(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0021764
(43) 공개일자 2013년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/74 (2006.01) *A61K 35/66* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0084225
(22) 출원일자 2011년08월23일
심사청구일자 2011년08월23일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
대한민국 (식품의약품안전청장)
충청북도 청원군 강외면 오송생명2로 187
(72) 발명자
한순영
서울특별시 강남구 선릉로69길 19, 역삼 레미안A 106동 1605호 (역삼동)
김은정
충청북도 청원군 옥산면 오산리 옥산아트빌아파트 304동 901호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

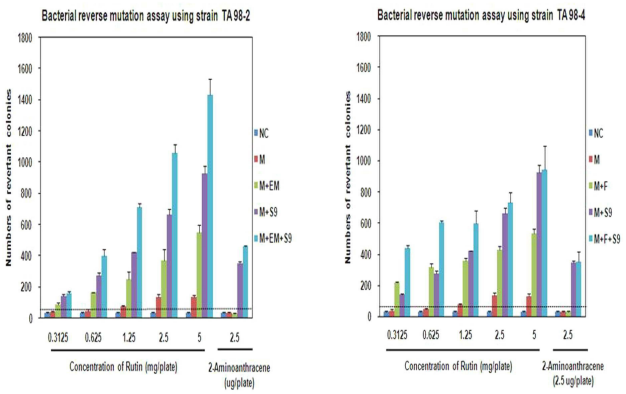
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **장내 미생물 효소복합체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 소화관내 대사계를 대신하여 시험관 내에서 의약품/식품성분 등의 독성 평가 또는 생리활성 평가를 위해 사용되는 분변 효소액(Fecalase)을 대체할 수 있는 사람의 소화관내에서 분리한 장내 미생물로 제조한 장내 미생물 효소복합체(intestinal microbial enzyme mixture, enzyme mix)및 이의 제조방법에 관한 것으로, p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드, p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드, 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드에 대해 기질 활성을 갖는 장내 미생물 효소복합체를 에임즈 시험에 대사 활성계로 적용하였을 때, 기존에 소화관내 대사계로 사용되어 왔던 피칼라제를 적용했을 때와 유의적으로 복귀돌연변이원 수가 증가함을 확인하였으므로, 본 발명의 장내 미생물 복합체를 소화관내 대사계에 대한 대사 활성계로 이용하여, 유전독성 평가시험인 시험관 내 염색체이상시험(In vitro Chromosomal Aberration Assay), 시험관 내 소핵시험(In vitro Micronucleus Assay), 쥐 임파종 분석(Mouse Lymphoma Assay, MLA), 시험관 내 포유류 세포 소핵시험(In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test), 코멧 분석(Comet Assay), 포유류 정원세포 염색체 이상 분석(Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Assay), SOS 크로모테스트(SOS chromotest) 및 복귀돌연변이 시험인 에임즈 시험(Bacterial Reverse Mutation Test, Ames Test)법, 또는 생리 활성 평가인 전자공여능(Electron donating ability)평가, SOD(Superoxide dismutase) 유사 활성 평가, 아질산염 분해 작용 측정(Nitrite scavenging ability)을 통한 항산화 활성 평가 및 항알러지 효과 평가에 적용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

김동현

서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)

이용섭

서울특별시 노원구 덕릉로112길 24, 청암아파트 103동 602호 (상계동)

한명주

서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)

여희경

서울특별시 송파구 토성로15길 6, 301호 (풍납동)

현양진

서울특별시 중랑구 봉우재로32길 42, 202호 (면목동)

김승희

서울특별시 양천구 목동동로 350, 목동5단지아파트 525동 303호 (목동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	09172약리기996
부처명	식품의약품안전평가원
연구사업명	약물대사기반연구
연구과제명	약물대사체의 in vitro 독성평가를 위한 장내미생물총 및 분리장내미생물 효소복합체 개발
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2009.06.01 ~ 2011.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

메가스페라 엘스데니(*Megasphaera elsdenii*), 파라박테로이즈 디스타소니스(*Parabacteroides distasonis*), 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*) 및 유박테리움 렉테일(*Eubacterium rectale*)을 1:1:1:1의 비율로 포함하는 장내 미생물 효소복합체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일은 인간 분변으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 장내 미생물 효소복합체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 장내 미생물 복합체는 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드(p-nitrophenyl-β-D-glucuronide), p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드(p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside), 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드(nitrophenyl-α-L-rhamnopyranoside) 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드(p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 기질에 대해 효소 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 장내 미생물 효소복합체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일은

1) 인간의 분변 시료를 배양하여 균주를 수득하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)에서 수득한 균주로부터 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드, p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드, 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 기질에 대한 효소 활성을 나타내는 균주를 선별하는 단계를 포함하는 방법에 의해 분리된 것을 특징으로 하는 장내 미생물 효소복합체.

청구항 5

1) 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일을 각각 배양하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 배양물을 초음파 분리하여 상등액을 수득하는 단계;및

3) 상기 단계 2)에서 수득한 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일의 상등액을 각각 1:1:1:1의 비율로 혼합하는 단계를 포함하는 장내 미생물 효소복합체의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 단계 1)에서 메가스페라 엘스데니 및 파라박테로이즈 디스타소니스는 35 ~ 39℃에서 10 ~ 14시간 배양하고, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일은 35 ~ 39℃에서 22 ~ 26시간 배양하는 것을 특징으로 하는 장내 미생물 효소복합체의 제조방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 메가스페라 엘스데니 및 파라박테로이즈 디스타소니스는 37℃에서 12시간 배양하고, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일은 37℃에서 24시간 배양하는 것을 특징으로 하는 장내 미생물 효소복합체의 제조방법.

청구항 8

제 1항의 장내 미생물 효소복합체를 유효성분으로 포함하는 검체의 유전 독성 평가용 약학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 유전 독성 평가는 시험관 내 염색체이상시험(In vitro Chromosomal Aberration Assay), 시험관 내 소핵시험(In vitro Micronucleus Assay), 쥐 임파종 분석(Mouse Lymphoma Assay, MLA), 시험관 내 포유류 세포 소핵시험(In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test), 코멧 분석(Comet Assay), 포유류 정원세포 염색체 이상 분석(Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Assay), SOS 크로모테스트(SOS chromotest) 및 복귀돌연변이 시험인 에임즈 시험(Bacterial Reverse Mutation Test, Ames Test)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 유전 독성 평가용 약학적 조성물.

청구항 10

제 1항의 장내 미생물 효소복합체를 유효성분으로 포함하는 검체의 생리활성 평가용 약학적 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 생리 활성 평가는 전자공여능(Electron donating ability)평가, SOD(Superoxide dismutase) 유사 활성 평가, 아질산염 분해 작용 측정(Nitrite scavenging ability)을 통한 항산화 활성 평가 및 항알러지 효과 평가로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 생리활성 평가용 약학적 조성물.

청구항 12

제 8항 또는 제 10항에 있어서, 상기 검체는 의약품 또는 식품인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 13

제 8항 또는 제 10항에 있어서, 상기 장내 미생물 효소 복합체는 소화관내 대사계로서 작용하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시험관 내에서 의약품 또는 식품성분 등의 독성 평가 또는 생리 활성 평가시 소화관내 대사계에 대한 대사 활성계로 사용되는 분변 효소액(fecalase)을 대체할 수 있는 사람의 소화관에서 분리된 장내 미생물로 제조한 장내 미생물 효소복합체(intestinal microbial enzyme mixture, enzyme mix) 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 경구 투여되는 의약품과 식품의 구성 성분 중에서 비극성도가 높은 알카로이드 및 소화관 벽내의 특수한 운반체(transporter)에 의해 운반되는 포도당과 같은 구성성분들은 위 또는 소장에서 쉽게 흡수된다. 그러나 극성이 높은 다당체와 배당체들은 소화관내에서 잘 흡수되지 않는다. 다당체와 배당체 성분들은 소화관 안에 서식하고 있는 미생물들에 의해 대사되며, 그 결과 생성되는 대사체들은 비극성도가 높아지므로 소화관 내로 흡수될 수 있다. 또한, 소화관내 미생물에 의해 대사를 받는 과정에서 생산되는 대사체들은 원래의 물질에 비해 생리 활성 또는 독성이 높은 경우가 많다. 따라서 경구 투여되는 식품과 의약품의 독성과 약리 평가에 있어서 소화관내 대사계는 간장 대사계 만큼이나 중요하다고 할 수 있다. 시험관에서 독성 물질의 활성화와 분해 정도를 평가하기 위해, 간장 대사계를 대신해서 간 세포분쇄액인 S9 복합체(S9 mixture)가, 소화관내 대사계를 대신해서는 분변효소액인 피칼라제(fecalase)가 개발된 바 있다.

[0003] 유전독성시험 및 생리활성 평가는 식품과 의약품의 구성 성분 중 생체내에 유입되어 돌연변이를 일으킬 가능성이 있는 물질을 탐색하는데 쓰이며, DNA나 염색체에 직접적으로 손상을 주어서 형태적 변화나 기능적 이상을 일으키는 현상을 관찰하는 시험분야이다. 따라서 유전독성시험은 새로운 신약이나 화학물질 개발시 물질 스크리닝 단계에서 반드시 수행해야 한다. 유전독성시험에는 시험관 내 염색체이상시험(In vitro Chromosomal Aberration Assay), 시험관 내 소핵시험(In vitro Micronucleus Assay), 쥐 임파종 분석(Mouse Lymphoma Assay, MLA), 시험관 내 포유류 세포 소핵시험(In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test), 코멧 분석(Comet Assay), 포유류 정원세포 염색체 이상 분석(Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Assay), SOS 크로모테스트(SOS chromotest) 및 복귀돌연변이 시험인 에임즈 시험(Bacterial Reverse Mutation Test, Ames Test)등이 있다.

[0004] 시험관 내 염색체이상시험은 시험물질에 의한 염색체의 구조적 이상을 측정하기 위한 시험법으로써 일반적으로 포유동물세포인 차이니즈 햄스터 폐(Chinese Hamster Lung, CHL)세포, 차이니즈 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO)세포를 사용한다. 시험관 내 소핵시험은 소핵을 가진 다염성 적혈구의 증가를 확인함으로써, 시험물질이 염색체나 세포분열장치에 주는 손상을 평가한다. 쥐 임파종 분석은 포유동물세포인 L5178Y tk+/- 세포를 이용하여 티미딘 키나제(thymidine kinase, tk) 유전자에서 전진 돌연변이(forward mutation)을 측정하는 시험법으로 시험물질의 유전자 돌연변이와 염색체 이상(chromosomal aberration) 모두를 측정할 수 있는 시험법이다. 상기 시험법은 복귀돌연변이 시험과 HPRT 돌연변이 시험에 비해 다양한 유전자 변이를 측정할 수 있다. 시험관 내 포유류 세포 소핵시험은 포유동물세포를 이용하여 염색체의 구조적이상(clastogenic) 및 수적이상(aneugenic)을 일으키는 물질을 측정하는 시험법으로써 간기(interphase) 세포의 세포질에 존재하는 소핵을 측정한다. 코멧 분석은 현재 DNA 손상 측정시험법으로써 각광받고 있는 시험법이다. 포유류 정원세포 염색체 이상 분석은 마우스의 정자세포에서 염색체이상시험을 수행하는 시험법으로써 다음 세대로 전이될 수 있는 생식세포(germ cell)에서 발생하는 유전독성을 검사한다. SOS 크로모테스트는 이스케리치아 콜라이(*Escherichia coli, E. coli*) PQ37/plasmid pKM 101 균주를 사용하여 시료의 항돌연변이 효과를 검토하는 시험법이다.

[0005] 유전독성시험 중 상기 에임즈 시험법은 히스티딘 합성이 저해된 미생물을 이용하여 시험물질에 의해 히스티딘 합성 균주로 전환되는지를 확인함으로써, 유전독성을 측정하는 시험법으로 1970년대 초반 Dr. Bruce Ames에 의해 개발되어 에임즈 시험법이라고 명명되었다. 이 시험법은 5 균주 이상을 이용하여 DNA의 단일 염기 수준에서 유전적 손상을 측정한다. 일반적으로 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium, S. typhimurium*) TA98, TA100 및 TA1537, 및 *E. coli* WP2uvrA 등의 5 균주를 사용하고, 시험물질의 특성에 따라 *S. typhimurium* TA102 균주를 사용하기도 한다. 에임즈 시험법은 유전독성시험법 중 빠르고 간편하면서도 발암성 시험결과와 매우 밀접한 상관관계를 보이는 시험법으로써 신약 개발의 초기 선별 단계 및 의약품, 식품첨가물, 농약, 일반 화학물질 등의 안전성 시험에서 널리 사용한다. 1975년 발암 물질로 알려진 300개의 화학물질에 대한 연구를 시작으로 거의 모든 화학물질에 대해 연구가 이루어졌으며 예전에 음성으로 판정되었던 화학물질에 대해서도 신규한 균주를 만들어서 재시험하고 있다. 전세계에서 발암물질을 검색하고자 할 때 가장 먼저 수행되어지는 기본적인 시험법으로서, 광범위한 화학물질에 대하여 수행되어졌고, 많은 수정된 방법들이 개발되고 있다.

[0006] 생리활성 평가에는 전자공여능(Electron donating ability)평가, SOD(Superoxide dismutase) 유사 활성 평가 및 아질산염 분해 작용 측정(Nitrite scavenging ability)을 통한 항산화 활성 평가 또는 항알러지 효과 평가가 있다. 전자공여능(Electron donating ability)시험은 Blois(1958)의 방법에 준하여 각 시료의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 대한 전자공여 효과로써 시료의 환원력을 측정하는 시험법이고,

SOD(Superoxide dismutase)유사 활성 시험은 Marklund의 방법에 따라 H_2O_2로 전환시키는 반응을 촉매하는 파이로갈롤(pyrogallol)의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성을 확인하는 시험법이며, 아질산염 분해 작용(Nitrite scavenging ability)은 각 시료 추출물을 이용하여 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 통해 잔존하는 아질산염의 백분율(%)로 나타낸다. 또한, 항알러지 효과는 알러지 항원이 호흡이나 피부를 통해서 사람에 유입되어 유도된 Th2세포로부터 생성되어 고농도로 존재하는 싸이토카인(cytokines)(Th2 cytokines: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13)의 측정을 통해 확인한다.

[0007] N-메틸-N'-니트로-N-니트로소 구아니딘(N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine, MNNG)는 체내의 대사 활성계를 거치지 않고도 유전독성 시험평가에 쓰이는 균주에 직접적으로 돌연변이를 유발하는 직접돌연변이원이며, 아플라톡신(aflatoxin)은 직접적으로 돌연변이를 일으키진 않지만, 간장 대사 활성계를 거치면서 돌연변이원으로 작용하므로 간접돌연변이원으로 분류된다. 이와 같이 시험관에서 간접돌연변이원의 독성을 활성화시키기 위해 에임즈 시험법에서는 인체내 대사 활성계 중 하나인 간장 대사계를 대신하여 S9 복합체가 쓰인다. 상기에 기재한 바와 같이 천연물, 한약, 식품 기능성 식품에 함유하고 있는 배당체와 다당체의 경우 장내 미생물의 대사를 받으나, S9 복합체에 의해 쉽게 분해되지 않는다. 그러므로 S9 복합체를 사용한 에임즈 시험법에서 배당체와 다당체와 같은 시험물질의 돌연변이성을 정확히 확인할 수 없는 단점이 있다. 그러므로 간장대사계인 S9 복합체와 함께 소화관내 대사계를 대신하여 분변 효소액(fecalase)이 개발된 바 있으나(GLEN TAMURA, CHERYL GOLD, ANNA FERRO-LUZZI*, AND BRUCE N. AMES. Fecalase:A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. Proc Natl. Acad Sci USA Vol. 77, No. 8, pp. 4961-4965), 개인 간의 차이가 크고, 안정성이 낮고, 상시 이용이 어려운 단점이 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 시험관에서 소화관내 대사계를 대신하여 의약품 또는 식품성분등의 유전독성 평가 또는 생리활성 평가를 위해 사용되는 분변 효소액(fecalase)을 대체할 수 있는 사람의 소화관에서 분리한 장내 미생물로 구성된 장내 미생물 효소복합체(intestinal microbial enzyme mixture, enzyme mix)를 제조하여 에임즈 시험법에 적용하였을 때, 간접돌연변이원 물질에 대하여 상기 피칼라제와 동일한 효소 활성의 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 장내 미생물 효소복합체(intestinal microbial enzyme mixture, enzyme mix) 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 메가스페라 엘스데니(*Megasphaera elsdenii*), 파라박테로이즈 디스타소니스(*Parabacteroides distasonis*), 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*) 및 유박테리움 렉테일(*Eubacterium rectale*)을 1:1:1:1의 비율로 포함하는 장내 미생물 효소복합체를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은

[0012] 1) 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일을 각각 배양하는 단계;

[0013] 2) 상기 단계 1)의 배양물을 초음파 분리하여 상등액을 수득하는 단계;및

[0014] 3) 상기 단계 2)에서 수득한 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일의 상등액을 각각 1:1:1:1의 비율로 혼합하는 단계를 포함하는 장내 미생물 효소복합체의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 장내 미생물 효소복합체를 유효성분으로 포함하는 검체의 유전 독성 평가용 약학적 조성

물을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은 상기 장내 미생물 효소복합체를 유효성분으로 포함하는 검체의 생리활성 평가용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 장내 미생물 효소복합체(intestinal microbial enzyme mixture, enzyme mix)는 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드(p-nitrophenyl-β-D-glucuronide), p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드(p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside), 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드(nitrophenyl-α-L-rhamnopyranoside) 또는 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드(p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside)기질에 대해 효소 활성을 가지며, 에임즈 시험법에 대사 활성계로 적용하였을 때, 기존에 소화관내 대사계로 사용되어 왔던 분변 효소액인 피칼라제(fecalase)를 적용했을 때와 유사하게 복귀돌연변이원 수가 유의적으로 증가함을 확인하였으므로, 본 발명의 장내 미생물 효소복합체를 소화관내 대사계에 대한 대사 활성계로 이용하여, 유전독성 평가시험인 시험관 내 염색체이상시험, 시험관 내 소핵시험, 쥐 임파종 분석, 시험관 내 포유류 세포 소핵시험, 코멧 분석, 포유류 정원세포 염색체 이상 분석, SOS 크로모테스트 및 복귀돌연변이 시험인 에임즈 시험법, 또는 생리 활성 평가인 전자공여능 평가, SOD 유사 활성 평가 및 아질산염 분해 작용 측정을 통한 항산화 활성 평가 및 항알러지 효과, 항염증 효과, 항암 효과, 항노화 효과의 효능을 시험관내(in vitro)에서 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 분변 효소액인 피칼라제(fecalase)를 4℃상태에서 보관하였을 때 시간의 변화에 따른 효소활성측정을 나타낸 도이다:

x축: 저장 일자(day);및

y축: 효소 활성.

도 2는 β-자일로시다제(β-xylosidase), β-글루커로니다제(β-Glucuronidase), α-람노시다제(α-Rhamnosidase) 및 β-글루코시다제(β-Glucosidase)의 저장방법에 따른 각 해당 기질에 대한 효소활성측정을 나타낸 도이다:

x축: 저장 일자(day);및

y축: 효소 활성.

도 3은 루틴(Rutin)과 대사 활성계로 작용하는 피칼라제(fecalase), 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 따로 또는 함께 처리하였을 때, 살모넬라 타이피뮤리움(*S. typhimurium*) TA98의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다:

NC : 음성 대조군;

M : 루틴 처리군;

M+EM : 루틴 및 장내 미생물 효소복합체를 함께 처리한 군;

M+S9 : 루틴 및 S9 복합체를 함께 처리한 군;

M+EM+S9 : 루틴, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 함께 처리한 군;

M+F : 루틴 및 피칼라제를 함께 처리한 군;및

M+F+S9 : 루틴, 피칼라제 및 S9 복합체를 함께 처리한 군.

도 4는 루틴과 대사 활성계로 작용하는 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 따로 또는 함께 처리하였을 때, *S. typhimurium* TA100의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다.

도 5는 루틴과 대사 활성계로 작용하는 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 따로 또는 함께 처리하였을 때, *S. typhimurium* TA102의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다.

도 6은 루틴과 대사 활성계로 작용하는 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 따로 또는 함께 처리하였을 때, *S. typhimurium* TA1535의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다.

도 7은 루틴과 대사 활성계로 작용하는 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체을 따로 또는 함께 처리하였을 때, *S. typhimurium* TA1537의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다.

도 8은 괴화(*Sophorae Flos*)와 대사 활성계로 작용하는 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체을 따로 또는 함께 처리하였을 때, *S. typhimurium* TA98의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다.

도 9는 괴화와 대사 활성계로 작용하는 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 따로 또는 함께 처리하였을 때, *S. typhimurium* TA100의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다.

도 10은 괴화와 대사 활성계로 작용하는 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 따로 또는 함께 처리하였을 때, *S. typhimurium* TA102의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다.

도 11은 괴화와 대사 활성계로 작용하는 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 따로 또는 함께 처리하였을 때, *S. typhimurium* TA1535의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다.

도 12는 괴화와 대사 활성계로 작용하는 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 따로 또는 함께 처리하였을 때, *S. typhimurium* TA1537의 복귀돌연변이 원수를 나타낸 도이다.

도 13은 선별된 균주들을 1:1:1:1로 혼합하여 제조한 장내 미생물 효소복합체및 피칼라제의 효소활성을 비교한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어 “대사 활성계” 란 인체 내의 간장 대사계 및 소화관내 대사계를 의미하며, 각 대사계에 대해 시험관 내에서 의약품 또는 식품성분 등의 독성 평가 또는 생리활성 평가를 위해 사용되는 대사 활성계로서 간장 대사계를 대신해서는 S9 복합체가 있고, 소화관내 대사계를 대신해서는 피칼라제(fecalase)가 있다. 시험물질에 따라 간장 대사계 및 소화관내 대사계에 의한 분해 정도, 활성화 정도가 상이하며, 대사 활성계에 의해 독성이 발생하는 경우도 있다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어 “장내 미생물 복합체(intestinal microbial enzyme mixture, enzyme mix)” 란 인간의 분변에서 분리하고 동정한 메가스페라 엘스데니(*Megasphaera elsdenii*), 파라박테로이즈 디스타소니스(*Parabacteroides distasonis*), 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*) 및 유박테리움 렉테일(*Eubacterium rectale*)을 1:1:1:1의 비율로 포함할 수 있다. 상기 복합체는 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드(p-nitrophenyl-β-D-glucuronide), p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드(p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside), 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드(nitrophenyl-α-L-rhamnopyranoside) 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드(p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside)에 대해 기질 활성을 가지며 소화관내 대사계로서 작용하는 것을 특징으로 하는 조성물이다.

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은, 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일을 1:1:1:1의 비율로 포함하는 장내 미생물 효소복합체를 제공한다.

[0024] 상기 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일은 인간 분변으로부터 분리된 것을 특징으로 하나, 이에 한정하지 않는다.

[0025] 상기 장내 미생물 복합체는 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드, p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드, 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드로 구성된 군으로부터 선택되는 어

느 하나 이상의 기질에 대해 효소 활성을 갖는 것을 특징으로 하나, 이에 한정하지 않는다.

[0026] 상기 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일은

[0027] 1) 인간의 분변 시료를 배양하여 균주를 수득하는 단계; 및

[0028] 2) 상기 단계 1)에서 수득한 균주로부터 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드, p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드, 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 기질에 대한 효소 활성을 나타내는 균주를 선별하는 단계를 포함하는 방법에 의해 분리된 것을 특징으로 하나, 이에 한정하지 않는다.

[0029] 또한, 본 발명은

[0030] 1) 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일을 각각 배양하는 단계;

[0031] 2) 상기 단계 1)의 배양물을 초음파 분리하여 상등액을 수득하는 단계;및

[0032] 3) 상기 단계 2)에서 수득한 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일의 상등액을 각각 1:1:1:1의 비율로 혼합하는 단계를 포함하는 장내 미생물 효소복합체의 제조방법을 제공한다.

[0033] 상기 단계 1)에서 메가스페라 엘스데니 및 파라박테로이즈 디스타소니스는 35 ~ 39℃에서 10 ~ 14시간 배양하고, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일은 35 ~ 39℃에서 22 ~ 26시간 배양하는 것이 바람직하고, 상기 메가스페라 엘스데니 및 파라박테로이즈 디스타소니스는 37℃에서 12시간 배양하고, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일은 37℃에서 24시간 배양하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0034] 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 분변의 효소에 대한 활성을 측정하고자, 건강한 성인의 신선한 분변을 채취하여 희석된 분변 추출물에 해당 기질을 첨가하여 효소의 활성을 측정하였다. 결과적으로, 100인의 분변 평균 효소활성은 개개인 사이에 상당한 차이를 보였으나 남녀간 및 나이에 따른 차이를 보이지는 않았다.

[0035] 장내 미생물을 분리 및 동정하기 위해 분변을 희석하고, 희석된 용액을 배양하였다. 배양된 균주에, 기질인 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드, p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드, 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드를 처리하여 상기 기질들 중 한 개 이상의 효소 활성이 0.5 μmol/min/mg 이상인 균주를 선별하고, 선별균의 염색체(chromosomal) DNA를 추출하고, 원핵생물 16S RNA 보편적 프라이머(universal primer)로 PCR을 실시하고 서열분석하였으며, NCBI Blast검색으로 균주를 동정하였다. 동정한 균주에서 p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드 효소활성이 우수했던 균주는 메가스페라 엘스데니였고, 팔미타제(Palmitase) 및 스테아라제(stearase) 효소활성이 우수한 균주는 파라박테로이즈 디스타소니스, p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드 효소활성이 우수했던 균주는 클렙시엘라 뉴모니애, p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드 효소활성이 우수했던 균주는 유박테리움 렉테일이었다.

[0036] 상기 균주를 배양하여 효소활성이 가장 높은 시간을 측정하였다. 측정한 결과를 기초로 하여 메가스페라 엘스데니 및 파라박테로이즈 디스타소니스 균주는 37℃에서 12 시간 배양하였고, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일 균주는 37℃에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 각각의 상기 균주를 집균하고 배지를 제거한 균체는 무게를 측정한 후, 각 균체에 혐기성 희석액을 넣어 현탁액을 만들고 현탁액을 초음파 처리하였다. 초음파 처리한 상등액을 원심분리한 후 상등액만 수집하였다. 수집된 상등액을 메가스페라 엘스데니 : 파라박테로이즈 디스타소니스 : 클렙시엘라 뉴모니애 : 유박테리움 렉테일 = 1:1:1:1로 섞은 후 0.2 ㎛ 셀룰로스(cellulose) 필터로 여과 멸균한 액을 장내 미생물 효소복합체 (enzyme mix)로 사용하였다. 그 결과, 상기 장내 미생물 효소복합체는 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드, p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드, 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드의 기질을 사용했을 때 모두 0.1 μmol/min/mg 이상인 것을 확인하였다. 또한, 기존의 분변효소액으로 잘 알려진 피칼라제를 4℃ 상태에서 보관하였을 때 시간의 변화에 따른 효소활성을 측정한 결과, β-자일로시다제(β-Xylosidase), β-글루커로니다제(β-Glucuronidase), α-람노시다제(α-Rhamnosidase) 및 β-글루코시다제(β-Glucosidase)의 경우 2주일 내에 효소활성이 현저히 저하되는 것을 확인하였으나(도 1 참조), 본 발명의 장내 미생물 효소복합체의 경우, β-자일로시다제, β-글루커로니다제, α-람노시다제 및 β-글루코시다제의 각 해당 기질에 대한 효소활성을 4℃, -20℃, 10% 글리세롤(glycerol), -80℃ 또는 동결건조 조건에서 확인하였을 때, β-자일로시다제 및 β-글루커로니다제는 온도조건과 10% 글리세롤조건에 관계없이 효소 활성이 일정하였고, α-람노시다제 및 β-글루코시다제의

경우 조건에 따라 효소 활성이 급격히 변하는 것을 확인하였다. 가장 안정한 조건은 동결건조하여 보관하는 조건이었다(도 2 참조). 또한, 장내 미생물 효소복합체 및 피칼라제(fecalase)의 활성을 비교하였을 때, β-글루커로니다제, β-자일로파이라노시다제, α-람노파이라노시다제, 아릴설파타제(Arylsulfatase) 및 β-글루코파이라노시다제에 대해 서로 유사한 활성을 보이는 것을 확인하였다(도 13 참조).

[0037] 에임즈 시험법에 상기 장내 미생물 효소복합체를 소화관내 대사계로 적용하였을 때, 피칼라제를 소화관내 대사계로 적용한 경우와 마찬가지로 돌연변이원으로 쓰인 시료 루틴 및 괴화에 대하여 *S .typhimurium* 균주에서 복귀돌연변이원수가 유의적으로 증가하였다(도8 내지 도12 참조).

[0038] 본 발명의 장내 미생물 효소복합체를 소화관내 대사계에 대한 대사 활성계로 이용하여, 유전독성 평가시험 또는 생리활성 평가에 적용할 수 있으므로, 상기 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일 균주를 포함하는 장내 미생물은 장내 미생물 효소복합체로서 유용하게 사용할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 장내 미생물 효소복합체를 유효성분으로 포함하는 검체의 유전 독성 평가용 약학적 조성물을 제공한다.

[0040] 상기 유전 독성 평가는 시험관 내 염색체이상시험, 시험관 내 소핵시험, 쥐 임파종 분석, 시험관 내 포유류 세포 소핵시험, 코멧 분석, 포유류 정원세포 염색체 이상 분석, SOS 크로모테스트 및 복귀돌연변이 시험인 에임즈 시험법으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하나, 이에 한정하지 않는다

[0041] 아울러, 본 발명은 상기 장내 미생물 효소복합체를 유효성분으로 포함하는 검체의 생리활성 평가용 약학적 조성물을 제공한다.

[0042] 상기 생리 활성 평가는 전자공여능 평가, SOD 유사 활성 평가, 아질산염 분해 작용 측정을 통한 항산화 활성 평가 및 항알러지 효과 평가로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하나, 이에 한정하지 않는다.

[0043] 상기 검체는 의약품 또는 식품인 것을 특징으로 하나, 이에 한정하지 않는다.

[0044] 상기 장내 미생물 효소 복합체는 소화관내 대사계로서 작용하는 것을 특징으로 하나, 이에 한정하지 않는다.

[0045] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 소화관내 대사계를 대신하여 기존에 사용되어왔던 분변 효소액(fecalase)를 제조하였다. 피칼라제, 장내 미생물 효소복합체 및 S9 복합체를 대사 활성계로 사용하여 살모넬라 타이피뮤리움(*S. typhimurium*) 균주의 복귀돌연변이원 수를 계수하였다. 구체적으로, 한약 및 식품의 성분인 루틴(Rutin) 또는 한약인 괴화(*Sophorae Flos*)에 대해 장내 미생물 효소복합체가 대사 활성계로 작용할 수 있는지 확인하기 위하여 루틴 또는 괴화를 분변으로부터 분리한 피칼라제, S9 복합체 및 장내 미생물 효소복합체를 따로 또는 함께 처리하여 *S. typhimurium* 균주의 복귀돌연변이원 수를 계수하였다. 그 결과, 상기 시료를 분변으로부터 분리한 피칼라제와 S9 복합체를 함께 처리하였을 때, 유의적으로 *S. typhimurium* TA98에서 복귀돌연변이원수가 유의적으로 증가하였고, 장내 미생물 효소복합체를 사용함에 따라서도 유의적으로 증가하였다(도3 내지 도12 참조).

[0046] 본 발명의 장내 미생물 효소복합체는 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드, p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드, 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드에 대해 기질 활성을 가지며, 에임즈 시험에 대사 활성계로 적용하였을 때, 기존에 소화관내 대사계로 사용되어 왔던 피칼라제를 적용했을 때와 유의적으로 복귀돌연변이원 수가 증가함을 확인하였으므로, 본 발명의 장내 미생물 효소복합체를 소화관내 대사계에 대한 대사 활성계로 이용하여, 유전독성 평가시험인 시험관 내 염색체이상시험, 시험관 내 소핵시험, 쥐 임파종 분석, 시험관 내 포유류 세포 소핵시험, 코멧 분석, 포유류 정원세포 염색체 이상 분석, SOS 크로모테스트 및 복귀돌연변이 시험인 에임즈 시험법 또는 생리 활성 평가인 전자공여능 평가, SOD 유사 활성 평가, 아질산염 분해 작용 측정을 통해 항산화 활성 평가 및 항알러지 효과 평가에 적용할 수 있다.

[0047] 따라서, 상기 메가스페라 엘스데니, 파라박테로이즈 디스타소니스, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일 균주를 포함하는 장내 미생물은 장내 미생물 효소복합체는 검체의 유전독성평가용 또는 생리활성 평가용 조성물로서 유용하게 사용할 수 있다.

[0048] 이하, 본 발명은 하기의 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다.

[0049] 단, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일뿐 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0050] **<실시예 1> 분변효소 제조 및 활성 측정**

[0051] 분변의 효소에 대한 활성을 측정하고자, 건강한 성인의 신선한 분변 1~10 g 이상 채취하여 4℃상태에서 신속하게 3배의 혐기성 희석액을 넣어 현탁액을 만든다. 혐기성 배지 희석액의 조성은 다음과 같다.

표 1

[0052]

소디움 포스페이트, 다이베이직(Sodium phosphate, dibasic , $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	6.0 g
포타슘 포스페이트 모노베이직(Potassium phosphate, monobasic (Na_2HPO_4, anhydrous)	4.5 g
트윈 80(Tween 80)	0.5 g
L-시스테인 하이드로클로라이드(L-cysteine hydrochloride)	0.5 g
증류수(Water, distilled)	1 L

[0053] 분변시료 현탁액을 500×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 추출한 후 상등액을 1분 간격으로 10회 초음파처리 하였다. 초음파처리 현탁액을 10,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상등액 추출하였다.

[0054] 희석된 분변 추출물에 β-글루커로니다제(β-glucuronidase), α-아라비노파이라노시다제(α-arabinopyranosidase), β-갈락토파이라노시다제(β-galactopyranosidase), β-자일로파이라노시다제(β-xylopyranosidase),

[0055] 리파제(팔미타제)(lipase(palmitase)), 리파제(스테아라타제)(lipase(stearatase)), β-아라비노파이라노시다제(β-arabinopyranosidase), β-셀로비오시다제(β-cellobiosidase), α-퍼코파이라노시다제(α-fucopyranosidase), β-퍼코파이라노시다제(β-fucopyranosidase), β-말토시다제(β-maltosidase), α-람노시다제(α-rhamnosidase), N-아세틸-α-갈락토스아미다제(N-acetyl-α-galactosamidase), N-아세틸-β-갈락토스아미다제(N-acetyl-β-galactosamidase), N-아세틸-β-글루코스아미다제(N-acetylβ-glucosamidase), α-아라빈퍼라노시다제(α-arabinfuranosidase), α-갈락토파이라노시다제(α-galactopyranosidase), α-자일로파이라노시다제(α-xylopyranosidase), β-만노파이라노시다제(β-mannopyranosidase), 설파제(Sulfatase) 및 β-글루코파이라노시다제(β-glucopyranosidase)에 해당하는 기질을 첨가하여 효소의 활성을 측정하였다. 결과적으로, 100인의 분변 평균 효소활성은 개개인 사이에 상당한 차이를 보였으나 남녀간 및 나이에 따른 차이를 보이지는 않았다.

[0056] **<실시예 2> 장내 미생물(intestinal microorganism) 동정**

[0057] 장내 미생물을 분리 및 동정하기 위해 건강한 성인 신선한 분변 1~10 g 이상 채취하여 신속하게 2~20배의 희석용 혐기성배지로 10^{-5}, 10^{-6} 또는 10^{-7} 의 농도로 희석하였다. 희석된 용액을 GAM(Gifu anaerobic medium) 배지, 혈액함유 GAM 배지, 혈액첨가 BL(Glucose-blood liver agar) 배지, TS(tryptic soy) 배지에 접종하고 TS 배지는 호기적 조건에서 24시간 배양하고, 나머지 배지는 혐기적 조건에서 72시간 배양하였다. 배양된 균주를 각 평판배지에서 10개씩 선택하여 혈청함유 반유동 GAM 배지에 이식하여 보관하였다. 기질인 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드, p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드, 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드를 사용하여 상기 기질들 중 한 개 이상의 효소 활성이 0.5 μmol/min/mg 이상인 균주를 선별하고 그람 염색하였다. 이어서 선별균의 염색체(chromosomal) DNA를 추출하고, 원핵생물 16S RNA 보편적 프라이머(universal primer)로 PCR를 실시하고 서열분석하였으며, NCBI Blast검색으로 균주를 동정하였다.

[0058] 동정한 균주에서 p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드 효소활성이 우수했던 균주는 메가스페라 엘스데니였고, 팔미타제(Palmitase) 및 스테아라제(stearase) 효소활성이 우수한 균주는 파라박테로이즈 디스타소니스, p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드 효소활성이 우수했던 균주는 클렙시엘라 뉴모니애, p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드 효소활성이 우수했던 균주는 유박테리움 렉테일이었다.

[0059] **<실시예 3> 장내 미생물 효소복합체 (intestinal microbial enzyme mixture, enayme mix)의 제조**

[0060] 상기 <실시예 1> 에서 분리된 각각의 균주를 배양하여 효소활성이 가장 높은 시간을 측정하였다. 측정한 결과를 기초로 하여 메가스페라 엘스데니 및 파라박테로이즈 디스타소니스 균주는 37℃에서 12 시간 배양하였고, 클렙시엘라 뉴모니애 및 유박테리움 렉테일 균주는 37℃에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 각각의 상기 균주를 4℃에서 8000 × g 로 30분간 집균하고 배지를 제거한 균체는 무게를 측정한 후 사용전까지 -80℃에서 보관하였다. 각 균체 1 g에 혐기성 희석액 9 ml를 넣어 현탁액을 만들고 현탁액을 1분 간격으로 10회 초음파 처리하였다. 초음파 처리한 상등액을 10,000 × g에서 20분간 원심분리한 후 상등액만 수집하였다. 수집된 상등액을 메가스페라 엘스데니 : 파라박테로이즈 디스타소니스 : 클렙시엘라 뉴모니애 : 유박테리움 렉테일 = 1:1:1:1로 섞은 후 0.2 ㎛ 셀룰로스(cellulose) 필터로 여과 멸균한 액을 장내 미생물 효소복합체 (enzyme mix)로 사용하였다.

[0061] 그 결과, 상기 장내 미생물 효소복합체는 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드, p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드, 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드의 기질을 사용했을 때 모두 0.1 μmol/min/mg 이상인 것을 확인하였다. 또한, β-자일로시다제(β-Xylosidase), β-글루커로니다제(β-Glucuronidase), α-람노시다제(α-Rhamnosidase) 및 β-글루코시다제(β-Glucosidase)의 각 해당 기질에 대한 효소활성을 4℃, -20℃, 10% 글리세롤(glycerol), -80℃ 또는 동결건조 조건에서 확인하였을 때, β-자일로시다제 및 β-글루코시다제는 온도조건과 10% 글리세롤조건에 관계없이 효소 활성이 일정하였으나, β-글루커로니다제 및 α-람노시다제의 경우 조건에 따라 효소 활성이 급격히 변하는 것을 확인하였다. 가장 안정한 조건은 동결건조하여 보관하는 조건이었다(도 2). 또한, 장내 미생물 효소복합체 및 피칼라제(fecalase)의 활성을 비교하였을 때, β-글루커로니다제, β-자일로파이라노시다제, α-람노파이라노시다제, 아릴설파제(Arylsulfatase) 및 β-글루코파이라노시다제에 대해 유사한 활성을 보이는 것을 확인하였다(도 13).

[0062] **<비교예 1> 피칼라제 제조**

[0063] 건강한 성인 분변 10 g 이상 채취하여 질소가스를 채워 냉장(4℃)로 신속하게 운반한다. 분변 무게 3배 혐기성 배지 희석액을 넣어 현탁액을 만든 후 500 × g 에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 수득하였다. 혐기성 배지 희석액의 조성은 상기 표 1과 같다.

[0064] 상등액을 1분 간격으로 10회 초음파처리한 후, 초음파처리 현탁액을 10,000 × g에서 10분간 원심분리하여 상등액 5 ㎖을 취한 후 세파크릴 S-300 컬럼 크로 마토그래피(Sephacryl S-300 column chromatography(2 ×10 cm))를 하여 분획을 수집하였다. 이 때의 분획량은 1.5 ㎖이다. 각 분획에 대해, 기질인 p-나이트로페닐-β-D-글루커로니드(p-nitrophenyl-β-D-glucuronide), p-나이트로페닐-β-D-자일로파이라노시드(p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside), 나이트로페닐-α-L-람노파이라노시드(nitrophenyl-α-L-rhamnopyranoside) 및 p-나이트로페닐-β-D-글루코파이라노시드(p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside)을 사용하여 효소활성을 측정하였다. 상기 네 가지 기질에 대해 0.1 μmol/min/mg 이상의 값을 나타내는 두 개의 분획을 모아 0.2 ㎛ 필터로 여과멸균하여 얻은 액을 분변 효소액(fecalase)으로 사용하였다.

[0065] 그 결과, 피칼라제를 4℃상태에서 보관하였을 때 시간의 변화에 따른 효소활성을 측정 한 결과, β-글루커로니다제, β-자일로파이라노시다제, α-람노파이라노시다제 및 β-글루코파이라노시다제의 경우 시간이 지남에 따라 효소 활성이 현저히 저하되는 것을 확인하였다(도 1).

[0066] **<실시예 4> 에임즈 시험법**

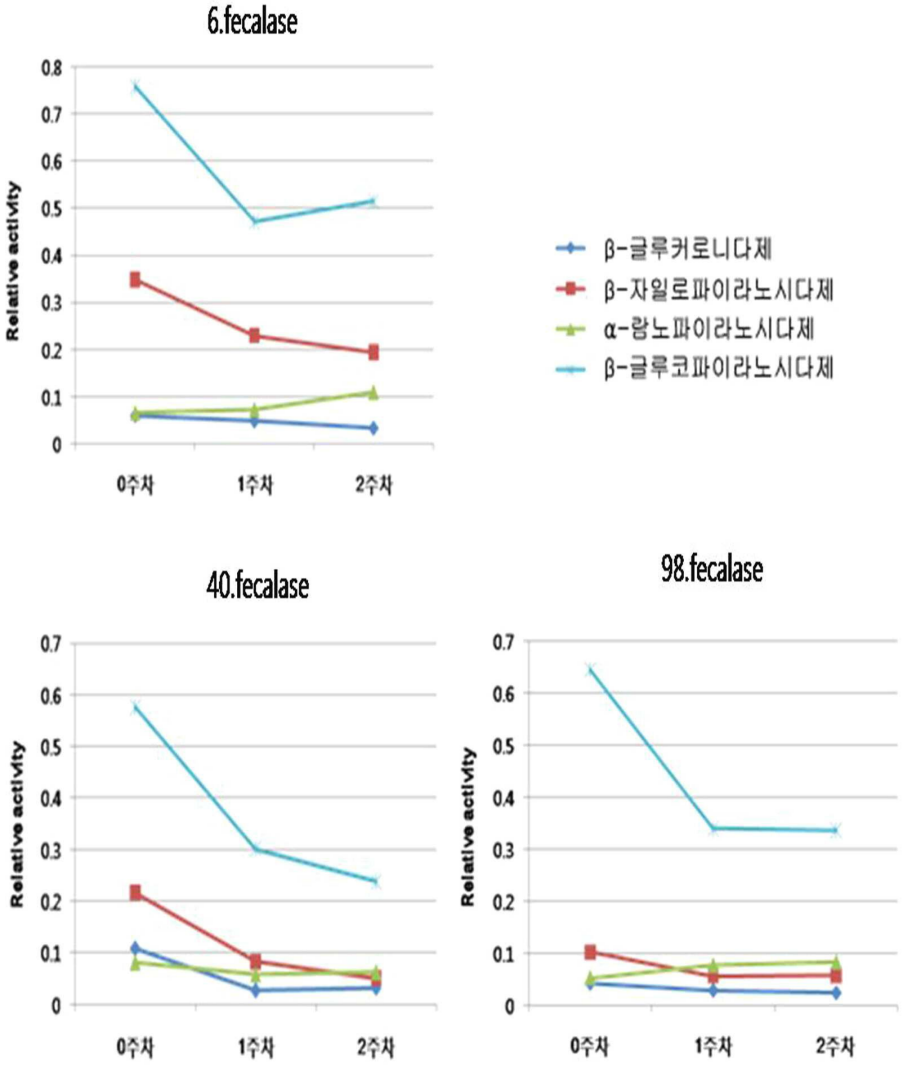
[0067] 효소 활성 측정 후에 기준에 적합한 피칼라제 또는 상기 장내 미생물 효소복합체를 이용하여 살모넬라 타이피뮤리움(*S. typhimurium*) TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537 균주에 대해 에임즈 시험을 실시하였다. 구체적으로, pKM101 플라스미드를 가지고 있는 *S. typhimurium* 균주 (TA98, 100 및 102)는 앰피실린(ampicillin)을 25 ㎍/㎖를 포함하는 멸균 영양 브로스(nutrient broth)에서 배양하였고, pAQ1 플라스미드를 가지는 *S. typhimurium* 균주(TA102)는 테트라사이클린(tetracycline) 2 ㎍/㎖을 포함하는 멸균 영양 브로스에서 배양하였다. R-플라스미드를 가지지 않는 *S. typhimurium* 균주(TA 1535 및 TA1537)는 항생제를 포함하지 않는 멸균 영양 브로스에서 배양하였다. 배지 10 ㎖에 동결 보관하였던 균주 10 ㎕를 접종하고, 접종 후 37℃ 에서 150 rpm

으로 진탕 배양하였다. 배양시간은 각 균주의 생장속도에 맞추어 TA100은 10~12시간, TA102 및 TA1535은 12~16 시간, TA98 및 TA1537은 14~16 시간 배양하였다. 시험관(5 ㎖)을 45℃의 항온수조에서 10분간 예열시킨 후 탑 아가(top agar) 2 ㎖를 넣었고, 0.5 mM L-히스티딘·HCl(L-histidine·HCl) 및 0.5 mM 비오틴(biotin) 용액을 각각 0.2 ㎖씩 넣었다. 상기 배양된 *S. typhimurium* TA98 또는 TA100, TA102, TA1535 및 TA1537의 세균현탁액 0.1 ㎖에 시료인 루틴 또는 괴화(*Sophorae Flos*)를 첨가하고, S9 복합체 0.5 ㎖ 및 피칼라제(fecalase) 0.5 ㎖, 또는 S9 복합체 0.5 ㎖ 및 장내 미생물 효소복합체 0.5 ㎖을 첨가하여 아가가 고루 섞이도록 잘 흔들어 주었다. 상기 제작된 Vogel-Bonner 한천평판배지 위에 배양혼합액을 부어 넣고 고루 퍼지도록 하였다. 접종된 평판배지는 37℃에서 48시간 배양한 후 집락(colony)을 계수하였다.

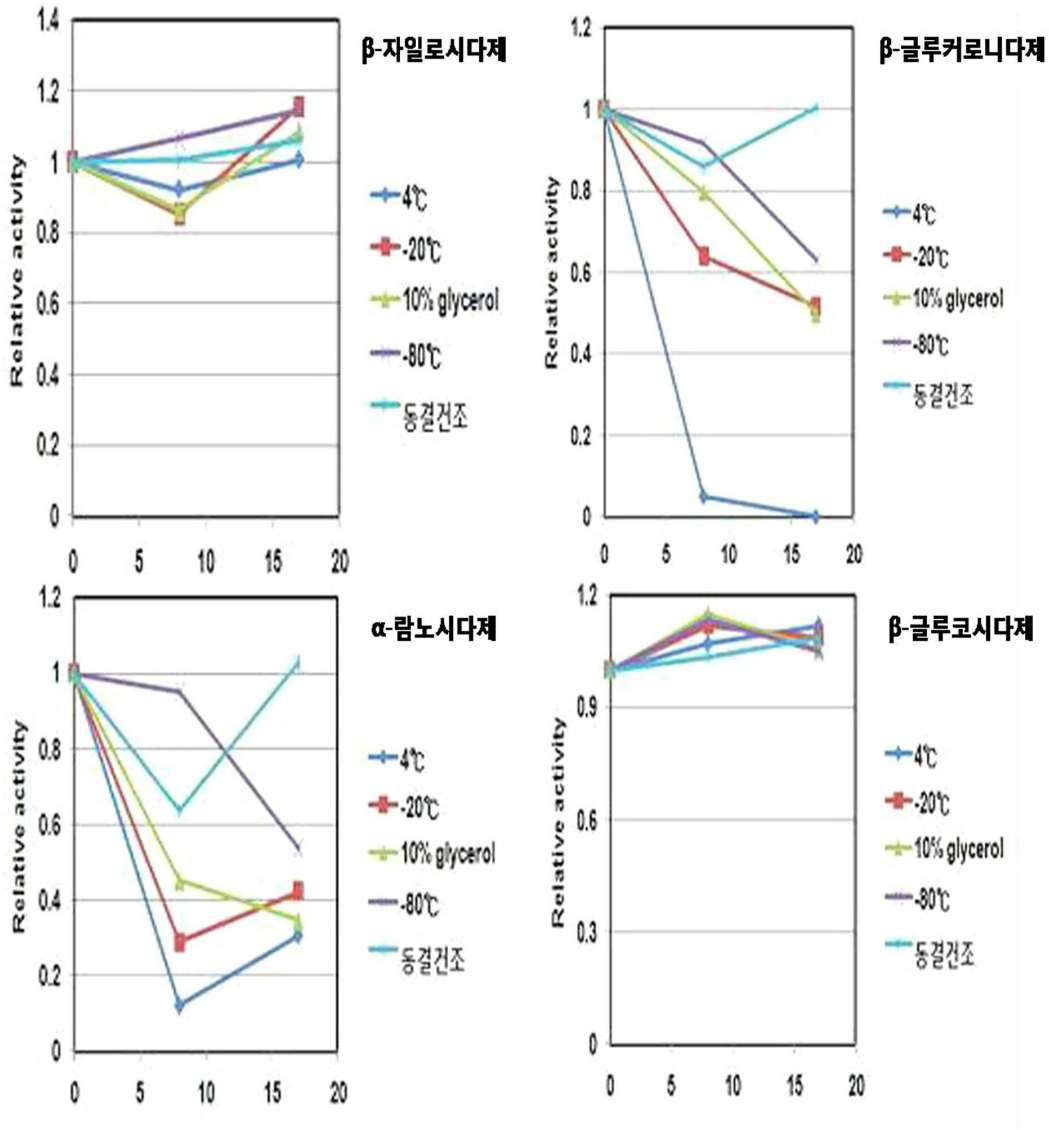
[0068] 그 결과, 한약 및 식품의 성분인 루틴은 쿼세틴(quercetin)을 투여한 경우와 같이 유의적으로 *S. typhimurium* TA98에서 복귀돌연변이원수가 유의적으로 증가하였고, 장내 미생물 효소복합체를 사용함에 따라서도 유의적으로 증가하였다(도3 내지 도7). 또한 괴화의 경우 피칼라제와 마찬가지로 장내 미생물 효소복합체를 사용함에 따라 복귀돌연변이원수가 유의적으로 증가하였다(도8 내지 도12).

도면

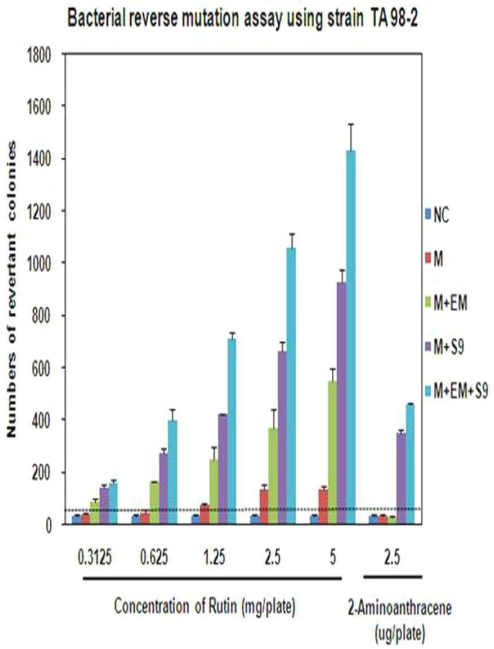
도면1

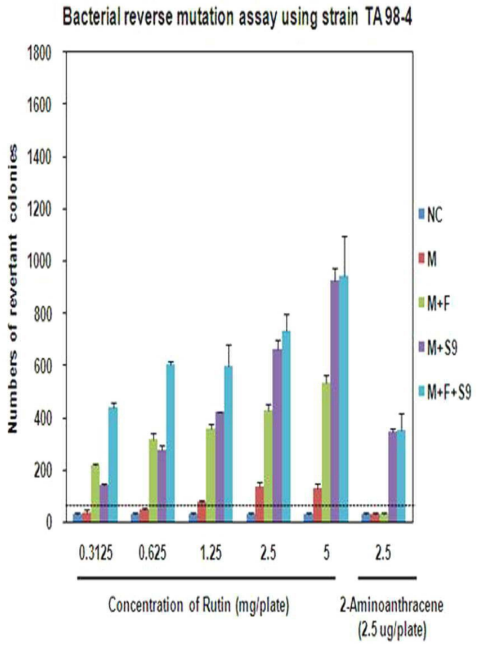


도면2

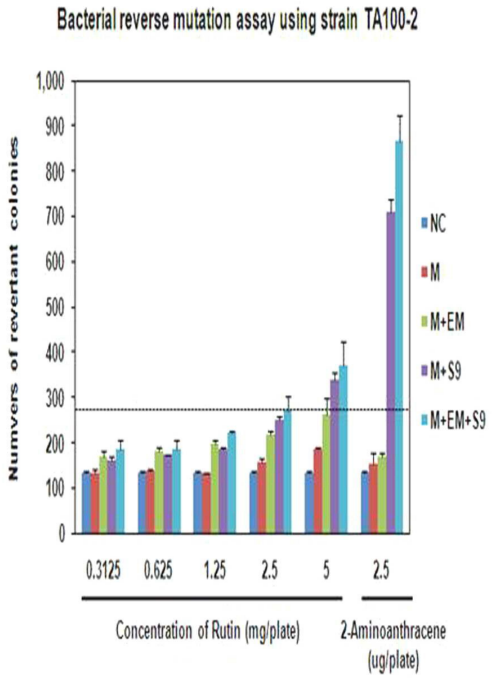

β-자일로시다제
Relative activity
4℃
-20℃
10% glycerol
-80℃
동결건조
β-글루커로니다제
Relative activity
4℃
-20℃
10% glycerol
-80℃
동결건조
α-람노시다제
Relative activity
4℃
-20℃
10% glycerol
-80℃
동결건조
β-글루코시다제
Relative activity
4℃
-20℃
10% glycerol
-80℃
동결건조

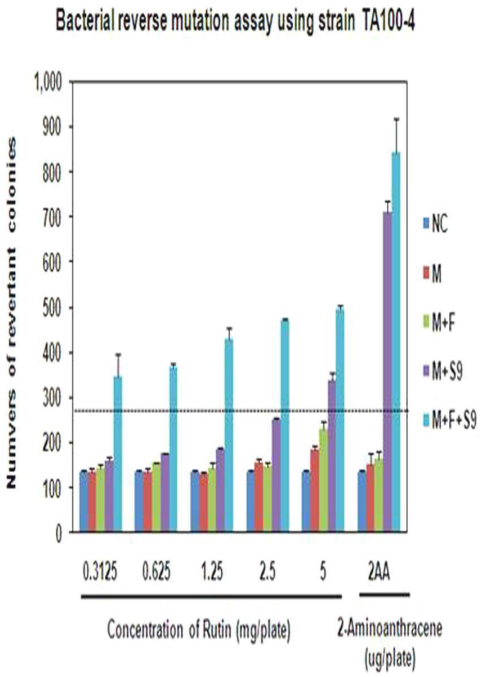
도면3


Bacterial reverse mutation assay using strain TA98-2
Numbers of revertant colonies
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+EM+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of Rutin (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

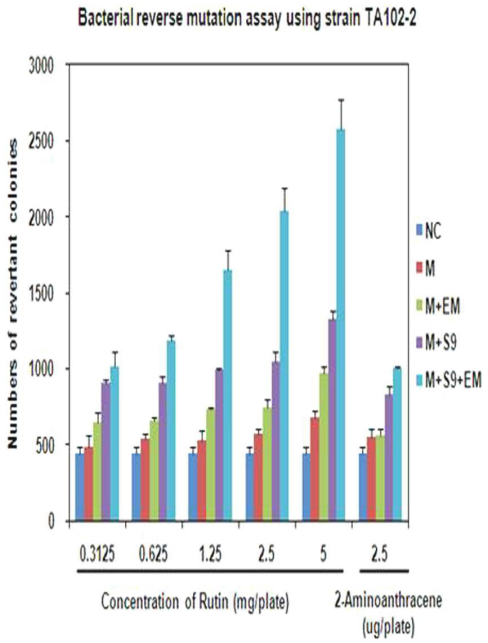

Bacterial reverse mutation assay using strain TA98-4
Numbers of revertant colonies
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
NC
M
M+F
M+S9
M+F+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of Rutin (mg/plate)
2-Aminoanthracene (2.5 ug/plate)

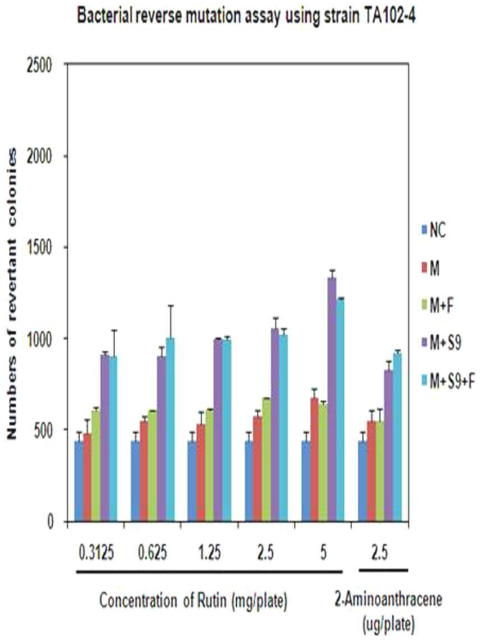
도면4


Bacterial reverse mutation assay using strain TA100-2
Numvers of revertant colonies
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+EM+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of Rutin (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

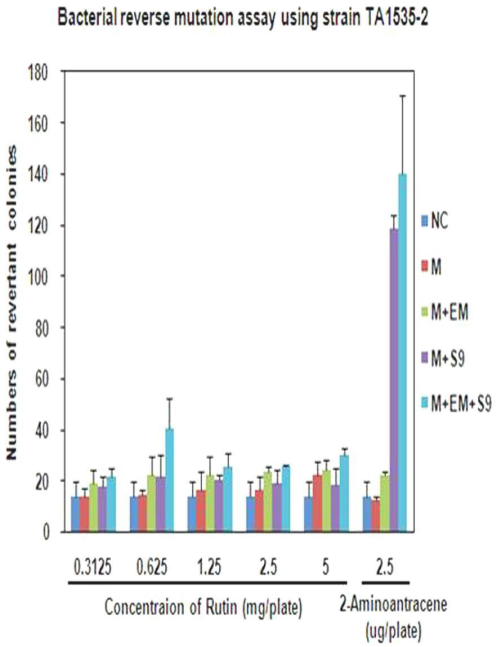

Bacterial reverse mutation assay using strain TA100-4
Numvers of revertant colonies
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
NC
M
M+F
M+S9
M+F+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2AA
Concentration of Rutin (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

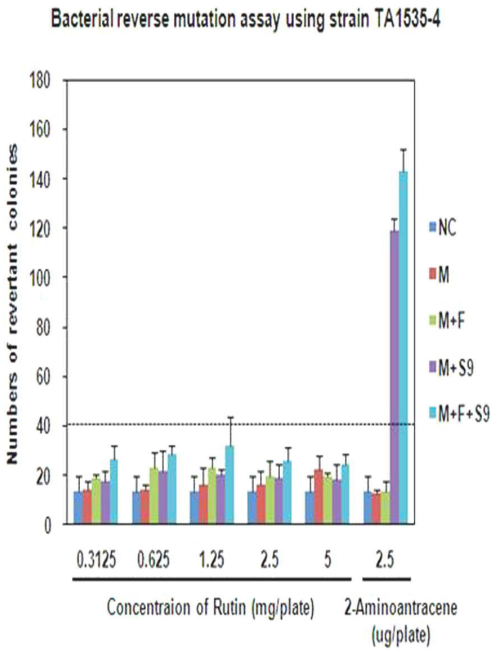
도면5


Bacterial reverse mutation assay using strain TA102-2
Numbers of revertant colonies
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+S9+EM
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of Rutin (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

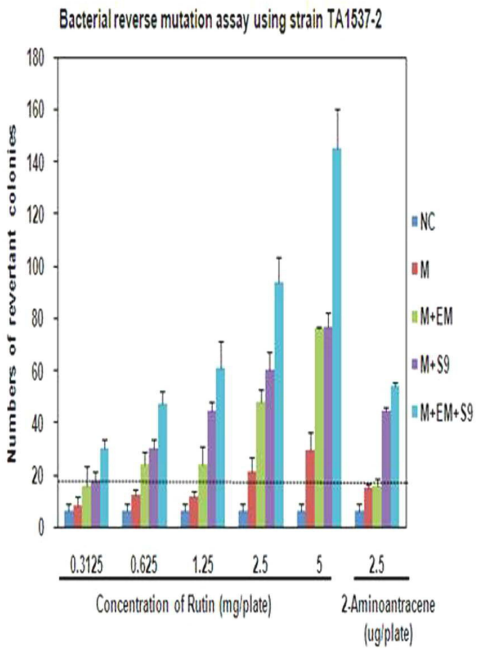

Bacterial reverse mutation assay using strain TA102-4
Numbers of revertant colonies
2500
2000
1500
1000
500
0
NC
M
M+F
M+S9
M+S9+F
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of Rutin (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

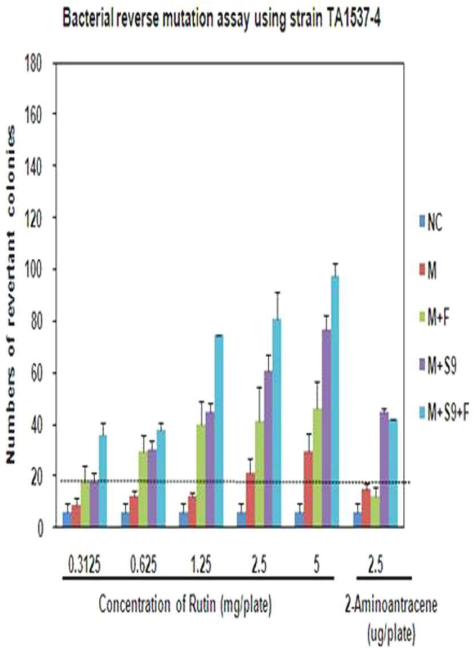
도면6


Bacterial reverse mutation assay using strain TA1535-2
Numbers of revertant colonies
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+EM+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentraion of Rutin (mg/plate)
2-Aminoantracene (ug/plate)

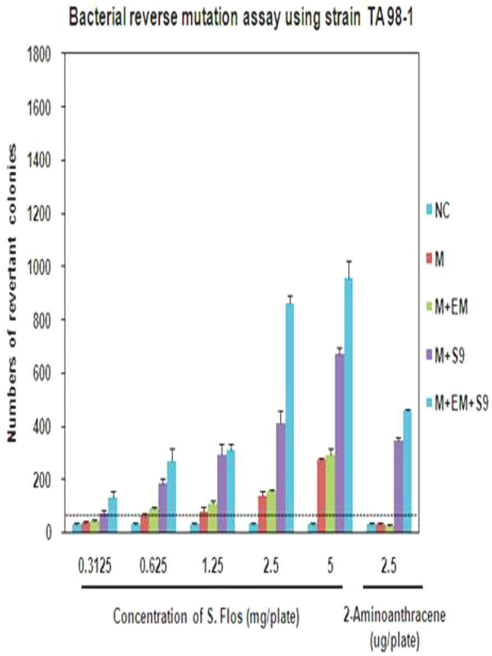

Bacterial reverse mutation assay using strain TA1535-4
Numbers of revertant colonies
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NC
M
M+F
M+S9
M+F+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentraion of Rutin (mg/plate)
2-Aminoantracene (ug/plate)

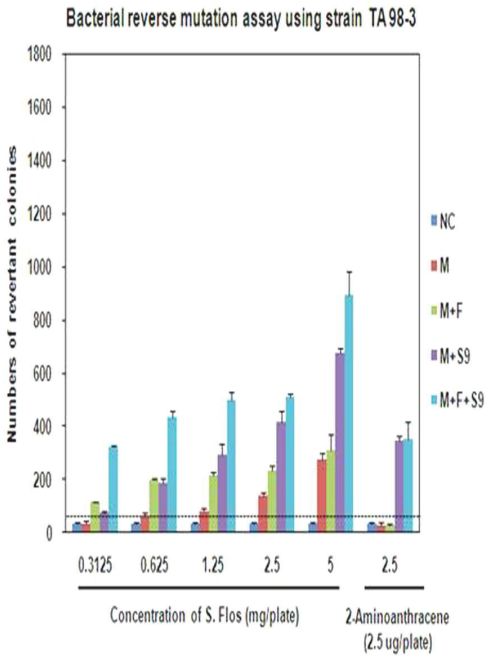
도면7


Bacterial reverse mutation assay using strain TA1537-2
Numbers of revertant colonies
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+EM+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of Rutin (mg/plate)
2-Aminoantracene (ug/plate)

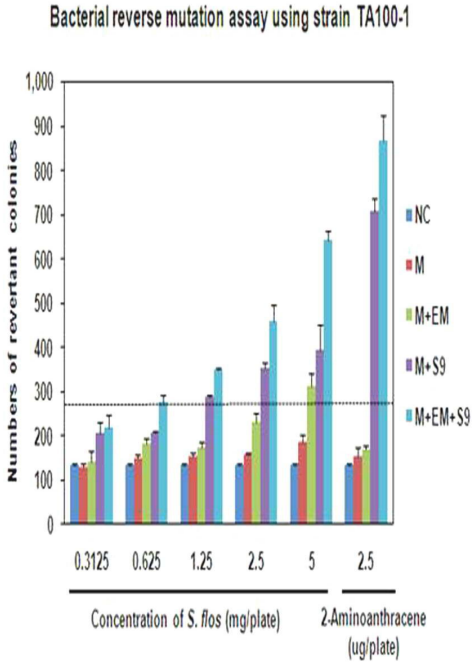

Bacterial reverse mutation assay using strain TA1537-4
Numbers of revertant colonies
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NC
M
M+F
M+S9
M+S9+F
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of Rutin (mg/plate)
2-Aminoantracene (ug/plate)

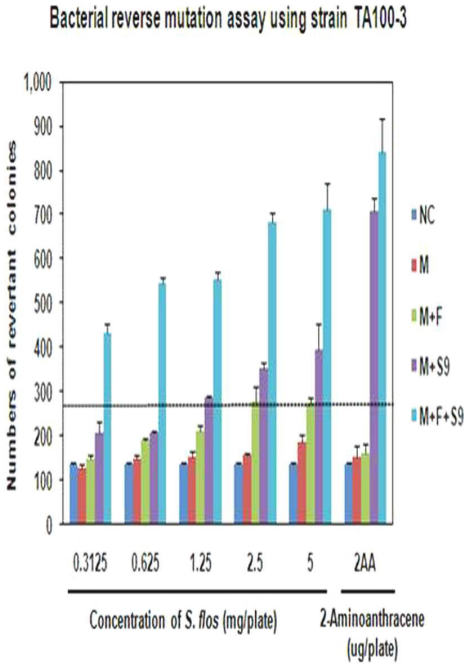
도면8


Bacterial reverse mutation assay using strain TA98-1
Numbers of revertant colonies
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+EM+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of S. Flos (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

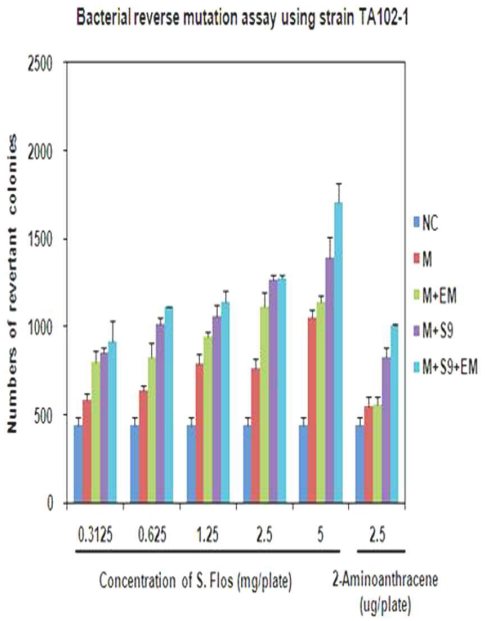

Bacterial reverse mutation assay using strain TA98-3
Numbers of revertant colonies
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
NC
M
M+F
M+S9
M+F+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of S. Flos (mg/plate)
2-Aminoanthracene (2.5 ug/plate)

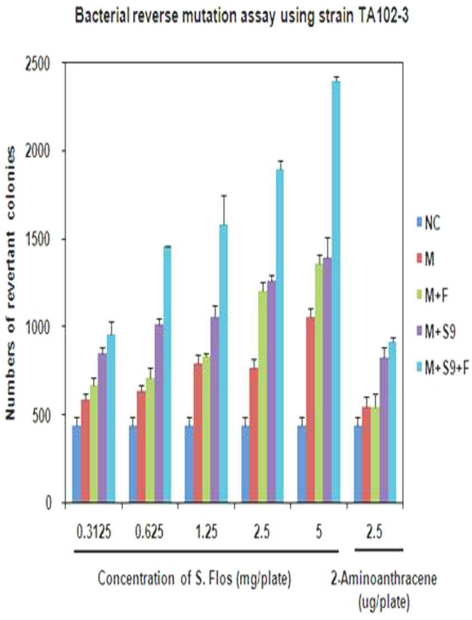
도면9


Bacterial reverse mutation assay using strain TA100-1
Numbers of revertant colonies
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+EM+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of S. flos (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

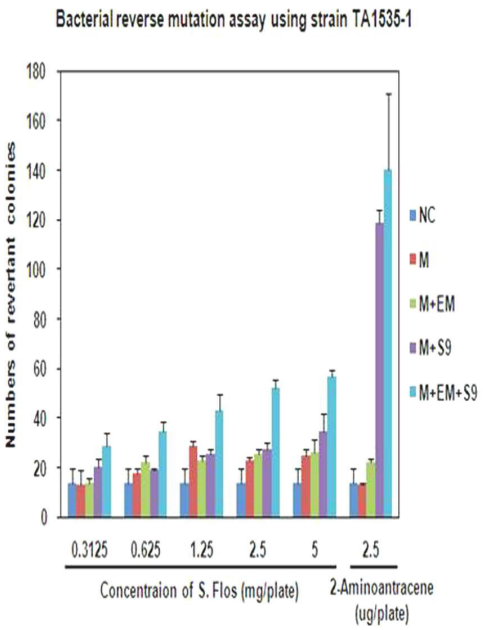

Bacterial reverse mutation assay using strain TA100-3
Numbers of revertant colonies
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
NC
M
M+F
M+S9
M+F+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2AA
Concentration of S. flos (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

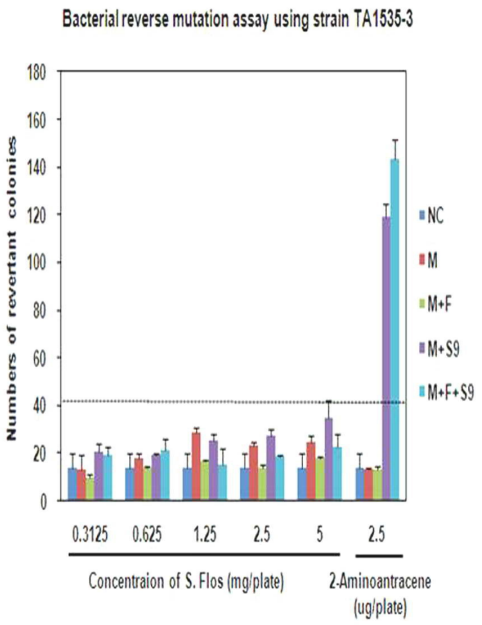
도면10


Bacterial reverse mutation assay using strain TA102-1
Numbers of revertant colonies
2500
2000
1500
1000
500
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+S9+EM
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of S. Flos (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

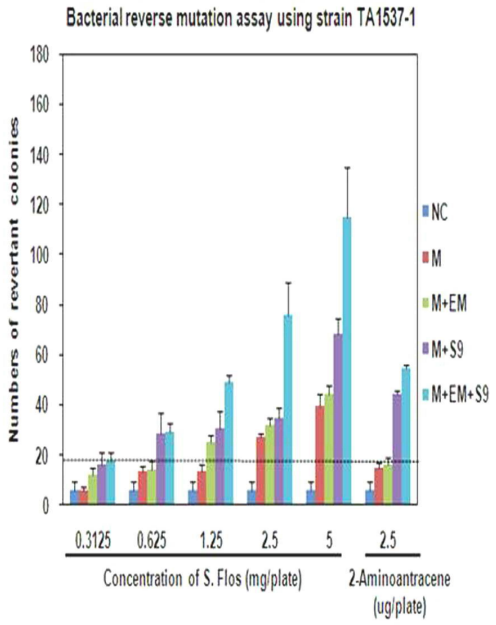

Bacterial reverse mutation assay using strain TA102-3
Numbers of revertant colonies
2500
2000
1500
1000
500
0
NC
M
M+F
M+S9
M+S9+F
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of S. Flos (mg/plate)
2-Aminoanthracene (ug/plate)

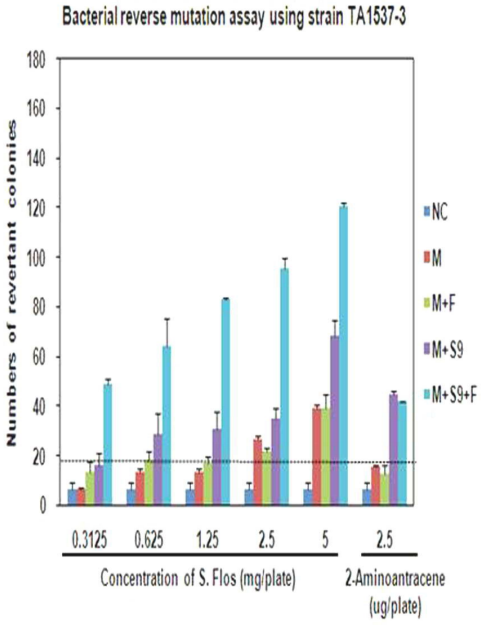
도면11


Bacterial reverse mutation assay using strain TA1535-1
Numbers of revertant colonies
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+EM+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentraion of S. Flos (mg/plate)
2-Aminoantracene (ug/plate)

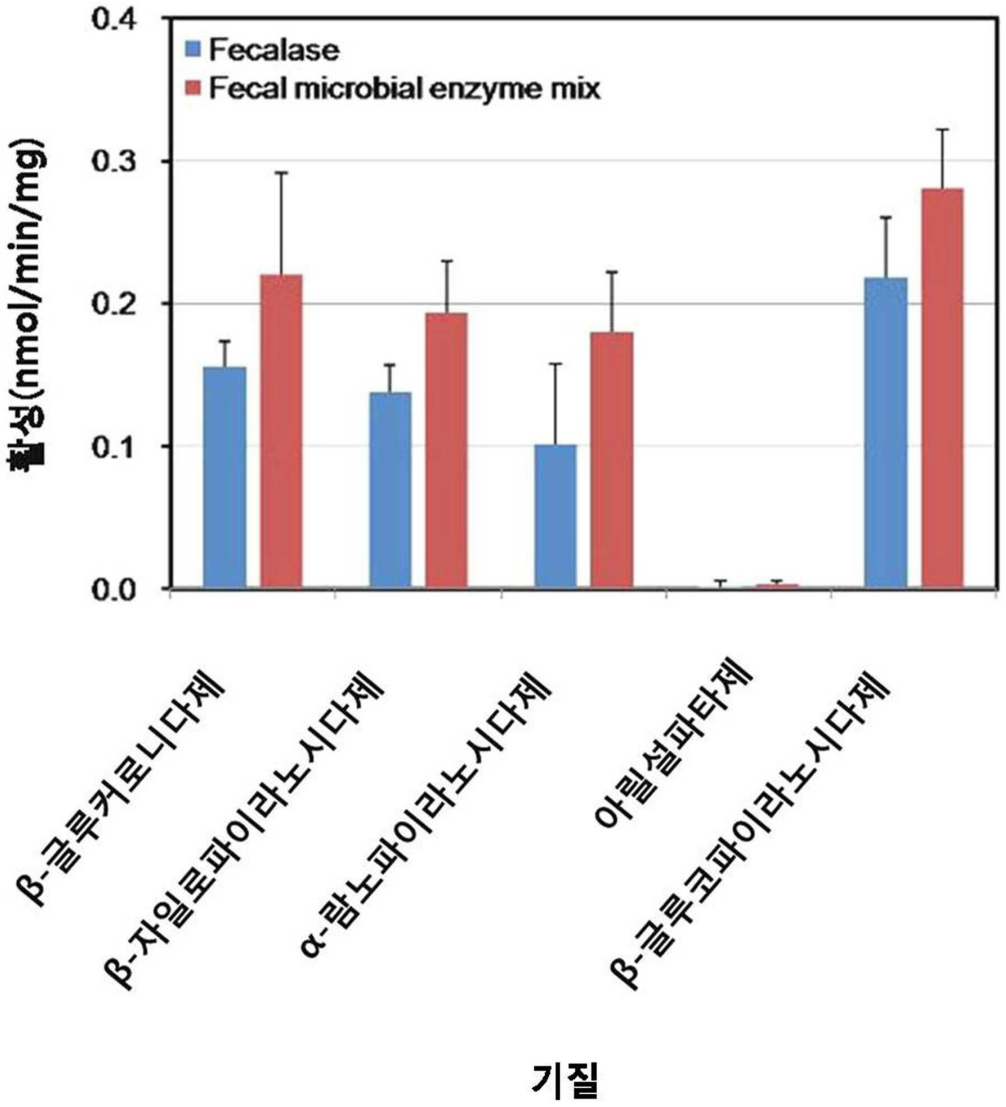

Bacterial reverse mutation assay using strain TA1535-3
Numbers of revertant colonies
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NC
M
M+F
M+S9
M+F+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentraion of S. Flos (mg/plate)
2-Aminoantracene (ug/plate)

도면12


Bacterial reverse mutation assay using strain TA1537-1
Numbers of revertant colonies
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NC
M
M+EM
M+S9
M+EM+S9
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of S. Flos (mg/plate)
2-Aminoantracene (ug/plate)


Bacterial reverse mutation assay using strain TA1537-3
Numbers of revertant colonies
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NC
M
M+F
M+S9
M+S9+F
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
2.5
Concentration of S. Flos (mg/plate)
2-Aminoantracene (ug/plate)

도면13


0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Fecalase
Fecal microbial enzyme mix
활성(nmol/min/mg)
β-글루커로니다제
β-자일로파이라노시다제
α-람노파이라노시다제
아릴설파타제
β-글루코파이라노시다제
기질