



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월18일
(11) 등록번호 10-1958686
(24) 등록일자 2019년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/135 (2016.01) A23L 2/38 (2006.01)
A61K 8/99 (2017.01) A61Q 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A23L 2/382 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0134380
(22) 출원일자 2018년11월05일
심사청구일자 2018년11월05일
(56) 선행기술조사문헌
US20090060962 A1
KR1020160053447 A
KR1020130115943 A
KR101822024 B1

(73) 특허권자
주식회사한국야쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
강희림
서울특별시 영등포구 신길3동 355-254
이명희
경기도 성남시 분당구 장미로 55 장미마을 104동 202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
경일호

전체 청구항 수 : 총 10 항

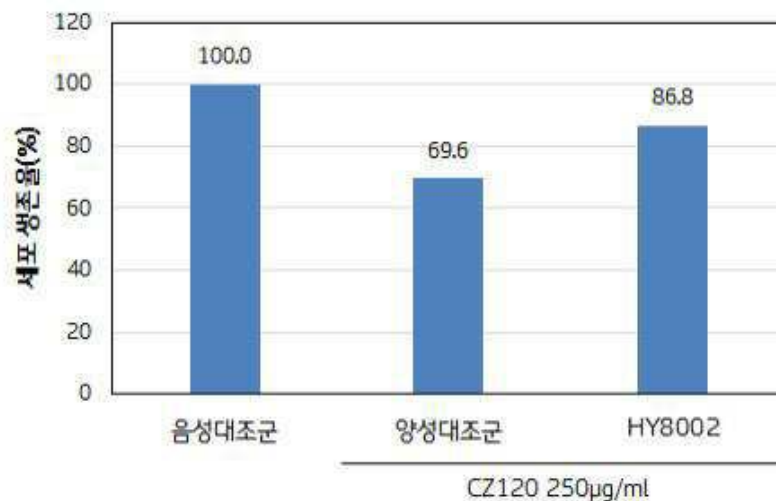
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 HY8002를 유효성분으로 함유하는 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선을 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선을 위한 조성물에 관한 것으로서, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002는 AhR(Aryl hydrocarbon receptor), CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 및 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 중금속이 포함된 미세먼지로 인한 피부의 손상을 방지 및 개선하는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 하는 발효유, 건강기능식품, 기능성 음료 등 식품조성물과 화장료 조성물로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/99 (2013.01)
A61Q 17/00 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23Y 2300/49 (2013.01)

(72) 발명자

이하예라

서울특별시 관악구 관악로 304 관악현대아파트 10
 4동 1501호

라제현

경기도 수원시 권선구 세화로151번길 36 201호(서
 둔동)

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

명세서

청구범위

청구항 1

비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC 13279BP)를 유효성분으로 함유하는 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선을 위한 식품조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC 13279BP)는 사람의 피부세포에서 AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선의 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 식품조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC 13279BP)는 사람의 피부세포에서 CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지에 의한 피부 손상 방지 및 개선의 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 식품조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC 13279BP)는 사람의 피부세포에서 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지에 의한 피부 손상 방지 및 개선의 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 식품조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

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

청구항 6

비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC 13279BP)를 유효성분으로 함유하는 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선을 위한 화장료 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC 13279BP)를 유효성분으로 함유하는 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선을 위한 화장료 조성물.

호: KCTC 13279BP)는 사람의 피부세포에서 AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선의 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC 13279BP)는 사람의 피부세포에서 CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지에 의한 피부 손상 방지 및 개선의 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 9

청구항 6에 있어서,

상기 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC 13279BP)는 사람의 피부세포에서 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지에 의한 피부 손상 방지 및 개선의 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 10

청구항 6 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선을 위한 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 사람의 피부세포에서 AhR(Aryl hydrocarbon receptor), CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 및 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 중금속이 포함된 미세먼지에 의한 피부의 손상을 방지 및 개선하는 효능을 갖는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선을 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대기 오염은 전 세계에 걸쳐 지속적으로 증가하고 있으며, 건강과 관계된 문제로 대두되고 있다. 대기 오염의 주요 물질에는 미세먼지, 다환방향족 탄화수소, 휘발성 유기화합물, 질소, 산화 유황, 오존, 중금속, 일산화탄소 등이 있다. 이 중 미세먼지에는 대기 오염 물질과 그의 공기 중 반응물까지 포함되어 있어 포괄적인 오염 물질로서 세계보건기구에서는 1군 발암물질로 분리하였다.

[0003] 2013년도 이후 우리나라 미세먼지 농도는 악화 또는 정체 중으로 세계보건기구 기준과 비교했을 때 현저히 높은 수준을 보이고 있어 사회적 문제로 여겨지고 있다. 서울지역 고농도 미세먼지 발생일수(PM10 일 평균농도가 $100 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{일}$ 이상인 날)는 2012년 5일에서 2014년 19일로 급격한 증가세를 보이고 있다. 초미세먼지 또한 서울지역 미세먼지 나쁨 일수는 2015년에 44일에서 2016년에 73일, 2017년 에 64일로 급격하게 증가하고 있다.

[0004] 장기간 미세먼지에 노출되면 면역력이 급격히 저하되어 감기, 천식, 기관지염, 폐암 등의 호흡기 질환은 물론 심혈관 질환, 피부질환, 안구질환과 같은 각종 질병에 노출될 수 있다. 특히, 피부는 우리 몸의 가장 바깥쪽에 존재하여 체내 장기를 보호하고 외부로부터 보호하는 역할을 하지만, 미세먼지와 같은 지속적인 외부환경에 취

약하다. 미세먼지는 피부장벽을 파괴하여 미세먼지 속 오염물질이 피부에 잘 침투할 수 있는 환경을 조성하고 체내 유입된 미세먼지는 각 세포에서 염증 반응을 일으키며 문제를 야기할 수 있다. 특히, 미세먼지에 포함된 각종 중금속은 피부에 닿을 경우에 가려움증, 수포, 홍반 등을 동반한 접촉성 피부염을 유발할 수 있다.

[0005] 아릴하이드로카본수용체(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)은 생체 외 물질(xenobiotic)을 인식하고 이에 대한 독성을 조절하는 전사인자의 수용체이다. 대표적인 생체 외 물질은 다환방향족 탄화수소와 다이옥신 등으로 환경 오염 물질을 인식하고 이에 대한 대사 및 독성 기작을 활성화 시킨다. 최근에는 이 수용체가 생체 내의 대사 물질 또는 천연 음식물에 의해서 활성화되어 생체 기능에 있어 중요하다고 알려지고 있다. AhR의 생물학적 영향은 광범위하며 해독작용 뿐만 아니라 세포 증식, 이동, 면역 조절, 신경계 영향을 포함한다. 활성화된 AhR은 생체 외 물질을 대사하는 효소(xenobiotic-metabolizing enzymes) 유전자를 전사하여 발현이 증가한다. 대표적인 효소로는 cytochrome P450s이 있으며 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 등을 포함한다.

[0006] 프로바이오틱스(Probiotics)는 2002년 FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nations)와 WHO(World Health Organization)에 의해 충분한 양을 섭취하였을 때 숙주의 건강에 도움을 주는 살아있는 미생물로 정의된다. 현재 식약처에서 고시형으로 등재한 프로바이오틱스는 총 19종으로 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*)이 있다.

[0007] 특히, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*)는 주로 사람의 분변 등에서 분리되어 유산균 증식과 유해균 억제 및 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있다고 알려져 있으나, 미세먼지로 인한 피부 손상에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다.

[0008] 이에 본 발명자들은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) HY8002가 중금속이 포함된 미세먼지에 의해 유도되는 피부 세포 사멸을 보호하고, 증가된 AhR 관련 유전자 발현을 감소시킴으로써 인간의 피부세포의 손상을 방지 및 개선하는 효능을 가진다는 사실을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0010270호(2017.01.26.)
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1822024호(2018.01.25.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 사람의 피부세포에서 AhR(Aryl hydrocarbon receptor), CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 및 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 중금속이 포함된 미세먼지로 인한 피부의 손상을 방지 및 개선하는 효능을 갖는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선을 위한 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인체유래의 각질세포(HaCaT)에 중금속이 포함된 미세먼지를 처리함으로써 발생하는 피부의 손상과 관련된 AhR(Aryl hydrocarbon receptor), CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 및 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 미세먼지에 의한 피부의 손상을 방지 및 개선하는 효능을 갖는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 미세먼지에 의한 피부의 손상 방지 및 개선을 위한 조성물을 제공하는 것을 특

정으로 한다.

[0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명에 따른 미세먼지는 European Reference Materials에서 제조된 ERM[®]-CZ120을 사용하였다. 해당 시료는 실제 도로 환경에서 분리된 미세먼지로 PM10 정도의 크기이다. 해당 시료는 비소(Arsenic), 카드뮴(Cadmium), 납(Lead), 니켈(Nickel)과 같은 중금속을 포함한다.

[0014] 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℃에서 2~3일간 혐기적으로 배양한 후 균주 집락을 분리하였다. 다시 BL 한천평판배지를 이용하여 단일 균주 집락을 분리하는 과정을 거친 후, 인체 내에서 생존하여 유익한 활성을 나타내기 위하여 필요한 내산성 및 내담즙성의 특징을 가진 비피도박테리움 균주를 선발하였다.

[0015] 이하, 선발된 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주의 미생물학적 특성은 다음과 같다.

[0016] (1)균의 형태 (BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 균의 형태)

[0017] 1)세포의 형상: 곤봉형, Y자형 등 다양

[0018] 2)그램염색: 양성

[0019] (2)집락의 형태 (BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 집락의 형태)

[0020] 1)형상: 원형

[0021] 2)크기: 1~3mm

[0022] 3)색조: 유백색

[0023] (3)생리학적 성질

[0024] 1)생육온도

[0025] 생육범위: 25~45℃

[0026] 최적온도: 37~41℃

[0027] 2)생육 pH

[0028] 생육범위: pH 2.0~8.0

[0029] 최적 pH: pH 6.5~7.0

[0030] 3)산소의 영향: 편성 혐기성

[0031] 4)보게스-프로스카우어(Voges - Proskauer) 반응: -

[0032] 5)카탈라아제: -

[0033] 6)암모니아 생성: -

[0034] 7)유응고성: -

[0035] 8)리트머스 밀크 환원: -

[0036] 9)유래아 분해효소: -

[0037] 10)베타-갈락토오스 분해효소: +

[0038] 11)알파-글루코오스 분해효소: +

[0039] (4)내산성

[0040] 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균

주를 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.

[0041] 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.

[0042] (5)내담즙산성

[0043] 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.

[0044] 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.

[0045] (6)분리 및 동정

[0046] 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>).

[0047] 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

[0048]

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

[0049] 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).

[0050] 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.

[0051] 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.

[0052] 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, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성 음료를 제조한다.

[0053] 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 B₁, B₂, B₅, B₆, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아마이드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

[0054] 한편, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균 또는 이의 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 외에 기타 화장료의 제형 또는 사용 목적 등에 맞게 임의로 선정한 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.

[0055] 또한, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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

[0056] 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002는 AhR(Aryl hydrocarbon receptor), CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 및 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자의 발현을 감소시킴으로써 중금속이 포함된 미세먼지로 인한 피부의 손상을 방지 및 개선하는 효능을 가지므로 이를 유효성분으로 하는 발효유, 건강기능식품, 기능성 음료 등 식품조성물과 화장료 조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 인체유래 각질세포(HaCaT)에서 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002의 미세먼지에 의한 세포사멸보호효과를 확인한 그래프이다.

도 2는 인체유래 각질세포(HaCaT)에서 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002의 미세먼지에 의한 AhR 유전자의 발현을 확인한 그래프이다.

도 3은 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002의 미세먼지에 의한 CYP1A1 유전자의 발현을 확인한 그래프이다.

도 4는 인체유래의 각질세포(HaCaT)에서 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002의 미세먼지에 의한 CYP1B1 유전자의 발현을 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 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.

[0059] <실시예 1>

[0060] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 동결건조분말 제조

[0061] 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.

[0062] <실시예 2>

[0063] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조

[0064] 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. 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 적정온도 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP

배지에서의 총 유산균 수가 1.0×10^9 cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.

[0065] 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.

[0066] 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.

[0067] <실시예 3>

[0068] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조

[0069] 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. 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% 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.

[0070] <실시예 4>

[0071] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조

[0072] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 동결건조분말 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B₁, B₂, B₅, B₆, 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.

[0073] <실시예 6>

[0074] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물의 제조

[0075] 영양화장수

[0076] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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%, 잔량의 방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수를 혼합하여 통상의 영양화장수 제조방법에 따라 제조하였다.

[0077] 영양크림

[0078] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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%, 잔량의 방부제, 미량색소, 미량향료 및 미

량정제수를 혼합하여 통상의 영양크림 제조방법에 따라 제조하였다.

[0079] 맛사지크림

[0080] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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%, 잔량의 방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수를 혼합하여 통상의 맛사지크림 제조방법에 따라 제조하였다.

[0081] 팩

[0082] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 동결건조분말 0.01중량%, 폴리비닐알콜 13중량%, 소듐카복시메틸셀룰로스 0.2중량%, 알란토인 0.1중량%, 에탄올 5중량%, 노닐페닐에테르 0.3중량%, 잔량의 방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수를 혼합하여 통상의 팩 제조방법에 따라 제조하였다.

[0083] <시험예 1>

[0084] 1-1. 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체의 제조

[0085] 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℃, 2~3일간 배양해 균수를 측정하였다.

[0086] 세포 실험에 적용 시 앞서 구한 균수를 기준으로 하여 세포 배양에 사용한 배지를 넣고 희석해 생균체로 사용하였다.

[0087] 1-2. 인체유래 각질세포(HaCaT) 세포의 배양

[0088] 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제를 포함한 DMEM 배지(Gibco, USA)에서 인간유래 각질세포(HaCaT)와 DMEM을 1:4의 중량비율로 2~3일에 한 번씩 계대 배양하여 사용하였다(배양 조건: 5% CO₂가 공급되는 37℃ 배양기).

[0089] 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. 인간유래 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 100배 세포배양접시에 넣고 잘 혼합한 후 배양기에서 2~3일간 배양하여 사용하였다.

[0090] 1-3. 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002의 세포 사멸보호효과

[0091] 상기 시험예 1-2의 인체유래 각질세포(HaCaT)를 96(well)에 웰(well)당 2×10^4 cells로 접종한 후, 24~48시간 동안 배양한 후, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다.

[0092] FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 시험예 1-1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체를 1×10^6 CFU/ml의 농도로 용해하여 상기 FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척된 각 웰의 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였고, 이와 동시에 증균속이 포함된 미세먼지인 ERM[®]-CZ120(European Reference Materials, Sigma)을 250 µg/ml의 농도로 상기 각 웰의 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였다.

[0093] 그런다음, 상기 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 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.

- [0094] 한편, 음성대조군으로는 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0095] 또한, 양성대조군으로는 인체유래 각질세포(HaCaT)에 상기 미세먼지 만을 처리한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0096] 여기서, '세포생존율'은 시험 진행 후 미세먼지 및 유산균 처리시의 흡광도를 시험 진행 후 음성대조군의 흡광도로 나눈 값의 백분율을 의미한다.
- [0097] 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0098] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 음성대조군의 세포 생존율 100%를 기준으로 미세먼지 만을 처리한 양성대조군의 경우에는 세포 생존율이 69.6%로 감소하였으나, 미세먼지와 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 동시에 처리한 실험군(HY8002)의 경우에는 세포 생존율이 86.8%까지 증가하였음을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 통하여 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002는 미세먼지 처리에 따른 세포의 사멸을 억제하는 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.
- [0099] <시험예 2>
- [0100] 2-1. 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 RNA 추출
- [0101] 상기 시험예 1-2의 인체유래 각질세포(HaCaT)를 96웰에 웰당 2×10^4 cells로 접종한 후에 24~48시간 동안 배양한 다음, FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척하여 주었다.
- [0102] FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지에 상기 시험예 1-1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체를 1×10^6 CFU/ml의 농도로 용해하여 상기 FBS가 들어가지 않은 DMEM 배지로 1회 세척된 각 웰의 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였고, 이와 동시에 중금속이 포함된 미세먼지인 ERM[®]-CZ120(European Reference Materials, Sigma)를 50 μ g/ml의 농도로 상기 각 웰의 인체유래 각질세포(HaCaT)에 처리하였다.
- [0103] 그런 다음, 상기 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체와 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)를 20~24시간 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)과 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)으로 확인하였다.
- [0104] 한편, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 상기 시험예 1-1의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체 만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다.
- [0105] 또한, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 양성대조군으로는 미세먼지 만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다.
- [0106] 또한, 유전자 발현 변화의 원인을 보다 명확히 하기 위하여 음성대조군으로는 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다.
- [0107] 2-2. 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 미세먼지가 처리된 인체유래 각질세포(HaCaT)에서의 유전자 발현 분석
- [0108] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002가 미세먼지에 대해 세포사멸을 보호하는 효과를 보여, 이를 설명하기 위해 외부물질에 대한 인식 및 독성 조절에 관련있는 CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 및 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1)와 이에 대한 상위 인자인 AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 유전자 발현을 분석하였다.
- [0109] 즉, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체 만을 처리한 경우를 제외한 상기 시험예 2-1의 분리한 각각의 RNA로부터 Omniscript reverse transcription

kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

- [0110] RNA 발현은 Taqman gene expression master mix(Taqman, USA)를 이용하였고, QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System(Applied biosystems, USA)로 분석 및 정량하였다. 이를 위해 사용한 인간유래 프라이머(primer)는 GAPDH(Hs03929097_g1), CYP1A1(Hs01054796_g1), CYP1B1(Hs00164383_m1), AHR(Hs00169233_m1)으로 Tagman사를 통해 주문하여 사용하였다. 유전자 발현의 지표인 Ct(treshhold cycle)를 바탕으로 유전자 발현의 배수차이(fold change)를 계산하였다.
- [0111] 그 결과를 도 2(Ahr 유전자 발현), 도 3(CYP1A1 유전자 발현) 및 도 4(CYP1B1 유전자 발현)에 나타내었다.
- [0112] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 음성대조군의 유전자 발현을 1을 기준으로, 미세먼지 만을 처리한 양성대조군에서는 AhR(Aryl hydrocarbon receptor)의 유전자 발현이 2.4배 증가하였으나, 미세먼지와 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacteirum animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체를 동시에 처리한 실험군(HY8002)에서는 AhR(Aryl hydrocarbon receptor)의 유전자 발현이 0.4배로 감소하였다.
- [0113] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 음성대조군의 유전자 발현 1을 기준으로, 미세먼지 만을 처리한 양성대조군에서는 CYP1A1(Cytochrome P450 1A1)의 유전자 발현이 24.9배 증가하였으나, 미세먼지와 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacteirum animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체를 동시에 처리한 실험군(HY8002)에서는 CYP1A1(Cytochrome P450 1A1)의 유전자 발현이 6.0배로 감소하였다.
- [0114] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인체유래 각질세포(HaCaT)에 아무것도 처리하지 않은 음성대조군의 유전자 발현 1을 기준으로, 미세먼지 만을 처리한 양성대조군에서는 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자 발현이 7.3배 증가하였으나, 미세먼지와 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacteirum animalis ssp. lactis*) HY8002 생균체를 동시에 처리한 실험군(HY8002)에서는 CYP1A1(Cytochrome P450 1A1)의 유전자 발현이 1.6배로 감소하였다.
- [0115] 이상의 도 2 내지 도 4의 실험결과를 종합하여 보면, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacteirum animalis ssp. lactis*) HY8002가 외부 물질에 대한 인식 및 독성 관련 유전자인 AhR(Aryl hydrocarbon receptor), CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 및 CYP1B1(Cytochrome P450 1B1) 유전자를 조절하여 미세먼지에 대한 보호 효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0116]

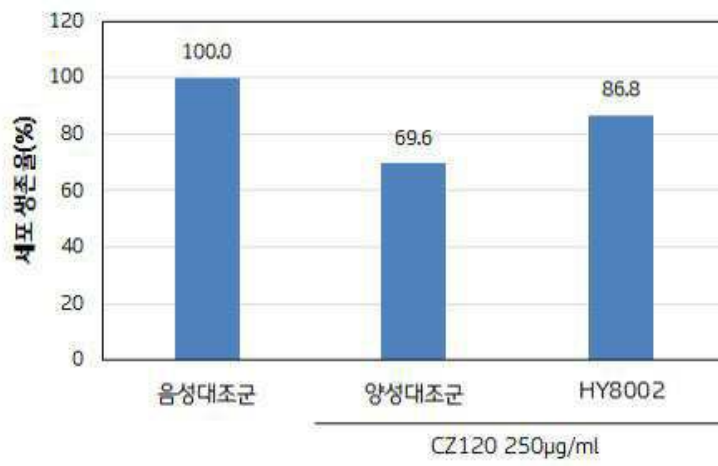
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13279BP

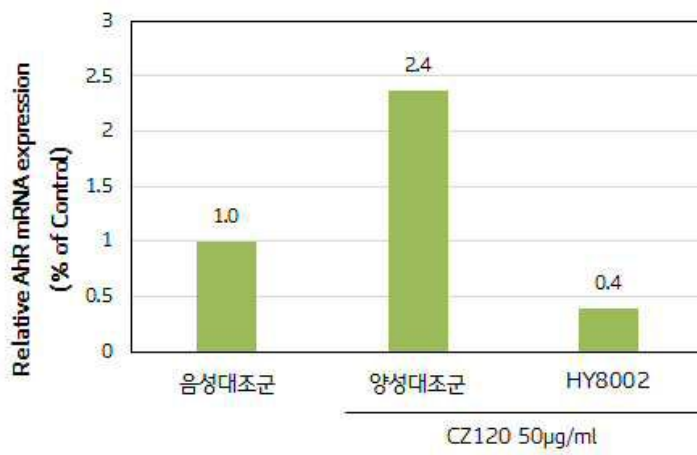
수탁일자 : 20170531

도면

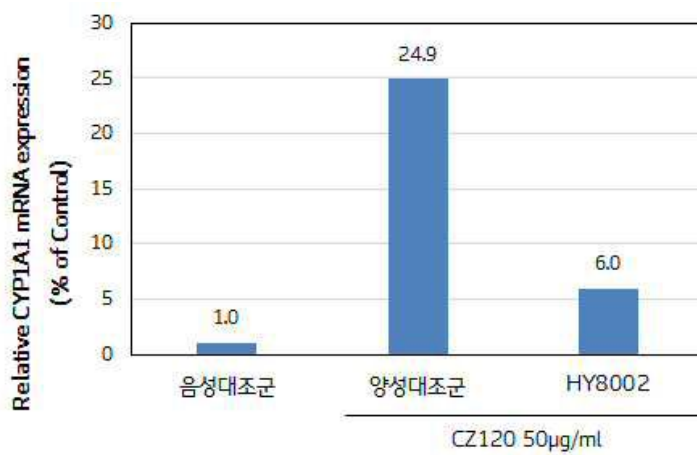
도면1



도면2



도면3



도면4

