

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2022-0164034
(43) 공개일자 2022년12월12일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/135 (2016.01) A23C 9/123 (2017.01)
C12N 1/20 (2006.01) C12Q 1/02 (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A23C 9/123 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7038529</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년04월07일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년11월03일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/014696</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/206106
국제공개일자 2021년10월14일</p> <p>(30) 우선권주장
JP-P-2020-069719 2020년04월08일 일본(JP)
JP-P-2020-158770 2020년09월23일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인
유키지루시 메그밀크 가부시기가이샤
일본 홋카이도 삿포르시 히가시쿠 나에보초 6-1-1</p> <p>(72) 발명자
가다, 시게키
일본 0650043 홋카이도 삿포르시 히가시쿠 나에보초 6초메 1방 1고 유키지루시 메그밀크 가부시기가이샤 내
츠카하라, 다쿠야
일본 0650043 홋카이도 삿포르시 히가시쿠 나에보초 6초메 1방 1고 유키지루시 메그밀크 가부시기가이샤 내
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 신수범, 이석재</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 장내 세균총 개선용 조성물**(57) 요약**

본원 발명은, 장내 세균총 개선 기능을 갖는 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로서 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것을 과제로 한다. 또 다른 본원 발명은, 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제 및 비피더스균 증식 촉진제를 제공하는 것을 과제로 한다. 본원 발명은, 락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 장내 세균총 개선용 조성물을 제공한다. 또 다른 본원 발명은, 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 인간 장내에서의 비피더스균 비율의 증가제 및 비피더스균 증식 촉진제를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)
C12Q 1/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23Y 2220/00 (2013.01)
A23Y 2240/00 (2013.01)
A23Y 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

기무라, 아키라

일본 0650043 홋카이도 삿포로시 히가시쿠 나에보
쵸 6쵸메 1방 1고 유키지루시 메그밀크 가부시키가
이샤 내

오가와, 나나

일본 0650043 홋카이도 삿포로시 히가시쿠 나에보
쵸 6쵸메 1방 1고 유키지루시 메그밀크 가부시키가
이샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 장내 세균총 개선용 조성물.

청구항 2

락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 장내 세균총 개선용 식품.

청구항 3

락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물.

청구항 4

락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 단쇄 지방산 증가 촉진용 식품.

청구항 5

락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 장내 세균의 다양성 증가 촉진용 조성물.

청구항 6

락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 장내 세균의 다양성 증가 촉진용 식품.

청구항 7

대상 식품 조성물의 인간 장내에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 평가하기 위한 인간 장내 세균총 모델이며,

프로테오박테리아문, 락토바실러스속에 속하는 세균을 포함하지 않고, 비피도박테리움속에 속하는 세균을 포함하는, 적어도 9균종 이상의 세균을 포함하는 평가용 균체 배양물로 구성되는 상기 인간 장내 세균총 모델.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 9균종 이상의 세균이, 파미큐테스문, 악티노박테리아문 또는 박테로이데테스문에 속하는 세균이며, 브라우티아속, 콜린세라속 또는 스트렙토코커스속에 속하는 세균을 포함하는 인간 장내 세균총 모델.

청구항 9

제8항에 있어서, 파미큐테스문에 속하는 세균이 균종수로서 56 내지 59%, 악티노박테리아문에 속하는 세균이 균종수로서 21 내지 24%, 박테로이데테스문에 속하는 세균이 균종수로서 17 내지 22% 포함되는 인간 장내 세균총 모델.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 9균종 이상의 세균이, 블라우티아 웨슬레라에, 비피도박테리움 롱굼, 비피도박테리움 슈도카테놀라탐, 유박테리움 렉탈레, 비피도박테리움 아돌레센티스, 콜린셀라 아에로파시엔스, 박테로이데스 유니포르미스, 도레아 룬기카테나, 박테로이데스 불가투스, 루미노코커스 구나바스, 페칼리박테리움 프라우스닛츠이, 파라박테로이데스 디스타소니스, 도레아 포르미시게네란스, 루미노코커스 오베움, 루미노코커스 토르퀘스, 박테로이데스 도레이, 플라보니프랙터 플라우티, 파라박테로이데스 메르다에, 로제부리아 이놀리니보란스, 클로스트리디움 넥사일, 스트렙토코커스 살리바리우스, 예가셀라 렌타, 클로스트리디움 볼테아에, 로제부리아 인테스티달리스, 코프로코커스 코메스, 박테로이데스 오바투스, 유박테리움 할리이, 로제부리아 호미니스 및 박테로이데스 테타이오타오미크론으로 이루어지는 군에서 선택되는 인간 장내 세균총 모델.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 9균종 이상의 세균이, 블라우티아 웨슬레라에, 비피도박테리움 롱쿰, 비피도박테리움 슈도카테놀라탐, 유박테리움 렉탈레, 비피도박테리움 아돌레센티스, 콜린셀라 아에로파시엔스, 박테로이데스 유니포르미스, 도레이 론기카테나, 박테로이데스 불가투스, 루미노코커스 구나바스, 페칼리박테리움 프라우스넛즈이, 블라우티아 오베움, 박테로이데스 도레이, 플라보니프랙터 플라우티, 스트렙토코커스 살리바리우스, 클로스트리디움 볼테아에 및 코프로코커스 코메스인 인간 장내 세균총 모델.

청구항 12

대상 식품 조성물의 인간 장내에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 평가하기 위한 인간 장내 세균총 모델의 배양 방법이며, 이하의 공정을 포함하는 배양 방법.

- (1) 프로테오박테리아문, 락토바실러스속에 속하는 세균을 포함하지 않고, 비피도박테리움속에 속하는 세균을 포함하는, 적어도 9균종 이상의 세균을, 변법 GAM 부용 배지에 첨가하는 공정
- (2) 혐기적 조건 하에서 배양하는 공정

청구항 13

대상 식품 조성물의 인간 장내에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 평가하는 방법이며, 이하의 공정을 포함하는 상기 평가 방법.

- (1) 제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 인간 장내 세균총 모델에, 평가 대상이 되는 식품 조성물을 첨가하여 배양하는 공정
- (2) (1)에서 얻어진 배양물의 단쇄 지방산 산생량의 측정 및/또는 다양성 지수를 산출하는 공정
- (3) (2)의 측정값 및/또는 산출값이, 상기 식품 조성물을 무첨가의 경우와 비교하여, 상대값이 1.0배 이상으로 되는 경우에, 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 갖는다고 평가하는 공정

청구항 14

장내 세균총 개선용 식품의 제조 방법이며, 제13항에 기재된 평가 방법에 있어서 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 갖는다고 평가된 식품 조성물을 사용하여 식품을 제조하는 방법.

청구항 15

락토바실러스·무코사예에 속하는 균주이며, SBT10028주(NITE BP-03275), SBT10217주(NITE P-03276), SBT10027주(NITE P-03274), SBT10038주(NITE P-03283), SBT2261주(NITE P-03272), SBT2027주(NITE P-03271), SBT2271주(NITE P-03273), SBT2025(NITE P-03189), SBT2269(NITE P-03191), SBT2867(NITE P-03192), SBT2268(NITE P-03190), SBT10043(NITE BP-03187) 및 SBT10228(NITE P-03188)로 이루어지는 균에서 선택되는 균주.

청구항 16

락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제.

청구항 17

락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 비피더스균 증식 촉진제.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 락토바실러스·무코사예가, 비피더스균과 배양하였을 때, 무첨가에 비해 1.1배 이상의 증식 활성을 갖는 주인 제.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 락토바실러스·무코사예가, SBT2025(NITE P-03189), SBT2268(NITE P-03190), SBT2269(NITE P-03191), SBT2867(NITE P-03192), SBT10043(NITE P-03187) 및 SBT10228(NITE P-03188)로 이루어지는 균에서 선택되는 1 이상의 유산균주인 제.

청구항 20

락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가용 식품.

청구항 21

락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 비피더스균 증식 촉진용 식품.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 락토바실러스·무코사예가, 비피더스균과 배양하였을 때, 무첨가에 비해 1.1배 이상의 증식 활성을 갖는 주인 식품.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 락토바실러스·무코사예가, SBT2025(NITE P-03189), SBT2268(NITE P-03190), SBT2269(NITE P-03191), SBT2867(NITE P-03192), SBT10043(NITE BP-03187) 및 SBT10228(NITE P-03188)로 이루어지는 군에서 선택되는 1 이상의 유산균주인 식품.

청구항 24

젖을 주성분으로 하는 배지 중에서 락토바실러스·무코사예를 배양하는 공정을 포함하는, 발효 유제품의 제조 방법이며, 락토바실러스·무코사예로서 이하의 성질을 갖는 주를 사용하는 것을 특징으로 하는 상기 제조 방법.

성질; 비피더스균과 배양하였을 때, 무첨가에 비해 1.1배 이상의 증식 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스·무코사예.

청구항 25

제24항에 있어서, 락토바실러스·무코사예가, SBT2025(NITE P-03189), SBT2268(NITE P-03190), SBT2269(NITE P-03191), SBT2867(NITE P-03192), SBT10043(NITE BP-03187) 및 SBT10228(NITE P-03188)로 이루어지는 군에서 선택되는 1 이상의 유산균주인 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원 발명은, 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로서 포함하는 장내 세균 개선용 식품 조성물 및 장내 세균총의 개선에 적합한 식품 조성물을 평가하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본원 발명은, 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제 및 증가 촉진용 식품에 관한 것이다. 또한, 본원 발명은, 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 비피더스균 증식 촉진제 및 증식 촉진용 식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인간의 장내에는 1000종, 40조개나 되는 세균이 서식하고, 복잡한 공생 관계(장내 세균총)를 형성하고 있다. 오믹스 해석의 진전에 의해, 건강 상태나 가령, 식사나 생활 습관이 장내 세균총에 영향을 주는 것에 더하여, 장내 세균총 밸런스(장내 세균의 다양성)의 흐트러짐이 질환의 발증이나 증약으로 연결되는 것이 밝혀져 왔다. 비만 및 당뇨병 환자에 있어서 장내 세균의 다양성이 감소하고 있는 것이나, 식이 섬유류의 섭취에 의해 장내 세균의 다양성이 증가하고, 관련되는 임상 증상이 개선되는 것 등도 실증되고 있다.

[0004] 또한, 장내 세균의 주요한 대사 산물인 단쇄 지방산에는 다양한 건강 기능 효과가 보고되어 있음과 함께 장내 세균의 다양성과의 관계도 시사되고 있다. 단쇄 지방산은 아세트산, 프로피온산, 부티르산으로 대표되는 탄소 수 6 이하의 지방산을 가리킨다. 이들은, 장내의 pH를 산성으로 함으로써 병원 미생물의 생육을 억제할 뿐만 아니라, 장관 상피 세포를 활성화하여, 숙주의 생체 방어나 면역계의 제어에 복잡하게 관여하고 있다. 또한, 장관의 연동 운동을 촉진시키는 대사 산물을 산생하는 장내 세균이나, 장관 점막의 항상성 유지에 관련되는 장

내 세균 등에 의해 이용되고 있는 것도 보고되어 있다. 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성이나 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산을 증가시키는 방법으로서, 장내 세균의 생육이나 대사 산물의 산생을 촉진시키는 식품용 조성물(프리바이오틱스)을 섭취하는 것이나, 유산균이나 비피더스균을 포함하는 식품용 조성물(프로바이오틱스)을 직접 섭취하는 것을 주된 방법으로서 들 수 있다.

[0005] 다종 다양한 장내 세균으로 구성되는 인간의 장내 세균총은, 락토바실러스속을 장내에 있어서의 우세 세균으로 하는 마우스 등의 모델 동물과는 크게 다르다. 또한, 인간에 있어서도 개인간에 장내 세균총이 크게 다를 뿐 아니라, 일본인의 장내 세균총이 외국인의 장내 세균총과 비교하여 특징적인 것도 알려져 있다(비특허문헌 1). 개인간, 인종간의 장내 세균총의 변동을 표준화하는 모델 평가계가 존재하지 않는 현상 상황에 있어서, 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성이나 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산을 증가시키는 식품 조성물을 선택하는 것은 매우 어렵다.

[0006] 여기서, 복수의 장내 세균을 장내 세균총에서 추출하여 인공적으로 장내 세균총을 재구축함으로써 표준화를 도모하는 평가 시험관 내(in vitro)계가 복수 보고되어 있지만(비특허문헌 2, 비특허문헌 3), 일본인의 장내 세균총을 인공적으로 재구축한 것은 보고되어 있지 않다. 또한, 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성이나 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산을 증가시키는 식품 조성물을 선택하는 것을 목적으로 구축된 평가계는 존재하지 않는다.

[0007] 비특허문헌 1에서는, 일본인의 장내 세균총의 메타게놈 해석에 의한 그 특징의 해명이 행해지고, 일본인의 장내 세균총에 있어서 우세한 장내 세균 50종류가 보고되되 함께, 11개국의 외국인 피험자의 장내 세균총과 비교하여, 브라우티아속, 비피도박테리움속, 콜린세라속, 스트렙토코커스속을 가장 풍부하게 포함하는 것이 보고되어 있다. 또한, 상기 50종류에, 프로테오박테리아문, 락토바실러스속은 포함되어 있지 않고, 이들 장내 세균은 일본인의 장내에 있어서 우세한 장내 세균이 아닌 것이 밝혀졌다. 또한, 비특허문헌 1에서 수집된 106명의 메타게놈 데이터로부터, 일본인의 장내 세균총의 분류학적 비율이 파미큐테스문, 악티노박테리아문, 박테로이데테스문에 속하는 장내 세균을, 균종으로서 각각 약 57%, 약 24%, 약 19% 포함하는 것도 밝혀졌다. 그러나, 이들 일본인의 장내 세균총에 있어서 우세한 장내 세균의 배양에 대해서는 실시되어 있지 않고, 배양 가능한 조합이나 그 배양 방법에 대해서도 검토되어 있지 않다.

[0008] 추출하는 균종수에 대해서는, 비특허문헌 2에서 장내 세균총의 최소 단위 모델로서 ASF(AlteredSchaeidler Flora)라고 불리는 장내 세균 8종류의 조합이 보고되어 있다. 또한, 비특허문헌 3에서는, 유럽인의 장내 세균총의 특징을 갖는 모델로서, 장내 세균 15종류의 조합이 보고되어 있다. 그러나, 일본인의 장내 세균총에 있어서 우세하지 않은 장내 세균이 포함되어 있고, 일본인의 장내 세균총의 특징이기도 한 비피도박테리움속도 포함되어 있지 않다.

[0009] 장내 세균은 유산균이나 비피더스균과 비교하여 높은 혐기 요구성을 갖고 있어, 배양하기가 매우 곤란하다. 이 때문에 각 장내 세균의 특징에 맞춘 배지에서 배양하는 것이 일반적이다. 비특허문헌 4에서는, 유럽인의 장내 세균총에 있어서 우세한 것이 보고되어 있는 복수 종류의 장내 세균을 단일의 배지(GAM 부용 배지, 닛스이)에서 배양하는 것이 가능한 것을 보고하고 있다. 그러나, 전술한 바와 같이 장내에 있어서의 우세 세균은 유럽인과 일본인에서는 크게 다른 것이며, 동 배지를 단일의 배지로 하여 일본인의 장내 우세 세균을 안정적으로 생육시킬 것을 기대할 수 없다. 또한, 균종마다 산생하는 단쇄 지방산을 비교하고 있지만, 단일의 장내 세균이 산생하는 것을 측정하고 있는 것에 지나지 않고, 균총 전체로서의 단쇄 지방산 산생량에 대해서는 불분명하였다.

[0010] 특허문헌 1에서는, 장내 세균총의 조성 밸런스를 거의 유지한 채 배양할 수 있는 장내 세균총 시뮬레이션 배양 방법이나 배양 장치가 보고되어 있다. 또한, 비특허문헌 5는 마찬가지로의 방법·장치를 사용하여 식이 섬유류가 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산을 증가시키는 것을 시험관 내(in vitro)에서 평가하고 있다. 특허문헌 1, 비특허문헌 5에서는 모두 평가용 배양물로서 분변을 사용하는 것을 특징으로 하고 있지만, 인간의 장내 세균총은 개인간에 크게 다르고, 인간 유래의 분변을 사용할 때는, 분변을 제공하는 개인간의 장내 세균총의 차이에 의한 영향을 받는다. 따라서, 분변을 사용하는 것에 의한, 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성이나 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산을 증가시키는 식품 조성물의 선택은 한정적이어서, 분변을 사용하지 않는 평가계의 구축이 요구되고 있었다. 또한, 그러한 평가계를 사용하여 선발되는, 장내 세균총의 다양성이나 단쇄 지방산 산생의 증가를 촉진시키는 장내 세균총 개선용 조성물이 요구되고 있었다.

[0011] 또한, 상기 장내 세균총에 있어서의 세균종의 밸런스는 건강 상태나 가령에 따라서 변화되고, 장내 세균 중 비피더스균이나 유산균의 비율이 감소하는 것이 보고되어 있다. 감소하는 비피더스균이나 유산균을 보충하는 방법으로서, 그들을 포함하는 발효 유제품을 섭취하는 것이 해결책 중 하나가 된다.

- [0012] 발효 유제품에 사용되는 유산균으로서 대표적인 종류로서는, 락토바실러스속에 속하는 유산균을 들 수 있다. 범용되는 균종으로서, 락토바실러스·델브룩키·서브스피시스·불가리쿠스, 락토바실러스·카제이, 락토바실러스·카세리, 락토바실러스·로이테리, 락토바실러스·헬베티카스 등을 들 수 있다. 한편, 그다지 유익하게 활용되고 있지 않은 균종으로서, 락토바실러스·무코사에를 들 수 있다.
- [0013] 특허문헌 2는, 유당불내증의 개선에 유용한 유산균의 하나로서 락토바실러스·무코사에가 예시되어 있다. 해당 특허문헌에 있어서의 락토바실러스·무코사에는, 장관 부착성 및 유당 분해능이 높은 것을 특징으로 하고 있으며, 인간 대장에 있어서의 비피더스균의 비율에 부여하는 작용이나, 시험관 내에 있어서의 비피더스균의 증식에 부여하는 작용에 대해서는 개시되어 있지 않다.
- [0014] 또한, 유당은 비피더스균의 증식을 촉진시키는 점에서, 유당 분해능이 높은 락토바실러스·무코사에의 섭취에서는, 인간 대장에 있어서의 비피더스균의 비율을 감소시킬 가능성이나, 비피더스균의 증식을 저해할 가능성도 생각할 수 있다.
- [0015] 비특허문헌 6 및 7에서는, 돼지 유래의 락토바실러스·무코사에 LM1에 대해서, 장관 부착성이 높은 것, 병원성 세균의 장관에의 부착을 억제하는 것을 나타내고 있다. 그러나, 모두, 락토바실러스·무코사에 LM1에 의한 비피더스균에의 작용에 대해서는 개시되어 있지 않다.
- [0016] 또한, 비특허문헌 6에서는, 장관에의 부착성을 시험관 내에서 해석한 예이며, 인간에 있어서의 효과를 개시하지 않는다. 비특허문헌 7에서는, 마우스를 사용하여 장관에의 병원성 세균의 부착 억제를 해석하고 있으며, 인간에 있어서의 효과를 개시하지 않는다.
- [0017] 이상과 같이, 락토바실러스·무코사에의 비피더스균 증식 촉진 작용이나, 인간 대장에 있어서의 비피더스균의 비율의 증가 작용에 대해서는 지금까지 개시되지 않았고, 그 방법에 대해서도 불분명하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0018] (특허문헌 0001) 일본 특허 제6482135호 공보
(특허문헌 0002) 국제 공개 W02008/001676호

비특허문헌

- [0019] (비특허문헌 0001) DNA Res. 2016 Apr;23(2):125-33.
(비특허문헌 0002) Appl Environ Microbiol. 1999 Aug;65(8):3287-92.
(비특허문헌 0003) Sci Transl Med. 2011 Oct 26;3(106):106ra106.
(비특허문헌 0004) Biosci Biotechnol Biochem. 2017 Oct;81(10):2009-2017.
(비특허문헌 0005) Sci Rep. 2018 Jan 11;8(1):435.
(비특허문헌 0006) J.Appl Microbiol. 2014년 117호 2권 485-497페이지
(비특허문헌 0007) Microb. Pathog. 2019년 137호 103760

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0020] 본원 발명은, 장내 세균총 개선 기능, 즉 단쇄 지방산 증가 기능 및/또는 다양성 증가 기능을 갖는 락토바실러스·무코사에를 유효 성분으로서 포함하는 식품 조성물 및 식품을 제공하는 것을 과제로 한다. 또한, 일본인의 장내 세균총의 특징을 갖는 신규의 장내 세균총 모델을 구축하는 것, 또한 당해 모델을 사용한 장내 세균총 개선 기능, 즉 단쇄 지방산 증가 기능 및/또는 다양성 증가 기능을 평가할 수 있는 새로운 모델 평가계의 제공과 이것을 사용한 식품 조성물의 스크리닝 방법의 제공을 과제로 한다. 또한, 나아가, 상기 새로운 평가 방법

이나 스크리닝 방법으로 얻어진 식품 조성물을 사용한 장내 세균총 개선 기능, 즉 단쇄 지방산 증가 기능 및/또는 다양성 증가 기능을 갖는 식품의 제공을 과제로 한다.

[0021] 또한, 본원 발명의 다른 과제는, 새로운 프로바이오틱스의 제공이다. 특히, 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제 및 증가용 식품을 제공하는 것이다. 또한, 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 비피더스균 증식 촉진제 및 증식 촉진용 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 본원 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 것이고, 일본인의 장내 세균총에 있어서 우세한 복수의 장내 세균을 추출하여, 인공적으로 일본인의 장내 세균총을 재구축하였다. 이 때, 장내의 분류학적 비율을 유지하는 것, 외국인과 비교하여 높은 존재비를 나타내는 장내 세균을 포함하는 것을, 일본인의 장내 세균총의 특징으로서 파악하여 추출하였다. 그리고, 추출한 장내 세균의 혼합물을 평가용 배양물로 하여, 이것과 함께 섭취에 의해 인간 장내의 단쇄 지방산이 증가하는 것이 이미 보고되어 있는 난소화성 식이 섬유류를 배양한 바, 양호한 재현성으로 단쇄 지방산의 증가가 확인되었다. 이로부터, 본원 발명이 개인간의 장내 세균총의 변동을 표준화하는 일본인의 장내 세균총에 있어서의 모델 평가계로서 유효한 것을 실증하고, 또한 일본인의 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산의 증가 평가에도 이용할 수 있는 것을 알아냈다. 마찬가지로, 본 모델 평가계는 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성 증가 평가에도 활용할 수 있는 것을 알아냈다.

[0023] 또한, 본원 발명은, 상기 일본인의 장내 세균총에 있어서의 모델 평가계를 사용하여, 단쇄 지방산 증가 기능, 다양성 증가 기능을 갖는 식품용 조성물로 하여 각종 유산균 및 비피더스균을 선발한 결과, 락토바실러스·무코사예가 당해 기능을 갖는 것이 확인되었다. 락토바실러스·무코사예의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용이나, 다양성 증가 촉진 작용에 대해서는 지금까지 알려져 있지 않고, 일본인의 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 용도, 다양성 증가 촉진 용도에 사용할 수 있는 것이 밝혀졌다.

[0024] 즉, 본원 발명은 이하의 구성을 갖는다.

[0025] <1>

[0026] 락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 장내 세균총 개선용 조성물.

[0027] <2>

[0028] 락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 장내 세균총 개선용 식품.

[0029] <3>

[0030] 락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물.

[0031] <4>

[0032] 락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 단쇄 지방산 증가 촉진용 식품.

[0033] <5>

[0034] 락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 장내 세균의 다양성 증가 촉진용 조성물.

[0035] <6>

[0036] 락토바실러스·무코사예의 균체 또는 균체 배양물을 유효 성분으로 하는 장내 세균의 다양성 증가 촉진용 식품.

[0037] <7>

[0038] 대상 식품 조성물의 인간 장내에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 평가하기 위한 인간 장내 세균총 모델이며,

[0039] 프로테오박테리아문, 락토바실러스속에 속하는 세균을 포함하지 않고, 비피도박테리움속에 속하는 세균을 포함하는, 적어도 9균종 이상의 세균을 포함하는 평가용 균체 배양물로 구성되는 상기 인간 장내 세균총 모델.

- [0040] <8>
- [0041] 상기 9균종 이상의 세균이, 파미큐테스문, 악티노박테리아문 또는 박테로이데테스문에 속하는 세균이며, 브라우티아속, 콜린세라속 또는 스트렙토코커스속에 속하는 세균을 포함하는, <7>에 기재된 인간 장내 세균총 모델.
- [0042] <9>
- [0043] 파미큐테스문에 속하는 세균이 균종수로서 56 내지 59%, 악티노박테리아문에 속하는 세균이 균종수로서 21 내지 24%, 박테로이데테스문에 속하는 세균이 균종수로서 17 내지 22% 포함되는, <8>에 기재된 인간 장내 세균총 모델.
- [0044] <10>
- [0045] 적어도 9균종 이상의 세균이, 블라우티아 웨슬레라에, 비피도박테리움 룡균, 비피도박테리움 슈도카테놀라탐, 유박테리움 렉탈레, 비피도박테리움 아돌레센티스, 콜린셀라 아에로파시엔스, 박테로이데스 유니포르미스, 도레이 론기카테나, 박테로이데스 불가투스, 루미노코커스 구나바스, 페칼리박테리움 프라우스넛츠이, 파라박테로이데스 디스타소니스, 도레이 포르미시게네란스, 루미노코커스 오베움, 루미노코커스 토르퀘스, 박테로이데스 도레이, 플라보니프랙터 플라우티, 파라박테로이데스 메르다에, 로제부리아 이놀리니보란스, 클로스트리디움 넥사일, 스트렙토코커스 살리바리우스, 예가셀라 렌타, 클로스트리디움 볼테아에, 로제부리아 인테스티날리스, 코프로코커스 코메스, 박테로이데스 오바투스, 유박테리움 할리이, 로제부리아 호미니스 및 박테로이데스 테타이오타오미크론으로 이루어지는 균에서 선택되는, <7> 내지 <9> 중 어느 것에 기재된 인간 장내 세균총 모델.
- [0046] <11>
- [0047] 적어도 9균종 이상의 세균이, 블라우티아 웨슬레라에, 비피도박테리움 룡균, 비피도박테리움 슈도카테놀라탐, 유박테리움 렉탈레, 비피도박테리움 아돌레센티스, 콜린셀라 아에로파시엔스, 박테로이데스 유니포르미스, 도레이 론기카테나, 박테로이데스 불가투스, 루미노코커스 구나바스, 페칼리박테리움 프라우스넛츠이, 블라우티아 오베움, 박테로이데스 도레이, 플라보니프랙터 플라우티, 스트렙토코커스 살리바리우스, 클로스트리디움 볼테아에 및 코프로코커스 코메스인, <7> 내지 <10> 중 어느 것에 기재된 인간 장내 세균총 모델.
- [0048] <12>
- [0049] 대상 식품 조성물의 인간 장내에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 평가하기 위한 인간 장내 세균총 모델의 배양 방법이며, 이하의 공정을 포함하는 배양 방법.
- [0050] (1) 프로테오박테리아문, 락토바실러스속에 속하는 세균을 포함하지 않고, 비피도박테리움속에 속하는 세균을 포함하는, 적어도 9균종 이상의 세균을, 변법 GAM 부용 배지에 첨가하는 공정
- [0051] (2) 혐기적 조건 하에서 배양하는 공정
- [0052] <13>
- [0053] 대상 식품 조성물의 인간 장내에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 평가하는 방법이며, 이하의 공정을 포함하는 상기 평가 방법.
- [0054] (1) <7> 내지 <11> 중 어느 것에 기재된 인간 장내 세균총 모델에, 평가 대상이 되는 식품 조성물을 첨가하여 배양하는 공정
- [0055] (2) (1)에서 얻어진 배양물의 단쇄 지방산 산생량의 측정 및/또는 다양성 지수를 산출하는 공정
- [0056] (3) (2)의 측정값 및/또는 산출값이, 상기 식품 조성물을 무첨가의 경우와 비교하여, 상대값이 1.0배 이상으로 되는 경우에, 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 갖는다고 평가하는 공정
- [0057] <14>
- [0058] 장내 세균총 개선용 식품의 제조 방법이며, <13>에 기재된 평가 방법에 있어서 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 갖는다고 평가된 식품 조성물을 사용하여 식품을 제조하는 방법.
- [0059] <15>
- [0060] 락토바실러스·무코사예에 속하는 균주이며, SBT10028주(NITE BP-03275), SBT10217주(NITE P-03276), SBT10027주(NITE P-03274), SBT10038주(NITE P-03283), SBT2261주(NITE P-03272), SBT2027주(NITE P-03271), SBT2271

주(NITE P-03273), SBT2025(NITE P-03189), SBT2269(NITE P-03191), SBT2867(NITE P-03192), SBT2268(NITE P-03190), SBT10043(NITE BP-03187) 및 SBT10228(NITE P-03188)로 이루어지는 군에서 선택되는 군주.

- [0061] 또 다른 본원 발명은, 상기 다른 과제를 해결하기 위한 것이고, 락토바실러스·무코사예에 비피더스균의 증식 촉진 작용이 있는 것을 처음 발견하고, 비피더스균 증식 촉진제 및 증식 촉진용 식품으로서의 용도 및 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제 및 증가용 식품에 적용하는 것이 가능한 것을 확인하여, 새로운 프로바이오틱스로서 본원 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0062] 즉 본원 발명은 또한, 이하의 구성을 갖는다.
- [0063] <16>
- [0064] 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제.
- [0065] <17>
- [0066] 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 비피더스균 증식 촉진제.
- [0067] <18>
- [0068] 락토바실러스·무코사예가, 비피더스균과 배양하였을 때, 무첨가에 비해 1.1배 이상의 증식 활성을 갖는 주인, <16> 또는 <17>에 기재된 제.
- [0069] <19>
- [0070] 락토바실러스·무코사예가, SBT2025(NITE P-03189), SBT2268(NITE P-03190), SBT2269(NITE P-03191), SBT2867(NITE P-03192), SBT10043(NITE BP-03187) 및 SBT10228(NITE P-03188)로 이루어지는 군에서 선택되는 1 이상의 유산균주인, <16> 내지 <18> 중 어느 것에 기재된 제.
- [0071] <20>
- [0072] 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가용 식품.
- [0073] <21>
- [0074] 락토바실러스·무코사예를 유효 성분으로 하는 비피더스균 증식 촉진용 식품.
- [0075] <22>
- [0076] 락토바실러스·무코사예가, 비피더스균과 배양하였을 때, 무첨가에 비해 1.1배 이상의 증식 활성을 갖는 주인, <20> 또는 <21>에 기재된 식품.
- [0077] <23>
- [0078] 락토바실러스·무코사예가, SBT2025(NITE P-03189), SBT2268(NITE P-03190), SBT2269(NITE P-03191), SBT2867(NITE P-03192), SBT10043(NITE BP-03187) 및 SBT10228(NITE P-03188)로 이루어지는 군에서 선택되는 1 이상의 유산균주인, <20> 내지 <22> 중 어느 것에 기재된 식품.
- [0079] <24>
- [0080] 젖을 주성분으로 하는 배지 중에서 락토바실러스·무코사예를 배양하는 공정을 포함하는, 발효 유제품의 제조 방법이며, 락토바실러스·무코사예로서 이하의 성질을 갖는 주를 사용하는 것을 특징으로 하는 상기 제조 방법.
- [0081] 성질; 비피더스균과 배양하였을 때, 무첨가에 비해 1.1배 이상의 증식 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스·무코사예.
- [0082] <25>
- [0083] 락토바실러스·무코사예가, SBT2025(NITE P-03189), SBT2268(NITE P-03190), SBT2269(NITE P-03191), SBT2867(NITE P-03192), SBT10043(NITE BP-03187) 및 SBT10228(NITE P-03188)로 이루어지는 군에서 선택되는 1 이상의 유산균주인, <24>에 기재된 제조 방법.
- [0084] 또한, 본원 발명은 또한, 이하의 구성을 갖는다.
- [0085] <26>

- [0086] 락토바실러스·무코사에의 균체 또는 균체 배양물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는 장내 세균총 개선 방법.
- [0087] <27>
- [0088] 락토바실러스·무코사에의 균체 또는 균체 배양물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는 단쇄 지방산 증가 촉진 방법.
- [0089] <28>
- [0090] 락토바실러스·무코사에의 균체 또는 균체 배양물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는 장내 세균의 다양성 증가 방법.
- [0091] <29>
- [0092] 락토바실러스·무코사에의 균체 또는 균체 배양물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가 방법.
- [0093] <30>
- [0094] 락토바실러스·무코사에의 균체 또는 균체 배양물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는 비피더스균 증식 촉진 방법.

발명의 효과

- [0095] 본원 발명의 일본인의 장내 세균총에 있어서의 모델 평가계는 일본인의 장내 세균총의 특징으로서, 일본인의 장내에서 우세하게 존재하는 장내 세균에 의해 구성되고, 일본인의 장내 세균총을 구성하는 장내 세균 분류학적 비율을 유지하고, 또한 외국인과 비교하여 높은 존재비를 나타내는 장내 세균을 포함하기 때문에, 본 모델 평가계를 이용함으로써, 각종 식품 조성물의 장내 환경 개선 기능을 평가할 수 있다.
- [0096] 또한, 본원 발명에 의해 인간이나 동물을 사용하지 않고, 또한 생체 시료인 인간 분변을 사용하지 않는 조건 하에서, 장내 세균총을 개선하는 식품 조성물을 선별하는 것이 가능하게 되었다.
- [0097] 나아가, 본원 발명에 의해 발견된 락토바실러스·무코사에를 유효 성분으로 하는 장내 세균총 개선용 조성물을 섭취함으로써, 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성이나 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산을 증가시킬 것을 기대할 수 있을 뿐 아니라, 이에 수반되는 대사 질환 및 비만 등의 증상의 개선을 기대할 수 있다.
- [0098] 또 다른 본원 발명은, 비피더스균의 증식 촉진 활성을 갖는 락토바실러스·무코사에를 유효 성분으로서 포함하는 발효 유제품을 제공하는 것이다. 그리고, 해당 락토바실러스·무코사에의 발효 유제품 등을 섭취함으로써, 인간 장내에 있어서의 비피더스균의 비율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 본원 발명에 의하면 새로운 프로바이오틱스의 제공이 가능하게 되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0099] (락토바실러스·무코사에)
- [0100] 본원 발명에 있어서의 락토바실러스·무코사에란, 락토바실러스·무코사에에 속하는 세균을 의미한다. 즉, 락토바실러스·무코사에 기준주 JCM12515와, 16S 리보솜 RNA 유전자의 염기 서열의 상동성이 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 더욱 바람직하게는 99% 이상인 균주를 가리킨다. 분리원으로서, 어느 것이어도 되고, 보다 바람직하게는 인간 유래이다.
- [0101] 본원 발명의 장내 세균총 개선용 조성물이나 식품의 유효 성분인 락토바실러스·무코사에의 균주로서는, 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성이나 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산을 증가시키는 균주이면 되고, 예를 들어 후술하는 실시예에서 활성이 나타내져 있는 SBT10028, SBT10043, SBT10217, SBT10027, SBT10038, SBT2261, SBT2027, SBT2271 등을 들 수 있다.
- [0102] 또 다른 본원 발명인 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제나 비피더스균 증식 촉진제의 유효 성분인 락토바실러스·무코사에의 균주로서는, 비피더스균 증식 촉진 활성을 갖는 균주이면 되고, 예를 들어 후술하는 실시예에서 활성이 나타내져 있는 SBT2025, SBT2268, SBT2269, SBT2867, SBT10043, SBT10228 등을 들 수 있다.
- [0103] 본 명세서의 인간 장내 세균총에 있어서의 장내 세균총 개선용 조성물, 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물 또는 다양성 증가 촉진용 조성물, 그리고 장내 세균총 개선용 식품, 단쇄 지방산 증가 촉진용 식품 및 다양성 증

가 촉진용 식품의 유효 성분인 락토바실러스·무코사에는, 인간 장내에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 활성 또는 다양성 증가 촉진 활성을 갖는 상태인 것이면 된다.

- [0104] 또한, 본 명세서의 비피더스균 비율의 증가제 및 비피더스균 증식 촉진제의 유효 성분인 락토바실러스·무코사에는 비피더스균 비율을 증가시키거나, 또는 비피더스균을 증식 촉진시키는 활성을 갖는 상태인 것이면 된다.
- [0105] 이들은 균체로서 순수하게 분리된 것에 한정되지 않고, 균체 배양물, 균체 현탁물, 기타 균체 함유물이어도 된다. 균체는 생균체여도 사균체여도 되고, 이 중에서도 생균체가 좋다.
- [0106] 생균체로서는, 균체를 배양하여 집균한 균체 농축물이나, 균체의 건조물, 동결 건조물을 들 수 있고, 균체 배양물로서는, 균체 배양액의 농축물, 건조물, 동결 건조물 이외에도, 락토바실러스·무코사에는 발효 유제품 등을 들 수 있다. 발효 유제품으로서, 치즈, 발효유, 유제품, 유산균 음료 등의 유제품 등을 예시할 수 있지만 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0107] 얻어진 배양물로부터 원심 분리 등의 집균 수단에 의해 분리된 균체를 그대로 본 발명의 유효 성분으로서 사용할 수 있다.
- [0108] 락토바실러스·무코사에는 통상법에 따라서 배양할 수 있다. 배지에는, 젓 배지 또는 젓 성분을 포함하는 배지, 이것을 포함하지 않는 반합성 배지 등 다양한 배지를 사용할 수 있다. 이러한 배지로서는, 환원 탈지유 배지 등을 예시할 수 있다.
- [0109] (발효 유제품)
- [0110] 본 명세서에 있어서 발효 유제품이란, 젓 또는 이것과 동등 이상의 무지방 젓 고형분을 포함하는 액체 또는 풀상체(糊狀體) 중에서, 락토바실러스·무코사에는 배양한 것을 가리킨다. 젓은 생유, 우유, 생산양유, 생면양유 등이면 되고, 탈지 분유를 물로 환원하여 사용해도 된다. 탈지 분유를 사용하는 경우의 농도에 대해서는, 무지방 고형분이 젓과 동등 이상으로, 락토바실러스·무코사에는 배양할 수 있는 농도라면 그 농도는 한정되지 않지만, 8%(w/w) 이상, 바람직하게는 9%(w/w) 이상, 보다 바람직하게는 10%(w/w) 이상인 것이 바람직하다.
- [0111] (탈지 분유 이외의 성분)
- [0112] 상기 발효 유제품은 탈지 분유 이외의 영양소를 포함하고 있어도 되고, 효모 엑기스를 첨가하는 경우에는 0.1%(w/w) 이상, 바람직하게는 0.2%(w/w) 이상, 보다 바람직하게는 0.5%(w/w) 이상인 것이 바람직하다. 그 밖의 영양소로서는, 당류, 아미노산, 미네랄, 비타민 등을 들 수 있다. 본원 발명의 발효 유제품에는, 락토바실러스·무코사에는 이외의 세균을 포함하고 있어도 된다. 예를 들어, 발효유의 발효 스타터로서, 범용되는 유산균, 예를 들어 락토바실러스 델브룩키 서브스피시스 불가리쿠스 및 스트렙토코쿠스 서모피루스를 포함할 수도 있다.
- [0113] 또한, 비피더스균 비율의 증가제 및 비피더스균 증식 촉진제의 유효 성분인 락토바실러스·무코사에는, 비피더스균과 혼합 배양하여, 증식이 촉진된 비피더스균과의 혼합 배양물(예를 들어, 발효 유제품)로서 제공할 수도 있다.
- [0114] (발효 유제품의 락토바실러스·무코사에는 생균수)
- [0115] 발효 유제품의 락토바실러스·무코사에는 대해서는, 생균으로서 포함되어 있는 것이 바람직하다. 본 명세서에 있어서 생균이란, 한천 등의 지지체에 영양소를 포함시킨 고체 배지에 콜로니가 형성되는 것(colony forming)을 가리키고, 생균수란 콜로니 형성 단위 cfu(colony forming unit)로 표현된다. 락토바실러스·무코사에는의 생균수를 측정하는 고체 배지로서는, 유산균용 배지인 MRS 한천 배지, 유산 간균용 배지인 LBS 한천 배지 등을 들 수 있다. 발효 유제품 중의 락토바실러스·무코사에는의 생균수는, 1.0E+06cfu/mL 이상인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1.0E+07cfu/mL 이상, 가장 바람직하게는 1.0E+08cfu/mL 이상이다.
- [0116] (단쇄 지방산 증가 촉진 작용)
- [0117] 본 명세서에 있어서 「단쇄 지방산 증가 촉진」이란, 인간 장내에 있어서 단쇄 지방산의 증가를 촉진시키는 것을 가리킨다. 단쇄 지방산의 증가 촉진 활성은, 일본인의 장내 세균총의 특징을 갖는 장내 세균총 모델에 있어서 식품용 조성물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에, 첨가한 경우쪽이 단쇄 지방산의 증가가 큰 경우에 당해 활성이 있다고 한다. 예를 들어, 후술하는 장내 세균총 모델에 있어서, 유산균이나 비피더스균 등의 세균, 난소화성의 식이 섬유류를 첨가하지 않고 배양한 경우에 얻어지는 단쇄 지방산 농도를 1.0배로 하였을 때, 유산균이나 비피더스균 등의 세균, 난소화성의 식이 섬유류를 첨가한 경우에 얻어지는 단쇄 지방산 농도가 1.0배보다 큰 경우에, 당해 활성이 있다고 한다. 당해 활성을 갖는 식품 조성물을 본원 발명에서는 단쇄 지방산 증가

촉진용 조성물이라고 한다. 본원 발명의 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물의 유효 성분으로 하는 락토바실러스·무코사에는, 락토바실러스·무코사예를 첨가하지 않고 배양한 경우에 얻어지는 단쇄 지방산 농도를 1.0배로 하였을 때, 락토바실러스 무코사예를 첨가한 경우에 얻어지는 단쇄 지방산 농도가 1.1배 이상을 나타내는 균주가 바람직하고, 보다 바람직하게는 1.5배 이상, 한층 더 바람직하게는 2.0배 이상을 나타내는 균주이다. 후술하는 실시예에서는, 어느 락토바실러스·무코사에도 부티르산과 총 단쇄 지방산의 양쪽이 무첨가에 비해 첨가한 경우에 1.0배보다 커지는 것을 확인하고 있다.

[0118] 여기서, 단쇄 지방산으로서는, 아세트산, 부티르산, 프로피온산, 혹은 이들의 합계인 총 단쇄 지방산을 들 수 있고, 이 중에서도 장내의 환경 변화를 단적으로 나타낸다고 여겨지는 부티르산을 평가 대상으로 하는 것이 바람직하다. 부티르산은 아세트산, 프로피온산과 비교하여 장관 상피 세포의 증식 활성이 높은 것이 알려져 있음과 함께, 각종 질환에서 장내 세균총에 있어서의 감소나, 부티르산을 산생하는 장내 세균의 감소가 보고되어 있다. 케양성 대장염 등의 염증성 장질환 환자에서는 부티르산을 산생하는 장내 세균으로서 대표적인 페칼리박테리움·프라우스닛츠이가 증상의 증악·관해에 수반하여 감소·증가하는 것이 보고되어 있다.

[0119] (다양성 증가 촉진 작용)

[0120] 본 명세서에 있어서 「다양성 증가 촉진」이란, 인간 장내 세균총에 있어서의 다양성의 증가를 촉진시키는 것을 가리킨다. 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성을 나타내는 지수로서, 종의 균등도를 나타내는 샤넨 인덱스(Shannon index)나, 계통학적인 정보를 고려한 계통 발생적 다양성 인덱스(Phylogenetic diversity index) 등이 다용된다.

[0121] 다양성의 증가 촉진 활성은, 일본인의 장내 세균총의 특징을 갖는 장내 세균총 모델에 있어서 식품용 조성물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에, 첨가한 경우쪽이 장내 세균총의 다양성을 나타내는 지수가 큰 경우에 당해 활성이 있다고 한다. 예를 들어, 후술하는 장내 세균총 모델에 있어서, 유산균이나 비피더스균 등의 세균, 난소화성의 식이 섬유류를 첨가하지 않고 배양한 경우에 얻어지는 다양성을 나타내는 지수를 1.0배로 하였을 때, 유산균이나 비피더스균 등의 세균, 난소화성의 식이 섬유류를 첨가한 경우에 얻어지는 다양성을 나타내는 지수가 1.0배보다 큰 경우에, 당해 활성이 있다고 한다. 당해 활성을 갖는 조성물을 본원 발명에서는 다양성 증가 촉진용 조성물이라고 한다. 본원 발명의 다양성 증가 촉진용 조성물의 유효 성분으로 하는 락토바실러스·무코사에는, 락토바실러스·무코사예를 첨가하지 않고 배양한 경우에 얻어지는 다양성을 나타내는 지수를 1.0 배로 하였을 때, 락토바실러스·무코사예를 첨가한 경우에 얻어지는 다양성을 나타내는 지수가 1.1배 이상을 나타내는 균주가 바람직하고, 보다 바람직하게는 1.2배 이상, 한층 더 바람직하게는 1.3배 이상을 나타내는 균주이다.

[0122] 본원 발명에 있어서, 상기 단쇄 지방산 증가 촉진 활성 또는 다양성 증가 촉진 활성 중 어느 한쪽, 혹은 양쪽의 활성을 갖는 경우에, 장내 세균총 개선 활성이 있다고 한다. 따라서, 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물, 다양성 증가 촉진용 조성물은, 장내 세균총 개선용 조성물이기도 하다. 또한, 마찬가지로 단쇄 지방산 증가 촉진용 음식품, 다양성 증가 촉진용 음식품은, 장내 세균총 개선용 음식품이기도 하다.

[0123] (인간 장내에 있어서의 장내 세균총 개선용 조성물, 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물 및 다양성 증가 촉진용 조성물)

[0124] 본원 발명의 인간 장내 세균총에 있어서의 장내 세균총 개선용 조성물, 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물 및 다양성 증가 촉진용 조성물의 유효 성분으로서는, 상술한 바와 같이, 락토바실러스·무코사예의 발효 배양물 그 자체나 락토바실러스·무코사예의 균체 그 자체를 이용할 수 있다. 발효 배양물로서는 바람직하게는 상술한 발효 유제품을 들 수 있다.

[0125] 당해 장내 세균총 개선용 조성물, 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물 및 다양성 증가 촉진용 조성물은, 또한 제제화하여 이용할 수도 있다. 제제화 시에는 제제상 허가되어 있는 부형제, 안정제, 교미제 등을 적절히 혼합하여 제제화할 수 있다. 제형으로서는, 정제, 캡슐제, 과립제, 산제, 분제, 시럽제 등이 가능하다. 의약 제제, 서플리먼트 등이 이것에 해당한다. 이들을 경구적으로 섭취함으로써 인간 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 통하여 장내 세균총의 개선이 기대된다.

[0126] (인간 장내에 있어서의 장내 세균총 개선용 음식품, 단쇄 지방산 증가 촉진용 음식품 및 다양성 증가 촉진용 음식품)

[0127] 본원 발명의 인간 장내 세균총에 있어서의 장내 세균총 개선용 음식품, 단쇄 지방산 증가 촉진용 음식품 및 다양성 증가 촉진용 음식품의 유효 성분으로서는, 락토바실러스·무코사예의 발효 배양물 그 자체나 락토바실러스

· 무코사예의 균체 그 자체를 이용할 수 있다. 식품으로서 이용되는 발효 배양물로서는 상술한 발효 유제품 등을 들 수 있다.

[0128] 또한, 당해 장내 세균총 개선용 식품, 단쇄 지방산 증가 촉진용 식품 및 다양성 증가 촉진용 식품은, 상기 장내 세균총 개선용 조성물, 상기 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물 및 다양성 증가 촉진용 조성물을 적당한 식품에 배합한 것을 이용할 수도 있다. 이들 배합은, 식품의 제조 공정 중에 원료에 첨가해도 되고, 소재에 배합시켜도 되고, 최종 제품인 식품에 배합할 수도 있다.

[0129] 식품의 예로서는, 치즈, 발효유, 유제품 유산균 음료, 유산균 음료, 버터, 마가린 등의 유제품, 우유 음료, 과일 음료, 청량 음료 등의 음료, 젤리, 캔디, 푸딩, 마요네즈 등의 알가공품, 버터 케이크 등의 과자·팬류, 나아가 각종 분유 외에도, 유아 식품, 영양 조성물 등을 들 수 있지만 특별히 한정되는 것은 아니다.

[0130] 또한, 본원 발명의 장내 세균총 개선용 식품, 단쇄 지방산 증가 촉진용 식품 및 다양성 증가 촉진용 식품은, 기능성 표시 식품, 특정 보건용 식품, 영양 기능 식품, 미용용 식품으로서 사용하는 것도 가능하다.

[0131] 이들에 식품을 섭취함으로써 인간 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 통하여 장내 세균총의 개선이 기대된다.

[0132] 락토바실러스·무코사예의 균체 및/또는 배양물을 배합하여, 인간 장내 세균총에 있어서의 장내 세균총 개선용 조성물, 단쇄 지방산 증가 촉진용 조성물 및 다양성 증가 촉진용 조성물, 인간 장내 세균총에 있어서의 장내 세균총 개선용 식품, 단쇄 지방산 증가 촉진용 식품 및 다양성 증가 촉진용 식품을 제조하는 경우, 배합 비율은 특별히 한정되지 않고, 제조의 용이성이나 바람직한 하루 투여량에 따라서 적절히 조절하면 된다. 투여 대상자의 증상, 연령 등을 고려하여 각각 개별로 결정되지만, 통상 성인의 경우, 락토바실러스·무코사예의 균체 배양물을 10 내지 200g, 혹은 균체 자체를 0.1 내지 100mg 섭취할 수 있도록 배합량 등을 조정하면 된다.

[0133] (장내 세균총 모델)

[0134] 본원 발명의 장내 세균총 모델은, 일본인의 평균적인 장내 세균총을 모델화한 균체 혼합 배양물이며, 프로테오박테리아문, 락토바실러스속에 속하는 세균을 포함하지 않고, 비피도박테리움속에 속하는 세균을 포함하는, 적어도 9균종 이상의 세균을 포함하는 것을 특징으로 하는 균체 혼합 배양물이다. 또한, 일본인의 평균적인 장내 세균총에 포함되는 세균으로서, 파미큐테스문, 악티노박테리아문, 박테로이데테스문에 속하는 세균으로 구성되고, 또한 특징으로서, 브라우티아속, 콜린세라속, 스트렙토코커스속의 세균을 포함하는 것이 바람직하다. 파미큐테스문, 악티노박테리아문, 박테로이데테스문에 속하는 장내 세균은, 각각 균종수의 구성비로서 56 내지 59%, 21 내지 24%, 17 내지 22% 포함하는 조합인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 각각 약 57%, 약 24%, 약 19%이다.

[0135] 또한, 파미큐테스문, 악티노박테리아문, 박테로이데테스문에 속하는 장내 세균을, 각각 56 내지 59%, 21 내지 24%, 17 내지 22% 포함하는 조합임과 함께, 브라우티아속, 콜린세라속, 스트렙토코커스속을 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

[0136] 본원 명세서에 있어서 균종이란, 세균의 「종」을 의미한다. 즉, 세균의 계통 분류학적 분류를 큰 순으로 「문」 「속」 「종」 「주」라고 칭하지만, 이 중의 「종」을 의미한다.

[0137] 상기 적어도 9균종 이상의 세균으로서, 블라우티아 웨슬레라에, 비피도박테리움 롱균, 비피도박테리움 슈도카테놀라탐, 유박테리움 렉탈레, 비피도박테리움 아돌레센티스, 콜린셀라 아에로파시엔스, 박테로이데스 유니포르미스, 도레아 론기카테나, 박테로이데스 불가투스, 루미노코커스 구나바스, 페칼리박테리움 프라우스닛츠이, 파라박테로이데스 디스타소니스, 도레아 포르미시게네란스, 루미노코커스 오베움, 루미노코커스 토르퀘스, 박테로이데스 도레이, 플라보니프랙터 플라우티, 파라박테로이데스 메르다에, 로제부리아 이눌리니보란스, 클로스트리디움 넥사일, 스트렙토코커스 살리마리우스, 예가셀라 웬타, 클로스트리디움 볼테아에, 로제부리아 인테스티날리스, 코프로코커스 코메스, 박테로이데스 오바투스, 유박테리움 할리이, 로제부리아 호미니스 및 박테로이데스 데타이오타오미크론(이상 29균종)으로부터 선택되는 어느 9균종 이상이면 되고, 더욱 바람직하게는 블라우티아 웨슬레라에, 비피도박테리움 롱균, 비피도박테리움 슈도카테놀라탐, 유박테리움 렉탈레, 비피도박테리움 아돌레센티스, 콜린셀라 아에로파시엔스, 박테로이데스 유니포르미스, 도레아 론기카테나, 박테로이데스 불가투스, 루미노코커스 구나바스, 페칼리박테리움 프라우스닛츠이, 블라우티아 오베움, 박테로이데스 도레이, 플라보니프랙터 플라우티, 스트렙토코커스 살리마리우스, 클로스트리디움 볼테아에 및 코프로코커스 코메스(이상 17균종)로부터 선택되는 어느 9균종 이상이면 되고, 한층 더 바람직하게는 이들 17균종을 포함하는 혼합 배양물이며, 가

장 바람직하게는 이들 17균종을 포함하는 혼합 배양물이다.

- [0138] 세균은, 일본인의 장내 세균총에 있어서 우세하게 존재하는 장내 세균 50종류 중, 국내의 분양 기관인 JCM(국립 연구 개발 법인 이화학 연구소 바이오리소스 연구 센터)에서 입수 가능한 29균종을 입수, 배양에 의해 증식이 확인된 균주로부터, 일본인의 장내 세균총의 특징을 갖도록 복수의 장내 세균을 추출한 조합이다.
- [0139] (배양 방법)
- [0140] 장내 세균총 모델인 균체 혼합물의 배양은, 이것을 구성하는 복수의 장내 세균을 단일의 조건에서 생육시킬 수 있는 조건이면 되고, 배지로서는, YCFA 배지(JCM 배지 번호 1130)나 EG 배지(JCM 배지 번호 14)를 들 수 있지만, 보다 조제가 간편한 GAM 부용, 변법 GAM 부용을 들 수 있다. 이 중에서도 변법 GAM 부용 배지가 바람직하다. 배양 온도는, 인간의 체온 부근의 온도로서 36 내지 38℃를 들 수 있고, 37℃가 바람직하다. 대장은 부위(횡행 결장, 원위 결장, 직장)에 따라서 pH가 다른 것이 알려져 있고, 단쇄 지방산의 산생, 혹은 숙주에 단쇄 지방산이 흡수됨으로써 pH가 변화된다. 이것에 따라서, 배양 전의 배지의 pH는 6 이상인 것이 바람직하고, 이 중에서도 7 이상이 바람직하고, 7.2 전후가 한층 더 바람직하다. 대장은 무산소 상태에 있고, 여기에 생육하는 장내 세균은 편성 혐기성이다. 따라서, 질소 가스에 의해 배지 중 및 배지 기층 중을 무산소 상태로 유지할 필요가 있다. 또한, 장내에는 장내 세균이 산생하는 탄산 가스나 수소 가스도 존재하는 점에서, 이들을 포함하면 바람직하다. 비율로서는 질소 80 내지 90%, 탄산 가스 5 내지 10%, 수소 가스 5 내지 10%를 들 수 있다. 배양 시간은, 배지 pH가 일정해질 때까지 행하는 것이 바람직하고, 16 내지 32시간이 바람직하고, 16시간이 한층 더 바람직하다.
- [0141] 균체 혼합물을 구성하는 각종 장내 세균은, 100mL의 배지에 대하여 1.0E+07로부터 1.0E+08cfu/mL 정도가 되도록 첨가한다. 균체 혼합물 전체에 있어서의 각종 장내 세균의 균수 구성비는, 첨가하는 세균수를 모든 균종에서 같게 함으로써 산출할 수 있다.
- [0142] (단쇄 지방산 증가 촉진 작용의 평가 방법)
- [0143] 본원 발명의 단쇄 지방산 증가 촉진 작용의 평가 방법은, 장내 세균총 모델로서의 균체 혼합물에, 평가 대상물을 첨가하여 상기 배양 방법에 의해 배양하고, 일정 시간 경과 후에 단쇄 지방산량을 측정하여, 무첨가의 경우와 비교함으로써 평가할 수 있다. 측정은, 예를 들어 배양 상청의 HPLC 등에 제공함으로써 행할 수 있다.
- [0144] (다양성 증가 촉진 작용의 평가 방법)
- [0145] 본원 발명의 다양성 증가 촉진 작용의 평가 방법은, 장내 세균총 모델로서의 균체 혼합물에, 평가 대상물을 첨가하여 상기 배양 방법에 의해 배양하고, 일정 시간 경과 후에 다양성을 나타내는 지수의 측정을 행하여, 무첨가의 경우와 비교함으로써 평가할 수 있다. 측정은, 배양물의 상청에서 추출한 계놈 DNA로부터 차세대 시퀀싱과 해석 파이프라인을 사용하여 다양성을 나타내는 지수를 산출(다양성의 수치화)함으로써 행할 수 있다.
- [0146] (스크리닝 방법)
- [0147] 본원 발명의 스크리닝 방법은, 장내 세균총 모델로서의 세균 혼합물에, 스크리닝 대상물을 첨가하여 상기 배양 방법에 의해 배양하고, 일정 시간 경과 후에 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 또는 다양성 증가 촉진 작용을 갖는 것을 선택할 수 있다.
- [0148] 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성이나 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산을 증가시키는 방법으로서, 장내 세균총을 구성하는 장내 세균에 작동하여, 단쇄 지방산이나 다양성을 증가시키는 유산균이나 비피더스균을 섭취하는 방법을 생각할 수 있다. 예를 들어, 그들을 포함하는 발효 유제품을 섭취하는 것이다. 발효 유제품에 사용되는 유산균으로서 대표적인 종류로서는, 락토바실러스속에 속하는 유산균을 들 수 있다. 범용되는 종으로서, 락토바실러스 불가리쿠스, 락토바실러스 카세리, 락토바실러스 류테리, 락토바실러스 헬베티카스 등을 들 수 있다. 한편, 그다지 유익하게 활용되고 있지 않은 균종으로서, 락토바실러스·무코사예를 들 수 있다. EFSA(유럽 식품 안전 기관)의 QPS(Qualified Presumption of Safety)에 있어서 안전성에 관한 우려가 없는 균종으로서 기재되어 있고, 병원성 세균의 정착을 억제하는 효과나 콜레스테롤 저하 효과를 갖는 프로바이오틱스 균주로서도 주목받고 있다. 본원 발명의 스크리닝 방법에 의해, 락토바실러스속의 각 균종의 유산균을 스크리닝한 바, 락토바실러스·무코사예에 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및 다양성 증가 촉진 작용이 있는 것을 처음으로 발견하였다.
- [0149] 본 스크리닝 대상물로서는, 유산균이나 비피더스균 등의 세균뿐만 아니라, 공지된 식품 조성물도 대상으로 할 수 있다. 또한, 후술하는 실시예에서는, 이미 단쇄 지방산을 증가시키는 것이 알려져 있는 난소화성 식이 섬유

류 α-CD(알파 시클로덱스트린)를 본 평가 방법으로 평가(스크리닝)한 바, 단쇄 지방산 및 다양성을 증가하는 것이 확인되었다.

[0150] (장내 세균총 개선용 식품의 제조 방법)

[0151] 본원 발명의 장내 세균총 개선용 식품의 제조 방법은, 상기한 평가 방법 또는 스크리닝 방법에 있어서 단쇄 지방산 증가 촉진 작용 및/또는 다양성 증가 촉진 작용을 갖는다고 평가된 식품 조성물을 사용하여 식품을 제조하는 방법이다. 본원 발명의 식품 조성물을 식품에 배합함으로써 식품을 제조할 수 있다. 이들 배합은, 식품의 제조 공정 중에 원료에 첨가해도 되고, 소재에 배합시켜도 되고, 최종 제품인 식품에 배합하여 제조할 수도 있다. 또한, 본원 발명의 식품 조성물이 유산균이나 비피더스균인 경우에는, 이들을 발효하여 배양물을 얻음으로써 제조할 수 있다.

[0152] (비피더스균)

[0153] 본 명세서에 있어서 「비피더스균」이란, 비피도박테리움속에 속하는 균을 의미한다. 비피더스균은 비피도박테리움속에 속하는 세균이면 특별히 한정되지 않지만, 비피도박테리움·롱균, 비피도박테리움·슈도카테놀라탐, 비피도박테리움·아돌레센티스, 비피도박테리움·비피담, 비피도박테리움·브레베, 비피도박테리움·덴티움 등을 들 수 있다. 이 중, 바람직한 예로서, 비피도박테리움·롱균을 들 수 있다. 또한, 균주로서는, 비피도박테리움·롱균 기준주 JCM1217 또는 비피도박테리움·롱균 SBT2928주(수탁 번호: FERM P-10657, 기탁일: 1989년 4월 13일, 독립 행정 법인 산업 기술 종합 연구소 특허 생물 기탁 센터)를 예시할 수 있다.

[0154] (비피더스균의 증식 촉진)

[0155] 본 명세서에 있어서 「비피더스균의 증식 촉진」이란, 비피더스균의 생균수가 증가하는 것을 가리킨다. 비피더스균의 증식 촉진 활성은, 비피더스균의 생균수 증가가, 락토바실러스·무코사예를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에서, 첨가한 경우쪽이 큰 경우에 당해 활성이 있다고 한다. 예를 들어, 시험관 내에 있어서 비피더스균을, 락토바실러스·무코사예를 첨가하지 않고 배양한 경우에 얻어지는 비피더스균의 생균수를 1.0배로 하였을 때, 락토바실러스·무코사예를 첨가한 경우에 얻어지는 비피더스균의 생균수가 1.0배보다 큰 경우에, 활성이 있다고 한다. 당해 활성을 갖는 제제를 본 발명에서는 비피더스균 증식 촉진제라고 한다. 본 발명의 비피더스균 증식 촉진제의 유효 성분으로 하는 락토바실러스·무코사예는, 락토바실러스·무코사예를 첨가하지 않고 배양한 경우에 얻어지는 비피더스균의 생균수를 1.0배로 하였을 때, 락토바실러스·무코사예를 첨가한 경우에 얻어지는 비피더스균의 생균수가 1.1배 이상을 나타내는 균주가 바람직하고, 보다 바람직하게는 1.5배 이상, 한층 더 바람직하게는 2.0배 이상을 나타내는 균주이다.

[0156] (비피더스균의 생균수)

[0157] 비피더스균의 생균수란, 비피더스균이 생육 가능한 혐기성 세균용 배지인 GAM 배지, 비피더스균용 배지인 TOS 프로피온산 한천 배지 등에 있어서 관측되는 콜로니 형성수를 가리킨다.

[0158] (인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가)

[0159] 본 명세서에 있어서 「인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가」란, 인간 장내 세균군에 있어서의 비피더스균의 비율이 증가되는 것을 말한다. 예를 들어, 비피더스균의 장내 세균에 있어서의 비율이 락토바실러스·무코사예를 섭취하기 전에 비해, 섭취 후의 비율이 1.0배보다 큰 경우에 활성이 있다고 한다. 당해 활성을 갖는 제를 본 발명에서는 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제라고 한다. 본 발명의 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제의 유효 성분으로 하는 락토바실러스·무코사예는, 섭취하기 전에 비해 섭취 후의 비율이 1.1배 이상을 나타내는 균주가 바람직하고, 보다 바람직하게는 1.3배 이상, 한층 더 바람직하게는 2.0배 이상, 더욱 바람직하게는 3.0배 이상을 나타내는 균주이다. 이러한 균주의 스크리닝 방법으로서, 먼저 장내 환경을 모방한 배양 조건 하, 시험관 내에 있어서 락토바실러스·무코사예를 첨가하지 않고 비피더스균을 배양한 경우에 얻어지는 비피더스균의 생균수를 1.0배로 하였을 때, 락토바실러스·무코사예를 첨가한 경우에 얻어지는 비피더스균의 생균수가 1.1배 이상을 나타내는 균주를 스크리닝하는 방법을 들 수 있다.

[0160] (비피더스균의 비율)

[0161] 인간 장내에 있어서의 비피더스균의 비율이란, 분변 중에 있어서의 DNA 중의 비피더스균의 비율을 의미한다. 분변 중에서 얻어진 DNA에 대해서, 16SrRNA 유전자를 PCR에 의해 증폭시키고, PCR산물 전체에 포함되는 비피더스균 유래의 DNA의 비율을 산출할 수 있다. 비율의 산출에 대해서는, 차세대 시퀀서에 의한 메타 16S 해석법이

나, T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)법 등의 균총 해석 방법을 사용할 수 있다.

- [0162] (인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제 및 비피더스균 증식 촉진제)
- [0163] 본 발명의 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제 및 비피더스균 증식 촉진제는, 락토바실러스·무코사예의 발효 배양물 그 자체나 균체 그 자체를 이용할 수 있다. 식품으로서 이용되는 발효 배양물로서는 상술한 발효 유제품을 들 수 있다.
- [0164] 또한 제제화하여 이용할 수도 있다. 제제화 시에는 제제상 허가되어 있는 부형제, 안정제, 교미제 등을 적절히 혼합하여 농축, 동결 건조시키는 것 이외에도, 가열 건조시켜 사균체로 해도 된다. 이들 건조물, 농축물, 페이스트상물도 함유된다.
- [0165] 또한, 비피더스균 증식 촉진 활성을 방해하지 않는 범위에서, 부형제, 결합제, 붕괴제, 활택제, 교미 교취제, 현탁제, 코팅제, 기타 임의의 약제를 혼합하여 제제화할 수도 있다. 제형으로서는, 정제, 캡슐제, 과립제, 산제, 분제, 시럽제 등이 가능하고, 이들을 경구적으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0166] (인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가용 식품 및 비피더스균 증식 촉진용 식품)
- [0167] 본 발명의 인간 장내의 비피더스균 비율의 증가용 식품 및 비피더스균 증식 촉진용 식품은, 락토바실러스·무코사예의 발효 배양물 그 자체를 이용할 수 있다. 식품으로서 이용되는 발효 배양물로서는 상술한 발효 유제품을 들 수 있다.
- [0168] 또한, 이들 식품은, 상기 인간 장내의 비피더스균 비율의 증가제 및 비피더스균 증식 촉진제를 적당한 식품에 배합한 것을 이용할 수도 있다. 이들 배합은, 식품의 제조 공정 중에 원료에 첨가해도 되고, 소재에 배합시켜도 되고, 최종 제품인 식품에 배합할 수도 있다.
- [0169] 식품의 예로서는, 치즈, 발효유, 유제품 유산균 음료, 유산균 음료, 버터, 마가린 등의 유제품, 우유 음료, 과즙 음료, 청량 음료 등의 음료, 젤리, 캔디, 푸딩, 마요네즈 등의 알가공품, 버터 케이크 등의 과자·팬류, 나아가 각종 분유 외에도, 유아 식품, 영양 조성물 등을 들 수 있지만 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0170] 또한, 본 발명의 인간 장내의 비피더스균 비율의 증가용 식품 및 비피더스균 증식 촉진용 식품은, 기능성 표시 식품, 특정 보건용 식품, 영양 기능 식품, 미용용 식품으로서 사용하는 것도 가능하다.
- [0171] 락토바실러스·무코사예의 균체 및/또는 배양물을 배합하여, 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가제, 비피더스균 증식 촉진제, 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가용 식품, 비피더스균 증식 촉진용 식품, 인간 장내에 있어서의 비피더스균 비율의 증가용 영양 조성물, 비피더스균 증식 촉진제 영양 조성물을 제조하는 경우, 배합 비율은 특별히 한정되지 않고, 제조의 용이성이나 바람직한 하루 투여량에 따라서 적절히 조절하면 된다. 투여 대상자의 증상, 연령 등을 고려하여 각각 개별로 결정되지만, 통상 성인의 경우, 락토바실러스·무코사예의 균체 배양물을 10 내지 200g, 혹은 균체 자체를 0.1 내지 100mg 섭취할 수 있도록 배합량을 조절하면 된다.
- [0172] 이하, 본원 발명의 실시예를 상세하게 설명하지만, 본원 발명이 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0173] **실시예**
- [0174] [시험예 1] 모델 평가계용 배양물의 조제
- [0175] 1. 일본인의 장 세균총의 특징을 갖는 장내 세균의 추출
- [0176] (1) 장내 세균의 입수 및 선택
- [0177] 일본인의 장내 세균총에 있어서 우세하게 존재하는 장내 세균 중 입수 가능한 균종을 분양 기관 JCM(국립 연구개발 법인 이화학 연구소 바이오리소스 연구 센터)에서 입수하고, 변법 GAM 부용 배지(상품 코드 05433, 닛스이)에서 배양하였다. 당해 배양에 의해 증식이 확인된 29종류의 장내 세균 중에서, 일본인의 장내의 분류학적 비율을 유지하는 조합으로 장내 세균을 추출하였다. 즉, 파미큐테스문, 악티노박테리아문, 박테로이데테스문에 속하는 장내 세균을, 균종수로서 각각 약 57%, 약 24%, 약 19% 포함하는 조합으로 하였다. 그리고, 이들 비율을 유지하고, 또한 외국인과 비교하여 일본인에게 높은 존재비를 나타내는 균속인 브라우티아속, 비피도박테리움속, 콜린세라속, 스트렙토코커스속을 포함하는 조합으로 장내 세균을 추출하였다.
- [0178] (2) 각종 농축 균체의 조제

[0179] 변법 GAM 부용 배지를 조제하여, 121℃, 15분간의 가열 처리로 배지를 멸균하였다. 상기 29균종의 장내 세균을 개개의 멸균 배지에 각각 식균하고, 혐기 워크 스테이션(컨셉 400, 센트랄 가가쿠 보에키)을 사용하여 37℃에서 혐기 배양하였다. 얻어진 각 배양물을 원심 조작에 의해 농축하고, 10%(v/v)가 되도록 글리세롤을 첨가하여 각종 농축 균체를 취득하였다. 이들 농축 균체를 -80℃에서 동결, 그 후 용해를 실시한 후, 단계 희석을 행하고, 변법 GAM 부용 한천 배지에 도말하여 생균수를 측정하고, 어느 균주에 대해서도 1.0E+07cfu/mL 이상의 생균수가 포함되어 있는 것을 확인하였다. 사용한 변법 GAM 부용 배지의 조성을 하기 표 1에 나타낸다.

표 1

성분	1L 중
펩톤	5.0 g
대두 펩톤	3.0 g
프로테오제 펩톤	5.0 g
소화 혈청말	10.0 g
효모 엑기스	2.5 g
육엑기스	2.2 g
간장 엑기스	1.2 g
포도당	0.5 g
용성 전분	5.0 g
L-트립토판	0.2 g
L-시스테인염산염	0.3 g
티오글리콜산나트륨	0.3 g
L-아르기닌	1.0 g
비타민 K1	5.0 mg
헤민	10.0 mg
인산2수소칼륨	2.5 g
염화나트륨	3.0 g

[0180]

[0181] 2. 시험 결과

[0182] 상기 1(1)의 방식에 따라서, 파미큐테스문, 악티노박테리아문, 박테로이데테스문에 속하는 장내 세균을, 각각 5균종, 2균종, 2균종 포함하는 합계 9균종의 조합, 7균종, 3균종, 2균종 포함하는 합계 12균종의 조합, 8균종, 3균종, 3균종 포함하는 합계 14균종의 조합, 10균종, 4균종, 3균종 포함하는 합계 17균종의 조합이 되도록 장내 세균을 추출하였다. 입수한 29균종에 포함되는 악티노박테리아문에 속하는 4균종 모두를 포함하는 17균종의 조합을 표 2에 나타낸다.

표 2

균종	균종명	JCM주 번호	문에 의한 분류
1	스트렙토코커스 살리바리우스	5 7 0 7 T	파미큐테스
2	루미노코커스 구나바스	6 5 1 5 T	파미큐테스
3	브라우티아 웨슬레라에	1 7 0 4 1 T	파미큐테스
4	도레아 른기카테나	1 1 2 3 2 T	파미큐테스
5	클로스트리디움 볼테아에	1 2 2 4 3 T	파미큐테스
6	유박테리움 텍탈레	1 7 4 6 3 T	파미큐테스
7	코프로코커스 코메스	3 1 2 6 4	파미큐테스
8	브라우티아 오베움	3 1 3 4 0	파미큐테스
9	페칼리박테리움 프라우스닛츠이	3 1 9 1 5	파미큐테스
1 0	플라보니프랙터 플라우티	3 2 1 2 5 T	파미큐테스
1 1	비피도박테리움 슈도카테놀라탐	1 2 0 0 T	악티노박테리아
1 2	비피도박테리움 퉁굽	1 2 1 7 T	악티노박테리아
1 3	비피도박테리움 아돌레센티스	1 2 7 5 T	악티노박테리아
1 4	콜린셀라 아에로파시엔스	1 0 1 8 8 T	악티노박테리아
1 5	박테로이테스 불가투스	5 8 2 6 T	박테로이테레스
1 6	박테로이테스 유니포르미스	5 8 2 8 T	박테로이테레스
1 7	박테로이테스 도레이	1 3 4 7 1 T	박테로이테레스

[0183]

[0184]

3. 모델 평가계의 배양 방법

[0185]

온도 및 pH를 경시적으로 모니터링 가능한 소용량의 배양 장치에, 멸균한 변법 GAM 부용 배지를 첨가하고, 배양 전에 질소, 이산화탄소, 수소의 혼합 가스를 일정 시간 통기하여, 배지 중의 용존 산소를 가능한 한 제거하였다. 구체적으로는, 실리콘 재질의 패킹류를 니트릴(NBR) 재질로, 튜브류를 파메드 튜브로 변경한 소량 다연 배양 장치(Bio Jr. 8, 에이블)를 사용하여, 혼합 가스의 비율은 각각 질소 80%, 탄산 가스 10%, 수소 10%의 혼합 가스로 통기하였다.

[0186]

재구축된 표 2에 나타내는 17균종의 세균의 혼합 배양물을 식균하고, 상기 혼합 가스를 통기하여, 교반하면서 배지의 pH가 일정해질 때까지 배양하였다. 모델 평가계의 혼합 배양물은 100mL의 배지에 대하여 각 장내 세균이 1.0E+07로부터 1.0E+08cfu/mL 정도이고, 교반은 100rpm 이하, 배양 개시 시의 pH는 7.2, 배양 시간은 16시간으로 행하였다.

[0187]

이하의 시험예에서는, 모델 평가계에 식품용 조성물 후보를 첨가하고, 상기 배양 방법에 의해 배양하였을 때의 배양물을 회수하여, 단쇄 지방산 산생량의 측정 및 다양성을 나타내는 지수의 산출을 행하고, 평가를 행한다.

[0188]

[시험예 2] 단쇄 지방산 및 다양성의 증가 촉진 작용의 평가 방법의 확립

[0189]

인간에 있어서 난소화성 식이 섬유류의 섭취에 의해 장내 세균총에서의 단쇄 지방산이 증가하는 것은 널리 알려져 있는 한편, 안정적으로 다양성을 증가시키는 식품 조성물은 지금까지 보고되어 있지 않다. 그러나, 비만이나 당뇨병, 지질 이상증을 갖는 환자에서는, 단쇄 지방산의 저하뿐만 아니라 다양성에 대해서도 저하가 보고되어 있고, 단쇄 지방산과 다양성에는 일정 정도 관계성이 있다고 추정된다.

[0190]

본 평가계는 표준화된 장내 세균총 모델을 이용하는 점에서, 개인간의 장내 세균총의 차이에 의해 비교가 곤란하였던 다양성의 증가 촉진 작용을 높은 정밀도로 확인할 수 있다.

[0191]

(1) 시험 방법

[0192]

시험 대상으로서, 상술한 단쇄 지방산을 증가시키는 것이 확인되고 있는 난소화성 식이 섬유류 α-CD(알파 시클로덱스트린, CAVAMAX WG Food, 시클로켄)를 본 평가계에 첨가하고, 단쇄 지방산이 증가되는지 확인함과 함께, 다양성에 대해서도 그 평가를 실시하였다. 난소화성 식이 섬유류는 인간이 섭취 가능한 양인 0.2%(3000g의 식사에 대하여 6g의 첨가를 상정)를 첨가하였다.

[0193]

(2) 단쇄 지방산 산생 증가 촉진 작용의 평가 방법

- [0194] 배양물의 상청으로부터 HPLC(ICS2100, 다이아텍)를 사용하여 부티르산 및 총 단쇄 지방산 산생량(아세트산/프로피온산/부티르산의 총합)의 산출을 실시하고, 평가를 실시하였다. 인간 대장에서 장내 세균에 의해 산생되는 대표적인 단쇄 지방산은, 아세트산, 프로피온산 및 부티르산의 3종류이다.
- [0195] (3) 다양성 증가 촉진 작용의 평가 방법
- [0196] 배양물의 상청에서 추출한 게놈 DNA로부터 차세대 시퀀서(Ion PGM, 서모 피셔 사이언티픽)와 해석 파이프라인(QIIME2)을 사용한 다양성을 나타내는 지수의 산출(다양성의 수치화)을 실시하고, 평가를 실시하였다.
- [0197] 장내 세균총의 다양성을 나타내는 지수로서, 새년 인덱스, 계통 발생적 다양성 인덱스의 2개의 지표를 선택하였다.
- [0198] (4) 시험 결과
- [0199] α -CD를 첨가하지 않은 대조구를 1.0으로 한 경우의 단쇄 지방산 산생량의 증가율은 부티르산이 1.57배이며, 총 단쇄 지방산산(아세트산/프로피온산/부티르산의 총합)도 1.13배로 증가하였다.
- [0200] 또한, 무첨가를 1.0으로 한 경우의 다양성 지수의 증가율은 새년 인덱스가 1.25배이며, 계통 발생적 다양성 인덱스도 1.05배로 증가하였다.
- [0201] 이상으로부터, 본 평가 방법에 있어서 α -CD의 첨가의 첨가에 의해, 단쇄 지방산의 증가가 양호한 재현성으로 확인되었다. 또한, 다양성의 증가에 대해서도, 양호한 재현성으로 확인되었다. 따라서, 본 평가 방법은, 모델 평가계로서 정밀도가 양호한 평가 방법인 것이 실증되었다.
- [0202] [시험예 3] 단쇄 지방산 및/또는 장내 세균총의 다양성을 증가시키는 유산균의 스크리닝
- [0203] (1) 시험 방법
- [0204] 락토바실러스·무코사예에 속하는 유산균을 시험예 2에서 실증된 평가 방법에 의해, 단쇄 지방산이 증가되는지 확인함과 함께, 다양성의 증가에 대해서도 평가하였다. 구체적으로는, 출원인이 보유하는 인간을 분리원으로 하는 락토바실러스·무코사예에 속하는 각 유산균(표 2)을, 100mL의 배지에 대하여 1.0E+07cfu/mL 정도 첨가하였다.
- [0205] (2) 단쇄 지방산 산생 증가 촉진 작용의 평가 방법
- [0206] 시험예 2와 마찬가지로 행하였다.
- [0207] (3) 다양성 증가 촉진 작용의 평가 방법
- [0208] 시험예 2와 마찬가지로 행하였다.
- [0209] (4) 시험 결과
- [0210] 모델 평가계에 있어서의 첨가에 의해 단쇄 지방산을 증가시키는 각종 유산균 및 비피더스균을 탐색한 바, 단쇄 지방산의 증가가, 락토바실러스·무코사예 배양물의 첨가로 양호한 재현성으로 확인되었다. 또한, 다양성의 증가에 대해서도, 양호한 재현성으로 확인되었다.
- [0211] 예를 들어, 출원인이 보유하는 인간을 분리원으로 하는 락토바실러스 람노시스, 락토바실러스 델브룩키 서브스피시스 불가리쿠스를 첨가한 경우의 단쇄 지방산 산생량의 증가율은 각각, 부티르산은 0.66배, 0.85배이며, 총 단쇄 지방산산(아세트산/프로피온산/부티르산의 총합)도 각각 0.94배, 0.95배로 감소하였다. 또한, 다양성 지수의 증가율은 각각, 새년 인덱스가 0.97배, 0.85배이며, 계통 발생적 다양성 인덱스도 0.95배, 0.95배로 감소하였다.
- [0212] 락토바실러스·무코사예를 첨가하지 않은 대조구를 1.0으로 한 경우의, 단쇄 지방산 산생량의 증가율을 표 3에, 다양성 지수의 증가율을 표 4에 나타내었다.

표 3

락토바실러스 무코사에 배양물의 첨가에 의한 단쇄 지방산 산생량의 증가율

균종명	SBT주 번호	분리원	부티르산	총 단쇄 지방산
락토바실러스 무코사에	1 0 0 2 8	인간	2. 3 3	1. 1 3
락토바실러스 무코사에	1 0 0 4 3	인간	1. 8 7	1. 2 2
락토바실러스 무코사에	1 0 2 1 7	인간	1. 7 4	1. 1 5
락토바실러스 무코사에	1 0 0 2 7	인간	1. 5 6	1. 1 2
락토바실러스 무코사에	1 0 0 3 8	인간	1. 4 7	1. 0 8
락토바실러스 무코사에	2 2 6 1	인간	1. 4 1	1. 1 0
락토바실러스 무코사에	2 0 2 7	인간	1. 3 4	1. 0 7
락토바실러스 무코사에	2 2 7 1	인간	1. 1 8	1. 1 1

[0213]

표 4

락토바실러스 무코사에 배양물의 첨가에 의한 다양성 지수의 증가율

균종명	SBT주 번호	분리원	새년 인덱스	계통 발생적 다양성 인덱스
락토바실러스 무코사에	1 0 0 2 8	인간	1. 2 6	1. 2 0
락토바실러스 무코사에	1 0 0 4 3	인간	1. 4 6	1. 3 6
락토바실러스 무코사에	1 0 2 1 7	인간	1. 3 6	1. 2 9
락토바실러스 무코사에	1 0 0 2 7	인간	1. 2 9	1. 2 0
락토바실러스 무코사에	1 0 0 3 8	인간	1. 3 8	1. 3 4
락토바실러스 무코사에	2 2 6 1	인간	1. 1 9	1. 1 1
락토바실러스 무코사에	2 0 2 7	인간	1. 2 5	1. 1 2
락토바실러스 무코사에	2 2 7 1	인간	1. 2 9	1. 2 2

[0214]

[0215] (5) 고찰

[0216] 일본인의 장내 우세 세균에 의해 재구축된 혼합 배양물인 장내 세균총 모델에, 장내 세균의 생육을 촉진시키는 식품 조성물로서 α-CD, 락토바실러스·무코사에를 첨가하고, 혼합 배양함으로써, 무첨가 시와 비교하였을 때, 단쇄 지방산 산생량의 증가 및/또는 다양성의 증가가 촉진되는 것을 확인할 수 있었다.

[0217] [시험예 4] 비피더스균의 증식 촉진

[0218] (1) 균주

[0219] 락토바실러스·무코사에로서는, 표 5의 인간을 분리원으로 하는 균주를 사용하였다. 또한, 비피더스균에 대해서는, 일본인의 유유아(乳幼兒)부터 고령자까지 넓게 분포하는 것이 알려져 있는 비피도박테리움·롱굽과 동균종의 기준주 JCM1217을 사용하였다.

표 5

사용 균주

종명	균주 번호	분리원
락토바실러스 · 무코사에	SBT2025	인간
락토바실러스 · 무코사에	SBT2268	인간
락토바실러스 · 무코사에	SBT2269	인간
락토바실러스 · 무코사에	SBT2867	인간
락토바실러스 · 무코사에	SBT10043	인간
락토바실러스 · 무코사에	SBT10228	인간

[0220]

[0221]

(2) 락토바실러스 · 무코사에 농축 균체의 조제

[0222]

유산균용 배지인 MRS 액체 배지를 조제하고, 121°C, 15분간의 가열 처리로 배지의 멸균을 실시하였다. 거기에, 표 5에 기재된 락토바실러스 · 무코사에 SBT2025, 락토바실러스 · 무코사에 SBT2268, 락토바실러스 · 무코사에 SBT2269, 락토바실러스 · 무코사에 SBT2867, 락토바실러스 · 무코사에 SBT10043 및 락토바실러스 · 무코사에 SBT10228을 식균하고, 혐기 배양 시스템(상품명: 아네로팩, 미쯔비시 가스 가가꾸 가부시킴이샤)을 사용하여 37°C, 16시간 혐기 배양하였다. 얻어진 배양물을 원심 조작에 의해 농축하고, 10%(v/v)가 되도록 글리세롤을 첨가하여 농축 균체를 취득하였다. 이들 농축 균체를 -80°C에서 동결, 그 후 용해를 실시한 후, 단계 회석을 행하고, MRS 한천 배지에 도말하여, 생균수를 측정하고, 어느 균주에 대해서도 2.0E+09cfu/mL 이상의 생균수가 포함되어 있는 것을 확인하였다.

[0223]

(3) 락토바실러스 · 무코사에 발효 유제품의 조제

[0224]

0.5%(w/w) 효모 엑기스, 2.5%(w/w) 포도당을 포함하는 10%(w/w) 탈지 분유를 조제하고, 115°C, 20분간의 가열 처리로 살균을 실시하였다. 거기에, 상기와 같이 조제한 각 농축 균체를 0.1%(v/v)가 되도록 첨가하고, 혐기 배양 시스템을 사용하여 37°C, 16시간 혐기 배양하였다. 얻어진 발효 유제품에 대하여 용량으로서 단계 회석을 행하고, 0.132%(v/v) 아세트산을 포함하는 유산 간균용 LBS 한천 배지에 도말하여, 생균수를 측정하고, 어느 균주에 대해서도 1.0E+06cfu/mL 이상의 생균수가 포함되어 있는 것을 확인하였다. 이들을 비피도박테리움 · 룡균 JCM1217과의 혼합 배양에 사용하였다.

[0225]

(4) 비피도박테리움 · 룡균 JCM1217 농축 균체의 조제

[0226]

혐기성 세균용 배지인 GAM 액체 배지(GAM 부용, 제품 코드 05422, 닛스이 세이야쿠 가부시킴이샤제)를 조제하고, 115°C, 15분간의 가열 처리로 배지의 살균을 실시하였다. 거기에, 비피도박테리움 · 룡균 JCM1217을 식균하고, 혐기 배양 시스템을 사용하여 37°C, 16시간 혐기 배양하였다. 얻어진 배양물을 원심 조작에 의해 농축하고, 10%(v/v)가 되도록 글리세롤을 첨가하여 농축 균체를 취득하였다. 이들 농축 균체를 -80°C에서 동결, 그 후 용해를 실시한 후, 단계 회석을 행하고, 비피더스균용 TOS 프로피온산 한천 배지에 도말하여, 생균수를 측정하고, 1.0E+09cfu/mL의 생균수가 포함되어 있는 것을 확인하였다. 이것을 락토바실러스 · 무코사에와의 혼합 배양에 사용하였다.

[0227]

(5) 락토바실러스 · 무코사에 발효 유제품과 비피도박테리움 · 룡균 JCM1217의 혼합 배양

[0228]

혐기성 세균용 배지인 GAM 액체 배지(GAM 부용, 제품 코드 05422, 닛스이 세이야쿠 가부시킴이샤제)를 조제하고, 115°C, 15분간의 가열 처리로 배지의 살균을 실시하였다. 거기에, 1%(v/v) 락토바실러스 · 무코사에 발효 유제품(1.0E+06cfu/mL 이상)과, 10%(v/v) 비피도박테리움 · 룡균 JCM1217 농축 균체(1.0E+09cfu/mL)를 첨가 혼합하고, 혐기 배양 시스템을 사용하여 37°C, 16시간 배양하였다. 대조구로서, 락토바실러스 · 무코사에 발효 유제품을 첨가하지 않은 시험구를 마련하였다. 또한, GAM 액체 배지는 장내 환경의 모델 배지로서 사용되고 있는 배지이다(PLOS ONE DOI:10. 1371/JOURNAL. PONE. 0160533 August 2, 2016).

[0229]

(6) 혼합 배양 후의 비피더스 생균수와 증식 촉진

[0230]

상기 혼합 배양물을 용량으로 10배가 되도록 단계 회석하고, 비피더스균의 선택 배지인 0.005%(w/v) 무피로신 리튬을 포함하는 TOS 프로피온산 한천 배지에 도말하고, 혐기 배양 시스템을 사용하여 37°C, 3일간 배양하였다. 한천 배지 상에 형성된 콜로니수를 관측하고, 대조구를 1.0배로 한 경우에 있어서의, 각 발효 유제품에 의한 콜

로니 형성수(cfu)의 증가, 즉 비피더스균의 증식 축진을 배율로 산출하였다.

[0231] 그 결과, 락토바실러스·무코사에 발효 유제품을 첨가하지 않은 대조구의 비피더스 생균수가 4.7E+08cfu/mL였던 것에 비해, SBT2025 발효 유제품 첨가에서는 8.7E+08cfu/mL(증식 축진 1.8배), SBT2268 발효 유제품 첨가에서는 1.0E+09cfu/mL(증식 축진 2.1배), SBT2269 발효 유제품 첨가에서는 1.0E+09cfu/mL(증식 축진 2.1배), SBT2867 발효 유제품 첨가에서는 1.3E+09cfu/mL(증식 축진 2.9배), SBT10043 발효 유제품 첨가에서는 5.1E+08cfu/mL(증식 축진 1.1배), SBT10228 발효 유제품 첨가에서는 1.3E+09cfu/mL(증식 축진 2.7배)였다. 즉, 이들 락토바실러스·무코사에 발효 유제품은, 비피더스균의 증식 축진이 대조구와 비교하여 1.1배 이상이었다(표 6). 또한 「E+08」 「E+09」는 「×10⁸」 「×10⁹」를 나타낸다.

표 6

락토바실러스·무코사에 발효 유제품의 비피더스균 증식 축진

발효 유제품(균주 번호)	비피더스 생균수 (cfu/mL)	증식 축진(배) (발효 유제품 없음을 1.0 배로 함)
없음	4.7E+08	1.0
있음 (SBT2025)	8.7E+08	1.8
있음 (SBT2268)	1.0E+09	2.1
있음 (SBT2269)	1.0E+09	2.1
있음 (SBT2867)	1.3E+09	2.9
있음 (SBT10043)	5.1E+08	1.1
있음 (SBT10228)	1.3E+09	2.7

[0232] [시험예 5] 인간 장내에 있어서의 비피더스균의 비율의 증가

[0234] (1) 균주와 발효 유제품의 시작

[0235] 시험예 4에서 증식 축진이 1.1배였던 SBT10043에 대해서, 식용 발효 유제품을 시작하였다. SBT10043을 MRS 한천 배지 상에 단일 콜로니 분리한 후, 1%(w/w) 식용 효모 엑기스, 2%(w/w) 식용 카제인 펩톤, 2%(w/w) 식용 포도당으로 구성된 영양 배지에 조균하고, 혐기 배양 시스템을 사용하여 37℃, 16시간 혐기 배양하였다. 이 배양물을 원심에 의해 용량으로 10배로 농축하고, 식용 농축 균체를 취득하였다. 다음에 0.5%(w/w) 식용 효모 엑기스, 2.5%(w/w) 식용 포도당을 포함하는 10%(w/w) 탈지 분유를 조제하고, 115℃, 20분간 살균하였다. 이 탈지유 배지에 10%(v/w)가 되도록 식용 농축 균체를 첨가하고, 밀폐된 용기 내에서 37℃, 24시간 정치 배양하였다.

[0236] 상기, 발효 유제품을, 새롭게 조제, 살균한 0.5%(w/w) 식용 효모 엑기스, 2.5%(w/w) 식용 포도당을 포함하는 10%(w/w) 탈지 분유에 10%(w/w)가 되도록 식균하고, 밀폐된 용기 내에서 37℃, 24시간 정치 배양하였다. 이것을 식용 발효 유제품으로 하였다. 또한, 식용 발효 유제품은 동일한 식용 발효 유제품을 종균으로 하여, 계대 배양을 반복하여 필요에 따라서 복수회 제조를 행하였다. 즉, 식용 발효 유제품을 동일한 탈지유 배지(0.5%(w/w) 식용 효모 엑기스, 2.5%(w/w) 식용 포도당을 포함하는 10%(w/w) 탈지 분유)에 10%(w/w)가 되도록 식균하고, 밀폐된 용기 내에서 37℃ 24시간 정치 배양하는 계대 배양을 반복하여, 식용 발효 유제품의 종균으로 함과 함께, 필요에 따라서 배양 중요도를 증가시켜, 식용 발효 유제품으로서 섭취에 사용하였다.

[0237] (2) 식용 발효 유제품에 있어서의 SBT10043의 생균수

[0238] 식용 발효 유제품 1.0mL를, 용량으로서 10배가 되도록 단계 희석을 행하고, 0.132%(v/v) 아세트산을 포함하는 유산 간균용 LBS 한천 배지에 도말하여, 생균수를 측정하고, 5.0E+08cfu/mL 이상의 생균수가 포함되어 있는 것을 확인하였다.

[0239] (3) 식용 발효 유제품의 섭취 기간과 섭취자

[0240] 상기 SBT10043을 포함하는 식용 발효 유제품을 1일당 200mL, 즉 1.0E+09cfu/일 이상이 되도록 14일간 섭취하였다. 섭취 전후의 분변을 회수하여 DNA를 추출하고, 균총 해석 방법의 하나인 T-RFLP법으로 비피더스균의 비율을 구하였다. 섭취하는 사람으로서는, 식용 발효 유제품 섭취 전에 비피더스균이 10% 미만인 섭취자 A와, 비피더스균이 10% 이상인 섭취자 B의 2명으로 행하였다.

[0241] (4) 섭취자 A에 있어서의 장내 비피더스균의 비율의 증가

[0242] 락토바실러스·무코사예를 포함하는 식용 발효 유제품 섭취 전의 섭취자 A의 대장내에 있어서의 비피더스균의 비율은 3.3%였지만, 상기 발효 유제품을 14일간 섭취 후에는 11.6%로 증가하였다. 즉, 상기 발효 유제품 섭취 전에 대하여 섭취 후에는 3.5배 증가하였다(표 7).

표 7

락토바실러스·무코사예를 포함하는 식용 발효 유제품 섭취 전후의 섭취자 A의 장내 세균군의 비율

균군	섭취 전(%)	섭취 후(%)
비피도박테리움	3.3	11.6
락토바실러스목	3.1	5.1
박테로이데스	50.7	55.1
프레보텔라	1.1	1.3
클로스트리디움 클러스터 IV	15.4	5.9
클로스트리디움 서브클러스터 XIVa	20.3	13.7
클로스트리디움 클러스터 IX	0.0	0.0
클로스트리디움 클러스터 XI	0.6	1.2
클로스트리디움 클러스터 XVIII	0.0	1.2
기타	5.5	4.8

[0243]

[0244] (5) 섭취자 B에 있어서의 장내 비피더스균의 비율의 증가

[0245] 락토바실러스·무코사예를 포함하는 식용 발효 유제품 섭취 전의 섭취자 B의 대장내에 있어서의 비피더스균의 비율은 19.9%였지만, 상기 발효 유제품을 14일간 섭취 후에는 25.9%로 증가하였다. 즉, 상기 발효 유제품 섭취 전에 대하여 섭취 후에는 1.3배 증가하였다(표 8).

[0246] 이상으로부터, 시험예 4에서 인간 대장내 환경을 모방한 배양 시험에 의해 비피더스균의 증식 촉진 활성을 나타내는 락토바실러스·무코사예를 포함하는 발효 유제품을 인간이 섭취함으로써, 대장내에 있어서의 비피더스균의 비율을 증가시킬 수 있는 것을 알았다.

표 8

락토바실러스·무코사예를 포함하는 식용 발효 유제품 섭취 전후의 섭취자 B의 장내 세균군의 비율

균군	섭취 전(%)	섭취 후(%)
비피도박테리움	19.9	25.9
락토바실러스목	2.7	1.5
박테로이데스	33.0	46.3
프레보텔라	0.0	0.0
클로스트리디움 클러스터 IV	5.9	6.1
클로스트리디움 서브클러스터 XIVa	32.5	17.9
클로스트리디움 클러스터 IX	0.0	0.0
클로스트리디움 클러스터 XI	0.0	0.0
클로스트리디움 클러스터 XVIII	0.0	0.0
기타	6.0	2.2

[0247]

산업상 이용가능성

[0248] 본원 발명에 의하면, 일본인의 장내 세균총을 인공적으로 재구축한 모델 평가계를 사용함으로써, 인간이나 동물

을 사용하지 않고, 또한 생체 시료인 인간 분변을 사용하지 않는 조건 하에서, 장내 세균총을 구성하는 장내 세균의 다양성이나 장내 세균총에 있어서의 단쇄 지방산을 증가시키는 식품 조성물을 탐색하는 것이 가능하다. 또한, 상기 모델 평가계를 사용하여 스크리닝한 락토바실러스·무코사이에 속하는 세균을 유효 성분으로서 포함하는 음식품 등을 섭취함으로써, 장내 세균총을 구성하는 장내 세균에 작용하여, 장내 세균총을 개선할 것을 기대할 수 있다.

[0249] 또 다른 본원 발명에 의하면, 시험관 내에서 비피더스균의 증식을 촉진시키는 락토바실러스·무코사이에의 발효 유제품을 섭취함으로써, 인간 대장에 있어서의 비피더스균의 비율을 증가시킬 수 있다. 이에 의해, 새로운 프로바이오틱스를 제공하는 것이 가능하게 되었다.

[0250] **수탁번호**

[0251] [기탁 생물 재료에 대한 언급]

[0252] (1) SBT10028

[0253] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소

[0254] 독립 행정 법인 제품 평가 기술 기반 기구 특허 미생물 기탁 센터(지바현 기사라즈시 가즈사 가마타리 2-5-8(우편번호 292-0818))

[0255] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자

[0256] 2020년 9월 15일(국제 기탁에의 이관일 2021년 3월 23일)

[0257] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호

[0258] NITE BP-03275

[0259] (2) SBT10217

[0260] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소

[0261] 상기 (1)과 동일함

[0262] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자

[0263] 2020년 9월 15일

[0264] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호

[0265] NITE P-03276

[0266] (3) SBT10027

[0267] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소

[0268] 상기 (1)과 동일함

[0269] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자

[0270] 2020년 9월 15일

[0271] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호

[0272] NITE P-03274

[0273] (4) SBT10038

[0274] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소

[0275] 상기 (1)과 동일함

[0276] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자

[0277] 2020년 9월 15일

[0278] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호

- [0279] NITE P-03283
- [0280] (5) SBT2261
- [0281] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소
- [0282] 상기 (1)과 동일함
- [0283] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자
- [0284] 2020년 9월 15일
- [0285] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호
- [0286] NITE P-03272
- [0287] (6) SBT2027
- [0288] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소
- [0289] 상기 (1)과 동일함
- [0290] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자
- [0291] 2020년 9월 15일
- [0292] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호
- [0293] NITE P-03271
- [0294] (7) SBT2271
- [0295] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소
- [0296] 상기 (1)과 동일함
- [0297] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자
- [0298] 2020년 9월 15일
- [0299] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호
- [0300] NITE P-03273
- [0301] (8) SBT10043
- [0302] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소
- [0303] 상기 (1)과 동일함
- [0304] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자
- [0305] 2020년 3월 27일(국제 기탁예의 이관일 2021년 3월 23일)
- [0306] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호
- [0307] NITE BP-03187
- [0308] (9) SBT2025
- [0309] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소
- [0310] 상기 (1)과 동일함
- [0311] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자
- [0312] 2020년 3월 27일
- [0313] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호
- [0314] NITE P-03189

- [0315] (10) SBT2268
- [0316] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소
- [0317] 상기 (1)과 동일함
- [0318] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자
- [0319] 2020년 3월 27일
- [0320] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호
- [0321] NITE P-03190
- [0322] (11) SBT2269
- [0323] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소
- [0324] 상기 (1)과 동일함
- [0325] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자
- [0326] 2020년 3월 27일
- [0327] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호
- [0328] NITE P-03191
- [0329] (12) SBT2867:
- [0330] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소
- [0331] 상기 (1)과 동일함
- [0332] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자
- [0333] 2020년 3월 27일
- [0334] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호
- [0335] NITE P-03192
- [0336] (13) SBT10228
- [0337] 가 당해 생물 재료를 기탁한 기탁 기관의 명칭 및 주소
- [0338] 상기 (1)과 동일함
- [0339] 나 가의 기탁 기관에 생물 재료를 기탁한 일자
- [0340] 2020년 3월 27일
- [0341] 다 가의 기탁 기관이 기탁에 대하여 붙인 수탁 번호
- [0342] NITE P-03188

수탁번호

- [0343] 기탁기관명 : 독립행정법인 제품평가기술기반기구 특허미생물기탁센터
수탁번호 : NITEBP-03187
수탁일자 : 20200327

기탁기관명 : 독립행정법인 제품평가기술기반기구 특허미생물기탁센터

수탁번호 : NITEBP-03275

수탁일자 : 20200915