



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0128949
(43) 공개일자 2021년10월27일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>A23L 19/00</i> (2016.01)
 <i>A23L 29/00</i> (2016.01) <i>A23L 33/10</i> (2016.01)
 <i>A23L 33/135</i> (2016.01) <i>A61K 35/747</i> (2014.01)
 <i>A61P 19/10</i> (2006.01) <i>C12P 17/06</i> (2006.01)
 <i>C12R 1/01</i> (2006.01) <i>C12R 1/225</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 1/20</i> (2021.05)
 <i>A23L 19/00</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0050549
 (22) 출원일자 2021년04월19일
 심사청구일자 2021년04월19일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020200046387 2020년04월17일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 강세찬
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 414호(서천동)</p> <p>권정은
 경기도 수원시 영통구 반달로 76, 204호(영통동)</p> <p>(74) 대리인
 위병갑</p> |
|--|--|

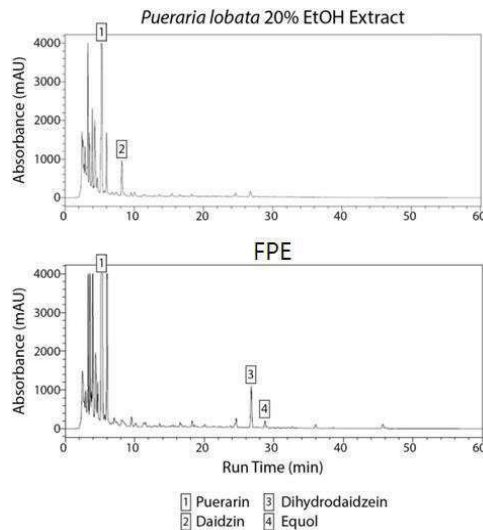
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 콩과 식물로부터 이소플라본 대사체인 다이하이드로다이드제인(dihydrodaidzein, DHD) 또는 에쿠올(equol)으로 생체 전환할 수 있는 신규한 미생물인 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P; 서열번호 3) 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 29/065 (2016.08)
A23L 33/10 (2016.08)
A23L 33/135 (2016.08)
A61K 35/747 (2013.01)
A61P 19/10 (2018.01)
C12P 17/06 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
C12R 2001/01 (2021.05)
C12R 2001/225 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425146199
과제번호	S3030487
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발(R&D)
연구과제명	미생물 생체전환 이소플라본유도체 함유 크론병치료제 비임상연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)엠바이옴세라퓨틱스
연구기간	2020.12.01 ~ 2022.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 3으로 표시되는 것인, 균주.

청구항 3

제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 식품용 조성물.

청구항 4

제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 식품 첨가용 조성물.

청구항 5

제1항의 균주를 이용하여, 콩과식물로부터 다이하이드로다이드제인 또는 에쿠올을 포함하는 콩과식물 발효물을 제조하는 방법에서,

상기 방법은,

(a) 콩과식물을 에탄올로 추출하는 추출단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 얻은 추출물에 제1항의 균주를 접종한 후 이를 교반하여 배양액을 만드는 배양단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 콩과식물로부터 다이하이드로다이드제인 또는 에쿠올을 포함하는 콩과식물 발효물을 제조하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (b) 배양단계의 교반속도는 100 내지 300rpm인 것을 특징으로 하는, 콩과식물로부터 다이하이드로다이드제인 또는 에쿠올을 포함하는 콩과식물 발효물을 제조하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 (b) 배양단계의 온도는 20 내지 40℃인 것을 특징으로 하는, 콩과식물로부터 다이하이드로다이드제인 또는 에쿠올을 포함하는 콩과식물 발효물을 제조하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 (b) 배양단계의 배양시간은 20시간 내지 80시간인 것을 특징으로 하는, 콩과식물로부터 다이하이드로다이드제인 또는 에쿠올을 포함하는 콩과식물 발효물을 제조하는 방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 (b) 배양단계의 추출물을 배양액 총량 기준으로 0.2 내지 10 중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는, 콩과 식물로부터 다이하이드로다이드제인 또는 에쿠올을 포함하는 콩과식물 발효물을 제조하는 방법.

청구항 10

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 발효물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 혈관염증 질환은 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 발효물을 유효성분으로 포함하는, 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 혈관염증 질환은 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaseus*) SEQ0315 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콩과식물은 콩과에 속하는 식물로서 이용성과 경제성이 매우 높아서 재배대상으로 많이 이용되고 있는 식물이다. 이 중에서도 칩(*Pueraria lobata*)은 한국, 일본, 중국 등에 분포하는 야생식물로서, 고대로부터 구황 식품으로 이용되었으며, 이른 봄 또는 늦은 가을에 캐어서 건조하여 약재로 이용하고 있으며, 발한, 해열, 하혈, 구갈, 두통을 다스린다고 하며, 고혈압, 협심증, 당뇨, 숙취제거, 항산화 효능 등에 이용되고 있다.

[0003] 한편, 칩에는 푸에라린(puerarin), 다이드진(daidzin), 다이드제인(daidzein), 제니스테인(genistein)과 같은 이소플라본(isoflavone) 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있어, 다양한 용도로 개발되어오고 있다.

[0004] 또한, 대두는 동물성 단백질에 비하여 아미노산이 적지만 식물성 단백질 및 식물 섬유가 풍부하며, 불포화 지방산을 포함하고 있기 때문에 영양적 가치가 뛰어나며, 골다공증 개선, 폐경기 증후, 항암효과, 비만증, 동맥경화, 고혈압, 항지방 혈중작용, 신장질환 등 광범위한 영역에 이용되고 있다.

[0005] 대두에는 다이드진(daidzin), 다이드제인(daidzein), 제니스틴(genistin), 제니스테인(genistein), 글리시틴(glycitin), 글리시테인(glycitein), 비오차닌(biochanin) A, 포르모노네틴(formononetin) 등이 함유되어 있다.

[0006] 본 발명의 생산 물질인 다이하이드로다이드제인은 콩의 주요 이소플라본(isoflavone) 중 하나인 다이드제인이 체내에 흡수되어 대사되는 과정 중에 생성되는 대사체 중 하나이며, 다이하이드로다이드제인은 이소플라보노이드(isoflavonoid)의 일종으로 항산화, 진통 효과 등이 있는 것으로 보고되어 있다. 또한, 본 발명의 또 다른 생산 물질인 다이하이드로제니스테인은 장 박테리아에 의한 대두 이소플라본 중 제니스테인의 대사산물이다.

- [0007] 상기 콩과식물에 포함된 이소플라본은 에스트라디올과 구조가 유사하여 타 물질에 비해 체내 흡수율이 높으며, 에스트로겐 수용체와 결합력이 뛰어나 항에스트로겐 작용 및 에스트로겐 유사 작용을 갖고 있다고 보고된 바 있으며, 항에스트로겐 작용에 의한 유방암, 전립선암 등의 호르몬 의존성 암의 예방 효과나 에스트로겐 유사 작용에 의한 갱년기 장애, 폐경 후의 골다공증, 고지혈증의 개선 효과가 보고되어있다.
- [0008] 특히, 이소플라본의 대사산물로는 최근 골다공증 등 여성호르몬 관련 질환의 예방 및 치료기능을 갖는 에쿠올(equol)과 같은 물질이 있으며, 에쿠올은 콩과식물의 이소플라본에 비해 에스트로겐 수용체와 결합능이 강하여, 유방이나 전립선 조직 등의 표적장기로 이행성이 현저히 높은 것이 보고되어있고, 폐경 후의 골밀도, 지질대사 개선 효과 또한 우수하다. 또한, 골다공증, 산부인과 질환, 전립선암, 위암, 유방암 등의 개선효과가 보고되어 있다. 이러한 에쿠올은 장내 미생물의 대사를 거쳐 생산 되지만, 에쿠올의 생산능에는 개인차가 있어 서양인의 에쿠올 생산자 비율은 약 20%, 동양인의 에쿠올 생산자 비율은 약 50%로 보고 되어있다.
- [0009] 그러나, 현재 보고되어 있는 균주들은 혐기적인 조건에서만 사용되기 때문에, 배양 시에 한계를 지니고 있어, 호기적 조건에서 에쿠올을 생산하는 미생물 개발이 시급한 실정이다.
- [0010] 한편, 최근 면역기능 조절이나 알레르기 억제 활성을 강조하는 건강기능식품의 개발물이 증가하고 있으며, 미래 기능성 식품의 잠재력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 알레르기는 과민반응이라는 뜻으로 면역시스템의 오작동으로 보통 사람에게는 별 영향이 없는 물질이지만, 특정 사람에게만 두드러기, 가려움, 콧물, 기침 등 이상 과민 반응을 일으키는 것을 의미한다. 최근 실내생활의 증가, 신소재의 개발, 외국으로부터 이물질 유입등과 같은 알레르기 유발 물질의 급증과 환경오염 및 스트레스로 인한 면역상태의 불안정, 식생활의 변화로 인하여 전 세계적으로 알레르기성 질환의 발병율이 증가하고 있는 추세이다.
- [0011] 따라서, 본 발명은 콩과 식물로부터 이소플라본 대사체인 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD), 다이하이드로제니스테인(Dihydrogenistein, DHG) 또는 에쿠올(Equol)로 생체 전환할 수 있는 신규한 미생물 3종을 개발하였고, 이는 각각 락토바실러스 사케이 SEQvitaP(*Lactobacillus sakei* SEQvitaP; 수탁번호 : KACC92053P; 서열번호 1) 균주, 락토바실러스 파라카제이 JS1(*Lactobacillus paracasei* JS1; 수탁번호: KCCM12288P; 서열번호 2) 균주 및 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 (*Pediococcus pentosaceus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P; 서열번호 3) 균주이며, 상기 미생물들을 이용하여 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD), 다이하이드로제니스테인(Dihydrogenistein, DHG) 또는 에쿠올(Equol)의 생산능을 확인하였다. 또한, 본 발명의 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 (*Pediococcus pentosaceus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P)는 비만세포의 탈과립을 억제하며, β -hexosaminidase release를 억제함으로써 알레르기, 아토피 개선 가능성을 지니고 있으며, TNF- α 로 유도된 혈관세포의 염증 반응을 억제함으로써 알레르기, 아토피와 같은 면역기능 조절뿐만 아니라 혈관의 염증을 억제함으로써 고지혈증, 콜레스테롤 개선 등의 효능을 함께 확인하여 알레르기 또는 혈관염증 질환의 치료용 조성물로 사용될 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 10-2009-0060510

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 이소플라본이 다량 함유되어있는 콩과식물을 이용하여 호기적 조건에서도 에쿠올(Equol)의 전구체인 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD) 및 다이하이드로제니스테인(Dihydrogenistein, DHG) 생산할 수 있으며, 또한 최종 생산물질인 에쿠올(Equol)을 제조할 수 있는 신규한 균주를 개발함에 그 목적이 있다.
- [0014] 또한, 상기 균주를 이용하여 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD), 다이하이드로제니스테인(Dihydrogenistein, DHG) 또는 에쿠올(Equol)을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0015] 또한, 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 알레르기 또는 혈관염증 질환의 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 "균주"는 서열번호 3으로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 식품용 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 식품 첨가용 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 상기 균주를 이용하여, 콩과식물로부터 다이하이드로다이드제인 또는 에쿠올을 포함하는 콩과식물 발효물을 제조하는 방법에서, 상기 "방법"은, (a) 콩과식물을 에탄올로 추출하는 추출단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 얻은 추출물에 제1항의 균주를 접종한 후 이를 교반하여 배양액을 만드는 배양단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 콩과식물로부터 다이하이드로다이드제인 또는 에쿠올을 포함하는 콩과식물 발효물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (b) 배양단계의 "교반속도"는 100 내지 300rpm인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (b) 배양단계의 "온도"는 20 내지 40℃인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (b) 배양단계의 "배양시간"은 20시간 내지 80시간인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (b) 배양단계의 "추출물"을 배양액 총량 기준으로 0.2 내지 3 중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 발효물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 발효물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 "혈관염증 질환"은 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 따른 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주를 이용하여 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD) 또는 에쿠올(Equol)을 제조하는 방법에 의하면, 호기적 조건에서도 배양가능하며, 이는 높은 생산능을 가지는 효과가 있다. 상기 신규 균주를 이용하는 경우, 알레르기 또는 혈관염증 질환에 개선 효과를 확인하였고, 이는 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 칩(*Pueraria lobata*) 추출물에서 펜토사세우스 SEQ0315 균주를 이용한 발효물(FPE)의 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD) 및 에쿠올(Equol)의 전환을 측정한 도이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 칩(*Pueraria lobata*) 추출물의 농도(2% 또는 5%) 첨가에 따른 펜토사세우스 SEQ0315 균주를 이용한 발효물(FPE)의 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD) 및 에쿠올(Equol)의 전환을 측정한 도이다. 다이하이드로다이드제인의 경우 칩 추출물 2%로 발효하였을 때 41.9 mg/g이 생성되었으며, 칩 추출물 5% 첨가 후 발효하였을 때는 59.72 mg/g으로 2% 첨가하였을 때보다 다이하이드로다이드제인의 생성량

이 약 1.42배 증가한 것으로 확인되었다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 RBL-2H3 세포주를 이용하여 각 시료의 세포독성을 측정한 도이다(페디오코커스 펜토사세우스 균주발효물; FPE, dihydrodaidzein; DHD, equol).

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 각 시료의 탈과립 억제율을 측정한 도이다(페디오코커스 펜토사세우스 균주발효물; FPE, dihydrodaidzein; DHD, equol, 양성대조군 ketotifen).

도 5는 본 발명의 실시예에 따른 각 시료의 COX-2, IL-6 및 TNF- α 의 발현량을 나타낸 도이다(dihydrodaidzein; DHD, equol).

도 6은 본 발명의 실시예에 따른 각 시료의 마우스 혈관세포인 MOVAS 세포주를 이용한 세포독성을 측정한 도이다(페디오코커스 펜토사세우스 균주발효물; EP, 쥬 추출물; PL, equol, 양성대조군 E2).

도 7은 본 발명의 실시예에 따른 각 시료의 혈관염증지표인 VCAM-1의 발현을 확인한 도이다(dihydrodaidzein; DHD, equol).

도 8은 본 발명의 실시예에 따른 각 시료의 혈관염증지표인 Nrf-2 및 HO-1의 발현을 확인한 도이다(dihydrodaidzein; DHD, equol).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0031] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0032] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.

[0034] 본 발명을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0035] 본 발명은 콩과식물 추출물로부터 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD), 다이하이드로제니스테인(Dihydrogenistein, DHG) 또는 에쿠올(Equol) 포함하는 발효물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0036] 본 발명의 제조 방법에서 사용되는 미생물은 다음과 같다.

[0037] 본 발명은 쥬 또는 대두 추출물을 이소플라본 대사체인 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD), 다이하이드로제니스테인(Dihydrogenistein, DHG) 또는 에쿠올(Equol)로 전환 할 수 있는 락토바실러스 사케이 SEQvitaP(*Lactobacillus sakei* SEQvitaP; 수탁번호 : KACC92053P) 균주, 락토바실러스 파라카세이 JS1(*Lactobacillus paracasei* JS1; 수탁번호: KCCM12288P) 균주 또는 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주 및 이를 이용하여 이소플라본 대사체인 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD), 다이하이드로제니스테인(Dihydrogenistein, DHG) 또는 에쿠올(Equol)을 포함하는 발효물을 제조하는 방법이다.

[0038] 상기 다이하이드로다이드제인, 다이하이드로제니스테인 또는 에쿠올을 포함하는 발효물을 제조하는 방법은, (a) 분쇄한 쥬 또는 대두를 에탄올로 교반 추출하는 추출단계; 및 (b) 상기 (a)단계에서 얻은 추출물에 상기 락토바실러스 사케이 SEQvitaP(*Lactobacillus sakei* SEQvitaP; 수탁번호 : KACC92053P) 균주, 락토바실러스 파라카세이 JS1(*Lactobacillus paracasei* JS1; 수탁번호: KCCM12288P) 균주 또는 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주들을 각각 접종한 후 이를 교반하여 배

양액을 만드는 배양단계;를 포함한다.

- [0039] 상기 다이하이드로다이드제인, 다이하이드로제니스테인 또는 에쿠올을 포함하는 쥘 발효물 또는 대두 발효물을 제조하는 방법은, 상기 (a) 추출단계에서 사용되는 원료를 이용할 수 있다. 본 발명에 사용되는 쥘 또는 대두의 형상에 관해서는 분말상이거나, 분쇄 또는 파쇄된 것일 수도 있고, 바람직하게는 일반적으로 분말상의 쥘 또는 대두를 사용하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 다이하이드로다이드제인, 다이하이드로제니스테인 또는 에쿠올을 포함하는 발효물을 제조하는 방법은 상기 (a) 추출단계에서 사용하는 용매로서 에탄올을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 추출의 효율성을 위하여 주정기 준으로 20% 내지 90%의 에탄올을 사용하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 다이하이드로다이드제인, 다이하이드로제니스테인 또는 에쿠올을 포함하는 쥘 발효물 또는 대두 발효물을 제조하는 방법은, 호기성 균주를 사용하기 때문에, 일정한 속도로 교반을 하여 산소를 공급하도록 한다. 이를 위하여, 바람직하게는 상기 (b) 배양단계의 교반속도를 100내지 300rpm으로 하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 다이하이드로다이드제인, 다이하이드로제니스테인 또는 에쿠올을 포함하는 쥘 발효물 또는 대두 발효물을 제조하는 방법은, 상기 락토바실러스 사케이 SEQvitaP(*Lactobacillus sakei* SEQvitaP; 수탁번호 : KACC92053P) 균주, 락토바실러스 파라카세이 JS1(*Lactobacillus paracasei* JS1; 수탁번호: KCCM12288P) 균주 또는 페디오코 커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주들 중 어느 하나를 배지에 접종한 후, 상기 균주가 생육 가능한 온도 영역에서 20 내지 80시간 동안 호기 발효시켜 배양한다. 바람직하게는 상기 온도를 28 내지 30℃로 하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 다이하이드로다이드제인, 다이하이드로제니스테인 또는 에쿠올을 포함하는 쥘 발효물 또는 대두 발효물을 제조하는 방법은 바람직하게는 상기 (b) 배양단계에서 상기 (a) 추출단계에서 추출된 추출물을 배양액 총량 기준 0.2 내지 2 중량%로 포함시키는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 사케이 SEQvitaP(*Lactobacillus sakei* SEQvitaP; 수탁번호 : KACC92053P) 균주, 락토바실러스 파라카세이 JS1(*Lactobacillus paracasei* JS1; 수탁번호: KCCM12288P) 균주 또는 페디오코 커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주들 중 어느 하나를 이용하여 제조된 쥘 발효물 또는 대두 발효물을 제공한다.
- [0045] 상기 단계를 거쳐 발효 처리되어 얻어지는 쥘 발효물 또는 대두 발효물에는 다이하이드로다이드제인, 다이하이드로제니스테인 또는 에쿠올이 생성되어 축적되어있다. 상기 조건으로 얻어지는 쥘 발효물 또는 대두 발효물은 발효 후의 상태 그대로 식품, 의약품, 화장품 등의 소재로서 사용할 수도 있으며, 필요에 따라서는 건조 처리 단계를 통해 건조 고형물 상태로 하여 식품, 의약품, 화장품 등의 소재로서 사용할 수도 있다.
- [0046] 바람직하게는 쥘 발효물 또는 대두 발효물의 보존 안정성을 향상시키기 위하여, 가열 건조 처리에 의해 고형상으로 보관하는 것으로 하며, 가열 건조 처리된 쥘 발효물 또는 대두 발효물은, 필요에 따라서 분말화 처리를 할 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 쥘 발효물 또는 대두 발효물은, 상술한 바와 같이, 유용 생리 활성 물질인 다이하이드로다이드제인 또는 에쿠올이 포함되어 있기 때문에, 다양한 생리 활성이나 약리 활성을 발현할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 쥘 발효물 또는 대두 발효물은 여성 호르몬 수용체의 조절 효과가 일반 쥘 발효물 또는 대두 추출물보다 고농도에서 우수하며, 세포 독성이 완화되는 특성을 갖고 있어, 인체에 안전하면서, 골다공증 등의 질환이나 증상의 예방 내지 개선에 유용하다. 또한, 본 발명의 쥘 발효물 또는 대두 발효물은, 특히 중 노년층 여성에 있어서의 여성호르몬 조절 장애에 따른 질환인 갱년기 장애 또는 폐경에 수반하는 증상의 예방 내지 개선에 유용하다.
- [0048] 또한, 본 발명의 쥘 발효물 또는 대두 발효물을 의약품 소재로서 사용하는 경우에는, 정제, 환제, 산제, 액제, 현탁제, 유제, 과립제, 캡슐제, 좌제 등의 형태의 의약 제제로 제조된다. 본 발명의 쥘 발효물 또는 대두 발효물을 함유하는 의약 제제는 갱년기 장애, 골다공증 등의 질환이나 증상의 예방 내지 개선제 등으로서 유용하다. 특히, 중 노년층에 있어서 권태 호소 내지 폐경에 수반하는 증상의 예방 또는 치료에 바람직하게 사용된다.
- [0049] 이러한 쥘 발효물 또는 대두 발효물을 더욱 효과적으로 적용시키기 위해서, 본 발명은 상기 쥘 발효물 또는 대두 발효물을 동결 건조하여 쥘 발효물 또는 대두 발효 동결 건조물을 제조하여 제공 할 수 있다.

- [0051] 일측면에서, 본 발명은 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주를 이용하여 제조된 발효물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(Adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0053] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0054] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0055] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(Witepsol), 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0057] 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여 형태로 다양하게 제형화 될 수 있다.
- [0058] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 봉해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0059] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.
- [0060] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.
- [0062] 일측면에서, 본 발명은 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주를 이용하여 제조된 발효물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0063] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 유효성분인 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0064] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스,

슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 하기 약학 조성물과 동일한 방식으로 제제화 되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알콜 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0065] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0066] 본 발명의 건강기능식품 조성물은, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능성 식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강 기능성 식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강 기능성 식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡슐 형태의 건강 기능성 식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡슐 기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강 기능성 식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강 기능성 식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0068] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험에는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0070] <실시예 1> 신규 균주의 동정

[0071] 약 1개월 동안 침 또는 대두 추출물을 섭취한 사람의 분변을 수집하여 gifu anaerobic medium(GAM), trypticase soy agar(TSA), ethylene bromide agar(EMA), brain heart infusion(BHI), reinforced clostridial medium(RCM), Lactobacilli MRS(MRS) 6종의 배지에 도말하여 28℃에서 24시간 동안 배양하면서 생성되는 colony의 형태와 색상을 기준으로 하여, 각각의 균주를 분리하였다.

[0072] 상기 분리된 균주들은 HPLC를 이용하여 분석하여 이소플라본 생성 균주를 확인하였다. 각각의 분리 균주를 규명하기 위해 genomic DNA를 Solgent사의 genomic DNA prep kit를 이용하여 추출하였으며, 각각의 primer는 세균의 16S rRNA부위를 특이적으로 증폭하는 forward primer인 27F(5' -agagtttgatcMtggctcag-3')와 reverse

primer인 1492R(5' -ggYtaccttg ttacgactt-3')를 사용하였다. PCR reaction mixture는 template 1 $\mu\ell$, 2X Taq PCR premix(QIAGEN) 10 $\mu\ell$, forward primer 2 $\mu\ell$ (10 pmole/ $\mu\ell$), reverse primer 2 $\mu\ell$ (10 pmole/ $\mu\ell$), dDW 5 $\mu\ell$ 를 섞은 뒤 PCR을 수행하였다.

[0073] PCR cycle은 94℃에서 10초, 45℃에서 20초, 72℃에서 1분 동안 수행하였으며, PCR 과정은 30번 반복하였다. 또한, Pre-denaturation과정은 94℃에서 2분 동안 수행하였고 post-elongation 과정은 72℃에서 5분 동안 수행하였으며, PCR 결과는 0.7% agarose gel에서 확인하였다. PCR product의 정제는 QIAquick Gel Extraction kit를 사용하였으며, 균주동정을 위해 정제된 DNA를 Solgent사에 의뢰하여 sequencing 한 뒤 NCBI BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 균주의 서열을 분석하였다. 최종 분리된 균주는 각각 락토바실러스 사케이 SEQvitaP(*Lactobacillus sakei* SEQvitaP; 수탁번호 : KACC92053P) 균주, 락토바실러스 파라카세이 JS1(*Lactobacillus paracasei* JS1; 수탁번호: KCCM12288P) 균주 및 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P) 균주이다. 본 발명은 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P; 서열번호 3) 균주에 관한 것이다.

[0075] <실시예 2> 쥬 또는 대두 추출물의 제조 및 배양액의 제조

[0076] 분쇄한 쥬 또는 대두를 20% 주정으로 추출하여 하기 표 1과 같은 조건으로 쥬 또는 대두 추출물을 제조한 후, 감압 여과하였으며, 회전진공농축기를 사용하여 용매를 제거하였다. 이후, 1L 삼각플라스크에 GAM 배지 100mL을 넣고, 하기 표 1과 같은 조건으로 추출물을 배지에 넣은 후 락토바실러스 사케이 SEQvitaP(*Lactobacillus sakei* SEQvitaP; 수탁번호 : KACC92053P; 서열번호 1) 균주, 락토바실러스 파라카세이 JS1(*Lactobacillus paracasei* JS1; 수탁번호: KCCM12288P; 서열번호 2) 균주 및 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P; 서열번호 3) 균주를 각각 0.1% 접종하여 배양액을 제조하였다. 본 발명은 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315(*Pediococcus pentosaseus* SEQ0315; 수탁번호: KACC92051P; 서열번호 3) 균주에 관한 것이다.

[0077] 이 때, 배양액 제조시의 배양 시간, 배양 온도, 교반 속도 및 추출물의 함량은 하기 표 1의 조건이 되도록 제조하였다.

표 1

	배양시간 (h)	배양온도 (℃)	교반속도 (rpm)	추출물함량 (%)
실시예1	24	28	250	0.2
실시예2	24	28	250	0.4
실시예3	24	28	250	0.6
실시예4	24	28	250	0.8
실시예5	24	28	250	1.0
실시예6	24	28	250	2.0
실시예7	24	28	100	2.0
실시예8	24	28	150	2.0
실시예9	24	28	200	2.0
실시예10	24	28	300	2.0
실시예11	24	37	250	2.0
실시예12	48	28	250	2.0
실시예13	48	37	250	2.0
실시예14	72	28	250	2.0
실시예15	72	37	250	2.0

[0081] <실시예 3> 배양액의 분석 조건

[0082] 상기 배양액의 분석에는 LC-20AD (Shimadzu, Japan) HPLC를 사용하였으며, 검출기는 PDA detector(Shimadzu, SPD-M20A)로 280nm에서 측정하였다. 컬럼은 Skypack C18(SKchemical, 4.6×150mm, 5micron), Mobile phase A는 water:acetic acid = 100: 1(v/v%), B는 water: acetonitrile: acetic acid = 50 : 50 :1(v/v%), flow rate는

1mL/min, column oven은 40℃, injection volume은 10 μ l를 사용하였다.

[0083] 그 결과 도 1 및 도 2에서 확인할 수 있는 것처럼 기존의 침 추출물에서는 확인할 수 없었던 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD) 및 에쿠올(Equol)이 본 발명의 페디오코커스 펜토사세우스 균주 SEQ0315를 이용한 침 발효물에서는 확인되었다. 이는 본 발명의 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주의 발효시 대사를 통해 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD) 및 에쿠올(Equol)을 생산해냄을 확인할 수 있는 결과이다.

[0085] <실험예 1> RBL-2H3 세포주에서의 세포독성 측정

[0086] RBL-2H3 세포주를 이용하여 각 시료의 세포독성을 측정하였다. 96well cell culture plate에 RBL-2H3세포주를 1×10^4 cell/well로 분주한 뒤 5% CO2 배양기에서 24시간동안 배양한 후 본 발명의 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주 발효물, 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD) 및 에쿠올(Equol)을 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 그 후 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였으며, 결과는 도 3과 같다. 도 3에서 확인할 수 있는 것처럼 3가지 시료 모두 고농도를 제외한 나머지 농도에서는 세포독성이 관찰되지 않았다.

[0088] <실험예 2> 비만세포의 탈과립 억제율 측정

[0089] 항알레르기 효과를 확인하기 위해, 비만세포의 탈과립 억제율을 측정하였다. 탈과립 억제율을 측정하기 위하여 RBL-2H3 세포주를 24 well plate에 2×10^5 cell/well로 분주한 후 24시간 배양하였으며, anti-DNP-BSA IgE를 0.5ug/ml의 농도로 처리한 후 24시간 배양하였다. 각각의 시료를 농도별로 20분간 처리하였으며, DNP-BSA 0.1ug/ml로 처리하고, substrate인 pNAG를 처리한 후 1시간동안 반응한 후 stop buffer를 200ul씩 첨가하였다. 이후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도 측정하였다. 그 결과는 하기의 표 1 및 도 4와 같다.

표 2

sample	100 μ M	50 μ M	25 μ M
FPE (SEQ0315)	51.1 $\pm$ 0.52	43.8 $\pm$ 0.25	15.9 $\pm$ 0.86
DHD	45.9 $\pm$ 0.65	25.6 $\pm$ 1.18	12.5 $\pm$ 1.25
equol	48.5 $\pm$ 0.82	28.1 $\pm$ 1.11	16.5 $\pm$ 0.82
Ketotifen (100 μ g/ml)	51.7 $\pm$ 0.13	42.7 $\pm$ 0.25	15.7 $\pm$ 2.23

[0093] 상기 실험방법을 통하여 본 발명의 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주 발효물, 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD), 에쿠올(Equol) 및 양성대조군인 ketotifen 모두 beta-hexosaminidase release를 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 확인되었다.

[0095] <실험예 3> COX-2, IL-6 및 TNF- α 의 발현량 측정

[0096] 염증반응 억제 효과를 확인하기 위한 실시간 PCR은 cDNA, TB Green, primer(COX-2, IL-6, TNF- α)를 이용하여 진행하였다. PCR 조성은 cDNA를 멸균증류수로 희석하여 사용하였고, 실시간 PCR cycle은 초기변성 95℃ 10분, 변성은 95℃ 30초, 어닐링은 60℃ 1분, 신장반응은 95℃ 1분으로 하여 40회 진행하였다. 용해 곡선은 55℃로 시작하여 95℃를 끝으로 하여 0.5℃씩 상승시키며 80번을 반응하여 원하는 형광값을 검출하였다. 형광신호 정량은 MAXPro 프로그램을 사용하였다. 각각의 RT-PCR에서 동량의 RNA가 사용되었음을 확인하기 위하여 하우스키핑 유전자인 β -actin에 대한 RT-PCR을 함께 진행하였다.

[0097] 그 결과 도 5에서 확인할 수 있는 것처럼 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)에 의해 COX-2의 유전자 발현 억제, 에쿠올(Equol)에 의해 TNF- α 의 발현이 억제되는 것을 확인하였으므로, 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)과 에쿠올(Equol)을 생성하는 본 발명의 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주와 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)과 에쿠올(Equol)을 포함하는 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주발효물을 이용할 경우 염증관련 인자인 COX-2와 TNF- α 모두 억제할 것을 예측하였다.

[0099] <실험예 4> 마우스 혈관세포인 MOVAS 세포주에서의 세포독성 측정

[0100] 마우스 혈관세포인 MOVAS 세포주를 이용하여 각 시료의 혈관세포에서의 세포독성을 측정하고자 하였다. MOVAS 세포주는 1×10^4 cell/well로 96well culture plate에 분주한 후 24시간동안 CO2 배양기에 배양하였으며, 24시간 후에 각각의 시료를 농도별로 24시간 처리하였다. 이후 MTT 시약(5mg/ml)을 처리하고 3시간동안 반응시켰으며, 반응 후 상등액 제거 후 DMSO 100ul로 세포를 녹인 후 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 측정하였다. 상기의 실험방법을 이용하여 MTT assay를 수행하였으며, 그 결과 도 6에서 확인할 수 있는 것처럼 에쿠올(Equol)에서만 고농도(100 μ M)에서 세포독성이 관찰되었다.

[0102] <실험예 5> 혈관염증지표인 VCAM-1, Nrf-2 및 HO-1의 발현 측정

[0103] 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)과 에쿠올(Equol)을 이용하여 혈관염증지표인 VCAM-1, Nrf-2 및 HO-1의 발현을 확인하고자 하였다. MOVAS 세포주를 60 mm cell culture plate에 1×10^6 cell/well로 분주한 후 24시간동안 CO2 배양기에 배양하였다. 이후 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)과 에쿠올(Equol)을 각각 농도별로 2시간 전처리를 수행하였으며, normal control을 제외한 나머지 well에 TNF- α 를 10ng/ml의 농도로 24시간동안 처리하여 염증을 유도하였다. 24시간 이후에는 cold PBS로 세척하였으며, homogenizer buffer를 이용하여 세포를 lysis시킨 후 protein을 추출하여 사용하였다. BCA법을 이용하여 protein 정량하였으며, VCAM-1, Nrf-2, HO-1의 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 도 7(VCAM-1) 및 도 8(Nrf-2 및 HO-1)에서 확인할 수 있는 것처럼 본 발명의 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주발효물의 유효물질인 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)과 에쿠올(Equol)에 의하여 VCAM-1의 발현이 억제되며(도 7 참조), 하위인자인 Nrf-2와 HO-1의 발현은 최종대사산물인 equol에 의하여 억제되는 것(도 8 참조)을 확인하였다. 따라서, 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)과 에쿠올(Equol)을 생성하는 본 발명의 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주와 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)과 에쿠올(Equol)을 포함하는 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주발효물을 이용할 경우 혈관염증관련 인자인 VCAM-1, Nrf-2 및 HO-1를 모두 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0105] 상기 실시예 및 실험예에 따라 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)과 에쿠올(Equol)을 생성하는 본 발명의 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주와 다이하이드로다이드제인(Dihydrodaidzein, DHD)과 에쿠올(Equol)을 포함하는 페디오코커스 펜토사세우스 SEQ0315 균주발효물은 항알레르기 효과 및 혈관염증 개선 효과를 확인하였으므로, 이는 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물과 알레르기 또는 혈관염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 사용될 수 있을 것이다.

[0107] 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 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0109]

기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC92053

수탁일자 : 20150409

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12288

수탁일자 : 20180713

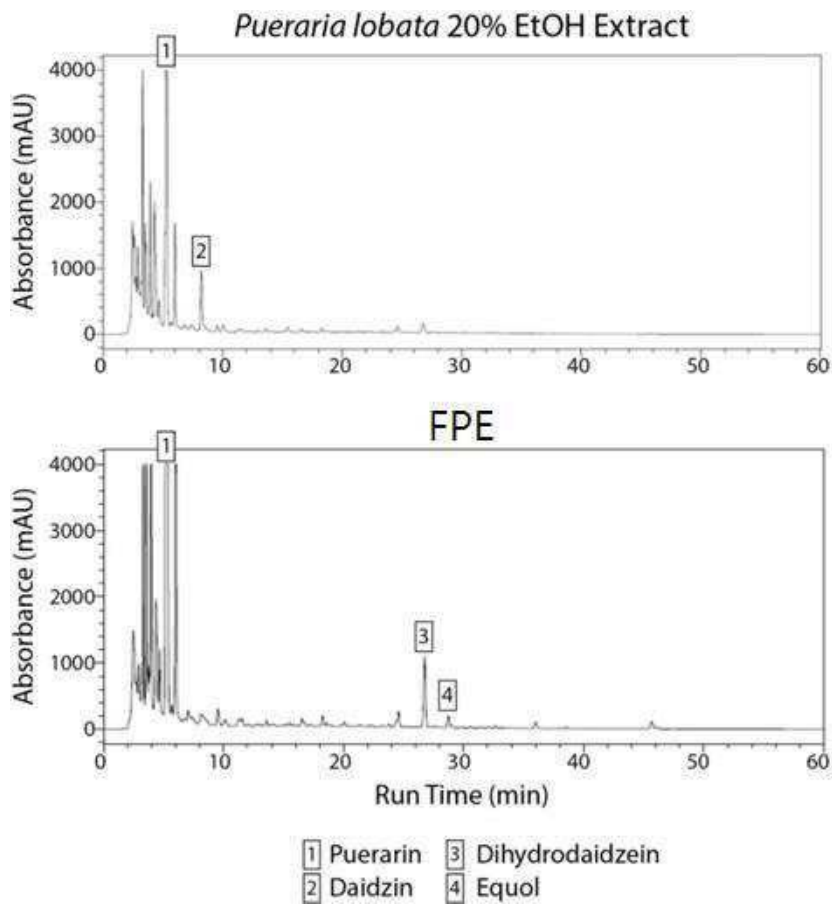
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC92051

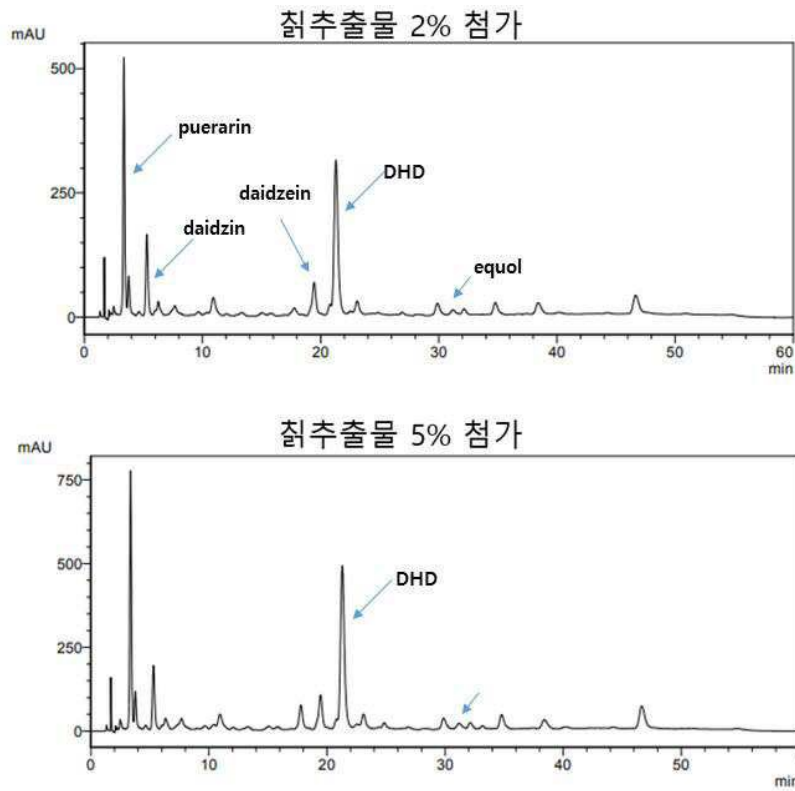
수탁일자 : 20150409

도면

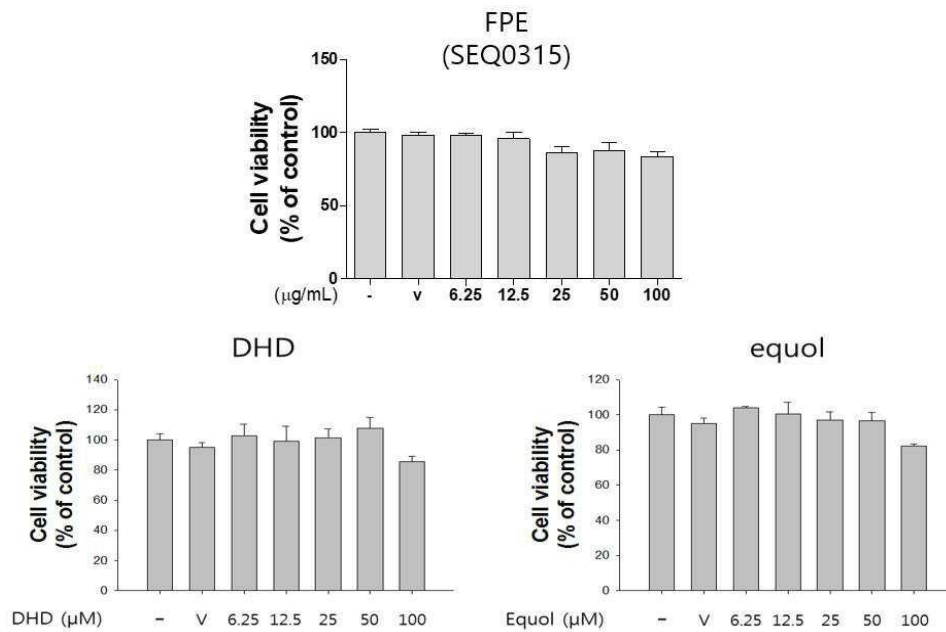
도면1



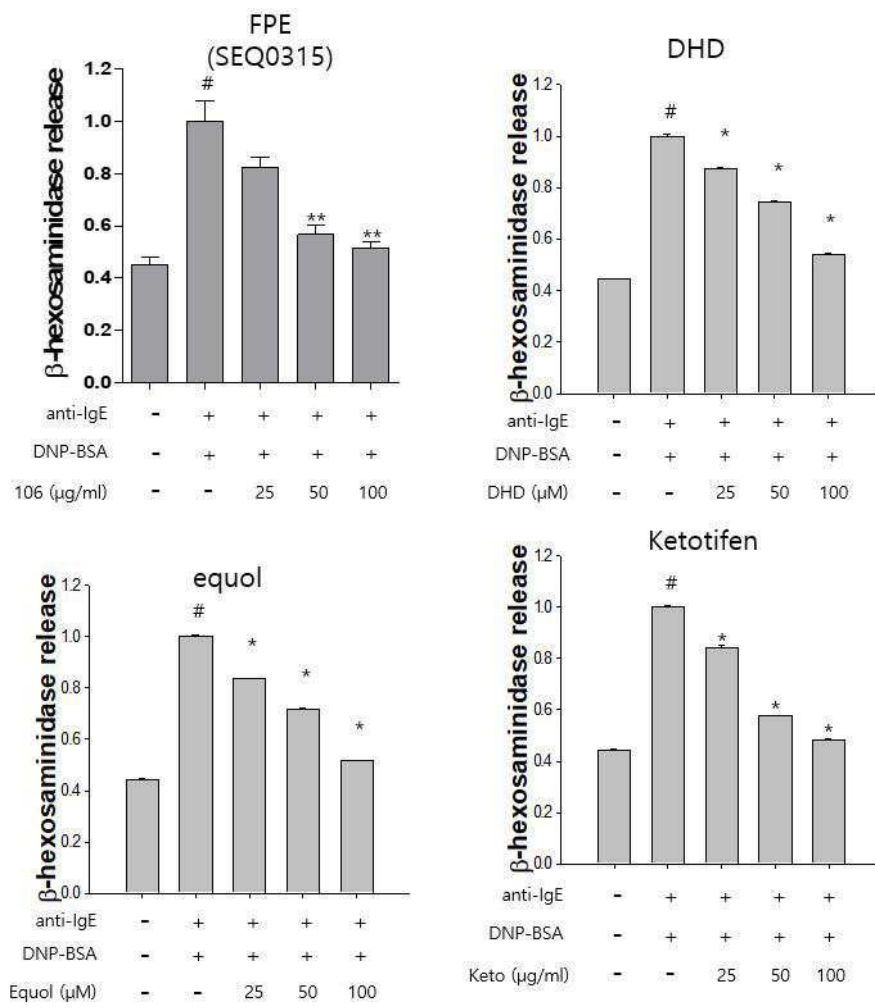
도면2



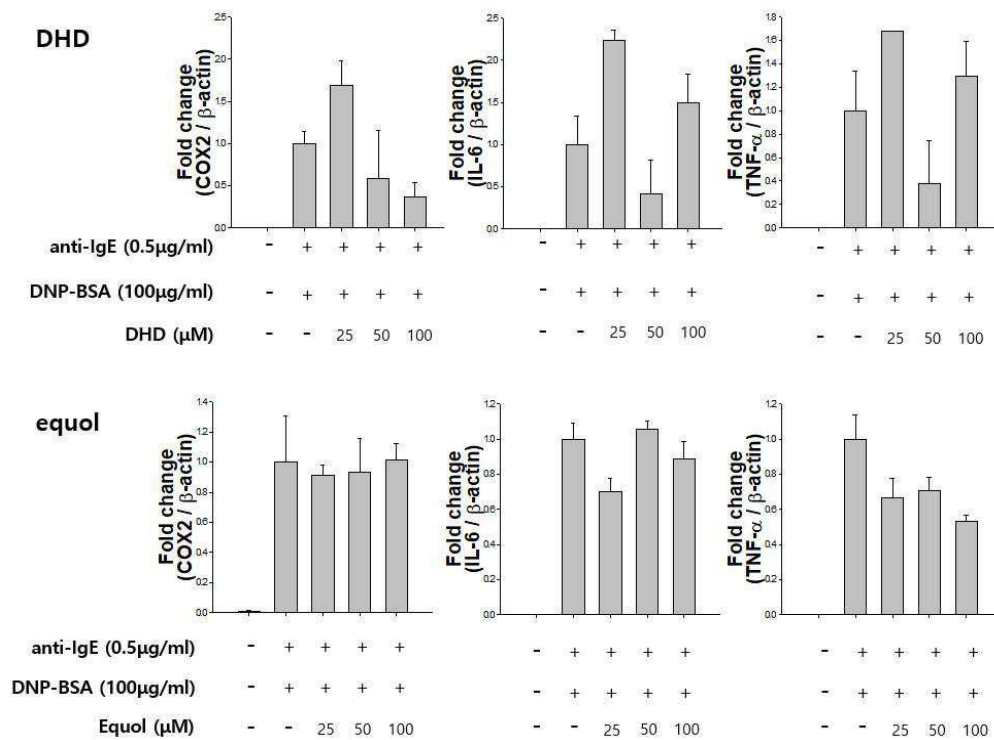
도면3



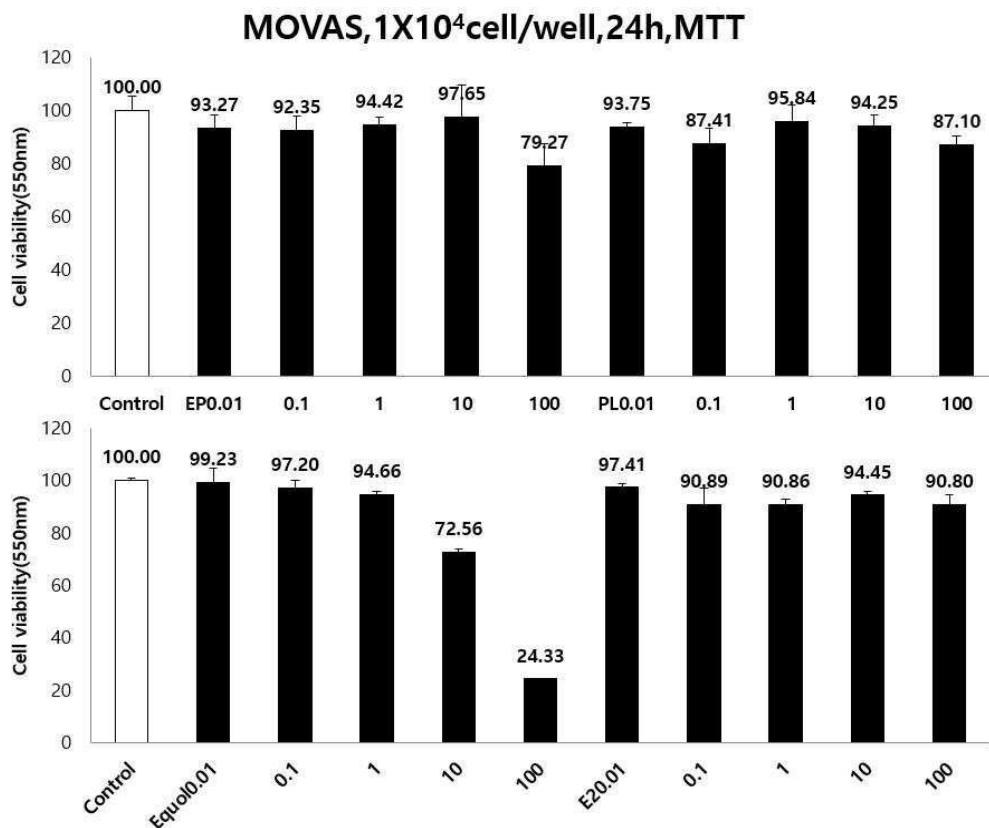
도면4



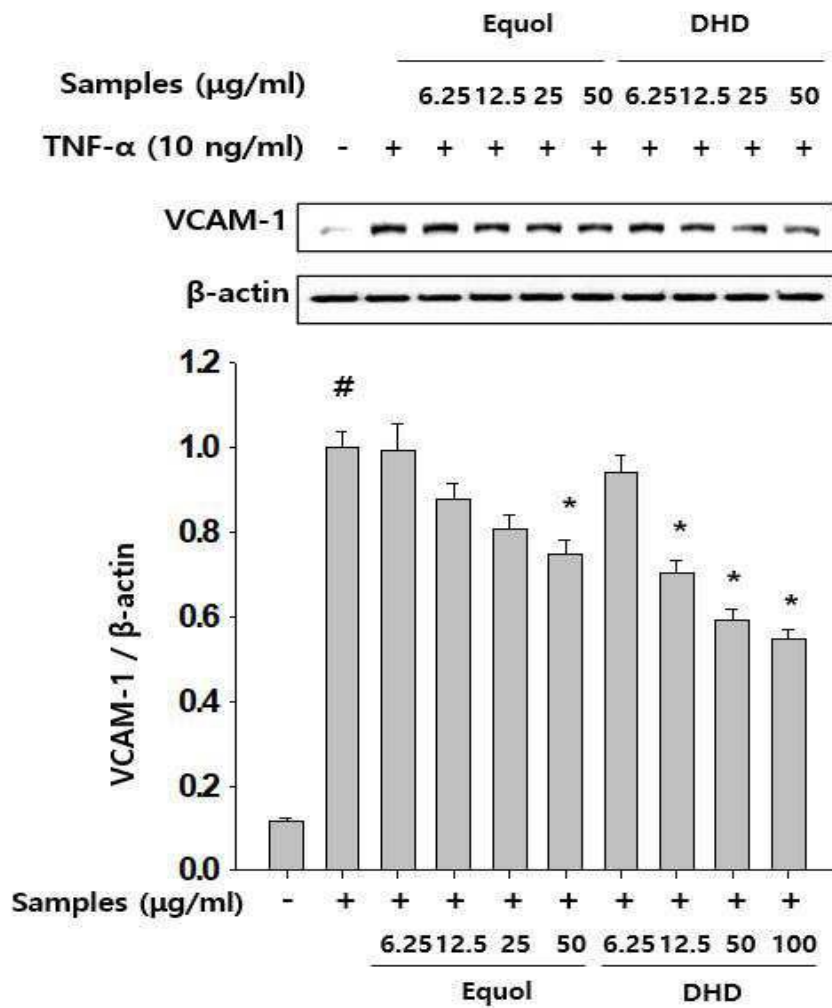
도면5



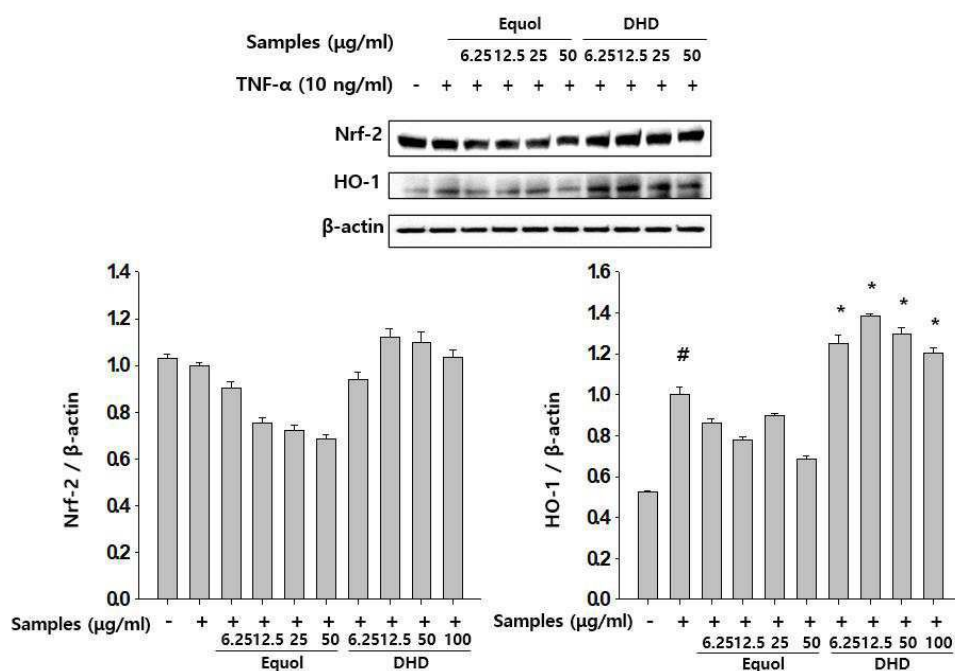
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> New microorganisms for producing dihydrodaidzein, dihydrogenistein or equol, and its use
- <130> PN2004-169
- <160> 3
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1002
- <212> DNA
- <213> Unknown
- <220><223> Lactobacillus sakei SEQvitaP
- <400> 1

gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg 60

acgaaagtct gatggagcaa cgccgcgtga gtgaagaagg ttttcggatc gtaaaactct 120

gttgttggag aagaatgtat ctgatagtaa ctgacaggt agtgacggt tccanccaga 180

aagccacggc taactacgtg ccaccagccg cgtaataacg taggtggcaa gcgttgtccg 240

gatttattgg gcgtaaagcg agcgcaggcg gtttcttnag tcagatgtga aagccttcgg 300

ctcaaccgaa gaagtgcac ggaaactgga gttgcagcct acaatccgaa ctnagaatgg 360

ttttaagaga ttagctaacc ctgcgggtct cgcaactcgt tgtaccatcc attgtagcac 420

gtgtgtagcc cangtcatan ggggnatgat gatttgacgt cgtccccacc ttcctccggt 480

ttgtcaccgg cagtctcact anagtccca mcttaatgct ggcaactagt aataagggtt 540

gcgctcgttg cgggacttaa cccaacatct cagcacacga gctgacgaca accatgcacc 600

acctgtcact ttgtccccga agggaaagct ctatctctag agtgggtcaaa ggatgtcaag 660

acctggttaag gttcttcgcg ttgcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg 720

ccccgtcaa ttcttttag tttcaacctt gcggtcgtac tccccaggcg gagtgcctaa 780

tgcgttagct gcggcactga agggcggaac cctccaaca cctagcactc atcgtttacg 840

gcatggacta ccagggtatc taatcctgtt tgetacccat gctttcgagc ctcagcgtea 900

gttacasacc agacagccrc cttcgccact ggtgttcttc catatatcta cgcatttcac 960

cgctacacat ggagttccac tgtccacttc tgcaactcaag tt 1002

<210> 2

<211> 1117

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Lactobacillus paracasei JS1

<400> 2

tgggggataa catttggaac cagatgctaa taccgcatag atccaagaac cgcattggatt	60
cttggctgaa agatggcgta agctatagct tttggatgga cccgcggcgt attagctagt	120
tggtaggta atggctcacc aaggcgatga tacgtagccg aactgagagg ttgatcggcc	180
acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttcac	240

aatggacgca agtctgatgg agcaacgccg cgtgagtga gaaggctttc gggtcgtaaa	300
actctgttgt tggagaagaa tggtcggcag agtaactgtt gtcggcgtga cggatccaa	360
ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt	420
atccggattt attgggcgta aagcgagcgc aggcgggtttt ttaagtctga tgtgaaagcc	480
ctcggcttaa ccgaggaagc gcatcggaaa ctgggaaact tgagtcaga agaggacagt	540
ggaactccat gtgtagcgtt gaaatgcgta gatatatgga agaacaccag tggcgaaggc	600
ggctgtctgg tctgtaactg acgctgaggc tcgaaagcat gggtagcgaa caggattaga	660

taccctggta gtccatgccg taaacgatga atgctaggtg ttggagggtt tccgcccttc	720
agtgcgcgag ctaacgcatt aagcattccg cctggggagt acgaccgcaa ggttgaaact	780
caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg	840
cgaagaacct taccaggtct tgacatcttt tgatcacctg agagatcagg ttcccccttc	900
gggggcaaaa tgacaggttg tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt	960
aagtcccga acgagcgcaa cccattatgac tagttgccag catttagttg ggcactctag	1020
taagactgcc ggtgataaac cggaggaagg tgggatgac gtcaaatcat catgcccctt	1080

atgacttggg ctacacagt gttacaatgg atggtac	1117
---	------

<210> 3

<211> 1289

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Pediococcus pentosaceus SEQ0315

<400> 3

acttccgtta attgattatg angacttgt actgattgag attttaacac gaagtgagt	60
gcgaacgggt gagtaacacg atgggttaac ctgccagaa gtaggggata acacctggaa	120
acagatgcta ataccgtata acagagaaaa ccgcatggtt tcttttaaa agatggctct	180

gctatcactt ctggatggac ccgcggcgta ttagctagtt ggtgaggtaa aggctcacca	240
aggcagtgat acgtagccga cctgagaggg taatcgcca cattgggact gagacacggc	300
ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcaca atggacgcaa gtctgatgga	360
gcaacgccgc gtgagtgaag aagggtttcg gctcgtaaag ctctgttgtt aaagaagaac	420
gtgggtaaga gtaactgttt accccagtga cggtatTTaa ccagaaagcc acggctaact	480
acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt atccgattt attgggcgta	540
aagcgagcgc aggcgggtctt ttaagtctaa tgtgaaagcc ttcggctcaa ccgaagaagt	600
gcattggaaa ctgggagact tgagtcaga agaggacagt ggaactccat gtgtagcgg	660
gaaatgcgta gatataTgga agaacaccag tggcgaaggc ggctgtctgg tctgcaactg	720
acgtgaggc tcgaaagcat gggtagcgaa caggattaga taccctggta gtccatgccg	780
taaacgatga ttactaagtg ttggagggtt tccgcccttc agtgtgcag ctaacgcatt	840
aagtaatccg ctggggaggt acgaccgcaa ggttgaaact caaaagaatt gacggggggcc	900
cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagctacg cgaagaacct taccaggtct	960
tgacatcttc tgacagtcta agagattaga ggttcccttc ggggacagaa tgacaggtgg	1020
tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga acgagcgcaa	1080
cccttattac tagttgccag cattaagttg ggcaactctag tgagactgcc ggtgacaaac	1140
cggaggaagg tggggacgac gtcaaatcat catgccctt atgacctggg ctacacacgt	1200
gttacaatgg atggtacaac gagtcgcgag accgcgaggt taagctaatc tcttaaaacc	1260
attctcagtt cggactgtag gctgcaact	1289