

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0023768

(43) 공개일자 2021년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C12N 1/20* (2006.01) *A61K 35/745* (2014.01)*A61K 8/99* (2017.01) *A61P 29/00* (2006.01)*A61P 3/10* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)*A61Q 19/00* (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*C12N 1/20* (2013.01)*A61K 35/745* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0105441

(22) 출원일자 2020년08월21일

심사청구일자 2020년08월21일

(30) 우선권주장

1020190103632 2019년08월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

용동은

서울특별시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌 A705

윤상선

서울특별시 은평구 백련산로 36, 303동 806호

(74) 대리인

이재영

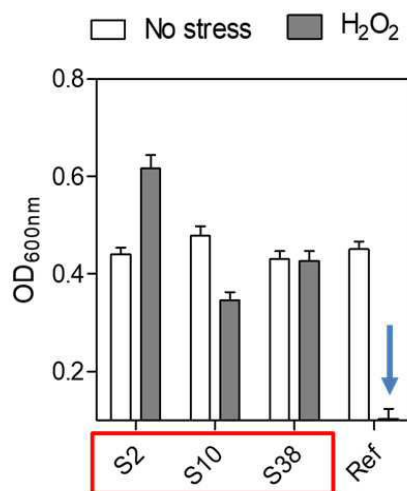
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 활성산소 조건에서 저항능을 가진 신규한 공생 미생물 균주 및 이의 용도

## (57) 요약

본 발명의 신규한 균주는 혐기성 조건 및 과산화수소가 과량으로 포함된 배양 조건에서 내성을 가지므로, 활성산소 조건에서 저항능, 즉 산화스트레스에 대항하는 방어기전을 가진다. 또한, 본 발명의 상기 신규한 균주는 활성산소 조건에서 저항능을 가지므로 목적하는 기관에 존재하는 정상 미생물 균총을 유지할 수 있다. 따라서, 본 발명의 상기 신규한 균주는 활성산소가 존재하는 환경에서 정상 미생물 균총을 유지하거나, 또는 면역활성을 증강시키는 용도로 매우 유용하게 활용될 수 있다.

## 대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 8/99 (2013.01)  
A61P 29/00 (2018.01)  
A61P 3/10 (2018.01)  
A61P 35/00 (2018.01)  
A61Q 19/00 (2013.01)  
C12R 1/01 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1544018734
과제번호	918003042SB010
부처명	농림수산식품부
과제관리(전문)기관명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	농림수산식품기술기획평가원-포스트게놈다부처유 전체사업
연구과제명	감염 억제 및 장 염증 완화 기능 프로바이오틱스 균주 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465030988
과제번호	H14C1324
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	글로벌 의료수요 해결을 위한 전략적 기술통합의 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2014.10.01 ~ 2023.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545018734
과제번호	918003-4
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	농림수산식품기술기획평가원-포스트게놈다부처유 전체사업-포스트게놈다부처유전체 사업
연구과제명	감염 억제 및 장 염증 완화 기능 프로바이오틱스 균주 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 포함되는 균주.

#### 청구항 2

상기 비피도박테리움 속 균주는 비피도박테리움 롱굼(*Bifidobacterium longum*)인 것인, 균주.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 비피도박테리움 롱굼은 수탁번호 KFCC11835P 또는 수탁번호 KFCC11834P로 기탁된 것인, 균주.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주는 활성산소 조건에서 저항능을 갖는 것인, 균주.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 균주는 면역활성 증강능을 갖는 것인, 균주.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 균주의 배양물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 균주의 배양물로부터 상기 균주가 제거된 배양액.

#### 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 균주의 배양물 또는 배양액의 추출물.

#### 청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 균주를 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물.

#### 청구항 10

제6항의 배양물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물.

#### 청구항 11

제7항의 배양액을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물.

#### 청구항 12

제8항의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물.

#### 청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 균주를 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 활성산소 조건에서 저항능을 가지는 신규한 공생 미생물 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 활성산소(Reactive oxygen species; ROS) 또는 활성산소종은 산소 원자를 포함한 화학적으로 반응성이 있는 분자를 의미한다. 상기 활성산소는 생물체내에서 생성되는 산소의 화합물로서, 과산화 이온과 과산화수소를 포함하고 짝지어지지 않은 전자를 가지고 있기 때문에 반응성이 매우 높아 생체 조직을 공격하고 세포를 손상시킬 수 있는 산화력이 매우 강력한 산소에 해당한다. 이와 같은 활성산소는 정상적인 대사과정에서도 발생할 수 있으며, 세포신호와 항상성을 조절하는데 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 그러나, 활성산소의 농도는 자외선이나 높은 열에 노출되는 것처럼 환경적인 스트레스로서 개체 내에서 급증할 위험이 존재하며, 이에 따라 세포 구조를 손상시켜 다양한 질환이 야기되도록 할 수 있다.

[0003] 화학적으로 산화스트레스가 존재하는 경우 활성산소의 생산량이 증가하거나, 글루타치온과 같은 항산화 방어 효과가 유의미한 수준으로 감소된다. 산화스트레스의 효과는 이러한 변화의 크기에 따라 달라질 수 있으며, 교란 수준이 적으면 세포는 스스로 이러한 상태를 극복하고 원상태로 돌아갈 수 있다. 그러나, 산화스트레스에 의한 교란 수준이 심각한 경우에는 세포 사멸이 발생할 수 있고, 심지어 산화스트레스가 보통 수준인 경우에도 세포 자살이 촉발될 수 있다. 상기 산화스트레스에 의해 발생된 활성산소는 개체에 존재하는 DNA에 직접적인 손상을 입힐 수 있고, 이에 따라 노화, 당뇨병, 고지혈증, 비만, 대장암, 류머티즘 또는 천식 등의 다양한 질환이 유발될 수 있다.

[0004] 한편, 장내 미생물은 숙주의 상피 보호벽상에서 공생하고 있는 균주와 다양한 미생물들로 구성되어 있고, 이렇게 공생중인 균주들은 개체의 건강 유지 및 생존에 있어, 신체 전반적으로는 대사, 염증, 면역, 혈액 생산 등의 생리 기능에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 공생 미생물 군총(공생미생물들의 총합)은 다양한 종(species)으로 구성되어 있으며, 다양한 유전자들(마이크로바이옴, microbiome)을 가지고 있어 외부 자극 및 미세한 환경 변화에 대응하며 인체와 매우 다이내믹(dynamic)한 상호작용을 한다. 정상 공생 미생물 군총을 가지고 있는 건강한 인체는 병원성 세균이 장내에 감염되면 다양한 항균 작용을 통해 병원균의 침입을 이겨낼 수 있다. 반면 광범위 항생제를 지속적으로 복용하거나, 또는 산화스트레스 조건 등에 노출되면 병원성 세균에 대한 면역 시스템이 정상적으로 작동하지 않는다고 알려져 있다.

[0005] 이에, 공생 미생물 군총을 유지하고, 산화스트레스 조건에서도 살아남을 수 있는 활성산소 조건에서 저항능을 가지며, 나아가 개체의 면역 반응을 증진시킬 수 있는 신규한 균주에 대한 연구가 필요한 실정이다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 활성산소 조건에서 저항능을 갖는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 포함되는 신규한 균주, 이의 배양액, 배양물 또는 그로부터 얻어진 추출물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 균주, 이의 배양액, 배양물 또는 그로부터 얻어진 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규한 균주, 이의 배양액, 배양물 또는 그로부터 얻어진 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역활성 증강 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 구현 예에서는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 포함되는 균주를 제공한다.

[0011] 본 발명의 상기 비피도박테리움 속 균주는 비피도박테리움 롱구(*Bifidobacterium longum*)인 것일 수 있다.

- [0012] 본 발명의 상기 비피도박테리움 룡균은 수탁번호 KFCC11835P(*Bifidobacterium longum* YMC\_19\_03\_38) 또는 수탁번호 KFCC11834P(*Bifidobacterium longum* YMC\_19\_03\_2)로 기탁된 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 상기 비피도박테리움 속에 포함되는 균주는 건강한 사람의 대변으로부터 얻은 균주 중에서, 혐기성 조건과 과산화수소가 과량으로 포함된 배양 환경에서 내성을 갖는 균주만 선별 분리된 것으로서, 통상의 방법에 따라 전체 게놈 서열 및 16s rRNA 유전자의 염기 서열을 이용한 계통 분석을 통해 선별된 균주가 비피도박테리움 속에 속하는 것을 확인하였다. 나아가, 상기 기탁된 두개의 균주(YMC\_19\_03\_38 및 YMC\_19\_03\_2)에 대해 각각 유전체 서열을 분석한 결과, 신규한 유전체 서열을 함유한 비피도박테리움 속에 속하는 미생물임을 다시 한번 확인하였다.
- [0014] 본 발명의 상기 균주는 활성산소 조건에서 저항능을 갖는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 상기 "활성산소 조건에서 저항능"은 산소호흡을 하는 모든 생물에서 에너지 생산을 위한 전자전달과정에서 부득이하게 발생되거나, 또는 감염 등에 의한 염증 반응에 의해 발생하는 활성산소가 존재하는 환경, 즉 산화스트레스 환경에서 사멸되지 않고 살아남을 수 있는 능력을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 신규한 균주는 혐기성 조건 및 과산화수소가 과량으로 포함된 배양 조건에서 내성을 가지므로, 활성산소 조건에서 저항능, 즉 산화스트레스에 대항하는 방어기전(산화스트레스에 대한 저항성)을 가지고 있을 수 있다. 나아가, 본 발명의 상기 신규한 균주는 활성산소 조건에서 저항능을 가지므로 목적하는 기관에 존재하는 정상 미생물 균총을 유지할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 상기 균주는 면역활성 증강능을 갖는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 상기 "면역활성 증강"은 면역반응을 조절하여 생체방어 능력을 증강시키는 것을 의미한다. 이와 같은 면역활성 증강은 다양한 질환에 대해 신체 방어 기전을 보강하는 중요한 치료, 예방학적 전략 중 하나로서, 면역세포의 활성을 증가시켜 면역반응을 자극하여 면역활성 증강 효과를 얻을 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 균주는 면역활성 증진 기능을 가질 수 있고, 예를 들면 선천 면역 반응을 매개 및 조절하는 사이토카인인 인터루킨-1(Interleukin-1; IL-1)의 발현 수준을 증가시켜 감염 및 다른 자극에 대한 숙주의 염증반응을 매개하여 면역활성을 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현 예에서는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 포함되는 균주의 배양물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 상기 배양물에서 상기 비피도박테리움 속 균주는 상기 균주에서 기재한 바와 동일하여 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0021] 본 발명의 상기 "배양물"은 미생물을 공지의 액체 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하며, 미생물이 포함되어 있는 배지를 의미한다.
- [0022] 본 발명의 상기 배양물은 본 발명의 상기 균주를 배지에서 배양시킨 후, 얻어지는 것으로서, 상기 배지는 비피도박테리움 속 균주의 배양에서 사용되는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들면, GYSM 배지, 흙산 한천 배지(Humic acid agar medium), 베넷트 한천 배지(Bennett's agar medium) 또는 맥아 추출 한천 배지(Malt extract agar medium)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 포함되는 균주의 배양물로부터 상기 균주가 제거된 배양액을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 상기 배양액에서 상기 비피도박테리움 속 균주 또는 배양물은 상기 균주 또는 배양물에서 기재한 바와 동일하여 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0026] 본 발명의 상기 "배양액"은 미생물을 공지의 액체 또는 고체 배지에서 배양하여 얻은 산물을 의미하며, 미생물이 포함되지 않은 개념이다.
- [0027] 본 발명의 상기 배양액은 소정의 균주를 액체 배지에서 배양한 뒤에 여과 또는 원심분리와 같은 방법을 통해 균주 자체가 제거된 액상의 산물을 의미한다.
- [0028] 본 발명의 상기 여과 방법은 특별히 제한되지 않으며, 상기 여과의 수행 횟수는 예를 들면 1회 내지 10회, 1회 내지 5회, 또는 1회 내지 3회 수행될 수 있다. 또한, 상기 여과 시에 여과지 또는 필터를 사용할 경우, 여과지

의 포어 사이즈는 5 내지 10  $\mu\text{m}$  여과지 또는 포어 사이즈가 0.1 내지 1.0  $\mu\text{m}$ 인 필터를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0030] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 포함되는 균주의 배양물 또는 배양액의 추출물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 상기 추출물에서 상기 비피도박테리움 속 균주, 배양물 또는 배양액은 상기 균주, 배양액 또는 배양물에서 기재한 바와 동일하여 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0032] 본 발명의 상기 추출물은 당업계에서 공지된 통상의 추출 방법, 예를 들면 용매 추출법, 이산화탄소를 이용한 초임계 유체 추출법(supercritical fluid extraction)에 의한 추출, 초음파를 이용한 추출법에 의한 추출, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리 또는 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 또는 이들의 조합 등의 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 용매 추출법에 이용되는 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올(예를 들면, 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올) 또는 이들의 혼합물인 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 다이에틸에테르, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 다이클로로메탄, 클로로포름, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 이중 물, 알코올, 함수 알코올, 다이에틸에테르, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 또는 헥산에서 선택될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 포함되는 균주, 이의 배양물, 배양액 또는 그로부터 얻어진 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 상기 식품 조성물에서 상기 비피도박테리움 속 균주, 배양물, 배양액 또는 추출물은 상기 균주, 배양액, 배양물, 추출물에서 기재한 바와 동일하여 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0037] 본 발명의 상기 식품은 건강기능식품일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 "건강기능식품"은 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 이는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 건강기능식품의 기능은 면역활성 증진 기능일 수 있고, 예를 들면 선천 면역 반응을 매개 및 조절하는 사이토카인인 인터루킨-1(Interleukin-1; IL-1)의 발현 수준을 증가시켜 감염 및 다른 자극에 대한 숙주의 염증반응을 매개하여 면역활성을 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 상기 "면역활성 증강"은 면역반응을 조절하여 생체방어 능력을 증강시키는 것을 의미한다. 이와 같은 면역활성 증강은 다양한 질환에 대해 신체 방어 기전을 보강하는 중요한 치료학적 전략 중 하나로서, 면역세포의 활성을 증가시켜 면역반응을 자극하여 면역활성 증강 효과를 얻을 수 있다.
- [0040] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 상기 균주 등이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 0.001 중량% 내지 90 중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 40 중량%로 포함할 수 있고, 장기간 섭취 용도일 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으나, 유효성분이 안전성 면에서 아무런 문제가 없는 경우에는 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.



- [0043] 본 발명의 상기 식품 조성물에서 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 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.
- [0044] 본 발명의 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 포함되는 균주를 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 상기 생균제 조성물에서 상기 비피도박테리움 속 균주는 상기 균주에서 기재한 바와 동일하여 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0048] 본 발명의 상기 "생균제"는 살아있는 미생물을 이용하여 목적하는 기관의 균총의 균형을 개선할 수 있는 제제를 의미한다.
- [0049] 본 발명의 상기 균주는 개체의 건강 증진을 위한 생균제 조성물로 사용될 수 있고, 이와 같은 생균제 조성물은 본 발명의 상기 비피도박테리움 속에 포함되는 균주 자체 등을 유효성분으로 포함하며, 부형제 또는 담체가 추가로 포함될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 상기 생균제 조성물은 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 신규한 균주 또는 이의 배양물을 약제학적 분야에서 통상적으로 사용하는 담체 및 향료와 혼합하여 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭실, 시럽, 산제, 현탁제 또는 과립제 등의 형태로 제조 및 투여될 수 있다. 담체로는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제 등을 사용할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 면역활성 증강 방법을 제공한다.
- [0053] 본 발명의 상기 방법은 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 포함되는 균주, 이의 배양액, 배양물 또는 그로부터 얻어진 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0054] 본 발명의 상기 방법에서 상기 비피도박테리움 속 균주, 배양물, 배양액 또는 추출물은 상기 균주, 배양액, 배양물 또는 추출물에서 기재한 바와 동일하여 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0055] 본 발명의 상기 "개체"는 면역력이 감소되어 있거나, 또는 면역활성 증진을 필요로 하는 개체로서, 면역활성이 요구되는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물을 의미하나, 본 발명에서 제공하는 상기 균주 등에 의해 면역활성이 증진될 가능성이 있는 개체는 제한 없이 모두 포함될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 상기 방법은 본 발명에서 제공하는 상기 균주, 이의 배양액, 배양물 또는 그로부터 얻어진 추출물을 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 판단범위 내에서 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다. 그러나, 본 발명의 목적상, 특정 개체에 대한 구체적인 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는 여부를 비롯한 구체적인 균주, 배양물, 배양액 또는 이의 추출물, 개체의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 투여 기간, 동시 사용되는 다른 유효성분 등을 고려하여 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

### 발명의 효과

- [0057] 본 발명의 신규한 균주는 혐기성 조건 및 과산화수소가 과량으로 포함된 배양 조건에서 내성을 가지므로, 활성산소 조건에서 저항능, 즉 산화스트레스에 대항하는 방어기전을 가진다. 또한, 본 발명의 상기 신규한 균주는 활성산소 조건에서 저항능을 가지므로 목적하는 기관에 존재하는 정상 미생물 균총을 유지할 수 있다. 따라서, 본 발명의 상기 신규한 균주는 활성산소가 존재하는 환경에서 정상 미생물 균총을 유지하거나, 또는 면역활성을 증강시키는 용도로 매우 유용하게 활용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간 배아줄기세포로부터 혈관망 조직으로의 분화를 유도하는 실험 설계도

를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 중배엽성 세포에 대하여 미분화 줄기세포의 마커인 OCT4와, 중배엽성 세포의 마커인 EOMES, MIXL1 및 BRACHY의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 선별된 균주의 활성산소 포함 배양 배지에서 배양 능력을 확인하기 위하여 OD<sub>600</sub> 값을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4 내지 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 대조군과 비교하여 선별된 균주에서 발현 수준이 변화된 유전자를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

## [0061] 실시예

### [0063] [준비예 1] 세포주의 준비 및 유지

[0064] 이하의 실험에서는 인간 배아 줄기세포를 사용하였고, 배지는 Stemfit 배지로 이틀에 한번 교체하였다. 여기서, 상기 Stemfit 배지로는 b-FGF(20 ng/ml)를 포함하는 것을 사용하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub> 및 37℃의 온도 조건 하에서 배양하였고, 세포를 7일 이내로 계대 배양하였다.

### [0066] [준비예 2] 후장 세포로의 분화 유도

#### [0067] 1. 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화 유도

[0068] 인간 배아 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화를 유도하기 위해 액티빈 A(100 ng/ml) 및 CHIR99021(3 μm)를 첨가한 RPMI1640 배지에 배아줄기세포를 200,000 세포수로 접종한 뒤 배양하며 내배엽성 세포로의 분화를 유도하였다. 분화 기간은 총 3일로, 2일 째에 상기 배지에 FBS를 0.2중량% 첨가하고, 3일 째에 상기 배지에 FBS를 2 중량%의 양으로 첨가하였으며, 1일 째에 보충제로 B27 보충제를 첨가하였다.

#### [0070] 2. 내배엽성 세포로부터 후장(hind gut) 세포의 분화 유도

[0071] 상기 내배엽성 세포로부터 후장 세포의 분화를 유도하기 위하여 FBS 2 중량%, FGF4(500 μg/ml) 및 CHIR99021(3 μM)를 첨가한 DMEM F-12 배지에 상기 내배엽성 세포를 접종한 뒤 4일 동안 분화를 유도하였다. 분화 유도 기간 이 도과하자 스페로이드(spheroids) 형상의 후장 세포가 얻어졌고, 웰당 30개의 스페로이드가 형성되었다.

### [0073] [준비예 3] 혈관망 조직으로의 분화 유도

[0074] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 인간 배아 줄기세포로부터 혈관망 조직으로의 분화를 유도하는 실험 설계도를 나타낸 것으로, 이하의 실험에서는 도 1에 나타난 조건으로 수행하였다.

#### [0076] 1. 중배엽성 세포로의 분화 유도

[0077] 인간 배아 줄기세포로부터 중배엽성 세포로의 분화를 유도하기 위하여, 상기 인간 배아 줄기세포를 12 μM CHIR99021 (Tocris)가 첨가된 DMEM F/12 (KSR20%) 배지에 접종하여 5부피% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 2 일간 배양하였다. 배양 후 얻어진 세포에 대하여, 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 미분화 줄기세포의 마커인 OCT4와, 중배엽성 세포의 마커인 EOMES, MIXL1 및 BRACHY의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과, 도 2에서 보는 바와 같이 상기 세포에



서 미분화 줄기세포의 마커인 OCT4 mRNA 발현 수준은 감소하고, 중배엽성 세포의 마커인 EOMES, MIXL1 및 BRACHY의 mRNA 발현 수준은 증가하였는 바, 중배엽성 세포로의 분화가 유도되었음을 확인할 수 있었다.

표 1

유전자	서열번호	특징	염기서열(5'-3')
OCT4	서열번호 1	정방향	5'-GGGGTTCTATTGGGAAGGTAT-3'
	서열번호 2	역방향	5'-TGTTGTCAGCTTCCTCCACC-3'
EOMES	서열번호 3	정방향	5'-ATCATTACGAAACAGGGCAGGC-3'
	서열번호 4	역방향	5'-CGGGGTGGTATTGTGTAAGG-3'
MIXL1	서열번호 5	정방향	5'-ACGTCCTTCAGCGCCGAACAG-3'
	서열번호 6	역방향	5'-TTGGTTCGGGCAGGCAGTTCA-3'
BRACHY	서열번호 7	정방향	5'-GTGCTGTCCAGGTGGCTTACAGATG-3'
	서열번호 8	역방향	5'-CCTTAACAGCTCAACTCTAACTACTTG-3'

상기 중배엽성 세포로부터 혈관계 세포로의 분화를 유도하기 위하여, 상기 중배엽성 세포로의 분화 배지에 BMP4 30 ng/ml, VEGFA 30 ng/ml 및 FGF-4 30 ng/ml를 처리한 뒤 5부피% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 6 일간 배양하였다. 배양 7 일 후에 배양 배지를 VEGFA 30 ng/ml, FGF-4 30 ng/ml 및 SB43152 10 μM를 포함하는 DMEM:F12 배지로 교체해 주고 5부피% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 2 일간 배양하였다.

## 2. 혈관망 조직의 형성

상기 혈관계 세포로부터 혈관망 조직을 형성하기 위하여, 혈관계 세포 집합체를 마트리젤과 콜라겐 I이 1:1의 부피로 혼합된 겔에 끼워 넣은 뒤 15% FBS (Gibco), 100 ng/ml VEGFA 및 100 ng/ml FGF-4를 포함하는 DMEM:F12 배지를 덮고 6 일간 배양하였고, 배양 시 2 내지 3 일 마다 신선한 배지로 교체해 주었다. 그 결과, 4일째에는 중배엽성 세포로 분화가 완료된 것을 볼 수 있고, 7일째에는 혈관계 세포로 분화가 유도되는 것을 확인할 수 있으며, 10일째에는 혈관망 조직이 형성되었다.

### [준비예 4] 혈관 조직을 포함하는 장관 오가노이드의 제작

이하의 실험에서는 도 1에 나타난 조건으로 수행하였다.

## 1. 후장 세포와 혈관망 조직의 공배양을 통한 장관 오가노이드의 분화 유도

상기 준비예 2에서 얻어진 후장 세포와 상기 준비예 3에서 얻어진 혈관망 조직을 BMP4 30 ng/ml, 12 μM CHIR99021, EGF 100 ng/ml, VEGFA 30 ng/ml 및 FGF-4 30 ng/ml가 첨가된 DMEM F/12 (KSR20%)에서 12 일 동안 3차원 공배양 하여 혈관 조직을 포함하는 장관 오가노이드의 분화를 유도하였다.

## 2. 장관 오가노이드의 성숙

상기와 같이 분화 유도된 장관 오가노이드를 마트리젤(Matrigel)을 이용하여 BMP4 30 ng/ml, 12 μM CHIR99021, EGF 100 ng/ml, VEGFA 30 ng/ml 및 FGF-4 30 ng/ml가 첨가된 DMEM F/12 (KSR20%)에서 5 일간 계대 배양하여 성숙시켰다. 후장 세포와 혈관망 조직의 공배양 개시 후 20일 후에 장관 오가노이드가 형성되었다.

### [실시예 1] 균주의 선별

균주를 얻기 위한 대변(Stool) 시료를 식염수를 이용하여 10<sup>-1</sup> 내지 10<sup>-10</sup> 배로 희석하였다. 상기 희석된 시료 중에서 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-10</sup> 배 희석된 시료를 2 mM의 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 포함된 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속

균주 특이적 배양 배지가 포함되어 있는 페트리 디스크에 각각 스프레딩하고, 37℃의 혐기성 조건에서 16시간 내지 18시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 페트리 디스크에 생성된 콜로니(Colony)인 8종의 균주를 선별하고(하기 표 2), 이를 이하 실시예에 사용하기 전까지 스킵 밀크에 넣고 -20℃에 보관하였다.

표 2

구분	박테리아 명칭
S2	<i>Bifidobacterium longum</i>
S10	<i>Bifidobacterium longum</i>
S38	<i>Bifidobacterium longum</i>

#### [실시예 2] 선별된 균주의 활성산소가 포함된 배지에서 배양 능력 확인

상기 실시예 1에 기재된 배양 배지와 동일한 성분을 포함하도록 액체 배양 배지에, 상기 실시예 1에서 선별된 8종의 균주를 각각 분주하고 37℃의 혐기성 조건에서 24시간 동안 배양한 뒤 OD<sub>600</sub> 값을 확인하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 여기서, 대조군으로는 레퍼런스 균주인 비피도박테리움 롱구(*Bifidobacterium longum*; Ref) 및 전형적 대장균(Typical *E.Coli*; tEc)를 사용하였다.

도 3에서 보는 바와 같이, 레퍼런스 균주(Ref)의 경우에는 과산화수소가 포함된 조건에서 OD<sub>600</sub> 값이 0인 반면, S2, S10 및 S38는 2 mM의 과산화수소가 포함된 조건에서 OD<sub>600</sub> 값이 0.4 내지 0.6인 것을 확인하였다.

상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 S2(수탁번호: KFCC11834P(*Bifidobacterium longum* YMC\_19\_03\_2)), S10 및 S38(수탁번호: KFCC11835P(*Bifidobacterium longum* YMC\_19\_03\_38))은 종래의 비피도박테리움 롱구과는 전혀 다른 활성산소 조건에 저항능을 갖는 신규한 균주임을 알 수 있다.

#### [실시예 3] 장관 오가노이드에서 신규한 균주의 효과 확인

본 발명의 상기 준비예 4에서 제조한 장관 오가노이드에 마이크로 인젝터(Micro Injector)를 사용하여 상기 실시예 2의 S2(Mac 0.5, 0.5  $\mu$ l) 또는 물(대조군)을 주입하고 3일 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 장관 오가노이드로부터 통상의 방법에 따라 RNA를 추출한 뒤, RNA 시퀀싱을 수행하고 분석 프로그램을 사용하여 대조군과 비교하여 RNA 발현 수준의 차이가 있는 유전자를 동정하고, 유전자 세트 농축 분석(Gene set enrichment analysis; GSEA) 소프트웨어(ver 4.0.3)를 사용하여 유전자 세트를 분석하고, 그 결과를 도 4 내지 도 7에 나타내었다.

도 4 내지 도 7에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 S2 균주를 투여한 경우에는 인터페론-1을 암호화하는 유전자의 발현 수준이 현저하게 증가되었으며(도 4 및 도 5), B 세포 수용체 코어 유전자(B cell receptor core genes)의 발현 수준이 현저하게 증가되었다(도 6 및 도 7).

상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 신규한 균주는 인터페론-1을 암호화하는 유전자 및 B 세포 수용체 코어 유전자의 발현 수준을 증가시킴으로써 활성산소에 저항성을 부여할 수 있을 뿐만 아니라, 면역반응을 활성화시켜 개체의 면역을 매우 효과적으로 증강시킬 수 있는 것을 알 수 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

#### 수탁번호

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11835P

수탁일자 : 20190806

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11834P

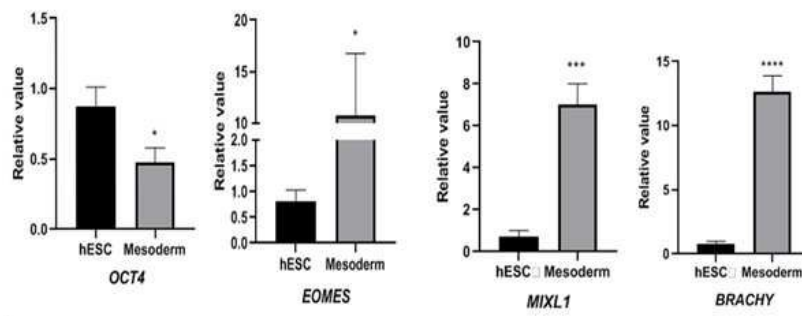
수탁일자 : 20190806

## 도면

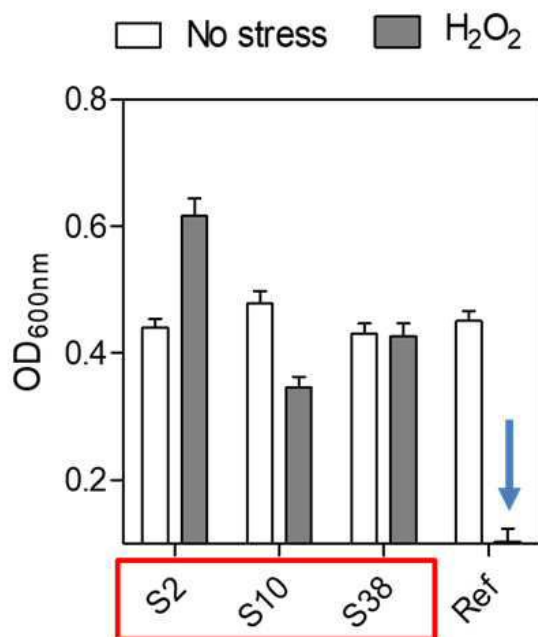
### 도면1

Day	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17
Factors	CHIR-99021		BMP4 VEGF-A FGF4		SB VEGF-A FGF4		15% PBS VEGF-A FGF4		3D Co-culture (blind gut)
Stage	Mesoderm	Vascular lineage Promotion			Vascular Networks				
DMEM F/12 Media + Knock out Serum Replacement 20%									
Day	D17	D19	D21	D23	D27	D29	D31	D33	D ...
Factors			BMP4 EGF CHIR-99021 VEGF-A FGF4				matrigel BMP4 EGF CHIR-99021 VEGF-A FGF4		
Stage	Contact of the colon with Vascular				Subculture and Long-term culture				
DMEM F/12 Media + Knock out Serum Replacement 20%									

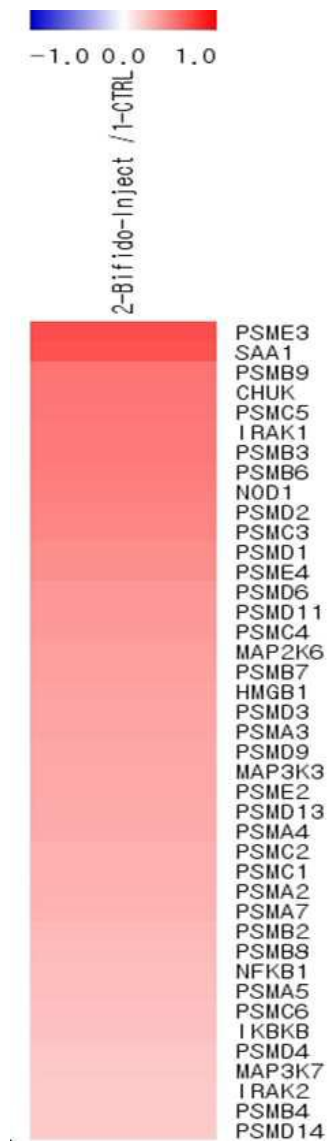
도면2



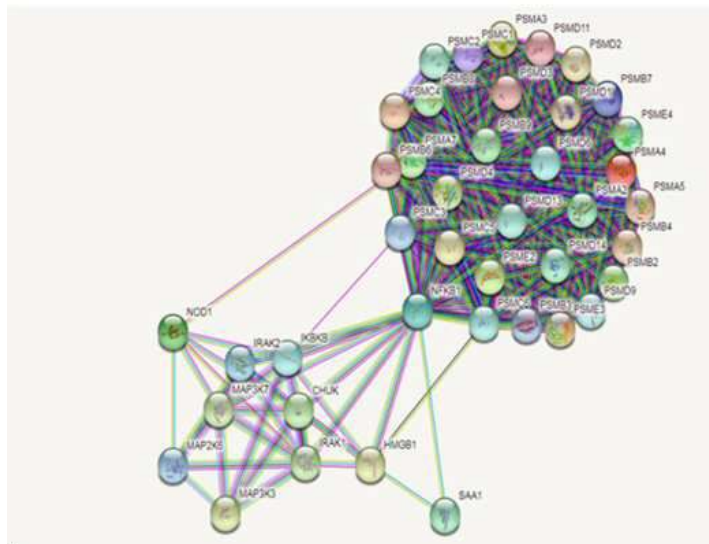
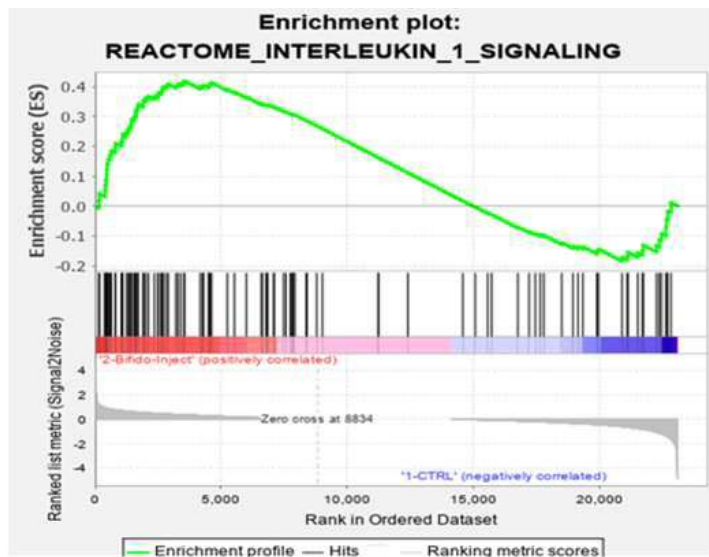
도면3



도면4

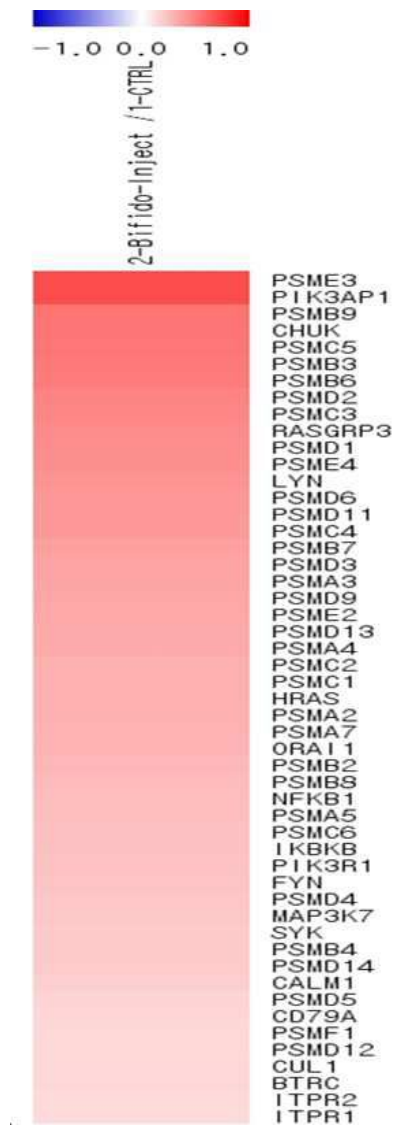


도면5

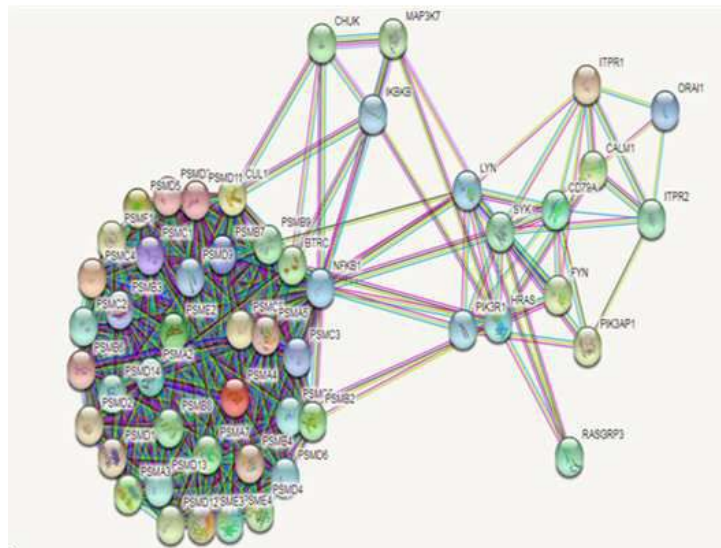
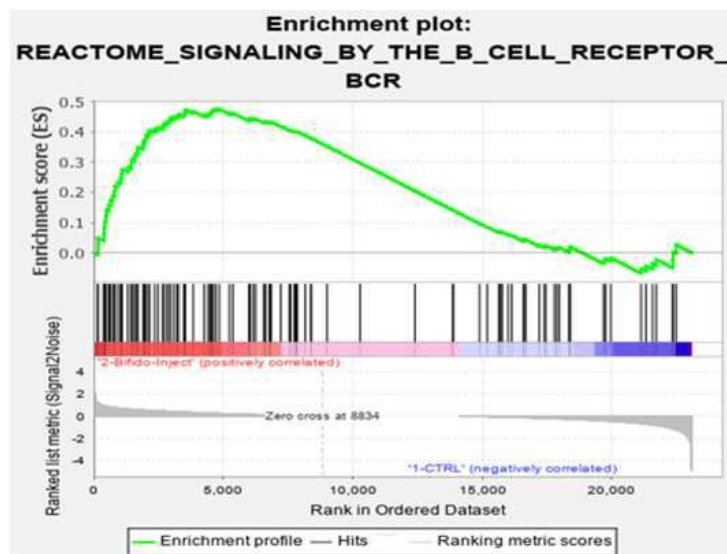




도면6



## 도면7



## 서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A new symbiotic bacteria having ability to resistance under reactive oxygen species conditions and use thereof
- <130> PDPB194076k01
- <150> KR 10-2019-0103632
- <151> 2019-08-23
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OCT4 forward primer

<400> 1

ggggttctat ttgggaaggt at 22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OCT4 reverse primer

<400> 2

tgttgtagc ttcctccacc 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EOMES forward primer

<400> 3

atcattacga aacagggcag gc 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EOMES reverse primer

<400> 4

cggggttggt atttgttaa gg 22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MIXL1 forward primer

<400> 5

acgtctttca ggcgcgaaca g 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MIXL1 reverse primer

<400> 6

ttggttcggg caggcagttc a 21

<210> 7

<211>

> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BRACHY forward primer

<400> 7

gtgctgtccc aggtggctta cagatg 26

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BRACHY reverse primer

<400> 8

ccttaacagc tcaactctaa ctacttg 27