



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2013년12월26일  
(11) 등록번호 10-1345226  
(24) 등록일자 2013년12월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/212 (2006.01)  
A23L 1/29 (2006.01) A61K 36/258 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0090695  
(22) 출원일자 2013년07월31일  
심사청구일자 2013년07월31일
- (56) 선행기술조사문헌  
The Journal of Microbiology, Vol.43,  
pp.456-462(2005.10.)\*  
International Journal of Systematic and  
Evolutionary Microbiology, Vol.58,  
pp.1164-1168(2008.)  
왕량, KAIST, 생명과학과, 박사학위논문,(2011.)  
Arch. Pharm. Res., Vol.26, pp.375-382(2003.)  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
충남대학교산학협력단  
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자  
송규용  
대전광역시 중구 태평동 삼부아파트 412동 101호  
남명수  
대전광역시 유성구 지족동 열매마을4단지아파트  
102동 402호  
김승형  
대전광역시 서구 내동 맑은아침아파트 104동 110  
3호
- (74) 대리인  
백경업

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **신규한 패니바실러스 속 엠비티213 균주, 이를 이용한 발효인삼 및 이를 이용한 발효인삼 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물**

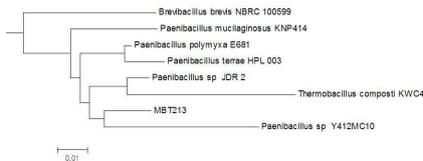
**(57) 요약**

본 발명은 신규한 패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P) 및 이를 이용한 발효인삼에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P)의 배양액은 인삼 내의 진세노사이드 Rg<sub>1</sub>을 Rd로 변환시키는 효과가 우수하다. 또한 이와 같은 효과를 이용하여 제조한 발효인삼 또는 이의 추출물은 MIP-1α (macrophage inflammatory protein-1α), IL-4(interleukin-4) 및 IL-13(interleukin-13)의 활성을 억제함으로써 아토피 피부염과 같은 각종 피부질환의 증세를 치료 또는 경감시키는 치료제로 용이하게 이용될 수 있다.

**대표도 - 도1**

```

1   TCTACCCACC TTGGAGGAGT GAGTCTTGG GGTACCTCA CCGACTTGG GGTGTGFAA CTCTGTGGT
71  GTGAGGGGG GTGTGTACA GAGCCGGGA CATTATTACC GGGGATGCT GATCCGGAT TACTAGAAAT
143 TCGATCTCA TCGAGGAGG TTGAGGCTG CACTCCGAC TGAGCTGGG TTGTGTAGAT TGGCTCTGC
211 TGGGAGCTC GCTTCCCGT GTACAGCCA TTGTAGTAG TGTGTAGCC AGGTCATAG GGGGATGATG
281 ATTGTAGATC ATCCCGGCTT TCTCTGGTT TTGACGGAG AGTCATCTA GAGTGGCCAG CTTATGTGCG
351 TGGACACTA AATGAGGAT TCGCTGTGT GGGGAGTAA AGCCAGATG TCGACAGAG GAGTGGAGAC
421 AAGCATGAC CAGCTGTCT CTTGTGCGG AAGGAMAGA TACATCTTG TACCGGTCAG AGGGATGTCA
491 AAGACTGATA AGTTCTTGG CATTGCTTG AATTAMACA CATACTCAC TGTGTGTGG GGTCCCGCTC
561 AATTCCTTG AGTTGAGTC TTGAGGATC AGTCCCGAG CGATATGCT AAGTGTGTA CTTGGGAGC
631 AAGGGTATCG AAGCCCTAA CAGCTAGCAT TCATGTGTT CAGGCTGGAC TACCAAGGTA TGTATCTGCG
701 TTTCCTCCC AGCTTTTGG CAGTCAAGT CAGTTACAG CAGAGAGTC GACTTGGCA CTGGTGTCC
771 TCGAGATTC TAGGATTC AGCCAGTAC GTAGATTC AGTCTCTCT TCGAGACTCA AGTACCGAG
841 TTCCATATCG GAGCTAGAT TTAGCTCTG GATTAGCAT CAGACTTAA TAGCCGCTG GGGGCTTCT
911 AGCCCAATA ATTCCGACA AGCTTGCCC CTTAGGAT TACCGGAGCTG CTGGGAGGTA GTTAGCCGGG
981 GCTTCTCTC TCAGGAGCG TCACTCGAT AGCAGTACT CTACCGAGC TTCTTCCCTG GAGAGAGAG
1051 TTAGATATC GAAAGACTC ATAGCTAGG GGGGCTTCT CAGTCAAGT TTCTCCGCTT GGGAGAGAT
1121 CCGTACTGCT GCTCTCGTA GAGTCTGGG CCGTGTCTA GTCCAGTGT GAGCGTTTAC GCTCTCAGT
1191 CCGATAGCA TGTGTGCTT GGTAGGCTT TACCCAGCA AGTACTAAT GGGCCGAGG TCGATCTGCA
1261 AGTAGAGAT TACTGCTCT TTGATGTTT CCGCATGGA GAATATATG TACTCGAT TACTTAGAT
1331 TTCCGATG TATCCAGTC TTACAGGAG GTACTAGG TGTACTCAC CCGTCCGGG GTAGCCCTCC
1401 TGGAGGAA GCTTCTCAT AGTCCGCTC GAGTGCATG ATAGCGGCC
    
```



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

신규한 패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P).

### 청구항 2

패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P)를 이용한 발효인삼.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 발효인삼은 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 MBT213 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하고 25~40℃에서 3~15일간 발효한 것을 특징으로 하는 발효인삼.

### 청구항 4

패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P)를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 발효인삼은 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 MBT213 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하고 25~40℃에서 3~15일간 발효한 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 6

제4항에 있어서,

상기 발효인삼의 추출물은 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 7

패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P)를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 발효인삼은 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 MBT213 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하고 25~40℃에서 3~15일간 발효한 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

### 청구항 9

제7항에 있어서,

상기 발효인삼의 추출물은 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

### 청구항 10

삭제

### 청구항 11

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 신규한 패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P) 및 이를 이용한 발효인삼에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 인삼(*Panax ginseng*)은 오갈피나목과(*Araliaceae*) 인삼 속에 속하는 다년생 초본류로 과거 수천년 전부터 우리나라를 비롯한 동양에서 약제 또는 건강식품으로 널리 사용되어 왔다. 또한 인삼은 수삼, 홍삼 등의 다양한 형태로 이용이 가능하며, 특히 수삼을 증기로 쪄서 가공한 홍삼이 인체에 유용한 다양한 진세노사이드를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 인삼의 주요 효능을 나타내는 사포닌(saponin)은 30종류 이상의 진세노사이드(ginsenoside)로 구성되는데, 진세노사이드는 면역력강화, 항염증작용, 항알러지작용, 항암효과, 발기부전에 대한 효과, 혈압강화작용, 항콜레스테롤작용, 항혈전작용, 성인병 및 노화에 대한 예방 및 치료효과가 있다고 알려져 있다.

[0004] 인삼의 사포닌은 트리테페노이드(triterpenoid) 계열의 담마란(dammarane) 골격에 글루코즈(glucose), 아라비노스(arabinose), 자일로즈(xylose), 람노스(rhamnose) 등이 결합되어 있는 중성배당체이다. 인삼을 물과 알코올로 추출할 때 인삼 사포닌의 진세노사이드 중에서 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올(20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol; Rb<sub>1</sub>), 20-O-[α-L-아라비노피라노실(1→6)-β-D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사디올(20-O-[α-L-arabinopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-20(S)-protopanaxadiol; Rb<sub>2</sub>), 20-O-[α-L-아라비노푸라노실(1→6)-β-D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사디올(20-O-[α-L-arabinofuranosyl(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-20(S)-protopanaxadiol; Rc), 20(S)-프로토파낙사트리올(20(S)-protopanaxatriol; Rg<sub>1</sub>) 등이 다량 존재하는 것이 확인된다.

[0005] 사포닌은 체내에서 장내 미생물에 의해 분해되어 흡수되는데(*Planta. Med.*, 1996, 62(5), 453-457), 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>의 경우, 장내 미생물에 의해 진세노사이드 Rd, 화합물 K(compound K)와 프로토파낙사디올로 순차적으로 전환되어 흡수된다. 하지만 인삼 사포닌을 분해하는 장내 미생물은 사람의 체질과 식습관에 따라 그 존재의 유무와 보유하고 있는 정도가 다르며, 대사 산물로 전환하는데 차이가 있어서 인삼을 복용한 후의 효능의 차이가 나타날 수 있다. 즉, 장내 미생물 균종이 사람마다 다르기 때문에 진세노사이드의 전환율과 생체이용율이 달라지게 된다(*J. Pharm. Pharmacol.* 1998, 50(10), 1155-1160). 이와 같은 진세노사이드 전환 활성을 통해 생성되는 것 중, 진세노사이드 Rd가 있는데, 일반적으로 진세노사이드 Rd는 신경세포의 분화를 촉진하여 보호하고, 화학물질 등에 의한 손상을 경감, 혈관수축을 억제하며 혈액순환을 촉진한다고 알려져 있다(*Journal of Korean Medical Science*, 2001, 16(Suppl), S66-69).

[0006] 따라서 장내 미생물의 차이로 인한 인삼 내의 진세노사이드의 흡수율의 차이를 없애기 위해, 다양한 미생물을 이용하여 인삼을 미리 발효함으로써 진세노사이드의 체내 흡수율을 제고하고, 또한 새로운 형태의 유용한 인삼 발효물을 제공하고자 하는 시도가 지속적으로 이루어지고 있다.

[0007] 그러나, 상기 미생물들을 이용해 발효된 인삼 내의 진세노사이드의 성분 및 함량을 확인했을 때, 진세노사이드의 전환능이 기대했던 것만큼 아주 높지는 않은 것으로 확인되고 있어 새로운 진세노사이드 전환 활성을 갖는 미생물을 개발하는 것에 대한 필요성이 제기되고 있다.

[0008] 한편, 아토피 피부염의 병인기전은 아직 완전하게 밝혀지지 않았지만 환경 내에서 흔한 물질(알레르기항원)에 대한 과민한 면역반응(알레르기반응)으로 인하여 피부에 만성적인 염증반응을 유발하여 아토피 피부염이 발생할 것으로 알려져 왔다. 또한, 아토피 피부염(atopic dermatitis)은 천식과 알레르기성 질환의 발달 전에 발생하는 만성적인 염증질환으로, 케모카인의 농도, 양적변화나 활성 정도에 따라 그 증상에 차이가 있으며(*Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2005, 5, 284-290), Th2 타입의 림프구가 병변부(lesional skin)로 침입하는 현상을 말하기도 한다.

- [0009] 현재 세계 인구의 0.5%~1%, 특히, 어린이의 경우 5~10%가 아토피 피부염으로 고생하는 것으로 알려져 있으며, 그 발증과 악화에는 환경인자가 크게 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 그 예로서, 아토피 피부염의 발병 빈도는 집먼지 진드기에 노출된 양과 상관성을 보이며 아토피 피부염의 중증도와도 유의한 상관관계를 보인다고 알려져 있다. 또한 환경 내에서 집먼지 진드기에 대한 노출을 줄임으로써 아토피 피부염의 중증도를 감소시킬 수 있다고 알려져 있다. 그 외에 아토피 피부염은 건조한 피부, 정상인에 비해 쉽게 피부 가려움증을 느끼는 특성, 세균, 바이러스, 곰팡이 등에 의한 감염, 정서적 요인, 환경적 요인 등이 서로 복합적으로 작용하여 일어나는 것으로 보인다. 최근 수십 년 동안 아토피 피부염의 발병률이 상승하고 있으며, 우리나라 또한 그 환자 수가 크게 늘고 있는 현실이다.
- [0010] 만성염증의 면역 반응에는 다양한 면역세포와 염증세포, 각종 화학매개체들이 관여하게 되는데 이러한 염증 반응에 관여하는 주된 세포는 T 세포, B 세포, 호산구, 호중구, 비만세포 등이 있다. 아토피 피부염에도 다양한 면역세포들이 관여하지만 그 중에서도 T 세포의 활성화가 주된 역할을 한다. 면역기능의 과정에서 T 세포의 분화는 면역기능의 항진 및 저하 등 면역에 관련된 중요한 역할을 하는 사이토카인(cytokine)을 통해 수행된다. 상기 사이토카인들로는 주로 IL(interleukin)-1, IL-2, IL-4, IL-12, INF- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) 등이 있으며, 상기 사이토카인의 영향으로 naive CD4<sup>+</sup> T 세포가 Th1 세포와 Th2 세포로 분화한다. 아토피 피부염이 진행되면 1차적으로 T 세포의 활성화가 일어나고 helper T 세포로 변하게 되며 변화된 helper T 세포는 발현되는 사이토카인에 따라 Th1과 Th2 세포로 분화하는데, 면역학적 진행 과정 중 비정상적인 성숙으로 인한 Th1과 Th2 세포간의 불균형으로 Th2 반응에 치우치게 된다(Immunol. Today., 2000, 21, 479~483).
- [0011] 한편, 외부 환경에서 항원이 유입되면 Th1과 Th2 세포의 면역학적 불균형이 일어나기도 하며 그로 인해 Th2 세포의 우세적인 활성화로 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 사이토카인을 분비하게 되는데 이때 B 세포에 의한 IgE 항체의 과생산, 비만세포에 의한 히스타민 증가, 호산구에 의한 염증 유발물질의 분비 등으로 과염증 증상 및 알러지성 질환이 유발된다. 급성아토피 피부염의 경우 다량의 IL-4, IL-5, IL-13 mRNA 표현세포(expressing cell)가 존재하지만 IL-12나 INF- $\gamma$  표현세포는 적은 편이다. 만성 아토피 피부염의 경우, 소수의 IL-4, IL-13 mRNA 표현세포(expressing cell)가 존재하지만 IL-5, GM-CSF(granulocyte-macrophage stimulating factor), IL-12, INF- $\gamma$  mRNA 표현세포는 급성아토피 피부염에 비해서 증가된다. 급성 아토피 피부염에서는 소수의 T 세포와 호산구도 염증반응에 중요한 역할을 하게 되며 만성 병변의 진피층에는 단핵구(mononuclear cell)가 주류를 이룬다(Int. Arch. Allergy Imm., 1994, 103, 188~193). 만성 아토피 피부염이 지속되려면 IL-5와 GM-CSF가 증가되어 호산구를 포함한 단핵구의 생존이 연장되어야 한다.
- [0012] 또한, 비만세포는 다양한 알레르기 질환인 아토피성 피부염, 천식, 알레르기성 비염, 류마티스 관절염 등에 있어서 매우 중요한데, 비만세포는 다른 세포와 달리 크고 굵은 이염색성의 과립을 함유하고 있으며, IgE가 이 세포를 가지고 있는 Fc $\epsilon$ RI(high-affinity receptor for IgE)에 결합된 상태에서 항원에 의해서 자극을 받게 되면 여러 면역반응과 염증반응에 관여한다(Cell, 1993, 75, 969~976). 일반적으로 피부를 포함한 림프관, 호흡기계 등의 인체 내의 결합조직에 널리 분포되어 있는 비만세포(mast cell)에 의해서 제2형의 알레르기 반응을 보이게 된다. 비만세포 표면의 존재하는 고친화성 IgE 수용체(Fc $\epsilon$ RI)에 과잉 별첨된 IgE가 결합하여 감작된 상태가 되고, 그 상태에서 다시 항원에 노출됨으로써 비만세포가 활성화되어 류코트리엔(Leukotrien, LT), 히스타민 등의 화학전달물질과 IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), GM-CSF 등의 사이토카인 분비로 과민 반응을 일으키게 된다. TNF- $\alpha$ 는 면역반응에 관여하는 중요한 매개체 중 하나이고 호중구와 호산구의 활성화를 유도하고 백혈구가 염증부위에 축적되도록 작용하며 자극에 의해 양이 증가하게 되면 내인성 발열원으로 작용해서 몸에 열을 발생시키거나 혈관 내피세포로부터 IL-1, IL-6와 같은 사이토카인의 분비를 촉진시키며 TNF- $\alpha$ 는 다형핵상과 단핵상 세포의 침윤을 유도하는 것으로 알려져 있다(Curr. Opin. Drug. Discov. Devel., 2001, 4, 635~650). 또한 B 세포에서 IgE로 전환되는데 많은 영향을 미치며 비만세포의 활성화에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있고, IL-4와 IL-13은 Th2 면역반응에 있어서 아토피 반응과 깊은 관련이 있다. Th2 림프구에서 생성되어 IL-5는 호산구 증가증에 영향을 미치는 중요한 사이토카인이며, 성숙한 호산구의 활성화 및 수명 연장에 관여하고 염증부위 축적에 기여한다. IL-13은 비만세포(mast cell)에서 IgE 생산에 영향을 주고 IL-13과 IL-4는 혈청의 전체적인 IgE 형성에 중요한 역할을 한다. 다양한 원인에 의해 아토피 피부염이 발생할 경우, 면역적인 반응에 의해서 외부항원을 인식하는데 중요한 요소인 면역글로불린 E(IgE)의 수치가 비정상적으로 증가하게 된다. 이는 대부분이 혈액 내에 존재하게 되는데 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 Th2 사이토카인의 증가가 일어나게 되며 표피의 과다형성 및 CD4 helper T 세포, 총 T 세포가 증가하게 된다. 또한, 최근 연구에서 알레르기 항원에 반응하여 알레르기 질환 원인인 비만세포와 Th2 세포의 활성화로 생성되는 IL-4와 IL-13이 비만세포 내에서 전사인자인 NFAT 단백질 중 NFAT-1에 의하여 조절되고(J. Biol. Chem., 2004, 279(35), 36210~36218),

MIP(macrophage inflammatory protein)-1a와 MIP-1beta의 유전자 발현이 염증활성세포에서 c-jun/AP-1의 전사 인자 활성화에 영향을 미친다는 연구결과도 보고된 바 있다(Int. Arch. Allergy Immunol., 2008, 148(2), 147~153)

- [0013] 한편, 기존에 아토피 피부염의 치료제로 가장 널리 이용되어 왔던 것은 주로 스테로이드제, 항히스타민제, 항생제 등과 같은 치료제이다. 이 중, 스테로이드제는 기관지천식 등의 염증성 질환에서 가장 널리 사용되는 치료제 이기는 하지만, 아직까지도 스테로이드제가 체내에서 반응하는 기전이 다 알려져 있지는 않는 실정이다. 한편, 기관지 천식이나 류마티스 관절염 등의 환자들 중 일부는 스테로이드제에 반응하지 않는 스테로이드 저항성을 보인다. 또한, 아토피 피부염은 스테로이드 계통의 약제를 통해 완전히 치료가 되기보다 만성화되면서 조직의 변성 및 섬유화가 일어나는 부작용이 종종 발생한다. 스테로이드제에 대한 저항성이 커지면, 만성 염증성 반응에서 다양한 세포를 통해 섬유화에 관련된 TGF- $\beta$ (tumor growth factor- $\beta$ ), IL-4, IL-13 등의 다양한 사이토카인이 분비되고, 이를 통해 섬유모세포(fibroblast)를 활성화시키는 IL-6의 분비가 증가되어 많은 섬유모세포의 분화, 증식이 초래되며, 세포의 기질(extra cellular matrix)이 과생산되어 세포 및 조직의 변형과 섬유화가 야기될 수도 있다.
- [0014] 따라서, 스테로이드제와 같은 아토피 피부염의 치료제들은 상기와 같은 여러 가지 부작용으로 인해 그 사용을 점차 제한하고 있는 추세이며, 아토피 피부염에 효과가 있으면서도 부작용이 없는 새로운 개념의 아토피 피부염의 치료용 조성물이 요구되고 있다.
- [0015]  $\beta$ -글루코시다아제( $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21)는 aryl과 alkyl 타입의  $\beta$ -글루코사이드( $\beta$ -glucoside), 올리고당(oligosaccharide) 등으로부터  $\beta$ -글루코사이드 결합을 가수분해하여 최종산물인 글루코스(glucose)를 생성하는 효소들을 포함한다.  $\beta$ -글루코시다아제는 식물의 경우 식물 호르몬이나 열매의 향기 형성을 활성화하는데 관여하거나, 식물 병원균의 저항성 기작에 관여하는 것으로 연구되고 있으며, 그 밖에 곰팡이, 효모, 박테리아와 동물의 조직 등에 분포되어 이들 안에서 각기 다른 기능들을 수행한다.
- [0016] 본 발명자들은  $\beta$ -글루코시다아제 활성이 있는 신규한 패니바실러스 속 MBT213 균주가 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 체내에서 이용하기 용이한 진세노사이드 Rd로 변환하는 기능이 우수하여, 체내이용율이 높은 발효인삼을 제조할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 균주를 이용한 발효인삼의 활성을 연구하던 중, 상기 발효인삼의 추출물이 아토피 피부염의 예방 또는 치료 효과가 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.
- [0017] 한국등록특허 제1285681호와 한국등록특허 제472964호에는 사포닌 생물전환능을 갖는 유산균을 이용하여 체내흡수율이 증진된 발효인삼이 개시되어 있으나, 본 발명에서 이용된 균주와는 전혀 다른 균주를 이용하며, 상기 발효 인삼이 아토피 치료효과가 있다는 것도 개시되어 있지 않다.
- [0018] 한편, 미생물 유래의  $\beta$ -글루코시다아제가 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 체내에서 이용하기 쉬운 타입의 진세노사이드 Rd로 변환시키는 기능이 있는 것으로 확인된 바 있는데(한국공개특허 제2013-0063959호 및 한국등록특허 제1182741호), 상기 한국공개특허 제2013-0063959호에는 아스퍼질러스 우사미 균주(*Aspergillus usami* KCTC 6954)가 생산하는  $\beta$ -글루코시다아제 효소를 이용한 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>의 전환방법, 한국등록특허 제1182741호에는 아스퍼질러스 니이거 균주(*Aspergillus niger* KCCM 11239)를 이용한 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>의 전환방법이 개시되어 있다. 그러나 상기 선행기술들에 개시된  $\beta$ -글루코시다아제 효소를 제조하기 위해 이용된 균주가 본 발명과 다를 뿐만 아니라, 균주 배양액으로부터 정제된 효소를 추출한 후, 진세노사이드를 직접적으로 전환하는 것만이 개시되어 있을 뿐, 균주 배양액을 이용하여 발효인삼을 제조하거나, 발효인삼 추출물이 아토피 치료용 조성물로 이용될 수 있다는 것은 전혀 개시되어 있지 않는다. 또한, 한국등록특허 제1017378호에는 발효인삼, 발효홍삼의 제조방법 및 이에 적합한 청국장 유래의 바실러스 서브틸리스 신규균주가 개시되어 있으나, 상기 선행기술은 본 발명과 전혀 다른 균주를 이용하여 발효인삼을 제조하기에, 본 발명과 전혀 다른 기술이라 할 수 있다. 마찬가지로, 한국공개특허 제2012-0125113호와 한국공개특허 제2012-0125112호에 인삼 발효능을 갖는 락토바실러스 플랜타리움 균주와 엔테로코커스 페칼리스 균주가 개시되어 있으며, 이를 이용하여 발효 인삼을 제조하는 방법이 개시되어 있으나, 역시 본 발명과 전혀 다른 균주를 이용하여 발효인삼을 제조하기에, 본 발명과 전혀 다른 기술이라 할 수 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0019]

- (특허문헌 0001) 한국등록특허 제472964호 (사포닌분해물을 함유하는 발효인삼 및 그 제조방법, 2005.02.15. 등록)
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제1017378호 (발효인삼, 발효홍삼의 제조방법 및 이에 적합한 청국장 유래의 바실러스 서브틸리스 신균주, 2011.02.17. 등록)
- (특허문헌 0003) 한국등록특허 제1182741호 (진세노사이드 알비1의 효율적인 생물전환 방법 및 그 산물, 2012.09.07. 등록)
- (특허문헌 0004) 한국등록특허 제1285681호 (사포닌 생물전환능을 갖는 균주 및 이를 이용한 체내흡수율이 증진된 발효인삼의 제조방법, 2013.07.04. 등록)
- (특허문헌 0005) 한국공개특허 제2012-0125112호 (인삼 발효능을 갖는 신규 엔테로코커스 패칼리스 C R N B-A 3 [K C T C 1 1 9 3 0 B P] 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 2012.11.14. 공개)
- (특허문헌 0006) 한국공개특허 제2012-0125113호 (인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 C R N B-2 2 K C T C 1 1 9 3 1 B P] 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 2012.11.14. 공개)
- (특허문헌 0007) 한국공개특허 제2013-0063959호 (아스피질러스 우사미 케이씨티씨 6954 균주가 생산하는 효소를 이용한 진세노사이드 알비1의 효율적인 전환방법 및 그 산물, 2013.06.17. 공개)

**비특허문헌**

[0020]

- (비특허문헌 0001) Dombrowicz, D. et al., Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity IgE receptor alpha chain gene., Cell, 1993, 75, 969~976.
- (비특허문헌 0002) Gomes, J.C, et al., Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from Anchieta salutaris on the histamine release induced in the rat and the guinea pig., Int. Arch. Allergy Imm., 1994, 103, 188~193.
- (비특허문헌 0003) Hasegawa, H. et al., Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria., Planta. Med., 1996, 62(5), 453~457.
- (비특허문헌 0004) Ichiyama T. et al., Cysteinyl leukotrienes induce macrophage inflammatory protein-1 in human monocytes/macrophages., Int. Arch. Allergy Immunol., 2008, 148(2), 147~153.
- (비특허문헌 0005) Lee J.S. et al., House dust mite, Dermatophagoides pteronissinus increases expression of MCP-1, IL-6, and IL-8 in human monocytic THP-1 cells., Cytokine, 2008, 42(3), 365~371.
- (비특허문헌 0006) Monticelli, S. et al., Role of NFAT proteins in IL13 gene transcription in mast cells., J. Biol. Chem., 2004, 279(35), 36210~36218.
- (비특허문헌 0007) Pivarcsi, A. et al., Chemokine networks in atopic dermatitis : traffic signals of disease., Curr. Allergy Asthma Rep., 2005, 5, 284~290.
- (비특허문헌 0008) Rengarajan, J. et al., Transcriptional regulation of Th1/ Th2 polarization., Immunol. Today., 2000, 21, 479~483.
- (비특허문헌 0009) von Moltke L.L. et al., Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from Panax ginseng., J. Pharm. Pharmacol. 1998, 50(10), 1155~1160.
- (비특허문헌 0010) Journal of Korean Medical Science, 2001, 16(Suppl), S66~69.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0021] 본 발명의 목적은 신규한 패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P) 및 이를 이용한 발효인삼을 제공하는 데에 있다. 또한, 본 발명의 목적은 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

**과제의 해결 수단**

[0022] 본 발명은 신규한 패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P)에 관한 것이다.

[0023] 또한 본 발명은 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼에 관한 것이다.

[0024] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼은, 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 MBT213 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하고 25~40℃에서 3~15일간 발효한 것일 수 있다.

[0025] 본 발명은 또한 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 발효인삼의 추출물은, 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있다.

[0027] 또 다른 형태로서, 본 발명은 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0028] 한편, 본 발명은 패니바실러스 속 MBT213 균주의 배양액을 원심분리한 후, 0.01~10mg/ml의 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>과 상기 원심분리된 배양액을 1:1~5의 부피비로 혼합하여 25~40℃, pH 5.0~9.0에서 3~15일간 반응시켜 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 진세노사이드 Rd로 전환하는 방법을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 MBT213 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하여 25~40℃에서 3~15일간 반응시켜 진세노사이드 Rd가 강화된 발효인삼을 제조하는 방법을 제공한다.

[0030] 이하, 본 발명을 더 자세하게 설명한다.

[0031] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주는 혐기성, 그람 양성, 운동성, 유포자 간균, 생육가능한 온도는 25~40℃, 바람직하게는 30~37℃이고, 생육가능한 pH는 5.0~8.0, 바람직하게는 pH 6.0~7.5이고, 배양에 적절한 시간은 36~96시간, 바람직하게는 48~96시간, 가장 바람직하게는 48~72시간이다. 상기 균주는 25℃ 미만, 40℃ 초과, pH 5.0 미만, pH 8.0 초과 조건에서는 잘 자라지 않는다.

[0032] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주는 일반적인 균주의 배양 배지에서는 다 생육 가능하지만, 배양에 가장 적합한 배지로는 TS 배지(trypticase soy broth), BCP 배지(Bromo Cresol Purple-Deoxycholate -Citrate-Lactose-Sucrose broth), GYP 배지(Glucose-Yeast-Peptone broth)이다.

[0033] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주는 β-글루코시다아제(β-glucosidase) 활성이 있다(β-글루코시다아제를 분비함).

[0034] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼은 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액 1~25 중량부를 혼합하여 발효한 것일 수 있다. 이 때, 물은 첨가하지 않거나 극히 소량만 첨가해도 발효는 진행되지만, 진세노사이드의 전환효과가 나타나기까지 발효가 진행되는 시간이 증가된다. 따라서, 물의 함량은 200 중량부 이상인 것이 바람직하며, 물의 함량이 1000 중량부를 초과해도 발효는 진행될 수 있으나, 역시 발효가 진행되는 시간이 증가된다. 또한 상기 조건에서 균주 배양액이 1 중량부 미만일 경우에는 발효가 진행되는 시간이 증가되기 때문에, 1 중량부 이상이 적절하며, 25 중량부를 초과해도 되지만, 25 중량부까지만 넣어도 발효가 충분히 진행되기에 그 이상은 첨가하지 않아도 된다. 또한, 상기 발효 조건은 25~40℃, 3~15일간 발효한 것일 수 있다. 상기 조건에서 25℃ 미만, 40℃를 초과하면 발효가 잘 되지 않는다. 또한 상기 조건에서 3일 미만에서는 발효가 충분히 진행되지 않는다. 15일을 초과하여 발효하여도 좋으나 이미 15일 내에서 진세노사이드의 전환이 충분히 수행되기 때문에, 제조비용면에서 15일 이내가 적절하다. 따라서, 상기 발효 온도, 발효기간의 범위에서 가장 발효효과가 좋은 발효인삼을 제조할 수 있다.

- [0035] 한편, 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼은 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효작용을 통해 체내에서 흡수 및 이용하기에 좋은 각종 진세노사이드가 강화된 발효인삼으로서, 특히 진세노사이드 Rd의 함량이 강화된 발효인삼일 수 있다. 상기 발효 전 인삼의 진세노사이드 Rd의 함량은 0.05~0.15 중량%일 수 있으며, 발효인삼 내의 진세노사이드 Rd의 함량은 0.25~0.85 중량%일 수 있다(건조 중량 기준).
- [0036] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용하여 진세노사이드 Rb1을 진세노사이드 Rd로 변환할 수 있는데, 이를 위해, 패니바실러스 속 MBT213 균주의 배양액을 원심분리한 후, 물에 녹인 0.01~10mg/ml의 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>과 상기 원심분리된 배양액을 1:1~5의 부피비로 혼합하여 25~40℃, pH 5.0~9.0에서 3~15일간 반응시킬 수 있다. 이 때 배양액의 원심분리는 5000rpm~10000rpm으로 수행하는 것이 적절하다. 상기 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>의 농도는 어떤 농도에서도 사용가능하나, 전환효율면에서 0.01~10mg/ml가 가장 적절하다. 이 때, 역시 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>과 상기 원심분리된 배양액을 1:1~5의 부피비로 혼합할 때, 1:1~5의 부피비를 벗어나도 진세노사이드 Rd로의 전환은 잘 수행되지만, 배양액의 소모가 많아 제조비용이 많이 들거나 진세노사이드 변환 시간이 오래 걸리기 때문에 비경제적이다.
- [0037] 또한, 진세노사이드 전환 조건인 또한, 진세노사이드 전환 조건인 25~40℃, pH 5.0~9.0, 3~15일에서, 25℃ 미만, 40℃ 초과 조건에서는 진세노사이드의 전환이 잘 되지 않거나 시간이 많이 걸릴 수 있으며, pH 5.0 미만, pH 9.0 초과 조건에서도 진세노사이드의 전환이 잘 되지 않거나 시간이 많이 걸릴 수 있다. 또한, 3일 미만인 경우에도 진세노사이드의 전환이 잘 되지 않거나 시간이 많이 걸릴 수 있다. 단, 15일을 초과하는 경우에도 진세노사이드의 전환이 잘 되지만, 이미 15일 이내에 대부분의 진세노사이드의 전환이 완료되어 15일까지만 반응을 수행해도 적절한 결과를 얻을 수 있다.
- [0038] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼(건조물 기준)에, 상기 발효인삼 중량의 2~20배(w/w)의 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매를 가하여 제조할 수 있다. 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 물 추출물로 제조되었을 경우, 그대로 이용할 수도 있으며, 물을 비롯한 다른 형태의 용매를 이용하여 추출하였을 어느 경우에도 농축물 또는 건조물 형태로 이용될 수 있다.
- [0039] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 필요에 따라, 유기용매(알코올, 에테르, 아세톤 등)에 의한 추출, 유기용매(n-헥산, 에틸아세테이트, n-부탄올)와 물의 분배, 컬럼크로마토그래피에 의한 방법, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법 등을 단독 또는 적합하게 조합하여 더욱 정제할 수 있으며, 필요에 따라 상법에 따라서 더욱 정제할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용하는 크로마토그래피에는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 박층크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography), 중압크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등이 이용될 수 있다.
- [0041] 상기 발효인삼의 제조에 이용되는 인삼은 파낙스(*Panax*) 속에 속하는 다년생 식물로, 고려인삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*Panax quinquefolia*), 전칠삼(삼칠, *Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonicus*), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*), 베트남삼(*Panax vietnamensis*), 파낙스 엘레가티오르(*Panax elegatior*), 파낙스 완지아누스(*Panax wangianus*) 및 파낙스 비핀라티피두스(*Panax bipinratifidus*), 파낙스 안구스티폴리움(*Panax angustifolium*)에서 선택되는 1종 이상의 인삼을 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 아울러 이들 인삼은 단독으로 또는 2종 이상 조합하여 사용할 수도 있다.
- [0042] 한편, 상기 인삼은 4~6년근의 인삼 뿌리를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0043] 또한, 본 발명은 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그

네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 락토바실러스 플랜타리움 CRNB-22를 이용한 발효인삼의 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0044] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 건조물 기준으로 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 락토바실러스 플랜타리움 CRNB-22를 이용한 발효인삼의 추출물은 천연물 유래의 조성물이기 때문에, 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0045] 또한, 본 발명은 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제가 첨가될 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 건강기능식품으로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스펙류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료를 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품이 포함될 수 있다.

[0046] 또한 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 그대로 건강기능식품으로 제품화할 수도 있고, 풍미나 향취를 높이기 위해 다양한 첨가물을 배합하여 제품화할 수 있다. 첨가물의 예로서는 각종 당질, 유화제, 감미료, 산미료, 과즙 등이 있다. 구체적으로는 포도당, 서당, 과당, 봉밀 등의 당질과 솔비톨, 키실리톨, 에레스리콜, 락티톨, 파라티니드 등의 당알코올, 글리세린지방산에스테르와 같은 지방산에스테르, 레시틴 등의 유화제 등이 사용될 수 있으며, 이외에도 비타민A, 비타민B, 비타민C, 비타민E 등의 각종 비타민류나 식물 엑기스, 곡물성분, 야채성분 등도 첨가제로 사용가능하다.

[0047] 한편, 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 파우치 형태에 멸균 포장되어 복용하기 용이한 형태로서 제공될 수도 있다.

**발명의 효과**

[0048] 본 발명은 신규한 패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P) 및 이를 이용한 발효인삼에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213, 미생물 수탁번호 KACC91831P)의 배양액은 인삼 내의 진세노사이드 Rg<sub>1</sub>을 Rd로 변환시키는 효과가 우수하다. 또한 이와 같은 효과를 이용하여 제조한 발효인삼 또는 이의 추출물은 MIP-1α (macrophage inflammatory protein-1α), IL-4(interleukin-4) 및 IL-13(interleukin-13)의 활성을 억제함으로써 아토피 피부염과 같은 각종 피부질환의 증세를 치료 또는 경감시키는 치료제로 용이하게 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0049] 도 1은 패니바실러스 속 MBT213 균주의 16s DNA 유전자의 염기서열(상단) 및 계통학적 위치를 나타내는 서식도(하단)이다.

도 2A는 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액에 온도별로 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>과 Rb<sub>2</sub>를 3일간 반응시킨 것의 TLC 분

석 결과를 나타낸다.

도 2B는 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액에 온도별로 진세노사이드 Re를 3일간 반응시킨 것의 TLC 분석 결과를 나타낸다.

도 2C는 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액에 온도별로 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 7일간 반응시킨 것의 TLC 분석 결과를 나타낸다.

도 2D는 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액에 pH별로 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 7일간 반응시킨 것의 TLC 분석 결과를 나타낸다.

도 2E는 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액에 최적 pH 7.0, 최적온도 30℃에서 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 14일간 반응시킨 것의 TLC 분석 결과를 나타낸다.

도 3은 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액으로 pH 7.0, 30℃, 14일 동안 Rb<sub>1</sub>을 반응시켜 분석한 HPLC 분석 스펙트럼을 나타낸다.

도 4는 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액으로 pH 7.0, 30℃, 14일 동안 발효한 발효인삼을 분석한 HPLC 분석 스펙트럼을 나타낸다.

도 5는 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물의 세포독성을 확인한 MTT 어세이 결과를 나타낸다.

도 6은 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물의 IL-13의 발현량을 확인한 ELISA 결과를 나타낸다.

도 7은 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물의 MIP-1 $\alpha$ 의 발현량을 확인한 ELISA 결과를 나타낸다.

도 8은 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물의 IL-13 mRNA 발현량을 확인한 real-time PCR 결과를 나타낸다.

도 9는 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 추출물의 IL-4 mRNA 발현량을 확인한 real-time PCR 결과를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0050] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0051] <실시예 1. 신규 미생물의 분리 및 동정>

[0052] EM 배양액(자연발효 배양물로 상온에서 2년 이상 다양한 식물체를 혼합하여 자연적으로 배양한 것)으로부터 BCP 한천배지(Bromo Cresol Purple-Deoxycholate-Citrate-Lactose-Sucrose Agar)를 이용하여 44종류의 미생물을 분리했다. 그 중에서 사포닌 분해능력을 가진  $\beta$ -글루코시다아제( $\beta$ -glucosidase) 활성을 가진 콜로니(colony)를 확인하기 위하여 에스컬린 한천배지(Esculin agar)에서 배양하고 검정색( $\beta$ -glucosidase 활성 양성 반응) 콜로니를 분리하였다. 사포닌 분해능력을 가진 균주는  $\beta$ -글루코시다아제(glucosidase)를 생성하는데, 에스컬린에  $\beta$ -글루코스(glucose)가 반응하여 생성된 에스컬레틴(esculetin)은 배지 내에서 페릭 암모늄 시트레이트(ferric ammonium citrate)와 반응하여 콜로니 주위에 검정색 환을 형성하게 된다.

[0053] 상기 에스컬린 한천배지에서 분리된 균주(콜로니)는 혐기성, 그람 양성, 운동성, 유포자 간균으로서, TS 액체배지를 이용하여 배양하였을 때, 생육가능한 온도는 25~40℃, 바람직하게는 30~37℃이고, 생육가능한 pH는 5.0~8.0, 바람직하게는 pH 6.0~7.5이었다. 상기 균주의 배양에 적절한 시간은 36~96시간, 바람직하게는 48~96시간, 가장 바람직하게는 48~72시간이었다.

[0054] 한편, 분리된 상기 균주의 DNA를 추출하여 16S DNA를 (주)솔젠트, 대전] 에서 분석했다. 상기 균주 DNA를 추출하고, 범용 프라이머(universal primer) (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 이용하여 PCR을 행하여 16S rDNA(16S rRNA 코딩 유전자)를 증폭하였다. 증폭조건은 96℃에서 2분간 반응한 다음 96℃

에서 denaturation 10초, 50℃에서 annealing 5초, 60℃에서 extension을 4분간 25회 반복하고, 60℃에서 2분간 최종 extension을 실시하였다. 증폭된 16S rDNA는 PCR 산물 정제 키트(Product Purification Kit, Qiagen)를 사용하여 정제한 후, Genetic analyzer 377(Perkin-Elmer)을 사용하여 유전 정보를 분석하였다. 16S rDNA의 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, 패니바실러스(*Paenibacillus*) 속을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 패니바실러스 속 Y412MC10(*Paenibacillus* sp. Y412MC10)의 16sDNA와 1450bp 중에서 1374bp가 동일하여 95%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었다(도 1 하단 참조). 따라서, 상기 균주는 패니바실러스 속 균주(*Paenibacillus* sp)로 동정되었고 패니바실러스 속 MBT213 균주(*Paenibacillus* sp. MBT213)로 명명하여 국립농업과학원 농업유전자원센터에 2013년 7월 18일 미생물 수탁번호 KACC91831P로 기탁하였다.

[0055] <실시예 2. 패니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 진세노사이드 전환 효과 확인>

[0056] 상기 패니바실러스 속 MBT213 균주는 TS 액체배지(trypticase soy broth, pH 7.3)에서 배양온도 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 7,500rpm에서 15분 원심분리하여, 상기 원심분리된 배양액(상층액, 균주 pellet 제외한 액상)을 이용하여 진세노사이드의 전환의 제조에 이용하였다.

[0057] 이 때, 진세노사이드의 전환을 위한 조건을 확인하기 위해서는 상기 원심분리된 배양액과 진세노사이드 0.2mg/ml의 Rb<sub>1</sub> 또는 Rb<sub>2</sub>를 1:1(v/v)의 비율로 혼합하고, 0.2µm filter로 여과한 후 pH 4.0~9.0, 30~40℃, 3~14일간 각 조건에 맞게 반응시켰다.

[0058] 반응이 끝난 시료는 TLC 및 HPLC를 이용하여 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>의 전환을 분석하였다. TLC 분석을 위해서는 TLC plate sheet(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Aluminium sheets)에 0.8cm 간격으로 각각 3µg을 집적한 후, 반응기 내에 정지하고 하층 반응액으로 클로로포름/메탄올/물(65:35:10, v/v)을 사용하여 5.5cm 전개하였다. 반응시킨 TLC plate에 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 분무하여 110℃에서 가열하여 발색시켰다. 상기 TLC 분석 결과는 도 2에 나타내었다.

[0059] 사용한 HPLC 장치는 Agilent Technologies 1260 infinity 이었으며, 컬럼은 ACE 5-C<sub>18</sub> 컬럼(250×4.6mm)를 사용하였다. 이동상으로 사용한 A 용매는 H<sub>2</sub>O, B 용매는 CH<sub>3</sub>CN을 사용하였다. 용매는 gradient elution system으로 0~35분(20% B), 35~85분(40%B), 85~105분(50%B), 105~135분(65% B), 135~145분(85% B), 145~155분(100% B), 155~160분(100% B), 160~163분(20% B), 163~165분(20% B)으로 조절하였다. 전개온도는 40℃이었고 유속은 1.0 ml/min이었으며, 검출기는 UV 205nm(Agilent Technologies 1260 infinity)를 사용하여 사포닌의 성분을 분석하였다.

[0060] 도 2A를 참고하면, 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액으로 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>과 Rb<sub>2</sub>를 각각 3일 동안 반응시킨 결과, 30, 35, 40℃의 반응온도에 따른 변화의 차이는 거의 없었고, 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>은 진세노사이드 Rd로 전환이 잘 되는 것으로 확인되었다. 진세노사이드 Rb<sub>2</sub>는 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>보다는 약하지만 일부가 진세노사이드 Rd로 전환이 되는 것을 알 수 있었다. 따라서 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액은 프로토포낙사디올 타입(protopanaxadiol type)의 진세노사이드를 분해하는 기능이 있는 것으로 확인되었다.

[0061] 도 2B를 참고하면, 패니바실러스 속 MBT213 배양액으로 진세노사이드 Re를 3일간 반응시킨 결과, 30, 35, 40℃에 반응 온도에 진세노사이드 Re의 변화는 없었다. 따라서 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액은 프로토포낙사트리올 타입(protopanaxatriol type)의 진세노사이드는 분해할 수 없는 것으로 나타났다.

[0062] 도 2C를 참고하면, 패니바실러스 속 MBT213 배양액으로 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 30, 35, 40℃의 조건에서 7일 동안 반응시킨 결과, 대부분의 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>이 거의 진세노사이드 Rd로 변화가 되었고, 온도는 증가할수록 남아 있는 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>의 밴드가 조금 진한 것으로 확인되었다. 따라서 패니바실러스 속 MBT213 배양액의 활성은 30℃에서 가장 높은 것을 알 수 있었다. 한편, 이번 실험 이전에 수행된 예비실험에서, 25℃에서는 5~10%의 진세노사이드가 변환되는 것으로 확인되었으며, 20℃와 45℃에서는 거의 진세노사이드의 변환이 되지 않는 것으로 확인되었다.

[0063] 한편, 도 2D를 참고하면, 진세노사이드의 전환에 효과적인 패니바실러스 속 MBT213 배양액의 최적 반응 pH를 알아보기 위해서 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0로 조절하여 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 30℃에 7일 동안 반응시킨 결과, pH 4.0은 거의 진세노사이드의 변환이 잘 되지 않았고, pH 5.0, 8.0, 9.0보다 pH 6.0과 7.0에서 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>이 Rd로 전환이 잘 되었다. 따라서 패니바실러스 속 MBT213 배양액이 작용하기 위한 최적 pH는 7.0으로

확인되었다. 한편, 이번 실험 이전에 수행된 예비실험에서, pH 10.0에서도 거의 진세노사이드의 변환이 되지 않는 것으로 확인되었다.

[0064] 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 도 2C 및 2D에서 확인된 최적 온도 30℃, 최적 pH 7.0로 조절하여 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 14일 동안 반응시킨 결과는 도 2E에 나타내다. 도 2E의 TLC 결과를 보면, 3, 7, 10, 14일로 반응기간이 길어질수록 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>에서 Rd로의 전환이 시간에 따라 확연하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 14일째는 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>이 Rd로 대부분 전환된 것으로 나타나 페니바실러스 속 MBT213은 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 진세노사이드 Rd로 전환하는 효과가 무척 우수한 것으로 확인되었다.

[0065] 한편, 도 3을 참고하면, 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 30℃, pH 7.0으로 조절하여 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>을 14일 동안 반응시킨 후 확인한 HPLC 결과는 TLC 결과와 유사한 패턴을 갖는 것으로 확인되었다. 0일째는 진세노사이드 Rb<sub>1</sub> peak가 보였고, 반응 3일째는 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>에서 진세노사이드 Rd가 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 반응 6, 10, 14일이 경과하면서 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>의 peak는 점점 줄어드는 반면에 진세노사이드 Rd의 peak가 점점 커지는 것을 확인할 수 있었다.

[0066] <실시에 3. 페니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 제조 및 진세노사이드 전환 효과 확인>

[0067] 다음으로는 페니바실러스 속 MBT213 균주 배양액을 이용하여 발효인삼을 제조한 후 인삼에서의 진세노사이드 전환 효과를 확인하였다. 너두를 제거한 6년근 인삼(수삼, 동체와 미삼 모두 포함)을 분쇄기를 이용하여 분쇄하고, 상기 분쇄된 인삼 100g에 물 400g을 첨가하였다. 물이 첨가된 상기 인삼 분쇄물을 75℃로 10분간 증탕으로 가열처리하고 30℃로 냉각시킨 후, 페니바실러스 속 MBT213 균주 배양액(TS 액체배지에서 30℃ 조건으로 72시간 배양) 15g을 접종하고 14일째까지 발효시켰다. 상기 페니바실러스 속 MBT213 균주 배양액은 진세노사이드 변환 실험과 달리, 원심분리하지 않고, 배양직후의 배양물을 바로 사용하였다.

[0068] HPLC 분석을 위해서는 상기 동일 인삼 분쇄물에 균주 배양액을 접종한 후 3, 7, 14일째에 각각의 발효일자의 발효인삼을 취하여 에탄올 처리를 하였다. 이 때, 각각의 발효인삼과 95% 에탄올 수용액을 1:4 중량비(총 20g)로 혼합한 후에 10,000×g에서 10분 원심분리한 후 상층액을 동결건조시켰다. 이 후, 상기 동결건조된 샘플을 증류수에 녹이고 부탄올 처리를 하였다. 부탄올 처리할 때도, 상기 물에 녹인 샘플과 수포화 부탄올 1:1(v/v) 비율로 혼합(총 2ml)하고, 부탄올 층을 추출하여 동결건조하여 최종적으로 얻은 샘플을 HPLC를 이용하여 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>에서 Rd로의 전환을 분석하였으며 이에 대한 결과는 도 4에 나타내었다. HPLC는 진세노사이드 전환 실험과 동일하게 하여 분석하였다.

[0069] 도 4의 HPLC 결과를 참고하면, 0일에는 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>의 peak(71분째의 peak)가 보였지만, 진세노사이드 Rd의 peak는 보이지 않았다(81분째의 peak). 그러나 발효기간이 지남에 따라 진세노사이드 Rd의 생성이 잘 진행되는 것으로 나타났고, 발효 14일째는 진세노사이드 Rb<sub>1</sub>의 peak는 줄어들었고, 진세노사이드 Rd의 peak는 크게 나타난 것으로 확인되었으며, 상기 진세노사이드 Rd 이외에도 새로운 여러 가지 peak가 생성되어, 발효를 통해 다양한 물질들이 새로 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 페니바실러스 속 MBT213 균주를 이용한 발효인삼의 진세노사이드 Rd의 함량은 0.25~0.85 중량%였다(수분함량 14%로 건조한 발효인삼을 총 100 중량%로 환산하여 얻은 값).

[0070] <실시에 4. 발효인삼 추출물, 인삼 추출물 및 홍삼추출물의 제조>

[0071] ① 실시예 3에서 제조한 14일째의 발효인삼을 수분 14%가 되도록 건조한 후, 물 10kg에 상기 발효인삼 건조물 1kg을 넣고 90℃에서 8시간 동안 추출한 후, 고형분을 제거한 여액을 동결건조하여 발효인삼 물 추출물을 제조하였다.

[0072] ② 또한, 상기 실시예 3에서 제조한 14일째의 발효인삼을 수분 14%가 되도록 건조하고, 100% 에탄올 4kg에 상기 발효인삼 건조물 1kg을 넣고 50℃에서 8시간 동안 추출한 후, 고형분을 제거한 여액을 감압증류하여 발효인삼 100% 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0073] ③ 발효인삼 물 추출물에 대한 비교군을 위해, 6년근 수삼을 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 수분 14%(w/w)가 되도록 건조하여, 상기 발효인삼 물 추출물의 제조와 동일한 방법을 이용하여 인삼 물 추출물을 제조하였다.

[0074] ④ 발효인삼 100% 에탄올 추출물에 대한 비교군을 위해, 6년근 수삼을 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 수분 14%(w/w)가 되도록 건조하여, 상기 발효인삼 100% 에탄올 추출물을 제조하는 것과 동일하게 인삼 에탄올 추출물

도 제조하였다.

[0075] ⑤ 또다른 비교군으로서, 상기 인삼 물 추출물과 인삼 100% 에탄올 추출물을 제조하는 것과 동일하게 홍삼을 이용하여 홍삼 물 추출물과 홍삼 100% 에탄올 추출물도 제조하였다.

[0076] <실시에 5. 발효인삼의 추출물의 아토피 치료 효과 확인>

[0077] 실시예 5-1. 발효인삼 추출물의 세포 독성 확인

[0078] MC/9 비만세포(MC/9 murine mast cell line, ATCC, USA)를 10% FBS(fetal bovine serum), 10% T-STIM, 0.05mM 2-mercaptoethanol, 2mM L-glutamine(Sigma-Aldrich, USA) 및 100 µg/ml streptomycin이 함유된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 맞추어 96웰 플레이트(96 well plate)에 분주하였다.

[0079] 세포 독성은 MTT 어세이를 약간 변형하여 실험에 사용하였으며, MC/9 비만세포는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양한 후 실시예 4에서 제조한 인삼 물 추출물(MBT-con)과 발효인삼 물 추출물(MBT213)을 최종 농도 400, 200, 100, 50, 25µg/ml로 하여 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10µl씩 각 웰(well)에 가하고 실험 종료시까지 배양하였으며 이 플레이트(plate)를 셰이커(plate shaker, Lab-Line, USA)에서 3.5스피드(speed)로 5분간 셰이킹(shaking)하고 ELISA 분석기(ELISA reader, Molecular devices, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정결과는 도 5에 나타내었다.

[0080] 도 5를 참고하면, 인삼 물 추출물과 발효인삼 물 추출물의 세포독성을 측정한 결과, 무처리군과 비교하여 25~400µg/ml의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.

[0081] 실시예 5-2. 발효인삼 추출물의 ELISA를 이용한 IL-13 및 MIP-1α의 감소 효과 확인

[0082] 실시예 4에서 제조한 인삼 물 추출물(MBT-con)과 발효인삼 물 추출물(MBT-213-14)이 비만세포에서 IL-13과 MIP-1α 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 비만세포에 사이클로스포린 A(Cyclosporin A, CsA)와 인삼 물 추출물(MBT-con, 100µg/ml)과 발효인삼 물 추출물(MBT-213-14, 100µg/ml)을 처리한 후 DNP-IgE(1µg/ml)로 자극한 뒤 24시간 후 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 MIP-1α 및 IL-13의 분비량을 측정하였다.

[0083] 이를 위해, 먼저 MC/9 세포를 48 웰 플레이트에 5×10<sup>5</sup>/ml로 1ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE(dinitrophenyl-IgE, 1µg/ml)로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였으며, 3시간 후 인삼 물 추출물(100µg/ml), 발효인삼 물 추출물(100µg/ml), 양성대조군으로 사이클로스포린 A(CsA, 10µg/ml)를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA(dinitrophenyl-bovine serum albumin, 0.5µg/ml)으로 자극한 뒤 16시간 후에 세포를 얻었다. 이 후, Mouse IL-13(eBioscience, USA), MIP-1α(eBioscience, USA) ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 항체를 마이크로플레이트(microplate)의 각각의 웰(well)에 100µl씩 분주하고 4℃에서 16시간 두었다. 16시간 반응 후에는, 각 웰(well)을 세척액(wash buffer)으로 세척하고 어세이 희석액(assay diluent)을 200µl씩 넣고 웰 입구를 밀봉하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 다음으로는 IL-13 및 MIP-1α의 표준품을 희석하고 상청액을 20배 희석한 후 마이크로플레이트를 세척하고 각 표준품과 상청액을 100µl씩 넣었으며 웰 입구를 밀봉하여 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이후에는 마이크로플레이트를 세척하고 working detector를 만들어서 각 웰에 100µl씩 넣고 1시간 동안 웰 입구를 밀봉하여 실온에서 반응시켰으며, 마이크로플레이트를 세척하고 기질 용액(substrate solution)을 만들어서 각 웰에 100µl씩 넣고 30분 동안 어두운 곳의 실온에서 반응시켰다. 마지막으로, stop solution을 각 웰에 50µl씩 넣고 마이크로플레이트 분석기(microplate spectrophotometer)에서 흡광도 450nm로 측정하였으며, IL-13에 관한 ELISA 결과값은 도 6에, MIP-1α에 대한 ELISA 결과값은 도 7에 나타내었다.

[0084] 도 6을 참고하면, MC/9 비만세포에서의 IL-13 분비는 무처리군(Only MC/9 cell)은 510.3±25.7(pg/ml)이었고, DNP-IgE를 처리한 대조군은 935.5±26.8(pg/ml)이었다. 양성대조군인 사이클로스포린 A(Cyclosporin A, CsA, 10µg/ml)는 IL-13 생산량이 596.7±25.0(pg/ml)으로 대조군에 비해 감소되었다. 인삼 물 추출물(MBT-con)과 발효인삼 물 추출물(MBT-213-14)을 처리한 군의 IL-13 분비는 100µg/ml에서 각각 874.9±18.0(pg/ml)과 654.2±29.4(pg/ml)이었다. 발효인삼 물 추출물은 양성대조군과 유사한 수준의 억제효과가 있기에, 인삼 물 추출물에 비해 발효인삼 물 추출물에서의 IL-13 분비량이 인삼 추출물에 비해 현저하게 억제되는 것으로 확인되었다.

[0085] 또한, 도 7을 참고하면, MC/9 비만세포에서 MIP-1α 분비량은 무처리군 (Only MC/9 cell)은 188.9±7.13(pg/ml)이었고, DNP-IgE를 처리한 대조군은 291.9±4.7(pg/ml)로 무처리군(Only MC/9 cell)에 비해

약 35.2% 이상 증가되었다. 양성대조군인 Cyclosporin A(CsA, 10 $\mu$ g/ml)는 MIP-1 $\alpha$  분비량이 203.6 $\pm$ 4.8(pg/ml)으로 대조군에 비해 감소되었다. 인삼 물 추출물(MBT-con)과 발효인삼 물 추출물(MBT-213-14)을 처리한 실험군의 MIP-1 $\alpha$  분비량은 100 $\mu$ g/ml에서는 각각 256.8 $\pm$ 6.06(pg/ml)과 210.6 $\pm$ 7.71(pg/ml)로 감소되었다. 역시 발효인삼 물 추출물은 양성대조군과 유사한 수준의 억제효과가 있기에, 발효인삼 물 추출물이 인삼 물 추출물에 비해 현저한 억제효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0086] 따라서, 상기 결과들을 통해 발효인삼 물 추출물이 인삼 물 추출물보다 아토피 치료 효과가 현저하게 우수할 것으로 예상되었다.

[0087] 한편, 상기 실험을 진행할 때, 발효인삼 100% 에탄올 추출물, 인삼 100% 에탄올 추출물, 홍삼 물 추출물, 홍삼 100% 에탄올 추출물에 대해서도 각각 100 $\mu$ g/ml 농도로 하여 MIP-1 $\alpha$  분비 억제 효과를 비교하였으며 이에 대한 결과는 표 1에 나타내었다.

[0088] 하기 표 1을 참고하면, DNP-IgE로 유도된 대조군에 대한 발효인삼 100% 에탄올 추출물의 MIP-1 $\alpha$  분비 억제 효과를 1.00으로 기준(각 결과값의 차이값)할 때, DNP-IgE로 유도된 대조군에 비교하여, 발효인삼 물 추출물에 비해 1.25배의 MIP-1 $\alpha$  분비 억제 효과가 있는 것으로 나타났으며, 인삼 에탄올 추출물, 홍삼의 물 또는 에탄올 추출물은 인삼 물 추출물과 그 효과가 비슷하였다.

표 1

조건	MIP-1 $\alpha$ 분비 억제 효과 (fold)
발효인삼 물 추출물	1.00
발효인삼 100% 에탄올 추출물	1.25
인삼 100% 에탄올 추출물	0.45
홍삼 물 추출물	0.51
홍삼 100% 에탄올 추출물	0.59

[0090] 실시예 5-3. 발효인삼 추출물의 real-time PCR을 이용한 IL-4 및 IL-13의 감소 효과 확인

[0091] 실시예 4에서 제조한 인삼 물 추출물(MBT-con)과 발효인삼 물 추출물(MBT-213-14)이 비만세포에서 IL-4 및 IL-13 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 세포에 사이클로스포린 A(CsA, 10 $\mu$ g/ml), 인삼 물 추출물(MBT-con, 100 $\mu$ g/ml)과 발효인삼 물 추출물(MBT-213-14, 100 $\mu$ g/ml)을 처리한 후 DNP-IgE(1 $\mu$ g/ml)으로 자극한 뒤 6시간 후 real-time PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction)로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다.

[0092] 이를 위해 먼저 총RNA를 추출하였다. MC/9 세포를 48-well plate에 5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml로 1ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE(1 $\mu$ g/ml)로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 3시간 후 인삼 물 추출물 및 발효인삼 물 추출물(100 $\mu$ g/ml)와 양성대조군으로 사이클로스포린 A(CsA, 10 $\mu$ g/ml)를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA(0.5 $\mu$ g/ml)으로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻었다. 그 세포에 Trizol(Ambion, USA) 시약을 1ml 넣고 e-tube(ependorf tube)에 넣은 후 클로로포름(Sigma Co.)을 100 $\mu$ l 넣었다. 클로로포름 처리된 세포 용출물의 e-tube를 얼음에 17분 동안 둔 후, 이를 13,000rpm으로 15분 동안 원심분리하여 층이 분리되면 새로운 e-tube에 상청액을 옮겨 담고, 상기 e-tube에 상청액과 동량으로 이소프로판올(Sigma, USA)을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 이때 상청액은 버리고 e-tube 내의 총RNA pellet을 80% 에탄올 수용액(Sigma USA)으로 세척한 후, 13000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상청액을 완전히 제거하고 RNA pellet이 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water (Invitrogen, USA)를 총RNA pellet의 양에 따라 10-30 $\mu$ l를 넣어 녹여, 최종적으로 총RNA를 얻었다.

[0093] 다음으로는 상기 총RNA 3 $\mu$ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 상기 총RNA에 2.5 $\mu$ l 10mM dNTPs mix와 1 $\mu$ l random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 $\mu$ l) 및 RNA inhibitor로서 1 $\mu$ l RNase inhibitor(20 U/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l 100mM DTT, 4.5 $\mu$ l 5x RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 $\mu$ l의 M-MLV RT(reverse transcriptase, 200 U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수를 가해 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20 $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하고, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

[0094] real-time PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였으며, 사용된 primer와 probe는 표 2에 게시하였다.

표 2

Target gene	Primer	Sequences
IL-4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5'-GTGTTCCCTTGTGCCGTAAG-3'
IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA-3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCTTT-3'
GAPDH-VIC	Probe	5'-CATGTTCCAGTATGACTCCACTCAG-3
mouse GAPDH probe set : Endogenous Control (VIC/ MGB Probe, Probe limited) from Applied Biosystems (4352339E)		

[0096] 유전자 발현은 Taqman PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard를 GAPDH(GAPDH-VIC)를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200nM이 되게 반응시켰다. real time PCR의 조건은 pre-denaturation을 50℃에서 2분, 94℃에서 10분, 그리고 40사이클(cycles)을 95℃에서 0.15분, 60℃에서 1분씩 수행하였으며 Target group의 RQ(relative quantitative)는 Quantitative PCR로 다음과 같이 측정하였으며, IL-13의 mRNA 발현량은 도 8, IL-4의 mRNA 발현량은 도 9에 나타내었다.

[0097]  $y = x(1+e)^n$

[0098] x : starting quantity

[0099] y : yield

[0100] n : number of cycles

[0101] e : efficiency

[0102] 도 8을 참고하면, IL-13 mRNA 유전자 발현은 무처리군(Only MC/9 cell)은 각각  $0.261 \pm 0.040$ 이었고, DNP-IgE로 자극한 대조군은  $0.994 \pm 0.007$ 으로 무처리군(Only MC/9 cell)에 비하여 약 73.7% 이상 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군인 사이클로스포린 A(CsA) 처리군은 각각  $0.341 \pm 0.080$ 로 대조군에 비하여 약 65.7% 이상 감소되었다. 인삼 물 추출물(MBT-con)과 발효인삼 물 추출물(MBT-213-14)을 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 각각 약 30.8%, 59.3% 감소되었다. 발효인삼 물 추출물은 양성대조군과 유사한 수준의 억제효과가 있기에, 발효인삼 물 추출물의 IL-13 mRNA 유전자 발현 억제 효과가 인삼 물 추출물보다 훨씬 더 우수함을 확인할 수 있었다.

[0103] 도 9를 참고하면, IL-4 mRNA 유전자 발현은 무처리군(Only MC/9 cell)은 각각  $0.176 \pm 0.013$ 이었고, DNP-IgE로 자극한 대조군은  $0.988 \pm 0.013$ 으로 무처리군(Only MC/9 cell)에 비하여 현저하게 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군인 사이클로스포린 A(CsA) 처리군은 각각  $0.214 \pm 0.023$ 로 대조군에 비하여 약 78.3% 이상 감소되었다. 인삼 물 추출물(MBT-con)과 발효인삼 물 추출물(MBT-213-14)을 처리 후 DNP-IgE로 자극하였을 경우의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 각각 33.9%와 73.6% 감소하였다. 발효인삼 물 추출물은 양성대조군과 유사한 수준의 억제효과가 있기에, 역시 발효인삼 물 추출물의 IL-4 mRNA 유전자 발현 억제 효과가 인삼 추출물에 비해 훨씬 더 우수함을 확인할 수 있었다. 따라서, 상기 결과들을 통해 발효인삼 물 추출물이 인삼 물 추출물보다 아토피 치료 효과가 현저하게 우수할 것으로 예상되었다.

[0104] 한편, 상기 실험을 진행할 때, 발효인삼 100% 에탄올 추출물, 인삼 100% 에탄올 추출물, 홍삼 물 추출물, 홍삼 100% 에탄올 추출물에 대해서도 각각  $100 \mu\text{g/ml}$  농도로 하여 IL-4 mRNA 억제 효과를 비교하였으며 이에 대한 결과는 표 3에 나타내었다. 하기 표 3을 참고하면, DNP-IgE로 유도된 대조군에 비교한 발효인삼 물 추출물의 IL-4 mRNA 억제 효과를 1.00으로 기준(각 결과값의 차이값)할 때, DNP-IgE로 유도된 대조군에 비교하여, 발효인삼 100% 에탄올 추출물의 효과는 1.12배의 IL-4 mRNA 억제 효과가 있는 것으로 나타났으며, 인삼 에탄올 추출물, 홍삼의 물 또는 에탄올 추출물은 인삼 물 추출물과 그 효과가 비슷하였다.

표 3

[0105]

조건	IL-4 mRNA 억제 효과 (fold)
발효인삼 물 추출물	1.00
발효인삼 100% 에탄올 추출물	1.12
인삼 100% 에탄올 추출물	0.49
홍삼 물 추출물	0.55
홍삼 100% 에탄올 추출물	0.59

[0106]

<실시에 6. 독성실험>

[0107]

실시에 6-1. 급성독성

[0108]

본 발명의 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물)을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 20마리를 대조군과 실험군에 각각 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 PEG-400/tween-80/에탄올(8/1/1, v/v/v)만을 투여하고, 실험군은 본 발명의 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물을 상기 PEG-400/tween-80/에탄올(8/1/1, v/v/v)에 녹여 각각 경구 투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 2g/kg/day 농도의 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물을 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.

[0109]

실시에 6-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험

[0110]

장기 독성 실험은 본 발명의 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물)을 각 농도로 8주 동안 C57BL/6J 마우스(각 군당 10마리)에 투여하여 실험하였다. 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 발명의 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물을 투여한 실험군과 PEG-400/tween-80/에탄올(8/1/1, v/v/v)만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 모든 조직에서 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0111]

<제제예 1. 약학적 제제>

[0112]

1-1. 정제의 제조

[0113]

본 발명의 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물) 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0114]

1-2. 주사액제의 제조

[0115]

본 발명의 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물) 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0116]

<제제예 2. 식품 제조>

[0117]

2-1. 조리용 양념의 제조

[0118]

본 발명의 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물)을 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0119]

2-2. 밀가루 식품의 제조

[0120]

본 발명의 페니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물)을 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품

을 제조하였다.

[0121] **2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0122] 본 발명의 패니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물)을 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 스프 및 육즙을 제조하였다.

[0123] **2-4. 유제품(dairy products)의 제조**

[0124] 본 발명의 패니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물)을 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0125] **2-5. 야채주스 제조**

[0126] 본 발명의 패니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물) 0.5g을 토마토 주스 또는 당근주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0127] **2-6. 과일주스 제조**

[0128] 본 발명의 패니바실러스 속 MBT213 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(물 추출물의 동결건조물) 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

**수탁번호**

[0129]

기탁기관명 : 국립농업과학원 농업유전자원센터

수탁번호 : KACC91831P

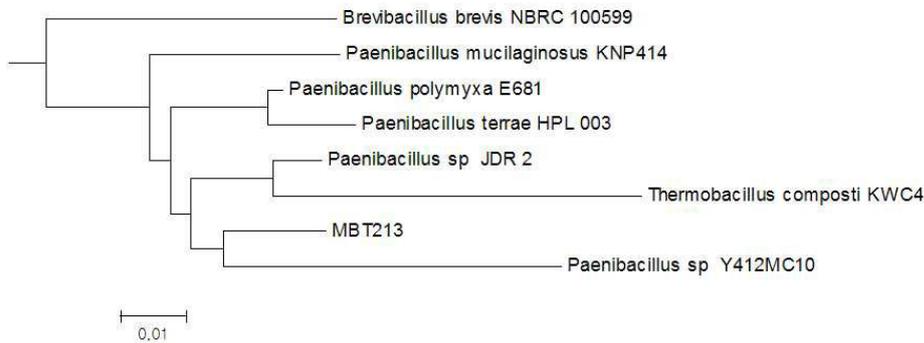
수탁일자 : 20130627

도면

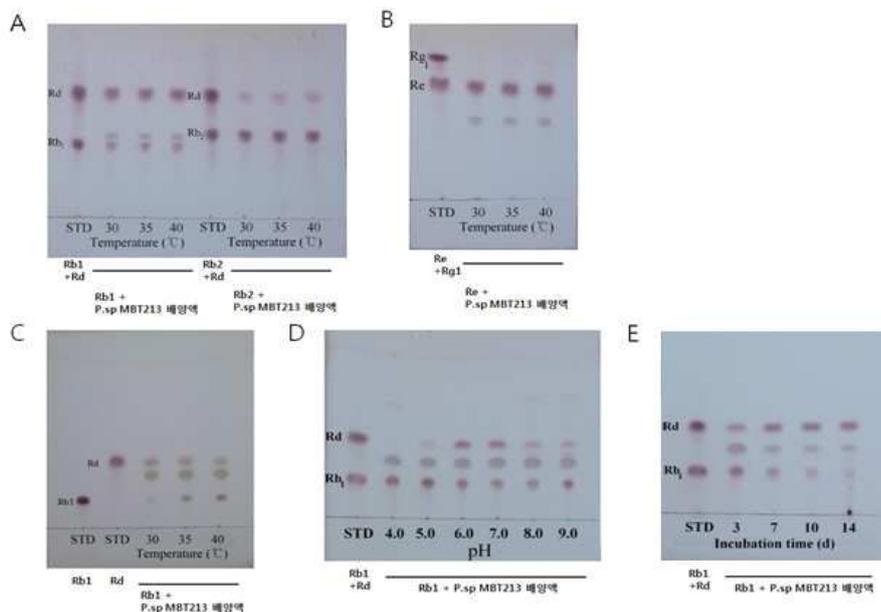
도면1

```

1   TCTACCCACC TTCGGCGGCT GGTCCTTGC GGTTACCTCA CCGACTTCGG GTGTTGTAAA CTCTCGTGGT
71  GTGACGGGCG GTGTGTACAA GACCCGGGAA CGTATTCACC GCGGCATGCT GATCCGCGAT TACTAGCAAT
141 TCCGACTTCA TGCAGGCAG TTGCAGCCTG CAATCCGAAC TGAGACTGGC TTTTTAGGAT TCGTCCATC
211 TCGCGACTTC GCTTCCCCTT GTACCAGCCA TTGTAGTACG TGTGTAGCCC AGGTCATAAG GGGCATGATG
281 ATTTGACGTC ATCCCCGCTT TCCTCCGGTT TGTACCAGGC AGTCATTCTA GAGTGCCAC CTTTATGTGC
351 TGGCAACTAA AATCAAGGGT TCGCTCGTT GCGGGACTTA ACCCAACATC TCACGACACG AGCTGACGAC
421 AACCATGCAC CACCTGTCTC CTCTGTCCCG AAGGAAAAGA TACATCTCTG TACCGGTGAG AGGGATGTCA
491 AGACCTGGTA AGGTTCTTCG CGTTGCTTCG AATTAACA CA TACTCCAC TGCTTGTGCG GGTCGCCGTC
561 AATTCCCTTG AGTTTCAGTC TTGCGACCGT ACTCCCCAGG CCGAATGCTT AATGTGTAA CTTCCGCACC
631 AAGGGTATCG AAACCCCTAA CACCTAGCAT TCATCGTTA CCGCGTGGAC TACCAGGTA TCTAATCCTG
701 TTTGCTCCCC ACGCTTTGCG GCCTCAGCGT CAGTTACAGC CCAGAGATGC GCCTTCGCCA CTGGTGTCC
771 TCCACATCTC TACGATTTT ACCGCTACAC GTGGAATTC ACTCTCCTCT TCTGCACTCA AGTACCCAG
841 TTTCCAATGC GACCTAAGGT TGAGCTCAG GATTAACAT CAGACTTAAA TAGCCGCTG CCGCGCTTT
911 ACGCCAATA ATTCGGACA ACGCTTGCCC CCTACGATT ACCGCGGCTG CTGGCAGTA GTTAGCCGGG
981 GCTTTTCTTC TCAGGTACC TCACCTCCGT AGCAGTTACT CTACCGAACG TTCTTCCCTG GCAACAGAGC
1051 TTTACGATCC GAAAACCTTC ATCACTCAGC CCGCGTTGCT CCGTCAGACT TTCGTCCATT GCGGAAGATT
1121 CCCTACTGCT GCCTCCGTA GGAGTCTGG CCGTGTCTCA GTCCAGTGT GGCCGTTAC CCTCTCAGGT
1191 CCGCTACGCA TCGTCCGCTT GGTAGCCGT TACCCACCA ACTAGCTAAT GCGCCGAGG TCCATCTGCA
1261 AGTGACAGAT TGCTCCGCTT TTCATTACTT CCCCATGCGA GAAAATAAAT TATCCGGTAT TAGCTAACGT
1331 TTCCGCTAGT TATCCAGTC TTACAGGCG GTACCTACG TGTACTCAC CCGTCCGCG CTAACCCCTC
1401 TGGAGAGCAA GCTCTCCATC AAGTCCGCTC GACTGCATGT ATAGCNCGC
    
```

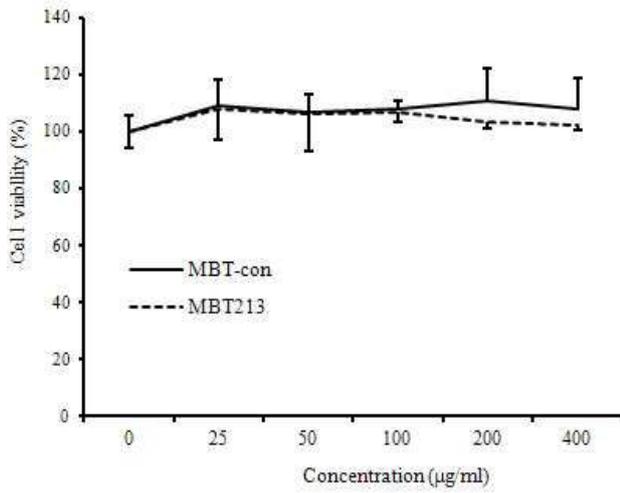


도면2

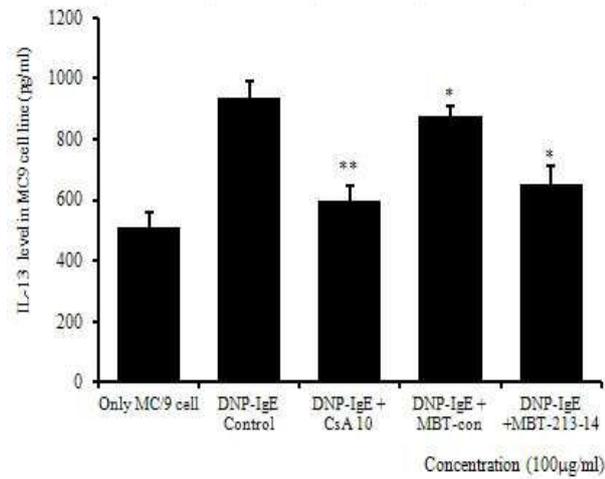




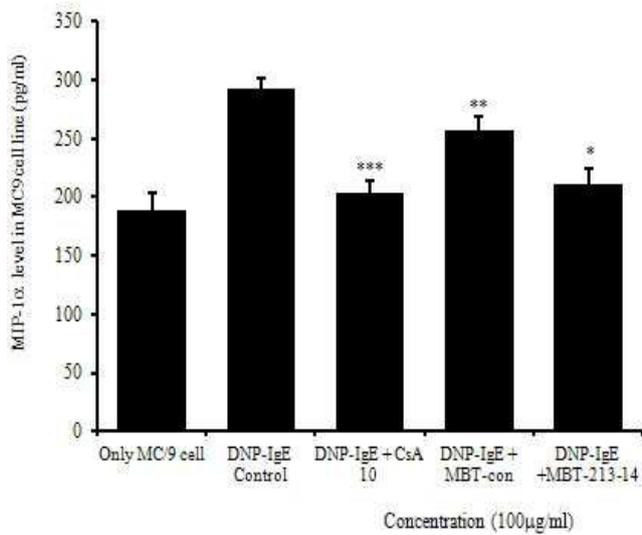
도면5



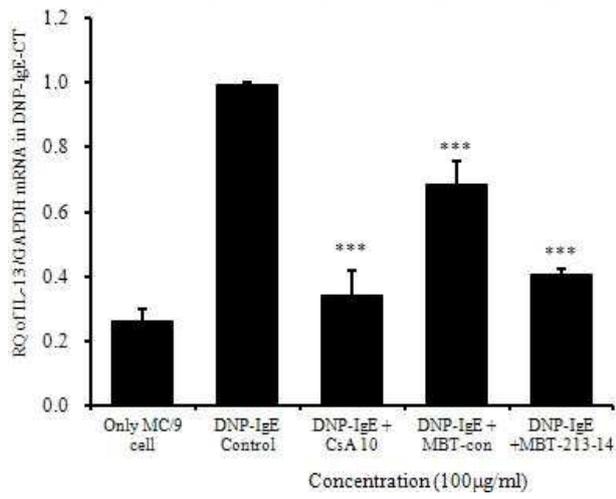
도면6



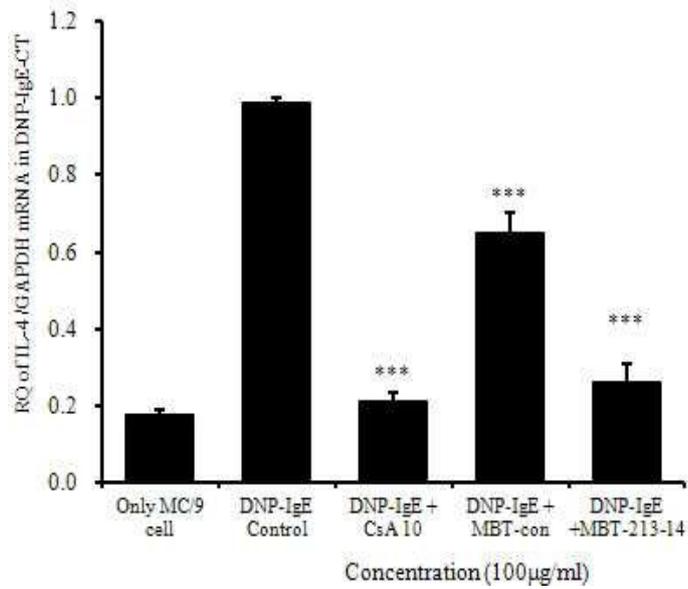
도면7



도면8



도면9



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)