(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월24일
(11) 등록번호 10-2146706
(24) 등록일자 2020년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A23L 2/38* (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 2/382 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0126533
(22) 출원일자 2018년10월23일
심사청구일자 2018년10월23일
(65) 공개번호 10-2020-0046201
(43) 공개일자 2020년05월07일
(56) 선행기술조사문헌
KR101822024 B1*
KR1020110115426 A*
KR1020140129579 A*
KR1020120125113 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사한국야쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
정운희
경기도 용인시 기흥구 공세로 226 청구아파트 103동 903호
라제현
경기도 수원시 권선구 서둔동 37-65 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
경일호

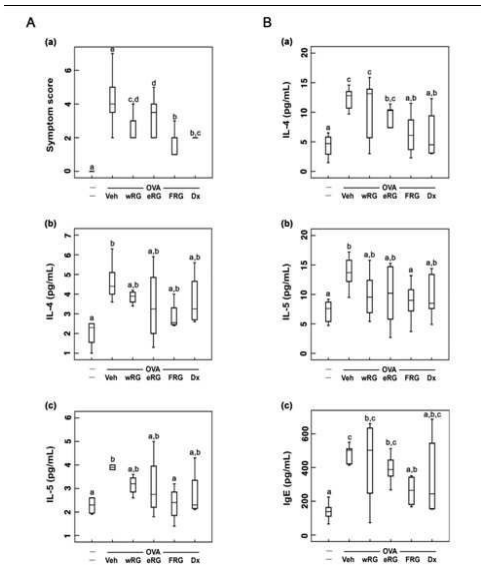
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 김영림

(54) 발명의 명칭 **비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스 HY8502의 유산균 조합을 이용한 진세노사이드 Rd가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 비염을 개선하기 위한 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 이용한 진세노사이드 Rd가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 비염을 개선하기 위한 조성물에 관한 것으로서, IL-4(Interlukin-4), IL-5(Interlukin-5) 및 IgE(Immunoglobulin E)의 발현 억제 및 장내미생물군(gut microbiota)의 조성을 조절함으로써 알레르기성 비염을 개선하는 효능을 갖는 건강기능식품 또는 식품소재로서 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/304 (2013.01)
A23V 2250/2124 (2013.01)
A23Y 2300/19 (2013.01)
A23Y 2300/21 (2013.01)
A23Y 2300/49 (2013.01)

(72) 발명자
김용태
경기도 성남시 중원구 원터로75번길 22 102호 (성남동)
최일동
경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 14 대우현대아파트 112동 704호
장성식
경기도 의정부시 부용로 49, 102동 806호
이정열
경기도 양평군 서종면 퉁점길 63 (서후리)
심재헌
경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 213동 901호 (공세동,탑실마을대주피오레2단지아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

홍삼 주정추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC13279BP)와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502(수탁번호: KCTC13475BP)의 유산균 조합으로 발효시켜 진세노사이드(ginsenoside) Rd가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 비염을 개선하기 위한 식품조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 발효홍삼 농축액은 IL-4(Interlukin-4), IL-5(Interlukin-5) 및 IgE(Immunoglobulin E)의 발현을 억제함으로써 알레르기성 비염을 개선하는 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 식품조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 발효홍삼 농축액은 장내미생물군(gut microbiota)의 조성을 조절함으로써 알레르기성 비염을 개선하는 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 식품조성물.

청구항 4

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 이용한 진세노사이드 Rd가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 비염을 개선하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 이용한 진세노사이드 Rd가 강화된 발효홍삼 농축액의 IL-4(Interlukin-4), IL-5(Interlukin-5) 및 IgE(Immunoglobulin E)의 발현 억제 및 장내미생물군(gut microbiota)의 조성을 조절함으로써 알레르기성 비염을 개선하는 효능을 갖는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적 알레르기 질환 중 하나인 알레르기성 비염(Allergic rhinitis; AR)은 전 세계 인구의 30%가 앓고 있는 질환이다. 알레르기성 비염은 알레르겐(allergen)과 특정 IgE의 상호 작용에 의해 비강 막에서 유발되는 질환으로서 치명적이지는 않지만 재채기, 코 막힘, 가려움증과 같은 과민증상을 동반하여 삶의 질을 저하시킨다. 이러한 증상은 주로 비만 세포(Mast cell, MC), 호염구, 호산구, 림프구 등 선천적 및 후천적 면역반응에 관여하는 세포에 의해 유발된다. 선천적 면역세포인 비만 세포, 호산구, 대식세포 및 수지상세포(dendritic cell; DC)는 IgE와 알레르기 항원의 자극으로 활성화되어 TNF-α, IL-4, IL-5, IL-10 및 히스타민을 분비하게 되고, 이로 인해 후천적 면역세포인 T세포가 활성화되어 미경험(naive) $CD4^+$ T세포가 T helper type 1(Th1), T helper type

2(Th2), T helper type 17(Th17) 및 regulatory T(Treg) 세포와 같은 효과(effector) T세포로 분화된다. 비만세포는 히스타민과 TNF-α, IL-4, IL-5와 같은 사이토카인을 분비하여 급성 및 만성 알레르기 반응을 유발한다. 알레르기성 비염 증상을 완화하기 위해 H_1 수용체 길항제, 코르티코 스테로이드(corticosteroid), 항 류코트리엔(anti-leukotriene) 등이 자주 사용되지만, 이러한 치료법은 부작용을 일으킬 수 있다.

[0003] 홍삼(Panax ginseng Meyer, Araliaceae)은 암, 알레르기 및 염증성 질환, 당뇨병 등 다양한 질병의 치료를 위해 기능성 식품 및 약초로 자주 사용된다. 주요 성분은 진세노사이드(ginsenoside)로 항암, 항염, 항 알레르기 및 항 당뇨와 같은 많은 생물학적 효과를 나타낸다. 진세노사이드 Rb1과 진세노사이드 Rb2를 포함하는 이러한 진세노사이드들은 compound 48/80에 의해 유도된 긁는 행동 및 염증반응을 생체 외(in vitro)와 생체 내(in vivo)에서 억제했다. 그러나, 이러한 진세노사이드들은장내 미생물군(gut microbiota) 또는 발효에 의해 진세노사이드 Rd, 진세노사이드 F2 및 화합물 K(compound K)로 전환되는데, 진세노사이드 Rd 및 화합물 K와 같은 경우는 전환되기 이전의 진세노사이드 보다 강력한 생물학적 활성을 나타냈다. 따라서, 홍삼의 생물학적 효과를 높이기 위해 열처리 또는 발효에 의해 변형된 많은 종류의 홍삼이 개발되었다. 예를 들어, 비피도박테리움 용해물(Bifidobacterial lysate)에 의해 발효된 화합물 K가 풍부한 홍삼은 비염 환자의 코막힘 증상을 완화시켰다. 그러나, 일반홍삼과 발효홍삼의 항 비염 효과의 차이 및 기전은 아직 밝혀지지 않았다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 오브알부민(ovalbumin; OVA)으로 비염을 유도한 마우스 모델을 이용하여 홍삼을 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합으로 발효시킨 발효홍삼 농축액이 IL-4, IL-5 및 IgE의 발현 억제 및 장내미생물군(gut microbiota)의 조성을 조절함으로써 항비염 효능을 갖는 것을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2011-0017314호(2011.02.21.)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2006-0000488호(2006.01.06.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 이용한 진세노사이드 Rd가 강화된 발효홍삼 농축액의 IL-4(Interlukin-4), IL-5(Interlukin-5) 및 IgE(Immunoglobulin E)의 발현 억제 및 장내미생물군(gut microbiota)의 조성을 조절함으로써 알레르기성 비염을 개선하는 효능을 갖는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 홍삼을 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합으로 발효시킨 발효홍삼 농축액이 IL-4(Interlukin-4), IL-5(Interlukin-5) 및 IgE(Immunoglobulin E)의 발현 억제 및 장내미생물군(gut microbiota)의 조성을 조절함으로써 알레르기성 비염을 개선하는 효능을 갖는 조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0008] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0009] 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)의 제조방법은 다음과 같다.

[0010] <u>원료삼의 계량</u>

[0011] 홍삼은 4년근 또는 6년근의 본삼 또는 미삼을 사용한다. 바람직하기로는 6년근 홍미삼을 사용하는 것이 바람직

하다.

[0012] 1차 추출(주정추출)

[0013] 상기 6년근 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻는다.

[0014] 홍삼 추출 시에 홍삼 무게의 10~20배의 주정을 사용한다고 알려져 있어 진세노사이드 추출수율을 최대로 하기 위해서 홍삼 무게의 20배의 주정을 사용한다.

[0015] 또한, 진세노사이드 추출수율을 최대로 하기 위하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하는 것이 바람직하다.

[0016] 2차 추출(주정추출)

[0017] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 다시 첨가하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻는다.

[0018] 3차 추출(주정추출)

[0019] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 다시 첨가하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻는다.

[0020] 상기 1차 주정 추출 단계에서 대부분(약 80~90%)의 진세노사이드 성분이 추출되지만, 나머지 잔량까지 추출하기 위해 2차 및 3차 주정추출을 하는 것이 바람직하다.

[0021] 냉각 및 여과

[0022] 상기 각각의 1차, 2차 및 3차 홍삼 주정추출물 40~50℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과한다.

[0023] 상기와 같이 퍼라이트 여과를 하는 이유는 일반적으로 미세한 현탁물이나 콜로이달 입자를 제거하기 위함으로 진세노사이드 성분은 여과에 의해서 함량의 변화가 없기 때문이다.

[0024] 한편, 상기 각각의 추출물을 40~50℃로 냉각하는 이유는 추출온도인 75~95℃에서는 추출물의 용해도 등의 원인으로 여과 효과가 반감되기 때문이다.

[0025] 감압농축

[0026] 상기 각각의 여과액을 25~30브릭스(Brix)로 감압농축한다.

[0027] 상기와 같이, 감압농축을 하는 이유는 홍삼 주정추출물의 주정을 제거하고, 각 추출물의 보관 및 변질 우려를 낮추기 위함이다.

[0028] 혼합 및 희석

[0029] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되게 희석한다.

[0030] 유산균 발효

[0031] 풍미 개선 및 화합물 K로의 최적 전환을 위하여 상기 희석액 100중량부에 대하여 유산균조합농도 0.1~1.0중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 서브시페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주(수탁번호: KCTC13279BP)와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주(수탁번호:KCTC13475BP)의 유산균 조합을 접종하여 35~39℃에서 6~24시간 동안 발효시킨다.

[0032] 특히, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주를 혼합하는 중량비율은 1 : 0.25~4인 것이 바람직하다.

[0033] 실활

[0034] 상기 유산균 발효액을 85~95℃에서 9~12분 동안 가열하여 상기 유산균 2종을 불활성화시킨다.

[0035] 상기와 같이, 유산균을 불활성화시키는 이유는 최종적으로 원하는 화합물 K가 프로토파낙사디올(protopanaxadiol; PPD)로 전환되는 것을 막기 위함이다.

[0036] 감압농축

[0037] 상기 유산균 2종이 불활성화된 발효액을 70~80브릭스(Brix)가 되게 감압농축한다.

[0038] 상기와 같이, 높은 브릭스로 감압농축하는 이유는 미생물 등에 의한 오염을 예방하기 위함이다.

[0039] 살균 및 포장

[0040] 상기 농축액을 85~95℃에서 0.5~1.5시간 동안 살균한 후 포장하여 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 제조한다. 특히, 완벽한 살균을 위하여 상기 온도 및 시간 동안 살균하는 것이 바람직하다.

[0041] 한편, 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료는 본 발명의 발효홍삼 농축액과 혼합과즙시럽 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조한다.

[0042] 또한, 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 포함하는 것 이외에 영양보조성분으로서 비타민 B_1, B_2, 판토텐산, B_6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출된 홍삼 주정추출물의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합으로 발효시킨 발효홍삼 농축액은 IL-4(Interlukin-4), IL-5(Interlukin-5) 및 IgE(Immunoglobulin E)의 발현 억제 및 장내미생물군(gut microbiota)의 조성을 조절함으로써 알레르기성 비염을 개선하는 효능을 갖는 건강기능식품 또는 식품소재로서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 PMA를 처리한 RBL-2H3 세포에서 발효홍삼 농축액의 IL-4 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 2는 오브알부민으로 알레르기 비염을 유발한 마우스의 코와 혈액에서의 발효홍삼 농축액의 항 비염 효능를 나타낸 그래프이다.

도 3은 오브알부민으로 알레르기 비염을 유발한 마우스의 폐세척액에서의 발효홍삼 농축액의 항 비염 효능를 나타낸 그래프이다.

도 4는 오브알부민으로 알레르기 비염을 유발한 마우스의 대장에서의 발효홍삼 농축액의 항 비염 효능를 나타낸 그래프이다.

도 5는 오브알부민으로 알레르기 비염을 유발한 마우스의 코와 혈액에서의 진세노사이드 Rd의 항 비염 효능를 나타낸 그래프이다.

도 6은 오브알부민으로 알레르기 비염을 유발한 마우스의 폐세척액에서의 진세노사이드 Rd의 항 비염 효능를 나타낸 그래프이다.

도 7은 오브알부민으로 알레르기 비염을 유발한 마우스의 대장에서의 진세노사이드 Rd의 항 비염 효능를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.

[0046] <실시예 1>

[0047] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주의 분리 및 동정

[0048] 홍삼의 발효능을 가진 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 건강한 사람의 분변을 취하여 이를 pH 2.3의 완충용액을 이용하여 혐기적으로 희석하여 내산성이

높은 균주의 생존과 선발에 활용하였다. 이렇게 희석된 분변 용액을 비피도박테리움을 분리하는 배지인 BL 한천평판배지에 도말하고 37℃에서 2~3일간 혐기적으로 배양한 후 균주 집락을 분리하였다. 다시 BL 한천평판배지를 이용하여 단일 균주 집락을 분리하는 과정을 거친 후, 인체 내에서 생존하여 유익한 활성을 나타내기 위하여 필요한 내산성 및 내담즙성의 특징을 가진 비피도박테리움 균주를 선발하였다.

[0049] 이하, 선발된 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주의 미생물학적 특성은 다음과 같다.

[0050] (1)균의 형태

[0051] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 균의 형태

[0052] 1) 세포의 형상 : 곤봉형, Y자형 등 다양

[0053] 2) 그람염색 : 양성

[0054] (2)집락의 형태

[0055] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 집락의 형태

[0056] 1) 형상 : 원형

[0057] 2) 크기 : 1~3mm

[0058] 3) 색조 : 유백색

[0059] (3)생리학적 성질

[0060] 1) 생육온도

[0061] 생육범위 : 25~45℃

[0062] 최적온도 : 37~41℃

[0063] 2) 생육 pH

[0064] 생육범위 : pH 2.0~8.0

[0065] 최적 pH : pH 6.5~7.0

[0066] 3) 산소의 영향 : 편성 혐기성

[0067] 4) 보게스 - 프로스카우어(Voges - Proskauer) 반응 : -

[0068] 5) 카탈라아제 : -

[0069] 6) 암모니아 생성 : -

[0070] 7) 유응고성 : -

[0071] 8) 리트머스 밀크 환원 : -

[0072] 9) 유래아 분해효소 : -

[0073] 10) 베타-갈락토오스 분해효소 : +

[0074] 11) 알파-글루코오스 분해효소 : +

[0075] 12) 당이용성

표 1

[0076]

당류	이용성	당류	이용성
D-xylose	-	Esculin	+
L-arabinose	-	Salicin	+
D-ribose	+	D-cellobiose	+
Adonitol	-	D-maltose	+
D-galactose	+	D-lactose	+

D-glucose	+	D-melibiose	+
D-fructose	+	D-saccharose	+
D-manose	+	D-trehalose	-
D-mannitol	-	Inulin	-
D-sorbitol	-	D-melezitose	-
αmethyl-D-mannoside	+	D-raffinose	+
αmethyl-D-glucoside	+	Starch	-
N-acetylglucoside	+	β-gentiobiose	+
Amygdalin	+	D-turanose	+
Arbutin	+	D-tagatose	-

[0077] (4)내산성

[0078] 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 10㎖ BL 액체배지에 접종하여 37℃에서 18시간 배양한 후, 이 배양액의 일정량을 다시 pH 2.3의 완충용액에 접종하여 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 상기 배양액의 일정량을 취하여 혐기성 완충용액에 일정비율로 희석하였다. BL 한천평판배지에 상기의 희석액을 일정량 접종한 후 37℃에서 48시간 동안 혐기 배양하여 나타나는 집락수를 계수하였다.

[0079] 그 결과, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 10% 정도의 낮은 사멸율을 보여 산에 대한 강한 내성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

[0080] (5)내담즙산성

[0081] 담즙산이 첨가된 BL 한천평판배지에 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 백금이로 접종하여 37℃에서 48시간 혐기 배양하여 집락의 생육여부를 관찰하였다.

[0082] 그 결과, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 0.15%(w/v)의 담즙산이 첨가된 배지에서도 생육하여 담즙산에 대한 내성도 지니고 있음을 알 수 있었다.

[0083] (6)분리 및 동정

[0084] 상기 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 최신의 분자생물학적 기법을 이용하여 분류 및 동정하고자 16S rDNA 분석을 실시하여 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

[0085] 즉, BL 한천평판배지에서 배양된 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주에서 콜로니를 취하고 이의 DNA를 분리하여 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 프라이머(primer)를 사용하여 PCR 반응[(95℃, 3분) x 1 cycle, (95℃, 30초; 50℃, 30초; 72℃, 90초) x 30 cycles, (72℃, 10분) x 1 cycle]을 수행하였다. 그 결과, 1.5kbp의 증폭산물을 얻은 후 정제하여 시퀀싱(sequencing) 반응을 통해 염기서열을 분석한 결과를 토대로 BLAST 검색결과(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)를 하기의 표 2에 나타내었다.

[0086] 하기의 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 균주의 16S rDNA 유전자는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*)의 16S rDNA 유전자와 99% 일치하는 것으로 확인되었다.

표 2

[0087]

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bifidobacterium animalis subsp. lactis strain CECT 8145 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2732	2732	89%	0.0	99%	KP202873.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis strain BF052, complete genome	2732	10929	89%	0.0	99%	CP009045.1
Bifidobacterium animalis strain A6, complete genome	2732	13661	89%	0.0	99%	CP010433.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis KLDS2.0603, complete genome	2732	13294	89%	0.0	99%	CP007522.1
Bifidobacterium animalis strain RH, complete genome	2732	5464	89%	0.0	99%	CP007755.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis ATCC 27673	2732	10929	89%	0.0	99%	CP003941.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis BI12, complete genome	2732	10929	89%	0.0	99%	CP004053.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis BLC1, complete genome	2732	10929	89%	0.0	99%	CP003039.2

[0088] 이상의 미생물학적 및 분자생물학적 동정 결과를 토대로 본 발명의 균주는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*)로 확인되었으며, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2017년 5월 31일자로 기탁하였다(수탁번호: KCTC13279BP).

[0089] <실시예 2>

[0090] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주의 분리 및 동정

[0091] 인삼을 항상 복용하는 건강한 사람의 분변을 BL 한천배지(일본, Nissui 제약(주))에 이식하여 혐기적으로 72시간 배양하고, 자라나온 콜로니들은 각각의 GAM 액체배지(일본, Nissui 제약(주))에 이식하여 24시간 배양하였다. 그리고, 여기에 하기의 비교예 1의 홍삼농축액을 1%(w/v, 1g/100mL)넣어 24시간 배양하였다. 상기 배양액(10mL)을 배양액의 2배(20mL)의 아세트산에틸(ethylacetate)로 추출하여 TLC [Silica gel 60G F254, Merck; 전개용매, 클로로포름-메탄올-물(65:35:10) 혼합물의 하층]을 수행하고 표준품 진세노사이드 F2 및 화합물 K와 비교하여 진세노사이드 F2와 화합물 K를 많이 만드는 균주를 선발하였다.

[0092] 이하, 선발된 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주의 미생물학적 특성은 다음과 같다.

[0093] (1)균의 형태

[0094] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 균의 형태

[0095] 1) 세포의 형상 : 곤봉형, Y자형 등 다양

[0096] 2) 그람염색 : 양성

[0097] (2)집락의 형태

[0098] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 집락의 형태

[0099] 1) 형상 : 원형

[0100] 2) 크기 : 1~3mm

[0101] 3) 색조 : 유갈색

[0102] (3)생리학적 성질

[0103] 1) 생육온도

[0104] 생육범위 : 25~42℃

[0105] 최적온도 : 37℃

[0106] 2) 생육 pH

[0107] 생육범위 : pH 2.0~8.0

[0108] 최적 pH : pH 6.5~7.0

[0109] 3) 산소의 영향 : 편성 혐기성

[0110] 4) 카탈라아제 : -

[0111] 5) 암모니아 생성 : -

[0112] 6) 당이용성

표 3

[0113]

당류	이용성	당류	이용성
L-tryptophan	-	gelatin	-
Urea	-	Esculin	-
D-Glucose	+	glycerol	-
D-mannitol	-	D-cellobiose	-
D-lactose	+	D-mannose	-
D-saccharose	-	D-melesitose	-
D-maltose	+	D-raffinose	+
Salicin	±	D-sorbitol	-
D-xylose	±	D-rhamnose	-
L-arabinose	±	D-trehalose	-

[0114] (4)분리 및 동정

[0115] 상기 본 발명의 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주를 최신의 분자생물학적 기법을 이용하여 분류 및 동정하고자 16S rDNA 분석을 실시하여 결과를 하기의 표 4에 나타내었다.

[0116] 즉, BL 한천평판배지에서 배양된 본 발명의 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주에서 콜로니를 취하고 이의 DNA를 분리하여 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 프라이머(primer)를 사용하여 PCR 반응[(95℃, 3분) x 1 cycle, (95℃, 30초; 50℃, 30초; 72℃, 90초) x 30 cycles, (72℃, 10분) x 1 cycle]을 수행하였다. 그 결과, 1.5kbp의 증폭산물을 얻은 후 정제하여 시퀀싱(sequencing) 반응을 통해 염기서열을 분석한 결과를 토대로 BLAST 검색결과(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), 하기의 표 4에 나타내었다.

[0117] 하기의 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 균주의 16S rDNA 유전자는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*)의 16S rDNA 유전자와 99% 일치하는 것으로 확인되었다.

표 4

[0118]

Accession	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
GQ898761.1	Uncultured bacteriumclone S4-97 16S ribosomal RNAgene, partial sequence	2638	2638	100%	0	99%
CP007443.1	Bifidobacterium adolescentis strain 22L, complete genome	2632	10530	100%	0	99%
GQ898816.1	Uncultured bacterium clone S4-173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	100%	0	99%
GQ898692.1	Uncultured bacterium clone S4-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	100%	0	99%
AP009256.1	Bifidobacterium adolescentis ATCC15703 DNA, complete genome	2615	12917	100%	0	99%
GQ898631.1	UnculturedbacteriumcloneS3-182 16S ribosomal RNAgene, partial sequence	2610	2610	100%	0	99%

[0119] 이상의 미생물학적 및 분자생물학적 동정 결과를 토대로 본 발명의 균주는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*)로 확인되었으며, 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium*

adolescentis) HY8502로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2018년 2월 1일자로 기탁하였다(수탁번호: KCTC13475BP).

[0120] <실시예 3>

[0121] 발효홍삼 농축액(FRG)의 제조

[0122] (1)원료삼 계량

[0123] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.

[0124] (2)1차 추출

[0125] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0126] (3)2차 추출

[0127] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0128] (4)3차 추출

[0129] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0130] (5)냉각 및 여과

[0131] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.

[0132] (6)농축

[0133] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.

[0134] (7)혼합 및 희석

[0135] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되도록 희석하였다.

[0136] (8)유산균 발효

[0137] 상기 희석액 100중량부에 대하여 유산균조합농도 1.0중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주(수탁번호: KCTC13279BP)와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주(수탁번호: KCTC13475BP)의 유산균 조합을 접종하여 37℃에서 24시간 동안 발효시켰다.

[0138] (9)실활

[0139] 상기 유산균 발효액을 90℃에서 10분 동안 가열하여 상기 유산균 2종을 불활성화시켰다.

[0140] (10)농축

[0141] 상기 유산균이 불활성화된 발효액을 75브릭스(Brix)가 되게 감압농축하였다.

[0142] (11)살균 및 포장

[0143] 상기 농축액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 제조하였다.

[0144] <실시예 4>

[0145] 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조

[0146] 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)과 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[0147] 먼저, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix° 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30℃에서 교반하여 혼합한 후

UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.

[0148] 그리고 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.

[0149] <실시예 5>

[0150] 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조

[0151] 본 발명의 상기 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B_1, B_2, 판토텐산, B_6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물 100중량부에 대하여 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 45℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 13 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.

[0152] <비교예 1>

[0153] 주정추출 홍삼 농축액(eRG)의 제조

[0154] (1)원료삼 계량

[0155] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.

[0156] (2)1차 추출

[0157] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0158] (3)2차 추출

[0159] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0160] (4)3차 추출

[0161] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0162] (5)냉각 및 여과

[0163] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.

[0164] (6)농축

[0165] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.

[0166] (7)혼합

[0167] 상기 각각의 감압농축액을 혼합하였다.

[0168] (8)살균 및 포장

[0169] 상기 혼합액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 홍삼 농축액(eRG)을 제조하였다.

[0170] <비교예 2>

[0171] 열수추출 홍삼 농축액(wRG)

[0172] 시중에서 판매 중인 대표적인 홍삼농축액(6년근 홍삼을 이용한 홍삼 농축액 120g, 구입시기: 2017년 5월 30일, 유통기간: 2019년 11월 1일)을 구입하여 사용하였다.

[0173] <시험예 1>

[0174] 발효홍삼 농축액(FRG)의 basophilic RBL-2H3 세포에서 IL-4 발현 억제

[0175] 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)', 비교예 1의 '주정추출 홍삼 농축액(eRG)'및 비교예 2의 '열수추출 홍삼 농축액(wRG)'이 PMA로 자극한 RBL-2H3 세포의 IL-4 발현량에 미치는 영향을 측정하였다.

[0176] 즉, IRBL-2H3 세포를 10% fetal bovine serum 및 1% antibiotic-antimycotic solution을 함유한 DMEM 배지에서 5% CO_2 - 95% 공기, 37℃ 배양조건에서 배양하였다. 상기 배양한 세포(3×10^5cells/mL)에 시험시료(실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 주정추출 홍삼 농축액(eRG) 및 비교예 2의 열수추출 홍삼 농축액(wRG)를 각각 10㎍/mL씩 처리, 진세노사이드 Rd는 10μM 처리) 및 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA, 50nM)을 처리하고 18시간 동안 배양하였다. 그런다음, 상기 배양액을 초음파 처리하여 상등액의 IL-4의 발현량을 IL-4 측정용 ELISA KIT(R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.)로 측정하였다.

[0177] 한편, 상기 홍삼 농축액을 처리하지 않고 PMA만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 시험을 한 것을 양성대조군(veh)으로 하고, 상기 홍삼 농축액 및 PMA를 처리하지 않은 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 시험한 것을 정상대조군(non)으로 하였다.

[0178] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0179] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 정상대조군(non)에서는 IL-4 발현이 거의 없었고, PMA만을 처리한 양성대조군(veh)에서는 IL-4 발현이 유의하게 증가하였다.

[0180] 그런데, 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)', 비교예 1의 '주정추출 홍삼 농축액(eRG)', 비교예 2의 '열수추출 홍삼 농축액(wRG)' 및 진세노사이드 Rd를 처리한 실험군에서는 PMA로 유도된 IL-4 발현을 억제하였는데, 그 중에서도 본 발명의 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'이 IL-4 발현을 가장 강력하게 억제하였음을 알 수 있었다.

[0181] <시험예 2>

[0182] <u>발효홍삼 농축액(FRG)의 알레르기 비염을 유발한 마우스의 비강 및 혈액에서의 IL-4, IL-5 및 IgE의 발현량 측정</u>

[0183] 오브알부민(OVA)으로 알레르기 비염(AR)을 유발한 마우스의 비강 및 혈액에서의 IL-4, IL-5 및 IgE의 발현량 측정을 통하여 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)', 비교예 1의 '주정추출 홍삼 농축액(eRG)'및 비교예 2의 '열수추출 홍삼 농축액(wRG)'이 항 비염 효능을 갖는지 측정하였다.

[0184] 2-1. <u>비염증상 측정</u>

[0185] 암컷 BALB/c 마우스(6주령, 19~21g)를 DBL(음성, 충청북도, 대한민국)에서 구입하여 우리에서 생육하였다(온도: 20~22℃, 습도: 50±10%, 빛: 07시~19시). 먹이는 실험실 평균 식이를 사용하였고, 물을 자유롭게 먹게하였다.

[0186] 상기 마우스를 군당 8마리로 구성된 6개의 군으로 나눈 후, 3개의 군의 마우스들에게 오브알부민(20μg, dissolved in 2mg/200μL of aluminum potassium sulfate solution)을 1일째와 14일째에 복강으로 투여하고, 26일째부터 28일째까지 오브알부민[10μLofnostril (10mg/mL) dissolved in saline]을 비강으로 투여하여 비염을 유발하였다.

[0187] 그런 다음, 상기 3개의 군 각각에 26일째부터 30일째까지 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)', 비교예 1의 '주정추출 홍삼 농축액(eRG)'및 비교예 2의 '열수추출 홍삼 농축액(wRG)' 각각을 50mg/kg씩 하루에 한 번 경구투여하였다.

[0188] 그런 다음, 31일째에 비강으로 오브알부민[10μL of nostril(10mg/mL) dissolved in physiological saline]을 투여하여 10분간 재채기, 코 긁음 등 비염증상을 관찰하였다.

[0189] 한편, 상기 홍삼 농축액 대신에 식염수만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 시험한 것을 양성대조군(veh)으로 하였고, 상기 홍삼 농축액 대신에 덱사메타손(dexamethasone) 만을 1mg/kg 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 시험한 것을 음성대조군(Dx)으로 하였다.

[0190] 또한, 마우스에 알레르기성 비염을 유발하지 않고, 평균 식이만을 한 것을 정상대조군(Nor)로 하였다.

[0191] 2-2. <u>비강세포에서의 IL-4 및 IL-5의 발현량 측정</u>

[0192] 상기 2-1의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 비강 점막을 RIPA buffer를 이용하여 호모게나이즈/라이시스(homogenize/lysis)한 다음, 상등액을 취하여 ELISA kit를 이용하여 IL-4 및 IL-5의 발현량을 측정하였다.

[0193] 2-3. 혈액 내에서의 IL-4, IL-5 및 IgE의 발현량 측정

[0194] 상기 2-1의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 혈액은 헤파린 튜브에 안와 채혈하고, 15,000g에서 15분간 원심분리하여 혈청을 확보한 다음, ELISA kit를 이용하여 IL-4, IL-5 및 IgE의 발현량을 측정하였다.

[0195] 상기 실험의 모든 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 표현하였다. 통계적 유의성은 one-way ANOVA와 Duncan의 multiple range test (P <0.05)를 사용하여 분석하였다.

[0196] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0197] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 오브알부민으로 알레르기 비염이 유도된 양성대조군(veh)에서는 재채기와 코 긁기, 비강 점막의 IL-4와 IL-5 발현량의 증가 등 알레르기 증상을 보였다. 그러나, 홍삼 농축액이 처리된 실험군(FRG, eRG, wRG)에서는 재채기와 코 긁기 증상을 유의하게 감소시켰으며 비강 점막의 IL-4와 IL-5 발현량을 감소시켰다. 특히, 본 발명의 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'이 비강세포에서의 비염증상을 강력하게 완화시켰고, 비강세포 및 혈액에서의 IL-4 및 IL-5 발현을 강력하게 억제하였음을 알 수 있었다.

[0198] <시험예 3>

[0199] 발효홍삼 농축액(FRG)의 알레르기 비염을 유발한 마우스의 폐세척액(BALF)에서의 Th_2 세포수, 호산구수 및 비만 세포수와 IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현량에 미치는 영향

[0200] 오브알부민(OVA)으로 알레르기 비염(AR)을 유발한 마우스의 폐세척액(BALF)에서 Th_2 세포수, 호산구수 및 비만 세포수와 IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현량 측정을 통하여 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)', 비교예 1의 '주정추출 홍삼 농축액(eRG)'및 비교예 2의 '열수추출 홍삼 농축액(wRG)'의 항 비염 효능을 측정하였다.

[0201] 3-1. Th_2 세포수, 호산구수 및 비만 세포수

[0202] 상기 2-1의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 폐세척액 2×10^5cells/0.1mL을 수거하여 fixation/permeabilization solution에 5분간 배양한 뒤, 세포 특이적 항체(호산구: PE-conjugated anti-Siglec-F와 APC-conjugated anti-F4/80, 비만세포: PE-conjugated anti-FcεRIα와 APC conjugated anti-CD117, Th_2 세포: PE-conjugated anti-IL-4와 PerCP-conjugated anti-CD4, 각각 1μg/100μL 처리)를 처리한 다음, 45분간 염색한 후 fixation buffer로 고정하고, FACS lysing solution로 용해한 다음 FACS buffer로 현탁하여 flow cytometer로 측정하였다.

[0203] 3-2. IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현량

[0204] 상기 2-1의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 폐세척액을 수거하여 RIPA buffer를 이용하여 호모게나이즈/라이시스(homogenize/lysis)한 다음, 상등액을 취하여 ELISA kit를 이용하여 IL-4, IL-5 및 TNF-α의 발현량을 측정하였다.

[0205] 상기 실험의 모든 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 표현하였다. 통계적 유의성은 one-way ANOVA와 Duncan의 multiple range test (P <0.05)를 사용하여 분석하였다.

[0206] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0207] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 오브알부민으로 알레르기 비염이 유도된 양성대조군(veh)에서는 비만 세포(Mast cell, MC), 호산구 및 Th_2 세포의 수를 증가시켰다. 그러나, 홍삼 농축액이 처리된 실험군(FRG, eRG, wRG)에서는 이러한 증상을 억제하였다. 특히, 본 발명의 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'은 비만 세포(MC), 호산구 및 Th_2 세포의 수를 가장 강력하게 억제하였고, IL-4, IL-5 및 TNF-α의 발현량을 감소시켰다.

[0208] <시험예 4>

[0209] 발효홍삼 농축액(FRG)의 알레르기 비염을 유발한 마우스의 대장에서의 myeloperoxidase(MPO) 활성, IL-4 및 IL-5 발현과 장내미생물군의 조성에 미치는 영향

[0210] 오브알부민(OVA)으로 알레르기 비염(AR)을 유발한 마우스의 대장에서의 myeloperoxidase(MPO) 활성, IL-4 및 IL-5 발현과 장내미생물군(gut microbiota)의 조성에 미치는 영향을 통하여 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)', 비교예 1의 '주정추출 홍삼 농축액(eRG)'및 비교예 2의 '열수추출 홍삼 농축액(wRG)'이 항 비염 효능을

갖는지 측정하였다.

[0211] 4-1. myeloperoxidase(MPO) 활성, IL-4 및 IL-5 발현

[0212] 상기 2-1의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 대장 조직을 수거하여 RIPA buffer를 이용하여 호모게나이즈/라이시스(homogenize/lysis)한 다음, 상등액을 취하여 ELISA kit를 이용하여 MPO의 활성과 IL-4, IL-5 및 TNF-α의 발현량을 측정하였다.

[0213] 4-2. 장내미생물군의 조성의 변화

[0214] 상기 2-1의 각 군의 마우스의 분변의 Firmicutes, Bacteroidetes, δ/γ-Proteobacteria, Actinobacteria의 total DNA는 SYBER premix를 이용하여 분리하였다. qPCR은 Takara thermal cycler로 진행되었고 95°C에서 30초 반응 후, 95°C에서 5초 denaturation과 63°C에서 30초 amplification하는 과정을 35cycle 진행하였다. 유전자 발현량은 bacterial rRNA와 대조하여 측정하였고 Microsoft Excel을 이용하였다.

[0215] 프라이머(Primer)는 다음과 같다.

[0216] <16s rRNA>

[0217] forward 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3'

[0218] reverse 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT-3'

[0219] <Firmicutes>

[0220] forward 5'-GGA GYA TGT GGT TTA ATT CGA AGC A-3'

[0221] reverse 5'-AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC-3'

[0222] <Bacteroidetes>

[0223] forward 5'-AAC GCG AAA AAC CTT ACC TAC C-3'

[0224] reverse 5'-TGC CCT TTC GTA GCA ACT AGT G-3';

[0225] <Actinobacteria>

[0226] forward 5'-TGT AGC GGT GGA ATG CGC-3'

[0227] reverse 5'-AAT TAA GCC ACA TGC TCC GCT-3';

[0228] <δ/γ-Proteobacteria>

[0229] forward 5'-GCT AAC GCA TTA AGT RYC CCG-3'

[0230] reverse 5'-GCC ATG CRG CAC CTG TCT-3'.

[0231] 상기 실험의 모든 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 표현하였다. 통계적 유의성은 one-way ANOVA와 Duncan의 multiple range test ($P < 0.05$)를 사용하여 분석하였다.

[0232] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0233] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 오브알부민으로 알레르기 비염이 유도된 양성대조군(veh)에서는 장내미생물군(gut microbiota)의 조성은 Firmicutes 집단을 크게 증가 시켰고, Bacteroidetes와 Actinobacteria 집단을 감소시켰다. 그러나, 홍삼 농축액이 처리된 실험군(FRG, eRG, wRG)에서는 Firmicutes 개체수를 억제하고, Bacteroidetes 및 Actinobacteria 집단을 증가시켜 F/B 비율을 감소시켰다.

[0234] 또한, 오브알부민으로 알레르기 비염이 유도된 양성대조군(veh)에서는 대장에서의 MPO 활성증가, IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현 증가가 있었다. 그러나, 홍삼 농축액이 처리된 실험군(FRG, eRG, wRG)에서는 MPO 활성억제, IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현이 억제되었다. 특히, 본 발명의 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'은 가장 강력하게 MPO 활성을 억제하였으며, IL-4, IL-5 및 TNF-α의 발현량을 강력하게 감소시켰다.

[0235] <시험예 5>

[0236] 발효홍삼 농축액(FRG)으로부터 추출된 진세노사이드 Rd의 알레르기 비염을 유발한 마우스의 비강 및 혈액에서의

IL-4, IL-5 및 IgE의 발현량 측정

[0237] 5-1. 발효홍삼 농축액(FRG)의 진세노사이드 함량분석

[0238] 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'을 경구투여한 마우스에서 진세노사이드 Rd가 가장 많이 흡수된 점을 이용하여 진세노사이드 Rd가 항 비염 활성을 나타내는지 알아보기 위하여 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'에서 진세노사이드 Rd를 분리하였다.

[0239] 즉, Discovery C18 컬럼(250 x 4.6mm, 5㎛, Sigma-Aldrich, MO, USA)과 203nm 흡광도를 갖는 자외선 검출기(UV detector)를 갖춘 Agilent 1200 series HPLC system(Agillent, Foster City, CA, USA)를 사용하여 상기 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'의 주입부피(injection volume)는 10.0㎕, 이동상(mobile phase)은 아세토니트릴(용매 A) 및 증류수(용매 B)이고, 이동속도(flow rate)는 1.6mL/min를 적용하였으며, 구배조건(gradient condition)은 용매 A/용매 B가 각각 15/85, 20/80, 39/61, 48/52, 70/30, 90/10, 15/85, 15/85이고, 이동시간(run time)은 각각 0~5분, 5~17분, 17~57분, 57~70분, 70~80분, 80~82분, 82~94분, 94~115분으로 하여 진세노사이드 함량을 분석하였다.

[0240] 그 결과를 하기의 표 5에 나타내었다.

[0241] 하기의 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 진세노사이드 Rd 함량이 11.89mg/g으로서 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'에 가장 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

표 5

[0242]

구 분	Crude saponin (%)	Ginsenoside content(mg/g)											
		Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3	F2	Rh2	CK
실시예 3	17.7	2.34	4.76	1.16	1.27	11.45	1.07	2.21	11.84	0.79	0.23	<0.40	0.42

[0243] 5-2. 비염증상 측정

[0244] 암컷 BALB/c 마우스(6주령, 19~21g)를 Orient Experimental Animal Breeding Center(서울, 대한민국)에서 구입하여 우리에서 생육하였다(온도: 20~22℃, 습도: 50ㅁ10%, 빛: 07시~19시). 먹이는 실험실 평균 식이를 사용하였고, 물을 자유롭게 먹게하였다.

[0245] 상기 마우스를 군당 8마리로 구성된 3개의 군으로 나눈 후, 1개의 군의 마우스들에게 오브알부민(20㎍, dissolved in 2mg/200㎕ of aluminum potassium sulfate solution)을 1일째와 14일째에 복강으로 투여하고, 26일째부터 28일째까지 오브알부민[10㎕Lofnostril (10mg/mL) dissolved in saline]을 비강으로 투여하여 비염을 유발하였다.

[0246] 그런 다음, 상기 1개의 군에 26일째부터 30일째까지 상기 5-1의 '발효홍삼 농축액(wRG)'에서 추출된 진세노사이드 Rd를 20mg/kg씩 하루에 한 번 경구투여 하였다.

[0247] 그런 다음, 31일째에 비강으로 오브알부민[10㎕L of nostril(10mg/mL) dissolved in physiological saline]을 투여하여 10분간 재채기, 코 긁음 등 비염증상을 관찰하였다.

[0248] 한편, 상기 진세노사이드 Rd 대신에 식염수만을 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 시험한 것을 양성대조군(veh)으로 하였고, 상기 진세노사이드 Rd 대신에 덱사메타손(dexamethasone) 만을 1mg/kg 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 시험한 것을 음성대조군(Dx)으로 하였다.

[0249] 또한, 마우스에 알레르기성 비염을 유발하지 않고, 평균 식이만을 한 것을 정상대조군(Nor)로 하였다.

[0250] 5-3. 비강세포에서의 IL-4 및 IL-5의 발현량 측정

[0251] 상기 5-2의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 비강 점막을 RIPA buffer를 이용하여 호모게나이즈/라이시스(homogenize/lysis)한 다음, 상등액을 취하여 ELISA kit를 이용하여 IL-4 및 IL-5의 발현량을 측정하였다.

[0252] 5-4. 혈액 내에서의 IL-4, IL-5 및 IgE의 발현량 측정

[0253] 상기 5-2의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 혈액은 헤파린 튜브에 안와 채혈하고, 15,000g에서 15분간 원심분리

하여 혈청을 확보한 다음, ELISA kit를 이용하여 IL-4, IL-5 및 IgE의 발현량을 측정하였다.

[0254] 상기 실험의 모든 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 표현하였다. 통계적 유의성은 one-way ANOVA와 Duncan의 multiple range test (P <0.05)를 사용하여 분석하였다.

[0255] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0256] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 오브알부민으로 알레르기 비염이 유도된 양성대조군(veh)에서는 재채기와 코 긁기, 비강 점막의 IL-4, IL-5 및 IgE 발현량의 증가 등 알레르기 증상을 보였다. 그러나, 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'에서 추출된 진세노사이드 Rd를 처리한 실험군(Rd)에서는 비강세포에서의 비염증상을 강력하게 완화시켰고, 비강세포 및 혈액에서의 IL-4, IL-5 및 IgE 발현을 강력하게 억제하였음을 알 수 있었다.

[0257] <시험예 6>

[0258] 발효홍삼 농축액(FRG)으로부터 추출된 진세노사이드 Rd의 알레르기 비염을 유발한 마우스의 폐세척액(BALF)에서 Th_2 세포수, 호산구수 및 비만 세포수와 IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현량에 미치는 영향

[0259] 오브알부민(OVA)으로 알레르기 비염(AR)을 유발한 마우스의 폐세척액(BALF)에서 Th_2 세포수, 호산구수 및 비만 세포수와 IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현량 측정을 통하여 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'에서 추출된 진세노사이드 Rd의 항 비염 효능을 측정하였다.

[0260] 6-1. Th_2 세포수, 호산구수 및 비만 세포수

[0261] 상기 5-2의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 폐세척액 2×10^5cells/0.1mL을 수거하여 fixation/permeabilization solution에 5분간 배양한 뒤, 세포 특이적 항체(호산구: PE-conjugated anti-Siglec-F와 APC-conjugated anti-F4/80, 비만세포: PE-conjugated anti-FcεRIα와 APC conjugated anti-CD117, Th_2 세포: PE-conjugated anti-IL-4와 PerCP-conjugated anti-CD4, 각각 1μg/100μL 처리)를 처리한 다음, 45분간 염색한 후 fixation buffer로 고정하고, FACS lysing solution로 용해한 다음 FACS buffer로 현탁하여 flow cytometer로 측정하였다.

[0262] 6-2. IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현량

[0263] 상기 5-2의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 폐세척액을 수거하여 RIPA buffer를 이용하여 호모게나이즈/라이시스(homogenize/lysis)한 다음, 상등액을 취하여 ELISA kit를 이용하여 IL-4, IL-5 및 TNF-α의 발현량을 측정하였다.

[0264] 상기 실험의 모든 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 표현하였다. 통계적 유의성은 one-way ANOVA와 Duncan의 multiple range test (P <0.05)를 사용하여 분석하였다.

[0265] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0266] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 오브알부민으로 알레르기 비염이 유도된 양성대조군(veh)에서는 비만 세포(Mast cell, MC), 호산구 및 Th_2 세포의 수를 증가시켰다. 그러나, 본 발명의 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'에서 추출한 진세노사이드 Rd는 비만 세포(MC), 호산구 및 Th_2 세포의 수를 가장 강력하게 억제하였고, IL-4, IL-5 및 TNF-α의 발현량을 감소시켰다.

[0267] <시험예 7>

[0268] 발효홍삼 농축액(FRG)으로부터 추출된 진세노사이드 Rd의 알레르기 비염을 유발한 마우스의 대장에서의 myeloperoxidase(MPO) 활성, IL-4 및 IL-5 발현과 장내미생물군의 조성에 미치는 영향

[0269] 오브알부민(OVA)으로 알레르기 비염(AR)을 유발한 마우스의 대장에서의 myeloperoxidase(MPO) 활성, IL-4 및 IL-5 발현과 장내미생물군(gut microbiota)의 조성에 미치는 영향을 조사하여 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'에서 추출된 진세노사이드 Rd의 항 비염 효능을 측정하였다.

[0270] 7-1. myeloperoxidase(MPO) 활성, IL-4 및 IL-5 발현

[0271] 상기 5-2의 각 군의 마우스를 희생시킨 후 대장 조직을 수거하여 RIPA buffer를 이용하여 호모게나이즈/라이시스(homogenize/lysis)한 다음, 상등액을 취하여 ELISA kit를 이용하여 MPO의 활성과 IL-4 및 IL-5의 발현량을

측정하였다.

[0272] 7-2. 장내미생물군의 조성의 변화

[0273] 상기 5-2의 각 군의 마우스의 분변의 Firmicutes, Bacteroidetes, δ/γ-Proteobacteria, Actinobacteria의 total DNA는 SYBER premix를 이용하여 분리하였다. qPCR은 Takara thermal cycler로 진행되었고 95°C에서 30초 반응 후, 95°C에서 5초 denaturation과 63°C에서 30초 amplification하는 과정을 35cycle 진행하였다. 유전자 발현량은 bacterial rRNA와 대조하여 측정하였고 Microsoft Excel을 이용하였다.

[0274] 프라이머(Primer)는 다음과 같다.

[0275] <16s rRNA>

[0276] forward 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3'

[0277] reverse 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT-3'

[0278] <Firmicutes>

[0279] forward 5'-GGA GYA TGT GGT TTA ATT CGA AGC A-3'

[0280] reverse 5'-AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC-3'

[0281] <Bacteroidetes>

[0282] forward 5'-AAC GCG AAA AAC CTT ACC TAC C-3'

[0283] reverse 5'-TGC CCT TTC GTA GCA ACT AGT G-3';

[0284] <Actinobacteria>

[0285] forward 5'-TGT AGC GGT GGA ATG CGC-3'

[0286] reverse 5'-AAT TAA GCC ACA TGC TCC GCT-3';

[0287] <δ/γ-Proteobacteria>

[0288] forward 5'-GCT AAC GCA TTA AGT RYC CCG-3'

[0289] reverse 5'-GCC ATG CRG CAC CTG TCT-3'.

[0290] 상기 실험의 모든 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 표현하였다. 통계적 유의성은 one-way ANOVA와 Duncan의 multiple range test ($P < 0.05$)를 사용하여 분석하였다.

[0291] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0292] 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 오브알부민으로 알레르기 비염이 유도된 양성대조군(veh)에서는 장내미생물군(gut microbiota)의 조성은 Firmicutes 집단을 크게 증가시켰고, Bacteroidetes와 Actinobacteria 집단을 감소시켰다. 그러나, 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'에서 추출된 진세노사이드 Rd가 처리된 실험군(Rd)에서는 Firmicutes 문의 균수를 억제하고, Bacteroidetes 및 Actinobacteria 문의 균수를 증가시켜 F/B 비율을 감소시켰다.

[0293] 또한, 오브알부민으로 알레르기 비염이 유도된 양성대조군(veh)에서는 대장에서의 MPO 활성증가, IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현 증가가 있었다. 그러나, 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)'에서 추출된 진세노사이드 Rd가 처리된 실험군(Rd)에서는 MPO 활성억제, IL-4, IL-5 및 TNF-α 발현이 억제되었다.

[0294] 이상의 시험결과를 종합하여 볼 때, 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)' 및 그로부터 추출된 '진세노사이드 Rd'가 IL-4, IL-5 및 IgE의 발현을 억제하고, 장내미생물군(gut microbiota)의 조성을 조절함으로써 알레르기성 비염 증상을 개선시킴을 알 수 있었다.

수탁번호

[0295]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13279BP

수탁일자 : 20170531

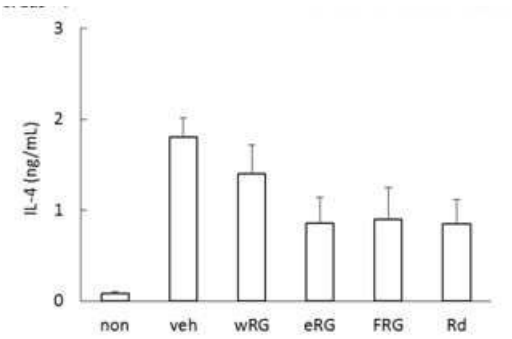
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13475BP

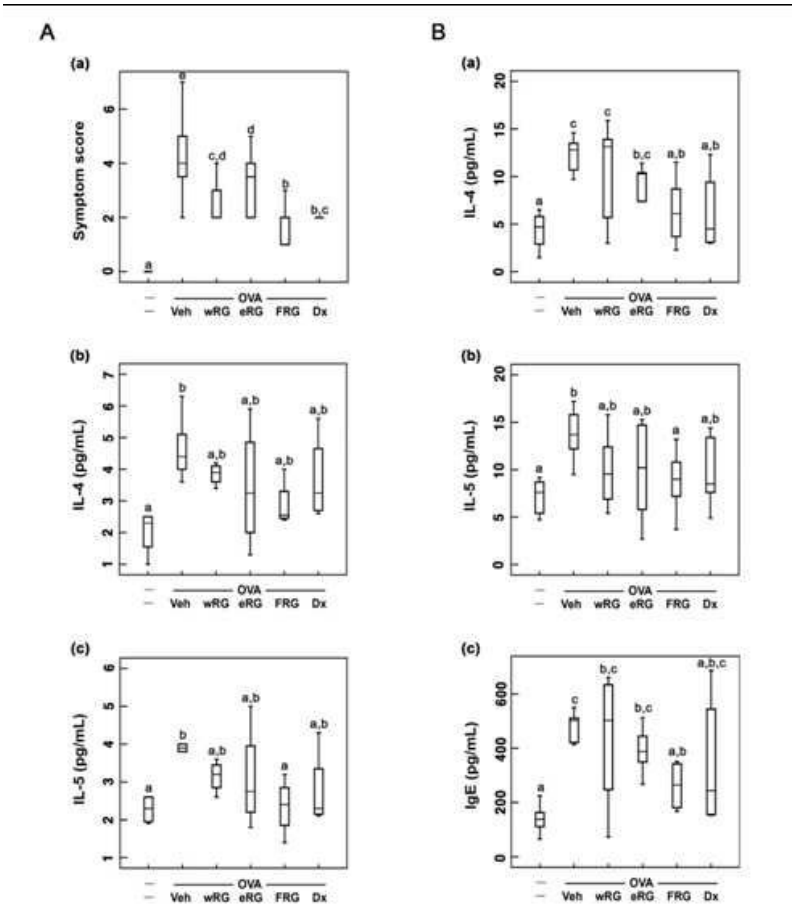
수탁일자 : 20180201

도면

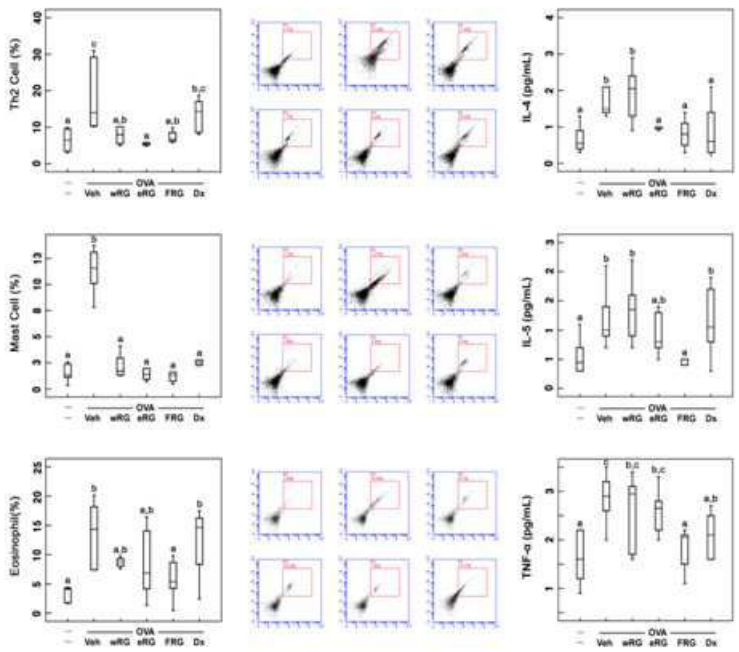
도면1



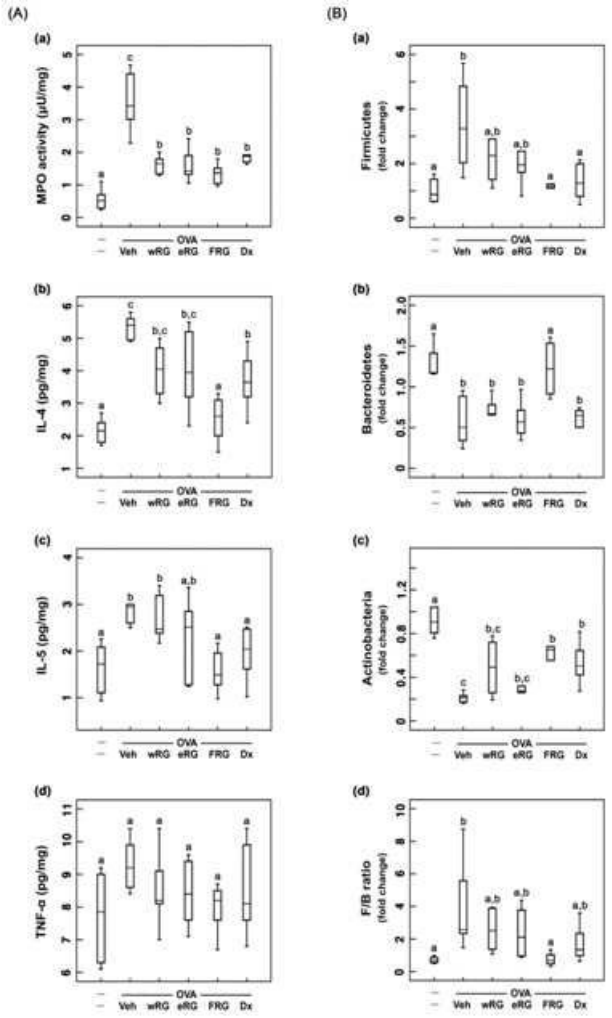
도면2


A
B
(a)
Symptom score
IL-4 (pg/mL)
(b)
IL-4 (pg/mL)
IL-5 (pg/mL)
(c)
IL-5 (pg/mL)
IgE (pg/mL)
OVA
Veh wRG eRG FRG Dx

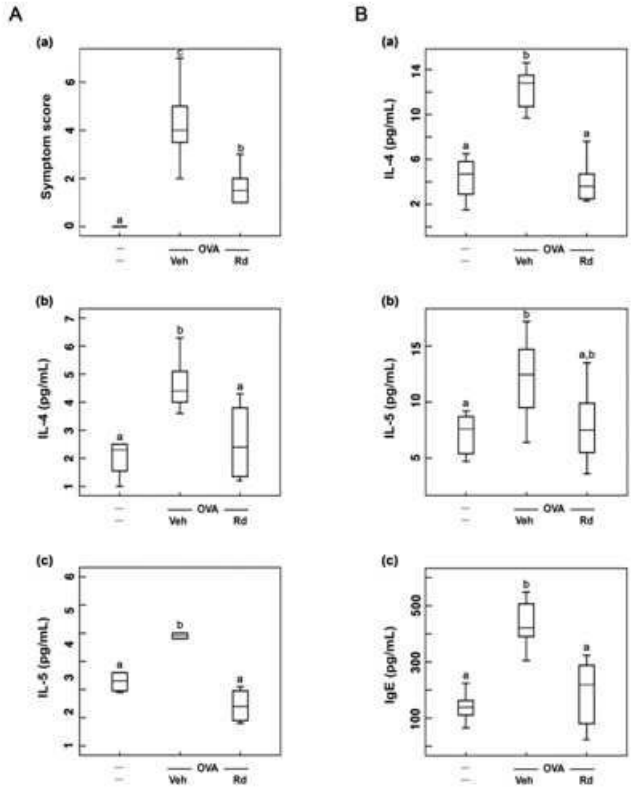
도면3


Th2 Cell (%)
IL-4 (pg/mL)
Mast Cell (%)
IL-5 (pg/mL)
Eosinophil(%)
TNF-α (pg/mL)
OVA
Veh wRG eRG FRG Dx

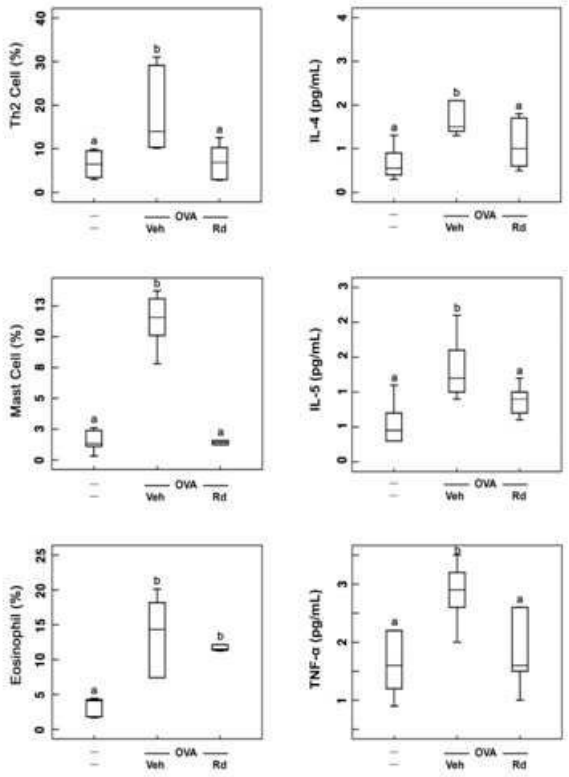
도면4


(A)
(a)
MPO activity (μU/mg)
(b)
IL-4 (pg/mg)
(c)
IL-5 (pg/mg)
(d)
TNF-α (pg/mg)
(B)
(a)
Firmicutes (fold change)
(b)
Bacteroidetes (fold change)
(c)
Actinobacteria (fold change)
(d)
F/B ratio (fold change)
OVA
Veh
wRG
eRG
FRG
Dx

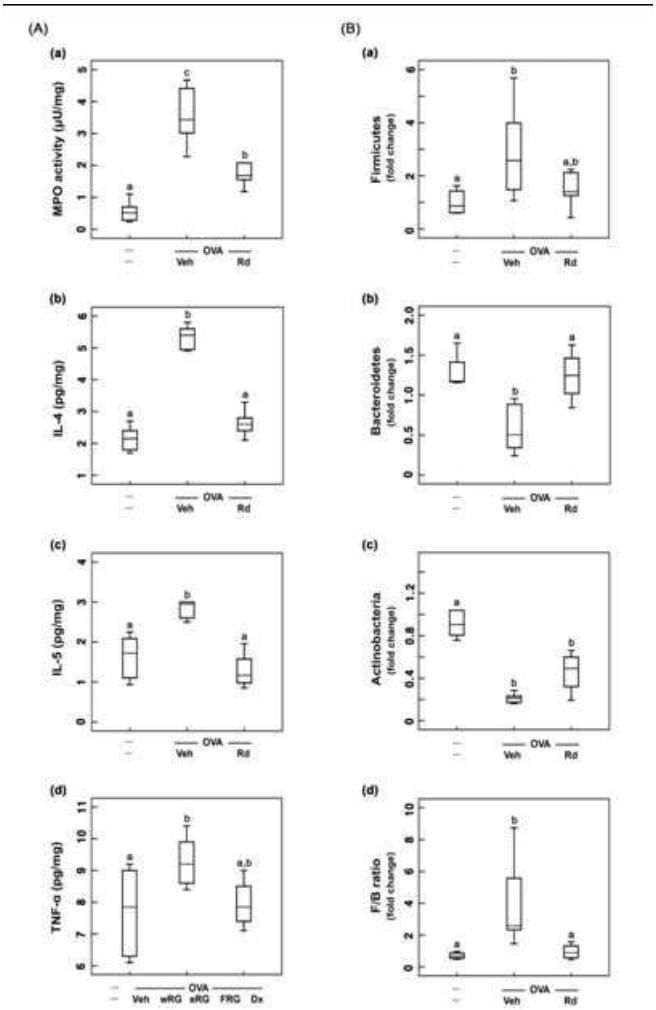
도면5


A
B
(a)
Symptom score
IL-4 (pg/mL)
(b)
IL-4 (pg/mL)
IL-5 (pg/mL)
(c)
IL-5 (pg/mL)
IgE (pg/mL)
OVA
Veh
Rd

도면6


Th2 Cell (%)
IL-4 (pg/mL)
Mast Cell (%)
IL-5 (pg/mL)
Eosinophil (%)
TNF-α (pg/mL)
OVA
Veh
Rd

도면7


(A)
(a)
MPO activity (μU/mg)
OVA
Veh
Rd
(b)
IL-4 (pg/mg)
(c)
IL-5 (pg/mg)
(d)
TNF-α (pg/mg)
Veh wRG sRG FRG Dx
(B)
(a)
Firmicutes (fold change)
(b)
Bacteroidetes (fold change)
(c)
Actinobacteria (fold change)
(d)
F/B ratio (fold change)