



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년02월23일  
(11) 등록번호 10-1017448  
(24) 등록일자 2011년02월17일

(51) Int. Cl.  
C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2008-0091535  
(22) 출원일자 2008년09월18일  
심사청구일자 2008년09월18일  
(65) 공개번호 10-2010-0032579  
(43) 공개일자 2010년03월26일  
(56) 선행기술조사문헌  
논문 4: Clin. Exp. Immunol.  
KR100842053 B1  
KR1020040022386 A  
KR1020050080630 A

(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  
최익하, 경일호

전체 청구항 수 : 총 15 항

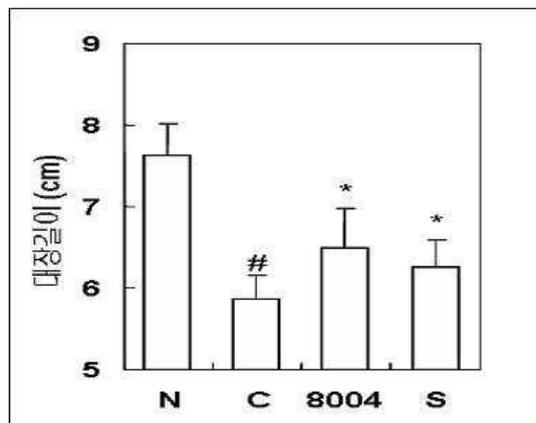
심사관 : 김민정

**(54) 대장의 건강 증진 효능을 갖는 비피도박테리움 롱검 에이취와이8004 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품**

**(57) 요약**

본 발명은 대장의 건강 증진 효능을 갖는 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품에 관한 것으로서, 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4의 억제 및 항염증성 사이토카인인 IL-10 분비를 증가시키고, TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소 억제, 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase) 활성 억제, 분변내 유해효소인 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제 활성을 저해함으로써 대장내 유해균 억제 및 염증발생 억제를 통하여 대장의 건강을 증진하는 목적으로 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

**대표도** - 도6



(72) 발명자

**이정희**

서울 광진구 자양3동 대동아파트 102동 1708호

**김철영**

경기도 수원시 영통구 영통동 947-8 와이티오피스  
텔 615호

**김동현**

서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 20동 902  
호

**허철성**

충남 천안시 신부동 대림한숲아파트 304동 505호

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

대장의 건강 증진 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004(기탁 번호: KCTC 11316BP).

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004는 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스 억제 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진 효능을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004는 돌연변이원의 DNA 손상을 억제하여 세포 생존율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진 효능을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004는 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4 활성 억제 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진 효능을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004는 항염증성 사이토카인 IL-10을 증가시키는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004는 TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소를 억제하며, 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase) 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004는 TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 베타-글

루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진에 효능을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004.

#### 청구항 8

상기 제1항의 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진용 약학적 조성물.

#### 청구항 9

상기 제2항 내지 제7항 중 어느 한 항의 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진용 약학적 조성물.

#### 청구항 10

상기 제1항의 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진용 발효유.

#### 청구항 11

상기 제2항 내지 제7항 중 어느 한 항의 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진용 발효유.

#### 청구항 12

상기 제1항의 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진용 음료.

#### 청구항 13

상기 제2항 내지 제7항 중 어느 한 항의 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진용 음료.

#### 청구항 14

상기 제1항의 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진용 건강기능식품.

#### 청구항 15

상기 제2항 내지 제7항 중 어느 한 항의 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 대장의 건강 증진용 건강기능식품.

### 명세서

#### 발명의 상세한 설명

**기술분야**

[0001] 본 발명은 대장의 건강 증진 효능을 갖는 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스 의 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 Toll Like Receptor4(이하 'TLR4' 라 함)의 억제 및 항염증성 사이토카인 IL-10 분비를 증가시키고 트리니트로벤젠 설펜산(Trinitrobenzene Sulfonic Acid, 이하 'TNBS' 라 함)으로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소 억제, 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase) 활성 억제, 분변내 유해효소인 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제 활성을 저해함으로써 대장내 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품에 관한 것이다.

**배경기술**

[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 보고 되었다. 대장의 선종성 용종이 이형성의 과정을 거쳐 대장암으로 진행되는 데에는 여러 단계에서의 분자생물학적 변화가DNA에서 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] 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-글루쿠로니다아제( $\beta$ -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*), 클로스트리듐 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 클로스트리듐(*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 발암물질을 생산하는 베타-글루쿠로니다아제( $\beta$ -glucuronidase) 그리고 트립토판에이즈(tryptophanase), 베타-글루코시다아제( $\beta$ -glucosidase) 활성이 매우 높다.

[0004] 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 보고 되고 있다. 현재까지 알려져 있는 프로바이오틱스의 효능에 관한 기전은 다음과 같다. 투여된 프로바이오틱스가 장내에서 균락화해서 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.

[0005] 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 보고 되었다. 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**

[0006] 본 발명은 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4의 억제 및 항염증성 사이토카인 IL-10 분비를 증가시키고 TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소 억제, 미엘로퍼옥시다제 활성 억제, 분변내 유해효소인 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제 활성을 저해함으로써 대장내 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제 해결수단**

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4의 억제 및 항염증성 사이토카인 IL-10 분비를 증가시키고, TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소 억제, 미엘로퍼옥시다제 활성 억제, 분변내 유해효소인 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제 활성을 저해함으로써 대장내 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0008] 이하, 본 발명을 좀 더 상세히 설명한다.

[0009] 본 발명에 따른 신균주를 분리하기 위하여 건강한 한국인 성인의 분변을 비에스(BS) 용액이 첨가된 비엘(BL) 한천배지에 도말한 후 37℃에서 72시간 혐기 배양하였다. 비에스 용액은 다음과 같이 제조하였다. 100ml의 멸균 비이커에 30g의 소듐 프로피오네이트(sodium propionate)를 정량하여 약 80ml의 증류수에 용해하고 100mg의 파로모마이신 설페이트(paromomycin sulfate), 400mg의 네오마이신 설페이트(neomycin sulfate), 6g의 리튬 클로라이드(lithium chloride)를 첨가하여 용해한 다음, 증류수를 첨가하여 100ml로 부피를 조절하고 121℃에서 15분 멸균한 후 비엘 한천배지 1L당 50ml을 첨가하였다. 형성된 균락 중에서 장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4 억제 등을 시험하여 본 발명의 신균주를 분리하였다.

[0010] 본 발명에 따른 신균주의 특성은 다음과 같다.

[0011] 1)균의 형태

[0012] 비엘 한천평판배지에서 37℃, 3일간 혐기 배양했을 때 균의 특성

[0013] ① 세포의 형태: 간균, Y자형, 곤봉형

[0014] ② 운동성: 없음

[0015] ③ 포자형성능: 없음

- [0016] ④ 그람(Gram) 염색: 양성
- [0017] 2)균락의 형태
- [0018] 비엘 한천평판배지에서 37℃, 3일간 혐기 배양했을 때 균락의 형태
- [0019] ① 형상: 원형
- [0020] ② 용기: 볼록
- [0021] ③ 표면: 매끄러움(Smooth)
- [0022] 3)생리적 성질
- [0023] ① 최적 생육온도: 36~38℃
- [0024] ② 최적 생육 pH: 6.0~7.0
- [0025] ③ 산소에 대한 영향: 절대혐기성
- [0026] 4)카탈라제: -
- [0027] 5)가스형성여부: -
- [0028] 6)15℃에서 생육: -
- [0029] 7)45℃에서 생육: +
- [0030] 8)인돌생산: -
- [0031] 9)젖산생산: +
- [0032] 10)16S rDNA 분석

[0033] 16S rDNA 분석을 통한 분자유전학적인 방법을 실시하여 본 발명의 신균주를 동정하였다.

[0034] 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[0035] 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 신균주의 16S rDNA 유전자는 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*)의 16S rRNA 유전자와 100% 일치하는 것으로 확인되었다.

**표 1**

**16S rDNA 염기 서열 분석 결과 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>**

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

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP300605.1	Bifidobacterium longum DJ018A, complete genome	2572	1.030e+04	99%	0.0	100%	
AY735493.1	Bifidobacterium longum strain BG3 16S ribosomal RNA gene, com	2571	2571	99%	0.0	99%	
AE014295.3	Bifidobacterium longum NCC2705, complete genome	2571	1.029e+04	99%	0.0	99%	
AY858359.1	Bifidobacterium longum strain SB11 16S ribosomal RNA gene, ne	2560	2560	99%	0.0	99%	
EF370991.1	Bifidobacterium longum strain THT-010301 16S ribosomal RNA ge	2558	2558	99%	0.0	99%	
AY675246.1	Bifidobacterium longum strain BG 16S ribosomal RNA gene, com	2558	2558	99%	0.0	99%	
AB437359.1	Bifidobacterium longum subsp. longum gene for 16S ribosomal R	2553	2553	99%	0.0	99%	
EF589142.1	Bifidobacterium longum strain IDCC 4101 16S ribosomal RNA ge	2547	2547	99%	0.0	99%	
AM272343.2	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone AP075.33	2547	2547	99%	0.0	99%	
EF071228.1	Uncultured actinobacterium clone M0043_074 16S ribosomal RNA	2547	2547	99%	0.0	99%	
AF321297.1	Bifidobacterium sp. group III-3 16S ribosomal RNA gene, partial	2540	2540	99%	0.0	99%	
DQ225034.1	Bifidobacterium longum strain PFK1 16S ribosomal RNA gene, pa	2532	2532	99%	0.0	99%	
D66104.1	Bifidobacterium longum bv. Infantis gene for 16S rRNA, partial s	2527	2527	99%	0.0	99%	
AB437360.1	Bifidobacterium longum subsp. suis gene for 16S ribosomal RNA,	2525	2525	99%	0.0	99%	
EF370990.1	Bifidobacterium longum bv. Infantis strain THT-010201 16S ribes	2516	2516	99%	0.0	99%	
AY736853.1	Bifidobacterium longum bv. Infantis 16S ribosomal RNA gene, pa	2514	2514	99%	0.0	99%	
MF53739.1	Bifidobacterium longum 16S ribosomal RNA	2491	2491	99%	0.0	98%	
AY151399.1	Bifidobacterium longum strain KB 6 16S ribosomal RNA gene, pe	2468	2468	98%	0.0	99%	
AY629878.1	Bifidobacterium longum bv. Infantis strain BT1 16S ribosomal RN	2451	2451	96%	0.0	99%	

[0037] 따라서 본 발명자들은 본 발명의 신균주를 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) HY8004로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2008년 4월 17일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC 11316BP).

[0038] 한편, 본 발명의 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4의 억제 및 항염증성 사이토카인 IL-10 분비를 증가시키고, TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소 억제, 미엘로퍼옥시다제 활성 억제, 분변내 유해효소인 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제 활성을 저해함으로써 대장내 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 대장의 건강 증진용 약학 조성물은 단독 또는 약제학적으로 사용되는 부형제들과 함께 약제학적으로 통상적으로 사용되는 방법에 따라 정제, 캡슐제 등과 같은 제제형태로 제제화하여 사용될 수 있다.

[0039] 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.

[0040] 물론, 상기 대장의 건강 증진용 약학조성물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0041] 또한, 본 발명의 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4의 억제 및 항염증성 사이토카인 IL-10 분비를 증가시키고, TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소 억제, 미엘로퍼옥시다제 활성 억제, 분변내 유해효소인 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제 활성을 저해함으로써 대장내 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 대장의 건강 증진용 발효유는 유산균배양액과 비피도박테리움 롱검 HY8004 및 혼합과즙시럽을 일정비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 발효유를 제조한다.

[0042] 또한, 본 발명의 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4의 억제 및 항염증성 사이토카인 IL-10 분비를 증가시키고, TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소 억제, 미엘로퍼옥시다제 활성 억제, 분변내 유해효소인 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제 활성을 저해함으로써 대장내 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 대장의 건강 증진용 음료는 혼합과즙시럽, 비피도박테리움 롱검 HY8004 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성음료를 제조한다.

[0043] 또한, 본 발명의 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4의 억제 및 항염증성 사이토카인 IL-10 분비를 증가시키고, TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소 억제, 미엘로퍼옥시다제 활성 억제, 분변내 유해효소인 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제 활성을 저해함으로써 대장내 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 갖는 새로운 비피도박테리움 롱검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 대장의 건강 증진용 건강기능식품은 상기 비피도박테리움 롱검 HY8004를 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**

[0044] 이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004는 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스의 억제, 전염증성 사이토카인 분비와 연관된 TLR4의 억제 및 항염증성 사이토카인 IL-10 분비를 증가시키고, TNBS로 유도한 대장염 실험동물모델에서 대장길이 축소 억제, 미엘로퍼옥시다제 활성 억제, 분변내 유해효소인 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제 및 콘드로이티나아제 활성을 저해함으로써 대장내 유해균 억제 및 염증발생을 억제함으로써 유해균 억제 및 염증발생 억제 효능을 통하여 대장의 건강을 증진하는 목적으로 이용될 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

- [0045] 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.
- [0046] <실시예 1>
- [0047] 비피도박테리움 롱검 HY8004를 포함한 동결건조분말 제조
- [0048] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004는 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 그램(g)당 약 10<sup>11</sup>cfu 균수를 얻었다. 이 동결건조 분말을 대장의 건강 증진 소재로 사용하였다.
- [0049] 한편, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004는 상기와 같이 동결건조된 분말 형태 또는 배양물 형태로 제공될 수 있다.
- [0050] <실시예 2>
- [0051] 비피도박테리움 롱검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조
- [0052] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0053] 정제의 제조
- [0054] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 롱검 HY8004를 포함한 동결건조분말 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 폴리비닐피롤리돈 97mg을 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고, 스테아린산 마그네슘 2mg을 가하여 혼합한 후, 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.
- [0055] 캡슐제의 제조
- [0056] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 롱검 HY8004를 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.
- [0057] <실시예 3>
- [0058] 비피도박테리움 롱검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0059] 유산균 배양액과 상기 실시예 1의 비피도박테리움 롱검 HY8004를 포함한 동결건조분말 및 혼합과즙시럽으로 구성된 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [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 6.65~6.70, 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 laboratory에서 구입, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간동안 배양하여, BCP 배지에서의 총 유산균수가 1.0 × 10<sup>9</sup>cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.

- [0061] 혼합과즙시럽은 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 68.85~88.85중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0062] 상기의 방법으로 제조된 유산균 배양액 65~75중량%와 상기 실시예 1의 비피도박테리움 룡검 HY8004를 포함한 동결건조분말 0.001~0.1중량% 및 상기 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 24.9~34.999중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 대장내 유해균 억제 및 대장염발생 억제 효능을 갖는 비피도박테리움 룡검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.
- [0063] <실시예 4>
- [0064] 비피도박테리움 룡검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 하는 기능성 음료
- [0065] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 룡검 HY8004를 포함한 동결건조분말과 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0066] 혼합과즙시럽은 액상과당 10~15중량%, 백설탕 3~5중량%, 갈색설탕 3~5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>o</sup> 10~15중량%, 펙틴 0.1~1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.05~0.15중량% 및 정제수 68.85~88.85중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0067] 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 29.9~39.999중량%와 상기 실시예 1의 비피도박테리움 룡검 HY8004를 포함한 동결건조분말 0.001~0.1중량% 및 멸균 정제수 60~70중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 대장내 유해균 억제 및 대장염발생 억제 효능을 갖는 비피도박테리움 룡검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0068] <실시예 5>
- [0069] 비피도박테리움 룡검 HY8004를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품
- [0070] 상기 실시예 1의 비피도박테리움 룡검 HY8004를 포함한 동결건조분말 0.001~0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드), 올리고당을 상기 실시예 1의 비피도박테리움 룡검 HY8004를 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.
- [0071] <시험예 1>
- [0072] 비피도박테리움 룡검 HY8004의 유해균 억제활성 측정
- [0073] 본 발명의 비피도박테리움 룡검 HY8004의 대장염 유발과 연관된 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*), 대장 점막의 염증 유발과 연관된 콘드로이티나제 활성을 갖는 박테로이드 멀티아시더스(*Bacteroides multiaacidus*)의 억제효과를 시험하였다.
- [0074] 1-1 비피도박테리움 룡검 HY8004의 박테로이데스 불가투스의 억제활성 측정
- [0075] (1)비엘(BL) 액체배지에서 약 20시간 배양된 비피도박테리움 룡검 HY8004와 갬(GAM) 액체배지에서 약 24시간 배양된 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*) KCCM11423을 갬 액체배지(Nissui)에 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.
- [0076] (2)비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-8, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KE-3, 비피도박테리움

롱검(*Bifidobacterium longum*) B10J4-1, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-1 각각에 대하여도 상기 (1)의 비피도박테리움 롱검 HY8004와 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 혼합배양방법과 동일한 방법으로 혼합 배양을 하여 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수를 측정하였다.

[0077] (3)대조구로 박테로이데스 불가투스 KCCM11423을 단독으로 깎 액체배지에 1% 접종한 다음 37℃에서 약 20시간 혐기적 조건에서 단독 배양한 다음, 박테로이데스(*Bacteroides*) 선택배지를 사용하여 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수를 측정하였다.

[0078] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0079] 도 1의 가로축에는 박테로이데스 불가투스 KCCM11423을 단독 배양한 균을 '11423'으로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 비피도박테리움 롱검 HY8004를 혼합 배양한 균을 'HY8004'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-8을 혼합 배양한 균을 'KJ-8'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KE-3을 혼합 배양한 균을 'KE-3'으로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) B10J4-1을 혼합 배양한 균을 'B10J4-1'로 표시하고, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423과 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-1을 혼합 배양한 균을 'KJ-1'으로 표시하였다.

[0080] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 박테로이데스 불가투스 KCCM11423을 단독 배양한 경우의 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수와 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004를 포함한 상기 비피도박테리아 균주들과 박테로이데스 불가투스 KCCM11423을 혼합 배양한 경우의 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수를 비교하였을 때, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004를 포함한 상기 비피도박테리아 균주들과 혼합 배양한 경우 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수가 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0081] 특히, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004와 혼합 배양하였을 때 박테로이데스 불가투스 KCCM11423의 생균수가 7.0 Log<sub>10</sub> cfu/ml로, 감소효과가 가장 크게 나타나, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004가 박테로이데스 불가투스의 증식을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0082] 1-2 비피도박테리움 롱검 HY8004의 박테로이드 물티아시더스의 억제활성 측정

[0083] (1)비엘 액체배지에서 약 20시간 배양된 비피도박테리움 롱검 HY8004와 깎(GAM) 액체배지에서 약 24시간 배양된 박테로이드 물티아시더스(*Bacteroides multiacidus*) BJY6을 깎 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.

[0084] (2)비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-8, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KE-3, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) B10J4-1, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-1 각각에 대하여도 상기 (1)의 비피도박테리움 롱검 HY8004와 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 혼합 배양방법과 동일한 방법으로 혼합배양을 하여 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수를 측정하였다.

[0085] (3)대조구로 박테로이드 물티아시더스 BJY6을 단독으로 깎 액체배지에 1% 접종한 다음 37℃에서 약 20시간 혐기적 조건에서 단독 배양한 다음, 박테로이데스(*Bacteroides*) 선택배지를 사용하여 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수를 측정하였다.

[0086] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0087] 도 2의 가로축에는 박테로이드 물티아시더스 BJY6을 단독 배양한 균을 'BJY6'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 비피도박테리움 롱검 HY8004를 혼합 배양한 균을 'HY8004'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-8을 혼합 배양한 균을 'KJ-8'로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KE-3을 혼합 배양한 균을 'KE-3'으로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) B10J4-1을 혼합 배양한 균을 '

B10J4-1' 로 표시하고, 박테로이드 물티아시더스 BJY6과 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-1을 혼합 배양한 균을 'KJ-1' 로 표시하였다.

[0088] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 박테로이드 물티아시더스 BJY6을 단독배양한 경우의 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수와 본 발명의 비피도박테리움 통검 HY8004를 포함한 상기 비피도박테리아 균주들과 박테로이드 물티아시더스 BJY6을 혼합 배양한 경우의 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수를 비교하였을 때, 본 발명의 비피도박테리움 통검 HY8004를 포함한 상기 비피도박테리움 균주들과 혼합 배양한 경우 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수가 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0089] 특히, 본 발명의 비피도박테리움 통검 HY8004와 혼합 배양하였을 때 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 생균수가 7.0 Log<sub>10</sub> cfu/ml로, 감소효과가 가장 크게 나타나, 본 발명의 비피도박테리움 통검 HY8004가 박테로이드 물티아시더스 BJY6의 증식을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0090] <시험예 2>

[0091] 비피도박테리움 통검 HY8004의 세포생존율(Cell viability) 측정

[0092] 돌연변이원은 Caco-2 세포에 DNA 손상을 입혀 세포생존율(cell viability)을 감소시킨다.

[0093] (1)본 발명의 비피도박테리움 통검 HY8004를 비엘 액체배지에 접종하고 37℃에서 overnight 혐기 배양한 후 균체를 회수하여 세척한 후 10ml의 생리식염수에 다시 분산시켰다. 상기 비피도박테리움 통검 HY8004 현탁액에 돌연변이원 4-NQO stock solution(1mg/ml)을 0.1mM 농도가 되도록 첨가한 다음, 37℃에서 150분간 100rpm으로 반응시켰다. 반응 완료 후 원심분리한 다음 상등액을 취하여 제공하고 돌연변이원 변형시험 반응물로 사용하였다. Caco-2 cell은 10% foetal calf serum과 2% 항생제를 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 Caco-2 cell 약  $1 \times 10^6$  cells를 24 well plate에 분주하여 37℃에서 18시간 동안 배양한 후, 본 발명의 비피도박테리움 통검 HY8004와 돌연변이원 4-NQO를 반응시킨 돌연변이원 변형시험 반응물 100 μl를 첨가하여 다시 37℃에서 18시간 동안 반응시켰다. 그 다음, 상기 Caco-2 cell을 DMEM 배지로 두 번 세척하고 100 μl씩 opaque-walled 96 well에 분주하고 30분간 상온에 방치한 다음, CellTiter-Glo Luminescent cell viability assay kit(Promega)를 이용하여 세포생존율을 측정하였다.

[0094] (2)비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-8, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KE-3, 비피도박테리움 통검(*Bifidobacterium longum*) B10J4-1, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-1 각각에 대하여도 상기 (1)의 비피도박테리움 통검 HY8004와 동일한 방법으로 세포생존율을 측정하였다.

[0095] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0096] 도 3의 가로축에는 비피도박테리움 통검 HY8004, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-8, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KE-3, 비피도박테리움 통검(*Bifidobacterium longum*) B10J4-1, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) sp. KJ-1과 돌연변이원 4-NQO 반응물에 의한 Caco-2 세포의 생존율 측정결과를 각각 'HY8004', 'KJ-8', 'KE-3', 'B10J4-1', 'KJ-1'로 하여 표시하였다.

[0097] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 비피도박테리움 통검 HY8004와 돌연변이원 4-NQO를 반응시킨 돌연변이원 변형시험 반응물에서 Caco-2 세포의 생존율이 약 99%로 가장 높게 나타났다.

[0098] <시험예 3>

[0099] 비피도박테리움 통검 HY8004의 TLR4 저해 측정

[0100] 비피도박테리움 통검 HY8004 시료 준비

- [0101] (1)TLR4 조절 능력을 측정하기 위하여, 본 발명의 비피도박테리움 룡검 HY8004를 비엘 액체배지에 접종하여 37℃에서 20시간 배양하였다. 상기 비피도박테리움 룡검 HY8004 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 다음 현탁액을 100℃에서 20분간 살균처리 하였다. 이렇게 사멸된 비피도박테리움 룡검 HY8004 균을 3,000rpm, 4℃에서 10분간 원심 분리하여 균체를 얻은 후 멸균된 PBS 완충용액 1ml에 현탁하였다. 이렇게 사멸된 비피도박테리움 룡검 HY8004 균 현탁액을 -20℃에 보관하면서 시험에 사용하였다.
- [0102] (2)락토바실러스 플라타림 BS1, 락토바실러스 sp. BR0285, 락토바실러스 sp. BR0559, 락토바실러스 sp. BR0262, 비피도박테리움 sp. CS-1, 비피도박테리움 sp. KK-1 각각에 대하여도 상기 (1)의 비피도박테리움 룡검 HY8004와 동일한 방법으로 시료를 준비하였다.
- [0103] 세포 준비
- [0104] 293-hTLR4A-HA cell(Invivogen)을 DMEM(GIBCO), 10% FBS(GIBCO), 1X Antibiotic-Antimycotic(GIBCO), 1X Blastidicin(Invivogen)을 혼합한 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 배양하였다.
- [0105] 비피도박테리움 룡검 HY8004의 NF-κB 활성 억제
- [0106] (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 비피도박테리움 룡검 HY8004(10<sup>5</sup> cfu/μl) 1μl를 같이 상기 293-hTLR4A-HA 세포에 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 발현되는 NF-κB의 양을 측정하기 위하여, Bright-Glo<sup>™</sup> Luciferase Assay System(Promega)을 이용하였다. 96-well plate에 100μl의 루시페라아제(luciferase) 완충용액을 넣어주고 2분간 상온에서 배양하였다. 배양이 완료된 후 Luminometer(Synergy HT, Bio-Tek)를 통하여 발광(Luminescence) 양을 측정 하였다.
- [0107] (2)락토바실러스 플라타림 BS1, 락토바실러스 sp. BR0285, 락토바실러스 sp. BR0559, 락토바실러스 sp. BR0262, 비피도박테리움 sp. CS-1, 비피도박테리움 sp. KK-1 각각에 대하여도 상기 (1)의 비피도박테리움 룡검 HY8004와 동일한 방법으로 hTLR4의 활성억제 정도를 측정하였다.
- [0108] 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0109] 도 4의 가로축에는 비피도박테리움 룡검 HY8004, 락토바실러스 플라타림 BS1, 락토바실러스 sp. BR0285, 락토바실러스 sp. BR0559, 락토바실러스 sp. BR0262, 비피도박테리움 sp. CS-1, 비피도박테리움 sp. KK-1을 각각 ‘HY8004’, ‘BS1’, ‘BR0285’, ‘BR0559’, ‘BR0262’, ‘CS-1’, ‘KK-1’ 로 하여 표시하였다.
- [0110] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 비피도박테리움 룡검 HY8004는 hTLR4의 억제율이 85%로 나타나, TLR4 저해능이 우수함을 알 수 있었다.
- [0111] <시험예 4>
- [0112] 비피도박테리움 룡검 HY8004의 IL-10 농도 증가 측정
- [0113] 세포 준비
- [0114] 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 시험에 사용하는 세포는 3 × 10<sup>5</sup> cell/ml로 맞추어 주었다.

- [0115] 비피도박테리움 롱검 HY8004의 IL-10 증가 측정
- [0116] 상기의 배양한 RAW264.7 세포에 상기 시험에 3의 비피도박테리움 롱검 HY8004 세포 조성물 시료를 agonist인 LPS와 같이 넣어주어 18시간 동안 배양하였다. 배양 후 IL-10 Cytokine을 측정하기 위하여 배지를 수거하였고, 이를 96 well IL-10 ELISA plate(Pierce)에 각각 50  $\mu$ l의 표준물질과 수거한 배지를 각각 넣어주고 플레이트(plate)를 덮은 다음, 2시간 동안 상온에서 반응하였다. TBS-T 완충용액으로 플레이트를 4회 세척하였다. 그 다음 50  $\mu$ l의 Biotinylated Antibody 용액을 넣어주고, 30분 동안 반응하였다. 다시 TBS-T 완충용액으로 플레이트를 4회 세척하였다. 다시 100  $\mu$ l의 Streptavidin-HRP 용액을 넣어주고, 30분 동안 반응한 다음 TBS-T 완충용액으로 플레이트를 4회 세척하였다. 그 다음 100  $\mu$ l의 TMB Substrate를 넣어주고, 암실에서 30분간 반응하였다. 반응 완료 후 100  $\mu$ l의 TMB-Stop 용액을 넣어 반응을 종료시킨 다음, ELISA reader를 이용하여 450nm와 550nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0117] 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0118] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, LPS 만을 처리했을 때의 IL-10의 농도가 814pg/ml인데 반하여, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004를 LPS에 처리 했을 때 IL-10의 농도가 약 1309pg/ml로 증가하였다.
- [0119] 따라서, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 HY8004는 항염증성 사이토카인인 IL-10의 농도를 증가시켜 염증억제 효과가 우수함을 알 수 있었다.
- [0120] <시험예 5>
- [0121] TNBS로 유도한 대장염 동물모델에서 비피도박테리움 롱검 HY8004 투여에 의한 대장길이 축소저해
- [0122] 먼저, 비피도박테리움 롱검 HY8004 균주를 비엘 액체배지에 접종하여 37℃에서 20시간 배양하였다. 이 배양액을 3,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 균체를 얻은 후 생리식염수로 2회 세척하고 다시 원심분리한 균체를 시험에 사용하였다.
- [0123] 실험동물은 (주)중앙실험동물에서 ICR mouse 4주령의 수컷 쥐를 사용하였다. 3일간 순화시킨 후 5일간 상기의 비피도박테리움 롱검 HY8004 균체를 각각 실험동물에 마우스 무게(kg)당 습중량 50mg/kg을 경구투여 하였으며, 비피도박테리움 롱검 HY8004 경구투여 3일 후 실험동물을 에테르(ether)에 가볍게 마취하고, 꼬리 등근 1ml 주사기를 항문을 통해 3.5~4cm 정도 깊이로 대장내 TNBS(Trinitrobenzene Sulfonic Acid)를 투여하였다. TNBS는 2.5mg을 50% 에탄올 용액에 용해한 후 100  $\mu$ l를 천천히 투여한 후 대장내 잘 퍼질 수 있도록 수직으로 30~60초간 유지시켰다. TNBS를 투여한 후 2일째 되는 날 해부를 시행하였다.
- [0124] 실험동물을 에테르 마취하여 맹장아래 1cm되는 지점부터 대장 끝까지를 적출하고 길이를 측정하였다.
- [0125] 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0126] 도 6의 가로축에는 TNBS를 처리하지 하지 않은 실험 동물군을 'N', TNBS만 처리된 실험 동물군을 'C', TNBS가 처리된 실험동물에게 비피도박테리움 롱검 HY8004를 투여한 실험 동물군은 '8004' 및 TNBS가 처리된 실험동물에게 케양성대장염 치료제인 설파살라진(sulfasalazine)을 투여한 실험 동물군은 'S'로 하여 표시하였다.
- [0127] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS 투여에 의해 실험동물의 대장길이가 축소되었으나, 비피도박테리움 롱검 HY8004 투여에 의해 대장길이 축소가 억제되어 대조군(S)의 대장길이와 유사한 수준인 것을 확인할 수 있었다( $p < 0.05$ ).
- [0128] <시험예 6>
- [0129] TNBS로 유도한 대장염 동물모델에서 비피도박테리움 롱검 HY8004 투여에 의한 대장조직의 Myeloperoxidase(MPO) 활성저해 측정

- [0130] 상기 시험에 5와 동일한 방법 및 조건으로 채취한 대장점막 조직에 0.5% hexa-decyl-trimethyl-ammonium bromide를 함유한 10mM 포타슘포스페이트 완충용액(pH 7.0)에 넣고 균질한 후 8000rpm에서 30분간 원심분리를 하였다. 이렇게 원심 분리된 상등액 100  $\mu$ l에 1.6mM tetra-methyl benzidine 100  $\mu$ l, 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5  $\mu$ l, 증류수 795  $\mu$ l를 넣고 650nm에서 time course로 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase)의 활성 변화를 측정하였다. 효소 활성은 37°C에서 효소가 분해하는 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 양을 말하여,  $\mu$ Unit/mg protein으로 표시하였다. 단백질량은 Bradford 방법에 준하여 시행하였다.
- [0131] 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0132] 도 7의 가로축에는 TNBS를 처리하지 하지 않은 실험 동물군을 'N', TNBS만 처리된 실험 동물군을 'C', TNBS가 처리된 실험동물에게 비피도박테리움 롱검 HY8004를 투여한 실험 동물군은 '8004' 및 TNBS가 처리된 실험동물에게 설파살라진을 투여한 실험 동물군은 'S'로 하여 표시하였다.
- [0133] 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS 투여에 의해 실험동물의 대장 조직내 미엘로퍼옥시다제(MPO) 활성이 증가되었으나, 비피도박테리움 롱검 HY8004 투여에 의해 미엘로퍼옥시다제(MPO) 활성이 TNBS를 처리하지 않은 대조구(N)와 거의 비슷한 수준으로 감소되었음을 알 수 있었다.
- [0134] <시험예 7>
- [0135] TNBS로 유도한 대장염 동물모델에서 비피도박테리움 롱검 HY8004 투여에 의한 분변 베타-글루쿠로니다아제, 베타-글루코시다아제, 콘드로이티나아제 활성 저해의 측정
- [0136] 분변처리
- [0137] 각 실험군의 마우스의 분변을 cold saline에 현탁 후 500rpm에서 5분간 원심분리하여 섬유질과 기타 불순물을 제거한 후 4°C, 8000rpm에서 30분간 원심분리하여 침전시켰다. 상등액은 제거하고 침전물을 분변 효소 활성 측정에 사용하였다.
- [0138] 7-1 베타-글루쿠로니다아제 활성 측정
- [0139] 분변 침전물을 0.1M 포타슘 포스페이트 완충용액(pH 7.0)으로 현탁한 후 10배 희석한 것을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 200  $\mu$ l, 0.1M 포타슘 포스페이트 완충용액(pH 7.0) 760  $\mu$ l, 그리고 기질(2mM p-nitrophenyl- $\beta$ -glucuronide) 40  $\mu$ l를 60분간 37°C에서 반응시킨 후 0.5N NaOH 500  $\mu$ l를 가하여 반응을 정지시킨 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액에 대해 405nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0140] 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0141] 도 8의 가로축에는 TNBS를 처리하지 하지 않은 실험 동물군을 'N', TNBS만 처리된 실험 동물군을 'C', TNBS가 처리된 실험동물에게 비피도박테리움 롱검 HY8004를 투여한 실험 동물군은 '8004' 및 TNBS가 처리된 실험동물에게 설파살라진을 투여한 실험 동물군은 'S'로 하여 표시하였다.
- [0142] 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS 투여에 의해 실험동물의 분변내 베타-글루쿠로니다아제 활성이 증가되었으나, 비피도박테리움 롱검 HY8004 투여에 의해 베타-글루쿠로니다아제 활성이 감소되었음을 알 수 있었다.
- [0143] 7-2 베타-글루코시다아제 활성 측정
- [0144] 분변 침전물을 100mM 포타슘 포스페이트 완충용액(pH 7.0)으로 현탁한 후 10배 희석한 것을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 50  $\mu$ l, 0.1M phosphate buffer 350  $\mu$ l, 기질(20mM p-nitrophenyl- $\beta$ -glucopyranoside) 100  $\mu$ l를 60분간 37°C에서 반응시킨 후 0.5N NaOH 400  $\mu$ l를 가하여 반응을 정지시킨 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액에 대해 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

- [0145] 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0146] 도 9의 가로축에는 TNBS를 처리하지 하지 않은 실험 동물군을 'N', TNBS만 처리된 실험 동물군을 'C', TNBS가 처리된 실험동물에게 비피도박테리움 룡검 HY8004를 투여한 실험 동물군은 '8004' 및 TNBS가 처리된 실험동물에게 설파살라진을 투여한 실험 동물군은 'S'로 하여 표시하였다.
- [0147] 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS 투여에 의해 실험동물의 분변내 베타-글루코시다아제 활성이 증가되었으나, 비피도박테리움 룡검 HY8004 투여에 의해 베타-글루코시다아제 활성이 감소되었음을 알 수 있었다.

[0148] 7-3 콘드로이티나아제 활성 측정

- [0149] 분변 침전물을 100mM 포타슘 포스페이트 완충용액(pH 7.0)으로 현탁한 후 10배 희석한 것을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 600 μl, chondroitin sulfate A(0.1mg/ml) 200 μl를 60분간 37℃에서 반응시킨 후 3000rpm, 4℃에서 원심분리하였다. 상등액 500 μl를 취하여 0.4M NaOH 100 μl, 0.4M potassium borate 100 μl와 혼합한 후 5분간 끓였다. 실온으로 냉각한 다음 67mM ρ-dimethylaminobenzaldehyde 3ml을 가한 후 다시 37℃에서 20분간 반응시키고 585nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0150] 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0151] 도 10의 가로축에는 TNBS를 처리하지 하지 않은 실험 동물군을 'N', TNBS만 처리된 실험 동물군을 'C', TNBS가 처리된 실험동물에게 비피도박테리움 룡검 HY8004를 투여한 실험 동물군은 '8004' 및 TNBS가 처리된 실험동물에게 설파살라진을 투여한 실험 동물군은 'S'로 하여 표시하였다.

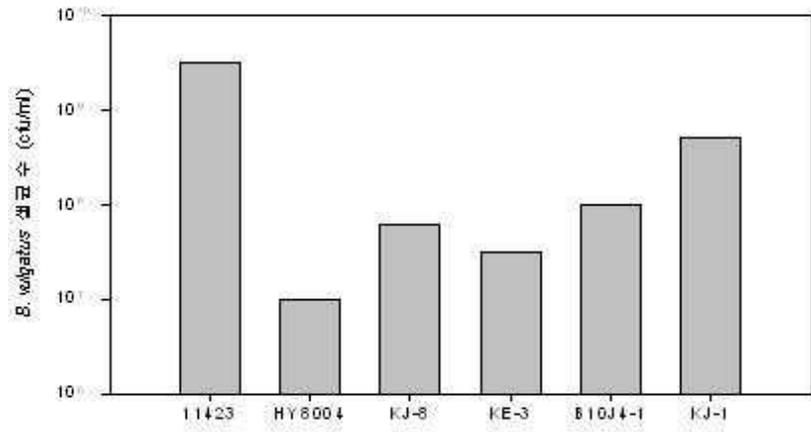
- [0152] 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS 투여에 의해 실험동물의 분변내 베타-글루코시다아제 활성이 증가되었으나, 비피도박테리움 룡검 HY8004 투여에 의해 베타-글루코시다아제 활성이 감소 되었음을 알 수 있었다.

**도면의 간단한 설명**

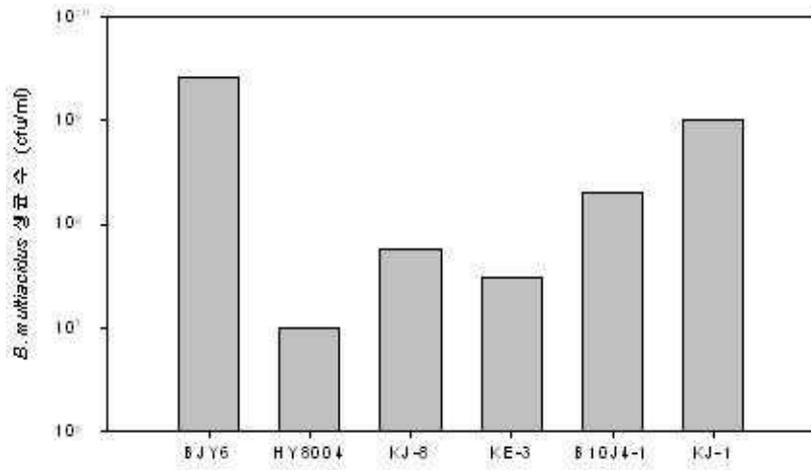
- [0153] 도 1은 비피도박테리움 룡검 HY8004의 박테로이데스 불가투스 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0154] 도 2는 비피도박테리움 룡검 HY8004의 박테로이드 몰티아시더스 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0155] 도 3은 비피도박테리움 룡검 HY8004의 세포 생존율 증가 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0156] 도 4는 비피도박테리움 룡검 HY8004의 hTLR4 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0157] 도 5는 비피도박테리움 룡검 HY8004의 IL-10 증가 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0158] 도 6은 TNBS로 유도한 대장염 실험동물에서 비피도박테리움 룡검 HY8004 처리에 의한 대장길이 축소 저해 효과를 측정 한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0159] 도 7은 TNBS로 유도한 대장염 실험동물에서 비피도박테리움 룡검 HY8004 처리에 의한 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase) 활성 저해 효과를 측정 한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0160] 도 8은 TNBS로 유도한 대장염 실험동물에서 비피도박테리움 룡검 HY8004 처리에 의한 베타-글루쿠로니다아제 활성 저해 효과를 측정 한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0161] 도 9는 TNBS로 유도한 대장염 실험동물에서 비피도박테리움 룡검 HY8004 처리에 의한 베타-글루코시다아제 활성 저해 효과를 측정 한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0162] 도 10은 TNBS로 유도한 대장염 실험동물에서 비피도박테리움 룡검 HY8004 처리에 의한 콘드로이티나아제 활성 저해 효과를 측정 한 결과를 나타낸 그래프이다.

도면

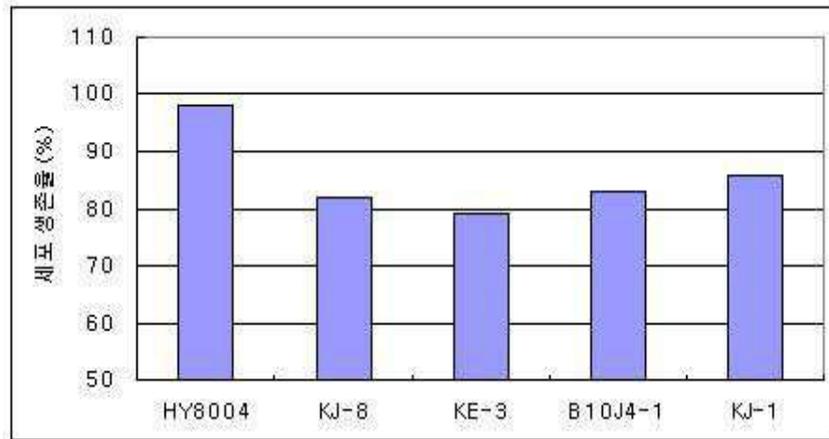
도면1



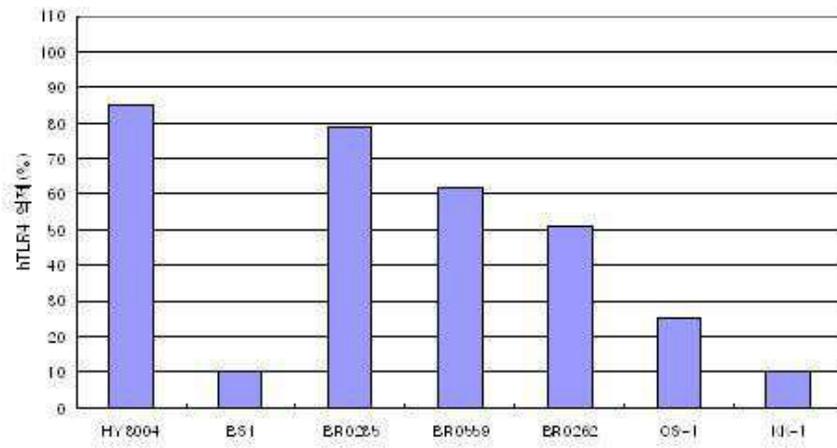
도면2



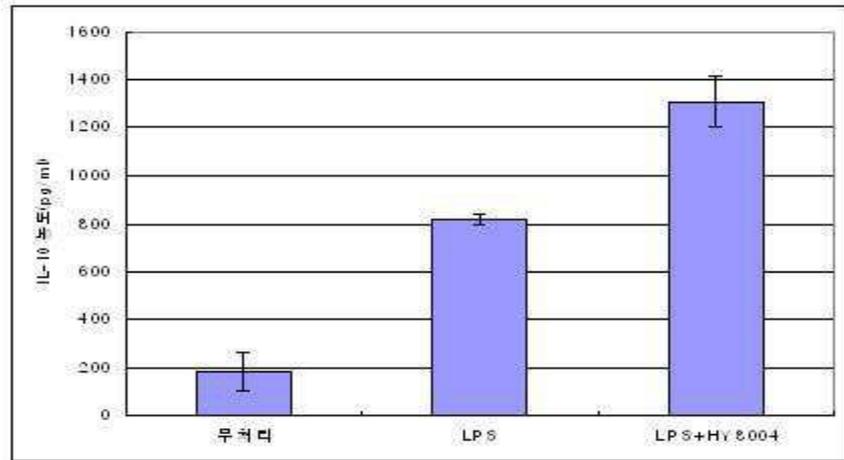
도면3



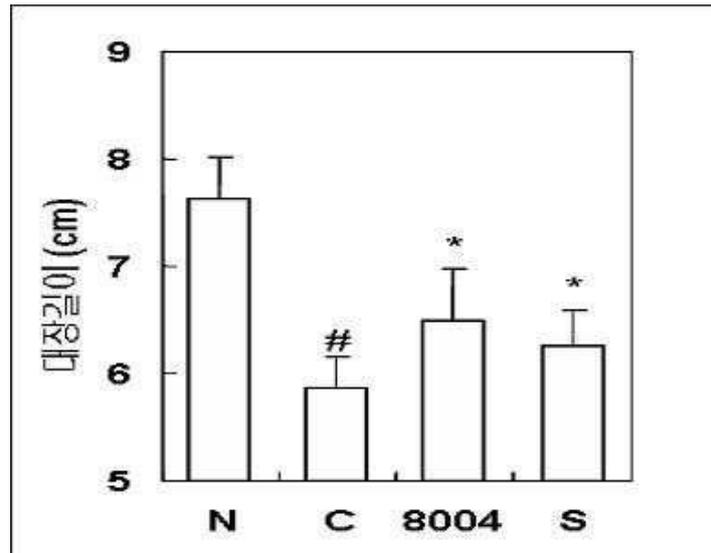
도면4



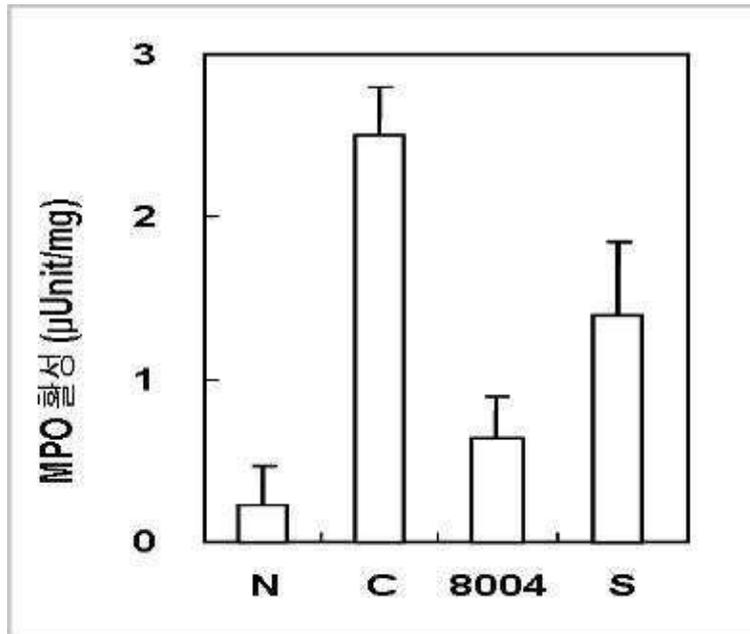
도면5



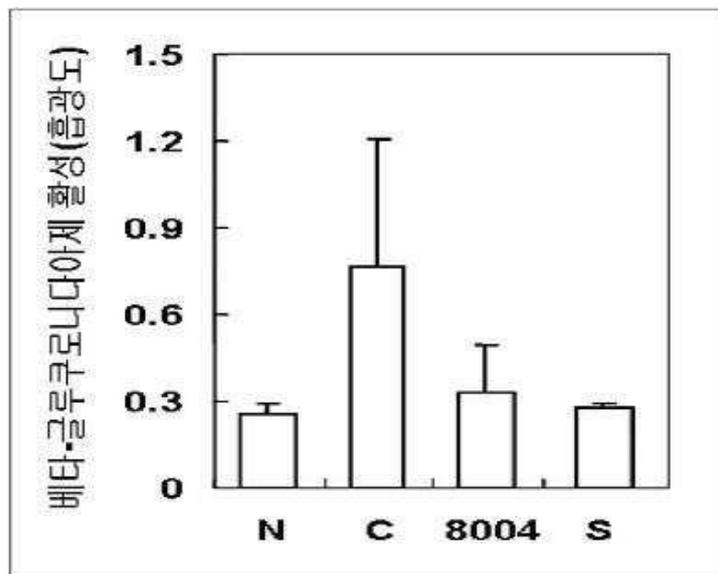
도면6



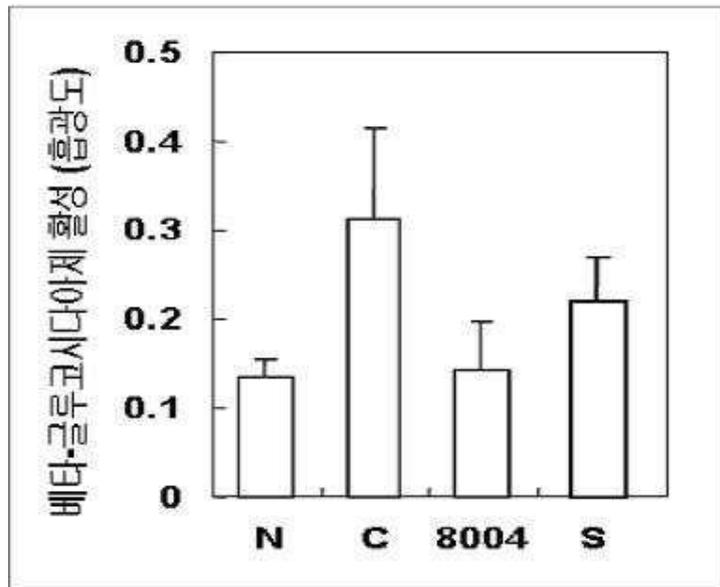
도면7



도면8



도면9



도면10

