



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0002857
(43) 공개일자 2012년01월09일

(51) Int. Cl.

A61K 31/35 (2006.01) A61K 31/335 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0063571

(22) 출원일자 2010년07월01일

심사청구일자 2010년07월01일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309-2, 조선대학교 내
(서석동, 조선간호대학교사)

인제대학교 산학협력단

경상남도 김해시 인제로 197 (어방동,
인제대학교)

(72) 발명자

정원교

광주광역시 서구 풍암2로 84, 102동 301호 (풍암
동, 한국아파트)

최일환

부산광역시 연제구 고분로 200, 108동 301호 (연
산동, 연산엘지아파트)

(74) 대리인

위병갑, 성정현

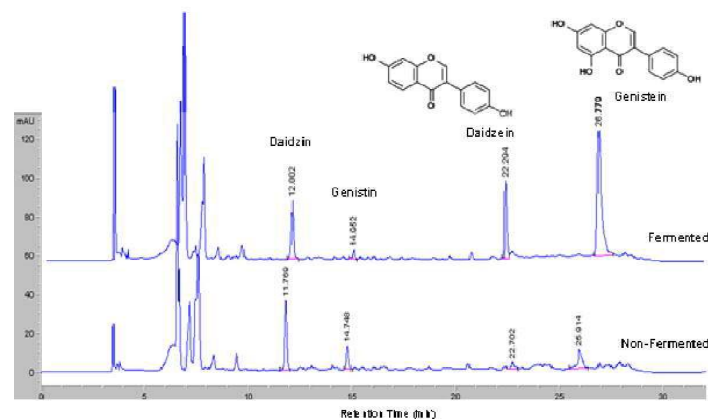
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 골질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물 및 골질환 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 발효 된장 추출물은 조골세포의 분화를 촉진하여 골 형성을 촉진하는 효과 및 뼈의 미네랄화작용을 증가시키는 효과를 제공할 뿐만 아니라, 천연물질로부터 추출된 것을 사용하여 생체 안정성이 우수하기 때문에 종래의 골질환 치료제들에 비해 독성으로 인한 각종 부작용을 유발하지 않으므로 각종 골질환들을 예방 및 치료할 수 있는 치료제 및 골 형성 능력을 개선할 수 있는 기능성 식품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 발효 된장 추출물은 된장을 25 ~ 35℃에서 40 ~ 60일 동안 발효시킨 발효 된장을 물 또는 유기용매에 가용하여 추출한 것임을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 추출물은 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein) 및 글리시테인(glycitein) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 이소플라본 아글리콘을 함유하는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 이소플라본 아글리콘은 상기 발효 된장 추출물 1g 당 다이드제인 120 ~ 610 μ g/g, 제니스테인 390 ~ 560 μ g/g 및 글리시테인 130 ~ 450 μ g/g의 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 골질환은 골다공증, 골연화증, 구루병, 골감소증, 저인산혈증, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골형성부진증, 골위축, 골이영양증, 파제트병(변형성골염), 암세포의 골전이에 의해 유발되는 뼈의 손상 및 고칼슘혈증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 조골세포(osteoblast)의 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 조골세포(osteoblast)에 의한 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase; ALP)의 활성을 증가시키고, 오스테오칼신(osteocalcin; OC)의 발현을 증가시켜 골 형성을 촉진하는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 제1형 콜라겐의 합성을 유도함으로써 골 형성을 촉진하는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물 및 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 개선용 건강보조식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 뼈 조직의 2/3는 주로 칼슘 포스페이트로 이루어진 무기물이고, 1/3은 주로 콜라겐으로 이루어진 유기물질로 구성되어 있다. 골조직에는 뼈 선조세포(osteoprogenitor cells), 조골세포(osteoblast), 파골세포(Osteoclast), 골내세포(Osteocyte) 등이 있는데, 파골세포는 기원이 다른 별개의 세포이고 나머지는 활성 상태가 다를 뿐 같은 세포이다. 이 중 뼈를 재생하는 조골세포는 골의 표면에 위치하며, 뼈 형성에 필요한 콜라겐 섬유(collagen fiber)를 합성 분비한다. 또한, 조골세포의 세포막에는 중성 및 알칼리성 포스파타제(phosphatase)가 많이 분포하고 있으며, 이들에 의해 PO_4^{3-}/Ca^{2+} 가 침착되어 뼈의 석회화(calcification)가 이루어진다.

[0003] 뼈는 단단하기만 한 조직이 아니고, 일생동안 지속적으로 변화하는 활동적인 조직이다. 뼈는 육안으로 외부의 피질골(치밀골)과 내부의 소주골(해면골, 스폰지뼈)로 구분하는데, 피질골은 물리적인 강도가 강하여 신체를 보호하고 지지하는 역할을 하고, 소주골은 충격을 흡수하거나 칼슘의 변화를 일정하게 유지하는 역할을 주로 한다. 뼈의 성장이 중단된 후에도 오래된 뼈는 파괴되어 없어지고(골 흡수), 새로운 뼈가 없어진 곳을 메우는 고정(골 형성)이 일생동안 반복되는, 이러한 현상을 뼈의 재형성(remodeling)이라 한다. 조골세포와 파골세포 사이의 상호작용이 균형을 이루어 골 흡수와 골 형성이 균형을 이루어야 뼈의 항상성이 유지되고 혈액 속의 칼슘 농도가 일정하게 유지되는데, 혈액에 칼슘이 부족하게 되면 이를 보충하기 위하여 골 흡수가 증가되어 뼈의 칼슘을 혈액으로 방출하게 되며, 골 흡수가 지속되면 뼈가 약해져 골다공증과 같은 질환이 발생한다.

[0004] 골다공증(osteoporosis)은 총 골량이 줄어들어 작은 충격에도 쉽게 골절이 생기는 일종의 노화현상으로 누구나 나이가 들면 피할 수 없으나, 특히 폐경기 이후 여성들에게 빈발하며, 갑상선, 부갑상선의 기능항진, 만성 신부전 및 부신피질호르몬의 투여에 의하여 발생되기도 한다. 의학적으로는 뼈의 콜라겐과 칼슘이 모두 감소되어 뼈의 강도가 약해진 것이며 골다공증이 생기면 골의 양이 감소되어 가벼운 사고에 의해서도 골절이 발생하며, 특히 여성에게서 골반골절 및 척추골절은 치명적이라 할 수 있다. 이러한 심각성 때문에 미국을 비롯한 선진국들은 일찍부터 골다공증의 원인 규명 및 치료제 개발에 많은 노력을 기울이고 있으며, 우리나라도 현재 많은 관심을 가지고 연구를 진행하고 있다.

[0005] 현재 골다공증 및 뼈의 손상에는 비스포스포네이트(bisphosphonates) 계열의 치료제가 이용되고 있다. 이들 비스포스포네이트 제제들은 대부분 뼈를 파괴하는 파골세포의 기능을 약화하고 사멸을 유도해 뼈의 손실을 느리게 하거나 멈추는 작용을 한다. 그러나 이들은 새로운 골의 형성을 촉진시키는 작용은 가지고 있지 않으며, 최근 비스포스포네이트를 복용하는 환자에서 턱뼈의 괴사, 중증 심방세동, 뼈나 관절의 무력화 또는 근골격의 통증이 발생하는 사례가 증가하고 있는 실정이다. 따라서 골 흡수를 억제하는 것보다 골의 형성을 촉진시키는 골다공증 예방 및 치료제의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다.

[0006] 한편, 콩 제품은 활성산소종(ROS)에 의한 손상, 유방암 및 전립선암, 고혈압, 심혈관질환, 골다공증, 폐경기 증상 등 몇몇 일반적 질병에 전반적으로 유익한 효과를 가져다주는 것으로 알려져 있다. 된장과 같은 콩 발효 제품은 아시아에서 전통 발효 식품으로 소비되어 왔으며, 역학 연구를 통해 아시아 국가, 특히 한국, 일본 및 중국에서 북아메리카와 유럽에 있는 국가보다 호르몬 관련 암(유방암, 전립선암), 관상동맥 심장병, 몇몇 폐경기 증상이 더 낮은 빈도로 나타나는 것으로 보고되었다.

[0007] 이중, 이소플라본은 천연적으로 콩에 존재하는 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)의 일종인 식물성 화학물질(phytochemical)로서, 여성 호르몬인 에스트로젠(estrogen)과 구조적으로 유사하고, 생물학적 작용이 유사한 것으로 보고되고 있고, 상기 식물성 에스트로젠은 암, 폐경기증후군, 심혈관 질환과 골다공증을 포함하는 호르몬 의존성 질병에 대한 잠재적인 대체 요법에 사용할 수 있는 것으로 밝혀져 있다.

[0008] 콩에 존재하는 이소플라본은 대부분 당을 포함한 형태인 다이드진(daidzin), 제니스틴(genistin) 및 글리시틴(glycitin) 등의 이소플라본 배당체로 존재하지만, 대두 발효 식품과 대두 가열식품의 경우에는 미생물 발효 시 β -글루코시다제(β -glucosidase)의 효소 반응 또는 가열 처리에 의하여 이소플라본 배당체보다는 당이 분해된 이소플라본 아글리콘의 함량이 높은 것으로 보고되어 있다.

[0009] 현재 콩 제품 또는 이소플라본 글리코시드의 생물학적 효과에 대해서는 많은 연구가 이루어졌으나, 발효된 콩 또는 이소플라본 아글리콘이 조골세포에 미치는 유리한 효과에 대한 연구는 이루어지지 않은 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 발효 된장 추출물에 이소플라본 아글리콘(isoflavone aglycone)이 많이 함유되어 있음을 확인하고, 이러한 성분들로 인해 조골세포의 분화를 촉진하여 골 형성을 촉진하는 활성이 있음을 확인함으로써 상기 발효 된장 추출물을 골질환의 치료제로 사용할 수 있음을 규명하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강보조식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발효 된장 추출물은 된장을 25 ~ 35℃에서 40 ~ 60일 동안 발효시킨 발효 된장을 물 또는 유기용매에 가용하여 추출한 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein) 및 글리시테인(glycitein) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 이소플라본 아글리콘을 함유할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 이소플라본 아글리콘은 상기 발효 된장 추출물 1g 당 다이드제인 120 ~ 610 $\mu\text{g/g}$, 제니스테인 390 ~ 560 $\mu\text{g/g}$ 및 글리시테인 130 ~ 450 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 함유할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 골질환은 골다공증, 골연화증, 구루병, 골감소증, 저인산혈증, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골형성부전증, 골위축, 골이영양증, 파제트병(변형성골염), 암세포의 골전이에 의해 유발되는 뼈의 손상 및 고칼슘혈증으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 조골세포(osteoblast)의 분화를 촉진하는 활성을 나타낼 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 조골세포(osteoblast)에 의한 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase; ALP)의 활성을 증가시키고, 오스테오칼신(osteocalcin; OC)의 발현을 증가시켜 골 형성을 촉진하는 활성을 나타낼 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 제1형 콜라겐의 합성을 유도함으로써 골 형성을 촉진하는 활성을 나타낼 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 발효 된장 추출물은 조골세포의 분화를 촉진시키고, 조골세포에 의한 염기성 인산분해효소의 발현 및 오스테오칼신의 발현을 증가시켜 골 생성을 촉진하는 효과가 있으며, 골 형성에 영향을 미치는 제1형 콜라겐 단백질, BMP-2 단백질의 합성을 유도하고, 조골세포 내의 히드록시아파타이트 및 미네랄 형태의 칼슘 아파타이트와 칼슘의 양을 증가시키며, 뼈의 미네랄화작용(mineralization)을 증가시키는 효과가 있다. 또한, 본 발명의 발효 된장 추출물은 천연물질로부터 추출된 것을 사용하여 생체 안정성이 우수하기 때문에 종래의 골질환 치료제들에 비해 독성으로 인한 각종 부작용을 유발하지 않으므로 각종 골질환들을 예방 및 치료할 수 있는 치

료제 및 골 형성 능력을 개선할 수 있는 기능성 식품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 본 발명에 따른 일실시예에서 발효 된장 추출물 및 비발효 된장 추출물로부터 추출한 이소플라본 아글리콘의 성분을 역상 HPLC 시스템을 사용하여 동시 정량한 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 일실시예에서 발효 된장 추출물이 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여, 다양한 농도의 발효 된장 추출물(10 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$)을 MG-63 세포에 24시간 동안 처리했을 때 수행한 MTT 분석 결과를 각 농도별로 비교하여 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 일실시예에서 발효 된장 추출물이 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여 발효 된장 추출물(100 $\mu\text{g/mL}$)을 MG-63 세포에 12 ~ 72시간 동안 처리했을 때 수행한 MTT 분석 결과를 처리 시간 별로 비교하여 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 일실시예에서 다양한 농도의 발효 된장 추출물(10 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$)을 48시간 동안 MG-63 세포주에 처리하였을 경우 처리 농도에 따른 염기성 인산분해효소(ALP)의 활성을 비교하여 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 일실시예에서 다양한 농도의 발효 된장 추출물(10 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$)을 72시간 동안 MG-63 세포주에 처리하였을 경우 처리 농도에 따른 오스테오칼신(OC)의 농도를 비교하여 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 일실시예에서 다양한 농도의 발효 된장 추출물(10 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$)을 24시간 동안 MG-63 세포주에 처리하였을 경우 처리 농도에 따른 BMP-2 단백질의 농도를 비교하여 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 일실시예에서 다양한 농도의 발효 된장 추출물(10 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$)을 72시간 동안 MG-63 세포주에 처리하였을 경우 처리 농도에 따른 제1형 콜라겐 단백질의 농도를 비교하여 나타낸 것이다.

도 8(a)는 본 발명에 따른 일실시예에서 미네랄화작용을 확인하기 위하여 다양한 농도의 발효 된장 추출물(10 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$)을 MG-63 세포주에 처리하고 7일 후에 Alizarine red-S로 염색하여 측정된 히드록시아파타이트 및 미네랄 형태의 칼슘 아파타이트의 양을 처리 농도에 따라 비교하여 나타낸 것이고, 도 8(b)는 발효 된장 추출물(100 $\mu\text{g/mL}$)을 처리한 경우 세포 내 칼슘의 양을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

본 발명은 발효 된장 추출물의 신규 용도에 관한 것으로서, 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0025]

또한, 본 발명자들은 발효 된장 추출물에 이소플라본 아글리콘이 많이 함유되어 있음을 확인하고, 이러한 추출물이 조골세포의 분화를 촉진하여 골 형성을 촉진시킨다는 사실을 규명하였다.

[0026]

뼈(bone)는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호한다. 또한 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다. 따라서 성장이 끝난 성인의 뼈는 멈추지 않고 죽는 날 까지 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 매우 역동적, 지속적으로 반복재생하면서 균형을 유지하게 된다. 이를 골 재형성(bone remodeling)이라고 한다. 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 뼈의 순환(turnover)은 성장과 스트레스에 의해서 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 적절히 뼈의 기능을 유지하는데 필수적이다.

[0027]

골 재형성에는 크게 두 종류의 세포가 관여하는 것으로 알려져 있다. 두 세포 중 하나는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)이고, 다른 하나는 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)이다. 조골세포는 RANKL(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)와 이것의 유도 수용체(decoy receptor)인 OPG(osteoprotegerin)를 생성한다. RANKL이 파골 전구세포(osteoclast progenitor cells) 표면에 있는 수용체인 RANK에 결합하면 파골 전구 세포가 파골세포로 성숙화(maturation)되어 골흡수(bone resorption)가 일어난다. 그러나 OPG가 RANKL과 결합하면 RANKL과 RANK간 결합이 차단되어 파골세포의 형성이 억제되고 필요 이상의 골 흡수가 일어나지 않게 된다. 오래된 뼈의 흡수 또는 파괴는 혈액세포(조혈모세포)에서 생기는 파골세포에 의해 이루어지며 이는 뼈에 구멍을 내어 적은 양의 칼슘이 혈류로 방출되어 신체기능을 유지하는데 사용된다. 한편 뼈세포에서 생성된 조골세포는 교원질로 구멍을 채우고 칼슘과 인의 침착물(hydroxyapatite)을 덮어서

단단한 새로운 뼈를 만들어 골격을 재건한다. 뼈가 파괴되기 시작하여 다시 새로운 뼈로 재형성되기까지는 약 100일 정도 걸린다. 유아에서는 1년 내에 뼈의 칼슘이 100% 바뀌지만 성인에서는 매년 골격의 약 10-30%가 이런 과정을 통하여 재형성되며, 파괴속도와 조골속도가 동일해야만 전과 같은 골밀도를 유지할 수 있다. 이와 같이 중요한 뼈에 균형이 깨질 경우 많은 질병이 야기될 수 있는데 특히 골다공증과 암세포의 골전이(bone metastasis)로 인한 뼈의 손상과 관련 된 질환이 대표적이다.

- [0028] 지금까지 골질환을 치료하기 위해 비스포스포네이트(bisphosphonates), 칼시토닌(calcitonins), 에스트로겐, 비타민 D 유사체 등이 사용되고 있으나, 이들은 대부분 파골세포의 기능을 억제함으로써 골량을 유지하는 골흡수 억제제이다. 따라서, 골다공증의 효과적인 예방 또는 치료를 위하여 뼈의 형성을 자극하고 소주골(trabecular) 미세구조(microarchitecture)의 불균형을 바로잡을 수 있는 만족스런 골 형성 촉진제(anabolic agent)에 대한 개발이 요구되고 있다.
- [0029] 새로운 골 형성이 조골세포의 1차적인 기능이므로, 골 형성을 조절할 수 있는 치료제는 조골세포 직계열(osteoblast lineage)의 세포 증식을 증가시키거나, 염기성 인산분해효소(ALP), 오스테오칼신(OC), 제1형 콜라겐과 같은 조절인자의 생성 및 미네랄화작용(mineralization)과 관련된 조골세포의 분화를 유도하는 역할을 할 수 있다.
- [0030] 따라서, 본 발명은 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서는 된장으로부터 이소플라본 아글리콘(isoflavone aglycone)을 많이 함유하고 있는 발효 된장 추출물을 얻었으며, 이러한 추출물 및 추출물에 함유된 이소플라본 아글리콘이 조골세포의 골 형성에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다. 본 발명의 일실시예에서는 조골세포의 분화에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 조골세포의 분화 초기단계에서 표현형 지표로 염기성 인산분해효소를 사용하고, 분화 최종단계에서 표현형 지표로 오스테오칼신 및 제1형 콜라겐을 사용하여 MG-63 세포주에서 분석하였다. 그 결과, 본 발명의 발효 된장 추출물은 조골세포의 분화를 촉진시키고, 조골세포에 의한 염기성 인산분해효소의 발현 및 오스테오칼신의 발현을 증가시켜 골 생성을 촉진시키며, 골 형성에 영향을 미치는 제1형 콜라겐 단백질의 합성을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, 상기 추출물은 BMP-2 단백질의 합성을 유도하는 역할을 하는데, 이는 골 형성에서 다른 인자의 발생에 중요한 역할을 하며, 뼈의 재형성 및 뼈의 미네랄화작용(mineralization)이 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 본 발명에 따른 발효 된장 추출물이 골질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0032] 본 발명에서 “이소플라본”은 이소플라본 배당체(isoflavone glycoside)와 이소플라본 아글리콘(isoflavone aglycone)을 모두 말하는데, 이소플라본 배당체는 이소플라본이 당과 결합한 배당체로 결합하되 분자량이 큰 특징이 있고, 이소플라본 아글리콘은 발효 처리에 의해 이소플라본에서 당이 제거된 상태로 이소플라본 배당체에 비하여 분자량이 작은 특징이 있다. 통상적으로 대두(콩) 내에는 이소플라본 배당체가 이소플라본 아글리콘 보다 많이 존재하며, 대두를 발효하는 경우 미생물에 의한 발효와 가수분해 때문에 많은 양의 이소플라본 배당체가 아글리콘 형태로 변화하기 때문에 대두의 발효 제품에서는 이소플라본 아글리콘이 더 많이 존재한다.
- [0033] 본 발명에서 “이소플라본 아글리콘(isoflavone aglycone)”은 비배당체 이소플라본이라고도 하며, 이소플라본 아글리콘의 종류로는 예를 들어, 제니스테인(Genistein), 다이드제인(Daidzein), 글리시테인(Glycitein) 등을 포함한다.
- [0034] 본 발명에서 “발효 된장 추출물”은 된장(soybean paste)을 25 ~ 35℃에서 40일 이상, 바람직하게는 40 ~ 60일 동안 발효시킨 발효 된장으로부터 추출하여 얻은 것을 의미하고, 이소플라본 아글리콘이 많이 함유되어 있다. 여기서, 된장은 특정하게 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 일반적으로 사용하는 모든 제조방법에 의해 제조된 것이라면 모두 사용할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 상기 된장은 삶은 콩에 미생물이 자연접종되어 만들어진 메주를 이용한 한국의 대표적인 반고체상 대두발효식품으로서, 오랜 세월동안 한국인의 식탁에서 중요한 위치를 차지하여 왔다. 된장은 원료 대두에서 유래되는 단백질, 탄수화물, 지방 등의 영양소가 골고루 갖추어진 우수한 조미식품으로, 곡류를 주식으로 하고 육류의 섭취량이 많지 않은 한국인에게 있어서 중요한 단백질 공급원으로서 식생활에 없어서는 안 될 중요한 식품으로 자리잡고 있다. 이러한 된장은 주원료인 단백질이 미생물의 작용으로 분해되어 생성된 분해산물과 발효과정 중에 미생물의 작용에 의해 새로이 생성되는 물질들로 구성되어 있으므로 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 콩에 함유된 물질과 발효과정 중에 생성되는 이소플라본과 피트산(phytic acid) 등 다양한 물

질들에 의한 항암효과, 혈중 지질 및 콜레스테롤 대사 개선, 그리고 항산화 활성 등 우수한 생리활성을 발휘하는 건강식품임이 규명되고 있다.

- [0036] 된장의 종류는 간장을 담가서 장물을 떠내고 건더기를 쓰는 재래식 된장과 메주에 소금물을 알맞게 부어 장물을 떠내지 않고 먹는 개량식 된장, 2가지 방법을 절충한 절충식 된장 등을 들 수 있다.
- [0037] 이에 제한되지는 않지만 일례로, 된장을 제조하는 일반적인 방법을 살펴보면, 재래식은 11 ~ 12월경에 콩으로 메주를 쑼 후 목침만한 크기로 빗어 2 ~ 3일간 말린 후 빗질을 깔고 훈훈한 곳에 쟁여서 띄운다. 30 ~ 40일이 지나 메주가 잘 떼을 때 메주를 쪼개어 벌에 말려 장독에 넣고 하루쯤 가라앉힌 말간 소금물을 붓는다. 20 ~ 30일이 지난 후 메주를 건져서 소금을 골고루 뿌리고 간장도 쳐서 질척하게 개어 항아리에 꼭꼭 눌러 담고 옷소금을 뿌린다. 빗물이 들어가지 않게 주의하면서 망사 등으로 봉해서 햇볕을 쬐면 메주가 삭아서 된장이 된다.
- [0038] 개량식은 간장을 쓰지 않고 된장을 위주로 하는 제조법이다. 재래식과 같은 방법으로 메주를 쑼 후 주먹만한 크기로 빗어서 너무 띄우지 말고 말려 독에 차곡차곡 담는다. 가라앉힌 말간 소금물을 메주가 잠길 정도로만 붓고 뚜껑을 덮어서 한 달 가량 둔다. 다른 독을 준비하여 이 메주를 옮겨 담으면서 켜켜이 소금을 뿌려 망사 등으로 봉해서 햇볕을 쬐어 익힌다.
- [0039] 절충식은 간장을 뜨고난 건더기로 된장을 담그면(재래식) 메주의 성분이 간장으로 많이 빠져 맛과 영양분이 적으므로, 간장도 맛있고 된장도 맛있는 것을 담그기 위해 이용한다. 굵직하게 뿔은 메주를 미리 삼삼한 소금물에 되직하게 개어 삭혀 두었다가 간장을 뜨고 남은 메주 건더기에 섞어 질척하게 치대어 담아 봉해 둔다.
- [0040] 본 발명에서 정의되는 “추출물”은 적절한 용매를 이용하여 발효 된장으로부터 추출한 것으로, 예를 들어, 발효 된장의 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 또한, 넓은 의미로는 추출물을 추가적으로 분획하여 얻은 분획물도 포함한다. 즉, 발효 된장 추출물은 추출용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다.
- [0041] 상기 추출을 위한 적절한 용매로는 물 또는 유기용매(극성 용매 또는 비극성 용매)를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 정제수(물), 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 디클로로메탄(dichloromethane), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0042] 상기 추출은 열수추출, 냉침추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출 또는 가열추출법 등의 추출방법 중 선택된 어느 하나의 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 정제 방법을 이용하여 정제될 수 있다. 발효 된장 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 발효 된장 추출물에 포함되어 있는 이소플라본 아글리콘으로는 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein), 글리시테인(glycitein) 등이 있으며, 이들 중 한 종 이상 혼합되어 존재한다. 이러한 이소플라본 아글리콘은 발효 된장 추출물 1g 당 다이드제인 120 ~ 610 μ g/g, 제니스테인 390 ~ 560 μ g/g 및 글리시테인 130 ~ 450 μ g/g의 농도로 함유되어 있는 것이 바람직하다.
- [0044] 또한, 본 발명에 따른 발효 된장 추출물은 10 ~ 500 /mL 농도 범위에서 사용될 수 있다.
- [0045] 한편, 본 발명에서 상기 “골질환”이란, 뼈의 이상으로 생기는 질환을 모두 포함하며, 바람직하게는 대사장애에 의해 뼈에 변성이 생긴 대사성 골질환을 포함한다. 본 발명에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 골질환의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 골다공증, 골연화증, 구루병, 골감소증, 저인산혈증, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골형성부전증, 골위축, 골이영양증, 파제트병(변형성골염), 암세포의 골전이에 의해 유발되는 뼈의 손상, 고칼슘혈증 등이 있다.
- [0046] 특히, 본 발명의 조성물은 조골세포(osteoblast)의 분화를 촉진하는 활성을 통해 골 형성을 촉진하는 골 형성 촉진제로 이용되어 골질환 예방 및 치료에 뛰어난 효과를 나타낼 수 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 조골세포(osteoblast)에 의한 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase; ALP)의 활성을 증가시키고, 오스테오칼신(osteocalcin; OC)의 발현을 증가시켜 골 형성을 촉진하는 효능을 나타낸다.
- [0048] 염기성 인산분해효소는 조골세포에서 분비되는 골 형성의 표지자로 가장 보편적으로 사용되는 골 형성 지표이다. 여러 가지 동종효소(기능은 같지만 구조가 약간씩 다른 효소형태)로서 신체의 여러 부위(특히 뼈와

간)에 정상적으로 많이 존재한다. 뼈를 생성하는 세포인 조골세포(osteoblast)에 많이 존재하며, 뼈의 병 진단과 치료효과 판정에 도움을 준다. 특히 뼈의 생성이 많아지는 모든 경우(예를 들면 골절, 종양에 의한 뼈의 파괴시 복구를 위해서 뼈의 생성이 증가한다), 조골세포의 활동이 증가되고 조골세포의 효소인 알칼리성 인산분해효소의 활성도 역시 증가된다.

- [0049] 오스테오칼신(bone Gla protein: BGP)은 감마-카르복실글루타민산(γ -carboxylglutamate: Gla) 잔기를 2 ~ 3군데 함유하며 아미노산 49 잔기로 구성된 분자량 약 5,900 Da의 비타민 K 의존성 칼슘 결합 단백질로 조골세포에서 합성된다. 뼈의 유기성분 중 90%는 콜라겐(collagen)이고 나머지 10%가 오스테오칼신, 오스테오넥틴(osteonectin), α -HS 당단백질(glycoprotein), 시아노단백질(cyanoprotein), 페투인(fetuin) 등의 비 콜라겐성 단백질이다. 뼈 속의 오스테오칼신은 국소 석탄화 조절을 하거나 뼈와 체액간의 Ca^{2+} 의 움직임을 제어하는 등 뼈의 대사에 있어서 중요한 생리적 역할을 한다. 오스테오칼신은 골아세포에서 합성된 후 세포내에서 비타민 K 의존성 탈탄산효소(carboxylase)에 의해 Gla화된다. 이 Gla화된 오스테오칼신(Gla-OC)만이 뼈 속의 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite)와 결합하여 골 기질에 축적되어 골 형성에 관여하지만 Gla화 되지 않거나 탈탄산된 오스테오칼신(Glu-OC)은 골기질과의 친화성이 약하여 혈액으로 방출되어 골흡수의 지표가 된다.
- [0050] 또한, 본 발명의 조성물은 제1형 콜라겐의 합성을 유도함으로써 골 형성을 촉진하는 효능을 나타낸다.
- [0051] 제1형 콜라겐은 뼈, 피부, 인대, 치아, 공막(눈의 흰자위) 등의 주요 성분으로, 이 콜라겐이 부족하면 뼈에 문제가 생기며 골 형성부전증이 나타나게 된다. 따라서, 이러한 제1형 콜라겐을 골 형성 지표로 사용할 수 있다.
- [0052] 따라서 상기와 같은 작용을 통해 본 발명의 발효 된장 추출물이 골질환을 예방 또는 치료할 수 있다는 사실을 알 수 있으며, 이에 따라 본 발명에 따른 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명에 따른 골질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 발효 된장 추출물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 골질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.
- [0054] 본 발명에 따른 발효 된장 추출물의 약학적으로 유효한 양은 0.1 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 10 mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 골질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0055] 또한, 상기에서약학적으로 허용되는이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- [0057] 본 발명에 따른 골질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명의 골질환의 예방 또는 치료용 조성물은 골질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.
- [0059] 따라서 본 발명은 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 포함하는 골질환의 증상을 예방 및 치료할 수 있는 약제를 제공할 수 있다.
- [0060] 나아가 본 발명에 따른 골질환의 예방 또는 치료용 조성물은 상기 기술한 바와 같이 골질환의 증상을 예방 및 개선하기 위한 약학적 조성물로 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 뼈의 이상을 개선할 수 있는 건강기능식품의 제조를 위한 식품용 조성물로도 사용할 수 있다.

- [0061] 그러므로 본 발명은 발효 된장 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환을 예방 또는 개선하기 위한 식품용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0062] 본 발명에 따른 상기 식품용 조성물은 골질환 증상의 예방 및 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.
- [0063] 본원에서 상기 “식품”이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.
- [0064] 본원발명에 따른 발효 된장 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환 증상의 예방 또는 개선을 위한 식품용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 “기능성 식품”이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0066] 또한, 본원발명에서 상기 “음료”란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 골질환의 증상을 예방 및 개선하기 위한 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0067] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 골질환을 예방 및 치료하기 위한 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0068] 따라서 본 발명은 골 형성 촉진 효과를 나타내는 발효 된장 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강보조식품을 제공할 수 있다.
- [0069] 상기 건강보조식품의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 형태 일 수 있다.
- [0070] 또한, 본원발명의 골질환 증상 개선을 위한 식품용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.
- [0071] 한편, 본 발명에 따른 골질환의 예방 또는 치료용 조성물은 조골세포의 분화를 촉진하여 골 형성을 촉진하는 효과 및 뼈의 미네랄화작용을 증가시키는 효과를 제공할 뿐만 아니라, 천연물질로부터 추출된 것을 사용하여 생체 안정성이 우수하기 때문에 종래의 골질환 치료제들에 비해 독성으로 인한 각종 부작용을 유발하지 않으므로 각종 골질환들을 예방 및 치료할 수 있는 치료제 및 골 형성 능력을 개선할 수 있는 기능성 식품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0072] 이하, 본 발명을 실시예 및 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구

체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073] <실시예 1>

[0074] <1-1> 재료 및 장치

[0075] ① 발효 된장 : 시중에서 판매하는 한국식 된장(대상, 한국)을 구입하여 45일 동안 발효시킨 후 사용하였다.

[0076] ② HPLC 장치와 시약 : 이소플라본의 분석에는 HPLC(Hewlett Packard 1100 series HPLC autosampler, Agilent Technologies, Forest Hill, Vic., Australia)를 사용하였는데, 이러한 HPLC 장비는 4개 용매 펌프(quaternary pump), 다이오드 어레이 UV 가시광선 검출기, 진공 탈가스(vacuum degasser) 및 열분석 조절 칼럼 구획을 구비한다.

[0077] 또한, HPLC-등급 용매로는 메탄올, 아세트산 및 아세토니트릴을 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0078] 이소플라본 추출에 사용된 모든 시약은 HPLC 분석용을 사용하였고, 0.5 μ m FH membrane(Milipore Co., Bedford, MA, USA)을 이용하여 여과하였다.

[0079] ③ 이소플라본 표준시약 : 이소플라본 아글리콘으로 체니스테인(4',5,7-트리히드록시이소플라본), 다이드제인(4',7-디히드록시이소플라본) 및 글리시테인(7,4'-디히드록시-6-메톡시이소플라본)을 분석하였으며, 이들의 표준물질로 β -글리코시드 표준 제니스틴 및 β -글리코시드 표준 글리시틴을 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, β -글리코시드 표준 다이드진은 Fluka(Neu-Ulm, Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

[0080] ④ 마이크로플레이트 리더 : PowerWave XS 모델의 마이크로플레이트 리더는 BioTek Instruments, Inc.(Winooski, VT, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0081] <1-2> 조골세포의 세포배양

[0082] 인간 골육종 세포주인 MG-63(CRL-1427)은 ATCC(American Tissue Culture Collection)로부터 제공받아 사용하였다.

[0083] MG-63 세포주는 10% FBS와 항생제(100 IU/mL 페니실린 G 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신)를 포함하는 최소 필수 배지(MEM, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 배양하였다. 여기서, FBS, 최소 필수 배지(MEM), 페니실린 G 및 스트렙토마이신은 GIBCO-BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0084] <1-3> 통계분석

[0085] 모든 측정 데이터는 평균값 $\pm$ SD(n = 3)로 나타내었으며, 결과들의 통계상 비교는 ANOVA(analysis of variance)를 사용하여 수행하였다. 대조군과 실험군들 간의 유의적인 차이(P < 0.05)는 Dunnett's test에 의해 분석하였다.

[0086] <실시예 2>

[0087] HPLC 분석

[0088] <2-1> HPLC 분석을 위한 이소플라본 추출 시료 준비

[0089] 발효된 된장과 발효되지 않은 된장으로부터 이소플라본을 추출하기 위하여, 우선 각 샘플(1.0 g)을 150ml 둥근 바닥 플라스크에 넣고 70% 메탄올 50ml을 넣은 다음, 히팅 맨틀에서 1시간 동안 환류시켰다. 다음으로 혼합물을 여과지(와트만 No.1)에 통과시켜 여과하고, 여과물을 100ml 메스플라스크에 모았다. 여과지에 남아있는 건조된 콩 건더기를 다시 한 번 세척하여 동일한 플라스크로 여과하고, 질소 스팀을 이용하여 여과액을 건조시켰다.

[0090] 건조된 시료를 10mM 암모늄 아세테이트 버퍼(0.1% 트리플루오로아세트산 포함)와 아세토니트릴을 50:50 비율로 혼합한 용액 1ml 에서 재현탁(resuspend)시키고, 용해되지 않은 시료를 침전시키기 위하여 Eppendorf

centrifuge(model 5415C; Crown Scientific Pty. Ltd., Vic., Australia)를 사용하여 14,000g에서 30분간 원심 분리 하였다. 이후, 원심분리로 분리한 상층액을 HPLC용 바이알(vial)에 옮겨 담아서 HPLC 측정용 이소플라본 시료로 준비하였다.

<2-2> 이소플라본의 HPLC 분석

이소플라본의 분석은 HPLC autosampler를 사용하여 수행하였는데, 이소플라본 이성질체를 분리하기 위하여 역상 HPLC 칼럼(μ Bondapak C18, 3.9×300 mm)을 사용하였다. 이동상은 0.1%(v/v) 인산을 함유한 물의 선형 용매 조성(A)과 아세토니트릴(B)을 사용하여 선형적인 구배용매법으로 분석하였다.

샘플 $10 \mu\text{l}$ 를 주입한 후, 시스템은 40분까지 용매 B가 10%에서 35%까지 증가하도록 설정하였고, 그 후 5분간 10%로 전환되며, 10분간 10%로 유지하였다. 유속은 0.87 mL/min 으로 조절하였고, 흡광도(UV 흡수)는 280nm에서 관찰하였다.

도 1에는 발효된 된장의 이소플라본 함량 및 화학적 변이를 시험하기 위하여, 발효되지 않은 된장과 발효된 된장의 이소플라본 추출물을 역상 HPLC로 분석한 결과를 나타내었다. 그 결과, HPLC 크로마토그램은 발효 된장 추출물이 발효되지 않은 추출물보다 많은 양의 이소플라본 아글리콘을 함유하고 있음을 보여준다(도 1 참조).

한편, 두 개의 주요한 비배당체 이소플라본인 다이드제인(daidzein) 및 제니스테인(genistein)은 발효 과정을 통해 상당히 증가하는 반면, 글리코시드인 다이드진(daidzin)과 제니스틴(genistin)은 감소하는 것으로 나타났다. 발효 된장에서 다이드제인과 제니스테인의 함량은 각각 $165.6 \pm 39.5 \mu\text{g/g}$ 및 $476.0 \pm 82.9 \mu\text{g/g}$ 으로 나타났다(표 1 참조).

표 1

된장 추출물의 이소플라본 함량

된장	글리코시드($\mu\text{g/g}$)		아글리콘($\mu\text{g/g}$)	
	다이드진	제니스틴	다이드제인	제니스테인
비발효	147.0 ± 22.4	42.1 ± 8.6	22.0 ± 6.1	86.0 ± 10.2
발효	96.1 ± 16.6	10.5 ± 6.5	165.6 ± 39.5	476.0 ± 82.9

<실시예 3>

추출물 농도에 따른 세포독성 측정 : MTT 분석

본 발명자들은 이소플라본 아글리콘을 많이 함유하는 발효 된장 추출물이 조골세포의 생존능력에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여, MG-63 세포주를 발효 된장 추출물로 처리하고, 세포의 생존능력을 MTT 분석법으로 검사하였다.

먼저, 상기 실시예 <1-2>에서 배양한 MG-63 세포주를 96-웰 플레이트에 분주하고, 발효 된장 추출물을 다양한 농도($10 \sim 500 \mu\text{g/mL}$)로 처리하였다. 이후, 배지를 제거하고 세포를 0.5 mg/mL 농도의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액에서 37°C , 5% 이산화탄소 조건에서 3시간 동안 배양하였다. 이후, 상층액을 제거하고, 마이크로플레이트 리더를 사용하여 540nm에서의 신호를 모니터링함으로써 포마잔의 형성을 관찰하였다.

그 결과, 상기 농도 범위의 발효 된장 추출물을 MG-63 세포주에 24시간 동안 처리하였을 때 전 농도 범위에서 세포의 생존능력에 영향을 끼치지 않음을 확인하였다(도 2 참조). 또한, 초기단계와 최종단계를 포함하는 조골세포의 분화과정에서 세포의 생존능력에 대한 KFSP의 효과를 확인하기 위하여, MG-63 세포주에 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 발효 된장 추출물을 처리한 후 72시간 동안 배양하였는데, 그 결과 발효 된장 추출물이 시험기간 동안 세포의 생존능력에 영향을 끼치지 않음을 확인하였다(도 3 참조).

<실시예 4>

[0103] **추출물의 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 효과 측정**

[0104] 본 발명자들은 이소플라본 아글리콘을 많이 함유하는 발효 된장 추출물이 골 형성을 촉진시키는지 확인하기 위하여, 골 형성 촉진에 대한 지표가 되는 염기성 인산분해효소(ALP)의 활성을 측정하였다.

[0105] 먼저, 상기 실시예 <1-2>에서 배양한 MG-63 세포주를 96-웰 플레이트에 각 웰 당 5×10^3 개씩 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 발효 된장 추출물($10 \sim 500 \mu\text{g/mL}$)을 웰에 넣고, 48시간 동안 배양한 후 세포들을 모았다. 세포를 생리 식염수로 3회 세척한 후, 0.1% 트리톤 X-100, 0.5mM MgCl_2 및 15mM p-니트로페닐 포스페이트(Sigma, St. Louis, MO, USA)가 포함되어 있는 0.1M $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ 버퍼(pH 10)에서 37℃에서 1시간 동안 배양하여 세포에서의 염기성 인산분해효소의 활성을 측정하였다. 염기성 인산분해효소의 활성은 시간당 $1\mu\text{m}$ 의 p-니트로페놀을 해리하는데 필요한 효소의 양으로 계산하였다.

[0106] 그 결과, MG-63 세포주의 성숙과정에서 발효 된장 추출물은 농도 의존적으로 ALP의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다(도 4 참조).

[0107] **<실시예 5>**

[0108] **추출물의 오스테오칼신 유도능 측정**

[0109] 본 발명자들은 이소플라본 아글리콘을 많이 함유하는 발효 된장 추출물이 골 형성을 촉진시키는지 확인하기 위하여, 골 형성 촉진에 대한 지표가 되는 오스테오칼신(OC)의 농도를 측정하였다. 오스테오칼신의 농도를 측정하기 위하여 오스테오칼신 ELISA 키트를 Takara(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

[0110] 먼저, 상기 실시예 <1-2>에서 배양한 MG-63 세포주를 발효 된장 추출물($10 \sim 500 \mu\text{g/mL}$)로 72시간 동안 처리한 후, 배지를 수집하였다. 이러한 샘플을 단일클론 검출 항체가 코팅된 96웰 미량정량 플레이트에 넣고, 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 결합되지 않은 물질을 세척 버퍼(50 mM Tris, 200mM NaCl 및 0.2% Tween 20)로 제거한 후, 항체와 결합시키기 위해 과산화효소(horseradish peroxidase)와 복합된 streptavidin을 첨가하였다. 과산화효소는 착색된 기질(테트라메틸벤지딘)을 색을 띄는 용매로 변환하는 것을 촉진하며, 색의 강도는 샘플에 존재하는 단백질의 양에 비례한다. 각 웰의 흡광도는 450nm에서 측정하였다. 결과는 처리하지 않은 대조군과 비교하여 활성의 변화 비율로 나타내었다.

[0111] 그 결과, 72시간 동안 발효 된장 추출물로 처리하는 경우, 추출물의 농도 의존적으로 OC의 농도를 상당히 증가시키는 것으로 나타났다(도 5 참조).

[0112] **<실시예 6>**

[0113] **추출물의 BMP-2 활성 유도능 측정**

[0114] 본 발명자들은 이소플라본 아글리콘을 많이 함유하는 발효 된장 추출물이 골 형성을 촉진시키는지 확인하기 위하여, 골 형성 촉진에 대한 지표가 되는 BMP-2의 농도를 측정하였다. BMP-2의 농도를 측정하기 위하여 BMP-2 ELISA 키트를 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0115] 먼저, 상기 실시예 <1-2>에서 배양한 MG-63 세포주를 발효 된장 추출물($10 \sim 500 \mu\text{g/mL}$)로 24시간 동안 처리한 후, 배지를 수집하였다. 이러한 샘플을 단일클론 검출 항체가 코팅된 96웰 미량정량 플레이트에 넣고, 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 결합되지 않은 물질을 세척 버퍼(50 mM Tris, 200mM NaCl 및 0.2% Tween 20)로 제거한 후, 항체와 결합시키기 위해 과산화효소(horseradish peroxidase)와 복합된 streptavidin을 첨가하였다. 과산화효소는 착색된 기질(테트라메틸벤지딘)을 색을 띄는 용매로 변환하는 것을 촉진하며, 색의 강도는 샘플에 존재하는 단백질의 양에 비례한다. 각 웰의 흡광도는 450nm에서 측정하였다. 결과는 처리하지 않은 대조군과 비교하여 활성의 변화 비율로 나타내었다.

[0116] 그 결과, 발효 된장 추출물은 농도 의존적으로 BMP-2 단백질 합성을 상당히 증가시키는 것으로 나타났다(도 6 참조).

[0117] <실시예 7>

[0118] 추출물의 제1형 콜라겐 농도에 미치는 효과 측정

[0119] 본 발명자들은 이소플라본 아글리콘을 많이 함유하는 발효 된장 추출물이 골 형성을 촉진시키는지 확인하기 위하여, 최종 분화단계에서 골 형성 촉진에 대한 지표인 제1형 콜라겐의 농도를 측정하였다.

[0120] 먼저, 상기 실시예 <1-2>에서 배양한 MG-63 세포주는 발효 된장 추출물(10 ~ 500 µg/mL)로 72시간 동안 처리하였다. 분자의 프로펩티드(propeptide) 부분을 측정하고, 단백질의 성숙한 형태의 합성을 반영하는 제1형 콜라겐 분석은 Prolagen-C 키트(Metra Biosystems, Mountainview, CA, USA)를 사용하여 제조사의 규정에 기술된 대로 수행하였으며, BCA(bicinchoninic acid) 단백질 분석법을 이용하여 세포의 제1형 콜라겐 농도를 측정하였다.

[0121] 그 결과, 발효 된장 추출물은 농도 의존적으로 제1형 콜라겐의 합성을 유도하는 것으로 나타났다(도 7 참조).

[0122] <실시예 8>

[0123] 추출물의 미네랄화작용에 미치는 효과 측정

[0124] <8-1> 미네랄화작용 유도능 측정

[0125] 본 발명자들은 이소플라본 아글리콘을 많이 함유하는 발효 된장 추출물이 골 형성을 촉진시키는지 확인하기 위하여, 최종 분화단계에서 골 형성 촉진에 대한 지표인 미네랄화작용(mineralization) 유도능을 측정하였다.

[0126] 미네랄화작용의 정도는 발효 된장 추출물을 처리하고 7일 후에 24웰 플레이트에서 Alizarin Red(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)로 염색하여 결정하였다. 세포를 1시간 동안 70%(v/v) 에탄올로 고정된 후, 탈이온수(pH 4.2) 내에서 상온에서 15분 동안 40mM Alizarin Red S로 염색하였다. aspiration으로 Alizarin Red S 용액을 제거한 후, 궤도 회전장치를 사용하여 세포를 PBS에서 상온에서 15분 동안 배양하였다. 다음으로 세포를 새로운 PBS로 한 번 헹구고, 10mM 소듐 포스페이트(pH 7.0)에서 10%(w/v) 세틸피리디늄 클로라이드로 15분 동안 연속적으로 탈염색하였다. 추출된 염색을 96웰 플레이트로 옮긴 후, 마이크로플레이트 리더를 사용하여 562nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0127] 그 결과, Alizarine Red-S 염색에 의한 미네랄화작용 데이터에 따르면(도 8a 참조), 발효 된장 추출물은 농도 의존적으로 세포에서 히드록시아파타이트의 양과 미네랄 형태의 칼슘 아파타이트 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 의 양을 증가시키는 것으로 나타났다.

[0128] <8-2> 칼슘 농도 측정

[0129] 본 발명자들은 미네랄화작용에 발효 된장 추출물이 미치는 영향을 더 명확히 확인하기 위하여, 분화에서 다른 중요한 과정인 칼슘 증착을 공초점 현미경과 Fura-2(Furaptra)를 사용하여 관찰하였다. 100 /mL 발효 된장 추출물로 24시간 동안 처리한 MG-63 세포주들을 상온에서 30분 동안 혈청이 제거된 배지에서 2Fura-2-AM(Molecular Probes Co., Eugene, OR, USA)와 배양하고, 로딩 용액(115mM NaCl, 5.4mM KCl, 1mM MgCl_2 , 2mM CaCl_2 , 20mM Hepes 및 10mM 글루코스, pH 7.42)에서 로드하였다. 2가 양이온이 없는 버퍼를 이용하여 지속적으로 세척한 후, Fura-2 형광 이미지를 Zeiss LSM 510 laser scanning confocal device(Zeiss, Switzerland)를 사용하여 분석하였다. 345 및 380nm 여기 파장에서 번갈아 발생하는 510nm 형광 방출을 각각의 세포에서 측정하였다.

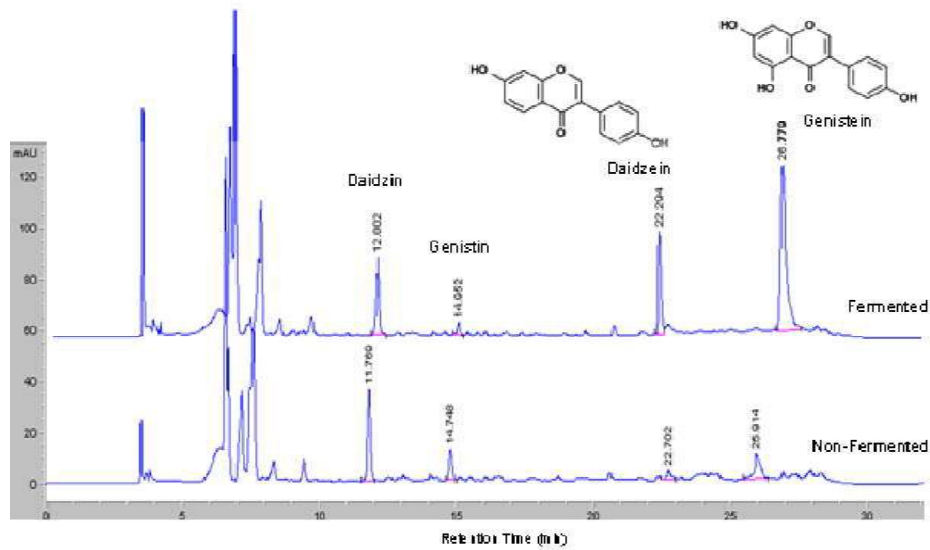
[0130] 그 결과, 된장 발효 추출물(100 µg/mL)은 세포 내 칼슘의 양을 증가시키는 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(도 8b 참조).

[0131] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

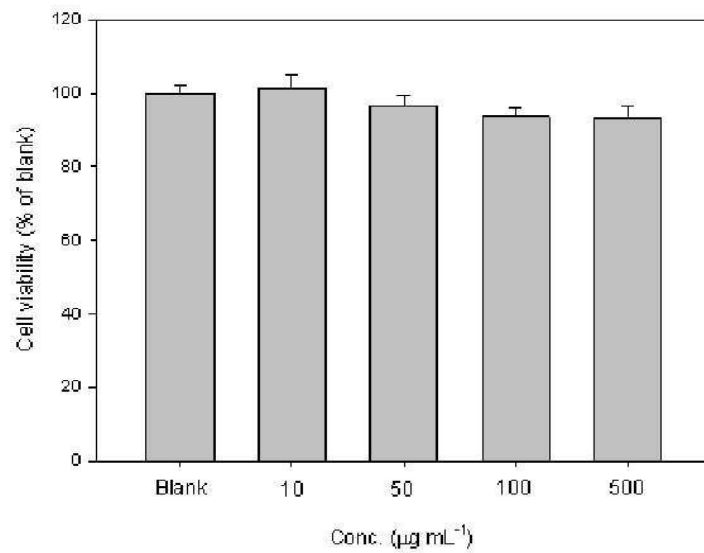
[0132]

도면

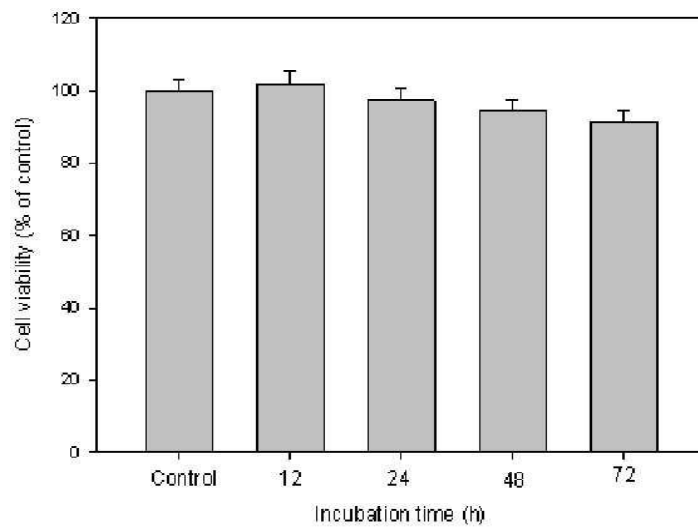
도면1



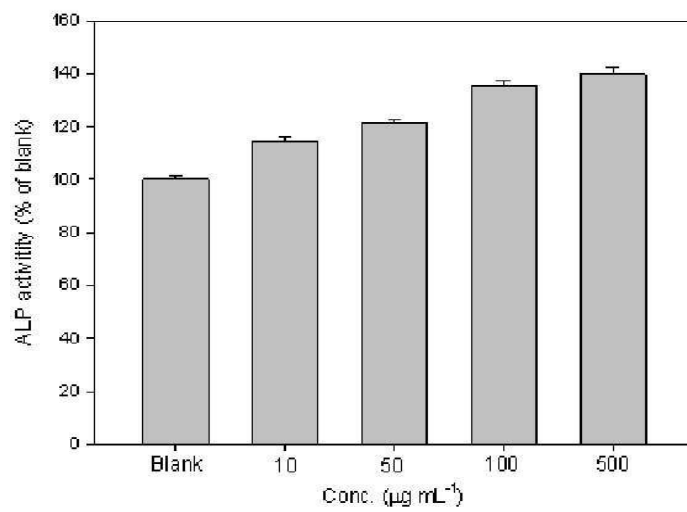
도면2



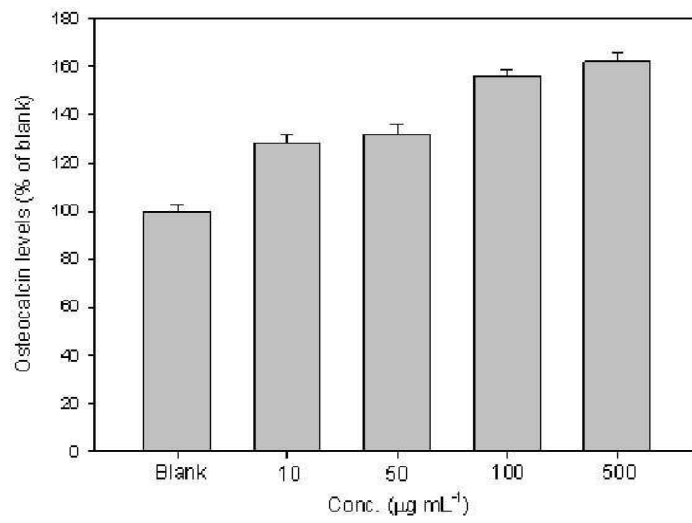
도면3



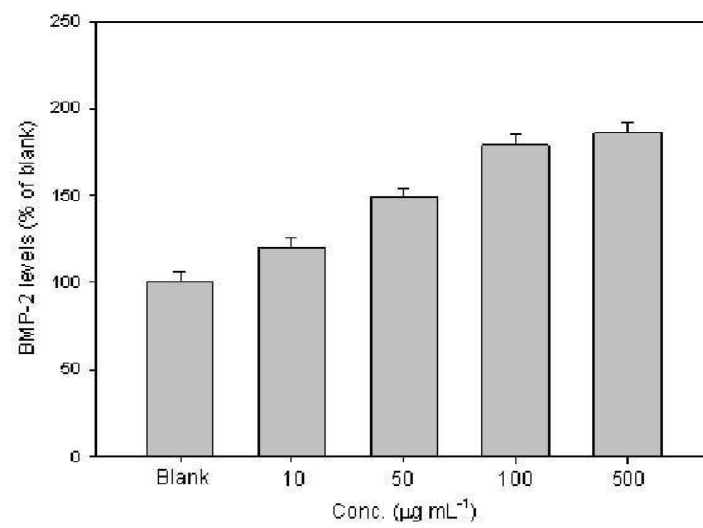
도면4



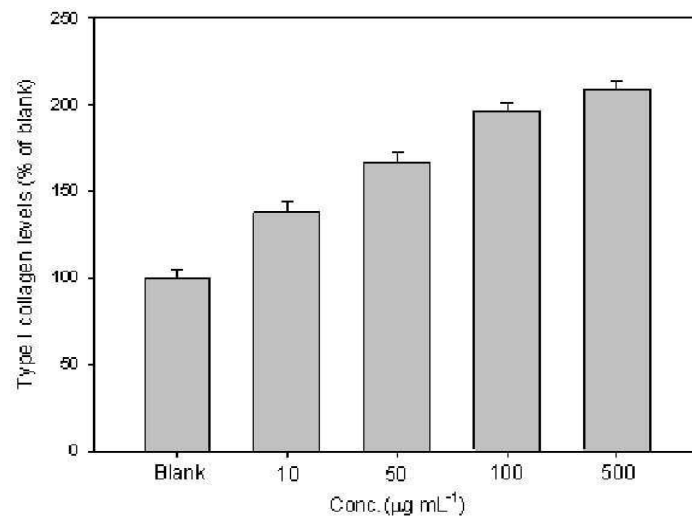
도면5



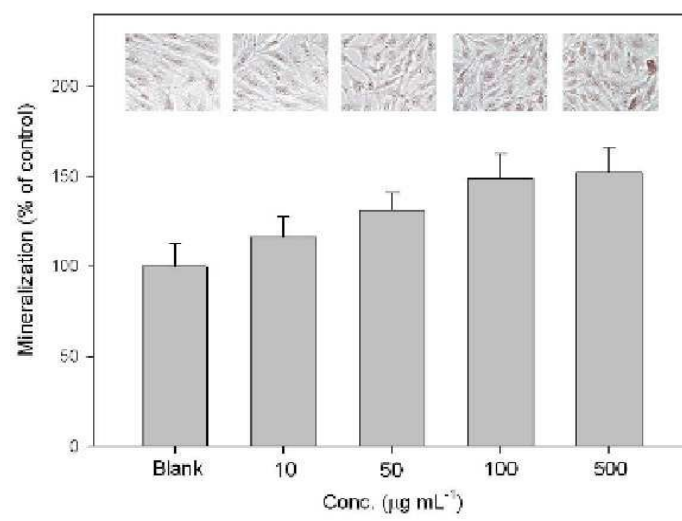
도면6



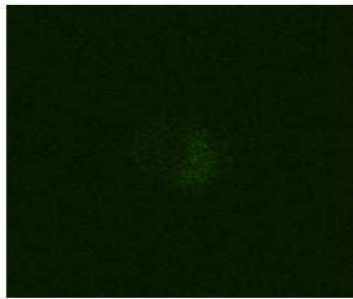
도면7



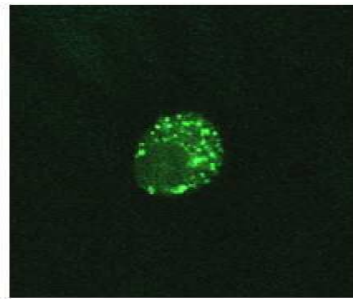
도면8a



도면8b



Blank



KFSP