

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0108958 (43) 공개일자 2010년10월08일
(51) Int. Cl. C12P 33/00 (2006.01) C12R 1/32 (2006.01) C12R 1/06 (2006.01) C12R 1/365 (2006.01)	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내	(72) 발명자 이강만 서울특별시 마포구 성산동 601 대림아파트 109동 901호
(21) 출원번호 10-2009-0027297 (22) 출원일자 2009년03월31일 심사청구일자 2009년03월31일	(74) 대리인 이병현	

전체 청구항 수 : 총 6 항

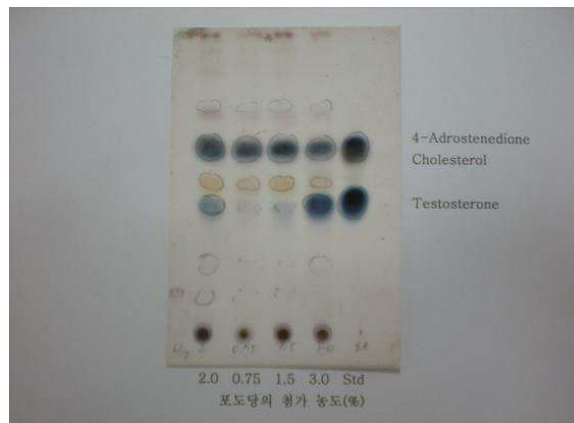
(54) 미생물을 이용하여 스테롤포함 천연물을 발효하여 얻어진 안드로젠 함유 발효생성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 미생물을 이용하여 스테롤포함 천연물을 발효하여 얻어진 안드로젠 함유 발효생성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 구체적으로는 스테롤을 포함하는 동물성 또는 식물성 천연물에 스테롤의 측쇄를 분해하는 능력을 가지는 미생물을 접종하여 발효시켜 안드로젠을 포함하는 발효생성물을 제조함으로써 남성의 갱년기 장애 또는 안드로젠 결핍에 의하여 발생하는 건강의 이상 현상을 억제하거나 치료할 수 있는 안드로젠을 포함하는 발효생성물을 제공한다.

본 발명의 안드로젠을 포함하는 발효생성물은 안드로젠 결핍에 따른 현상에 건강보조제 또는 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

스테롤을 포함하는 천연물을 스테롤의 측쇄를 분해하는 미생물을 이용하여 발효시켜 얻어진 안드로젠을 포함하는 발효생성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 미생물은 *Mycobacterium* 속, *Arthrobacter* 속, *Norcadia* 속 또는 *Brevibacterium* 속 미생물임을 특징으로 하는 안드로젠을 포함하는 발효생성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 안드로젠을 포함하는 발효생성물이 초기 스테롤 함량의 50 중량% 이하인 저스테롤 또는 무스테롤인 것을 특징으로 하는 발효생성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 스테롤을 포함하는 천연물이 계란이고, 미생물이 *Mycobacterium* 속 미생물임을 특징으로 하는 발효생성물.

청구항 5

스테롤을 포함하는 천연물에 포도당을 첨가하고 *Mycobacterium* 속, *Arthrobacter* 속, *Norcadia* 속, 또는 *Brevibacterium* 속 미생물을 접종하여 섭씨 20~40 도에서 5~100 일 배양하여 안드로젠을 포함하는 발효생성물을 제조하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 포도당은 배양배지 중량의 0.1~5 중량% 농도로 첨가하는 것을 특징으로 하는 안드로젠을 포함하는 발효생성물을 제조하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물을 이용하여 스테롤포함 천연물을 발효하여 얻어진 안드로젠 함유 발효생성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 구체적으로는 스테롤을 포함하는 동물성 또는 식물성 천연물에 스테롤의 측쇄를 분해하는 능력을 가지는 미생물을 접종하여 발효시켜 안드로젠을 포함하는 발효생성물을 제조함으로써 남성의 갱년기 장애 또는 안드로젠 결핍에 의하여 발생하는 건강의 이상 현상을 억제하거나 치료할 수 있는 안드로젠을 포함하는 발효생성물에 관한 것이다.

[0002] 사람의 수명연장에 따른 노령인구의 증가와 비례하여 갱년기 장애를 호소하는 사람들이 증가하는 추세이다. 이러한 갱년기 장애의 주요한 원인으로 성호르몬의 결핍 또는 생성저하를 생각할 수 있다. 갱년기 장애를 극복하는 방법으로 여성의 경우는 여성 성호르몬인 에스트로젠을 주기적으로 투여하는 호르몬요법이 시행되고 있으며, 남성의 경우는 남성 성호르몬인 테스토스테론 등의 안드로젠을 적용하는 호르몬요법이 시행되고 있다. 그러나 이러한 성 호르몬 대체요법은 합성 정제된 여성 또는 남성 성 호르몬을 의료기관에서 시행하는 방법이며 일반인이 손쉽게 이용할 수 없는 문제점이 있다. 따라서 동물성 또는 식물성 천연물을 발효시켜 얻어지는 발효산물에 성 호르몬 또는 성 호르몬 유사물질들을 생성물에 포함시킬 수 있다면 성호르몬 결핍 또는 불균형에서 오는 건강상의 이상증상을 억제 또는 치유할 수 있을 것이다.

[0003] 또한 계란의 경우 다량으로 함유되어 있는 콜레스테롤을 발효과정을 통하여 감소시키거나 제거함으로써 성인의 콜레스테롤 과다섭취를 염려하는 경우에 저스테롤 또는 무스테롤 계란발효산물을 제공할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0004] 본 발명은 스테롤의 측쇄를 분해할 수 있는 미생물을 계란 등 스테롤을 포함하고 있는 천연물에 접종하여 발효시켜 안드로젠을 포함하는 발효조성물을 생산함으로써 남성의 갱년기 장애 또는 안드로젠 결핍에 의하여 발생하는 건강의 이상 현상을 억제하거나 치료할 수 있는 안드로젠을 포함하는 발효생성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.
- [0005] 본 발명의 목적은 스테롤의 측쇄를 분해할 수 있는 미생물을 계란 등 스테롤을 다량 포함하고 있는 천연물에 접종하여 발효시켜 저스테롤 또는 무스테롤이며, 안드로젠을 포함하는 발효조성물을 생산함으로써 남성의 갱년기 장애 또는 안드로젠 결핍에 의하여 발생하는 건강의 이상 현상을 억제하거나 치료할 수 있는 안드로젠을 포함하는 조성물을 제공한다.

과제 해결수단

- [0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스테롤의 측쇄를 분해할 수 있는 *Mycobacterium* 속, *Arthrobacter* 속, *Norcadia* 속, *Brevibacterium* 속 등 미생물, 바람직하게는 *Mycobacterium* 속 미생물을 계란 등 스테롤을 다량 포함하고 있는 천연물에 접종하여 발효시켜 최종 스테롤 함량이 초기 스테롤 함량의 50 중량% 이하의 저스테롤 또는 무스테롤이며, 안드로젠을 포함하는 발효조성물을 제공한다.
- [0007] 본 발명에서는 미생물을 포도당이 포함된 배양배지에서 섭씨 30도에서 5일간 진탕배양하여 배양액을 종배양액으로 이용한다.
- [0008] 본 발명에서 발효 시 미생물의 종배양액은 스테롤을 포함하는 천연물 중량에 대해 5~1000중량% 양으로 사용하며, 바람직하게는 10~500 중량% 사용한다.
- [0009] 본 발명에서 이용 가능한 스테롤 함유 천연물에는 계란, 오리알, 메추리알 등의 동물성 천연물과 카카오, 콩, 마(산약, 천마), 저령, 인삼 등의 식물성 천연물이 있다.
- [0010] 배양배지는 nutrient broth(beef extract 3g, peptone 8g, 물 1000ml), yeast extract-malt extract broth(yeast extract 4g, malt extract 10g, glucose 4g, 물 1000ml), tryptone glucose broth(glucose 10g, sodium nitrate 1g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄ 0.5g, urea 0.5g, FeCl₃ 50mg, tryptic soy broth 1g, 물 1000ml) 등이 사용될 수 있으며, 발효에 사용하는 미생물에 따라 배양배지는 달라질 수 있다.
- [0011] 포도당의 농도는 배양배지 중량의 0.1~5중량 %가 바람직하며, 보다 바람직하게는 1.5~3.0 중량% 농도로 첨가하여 사용한다.
- [0012] 본 발명에서 발효기간은 5일 내지 100 일이고, 발효시 온도는 섭씨 20~40도로 유지하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 10~40일간, 섭씨 25~35도로 유지하는 것이 좋다.

효 과

- [0013] 본 발명은 스테롤의 측쇄를 분해할 수 있는 미생물을 계란 등 스테롤을 포함하고 있는 천연물에 접종하여 발효시켜 저스테롤 또는 무스테롤이며, 안드로젠을 포함하는 발효조성물을 생산함으로써 남성의 갱년기 장애 또는 안드로젠 결핍에 의하여 발생하는 건강의 이상 현상을 억제하거나 치료할 수 있는 안드로젠을 포함하는 발효생성물을 생산함으로써 이를 이용하여 손쉽게 안드로젠 결핍에서 오는 갱년기 장애를 예방하거나 치료할 수 있어 고령화 사회에서 노인건강유지를 위하여 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0015] **제조예: 미생물 종배양액의 제조**
- [0016] *Mycobacterium* 속 M3805 균주(KCTC 1829)를 포도당이 1중량% 포함된 nutrient broth 배지에 접종하여 섭씨 30도에서 5일간 진탕배양하고, 배양액을 종배양액으로 이용한다.
- [0017] **박충크로마토그래피법에 의한 정성분석**
- [0018] 실리카겔 박충판에 시료를 점적하고 클로로포름 : 에틸에테르 혼합액(10:2.5)에서 전개하여 용매를 말린 다음

자외선 하에서 자외선 흡수를 보이는 안드로젠 등의 물질의 존재를 확인하고, 10% 황산용액을 분무하고 섭씨 80 - 90 도 오븐에서 1시간 가열하여 발색시킨 후 스테롤 및 안드로젠 등의 물질을 확인한다.

[0019] 가스크로마토그래피법에 의한 정량분석

[0020] 스테로이드 분석용 칼럼이 부착된 가스크로마토그래피 기기를 이용하여 시료 중에 포함되어 있는 물질들을 분리하고 불꽃검출기로 검출하여 각각의 유지시간을 확인하고 피크면적으로부터 물질의 양을 정량한다.

[0021] 실시예 1. *Mycobacterium* 속 세균을 이용한 발효에서 안드로젠의 생성에 적합한 포도당 첨가농도 결정

[0022] 스테롤로부터 테스토스테론을 포함한 안드로젠의 발효에 적합한 포도당농도를 결정하기위하여 영양배지 (nutrient broth; beef extract 3g, peptone 8g, 물 1000ml)에 포도당을 0.75%, 1.5%, 2%, 3% 농도로 첨가하고 콜레스테롤을 0.1% 농도로 포함한 배양배지에서 *Mycobacterium* 속 M3805 균주(KCTC 1829)를 접종하여 20일 동안 섭씨 30도에서 진탕배양하여 발효액을 에틸아세테이트로 추출하여 실리카겔 박층크로마토그래피법으로 분석하였다.

[0023] 도 1에서 보는 바와 같이 포도당을 3% 첨가농도에서 4-안드로스텐디온 이외에도 테스토스테론의 생성이 현저하였다. 따라서 발효배지에서 포도당의 농도를 3%로 조정함으로써 테스토스테론의 생성을 향상시킬 수 있다.

[0024] 실시예 2. 계란의 *Mycobacterium* 속 세균을 이용한 발효에서 안드로젠의 생성확인과 경시적 변화

[0025] 종배양액 100 mL에 계란 1개의 내용물을 무균적으로 추가하고, 섭씨 30도에서 진탕배양하면서 10일 간격으로 배양액을 채취하여 에틸아세테이트 용매를 사용하여 추출하고, 추출액을 박층크로마토그래피 또는 가스크로마토그래피 분석을 시행하여 발효액에 포함되어 있는 콜레스테롤과 그의 분해산물인 안드로젠의 존재를 확인하였다.

[0026] 도 2에서 보는 바와 같이 발효일수가 증가함에 따라 스테롤의 양은 감소하고 안드로젠 물질은 증가하여 40일 배양에서는 스테롤의 반점은 거의 관찰되지 않았고 안드로젠 물질들의 반점들을 현저하게 확인할 수 있었다.

[0027] 또한, 물질의 경시적 변화를 정량하기위하여 가스크로마토그래피를 이용한 분석을 시행한 결과는 표 1에서와 보는 바와 같았다. 시간 경과에 따라서 콜레스테롤은 감소하고 안드로젠 물질은 축적됨을 확인할 수 있었다.

표 1

[0028] 발효시간에 따른 발효액(ml 당) 중 스테롤과 안드로젠의 변화

발효일수(일)	스테롤의 양(μ g)	4-안드로스텐디온의 양(μ g)	테스토스테론(μ g)
0	1052	-	-
10	722	-	-
20	526	56	-
30	176	226	-
40	18	354	24

[0029] 실시예 3. 첨가된 계란 양에 따른 콜레스테롤과 안드로젠의 변화

[0030] 계란 내용물을 혼화하고 그의 혼화물을 25 ml, 38 ml, 50 ml, 75 ml 씩을 미생물종배양 100 ml 에 각각 추가하고 배양하여 스테롤의 소진과 안드로젠의 생성에 소요되는 시간과 안드로젠의 양을 실험하였다.

[0031] 도 3에서 보는 바와 같이 같은 양의 종배양액에 계란 내용물의 첨가량을 변화시켰을 때 첨가량이 많을수록 스테롤이 소실되는데 걸리는 발효시간이 길어짐을 알 수 있었다. 75 ml를 첨가한 경우는 50일 발효에서도 스테롤이 잔존하고 있음을 확인할 수 있었다. 표 2는 가스크로마토그래피를 이용한 안드로젠의 정량 결과이다.

표 2

[0032] 첨가된 달걀 양에 따른 스테롤과 안드로젠의 변화

달걀 내용물 추가량	25 ml	38 ml	50 ml	75 ml
콜레스테롤이 소진되는데 걸리는 배양일수	25일	35일	40일	60일 이상
발효액 ml 당 4-androstendione의 생성량(μ g)	250	328	366	184
발효액 ml 당 잔존 콜레스테롤의 양(μ g)	-	-	-	194

[0033] 실험예 4. 발효생성물의 안드로겐의 효과

[0034] 안드로겐을 함유하는 발효생성물 건조물 2g(1440 μ g 안드로겐 함유)을 로션 베이스 45ml에 혼화하여 저녁에 눈썹에 적용함을 3개월 시행한 결과 도 4에서 보는 바와 같이 눈썹의 색깔과 수의 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 발효산물 중에 있는 안드로겐이 인체에 작용하여 효과를 나타냄을 생리학적으로 보여주는 결과이다. 따라서 발효생성물을 인체에 적용할 수 있는 적절한 제형(로션, 패취, 캡슐 등)으로 만들어 안드로겐의 결핍 또는 생성저하에서 나타나는 생리적 현상을 완화 또는 방지하는데 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 *Mycobacterium* 속 세균을 이용한 발효에서 포도당 첨가농도 변화에 따른 결과를 보여준다.

[0036] 도 2는 TLC에 의한 계란의 *Mycobacterium* 속 세균을 이용한 발효에서 안드로겐의 생성과 경시적 변화를 보여준다.

[0037] 도 3은 TLC에 의한 계란내용물 첨가량의 변화와 발효액 중 간존 콜레스테롤의 확인과 안드로겐의 생성의 확인을 보여준다.

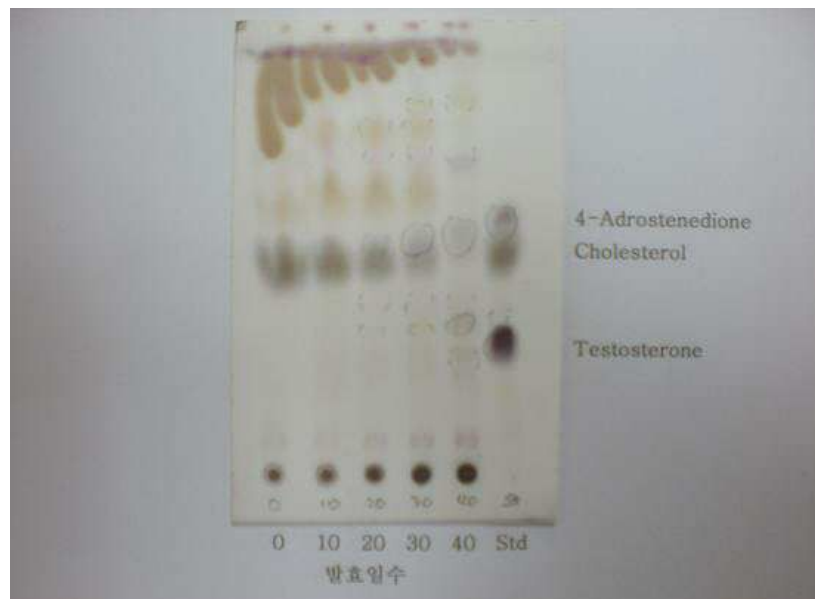
[0038] 도 4는 본 발명의 발효생성물을 적용한 눈썹에 대한 영향을 보여준다.

도면

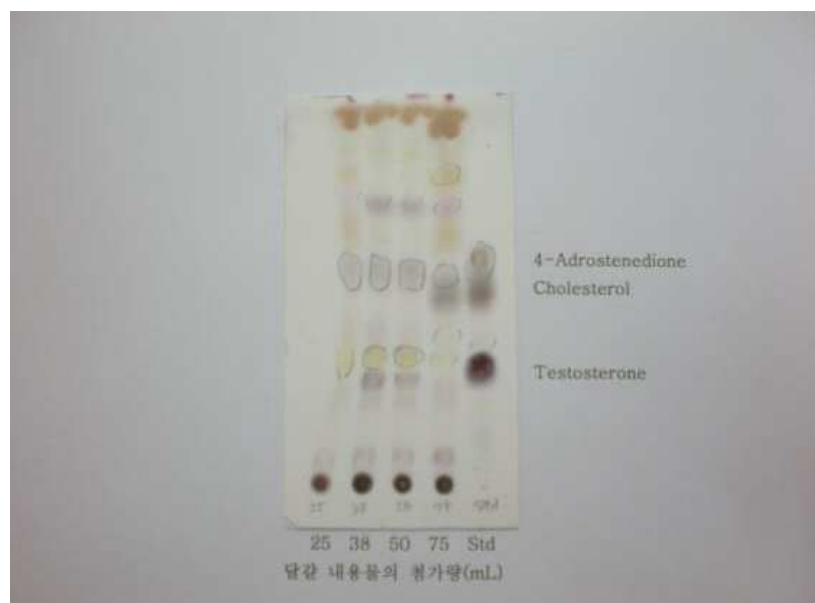
도면1



도면2



도면3



도면4



적용 전

3개월 적용 후