



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월27일
(11) 등록번호 10-1932955
(24) 등록일자 2018년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/135 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0100156
(22) 출원일자 2018년08월27일
심사청구일자 2018년08월27일
(30) 우선권주장
1020180068230 2018년06월14일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160053445 A
KR101743044 B1
KR101228608 B1
Aliment Pharmacol Ther. 2011 Jan;33(1):50-63

(73) 특허권자
주식회사한국야쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
김주연
경기도 수원시 영통구 덕영대로1555번길 20, 945동 515호
박수동
경기도 용인시 기흥구 고매로34번길 31, 205동 1003호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 5 항

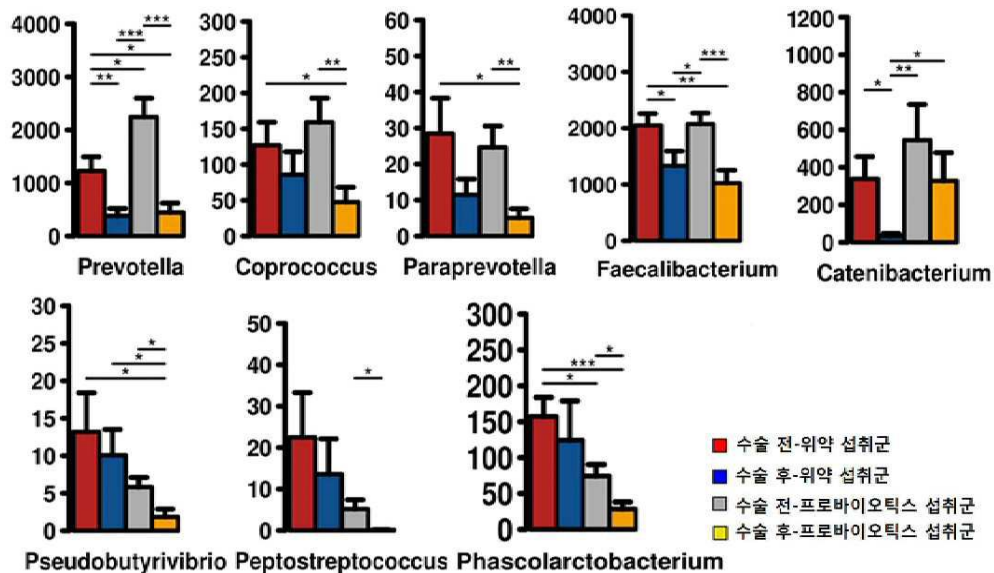
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 장내 균총 개선용 프로바이오틱스 조성물

(57) 요약

본 발명은 전방절제 수술을 시행한 대장암 환자의 장내 균총 개선을 위한 프로바이오틱스 조성물 및 이를 포함하는 식품 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 프로바이오틱스 조성물을 이용하면 장내 균총을 개선할 수 있으며, 특히, 전방절제 수술을 시행한 대장암 환자의 수술 후 회복을 촉진할 수 있다.

대표도 - 도13



(52) CPC특허분류

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2200/3204 (2013.01)

(72) 발명자

정지웅

서울특별시 영등포구 당산로16길 6, 603호

심재중

서울특별시 관악구 관악로30길 27, 121동 1303호

장성식

경기도 의정부시 부용로 49, 102동 806호

이정열

경기도 양평군 서종면 통점길 63

심재현

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152, 213동 901호

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC11874BP인 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712), 기탁번호 KFCC-10813인 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782) 및 기탁번호 KCTC13279BP인 비피도박테리움 애니멀리스 아종, 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002)를 포함하는 전방절제 수술을 시행한 대장암 환자의 장내 균총 개선용 프로바이오틱스 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로바이오틱스 조성물은 조성물 100 중량부당 10 내지 50 중량부의 락토바실러스 플란타룸 HY7712, 10 내지 50 중량부의 락토바실러스 카제이 HY2782 및 20 내지 80 중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 아종, 락티스 HY8002를 포함하는 것인 프로바이오틱스 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 프로바이오틱스 조성물을 포함하는 전방절제 수술을 시행한 대장암 환자의 장내 균총 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 조성물은 과립, 정제, 캡슐, 액상, 발효유 및 분말 형태인 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 식품 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 조성물은 식품학적으로 허용되는 첨가제, 부형제 또는 향미제를 더 포함하는 것인 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전방절제 수술을 시행한 대장암 환자의 장내 균총 개선을 위한 프로바이오틱스 조성물 및 이를 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 사람은 출생과 동시에, 미생물이 장내에 서식하기 시작하여 그 집단이 평형에 도달하면 안정된 장내 균총(intestinal microbial flora)을 형성한다. 장내 균총은 숙주의 생리적 조건, 음식물, 약물 및 스트레스 등과 같은 여러가지 요인에 따라 변동한다.

[0004] 장내 정상 균총을 구성하는 미생물의 숫자와 활동은 외래성 인자(alloogenic factor)와 내인성 인자(autogenic factor)에 의해서 조절되며(Yazawa T., Letters in applied Microbiology 10: 229-232, 1990), 전자는 숙주의 환경이나 식이 등에서 유발되고, 후자는 균총 내의 미생물들 사이에서 주로 일어나게 된다.

[0005] 즉, 정상 균총의 균형은 장내의 강한 혐기적 조건, 장의 연동운동, 연속적인 배설 하에서 장관 내의 서식처와 영양원에 대하여 경쟁하는 과정에서 이루어지고, 일부는 pH, 산화환원 전위, 담즙산, 박테리오킨(bacteriocin),

지방산, 유화수소 등에 의하여 정상균총의 균형이 이루어진다.

- [0006] 장내 균총을 구성하는 개개의 미생물은 물질생산 또는 분해능에 의해 숙주에게 피해 또는 이익을 주기도 한다. 장내 균총 전체로 보면 비타민 공급, 감염방지 및 장 기능(연동운동 및 흡수)에 관여하고, 이로 인해 장내 균총의 조성은 변비, 장 관련 질환 발생 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 노인들과 장이 좋지 않은 사람들은 장내에 비정상 균총이 형성되어 있다(Mitsuoka T, Journal of Industrial Microbiology, 6:263, 1990). 보통 소장에서의 균수가 현저히 증가하거나 유익균인 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* spp.)이 줄어들거나 없어지는 반면, 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C. perfringens*) 등의 클로스트리디움 속(*Clostridium* sp.)은 현저히 증가한 상태인 경우가 많다.
- [0007] 따라서 건강을 유지하기 위하여 비피도박테리움 속 등의 유익균 비중은 증가시키고, 유해균 비중은 적은 상태로 유지하는 것이 장내 균총 균형에 중요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제10-2016-0079122호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 일 목적은 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712; KCTC11874BP), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782; KFCC-10813) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002; KCTC13279BP)를 포함하는 전방절제 수술을 시행한 대장암 환자의 장내 균총 개선용 프로바이오틱스 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712; KCTC11874BP), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782; KFCC-10813) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002; KCTC13279BP)를 포함하는 전방절제 수술을 시행한 대장암 환자의 장내 균총 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712; KCTC11874BP), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782; KFCC-10813) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002; KCTC13279BP)를 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 명세서에 사용된 용어, '프로바이오틱스(probiotics)'는 프로(Pro)와 바이오틱스(biotics)의 합성어로, 세계보건기구(WHO)에서는 '충분한 양을 섭취했을 때 건강에 이로온 효과를 줄 수 있는 살아 있는 미생물'로 정의한다. 현재까지 알려진 대부분의 프로바이오틱스는 유산균(lactic acid bacteria)으로, 장에 도달한 후 장내 음식물을 분해하고, 비타민을 합성하는 등 유익한 작용을 한다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 프로바이오틱스 조성물은 조성물 100 중량부당 10 내지 50 중량부의 락토바실러스 플란타룸 HY7712, 10 내지 50 중량부의 락토바실러스 카제이 HY2782 및 20 내지 80 중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002를 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 조성물 100 중량부당 20 내지 40 중량부의 락토바실러스 플란타룸 HY7712, 20 내지 40 중량부의 락토바실러스 카제이 HY2782 및 30 내지 70 중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002를 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는, 조성물 100 중량부당 20 내지 30 중량부의 락토바실러스 플란타룸 HY7712, 20 내지 30 중량부의 락토바실러스 카제이 HY2782 및 40 내지 60 중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002를 포함할 수 있다.
- [0016] 한편, 본 발명의 프로바이오틱스 조성물은 분말 형태인 것이 바람직하며, 분말 형태인 경우에는 캡슐 형태로 코팅되어 있거나, 코팅되지 않을 수도 있다. 또한, 상기 프로바이오틱 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구 투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예

를 들어, 경구 투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 프로바이오틱스 조성물은 대장암 환자 중 전방절제 수술을 시행한 환자의 장내 균총을 개선하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 양상은 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712; KCTC11874BP), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782; KFCC-10813) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002; KCTC13279BP)를 포함하는 장내 균총 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 용어, '장내 균총 개선'은 유해균의 비율은 감소시키고, 유익균의 비율을 증가시키는 것을 의미한다.

[0020] 예를 들어, 상기 유익균은 *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Butyricicoccus*, *Butyricimonas*, *Butyrivibrio*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pseudobutyrvibrio* 또는 *Weissella* 속의 세균을 포함하나, 이에 한정하지는 않으며, 유해균은 *Campylobacter*, *Clostridium*, *Escherichia-Shigella*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* 또는 *Vibrio* 속의 세균을 포함하나, 이에 한정하지는 않는다. 일반적으로, 정상인의 장내 균총, 즉, 유해균과 유익균에 대한 비율은 2:8인 것이 바람직하다.

[0021] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 식품 조성물은 상기 프로바이오틱스 조성물을 유효성분으로 포함할 수 있으며, 상기 프로바이오틱스 조성물은 조성물 100 중량부당 10 내지 50 중량부의 락토바실러스 플란타룸 HY7712, 10 내지 50 중량부의 락토바실러스 카제이 HY2782 및 20 내지 80 중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 조성물 100 중량부당 20 내지 40 중량부의 락토바실러스 플란타룸 HY7712, 20 내지 40 중량부의 락토바실러스 카제이 HY2782 및 30 내지 70 중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002를 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는, 조성물 100 중량부당 20 내지 30 중량부의 락토바실러스 플란타룸 HY7712, 20 내지 30 중량부의 락토바실러스 카제이 HY2782 및 40 내지 60 중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002를 포함할 수 있다. →

[0022] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 식품 조성물은 대장암 환자의 장내 균총을 개선하는 것일 수 있으며, 특히, 대장암 환자 중 전방절제 수술 후에 불균형을 이루고 있는 장내 균총을 정상 수준으로 회복시키는 데 탁월한 효과를 갖는다.

[0023] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 식품 조성물은 과립, 정제, 캡슐, 액상(음료), 발효유 및 분말 형태로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용되는 첨가제, 부형제 또는 향미제를 더 추가할 수 있다.

[0025] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 사용되는 경우, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 조성물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 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 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0027] 또한, 상기 식품 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 더 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 바람직하다.

[0028] 한편, 본 발명의 식품 조성물은, 상기 조성물을 구성하고 있는 세균의 총량을 기준으로, 10^9 CFU/ml 내지 10^{10} CFU/ml의 생균을 포함하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 프로바이오틱스 조성물을 이용하면 장내 균총을 개선할 수 있으며, 특히, 전방절제 수술을 시행한 대장암 환자의 수술 후 회복을 촉진할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 프로바이오틱스 섭취 및 샘플 채취 과정을 개략적으로 나타낸다.
- 도 2는 대장암 환자의 장내 메타게놈에서 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 장내 균총의 알파-다양성(alpha-diversity)을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 대장암 환자의 장내 메타게놈에서 수술 전후 및 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 장내 균총의 알파-다양성을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 대장암 환자의 장내 메타게놈에서 수술 전후 및 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 장내 균총의 베타-다양성(beta-diversity)을 종 수준(OTU, Operational Taxonomic Unit)에서 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 5는 대장암 수술 후 분리한 메타게놈에서 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 장내 균총의 베타-다양성을 종 수준에서 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 6은 대장암 수술 후의 메타게놈에서 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 장내 균총의 베타-다양성을 속(genus) 수준에서 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 7은 위약 섭취군 및 프로바이오틱스 섭취군의 메타게놈에서 샘플링 차수에 따른 문(phylum) 수준의 장내 균총 변화를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 8은 위약 섭취군 및 프로바이오틱스 섭취군의 메타게놈에서 샘플링 차수에 따른 유익군의 조성을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 9는 위약 섭취군 및 프로바이오틱스 섭취군의 메타게놈에서 샘플링 차수에 따른 유해군의 조성을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 10은 위약 섭취군 및 프로바이오틱스 섭취군의 메타게놈에서 샘플링 차수에 따른 유해군과 유익군의 비율을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 11은 대장암 환자의 장내 메타게놈에서 전방절제 수술 전후 및 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 장내 균총의 네트워크 변화를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 12는 대장암 환자의 장내 메타게놈에서 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 균총 변화를 속 수준에서 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 13은 대장암 환자의 장내 메타게놈에서 전방절제 수술 전후 군주 수가 감소하거나 또는 프로바이오틱스 섭취에 의하여 군주 수가 감소하는 미생물 속을 확인한 결과를 나타낸다: 그래프의 세로축은 서열분석 결과 나타난 리드 수를 의미한다.
- 도 14는 대장암 환자의 장내 메타게놈에서 프로바이오틱스 섭취에 의하여 군주 수가 감소하는 미생물 속을 확인한 결과를 나타낸다: 그래프의 세로축은 서열분석 결과 나타난 리드 수를 의미한다.
- 도 15는 대장암 환자의 장내 메타게놈에서 전방절제 수술 전후 군주 수가 증가하거나 또는 프로바이오틱스 섭취에 의하여 군주 수가 증가하는 미생물 속을 확인한 결과를 나타낸다: 그래프의 세로축은 서열분석 결과 나타난 리드 수를 의미한다.
- 도 16은 대장암 환자의 장내 메타게놈에서 프로바이오틱스 섭취에 의하여 군주 수가 증가하는 미생물 속을 확인한 결과를 나타낸다: 그래프의 세로축은 서열분석 결과 나타난 리드 수를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 실험 방법

[0036] 1. 프로바이오틱스 조성물(분말)의 제조

[0037] 실험에 사용한 프로바이오틱스는 락토바실러스 플란타룸 HY7712 (*Lactobacillus plantarum* HY7712; KCTC11874BP: 이하, HY7712로 기재함), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782; KFCC-10813: 이하, HY2782로 기재함) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002: 이하, HY8002로 기재함; KCTC13279BP)의 복합균이다. 혼합 비율은 HY7712 25%, HY2782 25% 및 HY8002 50%이고, 프로바이오틱스 1일 복용량은 4×10^8 cfu/day이다.

[0038] 본 발명에 사용한 프로바이오틱스는 하기 명시된 방법으로 제조되었다. 먼저 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002)를 고체배지에서 순수 배양 후 순수 배양한 콜로니를 액체배지에 24시간 동안 배양하여 각각의 종균(seed starter)을 제조하였다. 배양 탱크의 배치(batch) 식 멸균 시스템을 이용하여, 121℃에서 15분간 멸균한 배양액 500L에 상기 제조된 종균을 총 배양액의 0.5%가 되도록 접종하여 16시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 각각의 배양액은 연속식 원심분리기를 이용하여 10배 내지 20배의 비율로 농축한 후 50% 내지 25%의 멸균탈지유(Skim milk)를 보호제로 사용하여 현탁하였다. 상기 제조된 농축균의 생균수는 10^9 CFU/ml 내지 10^{10} CFU/ml 이었다.

[0039] 프로바이오틱스 분말 식품은 상기 제조된 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002) 농축 분말에 중량 대비 44.56% 유당, 23.25% 식물성 크림, 15% 말티톨, 8% 자일리톨, 4.9% 딸기과즙분말, 1.8% 프락토올리고당, 0.4% 효소처리 스테비아 및 2%의 딸기향 분말을 혼합하여 제조하였다. 상기 제조된 프로바이오틱스 분말식품의 총량은 1포에 2g이었으며 1포에 포함된 총 프로바이오틱스 생균수는 2×10^8 CFU 이었다.

[0040] 대조 식품은 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*Lactobacillus plantarum* HY7712), 락토바실러스 카제이 HY2782(*Lactobacillus casei* HY2782) 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HY8002) 농축 분말 대신에 동일 비율의 유당을 혼합하는 것 이외에는 동일하게 제조되었다.

[0041] 한편, 상기 제조된 프로바이오틱스 분말 및 대조군 시험 식품은 하루 2회 복용하도록 하였다.

[0043] 2. 프로바이오틱스 조성물을 포함하는 발효유의 제조

[0044] 락토바실러스 플란타룸 HY7712, 락토바실러스 카제이 HY2782 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002를 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[0045] 먼저, 유산균 배양액은 원유 95.36 중량%와 탈지분유(또는 혼합분유) 4.6 중량%를 교반하여 15℃에서의 비중은 1.0473~1.0475, 적정산도는 0.200~0.220%, pH는 6.55~6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix)는 16.3~16.5% 정도가 되도록 혼합하였다. 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 적정온도 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02 중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP 배지에서의 총 유산균 수가 1.0×10^9 cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.75가 되도록 하여 제조하였다. 그런 다음, 혼합과즙시럽은 액상과당 13 중량%, 백설탕 5 중량%, 혼합과즙농축액 56Brix 10.9 중량%, 펙틴 1.0 중량%, 후레쉬후르츠 믹스 에센스 0.1 중량% 및 정제수 70 중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다. 이후, 상기 유산균 발효유 배양액 69.5 중량%와 락토바실러스 플란타룸 HY7712, 락토바실러스 카제이 HY2782 및 비피도박테리움 애니멀리스 아종. 락티스 HY8002 0.1 중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4 중량%를 조합하여 150 bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 발효유를 제조하였다.

[0047] 3. 대장암 환자의 분변 DNA 분석 수집

[0048] 시험 참여에 적합한 것으로 판단된 대장암 환자 60명을 선정하고, 대장암 환자로부터 도 1에 개시된 바와 같이 혈액 샘플 2회, 분변 샘플 4회(프로바이오틱스 조성물 섭취 전 2회, 섭취 후 2회)를 수집하였다.

[0049] 당업계에 알려진 분변내 DNA 분리 및 정제 방법을 사용하여, 수집된 분변 샘플로부터 고순도의 총 분변

DNA(total fecal DNA)를 분리하였다. 분리한 분변 DNA는 16S rRNA의 V3-V4 염기서열을 표적으로 하는 341F 프라이머(CCTACGGGNGGCWGCAG, 서열번호 1) 및 805R 프라이머(GACTACHVGGGTMTCTAATCC, 서열번호 2) 프라이머 세트를 이용하여 Illumina Miseq 300bp Paired end 방식으로 염기서열을 분석하였다. 수득한 염기서열 원파일(sequence raw file)에서 데이터 QC(quality control)로 품질(quality)이 낮은 서열은 제거하였다. 인덱스 서열 및 바코드 서열(bar-code sequence)로 원본 데이터 서열을 개인별로 분리(sorting)하고, 트리밍(trimming)으로 인덱스 서열 및 바코드 서열을 제거한 후 서열 페어링(sequence pairing)을 수행하였다. 페어링한 서열 중에서 키메리 서열(chimeric sequence)은 UCLUST 또는 ChimericSlayer 프로그램을 사용하여 제거하였다. 최종적으로 각 샘플의 양질 리드(high-quality read)를 확보하였다.

[0051] 4. 대장암 환자의 장내 미생물총 분석-생물정보학적 방법

[0052] 상기 3에서 확보한 서열은 QIIME 프로그램(Quantitative Insights Into Microbial Ecology program: <http://www.incodm.kr/QIIME>)의 아웃 클러스터링 스크립트(out clustering script)를 사용하여 유사성 97% 기준(3% distance)으로 나누었다. 이후 종의 수(OTU, Operational Taxonomic Unit)를 구분하고, 이를 바탕으로 종 분포도를 계산하였다. 종 다양성(Shannon's diversity) 및 종 균등도(Simpson's index)를 이용하여 개인별로 장내 미생물총의 종 다양성 및 우점도를 판단할 수 있다.

[0053] 개인별 장내 미생물총 조성은 SILVA 데이터베이스(<https://www.arb-silva.de/>)에서 BLAST 및 글로벌 얼라인먼트(global alignment)를 수행하여 확인하였다. 각각 계(superkingdom), 문(phylum), 강(class), 목(order), 과(family), 속(genus) 수준에서 장내 미생물총 동정을 실시하여 대장암 환자의 장내 미생물총 정보를 확인하였다.

[0054] 또한, 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS) 결과가 장내 미생물총을 충분히 대변하여 해석되었는지 확인하기 위하여 희박화(rarefaction) 분석을 수행하였다. QIIME 프로그램에서 97%의 서열 유사성을 기준으로 희박화 곡선(rarefaction curve)을 작성하여 서열분석 결과가 분변 내 총 미생물 군집(total bacterial community)를 충분히 대변하는지 확인하였다.

[0056] 5. 대장암 환자의 장내 미생물총 분석-통계학적 방법

[0057] 프로바이오틱스 섭취군 및 위약(placebo) 섭취군의 메타게놈(균유전체, metagenome) 분석 결과를 토대로 프로바이오틱스의 인체 적용 효과에 대한 통계학적 분석을 수행하였다.

[0058] 먼저, 대장암 환자 60명 개인별로 임상 실험 주차가 진행됨에 따른 장내 미생물총의 변화 양상을 분석하였다. 4번의 샘플링 차수별로 각 차수를 대표하는 군총 데이터를 확보하고, 이에 대한 비교 분석(comparative analysis)을 수행하여 프로바이오틱스 섭취의 영향을 확인하였다.

[0060] 6. 혈액 내 면역, 염증지표 및 장누수지표 분석

[0061] 대장암 환자로부터 대장암 수술 전, 프로바이오틱스 복용 전의 혈액을 채취하여 염증 및 장누수 지표를 측정하였다. 대장암 수술 후, 프로바이오틱스 또는 위약을 복용한 환자로부터 후 혈액을 채취하여 염증 및 장누수 지표를 추가로 측정하였다.

[0062] 측정 항목은 호중구(neutrophil), 림프구(lymphocyte), NLR (neutrophil/ lymphocyte ratio), 조놀린(Zonulin), 인터페론-감마(IFN- γ) 및 인터루킨-10(IL-10)이다.

[0064] 실험 결과

[0065] 1. 분변 내의 메타게놈 원본 데이터 분석

[0066] 전체 서열분석 샘플은 240개로 나타났고, 샘플당 평균 277,552 리드(reads)를 확보하였다. 상기 리드를 사용하여 SILVA 데이터베이스에서 분류 지정(taxonomy assignment)을 수행한 결과, 51,896개의 총 OTU를 확인하고, 샘플당 평균 877 ± 306 개의 OTU가 있음을 확인하였다.

[0068] 2. 알파-다양성(alpha-diversity) 분석

[0069] OTU 확인 및 분류 지정이 완료된 메타데이터(metadata, mapping file)를 환자, 샘플링차수, 병원, 수술 전후로 구분하여 알파-다양성 분석을 수행하였다. 알파-다양성은 단일 군집 내의 종 다양성 지표로 사용되며, 각 차수에 따른 샘플의 알파-다양성을 새넨 방법(Shannon method)으로 분석하였다.

[0070] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 샘플링 차수가 늘어날수록 전반적으로 새넨 인덱스(Shannon Index)가 감소하

여 종 다양성이 낮아진 것을 알 수 있었다. 프로바이오틱스 섭취군 및 위약 섭취군 모두 1차 및 2차 샘플의 새
 닌 인덱스가 3차 및 4차 샘플보다 높았으며, 이는 암에 의하여 균총이 장내 불균형(dysbiosis)을 이루다가 2차
 샘플링 후 실시한 수술에 의하여 장내 균총이 개선된 것을 의미한다.

[0071] 도 3에 나타난 바와 같이 프로바이오틱스 섭취군과 위약 섭취군을 비교하면, 전체적으로 프로바이오틱스 섭취군
 의 알파-다양성이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 또한 수술 후 결과를 비교하면 프로바이오틱스 섭취군의 알파-
 다양성이 위약 섭취군보다 낮으므로 환자의 장내 균총 정상화에 프로바이오틱스가 도움을 주는 것으로
 판단된다.

[0073] 3. 베타-다양성(beta-diversity) 분석

[0074] OTU 확인 및 분류 지정이 완료된 메타데이터를 환자, 샘플링차수, 병원, 수술 전후로 구분하여 베타-다양성 분
 석을 수행하였다. 베타-다양성은 샘플 간 균총 구성에 따른 관계를 나타내는 지표로 사용되며, 환경적 요인에
 대한 영향을 나타낼 수 있는 RDA 분석(redundancy analysis)으로 베타-다양성을 확인하였다.

[0075] 분석 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 수술 전에는 위약 섭취군과 프로바이오틱스 섭취군의 균총 구성이 유사한
 것으로 나타났으나, 수술 후에는 위약 섭취군과 프로바이오틱스 섭취군의 균총이 상이한 것을 확인할 수
 있었다.

[0076] 또한, 수술 후의 샘플(3차, 4차 샘플)에 대해서만 베타-다양성을 확인하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같
 이 프로바이오틱스 섭취군과 위약 섭취군 사이에 종 수준(OTU)에서 균총 구성이 명확하게 상이한 것을 알 수 있
 었다. 속 수준(genus level)에서 베타-다양성을 확인한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 프로바이오틱스 투여 여
 부에 따라 균총 구성이 현저하게 상이한 것을 확인할 수 있었다.

[0078] 4. 장내 균총의 변화 분석 - 문 수준(phylum level)

[0079] 메타게놈 데이터를 사용하여 분변 샘플 차수에 따른 장내 균총의 균주 변화를 문(phylum) 수준에서 분석하였다
 (도 7).

[0080] 위약 섭취군은 대체적으로 피르미쿠테스(*Firmicutes*)가 수술 전후 많은 비율을 차지하고 있었으며, 수술 후에는
 베루코미크로비아(*Verrucomicrobia*, 우미균류)의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 프로바이오틱스 섭취
 군은 위약 섭취군에 비해 악티노박테리아(*Actinobacteria*, 방선균류)와 프로테오박테리아(*Proteobacteria*)의 비
 율이 상대적으로 높았으며, 악티노박테리아의 경우 4차 샘플까지 그 비율이 유지되는 것을 확인할 수 있었다.
 아울러, 프로바이오틱스 섭취가 중단된 4차 샘플에서는 베루코미크로비아의 비율이 증가하는 양상이 나타나고,
 그에 따라 피르미쿠테스의 비율이 50% 미만으로 감소한 것을 알 수 있었다.

[0082] 5. 장내 균총의 변화 분석 - 유익균과 유해균의 비교

[0083] 메타게놈 데이터를 사용하여 분변 샘플 차수에 따른 장내 균총의 유익균 및 유해균에 대한 비율을 분석하였다.

[0084] 유익균은 *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Butyricicoccus*, *Butyricimonas*, *Butyrivibrio*, *Lactobacillus*,
Lactococcus, *Pseudobutyrvibrio*, *Weissella* 그리고 Unknown_*Bifidobacteriaceae*, Unknown_*Lactobacillae*s
 에 대한 각 그룹의 total read count 비율로 나타내었으며, 유해균은 *Campylobacter*, *Clostridium*,
Escherichia-Shigella, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio*에 대한
 각 그룹의 total read count 비율로 나타내었다.

[0085] 장내 유익균으로 파악되는 상기 균들의 분포에서는 *Akkermansia*와 *Bifidobacterium*의 비율이 가장 높은 것으로
 나타났으며, 1차와 2차보다 3차와 4차에서 상대적으로 더 많은 비율의 유익균이 분포하고 있음을 확인하였다(도
 8).

[0086] 또한, 장내 유해균으로 파악되는 균들의 분포에서는 *Escherichia-Shigella*와 *Fusobacterium*, *Staphylococcus*,
*Klebsiella*의 비율이 주된 유해균으로 나타났으며, 마지막 샘플 차수로 갈수록 그 비율이 줄어드는 것을 확인하
 였다(도 9).

[0087] 아울러, 장내 유해균과 유익균의 분포를 확인한 결과, 수술 전 및 항생제 투여 후에는 그 비율이 2:1 또는 1:1
 을 이루고 있어 불균형을 이루고 있었으며, 수술 이후, 프로바이오틱스의 섭취에 의해 유해균과 유익균의 비율
 이 2:8 수준으로 가까워졌으며, 특히, 4차 샘플의 경우, 프로바이오틱스 섭취군에서 유해균과 유익균의 비율이
 정확히 2:8임을 확인할 수 있었다(도 10). 이러한 결과로 볼 때, 대장암 환자의 전방절제 수술 이후, 본 발명에
 따른 프로바이오틱스 조성물의 섭취는 유익균과 유해균에 대한 비율의 정상화를 유도하는 역할을 하는 것으로

생각된다.

[0089] **6. 프로바이오틱스 섭취에 따른 군주 네트워크 변화**

[0090] 대장암 수술 전후 및 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 군주 네트워크 변화를 확인하였다. 수술 전의 샘플에서 위약 섭취군의 대표 미생물은 빨간색으로 나타나고, 프로바이오틱스 섭취군의 대표 미생물은 노란색으로 나타나며, 두 경우 모두 해당이 될 경우 주황색으로 나타난다.

[0091] 확인 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 위약 섭취군에서 수술 전에는 콜린셀라(*Collinsella*), 파스코락토박테리움 및 부티리시코커스(*Butyricicoccus*) 속 등이 우점을 하고 있는 것으로 나타났다. 또한, 패칼리박테리움, 서브돌리그라눌럼, 코프로코커스, 프리보텔라, 파라프리보텔라 속 등은 프로바이오틱스 섭취군과 유사하게 수술 전 많은 비율을 차지하고 있었다.

[0092] 또한, 수술 전의 군주들은 가까이 모여서 서로 복잡한 네트워크(network)를 형성하고 있으나, 수술 후의 군주들은 거리가 멀고 단순한 네트워크를 형성하는 것을 알 수 있었다.

[0093] 수술 후의 경우, 위약 섭취군에서는 에리시페라토클로스트리디움 (*Erysipelatoclostridium*)이 가장 대표적인 군주로 나타났다. 반면, 프로바이오틱스 섭취군에서는 베일로넬라, 비피도박테리움, 아이센베르지엘라, 훈가텔라(*Hungatella*) 속 등이 위약 섭취군보다 상대적으로 많은 비율을 차지하는 것을 알 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 수술 후 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 군총 변화를 분석하였다.

[0095] **7. 장내 군총의 군주 변화 분석 - 속 수준(genus level)**

[0096] 수술 후의 샘플(3차, 4차 샘플)에서 프로바이오틱스 섭취에 따른 군총 변화를 속 수준에서 분석하였다.

[0097] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 프로바이오틱스 섭취군에는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 베일로넬라(*Veillonella*), 빌로필라(*Bilophila*) 및 아이센베르지엘라(*Eisenbergiella*)가 상대적으로 많이 존재하는 것을 알 수 있었다. 위약 섭취군에서는 클로스트리디움강(*Clostridiale*), 파라프레보텔라(*Paraprevotella*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 코프로코커스(*Coprococcus*), 에스케리치아/시겔라(*Escherichia/Shigella*) 및 슈도모나스(*Pseudomonas*) 등이 상대적으로 많이 존재하였다. 또한, 프로바이오틱스 섭취군과 비교하여 위약 섭취군에는 유해성을 나타낼 수 있는 푸소박테리움(*Fusobacterium*), 파라프레보텔라, 슈도모나스, 에스케리치아/시겔라와 클로스트리디움(*Clostridium*)이 속하는 클로스트리디움 강 등이 상대적으로 많으므로 프로바이오틱스 섭취에 의하여 유해균의 비율을 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0099] **8. 장내 군총 군주의 증감 여부 확인**

[0100] 수술 전후 및 프로바이오틱스 섭취 여부에 따라 군주의 조성이 다양하게 변하므로, 각 미생물 속별로 수술 전후 및 프로바이오틱스 섭취 여부에 따른 리드(reads) 수에 대하여 통계적으로 비교하였다.

[0101] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 프리보텔라, 코프로코커스, 파라프리보텔라, 패칼리박테리움(*Faecalibacterium*) 및 카테니박테리움(*Catenibacterium*) 속 등은 수술 전의 군주 수보다 수술 후의 군주 수가 감소하는 것을 알 수 있었다. 특히 프리보텔라, 일부 패칼리박테리움과 코프로코커스는 대장암과 직접적인 관계를 갖는 군주로 알려져 있으며, 수술에 의하여 군총 수가 감소하는 것으로 나타났다.

[0102] 슈도부티리비브리오(*Pseudobutyrvibrio*), 펩토스트렙토코커스(*Peptostreptococcus*), 파스코락토박테리움(*Phascolarctobacterium*) 속은 수술 전보다 수술 후의 군주가 감소하면서, 프로바이오틱스 섭취군에서 군주 수가 현저하게 감소하는 군주로 나타났다. 따라서 섭취한 프로바이오틱스에 의하여 이들의 비율이 낮아졌을 가능성이 있다.

[0103] 또한, 도 14에 나타난 바와 같이 푸소박테리움(*Fusobacterium*), 서브돌리그라눌럼(*Subdoligranulum*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 루미노코커스(*Ruminococcus*), 알리스티페스(*Alistipes*) 속의 경우 위약 섭취군에서는 군총 비율이 증가하는 추세를 보이나, 프로바이오틱스 섭취군에서는 군총 비율이 감소하는 것을 알 수 있었다. 푸소박테리움과 서브돌리그라눌럼은 대장암과 직접적인 연관이 있는 군주임에도 불구하고, 프로바이오틱스 섭취에 의하여 감소하므로 대장암에 대한 예방 가능성을 확인할 수 있었다.

[0104] 또한, 도 15에 나타난 바와 같이 유익균으로 알려진 베일로넬라와 비피도박테리움 속이 프로바이오틱스 섭취군에서 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 비피도박테리움의 경우 섭취한 프로바이오틱스인 HY8002 군주 뿐만 아니라 다른 비피도박테리움을 지정(assignment)하는 OTU가 모두 증가하는 것을 알 수 있었다.

[0105] 또한, 도 16에 나타난 바와 같이 프로바이오틱스 섭취에 의하여 에스케리치아/시겔라, 홀더마넬라(*Holdemanelle*), 락토바실러스(*Lactobacillus*) 및 라크로클로스트리디움(*Lachnoclostridium*)의 균주 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 에스케리치아/시겔라의 경우 수술 후 프로바이오틱스 섭취에 의해 증가하는 것으로 보이나, 위약 섭취군보다는 균주 수가 감소하였다.

[0107] 9. 혈액 내 면역/염증 지표 및 장누수 지표 분석

[0108] 대장암 수술 후 위약 섭취군과 비교하여 프로바이오틱스 섭취군에서 급성 염증반응에 관여하는 호중구가 유의적으로 감소하고, 체액성 면역에 관여하는 림프구는 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한, 대장암 수술 후의 프로바이오틱스 섭취군에서는 장누수 지표인 조놀린(zonulin)이 위약 섭취군에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 항 종양성 물질인 인터페론-감마는 수술 후의 프로바이오틱스 섭취군에서 증가하였고, 항 염증성 사이토카인인 IL-10 또한 유의적으로 증가하였다.

[0109] 구체적인 측정 결과를 표 1에 기재하였다.

표 1

위약 섭취군										
	WBC	Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Plt count	NLR	Zonulin	IFN-γ	TNF-α	IL-10
V2(수술 전)	6.89	58.37	31.58	7.29	256.63	2.15	3.38	23.97	17.25	37.68
V6(수술 후)	6.76	57.47	31.94	6.72	323.00	1.99	2.99	22.39	15.14	38.37
변화량	-0.13	-0.90	0.36	-0.58	66.37	-0.15	-0.40	-1.58	-2.11	0.69
t-test	0.7283	0.6797	0.8529	0.2435	0.0017	0.4090	0.4223	0.6073	0.3663	0.8646

프로바이오틱스 섭취군										
	WBC	Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Plt count	NLR	Zonulin	IFN-γ	TNF-α	IL-10
V2(수술 전)	6.23	58.71	31.83	6.93	255.71	2.04	4.73	11.73	13.90	21.57
V6(수술 후)	5.73	52.40	34.94	6.79	315.71	1.63	2.10	13.85	13.58	27.72
변화량	-0.50	-6.31	3.11	-0.15	60.00	-0.41	-2.62	2.12	-0.32	6.15
t-test	0.1171	0.0027	0.0764	0.7491	0.0000	0.0299	0.0117	0.0077	0.5338	0.0002

[0110]

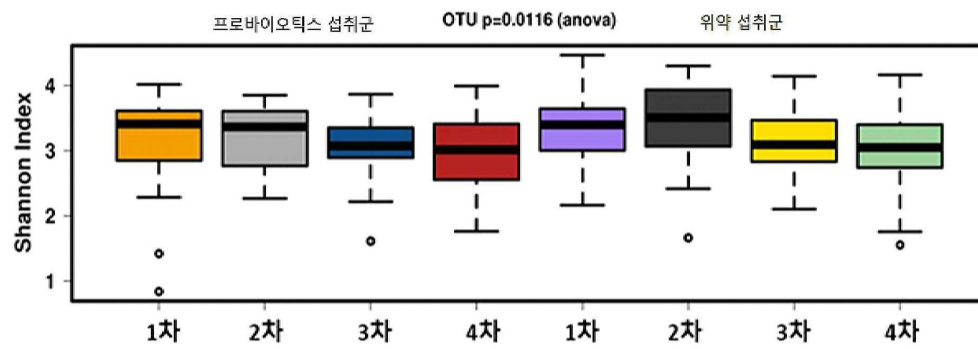
[0112] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

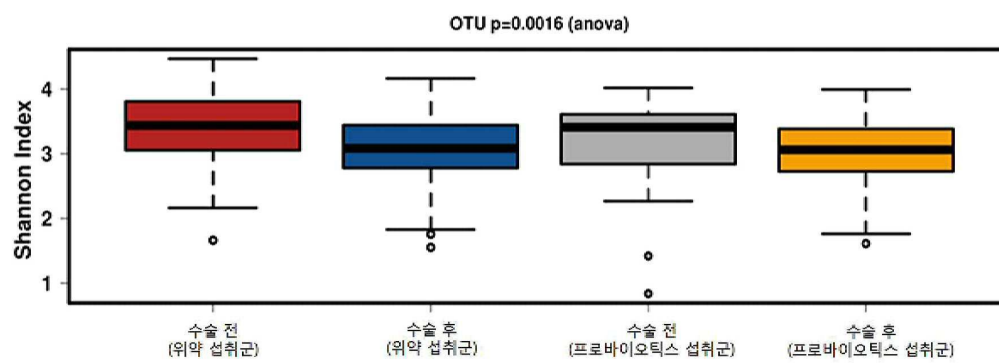
도면1



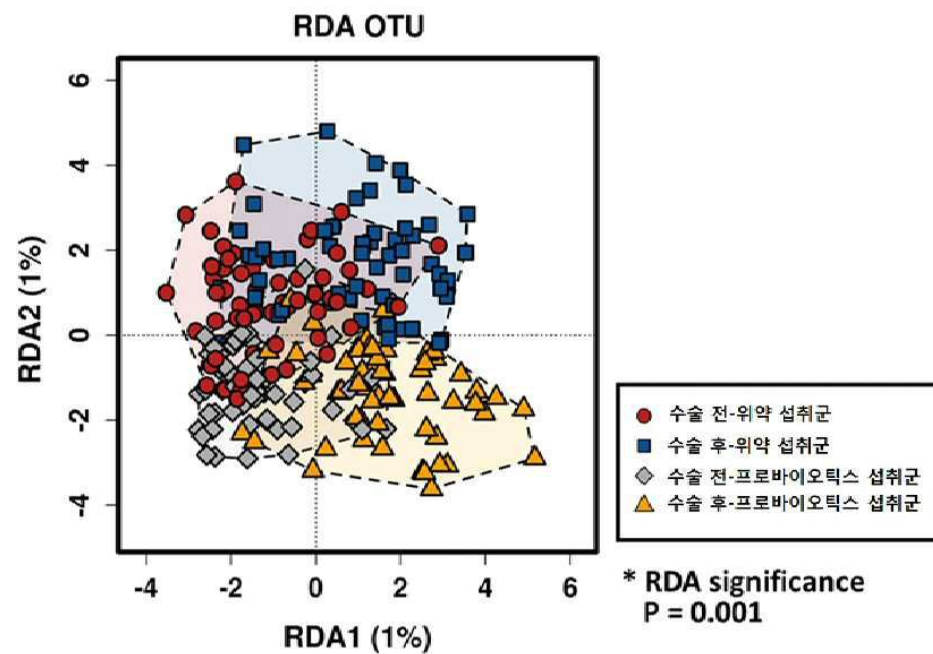
도면2



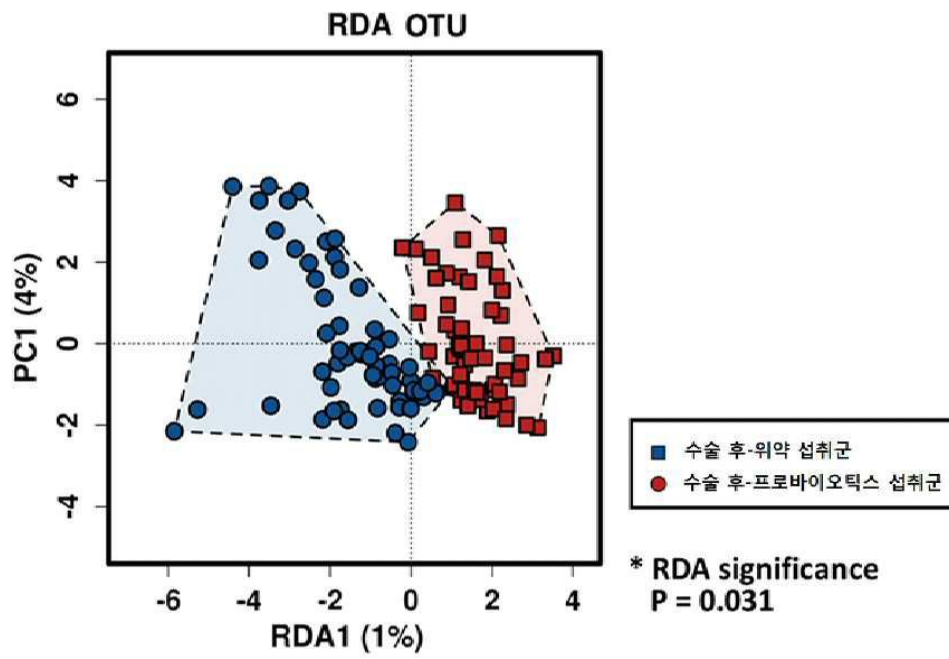
도면3



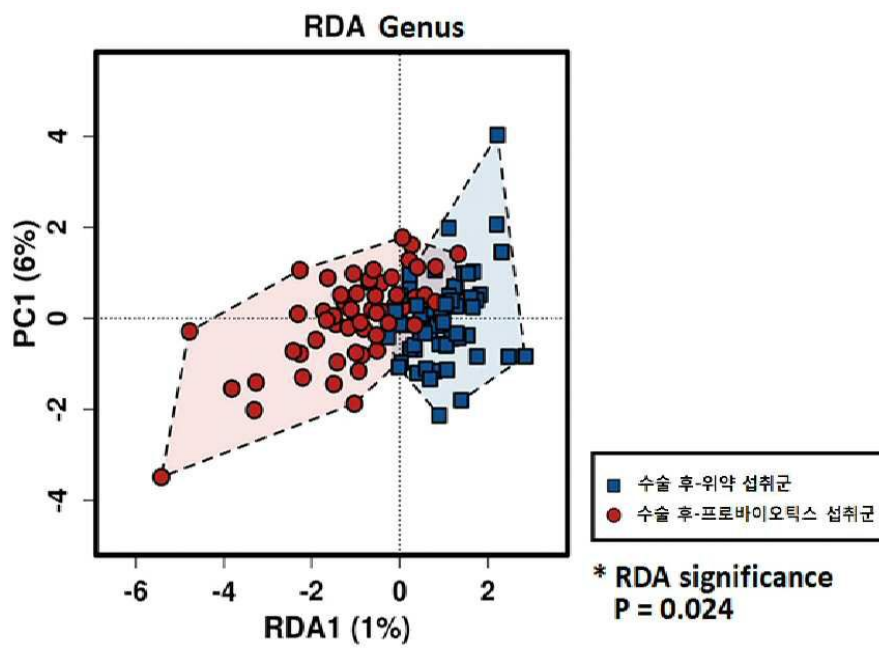
도면4



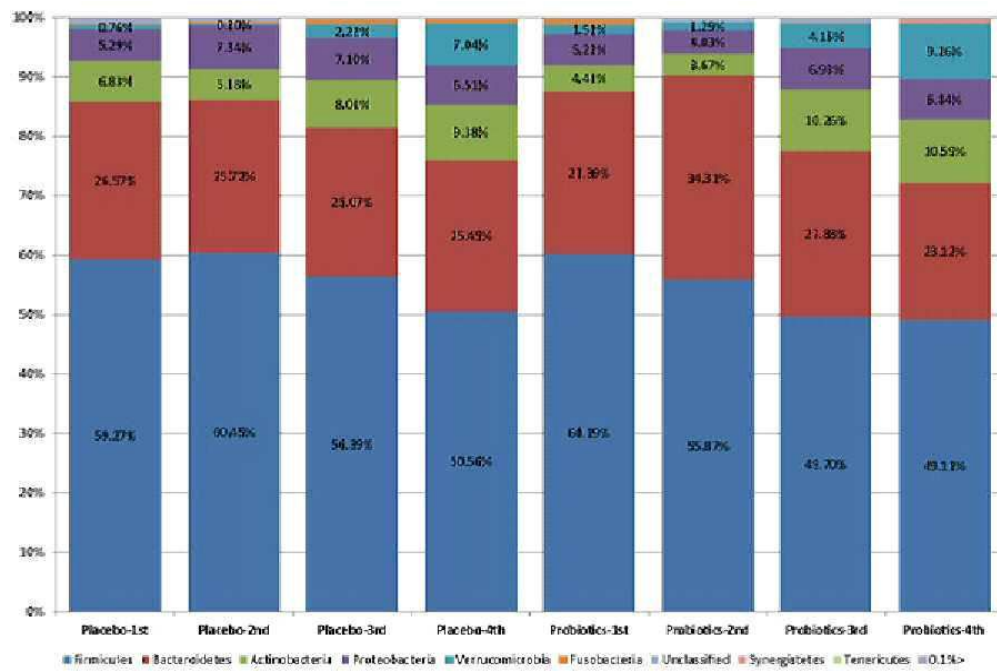
도면5



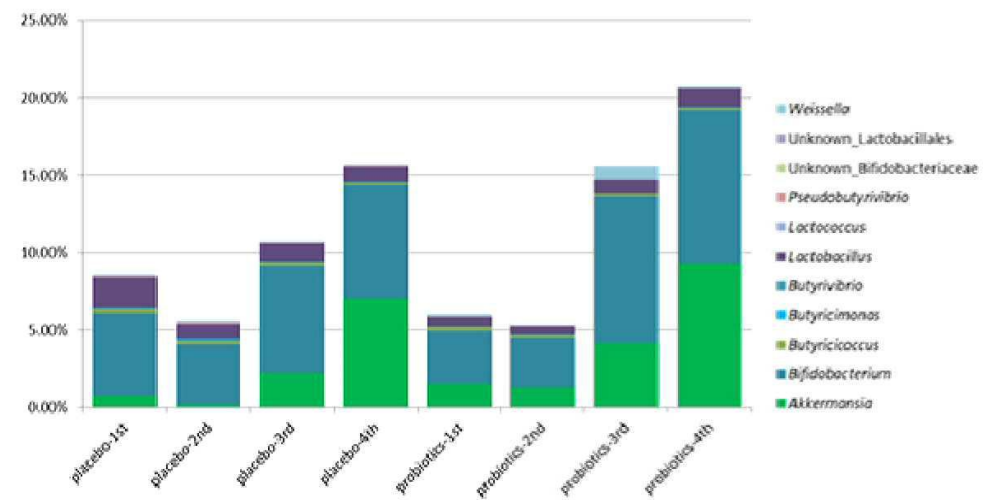
도면6



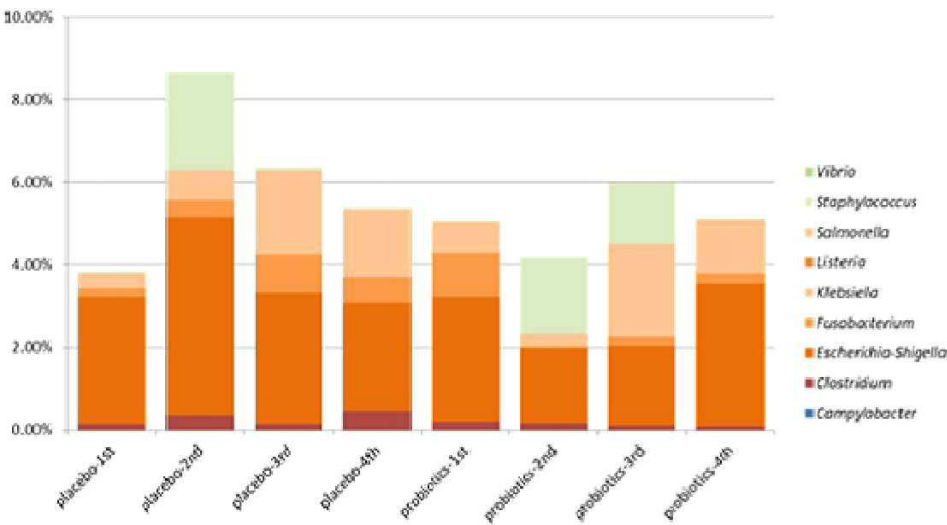
도면7



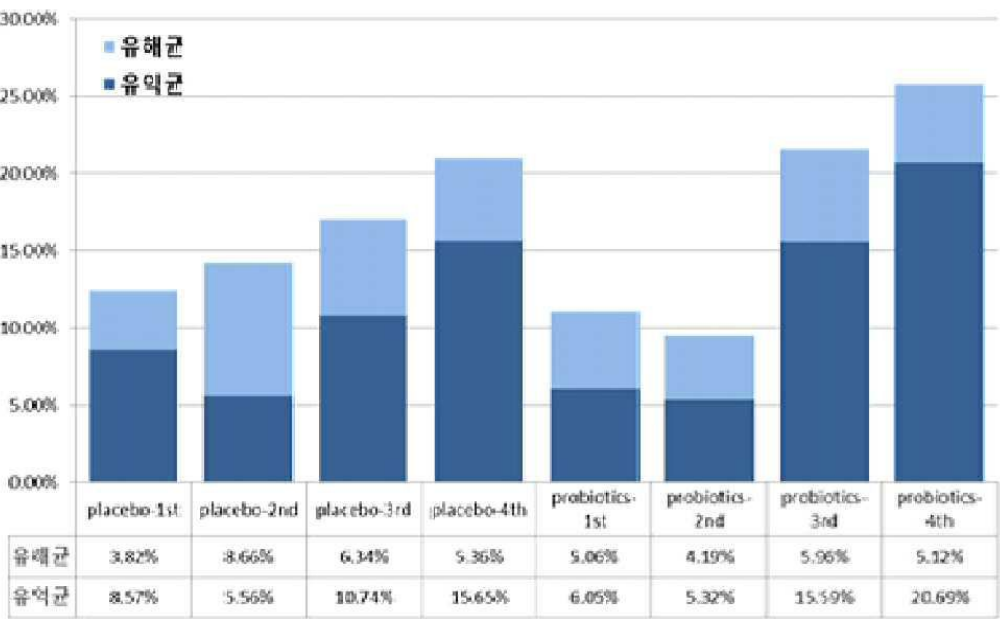
도면8



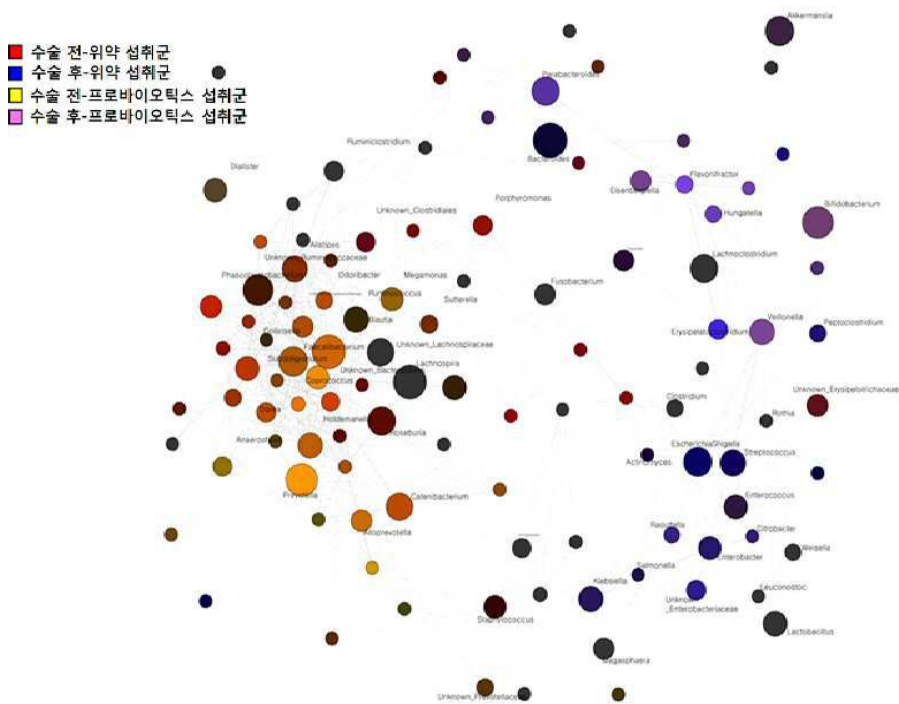
도면9



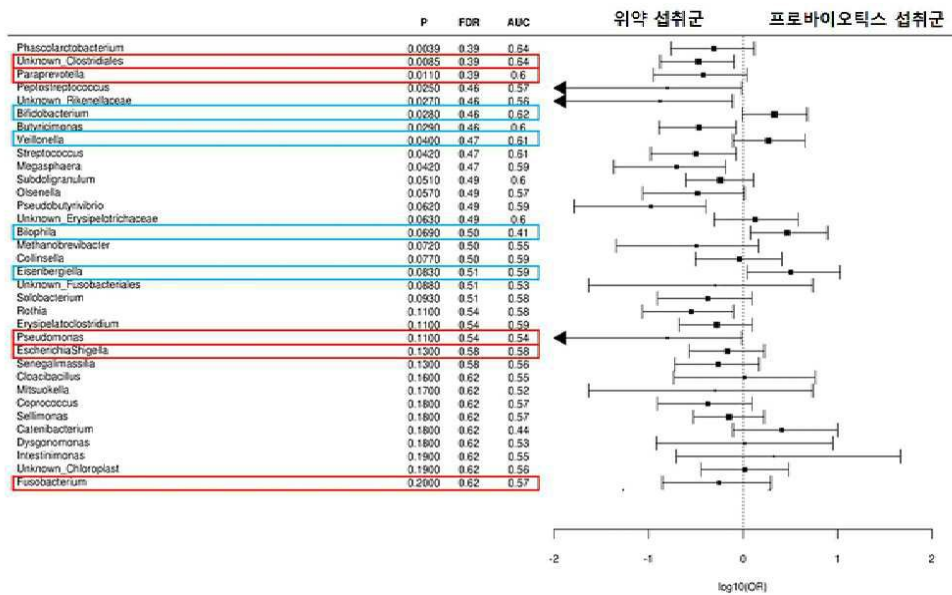
도면10



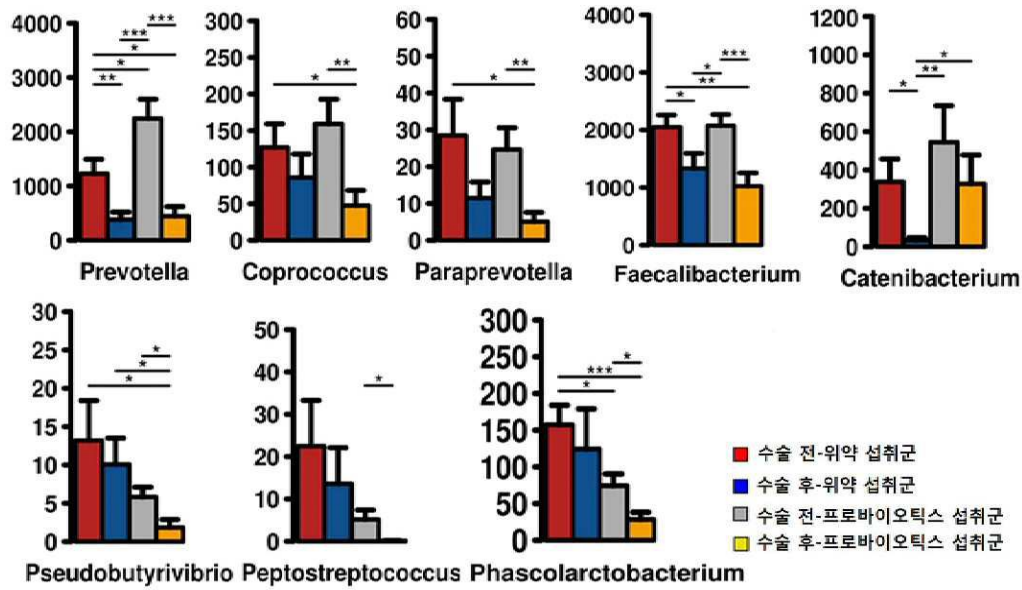
도면11



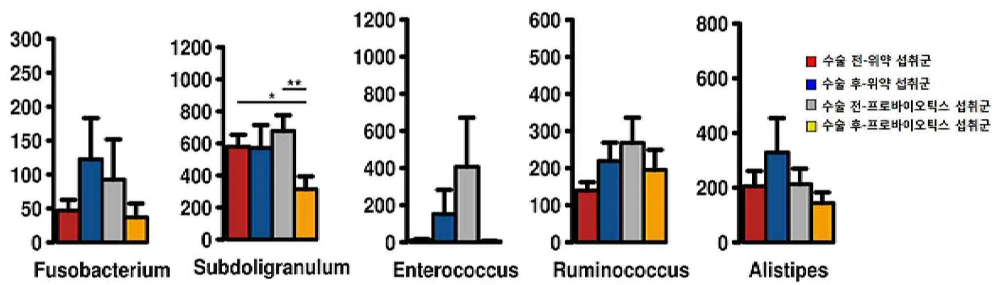
도면12



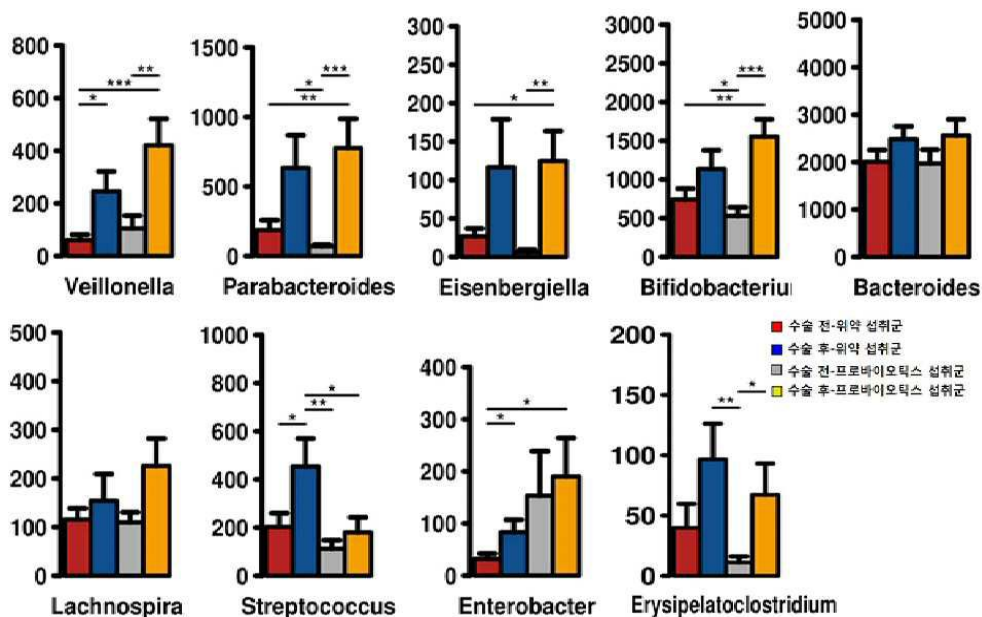
도면13



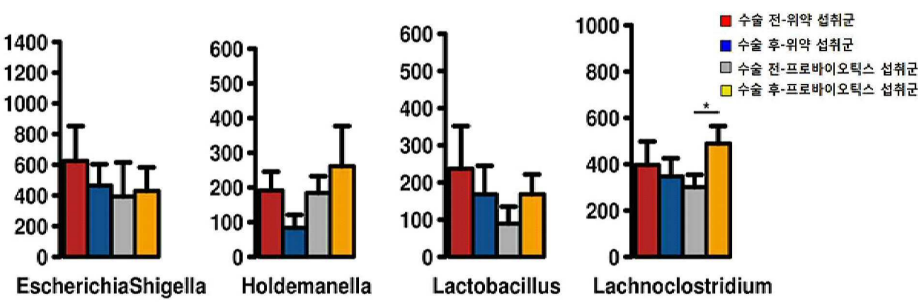
도면14



도면15



도면16



서열 목록

<110>	<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	805R primer for targeting V3-V4 sequence of 16s rRNA		
<400>	2		
gactachvgg gtmtctaadc c			21
<120>	Probiotics Composition for Improving Intestinal Microbial Flora		
<130>	PN180148		
<150>	10-2018-0068230		
<151>	2018-06-14		
<160>	2		
<170>	Kopatent In 2.0		
<210>	1		
<211>	17		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	341F primer for targeting V3-V4 sequence of 16s rRNA		
<400>	1		
cctacgggng gcwgcag			17
<210>	2		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	805R primer for targeting V3-V4 sequence of 16s rRNA		
<400>	2		
gactachvgg gtmtctaadc c			21