5회 (30 g/150 mL) 희석되고 접종을 위해 균질화되었다. 모든 작업은 CO₂ 가스로 채워진 혐기성의 챔버 내에서 이루어졌다. 상기 분리한 분변 내의 미생물에 의한 저항 전분 분해능을 확인하기 위해, 5회 희석된 인간 분변 200 μ L을 0.5% S4180 (RS2 유형)를 함유하는 CMR 배지 (15%의 소의 반추위액(bovine rumen fluid, CMR)을 함유하는 CM(chopped meat) 배지 (100mL 당 chopped meat pellets 1.02 g, pancreatic digest of casein 3.0 g, yeast extract 0.5 g, dipotassium phosphate 0.5 g, l-cysteine 0.05 g, resazurin 0.1 mg, vitamin K₁ 0.1 mg, 및 hemin 0.5 mg 함유)) 20 mL에 접종한 뒤, 혐기성 조건하에 37°C에서 150 rpm으로 진탕배양하였다. 이 후 배양 6시간 마다 저항 전분 (S4180)의 소모 정도를 측정하였고, DNS 방법으로 환원당의 총량을 확인함으로써 측정하였다. 접종 후 18 시간까지, 배지에서 RS의 양은 약 90 %로 유지되었다고, 접종 18 시간 후 48 시간까지 지속적으로 분해되었다 (도 2). 환원당의 수준은 전분 분해 시점에서 RS 분해의 초기 단계 (12 내지 24 시간)까지 점차 증가 하였다 전분이 지속적으로 분해됨에 따라 배지 내의 환원당의 양은 서서히 감소했다 (24 ~ 48 시간). 결국엔 전체 RS의 약 60 %가 분해되었다. RS와 함께 18 시간 동안 배양하는 동안, RS 과립의 응집에 의해 형성된 백색 클러스터가 관찰되었고, 클러스터된 과립에 부착된 박테리아 균주의 존재가 관찰되었다 (도 3). 상기 RS 과립에 부착된 박테리아가 RS 분해성 장내 세균일 것으로 판단하였다. 이에, 저항 전분의 소모 정도를 각 바이알별로 확인하면서 저항 전분 사용률이 가장 높은 바이알을 선택하여 과립 클러스터를 침전시켰다. 상등액을 분리하고 침전된 과립 클러스터에 0.8% NaCl 용액을 동일한 부피로 첨가하여 즉시 분산시켜 재부유시킨 뒤 다시 과립을 가라앉혀 상등액을 제거하는 세척 과정을 2회 수행하였다. 세척 후 처음 분리해 둔 상등액을 전분 과립과 혼합하였고 세포가 결합한 RS 과립은 전분 과립 클러스터의

형성으로 확인되었다. 세척된 펠릿 100 μ L과 희석된 상등액을 고체 CMR 배지 (0.5% 말토오스 및 0.5% 가용성 전분 함유)에서 배양하였다. 과립 클러스터 및 상등액 도말에 의해 고체 배지에서 자라는 미생물 콜로니에서 100 개의 콜로니를 선발하여 균주를 확인하였다 (표 2).

표 1

	Collection no.	Matched organisms	Top hit strain	Accession no.
과립 클러스터	P2P3	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Eq1	MH828351
	C11	<i>Collinsella aerofaciens</i>	JCM 10188	MH828352
상등액	S10	<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 5826	MH828353
	R3-8	<i>Paraclostridium benzoelyticum</i>	JC272	MH828354
	P8-2	<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 1290	MH828355
	AR5-10	<i>Shigella sonnei</i>	CECT 4887	MH828356
	SS1-3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336	MH828357
	EC8	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	MH828358
	ST3	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	CIP 106849	MH828359
	R12	<i>Escherichia coli</i>	U5/41	MH828360
	SS1-1	<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC 35469	MH828361
	R7	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	KJ-16	MH828362
	R5	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 13	MH828363
	R8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	NBRC 3425	MH828364

그 결과, 과립 클러스터에서 분리된 2 개의 균주는 RS 과립과 혼합될 때 과립 클러스터를 형성할 수 있었지만 상등액으로부터 분리된 12 개의 균주는 RS 과립 클러스터를 형성하지 못하여, RS 과립에 부착된 모든 세포가 RS 를 분해할 수 있는 것은 아니지만 모든 RS 분해 세포가 RS 과립에 부착될 수 있음을 알 수 있었다.

실시예 2. 선발 박테리아의 저항 전분 분해능 확인

상기 실시예 1에서 분리된 RS 분해성 장내 세균일 것으로 예측되는 14종의 박테리아의 저항 전분 분해능을 확인 하기 위해, RS2 유형의 S4180를 이용하여 분해 정도를 확인한 결과, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3만이 RS를 약 63.3% 이용할 수 있었으나, 콜린셀라 아에로파시엔스 C11과 상등액으로부터 분리된 12 종의 균주들은 RS를 분해할 수 없는 것으로 나타났다.

이에, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 균주를 한국농업미생물자원센터 (Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에 기탁하여 기탁 번호 92235P를 부여받았다.

실시예 3. 동종 균주간 저항 전분 분해능 비교

비피도박테리움 아돌센티스 P2P3와 다른 비피도박테리움 종들인 비피도박테리움 아돌센티스 DSM 20083, DSM 20086, DSM 20087, DSM 24849 (ATCC, Manassas, VA, USA) 및 비피도박테리움 아돌센티스 L2-32 (BEI resources) (Manassas, VA, USA)의 RS 분해능을 비교하였다. 이를 위해, 각 비피도박테리움 아돌센티스 종들은 0.5% 말토오스를 함유하는 CMTV 배지 (1% (v/v)의 미량무기질 (리터당 nitritotriacetic acid 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 g, $MnSO_4$ 0.5 g, NaCl 1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.18 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.18 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01 g, $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 0.02 g, H_3BO_3 0.01 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.01 g 및 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025 g 함유) 및 비타민 용액 (리터당 biotin 2 mg, folic acid 2 mg, pyridoxine-HCl 10 mg, thiamine-HCl $\cdot 2H_2O$ 5 mg, riboflavin 5 mg, nicotinic acid 5 mg, d-pantothenic acid 5 mg, vitamin B₁₂ 0.1 mg, 4-aminobenzoic acid 5 mg 및 lipoic acid 5 mg 함유)을 함유한 CM 배지) 5 mL에서 배양되었다. 600 nm에서의 OD 값이 0.6에 이른 후 200 μ L를 표 2의 RS(저항 전분)를 각각 0.5%씩 함유하는 CMTV 배지 20 mL에 각각 접종되었다. 접종 후 37°C에서 150 rpm으로 72 h 동안 혐기 조건으로 진탕배양하였다.

표 2

[0055]

	S4180	Hi-maize 260	Hi-maize 958	Novelose 330	Versafibe 1490	Versafibe 2470
RS 유형	RS 2	RS 2	RS 2	RS 3	RS 4	RS 4
전분 (%)	65	31	64	65	10	29
식이섬유 (%)	23	56	22	23	74	60
총 탄수화물 (%)	88	87	86	88	84	89

[0056]

그 결과, 비피도박테리움 아돌센티스 DSM 20087, DSM 24849 및 L2-32는 각각 RS를 9.8 %, 47.3 % 및 43.8 % 분해하였으며, DSM 20083 및 DSM 20086은 RS를 전혀 분해하지 못하는 것으로 나타났다 (도 4).

[0058]

실시예 4. 이중 균주간 저항 전분 분해능 비교

[0059]

비피도박테리움 아돌센티스 P2P3와 저항 전분 분해능을 가진 것으로 알려진 비피도박테리움 코에리눔(*B. choerinum*) FMB-1의 저항 전분 (S4180, HM 260, HM 958, NV 330, VF 1490 및 VF 2470) 분해능을 상기 실시예 3에서와 같이 비교하였다.

[0060]

그 결과, S4180에 대해서는 비피도박테리움 코에리눔 FMB-1과 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3의 분해능이 유사한 정도였으나, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3가 HM 260, HM 260, NV 330, VF 1490 및 VF 2470을 각각 37.3%, 69.6%, 44.5%, 51.6% 및 54.4% 분해한 반면, 비피도박테리움 코에리눔 FMB-1은 각각 4.0%, 50.3%, 45.7%, 31.0 및 3.8% 분해하는 것으로 나타났다 (도 5).

[0062]

실시예 5. 공배양 효과 확인

[0063]

비피도박테리움 아돌센티스 P2P3를 RS에서 배양할 때, 환원되는 글루코오스, 말토오스 및 말토트리오스와 같은 당류가 TLC 분석에서 검출되었다 (데이터 미도시). 이에, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3에 의해 생성된 환원당을 다른 미생물이 사용할 수 있는지를 확인하기 위해, S4180를 유일한 탄소 공급원으로 하여 CMTV배지에서 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3와 전분 분해 활성이 우수한 것으로 밝혀진 박테리오히데스 세타이오타오미크론 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) ATCC 29148를 공배양하였다. 구체적으로, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3와 박테리오히데스 세타이오타오미크론 ATCC 29148는 600 nm에서 OD 값이 0.6가 될 때까지 각각 따로 0.5% 말토오스를 함유하는 CM 배지 5 mL에서 배양한 뒤, 각각 200 μ L씩 0.5% S4180를 함유하는 CMTV 배지에 함께 접종하여 혐기 조건에서 150 rpm로 37°C에서 진탕배양하였다. 대조군으로서 각각 따로 0.5% S4180를 함유하는 CMTV 배지에 접종하여 배양하였다. PCR 분석을 위해 12시간마다 샘플을 채취하였다. DNA 추출 키트 (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 상기에서 채취한 시료로부터 유전체 DNA를 추출하였다. 그 후, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 및 박테리오히데스 세타이오타오미크론 ATCC 29148 각각의 16S rDNA 유전자의 특정 부분을 정량적으로 PCR 증폭하여 이들의 수준을 확인하였다 (비피도박테리움 아돌센티스 P2P3에 대한 프라이머: forward 5'-TGT CGG GAA AGA TTC ATC GGT AT-3' 및 reverse 5'-TTT AAG GGA TCC GCT CCA CC-3'; 및 박테리오히데스 세타이오타오미크론 ATCC 29148에 대한 프라이머: forward 5'-GTA TAA TCA GAC CGC ATG GTC TTG-3' 및 reverse 5'-GAT TAG CAT CCT GTC ACC AGG TA-3'). PCR 증폭을 위해 SYBR Green I을 CFX Connect Real-Time PCR 검출 시스템 (BioRad, Hercules, CA, USA)에 적용하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분 간 변성 후 95°C에서 30초, 58°C에서 30초 및 72°C에서 1분의 조건으로 40 사이클을 수행하였으며, 사이클 임계값 (Ct)은 Bio-Rad CFX 96 Manager 3.0 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. 이를 통해 확인한 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 및 박테리오히데스 세타이오타오미크론 ATCC 29148의 16S rDNA 변화와 잔류하는 RS 양은 도 6에 나타났다.

[0064]

그 결과, 박테리오히데스 세타이오타오미크론 ATCC 29148를 0.5% S4180 함유하는 CMTV 배지에서 단독으로 배양하였을 때, S4180는 분해되지 않았고, 균주 또한 잘 자라지 못하였다 (데이터 미도시). 그러나, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3는 RS를 배양 24시간 및 36시간 만에 약 22% 및 55% 분해하여 잘 성장하였고, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3 및 박테리오히데스 세타이오타오미크론 ATCC 29148를 공배양하였을 때는 배양 24시간 및 36시간에 RS 분해가 약9% 및 약42%로 나타나 오히려 RS 분해 정도가 감소한 것을 알 수 있었다 (도 6). 이를 통해, 박테리오히데스 세타이오타오미크론 ATCC 29148의 배양에는 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3에 의한 RS 분해로부터 방출되는 작은 당류들이 요구되는 것을 알 수 있으며, 박테리오히데스 세타이오타오미크론 ATCC 29148의 성장과 비례하여 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3에 의한 RS 분해가 감소하는 것을 알 수 있었다. 이와 유사하

게, 박테리오파지 세타이오파지 ATCC 29148이 단독 배양될 때는 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3보다 훨씬 느린 성장률을 나타냈으나 (12 시간, 24 시간 및 36 시간 배양시 각각 46 %에서 54 %, 18 %에서 82 % 및 7 %에서 93 %의 상대 비율), 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3와 함께 공배양했을 경우 박테리오파지 세타이오파지 ATCC 29148의 비율이 배양 12 h, 24 h 및 36 h에 62%, 64% 및 72%로 증가되었다.

[0065]

이를 통해, 비피도박테리움 아돌센티스 P2P3가 인간 장 미생물군에서 강력한 RS 대사를 수행하며, 다른 미생물의 성장에 필요한 작은 말토올리고사카라이드를 RS로부터 생성하는 강력한 프로바이오틱-자극 일차 분해자인 것을 알 수 있다.

수탁번호

[0067]

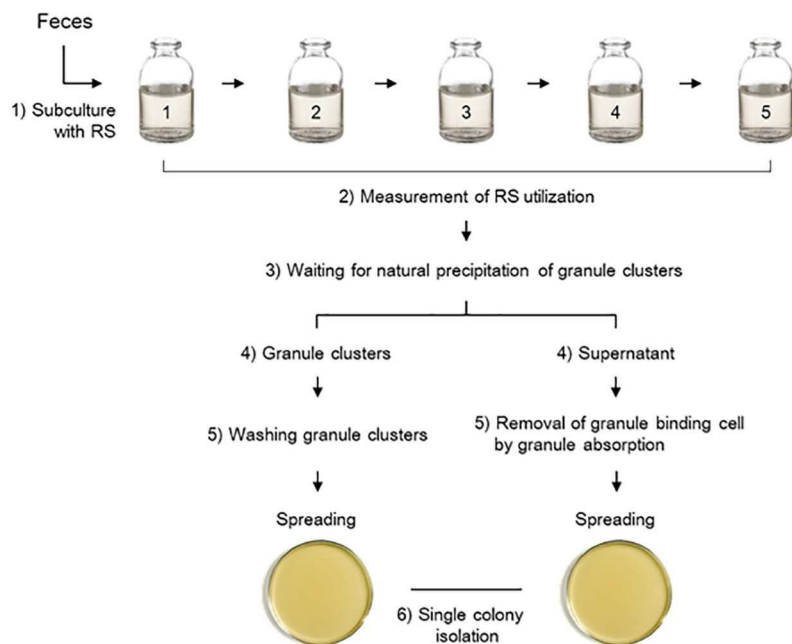
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC92235P

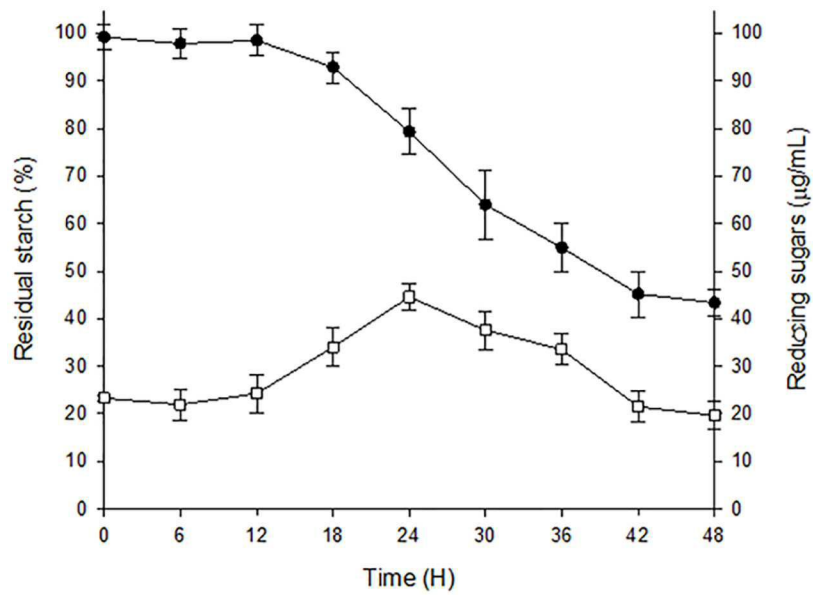
수탁일자 : 20181114

도면

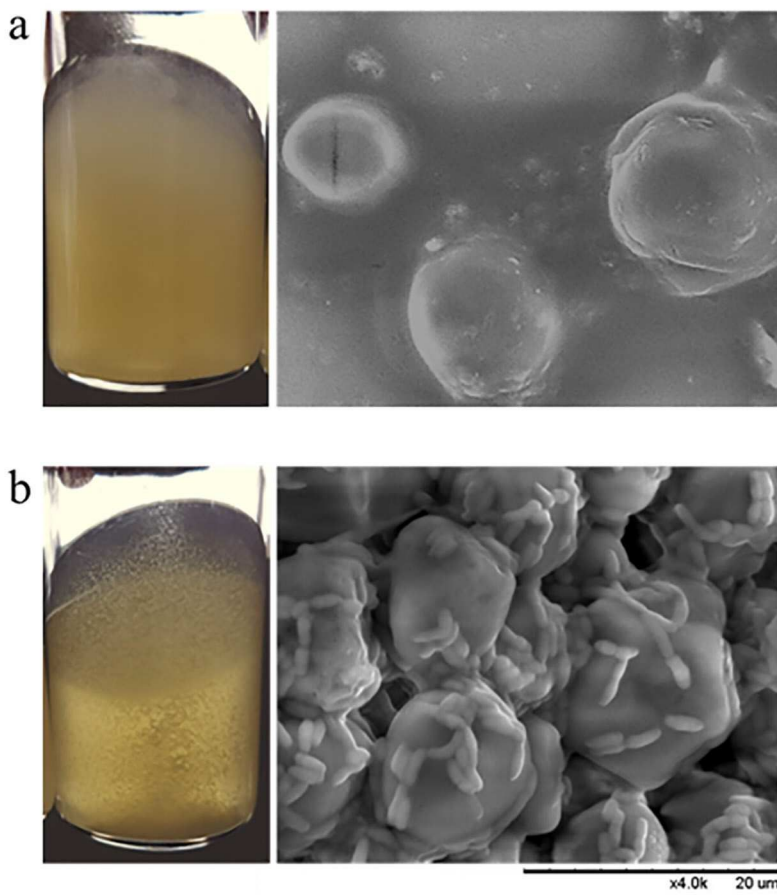
도면1



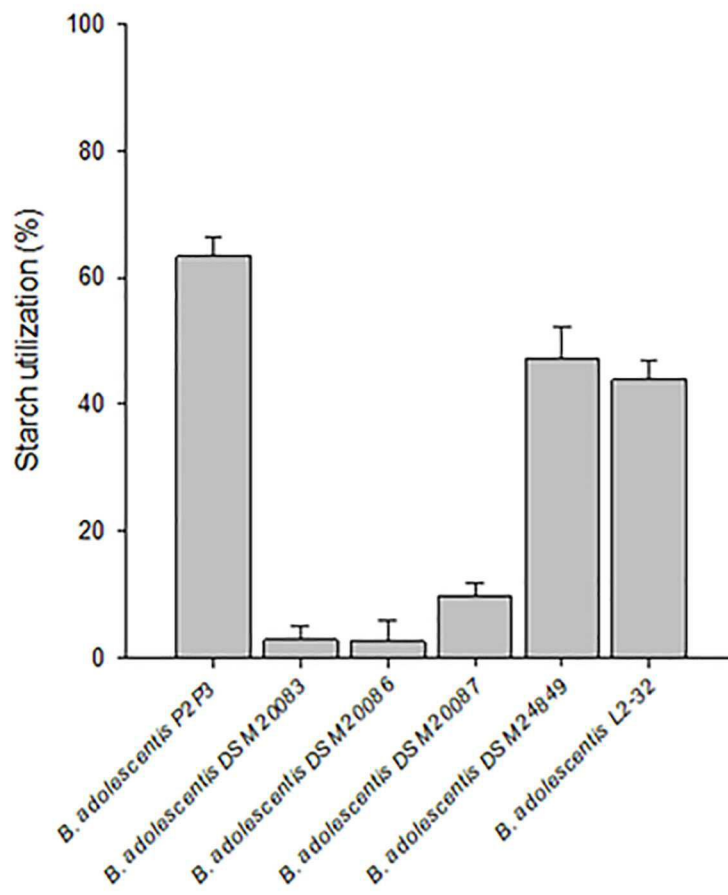
도면2



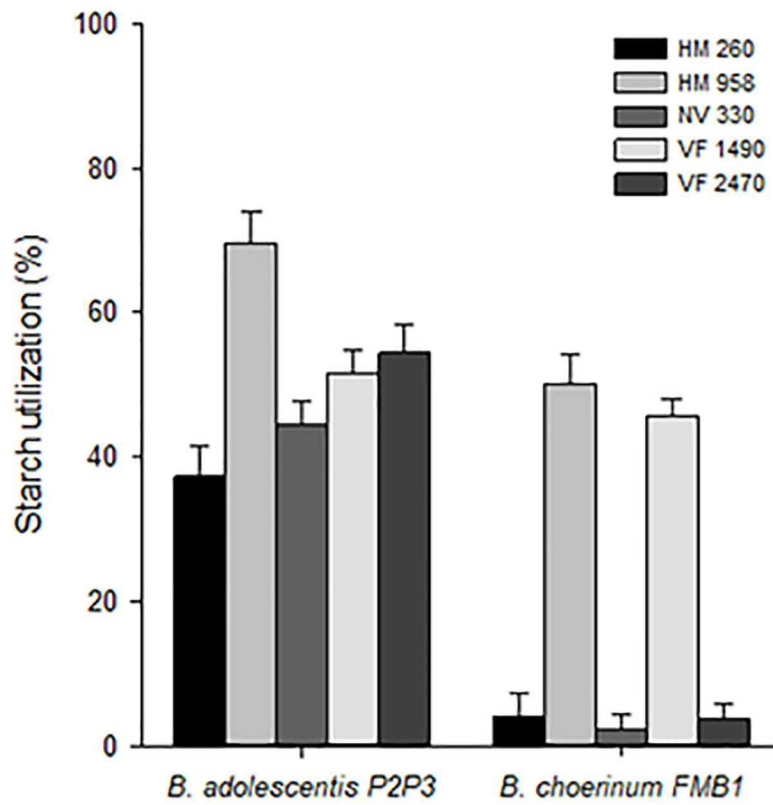
도면3



도면4



도면5



도면6

