



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월17일  
(11) 등록번호 10-1969906  
(24) 등록일자 2019년04월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23L 33/135 (2016.01) A23L 2/38 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A23L 33/135 (2016.08)  
A23L 2/38 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0124284
- (22) 출원일자 2018년10월18일  
심사청구일자 2018년10월18일
- (56) 선행기술조사문헌  
인터넷 신문기사( '[헬스 동아] "락토바실러스 유산균, 미세먼지 독성 낮춘다."', <http://news.donga.com>, 2018.04.25.)\*  
KR1020180037693 A  
International Journal of Immunopathology and Pharmacology vol.25, no.1, pp.31-38, 2012.\*  
KR1020120053214 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

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

전체 청구항 수 : 총 2 항

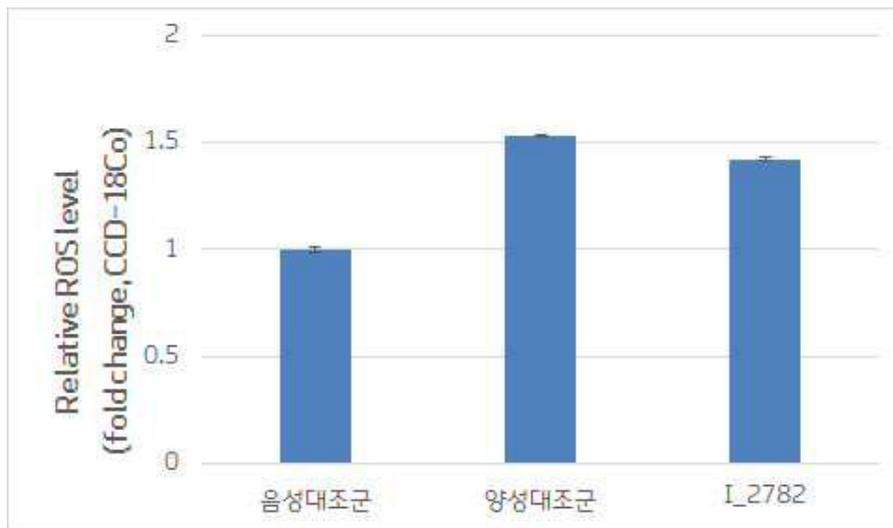
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 카제이 HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 면역 불균형을 해소하여 면역 항상성을 유지하기 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 면역 불균형을 해소하여 면역 항상성(immunological homeostasis)을 유지하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 인체 유래의 대장세포 및 기관지 세포에서 미세먼지로 인한 면역 불균형 해소를 위해 IL-37 유전자의 발현을 조절함으로써 면역 항상성을 유지하는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 하는 발효유, 건강기능식품, 기능성 음료 등 식품조성물로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)  
A23V 2200/324 (2013.01)  
A23Y 2220/17 (2013.01)

(72) 발명자

**강희림**

서울특별시 영등포구 신길3동 355-254

**정승희**

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

**라제현**

경기도 수원시 권선구 세화로151번길 36 201호(서  
둔동)

**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

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

사람의 기관지 세포에서 IL-37(Interleukin-37) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지로 인한 항염증 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782(수탁번호: KCTC 13438BP)를 유효성분으로 함유하는 항염증용 식품조성물.

**청구항 3**

청구항 2에 있어서,

상기 식품조성물은 발효유, 건강기능식품, 기능성 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 식품조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 면역 불균형을 해소하여 면역 항상성(immunological homeostasis)을 유지하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 미세먼지에 의해 유발되는 면역 불균형을 해소함으로써 인간의 기관지 세포 및 대장세포에 대한 면역 항상성을 유지하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 면역 불균형을 해소하여 면역 항상성(immunological homeostasis)을 유지하기 위한 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 인체의 면역시스템은 내부 및 외부 병원성 물질로부터 인체를 보호하기 위해 다양한 세포로 구성된 방어 체계를 구축하고 있다. 인체 면역계는 크게 면역을 억제 및 조절하는 메커니즘과 면역을 증진하는 메커니즘으로 구성되며, 면역계는 이러한 두 가지 면역작용이 적절한 균형을 이룸으로서 면역학적 항상성(immunological homeostasis)을 유지하고 있다. 이렇게 유지되는 면역학적 균형은 다양한 원인에 의해 그 불균형이 유도될 수 있으며, 이러한 불균형은 결국 다양한 질병을 발생시키는 결과를 초래한다. 면역 억제의 기능이 면역 반응에 비해 상대적으로 강하거나 이와 반대로 면역반응 기능이 면역억제 기능에 비해 강해질 경우 면역학적 불균형이 초래될 수 있다. 특히, 면역 반응이 면역 억제 기능보다 강해질 경우는 자가 면역질환 및 알러지 질환과 같은 염증성 질환을 초래하게 된다. 따라서, 면역학적 관점에서 바라본 질병은 면역시스템 항상성의 불균형에 의해 나타나는 결과물이며, 이러한 불균형을 조절하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다.

[0003] IL-37(Interleukin-37)은 최근에 발견된 IL-1 family 중에 하나로, 그 역할이 정확히 규명되어 있지는 않지만 만성적 염증반응, 자가면역 질환, 암 등의 면역 반응을 조절하여 염증을 억제하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 보다 자세히는 IL-37은 과면역반응이 일어났을 때 분비되어 대식세포나 수지상세포에서 분비되는 전염증성 사이토카인을 낮추고 대식세포의 분화를 억제하는 기능이 있는 것으로 알려져 있으나, 미세먼지에 대해서는 그 기전이 연구된 바 없다.

[0004] 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 세포 내 활성작용 과정에서 생성되며 세포분화, 유전자 발현, 사이토카인에 대한 반응 정도를 포함한 다양한 생물학적 과정에 연관되어 있다. 따라서 이러한 활성산소종(ROS)의 항상성을 유지하는 것은 세포 성장과 생존에 매우 중요하다. 산화스트레스는 활성산소종(ROS)의 생성과 이를 제거하는 항산화 반응 간의 불균형으로 인해 세포 내의 활성산소종(ROS)이 증가하여 DNA나 단백질,

지질(lipid)과 반응하여 손상시키는 현상이며 이는 노화나 심장과 관련된 질병들의 핵심 원인으로 알려져 있다. 이렇게 활성산소종(ROS)은 지금까지 단순히 단백질이나 DNA, 지질 등을 산화시켜 세포괴사를 일으키는 역할을 하는 물질로 인식되어 왔지만 또한 세포 내의 필수적인 2차 전달자(second messenger)로서 특정 사이토카인이나 성장 인자의 신호 전달에 중요한 역할을 수행한다. 비록 활성산소종(ROS)과 세포사멸과의 관계는 서로 상반된 보고가 있지만 확실한 것은 활성산소종(ROS)이 세포사멸에 있어 중간 신호 매개체의 역할을 하며, 신호를 전달하고 있다.

[0005] 미세먼지는 간단하게는 입자크기에 따라 포괄적으로 분류된다. 10 μg 이하의 미세먼지를 "PM10(thoracic particles)", 2.5 μm 이하를 "PM2.5(fine particles, 초미세먼지)", 0.1 μm 이하를 "UFP(ultrafine particles, 초극세입자)"라고 부르며, 2.5~10 μm 사이를 "PM10-2.5(coarse particles, 거친 미세입자)"라고 부른다. 대개 산업활동에 따른 화석연료의 연소가 PM2.5의 주요 근원이고, 그 외 난방, 요리, 실내활동, 생물적 혹은 무생물적 요인 역시 특정 지역의 주요 근원이 되기도 한다. 최근의 연구를 통해 미세먼지는 활성산소를 통해 산화적 스트레스를 유발하며, 이로 인한 염증반응을 통해 심뇌혈관 질환과 관련하여 심근경색을 포함한 기존의 허혈성 심질환, 심부전, 부정맥 및 뇌졸중을 유발 혹은 악화시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다. 특히, 장기간의 노출은 경한 질환에서부터 관련 질환 사망률까지도 증가시킬 수 있고, 미세먼지 농도를 감소시키는 것은 역으로 심뇌혈관 질환 관련 사망률을 감소시킬 수 있다. 또한 미세먼지로 인한 국내에서도 이에 대한 사회적 관심이 증가하고 있어 국내·외 자료를 근거로, 미세먼지에 대한 시급한 대책 마련이 필요하다.

[0006] 이에 본 발명자들은 사람의 기관지세포 및 대장세포에 대해 미세먼지로 인해 유발되는 면역 불균형을 해소하기 위해 IL-37이 발현되며, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 처리를 통해 면역 항상성이 회복됨에 따라 IL-37의 발현이 감소하여 면역 항상성 유지 효능을 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2005-0099380호(2005.10.13)  
 (특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0017754호(2014.02.12)

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 미세먼지에 의해 유발되는 면역 불균형을 해소함으로써 사람의 기관지 세포 및 대장세포에 대한 면역 항상성을 유지하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 면역 불균형을 해소하여 면역 항상성(immunological homeostasis)을 유지하기 위한 식품조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0009] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인체유래 장막세포(CCD-18Co) 및 인체 유래 기관지 상피세포(BEAS-2B)에 미세먼지를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하여 이로 인해 발생하는 면역 불균형을 해소하기 위하여 IL-37 유전자의 발현을 감소시킴으로써 면역 항상성 유지 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지로 인한 면역 불균형을 해소하여 면역 항상성(immunological homeostasis)을 유지하기 위한 발효유, 기능성 음료, 건강기능식품 등의 식품조성물을 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 배양하

였다. 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-플레이팅 방법(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 레이어 방법(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 한천평판 배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 콜로니(colony)를 형성하는 240 균주를 분리하였다. 분리된 균주들을 지시균으로 사용하여 소프트-아가 레이어 방법으로 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) YIT9018 배양액의 상층을 얻어 배양한 후, 플라크 형성 유무를 조사하여 플라크가 형성되는 것을 분리하였다. 그리고, 프로파아지가 제거된 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) YIT9029(일본미생물공업연구소 균주기탁 제5852호)를 지시균으로하여 소프트-아가 레이어 방법으로 분리된 균주들이 배양액 상층을 얻어 배양한 후, 플라크 형성 유무를 조사하여 플라크가 형성되지 않은 균주를 분리하였다. 또한 분리된 균주를 37℃에서 대수기 초기까지 배양한 후 42℃에서 30분간 열처리한 다음, 소프트-아가레이어 방법으로 플라크의 생성유무를 확인하여 플라크가 생성되지 않는 것을 프로파아지 커어드 스트레인(prophage cured strain)으로 최종 분리하였다. 이렇게 하여 분리된 균주의 수는 32 균주였다. 이 균주들이 균학적 특성을 조사하여 모균주인 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) YIT9018과 균학적 특성이 거의 동일한 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 분리하였다.

- [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)그람염색: 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: 성장가능 생육온도는 13 내지 43℃, 최적생장온도는 33 내지 37℃
- [0023] 2)생육 pH: 성장가능 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, 패트병 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.

**발명의 효과**

[0038] 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 인체 유래의 대장세포 및 기관지 세포에서 미세먼지로 인한 면역 불균형 해소를 위해 IL-37 유전자의 발현을 조절함으로써 면역 항상성을 유지하는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 하는 발효유, 건강기능식품, 기능성 음료 등 식품조성물로 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0039] 도 1은 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에서 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 미세먼지에 의한 활성산소 감소 효과를 확인한 그래프이다.

도 2는 인체 유래 기관지 상피세포(BEAS-2B)에서 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 미세먼지에 의한 활성산소 감소 효과를 확인한 그래프이다.

도 3은 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에서 마이크로어레이(microarray)를 통해 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따른 전체 유전자 발현 변화를 분석한 그래프이다.

도 4는 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에서 마이크로어레이(microarray)를 통해 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따라 발현이 감소한 유전자의 수와 실험군별 공통적인 유전자 수를 확인한 그래프이다.

도 5는 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에서 마이크로어레이(microarray)를 통해 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따라 발현이 증가한 유전자의 수와 실험군별 공통적인 유전

자 수를 확인한 그래프이다.

도 6은 인체 유래 기관지 상피세포(BEAS-2B)에서 마이크로어레이(microarray)를 통해 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따른 전체 유전자 발현 변화를 분석한 그래프이다.

도 7은 인체 유래 기관지 상피세포(BEAS-2B)에서 마이크로어레이(microarray)를 통해 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따라 발현이 감소한 유전자의 수와 실험군별 공통적인 유전자 수를 확인한 그래프이다.

도 8은 인체 유래 기관지 상피세포(BEAS-2B)에서 마이크로어레이(microarray)를 통해 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따라 발현이 증가한 유전자의 수와 실험군별 공통적인 유전자 수를 확인한 그래프이다.

도 9는 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에서 실시간중합효소 연쇄반응을 통해 미세먼지 및 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 처리에 의해 IL-37유전자의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

도 10은 인체 유래 기관지 상피세포(BEAS-2B)에서 실시간중합효소 연쇄반응을 통해 미세먼지 및 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 처리에 의해 IL-37유전자의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 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.
- [0041] <실시예 1>
- [0042] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 동결건조분말 제조
- [0043] 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.
- [0044] <실시예 2>
- [0045] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0046] 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 써모필러스균(*Streptococcus thermophilus*)과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP배지에서의 총 유산균 수가 5.0 X 10<sup>8</sup>cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.
- [0047] 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.
- [0048] 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.
- [0049] <실시예 3>
- [0050] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0051] 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.

- [0052] 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.
- [0053] <실시예 4>
- [0054] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0055] 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.
- [0056] <시험예 1>
- [0057] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 제조
- [0058] 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.
- [0059] 세포 실험에 적용시 앞서 구한 균수를 기준으로 하여 세포 배양에 사용한 배지를 넣고 희석해 생균체로 사용하였다.
- [0060] <시험예 2>
- [0061] 2-1. 인체 유래 정상 대장 세포(CCD-18Co)의 배양
- [0062] 인간 정상 대장 세포주인 CCD-18Co 세포는 한국세포주은행(서울)으로부터 분양을 받아 이용하였다. 10% FBS(fetal bovine serum)와 10U/mL 페니실린, 100μg/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 배지(Gibco, USA)에서 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)와 RPMI를 1:4의 중량비율로 2~3일에 한 번씩 계대 배양하여 사용하였다(배양 조건: 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃ 배양기).
- [0063] 즉, 계대를 위하여 RPMI 배지를 제거하고 PBS 4ml로 1회 세척한 후, Trypsin-EDTA Solution 1X(1XTE, Sigma)를 1ml 처리하여 배양기에 10~15분 동안 넣어두었다. 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)의 부착이 떨어진 것을 확인한 후 RPMI 배지 4ml를 넣어 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)를 회수하였다. 상기 회수된 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)를 1,200rpm으로 3분 동안 원심분리를 한 후, 상등액을 조심스럽게 제거하고, RPMI 배지 1ml를 넣어 세포 펠렛을 풀어 주었다. 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)와 RPMI 배지를 1:4의 중량비율로 희석한 후 100 μ 세포배양접시에 넣고 잘 혼합한 후 배양기에서 2~3일간 배양하여 사용하였다.
- [0064] 2-2. 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 대장세포에서 미세먼지에 대한 산화적 스트레스 개선 효과
- [0065] 상기 시험예 2-1의 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)를 96웰에 웰당 1x10<sup>5</sup> cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 RPMI 배지로 1회 세척하여 주었다.
- [0066] FBS가 들어가지 않은 RPMI 배지에 상기 시험예 1의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 1x10<sup>5</sup> CFU/ml 농도로 용해하여 상기 FBS가 들어가지 않은 RPMI 배지로 1회 세척된 각 웰의 세포에 처리하였다.
- [0067] 이와 동시에 ERM-CZ100(다환방향족탄화수소, Sigma)와 ERM-CZ120(중금속, Sigma)이 각각 100 μg/ml의 농도로 존재하는 미세먼지를 200 μg/ml의 농도로 상기 각 웰의 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 처리하였다.
- [0068] 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체와 미세먼지가 처리된 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)를 20~24시간 동안 배양한 후 PBS로 2번 세척해 주었다. 그런 다음 PBS에 2', 7'-

dichlorofluorescein diacetate(CM-H<sub>2</sub>DCFDA)를 최종농도 10 μM로 되게 희석한 뒤, 그 용액을 각 웰의 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 100 μl 넣어 주었다.

[0069] 그런 다음, 37°C에서 30분~2시간 동안 반응을 시킨 후 형광광도계를 이용하여 485nm와 535nm에서 형광농도를 측정하여 활성산소 함량의 배수차이(fold change)를 계산하였다.

[0070] 한편, 음성대조군으로는 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0071] 양성대조군으로는 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 상기 미세먼지 만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0072] 여기서, '배수차이(fold change)'는 시험 진행 후 미세먼지 및 유산균 처리 시의 활성산소에 의한 형광농도 값을 시험 진행 후 음성대조군에서 활성산소에 의한 형광 농도값으로 나눈 값을 의미한다.

[0073] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0074] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 음성대조군의 활성산소 1을 기준으로 미세먼지 만을 처리한 양성대조군의 경우에는 활성산소가 1.5배나 증가하였으나, 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 동시에 처리한 실험군(I\_2782)에서는 1.4배로 감소함을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 통하여, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782가 장막세포에서 미세먼지 처리에 따른 산화적 스트레스의 지표인 활성산소의 발생을 억제하는 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.

[0075] <시험예 3>

[0076] 3-1. 인체 유래 기관지 상피세포(BEAS-2B)의 배양

[0077] 인체 유래 기관지 상피세포주인 BEAS-2B 세포는 한국세포주은행(서울)으로부터 분양을 받아 이용하였다. BEGM bullet kit(Lonza, GB)를 사용하여 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)와 BEGM을 1:3의 중량비율로 2~3일에 한 번씩 계대 배양하여 사용하였다(배양 조건: 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기).

[0078] 즉, 계대를 위하여 BEGM 배지를 제거하고 PBS 4ml로 1회 세척한 후, Trypsin-EDTA Solution 1X(1XTE, Sigma)를 1ml 처리하여 배양기에 10~15분 동안 넣어두었다. 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)의 부착이 떨어진 것을 확인한 후 BEGM 배지 4ml를 넣어 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)를 회수하였다. 상기 회수된 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)를 1,200rpm으로 3분 동안 원심분리를 한 후, 상등액을 조심스럽게 제거하고, BEGM 배지 1ml를 넣어 세포 펠렛을 풀어 주었다. 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)와 BEGM 배지를 1:3의 중량비율로 희석한 후 100 μ 세포배양접시에 넣고 잘 혼합한 후 배양기에서 2~3일간 배양하여 사용하였다.

[0079] 3-2. 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 기관지 세포의 미세먼지에 대한 산화적 스트레스 개선 효과

[0080] 상기 시험예 3-1의 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)를 96웰에 웰당 2x10<sup>5</sup> cells로 접종한 다음 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM/F-12 배지로 1회 세척하여 주었다.

[0081] FBS가 들어가지 않은 DMEM/F-12 배지에 상기 시험예 1의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 1x10<sup>7</sup> CFU/ml 농도로 용해하여 상기 FBS가 들어가지 않은 DMEM/F-12 배지로 1회 세척된 각 웰의 세포에 처리하였다.

[0082] 이와 동시에 ERM-CZ100(다환방향족탄화수소, Sigma)와 ERM-CZ120(중금속, Sigma)이 각각 100 μg/ml의 농도로 존재하는 미세먼지를 200 μg/ml의 농도로 상기 각 웰의 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 처리하였다.

[0083] 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체와 미세먼지가 처리된 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)를 20~24시간 동안 배양한 후 PBS로 2번 세척해 주었다. 그런 다음 PBS에 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(CM-H<sub>2</sub>DCFDA)를 최종농도 10 μM로 되게 희석한 뒤 그 용액을 각 웰당 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 100 μl 넣어 주었다.

[0084] 그런 다음, 37°C에서 30분~2시간 동안 반응을 시킨 후 형광광도계를 이용하여 485nm와 535nm에서 형광농도를 측정하여 활성산소 함량의 배수차이(fold change)를 계산하였다.

- [0085] 한편, 음성대조군으로는 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0086] 양성대조군으로는 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 상기 미세먼지 만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0087] 여기서, '배수차이(fold change)'는 시험 진행 후 미세먼지 및 유산균 처리 시의 활성산소에 의한 형광농도 값을 시험 진행 후 음성대조군에서 활성산소에 의한 형광 농도값으로 나눈 값을 의미한다.
- [0088] 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0089] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 음성대조군의 활성산소 1을 기준으로 미세먼지 만을 처리한 양성대조군의 경우에는 활성산소가 1.2배나 증가하였으나, 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 동시에 처리한 실험군(I-2782)에서는 약 1.0배로 감소함을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 통하여, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782가 기관지 세포에서 미세먼지 처리에 따른 산화적 스트레스의 지표인 활성산소의 발생을 억제하는 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.
- [0090] <시험예 4>
- [0091] 4-1. 미세먼지가 처리된 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에서의 RNA 추출
- [0092] 상기 시험예 2-1의 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)를 96웰에 웰당  $2 \times 10^4$  cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다.
- [0093] FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 시험예 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 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)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 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 처리하였다.
- [0094] 그런 다음, 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체와 미세먼지가 처리된 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)를 20~24시간 동안 배양한 후, PBS로 2번 세척해 준 후 easy-spin™ lysis buffer(iNtRON, USA) 1ml를 넣고 상기 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)를 용해하였다. 상기 용해된 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)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.
- [0095] 한편, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 상기 시험예 1의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다.
- [0096] 또한, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 미세먼지 만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다
- [0097] 또한, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다
- [0098] 4-2. 미세먼지가 처리된 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에서의 유전자발현 분석
- [0099] 상기 시험예 4-1의 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.
- [0100] 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.
- [0101] 그 결과를 도 3 내지 도 5에 나타내었다.

- [0102] 한편, 도 3은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지를 동시에 처리한 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에서의 약 26,000여개의 유전자 발현을 전체적으로 비교해 보았을 때, 파란색은 유전자 발현이 감소된 것으로, 노란색은 유전자 발현이 증가된 것으로 구분할 수 있다.
- [0103] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(CCD\_1)과 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 실험군(CCD\_4)이 서로 유사한 유전자 발현양상을 보이는 것을 알 수 있었고, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(CCD\_2)과 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(CCD\_3)이 유사한 유전자 발현양상을 보이는 것을 알 수 있었다.
- [0104] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(CCD\_1)과 비교하여, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(CCD\_2)에서는 429개의 유전자가 다른 실험군(CCD\_3, CCD\_4)과 다르게 유전자 발현이 감소하였고, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(CCD\_3)에서는 약 126개의 유전자가 다른 실험군(CCD\_2, CCD\_4)과는 다르게 유전자 발현이 감소하였으며, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(CCD\_2)에서는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에의 처리 유무와 상관없이 동일한 320개의 유전자 발현이 감소하였고, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 실험군(CCD\_4)에서도 약 12개의 유전자가 다른 실험군(CCD\_2, CCD\_3)과 다르게 유전자 발현이 감소하였다.
- [0105] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(CCD\_1)과 비교하여, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(CCD\_2)에서는 492개의 유전자가 다른 실험군(CCD\_3, CCD\_4)과는 다르게 유전자 발현이 증가하였고, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(CCD\_3)에서는 약 148개의 유전자가 다른 실험군(CCD\_2, CCD\_4)과는 다르게 유전자 발현이 증가하였으며, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 실험군(CCD\_4)에서도 약 17개의 유전자가 다른 실험군(CCD\_2, CCD\_3)과 다르게 유전자 발현이 증가하였고, 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(CCD\_2)에서는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에의 처리 유무와 상관없이 동일한 약 509개의 유전자의 발현이 증가하였다.
- [0106] <시험예 5>
- [0107] 5-1. 미세먼지가 처리된 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에서의 RNA 추출
- [0108] 상기 시험예 2-1의 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co) 대신에 상기 시험예 3-1의 인체 유래 기관지 상피세포(BEAS-2B)를 사용한 것을 제외하고는 상기 시험예 4-1과 동일한 방법으로 실험하였다.
- [0109] 5-2. 미세먼지가 처리된 인체 유래 기관지 상피세포(BEAS-2B)에서의 유전자발현 분석
- [0110] 상기 시험예 4-1의 RNA 대신에 상기 시험예 5-1의 RNA를 사용한 것을 제외하고는 상기 시험예 4-2와 동일한 방법으로 실험하였다.
- [0111] 그 결과를 도 6 내지 도 8에 나타내었다.
- [0112] 한편, 도 6는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지를 동시에 처리한 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에서의 약 26,000여개의 유전자 발현을 전체적으로 비교해 보았을 때, 파란색은 유전자 발현이 감소된 것으로, 노란색은 유전자 발현이 증가된 것으로 구분할 수 있다.
- [0113] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(B\_1)과 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 실험군(B\_4)이 서로 유사한 유전자 발현양상을 보이는 것을 알 수 있었고, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(B\_2)과 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(B\_3)이 유사한 유전자 발현양상을 보이는 것을 알 수 있었다.
- [0114] 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 아무것도 처리하지 않은 대조군

(B\_1)과 비교하여, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(B\_2)에서는 26개의 유전자가 다른 실험군(B\_3, B\_4)과 다르게 유전자 발현이 감소하였고, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(B\_3)에서는 약 108개의 유전자가 다른 실험군(B\_2, B\_4)과는 다르게 유전자 발현이 감소하였으며, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(B\_2)에서는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 처리 유무와 상관없이 동일한 28개의 유전자 발현이 감소하였고, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 실험군(B\_4)에서도 약 163개의 유전자가 다른 실험군(B\_2, B\_3)과 다르게 유전자 발현이 감소하였다.

[0115] 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(B\_1)과 비교하여, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(B\_2)에서는 55개의 유전자가 다른 실험군(B\_3, B\_4)과는 다르게 유전자 발현이 증가하였고, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(B\_3)에서는 약 84개의 유전자가 다른 실험군(B\_2, B\_4)과는 다르게 유전자 발현이 증가하였으며, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 실험군(B\_4)에서도 약 202개의 유전자가 다른 실험군(B\_2, B\_3)과 다르게 유전자 발현이 증가하였고, 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에 미세먼지 만을 처리한 실험군(B\_2)에서는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에의 처리 유무와 상관없이 동일한 약 225개의 유전자의 발현이 증가하였다.

[0116] <시험예 6>

[0117] 6-1. 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 미세먼지가 처리된 인간 정상 대장 세포주(CCD-18Co)에서의 유전자 발현 분석

[0118] 마이크로어레이를 통해 유전자 발현 양상이 변화된 유전자를 분석하여 미세먼지에 의한 산화적 스트레스를 개선하는데 관련이 되어있는 IL-37 유전자의 발현이 미세먼지의 처리에 따라 증가하였다가 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 처리로 감소함이 확인되어, 실시간중합효소 연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction, q-PCR)을 통해 보다 더 자세히 분석하였다.

[0119] 즉, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 경우를 제외한 상기 시험예 4-1의 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), IL-37(Hs00367201\_m1)로 Tagman사를 통해 주문하여 사용하였다. 유전자 발현의 지표인 Ct(threshhold cycle)를 바탕으로 유전자 발현의 배수차이(fold change)를 계산하였다.

[0120] 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0121] 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조군(CCD\_1\_control)의 유전자 발현을 1로 하였을 때와 비교하여 미세먼지를 처리한 실험군(CCD\_2\_Inducer)에서는 IL-37의 유전자 발현이 2.9배 증가하였다가 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(CCD\_3\_HY2782)에서는 2.1배로 다시 감소함을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782가 미세먼지로 인한 면역불균형을 해소하여 대장세포의 면역 항상성을 유지하는 효능이 있음을 알 수 있다.

[0122] 6-2. 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 미세먼지가 처리된 인체 유래 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에서의 유전자 발현 분석

[0123] 마이크로어레이를 통해 유전자 발현 양상이 변화된 유전자를 분석하여 미세먼지에 의한 산화적 스트레스를 개선하는데 관련이 되어있는 IL-37 유전자의 발현이 미세먼지의 처리에 따라 증가하였다가 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 처리로 감소함이 확인되어, 실시간중합효소 연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction, q-PCR)을 통해 보다 더 자세히 분석하였다.

[0124] 즉, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체 만을 처리한 경우를 제외한 상기 시험예 5-1의 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), IL-37(Hs00367201\_m1)로 Tagman사를 통해 주문하여 사용하였다. 유전자 발현의 지표인 Ct(treshhold cycle)를 바탕으로 유전자 발현의 배수차이(fold change)를 계산하였다.

[0125] 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0126] 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조군(B\_1\_control)의 유전자 발현을 1로 하였을 때와 비교하여 미세먼지를 처리한 실험군(B\_2\_Inducer)에서는 IL-37의 유전자 발현이 1.7배 증가하였다가 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(B\_3\_HY2782)에서는 -1.3배로 다시 감소함을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782가 미세먼지로 인한 면역 불균형을 해소하여 기관지 세포의 면역 항상성을 유지하는 효능이 있음을 알 수 있다.

**수탁번호**

[0127]

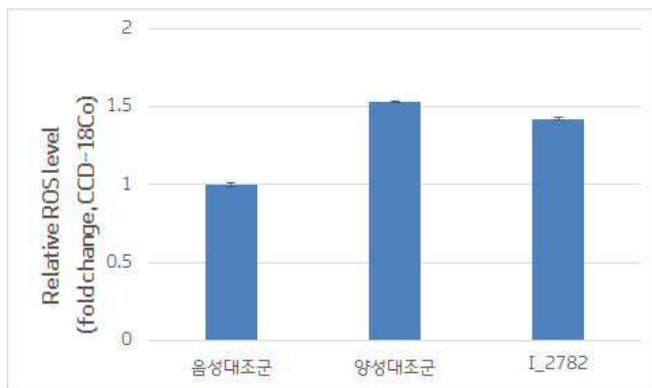
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13438BP

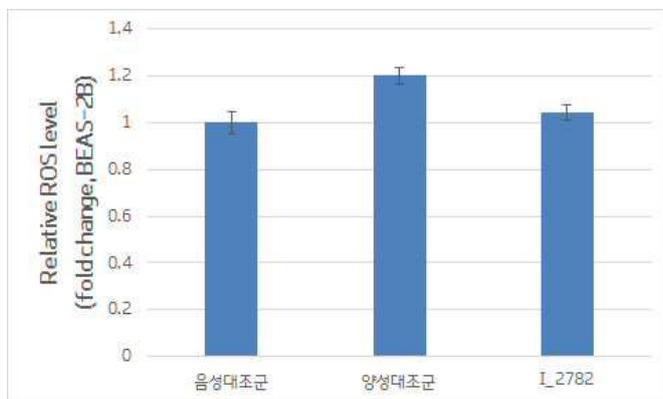
수탁일자 : 20171219

**도면**

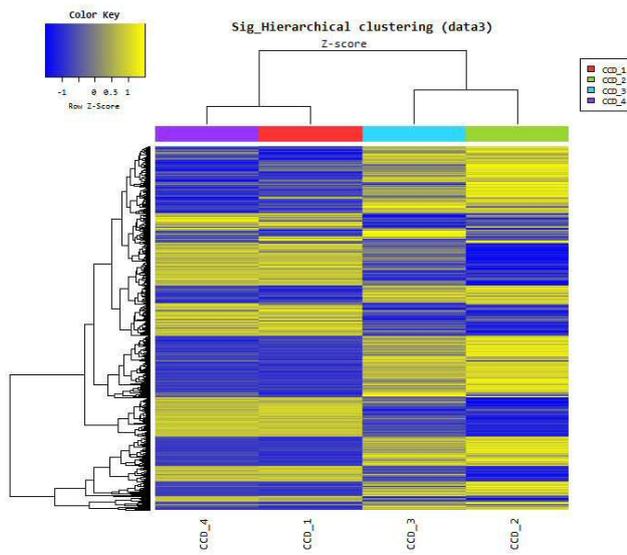
**도면1**



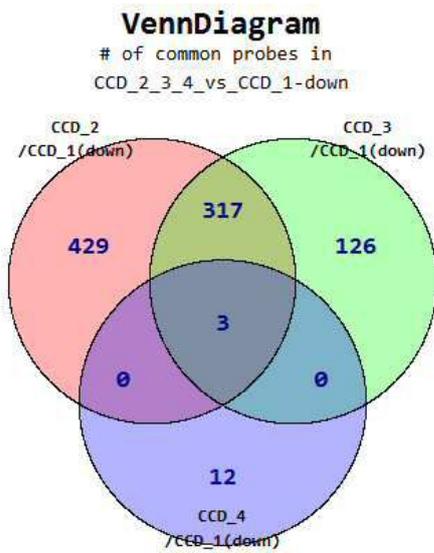
**도면2**



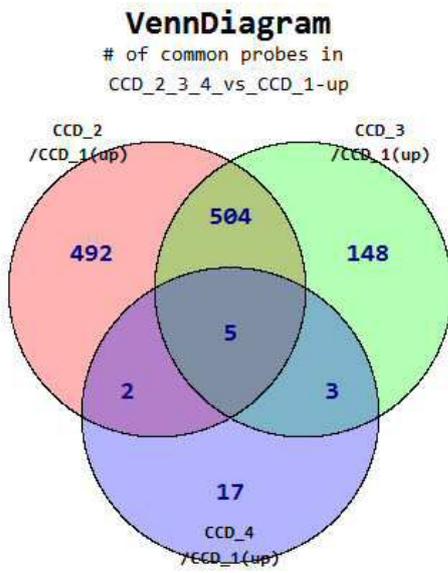
도면3



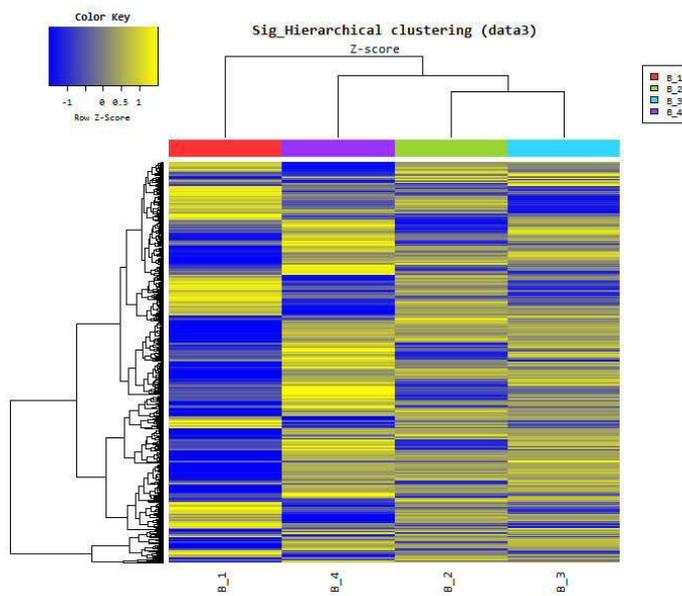
도면4



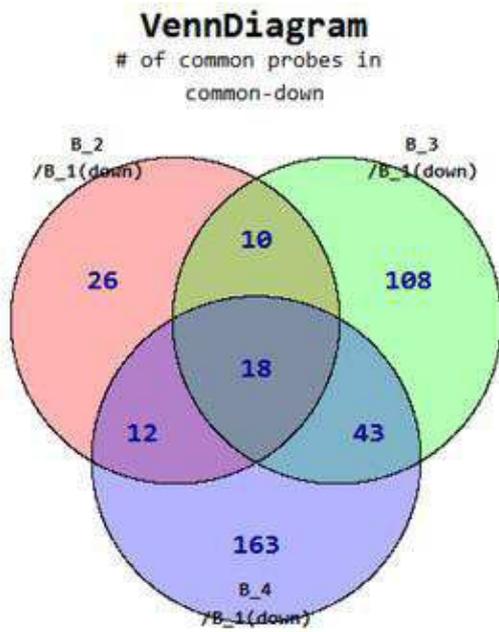
도면5



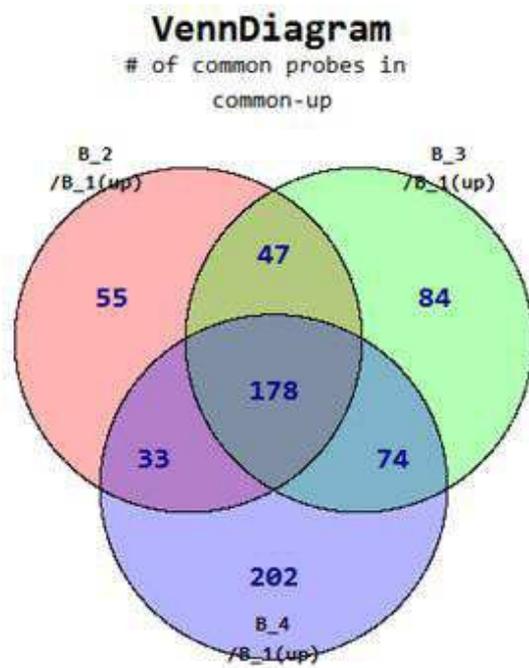
도면6



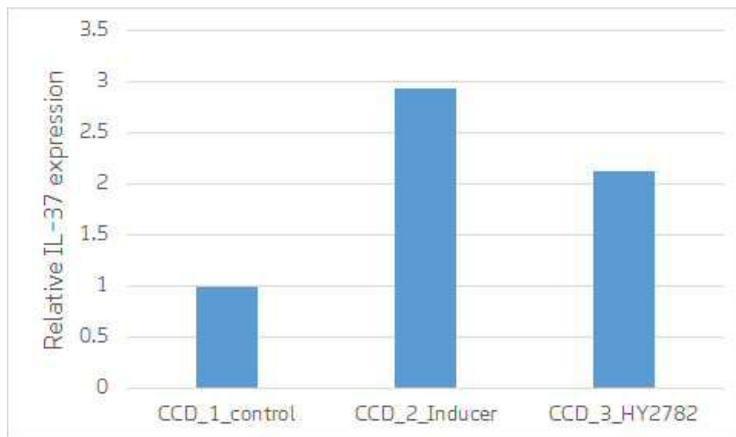
도면7



도면8



도면9



도면10

