(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월24일
(11) 등록번호 10-1732778
(24) 등록일자 2017년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A61K 35/00* (2015.01)
A61K 35/747 (2014.01) *C12P 7/56* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0164253
(22) 출원일자 2014년11월24일
심사청구일자 2014년11월24일
(65) 공개번호 10-2015-0063303
(43) 공개일자 2015년06월09일
(30) 우선권주장
201310632681.9 2013년11월29일 중국(CN)
201410468601.5 2014년09월15일 중국(CN)
(56) 선행기술조사문헌
JP2012000093 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
선웨이 바이오테크 코., 엘티디.
대만 타이페이 시티 114 네이후 디스트릭트 루에이구앙 로드 레인 358 앨리 30 넘버 1 2층
(72) 발명자
판, 추-밍
대만 타이페이 시티 106 다'안 디스트릭트 루이'안 스트리트 레인 264 넘버 3 4층
린, 치-후이
대만 뉴 타이페이 시티 251 탐수이 디스트릭트 종정 이 로드 섹션 1 레인 105 넘버13 15층
시, 청-웨이
대만 타이페이 시티 112 베이투 디스트릭트 지유안 퍼스트 로드 섹션 1 레인 46 앨리 21 넘버14 4층
(74) 대리인
김경희

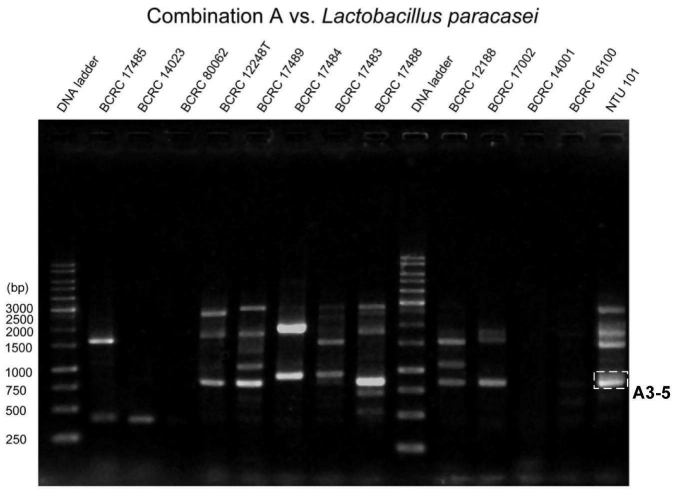
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **장내의 세균의 균상 개선, 위점막 손상 면적 감소, 위점막 손상 지수 감소, 및 위점막 중 조직 히스타민 농도 감소를 위한, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101를 함유하는 유산균 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 유산균주, 그 뉴클레오타이드 배열 및 프라이머 세트에 관한 것으로서. 그 중 상기 유산균주는 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101을 말하며, 해당 유산균주는 서기 2013년 11월 18일에 독일 생물자원센터에 위탁 보관되었고 그 위탁 보관 번호는 DSM 28047 이며, 또한 상기 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101(락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이 NTU 101)는 SEQ ID NO:1의 뉴클레오타이드를 갖추고 있으며, 본 발명은 유산균주L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 뉴클레오타이드 및 그 프라이머 세트를 제공하여 관련 기술 요원이 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 균주 감별 상에 근거로 사용할 수 있게 하고, 또한 더 나아가 관련 기술 요원이 DNA 분자 식별 표기를 이용해 분리 균주 배양 혹은 활균 배양을 하지 않고 신속하게 NTU 101균주를 감정할 수 있도록 한다.

대 표 도 - 도2a



(56) 선행기술조사문헌

Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012, vol. 93, pp. 903-916.*

International Biodeterioration & Biodegradation. 2012.12.28.(online), vol. 78, pp. 7-16.*

JP2004516842 A

JP2012000093 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

Lactobacillus 변이로 이루어진 순수 유산균가루인, 장내의 세균의 균상 개선, 위점막 손상 면적 감소, 위점막 손상 지수 감소, 및 위점막 중 조직 히스타민 농도 감소를 위한, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101를 함유하는 유산균 조성물로서,

상기 Lactobacillus 변이는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101이고, 2013년 11월 18일에 독일생물자원센터에 위탁 보관 번호 DSM 28047로 위탁 보관되었고,

상기 순수 유산균가루가 8주 동안 4g/일까지 투여되면, 인간 맹장 중 Clostridium perfringens의 수는 감소시키고 Bifidobacterium spp.의 수는 증가시켜, 장내의 세균의 균상 개선; 그리고 위점막 손상 지수를 98.74%까지 감소시키고, 그리고 인간 위점막 중 조직 히스타민 농도를 또한 감소시키며,

상기 순수 유산균가루에서 상기 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101 의 생균 측정 수가 $3x10^{9}$ CFU/g 내지 $1x10^{11}$ CFU/g의 범위에 있는 것을 특징으로 하는, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101를 함유하는 유산균 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 임의로 증폭된 다형성 DNA분석(Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) 및 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)의 기술을 통해, (1)A3-5F3 CGCCGAACGCGACTTACATC (SEQ ID NO: 4) 및 (2)A3-5R3 GGCAAATTTAAACTTGCCTTCAACG (SEQ ID NO: 5)의 프라이머로 증폭되어질 수 있는 것을 특징으로 하는 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101를 함유하는 유산균 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101과 탄소원을 배양기 중에 넣고 최소한 24시간을 배양시키면 상기 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101은 유산을 생성하게 되는 것을 특징으로 하는 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101를 함유하는 유산균 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 탄소원은 포도당, 갈락토우스, D-리보오스, 자일로오스, 과당, α-젖당, 맥아당, 자당, 트레할로오스 , 라피노오스, 이노시톨, 솔비톨, D-만니톨, 구연산, 덱스트린, 전분, 당밀 중 하나를 선택하여 사용할 수 있는 것을 특징으로 하는 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101를 함유하는 유산균 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101과 질소원을 배양기 중에 넣고 최소한 24시간 배양시키면 상기 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101은 유산을 생성하게 되는 것을 특징으로 하는Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101를 함유하는 유산균 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 질소원은 효모추출물, 육진액, 펩톤, 대두 펩톤, 트립신, 옥수수 굴루텐, 카세인, 요소,

구연산암모늄, 황산암모늄 중 하나를 선택하여 사용할 수 있는 것을 특징으로 하는 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101를 함유하는 유산균 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유산균주에 관한 것으로서, 특히 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101 (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이 NTU 101) 의 유산균주, 그 뉴클레오타이드 배열 및 프라이머 세트에 관한 것을 말한다.

배 경 기 술

[0002] 「유산균」이란 당류를 대사시키고 50%이상의 유산을 생성하는 세균을 말하며, 예를 들어 락토바실러스(Lactobacillus), 스트렙토코쿠스(Streptococcus), 류코노스토크 (Leuconostoc) 등이 여기에 속한다. 인류가 발효 유제품을 음용하기 시작한 것은 그 역사가 매우 오래되었고, 그로 인해 유산균은 매우 안전한 균종(GRAS, generally recognized as safe)으로 인식되어 왔으며, 또한 장 내의 대표적인 유익한 균으로 알려져 있다.

[0003] 유산균은「활생균」중 중요한 군 중 하나이며, 활생균의 정의는 「한 종류 혹은 여러 종류의 미생물을 인류가 섭취했을 때 인류 장 내의 균군의 품질을 증진시켜 주는 균」이다. 그 중 유산균이 장 내의 균군의 품질을 증진시켜 주는 작용은 다음과 같은 몇 가지로 정리할 수 있다.

[0004] (1)유기산을 생성하고, 장pH를 낮춘다.

[0005] (2)유해균과 양분을 경쟁한다.

[0006] (3)장 점막 상피에 부착되어 유해균의 증식 장소를 줄인다.

[0007] (4)항균 물질을 생성한다.

[0008] 현재 국내의 수 많은 발효 유제품은 모두 대규모의 인체 음용 실험을 통해 그 제품이 장 내에서 활성균 증진 효과가 있음을 증명하였고 또한 위생소의 보건 식품 인증을 획득한 후 유통되고 있다.

[0009] Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101 (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이 NTU 101) 은 타이완 국립 대학 미생물과 생화학 연구소 소장 판즈밍(潘子明) 교수 및 그 연구팀에서 연구 개발한 우량의 토종 유산균주이다. 현재 수 많은 문헌에서 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101 이 장과 위도의 균상을 개선하고, 혈압을 낮추고, 혈지방을 낮추고, 콜레스테롤을 낮추고, 알레르기를 방지하는 등의 다양한 보건 기능 효과를 나타내고 있음이 기재되어 있고, 이로 인해 매우 큰 시장 잠재력을 갖추고 있을 뿐만 아니라 이미 여러 종류의 제품에서 출시되었거나 혹은 출시 준비 중인 것으로 알려져 있다.

[0010] L. paracasei subsp. paracasei NTU 101이 제품화에는 성공했지만 그러나 여전히 균주 감별 및 특허 보호 신청 시 필요한 DNA 분자 식별 표기가 결핍되어 있는 상태이다. DNA 분자 식별 표기는 특정 균주의 DNA 혹은 DNA 다형성 맵을 감별하는 데 제공되어 사용된다. 전통적인 생화학 테스트와 비교해 봤을 때, DNA 분자 식별 표기로 균주를 감별하면 분리 균주를 배양할 필요가 없고, 또한 활균을 배양할 필요가 없으며 가공 제품에도 적용할 수 있다는 등의 장점이 있다.

[0011] 그러므로 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 특정 균주의 DNA 및 그 DNA 다형성 맵을 감별하는 데 제공하기 위하여, 본 발명인은 적극적인 연구와 개발 끝에 본 발명인 NTU 101유산균주, 그 뉴클레오타이드 배열 및 프라이머 세트를 발명하여 제시하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 주요 목적은 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101(락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이 NTU 101)의 유산균주, 그 뉴클레오타이드 배열 및 프라이머 세트를 제공하는 데 있으며, 이를 통해 관련 기술 요원이 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 균주 감별 상에 근거로 사용할 수 있고, 더 나아가 관련 기술 요원이 DNA 분자 식별 표기를 이용해 분리 균주 배양 혹은 활균 배양을 하지 않고 신속하게 NTU 101균주를 감정할 수 있도록 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 그러므로 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명인은 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101 (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이 NTU 101) 유산균주를 제공하고, 상기 유산균주는 서기 2013년 11월 18일에 독일생물자원센터에 위탁 보관되었고, 그 위탁 보관 번호는 DSM 28047이다. 그 중 상기 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101는 SEQ ID NO:1의 뉴클레오타이드를 갖추고 있다. 그 중 상기 유산균주는 더 나아가 순수 유산균가루 혹은 복합 유산균가루로 제작될 수 있으며, 성인이 매일 최소한 4 그램을 섭취할 수 있는 순수 유산균가루 혹은 복합 유산균가루는 최소한 장내의 세균의 균상을 개선(ameliorating)에 도움, 위점막 손상 면적 감소, 위점막 손상 지수 감소, 위점막 중 조직 아민 농도 감소 등의 효과를 얻을 수 있다.

[0014] 또한 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 전술된 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101유산균주를 감별하는 데 사용되는 프라이머 세트를 제공하며, 상기 프라이머 세트는 :(1)A3-5F3 CGCCGAACGCGACTTACATC (SEQ ID NO: 4);혹은 (2)A3-5R3 GGCAAATTTAAACTTGCCTTCAACG (SEQ ID NO: 4)이다. 그 중 임의로 증폭된 다형성 DNA분석 및 중합효소 연쇄반응의 기술을 통해 상기 A3-5F3프라이머를 SEQ ID NO:1을 갖춘 뉴클레오타이드로 증폭시킬 수 있다.

발명의 효과

[0015] 상술된 내용을 기존의 기술과 비교해 보았을 때, 본 발명은 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다. 본 발명은 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101유산균주의 뉴클레오타이드 및 프라이머 세트를 제공하여 관련 기술 요원이 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 균주 감별 상에 근거로 사용할 수 있고, 더 나아가 관련 기술 요원이 DNA 분자 식별 표기를 이용해 분리 균주 배양 혹은 활균 배양을 하지 않고 신속하게 NTU 101균주를 감정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도1은 프라이머 조합 A, J, L의 RAPD 다형성 맵 의 이미지도이다.

도2a, 도2b, 도2c는 프라이머 세트A와 casei group락토바실러스 아시도필루스의 RAPD 다형성 맵의 비교 분석 이미지도이다.

도3a, 도3b, 3c는 프라이머 세트L과 casei group락토바실러스 아시도필루스 의 RAPD 다형성 맵의 비교 분석 이미지도이다.

도4는 RAPD 다형성 토막 A3-5의 비교도이다.

도5는 RAPD 다형성 토막 L3-18의 비교도이다.

도6a, 도6b는 RAPD 다형성 토막 A3-5의 분자 표기 일관성의 테스트 맵이다.

도7은 위벽의 영상도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] **[실시방식]**

[0018] 본 발명의 구체적인 구조, 특징 및 기타목적을 이해하기 위해 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0019] NTU 101유산균주(Lactobacillus mutant)는 타이완 국립 대학 미생물과 생화학 연구소 소장 판즈밍(潘子明) 교수 및 그 연구팀에서 연구 개발한 우량의 토종 유산균주- Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101 (락

토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이 NTU 101)이다. 상기 유산균주는 서기 2013년 11월 18일에 독일생물자원센터(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH (DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany))에 위탁 보관 되었다. 그 상세 내용은 위탁 보관 번호 DSM 28047이다.

[0020] 아래 표1을 참조해 보면, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101와 탄소원을 배양기 중에 넣고, 최소한 24시간 배양 시키게 되면 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101은 일정한 량의 유산을 생성하게 된다. 또한 표1에서 나열된 상기 탄소원은 포도당, 갈락토우스, D-리보오스, 자일로오스, 과당, α-젖당, 맥아당, 자당, 트레할로오스 , 라피노오스, 이노시톨, 솔비톨, D-만니톨, 구연산, 덱스트린, 전분, 당밀 중 하나를 선택해서 사용할 수 있다.

표 1

[0021]

탄소원	활균수 (Log CFU/mL)	pH 값	유산량 (g/L)
포도당	9.43	3.73	17.48
갈락토우스	9.33	3.70	11.33
D-리보오스	9.54	4.07	7.25
자일로오스	8.94	6.37	0.40
과당	8.20	3.75	14.00
α-젖당	9.26	3.87	11.64
맥아당	9.45	4.16	8.55
자당	9.01	3.78	13.90
트레할로오스	9.04	3.79	13.26
라피노오스	8.78	5.23	1.80
이노시톨	8.89	6.48	0.41
솔비톨	9.65	4.15	7.49
D-만니톨	9.44	3.81	16.21
구연산	7.05	6.41	0.28
덱스트린	9.38	5.35	0.86
전분	9.24	5.82	0.30
당밀	9.70	4.50	6.02

[0022] 또한 아래 표2의 내용을 참조해 보면, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101과 질소원을 배양기 중에 넣고 최소한 24시간 배양 시키면 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101이 일정량의 유산을 생성하게 된다. 또한 도2에 나열된 상기 질소원은 효모추출물, 육진액, 펩톤, 대두 펩톤, 트립신, 옥수수 글루텐, 카세인, 요소, 구연산암모늄, 황산암모늄 중 하나를 선택해서 사용할 수 있다.

표 2

[0023]

질소원	활균 수 (Log CFU/mL)	pH 값	유산량 (g/L)
효모추출물	8.14	3.54	8.29
육진액	8.89	4.22	2.74
펩톤	8.95	3.74	5.91
대두 펩톤	8.30	3.90	5.82
트립신	8.84	3.87	4.45
옥수수 글루텐	9.14	4.14	4.11
카세인	8.27	4.68	1.77
요소	6.89	5.96	0.02
구연산암모늄	7.09	6.04	0.08
황산암모늄	6.69	5.84	0.07

[0024] 상술된 표1과 표2에 나열된 실험 자료들은 유산균주L. paracasei subsp. paracasei NTU 101가 확실히 일정량의 유산을 생성할 수 있음을 증명하고 있으며, 그러므로 가공 제품의 발효균으로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0025] 이어서, 효과적으로 유산균주L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 DNA를 감별하기 위해서 본 발명 내에서

는 MDBio, Inc., Taipei, Taiwan 주식 회사로부터 20가닥의 랜덤 프라이머(Random Primer)를 구매하였으며, 상기 랜덤 프라이머을 아래 표3과 같이 정리하였다.

표 3

[0026]

프라이머 번호	프라이머(5'→3')
B01	GTTTCGCTCC
B02	TGATCCCTGG
B03	CATCCCCCTG
B04	GGACTGGAGT
B05	TGCGCCCTTC
B06	TGCTCTGCCC
B07	GGTGACGCAG
B08	GTCCACACGG
B09	TGGGGGACTC
B10	CTGCTGGGAC
D11	AGCGCCATTG
D12	CACCGTATCC
D13	GGGGTGACGA
D14	CTTCCCCAAG
D15	CATCCGTGCT
D16	AGGGCGTAAG
D17	TTTCCCACGG
D18	GAGAGCCAAC
D19	CTGGGGACTT
D20	ACCCGGTCAC

[0027] 이어서 표3에 기재된 20 가닥 프라이머를 무균수에 넣고 100μM의 농도로 용해시킨 후, -20℃의 환경 하에 놓아둔다. 계속해서 아래 표4는 RAPD에 응용한 프라이머 조합이다. 표4에 나타난 바와 같이, 임의로 증폭된 다형성 DNA분석 (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) 기술을 통해 상술된 프라이머를 유산균주L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 DNA와 유사하게 증폭 시키고, 표3에 표시된 20 가닥 프라이머를 표4에 의거하여 16종 프라이머 세트로 배합 제작하며, 또한 각 프라이머 세트의 최종 농도는 1μM이 된다.

표 4

[0028]

프라이머 조합	프라이머
A	B01, B02, D11, D12
B	B03, B04, D13, D14
C	B05, B06, D15, D16
D	B07, B08, D17, D18
E	B09, B10, D19, D20
F	B07, B08, B09, D10
G	D11, D12, D13, D14
H	D15, D16, D17, D18
I	B01, B02, D13, D14
J	B03, B04, D15, D16
K	B05, B06, D17, D18
L	B08, B09, D19, D20
M	B05, B06, D11, D20
N	B03, B04, D11, D20
O	B07, B08, D11, D20
P	B09, B10, D11, D20

[0029] 이어서, 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용해 상술된 표4의 16종류 프라이머 세트 RAPD를 진행한다. 그 중 PCR(Polymerase Chain Reaction)의 반응 총체적은 25 ml이고, 그 안에 3 ng균주DNA, 80 nM프라이머, 1X Exsel reaction buffer, 5 U의 的 Exsel DNA polymerase (Bertec Enterprise, Taipei,

Taiwan), 200M dNTP 가 포함된다. PCR의 반응 조건은 95℃로 5 min간 가열하고, 이어서 다시 95℃로 30 sec 간 가열하며, 25℃로 3 min 간 접합, 70℃로 45 sec간 늘이기를 진행하며, 이러한 조건으로 35개의 사이클을 시행하고, 마지막으로 70℃로 7 min분간 늘이기를 한다.

[0030] 상술된 PCR 반응을 완료한 후, PCR 산물을 꺼내서 1%의 아가로오스(agarose)를 이용해 전기 영동 분석을 진행한다. 이어서 SYBR Safe염색제(Life Technologies Corporation)로 전기 영동 필름을 30 min분 간 염색하며, 염색 후 20 min이 지난 후 상기 염색된 전기 영동 필름을 남색광(488 nm) 램프실 내에서 관찰하고, 영상 처리 시스템을 통해 사진을 찍어 파일로 저장한다. 더 나아가 상술된 과정에서 얻은 RAPD 토막은 FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (Favorgen biotech Corp) 를 이용해 필름을 절단 회수하고, T&ATM Cloning Kit (Yeastern Biotech Co., Ltd., Taipei, Taiwan)를 통해 회수한 RAPD 토막에 대해 클론을 진행하여 마지막으로 밍신생물과학기술주식회사 (明欣生物科技有限公司, Taipei, Taiwan)로 보내 NTU 101균주의 독특성을 확인한다.

[0031] 도1은 프라이머 세트 조합 A, J, L의 RAPD 다형성 맵의 이미지도이다. 도1에 나타난 바와 같이, 16종류 프라이머 조합 중, 프라이머 세트A, J, L은 적당 수량의 RAPD다형성 토막을 생성할 수 있으며, 이로 인해 프라이머 세트A, J, L에서 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101균주 일관성을 갖춘 독특한 RAPD 다형성 맵을 생성할 수 있게 된다. 특히 프라이머 조합 A와 L이 이에 해당된다.

[0032] 아래 표5의 내용을 참조해 보면, 해당 내용은 NTU 101균주의 독특한 균주를 확인해 볼 수 있다. 도5에서 표시된 바와 같이, L. paracasei subsp. paracasei NTU 101이 외에, 표5에서 나열된 균주는 모두 중화민국 식품 공업 발전 연구소(Food Industry Research and Development Institute, FIRDI, Hsinchu, Taiwan)에서 구매한 것이며, 또한 이러한 균주는 모두 L. paracasei subsp. Paracasei와 매우 근접한 친연관계에 속하는 casei group락토바실러스 아시도필루스이다. 그 중 12 주의 L. paracasei (파라카제이), 10주의 L. casei (카제이), 7주의 L. rhamnosus (람노서스), 3주의 L. zeae (지에) 가 포함되어 있다.

표 5

[0033]

균종 (Microorganism)	균주ID/BCRC위탁 보관 번호
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	NTU101
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 10358
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 10697T
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 11197
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 12272
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 14025
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 16093
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 16094
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 17001
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 17004
Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이)	BCRC 17487
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 12188
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 12248T
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 14001

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 14023
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 16100
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 17002
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 17483
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 17484
Lactobacillus paracasei subsp. *tolerans* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 17485
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 17488
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이)	BCRC 17489
Lactobacillus paracasei (락토바실러스 카제이)	BCRC 80062
Lactobacillus zeae (락토바실러스 제이)	BCRC 17647T
Lactobacillus zeae (락토바실러스 제이)	BCRC 17942T
Lactobacillus zeae (락토바실러스 제이)	BCRC 80156
Lactobacillus rhamnosus (락토바실러스 람노서스)	BCRC 10940T
Lactobacillus rhamnosus (락토바실러스 람노서스)	BCRC 11673
Lactobacillus rhamnosus (락토바실러스 람노서스)	BCRC 12249
Lactobacillus rhamnosus (락토바실러스 람노서스)	BCRC 14027
Lactobacillus rhamnosus (락토바실러스 람노서스)	BCRC 16095
Lactobacillus rhamnosus (락토바실러스 람노서스)	BCRC 17006
Lactobacillus rhamnosus (락토바실러스 람노서스)	BCRC 17007
Lactobacillus rhamnosus (락토바실러스 람노서스)	BCRC 80065

[0034] 도2a, 도2b, 도2c는 프라이머 세트A와 casei group락토바실러스 아시도필루스의 RAPD 다형성 맵의 비교 분석 이미지도이다. 도2a에 나타난 바와 같이, 프라이머 세트A의 RAPD 다형성 토막과 Lactobacillus paracasei (락토바실러스 파라카제이)를 비교 대조해 본 결과, 프라이머 세트A의 RAPD다형성 토막의 (핵산)이 현저하고 독특한 차이를 드러내는 것을 알 수 있다. 또한 도2b에 나타난 바와 같이, 프라이머 세트A의 RAPD 다형성 토막과 Lactobacillus casei(락토바실러스 카제이)를 비교 대조해 본 결과, 프라이머 세트A의 RAPD 다형성 토막이 현저하고 독특한 차이를 드러내는 것을 알 수 있다. 또한 도2c에 나타난 바와 같이, 프라이머 세트A의 RAPD 다형성 토막과 Lactobacillus zeae (락토바실러스 제이) 및 Lactobacillus rhamnosus(락도바실러스 람노서스)를 비교 대조해 본 결과, 프라이머 세트A의 RAPD 다형성 토막이 현저하고 독특한 차이를 드러내는 것을 알 수 있다. 그 중 이 독특성을 갖춘 프라이머 세트A는 프라이머B02와 D11를 증폭해서 얻은 것이며, 더 나아가 A3-5라고 표시한다. 또한 첨부된 표에 나타난 바와 같이, 본 A3-5뉴클레오타이드 토막은 838bp을 갖추고 있으며, 그 뉴클레오타이드 정의는 SEQ ID NO:1이다. 이 외에도, 첨부된 표의 제2페이지에 나타난 바와 같이, 프라이머B02의 뉴클레오타이드 토막은 10bp를 갖추고 있고, 그 뉴클레오타이드 정의는 SEQ ID NO:2이다. 이와 상대적으로 프라이머D11의 뉴클레오타이드 토막도 역시 10bp를 갖추고 있고, 그 뉴클레오타이드 정의는 SEQ ID NO:3이다.

[0035] 계속해서, 도3a, 도3b, 3c는 프라이머 세트L과 casei group락토바실러스 아시도필루스 의 RAPD 다형성 맵의 비교 분석 이미지도이다. 도3a에 나타난 바와 같이, 프라이머 세트L의 RAPD 다형성 토막과 Lactobacillus paracasei (락토바실러스 파라카제이) 를 비교 대조해 본 결과, 프라이머 세트L의 RAPD 다형성 토막의 (핵산)은 현저하고 독특한 차이를 드러내는 것을 알 수 있다. 또한 도3b에 나타난 바와 같이, 프라이머 세트L의 RAPD 다형성 토막과 Lactobacillus casei (락토바실러스 카제이) 를 비교 대조해 본 결과, 프라이머 세트 L의 RAPD 다형성 토막이 현저하고 독특한 차이를 드러내는 것을 알 수 있다. 이어서 도3c에 나타난 바와 같이, 프라이머 세트L의 RAPD 다형성 토막과 Lactobacillus zeae (락토바실러스 제이) 및 Lactobacillus rhamnosus (락토바실러스 람노서스)를 비교 대조해 본 결과, 프라이머 세트 L의 RAPD 다형성 토막이 현저하고 독특한 차이를 드러내는 것을 알 수 있다. 그 중 이 독특성을 갖춘 프라이머 세트L은 프라이머B09과 D19를 증폭해서 얻은 것이며, 더 나아가 L3-18라고 표시한다. 또한 첨부된 표6에 나타난 바와 같이, 본 L3-18뉴클레오타이드 토막은 2477bp를 갖추고 있다.

표 6

[0036]

프라이머 조합 표시ID	길이(bp)	
L3-18	2477	ctggggacttcatgcgggagatacaatgacaaccgatattccg actgttttcactttagccggaaatatatcttttgatattaaagatga gtctggtgaggtaattggatctgctgttgcttcgaaagatactag aaagatagtcattacttttttcacagcacggagcagacctctcaaa cacagggaaaattgacggggccttctcaatttttttacattgggat gttgaacaggtttctcgagttgtgggcgtaagaataattgcactgt cagtggtcaaaagtttacttgagaggagggtaaaaatgtgacga ggatgacagctaaagtggcgagaactgggcatttgttcgcggtc ttattgattttgatgagtatgttaacaggcttagtgacaagtggcag ttcagttgtgacagccactgctaacattcgcccaacctataaaacc aatgctaatggtacctatccagaaaattcgtggcaggtcacggga
		caacaaaatgtgatcaatcaacgcggcggggatcaagtttcagg gtgggataacaatacaacatgggatggtgatgcgactaatacca cgaattcttacctgaaatttggtgaccccaataatccggattatca gattcgaaaatatgctaaagagacgaataccccggattgtacg acgtttatttgaacgtcaaaggcaatacacagcaaaatgtgaag cctgtagatattgtcttagttgttgatatgtctgggtcaatggagt tcaacagatataacacgaatcgagccggtgctgttcgtacagg tgttaagaatttcttgacatctattcaaaacgccggtctgggtaa ttacgtcaatgttggtttaattgggttttctagtcctggttatatcg gtggcgaatcgggttatattagtgtcaaattaggcaaagcagg taatgccagccagcaacaagcgattaatggtgcattgaatcca aggtttcaaggggtacgtatacgcagattggtttgcggcaag gatcagccatgctgaatgcggacaccagtggcaataaaaaaa tgatgattttgttaactgatggacgtgccgacttttttctaacaag gtgataaattcagagtggataaatggcacattgtatggcacta attttggatccagaagagatgaacccagcgataccgcacaac ttcgatggccgtacaccgatagttcaggtaataccatatatga tacttggcccgcaacattaggtgaggctaagaatgcaaaaga tagcggtaatgaggtgcacgctttaggcattcaactggctgac gaccgccaatacatgacaaaagaaaaaatacgccaaaacatg caacttattaccaattcaccggatttatacgaagatgctgatagt gccgacgctgttgaggcttatttgaacaatcaggcaaaggatat tatcaaaaattttaatactgtcaccgatggcacgatcacagacc cgattggtacgcaatttcaatatgcaaacaaccaggcgaccgt tacgagtgtcggcaagcaaactgtgccagcaagtgagttgcc aagtgcggcgatccaagatggtcaattgacggtgaatcacat gaacttgggtcaggatcaggaagttcaaatccattatcaagta

		cggatcaaaacagaggatgctggcttcaagcctgatttttggt accaaatgaatggtgaaacattgttgacaccaaaagcgggcg ctgccgctgttgactttgggattccttcaggcagggcaccagc aactacagtttatgtgcagaagcaatggcgccagttaagcaat caatcgttaccggatacgctcaacgtcacggtgcagcgaaaa gtggctgacggttcgcttgatccaaattggcaacagacctta gtccttaaaaaagctgataactggaaagctagctttacggcac ctgcgtataacaatcagggtcaaagtttttcatatgtcgttaag agtgaagatgcctcgggaattgatttgagttcgtttatcagttc tcaaaatatggatcagcaaacagcaacgttgactttgacaaat cagcagtatggttttcaatttcagaaaaaaacaaccgatggta ctgatttatcagcagatcagttgaaggccatgcagtttaactt aacccagtacagcgataacagttttcagcaggtatccaaaa ccaacgccatcacgtcaacggatctgcaggcactagcgcc ggggtattacggtattcaggaagctgcagcacctacaggt tatcaacttgatgggacaatgtatctttttcagctaacgtct gatgggcaatggcaataccatggcacaaaggacaatgtg acatcagggagtgttattaatggccagcagactttgaatcc tgttggtgataagtcagatgattttacggtgaccgggta gatct

[0037] 상술된 각종 실험 결과와 자료를 통해 봤을 때, 일단 프라이머 세트A와 L를 증폭해서 얻은 RAPD 다형성 토막 A3-5과 L3-18는 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101 (락토바실러스 파라카제이 subsp. 파라카제이 NTU 101)의 독특한 토막을 가지고 있음을 기초적으로 알 수 있다. 이를 더욱 더 정확히 확인하기 위해 반드시 DNA데이터 베이스-Genbank 내에서 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101와 상동 자료를 꺼내 비교 대조를 진행한다. 도4와 도5는 각각 RAPD 다형성 토막 A3-5와 L3-18의 비교 대조도이다. 도4에 점선으로 테두리를 친 곳을 참조해 보면, Genbank 데이터 베이스 내의 상동 자료와 서로 비교해 본 결과 RAPD 다형성 토막 A3-5는 확실히 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 분자 식별 표식을 할 수 있는 독특한 토막을 갖추고 있음을 알 수 있다. 또한 도5에 점선으로 테두리 친 곳을 참조해 보면, RAPD 다형성 토막 L3-18역시 동일하게 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 분자 식별 표시를 할 수 있는 독특한 토막을 갖추고 있음을 알 수 있다.

[0038] 그러므로 상술된 비교 대조 결과를 통해 RAPD 다형성 토막 A3-5 및 L3-18 모두 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 분자 식별 표식을 할 수 있는 독특한 토막을 갖추고 있음을 알 수 있다. 그러므로 분자 표기의 일관성을 확인하기 위해 반드시 분자 표기 일관성 테스트를 진행해야 했으며, 아래 표7에 나타난 바와 같이 우선 일관성 확인을 위한 프라이머를 미리 설계하였다.

표 7

[0039]

테스트 목표	프라이머 ID	프라이머 (5'→3')
L3-18	18FF	ATGCGGGAGATACAATGACAACCG
	18FR	CCCGTCAATTTTCCCTGTGTTTGA
	L3-18F	GAAAATTGACGGGGCCTTCTCA
	L3-18R	ACTGACAGTGCAATTATTCTTACGCCC
	L3-18F2	AAAACCAATGCTAATGGTACCTATCCAG
	L3-18R2	GGGGTCACCAAATTTCAGGTAAGAAT
	L3-18F3	GTCTGGGTCAATGGAGTTCAACAGATATA

A3-5	A3-5F	GGCATGGCGGTGCCGTTGAA
	A3-5R	ATCCCCGAATGGTGCCAGCA
	A3-5F2	GCCGAACGCGACTTACATCCA
	A3-5R2	GGCAATTTAAACTTGCCTTCAACGG
	A3-5F3	CGCCGAACGCGACTTACATC
	A3-5R3	GGCAAATTTAAACTTGCCTTCAACG
	A3-5F4	GCGACTTACATCCATTCTGCCAAG
	A3-5R4	GAAATTTAAACTTGCCTTCAACGGCA
	A3-5F5	GCCGAACGCGACTTAGATCCATT
	A3-5R6	TAAACTTGCCTTCAACGGCACCG
	A3-5F6	GCCGAACGCGACTTACAGCCA
	A3-5R7	TTTAAACTTGCCTTCAACGGCAC

[0040] 도6a, 도6b는 RAPD 다형성 토막 A3-5의 분자 표기 일관성의 테스트 맵이다. 도6a와 도6b에 나타난 바와 같이, 상기 표7의 프라이머를 사용해 NTU 101원 근친 균종(casei group(카제이 그룹)락토바실러스 아시도필루스)에 대해 일관성 테스트를 진행한 후, 프라이머 세트A3-5(F3/R3)가 NTU 101균주 일관성을 갖추고 있음을 알 수 있다. 그러므로 그 (핵산)은 NTU 101균주 일관성을 감별하는 데 사용할 수 있다. 첨부 표의 제3페이지에 나타난 바와 같이, 프라이머 세트A3-5F3의 뉴클레오타이드 토막은 20bp를 갖추고 있고, 그 뉴클레오타이드 정의는 SEQ ID NO:4이다. 또한 프라이머 세트A3-5R3의 뉴클레오타이드 토막은 25bp를 갖추고 있고 그 뉴클레오타이드 정의는 SEQ ID NO:5이다.

[0041] 상기 설명을 통해 NTU 101유산균주, 그 뉴클레오타이드 및 그 프라이머 세트에 대해 완전하게 설명하였고, 상술된 내용을 종합해 보면, 본 발명은 유산균주L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 뉴클레오타이드 및 그 프라이머 세트를 제공하여 관련 기술 요원이 L. paracasei subsp. paracasei NTU 101의 균주 감별 상에 근거로 사용할 수 있게 하고, 또한 더 나아가 관련 기술 요원이 DNA 분자 식별 표기를 이용해 분리 균주 배양 혹은 활균 배양을 하지 않고 신속하게 NTU 101균주를 감정할 수 있도록 하는 장점을 갖추고 있음을 알 수 있다.

[0042] 계속해서 본 발명인 유산균주(즉 Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101)을 보건에 응용하는 상황을 설명하면 다음과 같다. 본 발명인 유산균주는 NTU 101유산균 가루 혹은 복합 유산균 가루로 제작될 수 있으며, 성인이 매일 최소한 4 그램의 NTU 101유산균 가루를 섭취하면최소한 장내의 세균의 균상을 개선에 도움, 위점막 손상 면적 감소, 위점막 손상 지수 감소, 위점막 중 조직 아민 농도 감소 등의 효과를 얻을 수 있다. NTU 101유산균 가루가 위점막 손상 면적 감소, 위점막 손상 지수 감소, 위점막 중 조직 아민 농도 감소 등의 효과가 있음을 증명하기 위해 여러 실험 그룹을 구성하여 그 수치를 측정하였다.

[0043] 인증실험에 사용된 동물은 8주가 된 SD 흰쥐(Sprague-Dawley rats, SDRs)이며, 그 체중은 250~275그램을 선택하였다. 인증실험의 그룹은 각각 C그룹(C group), 0.5배 그룹(0.5X group), 1배 그룹(1X group), 5배 그룹(5X group), 활균 그룹(Live group), 사균A그룹(D-A group), 사균 B그룹(D-B group)으로 각각 분류하였으며, 각 구름은 8마리의 SD흰쥐를 포함하고 있다. 본 실험은 성인 제량 4 그램을 기초로 하여 식품약물관리국(Food and Drug Administration, FDA)에서 제공하는 인체 면적 환산 공식(Body Surface Area, BSA)으로 흰쥐의 1배 제량을 약 0.3(그램/흰쥐 체중)으로 하였다. 각 그룹 시험에서 사용된 테스트물 및 제량은 아래 표8의 내용과 같다.

표 8

[0044]

Group	Testing Sample	Dosage(g/kg rat bw)	비고
C	역침투수		
0.5X	복합 유산균 가루	0.15	포함균수:$3X10^{9}$ CFU/g
1.0X	복합 유산균 가루	0.3	포함균수:$3X10^{9}$ CFU/g
5.0X	복합 유산균 가루	1.5	포함균수:$3X10^{9}$ CFU/g
Live	NTU 101 유산균 가루	0.3	포함균수:$1X10^{11}$ CFU/g
D-A	NTU 101 사균 가루	0.3	포함균수:$1X10^{11}$ cells/g
D-B	NTU 101 사균 가루	0.3	포함균수:$1X10^{12}$ cells/g

[0045] 8주간의 실험 과정 중, 사료(chow diet)를 먹인 흰쥐, 그리고 각 그룹에 테스트물을 1.0mL의 무균증류수에 배치

한 후, 스테인리스 주사기 침을 갖춘 무균 플라스틱 침통으로 흰쥐에게 먹였다.

[0046] 표9에 나타난 바와 같이, 8주간의 실험 기간 동안 각 그룹 동물의 체중은 모두 시간이 흐름에 따라 정상적으로 증가하였으며 또한 각 그룹 동물의 체중 변화는 각 실험군 간에 현저한 차이가 없었다.($p>0.05$)

표 9

[0047]

Group	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8
C	357.84±18.55	424.31±25.04	464.13±27.39	508.03±30.65
0.5X	359.31±12.92	427.80±13.70	468.78±12.06	523.54±14.14
1X	364.43±12.24	434.34±18.27	463.68±18.22	517.61±24.64
5X	368.00±8.55	434.86±15.18	473.83±13.41	522.70±19.35
Live	352.89±4.66	418.33±10.32	459.41±12.47	509.69±17.06
D-A	363.11±9.41	434.93±12.76	474.33±15.12	531.58±22.58
D-B	365.23±19.19	434.36±29.51	477.61±29.71	532.68±35.14

[0048] 또한 표10에 나타난 바와 같이, 테스트물을 지속적으로 6 에서 8 주까지 먹인 후, 각 그룹 흰쥐의 마른 변의 중량은 제어 그룹(C group) 그룹보다 현저하게 증가했으며 실험 결과 장기적으로 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101 사균 가루를 먹인 흰쥐가 배출한 마른 변의 무게가 증가하는 것을 알 수 있었다.

표 10

[0049]

Group	Week 2	Week 6	Week 8
C	8.27±0.72bc	5.17±0.41a	4.61±0.69a
0.5X	8.54±0.34cd	5.71±0.34bc	5.61±0.31bc
1X	8.65±0.40cd	5.95±0.32cd	5.94±0.24c
5X	8.97±0.37d	5.60±0.25bc	5.63±0.25bc
Live	8.67±0.40cd	5.55±0.44b	5.85±0.24c
D-A	8.98±0.68d	6.23±0.37d	6.01±0.43c
D-B	8.35±0.58bc	5.85±0.26bc	5.70±0.18bc

[0050] 계속해서 표11의 내용을 참조해 보면, 해당 표는 각 그룹 흰쥐의 변과 맹장 내용물 중에 포함된 C. 퍼르린젠스(C. perfringens) 수량을 표시한 것이다. 표11의 실험 결과에 나타난 바와 같이, 연속으로 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101사균 가루를 4주와 6 주간 먹인 그룹에서는 SD흰쥐 변 중에 C. perfringens의 수량이($p<0.05$) 줄어드는 것으로 나타났고, 또한 실험 결과는 또한 연속으로 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101 사균 가루를 8주간 먹인 흰쥐 변 중에 C. perfringens의 수량이($p<0.05$) 현저하게 줄어드는 것을 알 수 있었다.

표 11

Group	변 C.퍼프린젠스 수량 (CFU/g)			맹장 퍼프린젠스 수량 (CFU/g)
	4-Week	6-Week	8-Week	8-Week
C	0.21±0.47b	2.17±2.89c	4.96±2.77d	5.42±5.07c
0.5X	0.00±0.00a	0.00±0.00a	1.00±1.46a	0.21±0.59b
1X	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.38±0.58a	0.00±0.00a
5X	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.83±0.99a	0.13±0.35b
Live	0.00±0.00a	0.00±0.00a	1.29±1.46ab	0.00±0.00a
D-A	0.00±0.00a	0.00±0.00a	2.75±2.13bc	0.00±0.00a
D-B	0.00±0.00a	0.00±0.00a	3.00±1.99c	0.04±0.12a

[0051]

[0052] 또한 8주간 테스트물을 먹인 후, SD흰쥐를 해부하여 맹장 내용물을 확인하였다. 표11에 나타난 바와 같이, NTU 101 사균 가루B이외에 연속으로 8주간 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101 사균 가루 A를 먹인 그룹 군에서 SD흰쥐 맹장 중의 C. perfringens 수량이 현저하게($p<0.05$) 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0053] 계속해서 표12의 내용을 참조해 보면, 해당 표는 각 그룹 흰쥐의 변과 맹장 내용물 중에 포함된 쌍기간균 수량(Bifidobacterium spp.) 수량을 표시한 것이다. 표12의 실험 결과에 나타난 바와 같이, 연속으로 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101사균 가루를 4주와 6 주간 먹인 그룹에서는 SD흰쥐 변 중에Bifidobacterium spp.의 수량이($p<0.05$) 증가되는 것으로 나타났고, 그 중 활균 그룹 SD 흰쥐의 변 중에 포함된 Bifidobacterium spp. 수량이 기타 그룹 SD 흰쥐보다 높은 것으로 나타났다. 실험 결과는 또한 연속으로 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101 사균 가루를 8주간 먹인 흰쥐 변 중에Bifidobacterium spp.의 수량이($p<0.05$) 현저하게 증가되는 것을 알 수 있었다.

표 12

Group	변 쌍기간균 수량 (CFU/g)			맹장 쌍기간균 수량 (CFU/g)
	4-Week	6-Week	8-Week	8-Week
C	4.40±0.29a	4.54±0.31a	4.76±0.34a	4.47±0.49a
0.5X	4.93±0.30c	5.68±0.20b	5.98±0.27cd	6.53±0.57d
1X	5.10±0.29c	5.57±0.40b	6.05±0.2cd	6.76±0.36de
5X	5.03±0.19c	5.54±0.24b	6.33±0.58d	7.10±0.43e
Live	8.56±0.42d	8.59±0.28c	8.72±0.33e	9.03±0.30f
D-A	4.82±0.38bc	5.58±0.62b	5.89±0.46c	5.88±0.16c
D-B	4.87±0.29bc	5.29±0.6ab	6.15±0.35cd	5.56±0.34c

[0054]

[0055] 또한 8주간 테스트물을 먹인 후, SD흰쥐를 해부하여 맹장 내용물을 확인하였다. 표12에 나타난 바와 같이, 연속으로 8주간 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101 사균 가루를 먹인 그룹 군에서 SD흰쥐 맹장 중의 Bifidobacterium spp. 수량이 현저하게($p<0.05$) 증가하는 것을 알 수 있었다. 그러므로 표11과 표12의 실험 통계 수치로 매일 최소한 0.3그램/흰쥐 체중(성인 제량 4그램)을 섭취하면 장 내에 최소한 세균의 균상을 개선(ameliorating)하는 데 도움이 된다는 것을 알 수 있다.

[0056] 계속해서 표13의 내용을 참조해 보면, 해당 표는 각 그룹 흰쥐의 변과 맹장 내용물 중에 포함된 유산간균 수량을(Lactobacillus spp.) 표시한 것이다. 표13의 실험 결과에 나타난 바와 같이, 연속으로 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101사균 가루를 4주와 6 주간 먹인 그룹에서는 SD흰쥐 변 중에Lactobacillus spp.의 수량이($p<0.05$) 증가되는 것으로 나타났고, 그 중 활균 그룹 SD 흰쥐의 변 중에 포함된Lactobacillus spp. 수량이 기타 그룹 SD 흰쥐보다 높은 것으로 나타났다. 실험 결과는 또한 연속으로 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101 사균 가루를 8주간 먹인 흰쥐 변 중에Lactobacillus spp.의 수량이($p<0.05$) 현저하게 증가되는 것을 알 수 있었다.

표 13

Group	변 유산간균 수량 (CFU/g)			맹장 유산간균 수량 (CFU/g)
	4-Week	6-Week	8-Week	8-Week
C	7.40±0.16a	8.70±0.32a	9.09±0.16a	8.15±0.39a
0.5X	8.06±0.14b	8.81±0.20ab	9.39±0.23b	8.82±0.16bc
1X	8.07±0.04b	8.92±0.17bc	9.64±0.28b	8.96±0.15bc
5X	8.04±0.14b	8.80±0.14ab	9.41±0.17b	8.77±0.23bc
Live	8.29±0.32c	9.11±0.19cd	9.62±0.25b	9.51±0.31d
D-A	8.08±0.19b	9.02±0.16bcd	9.46±0.15b	8.91±0.24bc
D-B	8.06±0.18b	9.15±0.14d	9.44±0.17b	8.71±0.28bc

[0057]

[0058] 또한 8주간 테스트물을 먹인 후, SD흰쥐를 해부하여 맹장 내용물을 확인하였다. 표12에 나타난 바와 같이, 연속으로 8주간 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101 사균 가루를 먹인 그룹 군에서 SD흰쥐 맹장 중의 Lactobacillus spp. 수량이 현저하게($p<0.05$) 증가하는 것을 알 수 있었다.

[0059] 계속해서 표14의 내용을 참조해 보면, 해당 표는 각 그룹 흰쥐의 변과 맹장 내용물 중에 포함된 단쇄지방산을(Short-chain fatty acids) 표시한 것이다. 표14의 실험 결과에 나타난 바와 같이, 0.5배 복합 유산균 가루, NTU101 사균 가루-B를 먹인 경우를 제외하고, 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101 사균 가루를 연속 8주 먹은 후의 각 그룹 SD 흰쥐의 맹장 중에 포함된 아세트산(Acetic acid), 프로피온산(propionic acid), 뷰티릭산(butyric acid)의 함량이 현저하게 증가하였다. 이미 일반적으로 널리 알려진 사실대로 이러한 단쇄지방산 특히 아세트산은 장 내의 pH값을 낮추고 장 내의 부생균의 생장을 억제하는 데 효과가 있었다.

표 14

Group	acetic acid (mM)	propionic acid (mM)	butyric acid (mM)
C	25.06±2.94ab	8.80±0.85a	5.78±1.69a
0.5X	36.34±5.04c	19.97±2.13de	6.93±0.57a
1X	45.07±3.78d	18.84±1.66d	17.78±4.79c
5X	46.62±3.00d	22.69±2.71f	17.95±3.98c
Live	45.19±2.01d	21.35±1.02ef	14.79±1.35b
D-A	27.41±4.60b	10.53±1.29b	6.63±1.39a
D-B	23.39±4.79a	14.51±2.22c	13.26±2.89b

[0060]

[0061] 계속해서 표15의 내용을 참조해 보면, 각 그룹 흰쥐의 급성 위부 손상 실험 수치를 확인하였다. 또한 각 그룹 흰주의 위벽 영상도인 도7의 내용을 동시에 참조해 보면, 도7과 표15의 내용에서 알 수 있듯이, 제어 그룹(C group)의 위 손상 면적(lesion area)은4.11±2.14 mm2에 달하며 손상 지수(lesion index)는0.0635±0.0419에 달한다. 한편 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101 사균 가루를 연속 8주간 먹인 그룹 중, NTU 101 순수 균가루, NTU 101 사균 가루-A와 NTU 101 사균 가루-B를 먹인 SD흰쥐의 경우 그 손상 지수가 제어 그룹에 비해 각각 98.74%, 67.71%, 76.69% 씩 감소한 것을 알 수 있다. 이와 동시에 각 그룹 별 흰쥐의 위액 pH값(pH value of gastric acid), 총산도(total gastric acidity), 위액 체적(volume of gastric acid)의 경우, 제어 그룹과 비교해 현저한 차이가 없음을 알 수 있다. 그러므로 도7과 표15의 실험 결과, 매일 최소한 0.3그램/흰쥐 체중(성인 제량 4그램)을 섭취하면 위점막 손상 면적 감소 및 위점막 손상 지수 감소 등의 효과를 얻는 것을 알 수 있었다.

표 15

[0062]

Group	Lesion area (mm^2)	Total mucosal area (mm^2)	Lesion index	Volume of gastric acid (mL)	pH value of gastric acid	Total gastric acility (mEq/L)
C	4.11±2.14c	677.16±92.39abc	0.0635±0.0419 c	5.00±1.82 a	1.77±0.43a	73.11±15.60ab
0.5X	0.37±0.29 ab	780.33±171.63bc	0.0047±0.0037 ab	5.23±1.66a	1.82±0.65a	78.69±22.71 ab
1X	0.47±0.44ab	792.31±162.64c	0.0061±0.0060 ab	5.10±2.34a	1.76±0.34a	86.28±18.36b
5X	0.07±0.10 a	713.48±94.02abc	0.0010±0.0013 a	5.58±2.66 a	1.55±0.32a	77.68±11.50ab
Live	0.06±0.06 a	711.03±100.71abc	0.0008±0.0009 a	6.24±1.43a	1.56±0.38a	78.99±15.18 ab
D-A	1.36±0.97b	652.91±54.00ab	0.0205±0.0147 b	5.70±1.77 a	1.69±0.40a	80.18±15.95ab
D-B	0.92±0.87 ab	638.79±82.88a	0.0148±0.0147 ab	5.58±2.09a	1.75±0.30a	68.74±7.67 a

[0063] 계속해서 표16의 내용을 참조해 보면, 각 그룹 흰쥐의 위점막 중의 지질과산화물 실험 수치를 확인하였다.

[0064] 표16에서 알 수 있듯이, 제어 그룹(C group)의 대조 그룹 위점막 중 지질과산화물의 차급 산물 말론알데히드(malonaldehyde, MDA) 농도는 23.28±3.75μM이다. 연속으로 8주간 복합 유산균 가루, NTU101유산균 가루, NTU101사균 가루를 먹인 흰쥐의 위점막 중 지질과산화물의 차급 산물 말론알데히드(malonaldehyde, MDA)의 농도가 현저하게 감소하였다. 또한 제어 그룹 위점막 중의수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase, SOD) 활성은 1.69±0.17 U/mL으로 연속 8주간 테스트물을 복용 시킨 각 그룹 흰쥐 위점막 중의 SOD활성이 현저하게 올라가는 것을($p<0.05$) 알 수 있었다. 그러므로 표16의 실험 결과로 매일 최소한 0.3그램/흰쥐 체중(성인 제량 4그램)을 섭취하면 위점막 손상을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

표 16

[0065]

Group	MDA conc. of stomach (μM)	SOD concentration (U/mL)	Histamine (μg/g)	PGE_2 (pg/mg protein)
C	23.28±3.75d	1.69±0.17b	111.94±2.78c	1433.84±45.03a
0.5X	16.96±3.91b	2.59±0.20c	67.24±5.35a	3078.21±50.94d
1X	16.15±2.22ab	3.22±0.62d	69.18±6.90a	3128.64±57.18bc
5X	13.46±1.76a	4.20±0.39e	74.07±8.43a	3208.15±21.95b
Live	14.90±1.31ab	4.29±0.59e	70.94±12.9a	3103.60±94.39a
D-A	14.90±1.46ab	4.07±0.79e	101.93±3.46b	3123.39±46.25bc
D-B	20.34±2.48c	3.36±0.93d	113.04±4.88c	3093.00±78.65bc

[0066] 또한 표16에 나타난 바와 같이, 연속으로 8주간 복합 유산균 가루, TU101유산균 가루, NTU101 사균 가루를 복용시킨 각 그룹 흰쥐 위점막 중의 히스티딘(Histidine) 농도가 현저하게 감소하였다. 또한 각 그룹 흰쥐 위점막 중의 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2, PGE2) 농도 역시 현저하게 ($p<0.05$) 증가하였다. 그러므로 표16의

실험 결과로 매일 최소한 0.3그램/흰쥐 체중(성인 제량 4그램)을 섭취하면 위점막 중의 히스티틴 농도를 효과적으로 감소시키고 프로스타글란딘 E2 농도를 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0067] 본 발명의 목적과 기술 방안, 장점들을 더욱 상세하게 이해시키기 위해 본 발명의 실시예를 들어 설명하였으며, 이러한 실시예는 부분적인 실시예에 해당하며 전부의 실시예는 아님을 밝혀둔다. 본 발명의 실시 방식 중에 묘사된 원소와 특징은 하나 혹은 복수 개의 기타 실시 방법 중에 표시된 원소와 특징들과 결합할 수 있다. 본 발명의 목적을 더욱 정확히 하기 위해 본 발명 내용과 관련이 없고, 관련 분야에 종사하는 사람이라면 익숙하게 숙지하고 있는 사항들은 설명을 생략하였다. 본 발명 중의 실시예 중 본 분야의 일반적인 기술 요원이 특별한 창조성 없이 쉽게 얻을 수 있는 실시예들 역시 본 발명의 보호 범위에 속함을 밝혀둔다.

수탁번호

[0068]

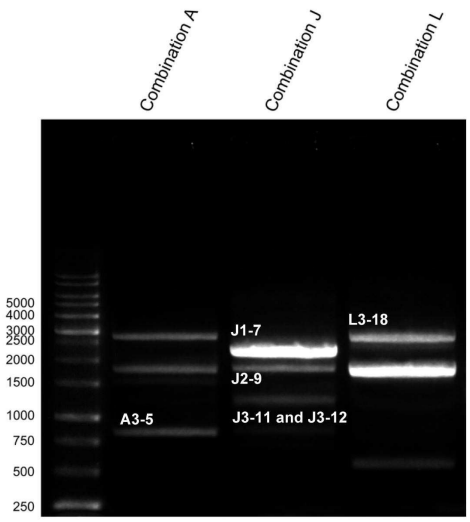
기탁기관명 : 독일 미생물자원센터

수탁번호 : DSMZDSM28047

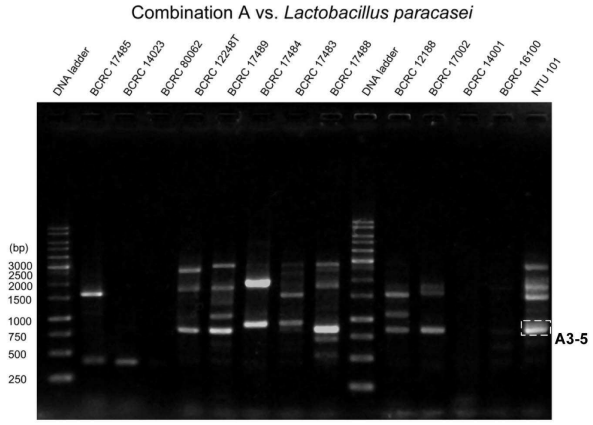
수탁일자 : 20131118

도면

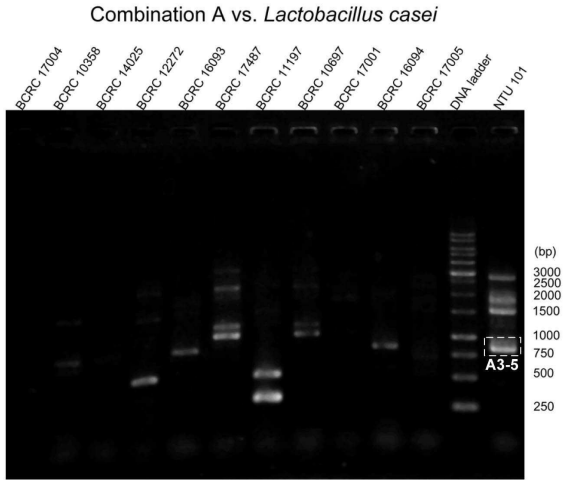
도면1



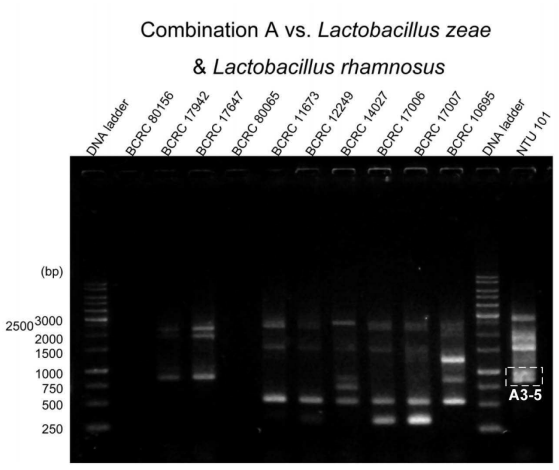
도면2a



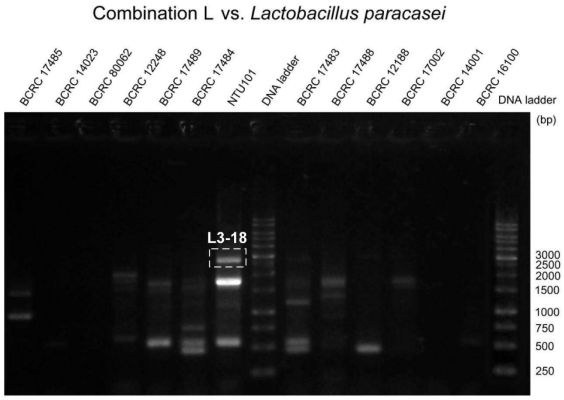
도면2b



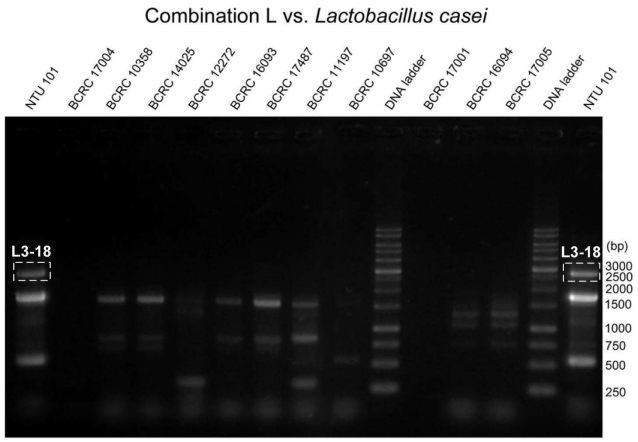
도면2c



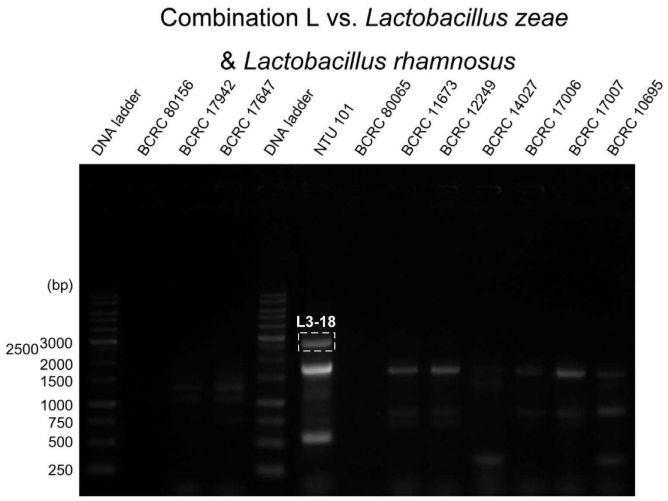
도면3a



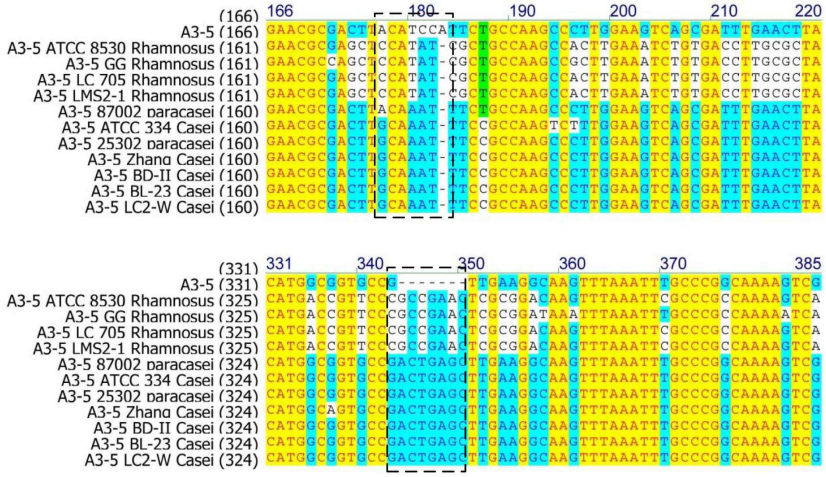
도면3b



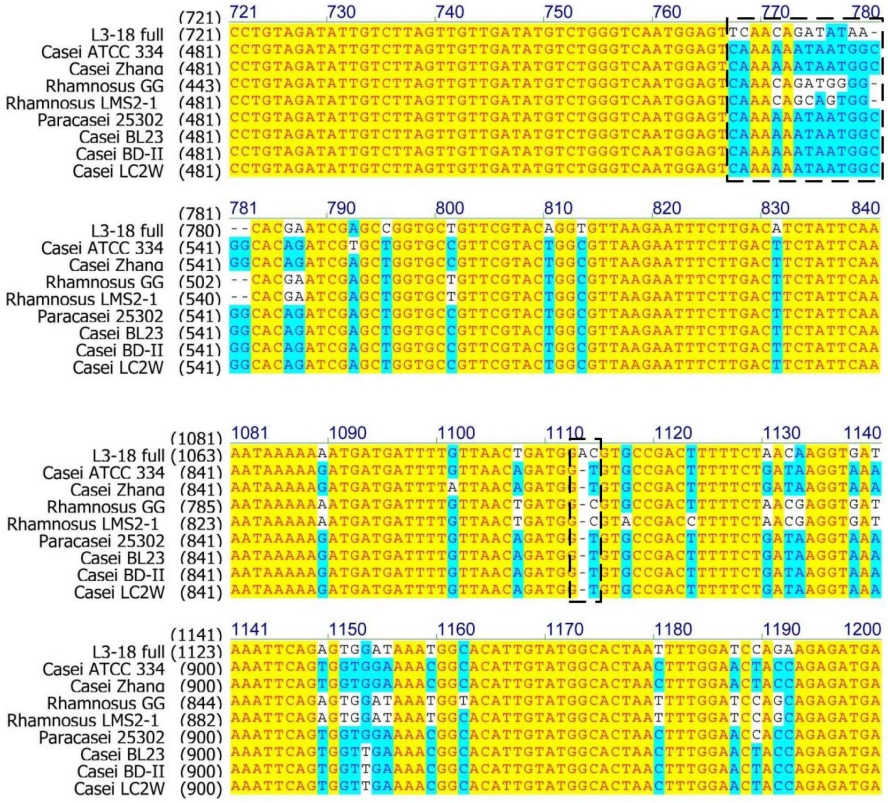
도면3c



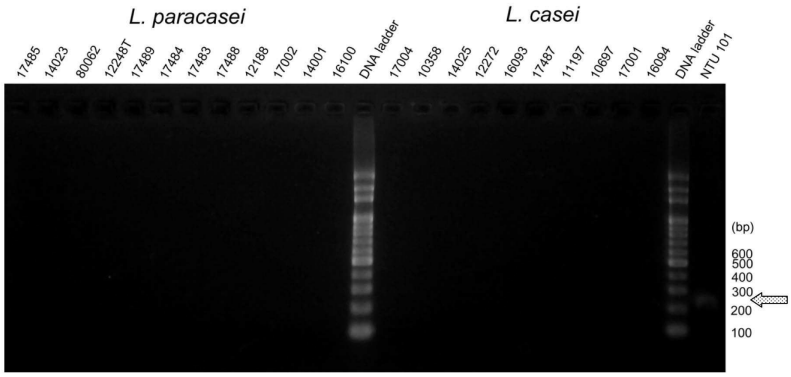
도면4


(166) 166 180 190 200 210 220
A3-5 (166) GAACGCGACTTACATCCATTCTGCCAAGCCCTTGGAAGTCAGCGATTTGAACTTA
A3-5 ATCC 8530 Rhamnosus (161) GAACGCGAGCTCCATAT-CGCTGCCAAGCCACTTGAAATCTGTGACCTTGCGCTA
A3-5 GG Rhamnosus (161) GAACGCCAGCTCCATAT-CGCTGCCAAGCCGCTTGAAATCTGTGACCTTGCGCTA
A3-5 LC 705 Rhamnosus (161) GAACGCGAGCTCCATAT-CGCTGCCAAGCCACTTGAAATCTGTGACCTTGCGCTA
A3-5 LMS2-1 Rhamnosus (161) GAACGCGAGCTCCATAT-CGCTGCCAAGCCACTTGAAATCTGTGACCTTGCGCTA
A3-5 87002 paracasei (160) GAACGCGACTTACAAAT-TTCTGCCAAGCCCTTGGAAGTCAGCGATTTGAACTTA
A3-5 ATCC 334 Casei (160) GAACGCGACTTGCAAAT-TTCCGCCAAGTCTTTGGAAGTCAGCGATTTGAACTTA
A3-5 25302 paracasei (160) GAACGCGACTTGCAAAT-TTCCGCCAAGCCCTTGGAAGTCAGCGATTTGAACTTA
A3-5 Zhang Casei (160) GAACGCGACTTGCAAAT-TTCCGCCAAGCCCTTGGAAGTCAGCGATTTGAACTTA
A3-5 BD-II Casei (160) GAACGCGACTTGCAAAT-TTCCGCCAAGCCCTTGGAAGTCAGCGATTTGAACTTA
A3-5 BL-23 Casei (160) GAACGCGACTTGCAAAT-TTCCGCCAAGCCCTTGGAAGTCAGCGATTTGAACTTA
A3-5 LC2-W Casei (160) GAACGCGACTTGCAAAT-TTCCGCCAAGCCCTTGGAAGTCAGCGATTTGAACTTA
(331) 331 340 350 360 370 385
A3-5 (331) CATGGCGGTGCCG------TTGAAGGCAAGTTTAAATTTGCCCGGCAAAAGTCG
A3-5 ATCC 8530 Rhamnosus (325) CATGACCGTTCCGGCGAAGTCGCGGACAAGTTTAAATTCGCCCGCCAAAAGTCA
A3-5 GG Rhamnosus (325) CATGACCGTTCCGGCGAAGTCGCGGATAAATTTAAATTTGCCCGCCAAAAATCA
A3-5 LC 705 Rhamnosus (325) CATGACCGTTCCGGCGAACTCGCGGACAAGTTTAAATTCGCCCGCCAAAAGTCA
A3-5 LMS2-1 Rhamnosus (325) CATGACCGTTCCGGCGAAGTCGCGGACAAGTTTAAATTCGCCCGCCAAAAGTCA
A3-5 87002 paracasei (324) CATGGCGGTGCCGACTGAGGTTGAAGGCAAGTTTAAATTTGCCCGGCAAAAGTCG
A3-5 ATCC 334 Casei (324) CATGGCGGTGCCGACTGAGGTTGAAGGCAAGTTTAAATTTGCCCGGCAAAAGTCG
A3-5 25302 paracasei (324) CATGGCGGTGCCGACTGAGGTTGAAGGCAAGTTTAAATTTGCCCGGCAAAAGTCG
A3-5 Zhang Casei (324) CATGGCAGTGCCGACTGAGGTTGAAGGCAAGTTTAAATTTGCCCGGCAAAAGTCG
A3-5 BD-II Casei (324) CATGGCGGTGCCGACTGAGGTTGAAGGCAAGTTTAAATTTGCCCGGCAAAAGTCG
A3-5 BL-23 Casei (324) CATGGCGGTGCCGACTGAGGTTGAAGGCAAGTTTAAATTTGCCCGGCAAAAGTCG
A3-5 LC2-W Casei (324) CATGGCGGTGCCGACTGAGGTTGAAGGCAAGTTTAAATTTGCCCGGCAAAAGTCG

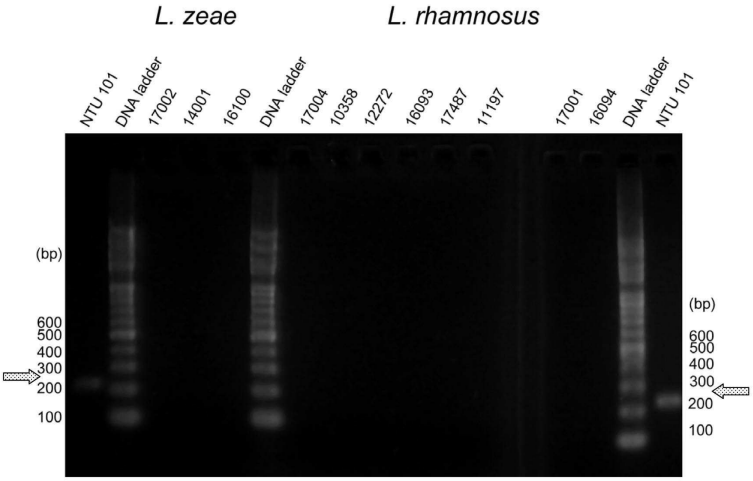
도면5


(721) 721 730 740 750 760 770 780
L3-18 full (721) CCTGTAGATATTGTCTTAGTTGTTGATATGTCTGGGTCAATGGAGTTCAACAGATATAA-
Casei ATCC 334 (481) CCTGTAGATATTGTCTTAGTTGTTGATATGTCTGGGTCAATGGAGTCAAAAAATAATGGC
Casei Zhang (481) CCTGTAGATATTGTCTTAGTTGTTGATATGTCTGGGTCAATGGAGTCAAAAAATAATGGC
Rhamnosus GG (443) CCTGTAGATATTGTCTTAGTTGTTGATATGTCTGGGTCAATGGAGTCAAACAGATGGGG-
Rhamnosus LMS2-1 (481) CCTGTAGATATTGTCTTAGTTGTTGATATGTCTGGGTCAATGGAGTCAAACAGCAGTGG-
Paracasei 25302 (481) CCTGTAGATATTGTCTTAGTTGTTGATATGTCTGGGTCAATGGAGTCAAAAAATAATGGC
Casei BL23 (481) CCTGTAGATATTGTCTTAGTTGTTGATATGTCTGGGTCAATGGAGTCAAAAAATAATGGC
Casei BD-II (481) CCTGTAGATATTGTCTTAGTTGTTGATATGTCTGGGTCAATGGAGTCAAAAAATAATGGC
Casei LC2W (481) CCTGTAGATATTGTCTTAGTTGTTGATATGTCTGGGTCAATGGAGTCAAAAAATAATGGC
(781) 781 790 800 810 820 830 840
L3-18 full (780) --CACGAATCGAGCCGGTGCTGTTCGTACAGGTGTTAAGAATTTCTTGACATCTATTCAA
Casei ATCC 334 (541) GGCACAGATCGTGCTGGTGCCGTTCGTACTGGCGTTAAGAATTTCTTGACTTCTATTCAA
Casei Zhang (541) GGCACAGATCGAGCTGGTGCCGTTCGTACTGGCGTTAAGAATTTCTTGACTTCTATTCAA
Rhamnosus GG (502) --CACGAATCGAGCTGGTGCTGTTCGTACTGGCGTTAAGAATTTCTTGACTTCTATTCAA
Rhamnosus LMS2-1 (540) --CACGAATCGAGCTGGTGCTGTTCGTACTGGCGTTAAGAATTTCTTGACTTCTATTCAA
Paracasei 25302 (541) GGCACAGATCGAGCTGGTGCCGTTCGTACTGGCGTTAAGAATTTCTTGACTTCTATTCAA
Casei BL23 (541) GGCACAGATCGAGCTGGTGCCGTTCGTACTGGCGTTAAGAATTTCTTGACTTCTATTCAA
Casei BD-II (541) GGCACAGATCGAGCTGGTGCCGTTCGTACTGGCGTTAAGAATTTCTTGACTTCTATTCAA
Casei LC2W (541) GGCACAGATCGAGCTGGTGCCGTTCGTACTGGCGTTAAGAATTTCTTGACTTCTATTCAA
(1081) 1081 1090 1100 1110 1120 1130 1140
L3-18 full (1063) AATAAAAAAATGATGATTTTGTTAACTGATGTACGTGCCGACTTTTTCTAACAAGGTGAT
Casei ATCC 334 (841) AATAAAAAGATGATGATTTTGTTAACAGATGT-TGTGCCGACTTTTTCTGATAAGGTAAA
Casei Zhang (841) AATAAAAAGATGATGATTTTATTAACAGATGT-TGTGCCGACTTTTTCTGATAAGGTAAA
Rhamnosus GG (785) AATAAAAAAATGATGATTTTGTTAACTGATGT-CGTGCCGACTTTTTCTAACGAGGTGAT
Rhamnosus LMS2-1 (823) AATAAAAAAATGATGATTTTGTTAACTGATGT-CGTACCGACCTTTTCTAACGAGGTGAT
Paracasei 25302 (841) AATAAAAAGATGATGATTTTGTTAACAGATGT-TGTGCCGACTTTTTCTGATAAGGTAAA
Casei BL23 (841) AATAAAAAGATGATGATTTTGTTAACAGATGT-TGTGCCGACTTTTTCTGATAAGGTAAA
Casei BD-II (841) AATAAAAAGATGATGATTTTGTTAACAGATGT-TGTGCCGACTTTTTCTGATAAGGTAAA
Casei LC2W (841) AATAAAAAGATGATGATTTTGTTAACAGATGT-TGTGCCGACTTTTTCTGATAAGGTAAA
(1141) 1141 1150 1160 1170 1180 1190 1200
L3-18 full (1123) AAATTCAGAGTGGATAAATGGCACATTGTATGGCACTAATTTTGGATCCAGAAGAGATGA
Casei ATCC 334 (900) AAATTCAGTGGTGGAAAACGGCACATTGTATGGCACTAACTTTGGAACTACCAGAGATGA
Casei Zhang (900) AAATTCAGTGGTGGAAAACGGCACATTGTATGGCACTAACTTTGGAACTACCAGAGATGA
Rhamnosus GG (844) AAATTCAGAGTGGATAAATGGTACATTGTATGGCACTAATTTTGGATCCAGCAGAGATGA
Rhamnosus LMS2-1 (882) AAATTCAGAGTGGATAAATGGCACATTGTATGGCACTAATTTTGGATCCAGCAGAGATGA
Paracasei 25302 (900) AAATTCAGTGGTGGAAAACGGCACATTGTATGGCACTAACTTTGGAACCACCAGAGATGA
Casei BL23 (900) AAATTCAGTGGTTGAAAACGGCACATTGTATGGCACTAACTTTGGAACTACCAGAGATGA
Casei BD-II (900) AAATTCAGTGGTTGAAAACGGCACATTGTATGGCACTAACTTTGGAACTACCAGAGATGA
Casei LC2W (900) AAATTCAGTGGTTGAAAACGGCACATTGTATGGCACTAACTTTGGAACTACCAGAGATGA

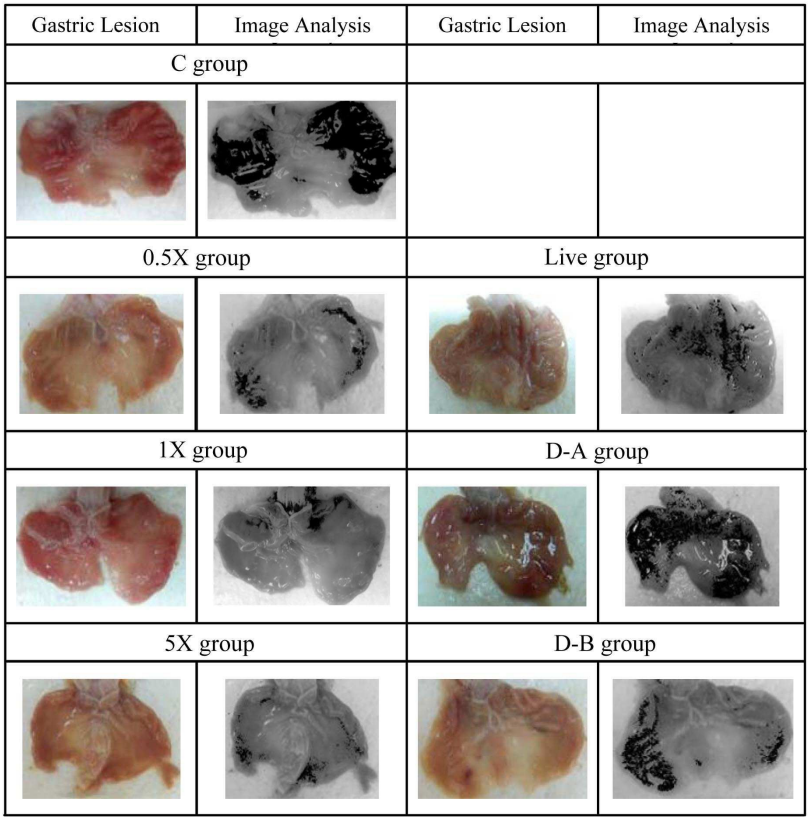
도면6a


L. paracasei
L. casei
17485
14023
80062
12248T
17489
17484
17483
17488
12188
17002
14001
16100
DNA ladder
17004
10358
14025
12272
16093
17487
11197
10697
17001
16094
DNA ladder
NTU 101
(bp)
600
500
400
300
200
100

도면6b


L. zeae
L. rhamnosus
NTU 101
DNA ladder
17002
14001
16100
DNA ladder
17004
10358
12272
16093
17487
11197
17001
16094
DNA ladder
NTU 101
(bp)
600
500
400
300
200
100
(bp)
600
500
400
300
200
100

도면7



서 열 목 록

<110> 신휘생물과학기술주식회사(晨暉生物科技股?有限公司)

<120> 유산균주, 그 뉴클레오타이드 배열 및 프라이머 세트

<140>

<141><160> 5

<210> 1

<211> 838

<212> DNA

<213> 유산균주

<400> 1

AGATCTAGCG CCATTGGTCT TGAAAGCTCG CCTGTTGCTG CAGCATTGGC 50

AGGATTGCGC GCAAATGAAG CGCGTTACAT CTGGAATAAG TATAAGGAAC 100

CTTATATCAC TTATCCGGCT GCCGAAAAAC CTGACAGTCT CGCATGGGTT 150

AATGAAATTC TCGCCGAACG CGACTTACAT CCATTCTGCC AAGCCCTTGG 200

AAGTCAGCGA TTTGAACTTA CCGGATTTGC ACTGGGTTGA GGTTTACTAT 250

CAAGACGGAT TAGCCATCAA CGTGATGTAT AGCTTGTCCG ACCCCAAAAA 300

ACGCGCGGTT GGCTTTAAAC TTAGCGATGG CATGGCGGTG CCGTTGAAGG 350

CAAGTTTAAA TTTGCCCGGC AAAAGTCGAA GCTTGCTGGC ACCATTCGGG 400

GATCTTTTTT CGTCATCAAG GTCAGCCATT GAAAAAAGAC AACTTTTTAA 450

CTTGATAAGC TTACACATAC AAAAAACGGC CACGGTGATG TTCCTCAATA 500

TTGGAGGTAT GACATCACCG TGGCCATTTT TGCGTATAAT CGTTTAAACA 550

AAGACTGAAA TGGCCAGCTG AATATTTAGA ACGGTGATCA CACCCGTCAG 600

AAAATAGCCG ACCCACCGCA CGAGTTGCGA ATTAACGTGG ATACCCATCA 650

AATCACGCCG ATTCGTCAAG GCCACCAACG GGAAAAGCGT AAATGGCAAG 700

GCAATGCTCA ATGACACCTG CGCATAGACA ATAACTTGCT CAAAGTTGTG 750

TTCGCTAAAA CCGATCATGA AGCCAATCAC CATGATGGGA ATGAGCGTCA 800

CAAGTCGCGT CAGCAACCTC CGCTCCCACA ATGGCGCT 838

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> 인공합성

<220>

<223> 인공합성 뉴클레오타이드

<400> 2

GTTTCGCTCC 10

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> 인공합성

<220>

<223>인공합성 뉴클레오타이드

<400> 3

AGCGCCATTG 10

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 인공합성

<220>

<223> 인공합성 뉴클레오타이드

<400> 4

CGCCGAACGC GACTTACATC 20

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 인공합성

<220>

<223> 인공합성 뉴클레오타이드

<400> 5

GGCAAATTTA AACTTGCCTT CAACG 25

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

고순수 유산균가루가 8주 동안 4g/일까지 투여되면,

【변경후】

고, 상기 순수 유산균가루가 8주 동안 4g/일까지 투여되면,