



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월16일
 (11) 등록번호 10-1969420
 (24) 등록일자 2019년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/135 (2016.01) *A61K 8/99* (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A61K 8/99 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2018-0112197
 (22) 출원일자 2018년09월19일
 심사청구일자 2018년09월19일
 (56) 선행기술조사문헌
 JP2010138147 A*
 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
 *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 4 항

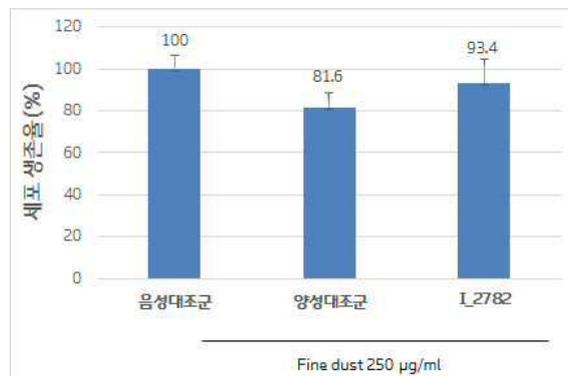
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 카제이 HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지와 자외선으로 인한 산화적 스트레스 및 피부 보습을 개선하기 위한 조성물**

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지와 자외선으로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress) 및 피부 보습을 개선하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 미세먼지 및/또는 자외선으로 인한 활성산소 생성억제, AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 유전자 발현 조절을 통한 산화적 스트레스 및 HAS2(Hyaluronan synthase 2)과 HYAL1(Hyaluronidase-1) 유전자 발현을 조절을 통한 피부세포의 보습을 개선하는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 함유하는 식품조성물과 화장료 조성물로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/302 (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

이호진

경기도 용인시 기흥구 공세로 76 세원아파트 102동
602호

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

삭제

청구항 3

사람의 피부세포에서 HAS2(Hyaluronan synthase 2) 유전자의 발현을 증가시킴으로써 미세먼지로 인하여 손상된 피부의 보습을 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782(수탁번호: KCTC 13438BP) 생균체를 유효성분으로 함유하는 피부 보습을 개선하기 위한 식품조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 3에 있어서,

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

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

사람의 피부세포에서 HAS2(Hyaluronan synthase 2) 유전자의 발현을 증가시킴으로써 미세먼지로 인하여 손상된 피부의 보습을 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782(수탁번호: KCTC 13438BP) 생균체를 유효성분으로 함유하는 피부 보습을 개선하기 위한 화장료 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 화장료 조성물은 영양 화장수, 영양 크림, 맛사지 크림, 팩 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 가지는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지와 자외선으로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress) 및 피부 보습을 개선하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 미세먼지 및/또는 자외선으로 인한 사람의 피부세포의 산화적 스트레스와 피부 보습을 개선 하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 미세먼지와 자외선으로 인한 산화적 스트레스 및 피부 보습을 개선하기 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 프로바이오틱스(Probiotics)는 '장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제제'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 연구 및 제품을 판매하고 있다.

[0003] 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 세포 내 활성작용 과정에서 생성되며 세포분화, 유전자의 발현, 사이토카인(cytokine)에 대한 반응 정도를 포함한 다양한 생물학적 과정에 연관되어 있다. 따라서 이러한 활성산소종의 항상성을 유지하는 것은 세포 성장과 생존에 매우 중요하다. 산화적 스트레스(oxidative stress)는 활성산소종의 생성과 이를 제거하는 항산화 반응 간의 불균형으로 인해 세포 내에 활성산소종이 증가하여 DNA나 단백질, 지질(lipid)과 반응하여 세포를 손상시키는 현상으로서, 이는 노화나 심장과 관련된 질병들의 핵심 원인으로 알려져 있다. 이렇게 활성산소종은 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 인자(growth factor)의 신호 전달에 중요한 역할을 수행한다. 비록 활성산소종이 세포사멸과의 관계는 서로 상반된 보고가 있지만 확실한 것은 활성산소종이 세포사멸에 있어 중간 신호 매개체의 역할을 하면서 신호를 전달하고 있다는 것이다.

[0004] 미세먼지는 입자크기에 따라 포괄적으로 분류되는데, 10 µg 이하의 미세먼지를 "PM10(thoracic particles)", 2.5 µm 이하의 미세먼지를 "PM2.5(fine particles, 초미세먼지)", 0.1 µm 이하의 미세먼지를 "UFP(ultrafine particles, 초극세입자)"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 인해 심뇌혈관질환과 관련하여 심근경색을 포함한 기존의 허혈성심질환, 심부전, 부정맥 및 뇌졸중을 유발 혹은 악화시킬 수 있는 것이 밝혀졌다. 특히, 장기간의 노출은 경한 질환에서부터 관련 질환 사망률까지도 증가시킬 수 있으며, 국내에서도 미세먼지에 대한 사회적 관심이 증가하고 있어 국내외 자료를 근거로, 미세먼지에 대한 시급한 대책 마련이 필요하다.

[0005] 자외선은 피하의 비타민 D 전구물질을 비타민 D로 바꾸어 줌으로써 구루병의 예방효과가 있고, 또 자외선의 살균작용과 자외선이 많은 사막이나 해변에서는 대기가 청정하다는 등의 이유에서 자외선의 유효성이 널리 인식되어 왔다. 그러나, 최근에는 피부노화의 주요 원인의 하나로 지적되면서 자외선의 피해가 인식되게 되었다. 또한 지표에 도달하는 유해한 단파장의 자외선을 차단하고 있는 오존층이 프레온가스 등에 의해 파괴되는 것이 보고되면서 일부 지역에서는 자외선 증가가 건강에 미치는 영향이 이미 관찰되고 있다. 자외선이 생물학적 영향을 미치는 주요부위는 눈과 피부이며 각각 파장에 따른 영향이 다르다. 피부가 일광(자외선)에 노출되면, 단기간에는 홍반, 색소침착이 일어나며, 장기간에 걸쳐 노출되면 피부노화가 촉진되고 피부암의 위험도 높아진다.

[0006] 이에 본 발명자들은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782가 미세먼지와 자외선으로 인한 활성산소 생성을 억제하고, 관련 유전자들의 발현을 조절함으로써 인간의 피부세포의 산화적 스트레스 및 피부 보습을 개

선하는 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 미세먼지와 자외선으로 인한 사람의 피부세포의 산화적 스트레스와 피부 보습을 개선 하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스 및 피부 보습을 개선하기 위한 식품조성물과 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인체유래 피부각질세포(HaCaT)에 미세먼지 및/또는 자외선을 처리하여 산화적 스트레스를 유도하여 이로 인해 발생하는 활성산소 생성을 억제하고, 산화적 스트레스 억제 및/또는 피부 건조와 관련된 유전자의 발현을 감소시킴으로써 사람의 피부세포의 산화적 스트레스와 피부 보습을 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스 및 피부 보습을 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 균체를 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 불활성화 될 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 분리된 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 레이어 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 같

다.

- [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: 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

[0032]

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 B₁, B₂, B₅, B₆, 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 미세먼지 및/또는 자외선으로 인한 활성산소 생성억제, AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 유전자 발현 조절을 통한 산화적 스트레스 개선 및 HAS2(Hyaluronan synthase 2)과 HYAL1(Hyaluronidase-1) 유전자 발현을 조절을 통한 피부세포의 보습을 개선하는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 함유하는 식품조성물과 화장료 조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 미세먼지에 의한 세포사멸 보호효과를 확인한 그래프이다.

도 2는 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 미세먼지에 의한 활성산소 감소 효과를 확인한 그래프이다.

도 3은 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 자외선에 의한 활성산소 감소 효과를 확인한 그래프이다.

도 4는 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 본 발명의 마이크로어레이(microarray)를 통해 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782와 미세먼지 처리에 따른 전체 유전자발현 변화를 분석한 그래프이다.

도 5는 인체유래의 각질세포(HaCaT)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 6는 인체유래의 각질세포(HaCaT)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 7은 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 실시간중합효소 연쇄반응을 통해 미세먼지 및 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 처리에 의해 AhR 유전자의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

도 8은 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 실시간중합효소 연쇄반응을 통해 미세먼지 및 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 처리에 의해 CYP1A1 유전자의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

도 9은 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 실시간중합효소 연쇄반응을 통해 미세먼지 및 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 처리에 의해 CYP1B1 유전자의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

도 10은 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 실시간중합효소 연쇄반응을 통해 미세먼지 및 본 발명의 락토바실러스

카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 처리에 의해 HAS2 유전자의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

도 11은 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 실시간중합효소 연쇄반응을 통해 자외선(UVB) 및 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 처리에 의해 HYAL1 유전자의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

도 12는 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 실시간중합효소 연쇄반응을 통해 자외선(UVB)과 미세먼지를 동시에 처리한 경우에 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 처리에 따른 HYAL1 유전자의 발현 변화를 확인한 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*) HY2782 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(Brix⁰)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 10⁸cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.
- [0049] 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix⁰ 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 56Brix⁰ 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT열처리(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% 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(비

타민 B₁, B₂, B₅, B₆, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아마이드) 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] 맛사지크림
- [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 맛사지크림 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 상기 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. 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 사균체의 제조
- [0073] 상기 1-1의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 4,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 균체를 PBS로 3회 세척하였다. 세척을 완료한 상기 균체를 3ml의 멸균 PBS에 녹여 100℃에서 15분간 열처리하여 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 사균체 시료를 제조하였다.
- [0074] 1-3. 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 항산화 활성 측정
- [0075] 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)의 환원에 의한 자유 라디칼 소거능력을

이용하여 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 항산화 활성을 측정하였다.

[0076] DPPH 라디칼 소거능(%)은 Lin 및 Chang의 방법(Lin M-Y and Chang F-J. 2000. Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Dig. Dis. Sci. 45:1617-1622)을 이용하여 다음과 같이 측정하였다.

[0077] 즉, 상기 시험에 1-2의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 사균체 800 μ l 및 DPPH 용액(0.2mM) 500 μ l을 고속으로 혼합한 후, 상온에서 차광하여 30분간 반응시킨 다음, 상기 혼합액을 5,000rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하여 분광광도계를 이용하여 517nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다.

[0078] 한편, 양성대조군으로서 상기 시험에 1-2의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 사균체 대신에 10 μ g/ml의 비타민C 240 μ l를 사용한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0079] 음성대조군으로서 상기 시험에 1-2의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 사균체 대신에 PBS 560 μ l를 사용한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0080] PBS 용액을 blank로 하여, DPPH 라디칼 소거능(%)은 아래의 수학적식으로 계산하였다.

[0081] 그 결과를 표 2에 나타내었다.

수학적식 1

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = 100 \times (1 - \frac{\text{1-시료의 흡광도}}{\text{blank의 흡광도}})$$

[0082]

[0083] 하기의 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 10 μ g/ml의 비타민C의 DPPH 라디칼 소거능을 기준(100%)으로 약 55% 수준의 항산화 활성을 보임을 알 수 있었다.

표 2

구분	DPPH 소거능(%)
비타민C(10 μ g/ml)	72.5
락토바실러스 카제이(<i>Lactobacillus casei</i>) HY2782	39.6

[0084]

[0085] <시험예 2>

[0086] 2-1. 인체유래 각질세포(HaCaT) 세포의 배양

[0087] 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% CO₂가 공급되는 37 $^{\circ}$ C 배양기).

[0088] 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 인체유래 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 ϕ 세포배양접시에 넣고 잘 혼합한 후 배양기에서 2~3일간 배양하여 사용하였다.

[0089] 2-2. 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 세포사멸보호효과

[0090] 상기 시험예 2-1의 인체유래 각질세포(HaCaT)를 96well(we11)에 well당 2x10⁴ cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다.

[0091] FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 시험예 1-1의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 1x10⁵ CFU/ml의 농도로 용해하여 상기 FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척된 각 well의 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였고, 이와 동시에 ERM-CZ100(다환방향족탄화수소, Sigma)와 ERM-CZ120(중금속, Sigma)이

각각 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 미세먼지를 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 상기 각 웰의 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였다.

[0092] 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체와 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)를 20~24시간 동안 배양한 후 CCK-8 assay 용액을 각 웰당 10 μl 처리하고, 1~4시간 후 분광광도계를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

[0093] 한편, 음성대조군으로는 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0094] 양성대조군으로는 인체유래 각질세포(HaCaT)에 상기 미세먼지 만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0095] 여기서, '세포생존율'은 시험 진행 후 미세먼지 및 유산균 처리시의 흡광도를 시험 진행 후 음성대조군의 흡광도로 나눈 값의 백분율을 의미한다.

[0096] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0097] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 음성대조군의 세포 생존율 100%를 기준으로 미세먼지 만을 처리한 양성대조군의 경우에는 세포 생존율이 81.6%로 감소하였으나, 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 동시에 처리한 실험군(I_2782)의 경우에는 세포 생존율이 93.4% 까지 증가하였음을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 통하여 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 미세먼지 처리에 따른 세포의 사멸을 억제하는 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.

[0098] <시험예 3>

[0099] 3-1. 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782의 미세먼지에 대한 산화적 스트레스 개선 효과

[0100] 상기 시험예 2-1의 인체유래 각질세포(HaCaT)를 96웰에 웰당 2×10^4 cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다.

[0101] FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 시험예 1-1의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 각각 1×10^5 CFU/ml와 1×10^6 CFU/ml 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 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 미세먼지를 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 상기 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였다. 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체와 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)를 20~24시간 동안 배양한 후 PBS로 2번 세척해 준 후 PBS에 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(CM-H₂DCFDA)를 최종농도 10 μM 로 되게 희석한 뒤 그 용액을 각 웰당 인체유래 각질세포(HaCaT)에 100 μl 넣어 주었다. 그런 다음, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분~2시간 동안 반응을 시킨 후 형광광도계를 이용하여 485nm와 535nm에서 형광농도를 측정하여 활성산소 함량의 배수차이(fold change)를 계산하였다.

[0102] 한편, 음성대조군으로는 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0103] 양성대조군으로는 인체유래 각질세포(HaCaT)에 상기 미세먼지 만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0104] 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.

[0105] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0106] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 음성대조군의 활성산소 1을 기준으로 미세먼지 만을 처리한 양성대조군의 경우에는 활성산소가 4.5배나 증가하였으나, 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782를 동시에 처리한 실험군(I_2782)에서는 상기 유산균 처리 농도에 따라 의존적으로 각각 4.2배(락토바실러스 카제이 HY2782 생균체를 1×10^5 CFU/ml 처리한 경우; I_2782 10^5), 3.0배(락토바실러스 카제이 HY2782 생균체를 1×10^6 CFU/ml 처리한 경우; I_2782 10^6)로 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 통하여, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782가 미세먼지 처리에 따른 산화적 스트레스의 지표인 활성산소

의 발생을 억제하는 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.

- [0107] 3-2. 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782의 자외선에 대한 산화적 스트레스 개선 효과
- [0108] 미세먼지 대신 Ultraviolet Crosslinkers(Upland, USA)를 이용하여 자외선(UVB)를 15 mJ/cm²의 강도로 처리하는 것과 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 생균체를 1x10⁵ CFU/ml의 농도로 고정된 것을 제외하고는 상기 시험예 3-1과 동일한 방법으로 시험하여 활성산소 함량의 배수차이(fold change)를 계산하였다.
- [0109] 한편, 음성대조군으로는 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0110] 양성대조군으로는 인체유래 각질세포(HaCaT)에 상기 자외선(UVB)만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0111] 여기서, '배수차이(fold change)'는 시험 진행 후 자외선 및 유산균 처리 시의 활성산소에 의한 형광농도 값을 시험 진행 후 음성대조군에서 활성산소에 의한 형광 농도값으로 나눈 값을 의미한다.
- [0112] 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0113] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 음성대조군의 활성산소 1을 기준으로 자외선만을 처리한 양성대조군의 경우에는 활성산소가 2배나 증가하였으나, 자외선과 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782를 동시에 처리한 실험군(U_2782)의 경우에는 1.5배로 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 통하여, 본 발명의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782는 자외선 처리에 따른 산화적 스트레스의 지표인 활성산소의 발생을 억제하는 효과를 갖는 것을 알 수 있다.
- [0114] <시험예 4>
- [0115] 4-1. 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 RNA 추출
- [0116] 상기 시험예 2-1의 인체유래 각질세포(HaCaT)를 96웰에 웰당 2x10⁴ cells로 접종한 후, 24-48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다.
- [0117] FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 시험예 1-1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 생균체를 1x10⁵ 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 25 µg/ml의 농도로 존재하는 미세먼지를 50 µg/ml의 농도로 상기 각 웰의 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였다.
- [0118] 그런 다음, 상기 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 생균체와 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)를 20~24시간 동안 배양한 후, PBS로 2번 세척해 준 후 easy-spin™ lysis buffer(iNtRON, USA) 1 ml를 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.
- [0119] 한편, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 상기 시험예 1-1의 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei) HY2782 생균체만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다.
- [0120] 또한, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 미세먼지만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다
- [0121] 또한, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다
- [0122] 4-2. 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 유전자발현 분석
- [0123] 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.

- [0124] 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/)와 KEGG(<http://kegg.jp>)를 통해 진행하였다. 모든 데이터 분석 및 시각화는 R3.3.3(www.r-project.org)에 의해 분석되었다.
- [0125] 그 결과를 도 4 내지 도 6에 나타내었다.
- [0126] 도 4는 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.
- [0127] 도 4에서 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 생균체 만을 처리한 실험군(4_2782)이 서로 유사한 유전자 발현양상을 보이는 것을 알 수 있었고, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지 만을 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.
- [0128] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(1_control)과 비교하여, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지 만을 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 미세먼지 만을 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 생균체 만을 처리한 실험군(4_2782)에서도 약 18개의 유전자가 다른 실험군(I_2782, 2_Inducer)과 다르게 유전자 발현이 감소하였다.
- [0129] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(1_control)과 비교하여, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지 만을 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.
- [0130] <시험예 5>
- [0131] 5-1. 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 유전자 발현 분석
- [0132] 마이크로어레이를 통해 유전자 발현양상이 변화된 유전자를 분석하여 미세먼지에 의한 산화적 스트레스를 개선하는데 관련이 되어있는 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자의 발현이 미세먼지의 처리에 따라 증가하였다가 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체의 처리로 감소함이 확인되어, CYP1B1을 포함한 산화적 스트레스와 관련된 유전자들을 실시간중합효소 연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction, q-PCR)을 통해 보다 더 자세히 분석하였다.
- [0133] 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), CYP1A1(Hs01054796_g1), CYP1B1(Hs00164383_m1), AHR(Hs00169233_m1), HAS2(Hs00193435_m1)으로 Tagman사를 통해 주문하여 사용하였다. 유전자 발현의 지표인 Ct(threshold cycle)를 바탕으로 유전자 발현의 배수차이(fold change)를 계산하였다.

- [0134] 그 결과를 도 7(Ahr 유전자 발현), 도 8(CYP1A1 유전자 발현), 도 9(CYP1B1 유전자 발현) 및 도 10(HAS2 유전자 발현)에 나타내었다.
- [0135] 도 7에서 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 AhR(Aryl hydrocarbon receptor)의 유전자 발현이 1.4배 증가하였으나, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(I_2782)에서는 AhR(Aryl hydrocarbon receptor)의 유전자 발현이 1.1배로 다시 감소하였다.
- [0136] 도 8에서 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 CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 유전자 발현이 172배 증가하였으나, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(I_2782)에서는 CYP1A1 유전자 발현이 90배로 다시 감소하였다.
- [0137] 도 9에서 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 CYP1B1 유전자 발현이 46배 증가하였으나, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(I_2782)에서는 CYP1B1 유전자 발현이 18배로 다시 감소하였다.
- [0138] 이상의 도 7 내지 도 9의 실험 결과를 종합하여 보면, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 미세먼지에 의해 유도되는 산화적인 스트레스를 완화시키는 효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.
- [0139] 한편, 도 10에서 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 HAS2(Hyaluronan synthase 2) 유전자 발현이 0.6배 감소하였으나, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(I_2782)에서는 HAS2 유전자 발현이 0.7배로 다시 증가하였다. 이러한 사실로부터, 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 미세먼지로 인해 건조해진 피부세포에 대해서 피부보습도를 개선하는 효능이 있음을 알 수 있다.
- [0140] 5-2. 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 자외선이 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 유전자 발현 분석
- [0141] 미세먼지 대신 자외선(UVB)을 15mJ/cm²의 강도로 처리한 것을 제외하고는 상기 시험예 5-1과 동일한 방법으로 유전자 발현 변화를 분석 및 정량하였다. 이를 위해 사용한 인간유래 프라이머는 GAPDH(Hs03929097_g1), HYAL1(Hs00201046_m1)으로 Tagman사를 통해 주문하여 사용하였다. 유전자 발현의 지표인 Ct(threshold cycle)를 바탕으로 유전자 발현의 배수차이(fold change)를 계산하였다.
- [0142] 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- [0143] 도 11에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(1_control)의 유전자 발현 1을 기준으로, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 자외선 만을 처리한 실험군(UVB)에서는 HYAL1(Hyaluronidase-1) 유전자 발현이 8.1배 증가하였으나, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 자외선과 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 동시에 처리한 실험군(U_2782)에서는 HYAL1 유전자의 발현이 6.8배로 다시 감소하였다. 이러한 사실을 통하여 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 자외선으로 인해 건조해진 피부세포에 대해서 피부보습도를 개선하는 효능이 있음을 알 수 있다.
- [0144] 5-3. 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 미세먼지와 자외선이 동시 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 유전자 발현
- [0145] 미세먼지 만을 처리하는 대신에 자외선(UVB)을 15mJ/cm²의 강도로 미세먼지와 동시 처리한 것을 제외하고는 상기 시험예 5-1과 동일한 방법으로 유전자 발현 변화를 분석 및 정량하였다. 이를 위해 사용한 인간유래 프라이머는 GAPDH(Hs03929097_g1), HYAL1(Hs00201046_m1)으로 Tagman사를 통해 주문하여 사용하였다. 유전자 발현의 지표인 Ct(threshold cycle)를 바탕으로 유전자 발현의 배수차이(fold change)를 계산하였다.
- [0146] 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [0147] 도 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 대조군(1_control)

의 유전자 발현 1을 기준으로, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 미세먼지와 자외선을 동시에 처리한 실험군(UVB+DUST)에서는 HYAL1 유전자의 발현이 6.5배 증가하였으나, 미세먼지와 자외선이 동시 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 생균체를 처리한 실험군(IU_2782)에서는 HYAL1 유전자의 발현이 4.5배로 다시 감소하였다. 이러한 사실을 통하여 본 발명의 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782는 미세먼지 및 자외선으로 인해 건조해진 피부세포에 대해서 피부보습도를 개선하는 효능이 있음을 알 수 있다.

수탁번호

[0148]

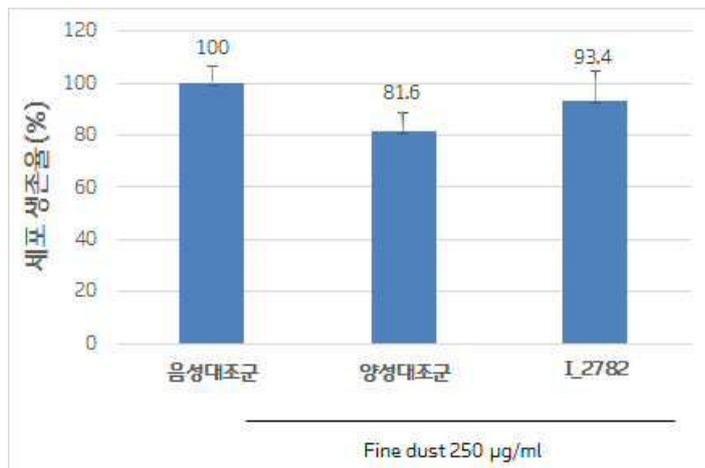
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13438BP

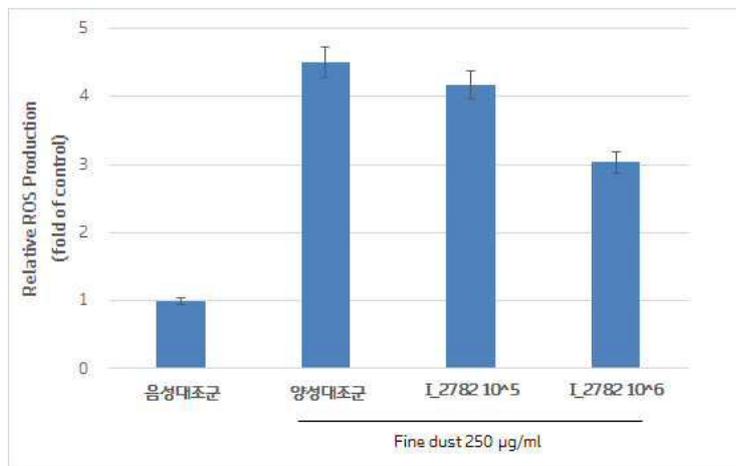
수탁일자 : 20171219

도면

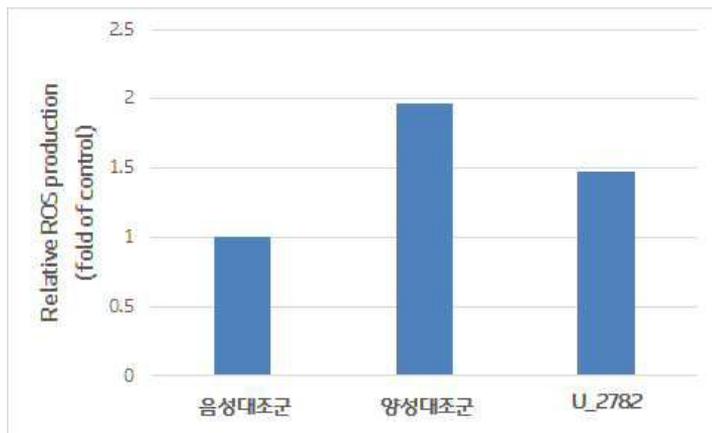
도면1



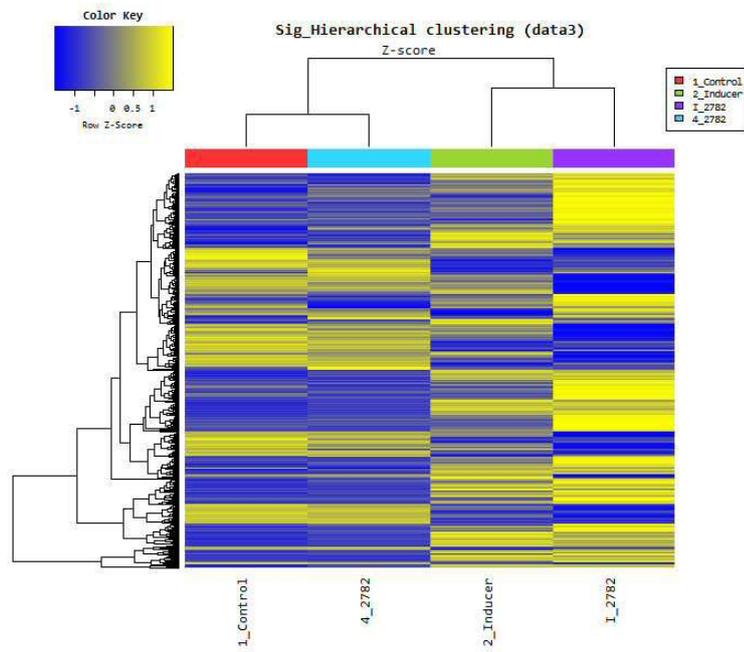
도면2



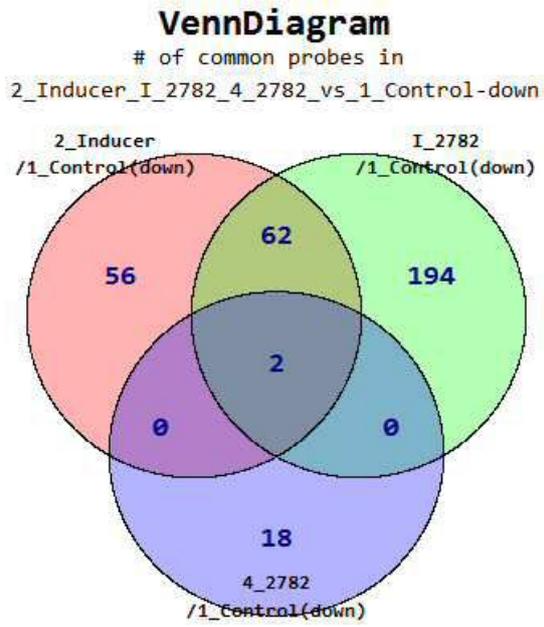
도면3



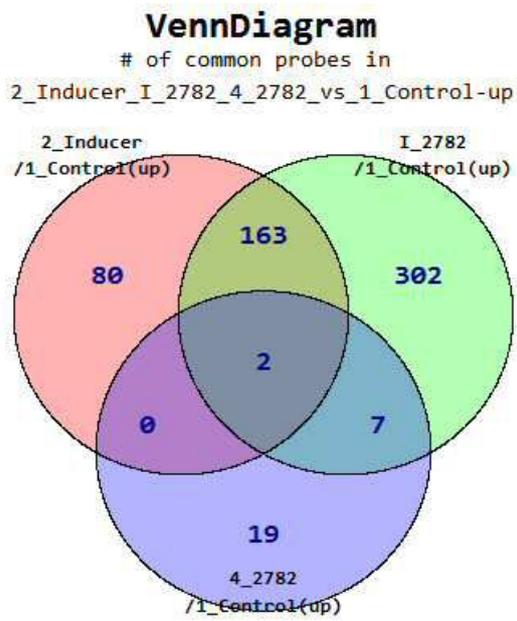
도면4



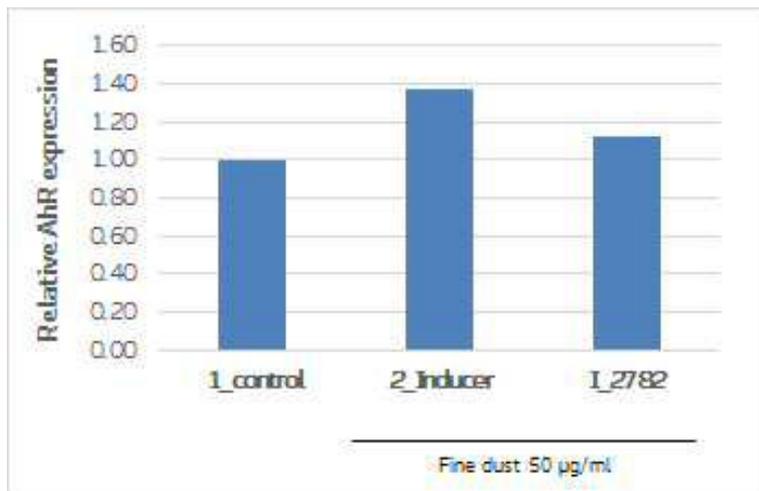
도면5



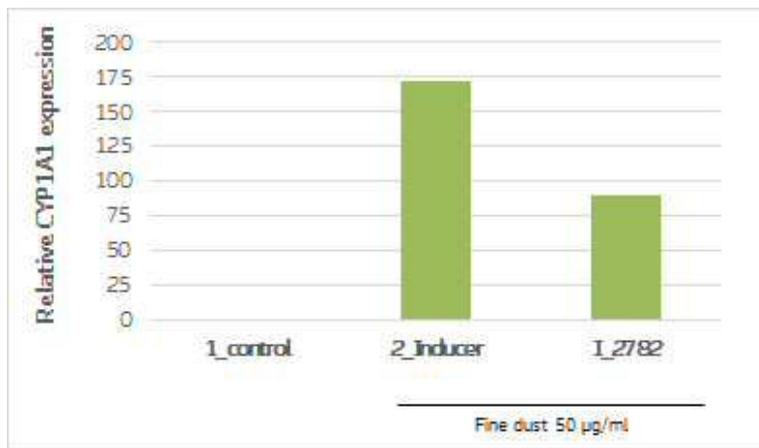
도면6



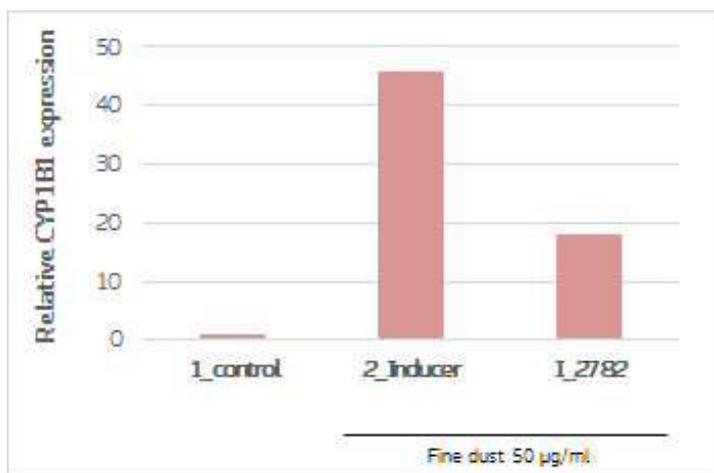
도면7



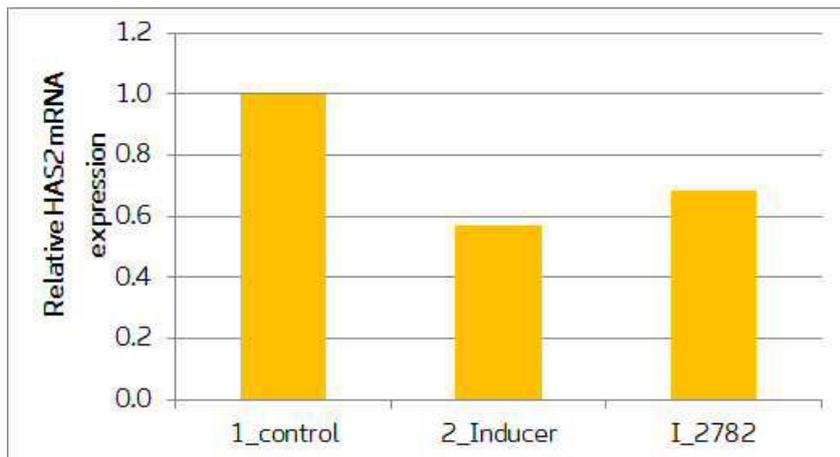
도면8



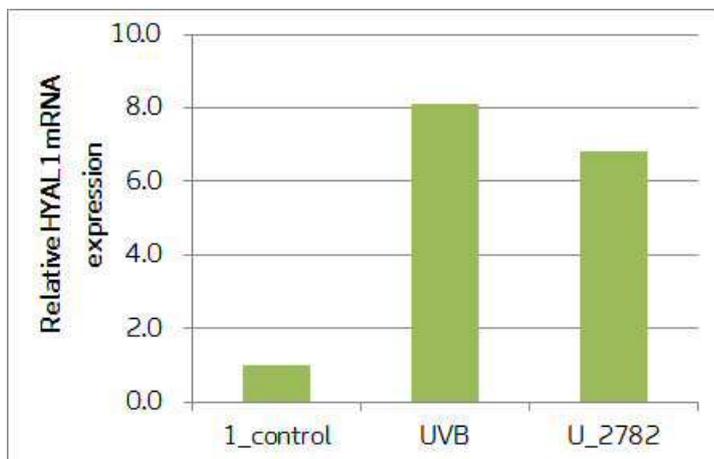
도면9



도면10



도면11



도면12

