



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월24일  
(11) 등록번호 10-2292475  
(24) 등록일자 2021년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23L 33/135 (2016.01) A23C 9/12 (2017.01)  
A23L 2/52 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A23L 33/135 (2016.08)  
A23C 9/1203 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0074013  
(22) 출원일자 2019년06월21일  
심사청구일자 2019년06월21일  
(65) 공개번호 10-2020-0145943  
(43) 공개일자 2020년12월31일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020150075770 A  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
주식회사 에치와이  
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)  
(72) 발명자  
정승희  
경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 17 금화마을  
5단지 502동 1603호  
강희림  
서울특별시 영등포구 도림로102길 3-6 (신길동)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
경일호

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 HY8002를 유효성분으로 함유하는 니코틴 금단증상 개선용 식품조성물

(57) 요약

본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 HY8002를 유효성분으로 함유하는 니코틴 금단증상 개선용 식품조성물에 관한 것으로서, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002는 예쁜꼬마선충에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체 관련 acr-15 유전자 및 acr-19 유전자의 발현을 감소시키는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 함유하는 니코틴 금단증상을 개선하는 발효유, 건강기능식품, 기능성 음료 등 식품조성물로 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

**A23L 2/52** (2013.01)  
A23V 2002/00 (2013.01)  
A23V 2200/30 (2013.01)  
A23Y 2300/21 (2013.01)

(72) 발명자

**이명희**

경기도 성남시 분당구 장미로 55 장미마을 104동 202호

**라제현**

경기도 수원시 권선구 세화로151번길 36 201호(서둔동)

**홍동기**

경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 17

**정성은**

서울특별시 송파구 송이로15길 31 102동 603호 (가락동, 쌍용2차아파트)

**정운희**

경기도 용인시 기흥구 공세로 226 청구아파트 103동 903호

**이하예라**

서울특별시 관악구 관악로 304 관악현대아파트 104동 1501호

**최일동**

경기도 용인시 기흥구 금화로58번길 10 금화마을주공4단지아파트 405-1704

**이정열**

경기도 양평군 서종면 통점길 63 404-1

**심재현**

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 213-901호

(56) 선행기술조사문헌

KR101958686 B1\*

CELL REPORT 제21권 제6호, 1434\_1441쪽, 2017년 11월 7일.

학위논문(SMITH, MICHAEL A, EAST CAROLINA UNIVERSITY, 2011년 12월)

학위논문(WASITHA PRAVEEN DE WASS THILAKARATHNA, DALHOUSIE UNIVERSITY, 2018년 04월)

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

예쁜꼬마선충에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptor) 관련 acr-15 유전자 및 acr-19 유전자의 발현을 감소시키는 효능을 갖는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 (*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC 13279BP)를 유효성분으로 함유하는 니코틴 금단증상 개선용 식품조성물.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

청구항 2에 있어서,

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

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 니코틴 금단증상 개선용 식품조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 예쁜꼬마선충에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptor; nAChR) 관련 acr-15 및 acr-19 유전자의 발현을 감소시키는 효능을 갖는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 니코틴 금단증상 개선용 식품조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[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] 니코틴에 지속적으로 노출되면, 니코틴의 뇌 보상 기전에 관여하는 여러 신경전달 물질에 변화가 일어난다. 실제 많은 수의 흡연자가 어느 시기에는 담배를 끊으려 하지만 금연을 시도하는 약 10~20%의 수에서만 1년 후까지 금연을 유지한다. 이러한 재발을 일으키는 인자 중에는 니코틴에 대한 갈망과 우울감, 정신적·사회적 스트레스를 포함한 심리적 니코틴 금단 증상이 있을 수 있다. 특히, 금연 후 수개월 안에 한 번이라도 흡연을 하면 재발

로 이어지기 쉬운데 이는 니코틴 의존자가 장기간 니코틴을 사용을 하지 않게 되면 니코틴의 뇌 보상 효과에 대한 민감도가 매우 증가하여 한번의 흡연으로도 강력한 뇌 보상효과가 일어나기 때문이다. 이러한 강력한 보상 효과와 금단 증상이 금연을 어렵게 만드는 중요한 요소가 된다.

[0004] 반복적으로 니코틴과 같은 의존성 물질에 노출되게 되면, 과도한 비정상적인 자극에 대한 항상성 반응으로 신경 적응 현상이 일어나게 된다. 예를 들어, 만성적으로 니코틴에 노출될 때 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 수가 증가하게 되는데 이는 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 탈감작이 증가됨으로써 나타나는 항상성 반응이다.

[0005] 니코틴 사용이 반복되고 지속적으로 니코틴에 노출되면  $\alpha 4\beta 2$  nACh 수용체처럼 친화도가 높은 니코틴 수용체부터 탈감작이 일어난다. 지속적으로 탈감작이 일어나게 되면 니코틴에 의한 콜린성 정보 전달의 정도가 감소하게 된다. 또한 니코틴 수용체가 탈감작된 상태로 오래 지속되면 친화도가 높은 nACh 수용체의 수가 보상적으로 증가한다. 결국 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 증가는 니코틴에 대한 감작을 일으킨다. 이런 상태에서 니코틴의 농도가 낮게 되고 기존의 증가된 니코틴성 아세틸콜린 수용체 때문에 니코틴 콜린성 시스템의 과흥분이 일어난다. 이런 콜린성 시스템의 과흥분은 불안, 흥분 등을 일으켜 흡연자가 재흡연을 하게 만든다.

[0006] 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)은 생물학·화학 연구에서 모델동물로서 흔히 이용되고 있는 모델동물이다. 예쁜꼬마선충은 설치류 실험을 대신하여 동물연구윤리 측면에서 유리하며, 약학 및 기능성 식품 조성물을 기존 시험관 수준의 실험(*in vitro*)에서 한 단계 더 나아가 개체 수준의 생체 내(*in vivo*) 활성 및 효능을 평가할 수 있는 장점이 있다. 또한, 최근 여러 저명한 연구논문에서 이러한 예쁜꼬마선충을 유산균의 기능성 발굴 및 작용기전 연구에 널리 이용하고 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002가 예쁜꼬마선충에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체 관련 유전자들의 발현을 감소시킴으로써 니코틴 금단증상을 개선하는 효과를 나타낸다는 사실을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2006-0034405호(2006.04.24.)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2015-0085942호(2015.07.27.)

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 예쁜꼬마선충에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptor; nAChR) 관련 *acr-15* 및 *acr-19* 유전자의 발현을 감소시키는 효능을 갖는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 니코틴 금단증상 개선용 식품조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0010] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 예쁜꼬마선충에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nAChR) 관련 *acr-15* 및 *acr-19* 유전자의 발현을 감소시키는 효능을 갖는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 니코틴 금단증상 개선용 식품조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0012] 본 발명에 따른 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 분리하기 위해 건강한 사람의 분변을 취하여 이를 pH2.3의 완충용액을 이용하여 혐기적으로 희석하여 내산성이 높은 균주의 생존과 선발에 활용하였다. 이렇게 희석된 분변 용액을 비피도박테리움을 분리하는 배지인 BL 한천평판배지에 도말하고 37°C에서 2~3일간 혐기적으로 배양한 후 균주 집락을 분리하였다. 다시 BL 한천평판배지를 이용하여 단일 균주 집락을 분리하는 과정을 거친 후, 인체 내에서 생존하여 유익한 활성을 나타내

기 위하여 필요한 내산성 및 내담즙성의 특징을 가진 비피도박테리움 균주를 선발하였다.

- [0013] 이하, 선발된 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주의 미생물학적 특성은 다음과 같다.
- [0014] (1)균의 형태 (BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 균의 형태)
- [0015] 1)세포의 형상: 곤봉형, Y자형 등 다양
- [0016] 2)그람염색: 양성
- [0017] (2)집락의 형태 (BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 집락의 형태)
- [0018] 1)형상: 원형
- [0019] 2)크기: 1~3mm
- [0020] 3)색조: 유백색
- [0021] (3)생리학적 성질
- [0022] 1)생육온도
- [0023]     생육범위: 25~45℃
- [0024]     최적온도: 37~41℃
- [0025] 2)생육 pH
- [0026]     생육범위: pH 2.0~8.0
- [0027]     최적 pH: pH 6.5~7.0
- [0028] 3)산소의 영향: 편성 혐기성
- [0029] 4)보게스-프로스카우어(Voges - Proskauer) 반응: -
- [0030] 5)카탈라아제: -
- [0031] 6)암모니아 생성: -
- [0032] 7)유용고성: -
- [0033] 8)리트머스 밀크 환원: -
- [0034] 9)유레아 분해효소: -
- [0035] 10)베타-갈락토오스 분해효소: +
- [0036] 11)알파-글루코오스 분해효소: +
- [0037] (4)내산성
- [0038] 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 10ml BL 액체배지에 접종하여 37℃에서 18시간 배양한 후, 이 배양액의 일정량을 다시 pH 2.3의 완충용액에 접종하여 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 상기 배양액의 일정량을 취하여 혐기성 완충용액에 일정비율로 희석하였다. BL 한천평판배지에 상기의 희석액을 일정량 접종한 후 37℃에서 48시간 동안 혐기 배양하여 나타나는 집락수를 계수하였다.
- [0039] 그 결과, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 10% 정도의 낮은 사멸율을 보여 산에 대한 강한 내성을 갖고 있음을 알 수 있었다.
- [0040] (5)내담즙산성
- [0041] 담즙산이 첨가된 BL 한천평판배지에 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 백금으로 접종하여 37℃에서 48시간 혐기 배양하여 집락의 생육여부를 관찰하였다.

[0042] 그 결과, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 0.15%(w/v)의 담즙산이 첨가된 배지에서도 생육하여 담즙산에 대한 내성도 지니고 있음을 알 수 있었다.

[0043] (6)분리 및 동정

[0044] 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>>).

[0045] 하기의 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 균주의 16S rDNA 유전자는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*)의 16S rDNA 유전자와 99% 일치하는 것으로 확인되었다.

표 1

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident	Accession
Bifidobacterium animalis subsp lactis strain CECT 8145 16S ribosome RNA gene, partial seq	2732	2732	89%	99	KP202873.1
Bifidobacterium animalis subsp lactis strain BF052 complete genome	2732	10929	89%	99	CP009045.1

[0047] 이상의 16S rRNA 서열 및 균학적 특성에 의해 본 발명의 균주를 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002로 명명하고, 이를 2017년 5월 31일자로 한국생명공학연구원에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 13279BP).

[0048] 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균 또는 이의 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 식품조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 등으로 사용될 수 있다.

[0049] 특히, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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.

[0050] 또한, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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.

[0051] 또한, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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**

[0052] 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002는 예쁜꼬마선충에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체 관련 acr-15 유전자 및 acr-19 유전자의 발현을 감소시키는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 함유하는 니코틴 금단증상을 개선하는 발효유, 건강기능식품, 기능성 음료 등 식품조성물로 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0053] 도 1은 인간 폐암세포인 A549 세포에서 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002의 니코틴에 의한 세포사멸 보호효과를 확인한 그래프이다.

도 2는 예쁜꼬마선충에서 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp.*

*lactis*) HY8002의 니코틴에 의한 *acr-15* 유전자의 발현을 확인한 그래프이다.

도 3은 예쁜꼬마선충에서 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002의 니코틴에 의한 *acr-19* 유전자의 발현을 확인한 그래프이다.

도 4는 예쁜꼬마선충에서 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002의 니코틴에 처리시 감소하는 생존율을 개선하는 효능을 확인한 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0054] 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.

[0055] <실시예 1>

[0056] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 동결건조분말 제조

[0057] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 BL 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.

[0058] <실시예 2>

[0059] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조

[0060] 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. 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 적정온도로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP배지에서의 총 유산균 수가 1.0X10<sup>9</sup>cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.

[0061] 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.

[0062] 상기 유산균 배양액 69.5중량%와 상기 실시예 1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 동결건조분말 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.

[0063] <실시예 3>

[0064] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조

[0065] 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. 그리고, 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 동결건조분말 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.

[0066] <실시예 4>

- [0067] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0068] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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 상기의 실시예 1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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.
- [0069] <시험예 1>
- [0070] 1-1. 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체의 제조
- [0071] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 BL 액체배지에 접종하여 37℃에서 18~20시간 배양하였다. 정확한 생균수를 확인하기 위해 배양이 완료된 상기 유산균을 십진 희석하여 BL agar 배지를 이용하여 37℃에서 2~3일간 배양해 균수를 측정하였다.
- [0072] 세포 실험에 적용 시 앞서 구한 균수를 기준으로 하여 세포 배양에 사용한 배지를 넣고 희석해 생균체로 사용하였다.
- [0073] 1-2. 인간 폐암세포인 A549 세포의 배양
- [0074] 인간 폐암세포인 A549 세포는 한국세포주은행(서울)으로부터 분양을 받아 이용하였다. 10% FBS(heat inactivated fetal bovine serum), 100U/mL 페니실린, 100μg/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 배지(Roswell Park Memorial Institute medium)에서 상기 A549 세포와 RPMI 배지를 1:4의 중량비율로 2~3일에 한 번씩 계대 배양하였다(배양 조건: 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃ 배양기).
- [0075] 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. A549 세포의 부착이 떨어진 것을 확인한 후 RPMI 배지 4ml를 넣어 A549 세포를 회수하였다. 상기 회수된 A549 세포를 1,200rpm으로 3분 동안 원심분리를 한 후 상등액을 조심스럽게 제거하고, RPMI 배지 1ml를 넣어 세포 펠렛을 풀어 주었다. A549 세포와 RPMI 배지를 1:4의 중량비율로 희석한 후 100배 세포배양접시에 넣고 잘 혼합한 후 배양기에서 2~3일간 배양하여 사용하였다.
- [0076] 1-3. 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002의 세포 사멸 보호효과
- [0077] 상기 시험예 1-2의 인간 폐암세포인 A549 세포를 96웰(well)에 웰(well)당  $2 \times 10^4$  cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 다음 FBS가 들어가지 않은 RPMI 배지로 1회 세척하여 주었다.
- [0078] FBS가 들어가지 않은 RPMI 배지에 상기 시험예 1-1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체를  $1 \times 10^6$  CFU/ml의 농도로 용해하여 상기 FBS가 들어가지 않은 RPMI 배지로 1회 세척된 각 웰의 A549 세포에 처리하였고, 이와 동시에 Nicotine((S)-3-[1-Methylpyrrolidin-2-yl]pyridine, Sigma #N3876)을 각각 10mM 농도로 상기 각 웰의 A549 세포에 처리하였다.
- [0079] 상기 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체와 니코틴이 처리된 A549 세포를 20~24시간 동안 배양한 후 CCK-8 assay 용액을 각 웰당 10μl 처리하고, 1~4시간 후 분광광도계를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.
- [0080] 한편, 음성대조군으로는 인간 폐암세포인 A549 세포에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0081] 또한, 양성대조군으로는 인간 폐암세포인 A549 세포에 상기 니코틴 만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.

- [0082] 여기서, '세포생존율'은 시험 진행 후 니코틴 및 유산균 처리시의 흡광도를 시험 진행 후 음성대조군의 흡광도로 나눈 값의 백분율을 의미한다.
- [0083] 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0084] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 음성대조군의 세포 생존율 100%를 기준으로 니코틴 만을 처리한 양성대조군의 경우에는 세포 생존율이 30%로 감소하였으나, 니코틴과 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페이스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 동시에 처리한 실험군(HY8002)의 경우에는 세포 생존율이 51.2%까지 증가하였음을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 통하여 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페이스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002는 니코틴 처리에 따른 세포의 사멸을 억제하는 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.
- [0085] <시험예 2>
- [0086] 2-1. 예쁜꼬마선충(*C.elegans*) 준비
- [0087] 본 실험에 사용한 예쁜 꼬마선충(*C. elegans*) N2 브리스틀 야생형종은Caenorhabditis Genetics Center(CGC, St. Paul, MN, USA)에서 제공받아 사용하였다. 예쁜 꼬마선충의 배양을 위해 5배 농축한 *E. coli* OP50 배양액을 대략 500mg이 되도록 Nematode Growth Media(NGM) 플레이트에 균일하게 분주하고 건조시킨 후 예쁜 꼬마선충(*C. elegans*)을 옮기고 25℃에서 약 4일간 배양하였다. 개체의 밀도가 높은 플레이트를 M9 버퍼를 이용하여 알과 성충 등을 모아 3,500rpm에서 1분간 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 차아염소산나트륨(Sodium hypochlorite)과 5N NaOH 혼합액을 가하여 약 3분간 흔들여 주며 알과 성충을 분리하였고, M9 버퍼를 이용하여 3번 세척하였다. 이 과정을 통해 분리한 알을 25℃에서 하룻밤 동안 로테이션(rotation)하여 부화시켜 L1 단계까지 성장시킨 후, 5배 농축한 *E. coli* OP50을 분주한 NGM 플레이트에 옮겨, 2일 후 L4 단계가 되도록 동조화(age synchronized worm)시켰다.
- [0088] 2-2. 세균 배양 및 분석용 플레이트 준비
- [0089] 비병원성 대장균 OP50을 LB배양액(Luria-bertani broth; 트립톤 10g/L, 효모추출물 5g/L, 염화나트륨 10g/L)을 이용하여 37℃에서 배양하였다. 상기 배양된 비병원성 대장균 OP50과 상기 시험예 1-1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페이스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체는 각각 NGM 플레이트에 대략 500mg씩 도말하였으며, 시험예 2-1의 동조화(age synchronized worm)시킨 L4 단계의 예쁜꼬마선충을 각각 NGM 플레이트에 옮긴 후 실험을 진행하였다. 니코틴 독성에 대한 보호효과를 평가하기 위하여 L4 단계의 예쁜꼬마선충이 놓여진 각각 NGM 플레이트에 니코틴 100 μM 농도를 고루 분산시켜 처리하였다.
- [0090] 2-3. 니코틴이 처리된 예쁜꼬마선충에서의 RNA 추출
- [0091] 상기 시험예 2-2의 예쁜꼬마선충을 48시간 동안 니코틴에 노출시킨 뒤 M9 버퍼를 이용하여 알과 성충 등을 모아 3,500rpm에서 1분간 원심분리 후 상등액을 제거하였으며, S버퍼를 이용하여 원심분리방식으로 성충을 여러 차례 세척하였다. 그런 다음, easy-spin™ lysis buffer(iNtRON, USA) 1ml를 넣고 상기 예쁜꼬마선충을 용해하였다. 상기 용해된 예쁜꼬마선충에서 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 Bio analyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)로 확인하였다.
- [0092] 한편, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 양성대조군으로는 니코틴 만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다.
- [0093] 또한, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 음성대조군으로는 예쁜꼬마선충에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다.
- [0094] 2-4. 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 니코틴이 처리된 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)에서의 유전자 발현 분석
- [0095] 상기 시험예 2-3의 분리된 각각의 RNA로부터 Omni script 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 예쁜꼬마선충 유래 프라이머(primer)는 act-2(Ce02507510\_s1), acr-15(Ce02478665\_g1), acr-19(Ce02411736\_g1)으로 Taqman사를 통해 주문하여 사용하였다. 유전자 발현의 지표인 Ct(treshhold cycle)를

바탕으로 유전자 발현의 배수차이(fold change)를 계산하였다.

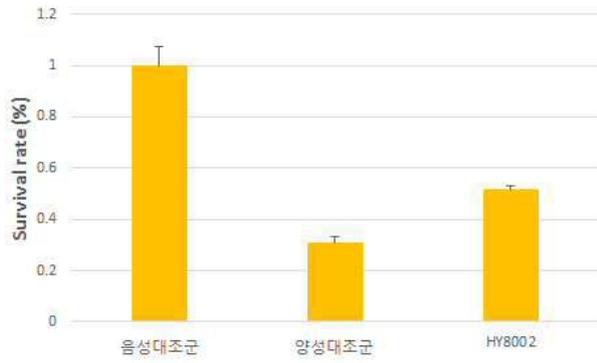
- [0096] 그 결과를 도 2(acr-15 유전자 발현) 및 도 3(acr-19 유전자 발현)에 나타내었다.
- [0097] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 예쁜꼬마선충에 아무것도 처리하지 않은 음성대조군의 acr-15 유전자 발현 1을 기준으로, 예쁜꼬마선충에 니코틴 만을 처리한 양성대조군에서는 acr-15 유전자 발현이 2.6배 증가하였으나, 예쁜꼬마선충에 니코틴과 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체를 동시에 처리한 실험군(HY8002)에서는 acr-15 유전자 발현이 1.2배로 다시 감소하였다.
- [0098] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 예쁜꼬마선충에 아무것도 처리하지 않은 음성대조군의 acr-19 유전자 발현 1을 기준으로, 예쁜꼬마선충에 니코틴 만을 처리한 양성대조군에서는 acr-19 유전자 발현이 2.3배 증가하였으나, 예쁜꼬마선충에 니코틴과 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체를 동시에 처리한 실험군(HY8002)에서는 acr-19 유전자 발현이 1.2배로 다시 감소하였다.
- [0099] 이상의 도 2 및 도 3의 실험결과를 종합하여 보면, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002는 예쁜꼬마선충에서 니코틴에 의해 유도된 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nAChR)의 발현으로 인해 발생하는 acr-15(AcetylCholine Receptor) 및 acr-19(AcetylCholine Receptor) 유전자 발현을 감소시킴으로써 니코틴 독성에 대한 보호 효과를 가지고 있음을 확인하였다.
- [0100] <시험예 3>
- [0101] 예쁜꼬마선충의 생존율 분석
- [0102] 니코틴에 따른 예쁜꼬마선충의 생존율을 분석하기 위하여 상기 시험예 2-3의 48시간 동안 니코틴에 노출시킨 예쁜꼬마선충을 새로운 NGM 플레이트 위에 옮기고 25℃에서 배양하면서 3일 간격으로 현미경을 통해 살아있는 선충의 개수를 계수하였다.
- [0103] 한편, 음성대조군(WT)으로는 예쁜꼬마선충에 비병원성 대장균 OP50 만을 섭취시키고 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0104] 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0105] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 비병원성 대장균 OP50 섭취 후 니코틴을 처리한 그룹(Nicotine)은 15일째에 생존율이 44% 이하로 떨어진 것으로 나타난 반면, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체 섭취 후 니코틴을 처리한 그룹(HY8002)은 15일째 이후에도 57% 이상의 생존율을 나타내어 약 13% 이상 높은 생존율을 보였다. 이러한 사실을 통하여 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002는 예쁜꼬마선충에서 니코틴 처리시 감소하는 생존율을 개선하는 니코틴 독성에 대한 보호효과를 나타내고 있음을 알 수 있다.

**수탁번호**

- [0106] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- 수탁번호 : KCTC13279BP
- 수탁일자 : 20170531

도면

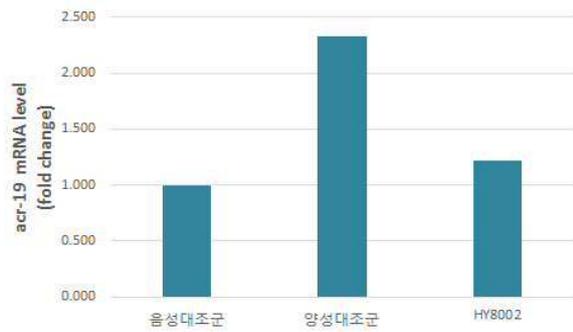
도면1



도면2



도면3



도면4

