



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2011년02월14일  
 (11) 등록번호 10-1014097  
 (24) 등록일자 2011년02월01일

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20* (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2008-0057422  
 (22) 출원일자 2008년06월18일  
 심사청구일자 2008년06월18일  
 (65) 공개번호 10-2009-0131510  
 (43) 공개일자 2009년12월29일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR100611720 B1  
 KR100813637 B1  
 논문 1: Korean J. Food Preservation  
 논문 2: Curr. Microbiol.  
 전체 청구항 수 : 총 16 항

(73) 특허권자  
**주식회사한국야쿠르트**  
 서울 서초구 잠원동 28-10  
 (72) 발명자  
**안영태**  
 경기 수원시 권선구 세류동 1147 미영아파트 109동 312호  
**이호용**  
 경기도 화성시 동탄면 성원아파트 104-702호  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**경일호**

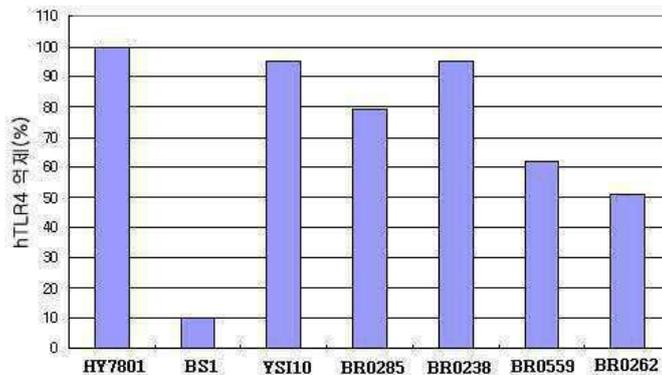
심사관 : 김민정

**(54) 대장의 건강 증진 효능을 갖는 락토바실러스 에스피. 에이취와이 7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 제 품**

**(57) 요약**

본 발명은 대장의 건강 증진 효능을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품에 관한 것으로서, 본 발명의 새로운 락토바실러스 sp. HY7801은 돌연변이 원 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4를 억제함으로써 대장내 돌연변이원 억제, 유해균 억제 및 염증발생 억제를 통하여 대장의 건강을 증진하는 목적으로 새로운 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

**대표도 - 도8**



(72) 발명자

**이정희**

서울 광진구 자양3동 대동아파트 102동 1708호

**김철영**

경기도 수원시 영통구 영통동 947-8 와이티오피스  
텔 615호

**허철성**

충남 천안시 신부동 대림한숲아파트 304동 505호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

대장의 건강 증진 효능을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801(기탁번호:KCTC 11315BP).

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801은 돌연변이원 4-NQO(4-nitroquinoline-1-oxide)에 대한 항돌연 변이능을 갖는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진 효능을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801은 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진 효능을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801은 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진 효능을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801은 박테로이드 멀티아시더스(*Bacteroides multiacidus*)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진 효능을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801은 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제(chondroitinase)활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801은 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4(Toll Like Receptor 4)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801.

### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801은 항염증성 사이토카인 IL-10을 증가시키는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801.

#### 청구항 9

제1항의 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 염증 예방 및 치료용 약학조성물.

#### 청구항 10

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항의 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 염증 예방 및 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 11

제1항의 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 발효유.

#### 청구항 12

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항의 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 발효유.

#### 청구항 13

제1항의 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 음료.

#### 청구항 14

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항의 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 음료.

#### 청구항 15

제1항의 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 건강기능식품.

#### 청구항 16

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항의 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 건강기능식품.

### 명세서

#### 발명의 상세한 설명

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 대장의 건강 증진 효능을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 돌연변이 유발원 4-nitroquinoline-1-oxide(이하 '4-NQO'라 함)에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*)의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제(chondroitinase) 억제 및 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine) 분비와 연관된 Toll Like Receptor 4(이하 'TLR4'라 함)를 억제함으로써 대장내 돌연변이원 억제, 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 최근에 서구형 식습관 등에 의해 대장질환이 지속적으로 늘어나고 있다. 대장항문 전문 대학병원 대장암센터는 1997년부터 2003년에 대장검사를 처음 받은 4만 764명을 분석한 결과 대장질환 이상증상이 42%로 나타났다고 밝혔다. 이중에는 대장용종이 36%로 가장 많아, 대장용종은 2001년 33%, 2002년 38.5%, 2003년에는 42.6%로 3년 전보다 약 10%의 증가했다. 그 다음으로 대장암이 2.8%, 대장염이 2.3%, 기타(만성염증, 궤양성대장염 등) 0.9% 순으로 나타났다. 이러한 대장질환이 증가하는 것은 고지방식과 지나친 육류 섭취나 인스턴트 음식 등 서구형 식생활과 유전적인 요인이 크게 작용하는 것으로 보고되었다. 대장의 선종성 용종이 이행성의 과정을 거쳐 대장암으로 진행되는 데에는 여러 단계에서의 분자생물학적 변화가 DNA에서 발생되는데 이러한 DNA의 변화는 암유전자(oncogene)의 활성화와 종양억제유전자(tumor suppressor gene) 기능의 손실이 축적되면서 대장 점막의 증식 양상을 변화시킴으로써 대장암의 발생에 기여하게 된다. 식이에 의한 발암 기전 중에서 동물성 지방은 담즙산의 분비를 증가시키는데 담즙산은 대장 상피 세포의 증식을 증가시키고 세포막의 변화를 가져오며 세포증식을 촉진하는 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2)의 생성을 증가시킨다. 또한 대장 장내 세균총에서 2차 담즙산 생성을 촉진하는 혐기성 세균의 증식을 초래하는데 2차 담즙산은 발암 물질로 알려져 있다. 그리고 동물성 고단백질식도 대사과정에서 아미노산으로 분해된 후 부패미생물에 의하여 트립토판 대사산물(indole, skatole 등), 암모니아, 페놀, 아민, 니트로소(nitroso) 화합물로 변화되어 발암물질로 작용한다.

[0003] 정상 장내 세균총은 약 500여종의 박테리아로 이루어져 있으며, 회장과 대장에 많이 존재한다. 장내 세균총은 그람 양성균의 균체내독소(endotoxin)와 같은 독소와 세포독성물질 또는 발암물질을 생산하는 베타-글루루쿠로니데이즈( $\beta$ -glucuronidase) 그리고 트립토판에이즈(tryptophanase)와 같은 유해한 효소를 생산한다. 세포독소(cytotoxin)와 균체내독소(endotoxin)는 선천성 면역반응(innate immune response)의 잠재적 자극원으로 대장 상피세포에서 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)을 분비시켜 염증성 장질환을 유발시킨다. 일반적으로 장내세균이 많은 위치에서 염증성 장질환이 주로 발생된다. 염증성 장질환은 무균동물(germ-free animals)에서는 쉽게 발생되지 않는다. 이것은 장내 세균총이 대장 염증의 발생과 지속에서 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 특히 대장균(*Escherichia coli*), 클로스트리움 디피실리균(*Clostridium difficile*), 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*)등이 궤양성 장질환의 발병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 대장에 존재하는 박테로이데스(*Bacteroides*)는 암모니아, 아민, 인돌 등을 생산하고 클로스트리움(*Clostridium*), 유박테리움(*Eubacterium*)은 2차 담즙산 등의 해로운 물질을 생산하여 숙주에게 유해한 균으로 알려져 있다. 그리고 이 유해균들은 숙주가 섭취한 단백질, 지방, 배당체 등으로부터 암모니아, 황화수소, 아민, 인돌, 니트로소 아민, 페놀성 화합물 등의 유해물질을 생산하게 하는 효소를 생산하며, 발암과 관계있는 베타-글루루코시데이즈( $\beta$ -glucosidase) 활성이 매우 높다.

[0004] 정상적인 위장관 조직의 점액질부위에는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan, GAG)이 다량 존재하며, 염증성 대장염 환자의 경우 정상인에 비해 글리코사미노글리칸의 조성이 달라진다. 콘드로이틴(chondroitin)과 더마틴(dermatin)은 글리코사미노글리칸의 주요 구성 성분중의 하나이다. 따라서 콘드로이틴 분해 효소인 콘드로이티나제(chondroitinase)의 활성을 저해함으로써 대장염을 예방 혹은 완화할 수 있다. 또한 Sol1 등은 인위적으로 콘드로이틴항산을 주입함으로써 인간과 동물의 관절이 염증과 같은 외상으로부터 비롯한 이 염증 완화를 확인하였다(미국특허 제5,498,606호).

[0005] 이러한 목적으로 장내 유익균인 유산균(lactobacilli) 및 비피도박테리아(bifidobacteria)를 이용한 프로바이오틱스(Probioitcs) 제품들이 많이 개발되었다. 이러한 유산균 프로바이오틱스는 항생제 연관 설사, 여행자 설사 등의 질환에서부터 과민성 장증후군, 염증성 장질환의 치료효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 현재까지 알려져 있는 프로바이오틱스의 효능에 관한 기전은 다음과 같다. 투여된 프로바이오틱스가 장내에서 군락화해서

병원균의 활성화와 성장, 장상피세포와의 접촉 등을 방해하는 것이다. 다음으로는 장상피세포나 점막 면역세포와의 관계를 통해서 숙주의 면역기능을 조절하거나 항진하고 장벽 기능(barrier function)을 강화시키는 것이다. 이러한 사실은 프로바이오틱스의 균주 자체가 장상피세포나 면역세포의 수용체를 통해 인식이 되거나 균주에서 분비된 효소나 단백질들을 통해서 세포 신호 전달 과정을 변화시키는 과정이 알려짐으로써 확인이 되었다.

[0006] 선천성 면역계(innate immunity)에서 가장 중요한 역할을 하는 TLR(Toll Like Receptor)은 병원성 미생물이 갖는 특이적인 분자패턴(pathogen-associated molecular patterns)을 인지하는데, TLR4는 그람 음성균의 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, 이하 'LPS'라고 함)를 인지함으로써 전염증성 유전자의 전사인자인 nuclear factor- $\gamma$ B(NF- $\gamma$ B) 경로를 통해 전염증성 사이토카인이 생산된다. 최근에 유산균이 TLR4를 억제시켜 유산균의 장내 면역증가와 관련하여 유산균이 대장염을 완화시켜 주는 것으로 보고되었다. 사이토카인은 대표적인 인체 면역을 위한 호르몬이며 면역관련 세포의 분화와 기능에 직접적인 영향을 끼친다. 그 중에서 인터루킨-10(IL-10)은 항염증 작용을 나타내며, 인터루킨 -12(IL-12), IFN- $\gamma$  등은 염증을 촉진하는 작용을 나타낸다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

[0007] 본 발명은 돌연변이원 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*)의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4를 억제함으로써 대장내 돌연변이원 억제, 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제 해결수단**

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 돌연변이 유발원 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*)의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4를 억제함으로써 대장내 돌연변이원 억제, 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0009] 이하, 본 발명을 좀 더 상세히 설명한다.

[0010] 본 발명에 따른 신균주를 분리하기 위하여 건강한 한국인 성인의 분변을 0.02% 소듐 아지드(sodium azide)가 포함된 엠알에스(MRS) 액체 배지에 넣고 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 10 $\mu$ l 백균이를 사용하여 배양액을 취하여 다시 0.02% 소듐 아지드가 포함된 엠알에스 한천 평판배지에 도말하고 37℃에서 48시간동안 배양하였다. 형성된 균락 중에서 돌연변이 유발원 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4 억제를 시험하여 본 발명의 신균주를 분리하였다.

[0011] 본 발명에 따른 신균주의 특성은 다음과 같다.

[0012] 1)균의 형태

[0013] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성

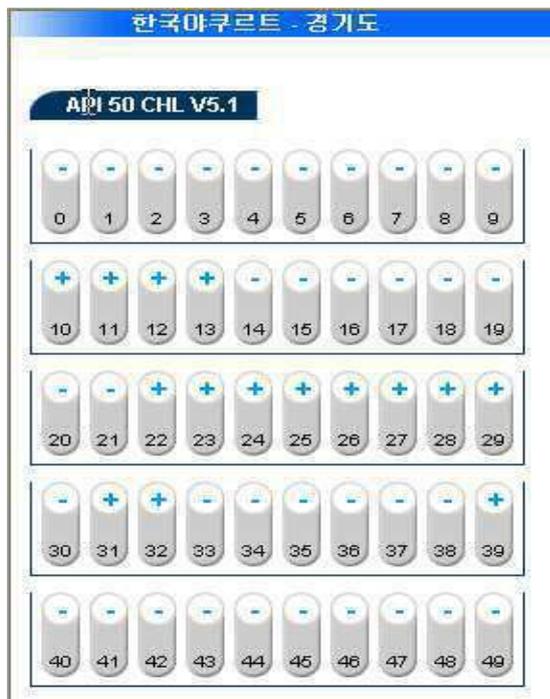
[0014] ① 세포의 형태: 간균

[0015] ② 운동성: 없음

[0016] ③ 포자형성능: 없음

- [0017]           ④ 그람(Gram) 염색: 양성
- [0018]   2)균락의 형태
- [0019]           엠탄에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균락의 형태
- [0020]           ① 형상: 원형
- [0021]           ② 용기: 볼록
- [0022]           ③ 표면: 매끄러움(Smooth)
- [0023]   3)생리적 성질
- [0024]           ① 최적 생육온도: 36~38℃
- [0025]           ② 최적 생육 pH: 6.0~6.5
- [0026]           ③ 산소에 대한 영향: 통성혐기성
- [0027]   4)카탈라제: -
- [0028]   5)가스형성여부: -
- [0029]   6)15℃에서 생육: -
- [0030]   7)45℃에서 생육: +
- [0031]   8)인돌생산: -
- [0032]   9)젖산생산: +
- [0033]   10)당이용성 검사
- [0034]   Api 50CHL kit(BIOMERIEUX)을 이용하여 당이용성 검사를 하였다.
- [0035]   그 결과를 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

**표 1**



[0036]

표 2

HY7801

GOOD IDENTIFICATION TO THE GENUS	
스트립	API 50 CHL V5.1
숫자화된 생화학적 패턴	-----++++-----++++-----+
참고사항	

동정결과	% ID	T Index	상반되는 생화학적 특성(Test against)
<b>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis 2</b>	<b>52.3</b>	<b>0.94</b>	<b>GAL 20%</b>
<b>Lactobacillus acidophilus 1</b>	<b>40.3</b>	<b>1.0</b>	

[0037]

[0038]

[0039]

[0040]

[0041]

11) 16S rDNA 분석

16S rDNA 분석을 통한 분자유전학적인 방법을 실시하여 본 발명의 신균주를 동정하였다.

16S rDNA 염기 서열 분석 결과를 표 3에 나타내었다( <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>).

표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 신균주의 16S rRNA 유전자는 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 선토리우스(*Lactobacillus suntoryeus*) 및 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*)의 16S rRNA 유전자와 100% 일치하는 것으로 확인되었다.

표 3

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">AY763430.1</a>	Lactobacillus acidophilus strain LHS 16S ribosomal RNA gene, partial s	2610	2610	100%	0.0	100%	
<a href="#">AY675251.1</a>	Lactobacillus suntoryeus strain LHS 16S ribosomal RNA gene, complet	2610	2610	100%	0.0	100%	
<a href="#">AY644397.1</a>	Lactobacillus suntoryeus strain M4 16S ribosomal RNA gene, partial se	2604	2604	100%	0.0	99%	
<a href="#">AY029223.1</a>	Lactobacillus sp. Y10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	
<a href="#">AY445815.1</a>	Lactobacillus suntoryeus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	
<a href="#">AY675248.1</a>	Lactobacillus suntoryeus strain LH 16S ribosomal RNA gene, complete	2599	2599	100%	0.0	99%	
<a href="#">AY763429.1</a>	Lactobacillus acidophilus strain LH4 16S ribosomal RNA gene, partial s	2593	2593	100%	0.0	99%	
<a href="#">AY675250.1</a>	Lactobacillus suntoryeus strain LH4 16S ribosomal RNA gene, complet	2593	2593	100%	0.0	99%	
<a href="#">EF533989.1</a>	Lactobacillus suntoryeus strain IDCC 3101 16S ribosomal RNA gene, i	2577	2577	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU420177.1</a>	Lactobacillus helveticus strain GMRS58 16S ribosomal RNA gene, part	2571	2571	100%	0.0	99%	
<a href="#">A3417737.1</a>	Lactobacillus oalinarum partial 16S rRNA gene and internal transcribe	2571	2571	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU483108.1</a>	Lactobacillus helveticus strain LL8 16S ribosomal RNA gene, partial se	2566	2566	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU419588.1</a>	Lactobacillus helveticus strain KLDS 1.0614 16S ribosomal RNA gene,	2566	2566	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU419587.1</a>	Lactobacillus helveticus strain KLDS 1.0612 16S ribosomal RNA gene,	2566	2566	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU377824.1</a>	Lactobacillus helveticus strain C09 16S ribosomal RNA gene, partial si	2566	2566	100%	0.0	99%	
<a href="#">EF536361.1</a>	Lactobacillus helveticus strain ZL12-1 16S ribosomal RNA gene, partia	2566	2566	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU419586.1</a>	Lactobacillus helveticus strain KLDS 1.0603 16S ribosomal RNA gene,	2560	2560	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU377823.1</a>	Lactobacillus helveticus strain C06 16S ribosomal RNA gene, partial si	2560	2560	100%	0.0	99%	
<a href="#">AB008210.1</a>	Lactobacillus helveticus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: )	2560	2560	100%	0.0	99%	
<a href="#">CPQ00517.1</a>	Lactobacillus helveticus DPC 4571, complete genome	2560	1.024e+04	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU183494.1</a>	Lactobacillus helveticus strain D5401 16S ribosomal RNA gene, partial	2560	2560	100%	0.0	99%	
<a href="#">AB362629.1</a>	Lactobacillus helveticus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: f	2560	2560	100%	0.0	99%	
<a href="#">AY369116.1</a>	Lactobacillus helveticus strain NCIMB 11971 16S ribosomal RNA gene	2560	2560	100%	0.0	99%	
<a href="#">AM113779.1</a>	Lactobacillus helveticus partial 16S rRNA gene, strain type strain: DSM	2560	2560	100%	0.0	99%	

[0042]

[0043]

이상에서 같은 본 발명의 신균주의 형태학적 특성, 생리적 및 성장 특성, Api 50CHL kit(BIOMERIEUX)의 당이용

성 및 16S rDNA 분석을 통한 분자유전학적인 방법에 근거하여 동정한 결과, 본 발명의 신균주는 락토바실러스속(Genus of *Lactobacillus*)에 속하는 것으로 확인되었으나, 종(species)까지는 동정하지 못하였다.

[0044] 따라서 본 발명자들은 본 발명의 신균주를 락토바실러스(*Lactobacillus*) sp. HY7801로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2008년 4월 17일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC 11315BP).

[0045] 한편, 본 발명의 돌연변이원인 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4 억제 효능을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 대장의 건강 증진용 약학 조성물은 단독 또는 약제학적으로 사용되는 부형제들과 함께 약제학적으로 통상으로 사용되는 방법에 따라 정제, 캡슐제 등과 같은 제제형태로 제제화하여 사용될 수 있다.

[0046] 사람의 경우, 통상적인 1일 투여량은 1~30mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 실제 투여량은 투여경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 건강상태 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다.

[0047] 물론, 상기 대장의 건강 증진용 약학조성물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0048] 또한, 본 발명의 돌연변이 유발원인 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4 억제 효능을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 대장의 건강 증진용 발효유는 유산균배양액과 락토바실러스 sp. HY7801 및 혼합과즙시럽을 일정비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 발효유를 제조한다.

[0049] 또한, 본 발명의 돌연변이원인 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4 억제 효능을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 대장의 건강 증진용 음료는 혼합과즙시럽, 락토바실러스 sp. HY7801 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성음료를 제조한다.

[0050] 또한, 본 발명의 돌연변이원인 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4 억제 효능을 갖는 새로운 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 대장의 건강 증진용 건강기능식품은 상기 락토바실러스 sp. HY7801을 포함하는 것 이외에 영양보조성분으로서 비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아마이드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

### 효 과

[0051] 이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 돌연변이 유발원인 4-NQO에 대한 항돌연변이, 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스와 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 억제 및 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4를 억제함으로써 대장내 돌연변이원 억제, 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 통하여 대장의 건강을 증진하는 목적으로 이용될 수 있다.

### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0052] 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.
- [0053] <실시예 1>
- [0054] 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 제조
- [0055] 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 식품원료용 Proteose peptone #3, Yeast Extract, Beef Extract 및 포도당을 첨가한 액체배지를 제조하여 37℃에서 약 16시간 배양한 후 배양액을 원심분리하고 멸균된 생리식염수로 세척한 다음 멸균유에 분산하였다. 다시 동결 건조하여 동결건조 분말 1그램(g)당 약  $10^{11}$  cfu 균수를 얻었다. 이 동결건조 분말을 대장의 건강 증진 소재로 사용하였다.
- [0056] 한편, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 상기와 같이 동결건조된 분말 형태 또는 배양물 형태로 제공될 수 있다.
- [0057] <실시예 2>
- [0058] 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조
- [0059] 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0060] 정제의 제조
- [0061] 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg, 폴리비닐피롤리돈 97mg의 원료를 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 2mg을 가하여 혼합한 후 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.
- [0062] 캡슐제의 제조
- [0063] 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 100mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 완전히 혼합한 후 통상의 캡슐제의 제조 방법에 따라서 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0064] <실시예 3>
- [0065] 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0066] 유산균 배양액과 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 및 혼합과즙시럽으로 구성된 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0067] 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 6.65~6.70, 20℃에서의 Brix<sup>o</sup>는 16.3~16.5%정도가 되도록 혼합하였다. 그런 다음, 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 40℃로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스 균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간동안 배양하여, BCP 배지에서의 총 유산균수가  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.
- [0068] 혼합과즙시럽은 액상과당 10~15중량%, 백설탕 3~5중량%, 혼합과즙농축액 56 Brix<sup>o</sup> 10~15중량%, 펙틴 0.1~1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.05~0.15중량% 및 정제수 61.85~78.85중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0069] 상기의 방법으로 제조된 유산균 배양액 65~75중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결

건조분말 0.001~0.1중량% 및 상기 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 24.9~34.999중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 항돌연변이, 장내 유해균 억제, 콘드로이티나제 활성 억제 및 TLR4 억제 효능을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.

- [0070] <실시에 4>
- [0071] 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 하는 음료
- [0072] 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말과 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0073] 혼합과즙시럽은 액상과당 10~15중량%, 백설탕 3~5중량%, 갈색설탕 3~5중량%, 혼합과즙농축액 56 Brix<sup>o</sup> 10~15중량%, 펙틴 0.1~1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.05~0.15중량% 및 정제수 58.85~73.85중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0074] 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 29.9~39.999중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 0.001~0.1중량% 및 멸균 정제수 60~70중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 항돌연변이, 장내 유해균 억제, 콘드로이티나제 활성 억제 및 TLR4 억제 효능을 갖는 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0075] <실시에 5>
- [0076] 락토바실러스 sp. HY7801을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품
- [0077] 상기 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 0.001~0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드), 올리고당을 상기의 실시예 1의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 동결건조분말 100중량%에 대하여 5~10중량%가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물에 멸균 정제수 10중량%를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 40~50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후, 12~14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.
- [0078] <시험예 1>
- [0079] 락토바실러스 sp. HY7801의 유해균 억제활성 측정
- [0080] 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801의 장내 유해균인 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*), 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 활성을 갖는 박테로이드 멀티아시더스(*Bacteroides multiacidus*)의 억제효과를 시험하였다.
- [0081] 1-1 락토바실러스 sp. HY7801의 클로스트리디움 퍼프린젠스의 억제활성 측정
- [0082] (1)엠폴에스 액체배지에서 약 20시간 배양된 락토바실러스 sp. HY7801과 갬(GAM) 액체배지에서 약 24시간 배양된 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) KCCM12098을 GAM 액체배지에 1%씩 접종한 다음, 37℃에서 약 20시간 혐기적 조건에서 혼합 배양하였다. 그런 다음, 클로스트리디아(*Clostridia*) 선택배지(Nissui)를 사용하여 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098의 생균수를 측정하였다.
- [0083] (2)락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) BS1, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) YS-I10, 락토바실러스 파라케이시아이(*Lactobacillus paracasei*) A3-4, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) EJ-I3, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K4-7, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K5-8 각각에 대하여도 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801과 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098의 혼합배양방법과 동일한 방법으로 혼합배양을 하여 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098의 생균수를 측정하였다.

- [0084] (3)대조구로 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098을 단독으로 GAM 액체배지에 1% 접종한 다음 37℃에서 약 20시간 혐기적 조건에서 단독 배양한 다음, 클로스트리디아(Clostridia) 선택배지(Nissui)를 사용하여 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098의 생균수를 측정하였다.
- [0085] 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0086] 도 1의 가로축에는 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098을 단독 배양한 균을 'KCCM12098'로 표시하고, 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098과 락토바실러스 sp. HY7801을 혼합 배양한 균을 'HY7801'로 표시하고, 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098과 락토바실러스 플라타룸 BS1을 혼합 배양한 균을 'BS1'로 표시하고, 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098과 락토바실러스 플라타룸 YS-I10을 혼합 배양한 균을 'YS-I10'로 표시하고, 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098과 락토바실러스 파라케이시아이 A3-4를 혼합 배양한 균을 'A3-4'로 표시하고, 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098과 락토바실러스 sp. EJ-I3을 혼합 배양한 균을 'EJ-I3'로 표시하고, 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098과 락토바실러스 sp. K4-7을 혼합 배양한 균을 'K4-7'로 표시하고, 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098과 락토바실러스 sp. K5-8을 혼합 배양한 균을 'K5-8'로 하여 표시하였다.
- [0087] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098을 단독 배양한 경우의 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098의 생균수와 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 상기 유산균들과 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098을 혼합 배양한 경우의 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098의 생균수를 비교하였을 때, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 상기 유산균들과 혼합 배양한 경우에 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098의 생균수가 감소하는 것을 알 수 있었다.
- [0088] 특히, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801과 혼합 배양하였을 때 클로스트리디움 퍼프린젠스 KCCM12098의 생균수가 7.8 Log<sub>10</sub> cfu/ml로 감소효과가 가장 크게 나타나, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801이 클로스트리디움 퍼프린젠스의 증식을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.
- [0089] 1-2 락토바실러스 sp. HY7801의 박테로이데스 불가투스의 억제활성 측정
- [0090] (1)엠탄에스 액체배지에서 약 20시간 배양된 락토바실러스 sp. HY7801과 갬(GAM) 액체배지에서 약 24시간 배양된 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*) KCCM11423을 GAM 액체배지에 1%씩 접종한 다음, 37℃에서 약 20시간 혐기적 조건에서 혼합 배양하였다. 그런 다음, 박테로이데스(*Bacteroides*) 선택배지(Nissui)를 사용하여 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수를 측정하였다.
- [0091] (2)락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) BS1, 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) YS-I10, 락토바실러스 파라케이시아이(*Lactobacillus paracasei*) A3-4, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) EJ-I3, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K4-7, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K5-8 각각에 대하여 도 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801과 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 혼합배양방법과 동일한 방법으로 혼합배양을 하여 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수를 측정하였다.
- [0092] (3)대조구로 박테로이데스 불가투스 KCCM11423을 단독으로 GAM 액체배지에 1% 접종한 다음 37℃에서 약 20시간 혐기적 조건에서 단독 배양한 다음, 박테로이데스(*Bacteroides*) 선택배지(Nissui)를 사용하여 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수를 측정하였다.
- [0093] 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0094] 도 2의 가로축에는 박테로이데스 불가투스 KCCM11423을 단독 배양한 균을 'KCCM11423'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 락토바실러스 sp. HY7801을 혼합 배양한 균을 'HY7801'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 락토바실러스 플라타룸 BS1을 혼합 배양한 균을 'BS1'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 락토바실러스 플라타룸 YS-I10을 혼합 배양한 균을 'YS-I10'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 락토바실러스 파라케이시아이 A3-4를 혼합 배양한 균을 'A3-4'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 락토바실러스 sp. EJ-I3을 혼합 배양한 균을 'EJ-I3'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스

KCCM11423과 락토바실러스 sp. K4-7을 혼합 배양한 균을 'K4-7'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 락토바실러스 sp. K5-8을 혼합 배양한 균을 'K5-8'로 하여 표시하였다.

[0095] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423을 단독 배양한 경우의 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수와 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 상기 유산균들과 박테로이데스 불가투스 KCCM11423을 혼합 배양한 경우의 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수를 비교하였을 때, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 상기 유산균들과 혼합 배양한 경우 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수가 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0096] 특히, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801과 혼합 배양하였을 때 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수가 7.0 Log<sub>10</sub> cfu/ml로 감소효과가 가장 크게 나타나, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801이 박테로이데스 불가투스의 증식을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0097] 1-3 락토바실러스 sp. HY7801의 박테로이드 물티아시더스의 억제활성 측정

[0098] (1)엠알에스 액체배지에서 약 20시간 배양된 락토바실러스 sp. HY7801과 갬(GAM) 액체배지에서 약 24시간 배양된 박테로이드 물티아시더스(*Bacteroides multiacidus*) BJY6을 GAM 액체배지에 1%씩 접종한 다음, 37℃에서 약 20시간 혐기적 조건에서 혼합 배양하였다. 그런 다음, 박테로이데스(*Bacteroides*) 선택배지(Nissui)를 사용하여 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수를 측정하였다.

[0099] (2)락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) BS1, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) YS-I10, 락토바실러스 파라케이시아이(*Lactobacillus paracasei*) A3-4, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) EJ-I3, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K4-7, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K5-8 각각에 대하여 도 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801과 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 혼합배양방법과 동일한 방법으로 혼합배양을 하여 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수를 측정하였다.

[0100] (3)대조구로 박테로이드 물티아시더스 BJY6을 단독으로 GAM 액체배지에 1% 접종한 다음 37℃에서 약 20시간 혐기적 조건에서 단독 배양한 다음, 박테로이데스(*Bacteroides*) 선택배지(Nissui)를 사용하여 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수를 측정하였다.

[0101] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0102] 도 3의 가로축에는 박테로이드 물티아시더스 BJY6을 단독 배양한 균을 'BJY6'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 락토바실러스 sp. HY7801을 혼합 배양한 균을 'HY7801'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 락토바실러스 플란타럼 BS1을 혼합 배양한 균을 'BS1'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 락토바실러스 플란타럼 YS-I10을 혼합 배양한 균을 'YS-I10'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 락토바실러스 파라케이시아이 A3-4를 혼합 배양한 균을 'A3-4'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 락토바실러스 sp. EJ-I3을 혼합 배양한 균을 'EJ-I3'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 락토바실러스 sp. K4-7을 혼합 배양한 균을 'K4-7'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 락토바실러스 sp. K5-8을 혼합 배양한 균을 'K5-8'로 하여 표시하였다.

[0103] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 박테로이드 물티아시더스 BJY6을 단독배양한 경우의 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수와 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 상기 유산균들과 박테로이드 물티아시더스 BJY6을 혼합 배양한 경우의 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수를 비교하였을 때, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 포함한 상기 유산균들과 혼합 배양한 경우 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수가 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0104] 특히, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801과 혼합 배양하였을 때 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수가 7.0 Log<sub>10</sub> cfu/ml로 감소효과가 가장 크게 나타나, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801이 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 증식을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

- [0105] <시험예 2>
- [0106] 락토바실러스 sp. HY7801의 콘드로이티나제 활성억제
- [0107] 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801의 콘드로이티나제 활성억제 여부는 Aguiar와 Michelacci(1999. Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography. Braz. J. Med. Biol. Res. 32:545-550.)의 방법을 변형하여 실시하였다.
- [0108] (1)엠폰에스 액체배지에서 약 20시간 배양한 락토바실러스 sp. HY7801을 원심분리하여 100mM 포타슘 포스페이트 완충용액(potassium phosphate buffer, pH7.0)으로 세척한 후 균체를 회수하였다. 이렇게 회수된 균체를 다시 동량의 100mM 포타슘 포스페이트 완충용액에 분산시키고 균체 현탁액을 시험에 사용하였다.
- [0109] 상기 균체 현탁액 100 $\mu$ l에 800 $\mu$ l의 100mM 포타슘 포스페이트 완충용액, 50 $\mu$ l의 콘드로이틴 설페이트 A(Sigma), 50 $\mu$ l의 1U 콘드로이티나제 ABC(Sigma)를 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 약 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 8,000rpm에서 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액 20 $\mu$ l를 취하여 200 $\mu$ l의 디메틸메틸렌블루(Dimethylmethylen blue; DMMB) 시약과 반응시켰다. 약 5분간 실온에서 방치한 다음 525nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0110] 억제활성은 아래와 같이 계산하였다.
- $$\text{Inhibition of chondroitinase activity} = 100 \times \frac{(\text{O.D. without cell suspension} - \text{O.D. with cell suspension})}{\text{O.D. without cell suspension}}$$
- O.D. without : O.D. in chondroitinase without lactic acid bacterial cell suspension.
- O.D. with : O.D. in chondroitinase with lactic acid bacterial cell suspension.
- [0111]
- [0112] 상기 디메틸메틸렌블루 시약은 16mg의 DMMB(Sigma)를 3.04g의 글리신(glycine, Sigma), 2.37g의 염화나트륨(NaCl), 95ml의 0.1M 염산(HCl)이 함유된 1L의 증류수에 넣어 용해시켜 pH 3.0에서 흡광도가 0.31(525nm)이 되도록 하였다(Farndale, R. W., D. J. Buttle, and A. J. Barrett. 1986. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by the use of dimethylmethylen blue. Biochimica et Biophysica Acta. 883:173-177.).
- [0113] (2)사멸균에 의한 콘드로이티나제 활성 억제를 시험하고자 락토바실러스 sp. HY7801 배양액을 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 열처리하여 락토바실러스 sp. HY7801을 사멸시킨 다음, 락토바실러스 sp. HY7801 균체를 멸균 증류수로 1회 세척하였다. 그런 다음, 사멸된 락토바실러스 sp. HY7801 균체를 다시 멸균 증류수에 분산시킨 다음, 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801 세포의 콘드로이티나제 활성 억제 측정방법과 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다.
- [0114] (3)락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) BS1, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) YS-I10, 락토바실러스 파라케이시아이(*Lactobacillus paracasei*) A3-4, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) EJ-I3, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K4-7, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K5-8 각각에 대하여도 상기(1)의 락토바실러스 sp. HY7801 생균의 콘드로이티나제 활성억제 측정방법과 상기(2)의 락토바실러스 sp. HY7801 사멸균의 콘드로이티나제 활성억제 측정방법과 동일한 방법으로 콘드로이티나제 활성억제를 측정하였다.
- [0115] 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0116] 도 4의 가로축에는 락토바실러스 sp. HY7801, 락토바실러스 플란타럼 BS1, 락토바실러스 플란타럼 YS-I10, 락토바실러스 파라케이시아이 A3-4, 락토바실러스 sp. EJ-I3, 락토바실러스 sp. K4-7, 락토바실러스 sp. K5-8을 각각 'HY7801', 'BS1', 'YS-I10', 'A3-4', 'EJ-I3', 'K4-7', 'K5-8'로 하여 표시하였다.
- [0117] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801를 포함한 상기 유산균들의 살아있는

세포 및 사멸세포에서 모두 콘드로이티나제 활성을 억제하는 것이 확인되었다.

- [0118] 특히, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 살아있는 세포에서 97.3%, 사멸세포에서 88.2%의 콘드로이티나제 억제활성을 나타내 가장 높은 콘드로이티나제 억제활성을 가짐을 알 수 있었다.
- [0119] <시험예 3>
- [0120] 락토바실러스 sp. HY7801의 돌연변이원 4-NQO의 구조상 변형정도 측정
- [0121] 본 시험에 사용한 돌연변이원은 4-NQO로 DMSO에 1mg/ml 농도로 녹여 stock solution을 제조하였다. 돌연변이원 4-NQO는 365nm에서 최대 흡광과장을 가진다. 그런데, 돌연변이원 4-NQO는 분자구조상의 변형이 생기면 그 변형 정도에 따라 돌연변이원의 기능을 못하게 되는데, 이때 최대 흡광과장도 변화하게 된다.
- [0122] (1)본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 엠알에스 액체배지에 접종하고 37℃에서 overnight 배양한 후 균체를 회수하여 세척한 후 10ml의 생리식염수에 다시 분산시켰다. 상기 락토바실러스 sp. HY7801 현탁액에 돌연변이원 4-NQO stock solution을 0.1mM 농도가 되도록 첨가한 다음 37℃에서 150분간 100rpm으로 반응시켰다. 반응 완료 후 원심분리한 다음 상등액을 취하여 제공하고 돌연변이원 변형시험 반응물로 사용하였다.
- [0123] UV-Visible spectrophotometer(Perkin-elmer)를 이용하여 300~500nm에서 상기 돌연변이원 변형시험 반응물내 돌연변이원 4-NQO의 흡광도 변화를 관찰하였다(Caldini, G., F. Trotta, M. Villarini, M. Moretti, R. Pasquini, G. Scassellati-Sforzolini, and G. Cenci. 2005. Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by microbial and mammalian cell-based tests. Int.J. Food Microbiol. 102:37-47.).
- [0124] (2)마찬가지로, 락토바실러스 플란타럼 BS1과 락토바실러스 플란타럼 YS-I10의 돌연변이원 4-NQO의 구조 변형능을 측정하기 위하여 상기 (1)의 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801의 돌연변이원 4-NQO의 구조 변형능 측정방법과 동일한 방법으로 4-NQO 변형능을 측정하였다.
- [0125] (3)대조구로는 상기 유산균들 대신 멸균 증류수를 첨가하여 상기 (1)의 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801의 돌연변이원 4-NQO의 구조 변형능 측정방법과 동일한 방법으로 4-NQO 변형능을 측정하였다.
- [0126] 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0127] 도 5의 'HY7801'은 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801의 돌연변이원 4-NQO의 구조 변형능 측정결과를 나타내고, 'BS-1'은 락토바실러스 플란타럼 BS1의 돌연변이원 4-NQO의 구조 변형능 측정결과를 나타내며, 'YS-I10'은 락토바실러스 플란타럼 YS-I10의 돌연변이원 4-NQO의 구조 변형능 측정결과를 나타낸다.
- [0128] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801이 돌연변이원 4-NQO의 구조상 변형을 유발하여 돌연변이원 4-NQO에 대한 항돌연변이능이 우수함을 알 수 있었다.
- [0129] <시험예 4>
- [0130] 락토바실러스 sp. HY7801의 세포생존율(Cell viability) 측정
- [0131] 상기 시험예 3의 돌연변이원 변형시험 반응물에 의한 Caco-2 세포의 생존율(viability)을 측정하였다. 돌연변이원은 Caco-2 세포에 DNA 손상을 입혀 세포생존율(cell viability)을 감소시킨다.
- [0132] (1)Caco-2 cell은 10% foetal calf serum과 2% 항생제를 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 Caco-2 cell 약  $1 \times 10^6$  cells을 24 well plate에 분주하여 37℃에서 18시간 동안 배양한 후, 상기 시험예 3의 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801와 돌연변이원 4-NQO를 반응시킨 돌연변이원 변형시험 반응물 100 $\mu$ l를 첨가하여 다시 37℃에서 18시간 동안 반응시킨 다음, 상기 Caco-2 cell을 DMEM 배지로 두 번 세척하고 100 $\mu$ l씩 opaque-walled 96 well에 분주하고 30분간 상온에 방치한 다음, CellTiter-Glo Luminescent cell viability assay kit(Promega)를 이용하여 세포생존율을 측정하였다.
- [0133] (2)락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) BS1, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)

YS-I10, 락토바실러스 파라케이시아이(*Lactobacillus paracasei*) A3-4, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) EJ-I3, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K4-7, 락토바실러스 sp.(*Lactobacillus* sp.) K5-8 각각에 대하여 도 상기 (1)의 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 세포생존율을 측정하였다.

- [0134] 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0135] 도 6의 가로축에는 락토바실러스 sp. HY7801, 락토바실러스 플란타럼 BS1, 락토바실러스 플란타럼 YS-I10, 락토바실러스 파라케이시아이 A3-4, 락토바실러스 sp. EJ-I3, 락토바실러스 sp. K4-7, 락토바실러스 sp. K5-8의 세포생존율 측정결과를 각각 'HY7801', 'BS1', 'YS-I10', 'A3-4', 'EJ-I3', 'K4-7', 'K5-8'로 하여 표시하였다.
- [0136] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801과 돌연변이원 4-NQO를 반응시킨 돌연변이원 변형시험 반응물에서 Caco-2 세포의 생존율이 약 94%로 가장 높게 나타났다. 이러한 사실은 상기 시험예 3에서와 같이 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801이 돌연변이원 4-NQO의 구조상 변형을 일으켜 돌연변이원 4-NQO의 유전독성을 상실시켜 Caco-2 cell과 배양했을 때 유전독성을 나타내지 못한 것임을 의미하므로, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 돌연변이원 4-NQO에 대한 항돌연변이능이 우수함을 알 수 있었다.
- [0137] <시험예 5>
- [0138] 락토바실러스 sp. HY7801의 항돌연변이 측정
- [0139] 돌연변이원 4-NQO에 의한 Caco-2 cell 손상을 육안으로 식별하기 위한 방법으로 TUNEL assay를 이용하였다. 돌연변이원에 의해서 세포 내부 nuclear DNA는 180-200bp 정도의 DNA 단편(fragment)으로 잘리게 되는데 이때의 3'-OH DNA 말단에 biotinylated nucleotide가 terminal deoxynucleotidyl transferase(rTdT)에 의해 incorporation된다. Horseradish peroxidase-labeled streptavidin이 biotinylated nucleotides에 결합되고 peroxidase substrate와 과산화수소, chromogen 및 diaminobenzidine에 의해 발색하여 암갈색을 띠게 된다.
- [0140] (1)TUNEL assay는 Dead End Colorimetric TUNEL system(Promega)을 이용하여 시행하였다. Poly-L-lysine coated slide의 제작은 Poly-L-lysine 액을 슬라이드 글라스에 두어 방울씩 떨어뜨리고 팁을 이용해 얇게 펼쳐 준 다음, 공기 중에 건조시킨 후에 증류수로 헹구주고 다시 30-60분간 공기 중에 건조시켜 제작하였다. 상기 시험예 3의 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801과 돌연변이원 4-NQO를 반응시킨 돌연변이원 변형시험 반응물을 첨가하여 반응시킨 Caco-2 cell을 원심분리한 후 세척한 다음, 슬라이드 위에 적당량 분주하고 공기 중에서 약 15분간 건조시켰다. 이렇게 건조된 슬라이드를 10% 포르말린(formalin)에 담귀 25분간 고정하고 PBS 완충용액으로 세척한 후 5분간 상온에 방치하였다. 다시 PBS 완충용액에 용해시킨 0.2% Triton X-100 용액에 담귀 5분간 상온에 두고 PBS 완충용액에 5분간 담귀 상온에 방치하는 것을 2회 반복하였다. 그 다음 살짝 두드려 물기를 떨어내고 100 $\mu$ l의 equilibration 완충용액을 도포하고 5-10분간 상온에 방치하면서, 그 동안 Biotinylated nucleotide mix와 rTdT reaction mix를 얼음에서 준비하여 슬라이드 당 100 $\mu$ l의 reaction mix를 시료에 도포하였다. 도포된 시약 주위를 티슈로 닦아내고 다시 100 $\mu$ l의 rTdT reaction mix를 도포하였다. Plastic cover lip으로 도포면을 덮고 humidified chamber를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 20X SSC 용액을 증류수를 이용하여 10배로 희석한 용액에 plastic cover slip을 제거한 슬라이드를 15분간 상온에서 담귀 두었다. 다시 PBS 완충용액에 담귀 5분간 상온에서 2회 세척하고 PBS 완충용액에 용해시킨 0.3% hydrogen peroxide 용액에 상온에서 3-5분간 반응시켜 효소를 비활성화 하였다. 다시 PBS 완충용액에 담귀 5분간 상온에서 세척하는 것을 2회 반복하고 Streptavidin HRP를 PBS 완충용액으로 500배 희석하여 100 $\mu$ l씩 슬라이드에 첨가하여 30분간 상온에 방치하였다. 다시 PBS 완충용액에 담귀 5분간 상온에서 2회 세척하고 50 $\mu$ l의 DAB substrate 20X 완충용액을 950 $\mu$ l의 증류수에 첨가해 희석한 후 50 $\mu$ l의 DAB 20X Chromogen과 50 $\mu$ l의 hydrogen peroxide 20X를 첨가하였다. DAB 용액 100 $\mu$ l씩을 각각의 슬라이드에 도포하고 배경이 밝은 갈색빛을 띠 때까지 두었다. 증류수로 여러 번 린스하고 mounting medium으로 mounting하여 현미경으로 관찰하였다.
- [0141] (2)락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) BS1과 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) YS-I10에 대하여도 상기 (1)의 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 TUNEL assay를 실시하였다.
- [0142] (3)음성대조군으로는 돌연변이원 4-NQO를 Caco-2 cell에 무처리 하고, 양성대조군으로는 돌연변이원 4-NQO를

Caco-2 cell에 처리하여 각각 상기 (1)의 시험방법과 동일한 방법으로 TUNEL assay를 실시하였다.

[0143] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0144] 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 플란타럼 BS1과 돌연변이원 4-NQO를 반응시킨 돌연변이원 변형시험 반응물을 Caco-2 cell에 처리한 경우(도 7의 '4') 및 락토바실러스 플란타럼 YS-I10과 돌연변이원 4-NQO를 반응시킨 돌연변이원 변형시험 반응물을 Caco-2 cell에 처리한 경우(도 7의 '5') 모두에서는 돌연변이원 4-NQO만을 Caco-2 cell에 처리한 경우(도 7의 '2')와 같이 암갈색을 띄었으나, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801과 돌연변이원 4-NQO를 반응시킨 돌연변이원 변형시험 반응물을 Caco-2 cell에 처리하였을 경우(도 7의 '3')에는 돌연변이원 4-NQO를 처리하지 않은 Caco-2 cell의 경우(도 7의 '1')와 유사한 색태를 나타내어 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801는 돌연변이원 4-NQO의 구조를 변형시켜 Caco-2 cell 내부 nuclear DNA의 절단을 막아 돌연변이원 4-NQO의 유전독성을 상실시키는 항돌연변이능이 우수함을 알 수 있었다.

[0145] <시험예 6>

[0146] 락토바실러스 sp. HY7801의 TLR4 저해

[0147] 락토바실러스 sp. HY7801 시료 준비

[0148] (1)TLR4 조절 능력을 측정하기 위하여, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 엠알에스 액체배지에 접종하여 37℃에서 20시간 배양하였다. 상기 락토바실러스 sp. HY7801 배양액을 3,000rpm, 4℃에서 10분간 원심 분리하여 균체를 얻은 후 멸균된 PBS 완충용액을 이용하여 3회 세척하였다. 그런 다음, 균체를 다시 멸균된 PBS 완충용액에 현탁한 후 흡광도를 측정하여 OD<sub>600</sub>=1.0으로 조절한 후 현탁액을 100℃에서 20분간 살균처리 하였다. 이렇게 사멸된 락토바실러스 sp. HY7801 균을 3,000rpm, 4℃에서 10분간 원심 분리하여 균체를 얻은 후 멸균된 PBS 완충용액 1ml에 현탁하였다. 이렇게 사멸된 락토바실러스 sp. HY7801 균 현탁액을 -20℃에 보관하면서 시험에 사용하였다.

[0149] (2)락토바실러스 플란타럼 BS1, 락토바실러스 플란타럼 YS-I10, 락토바실러스 sp. BR0285, 락토바실러스 sp. BR0238, 락토바실러스 sp. BR0559, 락토바실러스 sp. BR0262 각각에 대하여도 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 시료를 준비하였다.

[0150] 세포 준비

[0151] 293-hTLR4A-HA cell(Invivogen)을 DMEM(GIBCO), 10% FBS(GIBCO), 1X Antibiotic-Antimycotic(GIBCO), 1X Blastidin(Invivogen)을 혼합한 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 배양하였다.

[0152] 락토바실러스 sp. HY7801의 NF-κB 활성 억제

[0153] (1)TLR4 신호 전달에 의한 NF-κB의 핵내 도입 및 전사활성을 간접적으로 측정하였다. 상기 293-hTLR4A-HA 세포를 10cm<sup>2</sup> 세포배양접시에서 배양하였다. pNiFty-Luc(Invivogen)라는 reporter DNA를 배양된 293-hTLR4A-HA 세포에 transfection시켰다. 6시간 후 배지를 갈아주고 세포를 균일하게 96-well plate(Corning Incorporated 3603)로 옮긴 후, 18시간을 배양하였다. 1μg/ml의 TLR4 agonist(*E. coli* LPS, invivogen)와 상기 준비된 락토바실러스 sp. HY7801(10<sup>5</sup> bacteria/μl) 1μl를 같이 상기 293-hTLR4A-HA 세포에 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 발현되는 NF-κB의 양을 측정하기 위하여, Bright-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay System(Promega)을 이용하였다. 96-well plate에 100μl의 luciferase 완충용액을 넣어주고 2분간 상온에서 배양하였다. 배양이 완료된 후 Luminometer(Synergy HT, Bio-Tek)를 통하여 발광(Luminescence)양을 측정하였다.

[0154] (2)락토바실러스 플란타럼 BS1, 락토바실러스 플란타럼 YS-I10, 락토바실러스 sp. BR0285, 락토바실러스 sp. BR0238, 락토바실러스 sp. BR0559, 락토바실러스 sp. BR0262 각각에 대하여 상기 (1)의 락토바실러스 sp. HY7801과 동일한 방법으로 hTLR4의 활성억제 정도를 측정하였다.

- [0155] 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0156] 도 8의 가로축에는 락토바실러스 sp. HY7801, 락토바실러스 플라타림 BS1, 락토바실러스 플라타림 YS-I10, 락토바실러스 sp. BR0285, 락토바실러스 sp. BR0238, 락토바실러스 sp. BR0559, 락토바실러스 sp. BR0262를 각각 'HY7801', 'BS1', 'YS-I10', 'A3-4', 'BR0285', 'BR0238', 'BR0559', 'BR0262'로 하여 표시하였다.
- [0157] 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 hTLR4의 억제율이 약 100%로 나타나 TLR4 저해능이 우수함을 알 수 있었다.

[0158] <시험예 7>

[0159] 락토바실러스 sp. HY7801의 IL-10 농도 증가 측정

[0160] 세포 준비

[0161] Raw264.7 cell을 DMEM(GIBCO), 10% FBS(GIBCO), 1X Antibiotic-Antimycotic(GIBCO)을 혼합한 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 37℃에서 배양하였다. 그리고 정확한 Control을 위해 시험에 사용하는 세포는 3 × 10<sup>5</sup> cell/ml로 맞추어 주었다.

[0162] 락토바실러스 sp. HY7801의 IL-10 증가 측정

[0163] 상기의 배양한 RAW264.7 세포에 상기 시험예 6의 락토바실러스 sp. HY7801 세포 조성물 시료를 Agonist인 LPS와 같이 넣어주어 18시간동안 배양하였다. 배양 후 IL-10 Cytokine을 측정하기 위하여 배지를 수거하였고, 이를 96 well IL-10 ELISA plate(Pierce)에 각각 50μl의 Standard와 수거한 배지를 각각 넣어주고 플레이트(plate)를 덮은 다음, 2시간 동안 상온에서 반응하였다. TBS-T 완충용액으로 플레이트를 4회 세척하였다. 그 다음 50μl의 Biotinylated Antibody 용액을 넣어주고, 30분 동안 반응하였다. 다시 TBS-T 완충용액으로 플레이트를 4회 세척하였다. 다시 100μl의 Streptavidin-HRP 용액을 넣어주고, 30분 동안 반응한 다음 TBS-T 완충용액으로 플레이트를 4회 세척하였다. 그 다음 100μl의 TMB Substrate를 넣어주고, 암실에서 30분간 반응하였다. 반응 완료 후 100μl의 TMB-Stop 용액을 넣어 반응을 종료시킨 다음, ELISA reader를 이용하여 450nm와 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0164] 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0165] 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, LPS 만을 처리했을 때의 IL-10의 농도가 800pg/ml인데 반하여, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801을 LPS에 처리 했을때 IL-10의 농도가 약 1200pg/ml로 증가하였다.

[0166] 따라서, 본 발명의 락토바실러스 sp. HY7801은 항염증성 사이토카인인 IL-10의 농도를 증가시켜 염증억제 효과가 우수함을 알 수 있었다.

**도면의 간단한 설명**

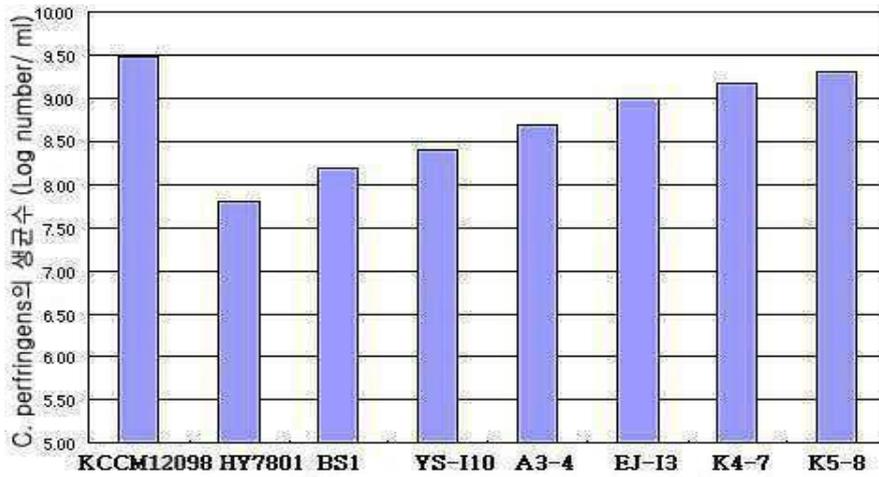
- [0167] 도 1은 락토바실러스 sp. HY7801의 클로스트리디움 퍼프린젠스 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0168] 도 2는 락토바실러스 sp. HY7801의 박테로이데스 불가투스 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0169] 도 3은 락토바실러스 sp. HY7801의 박테로이드 몰티아시더스 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0170] 도 4는 락토바실러스 sp. HY7801의 콘드로이티나제 활성 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0171] 도 5는 락토바실러스 sp. HY7801의 4-NQO 변형 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0172] 도 6은 락토바실러스 sp. HY7801의 세포 생존율 증가 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0173] 도 7은 락토바실러스 sp. HY7801의 항돌연변이 효과를 나타낸 사진이다.

[0174] 도 8은 락토바실러스 sp. HY7801의 hTLR4 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

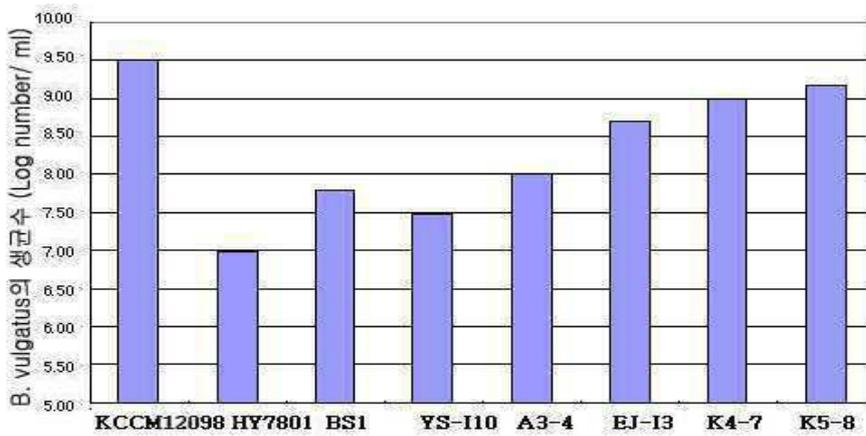
[0175] 도 9는 락토바실러스 sp. HY7801의 IL-10 증가 효과를 나타낸 그래프이다.

도면

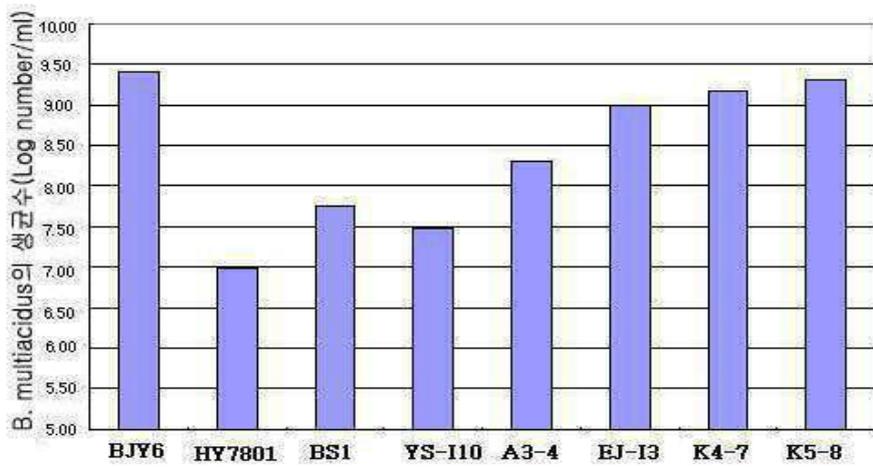
도면1



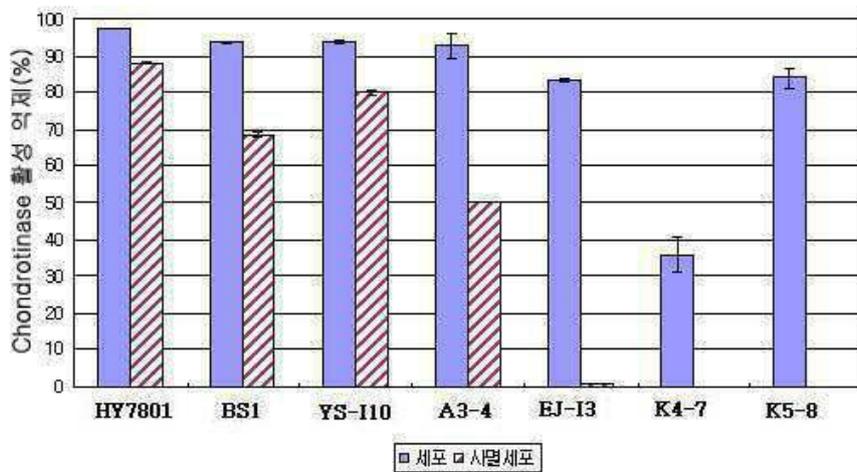
도면2



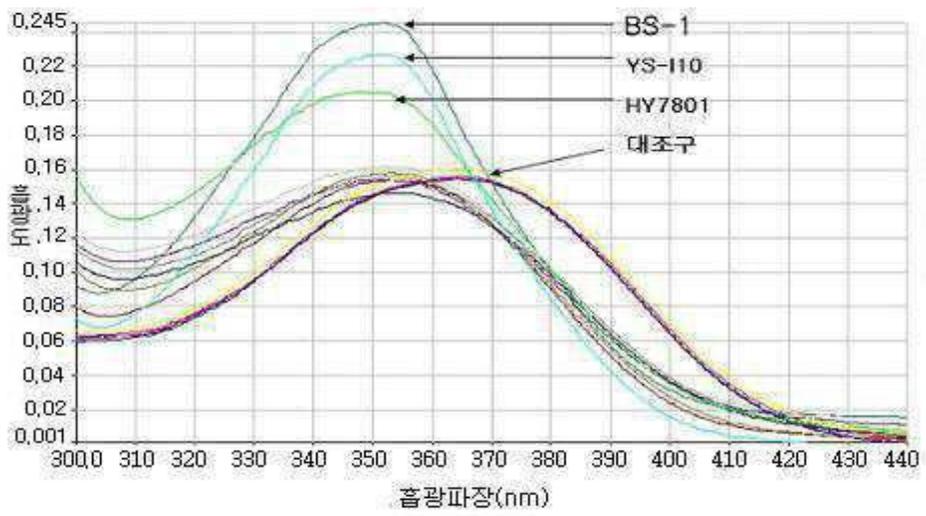
도면3



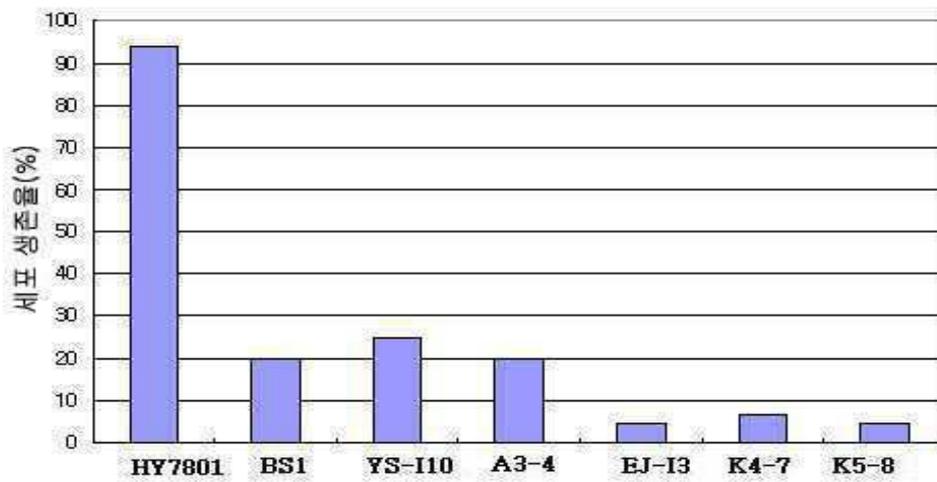
도면4



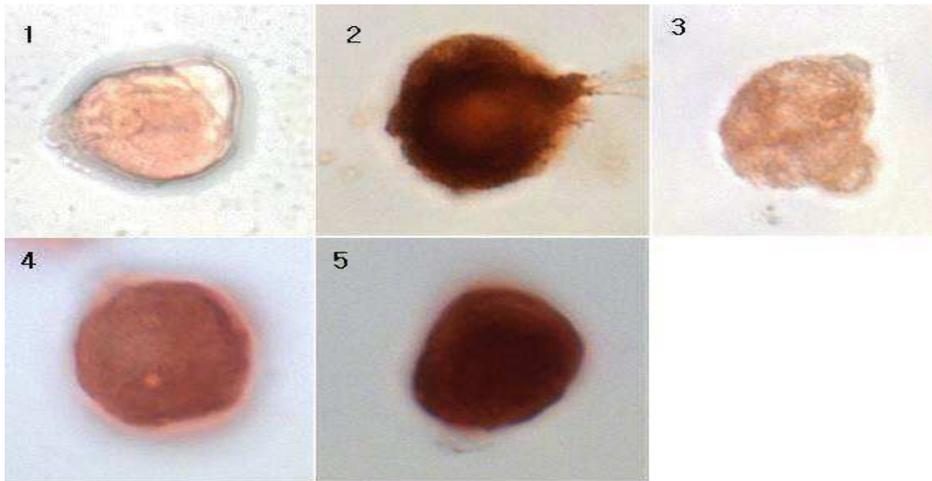
도면5



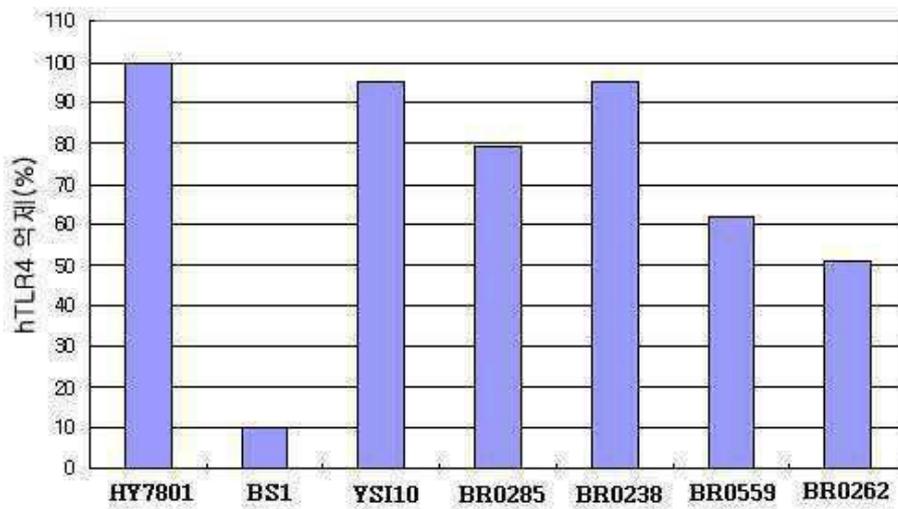
도면6



도면7



도면8



도면9

