



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월28일  
(11) 등록번호 10-2049970  
(24) 등록일자 2019년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23L 33/135 (2016.01) A23L 2/38 (2006.01)  
A61K 8/99 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)  
A61Q 19/08 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A23L 33/135 (2016.08)  
A23L 2/382 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0147423  
(22) 출원일자 2018년11월26일  
심사청구일자 2018년11월26일  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2010138147 A\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
주식회사한국야쿠르트  
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)  
(72) 발명자  
이하예라  
서울특별시 관악구 관악로 304 관악현대아파트  
104동 1501호  
이명희  
경기도 성남시 분당구 장미로 55 장미마을 104동  
202호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
경일호

전체 청구항 수 : 총 6 항

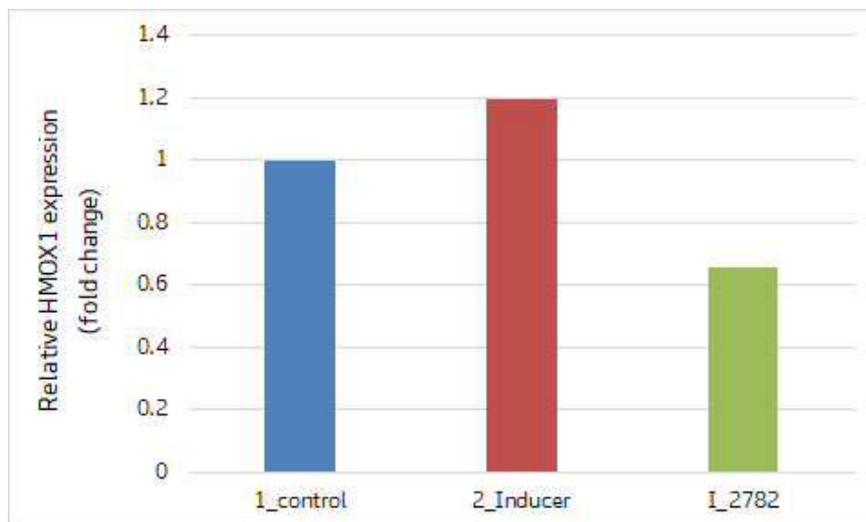
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 카제이 HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 산화적 스트레스를 개선하기 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress)를 개선하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 HMOX1(Heme oxygenase 1) 또는 FTL(Ferritin light chain) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 사람의 피부세포의 산화적 스트레스를 개선하는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 함유하는 식품조성물과 화장료 조성물로 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

*A61K 8/99* (2013.01)  
*A61Q 19/00* (2013.01)  
*A61Q 19/08* (2013.01)  
*A23V 2002/00* (2013.01)  
*A23V 2200/318* (2013.01)  
*A23Y 2220/17* (2013.01)  
*A61K 2800/522* (2013.01)

(72) 발명자

**강희림**

서울특별시 영등포구 신길3동 355-254

**라제현**

경기도 수원시 권선구 세화로151번길 36 201호(서  
문동)

**정승희**

경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 17 금화마을  
5단지 502동 1603호

**홍동기**

경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 17

**정성은**

서울특별시 송파구 가락동 21-6 가락쌍용 2차아파  
트 102동 603호

**최일동**

경기도 용인시 기흥구 금화로58번길 10 금화마을주  
공4단지아파트 405-1704

**이정열**

경기도 양평군 서종면 통점길 63 404-1

**심재현**

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 213-901호

(56) 선행기술조사문헌

Environmental and Molecular Mutagenesis 49,  
pp.192-199, 2008.\*  
차미연 외6명, 'Improvement of skin  
environment by changing Bacteria of human skin  
surface with Fermented Lespedeza Cuneata with  
Lactobacillus pentosus GFC01', IFSCC 2017  
Seoul, pp.1-18, 2017년.\*

KR101718465B1

KR101912258 B1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

사람의 피부세포에서 HMOX1(Heme oxygenase 1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress)를 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782(수탁번호: KCTC 13438BP) 생균체를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 피부의 산화적 스트레스(oxidative stress) 개선용 식품조성물.

**청구항 3**

사람의 피부세포에서 FTL(Ferritin light chain) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress)를 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782(수탁번호: KCTC 13438BP) 생균체를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 피부의 산화적 스트레스(oxidative stress) 개선용 식품조성물.

**청구항 4**

청구항 2 또는 청구항 3에 있어서,

상기 미세먼지로 인한 피부의 산화적 스트레스(oxidative stress) 개선용 식품조성물은 발효유, 건강기능식품, 기능성 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 미세먼지로 인한 피부의 산화적 스트레스(oxidative stress) 개선용 식품조성물.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

사람의 피부세포에서 HMOX1(Heme oxygenase 1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress)를 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782(수탁번호: KCTC 13438BP) 생균체를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 피부의 산화적 스트레스(oxidative stress) 개선용 화장료 조성물.

**청구항 7**

사람의 피부세포에서 FTL(Ferritin light chain) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress)를 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782(수탁번호: KCTC 13438BP) 생균체를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 피부의 산화적 스트레스(oxidative stress) 개선용 화장료 조성물.

**청구항 8**

청구항 6 또는 청구항 7에 있어서,

상기 미세먼지로 인한 피부의 산화적 스트레스(oxidative stress) 개선용 화장품 조성물은 영양 화장수, 영양 크림, 맛사지 크림, 팩 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 가지는 것을 특징으로 하는 미세먼지로 인한 피부의 산화적 스트레스(oxidative stress) 개선용 화장품 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress)를 개선하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 HMOX1(Heme oxygenases 1) 또는 FTL(Ferritin light chain) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 사람의 피부 세포의 산화적 스트레스를 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 산화적 스트레스를 개선하기 위한 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 프로바이오틱스(Probiotics)는 '장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제'라고 Fuller가 1989년 정의한 것을 시작으로 2001년에 발표된 '충분한 양을 섭취하였을 때 숙주의 건강에 도움이 되는 살아있는 미생물'이라는 FAO/WHO 정의가 널리 사용되고 있다. 이에 더하여 1999년 Salminen 등은 '숙주에 유익한 작용을 갖는 미생물 제제 또는 미생물의 성분'으로 정의하여 생균에서부터 사균으로까지 프로바이오틱스의 범위를 확대시킨 해석도 있다. 프로바이오틱스를 포함한 인간의 장내 미생물이 인간의 건강에 중요한 영향을 미친다는 연구결과 및 과학적 자료가 증가함에 따라 프로바이오틱스에 대한 소비자들의 인식이 더욱 확대되었으며, 그에 따라 프로바이오틱스 제품의 수요가 점차 증가하고 있다. 현재 식약처에서 등재한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 11종(*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*)과 락토코커스(*Lactococcus*) 1종(*Lc. lactis*), 엔테로코커스(*Enterococcus*) 2종(*E. faecium*, *E. faecalis*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 1종(*S. thermophilus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 4종(*B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis* subsp. *lactis*)까지 19종의 균주에 대하여 프로바이오틱스로 고시하였고 많은 기업체들이 프로바이오틱스에 대한 연구 및 제품을 판매하고 있다.

[0003] 대표적인 자유라디칼(Free radical)인 활성산소종(Reactive oxygen species; ROS)은 자외선이나 X-선 등의 방사에너지 흡수했을 경우에 외부로부터 들어온 화학물질을 대사하는 과정 및 염증반응시 백혈구가 활성화되었을 때 만들어진다. 이들은 또한 평상시 세포내 미토콘드리아의 호흡과정에서도 생겨난다. 세포 내에서는 이러한 활성산소종을 제거하는 기전을 발달시킴으로써 이들로 인한 손상을 최소화하고 있다. 활성산소의 제거능력에 비하여 너무 많은 활성산소가 만들어지면 세포는 산화적 스트레스 상황에 놓이게 된다. 다양한 염증성 질환에서 활성산소는 세포 내의 전사인자인 NF-κB와 AP-1을 활성화시킴으로써 염증반응을 증폭시킨다. Nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2(Nrf2)는 산화적 스트레스 및 발암과정에 대항하여 세포를 보호하는데 있어서 매우 중요한 전사인자로서, 이들은 antioxidant response element(ARE)와 결합하여 주요한 항산화효소와 phase II detoxifying 효소들의 전사를 활성화시키며, 이와 관련된 대표적 유전자가 HMOX1(Heme oxygenase 1)과 FTL(Ferritin light chain) 등으로 알려져 있다. Nrf2 의존성 세포보호반응은 다양한 기관과 조직을 보호할 수 있으므로 Nrf2의 활성은 암, 신경퇴행성질환, 심혈관계질환, 급·만성 폐손상, 자가면역질환 등 다양한 질병에 대한 방어역할을 수행할 수 있을 것으로 주목받아 왔다.

[0004] HMOX1은 세포내의 heme의 양을 적절히 유지하도록 하는 중요한 효소로 3가지의 동형단백질로 존재한다. 대부분의 세포에서 기본적인 대사활동에 관여하는 HMOX2 및 HMOX3과는 다르게, HMOX1은 산화적 스트레스, 지질다당류, 멜라토닌 및 아데노신과 같은 다양한 자극에 의해 유도되는 형태이다. HMOX1은 산화적 손상 억제, 염증 반응 감소 및 세포 증식 조절을 통해 조직의 항상성 유지에 주요한 역할을 수행한다. 논문(Free Radical Biology and Medicine, 2010, 48.2: 196-206.)에 따르면, 인체유래 피부각질세포에서 UVA에 의해 HMOX1 발현이 증가하는 것이 확인되었다. FTL 또한 논문(photochemical & photobiological sciences 2010, 9, 448~458)에서도 알 수 있듯이 인체유래 피부각질세포에서 자외선에 의해 유발되는 산화적 스트레스가 발생했을 때 그 발현이 증가하는 것이 확인되었다.

[0005] 미세먼지는 입자의 크기에 따라 지름이 10µm 이하인 미세먼지(PM10)와 지름이 2.5µm 이하인 초미세먼지

(PM2.5)로 분류된다. 미세먼지는 연소작용에 의해 발생하는 질산염, 암모늄, 황산염 등의 이온 성분과 탄소화합물, 금속화합물 등으로 이루어지며 구강과 점막에 의해 걸러지지 않아 폐포와 기관지에 붙어서 폐기능을 방해한다. 장기간 미세먼지에 노출시 천식, 기관지염 등의 호흡기질환은 물론 심혈관질환, 피부질환 등 각종 질병에 노출될 수 있다. 최근 연구에 따르면, 미세먼지는 인체내 산화스트레스를 초래하여 염증반응을 일으키며, 폐포속에 TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor-alpha), IL-1 $\beta$ (interleukin-1beta)를 증가시킨다. 이렇게 증가된 전염증성 사이토카인은 만성기관지염을 악화시킬 뿐만 아니라 아토피 피부염과 같은 피부질환을 악화시킨다. 따라서 이러한 미세먼지에 대한 대책 마련이 시급한 상태이다.

[0006] 이에 본 발명자들은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782가 미세먼지로 인한 활성산소 생성 억제와 관련된 유전자들의 발현을 조절함으로써 인간의 피부세포의 산화적 스트레스를 개선하는 효과를 가진다는 사실을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2005-0099380호(2005.10.13)

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명은 미세먼지로 인한 사람의 피부세포의 산화적 스트레스를 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스를 개선하기 위한 식품조성물과 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인체유래 피부각질세포(HaCaT)에서 HMOX1(Heme oxygenase 1) 또는 FTL(Ferritin light chain) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 사람의 피부세포의 산화적 스트레스를 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스를 개선하기 위한 식품조성물과 화장료 조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0011] 본 발명의 프로파이지(prophage)가 제거된 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 스미즈-코다타(Shimizu-Kadota)등의 방법(문헌: 1982, Appl. Environ. Microbiol. 43(6), p.1284)에 따라 분리하였으며, 그 분리과정은 다음과 같다.

[0012] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) YIT9018을 MRT 액체배지(문헌: 1969. Nippon Nogei Kagaku Kaishi. 43(5). p.311)에서 대수기 초기까지 배양하여 세척하고, 돌연변이 유발물질을 처리하여 37℃에서 30분간 배양하였다. 이를 원심분리하여 인산염용액(pH 7.0)으로 세척하여 새로운 MRT 액체배지로 현탁한 다음, 로고사(Rogosa) 한천평판배지(문헌: 1962. J.Infect. Dis. 110, p.258)에 도말하여 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 균체들 중에서 레프리카-플레이팅방법(replica-plating method, 문헌: 1982, Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory)에 의해 37℃에서 성장이 가능하고 42℃에서는 성장이 억제되는 균체들을 온도감수성 변이주로 분리하였다. 분리된 570개의 온도감수성 변이주들을 42℃에서 30분간 열처리하여 30℃에서 24시간 동안 배양하여 소프트-아가 레이어방법(soft-agar layer method, 문헌: 1959. Interscience publisher Inc. New York)으로 잠재성 파아지의 수를 측정하여 잠재성 파아지의 수가 열처리 후 현저히 증가하는 것을 열유발성 변이주(thermoinducible mutants)로 분리하였다. 분리된 열유발성 변이주를 잠재성 파아지가 불활성화될 수 있는 항혈청이 포함된 새로운 MRT 액체 배지에 접종하여 대수기 초기까지 배양한 다음 42℃에서 30분간 열처리한 후, 즉시 로고사 한천평판배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 콜로니(colony)를 형성하는 240균주를 분리하였다. 분리된 균주들을 지시균으로 사용하여 소프트-아가 레이어 방법으로 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) YIT9018 배양액의 상층을 얻어 배양한 후, 플라크 형성유무를 조사하여 플라크가 형성되는 것을 분리하였다. 그리고, 프로파이지가 제거된 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) YIT9029(일본미생물공업연구소 균주기탁 제5852호)를 지시균으로하여 소프트-아가 레이어 방법으로 분리

된 균주들이 배양액 상층을 얻어 배양한 후, 플라크 형성유무를 조사하여 플라크가 형성되지 않은 균주를 분리하였다. 또한 분리된 균주를 37℃에서 대수기 초기까지 배양한 후 42℃에서 30분간 열처리한 다음, 소프트-아가 레이저 방법으로 플라크의 생성유무를 확인하여 플라크가 생성되지 않는 것을 프로파이지 커어드 스트레인 (prophage cured strain)으로 최종 분리하였다. 이렇게 하여 분리된 균주의 수는 32균주였다. 이 균주들이 균학적 특성을 조사하여 모균주인 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) YIT9018과 균학적 특성이 거의 동일한 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 분리였다.

[0013] 이와 같이하여 분리된 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 균학적 특성은 다음과 같다.

[0014] (1)균의 형태 (37℃, MRS 한천 평판배지에서 2일간 배양)

[0015] 1)세포의 형태: 막대형

[0016] 2)그램염색: 양성

[0017] 3)운동성: 없음

[0018] (2)균락의 형태 (37℃, MRS 한천 평판배지에서 2일간 배양)

[0019] 1)형상: 원형

[0020] 2)표면: 매끈 (smooth)

[0021] (3)생리학적 성질

[0022] 1)생육온도:      생장가능 생육온도는 13 내지 43℃, 최적생장온도는 33 내지 37℃

[0023] 2)생육 pH:      생장가능 생육 pH는 4.5 내지 7.5, 최적 pH는 5.0 내지 5.5

[0024] 3)산소의 영향: 통성혐기성

[0025] 4)카탈리아제: -

[0026] 5)가스형성여부: -

[0027] 6)15℃에서 생육: -

[0028] 7)45℃에서 생육: +

[0029] 8)16S rDNA 분석

[0030] 16S rDNA 분석을 통한 분자유전학적인 방법을 실시하여 본 발명의 균주를 동정하였다. 16S rDNA 염기 서열 분석 결과를 표 1에 나타내었다( <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>).

[0031] 하기의 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 16S rRNA 유전자는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)의 16S rRNA 유전자와 99% 일치하는 것으로 확인되었다.

**표 1**

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident	Accession
Lactobacillus sp. strain KL-1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2723	2723	99	99	KX499357
Lactobacillus sp. strain 13-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2723	2723	99	99	KX499356
Lactobacillus casei strain CU 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2723	2723	99	99	KX426048
Lactobacillus casei strain HH7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2723	2723	99	99	KU587809
Lactobacillus paracasei strain FS3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2723	2723	99	99	KU315064

- [0033] 상기 16S rRNA 서열 및 균학적 특성에 의해 본 발명의 균주를 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782로 명명하였으며, 2017년 12월 19일자로 한국생명공학연구원(KCTC)에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 13438BP).
- [0034] 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균 또는 이의 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 식품조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 등으로 사용될 수 있다.
- [0035] 특히, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균 또는 이의 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 발효유는 프로바이오틱스의 동결건조분말, 유산균 배양액 및 혼합과즙시럽을 일정비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 발효유를 제조한다.
- [0036] 또한, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균 또는 이의 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료는 혼합과즙시럽, 프로바이오틱스의 동결건조분말 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성 음료를 제조한다.
- [0037] 또한, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균 또는 이의 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 프로바이오틱스의 동결건조분말을 포함하는 것 이외에 영양보조 성분으로 비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.
- [0038] 한편, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균 또는 이의 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 외에 기타 화장료의 제형 또는 사용 목적 등에 맞게 임의로 선정된 물질을 첨가할 수 있다. 예를 들어, 정제수, 유분, 계면활성제, 보습제, 고급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 지방산, 산화방지제, 방부제, 왁스, pH 조절제, 향료 등이 첨가될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균 또는 이의 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물의 제형은 특별히 제한되는 바가 없지만, 예를 들면, 영양 크림, 수렴 화장수, 유연 화장수, 로션, 에센스, 영양젤, 마사지 크림, 마스크 팩 등의 제형을 가질 수 있다.

**발명의 효과**

- [0040] 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 HMOX1(Heme oxygenase 1) 또는 FTL(Ferritin light chain) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 사람의 피부세포의 산화적 스트레스를 개선하는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 함유하는 식품조성물과 화장료 조성물로 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0041] 도 1은 본 발명의 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 마이크로어레이(microarray)를 통해 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따른 전체유전자 발현 변화를 분석한 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 마이크로어레이(microarray)를 통해 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따라 발현이 감소한 유전자의 수와 실험군별 공통적인 유전자 수를 확인한 그래프이다.
- 도 3는 본 발명의 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 마이크로어레이(microarray)를 통해 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따라 발현이 증가한 유전자의 수와 실험군별 공통적인 유전자 수를 확인한 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 실시간중합효소 연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction)을 통해 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따른 항산화 단백질 HMOX1 유전자 발현 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 실시간중합효소 연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction)을 통해 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따른 항산화 단백질 FTL 유전자 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.
- [0043] <실시예 1>
- [0044] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 포함한 동결건조분말 제조
- [0045] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 MRS broth 배지에서 배양한 후, 배양액을 8,000rpm에서 15분 동안 원심분리를 하여 얻은 프로바이오틱스 농축액에 대하여 코팅제 및 동결보호제로써 가압 살균된 10중량%의 탈지분유가 함유된 수용액을 1:1의 중량비율로 혼합한 다음, 영하 70℃에서 6시간 동안 동결 후 동결건조분말을 제조하였다.
- [0046] <실시예 2>
- [0047] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0048] 유산균 배양액은 원유 95.36중량%와 탈지분유(또는 혼합분유) 4.6중량%를 교반하여 15℃에서의 비중은 1.0473~1.0475, 적정산도는 0.200~0.220%, pH는 6.55~6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix<sup>0</sup>)는 16.3~16.5% 정도가 되도록 혼합하였다. 상기 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고, 적정온도로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써도필러스균(*Streptococcus thermophilus*)과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP배지에서의 총 유산균 수가  $5.0 \times 10^8$  cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.
- [0049] 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>0</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0050] 상기 유산균 배양액 69.5중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 동결건조분말 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.
- [0051] <실시예 3>
- [0052] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0053] 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>0</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0054] 그리고, 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 동결건조분말 0.1중량% 및 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0055] <실시예 4>
- [0056] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0057] 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 동결건조분말 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 동결건조분말 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물에 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12~14메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.
- [0058] <실시예 5>

- [0059] 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물의 제조
- [0060] 영양화장수
- [0061] 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 동결건조분말 0.01중량%, 밀납 4중량%, 폴리소르베이트 60 1.5중량%, 소르비탄세스퀴올레이트 0.5중량%, 유동과라핀 5중량%, 스쿠알란 5중량%, 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드 5중량%, 글리세린 3중량%, 부틸렌 글리콜 3중량%, 프로필렌 글리콜 3중량%, 카복시비닐폴리머 0.1중량%, 트리에탄올아민 0.2중량%, 미량의 방부제, 미량의 색소, 미량의 향료 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 영양화장수 제조방법에 따라 제조하였다.
- [0062] 영양크림
- [0063] 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 동결건조분말 0.01중량%, 밀납 10중량%, 폴리소르베이트 60 1.5중량%, 소르비탄세스퀴올레이트 0.5중량%, 유동과라핀 10중량%, 스쿠알란 5중량%, 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드 5중량%, 글리세린 5중량%, 부틸렌 글리콜 3중량%, 프로필렌 글리콜 3중량%, 트리에탄올아민 0.2중량%, 미량의 방부제, 미량의 색소, 미량의 향료 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 영양크림 제조방법에 따라 제조하였다.
- [0064] 맞사지크림
- [0065] 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 동결건조분말 0.01중량%, 밀납 10중량%, 폴리소르베이트 60 1.5중량%, 소르비탄세스퀴올레이트 0.8중량%, 유동과라핀 40중량%, 스쿠알란 5중량%, 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드 4중량%, 글리세린 5중량%, 부틸렌 글리콜 3중량%, 프로필렌 글리콜 3중량%, 트리에탄올아민 0.2중량%, 미량의 방부제, 미량의 색소, 미량의 향료 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 맞사지크림 제조방법에 따라 제조하였다.
- [0066] 팩
- [0067] 상기 실시예 1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 동결건조분말 0.01중량%, 폴리비닐알콜 13중량%, 소듐카복시메틸셀룰로스 0.2중량%, 알란토인 0.1중량%, 에탄올 5중량%, 노닐페닐에테르 0.3중량%, 미량의 방부제, 미량의 색소, 미량의 향료 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 팩 제조방법에 따라 제조하였다.
- [0068] <시험예 1>
- [0069] 1-1. 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 생균체의 제조
- [0070] 상기 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 MRS 액체배지에 접종하여 37℃에서 18~20시간 배양하였다. 정확한 생균수를 확인하기 위해 배양이 완료된 유산균을 십진 희석하여 MRS agar 배지를 이용하여 37℃에서 2~3일간 배양해 균수를 측정하였다.
- [0071] 세포 실험에 적용 시 앞서 구한 균수를 기준으로 하여 세포 배양에 사용한 배지를 넣고 희석해 생균체로 사용하였다.
- [0072] 1-2. 인체유래 각질세포(HaCaT) 세포의 배양
- [0073] 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제를 포함한 DMEM 배지(Gibco, USA)에서 인체유래 각질세포(HaCaT)와 DMEM을 1:4의 중량비율로 2~3일에 한 번씩 계대 배양하여 사용하였다(배양 조건: 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃ 배양기).
- [0074] 즉, 계대를 위하여 DMEM 배지를 제거하고 PBS 4ml로 1회 세척한 후, Trypsin-EDTA Solution 1X(1XTE, Sigma)를 1ml 처리하여 배양기에 10~15분 동안 넣어두었다. 인체유래 각질세포(HaCaT)의 부착이 떨어진 것을 확인한 후 DMEM 배지 4ml를 넣어 인체유래 각질세포(HaCaT)를 회수하였다. 상기 회수된 인간유래 각질세포(HaCaT)를 1,200rpm으로 3분 동안 원심분리를 한 후, 상등액을 조심스럽게 제거하고, DMEM 배지 1ml를 넣어 세포 펠렛을 풀어 주었다. 인체유래 각질세포(HaCaT)와 DMEM 배지를 1:4의 중량비율로 희석한 후 100 $\mu$ l 세포배양접시에 넣고 잘 혼합한 후 배양기에서 2~3일간 배양하여 사용하였다.
- [0075] 1-3. 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 RNA 추출
- [0076] 상기 시험예 1-2의 인체유래 각질세포(HaCaT)를 6 웰에 웰당 2x10<sup>4</sup> cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다.

- [0077] FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 시험에 1-1의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를  $1 \times 10^5$  CFU/ml의 농도로 용해하여 상기 FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척된 각 웰의 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였고, 이와 동시에 ERM-CZ100(다환방향족탄화수소, Sigma)와 ERM-CZ120(중금속, Sigma)이 각각 100  $\mu$ g/ml의 농도로 존재하는 미세먼지를 200  $\mu$ g/ml의 농도로 상기 각 웰의 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였다. 그런 다음, 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체와 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)를 24시간 동안 배양한 후, PBS로 2번 세척해 준 후 easy-spin™ lysis buffer(iNtRON, USA) 1ml를 넣고 상기 인체유래 각질세포(HaCaT)를 용해하였다. 상기 용해된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서 easy-spin™ [DNA free] Total RNA Extraction Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA 순도와 분해정도는 ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop, Wilmington, USA)와 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)로 확인하였다.
- [0078] 한편, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 상기 시험에 1-1의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다.
- [0079] 또한, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 미세먼지만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다
- [0080] 또한, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다
- [0081] 1-4. 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 유전자발현 분석
- [0082] 상기 시험에 1-3의 각각의 RNA 라벨링(labeling)과의 혼성화(hybridization)는 Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol(Agilent Technology, V 6.5, 2010)에 따라 마크로젠(Macrogen inc., Korea)에서 마이크로어레이(microarray)를 수행하여 분석하였다.
- [0083] 마이크로어레이(Microarray) 결과는 Agilent Feature Extraction software v11.0 (Agilent Technologies)를 통해 추출되어, Agilent feature extraction protocol에 따라 분석되었다. 유전자 풍부화(Gene-enrichment)와 특정 프로브(probe)에 대한 기능적 주석 분석(Functional Annotation analysis)은 gene ontology([www.geneontology.org/](http://www.geneontology.org/))와 KEGG(<http://kegg.jp>)를 통해 진행하였다. 모든 데이터 분석 및 시각화는 R3.3.3([www.r-project.org](http://www.r-project.org))에 의해 분석되었다.
- [0084] 그 결과를 도 1 내지 도 3에 나타내었다.
- [0085] 도 1은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체와 미세먼지를 동시에 처리한 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 약 26,000여개의 유전자 발현을 전체적으로 비교해 보았을 때, 파란색은 유전자 발현이 감소된 것으로, 노란색은 유전자 발현이 증가된 것으로 구분할 수 있다.
- [0086] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(1\_control)과 인체유래 각질세포(HaCaT)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체만을 처리한 실험군(4\_2782)이 서로 유사한 유전자 발현양상을 보이는 것을 알 수 있었고, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지만을 처리한 실험군(2\_Inducer)과 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(I\_2782)이 유사한 유전자 발현양상을 보이는 것을 알 수 있었다.
- [0087] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(1\_control)과 비교하여, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지만을 처리한 실험군(2\_Inducer)에서는 56개의 유전자가 다른 실험군(4\_2782, I\_2782)과 다르게 유전자 발현이 감소하였고, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(I\_2782)에서는 약 194개의 유전자가 다른 실험군(4\_2782, 2\_Inducer)과는 다르게 유전자 발현이 감소하였으며, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지만을 처리한 실험군(2\_Inducer)에서는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 인체유래 각질세포(HaCaT)에의 처리 유무와 상관없이 동일한 64개의 유전자 발현이 감소하였고, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체만을 처리한 실험군(4\_2782)에서도 약 18개의 유전자가 다른 실험군(I\_2782, 2\_Inducer)과 다르게 유전자 발현이 감소하였다.
- [0088] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(1\_control)과 비교하여, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지만을 처리한 실험군(2\_Inducer)에서는 80개의 유전자가 다른

실험군(4\_2782, I\_2782)과는 다르게 유전자 발현이 증가하였고, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(I\_2782)에서는 약 302개의 유전자가 다른 실험군(4\_2782, 2\_Inducer)과는 다르게 유전자 발현이 증가하였으며, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 실험군(4\_2782)에서도 약 19개의 유전자가 다른 실험군(I\_2782, 2\_Inducer)과 다르게 유전자 발현이 증가하였고, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(2\_Inducer)에서는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 인체유래 각질세포(HaCaT)에의 처리 유무와 상관없이 동일한 약 165개의 유전자의 발현이 증가하였다.

[0089]

<시험예 2>

[0090]

실시간 증합효소 연쇄반응을 이용한 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 유전자발현 분석

[0091]

마이크로어레이를 통해 유전자 발현 양상이 변화된 유전자를 분석하여 미세먼지에 의한 산화적 스트레스를 개선하는데 관련이 되어있는 HMOX1과 FTL 유전자의 발현이 미세먼지의 처리에 따라 증가하였다가 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 처리로 감소함이 확인되어, 실시간증합효소 연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction, q-PCR)을 통해 보다 더 자세히 분석하였다.

[0092]

즉, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 경우를 제외한 상기 시험예 1-3의 분리된 각각의 RNA로부터 Omniscript reverse transcription kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. RNA 발현은 Taqman gene expression master mix(Taqman, USA)를 이용하였고, QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System(Applied biosystems, USA)으로 분석 및 정량하였다. 이를 위해 사용한 인간유래 프라이머(primer)는 GAPDH(Hs03929097\_g1), HMOX1(Hs00157965\_m1), FTL(Hs00830226\_gH)로 Tagman사를 통해 주문하여 사용하였다. 유전자 발현의 지표인 Ct(threshold cycle)를 바탕으로 유전자 발현의 배수차이(fold change)를 계산하였다.

[0093]

그 결과를 도 4(HMOX1 유전자 발현) 및 도 5(FTL 유전자 발현)에 나타내었다.

[0094]

도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(1\_control)의 유전자 발현 1을 기준으로, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(2\_Inducer)에서는 HMOX1(Heme oxygenase 1) 유전자 발현이 1.2배 증가하였으나, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(I\_2782)에서는 HMOX1(Heme oxygenases 1) 유전자 발현이 0.7배로 다시 감소하였다.

[0095]

도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(1\_control)의 유전자 발현 1을 기준으로, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(2\_Inducer)에서는 FTL(Ferritin light chain) 유전자 발현이 1.4배 증가 증가하였으나, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(I\_2782)에서는 FTL(Ferritin light chain) 유전자 발현이 1.3배로 다시 감소하였다.

[0096]

이상의 도 4 및 도 5의 실험 결과를 종합하여 보면, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 HMOX1(Heme oxygenase 1) 유전자 또는 FTL(Ferritin light chain) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지에 의해 유도되는 피부세포의 산화적인 스트레스를 완화시키는 효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

**수탁번호**

[0097]

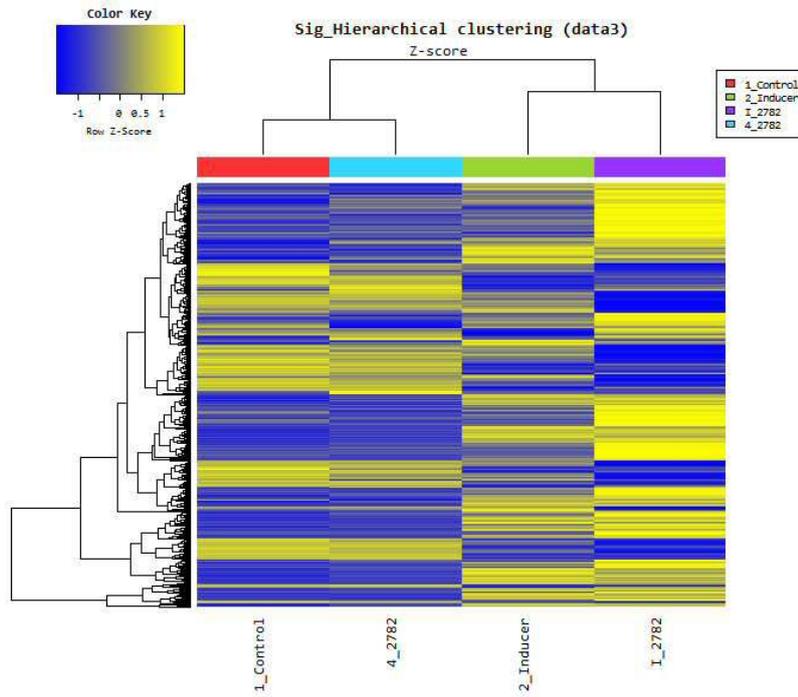
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13438BP

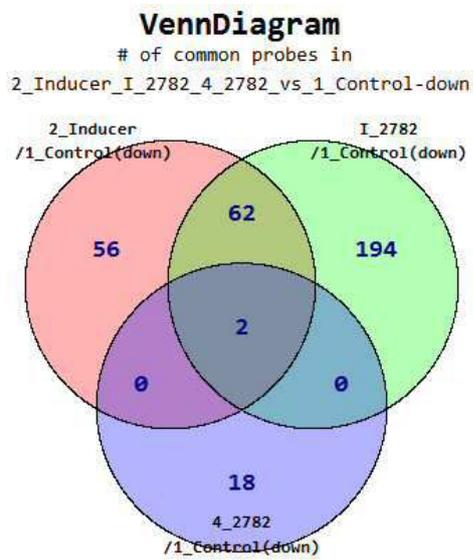
수탁일자 : 20171219

도면

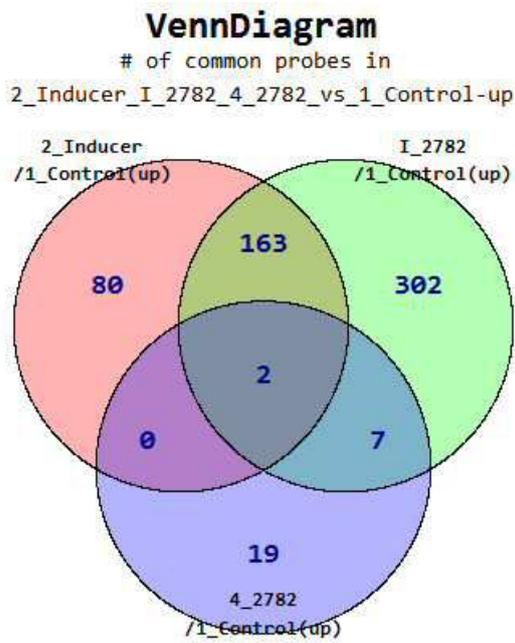
도면1



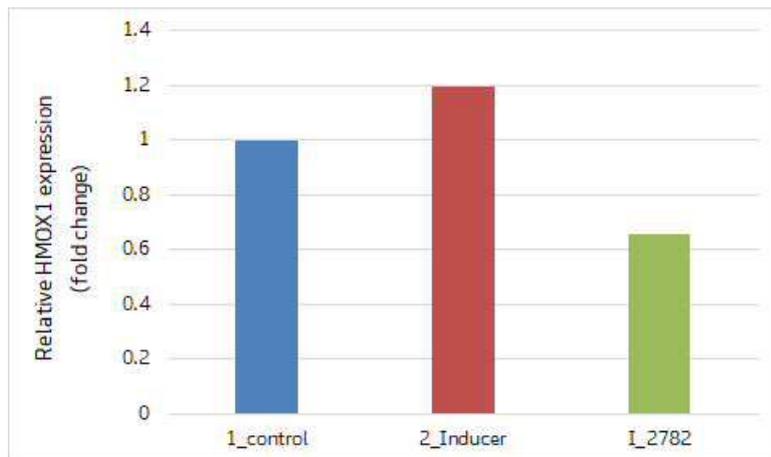
도면2



도면3



도면4



도면5

