

발 간 등 록 번 호
11-1543000-000567-01

모유 유래 균주인

Lactobacillus gasseri BNR17의

혈당 조절능을 이용한 기능성 원료 개발 및 제품화
(Application for individual recognition type and production
as functional materials of human breast milk-derived
Lactobacillus gasseri BNR17 with blood glucose-lowering
effect)

(주)바이오니아

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “모유 유래 균주인 *Lactobacillus gasseri* BNR17의 혈당 조절능을 이용한 기능성 원료 개발 및 제품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 9 월 18 일

주관연구기관명 : (주)바이오니아

주관연구책임자 : 김 응 중

세부연구책임자 : 김 응 중

연 구 원 : 김 재 호

연 구 원 : 기 혜 나

연 구 원 : 김 선 익

연 구 원 : 전 지 나

협동연구기관명 : 이화여자대학교

협동연구책임자 : 권 오 란

연 구 원 : 김 주 희

요 약 문

I. 제 목

모유 유래 균주인 *Lactobacillus gasseri* BNR17의 혈당 조절능을 이용한 기능성 원료 개발 및 제품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 전임상 시험을 통하여 BNR17 균주가 혈당 저하능을 나타내는 메카니즘을 혈당 및 insulin 측면 등 다양한 각도에서 규명함과 동시에, BNR17이 장내 세균총에 미치는 영향과는 어떤 상관관계를 가지는지를 조사하며, 또한 인체적용시험(Pilot study)을 통해 혈당 수준의 안정화, 염증 반응의 조절 등 다양한 각도에서 효과를 검증하고 인체에 효과를 나타내는 섭취량을 결정함.
- 전임상 및 임상 시험의 결과에 따라 BNR17이 인체에 효과를 나타내는 섭취량이 결정되면, 균주의 viability 및 효과를 최대한 유지시켜 주는 최적 제형을 확립함으로써 기능성과 안정성을 더욱 향상시키고, 경제적 생산이 가능하도록 할 것임.
- 전임상 및 임상 시험을 통해 메카니즘 및 기능성이 입증되면 개별 인정형 기능성 원료 인정.

III. 연구개발 내용 및 범위

- *Lactobacillus gasseri* 를 포함한 프로바이오틱스 유산균주의 혈당조절 기능성 및 안전성과 관련된 문헌과 섭취량, 유사 유산균 연구에 관련된 자료수집.
- *Lactobacillus gasseri* BNR17의 제품화를 위한 대량 생산 조건 확립 및 시제품 제작. 제형별 제품의 안정성 확립과 유효기간 설정함.
- *Lactobacillus gasseri* BNR17의 혈당 조절능 확인을 위한 인체적용시험 수행을 위하여 안전성 및 기능성 관련 문헌을 조사하고 분석함. 프로토콜을 비롯한 IRB 제출서류를 개발하고 IRB의 승인을 득함. 선정기준에 적합한 연구대상자를 모집하고 시험을 진행하며 기능성 및 안전성 관련 바이오마커를 분석함. 결과에 대한 통계분석을 수행하고 결과보고서를 작성함. Pilot study를 통하여 유효용량 설정하고, 이를 바탕으로 본 시험을 수행하여 기능성을 확인함.

IV. 연구개발결과

- 프로바이오틱스 유산균주가 당뇨 질환 동물 모델에서 glucose homeostasis를 정상화시키는 것으로 알려져 새로운 항당뇨 물질로서 주목받고 있다. 이에 (주)바이오니아는 모유로부터 프로바이오틱스 특성을 가진 *Lactobacillus gasseri* BNR17(이하 BNR17)을 분리하였으며, 전임

상, 임상실험을 통하여 이 균주가 혈당 저하 기능이 있음을 확인하였다.

- 첫 번째 동물실험은 10주간 고지방식이를 섭취시켜 당뇨병을 유도한 후 STZ를 투여하여 당뇨 증세가 나타나도록 하였으며, BNR17이 혈당과 관련 바이오마커에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과 식전 혈당 및 OGTT 역시 BNR17 투여에 의해 고지방식이 실험군보다 감소하는 것을 확인하였다. 고지방식이 및 STZ 투여가 HbA1c에 있어서 유의적인 증가를 유도하지는 않았으나, BNR17이 HbA1c를 다소 낮출 수 있음을 확인할 수는 있었다. 또한 포도당 수송체인 GLUT4의 발현이 BNR17에 의해 증가하는 것으로 나타났으며, 고혈당과 함께 동반되는 고인슐린증 (hyperinsulinemia)이 BNR17에 의해 완화되었다.

- 두 번째 동물실험을 통해, BNR17의 혈당감소 능력을 확인하였으며, 그 작용 기전을 예측할 수 있었다. BNR17 투여군의 지방 조직에서, 중요한 포도당 수송체인 GLUT4의 mRNA 발현량이 고탄수화물식이군보다 유의적으로 증가하는 것으로 나타나, BNR17이 항당뇨 효과를 가짐을 보여준다. 혈중 leptin, insulin 그리고 GIP가 BNR17에 의해 감소하는 것으로 나타나, BNR17에 의한 체중 및 지방 조직 무게의 증가 억제는 leptin이나 insulin의 감소와도 관련 있는 것으로 보인다.

첫 번째 고탄수화물식이로 비만을 유도한 동물실험에서 BNR17의 투여는 식이섭취량의 차이 없이 고탄수화물식이군에 비해 체중을 유의적으로 감소시켰다. 또한 복부 지방 및 피하 지방의 무게도 BNR17 투여군의 경우 거의 증가하지 않아 일반식이군과 유사한 정도의 무게를 가지는 것으로 나타났다. 내장 지방, 피하 지방, 부고환 지방, 신장 지방 등의 모든 지방 조직의 세포 크기가 BNR17 투여군에서 유의적으로 크게 감소였으며, 이는 BNR17이 지방 세포의 hypertrophy를 억제하는 것으로 보인다. 이러한 혈당 및 체지방 연구를 통하여 plos에 논문을 투고하였다.

- BNR17의 혈당 조절능 확인을 위해 유효용량 설정을 위한 인체적용시험(pilot study)를 수행하였다. Pilot study는 이중 맹검, 무작위 배정, 평행설계, 대조식품 대조시험으로 진행되었다. 연구대상자로는 과체중이며 내당능 장애가 있고, 과민성 대장 증후군 자각증상이 있는 20대 이상의 성인 남녀 55명을 모집하였다. 연구대상자들을 대조식품군(placebo), BNR17 저용량군(2×10^8 CFU), 중용량군(2×10^9 CFU), 고용량군($2 \times 5 \times 10^9$ CFU)으로 무작위 배정하고, 4주간 섭취하도록 하였다. 경구 당 부하 검사를 통해 당 부하 후 혈당의 변화를 2시간 동안 관찰하였고, AUC (Area Under the curve), Cmax (maximum concentration), Tmax (peak time)를 계산한 결과, AUC, Cmax, Tmax는 섭취 전후 변화량과 각 방문 시점 별 군간 유의적 차이가 보이지 않았으나 섭취 전후 비교 시 BNR17 저용량군과 중용량군에서 혈당 AUC가 유의적으로 저하되었다. (P=0.039, P=0.014) 시험식품 섭취 전과 후 BNR17의 장 점착능을 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행한 결과, 시험물질 섭취 후 중용량군에서 검출률이 90% 증가하여 가장 큰 증가율을 보였다. 대변 검체에서 염증반응 개선과 관련하여 interleukin-10 (IL-10), interleukin-6 (IL-6), 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 농도를 측정된 결과, 시험식품 섭취 후 TNF- α 의 발현이 대조군에 비해 고용량군에서 감소하였다.(P=0.058) 또한 과민성 대장 증후군의 증상 개선을 확인하기 위하여 증상의 심각 정도를 평가하는 설문지를 평가한 결과 고용량군에서 복통이 유의적으로 개선된 것이 관찰되었다.

- *Lactobacillus gasseri* BNR17의 혈당 조절능 및 장건강 기능성 확인을 위한 인체적용시험(본시험)을 수행하였다. 본 연구는 이중 맹검, 무작위 배정, 평행설계, 대조식품 대조시험으로 진행되었다. 본 연구에서는 혈당 조절능을 비롯해 pilot study에서 유의적인 효과가 확인된 장

건강 가능성을 평가하기 위하여 설사형 과민성 대장증후군인 만 20세 이상 65세 이하의 성인 남녀 60명을 모집하였다. 선정된 연구대상자는 대조군(placebo) 또는 시험군(BNR17)군으로 무작위 배정되어 8주간 시험식품을 섭취하며, 섭취 전후 혈당관련 바이오마커, 장 건강 관련 바이오마커를 측정하였다. 혈당관련지표 분석결과 공복혈당의 경우, BNR17군이 섭취 전과 비교하여 섭취 후에 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 8주간의 변화량에서는 대조군과 비교 시 유의적인 차이가 없었다. 장 건강 관련 지표의 경우, colonic transit time이 대조군에 비하여 BNR17군에 유의적으로 개선됨을 확인할 수 있었고, 증상개선여부에 대한 설문평가에서도 복통 개선여부 등의 항목에서 BNR17군이 대조군에 비하여 유의적으로 개선됨을 확인할 수 있었다.

- 유산균은 특성상 온도, 습도 등 환경의 변화에 유산균이 민감하므로 제형의 연구, 안정성이 무엇보다 중요하다. 그러므로 *Lb. gasseri* BNR17 유산균의 분말화 조건의 확립에 따른 분말을 이용한 캡슐, 스틱포, 정제, 제형을 개발하고, 제품의 안정성과 *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수 함량을 조사하여 제형에 따른 안정성(Stability)변화를 연구하였다. 이를 통해 상업적으로 사용할 수 있는 제형화를 완료하였다.
- 요구르트 제형, 나아가 BNR17 특이적 선택배지를 만들었으며 이를 통해 유가공 시장에 진입을 용이하게 하였다.
- 본 과제를 통해 완료한 동물실험, 인체시험을 통하여 기능성원료로 BNR17을 개발하였으며, 이를 통해 국내외 건강기능식품 소재로 라이선싱 아웃 및 상업화가 가능하다고 판단된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 유산균주는 요구르트 및 치즈 등 다양한 유제품뿐 아니라 김치 등 전통 식품의 주요 소재로써, 다양한 식품에 적용이 가능하기 때문에 큰 산업적 가치를 낼 수 있다.
- *Lb. gasseri* BNR17의 대량 생산 방법 및 최적 제형을 확립하는 등 제품화 관련 기술을 마련함으로써 후속 제품군의 개발 기술을 확보하였다.
- *Lb. gasseri* BNR17의 기능성과 안전성을 과학적으로 검증함으로써 소비자들의 신뢰도를 높였다. 특히 비만으로 인한 당뇨 질환이 심각한 북미 및 유럽 지역에 수출함으로써 외화 획득에 기여하고 건강기능 식품 소재의 개발 분야에서 국제적인 경쟁력을 갖출 수 있다.
- 이렇게 BNR17을 식품에 적용할 경우, 의약품이 아닌 식품을 통해 당뇨를 예방하거나 당뇨 증상의 완화에 도움을 줄 수 있는 새로운 패러다임을 제시할 수 있다.
- *Lb. gasseri* BNR17은 모유에서 분리된 유산균으로써 건강기능식품으로 출시될 경우, 소비자들에게 보다 쉽게 접근할 수 있을 것으로 기대된다.
- 현재 기능성 프로바이오틱스 유산균을 이용한 제품 개발이 활발하지만, 혈당조절 기능을 가진 프로바이오틱스 제품은 아직까지 개발되지 않은 상태이기 때문에, BNR17을 개발할 경우 국내외 기능성 유산균 시장에 새로운 이슈를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Application for individual recognition type and production as functional materials of human breast milk-derived *Lactobacillus gasseri* BNR17 with blood glucose-lowering effect

II. Objectives and background

- Determination of mechanism on blood sugar lowering function of BNR17 through the preclinical trial in various ways including measurement of blood sugar and insulin. In addition, Investigation on the correlation between BNR17 and intestinal bacteria to investigate what kind of effects BNR17 has on intestinal bacteria.
- Clinical trial (Pilot study) to stabilize blood sugar levels, and inflammatory response of the control to validate the effects from various angles and effects, to determine the intake. The effect of high viability and to establish the optimal formulations, thereby further enhancing functionality and stability, and to possible industrial production
- Approval as a functional raw material by demonstrating the mechanisms and functionality through preclinical and clinical trials.

III. Contents and scope of this study

- Data search and collection on literature involved in safety and blood sugar control function of probiotics including *Lactobacillus gasseri*, its intake, similar lactic acid bacteria research.
- Prototype production of *Lactobacillus gasseri* BNR17 products and Establishment of conditions for its mass production. the stability establishment by formulation formats and setting up of the validity period.
- Search and analysis of the relevant literature to perform a clinical trial for verifying blood sugar control function of *Lactobacillus gasseri* BNR17. Submission of the protocol, including the IRB documents to IRB committee and completion of approval of the IRB. Recruiting subjects suitable for selection criteria, conducting the trial and functional and analyzing safety-related biomarkers. Performing statistical analysis on the results and preparing clinical report. Setting up the effective dosage through pilot study and, performing the clinical trial based on this dosage and confirming the functionality of BNR17.

IV. Results of research and development

- Probiotics *Lactobacillus* is known to normalize glucose homeostasis in diabetes animal models and is receiving attentions as a new diabetes drug. This is a matter of anti-diabetes. *Lactobacillus gasseri* BNR17 (BNR17) was separated from the breast milk. Indicates that the blood sugar lowering capabilities, preclinical, clinical trials were confirmed.
- The first animal experiment from 10 weeks to induce diabetes by eating a high-fat diet. Diabetes symptom, caused by STZ injection is followed by a study of the impact of bio-markers in blood sugar. As a result, the blood sugar level, OGTT is reduced by BNR17. High-fat diet and STZ injection, this did not increase in HbA1c meaningful. But BNR17 reduced the HbA1c In addition, glucose transport chain GLUT4 expression is increasing by BNR17. Hyperglycemia is accompanied by high insulin (hyperinsulinemia) this was mitigated by BNR17.
- The next Preclinical trial, check the blood sugar reduction capabilities of the BNR17, were able to predict the mechanism. Glucose transport chain GLUT4 mRNA expression level showed that the increase in BNR17. This is the BNR17 anti-diabetic effect. Leptin, insulin, and GIP is reduced by BNR17. The reduction of the body weight and adipose tissue weight seems to be related to the decrease of leptin and insulin. High-carbohydrate diet to induce obesity. As a result, What's the difference between dietary intake without High-carbohydrate diet compared to the note that the military has reduced in weight. In addition, abdominal fat and subcutaneous fat don't increase the weight of almost similar to control. Visceral fat, subcutaneous fat, epididymis, kidney fat, All of the fatty tissue cells size was significantly reduced in BNR17 treated group. Based on these results, BNR17 is hypertrophy of fat cells seems to suppress.
- To evaluate the effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on glucose tolerance and the effective dose after consumption of BNR17 isolated from human breast milk, a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial (pilot study) was performed. Fifty-five overweight, post-prandial glucose intolerance, and additionally, subjective symptoms of irritable bowel syndrome subjects were recruited. Subjects were randomly assigned to four groups, placebo (dextrin) or low (2×10^8 CFU), intermediate (2×10^9 CFU), high ($2 \times 5 \times 10^9$ CFU) dose of BNR17, and asked to consume test materials for 4 weeks. AUC, Cmax, Tmax of blood glucose were not significantly different at baseline, 4 weeks, and in changes between pre- and post-treatment among groups. However, AUC changes between pre- and post-treatment were significantly decreased in low dose and intermediate dose group. Positively detected BNR17 in fecal samples by PCR showed the highest increase in intermediate dose group by 90% compared to baseline. Among the fecal inflammatory cytokines, TNF- α concentrations were low in high dose group compared to placebo group after 4 weeks intervention (P=0.058). Symptom scores of irritable bowel syndrome were significantly improved in abdominal pain in high dose group compared to

placebo group.

- To evaluate the effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on glucose tolerance and gut function after consumption of BNR17 isolated from human breast milk, a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial was performed. Sixty adults with IBS-D symptom were recruited. Subjects were randomly assigned to placebo or BNR17 groups and asked to consume test materials for 8 weeks. Fasting blood glucose was significantly decreased in the BNR17 group but not in the placebo group. Changes of fasting blood glucose were not significantly different between the groups. Colonic transit time and abdominal pain were significantly improved in the BNR17 group compared with the placebo group.

- Lactic acid bacteria are sensitive to changes in the environment, such as temperature and humidity. Therefore, the study of the formulation, stability is more important than anything. To establish the conditions of a lactic acid powder capsules, tablets, formulations. And research on the safety and product stability. Commercially available formulations were complete.

- Yogurt formulation, moreover, has developed a specific selective medium through which to facilitate entering the market.

- Preclinical trial and clinical trial has been developing functional raw materials BNR17. This enables domestic and international health supplements available for commercialization and licensing-out

V. The application of research and development result

- Lactic acid bacteria as well as a variety of dairy products such as yogurt and cheese that kimchi and other traditional foods is the main material can be applied in a variety of foods, because they give birth to big industrial value.

- *Lb. gasseri* BNR17 mass production methods, and to establish the optimal formulations and products by developing technologies related to subsequent product development technology.

- Functional and safe, scientifically proven by a raised consumers ' confidence. In particular, obesity and diabetes disease caused by severe foreign currency by exporting to North America and Europe contributed to obtaining health functional food materials in the field of international competitiveness.

- BNR17 can prevent diabetes through food, can present a new paradigm.

- *Lb. gasseri* BNR17 is a lactic acid bacteria isolation from breast milk, Will be easily accessible to consumers.

- The current functional probiotics Lactobacillus-based product development actively, but blood sugar control functionality with probiotics products has not been developed yet. BNR17 new issues are expected to be able to provide.

CONTENTS

(영 문 목 차)

SUMMARY	2
Chap. 1 Overview of the study	10
Chap. 2 Current status of technology in domestic and foreign	11
Chap. 3 Study contents and results	20
3.1. Baseline data collection through paper and database	21
3.2. Hypoglycemic effect of <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 through preclinical phase	40
I. Blood glucose-lowering effect of <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 in high fat diet and streptozotocin induced diabetic mice	40
II. Anti-obesity and anti-diabetic effect of <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 in high sucrose diet-induced obese mice	48
3.3 Artificial gastric juice and selective medium experiment	63
I. Artificial gastric juice test	63
II. Selective medium concentration test	64
III. Yogurt fermentation test	68
3.4 Formulation stability	70
3.5 Standardization of the mass production	85
3.6 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 Clinical trial for glycemic control (Pilot Study)	99
3.7 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 glycemic control and colon health Clinical trial	118
Chap. 4 Achievement and contribution to relevant fields	145
Chap. 5 Application plan of the study	148
Chap. 6 Technical information and knowledge acquired for the study	150
Chap. 7 References	158

목 차

요 약 문	2
제 1 장. 연구개발과제의 개요	10
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	11
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	20
제 1 절. 문헌 및 데이터 베이스를 통한 기초 자료 수집	21
제 2 절. 전임상시험을 통한 BNR17의 혈당 저하 효과	40
I. 고지방식이와 streptozotocin에 의해 당뇨가 유도된 동물에서 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 혈당 강하 효과	40
II. 고탄수화물식이 섭취에 의해 비만이 유도된 동물에서 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 항비만 및 항당뇨 효과	48
제 3 절. 인공위액 및 항생제 배지 실험	63
I. 인공위액 실험	63
II. 항생제 배지 농도 설정 실험	64
III. 요구르트 발효 후 항생제 배지 실험	68
제 4 절. 제형별 안정성 연구	70
제 5 절. 대량생산의 표준화	85
제 6 절. <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 혈당조절 기능성 확인을 위한 인체적용연구(Pilot Study)	99
제 7 절. <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 혈당조절 및 장 건강 기능성 확인을 위한 인체적용 연구(본시험)	118
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	145
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	148
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	150
제 7 장. 참고문헌	158

제 1 장. 연구개발과제의 개요

생활양식과 식습관의 변화로 인해 당뇨병의 유병률이 증가하고 있다. 세계보건기구(WHO)에 따르면 당뇨병 환자는 1994년 1억 1,040만 명에서 2003년 1억 9,400만 명으로 증가하였고 2025년에는 3억 3,300만 명에 이를 것으로 예상하고 있다. 국민건강영양조사에 따르면 국내 20세 이상 성인의 당뇨병 유병률은 2003년 6.4%에서 2007년 9.5%로 증가하였고, 2008년에는 9.7%로 크게 증가하지 않은 반면, 공복혈당장애 유병률은 2007년 16.0%에서 2008년 21.4%로 5.4%가 증가하였다. 대한당뇨병학회 진단소위원회에서 발표한 “진료지침 2011”에 의하면 공복혈당 126mg/dl 이상, 식후 2시간혈당 200mg/dl 이상을 당뇨병으로 정의하고 있다. 당뇨병은 망막병증, 신경병증, 족부궤양 등의 미세혈관 및 대혈관 합병증을 동반할 수 있으므로 혈당 조절을 위한 치료가 필수적이다. 또한 내당능장애는 75g의 포도당을 사용한 경구 당부하 검사에서 2시간 후 혈당이 140mg/dl 이상 199mg/dl 이하인 경우를 말하며, 공복혈당장애는 공복혈당이 100mg/dl 이상, 125mg/dl 이하인 경우로, 당뇨병으로의 진행을 막기 위해서는 적절한 관리가 필요하다.

*Lactobacillus gasseri*는 모유에서 확인되는 대표적인 균주이며, 내산성, 내담즙성 및 장세포에 대한 부착활성과 병원성 세균에 대해 우수한 항균활성의 특성을 가지고 있다. 미국의 US FDA의 GRAS에 등재되어 있으며, 국내에서는 건강기능식품 기능성원료 발효 미생물류의 프로바이오틱스에 속해있고, 현재 일본 외 여러 국가에서 유통되는 유산균 제품에 함유되어 있다. 최근의 연구에 따르면, 프로바이오틱스 유산균주가 당뇨 질환 동물 모델에서 glucose homeostasis를 정상화시키는 것으로 알려져 새로운 항당뇨 물질로서 주목받고 있다. 프로바이오틱스가 위장관을 통과하게 되면, 일정 시간 장내세균의 일부로서 장내에 머물게 되는데, 이때 gut contents를 분해함으로써 전체 에너지 균형에 영향을 미치게 된다. 또한, 프로바이오틱스를 비롯한 장내세균은 장관 면역세포와 밀접하게 상호작용하기 때문에, 체내의 면역체계 발달과 항상성 유지에도 큰 영향을 미친다. (주)바이오니아는 모유로부터 프로바이오틱스 특성을 가진 *Lactobacillus gasseri* BNR17을 분리하였으며, 동물 실험과 인체적용시험을 통해 혈당에 미치는 효과를 평가하고자 하였다.

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 Probiotic 기술개발 현황

- 최근 일본과 유럽의 기능성 식품 시장은 건강에 좋은 제품, 특히 2005년에 세계적으로 379가지의 제품이 출시된, probiotics에 의해 지배되고 있다. Probiotics 제품 중 낙농 제품은 1999년에 미화 약 13.5억 불의 매출을 시현하였고, 2004년에는 세계 기능성 식품 시장 총매출액(311억 불)의 56%를 점유한 핵심 상품영역이다. BCC Research에 따르면 probiotic 원료, 첨가제, 식품에 대한 글로벌 시장 규모는 2007년 149억 불, 2008년 159억 불로 집계되었으며 2013년에는 196억 불에 달할 것으로 예상된다. 이러한 수치는 매년 4.3%의 성장률을 보이는 것이다. (출처: BCC Research, The Probiotics Market: Ingredients, Supplements, Foods, 2008년 6월)
- Probiotic 시장은 크게 원료 (ingredients), 첨가제 (supplements)와 식품 (foods)으로 나뉘는데, 이중 식품 분야가 가장 큰 시장을 형성하고 있다. 2008년 138억 불의 시장 규모를 형성하였으며 2013년에는 170억 불 규모의 시장을 예상하고 있다. Probiotic에 대한 식품의 적용은 야쿠르트, Kefir, 배양 음료와 같은 낙농제품이 주를 이루고 있다. 야쿠르트 제품이 전체 probiotic 첨가식품 판매 중에서 36.6%를 차지하고 있으며, probiotic 치즈, 영양 bars, breakfast cereal, 유아식 등이 새로이 부상하는 식품으로 나타나고 있다.
- 두 번째로 큰 시장을 차지하는 probiotic 첨가제 분야는 2007년 12억 불의 시장을 형성했으며 2013년 17억 불에 달할 것으로 보인다. 첨가제 분야에서 probiotics는 캡슐, 정제, 파우더의 형태로 제공되며, 이중 캡슐 형태의 공급이 75%를 차지하고 있다.
- Probiotic 원료 시장은 2008년 약 7.9억 불에서 2013년 9.2억 불 규모로 2.8% 성장할 것으로 보인다. 이 중 lactobacillus 속이 가장 큰 비중을 차지하는데, 이는 2007년 판매된 probiotic 원료의 61.9%에 해당하는 것이다.
- 500개 이상의 probiotic F&B 제품이 지난 10년 동안 출시되었으며 이들 제품의 대부분은 건강에 이롭다는 장점으로 인해 성공을 거두었다. 이처럼 probiotics 시장은 기능성 식품의 제조 및 공급자들에게 충분한 기회를 제공할 수 있다.
- Probiotics 균주는 Danisco, Morinaga, BioGaia와 같은 회사에 의해 개발되어, Nestle, Attune과 같은 FMCG 회사에 제공 되고 있다. Probiotic 야쿠르트와 발효 우유의 유용성에 대한 인식이 가장 높은 유럽이 현재 가장 큰 probiotics 시장을 형성하고 있으며, 미국의 경우도 최근 probiotic 다이어트 첨가제에 대한 인식이 높아지면서 빠르게 성장하고 있는 시장이다. 일본의 경우 90년대 중반에 통신판매로 처음 식물성 유산균이 등장하여 2006년 유산균 음료와 야채음료가 연달아 발매돼 시장이 확대되고 있다. 2006년 가고메의 '식물성 유산균 라브레'로 40-50대 연령층 여성의 신규 수요를 개척한 이후 소비자의 식물성 유산균에 대한 인지가 급상

증가하면서 109억 엔의 시장을 형성했으며, 매년 큰 폭으로 판매가 증가하고 있다.

(출처: Marketsandmarkets.com, Probiotic market-advanced technologies and global market (2009-2014), 2009년 12월)

● 일본의 경우 90년대 중반에 통신판매로 처음 식물성 유산균이 등장하여 2006년 유산균 음료와 야채음료가 연달아 발매돼 시장이 확대되고 있다. 2006년 가고메의 '식물성 유산균 라브레'로 40-50대 연령층 여성의 신규 수요를 개척한 이후 소비자의 식물성 유산균에 대한 인지도가 급상승하면서 109억 엔의 시장을 형성했으며, 매년 큰 폭으로 판매가 증가하고 있다 (출처: BCC Research, The Probiotics Market: Ingredients, Supplements, Foods, 2008년 6월). (출처: Marketsandmarkets.com, Probiotic market-advanced technologies and global market (2009-2014), 2009년 12월)

● 국내에서도 다양한 분야에 probiotics가 적용되고 있다. 의약품 probiotics의 시장은 2001년 84개 품목에서 2003년 104개 품목으로 증가하여 5백 30억 원의 시장을 형성하였고, probiotics 관련 유산균 식품 시장은 2001년 9천 3백억 원에서 2009년 유산균 식품시장으로써 음료가 8천억, 발효유가 약 2조 5천억 시장을 형성하고 있는 것으로 파악되었다. (출처: 한국과학기술정보원, Probiotics의 연구개발 동향, 2006년 11월)

2. 유산균을 이용한 연구

● 인체에는 400여 종의 미생물이 100조개 이상 서식하는 것으로 알려져 있으며, 사람의 장 내용물은 식물과 미생물이 6:4비율로 들어 있다. 장 내 미생물은 유아기에는 유산균과 비피더스균을 비롯한 유용세균이 전체 장내 균총의 90% 이상을 차지 하지만, 노년기가 되면 클로스트리움을 비롯한 부패세균이 증가하여 노화를 촉진하게 된다. Probiotics는 인체 건강에 유리한 살아있는 미생물학적 음식물로 정의되며, 최근 주목받고 있는 것은 이들의 면역조절 효과이다. 특히 장 점막 면역계의 초기 면역기능의 획득과 유지 및 변화에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

● 주된 관심을 모으고 있는 유산균은 lactobacillo로, 만성 염증성 장염(chronic inflammatory bowel disease), 장 점막 세포 유래의 악성 종양 및 식품 알레르기 등의 질환 예방 및 치료 효과를 가진다. 이러한 연구의 시작은 장내에서 유산균의 집락화가 저하된 경우 만성 염증성 장염이나 대장암과 같은 장 질환 발생이 증가하고, IgE-매개성 알레르기 면역반응이 증가한다는 사실에서 비롯되었다.

● 유산균은 human colon cancer cells에서 hBD2(human beta defensin)의 발현을 유도함으로써 장 내 면역을 조절한다. 또한 장 세포인 CaCO2에서의 lactobacillus의 노출에 의해 inflammatory cytokine 인 IL-8의 생성과 Hsp70의 발현의 억제가 이루어진다고 한다. 이를 통해 유산균이 cytokine을 조절함으로써 염증반응을 조절하는데 직접적으로 관여하고 있다는 것을 알 수 있다.

- 유산균은 장내 상피세포에 enteric virus의 infection을 막는 기능을 가지고 있다. 이로써 유산균은 장내 바이러스의 침입을 인지하고 면역작용을 높임으로 장내 면역작용에 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

- 장내세포에서 Lactobacillus는 자가 면역반응과 TLR(Toll-like receptor)의 발현을 조절한다. 이는 유산균에 의한 장 내 건강 조절 작용이 TLR signaling과 연관이 있다는 것을 의미하는 것이다. 그러나 이에 대한 자세한 메커니즘에 대한 연구는 부족하다.

- 이처럼 probiotics는 피부 질환을 완화 시켜 주는 효능과 장 내 건강을 유지 시켜 주는 기능이 있으며, 이에 대한 많은 연구들이 체계적으로 수행되어 왔다. 그러나 이러한 연구들은 대부분이 생균 내지 사균을 이용한 실험으로써 깊이 있는 메커니즘에 대한 연구가 필요한 시점이다.

3. 프로바이오틱스를 이용한 제품의 생산 및 시장현황

가. 국내 제품생산 및 시장 현황

(1). 최근 시장 규모(Probiotics & 유산균 발효유)

- 정의 : 살아있는 상태로 체내에 들어가서 건강에 좋은 효과를 주는 세균을 말함.
현재까지 알려진 대부분의 프로바이오틱스는 유산균들이며 일부 Bacillus등을 포함.
- 국내 프로바이오틱 미생물시장 800억원 추정, 발효유 시장은 1조원 추정.
- 유산균을 이용한 제품 중 체중증가억제에 대한 기능성 제품은 현재까지 없음.
- 국내 유통되고 있는 유산균 제품의 경우 건강기능식품 공전에 고시된 유익한 유산균 증식, 유해균 억제 또는 배변활동 원활 기능성만을 이용한 제품이 다수.

(2). 유산균 제품의 시장 전망

① 유산균 발효유 업계

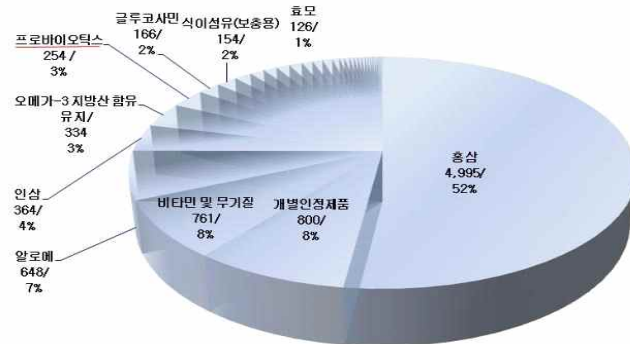
1971년 한국야쿠르트에 의해 국내에 처음 액상 요구르트가 소개되면서 지속적인 제품 개발을 통해 호상, 드링크 발효유들이 개발되었고, 최근에는 고기능성 드링크 발효유의 지속적인 개발로 다양한 제품군들이 형성되어 소비자들의 구매를 증가시키고 있으며 이는 2005년 국내 발효유 시장의 전체 규모 1조원을 넘어서는 계기가 되었음.

② Probiotics 업계

국내 시장규모는 800억원으로 추정되며, 비피도와 셀바이오텍에서 자체 개발한 스타터를 중소기업에 공급하고 있음(매출 공식 자료 미발표).

이전엔 주로 일본 등지에서 수입하여 완제품화 하였으며, 최근 각광 받는 비스판균은 대부분 일본에서 수입하여 국내에서 부형제 첨가하여 생균제제화 하였음. 일례로 일본 Mikuni Kagaku사의 원말을 순천당 제약이 수입하여 제제한 사례가 있음. 관련 기술 연구의 동향은 세계 최고 수준인 일본을 주축으로 여러 질병예방원인의 규명과 면역부활 기작, Genomic DNA

수준의 균주 해석 등이 활발히 이루어지고 있음.



[출처 : 한국식품연구원 2009년 건강기능식품 생산실적 통계자료 발췌]

Figure 1. 국내 건강기능식품의 품목별 시장 현황 (2009)

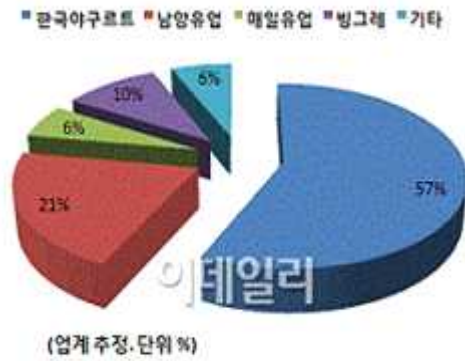
(단위:억원)

순위	구분	총생산액				
		2008	2009	2010	2011	2012
1	홍삼	4,184	4,995	5,817	7,191	6,484
2	개별인정형	416	799	1,129	1,435	1,807
3	비타민·무기질	531	761	991	1,561	1,646
4	알로에	639	648	584	692	687
5	프로바이오틱스 ¹⁾	190	254	317	405	518
6	오메가-3 지방산 함유유지	266	334	348	509	497
7	인삼	413	364	341	381	450
8	가르시니아캄보지아 추출물 ²⁾	-	-	208	207	440
9	식이섬유	1	99	117	116	168
10	감마리놀렌산	145	108	93	224	152
누계 (10품목)		6,785 (84.5%) ³⁾	8,363 (87.1%)	9,945 (93.2%)	12,719 (93.0%)	12,849 (91.2%)
11	기타품목	1,246 (15.5%)	1,235 (12.9%)	726 (6.8%)	963 (7.0%)	1,232 (8.7%)
총생산액		8,031	9,598	10,671	13,682	14,091

[출처 : 식품의약품안전처, 2013년 건강기능식품 생산통계자료]

Table 1. 건강기능식품 품목별 생산 실적

(3) 국내 주요 유업체 현황 및 제품출시 현황



[출처 : 경제 뉴스 이데일리 2011. 02. 18기사]

Figure 2. 2010년 업체별 발효유제품 시장 점유율

한국야쿠르트는 유제품업계를 선두자로서 기능성을 강조한 요거트 제품 출시에 강세를 보이고 있으며, 남양유업과 매일유업이 그 뒤를 따르고 있음.

나. 국내외 제품 현황

◆ 일반식품(요거트, 발효유)

* 한국야쿠르트



제품명: 헬리코박터 프로젝트 윌(위 기능성 발효유)

- 헬리코박터 프로젝트 윌'은 장은 물론 위 건강까지 생각한 신개념 발효유로 소비자들로부터 꾸준한 사랑을 받고 있음.
- 한국인에게 가장 흔한 위염균 억제라는 획기적 컨셉. 기존 장 건강 발효유와 차별화된 위 건강시장 활성화 발효유로 준 의약품 수준까지 끌어올림.

* 남양유업



제품명: 불가리스 (장 기능성 발효유)

- 드링크 발효유로서 장 건강의 일반적인 건강의 개념을 정착시킨 제품.
- 1990년대 출시되어 매년 10% 이상 성장, 발효유의 고급화와 기능화를 가져온 제품.

* 매일유업



제품명: 퓨어

- 한 병(130ml)당 Lactobacillus GG 복합유산균이 10억마리 이상 함유 있음.
- LGG유산균 대한 논문이 481편(2009.11기준) 발표되었으며 핀란드 발리오(Valio)사에서 독점 생산해 캡슐 처리 없이도 위산과 담즙에 살아남는 강력한 프로바이오틱 유산균 사용.

◆ 건강기능식품

* (주)셀바이오텍



제품명: 듀오락

- (주)셀바이오텍은 현재 국내 유산균시장의 원료는 80%이상을 공급하고 있으며 bifido 및 plbio 등이 면역활성 증강, 설사를 일으키는 로타바이러스에 대한 저해능, 헬리코박터 저해능 등 기능성을 앞세운 유산균을 개발하여 시장을 넓혀가고 있음.
- 이중코팅 유산균기술을 연구하여 특허를 획득하고 다른 프로바이오틱스 제품과의 차별성을 둬. 이중코팅은 위산에 불안정한 유산균이 장까지 도달할 수 있도록 단백질 1차 코팅, 다당류 2차 코팅과정을 통해 유산균의 안정성을 높였다는 특징이 있음.
- 프로바이오틱스 전문 생산 업체로 내수보다 수출에 강한 기업으로 유산균 기술을 활용한 제품에 노하우를 가지고 있음

* 수입제품



제품명: 듀오자임 플러스

- 콩과 파파야 열매에서 추출한 a-아밀라아제(α -amylase)와 프로테아제(protease)등의 식물성 효소가 함유된 복합 유산균으로 이루어진 프로바이오틱스 제품임.
- 식물성 효소는 면과 육류에 들어있는 녹말과 단백질의 분해를 도와 소화 에 도움 주는 것이 특징임.

* (주)비피도



제품명: 지근억 비피더스유산균

- (주)비피도의 지근억대표는 현직 서울대학교 식품 영양학과 교수로 한국인의 인체에서 분리한 300여 종의 비피더스균을 이용하여 많은 건강 기능식품을 생산하고 있으며 대장암을 억제하는 식품소재, 면역강화물질 및 안전한 비피더스균을 이용한 식용 수준의 미생물 유전자의 발현 시스템을 국내 특세 기술로 개발하고 있음.

*김정문알로에



제품명: 인터플러스10

- 인터플러스10은 유익한 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동을 원활히 하는 10종의 유산균(비피도박테리움, 락토바실러스, 스트렙토코커스 등) 과 장속에 살고 있는 유익한 세균의 생육을 돕는 올리고당 등의 유산균을 결합한 제품임.
- 이 제품은 유산균에 유산균의 먹이가 되는 활성촉진제까지 결합한 새로운 개념으로 미세입자코팅 3중 보호막을 하여 생산함.

다. 국외 제품생산 및 시장 현황

(1). 최근 시장 규모 (Probiotics & 유산균 발효유)

- 일본 유산균 음료 800억엔, 발효유가 2,500억엔 추정
- 전 세계 발효유 시장 2000년 409억달러 (년간 3%성장 예상)
- 기능성식품의 시장규모는 10%에 달하는 3조원 규모이며, 유산균과 관련한 시장규모는 다음과 같음.
- 유산균이용식품의 성장률은 IMF이후 경기가 회복되기 시작한 1999년 3%, 2000년 39%, 2001년 43%로 급성장하고 있으며 전체 건강보조식품전체매출대비 점유율은 1999년 3.07%, 2000년 3.87%, 2001년 4.21%로 상위 10위권 내를 계속 유지하고 있음.



[출처 : 셀바이오텍 시장현황자료 (<http://cellbiotech.com>)]

Figure 3. 세계 유산균 시장 규모

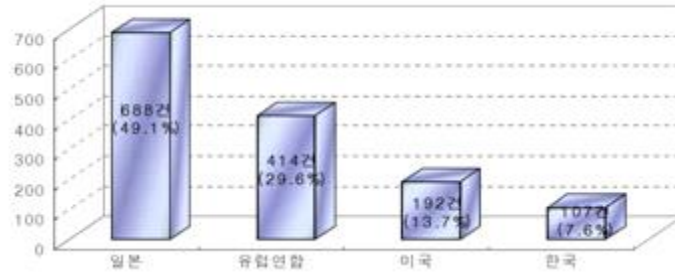
(2). 유산균 제품의 시장 전망

① 유산균 발효유 업계

세계 발효유 시장도 2005년 409억 달러에서 연평균 3%이상의 성장을 보일 것으로 추측되고 있으며, 서유럽, 일본, 중남미 등지에서 10%를 상회하는 지속적인 성장을 보이고 있음. 특히, 최근 중국 및 동남아에서는 프로바이오틱 유산균 제품이 선풍적인 인기를 끌고 있는데, 덴마크의 Chr Hansen사가 이미 중국의 우유제조업체와의 기술적 전략제휴를 맺는 등 서구 유업회사들의 사업진출이 급속도로 이루어지고 있음. 또한 중국 통계청에 따르면 2005~2015년 사이 중국의 유제품소비가 10배 증가할 전망이어서 그 시장 규모가 실로 대단하다 할 수 있음.

② Probiotics 업계

미국은 유럽이나 일본 등에 비해 Probiotics의 인지도가 부족한 편이어서, 야쿠르트사와 네슬레, 다농사 등을 중심으로 활발한 상품 연구 개발 및 판매개척이 이루어지고 있음. 국내외를 불문하고 앞으로 발효유 산업의 성장과 더불어 Probiotics 시장 확대는 지속화 될 것으로 전망됨.



[출처 : 한국기술거래소(기술및시장 동향 프로바이오틱스 기술)]

Figure 4. 세계주요지역별 프로바이오틱 특허출원 현황

또한 프로바이오틱은 일본, 유럽 등의 선진국을 중심으로 발전하고 있으며, 세계 주요 지역별 특허 출원 건수는 총 1,401건으로 이 중 일본특허가 688건(49.1%)으로 과반을 차지하고 있으며 유럽 414건(29.6%), 미국 192건(13.7), 한국 107건(7.6%) 이다.

(3). 제품출시 현황

* BioGaia (스웨덴)



제품명: 루테리 플러스 유산균

- 스웨덴의 세계적인 유산균 기업으로 모유에서 분리한 유산균인 루테리유산균을 연구하여 국제 특허출원하여 40여개국에 라이선스 계약체결.
- 우리나라의 (주)푸르밀, (주)선플러스에서 판매 중.
- 이 유산균은 국내에서 이슈화되어 KBS 수요기획 '엄마 젖의 신비', SBS 다큐멘터리 '모유의 특별한 도전'에서 스웨덴 가정을 예로 들며 영유아 상비약으로서 사용 가능성을 시사하여 비중있게 다뤄진 바 있어 신뢰도가 있는 제품.

* 다니스코 (미국)



제품명: VSL#3

- 세계적 유산균제조업체인 미국 다니스코에서 세계특허를 받은 8가지 유산균을 고농도로 혼합 제조하여 직수입되는 프리미엄 유산균제품.
- 체내 유익한 유산균을 공급해 주는 제제로 80편이 넘는 SCI 등재 논문 통해 그 효과가 세계적으로 입증하고 있음.
- 미국·영국·캐나다·이탈리아 등 세계 17개국에서 판매되고 있음.
- 우리나라의 건강보조식품 수입 판매업체 나무물산에서 판매 중 .

*하나마이(일본)



제품명: 1조마리 유산균

- (주)하나마이 대표 기능식품으로 일본 먹는 콜라겐과 유산균제품을 주로 생산 판매되어지고 있음.
- 일본의 GMP인증취득, 자사 일본 예방의학연구소를 통해 품질관리를 함으로서 소비자에게 신뢰성을 줌.
- 일본에서 화제를 모으고 있는 엔테로코카스, 페카리스균EC-12를 사용하였으며 스틱 한 개로 1조마리 유산균을 섭취할 수 있다는 것이 특징임.

4. 당뇨시장 규모

- ① 최근 서구형 식생활의 침투, 운동부족과 사회적 스트레스의 증가, 생활환경의 변화 등에 의해, 생활 습관병(만성질환)이나 면역, 알레르기 질환 환자수가 증가하는 경향을 보임. 그 중에서도 당뇨병의 증가추세가 현저함 .
- ② 현재 전 국민의 5%이상이 당뇨병 환자이고 본인이 당뇨병을 인지 못하는 경우까지 합치면 10% 정도로 추산됨.
- ③ 국내 당뇨병으로 인한 사망률이 매년 증가하고 있으며, 국내 당뇨병 사망률이 경제협력개발 기구 (OECD) 가입국 중 가장 높은 것으로 나타남.
- ④ 당뇨병 시장규모는 매년 10%가 넘는 성장을 보이고 있음.
- ⑤ 세계 당뇨병 시장규모는 2006년 20조이고 2010년에 30조에 이름 (Visiongain)

Table 2. 2형 당뇨병 환자의 국가별 증가 추이

국가	기간	환자가 증가한 배수
미국	24년(1976~2000)	1.5배
한국	30년(1971~2001)	5.1배
중국	14년(1986~2000)	3.4배
태국	29년(1971~2000)	3.8배
인도네시아	13년(1982~1995)	3.8배
싱가포르	7년(1985~1992)	2.1배
대만	10년(1985~1996)	1.6배
인도	21년(1979~2000)	4.0배

[출처 : 한국 경제 기사 2004.03.02기사]

Table 3. 세계 및 국내 당뇨병 시장 규모

구 분	2009	2010	2011
해외시장	288억불	300억불	321억불
국내시장	4,000억원	4,500억원	4950억

[출처 : 한국보건산업진흥원, 2012]

제 3 장. 연구 개발 수행 내용 및 결과

○ 연구범위, 연구수행방법 및 내용

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
혈당 관련 기능성, 섭취량 관련, 안전성 자료 조사	- 문헌과 데이터베이스 검색	- 논문, 특허, 시장 및 상품(제품) 조사
전임상시험을 통해 BNR17의 혈당 저하 효과 조사	- 동물 실험 수행	- 고탄수화물 식이로 비만을 유도한 실험 동물에서 비만 및 당뇨 관련 인자에 미치는 영향을 조사 - 고지방식 식이 및 streptozotocin으로 고혈당을 유도한 실험 동물에서 혈당 관련 인자에 미치는 영향을 조사
인체적용시험 수행 시 섭취방법	- 인공 위액 실험	- 예비 인체적용시험 수행 결과 인체내 <i>Lb. gasseri</i> BNR17의 생존 수 확보가 중요하다고 판단되어 인공위액 (pepsine)에서 생존율 실험
제형별 안정성 연구 및 유통기한 설정	-안정성 실험 및 제형의 이화학적 검사	- 각 제형에 따른 물리적, 화학적, 생물학적 요인에 대한 안정성 연구 진행 - 가혹/가속 조건 후 제형의 이화학적 검사와 미생물 실험을 실시하고, 지표 물질의 함량을 측정
Pilot study를 위한 샘플 제조	- 대량 생산	- 대량 생산 조건 확립 - 생산 공정의 표준화
인체적용시험 (pilot study)	- <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 혈당조절 기능성평가를 위한 유효 섭취량 설정을 위한 자료 수집 - 프로토콜과 기타 IRB 제출 문건을 개발하고 IRB 승인을 득함 - 피험자를 모집하고 시험식품을 배부하며, 바이오마커를 분석함 - 통계분석을 수행하고 결과보고서를 작성함	- 데이터베이스 검색 및 문헌 검토를 통한 관련 자료 수집 - 프로토콜, 연구자자료집(IB), 증례기록서(CRF), 피험자 동의서 및 동의설명문, 피험자 모집 공고문구 개발 - 개발된 서류를 IRB에 제출하고 승인을 득함 - 피험자 모집 및 선정기준에 적합한 피험자 등록 - 시험식품/대조식품 공급 - 기능성 및 안전성 바이오마커 분석 - 모니터링 - 통계분석 - 결과보고서 작성
인체적용시험 (본시험)	- <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 pilot study 결과를 기반으로 혈당조절 및 장건강 기능성평가를 위한 프로토콜 및 관련서류를 개발하고 IRB 승인을 득함 - 피험자를 모집하고 시험식품을 배부하며, 바이오마커를 분석함 - 통계분석을 수행하고 결과보고서를 작성함	- Pilot study 결과를 바탕으로 프로토콜개발 - 연구자자료집(IB), 증례기록서(CRF), 피험자 동의서 및 동의설명문, 피험자 모집 공고문구 개발 - 개발된 서류를 IRB에 제출하고 승인을 득함 - 피험자 모집 및 선정기준에 적합한 피험자 등록 - 시험식품/대조식품 공급 - 기능성 및 안전성 바이오마커 분석 - 모니터링 - 통계분석 - 결과보고서 작성

제 1 절. 문헌 및 데이터 베이스를 통한 기초 자료 수집

1. 기원 및 개발경위

가. 시험식품 기원에 관한 자료

*Lactobacillus gasseri*는 모유에서 확인되는 대표적인 균주이며, 내산성, 내담즙성 및 장세포에 대한 부착활성과 병원성 세균에 대해 우수한 항균활성의 특성을 가지고 있다. 유산균인 *Lactobacillus acidophilus*는 FDA의 GRAS list에 등재되어 있다. *Lactobacillus gasseri*는 *Lactobacillus acidophilus*에서 최근 유전학적 특성의 차이로 분류되어 나온 것으로서, *Lactobacillus acidophilus*와 동일한 생화학 및 생리학적 특성을 가진다. 국내에서는 건강기능식품 기능성원료 발효 미생물류의 프로바이오틱스에 속해있고, 현재 미국에서 유통되는 유산균 제품에 함유되어 있다.

나. 개발경위

생활양식과 식습관의 변화로 인해 당뇨병의 유병률이 증가하고 있다. 세계보건기구(WHO)에 따르면 당뇨병 환자는 1994년 1억 1,040만 명에서 2003년 1억 9,400만 명으로 증가하였고 2025년에는 3억 3,300만 명에 이를 것으로 예상하고 있다. 국내 20세 이상 성인의 당뇨병 유병률은 2003년 6.4%에서 2007년 9.5%로 증가하였고(22,24), 국민건강영양조사에 따르면 2008년에는 9.7%로 나타났다. 최근의 연구에 따르면, 프로바이오틱스 유산균주가 당뇨 질환 동물 모델에서 glucose homeostasis를 정상화시키는 것으로 알려져 새로운 항당뇨 물질로서 주목받고 있다. 정확한 메카니즘은 밝혀지지 않았으나, 프로바이오틱스는 유제품 등을 통해 전 세계적으로 많이 소비되는 식품 소재이기 때문에 이러한 효과는 당뇨 환자들에 대해 임상적으로 큰 의미를 가질 수 있다. 당뇨의 원인은 대부분 혈당 조절 및 insulin 분비 이상으로 알려져 있으나, 최근에는 pro-inflammatory cytokines의 증가로 인한 chronic low-grade inflammation이 insulin resistance와 type 2 diabetes의 근원적인 발병 인자임을 규명한 연구들이 다수 발표되고 있다. (주)바이오니아는 모유로부터 프로바이오틱스 특성을 가진 *Lactobacillus gasseri* BNR17을 분리하였으며, 동물 실험을 통하여 이 균주가 탁월한 혈당 저하 기능이 있음을 확인하였다.

다. 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

(1) 국내

원재료는 *Lactobacillus gasseri*로 건강기능식품공전상 발효미생물류 중 프로바이오틱스에 해당한다.

(2) 국외

GRAS(Generally recognized as safe)는 US FDA에서 식품 첨가물에 대한 면밀한 검토 후일반적으로 안전하다고 입증된 식품첨가물 목록이며, 유산균인 *Lactobacillus acidophilus*는 FDA의 GRAS list에 등재되어 있다.

(3) *Lactobacillus gasseri* 사용 현황

	<ul style="list-style-type: none"> ● 제품명: Phillips Colon Health Probiotic Supplement ● 유통국: 미국 ● 제조사: Phillips (Bayer) ● 주성분: <i>Lactobacillus gasseri</i>, <i>Bifidobacterium bifidum</i>, <i>Bifidobacterium longum</i> ● 일일섭취량: 10¹⁰ CFU/1 캡슐 1 캡슐/1 일 ● 표시내용: Replenishes Good Bacteria to Promote overall Digestive Health* Helps Naturally Promote Regularity Supports a Healthy Immune System ● 섭취 시 주의사항: If you are pregnant or breast-feeding, as a health professional before use. - Take 2-3 hours after antibiotic use - Keep out of reach of children. - Child resistant cap ● 섭취용도: Constipation, Diarrhea, Gas & Bloating
---	--

2. 기능성분(*Lactobacillus gasseri* BNR17)의 특성

가. 내산성 및 내담즙성

균주의 내산성 및 내담즙성을 확인하기 위하여, *Lactobacillus gasseri* BNR17을 MRS 액체배지 4ml에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18~20시간 배양한 후, 이 배양액의 일정량을 pH 2.0으로 조절한 MRS 액체배지에 초기균수 10⁷ CFU/ml가 되도록 다시 접종하였고, 37°C에서 2시간 배양한 후 MRS 한천평판 배지를 이용하여 생균수를 측정하였다. 또한, 내산성 실험을 실시한 배양액을 그대로 원심분리하여 균체만 회수한 후 0.3% oxgall이 첨가된 MRS 액체배지(pH 6.8)에 접종하였고, 37°C에서 9시간 배양한 후 역시 MRS agar plate를 이용하여 생균수를 측정하였다. *Lactobacillus gasseri* BNR17은 pH 2.0의 강한 산성처리에도 불구하고 생존율이 높은 것으로 확인되었으며, 0.3% oxgall 함유 배지에서도 생존률이 높게 나타났다.

나. 장내부착능 확인

RPMI1640 배지(Gibco)를 이용하여 인간의 장상피세포인 Caco-2 세포주를 배양한 plate 에 BNR17을 일정 균수 (약 10⁷ CFU/ml)가 되도록 접종하였다. 이를 37°C에서 1시간 배양한 후 인산완충용액으로 3회 세척하여 비부착 세포를 제거한 후 메탄올로 검체를 고정하였다. 이후 crystal violet 으로 염색하여 현미경으로 세포를 관찰하였다. 그 결과, *Lactobacillus gasseri* BNR17 이 Caco-2 세포에 잘 부착함을 확인하였다.

다. 병원성 세균에 대한 항균력 확인

BHI 액체배지(Difco)에서 37°C, 18시간 배양한 *Escherichia coli* KCTC (Korean Collection of Type Culture) 1039, *Bacillus cereus* KCTC1526, *Proteus mirabilis* KCTC2510, *Salmonella typhimurim* KCTC2421, *Staphylococcus aureus* KCTC1928, *Listeria monocytogenes* KCTC3710을 초기균수 10⁵ CFU/ml가 되도록 5ml의 BHI agar plate (agar 0.7% 함유) 6개에 각각 접종한 후, 이를 BHI agar plate (agar 1.5% 함유)를 부어 균한 6개의 평판배지위에 각각 겹쳐 부었다. 배지를 균한 후 각 배지에 직경이 약 4 mm 되는 well을 뚫고 그 위에 37°C, 24시간 배양한 본 발명의 유산균의 배양상층액 (2배

농축액) 40 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5시간 배양하였다. 그 결과, 뚜렷한 생육저해를 관찰할 수 있었으며, 따라서 본 균주는 여러 가지 병원성 세균에 대한 항균력이 있음을 확인하였다.

라. 항생제 내성 확인

MRS 한천평판배지에 면봉으로 *Lactobacillus gasseri* BNR17 배양액을 도말한 후 gentamicin, kanamycin, streptomycin, bacitracin, erythromycin, penicillin, tetracycline, ampicillin, chloramphenicol, vancomycin, ampicillin, cefoxitin, rifampin, neomycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, polymixcin B, trimethoprim이 첨가되어 있는 원형디스크를 올려놓은 후 37 $^{\circ}$ C, 24시간 동안 배양하였다. 그 결과, 본 발명의 *Lactobacillus gasseri* BNR17은 gentamicin, kanamycin, streptomycin 및 bacitracin, neomycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, polymixcin B, trimethoprim에 대해 내성을 나타내었다.

마. 항균 펩타이드 유전자의 검출

*Lactobacillus gasseri*종이 생산하는 것으로 알려진 항균펩타이드인 박테리오신 유전자의 염기서열에 특이적인 primer (5' - GGAGTAGGTGGAGCGACAGT - 3', 5' - TCCACCAGTAGCTGCCGTTA - 3')를 만들고, *Lactobacillus gasseri* BNR17의 genomic DNA를 template로 이용하는 PCR로 박테리오신 유전자의 유무를 조사하였다. 그 결과, *Lactobacillus gasseri* BNR17로부터 gassericin에 해당하는 PCR 산물을 확인하였으며, 그 염기서열을 종래에 보고되어 있는 gassericin T (NCBI Blast Search No. AB029612)의 염기서열을 비교한 결과, 약 98%의 상동성을 나타내었다.

3. 안전성 자료

가. 섭취근거 정보

국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료를 참고한다.

나. 기능성분 및 관련물질의 안전성 정보

건강기능식품의 기준 및 규격에 따르면, *Lactobacillus gasseri*는 제품의 기준 및 규격에 관한 내용으로 식용 가능하고 안전하다고 고시하고 있다. GRAS(Generally recognized as safe)는 US FDA에서 식품 첨가물에 대한 면밀한 검토 후일반적으로 안전하다고 입증된 식품첨가물 목록이며, 유산균인 *Lactobacillus acidophilus*는 FDA의 GRAS list에 등재되어 있다. *Lactobacillus gasseri*는 *Lactobacillus acidophilus*에서 최근 유전학적 특성의 차이로 분류되어 나온 그룹으로써, *Lactobacillus acidophilus*와 동일한 생화학 및 생리학적특성을 가진다. *Lactobacillus gasseri*와 *Lactobacillus coryniformis*를 10¹⁰ CFU/mouse/day만큼 섭취시켰을 때 alkaline phosphatase, esterase lipase (C8), lipase, trypsin, a-quimotrypsin, b-glucuronidase, a-mannosidase and a-fucosidase와 같은 효소작용에 아무런 영향을 주지 않았다. (Journal of Microbiology, vol 103, Nov 1, July 2007. 175-84)

4. 기능성 자료

가. 인체연구

- Design: RCT, double-blinded, placebo-controlled, parallel
- 연구대상자: 제 2 형 당뇨병 또는 정상 내당능의 남성 (n=48)
- 섭취기간: 4 주
- 시험물질: *Lactobacillus acidophilus* NCFM
- 바이오마커: insulin sensitivity, cytokines (TNF, IL-6, IL-1ra, C-reactive protein),
분변 내 *Lactobacillus acidophilus*
- 결과: 대조군과 비교하여 시험물질 섭취군이 insulin sensitivity 유의적 변화 ($P<0.01$),
분변 내 *Lactobacillus acidophilus*의 검출이 유의적 상승 ($P<0.01$)

나. 동물시험

(1) 자료 1

- 시험물질: *Lactobacillus gasseri* BNR17
- 동물: C57BL/KS/J db/db mice (n=48)
- 기간: 12주
- 투여방법: 경구
- 군: 1) control group, 2) rosiglitazone group (8mg/kgBW),
3~6) BNR17 (10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} CFU)
- 바이오마커: Fasting & postprandial 2 h blood glucose, HbA1c, oral glucose
tolerance test
- 결과: 대조군과 비교하여 10^{10} CFU 섭취군이
fasting blood glucose 6 주, 7 주째 유의적 감소 ($P<0.05$),
AUC glucose values 6 주, 9 주째 유의적 감소 ($P<0.001$, $P<0.01$)

(2) 자료 2

- 시험물질: *Lactobacillus acidophilus* NCDC14, *Lactobacillus casei* NCDC19
- 동물: Male Wistar rats, 6 - 8 weeks, n=30
- 기간: 28일
- 투여방법: 경구
- 군: 1) normal group (NCG), 2) diabetic control group (DCG), 3) SM(skim milk)
fed group (SMG) (15 ml/rat/day), 4) CD(control dahi) fed group (CDFG)
(15 g/rat/day), 5) PD(probiotic dahi) fed group (PDFG) (15 g/rat/day)
*DCG, SMG, CDFG, PDFG 군은 실험 시작 0일째에 복강 STZ 투여
- 바이오마커: Oral glucose tolerance test, plasma total-cholesterol, triglyceride,
HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, liver
glycogen, tissue lipid peroxidation, total nitrite, GSH, catalase
activity, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase

(GPx), total protein

- 결과: 대조군에 비하여,
 - DCG, SMG, CDFG 군에서 7 일째 insulin response 유의 ↓
 - PD 군에서 plasma HDL-cholesterol 유의 ↑ (P<0.05)
 - Liver glycogen plasma total cholesterol, plasma triglyceride, plasma LDL-cholesterol, liver total cholesterol, liver triglyceride 유의 ↓ (P<0.05)
 - TBARS 와 total nitrite 가 28 일째에 PDFG 군에서 유의 ↓ (P<0.05)
 - DCG 군 체장세포 GSH, catalase activity, SOD, GPx 유의 ↓ (P<0.05)

(3) 자료 3

- 시험물질: Lactobacillus johnsoniiLa1(LJLa1) strain
- 동물: Male Wistar rats (n=36)
- 기간: 2주
- 투여방법: 음용
- 군: 1) Water - 2DG (2DG: 2-deoxy-D-glucose), 2) La-1-2DG (La-1 : LJLa1), 3) Water-aCSF (aCSF: artificial cerebrospinal fluid), 4) La-1-aCSF
- 바이오마커: plasma concentrations (glucose, insulin, glucagon), oral glucose tolerance test
- 결과: 대조군에 비하여,
 - Plasma glucose 유의 ↓ (P<0.0005)
 - Plasma glucagon(30~120 min) 유의 ↓ (P<0.005)
 - OGTT 수행 시, water 와 LJLa1 간 15~90 분에 유의차 (P<0.05)

(4) 자료 4

- 시험물질: VSL#3 (probiotic compound)
- 동물: female NOD mice, 4-week-old, n=40
- 기간: 280 days
- 투여방법: 경구
- 군: 1) control group, 2) VSL#3 group (3 mg/mouse, resuspended in 100 µl PBS)
- 바이오마커: Non-fasting whole blood glucose, cytokine concentrations (IL-4, IL-10, IFN-γ), area of the Langerhans islets occupied by beta cells
- 결과: 대조군에 비하여, VSL#3군이 당뇨발병률 유의 ↓ (p<0.001), IL-10 생성 유의 ↑ (p<0.05)

5. *Lb. gasseri* BNR17 full sequencing

(주)지노믹트리에 full sequencing을 의뢰하였고 그 결과를 아래와 같이 첨부한다.
full sequencing raw data는 용량이 크므로 IPET에 직접 업로드 하였다.

(파일명: lib2.R1.fastq_filtered.fq와 lib2.R2.fastq_filtered.fq)



페이지 1 / 42

Bacterial Resequencing Project Report

1. Customer : 바이오니아 전지나 선생님

2. Date of Report : 2014 년 3 월 5 일

Genomictree, Inc.

☎ 지노믹트리 대전특별시 유성구 테크노 10로 44-6 (탑립동 829)
TEL 042-861-4551 (113) EMAIL : NGS@gmail.com

1. Workflow description

1.1. Library Preparation

1. DNA fragmentation by sonication
2. DNA-end repair, 3'-dA overhang and ligation of sequencing adaptors.
2. PCR amplification and size selection (usually 100-500bp, including adaptor sequence).
3. Qualified library for sequencing.

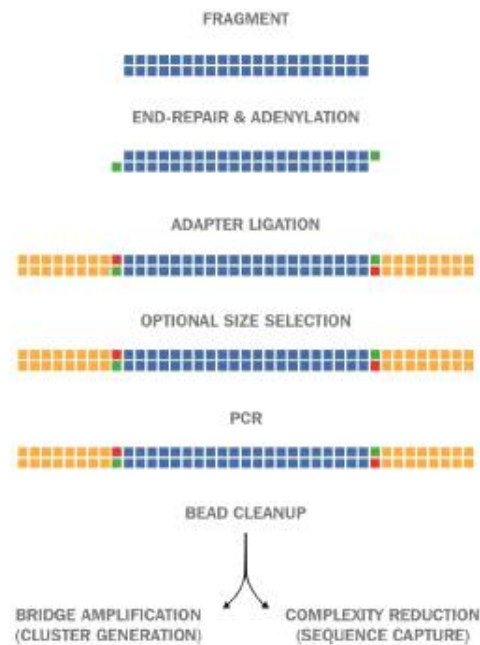


Figure 1. Experimental pipeline of library preparation. Enriched DNA fragment was repaired to overhang a 3'-dA, then adapters were ligated to the end DNA fragments. DNA fragments with proper size (usually 300~400bp, including adaptor sequence) were selected after PCR amplification. Finally qualified

library for sequencing was prepared.

1.2. Pipeline of Bioinformatics Analysis

Sequencing data are mapped to the reference genome. Only the unique mapped reads are used for standard analysis and personalized bioinformatics analysis. The pipeline of bioinformatics analysis is as follows:

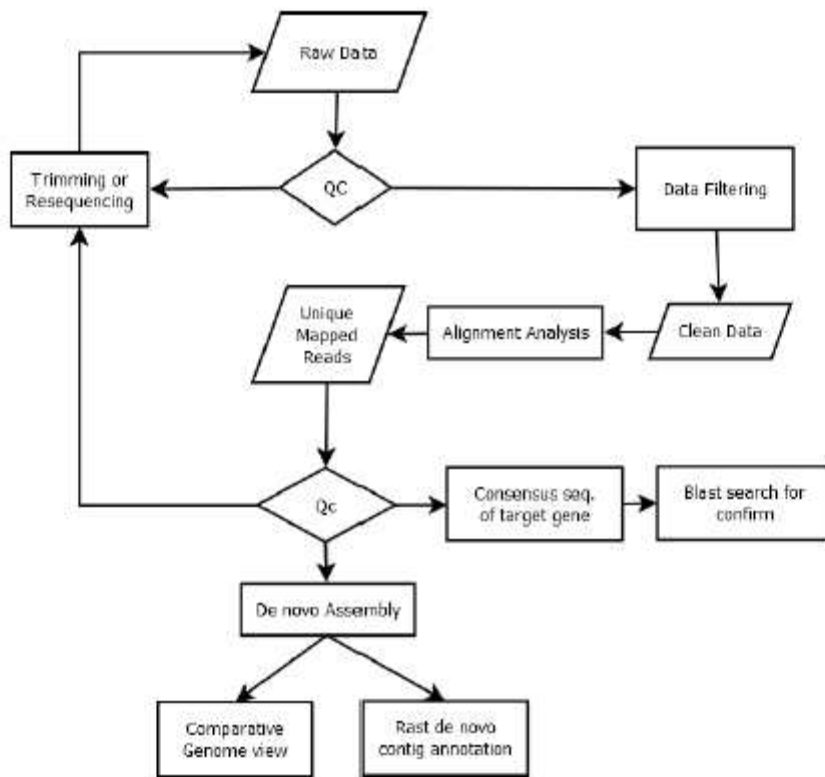


Figure 2. Pipeline of bioinformatics analysis. Sequence data was filtered to get clean data firstly. Then the production of data was estimated. All of the clean data was mapped to reference genome. Only the uniquely mapped reads were used for further analysis..

2. Reference mapping view

Figure. 아래 그림은 ATCC33323 reference genome에 대해 bioneer strain의 시퀀싱 결과 (reads)를 mapping한 결과임. ATCC33323 게놈중 일부 영역은 reads 들이 mapping되지 않음을 알 수 있음.

(Result/003.bioneer-genomeMappingView.png)



2.1. Sequencing & Mapping Summary ([Result/Qualimap/QualimapReport.html](#))

Globals

Reference size	1,894,360
Number of reads	9,595,276
Mapped reads	4,965,219 / 51.75%
Unmapped reads	4,630,057 / 48.25%
Paired reads	4,965,219 / 51.75%
Mapped reads, only first in pair	2,587,727 / 26.97%
Mapped reads, only second in pair	2,377,492 / 24.78%
Mapped reads, both in pair	4,577,982 / 47.71%
Mapped reads, singletons	387,237 / 4.04%
Read min/max/mean length	90 / 90 / 90
Clipped reads	0 / 0%
Duplication rate	83.39%

Globals (inside of regions)

Regions size/percentage of reference	1,894,360 / 100%
Mapped reads	4,965,219 / 51.75%
Mapped reads, only first in pair	2,587,727 / 26.97%
Mapped reads, only second in pair	2,377,492 / 24.78%
Mapped reads, both in pair	4,577,982 / 47.71%
Mapped reads, singletons	387,237 / 4.04%
Correct strand reads	0 / 0%

ACGT Content (inside of regions)

Number/percentage of A's	145,479,911 / 32.57%
Number/percentage of C's	77,775,271 / 17.41%

Number/percentage of T's	144,880,656 / 32.44%
Number/percentage of G's	78,504,741 / 17.58%
Number/percentage of N's	0 / 0%
GC Percentage	34.99%

Coverage (inside of regions)

Mean	235.86
Standard Deviation	158.39

Indels (inside of regions)

Total reads with indels	233,266
Insertions	125,609
Deletions	107,657
Homopolymer indels	52.13%

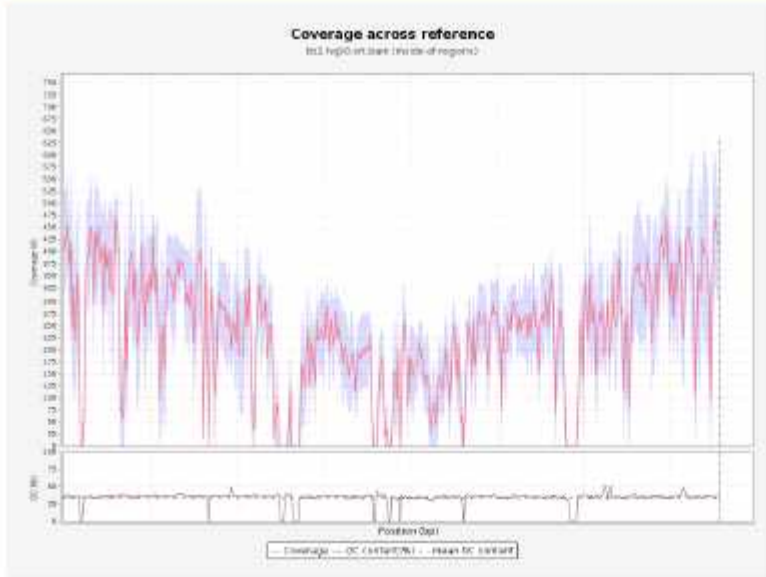
Insert size (inside of regions)

Mean	292.06
Median	325

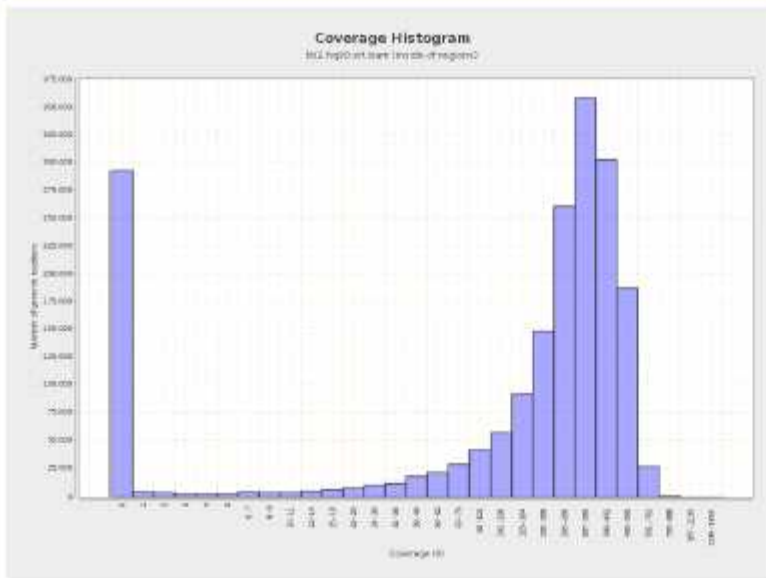
Chromosome stats (inside of regions)

Name	Length	Mapped bases	Mean coverage	Standard deviation
Lactobacillus-gasseri-ATCC-33323	1894360	446796000	235.86	158.38

Coverage across reference

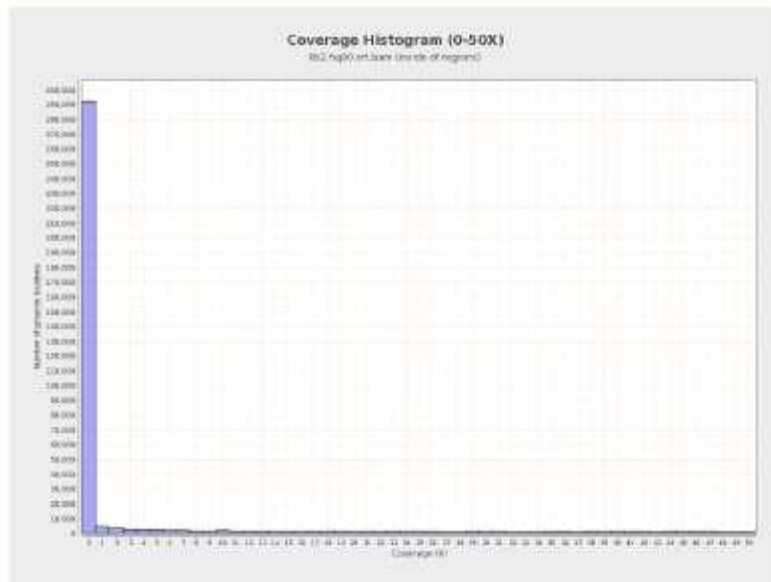


Coverage Histogram

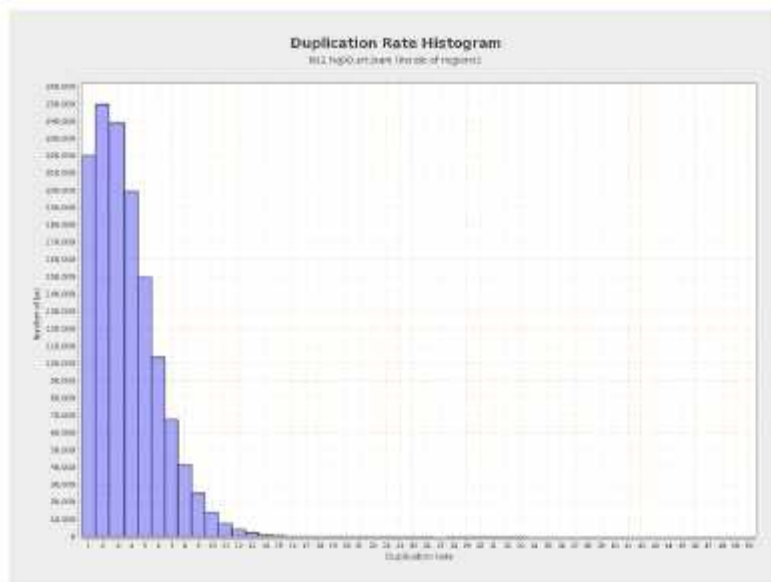


㈜ 지노믹트리 대전특별시 유성구 테크노 10로 44-6 (탑림동 829)
TEL 042-861-4551 (113) EMAIL : NGS@gmail.com

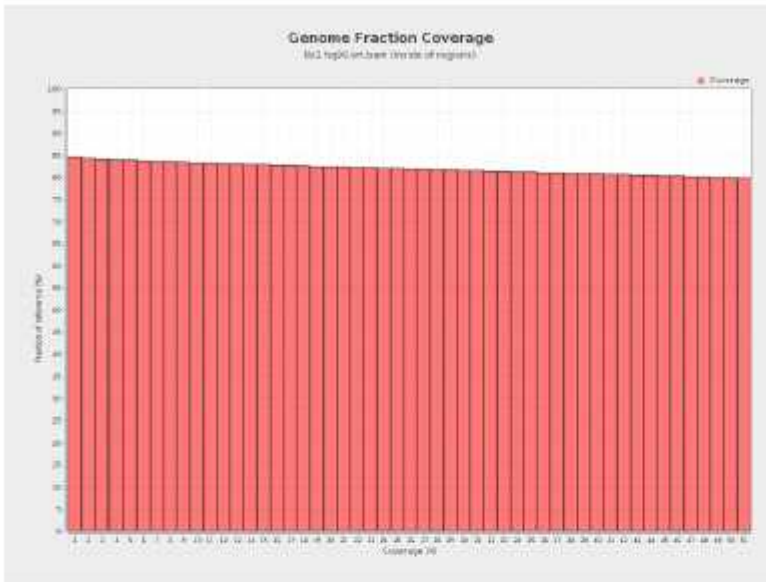
Coverage Histogram (0-50X)



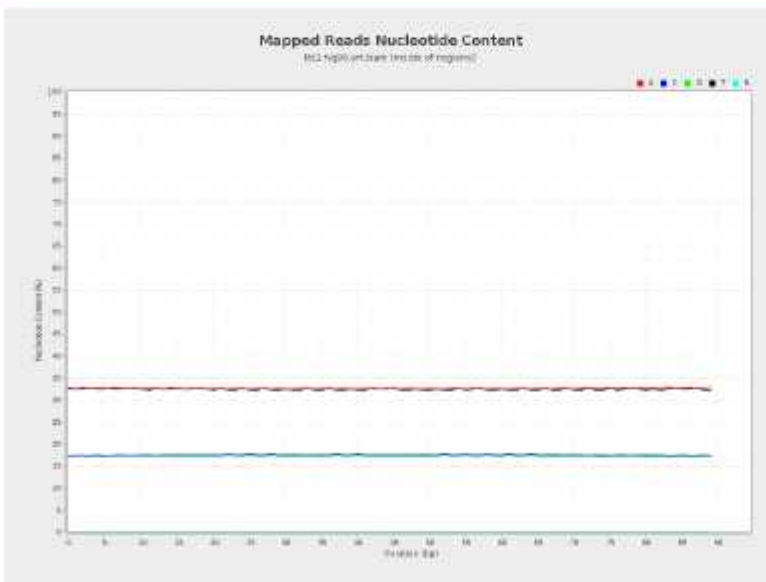
Duplication Rate Histogram



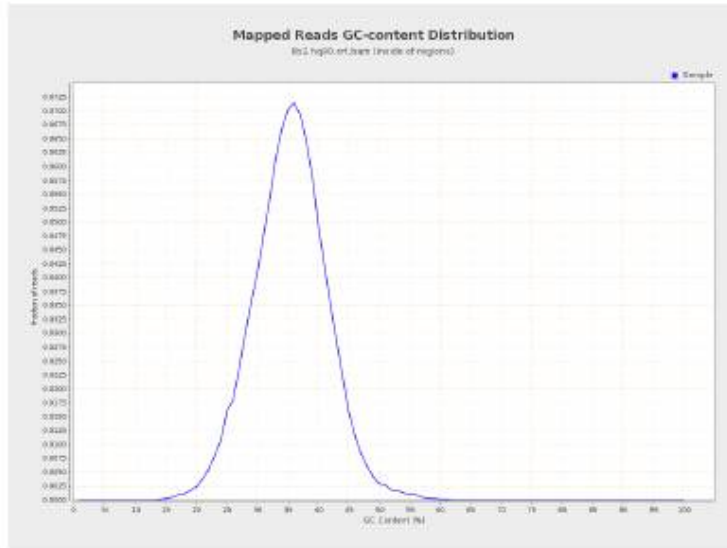
Genome Fraction Coverage



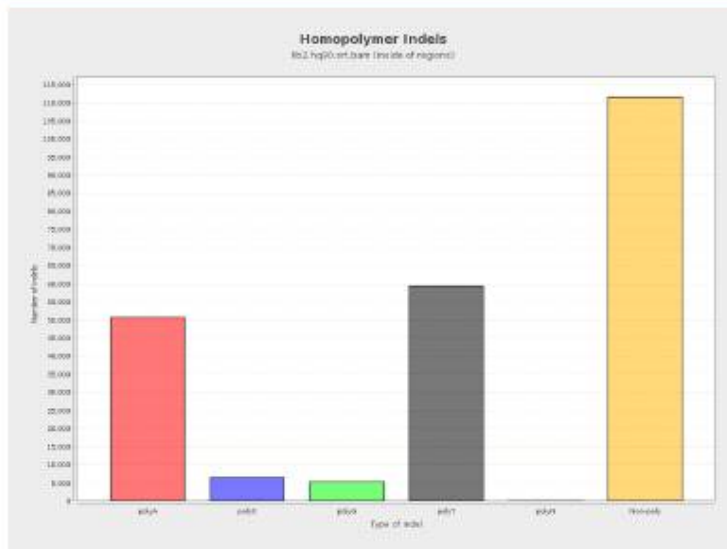
Mapped Reads Nucleotide Content



Mapped Reads GC-content Distribution



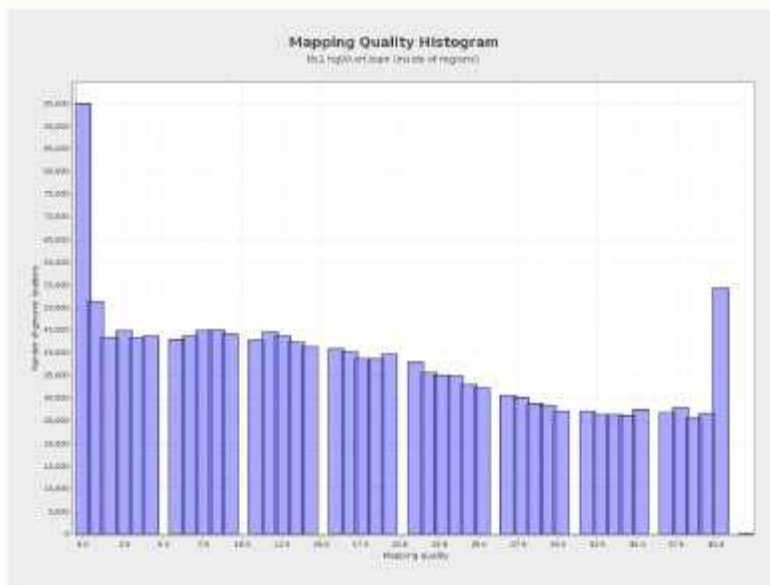
Homopolymer Indels



Mapping Quality Across Reference

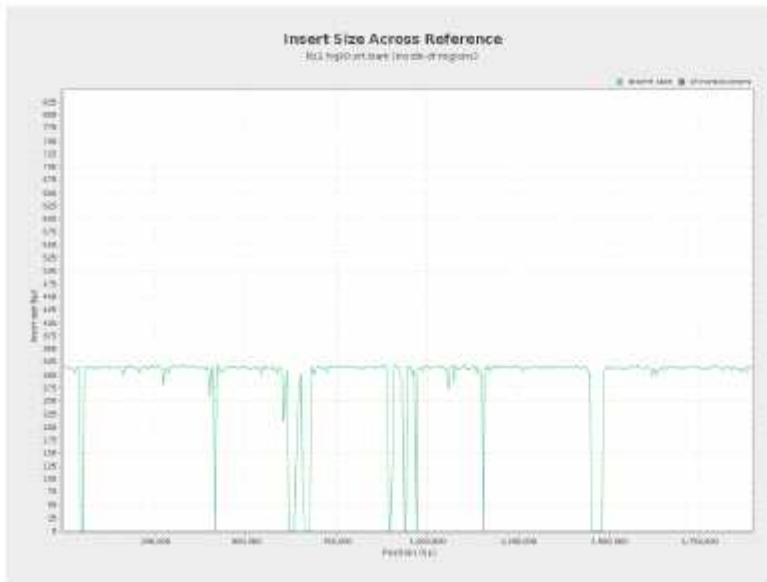


Mapping Quality Histogram

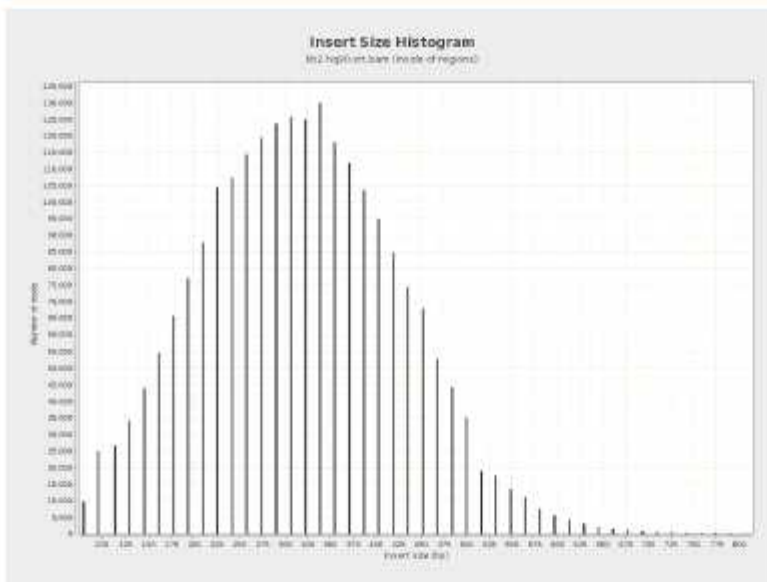


㈜ 지노믹트리 대전특별시 유성구 테크노 10로 44-6 (합림동 829)
TEL 042-861-4551 (113) EMAIL : NGS@gmail.com

Insert Size Across Reference



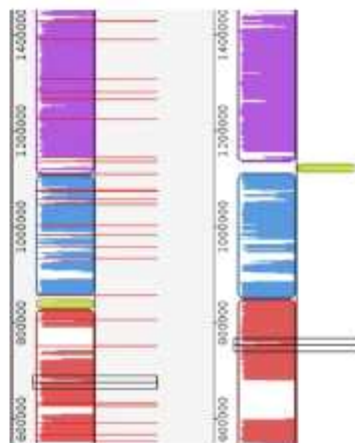
Insert Size Histogram



3. Visualization of Ordered Contig

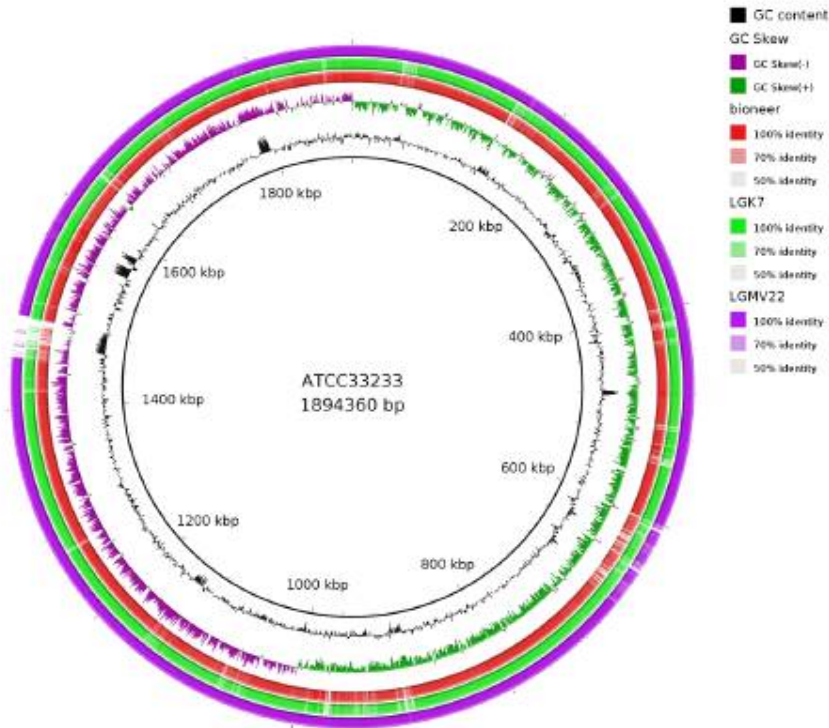
Assembly된 contig를 reference-aided ordering 을 통해 contig를 재정렬한 그림. Contig와 reference의 순서가 거의 유사함을 확인할 수 있음 (Result/003.mauve-align.view.jpg)

- Upper genome : bioneer strain, bottom genome : L. gasseri ATCC33323,
Red line : contig boundary



4. Visualizing reference –based comparisons of multiple sequences

ATCC33323, K7, MV22 및 bioneer-strain 비교 (Result/003.bioneer-33323.png)



제 2 절. 전임상시험을 통한 BNR17의 혈당 저하 효과

I. 고지방식이와 streptozotocin에 의해 당뇨가 유도된 동물에서 *Lb. gasseri* BNR17의 혈당 강하 효과 (Blood glucose-lowering effect of *Lb. gasseri* BNR17 in high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice)

가. 실험 방법

(1). 시료 준비

실험군을 위한 생균을 준비하기 위해, 매일 MRS broth에 배양한 균을 원심분리 ($5,500 \times g$, 10 min, 4°C)하여 PBS (Phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후, 최종 농도 10^9 CFU/ 0.2 ml와 10^{10} CFU/ 0.2 ml가 되도록 PBS에 현탁하였다. 대조군은 동량의 PBS를 사용하였다.

(2). 실험 동물의 사육 및 식이

본 연구에서는 9주령의 C57BL/6J mouse 40마리 (수컷, 평균체중 24.3g)를 (주)중앙실험동물(서울, 한국)에서 구입하여 1주일간 일반식으로 적응시킨 후 무작위로 10마리씩 선별하여 4 그룹으로 나누었다. 실험동물은 한 케이지에 2마리씩 사육하였고, 사육실 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 $55 \pm 5\%$ 로 유지하였으며 명암은 12시간 (06:00~18:00) 간격으로 조절하였다. 물과 식이는 제한 없이 공급하였으며, 실험동물은 매일 활동성 및 건강상태를 육안으로 관찰하였다. 실험동물은 일주일간 적응시킨 후 일반식이 (ND group, 2918C, contents of 6.0% fat, and 18.5% protein; 코아텍)를 섭취시킨 군과 고지방식이 (HFD group, D12451, contents of 45.0% fat, 20.0% protein, and 30.0% carbohydrate; 중앙실험동물)를 섭취시면서 1x PBS를 투여한 군, 그리고 고지방식이를 섭취시키면서 *Lb. gasseri* BNR17을 각각 10^9 CFU (HFD+BNR17(9) group) 또는 10^{10} CFU (HFD+BNR17(10) group)씩 1일 2회 경구투여한 군으로 나누어 사육하였다. 동물실험 시작 후 10주째에 0.1 M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 streptozotocin (STZ, Sigma, S0130, USA)을 일반식이군을 제외한 나머지 실험군에 50 mg/kg 체중의 농도로 1ml 주사기(0.25mm x 8mm, 31G, BD328820, USA)를 이용하여 3회 연속(1회/1일) 복강 내 주사(Intraperitoneal injection) 한 후, 4 주간 실험 식이를 섭취시키면서 제 2형 당뇨가 유발되도록 하였다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 (주)바이오니아 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행하였다.

(3). 당뇨 증세 측정

동물실험 기간 동안 체중 변화와 식전 혈당, 그리고 식후 2시간 혈당은 일주일에 1회 측정하였으며 혈당 변화는 혈당계 (GlucolabTM, Infofia, Korea)를 이용하여 측정하였다. 식이 및 수분 섭취량, 그리고 뇨 배설량은 streptozotocin 투여 후, 일주일에 1회 측정하였다. 경구당부하 검사 (OGTT, oral glucose tolerance test)는 실험 0주, 10주, 14주째에 16시간 이상 절식시킨 후 혈당치를 측정한 시점을 0 시간으로 하여, 실험식이를 투여 30분 경과 후 포도당 용액 (1g/kg body weight)을 경구투여 한 후, 30, 60, 90, 120분이 경과할 때마다 꼬리 정맥으로부터 채취한 혈액의 혈당을 측정함으로써 조사하였다. HbA1c는 0주, 10주, 14주째에 측정하였다 (Siemens, DCA VantageTM, UK). 동물실험 종료일에 실험 동물을 16시간 이상 절식 시킨 후 Zoletil 50 (5mg/kg BW,

Virbac S.A, France)과 Rompun (5mg/kg BW, Bayer AG, Germany)을 1:3 비율로 섞어 제조한 전신 마취제를 복강투여(intraperitoneal injection)하여 마취한 후, 심장채혈법으로 채혈하였으며, 혈액은 1시간 상온에서 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 취하여 -80°C 보관하였다.

(4). GLUT4 유전자의 발현 분석

RNA는 RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen)를 이용하여 white adipose tissue 각각 0.1 g으로부터 추출한 후, Accupower[®] Rocketscript[™] Cycle RT Premix kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. qPCR은 합성된 cDNA를 template로 하여 Accupower[®]2X Greenstar qPCR Master Mix (Bioneer, Korea)을 이용하여 Exicycler (Bioneer, Korea)상에서 수행하였으며, 이때 사용된 primer 염기서열은 실험 1의 Table 1과 같다.

(5). Insulin

혈청 중 insulin 농도는 Mercodia mouse insulin ELISA kit (Sweden)를 이용하여 측정하였다.

(6). 통계처리

실험 결과는 모두 평균과 표준오차로 나타내었다. 실험군간 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 pairwise t test로 검증하였다.

나. 실험 결과

(1). 체중

Lb. gasseri BNR17이 체중에 미치는 영향을 Figure 1에 나타내었다. STZ를 투여하기 전 10주동안, 고지방식을 투여한 실험군 (HFD)의 경우 일반식이군(ND)에 비하여 체중이 증가하였다. 그러나 11주째에 STZ를 투여한 이후에는 고탄수화물식을 섭취한 실험군의 체중은 증가가 둔화된 반면, *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 실험군 (HFD + BNR17(9)군과 HFD + BNR17(10))에서는 체중이 꾸준히 증가하는 것으로 나타났다. 체중 감소는 당뇨병 상태에서 세포의 포도당 이용이 저하되므로써 나타나는 현상인데, *Lb. gasseri* BNR17을 섭취하므로써 이러한 체중 손실을 방지시켜 주는 것으로 보인다.

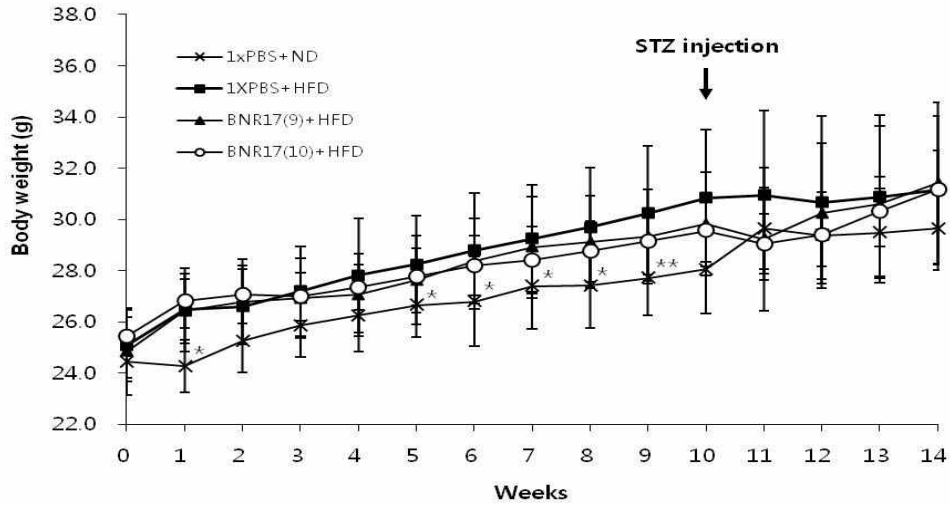


Figure 1. Effect of *Lb. gasseri* BNR17 supplementation on body weight of high-fat diet/STZ-induced diabetic mice. C57BL/6J mice were administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks and treated with STZ. Data are means \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus HSD group.

(2) 혈당

고지방식이 실험군에서 10 주 동안의 식전 혈당 변화는 없었으나, STZ투여에 의해 급격하게 식전 혈당이 증가하는 것으로 나타난 반면, *Lb. gasseri* BNR17 투여군의 경우 STZ 투여 이후에도 혈당 증가가 일어나지 않았다 (Figure 2). 한편 식후 혈당의 경우, 고지방식이 및 STZ 처리에 의한 유의적 증가가 나타나지 않아 *Lb. gasseri* BNR17이 식후 혈당에 미치는 영향을 확인할 수는 없었다 (결과 미제시).

일반적으로 당뇨로 판단되는 식전 혈당의 수치는 150 mg/dL 이상으로 알려져 있다. 그러나, 본 실험에서는 고지방식이 및 STZ에 의해 혈당이 증가하기는 하였으나, 심각한 당뇨 범위까지 증가하지 않은 고혈당증 (hyperglycemia)이 유도된 것으로 판단된다.

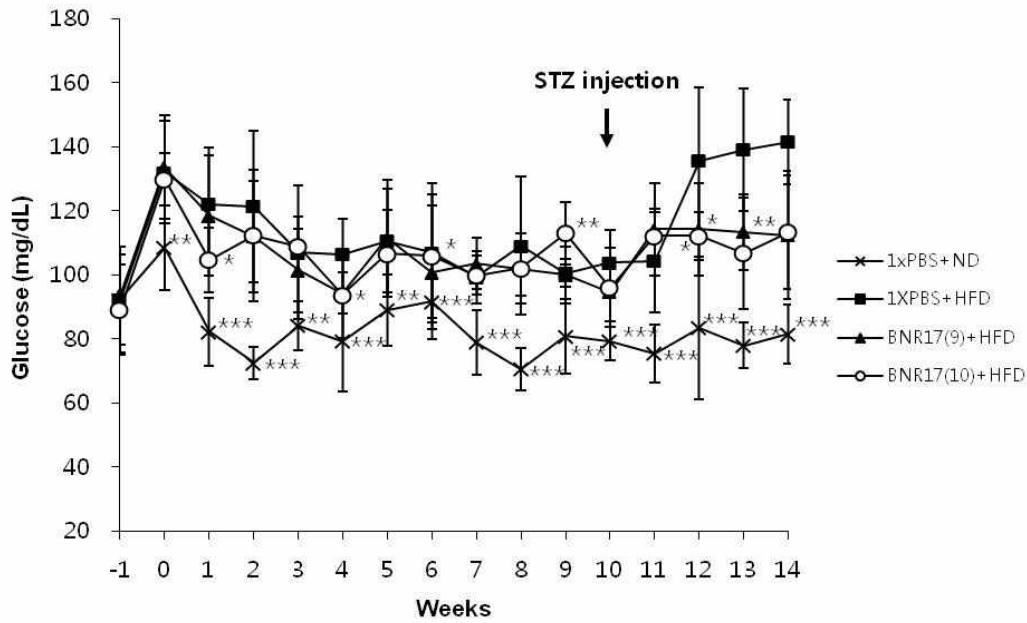


Figure 2. Effect of *Lb. gasseri* BNR17 supplementation on fasting blood glucose of high-fat diet/STZ-induced diabetic mice. C57BL/6J mice were administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks and treated with STZ. Data are means \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus HSD group.

(3) 당뇨병세

Lb. gasseri BNR17이 식이섭취량, 수분섭취량, 뇨 배설량은 Table 1과 같다. 식이섭취량의 경우, 일반 식이군이 다른 군들에 비해 높게 나타났는데, 이는 고지방식이보다 일반식이의 식감이 좋아 상대적으로 섭취량이 증가하였기 때문인 것으로 보인다. *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 실험군에서의 식이섭취량 변화는 없었다. 그러나, 수분섭취량 및 뇨 배설량은 일반식이군에 비해 고지방식이군에서 증가하는 경향을 보였고, *Lb. gasseri* BNR17 투여군에서는 유의적이지는 않지만 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는, 당뇨병의 주요 증세 중 다갈 (polydipsia), 다뇨 (polyuria) 증세를 *Lb. gasseri* BNR17이 개선시켜 줄 수 있음을 보여주고 있다.

Table 1. Food intake, water intake and urine volume of high-fat diet/STZ-induced diabetic mice at 4 week after STZ injection

	ND	HFD	HFD+ BNR17(9)	HFD+ BNR17(10)
Food intake (g/mouse/day)	3.72±0.66***	2.66±0.41	2.46±0.19	2.47±0.26
Water intake (mL/mouse/day)	4.07±0.90	4.84±1.27	3.54±1.02	3.76±0.42
Urine volume (mL/mouse/day)	0.26±0.03	0.37±0.03	0.26±0.05	0.23±0.10

Data are means ± SD. *** P < 0.001 versus HSD group.

(4) 내당능 검사 (OGTT)

Lb. gasseri BNR17이 내당능 (glucose tolerance)에 미치는 영향은 Figure 3과 같다.

0 주째와 10 주째에 각 실험군별 혈당은 차이가 없었으나, STZ 투여 14 주 후에는 실험군 별로 차이를 보였다. 포도당 섭취 후 30분에 일반식이군에 비해 나머지 실험군 모두 높은 혈당 수치를 보였으나, *Lb. gasseri* BNR17 투여군이 고지방식이 실험군보다 낮은 혈당 수치를 나타내었다. 60분 후에는 모든 실험군의 혈당 수치가 감소하기 시작하였으나 120분 후에도 *Lb. gasseri* BNR17 투여군은 고지방식이군에 비해 여전히 낮은 혈당 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 *Lb. gasseri* BNR17이 내당능을 개선시킬 수 있음을 보여주고 있다. 혈당반응면적 (AUC, area under the curve) 또한 STZ 투여 전에는 차이가 없었으나 STZ 투여 4주후에는, 일반식이군(ND)보다 고지방식이 대조군 (HFD)에서 유의적으로 높았고 *Lb. gasseri* BNR17 투여군 (HFD+BNR17(9), HFD+BNR17(10))에서는 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다.

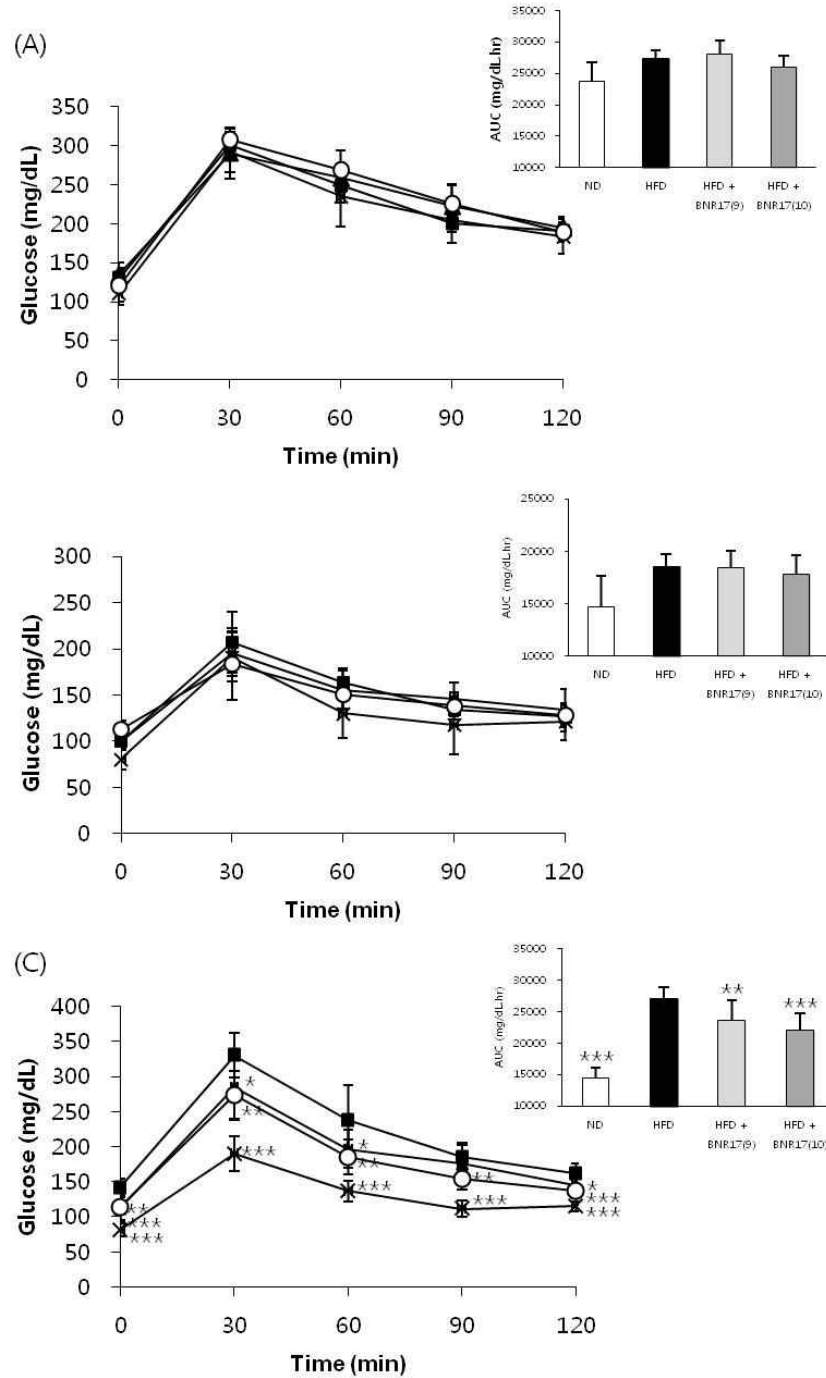


Figure 3. Effect of *Lb. gassseri* BNR17 supplementation on oral glucose tolerance test (OGTT) of high-fat diet/STZ-induced diabetic mice at (A) 0 week, (B) 10 week and (C) 14 week. *inset* correspond to AUC_{OGTT}. C57BL/6J mice were administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gassseri* BNR17 (10⁹ CFU or 10¹⁰ CFU) for 10 weeks and treated with STZ. Data are means \pm SD. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus HSD group.

(5) HbA1c

본 연구에서 고지방식이 및 streptozotocin의 투여로 혈당은 증가하였으나 HbA1c의 유의적인증가는 볼 수 없었다 (Table 2). 본 실험에서 HbA1c가 증가하지 않은 이유는, 고지방식이와 STZ의 투여로 인해 고혈당증이 유도되기는 하였지만 당뇨병으로까지는 진행되지 않았기 때문인 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고, *Lb. gasseri* BNR17 투여군의 경우, 고지방식이군에 비해 HbA1c의 수치가 낮게 나타나는 결과를 확인하였다.

Table 2. HbA1c of high-fat diet/STZ-induced diabetic mice at 4 week after STZ injection

Group	0 week	4 week (after STZ treatment)
ND	4.21 ± 0.29	4.26 ± 0.07
HFD	4.46 ± 0.25	4.74 ± 1.42
HFD + BNR17(9)	4.33 ± 0.18	4.31 ± 0.10
HFD + BNR17(10)	4.34 ± 0.15	4.28 ± 0.23

Data are means ± SD.

(6) GLUT4 유전자의 발현

일반식이군에 비해 고지방식을 섭취한 실험군의 경우, GLUT4의 발현이 현저히 저하되는 것으로 나타났으며, 이는 *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 실험군에서도 마찬가지로 나타났다 (Figure 4). 그러나, *Lb. gasseri* BNR17을 10^{10} CFU 투여한 실험군에서는 고지방식이 실험군에 비해 GLUT4의 mRNA 발현이 증가하는 경향을 보여, 선행 연구에서와 마찬가지로 *Lb. gasseri* BNR17이 GLUT4의 발현에 영향을 미치므로써 항당뇨 효과를 가지는 것으로 나타났다.

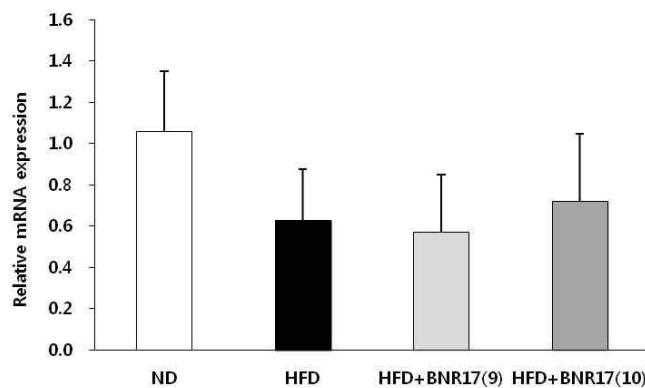


Figure 4. Effect of *Lb. gasseri* BNR17 supplementation on GLUT4 mRNA expression of high-fat diet/STZ-induced diabetic mice. C57BL/6J mice were administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks and treated with STZ. Data are means ± SD. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus HSD group.

(7) 혈중 insulin 농도

고지방식이를 섭취한 실험군의 경우, 일반식이군에 비해 혈중 insulin 농도가 증가하여 혈당 증가에 따른 고인슐린증 (hyperinsulinemia)이 유발되는 것으로 나타났으며, *Lb. gasseri* BNR17 투여군의 경우는 상대적으로 insulin 농도가 감소하는 경향을 보임을 확인할 수 있었다 (Figure 5).

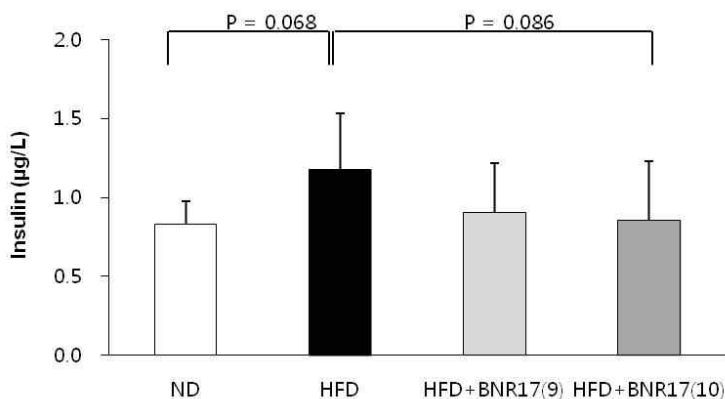


Figure 5. Effect of *Lb. gasseri* BNR17 supplementation on blood insulin concentration of high-fat diet/STZ-induced diabetic mice. C57BL/6J mice were administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks and treated with STZ. Data are means \pm SD.

다. 결론 및 고찰

- (1) 장기간의 고지방 급여는 인슐린 저항성을 유발하지만 당뇨병을 유발하지 않기 때문에 고지방과 저농도의 STZ으로 유도한 당뇨 동물들이 제 2형 당뇨병 연구에 널리 사용되고 있다. 본 실험에서도 같은 방법으로 제 2형 당뇨병을 유도하고자 10주간 고지방식이를 섭취시킨 후 STZ를 투여하여 고혈당 및 당뇨 증세가 나타나도록 한 후, *Lb. gasseri* BNR17이 혈당과 관련 바이오마커에 미치는 영향을 조사하였다.
- (2) 고지방식이 실험군은 고지방식이를 섭취하는 10주간에 걸쳐 체중이 일반식이군에 비해 증가하였으나 STZ의 투여로 혈당 증가가 유도된 이후에는 체중 증가 정도가 둔화된 반면, *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 실험군에서는 꾸준한 체중 증가억제를 보였다.
- (3) 식전 혈당 및 OGTT 역시 *Lb. gasseri* BNR17 투여에 의해 고지방식이 실험군보다 감소하는 것을 확인하였다.
- (4) 당뇨의 대표적 증세인 다음, 다식, 다갈 현상 중 다음, 다갈 현상이 완화되는 것을 확인하였다.
- (5) 고지방식이 및 STZ 투여가 HbA1c에 있어서 유의적인 증가를 유도하지는 않았으나, *Lb. gasseri* BNR17이 HbA1c를 다소 낮출 수 있음을 확인할 수는 있었다.
- (6) 중요한 포도당 수송체인 GLUT4의 발현이 *Lb. gasseri* BNR17에 의해 증가하는 것으로 나타났다.
- (7) 고혈당과 함께 동반되는 고인슐린증 (hyperinsulinemia)이 *Lb. gasseri* BNR17에 의해 완화되었다.

II. 고탄수화물식이 섭취에 의해 비만이 유도된 동물에서 *Lb. gasseri* BNR17의 항비만 및 항당뇨 효과 (Anti-obesity and anti-diabetic effect of *Lb. gasseri* BNR17 in high sucrose diet-induced obese mice)

가. 실험 방법

(1) 시료 준비

실험군을 위한 생균을 준비하기 위해, 매일 MRS broth에 배양한 균을 원심분리 ($5,500 \times g$, 10 min, 4°C)하여 PBS (Phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후, 최종 농도 10^9 CFU/ 0.2ml와 10^{10} CFU/ 0.2ml가 되도록 PBS에 현탁하였다. 대조군은 동량의 PBS를 사용하였다.

(2) 실험 동물

본 연구에서는 6주령의 C57BL/6J mouse 40마리 (수컷, 평균체중 22.7g)를 (주)중앙실험동물(서울, 한국)에서 구입하여 1주일간 일반식으로 적응시킨 후 무작위로 10마리씩 선별하여 4 그룹으로 나누었다. 실험동물은 한 케이지에 2마리씩 사육하였고, 사육실 온도는 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도는 $55 \pm 5\%$ 로 유지하였으며 명암은 12시간 간격으로 조절하였다. 물과 식이는 제한 없이 공급하였으며, 실험동물은 매일 활동성 및 건강상태를 육안으로 관찰하였다. 실험동물은 일주일간 적응시킨 후 일반식이(ND group, 2918C, contents of 6.0% fat, and 18.5% protein; 코아텍)를 섭취시킨 군 (ND group)과 고탄수화물식이(HSD group, AIN-76A, contents of 5.0% fat, 50.0% sucrose, 15.0% cornstarch 20.0% protein; 중앙실험동물)를 섭취하면서 1X PBS (phosphate buffered saline)를 투여한 군 (HSD group), 그리고 고탄수화물식이를 섭취시키면서 *Lb. gasseri* BNR17을 각각 10^9 CFU (HSD+BNR17(9) group) 또는 10^{10} CFU (HSD+BNR17(10) group)씩 1일 2회 경구 투여한 군으로 나누어 사육하면서 비만에 미치는 *Lb. gasseri*의 영향을 조사하였다. 체중과 식이섭취량은 일주일에 한번 측정하였으며, 10주 후에 체내 지방의 분포 정도를 보기 위해 CT (InveonTM, Siemens Medical Solutions USA, Inc.)를 촬영하였다. 동물실험 종료일에 실험 동물을 16시간 이상 절식시킨 후 Zoletil 50 (5mg/kg BW, Virbac S.A, France)과 Rompun (5mg/kg BW, Bayer AG, Germany)을 1:3 비율로 섞어 제조한 전신마취제를 복강투여 (intraperitoneal injection)하여 마취한 후, 심장채혈법으로 채혈하였으며, 혈액은 1시간 상온에서 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 취하여 -80°C 에 보관하였다. 이후 liver, spleen, kidney 및 mesenteric fat pad (MFP, 내장지방), subcutaneous fat pad (SFP, 피하지방), epididymal fat pad (EFP, 부고환지방), perirenal fat pad (PFP, 신장지방) 등 각 장기를 적출하여 그 무게를 측정하였다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 (주)바이오니아 동물실험윤리위원회의 승인하에 수행하였다

(3) Real-time PCR

RNA는 RNeasy Mini kit (Qiagen)와 RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen)를 이용하여 liver 및 white adipose tissue 각각 0.1 g으로부터 추출한 후, Accupower[®] RocketscriptTM Cycle RT Premix kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. qPCR은 합성된 cDNA를 template로 하여 Accupower[®]2X Greenstar qPCR Master Mix (Bioneer, Korea)을 이용하여 Exicycler (Bioneer, Korea)상에서 수행하였으며, 이때 사용된 primer 염기서열은 Table 1과 같다.

Table 1. Primer sequences of mouse mRNA

Target gene	Forward Primer (5'- 3')	Reverse Primer (5'- 3')
PPAR α	GTACGGTGTGTATGAAGCCATCTT	GCCGTACGCGATCAGCAT
PPAR δ	GCCATATTCCCAGGCTGTC	CAGCACAAGGGTCATCTGTG
CPT1	GTGACTGGTGGGAGGAATAC	GAGCATCTCCATGGCGTAG
ACO	GTGCAGCTCAGAGTCTGTCCAA	TACTGCTGCGTCTGAAAATCCA
UCP3	CCAGAGCATGGTGCCTTCGCT	CTCGTGTGAGCAGCAGTG
GLUT4	GGAAGGAAAAGGGCTATGCTG	TGAGGAACCGTCCAAGAATGA
SREBP-1c	ACGGAGCCATGGATTGCACA	AAGGGTGCAGGTGTCACCTT
ACC	ATGGGCGGAATGGTCTCTTTC	TGGGGACCTTGTCTTCATCAT
LPL	CCACAGCAGCAAGACCTTC	AGGGCGGCCACAAGTTTG
FAS	TGCTCCCAGCTGCAGGC	GCCCGGTAGCTCTGGGTGTA
Adiponectin	GAGATGCAGGTCTTCTGGTC	GCTCTCCTTTCCTGCCAG
TNF- α	AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA	GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG
ANGPTL4	AAAGAGGCTGCCGAGAT	TCTCCCAACCTGGAACA
β -Actin	GAGCGCAAGTACTCTGTGTG	CGGACTCATCGTACTCCTG

PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; PPAR δ , peroxisome proliferator-activated receptor δ CPT, carnitine palmitoyl-transferase; ACO, acyl CoA oxidase; UCP3, uncoupling proteins3; GLUT4, glucose transporter4; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding protein-1c; ACC, acetyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthetase; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ LPL, lipoprotein lipase; TNF- α , tumor necrosis factor- α

(4) Gut peptides 및 혈액 화학치 분석

혈청내 Adiponectin, ghrelin, GIP, GLP-1, glucagon, insulin, leptin 등의 gut peptides 는 Bio-Plex suspension array system (Luminex, Austin, USA)을 이용하여 분석하였으며, glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 등은 Clinical Analyzer 7020 (HITACHI, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

(5) 지방세포의 크기 분석

각 지방을 10% formalin으로 고정한 후 동결절편기를 이용하여 4 μ m로 절편하였고 haematoxylin과 eosin으로 염색하였다. 지방세포의 크기 분석을 위해 DIXI3000 (Leica, West Palm Beach, Germany)을 이용하여 지방 세포의 직경을 측정하였다.

(6) DGGE에 의한 장내 미생물 군집의 변화 조사

Lb. gasser BNR17의 투여가 고탄수화물식이로 비만이 유도된 동물의 장내세균 군집과 Lactobacilli 군집의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 일반식이군과 고탄수화물식이군, 그리고 고탄수화물식이 + BNR17(9)의 실험군에서는 4마리씩, 고탄수화물식이 + BNR17(10)의 실험군에서는 3마리씩 선정하여 맹장을 적출한 후 DGGE를 수행하고 염기서열 분석을 실시하였다. 맹장의 내용물로부터 Mobio Power soil isolation kit (MoBio

Laboratories, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출한 후, Table 2에 나와 있는 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Kyratec, Australia). PCR 조건은 total bacteria의 경우, GC338F와 518R primer를 사용하여 94°C에서 3분간 pre-denaturation 하고, 94°C에서 30초간 denaturation, 57°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension을 32회 반복한 뒤, 72°C에서 5분간 final extension을 하였으며, Lactobacilli의 경우, SGLAB0159f와 SGLAB0667을 사용하여 94°C에서 7분간 pre-denaturation 하고, 94°C에서 1분간 denaturation, 56°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 32회 반복한 뒤, 72°C에서 7분간 final extension을 하여 얻은 Lactobacilli PCR product를 1/100로 희석 후, 이를 template로 하여 DGGE를 위해 nested PCR 을 진행하였다 (GC338F와 518R primer를 사용하였으며 total bacteria 와 동일한 반응조건으로 PCR 진행).

Table 2. Primer sequences for DGGE

Group	Primer	Sequence (5' → 3')	Use
Total bacteria	GC338F	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCG	DGGE
	518r	GGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAG CAG	
Lactobacilli	SGLAB0159f	ATT ACC GCG GCT GCT GG	DGGE
	SGLAB0667	GGAAACAG(A/G)TGCTAATACCG	Real-time PCR
		CACCGCTACACATGGAG	

증폭된 PCR 산물을 이용하여 DGGE (Bio-rad, USA)를 수행하였다. Gel gradient는 total bacteria는 30%-60%, Lactobacilli는 30%-50% 로 진행하였으며 20 v에서 10분간 pre-loading후 80 v에서 840분간 loading 하였다. 그 후 1X SYBR green 으로 1시간 염색 후 관찰 하였다.

(7) Cloning을 통한 Lactobacillus 분포

균별로 장내에 존재하는 Lactobacilli 의 분포를 확인하기 위하여 Lactobacilli PCR후 PCR 산물을 이용하여 T&A Cloning (RBC, Taiwan)을 진행하였다. 그 결과로 얻은 colony 중 각 그룹별로 10개를 선택하여 universal primer 인 M13F, M13R primer 를 사용하여 94°C에서 7 분간 pre-denaturation 하고, 94°C에서 30초간 denaturation, 57°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension을 32 회 반복한 뒤,72°C에서 7분간 final extension 을 하여 얻은 PCR product를 서열분석하였다.

(8) 장내 미생물 중 Lactobacilli 의 정량

Lb. gasser BNR17이 장내 미생물 중의 Lactobacilli의 양적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 위 실험에서 추출한 genomic DNA를 10 ug으로 정량하여 real-time PCR(Exicycler, Bioneer, 한국)을 수행하였다. Lactobacilli genus의 16S rDNA에 특이적인 primer의 염기 서열은 Table 3에 나타내었으며, AccuPower Greenstar PCR PreMix(Bioneer, Korea)를 사용하였고, PCR 조건은 50°C에서 2분간 pre-denaturation 하고, 95°C에서 10분, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초간 45회 반복하였다.

(9) 통계처리

실험 결과는 모두 평균과 표준오차로 나타내었다. 실험군간 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 pairwise t test와 Wilcoxon rank sum test로 검증하였다.

나. 실험 결과

(1) 체중 및 지방조직 무게

Lb. gasseri BNR17을 섭취시킨 마우스의 체중 증가량, 식이 섭취량 및 각 지방을 포함한 장기 무게의 변화는 Figure 1, Figure 2 및 Table 3과 같다. 실험기간 동안의 체중 변화를 보면 일반식이군(ND)에 비해 고탄수화물식이군 (HSD)의 체중이 유의적으로 증가하였으며 (Figure 1과 Table 3), *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 군 (HSD+BNR17(9), HSD+BNR17(10))에서는 고탄수화물식이만 섭취한 군 (HSD)보다 체중 증가량이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이때 식이섭취량은 고탄수화물식이군과 *Lb. gasseri* BNR17 투여군 사이에서 유의적 차이가 없어 (Figure 2) 체중 감소가 식이섭취량이 아닌 *Lb. gasseri* BNR17 때문인 것으로 보인다.

혈액중 total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, glucose, triglyceride의 농도는 Table 3과 같다. *Lb. gasseri* BNR17의 투여 여부와 관계없이 고탄수화물식을 섭취한 세 군 모두 total cholesterol 및 LDL-cholesterol이 일반식이군에 비해 유의적으로 증가하였지만, *Lb. gasseri* BNR17의 투여에 의한 감소 효과는 나타나지 않았다. Glucose의 변화 역시 관찰할 수 없었다.

복부 지방과 피하 지방은 대표적인 비만 지방 조직으로서, 복부 지방은 인슐린 내당성이 나 심혈관 질환과 관련이 있고 피하 지방은 lipid profile과 연관이 있는 것으로 보고되어 있다. *Lb. gasseri* BNR17의 투여는 복부 지방 및 피하 지방 조직의 무게를 감소시키는 것으로 나타났는데, Figure 3의 CT image는 *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 군에서 피하 지방 및 내장 지방이 크게 감소한 것을 보여준다. Figure 4는 CT image상에 나타난 각 지방의 체적을 측정된 결과이며, *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 군의 경우, 각 지방의 체적이 유의적으로 감소함을 보여주었다. 내장 지방, 피하 지방, 부고환 지방, 신장 지방 등 각 지방 조직을 염색하여 image analyzer로 측정된 결과는 Figure 5, 6과 같다. 모든 지방세포에서 일반식이군에 비해 고지방식이군의 지방세포 크기가 유의적으로 증가된 것으로 나타났으며, *Lb. gasseri* BNR17 투여군에서는 고지방식이군에 비해 유의적으로 감소하였다. 본 연구에서는 이들 지방 조직의 세포 크기를 비교할 때 동일한 면적내에 보여지는 지방 세포의 크기를 측정하였기 때문에, *Lb. gasseri* BNR17 투여에 의해 지방 세포 크기가 작다는 것은 BNR17이 체지방 축적을 억제하여 지방 세포의 hypertrophy를 억제한 것으로 보여진다.

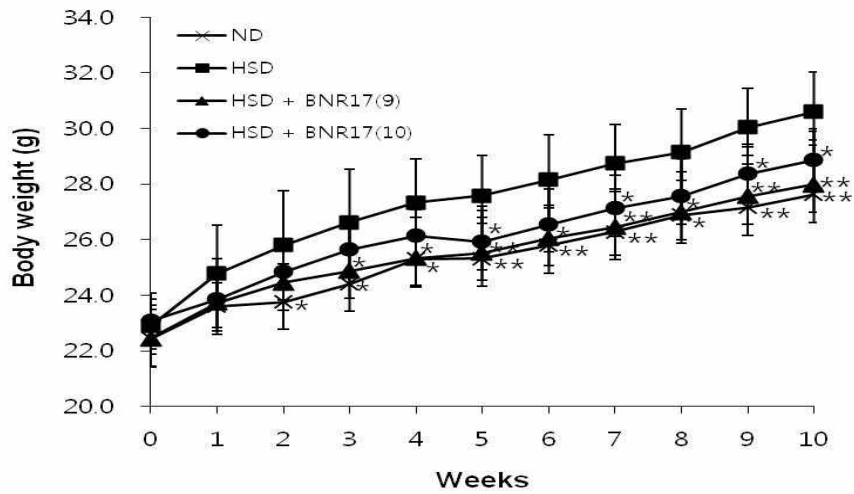


Figure 1. Change in body weight of C57BL/6J mice administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks. Data are means \pm SD. pairwise t test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus HSD group.

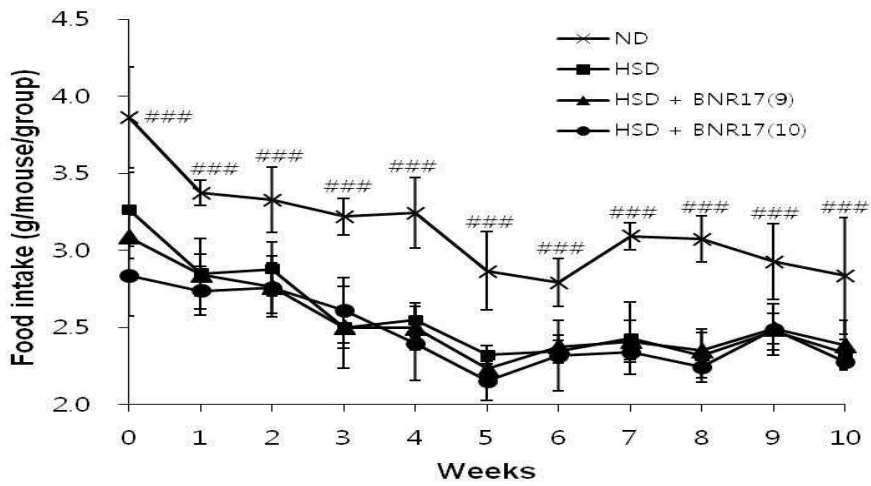


Figure 2. Change in food intake of C57BL/6J mice administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks. Data are means \pm SD. pairwise t test. ### $P < 0.001$ versus HSD group.

Table 3. Body weight, Fat weight and organs weight of mice fed ND, HSD or HSD containing *Lb. gasserii* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks.

	ND	HSD	HSD + BNR17(9)	HSD + BNR17(10)
Initial body weight (g)	22.41 ± 1.06	22.88 ± 1.20	22.44 ± 1.19	22.90 ± 0.77
Final body weight (g)	27.63 ± 1.77	30.59 ± 1.46**	27.98 ± 1.93##	28.35 ± 0.93 [#]
Food intake (g/mouse/day)	3.15 ± 0.20	2.57 ± 0.15***	2.58 ± 0.14***	2.47 ± 0.16***
Mesenteric fat pad (g)	0.27 ± 0.10	0.44 ± 0.10**	0.29 ± 0.08##	0.37 ± 0.05
Subcutaneous fat pad (g)	0.64 ± 0.10	1.15 ± 0.22***	0.73 ± 0.15###	0.95 ± 0.13**
Epididymal fat pad (g)	0.78 ± 0.17	1.11 ± 0.23**	0.80 ± 0.20##	0.87 ± 0.14
Perirenal fat pad (g)	0.43 ± 0.12	0.65 ± 0.14**	0.47 ± 0.14 [#]	0.55 ± 0.10
Liver weight (g)	1.16 ± 0.13	1.18 ± 0.09	1.01 ± 0.09*##	1.06 ± 0.15
Spleen weight (g)	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.02 [#]	0.16 ± 0.02
Kidney weight (g)	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Cholesterol	140.57 ± 12.88	192.00 ± 24.60**	177.63 ± 19.30**	188.18 ± 18.88**
HDL-cholesterol	69.22 ± 4.91	75.00 ± 4.60	79.28 ± 7.91*	79.32 ± 8.16
LDL-cholesterol	6.19 ± 0.95	18.2 ± 3.40**	16.47 ± 3.44**	18.34 ± 3.20**
Glucose	209.63 ± 30.29	204.00 ± 32.70	200.06 ± 62.73*	214.21 ± 56.52
Triglyceride	59.93 ± 25.27	24.60 ± 6.10	33.83 ± 13.17	29.22 ± 9.21

Data represent means ± SDs of 8 mice per group. pairwise t test: * P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus ND; [#] P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 versus HSD.

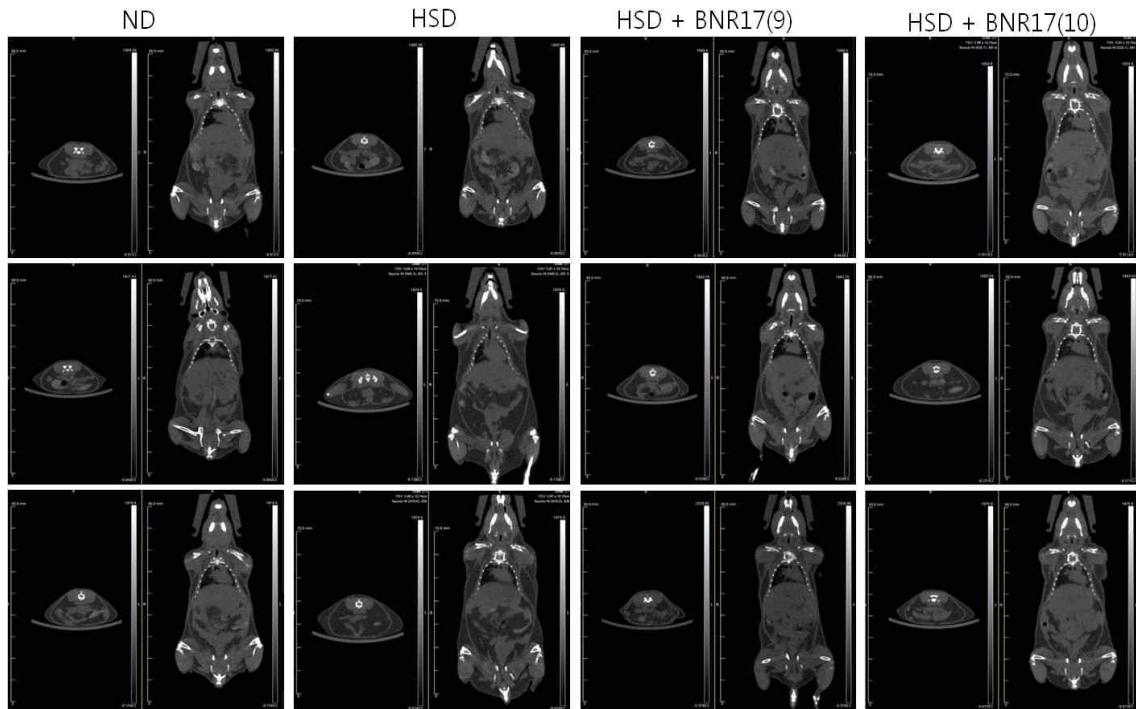


Figure 3. Representative CT scanning images of abdominal (left) and whole body (right) fat accumulation (in black) C57BL/6J mice.

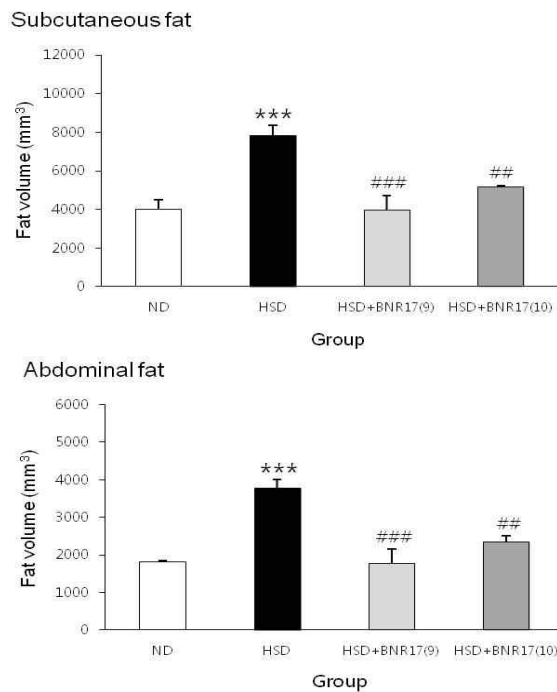


Figure 4. Fat volume of subcutaneous and abdominal fat of C57BL/6J mice administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks. Data are means \pm SD. pairwise t test. *** $P < 0.001$ versus ND group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ versus HSD group.

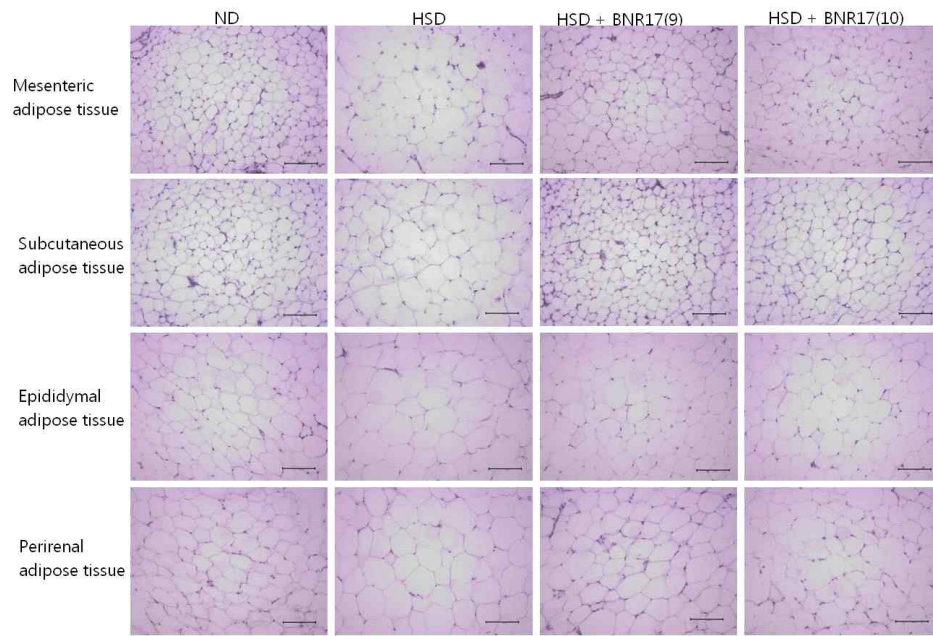


Figure 5. Representative adipose tissue staining images in C57BL/6J mice administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks.

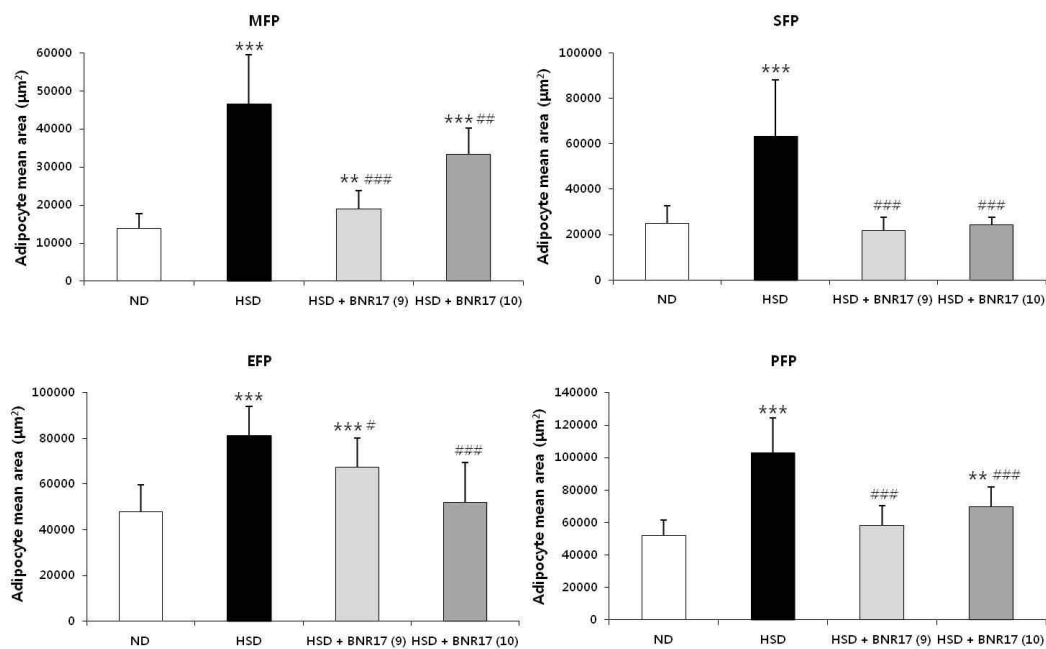


Figure 6. Adipocyte mean area (μm^2). Data are means \pm SD. pairwise t test. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus ND group; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ versus HSD group.

(2) 비만 및 당뇨 관련 유전자의 발현에 미치는 영향

Lb. gasseri BNR17이 비만 및 당뇨 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 real-time PCR로 분석하여 Figure 7과 8에 나타내었다. 먼저 liver에서 *Lb. gasseri* BNR17의 투여는 고탄수화물식이군 (HSD)에 비해 미토콘드리아에서의 fatty acid oxidation을 조절하는 효소인 ACO와 CPT1의 발현을 증가시켰으며, 또한 circulating lipoprotein lipase inhibitor로 알려져 있는 ANGPTL4의 발현도 증가시켰고, 이들의 발현을 조절하는 PPAR α 및 PPAR δ 유전자들의 mRNA 발현량 역시 크게 증가시킨 반면, 지방 합성에 관여하는 ACC 및 SREBP-1c의 mRNA 발현은 감소시키는 경향을 보였다. 그러나 지방산 합성에 관여하는 FAS에서는 오히려 고탄수화물식이군보다 유의적으로 증가하였으며, 또한 지방 조직에서 fat intake와 관련된 PPAR γ 와 LPL에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 이러한 결과들로 볼 때, *Lb. gasseri* BNR17의 항비만 효과는 지방산 합성이나 fat intake의 저해보다는 에너지 소비와 관련된 유전자의 발현을 조절하므로써 나타나는 것으로 사료된다.

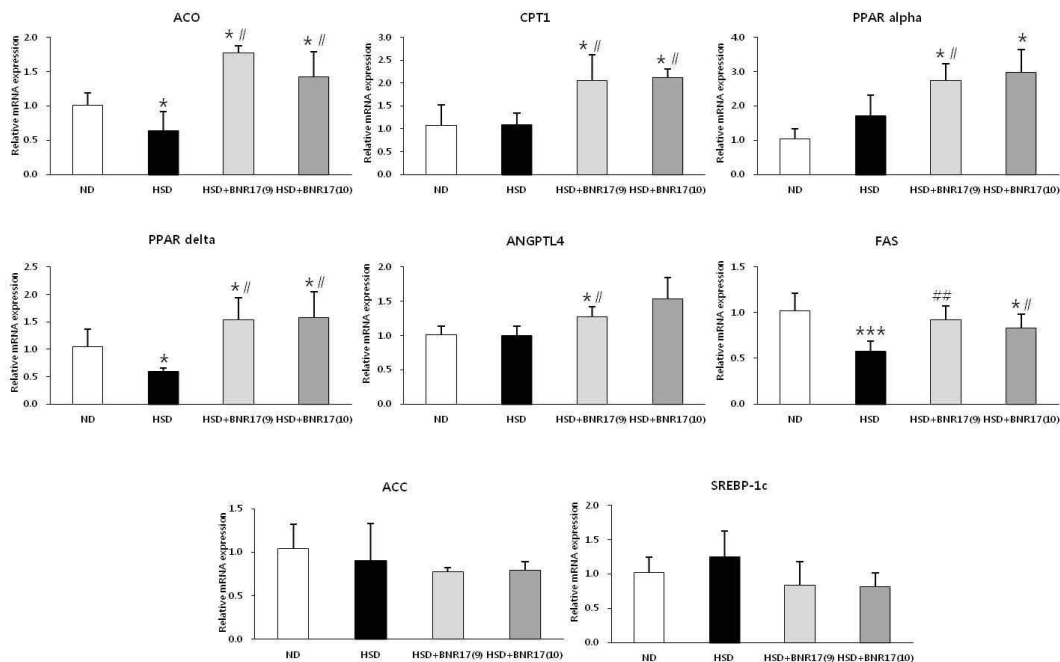


Figure 7. Effect of *Lb. gasseri* BNR17 on mRNA expression in the liver. C57BL/6J mice were given a ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks. The liver was removed and mRNA expression was measured by real-time RT-PCR using β -actin as a housekeeping gene. Data are means \pm SD. pairwise t test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus ND group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ versus HSD group

Lb. gasseri BNR17 투여군 (HSD+BNR17(9), HSD+BNR17(10))의 지방 조직에서 GLUT4의 mRNA 발현량이 고탄수화물식이군보다 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다 (Figure 8). GLUT4는 가장 중요한 포도당 수송체로서 근육으로의 포도당 수송을 증가시켜 포도당 소비를 촉진키므로써 혈당을 낮춘다. 주로 근육이나 지방 조직에서 발현

되는데, 그 중 지방 조직에서의 발현은 인슐린 내성이나 제 2형 당뇨병과 관련이 있는 것으로 보고되어 있으며, 따라서 이 실험 결과는 *Lb. gasseri* BNR17이 GLUT4의 발현에 관여한다는 것을 보여주고 있다.

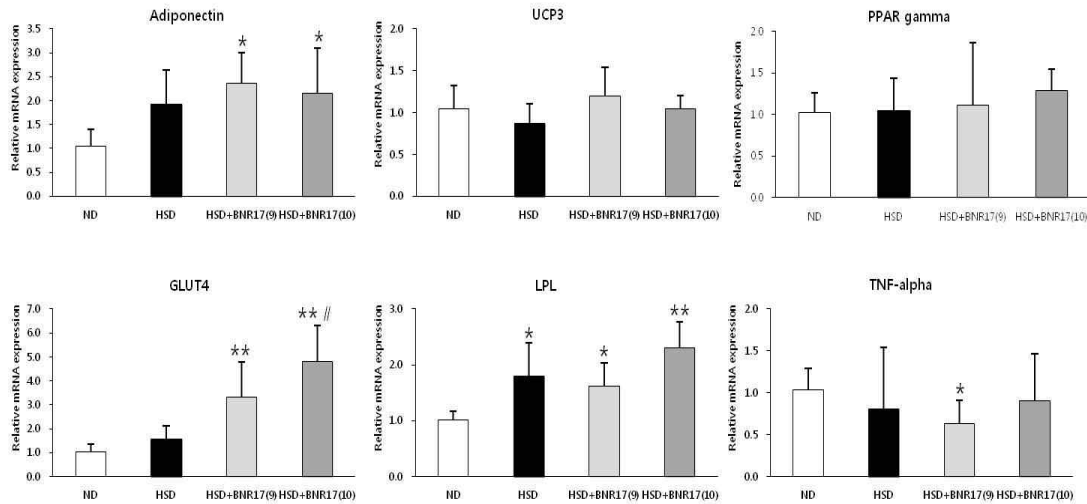


Figure 8. Effect of *Lb. gasseri* BNR17 on mRNA expression in the white adipose tissue. C57BL/6J mice were given a ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks. The white adipose tissue was removed and mRNA expression was measured by real-time RT-PCR using β -actin as a housekeeping gene. Data are means \pm SD. pairwise t test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus ND group; # $P < 0.05$ versus HSD group.

(3) 혈청 중 leptin과 insulin에 미치는 영향

Lb. gasseri BNR17이 비만 및 당뇨 관련 peptides의 농도에 미치는 영향을 Bio-plex system을 통해 조사하였다 (Figure 9). 본 연구에서 혈중 leptin의 경우, 고지방식이군에서 일반식이군에 비해 유의적으로 증가하였으나, *Lb. gasseri* BNR17에 의해 감소하는 것으로 나타났다. Leptin은 식욕과 에너지 소비를 조절하므로써 체중 증가에 관여하는 adipocyte hormone으로써, 비만일 경우 그 농도가 증가하며 피하 지방 세포는 leptin의 주요 발현원으로 알려져 있다. 따라서 *Lb. gasseri* BNR17에 의한 체중 및 피하지방 등 지방 조직 무게의 증가 억제는 leptin의 감소와 관련 있는 것으로 보인다. 한편 insulin은 섭취중추를 직접적으로 자극하여 음식물 섭취량을 증가시키므로써 지방 합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 조사 결과, 일반식이군에 비해 고탄수화물 식이군에서 insulin의 농도가 유의적으로 증가하는 고인슐린증 (hyperinsulinemia)을 보였으나, *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 군에서는 insulin의 농도가 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다.

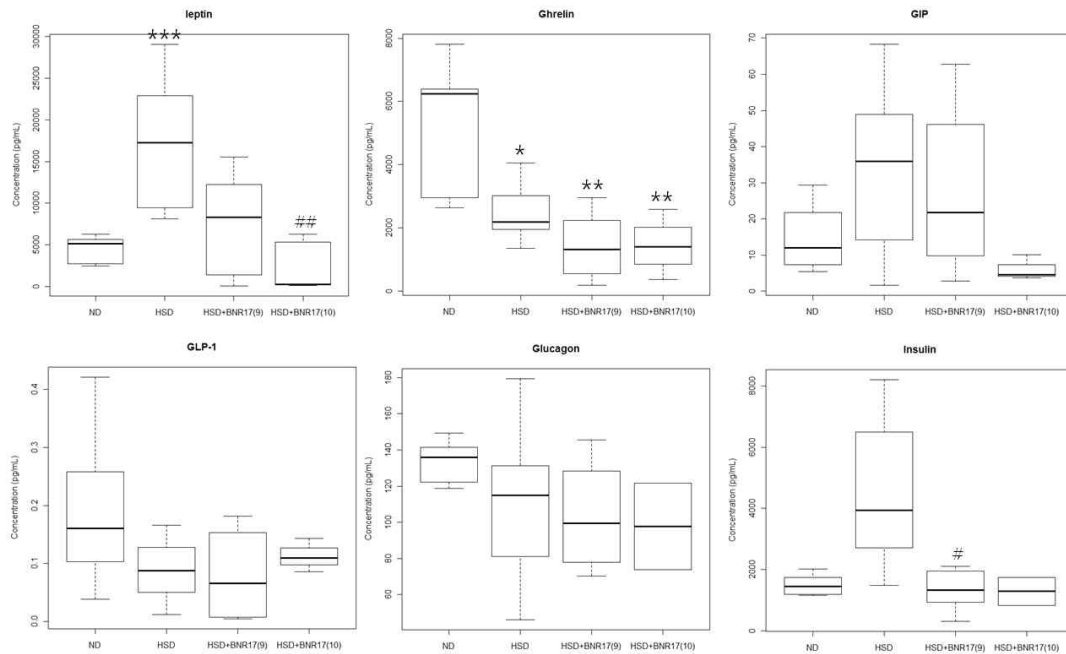


Figure 9. Effect of *Lb. gasseri* BNR17 on the endocrine hormones. C57BL/6J mice were given a ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks. The serum was obtained by centrifugation of whole blood and analyzed. Data are means \pm SD. GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GLP, glucagon-like peptide. Wilcoxon rank sum test. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus ND group; # P < 0.05 versus HSD group.

(4) 장내미생물의 군집 분석

DGGE에 의한 장내미생물의 양상을 살펴보기 위해 GC-clamp를 함유한 primer를 이용하여 PCR을 한 결과, total bacteria의 경우 약 500 bp의 PCR 산물을 얻었으며 Lactobacilli의 경우 약 124 bp의 PCR 산물을 얻었다. 이들을 이용하여 DGGE를 수행한 결과는 Figure 10과 11에 나타내었다. 분석 결과, total bacteria의 경우, 일반식이를 투여한 실험군에 비해 고탄수화물식이를 섭취한 실험군들에서는 변화가 있었으나, *Lb. gasseri* BNR17을 섭취한 실험군들 내에서 *Lb. gasseri* BNR17에 의한 차이는 볼 수가 없었다 (Figure 10). 그러나, Lactobacilli에서는 *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 실험군의 경우, 일반식이와 고지방식이 투여군과 비교했을 때 차이가 있는 밴드를 확인할 수 있었다 (Figure 11). 따라서, 실험군별로 한 개체씩에 대해 Lactobacilli에 대한 PCR을 수행한 후 이를 cloning하여 각 개체당 10개의 샘플을 염기서열 분석하고 동정한 결과 (Table 4), 일반식이군과 고탄수화물식이군에서 우점종으로 나타난 *Lb. apodemi*가 *Lb. gasseri* BNR17을 투여한 실험군에서는 사라진 것으로 나타났으며, 대신 *Lb. gasseri*가 새로운 우점종이 되는 것으로 나타났다.

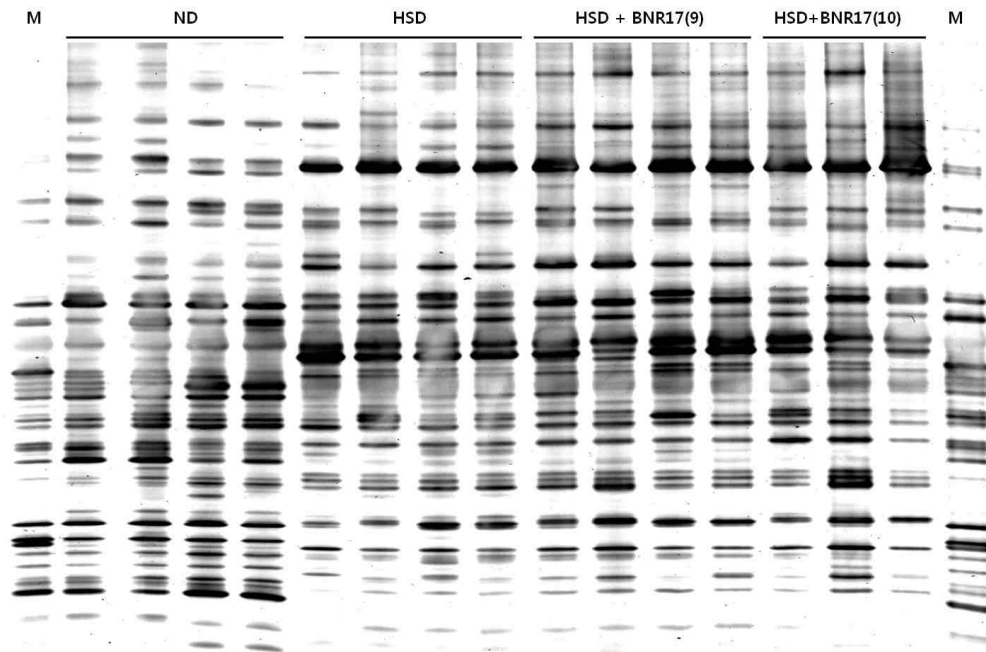


Figure 10. Analysis total bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in mice administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks.

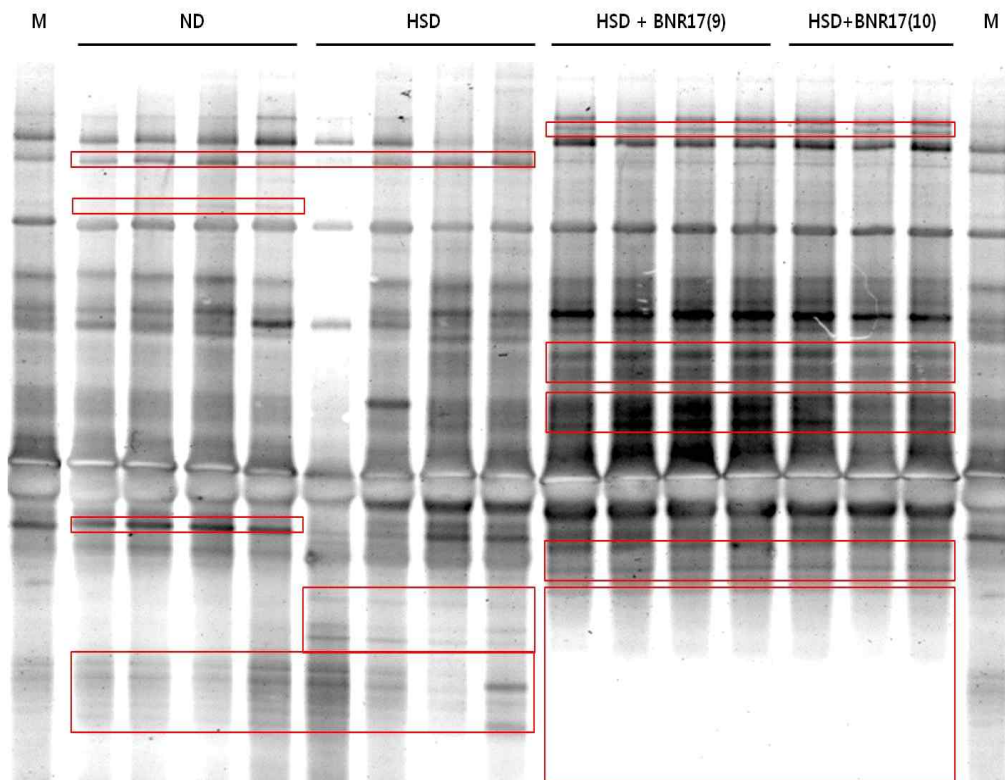


Figure 11. Analysis Lactobacilli by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in mice administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks. Different bands between groups were marked in red box.

Table 4. Identification of dominant bacteria in gut of mice administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks.

Group	No.	Closest relative	Accession No.	% Similarity
ND	1	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	99.5
	2	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
	3	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
	4	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
	5	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
	6	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
	7	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	99.5
	8	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
	9	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
	10	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
HSD	1	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
	3	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100
	5	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	99.5
	6	<i>Turicibacter sanguinis</i>	AF349724	93.7
	7	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	99.5
10	<i>Lactobacillus apodemi</i>	AJ871178	100	
HSD + BNR17(9)	1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
	2	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
	4	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
	4	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
	6	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
	7	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
	8	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
	9	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
	10	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
	HSD + BNR17(10)	1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413
2		<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
3		<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
4		<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
5		<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
6		<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
7		<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
8		<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	99.5
9		<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100
10		<i>Lactobacillus gasseri</i>	CP000413	100

(5) 장내 미생물 중 Lactobacilli의 정량

실험군들의 장내 Lactobacilli spp. 정량 분석한 real-time PCR 그래프는 Figure 12와 같으며, 이를 토대로 DNA copy수를 정량한 결과는 Table 5와 같다. 실험 결과, 일반식이군과 고탄수화물식이군에서 비슷한 수준의 Lactobacilli가 정량되었으며, BNR17 투여군끼리 비슷한 수준으로 정량되었는데, 이들간의 차이는 1000 ~ 3000 배 정도인 것으로 나타나 DGGE 결과와 같음을 볼 수 있었다. 이들의 결과로 볼 때, *Lb. gasseri* BNR17의 투여는 장내 미생물 군집 중 Lactobacilli의 증가를 일으키는 것으로 확인되었다. 이러한

양적 증가가 *Lb. gasseri* BNR17이 장내에 잘 부착하므로써 일어난 변화인지, 혹은 *Lb. gasseri* BNR17의 투여가 다른 Lactobacilli의 증식을 촉진시킨 것인지에 대한 조사는 좀 더 이루어져야 할 것으로 보인다.

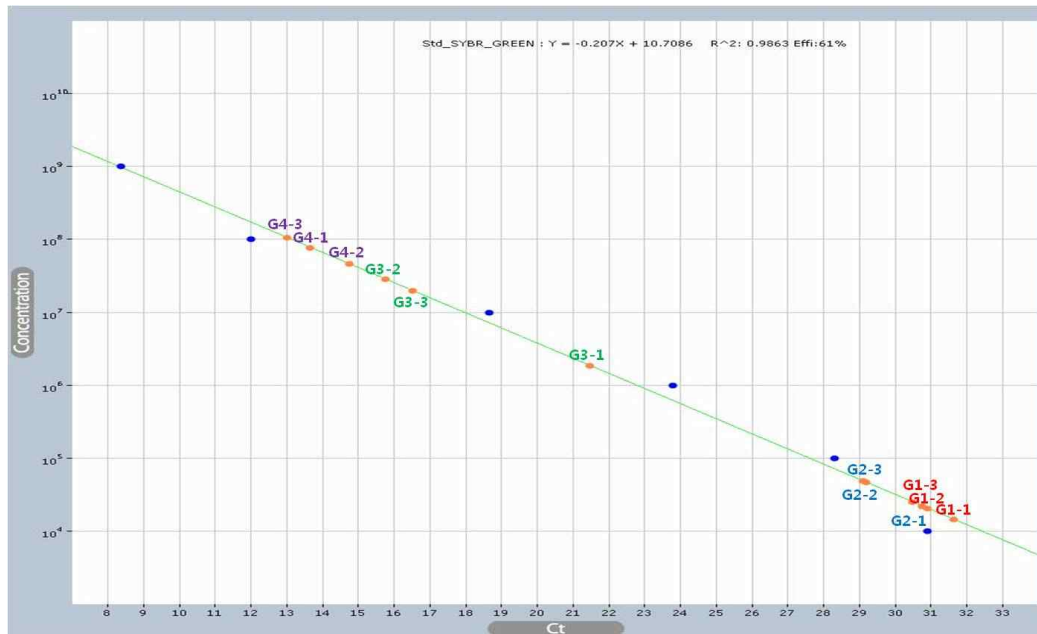


Figure 12. Real-time PCR graph of Lactobacilli detected in gut of mice administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks. G1-1, 2, 3 are belongs in ND group, G2-1, 2, 3 are belongs in HSD group, G3-1, 2, 3 are belongs in HSD+BNR17(9) group, G4-1, 2, 3 are belongs in HSD+BNR17(10) group.

Table 5. Lactobacilli detected from gut of mice administered with ND, HSD or HSD containing *Lb. gasseri* BNR17 (10^9 CFU or 10^{10} CFU) for 10 weeks by real-time PCR

Group	Animal No.	Ct	Copy number of amplified DNA	Average of copy number
ND	1	31.64	1.44E +04	1.90E +04
	2	30.89	2.06E +04	
	3	30.74	2.21E +04	
HSD	1	30.46	2.53E +04	4.01E +04
	2	29.09	4.86E +04	
	3	29.19	4.64E +04	
HSD + BNR17(9)	1	21.46	1.85E +06	1.66E +07
	2	15.74	2.82E +07	
	3	16.5	1.96E +07	
HSD + BNR17(10)	1	13.65	7.64E +07	7.53E +07
	2	14.73	4.56E +07	
	3	12.99	1.04E +08	

다. 결론 및 고찰

- (1) 본 연구에서 고탄수화물식이 일반식이에 비해 유의적으로 체중과 지방 무게를 증가시키므로써 비만을 유도하였다.
- (2) *Lb. gasseri* BNR17의 투여는 식이섭취량의 차이 없이 고탄수화물식이군에 비해 체중을 유의적으로 감소시켰다.
- (3) 복부 지방 및 피하 지방의 무게도 *Lb. gasseri* BNR17 투여군의 경우 거의 증가하지 않아 일반식이군과 유사한 정도의 무게를 가지는 것으로 나타났다.
- (4) 내장 지방, 피하 지방, 부고환 지방, 신장 지방 등의 모든 지방 조직의 세포 크기가 *Lb. gasseri* BNR17 투여군에서 유의적으로 크게 감소였으며, 이는 *Lb. gasseri* BNR17이 지방 세포의 hypertrophy를 억제하는 것으로 보인다.
- (5) 비만 및 당뇨 관련 유전자의 발현을 살펴보았을 때, fatty acid oxidation에 관여하는 유전자의 발현을 유의적으로 증가시켰으나, 지방산 합성이나 fat intake와 관련된 유전자의 발현에는 변화가 없거나 증가폭이 유의적이지 않았다. 따라서, *Lb. gasseri* BNR17의 항비만 효과는 지방산 합성이나 fat intake의 저해보다는 지방산 산화로 인한 에너지 소비와 관련된 유전자의 발현을 조절하므로써 나타나는 것으로 사료된다.
- (6) *Lb. gasseri* BNR17 투여군의 지방 조직에서, 중요한 포도당 수송체인 GLUT4의 mRNA 발현량이 고탄수화물식이군보다 유의적으로 증가하는 것으로 나타나, *Lb. gasseri* BNR17이 항당뇨 효과를 가짐을 보여준다.
- (7) 본 연구에서 혈중 leptin과 insulin이 *Lb. gasseri* BNR17에 의해 감소하는 것으로 나타나, BNR17에 의한 체중 및 지방 조직 무게의 증가 억제는 leptin이나 insulin의 감소와도 관련 있는 것으로 보인다.
- (8) 본 연구에서, BNR17을 10^9 CFU 투여한 실험군과 10^{10} CFU를 투여한 실험군 사이에서 각 바이오마커들의 차이가 나타나지 않아 BNR17의 효과가 용량 의존적으로 나타나지 않았는데, 이러한 결과는 당뇨 형질 전환쥐인 *db/db* 마우스를 이용하여 용량 의존적인 항당뇨 효과를 조사한 이전 실험과 차이를 보이는 점이다.

※ 비만은 당뇨 발병의 주요 위험인자이며, 과도한 에너지 섭취는 제2형 당뇨에 있어 원활하지 않은 혈당 조절에 대한 주요 인자로 간주됩니다. 체중조절과 제2형 당뇨에 대한 메타분석결과, 비만과 체중증가는 당뇨의 위험을 9배 이상 증가시키는 것으로 보고되었습니다. (J Am Coll Nutri 22(5), 331-339, 2003). 비만인에서는 인슐린저항과 인슐린 분비의 결함이 일찍 발생하는 것으로 보고되었고 전반적인 지방의 증가뿐만 아니라 특히 복부지방의 증가는 인슐린 저항성과 연관되는 것으로 보고되었습니다. (Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 19(4), 649-663, 2005). 따라서 혈당조절과 체지방과의 상관관계를 고려하여 본 동물시험에서는 고 탄수화물식으로 비만을 유도한 후, 혈당관련 지표와 더불어 체지방 관련 지표를 측정하였고 혈당과 더불어 체지방의 개선효과를 확인할 수 있었습니다. 따라서 후속 인체 연구로는 혈당 조절능을 평가하는 인체연구 (아래 인체적용시험의 실험 1 및 실험 2)를 수행하였고, 본 동물시험에서 도출된 유의적인 체지방 감소효과는 식약처에 개별인정 신청을 통하여 3등급 개별인정을 획득하였습니다. 본 연구의 주목표가 혈당 조절능 평가임을 고려하여 2건의 동물시험과 2건의 인체시험을 통하여 혈당 조절능을 평가하였고, 본 연구의 수행과 더불어 확인된 체지방연구는 개별인정 획득의 성과를 가져올 수 있었습니다.

제 3 절. 인공위액 및 선택배지 실험

I. 인공위액 실험

가. 실험방법

(1). 배양액 준비

배양액은 다음과 같이 2가지로 진행하였다. 하나는 증류수 1L를 1M HCl을 이용하여 pH2로 맞춘 MRS broth (10g propeose peptone, 10g beef extract, 5g yeast extract, 20g dextrose, 1g polysorbate 80, 2g ammonium citrate, 5g sodium acetate, 0.1g magnesium sulfate, 0.05g manganese sulfate, 2g dipotassium phosphate)를 121 °C, 15분 동안 멸균하였다. 이 액을 식힌 다음 일정량을 덜어 0.013g pepsine를 넣고 vortexing 한 후 멸균된 membrane을 통해 필터한 다음 MRS broth에 첨가하였다. MRS는 유산균을 배양하는 최적의 배지이므로 식 후(A)라고 가정하였다. 다른 하나는 증류수 1L를 1M HCl을 이용하여 pH2로 맞춘 후 2.05g NaCl, 0.6g KH₂PO₄, 0.11g CaCl₂, 0.37g KCl를 첨가하여 121 °C, 15분 동안 멸균하였다. 이 액을 식힌 다음 일정량을 덜어 0.013g pepsine를 넣고 vortexing 한 후 멸균된 membrane을 통해 필터한 다음 본 액에 첨가하였다 (Microbiology(2007) 153:291-299). 이 배양액은 위액에 가장 기본적인 성분인 인공위액으로 식 전(B)이라고 가정하였다.

(2). 배양

Lactobacillus gasseri BNR17을 MRS broth(difco)에 37°C 24시간 배양한 다음 각각의 준비된 배양액의 1% 씩 접종한 후 37°C 인큐베이터에서 2시간동안 배양하였다. 처리 전 균 수와 처리 후 균 수를 측정하기 위해 1ml 균 배양액을 9ml saline 용액으로 희석하여 MRS agar plate에 도말한 다음 37°C에서 24시간 배양 후 균 수 측정을 하였다.

나. 실험결과 및 고찰

처리 후 실험군 A에서는 처리 전 균 수보다 10배가량 증가한 반면, 실험군 B에서는 처리 전 균 수보다 10배가량 감소하였다 (Table 1). 실험군 A에 사용된 배지는 유산균 최적의 배양 배지이고 다른 균보다 산에 강한 유산균이므로 pH 2 임에도 불구하고 균이 증식하는데 있어서 도움을 준 것으로 판단된다. 그래서 기존의 실험 결과(2007년)에서 처리 전과 처리 후의 균수가 차이를 보이지 않았던 것도 MRS가 사용되었기 때문이라고 사료된다.

Table 1. Survival of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in stimulate gastric juice pH2

sample	처리 전 균수	처리 후 균수	
		MRS+pepsin (pH2) 식 후 가정 (A)	NaCl+KH ₂ PO ₄ +CaCl ₂ +KCl+pepsine (pH2) 식 전 가정 (B)
1	5.5*10 ⁶ cfu/ml	2*10 ⁷ cfu/ml	2*10 ⁵ cfu/ml
2	5.8*10 ⁶ cfu/ml	4*10 ⁷ cfu/ml	5.5*10 ⁵ cfu/ml
평균	5.6*10 ⁶ cfu/ml	3*10 ⁷ cfu/ml	3.8*10 ⁵ cfu/ml

펩시노젠 (비활성형)이 위속 염산과 작용해서 분자 일부가 제거되고 남은 부분이 펩신 (활성형)으로 만들어지게 된다. 실험에 사용된 펩신의 양은 421 unit 이며 음식물의 양과 질에 따라 차이가 있지만 소화관에서 3~4시간 소화되면서 더 많은 양의 효소와 다양한 소화효

소가 있다. 그러므로 실질적으로 식 전 섭취 시에는 여러 소화요소에 의해 균 수 감소가 100 배 이상 더 클 것이고 식 후 섭취 시에는 식 전 섭취 시보다 균 수 감소가 적을 것으로 예상된다.

2007년도와 이번에 진행한 실험을 비교해 보면 유산균 배양 시 필요한 영양분 (MRS 배지)이 있을 때와 없을 때 분명히 균 수 차이가 적어도 100배가량은 있다. 동물 실험 결과에서도 10^9 cfu/g 미만에서는 효능이 없다고 판단되어지므로 식 전에 섭취하는 것보다 통상적인 유산균 섭취방법인 식 후에 섭취하는 것이 적어도 섭취량만큼의 균 수를 확보할 수 있을 것이라 사료된다.

II. 항생제 배지 농도 설정 실험

가. 실험방법

(1) 종균 분양

요구르트 제조시 많이 쓰이는 종균 *S.thermophilus*(KCTC3779), *L. bulgaricus*(KCTC3635)를 KCTC로부터 분양을 받았다.

(2) 항생제 디스크 선택

Lb. gasseri BNR17, *S.thermophilus*, *L. bulgaricus*를 MRS 배지에 각각 overnight한 후 그 배양액의 1%를 멸균하여 식힌 0.8% agar에 첨가한 다음 MRS 고체 배지 위에 pour하여 균한다. 항생제 디스크 B10: bacitracin 10unit, N30: neomycin 30mcg, NA30: nalidixic acid 30mcg, S10: streptomycin 10mcg, PB 300: polymyxin B 300unit, K30: kanamycin 30mcg, YMP5: trimethoprim 5mcg (BD, USA) 를 사용하였고 항생제 디스크는 멸균된 핀셋을 이용하여 준비한 plate에 살포시 올려놓는다. 37°C 인큐베이터에 48 시간 배양한 다음 디스크 주위에 생긴 환의 길이를 측정한다.

(3) 내성이 있는 항생제 농도 설정

Overnight 한 *Lb. gasseri* BNR17, *S.thermophilus*, *L. bulgaricus*의 각각 1%를 0.8% agar를 멸균하여 식힌 다음 첨가하여 준비된 MRS 고체 배지 위에 pour한다. kanamycin(0.6mg/ml), neomycin (0.6mg/ml), polymyxin (4038unit/ml)의 solution을 만든 다음 각각을 항생제 디스크 (BD) 농도만큼 1/2 dilution 한다. 디스크 종이를 멸균한 후 핀셋으로 준비된 plate에 올려놓은 다음 각각의 항생제 kanamycin, neomycin, polymyxin B를 농도별로 50 μ l씩 적신다. 37°C 인큐베이터에 48 시간 배양한 다음 디스크 주위에 생긴 환을 확인한다.

(4) 혼합균주 중 *Lb. gasseri* BNR17의 생균 확인

Kanamycin(Sigma), polymyxin B(Sigma)를 각각 stock solution 50 μ g/1ml 을 만든 후 멸균 필터로 filtration 한 다음 멸균한 490ml MRS 고체배지를 식힌 후 kanamycin 146 μ g/1ml, polymyxin B 800unit/1ml 가 되도록 각각 첨가하고 나머지는 멸균수를 넣어 500ml을 맞추어 petri dish에 분주한다. 단일균주는 MRS 액체배지에서 overnight한 BNR17, *S.thermophilus*, *L.bulgaricus*를 각각의 1ml을 멸균 식염수 9ml에 serial dilution 하고, 혼합균주는 *Lb. gasseri*

BNR17, *S.thermophilus*, *L. bulgaricus*의 각각 1ml을 취한 다음 총 3ml 중 1ml을 멸균 식염수 9ml에 serial dilution 한다. 준비한 단일 균주와 혼합 균주를 항생제 고체 배지에 도말한 후 37°C 인큐베이터에 48 시간 배양한 다음 생균수를 확인한다.

나. 실험결과

(1) 항생제 디스크 주위의 환 길이 측정

NA30 (nalidixic acid 30 mcg), TMP5 (trimethoprim 5 mcg)는 *Lb. gasseri* BNR17, *S.thermophilus*, *L.bulgaricus* 3균주 모두 디스크 주위에 어떠한 환도 생기지 않았다. *Lb. gasseri* BNR17만 K30 (kanamycin 30mcg), N30(neomycin 30 mcg), PB300 (polymyxin B 300unit)의 3개의 디스크 주위에 환이 생성되지 않았고 *S.thermophilus*, *L.bulgaricus* 는 환이 생성 되었다. K30, N30, PB300에서 요구르트 종균으로 많이 사용되는 *S.thermophilus*와 *L.bulgaricus*으로부터 *Lb. gasseri* BNR17의 생균여부를 알 수 있음을 확인하였다. (figure 1. table 2)

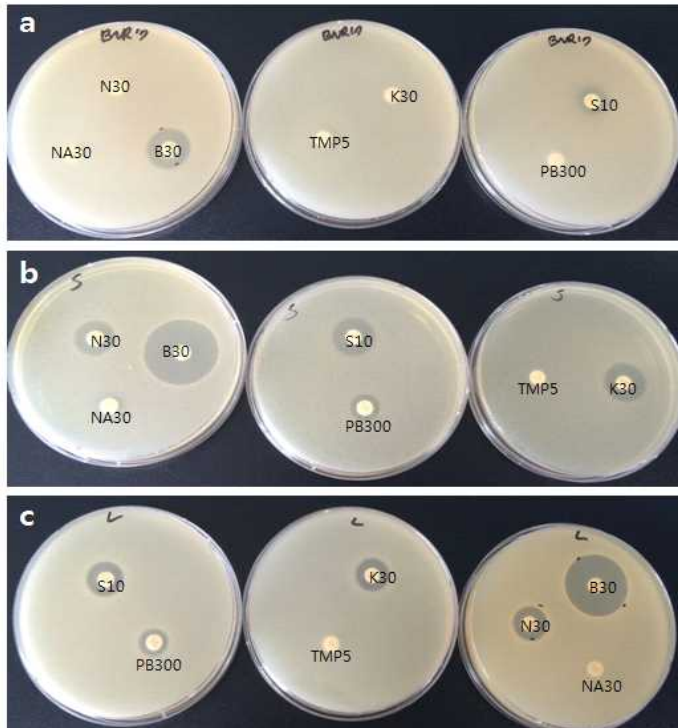


Figure 1. Antibiotic susceptibility test (a:BNR17, b:S.thermophilus, c:L.bulgaricus)

Table 2. Measuring clear zones

환 지름(mm)	BNR17	S.thermophilus	L.bulgaricus
B10	16	29	27
N30	0	15	15
NA30	0	0	0
S10	11	17	14
PB300	0	12	11
K30	0	17	14
TMP5	0	0	0

B10:bacitracin 10unit, N30:neomycin 30mcg, NA30: nalidixic acid 30mcg, S10:streptomycin 10mcg, PB 300: polymyxin B 300unit, K30 : kanamycin 30mcg, YMP5:trimethoprim 5mcg

(2) 내성이 있는 항생제 농도 설정

BNR17에서만 kanamycin ($7.5 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$), neomycin ($7.5 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$), polymyxin B ($62.5 \text{ unit}/50 \mu\text{l}$)에서 내성이 있음을 확인하였다. (figure 2.)

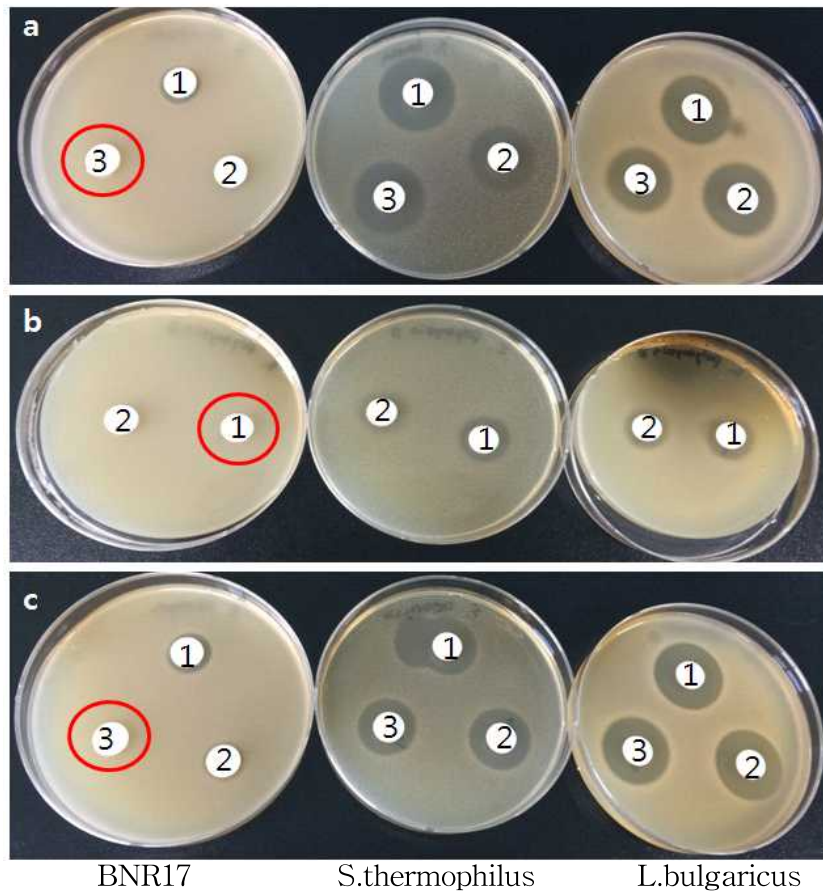


Figure 2. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs). a: kanamycin(1: $30 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, 2: $15 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, 3: $7.5 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$), b: polymyxin B (1: $62.5 \text{ unit}/50 \mu\text{l}$, 2: $31.25 \text{ unit}/50 \mu\text{l}$), c: neomycin(1: $30 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, 2: $15 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, 3: $7.5 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$)

(3) 혼합균주 중 BNR17의 생균 확인

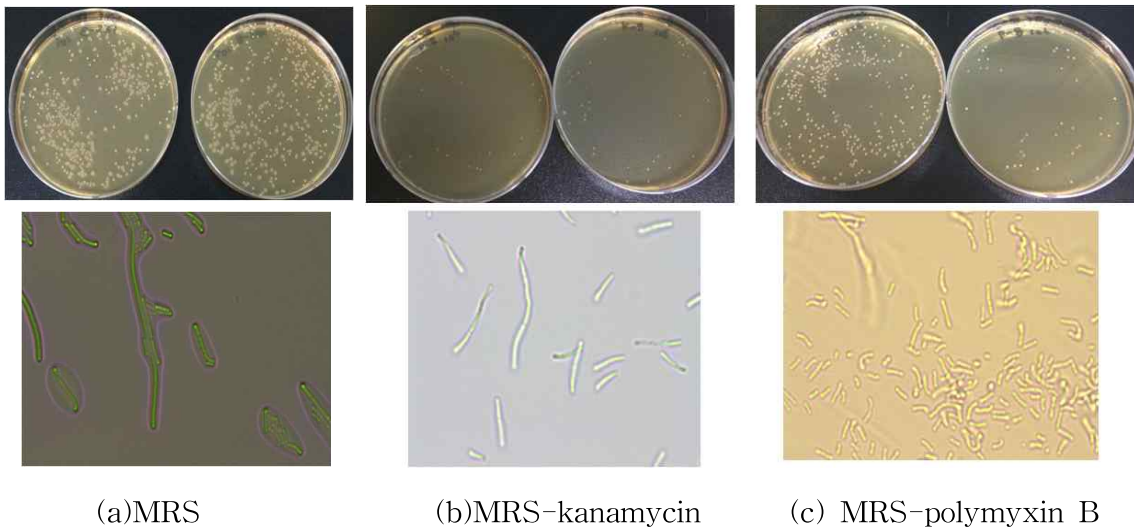
MRS에서 *Lb. gasseri* BNR17을 배양한 후 측정된 생균수와 각각의 BNR17, *S.thermophilus*, *L.bulgaricus*를 배양한 후 혼합하여 한 후 MRS-P와 MRS-K에서 확인된 생균수와 같다 (Table 3.). 이로 인해 요구르트에서 혼합배양 후 MRS-P와 MRS-K 항생제 선택배지를 사용하면 BNR17의 생균 수를 확인할 수 있을 것이라 사료된다. MRS-N($7.5 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$)은 BNR17의 생균수가 MRS에서 보다 10가량 적었고, *S.thermophilus*는 콜로니가 육안으로 관찰됨으로 neomycin은 선택배지로서 실험을 중단하였다.

Table 3. Viable cell count on antibiotic media

구 분	<i>Lb.gasseri</i> BNR17	<i>S.thermophilus</i>	<i>L.bulgaricus</i>	3균주 혼합
MRS	3.4×10^8	1.1×10^8	5.5×10^7	5.7×10^8
MRS-Kanamycin (7.5 μ g/50 μ l)	4.0×10^8	10 ³ NOT	10 ³ NOT	3.9×10^8
MRS-Neomycin (7.5 μ g/50 μ l)	2.6×10^7	1×10^4	10 ³ NOT	1.26×10^8
MRS-Polymyxin B (50unit/50 μ l)	6.1×10^8	10 ³ NOT	10 ³ NOT	6×10^8

MRS-K배지에서 자란 BNR17을 육안으로 콜로니 관찰시 MRS 배지의 콜로니보다 작은 형태였다. MRS-P배지에서 자란 BNR17의 콜로니를 현미경(Nikon, X1000)으로 관찰한 결과 MRS배지에서 관찰된 균체보다 사이즈가 거의 짧은 형태로 관찰되었고, 두 항생제 배지에서 자란 BNR17은 MRS에서 배양한 것보다 엉김 현상이 덜 하였다 (Figure 3). *S.thermophilus*와 *L.bulgaricus* 는 항생제 MRS-K와 MRS-P 배지에서 콜로니 확인을 할 수 없었으므로 사진을 첨부하지 않았다.

Figure 3. colony observation of BNR17 on microscope



III. 요구르트 발효 후 항생제 배지 실험

가. 실험방법

(1). 항생제 배지에서 *Lb. gasseri* BNR17 확인

Kanamycin(Sigma), polymyxin B(Sigma)를 각각 stock solution 50 $\mu\text{g}/1\text{ml}$ 을 만든 후 멸균필터로 filtration 한 다음 멸균한 490ml MRS 고체배지를 식힌 후 kanamycin 146 $\mu\text{g}/1\text{ml}$, polymyxin B 800unit/1ml 가 되도록 각각 첨가하고 나머지는 멸균수를 넣어 500ml을 맞추어 petri dish에 분주한다. MRS 액체배지에서 overnight한 *Lb. gasseri* BNR17, *S.thermophilus* (KCTC3779), *L.bulgaricus* (KCTC3635)를 각각 원심 분리기를 이용하여 셀 다운을 시킨 후 상등액을 버리고 0.5g씩 pellet의 무게를 재어 BNR17와 *S.thermophilus* (B+S), *Lb. gasseri* BNR17와 *L.bulgaricus* (B+L), *S.thermophilus*와 *L.bulgaricus* (S+L)를 100ml 우유에 첨가하여 설탕 1g과 함께 잘 믹스한다. 또한 세 균주 *Lb. gasseri* BNR17와 *S.thermophilus* 그리고 *L.bulgaricus*(B+S+L)를 동량을 사용하여 1g을 만들어 100ml 우유에 첨가하여 설탕 1g과 함께 잘 믹스한다. 요구르트 배양기 (Deni, USA)에 각각 넣고 10시간 동안 배양한다. 3시간 마다 각각을 serial dilution 하여 MRS배지와 항생제 배지에 도달한 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 인큐베이터에서 48시간 배양 후 생균수 측정 및 현미경 관찰을 한다.

나. 실험 결과

(1). *Lb. gasseri* BNR17 우유 발효 조건

Lb. gasseri BNR17은 설탕 없이 우유에서 요구르트로 진행되지 않았으며 설탕의 농도 0.5%, 1.0%에서 요구르트 진행이 되었다. *Lb. gasseri* BNR17은 당을 필요로 함을 재차 확인하였다.

(2).요구르트 제조 후 *Lb. gasseri* BNR17 확인

요구르트 배양기에서 배양한 결과 순두부 같은 형태로 요구르트 제형이 B+L, B+S, L+S, B+L+S에서 모두 확인 되었고 (figure 4), 요구르트 발효가 끝난 시간인 10시간째 생균수는 0시간 짜 생균수와 비슷하였다(Table 4). 최종 pH 측정 결과 B+L는 pH 3.93, B+L+S는 pH3.95로 B+S와 L+S보다 낮은 것으로 보아 lactobacillus 계열이 많을수록 pH를 낮추는 영향이 큰 것으로 보여진다. *Lb. gasseri* BNR17 단일 균주로 우유를 발효하면 유청이 생기므로 시중에서 사용되고 있는 요구르트 종균과 함께 배양 시 *Lb. gasseri* BNR17이 가지고 있는 효능을 극대화시킬 수 있을 것으로 판단된다.



Figure 4. 우유 발효 후 요구르트 제형화 사진

Table 4 . 시간대별 MRS와 항생제 고체배지에서의 생균수 측정

B+S+L	배지	0hr	3hr	6hr	10hr	B+S	배지	0hr	3hr	6hr	10hr
Milk	MRS	1.0×10^8	1.2×10^8	3.5×10^8	2.3×10^8	Milk	MRS	1.5×10^8	2.2×10^8	1.8×10^8	1.7×10^8
	MRS-Kanamycin (7.3µg/50µl)	7.7×10^7	8.2×10^7	6.4×10^7	8.4×10^7		MRS-Kanamycin (7.3µg/50µl)	1.4×10^8	1.1×10^8	1.1×10^7	1.3×10^7
	MRS-polymyxin B (40unit/50µl)	6.1×10^7	1.1×10^8	4.0×10^7	6.6×10^7		MRS-polymyxin B (40unit/50µl)	7.8×10^7	1.3×10^8	2.4×10^7	1.4×10^7

B+L	배지	0hr	3hr	6hr	10hr	S+L	배지	0hr	3hr	6hr	10hr
Milk	MRS	1.0×10^8	1.9×10^8	1.2×10^8	5.1×10^7	Milk	MRS	3.9×10^7	6.3×10^7	8.0×10^7	1.7×10^7
	MRS-Kanamycin (7.3µg/50µl)	1.2×10^8	7.1×10^7	6.4×10^7	5.1×10^7		MRS-Kanamycin (7.3µg/50µl)	X	X	X	X
	MRS-polymyxin B (40unit/50µl)	1.3×10^8	1.7×10^8	1.0×10^8	3.5×10^7		MRS-polymyxin B (40unit/50µl)	X	X	X	X

B:BNR17, S: S.thermophilus, L:L.bulgaricus

제 4 절. 제형별 안정성 연구 및 유통기한 설정

I. *Lb. gasseri* BNR17 유산균 제형 개발을 위한 추출물의 분말화 연구

가. 연구 목적

Lb. gasseri BNR17 배양액 분말화의 기술은 고체 액체 기체상의 물질을 특정 조건하에서 조절 속도로 내용물을 방출할 수 있도록 어떤 material이나 조직(system)내부에 포장하는 기술이다. 크기가 수 μm 단위에서 수mm 정도의 분말을 제조하는 기술이다. 본 연구에서는 모유에서 분리 동정하여 배양한 배양액을 각 형태의 제형을 위한 분말제조를 위한 공정연구를 수행하였다.

나. 연구 방법 조사 및 결과

일반적으로 건조 방법에 있어서는 우선 FD (freeze drying), SD (spray drying) 등의 건조 방법에 대하여 조사하였으며, *Lb. gasseri* BNR17 유산균의 건조 방법은 유산균 즉 미생물의 특성상 FD (freeze drying)의 건조방법으로 하였고 건조 시에 필요한 조건 (Table 1)들을 확립하였다. 제조된 분말 시작품에 대한 일반적 유산균 식품 기준 검사에서 적합함을 확인하였다 (Table 1).

Table 1. *Lb. gasseri* BNR17 FD (freeze drying) 분말화 조건

배 합	BNR17 배양액 및 동결건조 보호제 배합
예비동결	배합액을 -40℃에서 이상 동결
동결건조	예비 동결된 원료를 -30~-40℃이하로 72h 급속냉각
분 쇄	건조된 원료를 균일하게 분쇄
포 장	분쇄된 원료를 포장

Table 2. *Lb. gasseri* BNR17 FD (freeze drying) 분말의 일반 식품 기준 검사

검사항목	규 격	결 과	적 부
성 상	이미, 이취가 없어야 함	적 합	적 합
이 물	검출되어서는 안됨	불검출	적 합
유산균수	1,0*10E9	적 합	적 합
수 분	4.0%	3%	적 합
대 장 균	음성	음 성	적 합

II. *Lb. gasseri* BNR17 유산균의 제형 개발과 제형에 따른 안정성 검사

가. 연구 목적

Lb. gasseri BNR17 유산균의 특성상 온도, 습도 등 환경의 변화에 유산균이 민감하므로 제형의 연구에 있어가 생균 안정성이 무엇보다 중요하다. 그러므로 *Lb. gasseri* BNR17 유산균의 분말화 조건의 확립에 따른 분말을 이용한 캡슐, 스틱포, 정제, 제형을 개발하고, 제품의 안정성과 *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수 함량을 조사하여 제형에 따른 안정성(Stability)변화를 연구하고자 하였다.

나. 연구 방법

1차로 캡슐, 스틱포, 정제, 등 각 제형 중 건강기능식품의 유산균시장 조사에 의해 캡슐, 스틱포 제형의 연구를 먼저 하였고 그에 따른 공정 확립과 유산균의 특성상 냉장조건으로 제형의 기능성분인 *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수, 이화학적 검사와 대장균 균을 측정하였다.

다. 연구 결과

(1) 캡슐 제형의 공정 확립

Lb. gasseri BNR17의 캡슐 제형 시작품 제조를 위한 공정을 아래와 같이 확립하였다.

① 원료

모든 원료는 건강기능식품 공전, 식품공전, 식품첨가물공전 기준 규격에 적합한 원료를 구매하여 품질관리 후 적합한 것만 사용한다. 칭량 전 작업에 사용되는 기계, 기구 및 용기는 세척 소독 후 건조하여 사용한다.

② 칭량

칭량용 저울(1g-60Kg)에 적당한 용기(비닐백 또는 스테인레스용기)를 사용하여 원료들을 미생물의 혼입우려가 없는 원료 칭량실에서 정확하게 칭량한다.

③ 혼합(호모믹서, 더블콘믹서) : 칭량된 원료를 더블콘믹서에 충분히(20분간) 혼합한다

④ 충전 (캡셀, 성형기): 캡셀 충전기를 이용하여 기준 중량에 맞게 충전 한다

⑤ 탈분: 충전된 캡셀은 탈분기를 이용하여 탈분한다.

⑥ 선별 : 캡셀 충전 후 불량 캡셀을 캡셀 선별기를 이용하여 선별 한다.

⑦ 포장 : PE병 포장기를 이용하여 포장한다.

이와 같은 공정으로 *Lb. gasseri* BNR17의 캡셀 제형 시작품 (Figure 1)을 제조하였으며, 이에 대한 냉장보관 조건을 적용 한 후, *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수, 이화학적 검사와 대장균균 함량 변화에 대한 측정을 수행하여 식품으로서 안정성을 확인하였다. (Table 3, 4)

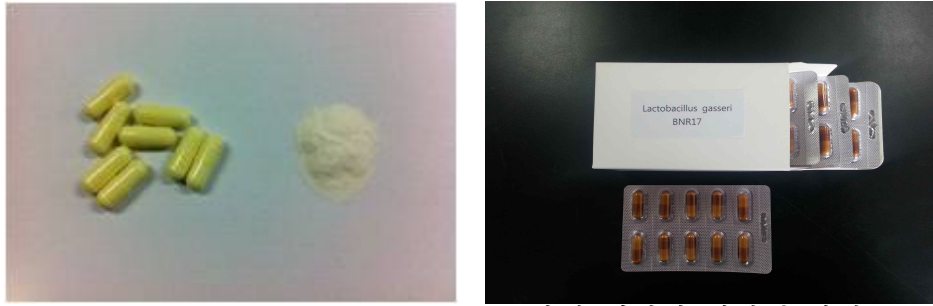


Figure 1. *Lb. gasseri* BNR17 캡셀 제형의 시작품 사진

Table 3. 캡셀 시작품의 이화학적 실험결과

구 분	기 준	4°C ± 2°C					비고
		생산직 후	4개월 후	8개월 후	12개월 후	14개월 후	
맛	·	○	○	○	○	○	
향	·	○	○	○	○	○	
색상	·	○	○	○	○	○	
붕해도	20분	적합	적합	적합	적합	적합	

Table 4. 캡셀 시작품의 미생물 실험결과

구 분	기 준	4°C ± 2°C					비고
		생산직 후	4개월 후	8개월 후	12개월 후	14개월 후	
대장균군	음 성	음성	음성	음성	음성	음성	
유산균 수 (cfu/g)	1g당, 100,000,000이상	적합	적합	적합	적합	적합	



Figure 2 . 봉해기

캡셀 시작품을 일자에 따른 균수 측정 결과 *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수는 1 log를 확인할 수 있었으며 4℃에서 보관되고 있는 시험물질(캡셀)은 생산 후 14개월 까지 유산균수가 유지되고 있는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 3,4)

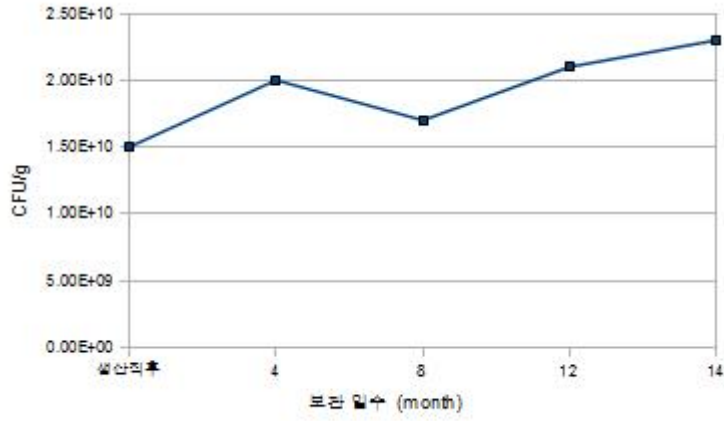


Figure 3 . *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수

검사성적서 1

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

판매명	Lactobacillus gasseri B9917	제조일자	2013-04-26
	유산균 제품	(유동기판)	
제조번호	BPF-13-04-26	장 명	진 선 익
검사목적	항균용	검사방법	2013-04-26

본사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사방법 중 제1차: 진 선 중

시험 항목	결과	검사방법
성상	이체의 내용물을 함유한 균체 결정체	균상학
유산균수 (cfu/g)	1.5 x 10 ¹⁰ CFU/g	균산성
대장균군	음성	균산성

검 사 원: 김 선 익
검사책임자: 김 중 훈

2013 년 04 월 29 일

바이오니아

Revision: A0210029T

검사성적서 2

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

판매명	Lactobacillus gasseri B9917	제조일자	2013-04-26
	유산균 제품	(유동기판)	
제조번호	BPF-13-04-26	장 명	진 선 익
검사목적	항균용	검사방법	2013-04-26

본사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사방법 중 제1차: 진 선 중

시험 항목	결과	검사방법
성상	이체의 내용물을 함유한 균체 결정체	균상학
유산균수 (cfu/g)	2.0 x 10 ¹⁰ CFU/g	균산성
대장균군	음성	균산성

검 사 원: 김 선 익
검사책임자: 김 중 훈

2013 년 08 월 29 일

바이오니아

Revision: A0210029T

검사성적서 3

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

판매명	Lactobacillus gasseri B9917	제조일자	2013-04-26
	유산균 제품	(유동기판)	
제조번호	BPF-13-04-26	장 명	진 선 익
검사목적	항균용	검사방법	2013-12-26

본사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사방법 중 제1차: 김 중 훈

시험 항목	결과	검사방법
성상	이체의 내용물을 함유한 균체 결정체	균상학
유산균수 (cfu/g)	1.7 x 10 ¹⁰ CFU/g	균산성
대장균군	음성	균산성

검 사 원: 김 선 익
검사책임자: 김 중 훈

2013 년 12 월 30 일

바이오니아

Revision: A0210029T

검사성적서 4

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

판매명	Lactobacillus gasseri B9917	제조일자	2013-04-26
	유산균 제품	(유동기판)	
제조번호	BPF-13-04-26	장 명	진 선 익
검사목적	항균용	검사방법	2014-04-26

본사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사방법 중 제1차: 김 중 훈

시험 항목	결과	검사방법
성상	이체의 내용물을 함유한 균체 결정체	균상학
유산균수 (cfu/g)	2.1 x 10 ¹⁰ CFU/g	균산성
대장균군	음성	균산성

검 사 원: 김 선 익
검사책임자: 김 중 훈

2014 년 04 월 28 일

바이오니아

Revision: A0210029T

검사성적서 5

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

판매명	Lactobacillus gasseri B9917	제조일자	2013-04-26
	유산균 제품	(유동기판)	
제조번호	BPF-13-04-26	장 명	진 선 익
검사목적	항균용	검사방법	2014-06-26

본사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사방법 중 제1차: 김 중 훈

시험 항목	결과	검사방법
성상	이체의 내용물을 함유한 균체 결정체	균상학
유산균수 (cfu/g)	2.3 x 10 ¹⁰ CFU/g	균산성
대장균군	음성	균산성

검 사 원: 김 선 익
검사책임자: 김 중 훈

2014 년 06 월 30 일

바이오니아

Revision: A0210029T

Figure 4. 검사 성적서

(2) 스틱포 제형의 공정 확립 : *Lb. gasseri* BNR17의 스틱 포 제형 시작품 제조를 위한 공정을 아래와 같이 확립하였다 (Figure 5).

① 원료

모든 원료는 건강기능식품 공전, 식품공전, 식품첨가물공전 기준 규격에 적합한 원료를 구매하여 품질관리 후 적합한 것만 사용한다. 칭량 전 작업에 사용되는 기계, 기구 및 용기는 세척 소독 후 건조하여 사용한다.

② 칭량

칭량용 저울(1g-60Kg)에 적당한 용기(비닐백 또는 스테인레스용기)를 사용하여 원료들을 미생물의 혼입우려가 없는 원료 칭량실에서 정확하게 칭량한다

③ 배합 : 칭량된 원료를 더블콘 믹서에 충분히(20분간) 혼합한다.

④ 충전(스티크포) : 혼합된 원료를 10열 스틱포 충전기에서 충전 한다

⑤ 포장 : 포장기를 이용하여 포장한다.

			
<p>원료보관 ⇒ (실온창고)</p>	<p>칭량 ⇒ (원료 소분작업)</p>	<p>혼합 및 조립 ⇒</p>	
			
<p>10열 스틱 충전 ⇒</p>	<p>M 봉투에 포장 후 무게 측정 ⇒</p>	<p>단케이스 포장 및 카톤 박스 포장⇒</p>	<p>출하</p>

Figure 5. 스틱포 제조공정도

이와 같은 공정으로 *Lb. gasseri* BNR17 의 스틱포 제형 시작품 (Figure 6)을 제조하였으며, 이에 대한 냉장조건을 적용 한 후, *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수, 이화학적 검사와 대장균 균 함량 변화에 대한 측정을 수행하여 식품으로서 안정성을 확인하였다. (Table 3, Table 4)



Figure 6. *Lb. gasseri* BNR17 이용한 스틱포 제형의 시작품

Table 3. 스틱포 제형 시작품의 이화학적 실험결과

구 분	기 준	4°C ±2°C					비 고
		생산직 후	4개월 후	8개월 후	12개월 후	14개월 후	
맛	·	○	○	○	○	○	
향	·	○	○	○	○	○	
색상	·	○	○	○	○	○	
수분	4.0%이하	적합	적합	적합	적합	적합	

Table 4. 스틱포 제형 시작품의 미생물 실험결과

구 분	기 준	4°C ±2°C					비 고
		생산직 후	4개월 후	8개월 후	12개월 후	14개월 후	
대장균군	음 성	음성	음성	음성	음성	음성	
유산균 수 (cfu/g)	1g당, 100,000,000이상	적합	적합	적합	적합	적합	



Figure 7. 감압 측정기

또한 *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수는 1 log를 확인 할 수 있었으며 4℃에서 보관되고 있는 시험물질(스틱포)은 생산 후 14개월 까지 유산균 수가 유지되고 있는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 8,9).

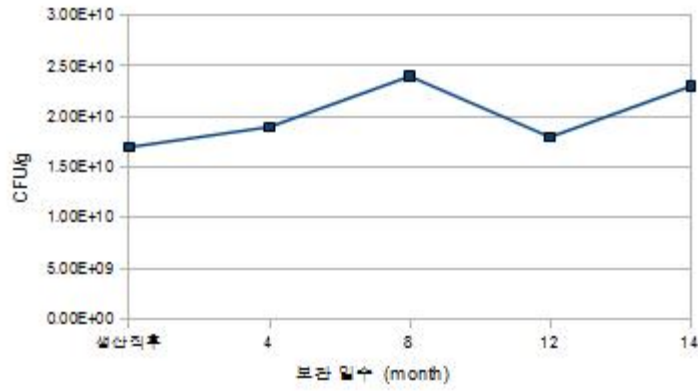


Figure 8. *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수

검사성적서 1

BIONEER 5/1

검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B9017	제조일자 (유통기한)	2013-04-26
제조번호	B97-13-04-26	성 명	김 현 익
검사목적	항균용	검사원행명	2013-04-26

검사 의뢰한 목적은 다음과 같습니다. 판사결과 후 제정처: 김 현 중

시험 항목	종류	검사방법
성상	이계의 분말	판균액
유산균수 (cfu)	1.7 x 10 ¹⁰ CFU/g	판균액
대장균군	음성	판균액

검 사 원: 김 현 익 2013.4.26
검사책임자: 김 중 2013.4.26

2013 년 04 월 29 일

바이오니아

Revision: 1 A40210K297

검사성적서 2

BIONEER 5/1

검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B9017	제조일자 (유통기한)	2013-04-26
제조번호	B97-13-04-26	성 명	김 현 익
검사목적	항균용	검사원행명	2013-04-26

검사 의뢰한 목적은 다음과 같습니다. 판사결과 후 제정처: 김 현 중

시험 항목	종류	검사방법
성상	이계의 분말	판균액
유산균수 (cfu)	1.8 x 10 ¹⁰ CFU/g	판균액
대장균군	음성	판균액

검 사 원: 김 현 익 2013.4.26
검사책임자: 김 중 2013.4.26

2013 년 08 월 29 일

바이오니아

Revision: 1 A40210K297

검사성적서 3

BIONEER 5/1

검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B9017	제조일자 (유통기한)	2013-04-26
제조번호	B97-13-04-26	성 명	김 현 익
검사목적	항균용	검사원행명	2013-12-26

검사 의뢰한 목적은 다음과 같습니다. 판사결과 후 제정처: 김 현 중

시험 항목	종류	검사방법
성상	이계의 분말	판균액
유산균수 (cfu)	2.4 x 10 ¹⁰ CFU/g	판균액
대장균군	음성	판균액

검 사 원: 김 현 익 2013.12.26
검사책임자: 김 중 2013.12.26

2013 년 12 월 30 일

바이오니아

Revision: 1 A40210K297

검사성적서 4

BIONEER 5/1

검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B9017	제조일자 (유통기한)	2013-04-26
제조번호	B97-13-04-26	성 명	김 현 익
검사목적	항균용	검사원행명	2014-04-25

검사 의뢰한 목적은 다음과 같습니다. 판사결과 후 제정처: 김 현 중

시험 항목	종류	검사방법
성상	이계의 분말	판균액
유산균수 (cfu)	1.8 x 10 ¹⁰ CFU/g	판균액
대장균군	음성	판균액

검 사 원: 김 현 익 2014.4.25
검사책임자: 김 중 2014.4.25

2014 년 04 월 28 일

바이오니아

Revision: 1 A40210K297

검사성적서 5

BIONEER 5/1

검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B9017	제조일자 (유통기한)	2013-04-26
제조번호	B97-13-04-26	성 명	김 현 익
검사목적	항균용	검사원행명	2014-04-25

검사 의뢰한 목적은 다음과 같습니다. 판사결과 후 제정처: 김 현 중

시험 항목	종류	검사방법
성상	이계의 분말	판균액
유산균수 (cfu)	2.3 x 10 ¹⁰ CFU/g	판균액
대장균군	음성	판균액

검 사 원: 김 현 익 2014.4.25
검사책임자: 김 중 2014.4.25

2014 년 06 월 30 일

바이오니아

Revision: 1 A40210K297

Figure 9. 검사 성적서

(3) 모유에서 분리 동정하여 배양한 배양액을 각 형태의 제형을 위한 분말제조 후 일자에 따른 균수 측정 결과 (Table 5,6)

Table 5. 분말 제품의 이화학적 실험결과

구 분	기 준	4°C ± 2°C					비고
		생산직 후	4개월 후	8개월 후	12개월 후	14개월 후	
맛	·	○	○	○	○	○	
향	·	○	○	○	○	○	
색상	·	○	○	○	○	○	
붕해도	20분	적합	적합	적합	적합	적합	

Table 6. 분말 제품의 미생물 실험결과

구 분	기 준	4°C ± 2°C					비고
		생산직 후	4개월 후	8개월 후	12개월 후	14개월 후	
대장균군	음 성	음성	음성	음성	음성	음성	
유산균 수 (cfu/g)	1g당, 10,000,000,000이상	적합	적합	적합	적합	적합	

또한 *Lb. gasseri* BNR17 유산균은 분말 생산 후 4°C에서 14 개월 까지 유산균 수 가 유지 됨을 알 수 있다.(Figure 10, 11)

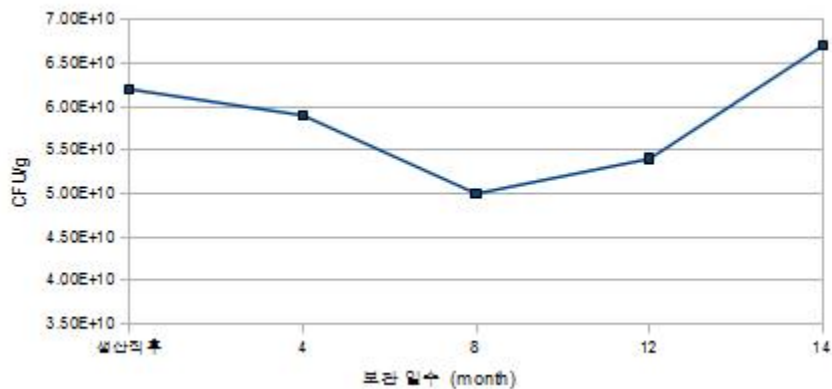


Figure 10. 분말 *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수

검사성적서 1 **검사성적서 2**

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

단체명	Lactobacillus gasseri B9817	제조일자 (유통기한)	2013-02-26
제품번호	B9F-13-02-26	성 명	김 선 익
검사목적	발효율	검수년월일	2013-02-26

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사뢰원 중 책임자: 김 중 훈

시험 항목	결과	검사방법
성상	이차, 이차와 없고 고유의 향미가 있는 회황색의 분말	감시적
유산균수 /g	6.0 x 10 ¹⁰ CFU/g	감시적
대장균군	음성	감시적

검 사 해: 김 선 익 *[Signature]*
 검사책임자: 김 중 훈 *[Signature]*

2013 년 03 월 04 일

바이오니아

Revision : AR210K297

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

단체명	Lactobacillus gasseri B9817	제조일자 (유통기한)	2013-02-26
제품번호	B9F-13-02-26	성 명	김 선 익
검사목적	발효율	검수년월일	2013-06-26

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사뢰원 중 책임자: 김 중 훈

시험 항목	결과	검사방법
성상	이차, 이차와 없고 고유의 향미가 있는 회황색의 분말	감시적
유산균수 /g	5.9 x 10 ¹⁰ CFU/g	감시적
대장균군	음성	감시적

*After 4 month stability 측정

검 사 해: 김 선 익 *[Signature]*
 검사책임자: 김 중 훈 *[Signature]*

2013 년 06 월 30 일

바이오니아

Revision : AR210K297

검사성적서 3 **검사성적서 4**

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

단체명	Lactobacillus gasseri B9817	제조일자 (유통기한)	2013-02-26
제품번호	B9F-13-02-26	성 명	김 선 익
검사목적	발효율	검수년월일	2013-10-27

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사뢰원 중 책임자: 김 중 훈

시험 항목	결과	검사방법
성상	이차, 이차와 없고 고유의 향미가 있는 회황색의 분말	감시적
유산균수 /g	5.0 x 10 ¹⁰ CFU/g	감시적
대장균군	음성	감시적

*After 8 month stability 측정

검 사 해: 김 선 익 *[Signature]*
 검사책임자: 김 중 훈 *[Signature]*

2013 년 10 월 30 일

바이오니아

Revision : AR210K297

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

단체명	Lactobacillus gasseri B9817	제조일자 (유통기한)	2013-02-26
제품번호	B9F-13-02-26	성 명	김 선 익
검사목적	발효율	검수년월일	2014-02-26

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사뢰원 중 책임자: 김 중 훈

시험 항목	결과	검사방법
성상	이차, 이차와 없고 고유의 향미가 있는 회황색의 분말	감시적
유산균수 /g	5.4 x 10 ¹⁰ CFU/g	감시적
대장균군	음성	감시적

*After 12 month stability 측정

검 사 해: 김 선 익 *[Signature]*
 검사책임자: 김 중 훈 *[Signature]*

2014 년 03 월 03 일

바이오니아

Revision : AR210K297

검사성적서 5

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

단체명	Lactobacillus gasseri B9817	제조일자 (유통기한)	2013-02-26
제품번호	B9F-13-02-26	성 명	김 선 익
검사목적	발효율	검수년월일	2014-06-26

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사뢰원 중 책임자: 김 중 훈

시험 항목	결과	검사방법
성상	이차, 이차와 없고 고유의 향미가 있는 회황색의 분말	감시적
유산균수 /g	6.0 x 10 ¹⁰ CFU/g	감시적
대장균군	음성	감시적

*After 16 month stability 측정

검 사 해: 김 선 익 *[Signature]*
 검사책임자: 김 중 훈 *[Signature]*

2014 년 04 월 29 일

바이오니아

Revision : AR210K297

Figure 11. 검사 성적서

(4) *Lb. gasseri* BNR17를 이용한 요구르트 제형화 실험

1). 실험방법

fermenter 배양 후 회수 되어진 *Lb. gasseri* BNR17 cell을 사용하여 요구르트 제형실험을 준비한다.(상황에 따라 flask MRS broth culture 후 cell down 시킨 pellet을 사용하여도 됨) 준비물로는 저지방 우유가 아닌 milk, 설탕, *Lb. gasseri* BNR17 cell이 필요하며 BNR17이 요구르트 제형이 가능하다는 실험 date를 기반으로 혼합제 종류에 의한 제형화 실험, 설탕 함량에 의한 제형화 진행 상황을 관찰한다.

2). 실험결과

Lb. gasseri BNR17 만으로 요구르트 제형화 진행은 시간이 오래 걸리며 층분리 현상이 일어나기 때문에 다른 첨가물(설탕)을 넣어 재형을 진행하였다.

결과 적으로 설탕을 첨가 한 것이 층분리 없이 제형화 되어지는 것을 확인 하였다.

또한 설탕 함량이 높을수록 요구르트 제형화가 빨리 이루어지며 점도와 맛도 좋아 지는 것을 확인하였다. 이에 *Lb. gasseri* BNR17 요구르트 제형시 설탕의 함량이 중요하다고 판단된다. (Figure 12, 13, 14, 15)

	우유 100ml	BNR17 1g	요플레 1ml	설탕 1g	스킴밀크 1g	요플레화 진행
1 sample	●		●			X
2 sample	●	●				X
3 sample	●	●	●			○
4 sample	●	●			●	X
5 sample	●	●		●		○
6 sample	●	●		●	●	X

Figure 12. 요구르트 배양시 8hr 진행 후

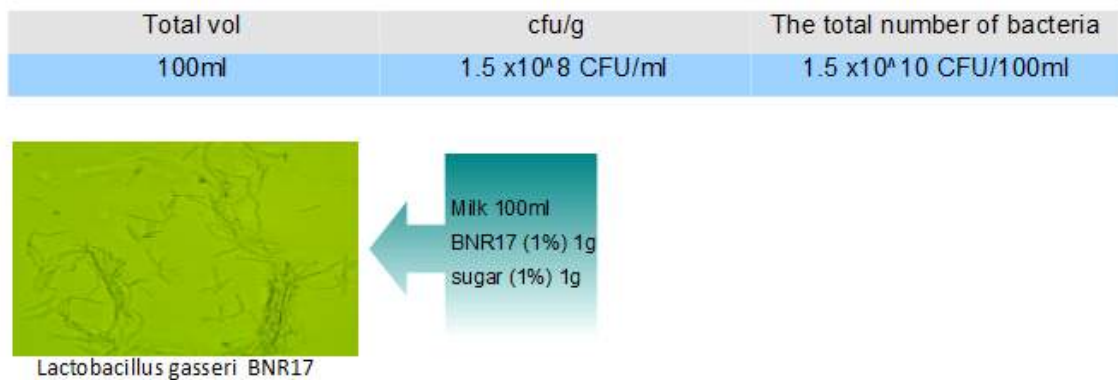


Figure 13. 균수 측정 및 현미경 사진

	우유 100ml	BNR17 1g	설탕 0.1g	설탕 0.5g	설탕 1g	설탕 2g	요플레화 진행
4 sample	●	●	●				X
5 sample	●	●		●			○
6 sample	●	●			●		○
7 sample	●	●				●	○



Figure 14. 설탕 함량 별 요구르트 배양시 8hr 진행 후

Manufacturing methods

Milk 100ml + BNR17 (1%) 1g + sugar (1%) 1g 8hr culture yogurt maker

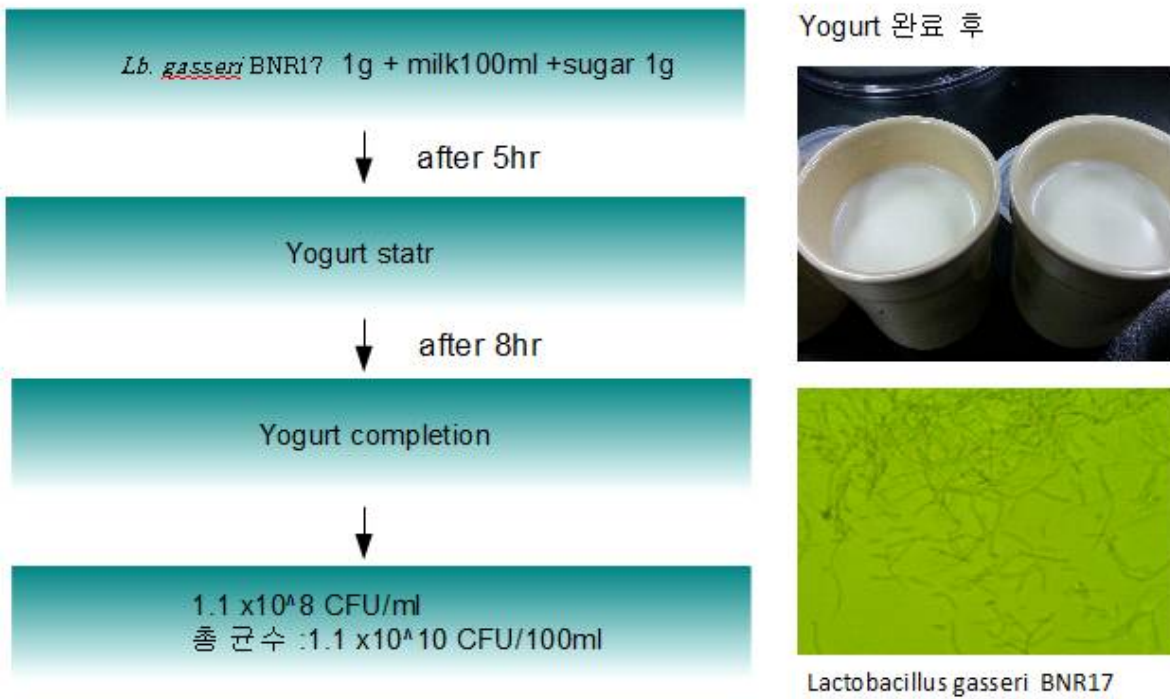


Figure 15. 요구르트 제형 공정도

또한 *Lb. gasseri* BNR17 사용 요구르트 제형은 4°C에서 20일 까지 유산균 수가 유지됨을 알 수 있다. (Table 7, 8, Figure 16, 18)

Table 7. 요구르트 제형의 이화학적 실험결과

구 분	기 준	4°C ± 2°C					비고
		생산직 후	5일 후	10일 후	15일 후	20일 후	
맛	·	○	○	○	○	○	
향	·	○	○	○	○	○	
색상	·	○	○	○	○	○	
붕해도	20분	적합	적합	적합	적합	적합	

Table 8. 요구르트 제형 완료 후 균수 측정 및 stability 측정 결과

구 분	기 준	4°C ± 2°C					비고
		생산직 후	5일 후	10일 후	15일 후	20일 후	
대장균군	음 성	음성	음성	음성	음성	음성	
유산균 수 (cfu/g)	1g당, 100,000,000이상	적합	적합	적합	적합	적합	

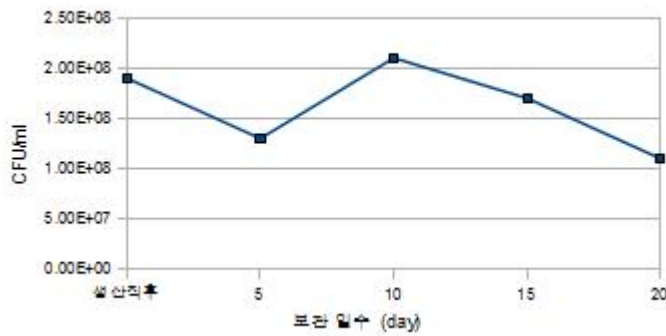


Figure 16. 요구르트 제형 후 *Lb. gasseri* BNR17 유산균 수



Figure 17. 요구르트 배양기

검사성적서 1

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B927	제조일자 (유통기한)	2014-04-01
제조번호	B97-14-04-01	성 명	김 선 익
검사목적	참고용	검사년월일	2014-04-01

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 승 훈

시험 항목	규격	결과	검사담당자
성상	유색적-황색의 균질한 액체로 이차 이화기없이야함	적합	김선익
무균성 고형화(%)	8.0 이상	적합	김선익
유기산(%)	전지크로 이상	적합	김선익
산도(%)	0.5 이상	적합	김선익
유산균수 (AU)	10 ⁷ 이상	1.9 x 10 ⁷ CFU/ml	김선익
대장균군	음성	음성	김선익

검 사 원: 김 선 익 *[인]*
 검사책임자: 김 승 훈 *[인]*

2014년 04월 01일
 바이오니아 

Revision: A4210K297

검사성적서 2

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B927	제조일자 (유통기한)	2014-04-01
제조번호	B97-14-04-01	성 명	김 선 익
검사목적	참고용	검사년월일	2014-04-05

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 승 훈

시험 항목	규격	결과	검사담당자
성상	유색적-황색의 균질한 액체로 이차 이화기없이야함	적합	김선익
무균성 고형화(%)	8.5 이상	적합	김선익
유기산(%)	전지크로 이상	적합	김선익
산도(%)	0.5 이상	적합	김선익
유산균수 (AU)	10 ⁷ 이상	1.3 x 10 ⁷ CFU/ml	김선익
대장균군	음성	음성	김선익

검 사 원: 김 선 익 *[인]*
 검사책임자: 김 승 훈 *[인]*

2014년 04월 08일
 바이오니아 

Revision: A4210K297

검사성적서 3

BIONEER 1/1


검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B927	제조일자 (유통기한)	2014-04-01
제조번호	B97-14-04-01	성 명	김 선 익
검사목적	참고용	검사년월일	2014-04-10

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 승 훈

시험 항목	규격	결과	검사담당자
성상	유색적-황색의 균질한 액체로 이차 이화기없이야함	적합	김선익
무균성 고형화(%)	8.0 이상	적합	김선익
유기산(%)	전지크로 이상	적합	김선익
산도(%)	0.5 이상	적합	김선익
유산균수 (AU)	10 ⁷ 이상	2.1 x 10 ⁷ CFU/ml	김선익
대장균군	음성	음성	김선익

검 사 원: 김 선 익 *[인]*
 검사책임자: 김 승 훈 *[인]*

2014년 04월 14일
 바이오니아 

Revision: A4210K297

검사성적서 4

BIONEER 1/1


검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B927	제조일자 (유통기한)	2014-04-01
제조번호	B97-14-04-01	성 명	김 선 익
검사목적	참고용	검사년월일	2014-04-15

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 승 훈

시험 항목	규격	결과	검사담당자
성상	유색적-황색의 균질한 액체로 이차 이화기없이야함	적합	김선익
무균성 고형화(%)	8.5 이상	적합	김선익
유기산(%)	전지크로 이상	적합	김선익
산도(%)	0.5 이상	적합	김선익
유산균수 (AU)	10 ⁷ 이상	1.7 x 10 ⁷ CFU/ml	김선익
대장균군	음성	음성	김선익

검 사 원: 김 선 익 *[인]*
 검사책임자: 김 승 훈 *[인]*

2014년 04월 18일
 바이오니아 

Revision: A4210K297

검사성적서 5

BIONEER 1/1

검 사 성 적 서

검체명	Lactobacillus gasseri B927	제조일자 (유통기한)	2014-04-01
제조번호	B97-14-04-01	성 명	김 선 익
검사목적	참고용	검사년월일	2014-04-20

검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 승 훈

시험 항목	규격	결과	검사담당자
성상	유색적-황색의 균질한 액체로 이차 이화기없이야함	적합	김선익
무균성 고형화(%)	8.5 이상	적합	김선익
유기산(%)	전지크로 이상	적합	김선익
산도(%)	0.5 이상	적합	김선익
유산균수 (AU)	10 ⁷ 이상	1.1 x 10 ⁷ CFU/ml	김선익
대장균군	음성	음성	김선익

검 사 원: 김 선 익 *[인]*
 검사책임자: 김 승 훈 *[인]*

2014년 04월 24일
 바이오니아 

Revision: A4210K297

Figure 18. 검사 성적서

제 5 절. 대량생산의 표준화

I. 플라스크 및 Jar 실험

1. ALMn(AMB), LFC(BNR) 및 MRS를 기본으로 한 배지에서의 성장성 비교 및 특정성분

1). 실험방법

MRS plate에서 2대 계대한 균주를 MRS broth 10ml에 1 loop 접종하고, 37°C에서 12시간 정치 배양하였다. 그 결과 실험에 사용한 seed 배양액은 OD₆₆₀가 0.470, pH는 4.27을 나타냈다. 실험에 사용할 배지는 Table 1과 같다.

Table 1. 각각의 실험배지 조성

	할량(%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ALMn	(1+CaCO ₃)	(1+Glc)	LFC	(4-CaCO ₃)	(4+SP)	MRS	(7+SP)	(7+SP-Bx)
Casein peptone				0.5	0.5	0.5	1	1	1
Soypeptone	1.5	1.5	1.5			0.5		1	1
Yeast extract	3	3	3	2	2	2	0.5	0.5	0.5
Beef extract							1	1	
Glucose			3	2	2	2	2	2	2
Lactose	3	3							
MSG	0.05	0.05	0.05						
L-cystein HCl	0.05	0.05	0.05						
Vit C	0.05	0.05	0.05						
K ₂ HPO ₄	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
Na acetate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
NH ₂ citrate				0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
K citrate	0.1	0.1	0.1						
MgSO ₄	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
MnSO ₄	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
CaCl ₂	0.05		0.05						
CaCO ₃		1		1		1			
트윈80	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
조제후 pH	6.05	6.1	6.05	6.24	6.18	6.28	6.27	6.35	6.25
측정결과									

상기 각 배지를 100ml씩 준비하여 250ml 삼각 플라스크에 넣고 120°C, 15분 멸균 한 다음 각 배지에 준비된 seed 배양액을 1%(v/v) 접종하였다. 접종된 플라스크를 37°C incubator에 넣고 정치배양하면서 배양 12시간 및 16시간 후 OD(Biotech, USA), 생균수 및 pH(Thermo, USA)를 측정하였다. 생균수는 0.85% saline 용액으로 serial dilution 하여 MRS agar 배지에 도말하여 측정하였다.

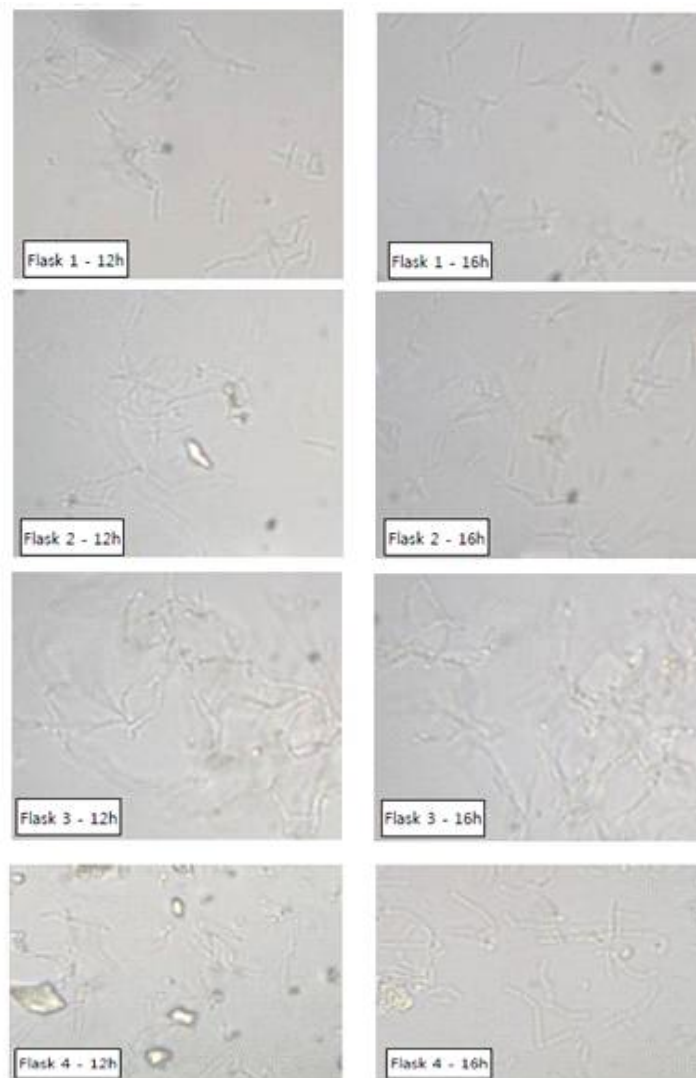
2). 실험결과 및 고찰

Table 2에 의하면 12 hr후 O.D값은 flask 2 (OD₆₆₀=0.905)가 가장 높으나 생균수는 flask 4 (3.4E+08 cfu/ml)가 가장 높다. CaCO₃를 뺀 flask 5 (1.5E+08 cfu/ml)에서는 생균이 떨어지는 것으로 보아 CaCO₃가 pH 감소를 막아주어 균이 성장하는데 있어서 도움을 주는 것으로 사료된다. 또한 현미경 관찰시 flask 4와 5를 비교했을 때 응집도가 CaCO₃를 첨가한 플라스크에서 완화된 모습을 보였다 (Figure 1).

Table 2. 12, 16hr 배양 후 O.D, pH, 생균수 측정

	1 ALMn	2 (1+CaCO ₃)	3 (1+Glc)	4 LFC	5 (4-CaCO ₃)	6 (4+SP)	7 MRS	8 (7+SP)	9 (7+SP-Bx)
12h OD ₆₆₀	0.182	0.905	0.439	0.616	0.383	0.666	0.339	0.396	0.362
12h pH	5.10	5.52	4.18	4.90	4.16	4.89	4.19	4.26	4.28
12h 생균(cfu/ml)	2.60E+08	3.40E+08	1.90E+08	3.50E+08	1.50E+08	4.00E+08	5.00E+07	1.30E+08	1.70E+08
16h OD ₆₆₀	0.294	0.936	0.526	0.554	0.440	0.562	0.406	0.440	0.398
16h pH	4.90	5.26	4.07	4.82	4.05	4.84	4.06	4.17	4.22
16h 생균(cfu/ml)	2.00E+08	3.10E+08	1.40E+08	2.30E+08	9.00E+07	2.70E+08	3.00E+07	4.00E+07	4.30E+07

(a)



(b)

	1 ALMn	2 (1+CaCO ₃)	3 (1+Glc)	4 LFC	5 (4-CaCO ₃)	6 (4+SP)	7 MRS	8 (7+SP)	9 (7+SP-Bx)
응집도	w	w	++	w	++	w	++	++	++

cf. ++: 심한 응집, w: 약한 응집

Figure 1. 12hr, 16hr배양 후 현미경 관찰 사진(a)과 응집도(b)

2. 포도당 및 유당의 이용성 확인

1). 실험방법

MRS plate에서 2대 계대한 균주를 멸균한 MRS broth 10ml에 1 loop접종하여, 37°C에서 12hr 동안 정치배양 하였다. 이 배양액 3.5ml을 35ml의 MRS broth에 옮겨 37°C에서 12hr동안 배양한 것을 종배양액으로 사용하였다. LFC(상기)배지는 5L jar에 3.5L 사입하고 121°C 에서 15분 멸균한 다음 준비된 종배양액을 무균적으로 1%(v/v)로 접종하였다. 배양 조건은 pH는 4.2, 온도는 37°C, agitation은 100rpm이었다. 실험에 사용할 배지 조성은 Table 3과 같다. LFC배지에 soypeptone 0.5% 를 첨가하여 유기질소원을 강화시키고 당을 2%에서 4% 로 증량하여 실험하였다.

Table 3. 실험배지 조성

성분명	(단위: %)		
	A	B	LFC (참고)
Casein peptone	0.5	0.5	0.5
Soypeptone	0.5	0.5	-
Yeast extract	2	2	2
Glucose	3	-	2
Lactose	-	3	-
K ₂ HPO ₄	0.2	0.2	0.2
Na acetate	0.5	0.5	0.5
NH ₂ citrate	0.2	0.2	0.2
MgSO ₄	0.01	0.01	0.01
MnSO ₄	0.005	0.005	0.005
CaCO ₃	-	-	1
트윈80	0.1	0.1	0.1
Feed 당			
Glucose	1	-	
Lactose	-	1	

2). 실험결과

glucose와 달리 lactose 에서는 배양초기에 생육지연 현상이 관찰되었다 (Figure 2). BNR17 을 배양하는데 있어서 lactose보다 glucose가 더 좋은 영향을 미치는 것으로 사료 된다.

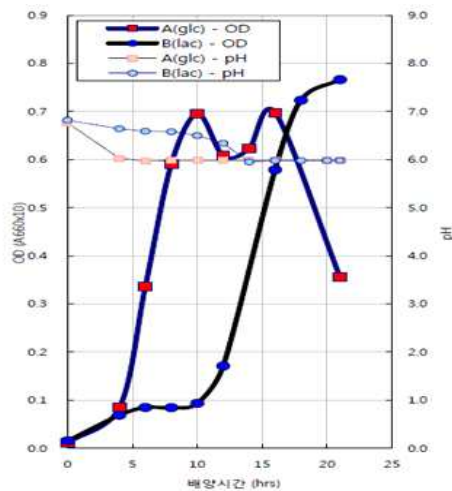


Figure 2. Glucose와 lactose에서의 생육차이

3. Jar fermenter 배양시 N₂ gas 혹은 CO₂ gas로 충전시 배양에 미치는 영향 확인

1). 실험방법

MRS plate에서 2대 계대한 균주를 멸균한 MRS broth 10ml에 1 loop접종하여, 37°C에서 12hr 동안 정치 배양하였다. 이 배양액 3.5ml을 35ml의 MRS broth에 옮겨 37°C에서 12hr 동안 배양한 것을 종배양액으로 사용하였다. LFC(상기)배지는 5L jar에 3.5L 사입하고 121°C에서 15분 멸균한 다음 준비된 종배양액을 무균적으로 1%(v/v)로 접종하였다. 배양조건은 pH는 5 N NaOH(산도조절제)를 이용하여 5.5으로 조절했으며, 온도는 37°C, agitation은 100rpm이었다. aeration은 N₂나 CO₂로 각각 충전하였다. 생균수는 saline 용액으로 serial dilution 하여 MRS agar 배지에 도말하여 측정하였다.

2). 실험결과

CO₂를 충전한 실험군이 N₂를 충전한 실험군보다 빠른 생육을 보이며 생균수에서도 20 hr이후에는 생육량이 동일해짐을 관찰하였다 (Table 4, Figure 3)

Table 4. N₂ 와 CO₂ 충전 후 생균수와 pH변화

배양시간	N ₂			CO ₂		
	생균수	pH	OD ₆₆₀	생균수	pH	OD ₆₆₀
0		7.20	0.012		7.08	0.006
8		6.50	0.169		5.77	0.313
10		5.65	0.265		5.22	0.560
12	1.4E+09	5.69	0.244	3.5E+09	5.19	0.678
14		5.18	0.469		5.23	0.791
16	7.6E+08	5.21	0.645	4.3E+09	5.20	0.864
18	3.3E+08	5.20	0.795	4.7E+09	5.18	0.919
19.5	3.8E+08	5.18	0.917	4.9E+09	5.20	0.935
23	4.4E+08	5.20	0.982	6.0E+09	5.18	1.004

4. Jar fermenter 배양시 rpm의 변화에 따른 성장속도 및 성장성을 확인.

1). 실험방법

30L fermenter working vol:20L 3대를 가동하며 비교 test 진행을 한다.

MRS plate에서 2대 계대한 균주를 멸균한 MRS broth 100ml에 1 loop접종하여, 37°C에서 12hr 동안 정치 배양하였다. 이 배양액 16ml을 800ml의 MRS broth에 옮겨 37°C에서 12hr 동안 배양한 것을 종배양액으로 사용하였다. MRS(상기)배지는 30L jar에 20L 넣은 후

121°C에서 30분 멸균한 다음 준비된 종배양액을 전량 800ml 을 무균적으로 4%(v/v)로 접종하였다. 배양조건은 temperature 37°C, agitation은 0 이며 rpm 각각 50, 100, 200

setting 후 배양과정시 시간별 O.D,pH,cell wet weight(g)를 측정한다.

2). 실험 결과

rpm 은 유산균의 growth 에 영향을 미치며 seed 배양 및 정치 배양시 배지가 하부로 가라앉은 현상과, 균 뭉침 현상이 발생되며 유산균의 성장을 더디지게 함으로서 rpm을 조절하여 성장을 확인하였다.

확인 결과 rpm의 영향은 큰 차이가 없어 보이나 100rpm 유지시 O.D 가 유지되는 경향을 보이며 fermentor 운용시에는 100rpm 이하로 설정한다.

다만 rpm 이 너무 낮을 경우 유산균끼리 뭉침 현상이 발생되어 성장에 저해 요인이 될 수 있을 것으로 판단된다. (Figure 4)

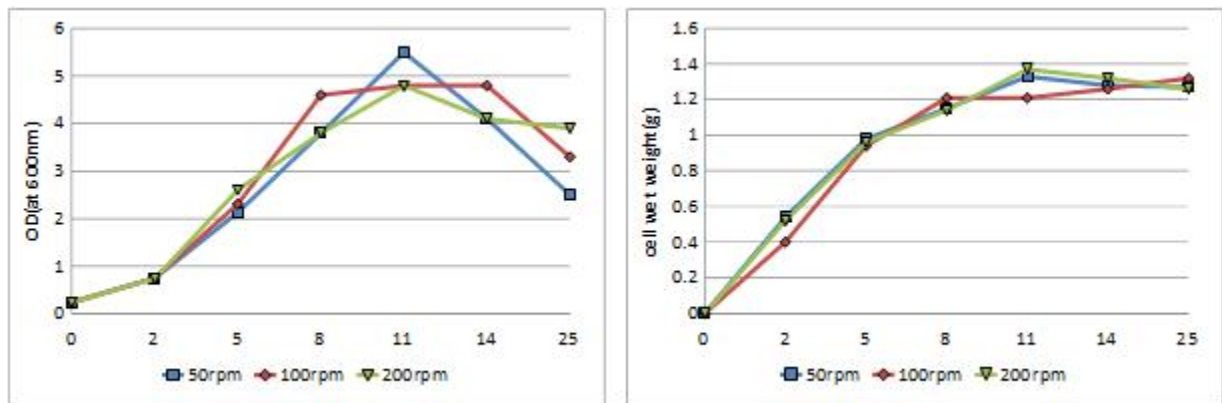


Figure 4. rpm의 변화에 따른 성장속도 및 성장성

5. Jar fermenter 배양시 airation 변화에 따른 성장속도 및 성장성을 확인

1). 실험방법

30L fermenter working vol:20L 3대를 가동하며 비교 test 진행을 한다.

MRS plate에서 2대 계대한 균주를 멸균한 MRS broth 100ml에 1 loop접종하여, 37°C에서 12hr 동안 정치 배양하였다. 이 배양액 16ml을 800ml의 MRS broth에 옮겨 37°C에서 12hr 동안 배양한 것을 종배양액으로 사용하였다. MRS(상기)배지는 30L jar에 20L 넣은 후

121°C에서 30분 멸균한 다음 준비된 종배양액을 전량 800ml 을 무균적으로 4%(v/v)로 접종하였다. 배양조건은 temperature 37°C, rpm 100 agitation 은 각각 0 , 500, 1000cc/min setting 후 배양 공정시 시간별 O.D, pH, cell wet weight(g)를 측정한다.

2). 실험 결과

유산균은 일반적으로 통성 혐기성 균주로서 약간의 용존 산소 혹은 혐기성 상태에서도 성장한다. 단 air 공급량이 많아지면 대사 과정이 변경 되므로 성장 보다는 부산물을 생산하는 경우가 많다. airation 하지 않은 상태에서 성장이 좋은 것으로 확인되었으며 발효기 운용 시 airation은 하지 않는 상태에서 운용 예정이다 (Figure 5).

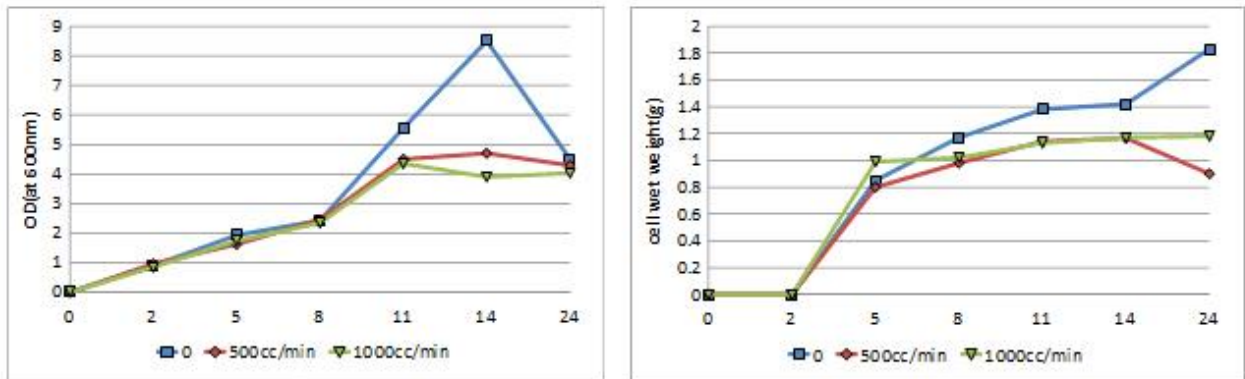


Figure 5. airation 변화에 따른 성장속도 및 성장성

6. Jar fermenter 배양시 temperature 변화에 따른 성장속도 및 성장성을 확인

1). 실험방법

30L fermenter working vol:20L 3대를 가동하며 비교 test 진행을 한다.

MRS plate에서 2대 계대한 균주를 멸균한 MRS broth 100ml에 1 loop접종하여, 37°C에서 12hr 동안 정치 배양하였다. 이 배양액 16ml을 800ml의 MRS broth에 옮겨 37°C에서 12hr 동안 배양한 것을 종배양액으로 사용하였다. MRS(상기)배지는 30L jar에 20L 넣은 후 121°C에서 30분 멸균한 다음 준비된 종배양액을 전량 800ml 을 무균적으로 4%(v/v)로 접종하였다. 배양조건은 37°C, rpm 100 agitation 0 temperature은 각각 37°C , 39°C, 41°C setting 후 배양공정시 시간별 O.D,pH,cell wet weight(g)를 측정한다.

2). 실험 결과

유산균 성장에 있어서 온도의 영향을 분석하기 위함이며 각각 37°C , 39°C, 41°C로 운용하여 결과를 확인 하였다.이는 모유에서 분리된 유산균이기에 사람의 체온에서 혹은 좀더 높은 온도를 설정하여 진행 하였다.

균주 의 성장 초기 37°C 보다 높은 온도가 유산균의 성장에 도움을 주은 것으로 확인하였다. 하지만 지속적인 성장이 되지 않기 때문에 일정 시간 이후에는 균체에도 많은 타격을 미칠거라 예상된다. 하지만 37°C 배양에는 14시간 까지 지속적으로 성장 하였으며 최종 O.D도 가장 높게 확인 되었다. 37°C 이하 에서는 초기 성장뿐만 아니라 균체도 지속적으로 성장 하지 않았다. 따라서 배양 온도는 37°C~38°C 정도를 유지 하는 것이 적합하다 판단된다. 또한 적정 배양 시간은 11h~14h 가 적합 하다 판단된다(Figure 6).

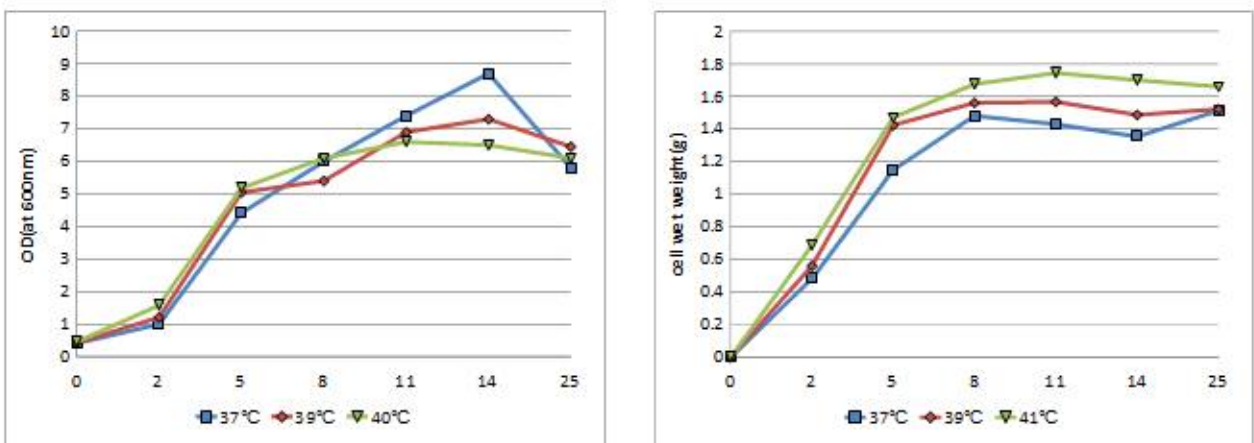


Figure 6. temperature 변화에 따른 성장속도 및 성장성

7. Jar fermenter 배양시 tween 80 농도 변화에 따른 성장속도 및 성장성을 확인

1). 실험방법

30L fermenter working vol:20L 1대를 가동하며 비교 test 진행을 한다.

MRS plate에서 2대 계대한 균주를 멸균한 MRS broth 100ml에 1 loop접종하여, 37°C에서 12hr 동안 정치 배양하였다. 이 배양액 16ml을 800ml의 MRS broth에 옮겨 37°C에서 12hr 동안 배양한 것을 종배양액으로 사용하였다. MRS(상기)배지는 30L jar에 20L 넣은 후

121°C에서 30분 멸균한 다음 준비된 종배양액을 전량 800ml 을 무균적으로 4%(v/v)로 접종하였다. 배양조건은 37°C, rpm 100 agitation 0 temperature 37°C setting 후 배양공정 시 시간별 O.D, pH, cell wet weight(g)를 측정한다.

2). 실험 결과

30L fermenter 발효 조건 확인 후 N-source 및 Tween 80 의 농도변화에 따른 실험에서 tween 80 함량을 0.1% →0.5% 로 증가 시킨 후 확인실험진행 하였다. Tween 80 의 역할은 유산균이 생성하는 lactic acid 에 의해 PH 가 저하 되면 균이 뭉치는 현상이 있는데 이를 방지하기 위이며 유산균 자체가 뭉치는 현상을 억제 시켜 줌으로써 좀 더 높은 성장을 보일거라 판단된다.

cell O.D 는 24h 까지 증가하는 양상을 보이며 최종 pH 3.25 로 상당히 낮은 값을 확인하였고 cell wet weight(g) 11h 이후 변화가 많지 않을 것을 확인하였다.

최종 배양 완료 후 cell 측정 결과 기존 대비 상승 하였으며 회수율을 9g/L 이므로 cell 성장에는 상당히 많은 영향을 미치는 것이라 판단된다(Figure 7).



Figure 7. tween 80 농도 변화에 따른 성장속도 및 성장성

II. Fermenter(350L) 실험

1. *Lb.gasseri* BNR17 배양공정 optimization pH 조절에 의한 성장공선확인

1). 실험방법

500L fermenter 3차에 걸쳐 pH 5.0 5.5 6.0 산도 조절 실험을 진행하였다.

MRS plate에서 2대 계대한 균주를 멸균한 MRS broth 100ml에 1 loop접종하여, 37°C에서 12hr 동안 정치 배양하였다. 이 배양액 11.2ml을 560ml의 MRS broth에 옮겨 37°C에서 12hr 동안 정치 배양 후 30L fermenter 121°C에서 30분 멸균한 14L의 MRS 배지에 접종한다.

12hr 동안배양 한 것을 종배양액으로 사용하였다. MRS(상기)배지는 500L에 350L 사입하고 다음 준비된 종배양액을 전량(14L) 무균적으로 4%(v/v)로 접종하였다. 배양조건은 pH는 3N NaOH(산도조절제)를 이용하여 pH 5.0 5.5 6.0 으로 조절했으며, 온도는 37°C, agitation 0 60~80rpm이었다.

2.) 실험결과

2-1) 3N NaOH(산도조절제) 사용 pH 5.5

Lb.gasseri BNR17 최대 생 균 수는 약 1.5×10^9 CFUs/ml 이며, pH는 5.5조절 가능하다. O.D는 10.0으로 확인된다. 회수된 g당 CFUs는 3.8×10^{11} CFUs/g으로 pH조절 실험 전 결과 대비 약 20배 정도 수득율을 증가시킬 수 있었다.

이전 결과와 함께 BNR17의 Morphology를 확인하였는데, 5.5 pH조절을 통해 12시간 배양까지 균이 뭉치지 않았으며 회수한 균의 pellet에서도 뭉치는 현상을 발견하지 못했다. 위 결과를 통해 pH 4.5 이하에서는 Morphology가 길어지거나 뭉치는 것으로 예상할 수 있으며, 이는 pH조절을 통해 개선할 수 있음을 시사한다. 앞으로 BNR의 상태를 확인하는 기준으로 pH와 그에 따른 Morphology 확인이 필요할 것이다.

위 결과를 통해 3N NaOH로는 pH조절이 가능하다고 생각된다. 7시간 30분 까지 pH가 떨어졌으나, 다시 5.5로 맞춰지는 걸 확인할 수 있다. 이는 초기 BNR의 급격한 성장에서 분비되는 bacteriocin을 산도조절제가 조절하지 못했으나 Stationary phase에 진입하면서 pH조절이 가능해 졌다고 생각된다.

pH조절을 통해 배양조건을 개선시킬 수 있을 거라는 가설을 실험적으로 증명한 결과라고 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 pH의 조절과 함께 당의 함량을 조절하여 좀 더 좋은 배양조건을 확립하려 한다(Figure 8,9).

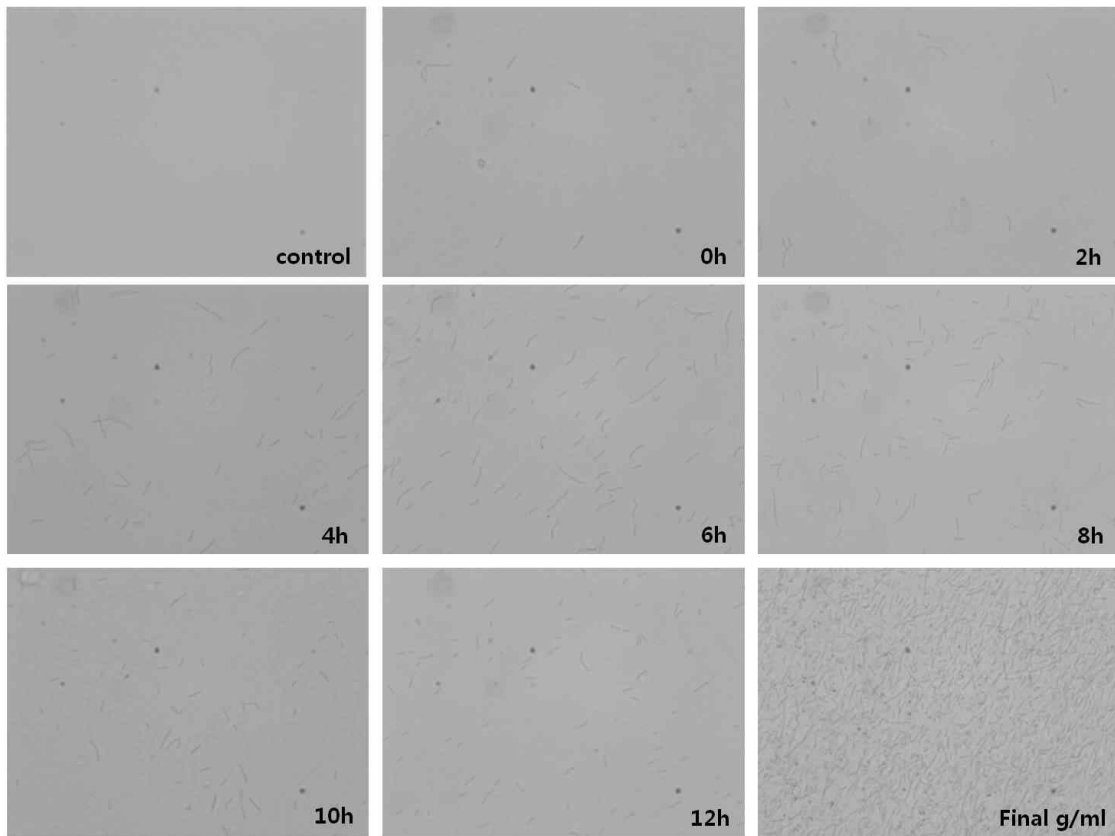


Figure 8. 시간대별 *Lbgasseri* BNR17 morphology

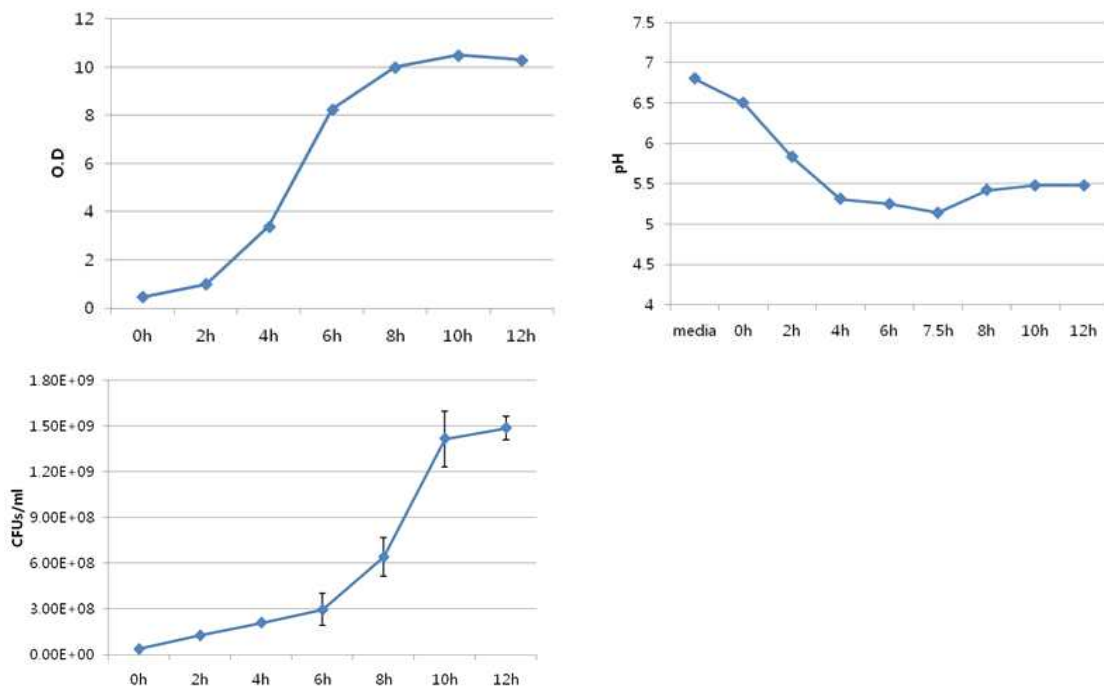


Figure 9. Growth curve (CFUs/ml, O.D, pH)

2-2). 3N NaOH(산도조절제) 사용 pH 5.0

Lb.gasseri BNR17 최대 생 균 수는 약 1.4×10^9 CFUs/ml 이며, pH는 5.0조절 가능. O.D는 11.2으로 확인된다. 회수된 g당 CFUs는 4.9×10^{10} CFUs/g으로 이전 pH조절 실험 전 결과에 비해 수득 율이 감소하였음을 알 수 있다.

이전 결과와 함께 BNR17의 Mophology를 확인하였는데, 5.0 pH조절을 통해 14시간 배양까지 균이 뭉치지 않았으며 회수한 균의 pellet에서도 뭉치는 현상을 발견하지 못했다. 이는 앞 결과와 같으며 pH조절이 BNR의 안전성에 중요한 역할을 한다고 생각되며 5.5조절 실험에 비해 5.0의 수득 율이 낮았음을 알 수 있다. 물론 CFUs/ml의 차이는 적었으나, 회수 후 CFUs/g은 6배 가량의 차이를 확인할 수 있다. 실험적 variation이 있을 것으로 예상된다. 또한 pH 6.0으로 조절할 필요성이 있다.

pH조절을 통해 배양조건을 개선시킬 수 있을 거라는 가설을 반복실험으로 증명한 결과라고 생각된다. 하지만 pH조건을 확실히 잡기 위해 5.5, 5.0, 6.0을 비교할 필요성이 있을 것으로 예상된다. (Figure 10, 11)

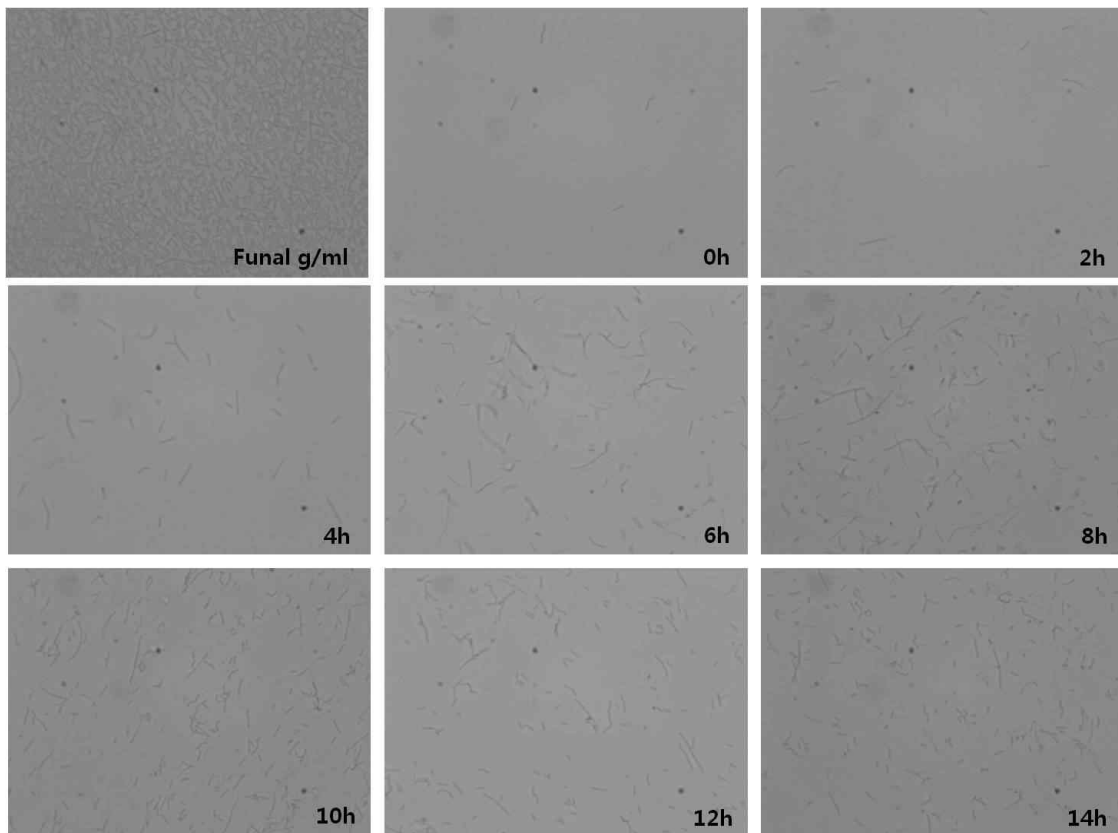


Figure 10. 시간대별 *Lb.gasseri* BNR17 mophology

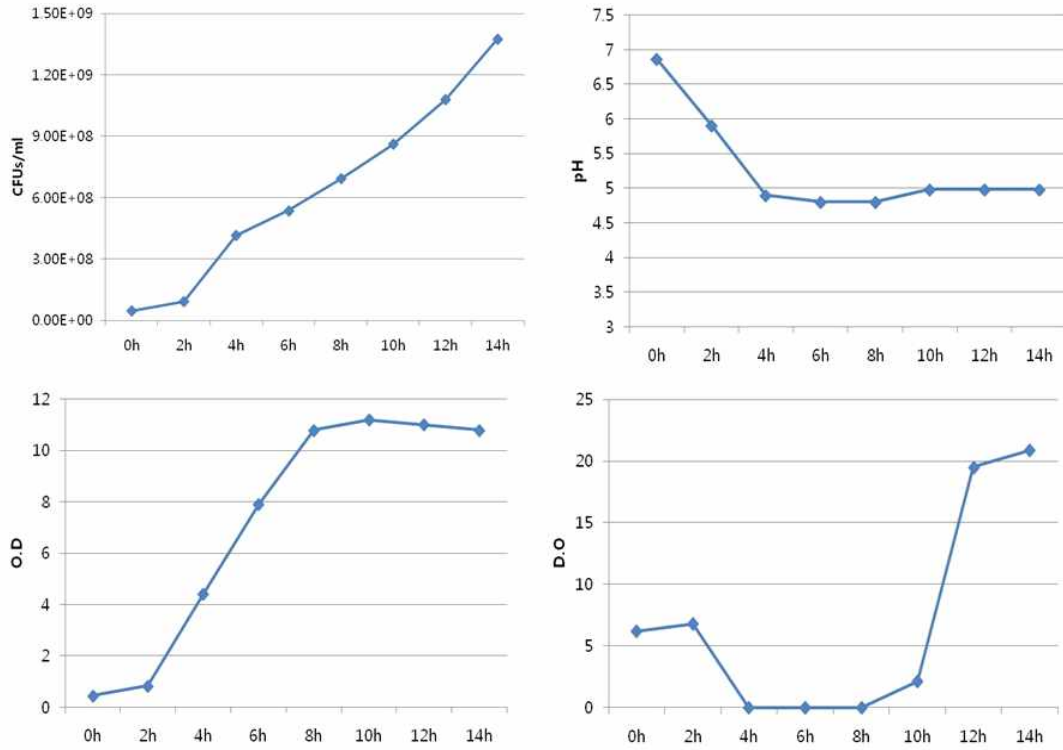


Figure 11. Growth curve (CFUs/ml, O.D, pH)

2-3). 3N NaOH(산도조절제) 사용 pH 6.0

Lb.gasseri BNR17 최대 생 균 수는 약 1.0×10^9 CFUs/ml 이며, pH는 6.0조절 가능. O.D는 10으로 확인된다. 회수된 g당 CFUs는 4.6×10^{10} CFUs/g이다.

이전 결과와 함께 BNR17의 Mophology를 확인하였는데, 이 역시 pH조절을 통해 균이 뭉치지 않았으며 회수한 균의 pellet에서도 뭉치는 현상을 발견하지 못했다. 이는 앞 결과와 같으며 pH조절이 BNR의 안전성에 중요한 역할을 한다고 생각된다.

위 결과를 통해 3N NaOH로는 pH조절이 가능하다고 생각된다. 5.5, 5.0과 6.0 조절 실험을 통해 pH조절이 BNR 배양조건에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 하지만 5.5조절 실험에 비해 6.0의 수득율이 낮았음을 확인할 수 있었으며, 위 결과를 바탕으로 최적 pH조건을 5.5로 정할 수 있다.

한 달여간 pH조절 실험을 반복한 결과, 최적 pH를 5.5로 정한다. 위 실험을 반복하고, pH조절 실험의 당 소비량을 측정한 뒤 위 조건 실험을 반복한 뒤, BNR17의 최적 배양조건을 확립하고, 생산 할 예정이다.(Figure 12, 13)

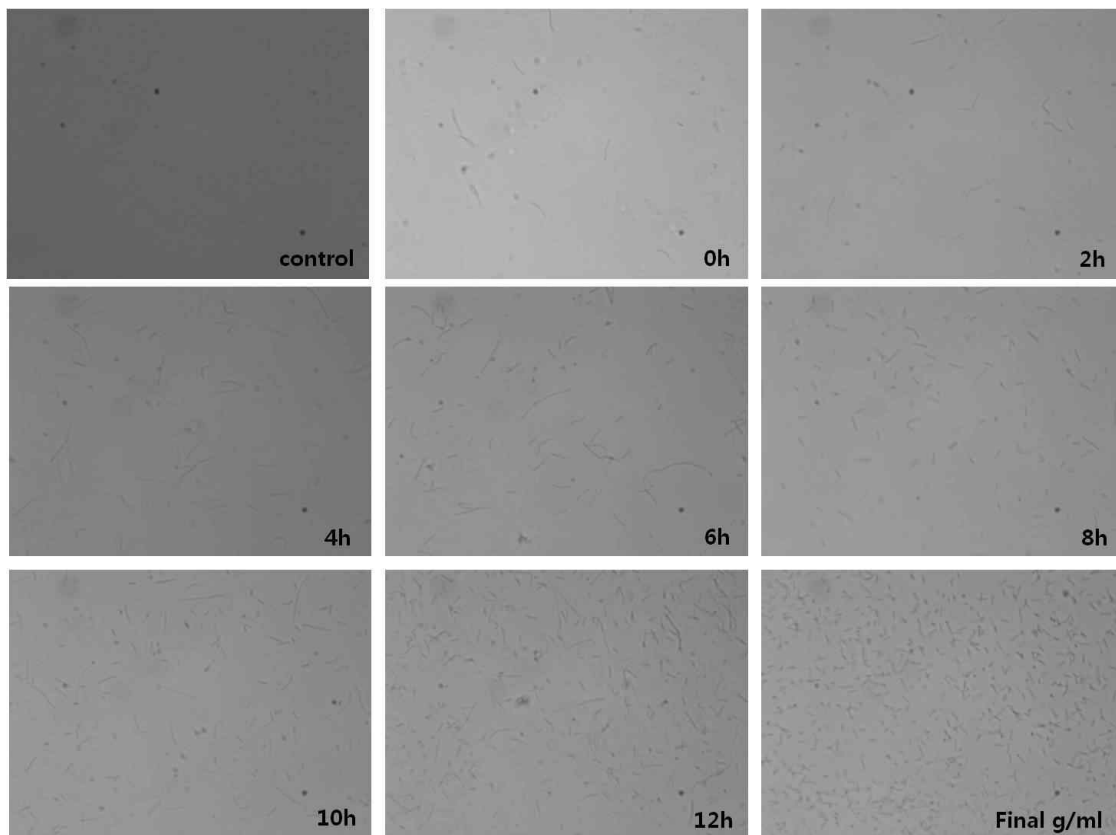


Figure 12. 시간대별 *Lb.gasseri* BNR17 morphology

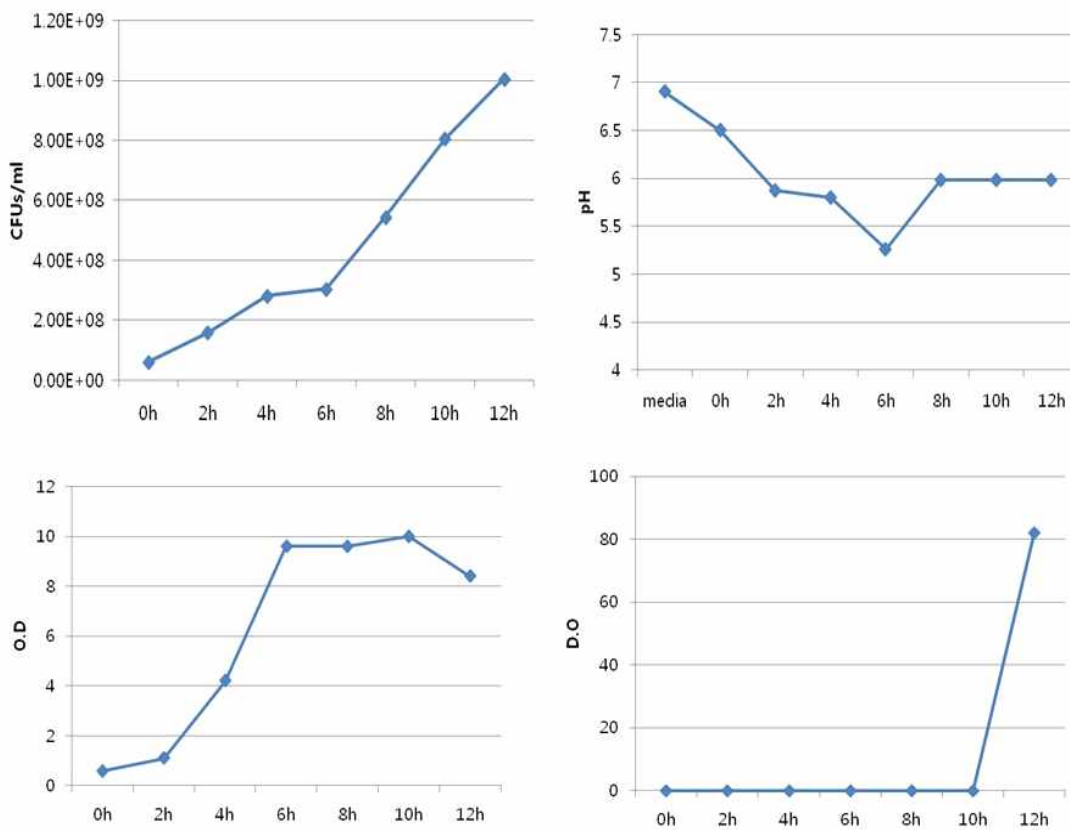
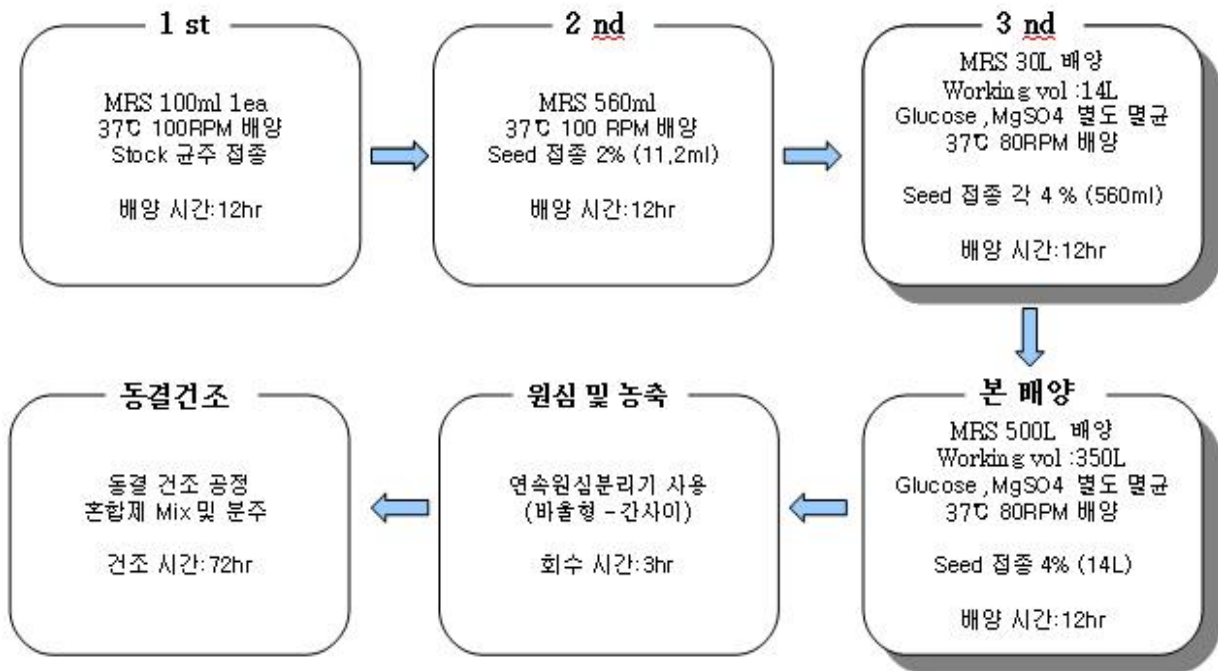


Figure 13. Growth curve (CFUs/ml, O.D, pH)

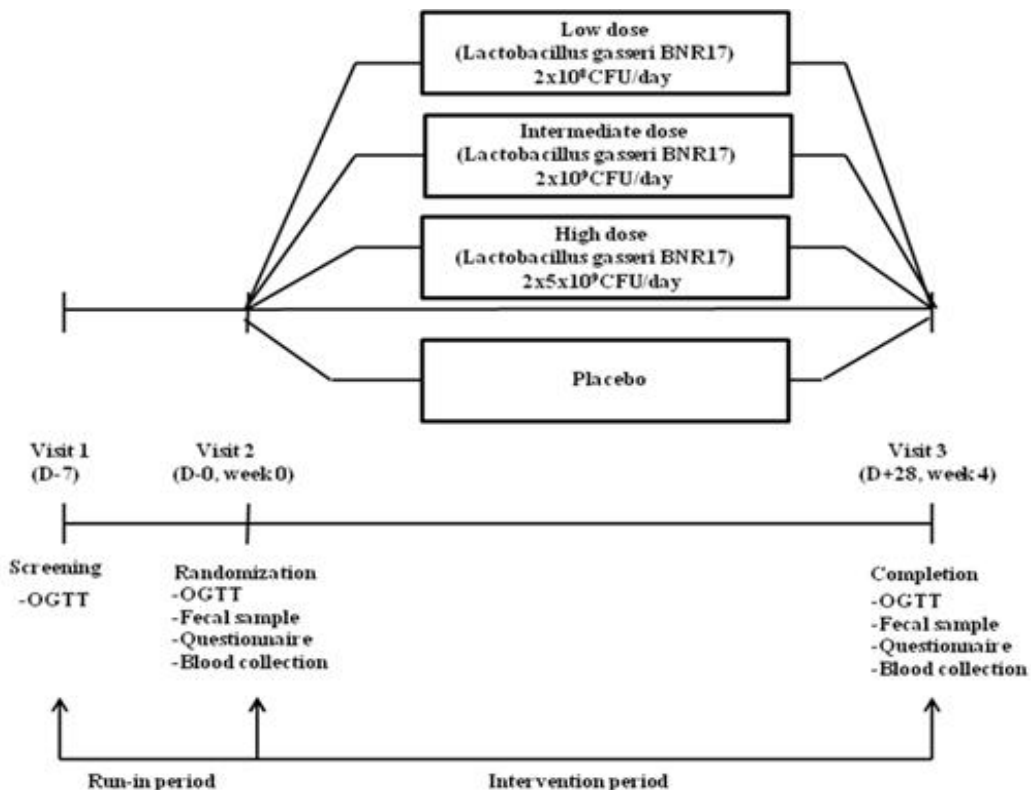
2. *Lb.gasseri* BNR17 배양공정 optimization 공정도



제 6 절. *Lactobacillus gasseri* BNR17 혈당조절 기능성 확인을 위한 인체적용연구 (Pilot Study)

1. 인체적용시험 개요

- 제목: 모유 유래 균주인 *Lactobacillus gasseri* BNR17의 내당능 개선 효과 확인을 위한 인체적용시험 (Pilot study)
- 시험대상: BMI 23kg/m²이상, 당 부하 30분 후 혈당이 140mg/dl 이상이며 IBS(Irritable bowel syndrome) 자각증상이 있는 만 20세 이상 성인
- 목적: *Lactobacillus gasseri* BNR17의 내당능 개선을 위한 유효 섭취량 설정
- 디자인: 4주간, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 실험
- 시험식품: *Lactobacillus gasseri* BNR17
- 대조식품: Dextrin
- 섭취 방법: 아침과 저녁 식전에 섭취
- 시험방법: 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자는 피험자 선정, 제외 기준에 의해 적합여부를 판정 받은 뒤 등록된 순서에 따라 대조군 또는 시험군 중 한 군으로 무작위 배정함



- 피험자수: 시험군 및 대조군은 각 군당 10명씩, 총 40명이 목표이고, 탈락률(20%)을 고려하여 선정기준에 적합한 대상자는 52명 이상 등록하기로 함

3. 인체적용시험 수행

가. 피험자 모집

- 피험자 선정기준

다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 피험자로 선정하였다.

- 1) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자
- 2) 만 20세 이상 성인
- 3) BMI 23kg/m²이상인 자
- 4) 당 부하 30분 후 혈당이 140mg/dl 이상인 자
- 5) IBS 자각 증상 있는 자

- 피험자 제외기준

다음 기술된 조건에 해당되는 사람을 피험자에서 제외시켰다.

- 1). 첫번째 방문 30일 이내에 한약 또는 건강기능식품을 일주일 이상 섭취한 자
- 2). 염증성 질환이 있거나, insulin, 소염 진통제, 항생제, 항응고제, ACE inhibitor, angiotensin II 길항제를 복용중인 자
- 3). 첫번째 방문 30일 이내에 임상시험에 참여한 자
- 4). 임신부 및 수유부
- 5). 알코올 중독자
- 6). 다음의 질환이 있는 경우
: 심부전, 관상동맥질환, 조절되지 않는 고혈압, 신기능장애, 간기능장애, 악성종양, 정신질환
- 7). 시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자
- 8). 연구자가 본 시험에 부적절하다고 판단하는 기타 질환

- 목표한 피험자의 수 및 설정근거

본 연구는 피험자 선정, 제외기준에 적합한 52명 이상을 확보하도록 하고, 인체적용시험 계획서의 위반 없이 시험을 종료한 피험자 40명 이상(시험군, 대조군 각각 10명 이상)을 통계분석하기로 계획하였다.

구 분	대조군 (placebo)	시험군 (저용량군)	시험군 (중용량군)	시험군 (고용량군)	합계
최종 평가 피험자수	10	10	10	10	40
Drop-out(20%) 고려 피험자수	13	13	13	13	52

나. 시험물질 정보

- 제형: 분말 (3g/포)
- 성분함량 : 1스틱포당 (3g) 아래와 같음

구 분	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 원말	Dextrin	합계
Placebo	0%	100%	100%
저용량시험식품	0.2%	99.8%	100% (10 ⁸ CFU)
중용량시험식품	2%	98%	100% (10 ⁹ CFU)
고용량시험식품	10%	90%	100% (5 X 10 ⁹ CFU)

다. 평가 변수

- 기능성 평가: Oral Glucose Tolerance Test, 분변 *Lactobacillus gasseri* BNR17 함량 by PCR, 분변 Interleukin-10, 배변습관 및 포만감 설문지
- 안전성 평가: 이상반응 (설사 등), 생체징후 (맥박, 혈압, 체온), 임상병리검사

라. 모니터링

피험자의 권리와 복지 보호, 보고된 인체적용시험 관련 자료가 근거문서와 대조하여 정확하고, 완전하며, 검증이 가능한지 여부 확인, 인체적용시험이 승인된 계획서에 따라 수행되는지의 여부 확인을 위하여 모니터링을 실시하였다. 구체적으로 피험자 기록 원본, 건강기능식품 관리 기록, 자료 보관(연구 파일) 등을 확인하였다.

마. 통계분석

무작위 배정 된 55명 피험자의 기본 특성은 ITT 분석을 실시하였으며, 기능성 평가는 시험을 완료한 42명을 대상으로 PP분석을 실시하여 결과를 정리하였다.

4. 결과

가. 피험자 특성

본 연구에 참여한 피험자들은 총 78명의 피험자를 스크리닝하여 경구 당부하 30분 후 혈당이 선정기준에 적합하지 않은 대상자들을 제외한 55명의 피험자가 선정되었다. 55명의 피험자 중 시험군에서 10명, 대조군에서 3명이 중도에 탈락하였다. 탈락 요인은 순응도 기준 부적합, follow-up loss로 인한 것이었다. 피험자는 20~54세로서 모든 군에서 경구 당부하 30분 후 혈당은 140 이상, BMI 23 이상으로 선정기준에 적합하고, 인구통계학적 지표를 비롯한 경구 당부하 30분 후 혈당, 공복혈당, 인슐린, 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 의 군 간 유의적 차이는 없었다.

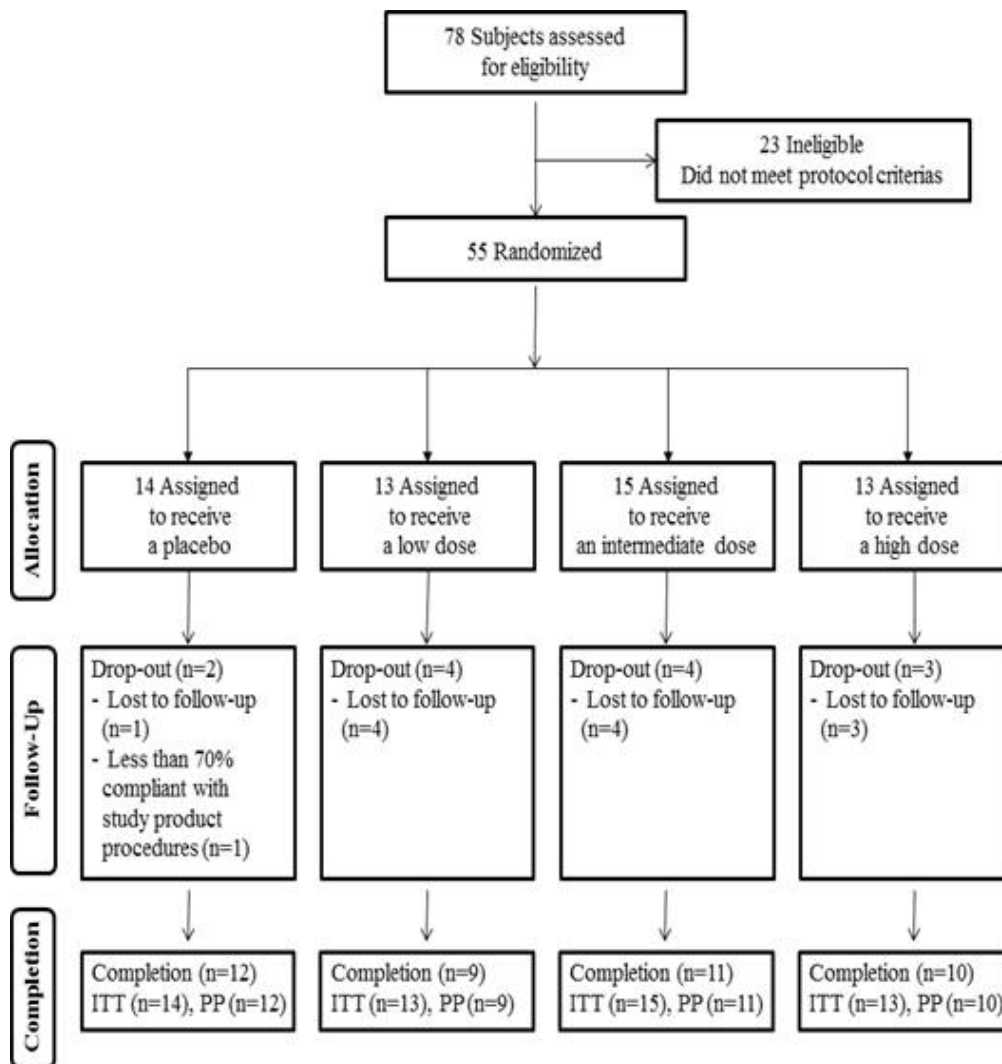


Figure 1. Flow of Study Participants Through the Trial

Table 1. Baseline characteristics of all the subjects¹⁾

Variable	Total (n=55)	Placebo (n=14)	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17			Normal range	P-value ²⁾
			Low (n=13)	Intermediate (n=15)	High (n=13)		
Sex, Male : Female (%)	65.5 : 34.5	57.1 : 42.9	46.2 : 53.8	86.7 : 13.3	69.2 : 30.8	-	-
Age (years)	28.69 ± 1.19	26.57 ± 1.95	33.87 ± 2.9	27.00 ± 2.31	27.77 ± 1.96	-	0.111
Height (cm)	172.26 ± 1.15	171.84 ± 1.92	169.02 ± 2.47	175.15 ± 2.04	172.63 ± 2.67	-	0.303
Weight (kg)	74.45 ± 1.49	75.43 ± 2.73	71.11 ± 2.18	75.35 ± 3.51	75.7 ± 3.32	-	0.679
Body Mass Index (kg/m ²)	24.93 ± 0.28	25.4 ± 0.52	24.83 ± 0.49	24.35 ± 0.63	25.22 ± 0.60	-	0.552
Systolic Blood Pressure (mmHg)	126.16 ± 1.89	127.71 ± 3.93	123.38 ± 2.58	125.27 ± 3.97	128.31 ± 4.55	< 140	0.799
Diastolic Blood pressure (mmHg)	83.69 ± 1.42	83.79 ± 1.71	81.77 ± 1.75	88 ± 4.02	80.54 ± 2.65	< 90	0.251
Pulse beat (beat/min)	83.11 ± 1.71	82.14 ± 2.21	81.15 ± 3.83	83.4 ± 3.22	85.77 ± 4.54	60 - 100	0.818
Temperature (°C)	35.76 ± 0.11	35.81 ± 0.21	35.59 ± 0.15	35.79 ± 0.18	35.85 ± 0.32	37	0.861
30min blood glucose (mg/dl)	170.31 ± 2.19	175.07 ± 6.30	174.92 ± 9.99	171.80 ± 8.52	158.85 ± 4.51	<140	0.417
Fasting blood glucose (mg/dl)	100.25 ± 1.44	101.29 ± 2.36	100.92 ± 4.42	101.40 ± 2.01	97.15 ± 2.64	<100	0.706
Insulin (mIU/L)	10.38 ± 0.69	11.50 ± 1.04	9.48 ± 0.72	8.31 ± 0.78	12.45 ± 2.34	2 - 25	0.126
Total Cholesterol (mg/dL)	185.69 ± 4.28	183.64 ± 6.63	204.46 ± 8.61	182.00 ± 8.23	173.38 ± 9.38	<200	0.080
Triglyceride (mg/dL)	120.75 ± 9.88	101.79 ± 14.07	142.23 ± 27.54	103.00 ± 11.74	140.15 ± 23.50	<150	0.284
HDL-Cholesterol (mg/dL)	53.73 ± 1.53	55.71 ± 2.40	52.39 ± 2.58	58.13 ± 4.30	50.31 ± 3.05	40 - 78	0.503
LDL-Cholesterol (mg/dL)	107.89 ± 3.56	105.21 ± 6.32	124.00 ± 7.51	103.87 ± 7.06	98.15 ± 6.64	<130	0.070

1) Data are presented as means ± SE.

2) Analysis of variance(ANOVA) among four groups.

나. 혈액검사 (안전성) 지표

0주와 4주의 혈액 안전성 지표를 분석한 결과, 각 군 별 모든 안전성 지표가 정상 범위 내에 있었다. 0주차의 ALT와 4주차의 WBC에서 군간 차이를 보였으나 모두 정상 범위 내에 있었다.

Table 2. Blood profiles of subjects (0 week)¹⁾²⁾

Variable	Total (n=55)	Placebo (n=14)	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17			Normal range	P-value ³⁾
			Low (n=13)	Intermediate (n=15)	High (n=13)		
Hematologic parameters							
WBC (Thous/uL)	6.42± 0.23	6.59± 0.42	6.32± 0.48	5.79± 0.28	7.08± 0.64	4.0 ~ 10.0	0.258
RBC (Mil/uL)	4.73± 0.06	4.69± 0.12	4.53± 0.14	4.86± 0.10	4.83± 0.11	(M) 4.2~6.3 (F) 4.0~5.4	0.193
Hemoglobin (g/dL)	14.54± 0.17	14.32± 0.33	14.27± 0.38	14.95± 0.32	14.58± 0.31	(M) 13~17 (F) 12~16	0.451
Hematocrit (%)	44.21± 0.53	43.29± 0.99	42.96± 1.28	45.67± 0.96	44.75± 0.98	(M) 39~52 (F) 36~48	0.229
Biochemical parameters							
AST (U/L)	24.24± 1.58	21.57± 1.21	26.00± 5.53	27.73± 2.72	21.31± 1.50	< 34	0.372
ALT (U/L)	25.36± 2.26	22.00± 2.23 ^b	20.92± 2.29 ^b	36.27± 6.95 ^a	20.85± 2.35 ^b	< 39	0.028*
Albumin (mg/dL)	4.67± 0.03	4.66± 0.08	4.61± 0.07	4.66± 0.07	4.73± 0.07	3.5 ~ 5	0.697
Creatinine (mg/dL)	0.90± 0.02	0.90± 0.03	0.85± 0.04	0.95± 0.02	0.90 ± 0.05	0.6 ~ 1.3	0.366

1) Data values are presented as the mean±SE

2) Laboratory normal ranges are from Seoul Medical Science Institute, Korea.

3) Statistical Statistical significances were determined by 1-way ANOVA followed Duncan's multiple range test. (p <0.05).

Table 3. Blood profiles of subjects (4 week)¹⁾³⁾

Variable	Total (n=42)	Placebo (n=12)	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17			Normal range	P-value ²⁾
			Low (n=9)	Intermediate (n=11)	High (n=10)		
Hematologic parameters							
WBC (Thous/uL)	6.63± 0.26	6.58± 0.35 ^{ab}	7.72± 0.85 ^a	5.45± 0.23 ^b	7.01± 0.38 ^a	4.0 ~ 10.0	0.010*
RBC (Mil/uL)	4.75± 0.07	4.70± 0.16	4.47± 0.14	4.92± 0.11	4.88± 0.13	(M) 4.2~6.3 (F) 4.0~5.4	0.125
Hemoglobin (g/dL)	14.52± 0.21	14.13± 0.40	13.82± 0.45	15.05± 0.33	15.05± 0.41	(M) 13~17 (F) 12~16	0.080
Hematocrit (%)	44.33± 0.63	43.33± 1.31	42.40± 1.39	45.83± 1.02	45.61± 1.15	(M) 39~52 (F) 36~48	0.159
Biochemical parameters							
AST (U/L)	20.98± 0.80	20.33± 1.11	18.22± 1.02	24.09± 1.96	20.80± 1.71	< 34	0.077
ALT (U/L)	20.19± 1.38	19.33± 2.27	15.33± 1.14	24.27± 3.75	21.10± 2.48	< 39	0.161
Albumin (mg/dL)	4.71± 0.04	4.73± 0.09	4.58± 0.09	4.79± 0.04	4.71± 0.05	3.5 ~ 5	0.232
Creatinine (mg/dL)	0.93± 0.02	0.91± 0.04	0.82± 0.03	0.99± 0.03	0.97± 0.06	0.6 ~ 1.3	0.062

1) Data values are presented as the mean±SE

2) Statistical Statistical significances were determined by 1-way ANOVA followed Duncan's multiple range test. (p <0.05).

3) Laboratory normal ranges are from Seoul Medical Science Institute, Korea.

다. 당 부하 검사 Area under the curve(AUC), Maximum concentration(Cmax), Peak time(Tmax) 변화

12시간 공복 상태에서 혈당을 측정 후, glucose 용액 섭취 30, 60, 90, 120분의 혈당을 측정하였다. 혈당 변화량의 차이를 관찰하기 위해 포도당 섭취 후 혈당의 농도변화에 따른 kinetics(AUC, Cmax, Tmax)를 각각 산출하여 통계적으로 비교하였다. 모든 지표에서 섭취 전후 변화량과 각 방문 시점 별 구간 차이는 보이지 않았다. 하지만 AUC 변화량의 경우 저용량과 중용량군에서 유의적으로 감소하였다. (Low $P=0.039$, Intermediate $P=0.014$)

Table 4. AUC, Cmax, Tmax of blood glucose levels after 75g glucose loading of all subjects during the intervention¹⁾

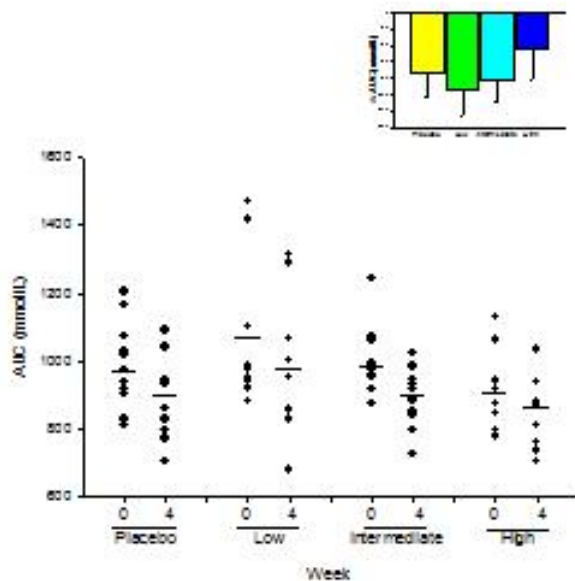
	Placebo (n=12)	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17			<i>P</i> -value ²⁾
		Low (n=9)	Intermediate (n=11)	High (n=10)	
AUC(mmol/l)					
Baseline	972.87± 37.70	1072.79± 73.35	985.10± 33.48	906.95± 37.39	0.127
Week 4	898.44± 32.11	980.05± 71.59	902.74± 28.21	864.19± 35.95	0.322
Change	-74.4± 29.96	-92.7± 32.38	-82.36± 27.57	-42.76± 39.08	0.742
<i>P</i> -value ³⁾	0.052	0.039	0.014	0.232	
Cmax(mg/dl)					
Baseline	179.9± 7.43	208.1± 14.53	179.7± 6.27	174.90± 9.21	0.086
Week 4	162.5± 6.98	182.5± 13.29	164.4± 5.68	164.80± 9.90	0.399
Change	-17.4± 7.12	-25.56± 9.18	-15.2± 7.38	-10.10± 7.76	0.611
<i>P</i> -value ³⁾	0.041	0.027	0.063	0.231	
Tmax(min)					
Baseline	45.00± 4.52	43.33± 5.27	38.18± 4.23	36.00± 4.00	0.451
Week 4	35.00± 3.37	33.33± 3.33	32.73± 2.73	36.00± 4.00	0.899
Change	-10.00± 4.26	-10.00± 7.07	-5.45± 5.45	-0.00± 6.32	0.569
<i>P</i> -value ³⁾	0.125	0.375	0.625	1.000	

1) Data are presented as means ± SE

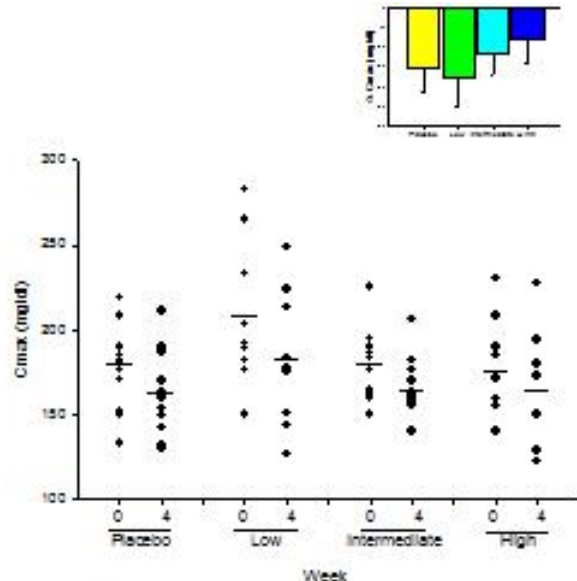
2) Statistical significances were determined at each time point by 1-way ANOVA followed Dunnett's multiple range test. ($p < 0.05$)

3) Statistical differences were determined by Wilcoxon's signed ranked test for continuous variables. ($p < 0.05$)

(A) AUC



(B) Cmax



(C) Tmax

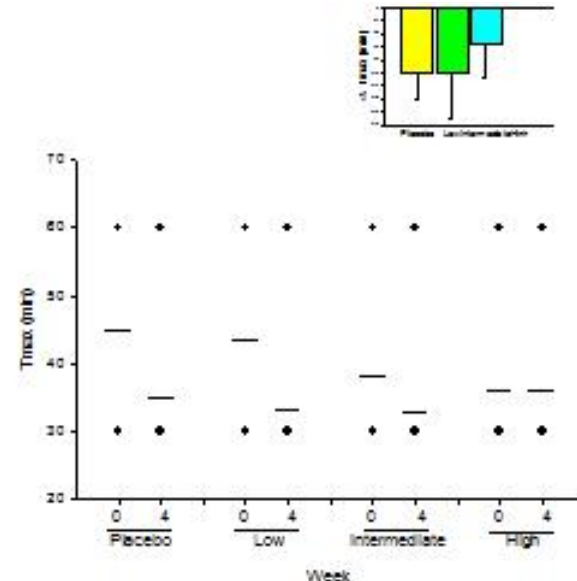


Fig. 2. Area Under the curve(AUC), maximum concentration(Cmax), and Peak time (Tmax) of all subjects by intervention groups (figure insets are delta change of the AUC, Cmax, Tmax by groups).

Subjects ingested 0 CFU (Placebo group, n=12), 10^8 CFU (Low dose group, n=9), 10^9 CFU (Intermediate dose group, n=11) or 5×10^9 CFU (High dose group, n=10) *Lactobacillus gasseri* BNR17. Each dot represents one subject and horizontal bars represent mean values. Insets represent delta values by intervention groups, from left: Placebo group, Low dose group, Intermediate dose group, High dose group *Lactobacillus gasseri* BNR17. *Significant differences were determined by Wilcoxon's signed ranked test for continuous variables.

라. 혈당 지표 간 상관분석

초기혈당과 혈당 변화량과의 관련성을 분석하기 위해 두 가지의 상관분석을 수행하였다. Baseline AUC와 AUC 변화량과의 상관분석에서 유의적인 상관성은 보이지 않았으며, 용량 의존적인 결과를 보이지 않았다. 하지만 대조군에 비해 중용량에서 더 높은 양의 상관성이 관찰되었으며, baseline 혈당이 높은 사람일수록 AUC 변화량 또한 큰 것이 관찰되었다. 이를 통해 볼 때, 보다 높은 혈당을 가진 피험자의 모집이 혈당 변화의 관찰에 더 적합한 조건으로 판단된다. 또한 Baseline fasting blood glucose와 AUC 변화량과의 상관분석에서 유의적인 상관성은 보이지 않았으며, 용량 의존적인 결과를 보이지 않았다. 하지만 대조군에서는 거의 상관관계가 관찰되지 않은 반면, 시험물질 군 중 중용량군에서 낮은 상관관계가 관찰되었다. 두 가지의 상관분석 모두에서 중용량이 대조군에 비해 혈당의 변화에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이를 토대로 baseline fasting blood glucose가 높고 낮은 사람을 층화하여, 이 중 대조군과 중용량의 AUC 변화 정도를 비교하였다. 유의성은 보이지 않았지만, Baseline fasting blood glucose가 높은 사람에서 대조군에 비해 중용량에서 더 큰 AUC 변화량이 관찰되었고, baseline의 혈당이 confounder로 작용할 수 있었던 것으로 사료된다.

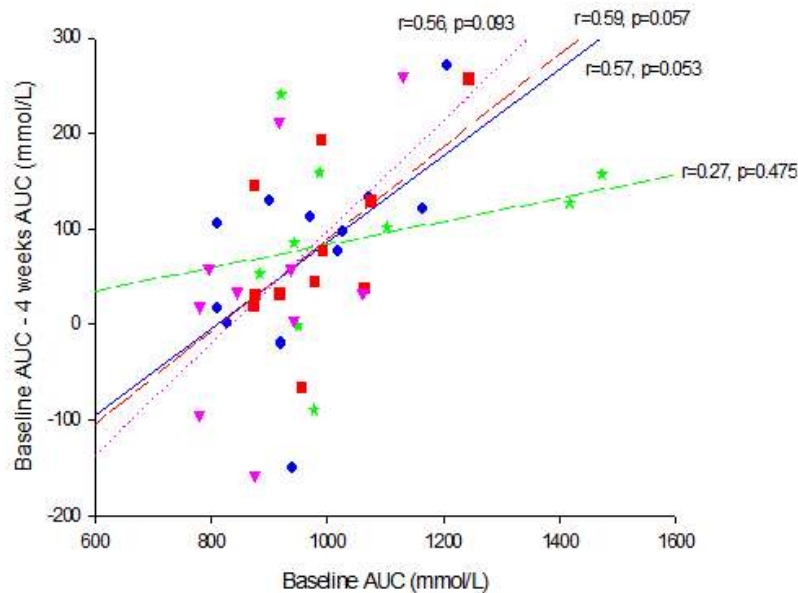


Fig 3. Relationship between Baseline AUC and AUC changes for correlation

42 Subjects ingested 0 CFU (Placebo group, ●, —), 10^8 CFU (Low dose group, ★, ----), 10^9 CFU (Intermediate dose group, ■, - · - · -) or 5×10^9 CFU (High dose group, ▼, ····) *Lactobacillus gasseri* BNR17. Each symbol represents one subjects. Statistical significance was determined by pearson correlation coefficient analyses.

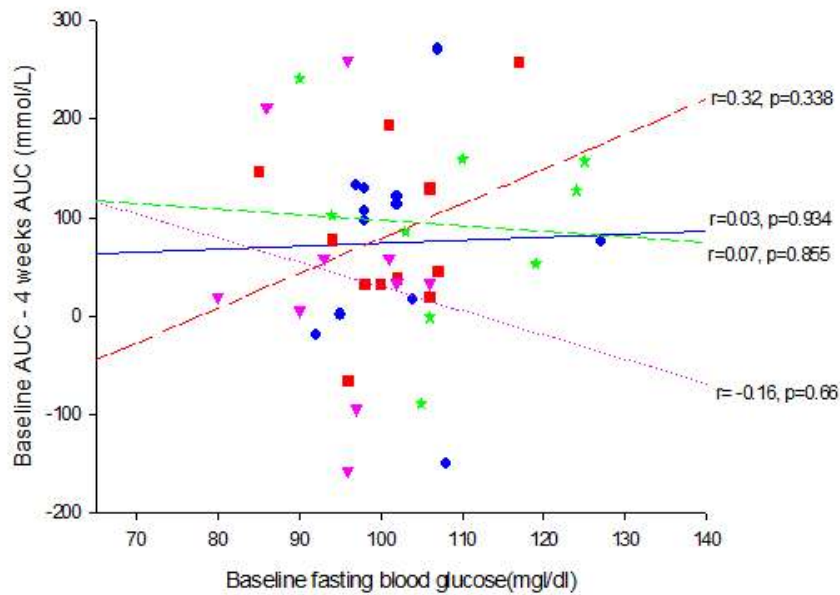
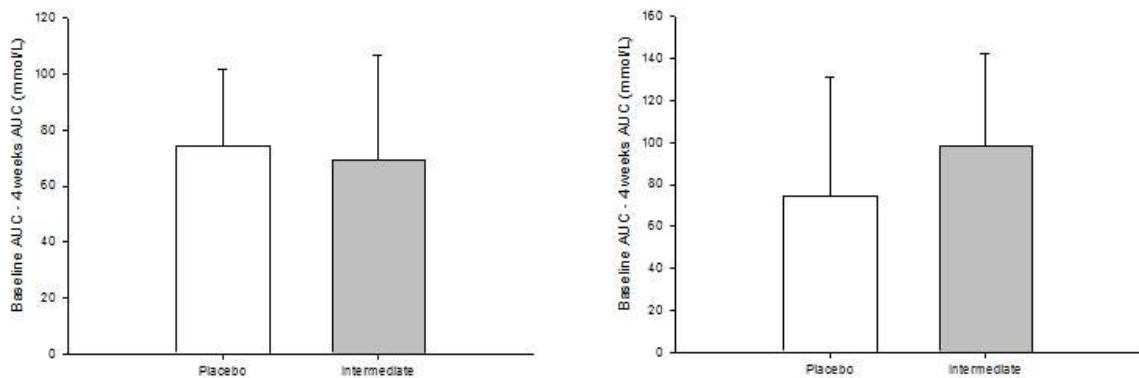


Figure 4. Relationship between Baseline fasting blood glucose and AUC change for correlation.

42 Subjects ingested 0 CFU (Placebo group, ●, —), 10^8 CFU (Low dose group, ★, ----), 10^9 CFU (Intermediate dose group, ■, - - - -) or 5×10^9 CFU (High dose group, ▼, ····) *Lactobacillus gasseri* BNR17. Each symbol represents one subjects. Statistical significance was determined by pearson correlation coefficient analyses



(A) Lower fasting blood glucose concentrations

(B) Higher fasting blood glucose concentrations

Figure 5. Comparison of AUC changes between placebo and intermediate dose group in subjects with lower or higher baseline fasting blood glucose concentrations

Subject with lower baseline fasting blood glucose (A), higher baseline fasting blood glucose (B); (0 CFU Placebo group, □), (10^9 CFU Intermediate dose group, ■). * Statistical significance was determined by using a Student's t-test or Wilcoxon's rank-sum test. ($P < 0.05$). ((A) Placebo n=6, Intermediate n=6 ; (B) Placebo n=6, Intermediate n=5)

마. 염증지표

염증반응의 개선을 보기 위한 유효성 평가변수로 Interleukin10(IL-10), Interleukin 6(IL-6), Tumor crossis factor-a(TNF-a)를 측정하였다. 통계적 outlier는 제외하였다.

- IL-10: 각 방문 시점과 섭취 전후 변화의 군간 유의적인 차이는 보이지 않았다.
- IL-6 : 각 방문 시점과 섭취 전후 변화의 군간 유의적인 차이는 보이지 않았다.
- TNF-a: 섭취 전후 변화의 군간 유의적인 차이는 보이지 않았다. 하지만 4주차에서 대조군 대비 고용량에서 유의적인 차이를 보였다(P=0.058).

Table 5. Fecal Cytokine levels of all subjects during the intervention period¹⁾

	Placebo ^{3)a)}	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17			P-value ⁴⁾
		Low ^{b)}	Intermediate ^{c)}	High ^{d)}	
IL-10(pg/ml)					
Baseline	4.75± 1.88	3.49± 1.38	1.84± 0.50	1.32± 0.40	0.226
Week 4	4.88± 1.31	4.66± 1.19	4.61± 2.23	0.77± 0.27	0.118
Change	0.13± 2.58	1.18± 1.85	2.77± 2.30	-0.55± 0.32	0.677
P-value ⁵⁾	0.945	0.250	0.219	0.383	
IL-6(pg/ml)					
Baseline	2.01± 0.58	2.16± 0.45	2.74± 0.77	1.00± 0.24	0.149
Week 4	1.78 ± 0.32	3.85± 1.69	2.12 ± 0.57	0.60± 0.24	0.124
Change	-0.23± 0.61	1.70± 1.52	-0.62± 1.01	-0.41± 0.28	0.323
P-value ⁵⁾	0.945	0.734	0.547	0.438	
TNF-a(pg/ml)					
Baseline	11.81± 9.91	2.35± 1.17	5.03± 1.77	3.07± 2.34	0.575
Week 4	4.67± 1.16	2.36± 1.18	4.22± 1.26	1.05± 0.45***	0.058
Change	-7.14± 9.53	0.02± 0.92	-0.81± 2.26	-2.02± 2.48	0.764
P-value ⁵⁾	0.250	0.625	0.641	0.938	

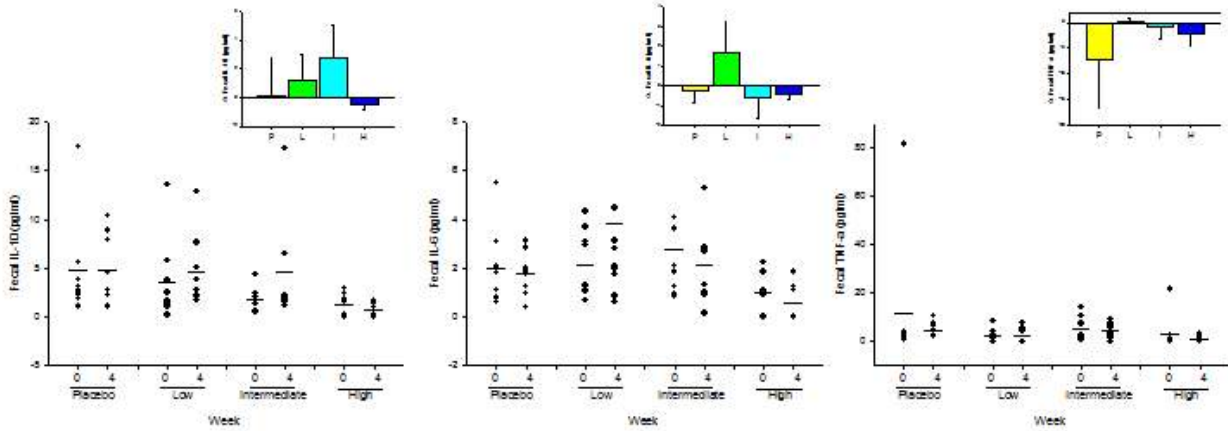
1). Data are presented as means ± SE

2). Statistical outliers were removed from analysis.

3). Number of subjects: IL10: a)n=8, b)n=9, c)n=7, d)n=8; IL-6; a)n=8, b)n=9, c)n=8, d)n=9; TNF-a; a)n=8, b)n=7, c)n=8, d)n=9

4). Statistical significances were determined at each time point by 1-way ANOVA followed by Dunnett's test. (p <0.05)

5). Statistical differences were determined by Wilcoxon's signed ranked test for continuous variables. (p <0.05)



(A) IL-10

(B) IL-6

(C) TNF-a

Figure 6. Fecal Cytokine levels of all subjects during the intervention period (figure insets are changes of concentration by groups)

Subjects ingested 0 CFU (Placebo group), 10^8 CFU (Low dose group), 10^9 CFU (Intermediate dose group) or 5×10^9 CFU (High dose group) *Lactobacillus gasseri* BNR17. The scatter plot shows the concentration of IL-10 (A), IL-6 (B), TNF-a (C). Each dot represents one single concentration of subject and horizontal bars represent mean values. Insets represent delta values by intervention groups (from left; Placebo Low dose, Intermediate dose, High dose group).

바. 분변 내 *Lactobacillus gasseri* 검출

장 점착능의 확인을 위해 분변 *Lactobacillus gasseri* BNR17의 검출여부를 PCR을 이용하여 평가하였다. 전체 실험된 샘플 대비 *Lactobacillus gasseri* 검출 샘플의 비율은 모든 군에서 증가하였다. 대조군은 visit 2에서 전체 14명 중 0명이 검출되었고, 시험식품 섭취 후 전체 13명 중 1명이 검출되어 7%의 검출률 상승을 보였다. 하지만 섭취 후 검출된 1명은 시험식품 순응도 미달(65.26%)로 분석에서 제외되었다. 저용량은 visit 2에서 전체 13명 중 2명이 검출되어 15%의 검출률을 보였지만, 시험식품 섭취 후 전체 9명 대비 7명에서 검출되어 77%의 검출률을 보였다. 중용량은 visit 2에서 전체 15명 중 0명이 검출되어 0%의 검출률을 보였지만, 시험식품 섭취 후 전체 11명 대비 10명에서 검출되어 90%의 검출률을 보여 가장 높은 검출율의 변화가 관찰되었다. 고용량은 visit 2에서 전체 13명 중 2명이 검출되어 15%의 검출률을 보였지만, 시험식품 섭취 후 전체 10명 대비 9명에서 검출되어 90%의 검출률을 보였다.

Table 6. Detection of *Lactobacillus gasseri* in fecal samples by PCR.

	Placebo		<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17					
	Week 0	Week 4	Low		Intermediate		High	
			Week 0	Week 4	Week 0	Week 4	Week 0	Week 4
Positive /tested	0 / 14	1 / 13	2 / 13	7 / 9	0 / 15	10 / 11	2 / 13	9 / 10
%	0%	7%	15%	77%	0%	90%	15%	90%

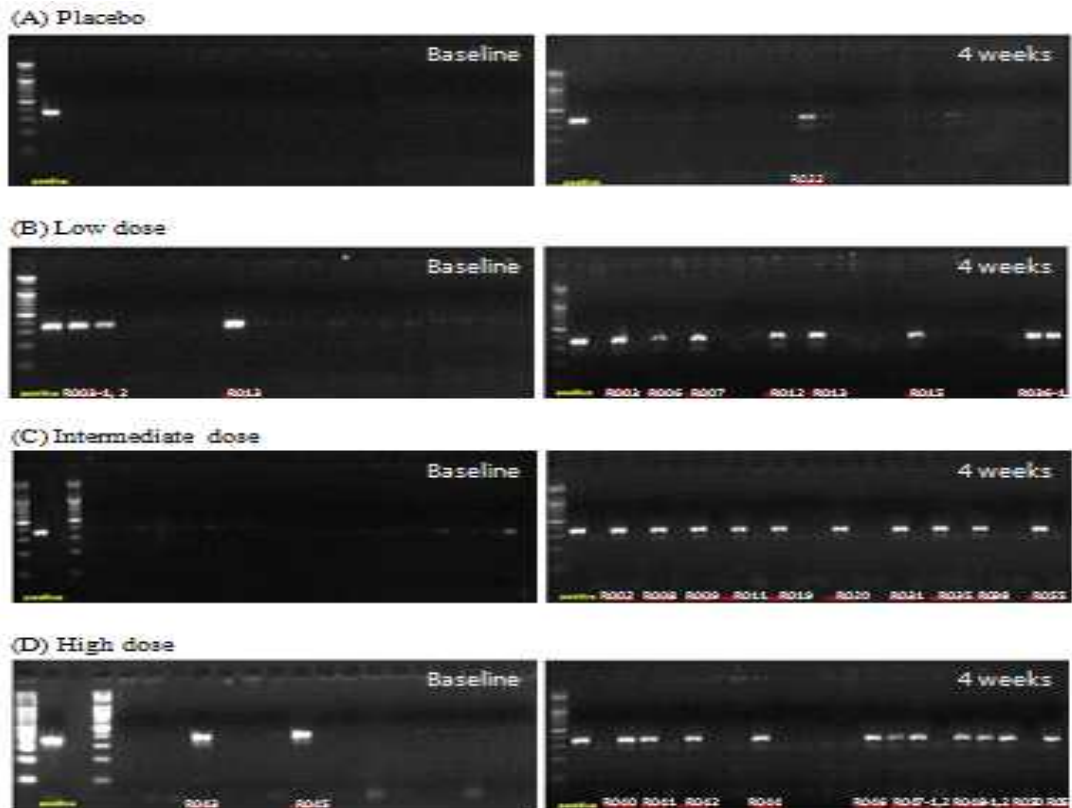


Figure 7. Gel electrophoresis images of PCR amplified fecal *Lactobacillus* samples by intervention groups.

Subjects ingested (A) 0 CFU (Placebo, left n=14, right n=13), (B) 10^8 CFU (Low dose, left n=13, right n=9), (c) 10^9 CFU (Intermediate dose group, left n=15, right n=11), (D) 5×10^9 CFU (High dose, left n=13, right n=10); The visible white band on Lane 1 and 2 represents DNA marker and positive control of *Lactobacillus gasseri* BNR17. The rests were samples.

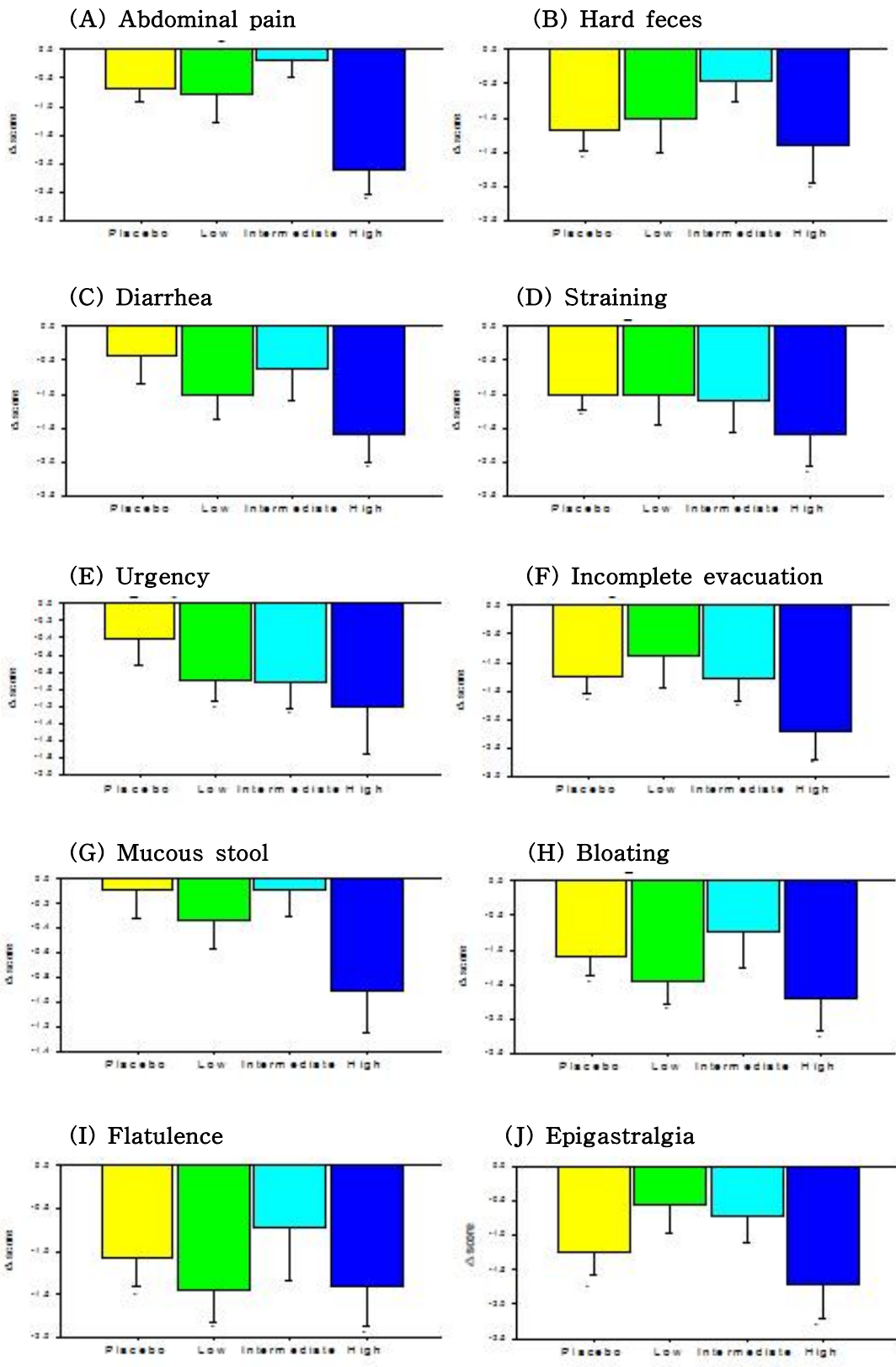
사. Irritable bowel syndrome symptom severity 설문지

과민성 대장 증후군 증상의 완화를 섭취 전 후의 점수 비교를 통하여 평가하기 위해 두 번째와 세 번째 방문에서 15개의 대표적인 과민성 대장 증후군 증상에 대한 설문을 수행하였다. 질문은 복통, 단단한 대변, 무른 변, 과도한 힘주기, 대변급박감, 잔변감, 점액 변, 팽만감, 방귀, 속쓰림, 가슴 쓰림, 위산역류, 식도 이물감, 식후 충만감, 조기만복감으로 구성되었으며 5점 척도로 평가되었다. 섭취 전후 비교 시 대조군에서 단단한 대변 ($P=0.008$), 과도한 힘주기($P=0.008$), 잔변감($P=0.004$), 팽만감($P=0.008$), 방귀($P=0.014$), 상복부 통증($P=0.008$) 등 총 6개의 항목이 유의적으로 개선되었다. 저용량에서는 대변 급박감($P=0.031$), 팽만감($P=0.016$), 방귀($P=0.016$) 등 총 3개의 항목이 유의적으로 개선되었다. 중용량에서는 대변 급박감($P=0.031$), 잔변감($P=0.031$), 식도 이물감($P=0.031$) 등 총 3개의 항목이 유의적으로 개선되었으며, 식후 충만감($P=0.008$)의 경우는 섭취 후에 오히려 유의적으로 감소하였다. 고용량에서는 복통($P=0.008$), 단단한 대변($P=0.047$), 무른 변($P=0.016$), 과도한 힘주기($P=0.016$), 잔변감($P=0.008$), 팽만감($P=0.018$), 방귀($P=0.031$), 상복부 통증($P=0.016$), 가슴 쓰림($P=0.047$) 등 9개 항목이 유의적으로 개선되었다.

Table 7. Symptom Scores related to Irritable bowel syndrome and satiety¹⁾

	Placebo (n=12)		<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17					
	Week 0	Week 4	Low (n=9)		Intermediate (n=11)		High (n=10)	
			Week 0	Week 4	Week 0	Week 4	Week 0	Week 4
Abdominal pain	2.25 ± 0.25	1.58 ± 0.15	2.11 ± 0.45	1.33 ± 0.24	2.00 ± 0.27	1.82 ± 0.26	3.30 ± 0.37	1.20 ± 0.20
Hard feces	2.50 ± 0.34	1.33 ± 0.14	2.56 ± 0.38	1.56 ± 0.18	2.45 ± 0.28	2.00 ± 0.23	3.20 ± 0.42	1.80 ± 0.25
Diarrhea	1.92 ± 0.36	1.50 ± 0.19	2.56 ± 0.47	1.56 ± 0.29	2.36 ± 0.36	1.73 ± 0.30	3.00 ± 0.49	1.40 ± 0.16
Straining	2.45 ± 0.31	1.42 ± 0.19	2.22 ± 0.43	1.22 ± 0.15	2.64 ± 0.39	1.55 ± 0.25	3.00 ± 0.49	1.40 ± 0.16
Urgency	1.92 ± 0.29	1.50 ± 0.19	2.33 ± 0.41	1.44 ± 0.34	2.45 ± 0.31	1.55 ± 0.28	2.70 ± 0.47	1.50 ± 0.22
Incomplete evacuation	2.50 ± 0.29	1.25 ± 0.13	2.33 ± 0.47	1.44 ± 0.18	2.82 ± 0.35	1.55 ± 0.25	3.70 ± 0.33	1.50 ± 0.22
Mucous stool	1.33 ± 0.22	1.25 ± 0.13	1.33 ± 0.24	1.00 ± 0.00	1.18 ± 0.12	1.27 ± 0.19	2.00 ± 0.37	1.10 ± 0.10
Bloating	2.83 ± 0.30	1.75 ± 0.18	2.89 ± 0.42	1.44 ± 0.24	2.73 ± 0.33	2.00 ± 0.36	3.60 ± 0.40	1.90 ± 0.23
Flatulence	2.83 ± 0.27	1.75 ± 0.18	3.22 ± 0.32	1.78 ± 0.28	2.73 ± 0.36	2.00 ± 0.38	3.50 ± 0.34	2.10 ± 0.18
Epigastralgia	2.92 ± 0.42	1.67 ± 0.22	2.00 ± 0.37	1.44 ± 0.24	2.18 ± 0.33	1.45 ± 0.21	3.20 ± 0.53	1.50 ± 0.17
Heartburn	1.83 ± 0.41	1.50 ± 0.23	2.00 ± 0.41	1.11 ± 0.11	2.00 ± 0.36	1.18 ± 0.12	2.40 ± 0.43	1.30 ± 0.15
Acid reflux	2.00 ± 0.39	1.58 ± 0.19	2.11 ± 0.39	1.33 ± 0.17	2.00 ± 0.30	1.18 ± 0.12	2.10 ± 0.43	1.20 ± 0.20
Globus	1.42 ± 0.34	1.08 ± 0.08	2.00 ± 0.44	1.11 ± 0.11	2.09 ± 0.37	1.00 ± 0.00	2.20 ± 0.49	1.00 ± 0.00
Post-prandial fullness	3.33 ± 0.22	2.67 ± 0.28	3.22 ± 0.32	2.56 ± 0.41	3.55 ± 0.21	2.27 ± 0.27	3.40 ± 0.27	2.90 ± 0.23
Early satiation	1.92 ± 0.29	2.00 ± 0.35	2.44 ± 0.44	2.67 ± 0.37	2.18 ± 0.26	1.73 ± 0.30	2.90 ± 0.41	2.20 ± 0.39

1) Data are presented as means ± SE



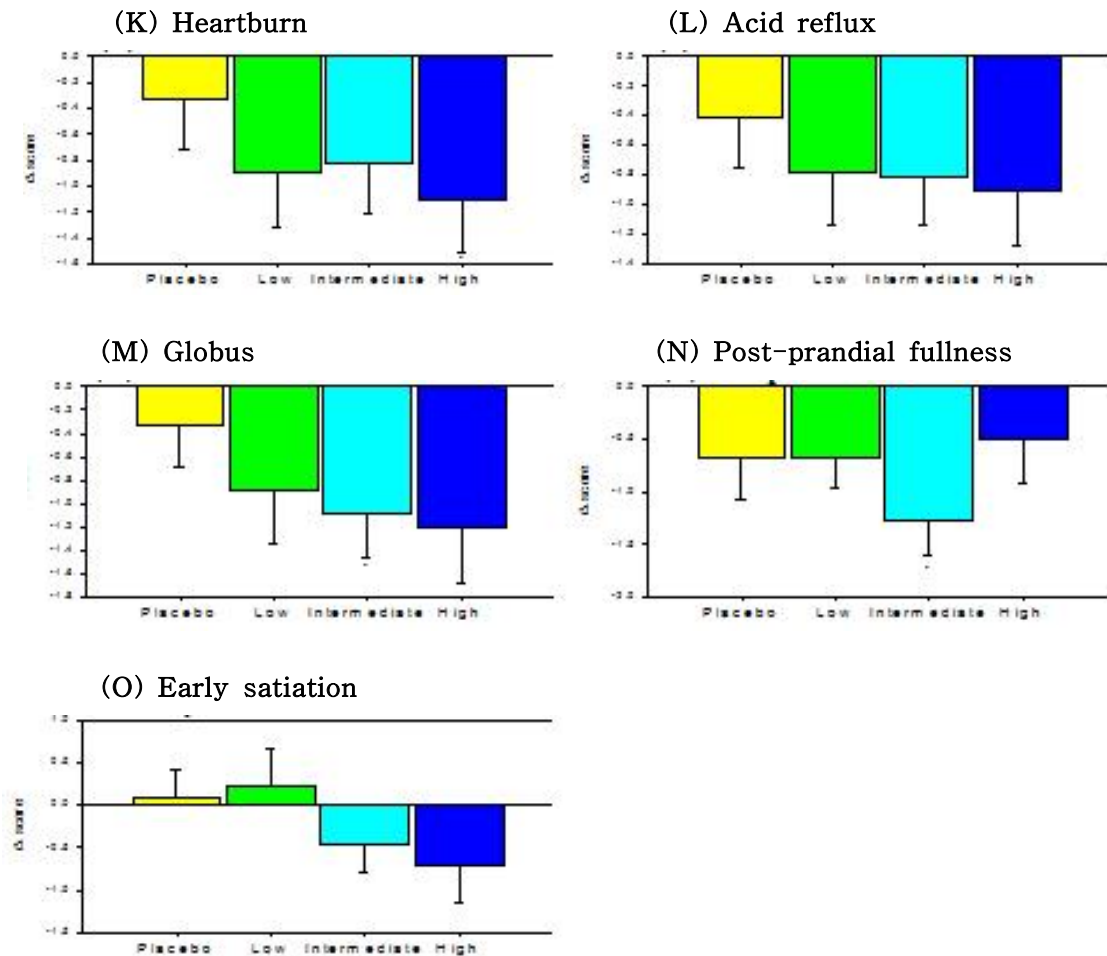


Figure 8. Delta score of each question by intervention groups.

Subjects ingested 0 CFU (Placebo group, n=12), 10^8 CFU (Low dose group, n=9), 10^9 CFU (Intermediate dose group, n=11) or 5×10^9 CFU (High dose group, n=10) *Lactobacillus gasseri* BNR17. Vertical bar chart shows the delta score of questions by intervention groups (from left, Placebo, Low dose, Intermediate dose, High dose group). Statistical differences were determined by Wilcoxon's signed ranked test for continuous variables.

아. 결론

혈당관련지표 분석결과, BNR17이 내당능 개선에 미치는 효과의 경우 용량 의존적인 경향을 보이지는 않았으나, 대조군에 비해 중용량에서 섭취 전후 비교시 내당능 개선 효과가 관찰되었다. PCR을 이용한 장 점착능 평가를 통하여 대조군에 비하여 시험물질 섭취 군에서 *Lactobacillus gasseri* BNR17의 효과적인 장 점착능을 확인할 수 있었다. 과민성 대장 증후군 증상 설문지 조사결과, 각 군 별 유의적 증상 개선이 관찰되었다.

IBS의 경우 전 세계 성인 인구의 약 10~20 %가 겪는 것으로 알려져 있고 이는 삶의 질을 크게 떨어지는 것으로 알려져 있다. 프로바이오틱스의 경우, IBS에 대한 개선효과가 널리 알려져 있으나, 그 효과는 균주에 특이적인 것으로 발표되었다(Curr Opin Clin Nutr Metab Care 14:581-587, 2011). 최근에는 건강인과 IBS인 자 약 200명을 비교한 인체연구에서, 건강

인 대비 IBS인 자에서 제2형 당뇨 시작의 첫 단계로 간주되는 prediabetes (모든 종류의 당부하 검사에서 이상을 나타내지는 않으나 장래에 당뇨병으로 되는 것)의 발병이 높은 것으로 확인되었다 (Am J Med Sci 338(2):116-9, 2009). IBS와 당뇨와의 상관관계에 대한 기전은 정확히 밝혀지지지는 않았으나, 장균총(gut microbiota)의 변화가 체내 염증 상태를 개선시키고, 이로 인해 인슐린 민감성을 상승시킴으로서 장기적으로 혈당 조절에 영향을 미치는 것으로 추측되고 있다 (Gut microbes 3:4, 279-288, 2012). 따라서 후속 인체연구에서는 IBS인 자에서 BNR17의 혈당개선 기능성 및 장기능 개선 효과를 평가함으로써 BNR17의 기능성을 과학적으로 입증하고자 한다.

제 7 절. *Lactobacillus gasseri* BNR17 혈당조절 및 장건강 기능성 확인을 위한 인체적용연구 (본시험)

I. 프로토콜 및 관련 서류 개발

가. 연구자 자료집 (IB)

(1). 기원 및 개발경위

유산균은 1857년 Pasteur에 의해 처음 발견되었으며 당시에는 포도주를 상하게 하는 해로운 미생물로 간주되었다. 1889년 파스퇴르 연구소의 Tissier는 모유 영양아의 장에서 혐기성 미생물의 일종인 *Bifidobacteria (Bacillus bifidus)*를 분리하였고, 1900년에 오스트리아의 소아과 의사인 Moro에 의해 인공영양아의 장에서 또 다른 유산균을 발견하여 *Lactobacillus acidophilus*라고 명명하였다. *Lactobacillus gasseri*는 *Lactobacillus acidophilus*에서 유전학적 특성의 차이로 분류되어 나온 probiotics로서, 모유에서 확인되는 대표적인 균주이며, 내산성, 내담즙성 및 장세포에 대한 부착활성과 병원성 세균에 대해 우수한 항균활성의 특성을 갖는 것으로 알려져 있다. (주)바이오니아는 모유로부터 *Lactobacillus gasseri* BNR17를 분리하였다.

프로바이오틱스는 적절한 양으로 섭취하였을 때, 숙주에게 건강 증진 작용을 하는 살아있는 미생물이다. 당뇨 질환 동물에게 프로바이오틱스나 oligofructose 등의 프리바이오틱스를 섭취시킬 경우, metabolic endotoxaemia가 정상화되고, plasma와 adipose tissue에서의 pro-inflammatory cytokines 농도가 감소하며, glucose homeostasis를 정상화시킨다는 연구결과가 발표되었다. 당뇨의 원인은 대부분 혈당 조절 및 insulin 분비 이상으로 알려져 있으나, 최근에는 Pro-inflammatory cytokines의 증가로 인한 chronic low-grade inflammation이 insulin resistance와 type 2 diabetes의 근원적인 발병인자임을 규명한 연구들도 다수 발표되고 있다. 당뇨 질환 동물에게 프로바이오틱스나 oligofructose 등의 프리바이오틱스를 섭취시킬 경우, metabolic endotoxaemia가 정상화되고, plasma와 adipose tissue에서의 pro-inflammatory cytokines 농도가 감소하며, glucose homeostasis를 정상화시킨다는 연구결과가 발표되었다. 정확한 메카니즘은 밝혀지지 않았으나, 프로바이오틱스는 유제품 등을 통해 전 세계적으로 많이 소비되는 식품 소재이기 때문에 이러한 효과는 당뇨 환자에게 대해 임상적으로 큰 의미를 가질 수 있다.

(주)바이오니아는 모유로부터 프로바이오틱스 특성을 가진 *Lactobacillus gasseri* BNR17를 분리하였으며, 동물 실험을 통하여 이 균주가 탁월한 혈당 저하 기능이 있음을 확인하여 특허 (등록번호: 943747) 및 논문으로 발표한 바 있다. 과체중이며 과민성 대장증후군의 자각증상이 있는 성인을 대상으로 *Lactobacillus gasseri* BNR17의 장기능 개선을 평가했던 선행연구에서, *Lactobacillus gasseri* BNR17 섭취 시 장내 염증반응이 개선되었고, 장건강 관련 설문 조사 결과 과민성대장증후군의 증상이 완화된 것을 확인할 수 있었다. 또한 과민성 대장 증후군을 무른 변과 단단한 변의 정도로 설사형과 변비형으로 구분하였을 때, 설사형 과민성 대장 증후군인 대상자에서 장기능 개선 정도가 더 큰 것으로 나타났다. 동일연구에서 *Lactobacillus gasseri* BNR17의 혈당 조절 기능을 평가한 결과, 식후 혈당 조절에 유의적 변화는 없었으나, 섭취 전후 비교 시 유의적으로 식후 혈당이 저하된 것이 확인되었다. 또한 동일 균주를 이용한 동물실험에서

공복혈당이 유의적으로 저하되었으며, 내당능이 유의적으로 개선되는 것이 관찰되었다.
따라서, 본 연구에서는 선행 인체적용시험 결과를 바탕으로, 설사형 과민성 대장 증후군인 자에서 *Lactobacillus gasseri* BNR17 섭취가 장건강 개선 및 혈당 조절에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

(2) 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료





(가). 국내

원재료는 *Lactobacillus gasseri*로 건강기능식품공전상 발효미생물류 중 프로바이오틱스에 해당한다.

(나). 국외

GRAS(Generally recognized as safe)는 US FDA에서 식품 첨가물에 대한 면밀한 검토 후일반적으로 안전하다고 입증된 식품첨가물 목록이며, 유산균인 *Lactobacillus acidophilus*는 FDA의 GRAS list에 등재되어 있다.

(다). *Lactobacillus gasseri* 사용 현황

판매국	제품명	제조사	주성분	제품사진
미국	Colon Health Probiotic Supplement	Phillips (Bayer)	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	
	Triple probiotic	Nature Made	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	
일본	Kyo-Dophilus	Vitasup	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	
	LG21	Meiji	<i>Lactobacillus gasseri</i> OLL2716	

(3) 기능성분(*Lactobacillus gasseri* BNR17)의 특성

(가) 내산성 및 내담즙성

균주의 내산성 및 내담즙성을 확인하기 위하여, *Lactobacillus gasseri* BNR17을 MRS 액체배지 4 ml에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 18~20시간 배양한 후, 이 배양액의 일정량을 pH 2.0으로 조절한 MRS 액체배지에 초기균수 10⁷ CFU/ml가 되도록 다시 접종하였고, 37℃에서 2시간 배양한 후 MRS 한천평판 배지를 이용하여 생균수를 측정하였다. 또한, 내산성 실험을 실시한 배양액을 그대로 원심분리하여 균체만 회수한 후 0.3% oxgall이 첨가된 MRS 액체배지(pH 6.8)에 접종하였고, 37℃에서 9시간 배양한 후 역시 MRS agar plate를 이용하여 생균수를 측정하였다. *Lactobacillus gasseri* BNR17은 pH 2.0의 강한 산성처리에도 불구하고 생존율이 높은 것으로 확인되었으며, 0.3% oxgall 함유 배지에서도 생존율이 높게 나타났다.

(나) 장내부착능 확인

RPMI1640 배지(Gibco)를 이용하여 인간의 장상피세포인 Caco-2 세포주를 배양한 plate에 BNR17을 일정 균수 (약 10^7 CFU/ml)가 되도록 접종하였다. 이를 37°C에서 1시간 배양한 후 인산완충용액으로 3회 세척하여 비부착 세포를 제거한 후 메탄올로 검체를 고정하였다. 이후 crystal violet으로 염색하여 현미경으로 세포를 관찰하였다. 그 결과, *Lactobacillus gasseri* BNR17이 Caco-2 세포에 잘 부착함을 확인하였다.

(다) 병원성 세균에 대한 항균력 확인

BHI액체배지(Difco)에서 37°C, 18시간 배양한 *Escherichia coli* KCTC (Korean Collection of Type Culture) 1039, *Bacillus cereus* KCTC1526, *Proteus mirabilis* KCTC2510, *Salmonella typhimurim* KCTC2421, *Staphylococcus aureus* KCTC1928, *Listeria monocytogenes* KCTC3710을 초기균수 105 CFU/ml가 되도록 5ml의 BHI agar plate (agar 0.7% 함유) 6개에 각각 접종한 후, 이를 BHI agar plate (agar 1.5% 함유)를 부어 균한 6개의 평판배지위에 각각 겹쳐 부었다. 배지를 균한 후 각 배지에 직경이 약 4 mm되는 well을 뚫고 그 위에 37°C, 24시간 배양한 본 발명의 유산균의 배양상층액 (2배 농축액) 40 μ l를 첨가하여 37°C, 5시간 배양하였다. 그 결과, 뚜렷한 생육저해를 관찰할 수 있었으며, 따라서 본 균주는 여러 가지 병원성 세균에 대한 항균력이 있음을 확인하였다.

(라) 항생제 내성 확인

MRS 한천평판배지에 면봉으로 *Lactobacillus gasseri* BNR17 배양액을 도말한 후 gentamicin, kanamycin, streptomycin, bacitracin, erythromycin, penicillin, tetracycline, ampicillin, chloramphenicol, vancomycin, ampicillin, cefoxitin, rifampin, neomycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, polymixcin B, trimethoprim이 첨가되어 있는 원형디스크를 올려놓은 후 37°C, 24시간 동안 배양하였다. 그 결과, 본 발명의 *Lactobacillus gasseri* BNR17은 gentamicin, kanamycin, streptomycin 및 bacitracin, neomycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, polymixcin B, trimethoprim에 대해 내성을 나타내었다.

(마) 항균 펩타이드 유전자의 검출

Lactobacillus gasseri 종이 생산하는 것으로 알려진 항균펩타이드인 박테리오신 유전자의 염기서열에 특이적인 primer (5' - GGAGTAGGTGGAGCGACAGT - 3', 5' - TCCACCAGTAGCTGCCGTTA - 3')를 만들고, *Lactobacillus gasseri* BNR17의 genomic DNA를 template로 이용하는 PCR로 박테리오신 유전자의 유무를 조사하였다. 그 결과, *Lactobacillus gasseri* BNR17로부터 gassericin에 해당하는 PCR 산물을 확인하였으며, 그 염기서열을 종래에 보고되어 있는 gassericin T (NCBI Blast Search No. AB029612)의 염기서열을 비교한 결과, 약 98%의 상동성을 나타내었다.

(4) 안전성 자료

건강기능식품의 기준 및 규격에 따르면, *Lactobacillus gasseri*는 제품의 기준 및 규격에 관한 내용으로 식용 가능하고 안전하다고 고시하고 있다. GRAS(Generally recognized as safe)는 US FDA에서 식품 첨가물에 대한 면밀한 검토 후 일반적으로 안전하다고 입증된 식품 첨가물 목록이며, 유산균인 *Lactobacillus acidophilus*는 FDA의 GRAS list에 등재되어 있다. *Lactobacillus gasseri*는 *Lactobacillus acidophilus*에서 최근 유전학적 특성의 차이로 분류되어 나온 그룹으로써, *Lactobacillus acidophilus*와 동일한 생화학 및 생리학적특성을 가진다.

GRAS에 등재되어 있는 경우는 그 안전성이 입증되어 국내 식품의약품안전청에서도 안전성자료를 요구하지 않는다. *Lactobacillus gasseri* 와 *Lactobacillus coryniformis* 를 10^{10} CFU/mouse/day 만큼 섭취시켰을 때 alkaline phosphatase, esterase lipase (C8), lipase, trypsin, a-quimotrypsin, b-glucuronidase, amannosidase and a-fucosidase와 같은 효소작용에 아무런 영향을 주지 않았다. (Journal of Microbiology, vol 103, Nov 1, July 2007. 175-84)

(5) 기능성 자료

“제 2 절. 문헌 및 데이터 베이스를 통한 기초 자료 수집 - 5. 기능성자료“항목 참고

2. 프로토콜

가. 연구 목적

Lactobacillus gasseri BNR17의 혈당 개선 및 장기능 개선효과를 확인한다.

나. 연구디자인

무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 실험

다. 시험식품 및 섭취량

Lactobacillus gasseri BNR17: 10^{10} CFU/day

라. 피험자 주요 선정기준

- 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자
- 만 20세 이상 65세 이하의 성인남녀
- 설사형 과민성대장증후군인 자
- 평상시 유산균을 섭취하지 않는 자

마. 피험자수: 60명

바. 시험 방법

: 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자는 피험자 선정, 제외 기준에 의해 적합여부를 판정 받는다. 선정된 피험자는 등록된 순서에 따라 대조군 또는 시험군으로 무작위배정되고, 8주간 대조식품(말토덱스트린) 또는 시험식품(10^{10} CFU/day)을 섭취한다. 0, 4, 8주에 관련 바이오마커를 분석한다.

사. 기능성평가 항목

- 혈당조절: 공복혈당, insulin, HbA1c
- 장건강: Colonic transit time, IBS 관련 설문조사 (IBS 증상 설문평가, bristol stool scale, subjective global assessment of IBS symptom improvement, 건강상태 등) 등

아. 안전성평가 항목

- 이상반응, 활력징후, 임상병리검사



3. IRB 제출 및 승인

개발된 프로토콜, 연구자자료집(IB), 증례기록서, 동의서 및 설명문 등의 서류를 분당차병원 IRB에 제출하고 승인을 득하였다 (연구번호: BD2013-064).

<p>㈜바이오니아 Bioneer Protocol No. BNR17(BS)_Bioneer Version No. 1.0 Confidential</p> <p style="text-align: center;">인체적용시험 계획서</p> <p style="text-align: center;">설사형 과민성 대장증후군인 자에서 모유 유래 균주인 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 장기능 개선 효과 확인을 위한 인체적용시험</p> <p>Protocol No. : BNR17(BS)_Bioneer Version No. : 1.0 Version Date : 2013. 5. 21</p> <p style="text-align: center;">Confidential</p> <p>본 인체적용시험 계획서에 포함된 정보는 (주)바이오니아의 독점자산이며 시험기관장, 인체적용 시험 책임자 및 담당자, 관련 행정기관, 시험기관의 기관생명윤리위원회(IRB)를 위한 것입니다. 본 계획서는 인체적용시험을 실시 또는 평가하기 위한 목적으로만 사용할 수 있으며, (주)바이오니아의 동의가 없을 경우 내용의 사용, 공개, 출판 및 기타 발표를 할 수 없습니다.</p>	<p>㈜바이오니아 Bioneer Lactobacillus gasseri BNR17 Version 1.0 Confidential</p> <p style="text-align: center;">인체적용시험자 자료집 (Investigator's Brochure)</p> <p style="text-align: center;"><i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17</p> <p>Version No. : 1.0 Version Date : 2013.5.21</p> <p style="text-align: center;">Confidential</p> <p>본 인체적용시험자료집에 포함된 정보는 (주)바이오니아의 독점자산이며 시험기관장, 인체적용시험 책임자 및 담당자, 관련 행정기관, 시험기관의 윤리위원회(IRB)를 위한 것입니다. 본 자료집은 인체적용시험을 실시 또는 평가하기 위한 목적으로만 사용할 수 있으며, (주)바이오니아의 동의가 없을 경우 내용의 사용, 공개, 출판 및 기타 발표를 할 수 없습니다.</p>	<p>㈜바이오니아 Bioneer Version 1.0 Confidential</p> <p style="text-align: center;">시험자 동의를 위한 설명서 (Version 1.1)</p> <table border="1"> <tr> <td>연구제목</td> <td>설사형 과민성 대장증후군인 자에서 모유 유래 균주인 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 장기능 개선 효과 확인을 위한 인체적용시험</td> </tr> <tr> <td>연구책임자</td> <td>장 명) 장기능 교수 (소속) 분당차병원 소화기내과 (유선전화) 031-780-4220</td> </tr> <tr> <td>시험담당자</td> <td>장 명) 김희정 조교수, 윤상표 조교수 (소속) 분당차병원 소화기내과 (유선전화) 031-780-4220</td> </tr> </table> <p>* 질병 유병률 추정치(성인) : 10% (국내), 위험인자 : 불균형 소화, 면역력 저하, 장기 장구제에 노출되어 있는 경우 등이다.</p> <p>주요한 본 인체적용시험에 참여하여 주실 것을 요청 드립니다. 본 연구의 참여결정은 귀하의 의사에 달려 있습니다. 모든 사항은 귀하의 자유의사에 따라 참여를 결정하거나 기기를 결정할 수 있습니다. 또한 연구결과를 언제라도 중단할 결정할 수 있으며, 이로 인하여 어떠한 불이익도 받지 않을 것입니다.</p> <p>아래의 내용은 본 인체적용시험 내용 및 본 연구에 참여하실 경우 귀하의 역할과 연구 진행과정 등에 대하여 설명드리고자 하였습니다. 이 설명서를 신중하게 읽어보신 후, 귀하가 본 인체적용시험에 참여할 것인지 여부를 결정하시기 바랍니다. 이 연구를 왜 수행하며, 무엇이 어떻게 진행되는지 귀하가 이해하는 것이 중요하게 여겨집니다.</p> <p>본 시험에 대하여 설명한 이 설명서 읽으셨는지 여부와 관련하여 질문이 있으시면, 귀하가 본 시험 참가 여부를 결정하기 전에 질문하면 됩니다. 질문은 해 주어드립니다. 또한 충분한 시간을 갖고 상사 숙고하여 읽으신 후, 가용이 다른 사람과 상의하실 수 있으며, 궁금하신 사항이 있으시면 인체적용시험책임자나 시험 담당자에게 질문하실 수 있습니다.</p> <p>1. 본 인체적용시험(이하 시험)의 목적 분당차병원 소화기내과에서는 자항자를 대상으로 시험식(복합유산균 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17)과 대조식(락토박테리움)을 비교하는 시험을 실시하고 있습니다. 본 시험은 설사형 과민성 대장증후군인 자를 대상으로 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 장기능 개선 효과를 평가하기 위한 목적으로 수행됩니다.</p> <p>2. 본 시험의 방법 본 시험은 설사형 과민성 대장증후군인 자를 대상으로 먼저 양성(과거병력 및 의약품 복용력, 신체검사, 혈액검사, 항체 및 소변검사)을 평가한 후, 안정된 피험자는 무작위 배정되어 8주간 시험식(복합유산균 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17) 또는 대조식을 섭취하게 됩니다. 장기능 개선 효과를 평가하기 위하여 시험계획서에 따라 일정한 시점을 시험할 예정입니다. 시험 기간 동안 장내 미생물 분석에 사용될 수 있습니다. 본 시험 종료 이후에 추가분석이 이루어지는 경우에도 같은 조건정보를 수집할 수 있도록 의뢰되어 관리될 예정입니다.</p>	연구제목	설사형 과민성 대장증후군인 자에서 모유 유래 균주인 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 장기능 개선 효과 확인을 위한 인체적용시험	연구책임자	장 명) 장기능 교수 (소속) 분당차병원 소화기내과 (유선전화) 031-780-4220	시험담당자	장 명) 김희정 조교수, 윤상표 조교수 (소속) 분당차병원 소화기내과 (유선전화) 031-780-4220				
연구제목	설사형 과민성 대장증후군인 자에서 모유 유래 균주인 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 장기능 개선 효과 확인을 위한 인체적용시험											
연구책임자	장 명) 장기능 교수 (소속) 분당차병원 소화기내과 (유선전화) 031-780-4220											
시험담당자	장 명) 김희정 조교수, 윤상표 조교수 (소속) 분당차병원 소화기내과 (유선전화) 031-780-4220											
<p style="text-align: center;">계획서</p>	<p style="text-align: center;">연구자자료집</p>	<p style="text-align: center;">동의 설명문</p>										
<p>㈜바이오니아 Bioneer Version 1.1 Confidential</p> <p style="text-align: center;">인체적용시험 피험자 동의서 (Version 1.1)</p> <p>본인은 본 인체적용시험의 목적과 구체적인 방법, 예상되는 효과 및 부작용, 개인정보의 수집 및 이용 등에 대한 설명서를 받아 보았으며, 인체적용시험 책임자로부터 그 내용을 충분히 듣고 이해하였습니다.</p> <p>모든 시험 참여에 동의하지 않았을 경우 언제든 철회가 되지 않으며, 시험 참여에 동의한 경우라도 인체적용 시험을 중단할 수 있으며, 동의 철회에 따른 모든 조항은 효력이 없습니다. 동의 철회를 통한 인체적용 시험에 대한 동의는 철회된 후에도 효력이 발생하지 않는다는 사실에 대한 설명을 들었습니다.</p> <p>본인은 위 시험에 대한 설명을 충분히 듣고 이해하였으며, 자발적으로 본 연구에 참여하는 것에 동의하며, 동의 철회가 가능한 것임을, 사후 1년을 적용받을 것임을 알고 있습니다.</p> <p>목 적 : 인체적용시험 장 명 : _____ (서명) 서 명 일 : _____년 _____월 _____일</p> <p>방정 대리인 (필요 시) 장 명 : _____년 _____월 _____일 (서명) 서 명 일 : _____년 _____월 _____일 피험자위의 관계 : _____</p> <p>인체적용시험 장 명 : _____년 _____월 _____일 (서명) 서 명 일 : _____년 _____월 _____일</p> <p style="text-align: center;">7</p>	<p style="text-align: center;">증례기록서</p> <p style="text-align: center;">Electronic Case Report Form</p> <p style="text-align: center;">설사형 과민성 대장증후군인 자에서 모유 유래 균주인 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR 17의 장기능 개선 효과 확인을 위한 인체적용시험</p> <p>Protocol No. : BNR17(BS)_Bioneer BIF Version No. : 1.0 Version Date : 2013.5.2</p> <p>인체적용시험 일시/기관 : 분당차병원 인체적용시험 책임자 : 분당차병원 소화기내과 인체적용시험 담당자 : _____ Screening No. : _____ Subject Initial : _____ Random No. : _____</p> <p>• 증례기록서 기입 시 주의사항 1. 중요 기록시 병 치료한 다음 내역서 또한 수정을 기록하여 주십시오. 2. *유전 : 불확실한, 해당 사항 없음, 불확실하여 주십시오. *Not Done = 시행하지 않음 *Not Applicable, Not Applicable = 적용불가/영역/기록되지 않음 *Unknown = 알지 못함 3. 기록 없는 불확실한 정보도 기록하여 주십시오.</p>	<p style="text-align: center;">차의과학대학교 분당차병원</p> <p>우)463-712 경기도 성남시 분당구 야탑로 59 / ☎ 031)780-5302 / FAX 031)780-5305 / 담당 : 이현정</p> <p>문서번호 : 의학연구윤리심의위원회(BR) 2013-0068</p> <p>시험일자 : 2013. 07. 09</p> <p>수 신 : ㈜바이오니아 대표이사 장 조 : 담당자</p> <p>제 목 : 2013년 07월 A채널 영구성의 승인 통지서 발송 건.</p> <p>1. 귀하의 무궁한 발전을 기원합니다. 2. 귀사에서 제출한 연구과제에 대한 심의결과를 다음과 같이 알려드립니다. - 다 - 음 -</p> <p>1. 심의일자 (승인일자) : 2013년 07월 09일 (수) 2. 심의종류 : 연구과제 3. 승인된 연구과제</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>연구번호</th> <th>연구제목</th> <th>책임 연구자</th> <th>의뢰자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>답변일자</td> <td>BD2013-064</td> <td>설사형 과민성 대장증후군인 자에서 모유 유래 균주인 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 장기능 개선 효과 확인을 위한 인체적용시험</td> <td>장기능</td> <td>㈜바이오니아</td> </tr> </tbody> </table> <p>*첨 부 : 승인 통지서 1부 붙</p> <p style="text-align: right;">차의과학대학교 분당차병원장</p>	구분	연구번호	연구제목	책임 연구자	의뢰자	답변일자	BD2013-064	설사형 과민성 대장증후군인 자에서 모유 유래 균주인 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 장기능 개선 효과 확인을 위한 인체적용시험	장기능	㈜바이오니아
구분	연구번호	연구제목	책임 연구자	의뢰자								
답변일자	BD2013-064	설사형 과민성 대장증후군인 자에서 모유 유래 균주인 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 장기능 개선 효과 확인을 위한 인체적용시험	장기능	㈜바이오니아								
<p style="text-align: center;">동의서</p>	<p style="text-align: center;">증례기록서</p>	<p style="text-align: center;">IRB 승인서</p>										

4. 시험 수행 및 모니터링

가. 시험 수행

혈당 관련 바이오마커로는 0, 8주에 공복혈당, insulin, HbA1c를 측정하였다. 장건강 관련 바이오마커로는 0, 4, 8주에 IBS 관련 설문조사(Bristol stool scale, subjective global assessment of IBS symptom improvement, VAS pain, QOL 등)를 하였고, 0, 8주에 colonic transit time 등을 측정하였다.

< 장건강 바이오마커 평가 >

<p>Bristol stool scale</p> <p>귀하의 대변양상이 여러 가지 그림을 보시고 가장 가깝다고 판단되는 것 하나만 골라 번호에 중 크라히 표시해 주십시오.</p> <p>① 단단한 덩어리 또는 알갱이 모양 ② 딱딱하고 울퉁불퉁한 소시지 모양 ③ 표면에 갈라진 막대 또는 소시지 모양 ④ 표면에 부드러운 막대 또는 소시지 모양 ⑤ 울퉁불퉁한 수제비 모양 ⑥ 죽처럼 묽어진 모양 ⑦ 덩어리가 전혀 없는 물결사</p> <p>Subjective global assessment of IBS symptom improvement</p> <p>지난 일주일 동안 당신의 과민성 장 증후군 증상의 격렬한 초점이 있었습니까? 예 아니오</p>	<p>과민성 장증후군 증상정도</p> <p>아래의 질문은 과민성 장증후군의 증상정도를 알아보기 위한 것입니다. 현재를 포함한 지난 10일간을 생각하시고, 귀하의 장증후군 증상이 0점부터 100점 중 어느 정도로 심하다고 생각하든지 그 정도를 가리키신 위에 X표시에 주십시오.</p> <p>예를 들어:</p> <p>1. 복통이 어느 정도로 심합니까? 0점 (중요 없음) ----- X ----- 100점 (매우 심함)</p> <p>2. 복부팽만감이나, 팽창하거나, 꼬이는 것 같은 느낌이 어느 정도로 심합니까? 0점 (중요 없음) ----- X ----- 100점 (매우 심함)</p> <p>3. 귀하의 배변습관에 대해 어느 정도로 만족하십니까? 0점 (불만족) ----- X ----- 100점 (매우 만족)</p> <p>4. 대체적으로, 과민성 장증후군이 귀하의 삶에 얼마나 지장을 준다고 생각하십니까? 0점 (전혀 지장 없음) ----- X ----- 100점 (매우 지장 있음)</p> <p>5. 지난 10일 동안 복통이 있었던 날은 며칠이었는지 기록해 주십시오. <input type="checkbox"/> 일</p> <p>6. 지난 10일간 하루 평균 배변 횟수는 얼마 인가요? <input type="checkbox"/> 회</p>	
<p>IBS 관련 설문조사</p>		<p>Colonic transit time 측정</p>

나. 모니터링

e-CRF데이터 export를 통한 데이터 오류 검토, site monitoring을 통해 원자료와 e-CRF 상의 데이터를 대비하고 확인하는 모니터링을 수행하였다.

	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Rno</th> <th>상세사항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PR005</td> <td>기능성평가: Rome 설문평가 실시 여부 확인 (wk0)</td> </tr> <tr> <td>PR008</td> <td>기능성평가: 과민성 장증후군 설문 실시 여부 확인 (wk8)</td> </tr> <tr> <td>PR009</td> <td>인상병리검사(혈액): neutrophils 임상적 의미 확인 (wk8)</td> </tr> <tr> <td>MR013</td> <td>순응도 확인: 순응도확인 여부 확인 (wk4)</td> </tr> <tr> <td>PR011</td> <td>순응도 확인: 순응도확인 여부 확인 (wk4)</td> </tr> <tr> <td>PR027</td> <td>순응도 확인: 순응도확인 여부 확인 (wk4)</td> </tr> <tr> <td>MR018</td> <td>기능성평가: QOL 확인 (wk4)</td> </tr> <tr> <td>PR033</td> <td>기능성평가: Rome 설문평가 실시 여부 확인 (wk0)</td> </tr> <tr> <td>MR021</td> <td>활력징후: 맥박, 수축기 혈압, 이완기 혈압, 체온 확인 (wk0)</td> </tr> </tbody> </table>	Rno	상세사항	PR005	기능성평가: Rome 설문평가 실시 여부 확인 (wk0)	PR008	기능성평가: 과민성 장증후군 설문 실시 여부 확인 (wk8)	PR009	인상병리검사(혈액): neutrophils 임상적 의미 확인 (wk8)	MR013	순응도 확인: 순응도확인 여부 확인 (wk4)	PR011	순응도 확인: 순응도확인 여부 확인 (wk4)	PR027	순응도 확인: 순응도확인 여부 확인 (wk4)	MR018	기능성평가: QOL 확인 (wk4)	PR033	기능성평가: Rome 설문평가 실시 여부 확인 (wk0)	MR021	활력징후: 맥박, 수축기 혈압, 이완기 혈압, 체온 확인 (wk0)
Rno	상세사항																				
PR005	기능성평가: Rome 설문평가 실시 여부 확인 (wk0)																				
PR008	기능성평가: 과민성 장증후군 설문 실시 여부 확인 (wk8)																				
PR009	인상병리검사(혈액): neutrophils 임상적 의미 확인 (wk8)																				
MR013	순응도 확인: 순응도확인 여부 확인 (wk4)																				
PR011	순응도 확인: 순응도확인 여부 확인 (wk4)																				
PR027	순응도 확인: 순응도확인 여부 확인 (wk4)																				
MR018	기능성평가: QOL 확인 (wk4)																				
PR033	기능성평가: Rome 설문평가 실시 여부 확인 (wk0)																				
MR021	활력징후: 맥박, 수축기 혈압, 이완기 혈압, 체온 확인 (wk0)																				
<p>e-CRF</p>	<p>모니터링</p>																				

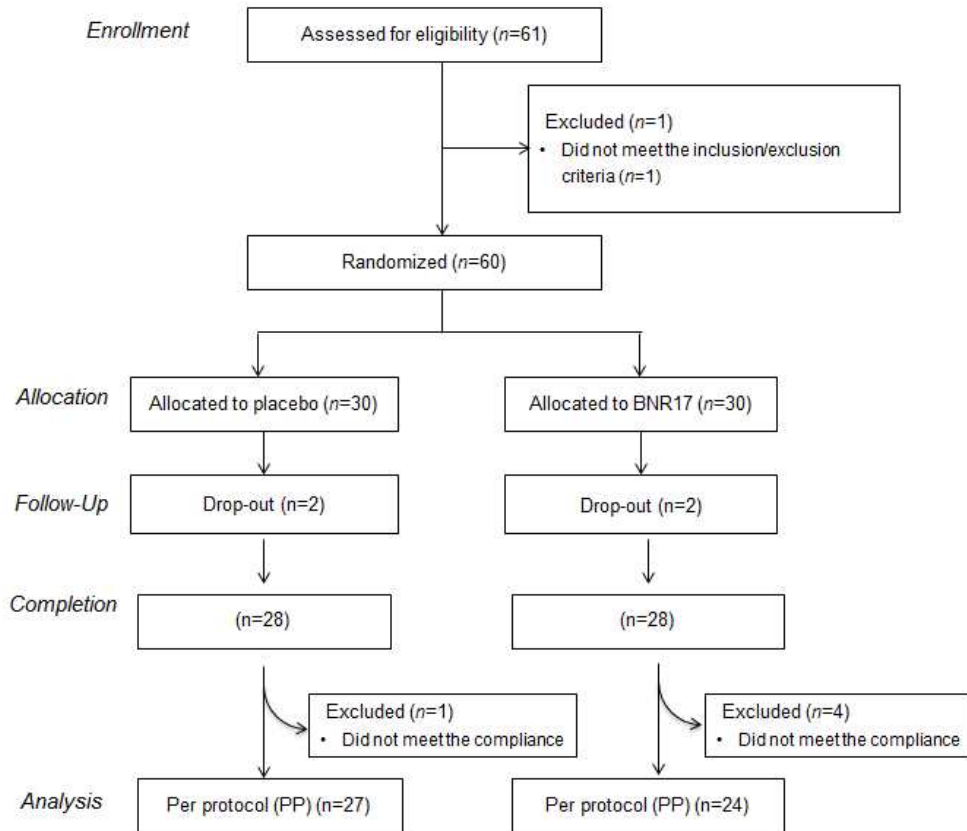
5. 시험 결과

가. 피험자 모집 및 등록

: 총 61명의 피험자를 스크리닝하여 선정기준에 적합한 60명의 피험자를 선정하였다.

대조군과 시험군에 각각 30명씩 부작용 배정하였으며, 각 군에서 2명씩 중간 탈락함.

또한 순응도 80%를 만족하지 못한 5명(대조군 1명, 시험군 4명)을 제외한 PP set (per protocol set) 51명을 대상으로 통계분석을 수행하였다.



나. 기초특성

성별과 나이, 체중, BMI, SBP, DBP, 흡연은 Placebo군과 BNR 17군에서 차이를 보이지 않았으나 음주력은 군간에 유의한 차이를 보였다.

Table 8. Baseline characteristics¹⁾

	Placebo (n = 27)	BNR17 (n = 24)	P-value ²⁾
Gender (Male / Female)	10 / 17	12 / 12	0.3508
Age (years)	38.0 (30.0, 46.0)	35.0 (32.0, 40.5)	0.2639
Weight (Kg)	62.7 (54.0, 77.0)	68.2 (56.4, 82.5)	0.2736
BMI (Kg/m ²)	22.9 (20.1, 27.9)	23.9 (21.6, 27.6)	0.4335
SBP (mm Hg)	118.0 (104.0, 134.0)	119.5 (110.0, 135.5)	0.4848
DBP (mm Hg)	70.0 (64.0, 77.0)	70.5 (67.0, 81.5)	0.6706
Alcohol consumption (Current drinker / former drinker / non-drinker)	15 / 3 / 9	22 / 1 / 1	0.0066
Smoking (Current smoker / former smoker / non-smoker)	2 / 4 / 21	5 / 5 / 14	0.2714

1) Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values).

2) Between-group comparisons using Student's t-test or Wilcoxon rank sum test for continuous variables and Chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables.

다. 혈당 관련 지표

공복혈당, HbA1c, 인슐린 평가결과, 8주간의 변화값에 대한 군간 유의한 차이는 없었다. 그러나 섭취 전후 비교시, 대조군은 유의한 차이가 없었으나, BNR17 군에서는 8주째에 통계적으로 유의한 공복혈당의 변화를 확인할 수 있었다. HbA1c, Insulin는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 혈당이 110 mg/dL 이상인 피험자들이 각 군에 5명씩 배정되었고 혈당의 변화를 비교해보면 BNR17은 5명이 -10, -5, -18, -1, -18 mg/dL 변화하여 평균 10.4 mg/dL 감소하였고 Placebo군은 5명이 +5, +0, -8, -9, -2 변화하여 평균 2.8 mg/dL이 감소하였다. 비록 혈당이 높은 피험자의 숫자가 적지만 pilot study에서 혈당감소에 유의한 효과를 보였다는 결과에 부합됨을 확인할 수 있다.

Table 9. Glucose, HbA1c and insulin in fasting blood¹⁾

	Placebo (n = 27)	BNR17 (n = 24)	P-value ³⁾
Glucose (mg/dL)			
Week 0	99.0 (93.0, 112.0)	101.5 (98.0, 105.5)	0.4499
Week 8	99.0 (92.0, 106.0)	97.5 (94.5, 102.0)	0.6985
Δ Week 8 - 0	-2.0 (-5.0, 5.0)	-3.0 (-8.0, 0.5)	0.3070
P-value ²⁾	0.4402	0.0138	
HbA1c (%)			

Week 0	5.5	(5.3, 5.8)	5.4	(5.3, 5.8)	0.5184
Week 8	5.5	(5.3, 5.7)	5.5	(5.2, 5.7)	0.5308
Δ Week 8 - 0	0.0	(-0.1, 0.2)	0.0	(-0.1, 0.1)	0.9772
<i>P</i> -value ²⁾	0.7880		0.7894		
Insulin (μIU/mL)					
Week 0	4.4	(3.5, 7.3)	5.1	(2.7, 7.0)	0.6919
Week 8	4.2	(2.7, 7.8)	3.7	(2.4, 5.5)	0.2420
Δ Week 8 - 0	-0.5	(-1.7, 1.5)	-1.0	(-2.0, 0.7)	0.4909
<i>P</i> -value ²⁾	0.3648		0.2050		

1) Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values).

2) Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

3) Between-group comparisons using Wilcoxon rank sum test.

라. 장건강 관련 지표

(1). Colonic transit time

Placebo군에서는 0주와 8주에 colonic transit time의 차이가 없으나, BNR17군에서는 colonic transit time이 0주대비 8주째 통계적으로 유의하게 증가함으로써 BNR17의 유의적인 효과를 확인할 수 있었다. Subgroup analysis를 수행한 결과, BNR17은 총 24명이 CTT분석에 참여했으며 uneffective와 fast transit time에서 정상으로 변화되거나 정상 유지된 수는 8명(33.33%) 이었고, 대조군은 27명이 CTT분석에 참여했으며 uneffective와 fast transit time에서 정상으로 변화되거나 정상 유지된 수는 8명(29.62%) 이었다. 특히, fast transit time(diarrhea 등)에서 정상수치로 변화된 피험자의 경우, 대조군은 2명, BNR17군은 6명으로서 BNR17의 효과를 확인할 수 있었다.

Table 10. Colonic transit time¹⁾

	(unit: hr)		
	Placebo (n = 27)	BNR17 (n = 24)	<i>P</i> -value ³⁾
Week 0	8.4 (2.4, 31.2)	5.4 (0.0, 28.7)	0.3578
Week 8	13.2 (0.0, 26.4)	19.2 (2.4, 40.8)	0.1460
Δ Week 8 - 0	-2.4 (-14.4, 10.8)	2.4 (-1.2, 20.4)	0.0155
<i>P</i> -value ²⁾	0.2762	0.0464	

1) Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values).

2) Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

3) Between-group comparisons using Wilcoxon rank sum test.

(2) IBS 증상 설문평가

‘Q1. 복통이 어느 정도로 심합니까?’, ‘Q2. 복부팽만 (붓거나, 똥똥 하거나, 쪼이는 것 같은 느낌)이 어느 정도로 심하십니까?’, ‘Q3. 귀하의 배변습관에 대해 어느 정도로 만족하십니까?’ ‘Q5. 지난 10일 동안 복통이 있었던 날은 며칠이었는지 기록해 주십시오.’ 문항에서 BNR 17군

이 대조군에 비하여 증상의 호전을 보였다. 하지만 ‘Q6. 지난 7일간 하루 평균 배변 횟수는 얼마입니까?’ 문항에서는 placebo 군에서 유의한 호전을 보인 반면 BNR17군에서는 배변횟수의 호전은 보이지 않았다. 즉 요약하면 증상의 정도는 BNR17군에서 대체로 유의하게 호전되었으나 배변횟수는 placebo군에서만 호전되었다.

Table 11. Questionnaire for the degree of IBS symptom¹⁾

	Placebo (n = 27)		BNR17 (n = 24)		P-value ³⁾
Q1. 복통이 어느 정도로 심합니까?					
Week 0	4.7	(2.1, 6.5)	3.6	(1.9, 6.8)	0.7055
Week 4	4.5	(1.8, 6.0)	1.8	(1.1, 3.1)	0.0157
Week 8	2.9	(1.1, 5.3)	1.2	(0.5, 2.7)	0.0178
Δ Week 8 - 0	-0.4	(-3.1, 0.5)	-2.1	(-4.2, 0.4)	0.2613
P-value ²⁾	0.1142		0.0032		
Q2. 복부팽만 (붓거나, 똥똥하거나, 찌르는 것 같은 느낌)이 어느 정도로 심하십니까?					
Week 0	6.4	(1.8, 7.4)	6.8	(4.4, 8.0)	0.1895
Week 4	5.2	(1.2, 6.6)	3.1	(1.3, 5.1)	0.2692
Week 8	3.1	(2.0, 5.9)	1.9	(0.9, 3.1)	0.0578
Δ Week 8 - 0	-0.7	(-4.3, 0.9)	-4.0	(-5.6, -1.3)	0.0134
P-value ²⁾	0.1172		<0.0001		
Q3. 귀하의 배변습관에 대해 어느 정도로 만족하십니까?					
Week 0	3.2	(1.1, 7.0)	1.7	(0.7, 2.8)	0.0405
Week 4	3.4	(2.1, 6.5)	5.0	(1.5, 7.1)	0.9699
Week 8	3.3	(1.5, 6.2)	5.7	(1.5, 7.8)	0.5457
Δ Week 8 - 0	0.3	(-1.3, 1.8)	2.0	(-0.1, 5.1)	0.0300
P-value ²⁾	0.8426		0.0008		
Q4. 대체적으로, 과민성 장증후군이 귀하의 삶에 얼마나 지장을 준다고 생각하십니까?					
Week 0	5.5	(2.8, 7.8)	6.8	(4.9, 8.1)	0.2342
Week 4	5.1	(2.5, 6.9)	4.0	(2.6, 7.1)	0.9323
Week 8	3.5	(2.2, 6.6)	4.8	(2.2, 7.6)	0.5272
Δ Week 8 - 0	-0.5	(-2.8, 0.9)	-0.8	(-2.9, 0.5)	0.6438
P-value ²⁾	0.1792		0.0508		
Q5. 지난 10일 동안 복통이 있었던 날은 며칠이었는지 기록해 주십시오.					
Week 0	3.0	(1.0, 4.0)	3.0	(1.0, 5.0)	0.6062
Week 4	2.0	(1.0, 3.0)	1.0	(0.0, 3.0)	0.0680
Week 8	2.0	(1.0, 3.0)	1.0	(0.0, 2.0)	0.1462
Δ Week 8 - 0	-1.0	(-1.0, 1.0)	-1.5	(-3.8, 0.5)	0.1481

<i>P</i> -value ²⁾	0.3424	0.0051	
Q6. 지난 7일간 하루 평균 배변 횟수는 얼마 입니까?			
Week 0	2.0 (1.0, 4.0)	2.5 (2.0, 3.0)	0.4505
Week 4	2.0 (1.0, 4.0)	2.5 (1.0, 3.0)	0.7889
Week 8	1.5 (1.0, 2.0)	1.5 (1.0, 3.5)	0.5809
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, 0.0)	-1.0 (-1.5, 1.0)	0.8254
<i>P</i> -value ²⁾	0.0172	0.0966	

1) Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values). Q1-Q4: Visual analogue scale, 0 (not at all) - 10 (extremely), Q5: day, Q6: number of frequency.

2) Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

3) Between-group comparisons using Wilcoxon rank sum test.

(3). Bristol stool scale

Placebo군의 경우, 0주째에는 type 6이 가장 많았으나 8주후에는 type 4가 가장 많은 형태를 보였다. BNR17군에서는 처음과 8주후 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 12. Bristol Stool Scale¹⁾

	Placebo (n = 27)	BNR17 (n = 24)	<i>P</i> -value ³⁾
Week 0	0 / 2 / 0 / 10 / 3 / 12 / 0 5.0 (4.0, 6.0)	2 / 0 / 0 / 6 / 3 / 10 / 3 6.0 (4.0, 6.0)	0.1771 0.3262
Week 4	1 / 1 / 0 / 13 / 3 / 9 / 0 4.0 (4.0, 6.0)	0 / 0 / 3 / 11 / 4 / 4 / 2 4.0 (4.0, 5.5)	0.1430 0.7778
Week 8	1 / 1 / 3 / 14 / 6 / 2 / 0 4.0 (4.0, 5.0)	0 / 0 / 5 / 7 / 4 / 8 / 0 4.5 (4.0, 6.0)	0.0883 0.1491
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-0.5 (-1.5, 0.0)	0.6705
<i>P</i> -value ²⁾	0.0079	0.2436	

1) Type 1 (Separate hard lumps, like nuts) / Type 2 (Sausage-shaped, but lumpy) / Type 3 (Like a sausage but with cracks on its surface) / Type 4 (Like a sausage or snake, smooth and soft) /

Type 5 (Soft blobs with clear cut edges) / Type 6 (Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool) / Type 7 (Watery, no solid pieces) (all such values). Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values).

2) Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

3) Between-group comparisons using Fisher's exact test and Wilcoxon rank sum test.

(4). Subjective global assessment of IBS symptom improvement

BNR17군에서 증상이 호전되었다는 대답이 더 많은 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (P =0.0879).

Table 13. Subjective global assessment of IBS symptom improvement

	Placebo (n = 27)	BNR17 (n = 24)	P-value ¹⁾
	(improved / not improved)		
Week 0	0 / 27	0 / 24	-
Week 4	14 / 13	15 / 9	0.4435
Week 8	14 / 13	18 / 6	0.0879

1) Between-group comparisons using Chi-square test.

(5). 건강상태 설문조사

‘Q2. 일년 전과 비교했을 때, 현재 귀하의 전반적인 건강상태는 어떻습니까?’ 문항에서 BNR17 군에서 건강상태가 호전되었다고 응답하였고 ‘Q3-4. 계단으로 여러 층 걸어 올라가는 것’ 과 ‘Q4-1. 일이나 다른 일상적인 활동으로 보내는 시간을 줄였다.’ ‘Q4-2. 원하는 것보다 적은 양의 일을 했다.’, ‘Q6. 지난 4주 동안에, 귀하의 신체적인 건강 문제 혹은 정서적인 문제로 인하여, 귀하의 가족, 친구, 이웃 또는 동료들과의 정상적인 사회활동에 어느 정도 지장이 있었습니까?’, ‘Q7. 지난 4주 동안에, 몸에 통증이 얼마나 많이 있었습니까?’, ‘Q8. 지난 4주 동안에, 귀하의 몸의 통증 때문에 정상적인 일 (집 밖의 일과 집안 일을 포함해서)을 하는 데 얼마나 지장이 있었습니까?’, ‘Q9-1. 귀하는 원기 왕성하다고 느꼈습니까?’ 문항에서 BNR 17 군에서 증상이 호전되었다. ‘Q5-1 일이나 다른 일상적인 활동으로 보내는 시간을 줄였다.’, ‘Q9-7. 귀하는 완전히 지쳤습니까?’, ‘Q9-9. 귀하는 피곤함을 느꼈습니까?’, ‘Q11-4. 나의 건강상태는 최고로 좋다.’ 문항에서는 Placebo 군에서 증상이 호전되었다. ‘Q5-3. 일이나 다른 일상적인 활동을 하는 데 평소처럼 주의를 기울이지 못했다.’문항에서는 두군 모두 증상이 호전되었다.

Table 14. Questionnaire for health status¹⁾

	Placebo (n = 27)	BNR17 (n = 24)	P-value ³⁾
Q1. 전반적으로 귀하의 건강상태는 어떠합니까?			
Week 0	2.0 (2.0, 3.0)	2.0 (2.0, 3.0)	0.8869
Week 4	2.0 (2.0, 3.0)	2.0 (2.0, 3.0)	0.4469
Week 8	2.0 (2.0, 3.0)	2.0 (2.0, 2.5)	0.2450
Δ Week 8 - 0	0.0 (0.0, 0.0)	0.0 (-1.0, 0.0)	0.0987
P-value ²⁾	0.7539	0.3367	
Q2. 일년 전과 비교했을 때, 현재 귀하의 전반적인 건강상태는 어떻습니까?			
Week 0	2.0 (2.0, 3.0)	3.0 (2.0, 3.0)	0.0217
Week 4	2.0 (2.0, 3.0)	2.0 (2.0, 3.0)	0.6885
Week 8	2.0 (2.0, 2.0)	2.0 (1.0, 3.0)	0.3912
Δ Week 8 - 0	0.0 (-1.0, 0.0)	-1.0 (-1.0, 0.0)	0.3113
P-value ²⁾	0.0629	0.0048	
Q3. 다음 문항들은 귀하가 평상시 하는 활동에 관한 것입니다. 귀하의 건강상태 때문에 이러한 일상적인 활동을 하는 데 제한을 받습니까? 만약 그렇다면, 어느			

정도 제한을 받습니까?

Q3-1. 격렬한 활동(예: 달리기, 무거운 짐 들기, 격렬한 운동에 참여하기)

Week 0	1.0	(1.0, 2.0)	1.0	(1.0, 2.0)	0.6816
Week 4	1.0	(1.0, 2.0)	1.0	(1.0, 2.0)	0.6975
Week 8	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.9242
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 0.5)	0.5419
<i>P</i> -value ²⁾		0.2131		0.4639	

Q3-2. 다소 힘든 활동(예: 탁자 옮기기, 비로 방 쓸기, 한두 시간 산보하기, 자전거 타기)

Week 0	1.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.1068
Week 4	2.0	(1.0, 2.0)	1.0	(1.0, 2.0)	0.5821
Week 8	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.8636
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 0.0)	0.2057
<i>P</i> -value ²⁾		0.0684		0.7656	

Q3-3. 조금 무거운 시장바구니를 들거나 운반하는 것

Week 0	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.5229
Week 4	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.7189
Week 8	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.5, 2.0)	0.9502
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 0.0)	0.5380
<i>P</i> -value ²⁾		0.0723		0.1250	

Q3-4. 계단으로 여러 층 걸어 올라가는 것

Week 0	2.0	(1.0, 2.0)	1.0	(1.0, 2.0)	0.3263
Week 4	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.4286
Week 8	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.5, 2.0)	1.0000
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 1.0)	0.3433
<i>P</i> -value ²⁾		0.1484		0.0479	

Q3-5. 계단으로 한 층 걸어 올라가는 것

Week 0	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.8306
Week 4	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.8926
Week 8	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.5578
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 0.0)	0.0	(0.0, 0.0)	0.5843
<i>P</i> -value ²⁾		0.3594		1.0000	

Q3-6. 허리를 굽히는 것, 무릎을 꿇는 것

Week 0	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.9039
Week 4	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.3351
Week 8	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(1.5, 2.0)	0.7684
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 0.5)	1.0000
<i>P</i> -value ²⁾		0.2668		0.1250	

Q3-7. 허리와 무릎을 동시에 굽히는 것

Week 0	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.8344
Week 4	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.3237
Week 8	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.8072
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 1.0)	0.9656
<i>P</i> -value ²⁾		0.1855		0.2734	

Q3-8. 1킬로미터 이상 걷는 것					
Week 0	2.0	(1.0, 2.0)	1.5	(1.0, 2.0)	0.8082
Week 4	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.6164
Week 8	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.4982
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 0.0)	0.0	(0.0, 1.0)	0.8866
<i>P</i> -value ²⁾	0.2344		0.7949		
Q3-9. 200-300미터 정도 걷는 것					
Week 0	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.6914
Week 4	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.5171
Week 8	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.3030
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 0.0)	0.0	(0.0, 0.0)	0.2911
<i>P</i> -value ²⁾	0.2891		1.0000		
Q3-10. 100미터 걷는 것					
Week 0	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.8373
Week 4	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.6602
Week 8	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.1370
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 0.0)	0.0	(0.0, 0.0)	0.4017
<i>P</i> -value ²⁾	0.1250		1.0000		
Q3-11. 혼자 목욕을 하거나, 또는 옷 갈아입는 것					
Week 0	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.2273
Week 4	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	0.3662
Week 8	2.0	(2.0, 2.0)	2.0	(2.0, 2.0)	1.0000
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 0.0)	0.0	(0.0, 0.0)	0.2273
<i>P</i> -value ²⁾	0.1250		1.0000		
Q4. 지난 4주 동안에, 귀하의 신체적인 건강 때문에 귀하의 일이나 일상적인 활동을 하는 데 다음과 같은 문제가 얼마나 자주 있었습니까?					
Q4-1. 일이나 다른 일상적인 활동으로 보내는 시간을 줄였다.					
Week 0	3.0	(2.0, 4.0)	3.0	(2.0, 4.0)	0.9206
Week 4	3.0	(2.0, 4.0)	4.0	(3.0, 4.0)	0.1257
Week 8	3.0	(3.0, 4.0)	4.0	(3.0, 4.0)	0.1515
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.5	(0.0, 1.0)	0.5437
<i>P</i> -value ²⁾	0.1830		0.0184		
Q4-2. 원하는 것보다 적은 양의 일을 했다.					
Week 0	3.0	(2.0, 4.0)	3.0	(2.0, 4.0)	0.5116
Week 4	4.0	(3.0, 4.0)	3.5	(3.0, 4.0)	0.5675
Week 8	3.0	(3.0, 4.0)	4.0	(3.0, 4.0)	0.6090
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.5	(0.0, 1.5)	0.4449
<i>P</i> -value ²⁾	0.1353		0.0219		
Q4-3. 일이나 다른 일상적인 활동 중에서 할 수 없는 것이 있었다.					
Week 0	3.0	(3.0, 4.0)	3.0	(3.0, 4.0)	0.9919
Week 4	4.0	(3.0, 4.0)	4.0	(3.0, 4.0)	0.9571
Week 8	4.0	(3.0, 4.0)	4.0	(3.0, 4.0)	0.5167
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 1.0)	0.9840

P -value ²⁾	0.1185	0.1060
Q4-4. 일이나 다른 일상적인 활동을 하는데 어려움이 있었다 (예: 더 노력을 해야 했다).		
Week 0	0.0 (0.0, 1.0)	0.5 (0.0, 1.0)
Week 4	4.0 (3.0, 4.0)	3.5 (3.0, 4.0)
Week 8	4.0 (3.0, 4.0)	4.0 (3.0, 4.0)
Δ Week 8 - 0	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)
P -value ²⁾	0.4602	0.0582
Q5. 지난 4주 동안에, 정서적인 문제(예: 기분이 좋지 않거나 불안을 느끼는 것) 때문에 귀하의 일이나 일상적인 활동을 하는데 다음과 같은 문제가 얼마나 자주 있었습니까?		
Q5-1 일이나 다른 일상적인 활동으로 보내는 시간을 줄였다.		
Week 0	3.0 (2.0, 4.0)	3.5 (2.5, 4.0)
Week 4	4.0 (3.0, 4.0)	4.0 (3.0, 4.0)
Week 8	4.0 (3.0, 4.0)	4.0 (3.0, 4.0)
Δ Week 8 - 0	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)
P -value ²⁾	0.0011	0.1455
Q5-2. 원하는 것보다 적은 양의 일을 했다.		
Week 0	3.0 (2.0, 4.0)	3.5 (2.5, 4.0)
Week 4	4.0 (3.0, 4.0)	4.0 (3.0, 4.0)
Week 8	3.0 (3.0, 4.0)	4.0 (3.0, 4.0)
Δ Week 8 - 0	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)
P -value ²⁾	0.1272	0.1303
Q5-3. 일이나 다른 일상적인 활동을 하는데 평소처럼 주의를 기울이지 못했다.		
Week 0	3.0 (2.0, 4.0)	3.0 (2.5, 4.0)
Week 4	4.0 (3.0, 4.0)	4.0 (3.0, 4.0)
Week 8	4.0 (3.0, 4.0)	4.0 (3.5, 4.0)
Δ Week 8 - 0	0.0 (0.0, 1.0)	1.0 (0.0, 1.0)
P -value ²⁾	0.0319	0.0438
Q6. 지난 4주 동안에, 귀하의 신체적인 건강 문제 혹은 정서적인 문제로 인하여, 귀하의 가족, 친구, 이웃 또는 동료들과의 정상적인 사회활동에 어느 정도 지장이 있었습니까?		
Week 0	1.0 (0.0, 1.0)	1.0 (0.0, 1.5)
Week 4	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)
Week 8	1.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)
Δ Week 8 - 0	0.0 (-1.0, 0.0)	-0.5 (-1.0, 0.0)
P -value ²⁾	0.3261	0.0150
Q7. 지난 4주 동안에, 몸에 통증이 얼마나 많이 있었습니까?		
Week 0	2.0 (1.0, 2.0)	2.0 (1.0, 3.0)

Week 4	1.0	(1.0, 3.0)	1.0	(0.0, 1.5)	0.1622
Week 8	1.0	(1.0, 2.0)	1.0	(0.0, 1.0)	0.0996
Δ Week 8 - 0	0.0	(-1.0, 0.0)	-1.0	(-2.0, 0.5)	0.1497
<i>P</i> -value ²⁾		0.4781		0.0221	

Q8. 지난 4주 동안에, 귀하는 몸의 통증 때문에 정상적인 일 (집 밖의 일과 집안 일을 포함해서)을 하는 데 얼마나 지장이 있었습니까?

Week 0	1.0	(0.0, 1.0)	1.0	(1.0, 1.0)	0.3220
Week 4	1.0	(0.0, 1.0)	1.0	(0.0, 1.0)	0.8948
Week 8	1.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 1.0)	0.0894
Δ Week 8 - 0	0.0	(-1.0, 0.0)	-1.0	(-1.0, 0.0)	0.0816
<i>P</i> -value ²⁾		0.3492		0.0030	

Q9. 아래의 질문들은 지난 4주 동안 귀하가 어떻게 느꼈고, 또 어떻게 지냈는지에 대한 설문입니다. 아래의 각 항목에 대하여, 귀하가 느꼈던 것과 가장 가까운 번호에 답해주시오. 지난 4주 동안에, 얼마나 자주

Q9-1. 귀하는 원기 왕성하다고 느꼈습니까?

Week 0	3.0	(1.0, 3.0)	2.5	(1.5, 3.0)	0.9299
Week 4	2.0	(1.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.4273
Week 8	3.0	(1.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.1285
Δ Week 8 - 0	0.0	(-1.0, 1.0)	-0.5	(-1.0, 0.0)	0.1876
<i>P</i> -value ²⁾		0.7040		0.0082	

Q9-2. 귀하는 아주 초조했었습니까?

Week 0	3.0	(2.0, 3.0)	3.0	(3.0, 4.0)	0.2581
Week 4	3.0	(2.0, 4.0)	3.0	(3.0, 4.0)	0.4665
Week 8	3.0	(2.0, 4.0)	4.0	(2.5, 4.0)	0.2157
Δ Week 8 - 0	0.0	(-1.0, 1.0)	0.0	(0.0, 1.0)	0.9840
<i>P</i> -value ²⁾		0.2737		0.2813	

Q9-3. 귀하는 아무것도 당신을 즐겁게 할 수 없을 정도로 기분이 저조했었습니까?

Week 0	3.0	(3.0, 4.0)	3.0	(3.0, 4.0)	0.4388
Week 4	3.0	(2.0, 4.0)	3.5	(3.0, 4.0)	0.1188
Week 8	3.0	(3.0, 4.0)	3.5	(3.0, 4.0)	0.5316
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 1.0)	0.6655
<i>P</i> -value ²⁾		0.1572		0.6172	

Q9-4. 귀하는 차분하고 평온하다고 느끼셨습니까?

Week 0	2.0	(2.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.6242
Week 4	2.0	(1.0, 3.0)	1.0	(1.0, 2.0)	0.2056
Week 8	2.0	(1.0, 3.0)	1.0	(1.0, 3.0)	0.5329
Δ Week 8 - 0	0.0	(-1.0, 1.0)	0.0	(-1.0, 0.0)	0.8352
<i>P</i> -value ²⁾		0.3352		0.1548	

Q9-5. 귀하는 활력이 넘쳤습니까?

Week 0	2.0	(1.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.4695
Week 4	2.0	(2.0, 3.0)	2.0	(1.0, 2.5)	0.1332
Week 8	2.0	(2.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.5648
Δ Week 8 - 0	0.0	(-1.0, 1.0)	0.0	(-1.0, 1.0)	0.7915
P -value ²⁾		0.8049		1.0000	

Q9-6. 귀하는 마음이 많이 상하고

우울했었습니까?

Week 0	3.0	(2.0, 4.0)	3.0	(3.0, 4.0)	0.1283
Week 4	3.0	(3.0, 4.0)	4.0	(3.0, 4.0)	0.3095
Week 8	3.0	(2.0, 4.0)	3.0	(3.0, 4.0)	0.5553
Δ Week 8 - 0	0.0	(-1.0, 1.0)	0.0	(-1.0, 0.5)	0.2716
P -value ²⁾		0.4565		0.6921	

Q9-7. 귀하는 완전히 지쳤습니까?

Week 0	2.0	(2.0, 3.0)	3.0	(3.0, 4.0)	0.0485
Week 4	3.0	(2.0, 3.0)	3.0	(2.0, 4.0)	0.3831
Week 8	3.0	(2.0, 4.0)	3.0	(2.0, 4.0)	0.3913
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(-1.0, 1.0)	0.0159
P -value ²⁾		0.0041		0.2930	

Q9-8. 귀하는 행복했었습니까?

Week 0	2.0	(1.0, 3.0)	1.5	(1.0, 2.5)	0.4398
Week 4	2.0	(1.0, 3.0)	1.5	(1.0, 2.0)	0.1973
Week 8	2.0	(1.0, 3.0)	2.0	(0.5, 2.5)	0.2824
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 0.0)	0.4436
P -value ²⁾		0.8258		0.7891	

Q9-9. 귀하는 피곤함을 느꼈습니까?

Week 0	1.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.0)	0.6590
Week 4	2.0	(1.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.6404
Week 8	2.0	(1.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.4667
Δ Week 8 - 0	1.0	(0.0, 1.0)	0.0	(-1.0, 1.0)	0.2179
P -value ²⁾		0.0199		0.6059	

Q10. 지난 4주 동안에, 귀하의 신체적인 건강 문제 혹은 정서적인 문제로 인하여, 귀하의 사회활동(예: 친구나 친지 방문하는 것)에 얼마나 자주 지장이 있었습니까?

Week 0	3.0	(2.0, 3.0)	3.0	(2.5, 4.0)	0.3878
Week 4	3.0	(3.0, 4.0)	3.5	(3.0, 4.0)	0.1214
Week 8	3.0	(3.0, 4.0)	4.0	(3.0, 4.0)	0.0393
Δ Week 8 - 0	1.0	(0.0, 1.0)	0.5	(0.0, 1.0)	0.8218
P -value ²⁾		0.0176		0.0005	

Q11. 다음 각 항목에 대하여 귀하의 경우는 어디에 해당하는지 답해 주십시오.

Q11-1. 나는 다른 사람보다 쉽게 병에 걸리는 것 같다.

Week 0	2.0	(2.0, 3.0)	3.0	(2.0, 3.0)	0.5997
--------	-----	------------	-----	------------	--------

Week 4	3.0	(2.0, 4.0)	3.0	(1.0, 3.5)	0.4409
Week 8	3.0	(2.0, 4.0)	3.0	(2.0, 3.0)	0.9298
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 0.5)	0.6063
P -value ²⁾		0.1396		0.7949	
Q11-2. 나는 내가 아는 다른 사람들만큼 건강하다.					
Week 0	1.0	(1.0, 3.0)	1.0	(1.0, 2.5)	0.5364
Week 4	1.0	(1.0, 2.0)	1.5	(1.0, 3.0)	0.7292
Week 8	1.0	(1.0, 3.0)	1.0	(1.0, 2.0)	0.2645
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 0.0)	0.0	(-1.0, 0.5)	0.6774
P -value ²⁾		0.7305		0.7032	
Q11-3. 건강이 점점 나빠질 것이라고 예상한다.					
Week 0	2.0	(1.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.5683
Week 4	3.0	(2.0, 4.0)	2.0	(1.5, 3.0)	0.2296
Week 8	2.0	(2.0, 3.0)	2.0	(1.5, 3.0)	0.5566
Δ Week 8 - 0	0.0	(0.0, 1.0)	0.0	(0.0, 1.0)	0.9920
P -value ²⁾		0.3135		0.1431	
Q11-4. 나의 건강상태는 최고로 좋다.					
Week 0	2.0	(2.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.2989
Week 4	2.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.8288
Week 8	2.0	(1.0, 3.0)	2.0	(1.0, 3.0)	0.8205
Δ Week 8 - 0	0.0	(-1.0, 0.0)	0.0	(-1.0, 0.0)	0.1916
P -value ²⁾		0.0207		0.4978	

1) Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values). Q1, Q2: 5-point Likert scale, 0 (best) - 4 (worst). Q3: 3-point Likert scale, 0 (very much) - 2 (not at all). Q4, Q5, Q9, Q10: 5-point Likert scale, 0 (always) - 4 (not at all). Q6-Q8: 5-point Likert scale, 0 (not at all) - 4 (extremely). Q11: 5-point Likert scale, 0 (absolutely) - 4 (not at all)

2) Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

3) Between-group comparisons using Wilcoxon rank sum test.

(6) IBS-QOL 설문조사

‘Q6. 과민성 장증후군으로 배에 가스가 차서 부글거렸다.’ 의 증상 호전 정도가 BNR 17군에서 더 크게 나타났으며 ‘Q8. 과민성 장증후군 때문에 전신이 피로했다.’ 와 ‘Q13. 과민성 장증후군으로 인해 다른 사람들에게 화를 냈다’ 에서 BNR17군이 8주째에 placebo군에 비교하여 증상의 차이를 보였다. ‘Q17. 과민성 장증후군 때문에 평소 좋아하는 음식을 먹을 수 없었다’ 문항에서는 Pacey군에 BNR 17군보다 Baseline 에서 증상을 더 많이 호소하고 있었고, 복용 8주째의 증상의 호전 정도도 더욱 크게 나타났다. ‘Q18. 과민성 장증후군 때문에 낯선 장소를 가거나 장거리를 이동하는 것이 꺼려졌다.’, ‘Q19. 과민성 장증후군 때문에 외식하는 것이나 회식하는 것이 꺼려졌다.’ 그리고 ‘Q29. 과민성 장증후군 때문에 성관계가 소홀해졌다.’ 문항에서는 BNR 17군에서는 증상호전이 없었으나 Placebo 군에서는 증상호전이 있었다.

Table 15. IBS-QOL questionnaire¹⁾

	Placebo (n = 27)		BNR17 (n = 24)		P-value ³⁾
Q1. 과민성 장증후군으로 배가 아팠다.					
Week 0	3.0	(2.0, 3.0)	3.0	(1.0, 3.0)	0.8225
Week 4	1.0	(1.0, 2.0)	1.0	(0.0, 2.0)	0.2210
Week 8	1.0	(1.0, 2.0)	1.0	(0.0, 1.0)	0.0657
Δ Week 8 - 0	-1.0	(-2.0, 0.0)	-1.5	(-2.0, 0.0)	0.3368
P-value ²⁾	0.0003		< 0.0001		
Q2. 과민성 장증후군으로 배가 똥똥하고 팽창된 느낌이 들었다.					
Week 0	3.0	(2.0, 3.0)	3.0	(2.0, 3.5)	0.1949
Week 4	1.0	(1.0, 2.0)	2.0	(1.0, 2.5)	0.4346
Week 8	1.0	(1.0, 2.0)	1.0	(0.5, 1.5)	0.2229
Δ Week 8 - 0	-1.0	(-2.0, 0.0)	-2.0	(-2.0, -1.0)	0.0533
P-value ²⁾	0.0006		< 0.0001		
Q3. 과민성 장증후군으로 대변은 나오지 않으면서 아랫배만 묵직한 증상이 있었다.					
Week 0	2.0	(1.0, 3.0)	2.5	(1.0, 3.0)	0.3215
Week 4	1.0	(0.0, 2.0)	1.0	(0.0, 2.0)	0.6554
Week 8	1.0	(0.0, 2.0)	1.0	(0.0, 1.5)	.04791
Δ Week 8 - 0	0.0	(-1.0, 0.0)	-1.0	(-2.0, 0.0)	0.1181
P-value ²⁾	0.0372		0.0010		
Q4. 과민성 장증후군 때문에 대변이 평소보다 딱딱해지거나 혹은 묽어졌다.					
Week 0	3.0	(3.0, 4.0)	3.0	(2.5, 4.0)	0.8153
Week 4	1.0	(1.0, 3.0)	1.0	(0.0, 3.0)	0.6204
Week 8	2.0	(1.0, 3.0)	1.0	(1.0, 2.0)	0.2057
Δ Week 8 - 0	-1.0	(-2.0, 0.0)	-2.0	(-2.0, -1.0)	0.0997
P-value ²⁾	< 0.0001		< 0.0001		
Q5. 과민성 장증후군 때문에 대변보는 횟수가 평소보다 많아졌거나 줄어들었다.					
Week 0	3.0	(2.0, 3.0)	3.0	(2.0, 4.0)	0.6088
Week 4	1.0	(0.0, 2.0)	1.0	(0.5, 3.0)	0.4722

Week 8	2.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 2.0)	0.4643
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, -1.0)	-2.0 (-2.5, -1.0)	0.1797
P -value ²⁾	< 0.0001	< 0.0001	
Q6. 과민성 장증후군으로 배에 가스가 차서 부글거렸다.			
Week 0	3.0 (1.0, 4.0)	3.0 (2.5, 4.0)	0.1873
Week 4	1.0 (0.0, 3.0)	1.0 (0.5, 2.0)	0.8080
Week 8	2.0 (1.0, 2.0)	1.0 (0.5, 2.0)	0.0825
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-2.0 (-3.0, -1.0)	0.0221
P -value ²⁾	0.0041	< 0.0001	
Q7. 과민성 장증후군으로 밤에 잠을 잘 수 없었다.			
Week 0	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 1.5)	0.9278
Week 4	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0.2751
Week 8	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0.2921
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, 0.0)	-1.0 (-1.0, 0.0)	0.7450
P -value ²⁾	0.0124	0.0012	
Q8. 과민성 장증후군 때문에 전신이 피로했다.			
Week 0	2.0 (1.0, 3.0)	2.0 (1.0, 2.5)	0.9604
Week 4	1.0 (0.0, 1.0)	0.5 (0.0, 1.0)	0.6264
Week 8	1.0 (1.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.0275
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, -1.0)	-1.0 (-2.0, -1.0)	0.2209
P -value ²⁾	< 0.0001	< 0.0001	
Q9. 과민성 장증후군 때문에 어떤 일에 집중하기 어려웠다.			
Week 0	2.0 (1.0, 3.0)	2.0 (1.0, 3.0)	0.9609
Week 4	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 1.0)	0.3797
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	0.5 (0.0, 1.0)	0.3400
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-1.0 (-2.0, 0.0)	0.9535
P -value ²⁾	0.0012	0.0003	
Q10. 과민성 장증후군 때문에 성욕이 줄어들었다.			
Week 0	1.0 (0.0, 3.0)	1.0 (0.0, 2.0)	0.2261
Week 4	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.5)	0.1925
Week 8	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0.1011
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-0.5 (-1.5, 0.0)	0.5493
P -value ²⁾	0.0001	0.0083	
Q11. 과민성 장증후군 때문에 우울했다.			
Week 0	1.0 (1.0, 2.0)	1.0 (0.0, 2.0)	0.3038
Week 4	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.5)	0.2972
Week 8	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.0994
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, 0.0)	-1.0 (-2.0, 0.0)	0.8354
P -value ²⁾	0.0017	0.0032	
Q12. 과민성 장증후군으로 짜증이 났다.			
Week 0	2.0 (2.0, 4.0)	2.0 (1.0, 3.0)	0.1826
Week 4	1.0 (0.0, 1.0)	1.0 (0.0, 1.5)	0.8487
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.0487
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-1.5 (-3.0, 0.0)	0.8773
P -value ²⁾	< 0.0001	0.0054	

Q13. 과민성 장증후군으로 인해 다른 사람들에게 화를 냈다.			
Week 0	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 2.0)	0.5648
Week 4	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0.0968
Week 8	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0.0156
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, 0.0)	-0.5 (-1.5, 0.0)	0.5997
<i>P</i> -value ²⁾	0.0076	0.0020	
Q14. 과민성 장증후군 때문에 신경이 예민해졌다.			
Week 0	2.0 (2.0, 3.0)	2.0 (1.0, 2.5)	0.2777
Week 4	1.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.1883
Week 8	1.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.1828
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, -1.0)	-1.0 (-2.0, 0.0)	0.5042
<i>P</i> -value ²⁾	< 0.0001	0.0003	
Q15. 과민성 장증후군의 증상이 나타날까봐 외출 전에 음식을 먹거나 마시지 않았다.			
Week 0	1.0 (1.0, 2.0)	1.0 (0.0, 2.5)	0.4290
Week 4	0.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.2603
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.1824
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, 0.0)	-0.5 (-1.0, 0.0)	0.9051
<i>P</i> -value ²⁾	0.0049	0.0022	
Q16. 과민성 장증후군 때문에 먹는 음식에 항상 신경을 써야 했다.			
Week 0	2.0 (1.0, 3.0)	1.0 (0.5, 2.0)	0.1339
Week 4	1.0 (0.0, 2.0)	0.5 (0.0, 1.5)	0.1172
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	0.5 (0.0, 1.0)	0.3050
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, 0.0)	0.0 (-1.0, 0.0)	0.2774
<i>P</i> -value ²⁾	0.0032	0.0371	
Q17. 과민성 장증후군 때문에 평소 좋아하는 음식을 먹을 수 없었다.			
Week 0	1.0 (1.0, 2.0)	0.5 (0.0, 1.5)	0.0328
Week 4	1.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.1606
Week 8	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.6178
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	0.0 (-1.0, 0.0)	0.0702
<i>P</i> -value ²⁾	0.0025	0.2642	
Q18. 과민성 장증후군 때문에 낯선 장소를 가거나 장거리를 이동하는 것이 꺼려졌다.			
Week 0	1.0 (1.0, 2.0)	1.0 (0.0, 2.0)	0.1263
Week 4	1.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.3251
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.1327
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, 0.0)	0.0 (-1.0, 0.0)	0.6115
<i>P</i> -value ²⁾	0.0056	0.0857	
Q19. 과민성 장증후군 때문에 외식하는 것이나 회식하는 것이 꺼려졌다.			
Week 0	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 2.0)	0.3746
Week 4	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.6084
Week 8	1.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.5639
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, 0.0)	0.0 (-1.0, 0.0)	0.4333
<i>P</i> -value ²⁾	0.0390	0.0938	

Q20. 과민성 장증후군 때문에 일(직장/집안/학교)에 지장이 있었다.			
Week 0	2.0 (1.0, 2.0)	2.0 (1.0, 3.0)	0.4649
Week 4	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 1.0)	0.9198
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.2040
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-1.0, 0.0)	-1.0 (-2.0, 0.0)	0.2620
<i>P</i> -value ²⁾	0.0011	0.0004	
Q21. 과민성 장증후군 때문에 취미 또는 여가활동에 지장이 있었다.			
Week 0	2.0 (1.0, 3.0)	1.0 (0.5, 3.0)	0.6056
Week 4	0.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 1.0)	0.6200
Week 8	0.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.6815
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-1.0 (-2.0, 0.0)	0.9844
<i>P</i> -value ²⁾	0.0002	0.0004	
Q22. 과민성 장증후군으로 인해 내가 하찮은 존재라고 여겨졌다.			
Week 0	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.9729
Week 4	0.0 (0.0, 0.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0.3329
Week 8	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0.0070
Δ Week 8 - 0	0.0 (0.0, 0.0)	0.0 (-1.0, 0.0)	0.1326
<i>P</i> -value ²⁾	0.7266	0.0742	
Q23. 과민성 장증후군 때문에 어디를 가도 화장실 위치를 먼저 확인해야 하는 번거로움이 있었다.			
Week 0	2.0 (1.0, 3.0)	1.0 (0.0, 3.0)	0.2659
Week 4	1.0 (0.0, 2.0)	0.5 (0.0, 1.0)	0.6136
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 1.0)	0.5257
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-1.0 (-2.0, 0.0)	0.6218
<i>P</i> -value ²⁾	0.0010	0.0114	
Q24. 과민성 장증후군이 더 나빠지는 것은 아닌지 걱정되었다.			
Week 0	2.0 (1.0, 3.0)	3.0 (1.0, 3.0)	0.6361
Week 4	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 2.0)	0.9529
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 1.5)	0.9126
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-1.0 (-2.0, -0.5)	0.5482
<i>P</i> -value ²⁾	< 0.0001	0.0010	
Q25. 과민성 장증후군으로 인한 설사를 참지 못하고 공공장소에서 실수할까봐 걱정스러웠다.			
Week 0	2.0 (1.0, 3.0)	1.0 (1.0, 3.0)	0.5065
Week 4	0.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.6860
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.3252
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-1.0 (-2.0, 0.0)	0.7637
<i>P</i> -value ²⁾	0.0021	0.0029	
Q26. 과민성 장증후군이 언제 갑자기 나타날지 예측할 수 없어 불안했다.			

Week 0	2.0 (1.0, 3.0)	1.0 (1.0, 3.0)	0.3432
Week 4	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 1.0)	0.6107
Week 8	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 1.0)	0.4316
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-1.0 (-2.0, 0.0)	0.6303
<i>P</i> -value ²⁾	0.0005	0.0236	
Q27. 과민성 장증후군으로 인해 매사에 의욕이 없었다.			
Week 0	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (0.0, 2.0)	0.3089
Week 4	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.5396
Week 8	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.1590
Δ Week 8 - 0	0.0 (-1.0, 0.0)	-0.5 (-1.0, 0.0)	0.9122
<i>P</i> -value ²⁾	0.0116	0.0184	
Q28. 과민성 장증후군 때문에 대변을 본 후에도 개운하지 않고 곧바로 또 대변을 보고 싶었다.			
Week 0	2.0 (1.0, 4.0)	3.0 (1.0, 4.0)	0.7634
Week 4	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (1.0, 3.0)	0.6891
Week 8	1.0 (1.0, 2.0)	1.0 (0.0, 1.5)	0.1752
Δ Week 8 - 0	-1.0 (-2.0, 0.0)	-1.0 (-3.0, 0.0)	0.3978
<i>P</i> -value ²⁾	<0.0001	<0.0001	
Q29. 과민성 장증후군 때문에 성관계가 소홀해졌다.			
Week 0	1.0 (0.0, 2.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.0976
Week 4	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 1.0)	0.5853
Week 8	0.0 (0.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0.1083
Δ Week 8 - 0	0.0 (-2.0, 0.0)	0.0 (-1.0, 0.0)	0.4363
<i>P</i> -value ²⁾	0.0208	0.0723	

1) Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values). Q1-Q29: 5-point Likert scale, 0 (not at all) - 4 (extremely).

2) Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

3) Between-group comparisons using Wilcoxon rank sum test.

(7) 안전성평가

군간 비교나 군내 전후 비교 시 임상적으로 유의한 변화가 없었다.

Table 16. Safety parameters in blood and urine¹⁾

	Placebo (n = 27)	BNR17 (n = 24)	P-value ³⁾
Pulse (beats/min)			
Week 0	76 (68, 84)	75 (68, 81)	0.7176
Week 8	77 (70, 83)	74 (69, 80)	0.6420
<i>P</i> -value ²⁾	0.6886	0.9568	
Body temperature (°C)			
Week 0	36.5 (36.3, 36.7)	36.5 (36.3, 36.8)	0.6691
Week 8	36.4 (36.2, 36.6)	36.5 (36.4, 36.6)	0.1014
<i>P</i> -value ²⁾	0.2392	0.8133	
RBC (10 ⁶ /uL)			
Week 0	4.6 (4.2, 4.7)	4.7 (4.4, 5.0)	0.1782
Week 8	4.4 (4.1, 4.9)	4.6 (4.3, 5.0)	0.2599
<i>P</i> -value ²⁾	0.1971	0.0546	
WBC (10 ³ /uL)			
Week 0	5.7 (4.7, 6.7)	6.0 (4.8, 6.7)	0.3957
Week 8	5.9 (5.3, 6.9)	5.7 (4.7, 6.7)	0.3650
<i>P</i> -value ²⁾	0.0747	0.8355	
Hb (g/dL)			
Week 0	13.3 (12.6, 14.8)	14.4 (13.4, 15.3)	0.0713
Week 8	13.3 (12.4, 14.5)	13.6 (13.2, 15.1)	0.1862
<i>P</i> -value ²⁾	0.0518	0.1007	
Hct (%)			
Week 0	39.8 (38.6, 44.1)	42.9 (40.5, 46.6)	0.1129
Week 8	40.9 (38.2, 43.6)	41.3 (39.6, 44.5)	0.1802
<i>P</i> -value ²⁾	0.1172	0.0178	
Platelet (10 ³ /uL)			
Week 0	245.0 (210.0, 287.0)	223.5 (202.5, 254.5)	0.0703
Week 8	256.0 (218.0, 300.0)	242.5 (190.5, 273.0)	0.2250
<i>P</i> -value ²⁾	0.2188	0.0591	
Neutrophils (%)			
Week 0	54.7 (46.5, 60.0)	55.2 (51.4, 60.6)	0.5334
Week 8	57.4 (51.2, 62.4)	56.3 (52.8, 61.1)	0.9098
<i>P</i> -value ²⁾	0.2087	0.0951	
Eosinophils (%)			
Week 0	2.0 (1.4, 2.8)	2.0 (1.2, 3.1)	0.9397
Week 8	1.8 (1.4, 3.0)	2.3 (1.4, 4.0)	0.6777
<i>P</i> -value ²⁾	0.8651	0.3754	
Basophils (%)			
Week 0	0.8 (0.6, 1.0)	0.8 (0.5, 0.9)	0.4402
Week 8	0.8 (0.6, 1.1)	0.7 (0.5, 1.1)	0.3832
<i>P</i> -value ²⁾	0.9529	0.8622	

Lymphocytes (%)			
Week 0	34.7 (29.6, 40.4)	33.8 (29.5, 39.2)	0.8651
Week 8	32.6 (27.3, 37.6)	32.4 (28.0, 39.1)	1.0000
<i>P</i> -value ²⁾	0.2297	0.3264	
Monocytes (%)			
Week 0	6.9 (6.2, 8.0)	6.8 (5.7, 8.5)	0.8948
Week 8	6.2 (5.6, 7.6)	6.1 (5.6, 7.2)	0.8576
<i>P</i> -value ²⁾	0.0220	0.2499	
AST (IU/L)			
Week 0	18.0 (15.0, 23.0)	18.5 (15.0, 23.5)	0.6091
Week 8	18.0(14.0, 19.0)	17.5 (16.5, 21.0)	0.4430
<i>P</i> -value ²⁾	0.1056	0.2923	
ALT (IU/L)			
Week 0	18.0 (13.0, 25.0)	18.5 (13.0, 25.5)	0.9925
Week 8	19.0 (13.0, 27.0)	17.5 (13.0, 28.0)	0.8575
<i>P</i> -value ²⁾	0.3114	0.5048	
BUN (mg/dL)			
Week 0	11.6 (9.1, 14.3)	12.9 (10.3, 14.1)	0.6918
Week 8	10.8 (8.9, 14.2)	11.6 (9.8, 12.9)	0.5776
<i>P</i> -value ²⁾	0.1790	0.6077	
Creatinine (mg/dL)			
Week 0	0.8 (0.7, 1.0)	0.9 (0.8, 1.0)	0.4363
Week 8	0.8 (0.7, 1.0)	0.9 (0.8, 1.0)	0.6437
<i>P</i> -value ²⁾	1.0000	0.4850	
Uric acid (mg/dL)			
Week 0	4.3 (3.4, 5.8)	4.5 (3.4, 5.6)	0.8457
Week 8	4.2 (3.5, 5.8)	4.9 (3.6, 5.6)	0.7672
<i>P</i> -value ²⁾	0.7183	0.3790	
Total protein (g/dL)			
Week 0	7.2 (6.7, 7.4)	7.0 (6.8, 7.3)	0.3784
Week 8	7.0 (6.8, 7.3)	7.0 (6.8, 7.3)	0.7540
<i>P</i> -value ²⁾	0.2295	0.3753	
Albumin (g/dL)			
Week 0	4.6 (4.4, 4.7)	4.7 (4.6, 4.9)	0.0692
Week 8	4.5 (4.3, 4.6)	4.6 (4.3, 4.8)	0.4083
<i>P</i> -value ²⁾	0.3991	0.0667	
Blood in urine (-/trace/+)			
Week 0	15 / 5 / 7	18 / 4 / 2	0.2340
Week 8	18 / 4 / 5	18 / 4 / 2	0.6170
Protein in urine (-/trace/+)			
Week 0	16 / 10 / 1	20 / 3 / 1	0.0829
Week 8	15 / 11 / 1	19 / 4 / 1	0.1185

Glucose in urine (-/trace/+)			
Week 0	27 / 0 / 0	23 / 0 / 1	0.4706
Week 8	27 / 0 / 0	22 / 2 / 0	0.2165
Urinary pH			
Week 0	6.0 (5.5, 6.5)	6.0 (5.5, 6.5)	0.6767
Week 8	5.5 (5.5, 6.0)	5.5 (5.3, 6.8)	0.6693
<i>P</i> -value ²⁾	0.3523	0.9413	

1) Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values).

2) Within-group comparisons using paired t-test or Wilcoxon signed rank test.

3) Between-group comparisons using Student's t-test or Wilcoxon rank sum test for continuous variables and Chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables.

(8). 결론

혈당관련지표 분석결과 공복혈당의 경우, BNR17군이 BNR17 섭취 전과 비교하여 섭취 후에 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었으나, 8주간의 변화량이 대조군과 비교 시 유의적인 차이는 없었다. 장 건강 관련 지표의 경우, colonic transit time이 대조군에 비하여 BNR17군에 유의적으로 개선됨을 확인할 수 있었고, 증상개선여부에 대한 설문평가에서도 보통 개선여부 등의 항목에서 BNR17군이 대조군에 비하여 유의적으로 개선됨을 확인할 수 있었다.

※ 건강인과 IBS인 자 약 200명을 비교한 인체연구에서, 건강인 대비 IBS인 자에서 제2형 당뇨병 시작의 첫 단계로 간주되는 prediabetes(prediabetes: 모든 종류의 당 부하 검사에서 이상을 나타내지는 않으나 장래에 당뇨병으로 되는 것)의 발병이 높은 것으로 확인되었다 (Am J Med Sci 338(2):116-9, 2009). IBS와 당뇨병과의 상관관계에 대한 기전은 정확히 밝혀지지 않았으나, 장 균총(gut microbiota)의 변화가 체내 염증 상태를 개선시키고, 이로 인해 인슐린 민감성을 상승시킴으로서 장기적으로 혈당 조절에 영향을 미치는 것으로 추측되고 있다. (Gut Microbes 3:4, 279-288, 2012). 프로바이오틱스의 경우, IBS에 대한 개선효과가 널리 알려져 있으나, 그 효과는 균주에 특이적(strain-specific)인 것으로 발표되었다. (Curr Opin Clin Nutr Metab Care 14:581-587, 2011). 따라서, 국내에서 개발된 probiotics의 혈당 조절능 및 IBS 개선 효과가 본 연구를 통하여 과학적으로 입증된다면, 국내뿐 아니라 해외 프로바이오틱스 시장에서도 상업적 성공 가능성이 매우 클 것으로 기대된다.

이러한 연구계획은 3차년도 과제계획서에도 이미 기술하였던 내용이며, 혈당 조절능과 더불어 장 건강 기능성에 대한 기능성 입증은 BNR17의 상업적 성공 가능성을 높이는데 큰 기여를 할 것으로 기대된다. 이에 실험 2에서는 과민성대장증후군인 자를 대상으로 8주간의 시험식품 공급 후 혈당과 장 건강 관련 지표를 측정하였으며 주요 결과는 다음과 같다. 공복혈당의 경우 8주간의 변화량에 대한 군간 비교 시에는 유의적인 차이가 없었으나, BNR17군에서는 섭취 전 대비 8주간의 섭취 후 유의적으로 감소한 반면, 대조군에서는 유의적인 차이가 없음을 확인함으로써 BNR17의 혈당 조절 능을 확인할 수 있었다. HbA1c, 인슐린의 경우 군내 섭취전후 비교시나 군간 비교 시 유의적인 차이가 없었고, 장 건강 관련 지표의 경우, 8주간의 섭취 후 colonic transit times의 변화량이 대조군 대비 BNR17군에서 유의적으로 개선됨을 확인하였으며, 증상개선여부에 대한 설문평가에서도 보통개선여부 등의 항목에서 BNR17군이 대조군에 비하여 유의적으로 개선됨을 확인할 수 있었다.

제 4 장. 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011.8 ~ 2012.8.)	<i>in vitro</i> 및 진입상 시험을 통해 <i>Lb.</i> <i>gasseri</i> BNR17이 혈당 저하능을 나타내는 메카니즘 규명 및 제품화 연구	문헌 및 데이터베이스를 통한 기초자료 수집	100%	섭취량 평가자료, 안전성 자 료, 생물학적 유용성 자료 등 을 문헌 및 데이터베이스를 통하여 자료 확보
		원료의 안전성 조사	100%	자료조사 및 문서화
		동물시험을 통해 BNR17의 혈당조절 효과 확인 및 메 카니즘 규명	100%	-실험 1. High-sucrose diet를 섭취시킨 마우스에서 <i>Lb.</i> <i>gasseri</i> BNR17이 나타내는 항 비만, 항당뇨 효과에 관한 연구 -실험 2. High-fat diet와 streptozo- tocin으로 고혈당을 유도한 마우스에서 <i>Lb. gasseri</i> BNR17이 나타내는 항당뇨 효 과에 관한 연구
		Pilot study를 위한 샘플 제 조	100%	<i>Lb. gasseri</i> BNR17의 pilot study 인체 시험에 필요한 sample 생산
	모유에서 분리한 <i>Lactobacillus</i> <i>gasseri</i> BNR17의 혈당조절 기능성 확인을 위한 인체적용시험 연구 (pilot study)	문헌 및 데이터베이스를 통한 기초 자료 수집	100%	- <i>Lb. gasseri</i> BNR17의 기초 연구결과 및 유사 유산균 연구결과의 종합 검토를 통해 프로토콜 작성을 위한 기초 자료 수집
		<i>Lb. gasseri</i> BNR17 혈당조절 기능성 확인을 위한 인체적용시험 (pilot study) 수행	100%	- 수집된 기초 자료를 바탕으로 프로토콜 및 IRB 승인을 위한 서류 개발 - 개발된 프로토콜 및 관련 서류에 대한 IRB 승인 - 피험자 모집, 스크리닝 및 선정 - 시험 수행 - 모니터링 - 바이오마커 분석 - 통계 분석

2차 년도 (2012.8 ~ 2013.8.)	<i>Lb. gasseri</i> BNR17의 대량생산 조건확립	<i>Lb. gasseri</i> BNR17의 대량 생산 조건 확립 및 생산 공 정 표준화	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 대량 생산 조건 확립 - 생산 공정의 표준화 - 최적 제형의 시생산 및 기 준서 작성
	제형별 안정성 연구 및 유통기 한 설정	<i>Lb. gasseri</i> BNR17의 최적 제형 연구 (2차년도와 3차년 도에 걸쳐서 진행)	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 최적 제형의 시생산 및 기준 서 작성 - 분말, 캡슐, 타블렛 등 최적 제형 연구 - 요쿠르트 등 유제품 제형 연 구
	모유에서 분리한 <i>Lactobacillus</i> <i>gasseri</i> BNR17의 혈당조절 및 장건강 기능성 확인을 위한 인체적용시험 연구(본시험)	모유에서 분리한 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 혈당조절 및 장건강 기능성 확인을 위한 인체적용시험연구 (본시험) 프로토콜 개발 및 IRB 승인	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 프로토콜 개발 - 연구자자료집(IB) 개발 - 증례기록서(CRF) 개발 - 피험자 동의서 및 동의 설명문 개발 - 피험자 모집 공고문구 개발 - IRB 심의 신청 - IRB 승인

3차 년도 (2013.8 ~ 2014.8)	제형별 안정성 연구 및 유통기 한 설정	<i>Lb. gasseri</i> BNR17의 최적 제형 연구 및 유통기한 설정 (2차년도와 3차년도에 걸쳐서 진행)	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 최적 제형의 시생산 및 기준 서 작성 - 분말, 캡셀, 타블렛 등 최적 제형 연구 - 요쿠르트 등 유제품 제형 연 구 - 각 제형에 따른 물리적, 화 학적, 생물학적 요인에 대한 안정성 연구 진행 - 가속, 가혹 실험을 통해 얻어 진 결과를 근거로 유통기한 및 안정성 자료 확보 -정량적 시험법 적용
	개별 인정형 기능성 원료 의 인증 신청에 필 요한 자료의 작 성 및 제출	<ul style="list-style-type: none"> -원료의 특성에 관한 자료 -기능성분과 유해물질에 관 한 규격 및 시험방법에 관 한 자료 -기능성 내용 및 그에 관한 자료 -섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 -의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 	100%	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Lb. gasseri</i> BNR17 full sequencing -효능에 대한 기전연구 및 <i>in vitro</i> 실험 -문헌 및 데이터베이스를 통한 자료 확보
	모유에서 분리한 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 혈당조절 및 장건강 기능성 확인을 위한 인체적용시험 연구(본시험)	모유에서 분리한 <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17의 혈당조절 및 장건강 기능성 확인을 위한 인체적용시험연구 (본시험) 시험 수행, 통계분석 및 결과보고서 작성	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 선정기준에 적절한 피험자 를 모집하고 스크리닝함 - 시험제품(유산균/대조식품) 배부 및 시험수행 - 시험 진행 현황 모니터링 - 혈당 조절 및 장기능 관련 바이오마커 분석 - 시험결과 통계분석 - 결과보고서 작성

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구결과 활용계획

(1). 기능성식품으로써의 활용

- 한국인 유래 모유 유산균의 database 구축 및 이를 활용한 프로바이오틱 제품을 개발한다.
- 개별인정형 건강기능식품원료 인정 획득과 건강기능식품 기준·규격 인정을 획득한다.
- 기존 유산균 함유제품에 첨가하여 기능성 식품의 개발에 이용한다.
- 소재의 안전성과 효능 입증을 통해 유아용 또는 어린이용 제품 개발에 적용한다.
- 가축용 사료 첨가제로서 활용, 질병으로부터 예방 효과가 우수한 사료를 개발한다.
- 한국인 유래 모유유산균의 우수성을 입증하여 probiotic 사업의 활성화 방안으로 활용한다.

(2). 원천기술 확보로 국가 경쟁력 증진시키는 기술로서의 활용

- 세계 유산균 시장은 유럽 7조, 미국 5조, 일본 4조, 아시아 1조, 기타 4조 등 총 21조원 규모이며, 매년 30%의 폭발적인 시장 성장률을 보여주고 있다. 그러나 전 세계적으로 이러한 유산균의 유용성에도 불구하고 유산균에 대한 연구는 극히 초보 단계에 있다. 이 기술에 대한 투자와 연구 성과를 높임으로써 유산균 강대국의 입지를 굳힐 수 있다.
- 당뇨, 비만의 치료를 목표로 하는 후보 물질의 발굴에 대한 핵심 기술의 발전을 유도한다.
- 모유 유래 유산균으로부터 고부가 신기능성 생물소재를 개발하고 원천기술을 확보한다.
- 발효유산균의 유용성에 대한 과학적 근거를 제시함으로써 발효식품 산업의 국제 경쟁력을 높이고 자체 기술개발로 기술보호 장벽의 극복과 국내 발효산업의 기술자립화를 유도한다.
- 연구결과를 국제학술지에 발표함으로써 한국인 유래 모유유산균의 우수성을 세계에 알린다.
- 발효유산균의 유용성에 대한 과학적 근거의 제시를 통해 발효 산업의 국제 경쟁력을 재고할 수 있다.
- 지속적인 기술개발로 발효 산업의 생산성을 향상시킨다.
- 모유 유산균에 의한 항비만, 항당뇨 기작, 을 밝힘으로써 예방 또는 치료를 토대로 발효식품의 우수성을 홍보함으로써 국내 소비뿐만 아니라 수출 촉진을 유도할 수 있다.

(3). 연구수행 과정을 통한 연구 인력 양성 효과로 활용

- 기술 확산 및 연구인력 양성을 촉진하고 기술기반 뿐만 아니라 인프라를 확립한다.
- 본 연구결과를 토대로 미생물, 발효공학 연구 분야의 확대 및 관련 인력을 확충한다.
- 국내 발효식품 및 발효유산균 관련 전문연구인력의 양성과 기반기술을 확립한다.
- 기업체의 활발한 연구 활동뿐만 아니라 기술 경쟁력을 통한 국내 연구기술력을 높인다.

2. 기대성과

(1). 기술적 측면

- 유산균의 항비만, 항당뇨 관련 유효성분의 효과를 임상적으로 규명한다.

- 식품 및 의약분야에 적용할 수 있는 새로운 개념의 제품을 개발 한다.
- 증상에 따른 유산균 선정과 효능 검증 기술 개발 기반을 제공한다.
- 유산균의 효능을 최적화할 수 있는 생산 및 가공기술 개발한다.
- 자체기술개발에 의한 기술 보호 장벽 극복과 국내 유산균 산업의 기술 자립화를 유도한다.

(2). 경제적·산업적 측면

- 유산균 함유 제품의 다양화와 고급화로 소비자 기호를 충족시킨다.
- 항비만, 항당뇨, 혈당조절 능력이 입증된 제품을 개발함으로써 제품의 부가가치 향상시킨다.
- 국내 유산균 관련 전문연구인력 양성과 기반기술 확립한다.
- 기능성 유산균 함유 제품을 개발함으로써 매출을 향상시킨다.
- 유산균 함유 제품의 다양화와 고급화로 유산균 시장 확대를 유도한다.
- 한국인 유래 모유 유산균소재 및 함유 식품의 해외 시장 창출에 기여한다.
- 임상시험결과를 통해 기능성 발효식품의 상품성 향상 및 시장 확대를 유도한다.
- 기능성소재 개발로 국민건강 증진에 기여한다.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, 2002, London
2. International Dairy Federation and European Food and Fed Cultures Association, 2002, Inventory of microorganisms with a documented history of use in food, Bulletin of IDF, 377
3. dos Santos LM, Santos MM, de Souza Silva HP, Arantes RM, Nicoli JR, Vieira LQ Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection, *Med Microbiol Immunol.* 200 (2011) 29-38
4. Kim H, Jung BJ, Jung JH, Kim JY, Chung SK, Chung DK, *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid alleviates TNF- α -induced inflammation in the HT-29 intestinal epithelial cell line, *Mol Cells.* 33 (5) (2012) 479-86
5. Jeon JH, Kim SK, Baik JE, Kang SS, Yun CH, Chung DK, Han SH, Lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* enhances IL-6 expression in activated human basophils, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 35 (4) (2012) 363-74
6. Kang SS, Ryu YH, Baik JE, Yun CH, Lee K, Chung DK, Han SH, Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* induces nitric oxide production in the presence of interferon- γ in murine macrophages, *Mol Immunol.* 48(15-16) (2011) 2170-7
7. Kim HG, Lee SY, Kim NR, Lee HY, Ko MY, Jung BJ, Kim CM, Lee JM, Park JH, Han SH, Chung DK, *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid down-regulated *Shigella flexneri* peptidoglycan-induced inflammation, *Mol Immunol.* 48 (4) (2011) 382-91
8. Won TJ, Kim B, Song DS, Lim YT, Oh ES, Lee do I, Park ES, Min H, Park SY, Hwang KW, Modulation of Th1/Th2 Balance by *Lactobacillus* Strains Isolated from Kimchi via Stimulation of Macrophage Cell Line J774A.1 In Vitro, *J Food Sci.* 76(2) (2011) H55-61
9. Helin, T., Haahtela, S., and Haahtela, T, No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy* 57 (2002) 243-246

10. Maudsdotter L, Jonsson H, Roos S, Jonsson AB, Lactobacilli reduce cell cytotoxicity caused by *Streptococcus pyogenes* by producing lactic acid that degrades the toxic component lipoteichoic acid, *Antimicrob Agents Chemother.* 55 (2011) 1622-8
11. Vizoso Pinto MG, Rodriguez Gómez M, Seifert S, Watzl B, Holzapfel WH, Franz CM, Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro, *Int J Food Microbiol.* 133 (2009) 86 - 93
12. Paolillo R, Romano Carratelli C, Sorrentino S, Mazzola N, Rizzo A, Immuno modulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells, *Int Immunopharmacol.* 9 (2009) 1265-1271.
13. Maragkoudakis PA, Chingwaru W, Gradisnik L, Tsakalidou E, Cencic A, Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection, *Int J Food Microbiol.* 141 (2010)
14. Natalie S. Dykstra, Lucie Hyde, Alexander MacKenzie, David R. Mack, *Lactobacillus plantarum* 299v Prevents Caspase-Dependent Apoptosis In Vitro, *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 3 (2011) 21-26
15. Chiu YH, Hsieh YJ, Liao KW, Peng KC, Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factor, *Clin Nutr.* (2010) 131-40
16. Fischer, W, Physiology of lipoteichoic acids in bacteria, *Adv. Microb. Physiol.* 29 (1998) 233-302
17. Lotz, S., I. Wilde, G. van Zandbergen, T. Hartung, W. Solbach, and T. Laskay, Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2, *J.Leukoc.Biol.* 75 (2004) 467-477
18. Morath, S., A. Geyer, and T. Hartung, Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*, *Exp.Med.* 193 (2001) 393-397
19. Grangette, C., S. Nutten, E. Palumbo, S. Morath, C. Hermann, J. Dewulf, B. Pot, T. Hartung, P. Hols, and A. Mercenier., Enhanced anti inflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoicacids, *PNAS.* 102 (2005) 10321-10326
20. Glauser, M. P., G. Zanetti, J. D. Baumgartner, and J. Cohen, Septic shock:

pathogenesis. *Lancet*. 338 (1991) 732-736.

21. Ulevitch, R. J., and P. S. Tobias, Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin, *Annu.Rev.Immunol*. 13 (1995) 437-457
22. Lakhani, S. A., and C. W. Bogue, Toll-like receptor signaling in sepsis, *Curr.Opin.Pediatr*. 15 (2003) 278-282
23. Michelsen, K. S., A. Aicher, M. Mohaupt, T. Hartung, S. Dimmeling, C. J. Kirschning, and R. R. Schumann, The Role of Toll-like Receptors (TLRs) in Bacteria-induced Maturation of Murine Dendritic Cells (DCs), *J. Biol. Chem*. 276 (2001) 25680-25686
24. Medvedev, A. E., K. M. Kopydlowski, and S. N. Vogel, Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: Dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression, *J.Immunol*. 164 (2000) 5564-5574
25. Lehner, M. D., S. Morath, K. S. Michelsen, R. R. Schumann, and T. Hartung, Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different toll-like receptors independent of paracrine mediators, *J.Immunol*. 166 (2001) 5161-5167
26. Tang, X., D. L. Marciano, S. E. Leeman, and S. Amar, LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF- α factor, and STAT6(B) with effects on multiple cytokines, *PNAS*. 102 (2005) 5132-5137
27. Cook, D. N., D. S. Pisetsky, and D. A. Schwartz., Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease, *Nat.Immunol*. 5 (2004) 975-979
28. Yang, S., R. Tamai, S. Akashi, O. Takeuchi, S. Akira, S. Sugawara, and H. Takada. 2001. Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture, *Infect.Immun* 69 (2001) 2045-2053
29. Jacinto, R., T. Hartung, C. McCall, and L. Li, Lipopolysaccharide and Lipoteichoic acid induced tolerance and cross tolerance: distinct alterations in IL-1 receptor associated kinase, *J.Immunol*. 168 (2002) 6136-6141
30. Sugawara, S., R. Arakaki, H. Rikiishi, and H. Takada, Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblasts and

monocytes in a CD14-dependent manner, *Infect.Immun.* 67 (1999) 1623-1632

31. De Kimpe, S. J., M. Kengatharan, C. Thiemermann, and J. R. Vane, The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (1995) 10359-10363
32. Kengatharan, K. M., S. De Kimpe, C. Robson, S. J. Foster, and C. Thiemermann, Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure, *J.Exp.Med.* 188 (1998), 305-315
33. Morath, S., A. Stadelmaier, R. Geyer, R. R. Schmidt, and T. Hartung, Synthetic lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus of cytokine release, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 1635-1640
34. Nomura, F., S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto, K. Nakanishi, M. Kimoto, K. Miyake, K. Takeda, and S. Akira, Cutting Edge: Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression, *J.Immunol.* 164 (2000) 3476-3479
35. Sato, S., F. Nomura, T. Kawai, O. Takeuchi, P. F. Mührladt, K. Takeda, and S. Akira, Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR 4 mediated signaling pathways. *J.Immunol.* 165 (2000) 7096-7101
36. Rosenstiel, P., M. Fantini, K. Bräutigam, T. Kühbacher, G. H. Waetzig, D. Seegert, and S. Schreiber, TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells, *Gastroenterology.* 124 (2003) 1001-1009
37. Cleveland, M. G., J. D. Gorham, T. L. Murphy, E. Tuomanen, and K. M. Murphy, Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway, *Infect.Immun.* 64 (1996) 1906-1912.
38. Wang, J. H., M. Doyle, B. J. Manning, Q. D. Wu, S. Blankson, and H. P. Redmond, Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of toll-like receptor 2 expression, *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 36068-36075
39. Myokai, F., S. Takashiba, R. Lebo, and S. Amar, A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor α gene expression: Molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 96 (1999) 4518–4523

40. Henry–Stanley MJ, Zhang B, Erlandsen SL, Wells CL, Synergistic effect of tumor necrosis factor–alpha and interferon–gamma on enterocyte shedding of syndecan–1 and associated decreases in internalization of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, *Cytokine*. 34 (2006) 252–259
41. Chavakis T, et al., The anti–inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*, *Trends Immunol*. 28 (2007) 408–418
42. Paolillo R, Romano Carratelli C, Sorrentino S, Mazzola N, Rizzo A, Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells, *Int Immunopharmacology*. 9 (2009)
43. Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K, Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte b–defensin 2, *Clinical and Experimental Immunology*. 151 (2008)
44. Meydani SN, Ha WK. Immunologic effects of yogurt, *Am J Clin Nutr* 71 (2000) 861–872.
45. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization, *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 (2005) 2880–2885
46. Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ., Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells, *J. Immunol*. 168 (2002) 171–178
47. Wallace TD, Bradley S, Buckley ND, Green–Johnson JM, Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J Food Protect*. 66 (2003) 466–472
48. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY, Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *J Appl Microbiol*. 100 (2006) 1171–85
49. McFarland LV, Dublin S, Meta–analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome, *World J Gastroenterol*. 14 (2008) 2650–2661
50. Vanderpool C, Yan F, Polk DB, Mechanisms of probiotic action: implications for

- therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 14 (2008) 1585-1596
51. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB, *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice, *Inflamm Bowel Dis.* 8 (2002) 71
 52. Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang SS, Im J, Yun CH, Kim DW, Lee K, Chung DK, Ju HR, Han SH, Differential immuno stimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids, *Int Immunopharmacol.* 9 (2009) 127-133
 53. Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, Siren J, Matikainen S, Julkunen I. *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 75 (2004) 764-71
 54. Kim HG, Kim NR, Gim MG, Lee JM, Lee SY, Ko MY, Kim JY, Han SH, Chung DK, Lipoteichoic Acid Isolated from *Lactobacillus plantarum* Inhibits Lipopolysaccharide-Induced TNF- α Production in THP-1 Cells and Endotoxin Shock in Mice. *J Immunol.* 180 (2008) 2553-2561
 55. Vaarala O, Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli, *Clin Exp Allergy.* 33 (2003) 1634-40
 56. H.S. Seo, S.M. Michalek, M.H. Nahm, Lipoteichoic acid is important in innate immune responses to Gram-positive bacteria, *Infect. Immunol.* 76 (2008) 206 - 213
 57. I. Ginsburg, Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation, *Lancet Infect.* 2 (2002) 171-179
 58. O. Takeuchi, K. Hoshino, S. Akira, Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection, *J. Immunol.* 165 (2000) 5392 - 5396
 59. N.W.J. Schroder, S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U.B. Gobel, J.R. Weber, R.R. Schumann, Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 15587 - 15594

59. T.J. Standiford, D.A. Arenberg, J.M. Danforth, S.L. Kunkel, G.M. van Otteren, R.M. Strieter, Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis, *Infect. Immunol.* 62 (1994) 119 - 125
61. E. Ellingsen, S. Morath, T. Flo, A. Schromm, T. Hartung, C. Thiemermann, T. Espevik, D. Golenbock, D. Foster, R. Solberg, A. Aasen, J. Wang, Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14, *Med. Sci. Monit.* 8 (2002) 149 - 156
62. H.G. Kim, S.Y. Lee, N.R. Kim, M.Y. Ko, J.M. Lee, T.H. Yi, S.K. Chung, D.K. Chung, Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid (LTA) on *Staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor- α production, *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (2008) 1191 - 1196
63. S.H. Han, J.K. Kim, M. Martin, S.M. Michalek, M.H. Nahm, Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as Staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2, *Infect. Immunol.* 71 (2003) 5541 - 5548
64. H.G. Kim, M.G. Gim, J.Y. Kim, H.J. Hwang, M.S. Ham, J.M. Lee, T. Hartung, J.W. Park, S.H. Han, D.K. Chung, Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* elicits both the production of Interleukin-23p19 and suppression of pathogen-mediated Interleukin-10 in THP-1 cells, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49 (2007) 205 - 214
65. T. van der Poll, C.V. Keogh, X. Guirao, W.A. Buurman, M. Kopf, S.F. Lowr, Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia, *J. Infect. Dis.* 176 (1997) 439-444
66. M.K. Dahle, G. Øverland, A.E. Myhre, J.F. Stuestøl, T. Hartung, C.D. Krohn, Ø. Mathiesen, J.E. Wang, A.O. Aasen, The phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is activated by lipoteichoic acid and plays a role in Kupffer cell production of interleukin-6 (IL-6) and IL-10, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5704-5711
67. C. Grangette, S. Nutten, E. Palumbo, S. Morath, C. Hermann, J. Dewulf, B. Pot, T. Hartung, P. Hols, A. Mercenier, Enhanced antiinflammatory capacity of *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 10321 - 10326
68. M.D. Lehner, S. Morath, K.S. Michelsen, R.R. Schumann, T. Hartung, Induction of

Cross-Tolerance by Lipopolysaccharide and Highly Purified Lipoteichoic Acid Via Different Toll-Like Receptors Independent of Paracrine Mediators, *J. Immunol.* 8 (2001) 5161-5167

69. S. Deininger, A. Stadelmaier, S. von Aulock, S. Morath, R.R. Schmidt, T. Hartung, Definition of structural prerequisites for lipoteichoic acid-inducible cytokine induction by synthetic derivatives, *J. Immunol.* 170 (2003) 4134 - 4138
70. S. Bhakdi, T. Klonisch, P. Nuber, W. Fischer, Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids, *Infect. Immunol.* 59 (1991) 4614 - 4620
71. R.Z. Zeng, H.G. Kim, N.R. Kim, H.Y. Lee, B.J. Jung, M.Y. Ko, S.Y. Lee, D.K. Chung, Protein expression changes in human monocytic THP-1 cells treated with lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus aureus*, *Mol. Cells.* 29 (2010) 585-594
72. Knapp S, von Aulock S, Leendertse M, Haslinger I, Draing C, Golenbock DT, van der Poll T, Lipoteichoic acid-induced lung inflammation depends on TLR2 and the concerted action of TLR4 and the platelet-activating factor receptor, *J Immunol.* 180 (2008) 3478-84
73. Holt, P. G., and Sly, P. D, Interactions between RSV infection, asthma, and atopy: unraveling the complexities. *J. Exp. Med.* 18 (2002) 1271-1275

제 7 장. 참고문헌

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27(5):1047-53.
2. Hungin AP, Whorwell PJ, Tack J, Mearin F. The prevalence, patterns and impact of irritable bowel syndrome: an international survey of 40,000 subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17(5):643-50.
3. Jones R, Lydeard S. Irritable bowel syndrome in the general population. *BMJ* 1992;304(6819):87-90.
4. Wilson S, Roberts L, Roalfe A, Bridge P, Singh S. Prevalence of irritable bowel syndrome: a community survey. *Br J Gen Pract* 2004;54(504):495-502.
5. Colwell LJ, Prather CM, Phillips SF, Zinsmeister AR. Effects of an irritable bowel syndrome educational class on health-promoting behaviors and symptoms. *Am J Gastroenterol* 1998;93(6):901-5. doi: 10.1111/j.1572-0241.1998.00273.x.
6. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, et al. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005;128(3):541-51.
7. Cross ML. Immunoregulation by probiotic lactobacilli: pro-Th1 signals and their relevance to human health. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2002;3:115 - 25.
8. Yun SI, Park HO, Kang JH. Effect of Lactobacillus gasseri BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J Appl Microbiol* 2009;107(5):1681-6. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04350.x.
9. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in high fructose fed rats. *Nutrition* 2007;23(1):62-8. doi: 10.1016/j.nut.2006.09.002.
10. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007;50(11):2374-83. doi: 10.1007/s00125-007-0791-0.
11. Takahashi H, Fujita T, Suzuki Y, Benno Y. Monitoring and survival of Lactobacillus gasseri SBT2055 in the human intestinal tract. *Microbiol Immunol* 2006;50(11):867-70.
12. Alcantara CS, Yang CH, Steiner TS, et al. Interleukin-8, tumor necrosis factor-alpha, and lactoferrin in immunocompetent hosts with experimental and Brazilian children with acquired cryptosporidiosis. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68(3):325-8.
13. Ko G, Jiang ZD, Okhuysen PC, DuPont HL. Fecal cytokines and markers of intestinal inflammation in international travelers with diarrhea due to Noroviruses. *J*

Med Virol 2006;78(6):825-8. doi: 10.1002/jmv.20630.

14. Quan C, Talley NJ, Cross S, et al. Development and validation of the Diabetes Bowel Symptom Questionnaire. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17(9):1179-87.
15. Kajander K, Hatakka K, Poussa T, Farkkila M, Korpela R. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22(5):387-94. doi: 10.1111/j.1365-2036.2005.02579.x.
16. Zimmerman J. Extraintestinal symptoms in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel diseases: nature, severity, and relationship to gastrointestinal symptoms. *Dig Dis Sci* 2003;48(4):743-9.
17. Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr* 2010;104(12):1831-8. doi: 10.1017/s0007114510002874.
18. Lara-Villoslada F, Sierra S, Boza J, Xaus J, Olivares M. [Beneficial effects of consumption of a dairy product containing two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714 in healthy children]. *Nutr Hosp* 2007;22(4):496-502.
19. Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, et al. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS One* 2011;6(4):e18735. doi: 10.1371/journal.pone.0018735.
20. Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int J Mol Sci* 2010;11(6):2499-522. doi: 10.3390/ijms11062499.
21. Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Wurthwein G, Rohdewald P. Antidiabetic effect of Pycnogenol French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci* 2004;75(21):2505-13. doi: 10.1016/j.lfs.2003.10.043.
22. Van der Does FE, De Neeling JN, Snoek FJ, et al. Symptoms and well-being in relation to glycemic control in type II diabetes. *Diabetes Care* 1996;19(3):204-10.
23. Mazze RS, Lucido D, Shamon H. Psychological and social correlates of glycemic control. *Diabetes Care* 1984;7(4):360-6.
24. Al-Salami H, Butt G, Fawcett JP, Tucker IG, Golcorbin-Kon S, Mikov M. Probiotic treatment reduces blood glucose levels and increases systemic absorption of gliclazide in diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2008;33(2):101-6.
25. Li YC. Effects of brewer's yeast on glucose tolerance and serum lipids in Chinese adults. *Biol Trace Elem Res* 1994;41(3):341-7.
26. Laitinen K, Poussa T, Isolauri E, Nutrition AMIaIMG. Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomised controlled trial. *Br J Nutr* 2009;101(11):1679-87. doi: 10.1017/s0007114508111461.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치 식품 기술 개발 사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치 식품 기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.