

121047-
2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
유용농생명자원산업화기술개발사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004379-01

생물강화
기술활용
동태등에
를이용한
비타민
B2/B9
증강
파라바이
오틱스
사료첨가
물개발

생물강화기술 활용 동태등에를 이용한
비타민B2/B9 증강 파라바이오틱스
사료첨가물 개발

2023. 05. 31.

2023

주관연구기관 / 환동해산업연구원
공동연구기관 / 한국식품연구원
공동연구기관 / (주)시그널케어

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생물강화기술 활용 동애등에를 이용한 비타민B2/B9 증강 파라바이오틱스 사료첨가물 개발”(개발기간 : 2022.04.01 ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023. 05. 31.

주관연구기관명 : 환동해산업연구원 (대표자) 전 강 원 (인)

공동연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자) 백 형 희 (인)

공동연구기관명 : (주)시그널케어 (대표자) 양 동 섭 (인)



주관연구책임자 : 홍 선 미

공동연구책임자 : 이 상 희

공동연구책임자 : 양 동 섭

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서

보안등급
일반[], 보안[]

중앙행정기관명	농림축산식품부		사업명	사업명		유용농생명자원 산업화기술개발사업							
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명		유용농생명자원 산업화기술개발							
공고번호	2021-24호		총괄연구개발 식별번호										
			연구개발과제번호		121047-2								
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0805	35%	LB0306	35%	LB0606	30%						
	농림식품과학기술 분류	RA0306	35%	CA0105	35%	AB0299	30%						
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문												
	영문												
연구개발과제명	국문		생물강화기술 활용 동태등을 이용한 비타민B2/B9 증강 파라바이오틱스 사료첨가물 개발										
	영문		Development of BSF-Parabiotics Feed Additives with VitaminB2/ B9 Enhanced by Biofortification Technology										
주관연구개발기관	기관명		환동해산업연구원		사업자등록번호								
	주소		(우)36315 경북 울진군 죽변면 해 양과학길 22		법인등록번호								
연구책임자	성명		홍 선 미		직위		책임연구원						
	연락처	직장전화			휴대전화								
		전자우편			국가연구자번호								
연구개발기간	전체		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)										
	단계		1단계		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원	기관부담		그 외 기관 등의 지원금				연구개발비외 지원금					
	연구개발비	연구개발비	지방자치단체		기타()		합계						
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계					
총계	525,000	-	33,500			525,000	33,500	558,500					
1단계	1년차	225,000	-	8,500		225,000	8,500	233,500					
	2년차	300,000	-	25,000		300,000	25,000	325,000					
	3년차												
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고		
	역할		기관유형										
공동연구개발기관	한국식품연구원		이상희		책임 연구원		-				공동 책임		출연연
	농업회사법인(주) 시그널케어		양동섭		대표		-				공동 책임		중소 기업
위탁연구개발기관													
연구개발담당자 실무담당자	성명		조현솔		직위		원급연구원						
	연락처	직장전화			휴대전화								
		전자우편			국가연구자번호								

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022 년 12 월 31 일

연구책임자: 홍 선 미

주관연구개발기관의 장: 환동해산업연구원 전 강 원
 공동연구개발기관의 장: 한국식품연구원 백 형 희
 공동연구개발기관의 장: (주)시그널케어 양 동 섭



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		유용농생명자원산업화기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명		유용농생명자원산업화기술개발사업				연구개발과제번호	121047-2
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0805	35%	LB0306	35%	LB0606	30%
	농림식품 과학기술분류	RA0306	35%	CA0105	35%	AB0299	30%
총괄연구개발명							
연구개발과제명		생물강화기술 활용 동애등애를 이용한 비타민B2/B9 증강 파라바이오틱스 사료첨가물 개발					
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)					
총 연구개발비		총 558,500 천원 (정부지원연구개발비: 525,000 천원, 기관부담연구개발비 : 33,500 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점기준(4) 종료시점목표(6)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	환경정화 곤충이자 경제성 곤충인 동애등애의 영양성분을 배지로 비타민B군 생산 기능을 가진 유산균으로 바이오공정하여 (1)안전한 천연 비타민B2/B9_생물강화공정(BioFortification) 기술 확립과 대량생산을 최적화하고, (2)장내 염증 완화 기능을 입증하여 (3)반려견 장내 환경개선 사료 (시)제품 개발을 통해 안정적 반려견 사료 첨가제 소재 개발을 목표로 함					
	전체 내용	<p>1) 비타민B2/B9 생산 유산균 활용 생물강화기술 최적화 및 대량생산</p> <ul style="list-style-type: none"> • 최적 유산균 생산 지표성분 비타민B2/B9 공정 고도화 • 생물강화기술 비타민B2/B9 정량정성분석(TLC,LC,MS/MS 등) • 생물강화 비타민B2/B9 함유 동애등애 성분분석 및 규격화 • 대량생물공정(파일럿배양포함) VitB2/B9 대사체 최적화 • 파라바이오틱스(생균,사균,대사체,프리) 원료 규격화 • 파라바이오틱스의 안전성, 안정성 및 유효기간 설정 <p>2) 비타민B2/B9 생물강화소재의 장내 염증완화 효능 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> • 세포내 독성 유무 확인 • 항염증 사이토카인 발현에 따른 항염증 억제 효과 분석 • 장내염증 유발 지표 항염증 기능 해석 • 유효, 기능성 섭취량 및 안전성 시험 • 항염증 억제 기능 전임상 분석 					

연구개발 목표 및 내용	전체 내용		<p>3) 동애등에 파라바이오틱스 활용 반려견 사료 제형화, (시)제품화 및 안전성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> • 동애등에 파라바이오틱스 제형화와 반려견대상 관능테스트 • 비타민B_생물강화 동애등에 사료 급이에 따른 장내환경평가 • 동애등에 파라바이오틱스 사료의 유효기간 및 안정성 분석 • 비타민B_생물강화 동애등에 함유 사료성분분석 및 규격화 • 동애등에 파라바이오틱스의 반려견 사료 (시)제품 생산
	해당 연도 (2021년)	<p>목표</p> <ul style="list-style-type: none"> • 주관연구기관(환동해산업연구원): 동애등에 활용 비타민B2/B9 증강 생물강화 기술 확립 • 공동연구기관1(한국식품연구원): 비타민B2/B9의 in vitro 실험을 통한 장내 염증완화 효능 규명 • 공동연구기관2(시그널케어): 동애등에_파라바이오틱스(BSF_ParaBiotics) 제형 및 테스트 <p>내용</p> <ul style="list-style-type: none"> • 주관연구기관(환동해산업연구원): <ul style="list-style-type: none"> - 기선발된 비타민B2/B9 생산 유산균 활용 동애등에 DoE 작성 (N/C, Temp, pH, O2) - BSF_비타민B2/B9 정량정성 분석법 확립 및 확인 (TLC, HPLC, ELISA kit 등) - BSF_비타민B2/B9 원료 습식 및/또는 건조법 확립 - 대량배양 조건 확립 후 성분 및 비타민B2/B9 분석 (열량, 일반성분, 기타 비타민 등) • 공동연구기관(한국식품연구원) <ul style="list-style-type: none"> - 질 환세포주 모델 확립 - 세포독성 유무 확인 - 세포내 염증 마커측정: 사이토카인(IL-6, TNF-a 등) 발현분석 - 표준품(또는 경쟁품)과의 항염 효능 비교 - 효능 스크리닝을 통한 후보 소재 도출 • 공동연구기관(시그널케어) <ul style="list-style-type: none"> - 동애등에 분말화 및 전처리 후 공급체계 마련 - BSF_ParaBiotics 내 반려견 사료 레시피 및 제형화 테스트 - 제형된 사료 안전성 및 안정성평가(사료검증센터_공인성적서) - 반려견 사료 레시피에 따른 관능 테스트 	
연구개발성과	<p>(정량적성과)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 특허출원 3건, 상표출원 5건, 국제균주기탁(KCCM) 3종 • 기술이전 4건 • 논문 6건(SCI) 및 학술발표 17건(생물공학회, 미생물생명공학회, 해양바이오학회 등) • (시)제품 5건_사랑하개, 제로 외 3건 • 고용창출 9건(시그널케어) • 홍보(언론보도) 5건 <p>(정성적성과)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 동애등에 비타민B2/B9 생산 공정 확립 및 정량정성확립(1.7mg/100g, 30µg/100mL) • HiLAB 인간장세포 항균, 부착능 및 비타민B2(rib, FMN, FAD) /B9 생산 확인 • HiLAB 비타민B2/B9 Caco-2, Raw264.7 및 공세포(Caco-2/Raw264.7) 항염지표확인 • HiLAB 비타민B2/B9 급성, 만성유도 마우스 예방 및/또는 치료효능 확인 • 비타민B2/B9 함유 HiLAB의 장내 마이크로바이옴 분석 완료(염증완화균주) • 비타민B2/B9 함유 HiLAB의 반려견 시제품 2건 외 3건 		
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>(활용계획)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 천연비타민B2/B9_생물강화 동애등에 사료첨가제(파라바이오틱스 동애등에) 함유 장염예방 반려견사료 제품화 • 파라바이오틱스 동애등에 사료첨가제 함유 장염예방 반려묘 및 양어사료 제품화 • 파라바이오틱스 동애등에 사료첨가제의 주력 사료 제품화 및 브랜드화 • 파라바이오틱스 동애등에 사료첨가제 내수 및 외수 시장 개척 <p>(현재 계약 체결된 중국시장 진출 및 진행 중인 미국, 캐나다 시장 진입 가능)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 기타 곤충활용 파라바이오틱스(비타민B_생물강화) 제품 개발 및 상용화 		

<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p>(기대효과)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 파라바이오틱스 사료개발로 반려견 장내 환경 및 마이크로바이옴 개선 기대 • 동애등에의 지용성비타민(VitA,D,E)와 유산균 생산 수용성비타민(VitB2,B9) 복합물로 반려견사료의 고품질화 가능 • 대체 곤충단백질뿐 아니라 천연비타민 첨가를 통한 사료첨가물로의 기능성증대 • 생물강화기술 적용 천연비타민첨가를 통한 면역증가, 성장효과의 사료첨가제 개발 • 천연비타민 함유 동애등에 사료첨가물의 기능 업그레이드 및 고부가가치성 증가 • 경제성곤충인 동애등에 사료원료로서의 유산균 발효를 통한 안전성 증대 • 환경정화곤충인 동애등에 활용을 통한 동애등에 기능 업사이클링 실현 • 천연 비타민B2/B9 소재 동애등에 사료를 통한 반려견 장내염증 완화 효과 기대 • 천연비타민B 사료첨가제를 활용한 항생제 대체효과 및 반려견 면역증진 효과기대 • 천연비타민 사용으로 합성비타민 사용감소에 따른 반려견 부작용 감소 • 생물강화기술 천연비타민 첨가제 개발에 따른 국내 사료의 고부가가치화 • 단백질 가수분해 및 천연비타민 생산이 가능한 곤충사료 개발에 따른 소득증대 • 원가감소 및 기능성 증대를 통한 국제경쟁력 강화 및 사료 산업의 발전 • 육류 대신 곤충단백질 활용을 통한 저탄소화 • 사료첨가제으로써 안전한 파라바이오틱스 사료 적용 종(어류 등) 확대 가능 • 수산 및 농업을 융합한 연구를 통한 지속적 수요 가능한 신시장 창출 • 국내뿐 아니라 국외시장으로의 배합사료 첨가물로서 수출 가능 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>생물강화기술</p>	<p>동애등에</p>	<p>리보플라빈</p>	<p>엽산</p>	<p>항염</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>biofortification</p>	<p>black soldier fly</p>	<p>riboflavin</p>	<p>folate</p>	<p>anti inflammation</p>

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요	01
제 1 절 연구개발의 목적	01
제 2 절 연구개발의 필요성	03
제 3 절 연구개발의 범위	17
제 2 장 연구개발과제의 수행과정 및 수행내용	21
제 1 절. 연구개발의 추진계획	21
1. 연구개발 추진전략	21
2. 연구개발 추진 세부 흐름도	22
3. 연구개발 추진 체계	23
제 2 절. 연구개발의 수행내용	25
1. 생물강화공정 기반 비타민 B2/B9 소재화 기술(주관)	25
2. 비타민B2/B9 파라바이오틱스 효능 평가(공동1)	34
3. BSF_비타민B2/B9 파라바이오틱스 사료 안정화(공동2)	39
제 3 장 연구개발의 수행결과 및 목표 달성 정도	48
제 1 절. 연구수행 결과	48
1. 정성적 연구 개발 성과	48
2. 연구 개발 결과	51
3. 정량적 연구 개발 성과	148
제 2 절. 연구 목표 달성 정도	154
제 4 장 목표 미달 시 원인분석	156
제 5 장 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	157
제 6 장 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	158

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

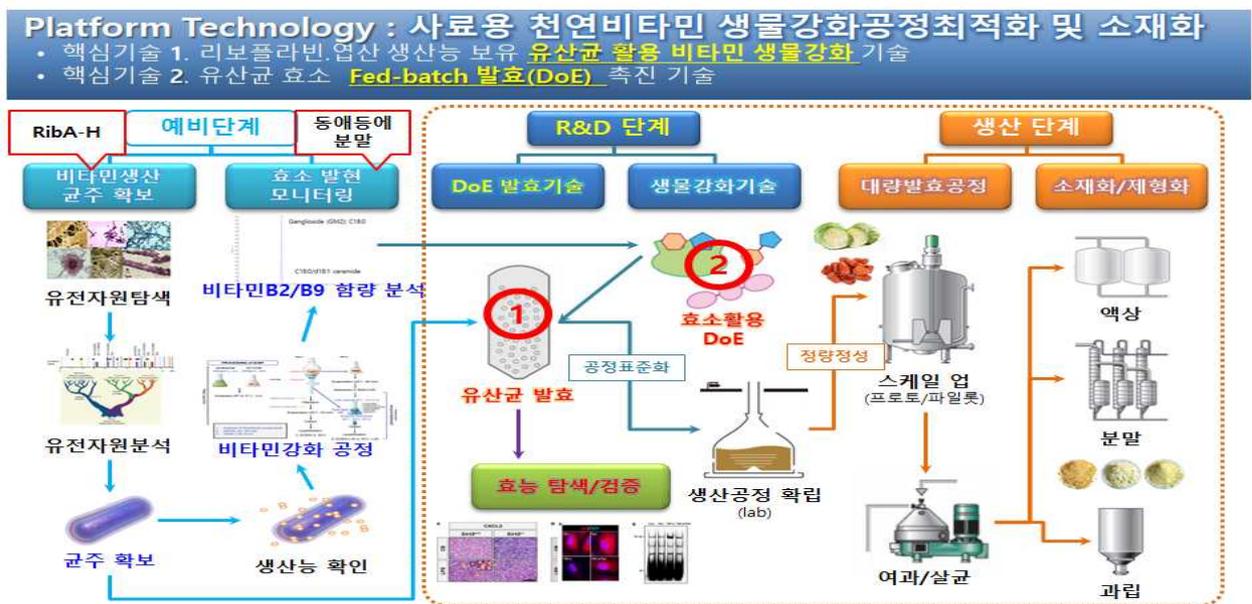
1-1. 연구개발 최종 목적

1) 연구개발 목표

환경정화 곤충이자 경제성 곤충인 동애등에의 영양성분(C/N, 무기염류)을 비타민 B군 생산 기능을 가진 유산균으로 바이오공정하여 지속가능한 곤충생산-제조-서비스 All in one system 구축

- (1) 안전한 천연 비타민B2/B9_생물강화공정(BioFortification) 기술 확립과 대량생산
- (2) 장내 염증 완화 기능 입증
- (3) 반려견 장내 환경개선 사료 (시)제품 개발을 통해 안정적 사료공급 시스템 확립

[기술개발 개념도]



2) 연구개발 정성적 목표

- (1) 비타민B2/B9 생물강화공정(BioFortification)기술개발
 - ① 동애등에(N/C/기타 무기염류) ② 비타민B생산 유산균적용, ③ 48시간 이내 배양 (VitB2/B9 yield: 2 mg 이상/100g)
 - ② 천연 비타민B 성분 표준화(5% BSF in 1 L DW, w/v)
 - 비타민B2(riboflavin; 20 µg/g), 비타민B9(folate; 0.01 mg/g)
- (2) 장내염증 완화 기능 입증(세포/전임상)
- (3) 비타민B_생물강화 반려견사료 (시)제품 개발(유효기간 설정 완료)

1-2. 연구개발 세부 목표

1) 주요 기능

- ① 유산균 발효에 의한 동애등에(BSF, N/C etc) 성분의 가수분해(소화흡수증대)와 유산

균 생산 비타민 B2/B9(장내 염증 완화 및 장내환경 개선) 성분 강화

- ② 동애등에에 함유된 지용성 비타민A, D, E와 유산균 바이오공정에 의해 안전하게 생산된 수용성 비타민 B2/B9이 더하여진 사료첨가물 소재 생산
- ③ 바이오공정에서 생산된 프로바이오틱스(유산균 생균+사균), 프리바이오틱스(동애등에), 포스트바이오틱스(비타민B2/B9)가 결합된 파라바이오틱스(ParaBiotics) 사료를 통하여 반려견 장내 환경 개선
- ④ BSF_비타민B2/B9의 반려견 장염 예방 또는 개선 효능

2) 주요 성능

- ① 동애등에(5%)에서 생물강화기술(유산균 발효)에 의한 천연 비타민B2/B9 함량 증가

비타민	건조동애등에	유산균	장의 생물강화반응	증감	장내 생물강화반응
B2	+(0.01 mg/g)	-	+(0.02 mg/g)	2배 이상	++
B9	-	-	+(0.1 µg/g)	0.1배 이상	++
A	+(300 µg/kg)	-	+(300 µg/kg)	유지	+
D	+(256 IU/kg)	-	+(256 IU/kg)	유지	+
E	+(6.2 IU/kg)	-	+(6.2 IU/kg)	유지	+
K2	-	-	+(0.01 mg/g)	+	++

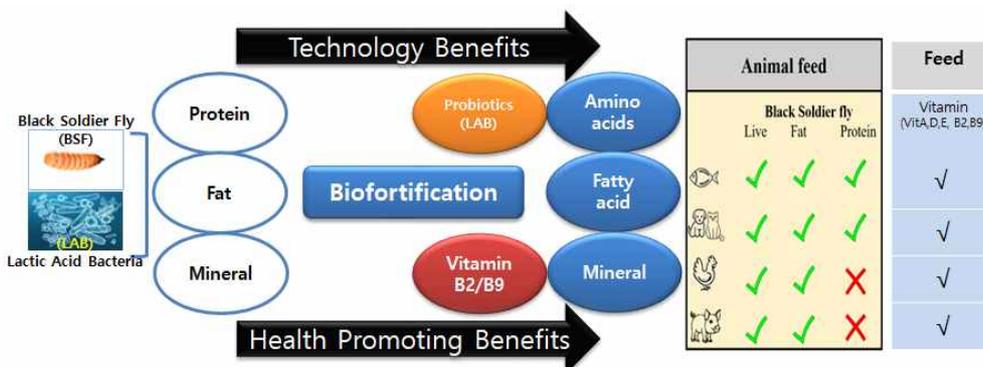
- ② 동애등에 생물강화반응 후 원료 성분의 규격화(공인분석성적서)
- ③ 세포 및/또는 전임상 시험에 의한 장내 염증 완화 효과 증명(IBD or IM cytokine 변화)
- ④ 원료 및/또는 (시)제품의 안전성 및 안정성 확인(공인분석기관)
- ⑤ 반려견 사료 제형화 및 관능 테스트

3) 핵심 기술

- ① 동애등에 성분 활용 유산균 발효에 의한 천연 비타민B2/B9 생물강화기술
- ② 유산균 생산 수용성 비타민B2/B9와 동애등에 지용성 비타민A, D, E의 복합체 활용 기술
- ③ 파라바이오틱스(유산균생균+사균+동애등에+BioVitB2/B9) 반려견 사료 제형화 기술
- ④ 동애등에의 유산균(프로테아제, 리파아제, 셀룰라아제 함유)발효의 생물적 가수분해 기술

4) 적용 범위

- ① 강아지 장염 예방을 위한 천연비타민 함유 사료 첨가물로의 맞춤형 사료
- ② 반려동물(개, 고양이)용 천연 비타민 강화 간식 제조를 위한 첨가물
- ③ 파라바이오틱스(유산균 생균+사균+동애등에+BioVitB2/B9) 양어 및 관상어 사료 확대



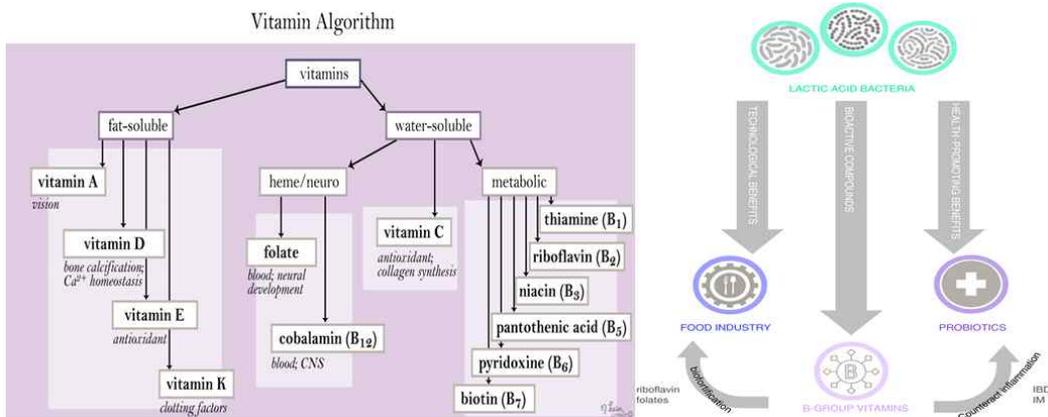
제 2 절 연구개발의 필요성

2-1. 연구개발의 중요성

(1) 기술적 측면

① 미생물을 이용한 천연 비타민 생산

- 비타민류의 주 용도는 사료첨가물, 식품소재, 의약품, 건강식품, 화장품, 시약류 등 다양하게 사용되고 있으며 비타민류가 화학공업의 목표로 되고 있으나 앞으로는 Bio factor나 probiotics 등의 관련 분야로 가져와 기능, 용도개발, 생산이 필요
- 비타민은 미생물과 식물에서 생산될 뿐 아니라 식품으로 공급되어 중요성이 간과되고 있으나 질병노출, 스트레스 등에 의해 비타민 합성이 저하되고 수용성 비타민의 경우 소변으로 배출되어 지속적 공급이 필요하여 미생물을 이용한 생물강화기술 도입 필요
- 합성 비타민의 경우는 활성형이 적어 천연비타민 활성형으로 공급이 필요
- 지용성 비타민은 A, D, E, K가 있으며 비타민A는 효모(*Saccharomyce cerevisiae*)와 곰팡이(*Blakeslea trispora*)에 의해 합성되며, 비타민 D는 일광노출로 자연 합성, 비타민 E는 합성 미생물인 *Euglena gracilis*, 비타민K는 *Flavobacterium sp*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*와 Lactic acid 등에서 생산이 가능함
- 수용성 비타민C는 인체에서 합성되지 않는 필수 식이성분이며, 화학합성법과 미생물변환법을 조합하여 생산 가능함
- 수용성 비타민B는 B군의 8개 중 비타민B1은 *B. subtilis*(315mg/L), B2는 효모, *B. subtilis*, *A. gossypii*(13g/L), B3는 *Rhodococcus rhodochrous*, B5는 *Fusarium oxysporum*, B6는 화학 합성 공정으로 합성되며 B7은 *S. marcescens*(600mg/L), B9은 *B. subtilis*, B12는 *B. megaterium* 등에서 생산되고 있음
- 유산균이 생산한 비타민B2와 B9의 IBD(inflammatory bowel disease), IM(Intestinal mucositis)에 효능 연구로 이에 대한 산업적 적용 필요(2020년)



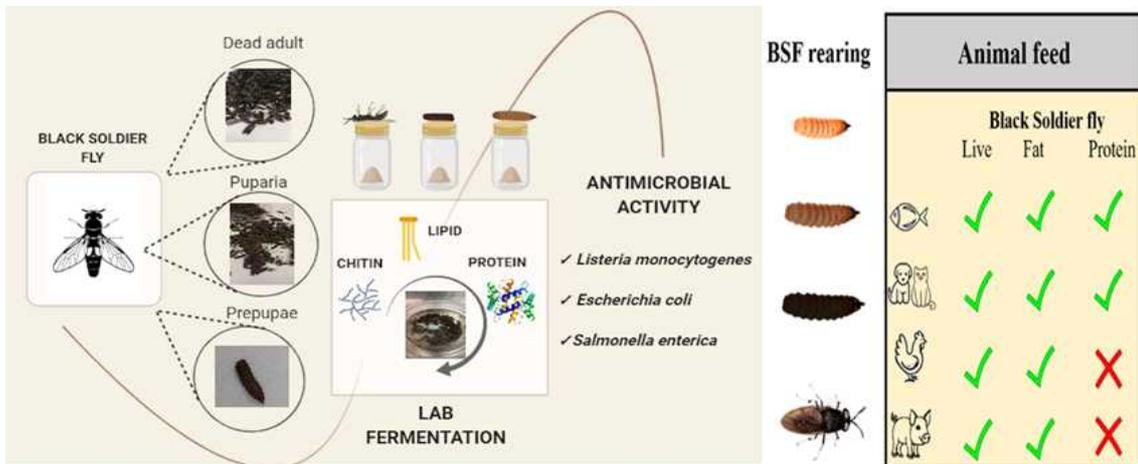
② 복합기능성 사료 첨가물의 필요

- 성장촉진용 항생제 사용 전면금지('11.07)로 인한 무항생제 사육 시 발생할 수 있는 생산성 감소, 질병 발생률 증가 등의 문제를 해결하기 위해 효율적인 항생제 대체물질 개발 및 면역강화 물질(미량원소 및 비타민류) 활용기술 확립 필요
- 기능성 유효 대체물질은 축산물 내 잔류, 내성균 출현 관련 위험성이 없기 때문에 적극적 소재 개발 및 이들의 실용적인 이용방법 확립 시급
- 생균제, 유기산, 식물추출물, 효소제, 면역증강제 등 다양한 종류의 항생제 대체물질이 개발·사용되고 있으나 성장촉진, 사료효율 개선 등 생산성 측면에서의 효과가 대부분임
- 생산성뿐만 아니라, 질병 예방 및 치료 효과를 포함하는 고효율 항생제 대체물질, 면역증강물질 개발이 필요
- 스트레스 저감을 통한 생산성 향상 및 고품질 안전 사료 생산 기술 확립 필요

- 반려견 스트레스 요인이 생산성 감소, 내병성 저하, 질병 발생률 등 다양한 문제 유발
- 사료, 육종 및 사양기술 발달로 인해 단기간에 고도성장을 하는 치어에 있어 스트레스 예방 및 체내 대사 조절 필요
- 반려견 산업의 질적 성장, 사양기반 안정화, 소비자 신뢰 확보 및 국민 건강을 위해 반려견의 위생, 안정성 확보, 효율적인 면역강화 대체물질 개발(항균물질, AMPs, 비타민류) 및 기술 확립 필요

③ 곤충의 사료화 기술

- 곤충 유래 항생펩타이드들은 새로운 개념의 차세대 항생제로서 주목을 받고 있으며 이들 펩타이드 항생제는 내성 및 부작용이 없어 천연 항생제로 개발용이
- 곤충 체내에서 자연 면역에 관련된 항생펩타이드를 유도하여 육계 사육에 성공사례 있음
- 항생펩타이드의 3차원 구조에 기초한 구조-항생 활성 상관관계 연구 및 펩타이드 공학 기술을 이용하여 항생활성이 증가된 고기능성 항생펩타이드 개발 가능
- 펩타이드 합성기술과 설계에 바탕을 둔 다양한 펩타이드 공학기술은 생리 기능성이 조절된 의약품, 백신, 진단 시약 개발에 많이 이용되고 있음
- 갈색거저리, 누에를 포함한 곤충으로부터 다양한 항생펩타이드가 분리되었고 이들 항생펩타이드를 대장균, 곤충 벡로바이러스 등 다양한 발현계를 이용하여 대량 생산하고자하는 많은 연구가 시도되었으나 성공하지 못함

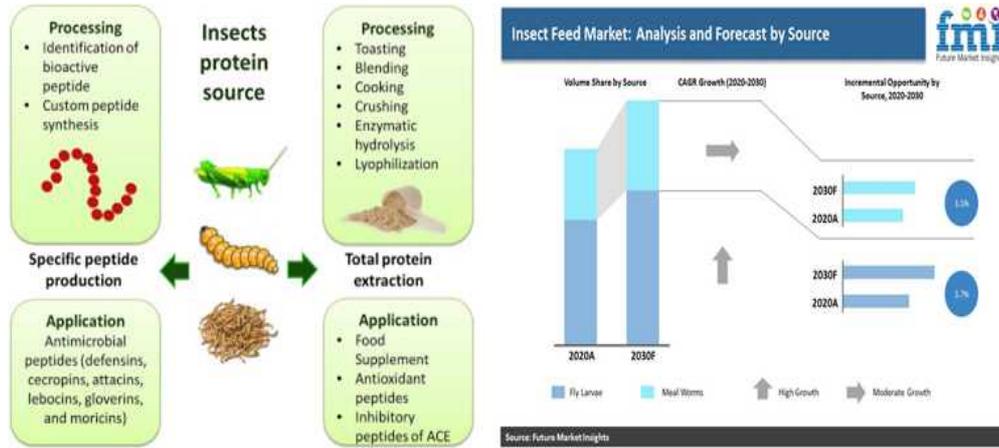


(2) 경제 산업적 측면

- ① 국내 사료의 지속적 발전과 육성을 위해 대체 단백질 시장의 생산 및 가격 불확실성에 대비하여 사료의 중요 원료인 육류, 어분 대체물과 더불어 기능성 미량첨가물(비타민)의 개발 대책 필요
- ② 식용곤충에 해당하는 갈색거저리와 누에는 인·축 적용 항생펩타이드 등 천연항생제 생산을 위한 살아있는 생체공장으로 매우 적합하나 고가의 문제 제시
 - 비경제성 (100원/마리), 짧은 세대(45일), 인공사료 및 인공부화법이 개발되어 있어 연중 집단 대량사육이 가능
 - 누에는 인구 공통병원균이 없어 누에를 이용하여 생산된 천연항생제는 인간, 가축 및 어패류에 안전성이 매우 높음
- ③ 갈색거저리, 누에는 식품의약품안전처로부터 일반식품 및 기능성식품의 원료로 인정받아 안전성이 확보됨
- ④ 갈색거저리, 누에는 각종 유용단백질을 다량 함유하고 있어 사료 첨가제로 사용 시 가축의 성장 촉진 효과를 나타낼 것으로 판단됨
- ⑤ 곤충산업은 21세기 녹색 신성장산업으로 급부상되어 바이오산업과 연결된 곤충산업 육성 필요
 - 세계 곤충산업 시장규모는 2020년 최대 38조원 수준으로 성장할 것으로 전망
 - 국내 곤충산업 시장규모는 2015년 3,000억 원에서 2020년 5,300억 원으로 증가
 - 향후 유용 곤충자원의 활용범위가 식품산업, 생명과학 및 의학 분야 등 다양한 측면으로

확대될 것으로 전망

- ⑥ 최근 누에 생체 내 천연항생제를 대량생산하는 기술을 개발하고, 천연항생제 동태등에 분말을 육계에 적용 시 일반사료에 소량의 첨가(0.05%)로도 높은 사료요구율 개선과 증체 효과가 확인되어 곤충의 고기능성 사료화에 따른 고부가가치 창출 가능성이 주목됨
- ※ 체중 5.2% 증가; 사료요구율 6.2% 개선; 대장균 5.5%, 살모넬라균 15.6% 감소; 총 향산화 활성 1.86% 증가; 코디졸 함량 41.8% 감소



(3) 사회문화적 측면

- ① 친환경, 웰빙(Well-being)에 대한 선호와 함께 소비자들의 소득수준 향상과 건강에 대한 관심이 높아져 반려견의 사료도 브랜드 특화된 고품질 제품 개발이 필요
 - 반려견 문화가 일반화됨에 따라 반려견의 건강, 안전 강화에 따른 사료와 간식에 대한 소비 경향도 변화되고 있음
- ② 반려견 사료업계 간의 신뢰 구축
 - 유럽과 일본은 반려견 사료 업계의 경영 및 기술지도를 병행하고 있으며 소비자의 주문에 따른 맞춤형 사료와 간식을 생산, 공급하고 있음
- ③ 국내 반려견 보호와 국민건강 보호 차원에서 사료의 안전성 문제를 매우 중요하게 다루어져야 함
- ④ 농업과 바이오기술을 융합한 연구로 지속적인 수요가 가능한 신시장 창출이 필요
 - 최근 곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법률에 제정되고 곤충 산업화에 대한 연구가 활발하며 이미 축산, 양계에서는 곤충을 이용한 사료개발과 제품화에 따른 후속연구 필요
- ⑤ 곤충산업 육성을 위한 정부 정책 의지 및 지자체간 경쟁이 심화 됨
 - 정부 차원에서 곤충산업 육성을 위한 제도적 기반 및 5개년 종합계획 수립됨
 - 광역자치단체별 곤충산업 발전계획 수립 및 관련 지원 사업 경쟁적 추진되었음
 - 이미 축산과 수산에서는 곤충을 이용한 사료개발 연구하였으나 영양성분 활용에 그침
- ⑥ 곤충종별 활용용도 및 성장 전망이 밝음
 - 식·약용 곤충은 전통 민간 약재로 광범위하게 활용되어 왔으며, 향후 약리성 및 독성 평가 결과에 따라 기능성 식품 및 약재 원료 분야에서 큰 폭의 성장이 예상
 - 식·약용 곤충의 기능, 효능 등은 유효하나 경제적인 문제 해결 요구

(4) 국내외 산업 동향

- ① 국내외 비타민산업 현황 및 전망
 - 비타민은 단순 건강 보조제에서 필수 건강보조식품으로 비타민 시장은 지속적으로 증가
 - 최근 산업적으로 생산되는 비타민은 식품 및 사료 첨가제뿐만 아니라 화장품, 질병 치료제 및 건강 기능 식품으로 사용
- ② 국내 곤충산업 현황 및 전망
 - 국내는 14,118종의 곤충을 보유하고 있는 것으로 보고됨(2010년)
 - 곤충사육농가는 총 265호이며 장수풍뎅이, 꽃무지, 사슴벌레, 귀뚜라미 등을 생산

③ 국내 곤충산업 시장규모 및 전망

- 국내 곤충산업 시장규모는 약 1,570억 원(2009년), 2015년에는 약 2,980억 원 규모 성장
- 사료용, 의약품 곤충에 관한 연구가 활발하며 정부의 곤충산업 육성정책 발표에 따른 급속한 성장 예상



구분	수용성비타민	지용성비타민
종류	B군, C	A, D, E, K
성질	물에 녹음	기름에 녹음
성분	C, H, O, N, S, Co	C, H, O
결핍	급성	만성
공급	매일섭취	간헐적섭취
과량섭취	배설	축적
중요도	주요비타민	미세영양소

지속적 개발
및 제품화

최근 연구개발

(5) 정부 지원의 필요성

(가) 추진 근거

① 산업기술혁신촉진법 제 11조(산업기술개발사업)

- 산업기술혁신촉진법 제11조에 의거하여 산업통상자원부는 ‘산업기술분야의 미래유망 기술’의 개발을 위한 ‘산업기술개발사업’의 추진 가능

② 산업발전법 2장 7조

- 신산업의 부가가치 및 고용 창출, 신산업의 발전 방향에 대한 내용에 있어 자연정화 곤충인 동애등애와 유산균 자원의 신산업발전방향 추진 필요
- 신산업의 부가가치 및 고용 창출, 신산업의 발전 방향에 대한 내용에 있어 경제적 가치를 높이기 위한 가장 저렴하며 고품양인 동애등애와 유산균 자원을 활용한 반려견 사료 신산업 발전 방향 추진 필요

(나) 사업의 시급성

① 반려견 장내환경 개선 신소재 사료 개발 측면

- 국내 곤충산업과 사료산업은 저장 기술, 가공 시설, 품질관리는 선진국 수준이며 곤충을 이용한 기능의 품질은 고급화 되었으나, 유산균에 의한 자연효소처리와 천연 비타민 생산은 미미함
- 사료 산업에 있어 고단백질의 곤충이 활용되고 있지만 곤충 유래의 푸코스는 반려견의 알러지를 유발할 수 있으므로 이의 저감화된 사료의 필요성이 제기됨. 이에 안전성이 확보된 유산균을 활용한 효소처리로 알러지원을 감소시키고자 함
- 곤충의 사료화에 있어 유산균 발효에 의한 경쟁력 있는 천연비타민 신소재소재, 제품 등의 개발로 국내 역량 강화
- 동애등애를 가공하여 생산자와 소비자의 단순 연결 외의 타 소득 증대에 기여할 뿐만 아니라 부가가치 창출 가능한 소재로의 효율 증가 필요
- 동애등애 지용성 비타민과 생물바이오공정에 의한 비타민 생산으로 새로운 이익 창출 및 환경오염 예방, 방지 가능
- 사료 소재 산업은 다른 산업과의 연관 관계가 커서 고용기회 창출, 포장, 유통 산업의 발전 유도
- 동애등애의 비타민 소재(비타민 A, D, E와 B1) 외 유산균 생산 비타민 소재(비타민 B2, B9)는 보조 사료 경쟁의 요소로 부각 가능하여 배합사료의 영양 기능성 확대 가능

(다) 정부의 중장기 계획과의 연계성

- ① 시장개방 확대와 국내사료 산업의 활성화를 위한 국제경쟁력 강화를 위한 천연 비타민 포함 유산균(파라바이오틱스; 반려견 장내환경 개선) 소재에 대한 개발로 수용 증대 필요
- ② 곤충 단백질의 국내산 이용이 활발하지만 곤충 원료의 또 다른 형태로의 기술개발 특히 프로바이오틱스 또는 산업소재와의 연계성으로 국내 경제 역할 필요
- ③ 정부 차원의 다양한 지원에 의해 기능성 식품 및 소재에 관한 연구개발 진행 중으로 또 다른 트렌드 소재 개발 필요
- ④ 동애등에 원료는 농림식품부는 고부가가치식품기술개발사업, 교육부는 유전자-동의보감 사업, 한국식품연구원은 식품소재의 기능성 탐색, 개인맞춤형 식품연구가 진행되었으며 이를 기반으로 한 새로운 지원 필요
- ⑤ 동애등에를 비롯한 곤충 연구와 산업의 국내 기술은 높은 수준이며 이를 통해 유효 소재 부분의 전문가 활용을 통한 반려견 사료 개발로 기존의 유효성분 외의 중장기 비타민류의 신소재 개발 필요

2-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 국내외 시장 동향

(1) 국내외 시장규모 및 수출입 현황

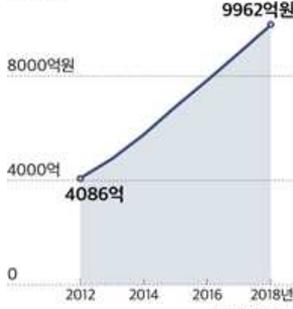
① 국내외 사료시장의 규모 및 성장

- 국내사료산업은 1997년 IMF 구제금융 직전까지 꾸준한 성장세 보이다가 2000년대 초중반 성장정체 현상 두드러짐
- 국내 배합사료 생산량은 국민소득 증가에 힘입어 육류소비 증가로 성장세를 지속하며 경기침체 가축 질병의 원인으로 증감을 되풀이하지만 성장 추세 유지
- 국내의 단체별 생산실적을 보면 사료협회, 농협사료, 기타에서 농협사료의 비중이 상승
- 한국은 세계에서 두 번째 큰 사료원료 수입국이며 생산에 있어서는 세계 12위로 사료 원료의 안정적 확보 필요
- CJ 제일제당은 1996년 인도네시아, 필리핀, 베트남, 중국 등에 사료공장 준공하여 14개의 해외 생산기지 확보
- 선진팜스코, 대한사료, 한일사료, 우성사료 등은 중국, 필리핀, 베트남에 진출
- 국내 반려견 사료는 건사료, 습식사료, 간식이며 9962억원(2018년) 시장규모로 지속적 상승이 예상됨(유로모니터)
- 국내 펫푸드 브랜드는 로얄캐닌(13.5%), ANF(4.3%) 등으로 주로 해외상품임
- 국외 펫푸드 역시 건습식사료와 영양간식류이며 모두 지속적 상승이 예상됨
- 최근 국내외 펫푸드 사료에는 프로바이오틱스 사료도 꾸준히 상승하고 있음

② 국내외 곤충시장의 규모 및 사료시장성장

- 국내 전체 곤충시장 규모는 3,000억 원(2017년), 2020년 이후 7,000억 원 규모 확대
- 한국의 곤충산업 시장규모는 2,616억 원(2020년)으로 2030년에는 6,309억 원 예상
- 국내 식용곤충 흰점박이꽃무지 외 6종은 고가로 사료 활용에 어려움
- 국내 곤충시장은 화분매개용(880억)으로 가장 높고 다음이 사료, 의약용으로 700억 원 임
- 국외에서 곤충사료 시장은 지속적으로 성장하고 있으며 주로 동애등에(BSF)와 갈색거저

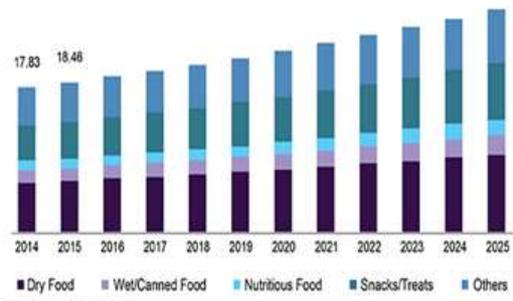
한국 펫푸드 시장 규모
단위: 원



펫푸드 브랜드별 시장점유율



U.S. pet food market size by product, 2014 - 2025 (USD Billion)



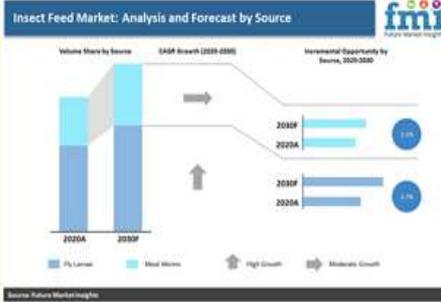
리(mealworm)으로 2030년까지 지속적 성장 예상

- 국외에서 곤충사료는 유럽에서 가금류와 양어 사료로 활용되며 라틴아메리카와 동아시아에서도 같은 양상임

우리나라의 곤충 시장



국내 곤충산업 시장규모



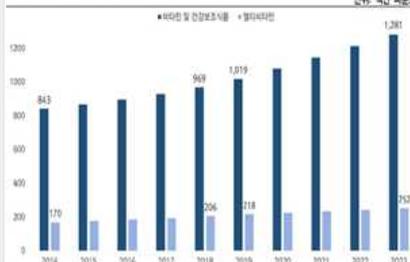
③ 국내외 프로바이오틱시장의 규모 및 비타민 시장의 성장

- 국내 프로바이오틱스 건강기능식품 시장규모는 200억 원대에 이르고, 특히 발효 식품을 대상으로 한 한국형 유산균 제품이 대세를 이루고 있으며, 최근 스트레스, 미세먼지 등의 환경 영향에 따른 알레르기 증상 억제를 위한 프로바이오틱스 시장이 확대되고 있음
- 2018년 기준 개별인정형 건수는 체지방감소가 1위, 뼈 건강이 2위, 혈당, 혈중콜레스테롤 개선 등의 순으로 차지하고 있는데, 이는 소비패턴 및 인식도에 기인되기 때문에 본 연구 사업으로 개발된 '천연 비타민B 소재'는 synbiotics의 의미를 구현하는 제품으로의 시장 진입이 가능할 것으로 판단됨
- 현재 섭취중인 건강기능식품은 비타민(27.4%), 홍삼(19.4%), 유산균·프로바이오틱스 제품(13.8%) 순임
- 국내 수용성 비타민B군은 고함량제품의 경우는 상승하나 저함량의 경우 판매량 하락됨
- 국외 비타민과 멀티비타민 시장은 지속적으로 상승하여 비타민시장은 1,281파운드(호주, 2023년)로 예상됨
- 국외 수용성 비타민B군의 시장은 비타민C시장보다 더 높고 지속적으로 성장하는 추세임

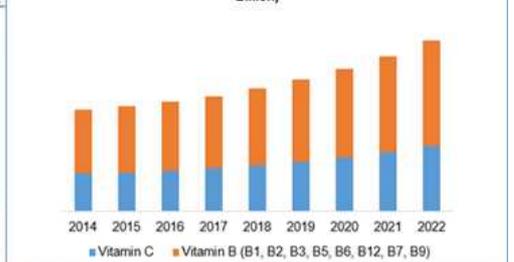
비타민B군 시장 변화



비타민 및 건강보조식품, 멀티비타민 시장규모(14~23)



Global Water Soluble Vitamins Market Revenue By Product Type 2014-2022 (USD Billion)



(2) 국내외 주요 수요처 현황

① 국내 주요 수요처

- 엔토모는 동애등에로 반려동물 간식을 제조 판매(아마존)

- 푸디웬도 동애등에로 반려동물 간식을 제조해 미국, 중국, 벨기에, 인도네시아에 수출함
- 큐어애니케어는 벼메뚜기와 누에번데기를 원료로 구푸(GOOFOO) 반려견 사료를 출시
- 제일사료는 갈색거저리 단백질을 이용한 아토피질환처방식 벨릭서(Velixer, 2019) 출시
- 케일은 갈색거저리 단백질을 이용한 식이 알러지 완화 ‘펫스미스 블랙라벨’ 출시(2018)
- 갈색거저리, 벼메뚜기는 동물성 곤충사료로 인정되었으며, 이 외에도 관련 식용곤충과 동애등에를 사육하는 국내의 농업회사법인의 다수 사료 회사가 있음

② 국외 주요 수요처

- WilderHarrier(캐나다, 2015)는 귀뚜라미, 갈색거저리, 동애등에를 사료로 활용함
- Enterra(캐나다, 2007)는 건조 동애등에의 단백질, 오일 등을 반려견 사료 혼합 사용
- Entocycle(영국, 2014)는 동애등에를 사료화하고 배설물을 비료화 함
- BetaHatch(미국, 2015)는 갈색거저리, 동애등에를 사료로 활용함
- Yora(영국)는 땅벌레(grubs) 40%를 포함한 반려동물 사료 출시
- Protics(네델란드) 곤충사육 기업은 국가지원사업을 통해 양식어사료 공장 설립

(3) 국내외 경쟁기관 및 기술 현황

① 국내 경쟁기관 현황

- 곤충 사료 연구기관 : 곤충 사료 개발 관련한 연구는 국립농업과학원, 국립축산원 등 국가기관을 중심으로 추진되고 있으며, 일부 대학(동국대, 전북대, 전남대, 순천향대 등)에서도 관련 연구가 일부 수행되고 있는 실정임
- 정관장은 반려동물 사료 지니펫 브랜드로 홍삼 성분 활용 면역력 증대한 맞춤형 사료화
- 제일사료는 갈색거저리 단백질을 이용한 아토피 질환처방식 벨릭서(Velixer, 2019) 출시
- 케일은 갈색거저리 단백질을 이용한 식이 알러지 완화 ‘펫스미스 블랙라벨’ 출시(2018)
- 엔토모는 동애등에로 반려동물 간식을 제조 판매(아마존)
- 푸디웬도 동애등에로 반려동물 간식을 제조해 미국, 중국, 벨기에, 인도네시아에 수출함
- 큐어애니케어는 벼메뚜기와 누에번데기를 원료로 구푸(GOOFOO) 반려견 사료를 출시(눈물 및 피부질환 개선 등의 면역력 증강)
- 관상어용 곤충사료는 K-PET, NATURALHAN, 에스웬 등에서 시판 중에 있으며,
- CJ, (주) 그린테코 등은 동애등에를 이용한 가축 사료 개발

② 국외 경쟁기관 현황

- 미국 식용곤충 기업
 - BetaHatch(미국, 2015)는 갈색거저리, 동애등에를 사료로 활용함
 - 차폴은 온오프라인으로 귀뚜라미 에너지바 식품 전문회사(2015년)
 - 엑소도 귀뚜라미 단백질바를 제조하여 클라우드 펀딩 식품 전문회사
 - 식스푸드는 귀뚜라미, 쌀, 콩을 원료로 스낵과, 바비큐, 체다치즈 등을 가미
 - 이외에도 비티 푸드(귀뚜라미 쿠키), 호퍼푸드, 푸드트럭, 어스파이어 등 있음
- 유럽 식용곤충 기업
 - 영국의 요라(YORA)는 땅벌레(grubs) 40%를 포함한 반려동물 사료 출시(알러지개선)
 - 네델란드의 프로바이오틱스 곤충사육 기업은 국가지원사업을 통해 양식어사료 공장 설립
 - 에디블 유니크는 식용곤충 1차 가공 전문 식품 전문회사
 - 버그그립은 식용곤충 스택, 파우더를 제조하여 레스토랑 운영
 - 유럽 엔토모파지는 프랑스 식용곤충 1차 가공 및 조리식품 제조 판매
 - 이외에도 하이프로마인(폴란드), 프로티팜(네델란드) 등 있음
- 태국 식용곤충 기업
 - 타일랜드 유티크는 식용곤충 전문 판매회사로 식용곤충 관련 다수 식품 판매
 - 하이소는 식용곤충 판매와 귀뚜라미, 누에번데기 스낵을 제조, 판매함

- 아시아에서 유일하게 식용곤충을 브랜딩함
- 중국은 다수의 곤충이 식품화되고 판매되고 있음

③ 국내 기술 현황

<곤충활용 사료>

- 동애등에 유충과 갈색거저리의 흰다리새우 사료 첨가물 개발(2020, 제주대학)
- 동애등에의 첨가농도에 따른 이유자돈의 영양소화율과 경제성 연구(2020, 농촌진흥청)
- 동애등에 유충 지방의 육계 성장과 생산성 효과(2020, 건국대학)
- 동애등에 유충과 갈색거저리의 흰다리새우 사료 첨가물 개발(2020, 제주대학)
- 바실러스, 호모, 유산균으로 곤충한방발효 사료 개발(2020, 선바이오)
- 식용곤충을 이용한 양어치어용 사료 개발(2018, 푸디웜)
- 갈색거저리 유충 가수분해물의 반려동물 사료 가치 분석(2017, 한림대학)
- 갈색거저리 유충 성분의 조피볼락 사료원료로의 평가(2017, 강릉원주대학)
- 갈색거저리 유충 육계의 발육특성과 사료 가치 분석(2014, 전남대학)
- 기능성 누에의 곤충 사료 첨가제 개발(2013, 원광대학)
- 동애등에 유충에 미생물 처리하여 양어 사료 적합성 효능(2012, 산청농업기술센터)

<식용곤충 식품화 기술>

- 갈색거저리 분말에 비타민E(토코페롤)첨가는 안전성에 유효(2017, 민경태)
- 갈색거저리 첨가 쌀 팽화스낵의 항산화효과(2017, 조선영)
- 케일은 식용곤충의 단백질추출 후 분말화 기술을 개발

<사료내 비타민>

- 비타민C와 항생제 대체제로 유용균주를 이용한 양어배합 사료 개발(2014, 제주대학)
- 식용폐기물을 이용한 사료첨가용 비타민B2의 생산균주개발, 사료개발(2005, 제일바이오)
- 사료내 비타민E의 거세 한우에 미치는 영향(2006, 경상대학)
- 비타민E의 추가급여에 따른 돼지육질 평가연구(2001, 단국대학)
- 비타민 및 미네랄 혼합물의 참전복 배합사료 연구(1999, 강릉대학)
- 동물사료 첨가용 비타민B2 발효, 생산, 산업화 연구(1992, 한국과학기술연구원)

④ 국외 기술 현황

<곤충활용 사료>

- 동애등에 유충 단백질의 동물건강을 위한 가능성(2020, 벨기에)
- 동애등에와 집파리의 가금류 생산을 위한 사료 적용(2020, 독일)
- 동애등에 유충의 사료로의 영양학적 가치(2020, 네델란드)
- 동애등에의 사료첨가물로의 적합성(2020, 이탈리아)

<식용곤충 식품화 기술>

- 태국과 라오스는 칠리 반죽에 물장균 분말을 넣은 1차 가공기술 연구(2013)
- 식용곤충의 단백질추출기술은 하이프로바인(폴란드), 프로티팜(네델란드), 씨푸푸드(미국)
- 식용곤충의 오일추출기술은 Aqueos 추출(오메가3/6), Soxhlet 추출, Folch 추출 등 있음

2) 지식재산권, 표준화 및 인증기준 현황

(1) 국내 지식재산권 현황

① 곤충활용 사료

- 동애등에 분말을 포함하는 가축 사료용 조성물 및 이의 제조방법(2019)
- 동애등에를 이용한 악취 제거용 사료첨가제 제조법 및 악취 제거용 사료(2019)
- 클로렐라를 포함하는 곤충 사료용 조성물로 사육한 곤충을 포함하는 가축 사료(2018)
- 곤충 기름을 이용한 반려동물 사료 제조방법(2018)

- 감귤박과 감귤피를 함유하는 곤충사료용 조성물을 함유한 가축 사료(2018)
- 복어 먹은 동애등에 애벌레 사료를 이용한 가금류 사육법(2017)
- 농업부산물을 활용한 갈색거저리 전용 사료 조성물(2017)
- 갈색거저리를 이용한 넙치 사료용 조성물 및 이의 제조방법(2016)
- 식용곤충 진액 부산물을 활용한 동물사료(2016)
- 곤충을 이용한 양어용 사료 첨가제(2015)
- 곤충 분말을 포함하는 애완동물용 사료 분말 및 이를 이용한 사료의 제조법(2014)
- 갈색거저리를 함유한 육용계 사료첨가제(2013)

② 비타민 사료

- 하이드록시비타민D 및 항산화제/항염증제 조합물 함유 가금류 사료(2017)
- 바실러스 서브틸러스와 비타민B2를 함유한 양어용 보조사료와 제조방법(2017)
- 광물질과 비타민을 포함하는 반추동물 사료 조성물(2016)
- 사료원료의 비타민A 카로티노이드 분석법(2016, 건국대학)
- 메티오닌 및 비타민E를 포함하는 사료 첨가제 조성물 및 제조방법(2015)
- 비타민 강화 미강을 이용한 사료 첨가제와 이의 제조방법(2014, 현농)
- 아연-비타민C 킬레이트를 포함하는 사료 첨가제 조성물 및 제조법(2012, 휘드베스트)
- 엽산이 혼입된 대두 발효 고분자물질 및 이를 포함하는 조성물(2009)
- 이중 코팅된 비타민C 및 이를 함유하는 사료 첨가제(2006, 누보비엔티)
- 폐기물을 이용한 비타민 사료와 그 제조방법(2006)
- 비타민B1의 유도체를 함유하는 양식어류 사료 첨가용 조성물(2005, 두산)

(2) 국외 지식재산권 현황

① 곤충활용 사료

- Black soldier fly pet attractant and preparation method thereof(2020, 중국)
- Production and processing of insect for transformation into protein meal for fish and animal diets(2017, 미국)
- Production live insect 'mini-larvae and use thereof for feeding aquarium fish, alevins of farm fish and pets(2009, 미국, 중국)

② 비타민 사료

- Multi vitamin additive for green poultry immune feed and preparation method of multi vitamin additive(2020, 중국; 가금 면역을 위한 멀티비타민 첨가제)
- Compound vitamin premix feed preparation and preparation method(2019, 중국; 화합물 비타민 사료 조리)
- Dairy cow vitamin feed and preparation method thereof(2019, 중국; 젖소 비타민사료)
- High protein vitamin fish feed(2017, 중국; 고단백 비타민 피쉬 공급)
- Special vitamin feed additive for egg type breeding chicken and preparation a method for special vitamin feed(2013, 중국; 산란용 증식닭의 특별비타민 사료 첨가제)

(3) 국내외 표준화 현황

① 단미사료의 범위

- 식물성: 곡류, 강피류, 박류(단백질류), 서류, 식품가공부산물류, 조류(거대, 미세조류), 채소류, 과일류, 버섯류 등
- 동물성: 단백질류, 무기물류, 유지류, 곤충류(거저리유충, 건조귀뚜라미, 건조메뚜기, 동애등에 유충, 번데기, 장구벌레, 파리유충, 혼합유충) 등
- 광물성: 식염류, 인산염류, 칼슘염류 등
- 혼합제: 애완용 동물의 간식용, 영양보충용은 소량의 보조사료(보존제와 향미제) 첨가

② 보조사료의 범위

- 품질저하방지용: 결합제(구아검, 알긴산나트륨 등), 유화제(레시틴, 글리세린지방산 등),

보존제(구연산, 젖산, 향산화제 등)

- 효용 증대용: 아미노산제, 비타민제, 효소제, 유익세균, 향미제, 구산염제, 완충제, 착색제, 추출제, 올리고당 등
- 혼합제(영양보충제)

③ 유해사료 범위

- 관리대상 중금속 및 곰팡이독소: 비소, 불소, 크롬, 납, 수은, 카드뮴, 아플라톡신, 셀레늄, 오클라톡신
- 잔류농약: 다이아지논 외 26종

(4) 국내외 사료시험검사 기관

- 관련규정: 농림축산식품고시 제2019-59호(2019.10.24.)
- 사료검사기준 제27조(사료검사기관): 사료관리법 제20조의 2 및 동법 시행규칙 제 22조
- 국내 15기관: 축산연구원(안성, 2000), 사료기술연구소(한국사료협회, 서울; 2000), 사료연구소(한국단미사료협회, 세종; 2002), 동물자원공동연구소(강원대, 춘천; 2006), 사료영양연구소(부경대, 부산; 2007), 동물약품기술연구연구원(한국동물약품협회, 성남; 2013), 농업기술실용화재단(익산; 2014), 농업과학연구소(충남대, 대전; 2005), 제일사료(하림중아연연구소, 대전; 2016), 오에티씨(서울, 2016), 제일분석센터(서울; 2016), 한국펫푸드연구소(천안; 2016), 피켄코리아(대전; 2016), 한국첨단시험연구원(성남; 2018), 동물자원연구센터(건국대, 서울; 2018)

3) 표준화 전략

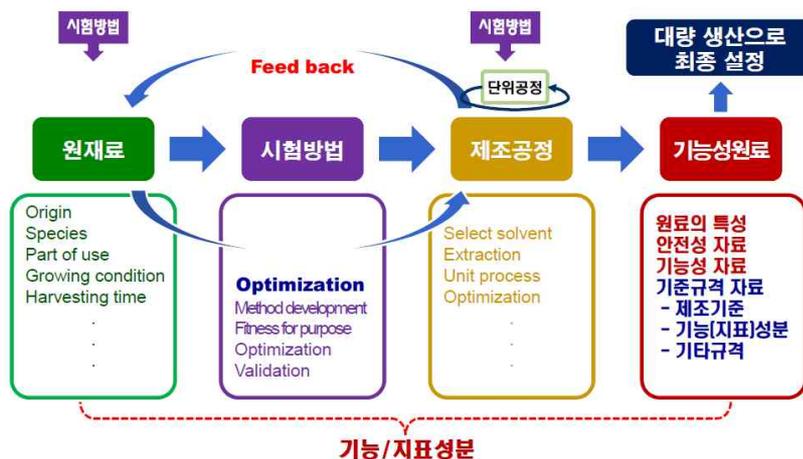
① 공정: 비타민B2/B9 생물강화공정 최적화

- 동애등에분말(PreBiotics), 유산균(ProBiotics; 기확보), 발효공정(C/N, 온도, 시간)
- 수거 및 원료화(전성분분석)
- 리보플라빈(Vit B2, B9) 정량정성 분석 완료(함량완료_한국식품기능연구원/자체분석)
- 반려동물 배합사료로의 제형화 조건 확립(시그널케어)

② 원료: BSF_VitB2/B9 Powder(보조사료 인증_한국단미사료협회)

③ 정량: 기존 동애등에 대비 BSF_VitB2/B9 일반성분 및 비타민 함량

④ 효능: 장내환경개선 분석서(자체분석_한국식품연구원)



나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술 현황 및 수준

- Berenjian 등(2011)은 natto에서 분리한 *Bacillus subtilis* natto 균주를 발효조건 최적화를 통해 5% 효모추출물, 5% glycerine, 18.9% 대두펩톤, 0.06% 제2인산칼륨 배지에서 120시간 배양하여 226 mg/l의 MK-7을 얻었고, 생산성은 시간당 1.8 mg/l, 단위세포 당 specific productivity는 16 mg MK7/g-cell이었음(Aydin et al., 2014)
- Puri 등(2015)은 *Bacillus subtilis* MTCC 2756를 10% 대두분, 0.5% 효모 추출물, 0.05% 제2인산칼륨, 5% glycerine이 함유된 배지에서 상기 균주를 16시간 성장시킨 후, MK-7의 전구체인 1-naphthol과 tween 80을 각각 배지 내에서 농도가 0.2% 및 0.1%가 되도록 첨가한 후 8시간 추가 배양하여 14.4 mg/l의 MK-7을 얻었으며, 생산성은 시간(hr)당 0.6 mg/l이었음
- Tani 등(1986)은 *Flavobacterium meningosepticum* mutant가 배양액 L당 MK 함량이 34 mg이었고, Sato 등(2001)은 natto 분리 균주인 *B. subtilis* MH-1와 diphenylamine 내성 돌연변이 균주인 D200-41을 10% 대두추출물, 5% glycerol, 0.5% yeast extract와 0.05% K₂HPO₄(pH 7.3)배지에 37°C에서 1일 교반 배양 후 45°C, 5일 정지 배양했을 때 최대 MK 함량이 60 mg/L 이었다고 보고함
- Tsukamoto 등(2001)은 비타민 K₂(MK-7)가 골단백인 osteocalcin의 카르복실화에 중요한 역할을 하며, 나토제품이 다른 식품에 비해 높은 MK-7을 함유하고 있고, *B. subtilis* mutant 균주로 생산된 나토제품의 MK-7 함량이 1,719 μ g/100g natto으로서 상업균주로 제조된 natto 제품에 비해 2배 더 높은 함량을 보였다고 보고함
- Hojo 등(2007)은 Propionibacteria가 주요 menaquinone인 tetrahydro-menaquinone-9 (MK-9(4H))을 생산한다고 밝혔으며, propionibacteria로 발효시킨 치즈 중 Norwegian Jarlsberg 치즈와 에멘탈 치즈가 아펜젤라 치즈나 그루웨어 치즈보다 MK-9함량이 200-650 ng/g으로서 매우 높은 함량을 나타내었다고 보고함
- 비타민 K를 생산하는 젖산균에 관한 연구로는 Morishita 등(1999)이 발표하였는데 *Lactococcus lactis* sp. cremoris YIT 2001과 *Leuconostoc lactis* YIT 3001균주가 환원탈지유나 두유배지에 배양되었을 때 menaquinone 함량이 29-123 μ g/L으로 나타나 유제품이나 기타 식품 발효용 스타터로 사용될 수 있음을 시사하였음
- MK-7은 osteoblast 형성을 촉진시키고 osteoclast를 감소시켜, 골형성을 돕고 골흡수는 막아주며, 뿐만 아니라, 체내 칼슘 이용에 특별한 단백질인 osteocalcin 및 matrix Gla protein(MGP)을 활성화 시켜 혈관에 발생하는 칼슘 경화 방지, 뼈 골절 방지 및 골다공증 예방에 사용되고 있음(Koshihara et al., 2008)
- 비타민 K₂는 조골세포를 활성화하고, 뼈의 형성을 촉진하는 역할을 하는데 그 기전은 γ -carboxylase의 cofactor로써 osteocalcin의 glutamine acid residue를 γ -carboxyl glutamic acid를 갖는 γ -carboxylated osteocalcin을 만들고 이는 hydroxyapatite와 결합하여 뼈의 석회

화를 촉진함(Hauschka 등, 1989; Shearer, 1995)

- Szulc 등(1994)은 혈액의 undercarboxylatedosteocalin의 농도가 높은 그룹이 낮은 그룹에 비하여 골밀도가 낮은 것으로 보고하였고, Lambert 등(1986)과 Sadowski 등(1993)의 연구에서는 혈액 내 비타민 K 농도가 연령과 상관성이 있다고 보고한 바 있어 비타민 K가 골밀도에 영향을 미치는 중요한 인자임을 시사하고 있음

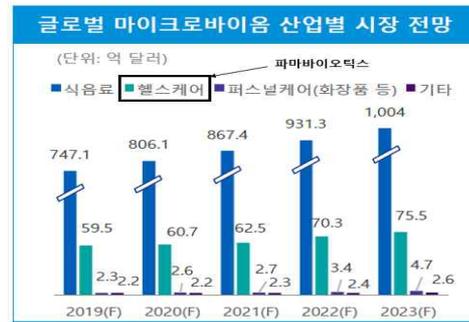
2) 시장현황

- 세계 건강기능식품 시장규모는 '15년 기준 1,179억 달러로 추정되며, 연평균 7.3% 성장하여 2020년에는 1,677억 달러에 이를 것으로 전망하고 있음(농림부 보도자료, 2017)

[세계 건강기능식품 시장 규모]



[글로벌 마이크로바이옴 산업시장]



- 세계시장에서 가장 큰 규모를 보이고 있는 곳은 미국으로 약 404억 달러 규모이며, 중국은 약 163억 달러, 일본은 약 109억 달러 순임

[국가별 건강기능식품 시장규모 및 전망 (단위 : 억 달러 / %)]

구분	2015년	2020년	연평균 성장률	점유율 (2015기준)
미국	404	568	7.1	34.3
서유럽	168	190	2.5	14.2
중국	163	267	10.4	13.8
아시아(중국, 일본 제외)	118	187	9.5	10.0
일본	109	122	2.3	9.2
남미	89	155	11.7	7.5
기타	127	188	8.2	10.8
합계	1,179	1,677	7.3	100.0

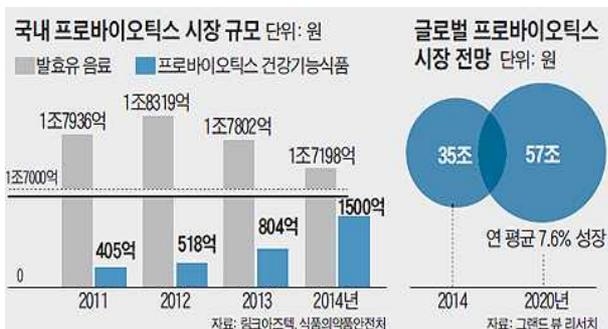
※ 건강기능식품 시장 동향, 연구성과실용화진흥원, 2016.10

(원자료 : NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014)

- 한편 일본은 지난 '15년부터 사업자가 식품의 기능을 입증하면 관련 사업자의 책임 하에 건강 효과를 제품 전면에 표기할 수 있는 '기능성표시 식품제도'를 도입하여 시행하고 있음
 - 우리나라의 건강기능식품과 유사한 종전의 특정보건용도 식품의 경우 임상실험을 통해 정부의 허가를 받기까지 약 5년의 시간과 비용이 소요됨에 따라 신청업체들이 대기업에 국한된다는 지적이 있었음

- 일본 야노경제연구소에 따르면, 기능성표시 식품시장 규모가 '15년 446억 엔에서 '16년에는 1,483억 엔으로 3배 이상 확대될 것으로 전망하고 있음
 - 日 기능성표시 식품제도 시행 2년, 시장규모 급성장(KOTRA 해외시장뉴스, 2017.4)
- 기능성 식음료, 식품보조제, 가축사료에 프로바이오틱스를 이용하기 위한 개발은 Hansen Holdings A/S(덴마크), Danone(프랑스), Nestle S.A.(스위스) 등의 유럽 회사와 일본의 Yakult Honsha Co. Ltd., 미국의 E. I. DuPont de Nemours 등이 있음
- 프로바이오틱스 재료 시장의 규모는 '15년 기준 약 330억불(약 36조원)에 달하며, 2020년까지 매년 7%씩 증가하여 470억불(한화 53조원)에 이를 것으로 예측됨

[국내·외 시장 비교]



[세계 프리바이오틱스 시장]



- BioGaia AB(스웨덴), Lifeway Foods, Inc.(미국), Probi AB(스웨덴), Nebraska Cultures Inc.(미국) Probiotics International Ltd(영국)과 같은 중소 업체들이 독자적인 엔지니어링을 통해 건강에 유익한 미생물 균주 특허를 확보하고 프로바이오틱스 시장에 진출을 시도하고 있음
- 비타민 및 무기질 건강기능식품 시장의 판매규모는 2014년 1,415억 원에서 2017년 2,259억 원으로 연평균 16.9% 성장 함
- 비국내 음료류 시장은 성장세를 지나 성숙기로 웰빙 등의 트렌드를 접목한 신제품이 출시되고 있어 음료류 시장은 2012년 44,337억 원에서 2016년 51,049억 원으로(8.8% 연평균) 증가
- 야채즙 중 농축 채소즙 시장은 2014년 1,267억 원에서 2017년 1,630억 원으로(8.8% 연평균) 증가 됨

[국내 비타민 및 무기질 건강기능식품 시장과 농축 채소즙 규모(단위 : 억원)]

구분	2014	2015	2016	2017	CAGR
비타민 및 무기질 건강기능식품	1,415	2,079	1,843	2,259	16.9%
농축 야채즙	1,267	1,387	1,499	1,630	8.8%
합계	2,682	3,466	3,342	3,889	13.2%

- 건강기능식품의 유통채널은 인터넷몰, 다단계, 방문판매, 대리점, 약국 대형할인점 등이 있으며 대형마트나 백화점 등의 자유판매와 신고의무 완화로 진입가능성 높음

3) 경쟁기관현황

- 낙농이 발달한 유럽에서는 이미 1982년부터 <Biotech G Program>에 의해 유산균 유전자에 대한 체계적인 연구가 진행 되어왔고, 지금은 60여 개의 연구단체가 참여한 STARLAB (Strategic & Applied Research in Lactic Acid Bacteria) 프로젝트를 통해 균주의 개량, 대사회로의 규명과 수식, 유용물질의 생산개발을 추진하고 있음(임번삼, 프로바이오틱스의 기술 및 시장 동향. KISTI 기술동향보고서, 2003)
- 이 밖에도 Nordic Program과 유럽연합행사(EU Fair CT96 Probdemo)를 통해 프로바이오틱 유산균에 대한 기준을 마련한바 있고, 현재 서유럽에서는 프로바이오틱과 항산화제가 기능성 식품 시장을 주도하고 있으며, 이에 부응한 제품들이 개발됨
- 이들에게 관심이 많은 건강요인은 면역증강, 변비에방, 콜레스테롤 저하, 암 예방, 튼튼한 뼈, 에너지 충전, 소화기 건강 등으로 프로바이오틱의 효능과 관련된 것이 많음
- 미국에서는 청장년을 대상으로 부상하고 있는 맞춤형식품은 식이섬유, 기능성 물질(비타민, 무기질, 호르몬), 저열량 감미료 및 면역강화나 병원성 억제용 유산균 음료가 주류를 이루고 있음
- Danone, Nestle, Child-Hansen 등은 특정 균주와 개인건강을 연계한 제품을 출시하였고, Syonny Field Farm은 6종의 프로바이오틱을 혼합한 "Nutrica"를 발매하여, 소화증진, 유당 불내증 완화, 칼슘흡수능 개선, 면역 향상, 암 예방 등을 모두 해결하려고 시도하여 인기를 얻고 있음
- 일본에서 건강기능식품 시장은 소화기계 제품이 주도하고 있고, Snow Brand, Yakult, Meiji Dairy Product 등의 유가공업체가 중심이 되어 요구르트 등의 다양한 유산균 음료를 개발 출시 하였음
- 전문 발효기업인 Kyowa Hakko는 유산균의 종균을 공급하는 스타터 비즈니스를 주도하고 있으며, Ajinomoto는 유산균 음료인 칼피스를 녹차와 혼합한 제품을 개발하여 크게 히트함

4) 지식재산권현황

- 공빠니 자베 다노느 등(2009)은 '유산균에 의한 비타민 K2의 생산 촉진을 위한 배양 방법 및 식품제조에서의 이의 적용(10-2009-0094235)'에 관한 기술을, 그노시스 등(이탈리아, 2014)은 '비타민 K2의 제조방법'에 관한 기술을 보유하고 있음
- Tani 등(1989)은 Flavobacterium에 의해 MK-4, MK-5 및 MK-6의 효과적인 생산이 보고되고 있고, 생산된 MK-4의 최대 농도는 192mg/l이었다(Tani, Y. et al. 1989). Morishita 등(1999)에 따르면, 긴 이소프렌 곁가지(side chain)를 갖는 MKs의 산업 생산은 최근까지 보고되지 않았다.
- 젓산 박테리아로부터 MK-7 29~123 μ g/L이 생산되었고, Bacillus subtilis로부터 생산된 발효된 콩식품인 "나또"는 일본에서 인기가 있는 것으로, MK(600~900 μ g/100g)을 다량 함유하고 있다(Sakano, T. 등1988).
- 나또를 제조하는 데 사용되는 *Bacillus subtilis*는 식용이 가능하며, 그것은 식품 산업에서 MK의 가장 유리한 원료들 중 하나이다. Yoshinori Tsukamoto 등(2001)에 따르면, 건조 중량을 기준으로 1,719 μ g/100g의 생산량을 갖는 Bacillus subtilis "나또"의 유사체 저항성 변이주(analogous resistant mutant)를 발견하였고, 다음과 같은 목록의 몇몇 특허 또는 특허 출원에 따르면, 비타민 K2(MK-7)는 건조 중량을 기준으로 약 1.0 μ g/g 또는 그 이하로 생산된다(US 2004/043015; US 2005/0025759; US 2002/0146786; US 2001/0046697).

제 3 절 연구개발의 범위

3-1. 최종 개발목표 및 내용

(1) 최종목표

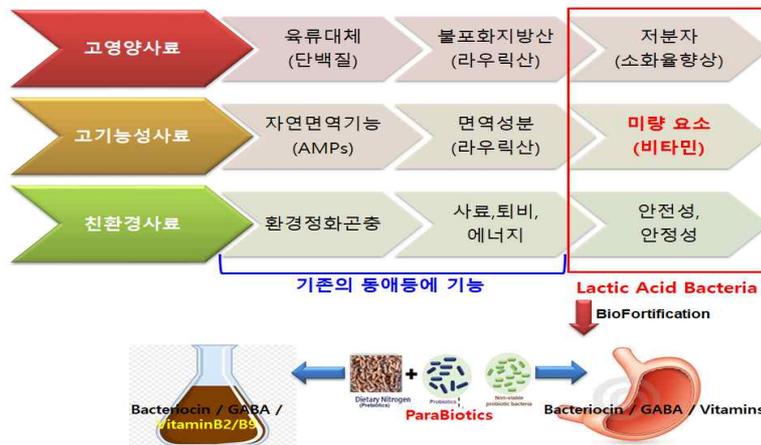
생물강화기술(BioFortification) 기반의 천연 비타민B2/B9 증강 사료 첨가물 개발을 위한

- ① 동애등에(Black Soldier Fly; BSF) 배지에서 유산균 공정을 통한 비타민B2/B9 생산 (LAB; GRAS's PostBiotics¹⁾) 공정 고도화
- ② 장내 염증 완화 기능을 세포/전임상 입증
- ③ 동애등에의 지용성비타민(Vit A, D, E)에 수용성 비타민B2/B9이 강화된 반려견 사료 첨가물 (BSF_ParaBiotics²⁾) 제품 생산 시스템 구축

축하고자 함

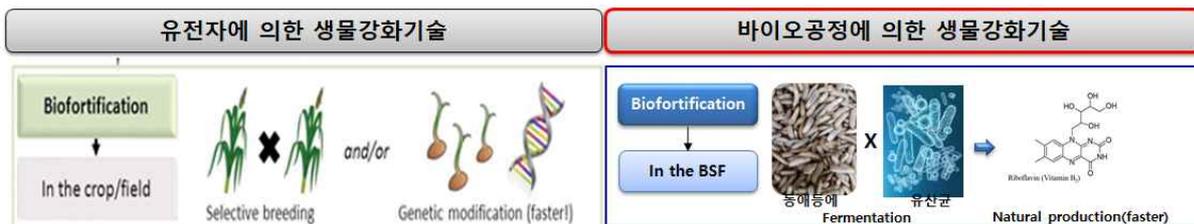
(2) 기술개발 개념도

- 비타민B2/B9 증강된 반려견 사료첨가제 개발을 통한 동애등에의 사료로서 경제성 강화



(3) 연구개발의 핵심기술

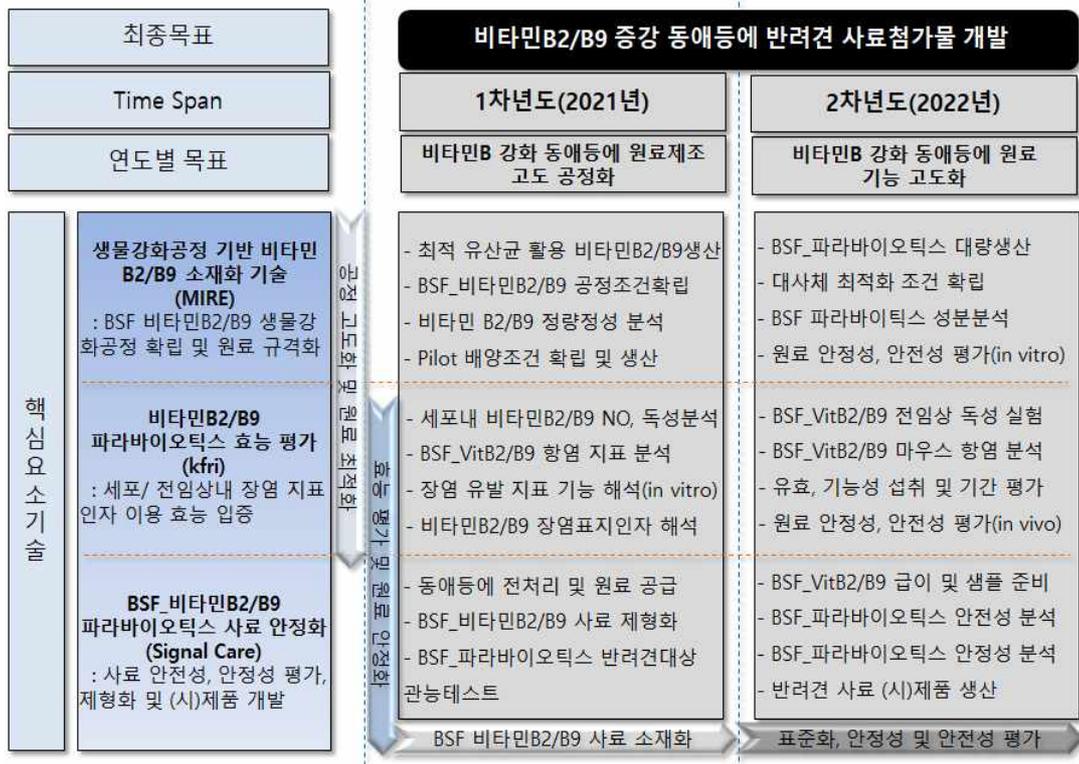
- ① 유산균발효를 통한 천연 비타민B2/B9 생산기술(생물강화기술; BioFortification)
 - 연구진이 보유한 유산균주(*Lactobacillus sp*, *Leuconostoc sp*, *Lactococcus sp*)의 최적 배양 조건을 확립하여 천연 비타민B2(riboflavin)과 비타민B9(folate)를 생산함
 - 리보플라빈 생성에 관여하는 전환효소(Rib A~H)의 유전체(TF) 기반으로 반응을 촉진하는 효소단백질 활용하여 대사체 반응 유도 및 촉진
- ② 유산균발효에 의한 가수분해 촉진 기술(Biohydrolysis: Proteolysis, Lipolysis)
 - 동애등에의 단백질(46%), 지방(32%), 탄수화물(2%)을 유산균발효에 의해 가수분해하여 사료계수 상승효과
 - 사료(양계, 반려견 등)로 인증된 동애등에와 GRAS균주인 유산균과의 콜라보에 의한 천연 비타민(활성형) 생산으로 안전성, 기능 및 경제적 가치 증대



1)포스트바이오틱스(postbiotics): 프로바이오틱스(유산균)이 발효 후 생산한 2차 대사산물로 기능성 물질
 2)파라바이오틱스(parabiotics): 프로바이오틱스와 사균/불활성화 된 세포잔여물과 그 대사체(postbiotics)의 활용

3-2. 연구개발과제의 내용

(1) 연차별 연구목표 및 연구내용 모식도



(2) 참여기관 연구목표 및 연구내용

가. 1차년도(2021년)

① 연구개발 목표

- 주관연구기관(환동해산업연구원): 동애등에 활용 비타민B2/B9 증강 생물강화 기술 확립
- 공동연구기관1(한국식품연구원): 비타민B2/B9의 in vitro 실험을 통한 장내 염증완화 효능 규명
- 공동연구기관2(시그널케어): 동애등에_파라바이오틱스(BSF_ParaBiotics) 제형 및 테스트

② 연구개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(환동해산업연구원):
 - 기선발된 비타민B2/B9 생산 유산균 활용 동애등에 DoE 작성(N/C, Temp, pH, O₂)
 - BSF_비타민B2/B9 정량정성 분석법 확립 및 확인(TLC, HPLC, ELISA kit 등)
 - BSF_비타민B2/B9 원료 습식 및/또는 건조법 확립
 - 대량배양 조건 확립 후 성분 및 비타민B2/B9 분석(열량, 일반성분, 기타 비타민 등)
- 공동연구기관(한국식품연구원)
 - 질환세포주 모델 확립
 - 세포독성 유무 확인
 - 세포내 염증 마커측정: 사이토카인(IL-6, TNF-a 등) 등 발현억제효과 분석
 - 표준품(또는 경쟁품)과의 항염 효능 비교
 - 효능 스크리닝을 통한 후보 소재 도출
- 공동연구기관(시그널케어): 동애등에_파라바이오틱스(BSF_ParaBiotics) 제형 및 테스트

- 동애등에 분말화 및 전처리 후 공급체계 마련
- BSF_ParaBiotics 내 반려견 사료 레시피 및 제형화 테스트
- 제형된 사료의 안전성 및 안정성 평가(사료검증센터_공인성적서)
- 반려견 사료 레시피에 따른 관능 테스트

가. 2차년도(2022년)

① 연구개발 목표

- 주관연구기관(환동해산업연구원): BSF_ParaBiotics 비타민B2/B9 공정 및 성분 최적화
- 공동연구기관1(한국식품연구원): 동물모델에서 BSF_비타민B2/B9의 장내 염증완화 효능 평가 및 입증
- 공동연구기관2(시그널케어): BSF_ParaBiotics 안전성, 안정성 평가 및 (시)제품 제작

② 연구개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(환동해산업연구원):
 - BSF_비타민B2/B9 대량생산 최적화 및 함량 확인
 - 생물강화기술에 의한 BSF_비타민 B2/B9 성분의 표준서 작성
 - BSF 배양발효물의 성분분석(조단백, 조지방, 열량, 무기염류 등)
 - BSF_ParaBiotics 안정성 및 안전성 분석(MTT 및 온도)
 - BSF_ParaBiotics의 식중독균 완화기능 평가
- 공동연구기관(한국식품연구원)
 - 염증성 장 질환 동물 모델 확립
 - 염증 정도 측정: 몸무게, 대장 길이 및 무게, 조직학적 분석 등 염증위험지수 및 염증완화 분석
 - 도출 소재의 내부 간이독성 평가
 - 조직 내 염증성 사이토카인 분석
 - 혈액 생화학적 마커 및 장 내 균집 변화 분석
 - 도출된 소재 급이에 의한 장내환경 개선 효능분석
- 공동연구기관(시그널케어): BSF_ParaBiotics 안전성, 안정성 및 (시)제품 개발
 - BSF_ParaBiotics 사료의 유효기간 설정 실험(공인인증기관 분석)
 - 반려견 BSF_ParaBiotics 사료 레시피 및 제형화 테스트
 - 제형된 사료의 안전성 및 안정성 평가(사료검증센터_독성, 미생물, 위해물질 등)
 - 반려견 사료 레시피에 따른 제품 개발 및 사업화

3-3. 연구개발 성과 및 평가방법

- 기술개발 목표

- 1) 비타민B2/B9 사료(첨가물) 1종 개발
- 2) 특허출원 2건

○ 연구개발과제 단계별(또는 연차별) 주요 결과물

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자유치	논문	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
SCI	비SCI	논문 평균 IF	학술 발표	명	명	명	명	명	명	명	건	건	건	명	명	명			
단위	건	건	건	평균 10건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	명	명	명	명
가중치	20		10		10	10	20			10				10					10
최종목표																			
2021년도			2																
2022년도	1		1		1	10	1			1		1	1	1	3				1
소 계	1	0	3		1	10	1			1		1	1	1	3				1
종료 1차년도		1					1	100		1									1
종료 2차년도								200		1									1
종료 3차년도								500		1									1
소 계		1					1	800		3									3
합 계	1	1	3		1	10	2	800		4		1	1	1	3				4

* 단계별 연구성과 목표는 향후 중간/최종/추적평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

제 2 장 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

제 1 절 연구개발의 추진 계획

1. 연구개발 추진 전략

1) 동애등으로부터 생물강화기술(유산균)을 이용한 비타민B2/B9 증강 반려견 사료 개발

- 환동해산업연구원(지역특화연구원)
 - * 최적배양조건확립: 주관기관으로부터 제공받은 원료로 공배양조건 설정과 지표물질에 대한 함량분석을 실시함
 - * 유산균 발효 및 효소반응촉진 기술을 개발함
 - * 개발된 기술은 파일럿 수준 및 대량생산공정을 확립할 수 있도록 체계화 함
- 한국식품연구원(출연연구원)
 - * 소규모, 파일럿 및 대량생산공정으로 얻어진 소재의 세포수준 효능평가 결과물은 주관기관 및 경북바이오와 공유하여 전임상 단계 진입 시 선택과 집중할 수 있도록 함
- 농업회사법인(주)시그널케어(공동2)_사료 제조·판매, 곤충사육
 - * 원료확보 및 공급: 곤충사료제조 회사인 시그널케어는 곤충사육이 가능한 농업회사법인(주)한마을 기업을 운영하고 있어 곤충 원료 공급에 유리하며 주관기관인 환동해산업연구원 (MIRE)에 지속적 공급이 가능함
 - * 사료 제형화 및 제품화: 시그널케어는 갈색거저리, 흰점박이꽃무지 등의 식용곤충을 이용한 사료제조시설(HACCP인증)을 보유하고 현재 반려견, 반려묘의 사료제조 판매를 하고 있어, 환동해산업연구원과 한국식품연구원에서 생산, 기능 입증된 BSF_파라바이오틱스 소재를 대상으로 제품화 및 사업화 진입 가능
 - * 연구개발: 서라벌대학, (주)애니온과 경주 '동경이' 맞춤형 사료개발 사업화 예정
 - * 연구개발: 포항테크노파크 바이오팀과 노령견 골다공증 및 뼈건강을 위한 맞춤형 사료 개발 사전연구 진행 중
 - * 국내외시장 개척: 미국애견협회(American Kennel Club; AKC)와 월마트(Walmart; 8,000 개 지점 보유), 캐나다 미국 유통업체인 SIZ INT를 통해 사료 수출 협의 중
 - * 국내외시장 개척: 중국_북영야쿠르트 지역지사와의 판매계약 완료
 - * BSF_Parabiotics 사료 개발 후 확장된 국내외(미국, 캐나다, 중국) 판로 개척 예정임

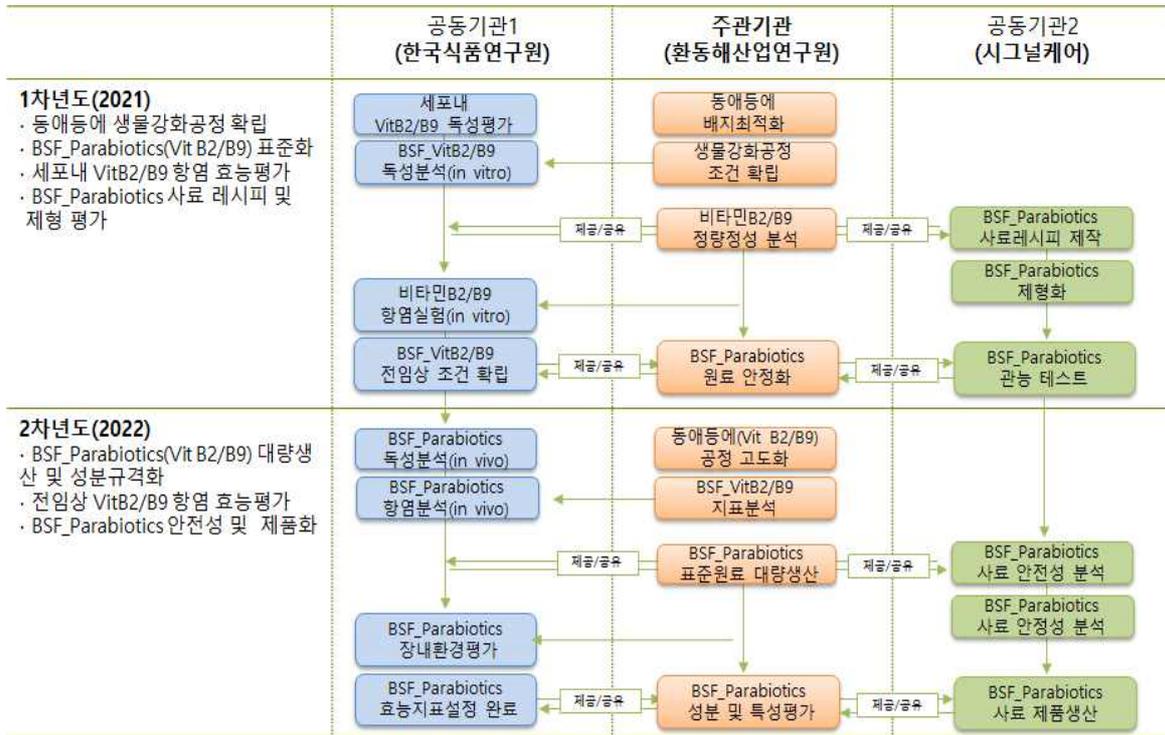
(2) 원료공급, 소재생산, 표준화 관련 된 국내외 전문가 활용 및 기술정보 수집

- ① 소재의 생산·가공·제조·유통과 관련된 산·학·연 전문가 확보 및 기술정보 수집
 - 사업운영진을 중심으로 정기적인 워크샵 및 세미나를 통해 결과공유, 추진전략 보강, 기술 개발 및 사업화에 관한 자문 등으로 사업목표를 달성할 수 있도록 추진함
- ② 국내외 곤충 및 사료 연구 전문가 활용
 - 국내 농촌진흥청(누에, 동애등에 사료화; 박관호 박사), 국립수산물과학원(동애등에 사료; 이봉주 박사), 동국대(동애등에 사료 및 에너지전환; 구태원 교수), 세종대(식용곤충 식품 및 사료; 윤은영 교수)와의 유기적 업무협의를 통한 연구개발의 오류 최소화

- 국외 큐슈대학 곤충산업화센터(쿠사카베 교수, 이재만 교수) 및 곤충단백질 생산 기업인 카이코社(큐슈소재, 와타나베 대표)와의 교류를 통한 국제협력 및/또는 자문
- 국내 시험검사기관 한국기능식품연구원(가미현 박사), 한국식품연구원(신재욱 박사)와의 교류를 통한 협력 및 자문을 통한 시험법의 유효성 검증

2. 연구개발 추진 세부 흐름도

(1) 연구개발 협력 체계도

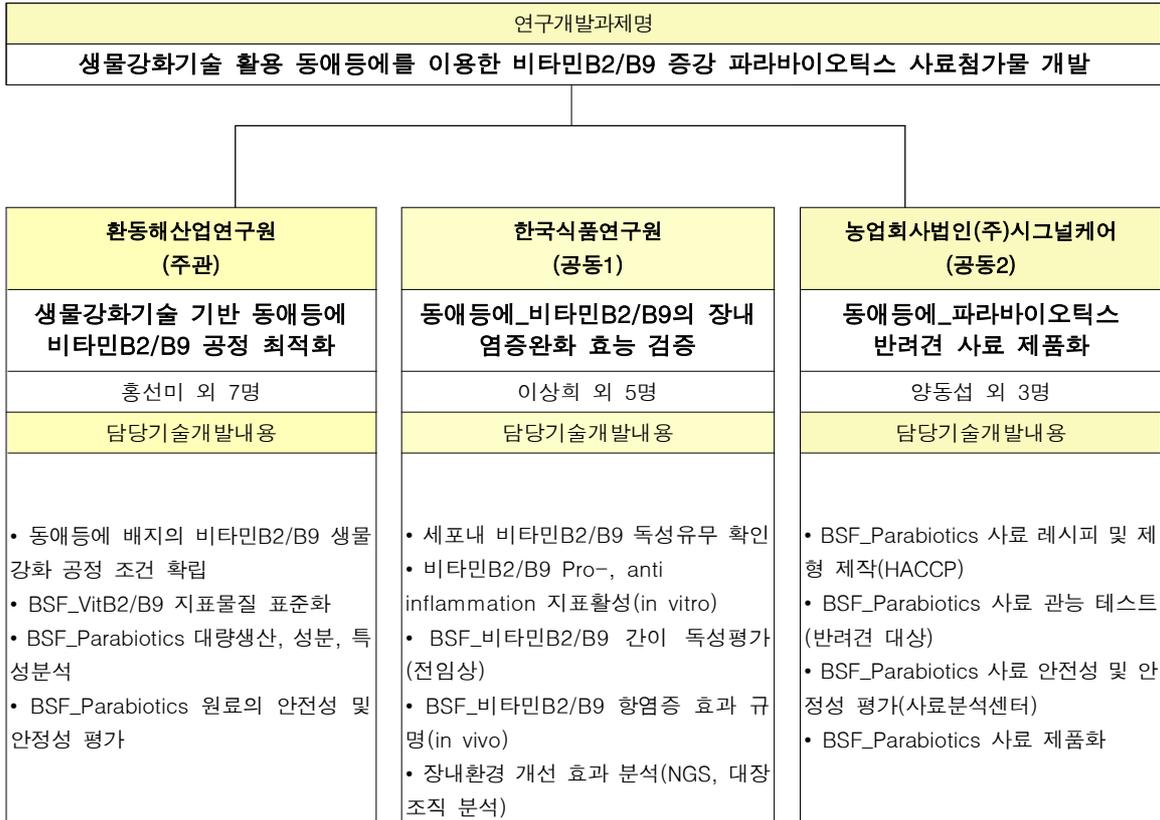


(2) 테스트베드 구축방안

- ① 시그널케어(공동연구기관, 참여기업)가 갖추고 있는 곤충사육, 사료제조, 생산, 제품개발 등 설비를 이용하여 사료를 생산하기 위한 테스트 베드를 구축하고 및 시범서비스 추진함
- ② 개발사료 및 이를 응용한 제품은 국내외 사료기업(미국, 중국 등)에 기술홍보를 추진함
- ③ 시그널케어는 경주시 ‘동경이’ 사료개발 프로젝트를 수행하는 기관으로 곤충사료 제조, 제품 개발 등으로 확장하여 곤충을 주성분으로 반려견 사료화 기술 수립

3. 연구개발 추진 체계

1) 연구개발 추진 체계



2) 선행연구와의 차별화 방안

- **원료 및 소재:** 기존 특허는 갈색거저리, 동애등에 추출발효물의 항균 기능성 사료 조성물이나, 본 제안은 유산균이 생산한 수용성 비타민B2/B9과 복합체의 기능성분을 반려견의 장내환경 개선과 장염 예방 효과를 입증하고자 함
- **핵심기술:** 기존 특허는 항균기능의 유산균을 활용하였지만, 본 연구에서는 비타민B2/B9 합성 효소(RibA-G)를 가진 유산균을 활용하여 효소의 반응 촉진을 통한 비타민B(VitB2, B9) 생물 강화기술 적용
- **차별성1:** 동애등에 건조 또는 추출물 배지를 유산균 생물전환기술의 개발 방향으로 연구를 추진하여 유산균발효 및 효소반응 촉진 기술을 통한 비타민B 강화 소재의 개발
- **차별성2:** 비타민B의 반려견 장염 예방 소재로의 연구결과는 미진하여 비타민B2/B9외의 기능 입증을 통한 곤충사료의 업그레이드
- **차별성3:** 동애등에에서 유산균에 의해 생산된 **비타민B2/B9 정량, 정성, 구조의 신규성**

3) 추진 일정

1차년도(2021년)																
일련 번호	연구수행내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	BSF_VitB2/B9 생물강화기술 구축				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	60,000	홍선미 (MIRE)
2	지표물질 설정 및 성분 분석									■	■	■	■	■	40,000	홍선미 (MIRE)
3	세포수준 효능평가법 확립				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	이상희 (kfri)
4	BSF_VitB2/B9 in vitro 효능평가							■	■	■	■	■	■	■	60,000	이상희 (kfri)
6	BSF 전처리 및 사료 레시피				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	50,000	양동섭 (SignalCar e)
7	BSF_Parabiotics 제형화 및 안정화									■	■	■	■	■	40,000	양동섭 (SignalCar e)
2차년도(2022년)																
1	표준발효공정 확립 및 지표 표준화 확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	60,000	홍선미 (MIRE)
2	원료의 안정화 분석			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	홍선미 (MIRE)
3	BSF_VitB2/B9 in vivo 효능 평가	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	80,000	이상희 (kfri)
4	BSF_VitB2/B9 장내환경분석 (in vivo)						■	■	■	■	■	■	■	■	20,000	이상희 (kfri)
5	BSF_Parabiotics 시제품 및 제품화	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	60,000	양동섭 (SignalCar e)
6	사료 안전성 및 안정성 분석					■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	양동섭 (SignalCar e)

제 2 절 연구개발의 수행과정 및 수행내용

1. 생물강화공정 기반 비타민 B2/B9 소재화 기술(주관_환동해산업연구원)

<실험방법 및 과정>

(1) 실험재료 수급과 유산균주 분리

본 연구에서 사용한 동애등에 유충분말은 CIEF(전라북도 김제시)에서 마이크로웨이브 건조 후 분말화 된것을 2021년 구입하였으며, 원료는 20℃에 냉동 보관하여 필요시에 사용하였다. 또한 유산균은 동해(울진, 영덕 수심 10m; 2019년) 해수를 0.1%(v/v) bromocresol purple (BCP)가 첨가된 DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) agar 배지에 도말하여 37℃에서 1일간 배양하였다. 이후 BCP와의 반응에 의해 형성된 노란색 콜로니의 선별을 반복하여 단일 종을 분리하고 16s rRNA 유전자 프라이머(27F와 1492R)로 증폭 후, Genebank 데이터베이스에서 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 확인하여 균주별 بانک화하였다. 분리된 유산 균주는 MRS 액체 배지에서 배양하여 50%(v/v) 글리세롤을 혼합하여 최종 글리세롤 농도가 25%가 되도록 한 후, -70℃에서 보관하였다.

(2) 비타민B2와 B9 생산 유산균의 확인

해수에서 분리된 유산균 배양을 대상으로 생물학정보 시스템은 NCBI의 data base 기반으로 리보플라빈(riboflavin, vitaminB2; rib gene) 합성에 관여하는 유전자로 ribA, ribB, ribC, ribD, ribF, ribH, ribT, ribU에 대해 *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 4종 각각의 프라이머를 제작하여 사용하였다(Table 1). 또한 엽산(folate; vitaminB9; fol gene) 합성에 관여하는 유전자로 dfrA, folB, folC, folD, folE, folK, folP, folQ 유전자를 *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 4종 각각의 프라이머를 제작하여 RT-PCR과 gDNA의 유전자 분석에 의해 확인하였다(Table 2). 각 종별 10종을 선발하여 MRS배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양 후, 10,000 rpm에서 10분간 분리하고 total RNA를 Trizol(TheermoFisher, USA)로 분리하였다. PrimeScript 1st strand c DNA synthesis kit(TAKARA, Japan)으로 합성하여 주형으로 사용하였다. 이후 각 rib 와 fol 유전자의 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler(Japan)으로 상기 균주의 rib 및 fol 유전자 증폭하였다.

또, 게놈 상에 존재하는 유전자 확인을 위하여 mini genomic DNA extraction kit(Promega)를 이용하여 각 균주의 유전체 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 상기 분리된 유전체 DNA를 주형으로, 각 유산균의 각 게놈 내에서 확인된 rib, fol 유전자의 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler(Japan)으로 상기 균주의 Me 유전자 부위를 증폭하여 1% 아가로스 겔을 이용하여 확인하였다. 확인된 유산균 중에서 우수균주 4종을 선발하여 한국미생물센터에 기탁하고 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P), 본 실험에 이용하였다.

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) primer sequence of riboflavin biosynthesis genes

Strain	Gene	Sequence	size(bp)	Referenece
<i>L. lactis</i>	ribA	F: ATGTTCCAATATAATAAAGTA R: TCAAACAAATGTCCCATTTT	1,197	CP001834
	ribB	F: ATGTTTACAGGAATAATTGAA R: AAAAATCCGTTGTAAATAG	651	
	ribD(G)	F: ATGAAAAAAGACGAATACTAC R: AGAAGCTCACTTTCTAATAA	1.089	
	ribF	F: ATGGAAATATTAGAATTTAAC R: GCTTTGAAATCACGAGCAATT	903	
	ribH	F: ATGAAAATTATTGAAGGAAAT R: CCAATCTTTCTCATTAATC	465	
<i>L. plantarum</i>	ribA	F: ATGGATACAATGAAAAAGGTA R: TCGTGTCCCTCCGTTAGTGTG	1,215	AP018405
	ribB	F: ATGTTTTCTGGAATTATTCAA R: TGA CTCCCCTCTAATGCTAAT	603	
	ribD(G)	F: ATGTAACTGATTTTATGCAA R: TTA ACTTCCTTT CGAACGGCC	1,068	
	ribF	F: ATGCAGGTGATTAATTTAAAG R: TGTGCCTCCAAACGATTTGAT	1,002	
	ribH	F: ATGACA ACTTTTAACGGCAA R: TCAGCTTTTAATATTGCCCG	474	
	ribC	F: ATGCAAGTAATCAATTTAGAT R: CGATAATTAGCGCTAACTAAC	684	
	ribT	F: GTGCTCGTTAAATATCGGAAG R: TGGTGATTGGTTGTTGTTGGT	384	
<i>L. mesenteroides</i>	ribA	F: ATGACAAGTACTACAGAAAAA R: AGCTTGTGATTAAATTTTCC	1.194	CP021491
	ribB	F: ATGTTTACAGGTATTACACAA R: TTTCTTTTCATTAATATTTT	591	CP065995
	ribD(G)	F: ATGAATGATTTAACATGGATG R: TGC GTTCCCCCTTGATGATTG	1.035	"
	ribF	F: ATGACTATGACAGAATTAATT R: AATTTTGTATTAATAATGC	951	"
	ribH	F: ATGATTTATAAAGCTAAGTTA R: ATGGATTTTATTTGCTCAAAG	471	CP035139
	ribT	F: ATGTTGACACAATCAAGACAA R: ACCGTTTTTCGCGATGTTGCT	375	CP065995
	ribU	F: ATGCAATTGTTCTGTAAACG R: GAATGAAACCTTCTCTGGAGC	591	CP020731
<i>L. brevis</i>	ribA	F: ATGACTAGTCGAGTTGAGGAT R: TCATTATCTGTCACCTCATTT	1,200	CP019743
	ribB	F: ATGTTACAGGAATAATTACA R: TCATCAGTCATCCCCCTAAC	606	
	ribD(G)	F: ATGCAACAAGCCGTCATAGCG R: TCCTGTGAACATTTACGTTGC	1.054	
	ribF	F: ATGGACGTTATTCGTATACAC R: TGC GTTAACCGCTGAAAATAC	948	
	ribH	F: ATGACTGAGATTTTAGGCTTA R: CGTAGCTCCGATAACTGTTGC	474	

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) primer sequence of folate biosynthesis genes

Strain	Gene	Sequence	size(bp)	Referenece
<i>L. lactis</i>	dfrA	F: ATGACTGTAAAACCTTTTTATT R: ATAATGTATTTTACAAATTGT	492	LT599049
	folB	F: ATGTACAAAATAAACTTAAT R: CCTCTCATCTCAATTTTCAGCT	351	"
	folC	F: ATGTCTATAGAAGAAGCATTG R: TTCTCTTTTTTCAAAAACCTCA	1,284	"
	folD	F: ATGAATGTTAGCTTATGGTAT R: TTATTTTCATTCATTTTTCTA	885	"
	folE	F: ATGCAAACAACCTACTTAAGC R: AAAAGACTTTCTAAAAATTCC	1,050	"
	folP	F: ATGAAAATCTTAGAACCTAAT R: AATTCCTTATAAATTTCAATT	1,074	"
	folQ	F: ATGAATGAAGACCTAATTGCT R: CTTTTGTATTGATAATTTTT	498	"
<i>L. plantarum</i>	dfrA	F: ATGATTGCATTGATATGGGCA R: CGACGGCGGAAATCATCAAAT	492	AL935263
	folB	F: ATGGGCATGATTCTGAATTAAT R: TTGCCATTCGGCGTCCCCTCC	369	AP018405
	folC	F: ATGATTGACACTTATTCAGCA R: TCAGTTTCTGAGTCGCTGCCA	1,335	"
	folD	F: GTGACGAAGATTATTGATGGT R: TCACTTACATCACTCCACTTT	861	"
	folE	F: ATGATTGATGAGAAGAACCAA R: TTTGCGATTGCTGTAAGAAT	570	"
	folK	F: ATGGCAAGTAGGGAAGAACGG R: TCATCTAACTCACTCACATTT	513	"
	folP	F: ATGTTAGTACAAGATATCACC R: TCATTATTCGATAACCAATAG	1,149	"
	folQ	F: ATGACGACGACTTGGTTGATT R: AGTTTTGTGATTAATTTAAG	588	ER039783
<i>L. mesenteroides</i>	dfrA	F: ATGACCAAAATTAATGGTA R: ATGCGTTCGTAGCGTTCGACA	492	CP028255
	folC	F: ATGGATAAAAGCGAGTAAAA R: ATACGTCCCTCCCTATGAATC	1,314	"
	folD	F: ATGACAGAGATTTTAGATGGT R: TGATGTTGTTCTGCTAGTGTT	846	"
	folE	F: GTGATTGCACAAGAGTTAATT R: ATATATTTGTATGGATCTGTA	786	"
	folQ	F: ATGAAAAAATAGTAATCGCA R: TTATGAACCAAACCTTGACAAT	618	GLE85150
<i>L. brevis</i>	ribA	F: ATGCTAATCTTTTTATGGGCA R: TGCCGCTGATATTGTTCAAAA	492	CP015338
	ribB	F: TTGGCTATTGATCGCGAAAAG R: TGGACAATTGGAGGAGCTGGC	444	"
	folD	F: TTGTCAGGGAGAATGTGTGAT R: TTGTTGCCACGTTGCTCACTC	972	AP012167
	folE	F: ATGTTTGAAAGTAATCATGCC R: TGTTGAGCCGTTTCAGATGGT	327	CP015338

(3) 선발 유산균의 동태등에 배지의 발효 조건 최적화

유산균 배양액(발효 원료)으로는 제조된 동태등에 분말을 5%(w/v) 이용하였다. 원료에 질소원으로 0.5%의 yeast(BD, USA)와 탄소원으로 각각 2%(w/v) 덱스트로스(D-glucose, Sigma, USA) 80mL, 1%(w/v) 전분(starch, Sigma, USA) 80mL, 2%(w/v) 수크로오스(sucrose, Sigma, USA) 80mL, 또는 2%(w/v) 말토오스(maltose, Sigma, USA) 80mL를 첨가하여 각 배지를 제조하고, 대조군으로는 유산균 배양에 일반적으로 이용되는 MRS 배지를 이용하였다. 상기 제조된 각각의 발효 원료에 *L. plantarum* (KCCM 13068P), *L. lactis* (KCCM 13066), *L. mesenteroides* (KCCM 13067P), *L. brevis* (KCCM 13069P)을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고, 25°C, 30°C, 35°C 또는 37°C 에서 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였다. 각 시간별 24, 48, 72시간 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 유산균의 생균수는 각 배양액에 상기 LAB Counts는 각 배양액에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 배양물을 1%(v/v)로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다.

(4) 동태등에 추출물과 추출발효물의 미생물 안정성 및 pH 분석

동태등의 추출발효물의 천연 비타민B2/B9 손실을 최소화하고 배양 배지로 활용하기 위한 멸균 조건을 3M 바이오필름 대장균용 (3M, USA)을 통해 확인하였다. 유산균 배양하기 전 반드시 진행되어야 하는 저온살균 60°C에서 1~6시간과 고온고압멸균을 121°C에서 5분간 진행한 결과 멸균 전후의 모든 미생물을 확인하였다. 멸균된 동태등에 추출물배지에 유산균을 배양한 후 배양 착즙액의 장기 보관을 위하여 유산균을 사멸을 위해 80°C에서 20분간 열을 가하거나 생균상태의 유산균을 위해 동결건조 또는 배양물에서 유산균과 기타미생물을 확인하였다. 제조한 동태등에 추출발효물의 수소이온농도는 pH meter(Pettler Tolendo, USA)를 이용하여 측정하였다.

(5) 동태등에 추출발효의 탄소원과 질소원에 따른 항균활성 측정

항균효과를 확인하기 위한 시험균주인 리스토넬라 안굴라룸 (*Listonella anguillarum*, KCTC2711; La), 스트렙토코쿠스 파라우베리스 (*Streptococcus parauberis*, KCTC 3651; Sp), 및 스트렙토코쿠스 이니에 (*Streptococcus iniae*, KCTC3657; Si)를 Luria-Bertani (LB) 배지에 접종하고 37°C에서 24시간 동안 전배양 (pre-culture)하였다. 이어서, 페트리디쉬에 1 (w/v)%의 LB agar를 20 mL씩 분주하고 응고하여 평판배지를 제조한 후, 앞서 전배양한 시험균주 각각을 200 µL씩 첨가하고 멸균된 유리봉으로 배지 위에 고르게 도포한 후, 30분동안 건조시켰다. 건조된 배지 위에 페이퍼 디스크 (8 mm, Toyo Roshi Kaicha Ltd, Japan)를 올렸다. 상기 준비된 페이퍼 디스크에 상기 대조시료 1 내지 2 및 시험시료 1 내지 6을 각각 30µL씩 주입하고, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 페이퍼 디스크 주변의 억제환 (inhibition clear zone)의 직경을 측정하였고, 구체적으로 페이퍼 디스크 주위에 생긴 환의 길이를 측정하는 것으로 디스크원의 중심에서 항균 클리어 환 길이에서 디스크 반원길이를 빼고 측정하는 것이다. 또한 *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*에 대한 항균활성을 위해 각각 MacConKey Agar, LB 및 Oxford agar 세균배양 배지에서 디스크법으로 확인하였다.

(6) 동애등에 추출발효의 TLC분석

먼저, GABA 성분을 확인하기 위해 얇은 막 크로마토그래피(Thin layer chromatography, (TLC silica gel 60 RP F254, Merck)) 분석을 수행하였다. 발효 상청액, 1% GABA(w/v ; sigma), 0.5% MSG(w/v)을 Merck TLC silica gel(USA)에 각 3 μ L씩 점적하였다, 전개용매로 n-부탄올: 아세트산: 물을 5:2:2 ($v/v/v$) 비율로 혼합하여 사용하였으며, 2시간 동안 전개하여 건조 시킨 후 0.2% ninhydrin 용액으로 발색시켜 발효물의 GABA spot을 확인하였다.

다음으로 비타민B2와 B9을 확인하기 위해 대조군으로는 비타민B2(Riboflavin; R4500; Sigma USA)과 비타민B9(Folic acid; F7876; Sigma USA) 각 5 μ g/mL(0.05%) 표준 용액을 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 RP F254, Merck)에 3 μ L씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 비타민B2과 B9의 유무를 확인하였다. 상기 TLC에서 분리에 사용된 용매는 부탄올(n-butanol):클로로포름(chloroform):아세트산(acetic acid):수산화암모늄(ammonium hydroxide):물(water) 비율이 7:4:5:1:1의 부피비가 되도록 혼합하여 이용하였다. 용매 분리 후 결과는 UV 램프로 발색하여 확인하였다.

(7) 동애등에 추출발효물에서의 비타민B2와 B9의 ELISA 정량분석

동애등에 추출물(5%, w/v)을 121 °C에서 5분간 멸균한 후, *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종 유산균을 각 1%씩 접종한 후 30°C에서 호기 상태로 24, 48, 72시간 배양한 용액을 시험용액으로 제조하였다. 각 시간별의 유산균발효물을 초음파파쇄기(Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz(amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 3,000–5,000 rpm으로 10–15분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 수집된 상청액을 0.45 μ m 시린지 필터(ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터한 후 ELISA 시료로 이용하였다. 비타민B2(Mybiosource, USA)와 B9(Mybiosource, USA)이 코팅된 96-well microplate에 100 μ L의 각 준비된 시료와 standard(각 비타민B2, 비타민B9)를 분주하여 25°C에서 1시간 동안 정치하고, washing buffer로 각 well을 3번씩 세척하였다. Assay buffer(1X) 100 μ L씩 분주하여 1시간 동안 블로킹(blocking)하고 washing buffer로 세척하였다. 2시간 뒤에 검출 항체(detection antibody)와 enzyme(HRP)이 conjugation된 Avidin을 100 μ L를 분주 한 후에 상온에서 1시간 동안 반. 다시 washing buffer로 7번 세척한 다음, substrate 용액을 100 μ L 처리하였다. 상온에서 10분 동안 암반응시킨 후, stop solution을 50 μ L씩 분주하여 반응을 종결시켰으며, ELISA reader (BioTek Instruments Inc.USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(8) 동애등에 추출발효물에서의 비타민B2와 B9의 HPLC 정량분석

동애등에 추출물(5%, w/v) 을 121 °C에서 5분간 멸균한 후, *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종 유산균을 각 1%씩 접종한 후 30°C에서 호기 상태로 24, 48, 72시간 배양한 용액을 시험용액으로 제조하였다. 각 시간별의 유산균발효물을 초음파파쇄기(Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz(amplitude, 20%)로 pulse on 2초,

pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄하였으며, 3,000–5,000 rpm으로 10–15분간 원심분리하여 상청액을 수집하였다. 수집된 상청액을 0.45um 시린지 필터(ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하였다. HPLC 수행 시 양성대조군으로는 비타민 B2(Riboflavin; R4500; Sigma USA)과 비타민B9(Folic acid; F7876; Sigma USA) 각 5 µg/mL(0.05%; w/v)을 이용하였다. HPLC용 컬럼은 CapcellPAK UG120 C18(4.6 x 250 mm, 5 µm; OSAKA SODA, Japan)를 사용하였고 이동상 용액은 메탄올(methanol)과 10 mM NaH₂PO₄ 용액(pH5.5)을 35:65로 혼합하여 사용하였고, 컬럼의 온도는 40°C로 유지시켰으며 유속은 0.8 ml/min으로 하였다. 형광검출기(여기파장: 445 nm, 측정파장: 530 nm)를 이용하여 검출하였고, 시험용액과 표준용액을 각 10 µL씩 주입하여 앞의 조건으로 실험하였다.

(9) 비타민B2와 B9 생산의 파일럿 및 대량생산 공정 조건 분석

동애등에 유충을 15 ~ 18시간 온도 27°C, 습도 60%에서 키우고 3일 동안 절식시켜 동애등에 유충의 내장을 깨끗하게 하였다. 다음으로 동애등에 유충을 흐르는 물에 세척한 후, 마이크로웨이브로 건조하여 살충 처리하였다. 건조시킨 동애등에 유충을 분쇄기를 사용해 분말로 제조하였다. 분쇄기 사용에 의한 열 발생을 방지하기 위해 1분간 분쇄 후 3분간 휴지하는 분쇄 Cycle을 5회 반복하여, 동애등에 유충 분말 (*Hermetia illucens*; Hi)을 제조하였다. 제조한 동애등에 유충 분말 (Hi) 50g과 물 1L (5 %, w/v)를 혼합하고, 초음파로 750 watt, 10kHz 조건에서 10초 간격으로 5분간 조사하여 혼합하였다 (Sonics Vibra-Cell, USA). 그 후, 상기 혼합물을 121°C 고온고압기 (Autoclave; steam sterilizer)에서 5 ~ 20분간 처리하여 동애등에 유충의 열수 추출물 (Hotwater Extract of *Hermetia illucens*, HiHe)을 제조하였다. 열수 추출물은 -70°C에서 보관 후 동결건조하거나 제조 직후 동결건조하여 분말화하거나 추출물 액상을 취하여 실험 또는 소재화 또는 제품화에 이용하였다.

동애등에 유충 추출물의 유산균 발효물을 제조하는 데 있어, 유산균 발효를 효과적으로 일어나게 할 수 있는 최적조건으로서 탄소원 첨가 필요 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

위에서 제조한 동애등에 유충의 열수 추출물 (HiHe) 1 L 또는 3 L(pilot 배양) 및 100 L 이상에 추출물 부피 기준으로 첨가 탄소원으로서 갈락토스 (Galactose Sigma, USA) 20 g (2 %; w/v), 질소원으로 효모 분말 (기산바이오, 한국) 5 g (0.5 %; w/v)를 첨가한 배지를 준비하였다. 또한, 대조군으로 일반적으로 사용되는 유산균 배지인 DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) 배지 (대조배지), HiHe 1 L만 있는 배지를 준비하였다.

준비한 3종의 배지에 각각 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 를 1x10⁸ cfu/ml 농도로 10 mL (1%; v/v) 접종하였고, 배지에 접종된 유산균을 30°C에서 24시간동안 배양하였다.

배양 24시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였으며, 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1%(v/v)로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하였다.

(10) 파일럿 및 대량배양 동태등에 추출 발효물의 비타민 B2, FMN, FAD 생산량 측정

배지에 각각 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 를 10 mL (1%; v/v)의 농도로 접종한 후 배양한 용액을 시험용액 (GY_HiHe_Lm)으로 준비하였고, 대조군으로 미생물 접종 없이 배양한 대조용액으로 준비하였다 (GY_HiHe). 구체적으로, 30°C에서 호기 상태로 24시간 배양을 진행하였다.

GY_HiHe_Lm 및 GY_HiHe를 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 수집된 상청액을 0.45 µm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하였다.

HPLC 수행 시 표준물질로 비타민 B2 (Riboflavin; R4500; Sigma USA)와 FMN (Flavin mononucleotide; F2253, Sigma USA), FAD (Flavin Adenine dinucleotide; F8384, Sigma USA) 각각 5 µg/mL (0.05%; w/v)을 이용하였다. HPLC용 컬럼은 CapcellPAK UG120 C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm; OSAKA SODA, Japan)를 사용하였고 이동상 용액은 메탄올 (methanol)과 10 mM NaH₂PO₄용액(pH5.5)을 25:75의 부피비 (v:v)로 혼합하여 사용하였고, 컬럼의 온도는 40°C로 유지시켰으며 유속은 0.8 ml/min으로 하였다. 형광검출기 (여기파장: 445 nm, 측정파장: 530 nm)를 이용하여 검출하였고, 상기 HPLC 시험용액과 상기 표준물질을 각 10 µL씩 주입 후 이동상용액은 유속 0.8 ml/min 조건으로 실험을 진행하였다.

(10) 파일럿 및 대량배양 동태등에 추출 발효물의 비타민 B9 생산량 측정

동태등에 추출물(5%, w/v)을 121°C에서 5분간 멸균한 후, *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종 유산균을 각 1%씩 접종한 후 30°C에서 호기 상태로 24, 48, 72시간 배양한 용액을 시험용액으로 제조하였다. 각 시간별의 유산균발효물을 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz(amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 3,000–5,000 rpm으로 10–15분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 수집된 상청액을 0.45µm 시린지 필터(ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터한 후 ELISA 시료로 이용하였다. B9(Mybiosource, USA)이 코팅 된 96-well microplate에 100 µL의 각 준비된 시료와 standard(각 비타민B2, 비타민B9)를 분주하여 25°C에서 1시간 동안 정치하고, washing buffer로 각 well을 3번씩 세척하였다. Assay buffer(1X) 100 µL씩 분주하여 1시간 동안 블로킹(blocking)하고 washing buffer로 세척하였다. 2시간 뒤에 검출 항체(detection antibody)와 enzyme(HRP)이 conjugation된 Avidin을 100 µL를 분주 한 후에 상온에서 1시간 동안 반. 다시 washing buffer로 7번 세척한 다음, substrate 용액을 100 µL 처리하였다. 상온에서 10분 동안 암반응시킨 후, stop solution을 50 µL씩 분주하여 반응을 종결시켰으며, ELISA reader (BioTek Instruments Inc.USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(11) BSF_Parabiotics의 인간 장 내 세포 생존율 분석

Caco-2 세포 (한국세포주은행; <http://cellbank.snu.ac.kr>)를 1x10⁵ 단층으로 10% FBS (Gibco, USA)를 포함하는 DMEM (Gibco, USA)내에 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포 생존율은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Molecular Technologies Inc., Japan) 분석법을 이용하였고, Caco-2 세포를 96-well plate에 1x10⁵ cell/well 분주하여 24시간 배양하고 0.5% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체하여 12시간 방치하였다.

처리된 세포는 파쇄, 원심분리 과정을 거쳐 수집한 GY_HiHe_Lm, GY_HiHe_LI, GY_HiHe_Lp, GY_HiHe_Lb 및 GY_HiHe 각각의 상청액을 각각 10, 100 또는 1,000 µg/mL의 농도로 상기 배지에 희석하여 처리한 Caco-2 세포는 24, 48, 72시간 또는 7일 동안 배양한 후 CCK-8 시약을 well당 10 µL 첨가하여 2시간동안 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하고, ELISA reader (BioTek Instruments Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 상기 희석한 상청액을 첨가하지 않은 대조군 (CON) 대비 상대 백분율로 측정하였다.

(12) BSF_Parabiotics 소재의 인간 장 내 세포와의 부착능 분석

Caco-2 세포 (한국세포주은행; <http://cellbank.snu.ac.kr>)를 10% FBS (Gibco, USA)를 포함하는 DMEM (Gibco, USA) 배지에 1x10⁵ 단층으로 접종하여, 37°C, CO₂ 배양기에서 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종 유산균을 첨가하여 배양하였다. Caco-2세포는 사람의 대장암 세포 (Colorectal carcinoma에서 유래한 세포로 배양하면 사람의 소장상피세포로 분화하여 장내 흡수, 투과 등의 실험에 유효하다.

구체적으로 Caco-2세포에 류코노스톡 메센테로이데스를 1:1,000 (Caco-2 세포 : 류코노스톡 메센테로이데스; 1x10⁵ cells/well: 1x10⁸ cfu/well)의 비율로 상기 실시예 3의 시험배지 1에 접종하고 (GY_HiHe_Lm_Ca), 24시간, 48시간, 72시간 또는 7일 동안 37°C의 온도에서 CO₂ 배양을 진행하였고, 배지 내 균을 제거하고 세포에 붙은 유산균 수만으로 계수하였다. 대조군으로 상기 시험배지 1 배지 대신 상기 실시예 3의 MRS 배지에 Caco-2세포 및 류코노스톡 메센테로이데스를 접종하여 (MRS_Lm_Ca) 계수하였다.

각 유산균의 부착 기능은 MRS_Lm_Ca와 GY_HiHe_Lm_Ca 각각의 Caco-2 세포수에 대한 유산균 생균수의 비율로 표시하였다.

(13) BSF_Parabiotics의 인간 장 내 세포내에서의 비타민B2, FMN, FAD, 및 비타민B9 생산능

Caco-2 세포에 동해등에 배지의 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종 유산균 발효물 (30°C, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_Lm_Ca), 각 시간별의 Caco-2세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 류코노스톡 메센테로이데스, 락토코쿠스 락티스, 락토바실러스 플란터룸, 락토바실러스 브레비스를 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca). 수집된 상청액을 0.45µm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험용액으로 이용하여, 상기 실시예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다.

또한, 상기 수집된 상청액을 0.45 µm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 비타민 B9 ELISA 시료로 이용하여, 앞서 설명한 내용과 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였다.

(14) BSF_Parabiotics의 인간 장 내 세포내의 유해균 부착 억제능 분석

동애등에 추출물에서 발효된 유산균 류코노스톡 메센테로이데스의 Caco-2 세포내의 유해균 3종 대장균 (*Escherichia coli*, *E. coli*, ATCC 11775), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, ATCC 12600), 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*, ATCC 15313)에 대한 억제능을 분석하였다.

각 3종의 유해균과 류코노스톡 메센테로이데스 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)를 MRS 배지 내에 1) 동시접종, 2) 유산균 선 접종 후 유해균 후 접종, 3) 유해균 선 접종 후 유산균 후 접종한 각각의 실험군 시료에 대해 MRS (BCP 포함) 1% agar 배지에 100 µL씩 접종하여 생균수를 조사하였다. 또한, 각 3종의 유해균과 류코노스톡 메센테로이데스는 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)로 Caco-2 세포 (1×10^5 cells/well)에 1,000:1의 비율로 접종하였다.

실험은

- 1) 부착 경쟁능 (Competitive adhesion); Caco-2 세포내에 류코노스톡 메센테로이데스와 3종의 각각의 유해균 (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*)을 동시에 1시간 동안 공접종하는 경쟁분석,
- 2) 부착억제능 (inhibition adhesion); Caco-2 세포내에 유산균인 류코노스톡 메센테로이데스를 1시간 먼저 접종한 후, 각 유해균 (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*)을 접종하여 1시간 동안 시간차 접종하는 억제능 분석,
- 3) 대체능 (displacement); Caco-2 세포내에 유해균을 1시간 먼저 접종한 후, 유산균인 류코노스톡 메센테로이데스를 접종하여 1시간 동안 시간차 접종하는 대체능 분석의 3가지 유형으로 실험하였다.

유해균 3종과 류코노스톡 메센테로이데스에 대해 각각 페어링 처리하여 확인하였다. 확인은 배지의 균 제거를 위해, 상청액을 제거하고 PBS로 2~3회 세척 후, 세포를 수집하여 real-time PCR 시료로 사용하였다.

유산균인 류코노스톡 메센테로이데스, 락토코쿠스 락티스, 락토바실러스 플란터룸, 락토바실러스 브레비스와 3종 유해균은 Real-time PCR은 BIOPREMIER (Portugal)의 Salmonella sp real-time PCR detection kit (BIOPFS-0001), *E. coli* real-time PCR detection kit (BIOPFS-0002), Vibrio real-time PCR detection kit (BIOPFS-0004), *Listeria monocytogenes* real-time PCR detection kit (BIOPFS-0003)를 사용하여 진행하였다. 대조군으로는 Caco-2 세포에 단일 접종한 유해균을 사용하여 7500 real time PCR system (ABI Applied Biosystems, USA)으로 분석하였다. 상기 PCR을 수행한 결과, 동애등에 추출물에 의해 발효된 유산균의 항균효과를 확인하였다.

2. 비타민B2/B9 파라바이오틱스 효능 평가(공동1_한국식품연구원)

1] 세포 기반 장내 염증완화 효능 평가를 위한 비타민 B2/B9 성분 강화 소재 스크리닝

1) 세포 배양

인간의 대장암 세포주인 Caco-2 세포는 ATCC에서 분양받아 사용하였으며, 1% non-essential amino acid (NEAA), 2 mM L-glutamine, 1.0 mM sodium pyruvate, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)와 20% fetal bovine serum (FBS)가 함유된 MEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 계대 배양을 수행하였다. 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 10% FBS와 penicillin(100 U/mL)과 streptomycin(100 µg/mL)을 넣은 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 계대 배양을 수행하였다.

2) 세포 생존율

세포 생존율은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Molecular Technologies Inc., Japan) 분석법을 이용하였다. Caco-2 세포를 96-well plate에 1×10^4 cell/well 분주하여 24시간 배양하고 0.5% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체하여 12시간 starvation 시켰다. 소재 발효물을 증류수에 녹여 50 mg/mL로 stock을 만든 후 농도별로 배지에 희석하여 처리 후 2시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS를 10 µg/mL 처리하였다. 24시간 배양한 후 CCK-8 시약을 well당 10 µL 첨가하여 2 h 동안 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다. RAW264.7 세포는 48-well plate에 1×10^5 cells/well을 분주하여 24시간 배양하고 시료를 농도별로 처리한 다음, 1시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS를 1 µg/mL 처리하였다. 20시간 배양한 후 CCK-8 시약을 첨가하여 2 h 동안 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다. ELISA reader (BioTek Instruments Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군 대비 백분율로 나타내었다.

3) Western blot analysis

6 well에 Caco-2 세포 (5×10^5 cells/well)를 24시간 배양 후 농도별로 시료를 처리한 다음, 2시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS (10 µg/mL)를 24시간 처리하였다. RAW264.7 세포는 6 well에 (9×10^5 cells/well)로 24시간 배양 후 농도별로 시료를 처리한 다음, 1시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS (1 µg/mL)를 20시간 처리하였다. 이후 PBS로 세포 세척 후, lysis buffer를 세포에 분주하여 lysis 시킨 후 원심분리하여 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 BCA kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 12%의 polyacrylamide gel에 전기영동하고 Poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, USA)에 200 mA, 2시간 동안 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 0.05% Tween 20/Tris-buffered saline (0.05% T/TBS)에 넣고 상온에서 blocking 시킨 후, 1차 항체를 TBST에 1:1000으로 희석시켜 멤브레인과 incubation 시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (Cell signaling, USA), COX-2 antibody (Cell signaling, USA), β-actin antibody (Santa Cruz, USA)을 이용하여 4°C에서 overnight 시킨 후 0.1% TBST로 3회 세척한 다음 2차 항체 (goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz, CAL, USA)를 1 : 5000으로 0.1% TBST에 희석하여 1시간 반응한 뒤 TBST로 5회 세척하였다. Specific band는 ECL solution (Bio-Rad, USA)를 사용하여 chemidoc XRS+ imaging system (Bio-rad, USA)를 통해 측정하였다.

4) NO 발현 저해능 측정

RAW264.7 세포를 48-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 배양하였다. 시료를 농도별로 처리한 다음, 1시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하였다. 20시간 배양 후 상등액을 따서 각 well의 상등액 100 μL 와 nitrite ion standard solution(0, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100 μM) 100 μL 씩을 동량의 Griess reagent와 혼합하여 상온에서 호일로 차광하고 15분간 반응시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 농도는 nitrite ion standard solution에서 얻어진 standard curve를 이용하여 산출하였다.

5) 사이토카인 발현 저해능 측정

RAW264.7 세포를 48-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 배양하였다. 시료를 농도별로 처리한 다음, 1시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하였다. 20시간 배양 후 상등액을 따서 세포 배양액 내의 TNF- α , IL-6의 농도는 BD OptEIA™ Set ELISA (TNF- α , IL-6)의 protocol을 따라 실험하여 측정하였다. ELISA를 위한 96-well microplate에 100 μL 의 포획 항체(capture antibody)를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 정치하였다. 다음 날 washing buffer로 각 well을 3번씩 세척해 주었다. Assay buffer(1X) 200 μL 씩 분주하여 1시간 동안 블로킹(blocking)하고 washing buffer로 세척한 후 배양 상등액과 standard을 100 μL 씩 분주하였다. 2시간 뒤에 washing buffer로 5회 세척 후, 검출 항체(detection antibody)와 enzyme(HRP)이 conjugation된 Avidin을 100 μL 를 분주 한 후에 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 7번 세척한 다음, substrate 용액을 100 μL 처리하였다. 상온에서 10분 동안 암반응시킨 후, stop solution을 50 μL 씩 분주하여 반응을 종결시켰으며, ELISA reader (BioTek Instruments Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Co-culture model of Caco-2/RAW264.7 cells

Caco-2 세포를 12-transwell의 상층부 (apical side) (0.4 μm pore size)에 1×10^5 cells/well의 농도로 seeding함. 세포 배지는 2일에 한번씩 교체하며, 10일동안 배양하였다. Monolayer 형성을 확인하기 위해 10일 배양 동안 Millicell-ERS (Millipore, Bedford, MA, USA) 기기를 사용하여 TEER 값을 측정 후 800 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 이상이 되었을 때 본 실험에 사용하였다. RAW 264.7 세포는 새 12-transwell의 하층부 (basolateral side)에 3×10^5 cells/well의 농도로 seeding 후, 24시간 배양하였다. Co-culture에서 소재의 항염증 효과를 확인하기 위해 transwell 상층부 insert (Caco-2)를 RAW264.7 세포가 깔려있는 transwell에 삽입 후 시료를 농도별로 처리한 후 2시간 뒤 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharide (LPS)를 transwell 하층부 (Raw 264.7)에 처리하고 20시간 동안 37°C incubation 후 상등액을 수거 (ELISA, NO assay용) 및 lysis buffer를 처리하여 단백질을 프랩하였다 (Western blot용).

2] 도출된 소재로부터 전임상실험 기반 장내 염증완화 효능 평가

1) 실험동물 준비 및 군 구성

본 실험에 사용한 실험동물은 KFRI-IACUC(Korea Food Research Institute, Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 (KFRI-M-22032)을 받아 사용지침에 의해 관리되었다. 19~22 g의 7주령 암컷 C57BL/6 마우스를 오리엔트 바이오 (Orient Bio, Seong-nam, Korea)로부터 구입하여 실험동물용 아크릴 사육케이지에서 1주일 동안 주위 환경에 적응시킨 후, 본 실험에 사용하였다. 실험동물 사육은 온도 22 ± 1 °C 및 습도 55 ± 5 %를 유지하였으며, 명암주기는 12시간(조도 300 Lux)로 설정하였다. 체중을 측정하여 각 군을 정상군(Normal), DSS로 대장염을 유도한 대조군(DSS)

으로 정하였으며, DSS로 대장염을 유도하고 vitamin B2 (PC)를 37.2 µg/kg 농도로 투여한 그룹을 양성대조군으로 설정하였으며, DSS로 대장염을 유도하고 발효 전 시료 2,000 mg/kg 농도로 투여한 군(HeHi_H)과 DSS로 대장염을 유도하고 발효 후 시료 1,000 mg/kg를 저농도로 투여한 군(Lm_L과 Lp_L)과 2,000 mg/kg의 고농도 군(Lm_H과 Lp_H)으로 분류하였다.

2) 급성 궤양성 대장염 유도 및 시료 투여

급성 대장염을 유도하기 전, 7일간 시료를 경구 투여하였으며, 이후 7일 동안 급성대장염을 유도하였고, 유도기간인 7일 중에도 시료를 동일하게 경구 투여 하여 총 실험기간을 14일로 설정하였다. 급성 대장염 유도는 음용수에 dextran sulfate sodium(DSS: M.W. 36,000~50,000)을 3%로 희석하여, 7일 동안 자유 음용수로 섭취하게 하여 대장염을 유도하였다. 정상군은 음용수만 공급하였으며, 각 시료는 음용수에 희석하여 경구 투여로 섭취하였다. 실험은 총 14일간 진행되었으며 실험 시작 14일 후 희생하였다.

3) 만성 궤양성 대장염 유도 및 시료 투여

순화기간 종료 후, 정상군(normal control, NC)과 대조군(DSS)은 멸균 음용수, 양성대조군(positive control)은 vitamin B2 37.2 µg/kg, Lm 소재 저농도 군(Lm_L)은 1,000 mg/kg, Lm 소재 고농도 군(Lm_H)은 2,000 mg/kg, Lp 소재 저농도 군(Lp_L)은 1,000 mg/kg, Lp 소재 고농도 군(Lp_H)은 2,000 mg/kg 농도로 7개군으로 나누어 멸균 음용수에 희석하여 200 µL씩 시료를 경구투여 하였다. 만성 대장염 동물모델은 DSS와 음용수를 일정 주기를 반복적으로 투여하여 유발한다. 본 연구에서는 2%의 DSS 농도와 만성 대장염 유발을 위한 3주기를 아래와 같이 설정하였다. 정상군(normal control)을 제외한 모든 실험군에 DSS로 염증을 유발하였으며, 1주기는 DSS와 음용수를 각 5일씩 투여하였으며, 2주기는 각 3일과 7일, 3주기는 각 3일과 6일씩 투여하였다. 시료는 처음 DSS를 투여하는 시작일부터 실험 종료일 까지 총 29일간 경구투여 하였다.

4) 체성분 분석기를 활용한 근육량 측정

동물의 근육량(lean mass)은 경구투여일을 기준으로 28일차, 해부 전날 측정하였다. 측정 시 움직임에 의한 오차를 방지하고자, 마취제인 isoflurane 2% 농도로 호흡마취를 하였다. 호흡마취 후, 동물을 엎드린 상태에서 팔과 다리를 양옆으로 뻗는 자세로 동물을 측정부에 배치하였다. 이 중 에너지 엑스선 흡수계측법(Dual Energy X-ray Absorptiometry, DEXA) 방식의 InAnalyzer (Medikors Inc., Korea) 장비를 활용하였으며, high 80 kV 및 1.0 mA, low 55 kV 및 1.25 mA로 분석조건을 설정하였다. 측정 후, InAnalyzer software를 사용하여 이미지를 확보하였으며, 근육량 정보와 이미지를 획득하였다.

5) 질병활성화정도(Disease activity index; DAI) 측정

질병활성도는 크게 체중감소, 변의 상태, 혈변의 유무로 분류하여 각 상태에 따라 점수를 부여한 후 합산하였다. 체중감소의 경우 감소가 0%는 0점, 0~10%는 1점, 11~15%는 2점, 16~20%는 3점, 20%이상은 4점을 부여하였다. 변의 상태는 정상적인 경우 0점, 약간의 묽은 상태는 2점, 설사의 경우는 4점을 부여하였다. 혈변의 경우 없는 경우 0점, 혈변이 있는 경우 4점을 부여하였다. 체중측정의 경우, 군별 체중의 오차를 최소화하기 위해 실험 전 체중을 측정하여 군 분리를 하였으며, 실험이 수행되는 기간 동안 매일 동일한 시간대에 체중을 측정하였다.

6) 혈액채취 및 장기적출

채취한 혈액은 실온에서 30분정도 방치한 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 회수

한 후 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다. 채혈 직후 간과 비장 및 대퇴사두근을 각각 적출하여 무게를 측정하였다. 맹장에서부터 항문까지 분리하여 생리식염수에 담가 겉에 묻어 있는 혈액과 지방을 제거하고 흡습지에 수분을 제거한 뒤 대장의 길이를 측정하였다. 맹장을 분리한 뒤, 대장 내부를 생리식염수로 세척한 이후 상행결장은 -80°C 초저온 냉동고에 보관하고, 하행결장은 10% formalin 용액을 사용하여 보존하였다.

7) 대장길이 및 장기무게 측정

실험 종료 후 동물은 호흡마취 후 후대정맥에서 채혈하였다. 이후 항문으로부터 맹장까지 적출하여 길이를 측정하였으며, 이후 맹장을 분리하여 무게를 측정하였다. 또한, 간과 비장을 적출하여 무게를 측정하였다.

8) H&E를 통한 조직학적 분석

Hematoxylin and Eosin(H&E) staining법을 이용해 조직을 염색하였다. 10% formalin에 보존된 마우스의 대장 조직을 절단하여 파라핀으로 고정하고 조직 슬라이드의 파라핀을 제거하기 위해 xylene 용액에 5분간 3회 담근 후, 100%, 95%, 70% ethanol에 차례대로 5분씩 담갔다. 염색을 위해 hematoxylin 용액에 약 5분 동안 염색한 뒤 흐르는 물에 수세하였다. 1% HCl 용액과 1% 암모니아 용액을 이용하여 세포질의 hematoxylin을 제거하고 eosin 용액에 2분간 세포질을 염색하였다. 이후 70%, 95%, 100% ethanol, xylene에 차례대로 5분 동안 담근 뒤 cover glass를 덮어 봉입하였다. 이를 SZX10 현미경 (올림푸스, 서울, 대한민국)을 사용하여 장조직의 염증세포 분포와 상피세포를 조직학적 관찰, 촬영하였다.

9) Western blot analysis

마우스 대장조직의 총 단백질은 RIPA buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5 M EDTA, 0.1 M EGTA)를 사용하여 용리한 뒤 10% SDS-PAGE에서 분리 하고 polyvinylidene difluoride membrane (Roche, Indianapolis, IN, USA)으로 transfer 하였다. Blot은 0.05% Trisbuffered saline Tween 20를 용매로 한 5% nonfat dried milk로 blocking한 후 1차 항체는 1:1,000의 비율로 희석한 antibody (Cell Signaling, Canvers, USA)를 사용하여 4°C 에서 O/N incubation하였다. 0.1% TBST로 10분간 3번 세척 한 후 blot은 1:5,000 비율로 희석한 horseradish peroxidaseconjugated anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany)를 2차 항체로 사용 하여 상온에서 1시간 incubation 후 0.1% TBST로 5회 세척하였다 Specific band는 ECL solution (Bio-Rad, USA)를 사용하여 chemidoc XRS+ imaging system (Bio-rad, USA)를 통해 측정하였다.

10) Real-time PCR

Pure link RNA mini kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 RNA를 분리하였다. 대장조직 0.1 g을 동결 상태로 1 mL의 RNAiso Plus (TakaRa, Otsu, Japan)를 첨가한 후 homogenizer로 균질화하여 5분 동안 상온에서 가라앉혔다. Chloroform 200 μL 를 넣고 맹렬히 섞은 뒤 다시 상온에서 5분 동안 가라앉히고 10,000 rpm, 4°C 에서 10분 동안 원심 분리하였다. 분리된 상층액을 취하여 상층액과 동량의 70% 에탄올을 가하여 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. RNA Maxime RT premix Kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. Oligo dT Primer (50 μM) 1 μL , dNTP Mixture (10 μM each) 1 μL , template RNA 1 μg 을 취하여 RNase free dH_2O 로 20 μL 가 되게 부피를 맞추고 45°C 에서 60분간 반응시켜 cDNA를

합성하고 95°C에서 5분간 반응시켜 효소의 활성을 억제하였다. 합성된 cDNA는 -20°C에서 보관하고 Real-Time PCR 수행 시에 template으로 사용하였다. Template로 합성된 cDNA는 Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied biosystems)을 사용하여 mRNA 발현 분석을 하였다. 각 유전자의 발현을 분석할 수 있는 primer는 Macrogen사 (Seoul, Korea)에서 합성하였다. 95°C에서 10분 동안 초기 denaturation 한 후에 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 1 cycle로 하여 40회 반응시켰다. 각 cycle 마다의 형광신호를 감지하여 나타내는 threshold cycle, C(t) 값을 분석하여 CFX96 Real time system (Bio-rad, Hercules, CA, USA)으로 각 실험군 간의 mRNA 발현을 정량분석 하였다. Internal transcription marker로는 β -actin, GAPDH를 사용하였으며 증폭 시 사용한 gene primer 염기서열은 다음과 같다.

Table. Primer 염기서열

Gene		Sequence
TNF- α	forward	5'-ACCCTCACACTCAGATCATC-3'
	reverse	5'-GAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
IL 6	forward	5'-TGGAGTACCATAGCTACCTG-3'
	reverse	5'-TGACTCCAGCTTATCTGTTA-3'
IL-1 β	forward	5'-TGTAATGAAAGACGGCACAC-3'
	reverse	5'-TCTTCTTTGGGTATTGCTTG-3'
ZO-1	forward	5'-GCTTTAGCGAACAGAAGGAGC-3'
	reverse	5'-TTCATTTTTCCGAGACTTCACCA-3'
Occludin	forward	5'-TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA-3'
	reverse	5'-CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG-3'
Claudin-1	forward	5'-CCCTTCAGCAGAGCAAGGTT-3'
	reverse	5'-TAGGGCAACCAAGTGCCTTT-3'
β -actin	forward	5'-CAGCTGAGAGGGAAATCGTG-3'
	reverse	5'-CGTTGCCAATAGTGATGACC-3'

11) Next generation sequencing(NGS) 분석

장내 마이크로바이옴(microbiome) 분석을 위해 수집한 분변 내 박테리아의 총 DNA를 추출하였다(PowerSoil DNA Isolation kit, MO BIO Laboratories Inc., Hilden, Germany). 시료의 16S rRNA V3-V4 지역을 타겟으로 하는 프라이머(forward primer 5' TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG/ reverse primer 5' GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C)를 이용하여 증폭하였다. 증폭하여 정량이 끝난 시료는 MiSeq(Illumina, San Diego, CA, USA)을 이용하여 시퀀싱을 수행하였고, 시퀀싱 결과는 adapter trimming, merge paired-end reads, quality check, chimeric sequence 제거 과정을 통해 분석에 필요한 시퀀스를 획득하였다. 모든 결과는 RDP(v.2.11)를 이용하여 taxonomy profiling을 실시한 후 분석에 필요한 operational taxonomic units(OTUs, 97% identity)를 얻었다. 이후 QIIME를 이용하여 다양성 분석 및 LDA Effect Size(LEfSe)를 실시하여 그룹별 박테리아의 상대적 구성을 비교 분석하였다.

3. BSF_비타민B2/B9 파라바이오틱스 사료 안정화(공동2_시그널케어)

(1) 실험 재료

동애등에는 마이크로웨이브로 2~6분 건조하고 분말화한 것을 구입하여 환동해산업연구원에 공급하였다(2021. 06). 반려견 대상의 기호도 조사를 위한 시료는 환동해산업연구원에서 동애등에 추출물에 4종의 유산균(식품공전 등록균주 및 국제균주기탁 완료)으로 배양 후, 동결건조한 분말을 -20°C 에 저장하여 섭식 실험에 사용하였다. 대조군으로는 동애등에 분말을 사용하였다.

(2) 반려견 식이 실험

반려견은 건강에 이상이 없는 개체로 체급별 소형견 8마리, 중형견 8마리, 대형견 4마리를 무작위 선발하여(표1) 첫 번째는 유산균발효물(HiLAB)만을 급여, 두 번째는 기존사료에 유산균 발효물을 첨가하는 방법으로 급여하였다. 급여량은 2g/일로 아침, 저녁으로 급여하였다. 급여 시에 바로 섭식하는 경우(2점), 탐색 후 섭식하는 경우(1점), 섭식하지 않는 경우(0점)으로 하였다. 급여 후 설사 또는 이상 징후 등을 관찰하여 일지를 작성하였다.

표 1 반려견 개체 정보

반려견 개체 정보								
개체	성별	연령	개체	성별	연령	개체	성별	연령
소형견 #1	female	1yr	중형견 #1	male	5yr	대형견 #1	female	2yr
소형견 #2	male	3yr	중형견 #2	female	3yr	대형견 #2	female	4yr
소형견 #3	female	2yr	중형견 #3	female	2yr	대형견 #3	male	3yr
소형견 #4	female	2yr	중형견 #4	male	7yr	대형견 #4	male	7yr
소형견 #5	female	6yr	중형견 #5	male	2yr			
소형견 #6	male	8yr	중형견 #6	female	9yr			
소형견 #7	male	5yr	중형견 #7	male	3yr			
소형견 #8	female	10yr	중형견 #8	female	1yr			

(3) 동애등에 추출발효물의 사료 제형화 실험

동애등에 추출발효물 분말을 첨가물로 한 사료 제형 테스트를 위해 일단 각 재료를 혼합하여 배합후 압출가공처리하였다. 익스팬더 기계에서 고온/고압 상태를 유지하면서 소형견, 중형, 대형견에 맞추어 모양과 크기를 조절하였다. 남은 수분을 제거하기 위해 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ 로 열풍건조하고 유지(갈색거저리 기름), 미네랄, 비타민 등을 스프레이한 후 완성하였다. 동애등에 추출발효물은 고온처리에 의해 사균화 되기에 60, 80, 그리고 100°C 온도별 실험을 진행하였다.

(4) 시제품 분석 실험

시제품분석은 사료 표준분석 방법을 따라서 시행 하였다.

(a) 수분 분석_가열 감량법

- 미리 건조하여 항량을 구한 알미늄제 칭량병에 시료 2~5g을 정확히 칭량한다.
- 항온건조기로 105℃에서 항량이 될 때까지 건조한다
- 데시케이터 내에서 30분간 방냉한다.
- 무게를 달아 감량을 수분 함량으로 하였다.
- 수분(%)= 건조전 중량-건조후 중량/시료중량 X100

(b) 조단백질 분석_자동분석법(dumas method)

- 기기의 조작법 대로 기기의 전원을 켜 작동시킨다.
- 연소로가 온도 평형을 유지한 후 시작하여 정상 작동을 확인한. 이때 연소로의 온도는 850에서 1050℃의 권장적정온도 범위 내에 있어야한다.
- 연소로 아래 부위에 stainless steel screen과 glass wool을 삽입한 후 연소관을 준비한다.
- 시료 적정량을 tin foil 시료용기에 취한다.
- 무게변화 방지를 위해 1분 이내에 무게를 측정한다.
- 시료를 취한 시료 용기를 시료 주입 장치를 이영하여 기기 분석을 한다.
- 표준 시약을 이용하여 표준곡선을 구한 다음 시료의 농도를 구한다.
- 질소 함량에 단백질 환산계수를 곱하여 조단백질 함량을 구한다.

(c) 조섬유 분석_여과포 분석법

- 용제 내에서 내산성인 마커펜을 이용하여 여과포 표면에 식별번호를 표기한다.
- 저울 천칭의 영점을 맞추고 빈 여과포의 무게(W1)를 기록한다.
- 각 여과포에 1 g의 시료를 넣고 무게(W2)를 측정한다.
- 바탕값 보정(C)을 위해 적어도 하나의 빈 여과포를 같이 실험 진행한다.
- 열 밀봉기를 사용하여 여과포의 윗부분을 완벽히 밀봉한다.
- 비커에 여과포를 넣고 석유에테르를 잠길 정도로 붓고 30분간 탈지한다.
- 잘 건조된 여과포를 여과포 걸이에 층층이 쌓아 기계 안에 넣고 기기를 작동한다.
- 조섬유 추출과 헹굼 처리가 끝나면 뚜껑을 열고 여과포를 비커에 넣은 다음 아세톤을 여과포가 잠길 만큼 붓는다.
- 아세톤에서 여과포를 꺼내 철망그물 위에 놓고 아세톤을 증발시킨다. 아세톤을 증발 시킨 여과포를 102℃에서 완전히 건조시킨다.
- 건조기에서 여과포를 꺼내어 방형 파우치에 곧바로 넣은 다음 손으로 눌러 평평하게 하여 공기를 빼낸다. 실온이 될 때까지 냉각하여 여과포의 무게를 측정한다. 여과포를 담은 도가니의 무게를 잰 후 , 각 여과포를 도가니에 넣고 도가니+여과포의 무게를 계산한다.
- 600±15℃의 회화로에서 2시간 회화시키고 끝나면 도가니를 150℃ 내외로 식힌 후 데시케이터에 넣고 실온까지 식힌다. 충분히 식으면 데시케이터에서 도가니를 하나씩 빼내어 도가니+회화된 여과포의 무게(Wb)를 측정해 손실된 유기물질(W3)을 계산한다.

- 계산식 : 조섬유(%)=100x(W-(W1xC))/W2
- * W1: 여과포의 자체 무게
- W2: 시료의 무게
- W3: 유기물질 무게
- W3: Wa-Wb
- Wa= 도가니+건조 후 여과포의 무게
- Wb= 회화 후 도가니+여과포의 무게
- C: 빈 여과포의 회분 보정 값
- C= (C2-C3)/C1
- C1= 빈 여과포의 무게
- C2= 도가니+ 건조 후 빈 여과포의 무게
- C3= 회화 후 도가니+ 빈 여과포의 무게

(d) 조지방 분석_에테르 추출법

- 지방 정량병을 95~100℃에서 2시간정도 건조한다.
- 데시케이터 내에서 30분간 방냉 후 칭량한다.
- 시료 2~3 g을 2번 여과지에 싸서 95~100℃에서 2시간 건조한다.
- 지방추출장치에 넣고 에테르를 부어 80℃로 가열하여 8시간 지방을 추출한다.
- 에테르를 회수한다.
- 지방 정량병을 95~100℃에서 3시간 건조 후 데시케이터 내에서 40분간 방냉 후 칭량하여 지방 정량병의 중량을 감 한 것을 시료량에 대한 백분율을 구하여 지방함량으로 한다.
- 조지방(%)= 추출후 지방 정량병 중량- 추출전 지방 정량병 중량/시료중량x100

(e) 조회분 측정

- 600℃ 전기로에서 1~2시간 태운다.
- 태운 크루시블을 데시케이터내에서 40분간 방냉 후 칭량한다.
- 시료 2~3 g을 취하여 전기로로 열을 가하여 예비 회화한다.
- 600℃ 전기로에 넣어 2시간 태운 후 데시케이터내에서 40분간 방냉 후 칭량한다.
- 칭량한 중량으로부터 크루시블 중량을 감한 것을 조회분 함량으로 한다.
- 조회분(%)= 회화 후 무게(시료+크루시블)-크루시블/시료중량x100

(f) 칼슘 측정

- 시료 2~5g을 크루시블에 취하고 열판에서 예비 회화시킨 후 전기로 600℃에서 2시간 이상 회화 시킨 후 방냉한다.
- 염산용액 10 mL을 가하여 하룻밤 방치 용해시킨다.
- 6번 여과지를 이용 뜨거운 물로 여과하여 일정량 맞춰 시료액으로 한다.
- 시료액 일정량을 50 mL 메스플라스크에 넣는다.
- 5% 란타늄용액 10 mL을 넣고 다시 염산 용액 1 mL을 거혁ㅎ 증류수로 표선을 맞춘다.
- 미리 30분간 예열한 원자흡광광도계 파장422.7 nm에서 흡광도를 측정한다.
- 칼슘 표준 용액을 0,2,4,8,10 ppm이 되도록 50 mL 메스플라스크에 취한 다음 여기에 5% 란타늄용액 10 mL을 각각 넣고 증류수로 표지선까지 채운 다음 흡광도를 측정한 다음 표준곡 선을 작성한다.
- 칼슘(%)= 시료액의 흡광도/1ppm기준 흡광도x희석배수/시료중량x10⁶x100

(g) 인 측정

- 25 mL 메스플라스크에 시료액 1~20 mL를 취한다
- 발색제 2.5 mL을 가한다.
- 증류수로 표선을 맞춘 후 혼합하고 15분간 방치 후 470 nm에서 흡광도를 측정하고 표준액도 같은 방법으로 측정한다
- 인(%)=(시료액의 흡광도/1ppm기준 흡광도x희석배수)/(시료중량x106)X100

(h) 납, 카드뮴, 비소 측정

- 시료(5~20 g)를 분해 플라스크에 취해 물 50~70 ml, 질산 10~40 mL를 넣고 혼합하여 방치한다.
- 다음에 조용히 가열하여 격렬한 반응이 그치면 식힌다.
- 황산 5~20 mL을 넣고 다시 조용히 가열한다.
- 내용물이 암색이 되기 시작하면 질산 2~3 mL 씩을 추가하면서 가열을 계속하여 내용물이 미황색에서 무색이 되면 분해가 끝난 것으로 한다.
- 분해액을 식힌 후 물 30~50 mL, 포화수산화암모늄용액 10~25 mL를 가해서 황산의 흰 연기가 발생 할 때 까지 가열하고 식힌 다음 물로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다.
- 표준 용액과 시험용액을 ICP(유도결합플라즈마)에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

(i) 수은 측정

- 750℃ 전기로에서 보트위에 2번 시약을 깔고 그 위에 배합사료0.1g을 취하여 깔고 2번 시약으로 덮고 그 위에 1번 시약을 깔고 다시 2번 시약을 덮는다.
- 수은 전용분석기의 글라스 캡을 열고, 시료 처리 보트를 밀어 넣어 캡을 닫는다
- 기기를 작동시켜 측정량을 ng으로 기록한다.
- 수은량(ppm)= 시료측정량(ng)/ 시료량(mg)

(j) 불소 측정

- 200 mL 비이커에 불소농도가 400 µg 정도가 되도록 시료를 정확히 취한다.
- 여기에 1 N-염산 20 mL를 넣고 60℃정도로 가온 하면서 자석교반기로 20분간 교반한다.
- 200mL 메스플라스크에 50 mL 초산소다용액과 구연산소다 용액 50 mL를 가한후 증류수로 표선까지 취한 용액을 시료액으로 한다.
- 이온미터에 불소전극과 비교전극을 장치하고 저 농도의 불소용액(100 ppm)에 담근 후 실온에서 안정시킨다.
- 시료액의 불소농도와 비슷한 농도의 표준 용액을 100 mL 비이커에 일정량을 취하여 1N-염산 10mL, 초산소다용액 25mL와 구연산소다 용액 25mL를 첨가하고 증류수로 일정량을 만든 후 교반기에서 최저속도로 서서히 저어주면서 전위차를 읽는다.
- 위와 같은 방법으로 표준용액의 전위값으로 표준 방정식을 구한다.
- 시료액 일정량을 100 mL 비이커에 취하여 교반기로 서서히 저어 주면서 시료액의 전위 값을 구한다.
- 불소(ppm)= 기울기값(ppm)x 시료액의 전위값x 희석배수/ 시료중량(g)

(h) 셀레늄 분석

- 분석시료 2 g을 정확히 칭량하여 200 ml의 톨비이커에 넣는다.
- 질산 20 mL 및 과염소산 5 mL를 가하여 시계접시를 덮고 하룻밤 방치한다.
- 가열교번기에서 서서히 가열하다 거품이 사라지면 온도를 높여 건조 직전까지 농축한다.
- 방냉 후, 염산 5 mL를 가하고 5분간 가열하여 환원시킨다.
- 다시 방냉 후 증류수로 100 mL의 메스플라스크에 옮기고 표선까지 증류수를 가하여 시료액으로 하고 시료액을 넣지 않고 조제하여 blank로 한다.
- 시료액의 일정량을 100 mL의 톨비이커에 정확히 넣는다.
- EDTA 용액 5 mL를 가하여 pH를 염산:증류수(1:4)로 1.0~1.5로 조정한다.
- 염산:증류수(1:100)로 100 mL의 분액깔때기에 옮겨 담는다.
- 시클로hex산 10 mL를 정확히 가하고 5분간 진탕한다.
- 방치한 후 수층(하층)을 버리고 잔류액을 염산:증류수(1:100) 25 mL씩 2회 진탕 세정한다.
- 시클로hex산층(상층)을 시험관에 옮겨 담는다.
- 적당량의 무수황산나트륨을 가하여 탈수한 후 2S번여과지로 여과하여 시료액으로 한다.
- blank용액 및 각 셀레늄 표준액을 동일하게 조제한다.
- blank용액을 대조액으로 하고 시료용액에 대하여 여기파장 378 nm 및 형광파장 520 nm로 형광강도를 측정한다.

(i) 아플라톡신(B1, B2, G1, G2), 오크라톡신 A 분석

-전체 검체 중 4분법 등으로 대표성이 확보된 500 g 이상의 검체를 표준체 30 mesh 이상(체 눈크기 600 μ m 이하)의 체를 통과하도록 분쇄한다. 체를 통과한 검체를 다시 혼합해 균질화한다.

-균질화한 시료 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고 10% 포름산 함유 수용액 10 mL와 아세토니트릴 10 mL를 가한 뒤 30분간 진탕한다. 진탕 후 추출물에 무수황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 1 g을 추가하여 1분간 강하게 흔들어서 섞은 다음 4°C, 4,000 G에서 10분간 원심분리하여 상층액 1 mL를 취한다.

-d-SPE(PSA 25 mg과 C18 25 mg)가 미리 담겨져 있는 2 mL 원심분리관에 추출로부터 얻은 상층액 1 mL를 가하고 1분간 충분히 혼합한 후 이를 4°C, 4,000G에서 10분간 원심분리한다. 정제된 상층액 0.4 mL, 3차 증류수 0.5 mL 및 아세토니트릴 0.1 mL를 합하여 교반한 뒤 4°C에서 30분간 방치 후 멤브레인 필터(PTFE, 0.2 μ m)로 여과한 후 시험용액으로 한다.

-액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS) 분석조건

가) 컬럼: C18 (100 mm x I.D 2.1 mm, 1.7 μ m) 또는 이와 동등한 것

나) 컬럼 온도: 40°C

다) 유속: 0.35 mL/분

라) 주입량: 2 μ L

마) 이동상: A: 5 mM 포름산암모늄 및 0.1% 포름산 수용액

B: 5 mM 포름산암모늄 및 0.1% 포름산 함유 메탄올

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	95	5
1.5	95	5
2.5	70	30
4.0	40	60
5.0	20	80
6.0	1	99
8.5	1	99
8.6	95	5
13.0	95	5

- 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: ESI positive-ion 및 negative-ion mode

나) Capillary voltage: 3.5 kV

다) Collision gas: 질소(N₂)

- 내부표준물질의 첨가 방법은 검량선용 표준용액, 공시험용액 및 검체에 내부표준물질의 일정량을 직접 첨가하거나 자동주입기 프로그램 등을 이용하여 주입 전에 용액과 혼합시키는 방법으로 한다.

- 예시) 내부표준물질 첨가 수준: ¹³C₁₇ Aflatoxins 5 µg/L, ¹³C₁₅ Deoxynivalenol 100 µg/L, ¹³C₃₄ Fumonisin 50 µg/L, ¹³C₂₄ T-2 toxin 10 µg/L, ¹³C₂₂ HT-2 toxin 100 µg/L, Ochratoxin A-d5 5 µg/L, ¹³C₁₈ Zeralenone 30 µg/L

○ 곰팡이독소 11성분 및 내부표준물질 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

분석성분 (Compound)	머무름 시간 (Retention time, min)	이온화 (Ionization)	선구이온 (Precursor ion, <i>m/z</i>)	생성이온 (Product ion, <i>m/z</i>)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
Aflatoxin B ₁	4.53	[M+H] ⁺	313.0	285.0	25
				241.0	40
Aflatoxin B ₂	4.42	[M+H] ⁺	315.0	259.0	35
				287.0	35
Aflatoxin G ₁	4.29	[M+H] ⁺	329.0	243.0	30
				311.0	20
Aflatoxin G ₂	4.16	[M+H] ⁺	330.9	313.0	25
				245.0	35
Deoxynivalenol	3.04	[M+H] ⁺	297.3	249.1	10
				191.0	58
Fumonisin B ₁	5.08	[M+H] ⁺	722.0	352.3	45
				704.2	40
Fumonisin B ₂	5.53	[M+H] ⁺	706.4	335.9	35
				354.3	30
Ochratoxin A	5.49	[M+H] ⁺	404.1	238.9	25
				192.7	50
T-2 toxin	5.31	[M+NH ₄] ⁺	483.8	215.0	20
				263.1	10
HT-2 toxin	5.05	[M+NH ₄] ⁺	442.5	263.1	10
				215.1	10
Zearalenone	5.55	[M-H] ⁻	317.0	175.1	25
				186.9	15
¹³ C ₁₇ Aflatoxin B ₁	4.53	[M+H] ⁺	330.1	301.0	25
				283.9	40
¹³ C ₁₇ Aflatoxin B ₂	4.42	[M+H] ⁺	332.0	273.0	30
				257.0	35
¹³ C ₁₇ Aflatoxin G ₁	4.29	[M+H] ⁺	346.0	257.0	30
				299.0	30
¹³ C ₁₇ Aflatoxin G ₂	4.16	[M+H] ⁺	348.0	330.0	30
				301.2	30
¹³ C ₁₅ Deoxynivalenol	3.04	[M+H] ⁺	312.0	215.8	10
				198.0	15
¹³ C ₃₄ Fumonisin B ₁	5.08	[M+H] ⁺	756.1	374.3	40
				356.3	45
¹³ C ₃₄ Fumonisin B ₂	5.53	[M+H] ⁺	740.0	374.3	50
				356.33	40
Ochratoxin A-d5	5.49	[M+H] ⁺	409.1	321.0	36
				239.5	20
¹³ C ₂₄ T-2 toxin	5.31	[M+NH ₄] ⁺	508.0	322.1	10
				260.07	10
¹³ C ₂₂ HT-2 toxin	5.05	[M+NH ₄] ⁺	464.2	278.1	10
				229.1	15
¹³ C ₁₈ Zearalenone	5.55	[M-H] ⁻	335.1	185.0	40
				140.0	40

* 밑줄 그은 이온은 정량이온이며, 그 외는 정성이온임.

** 각 생성이온에 대한 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적 값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 생성이온도 적용이 가능함.

-정성 및 정량시험

1) 정성 및 정량을 위한 시험은 3회 이상 실시한다.

2) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용($1/x$) 방식을 활용할 수 있다.

-정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 반응세기의 비율(response ratio)을 비교하여 그 비율이 $\pm 30\%$ 이내에서 일치하여야 한다.

-정량시험

가) 정성시험에서 검출된 곰팡이독소는 아래 나)의 방법에 따라 정량한다.

나) 내부표준물질을 이용하여 표준물질과 내부표준물질과의 피크 면적(또는 높이)의 비로부터 표준물질 각각의 검량선을 작성하고 시험용액의 크로마토그램으로부터 정량이온(Quantitative ion)과 내부표준물질의 정량이온과의 각 피크 면적(또는 높이) 비에 따라 각각 정량한다.

다) 정량한계

- (1) Aflatoxin B1, B2, G1, G2: 0.0025 mg/kg
- (2) Deoxynivalenol: 0.05 mg/kg
- (3) Fumonisin B1, B2: 0.05 mg/kg
- (4) Ochratoxin A: 0.01 mg/kg
- (5) T-2 toxin: 0.05 mg/kg
- (6) HT-2 toxin: 0.05 mg/kg
- (7) Zearalenone: 0.0125 mg/kg

(j)살모넬라 분석

- 1차 증균배양: 시료 25g을 취하여 225ml의 펩톤수(Beffered peptone water)에 가한 후 35~37°C 에서 24±2시간 증균 배양한다.

-2차 증균배양: 1차 증균배양액 0.1ml를 취하여 10ml의 Rappaport-Vassiliadis broth에 접종하여 42±1°C에서 24±2시간 배양한다. 또한 1차 증균배양액 1ml를 취하여 10ml의 Tetrathionate Broth에 접종하여 36±1°C에서 24±2시간 배양한다.

-분리배양: 각각의 2차 증균배양액 1~2 백금이를 MacConkey agar, SS(Salmonella&Shigella) agar, Desoxycholate Citrate agar, XLD agar, Bismuth Sulfite agar 또는 Brilliant Green Sulfa (BG Sulfa) Agar 중 2개를 선택, 도말하여 35~37°C에서 24±2시간 배양한 후 집락을 관찰한다. 이때 살모넬라 의심 집락은 확인시험을 한다.

-살모넬라로 의심되는 집락을 보통한천배지에 옮겨 35~37°C에서 18~24시간 배양한 후, TSI 사면배지의 사면과 고층부에 접종하고 35~37°C에서 18~24시간 배양하여 생물학적 성상을 검사한다. 유당, 서당 비분해(사면부 적색), 가스 생성(균열 확인) 양성이면 생화학 검사를 실시한다.

-생화학검사는 우선 Urea 반응검사와 Phenylalanine 반응검사를 실시하여 음성을 나타내는 균에 대해 진행하며 살모넬라의 일반적인 생화학적 반응은 다음과 같다.

표 20 살모넬라의 일반적인 생화학적 반응

균		Salmonella	S. typhosa
성상	Glucose	+	+
	Lactose	-	-
	Sucrose	-	-
	gas 형성	+	-
	H ₂ S 생성	+	(±)
Indole	-	-	
Methyl Red	+	+	
Voges Proskauer	-	-	
Citrate	(±)	(±)	
Urea	-	-	
KCN	-	-	
운동성	+	+	
Phenylalanine	-	-	
Gelatin 액화	-	-	
※ (±)는 양성 이거나 음성			

(5) 동애등에 추출발효물 급여 반려견 혈액분석_보호자 동의하에 개별 건강검진 결과 수집

동애등에 추출발효물 분말을 첨가물로 한 사료를 섭취한 4마리의 중형견의 혈액을 23G 주사기와 EDTA가 함유되어 있는 채혈관을 사용하여 경정맥에서 5 ml 채취한 후 혈구 분석기로 분석하였다. 혈액의 생화학 분석을 위해 채취한 혈액을 RT에서 3000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장 샘플은 생화학 분석기로 분석하였다.

- 혈청군(Serogroup)결정 시험

이상의 생화학 검사결과 살모넬라로 판단되는 균들의 혈청학적 검사를 실시하는데 먼저 O항원 다가(Polyvalent) 항혈청(Difco 社)으로 슬라이드 응집반응을 실시하여 Polygroup을 결정한 후 단일(Single) 항혈청(Difco 社) 슬라이드 응집반응을 통해 혈청군(Serogroup)을 결정하여 D group 여부를 확인한다.

Serotype	Group	Antigenic Formula Somatic(O)
<i>typhi</i>	D1	9, 12, (Vi)
<i>enteritidis</i>	D1	1, 9, 12
<i>dublin</i>	D1	1, 9, 12
<i>pullorum</i>	D1	9, 12
<i>gallinarum</i>	D1	1, 9, 12
<i>ontario</i>	D2	9, 46

표 22 Salmonella D Group의 주요 혈청군

제 3 장 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

제 1 절 연구수행 결과

1. 정성적 연구개발성과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2021년)	생물강화공정 기반 비타민B2/B9 소재화 기술 (세부:MIRE)	BSF_VitB2/B9 생산 공정 최적화	비타민B2/B9생산 유산균 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 생물정보학 기반의 유산균 4종에 대한 rib, fol 유전자 선발 완료 - rib, fol 포함 유산균에 대한 3종의 pathogen에 대한 항균분석 완료 - VitB2(ribA, B, C, D, H, F, T) 유전자 gDNA 및 cDNA의 MRS 및 Hi 배지 내 발현 확인 유산균 24종 확인 - VitB9(folA, B, C, D, H, E, K, P, Q) 유전자 gDNA 및 cDNA의 MRS 및 Hi 배지 내 발현 확인 유산균 24종 확인 - 4종의 유산균 중에 우수균주 8종 1차 선발 후 최종 우수균주 4종 선발 - 우수균주 4종 국제균주 기탁완료 (KCCM13066, 13067, 13068, 13069)
			BSF_비타민B2/B9 공정조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 동애등에추출물배지(HeHi)내의 VitB2/B9 발현 확인_TLC, HPLC, ELISA - 유산균주별 HeHi의 VitB2/B9 시간별 발현_24시간 최적화(대조군: MRS배지) - 우수균주의 공배양에 의한 양산조건 검토_ <i>L. lactis</i> 우점균화 확인 - 2, 3, 4 균주의 공배양에 따른 공정최적화_48시간 2종 이상 배양에 따라 0.5배 증가 - C/N비에 따른 VitB2/B9 생산 조건 분석_0.5% yeast, 2% galactose 내에서 1균주 24시간 발현의 최적화
			비타민B2/B9 정량정성분석	<ul style="list-style-type: none"> - Hi분말 VitB2 0.7mg/100g, VitB9 없음 - Hi_Ll, Hi_Lp, Hi_Lm, Hi_Lm 발효물의 VitB2, HPLC 정량 및 VitB9 ELISA 정량 - 펫사료첨가물 및 전임상 시료 정량분석 - 비타민B3 및 기타 성분분석의 Hi 분말과 HiLAB 비교
			Pilot 배양조건 확립 및 생산	<ul style="list-style-type: none"> - 5% Hi (w/v)에 0.5% yeast, 2% galactose 배지 - Lm, Lp, Lb 및 Ni 각 균주를 24시간 30 ~ 35 °C 혐기 공정_생균수, pH, VitB2 - 저온(-4°C), dark, 1개월 내 VitB2/B9 안정, 동결건조 후 저온(-4 ~ -70°C), dark, 6 ~ 12 개월 내 VitB2/B9 안정

	비타민B2/B9 파라바이오틱스 효능평가 (협동1: kfri)	BSF_VitB2/B9 in vitro 분석	- 질환세포주 모델 확립	- 염증확인을 위한 대장상피세포인 Caco-2와 대식세포인 RAW264.7로 각각 세포 모델을 구축 - 실제 체내 대장과 비슷한 환경을 위해 Caco-2 세포와 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 co-culture system을 확립함
			- 세포내 안전성	- 표준품 Vit B2/B3/B9 및 동애등에 발효 추출물 소재 5종에서 HLLm 고농도 처리군(800 µg/ml)을 제외하고는 세포독성 없음을 확인함
			- 세포내장염인자	- 동애등에 발효 추출물 중 Lm, Lp 소재에서 iNOS, COX-2, TNF-a, IL-6 및 NO를 분석하여 장내 염증억제 효능을 확인함
			- 장염유발 지표해석	- 다양한 염증인자를 분석결과 동애등에 발효 추출물 중 Lm, Lp를 후보소재로 도출함
	BSF_비타민B2 /B9 파라바이오틱스 사료 안정화 (협동2:SignalCare)	BSF원료 안정화 및 사료 안전성	- 전처리,원료공급	- 동애등에 사육 위탁 후 공급 - 동애등에 유충 절식, 수세, 건조, 분쇄, 저장 및 원료 공급 라인 - 열풍건조, 마이크로웨이브 방법 비교
			- 사료 제형화	- HiLAB의 분말 사료 - HiLAB의 Tablet 사료 - HiLAB 액상 사료 진행
			-반려견 기호도 조사	- 소형견, 중형견, 대형견 대상 선발 - 10 -30 % 첨가에 따른 기호도 조사 - HiLAB 섭취에 따른 몸무게 등 확인 - 반려견 행동 조사
	2차 년도 (2022년)	생물강화공정 기반 비타민B2/B9 소재화 기술 (세부:MIRE)	BSF_VitB2/B9 대량생산 및 특성분석	- BSF_VitB 대량 생산 및 안정성
- 비타민B2, B3 및 B9 정량분석				- BSF 추출발효물 내 4종의 유산균 비타민B2군(리보플라빈, FMN, FAD) HPLC, ELISA 정량 - BSF 유산균 발효물과 MRS 발효물 내의 비타민 B2, B9 비교
- 인간장내세포내 비타민B2/B9 생산				- 인간장세포(Caco-2세포)내의 선발 유산균의 부착능 분석 - HiLAB 4종의 유산균의 인간장세포내의 비타민B2군(리보플라빈, FMN, FAD), B9 생산능 확인
- 인간장내세포내 항균기능 분석				- 병원균 3종(<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus sp</i> , <i>Listeria sp</i>)의 항균 효능

비타민B2/B9 파라바이오틱스 효능평가 (협동1: kfri)	BSF_VitB2/B9 in vivo 분석	- 대장염 질환 동물 모델 확립	- 급성대장염(14일)과 만성대장염 (29일) 모델을 확립하고 동태등에 발효물 소재 중 Lm, Lp의 장내염증 완화 효능을 확인함
		- 도출 소재의 간이 독성 평가	- 도출된 소재 Lm, Lp에서 DSS로 유도한 군보다 높은 체중을 유지하였으며 실험기간 육안적으로 관찰한 이상이 없는 것으로 나타나 독성이 없음을 확인함
		- 도출 소재의 항염지표분석	- Lm, Lp에서 장내 염증인자 및 염증성 사이토카인 발현량이 감소됨을 확인으로써 염증수준이 완화됨을 확인함
		- 도출된 소재의 장내 군집 및 장내환경 개선 효능평가	- 질병활성도인 DAI나 대장 조직, 조직 무게, 대장의 조직학적 변화를 분석한 결과, Lm, Lp소재 투여 시 설사 및 혈변을 억제하고 대장 및 비장 내 염증수준이 완화됨 - 점막 장벽 온전성인 ZO-1, occludin, claudin이 개선됨을 확인함으로써 장 건강에 효능이 있는 소재임을 확인함 - 분변 검사를 통하여 Lm, Lp 소재 투여 시 유익균이 증가됨을 확인함
BSF_비타민B2 /B9 파라바이오틱스 사료 안정화 (협동2:SignalC are	BSF_VitB2/B9 사료 개발	- HiLAB 제품화	- “사랑하개”분말 사료 시제품 제형 제조 - HiLAB 4종의 유산균 활용 - HiLAB 파라바이오틱스(BSF_Para) 첨가 등 시험 제조
		- 성분 분석 및 안정성 분석	- 일반성분분석, 곰팡이 등 미생물 분석 - 유해성분 분석
		-BSF_ParaBiotics 제품 안전성 분석	- 시제품 섭취 반려견 건강 검진 및 분변 육안 검사 진행
		BSF_ParaBiotics 제품 안전성 분석	- 시제품 성분 검사 및 자가 품질 검사 진행

2. 연구개발 결과

(1) 동애등에 추출발효물의 발효공정 및 항균활성 조건 분석

동애등에 유충 추출물의 유산균 발효물을 제조하는 데 있어, 유산균 발효를 효과적으로 일어나게 할 수 있는 최적조건으로서 탄소원 첨가 필요 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 확인하기 위해, 60°C에서 1~6시간 저온 살균할 경우 기타 미생물이 발견되어 121°C에서 5분간 멸균하여 제조한 동애등에 유충의 열수 추출물 (Hotwater extracted *H. illucens*; HeHi 5%, w/v) 1L와 첨가 탄소원으로서는 덱스트로스 (D-glucose, Sigma, USA) 20 g (시험배지 1), 갈락토스 (D-glucose, Sigma, USA) 20 g (시험배지 2), 만노스 (D-glucose, Sigma, USA) 20 g (시험배지 3), 수크로스 (D-glucose, Sigma, USA) 20 g (시험배지 4), 글루코스 (D-glucose, Sigma, USA) (시험배지 5) 20 g, 스타치 (한울식품, 한국) (시험배지 6) 10g 을 각각 혼합한 배지 6개를 준비하였다 (2%; w/v). 대조군으로 일반적으로 사용하는 유산균 배지인 DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) 배지, HeHi 1 L만 있는 배지를 준비하였고, 그 정보를 하기 표 4에 나타내었다. 8종의 배지에 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종의 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30°C에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 상기 LAB Counts는 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1 (v/v)%로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 그 결과, 또한, 갈락토스, 만노스, 수크로스, 또는 글루코스를 첨가한 배지는 탄소원을 첨가하지 않은 경우보다 유산균의 성장을 증가시킴을 확인할 수 있었다(data not shown). 이후 동애등에 유충의 열수 추출물 또는 실시예 3에 따른 동애등에 유충의 열수 추출물의 유산균 발효물의 항균활성을 평가하였다. 상기 항균활성 평가 대상 미생물은 비브리오균 (*Listonella anguillarum*), 연쇄구균 (*Streptococcus parauberis* 및 *Streptococcus iniae*)을 사용하였다. 탄소원 첨가 배지에 균주를 개별적으로 접종한 시료는 대조군인 대조시료 1보다 조금 작은 억제 환이 생성되었다. 공접종을 진행한 시료 들은 균주를 개별적으로 접종한 시료들보다 전체적으로 억제 환이 동일하거나 넓었고, 0.5% yeast extract를 첨가한 시료들은 대조군인 대조시료 1과 유사하거나 조금 작은 억제 환이 생겨 항균성이 높아짐이 확인되었다. 따라서 동애등에 유충의 열수 추출물 (HeHi)에 0.5% yeast extract와 탄소원이 첨가된 배지에 유산균 4종에 의한 발효 과정을 거치면서 각 유산균과 유사한 수준으로 시험균주 (리스토넬라 안굴라룸, 스트렙토코쿠스 파라우베리스 및 스트렙토코쿠스 이니에)에 대한 항균 효과를 획득함을 확인하였다.

비브리오균 및 연쇄구균은 어류에 있어서 비브리오증 및 연쇄구균증과 같은 질병을 유발하는 어병균으로 알려져 있는 바, 본 발명의 동애등에 추출물의 유산균 발효물에 대해 유산균 접종 후 발효단계를 거침으로써, 어병균 등에 대해 우수한 항균효과를 가짐을 확인할 수 있었고, 동애등에의 추출물의 유산균 발효물 (HiLAB)은 질병에 대한 예방, 개선 또는 치료용 물질로 사용할 수 있음을 확인하였다 (Fig 1)

		BSF extracted in hot water						
LAB	Lp3LI (TS33.90,DSW/TS95)							
Nitrogen	No	0.5% yeast						
Carbohydrate	No	No	2% Glucose	2% Galactose	2% Dextrose	2% Sucrose	1% Starch	2% Mannose
<i>V. anguillarum</i>								
<i>S. parauberis</i>								
<i>S. iniae</i>								

Fig 1. Antibacterial activity according to adding yeast extract and carbon.

(2) 비타민B2, B9 생산 유산균의 확인

해수에서 분리한 유산균 중 항균효과가 있는 100여종의 유산균 중 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 4종에서 6균주씩 총 24종에 있어서 게놈상의 rib 유전자와 fol 유전자 및 24시가 MRS배지에서 배양 후 발현하는 rib 유전자와 fol 유전자를 RT-PCR로 확인하여 유용 균주를 선별하였다. NCBI에서 확인한 *L. lactis*와 *L. brevis*는 ribA, ribB, ribD, ribF, ribH 5개 유전자, *L. plantarum*는 ribA, ribB, ribD, ribF, ribH, ribC, ribT 7개 유전자, *L. mesenteroides* ribA, ribB, ribD, ribF, ribH, ribT, ribU 7개 유전자를 대상으로 프라이머를 제작하여 사용하였다(Table 1). 또한 엽산의 경우는 *L. lactis*와 *L. brevis*는 ribA, ribB, ribD, ribF, ribH 5개 유전자, *L. plantarum*는 ribA, ribB, ribD, ribF, ribH, ribC, ribT 7개 유전자, *L. mesenteroides* ribA, ribB, ribD, ribF, ribH, ribT, ribU 7개 유전자를 대상으로 프라이머를 제작하여 사용하였다(Table 2).

4종의 유산균 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 24 균주에 대한 게놈 DNA와 24시간 배양 유산균에서 분리한 cDNA를 대상으로 RT-PCR를 분석하였다(Fig 3). 이를 바탕으로 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*의 유전자를 표로 정리하였다. 게놈과 cDNA에서 확인된 리보플라빈 유전자와 엽산유전자가 발현을 대상으로 각 종별로 유효균주를 8균주를 선별하고 그 중 본 연구에서는 각 종별 4균주를 선별하여 동애등에 추출 발효물의 비타민B2와 B9 생산 균주로 이용하였다. 선별된 균주는 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P)로 한국미생물센터에 기탁하였다.

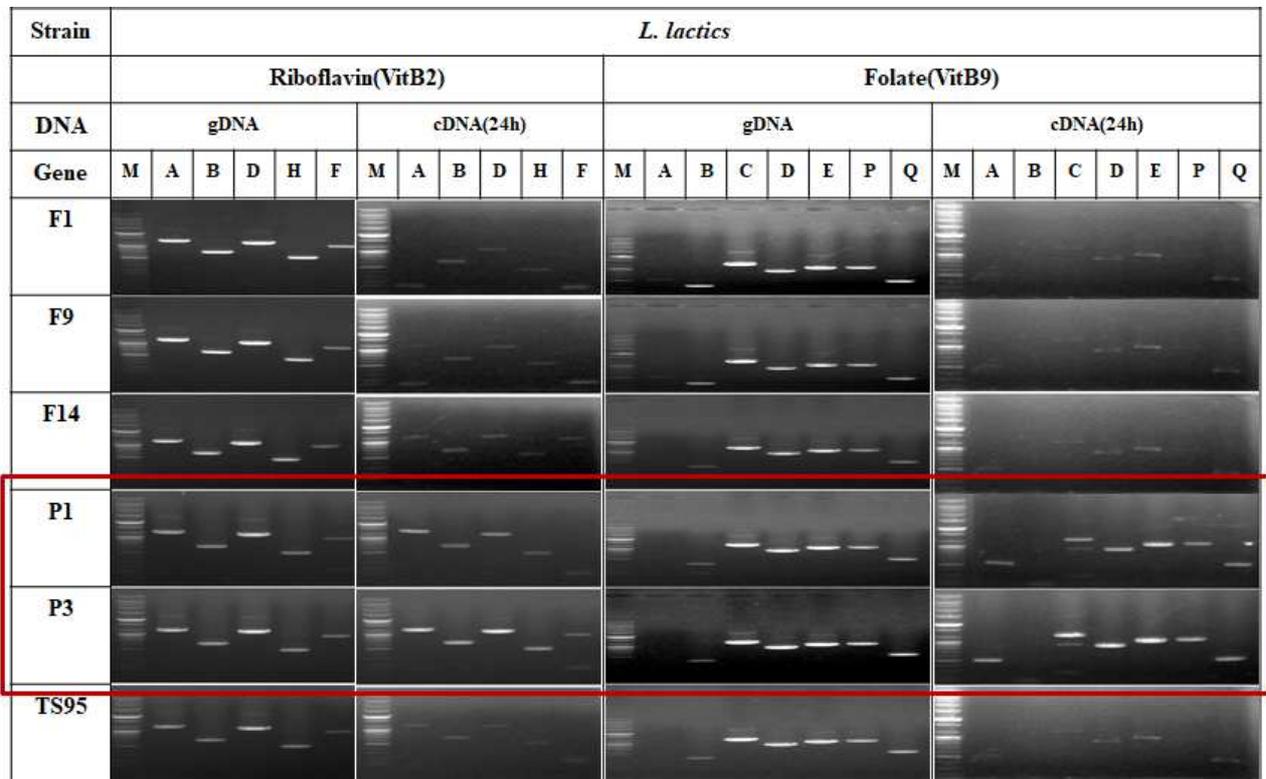


Fig 3 . A, Identification of the vitamin B2 and B9 biosynthesis genes in genomic DNA and cDNA of each 6 strain *L. lactis* by PCR.

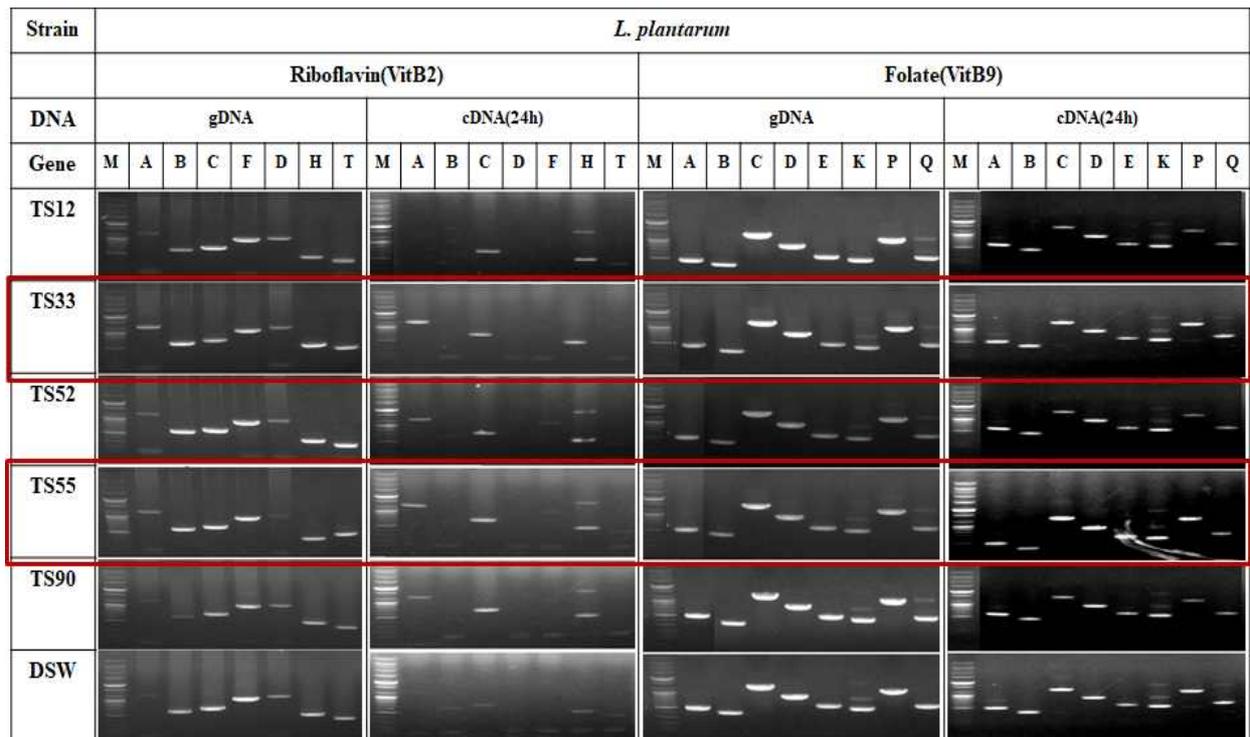


Fig 4 . A, Identification of the vitamin B2 and B9 biosynthesis genes in genomic DNA and cDNA of each 6 strain *L. plantarum* by PCR.

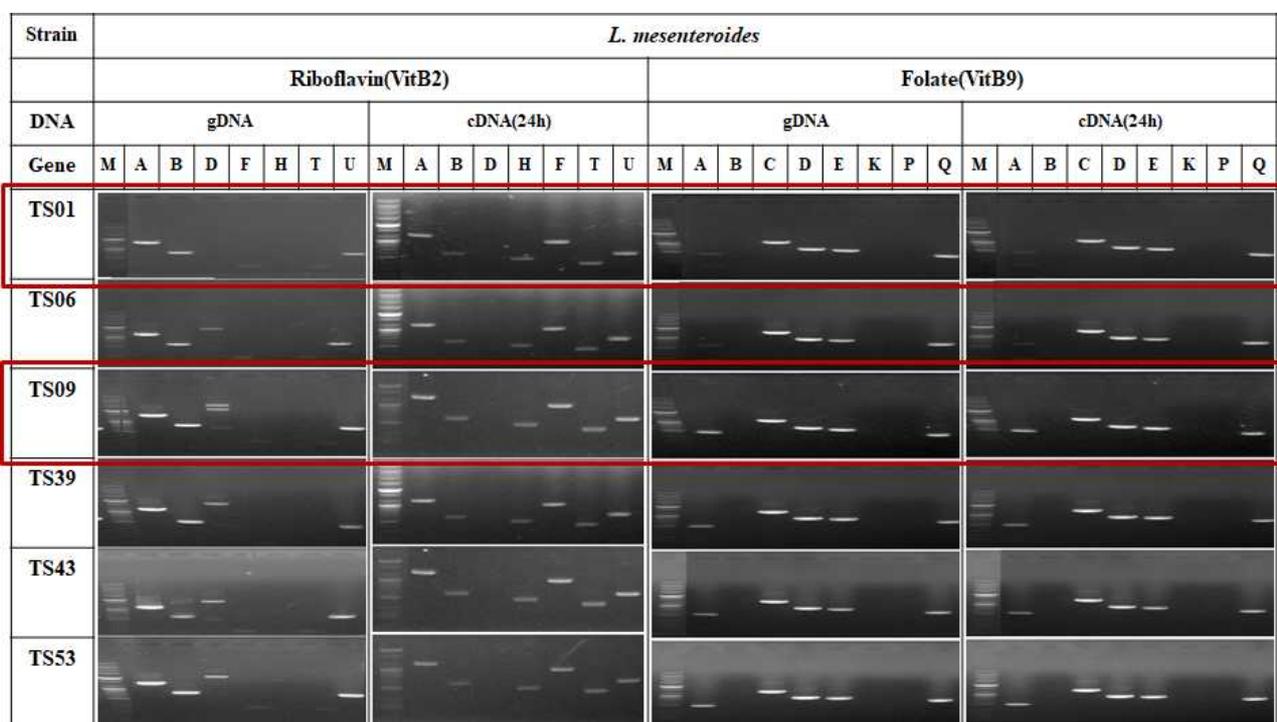


Fig 5 . A, Identification of the vitamin B2 and B9 biosynthesis genes in genomic DNA and cDNA of each 6 strain *L. mesenteroides* by PCR.

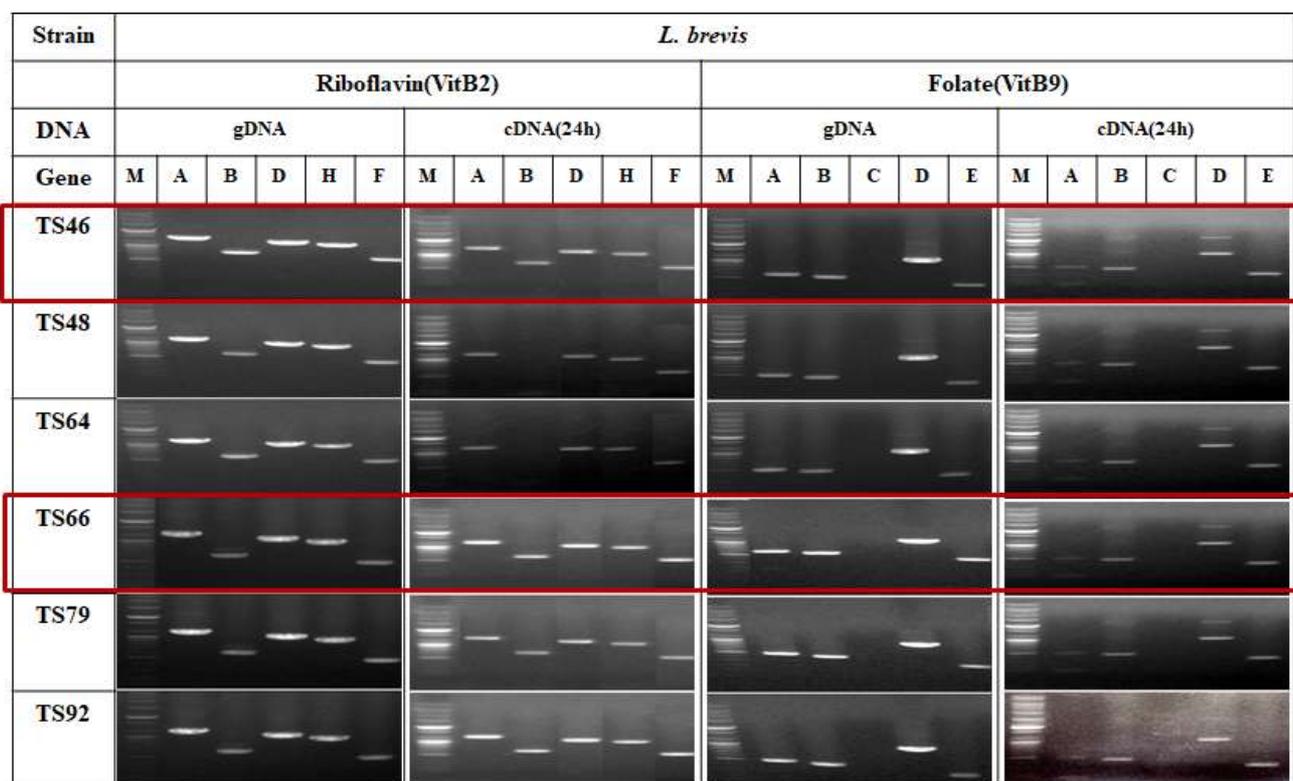


Fig 6 . A, Identification of the vitamin B2 and B9 biosynthesis genes in genomic DNA and cDNA of each 6 strain *L. brevis* by PCR.

Table 3. Presence of the riboflavin (VitB2) biosynthesis genes in gDNA of different LAB strains

Strain	No	Rib GENE(bp)							
		ribA	ribB	ribD(G)	ribF	ribH	ribC	ribT	ribU
<i>Lactococcus lactis</i>	Size(bp)	1,197	651	1,089	903	465	-	-	-
	F1	++	++	++	+	++			
	F9	++	++	++	+	++			
	F14	++	++	++	+	++			
	P1	++	++	++	+	++			
	P3	++	++	++	+	++			
	TS95	++	++	++	+	++			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Size(bp)	1,215	603	1,068	1,002	474	684	384	-
	TS12	+	+	+	+++	+	++	+	
	TS33	+	++	+	+++	++	++	++	
	TS52	+	++	+	+++	++	++	++	
	TS55	+	++	+	+++	+	++	++	
	TS90	+	+	+	+++	+	++	+	
	DSW	+	++	+	+++	+	++	+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Size(bp)	1,194	591	1,035	951	471	-	375	591
	TS01	++	+	+	++	+		+	+
	TS06	++	+	+	++	+		+	+
	TS09	++	+	+	++	+		+	+
	TS39	++	+	+	++	+		+	+
	TS43	++	+	+	++	+		+	+
	TS53	++	+	+	++	+		+	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	Size(bp)	1,200	606	1,054	948	474	-	-	-
	TS46	+++	++	+++	+++	+			
	TS48	+++	++	+++	+++	+			
	TS64	+++	++	+++	+++	+			
	TS66	+++	++	+++	+++	+			
	TS79	+++	++	+++	+++	+			
	TS92	+++	++	+++	+++	+			

Table 4. Presence of the folate (VitB9) biosynthesis genes in gDNA of different LAB strains

Strain	No	fol GENE(bp)							
		dfrA	folB	folC	folD	folE	folK	folP	folQ
<i>Lactococcus lactis</i>	Size(bp)	492	351	1,284	885	1,050	-	1,074	498
	F1	-	+	+++	++	++		+	+
	F9	-	+	+++	++	++		+	+
	F14	-	+	+++	++	++		+	+
	P1	-	+	+++	++	++		+	+
	P3	-	+	+++	++	++		+	+
	TS95	-	+	+++	++	++		+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Size(bp)	492	369	1,335	861	570	513	1,149	588
	TS12	++	++	+++	+++	++	++	+++	++
	TS33	++	++	+++	+++	++	++	+++	++
	TS52	++	++	+++	+++	++	++	+++	++
	TS55	++	++	+++	+++	++	++	+++	++
	TS90	++	++	+++	+++	++	++	+++	++
	DSW	++	++	+++	+++	++	++	+++	++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Size(bp)	492	387	1,314	846	786	507	1,080	618
	TS01	-		++	++	++			+
	TS06	-		++	++	++			+
	TS09	+		++	++	++			+
	TS39	+		++	++	++			+
	TS43	+		++	++	++			+
	TS53	+		++	++	++			+
<i>Lactobacillus brevis</i>	Size(bp)	492	444	1,323	972	327	-	-	-
	TS46	+	+		+++	+			
	TS48	+	+		+++	+			
	TS64	+	+		+++	+			
	TS66	+	+		+++	+			
	TS79	+	+		+++	+			
	TS92	+	+		+++	+			

Table 5. Presence of the riboflavin biosynthesis genes in cDNA of different LAB strains at 24h fermentation

Strain	No	Rib GENE(bp)							
		ribA	ribB	ribD(G)	ribF	ribH	ribC	ribT	ribU
<i>Lactococcus lactis</i>	Size(bp)	1,197	651	1,089	903	465	-	-	-
	F1	+	+	+	-	+			
	F9	-	+	+	+	-			
	F14	-	+	+	+	-			
	P1	+	+	+	+	-			
	P3	++	-	++	+	-			
	T895	+	+	+	+	+			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Size(bp)	1,215	603	1,068	1,002	474	684	384	-
	T812	-	-	-	-	+	++	+	
	T833	+	-	-	+	+	++	+	
	T852	+	-	-	+	+	++	-	
	T855	+	-	-	+	+	++	+	
	T890	+	-	-	-	+	++	-	
	DSW	-	+	-	-	+	+	+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Size(bp)	1,194	591	1,035	951	471	-	375	591
	T801	++	+	-	++	+		+	++
	T806	++	+	-	++	+		+	+
	T809	++	+	-	++	+		+	++
	T839								
	T843								
	T853	++	+	-	++	+		+	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	Size(bp)	1,200	606	1,054	948	474	-	-	-
	T846	++	+	++	++	++			
	T848	+	-	+	+	+			
	T864	+	-	+	+	+			
	T866	++	+	++	++	++			
	T879	++	+	++	++	++			
	T892	++	+	++	++	++			

Table 6. Presence of the folate biosynthesis genes in cDNA of different LAB strains

Strain	No	fol GENE(bp)							
		dfraA	folB	folC	folD	folE	folK	folP	folQ
<i>Lactococcus lactis</i>	Size(bp)	492	351	1,284	885	1,050	-	1,074	498
	F1								
	F9								
	F14								
	P1	+	-	+	+	++		+	+
	P3	+	-	++	++	++		+	+
	T895	-	-	-	+	+		-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Size(bp)	492	369	1,335	861	570	513	1,149	588
	T812	+	+	+	++	+	++	+	+
	T833	+	+	++	++	+	++	++	+
	T852	+	+	+	++	+	+	+	+
	T855	+	+	++	++	+	+	++	+
	T890	+	+	+	++	+	+	+	+
	DSW	+	+	+	++	+	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Size(bp)	492	387	1,314	846	786	507	1,080	618
	T801	+		+	+	+			+
	T806	+		+	+	+			+
	T809	+		++	++	+			+
	T839								
	T843								
	T853	+		++	++	+			+
<i>Lactobacillus brevis</i>	Size(bp)	492	444	1,323	972	327	-	-	-
	T846	+	+	-	+	+			
	T848	+	+	-	+	+			
	T864	+	+	-	+	+			
	T866	+	+	-	+	+			
	T879	+	+	-	+	+			
	T892	+	+	-	+	+			

(3) 동애등에추출물의 유산균 발효에 의한 가바 및 비타민B2, B9 생산 확인

동애등에 추출물의 유산균 발효물 (HiLAB)의 가바 함량의 증가 여부를 확인하기 위해, 상기 실시 예 4의 시료 1f 내지 6f의 제조방법과 실질적으로 동일한 방법으로. HiHe에 0.5% yeast extract 첨가 후 탄소원으로 2%의 덱스트로스, 갈락토스, 만노스, 수크로스를 각각 첨가하고 락토바실러스 플란타룸 및 락토코쿠스 락티스 4종으로 공접종하고 30℃에서 24시간 배양하여 유산균 발효물을 준비하였다. 상기 yeast extract는 효모 유래 질소원으로 사용 된 것으로 가바생성 촉진 및 수율증가 효과가 있다. GABA 함량을 분석한 결과, 탄소원을 첨가하지 않은 대조시료 3에서는 가바 생성이 확인되지 않았으나, 탄소원을 첨가하여 얻은 시험시료 7 내지 10의 분석결과에서는 가바를 나타내는 band가 더 진하게 나타나, 가바의 함량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히, 갈락토스 또는 수크로스를 첨가하여 배양한 유산균 발효물 시료 에서 가바 함량의 증가는 더 높게 나타났다 (Fig 2a).

각 배양액에는 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P)

4종의 유산균을 접종하여 30℃에서 호기 상태로 24, 36, 48시간 동안 유산균을 배양(발효)하였고, 24 시간의 유산균 배양 완료 후 유산균을 3,000-5,000 rpm으로 10-15분 원심분리 하여 상청액내에서 유산균을 초음파 30초 후 상청액을 수집한 후 TLC 시료로 이용하였다. 용매 분리 후 결과는 UV램프로 발색하여 확인하였으며, Fig 2b에 발색 결과 사진을 나타내었다. Fig 2b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 4종의 유산균 동애등에 추출발효물 모두에서 비타민B2가 확인되었으며, *L. plantarum* 추출 배양물에서 비타민B2가 더 뚜렷하게 확인되었으나, 비타민B9의 경우는 비타민B2와 rf값이 유사하여 비교가 어려웠다.

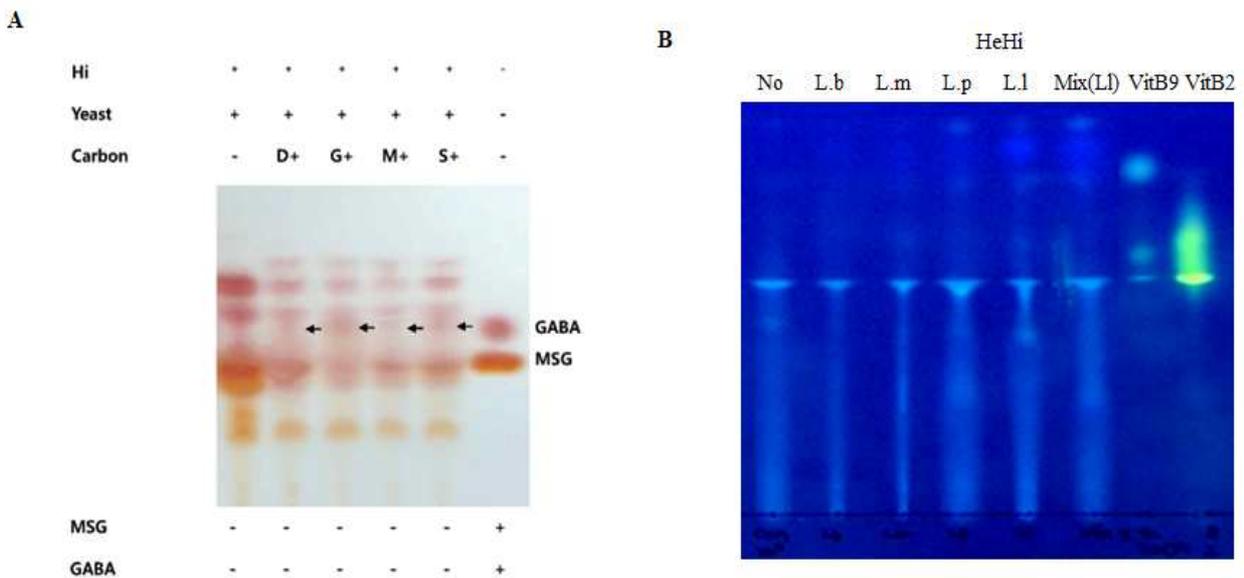


Fig 7. A, Presence of the vitaminB and K biosynthesis genes among different LAB strains (NCBI). B, TLC of Vitamin B2 and B9 obtained after fermented by each lactic acid bacteria in HeHi (hot water extracted *H. illucense*).

(4) 선발된 8종 유산균의 동애등에추출물에서의 생균수와 pH 확인

동애등에 유충 추출물의 유산균 발효물을 제조하는 데 있어, 유산균 발효를 효과적으로 일어나게 할 수 있는 최적조건으로서 탄소원 첨가 필요 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 상기 8종의 배지에 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 8종의 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30°C에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였으며, 측정결과를 나타냈다. 상기 LAB Counts는 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1 (v/v)%로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 앞서 확인한 배지 조건으로 5%의 동애등에 분말과 2% 갈락토스, 0.5%의 효모를 첨가한 배지는 MRS 일반 유산균 배지와 비교하여 유산균의 성장과 pH를 확인하였다(Fig 8). 각 균주별로 48시간에는 생균수가 조금 낮아지는 것은 동애등에 배지와 MRS배지에서 유사하였으나 평균적으로는 동애등에 배지에서 성장이 10^{11} ~ 10^{12} 가 유지되었다. 배지의 pH는 MRS가 3.9~4.1인가에 비해 동애등에 배지는 48시간 배양까지 6.35~7.02로 유지되었다(Fig8A, 8B)

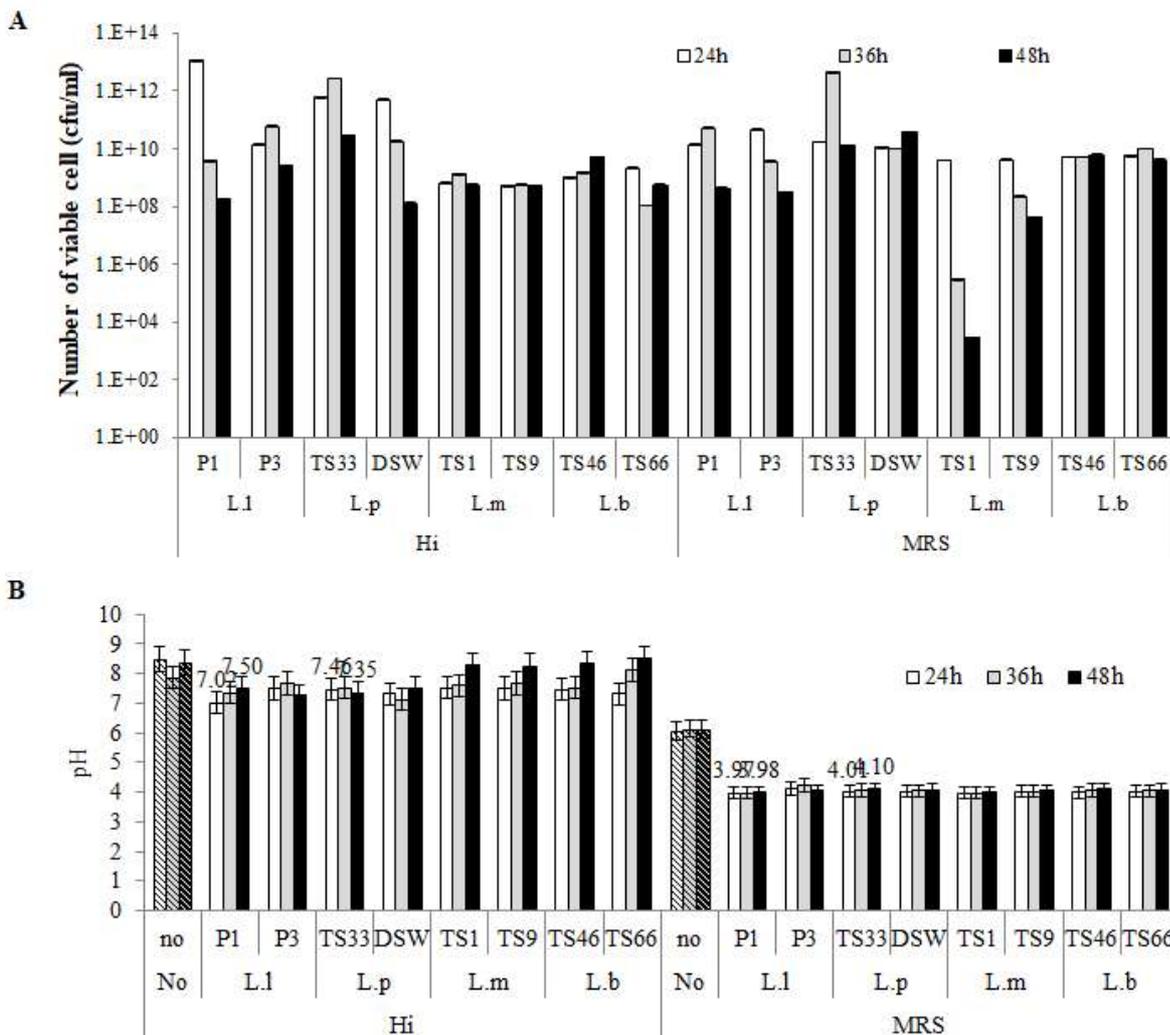


Fig 8. Viable cell (A) and pH value of selected lactic acid bacteria in *H. illucens* (experiment; without carbon and protein) and MRS (control) media according to culture time.

(5) 선발된 8종 유산균의 동애등에추출물에서의 비타민B2, B9 생산조건 확인

동애등에 유충 추출물의 유산균 발효물을 제조하는 데 있어, 유산균 발효를 효과적으로 일어나게 할 수 있는 최적조건으로서 탄소원 첨가 필요 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 동애등에 추출물 배지에 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 8종 의 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30°C에서 24, 36, 48시간동안 배양하였다. 24, 36, 48시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였으며, 측정결과를 나타냈다. 상기 LAB Counts는 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1 (v/v)%로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 앞서 확인한 배지 조건으로 5%의 동애등에 분말과 2% 갈락토스, 0.5%의 효모를 첨가한 배지는 MRS 일반 유산균 배지와 비교하여 비타민B2와 B9을 ELISA에 의해 확인하였다(Fig 9). 리보플라빈의 경우는 각 균주 중 *L. mesenteroides*인 MIRE_TS01이동애등에 배지와 MRS배지에서 높게 확인되었다(Fig 9A). 엽산의 경우는 각 균주 중 *L. mesenteroides*인 MIRE_TS01이 동애등에 배지에서 높게 확인되었다(Fig 9B). MRS배지에서 24시간 높게 나오는 것은 배지특성에 의한 것으로 생각된다.

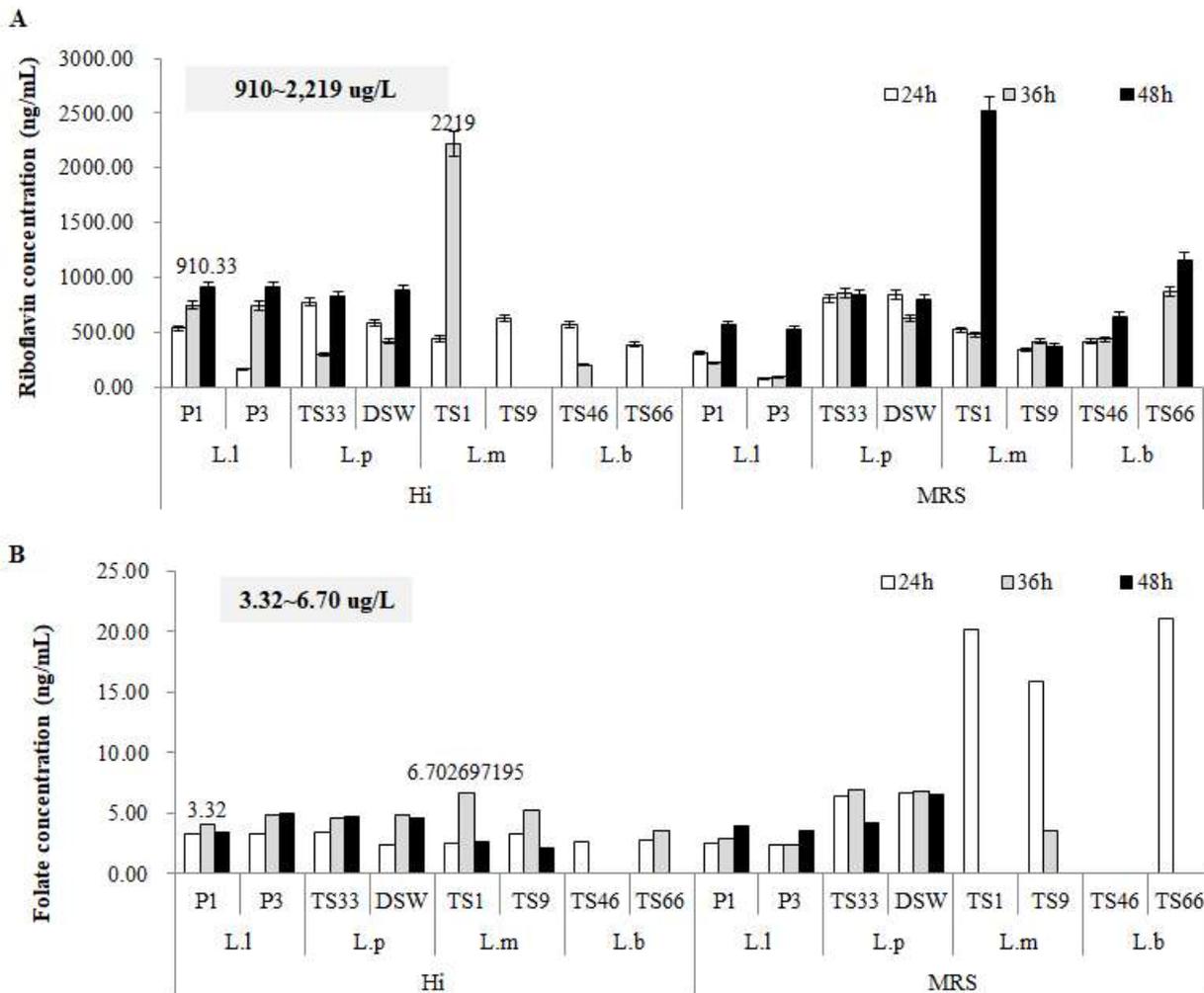


Fig 9. Vitamin B2 and B9 concentration of selected lactic acid bacteria in *H. illucens* (experiment; without carbon and protein) and MRS (control) media according to culture time using ELISA.

(6) 비타민B2/B9 생산증가를 위한 공배양 조건 검토

리보플라빈과 엽산생산 관련 유전자를 가지는 4종의 유산균 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 4종과 이를 혼합해 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30°C에서 24시간동안 배양하였다. 배양의 비율은 표7에 제시한 것으로 각각 다르게 조절하였다.

Table 7. Combinations of LAB assessed in vitro for their ability to increase production of riboflavin and folate and the viability in *H. illucens* media

Combination	Ratio			
	<i>L. lactis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. brevis</i>
A	10	90	0	0
B	10	0	90	0
C	10	0	0	90
D	10	45	45	0
E	10	45	0	45
F	10	0	45	45
G	10	50	20	20
H	10	30	30	30
I	25	25	25	25

24시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였으며, 측정결과를 나타냈다. 상기 LAB Counts는 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1 (v/v)%로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 앞서 확인한 배지 조건으로 5%의 동애등에 분말과 2% 갈락토스, 0.5%의 효모를 첨가한 배지는 MRS 일반 유산균 배지와 비교하여 유산균수를 확인하였다(Fig 10). 각 균주는 동애등에 배지에서 평균적으로는 10^{11} - 10^{14} cfu/ml 가 유지되었고 혼합의 경우가 균체수가 10^{14} cfu/ml 정도로 확인되었다(Fig10A). 이에 유산균을 혼합하여 자란 생균수를 16s rDNA와 각 유전자의 rib 또는 fol 프라이머로 확인한 결과 99% 이상이 *L. lactis*로 확인되었다. 4종 공배양의 경우(I) *L. lactis*가 81.85%, *L. mesenteroides* 13.6%, *L. brevis* 4.6%이며 *L. plantarum*은 확인되지 않았다(Fig10B).

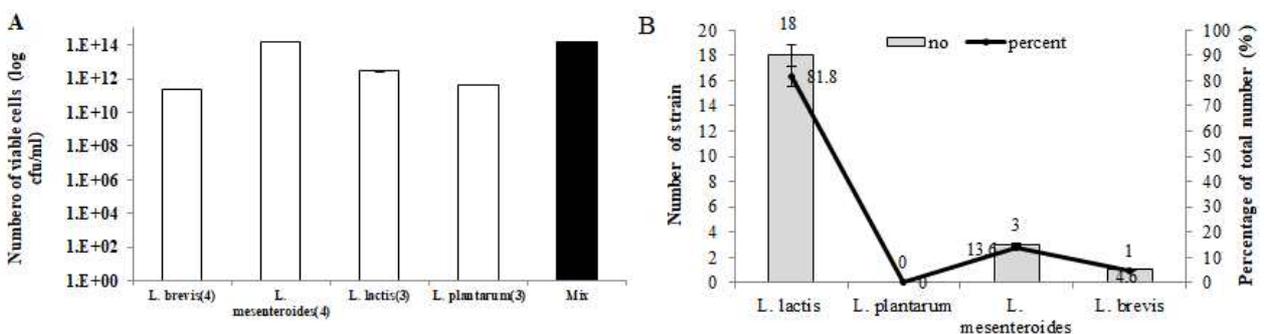


Fig. 10 Viable cell (A) and number of strina (B; combination I) of different ratio co-inoculated LAB strain in *H. illucens* (experiment; without carbon and protein).

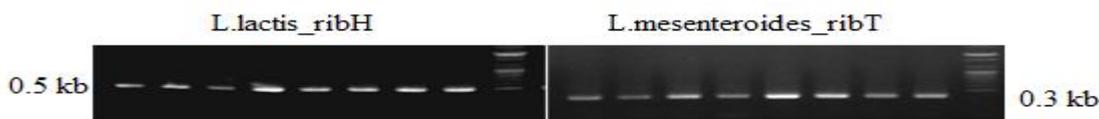


Fig. 11 Identification by PCR analysis using ribH and ribT primer in different ratio co-inoculated 4 LAB strain

(7) 동애등에 추출물에서의 선발4종 유산균의 생균수와 pH 확인

선발된 8균주 중 우수균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종하고 30°C에서 24, 48시간동안 배양하였다. 24, 48시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였으며, 측정결과를 나타냈다. 상기 LAB Counts는 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1 (v/v)%로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 앞서 확인한 배지 조건으로 5%의 동애등에 분말과 2% 갈락토스, 0.5%의 효모를 첨가한 배지는 MRS 일반 유산균 배지와 비교하여 유산균의 성장과 pH를 확인하였다(Fig 12). 각 균주별로 48시간에는 생균수가 조금 낮아지는 것은 동애등에 배지와 MRS 배지에서 유사하였으나 평균적으로는 동애등에 배지에서 성장이 10^{11} – 10^{12} cfu/ml 가 유지되었다. 2개, 3개, 4개 균주를 앞서 제시한 Table 7에 제시한 것과 같이 유산균을 접종 한 경우 단일종보다 혼합의 경우가 균체수가 10^{14} – 10^{16} cfu/ml 으로 높았다(Fig12A). MRS 배지에서는 동애등에 배지에 비교해 혼합균주일 때 더 낮은 생균수로 관찰되었다. 배지의 pH는 MRS가 3.9~4.1인 것에 비해 동애등에 배지는 48시간 배양까지 6.35~7.02로 유지되었다(Fig12A, 122B) 이는 앞서 8종의 결과와 동일하였다.

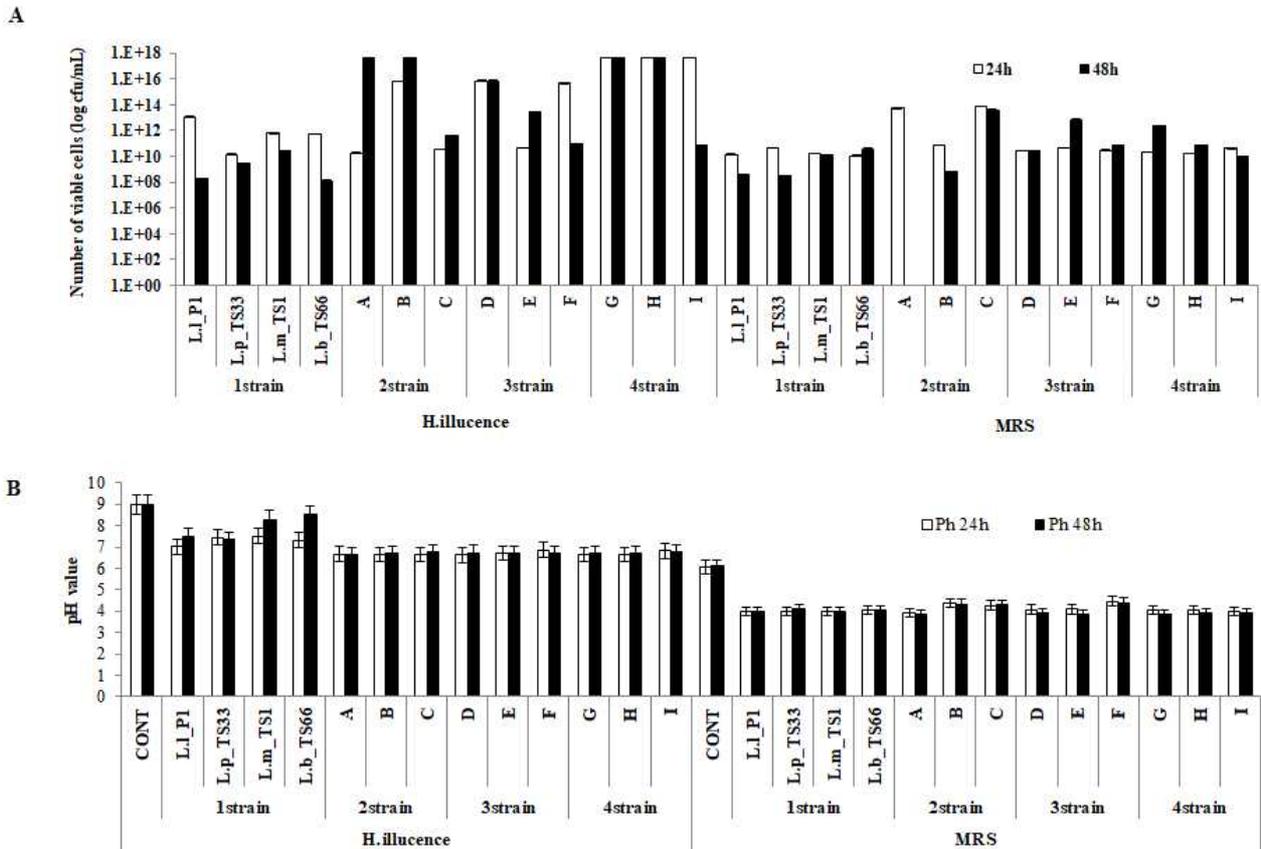


Fig. 12 Viable cell (A) and pH value of different ratio co-inoculated LAB strain in *H. illucens* (experiment; without carbon and protein) and MRS (control) media according to culture time.

(8) 동애등에 추출물에서의 선발4종 유산균의 질소원에 따른 pH 및 생균수

동애등에 추출물 배지에 질소원으로 효모를 0.5, 1, 2, 3, 4, 5% 로 접종하여 pH와 생균수를 각 유산균에 대해 조사하였다. 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종하고 30°C에서 24 시간동안 배양하였다. 24 시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였으며, 측정결과를 나타냈다. 상기 LAB Counts는 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1 (v/v)%로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 앞서 확인한 배지 조건으로 5%의 동애등에 분말과 효모를 각 농도별로 첨가한 배지는 MRS 일반 유산균 배지와 비교하여 유산균의 성장과 pH를 확인하였다(Fig 13). 각 균주별로 24시간에는 생균수가 조금 낮아지는 것은 동애등에 배지와 MRS배지에서 유사하였으나 평균적으로는 동애등에 배지에서 성장이 10^9 - 10^{11} cfu/ml 가 유지되었다. 고농도의 효모를 더한 경우 저농도 경우 보다 균체수가 10^{10} - 10^{11} cfu/ml 으로 높았다(Fig13A). 동애등에 배지는 배양하지 않은 배지는 24시간 배양에서 *L. lactis*의 경우 효모 무첨가는 $4E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $2E+10$, 1% 효모 첨가는 $5E+09$, 2% 효모 첨가는 $7E+09$, 3% 효모 첨가는 $2E+10$, 4% 효모 첨가는 $1E+10$, 5% 효모 첨가는 $2E+10$ 이었다. *L. plantarum*의 경우 효모 무첨가는 $4E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $2E+10$, 1% 효모 첨가는 $5E+09$, 2% 효모 첨가는 $7E+09$, 3% 효모 첨가는 $2E+10$, 4% 효모 첨가는 $1E+10$, 5% 효모 첨가는 $2E+10$ 이었다. *L. mesenteroides*의 경우 효모 무첨가는 $4E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $2E+10$, 1% 효모 첨가는 $5E+09$, 2% 효모 첨가는 $7E+09$, 3% 효모 첨가는 $2E+10$, 4% 효모 첨가는 $1E+10$, 5% 효모 첨가는 $2E+10$ 이었다. *L. brevis*의 경우 효모 무첨가는 $4E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $2E+10$, 1% 효모 첨가는 $5E+09$, 2% 효모 첨가는 $7E+09$, 3% 효모 첨가는 $2E+10$, 4% 효모 첨가는 $1E+10$, 5% 효모 첨가는 $2E+10$ 이었다.

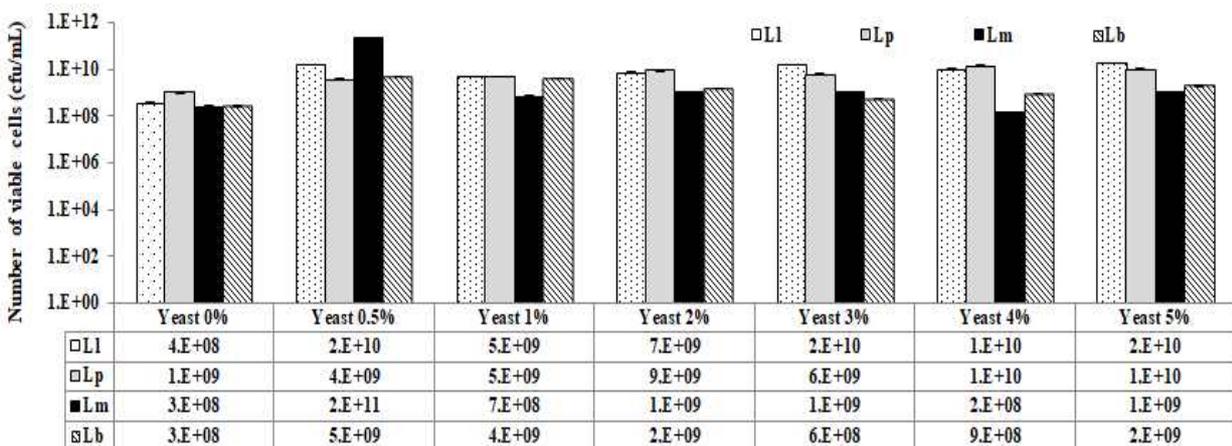


Fig. 13 The number of viable cells of 4 LAB strains according to the percentage adding yeast in *H. illucens* media at 30°C fermentation during 24h.

MRS 배지에서는 동애등에 배지에 비교해 혼합균주일 때 더 낮은 생균수로 관찰되었다. 배지의 pH는 MRS가 3.9~4.1인 것에 비해 동애등에 배지는 배양하지 않은 배지는 pH 8.81 정도로 알칼리였으나 24시간 배양에서 *L. lactis*의 경우 효모 무첨가는 pH 8.81, 0.5% 효모 첨가는 pH 7.85, 1% 효모 첨가는 pH 5.04, 2% 효모 첨가는 pH 4.82, 3% 효모 첨가는 pH 4.85, 4% 효모 첨가는 pH 5.38, 5% 효모 첨가는 pH 5.46 이었다. *L. plantarum*의 경우 효모 무첨가는 pH 6.68, 0.5% 효모 첨가는 pH 7.10, 1% 효모 첨가는 pH 5.21, 2% 효모 첨가는 pH 5.47, 3% 효모 첨가는 pH 5.47, 4% 효모 첨가는 pH 5.24, 5% 효모 첨가는 pH 5.72 이었다. *L. mesenteroides*의 경우 효모 무첨가는 pH 7.13, 0.5% 효모 첨가는 pH 6.08, 1% 효모 첨가는 pH 6.47, 2% 효모 첨가는 pH 6.27, 3% 효모 첨가는 pH 6.51, 4% 효모 첨가는 pH 6.53, 5% 효모 첨가는 pH 6.70 이었다. *L. brevis*의 경우 효모 무첨가는 pH 6.94, 0.5% 효모 첨가는 pH 7.12, 1% 효모 첨가는 pH 5.79, 2% 효모 첨가는 pH 6.20, 3% 효모 첨가는 pH 6.24, 4% 효모 첨가는 pH 6.34, 5% 효모 첨가는 pH 6.42 이었다.

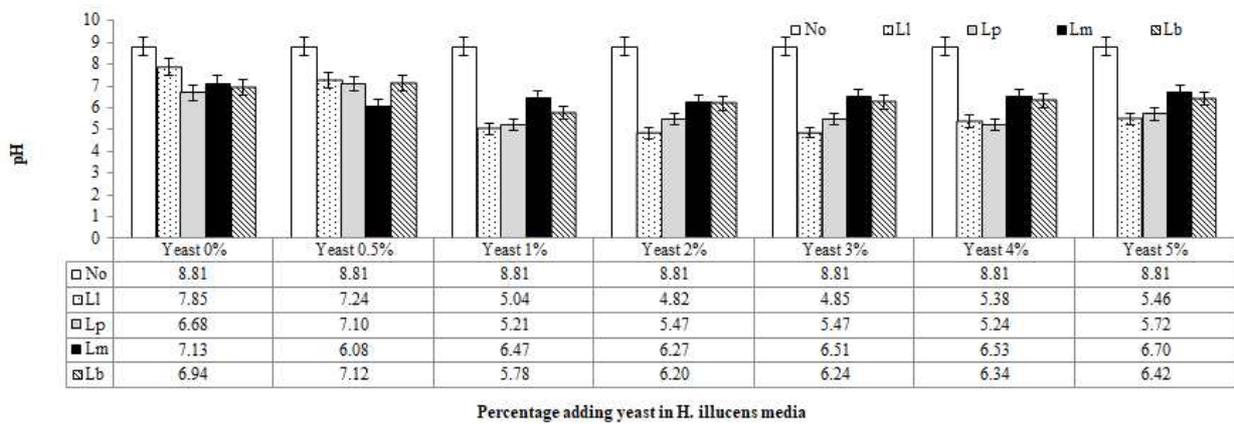


Fig. 14 pH of 4 LAB strains according to the percentage adding yeast in *H. illucens* media at 30°C fermentation during 24h.

(9) 동애등에 추출물에서의 선발4종 유산균의 질소원에 따른 비타민B2의 정량

동애등에 추출물 배지에 질소원으로 효모를 0.5, 1, 2, 3, 4, 5% 로 접종하여 pH와 생균수를 각 유산균에 대해 조사하였다. 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30°C에서 24 시간동안 배양하였다. 24 시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양물에서 비타민B2 농도를 HPLC와 ELISA에 의해 분석하였다 (Fig 15). 동애등에 배지에 0.5% 효모 첨가는 0.99 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.97 mg/100g, 2% 효모 첨가는 3.98 mg/100g, 3% 효모 첨가는 5.56 mg/100g, 4 % 효모 첨가는 7.90 mg/100g, 5 % 효모 첨가는 9.85 mg/100g 이었다. 동애등에 *L. lactis*의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 0.97 mg/100g, 1% 효모 첨가는 0.08 mg/100g, 2 % 효모 첨가는 0.32 mg/100g, 3 % 효모 첨가는 1.61 mg/100g, 4 % 효모 첨가는 4.34 mg/100g, 5 % 효모 첨가는 5.90 mg/100g 이었다. *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 0.44 mg/100g, 1% 효모 첨가는 0.28 mg/100g, 2% 효모 첨가는 0.93 mg/100g, 3% 효모 첨가는 2.49 mg/100g, 4% 효모 첨가는 3.52 mg/100g, 5% 효모 첨가는 5.90 mg/100g 이었다. *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 0.97 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.82 mg/100g, 2 % 효모 첨가는 3.53 mg/100g, 3% 효모 첨가는 5.10 mg/100g, 4 % 효모 첨가는 13.07 mg/100g, 5% 효모 첨가는 7.92 mg/100g 이었다. *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 0.92 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.52 mg/100g, 2% 효모 첨가는 3.56 mg/100g, 3% 효모 첨가는 5.94 mg/100g, 4% 효모 첨가는 6.70 mg/100g, 5% 효모 첨가는 8.69 mg/100g 이었다 (Fig 15A). 이는 비타민 B2 ELISA의 결과와 유사하였다.(Fig 15B).

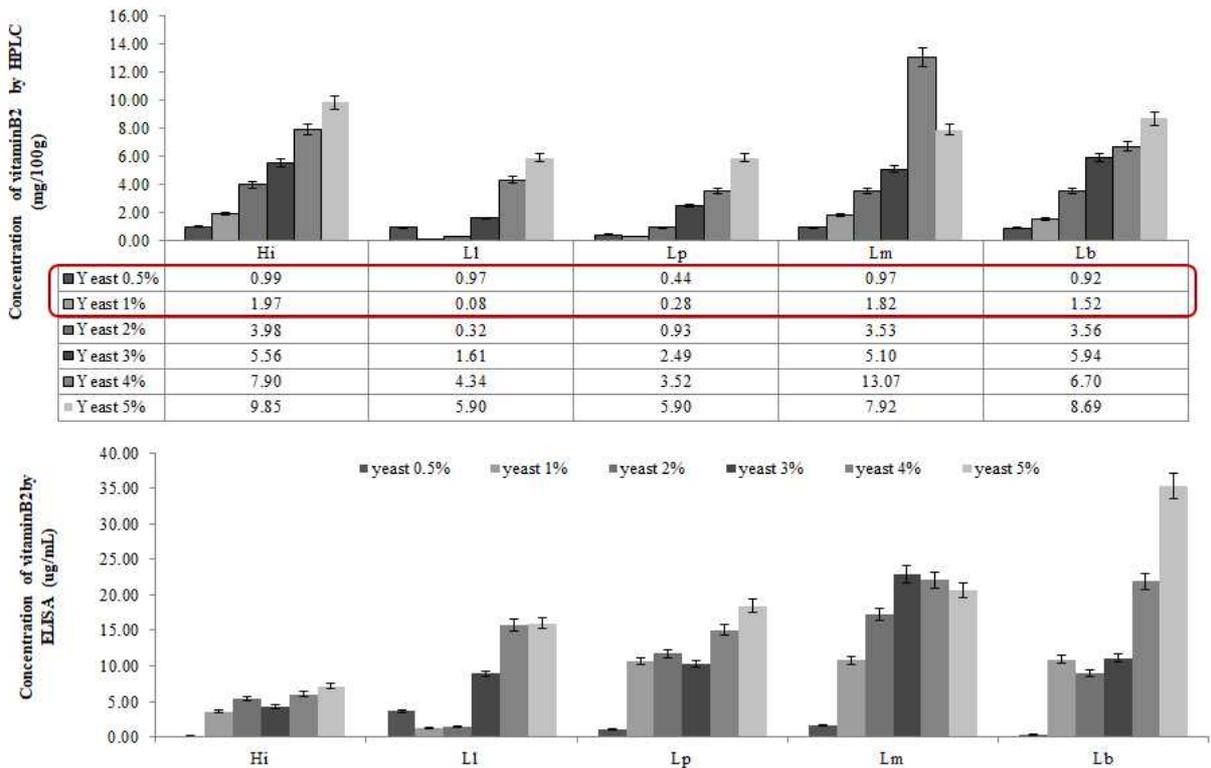


Fig. 15 The concentration of vitaminB2 according to the addition of yeast of LAB used this study in H.illucens media at 30°C fermentation during 24h

(10) 동애등에 추출물에서의 선발4종 유산균의 질소원에 따른 비타민B9의 정량

동애등에 추출물 배지에 질소원으로 효모를 0.5, 1, 2, 3, 4, 5% 로 접종하여 pH와 생균수를 각 유산균에 대해 조사하였다. 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30°C에서 24 시간동안 배양하였다. 24 시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물에서 비타민B9 농도를 ELISA에 의해 분석하였다 (Fig 15). 동애등에 배지에서 비타민B9은 측정이 되지 않았다. 동애등에 *L. lactis*의 24시간 배양의 경우 0.5% - 3% 효모 첨가는 0.0 ng/mL, 4% 효모 첨가는 0.12 ng/mL, 5% 효모 첨가는 0.0 ng/mL, 이었다. *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 0.0 ng/mL, 1% 효모 첨가는 0.91 ng/mL, 2% 효모 첨가는 0.81 ng/mL, 3% 효모 첨가는 0.92 ng/mL, 4% 효모 첨가는 0.76 ng/mL, 5% 효모 첨가는 0.27 ng/mL 이었다. *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 0.67 ng/mL, 1% 효모 첨가는 0.73 ng/mL, 2% 효모 첨가는 0.0 ng/mL, 3% 효모 첨가는 1.67 ng/mL, 4% 효모 첨가는 1.12 ng/mL, 5% 효모 첨가는 0.0 ng/mL 이었다. *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 0.0 ng/mL, 1% 효모 첨가는 1.51 ng/mL, 2% 효모 첨가는 0.06 ng/mL, 3% 효모 첨가는 0.0 ng/mL, 4% 효모 첨가는 0.70 ng/mL, 5% 효모 첨가는 1.51 ng/mL 이었다.(Fig 16). 이는 비타민 B9 HPLC의 분석은 측정되지 않아 ELISA에 의한 값을 제시한다(Fig 16).

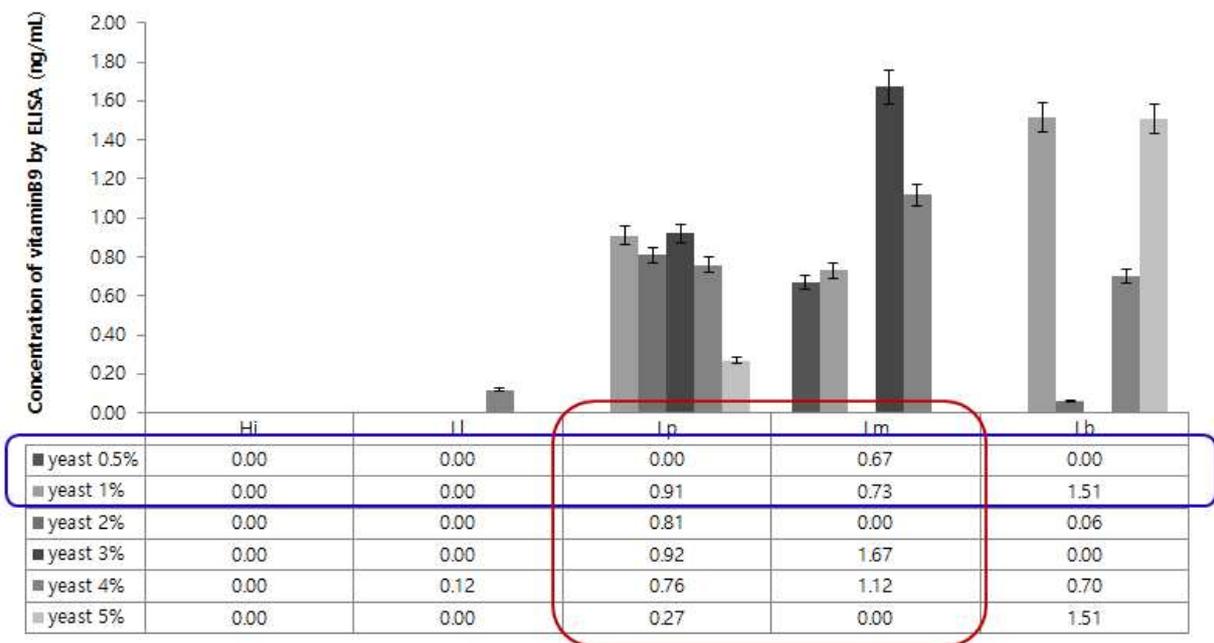


Fig. 16 The concentration of vitaminB9 according to the addition of yeast of LAB used this study in *H.illucens media* at 30°C fermentation during 24h

(11) 동애등에 추출물에서의 선발4종 유산균의 효모 첨가에 따른 비타민B2/B9 최적화

동애등에 추출물 배지에 질소원으로 효모를 0.5, 1, 2, 3, 4, 5% 로 접종하여 pH와 생균수, 비타민B2와 B9의 결과를 종합하면 2% 이상의 효모에서 유래하는 비타민의 영향으로 유산균 성장과 리보플라빈과 엽산의 생산에 유의하지 않다고 판단되어 이를 0.5%와 1%의 효모 첨가에 대한 온도 따른 비타민B2와 B9 생산에 대한 분석을 진행하였다(Fig 17).

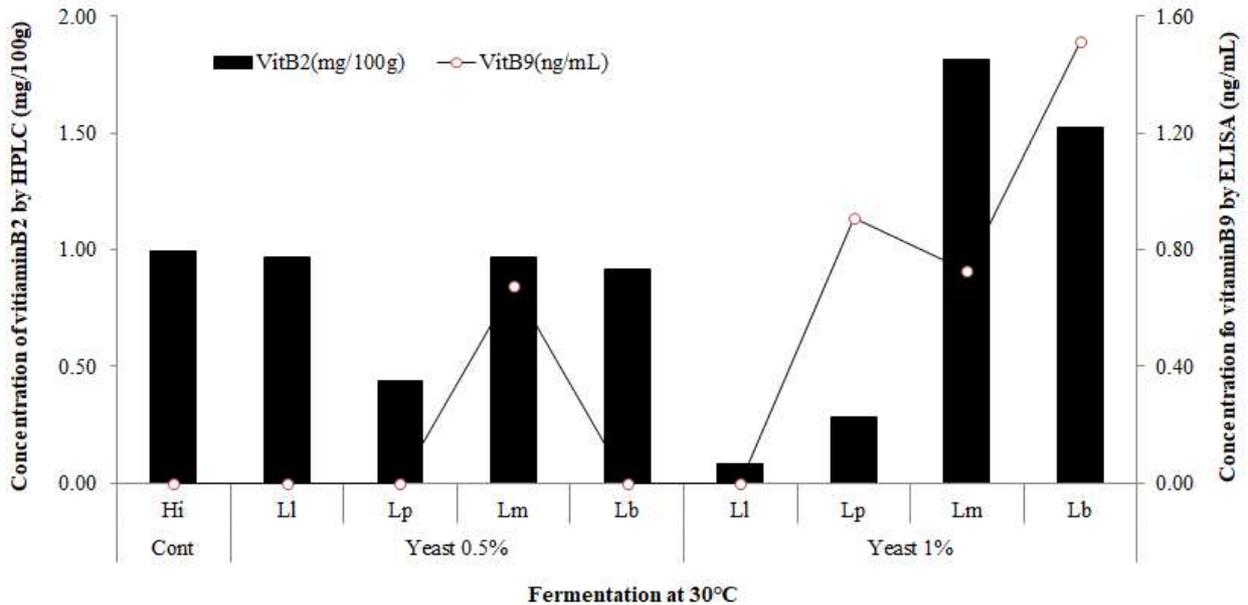


Fig. 17 The concentration of vitaminB2 and vitaminB9 according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed that VitaminB2 was safe even after sterilization. **L. brevis / L. lactis and L. plantarum / L. mesenteroides**

(12) 동애등에 추출물에서의 선발4종 유산균의 배양 온도에 따른 pH 및 생균수

동애등에 추출물 배지에 질소원으로 효모를 0.5%, 1% 로 접종하고 온도의 변화에 따른 pH와 생균수를 각 유산균에 대해 조사하였다. 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고, 25, 30, 35, 37°C에서 24 시간동안 배양하였다. 24 시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였으며, 측정결과를 나타냈다. 상기 LAB Counts는 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1 (v/v)%로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 앞서 확인한 배지 조건으로 5%의 동애등에 분말과 효모를 각 농도별로 첨가한 배지는 MRS 일반 유산균 배지와 비교하여 유산균의 성장과 pH를 확인하였다(Fig 18, 19). 각 균주별로 24시간에는 생균수가 조금 낮아지는 것은 동애등에 배지와 MRS배지에서 유사하였으나 평균적으로는 동애등에 배지에서 성장이 10^9 - 10^{11} cfu/ml가 유지되었다. 25°C 경우 30°C 이상의 배양 온도 경우 보다 균체수가 10^{10} - 10^{11} cfu/ml로 낮았다(Fig18). 동애등에 배지의 25°C 의 24시간 배양에서 *L. lactis*의 경우는 $3E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $5E+09$, 1% 효모 첨가는 $7E+09$ 이었다. 30 °C 의 24시간 배양에서 *L. lactis*의 경우는 $4E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $2E+10$, 1% 효모 첨가는 $1E+10$ 이었다. 35°C 와 37°C의 24시간 배양에서 *L. lactis*의 경우는 30°C 와 유사한 생균수로 측정되었다. *L. plantarum*의 경우 $1E+09$, 0.5% 효모 첨가는 $4E+09$, 1% 효모 첨가는 $3E+09$ 이었다. 30 °C 의 24시간 배양에서 $1E+09$, 0.5% 효모 첨가는 $4E+09$, 1% 효모 첨가는 $2E+10$ 이었다. 35°C 와 37°C의 24시간 배양에서 *L. plantarum*의 경우는 30°C 와 유사한 생균수로 측정되었다. *L. mesenteroides*의 경우 $3E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $2E+11$, 1% 효모 첨가는 $3E+08$ 이었다. 30 °C의 24시간 배양에서 $3E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $2E+11$, 1% 효모 첨가는 $2E+11$ 이었다. 35°C와 37°C 의 24시간 배양에서 *L. mesenteroides*의 경우는 30°C 와 유사한 생균수로 측정되었다. *L. brevis*의 경우 $2E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $2E+09$, 1% 효모 첨가는 $2E+09$ 이었다. 30°C 의 24시간 배양에서 $3E+08$, 0.5% 효모 첨가는 $5E+09$, 1% 효모 첨가는 $3E+09$ 이었다. 35°C 와 37°C의 24시간 배양에서 *L. brevis*의 경우도 30°C 와 유사한 생균수로 측정되었다.

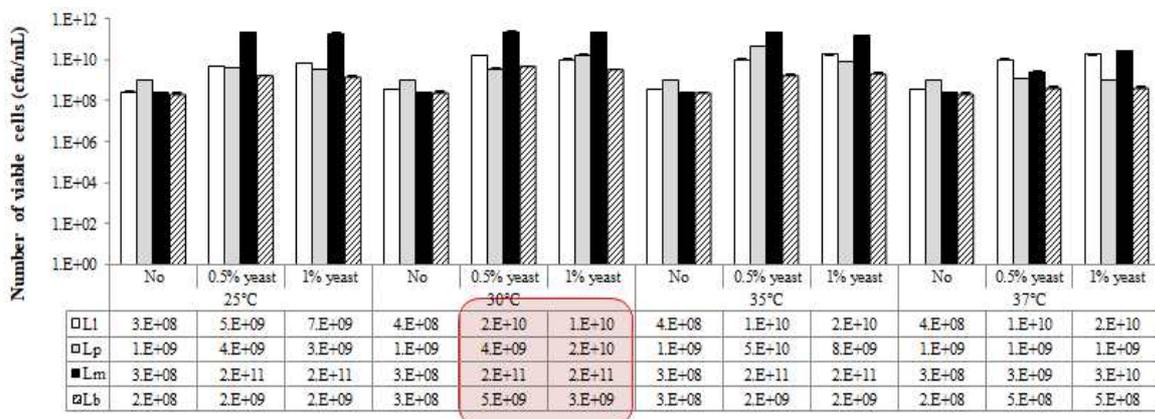


Fig 18 The number of viable cells and pH of 4 LAB strains according to temperature in *H. illucens* media at 30°C fermentation during 24h.

동애등에 추출물 배지에 질소원으로 효모를 0.5 %, 1% 로 접종하고 온도의 변화에 따른 pH를 각 유산균에 대해 조사하였다. 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고, 25, 30, 35, 37 °C에서 24 시간동안 배양하였다. 24 시간 후의 pH를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였으며, 측정결과를 나타냈다(Fig 19). 배지의 pH는 MRS가 3.9~4.1인 것에 비해 동애등에 배지는 배양하지 않은 배지는 pH 8.81 정도로 알칼리였으나 24시간 배양에서 *L. lactis*의 25°C 경우 0.5% 효모 첨가는 pH 7.17, 1% 효모 첨가는 pH 7.16, *L. plantarum*의 경우 효모 0.5% 효모 첨가는 pH 7.15, 1% 효모 첨가는 pH 7.13, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 pH 6.11, 1% 효모 첨가는 pH 6.01, 및 *L. brevis*의 경우 효모 0.5% 효모 첨가는 pH 7.21, 1% 효모 첨가는 pH 7.0이었다(Fig 19). 30 °C *L. lactis* 경우 0.5% 효모 첨가는 pH 7.24, 1% 효모 첨가는 pH 7.12, *L. plantarum*의 경우 효모 0.5% 효모 첨가는 pH 7.10, 1% 효모 첨가는 pH 6.87, *L. mesenteroides*의 경우 6.08, 1% 효모 첨가는 pH 5.88, 및 *L. brevis*의 경우 효모 0.5% 효모 첨가는 pH 7.12, 1% 효모 첨가는 pH 7.07이었다. 35 °C *L. lactis* 경우 0.5% 효모 첨가는 pH 7.24, 1% 효모 첨가는 pH 7.12, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 pH 7.10, 1% 효모 첨가는 pH 6.87, *L. mesenteroides*의 경우 6.08, 1% 효모 첨가는 pH 5.88, 및 *L. brevis*의 경우 효모 0.5% 효모 첨가는 pH 7.09, 1% 효모 첨가는 pH 7.08 이었다. 37°C *L. lactis* 경우 0.5% 효모 첨가는 pH 7.14, 1% 효모 첨가는 pH 7.13, *L. plantarum*의 경우 효모 0.5% 효모 첨가는 pH 6.76, 1% 효모 첨가는 pH 6.52, *L. mesenteroides*의 경우 pH 6.07, 1% 효모 첨가는 pH 5.95, 및 *L. brevis*의 경우 효모 0.5% 효모 첨가는 pH 7.09, 1% 효모 첨가는 pH 7.08이었다. *L. mesenteroides*의 경우는 25 - 30°C에서 pH 6.07 정도였으나 37°C pH 6.99로 이는 유산균의 성장의 영향에 기인하는 것으로 판단된다. 그 외 3종은 대략 pH 7.07 정도의 중성을 유지하였다.

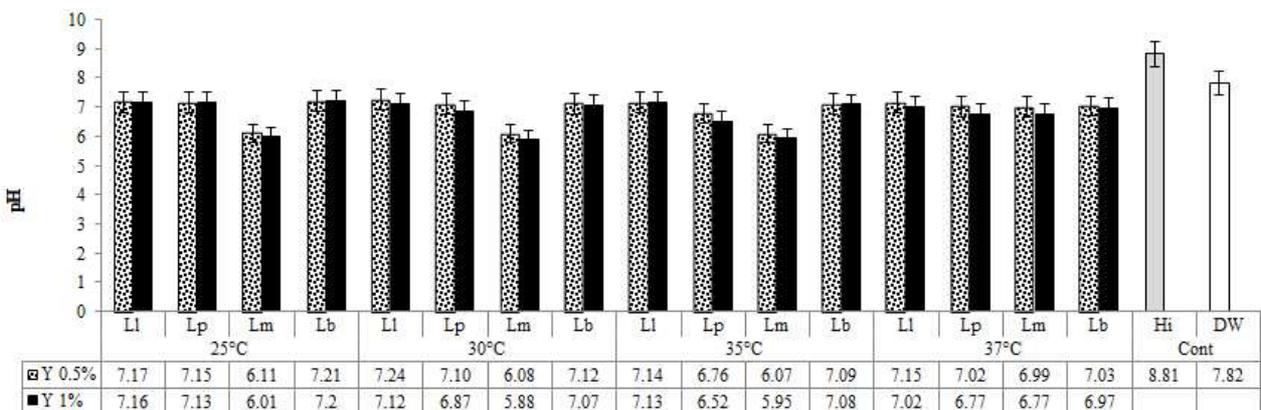


Fig 19. Change of pH according to the addition of yeast in Hi media and different temperature for vitamin B2 production

(13) 동애등에 추출물에서의 질소원과 온도에 따른 비타민B2의 생산 우수균주 선발

동애등에 추출물 배지에 N/C로 2% 갈락토스와 효모 0.5, 1% 로 접종하여 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발 하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 25, 30, 35, 37°C에서 24 시간동안 배양하고 최적 발효물에서 비타민B2 농도를 HPLC에 의해 분석하였다 (Fig 20). 멸균증류수에 2% 갈락토스와 효모 0.5%, 1% 로 접종한 경우에는 각 0.59, 1.4 mg/100g의 농도로 측정되었다. 동애등에 분말과 추출물에서는 각 0.24와 0.82 mg/100g이었다. 동애등에 배지에 0.5% 효모 첨가는 0.99 mg/100g이었다. 무첨가의 경우는 0.5 %와 1%의 경우 0.66와 1.48 mg/100g이었던 것에 반해 25 °C 동애등에 *L. lactis*의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.53 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.49 mg/100g이었다. *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.38 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.20 mg/100g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.63 mg/100g, 1% 효모 첨가는 2.28 mg/100g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.29 mg/100g, 1% 효모 첨가는 2.29 mg/100g 이었다(Fig 20).

동애등에 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.54 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.45 mg/100g이었다. *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.38 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.46 mg/100g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.92 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.88 mg/100g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.94 mg/100g, 1% 효모 첨가는 2.24 mg/100g 이었다(Fig 20).

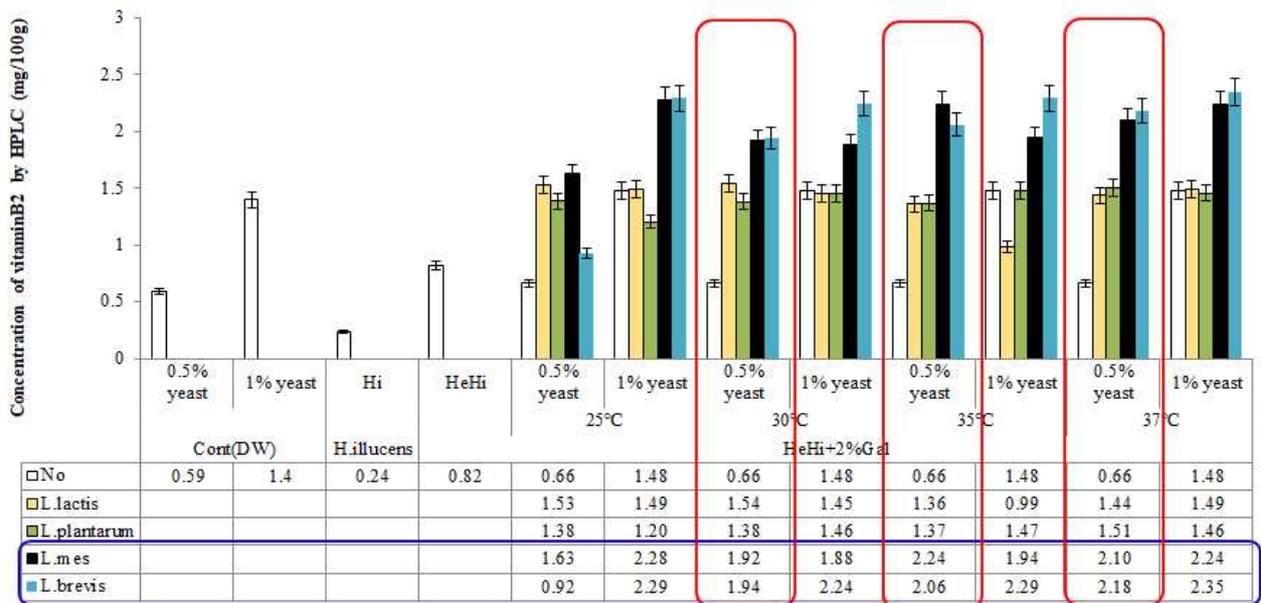


Fig 20 The concentration of vitaminB2 and vitaminB9 according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed thatVitaminB2 was safe even after sterilization. **L. brevis / L. lactis and L. plantarum / L. mesenteroides**

동애등에 *L. lactis*의 35 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.36 mg/100g, 1% 효모 첨가는 0.99 mg/100g이었다. *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.37 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.47 mg/100g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.24 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.94 mg/100g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.06 mg/100g, 1% 효모 첨가는 2.29 mg/100g 이었다(Fig 20).

동애등에 *L. lactis*의 37 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.44 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.49 mg/100g이었다. *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.51 mg/100g, 1% 효모 첨가는 1.46 mg/100g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.10 mg/100g, 1% 효모 첨가는 2.24 mg/100g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.18 mg/100g, 1% 효모 첨가는 2.35 mg/100g 이었다(Fig 20).

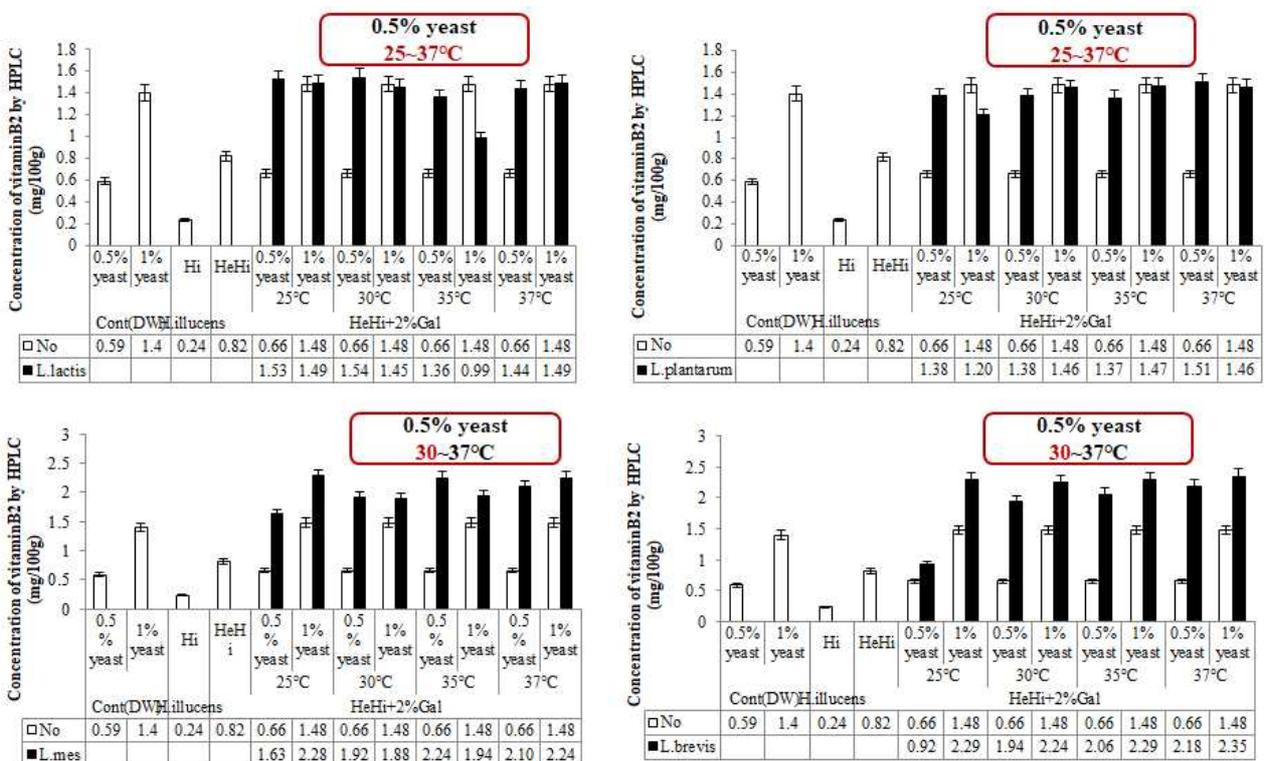


Fig 21 The concentration of vitaminB2 and vitaminB9 according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed that VitaminB2 was safe even after sterilization. ***L. brevis* / *L. lactis* and *L. plantarum* / *L. mesenteroides***

위의 결과를 종합하여 각 유산균주에 따른 비타민B2 생산에 적합한 N/C와 배양온도를 Fig 21에 요약하였다. 사용균주의 적합한 효모농도는 0.5%로 확인되었으며, *L. lactis*와 *L. plantarum*는 25 - 37°C, *L. mesenteroides*, *L. brevis*의 경우 30 - 37°C의 온도 범위가 적합하게 확인되었다.

(14) 동애등에 추출 배양물 N/C 조건에서 비타민B2 정량분석

앞서 실험 결과를 기반으로 동애등에 추출물 배지에 N/C로 2 % 갈락토스와 효모 0.5%를 접종하여 선발된 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1, KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS33, MIRE_TS55), *L. mesenteroides*(MIRE_TS01, MIRE_TS09), *L. brevis*(MIRE_TS46, MIRE_TS66) 4종을 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 25, 30, 35, 37°C에서 24 시간동안 배양하고 최적 발효물에서 비타민B2 농도를 HPLC에 의해 분석하였다 (Fig 22). 멸균증류수에 2% 갈락토스와 효모 0.5%를 접종한 경우에는 각 0.59 mg/100g의 농도로 측정되었다. 비타민B2의 경우 동애등에 분말과 추출물에서는 각 0.24와 0.82 mg/100g 이었다. 동애등에 배지에 0.5% 효모 첨가는 0.99 mg/100g이었다. 무첨가의 경우는 0.5 %의 경우 0.66 mg/100g이었던 것에 반해 25 °C 동애등에 *L. lactis*의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.53 mg/100g, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.38 mg/100g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.63 mg/100g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.29 mg/100g 이었다(Fig 22).

동애등에 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.54 mg/100g, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.38 mg/100g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.92 mg/100g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.94 mg/100g 이었다(Fig 22). 35 °C의 24시간 배양의 경우 *L. lactis*의 0.5% 효모 첨가는 1.36 mg/100g, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.37 mg/100g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.92 mg/100g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.94 mg/100g, 1% 효모 첨가는 2.24 mg/100g 이었다(Fig 22). 37°C의 24시간 배양의 경우 *L. lactis*의 0.5% 효모 첨가는 1.44 mg/100g, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.51 mg/100g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.10 mg/100g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.18 mg/100g 이었다(Fig 22).

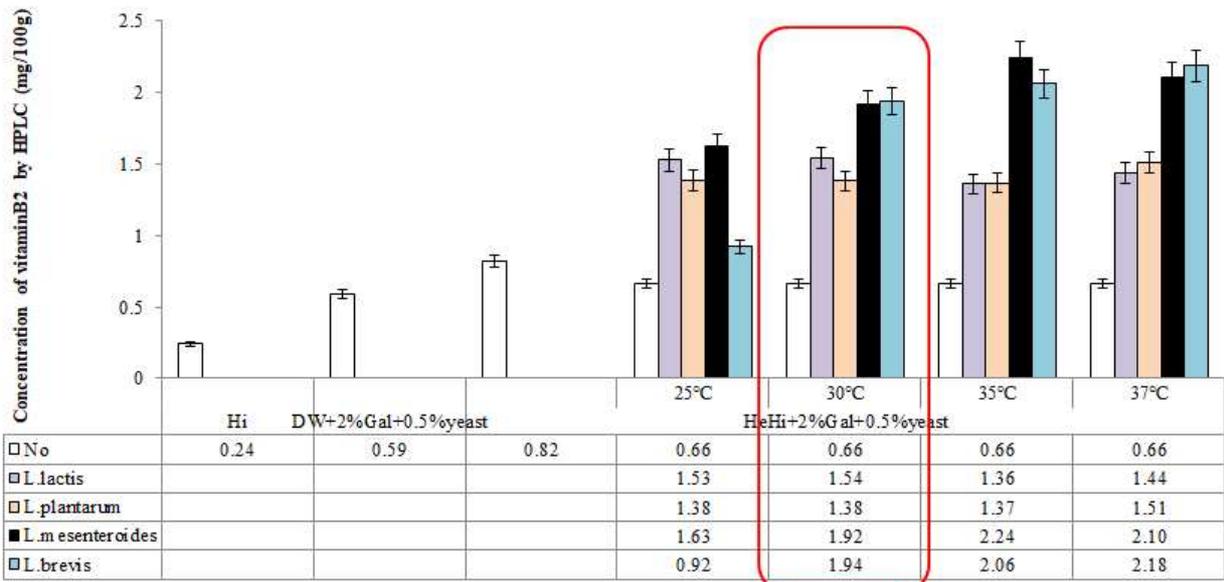


Fig 22 The concentration of vitaminB2 according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed that VitaminB2 was safe even after sterilization. **L. brevis / L. lactis and L. plantarum / L. mesenteroides**

(15) 동애등에 추출 배양물 N/C 조건에서 비타민B9 정량분석

비타민B2 측정과 동일한 조건인 동애등에 추출물 배지에 N/C로 2% 갈락토스와 효모 0.5 %를 접종하여 선발된 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1, KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS33, MIRE_TS55), *L. mesenteroides*(MIRE_TS01, MIRE_TS09), *L. brevis*(MIRE_TS46, MIRE_TS66) 4종을 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 25, 30, 35, 37 °C에서 24 시간동안 배양하고 최적 발효물에서 비타민B9 농도를 ELISA에 의해 분석하였다 (Fig 23). 멸균증류수에 2% 갈락토스와 효모 0.5%를 접종한 경우에는 각 0.62 ng/mL의 농도로 측정되었다. 비타민B9의 경우 25°C 동애등에 *L. lactis*의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.72 ng/mL, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.42 ng/mL, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.74 ng/mL, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.24 ng/mL 이었다(Fig 23) 동애등에 *L. lactis*의 30°C의 24시간 배양의 경우 비타민B9의 경우 25°C 동애등에 *L. lactis*의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.63 ng/mL, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.78 ng/mL, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.67 ng/mL, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.03 ng/mL 이었다(Fig 23). 35°C의 24시간 배양의 경우 *L. lactis*의 0.5% 효모 첨가는 1.69 ng/mL, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.79 ng/mL, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.49 ng/mL, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.22 ng/mL이었다(Fig 22). 37°C의 24시간 배양의 경우 *L. lactis*의 0.5% 효모 첨가는 0.04 ng/mL, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.45 ng/mL, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.61 ng/mL, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.78 ng/mL이었다(Fig 23).

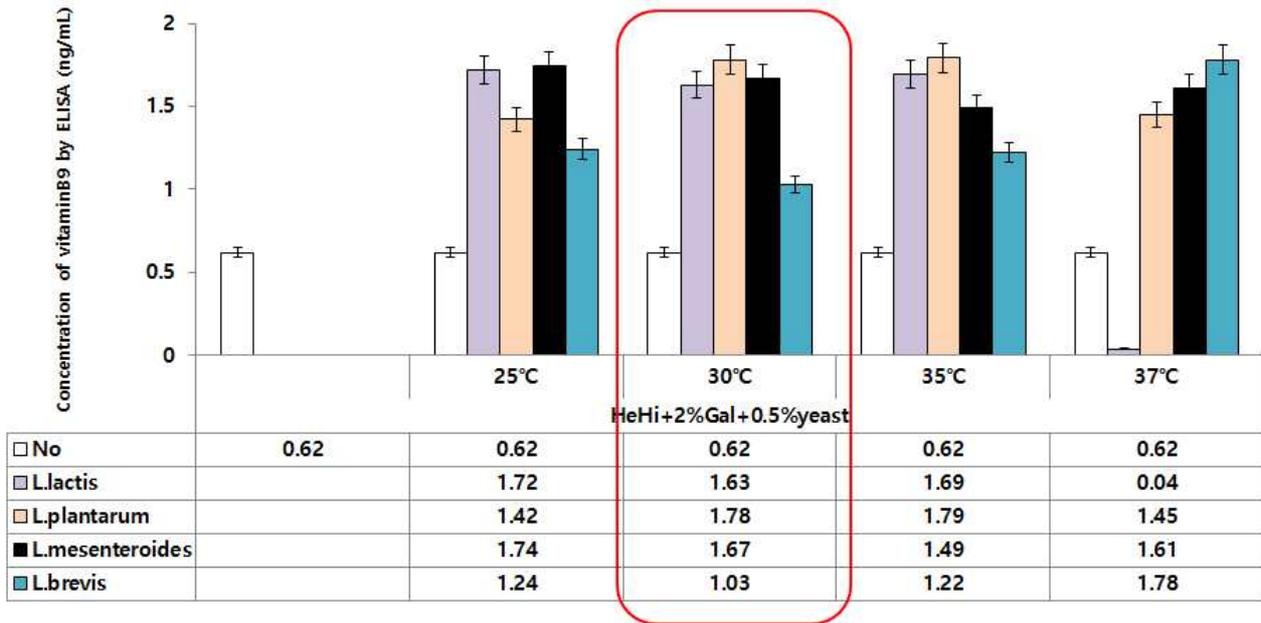


Fig 23 The concentration of vitaminB9 according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed that VitaminB2 was safe even after sterilization. **L. brevis / L. lactis and L. plantarum / L. mesenteroides**

(16) 동애등에 추출 배양물 N/C 조건에서 비타민B3 정량분석

비타민B2와 B9 측정과 동일한 조건인 동애등에 추출물 배지에 N/C로 2 % 갈락토스와 효모 0.5 %를 접종하여 선발된 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1, KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS33, MIRE_TS55), *L. mesenteroides*(MIRE_TS01, MIRE_TS09), *L. brevis*(MIRE_TS46, MIRE_TS66) 4종을 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종하고 25, 30, 35, 37 °C에서 24 시간동안 배양하고 최적 발효물에서 비타민B3 농도를 ELISA에 의해 분석하였다 (Fig 24). 멸균증류수에 2% 갈락토스와 효모 0.5%를 접종한 경우에는 각 0.62 ng/mL의 농도로 측정되었다. 비타민B3의 경우 동애등에 분말과 추출물에서는 각 86 ng/mL이었다. 동애등에 배지에 0.5% 효모 첨가는 53 ng/mL이었다. 비타민B3의 경우 25 °C 동애등에 *L. lactis*의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 39.41 ng/mL, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 51.61 ng/mL, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 55.68 ng/mL, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 40.64 ng/mL 이었다(Fig 24).

동애등에 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 비타민B9의 경우 25 °C 동애등에 *L. lactis*의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 47.91 ng/mL, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 30.65 ng/mL, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 32.13 ng/mL, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 33.24 ng/mL 이었다(Fig 24). 35 °C의 24시간 배양의 경우 *L. lactis*의 0.5% 효모 첨가는 48.78 ng/mL, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 57.78 ng/mL, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 32.13 ng/mL, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 48.65 ng/mL이었다(Fig 22). 37 °C의 24시간 배양의 경우 *L. lactis*의 0.5% 효모 첨가는 67.4 ng/mL, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 100.07 ng/mL, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 56.79 ng/mL, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 59.63 ng/mL이었다(Fig 24).

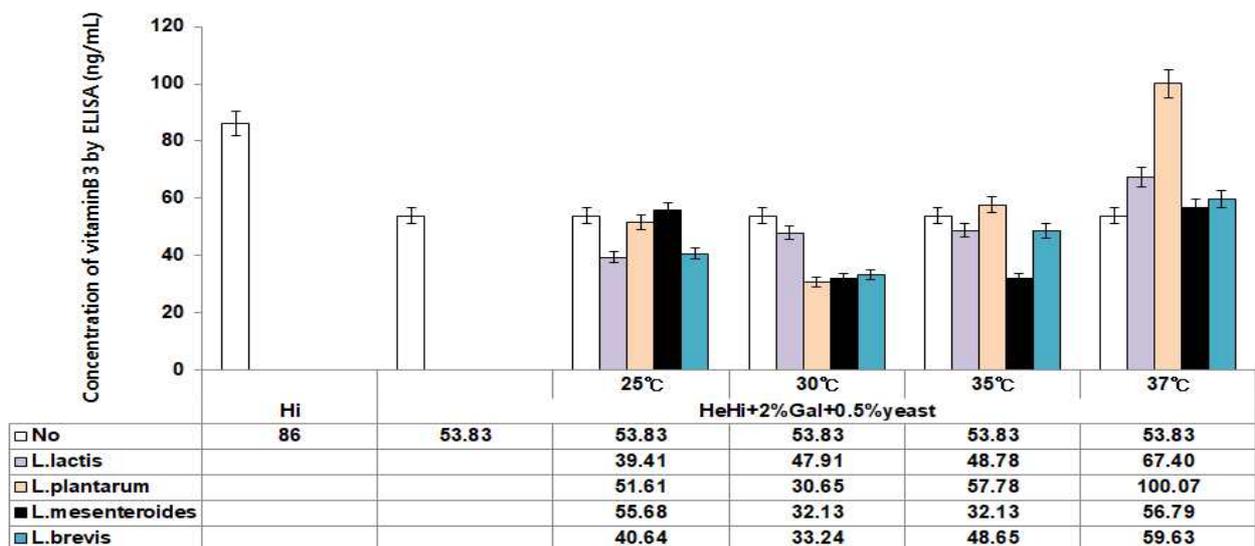


Fig 24 The concentration of vitaminB3 according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h by ELISA.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed that VitaminB2 was safe even after sterilization. ***L. brevis* / *L. lactis* and *L. plantarum* / *L. mesenteroides***

이들을 종합하면 동애등에 추출물 배지에 N/C로 2 % 갈락토스와 효모 0.5 %를 접종하여 선발된 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1, KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS33, MIRE_TS55), *L. mesenteroides*(MIRE_TS01, MIRE_TS09), *L. brevis*(MIRE_TS46, MIRE_TS66) 4종을 동애등에 추출물 배지에서의 비타민B2, B9의 양은 30 ~ 35°C에서의 적정온도였으나, 비타민B3의 경우는 동애등에 분말보다 적으며 유산균주에 따라 편차가 있는 것으로 확인되었다(Fig 25).

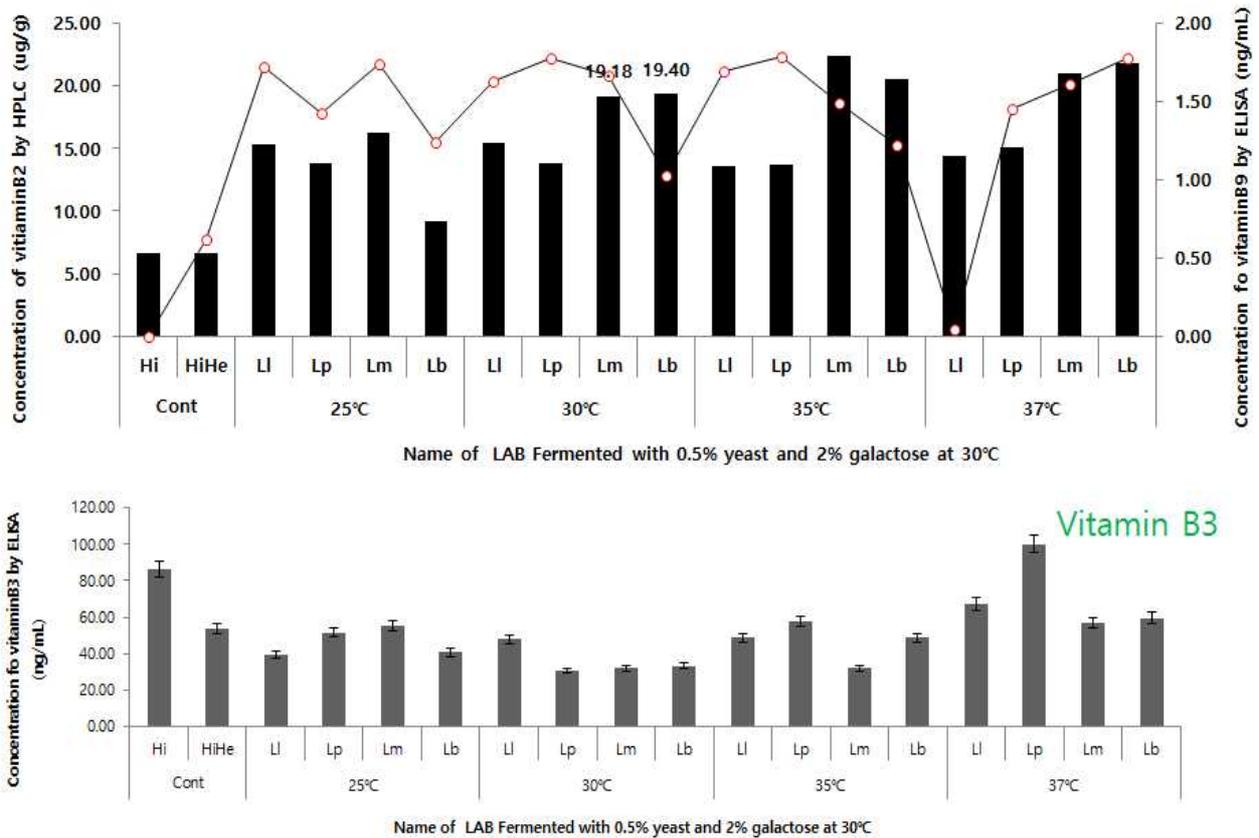


Fig 25 The concentration of vitamin B2, B3 and B9 according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C. It was confirmed that Vitamin B2 was safe even after sterilization. **L. brevis / L. lactis and L. plantarum / L. mesenteroides**

(17) 비타민B2 및 B9의 생산 유산균주의 응집력 분석

동애등에 추출물 배지에 N/C로 2 % 갈락토스와 효모 0.5, 1% 로 접종하여 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1, KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS33, MIRE_TS55), *L. mesenteroides*(MIRE_TS01, MIRE_TS09), *L. brevis*(MIRE_TS46, MIRE_TS66) 중에서 선발된 4 종에 대해 각 시간별로 유산균주의 응집력을 MRS배지에서 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 24시간에 조사하였다. OD 0.25를 기준으로 하였을 때는 *L. lactis*(MIRE_P1, KCCM 13066P)가 응집력이 약했으나 24시간에는 높아졌다. OD1에서는 *L. mesenteroides*(MIRE_TS01, MIRE_TS09)이 응집력이 낮았고 24시간에는 다른 균주와 비슷하게 높아졌다. 특히 *L. brevis*(MIRE_TS46, MIRE_TS66)의 경우에는 가장 좋은 응집효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig 26).

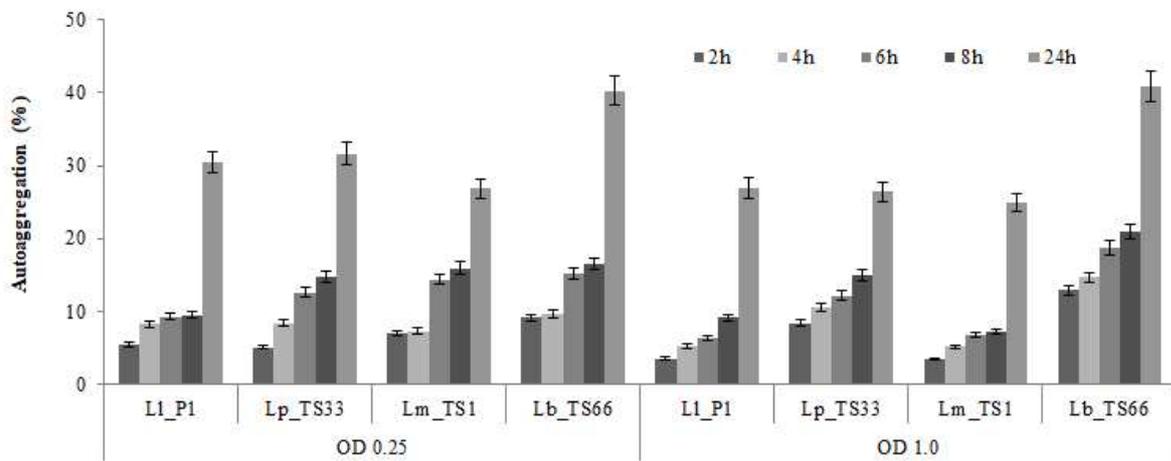


Fig 26 The percentage of autoaggregation of 4 LAB isolateds used this study in MRS media.
L. brevis / L. lactis and L. plantarum / L. mesenteroides

(18) 동애등에 비타민B2/B9(HiLAB_VitB2/B9) 사료 소재 공정

동애등에 발효물 사료 첨가물의 소재 공정은 앞서 비타민 B2와 B9의 정량 값을 기준으로 확립하였다. 동애등에 추출물 배지는 121 °C에서 15분 멸균과정을 통해 동애등에 분말을 제거한 것과 제거하지 않은 것으로 나누어 제조하였다. 이는 사료제조 시에는 동애등에 분말을 사용하지만 추출물과 유산균의 효능을 정확하게 하기 위해 실험소재로 구분하여 제조하였다. 멸균된 배지에 에 N/C로 2% 갈락토스와 효모 0.5% 로 첨가하고 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30 °C에서 24시간 동안 배양하고 최적 발효물에서 비타민 B2, B9 외의 기타 성분분석과 특성을 분석하였다 (Fig 27).

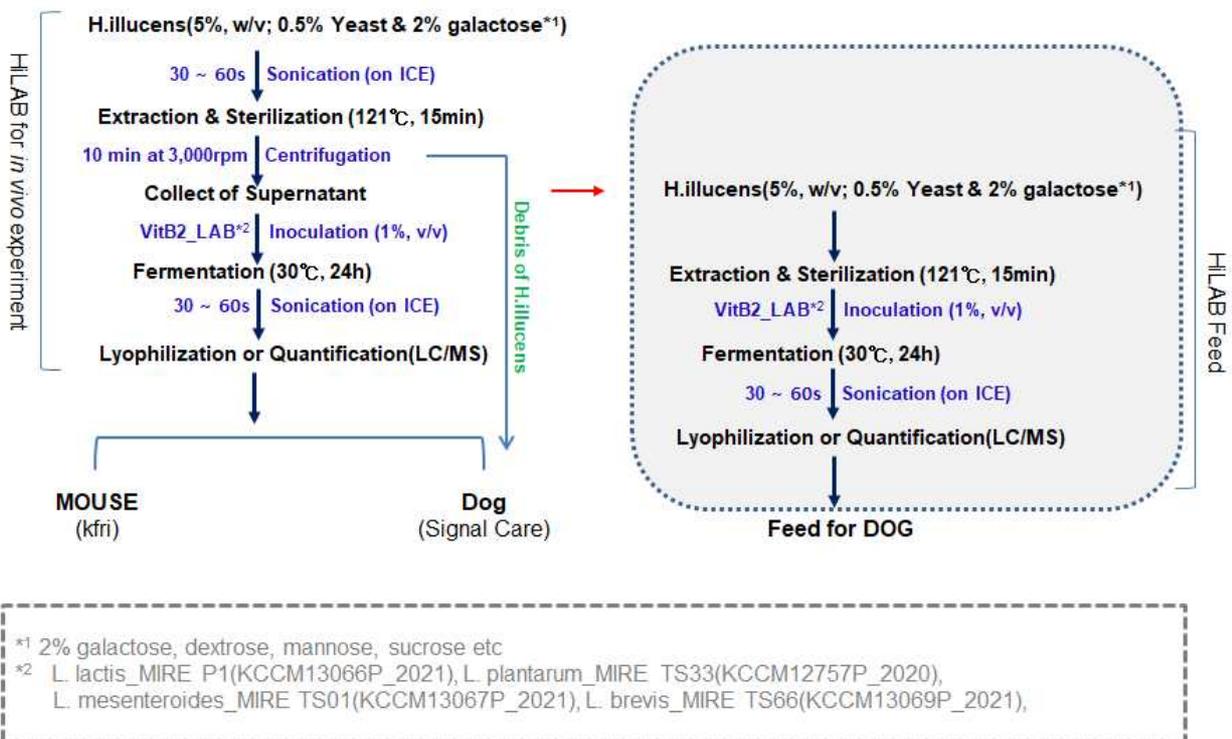


Fig 27 The processing of HiLAB feed additives .
L. brevis* / *L. lactis* and *L. plantarum* / *L. mesenteroides

(19) 동애등에 유산균 사료첨가물(HiLAB_VitB2/B9) 내의 비타민B2군 (rib, FAD, FNM)

동애등에 발효물 사료 첨가물의 소재 공정은 앞서 비타민 B2와 B9의 정량 값을 기준으로 확립하였다. 동애등에 추출물 배지는 121도에서 15분 멸균과정을 통해 동애등에 분말을 제거한 것과 제거하지 않은 것으로 나누어 제조하였다. 이는 사료제조 시에는 동애등에 분말을 사용하지만 추출물과 유산균의 효능을 정확하게 하기 위해 실험소재로 구분하여 제조하였다. 멸균된 배지에 에 N/C로 2 % 갈락토스와 효모 0.5 % 로 첨가하고 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30°C에서 24 시간동안 배양물의 비타민B2는 HPLC로 분석하였다. 비타민B2의 경우 동애등에 분말과 추출물에서는 각 3.45 µg/g이었다. 동애등에 배지에 0.5% 효모 첨가는 7.98 µg/g이었다. 동애등에 분말을 포함한 추출물의 *L. lactis*의 30°C의 24 시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.11 µg/g. *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 7.46 µg/g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 12.43 µg/g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 12.50 µg/g 이었다(Fig 28). 동애등에 분말을 포함하지 않은 추출물(HiLABsup)의 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.24 µg/g. *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 13.26 µg/g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 18.56 µg/g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 8.40µg/g 이었다(Fig 28).

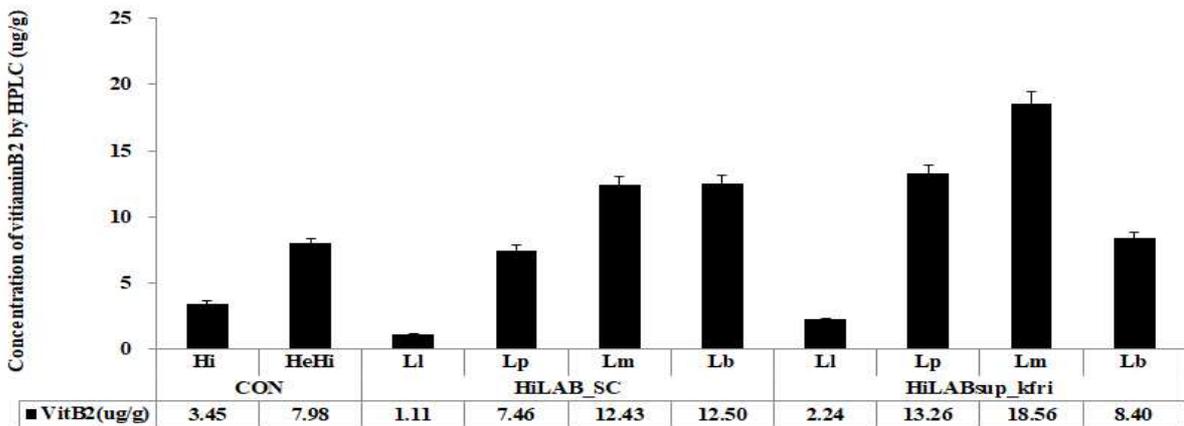


Fig 28 The concentration of vitaminB2 according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed thatVitaminB2 was safe even after sterilization. **L. brevis / L. lactis and L. plantarum / L. mesenteroides**

비타민B2군에는 유리된 형태인 리보플라빈과 조효소 형태인 FMN(flavin mononucleotide)와 FAD(flavin adenine dinucleotide)가 존재한다. 리보플라빈은 전자를 주고받는 산화-환원반응에 관여하며 FMN과 FAD를 통해 작용한다. 리보플라빈의 조효소인 FMN 농도는 동애등에 분말과 추출물에서는 각 10 µg/g이었다. 동애등에 분말을 포함한 추출물에서의 FMN 농도는 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.0 µg/g, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 3.2 µg/g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 4.1 µg/g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 4.6 µg/g 이었다(Fig 29). 동애등에 분말을 포함하지 않은 추출물(HiLABsup)의 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.02 µg/g, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 6.05 µg/g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 8.01 µg/g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 3.40 µg/g 이었다(Fig 29).

리보플라빈의 조효소인 FAD 농도는 동애등에 분말과 추출물에서는 각 40 µg/g이었다. 동애등에 분말을 포함한 추출물에서의 FAD 농도는 *L. lactis*의 30°C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 10.0 µg/g, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 3.1 µg/g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 4.1 µg/g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 4.6 µg/g 이었다(Fig 29). 동애등에 분말을 포함하지 않은 추출물(HiLABsup)의 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 25.0 µg/g, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 21.05 µg/g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 30.01 µg/g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 13.40µg/g 이었다 (Fig 29).

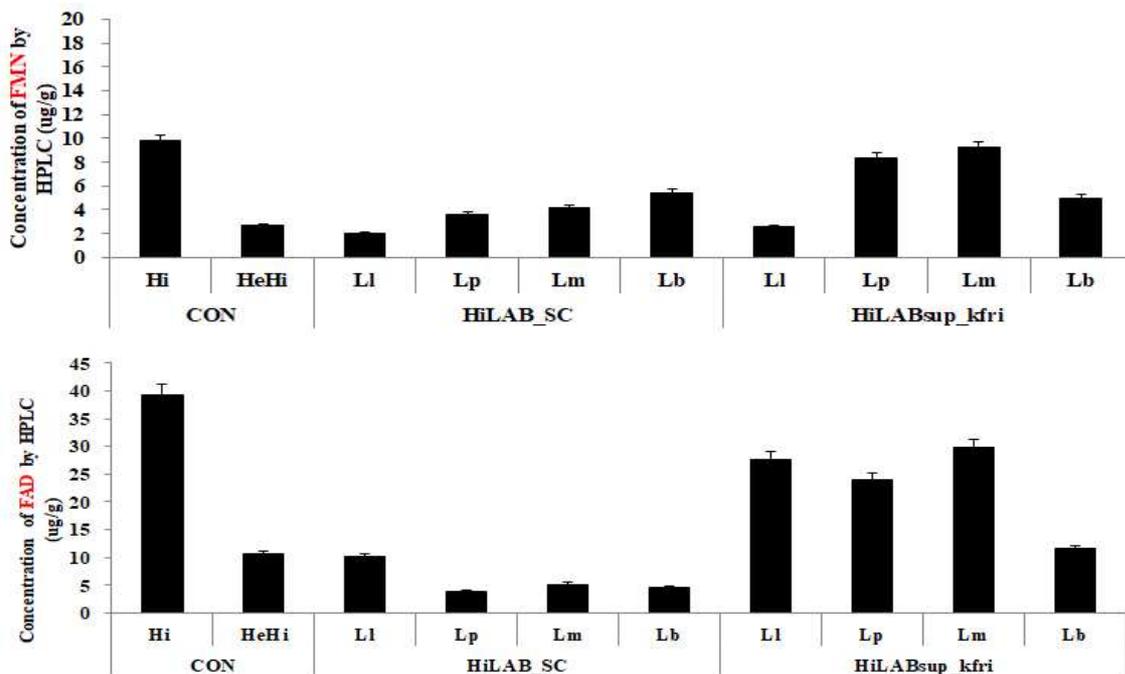


Fig 29 The concentration of FMN and FAD according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed that VitaminB2 was safe even after sterilization. **L. brevis / L. lactis and L. plantarum / L. mesenteroides**

(20) 동애등에 유산균 사료첨가물(HiLAB_VitB2/B9) 내의 비타민B2군 총 농도 비교

앞서 정량한 동애등에 추출 배양물에서 비타민B2군에는 유리된 형태인 리보플라빈과 조효소 형태인 FMN(flavin mononucleotide)와 FAD(flavin adenine dinucleotide)의 정량을 정리하였다. 동애등에 분말을 포함한 추출물고 포함하지 않은 추출배양물의 비교는 분말이 없는 것이 정량 값이 높았다.

리보플라빈과 리보플라빈의 조효소인 FMN, FAD를 모두 더한 경우, 동애등에 분말을 포함한 추출물에서의 비타민B2군 농도는 *L. mesenteroides*, *L. brevis*의 경우 가높았으며, 분말을 포함하지 않은 경우에는 *L. mesenteroides*의 경우가 가정 높았으며 다음으로 *L. plantarum*, *L. lactis* *L. brevis*의 순서였다. *L. lactis*의 경우 리보플라빈 양이 적은 것에 비해 FAD의 정량 값이 높았다 (Fig 30).

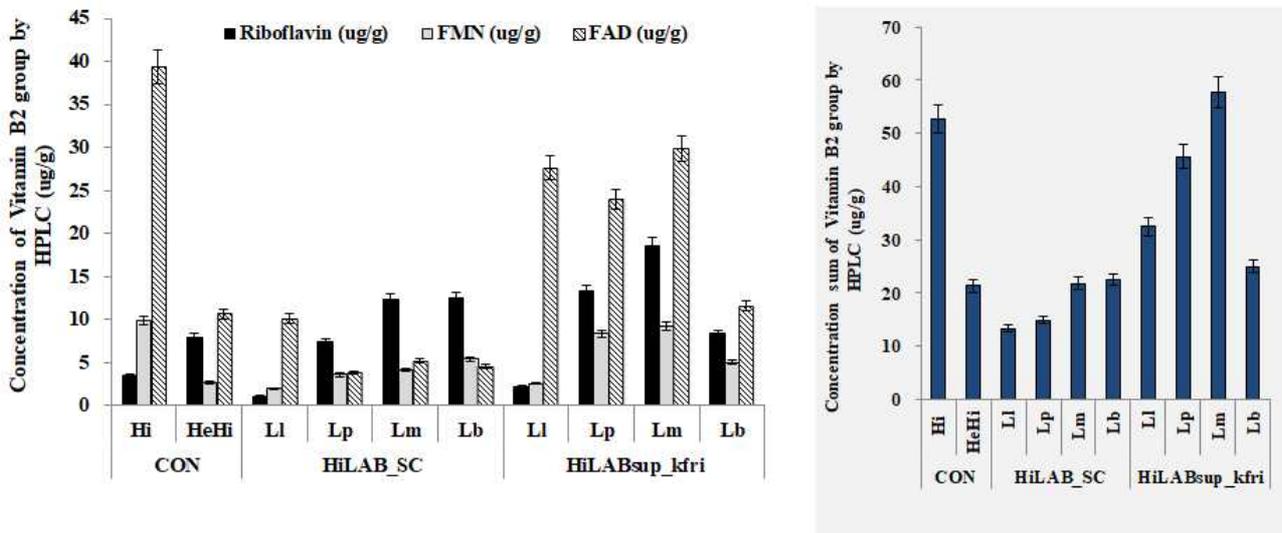


Fig 30 The concentration of riboflavin, FMN and FAD according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h. A, each riboflavin, FMN, FAD; B, sum of riboflavin group.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed that VitaminB2 was safe even after sterilization. ***L. brevis* / *L. lactis* and *L. plantarum* / *L. mesenteroides***

(21) 동애등에 유산균 사료첨가물(HiLAB_VitB2/B9) 내의 비타민B3와 B9 비교

동애등에 발효물 사료 첨가물의 소재 공정은 앞서 비타민 B2와 B9의 정량 값을 기준으로 확립하였다. 동애등에 추출물 배지는 121도에서 15분 멸균과정을 통해 동애등에 분말을 제거한 것과 제거하지 않은 것으로 나누어 제조하였다. 이는 사료제조 시에는 동애등에 분말을 사용하지만 추출물과 유산균의 효능을 정확하게 하기 위해 실험소재로 구분하여 제조하였다. 멸균된 배지에 에 N/C로 2 % 갈락토스와 효모 0.5 % 로 첨가하고 유효 균주 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종을 선발하고 동애등에 추출물 배지에 유산균을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30°C에서 24 시간동안 배양물의 비타민B3, 비타민B9은 ELISA로 분석하였다(Fig 31).

비타민B3의 경우 동애등에 분말과 추출물에서는 각 113.55 ng/g이었다. 동애등에 분말을 포함한 추출물의 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 170.86 ng/g, *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 102.67 ng/g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 88.52 ng/g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 81.51 ng/g 이었다(Fig 31). 동애등에 분말을 포함하지 않은 추출물(HiLABsup)의 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 99.59 ng/g, *L. plantarum*의 경우는 78.80 ng/g, *L. mesenteroides*는 63.04 ng/g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 91.19 ng/g 이었다(Fig 31).

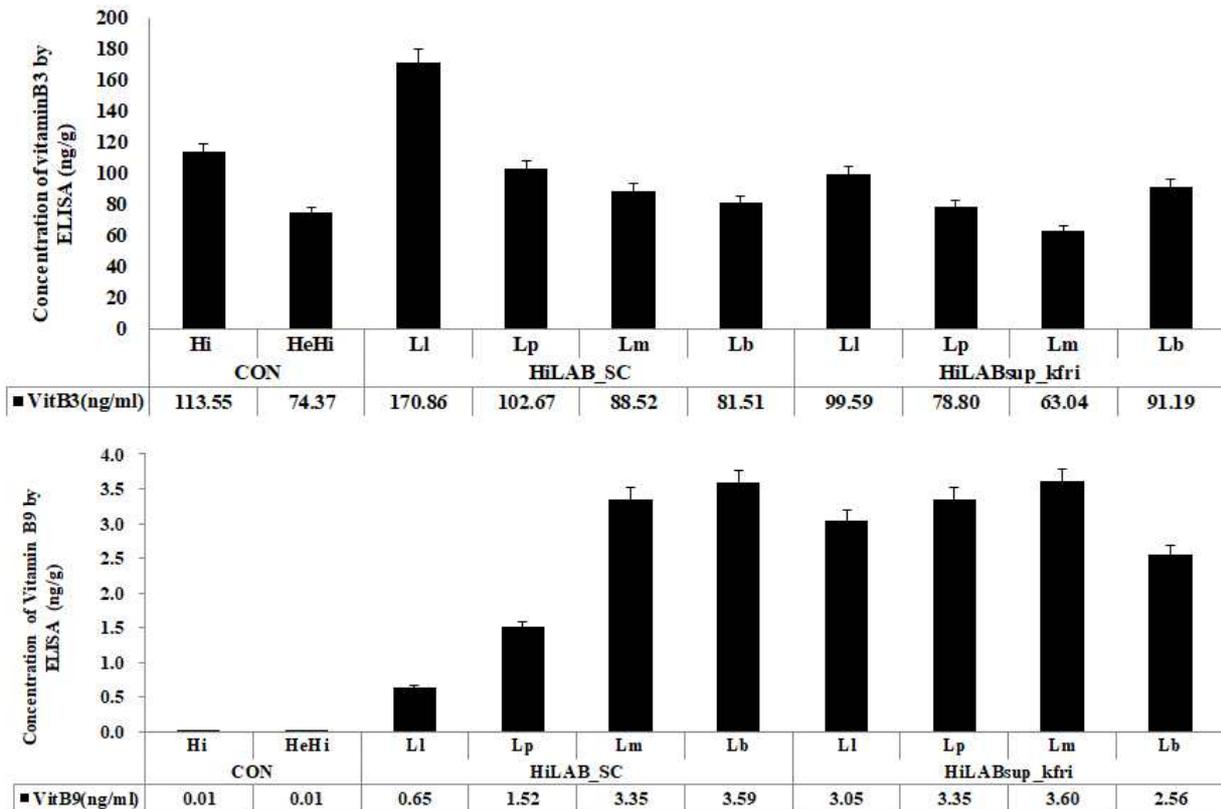


Fig 31 The concentration of vitamin B3, and B9 according to the addition of yeast of LAB used this study in Hi media at 30°C fermentation during 24h. A, each riboflavin, FMN, FAD; B, sum of riboflavin group.

※ Fermentation was performed after sterilization at 121°C . It was confirmed that VitaminB2 was safe even after sterilization. **L. brevis / L. lactis and L. plantarum / L. mesenteroides**

비타민B9의 경우 동애등에 분말과 추출물에서는 각 0.01 ng/g이었다. 동애등에 분말을 포함한 추출물의 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 0.5% 효모 첨가는 0.65 ng/g. *L. plantarum*의 경우 0.5% 효모 첨가는 1.52 ng/g, *L. mesenteroides*의 경우 0.5% 효모 첨가는 3.35 ng/g, *L. brevis*의 경우는 3.59 ng/g 이었다(Fig 31). 동애등에 분말을 포함하지 않은 추출물(HiLABsup)의 *L. lactis*의 30 °C의 24시간 배양의 경우 3.05 ng/g. *L. plantarum*의 경우는 3.35 ng/g, *L. mesenteroides*는 3.60 ng/g, *L. brevis*의 경우 0.5% 효모 첨가는 2.56 ng/g 이었다(Fig 31).

아래 표와 그림은 각각 시제품과 전임상 실험을 위한 소재의 정량 값이다.

Table 9. List of HiLAB_VitB sample for *in vitro* analysis (20220415, kfri)

	Control		HeHi ¹⁾		
	HeHi_powder	Ll_SF (<i>L. lactis</i>)	Lp_SF (<i>L. plantarum</i>)	Lm_SF (<i>L. mesenteroides</i>)	Lb_SF (<i>L. brevis</i>)
VitB2 ²⁾ (ug/g)	3.5	2.2	13.3	18.6	8.4
VitB3 ³⁾ (ng/g)	113.6	99.6	78.8	63.4	91.2
VitB9 ³⁾ (ng/g)	-	30.5	33.5	36.0	25.6

Table 9. List of HiLAB_VitB sample for *in vitro* analysis (20220415, SignalCare)

	Control		HeHi ¹⁾		
	HeHi_powder	Ll_SF (<i>L. lactis</i>)	Lp_SF (<i>L. plantarum</i>)	Lm_SF (<i>L. mesenteroides</i>)	Lb_SF (<i>L. brevis</i>)
VitB2 ²⁾ (ug/g)	3.5	1.1	7.5	12.4	12.5
VitB3 ³⁾ (ng/g)	113.6	170.9	102.7	88.5	81.5
VitB9 ³⁾ (ng/g)	-	0.65	1.52	3.35	3.59

- 1) HeHi, Hotwater Extracted *H. illucense*; 2) analysis by HPLC; 3) analysis by ELISA;
- Ll, *Lactococcus lactis*; Lp, *Lactobacillus plantarum*; Lm, *Leuconostoc mesenteroides*; Lb, *Lactobacillus brevis*
- 2% Galactose / 0.5% Yeast / 30°C

사진	한국식품연구원					㈜시그널케어				
	Hi con	HiLl	HiLp	HiLm	HiLb	Hi con	HiLl	HiLp	HiLm	HiLb
동결건조무게	8g	7g	5.3g	7.3g	8.5g	200g	80.47g	67.47g	47.85g	49.4g

(22) 동애등에 추출 발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포 생존을 분석

Caco-2 세포 (한국세포주은행; <http://cellbank.snu.ac.kr>)를 1x10⁵ 단층으로 10% FBS (Gibco, USA)를 포함하는 DMEM (Gibco, USA)내에 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포 생존율은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Molecular Technologies Inc., Japan) 분석법을 이용하였고, Caco-2 세포를 96-well plate에 1x10⁵ cell/well 분주하여 24시간 배양하고 0.5% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체하여 12시간 방치하였다.

파쇄, 원심분리 과정을 거쳐 수집한 GY_HiHe_Lm 및 GY_HiHe 각각의 상청액을 각각 10, 100 또는 1,000 µg/mL의 농도로 상기 배지에 희석하여 처리한 Caco-2 세포는 24, 48, 72시간 또는 7일 동안 배양한 후 CCK-8 시약을 well 당 10 µL 첨가하여 2시간동안 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하고, ELISA reader (BioTek Instruments Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 상기 희석한 상청액을 첨가하지 않은 대조군 (CON) 대비 상대 백분율로 측정하였고, 그 결과를 나타내었다. Caco-2 세포 생존율을 분석한 결과, 동애등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 첨가 발효물에서 아무것도 첨가하지 않은 대조군 대비 모두 세포 생존율이 높게 측정되는 바, 상기 발효물을 첨가하더라도 세포 생존율이 줄어들지 않은 것을 확인하여, 독성이 없는 것을 확인하였다.

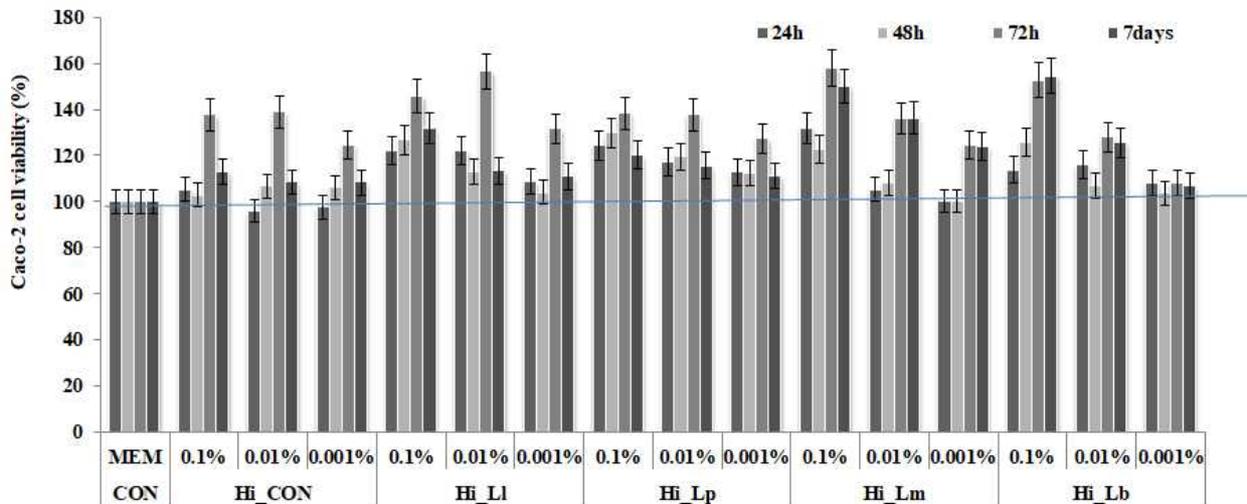
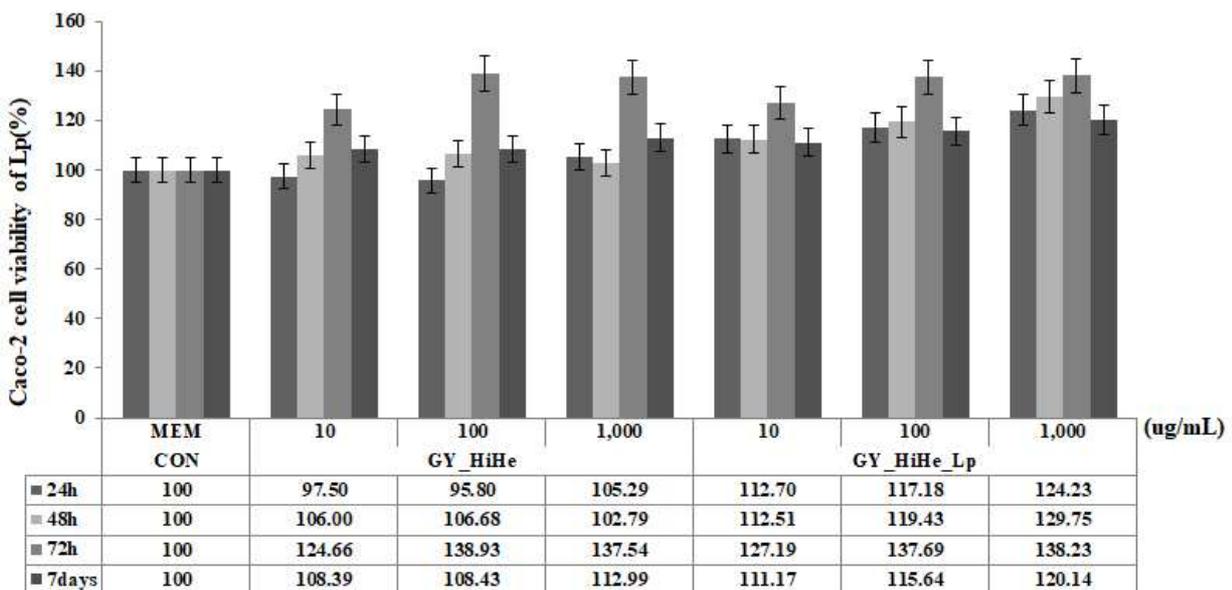
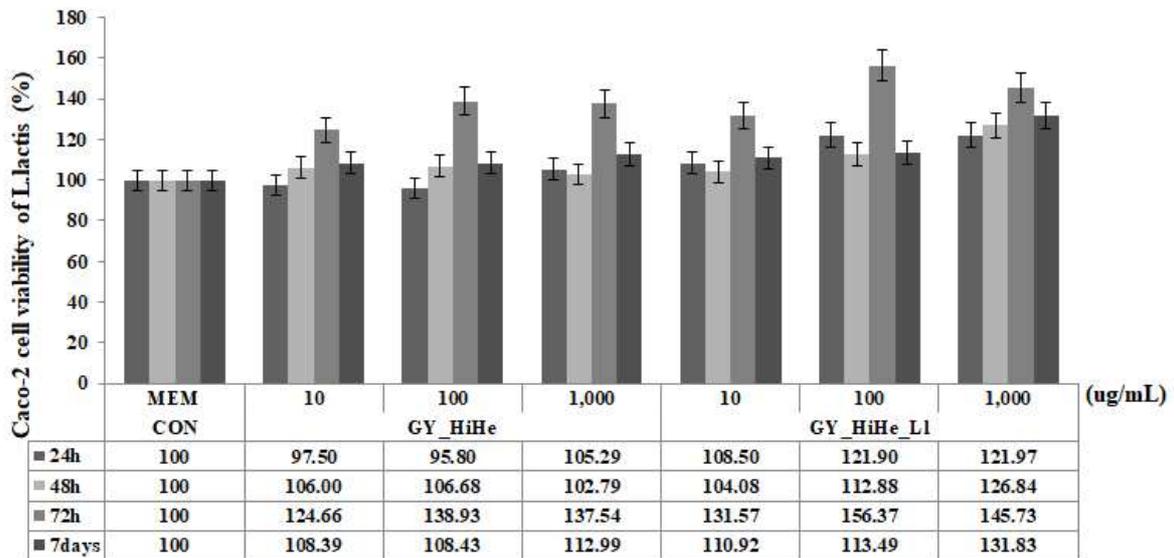


Fig. 32 Viability according to different concentration and time after HiLABsup_VitB treatment on Caco-2 cells

Caco-2 세포 생존율을 분석한 결과, 동태등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 각각의 생존율의 결과는 다음 그림과 같다.



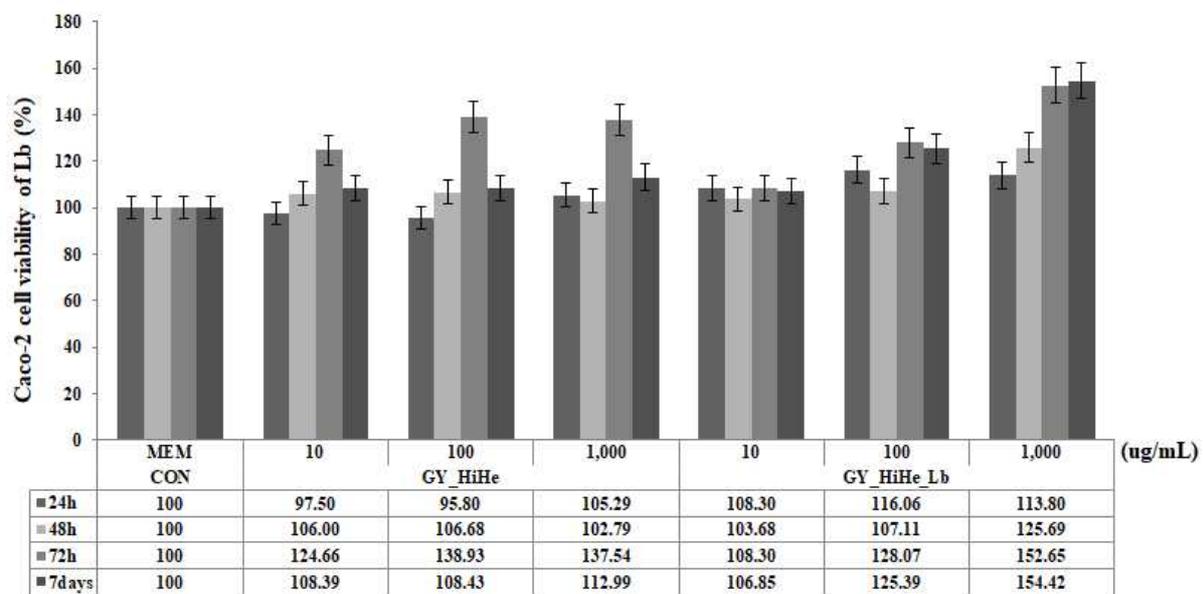
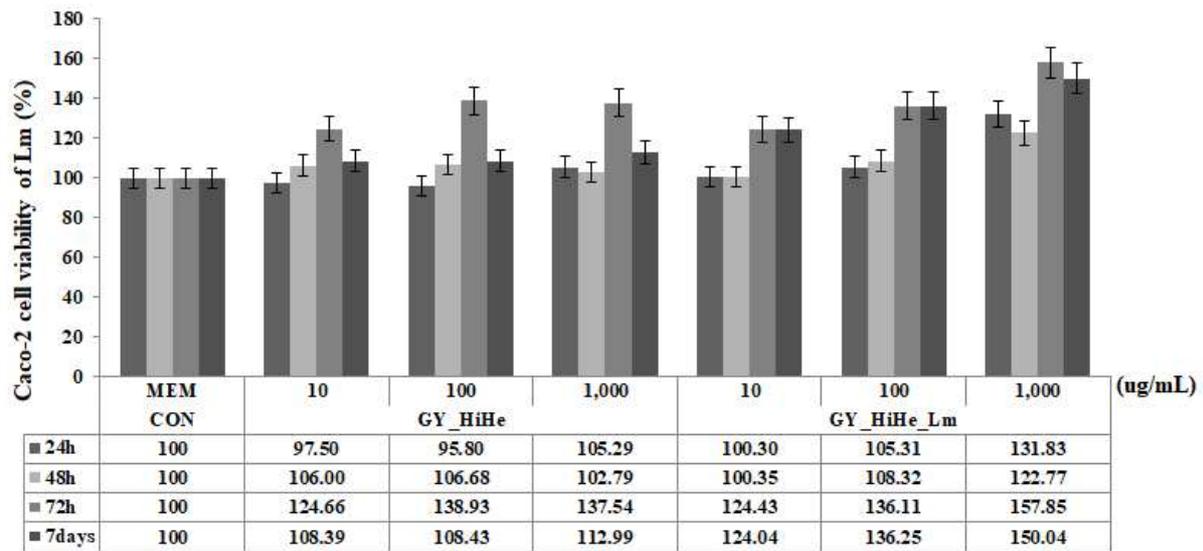


Fig. 33 Effects of different concentration and time after HiLABsup_VitB treatment on Caco-2 cells

(23) 동애등에 추출 발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포 부착능 분석

Caco-2 세포 (한국세포주은행; <http://cellbank.snu.ac.kr>)를 10% FBS (Gibco, USA)를 포함하는 DMEM (Gibco, USA) 배지에 1×10^5 단층으로 접종하여, 37°C, CO₂ 배양기에서 각각 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*를 첨가하여 배양하였다. Caco-2세포는 사람의 대장암 세포 (Colorectal carcinoma에서 유래한 세포로 배양하면 사람의 소장상피세포로 분화하여 장내 흡수, 투과 등의 실험에 유효하다.

Caco-2세포에 각각의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*를 1:1,000 (Caco-2 세포 : 류코노스톡 메센테로이데스; 1×10^5 cells/well: 1×10^8 cfu/well)의 비율로 접종하고 (GY_HiHe_Lm_Ca), 24시간, 48시간, 72시간 또는 7일 동안 37°C의 온도에서 CO₂ 배양을 진행하였고, 배지 내 균을 제거하고 세포에 붙은 유산균 수만으로 계수하였다. 대조군으로 MRS 배지에 Caco-2세포 및 각각의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*를 접종하여 (MRS_Lm_Ca) 계수하였다.

각 유산균의 부착 기능은 MRS_Lm_Ca와 GY_HiHe_Lm_Ca 각각의 Caco-2 세포 수에 대한 유산균 생균수의 비율로 표시하였다.

Caco-2 세포 수에 대한 유산균 생균수의 비율을 측정된 결과, GY_HiHe_Lm_Ca 등의 각 유산균 접종 시의 경우 유산균 생균수 비율이 높은 것을 확인하였고, 이를 통해, 동애등에 추출물이 첨가되는 경우 인간 장내 세포와의 부착능이 더 우수한 것을 확인하였다.

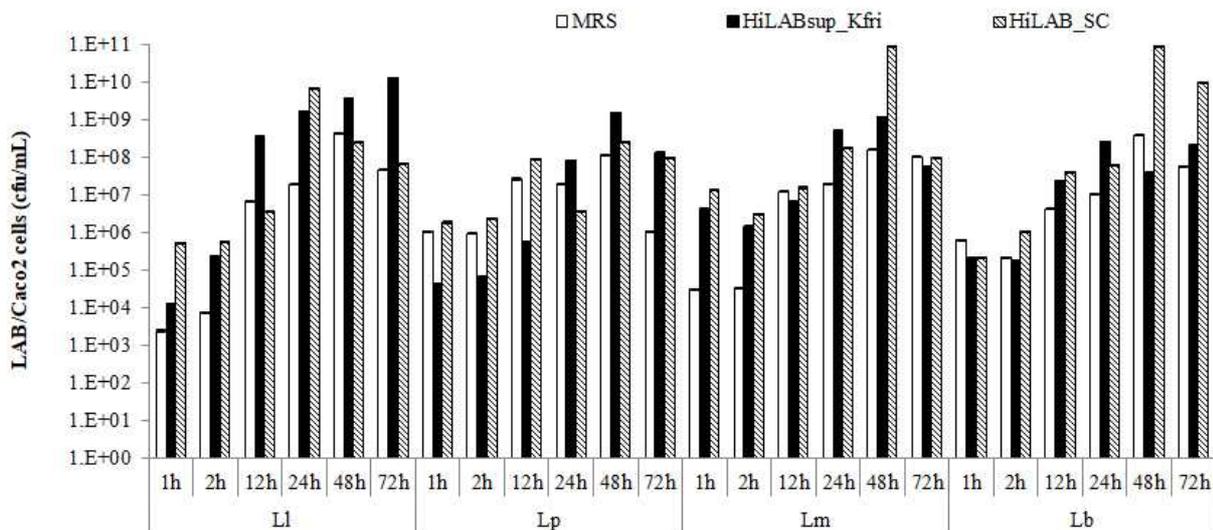
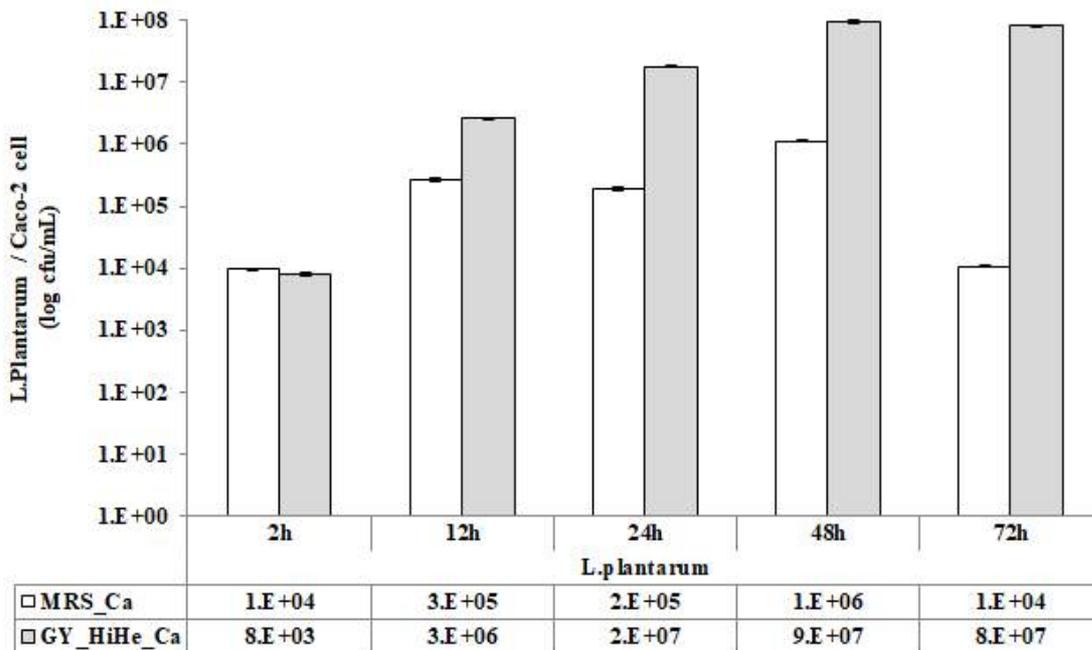
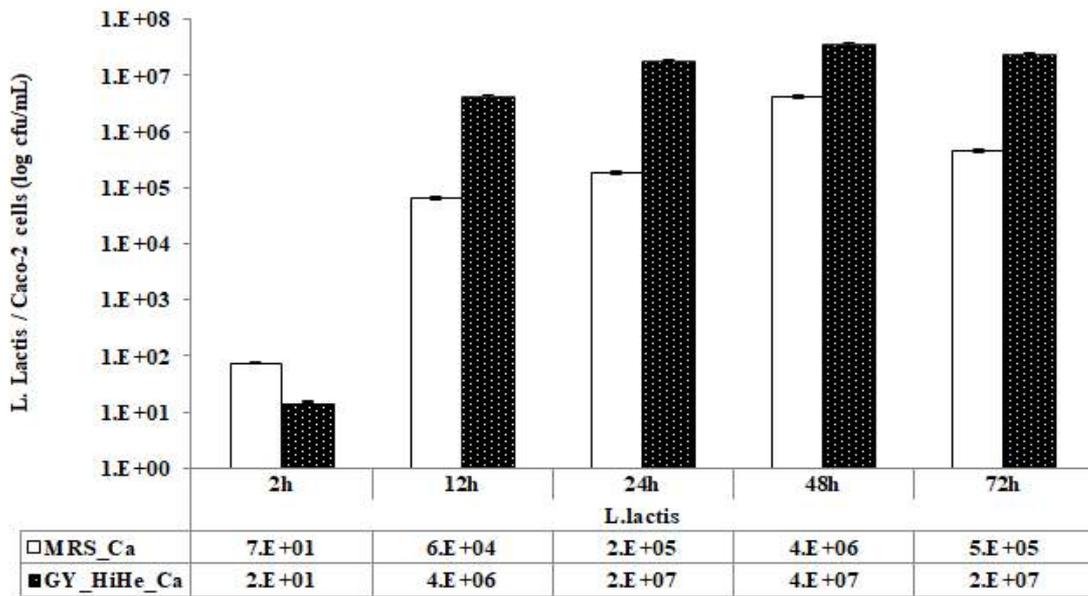


Fig. 34 Adhesion of selected probiotics *L. lactis* (KCCM13202P), *L. plantarum* (KCCM13068), *L. mesenteroides* (KCCM 13200P), *L. brevis* (KCCM 13201P) in MRS media (control) and *H. illucense* media without (10 % HiLABsup_kfri) and with (10 % HiLAB) *H. illucense* powder to Caco-2 cells during incubation time.

Caco-2 세포 생존율을 분석한 결과, 동태등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 각각의 부착능의 결과는 다음 그림과 같다.



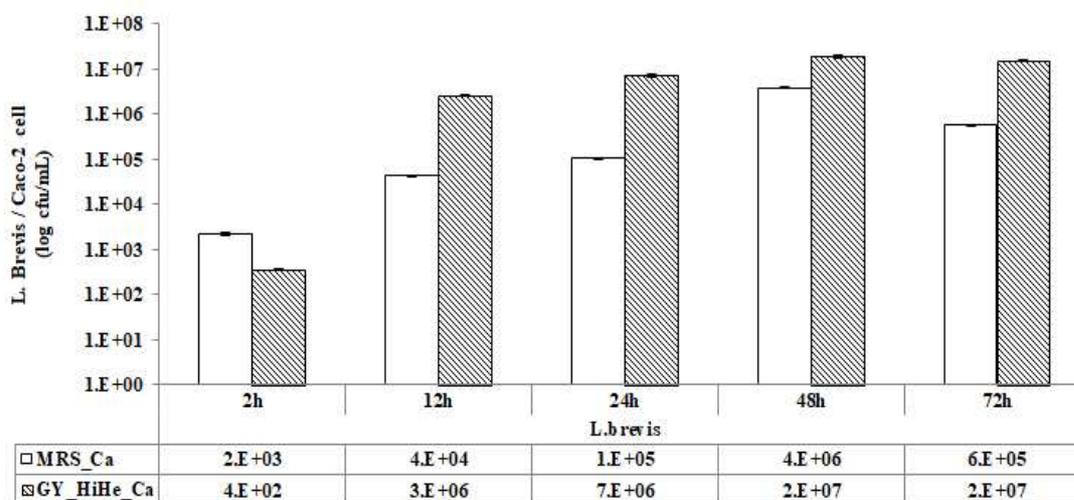
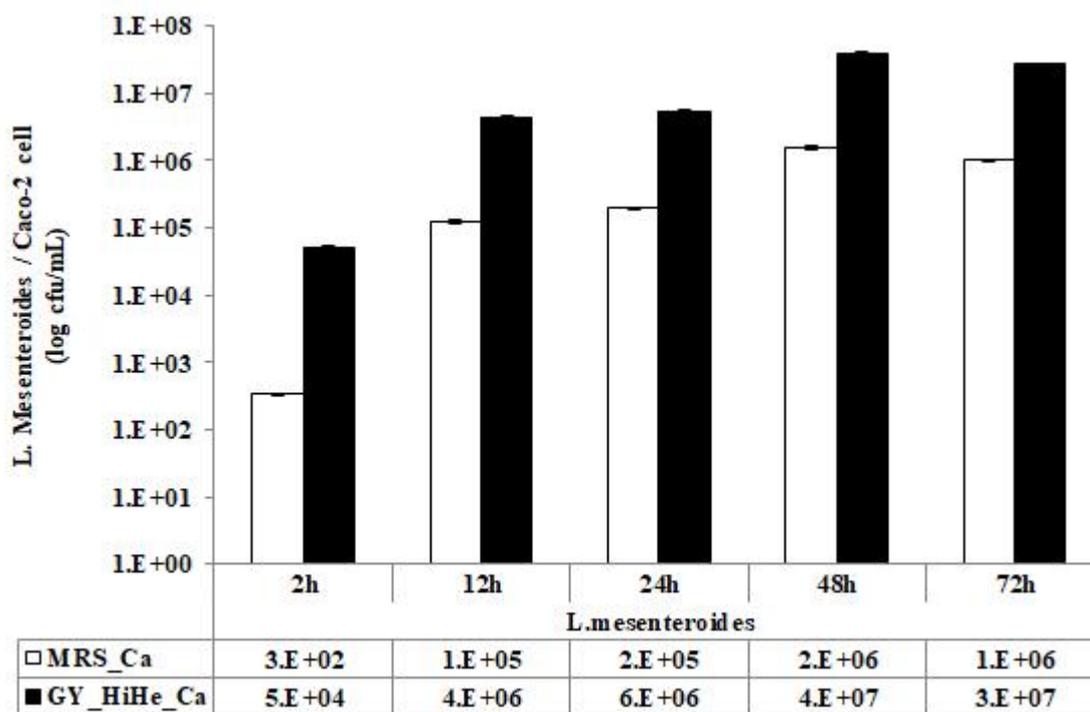


Fig. 35 Adhesion of selected probiotics *L. lactis* (KCCM13202P), *L. plantarum* (KCCM13068), *L. mesenteroides* (KCCM 13200P), *L. brevis* (KCCM 13201P) in MRS media (control) and *H. illucense* media without (10 % HiLABsup_kfri) and with (10 % HiLAB) *H. illucense* powder to Caco-2 cells during incubation time.

(24) 동애등에 추출 발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포내에서의 비타민 B2 생산 확인

Caco-2 세포에 동애등에 배지의 각각의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 발효물 (30°C, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_Lm_Ca), 각 시간별의 Caco-2세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 유산균을 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca). 수집된 상청액을 0.45um 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하여, 상기 실시예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다. 또한, 수집된 상청액을 0.45 µm시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 비타민 B9 ELISA 시료로 이용하여, 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였고, 그 결과를 나타내었다. 비타민 B2의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_Lm_Ca의 비타민 B2의 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 동애등에 추출물의 각각의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 발효물이 우수한 비타민 B2 생성능을 가지는 것을 확인하였다(Fig 36).

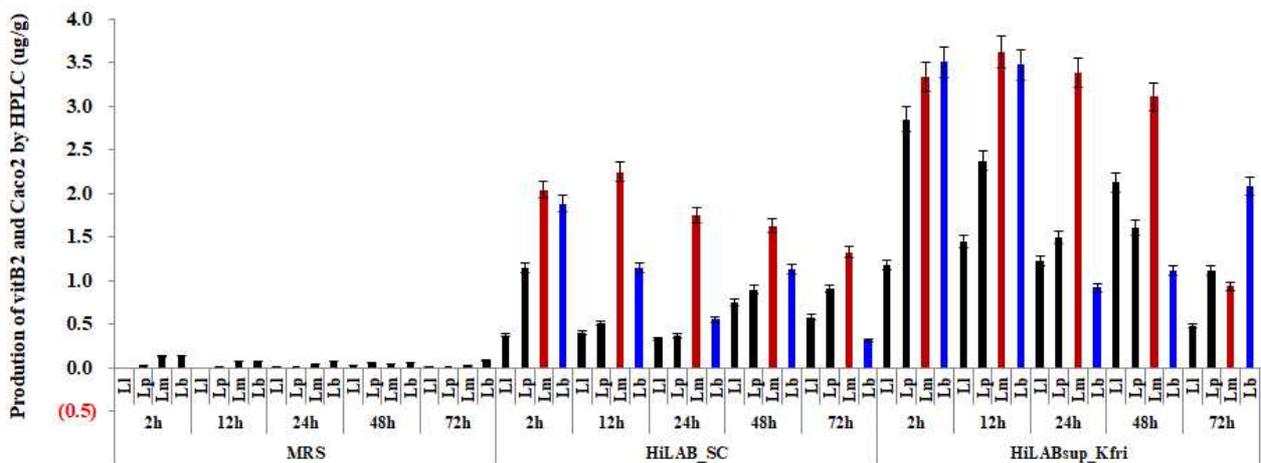


Fig 36 Riboflavin (Vit B2) production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

(25) 동애등에 추출 발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포내에서의 FMN 생산 확인

Caco-2 세포에 동애등에 배지의 각각의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 발효물 (30℃, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_Lm_Ca), 각 시간별의 Caco-2세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 유산균을 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca). 수집된 상청액을 0.45 μm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하여, 상기 실시 예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다. 또한, 수집된 상청액을 0.45 μm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 FMN 시료로 이용하여, 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였고, 그 결과를 나타내었다. FMN의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_Lm_Ca의 FMN의 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 특히 NO_Ca의 경우 FMN이 생성되지 않았지만, GY_HiHe_Lm_Ca의 경우 FMN 생성을 확인하여, 동애등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 각 발효물이 우수한 FMN 생성능을 가지는 것을 확인하였다.

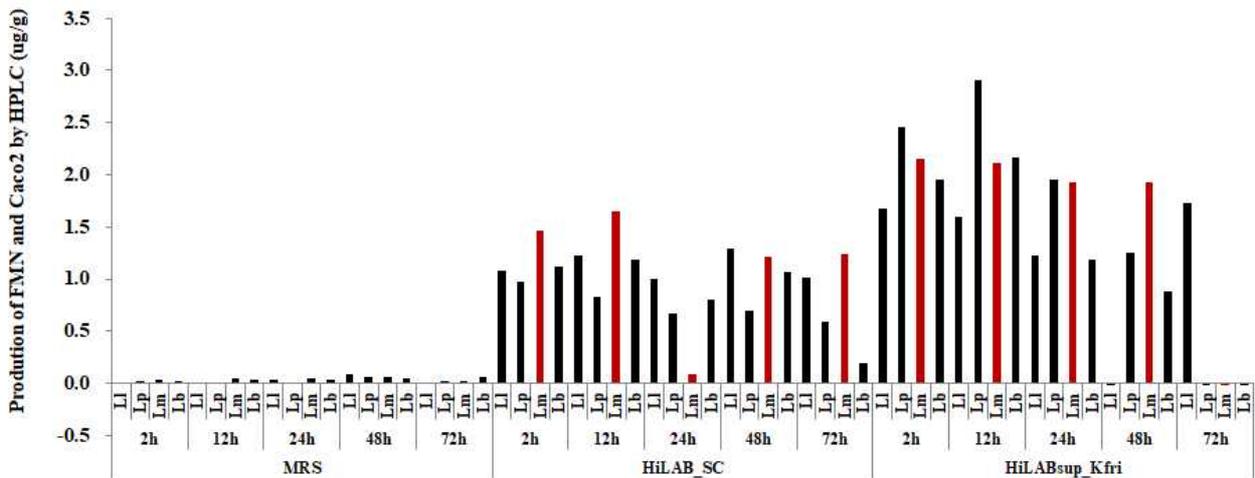


Fig. 37 FMN production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

(26) 동애등에 추출 발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포내에서의 FAD 생산 확인

Caco-2 세포에 동애등에 배지의 각각의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 발효물(30°C, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_Lm_Ca), 각 시간별의 Caco-2세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 유산균을 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca). 수집된 상청액을 0.45um 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하여, 상기 실시예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다. 또한, 수집된 상청액을 0.45 µm시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 비타민 B9 ELISA 시료로 이용하여, 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였고, 그 결과를 나타내었다. FAD의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_Lm_Ca의 FAD의 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 특히 NO_Ca의 경우 FMN이 생성되지 않았지만, GY_HiHe_Lm_Ca의 경우 FAD 생성을 확인하여, 동애등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 각 발효물이 우수한 FMN 생성능을 가지는 것을 확인하였다.

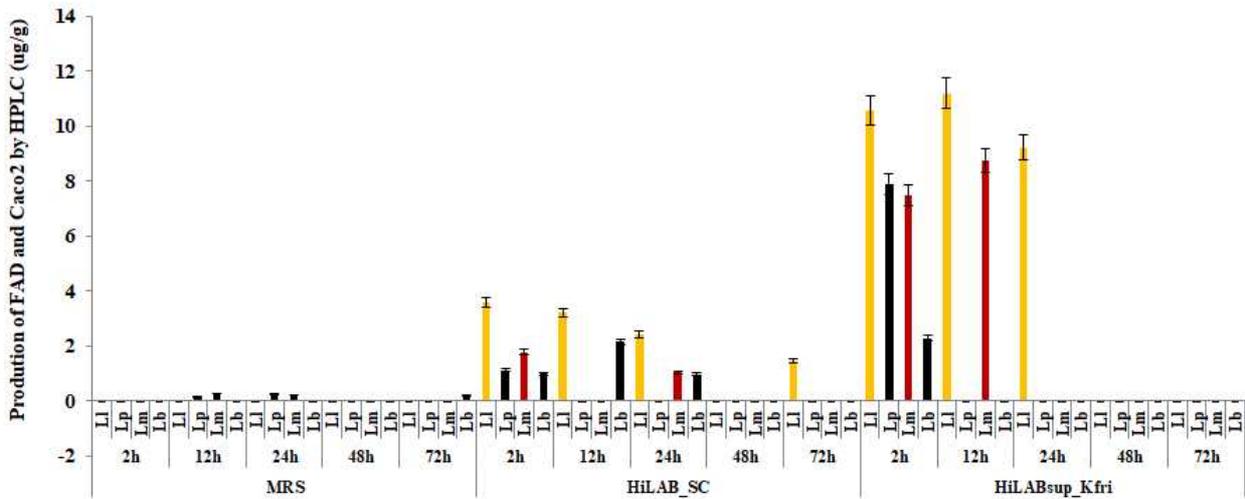


Fig. 38 FAD production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

FAD의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_Lm_Ca의 FAD의 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 비타민B2 그룹의 riboflavin, FMN, FAD의 생산량을 확인한 결과, 동애등에 추출물에서 자란 유산균이 MRS 배지에서 생산된 경우보다 riboflavin, FMN, FAD 모두 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 특히 12시간까지 FAD 생산량이 높았다. 리보플라빈의 경우에는 시간별로 생성양이 증가되는 것도 확인되었다.

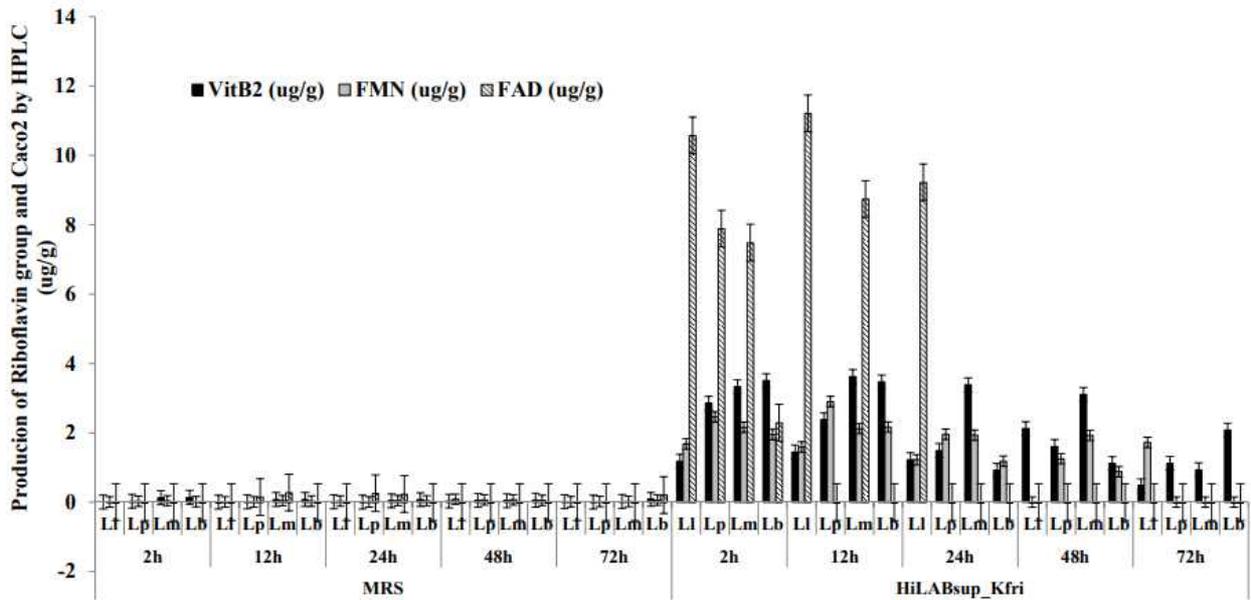


Fig FAD production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

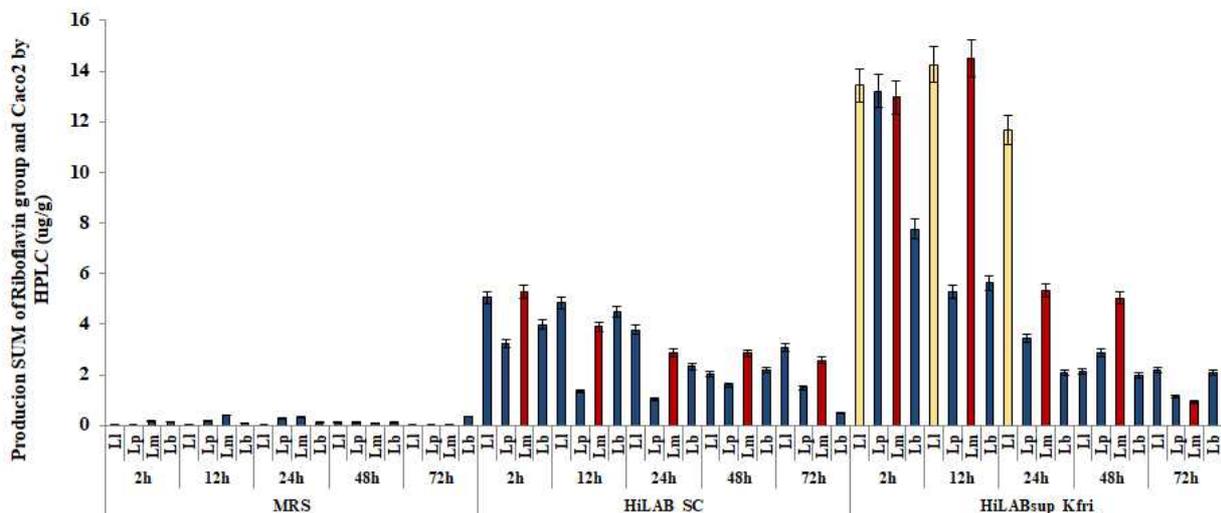


Fig 39 Production sum of Vitamin B2 group in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

(27) 동애등에 추출 발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포내 4종 유산균의 B9 생성능

Caco-2 세포에 동애등에 배지의 각각의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 발효물(30°C, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_Lm_Ca), 각 시간별의 Caco-2세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonic, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 유산균을 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca). 수집된 상청액을 0.45um 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하여, 상기 실시 예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다. 또한, 수집된 상청액을 0.45 µm시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 비타민 B9 ELISA 시료로 이용하여, 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였고, 그 결과를 나타내었다. 비타민 B9의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_LL_Ca의 비타민 B9의 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 특히 NO_Ca의 경우 이 생성되지 않았지만, GY_HiHe_LL_Ca 포함한 각 유산균의 경우 비타민 B9도 확인하여, 동애등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 각 발효물이 비타민 B9도 생성되는 것을 확인하였다.

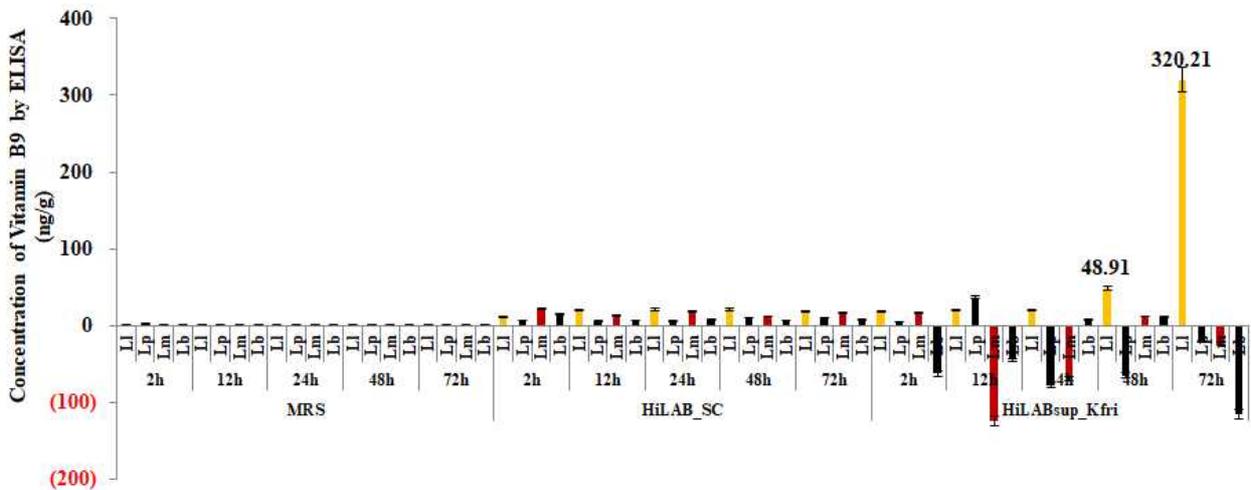


Fig. 40 Folate (Vit B9) production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

(28) 동애등에 추출 발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포내 4종 유산균의 B3 확인

Caco-2 세포에 동애등에 배지의 각각의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 발효물 (30°C, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_Lm_Ca), 각 시간별의 Caco-2세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 유산균을 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca).

수집된 상청액을 0.45um 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하여, 상기 실시 예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다.

또한, 수집된 상청액을 0.45 µm시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 비타민 B3 ELISA 시료로 이용하여, 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였고, 그 결과를 나타내었다. 비타민 B3 의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_Lm_Ca의 비타민 B3의 농도를 확인하였고, 특히 NO_Ca의 경우 이 생성되지 않았지만, GY_HiHe_Lm_Ca 포함한 각 유산균의 경우 비타민 B3도 확인하여, 동애등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 각 발효물이 우수한 비타민 B3도 유지되는 것을 확인하였다.

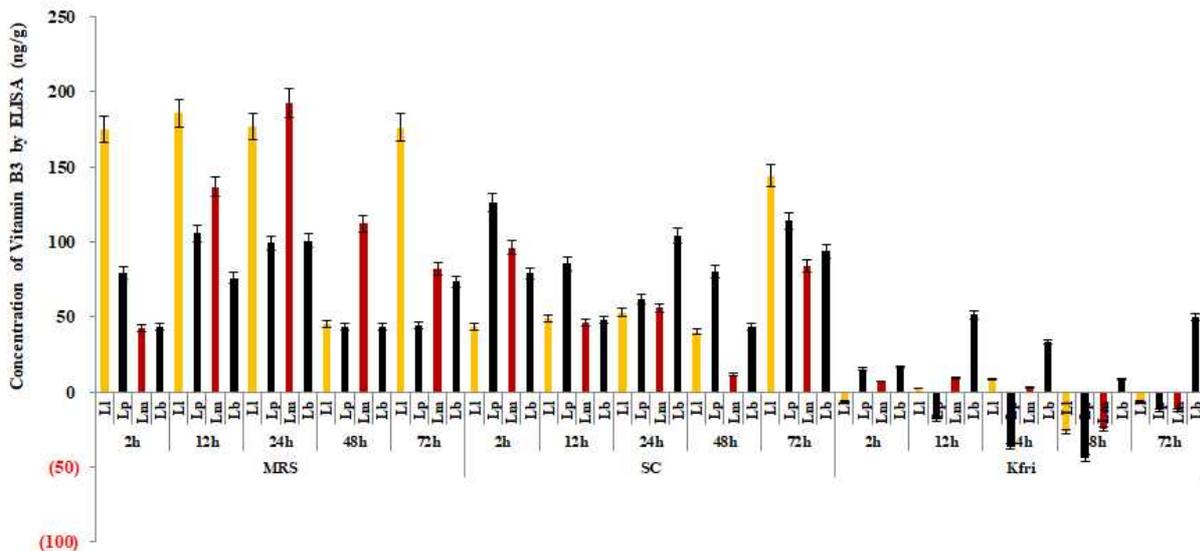


Fig. 41 Niacin (Vit B3) production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

(29) 동애등에 추출 발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포내 *L. lactis*의 B2/B9 생성능

Caco-2 세포에 동애등에 배지의 락토코쿠스 락티스 발효물 (30℃, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_LL_Ca), 각 시간별의 Caco-2세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 류코노스톡 메센테로이데스를 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca).

수집된 상청액을 0.45 μm시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하여, 상기 실시 예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다.

또한, 수집된 상청액을 0.45 μm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 비타민 B9 ELISA 시료로 이용하여, 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였고, 그 결과를 나타내었다. FAD의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_LL_Ca의 FMN 및 FAD 생성의 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 특히 NO_Ca의 경우 FMN이 생성되지 않았지만, GY_HiHe_LL_Ca의 경우 FAD 생성을 확인하여, 동애등에 추출물의 락토코쿠스 락티스 발효물이 우수한 B2, FMN, FAD 및 비타민 B9 생성능을 가지는 것을 확인하였다.

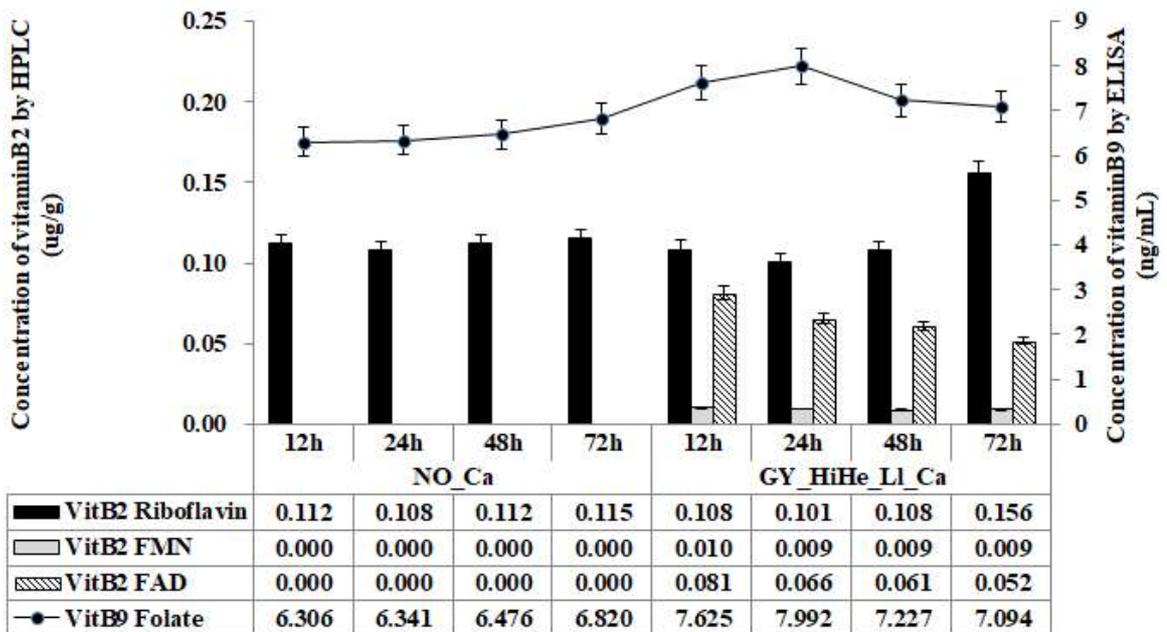


Fig 42 Riboflavin (Vit B2) production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. lactis*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

(30) 동애등에 추출 발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포내 *L. plantarum*의 B2/B9 생성능

Caco-2 세포에 동애등에 배지의 락토바실러스 플란터룸 발효물 (30°C, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_Ll_Ca), 각 시간별의 Caco-2세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 류코노스톡 메센테로이데스를 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca).

수집된 상청액을 0.45um 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하여, 상기 실시 예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다.

또한, 수집된 상청액을 0.45 µm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 비타민 B9 ELISA 시료로 이용하여, 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였고, 그 결과를 나타내었다. FAD의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_Lp_Ca의 FMN 및 FAD 생성의 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 특히 NO_Ca의 경우 FMN이 생성되지 않았지만, GY_HiHe_Lp_Ca의 경우 FAD 생성을 확인하여, 동애등에 추출물의 락토바실러스 플란터룸 발효물이 우수한 B2, FMN, FAD 및 비타민 B9 생성능을 가지는 것을 확인하였다.

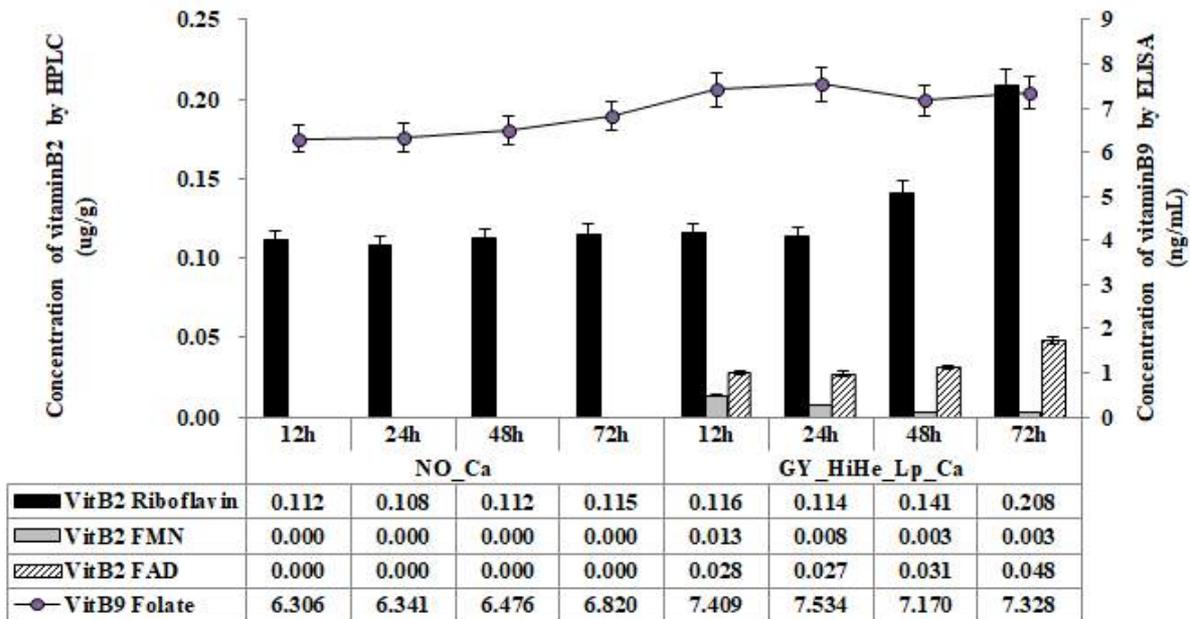


Fig 43 Riboflavin (Vit B2) production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. plantarum*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

(31) 동애등에추출발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포내 *L. mesenteroides*의 B2/B9 생성

Caco-2 세포에 동애등에 배지의 락토바실러스 메센테로이데스 발효물 (30°C, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_LI_Ca), 각 시간별의 Caco-2 세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 류코노스톡 메센테로이데스를 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca).

수집된 상청액을 0.45 µm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하여, 상기 실시예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다.

또한, 수집된 상청액을 0.45 µm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 비타민 B9 ELISA 시료로 이용하여, 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였고, 그 결과를 나타내었다. FAD의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_Lm_Ca의 FMN 및 FAD 생성의 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 특히 NO_Ca의 경우 FMN이 생성되지 않았지만, GY_HiHe_Lm_Ca의 경우 FAD 생성을 확인하여, 동애등에 추출물의 락토바실러스 메센테로이데스 발효물이 우수한 B2, FMN, FAD 및 비타민 B9 생성능을 가지는 것을 확인하였다.

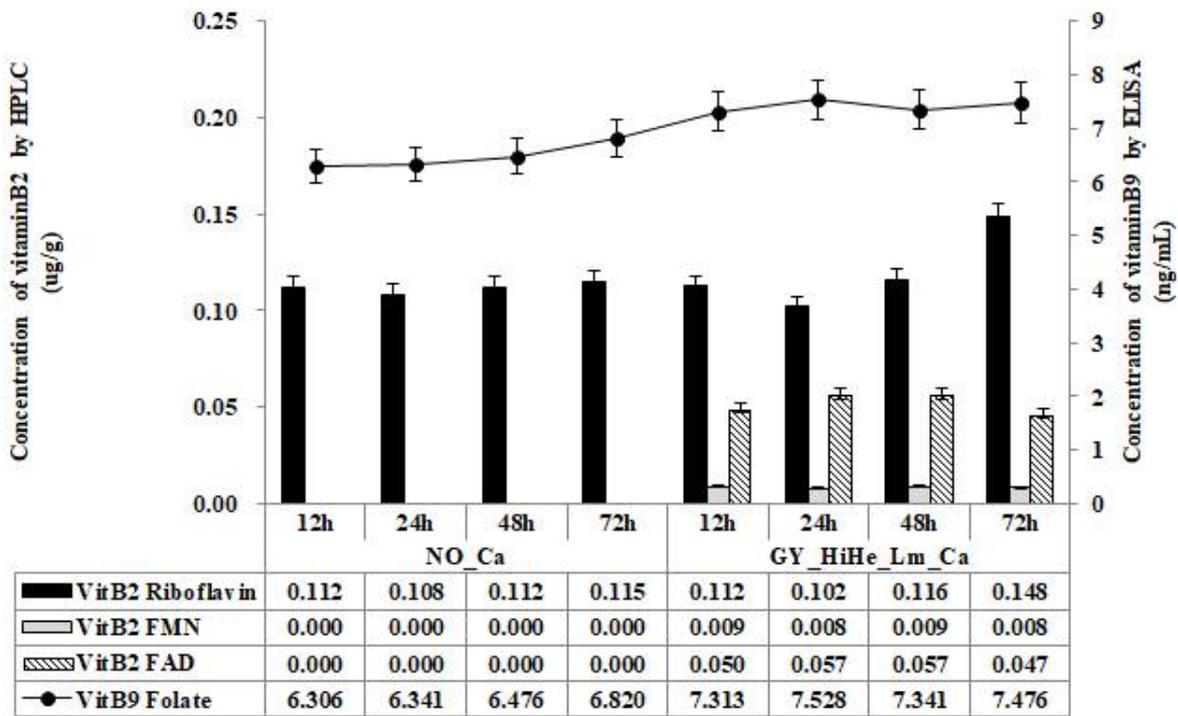


Fig 44 Riboflavin (Vit B2) production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB,, *L. mesenteroides*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

(32) 동애등에추출발효물(HiLAB_VitB2/B9) 인간장내 세포내 *L. brevis*의 B2/B9 생성능

Caco-2 세포에 동애등에 배지의 락토바실러스 브레비스 발효물 (30°C, 24시간)을 첨가하여 12시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 배양하였고 (GY_HiHe_LI_Ca), 각 시간별의 Caco-2세포와 배지를 모아 초음파파쇄기 (Sonics, USA)를 이용하여 750 watt, 20 kHz (amplitude, 20%)로 pulse on 2초, pulse off 10초 조건 하에 3회 반복하여 파쇄 하였으며, 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 수집하였다. 대조군으로 류코노스톡 메센테로이데스를 첨가하지 않고, Caco-2 세포만을 배양하여 상청액을 수집하였다 (NO_Ca).

수집된 상청액을 0.45um 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 HPLC 시험 용액으로 이용하여, 상기 실시 예 4와 실질적으로 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였다.

또한, 수집된 상청액을 0.45 µm 시린지 필터 (ADVANTEC, Japan)를 이용하여 필터링한 후 비타민 B9 ELISA 시료로 이용하여, 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였고, 그 결과를 나타내었다. FAD의 생산량을 확인한 결과, GY_HiHe_Lm_Ca의 FMN 및 FAD 생성의 생산량이 더 높은 것을 확인하였고, 특히 NO_Ca의 경우 FMN이 생성되지 않았지만, GY_HiHe_Lm_Ca의 경우 FAD 생성을 확인하여, 동애등에 추출물의 락토바실러스 브레비스 발효물이 우수한 B2, FMN, FAD 및 비타민 B9 생성능을 가지는 것을 확인하였다.

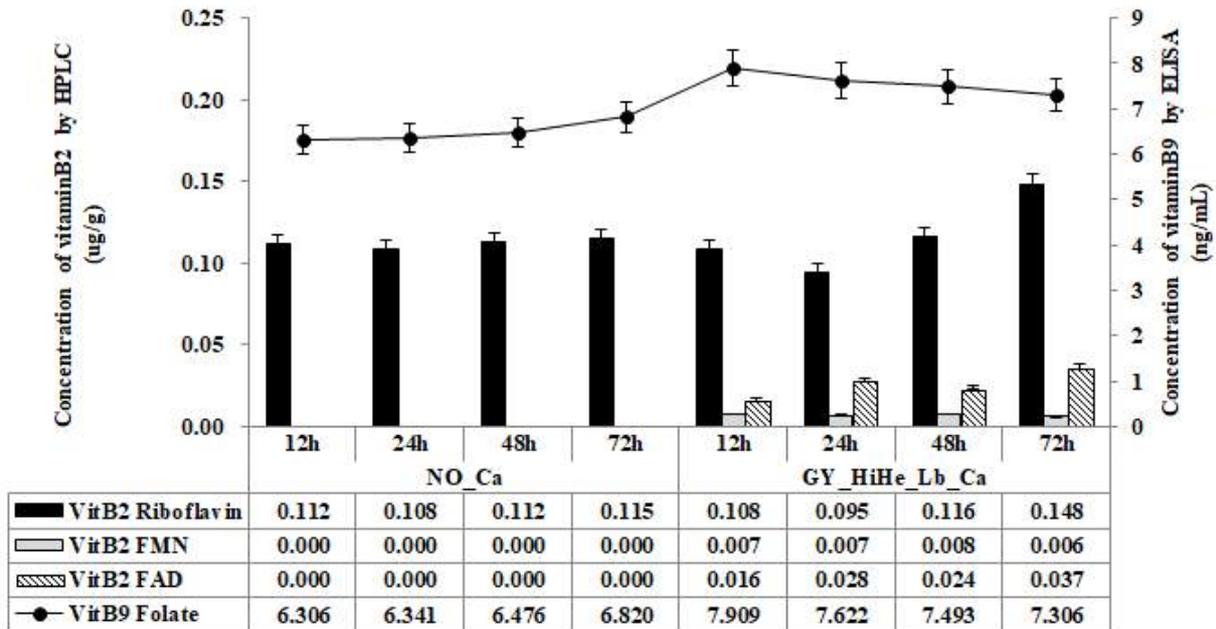


Fig 45 Riboflavin (Vit B2) production in a co-culture of selected probiotics and Caco-2 cells. LAB, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*. MRS media, control; HiLAB_SC, LAB cultured under *H. illucense* media with *H. illucense* powder; HiLABsup_kfri, LAB cultured under *H. illucense* media without *H. illucense* powder.

(33) 인간 장 내 세포내의 *L. lactis*의 유해균 부착 억제능 분석

동애등에 추출물에서 발효된 유산균 락토코쿠스 락티스의 Caco-2 세포내의 유해균 3종 대장균 (*Escherichia coli*, *E. coli*, ATCC 11775), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, ATCC 12600), 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*, ATCC 15313)에 대한 억제능을 분석하였다.

각 3종의 유해균과 락토코쿠스 락티스 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)를 MRS 배지 내에 1) 동시접종, 2) 유산균 선 접종 후 유해균 후 접종, 3) 유해균 선 접종 후 유산균 후 접종한 각각의 실험군 시료에 대해 MRS (BCP 포함) 1% agar 배지에 100 μ L씩 접종하여 생균수를 조사하였다.

또한, 각 3종의 유해균과 락토코쿠스 락티스는 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)로 Caco-2 세포 (1×10^5 cells/well)에 1,000:1의 비율로 접종하였다.

실험은 부착 경쟁능 (Competitive adhesion); Caco-2 세포내에 락토코쿠스 락티스와 3종의 각각의 유해균 (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*)을 동시에 1시간 동안 공접종하여 경쟁 분석하였다.

유해균 3종과 락토코쿠스 락티스에 대해 각각 페어링 처리하여 확인하였다. 확인은 배지의 균 제거를 위해, 상청액을 제거하고 PBS로 2~3회 세척 후, 세포를 수집하여 생균수 확인 시료로 사용하였다(Fig 46)

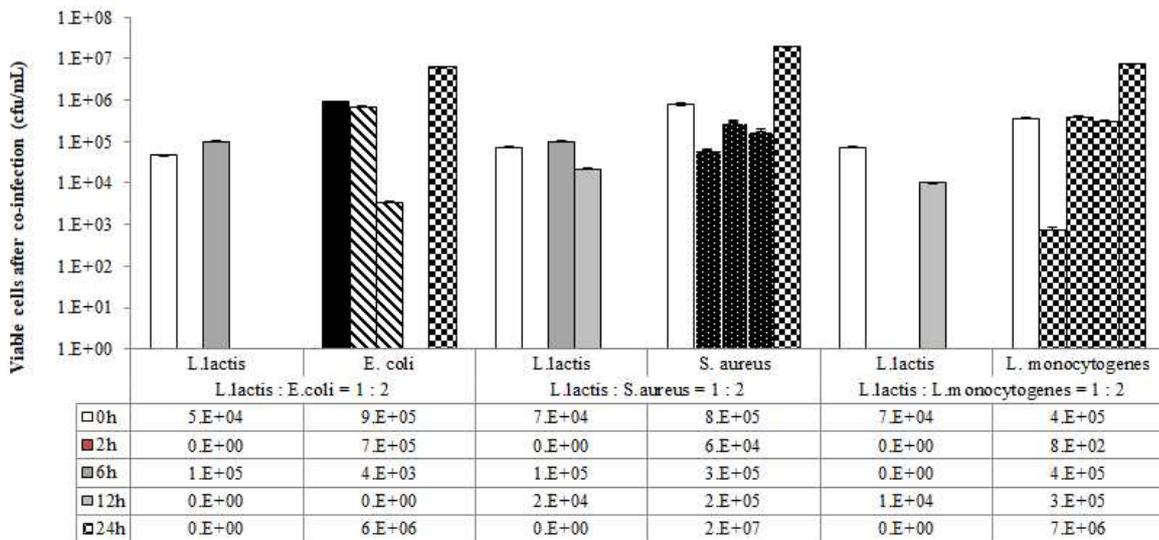


Fig 46 Number of viable cell of experimental bacteria (*L. lactis*) and pathogens bound in MRS media in protection assay.

(34) 인간 장 내 세포내의 *L. plantarum*의 유해균 부착 억제능 분석

동애등에 추출물에서 발효된 유산균 락토바실러스 플란터룸의 Caco-2 세포내의 유해균 3종 대장균 (*Escherichia coli*, *E. coli*, ATCC 11775), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, ATCC 12600), 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*, ATCC 15313)에 대한 억제능을 분석하였다.

각 3종의 유해균과 락토바실러스 플란터룸 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)를 MRS 배지 내에 1) 동시접종, 2) 유산균 선 접종 후 유해균 후 접종, 3) 유해균 선 접종 후 유산균 후 접종한 각각의 실험군 시료에 대해 MRS (BCP 포함) 1% agar 배지에 100 μ L씩 접종하여 생균수를 조사하였다. 또한, 각 3종의 유해균과 락토바실러스 플란터룸은 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)로 Caco-2 세포 (1×10^5 cells/well)에 1,000:1의 비율로 접종하였다.

실험은 부착 경쟁능 (Competitive adhesion); Caco-2 세포내에 락토바실러스 플란터룸와 3종의 각각의 유해균 (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*)을 동시에 1시간 동안 공접종하여 경쟁 분석하였다.

유해균 3종과 락토바실러스 플란터룸에 대해 각각 페어링 처리하여 확인하였다. 확인은 배지의 균 제거를 위해, 상청액을 제거하고 PBS로 2~3회 세척 후, 세포를 수집하여 생균수 확인 시료로 사용하였다.

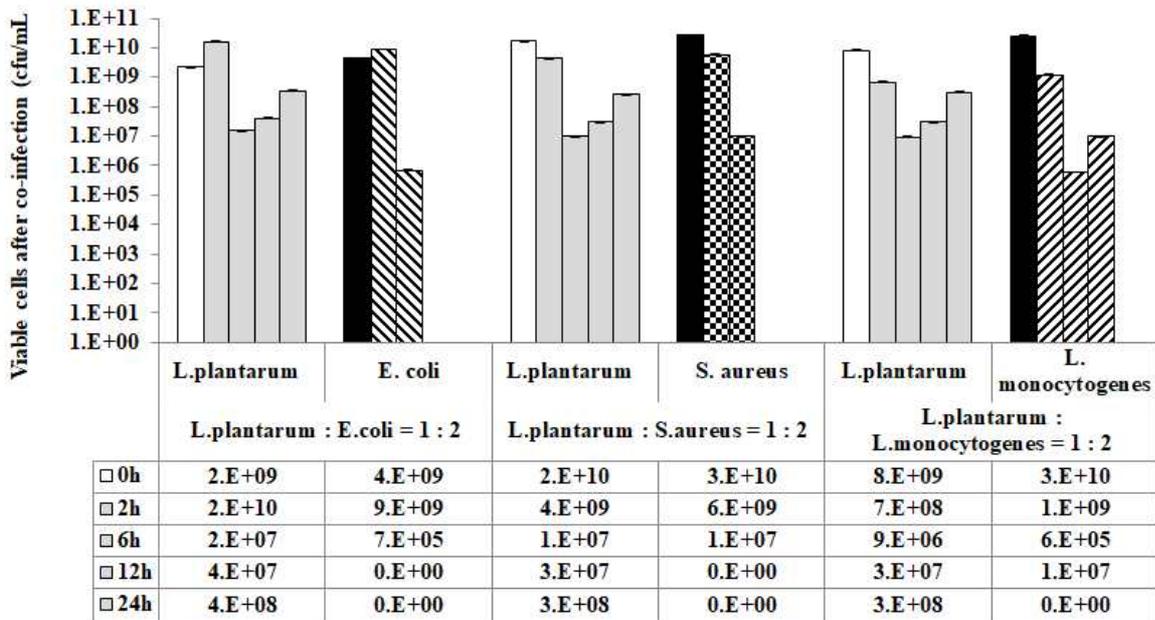


Fig 47 Number of viable cell of experimental bacteria (*L. plantarum*) and pathogens bound in MRS media in protection assay.

(35) 인간 장 내 세포내의 *L. mesenteroides*의 유해균 부착 억제능 분석

동애등에 추출물에서 발효된 유산균 류코노스톡 메센테로이데스의 Caco-2 세포내의 유해균 3종 대장균 (*Escherichia coli*, *E. coli*, ATCC 11775), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, ATCC 12600), 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*, ATCC 15313)에 대한 억제능을 분석하였다.

각 3종의 유해균과 류코노스톡 메센테로이데스 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)를 MRS 배지 내에 1) 동시접종, 2) 유산균 선 접종 후 유해균 후 접종, 3) 유해균 선 접종 후 유산균 후 접종한 각각의 실험군 시료에 대해 MRS (BCP 포함) 1% agar 배지에 100 μ L씩 접종하여 생균수를 조사하였다. 또한, 각 3종의 유해균과 류코노스톡 메센테로이데스는 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)로 Caco-2 세포 (1×10^5 cells/well)에 1,000:1의 비율로 접종하였다.

실험은 부착 경쟁능 (Competitive adhesion); Caco-2 세포내에 류코노스톡 메센테로이데스와 3종의 각각의 유해균 (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*)을 동시에 1시간 동안 공접종하여 경쟁 분석하였다.

유해균 3종과 류코노스톡 메센테로이데스에 대해 각각 페어링 처리하여 확인하였다. 확인은 배지의 균 제거를 위해, 상청액을 제거하고 PBS로 2~3회 세척 후, 세포를 수집하여 생균수 확인 시료로 사용하였다.

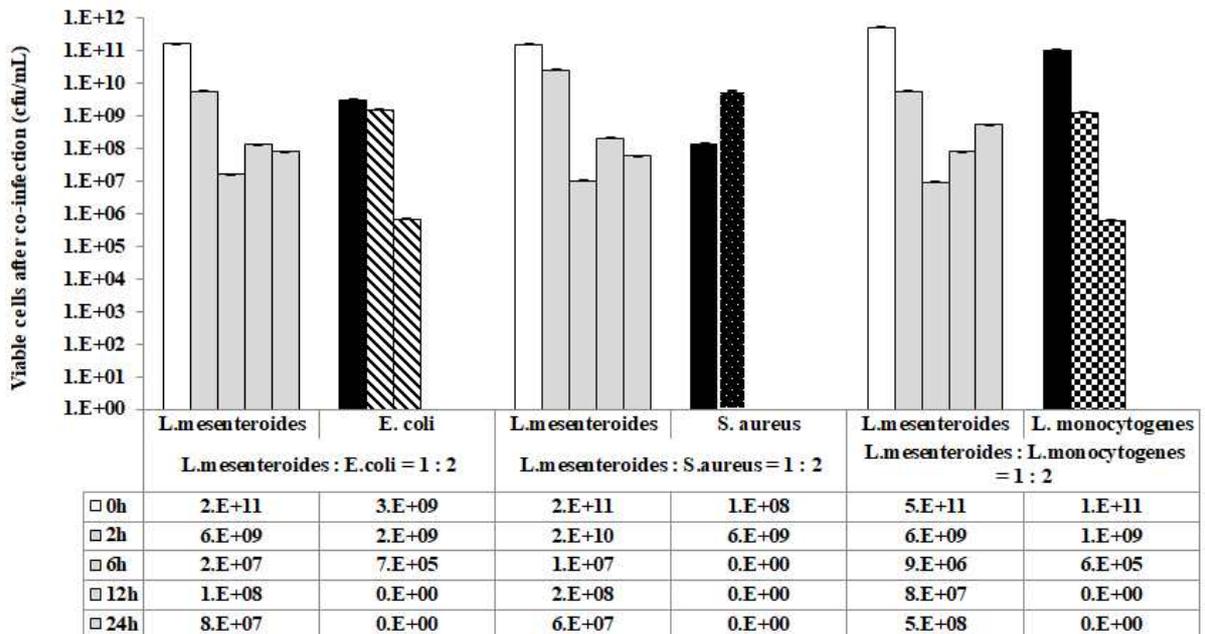


Fig 47 Number of viable cell of experimental bacteria (*L. mesenteroides*) and pathogens bound in MRS media in protection assay.

(36) 인간 장 내 세포내의 *L. brevis*의 유해균 부착 억제능 분석

동애등에 추출물에서 발효된 유산균 락토바실러스 브레비스의 Caco-2 세포내의 유해균 3종 대장균 (*Escherichia coli*, *E. coli*, ATCC 11775), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, ATCC 12600), 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*, ATCC 15313)에 대한 억제능을 분석하였다.

각 3종의 유해균과 락토바실러스 브레비스 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)를 MRS 배지 내에 1) 동시접종, 2) 유산균 선 접종 후 유해균 후 접종, 3) 유해균 선 접종 후 유산균 후 접종한 각각의 실험군 시료에 대해 MRS (BCP 포함) 1% agar 배지에 100 μ L씩 접종하여 생균수를 조사하였다. 또한, 각 3종의 유해균과 락토바실러스 브레비스는 (OD600=1; 1×10^8 cfu/well)로 Caco-2 세포 (1×10^5 cells/well)에 1,000:1의 비율로 접종하였다.

실험은 부착 경쟁능 (Competitive adhesion); Caco-2 세포내에 락토바실러스 브레비스와 3종의 각각의 유해균 (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*)을 동시에 1시간 동안 공접종하여 경쟁 분석하였다.

유해균 3종과 락토바실러스 브레비스에 대해 각각 페어링 처리하여 확인하였다. 확인은 배지의 균 제거를 위해, 상청액을 제거하고 PBS로 2~3회 세척 후, 세포를 수집하여 생균수 확인 시료로 사용하였다.

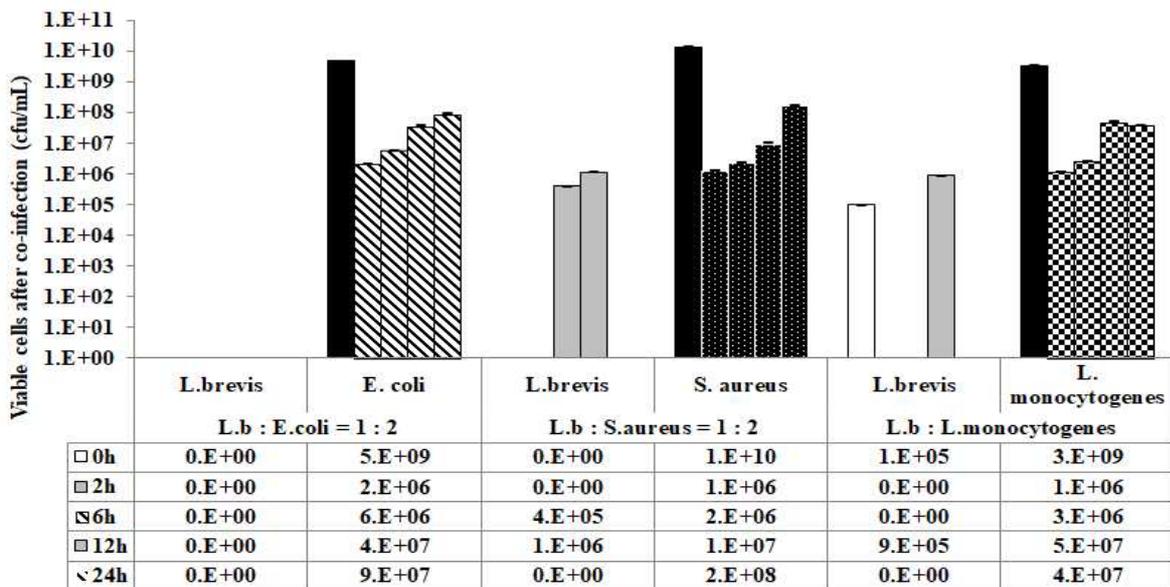


Fig 48 Number of viable cell of experimental bacteria (*L. brevis*) and pathogens bound in MRS media in protection assay.

(37) 동애등에 유산균 발효물(HiLm)의 항균활성 분석

L. plantarum(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 3종의 유산균을 대장균과 2종의 식중독 균에 대한 항균활성을 측정하였다. 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL씩 접종하고 30°C에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 상기 LAB Counts는 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1(v/v)%로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 이후 동애등에 유충의 열수 추출물의 유산균 발효물의 항균활성을 평가하였다. 상기 항균활성 평가 대상 미생물은 대장균 (*E. coli*), 식중독균(*S. aureus*, *L. monocytogenes*)를 MRS 배지에 균주를 개별적으로 조금 작은 억제 환이 생성되었다.

E. coli, *S. aureus*, *L. monocytogenes*에 있어서 장염과 식중독 등과 같은 질병을 유발하는 균으로 알려져 있는 바, 본 발명의 동애등에 추출물의 유산균 발효물에 대해 유산균 접종 후 발효단계를 거침으로써, 대장균과 식중독균 등에 대해 우수한 항균효과를 가짐을 확인할 수 있었고, 동애등에의 추출물의 유산균 발효물 (HiLAB)은 질병에 대한 예방, 개선 또는 치료용 물질로 사용할 수 있음을 확인하였다 (Fig 49)

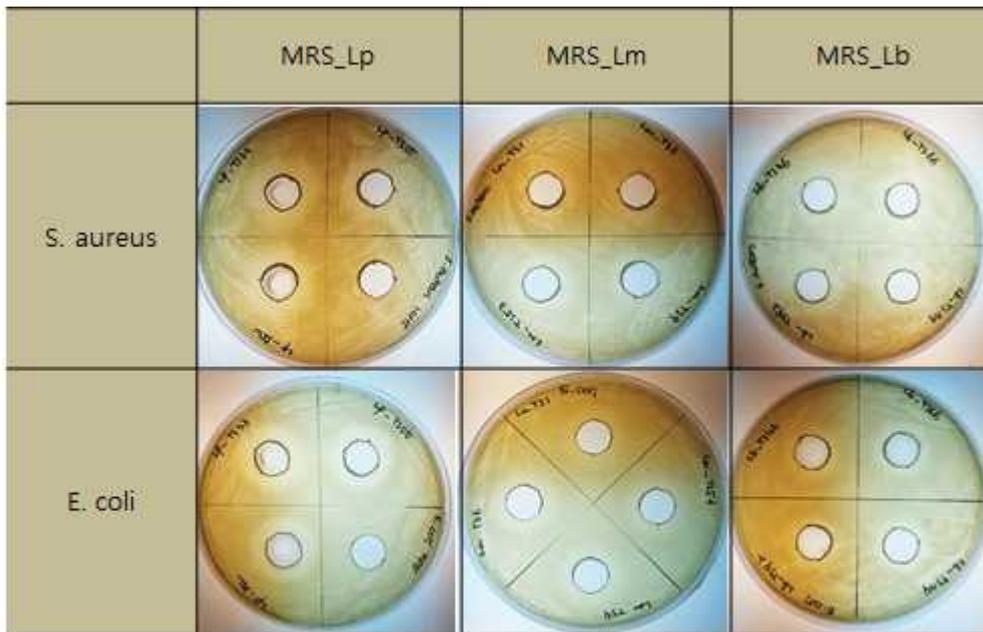


Fig 49. Antibacterial activity in MRS agar plate

다음으로 MRS배지에서 확인한 균에 대해 대장균과 2종의 식중독 균의 세균배양배지에서의 *L. lactis*(MIRE_P1; KCCM 13066P), *L. plantarum*(MIRE_TS55; KCCM 13068P), *L. mesenteroides*(MIRE_TS1; KCCM 13067P), *L. brevis*(MIRE_TS66; KCCM 13069P) 4종의 유산균을 대장균과 2종의 식중독 균에 대한 항균활성을 측정하였다. 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1 mL 씩 접종하고 30°C에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 상기 LAB Counts는 각 액체 배지에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 발효물을 1 (v/v)%로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 이후 동애등에 유충의 열수 추출물의 유산균 발효물의 항균활성을 평가하였다. 상기 항균활성 평가 대상 미생물은 대장균 (*E. coli*), 식중독균(*S. aureus*, *L. monocytogenes*)를 MRS 배지에 균주를 개별적으로 조금 작은 억제 환이 생성되었다.

E. coli, *S. aureus*, *L. monocytogenes*에 있어서 장염과 식중독 등과 같은 질병을 유발하는 균으로 알려져 있는 바, 본 발명의 동애등에 추출물의 유산균 발효물에 대해 유산균 접종 후 발효단계를 거침으로써, 대장균과 식중독균 등에 대해 우수한 항균효과를 가짐을 확인할 수 있었고, 동애등에의 추출물의 유산균 발효물 (HiLAB)은 질병에 대한 예방, 개선 또는 치료용 물질로 사용할 수 있음을 확인하였다 (Fig 50)

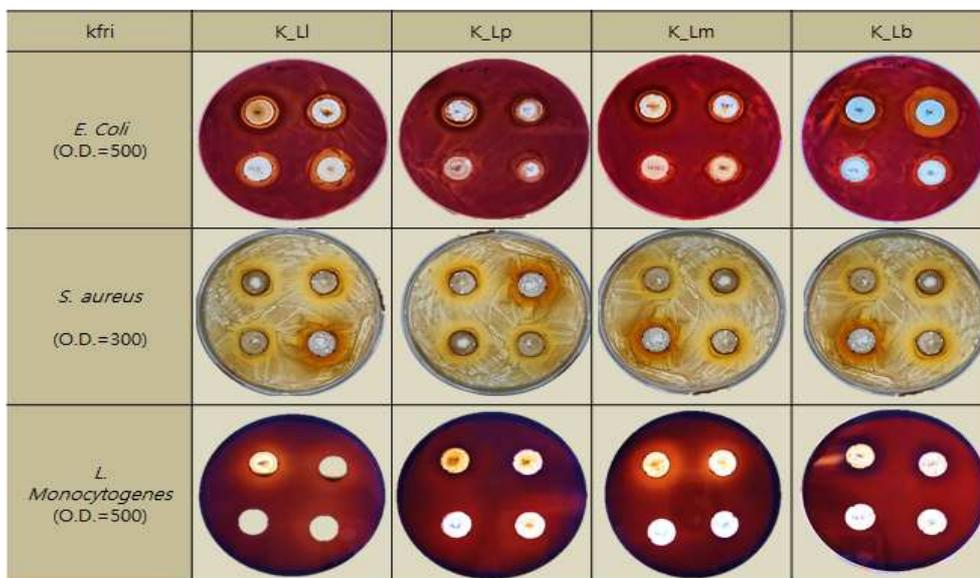


Fig 50. Antibacterial activity in MacConkey, LB, and Oxford Agar

Table 7. Summary of antibacterial activity for HiLAB in MacConkey, LB, and Oxford agar. (1.3 ~1.5 cm, +; 1.6 ~2.0 cm, ++; 2.1 ~2.5 cm, +++; 2.6 ~3.0 cm, ++++)

LAB/ Pathogene ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	K_Ll				K_Lp				K_Lm				K_Lb			
	400	200	100	50	400	200	100	50	400	200	100	50	400	200	100	50
<i>E. coli</i>	++	+++	++++	++++	++	++	+	ND	++	++	+	ND	++	+++	++	+
<i>S. aureus</i>	++				+++				+++				+++			
<i>L. monocytogenes</i>	+++	++	+++	ND	+++	++	+++	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(38) 동애등에 유산균 발효물(HiLm)의 성분분석_한국기능식품연구원

동애등에 발효물 사료 첨가물의 성분비교를 위해 식품의약품안전처에 고시된 방법에 따라 외부 공인기관을 통해 성분분석을 진행하였다. 마이크로웨이브에 의해 건조된 동애등에 분말의 열량은 347.6 Kcal/100g, 탄수화물은 16.78%, 조단백질은 46.91%, 조지방 10.3%, 수분은 5.13%, 회분 20.88 %였으며 칼슘은 6,646 mg/100g, 마그네슘 324.48 mg/100g, 철은 25.54 mg/100g 로 확인되었다. *Leuconostoc mesenteroides* 로 발효한 동애등에 추출발효물은 열량은 35074 Kcal/100g, 탄수화물은 31.29%, 조단백질은 39.07%, 조지방 7.7%, 수분은 5.85%, 회분 16.09 %였으며 칼슘은 4,856 mg/100g, 마그네슘 243.29 mg/100g, 철은 20.55 mg/100g로 확인되었다. 발효물의 대부분 성분이 발효전보다 낮아졌으며, 탄수화물만이 1배정도 높았고 이는 갈락토스 등의 당류의 첨가에 의한 것으로 생각되어 이후 첨가량을 0.2 % 정도로 적게 첨가하는 것에 재현성 실험을 진행 중이다(Table 8).

Table 8. Comparison of component of Hi(BSF powder) and HiLm.

Index	Hi_Powder	HiLm_5% Fermentation Solution
Caroli(Kcal/100g)	347.6	350.74
Carbohydrate(%)	16.78	31.29
Crude Protein(%)	46.91	39.07
Crude Fat(%)	10.3	7.7
Moisture(%)	5.13	5.85
Ash(%)	20.88	16.09
Ca(mg/100g)	6,646.1	4,865.6
Mg(mg/100g)	324.48	243.29
Fe(mg/100g)	25.54	20.55

다음으로 동애등에 발효물 사료 첨가물의 비타민 성분 비교를 위해 식품의약품안전처에 고시된 방법에 따라 외부 공인기관을 통해 성분분석을 진행하였다. 마이크로웨이브에 의해 건조된 동애등에 분말의 수용성비타민으로 비타민B군 티아민(Vit B1)은 0.083 mg/100g, 리보플라빈(Vit B2)은 0.91 mg/100g, 나이아신(Vit B3)은 8.89 mg/100g, 판토텐산(Vit B5)은 1.54 mg/100g, 비오틴(Vit B7)은 145 µg/100g 으로 확인되었고 나머지 비타민B6, 비타민B9, 비타민B12는 검출되지 않았다. *Leuconostoc mesenteroides*로 발효한 동애등에 추출발효물은 수용성비타민으로 비타민 B군 티아민(Vit B1)은 0.072 mg/100g, 리보플라빈(Vit B2)은 1.86 mg/100g, 나이아신(Vit B3)은 11.83 mg/100g, 판토텐산(Vit B5)은 1.04 mg/100g, 비오틴(Vit B7)은 132.74 µg/100g 으로 확인되었고, 나머지 비타민B6, 비타민B9, 비타민B12는 검출되지 않았다. 발효물에서 비타민B2, B3 외에는 발효전보다 농도가 낮아졌고 비타민B9의 경우는 미량으로 HPLC 검출에 한계가 있어 ELISA 방법에 의해 측정된 값으로 대신하였다(Table 8). 또한 발효 전에는 지용성 비타민인 비타민A, D, E, K의 분석결과 기존에 알려진 비타민A 성분은 불검출 되었으며, 외의 비타민D 2.1 µg/100g, 비타민E 1.1 µg/100g, 비타민K 2.48 µg/100g이며, 발효 후에는 지용성 비타민인 비타민A, D, E, K의 분석결과 기존에 알려진 비타민A 성분은 역시 불검출이며, 외의 비타민D 1.9 µg/100g, 비타민E 0.9 µg/100g, 비타민K 2.08 µg/100g로 발효전보다 모두 낮게 검출되었다 (Table 9). 이는 발효 동안 발생하는 열 또는 공정후의 처리에서 오는 값의 차이로 생각된다.

Table 9. Comparison of vitamin component of Hi(BSF powder) and HiLm. WSV, water soluble vitamin; FSV, Fat soluble vitamin.

	Index	Hi_Powder	HiLm_5% Fermentation Solution
WSV	VitB1(tiamin; mg/100g)	0.083	0.072
	VitB2(mg/100g)	0.91	1.86
	VitB3(niacin; mg/100g, NE)	8.89	11.83
	VitB5(pantoten; mg/100g)	1.54	1.04
	VitB6(Pyridoxine)	-	-
	VitB7(Vit8, VitH, biotin; µg/100g)	145.6	132.74
	VitB9(folate; µg/100g)	-	36 ng/mL(ELISA : 자체분석)
	VitB12(cobalamin)	-	-
FSV	VitA(µg/100g; RE)	-	-
	VitD(µg/100g; IU)	2.1	1.9
	VitE(µg/100g; a-TE)	1.1	0.9
	VitK(µg/100g)	2.48	2.08

2-2. 비타민B2/B9 파라바이오틱스 효능 평가(공동1_한국식품연구원)

1 세포 기반 장내 염증완화 효능 평가를 위한 비타민 B2/B9 성분 강화 소재 스크리닝

(1) 표준품 Vit B2/B3/B9을 처리하여 세포독성 확인

세포 독성을 확인하기 위해 Caco-2 세포에 표준품인 Vit B2, B9을 6.25, 12.5, 25, 50 100 µg/mL 농도로 2시간 처리하였다. 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS (10 µg/mL)을 처리 후 24시간 동안 배양하였고, RAW264.7 세포에는 Vit B2, B3, B9을 25, 50, 100 µg/mL 농도로 1시간 처리한 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS (1 µg/mL)을 처리 후 18시간 동안 배양하였다. CCK-8 assay를 이용하여 세포생존율을 측정된 결과, Caco-2 세포에서는 Fig. 1(A)에서 보는 것과 같이, Vit B2는 고농도인 100 µg/mL 처리군에서 대조군 대비 유의적인 차이를 나타내며 70%대로 감소하였다. 반면 Vit B9는 모든 농도에서 대조군과 비교할 경우 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였으며 (Fig.1B), 추후 실험은 Vit B2, B9 모두 세포독성이 없는 농도범위인 25, 50 µg/mL에서 진행하였다. RAW264.7 세포에서는 Fig. 1(C)에서 Vit B2, B3, B9 모든 농도에서 세포생존률 80% 이상을 나타내어 세포독성을 나타내지 않았다.

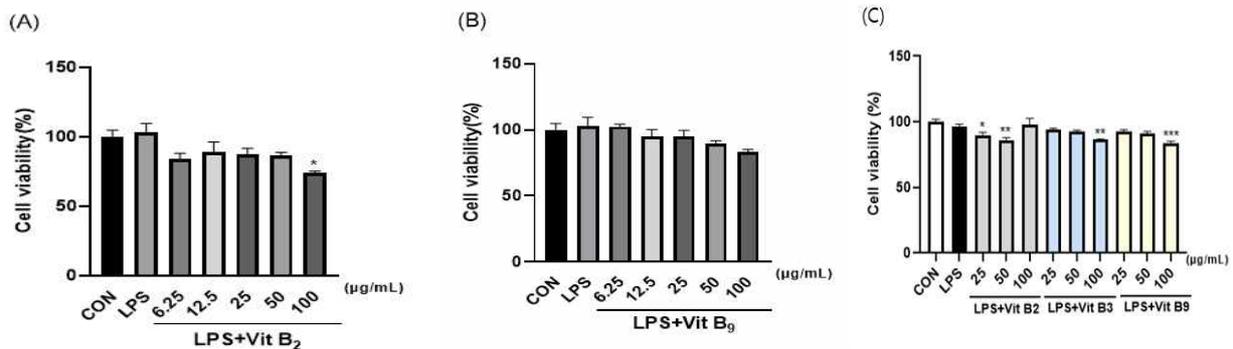


Fig. 1. Effects of different concentrations of vitamin B2, B3, B9 on Caco-2 cells and RAW264.7 cells.

- Caco-2 cells were treated with vitamin B2, B9 for 2h, then treated with LPS (10 µg/mL) for 24 h (A,B).
- Raw264.7 cells were treated with vitamin B2, B3, B9 for 1 h, then treated with LPS (1 µg/mL) for 20 h (C).
- Cell viability was determined by CCK-8 assay.
- The data shown are means ± SEM (n = 3). *p < 0.05 **p < 0.01 and ***p < 0.001 vs. control group

(2) 표준품 Vit B2/B3/B9의 장내 염증인자 발현 억제 확인

체내에 염증반응이 일어나게 되면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 다량의 NO가 생성되며, 이로 인해 유전자 변이, 신경 및 조직 손상이 유발된다. COX-2는 정상세포에서는 그 농도가 매우 낮으나 염증 관련 세포에서 여러 자극에 의해 유도 발현되어 염증에 관여하는 프로스테그란딘(PG)류 생성에 관여한다. Caco-2 세포, RAW264.7 세포에서 장내 염증인자인 iNOS, COX-2의 발현유무를 확인하기 위해 Western blot으로 확인하였다. Fig 2(A)와 같이 대조군 대비 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24시간) 처리군에서 염증인자인 iNOS, COX-2의 발현을 유의적 차이를 나타내며 증가함을 보였다. 같은 LPS 농도 및 처리시간 조건으로 비타민 B2, B9를 먼저 2시간 처리하여 iNOS, COX-2의 발현을 확인한 결과, Fig.2(B)에서 LPS로 증가한 iNOS의 발현을 비타민 B2는 억제시키지 못하였고, 비타민 B9는 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 나타내었다. COX-2의 발현은 Fig.2(C)에서와 같이 비타민 B2의 저농도(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 비타민 B9의 고농도(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리군이 LPS 처리군 대비 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. 이와는 다른 경향으로 RAW264.7 세포에서는 Fig 2(D-F)에서 보이듯이, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 20시간) 처리로 유도된 iNOS, COX-2의 발현을 비타민 B3, B9는 억제시키지 못하였고, 비타민 B2 고농도(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리군에서 iNOS의 발현을 억제시켰다. 따라서 Caco-2 세포에서 염증인자인 iNOS, COX-2 모두 억제시키는 비타민 B9이 장내 염증완화에 효능이 있고, RAW 264.7에서 비타민 B2의 iNOS 억제 효능을 보아 항염증 활성이 있음을 확인하였다.

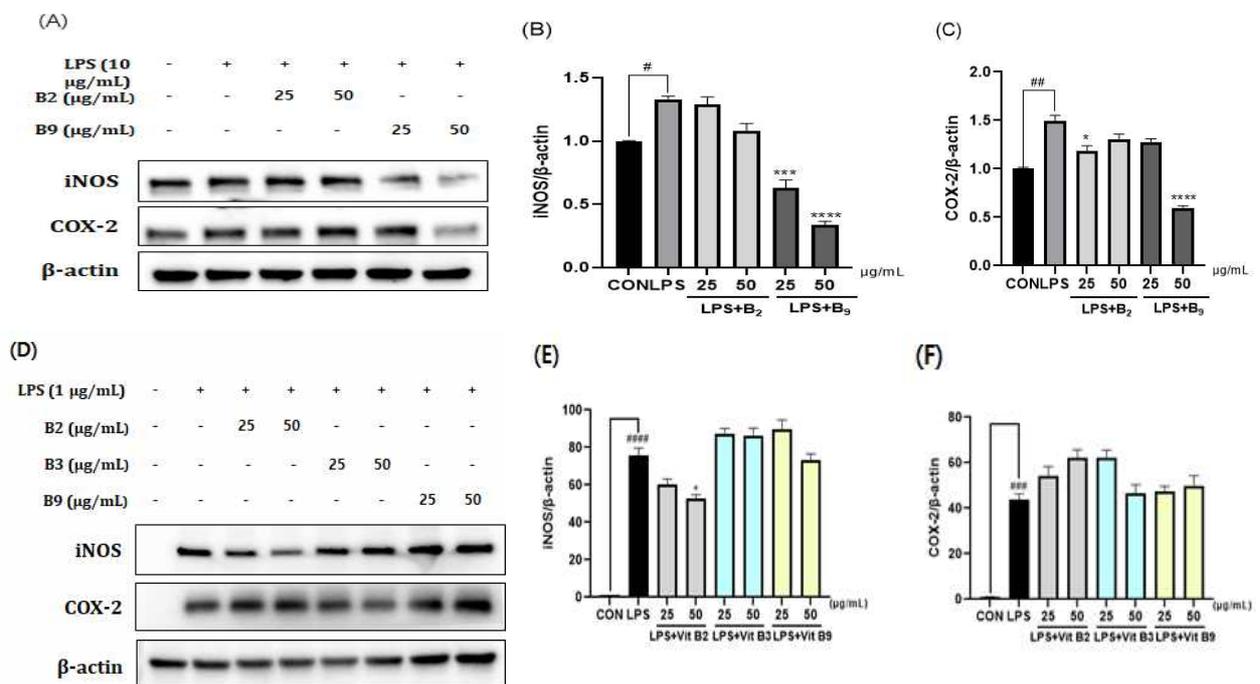


Fig. 2. Effects of Vitamin B2, B3, B9 on protein expression levels of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated Caco-2 cells and RAW264.7 cells.

- Caco-2 cells were *pre-treated* with vitamin B2, B9 for 2h, then LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h (A,B,C).
- RAW264.7 Cells were *pre-treated* with vitamin B2, B3, B9 for 1 h, then LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 20 h (D,E,F).
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blotting and quantified.
- The data shown are means \pm SEM (n = 3). [#]p < 0.05 ^{##}p < 0.01 ^{###}p < 0.001 and ^{****}p < 0.0001 vs. control group, ^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01 and ^{***}p < 0.001 vs. LPS alone group.

(3) 표준품 Vit B2/B3/B9의 염증성 사이토카인 및 NO 발현억제 확인

대표적인 염증성 procytokine의 일종인 IL-6, TNF- α 는 in vitro 및 in vivo 상에서 염증반응을 조절하는 물질로 LPS와 같은 염증자극물질에 의해 생성이 촉진되는 것으로 알려져 있다. Vit B2, B3, B9이 염증성 사이토카인과 염증매개물질인 세포 내 NO 생성에 미치는 영향을 LPS 유도에 의해 활성화된 RAW264.7 세포 내에서 측정하였다. RAW264.7에서 LPS 처리로 유도된 TNF- α 의 분비량을 Vit B2는 농도 의존적으로 감소시켰고(Fig. 3A), IL-6의 분비량은 Vit B2, B3, B9 모든 농도 처리군에서 유의적으로 감소시킴을 확인하였다 (Fig. 3B). Fig. 3(C)에서 LPS 처리에 의해 NO의 생성이 현저히 증가 하였으며, LPS에 의한 NO의 생성은 Vit B2, B3 (25 μ g/mL 처리군 제외), B9에 의해 저해됨을 확인하였다.

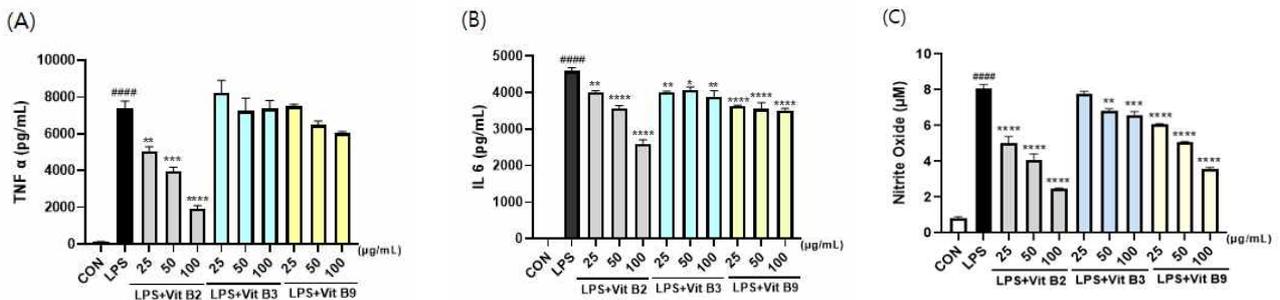


Fig. 3. Effects of different concentrations of Vitamin B2, B3, B9 on Raw264.7 cells.

- Raw264.7 cells were treated with vitamin B2, B3, B9 for 1 h, then treated with LPS (1 μ g/mL) for 20 h.
- Cell supernatant was analyzed by ELISA assay (A, B) and NO assay (C).
- The data shown are means \pm SEM (n = 3). ####p < 0.0001 vs. control group, *p < 0.05 **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001 vs. LPS group.

(4) 동애등에 추출물 및 발효추출물 소재 6종에 대한 세포독성 확인

세포 독성을 확인하기 위해 Caco-2 세포에서 동애등에 추출물 및 그 발효 추출물 소재 6종을 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL 농도로 2시간 먼저 처리 후 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS (10 µg/mL)을 24시간 동안 처리하여 CCK-8 assay를 이용한 세포생존율을 측정하였다. Fig. 4(A),(B)에서와 같이, 소재 처리군(동애등에 추출물 및 그 발효물)이 대조군과 비교하여 세포 증식효과가 있었고, 고농도 처리군에서 증식효과가 증대됨을 확인하였다. 동애등에 추출물 및 발효추출물 소재 6종의 장내 염증 억제 스크리닝을 위해 세포독성이 없는 농도인 200, 400 µg/mL 두 농도로 추후 실험을 진행하였다.

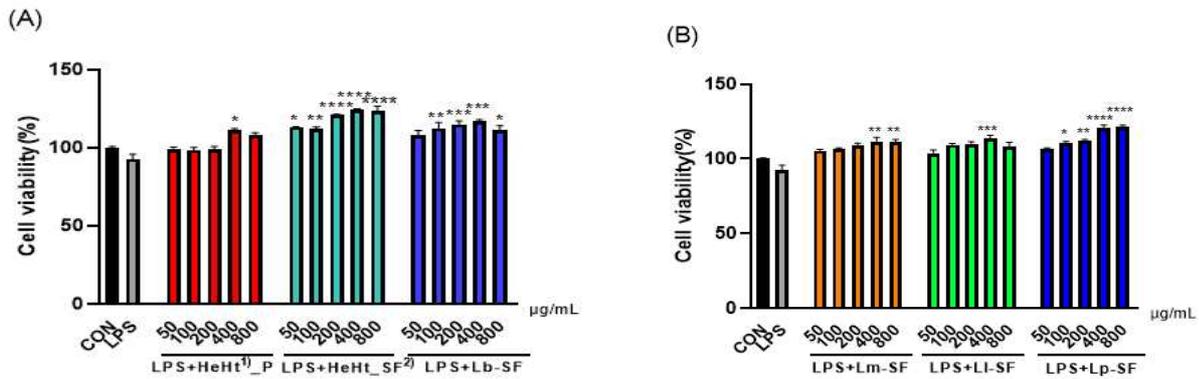


Fig. 4. Effects of different concentrations of HiLAB_VitB sample on Caco-2 cells.

- Caco-2 cells were treated with vitamin for 2h, then treated with LPS for 24 h.
- Cell viability was determined by CCK-8 assay.
- The data shown are means ± SEM (n = 3). *p < 0.05 **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001 vs. control group
 1) HeHi, Hotwater Extracted *H. illicence*; 2) SF, Sonicated Supematant Fraction;
 Ll, *Lactococcus lactis*; Lp, *Lactobacillus plantarum*; Lm, *Leuconostoc mesenteroides*; LB, *Lactobacillus brevis*

(5) 동애등에 추출물 및 발효추출물 소재 6종의 장내 염증인자 발현 확인

Caco-2 세포에서 동애등에 추출물 및 발효추출물 소재 6종의 장내 염증인자 억제효능을 확인하기 위해 Western blot으로 iNOS, COX-2의 발현을 확인한 결과, Fig. 5와 같이 대조군 대비 LPS (10 µg/mL 24시간) 처리군이 염증인자인 iNOS, COX-2의 발현을 유의적 차이를 나타내며 증가함을 보였다. 같은 LPS 농도 및 처리시간 조건으로 소재들을 먼저 2시간 처리하여 iNOS, COX-2의 발현을 억제시키는지 확인한 결과, Fig.5(B)와 같이 LPS로 증가한 iNOS의 발현을 HeHt_SF 처리군을 제외한 모든 소재가 억제시킴을 확인하였다. 특히 Ll_SF, Lp_SF, Lb_SF는 저농도 처리군(200 µg/mL)에서 iNOS의 발현을 유의적으로 감소하였으나, Fig. 5(C)에서 COX-2의 발현은 추출물 및 발효물 처리군에서 유의적인 억제 효능을 나타내지 않았지만, Ll_SF 처리군에서 LPS 처리군에 비해 어느 정도 감소됨을 확인할 수 있었다.

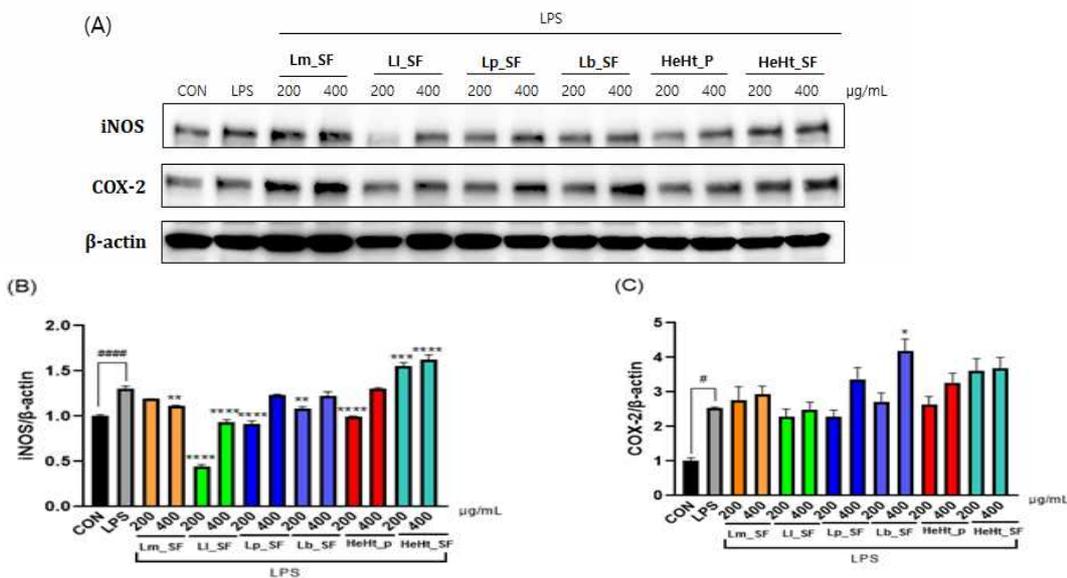


Fig. 5. Effects of HiLAB_VitB sample on protein expression levels of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated Caco-2 cells.

- Cells were *pre-treated* with for 2h and LPS (10 µg/mL) for 24 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blotting and quantified.
- The data shown are means ± SEM (n = 3). #p < 0.05 #####p < 0.0001 vs. control group. *p < 0.05, **p < 0.01 ***p < 0.001 and ****p < 0.0001 vs. LPS alone group.

(6) 동애등에 추출물 및 발효추출물 소재 5종에 대한 세포독성 확인

세포 독성을 확인하기 위해 RAW264.7 세포에 동애등에 추출물 및 그 발효추출물 소재 5종을 100, 200, 400, 800 µg/mL 농도로 1시간 먼저 처리 후 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS (1 µg/mL)을 20시간 동안 처리하여 CCK-8 assay를 이용한 세포생존율을 측정하였다. Fig. 6에서와 같이 HI_Lm 고농도 처리군(800 µg/mL)을 제외한 모든 그룹에서 세포생존율 80%이상을 나타내어 세포독성이 없음을 확인하였고, 추가적인 항염증 실험도 200~400 µg/mL 농도에서 진행하였다.

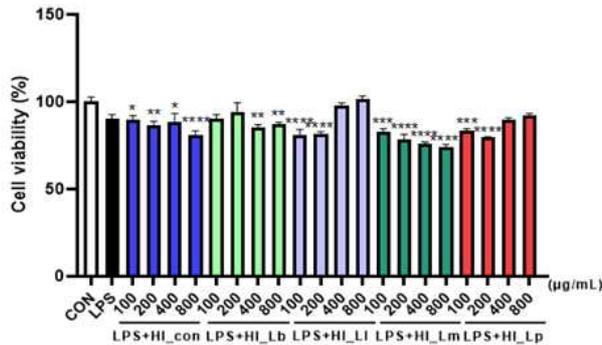


Fig. 6. Effects of different concentrations of HiLAB_VitB sample on Raw264.7 cells.

- Raw264.7 cells were treated with samples for 1 h, then treated with LPS (1 µg/mL) for 20 h.
 - Cell viability was determined by CCK-8 assay.
 - The data shown are means ± SEM (n = 3). *p < 0.05 **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001 vs. control group
- * HeHi, Hotwater Extracted *H. illucense*; Lb, *Lactobacillus brevis*; Ll, *Lactococcus lactis*; Lm, *Leuconostoc mesenteroides*; Lp, *Lactobacillus plantarum*;

(7) 동애등에 추출물 및 발효추출물 소재 5종의 염증인자 발현 확인

RAW264.7 세포에서 동애등에 추출물 및 그 발효추출물 소재 5종의 장내 염증인자 억제 효능을 확인하기 위해 Western blotting을 통해 iNOS, COX-2의 발현을 확인하였다. 그 결과, 대조군(CON)은 iNOS, COX-2 단백질이 거의 발현되지 않은 반면, LPS 처리군에서는 발현이 현저히 증가됨을 확인하였고 (Fig. 7A), 밴드를 정량한 결과 (Fig. 7B-7C) 유의적 차이는 나지는 않았지만, Lm 처리군은 LPS로 염증이 유도된 iNOS, COX-2 단백질을 발현을 억제하는 경향을 나타내었다. Caco-2 세포에서도 마찬가지로 소재 5종 먼저 처리 후 2시간 뒤 CON을 제외한 모든 그룹에 LPS (10 µg/mL) 처리하여 20시간 뒤 발현된 iNOS, COX-2 단백질을 확인하였다. 그 결과, iNOS, COX-2 단백질 발현은 대조군(CON)에 비해 LPS 처리시 유의적 차이를 나타내며 증가하였고, Lm 처리 후 (200 µg/mL, 400 µg/mL) iNOS, COX-2 발현 수준이 감소함을 확인하였다. 이것으로 보아 Lm이 항염증 활성 및 장내 염증완화에 효능이 있는 소재로서 사료된다.

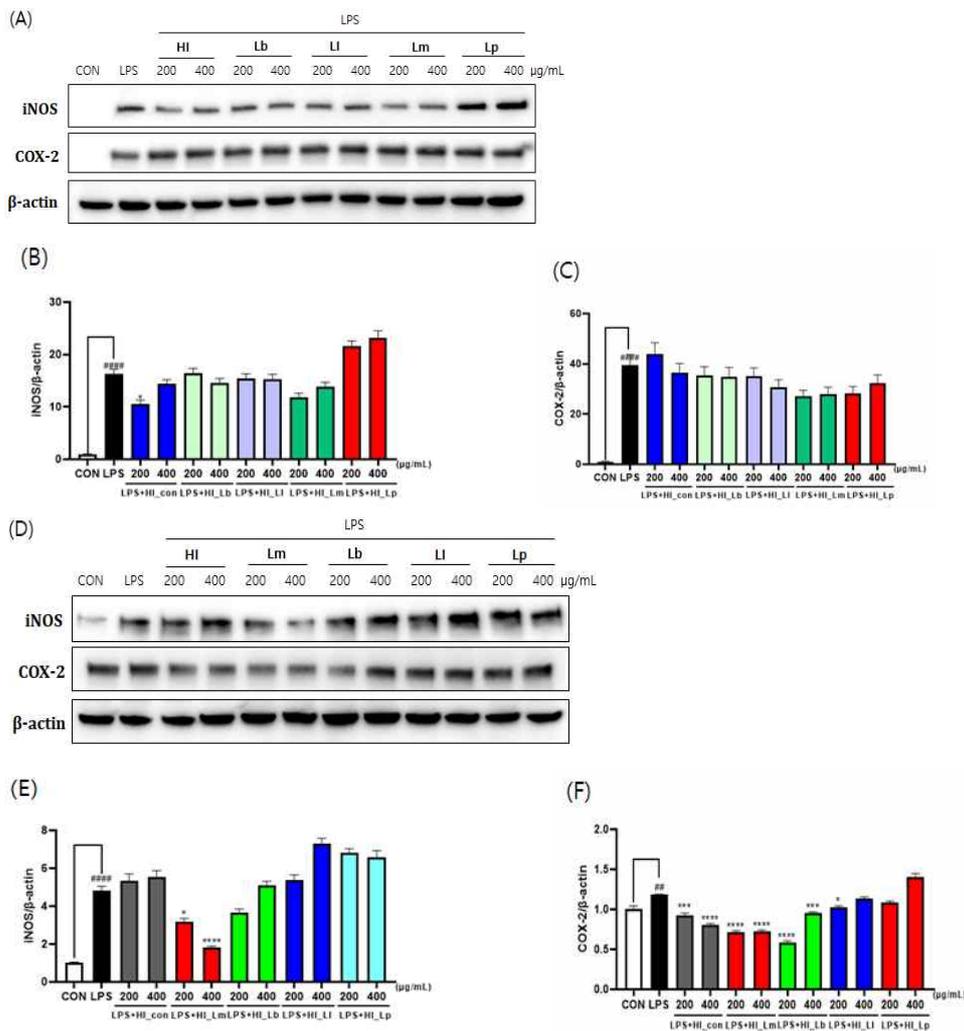


Fig. 7. Effects of HiLAB_VitB sample on protein expression of iNOS and COX-2 in Raw 264.7 cells and Caco2 cells.

- RAW264.7 cells were *pre-treated* with HiLAB_VitB sample for 1 h, then LPS (1 µg/mL) for 20 h. (A,B,C)
- Caco2 cells were *pre-treated* with for 2 h and LPS (10 µg/mL) for 24 h. (D,E,F).
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blotting and quantified.
- The data shown are means ± SEM (n = 3). ##p < 0.01, ###p < 0.001, ####p < 0.0001 vs. control group, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.0001 vs. LPS group.
- * HeHi, Hotwater Extracted H. illucence; Lb, Lactobacillus brevis Ll, Lactococcus lactis; Lm, Leuconostoc mesenteroides; Lp, Lactobacillus plantarum;

(8) 동애등에 추출물 및 발효추출물 소재 5종의 염증 사이토카인 및 NO 발현억제 확인

염증성 cytokine으로 대표되는 IL-6, TNF- α 는 염증반응을 매개하는 물질로 특히 초기 염증반응에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 소재가 LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage가 분비하는 염증성 cytokine의 생성억제 효과를 측정하기 위해 ELISA 방법을 이용하여 염증성 cytokine의 생성량을 측정한 결과, 발효물 Lm, Lp 처리군은 LPS로 염증이 유도된 Raw 264.7 macrophage에서 증가된 TNF- α , IL-6를 효과적으로 감소시켰다. 발효물 Lm 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리는 LPS 단독 처리군에 비해 유의적으로 TNF- α 생성량을 감소시켰고 (Fig. 8A), 발효물 Lm, LP 농도별 처리군에서 염증 매개 반응으로 유도된 IL-6의 생성량을 현저히 감소되었다 (Fig. 8B). LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage는 NO의 생성이 현저히 증가되었고, 동애등에 추출물 및 발효추출물 5종을 농도별로 처리한 Raw264.7 macrophage에서는 LPS 처리군보다 효과적으로 NO 생성이 감소되지는 않았다 (Fig. 8C). 앞서 Fig. 6의 Lm 고농도 처리군 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포생존을 70%대를 감안하면 NO 생성억제 효능이 있다고 보기는 미미하고, Lm 100~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 10~21%의 생성저해 효과를 나타냈으며 농도에 따른 유의적인 차이는 없었다.

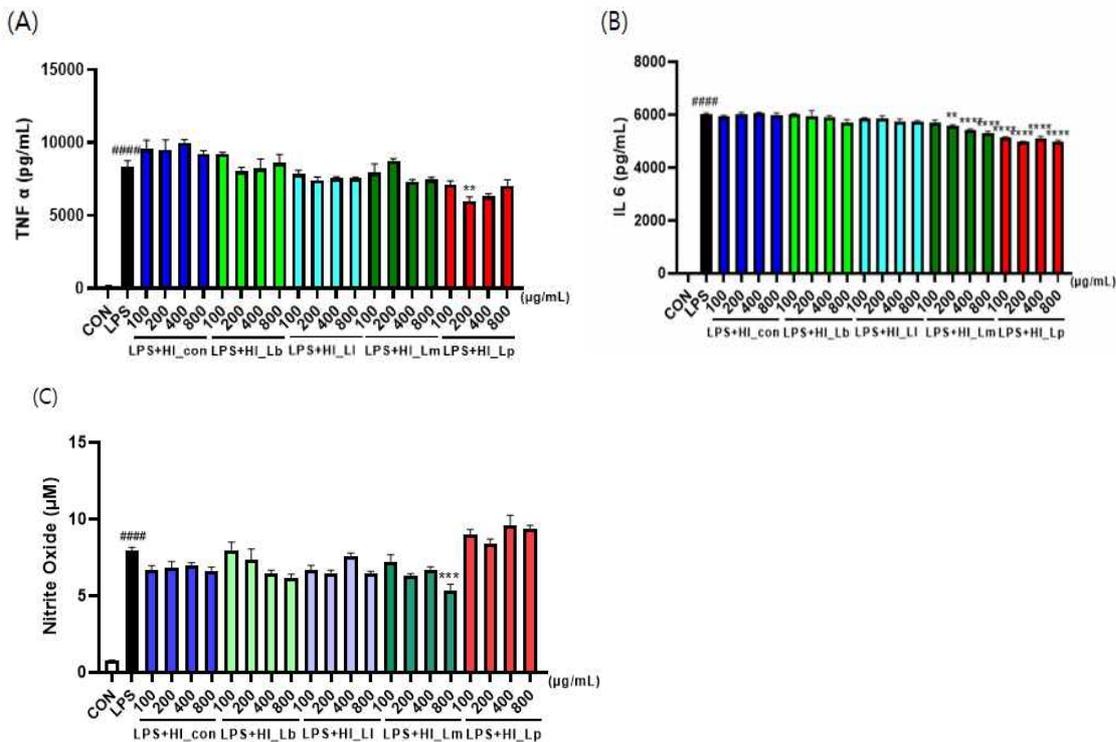


Fig. 8. Effects of different concentrations of HiLAB_VitB sample on Raw264.7 cells.

- Raw264.7 cells were treated with samples for 1 h, then treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 20 h.
 - Cell supernatant was analyzed by ELISA assay (A, B) and NO assay (C).
 - The data shown are means \pm SEM (n = 3). ####p < 0.0001 vs. control group, **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001 vs. LPS group.
- * HeHi, Hotwater Extracted *H. illucense*; Lb, *Lactobacillus brevis* Li, *Lactococcus lactis*; Lm, *Leuconostoc mesenteroides*; Lp, *Lactobacillus plantarum*;

(9) 표준품 Vit B2/B9의 Co-culture (Caco-2/RAW264.7) 모델 내 장내 염증억제 활성 확인

염증성 장질환에 관한 비타민 B2, B9의 항염 효능을 규명하고자 대장상피세포로 분화시킨 Caco-2 세포와 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 co-culture함으로써 실제 인체 내의 대장과 비슷한 환경을 조성하였고, lipopolysaccharide (LPS) 로 염증을 유도한 후, 표준품을 상층부에 2시간 처리하여 20시간 뒤 하층부 상등액 및 단백질에서 염증 억제인자인 iNOS, COX-2 및 염증 사이토카인의 발현량을 확인하였다. 그 결과, iNOS의 단백질 발현은 LPS 처리시 대조군 (CON) 대비 발현량의 증가가 미미하였고, COX-2의 발현은 LPS 처리시 대조군 대비 현저히 증가하였지만 비타민 B2, B9은 iNOS, COX-2의 발현 저해를 보이지 않았다 (Fig. 9A). 하부 상등액으로 염증성 사이토카인의 발현량을 확인한 결과, TNF- α , IL-6의 발현량은 대조군 대비 LPS 그룹에서 대조군(CON) 대비 유의적으로 증가하였지만 마찬가지로 비타민 B2, B9의 사이토카인 발현량 저해 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 9B-9C).

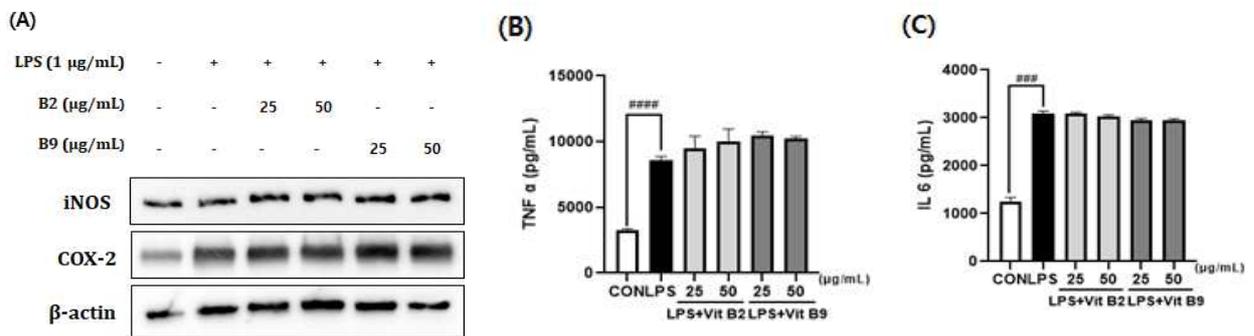


Fig. 9. Effects of Vitamin B2, B9 on protein expression of iNOS and COX-2 and cytokines in co-cultured Raw 264.7 macrophages (basolateral side).

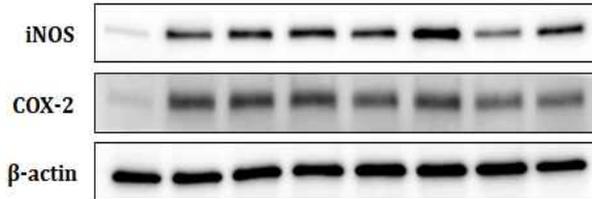
- Caco-2 cells were *pre-treated* with vitamin B2, B9 for 2 h, then RAW264.7 cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 20 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blotting (A), cell supernatant was analyzed by ELISA assay (B,C).
- The data shown are means \pm SEM (n = 3). $^{***}p < 0.001$, $^{####}p < 0.0001$ vs. control group

(10) 동애등에 추출물 및 발효추출물 소재 3종의 Coculture (Caco-2/RAW264.7) 모델 내 장내 염증억제 활성 확인

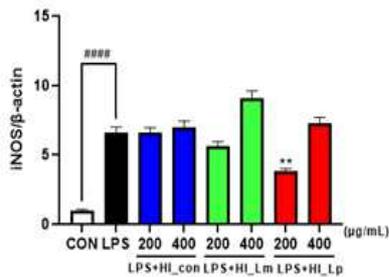
앞서 Fig. 1-8에서 *in vitro* 내 항염증 효능 스크리닝 후 도출된 소재 HI_Lm, HI_Lp에 대해 Co-culture (Caco-2/RAW264.7) 모델에서 항염 효능을 규명하고자 하였다. Caco-2 세포를 Transwell에서 열흘간 분화시킨 후 하부 RAW264.7 cell에 LPS로 염증을 유도하여 소재를 상층부에 2시간 처리하여 20시간 뒤 하층부 상등액 및 단백질에서 염증 억제인자인 iNOS, COX-2 및 염증 사이토카인과 NO의 발현량을 확인하였다. iNOS의 단백질 발현은 LPS 처리시 대조군(CON) 대비 발현량이 현저하게 증가하였고, HI_Lm 저농도(200 µg/mL) 그룹에서 iNOS의 발현이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 10B). COX-2의 단백질 발현은 LPS 처리 시 대조군 대비 현저히 증가하였고, HI_Lm 저농도(200 µg/mL), HI_Lp 저농도(200 µg/mL) 그룹에서 COX-2의 발현이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 10C). 하부 상등액으로 염증성 사이토카인의 발현량을 확인한 결과, TNF- α , IL-6의 발현량은 대조군 대비 LPS 그룹에서 대조군(CON) 대비 유의적으로 증가하였고, HI_Lp 처리 시 각각 고농도, 저농도에서 염증 억제 효능을 보였다 (Fig. 10D-10E). LPS로 유도된 NO 발현량은 HI_LP 처리 시 유의적으로 저해 활성을 나타내었다 (Fig. 10F). 이러한 결과로 장내 염증완화 효능은 HI_Lp가 HI_Lm보다 더 크다는 것을 확인할 수 있었다.

(A)

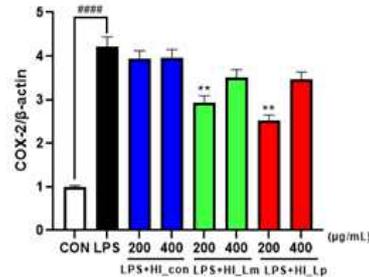
LPS (1 µg/mL)	-	+	+	+	+	+	+	+
Hi (µg/mL)	-	-	200	400	-	-	-	-
Hi_Lm (µg/mL)	-	-	-	-	200	400	-	-
Hi_Lp (µg/mL)	-	-	-	-	-	-	200	400



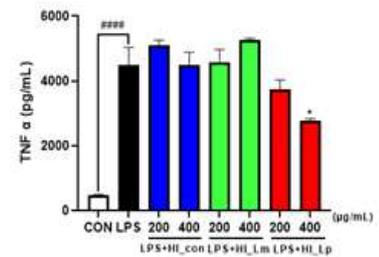
(B)



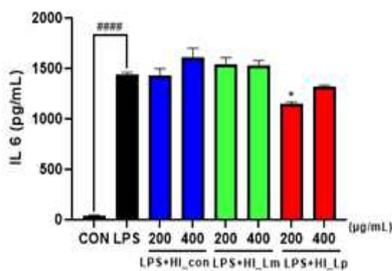
(C)



(D)



(E)



(F)

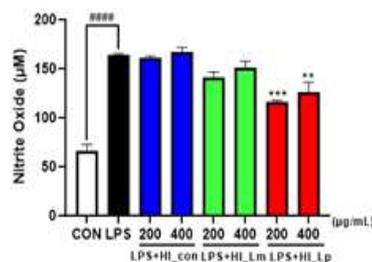


Fig. 10. Effects of HiLAB_VitB sample on protein expression of iNOS and COX-2 and cytokines in co-cultured Raw 264.7 macrophages (basolateral side).

- Caco-2 cells were *pre-treated* with HiLAB_VitB for 2 h, then RAW264.7 cells were treated with LPS (1 µg/mL) for 20 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blotting and quantified (A,B,C), cell supernatant was analyzed by ELISA assay (D,E,F).
- The data shown are means ± SEM (n = 3). ****p < 0.0001 vs. control group, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001 vs. LPS alone group.

2 선발 소재의 전임상실험 기반 장내 염증완화 효능 평가_급성 및 만성대장염 모델_Lm소재

(1) 체중의 변화

급성대장염모델을 통한 체중의 변화를 측정한 결과, DSS를 급이한 지 4일차까지는 큰 변화가 없다가 5일차부터 급격한 체중감소를 확인하였다(Fig 11A). 실험 종료일인 DSS 급이 7일차에 마우스 체중을 관찰한 결과 정상군(NC)은 실험 시작시점 체중에 비해 $101.42 \pm 1.61\%$ 으로 가장 높은 수치를 나타내었고, DSS군은 $76.83 \pm 4.31\%$ 으로 정상군과 비교하여 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.001$). 또한 양성대조군(vitamin B2(PC))으로 설정한 그룹의 체중은 $83.15 \pm 1.62\%$ 로 시료 투여군 중에 가장 체중감소가 억제되었으며($p < 0.01$), 발효전 시료의 처리군(HeHi_H)은 체중감소 억제 효과는 보이지 않았으나, 발효후 저농도(Lm_L) 및 고농도 시료 처리군(Lm_H)에서는 각각 $81.42 \pm 3.09\%$ 와 $81.93 \pm 1.42\%$ 로 유의적으로($p < 0.05$) 체중감소를 억제하는 효과를 확인하였다 (Fig. 11B). 이는 양성대조군으로 설정한 vitamin B2가 발효과정에서 생성되는 데, 발효 후 시료 내 존재하는 vitamin B2가 대장염으로 유발된 마우스의 항염 효과를 보이는 것으로 사료된다. 만성대장염모델을 통한 체중의 변화를 관찰한 결과, DSS를 급이한 지 5일차까지는 큰 변화가 없다가 6일차부터 급격한 체중감소를 확인하였다. 이후 6일차부터 5일간 DSS에서 음용수로 교체하여 회복하는 기간에는 체중의 감소가 감소하는 듯 했지만, 2번째 DSS급이(실험 11~13일차)기간에 다시 체중이 감소하는 경향을 보였다. 이후 두 번째 회복기간(실험 14일~20일)에 체중이 점차 증가하는 경향을 보였고, 세 번째 DSS급이(실험 21일~23일) 시점에서부터 DSS군과 시료 투여군과의 회복속도에 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 11C). 실험 종료일인 29일차의 경우, 체중변화량이 정상군(NC)의 경우 $113.8 \pm 4.0\%$ 로 가장 높았으며, DSS군은 $94.1 \pm 10.7\%$ 로 유의적으로 감소함을 확인하였다($p < 0.001$). 양성대조군(vitamin B2(PC), Lm_L 및 Lm_H군의 경우 각각 $104.2 \pm 7.7\%$, $101.9 \pm 2.9\%$, $103.3 \pm 1.8\%$ 의 체중변화를 보였으며, 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 전체적으로 모두 DSS군보다 높은 체중을 유지하는 경향을 확인하였다(Fig 11D).

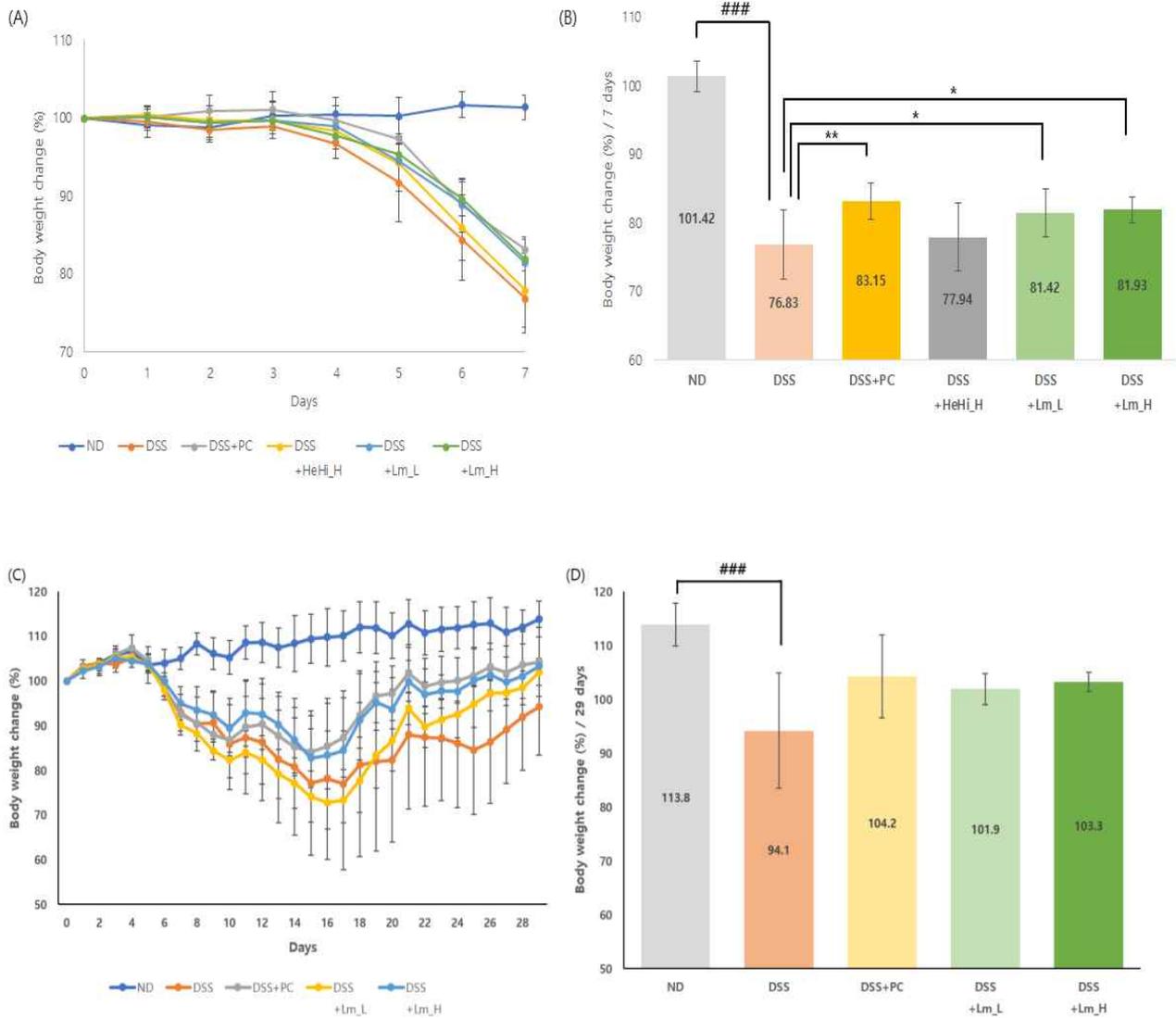


Fig 11. Effects of fermented supplementation with *Leuconostoc mesenteroides* on the change of body weight in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis (### $p < 0.001$ vs. control, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. DSS alone).

(2) 질병활성도(Disease activity index; DAI)

DSS유도에 의한 궤양성 대장염 모델은 마우스의 체중 감소, 설사, 혈변을 특징으로 하는 임상 증후가 나타난다. 본 연구에서는 이러한 임상증상에 대한 각 점수를 환산하여 투여물질의 영향을 측정 및 계산하였다. 급성대장염모델의 경우, 희생 전날일 DSS급이 6일차에 측정한 결과, 정상군(NC)에서는 아무런 증상이 나타나지 않은 반면(0점), DSS 투여군에서는 DAI가 유의적으로 ($p<0.001$) 증가 하였다(10.33 ± 1.03 점, Fig. 12A). 양성대조군(vitamin B2 (PC)), 발효 후 저농도(Lm_L) 및 고농도 투여군(Lm_H)의 경우 DSS단독 투여군과 DAI수치를 비교하였을 때 각각 8.17 ± 0.98 점($p<0.01$), 8.33 ± 1.03 점($p<0.01$), 8.67 ± 0.41 점($p<0.05$)으로 질병활성도 점수가 낮았다(Fig. 12B). 발효전 시료 처리군(HeHi_H) 점수가 감소되는 경향은 보였으나 유의적인 차이가 없고, 발효 후 두 시료에서 모두 점수가 유의적으로 낮아진 이러한 결과는 체중의 변화와 유사한 경향을 보였다. 이는 발효 후 형성된 vitamin B2가 장내 염증을 조절함으로써 설사 및 혈변을 억제하고 이로 인한 체중감소를 조절한 것으로 생각된다. 만성대장염모델의 경우, 체중변화와 유사한 경향을 보였는데, DSS를 급이한 지 4일까지는 큰 변화가 없다가 5일차부터 DAI수치가 상승하였다. 이후 7일차부터 10일차 까지 증가하였으며, 이후 2번째 DSS급이(실험 11~13일차)기간에 다시 증가하는 경향을 보였다. 이후 두 번째 회복기간(실험 14일~20일)에는 DAI가 점차 감소하는 경향을 보였고, 세 번째 DSS급이(실험 21일~23일) 시점에서부터 DSS군과 시료 투여군과의 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 12C). 희생 전날인 28일을 기준으로 각 DAI를 확인한 결과, 정상군(NC)은 0점, DSS군은 3.4 ± 1.5 점으로 유의적인 차이가 있었으며($p<0.01$), DSS군과 vitamin B2 (PC)군은 1.0 ± 1.4 점($p<0.05$), Lm_L 및 Lm_H는 각각 1.8 ± 1.6 점($p<0.05$), 0.6 ± 0.9 점($p<0.01$)으로 모두 유의적인 차이가 확인됨으로써, 급성대장염과 마찬가지로 발효 후 형성된 vitamin B2가 장내 염증을 조절함으로써 설사 및 혈변을 억제하고 이로 인한 체중감소를 조절한 것으로 생각된다.

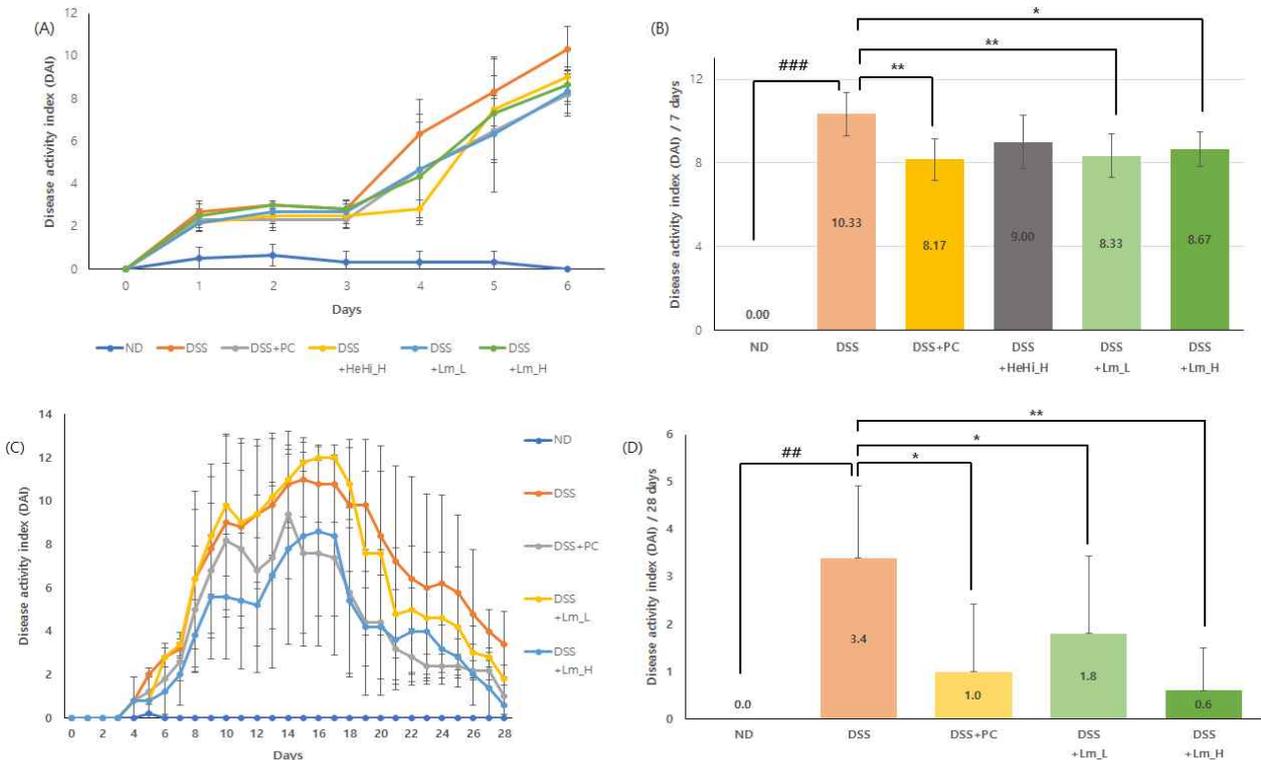


Fig 12. Effect of fermented supplementation with *Leuconostoc mesenteroides* on DSS-induced the DAI increase in mice. DAI was calculated as described in Materials and Methods. Data were represented in the mean \pm S.D. from triplicate experiments (### $p<0.001$ vs. control, * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. DSS alone).

(3) 대장 조직의 육안적 길이 및 조직 무게 변화

급성대장염 동물모델에서 장 길이의 변화는 염증진행과 연관성이 있기 때문에 본 연구에서는 DSS로 유도된 동물모델에서 대장길이 변화에 대한 투여소재의 영향을 확인하였다. 측정결과, 정상군(ND)의 대장 길이는 7.05 ± 0.17 cm로 측정된 반면, DSS 투여군은 4.87 ± 0.29 cm로 정상군에 비하여 대장 길이가 현저하게 짧아졌다($p < 0.001$). 양성대조군(vitamin B2 (PC))과 발효 전 처리군(HeHi_H)에서는 대장길이가 다소 증가하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 확인되지 않았으며, 발효 후 저농도 및 고농도에서는 각각 5.68 ± 0.41 cm ($p < 0.01$)와 5.62 ± 0.31 cm ($p < 0.05$)로 DSS로 유도된 대장길이의 감소는 유의적으로 억제되었다(Fig. 13A, B). 이는 체중의 변화, 질병 활성도와 마찬가지로 발효 생성물에 의한 장내 염증을 완화시킴으로써 대장길이 단축을 조절한 것으로 보인다. 만성대장염모델의 경우도 급성대장염 모델과 유사한 결과를 확인하였는데, 대장 길이를 측정한 결과, 정상군(NC)은 8.08 ± 0.33 cm, DSS군은 5.84 ± 0.30 cm로 현저하게 단축됨을 확인하였으며($p < 0.001$), PC군, Lm_L군 및 Lm_H군은 각각 6.9 ± 0.29 cm, 6.38 ± 0.64 cm, 6.66 ± 0.42 cm로 Lm_L군을 제외하면 모두 유의적으로 증가함을 확인하였다($p < 0.01$)(Fig. 13C, D). 이를 통해, 대장 및 비장 내 염증수준이 완화되었다고 할 수 있다.

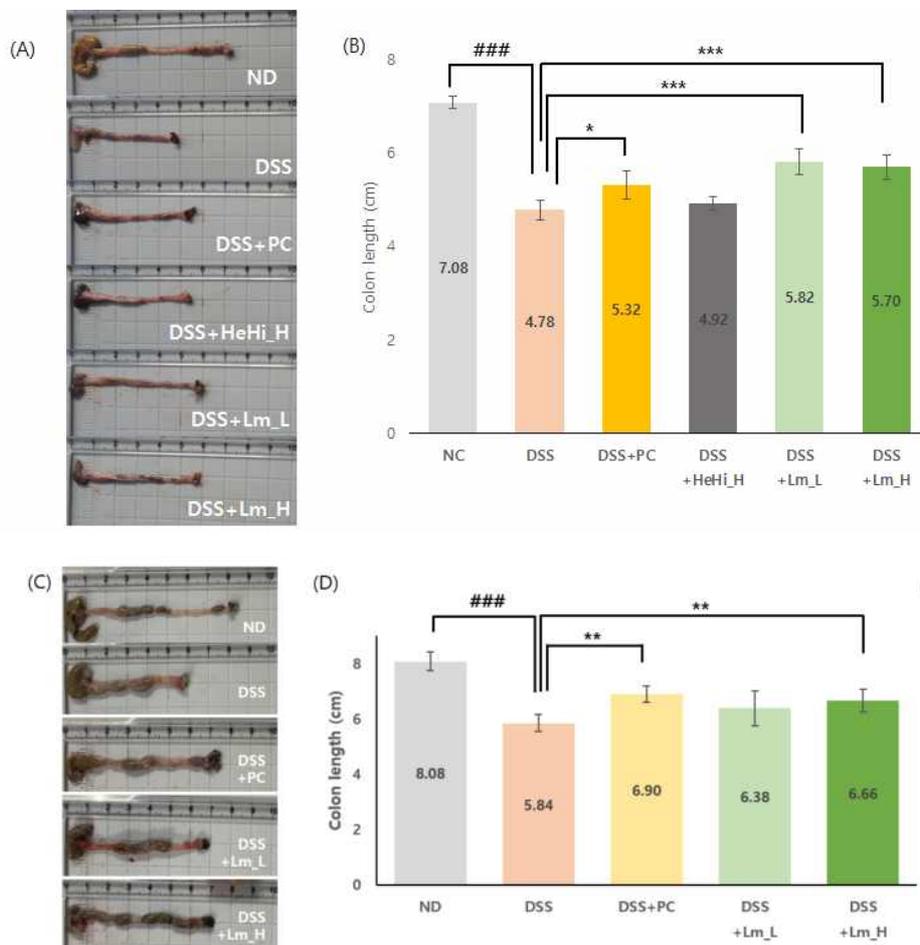


Fig. 13. Effect of fermented supplementation with *Leuconostoc mesenteroides* on DSS-induced the colon length shortening in mice. Data were represented in the mean \pm S.D. from triplicate experiments (### $p < 0.001$ vs. control, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. DSS alone).

(4) 대장의 조직학적 변화

DSS에 의한 급성(Fig. 14A) 및 만성염증(Fig. 14B)이 유도된 마우스의 대장 조직과 시료를 투여한 마우스의 대장 조직의 형태학적 변화를 확인하기 위해 hematoxylin과 eosin을 사용하였으며, 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. Hematoxylin과 eosin을 이용한 조직학적 검사를 확인하였을 때, 정상군은 대장 조직에서 이상소견이 없었으나 DSS군 및 HeHi군은 핵의 파괴와 점막과 점막하에 염증세포의 침윤, 상피조직의 손실을 확인할 수 있었다. vitamin B2 (PC)군과 Lm_L군 및 Lm_H군은 정상군(NC)에 비해 조직 형태가 부분적으로 손상된 것을 확인할 수 있었으나 DSS로 인한 대장 조직의 형태학적 변화가 회복되는 것을 관찰할 수 있었으며, 이와 같은 경향은 급성 및 만성 염증 모두에서 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

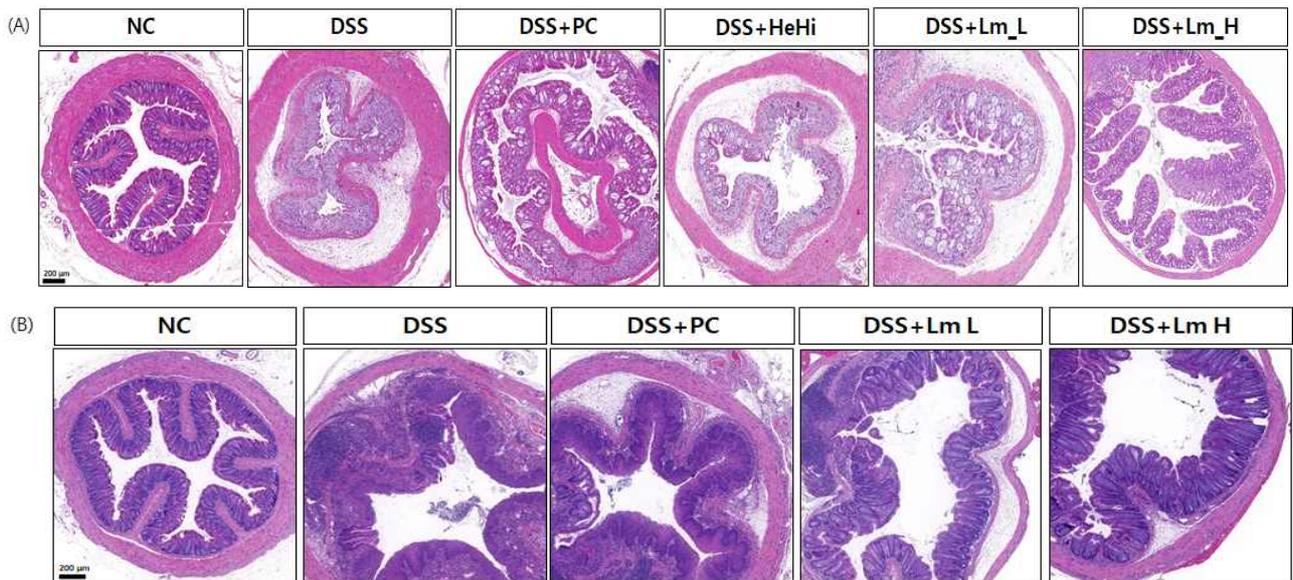


Fig. 14. H&E stain: Colonic mucosa of mice with DSS-induced acute (A) and chronic (B) colitis.

(5) 근육량 변화

DSS에 의한 염증이 유도된 마우스와 시료를 투여한 마우스의 근육량의 변화를 확인하기 위해 DEXA원리를 활용한 체성분 분석기를 사용하였으며, 이미지를 촬영하여 관찰하였다. 급성대장염 모델의 경우 DSS군과 시료 투여군과의 유의적인 차이를 확인할 수 없었지만, 만성대장염모델의 경우에는 유의적인 차이를 확인할 수 있었다. 정상군(NC)의 경우 20.28 ± 1.48 g, DSS군의 경우 16.61 ± 1.76 g로 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었으며($p < 0.001$), Lm_L군을 제외한 vitamin B2 (PC)군 및 Lm_H군은 각각 18.61 ± 1.07 g, 18.90 ± 0.64 g으로 DSS군에 비해 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 15A). 이는 촬영된 사진에서도 유사한 경향을 확인할 수 있는데, 사진 내 마우스의 파란색으로 촬영된 부분이 근육량을 의미한다(Fig. 15C). 또한, 적출된 대퇴사두근의 무게를 측정한 결과, 정상군(NC)에 비해 DSS군의 무게가 유의적으로 감소함은 확인하였으나($p < 0.05$), DSS군에 비해 PC군과 Lm_H군에서 다소 증가하는 경향만 확인할 수 있었다. 이는 대퇴사두근만을 한정하여 확인한 결과로 보이며, 타 근육을 종합적으로 확인해 볼 필요가 있다고 생각된다. 대퇴사두근이 증가하는 경향을 보이며, 체성분분석을 통해, vitamin B2(PC) 및 Lm_H소재가 근육량이 전체적으로 증가함을 확인한 것으로 보아, 장기간 투여했을 시, 근육의 증가에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

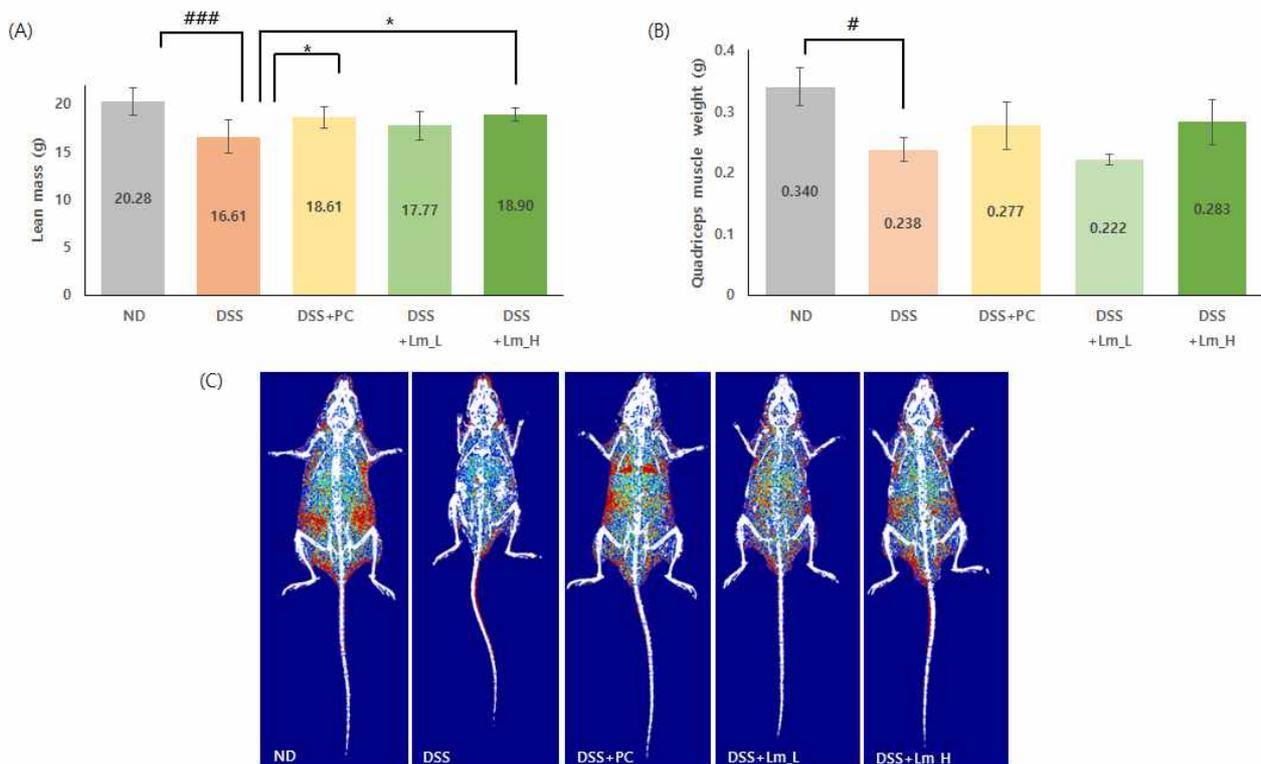


Fig. 15. Effects of fermented supplementation with *Leuconostoc mesenteroides* (A-C) and *Lactobacillus plantarum* (D-F) on the change of muscle weight in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis ($p < 0.05$ and $###p < 0.001$ vs. control, $* p < 0.05$, $ p < 0.01$ vs. DSS alone).**

(6) 급성대장염 모델에서의 분변 내 세균 분포 분석

각 군별 분변시료의 세균 분포를 분석하여 미생물학적 분류 단계를 문(phylum)과 과(family), 종(species) 수준별로 차지하는 세균의 상대적 분포비율을 Fig.16에 나타냈다. 문(phylum) 수준에서 비교 시, 전체적으로 *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*가 주요 분포 세균으로 확인되었다. 특히, 정상군(NC)에 비해 DSS군에서 *Bacteroidetes*가 43.7%에서 22.6%로 감소되었으며, 양성대조군(vitamin B2(PC))과 Lm_H군에서 각각 26.3%와 27.3%로 증가함을 확인하였다(Fig.16A). 과(family) 수준에서는 *Bacteroidaceae* family에 속하는 세균 중 *Phocaeicola vulgatus*는 위장관(GI tract) 내 존재하는 지질다당류(liposaccharide, LPS)를 저감시키는 유익균으로, 정상군(NC)에서 37.3%를 차지하고 있는 데에 반해, DSS군에서는 1.7%로 감소하였으며, 양성군(vitamin B2 (PC))에서 14.1%, Lm_H그룹에서 16.87%로 증가함을 확인하였다(Fig.16B, C). 반대로, *Bacteroidaceae* family 중 *Bacteroides caccae*는 염증성 장 질환을 유발하는 세균으로, 정상군(NC)에서 3.6%를 차지하였지만, DSS군에서 15.6%로 4.3배 증가하였으며, 양성대조군(vitamin B2 (PC))에서 8.5%, Lm_H군에서 5.7%로 감소하는 경향을 확인하였다. 또한 *Lactobacillaceae* family의 경우, 대표적인 프로바이오틱스로 분류된 family로, 정상군(NC)의 경우 23.3%를 차지하며, DSS군에서는 8.1%로 감소하였으며, Lm_L그룹과 Lm_H그룹에서 각각 13.4%, 10.6%로 증가하였다. *Lactobacillaceae* family에 속하는 세균 중 공통적으로 *Ligilactobacillus apodemi*를 포함하고 있었다. 또한 *Lachnospiraceae* family에 속하는 *Kineothrix alysoides*는 체내에서 단쇄지방산(Short chain fatty acids, SCFAs) 중 하나인 낙산(butyrate)을 생성하는 유익균인데, 정상군(NC)에서 6.0%에서 DSS군 2.9%로 감소하였으며, 양성대조군(vitamin B2 (PC)), HeHi군, Lm_L 및 Lm_H군에서 각각 3.1%, 4.6%, 2.6% 및 4.1%로 증가함을 확인하였다. *Clostridiaceae* family는 대장염과 관련된 주요 세균으로, 정상군(NC)에서 1.1%에서 DSS군에서 8.9%로 검출되었으며, 양성대조군(PC), Lm_L 및 Lm_H군에서 각각 5.8%, 3.1% 및 2.4%로 감소함을 확인하였다. 또한 *Oscillospiraceae* family에 속하는 *Monoglobus pectinilyticus*의 경우 식이섬유와 펙틴을 많이 섭취하는 사람의 분변에서 검출되는 펙틴 분해 세균으로서, 정상군(NC)과 DSS군에서는 0.4%로 같은 비율을 차지하였는데, vitamin B2 (PC)군, HeHi군, Lm_L 및 Lm_H군에서 각각 0.8, 0.6, 1.4 및 1.4%로 증가함을 확인하였다. 또한 *Oscillospiraceae* family *Ruminococcus bromii*의 경우에도 낙산(butyrate)과 프로피온산(propionate)을 생성하는 유익균으로서 정상군(NC) 0.4%에서 0.1%로 감소하였으며, PC군 0.3%, Lm_H군에서 2.1%로 각각 증가함을 확인하였다. 한편, *Oscillospiraceae* family에 속하는 *Ruminiclostridium papyrosolvens*은 염증과 관련된 세균으로, 정상군(NC)에서는 검출되지 않았으며, DSS군에서 2.7%로 상승하였다가 양성군(vitamin B2 (PC))에서는 0.4%로 감소하였고, Lm_L와 Lm_H군에서도 각각 0.6%, 0.9%로 감소하였다. *Lachnospiraceae* family에 속하는 *Ruminococcus lactaris*는 초산염(acetate), 젖산(lactate), 포름산염(formate) 등의 대사산물을 생성하는 유익균으로, DSS군의 분변에서 1.1%로 검출되었으며, Lm_H군에서 2.0%로 약 1.8배 증가함을 확인하였다.

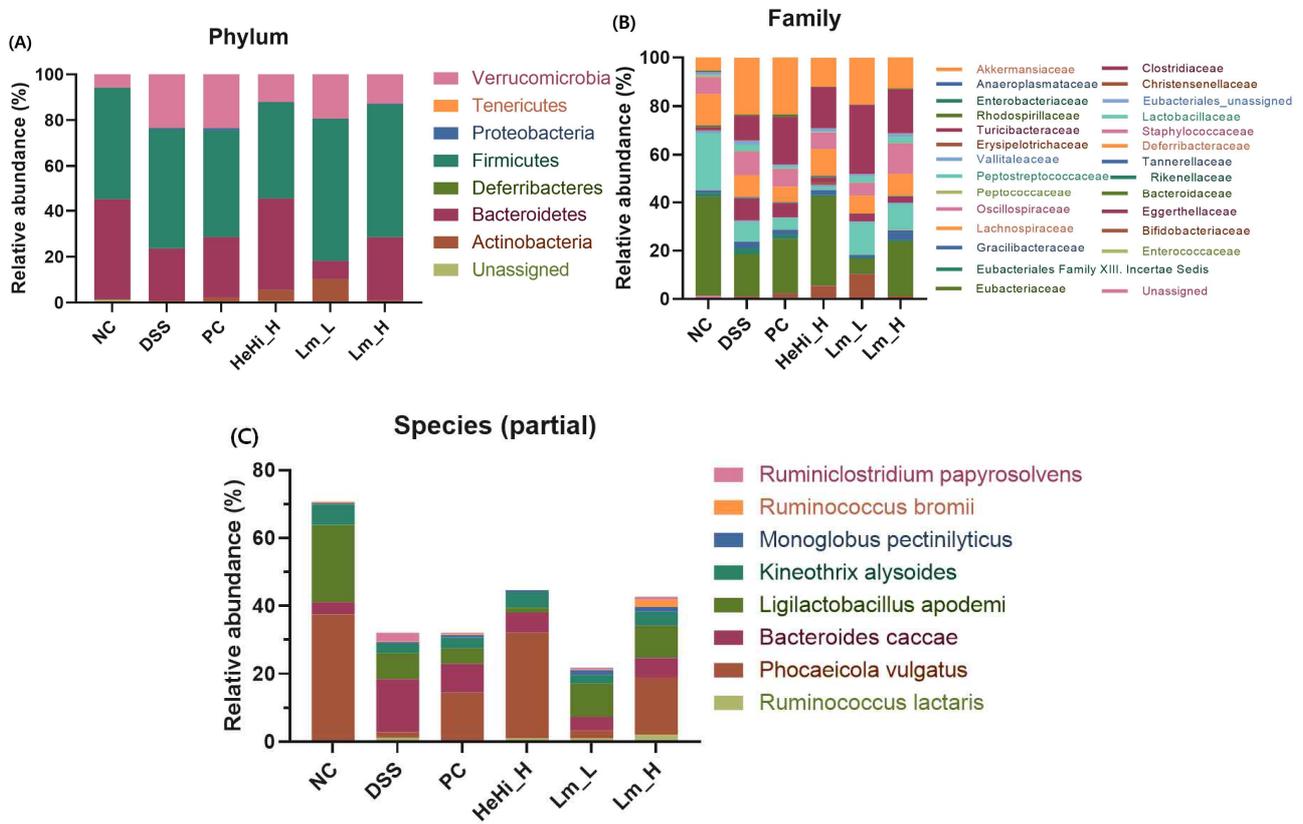


Fig. 16. Relative abundances evaluated at the phylum (A) family (B) and species (partial) level (C) in gut bacterial communities of the induced acute colitis mice. Bacterial taxa are clustered and identified by OTU analysis.

(7) 만성대장염 모델에서의 분변 내 세균 분포 분석

각 군별 분변시료의 세균 분포를 분석하여 미생물학적 분류 단계를 문(phylum)과 과(family), 종(species) 수준별로 차지하는 세균의 상대적 분포비율을 Fig.36에 나타냈다. 문(phylum) 수준에서 비교 시, 급성대장염 모델에서의 결과와 같이 *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*가 주요 분포 세균으로 확인되었다. 특히, *Firmicutes*가 모든 군에서 가장 높은 비중을 차지하였다(Fig.17A). 과(family) 수준에서 보면, *Bacteroidaceae* family에 속하는 *Bacteroides caccae*가 염증성 장질환을 유발하는 세균으로, 정상군(NC)에서는 0.9%를 차지하고 있으며, DSS군에서는 4.5%로 증가하였고, 양성대조군(PC)과 Lm_L 및 Lm_H그룹에서 각각 1.1%, 0.3% 및 2.2%로 수치가 낮아지는 경향을 보였다(Fig.17B, C). *Erysipelotrichaceae* family의 경우 체내에서 단쇄지방산(Short chain fatty acids, SCFAs)을 생성하는 유익균인데, 각각 정상군(NC)에서 15.6%를 차지하였는데, DSS군에서는 2.3%로 감소하는 것으로 확인되었으며, 양성대조군(PC)에서는 3.7%로 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. *Lachnospiraceae* family 또한 낙산(butyrate)과 프로피온산(propionate) 대사와 관련된 균으로, 정상군(NC)에서 9.3%에서 8.5%로 감소하는 경향을 확인하였다. *Muribaculum intestinale*가 속한 *Muribaculaceae* family도 단쇄지방산을 생성하는 주요 세균으로, 정상군(NC)에서 11.1%에서 0.7%까지 DSS군에서 감소하였으며, 양성대조군(PC)과 Lm_H군에서 각각 7.7%와 2.2%로 증가함을 확인하였다. *Peptostreptococcaceae* family의 경우, 병원균으로 알려진 *Romboutsia timonensis*가 속한 과로, 정상군(NC) 0.9%에서 DSS군에서 7.3%로 상승하였으며, PC군 및 Lm_H군에서 각각 6.7%와 3.0%로 감소함을 확인하였다. 특히 대표적인 유산균이 속해있는 *Bifidobacteriaceae*과 *Lactobacillaceae* family의 경우, 정상군(NC)에서 각각 6.1%와 24.6%이었던 것이 DSS군에서 0.2%와 21.8%로 감소하였다. *Bifidobacteriaceae* family의 경우 PC군, Lm_H군에서 각각 3.8%, 2.7% 상승하는 경향을 확인했으며, *Lactobacillaceae* family는 양성대조군(PC)에서 45.6%로 약 1.9배 상승함을 확인하였고, *Lactobacillus intestinalis*의 경우 DSS군 2.5%에서 Lm_H군 4.8%로 증가하였다. 또한 젖산(lactate)를 생성하는 *Atopobiaceae* family가 DSS군에서 0.01%를 차지 하였는데, 양성대조군(PC)과 Lm_H군에서 각각 0.3%와 6.0%로 상승함을 확인하였다. 또한 세로토닌과 지질대사에 유익균으로 알려진 *Turicibacter sanguinis*가 속한 *Turicibacteraceae* family가 DSS군 8.1%에서 양성대조군(PC)과 Lm_H군에서 각각 8.7%와 10.3%로 상승함을 확인하였다.

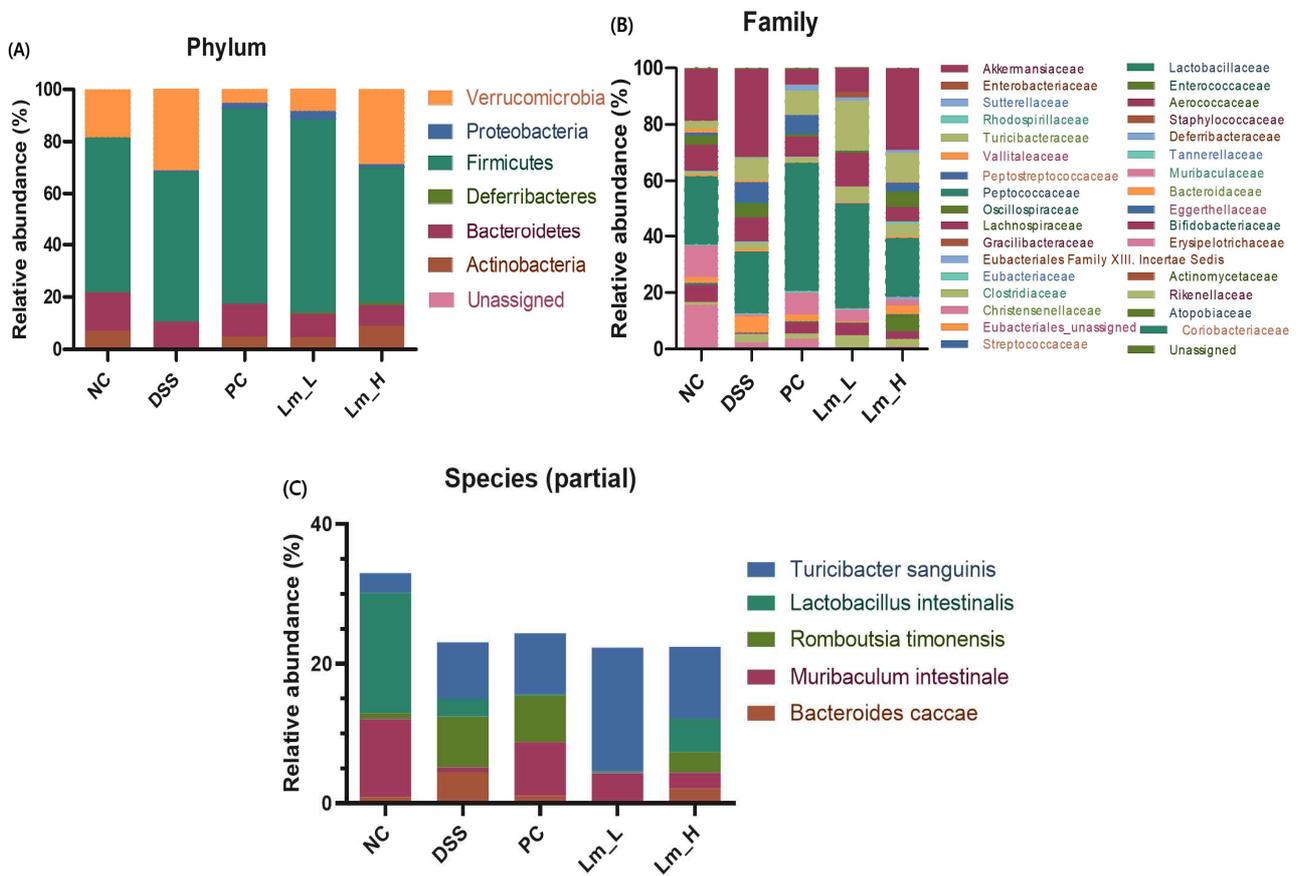


Fig. 17. Relative abundances evaluated at the phylum (A) family (B) and species (partial) level (C) in gut bacterial communities of the induced chronic colitis mice. Bacterial taxa are clustered and identified by OTU analysis.

2 선발 소재로부터 전임상실험 기반 장내 염증완화 효능 평가_만성대장염 모델-HiLp

(1) 체중의 변화

만성대장염모델을 통한 체중의 변화를 관찰한 결과, DSS를 급이한 지 5일차까지는 큰 변화가 없다가 6일차부터 급격한 체중감소를 확인하였다. 이후 6일차부터 5일간 DSS에서 음용수로 교체하여 회복하는 기간에는 체중의 감소가 감소하는 듯 했지만, 2번째 DSS급이(실험 11~13일차)기간에 다시 체중이 감소하는 경향을 보였다. 이후 두 번째 회복기간(실험 14일~20일)에 체중이 점차 증가하는 경향을 보였고, 세 번째 DSS급이(실험 21일~23일) 시점에서부터 DSS군과 시료 투여군과의 회복속도에 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 18A). 실험기간 29일차의 경우, 체중변화량이 NC의 경우 $113.8 \pm 4.0\%$ 로 가장 높았으며, DSS군은 $94.1 \pm 10.7\%$ 로 유의적으로 감소함을 확인하였다($p < 0.001$). PC군, Lp_L군은 각각 $104.2 \pm 7.7\%$, $102.1 \pm 2.2\%$ 로 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 확인되지 않았으며, LP_H군의 경우 $109.7 \pm 4.8\%$ 로 유의적인 차이를 보였다($p < 0.01$)(Fig. 18B).

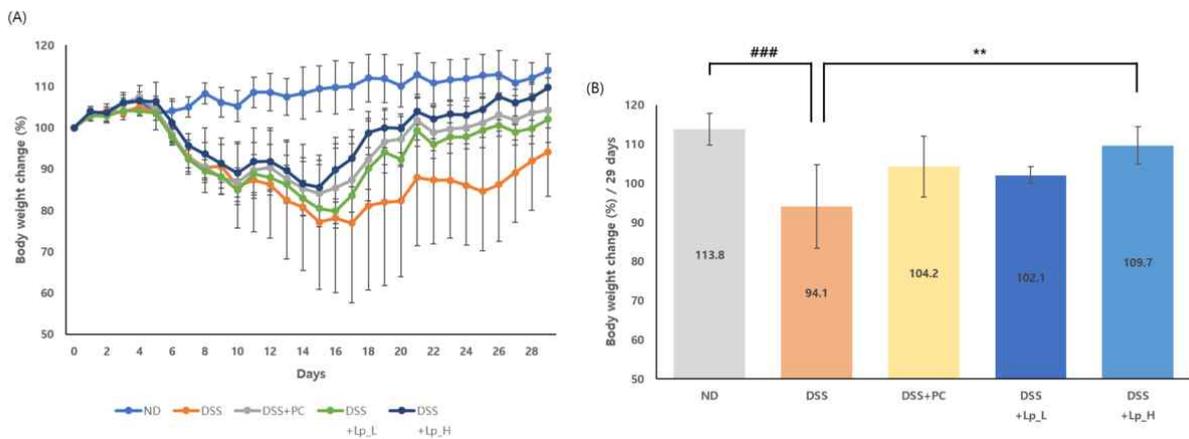


Fig. 18. Effects of fermented supplementation with *Lactobacillus plantarum* on the change of body weight in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis (#### $p < 0.001$ vs. control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. DSS alone).

(2) 질병활성도(Disease activity index; DAI)

DSS유도에 의한 궤양성 대장염 모델은 마우스의 체중 감소, 설사, 혈변을 특징으로 하는 임상 증후가 나타난다. 본 연구에서는 이러한 임상증상에 대한 각 점수를 환산하여 투여물질의 영향을 측정 및 계산하였다. 본 실험의 DAI를 확인한 결과, 체중변화와 유사한 경향을 보였는데, DSS를 급이한 지 4일차까지는 큰 변화가 없다가 5일차부터 DAI수치가 상승하였다. 이후 7일차부터 10일차 까지 증가하였으며, 이후 2번째 DSS급이(실험 11~13일차)기간에 다시 증가하는 경향을 보였다. 이후 두 번째 회복기간(실험 14일~20일)에는 DAI가 점차 감소하는 경향을 보였고, 세 번째 DSS급이(실험 21일~23일) 시점에서부터 DSS군과 시료 투여군과의 차이를 확인할 수 있었다 (Fig. 19A). 희생 전날인 28일을 기준으로 각 DAI를 확인한 결과, 정상군(NC)은 0점, DSS군은 3.4 ± 1.5 점으로 유의적인 차이가 있었으며($p < 0.01$), DSS군과 PC군은 1.0 ± 1.4 점($p < 0.05$), Lp_L 및 Lp_H는 각각 0.8 ± 1.3 점($p < 0.05$), 0.4 ± 0.9 점($p < 0.01$)으로 모두 유의적인 차이가 확인됨으로써(Fig. 19B), 급성대장염과 마찬가지로 발효 후 형성된 vitamin B2가 장내 염증을 조절함으로써 설사 및 혈변을 억제하고 이로 인한 체중감소를 조절한 것으로 생각된다.

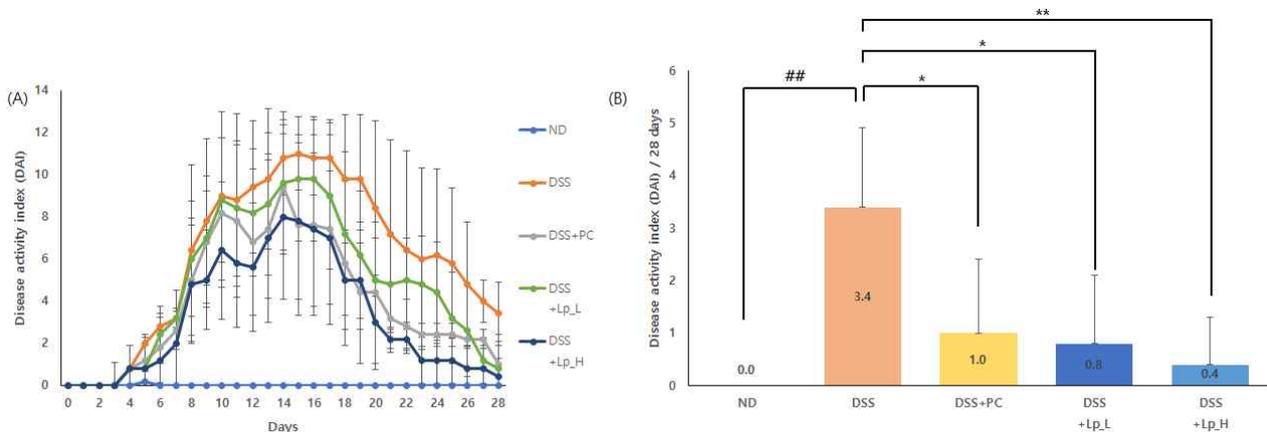


Fig. 19. Effect of fermented supplementation with *Lactobacillus plantarum* on DSS-induced the DAI increase in mice. DAI was calculated as described in Materials and Methods. Data were represented in the mean \pm S.D. from triplicate experiments ($##p < 0.01$ vs. control, $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ vs. DSS alone).

(3) 대장 조직의 육안적 길이 및 조직 무게 변화

대장염 동물모델에서의 장 길이 변화는 염증진행과 연관성이 있기 때문에, 본 연구에서는 DSS로 유도된 동물모델에서 대장길이 변화에 대한 투여소재의 영향을 확인하였다. 측정 결과, 대장길이를 측정한 결과, 정상군(NC)은 8.08 ± 0.33 cm, DSS군은 5.84 ± 0.30 cm로 현저하게 짧아짐을 확인하였으며($p < 0.001$), vitamin B2 (PC)군, Lp_L군 및 Lp_H군은 각각 6.9 ± 0.29 cm, 6.02 ± 0.18 cm, 6.78 ± 0.29 cm로 Lp_L군을 제외하면 모두 유의적으로 증가함을 확인하였다($p < 0.01$)(Fig. 20A, B). 이는 체중의 변화, 질병활성도와 마찬가지로 발효 생성물에 의한 장내 염증을 완화시킴으로써 대장길이 단축을 조절한 것으로 보인다. 체중 대비 맹장 무게를 측정한 결과, 대장길이 결과와 유사하게, 정상군(NC)에 비해 DSS군에서 유의적으로 감소하였으며, 양성대조군, 발효 저농도 및 고농도에서 모두 유의적으로 증가함을 확인하였다. 또한, 체중무게 대비 비장의 무게를 측정한 결과, 정상군 0.0026 ± 0.0002 ,에서 DSS군이 0.0102 ± 0.0038 로 현저히 증가함을 확인하였으며($p < 0.001$), vitamin B2 (PC)군과 Lp_L 및 Lp_H군에서 모두 0.0059 ± 0.0015 , 0.0070 ± 0.0017 , 0.0061 ± 0.0012 으로 유의적으로 감소하는 경향을 확인할 수 있었다($p < 0.01$)(Fig. 20C). 이를 통해, 이를 통해, 대장 및 비장 내 염증수준이 완화되었다고 할 수 있다.

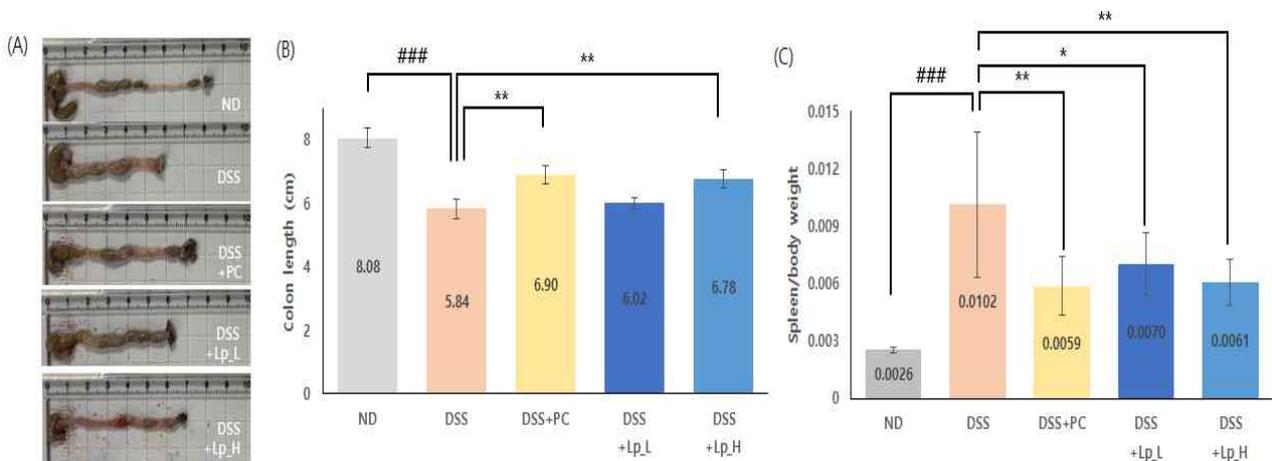


Fig. 20. Effect of fermented supplementation with and *Lactobacillus plantarum* on DSS-induced the colon length shortening in mice and cecum weight per body weight. Data were represented in the mean \pm S.D. from triplicate experiments (### $p < 0.001$ vs. control, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. DSS alone).

(4) 대장의 조직학적 변화

DSS에 의한 만성염증이 유도된 마우스의 대장 조직과 시료를 투여한 마우스의 대장 조직의 형태학적 변화를 확인하기 위해 hematoxylin과 eosin을 사용하였으며, 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. Hematoxylin과 eosin을 이용한 조직학적 검사를 확인하였을 때, 정상군은 대장 조직에서 이상소견이 없었으나 DSS군 및 HeHi군은 핵의 파괴와 점막과 점막 하에 염증세포의 침윤, 상피 조직의 손실을 확인할 수 있었다. PC군과 Lp_L군 및 Lp_H군은 정상군(NC)에 비해 조직 형태가 부분적으로 손상된 것을 확인할 수 있었으나 DSS로 인한 대장 조직의 형태학적 변화가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 21).

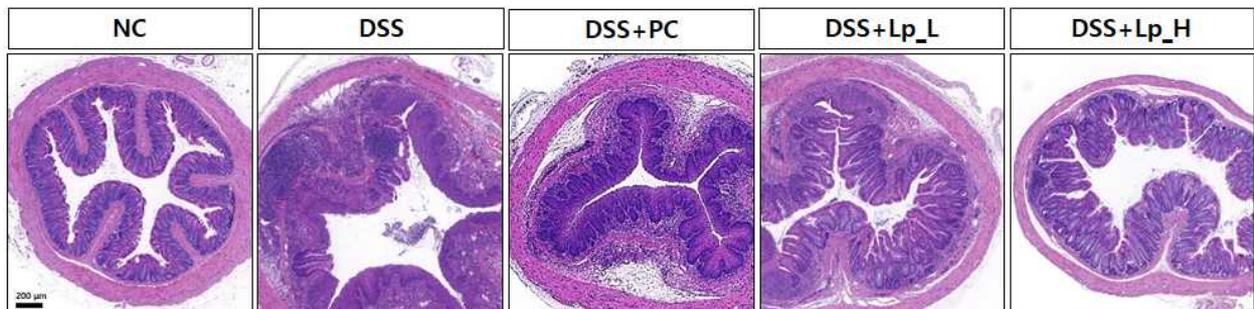


Fig. 21. H&E stain: Colonic mucosa of mice with DSS-induced acute colitis.

(5) 근육량 변화

DSS에 의한 염증이 유도된 마우스와 시료를 투여한 마우스의 근육량의 변화를 확인하기 위해 DEXA원리를 활용한 체성분 분석기를 사용하였으며, 이미지를 촬영하여 관찰하였다. 정상군(NC)의 경우 20.28 ± 1.48 g, DSS군의 경우 16.61 ± 1.76 g로 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었으며($p < 0.001$), Lp_L군을 제외한 PC군 및 Lp_H군은 각각 18.61 ± 1.07 g, 19.02 ± 0.78 g로 DSS군에 비해 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 22A). 이는 촬영된 사진에서도 유사한 경향을 확인할 수 있는데, 사진 내 마우스의 파란색으로 촬영된 부분이 근육량을 의미한다(Fig. 22C). 또한, 적출된 대퇴사두근의 무게를 측정한 결과, 정상군(NC)에 비해 DSS군의 무게가 유의적으로 감소함을 확인하였으며($p < 0.05$), DSS군에 비해 모든 시료군에서 무게가 증가하는 경향을 보였으며, 특히 Lp_H군에서 0.322 ± 0.035 g으로 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 대퇴사두근이 증가하는 경향을 보이며, 체성분 분석을 통해, vitamin B 및 Lp_H소재가 근육량이 전체적으로 증가함을 확인한 것으로 보아, 장기간 투여했을 시, 근육의 증가에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

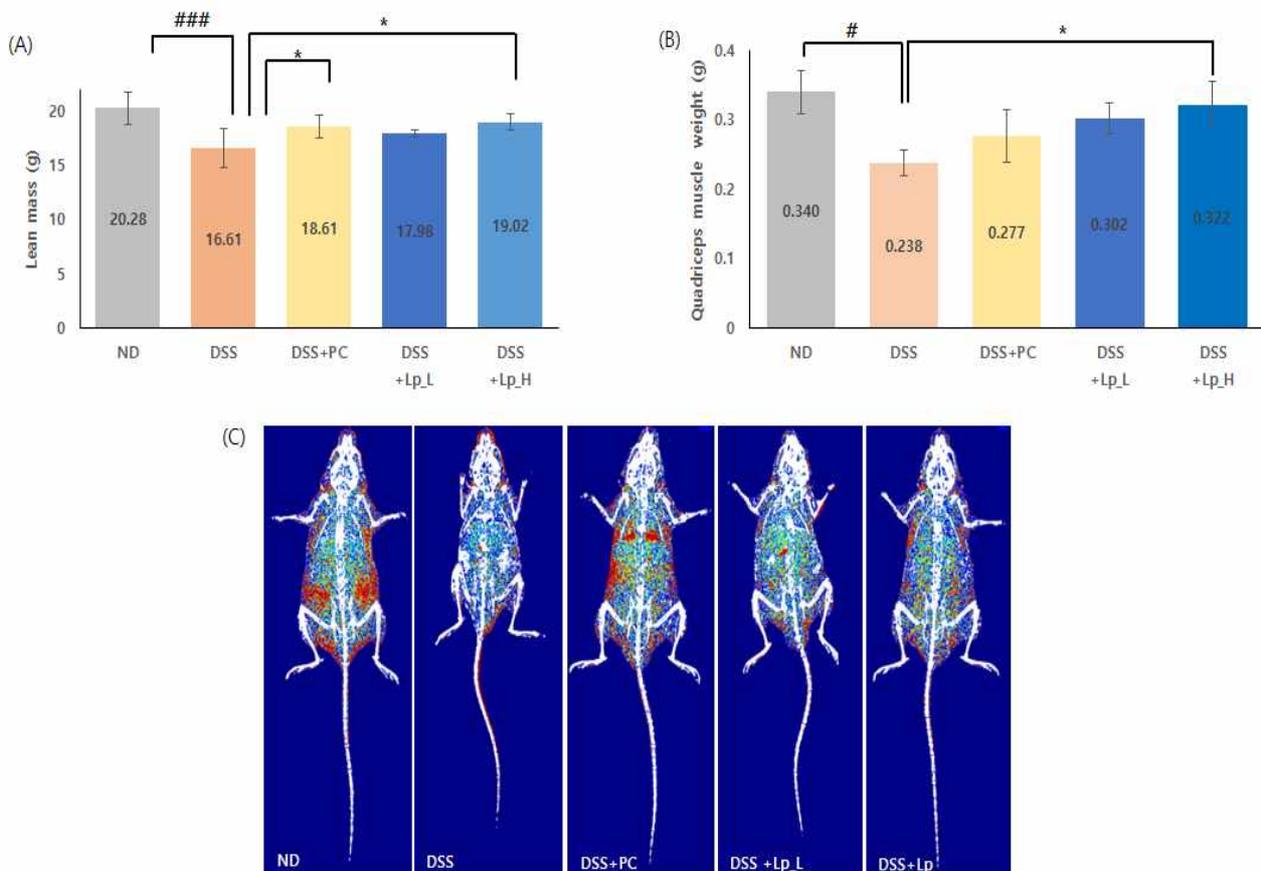


Fig. 22. Effects of fermented supplementation with *Lactobacillus plantarum* on the change of muscle weight in C57BL/6 mice with DSS-induced colitis ($^{\#}p < 0.05$ and $^{\#\#\#}p < 0.001$ vs. control, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. DSS alone).

(6) 대장 조직에서 장내 염증인자 및 염증성 사이토카인 발현량 변화

실험군간 대장조직의 염증 정도를 대표적인 염증 지표인자인 COX-2와 iNOS의 단백질 발현을 western으로 분석해 보았을 때, 정상군(ND)에 비해 DSS군의 COX-2와 iNOS 발현이 유의적으로 증가한 반면 DSS+PC군에서 이들 유전자 발현은 정상군 수준으로 감소하였다 (Fig. 23B-23C). DSS+Lm투여군, DSS+Lp투여군에서는 저농도에서 고농도로 갈수록 COX-2, iNOS의 발현이 현저히 감소하였으며, Lm, Lp 투여 농도 의존적으로 항염증 활성이 큰 것을 확인하였다. 염증성 사이토카인으로 TNF- α 와 IL-6의 대장 조직 발현량을 Fig. 22A에서 western으로 먼저 분석하였을 때 정상군(ND)에 비해 DSS군의 TNF α 와 IL 6 발현이 현저히 증가하였지만 DSS+소재 투여군에서는 증가한 사이토카인의 발현량을 억제하지 못하였다. 염증 사이토카인들의 유전자 발현에도 영향을 주는지 확인하기 위해 Realtime PCR을 이용하여 DSS로 궤양성 대장염을 유도한 마우스의 대장조직에서 TNF- α , IL-6와 IL 1 β 의 mRNA 발현을 측정하였다. 그 결과 정상군(ND)에 비해 DSS군에서 TNF- α , IL-6와 IL 1 β mRNA 발현이 현저하게 증가하였다. 반면 Lm_H (고농도)투여군에서만 증가한 TNF- α 의 유전자 발현량이 유의적으로 감소되었고 (Fig. 23D), 장 조직 내 IL-6, IL 1 β 유전자 발현량은 모든 소재투여군 (PC, Lm_L, Lm_H, Lp_L, Lp_H)에서 정상군(ND) 수준으로 감소하였다 (Fig. 23E-F).

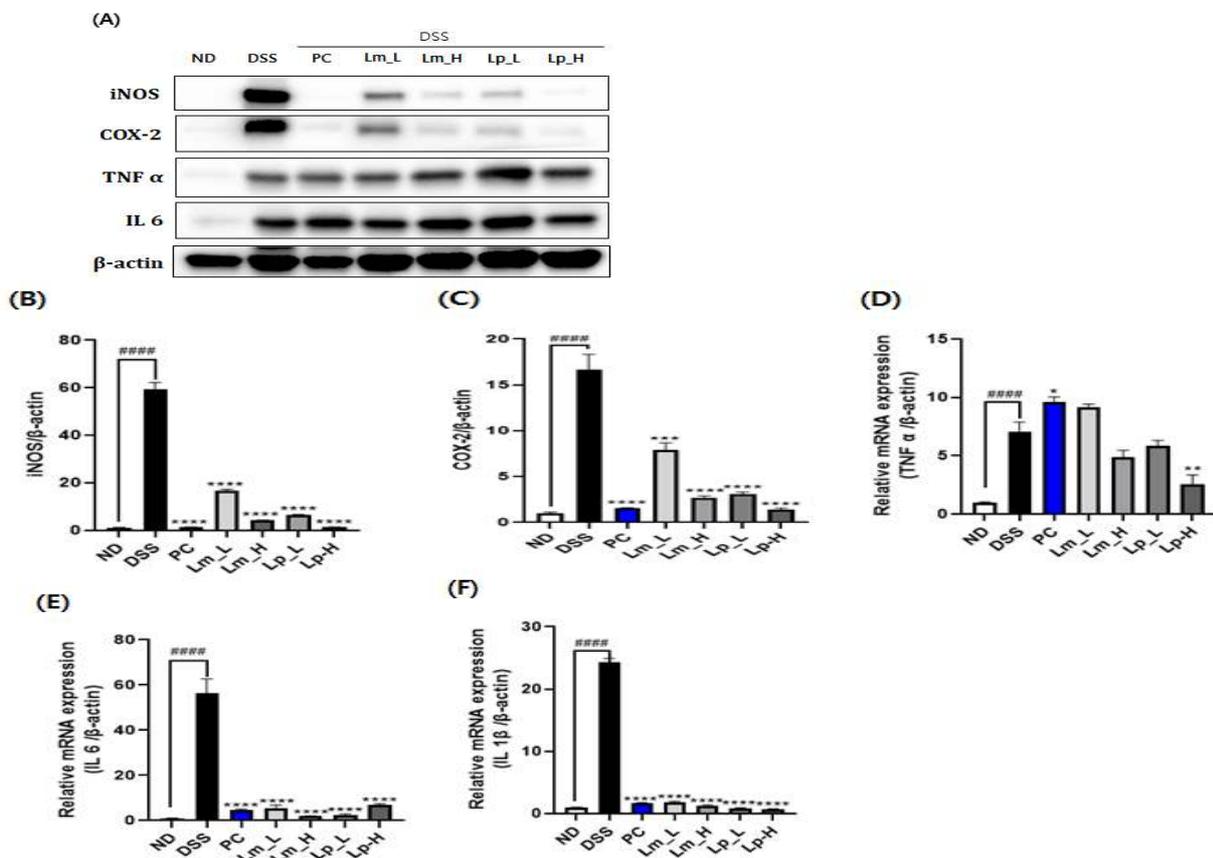


Fig. 23. Effects of fermented supplementation with *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* on inflammatory mediators in colon tissues of C57BL/6 mice with DSS-induced colitis. Total proteins were isolated and analyzed by Western blotting and quantified (A,B,C), TNF- α , IL-6, IL 1 β mRNA expression in colorectal region were measured by qRT-PCR (D,E,F). Value are presented as the mean \pm SE. (##### p <0.0001 vs. control, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 and **** p <0.0001 vs. DSS alone).

(7) 대장 조직에서 tight junction 단백질의 발현량 변화

DSS에 의한 대장 염증 유발 시 점막 장벽 온전성 확인을 위해 밀착연접 단백질인 zonula occludens (ZO)-1, occludin, claudin-1의 장조직 내 유전자 발현을 Real-time PCR을 통해 확인하였다. DSS에 의한 대장 염증 유발한 장조직의 PCR 실험결과, IDSS에 의해 유의적으로 감소되었던 밀착연접 단백질인 ZO-1, occludin, claudin-1 유전자 발현이 Lp_H (고농도) 투여군에서 유의적으로 증가하여 장벽 온전성이 회복되는 것을 확인하였다 (Fig. 24). 또한 정상군(ND)에 비해 감소된 DSS군의 ZO-1 mRNA 발현량을 Lm_L, Lm_H 투여군에서 개선됨을 확인함으로써 Lm, Lp가 장 건강에 효능이 있는 소재로서 사료된다.

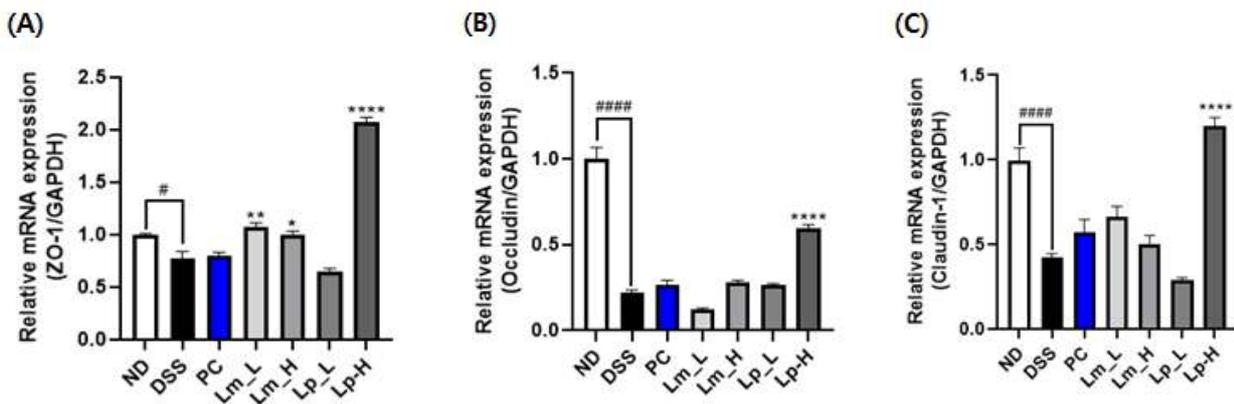


Fig. 24. Effects of fermented supplementation with *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* on inflammatory mediators in colon tissues of C57BL/6 mice with DSS-induced colitis. ZO-1, Occludin, Claudin-1 mRNA expression in colorectal region were measured by qRT-PCR. Value are presented as the mean \pm SE. (# $p < 0.05$, ##### $p < 0.0001$ vs. control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ vs. DSS alone).

(8) 만성대장염 모델에서의 분변 내 세균 분포 분석

각 군별 분변시료의 세균 분포를 분석하여 미생물학적 분류 단계를 문(phylum)과 과(family), 종(species) 수준별로 차지하는 세균의 상대적 분포비율을 Fig.25에 나타냈다. 문(phylum) 수준에서 비교 시, 급성대장염 모델에서의 결과와 같이 *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*가 주요 분포 세균으로 확인되었다. 특히, *Firmicutes*가 모든 군에서 가장 높은 비중을 차지하였다(Fig.25A). 과(family) 수준에서 보면, *Bacteroidaceae* family에 속하는 *Bacteroides caccae*가 염증성 장질환을 유발하는 세균으로, 정상군(NC)에서는 0.9%를 차지하고 있으며, DSS군에서는 4.5%로 증가하였고, 양성대조군(vitamin B2 (PC))과 Lp_L 및 Lp_H그룹에서 각각 1.1%, 1.4% 및 0.9%로 수치가 낮아지는 경향을 보였다(Fig.25B, C). *Bacteroidaceae* family에 속하는 *Phocaeicola vulgatus*는 위장관(GI tract) 내 존재하는 지질다당류(liposaccharide, LPS)를 저감시키는 유익균으로, DSS군에서는 1.3%를 차지하고 있었는데, 양성군(PC)과 Lp_H군에서는 각각 1.4%와 6.8%(약 5.2배)로 증가함을 확인하였다. 장내 염증과 관련된 *Oscillospiraceae* family의 경우, 정상군(NC)에서는 3.1%를 차지하고 있었으며, DSS군에서는 5.4%로 증가하였고, 양성대조군(PC), Lp_L 및 Lp_H그룹에서 각각 0.8%와 0.4% 및 0.2%로 감소함을 확인하였다. *Lachnospiraceae* family 또한 낙산(butyrate)과 프로피온산(propionate) 대사와 관련된 균으로, 정상군(NC)에서 9.3%에서 8.5%로 감소하는 경향을 확인하였다. 특히, 대표적인 유산균으로 알려진 *Lactobacillus johnsonii*가 DSS군에서는 12.9%를 차지하고 있었는데, 양성군(PC)과 Lp_H군에서는 각각 32.1%와 38.6%로 증가함을 확인하였다. *Muribaculum intestinale*가 속한 *Muribaculaceae* family도 단쇄지방산을 생성하는 주요 세균으로, 정상군(NC)에서 11.1%에서 0.7%까지 DSS군에서 감소하였으며, 양성대조군(vitamin B2 (PC))과 Lp_H군에서 각각 7.7%와 5.9%로 증가함을 확인하였다. 특히 대표적인 유산균이 속해 있는 *Lactobacillaceae* family의 경우, 정상군(NC)에서 24.6%이었던 것이 DSS군에서 21.8%로 감소하였는데, *Lactobacillaceae* family는 양성대조군(vitamin B2 (PC))에서 45.6%로 상승함을 확인하였고, Lp_L와 Lp_H군에서는 각각 55.8%(약 2.6배), 41.8%(1.9배)로 상승하는 것을 확인하였다. 또한 젖산(lactate)를 생성하는 *Atopobiaceae* family가 DSS군에서 0.01%를 차지 하였는데, 양성대조군(PC)과 Lp_L 및 Lp_H군에서 각각 0.3%, 1.1% 및 0.9%로 상승함을 확인하였다. 또한 세로토닌과 지질대사에 유익균으로 알려진 *Turicibacter sanguinis*가 속한 *Turicibacteraceae* family가 DSS군 8.1%에서 양성대조군(PC)과 Lp_H군에서 8.7%로 상승함을 확인하였다.

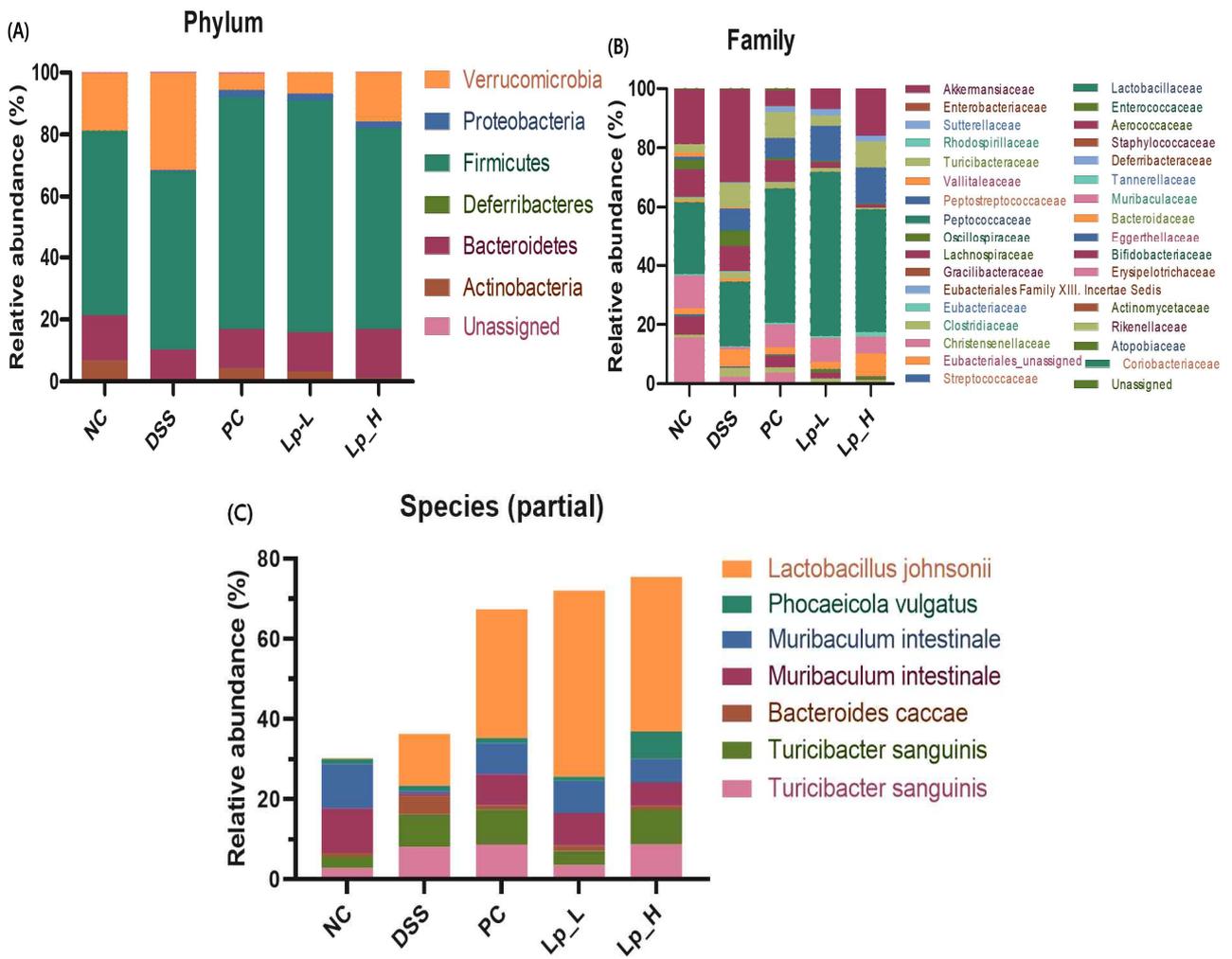


Fig. 25. Relative abundances evaluated at the phylum (A) family (B) and species (partial) level (C) in gut bacterial communities of the induced chronic colitis mice. Bacterial taxa are clustered and identified by OTU analysis.

2-3. 동애등에 파라바이오틱스 반려견 사료 제품화(공동2_시그널케어)

(1) 동애등에 추출발효물의 반려견 기호성 1차 분석

반려견은 소형견 8마리, 중형견 8마리, 대형견 4마리를 대상으로 첫째는 유산균발효물(HiLAB)만을 급여, 두 번째는 기존사료에 유산균 발효물을 첨가하는 방법으로 급여하였다. 급여량은 2g/일로 아침, 저녁으로 나눠 급여하였다. 동애등에 추출물(HeHi)과 추출발효물(HiLAB_L. lactis, L. plantarum, L. mesenteroides, L. brevis) 급여에 대한 기호성의 큰 차이는 없었다. 추출 과정이 없는 분말의 경우보다는 기호성은 높은 것으로 확인되었다. 또한 동애등에 추출 발효물(HiLAB)만을 급여하였을 때보다 기존사료와 함께 급여했을 때 견종 모두 기호도가 높아지는 것이 관찰되었다(표 2). 2주 테스트 후 급여했을 경우는 대부분 견종에서의 기호도가 좋아지는 것으로 확인되었다.

표 2. 동애등에 유산균 발효물의 반려견 기호성 분석

유산균 종류	반려견 대상 기호성 테스트_소형견 8마리 중형견 8마리 대형견 4마리_하루 권장량 2g 기준														
	HeHi			Ll_SF (L. lactis)			Lp_SF (L. plantarum)			Lm_SF (L. mesenteroides)			Lb_SF (L. brevis)		
견종	소형견	중형견	대형견	소형견	중형견	대형견	소형견	중형견	대형견	소형견	중형견	대형견	소형견	중형견	대형견
유산균 발효물 직접 급여	4/8	4/8	3/4	4/8	4/8	2/4	4/8	4/8	2/4	3/8	2/8	4/4	3/8	3/8	2/4
기존 사료 + 유산균 발효물 급여	5/8	6/8	3/4	5/8	6/8	3/4	6/8	6/8	2/4	5/8	5/8	2/4	6/8	5/8	3/4

(2) 동애등에 추출발효물 급여에 따른 반려견 행동 분석

첫 번째 유산균발효물(HiLAB)만을 급여한 소형견 8마리, 중형견 8마리, 대형견 4마리의 경우와 두 번째 기존사료에 유산균 발효물을 첨가한 소형견 8마리, 중형견 8마리, 대형견 4마리에 2g/일 ($2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^{10}$) 급여했을 경우 이상 징후는 없었다. HiLAB_L. lactis, L. plantarum의 경우에는 소형견과 중형견은 유산균 직접 급여는 50%, 기존사료에 첨식할 경우 75%의 기호도도 높았고 이상 징후도 없었다 (그림 1). 급여량은 2g/일로 아침, 저녁으로 급여하였다. 동애등에 추출물(HeHi)과 추출발효물(HiLAB_L. lactis, L. plantarum, L. mesenteroides, L. brevis) 급여에 대한 기호성의 큰 차이는 없었다. 하지만 추출 과정 없는 분말의 경우보다는 기호성은 높은 것으로 확인되었다. 또한 동애등에 추출발효물(HiLAB)만을 급여하였을 때보다 기존사료와 함께 급여했을 때 견종 모두 기호도가 높아지는 것으로 관찰되었다 (Table 1). 2주 테스트 후 급여했을 경우는 대부분 견종에서의 기호도가 좋아지는 것으로 확인되었다. HiLm의 경우는 단일급식에서 대형견에 좋은 기호도가 확인되었다.

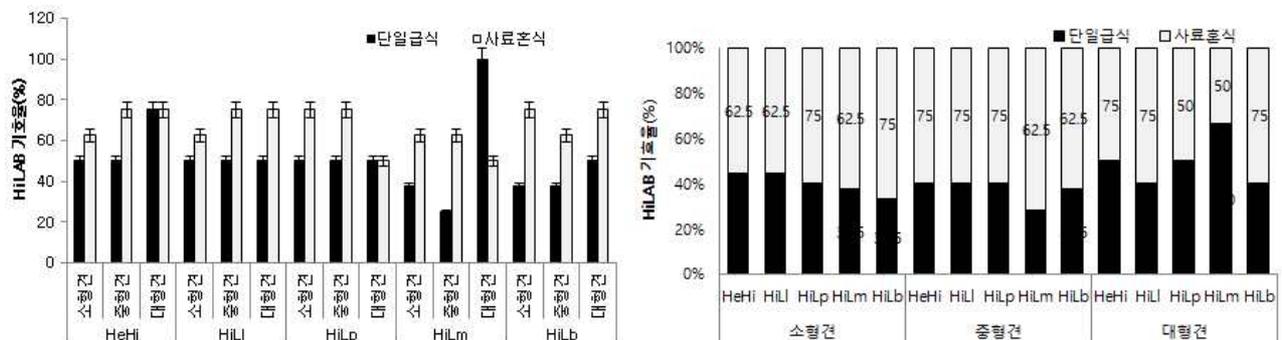


그림 1. 동애등에 추출발효물의 반려견에 따른 기호율

(3) 반려견 시제품 사료 제조 레시피

사랑하개	함유량(%)
동애등에	20
북어	18
참쌀	15
청도반시	10
미강	10
고소애	8
송어	5
꽃병이	2
시래기	2
홍계	2
새송이 버섯	2
비타민C	1
천연미네랄	1
유산균	1
초유	1
해바라기오일	1.5
곤충오일	0.5
전체	100

표 1 사료성분목록

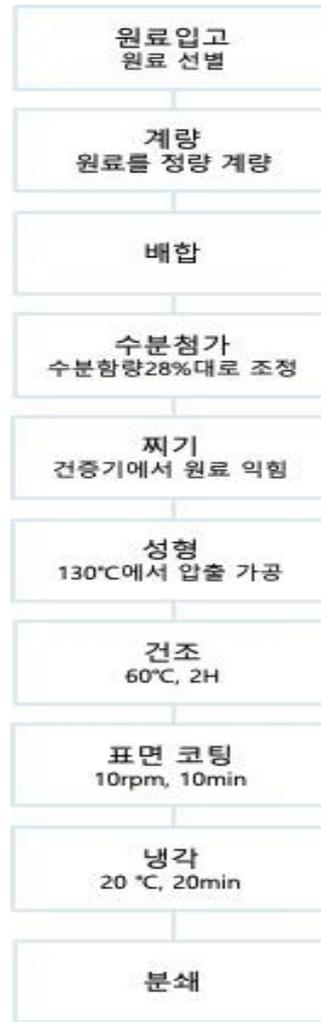


그림 1 사료 생산 공정도

사료는 기존 자사제품 사료를 바탕으로 영양 균형을 고려해 동애등에 20%, 북어 18% 참쌀 15%, 청도반시 10%, 미강10%, 고소애 8% 송어 5%, 꽃병이 2%, 시래기 2%, 홍계2%, 새송이 버섯 2%, 비타민C 1%, 천연미네랄1%, 유산균 1%, 초유 1%, 해바라기오일 1.5%, 곤충오일 0.5% 조성의 사료레시피를 만들었다. 사료 생산 공정에 따라 원료 입고, 계량, 배합, 수분첨가, 찌기, 성형(압출가공), 건조, 오일코팅, 냉각, 분쇄 순으로 진행되어 분말사료를 생산 하였다. (재)환동해산업연구원으로부터 공급 받은 동애등에 파라바이오틱스 (HiLAB 파라바이오틱스(BSF_Para) 60 ml을 생산된 사료 80 g 섞어서 급여 할 수 있는 사료 시제품을 개발하여 지역 관할 지자체인 경북도청에 사료 등록하였다. (그림1~2, 표1).

(4) 사료 제형 실험 기본 성분 분석 및 안정성(독성 물질) 분석

시제품인 동애등에 추출발효물을 첨가한 사료는 다양한 제형형태로 제조되었다. 압축성형 건식사료(Extruded pet food)는 유산균이 사균 형태인 BSF_parabiotics 형태로 제조되었다. 또한 액상 사료는 발효액을 그대로 사용하여 생균 형태로 사용하지만 보관, 유통, 및 섭식 양 등의 조건들을 고려하여 사용하였다



시제품인 동애등에 추출발효물 함유 반려견 사료의 기본 성분 분석을 하였고 또한 사료의 안정성을 확인 하기위해 미생물 독성물질을 분석하였다. 기본적인 성분으로 수분 6.95%, 조단백질 29.17%, 조지방12.38%, 조섬유 28.3%, 조회분 14.53%, 칼슘3.21%, 인 1.64%를 함유하여 사료의 성분으로 적합하였다. 중금속 함량은 납 불검출, 카드뮴 0.21 ppm, 비소 2.33 ppm, 수은 0.02 ppm, 불소177.36 ppm, 셀레늄 불검출, 멜라민 불검출로 사료 중금속 및 기타 기준 안정성에서 적합하였다. 곰팡이 독소 검사에서는 아플라톡신B1, 아플라톡신B2, 아플라톡신G1, 아플라톡신G2, 살모넬라 D그룹 모두 불검출 되어 사료의 안정성이 입증 되었다.

표 2 사료 성분 분석 및 곰팡이 독소 분석


 사령규칙 [별지 제20호서식] <개정 2019. 7. >

사료검정증명서

(30007) 세종특별자치시 전의면 미래산단4로 95
 한국단미사료협회 사료연구소 담당부서 사료검정 책임자 김용익 담당자 강명규
 전화번호 (044) 863-5790 팩스번호 (044) 863-5795

문서 번호	한단협 분석(검정) 제2022-14878호			
시행 일	2022년 08월 04일			
수신	농업회사법인주식회사시그널케어			
접수번호	자7 - 1165	접수연월일	2022년 07월 26일	
검정번호	2007-1286	검정일	2022년 08월 04일	
제조·수입업자	회사명	농업회사법인주식회사시그널케어		
	성명	양동섭		
	주소	경북 청도군 화양읍 합천2길 42 전화번호 010-7546-5225 팩스번호 054-373-4764		
제품명	사랑하개			
사료명칭	애완개			
사료형태	펠릿사료			
수입일		제조일		
의뢰성분	단위	검정결과	검정방법	비고
수분(35도 2시간)	%	6.95	사료표준분석방법	
조단백질	%	29.17	사료표준분석방법	
조지방(E)	%	12.38	사료표준분석방법	
조섬유	%	2.83	사료표준분석방법	
조회분	%	14.53	사료표준분석방법	
칼슘(Ca)	%	3.21	사료표준분석방법	
인(P)	%	1.64	사료표준분석방법	
납(Pb)	ppm	불검출	사료표준분석방법	
카드뮴(Cd)	ppm	0.21	사료표준분석방법	
비소(As)	ppm	2.33	사료표준분석방법	
수은(Hg)	ppm	0.02	사료표준분석방법	
불소(F)	ppm	177.36	사료표준분석방법	
셀레늄(Se)	ppm	불검출	사료표준분석방법	
아플라톡신 B1	ppb	불검출	사료표준분석방법	
오크라톡신A(HPLC)	ppb	불검출	사료표준분석방법	
아플라톡신 B2	ppb	불검출	사료표준분석방법	
아플라톡신 G1	ppb	불검출	사료표준분석방법	
아플라톡신 G2	ppb	불검출	사료표준분석방법	
살모넬라O그룹		불검출	사료표준분석방법	
멜라민		불검출	사료표준분석방법	

사료관리법 제 20조에 따라 검정을 실시한 결과 위와 같이 검정되었음을 증명합니다.

2022년 08월 04일

한국단미사료협회 사료연구소


용도	자가품질검사
----	--------

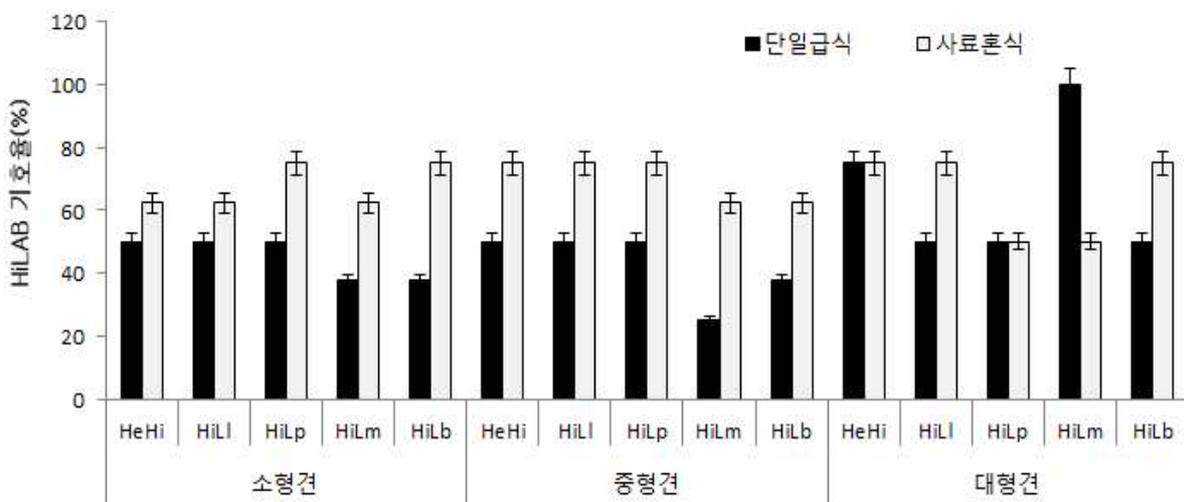
*사료명칭: 성분등록증에 명시된 '사료명칭'을 기재
 *제조 또는 수입 연월일: 제품 포장재에 표시되어 있는 제조 또는 수입 연월일 기재

(5) 동애등에 추출발효물의 반려견 기호성 분석

반려견은 소형견 8마리, 중형견 8마리, 대형견 4마리를 대상으로 첫 번째는 유산균발효물 (HiLAB)만을 급여, 두 번째는 기존사료에 유산균 발효물을 첨가하는 방법으로 급여하였다. 급여양은 2g/일로 아침, 저녁으로 나눠 급여하였다. 동애등에 추출물(HeHi)과 추출발효물급여에 대한 기호성의 큰 차이는 없었다. 추출 과정이 없는 분말의 경우보다는 추출 발효물이 기호성은 높은 것으로 확인되었다. 또한 동애등에 추출 발효물(HiLAB)만을 급여하였을 때보다 기존 사료와 함께 급여했을 때 견종 모두 기호도가 높아지는 것이 관찰되었다(표 3). 2주 테스트 후 급여했을 경우는 대부분 견종에서의 기호도가 좋아지는 것으로 확인되었다.



그림 3 동애등에 추출발효물 급여사진



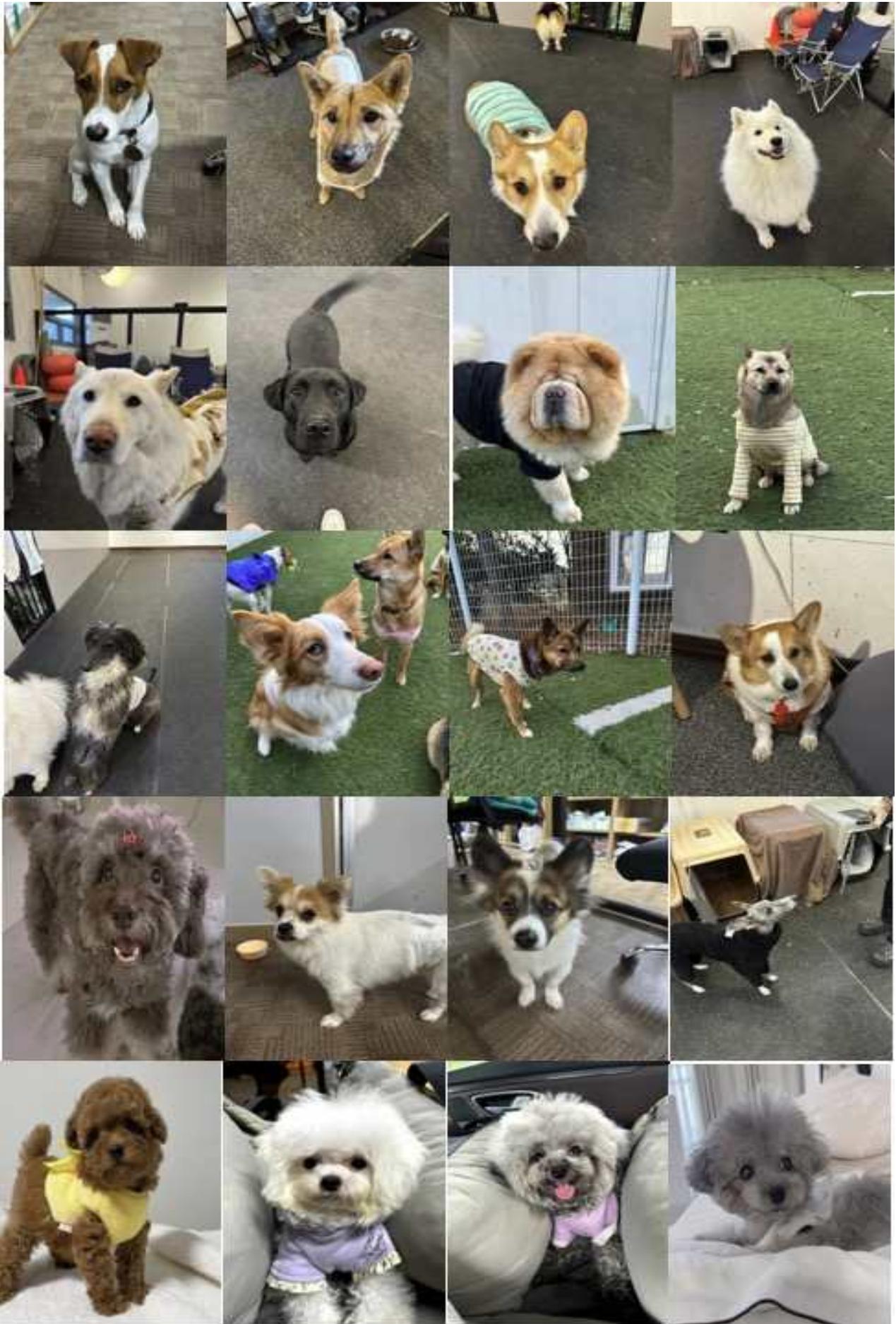


그림 4 사료급이에 참가한 반려 친구들_보호자들의 동의하체 진행

(6) BSF_ParaBiotics 제품 안전성 분석

동애등에 추출 발효물을 2 g/day로 아침, 저녁으로 나누어 급여 후 반려견의 행동을 분석하였다. 시험기간 동안 자유 음수를 실시하였고 일일 2시간 이상 야외에서 운동 할 수 있도록 하였다. 혈액분석을 통해 림프구, 적혈구, 혈소판 등 여러 가지 혈구 세포 및 혈액 구성인자 수치들이 정상 범위를 벗어나지 않았거나 범위를 크게 벗어나지 않고 건강했으며 혈액 화학분석에서도 간수치 및 췌장염 인자들인 ALT 및 albumin 등 모든 인자들 역시 정상 범위의 수치를 크게 벗어나지 않음을 보였다. 혈액의 나트륨, 칼륨, 염화 이온 등 전해질 수치도 정상을 범위를 보여 동애등에 추출물 급여 반려견들의 건강에 이상이 없음을 알 수 있었다 (표4). 모든 반려견이 하루 1회 이상의 정상적인 배변활동을 하였고, 분변 외관을 보았을 때도 묽은 변을 보는 반려견 없이 모두 정상 배변활동을 보였다 (그림5). 따라서 BSF_ParaBiotics 제품의 안전성에 이상이 없음을 알 수 있다.

표4 동애등에 유산균 발효물 급여 반려견 혈액분석

검사	정상범위	고야	롤루	몽이	장농
CBC					
WBC	6 ~ 17 (10x9/L)	10.6(=)	17(=)	15(=)	10(=)
WBC-Lymph(#)	0.8 ~ 5.1 (10x9/L)	1.3(=)	2.8(=)	3.2(=)	3.4(=)
WBC-Mono(#)	0 ~ 1.8 (10x9/L)	0.3(=)	0.6(=)	0.7(=)	0.4(=)
WBC-Gran(#)	4 ~ 12.6 (10x9/L)	9(=)	13.6(▲)	11.1(=)	6.2(=)
WBC-Lymph(%)	12 ~ 30 (%)	11.8(▼)	16.3(=)	21.6(=)	33.6(▲)
WBC-Mono(%)	2 ~ 9 (%)	3.2(=)	3.6(=)	4.5(=)	4.6(=)
WBC-Gran(%)	60 ~ 83 (%)	85(▲)	80.1(=)	73.9(=)	61.8(=)
RBC	5.5 ~ 8.5 (10x12/L)	7.91(=)	11.73(▲)	7.19(=)	8.88(▲)
Hemoglobin(Hb)	11 ~ 19 (g/dL)	16.9(=)	23.5(▲)	14.9(=)	19.4(▲)
Hematocrit(Hct)	39 ~ 56 (%)	57.5(▲)	83.1(▲)	50.4(=)	63.7(▲)
MCV	62 ~ 72 (fL)	72.8(▲)	70.9(=)	70.1(=)	71.8(=)
MCH	20 ~ 25 (pg)	21.3(=)	20(=)	20.7(=)	21.8(=)
MCHC	30 ~ 38 (g/dL)	29.3(▼)	28.2(▼)	29.5(▼)	30.4(=)
RDW-CV	11 ~ 15.5 (%)	14.6(=)	14.3(=)	14.8(=)	14.6(=)
Platelet	117 ~ 460 (10x9/L)	296(=)	415(=)	244(=)	277(=)
MPV	7 ~ 12.9 (fL)	8.7(=)	10.1(=)	8.3(=)	9.1(=)
PDW-CV	~ (%)	15.7	15.8	16.2	15.5
PCT	~ (%)	0.26	0.42	0.2	0.25
WBC-EOS%	~ (%)	4.5	3.4	3	4
Chemistry					
ALT	17 ~ 78 (U/L)	38(=)	53(=)	46(=)	54(=)
ALKP	47 ~ 254 (U/L)	131(=)	75(=)	67(=)	129(=)
BUN	9.2 ~ 29.2 (mg/dL)	24.1(=)	21.3(=)	42.7(▲)	32(▲)
Creatinine	0.4 ~ 1.4 (mg/dL)	1.07(=)	0.93(=)	1.85(▲)	1.25(=)
Glucose	75 ~ 128 (mg/dL)	100(=)	100(=)	118(=)	104(=)
Protein-Total	5 ~ 7.2 (g/dL)	5.9(=)	5.6(=)	5.7(=)	6.5(=)
Albumin	2.6 ~ 4.0 (g/dL)	3.1(=)	3(=)	2.7(=)	3.3(=)
GGT	5 ~ 14 (U/L)	5(=)	4(▼)	1(▼)	2(▼)
Cholesterol-Total	111 ~ 312 (mg/dL)	195(=)	203(=)	216(=)	306(=)
Calcium[Ca ⁺⁺]	9.3 ~ 12.1 (mg/dL)	10.6(=)	10.9(=)	10.1(=)	10.6(=)
Phosphorus-Inorganic	1.9 ~ 5 (mg/dL)	3.8(=)	3.6(=)	2.7(=)	3.8(=)
Bilirubin-Total	0.1 ~ 0.5 (mg/dL)	0.1(=)	0.1(=)	0.1(=)	0.1(=)
Lipase	10 ~ 160 (U/L)	37(=)	41(=)	56(=)	37(=)
Amylase	200 ~ 1400 (U/L)	678(=)	401(=)	827(=)	478(=)
CRP	0 ~ 7 (mg/L)	9(▲)	9(▲)	9(▲)	9(▲)
Globulin	1.6 ~ 3.7 (g/dL)	2.8(=)	2.6(=)	3(=)	3.2(=)
ALB/GLOB	0.7 ~ 1.9 ()	1.1(=)	1.2(=)	0.9(=)	1(=)
Electrolyte Analysis					
Na ⁺	141 ~ 152 (mmol/L)	146(=)	146(=)	148(=)	151(=)
K ⁺	3.8 ~ 5 (mmol/L)	4.3(=)	4.2(=)	4(=)	4.2(=)
Cl ⁻	102 ~ 117 (mmol/L)	106(=)	109(=)	111(=)	111(=)
Na/K	29.9 ~ 39.2 ()	34(=)	34.8(=)	37(=)	36(=)

(7) BSF_ParaBiotics 제품 급여 후 대변 확인

동애등에 추출 발효물을 2 g/day로 아침, 저녁으로 나누어 급여 후 반려견의 행동을 분석하였다. 시험기간 동안 자유 음수를 실시하였고 일일 2시간 이상 야외에서 운동 할 수 있도록 하였다. 모든 반려견이 하루 1회 이상의 정상적인 배변활동을 하였고, 분변 외관을 보았을 때도 묽은 변을 보는 반려견 없이 모두 정상 배변활동을 보였다 (그림5). 따라서 BSF_ParaBiotics 제품의 안전성에 이상이 없음을 알 수 있다.

그림 5 반려견 분변사진



(8) BSF_ParaBiotics 첨가 다양한 반려견 시제품 제조_고구마와 콜라보

동애등에 추출 발효물을 첨가한 다양한 시제품을 제조하기 위해 반려견의 좋아하는 고구마, 그레놀라, 황태 등을 첨가한 다양한 제품을 시도하였다. 고구마의 사용은 기호성은 높일 수 있으나 비만 등에 대한 후속 실험이 필요하다.

사랑하개 건식 고구마_동애등에 사료	사랑하개 건식 고구마_동애등에 사료
	
	
	

(9) BSF_ParaBiotics 첨가 다양한 반려견 시제품 제조_황태와 콜라보

동애등에 추출 발효물을 첨가한 다양한 시제품을 제조하기 위해 반려견의 좋아하는 황태를 베이스로 산양유, 사과육수 등을 첨가하고 건식 또는 습식 상태의 다양한 제품을 시도하였다. 황태의 사용은 반려견의 종류에 따라 기호성이 다르나 건강식으로 가능하여 이후 제품화할 계획이다.

사랑하개 건식 산양유_분말타입	사랑하개 건식 황태_동애등에 사료
	
사랑하개 습식 사과육수_동애등에 사료	사랑하개 습식 산양유_젤리타입
	

(10) BSF_ParaBiotics 첨가 다양한 반려견 시제품 제조_곡물과 콜라보

동애등에 추출 발효물을 첨가한 다양한 시제품을 제조하기 위해 반려견의 좋아하는 그래놀라, 보리, 등을 첨가한 다양한 제품을 시도하였다. 곡물의 사용은 이취는 감소하였지만 고칼로리와 고탄수화물 함량이 동반되어 관련 제조 레시피에 대한 실험이 필요하다.

사랑하게 건식 그래놀라_동애등에 사료	사랑하게 건식 5종 곡물_동애등에 사료
	
	

(11) BSF_ParaBiotics 첨가 다양한 반려견 시제품 제조_식용곤충과 외래어종 콜라보

동애등에 추출 발효물을 첨가한 다양한 시제품을 제조하기 위해 식용곤충인 갈색거저리와 민물고기의 교란종인 배스, 강준치의 어분 등을 첨가한 다양한 제품을 시도하였다. 이취감소를 위해 기타 과일(Apple, Beet, Carot; ABC), 곡물, 황태 등의 조합 사용은 이취는 감소하였지만 고칼로리와 고탄수화물 함량이 동반되어 관련 제조 레시피에 대한 실험이 필요하다.

사랑하개 하이포알러제닉 곤충단백질 사료	사랑하개 ABC원료_동애등에 사료
 <p>A large bag of SchWelpе dog food. The packaging is primarily brown and white, featuring a photo of a dog's face. Text on the bag includes 'SchWelpе', '알러지프리 천연 곤충단백질 기능성사료, 슈웬프', and 'ALL AGE 8mm'. There are also icons for various benefits like '비타민 강화', '면역력 강화', '소화력 강화', '피부 건강', and '눈 건강'.</p>	 <p>A large teal-colored bag of Zero Care dog food. The packaging features a stylized orange and white logo with the text 'Zero Care' and 'Only Contain Natural Zero Chemicals!'. It also mentions 'All Life Stages' and 'Net weight 3.5 lbs (1.59 kg)'. There is a small 'NASC' logo in the bottom right corner.</p>
사랑하개 배스어분 혼합_동애등에 사료	사랑하개 강준치어분 혼합_동애등에 사료
 <p>A smaller bag of Hugmoer Bass dog food. The packaging is white with orange and red accents. It features the text '허그 모어 배스' and '100g'. Below the main text, there is a detailed list of ingredients and nutritional information in Korean.</p>	 <p>A smaller bag of Hugmoer Kangjunchi dog food. The packaging is white with green and blue accents, featuring a landscape illustration of a river and fields. It features the text '허그 모어 강준치' and '100g'. Below the main text, there is a detailed list of ingredients and nutritional information in Korean.</p>

3. 정량적 연구개발성과

1) 정량적 연구개발성과 요약

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (2021~2022)	계	가중치 (%)		
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문	목표(단계별)	2	2		
		실적(누적)	6	6	300	
	특허	목표(단계별)	1	1		
		실적(누적)	13	13	1,300	
	보고서원문	목표(단계별)	-	-		
		실적(누적)	2	2	200	
	생명자원	목표(단계별)	3	3		
		실적(누적)	5	5	167	
	학술발표	목표(단계별)	3	3		
		실적(누적)	17	17	566	
	연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시 (이전)	목표(단계별)	1	1	
			실적(누적)	4	4	400
기술료		목표(단계별)	10	10		
		실적(누적)	15	15	150	
시제품		목표(단계별)	1	1		
		실적(누적)	5	5	500	
매출액		목표(단계별)	-	-		
		실적(누적)	81,597.608	81,597.608		
고용창출		목표(단계별)	1	1		
		실적(누적)	9	9	900	
홍보		목표(단계별)	1	1		
		실적(누적)	11	11	1,100	
교육지도		목표(단계별)				
		실적(누적)	5	5	500	
수상		목표(단계별)				
		실적(누적)	1	1	100	
타연구활용		목표(단계별)				
		실적(누적)	1	1	100	
계	목표(단계별)	13	13			
	실적(누적)	76	76	584.6		

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거	
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (2021~2022)	n단계 (YYYY~YYYY)		
1	VitB2	µg/g	50	한국	중상	중상	1.6µg/g		HPLC
2	VitB9	ng/g	30	한국	중상	중상	3ng/mL		ELISA
3	VitB3	µg/g	20	한국	중상	중상	2.0µg/g		HPLC

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

※ 치즈 등의 동물성 유래의 비타민K2 외의 식물기반 중심

2) 세부 정량적 연구개발성과 (Fris 사이트에 업로드 완료)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	<i>Lactococcus lactis</i> fermented spinach juice suppresses LPS-induced expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines through the NF-κB pathway in HUVECs	Experimental and Therapeutic medicine	Sanghee Lee, Ah-Ram Han, BM Kim, MJ Sung SunMee Hong	23	UK	Spandidos Publications	SCI(IF2.7)	2022.03.21	PMC9019603	50
2	Inhibitory effect of fermented spanish extract on inorganic phosphate-induced vascular calcification in ex vivo aortic rings	Journal Korean Soc Fodd culture	Sanghee Lee, SunMee Hong MiJung Sung	37 (3)	Korea	Korean Soc F o d d culture	비SCIE(KCI)	2022.06.30	1225-7060	50
3	Effect of fermented black soldier fly on the body-fat improvement of immature masu salmon (<i>Oncorhynchus masou</i>)	JKAIS	HyunSol Jo SunMee Hong	23 (12)	Korea	JKAI	비SCIE(KCI)	2022.12.30	1975-4701	50
4	Effect fermented black soldier fly on promotion of beneficial intestinal bacteria of <i>juvenile marbled flounder</i>	JKAIS	HyunSol Jo SunMee Hong	23 (12)	Korea	JKAI	비SCIE(KCI)	2022.12.30	1975-4701	50
5	Effect of Dietary supplementation of fermented mealworm on the growth of <i>juvenile stone flounder</i>	JKAIS	HyunSol Jo SunMee Hong	22 (4)	Korea	JKAI	비SCIE(KCI)	2021.01.21	1975-4701	50
6	Characterization of LAB-inoculated salt fermented <i>Protaetia Brvitaris</i> sauce	JKAIS	HyunSol Jo SunMee Hong	22 (9)	Korea	JKAI	비SCIE(KCI)	2021.05.26	1975-4701	50

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국프로바이오틱스	조현술, 이상희, 홍선미	2022.12.02	세종대학	유산균의 메나퀴논의 골대사 효능
2	한국해양바이오효학회	조현술, 홍선미	2022.11.03	완도예술	동애 등에 유산균발효물의 산천어 장내 환경 개선
3	한국식품영양학회	조현술, 이상희, 홍선미	2022.10.20	제주ICC	시금치 발효물의 조골 효능 검증
4	한국식품영양학회	이애신, 이상희	2022.10.20	제주ICC	MK4의 nfkb바인딩 효과
5	한국프로바이오틱스	조현술, 이상희, 홍선미	2022.09.30	제주신화	시금치의 비타민K복합물의 지질개선 효능
6	한국미생물생명공학회	조현술, 이상희, 홍선미	2022.06.23	경주HICO	시금치유산균 발효물의 항비만 개선 효능
7	한국미생물생명공학회	조현술, 홍선미	2022.06.23	경주HICO	동애 등에 유산균발효물의 산천어 성장 효과
8	한국프로바이오틱스	조현술, 홍선미	2022.04.14	대전컨벤션	유산균발효에 따른 메나퀴논 생산과 분리 및 특성분석
9	한국수산과학회	박수정, 조현술, 홍선미	2021.04.29	부산백스코	발효유산균의 문치가자미 성장 효과
10	한국수산과학회	조현술, 홍선미	2021.04.29	부산백스코	해양유산균의 항균성을 이용한 항펩타이드 특성분석
11	한국미생물학회	조현술, 홍선미	2021.06.23	부산백스코	어류 장내 미생물 마이크로바이오타 분석
12	한국미생물학회	박수정, 조현술, 홍선미	2021.06.23	부산백스코	장내 비피도균 촉진 DHNA 확인
13	한국식품과학회	조현술, 홍선미	2021.07.07	대전컨벤션	식품저장 및 산패방지를 위한 유산균 적용
14	한국식품과학회	박수정, 조현술, 홍선미	2021.07.07	대전컨벤션	Men 유전자 포함 유산균의 메나퀴논 생산
15	한국미생물생명공학회	조현술, 홍선미	2021.08.25	창원CECO	식품산패 방지를 위한 유산균의 활용 및 특성 분석
16	한국해양바이오효학회	조현술, 홍선미	2021.11.04	대전선샤인	문치가자미의 유산균 장내 마이크로비타 분석
17	한국해양바이오효학회	조현술, 홍선미	2021.11.04	대전선샤인	돌가자미 유산균사료첨가물에 의한 성장 촉진

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식
2022	류코노스톡 메센테로이데스를 포함하는 동애등에 추출물 내 비타민 또는 이의 유도체 생성용 조성물 및 이의 용도	비타민B2/B9 증강 동애등에 발효물의 장염증 개선	완성	10-2022-0165143	여	예정	부	통상실시
2022	동애등에 유산균 발효물을 포함하는 지질대사 개선용 사료 조성물	동애등에 발효물의 불포화지방산 개선	완성	10-2022-0006037	여	예정	부	통상실시

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
2022	간이기술가치평가보고서	2022. 12	한국식품연구원/환동해산업연구원
2021	연차보고서(1차년)	2021. 12	동립수산기술기획평가원

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Lactobacillus brevis MIRE_TS64	KCCM13201P	한국미생물보존센터	2021.06.03
2	Lactococcus lactis MIRE_P1	KCCM13066P	한국미생물보존센터	2021.10.27
3	Leuconostoc mesenteroides MIRE_TS01	KCCM13067P	한국미생물보존센터	2021.10.27
4	Lactobacillus plantarum MIRE_TS55	KCCM13068P	한국미생물보존센터	2021.10.27
5	Lactobacillus brevis MIRE_TS66	KCCM13069P	한국미생물보존센터	2021.10.27

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원번호	등록번호	등록인	등록일	등록번호		
1	류코노스톡 메센테로이데스를 포함하는 동애등에 추출물 내 비타민 또는 이의 유도체 생성용 조성물	한국	환동해산업연구원 / 한국식품연구원	22.11.30	10-2022-0165143	1-1-2022-1288532-29				100	여
2	락토바실러스 플란티움을 포함하는 동애등에 추출물 내 비타민 또는 이의 유도체 생성용 조성물	한국	환동해산업연구원 / 한국식품연구원	22.11.30	10-2022-0165153	1-1-2022-1288532-29				100	여
3	비타민K 복합물을 포함하는 비만개선 조성물	한국	환동해산업연구원 / 한국식품연구원	22.04.26	10-2022-0051680	1-1-2022-0449694-60				50	부
4	비타민K 복합물을 포함하는 골형성 촉진 조성물	한국	환동해산업연구원 / 한국식품연구원	22.04.26	10-2022-0051681	1-1-2022-04052993-17				50	부
5	동애등에 유산균 발효물을 포함하는 지질대사 개선사료 조성물	한국	환동해산업연구원	22.01.14	10-2022-0006037	1-1-2022-1288532-29				50	부
6	상표출원 HiLAB (31류)	한국	환동해산업연구원	21.11.04	40-2021-0224627	40-2021-0224627				100	부
7	상표출원 HiLAB (35류)	한국	환동해산업연구원	21.11.04	40-2021-0224523	40-2021-0224523				100	부
8	상표출원 PbLAB (30류)	한국	환동해산업연구원	21.11.04	40-2021-0224516	40-2021-0224516				80	부
9	상표출원 PbLAB (31류)	한국	환동해산업연구원	21.11.04	40-2021-0224517	40-2021-0224517				80	부
10	상표출원 PbLAB (35류)	한국	환동해산업연구원	21.11.04	40-2021-0224518	40-2021-0224518				80	부
11	상표출원 TmLAB (30류)	한국	환동해산업연구원	21.11.04	40-2021-0224519	40-2021-0224519				80	부
12	상표출원 TmLAB (31류)	한국	환동해산업연구원	21.11.04	40-2021-0224520	40-2021-0224520				80	부
13	상표출원 TmLAB (35류)	한국	환동해산업연구원	21.11.04	40-2021-0224521	40-2021-0224521				80	부

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	HiLAB_VitB			√		√				
2	HiLAB_lipid			√		√				

- 저작권(해당사항없음)
- 신기술 지정(해당사항없음)
- 기술 및 제품 인증(해당사항없음)
- 표준화(해당사항없음)

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화소요기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	사랑하개	2022.10.13	시그널케어	시그널케어	사료	1년		
2	제로케어	2022.09.28	시그널케어	시그널케어	사료	1년		
3	HiShLAB 토숙어류사료	2022.06.30	국립수과원	환동해산업연구원	사료	-		
4	HiLAB 산천어사료	2021.07.30	국립수과원	환동해산업연구원	사료	-		
5	해수어치어사료	2021.03.03	국립수과원	환동해산업연구원	사료	-		

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상/혼합	동애등에 추출물 내 비타민 유도체 생성 조성물	시그널케어	22.12.15	10,000,000	
2	통상/혼합	동애등에 유산균발효 지질대사 개선용 사료첨가물	시그널케어	22.12.15	5,000,000	
3	통상/혼합	갈색거저리 유산균발효 사료첨가물	시그널케어	21.12.17	5,000,000	
4	통상/혼합	흰점박이꽃무지 유산균발효 식품	시그널케어	21.10.15	5,000,000	

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적(해당사항없음)

사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술이전	기존제품개선	국내	사랑하개	곤충사료	시그널케어	81,597,608		2022	
2	기술이전	기존제품개선	국내	제로케어	곤충사료	시그널케어	0		2022	

매출 실적((해당사항없음))

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
사랑하개	2022	81,597,608		81,597,608	
합계		81,597,608		81,597,608	

사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과(해당사항없음)

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2023 ~ 2024 (2년)		
	소요예산(천원)	30,000		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		0	150,000	500,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내			1	2
국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수 출			

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년	2022년	
1	비타B사료사업	(주)시그널케어	4	5	9
합계			4	5	9

고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	1
		생산인력	2
	개발 후	연구인력	3
		생산인력	6

비용 절감((해당사항없음))

경제적 파급 효과

[사회적 성과]

법령 반영 (해당사항없음)

정책활용 내용(해당사항없음)

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영(해당사항없음)

전문 연구 인력 양성(해당사항없음)

산업 기술 인력 양성(해당사항없음)

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관 명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비
1	농림식품기술 기획평가원	유용농생명자원 산업화기술개발	생물강화기술 활용 동애등예를 이용한 비타민B2/B9 증강 파라바이오틱스 사료첨가물 개발	홍 선 미	567,500,000

국제화 협력성과(해당사항없음)

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	신문보도	ydinews	환산연 한식연 시그널케어 유산균 비타민 기술이전	2022.12.25
2	신문보도	대경일보	환산연 한식연 유산균 비타민 기술이전	2022.12.22
3	신문보도	울진투데이	환산연 한식연 스타트업 기업 유산균 비타민 기술이전	2022.12.21
4	신문보도	파이내셜데일리	환산연 지질대사 개선 유산균조성물 기술이전	2022.12.21
5	신문보도	데일리대구경북	(주) 시그널케어 지질대사 개선 유산균조성물 기술이전	2022.12.21
6	신문보도	도민일보	지질대사 개선 유산균조성물 기술이전	2022.12.21
7	박람회	대구펍쇼	대구펍쇼	2022.06.10
8	신문보도	영남매일신문	산업곤충 포스트바이오틱스 어류 반려동물 사료첨가제 개발	2021.10.21
9	신문보도	경북일보	곤충활용 탄소저감형 사료기술화	2021.10.21
10	신문보도	경북도민일보	동해 유산균 활용 탄소저감형 사료기술화	2021.10.21

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	우수포스터상	Evaluation and identification of the antimicrobial substance form marine bacteria against fish pathogens	조현솔	2021.04.29	한국수산과학회

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비(해당사항없음)

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

1.

3) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당없음)

2.

제 2 절 연구 목표 달성 정도

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> • 동애등에 기반 비타민B2/B9 공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 비타민B2/B9 생산 우수 유산균 4종 : Ll, Lm, Lp, Lb (국제균주기탁 및 특허출원 완료) • 최적공정 : 30℃, 24h, Dark, anaerobic • 전후공정 : 멸균 및 비타민B2/B3/B9 유지 	<ul style="list-style-type: none"> • 100
<ul style="list-style-type: none"> • 동애등에 기반 유산균 생산 비타민B2/B9 정량 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. lactis</i> VitB2 0.22 mg/100g VitB9 30.5 ng/mL • <i>L. plantarum</i> VitB2:1.33 mg/100g VitB9 33.5 ng/mL • <i>L. mesenteroides</i> VitB2 1.86mg/100g VitB9 36ng/mL • <i>L. brevis</i> VitB2 1.25 mg/100g VitB9 25.6 ng/mL ※ Hi VitB2 0.91 mg/100g / HeHi VitB2 0.35 mg/100g 	<ul style="list-style-type: none"> • 100
<ul style="list-style-type: none"> • HiLAB의 인간장세포 (Caco-2)내의 비타민 B2균(rib, FMN, FAD) /B9 생산 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. lactis</i> rib 0.156, FMN 0.010, FAD 0.066 µg/g VitB9 7.227 ng/mL • <i>L. plantarum</i> rib 0.208, FMN 0.013, FAD 0.048 µg/g VitB9 7.476 ng/mL • <i>L. mesenteroides</i> rib 0.148, FMN 0.009, FAD 0.047 µg/g, VitB9 7.476 ng/mL • <i>L. brevis</i> rib 0.148, FMN 0.008, FAD 0.037 µg/g VitB9 7.306 ng/mL ※ Caco-2 세포 rib 0.112 µg/g, Vit9 6.820 ng/mL, FMN과 FAD 측정 안 됨 	<ul style="list-style-type: none"> • 100
<ul style="list-style-type: none"> • HiLAB의 인간장세포 (Caco-2) 내 부착능과 항균 효능 	<ul style="list-style-type: none"> • 인간장세포(Caco-2) 24~72h <i>L. lactis</i>, <i>L. mesenteroides</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. brevis</i> 순으로 부착 효능 있음 • 인간장세포(Caco-2) 내의 대장균(<i>E. coli</i>), 식중독균(<i>S. aureus</i>, <i>L. monocytogenes</i>)의 부착기능 억제 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 100
<ul style="list-style-type: none"> • HiLAB의 4종의 항염 효능 입증_in vitro 	<ul style="list-style-type: none"> • Raw264.7: iNOS, COX2, TNF-a, IL6, NO 억제 • Caco-2: iNOS, COX2, TNF-a, IL6, NO 억제 • Caco-2/Raw264.7: iNOS, COX2, TNF-a, IL6, NO 억제 ※ 비타민B2, B3, B9 표준품에 대한 항염증 억제기능 유사 	<ul style="list-style-type: none"> • 100

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> • HiLm의 급성대장염 완화 효능_in vivo (DSS 급성대장염 유도 마우스) 	<ul style="list-style-type: none"> • 급성대장염 유도 마우스는 HiLm 섭식 7일 및 21일에 체중 회복과 질병활성도(DAI: 0.8) 낮아짐(표준품 VitB2 섭식과 유사결과) • HiLm 급이 급성대장염 유도 마우스의 대장 길이는 5.84 cm에서 6.66 cm로, 대장조직 형태도 회복 됨 • 급성대장염 유도 마우스의 근육량은 0.238g에서 HiLm 섭식 시에 0.283 g으로 증가함 • 급성대장염 유도 마우스의 장내 마이크로바이옴 결과 <i>Verrucomicrobia</i>, <i>Firmicutes</i>, <i>Bacteroidetes</i>, <i>Actinobacteria</i> phylum이 주요 분포군으로 지질다당류 저감균, 염증질환 저감, 낙산, 피로피온산 생산균, 대장염유발균 억제, 펙틴분해균, 항염균 등이 확인 됨 	<ul style="list-style-type: none"> • 100
<ul style="list-style-type: none"> • HiLp의 만성대장염 완화 효능_in vivo (DSS 만성대장염 유도 마우스) 	<ul style="list-style-type: none"> • 만성대장염 유도 마우스는 HiLp 섭식 29일에 체중 회복 과 질병활성도(DAI:0.4) 낮아짐(표준품 VitB2 섭식시 1.0 보다 더 낮음) • HiLm 급이시, 만성대장염 유도 마우스의 대장 길이는 5.84 cm에서 6.78 cm로, 대장조직 형태도 회복 됨 • 만성대장염 유도 마우스의 근육량은 0.238g에서 HiLp 급이시에 0.322 g으로 증가함 • 만성대장염 유도 마우스의 대장에서 HiLp 급이시에 iNOS, COX2, TNFa, IL6 의 사이토카인 발현 감소 • 만성대장염 유도 마우스의 대장에서 HiLp 급이시에 점막 의 tight junction 지표인자 ZO-1, OCCLUDIN, claudin-1 발현 증가(대장점막 회복) • 만성대장염 유도 마우스의 장내 마이크로바이옴 결과 <i>Verrucomicrobia</i>, <i>Firmicutes</i>, <i>Bacteroidetes</i>, <i>Actinobacteria</i> phylum이 주요 분포군으로 <i>Bacteroides caccae</i>, <i>Oscillospiraceae sp</i> (염증질환), <i>Phocaeicola vulgatus</i>(LPS감소), <i>Lachnospiraceae sp</i> (낙산·피로피온산 생산), 대장염유발균 억제, 항염균 등이 확인 됨 	<ul style="list-style-type: none"> • 100
<ul style="list-style-type: none"> • HiLAB 시제품 및 안전성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • HiLAB포함 사랑하개 시제품 제조, 성분분석, 안전성 확인 • HiLAB포함 사랑하개 반려견 기호도 조사 • HiLAB포함 사랑하개 시제품 급이 반려견의 대변, 혈액(보호자 건강검진 후 결과공유) 등 확인 • HiLAB 포함 기호도 향상을 위한 곡류, 고구마, 황태 등의 다양한 시제품 12 종 이상 시험 분석 중 	<ul style="list-style-type: none"> • 100

제 4 장 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 해당사항 없음
-

2) 자체 보완활동

- 유산균의 리보플라빈 합성 효소를 재조합단백질 생산과 생산 유도 활성 분석
 - 비타민B2균의 riboflavin 외의 FMN, FAD에 의한 각각의 효능 평가
※비타민B2(riboflavin, FMN, FAD) 합성 유산균 4종에 대한 생산과 특성 특허 완료
 - 동애등에 외 식용곤충의 VitB2/B9의 함량 및 비율에 따른 장염 기전 연구 진행
(DSS에 의한 급성 및 만성 마우스)
 - 동애등에 및/또는 식용곤충 유산균 생균/사균 발효물의 장내 염증 완화 입증 실험
-

3) 연구개발 과정의 성실성

(정성적 성과)

- 인간장세포(Caco-2) 부착능, 항균 및 비타민B2/B9 생산 유효 균주 4종 선발 완료
- 동애등에 유산균(HiLAB) 생산 비타민B2(rib, FMN, FAD), B9 생산 바이오공정 표준화 확립
- 비타민B군 강화(VitB1, B2, B3, B5, B7, B9) 동애등에 유산균(HiLAB) 소재화 완료
- Caco-2, Raw264.7 및 공세포(Caco-2/Raw264.7) 내의 항염관련 사이토카인 분석 완료
- 급성대장염 유도 마우스에서의 HiLm 소재의 체중증가, DAI감소, 대장, 근육량 회복 확인
- 만성대장염 유도 마우스에서의 HiLp 소재의 체중증가, DAI감소, 대장, 근육량 회복확인
- 급·만성 대장염 유도 마우스의 장내 마이크로바이옴의 염증 감소 균주 활성 확인
- HiLAB 반려견 기호도, 행동 조사에 의한 레시피 완성 및 시제품 사료 성분분석 완료

(정량적 성과) : 목표 이상 성과 도출

- 기술이전 4건_기술료 2,000 만원
- 시제품 5건 이상
- 고용창출 9명 이상
- 홍보 11건 이상
- 교육지도 5명 이상
- 논문 6건 및 학술발표 17건
- 보고서 2건_기술가치평가보고서, 연차보고서
- 국제균주 기탁 5건
- 특허출원 3건 및 상표출원 8건('23년 1월내 등록 예정)

- 연구개발의 정성적 및 정량적 성과는 계획 목표를 상회하며, 연차별 목표와 추진일정에 성실하게 임함
 - 연구개발의 세부 및 공동연구기관은 상호 유기적 관계로 성실하게 임함
-

제 5 장 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

1. 기술개발 측면

(곤충산업)

- 동애등에기반의 천연 비타민B2/B9 생산 바이오공정 확립 및 기타 식용곤충 확대 적용
- 비타민B2군(rib, FMN, FAD) 강화 동애등에 대한 사료첨가제로의 제품 업그레이드
- 반려견 장염을 예방 가능한 유효 유산균 4종의 사료첨가제의 다양한 제품 응용
- GRAS 유산균주로 생산된 천연안심 비타민B2/B9 추출, 분리, 정제 및 정량 기술화
- 비타민B군 강화(VitB1, B2, B3, B5, B7, B9) 동애등에 발효사료첨가제(HiLAB) 신소재화
- 천연 비타민B군 강화 반려견 급성 및 만성대장염 예방 및/또는 치료제(실험전) 가능성 높음
- 동애등에 이외의 식용곤충 10종에 적용한 장염예방의 기능성 곤충식품로의 확대
- 산업곤충 프리바이오틱스 원료로의 국내외 곤충산업의 단백질 외의 비타민 강화 소재
- 면역유도 소재를 활용한 산업 곤충의 천연항생제 유도 바이오 기술 적용 가능 (융복합분야)
- 리보플라빈 FMN, FAD 함유 동애등에 포스트바이오틱스 새로운 융복합 기술 개발
- 프로바이오틱스의 비타민B 장내생산 가능한 포스트바이오틱스 및 파라바이오틱스 적용
- 비타민B2/B9의 식의약소재 적용을 위한 파마바이오틱스 소재화

2. 사회문화적 측면

- 친환경 웰빙(well-being) 선호의 소비자들의 선호 받을 수 있는 반려견 사료 개발
- 국내농업과 바이오기술 융합 연구에 의한 반려견 사료 시장 진입과 수요 창출
- 반려견 외 반려묘와 어류, 가축에 이르는 다양한 사료첨가물로 개발 가능
- 곤충산업육성 정책이후 새로운 바이오 기술 및 소재의 후속연구로 연계 가능
- 식용곤충산업에 적용하여 소비자의 혐오감은 줄이고 기능성 강화 소재 제안
- 환경정화곤충이자 산업곤충인 동애등에 활용으로 탄소저감 또는 탄소제로 정책에 도움

3. 경제적 측면

- 국내 곤충농가와 산업화를 연계 할 수 있는 all in one 시스템으로 사료시장 진입
- 국내 동애등에 분말사료 대비 포스트바이오틱스 사료첨가제로의 2배 이상 성장 예상
- 기술기여도_연구개발성과로 사랑하게 제품 공정 개선에 기여 예정_’23 (시그널케어 연매출액 산정에 의해 기술기여도 산정)_**농업회사법인 기술료 감면 신청 예정**(기술실시보고서)

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
생물강화기술 활용 동애등에를 이용한 비타민B2/B9 증강 파라바이오틱스 사료첨가물 개발	생물강화공정 BSF_VitB2/B9 공정 최적화	한국농수산대학 산업연구원	지자체 출연연 (비영리)	200	200	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
	BSF_VitB2/B9 장내염증완화 효능 검증	한국식품연구원	정부 출연연 (비영리)	200	200	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
	BSF_파라바이오 틱스 반려견 사료 제품화	농업회사법인(주)시그널케어	중소기업 (영리)	167.5*	125	74.627	기존 공정개선	해당 없음	-
계				567.5	525	-	-	-	-

* 최초 연구계획서의 기업부담금 42.5백만원 적용, 실제 기업부담금은 33.5백만원임

제 6 장 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE	1				
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내		1			
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발	1				
	상품출시					
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)	10,000	15,000	30,000	50,000	100,000
	기술료(단위 : 천원)	470	705	1,410	2,350	5,000
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 농림식품기술기획평가원(IPET)	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구개발초록
	4) 정량성과실적평가표_선제출 230130

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원산업화기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원산업화기술개발사업 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		121047-2	
사업구분	유용농생명자원산업화 기술개발				
연구분야	농림식품융복합			과제구분	단위
사업명	유용농생명자원산업화 기술개발				주관
총괄과제				총괄책임자	기재하지 않음
과제명	생물강화기술 활용 동애등애를 이용한 비타민B2/B9 증강 파라바이오틱스 사료첨가물 개발			과제유형	개발
연구개발기관	환동해산업연구원			연구책임자	홍 선 미
연구기간	연차	기간	정부	민간	계
연구개발비 (천원)	1차년도	2021.04.01.~2022.12.31.	225,000	8,500	233,500
	2차년도	2022.01.01.~2022.12.31.	300,000	25,000	325,000
	계	2021.04.01.~2022.12.31.	525,000	33,500	558,500
참여기업	농업회사법인 주식회사 시그널케어				
상대국	-	상대국연구개발기관		-	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2023. 02. 06

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
환동해산업연구원	책임연구원	홍 선 미

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	홍 선 미
-----	-------

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히불량)

- 생물정보학 기반으로 VitaminB2(riboflavin; rib) 합성 유전자 rib A, B, C, D, F, H T, U) 및 VitaminB9(folate; fol) 합성 유전자 fol A, B, C, D, D, E, K, P Q 의 유전자를 포함하는 유산균 4종의 *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*의 게놈(PCR)과 전사체 확인(RT-PCR) 및 리보플라빈과 엽산 발현 확인(TLC)를 통한 우수 균주 4종(16균주)을 선발 후, 동애등에 추출 배지의 최적 공정 확립
- 동애등에 열풍 및/또는 마이크로웨이브 건조파우더의 추출물 배지(5%; w/v)로 리보플라빈(VitaminB2; VitB2) 와 엽산(VitaminB9; VitB9) 생성 기능의 유산균으로 바이오공정 후, 정량(HPLC, ELISA)하여 VitB2 균(riboflavin, FMN, FAD)과 VitB9 의 증량의 4균주 선발 완료
- 동애등에의 비타민B2/B9 복합물의 생산 공정을 위한 전처리(유해균 멸균; 121 °C, 20분; 0.5% yeast, 2% galactose), 유산균 접종(1% w/v, 30°C, 24h, Dark), 후처리(유산균 사균, 비타민K유지; 80°C, 10분)
- 동애등에 추출물 배지(5% w/v)의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 각 균주에서의 비타민B 22.2 µg/g, 13.3 µg/g, 18.6 µg/g, 8.4 µg/g, 비타민B9 30.5 ng/g, 33.5 ng/g, 36 ng/g, 25.6 ng/g 생산 24시간 공정 최적화_비타민B2균 리보플라빈, FMN, FAD 증량 확인
- 동애등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 배양 된 균주가 MRS 배지의 균주보다 인간장세포(Caco-2) 경우 24~72시간 시간에 따른 부착효능 높음 확인
- 동애등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 배양 된 균주는 인간장내세포(Caco-2)에서 비타민B2균 리보플라빈, FMN, FAD 증가 확인 및 비타민B9 등 확인
- 동애등에 추출물의 *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis* 배양 된 균주는 인간장내세포(Caco-2)에서 대장균(*E. coli*), 식중독균(*staphylococcus sp*), 환경균(*Listeria sp*)의 항균 기능 확인
- LPS로 염증이 유도된 Caco-2 및 Raw264.7 세포에서 비타민B2/B9 함유 동애등에 발효물 4종의 iNOS, COX2, TNF-a, IL6, NO에 대한 항염 효능 확인. 특히, HiLm의 경우가 항염기능이 가장 좋음. 표준품 비타민B9과 B3는 항염기능 낮음.
- 또한, 공배양세포(Caco-2/Raw264.7)에서 비타민B2/B9 함유 동애등에 발효물 4종의 iNOS, COX2, TNF-a, IL6, NO에 대한 항염 효능 확인
- 급성장염 유도(3% DSS/7days) 마우스에 HiLm 14일 급이시 체중 회복, 질병활성지수(DAI) 감소, 대장 길이와 무게 회복, 대장점막의 회복 및 근육량의 증가 유도가 확인 됨
- 급성장염 유도(3% DSS/7days) 마우스에 HiLm 14일 급이 후, 분변내의 NGS 분석 결과, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria (phylum)*의 주요 균주로 이들은 항염증, 단쇄지방산 생산, 낙산, 프로피온산 생성, 대장염 감소 등의 기능으로 알려진 종 확인
- 만성장염 유도(2% DSS/5days, 3days, 3days) 마우스에 HiLp 29일 급이시 체중 회복, 질병활성지수(DAI) 감소, 대장길이와 무게 회복, 대장점막의 회복, 장내염증 사이토카인 iNOS, COX2, TNF-a, IL6 감소, tight junction 유전자의 ZO-1, occludin, claudin-1 이 발현 증가 및 근육량의 증가 유도가 확인 됨
- 급성장염 유도(3% DSS/7days) 마우스에 HiLm 29일 급이 후, 분변내의 NGS 분석 결과, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria (phylum)*의 주요 균주로 이들은 항염증, 단쇄지방산 생산, 낙산, 프로피온산 생성, 대장염 감소 등의 기능으로 알려진 종으로 확인 됨
- 동애등에 원료 전처리(마이크로웨이브)를 통한 비타민B균 손실 저감 전처리 공정 확립
- 동애등에 발효물(HiLAB) 사료첨가제 기호도 개선 소재 선발_고구마, 과일(ABC), 곡류, 황태 등
- 동애등에 발효물(HiLAB) 사료첨가 '사랑하개' '제로' 시제품 2건 제조 및 반려견 기호도 검증 완료
- 동애등에 발효물(HiLAB) 기호도 개선을 위한 고구마, 과일, 곡류 함유 시제품 12종 분석 중

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히불량)

○ 기술적 측면

- 비타민B2/B9 소재 생산의 원천기술 확보로 다양한 제품으로의 응용가능성과 제품화에 따른 기술 강화
- 프로바이오틱스 제품의 기능성과 안전성에 대한 검증을 통해 천연 유용성분의 확보 및 브랜드화
- 고단백질 동애등에의 비타민B군 강화를 위한 유산균활용 비타민B2/B9 생산기술 확보
- 주요 수용성 비타민B2 생산(rib, FMN, FAD), 검정 기술확보를 통한 건강사료첨가물 개발
- 비타민B2 생산(rib, FMN, FAD) 기술의 식용곤충 적용을 통한 건강 곤충식품 개발
- 동애등에의 비타민B군(B1, B2, B3, B5, B7, B9)의 사료첨가물 외 다양한 제품 시도
- 민감 반려동물의 급성, 만성 대장염 등에 대한 보충제 사용에 대한 근거 마련

○ 경제적, 산업적 측면

- 기능성 유산균 및 소재로 인한 고용창출, 기능성식품산업, 제약산업 등 연관 산업의 동반성장
- 동애등에 사료소재로서의 가치를 업그레이드하여 농가, 기업의 더 많은 이익 창출에 기여
- 참여기업의 제품 다양화를 통한 신제품 및 신산업 창출에 기여
- 유산균이 생산하는 안전한 비타민B2/B9 활용 천연 안심소재 상용화 및 산업화
- 대사성 질환 관련 예방 사료 개발에 의항 반려동물 대상(반려견, 반려묘 등) 상품제시
- 신개념의 비타민B군 복합 산업곤충 기술개발로 다양한 부가가치 상품 활용
- 미래4차 산업 사회의 사업 콘텐츠 제시 및 새로운 환경 문화 생성의 초석 마련
- 비타민B2군(rib, FMN, FAD)의 일반식품 및 기능성 사료첨가물의 소재화로 고부가가치 창출
- 웰빙, 건강을 추구하는 세계 식품업의 가장 강력한 트렌드인 반려동물 사료 시장 경쟁의 가속화
- 비타민 및 무기질 식품시장과 농축 고단백질, 고비타민 시장의 성장과 함께 동반상승

○ 사회적 측면

- 장염예방, 면역, 근력개선 등의 효능이 있는 것으로 알려진 비타민B2군 함유 제품의 상품화
- 천연비타민B2/B9 소재화에 따른 국민의 삶의 질 향상에 기여
- 국내 동애등에 또는 식용곤충을 활용한 고부가가치 성장 산업 육성
- 수용성비타민 비타민B군 함유 산업곤충 포스트, 신바이오틱스 또는 파라바이오틱스 산업 영역 확대
- 국내 바이오산업 연구개발 증진, 인력양성, 고용창출 및 글로벌 강소 기업 육성
- 바이오컨버전 기술을 통한 곤충 농가의 소득증대 및 안정화
- 대사성질환 예방으로 반려동물 건강 및 웰빙 증대 기여
- 반려동물 건강 증진 기여 및 동애등에와 산업곤충의 고부가가치화에 기여

○ 정책파급효과

- 동애등에 유래 천연 비타민B군을 이용한 융·복합 기술 개발을 통한 기능성 사료 첨가물 소재화
- 농민소득 증대 및 국내산 곤충산업의 경쟁력 확대 정책에 기여
- 단순 기술을 지양하고 기존 핵심 기술성과와 연계한 산업화 기술 개발
- 안전한 미래형 천연물 유래의 비타민B군 함유 등의 천연 비타민B군 고단백질 시장 개척
- 정부의 '현장밀착형 규제혁신 방안'(2019년 4월)의 시장 진·출입 활성화, 신제품 개발촉진, 기능성 표시 제 개선, 마케팅 경쟁력 제고 등의 신고의무 완화의 법 제도적 장려 요인에 적합

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히불량)

○ 원천기술 확보

- 유산균 발효 및 유산균 생산 효소반응을 통한 독자적인 기술 확보
- 장염예방, 면역증강, 근력개선에 도움을 줄 수 있는 천연비타민B2군 함유 사료첨가물 생산기술 확보
- 곤충기반 천연비타민B2/B9 생산 개발기술 결과를 활용한 국내외 논문 및 지적재산권
- 비타민B2군(rib,FMN,FAD)/B9 함유 반려동물 급성 및 만성 대장염 예방 및/또는 치료 사료첨가물 소재
- 비타민B2군(rib,FMN,FAD)/B9 함유 반려동물 면역강화 사료첨가물 소재화
- 비타민B2군(rib,FMN,FAD)/B9 함유 반려동물 근력개선 사료첨가물 소재화

○ 제품화

- 제안기업의 HACCP 사료생산시설을 활용한 안전한 사료 제조 및 생산
- 유산균발효 및 효소반응을 통한 기능성 향상 및 독자적 기술개발 활용 브랜드 창출
- 발효기술을 통한 시간, 비용절감 및 생산성의 다양화 시도
- 특허출원, 등록 및 기술이전 등을 통한 퍼플오션
- 원천기술을 이용한 유용소재의 산업화 응용기술 개발
- 기존 경쟁제품과의 비교 테스트 등을 통한 홈페이지 활용(온라인)제품 홍보 및 판로 개척(오프라인)
- 곤충농가 또는 곤충산업협동조합과 협력하여 지속적 생산라인 마련
- 고부가1차 가공제품 생산 후 2차 가공식품 공장 구축으로 연계
- 국내 내수시장 진입 후 국외 시장 마케팅 및 판로개척
- 동애등에 또는 식용곤충 기반 유산균활용 비타민B2/B9 함유 제품 생산하여 기존 거래처와 본사의 온라인, 오프라인 판매 실시 예정(현재 사이트 구축 중)
- 수출을 위한 KOTRA 등과의 업무협력을 통한 중국 등의 동아시아 시장 개척 예정

○ 신산업 창출 방안

- 유산균과 유산균 발효 및 효소반응에 의해 생산된 산물의 복합소재(synbiotics)
- 유산균의 다양한 고부가가치 제품뿐만 아니라 다양한 형태의 생산에 적용
- 허약 반려동물, 노령견 및 사회환경 변화에 따른 반려동물의 보호자의 니즈 부합하는 제품 개발
- 장염예방, 면역강화, 근력개선 등의 효능의 비타민B2/B9 강화 소재를 활용한 목적 제품

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히불량)

- 연구계획시 제안한 연구개발 목표 및 연구내용을 성실히 수행하였으며 당초 계획에 비하여 정성적 및 정량적 목표를 상회하는 연구 성과 도출 함

5. 공개 발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

• 논문발표 6건

- ① Lactococcus lactis fermented spinach juice suppresses LPS-induced expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines through the NF- κ B pathway in HUVECs. 2022.03. 21 Experimental and Therapeutic medicine. SangHee Lee, ArRam Han, ByungMok Kim, MiJung Sung, SunMee Hong
- ② Inhibitory effect of fermented spanish extract on inorganic phosphate-induced vascular calcification in ex vivo aortic rings. 2022.06.30. Journal Korean Soc Food culture. SangHee Lee, ArRam Han, SunMee Hong, MiJung Sung
- ③ Effect of fermented black soldier fly on the body-fat improvement of immature masu salmon (*Oncorhynchus masou*) 2022.12.30. JKAIS 23(12), HyunSol Jo, SunMee Hong
- ④ Effect fermented black soldier fly on promotion of beneficial intestinal bacteria of juvenile marbled flounder. 2022.12.30. JKAIS 23(12), HyunSol Jo, SunMee Hong
- ⑤ Effect of Dietary supplementation of fermented mealworm on the growth of *juvenile stone flounder* 2021.04.30. JKAI. 22(4), HyunSol Jo, SunMee Hong,
- ⑥ Characterization of LAB-inoculated salt fermented *Protaetia brvitarsis* sauce 2021.04.30. JKAIS 22(9), HyunSol Jo, SunMee Hong

○ 산업재산권(특허출원 3, 상표출원 8)

• 특허출원 3건

- ① 류코노스톡 메센테로이데스를 포함하는 동애등에 추출물 내 비타민 또는 이의 유도체 생성용 조성물 (10-2022-0165143 / 2022.11.30.)
- ② 락토바실러스 플란터룸을 포함하는 동애등에 추출물 내 비타민 또는 이의 유도체 생성용 조성물 (10-2022-0165153 / 2022.11.30.)
- ③ 동애등에 유산균 발효물을 포함하는 지질대사 개선사료 조성물 (10-2022-0006037 / 2022.01.14.)

• 상표출원 8건

- ① HiLAB _ 31류(40-2021-0224627 / 2021.11.04)
- ② HiLAB _ 35류(40-2021-0224523 / 2021.11.04)
- ③ PbLAB _ 30류(40-2021-0224516 / 2021.11.04)
- ④ PbLAB _ 31류(40-2021-0224517 / 2021.11.04)
- ⑤ PbLAB _ 35류(40-2021-0224518 / 2021.11.04)
- ⑥ TmLAB _ 30류(40-2021-0224519 / 2021.11.04)
- ⑦ TmLAB _ 31류(40-2021-0224520 / 2021.11.04)
- ⑧ TmLAB _ 35류(40-2021-0224521 / 2021.11.04)

• 생명자원 기탁 4건

- ① Lactobacillus brevis MIRE_TS64 (KCCM13201P; 2021.06.03)
- ② Lactococcus lactis MIRE_P1 (KCCM13066P; 2021.10.27)
- ③ Leuconostoc mesenteroides MIRE_TS01(KCCM13067P; 2021.10.27)
- ④ Lactobacillus plantarum MIRE_TS55(KCCM13068P; 2021.10.27.)
- ⑤ Lactobacillus brevis MIRE_TS66(KCCM13069P; 2021.10.27.)

• 학회발표 17건

- ① 유산균의 메나퀴논의 골대사 효능 2022.12.02. 한국프로바이오틱스(세종대학)
- ② 동애등에 유산균발효물의 산천어 장내 환경 개선 2022.11.03. 한국해양바이오학회(완도에홀회관)
- ③ 시금치 발효물의 조골 효능 검증 2022.10.20. 한국식품영양학회(제주 ICC)
- ④ MK4의 nfkb바인딩 효과 2022.10.20. 한국식품영양학회(제주 ICC)
- ⑤ 시금치의 비타민K복합물의 지질개선 효능 2022.09.30. 한국생물공학회(제주신화월드)
- ⑥ 시금치유산균 발효물의 항비만 개선 효능 2022.06.23. 한국미생물생명공학회(경주HICO)
- ⑦ 동애등에 유산균발효물의 산천어 성장 효과 2022.06.23. 한국미생물생명공학회(경주HICO)
- ⑧ 유산균발효에 따른 메나퀴논 생산과 분리 및 특성분석 2022.04.`4 미생물학회(대전컨벤션센터)
- ⑨ 돌가자미 유산균사료첨가물에 의한 성장 촉진. 2021.11.04. 한국해양바이오학회(대전 선샤인호텔)
- ⑩ 문치가자미의 유산균 장내 마이크로비타 분석. 2021.11.04. 한국해양바이오학회(대전 선샤인호텔)
- ⑪ 식품산패 방지를 위한 유산균의 활용 및 특성 분석 2021.08.25. 한국미생물생명공학회(창원 CECO)
- ⑫ Men 유전자 포함 유산균의 메나퀴논 생산 2021.07.07. 한국식품과학회(대전컨벤션센터)
- ⑬ 식품저장 및 산패방지를 위한 유산균 적용 2021.07.07. 한국식품과학회(대전컨벤션센터)
- ⑭ 장내 비피도균 촉진 DHNA 확인. 2021.06.23. 한국미생물학회(부산백스코)
- ⑮ 어류 장내 미생물 마이크로바이오타 분석 확인. 2021.06.23. 한국미생물학회(부산백스코)
- ⑯ 해양유산균의 항균성을 이용한 향렷타이드 특성분석 2021.04.29. 한국수산과학회(부산백스코)
- ⑰ 발효유산균의 문치가자미 성장 효과 2021.04.29. 한국수산과학회(부산백스코)

II. 연구목표달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
동애등에 기반 비타민B2/B9 생산 공정 확립	15	100	비타민B군(VitB1,B2,B3,B5,B7,B9) B2 1.7 mg/100g, B9 30 ng/mL
인간장내세포 HiLAB_VitB2/B9 정량정성 분석	15	100	비타민B2군(rib,FMN,FAD) 15 µg/g 비타민B9 320 ng/g
HiLAB(Li,Lp,Lm,Lb) 항염사이토카인 지표확인 in Caco-2, Raw264.7, Caco-2/Raw264.7	15	100	iNOS, COX2, TNF-a, IL6
HiLm 및 HiLp 급성 및 만성 항염 확인	15	100	DSS유도마우스의 체중, DAI, 항염, 근개선, NGS 등
동애등에 비타민B2/B9 유산균 조성물 특허 출원	20	100	특허출원 5건 및 국제균주기탁 5종
HiLAB 사료첨가물 함유 시제품 제조	20	100	반려견 사료 시제품 2종 (사랑하개, 제로 제품개선)
합계	100점	100	-

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 사업은 고단백질 고영양원으로서의 동애등을 프리바이오틱스로 비타민B2(riboflavin)와 비타민B9(folate) 생산 유전자를 가지는 유산균으로 발효 공정하여 비타민B2군(riboflavin, FMN, FAD)와 비타민B9 생산에 유효한 바이오공정을 확립했다(30℃, 24h, Dark, Air, 100rpm). rib/fol 유전자 보유 유산균 Lp(KCCM13068P), Lm(KCCM13067P) Li(KCCM13066P), Lb(KCCM13069P) 4종을 선발하고, 동애등에(5%, w/v, 0.5% yeast, 2% galactose) 배지에 각각의 유산균으로 바이오공정 시 비타민B2와 B9 생산이 유효함을 확인하였다. 동애등에 추출발효물은 비타민B2(1.8 mg/100g), 비타민B9(30 ng/100g) 정량하였다. 또한 동애등에 배지에서 배양 된 유산균을 인간장내세포(Caco-2)에 세포내 부착능 및 비타민B2, B9가 시간경과에 따라 생산되었고, 유해균 대장균, 식중독균 등의 억제에도 효과가 있음을 확인하였다. 선발 된 HiLi, HiLb, HiLm, HiLp 4종은 Caco-2, Raw264.7과 Caco-2/Raw264.7 공세포내에서 iNOS, COX2, TNF-a, IL6 사이토카인 억제를 확인되었다. 또한 급성장염 유도 마우스에 HiLm 급이시 장염으로 인한 체중감소를 회복하고, DAI 감소, 대장길이 회복, 근력 개선 등의 효과가 확인되었다. HiLp의 경우는 만성장염 유도 마우스에서 체중감소를 회복하고, DAI 감소, 대장길이 회복, 근력 개선 등의 유효한 효과가 확인되었다. 급성과 만성장염 유도 마우스에서 HiLm, HiLp 급이 시에 모두 항염증에 관련 된 세균형성이 되는 것이 확인되었다. 이를 통해 유산균이 생산한 비타민B2군(rib, FMN, FAD) 함유 동애등에 발효물은 항염, 대장염 회복, 근력개선 및 장내 마이크로바이옴의 호전이 확인하였다. 이는 동애등에 분말, 표준품 비타민 B 보다 동애등에 유산균 발효물(HiLAB_VitB2/B9)의 경우가 항염 등에 유효하였고, 동애등에 유산균배양에 의한 비타민B2 복합물이 함유된 파라바이오틱스B군 시제품(VitB1, B2, B3, B5, B7, B9) 함유 반려견 사료 시제품을 제조하였다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 계획 된 연구개발 목표 및 연구내용을 성실히 수행하여 당초계획보다 정성적 및 정량적 목표 상회
- 사료 이외의 면역증강, 향균기능 외의 기타 대사물 활용 식품과 의약 소재 등의 가치 고려.
- 동애등에기반의 유산균 생산 비타민B2군 생산의 창의성, 독창성 및 신규 기술개발 및 소재화 노력

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 동애등에 기반의 비타민B2/B9 생산 프로바이오틱스 새로운 융합 제품 개발 및 적용확대
- 비타민B2 소재 생산의 원천기술 확보로 다양한 제품으로의 응용가능성과 제품화에 따른 기술 강화
- 프로바이오틱스 제품의 기능성과 안전성에 대한 검증을 통해 천연 유용성분의 확보 및 브랜드화
- 유산균발효에 의한 저분자화로 소화흡수율 및 장염 예방으로 반려동물의 보호자 니즈 만족
- 고부가가치 프로바이오틱스 소재 개발에 따른 곤충농가의 소득 증대 및 농가수 확대
- 단백질, 탄수화물, 지방 분해효소의 영향으로 저분자화 되어 소화흡수율이 높음
- 동애등에 이외의 다른 식용곤충에 적용 확대하여 농산가공품의 가속화

IV. 보안성 검토

○ 해당사항 없음

1. 연구책임자의 의견

- 유산균에 의해 생산 된 비타민B2군(rib, FMN, FAD)/ B9의 항염, 대장염 예방, 근력개선 등의 효과 확인 되어 관련 연구의 식용곤충에 적용 연구 필요함

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

- 동애등에 기반 비타민B2/B9 생산의 신규성, 창의성, 독창 기술개발 및 사료첨가물(HiLAB 4종) 완료

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	류코노스톡 메센테로이데스를 포함하는 동애등에 추출물 비타민 또는 이의 유도체 생성용 조성물
②	락토바실러스 플라타룸을 포함하는 동애등에 추출물 내 비타민 또는 이의 유도체 생성용 조성물
③	동애등에 유산균 발효물을 포함하는 지질대사 개선 사료 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 결	정책 자료	기타
①의 기술		√			√	√	√			
②의 기술		√			√	√				
③의 기술		√			√	√	√			

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	류코노스톡 비타민B2/B9 함유 발효소재 항균, 항염 및 급성장염예방 관련 제품화
②의 기술	락토바실러스 비타민B2/B9 함유 발효소재 항균, 항염 및 만성장염예방 관련 제품화
③의 기술	동애등에 유산균 복합물의 지질대사 개선 사료첨가물

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만 원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인 증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용예)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	논문 비SCI			논문 평균 I/F	학술발표	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	10	20			10	10	10	10		10				10				10	
최종목표	5	1			1	10	2	10		2		4	2		6			1	
연구기간내 달성실적	5		5		3	15	5			9		1	5		17	5		10	1
연구종료후 성과창출 계획		1					1	100		1		1			1				

