

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( ), 비공개( O ) 발간등록번호( O )

## 고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003045-01

# 소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 식품소재 및 제품 개발 최종보고서

2020. 3. 27.

주관연구기관 / 서울우유협동조합  
협동연구기관 / 삼성서울병원  
협동연구기관 / 경희대학교

농 립 축 산 식 품 부  
농림식품기술기획평가원

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오텍스 식품소재 및 제품 개발” (개발기간 : 2017. 6. 15 ~ 2019. 12. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 03. 18.

주관연구기관명 : 서울우유협동조합 (대표자) 문진섭 (인)

협동연구기관명 : 삼성서울병원 (대표자) 권오정 (인)

협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 이범석 (인)

주관연구책임자 : 서울우유협동조합 강신호

협동연구책임자 : 삼성서울병원 최연호

협동연구책임자 : 경희대학교 이주훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117069-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017. 6. 15 ~ 2019. 12. 31	단 계 구 분	(해당단계)/ <u>(총 단계)</u>
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 식품소재 및 제품 개발			
	세부 과제명	주관 : 소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 식품소재 및 제품 개발 제1협동 : 메타게놈 분석을 활용한 소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 효과 검증 제2협동 : 소아 청소년 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 효과 검증			
연구책임자	강신호	해당단계 참여연구원 수	총: 37명 내부: 37명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 540,000천원 민간: 540,000천원 계: 1,080,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 37명 내부: 37명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 540,000천원 민간: 540,000천원 계: 1,080,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울우유협동조합			참여기업명	서울우유협동조합
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 숙명여자대학교			연구책임자: 윤요한	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안등급 일반 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		10-1 7836 72									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱 스 식품소재 및 제품 개발	보고서 면수 112p
---	----------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 자생 식물농산자원인 꾸지뽕잎 추출물을 사용한 천연물 유래 폴리페놀 프리바이오틱스의 개발</li> <li>○ 숙주의 장 내에서 폴리페놀 프리바이오틱스의 활용도가 높은 한국인 유아분변유래 토종 유산균인 <i>Lactobacillus gasseri</i> 505 신규 프로바이오틱스 소재 개발</li> <li>○ 천연물 유래 폴리페놀 프리바이오틱스 및 토종프로바이오틱스 <i>L.gasseri</i> 505의 상보적 상승작용에 의한 신바이오틱스 소재의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 효과 검증</li> <li>○ 인체적용시험(human research)을 통한 국내 농산자원 및 토종 생물자원을 융합한 first in class 개념의 세계선도형 식품핵심소재 개발</li> <li>○ 신바이오틱스 식품 핵심 신소재를 이용한 기능성 유제품 (분말 제제 1종 및 발효유 1종)의 개발</li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신바이오틱스 식품 핵심 신소재를 이용한 기능성 유제품 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연물 유래 폴리페놀 프리바이오틱스 개발</li> <li>- 한국인 유아분변유래 <i>L. gasseri</i> 505 프로바이오틱스 소재 개발</li> <li>- 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 기능성을 가진 신바이오틱스(폴리페놀 프리바이오틱스, <i>L. gasseri</i> 505) 소재 개발</li> <li>- 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 기능성을 가진 신바이오틱스 분말제제 1종 및 발효유 1종의 시제품 생산 완료</li> </ul> </li> <li>○ 신바이오틱스의 염증성 장 질환 개선 작용기작 규명             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 염증성 장 질환 완화 기능성 검증을 위한 동물 모델 및 검증 시스템 확립</li> <li>- 동물 및 인체의 장내균총 메타게놈 분석을 통한 염증성 장 질환, 장내균총, 신바이오틱스의 상관관계 규명</li> </ul> </li> <li>○ 연구결과의 홍보             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내전문학술지에 논문 게재(SCI급 1건, 비SCI급 1건)</li> <li>- 국내외 학회 발표(7건)</li> <li>- 수상실적(1건)</li> <li>- 국내특허 등록(1건) 및 출원(2건)</li> <li>- 기술이전(1건) 및 제품화(2건)</li> <li>- 국내 행사 홍보 (1건)</li> <li>- 인력양성(2명) 및 고용창출(1명)</li> </ul> </li> </ul>
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술적 측면             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 농생물 자원 유래 프리바이오틱스 소재들의 평가 시스템 표준화 기술의 확립</li> <li>- 농생물 자원 유래의 신바이오틱스 소재를 건강기능성 식품소재로서 산업화하여 최근 발생하고 있는 장 기능 관련 각종 대사질환 및 대장암 발생을 예방적 차원에서 방지하여 사회적 의료비용의 절대적 감소</li> </ul> </li> <li>○ 경제.산업적 측면             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 자생 농생물 자원 유래 건강기능성 소재(꾸지뽕 잎 및 <i>L. gasseri</i> 505)를 발굴 및 개발하고 염증성 장 질환 및 장내균총 개선</li> </ul> </li> </ul>

	<p>기능성을 검증함으로써 국내 농산물 자원의 우수성을 증명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 농가, 대학 및 사업단의 협력을 통한 체계적 연구 개발 프로세스를 확립하고 고부가가치 식품 소재를 활용한 사업화 및 융합 연구개발 체계 구축</li> <li>- 국내 농산물 기반 프리바이오틱스 식품소재의 효용성을 증대시켜 대상농산물 생산 관련 고부가가치 사업화 계획</li> <li>- 기존의 건강기능식품과 개념적으로 차별화된 장 건강 기능성 프리미엄 식품 시장 창출</li> <li>- 농산물 자원 유래 신바이오틱스를 건강기능성 식품 소재로 사업화할 수 있는 기반을 마련하고 관련한 원천 특허를 보유한 선진국으로 도약하여 세계시장 진출 및 선진국 장벽 진입</li> <li>- 천연물 유래 프리바이오틱스 응용 기술과 기존의 프로바이오틱스 및 식품 제조 기술과의 융합을 통해 우리나라 소재 산업 및 장 기능 개선용 식품 산업을 세계 시장을 선도할 수 있는 글로벌 산업으로 발전</li> </ul>				
국문핵심어 (5개 이내)	꾸지뽕잎	락토바실러스 가세리	신바이오틱스	염증성 장 질환	장내균총
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Cudrania tricuspidata</i> leaf	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Synbiotics	Inflammatory Bowel Disease	Gut microbiota

# 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	7
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	23
2-1. 연구내용 .....	23
2-1-1. 소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 식품소재 및 제품 개발 .....	23
2-1-2. 소아 청소년 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 효과 검증 .....	64
2-1-3. 메타게놈 분석을 활용한 소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장 내균총 개선 효과 검증 .....	71
2-2. 연구개발 성과 .....	101
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	104
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	108
붙임. 참고 문헌 .....	110

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 국내 자생 식물농산자원인 꾸지뽕잎 추출물을 사용한 천연물 유래 폴리페놀 프리바이오틱스의 개발
- 숙주의 장 내에서 폴리페놀 프리바이오틱스의 활용도가 높은 한국인 유아분변유래 토종 유산균인 *Lactobacillus gasseri* 505 신규 프로바이오틱스 소재 개발
- 천연물 유래 폴리페놀 프리바이오틱스 및 토종프로바이오틱스 *L.gasseri* 505의 상보적 상승작용에 의한 신바이오틱스 소재의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 효과 검증
- 인체적용시험(human research)을 통한 국내 농산자원 및 토종 생물자원을 융합한 first in class 개념의 세계선도형 식품핵심소재 개발
- 신바이오틱스 식품 핵심 신소재를 이용한 기능성 유제품 개발(분말 체제 1종 및 발효유 1종)



그림 1. 천연물 유래 신바이오틱스 소재의 청소년 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 효과

## 1-2. 연구개발의 필요성

### 가. 천연물 유래 신바이오틱스 소재 개발의 필요성

- 천연물을 이용한 건강식품에 대한 관심과 소비가 급증하는 시점에서 보다 안전하고 효능이 우수한 기능성 식품소재의 개발이 절실히 요구되고 있음. 우리나라는 전통적으로 천연물을 이용한 발효식품을 섭취해 왔으며 이를 통해 생명 및 건강을 유지해옴. 따라서 천연물 식품소재 및 이를 이용한 장기능 개선용 프리바이오틱스를 개발하기 위하여 지역 농산물 천연물식품소재에 대한 프리바이오틱스 가능성을 탐색하고, 선별된 천연물 식품소재를 인체 유래 기능성 프로바이오틱스를 이용하여 발효시키고, 발효물에 대한 신바이오틱스의 기능을 평가하고자 함.



- 프로바이오틱스(Probiotics)는 사람이나 동물에게 건조세포나 발효산물의 형태로 투여하여 숙주의 장내균총을 개선하여 좋은 영향을 주는 단일 또는 복합형태의 생균제를 의미함. 이러한 프로바이오틱스는 구체적으로 세 가지의 카테고리로 구분되어지는데, 첫째는 인체의 치료를 목적으로 하는 정장제(整腸劑), 둘째는 사료첨가제로서의 생균제(生菌劑) 그리고 셋째는 식품으로서의 유산균식품으로 나뉘질 수 있음. 최근 30년간 프로바이오틱스에 대한 국제 SCI(E)논문 publication을 조사한 결과 2000년 이후 급격하게 증가하기 시작하였으며 2010년부터는 매년 2000건 이상의 연구논문이 보고되는 등 프로바이오틱스에 대한 관심은 지속적으로 증대되고 있음.
- 프리바이오틱스(Prebiotics)는 장내에 서식하고 있는 미생물들의 성장과 활력에 선택적으로 작용하여 숙주에게 유익한 영향을 주는 비소화성 식품 성분들을 총칭하는 물질로서 생균제의 기질로 작용하여 궁극적으로는 숙주의 건강을 향상시키는 기능을 발휘함. 최근까지 보고된 프리바이오틱스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌, 펙틴 등의 식이섬유와 비소화성 당류(non-digestible carbohydrate)인 oligosaccharide (fructooligo-, galactooligo-, maltooligo-, inulooligo-)들이며, 이들은 특정균주의 선택적인 성장을 촉진하여 장관 내 미생물 균총의 성장과 증식에 관여함.
- 프리바이오틱스는 주로 비소화성 당류들을 포함하지만 이는 유익균 뿐만 아니라 non-probiotic bacteria(식중독 병원균 포함)에도 영향을 줄 수 있기 때문에 최근에는 프리바이오틱스의 개념이 좀 더 광범위한 의미로 발전되고 있는 실정임. 최근 폴리페놀과 같은 비탄수화물(non-carbohydrate) 물질들도 장내 유익균들의 성장을 촉진하는 동시에 유해균들의 성장을 억제한다는 임상 연구 결과가 보고되고 있으며, 이러한 연구동향에 맞추어 본 연구진은 천연물 유래 프리바이오틱스 소재를 발굴할 수 있는 시스템을 구축하였 음.
- 기본적으로 프리바이오틱스는 프로바이오틱스의 장내 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 식이 내 신바이오틱스 체제를 첨가한 후 쥐에게 투여하여 분변을 관찰한 연구의 결과, 비피더스균과 락토바실러스균 등 유용 균주의 균수가 상당 부분 증가한 형태를 보였고 이를 통해 신바이오틱스의 장내 균총의 개선 효과를 확인할 수 있었음. 또한, 염증성 장 질환의 경우에도 특정 프리바이오틱스를 대사할 수 있는 프로바이오틱스를 처리한 결과 염증성 사이토카인의 감소 효과를 확인할 수 있었음. 이와 같이 신바이오틱스에 대한 활발한 연구가 진행되고 있는 상황이며 다양한 질병에 있어서 신바이오틱스의 접근이 이루어지고 있는 실정임.
- 하지만, 아직까지 신바이오틱스 연구의 많은 부분은 비소화성의 oligosaccharide을 활용한 것이며 비탄수화물 계열의 프리바이오틱스와 프로바이오틱스의 시너지 효과를 평가한 연구는 거의 전무한 실정임. 따라서 국내의 다양한 천연식품소재를 대상으로 비탄수화물 프리바이오틱스 소재를 개발하고 이를 이용하는 프로바이오틱스에 대한 연구가 시급한 것으로 판단됨.

나. 신바이오틱스와 장 면역능

- 프로바이오틱스, 프리바이오틱스 및 신바이오틱스의 역할은 장내에 존재하는 미생물의 균형을 조절함과 동시에 병원성 미생물의 증식이나 체내 침입을 억제하는 작용을 하며, 특히 숙주의 면역 기능(선천성 및 후천성)을 조절하는 것임(그림 2).

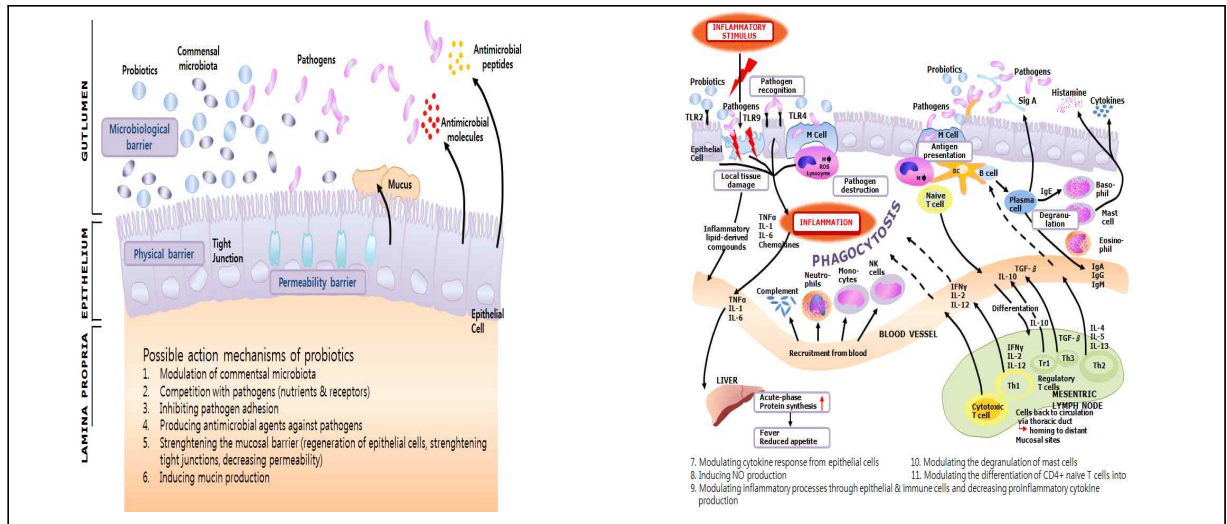


그림 2. Probiotics의 작용기전 (Kekkonen, R. 2008. Immuno-modulatory effects of probiotic bacteria in healthy adults. Ph.D thesis. University of Helsinki)

- 장 기능을 저하시키는 가장 대표적인 질환인 염증성 장 질환(Inflammatory Bowel Disease; IBD)은 소화관을 침범하는 원인 미상의 만성 염증성 질환에 대해 일반적으로 일컫는 용어로 만성 비 특이적 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 크론병(Crohn's disease)으로 나눌 수 있음.
- **크론병**은 소장이나 대장에 염증을 일으키는 질환 중 장결핵, 이질처럼 원인이 알려진 것을 제외하고, 아직 원인이 밝혀지지 않은 특발성 염증성 장 질환을 말함. 이 질환은 **15세에서 30세의 비교적 젊은 층에 호발하며, 전체적으로 볼 때 점차 증가하는 추세인데 이것은 식생활의 서구화, 특히 장 기능 및 면역작용과 관계가 있을 것으로 추정됨.**
- 현재 면역반응에 대한 결과로 나타나는 다양한 염증성 장 질환의 치료 및 예방법은 주로 항염증제의 사용에 의존하고 있으며, 그 밖에도 부신피질 호르몬제, 면역억제제, 항생제 및 항산화제 등이 사용되고 있음. 현재 항염증 소재로 사용되고 있는 주된 약물인 스테로이드계와 비스테로이드계 약물은 높은 비용과 더불어 백내장, 녹내장, 면역력 저하, 위장장애 등 심각한 부작용이 문제시 되고 있음 (표 1).

표 1. 염증성 장 질환 치료제

분류	성분	부작용
항염증제	메살라진, 설파살라진	복부허실, 두통, 피진, 간질환, 남성불임
부신피질 호르몬제	프레드니솔론, 부대소나이드	부신피질 부전증, 소화성 궤양, 당뇨병, 정신장애
면역억제제	아자치오프린, 사이클로스포린	효과 불분명 및 발암 우려
항생제	메트로니다졸, 시프로플록사신	효능은 인정되나 임상적 향상에 대한 효과는 불분명
항산화제	알로푸리놀, 디메틸설폭사이드	급성과민증상, 통증 등

- 이러한 항염증 치료제의 부작용을 완화하고 비용을 경감하기 위해서는 기능성 식품 소재의 꾸준한 섭취를 통하여 증상을 완화하는 것이 필요하며, 체내에서 안전하다고 알려진 프로바이오틱스 및 국내 자생 농산물 자원 유래 프리바이오틱스 소재를 적용함으로써 면역과 관련된 염증성 장 질환을 완화하는데 도움이 될 것으로 기대됨.
- 장 건강은 성별, 연령에 상관없이 건강을 유지하는 데 필수적인 요소임. 염증성 장 질환은 만성 질환 중 하나로 생명을 위협할 수 있는 중한 질환은 아니지만 평생에 걸쳐 증상들이 반복되고 악화되기 때문에 일상생활에 큰 어려움을 주며 계속되는 의료비의 지출로 삶의 질을 크게 떨어뜨리는 질환임. 따라서 적절한 치료와 예방을 통해 증상을 호전시키고 삶의 질을 개선시키는 것이 매우 중요함.

다. 장내균총(Gut microbiota)과 식품의 관련성 연구의 중요성

- 장내균총이란 인간의 장에 존재하는 전체 미생물 집단을 의미함. 인간의 장은 광범위한 다량의 미생물이 군집을 이루고 있으며, 이들 미생물은 인체의 대사기능 및 면역 항상성을 조절하고, 다양한 생리반응에 핵심으로 작용하는 등 숙주인 인간에게 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있음.
- 현재 gut microbiome으로 알려진 장내균총의 유전체에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며, 이 연구들의 결과는 장내균총의 유전체가 면역 연관성의 복잡한 질병에 중요한 영향을 미친다는 사실과 질병 성향과의 인과관계를 뒷받침할 수 있는 중요한 증거로 제시되고 있음.
- 장내균총의 기본 기능은 외부에서 침입한 병원성 미생물의 서식을 방해하고 체내에 존재하는 병원성 미생물의 과도한 증식을 억제하는데 있지만, 장내균총과 에너지 대사, 비만, 당 조절, 신경발달 등의 관련성이 연구됨에 따라 인간의 장내균총과 관련된 분야는 많은 관심을 받고 있는 상황임.
- 이러한 장내균총의 형성은 환경적으로 어떠한 삶을 살고 있는지, 어떠한 유전자를 갖고 있

는지, 질병이나 질환에 따라 다양하게 나타나지만 무엇보다 그 사람의 식습관과 식품 내 존재하는 미생물의 종류 등에 따라 개인별로 매우 다양함.

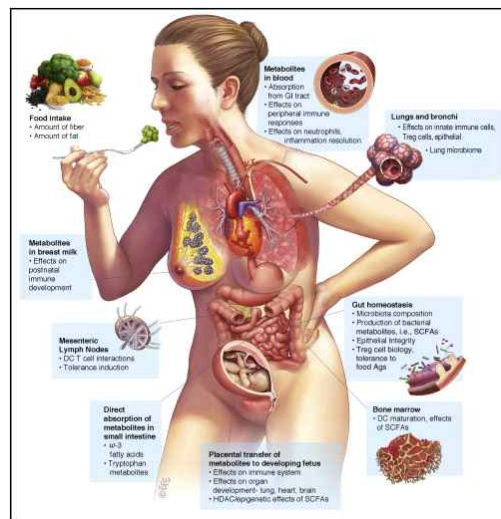


그림 3. 식이방법에 의한 장내 미생물 변화 및 그에 따른 질환과의 관계 (Alison et al. 2014)

- 장내균총과 숙주와의 공생적 관계와 장내균총이 숙주의 건강에 주는 이로움에 관련된 연구 결과가 보고된 바 있으며 정상 장내균총의 붕괴는 질병을 유발하는 등 숙주의 건강에 악영향을 끼치는 사실이 알려짐. 정상 장내균총은 병원성균의 증식을 억제함으로써 감염에 대한 저항성이 증가 시킨다는 연구 보고와 숙주의 면역기능 향상, 장 상피세포의 증식을 자극 한다는 연구결과도 보고된 바 있음.
- 2009년 Jeffery N. Gordon 박사는 gnotobiotic mice를 사용하여 식이방법(고지방-고당분 / 저지방-고식이섬유)에 따라 장내균총이 하루만에 변하는 것을 확인하였음.
- 장내균총과 숙주인 인간의 건강과 밀접한 관련성이 제시되고 있는 만큼 한국인의 장내를 구성하는 미생물의 종류와 특성을 확인하는 일, 개별적으로 그리고 군집으로서 장내 미생물을 이해하는 일은 매우 중요한 과제임.

라. 프로바이오틱스, 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 연구개발의 중요성

- 프로바이오틱스란 인간이나 동물 등 숙주의 건강에 유익한 효과를 나타내는 미생물 또는 그 성분으로 균주 특이적(strain specific)이며 같은 종과 속에 해당하는 균주라도 효능은 매우 상이함.
- 프로바이오틱스는 정장작용 등 일차적인 기능성 외에도 면역증강, 대사증후군, 뇌건강 등 신체 전반에 도움을 주는 기능성이 보고되고 있음.
- 프로바이오틱스는 생균제 제품과 사균제 제품, 박테리옌 함유 제품, 유전자재조합 제품

등이 있으며 생균제는 균체 자체의 작용, 사균제는 균체가 분비한 항균물질의 작용을 이용하며 사료첨가제로는 생균제, 인체 의약품으로는 정장제나 유산균제제로 쓰임.

- 이러한 프로바이오틱스의 효능을 검증한 연구결과로, sokol 등(2008)은 *Faecalibacterium prausnitzii*를 Caco-2 cell과 co-culturing 하여 항염증 효과를 입증하였으며, 크론 병이 있는 쥐에게 투여하여 질환을 완화시킬 수 있다고 보고함 (그림 4).

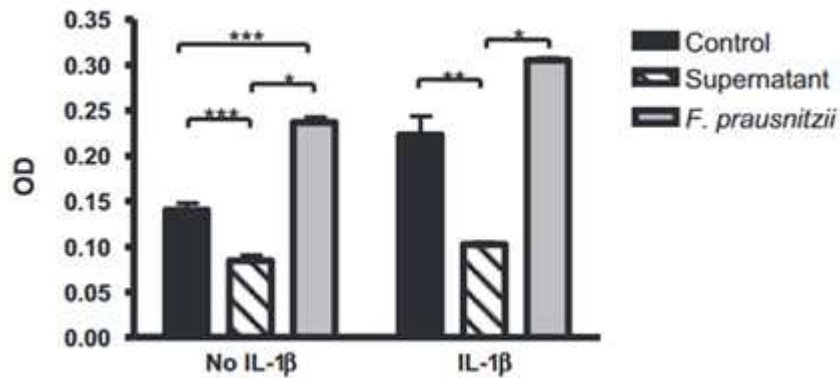


그림 4. *F. prausnitzii*에 의한 면역력 증가(Sokol et al. 2008)

- 프리바이오틱스란 숙주에게는 비소화성 식품성분이지만 대장 내 유용 미생물에 의해 이용되어 미생물의 생육이나 활성을 촉진함으로써 숙주 건강에 좋은 효과를 나타 낼 수 있음.
- 또한 프리바이오틱스 중의 하나인 Maillard Reaction Product(MRP)는 소장에서 소화가 잘 되지 않고 장내 미생물총에 의해 이용되며, 항산화, 알러지 저감화, 장내 유해균 감소 등 건강에 유익한 여러 기능성을 나타내는 것으로 알려져 있음. 락토글로불린 (lactoglobulin) 및 카제인산 (caseinate)과 포도당이 반응하여 생성된 MRPs가 bifidogenic 효과를 나타내어 *E. coli* 등의 장내 유해세균 감소에 효과를 보인다는 연구 보고가 있음 (그림 5).

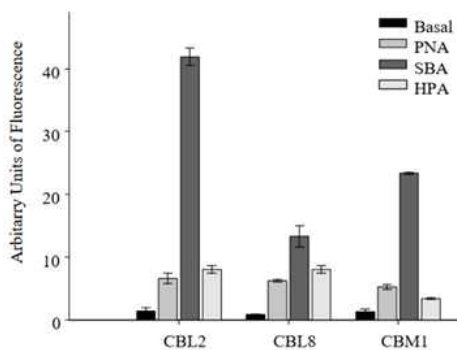


그림 5. MRP에 의한 장내 유해세균 감소 효과

- 신바이오틱스란 프리바이오틱스와 프로바이오틱스가 함께 장 내에서 시너지 효과를 내어 단일 형태로서의 이점을 보완하여 부족한 유용균을 보충해주고 이 유용균이 정착하는데

도움을 줄 수 있는 프리바이오틱스를 공급한 형태임.

- 2016년 Delzenne 연구진은 inulin-type의 fructans와 *Lactobacillus reuteri* 100-23를 synbiotics로 백혈병에 걸린 동물모델에 투여하여 장내균총 및 그에 대한 효과를 확인하였음. 그 결과 *Enterobacteriaceae*의 수준과 장내 항생물질의 양이 증가하였고 이를 통한 면역력 증강의 효과를 The ISME Journal에 보고하였음 (Delzenne et al. 2016).

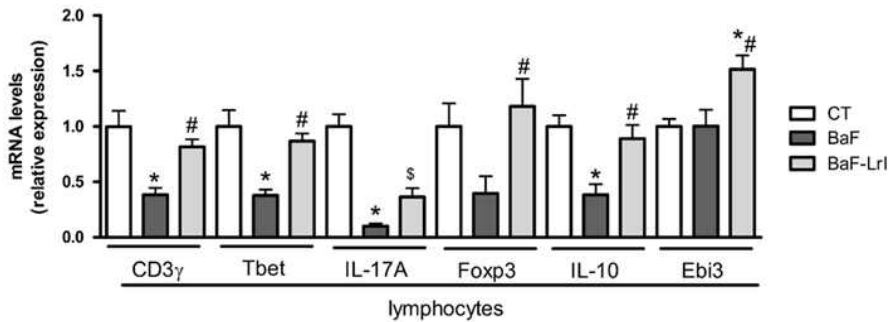


그림 6. Fructan과 *L. reuteri*와의 신바이오틱스 투여에 의한 면역력 증강 효과

- 한편 프로바이오틱스의 특성에 따라 생존의 기질로 이용할 수 있는 프리바이오틱스의 종류가 다르며, 어떤 기질을 이용하느냐에 따라 생산하는 대사물질이 달라지기 때문에 다양한 프로바이오틱스와 다양한 프리바이오틱스의 조합에 대한 효과 연구가 필요함.

### 1-3. 연구개발 대상의 국내·외 현황

#### 가. 국내·외 농산자원을 활용한 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 식품소재 개발 현황

- 생명자원의 활용 극대화 : 의약바이오, 농업바이오, 산업바이오, 융합바이오 등 생명공학 기술(Biotechnology)의 발달로 천연자원(특히, 식물, 동물, 해조류 등)의 활용가치는 급속도로 확대되고 있음. 천연의약품 및 화장품, 건강기능성 식품, 생물유래 신소재 개발, 종자 개량, 유전체 연구 등 다양한 산업 분야에 고부가가치 제품을 창출함에 있어 생명공학 기술이 적용되고 있으며, 천연자원이 소재로서 활용되고 있음.
- 식물 또는 농산자원을 이용한 기능성 소재의 발굴과 이를 식품에 적용하기 위한 학계의 연구와 시장은 전 세계적으로 확대되고 있는 추세이나, 실제 상용화를 위한 국내 가공기술 수준은 아직 미흡한 실정임. 또한 이러한 천연소재를 프리바이오틱스로서 개발하고자 하는 접근은 전무한 실정임.
- 프리바이오틱스는 주로 oligosaccharide들을 포함하지만 이는 유익균의 성장뿐 아니라 식 중독 병원균이 포함된 non-probiotic bacteria에도 영향을 줄 수 있기 때문에 최근에 사용되는 프리바이오틱스의 개념은 좀 더 광범위한 의미로 발전되고 있는 실정임. 최근 폴리페놀 물질과 같은 비탄수화물(non-carbohydrate) 물질들도 장내 유익균들 대부분의 성

장을 촉진하며 유해균들의 성장은 선택적으로 억제하는 임상 연구 결과가 보고되고 있으며, 김치 중에 존재하는 allicin성분의 경우에는 김치의 대표적 프로바이오틱스 균주인 *Leuconostocs*의 성장을 저해하지 않으면서 부패 미생물들의 성장만 선택적으로 저해시킴으로써 프리바이오틱스의 기능을 한다고 알려져 있음.

- 페놀류에 속하는 hydrocinnamic acid들은 식물체에 섬유질의 형태로 고농도 존재함. 대부분의 섬유질은 배변을 통해서 배출이 되나 일부는 효소적 분해를 통해 hydrocinnamic acid를 생성함. 이러한 효소적 분해 작용은 소장의 상피세포에서도 진행 되지만 대부분은 대장 상피세포에서 진행 되는 것으로 판단되어 장내 미생물이 분비하는 분해효소가 hydrocinnamic acids류를 생성하는 중요한 인자로 여겨짐. 따라서 이러한 분해효소를 대량으로 분비하는 유산균의 경우 인슐린의 분비 촉진 등과 같은 메커니즘에 깊이 관여 할 것으로 예상되어짐 (그림 7).

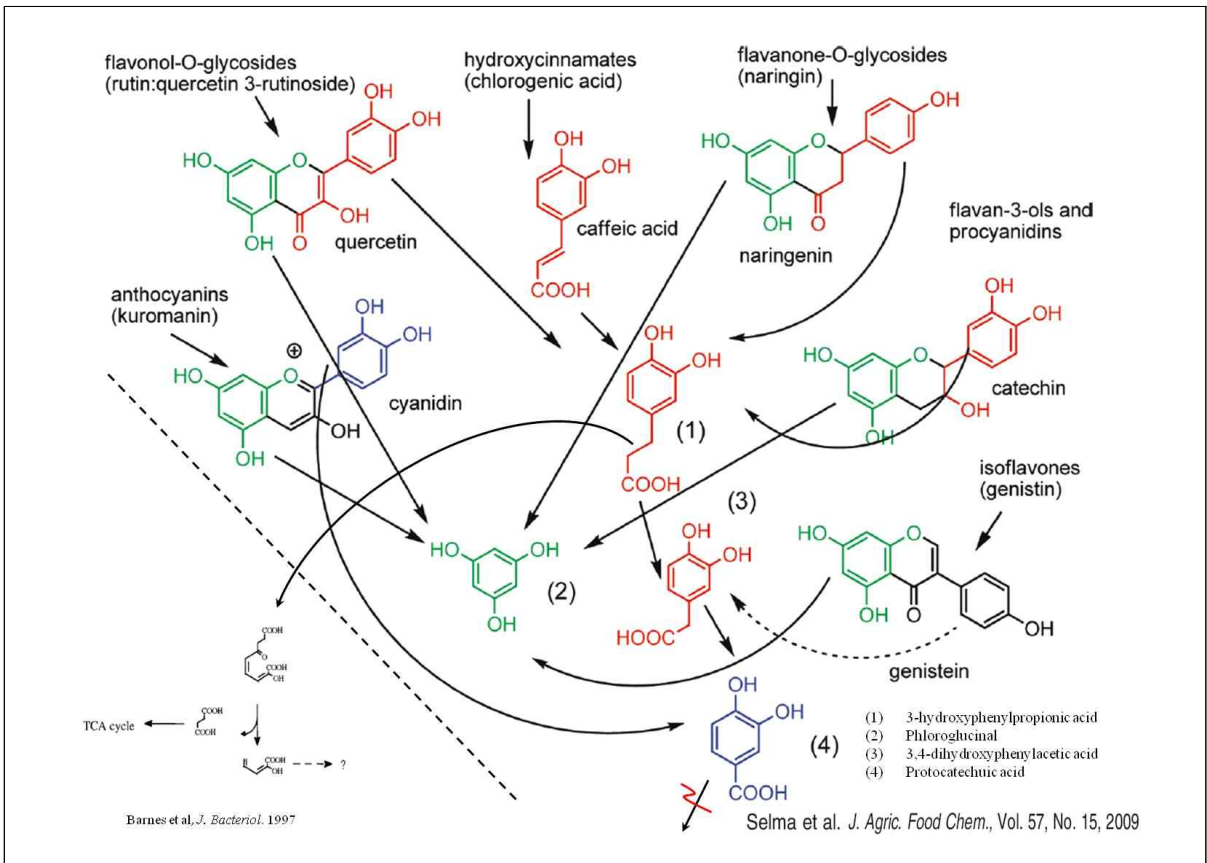


그림 7. 장 microbiota에 의한 주요 폴리페놀 분해 메커니즘

- 또한 chlorogenic acid는 식이로 섭취되면 소장에 도착하여 장내 세균들에 의하여 가수분해 되고, 저분자화 되어 caffeic acid의 형태로 흡수되지만 대부분은 흡수되지 못하고 대장을 통하여 배출됨. 그러나 caffeic acid는 위와 소장에서 chlorogenic acid에 비해 훨씬 잘 흡수되며 뛰어난 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려져 있음. 지금까지의 연구에 의하면 quinic acid와 에스테르 결합된 caffeic acid(chlorogenic acid)는 caffeic acid 자체로 흡수될 때보다 더 흡수율이 적다고 밝혀졌음. Chlorogenic acid과 caffeic acid는 서로 다

른 메커니즘을 통하여 흡수되는 것으로 알려져 있으며, 특히 chlorogenic acid은 인체 내에서 두 가지의 흡수 메커니즘을 가지고 있음. 그 중 하나는 chlorogenic acid 그대로 흡수되는 것이고 또 다른 메커니즘은 위 또는 소장에서 caffeic acid와 quinic acid로 가수분해된 후 흡수되는 것임. Caffeic acid도 인체 내에서 두 가지의 메커니즘을 가지고 있음. 그 중 하나는 위에서 비 이온적 상태로 수동적 흡수가 이루어지는 것이고, 나머지는 소장에서 이온적 상태로 능동적 흡수가 이루어지는 것임. 이 연구에서 chlorogenic acid로의 흡수율은 33%정도인 반면 caffeic acid로의 흡수율은 95% 정도로 caffeic acid은 quinic acid가 에스테르 결합된 형태보다 세배정도 더 잘 흡수되어지는 것으로 나타남. 즉 식품 및 식물체 속에 존재하는 고기능성 항산화 성분인 chlorogenic acid와 같은 hydroxycinnamic acid들의 흡수 및 작용은 인체 장내 미생물들의 효소적인 작용에 크게 의존하므로 장내균총이 유용물질의 흡수율에 지대하게 영향을 미친다고 할 수 있음.

- 본 연구진은 이러한 메커니즘에 기인하여 천연 식물추출물의 페놀성분이 특정 유산균의 생장과 대사에 관여함을 입증하였으며, 이러한 신바이오틱 상호작용(symbiotic interaction)이 장관 내 면역조절 및 염증억제 활성화에 상승작용을 보임을 검증하였음. 이를 통해 국내산 천연 식물 추출물 프리바이오틱스와 신바이오틱스의 대량 생산공정에 대한 연구를 선도적으로 진행하였음.
- 따라서 기존에 활발히 연구된 프로바이오틱스 분야와 병행하여 본 연구진이 연구해온 천연 자원 유래 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 소재의 안전성 및 기능성 검증이 완료되면, 새로운 개념의 식품 핵심신소재의 발굴, 표준화된 평가시스템 구축, 응용제품 개발을 통한 산업화를 통해 국내 식품시장의 신 성장 동력 창출이 가능할 것으로 사료됨.
- 또한 천연자원은 향후 미래 사회를 지탱하는 무궁한 가치의 고부가가치 식품자원이자 식품 핵심소재로서 발전가능성이 높은 거대 시장이며, 농림축산식품부 10대 농생명 소재 분류를 보면 천연 장 기능 개선제 개발 사업이 포함되어 있음 (표 2).

표 2. 농림축산식품부 10대 농생명소재

구분	주요 내용	소재	관련산업	주요 소재기업
천연 장기능 개선제	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 장 정착능력이 우수한 고기능성 프로&amp;프리바이오틱스 개발</li> <li>- 고기능성 프로&amp;프리바이오틱스 확보</li> <li>- 전통 발효 식품 유래 프로&amp;프리바이오틱스 확보</li> <li>- 인체 적합성이 높은 맞춤형 프로&amp;프리바이오틱스 확보</li> <li>- 유전체 기반 식이섬유 및 올리고당류 개발</li> </ul>	식품소재	식품산업, 의약품 산업	(주)오리온, (주)CJ제일제당, (주)한국야쿠르트, (주)셀바이오텍, (주)에이엠바이오
천연 항생제	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 무(저)독성의 천연 항생제 대체재 개발</li> <li>- 미생물(생균제) 항생제 대체재</li> </ul>	동물건강 소재	생물 농산업	카길에그푸리나, (주)CJ,



대체재	- 약용식물(허브) 추출물 향생제 대체재 - 농산물 가공 부산물을 이용한 향생제 대체재			(주)미야리산제약, (주)인트론바이오 테크놀로지
천연 5味 소재	○ 천연 기능성 감미·조미료 소재 상용화 기술 개발 - 향당뇨·비만·충치 감미료 소재 생산기술 확보 - 천연 고감미료(혼합 감미제) 확보	식품소재, 농산업 소재	식품산업	(주)CJ, (주)대상, (주)삼양사, 카길에그푸리나, 코카콜라
기능성 아미 노산	○ 농축수산업 및 식품산업 부산자원을 원료로 한 유용 아미노산과 펩타이드 개발 - 신부가가치의 건강식품용, 화장품용, 사료용 등의 향균/항비만/향당뇨/향치매 기능의 펩타이드 개발	동물건강 소재, 농산업 소재, 생활소재, 식품소재	식품산업, 향장품 산업, 의약품 산업	(주)CJ, 펩트론, (주)코스데이, (주)샘표, (주)바이오FD&C, (주)케이젠, (주)에이앤랩
기능성 효소	○ 고기능 및 신기능 산업효소 개발 - 가축 사료용 효소 개발 - 식품첨가물 효소 개발 - 펄프, 세제, 섬유 제조를 위한 효소개발	농산업 소재, 생활소재, 동물건강 소재	식품산업, 의약품 산업, 바이오 에너지 산업	화이자, DSM, Novozyme, Novo-Nordise , (주)CJ, (주)인섹트 바이오효소

○ 미국, 중국, 유럽 등에서는 농산물 및 천연물 자원을 단순한 식량 차원이 아닌 건강수명 연장을 위한 소재로서 발전 가능성이 높은 분야로 보고 기능성식품 소재의 산업화에 역량을 집중하고 있음. Internatinal Society for Nuraceuticals & Functional Foods에서는 국제적인 기능성 식품, 천연물 자원을 이용하여 질병 감소에 도움을 줄 수 있는 식이 소재 제품을 개발하고 정보를 교류하고 있음.

○ **프로바이오틱스 및 프리바이오틱스 식품 소재의 산업화에 역량 집중:** 일본, 미국, 유럽 등에서는 일찍부터 유산균 음료, 유제품, 의약품, 생균제제의 개발을 추진해 왔으며, 유산균 및 비피더스균 등의 프로바이오틱스, 생체 내 유용균의 증식인자인 올리고당, 식이섬유 등의 프리바이오틱스 소재연구는 세계 최고 수준임. 특히, 장내 유용균, 유해균이 미치는 장내균총과 건강유지, 식이섭취의 상관관계에 관련된 연구들을 발전 가능성이 높은 분야로 판단하여 관련연구를 활발히 진행하고 있음.

#### 나. 국내 프로바이오틱스, 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 시장 현황

○ 국내의 프로바이오틱스 관련 제품은 한정된 균주가 혼합되어 있는 유제품 형태이거나, 김치나 장류, 젓갈 등의 농수산물식품의 형태로 생산되어 판매되고 있음. 한국야쿠르트(주), 남양유업(주), 서울우유, 매일유업(주), 파스퇴르유업(주), 롯데햄우유(주) 등의 대기업이 유산균 발효유와 낙농발효제품을 생산하고 있음. 반면 셀바이오텍(주), (주)비피도, 파마넥스, 바이오솔루션, 선플러스 등의 바이오벤처는 유산균 중심의 프로바이오틱 스타터를 생

산하고 있으며, 제일바이오(주) 등의 중소기업에서는 사료용으로 프로바이오틱스를 생산 및 판매하고 있음.

- 최근 프로바이오틱스는 장 기능과 면역력을 높이고 체지방을 떨어뜨리는 등 다양한 기능이 확인되면서 새로운 건강 필수품으로 부각되고 있음. 식약처에 따르면 2018년 건강기능식품 생산실적 분석 결과, 18년 건강기능식품 생산량은 54,771톤으로 전년대비 15.6% 증가, 총 매출액은 25,221억원으로 전년대비 12.7%, 증가하였음. 수출액은 1,256억원으로 전년대비 16.9% 증가, 수입액은 6,727억원으로 17.1% 증가하였음. 2018년 기준, 건강기능식품 매출액 중 프로바이오틱스 품목은 3위이며, 매출액은 2,994억원 정도임.
- 국내에서 판매되고 있는 발효유, 유산균 체제 내 대부분의 프로바이오틱스는 현재 외국에서 수입되고 있는 실정이지만 국내 여러 기업들이 자체적으로 기능성 유산균들을 개발하는 연구를 진행하고 있으며, 김치와 같은 발효식품 또는 신생아 분변에서 유산균을 분리하고 선별하여 상업화시키고 있음. 대표적으로 쉐바이오텍의 ‘듀오락’ 이 국내 시장을 이끌어나가고 있음. 또한 최근 CJ제일제당, 대상, 풀무원 등 주요 식품기업들이 프로바이오틱스 시장에 진입하고 있음. 이렇게 매년 지속적으로 성장 중인 프로바이오틱스 시장 진입과 마케팅 활용을 위해서는 차별화된 균주 개발이 필요하다 판단됨.
- 프로바이오틱스 시장규모가 가장 큰 제품은 발효유 중 특히 액상 발효유로, 1971년부터 국내에서 생산되었으며 2003년에 시장규모가 1조원을 돌파하였음. 최근 장 건강뿐만 아니라 위장에 효과가 좋은 제품으로 제품 연구방향이 이어지고 있으며, 미용에 효과가 있는 미용발효유의 출시도 있음.
- 건강기능식품업체 매출액 현황은 표 3과 같음.

표 3. 매출액 상위 10개 건강기능식품업체 현황(2015)

순위	매출액	
	업체명	금액 (천원)
총계		1,068,752,178
1	(주) 한국인삼공사	522,888,045
2	(주) 한국야쿠르트	87,119,947
3	고려은단 (주)	86,242,485
4	주식회사 노바텍스	80,503,008
5	콜마비엔에이치(주)선바이오텍사업부분	79,283,553
6	(주) 서흥	50,165,999
7	(주) 에스트라	47,192,501
8	(주) 쉐바이오텍	46,469,260
9	코스맥스바이오 (주)	16,105,139
10	콜마비엔에이치 (주) 푸디팜사업부분	42,782,241

자료 : 식품의약품 안전처 건강기능식품정책과

- 한국야쿠르트의 대표 제품인 율은 헬리코박터균의 증식과 위벽 부착을 억제하는 효과가 가장 뛰어난 유산균이 들어있으며, 1,000원짜리 단일 제품임에도 출시 4년여 만에 1조원 매출을 달성하는 기록을 세움. 15년간 팔린 율은 총 32억병으로 3조 5,900억원에 달하며, 지금도 1초에 7개씩 팔리고 있음(그림 8).

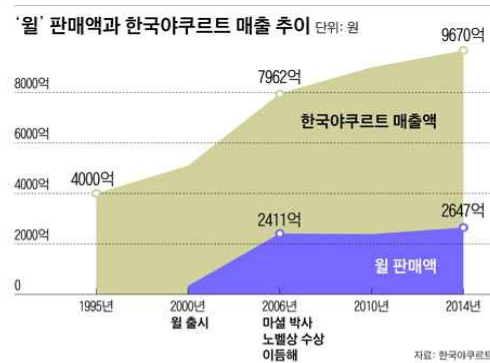


그림 8. 한국야쿠르트 매출액

- CJ제일제당의 대표 제품인 BYO 유산균은 김치유산균을 활용한 제품으로, 피부유산균, 장유산균, 및 멀티유산균 3종을 갖춘 유산균 브랜드임. 출시 첫해 매출 140억원에서 2015년 300억원, 2016년 약 550억원을 기록했으며 누적 매출 1,000억원을 돌파하였음(그림 9).



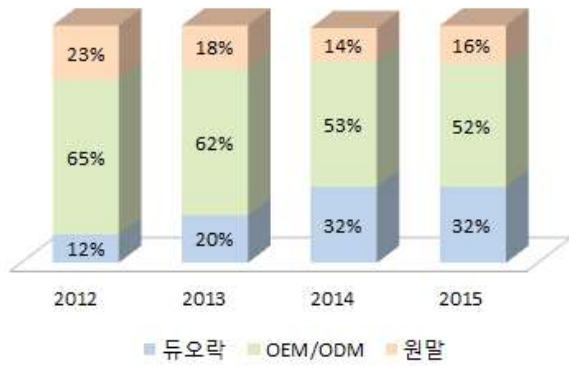
그림 9. CJ 건강기능식품 현황

- 셀바이오텍의 대표 제품인 듀오락은 세계 최초로 이중코팅 기술이 적용되었으며, 프로바이오틱스를 단백질로 코팅한 후 다당류로 한 번 더 코팅한 기술로, 장내 도달률을 향상시킨 제품임. 듀오락은 60% 수준의 재구매율을 유지하고 있으며, 2009년 3억원으로 시작했던 매출액이 현재 100억을 돌파하였음(그림 10).



(자료 : 아이투자 www.itooza.com)

[표] 셀바이오텍 제품별 매출 비중



(자료: 아이투자, KDB대우증권, 셀바이오텍)

그림 10. 셀바이오텍 제품별 매출 비중

다. 세계 프로바이오틱스, 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 시장 현황

- 세계 프로바이오틱스 시장은 약 21조원 규모로 유럽(33%), 미국(24%), 일본(19%) 등이 76%를 차지하는 선진국 중심 시장임. 현재 세계적으로 유산균 배양기술을 보유한 회사는 덴마크의 다니스코, 크리스찬한센, 일본의 모리나가, 캐나다의 로셀 등이며 종균개발에서 완제품 생산까지 이르는 거대한 경제적 규모의 생산체제를 구축한 기업은 세계적으로 5개사 정도로 추정되고 있음.
- 서유럽에서는 프로바이오틱스와 항산화제가 기능성 식품 시장을 주도하고 있음. 이들이 관심을 갖는 건강요인은 면역증강, 변비예방, 콜레스테롤 저하, 암 예방, 튼튼한 뼈, 에너지 충전, 소화기 건강 등으로 프로바이오틱의 효능과 관련된 것이 많음.
- 미국에서는 Danone, Nestle, Child-Hansen 등의 회사가 특정 균주와 개인건강을 연계한 제품을 출시하였으며, Syonny Field Farm은 6종의 프로바이오틱을 혼합한 “Nutrica”를 발매하여, 소화증진, 유당 불내증 완화, 칼슘흡수능 개선, 면역 향상, 암 예방 등의 기능을 목표로 하고 있음. 현재 미국 FDA와 AAFCO에서 승인된 생균제 첨가가능 미생물 균주의 현황은 표 4와 같음.

표 4. FDA와 AAFCO에서 승인된 생균제 첨가 미생물 균주

<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bifidobacterium thermopilum</i>	<i>Pediococcus acidilatici</i>
<i>Bacillus lentus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Propionibacterium</i>

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Shermanii</i>
<i>Bacteroides amylophilus</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Bacteroides capillosus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>Bacteroides suis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Streptococcus faecium</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
		<i>Streptococcus thermophilus</i>

- 최근 들어, 일본의 모리나가유업은 프로바이오틱스와 프리바이오틱스를 혼합한 신바이오틱스 제품을 기획하였으며 대표적 제품은 비피더스균 BB536에 lactulose와 lactoferin을 첨가한 “락토페린요구르트” 임. 또한 관동지역에만 판매하기 시작한 우유형태의 음료 “락토페린플러스”가 호조를 보이고 있으며 현재 전국적으로 판매망을 넓히고 있음.
- 성장세에 있는 프로바이오틱스 시장에 비해 프리바이오틱스 시장은 아직 미미한 수준임. 올리고당이 일본 등 일부 국가에서 시장을 형성하고 있으나 이는 프리바이오틱스로서가 아니라 대체 감미료로서 형성된 시장임. 국민건강 증진을 위해 세계 각국은 기능성식품산업을 육성하고 있으며, 장 건강을 위한 프리바이오틱스도 기능성식품의 한 종류로 인정되고 있는 추세임.
- 프리바이오틱스에 대한 선진국들의 기술수준이나 관심도가 높지 않아, 이 분야의 연구개발에 집중적으로 투자하면 단기간에 선도적 위치를 점할 수 있을 것으로 예상됨(그림 11).

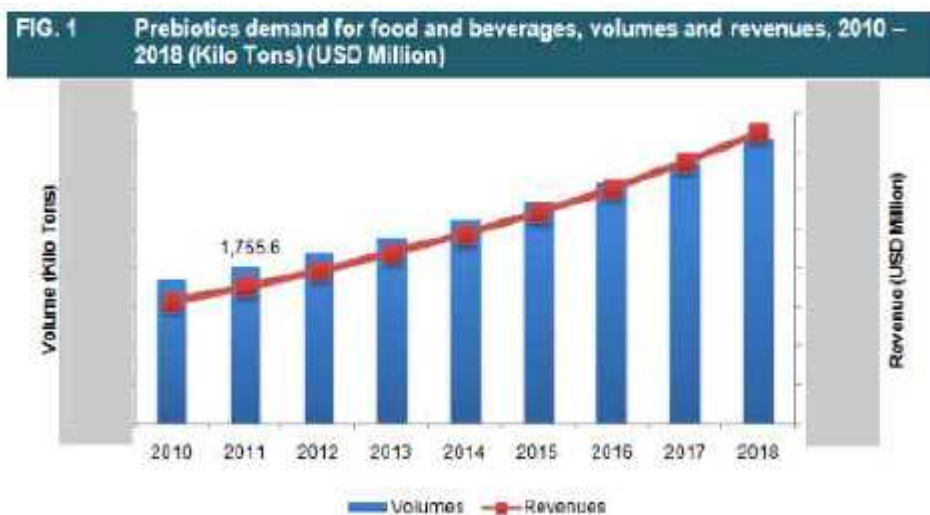


그림 11. 프리바이오틱스 식품과 음료의 소비량

#### 1-4. 연구개발 범위

##### 가. 신바이오틱스 지표물질 탐색 및 안전성, 기능성 검증

(1) 연구개발의 목표

- 천연물유래 신규 신바이오틱스 제조, 안전성 및 기능성 검증
- 인체적용시험을 통한 신바이오틱스 소재의 및 염증성 장 질환 개선 효과 확인
- 장내 마이크로바이옴 분석을 위한 기초조건 확립 및 최적화

(2) 연구개발의 내용

- 신바이오틱스 샘플 제조 및 제공
- 지표물질 (milk peptide 탐색 및 기능성 검증(*in vitro*))
- 신바이오틱스의 안전성 및 장 질환 개선 기능성 검증(*in vivo*)
- 건강한 소아 청소년 군에서 반복 투여를 통한 안정성 검증
- 동물모델 및 사람 장내 미생물총 분석을 위한 total fecal DNA 분리 방법 최적화
- 분변샘플로부터의 장내 균총 동정용 16S rRNA universal primer set의 최적화

##### 나. 신바이오틱스의 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 효과 검증

(1) 연구개발의 목표

- 신바이오틱스 소재의 표준화 및 제품 규격화
- 인체적용시험을 통한 신바이오틱스 소재의 염증성 장 질환 개선 효과 검증
- 동물모델 장내균총 메타게놈 분석을 활용한 신바이오틱스의 효과 검증

(2) 연구개발의 내용

- 신바이오틱스 샘플 제조 및 제공
- 신바이오틱스 내의 지표물질 표준화 및 제품 규격검토
- 신바이오틱스에 의한 염증성 장 질환 환자의 장내 대사물질 프로파일링
- 크론병 환자를 대상으로 신바이오틱스의 투여를 통한 염증성 장 질환의 활성화도 개선 효과 검증
- 지표물질 기능성 검증을 위한 동물모델의 분변 메타게놈 분석
- 정상 소아청소년의 장내 균총 메타게놈 분석
- 염증성 장 질환 환자의 신바이오틱스 투여에 대한 분변샘플 수집

##### 다. 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 기능성 신바이오틱스 유제품 개발

(1) 연구개발의 목표

- 소아 청소년 염증성 장 질환 개선 기능성의 신바이오틱스 제품 대량시험 및 시험생산
- 인체적용시험을 통한 신바이오틱스 소재의 염증성 장 질환 개선 효과 검증
- 인체적용시험 유래 분변의 메타게놈 분석을 통한 신바이오틱스의 염증성 장 질환 및 장내 균총 개선 효과 검증

(2) 연구개발의 내용

- 현장시험을 통한 대량생산 공정 개발
- 시제품 내 기능성 물질 함량 평가
- 최종 시제품 생산(신바이오틱스 분말 제제 1종 및 발효유 1종)
- 기능성원료 인정 신청 관련 서류 작성
- 1-2 차년도 연구 결과 통계학적 분석 및 논문 작성
- 신바이오틱스 복용 환자군 장기 예후 관찰 비교
- 수집된 분변의 메타게놈 분석을 위한 NGS 수행
- 생물정보학을 활용한 염증성 장 질환 환자의 장내 미생물총 분석 및 분석결과 추적
- 염증성 장 질환 환자의 장내 미생물총 분석 및 통계학적 분석

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 연구내용

#### 2-1-1. 소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 식품 소재 및 제품 개발

[주관 : 서울우유협동조합 강신호]

#### 가. 소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 식품소재 및 제품 개발

##### (1) 천연물 유래 신규 신바이오틱스 제조 및 제공

##### (가) 천연물 유래 프리바이오틱스 소재(꾸지뽕잎 농축분말) 제조

- 무농약 친환경 재배 인증업체인 밀양꾸지뽕 영농조합을 통해 꾸지뽕잎 원료를 수급하여 아래 공정도(그림 1-1)와 같이 프리바이오틱스 소재로서 꾸지뽕잎 농축분말을 제조함.



그림 1-1. 꾸지뽕잎농축분말 원료 공정도

##### (나) 프로바이오틱스 소재(*L. gasseri* 505) 제조

- 서울우유에서 분리한 유아분변 유래 프로바이오틱스 *L. gasseri* 505를 식품소재로 사용하기 위해 GMP 생산설비에서 pilot scale 생산을 진행하였으며, 제조공정은 아래의 공정도(그림 1-2)와 같음.





그림 1-2. 유산균분말 원료 및 제조공정도

(다) 신바이오틱스 발효분말 소재 대량생산







- 신바이오틱스 고농축 혼합분말 제제의 원료로 사용하기 위하여 프리바이오틱스 소재인 꾸지뽕잎 추출물과 프로바이오틱스 *L. gasseri* 505을 이용하여 신바이오틱스 발효분말 소재의 대량생산을 진행하였으며, 신바이오틱스 발효분말 소재 제조를 위한 배합비율 및 제조공정은 아래 표 1-1,2와 같음.

표 1-1. 신바이오틱스 발효액 배합비율

원료명	함량(%)
우유	99.5
꾸지뽕잎농축분말	0.2
*유산균 분말( $1 \times 10^{11}$ )	0.3
합계	100

\* 유산균 - 장면역 기능성 유산균, *L. gasseri* 505

표 1-2. 신바이오텍스 발효분말 제조과정

		
		
<p>발효유 배양 탱크 및 제조 시설</p>	<p>건조 트레이 및 동결건조기</p>	<p>신바이오텍 발효유 및 농축 건조물</p>

- ① 원료유(살균유) 투입 후 교반 및 가온(60℃)
- ② 꾸지뽕잎농축분말 원료 투입 후 자재가 섞이도록 교반
- ③ 살균(85℃, 20분)
- ④ 냉각(41℃로 조정)
- ⑤ 유산균 분말 계량 및 접종(뭉치지 않도록 풀어가며 진행)
- ⑥ 41℃로 일정하게 유지하여 40시간 배양(pH 3.95~4.00)
- ⑦ 커드 파쇄 후 냉각 및 충전
- ⑧ 급속동결
- ⑨ 동결건조(40℃ 이하, 40시간)
- ⑩ 분쇄 및 포장

(라) 신바이오텍스 고농축 혼합분말 및 위약군 제제 생산

- 꾸지뽕잎 및 *Lactobacillus gasseri* 505를 포함하는 신바이오텍스 소재가 주원료인 혼합 분말 제제와 대조군 비교를 위한 위약 제제를 대량생산하여 제1협동기관(삼성서울병원) 및 위탁기관(숙명여자대학교)에게 인체적용시험용 및 전임상 시험용 샘플을 제공함.
- 신바이오텍스 고농축 혼합분말 및 위약군 제제의 배합비율은 표 1-3과 같음.
- 위약군 제제의 배합비율은 표 1-4과 같음.
- 신바이오텍스 고농축 혼합분말 및 위약군 제제 제조공정은 그림 1-3과 같음.

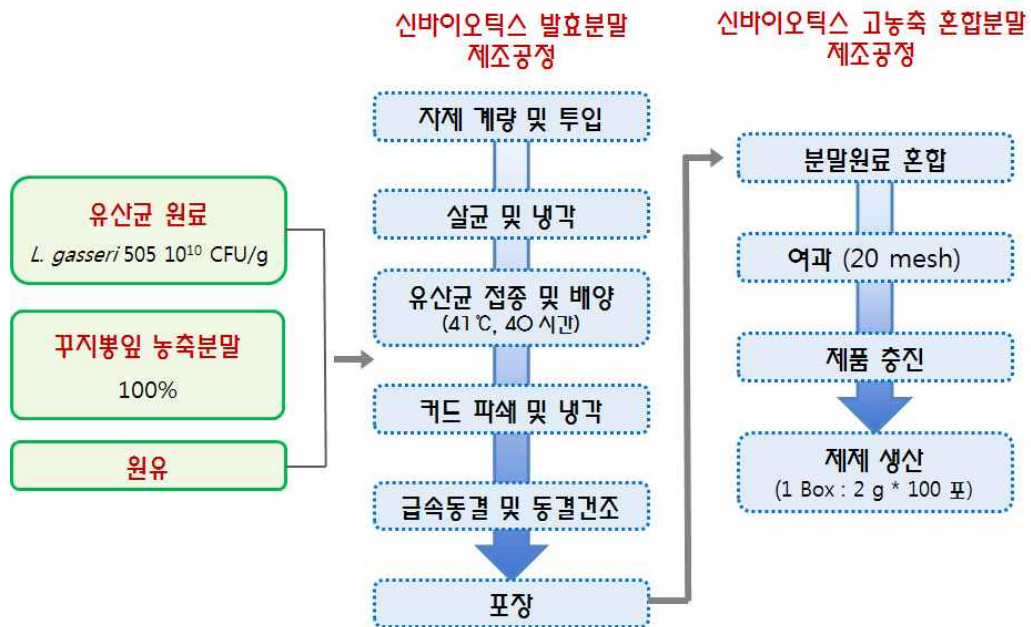
- ① 원료별 칭량
- ② 사별(30 mesh)
- ③ 혼합
- ④ 여과(20 mesh)
- ⑤ 제품 충전(스틱 포장)
- ⑥ 포장

표 1-3. 신바이오틱스 고농축 혼합분말 제제 배합비율

신바이오틱스 고농축 혼합분말 제제 배합비율 (요구르트맛)	
원료명	함량(%)
포도당	47.5
신바이오틱스 소재(발효분말)	40
자일리톨	9.3
분말향	1.2
구연산	1
이산화규소	1
합계	100

표 1-4. 위약군 제제 배합비율

위약군 제제 배합비율 (요구르트맛)	
원료명	함량(%)
포도당	47.5
탈지분유	40
자일리톨	9.3
분말향	1.2
구연산	1
이산화규소	1
합계	100





분말원료 혼합믹서  
및 진동체

스틱 포장기 및 임상실험용 제제

그림 1-3. 신바이오틱스 고농축 혼합분말 제제 생산 공정도

## (2) 지표물질 탐색 및 기능성 검증 (*in vitro*)

### (가) 신바이오틱스 발효분말 내 지표물질 확인 및 합성

- 대량생산한 신바이오틱스 발효분말 내의 기능성 지표물질인 milk peptide을 확인하기 위해 MALDI-TOF/MS/MS 분석을 실시하였으며, 세부 분석 조건은 다음과 같음.
- Ziptip c18 전처리를 통해 정제한 신바이오틱스 발효분말을 matrix(HCCA)와 1:1로 섞은 후 small anchorchip plate에 1 L 분주함. MS 분석 조건은 700-3,500 m/z (nitrogen laser 337 nm, Positive mode, Reflector mode(20 kV), 500 laser shot at once)이며, 각각의 peptide의 MS data를 분석 후 main peak에 관하여 MS/MS spectrum을 얻은 후 Database(Swissprot)을 이용해 peptide identification을 진행하였음.
- 총 21개의 우유 유래 펩타이드를 Identification 하였으며(표 1-5), 기능성 평가를 위해 펩타이드 합성 업체인 펩트론(대전, 대한민국)에 의뢰하여 펩타이드 자동합성기(PeptrEX)를 통해 순도 98% 이상의 펩타이드를 합성함.

표 1-5. 신바이오틱스 발효분말 내의 기능성 milk peptide 서열

m/z peptide	Protein	Position	Sequence	CT				Ref.
				505	545	599	575	
997.9	β-Casein	101-108	PKHKLMPF	•	•	•	•	
1038.7	β-Casein	197-206	VLGPVVRGPF	•	•	•	•	(Miguel et al. 2006)
1151.8	β-Casein	199-209	GPVVRGPFPIV	•	•	•	•	(Hayes et al. 2007)
1265.1	β-Casein	198-209	LGPVVRGPFPIV	•	•	•	•	
1283.1	β-Casein	144-154	MHQPHQLPPT		•			(Ebner et al. 2015)
1363.6	β-Casein	197-209	VLGPVVRGPFPIV	•				(Quirós et al. 2007)
1469.3	β-Casein	143-154	WMHQPHQLPPT	•	•			(Chang et al. 2014)
1665.5	α <sub>2</sub> -Casein	1-14	RPKHPIKHQGLPQE	•	•	•	•	(Lignitto et al. 2010)
1881.3	β-Casein	193-209	YQEPVLGPVRGPFPIV	•	•	•	•	(Yamamoto et al. 1994)
1994.3	β-Casein	192-209	LYQEPVLGPVRGPFPIV	•	•	•	•	(Regazzo et al. 2010)
2107.4	β-Casein	191-209	LLYQEPVLGPVRGPFPIV	•	•	•	•	(Yamamoto et al. 1994)
2235.0	α <sub>2</sub> -Casein	1-19	RPKHPIKHQGLPQEVLEN		•	•	•	(Johansson et al. 2009)
2254.3	β-Casein	190-209	FLLYQEPVLGPVRGPFPIV	•				(Kirilov et al. 2011)
2260.37	α <sub>2</sub> -Casein	190-207	MKPWIQPKTKVIPYVRYL	•				
2348.3	α <sub>2</sub> -Casein	1-20	RPKHPIKHQGLPQEVLENL	•	•	•	•	(Møller et al. 2013)
2479.2	β-Casein	165-186	LSQSKVLPVPQKAVPYQRDMP	•	•	•	•	
2764.4	α <sub>2</sub> -Casein	1-23	RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF	•	•	•	•	(Lahov and Regelson 1996)
2790.8	β-Casein	165-189	LSQSKVLPVPQKAVPYQRDMPPIQA	•				
2938.6	β-Casein	165-190	LSQSKVLPVPQKAVPYQRDMPPIQAF	•	•	•	•	(Kirilov et al. 2011)
3051.3	β-Casein	165-191	LSQSKVLPVPQKAVPYQRDMPPIQAFI	•	•	•	•	
3115.4	α <sub>2</sub> -Casein	183-207	VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL	•	•	•	•	(Recio and Visser 1999)

- 합성된 펩타이드의 서열을 확인하기 위하여 농도 10 μg/mL으로 증류수에 용해하여 MALDI-TOF/MS/MS 분석을 진행하였고 분석결과는 아래 그림 1-4 및 표 1-6와 같으며, 신바이오틱스 발효분말 내에서 동정한 milk peptide의 분자량 및 서열과 동일함을 확인하였음.

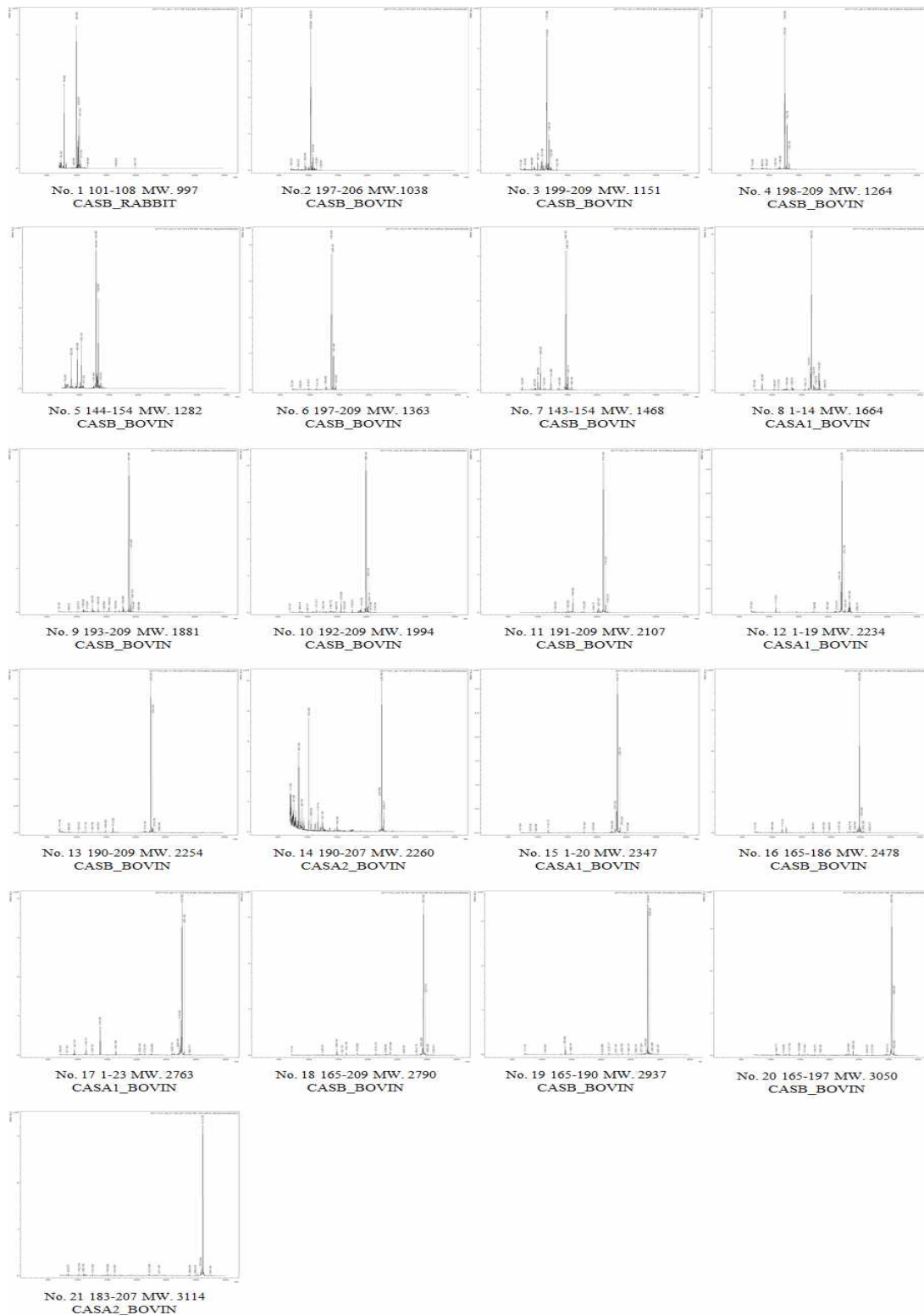


그림 1-4. 신바이오틱스 유래 milk peptide 21종 분석 결과

표 1-6. 신바이오틱스 유래 milk peptide 서열 및 분자량

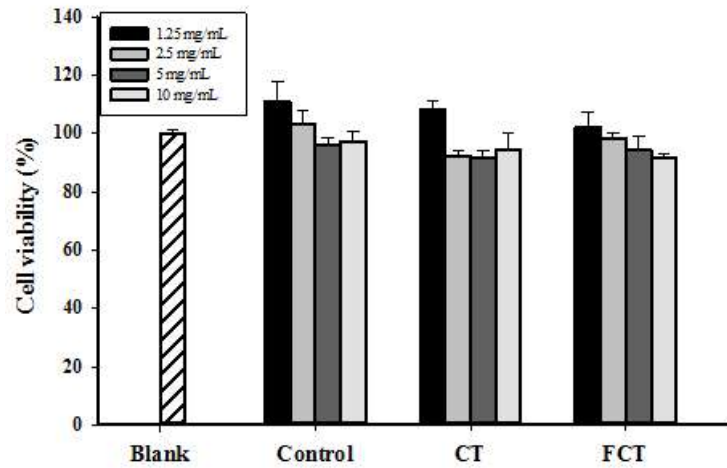
NO	Peptide	Sequence	Molecular Weight	Origin
1	$\beta$ -Casein	101-108	997	BOVIN
2	$\beta$ -Casein	197-206	1038	BOVIN
3	$\beta$ -Casein	199-209	1151	BOVIN
4	$\beta$ -Casein	198-209	1264	BOVIN
5	$\beta$ -Casein	144-154	1282	BOVIN
6	$\beta$ -Casein	197-209	1363	BOVIN
7	$\alpha$ S1-Casein	143-154	1468	BOVIN
8	$\beta$ -Casein	1-14	1664	BOVIN
9	$\beta$ -Casein	193-209	1881	BOVIN
10	$\beta$ -Casein	192-209	1994	BOVIN
11	$\beta$ -Casein	191-209	2107	BOVIN
12	$\alpha$ S1-Casein	1-19	2234	BOVIN
13	$\beta$ -Casein	190-209	2254	BOVIN
14	$\alpha$ S2-Casein	190-207	2260	BOVIN
15	$\alpha$ S1-Casein	1-20	2347	BOVIN
16	$\beta$ -Casein	165-186	2478	BOVIN
17	$\alpha$ S1-Casein	1-23	2763	BOVIN
18	$\beta$ -Casein	165-209	2790	BOVIN
19	$\beta$ -Casein	165-190	2937	BOVIN
20	$\beta$ -Casein	165-197	3050	BOVIN
21	$\alpha$ S2-Casein	183-207	3114	BOVIN

(나) 신바이오틱스 발효분말 및 지표물질의 기능성 검증 (*in vitro*)

① 신바이오틱스 발효분말의 면역증강 활성 평가

- 신바이오틱스 발효분말의 면역증강 활성 평가를 위해 RAW 264.7 macrophage cells(ATCC, 미국)의 면역증강 활성 정도를 lipopolysaccharides(LPS)와 비교하여 nitric oxide(NO), immuno-modulating cytokine들의 발현을 통해 확인하였음.
- 신바이오틱스 발효분말이 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행함.
- 신바이오틱스 발효분말을 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL 농도로 24 시간 동안 RAW 264.7에 처리한 후에 살아있는 세포에서 보라색 formazan을 형성하는 MTT 시약을 1 mg/mL로 세포에 처리하여 3시간 후 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 그 흡광도를 540 nm에서 측정함. 아무것도 처리하지 않은 blank를 100%로 계산하여 농도별 세포생존율을 %로 계산하여 비교함.

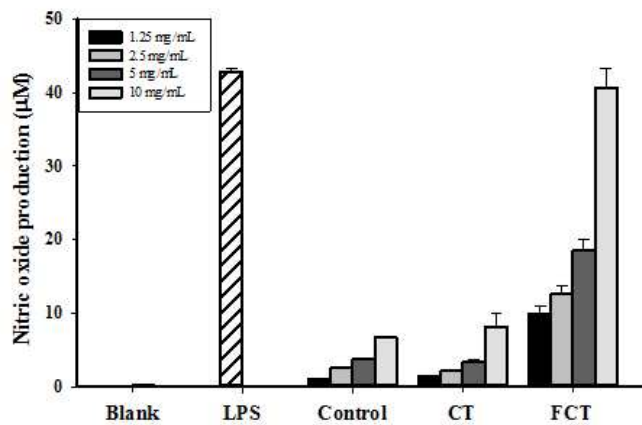
- 처리한 모든 농도에서 80% 이상의 세포생존율을 나타내는 것으로 보아 신바이오틱스 발효분말이 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인함(그림 1-5).



- \* Con : 우유
- \* CT : 꾸지뽕잎 첨가 우유
- \* FCT : 꾸지뽕잎 및 *L. gasseri* 505를 포함하는 신바이오틱스 발효분말

그림 1-5. 신바이오틱스 발효분말의 세포독성 유무 평가

- NO는 선천면역의 대표적인 세포인 대식세포에 의해 생성되어 면역계에서 외부물질에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호 전달 물질임. NO 생성량을 측정된 결과, 신바이오틱스 발효분말을 처리하였을 때 유의적으로 가장 높은 활성을 나타냄(그림 1-6).

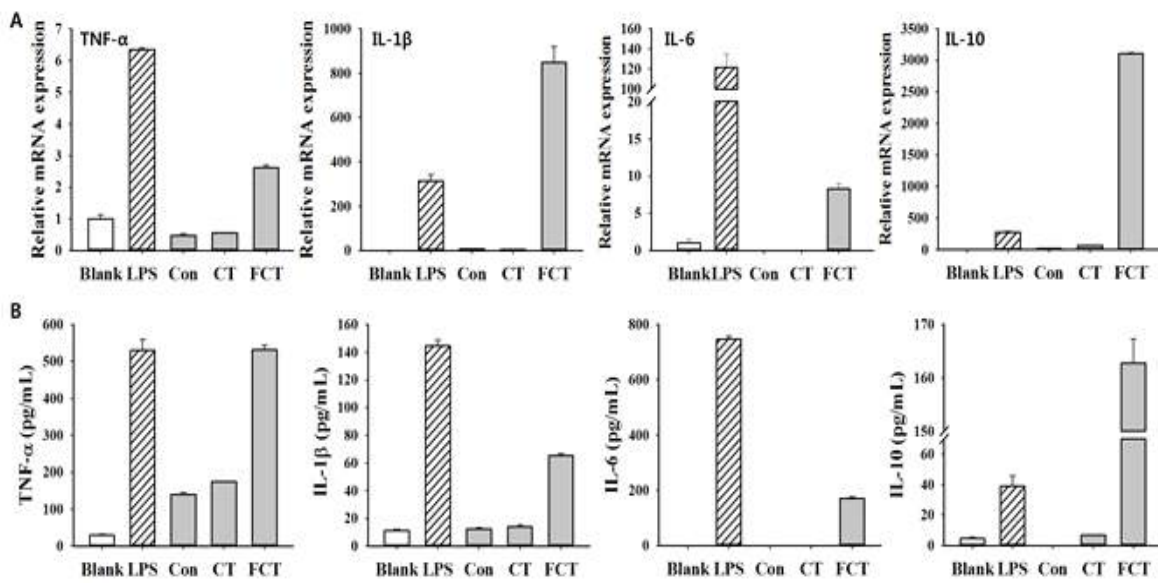


- \* Con : 우유
- \* CT : 꾸지뽕잎 첨가 우유
- \* FCT : 꾸지뽕잎 및 *L. gasseri* 505를 포함하는 신바이오틱스 발효분말

그림 1-6. 신바이오틱스 발효분말 처리에 따른 NO 생성량



- 신바이오틱스 발효분말의 면역증강 활성을 확인하기 위하여 real-time PCR 및 ELISA 분석을 통해 면역조절 관련 cytokine들의 mRNA 및 단백질 발현정도를 측정함.
- $TNF-\alpha$ 는 수지상세포를 성숙시켜 T 세포의 활성화와 성장 등을 조절하며 암세포의 살상 및 암 전이의 억제 작용 등의 항암작용을 나타냄(Strieter et al. 1993, Kikuchi et al. 2003).  $IL-1\beta$ 는 T 세포의 활성화, B 세포의 성숙 및 NK 세포의 활성을 증가시키며, 암세포의 증식을 억제하는 활성을 가지고 있고,  $IL-6$ 는 B 세포의 분화 촉진, 항체 분비 자극, Ig 생성 유도 및 T 세포의 분화 증식에 관여함(Chen et al. 2001, Delgado et al. 2003). 따라서 이 cytokine들의 생성을 조절하는 물질들은 면역반응을 조절하는 작용과 항암기능을 가지고 있을 것으로 추정됨.
- 따라서, Raw 264.7 cell에 신바이오틱스 발효분말을 24시간 처리한 후 면역조절 관련 cytokine들을 분석 결과, 신바이오틱스 발효분말을 처리하였을 때 염증 유발과 관련된 cytokine들( $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$ )의 mRNA는 감소하였으며, 염증 완화와 관련된 cytokine인  $IL-10$ 의 mRNA는 증가하였다. 또한  $IL-1\beta$ 와  $IL-6$ 의 단백질 발현량은 감소했고  $IL-10$ 의 단백질 발현량이 증가함을 통해 현저한 면역증강 활성을 나타냄(그림 1-7).



- \* Con : 우유
- \* CT : 꾸지뽕잎 첨가 우유
- \* FCT : 꾸지뽕잎 및 *L. gasseri* 505를 포함하는 신바이오틱스 발효분말

그림 1-7. 신바이오틱스 발효분말 처리에 따른 면역조절 cytokine 발현량 (A. real-time PCR을 통한 mRNA 발현량, B. ELISA를 통한 단백질 발현량)

- Nitric Oxide Synthase(NOS)는 L-arginine이 L-citruline으로 변화되는 과정에서 면역계에서 외부물질에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호 전달 물질인 NO를 생성함(Nathan et al. 1991). NOS는 세포질 내 항상 존재하는 constitutive(eNOS)와 면역학적으로 변화에 의해 유도되는 inducible form(iNOS)가 있으며, 이 중 LPS와 사이토카인에 의해 NOS 유전자 발현이 유도되는 것은 iNOS임(Vane et al. 1994).
- RAW 264.7 세포에서 신바이오틱스 발효분말에 의한 iNOS의 발현을 확인한 결과, mRNA 및 단백질 수준에서 모두 가장 높은 발현량을 나타내었음(그림 1-8).

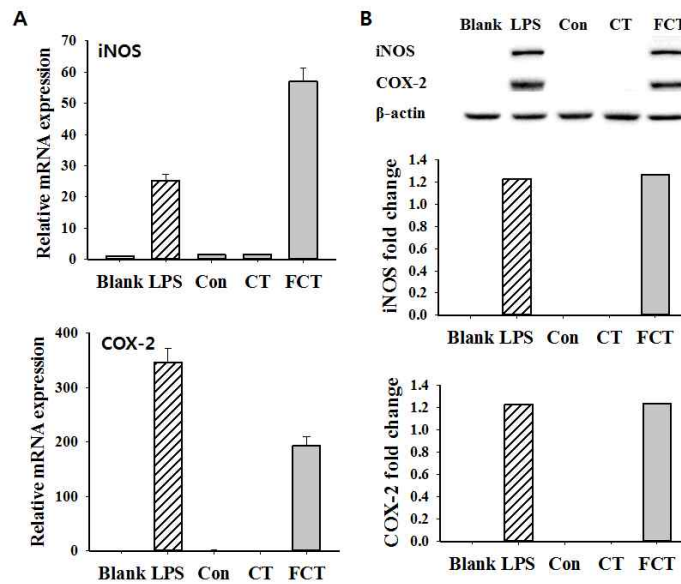


그림 1-8. 신바이오틱스 발효분말 처리에 따른 면역조절 marker 발현량 (A. real-time PCR을 통한 mRNA 발현량, B. Western-blotting을 통한 단백질 발현량)

## ② 신바이오틱스 내 지표물질의 기능성(항산화 및 염증억제 활성) 검토

- 상기 면역증강 활성 관련 실험결과를 근거로 하여 신바이오틱스 발효물의 면역 조절 효과를 확인하였으며, 신바이오틱스 발효물 내 기능성 지표물질의 효과를 확인하고자 MALDI-TOF/MS/MS 분석을 통해 확인된 milk peptide 21종의 기능성을 추가적으로 확인함(그림 1-9).
- milk peptide 21종의 항산화 활성을 ABTS, DPPH, FRAP, ORAC assay를 통해 확인한 결과, 종합적으로 항산화 활성이 우수한 peptide 6종(pep\_11, pep\_13, pep\_14, pep\_16, pep\_20, pep\_21)을 선별하였음. 이 중 pep\_14, pep\_16, pep\_21을 선별하여 전 임상 시험을 통한 장 질환 개선 기능성 검증실험에 사용하였음.

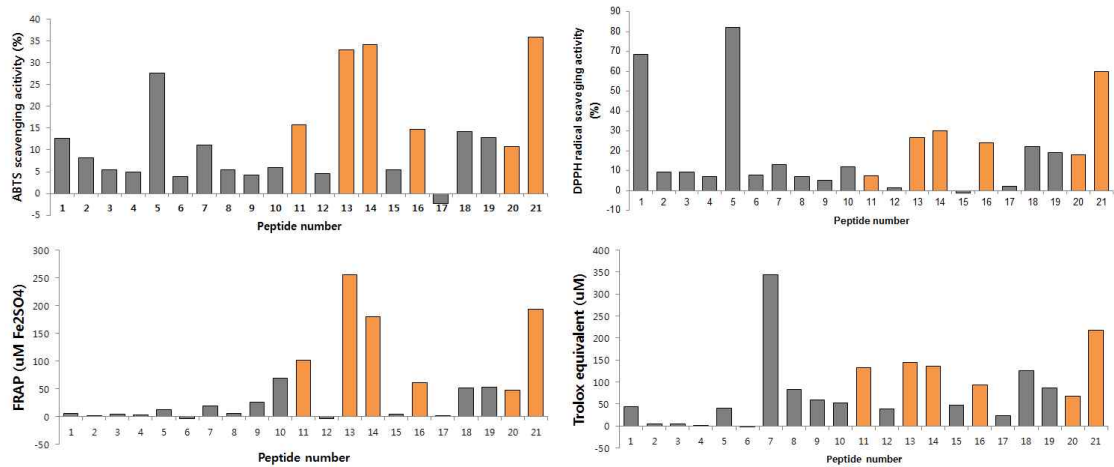


그림 1-9. 신바이오틱스 milk peptide 21종의 항산화 활성 측정 결과

- 장 염증 완화 활성을 평가하기 위하여 염증을 유발한 세포모델을 확립하였으며 기능성 지표물질(milk peptide) 탐색에 이용함. 사람 대장 상피 세포주인 HT-29를 염증 유발 물질인 lipopolysaccharides(LPS) 및 TNF- $\alpha$ 로 유도하여 기능성 지표물질 처리에 따른 염증 완화의 정도를 측정하였음.
- 신바이오틱스 지표물질의 세포독성 유무 확인(MTT assay) : milk peptide 21종이 HT-29 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행함.
- pep\_11과 pep\_13을 제외하고는 모든 처리 농도(0.1, 0.5, 1 mg/mL)에서 24시간 처리하였을 때 80% 이상의 세포생존율을 나타내는 것으로 보아 세포독성에 영향을 주지 않는 것으로 판단함. pep\_11과 pep\_13은 서열 내에 지용성 아미노산 서열이 많이 존재하여 peptide 용해 시 DMSO를 사용하여 세포독성에 영향을 준 것 이라 판단됨(그림 1-10).

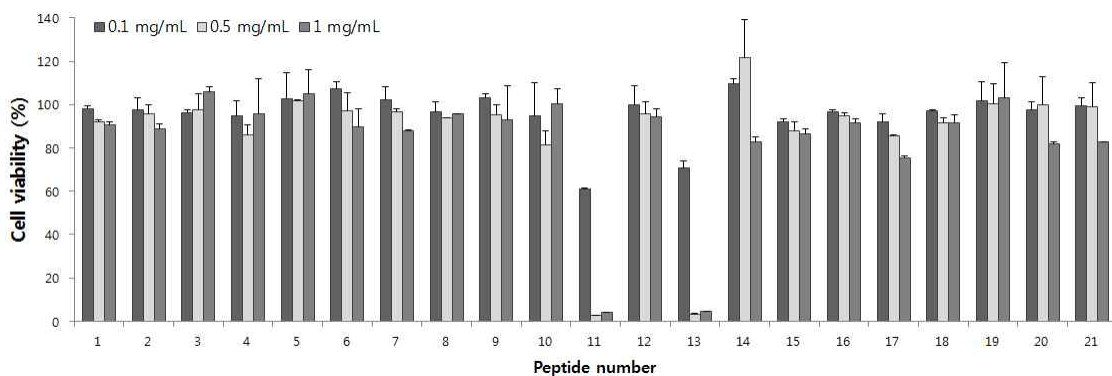


그림 1-10. 신바이오틱스 milk peptide 21종의 세포독성 유무 평가

- 신바이오틱스 지표물질인 milk peptide에 의한 염증 완화정도를 확인하기 위하여 NO 발현량을 측정하였으며, LPS로 염증을 유도한 HT-29세포에 milk peptide 21종을 50 및

100 ug/mL의 농도로 24시간 처리하였을 때 모두 NO 발현을 감소시킴에 따라 염증억제 활성을 나타냄(그림 1-11).

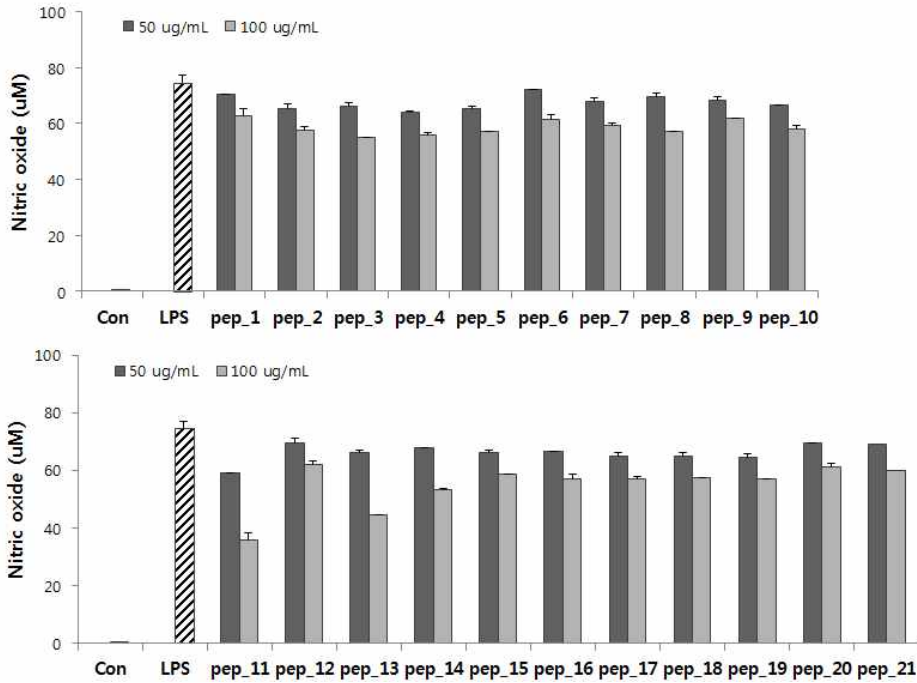


그림 1-11. 신바이오틱스 milk peptide 21종 처리에 따른 NO 발현량

(다) 전임상 시험을 통한 신바이오틱스 발효분말 및 지표물질의 세포독성 및 기능성 검증

① 염증성 장 질환 유도 마우스 모델 통한 신바이오틱스의 장 질환 개선 기능성 검증

- 신바이오틱스 소재 및 cell culture system 염증억제 스크리닝을 통해 선별한 지표물질의 마우스 모델을 이용한 염증성 장 질환 완화 조절 기능성을 검증함(그림 1-12).
- 투여 농도 및 그룹은 표 1-7과 같으며, 3주간 경구 투여를 진행하였음.

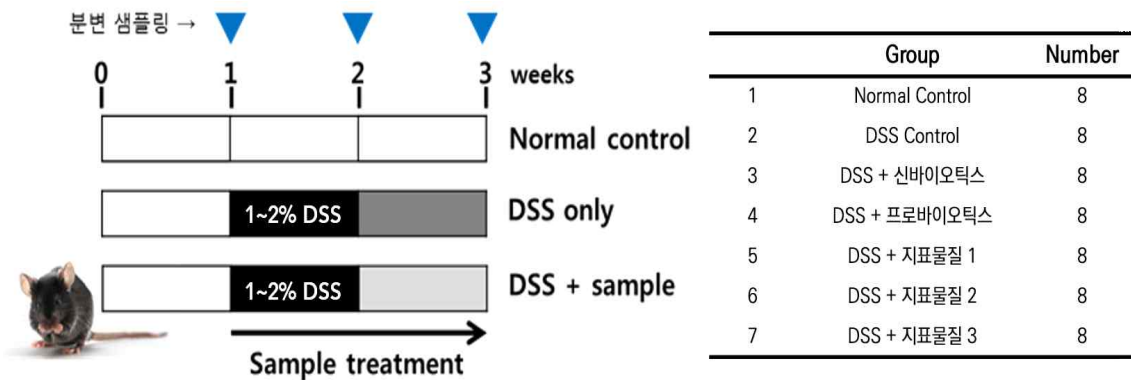


그림 1-12. 신바이오틱스 및 지표물질의 염증성 장 질환 개선 효능 검증 *in vivo* 모델

표 1-7. 장염증 개선 기능성 검증 실험 그룹

Treatment		n
Normal	PBS	8
Control	DSS + PBS	8
Syn	DSS + synbiotics (꾸지뽕발효분말)	8
Pro	DSS + probiotics	8
Pep1	DSS + pep 14	8
Pep2	DSS + pep 16	8
Pep3	DSS + pep 21	8

- \* Probiotics :  $10^8$  CFU/kgbw/day
- \* Synbiotics : 1500 mg/kg bw/day
- \* Peptide : 20 mg/kg bw/day

㉠ 체중 변화와 식이섭취량 확인 및 분변을 이용한 질병활성도(Disease activity index, DAI) 측정

- 예비실험 결과, DSS를 1.5%와 2.5% 농도로 처리했을 때 독성이 지나치게 높아 빈사 또는 사망 유도가 일어나 1.0%의 DSS를 처리하고자 하였으며, 마우스의 상태와 체중 변화에 따라 DSS의 농도를 변경하였음.
- 모든 그룹에서 1% DSS 자율급수를 진행한 결과 경구투여 4일 후 분변의 상태변화가 미미하였고 체중이 증가하였으므로, 체중에 따른 장염증 유도를 위해 DSS의 농도를 2%로 조절하여 자율급수를 진행함.
- 그룹에 따른 마우스의 체중변화를 관찰한 결과, DSS를 처리하지 않은 normal군의 경우 꾸준한 체중 증가를 나타냈으며, DSS를 단독으로 처리한 실험군의 경우 체중 감소율은 27.92%였음(표 1-8).
- DSS를 처리한 실험군의 경우에는 DSS 단독 처리군보다 지표물질 2번을 투여한 그룹의 체중 감소율이 28.07%로 가장 컸으며, 신바이오틱스를 투여한 실험군에서도 25.82% 감소하는 경향을 보였음.
- 프로바이오틱스를 투여한 실험군에서 체중감소율은 16.86%로 DSS처리군 중에서는 가장 낮은 수준의 체중 감소율을 보였음.
- 지표물질 1과 3의 체중 감소율은 각각 22.75, 23.17%였으며, DSS 단독 투여군의 체중 감소율보다는 낮은 수준으로 나타남.

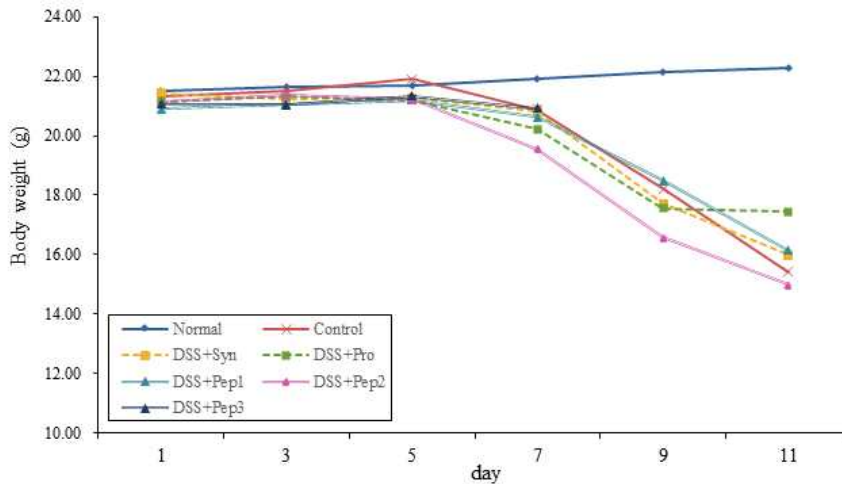


그림 1-13. 그룹 별 1-2% DSS 급수에 따른 몸무게 변화 확인

표 1-8. 그룹별 체중 변화량

	초기체중	마지막체중	체중증가량	체중증가율(%)
Normal	21.53	22.19	0.66	3.09
Control (DSS)	21.37	15.42	-5.95	-27.92
DSS+synbiotics	21.43	15.97	-5.60	-25.82
DSS+probiotics	21.16	17.43	-3.64	-16.86
DSS+지표물질 1	20.91	16.14	-4.78	-22.75
DSS+지표물질 2	21.13	14.98	-5.85	-28.07
DSS+지표물질 3	21.06	16.16	-4.90	-23.17

- 마우스의 그룹별 식이섭취량은 이틀 간격으로 측정하였고, normal 군에 비하여 대부분 식이섭취가 크게 감소하는 것을 확인함(표 1-9).
- 특히 지표물질 2와 3 처리군의 식이섭취량이 크게 감소하였으나, 지표물질 3 처리군은 식이섭취량의 감소에 비하여 상대적으로 체중감소율이 낮은 것으로 확인됨.

표 1-9. 그룹별 식이섭취량 변화 확인

	1차 (1-3일)	2차 (3-5일)	3차 (5-7일)	4차 (7-9일)	5차 (9-11일)	섭취증가율 (%)
Normal	1.39	1.37	1.43	1.45	1.44	3.43
Control (DSS)	0.97	0.96	0.74	0.40	0.50	-48.63
DSS+synbiotics	1.19	1.22	1.23	0.58	0.59	-50.75
DSS+probiotics	1.37	1.33	0.99	0.57	0.91	-33.56
DSS+지표물질 1	1.45	1.33	1.14	0.77	0.94	-35.02
DSS+지표물질 2	1.41	1.35	1.01	0.69	0.43	-69.30
DSS+지표물질 3	1.44	1.27	1.30	0.69	0.45	-68.41

- 2% DSS 처리를 통하여 분변의 상태에 따른 질병활성도를 계산하였고 점수가 높을수록 설사와 혈변 증상이 심한 것으로 판단함.
- 8일 간 DSS를 처리하며 그룹 별로 관찰한 결과, 대조군 대비 지표물질 2 처리군이 혈변 및 설사가 가장 심하게 나타났으며 11일째에는 모든 처리군에서 혈변 및 설사 증상이 완화되었음을 확인함(그림 1-14).

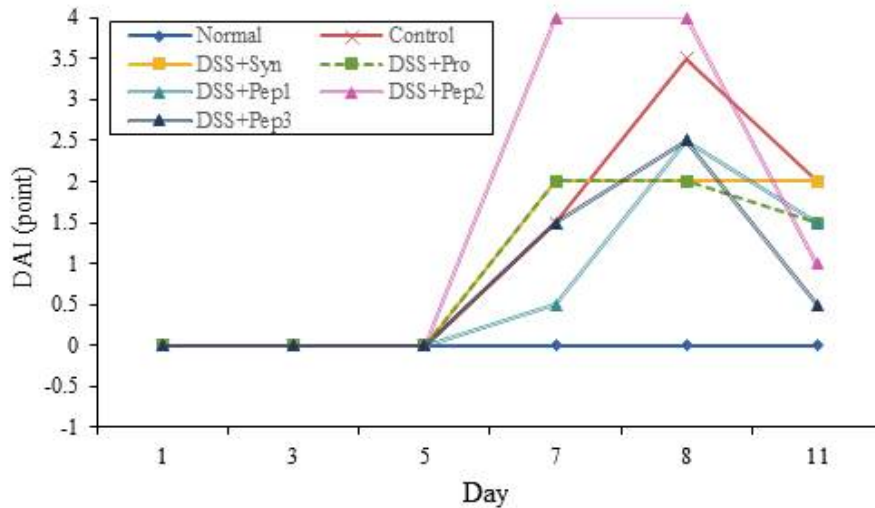


그림 1-14. DSS 급수 후 분변을 이용한 질병활성도 점수 (DAI Score)

- 그룹에 따른 장 길이의 차이를 비교한 결과, DSS를 처리하지 않은 normal군의 소장은  $38.39 \pm 1.59$  cm, 대장은  $7.33 \pm 0.79$  cm 였으며, DSS를 처리한 control군의 소장은  $36.54 \pm 1.15$  cm, 대장은  $4.73 \pm 0.53$  cm로 DSS를 처리하지 않은 normal군에 비하여 짧게 나타남.
- 신바이오틱스와 프로바이오틱스 처리군의 경우 소장은 각각  $36.51 \pm 1.45$ ,  $36.03 \pm 1.34$  cm 였으며, 대장은 각각  $5.09 \pm 0.54$ ,  $5.38 \pm 0.57$  cm 로 normal군에 비하여 짧게 나타났으나, DSS 단독 처리군과 비교하였을 때 크게 차이를 나타내지 않음.
- 지표물질 처리군의 경우 소장은  $35.96 \pm 1.47$ ,  $35.25 \pm 1.21$ ,  $37.41 \pm 1.65$  cm로 지표물질 3 처리군이 DSS를 처리한 실험군 중 가장 긴 소장길이를 나타냈음.
- 지표물질 처리군의 대장 길이는 각각  $5.33 \pm 0.08$ ,  $4.75 \pm 0.33$ ,  $5.26 \pm 0.79$  cm로 DSS 단독 처리군과 비교하였을 때 지표물질 2 처리군의 경우 비슷한 수준을 나타냈으며, 지표물질 1과 3 처리군의 경우 대장의 길이가 더 긴 것을 확인함.

표 1-10. 그룹별 장 길이 변화 확인

(unit : cm)

	소장	대장
Normal	38.39±1.59	7.33±0.79
Control (DSS)	36.54±1.15	4.73±0.53
DSS+synbiotics	36.51±1.45	5.09±0.54
DSS+probiotics	36.03±1.34	5.38±0.57
DSS+지표물질 1	35.96±1.47	5.33±0.08
DSS+지표물질 2	35.25±1.21	4.75±0.33
DSS+지표물질 3	37.41±1.65	5.26±0.79

- 장기 무게의 경우 DSS를 처리하지 않은 normal군의 간의 무게는 평균 1.13±0.10 g이었으며, 비장은 0.06±0.01 g으로 확인됨.
- DSS를 처리한 control군의 평균 간 무게는 0.78±0.12 g, 비장은 평균0.04±0.01 g으로 DSS를 처리하지 않은 normal군에 비하여 낮은 무게를 나타냈으며, 지표물질 2 처리군 또한 control 군과 유사하게 장기 무게가 감소한 것을 확인함.
- DSS를 처리한 실험군 모두 normal 군에 비하여 간의 무게가 낮게 나타났으며 프로바이오틱스를 처리한 실험군에서 간(0.90±0.03 g)과 비장(0.09±0.02 g)의 무게가 높았음.
- DSS 처리군 중 프로바이오틱스와 지표물질 1 처리군을 제외한 나머지 처리군은 normal 군에 비해 비장 무게가 적었으며, 지표물질 2의 비장 무게는 0.04±0.01 g으로 control군과 동일한 수준으로 나타남.

표 1-11. 그룹별 장기 무게 확인

(unit : g/마리)

	간	비장
Normal	1.13±0.10	0.06±0.01
Control (DSS)	0.78±0.12	0.04±0.01
DSS+synbiotics	0.81±0.09	0.05±0.02
DSS+probiotics	0.90±0.03	0.09±0.02
DSS+지표물질 1	0.88±0.07	0.06±0.02
DSS+지표물질 2	0.78±0.04	0.04±0.01
DSS+지표물질 3	0.89±0.01	0.05±0.02

㉞ 결장 조직의 병리학적 검사

- 결장 부분을 10% 포르말린 용액에 24시간 고정 후 수돗물로 세척하여 알코올로 탈수시킴. 파라핀으로 고정하여 24시간 동안 56℃에서 반응시킨 후 슬라이스하고, 슬라이드에 수집하여 탈파라핀화 후에 헤마토실린과 에오신으로 염색하여 현미경을 통해 관찰함.
- 검경결과, 대조군(normal)에 비하여 DSS를 처리한 모든 실험군에서 공장염(colitis)이 유발된 것이 관찰되었으며, 양성 대조군(control)과 비교하였을 때 peptide 2와 peptide 3을 투여한 그룹에서 병변 정도가 감소하는 것을 확인함(그림 1-15).



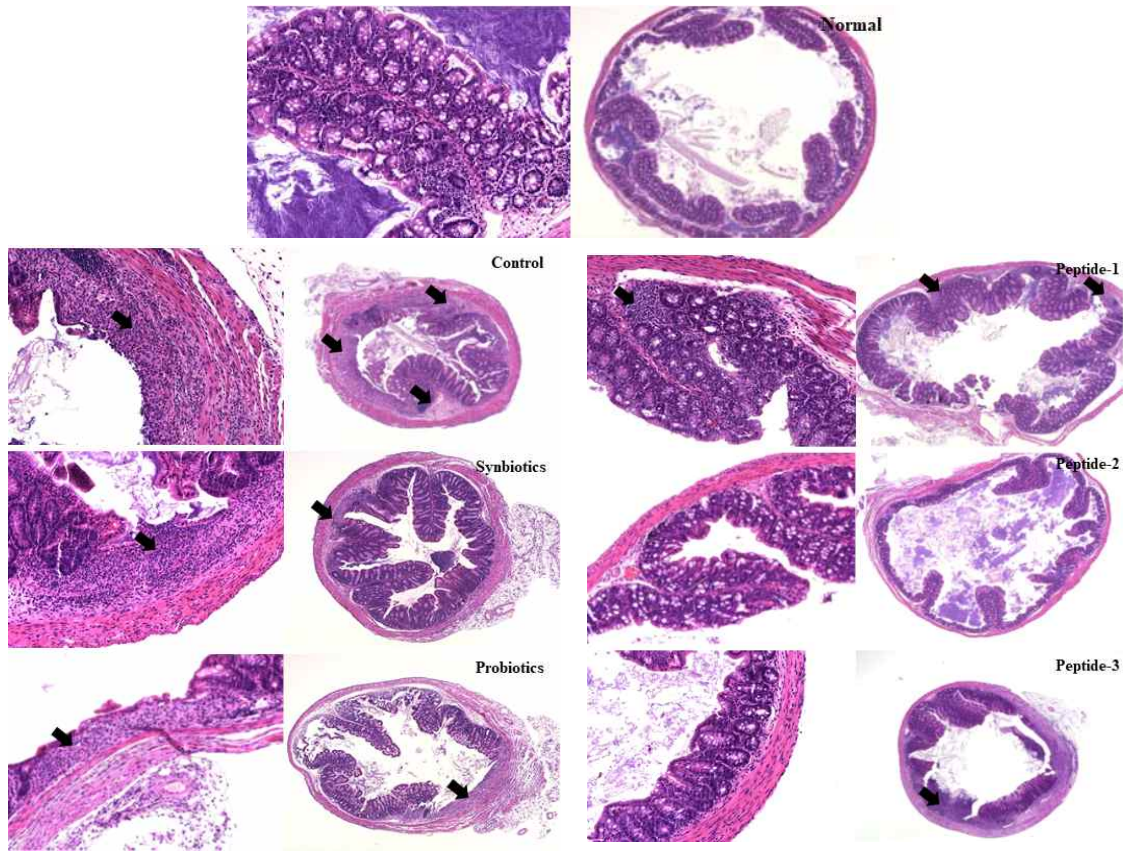


그림 1-15. H&E staining을 이용한 조직병리학적 검사

- peptide 3 투여군의 경우, severe(++++에 해당되는 개체가 관찰되었으나 급성으로 병변이 심하게 진행된 것으로 보아 DSS가 개체에 특이적으로 많이 투여된 것으로 판단됨.
- 간에서의 양성 대조군에 비하여 synbiotics > probiotics > peptide 1 = peptide 2 > peptide 3 순으로 위축 소견이 관찰되어 peptide 3의 위축 정도가 가장 적게 관찰됨.
- 이러한 소견은 시험물질의 영향보다는 공장염에 의하여 식이섭취량이 감소하면서 발생한 이차적인 영향으로 판단하였으며, 종합적으로 비교하였을 때 양성 대조군에 비하여 peptide 1, 2, 3을 투여한 실험군의 병변 정도가 낮게 나타나는 것으로 확인됨(표 1-12).

표 1-12. 조직병리 그룹별 증상정도 비교

Organ	Score	Normal (3)	Control (3)	Synbiotics (3)	Probiotics (3)	Peptide 1 (3)	Peptide 2 (3)	Peptide 3 (3)
Colon	±	0	0	1	1	3	1	1
	+	0	0	2	1	0	0	0
	++	0	2	0	1	0	0	0
	+++	0	1	0	0	0	0	0
	++++	0	0	0	0	0	0	1
Liver	±	0	0	0	0	1	0	2
	+	0	0	2	1	1	2	0
	++	0	1	1	1	1	1	0
	+++	0	2	0	1	0	0	0

Grade- ±: minimal, +: mild, ++: moderate, +++: marked, ++++: severe

㉔ 결장 조직의 사이토카인 발현 측정

- 결장 조직에서 염증 발현 마커 사이토카인의 생성을 RT-PCR을 이용하여 mRNA 수준에서 확인하며, 염증 발현 마커로는 IL-1 $\beta$ , IL-6, COX-2, TNF- $\alpha$ , NOS2의 mRNA 발현량을 정량함.

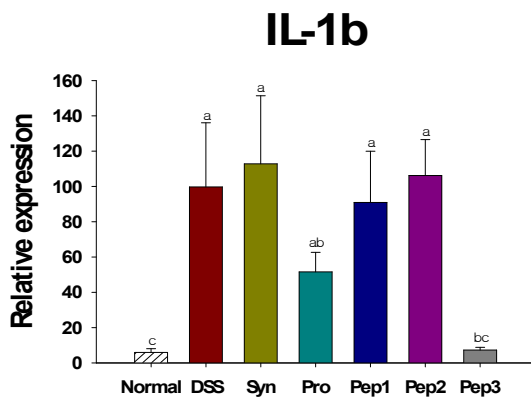


그림 1-16. 결장 내 IL-1 $\beta$  mRNA 발현량

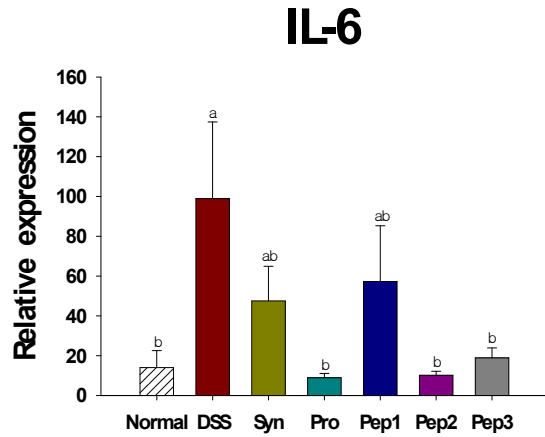


그림 1-17. 결장 내 IL-6 mRNA 발현량

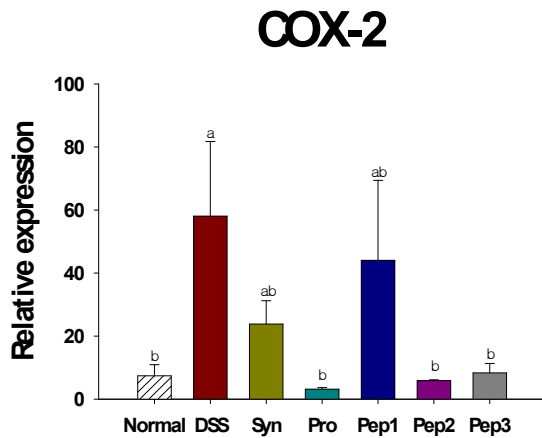


그림 1-18. 결장 내 COX-2 mRNA 발현량

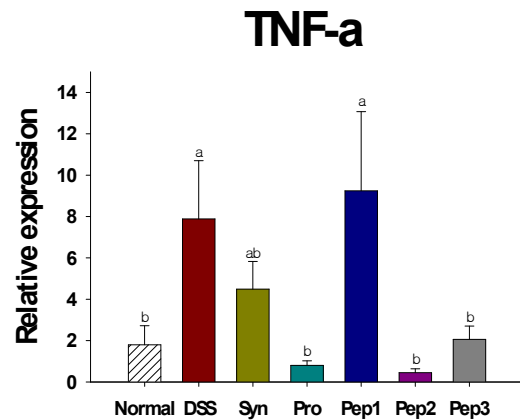


그림 1-19. 결장 내 TNF- $\alpha$  mRNA 발현량

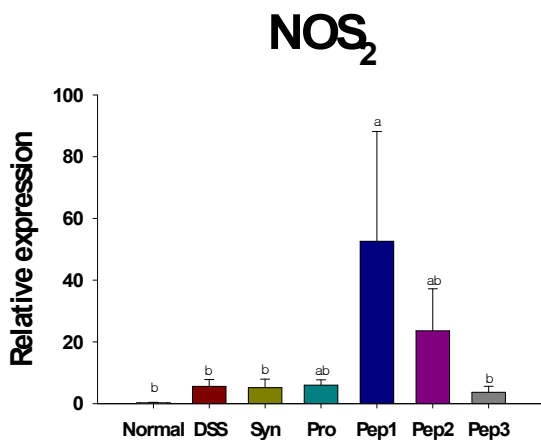


그림 1-20. 결장 내 NOS<sub>2</sub> mRNA 발현량

- IL-1 $\beta$ 는 활성화된 대식세포에 의해 분비되는 주요 사이토카인으로 세포 증식, 분화 및 세포사멸을 포함하는 다양한 세포활동에 관여함. 이의 상대적 유전자 발현량을 확인한 결과, DSS를 단독으로 처리한 control군 대비 peptide 3 처리군에서 유전자 발현량이 낮았고(p<0.05), 이는 normal군과 유사한 결과를 나타냄(그림1-16).
- IL-6는 T-cell이나 대식세포(macrophage)에서 분비되는 활성인자로 감염, 외상 특히 화상이나 염증으로 이어지는 조직손상으로 여러 염증 반응을 촉진함. IL-6의 과잉생산은 염증성 질환, 여러 면역 이상증, 림프계 종양 발생과 깊은 관련이 있음. 상대적 유전자 발현량을 측정 결과, control군 대비 probiotics, peptide 2, peptide 3 처리군에서 mRNA 발현량이 유의적으로 낮은 것을 확인함(p<0.05, 그림1-17).
- COX-2는 염증반응과 관련된 prostaglandin 합성에 관여하는 사이토카인으로 상대적 유전자 발현량 확인 결과, control군 대비 probiotics, peptide 2, peptide 3 처리군에서 COX-2 유전자 발현량이 유의적으로 낮음을 확인함(p<0.05, 그림1-18).
- TNF- $\alpha$ 는 면역세포 조절의 중요한 역할을 하며, 체내 발열원으로 종양세포에 신호를 주어 자살하도록 만들거나, 그 밖에 바이러스의 세포 내 복제 저해, 대식세포 자극, 염증반응 촉진, 내재면역반응(innate immune response)에 폭넓게 관여하는 신호분자임. 이의 상대적 유전자 발현량을 확인한 결과, control군 대비 probiotics, peptide 2, peptide 3 처리군에서 상대적 유전자 발현량이 낮게 확인됨(p<0.05, 그림1-19).
- 산화질소는 신경 전달 및 항균 및 항암 작용을 포함한 여러 과정에서 생물학적 매개체로 작용하는 반응성 자유 라디칼임. NOS2는 간에서 발현되고 lipopolysaccharide와 특정 사이토카인의 조합에 의해 유도 될 수 있는 nitric oxide synthase를 코딩하는 유전자로 발현이 많이 될수록 산화질소의 수준이 높음을 있음을 의미함. 상대적 유전자 발현량 측정 결과, control군 보다 peptide 1 처리군의 상대적 유전자 발현량이 높게 나타남(p<0.05, 그림 1-20).
- 프로바이오틱스와 peptide 3 처리군에서 공통적으로 염증 발현 마커 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, COX-2, TNF- $\alpha$ )의 mRNA 발현량이 control군 대비 적은 것을 확인하였으며, 두 물질이 염증 개선에 효과가 있다고 사료됨.

㉔ 결장 조직의 항산화 효소 발현 측정

- 결장 조직을 균질화하여 결장 조직 내의 항산화 효소인 myeloperoxidase(MPO) 활성, superoxide dismutase(SOD) 활성, catalase(CAT) activity, glutathione peroxidase activity(GPx) 등을 RT-PCR를 이용하여 확인함.

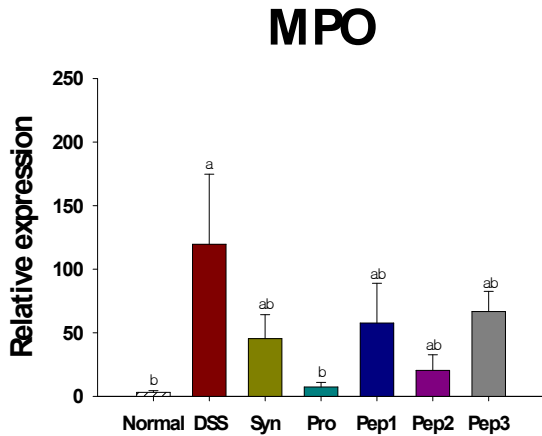


그림 1-21. 결장 내 MPO 활성 확인

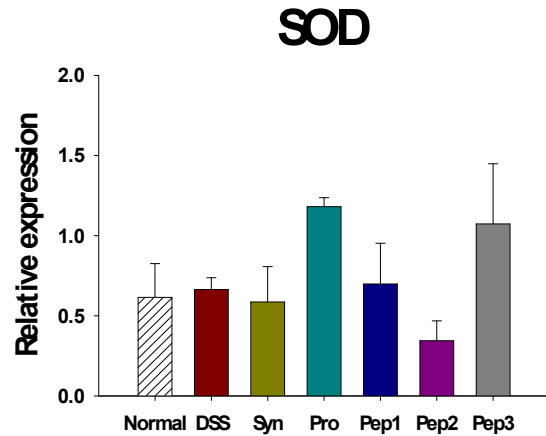


그림 1-22. 결장 내 SOD 활성 확인

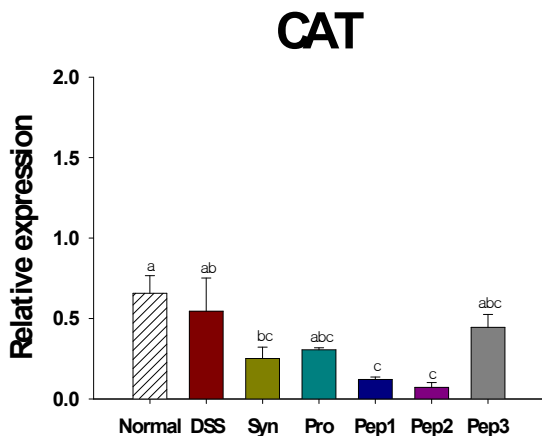


그림 1-23. 결장 내 CAT 활성 확인

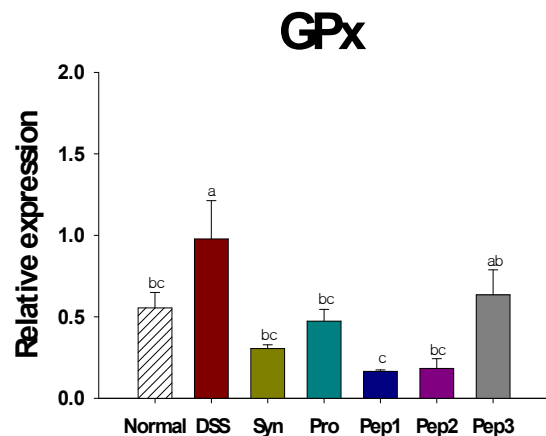


그림 1-24. 결장 내 GPx 활성 확인

- MPO는 주로 호중구에 포함되어있는 효소로, 과산화효소와 염소이온에서 차아염소산을 생산하는 반응을 촉매하여 항균·항바이러스 작용을 가짐. 상대적 유전자 발현량 측정 결과 control 처리군에 비하여 probiotics 처리군에서 MPO 발현량이 유의적으로 낮게 나타났고 ( $p < 0.05$ ), synbiotics와 peptide 처리군에서도 낮게 확인됨(그림 1-21).
- SOD는 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔줌으로써 독성으로부터 세포를 방어하는 작용을 함. 상대적 유전자 발현량 측정 결과 normal군과 control군 대비 probiotics와 peptide 3 처리군에서 유전자 발현량이 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었음(그림 1-22).

- CAT는 과산화수소가 분해되어 물과 산소가 만들어지는 반응을 촉매하는 효소로 상대적 유전자 발현량 측정 결과 control군에 비하여 나머지 처리군이 catalase에 영향을 미치지 않았음(그림 1-23).
- GPx는 글루타티온과 과산화수소 또는 지질과산화물로부터 산화형 글루타티온과 물 또는 알코올을 생성하는 반응을 촉매하는 효소이며, 생체 내에서 과산화수소나 지질과산화물을 제거하는 작용을 함. 상대적 유전자 발현량 측정 결과 control군에서 가장 높게 나타났으며 처리군과 normal군 사이에 유의적 차이는 없었으나 처리군에서 더 낮은 발현량을 나타내었음(그림 1-24).

㉞ 혈청의 Nitric Oxide(NO) 측정

- 혈청으로부터 NO를 측정한 결과, probiotics 투여군과 peptide-1 투여군에서 DSS만을 투여한 그룹에 비하여 NO 생성이 감소하는 것을 확인하였음(그림 1-25).

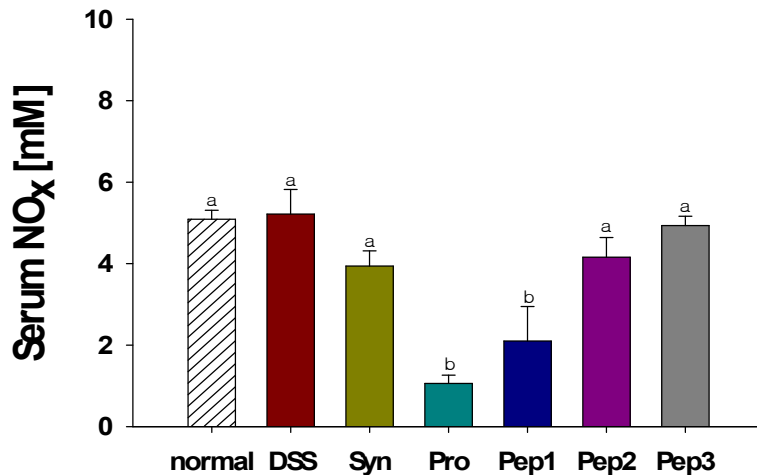


그림 1-25. 혈청 Nitric Oxide (NO) 비교

㉞ 혈청의 염증성 사이토카인 생성량 측정

- 염증 발현 마커 사이토카인의 생성을 ELISA kit를 통하여 확인하였으며, 염증 발현 마커로는  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ , IL-6, IL-18의 농도를 확인함.
- $TNF-\alpha$ 는 control군 대비 peptide 처리군에서 모두 낮은 농도로 확인되었으며, peptide 2에서 다른 처리군에 비하여 상대적으로 높게 확인되었으나 유의적 차이는 나타나지 않았음(그림 1-26).
- $IFN-\gamma$ 도 control군 대비 peptide 처리군에서 모두 낮은 농도로 확인되었으며, peptide 3에서 다른 처리군에 비하여 낮은 농도로 확인되었으나 유의적 차이는 나타나지 않았음(그림 1-27).

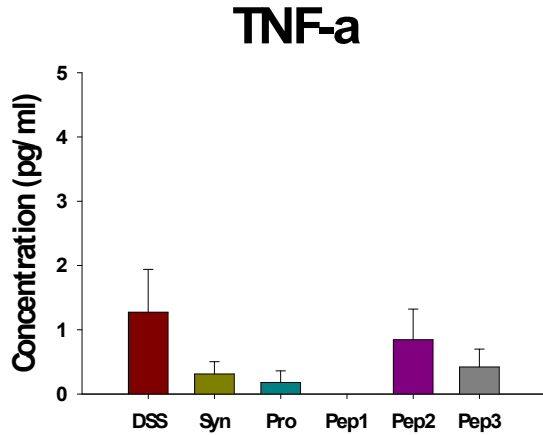


그림 1-26. 혈액 TNF- $\alpha$  농도

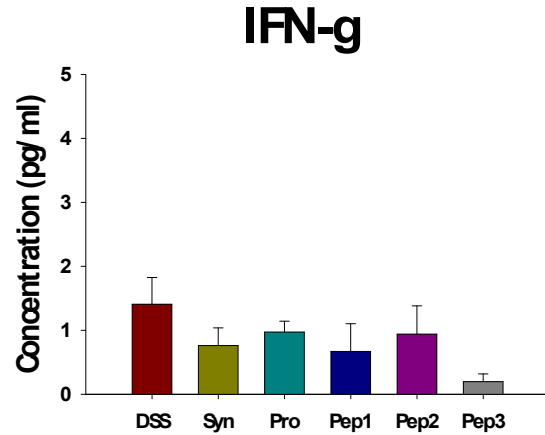


그림 1-27. 혈액 IFN- $\gamma$  농도

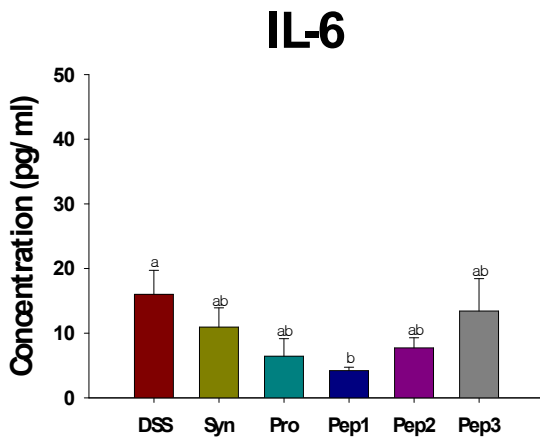


그림 1-28. 혈액 IL-6 농도

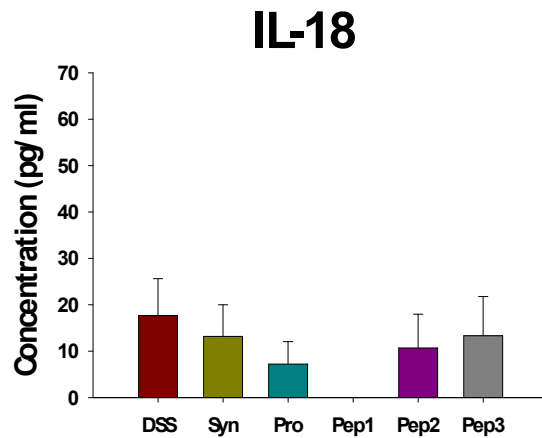


그림 1-29. 혈액 IL-18 농도

- IL-6와 IL-18 농도는 control군 대비 peptide 1 처리군에서 낮게 확인되었으며, 두 개의 pro-inflammatory 사이토카인의 농도가 유사한 경향을 보이는 것으로 확인됨(그림 1-28~29).
- 혈청에서의 염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-18)을 확인해 보았을 때, IL-6를 제외한 사이토카인 결과에서는 그룹 간 유의적인 차이를 나타내지 않았음.
- IL-6의 경우에는 control군 대비 peptide 1을 처리한 처리군에서 농도가 유의적으로 낮은 것을 확인하였음( $p < 0.05$ ).
- 혈청에서 확인한 결과에서는 peptide 1 처리군에서 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18 사이토카인의 농도가 낮게 확인되었으며, 이는 결장조직에서의 사이토카인 발현을 측정했던 결과와 약간의 차이를 보였음.

(라) 신바이오틱스의 안전성 검증

① 단회 투여 독성 시험

- 단회 독성시험은 synbiotics 1500 mg/kg bw의 고농도로만 진행되었으며, 1회 경구 투여 하여 6시간 동안 아무런 증상이 발견되지 않았고 그 후 2주간 이상 증후 및 사망사례가 없었음(표 1-13).

표 1-13. 단회 독성 실험을 통한 생존율 확인

Group	Survival rate (%)
Control	100
Synbiotics	100

- 1500 mg/kg bw의 synbiotics 투여 그룹과 대조군을 비교했을 때 체중의 변화 및 장기 무게에서 유의적 차이를 보이지 않은 것을 보아 1500 mg/kg bw의 synbiotics의 단회 투여는 독성도를 나타내지 않음을 확인하였음(표 1-14~15).

표 1-14. 단회 투여 독성 시험 중 체중 변화 확인

(단위: g, mean±SD)

기간	Control	Synbiotics
1일	15.89±1.91	15.38±1.87
4일	19.87±2.39	19.84±1.66
7일	20.54±2.53	20.83±1.86
11일	20.57±2.84	20.49±2.13
14일	21.96±2.20	21.29±2.36

표 1-15. 단회 투여 독성 시험에 대한 체중 대비 장기 무게 비율 (%)

(단위: %, mean±SD)

	Control	Synbiotics
뇌	2.02±0.34	1.89±0.14
폐	0.96±0.13	0.97±0.08
흉선	0.43±0.09	0.44±0.08
심장	0.69±0.10	0.63±0.05
간	4.69±0.52	4.64±0.34
비장	0.42±0.10	0.35±0.04
신장	1.56±0.28	1.46±0.25
고환	0.90±0.09	0.93±0.13

- 혈액학적 분석 결과 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, glucose, total protein을 확인한 결과, synbiotics 고농도 투여군에서 ALP와 glucose 수치가 대조군에 비하여 상대적으로 낮게 확인되었으나 유의적 차이를 보이지 않았음(표 1-16).

표 1-16. 단회 투여 독성 시험에 대한 혈액학적 분석 확인

Parameter	Control	Synbiotics
Albumin (g/dL)	3.3±0.2	3.2±0.2
ALP (U/L)	195.3±35.1	176.9±31.4
ALT (U/L)	37.8±4.9	39.5±5.3
AST (U/L)	69.2±14.1	64.0±8.5
Bilirubin (mg/dL)	0.01±0.00	0.01±0.00
Glucose (mg/dL)	170.1±26.6	159.6±22.8
Total Protein (g/dL)	5.2±0.3	5.2±0.4
AG ratio	1.86±0.26	1.72±0.35



② 다회 투여 독성 시험

- 다회 독성 시험은 synbiotics 저농도, 중농도, 고농도의 농도로 12주간 1일 1투여를 진행하였으며, 12주간 이상증후 및 사망사례가 없었음(표 1-17).

표 1-17. 다회 독성 실험을 통한 생존율 확인

그룹	생존율 (%)
Control	100
Low Synbiotics	100
Mid Synbiotics	100
High Synbiotics	100

- 2주 간격으로 몸무게의 변화를 측정한 결과 수컷과 암컷 간의 체중 차이가 있었으나 그룹 간 유의적인 차이는 나타나지 않았음(표 1-18).

표 1-18. 단회 투여 독성 시험 중 체중 변화 확인

(단위: g, mean±SD)

기간	Control	Low-Syn	Mid-Syn	High-Syn
0주	19.15±7.4	19.29±7.5	19.69±7.3	19.54±7.6
2주	20.19±8.1	20.63±8.4	21.16±8.4	21.16±8.2
4주	21.86±8.7	22.17±8.9	22.89±8.5	22.99±9.1
6주	22.47±9.2	23.25±9.2	23.61±9.2	23.89±9.1
8주	23.16±9.2	24.15±9.2	24.18±9.1	24.44±9.0
10주	23.64±8.8	24.27±8.9	25.08±9.1	25.12±8.9
12주	24.49±9.3	24.96±9.4	25.40±9.1	25.86±9.2

- 2주 간의 반복 투여 후 희생을 통하여 체중 대비 장기무게의 비율을 비교한 결과, 고농도의 신바이오틱스를 투여한 실험군에서 흉선(갑상선)과 고환이 유의적으로 작게 확인되었으며, 중농도의 신바이오틱스를 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 뇌와 흉선이 유의적으로 작게 확인되었음(표 1-19).

- 그룹 간 장기 무게의 차이는 투여 농도에 의존적으로 나타나지 않아 신바이오틱스 투여로 인한 독성학적 변화로 해석하기 어려우며, 형태학적 변화는 동반되지 않았음.

- 다른 장기들의 무게는 실험군에 따른 유의적 차이가 나타나지 않았음.

표 1-19. 다회 투여 독성 시험에 대한 체중 대비 장기 무게 비율 (%)

(단위: %, mean±SD)

	Control	Low-Syn	Mid-Syn	High-Syn
뇌	1.90±0.12 <sup>a</sup>	1.92±0.12 <sup>a</sup>	1.68±0.09 <sup>b</sup>	1.87±0.15 <sup>ab</sup>
폐	0.66±0.03 <sup>ab</sup>	0.71±0.04 <sup>a</sup>	0.66±0.04 <sup>ab</sup>	0.64±0.09 <sup>b</sup>
흉선	0.33±0.06 <sup>a</sup>	0.31±0.07 <sup>ab</sup>	0.27±0.04 <sup>bc</sup>	0.23±0.05 <sup>c</sup>
심장	0.51±0.06	0.54±0.07	0.51±0.04	0.55±0.06
간	4.04±0.35	4.12±0.47	4.23±0.48	4.14±0.36
비장	0.25±0.02	0.25±0.05	0.24±0.03	0.25±0.05
신장	1.30±0.17	1.38±0.28	1.34±0.30	1.36±0.19
고환	0.88±0.08 <sup>a</sup>	0.81±0.11 <sup>ab</sup>	0.82±0.09 <sup>ab</sup>	0.75±0.10 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>The letters within the same row were significantly different (P<0.05).

- 혈액학적 분석을 통하여 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, glucose, total protein, AG ratio 등을 확인한 결과, 중농도의 신바이오틱스를 투여한 그룹은 대조군에 비하여 glucose 양이 낮게 확인되었음(표 1-20).

표 1-20. 단회 투여 독성 시험에 대한 혈액학적 분석 확인

Parameter	Control	Low-Syn	Mid-Syn	High-Syn
Albumin (g/dL)	3.0±0.1	2.9±0.1	3.1±0.1	3.1±0.2
ALP (U/L)	94.3±24.9	98.4±25.2	102.6±34.0	103.8±31.0
ALT (U/L)	44.7±15.5	43.8±16.2	38.5±6.2	39.0±4.6
AST (U/L)	78.3±25.3	81.2±33.8	71.7±12.2	65.5±7.3
Bilirubin (mg/dL)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Glucose (mg/dL)	200.5±30.1 <sup>a</sup>	178.7±43.1 <sup>ab</sup>	167.2±34.3 <sup>b</sup>	168.8±31.6 <sup>ab</sup>
Total Protein (g/dL)	53.6±9.2	58.2±7.6	56.4±8.0	54.9±12.3
AG ratio	1.4±0.2	1.2±0.1	1.3±0.2	1.4±0.3

(2) 신바이오틱스 소재의 표준화 및 제품 규격화

(가) 신바이오틱스 발효유 소량 제조

① 신바이오틱스 발효유 제조를 위한 기초공정도 및 최적 배합비 작성

- 기능성 신바이오틱스 소재(꾸지뽕잎 추출물 및 *L. gasseri* 505)를 이용한 발효액 제조를 위한 최적 배합비 작성(표 1-21)
- 기능성 신바이오틱스 소재(꾸지뽕잎 추출물 및 *L. gasseri* 505)를 이용한 발효액 제조를 위한 기초공정도 확립(그림 1-30)
- 신바이오틱스 소재 첨가 발효액의 제조 방법은 다음과 같으며, 제조한 발효액은 그림 1-31과 같음.

㉠ 원료 (우유, 꾸지뽕잎 추출물, 정백당) 계량 및 교반 (무가당은 정백당 및 향 제외)

㉡ 향 투입 후 교반

㉢ 살균 (95℃, 5분)

㉣ 냉각 (41-43℃로 조정)

㉤ 프로바이오틱스 접종 ( $10^{10}$  CFU/mL)

㉥ 41℃ 배양 후 pH 4.4-4.5에서 배양 종료

㉦ 냉각 후 커드 파쇄 (그림 1-31)

표 1-21. 신바이오틱스 발효유 배합비

원료명	합량(%)
	플레인
우유	86.93
가당꾸지뽕농축액(60bx)	0.7
선별 유산균( $10^9-10^{10}$ cfu/g)	0.3
배양 종균	0.2unit/L
정백당	12
향	0.07
합계	100

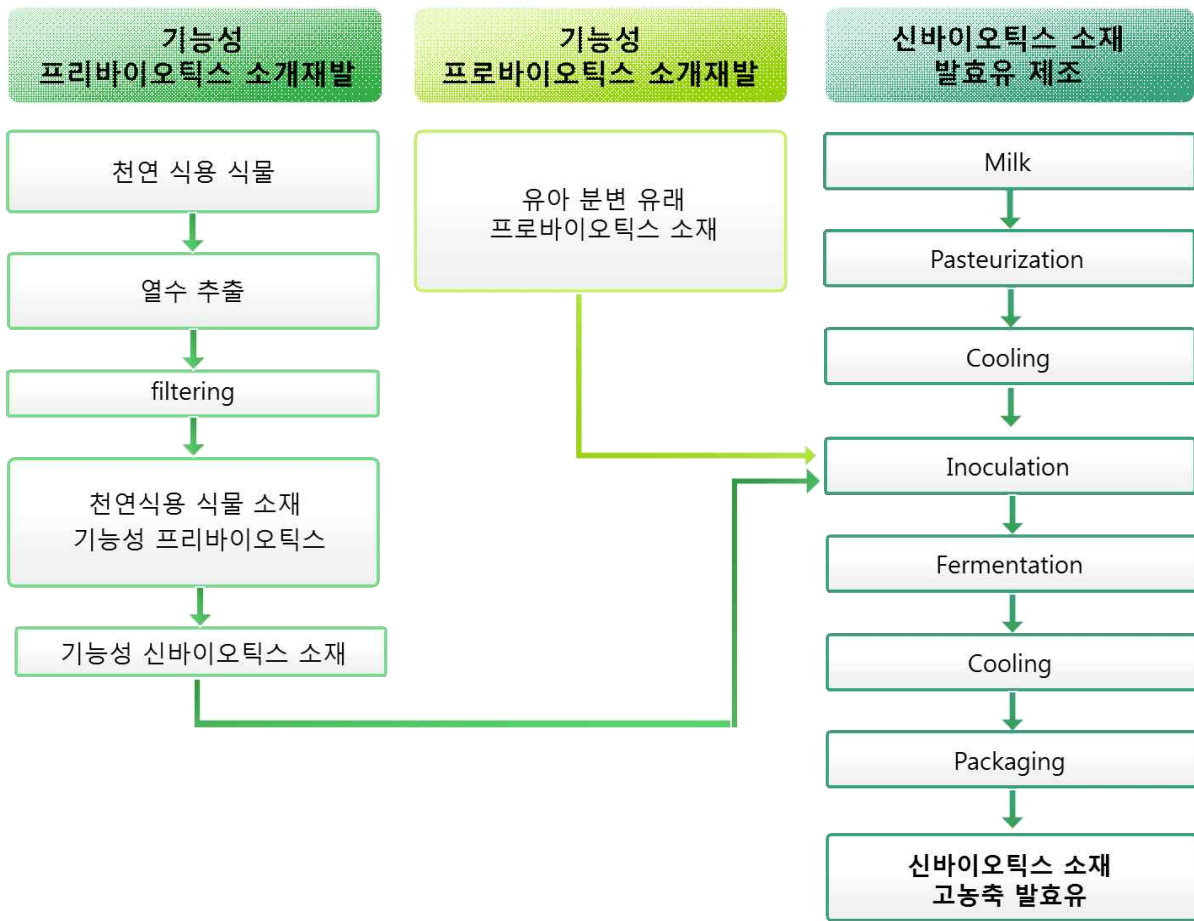


그림 1-30. 신바이오틱스 발효유 기초 공정도



그림 1-31. 신바이오틱스 발효유 제조 과정

(왼쪽: 교반, 오른쪽 위: 배양 직후 커드 상태, 오른쪽 아래: 커드 파쇄 후)



그림 1-32. 신바이오틱스 발효유

② 신바이오틱스 발효유 유산균수 측정

- 제조한 신바이오틱스 소재 발효유의 배양 전/후 총 유산균수 및 *L. gasseri* 505 균수를 비교 측정함(표 1-22).
- 발효액 발효 후 총 유산균수는 발효 전에 비해 1.2 log CFU/mL 증가하였으며, *L. gasseri* 505의 배양 후 균수는 7.84 log CFU/mL로 발효 전과 비교했을 때 증가하였음.
- 유산균수의 증가는 천연 식용 소재 꾸지뽕잎 추출물이 프리바이오틱스로서 작용하여 유산균수를 증가시킨 것으로 사료되며, 상업 균주와 유아 분변 유래 선발 균주의 synergic effect로 인하여 총 유산균수가 증가함.

표 1-22. 신바이오틱스 소재 첨가 발효유 총 유산균수 및 *L. gasseri* 505 균수 측정  
(단위: log CFU/mL)

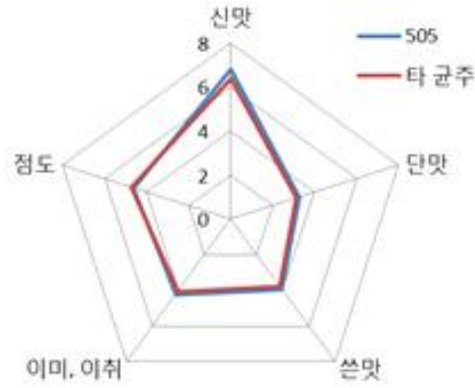
	배양 전		배양 후	
	총 유산균수	<i>L. gasseri</i> 505	총 유산균수	<i>L. gasseri</i> 505
Control	6.16	-	9.24	-
505	7.85	7.54	9.05	7.84

③ 신바이오틱스 발효유 관능적 특성 평가

- 신바이오틱스 발효유를 대상으로 제품 특성 및 기호도를 평가하였음.
- 제품의 신맛, 단맛, 쓴맛, 이미이취 및 점도 조사 결과, 신맛과 점도가 비교적 높게 나타남

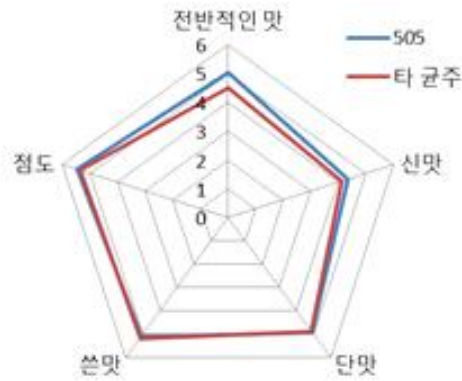
(그림 1-33).

- 제품의 신맛, 단맛, 쓴맛, 점도 및 전반적인 맛을 대상으로 기호도 평가 결과(그림1-34), 신맛의 기호도가 비교적 높게 평가됨.
- 전반적인 맛의 기호도 역시 비교적 높게 평가된 것으로 보아 발효유의 신맛이 기호도에 영향을 준 것으로 사료됨.



균주	신맛	단맛	쓴맛	이미, 이취	점도
505	6.83	3.25	3.92	4.25	4.62
타 균주	6.38	3.12	3.79	4.08	4.75

그림 1-33. 신바이오틱스 발효유 강도 관능적 특성



균주	전반적인 맛	신맛	단맛	쓴맛	점도
505	5.04	4.33	4.92	5.08	5.46
타 균주	4.5	4.12	4.88	5.17	5.38

그림 1-34. 신바이오틱스 발효유 기호도 관능적 특성

(나) 신바이오틱스 발효유 및 분말제제 pilot scale 생산

① 신바이오틱스 발효유 pilot scale 생산

- 신바이오틱스 발효유 pilot scale 생산 시험을 위해 그림 1-35의 공정과정을 통해 꾸지뽕잎 추출물을 대량생산하였음.
- 대량생산된 꾸지뽕잎 추출물과 *L. gasseri* 505를 이용하여 신바이오틱스 발효유의 pilot scale 생산 시험을 위해 표 1-20의 배합비와 그림 1-36의 공정과정을 통해 제조하였음.

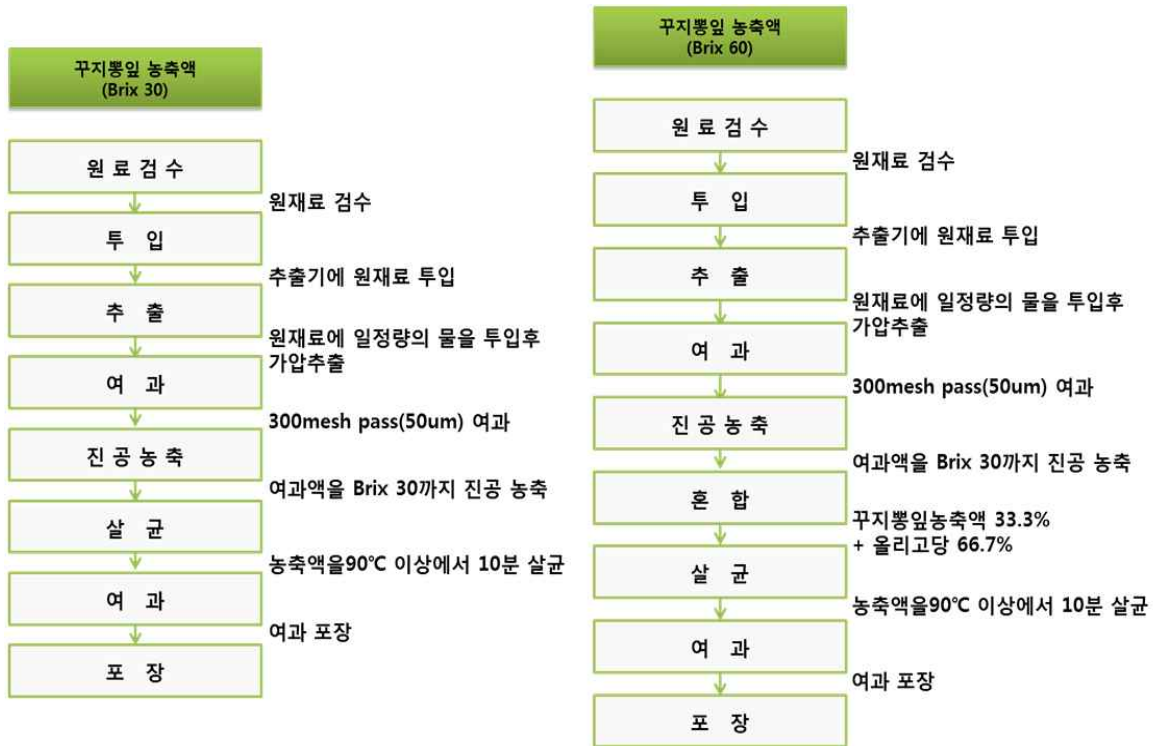


그림 1-35. 꾸지뽕잎 추출물 농축액 대량생산 공정

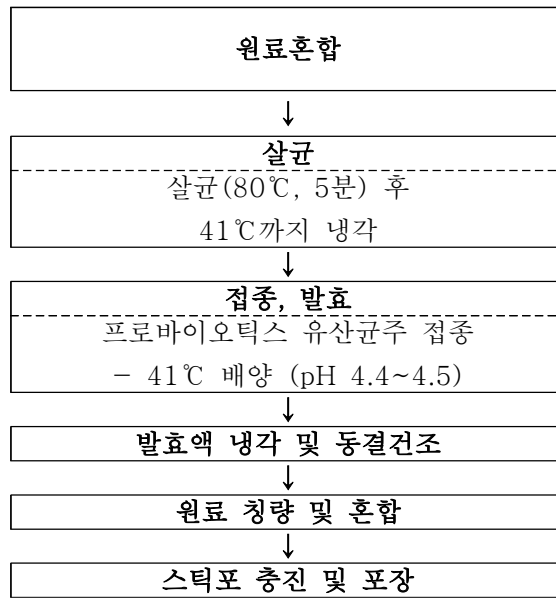


그림 1-36. 신바이오틱스 발효유의 pilot scale 제조 공정  
(왼쪽 위: 배합탱크, 오른쪽 위 발효탱크, 왼쪽 아래: 혼합, 오른쪽 아래: 살균)

② 신바이오틱스 분말 제제 pilot scale 생산

- 프리바이오틱스 소재인 꾸지뽕잎 추출물과 프로바이오틱스 *L. gasseri* 505를 이용하여 신바이오틱스 분말 제제 대량생산 시험을 위해 발효탱크와 동결건조 시스템을 사용한 Pilot scale 실험을 진행하였음.
- 신바이오틱스 분말 제제는 신바이오틱스 발효분말과 부형제 및 기타원료와 혼합하여 그림 1-37의 공정에 따라 제조하였음.
- 동결건조하여 분말상태로 제조된 신바이오틱스 분말 제제는 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 효능 검증을 위한 전임상 및 임상시험 제제로 사용하였음.





신바이오틱스 발효물 제조



신바이오틱스 발효물의 동결건조



원료 칭량



원료 혼합



스틱포 충전



용량 확인

그림 1-37. 신바이오틱스 분말 제제 제조공정

(다) 신바이오틱스 소재 적용 발효유 및 분말제제 시제품(대량)생산

① 신바이오틱스 발효유 대량생산

㉠ 제품 특징

- 프리바이오틱스로 페놀함량이 높은 꾸지뽕잎 추출물과 항산화 활성이 높은 선발 유산균 (프로바이오틱스 *L. gasseri* 505) 함유
- Flavor : 플레인
- 포장 및 용량 : 컵(PS) / 180 mL
- 축산물가공품의 유형 : 농후발효유

㉔ 배합비율

표 1-23. 신바이오틱스 발효유 배합비

원료명	함량(%)
	가당 플레인
우유	86.5
탈지분유	1.5
가당꾸지뽕농축액(60 ° bx)	1.4
선별 유산균(109-1010)	0.03
배양 종균	0.2 unit/L
정백당	10.5
향료	0.07
합계	100

㉕ 신바이오틱스 발효유 제조 공정도

- 원료(우유, 꾸지뽕잎 추출물 농축액, 정백당) 계량 및 교반
- 향 투입 후 자재가 섞이도록 교반
- 살균(95℃, 5분)
- 냉각(41-43℃로 조정)
- 유산균(배양 종균, 선별 유산균) 접종
- 41℃ 배양 후 pH 4.4~4.5에서 배양 종료
- 냉각 후 커드 파쇄(교반 - 1,000 rpm, 10분 이상)
- 균질(30 bar) 후 냉각



그림 1-38. 신바이오틱스 발효유 제조공정

㉖ 신바이오틱스 발효유 보존 테스트

- 시험생산 제품을 10, 15, 20℃ 저장고에서 28일간 저장. 제품의 성상 및 풍미, 산도, pH, 유산균수 및 대장균군수 측정함.

- 시중 유통 및 저장 온도는 1~10℃로, 10℃에서는 비교적 1X10<sup>9</sup> CFU/mL 정도의 유산균 수를 유지하는 것으로 확인할 수 있었음. 성상이나 풍미는 저장 15일차까지는 양호한 편이나 15일 이후부터는 강한 산미 발생함.
- 20℃ 저장 시에는 산미 진행 속도가 매우 빠르므로 제품 개발 시 유통 및 저장온도에 주의해야 할 필요 있음.

표 1-24. 신바이오틱스 발효유 제품 보존 테스트 결과

저장 일수	온도 (℃)	성상/풍미	T.A.	pH	대장 균군	총유산균수 (BCP)	Lactobacillus (MRS)
0일	-	양호	0.73	4.47	N.D.	1.72E+09	1.10E+09
1일	10	양호	0.73	4.37	N.D.	2.00E+09	1.49E+09
	15	양호	0.75	4.36	N.D.	1.69E+09	1.42E+09
	20	양호	0.78	4.27	N.D.	1.91E+09	1.28E+09
6일	10	양호	0.81	4.33	N.D.	1.56E+09	1.17E+09
	15	양호	0.85	4.13	N.D.	1.54E+09	1.26E+09
	20	산미 강함	1.00	3.97	N.D.	1.54E+09	9.85E+08
9일	10	양호	0.81	4.40	N.D.	1.67E+09	1.47E+09
	15	양호	0.87	4.16	N.D.	1.54E+09	1.34E+09
	20	산미 강함	1.01	3.96	N.D.	1.16E+09	1.12E+09
12일	10	양호		4.19	N.D.	1.65E+09	1.44E+09
	15	양호		4.13	N.D.	1.43E+09	1.26E+09
	20	산미 강함		3.92	N.D.	1.20E+09	9.15E+08
15일	10	양호	0.86	4.23	N.D.	1.24E+09	1.26E+09
	15	양호	0.92	4.14	N.D.	1.27E+09	1.06E+09
	20	산미 강함	1.13	4.14	N.D.	3.60E+08	3.75E+08
20일	10	산미 강함	0.84	4.04	N.D.	1.61E+09	1.17E+09
	15	산미 강함	0.95	3.99	N.D.	1.21E+09	1.02E+09
	20	산미 강함	1.12	3.77	N.D.	9.50E+07	6.50E+07
23일	10	산미 강함	0.87	4.19	N.D.	1.17E+09	1.03E+09
	15	산미 강함	0.95	4.09	N.D.	6.95E+08	4.75E+08
	20	산미 강함	1.2	3.81	N.D.	5.55E+07	2.55E+07
26일	10	산미 강함	0.93	4.18	N.D.	8.00E+08	6.85E+08
	15	산미 강함	0.97	4.03	N.D.	5.30E+08	3.90E+08
	20	산미 강함	1.21	3.79	N.D.	8.65E+07	3.70E+07
28일	10	산미 강함	0.9	4.12	N.D.	7.05E+08	6.40E+08
	15	산미 강함	0.98	4.05	N.D.	4.65E+08	3.00E+08
	20	산미 강함	1.22	3.82	N.D.	5.60E+07	1.90E+07

㉞ 사내외 관능검사

- 신바이오틱스 발효유 시험생산 제품을 대상으로 제품 특성 기호도를 평가함. 연구소 직원 20명을 대상으로 한 1차 평가, 숙명여대 대학원생 대상 2차 평가, 고려대 대학원생 대상 3차 평가가 이루어짐.

- 발효유의 전체적인 맛, 단맛, 향, 물성, 물성에 대한 기호도 및 강도에 대한 평가 진행(9점 척도 사용). 전반적인 기호도가 높았고, 꾸지뽕잎 추출물 특유의 느낌이 약하게 있어 이미, 이취가 있다고 표현했으나 기호도에 크게 영향을 미치지 않음.

■ 사내 관능검사 결과(연구소 직원 20명 대상)

- 제품의 전반적인 기호도는 6.40으로 높은 편임 (표 1-25).

표 1-25. 신바이오틱스 발효유 1차 관능검사 결과

[9 점 척도]

	전반적인 맛	단맛		요거트 풍미		물성		이미, 이취
	기호도	강도	기호도	강도	기호도	강도	기호도	강도
평균	6.40	5.95	5.65	5.85	6.10	4.85	6.30	4.55

■ 사외 관능검사 결과(숙명여대 교수 및 학생 16명 대상)

- 제품의 전반적인 기호도는 7.25로 매우 높은 편이며, 이미/이취에 대한 인지 부분은 낮은 편으로 평가됨(표 2-25).

표 1-26. 신바이오틱스 발효유 2차 관능검사 결과

[9 점 척도]

	전반적인 맛	단맛		요거트 풍미		물성		이미,이취
	기호도	강도	기호도	강도	기호도	강도	기호도	강도
평균	7.25	6.63	6.75	5.44	6.31	9.63	6.06	3.88

■ 사외 관능검사 결과(고려대 학생 20명 대상)

- 전반적인 맛 기호도가 높은 편이며, 이미/이취에 대한 강도도 비교적 낮게 느끼는 것으로 평가됨(표 1-27).

표 1-27. 신바이오틱스 발효유 3차 관능검사 결과

[9 점 척도]

	전반적인 맛	단맛		요거트 풍미		물성		이미,이취
	기호도	강도	기호도	강도	기호도	강도	기호도	강도
평균	6.20	6.50	5.08	6.80	6.35	5.45	5.83	2.85

(나) 신바이오틱스 분말 및 캡슐 제제 대량생산

① 신바이오틱스 분말 제제 원료 대량생산

- 신바이오틱스 발효 분말 원료인 발효액 대량생산을 위해 꾸지뽕잎 추출물 농축액 및 선발 프로바이오틱스 유산균의 대량생산 작업을 수행함.
- 신바이오틱스 분말 제제 원료의 배합비 작성(표 1-28)과 제조공정을 확립함.

표 1-28. 신바이오틱스 고농축 발효액 배합비율

원료명	함량(%)
우유	98.3
가당꾸지뽕잎농축액(60bx)	1.4
*유산균 분말(1*1011)	0.3
합계	100

\* 유산균 - 장면역 기능성 유산균, *L. gasseri* 505

- 제조 방법

- ㉠ 원료유(살균유) 투입 후 교반 및 가온(60℃)
- ㉡ 꾸지뽕잎 추출물 농축액 원료 투입 후 자재가 섞이도록 교반
- ㉢ 살균(85℃, 15분)
- ㉣ 냉각(41℃로 조정)
- ㉤ 유산균 분말 계량 및 접종(묻치지 않도록 풀어가며 진행)
- ㉥ 41℃로 일정하게 유지하여 40시간 배양(pH 3.95~4.00)
- ㉦ 커드 파쇄 후 냉각 및 동결건조



그림 1-39. 신바이오틱스 고농축 발효액 제조 설비 및 제품 - 배양탱크, 동결건조기

② 신바이오틱스 분말 제제 대량생산

- 신바이오틱스 발효분말 소재를 주원료로 한 혼합 분말 제제의 대량생산 시험을 진행함.

- 제품 특징

㉠ 신바이오틱스 발효 분말을 주원료로 사용, 요구르트 맛이 나는 혼합 분말

㉡ Flavor : 요구르트

㉢ 포장 및 용량 : PE 스틱 / 2 g \*100포

㉣ 제조공정 : 원료 칭량 및 투입 → 정립(20 mesh) → 혼합 → 스틱 충전 → 상자 포장

표 1-29. 신바이오틱스 분말 제제 배합비율

원료명	함량(%)
포도당	47.5
신바이오틱스 발효분말	40
자일리톨	9.3
향분말	1.2
구연산	1
이산화규소	1
합계	100



그림 1-40. 신바이오텍스 분말 제제 제조 설비 및 제품  
 - 혼합믹서, 스틱 충전기, 자동포장기

③ 신바이오텍스 캡슐 제제 대량생산

- 신바이오텍스 발효 분말을 주원료로 한 하드캡슐 제제의 대량생산 시험을 진행
- 제품 특징

㉠ 신바이오텍스 발효 분말을 주원료로 사용, 간편한 하드캡슐 알약 형태

㉡ 포장 및 용량 : PE병 / 46 g(460 mg \*100 캡슐)

㉢ 제조공정 : 원료 칭량 및 투입 → 정립(20 mesh) → 혼합 → 캡슐 충전 → 병 포장

표 1-30. 신바이오텍스 소재 고농축 하드캡슐 제제 배합비율

원료명	함량(%)
신바이오텍스 발효분말	43
유당	52
베타시클로텍스트린	2
스테아린산마그네슘	2
이산화규소	1
합계	100



그림 1-41. 신바이오텍스 캡슐 제제 제조 설비 및 제품  
- 하드캡슐 충전기, 선별기, 병포장기



## 2-1-2. 소아 청소년 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 효과 검증

[제1협동 : 삼성서울병원 최연호]

### 가. 정상 소아청소년 대상 신바이오틱스의 안정성 및 효과 검증

#### (1) 건강한 소아 대상군 모집

- 46명의 건강한 소아 대상으로 연구 시작하였고 9명 중도 탈락하여 총 37명을 대상으로 연구 종료.

#### (2) 건강한 소아 대상 synbiotics 안전성 검증

- 모든 대상자는 6주간 synbiotics (*L. gasseri* 505와 꾸찌빵 잎 추출물)으로 만든 임상 시험용 시험약을 복용하도록 하였고, 투여 전과 후의 임상 증상을 비교하여 안정성을 확인함. 대상자의 평균 나이는 13.9세였고, 유산균 복용 전 평균 CRP 0.49 mg/dl, ESR 9.3 mm/hr, Hct 40.9%, calprotectin 27.1  $\mu$ g/g로 확인.

#### (3) 안전성 결과 분석

- 정상 소아청소년 대상 신바이오틱스의 안전성 검증.

#### (4) 효과 검증

- 정상 소아청소년을 대상으로 신바이오틱스 투여 전과 후의 분변 내 단쇄지방산(short chain fatty acid, SCFA)를 분석함. 그 결과 모든 단쇄지방산의 함량에서 투여 전과 후에 통계적으로 유의한 차이가 발견되지 않았음.

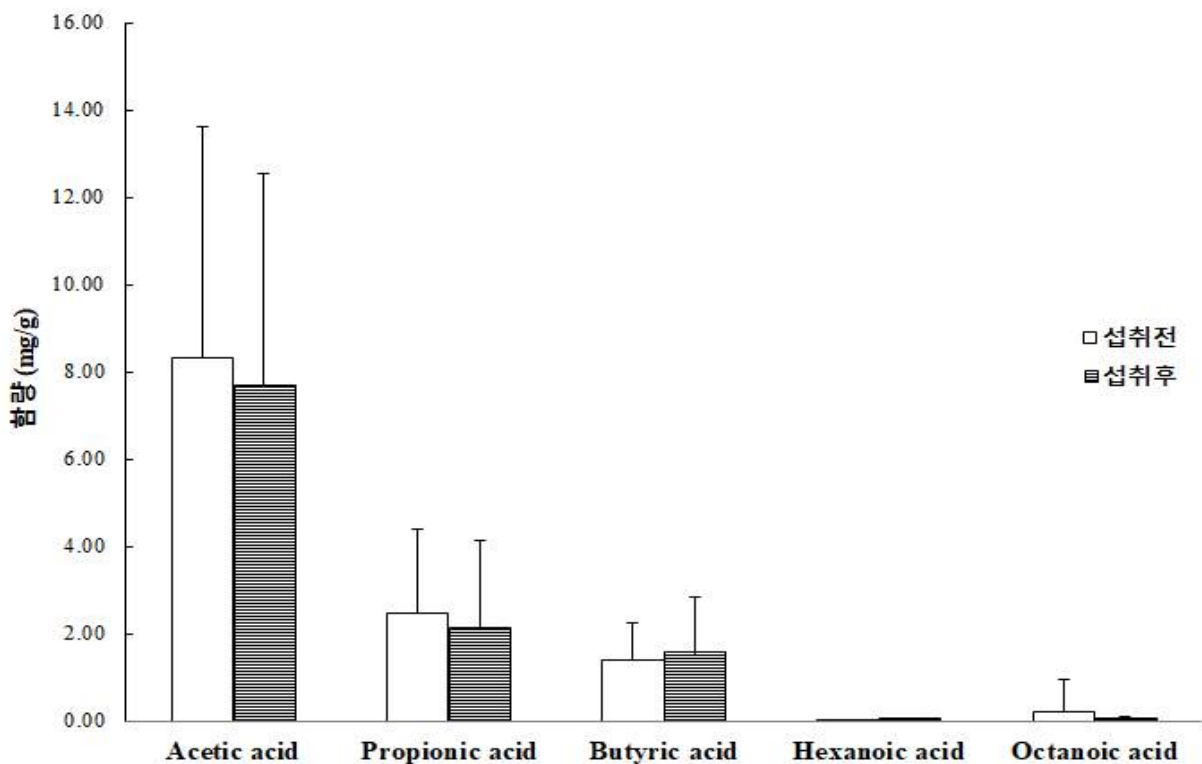


그림2-1. 건강한 소아의 분변 내 synbiotics 섭취 전 후 단쇄지방산 함량 비교

나. 크론병 환자 대상 신바이오틱스의 효과 검증

(1) 크론병 환자 대상군 모집

가) 기관윤리심의위원회에 계획서 제출

SMC201804028-HA002 2013.12.23 개정본

### 연구심의 신청서 I

접수처 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)

IRB File No.	SMC 2018-04-028	접수처 확인	접수일	2018.04.05
--------------	-----------------	--------	-----	------------

e-IRB 사용권한 (아래의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)

연구책임자	신정일	2018.04.04
연구담당자	의뢰일	
담당모니터	의뢰일	

연구과제명  
 국문: 소아 청소년 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 개발 및 효과 검증  
 영문: Research on the development of natural substance originate synbiotics food material and merchandise improving pediatric inflammatory bowel diseases activity and intestinal microbiota

연구기관 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교직원유일
연구책임자					2019.07.26

연구주제

- 연구자 주도  의뢰자 주도
- 약물  생물학적 제제  세포치료제  건강기능식품

연구분류1

- 의료기술  의약기기 (  1등급  2등급  3등급  4등급 )
- 해당사항 없음

연구분류2

- 인간대상연구  인체유래물(장제)연구  의무기록연구
- 유전자연구  유전자 치료
- 배아연구  체세포핵재배이연구  줄기세포주연구
- 기타 ( )

연구분류3

- 전향적 연구  후향적 연구  전향적 & 후향적 병행연구
- 문헌연구  설문조사  자료분석 및 분석연구

연구분류4

- 관찰연구 (  단면조사연구  환자대조군연구  코호트연구 )
- 기타 ( )

연구분류5

- 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)

일반명: 신바이오틱스      상품명:     

1 / 3

SMC201804028-HA002 2013.12.23 개정본

소회기계

기관구분:  단일기관  국내다기관(광역기관수: 0 )  다국가다기관(광역기관수: 0 )

전체피험자총래수: 전체 140명      국내      명      분면      명

피험자들의:  필요  불필요      MFDS 승인(IND 등)  필요  불필요

목적:  학술용  국내허가용(MFDS)  해외허가용(국가별: )

Phase:  I (  First-in-human  First-non-human )  
 II  III  IV  PMS  기타

생물학적동등성시험:  예  아니오

연구예종기간: 2018.01.23 - 2018.01.23

지원의뢰기관: 기관명: 농림수산식품부      성명:      대표(직위):      CRO:     

연구비: 총 70000000 원 (연구인접비 포함)      현물유무  유  무

심사비채공자:  의뢰(지원기관)  연구 책임자  심사비 면제

첨부파일: 2차년도 추가성인0404.zip

연구책임자첨부:     

관리자첨부: (첨부) 임상시험계획서 [ ] [ ]  
 (첨부) 중재기록서 (CRF) [ ] [ ]  
 (첨부) 피험자 동의서 (Informed Consent Form) [ ] [ ]  
 (첨부) 시험책임자의 최근 이력 또는 기타 경력에 관한 문서 (CV) [ ] [ ]  
 (첨부) 승인서 [ ] [ ]  
 (첨부) 연구자서약서 [ ] [ ]  
 시간이 촉박하여 빠른 심사 부탁드립니다. 감사합니다.

관리자 Comment: **★ 본 과제의 정식심의 예정일은 2018년 04월 12일(목)입니다. ★**  
 <제출서류>  
 1. 임상시험계획서 [1.0] [ ]  
 2. 중재기록서 (CRF) [ ] [ ]  
 3. 피험자 동의서 (Informed Consent Form) [1.0][20180123]  
 4. 시험책임자의 최근 이력 또는 기타 경력에 관한 문서 (CV) [ ] [ ]  
 5. 승인서 [ ] [ ]  
 6. 연구자서약서  
 7. 피험자 보상규약  
 8. 초이승박서 [1.0][20180123]

2 / 3

(나) 기관윤리심의위원회 지적 사항 반영한 시정계획서 제출

SMC201804028002-HA001 2013.12.23 개정본

### 시정계획서

접수처 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)

IRB File No.	SMC 2018-04-028-002	접수처 확인	접수일	2018.08.02
--------------	---------------------	--------	-----	------------

e-IRB 사용권한 (아래의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)

연구책임자	삼성서울병원	신정일	2018.08.02
연구담당자	삼성서울병원	의뢰일	
담당모니터	삼성서울병원	의뢰일	

연구과제명  
 국문: 소아 청소년 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 개발 및 효과 검증  
 영문: Research on the development of natural substance originate synbiotics food material and merchandise improving pediatric inflammatory bowel diseases activity and intestinal microbiota

임상시험코드:      Study Nick Name: 신바이오틱스 연구

연구기관 정보

구분	성명	소속	부서	전화번호	교직원유일
연구책임자	삼성서울병원				2020.05.30
공동연구자	삼성서울병원				2020.04.27
공동연구자					
공동연구자					
연구실무담당자	삼성서울병원				2020.04.15

Phase:  I (  First-in-human  First-non-human )  
 II  III  IV  PMS  기타

연구분류1

- 약물  생물학적 제제  세포치료제  건강기능식품
- 의료기술  의약기기 (  1등급  2등급  3등급  4등급 )
- 해당사항 없음

연구분류2

- 인간대상연구  인체유래물(장제)연구  의무기록연구
- 유전자연구  유전자 치료
- 배아연구  체세포핵재배이연구  줄기세포주연구
- 기타 ( )

일반명:      상품명:     

1 / 2

SMC201804028002-HA001 2013.12.23 개정본

연구분류3:  전향적 연구  후향적 연구  전향적 & 후향적 병행연구

연구분류4:  문헌연구  설문조사  자료분석 및 분석연구

연구분류5:  관찰연구 (  단면조사연구  환자대조군연구  코호트연구 )

연구분류6:  기타 ( )

연구분류7:  인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)

일반명: 신바이오틱스      상품명:     

전체피험자총래수: 전체 96명      국내      96명      분면      96명

지원의뢰기관: 기관명: 농림수산식품부      대표(직위):      성명:     

시험사용:  연구계획  연구과제명  연구기관  연구책임자  시험담당자  
 의뢰기관  동의서  감사합격  연구비  기타

내용: 김해라, 최영욱 연구자 삭제

첨부파일: Review of Saccharomyces boulardii as a treatment opinion in\_IBD[1].pdf      새 폴더[44].zip

연구책임자첨부:     

관리자첨부: (첨부) 임상시험계획서 [ ] [ ]  
 (첨부) 중재기록서 (CRF) [ ] [ ]  
 (첨부) reference 논문 [ ] [ ]  
 (첨부) 시험책임자 동의서 [ ] [ ]  
 시험이 급하여 빠른 심의 부탁드립니다.

관리자 Comment: <제출서류>  
 1. 임상시험계획서  
 2. 중재기록서 (CRF)  
 3. reference 논문  
 4. 시험책임자 동의서

위와 같이 임상시험 시정계획서를 제출합니다.

연구책임자	삼성서울병원	신정일	2018.08.02
-------	--------	-----	------------

삼성서울병원 원장 귀하

1 / 2

(다) 기관윤리심의위원회 심사 및 승인

SMC201804028005-HE001 2013.12.23 개정본

**통지서**

본 과제의 문서보존기간은 10년입니다.

수신	의외(지원)기관	농림수산식품부
연구책임자		
IRB File No.	SMC 2018-04-028-005	심사내용
변경신청서	통지일자	2018.10.11
연구과제명	국문 소아 청소년 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 천연물 유래 신바이오틱스 개발 및 효과 검증 영문 Research on the development of natural substance originate synbiotics food material and merchandise improving pediatric inflammatory bowel diseases activity and intestinal microbiota	
임상시험코드	Study Nick Name	신바이오틱스 연구

연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input type="checkbox"/> 세포치료제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 의료시술 <input type="checkbox"/> 의료기기 ( <input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급 ) <input type="checkbox"/> 해당사항 없음
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물(경제)연구 <input type="checkbox"/> 의무기록연구 <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자 치료 <input type="checkbox"/> 태아연구 <input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포주연구 <input type="checkbox"/> 기타 ( )
연구분류3	<input checked="" type="checkbox"/> 관찰적 연구 <input type="checkbox"/> 우향적 연구 <input type="checkbox"/> 전향적 & 우향적 병행연구 <input checked="" type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구
연구분류4	<input type="checkbox"/> 관찰연구 ( <input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 환자대상조금연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구 ) <input type="checkbox"/> 기타 ( )
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)
일반명	신바이오틱스 상품명
정체시험자중계수	전체 96명 국내 96명 본원 96명
연구승인기간	2018.08.07 ~ 2019.08.06
지원의뢰기관	기관명 농림수산식품부 대표(직위) 성명
제출서류목록	1. 승낙서 1005 2. 통지서1005

1 / 2

SMC201804028005-HE001 2013.12.23 개정본

승인일자	평가일자	2018.10.10
승인일자	2019년 06월 06일부터	비고
심사결과	<input checked="" type="radio"/> 승인 <input type="radio"/> 시정승인 변경 계획 보고 (IRB File No.2018-04-028-005)의 심사결과에 따른 시정 보고서 연구참여 승낙서와 연구 동의서 및 설명문 변경 (20181005)이 제출되어 적절한 시정 반영됨을 확인합니다. 연구대상자에 대한 최소위험 이하의 내용으로 신속심사 요건에 해당합니다.	

시장 / 보편 계획 및 그 밖의 IRB결정사항에 대한 이의신청은 해당 심사결과 통지일로부터 3개월 이내에 제출하시기 바랍니다.  
 신규 계획의 승인이 심사결과 통지일로부터 1년이상 경과할 경우에는 시정 / 보완 계획을 제출하실 수 없으며, 해당 연구는 다시 신규 계획으로 제출하시기 바랍니다.  
 본 과제의 연구자와 이해상충(COI, Conflict of Interest)이 있는 위원은 심사 결정과정에 참여하지 않습니다.  
 본 임상연구 결과는 임상시험실시기준의 사전 서면동의 없이는 어떤 경우라도 학술목적 이외에 실시기관명을 사용할 수 없습니다.  
 본서 하단의 바코드를 스캔하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.  
 본 위원은 국제 임상시험 통일언어(ICH) 및 임상시험관리기준(GCP)을 준수합니다.

삼성서울병원 Institutional Review Board

2 / 2

(라) 대상자 모집

- Crohn's disease로 진단 받은 경증에서 중등도 환자 중 생물학제제 투약 치료를 하고 있는 환자 96명을 대상으로 피험자의 기본정보와 임상정보를 조사함. 모든 피험자는 반반의 확률로 대조군 48명, 시험군 48명으로 무작위 배정되어 첫 8주 동안 배정된 시험제품을 복용하도록 함.

① 대상집단

: 만 10세 ~ 25세 크론병 환자

② 선정기준

- 삼성서울병원 소아청소년과에서 만10세~25세 크론병을 진단받은 환자중 Anti-TNF alpha agent (Infliximab, Adalimumab등) 을 투약 중인 환자군 중 PDAI score 30점 미만의 경증~중등도 환자군

③ 제외기준

- 복부 수술력
- 임신 및 수유
- 최근 3개월내의 항생제 치료
- 최근 6주 이내에 다른 probiotics/prebiotics 를 복용한 경력이 있는 경우
- 나이 : < 10세, > 25세
- 최근 2개월 내의 크론병 관련 약물 변경
- 기타 연구시험 책임자의 판단으로 연구수행이 곤란하다고 판단되는 경우

④ 중도탈락 기준

- 시험제제의 투여가 적절히 이루어지지 않은 경우
- 민간요법 혹은 타 프로바이오틱스 투여 등 허용된 범위 이외의 치료를 하는 경우

- 기타 연구자의 판단으로 연구수행이 곤란하다고 판단되는 경우

⑤ 목표 대상자 수: 96명

⑥ 목표 대상자 수 산출근거 : 실험군과 대조군에서의 호전률을 각각 30%, 10%라고 할 때 예상되는 차이는 20%임. 목표피험자의 수는 다음과 같은 공식에 의해 산출될 수 있음. (검정력 80%, significance level 0.05)

- Estimated sample size for two-sample comparison of proportions

- Test Ho:  $p_1 = p_2$ , H1:  $p_1 \neq p_2$

- where  $p_1$  is the proportion in control group, and  $p_2$  is the proportion in treatment group

- Assumptions:

alpha = 0.0500 (both-sided)

power = 0.8

$p_1 = 0.1000$

$p_2 = 0.3000$

$n_2/n_1 = 1.00$

Estimated required sample sizes:

$$n_1 = n_2 = \frac{[(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 (p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2))]}{\epsilon^2} \approx 68$$

$$n_1 = n_2$$

$$z_{\alpha/2} = 1.96, z_{\beta} = 0.84, p = 0.1, p = 0.3, \epsilon = 0.2$$

- 탈락률을 20%로 추정 한 이유 : 소아 환자를 대상으로 한 연구에서 탈락률이 높을 수 있고, 3개월의 추적 관찰 기간 동안 치료 약제의 변경이나, 질병 악화 등으로 항생제를 사용하는 경우 중도 탈락률이 높아질 수 있어 20%로 추정함.

⑦ 연구 방법

방문수	1	2	3
주수	0 (±7일)	8 (±7일)	16 (±7일)
동의서	●		
선정/제외 기준	●		
키/체중 측정	●	●	●
혈액검사(CBC, CRP, ESR, Albumin)	●	●	●
Calprotectin	●	●	●
Trough Level 측정		●	●
Stool pyrosequencing 샘플링	●	●	●
이상반응 유무 확인	●	●	●
임상시험용 유산균제 배부	●		
임상시험 순응도 확인	●	●	●
임상 증세 체크	●	●	●

㉠ 방문1 (0주 ± 7일)

- 서면 동의서 취득
- 선정/제외기준 확인
- 키/체중 측정
- 혈액검사 (CBC, CRP, ESR, Albumin)
- Calprotectin
- Stool pyrosequencing 샘플링
- 임상시험용 유산균제 배부
- 이상반응 유무 확인

㉡ 방문 2 (8주 ± 7일)

- 키/체중 측정
- 혈액검사 (CBC, CRP, ESR, Albumin)
- Calprotectin
- Stool pyrosequencing 샘플링
- 이상반응 유무 확인
- Trough Level 측정

㉢ 방문 3 (16주 ± 7일)

- 키/체중 측정
- Stool pyrosequencing 샘플링
- 이상반응 유무 확인
- 임상시험용 순응도 확인
- Trough Level 측정

㉣ 통계분석

- 3개의 그룹에서 신바이오틱스 복용전과 복용후, 신바이오틱스 복용 중단후의 stool pyrosequencing에서 장내 균총의 분율을 비교하여 유익균 (Lactobacillus) 의 분율의 증가를 확인. 보조지표로 장내 염증에 대한 지표들 (임상증상, hematocrit, CRP, ESR, Albumin, PCDAI, stool calprotectin) 의 호전 정도를 비교. Biologics trough level의 변화 정도를 비교
- 주된 가설 : 크론병 환자에서 Synbiotics의 복용은 크론병 환자에서 장내 균총의 유익균 분율을 변화시킨다.
- 보조 가설 : 크론병 환자에서 Synbiotics의 복용은 염증을 감소시킨다.
- 장내 염증의 지표 : PCDAI, Stool Calprotectin 등 크론병 환자에서 anti-TNF alpha agent trough level을 증가시킨다.
- 모집단 : 10세 이상 ~ 25세 이하의 크론병 진단 받은 환자
- 표본 : 서울삼성병원을 방문한 자, 크론병을 진단 받은 환자. 10 ~ 25세의 연령

- Primary endpoint : 2개의 그룹에서 신바이오틱스 복용 전과 복용 후, 신바이오틱스 복용 중단 후의 stool pyrosequencing에서 장내 균총의 분율을 비교하여 유익균(Lactobacillus)의 분율의 증가를 확인한다.
- Secondary endpoint : 1) 장내 염증에 대한 지표들 (임상증상, hematocrit, CRP, ESP, Albumin, PCDAI, stool calprotectin)의 호전 정도를 비교한다. 2) Biologics trough level의 변화 정도를 비교한다.
- Stool pyrosequencing에서 장내 유익균총의 분율의 두 그룹간 차이를 변수의 빈도 분석, 교차 분석을 하고, T-test, paired T-test, McNemar 검정 등을 이용하여 통계 분석

(2) Synbiotics 투여 전과 후 평가

- Synbiotics(*L. gasseri* 505와 꾸찌뿌잉 추출물)를 함유한 시험제제를 응용하는 피험자군 과(43명), 대조군(41명)으로 나누어 8주간 복용 후 임상 지표들을 비교하여 효과 검증.
- 피험자군과 대조군의 복용 전 후 비교 값은 다음과 같음.

표 2-1. 크론병 환자 대상으로 대조군과 신바이오틱스 복용군 간의 비교

		대조군	신바이오틱스 복용군	p-value
0주	CRP (mg/dl)	0.2	0.2	0.686
	ESR (mm/hr)	12.3	16.0	0.228
	Hct (%)	43.6	43.3	0.721
	calprotectin (μg/g)	381.8	372.4	0.501
	PCDAI	3.6	4.6	0.562
8주	CRP (mg/dl)	0.2	0.2	0.939
	ESR (mm/hr)	12.3	42.7	0.283
	Hct (%)	43.7	15.5	0.277
	calprotectin (μg/g)	437.4	427.0	0.819
16주	CRP (mg/dl)	0.3	0.2	0.201
	ESR (mm/hr)	12.3	13.7	0.600
	Hct (%)	43.5	42.5	0.233
	calprotectin (μg/g)	412.9	412.6	0.685
	PCDAI	1.2	3.1	0.198

표 2-2. 크론병 환자 대상으로 신바이오틱스의 복용 전, 후 비교

	신바이오틱스 복용전	신바이오틱스 복용 16주 후	p-value
CRP (mg/dl)	0.2	0.2	0.669
ESR (mm/hr)	16.0	13.7	0.488
Hct (%)	43.3	42.5	0.389
calprotectin (μg/g)	372.4	412.6	0.649
PCDAI	4.6	3.1	0.959

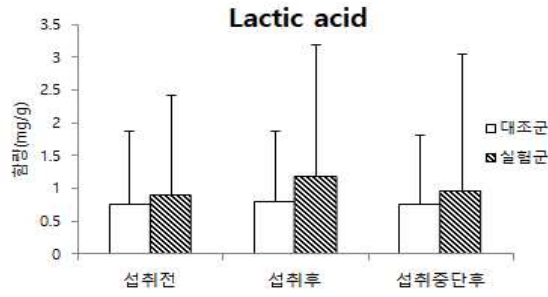


그림2-2. 분변 내 lactic acid 함량

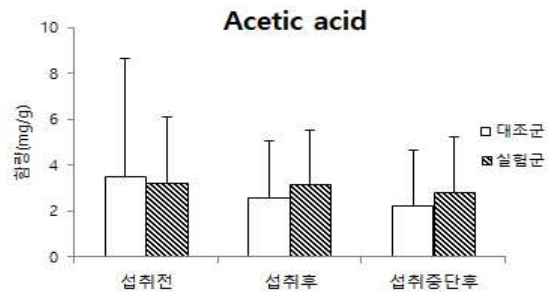


그림2-3. 분변 내 acetic acid 함량

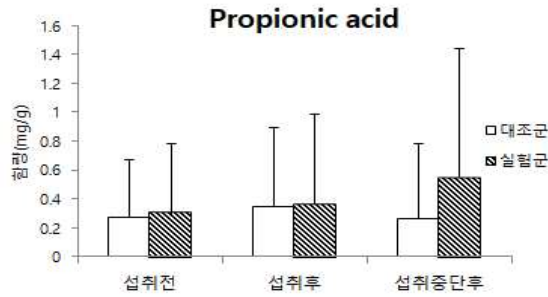


그림2-4. 분변 내 propionic acid 함량

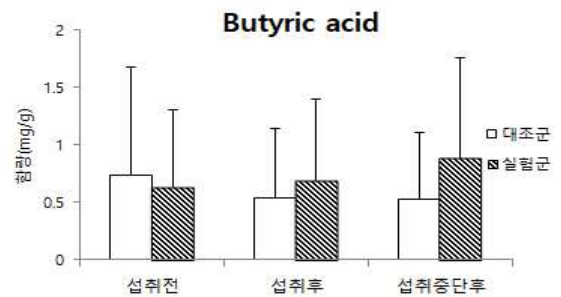


그림2-5. 분변 내 butyric acid 함량

### (3) 검사 결과 분석 및 정리

- 결론적으로 볼 때 총 16주간의 관찰 기간 동안 신바이오틱스의 염증성 장 질환에서 임상적 효과는 통계학적으로 유의하지 않은 것으로 확인됨. 신바이오틱스의 효과를 검증하기에는 관찰 기간이 충분하지 못한 것으로 사료되어 후속 연구에서는 보다 장기적인 추적 관찰이 필요할 것으로 사료됨.

### 2-1-3. 메타게놈 분석을 활용한 소아청소년의 염증성 장 질환 및 인체 장내균총 개선 효과 검증

[제2협동 : 경희대학교 이주훈]

#### 가. 장내 마이크로바이옴 분석을 위한 기초조건 확립 및 최적화

##### (1) 사람 장내 미생물 총 분석을 위한 total fecal DNA 분리 방법 최적화

###### (가) Total fecal DNA 분리를 위한 Lysis buffer 최적화

- Total fecal DNA 분리 방법에 있어 가장 처음 단계로 lysis buffer를 사용하게 되는데, 어떤 lysis buffer를 사용하는가에 따라 분리된 total fecal DNA의 순도와 양이 달라짐을 확인함.
- 기존에 사용하였던 ASL buffer (QIAamp DNA stool mini kit)와 선연구에 사용되었던 lysis buffer(500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), and 4% sodium dodecyl sulfate (SDS))를 비교함.
- 각 buffer에 lysis 시킨 후에 100 °C에 열처리를 하여 total fecal DNA를 분리하였으며 이를 전기영동하여 확인한 결과 그림 3-1과 같음.

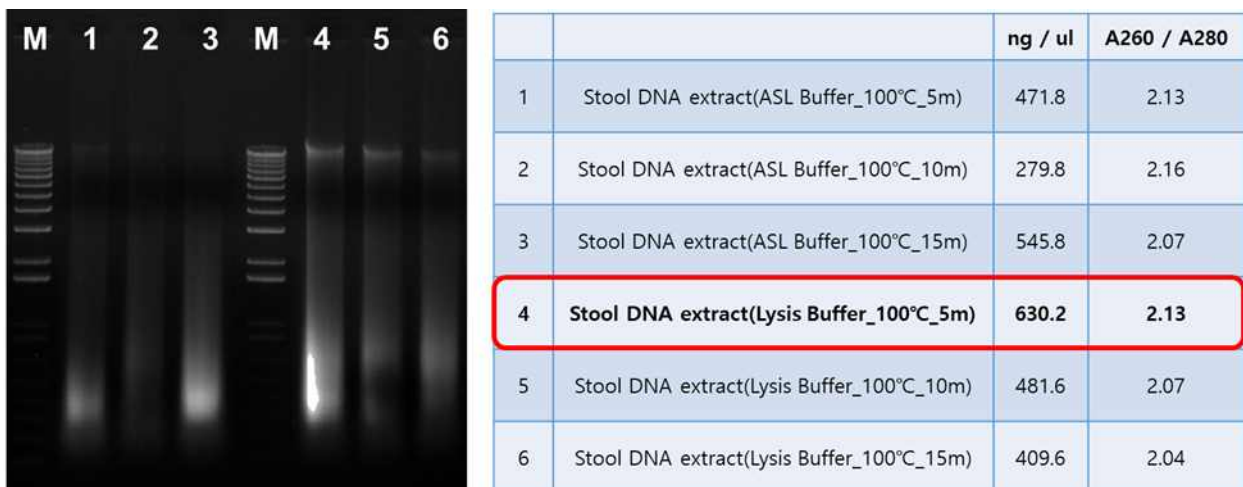
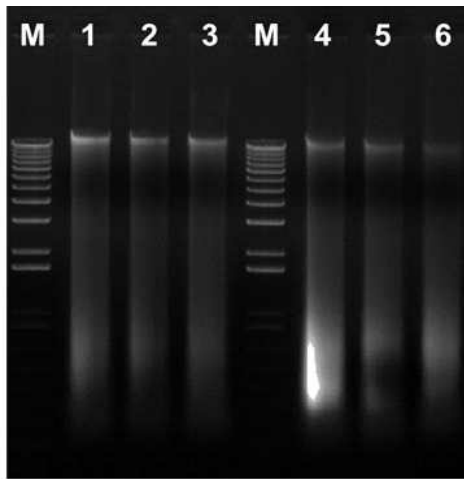


그림 3-1. 기존에 사용된 ASL buffer와 최적화된 lysis buffer 비교

###### (나) 열처리 방법 최적화

- 선연구에 이용되었던 열처리 방법을 수집함.
- 열처리 방법 중 주요한 요소는 온도와 시간임.
- 다양한 열처리 방법 중 QIAamp DNA stool kit의 방법인 70°C, 10분의 열처리 방법보다 lysis 효과가 우수한 열처리 방법을 선정함.
- 또한 10분간 열처리 보다 lysis 효과가 우수한 열처리 시간을 선정하기 위해 각 5분, 10분, 15분으로 진행함.
- 열처리 조건을 비교해본 결과 그림 3-2와 같음.
- 최종적으로 열처리 온도는 100°C, 열처리 시간은 5-10분으로 최적화하였음.



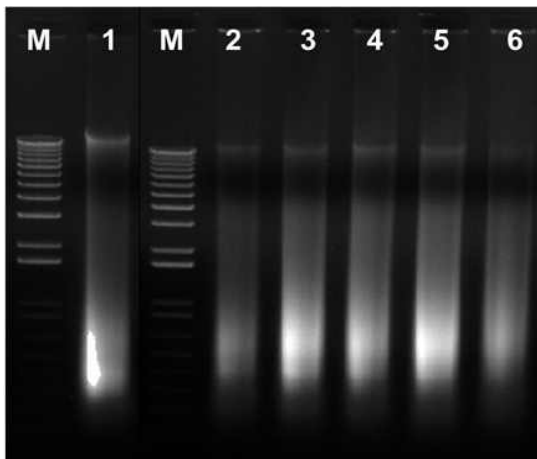


		ng / ul	A260 / A280
1	Stool DNA extract(Lysis Buffer_70°C_5m)	316.1	2.13
2	Stool DNA extract(Lysis Buffer_70°C_10m)	236.4	2.14
3	Stool DNA extract(Lysis Buffer_70°C_15m)	296.7	2.12
4	Stool DNA extract(Lysis Buffer_100°C_5m)	630.2	2.13
5	Stool DNA extract(Lysis Buffer_100°C_10m)	481.6	2.07
6	Stool DNA extract(Lysis Buffer_100°C_15m)	409.6	2.04

그림 3-2. 열처리 온도 및 시간에 따른 비교와 결과

(다) Bead-beating 방법 최적화

- 기존에 사용되었던 Bead-beating 방법을 수집함.
- Bead-beating time 중 가장 lysis 효과가 뛰어난 시간을 선정함.
- Bead-beating time을 각각 0, 0.25, 0.5, 1, 3, 5분을 진행하여 lysis 효과를 비교함.
- 다양한 Bead-beating time 중 lysis 효과가 가장 우수한 시간을 선정함.
- Lysis 효과를 비교해 본 결과 그림 3-3과 같음.
- <그림 3-3>을 보았을 때 Bead-beating은 lysis에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인함.
- 최종적으로 Total fecal DNA 분리 시 bead-beating 방법은 진행하지 않기로 선정함.



		ng / ul	A260 / A280
1	Stool DNA extract(Bead beating 0s)	630.2	2.13
2	Stool DNA extract(Bead beating 15s)	590.8	2.11
3	Stool DNA extract(Bead beating 30s)	485.4	2.13
4	Stool DNA extract(Bead beating 1min)	443	2.2
5	Stool DNA extract(Bead beating 3min)	504.9	2.11
6	Stool DNA extract(Bead beating 5min)	459.1	2.03

그림 3-3. Bead-beating 방법 비교 및 결과

(2) 분변샘플로부터의 장내 균총 동정용 16S rRNA universal primer set의 최적화

(가) 선연구에 이용된 16S rRNA universal primer sets 예시

- 장내 미생물총에 대한 선연구 중 Illumina MiSeq sequencing 에 이용되었던 16S rRNA universal primer sets와 특징을 표 3-1과 같이 정리함.

표 3-1. 선연구에 이용되고 있는 16S rRNA universal primer sets 예시와 특징

	Primer	Sequence(5' to 3' )	Target site	Predicted size (bp )	Properties
1	27F	AGRGTTTGATCMTGGCTCAG	V1-V3	492	27F : Low <i>Bifidobacterium</i> 519R : Amplify sequences from most phyla
	519R	GTNTTACNGCGGCKGCTG			
2	27F	AGRGTTTGATCMTGGCTCAG	V1-V2	311	Specific to the bacterial domain
	338R	GCTGCCTCCCGTAGGAGT			
3	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	V4	292	Diversity at bacterial phylum level
	806R	GGACTACHVHHHTWTCTAAT			
4	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	V3-V4	464	High coverage & the least biased Improve coverage of primer V4 region
	805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC			
5	520F	AYTGGGYDTAAAGNG	V4-V5	406	926R : Low non-coverage rate
	926R	CCGTCAATYYTTTRAGTTT			

- 메타지노믹스를 수행하기 위해 16S rRNA sequence target primer set은 다양한 균주를 검출할 수 있어야 함.
- 또한 Illumina MiSeq sequencing을 진행하기 위해 300bp 길이의 paired-end reads에 적합한 PCR product size를 가져야 함.
- 따라서 선연구에 이용되었던 5 가지 primer sets 중 위의 조건을 만족하는 후보군 primer sets을 표 3-2 와 같이 선정함.

표 3-2. 장내균총 분석 연구에 이용될 후보군 primer sets 선정

	Primer	Sequence(5' to 3' )	Target site	Predicted size (bp)
1	27F	AGRGTTTGATCMTGGCTCAG	V1-V3	492
	519R	GTNTTACNGCGGCKGCTG		
2	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	V3-V4	464
	805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC		
3	520F	AYTGGGYDTAAAGNG	V4-V5	406
	926R	CCGTCAATYYTTTRAGTTT		

(나) 후보군 16S rRNA universal primer set 에 대한 평가

- *In vitro* 상에서 선정한 후보군 primer sets의 sensitivity를 검증한 결과는 표 3-3과 같음.

표 3-3. *In vitro* 상에서 universal primer sets를 이용한 장내 박테리아 검출 결과

Intestinal Bacteria	27F/519R	341F/805R	520F/926R
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 35038	4	2	
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC 13734			
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393			
<i>Weissella confusa</i> ATCC 10881	1	7	1
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700			
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 15521			
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HR84		1	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703			
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990			
<i>Bacillus subtilis</i> DHL01			5
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	1	2	
<i>Listeria monocytogenes</i> ScottA	1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027			
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium SL1344	14	8	3
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890	12	6	
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC 19258		1	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> NBRC 100931			
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 19398		1	
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	9	10	22
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	8	12	16
<i>Citrobacter sedlakii</i> ATCC 51115			1
<i>Lactobacillus plantarum</i> PFF01			2
Total	50	50	50

- 27F/519R primer set의 경우 총 8 종의 균주, 341F/805R primer set의 경우 총 10 종의 균주, 520F/926R primer set의 경우 총 7종의 균주를 검출함.
- 341F/805R primer set이 가장 다양한 균주를 검출하는 것을 확인함.
- *In vitro* 분석 수행 결과 표 3-3을 통해 341F/805R primer set이 다른 두 primer sets에 비해 sensitivity가 높다는 것을 알 수 있음.

(다) 후보군 primer set을 이용한 메타지노믹스에 최적화된 primer set 제작

- 대부분의 대장질환자에게서 발견되는 대표 장내 미생물의 종류 20 여종을 선정 한 후, 16S rRNA sequence를 NCBI의 Database에서 확보함.
- 확보된 16S rRNA sequence를 이용하여 simulation을 통한 multiple alignment 비교 분석함.
- 이를 통해 후보군 16S rRNA universal primer의 문제점을 보완하여 최적화된 primer set을 디자인함.
- 새롭게 디자인한 최적화된 16S rRNA universal primer sets 은 표 3-4와 같음.

표 3-4. Modified 16S rRNA universal primer set 제작

	Primer	Sequence(5' to 3' ) <sup>b</sup>	Target site	Predicted size (bp)
1	27F_M <sup>a</sup>	AGRGTTYGATYHTGGCTCAG	V1-V3	492
	519R	GTNTTACNGCGGCKGCTG		
2	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	V3-V4	464
	805R_M	GACTACHVGGGTMTCTAATCC		
3	520F	AYTGGGYDTAAAGNG	V4-V5	406
	926R_M	CCGTCAATTYHTTTRAGTTT		

(<sup>a</sup>M: Modified 16S rRNA universal primer/ <sup>b</sup>R, A/G; Y, C/T; H, A/C/T; N, A/C/G/T; K, G/T; M, A/C; D, A/G/T)

(라) 16S rRNA universal primer sets의 primer coverage 비교분석

- 16S rRNA sequence Database인 SILVA Database를 바탕으로 기존의 16S rRNA universal primer와 modified primer sets의 *in silico* 분석을 진행한 결과 표 3-5와 같음.

표 3-5. In silico 상에서 16S rRNA universal primer coverage의 비교

Phylum	Total	27F	27F_M	805R	805R_M	926R	926R_M
Unclassified bacteria	36,233	7,484	<b>7,855</b>	33,681	<b>34,779</b>	33,677	<b>34,435</b>
Absconditabacteria (SR1)	558	97	<b>98</b>	553	<b>553</b>	537	<b>537</b>
Acetothermia	46	16	<b>17</b>	46	<b>46</b>	-	-
Acidobacteria	16,782	5,266	<b>5,518</b>	16,369	<b>16,369</b>	16,422	<b>16,427</b>
Actinobacteria	222,485	21,985	<b>23,040</b>	155,055	<b>154,976</b>	219,538	<b>219,584</b>
Aminicenantes	1,533	137	<b>141</b>	1,529	<b>1,528</b>	1,526	<b>1,526</b>
Aquificae	1,007	170	<b>172</b>	989	<b>989</b>	987	<b>987</b>
Armatimonadetes	1,161	302	<b>317</b>	1,086	<b>1,086</b>	819	<b>1,117</b>
Atribacteria	73	37	<b>43</b>	73	<b>73</b>	71	<b>71</b>
Bacteriodetes	181,178	40,620	<b>42,327</b>	178,083	<b>178,073</b>	177,763	<b>177,854</b>
BRC1	407	30	<b>31</b>	399	<b>399</b>	397	<b>397</b>
Caldiserica	230	32	<b>37</b>	228	<b>228</b>	227	<b>227</b>
Calescamantes	3	2	<b>2</b>	-	<b>3</b>	-	-
Chlamydiae	643	7	<b>8</b>	629	<b>629</b>	640	<b>640</b>
Chlorobi	438	230	<b>234</b>	434	<b>434</b>	428	<b>429</b>
Chlorobi	781	369	<b>390</b>	764	<b>766</b>	773	<b>774</b>
Ingnavibacteriae							
Chloroflexi	22,422	3,771	<b>4,025</b>	8,354	<b>15,092</b>	12,175	<b>12,182</b>
Chrysiogenetes	12	7	<b>7</b>	12	<b>12</b>	11	<b>11</b>
Cloacimonetes	288	64	<b>73</b>	269	<b>269</b>	283	<b>284</b>

Cyanobacteria	78	21	21	77	77	78	78
Cyanobacteria/ Chloroplast	26,495	7,541	7,800	25,589	25,854	25,928	25,937
Deferribacteres	428	168	190	423	423	418	418
Deinococcus- Thermus	2,144	651	658	2,118	2,118	2,104	2,107
Dictyoglomi	20	9	9	20	20	19	19
Elusimicrobia	374	110	113	371	371	365	366
Fibrobacteres	838	192	194	829	829	773	774
Firmicutes	485,301	91,816	97,470	475,708	475,711	474,823	474,558
Fusobacteria	12,028	3,360	3,486	11,907	11,907	11,771	11,777
Gemmatimonadetes	1,717	545	560	1,668	1,668	1,673	1,677
Hydrogenedentes	470	107	117	457	457	461	461
Latescibacteria	560	80	87	554	554	547	547
Lentisphaerae	1,821	205	213	1,780	1,780	1,772	1,772
Marinimicrobia	1,084	532	534	926	1,080	1,074	1,076
Microgenomates	131	77	78	-	77	90	90
Nitrospinae	568	179	186	556	556	563	564
Nitrospirae	1,800	794	818	1,770	1,770	1,756	1,756
Omnitrophica	21	5	5	17	17	21	21
Parcubacteria	168	47	47	160	160	154	154
Planctomycetes	11,745	2,825	2,935	11,475	11,475	11,468	11,484
Poribacteria	104	13	15	102	102	24	24
Proteobacteria	429,385	117,696	121,849	421,532	422,093	242,265	422,587
Saccharibacteria	2,679	852	882	2,650	2,650	66	66
Spirochaetae	10,601	1,811	1,935	9,710	9,739	9,995	9,998
Synergistetes	1,355	784	853	1,303	1,303	1,327	1,328
Tenericutes	4,898	1,121	1,136	4,821	4,821	3,530	3,533
Thermode sulfobacteria	126	31	33	126	126	125	125
Thermotogae	706	253	268	700	700	689	689
Verrucomicrobia	10,785	3,287	3,513	10,319	10,320	10,522	10,527
Total	1,494,710	315,738	330,340	1,386,221	1,395,062	1,270,675	1,451,995
		21.12%	22.10%	92.74%	93.33%	85.01%	97.14%

- *In silico* 분석 결과 기존의 16S rRNA universal primer를 변형하였을 때 primer coverage가 증가함.
- 27F\_M primer는 기존의 27F primer 보다 primer coverage 약 1% 증가하였고, 특히 Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria에 대한 coverage가 조금 증가함.
- 805R\_M primer의 경우 기존의 805R primer와 큰 차이는 없으나 primer coverage가 0.6% 증가한 것을 확인하였고, Proteobacteria에 대한 coverage가 조금 증가함.
- 926R\_M primer는 기존의 926R primer에 비해 primer coverage가 약 12% 증가하는 양상을 보였고, 특히 Proteobacteria에 대한 primer coverage가 2배 가까이 증가함.
- 표 3-5를 통해 선연구에 이용되었던 16S rRNA universal primer를 변형하여 제작한

- primer가 보다 coverage가 높으며, 다양한 균종을 검출할 수 있다는 것을 알 수 있음.
- 특히 3 가지 modified primer 중 805R\_M primer와 926R\_M primer가 높은 coverage를 가짐.
  - 메타지노믹스 연구에 최적화된 primer를 선정하기 위해 modified 16S rRNA universal primer인 27F\_M, 805R\_M, 926R\_M primer를 사용하기로 함.

(3) 동물모델에서의 신바이오틱스 효능 검증 메타게놈 분석

(가) Raw data QC 및 trimming

- 메타게놈 분석 전 raw read pairing을 수행함.
- Illumina MiSeq을 활용하여 paired end 방법으로 메타게놈 분석을 수행함에 따라 각 read에 맞는 pairing 작업을 수행하고 pairing 되지못한 sequence들은 제거함.
- 이렇게 얻은 paired reads에 대하여 low quality의 sequence를 제거하고자 trimming을 수행하였으며 그에 대한 결과를 표 3-6에 나타내었음.

표 3-6. Paired raw reads 의 QC 및 trimming

Name	Number of reads	Avg. length	Number of reads after trim	Percentage trimmed	Avg.length after trim
Con-1w	159,044	249.9	159,031	99.99%	249.4
Con-6w	128,796	244.8	128,790	~100%	244.1
Con-11w	157,756	250.6	157,747	99.99%	250
AOM-DSS-1w	171,572	249.9	171,559	99.99%	249.4
AOM-DSS-6w	128,338	250.8	128,329	99.99%	250.3
AOM-DSS-11w	110,780	250.6	110,778	~100%	250
LG-1w	121,912	249.6	121,904	99.99%	249
LG-6w	130,680	250.7	130,675	~100%	250.2
LG-11w	143,330	250.6	143,330	100%	250
CT-1w	141,516	232.8	141,498	99.99%	232.3
CT-6w	118,750	250.4	118,749	~100%	249.8
CT-11w	143,806	249.4	143,796	99.99%	248.7
FCT-1w	164,532	250.6	164,525	~100%	250.1
FCT-6w	139,416	250.1	139,411	~100%	249.4
FCT-11w	151,654	250.5	151,649	~100%	249.8

(나) QIIME pipeline 프로그램을 활용한 메타게놈 분석

- Trimmed 된 raw sequence로부터 chimeric sequence 제거와 OTU clustering을 QIIME pipeline program을 이용하여 수행하였음.
- Clustering된 OTU들은 Silva database로부터 taxonomy assignment를 수행하였음.
- 각 샘플에 대한 taxonomy assignment 수행 결과는 그림 3-4에 나타내었음.

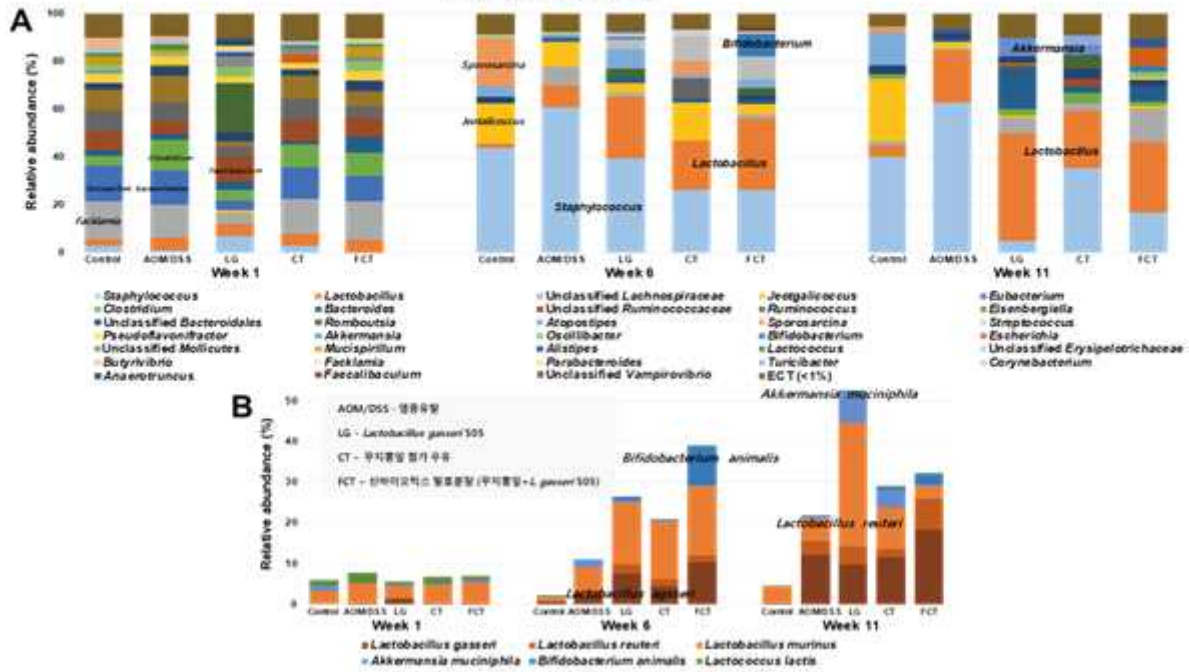


그림 3-4. 염증성 장 질환 유발 동물에 프리·프로·신바이오틱스 섭취에 따른 장내 균총 변화

- 1주차에는 *Facklamia*, Unclassified *Bacteroidales*, *Clostridium*, *Faeclibaculum* 등이 우점을 하고 있으며 모든 그룹에서 유사한 비율로 균총이 나타남.
- AOM-DSS의 경우 경과가 지날수록 *Clostridium*의 비율이 다른 군보다 높은 비율을 보이며 경과가 지날수록 *Staphylococcus*가 가장 많은 균총으로 나타남.
- Control 그룹은 경과가 지날수록 *Jeotgalicoccus*, *Staphylococcus*, *Sporosarcina*가 가장 많은 균총으로 나타남.
- Control 6주차에서 나타난 *Sporosarcina*는 쥐의 mucosa에서 발견된 이력이 있음 (Clavel et al. 2009).
- *Staphylococcus*의 경우 1주차에서는 보이지 않다가 6주, 11주에서 발견되는 것으로 보아 서식 환경에 영향을 많이 받은 것으로 추정됨. 또한 CT, FCT, LG 그룹이 AOM-DSS와 control에 비해 *Staphylococcus*의 비율이 낮은 것과 *Lactobacillus*의 비율이 높아짐과 연관 지을 수 있음. *Lactobacillus* 등이 *Satphylococcus*의 장내 정착을 저해한다는 보고가 있었음 (Keren et al. 2011; Vesterlund et al. 2006).
- *Lactobacillus*의 경우 Control 그룹에서는 매우 적게 나타났으나 CT, FCT, LG 그룹에서 모두 최소 17%에서 27%까지 증가하였으며 11주에서는 *Staphylococcus*의 비율이 많이 낮아짐.
- *Streptococcus*의 경우 보고된 바로는 대장암 환자에서는 우점종이지만, 이번 연구에서는 6주차에서만 증가하였다가 감소하는 추세를 보임 (Wang et al. 2012).
- *Bifidobacterium*의 경우 FCT-6주에서만 가장 많은 비율을 보였음.
- *Akkermansia*의 경우 비만을 유도할 수 있는 균주인데, CT-11주와 LG-11주에서 많은 비율을 보였으나 FCT에서는 낮았으며 control에서는 발견되지 않음.

(다) 분석된 자료로 부터의 diversity 분석

- 분석된 자료로부터 PCoA 분석을 수행하였으며 이에 대한 결과를 그림 3-5에 나타내었음.



그림 3-5. 분석된 데이터로부터의 주차에 따른 각 그룹별 PCoA 분석

- PCoA 분석은 Unweighted UniFrac 계산을 통하여 분석하였음.
- 모든 그룹의 1주차 샘플의 미생물 군집도는 유사한 것으로 나타남.
- 암유발균(AOM-DSS)과 정상균(Control)은 11주로 갈수록 서로 다른 군총을 갖는 것으로 나타남.
- 암유발균에 체제를 투여한 경우(LG, CT, FCT) 11주차로 진행이 될수록 유사한 군총을 갖게 되는 것으로 나타남.

나. 동물모델 장내균총 메타게놈 분석을 활용한 신바이오틱스의 효과 검증

(1) 지표물질 기능성 검증을 위한 동물모델의 분변 메타게놈 분석

(가) 동물모델에 대한 기능성 물질 검사

- 1차년도 결과를 토대로 Synbiotics 투여로 인한 장내 균총 개선에 대하여 물질을 검증하고자 꾸지뽕잎과 *Lactobacillus gasseri* 505를 우유에서 발효한 후 생성된 peptide를 분리하여 후보군 3종을 선정하여 동물모델에 대한 투여실험을 확인함.
- 총 3주간 실험을 진행하였으며 각 주차마다 그룹별로 분변을 수집하였음.
- AOM-DSS를 처리하지 않은 그룹과 처리한 그룹으로 나누어지며 처리한 그룹에 대하여 PBS만 처리한 군과 *L. gasseri* 505를 처리한 군과 synbiotics 처리군, 후보 peptide 1, 2, 3 그룹을 나누어 진행하였음.
- 각 샘플로부터 total DNA를 확보하였으며 이로부터 16S rRNA V3-V4 region에 대한



amplicon을 PCR 반응을 통해 확보하였음.

- Illumina MiSeq을 이용하여 NGS 분석을 수행하였음(표 3-7).

표 3-7. NGS 분석에 대한 Read data

Read count	Normal	Control	Probiotics	Synbiotics	Peptide 1	Peptide 2	Peptide 3
1week	42,942	30,755	33,043	27,838	32,001	14,934	33,043
2week	14,577	40,878	32,625	26,850	43,202	40,487	32,625
3week	38,802	20,239	17,548	8,729	13,141	19,410	17,548

- NGS 분석 결과 최소 8,729부터 43,202까지 read count를 확보하였음.

- 이에 대하여 8,729 read count로 normalization을 수행하였으며 이를 토대로 QIIME 분석을 수행하였음.

- 21개의 샘플로부터 확보된 sequence들로부터 rarefaction curve를 그린 결과 아래와 같았음(그림 3-6).

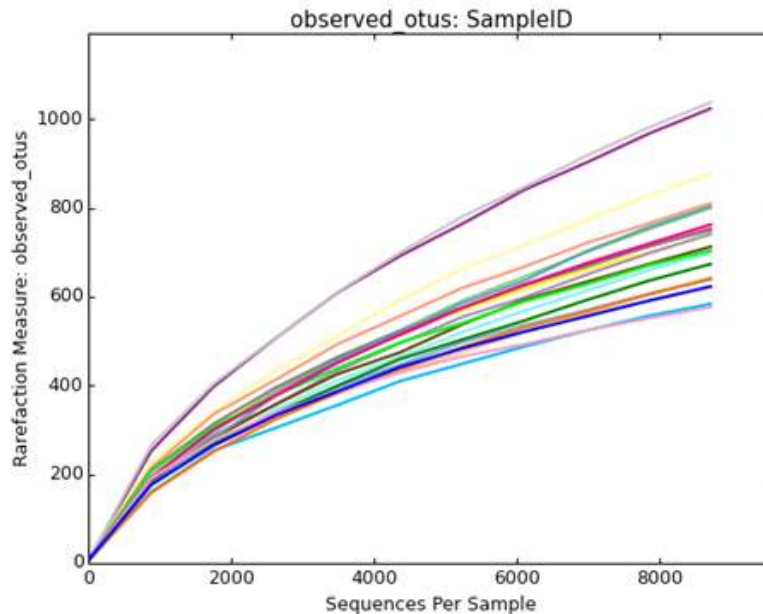


그림 3-6. 확보된 샘플의 Rarefaction curve

- 모든 샘플로부터 분석에 충분한 read count를 확보하였으며 rarefaction curve의 미분 값이 0으로 수렴하는 것으로 확인하였음.

- Rarefaction curve의 경우 sequence가 나타내는 OTU에 대한 수를 나타내는 것으로 read count가 증가할수록 수렴하는 이유는 해당 sequence가 나타내는 OTU가 그만큼 많아지지 않기 때문임.

- Data QC를 통과한 후 sequence를 토대로 QIIME 프로그램을 이용하여 metagenome

analysis를 수행하였으며 16S rRNA sequence database는 SILVA 128를 사용하였으며 21개의 샘플에 대하여 균총 분석을 수행하였음.

- 각 샘플에 대하여 균총 분석을 수행하였으며 family level에서 분석을 수행하였음(그림 3-7).

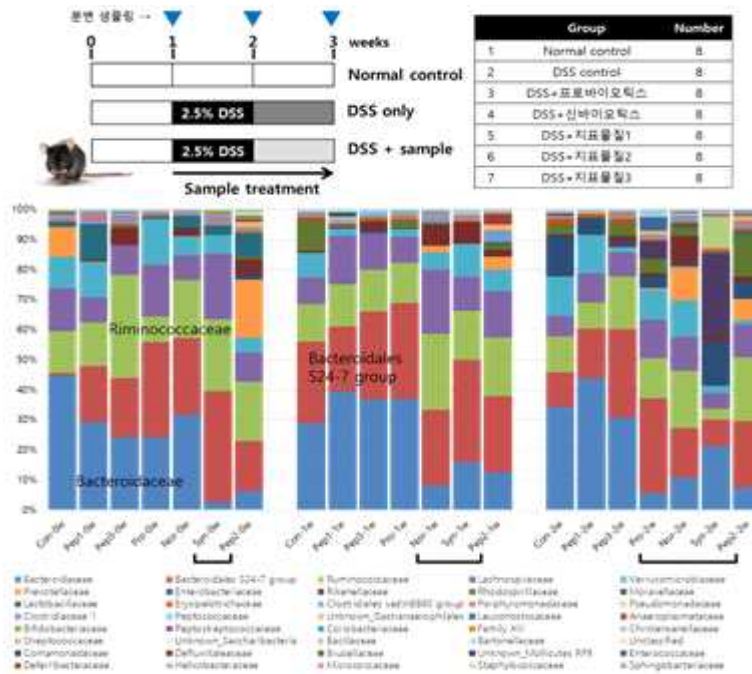


그림 3-7. 동물모델에 대한 장내 균총 분석

- 모든 샘플에서 Bacteroidaceae가 우점하고 있으며 Ruminococcaceae가 두 번째로 많은 양을 차지하고 있음.
- 전체적인 균총의 변화를 보았을 때 각각 처리한 그룹에 대하여 특이적인 균주가 발견되지 않았음.
- 따라서 균총에 따른 PCoA분석을 통하여 어떤 peptide가 synbiotics 섭취 군과 유사한 효과를 나타낼 수 있는지 확인하였음(그림 3-8).

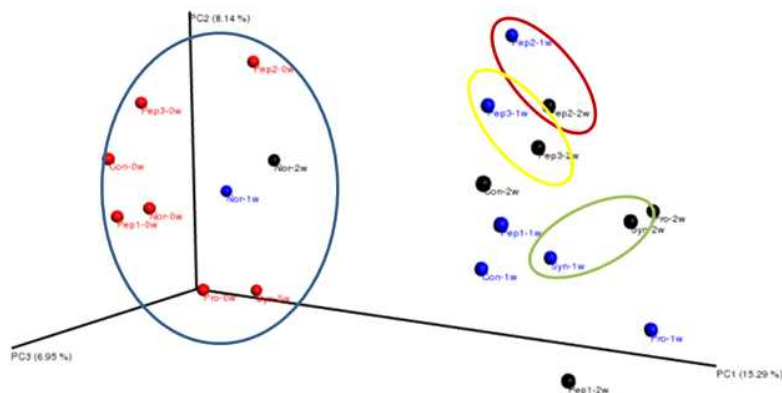


그림 3-8. 균총 분석에 대한 PCoA 분석

- PCoA 분석은 Unweighted Unifrac을 이용하였으며 Emperor 프로그램을 사용하여 시각화하였음.
- 그림에서 나타나듯이 0주차와 normal 그룹은 하나의 cluster를 이루고 있는 것으로 나타났으며 이는 초기 장내균총의 유사성과 normal diet에 대한 장내균총 변화가 적음을 나타냄.
- 반면 probiotics 및 synbiotics 그룹을 기준으로 control 그룹과 3종류의 peptide 그룹이 나뉘었음.
- 또한 control 그룹의 1주차와 2주차에 peptide 1그룹 1주차가 가까이 위치하는 것으로 보아 peptide 1은 synbiotics와 유사한 효과를 나타내지 못하는 것으로 확인되었음.

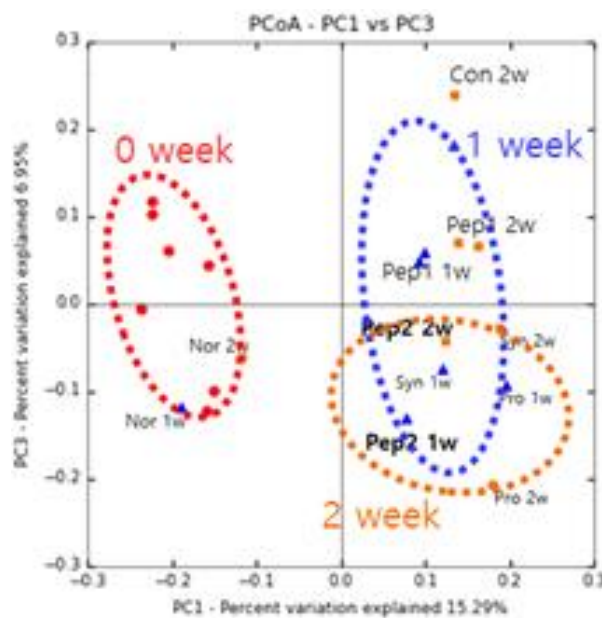


그림 3-9. 균총 분석에 대한 2D PCoA 분석

- QIIME 분석을 통하여 2D PCoA 분석을 수행한 결과 probiotics 섭취 군과 synbiotics 섭취 군이 peptide 2를 섭취한 그룹과 유사한 그룹에 속하는 것을 확인할 수 있음(그림 3-9).
- 따라서 synbiotics 내 존재하는 3종의 peptide 중에서 peptide 2 샘플이 장내균총 개선 효과 및 염증성 장 질환에 대하여 효과를 나타내는 것으로 확인되었음.

(2) 정상 소아청소년의 장내균총 메타게놈 분석

(가) 샘플 수집 현황

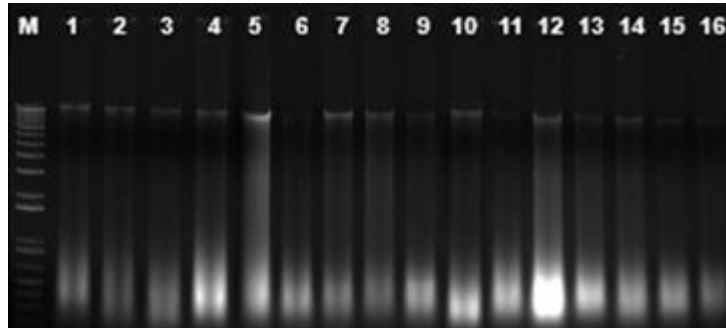
표 3-8. 정상 청소년 환자에 대한 분변샘플 현황

환자 정보				1차 (전)	2차 (후)	
번호	이름	성별	나이	진행 상황	진행 상황	
1	CYS	여	18	●	●	
2	YHJ	남	15	●	●	
3	KSY	여	12	●	●	
5	CHS	여	15	●	●	
6	LSH	남	11	●	●	
7	MTH	남	15	●	●	
12	LJM	남	16	●	●	
14	CHJ	남	14	●	●	
15	EJH	남	16	●	●	
16	HJW	남	17	●	●	
19	HHS	남	14	●	●	
20	KBJ	남	13	●	●	
23	LHY	여	13	●	●	
24	LHR	남	12	●	●	
25	LHY	남	10	●	●	
26	BDY	남	13	●	●	
27	CSJ	남	12	●	●	
28	LSW	남	10	●	●	
30	KJH	남	15	●	●	
31	KHJ	여	19	●	●	
13	KSY	여	18	●	●	
21	KEB	여	13	●	●	
33	KJH	남	14	●	●	
34	KSY	남	16	●	●	
36	KWJ	남	13	●	●	
39	KHS	여	19	●	●	
40	BSY	여	12	●	●	
41	YJM	여	12	●	●	
42	LJH	남	14	●	●	
43	KNR	여	12	●	●	
44	JYS	남	15	●	●	
46	HDW	남	17	●	●	
17	BJY	여	13	○	○	
8	KMG				동의 철회	
32	KYS				동의 철회	
37	YHS				동의 철회	
38	LCW				동의 철회	
45	PMK				동의 철회	
4	CMJ				동의 철회	
9	CJH				동의 철회	
10	CJH				동의 철회	
22	MCY				동의 철회	
29	KHB				동의 철회	
11	KYS				탈락	
18	LJH				탈락	
35	PSH				탈락	

- 총 46명 중 동의 철회 10명, 탈락 3명(회색으로 표시)을 제외한 33명을 대상으로 함.
- 17번 환자의 경우 분변샘플을 받았으나 분변 DNA의 양이 NGS 분석을 진행하기에 때

우 적은 양이어서 제외 후 총 32명의 분변 샘플을 대상으로 메타게놈 분석을 진행함(표 3-8).

(나) Extract of stool DNA



	sample	ng / ul	A260 / A280
1	1-1차	288.2	2.03
2	2-1차	178.6	2.15
3	3-1차	160.6	2.11
4	5-1차	138.6	2.09
5	6-1차	194.2	2.12
6	7-1차	274.2	2.15
7	12-1차	198.5	2.13
8	14-1차	452.7	2.06
9	15-1차	342.3	2.1
10	16-1차	182.6	2.14
11	19-1차	155.5	2.18
12	20-1차	142.5	2.02
13	23-1차	139.2	2.13
14	24-1차	130.8	2.21
15	25-1차	218.1	2.05
16	26-1차	251.2	2.17
∴	∴	∴	∴
40	31-2차	173.2	2.01

그림 3-10. Total fecal DNA 분리 정제

- Extract한 stool DNA 66개 중 16개의 gel electrophoresis를 수행하였음.
- 표는 stool DNA의 Nanodrop 결과로 DNA농도와 purity를 나타냄.
- 두 결과 모두 이상 없이 실험이 진행되었으며, 충분한 양의 농도와 pure한 DNA를 extract하였음을 알 수 있음(그림 3-10).

(다) PCR of stool DNA

PCR

PCR mixture		PCR condition	
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 ul	Initial Denaturation	95°C, 3 min
DNA (5 ng / ul)	5 ul	30 cycle : Denaturation Annealing Extension	95°C, 30 sec 54°C, 30 sec 72°C, 30 min
F primer (1 pmol)	10 ul		
R primer (1 pmol)	10 ul		
Total	50 ul	Final extension	72°C, 5 min

\* F primer : 341F overhang primer (49 mer)

\* R primer : 805R\_M modified overhang primer (55 mer)

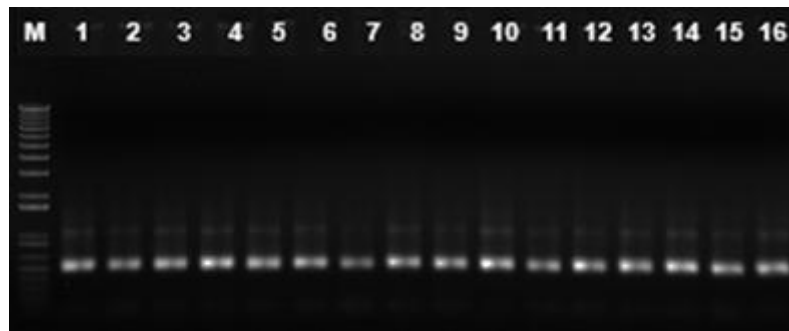
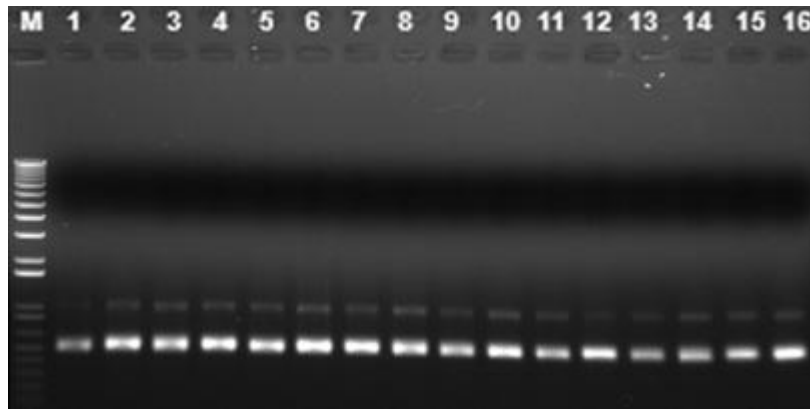


그림 3-11. 16S rRNA PCR 수행

- Stool DNA로부터 16S rRNA amplicon을 제작하기 위해 PCR을 진행함.
- V3, V4를 타겟으로 하는 프라이머를 사용하였음.
- Gel electrophoresis 사진은 PCR한 16S rRNA amplicon으로 문제없이 진행되었음을 알 수 있음 (그림 3-11).

(라) Gel extraction



	sample	ng / ul	A260 / A280
1	1-1차	61.6	1.96
2	2-1차	48.8	2.00
3	3-1차	49.5	2.00
4	5-1차	58.0	1.96
5	6-1차	40.0	2.00
6	7-1차	68.0	1.94
7	12-1차	40.9	1.85
8	14-1차	53.1	1.87
9	15-1차	69.2	1.92
10	16-1차	87.6	1.88
11	19-1차	87.6	1.83
12	20-1차	50.3	1.91
13	23-1차	82.2	1.94
14	24-1차	79.8	1.89
15	25-1차	72.2	1.95
16	26-1차	70.6	1.87
∴	∴	∴	∴
40	31-2차	67.3	1.93

그림 3-12. 16S rRNA PCR product

- 제작한 library를 sequencing 하기 위해 gel extraction을 진행하였음.
- Axygen, gel extraction kit를 이용하였으며, 표는 gel extraction 후 nanodrop 결과로 이는 이후 sequencing에 사용하기 충분한 농도이며, pure한 DNA임을 알 수 있음(그림 3-12).

(마) NGS 분석 및 data QC

- 20명의 샘플, 즉 40개의 샘플에 대하여 NGS metagenome 분석을 수행하였음(표 3-9).

표 3-9. NGS 분석에 따른 샘플별 read count

환자 No.	State	Read count	환자 No.	State	Read count
1	Before	160,393	19	Before	82,948
1	After	170,761	19	After	84,440
2	Before	135,206	20	Before	99,549
2	After	113,011	20	After	65,036
3	Before	135,520	23	Before	184,604
3	After	50,694	23	After	72,883
5	Before	74,204	24	Before	107,106
5	After	135,315	24	After	55,290
6	Before	111,546	25	Before	65,366
6	After	68,790	25	After	177,975
7	Before	65,002	26	Before	194,500
7	After	199,561	26	After	196,473
12	Before	81,165	27	Before	71,890
12	After	154,111	27	After	139,567
14	Before	179,695	28	Before	73,532
14	After	65,377	28	After	273,354
15	Before	93,178	30	Before	160,434
15	After	104,363	30	After	153,796
16	Before	109,674	31	Before	81,457
16	After	77,778	31	After	190,522

- 확보된 샘플들 중에서 1차/2차 샘플이 모두 확보된 샘플들로부터 우선적으로 20명의 환자 샘플로부터 metagenome 분석을 수행하였음.
- 각 샘플들로부터 최소 50,694부터 최대 273,354개의 read count를 확보하였음.
- 이에 대하여 최소값 50,694의 read 수로 normalization을 QIIME 프로그램을 이용하여 진행하였으며 이를 토대로 metagenome 분석을 수행하였음.



(바) Alpha-diversity

- 6주간 placebo를 섭취하고 6주간 프로바이오틱스를 섭취한 환자들에 대하여 장내 균총의 변화를 alpha-diversity를 분석하였음.
- Alpha-diversity는 그룹 내 균총에 대한 다양성을 나타냄(그림 3-13).

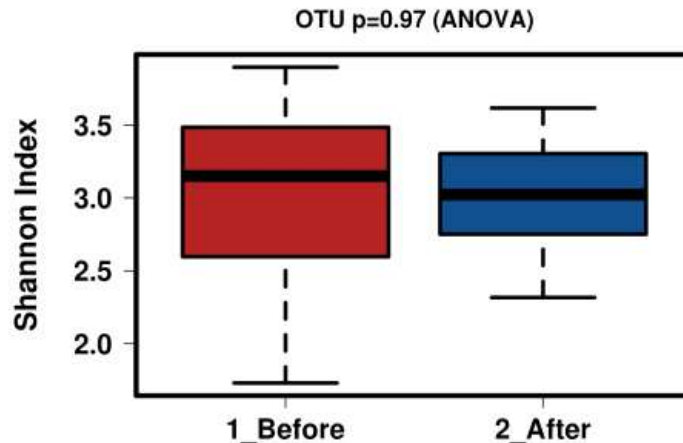


그림 3-13. NGS 분석에 따른 샘플별 read count

- 그림에서 나타낸 것과 같이 프로바이오틱스 섭취 전과 후에 대하여 Shannon index의 수치는 유의적으로 변하지 않았음.
- 이를 통하여 프로바이오틱스 섭취에 의한 장내 균총의 OTU 수준의 다양성에 있어서 차이는 나지 않는 것으로 판단됨.
- 뿐만 아니라 Genus~Phylum 수준에서도 유의적인 차이를 나타내지 않았음.
- 이는 다양성 수치상으로 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 균총 조성 상에는 전후 균주 분포가 다를 수 있음을 균주 분석을 통해 확인할 수 있었음.

(사) Beta-diversity

- Beta diversity는 그룹간의 균총을 비교하는 분석으로 장내균총 수준의 변화를 확인할 수 있음.
- 따라서 각 환자들에 대하여 probiotics 섭취 전 분변과 섭취 후 분변의 균총 수준의 변화를 확인하였음.
- 20명의 환자에 대하여 장내 총 변화를 PCoA 분석을 통하여 비교하였음(그림 3-14).
- 각 환자들의 프로바이오틱스를 섭취하기 전 장내 미생물과 섭취 후 장내미생물의 균총 수준에 대하여 표시하여 나타내었음.
- 그림에서 확인할 수 있듯이 두 그룹 간에 차이를 보이긴 하나 통계적으로 확인해 볼 때 두 그룹은 유의적인 차이가 없었음(p=0.823).
- 이는 앞서 언급한대로 균총 수준에 대한 수치를 비교한 값으로 두 그룹 간에 유의적인 차이가 나타나지 않을 가능성이 농후함.
- 따라서 각각의 샘플에 대하여 균주의 증감 등을 확인하였음.

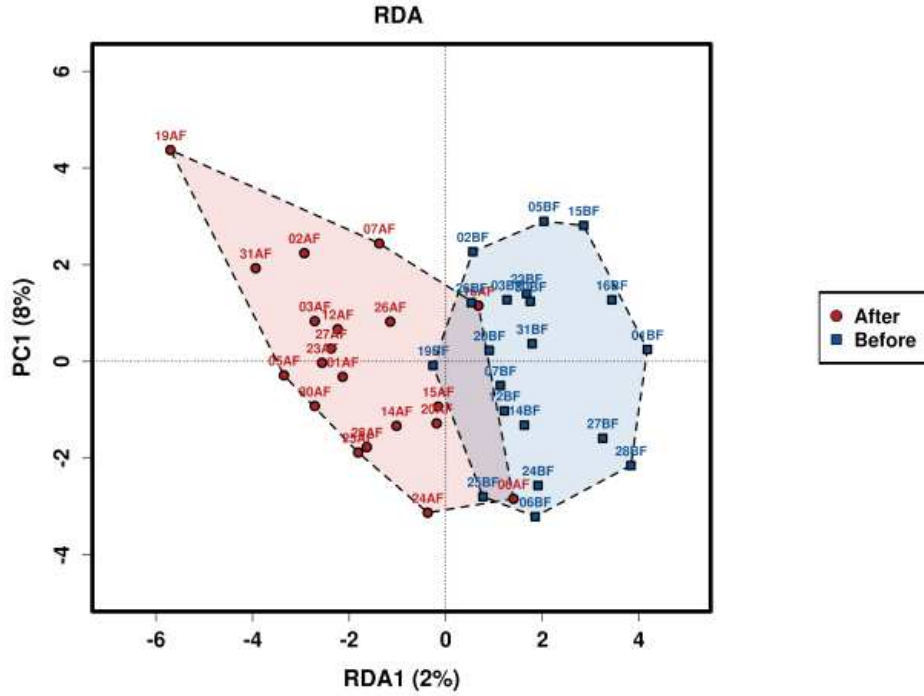


그림 3-14. 프로바이오틱스 섭취 전후에 대한 균총 변화

(아) 균총 분석 수행

- 각 샘플에 대한 균총 분석에 앞서 각 샘플이 속한 그룹 특이적 균주를 탐색하였음.
- 20개의 프로바이오틱스 섭취 전 샘플과 20개의 프로바이오틱스 섭취 후 샘플에 대한 비교 분석을 통계적 분석 방법(T-test)을 사용하였음.

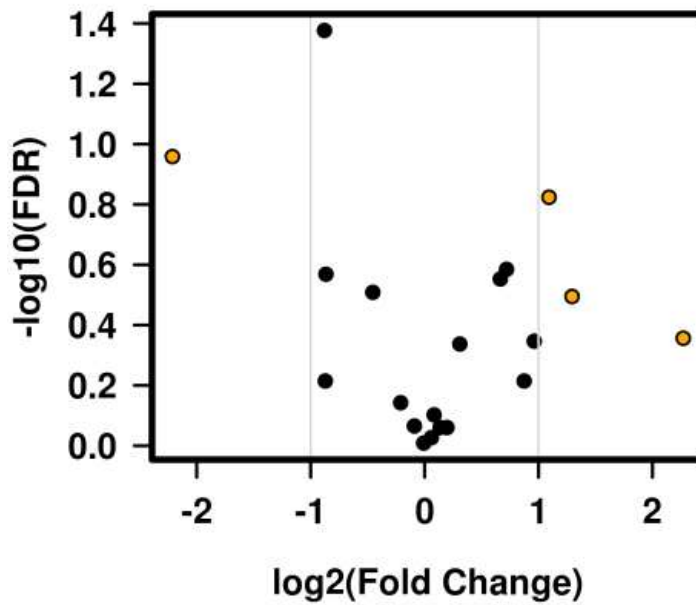


그림 3-15. Genus 수준에서의 두 그룹간의 균총 변화

- 그림 3-15에 나타나 있듯이, 두 그룹 간 차이가 큰 경우 양 옆에 나타나게 되어 있음.
- 또한 전 샘플에 대한 후 샘플의 비율의 log를 취한 Fold change 값에서 *Bifidobacterium*과 *Collinsella*, *Dialister*, *Megamonas*가 증가하는 균주임을 확인하였음 (그림 3-16).

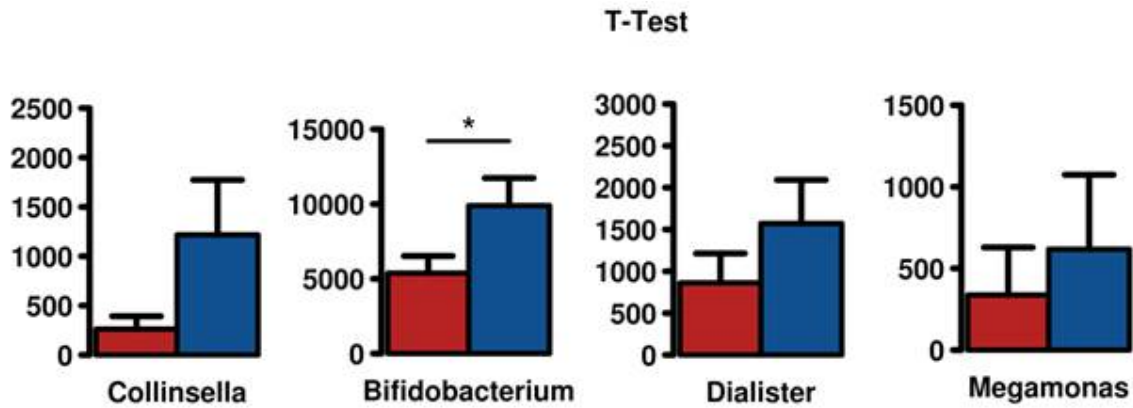


그림 3-16. Genus 수준에서의 증가한 균주 (전: 빨간색, 후: 파란색)

- *Bifidobacterium*의 경우 섭취 전 장내균총 내 존재하는 수보다 섭취 후 장내 존재하는 균의 수가 많아진 것을 확인할 수 있었음 ( $p < 0.05$ ).
- 하지만 *Collinsella*, *Dialister*, *Megamonas*는 변한 비율은 높지만 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았음.
- 특히 *Lactobacillus*의 경우, 섭취 전에 비하여 증가하였지만 분변에서 발견되는 비율이 매우 적고 증가된 수치는 유의적인 차이를 보이지 않았음(그림 3-17).

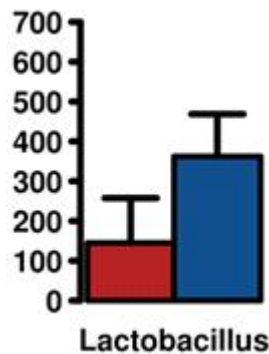


그림 3-17. 섭취 전후에 따른 *Lactobacillus*의 변화 (전: 빨간색, 후: 파란색)

- 또한 섭취로 인하여 균주가 감소하는 genus가 있었음(그림 3-18).

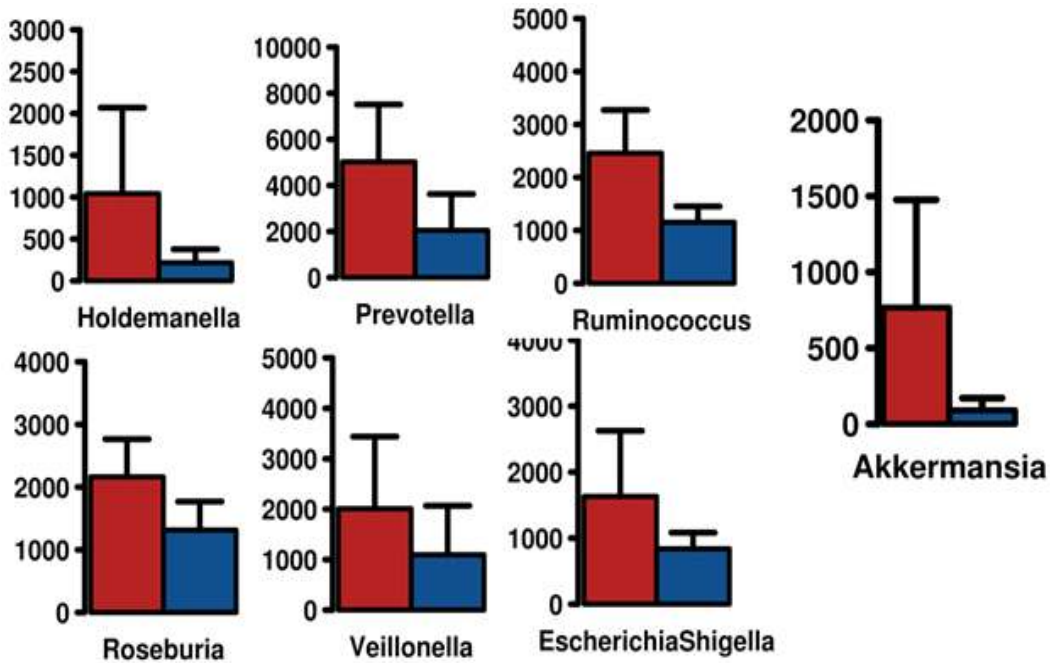


그림 3-18. Genus 수준에서의 감소한 균주 (전: 빨간색, 후: 파란색)

- 감소한 균주 모두 유의적인 차이를 보이지 않았으나 대표적으로 *Ruminococcus*, *Prevotella*, *Holdemanella* 균주가 Fold change 값이 크게 나타났음.
- *Prevotella*의 경우 감소한 균주들 중 장내에 높은 비율을 차지하고 있는 균주이며 이는 염증성 장 질환과 연관된 균주이며 그 비율이 줄었음에 따라 장 질환이 개선되었다고 사료됨.

(자) 추가 분석

- 내원하는 환자에 대한 분변샘플을 수집하는 연구이기 때문에 수집에 어려움이 따름.
- 현재까지 확보된 분변은 총 38명의 분변을 확보하였으며 이 중 6명의 분변만이 미 수집 상태임.
- 32쌍의 분변샘플 중 20쌍에 대한 분석은 완료된 상태이며 12쌍에 대한 분석은 진행 중에 있으며 11월 중으로 분석이 완료될 예정임.
- 따라서 나머지 6명의 분변이 모두 회수 될 경우 NGS 분석을 곧바로 수행하고 38명의 장내균총 정보를 토대로 프로바이오틱스 섭취에 따른 장내균총 변화에 대한 결론을 도출할 예정임.

(3) 염증성 장 질환 환자의 신바이오틱스 투여에 대한 분변샘플 수집

(가) 실험군 모집에 따른 분변샘플 수집

- 삼성 서울병원을 내원하는 크론병으로 진단받고 치료중인 환자를 대상으로 실험에 대한 설명과 그에 대한 설문조사를 통해 수행여부를 확인하고 연구수행 동의 시 내원했을 때

분변샘플을 수집하여 장내 균총을 분석하고자 함.

- 8주간 probiotics 및 synbiotics를 섭취하고 그에 따른 장내균총의 변화와 복용을 끊고 8주간 지낸 후 장내균총이 유지가 가능한지 혹은 증상의 완화가 있는지에 대한 여부를 확인하고 이에 대한 장내균총 분석 자료와 상관관계성을 증명하고자 함.
- 현재 실험을 위한 실험자가 계속 모집 중이며 모집된 환자의 경우 삼성서울병원에서 장내균총 분석을 위한 분변샘플을 보관하고 있음.
- 분변상태로 장기 보관을 피하기 위하여 일정량 수집이 된 경우 전달 받아 최적화된 total fecal DNA 순수 분리 정제를 수행할 예정임.

다. 인체 임상실험 유래 분변의 메타게놈 분석을 통한 신바이오틱스의 염증성 장 질환 및 장내 균총 개선 효과 검증

(1) NGS 분석을 위한 total fecal 음 고순도 분리정제

(가) 분변 수집 현황 및 수집된 분변으로부터 최적화된 total fecal DNA 분리 정제

- 삼성서울병원으로부터 총 83명의 염증성 장질환(IBD) 환자의 분변샘플을 확보하였음.
- 97번 환자의 경우 total fecal DNA를 분리하기에 분변 샘플의 양이 너무 적어 분석 수행에서 제외되었음.
- 따라서 82명의 분변, 신바이오틱스 섭취 전, 섭취 후, 섭취 종료 6주 후의 환자별 3번의 샘플을 확보하여 총 246개의 샘플로부터 고순도의 genomic DNA를 순수분리 정제하였음(100명의 모집 환자 중 동의철회 16명, 샘플 미수령 1명, 샘플 부족 1명, 균총 분석 82명, 표 3-10).

표 3-10. IBD 청소년 환자에 대한 분변샘플 현황

No	이름	실험군	1st visit	2nd visit	3rd visit	No	이름	실험군	1st visit	2nd visit	3rd visit	No	이름	실험군	1st visit	2nd visit	3rd visit	No	이름	실험군	1st visit	2nd visit	3rd visit
1	LYS	대조군	1	1	1	26	KTW	대조군	1	1	1	51	KKK	대조군	1	1	1	76	JSJ	대조군	1	1	1
2	KKN	유산균	1	1	1	27	JSJ	유산균	1	1	1	52	NYJ	유산균	1	1	1	77	LSJ	유산균	1	1	1
3	KYE	대조군	1	1	1	28	SBK	유산균	1	1	1	53	SHU	유산균	1	1	1	78	MCH	유산균	1	1	0
4	KWS	유산균	1	1	1	29	LHA	유산균	1	1	1	54	HHL	유산균	1	1	1	79	PJS	대조군	1	0	0
5	HCO	유산균	1	1	1	30	KEJ	유산균	1	1	1	55	KDH	유산균	1	1	1	80	KMJ	대조군	1	1	1
6	KJI	대조군	1	1	0	31	SCS	대조군	1	1	1	56	SVJ	유산균	1	0	0	81	KSI	대조군	1	1	1
7	KDY	대조군	1	1	0	32	HTY	유산균	1	1	1	57	SVH	대조군	1	1	1	82	PHW	유산균	1	0	0
8	LJM	유산균	1	1	1	33	AJH	유산균	1	1	1	58	BHK	유산균	1	1	1	83	SMS	유산균	0	0	0
9	KJH	유산균	1	1	1	34	NSH	대조군	1	1	1	59	CHT	대조군	1	1	1	84	KTW	유산균	1	1	1
10	LYJ	유산균	1	1	1	35	KHS	대조군	1	1	0	60	KDE	대조군	1	1	1	85	CJS	대조군	1	0	0
11	CMS	유산균	1	1	1	36	PWS	대조군	1	1	1	61	KYS	대조군	1	1	1	86	KVB	유산균	1	0	0
12	KJK	대조군	1	1	1	37	PHS	대조군	1	1	1	62	LSH	유산균	1	1	1	87	SIW	대조군	1	1	1
13	KDK	대조군	1	1	1	38	JJS	대조군	1	1	1	63	KSH	대조군	1	1	1	88	LJH	유산균	1	1	1
14	PBY	유산균	1	1	0	39	CIK	유산균	1	0	0	64	CDI	유산균	1	1	1	89	PHJ	유산균	1	1	1
15	SKJ	대조군	1	1	1	40	KJH	대조군	1	0	0	65	PJH	유산균	1	1	1	90	LSJ	대조군	1	0	0
16	LJC	대조군	1	1	1	41	SEA	유산균	1	1	1	66	KCY	대조군	1	1	1	91	YYJ	유산균	1	1	1
17	KIM	대조군	1	1	1	42	KVY	대조군	1	1	1	67	PES	유산균	1	1	1	92	WWJ	대조군	1	1	1
18	PBC	대조군	1	1	1	43	YKY	유산균	1	0	0	68	PHM	유산균	1	1	1	93	JYJ	대조군	1	1	1
19	PJY	유산균	1	1	1	44	MKT	대조군	1	1	1	69	JSH	유산균	1	1	1	94	NCK	대조군	1	1	1
20	SBJ	유산균	1	1	1	45	PSH	대조군	1	1	1	70	ASM	유산균	1	1	1	95	BHJ	대조군	0	0	0
21	KJH	유산균	1	1	1	46	NHY	대조군	1	1	1	71	CBR	대조군	0	0	0	96	YYJ	유산균	1	1	1
22	KNY	대조군	1	1	1	47	OSJ	유산균	1	1	1	72	KMS	유산균	1	1	1	97	OMS	대조군	1	1	1
23	CIH	유산균	1	1	1	48	SDY	대조군	1	1	1	73	LSW	대조군	1	1	1	98	LJY	대조군	1	1	1
24	CES	대조군	1	1	1	49	PSH	유산균	1	1	1	74	KSW	대조군	1	1	1	99	KMW	유산균	1	1	1
25	SWC	대조군	1	1	1	50	KYO	유산균	1	1	1	75	NKT	대조군	1	1	1	100	KDH	대조군	1	1	1

- 확보된 분변을 화용하여, 1차년도에 최적화한 방법을 토대로 청소년 IBD환자의 장내 균총 분석을 위한 분변으로부터 고순도의 total fecal DNA를 분리 정제하였음.
- 246개의 total fecal DNA는 NGS분석을 위하여 16S rRNA amplicon library 제작에 사용함.

(나) 마이크로바이옴 분석을 위한 NGS Library 제작

- NGS 분석을 위하여 246개의 total fecal DNA의 QC를 전기영동을 통하여 확인하였으며 이로부터 16S rRNA V4-V5 region amplicon을 확보하기 위한 PCR을 수행함.
- 16S rRNA V4-V5 region 분석을 위하여 FWD:  
5 '-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' ; REV:  
5 '-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3' 의 primer를 사용하였음.
- Library에 사용된 primer에는 universal primer sequence를 포함하여 Illumina adapter sequence와 Golay barcode, forward primer pad, Forward primer linker가 연결되어있어 MiSeq 분석 후 샘플별 parsing이 가능함.
- PCR 조건은 아래와 같이 수행하였음(표 3-11).

표 3-11. NGS library 제작을 위한 PCR 조건

Reagent	Volume	Temperature	Time, 96-well	Time, 384-well	Repeat
PCR-grade water	13.0 µL	94 °C	3 min	3 min	
PCR master mix (2x)	10.0 µL	94 °C	45 s	60 s	x35
Forward primer (10 µM)	0.5 µL	50 °C	60 s	60 s	x35
Reverse primer (10 µM)	0.5 µL	72 °C	90 s	105 s	x35
Template DNA	1.0 µL	72 °C	10 min	10 min	
Total reaction volume	25.0 µL	4 °C	hold	hold	

(2) 염증성 장 질환 환자의 장내균총 분석

(가) 확보된 분변샘플로부터 염증성 장 질환 환자의 장내균총 분석 수행

- 실험군과 대조군에 상관없이 확보된 82명의 첫 번째 분변샘플의 균총 분석을 수행함.
- 확보된 82개의 분변샘플의 균총 분석 결과 *Firmicutes*의 비율이 가장 많은 것으로 나타났으며 *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* 순으로 많은 것으로 나타났음.
- Genus 수준에서의 분석 결과 *Bacteroides*의 비율이 가장 많았으며 특이적으로 *Bifidobacterium*의 비율이 많은 것으로 나타났음.
- 이는 소아청소년의 분변샘플로부터 분석을 수행하였기에 보고된 IBD환자들의 장내균총과 다르게 *Bifidobacterium*의 비율이 상대적으로 많아진 것으로 확인되었음.
- 또한 *Escherichia-Shigella*의 비율이 높고 *Lachnospiraceae*의 비율이 높은 것으로 나타났는데, 이는 다른 IBD 환자들의 장내균총에서도 특이적으로 발견되는 genus와 family인 것으로 확인되었음(그림 3-19).

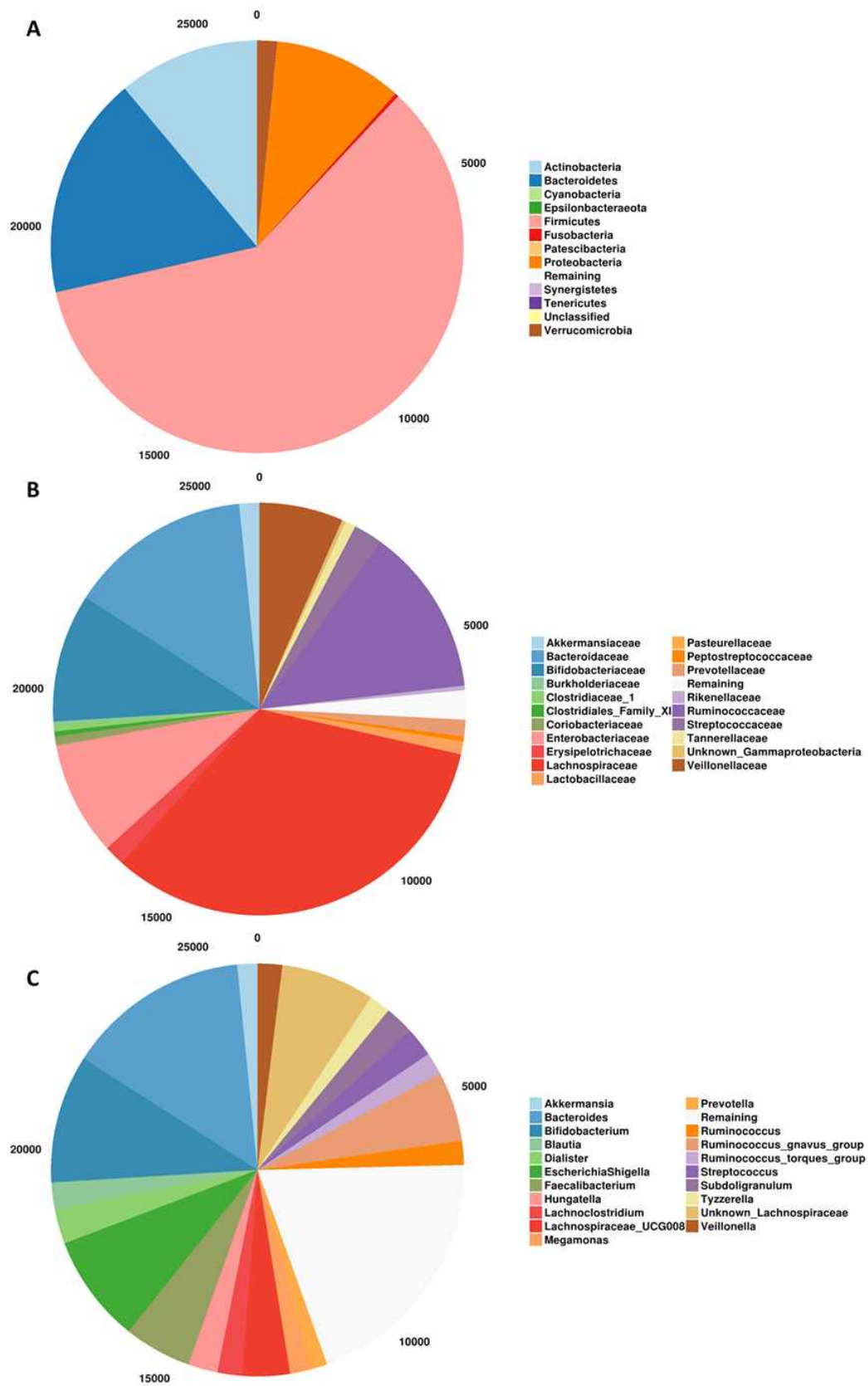


그림 3-19. IBD환자의 장내 균총 조성 ((A)Phylum, (B)Family, (C)Genus level)

(나) 그룹에 따른 염증성 장 질환 환자의 장내 균총 비교

- 신바이오틱스 섭취에 앞서 염증성 장 질환 환자의 장내균총을 비교하여 두 그룹 간 차이가 없음을 확인하였음(그림 3-20).
- Shannon diversity 분석 결과 평균에서는 차이를 보였으나 ANOVA 분석 수행 결과 두 그룹 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았음( $p=0.3$ ).
- 뿐만 아니라 균총의 풍부도를 나타내는 Richness의 경우도 마찬가지로 ANOVA 분석 수행 결과 유의적인 차이를 보이지 않았음( $p=0.98$ ).

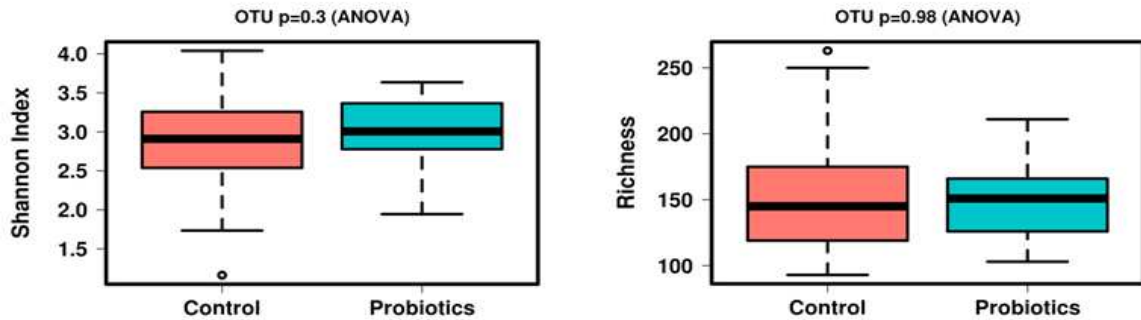


그림 3-20. IBD환자의 장내 균총 조성차이 (Shannon (左), Richness (右))

(3) 신바이오틱스 섭취에 의한 염증성 장 질환 환자의 장내균총 변화 분석

(가) 실험군과 대조군간 장내균총 다양성 차이 분석

- 실험군 및 대조군의 장내균총 분석에 따른 alpha-diversity 분석 수행한 결과 visit에 따른 그룹간 균총 diversity가 유의적인 차이를 보이지 않았음( $p=0.73$ ,  $F=0.56$ , ANOVA) (그림3-21).
- 각 샘플은 41개의 node를 나타내고 있으며 Shannon 수치의 평균치는 대조군의 경우 시료 섭취 기간 동안 증가를 보였으나 washout 후에는 다시 감소하는 것으로 나타났음.
- 신바이오틱스를 섭취한 그룹의 경우 실험이 진행됨에 따라 diversity가 감소했으며 이는 신바이오틱스 섭취에 의한 장내균총에 우점 형성을 유추 해 낼 수 있음.

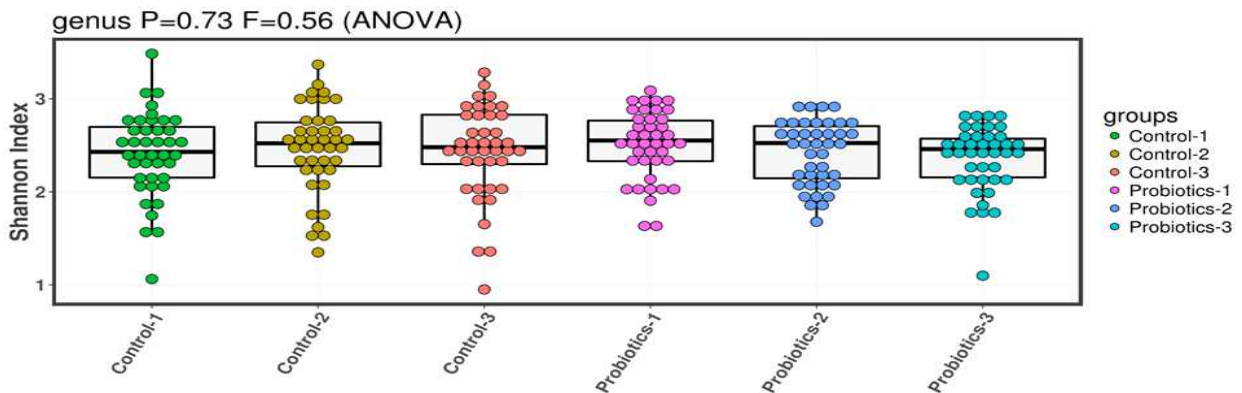


그림 3-21. Visit에 따른 Group 별 장내 균총 diversity 변화



(나) 실험군과 대조군간 장내균총 차이 분석

- 실험군과 대조군의 visit에 따른 장내균총의 조성을 분석하여 이들이 얼마나 다른지 분석하는 beta-diversity 분석을 수행하였음.
- 246개의 모든 샘플로부터 그룹 및 visit에 따라 beta-diversity를 분석 한 결과 모든 샘플들이 고르게 퍼져있는 것으로 나타났음(그림 3-22).
- 이는 균총 구성에 있어 다양성이 각기 다르며 공통된 조성을 갖는 그룹 혹은 visit은 존재하지 않는 것으로 나타났음.

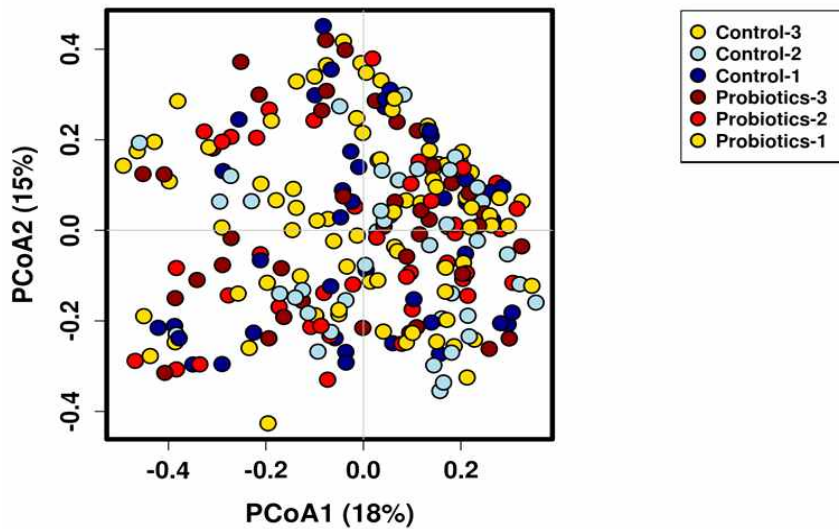


그림 3-22. IBD환자의 장내 균총 차이 (PCoA Bray-Curtis: genus level)

- 하지만 그룹별로 parsing하여 그룹 내에서 visit 별 장내 균총의 변화 추이를 확인한 결과 대조군에서는 확연하게 나타나지 않았으나 신바이오틱스를 섭취한 그룹의 경우 visit 별로 그룹을 이루는 것을 확인할 수 있었음(그림 3-23).

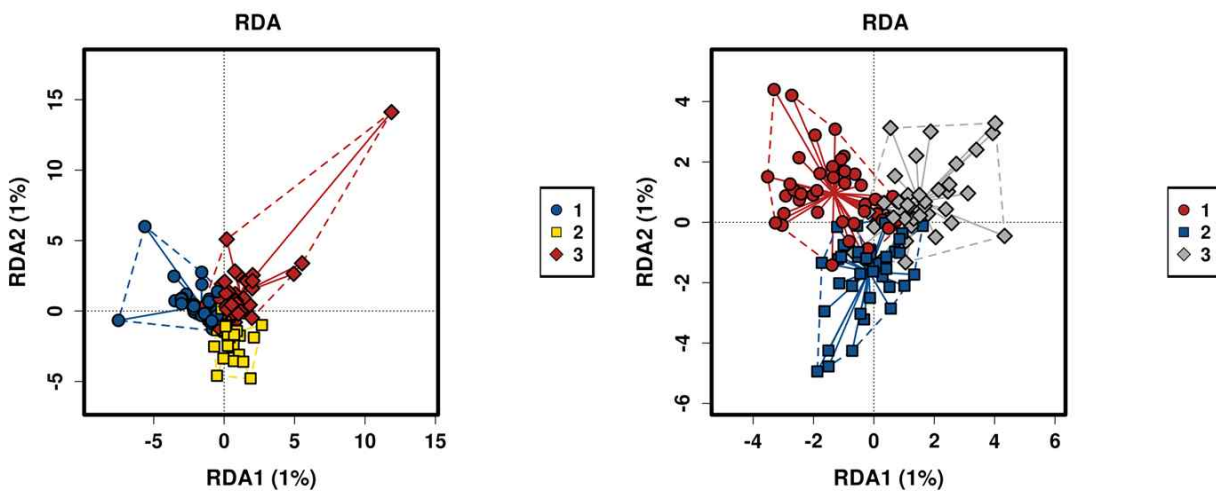


그림 3-23. 그룹에 따른 visit 별 장내 균총 차이 분석 (1: 섭취 전, 2: 섭취 후, 3: 섭취 종료 6주 후)

(다) 실험군과 대조군간 장내균총 조성 분석

- 실험군과 대조군간 장내균총의 조성을 분석 한 결과 두 그룹 모두 *Firmicutes*가 가장 많은 Phylum으로 분석되었으며 *Bacteroidetes*가 다음으로 많았음(그림 3-24).
- 신바이오틱스 섭취한 그룹의 경우 특이적으로 *Proteobacteria*의 비율이 높게 유지되고 있는 것으로 나타났으며 *Bacteroidetes*의 비율이 상대적으로 높은 것으로 나타났음.
- 대조군의 경우 *Verrucomicrobia*가 상대적으로 높은 비율을 보였으며 이 phylum에 속하는 genus는 *Akkermanisia*가 있으며 실험이 진행될수록 그 비율이 줄어드는 것을 나타내었음.

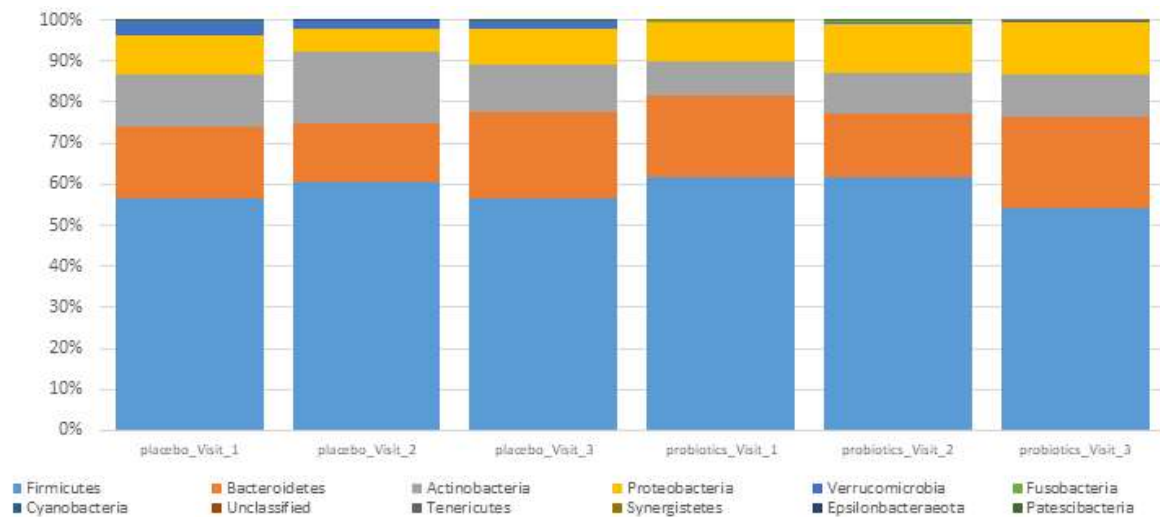


그림 3-24. Phylum 수준에서의 IBD 환자의 장내균총 조성

- 실험군과 대조군간의 장내 균총을 Genus 수준에서 분석한 결과 *Bifidobacterium*, *Akkermansia* 와 같은 유익균의 relative abundance가 synbiotics 섭취 후 증가하는 것을 확인였으며, *Clostridium*, *Prevotella* 와 같은 유해균의 relative abundance는 placebo그룹에서 증가하는 것을 확인함(그림 3-25).
- 하지만 신바이오틱스를 섭취한 그룹의 경우 *Bifidobacterium*이 초기 비율에 비하여 증가하는 것을 나타냈으며 이는 우유와 *Lactobacillus gasseri* 505 및 꾸지뽕잎 발효산물을 섭취하였기 때문에 증가한 것으로 예상되며, 동물실험 결과와 유사하게 그 비율이 증가한 것으로 나타났음.

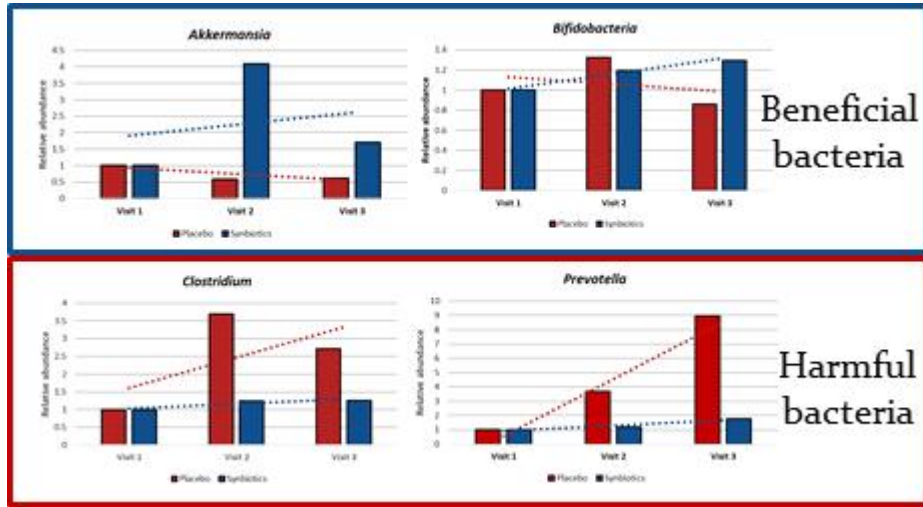


그림 3-25. Genus 수준에서의 IBD 환자의 장내균총 조성

(라) 실험군 및 대조군의 임상적 효과와 장내균총과의 관계

- 실험군과 대조군 환자의 임상적 효능을 확인하기 위하여 Calprotectin, ESR(Erythrocyte Sedimentation Rate), CRP(C-reactive protein)를 삼성서울병원에서 측정하여 결과를 전달 받았음(그림 3-26).

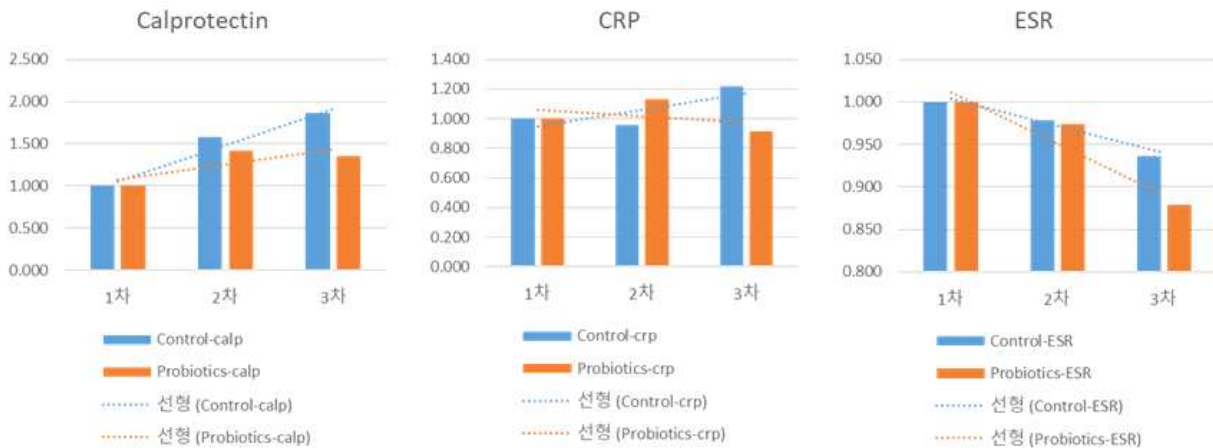


그림 3-26. Visit에 따른 환자의 임상 결과 (삼성서울병원)

- Calprotectin 및 CRP, ESR 모두 염증과 관련된 수치로써 그 수치가 낮아지게 될 경우 염증이 호전되고 있음을 나타낼 수 있음. 본 연구에서는 Calprotectin이 증가하는 양상을 보였음.
- 이러한 임상 수치들로부터 장내균총과의 연관성을 확인하기 위하여 통계학 및 생물정보학적 분석을 통하여 이들의 상관관계를 확인하였음.
- 신바이오틱스를 섭취한 그룹 환자들의 장내균총만 따로 분리하여 Calprotectin 결과와의 관계를 분석한 결과 *Ruminococcus\_torques\_group*과 *Unknown\_Lachnospiraceae*가 유의적으로 상관관계를 갖는 것으로 나타났음(FDR=0.0087, 0.0061) (그림 3-27).

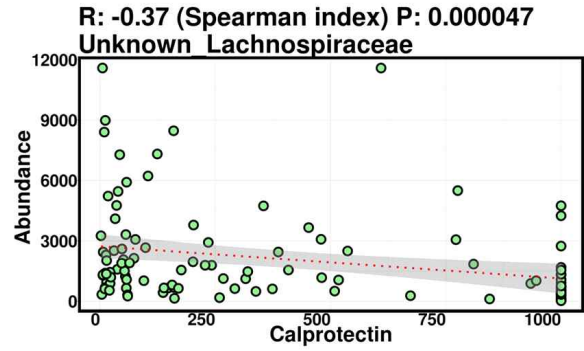
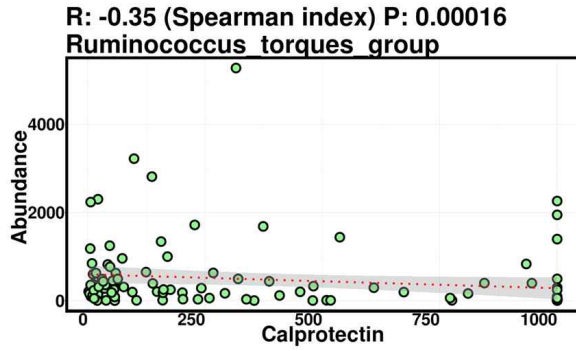


그림 3-27. Calprotectin과의 Spearman correlation 분석

- 신바이오틱스를 섭취한 그룹의 환자의 visit별 ESR 수치에 대한 장내균총의 genus와의 상관관계를 분석한 결과 Unknown\_Lachnospiraceae와 Lachnospiraceae\_UCG008과의 Spearman 상관관계가 유의적인 것으로 나타났음(FDR=0.0049, 0.0049) (그림 3-28).

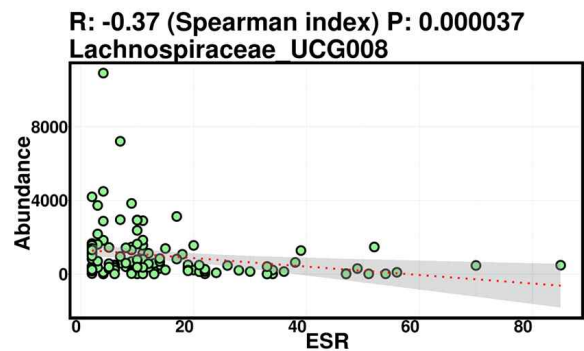
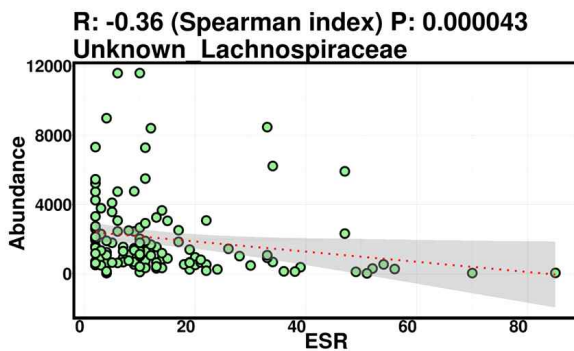


그림 3-28. ESR과의 Spearman correlation 분석

- 신바이오틱스를 섭취한 그룹의 환자의 visit별 CRP 수치에 대한 장내 균총의 genus와의 상관관계를 분석한 결과 Clostridium sensu stricto와는 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타났으며(FDR=0.0014), Bifidobacterium과는 음의 상관관계를 갖는 것으로 나타났음(FDR=0.01) (그림 3-29).

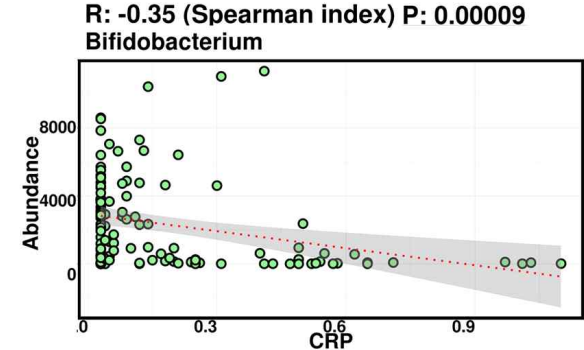
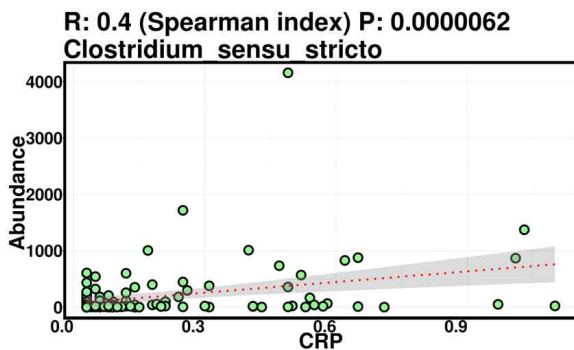


그림 3-29. CRP와의 Spearman correlation 분석

- 염증성 장 질환 환자의 장내균총과 염증 지표와의 상관관계(spearman correlation) 분석을 진행함(그림 3-30).
- Calprotectin, CRP(C-reactive protein), ESR(Erythrocyte Sedimentation Rate)는 모두 염증의 정도를 나타내는 지표이며, 염증이 감소함에 따라 이 값들이 감소하는 경향을 보임.
- 염증지표와 장내균총의 상관관계를 분석한 결과 유익균인 *Bifidobacterium*, *Lachnospiraceae*가 증가함에 따라 염증이 감소하는 관계를 가짐.
- *Lachnospiraceae*는 SCFA(Short Chain Fatty Acid)producer로 보고되어 있음.
- 또한 유해균인 *Escherichia-Shigella*, *Clostridium* spp., *Prevotella* 와 같은 유해균은 염증이 증가함에 따라 이들도 증가하는 관계를 가짐을 확인함.
- 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 신바이오틱스를 섭취 시 *Bifidobacterium*과 같은 유익균이 증가하며, 이와 같은 유익균의 증가는 염증의 감소와 상관관계가 있음을 확인하여 신바이오틱스가 장내 염증의 감소 및 균총 개선에 효과를 보여 줄 수 있다고 할 수 있음.

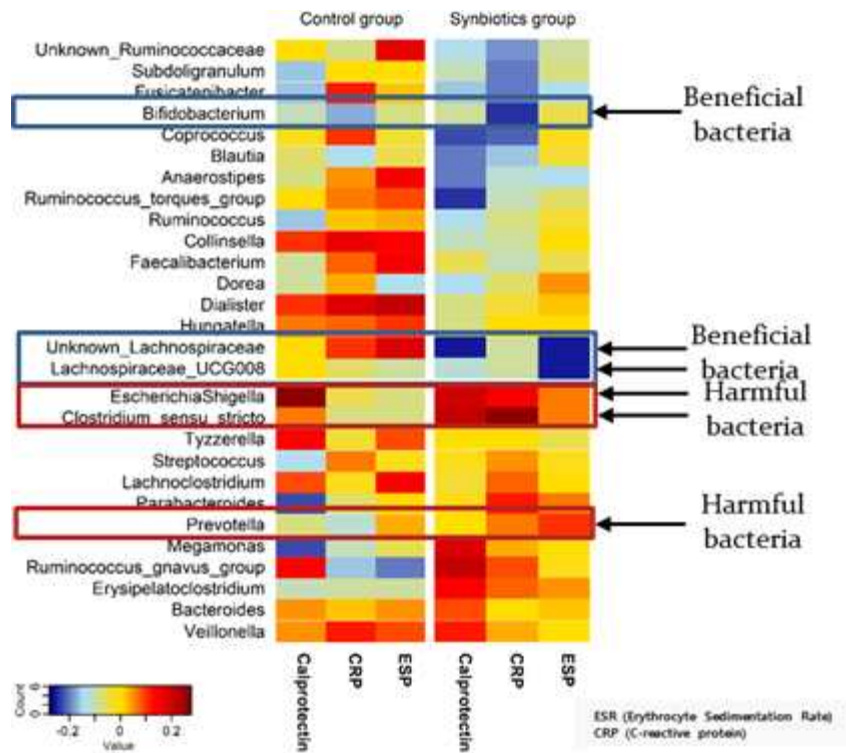


그림 3-30. IBD환자의 장내균총과 염증지표의 Spearman correlation 분석

2-2. 연구개발 성과

가. 논문게재 및 학술대회 발표

(1) 논문게재

번호	논문명	주저자명	학술지명	Vol. (No.)	게재일	국명/SCI여부
1	Immunomodulatory effects of fermented milk based on synbiotic interaction between <i>Cudrania tricuspidata</i> leaf extract and <i>Lactobacillus gasseri</i> 505	Ji Young Lee, Su Gyeong Kim	Journal of Milk Science and Biotechnology	36(1): 39-48	18.3.28	대한민국 /비SCI
2	Enhanced production of galactooligosaccharides enriched skim milk and applied to potentially synbiotic fermented milk with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15	Nam Su Oh	Food Science of Animal Resources	39(5): 725~741	19.7.18	대한민국 /SCI
3	Synbiotic combination between <i>Lactobacillus gasseri</i> 505 and a <i>Cudrania tricuspidata</i> leaf extract prevents hepatic toxicity induced by colorectal cancer in mice	Nam Su Oh, Jae Yeon Joung	Journal of Dairy Science	-	In submission	USA /SCI
4	Anticancer effect of a synbiotic combination between <i>Lactobacillus gasseri</i> 505 and a <i>Cudrania tricuspidata</i> leaf extract on colitis-associated colorectal cancer	Ju-Hoon Lee, Nam Su Oh, Ji Young Lee	mBio	-	In submission	USA /SCI
5	Anti-inflammatory effect of peptide derived from the synbiotics, fermented cudrania tricuspidate with <i>Lactobacillus gasseri</i> , on inflammatory bowel disease	Jimyeong Ha, Yohan Yoon	Journal of Dairy Science	-	In submission	USA /SCI

(2) 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표제목	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Fermentative metabolism of synbiotic combination and their beneficial effect on gut health and	2017 세종대학교 탄수화물소재연구소 정기 학술심포지엄	오남수	2017.9.15	서울	대한민국

	modulation of gut microbiota					
2	<i>Bacillus cereus</i> isolated from South Korea	제7회 Annual Congress on Clinical Microbiology	이주훈	2017.09.25	시카고	미국
3	Effect of functional peptides derived from natural synbiotics on inflammatory bowel disease	한국축산식품학회	오혜민	2018.05.25	제주	대한민국
4	Beneficial effect of symbiotic fermented milk on gut health and modulation of gut microbiota	2018 한국식품과학회 정기학술대회	이지영	2018.06.29	부산 벅스코	대한민국
5	<i>Cudrania tricuspidata</i> leaf extract supplemented milk fermented with <i>Lactobacillus gasseri</i> 505 prevents hepatic toxicity induced by colorectal cancer in mice	한국미생물생명공학회	정재연	2019.06.25	제주 ICC	대한민국
6	Probiotic and anti-obesity potential of <i>Lactobacillus rhamnous</i> 4B15 isolated from infant feces	한국식품과학회	박민희	2019.06.27	인천 송도 컨벤시아	대한민국
7	Metagenomic study of clinical effects on irritable bowel syndrome using synbiotics	American society for microbiology	You Tae Kim, Ju-Ho on Lee	2019.06.21	샌프란시스코	미국

### (3) 포상 및 수상 실적

번호	포상명	포상내용	포상자	포상일자	포상기관
1	The excellence oral presentation award	표창장	오혜민	2018.05.25	KoSFA

나. 특허 출원/등록

번호	특허명	출원/등록번호	출원/등록일	비고
1	유아 분변에서 분리한 균주 및 이를 이용한 항산화 및 면역강화 기능을 갖는 발효유의 제조방법	1017836720000	2017.09.26	등록
2	항비만 활성을 갖는 유산균을 함유하는 식품 또는 약학적 조성물	10-2019-0128820	2019.10.17	출원
3	항산화 기능성 발효 유청 조성물	10-2019-0135509	2019.10.29	출원

다. 기술실시

번호	기술명	실시기관	기술실시일
1	항산화 및 면역강화 기능성 소재를 활용한 유제품의 제조	서울우유협동조합	2019.12

라. 사업화

번호	사업화명	제품명	업체명	비고
1	신바이오틱스 발효유	신바이오틱스 발효유 (컵(PS) / 180 mL)	서울우유협동조합	시제품 완료 (사업화 예정)
2	신바이오틱스 분말 제제	신바이오틱스 고농축 혼합분말 제제 (2 g / 100포 / 박스)	서울우유협동조합	시제품 완료 (사업화 예정)

마. 기타 실적

(1) 홍보실적

번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	기타	행사홍보	<i>Lactobacillus gasseri</i> 505로 제조한 유산균 혼합제제 홍보전시	2019.11.14

(2) 인력양성

번호	인력양성명	인력양성년도	인력양성내용
1	이요셉	2019	석사학위취득
2	김선균	2019	석사학위취득

(3) 고용창출

번호	고용창출명	고용창출년도	고용창출내용
1	황아영	2018	서울우유협동조합 신규채용



### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표 및 목표 달성여부

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	[주관] 천연물유래 신규 신바이오틱스 제조, 안전성 및 기능성 검증	프리바이오틱스 및 신바이오틱스 샘플 제조 및 제공	100	- 전임상 및 임상시험을 위한 프리바이 오틱스(꾸지뽕잎 추출물) 및 신바이 오틱스 제제(꾸지뽕잎 추출물+ <i>L.</i> <i>gasseri</i> 505) 실험실 소량생산 및 위탁/협동기관에 제공
		지표물질 (milk peptide, phenolic compound) 탐색 및 기능성 검증	100	- 신바이오틱스 발효물 내 지표물질인 펩타이드 21종에 대한 세포독성시험 과 항산화 및 염증억제 활성 기능성 검증
		신바이오틱스의 장 질환 개선 기능성 검증 ( <i>in</i> <i>vivo</i> )	100	- 기능성 지표물질(milk peptide) 21종 중 항산화 및 항염증 활성이 가장 우수한 3종에 대한 염증성 장 질 환 마우스 모델의 염증 개선 효과 확인 및 검증
	[제1협동] 정상 소아청소년 대상 신바이오틱스의 안정성/효과 검증	건강한 소아 대상군 모집	100	- 46명의 건강한 소아 대상으로 연구 시작하였고 13명 중도 탈락하여 총 33명을 대상으로 연구 종료함.
		건강한 소아 대상 Synbiotics 안정성 검증	100	- 모든 대상자는 6주간 synbiotics 로 만든 임상 시험용 시험약을 복용하 도록 함. 복용 전과 후의 임상 증상 을 비교하여 안정성을 검증함
		검사 결과 분석	100	- 정상 소아청소년 대상 신바이오틱스 의 안정성 검증됨
	[제2협동] 장내 마이크로바이옴 분석을 위한 기초조건 확립 및 최적화	동물모델 및 사람 장내 미생물총 분석을 위한 total fecal DNA 분리 방법 최적화	100	- Lysis buffer, Bead-beating처리 유무, 온도를 기반으로 동물모델 및 사람 분변의 total fecal DNA 분리 방법 최적화
		분변샘플로부터의 장내 균총 동정용 16S rRNA universal primer set의 최적화	100	- 후보 16S rRNA universal primer sets를 <i>in silico</i> 분석 결과를 기반으 로 최적화된 primer를 선정하여 다 양한 균주를 검출할 수 있도록 최적 화 함

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
	[주관]	신바이오틱스 샘플 제조	100	- 신바이오틱스 분말제제 pilot scale

2차 년도	신바이오틱스 소재의 표준화 및 제품 규격화	및 제공		제조 및 위탁/협동기관에 전임상 및 임상시험을 위한 제제로 제공
		신바이오틱스의 안전성 및 장 질환 개선 기능성 검증 ( <i>in vivo</i> )	100	- 신바이오틱스 제제의 단회(2주) 및 다회(12주) 투여 독성 시험 결과 생존율 및 혈액학적으로 이상 증후가 발견되지 않아 안전성 확인 - 신바이오틱스 투여를 통한 혈당수치 감소 확인
		신바이오틱스 내의 지표물질 표준화 및 제품 규격검토	100	- 신바이오틱스 발효액 내 지표물질인 펩타이드 21종의 정성/정량 분석
		신바이오틱스에 의한 염증성 장 질환 환자의 장내 대사물질 프로파일링	100	- 신바이오틱스 제제를 섭취한 염증성 장 질환 환자 분변 내 대사물질로서 SCFA(lactic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid) 분석
		소아청소년 염증성 장 질환 개선 기능성 신바이오틱스 제제의 개발	100	- 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 임상 효능 검증이 완료된 신바이오틱스 소재 적용 제제의 pilot scale 시험생산
	[제1협동] 크론병 환자 대상 신바이오틱스의 효과 검증	크론병 환자 대상군 모집	100	- 100명의 크론병 환자를 대상으로 연구 시작 하였고 17명 중도 탈락하여 83명으로 연구 종료함
		Synbiotics 투여 전과 후 평가	100	- Synbiotics를 함유한 시험제제를 복용하는 피험자군과(43명), 위약을 복용하는 대조군(41명)으로 나누어 8주간 복용시킨 후 복용 전과 후의 여러 임상 지표를 비교하여 효과를 검증함
		검사 결과 분석 및 정리	100	- 크론병 환자를 대상으로 신바이오틱스의 임상적 효과 분석
	[제2협동] 동물모델 장내균총 메타게놈 분석을 활용한 신바이오틱스의 효과 검증	지표물질 기능성 검증을 위한 동물모델의 분변 메타게놈 분석	100	- 꾸지뽕잎과 유산균을 발효한 후 생성된 peptide를 투여한 쥐의 분변을 확보한 후 fecal total DNA를 분리 정제 - Fecal total DNA의 16S rRNA amplicon sequencing을 통하여 얻은 raw data와 생물정보학적 방법을 기반으로 메타게놈 분석
		정상 소아청소년의 장내 균총 메타게놈 분석	100	- 정상 소아청소년의 분변을 받아 total fecal DNA를 정제 후 16S rRNA amplicon sequencing을 진행 - 생물정보학을 기반으로 alpha-diversity, beta-diversity,

			균총 분석을 수행함
	염증성 장 질환 환자의 신바이오틱스 투여에 대한 분변샘플 수집	100	- 삼성병원으로부터 수집된 분변을 전달 받음 - 전달 받은 샘플은 장기 보관을 피하기 위하여 일정량 수집이 된 경우 total fecal DNA 순수 분리 정제를 수행함

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도	[주관] 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 기능성 신바이오틱스 유제품 개발	소아청소년 염증성 장 질환 개선 기능성 신바이오틱스 발효유의 개발	100	- Pilot scale test를 통한 현장시험 공정 및 배합비 확립 - 신바이오틱스 발효유와 분말제제 시제품 제작
		기능성 표시기준 및 관련 법령 검토	100	- 식품의 기준 및 규격, 건강기능식품의 기준 및 규격 법령 검토를 통한 제품 규격 및 표시기준 설정
		기능성원료 인정 신청 관련 서류 작성	100	- 식약처 영양기능팀과 개별인정 원료 신청 관련 맞춤형 기술상담을 실시하였으며, 신바이오틱스 발효분말에 대한 개별인정 원료 신청을 준비 중에 있음
	[제1협동] 신바이오틱스의 염증성 장 질환 개선효과 통계분석 및 장기 예후 관찰 비교	관련 임상자료 분석 및 효과 분석	100	- 총 16주 간의 관찰 기간 동안 신바이오틱스의 염증성 장 질환에서 임상증상과 혈액학적 지표, 변의 염증수치에서의 개선효과는 통계학적으로 유의하지 않음. 후속 연구에서는 보다 장기적인 효과 확인이 필요할 것으로 사료됨.
	[제2협동] 인체 임상실험 유래 분변의 메타게놈 분석을 통한 신바이오틱스의 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 효과 검증	수집된 분변의 메타게놈 분석을 위한 NGS 수행	100	- 수집된 82명의 장 질환 환자의 분변 샘플을 확보하였음 - NGS 수행을 위하여 total fecal DNA를 정제후 16S rRNA amplicon sequencing을 진행함
		생물정보학을 활용한 염증성 장 질환 환자의 장내 미생물총 분석 및 분석결과 축적	100	- 확보된 염증성 장 질환 환자의 시험 전 장내균총 분석 수행 - 실험군과 대조군의 분변 샘플로부터 생물정보학적 분석을 통한 염증성 장 질환자의 특이적 미생물총 분석
		염증성 장 질환 환자의 장내 미생물총 분석 및 통계학적 분석	100	- 염증성 장 질환 환자의 장내균총 분석을 기반으로 하여 신바이오틱스의 효능을 통계학적으로 분석함

### 3-2. 관련분야 기여도

- 국내 자생 식물추출물에서 유래한 꾸지뽕잎 추출물의 프리바이오틱스 소재로서의 새로운 가능성에 대해 발견함으로써 식이섬유나 난소화성 올리고당으로 한정되어 있는 프리바이오틱스 시장의 범주를 확장시킬 수 있을 것이라 생각하며, 신규 프리바이오틱스 발굴 연구에 활용이 가능할 것으로 기대됨.
- 국내 자생 농산물과 한국인 분변 유래 유산균주를 적용한 유제품 제조 공정을 개발하고, 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 기능성과 안전성 연구를 통하여 국내외 시장에 국산자원의 우수성을 알리고 낙농가 수익증대에 기여할 것으로 사료됨.
- 장내 마이크로바이옴 프로파일링 연구는 선진국 위주로 연구되고 있는 분야임. 하지만 본 연구를 통해 한국인 장내 마이크로바이옴 데이터베이스를 구축하였으며, 면역과 관련 복잡한 질병에 장내 마이크로바이옴이 중요한 영향을 미친다는 사실을 밝혔음. 추후 다양한 질환과 장내 마이크로바이옴의 인과관계를 연구하는데 중요한 근거로 제시될 수 있을 것이라 사료됨.
- 소아청소년 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 효능을 지니는 신바이오틱스 소재 적용 발효유와 분말제제의 유제품을 개발을 통해 유가공 산업의 부가가치 상승과 국민건강 증진에 기여할 것으로 기대됨.

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

### 4-1. 연구결과의 활용계획

#### ○ 신바이오틱스 소재 적용 유제품 개발

- 소아청소년 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 효과를 갖는 신바이오틱스 식품 소재 및 유제품의 개발 (발효유, 분말 제제)
- 주관연구기관인 서울우유협동조합의 유통망을 통하여 제품을 출시하고 홍보할 예정
- 본 연구과제의 수행 결과를 통해서 주관연구기관인 서울우유협동조합에서 기술이전 자체사업화 실시
- 임상시험 데이터를 기반으로 한 신바이오틱스 발효분말의 개별인정형 원료 획득을 위해 식약처 주관 사전 모듬 토의를 완료하였으며 원료(꾸지뽕)의 표준화 및 지표 물질의 분석법을 보완하여 개별인정형 원료 신청 과정을 진행할 예정

#### ○ 인체 장내 균총과 다양한 질환과의 인과관계 규명 연구 시스템 구축

- 장내 균총 분석법 및 염증성 장 질환과 장내균총과의 관련성에 대한 연구 시스템 확립을 통해 다양한 질환 예방 및 치료에 실마리를 제공할 수 있는 병리 연구에 활용 가능
- 본 연구를 통해 확보된 임상실험 데이터를 바탕으로 식품 소재로서의 임상 기간 및 세밀화된 요인별 통계 모델 수립 예정
- 구축된 연구시스템을 통해 신규 발굴될 기능성 소재의 질환 예방 및 치료 효과 검증에 활용이 가능하며, 기능성 식품소재의 선별 시스템으로 활용이 가능

### 4-2. 기술이전을 통한 사업화 실시

#### ○ 본 연구과제의 수행결과를 통해서 주관연구기관인 서울우유협동조합에서 기술이전 자체사업화를 위하여 기술실시 계약을 체결함.

#### ○ 현재 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 신바이오틱스 소재 적용 발효유와 분말제제 시제품 제작을 완료하였으며, 출시 예정 제품의 대량생산을 위한 최적화 공정을 완성할 계획임. 또한, 유통·저장 중의 제품 안정성과 제제 안전성 연구를 진행한 후 외부관능검사[초점그룹인터뷰(FGI) 및 소비자 기호도조사]를 통해 제품의 마케팅 방안을 수립하고 본제품 생산 전 신규 품목제조보고서 신고 예정임.

#### ○ 국내 프로바이오틱스 제품은 장 기능 및 소화 개선 등의 효과를 지니는 제품에 초점이 맞추어지고 있으며, 이를 확대하여 장 기능 개선, 면역 조절 및 장내 균총 개선 효능을 나타낼 수 있는 기능성 유제품의 개발을 통해 유제품의 활용 가능성을 증대시켜 기능성 유제품 시장에 진입할 수 있을 것으로 사료됨.

- 염증성 장 질환 및 장내균총 개선 신규 프리바이오틱스, 프로바이오틱스 소재를 국내 자생 천연자원 및 한국인 유래 분변으로부터 확보하였으며 이를 활용한 신바이오틱스의 제품화를 통해 국내 낙농가 소득 증대 및 고부가가치 시장창출을 기대할 수 있을 것으로 사료됨.

## 붙임. 참고문헌

- Kekkonen, R. (2008). Immuno-modulatory effects of probiotic bacteria in healthy adults. *Ph.D thesis. University of Helsinki.*
- Alison, A. (2014). Environment and the network society. *Media. Basingstoke: Palgrave Macmillan.*
- Sokol et al. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105(43), 16731–16736.
- Delzenne et al. (2016). Synbiotic approach restores intestinal homeostasis and prolongs survival in leukaemic mice with cachexia. *The ISME Journal.* 10(6), 1456–1470.
- Strieter et al. (1993). Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in disease states and inflammation. *Critical care medicine.* 21(10), S447–63.
- Kikuchi et al. (2003). Tumour necrosis factor- $\alpha$  but not lipopolysaccharide enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation. *Immunology.* 108(1), 42–49.
- Chen et al. (2001). Circulating IL-6 as a predictor of radiation pneumonitis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.* 49(3), 641–648.
- Delgado et al. (2003). Production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1- $\beta$ , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides.* 37(6), 355–361.
- Nathan et al. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current opinion in immunology.* 3(1), 65–70.
- Vane et al. (1994). Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 91(6), 2046–2050.
- Halfvarson et al. (2017). Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature microbiology.* 2(5), 1–7.
- Clavel, et al. (2009). "Isolation of bacteria from the ileal mucosa of TNFdeltaARE mice and description of Enterorhabdus mucosicola gen. nov., sp. nov." *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 59(7): 1805–1812.
- Vesterlund et al. (2006). "Staphylococcus aureus adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria." *Microbiology.* 152(6): 1819–1826.
- Markowiak, et al. (2017). "Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health." *Nutrients.* 9(9): 1021.
- Plaza-Diaz et al. (2017). Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients.* 9(6), 555.
- Derwa, et al. (2107). "Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease." *Alimentary pharmacology &*

*therapeutics*. 46(4): 389–400.

- Sánchez et al. (2017). "Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease." *Molecular nutrition & food research*. 61(1): 1600240.
- Chu et al. (2016). Gene–microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* 352(6289), 1116–1120.
- Jin et al. (2017). "Effects of environmental pollutants on gut microbiota." *Environmental Pollution*. 222, 1–9.
- Chang et al. (2017). Impaired intestinal permeability contributes to ongoing bowel symptoms in patients with inflammatory bowel disease and mucosal healing. *Gastroenterology*. 153(3), 723–731.



주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.