

RS-2022  
-IP12204  
0

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
기술사업화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004770-01

# 김치 종균 프로바이오틱스의 개별인정 기능성 개발

2024.07.29.

대상(주) /  
충북대학교 /

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

김치

종균

프로바이오틱스의

개별인정

기능성

개발

2024

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “김치 종균 프로바이오틱스의 개별인정 기능성 개발”(개발기간 : 2022. 4. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 07. 29.

주관연구기관명 : 대상(주)                      임 정 배                      (인)  
공동연구기관명 : 충북대학교              김 양 훈                      (인)

주관연구책임자 : 류 병 희                      (인)  
공동연구책임자 : 한 남 수                      (인)

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급				
							일반[ <input checked="" type="checkbox"/> ], 보안[ <input type="checkbox"/> ]				
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		기술사업화지원사업		
전문기관명 (해당 시 작성)					사업명		내역사업명 (해당 시 작성)		민간중심 R&D 사업화		
공고번호		제2022-34호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
					연구개발과제번호		122040-02				
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0906	45%	LB1801	30%	LB0906	25%				
	농림식품과학기술분류	PA0201	45%	PA0102	30%	CA0105	25%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		김치 종균 프로바이오틱스의 개별인정 기능성 개발							
		영문		Functional ingredient development of kimchi starter probiotics for functional health foods							
주관연구개발기관		기관명		대상(주)		사업자등록번호		1098114886			
		주소		서울 종로구 창경궁로 120 종로플레이스(우)03130		법인등록번호		1101110327125			
연구책임자		성명		류병희		직위					
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호					
연구개발기간		전체		2022. 04. 01 - 2023. 12. 31.(21개월)							
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2022. 04. 01 - 2023. 12. 31.(21개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타( )		합계			연구개발비 외 지원금
		현금		현금		현금		현금		합계	
총계		462,000		24,000		179,000		486,000		179,000	
1단계		1년차		198,000		9,000		80,000		207,000	
		2년차		264,000		15,000		99,000		279,000	
n단계		1년차									
		n년차									
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		충북대학교									
공동연구개발기관											
위탁연구개발기관											
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자		성명				직위					
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호					

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

2024년 07월 29일

연구책임자: 류 병 희 (인)

주관연구개발기관의 장: (직인)

공동연구개발기관의 장: (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

<b>사업명</b>	<b>기술사업화지원사업</b>			<b>총괄연구개발 식별번호</b> (해당 시 작성)			
<b>내역사업명</b> (해당 시 작성)	<b>민간중심 R&amp;D 사업화 지원</b>			<b>연구개발과제번호</b>			
<b>기술 분류</b>	<b>국가과학기술 표준분류</b>	LA0906	45%	LB1801	30%	LB1702	25%
	<b>농림식품 과학기술분류</b>	PA0201	45%	PA0102	30%	CA0105	25%
<b>총괄연구개발명</b> (해당 시 작성)							
<b>연구개발과제명</b>	김치 종균 프로바이오틱스 유산균의 맞춤형 기능성 개발						
<b>전체 연구개발기간</b>	2022.04.01. ~ 2023.12.31. (1년 9개월)						
<b>총 연구개발비</b>	총 665,000 천원 (정부지원연구개발비: 462,000 천원, 기관부담연구개발비 : 203,000 천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)						
<b>연구개발단계</b>	기초[ ] 응용[ √ ] 개발[ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]			<b>기술성숙도</b> (해당 시 기재)	착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )		
<b>연구개발과제 유형</b> (해당 시 작성)							
<b>연구개발과제 특성</b> (해당 시 작성)							
<b>연구개발 목표 및 내용</b>	<b>최종 목표</b>		<p><b>[연구목표]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기존과제 유전체 연구 기반 김치 프로바이오틱스 유산균 산업화(포스트게놈다부처유전체사업)에서 도출된 항염증 장 건강 및 간 건강 김치 유산균의 맞춤형 건강 개선 효과 규명 및 건강기능식품 소재 산업화</li> <li>○ 김치 종균 프로바이오틱스의 건강기능식품 개별인정 원료 등록을 위한 기능성 발굴 및 동물시험을 통한 기전, 효능 확인</li> <li>○ 전장 유전체 분석을 통한 프로바이오틱스 건강기능식품 원료 안전성 확인</li> <li>○ 개발 중인 건강기능별 국내 건강기능식품의 시장성 평가, 사업성 분석 수행을 통한 개별 인정 추진</li> </ul>				
	<b>전체 내용</b>		<p><b>[연구내용]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사업화 후속 연구로서, 유전체 연구 기반 김치 프로바이오틱스 산업화(포스트게놈 다부처유전체사업)에서 도출된 김치 종균 프로바이오틱스의 맞춤형 건강개선 효과 및 안전성 규명</li> <li>○ 항염증 장 건강 유산균의 호흡기 건강, 체지방 감소 기능성 확인, 간 건강 기능 유산균의 비알콜성 간손상 예방효과 및 구강건강(잇몸 건강) 증진 기능성 확인</li> </ul> <p><b>[연구전략]</b></p> <p>(1) 기 확보된 유전체 기반 프로바이오틱스 라이브러리에서 맞춤형 건강개선 기능성 균주를 추가 발굴하고, (2) 기능성 및 기전을 동물질환 모델 시스템을 통해 검증하고, (3) 프로바이오틱스 생산공정 표준화 및 안전성을 확인하여, (4) 개별 인정 기능성 프로바이오틱스 소재로 개발함</p>				
	<b>1단계</b> (해당 시 작성)	<b>목표</b>					
		<b>내용</b>					
<b>2단계</b>	<b>목표</b>						

	성과 목표	성과 내용
연구개발성과	○ 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 - 비알코올성 간 건강 및 구강 건강	<ul style="list-style-type: none"> <li>시험관 실험을 통한 구강건강 후보 소재 선정 : L. rhamnosus DM65, L.plantarum DSR920 (1:3 비율)</li> </ul>
	○ 건강기능성 평가모델 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>구강건강 pilot study 실험계획 확립, 건적 및 계약 완료</li> <li>비알콜성 간건강 동물실험 계획 확립, 건적 및 계약 완료</li> </ul>
	○ 비알콜성 간건강을 위한 in vivo 질환 마우스 모델 기반 간조직에서의 지방 감소 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>동물 실험을 통한 비알콜성 간건강 소재 확보 : L.plantarum DSR330</li> </ul>
	○ 구강건강 개선 평가를 위한 pilot study을 통한 프로바이오틱스 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>구강건강 후보소재 시생산 완료</li> <li>임상시험식품 제조 완료</li> <li>구강건강 pilot study 대상자 모집 완료</li> </ul>
	○ 개발중인 건강기능별 국내 건강기능식품의 시장성 평가, 사업성 분석 수행, 개별인정 추진 기능성 선정	<ul style="list-style-type: none"> <li>건강기능식품 시장성 평가, 사업성 분석을 통한 개별인정 추진 기능성 선정 완료</li> </ul>
	○ 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 - 호흡기 건강 및 체지방 감소	<ul style="list-style-type: none"> <li>우수 프로바이오틱스 균주 확보 체지방 감소(L. reuteri EFEL6901) 호흡기 건강(L. reuteri EFEL6901)</li> </ul>
	○ In vivo 건강기능성 평가모델 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>in vivo 건강기능성 평가 모델 확보 (호흡기 건강, 체지방 감소)</li> </ul>
	○ 호흡기 또는 체지방 건강을 위한 in vivo 질환 마우스 모델 기반 효능, 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>염증 세포 침윤도 및 세기관지 변화도, 염증 바이오마커를 개선하는 천식 마우스 모델 생체 내 질환 바이오 마커 측정</li> </ul>
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p><b>[연구개발 성과]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발된 프로바이오틱스 기능을 입증할 SCI급 논문 2편 이상 게재(IF 평균 3.5)</li> <li>○ 특허 2건 이상 출원 및 2건 이상 등록</li> <li>○ 기술이전 1건 이상 및 맞춤형 건강개선 기능성 프로바이오틱스 소재 1건 이상 상품화</li> <li>○ 고용창출 1명 및 인력양성 4명 이상</li> </ul>	<p><b>[활용계획]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 맞춤형 건강개선 기능성의 동물질환 모델시스템을 통해 효능이 우수한 기능성 프로바이오틱스를 1건 이상 기술이전을 받은 뒤, 자체적으로 인체적용시험 추진에 정임</li> <li>○ 인체적용시험을 통해 기능성 검증 후 개별인정 신청 및 등록하여, 건강기능식품 소재로 프로바이오틱스 시장에 진입, 원료의 판매를 통한 사업화를 추진</li> <li>○ 개별인정형 건강기능식품 프로바이오틱스 및 김치 등 일반식품의 기능성 표시 제도에 적용할 수 있는 원료로 판매</li> <li>○ 개별인정형 건강기능식품 사업화 - 건강기능식품 제조, 판매하는 당사 계열사 대상라이프사이언스(주)를 통해 차별화된 개별인정형 건강기능식품 개발 및 판매</li> <li>○ 김치의 기능성 표시 제품화 - 고시형 프로바이오틱스와 차별화되는 개별인정형</li> </ul>
	○ 전장 유전체 분석을 통한 프로바이오틱스 건강기능식품 원료 안전성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>장 내 유익균 및 유해균의 상대적 풍부도를 조절하고 유익한 대사 산물을 생성하는 천식 마우스 모델의 장내 마이크로바이옴 분석</li> </ul>

	<p>프로바이오틱스를 적용하여 기능성 표시 제품화</p> <p><b>[기대효과]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 프로바이오틱스의 다양한 유전체 및 대사체, 기능성 등 정보 및 분석기술을 통하여 국내 전통 발효 미생물 및 프로바이오틱스 연구에 활용할 수 있음</li> <li>○ 간 건강(비알콜성), 구강 건강(잇몸 건강), 체지방 감소, 호흡기 건강 중 기능성이 입증된 프로바이오틱스를 활용하여 국제 연구 경쟁력을 확보할 수 있으며, 한국의 전통발효 식품에 접목하여 상용화 할 수 있음</li> <li>○ 장내 유용 미생물 기반 기능성 소재의 특허 출원 및 제품화할 수 있음</li> <li>○ 우수 프로바이오틱스의 추가 기능성 확보를 바탕으로 한 건강기능식품 개별인정형 원료 개발에 기여할 것으로 판단됨</li> <li>○ 선발된 프로바이오틱스 종균의 기능성 및 안전성 분석을 통한 개별인정형 건강기능식품 원료 등록 추진, 식물성 프로바이오틱스 종균 이용 다양한 발효 상품의 산업화 및 세계화 가능</li> <li>○ 개발된 소재의 제품화를 통해 전문인력 고용창출 및 연간 5억원 이상의 매출 창출이 기대됨</li> </ul>												
<b>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</b>													
<b>연구개발성과의 등록·기탁 건수</b>	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신제품		
<b>연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황</b>	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)				ZEUS 등록번호	
<b>국문핵심어 (5개 이내)</b>	유산균		프로바이오틱스		마이크로바이옴		기능성		건강기능식품				
<b>영문핵심어 (5개 이내)</b>	lactic acid bacteria		probiotics		microbiome		function		health functional food				

## < 목 차 >

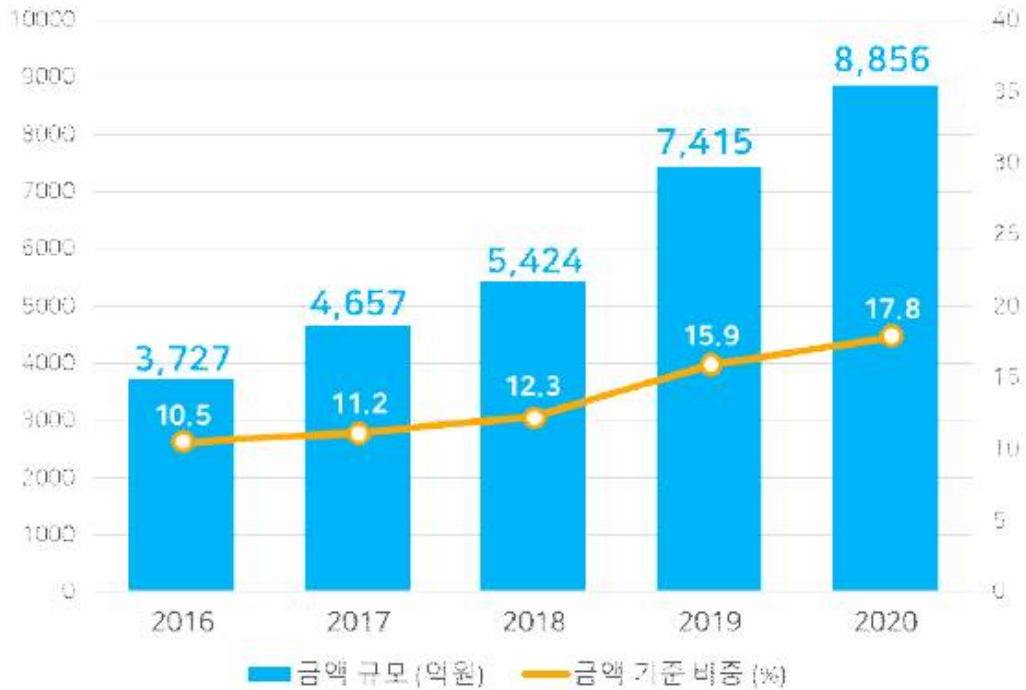
1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

# 1. 연구개발과제의 개요

## ■ 국내 프로바이오틱스 시장은 개별인정원료 유산균과 함께 빠르게 성장하고 있음

○ 2018년도를 기점으로, 프로바이오틱스가 국내 건강기능식품 전체 시장 성장을 주도하고 있으며, 2020년 건강기능식품시장에서 금액 기준 상위 5개 기능성 원료 중 프로바이오틱스가 두 번째로서 약 8,856억원 매출을 기록했으며, 2016년부터 지난 5년간 연평균성장률 7%로 크게 증가하고 있음.



[그림1] 최근 프로바이오틱스 총 매출 (건강기능식품 및 소비자 실태 조사, 2020)

○ 프로바이오틱스 제품에 주로 사용되는 원료는 고시형 유산균으로 등록된 유산균은 19종이며, 이에 속하는 유산균은 건강기능식품법에 의거하여 일일 섭취량 1억~100억 CFU 일 경우, 유익한 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원활의 기능을 제품에 표시할 수 있음(건강기능식품공전)

종 류	
Lactobacillus	<i>L.acidophilus, L.casei, L.gasseri, L.delbrueckii ssp. bulgaricus, L.helveticus, L.fermentum, L.paracasei, L.plantarum, L.reuteri, L.rhamnosus, L.salivarius</i>
Lactococcus	<i>Lc. lactis</i>
Enterococcus	<i>E.faecium, E.faecalis</i>
Streptococcus	<i>S.thermophilus</i>
Bifidobacterium	<i>B.bifidum, B.breve, B.longum, B.animalis ssp. lactis</i>

[표1] 고시형 유산균 19종

○ 고시형 유산균의 장건강 기능과는 다른 차별화된 기능성으로 개별인정원료 유산균의 시장이 성장하고 있으며, 특히 체지방 감소 유산균, 질 건강 유산균, 갱년기 여성용 유산균 등이 건강기능식품으로 제품화되어 고시형 프로바이오틱스 제품과 차별화되는 기능성으로 고부가가치 제품으로 판매되고 있음.



등록일	인정번호	원료명	기능성내용
2013.07.05	제2009-28호 (2009.04.07)	프로바이오틱스(드시모네)	유익한 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 장면역을 조절하여 장건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)
2013.09.26	제2013-17호 (2013.07.03)	<i>Lactobacillus sakei</i> Probio65	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움 수 있음(생리활성기능 2등급)
2014.02.19	제2014-5호 (2014.02.04)	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17	체지방 감소에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)
2014.04.28	제2014-16호 (2014.04.23)	프로바이오틱스 ATP	면역과민반응에 의한 피부상태개선에 도움 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함(생성기능 3등급)
2014.07.14	제2014-27호 (2014.07.03)	UREX 프로바이오틱스	유산균 증식을 통한 여성 질 건강에 도움을 있음(생리활성기능 2등급)
2015.01.26	제2015-1호 (2015.01.05)	<i>Lactobacillus plantarum</i> HY7714	피부 보습에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)
2015.01.26	제2015-2호 (2015.01.05)	<i>Lactobacillus plantarum</i> HY7714	자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)
2018.01.05	제2017-6호 (2017.12.29)	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17	체지방 감소에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)
2018.12.14	제2018-12호 (2018.11.22)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC3201 열처리배양건조물	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움 수 있음(생리활성기능 2등급)
2019.05.09	제2019-4호 (2019.04.05)	Lactobacillus 복합물 HY7601 + KY1032	체지방 감소에 도움을 줄 수 있음

[표2] 프로바이오틱스 개별인정원료(식약처, 식품안전나라 홈페이지)

### ■ 일반식품의 기능성 표시 제도로 건강기능식품 원료시장이 확대

○ 일반식품이 충분한 과학적 근거를 갖추는 경우 기능성 표시를 할 수 있도록 일반식품 기능성 표시제를 20년 12월부터 시행하고 있으며, 고시된 건강기능식품 기능성 원료 29종을 사용한 식품이거나, 29종 이외의 원료를 사용할 경우, 건강기능식품 원료로 별도로 인정받은 원료를 사용하면 가능하다.

○ ‘기능성표시식품’은 22년 1월 기준, 196품목(한국식품산업협회 홈페이지 등록 기준)이 등록되어 있으며, 이 중 음료류가 80종으로 가장 많고, 과자류·빵류(떡류) 17품목, 유가공품 15품목이며, 일반 식품의 기능성 표시 확대로 식품 시장 및 건강기능식품 원료시장이 함께 성장할 것으로 판단되고 있음.



[그림2] 일반식품 기능성 표시 제품

### ■ 사회환경 변화에 따른 프로바이오틱스의 새로운 기능성 탐색

○ 사회·환경 측면에서 삶의 질 개선, 인구 고령화 등에 따라 건강기능식품에 대한 수요가 증가하고, 소비자의 다양한 욕구로 새로운 기능성 제품 시장이 부각되고 있으며, 황사, 미세먼지 등으로 인한

환경오염이 대두되면서 비알코올성 간 손상 예방, 호흡기 건강에 대한 요구도가 증가하고 있고, 치은염과 치주질환은 진료 인원 순위 2위, 1인당 진료비는 71,265원으로 주요 건강 문제로 나타나고 있음(건강보험심사평가원,2018).

○ 해외 기능성 유산균 사례를 보면, BLIS Probiotics(뉴질랜드)의 M18, K12 유산균의 기능성원료를 사용한 충치, 잇몸 건강, 목 건강 프로바이오틱스 제품을 상품화하고 있으며, Respiratory care Probiotics 를 소구하여 판매되는 제품들이 존재함. COVID19 대유행에 따른 면역증진, 호흡기 건강에 대한 이슈로 함께 주목되고 있어 향후 호흡기 건강, 잇몸 건강 관련 건강기능성 원료는 국내시장에서 수요가 증가하고, 건강기능식품 및 일반식품의 기능성 표시 제품에 대한 소비자 니즈도 높을 것으로 예상되고 있음.



[그림3] 해외 기능성 유산균 제품

○ 식품의약품안전처에서는 환경적 문제로 국민적 관심이 증폭된 호흡기 건강과 환자가 고령화 사회화 현상과 함께 급증하고 있는 잇몸 건강에 대한 신규 기능성 원료에 대한 가이드를 제정하였으며(2020년), 업계 및 학계에서 건강기능식품 원료 개발 진행 중에 있음. 프로바이오틱스는 최근 마이크로바이옴 기술의 발달과 함께 다양한 잠재적 기능이 규명되고 있으며, 프로바이오틱스가 갖는 면역 조절, 항염증 등의 기능은 호흡기 및 잇몸 건강에 효과가 있는 원료로서의 개발이 가능할 것으로 판단되고 있음.

■ 비알코올성 간 건강 개선 건강기능성 유산균 발굴

○ 일반적으로 탄수화물과 지방은 혈중 포도당과 인슐린에 의해 대사과정이 치밀하게 조절되나, 탄수화물 또는 지방의 과잉 섭취로 영양 과잉 상태가 지속될 경우 고혈당이 동반되며, 혈중 유리 지방산(free fatty acid) 수준이 증가됨. 과량의 에너지는 지방축적을 촉진하게 되며, 탄수화물과 지방 대사 이상이 장기화 되면서 인슐린 저항성이 유발되게 됨.

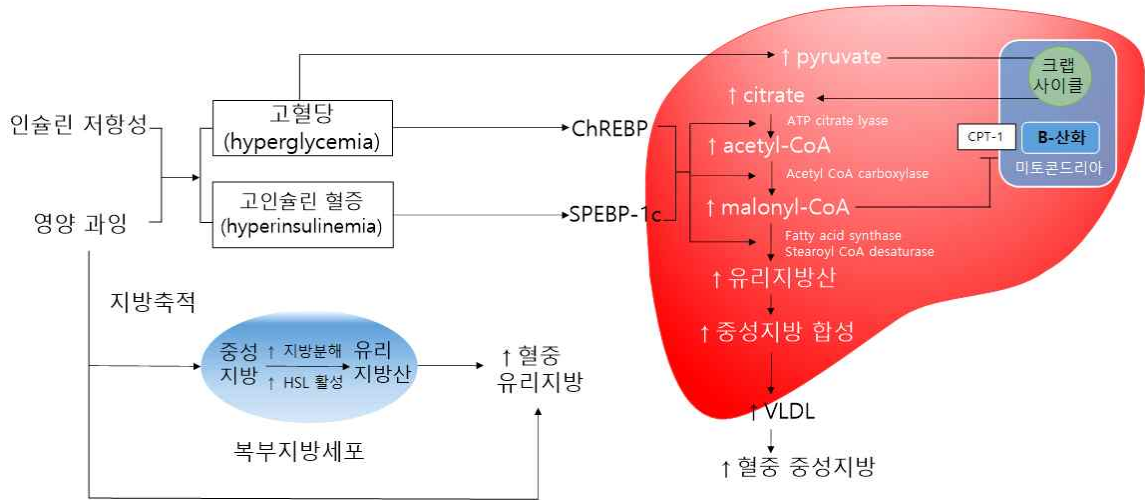
○ 인슐린 저항성이 있는 경우 혈중 인슐린 민감성이 감소하기 때문에 혈중 인슐린 수준은 높게 유지되며, 고혈당 상태가 지속된다. 이러한 상태에서는 지방조직에서 호르몬감수성 지방질가수분해 효소(hormone-sensitive lipase) 활성이 증가되어 지방조직의 분해가 촉진되면서 결과적으로 혈중 유리 지방산 농도는 더욱 증가함. 따라서 영양 과잉으로 인한 지방산 섭취와 지방조직에서 분해된 지방산이 배가되면서 간으로 유입되는 유리 지방산 수준도 비례적으로 증가하게 됨.

○ 간으로 유입된 지방산은 베타-산화( $\beta$ -oxidation) 과정을 통해 산화되어 에너지원으로 이용될 수도 있고, 중성지방으로 전환되어 간에 축적될 수도 있지만, 고인슐린혈증(hyperinsulinemia)과 고혈당(hyperglycemia)이 지속될 경우에는 지방산 산화가 억제되고, 중성지방 합성이 촉진됨

○ 즉, 간에서 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)와 carbohydrate response element binding protein (ChREBP)이 활성화되어 지방산 합성을 촉진하는 유전자 발현이 증가되며, 지방산 합성 증가로 생성되는 말로닐-CoA (malonyl-CoA)가 carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1)의 작용을 억제하여 미토콘드리아에서 지방산 베타-산화를 감소시킴. 따라서 지방산 산화는 억제되면서 중성지방 합성에 필요한 지방산이 지속적으로 공급되면서 간 내 지방축적이 촉진되는 것임

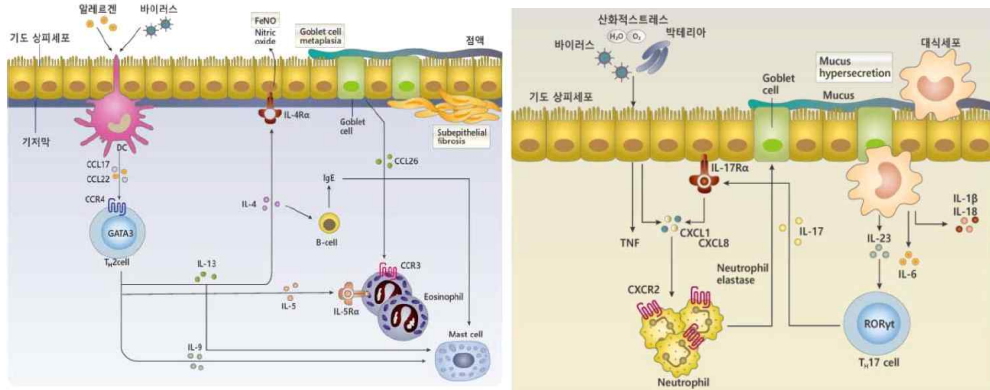
■ 호흡기 면역력 개선 건강 기능성 유산균 발굴

○ 코로나 19로 인해 면역력 증식 식품에 대한 관심 증가는 개인 스스로 식습관을 통해 건강관리를 하는 ‘셀프메디케이션’트렌드 확산으로 이어지고 있음 (한국건강기능식품협회, 2020). 이에, 호흡기 건강에 도움 줄 수 있는 식품, 특히 면역력과 장건강을 증진시킬 수 있는 제품에 대한 수요 증가로 이어지고 있음



[그림4] 영양 과잉, 인슐린 저항성과 간 내 지방축적(출처: 식약처, 2020)

○ 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)과 같은 호흡기 질병은 바이러스나 알레르기 항원 등 다양한 외부 유래 요인에 의해서 수지상세포(dendritic cell)의 항원제시를 통해 Th2가 각종 사이토카인을 분비하여 만성적인 기도 염증 상태를 만들게 되어 발생 됨. 또한, 산화적 스트레스에 의해 발생하는 염증은 주로 호중구성 염증 반응으로 상피세포에서 전염증성 사이토카인 등이 분비되어 염증을 발생시키고 점액 과분비를 유도하여 기관지를 막아 천식과 같은 호흡 장애를 발생시킴(Barnes et al., 2018)



[그림5] 염증성 호흡기 질환의 발생 메카니즘(출처: 식약처, 2020)

○ 프로바이오틱스는 단쇄지방산(Short-chain fatty acids), 항균펩타이드 (Antimicrobial peptides), 세포외다당류(Exopolysaccharides)와 같은 대사물질을 생성하여 인체의 면역시스템을 증진 시키는 것으로 밝혀져 아토피, 류마티스 등의 면역질환에 효과적임(Maurya et al., 2014). 특히, Lactobacillus reuteri는 비장에서 Treg 세포를 증가시켜 염증을 낮추고 폐에서 히스타민과 사이토카인을 감소시켜 호흡기 질환을 개선하는 효과가 있는 것을 보고됨(Li et al., 2021). 또한 Bacillus spp.나 L. rhamnosus는 기도의 객담을 감소시키고 기관지상피세포에서 호중구와 대식세포를 조절하며 폐섬유화 관련 전사인자를 감소시켜 만성 폐쇄성 폐질환을 완화시키는 것으로 나타남(Holzafel et al., 2021; Carvalho et al., 2019)

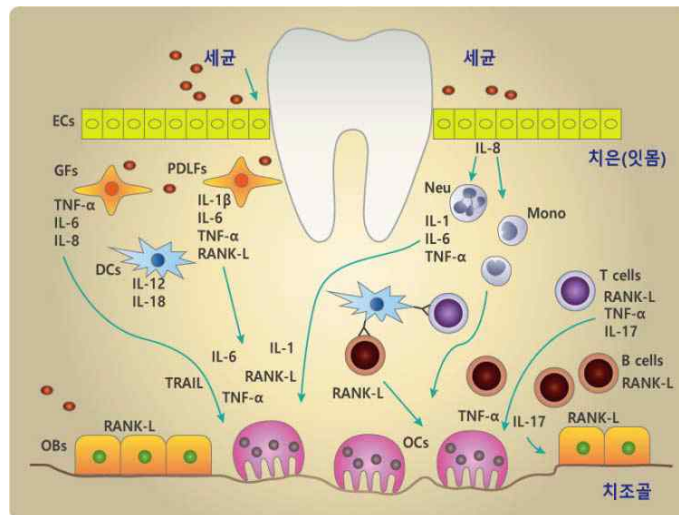
■ 잇몸건강 개선 건강기능성 유산균 발굴

○ 구강 세균 중 대표적인 치주질환 병원균(periodontal pathogens)에는 Porphyromonas gingivalis,

Treponema denticola, Prevotella intermedia, Aggregatibacter actinomycetemcomitans 등이 있는데, 이들 미생물이 형성하는 lipopolysaccharides (LPS) 내 독소 혹은 대사산물은 조직과 면역세포에서부터 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 분비를 증가시킴

○ 특히, IL-1β와 TNF-α는 조직파괴에 관여하는 대표적인 사이토카인으로, IL-1β는 염증세포의 recruitment, 다형핵백혈구(polymorphonuclear leukocyte)의 priming/degranulation 활성화, prostaglandin과 같은 염증성 매개체와 matrix metalloproteinases (MMP)의 생성 증가, 콜라겐 합성 저해, T와 B 림프구 활성을 유발하며, TNF-α는 세포 apoptosis, 골 흡수, MMP 분비, intercellular adhesion molecule (ICAM) 발현 및 IL-6생성을 증가시키고, IL-6는 파골세포 형성 및 골 흡수, T 림프구 분화를 촉진함으로써 조직 파괴 과정에 관여함

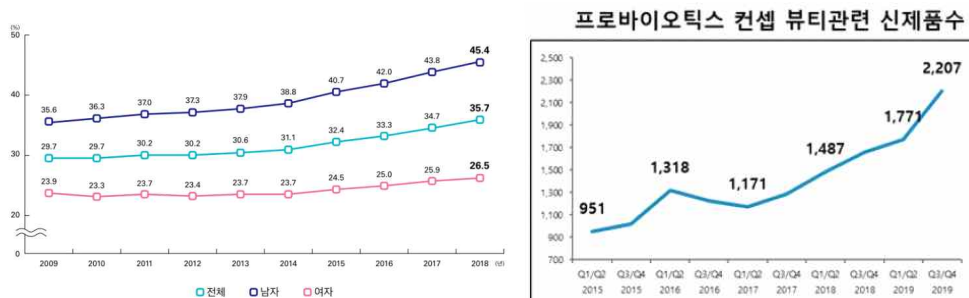
○ 반대로, interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), interleukin-1receptor antagonist (IL-1ra) 등의 비염증성 사이토카인과 tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)의 생산이 증가되면서 건강한 치주 상태를 유지하게 됨



[그림6] 잇몸질환과 사이토카인(출처: Journal of Immunology Research, 2013)

■ 체지방 감소 발효 유산균 발굴

○ 체지방의 증가는 각종 대사 질환 및 심장병, 암, 관절염의 주요 원인으로 알려져 있으나 서구화된 식습관으로 비만환자들은 지속적으로 증가하고 있음. 대부분의 비만 치료제는 식욕을 억제하는 신경전달물질로 치료제들은 심장질환, 호흡기질환, 신경계 질환 등의 부작용과 함께 그 효능의 지속성도 낮아질 것으로 나타나 부작용이 없는 비만 치료제의 개발이 필요함. 또한, 기존 장 건강 향상을 벗어나 체지방 감소 기능성을 가진 프로바이오틱스 소재의 뷰티관련에 대한 연구들이 활발히 진행 중이며, 이와 관련된 프로바이오틱스 제품들이 출시되고 있음 (IPET, 2021)

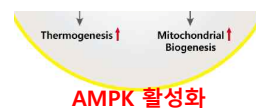


[그림7] 10년간 비만 유병률(좌), 프로바이오틱스 제품수(우)(출처: 대한비만학회, 2019; IPET, 2021 포스트바이오틱스 분야 동향 보고서)



○ 비만환자는 체내의 전구지방세포(preadipocytes)가 지방세포로 과도하게 분화되며, 이때 관여하는 것으로 알려진 전사인자 C/EBPs(CAAT enhancer binding proteins), PPARs(Peroxisome Proliferator Activated receptor)와 ADD/SREBPs(Adipocyte determination, differentiation dependent factor1/sterol response element binding proteins)등에 의해 지방화의 속도가 조절됨. 최근 연구에 따르면 *Lactobacillus fermentum*와 *L. reuteri* 프로바이오틱스 유산균은 지방을 합성하는 lipase를 저해하고 전구지방세포의 분화를 조절하는 전사인자를 저해하여 체지방이 감소한다는 연구결과가 보고 됨(Kim et al., 2020). 또한 프로바이오틱스에 의해 AMPK (AMP-activated protein kinase)와 HSL (Hormone-sensitive lipase)와 같은 에너지대사 조절인자가 활성화 되어 체내 중성지방을 분해하여 촉진하여 지방 생성 억제 뿐만아니라 체내 지방 감소에 효과를 보이는 것으로 나타나 체지방을 감소시킬 수 있는 프로바이오틱스 개발의 산업화가 필요함(Han et al., 2021)

### 지방세포 분화



[그림8] 지방세포의 생성과 체지방의 분해

### ■ 지난 과제와의 연결, 사업화 확장성

○ 지난 과제 “김치용 프로바이오틱스 개발 및 건강기능 김치 산업화”에서 우리 기관은 장 건강 기능성을 가진 프로바이오틱스이면서, 관능적 품질도 우수한 유산균을 개발하고, 김치용 발효종균으로 사용하여 건강 기능성을 보유한 고품질 김치를 생산, 상품화하였음.

○ 장 내 유익한 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원활의 기능을 표시할 수 있는 장 건강 기능성은 고시형 균주 19종을 사용하여 표시가 가능하며, 기능성 표시 제품의 원료로 활용하거나, 프로바이오틱스 건강기능식품으로 상품화하기에 고시형 유산균과의 차별성을 강조하기가 어려운 상황임.

○ 이에 고시형 유산균과 차별화되고, 기능성 표시 제품으로 활용과 건강기능식품 제품화를 위한 시장규모가 형성되어 있고, 사회. 환경적으로 향후 수요가 발생할 맞춤형건강 기능성을 발굴하여 배타적 지위를 얻을 수 있는 개별인정형 원료로 개발하는 것이 산업화 차원에서 필요함.

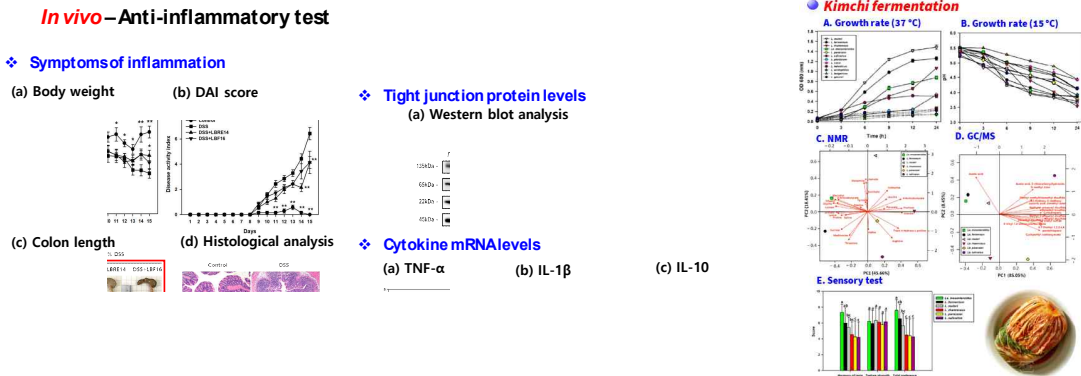
○ 프로바이오틱스의 기능성은 최근 건강기능식품 시장 규모와 시장 성장률, 소비자 트렌드를 토대로 하여 체지방 감소, 간 건강, 호흡기 건강, 구강 건강 4가지 기능성을 개별인정 추진할 기능성으로 선정하였으며, 지난 과제에서 도출한 프로바이오틱스 라이브러리를 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 실시하여 과제 기간 내에 인체적용시험 전단계까지 완료할 계획임

○ 맞춤형 건강기능의 개별인정형 원료로서 개발하여, 장 건강 기능과 개별인정 기능성이 추가되어 듀얼 기능성 소구 가능한 프로바이오틱스 기능성 소재보다 차별화된 상품화 가능하고, 일반식품의 기능성 표시제도를 통해 김치 등 일반 식품에도 적용이 될 수 있어, 확장성을 기대할 수 있음.

### ■ 사전연구결과

○ 장 건강 프로바이오틱스 김치 종균

-대장에서 분리한 후보균주의 장내 안전성과 안정성을 평가하고 *in vitro* 대장상피세포와 *in vivo* 염증 마우스 모델에서 항염증 평가하여 장 건강 프로바이오틱스 균주 선발함  
-장 건강 김치 종균을 스타터로 사용한 김치의 품질특성 분석을 통해 질환 맞춤형 프로바이오틱스 김치 종균을 선발함

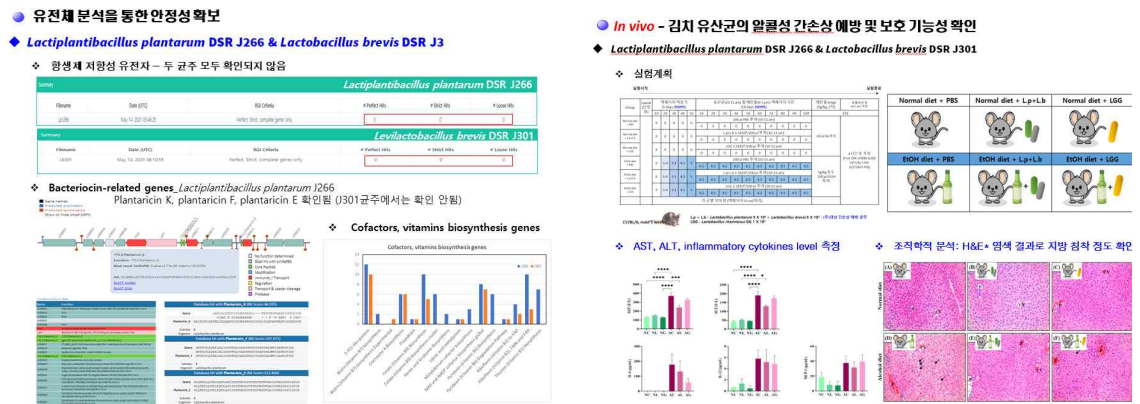


[그림9](좌) 장 건강 프로바이오틱스 균주의 항염증 효과

(우) 장건강 프로바이오틱스 사용 김치의 품질특성

○ 간 건강 프로바이오틱스 김치 종균

-후보 균주의 유전체 분석을 통한 안전성 확보하고 *in vitro*와 *in vivo* 알콜성 간손상 마우스 모델에서 알코올 및 아세트알데하이드 분해능, 간세포 손상 억제 효능을 검증을 통해 간 건강 프로바이오틱스 균주를 선발함

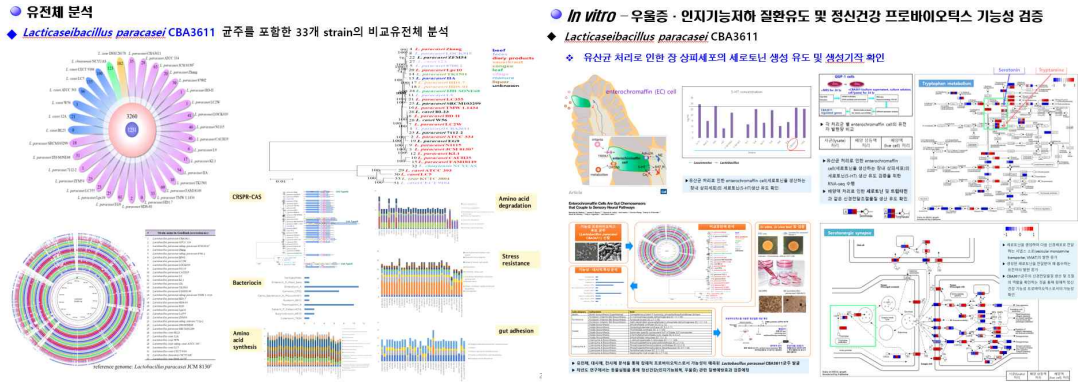


[그림10](좌) 유전체분석을 통한 안전성확보

(우) 간 건강 프로바이오틱스 균주의 알콜성 간손상 보호 효과

○ 정신 건강 프로바이오틱스 김치 종균

-유전체분석을 통해 대사체 기반 기능성 유산균을 선별하고 *in vivo* 우울증 및 인지기능 저하 마우스 모델에서 인지기능 개선 및 세로토닌 유도 효과를 통한 정신건강 프로바이오틱스 기능성 검증 및 균주 선발



[그림11](좌) 유전체분석을 통한 기능성 유산균 선별

(우) 정신 건강 프로바이오틱스 균주의 우울증 저하 및 인지기능 개선 효과

○ 유용 미생물 및 유전자원 확보

-장/간/정신 건강 프로바이오 바이오티크스 발굴 및 유전체 분석을 통해 미생물과 유용 유전자원을 확보함

● 전략미생물 애독, NABIC 등록

No	Genus	Strain	Accession	Registration Date
1)	Lactobacillus	gaber	WIKIM0074	2017.10.18
2)	Lactococcus	raffinolis	WIKIM0068	2017.10.18
3)	Lactobacillus	paracasei	CBA3611	2017.10.18
4)	Lactobacillus	sp. CBA3603	WIKIM0092	2017.10.18
5)	Lactococcus	gelidus	subsp. gustomatum CBA3613	2017.10.18
6)	Lactococcus	mesenteroides	DRCL1506 L4-120-3	2017.10.18
7)	Lactococcus	mesenteroides	DRCL1506 L4-120-6	2017.10.18
8)	Lactobacillus	reuteri	EFEL6901	2017.10.18
9)	Lactobacillus	fermentum	EFEL6900	2017.10.18
10)	Sporolactobacillus	terreus	K2	2017.10.18
11)	Bifidobacterium	longum	subsp. infantis WJ	2017.10.18
12)	Bifidobacterium	fedium	W8	2017.10.18
13)	Lactobacillus	brevis	DRCL301	2017.10.18

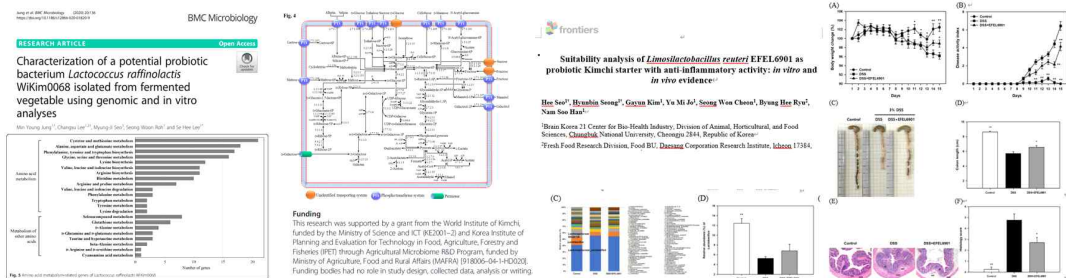
● 전략미생물 애독, NABIC 등록

No	분석대상 [유전자원, 유전자원 명칭, 의 견별 기재]	분석내용	등록기간	등록번호	생산량 [t/년]
1	Lactobacillus gaber WIKIM0074	유전자원 분석	18.11.20	CP045006-8 igen=00000468	0.02
2	Lactococcus raffinolis WIKIM0068	유전자원 분석	18.11.20	CP045006-4 igen=00000297	0.02
3	Lactococcus mesenteroides CBA3618	유전자원 분석	19.10.31	CP045404 igen=00009812	0.02
4	Lactobacillus paracasei CBA3611	유전자원 분석	19.11.06	CP041657 igen=0000412	0.03
5	Lactobacillus sp. CBA3603(WIKIM0092)	유전자원 분석	20.07.13	CP047195 igen=00014370	0.03
6	Lactococcus gelidus subsp. gustomatum CBA3613	유전자원 분석	20.07.13	CP058617	0.02
7	Lactococcus mesenteroides DRCL1506 L4-120-3	유전자원 분석	20.11.11	igen=0001126	4.4
8	Lactococcus mesenteroides DRCL1506 L4-120-6	유전자원 분석	20.11.11	igen=0001125	2.1
9	Lactobacillus reuteri EFEL6901	유전자원 분석	21.08		
10	Lactobacillus fermentum EFEL6900	유전자원 분석	21.08		
11	Sporolactobacillus terreus K2	유전자원 분석	21.08		
12	Bifidobacterium longum subsp. infantis WJ	유전자원 분석	21.08		
13	Bifidobacterium fedium W8	유전자원 분석	21.08		
14	Lactobacillus brevis DRCL301	유전자원 분석	21.08		

[그림12] 미생물 유전체사업을 통한 유전자원 확보 성과

○ 학술성과

-장/간/정신 건강 프로바이오 바이오티크스 발굴을 통해 국내외 전문 학술지에 10편의 논문을 게재하고 국내 및 국제 학술대회에서 43건의 학술 결과 발표 성과를 달성



[그림13] 기능성 김치 프로바이오틱스 유산균 관련 학술 성과

○ 지식재산권 출원 및 등록

-간 기능 개선 및 장건강 면역활성, 정신건강 프로바이오틱스 종균 특허 출원 4건 특허 등록 2건의 성과 달성

● 지식재산권특이 - 출원

NO	지식재산권 대상 명칭 (권명/권장 기제)	국명	출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호
1	간 기능 개선용 유산균 및 이의 용도	한국	대성(주)	2018.11.12	10-2018-0136819			
2	프로바이오틱스 기능이 있는 신규 발효유산균 균주 및 이를 포함하는 조성물	한국	송죽이학교 산학협력단	2020.10.15	10-2020-0133154	서희 한남수	실시중	
3	프로바이오틱스 기능이 있는 신규 발효유산균 균주 및 이를 포함하는 조성물	한국	송죽이학교 산학협력단	2020.12.23	10-2020-0162513	서희 한남수	실시중	
4	폴로스루리디오아미노산 유도체, 항산화 활성을 갖는 발효유산균 균주 및 이를 포함하는 조성물	한국	천국세종연구소	2019.11	10-2019-0016553	이세진, 김준호, 안희재, 노성훈, 조현호	실시중	



● 지식재산권특이 - 등록

NO	지식재산권 대상 명칭 (권명/권장 기제)	국명	출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호
1	폴로스루리디오아미노산 유도체, 항산화 활성을 갖는 발효유산균 균주 및 이를 포함하는 조성물	한국	천국세종연구소	2019.10.02	10-2019-0117997	노성훈, 정인영, 이세진, 조현호	2020.01.08	10-2085100
2	폴로스루리디오아미노산 유도체, 항산화 활성을 갖는 발효유산균 균주 및 이를 포함하는 조성물	한국	천국세종연구소	2019.10.02	10-2019-0117998	노성훈, 정인영, 이세진, 조현호	2020.01.08	10-2085101



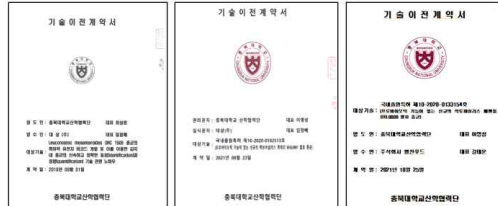
[그림14] 기능성 김치 프로바이오틱스 유산균 특허 출원 및 등록

○ 기술이전 성과

-기능성 김치 프로바이오틱스의 산업화를 위한 기술이전 3건의 성과 달성

● 기술이전

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	기술도입 일자
1	양도	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC 1506 균주의 특이적 유전자 비코딩 개발 및 이를 이용한 김치 내 중균과 신속하고 정확한 동정 (identification) 과 정량 (quantification) 기술 관련 노하우	대상(주)	2019.09.01	10,000,000	2019.10.31
2	실시권	크니출원특허 제10-2020-0162513호 프로바이오틱스 기능이 있는 신규 발효유산균 균주 및 이를 포함하는 조성물	대상(주)	2021.08.23	20,000,000	2021.08
3	실시권	크니출원특허 제10-2020-0133154호 프로바이오틱스 기능이 있는 신규 발효유산균 균주 및 이를 포함하는 조성물	(주)일한푸드	2021.10.25	65,000,000	
<b>총액</b>					97,000,000	



[그림15] 기능성 김치 프로바이오틱스의 기술이전 성과

■ 연구성과 산업화 진행 현황

○ 기능성 후보 균주 적용 맛김치 시제품을 제작하여 소비자 기능성 및 기호도 조사와 품질특성분석을 통해 발효 품질 안정화 및 최적 제품 선별



※ 기능성 소비자 선호도 조사

Base for	평균성	신뢰성
	Top2%	Mean
장 건강에 좋은 김치	67.4	3.70
간 건강에 좋은 김치	43.0	3.27
정신 건강에 좋은 김치	26.0	2.83

※ 기능성별 적합 김치종류 기호도 조사

Base for	장건강 (%)	간건강 (%)	정신건강 (%)
배우김치	60.2	29.0	24.0
동치미	20.2	29.0	27.2
총각김치	8.6	19.8	20.0
총각김치	5.2	8.8	11.0
적두기	4.2	8.8	10.6
없음/오름	1.6	4.2	6.6

↓  
기능성 별 김치 제조&발효 테스트

김치종류	장건강 김치(배우김치) (L. brevis J301 적용)	장건강 김치(백김치) (L. reuteri 14 적용)	정신건강 김치(총각김치) (L. paracasei CBA3611 적용)
시제품	시제품	시제품	시제품

[그림16] 기능성 김치 프로바이오틱스의 활용한 시제품 김치 제작

○ 건강 기능성 균주를 적용한 김치 제품 산업화를 위한 기술이전 및 품질 안정화, 대사체 분석, 미생물 분석, 소비자조사 관능평가를 통해 유산균 starter 적용 김치 생산을 최적화함

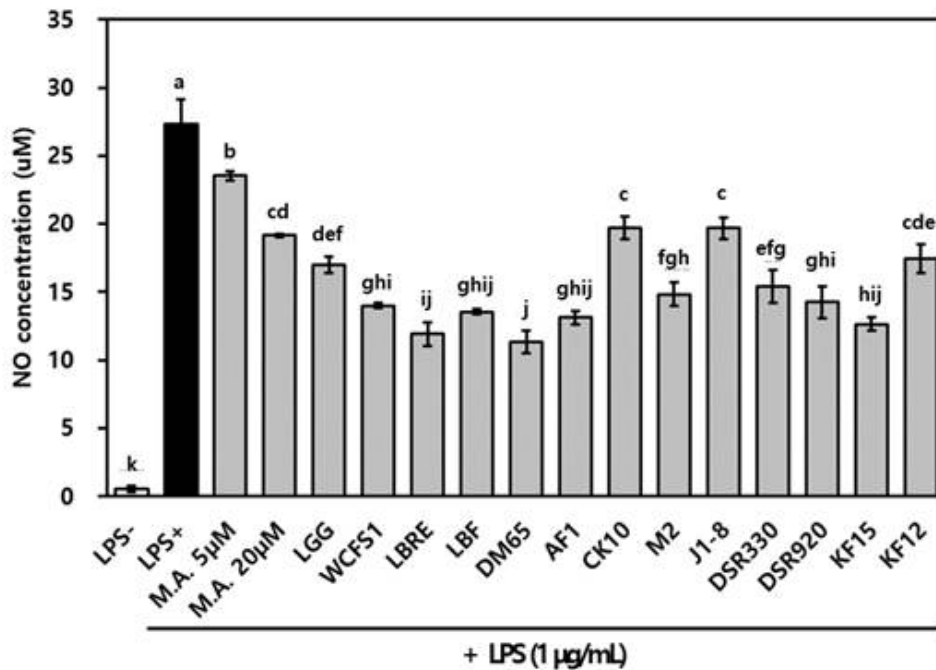
○ 김치종균으로 최종 선별된 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* DRC 1506을 김치 전 제품에 적용하였으며 연평균 약 2천억원의 매출을 기록하고 있음.

○ 최종 선별된 건강 유산균 발효 종균 *Lactobacillus reuteri* EFEL6901을 백김치에 적용하여 상품화했으며 2021년 총 6억 4,500만원의 매출액 달성함





		고혈압		
7	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSR920	대사질환, 염증 질환 예방	대상	DSR920
8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSR M2	항바이러스, 질염/요로감염 예방, 항염증, 당뇨/고혈압	대상	M2
9	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSR KF12	항균, 항진균	대상	KF12
10	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSR KF15	항균, 항진균	대상	KF15
11	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> AF1	항진균	대상	AF1
12	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> J1-8	-	대상	J1-8
13	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> DM65	-	닥스메디	DM65



<Figure 1> Effects of heat-killed bacteria on nitric oxide in LPS-induced Raw 264.7 cells. M.A., methyl arginine. NO inhibition was measured by Griess reaction assay. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations (n=3). Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

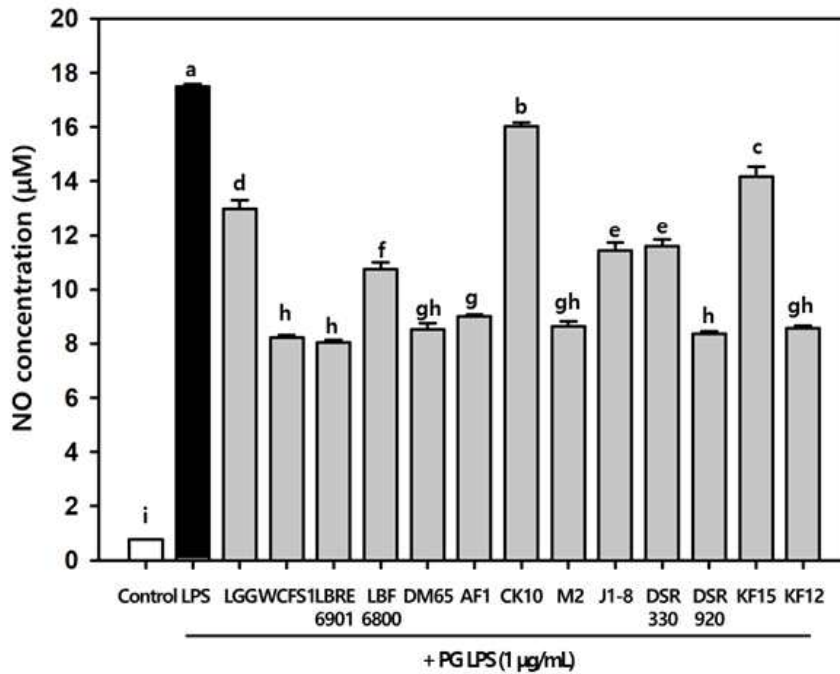
○ 항염증 활성 측정: *Porphyromonas gingivalis*(*P.gingivalis*) 유래 lipopolysaccharide로 유도한 RAW 264.7 대식세포에서산화 질소 (Nitric oxide, NO) 억제능

- 후보 유산균의 항염증 활성을 분석하기 위해 RAW 264.7 대식세포 ( $2 \times 10^5$  cells/well)에 열 불활성화 유산균 시료(Heat-killed cell)와 치주질환 원인 세균인 *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) 유래 lipopolysaccharide (PG LPS, 1ug/mL)를 첨가하여 24시간 동안 자극하여 염증 매개물질인 nitric oxide (NO)를 과다 생성시킨 후, Griess reaction을 통해 균주의 NO 억제 활성을 측정하였음

- 그 결과, PG LPS 처리시 NO 농도가 현저히 증가하였으며, 테스트된 모든 열 불활성화 유산균 시

료 (Heat-killed cell)는 유의적으로 NO를 억제하였음

-*Lactiplantibacillus plantarum* CK10, *L. plantarum* KF15를 제외한 균주들은 LGG보다 낮거나 WCFS1과 유사하게 NO를 유의하게 억제하였음



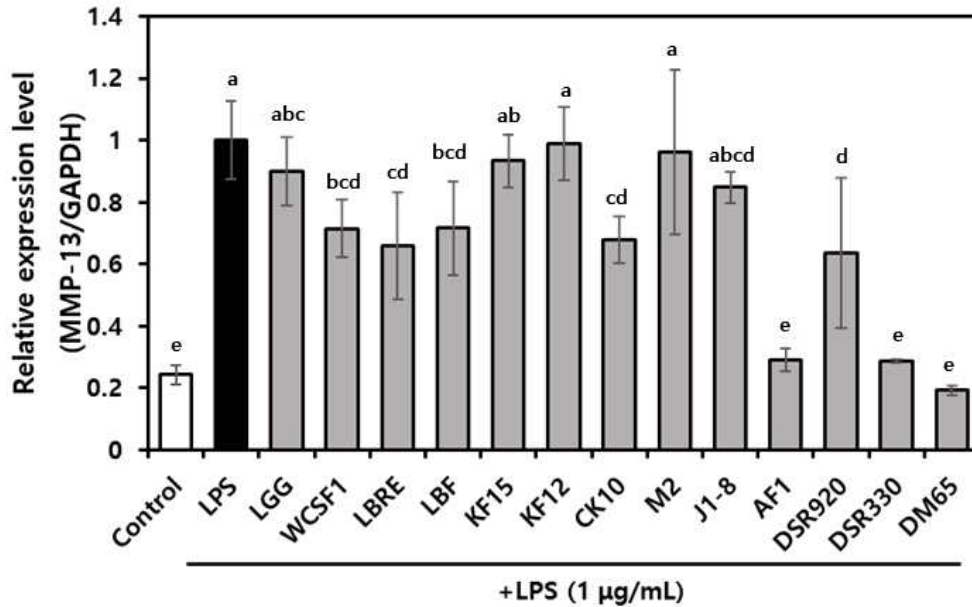
<Figure 2> Effects of heat-killed bacteria on nitric oxide in PG LPS-induced Raw 264.7 cells. NO inhibition was measured by Griess reaction assay. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations (n=3). Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

○ 항염증 활성 측정: 단백분해효소 (MMP-13) 발현양 측정

- 후보 유산균의 치주 조직이나 결합 조직을 분해하는 단백분해효소인 matrix metalloproteinase-13 (MMP-13)의 생성 억제능을 분석하기 위해 YD-38 치은 상피세포( $1 \times 10^6$  cells/well)에 열 불활성화 유산균 시료와 대장균 유래 LPS 1ug/mL를 첨가하여 24시간 동안 자극한 뒤, RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 GAPDH, MMP-13 primer를 사용하여 mRNA 발현양을 측정하였음

- 그 결과, LPS를 자극하지 않은 안정한 상태에서의 YD-38 cell에서 MMP-13의 mRNA 발현은 거의 확인되지 않았지만, LPS 자극에 의해 발현양이 현저하게 증가되었음

-*L. plantarum* DSR KF15, *L. plantarum* DSR KF12, *L. plantarum* DSR M2, *L. plantarum* DSR J1-8를 제외한 모든 열 불활성화 시료는 MMP-13의 발현을 유의하게 억제하였고, 이는 양성대조군인 WCFS1과 유사하였음



<Figure 3> Effects of heat-killed bacteria on mRNA expression of MMP-13 in PG LPS-induced YD-38 cells were measured after 24 h. Expressed mRNA levels of MMP-13 were determined by real-time PCR. Cells were treated with heat-killed bacteria and stimulated with PG LPS for 24 h. Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

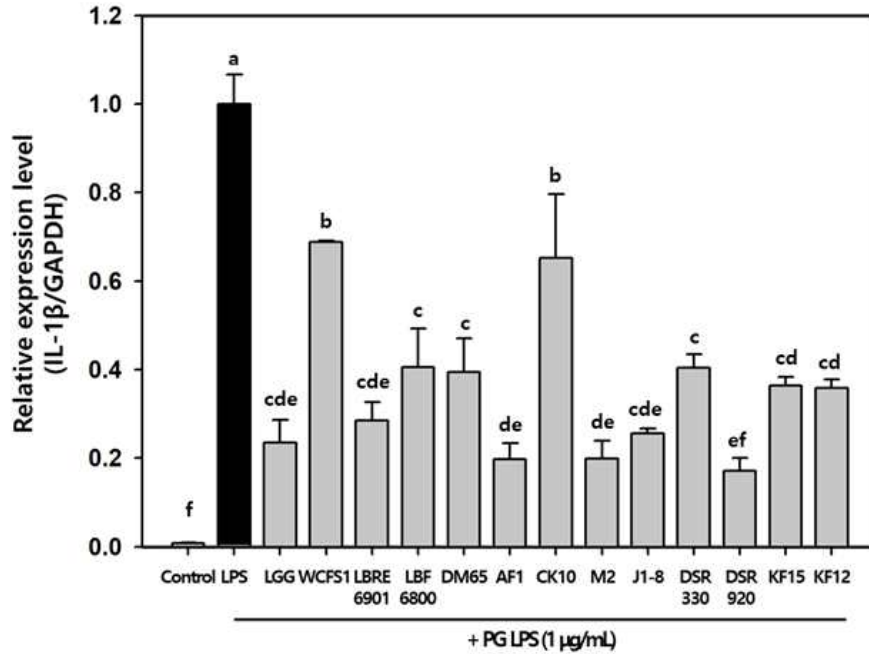
○ 항염증 활성 측정: 염증 관련 유전자(IL-1 $\beta$ , IL-6) 발현양 측정

- 후보 유산균의 항염증 활성을 분석하기 위해 RAW 264.7 대식세포 ( $1 \times 10^6$  cells/well)에 열 불활성화 유산균 시료와 *P. gingivalis* 유래 lipopolysaccharide (PG LPS, 1ug/mL)를 첨가하여 24시간 동안 자극한 뒤, RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 GAPDH, IL-1 $\beta$ , IL-6 primer를 사용하여 염증 관련 물질의 mRNA 발현양을 측정하였음

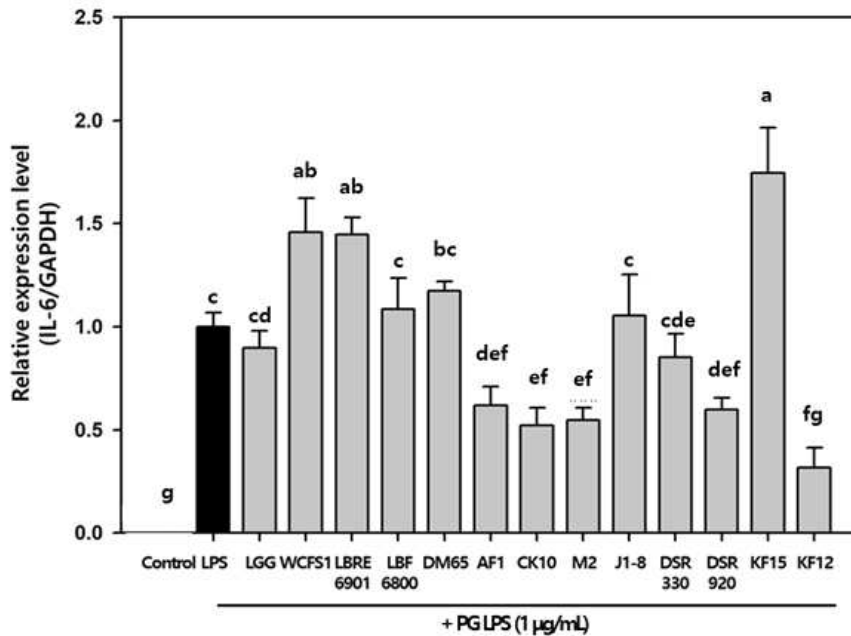
- 그 결과 테스트된 대부분의 열 불활성화 시료는 PG LPS 자극에 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 mRNA 발현을 유의하게 억제하였으며, 그 효과는 양성대조구인 LGG, WCSF1과 유사하거나 더 낮았음

-모든 열 불활성화 시료는 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현양을 유의적으로 감소시켰으며, *L. plantarum* AF1, *L. plantarum* CK10, *L. plantarum* DSR M2, *L. plantarum* DSR330, *L. plantarum* DSR920, *L. plantarum* DSR KF12의 열 불활성화 시료는 IL-6의 발현을 유의하게 억제하였음

A



B



<Figure 4> Effects of heat-killed bacteria on mRNA expression of IL-1 $\beta$  (A) and IL-6 (B) in PG LPS-induced RAW 264.7 cells were measured after 24 h. Expressed mRNA levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 were determined by real-time PCR. Cells were treated with heat-killed bacteria and stimulated with PG LPS for 24 h. Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

▶ 최종적으로 NO생성을 저해시키고 염증성 물질(IL-1 $\beta$ , IL-6) 및 단백분해효소(MMP-13)의 mRNA 발현양을 억제하여 우수한 항염 활성을 내는 2종 *L. plantarum* DSR920과 *L. rhamnosus* DM65의 균주를 선발함

## 2. 구강 건강 혼합 균주 시너지 효과 분석

### ○ 선발 균주의 혼합 비율 설정

- 선발된 *L. plantarum* DSR920과 *L. rhamnosus* DM65의 열 불활성화 시료를 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1로 비율을 선정하여 사용함

<Table 2> List of strains used in this study

Strains	Properties	Note	Code
1 <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG	상업적 균주	Positive control	LGG
2 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> WCFS1	상업적 균주	Positive control	WCFS1
3 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSR920	대사질환, 염증 질환 예방	대상	DSR920
4 <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> DM65	-	닥스메디	DM65

<Table 3> List of mixed strains in this study

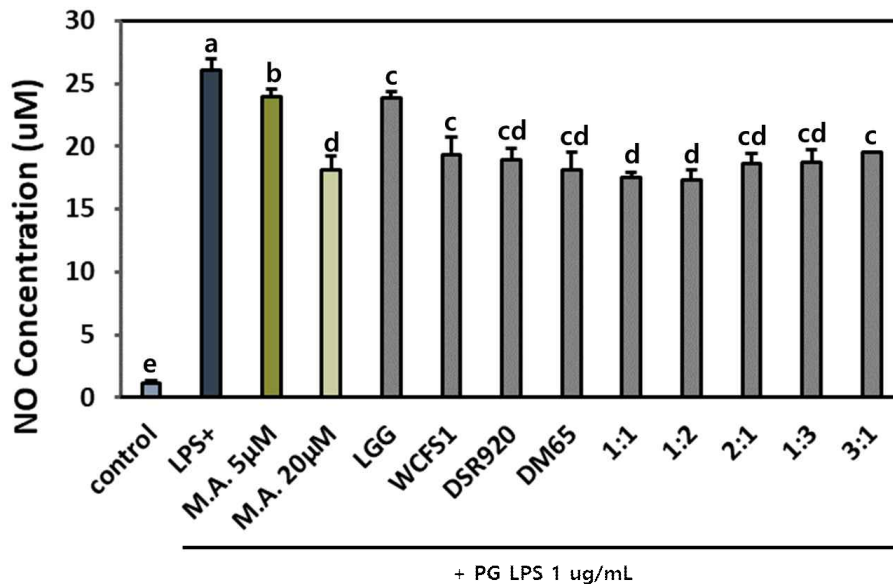
Strains	Ratio	Code
1	1:1	1:1
2 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSR920 :	1:2	1:2
3	2:1	2:1
4 <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> DM65	1:3	1:3
5	3:1	3:1

### ○ 혼합 균주의 항염증 활성 측정: *Porphyromonas gingivalis* 유래 lipopolysaccharide로 유도한 RAW 264.7 대식세포에서산화 질소 (Nitric oxide, NO) 억제능

- 혼합 균주의 항염증 활성을 분석하기 위해 RAW 264.7 대식세포( $2 \times 10^5$  cells/well)에 열 불활성화 유산균 시료(Heat-killed cell)와 치주질환 원인 세균인 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 유래 lipopolysaccharide (PG LPS, 1ug/mL)를 첨가하여 24시간 동안 자극하여 염증 매개물질인 nitric oxide (NO)를 과다 생성시킨 후, Griess reaction을 통해 균주의 NO 억제 활성을 측정하였음

- 그 결과, LPS 처리시 NO 농도가 현저히 증가하였으며, NO 합성 효소 저해제인 메틸 아르기닌 처리는 LPS 처리 군에 비해 용량 의존적으로 NO 생성을 억제하였으며( $p < 0.001$ ), 테스트된 모든 열 불활성화 균주 (Heat-killed cell)은 WCFS1과 유사하게 NO를 유의하게 억제하였음

- 단일 균주와 혼합 균주 간 NO 억제능이 큰 차이를 보이지는 않음



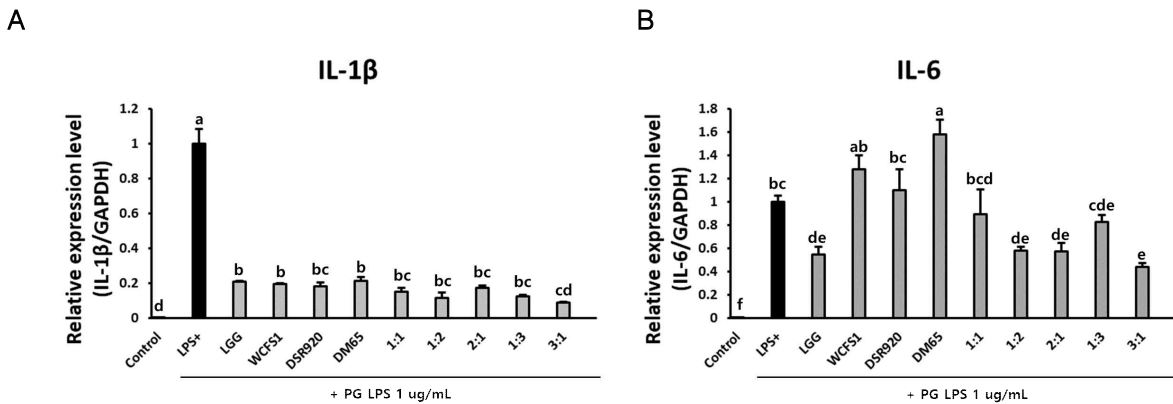
<Figure 5> Effects of mixed heat-killed bacteria on nitric oxide in PG LPS-induced Raw 264.7 cells. NO inhibition was measured by Griess reaction assay. M.A, methyl arginine. The mixing ratio of DSR920 and DM65 is as follows; 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations (n=3). Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

○ 혼합 균주의 항염증 활성 측정: 염증 관련 유전자(IL-1 $\beta$ , IL-6) 발현양 측정

- 선발된 혼합 균주의 항염증 활성을 분석하기 위해 RAW 264.7 대식세포( $1 \times 10^6$  cells/well)에 열 불활성화 유산균 시료와 PG LPS, 1 ug/mL를 첨가하여 24시간 동안 자극한 뒤, RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 GAPDH, IL-1 $\beta$ , IL-6 primer를 사용하여 염증 관련 물질의 mRNA 발현양을 측정하였음

- 그 결과, 테스트된 모든 혼합 균주의 열 불활성화 시료는 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현을 유의하게 억제하였으며, 그 효과는 양성 대조구인 LGG, WCFS1과 유사하였음

- DSR920 3: DM65 1 혼합 균주는 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 발현양을 가장 유의적으로 억제하였으며, 단일 균주 처리와 비교했을 때 시너지 효과를 보임



<Figure 6> Effects of mixed heat-killed bacteria on mRNA expression of IL-1 $\beta$  (A) and IL-6 (B) in PG LPS-induced RAW 264.7 cells were measured after 24 h. Expressed mRNA levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 were determined by real-time PCR. Cells were treated with mixed heat-killed bacteria and stimulated with PG LPS for 24 h. The mixing ratio of DSR920 and DM65 is as follows; 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1. Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

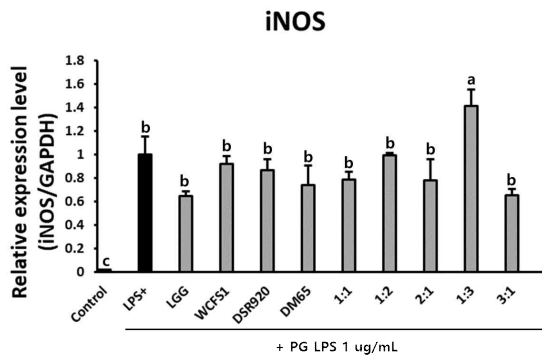
○ 항염증 활성 측정: 염증 관련 유전자(iNOS, COX-2) 발현양 측정

- 선발 혼합 균주의 염증 매개 물질 억제능을 분석하기 위해 RAW 264.7 대식세포( $1 \times 10^6$  cells/well)에 유산균 열 불활성화 단일 및 혼합 시료(Heat-killed cell)와 PG LPS 1ug/mL를 첨가하여 24시간 동안 자극한 뒤, RNA를 추출하고, cDNA를 합성하였음. 이후, GAPDH, iNOS, COX-2 primer를 사용하여 염증 관련 물질의 mRNA 발현양을 측정하였음

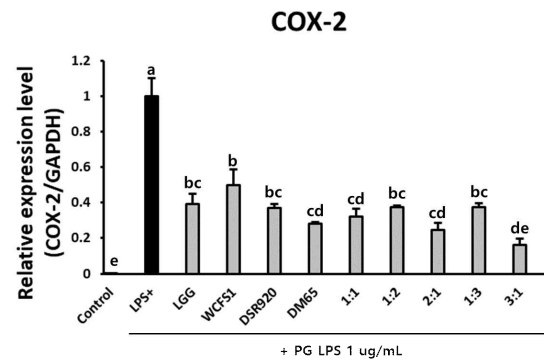
- 그 결과, 대부분의 열 불활성화 단일 시료 및 혼합 시료는 iNOS와 COX-2의 발현양을 유의적으로 억제하였음

- iNOS와 COX-2의 mRNA 발현양을 가장 유의적으로 억제한 시료는 DSR920 3 : DM65 1 혼합 시료이며, 단일 시료 처리와 비교했을 때 시너지 효과를 보임

A



B



<Figure 7> Effects of mixed heat-killed bacteria on mRNA expression of iNOS (A) and COX-2 (B) in PG LPS-induced RAW 264.7 cells were measured after 24 h. Expressed mRNA levels of iNOS and COX-2 were determined by real-time PCR. Cells were treated with mixed heat-killed bacteria and stimulated with PG LPS for 24 h. The mixing ratio of DSR920 and DM65 is as follows; 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1. Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

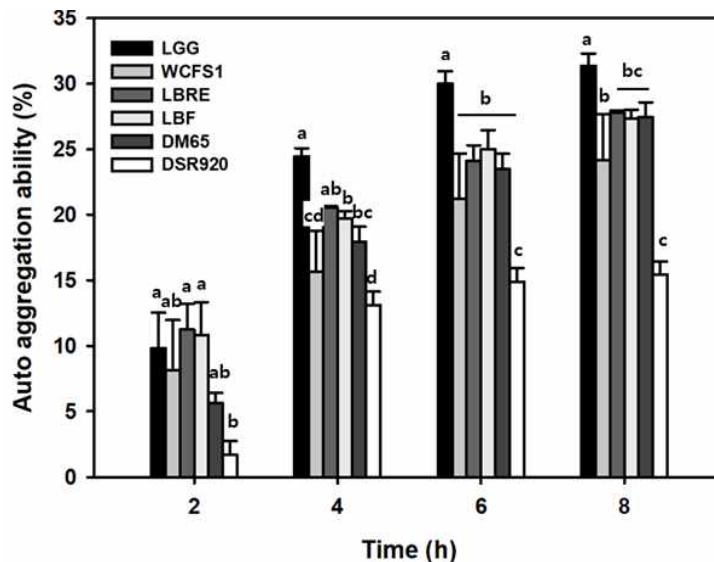
### 3. 구강 건강 우수 균주의 특성 분석

#### ○ 구강 건강 우수 균주의 자가 응집능(auto-aggregation ability) 측정

- 숙주의 점막 표면 접착에 도움을 주는 자가 응집능을 평가하기 위해 균주를 phosphate buffer saline에 현탁시킨 후 8시간 동안 2시간 간격으로 600nm에서 흡광도를 측정함

- 그 결과, 균주 간 접촉 시간의 연장에 따라 자동 응집 능력이 점진적으로 증가하였으며, *L. plantarum* DSR920을 제외한 *L. reuteri* EFEL6901, *L. fermentum* EFEL6800, *L. rhamnosus* DM65의 효과가 양성대조군인 *L. plantarum* WCFS1보다 높았음

- 우수한 공동 응집 능력은 균주가 구강에서 점막 표면에 잘 집락화할 수 있고 다른 박테리아 종의 세포를 제거하는데 도움이 되며 유해균의 집락화를 억제할 수 있음을 나타냄



<Figure 8> Auto-aggregation ability of each strain (%). Results are expressed as means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

#### ○ 구강 건강 우수 균주의 유기 용매에 대한 표면 소수성(surface hydrophobicity) 분석

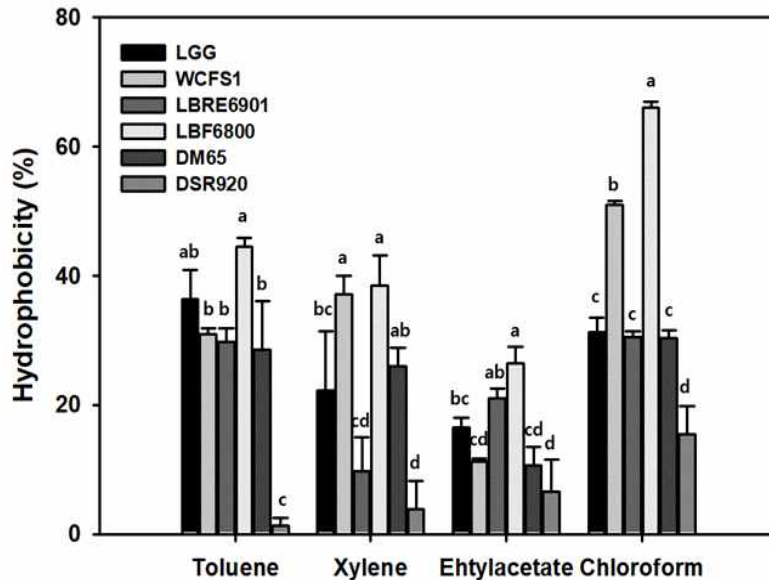
- 균주와 환경 또는 숙주 사이의 상호 작용의 강도에 영향을 줄 수 있는 세포 표면 소수성을 측정하기 위해 microbial adhesion to hydrocarbons(MATH) assay를 이용함. 동일한 균주의 균주를



phosphate buffer saline에 세척한 후, toluene, xylene, ethylacetate, chloroform과 희석하여 30분 간 실온에서 배양하고 수용층의 600nm에서 흡광도를 측정함

- 그 결과, 유기용매에 대한 소수성 능력은 *L. fermentum* EFEL6800이 가장 우수했으며 상업적 균주보다 그 효과가 우수함. *L. reuteri* EFEL6901과 *L. rhamnosus* DM65의 효과는 비슷한 수준이었으며 *L. plantarum* DSR920이 가장 낮은 효과를 보임

- 높은 박테리아 표면 소수성이 숙주 상피 세포에 대한 박테리아 부착을 강화하여 박테리아와 숙주 상호작용을 높일 수 있음을 나타냄

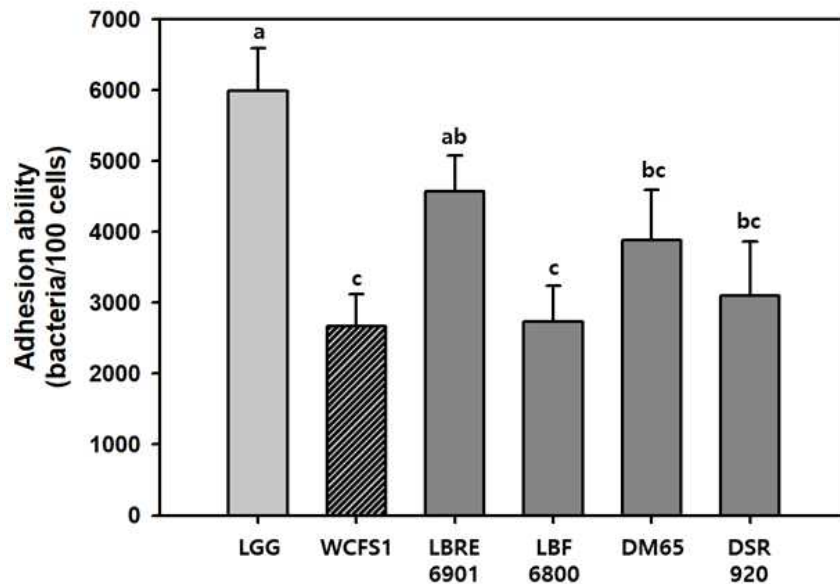


<Figure 9> Adhesion ability of 6 LAB strains to YD-38 as human gingival epithelial cell. Results are expressed as means  $\pm$  SD (n = 3). Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

### ○ 구강 건강 우수 균주의 구강 상피세포 부착능 평가

- 구강 상피세포 부착능을 평가하기 위해 폴리스틸렌 막(polystyrene membrane)처리가 된 well plate를 사용하여 치은 상피 세포주인 YD-38를 monolayer로 배양한 후 구강과 유사한 환경을 조성하여 실험에 사용. 그 위에  $10^8$  CFU/mL까지 배양한 균주를 접종하고, 2시간 동안 배양 후 cell monolayer에 붙은 균을 계수하는 방법으로 후보 균주의 구강내 안정성을 비교함

- 그 결과, 대조균으로 사용한 LGG보다 구강 상피세포 부착능이 낮았으나 그 중 *L. reuteri* EFEL6901, *L. rhamnosus* DM65, *L. plantarum* DSR920 균주가 WCFS1보다 높은 부착능을 보임



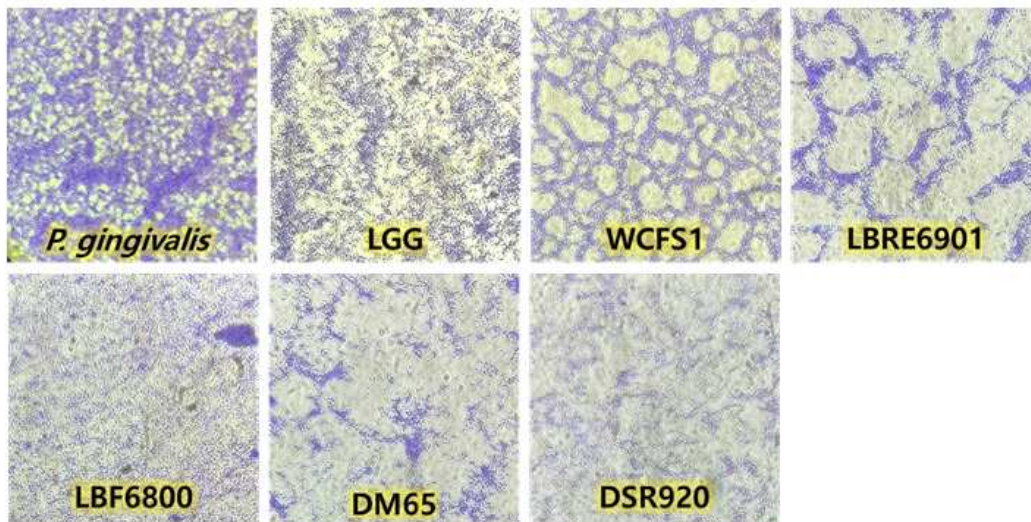
<Figure 10> Adhesion ability of 6 LAB strains to YD-38 as human gingival epithelial cell. Results are expressed as means  $\pm$  SD (n = 3). Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

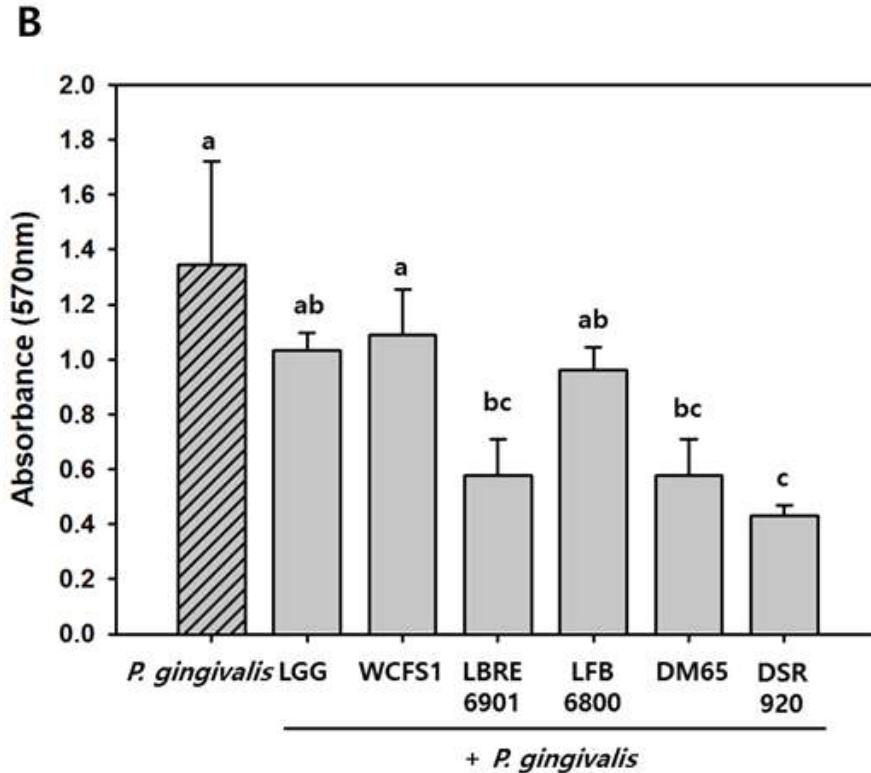
○ 구강 건강 우수 균주의 유해균 생물막 생성 억제능 평가

- 균주의 항균활성을 평가하기 위해, 치주질환의 주된 원인균인 *P. gingivalis*를 단독으로 배양하거나 유산균과 48시간 동안 공동배양한 후 1% crystal violet으로 염색하여 생성된 biofilm을 현미경으로 관찰하고 99% isopropanol로 용해시켜 570nm에서 흡광도를 측정함

- Biofilm inhibition assay 결과, *L. reuteri* EFEL6901, *L. rhamnosus* DM65, *L. plantarum* DSR920균주가 유의적으로 억제하였으며 이는 구강 병원성의 집락형성 및 성장을 억제할 수 있음을 나타냄

**A**





<Figure 11> *P. gingivalis* biofilm inhibition by 6 lactic acid bacteria. Microscopy images (A) of *P. gingivalis* biofilm treated with 6 LAB strains *P. gingivalis* biofilm stained with 1% crystal violet after cultured for 48 h. Absorbance value (B) at 570nm of 6 LAB on biofilm formation of *P. gingivalis*. Results are expressed as means  $\pm$  SD (n = 3). Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

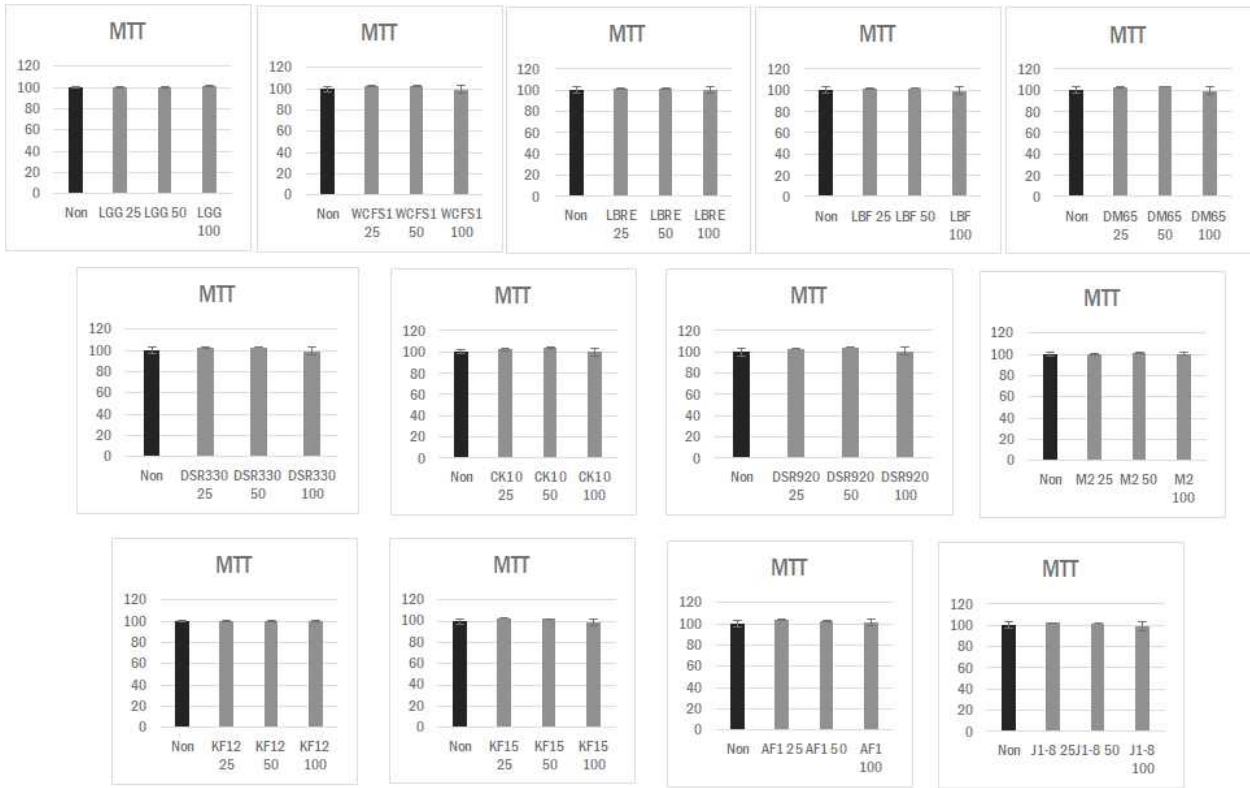
#### 4. 비알콜성 간건강 프로바이오틱스 우수 후보 발굴

##### ○ 세포독성 측정 : HepG2 인간 간암세포에서 후보 유산균의 세포독성 확인

- 후보 유산균의 세포 독성을 분석하기 위해 HepG2 인간 간암세포( $5 \times 10^4$  cells/well)에 열 불활성화 유산균 시료 (Heat-killed cell)를 농도별 (0,  $1.25 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  cells/well)를 첨가하여 24시간 동안 동시 배양한 후, MTT assay를 통해 균주의 세포독성을 측정하였음

- 그 결과, 테스트된 모든 열 불활성화 균주 (Heat-killed cell)은 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았음

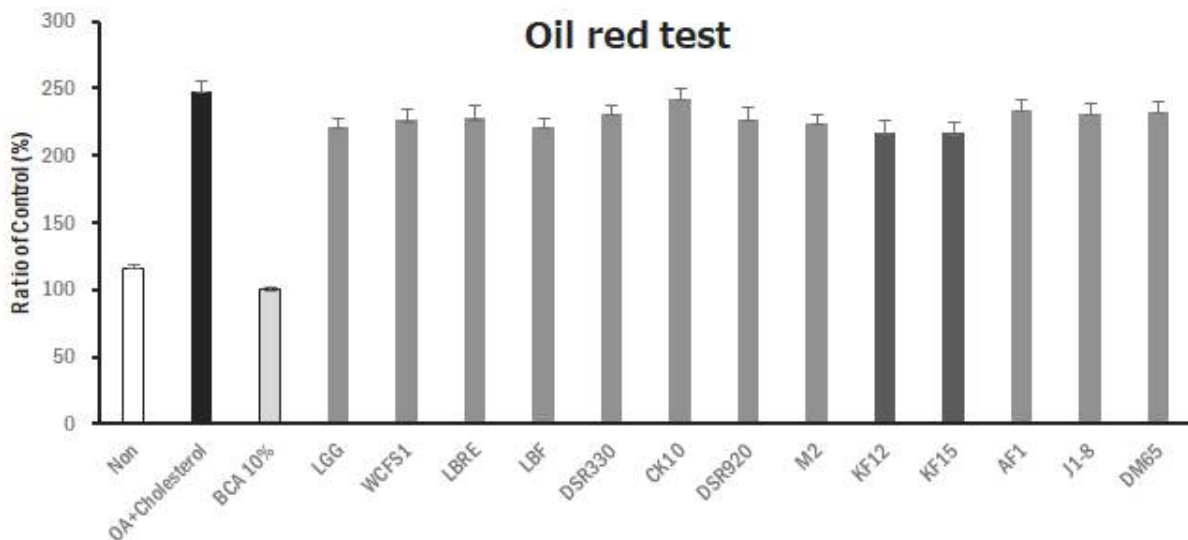
- 연속된 세포 실험은 열 불활성화 유산균 시료 (Heat-killed cell)를 가장 높은 농도 ( $5 \times 10^4$  cells/well)를 첨가하여 진행하였음



<Figure 12> Cytotoxicity of heat-killed bacteria in HepG2 hepatocytes

○ HepG2 간세포에서 지질 축적 감소 효능 평가

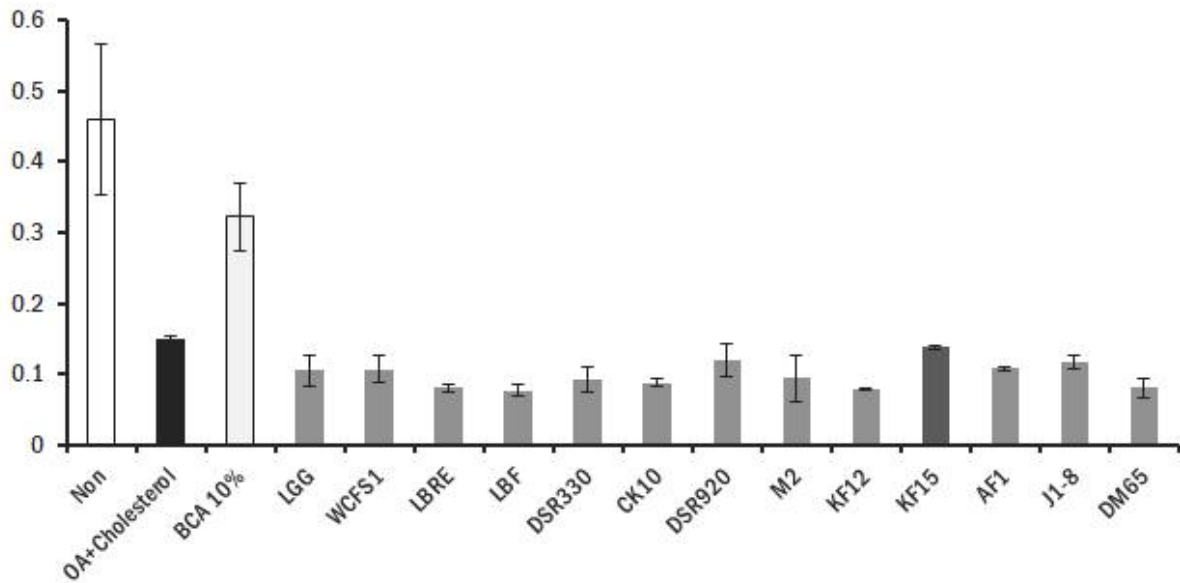
- 후보 유산균의 세포 독성을 분석하기 위해 HepG2 인간 간암세포( $5 \times 10^4$  cells/well)에 열 불활성화 유산균 시료와 1mM oleic acid + 75 ug/ml cholesterol를 첨가하여 6시간 동안 지질 축적을 유도한 뒤, oil red로 15분 염색하고 수회 워싱 한 후 100% isopropanol로 10분간 용해하였음
- 용해한 isopropanol을 510 nm에서 흡광도를 측정하여 비율로 지질 축적을 나타낸 결과, *L. plantarum* KF12와 *L. plantarum* KF15가 가장 지질 축적을 억제하였음



<Figure 13> Oil red test of heat-killed bacteria in HepG2 hepatocytes

### ○ HepG2 간세포 내 콜레스테롤 축적 감소 효능 평가

- 후보 유산균의 세포 독성을 분석하기 위해 HepG2 인간 간암세포( $5 \times 10^4$  cells/well)를 배양하고 24시간 전에 serum free 배지로 바꾸어줌. 열 불활성화 유산균 시료를 첨가하여 2시간 동안 배양한 후, 1mM oleic acid + 75 ug/ml cholesterol를 첨가하여 6시간 동안 콜레스테롤 축적을 유도한 뒤, 상등액을 제거하고 RIPA buffer를 이용하여 세포를 용해하였음
- 용해한 샘플을 콜레스테롤 ELISA kit를 이용하여 측정한 결과, 1mM oleic acid + 75 ug/ml cholesterol 처리시 세포 내 콜레스테롤 양이 감소하였고, 대부분의 열 불활성화 유산균 시료 처리 군에서 세포 내 콜레스테롤 양이 보다 더 감소하였으나, *L. plantarum* KF15 처리군에서는 더 감소하지 않았음



<Figure 14> Cholesterol level ratio of heat-killed bacteria in HepG2 hepatocytes

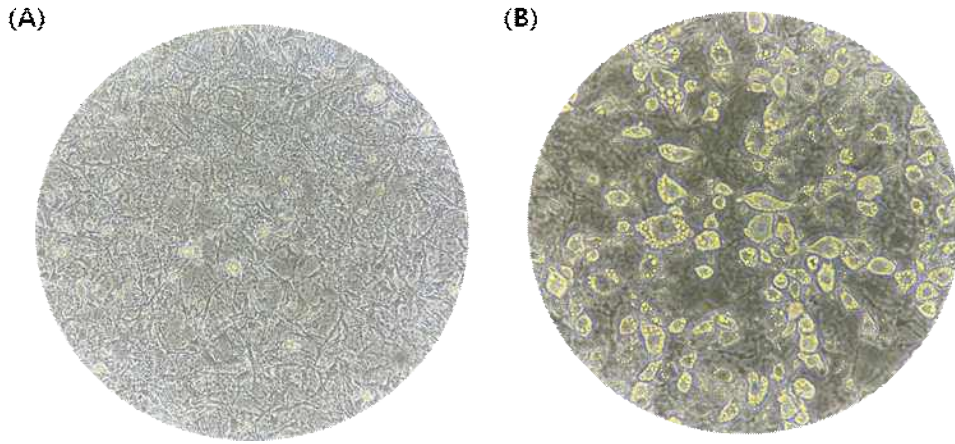
### 제2 세부과제 (체지방 감소, 호흡기 건강)

#### 1. 포스트게놈 다부처 유전체 사업에서 도출된 김치 유산균의 체지방 감소 *in vitro* 기능성 탐색 및 효과 검증

##### ○ 지방전구세포(3T3-L1 cell line) 분화 유도 및 실험 균주 전처리

- 지난 포스트게놈 다부처 유전체 사업에서 장건강 김치 유산균으로 발굴한 *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901과 *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800 균주의 체지방 감소 건강기능성 평가를 위하여 식품의약품안전처에서 제공한 건강기능 식품 가이드라인에 따라 3T3-L1 pre-adipocyte를 이용하여 분석하였음

- America type culture collection (ATCC)의 분화 조건에 따라 1.0  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM IBMX 및 1.0  $\mu$ g/mL insulin (MDI 유도 배지)를 이용하여 분화를 유도하였고, 현미경을 통해 지질 축적을 관찰함



<Figure 15> Microscopic observation results (A) before and (B) after differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

- *L. reuteri* EFEL6901과 *L. fermentum* EFEL6800 선발 균주를 121°C에서 90분으로 열 불활성화 시킨 균주(heat-killed)와 대사산물이 포함되어 있는 상층액 두가지 성분의 세포독성 평가를 진행하였음

<Table 4> List of strains used in this study

NO.	Samples	Properties	Code
1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG	Commercial strain	LGG
2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> EFEL6901	Health benefits for IBD	LBRE
3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> EFEL6800		LBF
4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> EFEL6501	$\beta$ -glucosidase activity	B1

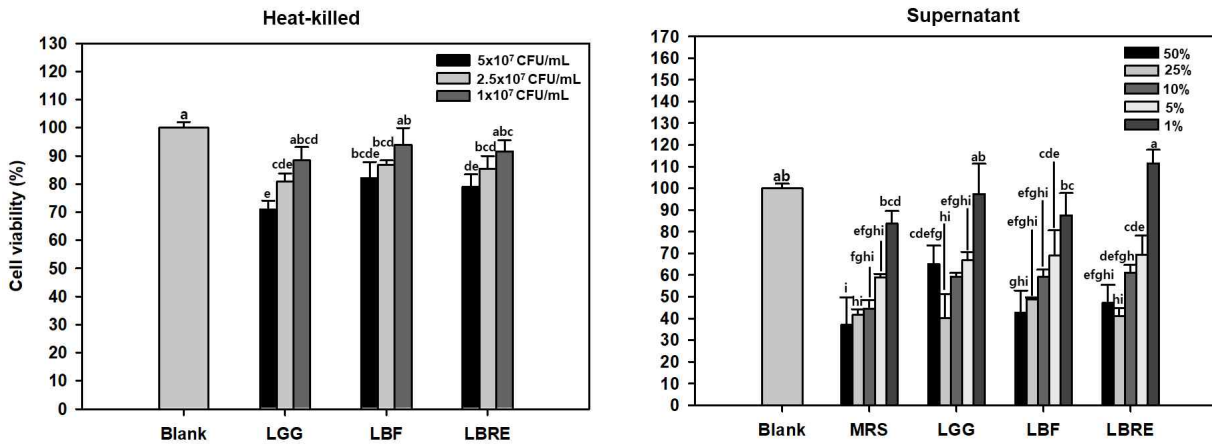
<Table 5> Preparation of bacterial strains used to evaluate the cytotoxicity of lactic acid bacteria in 3T3-L1 preadipocytes

Terminology	Methods	Components
CFS (cell free supernatants)	① Adjust the OD <sub>600</sub> of bacteria cells to 1 in MRS broth (bacterial cell cultures OD <sub>600</sub> of 1.0 = 5 x 10 <sup>8</sup> cells/ml) ② Centrifuge and filtering supernatant for use	Metabolites without whole cell
Heat killed cell	① Adjust the OD <sub>600</sub> of bacteria cells to 1 in MRS broth (bacterial cell cultures OD <sub>600</sub> of 1.0 = 5 x 10 <sup>8</sup> cells/ml) ② Cell pellets were rinsed twice with PBS ③ Treatment with 90°C for 30min ④ Use of 5x10 <sup>7</sup> bacterial cells/well (=2.5 X 10 <sup>8</sup> CFU/mL)	Intracellular extracts + Cell fragments



○ 균주 처리 시 농도 선정을 위한 세포 독성 평가 분석

- 세포독성 평가 결과 열 불활성화 균주 처리를 했을 때는 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았고, 상층액 성분의 경우 50%와 25%의 농도에서 세포 독성이 나타났음. 따라서, 이후 실험에서는 열 불활성화 균주의 경우,  $1 \times 10^7$  CFU/mL, 상층액의 경우 10-1% 사이의 농도로 처리하여 체지방 감소 실험을 진행하였음



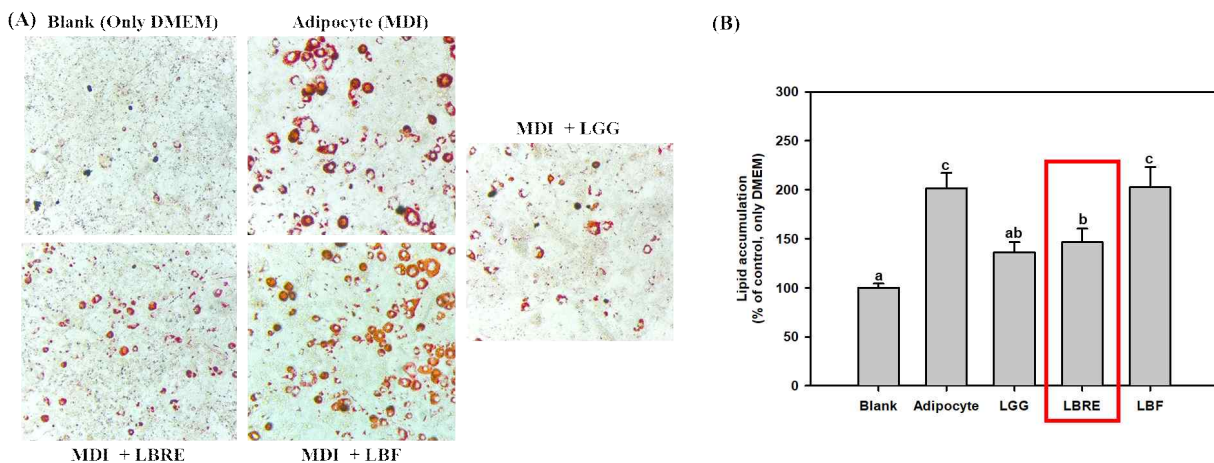
<Figure 16> Effects of various lactic acid bacteria derived components on 3T3-L1 cell viability. (A) Heat-killed cells. (B) Supernatant. Results are expressed as means ± standard deviations (n=3). Statistical significance between groups was determined by ANOVA when  $p < 0.05$ .

○ 균주의 열 불활성화 및 상층액 성분의 체지방 축적 감소 평가

- 체지방 축적 감소 평가를 위해 3T3-L1 cell을  $1 \times 10^6$  cell/well의 농도로 6 well에 seeding한 후 세포가 confluency에 도달할 때까지 배양하여 분화를 유도하였으며, 이 때 세포 배지 교체와 함께 제조한 박테리아 샘플을 처리하였음

- 분화 9일차에 지질 축적억제 실험을 위해 세포를 10%의 포르말데하이드로 고정하여 60%의 Oil red O 염색 시약을 이용해 지방구를 염색하였고, 이를 현미경으로 관찰한 후, 410nm에서 흡광도를 측정하였음

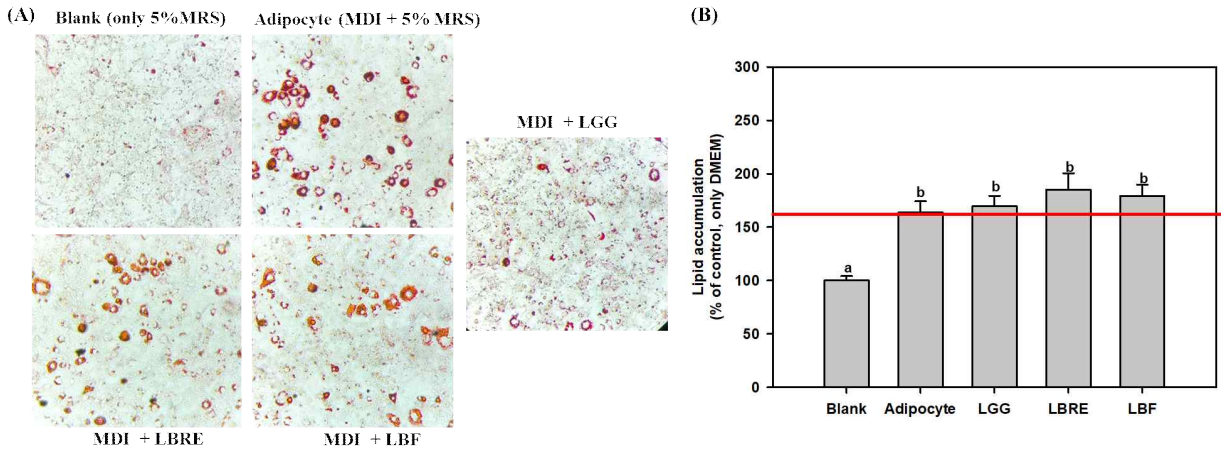
- 실험 결과, 열 불활성화 시료의 경우 *L. fermentum* EFEL6800 (LBF)는 지질 축적 감소 효과가 나타나지 않았으며, *L. reuteri* EFEL6901 (LBRE)의 경우에는 positive control로 사용한 *L. rhamnosus* GG (LGG)와 비슷한 수준으로 지질 축적을 억제하였음 (50% 감소)



<Figure 17> Inhibitory effect of heat-killed LAB on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Cells were treated with heat-killed LAB at  $1 \times 10^7$  CFU/mL concentration. (A) Images of Oil red O-stained 3T3-L1 cells on plates. (B) Levels of oil accumulation were determined by quantifying Oil red O staining. Results are expressed as means ± standard deviations (n=3).

Statistical significance between groups was determined by ANOVA when  $p < 0.05$ .

- 상층액 성분의 경우, 모든 균주에서 지질 축적 감소 효과가 나타나지 않음



<Figure 18> Impact of various LAB at culture supernatant on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Cells were treated with 5% of LAB culture supernatant. (A) Images of Oil red O-stained 3T3-L1 cells on plates. (B) Levels of oil accumulation were determined by quantifying Oil red O staining. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations ( $n=3$ ). Statistical significance between groups was determined by ANOVA when  $p < 0.05$ .

▶ 앞선 결과를 토대로 지방 세포 분화 관련 바이오마커들의 유전자 발현 수준 평가를 위해 RT-qPCR을 이용한 실험 조건을 설정하였음 (Table 6)

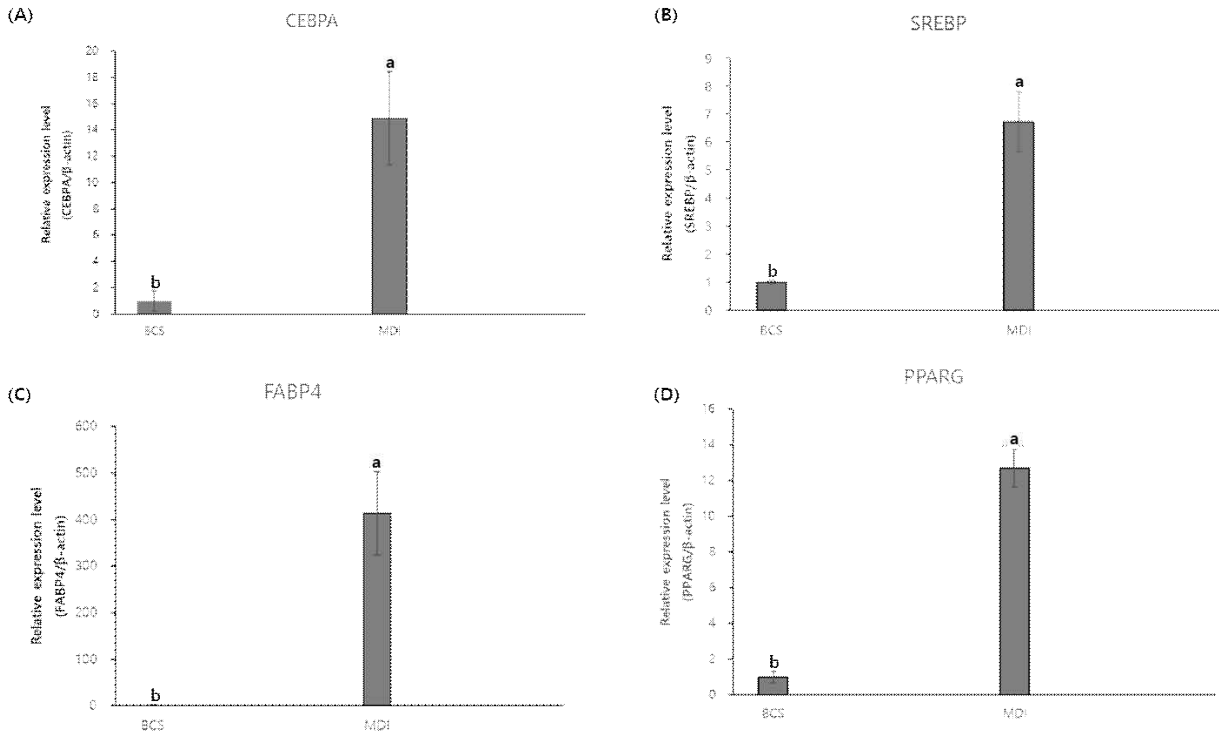
<Table 6> Primer sequences used for qRT-PCR.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
$\beta$ -actin	TACAGCTTCACCACCACAGC	GGAAAAGAGCCTCAGGGCAT
PPARG (PPAR $\gamma$ )	AAGGGTGCCAGTTTCGATCC	AAGGGTGCCAGTTTCGATCC
CEBPA (CEBP $\alpha$ )	TGCTGGAGTTGACCAGTGAC	AACCATCCTCTGGGTCTCCA
SREBF1 (SREBP-1c)	GATGCGGCTGTTGTCTACCA	TTGGGAGGCTGGTTTTGACC
FABP4 (aP2)	GCCCAACATGATCATCAGCG	TGGTCGACTTTCATCCCAC

- 사용한 프라이머의 특이성을 확인하기 위해 pre-adipocyte와 adipocyte 두 가지 조건을 이용해 지질 축적과 관련된 바이오마커들의 mRNA expression level을 측정하였음

- 실험 결과, 4가지 바이오마커 모두 pre-adipocyte (BCS)와 adipocyte (MDI)를 비교했을 때, adipocyte에서 유의적으로 발현량이 증가하여 분화 유도가 잘 이루어진 것을 알 수 있었음





<Figure 19> Comparison of the mRNA expression levels of adipogenic and lipogenic factors between adipocyte and pre-adipocyte in 3T3-L1 cells. (A) CEBP/α, (B) SREBP-1, (C) FABP4, (D) PPAR-γ. Results are expressed as means ± standard deviations (n=3). Statistical significance between groups was determined by ANOVA when  $p < 0.05$ .

- mRNA expression level 분석 조건 확립에 따라서 지난 실험에서 지질 축적 억제 효과가 나타났던 *L. reuteri* EFEL6901 열 불활성화 균주를 이용하여 유전자 발현수준을 측정중임 (12월 중 완료)

- 또한, 체지방 감소 효과를 가지는 새로운 균주 선발을 위해 현재 보유하고 있는 여러 식물 발효 식품 유래 유산균들을 이용하여 2차 실험을 계획중임 (12월 중 완료)

## 2. 호흡기 건강 프로바이오틱스 우수 후보 발굴

○ 항염증 활성 측정: 염증성 사이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α)와 염증 매개 물질(COX-2) 발현양 측정

- 선발 혼합 균주의 항염증 활성 및 염증 매개물질 억제능을 분석하기 위해 RAW 264.7 대식세포 ( $1 \times 10^6$  cells/well)에 유산균 혼합 시료 (Heat-killed cell)와 대장균 유래 lipopolysaccharide (LPS, 1 ug/mL)를 첨가하여 24시간 동안 자극한 뒤, RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 GAPDH, IL-1β, IL-6, TNF-α와 COX-2 primer를 사용하여 염증 관련 물질의 mRNA 발현양을 측정하였음

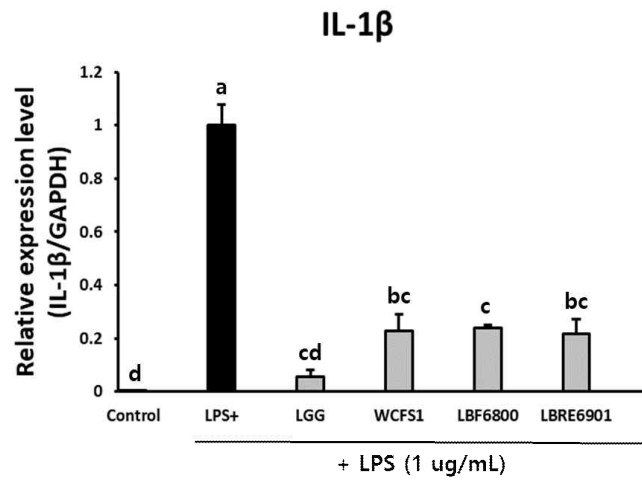
- 그 결과, 모든 열 불활성화 시료는 IL-1β, IL-6와 COX-2의 mRNA 발현을 유의하게 억제하였으며, 그 효과는 양성대조구인 WCFS1과 유사하거나 더 우수하였음

- LBRE6901균주가 항염증성 사이토카인과 염증 매개 물질의 mRNA 발현양을 가장 유의적으로 억제함

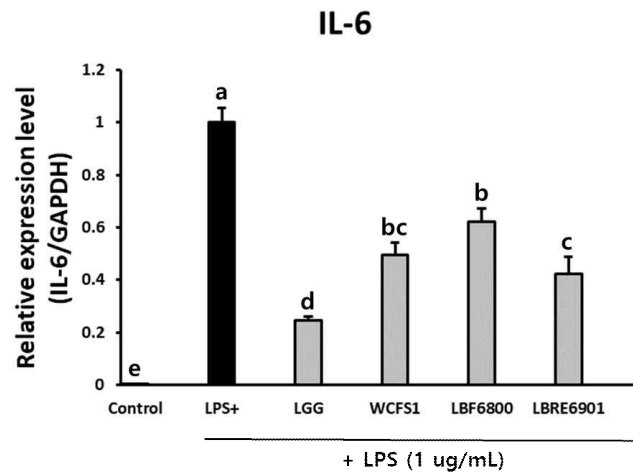
<Table 7> List of strains used in this study

	Strains	Properties	Note	Code
1	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG	상업적 균주	Positive control	LGG
2	<i>Lactoplantibacillus plantarum</i> WCFS1	상업적 균주	Positive control	WCFS1
3	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> EFEL6901	장 건강	충북대	EFEL6901
4	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> EFEL6800	장 건강	충북대	EFEL6800

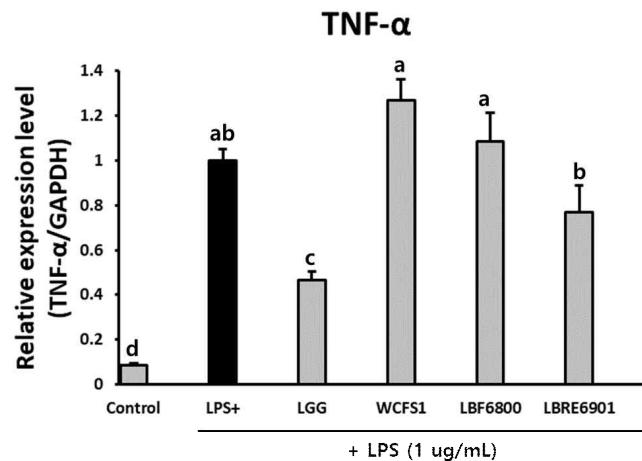
(A)



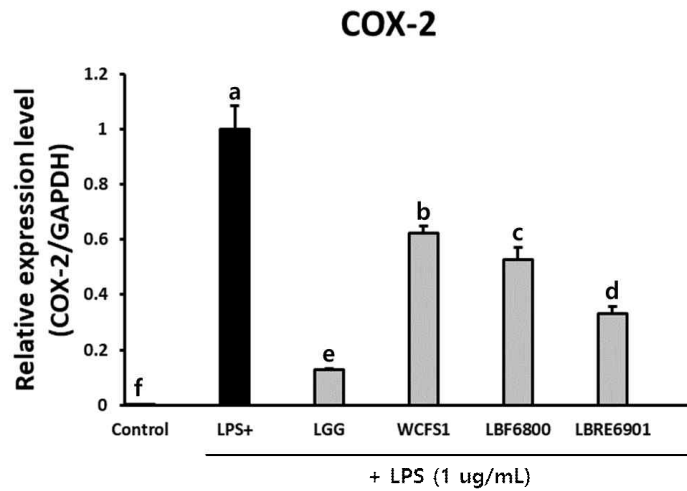
(B)



(C)



(D)



<Figure 20> Effects of heat-killed bacteria on mRNA expression of IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), TNF- $\alpha$  (C), and COX-2 (D) in LPS-induced RAW 264.7 cells were measured after 24 h. Expressed mRNA levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and COX-2 were determined by real-time PCR. Cells were treated with heat-killed bacteria and stimulated with LPS for 24 h. Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  according to Turkey's multiple range test.

▶ 2차년도

제1 세부과제 (구강(잇몸) 건강 및 비 알콜성 간 건강)

1. 구강 건강 인체적용 파일럿 실험

- 인체적용시험 경과보고서

인체적용시험 경과보고서  
Clinical Study Progress Report

잇몸 건강에 영향을 미치는 DM163 과 DSR920 복합유산균의 기능성을  
평가하기 위한 인체적용 파일럿 시험  
(IRB No. ATDH-2023-0002)  
Report ver. 1.0 / 2023. 10. 26

시험대상 품목	복합유산균 제재
임상시험책임자	사과나무의료재단 구강악안면외과 김영연 병원장
실시기관	사과나무의료재단 사과나무치과병원 (경기도 고양시 일산서구 중앙로 1450)
의뢰자	대상(주), (주)닥스메디오랄바이올
연구기간	2023. 08. 08 – 2024. 08. 31
임상연구계획서	Version 1.3 (2023. 10. 10)

\*본 임상시험결과보고서에 포함되어 있는 모든 정보는 관련 법규에서 정하거나 의뢰자가 인정하는 경우를 제외하고  
의뢰자의 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

**Confidential**

<b>경과보고서</b>	
임상시험 제목	잇몸 건강에 영향을 미치는 DM163과 DSR920 복합유산균의 기능성을 평가하기 위한 인체적용 파일럿 시험
임상시험 목적	(1) 복합균주의 복용이 잇몸건강 유지(개선)에 긍정적 영향을 미치는지 확인하기 위함 (2) 파일럿 연구 진행상황 및 결과를 토대로 본시험 진행 가능성 탐색 및 표본크기 산출에 활용하기 위함.
구분	<input checked="" type="checkbox"/> 단일기관 <input type="checkbox"/> 다기관
시험기관	사과나무의료재단 사과나무치과병원 (경기도 고양시 일산서구 중앙로 1450)
임상시험 책임자	사과나무치과병원 김영연 병원장
임상시험 의뢰자	대상(주), ㈜닥스메디오칼바이옴
시험 단계 및 디자인	단일기관, 이중눈가림, 층화무작위배정, 평행설계, 위약대조연구(single-center, double-blinded, parallel, stratified randomized controlled trial)
임상시험용 시작품	분말형태의 DM163과 DSR920 복합균주
대상자 질환	경미한 치주염이나 경미한 치주출혈
대상자 수	총 30명 (2개군: 시험군, 대조군)
섭취 기간	12주
IRB 승인 내역	2023.03.06. - 최초심의 신청(1차) 2023.03.10. - 보완승인(연구심의 신청서, 연구계획서, 증례기록지, 동의서 등 보완 조건) 2023.03.28. - 보완심의 신청(2차) 2023.04.03. - 보완승인(연구기간: 2023.04.03 - 2024.0.31) 2023.05.12. - 변경심의 신청(3차) (동의서, 증례기록서 등 보완) 2023.05.25. - 변경승인 2023.07.10. - 변경심의 신청(4차) (시험품 배합비 보완) 2023.07.18. - 변경승인 2023.08.31. - 변경심의 신청(5차) (연구담당자, 섭취방법, 동의서, 식이조사지, 설문지 등) 2023.09.07. - 변경승인 2023.10.06. - 변경심의 신청(6차) (대상자 선정/제외조건 등) 2023.10.11. - 변경승인
연구기간	계약서 합의일(2023.08.08.) - 2024.08.31.
효과 평가 기준	1차 결과변수: PD (치주낭탐침깊이), GI (치은지수) <ul style="list-style-type: none"> <li>• PD: 병리조직학적으로 치은변연에서 치은 상피가 부착하고있는 치은 열구 기저부 하방까지의 깊이를 의미함.</li> <li>• GI: 수치가 높을수록 잇몸건강이 악화되어 있는 것을 의미함.</li> </ul> 2차 결과변수: 항염지표(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , hs-CRP), 항균지표( <i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>C. rectus</i> , <i>F. nucleatum</i> ), 기타 임상지표(PI, BOP, GR, CAL)

	평가 방법: 1차 결과변수에 대해 중례기록지에 기록된 baseline, 6주 추적 시점, 12주 추적 시점의 데이터를 바탕으로 baseline 대비 섭취 6주 후와 12주 후의 대조군과 시험군의 변화량을 통계적 처리방법으로 비교 분석하여 잇몸건강 기능성을 확인할 예정이다.
안전성 평가변수	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 이상반응(adverse event, AE)</li> <li>2. 제품 이상반응(adverse drug reaction, ADR)</li> <li>3. 중대한 이상반응(serious AE, SAE)</li> </ol>
선정기준	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 만 19세 이상 만 70세 미만 성인</li> <li>2. Ramfjord 치아의 여섯 부위 치주낭 탐침깊이(PD) 평균값이 3 mm 이상 5 mm 이하인 치아가 한 개 이상인 자</li> <li>3. Ramfjord 치아의 탐침 시 출혈(BOP, bleeding on probing) 부위 10% 이상인 자</li> <li>4. 치은염 또는 경증 치주염 증상이 있는 자</li> <li>5. 현존 자연치아(치근, 임플란트, 매복치 제외한 영구치(단, 크라운은 포함) 수 20개 이상인 자</li> </ol>
제외기준	<p>(1) 구강건강 상태</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ramfjord 치아의 여섯 부위 치주낭 탐침깊이(PD) 최대값이 5 mm 초과인 부위가 2개 이상인 자</li> <li>2. 시험 시작일 기준 1개월 이내 스케일링 또는 6개월 이내 치주치료를 받은 자</li> <li>3. 구강 내 연조직에 심각한 병적 소견을 보이는 자</li> <li>4. 구강 내 치아우식증 치료중인 자 또는 즉시 치아우식증 치료를 받아야 할 치아가 존재하는 자</li> <li>5. 수술 또는 급성치료를 요하는 치주염 환자</li> <li>6. 중등증 치주염 증상이 있는 자 중 치료를 위해 약물을 복용 중이거나 약물 처방이 필요한 자</li> <li>7. 시험 기간 중 동반되는 치과질환에 의해 수술, 발치 등이 필요한 자</li> </ol> <p>(2) 전신건강 상태</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 임상적으로 유의한 심혈관계, 면역계, 감염성, 종양성 질환을 보유한 자</li> <li>2. 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100 mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정 기준)</li> <li>3. 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복혈당 180 mg/dL 이상 또는 3개월 이내 당뇨로 인해 약제를 새로 시작한 경우)</li> <li>4. 정신분열증, 우울증, 약물중독, 알코올 중독 등 정신질환을 보유한 자</li> <li>5. 출혈성 병력이나 질환 보유자, 또는 이의 예방을 위해 항혈소판제 또는 항응고제 복용 중인 자</li> <li>6. 과거 5년 이내 알로로 진단받은 자</li> <li>7. 최근 1개월 이내 치주상태에 영향을 줄 수 있는 약물(phenytoin, CCBs, cyclosporine, coumadin, NSAIDs, aspirin 등)을 5일 이상 연속 복용한 자</li> <li>8. 최근 1개월 이내 항생제, 치주질환보조치료제 복용 경험이 있는 자</li> </ol> <p>(3) 생리적 상태</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 임신부 및 임신 준비 여성</li> <li>2. 수유부</li> <li>3. 출산 후 6개월 이내 여성</li> </ol> <p>(4) 구강 행태 및 생활 습관</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. 과다흡연자(heavy smoker, 하루 평균 흡연량 25개피 이상)[13]</li> <li>5. 과도한 음주자(남성 하루 4잔 이상(일주일 15잔 이상), 여성 하루 3잔 이상(일주일 8잔 이상); 보건복지부 기준(표준 진) 알코올 7 g = 소주 1잔(50 mL) = 맥주 1잔(200 mL))</li> </ol> <p>(5) 기타</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 시험식품에 대한 알러지/부작용이 있는 자</li> </ol>

	<ol style="list-style-type: none"> <li>2. 시험 시작일 기준 1개월 전부터 시험 기간 중 시험식품 외 유산균 복용한 자</li> <li>3. 최근 1개월 내 다른 임상연구에 참가한 자</li> <li>4. 연구자에 의해 시험 참가에 부적합하다고 판단되는 자</li> </ol>
시험중지 및 중도탈락 기준	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 대상자가 시험참여를 중단 의사를 밝힌 경우.</li> <li>2. 이상반응 보고를 한 대상자 중 연구책임자의 임상적 판단 하에 시험 참여를 지속하기에 부적절하다는 결론을 내리는 경우.</li> <li>3. 시험기간 중 임신한 경우.</li> <li>4. 시험기간 중 새롭게 질병의 진단을 받는 등 신체적/정신적 상태에 급격한 변화가 동반된 경우.</li> <li>5. 시험기간 중 시험물질 외의 유산균 원료 건강기능식품을 섭취한 경우.</li> <li>6. 시험기간 중 항생제를 투여한 경우.</li> <li>7. 시험기간 중 위약물질 및 시험물질의 섭취를 연속으로 2일 이상, 전체 섭취 기간 중 8일 이상(전체 섭취일수의 10%) 중단한 경우.</li> <li>8. 추적 기간 중 진행한 혈액/혈액화학 검사 항목에서 정상범위 외의 결과가 나온 대상자 중 시험책임자의 임상적 판단 하에 시험 참여를 지속하기에 부적절하다는 결론을 내리는 경우.</li> </ol>
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 경증 치주염이나 치은염 증상이 있는 반건강인 중 잇몸건강 기능성을 측정할 수 있는 바이오마커에 대해 위약물질 혹은 시험물질(복합유산균) 섭취 전, 섭취 후 6주, 섭취 후 12주에 추적 관찰하여 섭취 전 대비 6주와 12주 후의 변화량에서 두 군간 차이가 있는지 비교 분석하는 연구임.</li> <li>• 비교군은 복합군주를 3개월간 섭취할 대상자군이며, 위약대조군과 비교군의 정보는 이중가림되어 취급될 것이므로 시험대상자와 연구자 모두 대상자의 배정 군을 알 수 없음.</li> <li>• 연령대, 성별을 공변량으로 지정하여 위약대조군과 시험군에 층화무작위 배정함.</li> <li>• 무작위배정은 통계분석 프로그램 R에서 psych package 내 block.rand 함수를 활용할 것이며, 배정 결과는 다음의 같은 무작위배정표에 의해 A군 또는 B군에 할당될 것임.</li> <li>• A군과 B군은 대조군 또는 비교군 중 하나를 나타내며 특정 군에 대한 구분은 연구가 종료될 시점까지 대상자와 연구자가 알 수 없으나, 이상보고를 보이는 혹은 기타 사유로 탈락자가 발생하였을 때 필요에 의해 연구책임자 및 자료분석처리자(통계학자)에게 공개될 수 있음.</li> <li>• 관찰항목: 방사선학적 검사, 치식제거 및 치근면활택술(SRP), 활력징후, 설문조사, 섭취기록지, 식이조사, 임상적 검체 검사, 임상적 증상 검사, 이상반응 검사</li> </ul>
통계분석방법	<p>(1) 기술통계</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 각 군의 baseline/6주 경과/12주 경과 시 분석대상 수 현황 파악.</li> <li>• 각 군의 관찰 시점에서의 인구사회학적 변수, 1차 결과변수, 2차 결과변수 관찰 결과를 연속형 변수의 경우 평균(M)과 표준편차(SD) 값으로, 범주형 변수의 경우 범주의 빈도, 분율(%) 등을 빈도표의 형태로 제시.</li> </ul> <p>(2) 검정통계</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baseline 변수 차이검정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Baseline에서 예후인자 및 평가변수의 대조/시험군 간 차이검정을 실시하되, 그 전에 연속형 변수는 정규성 검정을 1차적으로 진행.</li> <li>- Baseline에서의 군간 차이검정은 범주형 변수는 카이제곱 검정, 연속형 변수는 정규성 만족 시 독립 이표본 t-검정, 정규성 가정 위배 시 Mann-Whitney U 검정 실시.</li> </ul> </li> <li>• 결측값 처리 방식에 따른 결과변수 가설 검정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 탈락자 발생이나 측정 시 오류로 인해 결측값이 발생할 시, 기본적으로는 해당 대상은</li> </ul> </li> </ul>

	<p>제외하여 분석하되, 결과변수가 연속형일 경우 두 baseline대비 6주후 변화량, baseline 대비 12주후 변화량에 대해 각 군의 차이 검정은 독립 이표본 t-검정, 범주형일 경우 카이제곱 검정을 실시.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 결측값이 존재하지 않거나 평균대체법 등의 결측값에 대체값을 적용할 시, 위의 결측값 존재 시의 분석 방법을 적용하거나, 반복측정 분산분석(repeated measure ANOVA)을 수행.</li> <li>- 공변량 존재 시 결과변수 가설 검정             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대상자 모집 후 주요 예후인자에 대해 층화하여 무작위 배정을 했음에도 baseline에서 대조군/시험군 간 통계적으로 유의한 차이를 보였을 시, 해당 변수는 공변량으로 지정하여 가설 검정 시 보정하는 통계적 방법을 시행해야 함. 공변량이 존재하고 결측값이 없을 시 공분산분석(ANCOVA)을 수행, 결측값이 존재할 시 일반화 선형 혼합 모형(GLMM)을 활용.</li> <li>- 통계적 가정 위배 시 가설 검정.</li> <li>- 위의 연속형 변수 통계 분석 방법은 두 군의 정규성 가정을 만족했을 때 수행할 분석법이며, 정규성 가정에 위배가 될 시에는 Mann-Whitney U 검정을 하거나, 일반화 선형 혼합 모형을 활용.</li> </ul> </li> </ul> <p>(3) 연구시작 후 6개월 경과 시 중간분석: ITT (intent to treat)군 분석              (4) 연구종료 후: PP (per-protocol), FAS (full analysis set), ITT군 분석</p>																																																																																																																																											
<p>대상자 모집 현황 2023.10.30. 기준</p>	<p>첫 시험대상자 참여신청일: 2023.08.25.              첫 시험대상자 등록일: 2023.09.12.              방문: 15명              시험대상자 등록: 7명              시험대상자 제외: 8명              방문예정: 10명              대기인원: 110명</p> <table border="1" data-bbox="428 1064 1254 1310"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Year</th> <th colspan="5">2023</th> <th colspan="8">2024</th> </tr> <tr> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>스크리닝</td> <td>5</td> <td>21</td> <td>15</td> <td>36</td> <td>42</td> <td>42</td> <td>18</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>선발</td> <td>1</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>6</td> <td>7</td> <td>7</td> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>진행누적</td> <td>1</td> <td>4</td> <td>7</td> <td>13</td> <td>20</td> <td>27</td> <td>30</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>v1</td> <td>1</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>6</td> <td>7</td> <td>7</td> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>v2</td> <td></td> <td>1</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>6</td> <td>7</td> <td>7</td> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>v3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>6</td> <td>7</td> <td>7</td> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>v4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>6</td> <td>7</td> <td>7</td> <td>3</td> <td></td> </tr> <tr> <td>비고</td> <td>선발 시작</td> <td>입위 시작</td> <td></td> <td></td> <td>중간 보고서</td> <td>일여 분석1차</td> <td>모집 완료</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>입위 완료</td> <td>일여 분석2차</td> <td>최종 보고서</td> </tr> </tbody> </table>	Year	2023					2024								8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	스크리닝	5	21	15	36	42	42	18							선발	1	3	3	6	7	7	3							진행누적	1	4	7	13	20	27	30							v1	1	3	3	6	7	7	3							v2		1	3	3	6	7	7	3						v3				1	3	3	6	7	7	3				v4						1	3	3	6	7	7	3		비고	선발 시작	입위 시작			중간 보고서	일여 분석1차	모집 완료				입위 완료	일여 분석2차	최종 보고서
Year	2023					2024																																																																																																																																						
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8																																																																																																																															
스크리닝	5	21	15	36	42	42	18																																																																																																																																					
선발	1	3	3	6	7	7	3																																																																																																																																					
진행누적	1	4	7	13	20	27	30																																																																																																																																					
v1	1	3	3	6	7	7	3																																																																																																																																					
v2		1	3	3	6	7	7	3																																																																																																																																				
v3				1	3	3	6	7	7	3																																																																																																																																		
v4						1	3	3	6	7	7	3																																																																																																																																
비고	선발 시작	입위 시작			중간 보고서	일여 분석1차	모집 완료				입위 완료	일여 분석2차	최종 보고서																																																																																																																															
<p>첨부</p>	<p>연구계획서 v1.3</p>																																																																																																																																											

- 현재 시험대상자 모집 및 등록은 완료된 상황임. 다만 최근 감기 유행으로 대상자들의 항생제 복용(중도탈락사유)의 우려가 있어, 추후 원래 계획한 최종 모집 인원 수(20명) 보다 모자랄 경우 연구 기간 및 인원수를 증대하여 진행할 예정임.



## 2. 비알콜성 간 건강 개선 동물 실험

### ○ 비알콜성 간 건강 개선 동물평가모델

- 4주령의 수컷 C57BL/6J mouse를 항온항습(23±1℃, 53±2%) 하에서 12시간 주기로 광주기 및 암주기로 명암이 자동 조절되는 사육실에서 약 일주일 동안 마우스용 lab chow를 공급하며 환경에 적응하도록 하였음. 환경 적응 후, 체중을 측정하여 무작위 난괴법으로 정상식이군, 고지방식이군, 대조군으로 나누어 실험 식이를 공급하였음.

- 후보 균주 Lactobacillus plantarum DSR330 (이하 DSR)의 체지방 및 간기능 개선 효능을 분석하기 위하여 실험동물에 60% kcal fat 식이를 5주 간 공급한 후, 후보 균주(DSR)를 각각  $1 \times 10^8$  CFU/day,  $1 \times 10^9$  CFU/day 용량으로 7주 간 C57BL/6J 마우스에 1일 1회 경구투여하고 정상식이군(NC)과 고지방식이군(HFD)은 동량의 증류수를 투여하였음.

<Table 8> Animal study design

그룹		식이조성(1-12주)	경구투여(6-12주)
ND	정상식이군	10% kcal fat 식이	증류수
HFD	고지방식이군	60% kcal fat 식이	증류수
Silymarin	Silymarin 대조군		200 mg/kg
DSR-8	DSR 저농도군		$1 \times 10^8$ CFU/day
DSR-9	DSR 고농도군		$1 \times 10^9$ CFU/day

- 사육을 완료한 실험동물을 12시간 절식시킨 후 개체 별로 체중을 측정한 뒤 마취하여 채혈하였음.

- 표시된 결과값은 평균±평균오차(mean±SEM)로 나타내었으며, SPSS 프로그램을 이용하여 통계 처리 하였음. 던컨의 다중범위검정 (Duncan's multiple range test)을 사용하여 p<0.05 에서 유의성을 나타내었으며, 그룹 간 유의성은 t-test를 통해 확인하였음.

- 채혈 후에는 간, 지방조직 등을 적출하고, 적출된 조직은 표면에 묻은 혈액을 0.9% 생리식염수로 씻어내고 trimming한 다음, 여지로 수분을 제거한 후 중량을 측정하여 액체질소로 급속 동결하여 분석 전까지 -70℃에서 보관하였음. 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리하여 분석 전까지 -70℃에서 보관하였음

### ○ 체지방 수준에 미치는 영향

- 실험동물의 체중 및 체지방량(갈색지방, 피하지방, 부고환지방, 신장주변지방, 후복막지방)을 측정 한 결과는 표 9에 나타내었음

- 체중은 ND보다 HFD이 유의하게 높았고, DSR은 농도 의존적으로 HFD 보다 체중이 낮았으며, 특히 DSR-9는 유의한 체중감소를 보였음

- 피하지방은 ND보다 HFD이 유의하게 높았고, DSR은 농도 의존적으로 HFD 보다 피하지방이 낮았으며, 특히 DSR-9는 유의한 피하지방 저하를 보였음

<Table 9> DSR 처리에 따른 체중 및 체지방량 변화

Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR330-8	DSR330-9
Weight (g)	28.58±1.18 <sup>a</sup>	<b>39.79±1.69<sup>d**</sup></b>	31.86±1.18 <sup>ab#</sup>	36.00±1.15 <sup>c</sup>	33.07±0.93 <sup>bc</sup>
Relative adipose tissue weight (g/100 BW)					
Brown fat	0.40±0.06 <sup>ns</sup>	0.30±0.04	0.39±0.14	0.34±0.02	0.29±0.05
Subcutaneous fat	0.95±0.17 <sup>a</sup>	<b>2.47±0.46<sup>b</sup></b>	1.11±0.24 <sup>a</sup>	2.26±0.26 <sup>b</sup>	1.99±0.25 <sup>b</sup>
Visceral fat	4.04±0.37 <sup>a</sup>	<b>7.51±0.71<sup>b</sup></b>	5.48±0.74 <sup>ab</sup>	7.42±0.63 <sup>b</sup>	6.64±0.71 <sup>b</sup>
Epididymal fat	2.24±0.19 <sup>a</sup>	<b>4.31±0.38<sup>b</sup></b>	3.74±0.45 <sup>b</sup>	4.62±0.44 <sup>b</sup>	4.15±0.41 <sup>b</sup>
Retroperitoneal + Perirenal fat	0.55±0.13 <sup>a</sup>	<b>1.67±0.30<sup>b</sup></b>	0.88±0.30 <sup>ab</sup>	1.59±0.30 <sup>b</sup>	1.13±0.29 <sup>ab</sup>
Mesenteric fat	1.25±0.27 <sup>ns</sup>	1.54±0.35	0.87±0.29	1.12±0.21	1.36±0.35
Subcutaneous fat + Visceral fat	4.99±0.48 <sup>a</sup>	<b>9.98±1.17<sup>c</sup></b>	6.59±0.98 <sup>ab</sup>	9.68±0.73 <sup>c</sup>	8.64±0.91 <sup>bc</sup>

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean±S.E.

Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, and \*\*\*p<0.001 versus the ND group; #p<0.05 versus the HFD group by Student t-test.

○ 간 조직의 형태학적 변화 및 간 기능 지표에 미치는 영향

- 실험동물의 간 조직의 무게를 측정된 결과는 표 10에 나타내었음. 간 무게는 그룹 간에 유의한 차이가 없었음

<Table 10> DSR 처리에 따른 간 무게 변화

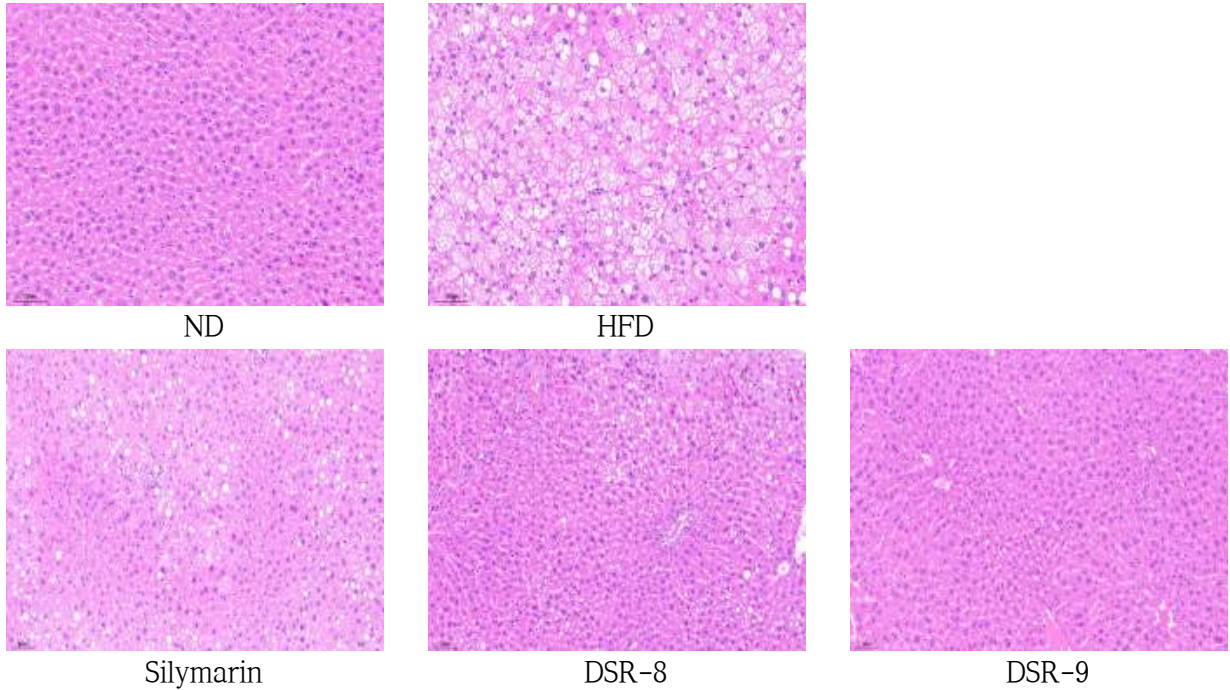
Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR330-8	DSR330-9
Heart (g/100 g BW)	0.39±0.04 <sup>b</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.35±0.01 <sup>ab</sup>	0.33±0.02 <sup>ab</sup>	0.35±0.01 <sup>ab</sup>
Liver (g/100 g BW)	3.05±0.09 <sup>ns</sup>	3.11±0.64	2.46±0.38	2.63±0.11	2.92±0.11

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean±S.E.

Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

- 간 조직의 H&E staining을 통한 형태학적 관찰 결과는 그림 1에 나타내었음. 간 조직에서는 HFD의 간세포에서 비대해진 지방조직이 확인되었으나, silymarin과 DSR은 ND와 유사한 형태로 확인되었음.



**<Figure 21> DSR 처리에 따른 간 조직의 형태학적 변화**

- 혈청에서 간 기능 지표(AST, ALT, ALP)를 분석한 결과는 표 3에 나타내었음. GGT는 측정값이 낮아(마이너스로 측정 불가) 결과에서 제외하였음. 혈중 AST 및 ALT 함량은 ND보다 HFD이 유의하게 높았고, DSR은 HFD 보다 AST 및 ALT 함량이 낮았으며, 처리 간에 유의한 차이는 없었음. 또한 ALP 함량은 ND보다 HFD이 유의하게 높았으나 DSR 처리에 의한 유의한 변화는 없었음.

**<Table 11> DSR 처리에 따른 혈중 간 기능 관련 지표 변화**

Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR-8	DSR-9
AST (mg/dL)	16.16 ± 2.81 <sup>a</sup>	<b>59.66 ± 4.74<sup>c</sup></b>	<b>20.58 ± 3.38<sup>a</sup></b>	<b>46.36 ± 4.58<sup>b</sup></b>	<b>45.45 ± 3.58<sup>b</sup></b>
ALT (mg/dL)	58.19 ± 3.55 <sup>a</sup>	<b>143.15 ± 11.19<sup>c</sup></b>	88.70 ± 39.52 <sup>b</sup>	101.17 ± 6.54 <sup>b</sup>	89.75 ± 7.33 <sup>b</sup>
ALP (mg/dL)	22.14 ± 1.35 <sup>a</sup>	<b>31.57 ± 1.54<sup>b</sup></b>	<b>28.00 ± 3.27<sup>ab</sup></b>	25.29 ± 2.63 <sup>ab</sup>	24.29 ± 4.14 <sup>ab</sup>

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean ± S.E.

Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

**○ 간 조직의 형태학적 변화 및 간 기능 지표에 미치는 영향**

- 혈청 지질 및 변 지질 함량을 분석한 결과는 각각 표 12와 표 13에 나타내었음.

- 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤은 ND보다 HFD이 유의하게 높았고, 중성지방은 DSR-9에서 유의하게 낮았음.

- 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤은 모든 DSR에서 HFD 보다 유의하게 낮았음. 또한 HDL-콜레스테롤은 ND보다 HFD이 유의하게 낮았고, 모든 DSR에서 HDL-콜레스테롤이 HFD 보다 유의하게 높았음.

<Table 12> DSR 처리에 따른 혈중 지질 함량 변화

Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR-8	DSR-9
Triglyceride (mg/dL)	39.70 ± 4.62 <sup>a</sup>	<b>51.69 ± 3.07<sup>b</sup></b>	<b>44.47 ± 2.96<sup>ab</sup></b>	44.06 ± 1.67 <sup>ab</sup>	38.37 ± 2.35 <sup>a</sup>
Total Cholesterol (mg/dL)	64.44 ± 6.99 <sup>a</sup>	<b>104.93 ± 6.46<sup>c</sup></b>	80.91 ± 4.08 <sup>b</sup>	72.47 ± 1.91 <sup>ab</sup>	65.63 ± 3.77 <sup>ab</sup>
HDL-Cholesterol (mg/dL)	46.59 ± 4.68 <sup>b</sup>	<b>24.26 ± 1.45<sup>a</sup></b>	<b>41.24 ± 1.73<sup>b</sup></b>	<b>41.52 ± 1.29<sup>b</sup></b>	<b>44.18 ± 1.29<sup>b</sup></b>
LDL-Cholesterol (mg/dL)	22.85 ± 5.28 <sup>a</sup>	<b>80.67 ± 5.75<sup>c</sup></b>	<b>39.67 ± 4.64<sup>b</sup></b>	<b>30.95 ± 1.36<sup>ab</sup></b>	<b>21.45 ± 4.41<sup>a</sup></b>

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean ± S.E.

Values with different letters are significantly different at p < 0.05 after Duncan's multiple range test within group.

- 분변 중성지방 및 총 콜레스테롤은 ND보다 HFD이 유의하게 높았고, DSR은 농도 의존적으로 HFD 보다 분변 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량이 낮았음.

<Table 13> DSR 처리에 따른 분변 지질 함량 변화

Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR-8	DSR-9
Triglyceride (mg/dL)	22.06 ± 2.07 <sup>a</sup>	<b>71.77 ± 0.42<sup>d</sup></b>	<b>46.34 ± 0.67<sup>bc</sup></b>	47.68 ± 0.84 <sup>c</sup>	43.34 ± 0.34 <sup>b</sup>
Total Cholesterol (mg/dL)	50.12 ± 0.71 <sup>a</sup>	<b>121.89 ± 0.78<sup>d</sup></b>	103.81 ± 0.74 <sup>c</sup>	106.00 ± 1.36 <sup>c</sup>	87.89 ± 0.97 <sup>b</sup>

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean ± S.E.

Values with different letters are significantly different at p < 0.05 after Duncan's multiple range test within group.

○ 체지방합성에 미치는 영향

- 간 조직과 피하 지방조직에서 체지방합성 관련 유전자 발현을 분석한 결과는 각각 표 14과 표 15에 나타내었음. 간 조직에서 지방세포 분화에 관여하는 SREBP1c 및 FAS 유전자 발현은 ND보다 HFD이 유의하게 높았음. 특히, DSR-9에서는 SREBP1c과 FAS 유전자 발현은 농도 의존적으로 HFD보다 낮게 나타났음. 또한 ACC1 유전자 발현은 ND보다 HFD이 유의하게 낮았고, 모든 DSR은 HFD보다 ACC1 유전자 발현이 높게 나타났음.

<Table 14> DSR 처리에 따른 분변 지질 함량 변화

Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR-8	DSR-9
PPAR $\gamma$	1.07 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.55 ± 0.33 <sup>bc</sup>	0.31 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.82 ± 0.22 <sup>c</sup>	1.63 ± 0.18 <sup>bc</sup>
SREBP1c	1.70 ± 0.14 <sup>a</sup>	<b>12.29 ± 0.48<sup>c</sup></b>	4.49 ± 0.75 <sup>b</sup>	3.66 ± 0.29 <sup>b</sup>	4.15 ± 0.30 <sup>b</sup>
ACC1	1.15 ± 0.08 <sup>b</sup>	<b>0.18 ± 0.06<sup>a</sup></b>	0.59 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.30 <sup>b</sup>
FAS	1.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	<b>4.86 ± 0.37<sup>c</sup></b>	0.94 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.33 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.25 <sup>a</sup>

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean ± S.E.

Values with different letters are significantly different at p < 0.05 after Duncan's multiple range test within group.

- 피하 지방조직에서 지방세포 분화에 관여하는 PPAR $\gamma$ , SREBP1c 및 C/EBP $\alpha$ 와 지방산 생합성을 조절하는 ACC1 및 FAS 유전자 발현은 ND보다 HFD이 유의하게 높았음

- 모든 DSR은 HFD보다 PPAR $\gamma$ , SREBP1c, C/EBP $\alpha$ , ACC1 및 FAS 유전자 발현이 유의하게 낮았음

<Table 15> DSR 처리에 따른 피하 지방조직의 지방세포 분화 및 지방합성 관련 유전자 발현 변화

Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR-8	DSR-9
PPAR $\gamma$	1.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	<b>7.60<math>\pm</math>1.12<sup>c</sup></b>	0.84 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	5.14 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	5.34 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>
SREBP1c	1.05 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	<b>80.77<math>\pm</math>3.16<sup>c</sup></b>	0.68 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	59.45 $\pm$ 7.34 <sup>b</sup>	52.44 $\pm$ 4.58 <sup>b</sup>
C/EBP $\alpha$	1.15 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	<b>26.47<math>\pm</math>4.64<sup>b</sup></b>	2.68 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	23.80 $\pm$ 3.74 <sup>b</sup>	19.51 $\pm$ 3.92 <sup>b</sup>
FABP4	1.04 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	3.75 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.86 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
ACC1	1.26 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	<b>17.84<math>\pm</math>2.23<sup>b</sup></b>	3.68 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	3.73 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	2.28 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>
FAS	1.07 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	<b>4.82<math>\pm</math>0.53<sup>b</sup></b>	1.61 $\pm$ 1.58 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean $\pm$ S.E.

Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

○ 체지방분해에 미치는 영향

- 간 조직과 피하 지방조직에서 체지방분해 및 지방산화 관련 유전자 발현을 분석한 결과는 각각 표 8과 표 9에 나타내었음. 간 조직에서 지방분해 및 지방산화에 관여하는 ACO, PPAR $\alpha$  및 CPT1 유전자 발현은 ND보다 HFD이 유의하게 낮았고, 모든 DSR은 HFD보다 ACO, PPAR $\alpha$  및 CPT1 유전자 발현이 유의하게 높았음. DSR간의 비교에서는 DSR-8이 DSR-9보다 높은 유전자 발현을 보였음

<Table 16> DSR 처리에 따른 피하 간 조직의 지방분해 및 지방산화 관련 유전자 발현 변화

Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR-8	DSR-9
ACO	1.05 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.48 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.87 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.71 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	2.49 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>
PPAR $\alpha$	1.18 $\pm$ 0.02 <sup>cd</sup>	<b>0.52<math>\pm</math>0.02<sup>a</sup></b>	0.70 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	1.35 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>
CPT1	1.09 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	<b>0.25<math>\pm</math>0.02<sup>a</sup></b>	0.50 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.16 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean $\pm$ S.E.

Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

- 지방 조직에서 지방분해 및 지방산화에 관여하는 ACO 및 HSL 유전자 발현은 ND보다 HFD이 유의하게 낮았음. DSR-9은 HFD보다 HSL 유전자 발현이 유의하게 높았음

- CPT1 유전자 발현은 ND보다 HFD이 유의하게 높았음. 모든 DSR은 HFD보다 CPT1 유전자 발현이 유의하게 낮았음. DSR 간의 비교에서는 DSR-8이 DSR-9보다 낮은 유전자 발현을 보였음

<Table 17> DSR 처리에 따른 피하 지방조직의 지방세포 분화 및 지방합성 관련 유전자 발현 변화

Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR-8	DSR-9
ACO	1.16 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	<b>0.10<math>\pm</math>0.01<sup>a</sup></b>	0.30 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
HSL	1.10 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	<b>0.28<math>\pm</math>0.03<sup>a</sup></b>	0.04 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	1.73 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>
CPT1	1.12 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	3.68 $\pm$ 0.51 <sup>ab</sup>	0.76 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	7.50 $\pm$ 2.67 <sup>b</sup>	1.71 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean ± S.E.

Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

○ 에너지대사조절에 미치는 영향

- 에너지대사조절 관련 호르몬 함량을 분석한 결과는 표 18에 나타내었음. 혈중 인슐린과 렙틴 함량은 ND보다 HFD이 유의하게 높았고, 모든 DSR은 HFD보다 인슐린 및 렙틴 함량이 유의하게 낮았으며, 렙틴의 경우 DSR-8이 DSR-9보다 낮은 함량을 보였음. 또한 혈중 아디포넥틴 함량은 ND보다 HFD이 유의하게 낮았고, 모든 DSR은 HFD보다 혈중 아디포넥틴 함량이 유의하게 높았음

<Table 18> DSR 처리에 따른 혈청 에너지대사조절 관련 호르몬 변화

Variable	ND	HFD	Silymarin	DSR-8	DSR-9
Insulin (ng/mL)	1.65±0.35 <sup>a</sup>	<b>11.61±0.19<sup>c</sup></b>	<b>2.45±0.25<sup>b</sup></b>	2.73±0.13 <sup>b</sup>	2.51±0.34 <sup>b</sup>
Adiponectin (ug/mL)	28.72±1.87 <sup>b</sup>	<b>13.62±1.85<sup>a</sup></b>	25.23±2.74 <sup>b</sup>	29.19±0.79 <sup>b</sup>	29.95±0.79 <sup>b</sup>
Leptin (ng/mL)	13.98±0.54 <sup>a</sup>	<b>75.61±0.94<sup>e</sup></b>	<b>24.66±1.42<sup>b</sup></b>	<b>43.29±1.21<sup>c</sup></b>	<b>46.83±1.46<sup>d</sup></b>

ND, normal diet; HFD, high fat diet.

Values are the mean±S.E.

Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

3. 건강기능식품 시장 현황 분석

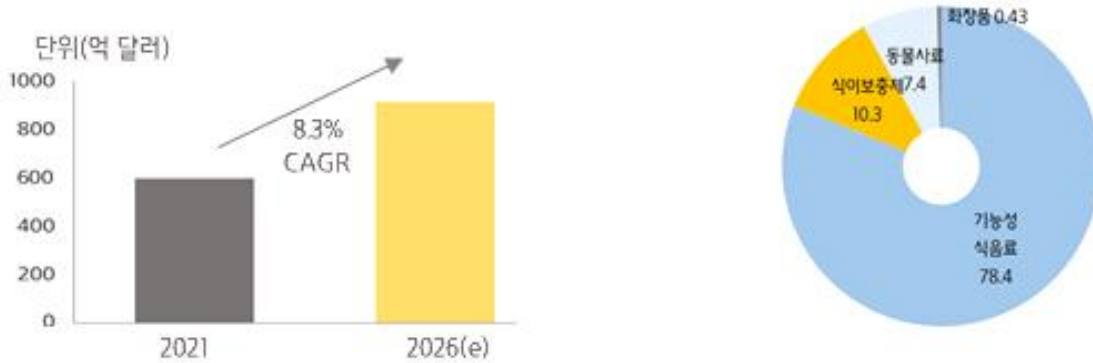
○ 유산균 시장 개요

- 고시형 유산균도 개별인정처럼 임상(동물) 연구결과를 앞세운 마케팅을 내세워 판매하고 있음. 플라이오틱스 트렌드는 '장까지 살아서 코팅 → 인체, 모유, 식물 등 유래 (origin) 보장균수, 냉장유통 → 신, 포스트, 파라 바이오틱스 분말 스틱포 → 개별인정 기능성/특허 유산균 → 고시형 제품 과학적 연구로 효능강조'로 변화해 왔음.

<Figure 22> 유산균 시장 마케팅 트렌드 변화

○ 글로벌 시장 규모

- 글로벌 프로바이오틱스 시장은 2026년 915억달러(117조원) 전망됨. 세계 유산균 시장은 아태지역, 유럽, 북미 중심으로 형성, 아태지역은 21년 281억달러(36조원)에서 약 9.8% 성장으로 26년 448억달러(57조원) 예상. 아-태지역에서 큰 시장은 중국과 일본이며, 빠른 성장 시장은 호주와 뉴질랜드, 가파른 성장예상은 동남아시아, 인도 등 개발도상국으로 건강과 웰빙트렌드 중심시장임.



<Figure 23> 글로벌 시장 규모 및 시장 점유율

○ 국내 기능성 원료 개발 현황 및 유망 시장

- 국내 기능성 원료 현황으로 개별인정 등록 원료 개수 27개(한 원료에 두 업체인 경우 각각 카운트)이고, 유산균 소재로는 23종류, 기능성으로는 16가지 기능성에 개별인정형 원료로 등록되어 있음.



<Figure 24> 개별인정형 등록 현황

- 개별인정형 소재로 등록된 16가지 기능성 외, 미개발 기능성은 구강, 기억력, 청력, 위, 키성장, 피로, 신장, 요로, 눈, 스트레스 혈압, 남성갱년기, 관절, 수면, 혈행, 정자운동성, 근력, PMS(월경 증후군) 19가지가 있으며, 유망 시장은 노령화 사회, 노인 인구 증가에 맞추어 노화관련 질환 및 기능이 유망하다고 보임.

○ 기술 동향

- 동결건조 안정화 기술로 내산성, 내담즙성, 안정성 향상시키는 프롤리 공법 특허가 대표적이고, 장내 정착 향상을 위해 실크피브로인 특허가 있으며, 단백질당류를 이용한 바이오-서포트 특허 등이



있음

- 제조회사들은 각자 코팅 기술을 보유하고 있음. SP코팅(메디오젠), 4중코팅(일동제약), 프로바이오텍(Rosell), 심리스(모리나가) 등이 있으며, 동결건조된 균주에 코팅하여 내압성, 내온성, 내산성 등을 강화함
- 코스맥스엔비티에서 유산균제조 전용생산 라인 구축함. 온도 20도 이하, 습도 25%이하 관리하는 룸에서 생산함

## 제2 세부과제 (호흡기 건강 개선)

### 1. 알레르기 천식 완화 효과 검증

○ 알레르기 천식 감작 및 유도 동물 모델 설계

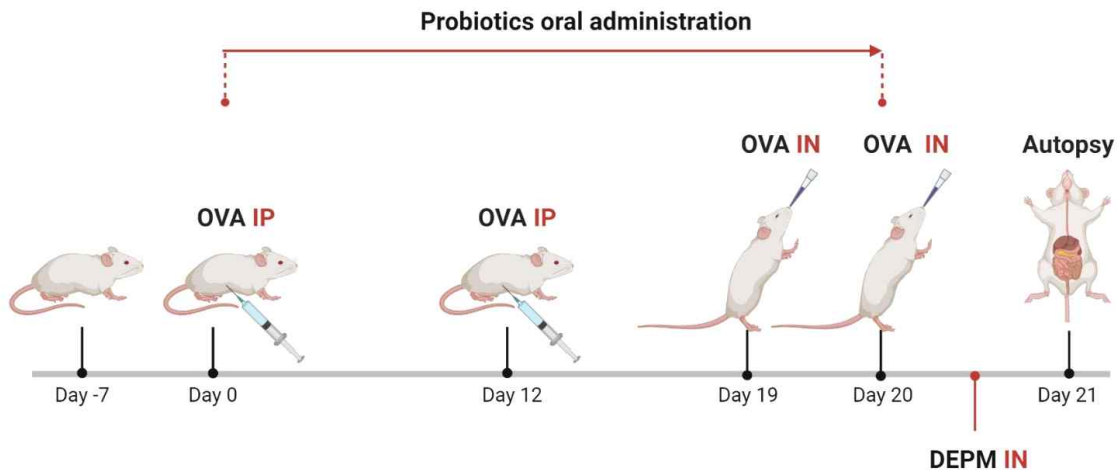
#### 1) 천식 감작 (Sensitization)

- Al(OH)<sub>3</sub>과 Saline을 1:1 (w/v)로 희석한 후 ovalbumin (OVA) 100 µg을 첨가한 용액 200 µL를 각각 실험 0, 12일째에 복강접종 함

#### 2) 천식 유발 (Induction)

- 실험 19, 20일 째에 OVA (50 µg/50 µL)를 비강접종 함. 실험 20일째 OVA 비강접종 후 diesel exhaust particulate matter (DEPM) (200 µg/20 µL)을 3시간 간격으로 3회 비강접종 함

- 동물 모델은 BALB/c, 6주령 마우스를 사용하였으며, 양성 대조군으로 synatura syrup (진해거담제)를 사용하였음



<Figure 25> Study design to analyze the effects of LAB strains on the asthma model. *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901 and *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800 were orally administered from days 0 to 20. On days 0 and 12, ovalbumin (OVA) was used to sensitize the mice via intraperitoneal injection (IP). Following the last OVA challenge, a solution of diesel exhaust particulate matter (DEPM) was administered three times with a 3 h interval. On day 21, the mice were euthanized.

<Table 19> List of strains used in this study

No.	Strain	Code
1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> EFEL6901	LBRE6901
2	<i>Limosilatobacillus fermentum</i> EFEL6800	LBF6800

<Table 20> The experimental group of this study

Number	Sensitization	Induction of asthma	Samples (per oral administration, 200 $\mu$ L)
1	Saline	Saline	Saline
2	Al(OH) <sub>3</sub> + OVA	OVA + DEPM	Saline
3	Al(OH) <sub>3</sub> + OVA	OVA + DEPM	Synatura (200 mg)
4	Al(OH) <sub>3</sub> + OVA	OVA + DEPM	LBRE6901 1 X 10 <sup>8</sup> CFU
5	Al(OH) <sub>3</sub> + OVA	OVA + DEPM	LBRE6901 1 X 10 <sup>9</sup> CFU
6	Al(OH) <sub>3</sub> + OVA	OVA + DEPM	LBF6800 1 X 10 <sup>8</sup> CFU
7	Al(OH) <sub>3</sub> + OVA	OVA + DEPM	LBF6800 1 X 10 <sup>9</sup> CFU

○ 프로바이오틱스 경구 투여에 따른 천식 마우스 모델의 무게 변화

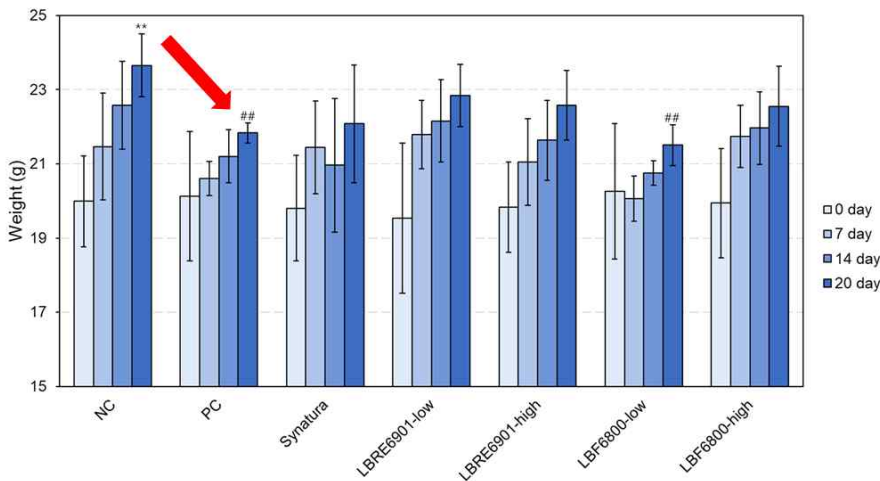
- 후보 유산균의 경구 투여에 따른 알레르기 천식 유도 마우스 모델의 체중 무게 변화 및 장기(비장 및 폐) 무게를 측정함. 체중 변화는 1주일에 한번 씩 측정하였으며, 장기 무게는 다음과 같은 공식으로 전체 무게에 대한 장기의 상대적 무게를 계산함

: Relative organ weight = organ weight (g)/terminal body weight (g) × 100%

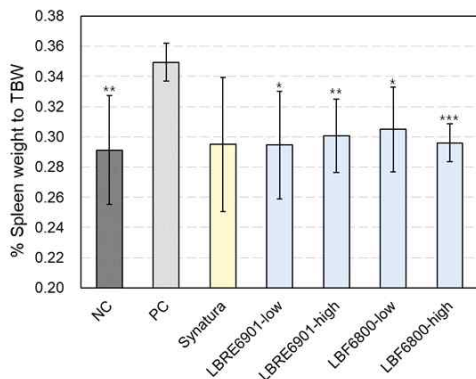
- 그 결과, NC 그룹은 3주간 무게가 꾸준히 증가하는 반면, 천식을 유도한 PC 그룹은 큰 변화를 보이지 않았음. 반면, LBRE6901을 섭취한 그룹은 NC 그룹과 유사하게 무게가 증가하는 경향을 보였음(Figure 19)

- 또한, 마우스의 총 무게에 대한 비장과 폐의 상대적 무게를 나타낸 결과, 염증 유발 시 무게가 증가한다고 알려진 비장의 경우, PC 그룹에서 크게 증가한 반면, 유산균 처리 시 유의적으로 감소하였음

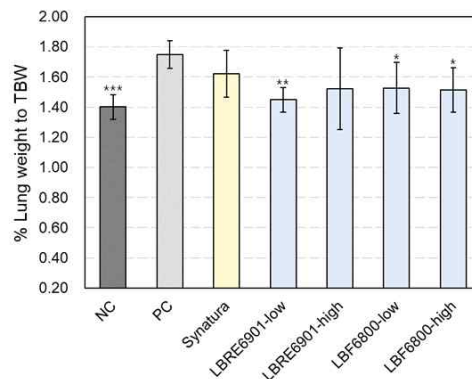
(A) Body weight



(B) % Spleen weight to TBW



(C) % Lung weight to TBW



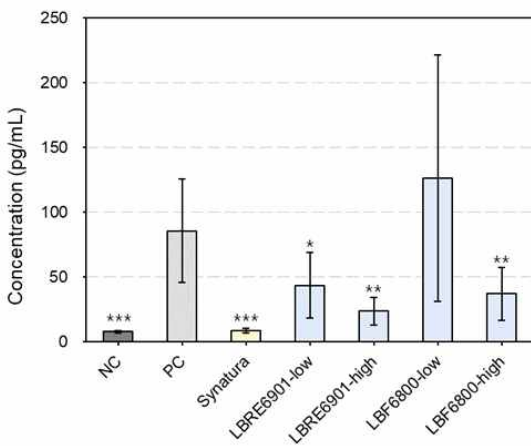
<Figure 26> Changes in body weight of mice (A), changes in relative spleen (B) and lung (C). The relative weights of spleen and lungs were calculated using the following formula: relative organ weight = organ weight (g)/terminal body weight (g) × 100%. Bars represent the mean ±

SD from five mice per group. NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901; LBF6800, *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800; low,  $1 \times 10^8$  CFU/mouse; high,  $1 \times 10^9$  CFU/mouse. All data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 compared with positive control (PC).

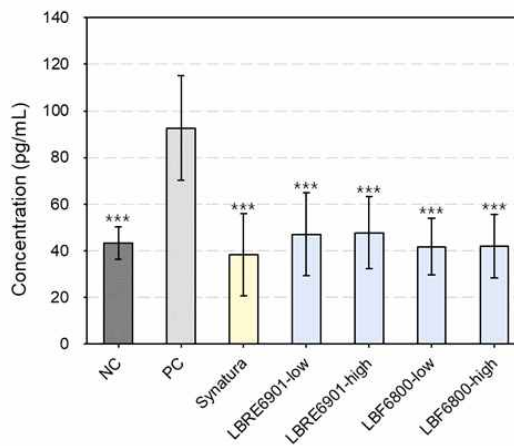
○ 프로바이오틱스 경구 투여에 따른 Th2형 사이토카인 및 IgE 발현양 분석

- 천식 마우스 모델에서 OVA으로 인해 유도된 Th2형 사이토카인인 IL(Interleukin)-4, IL-5, IL-13과 IgE의 발현양을 측정하기 위해 기관지 폐포 세척액과 혈청을 이용하여 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하였음
- 그 결과, 천식이 유도됨에 따라 Th2형 사이토카인 및 OVA-specific IgE의 발현양이 유의적으로 증가하였으며, LBRE6901을  $1 \times 10^9$  CFU/200  $\mu$ L 투여했을 때 가장 유의적으로 억제하였음 (Figure 20)

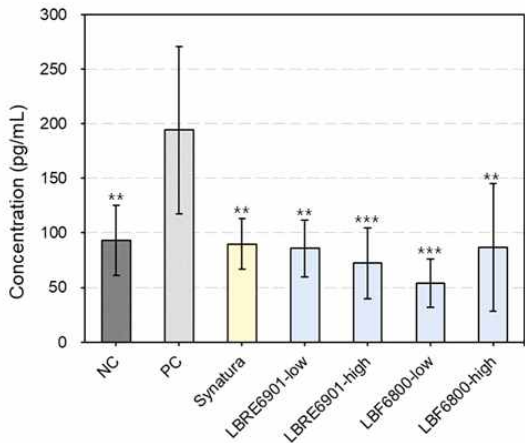
(A) IL-4



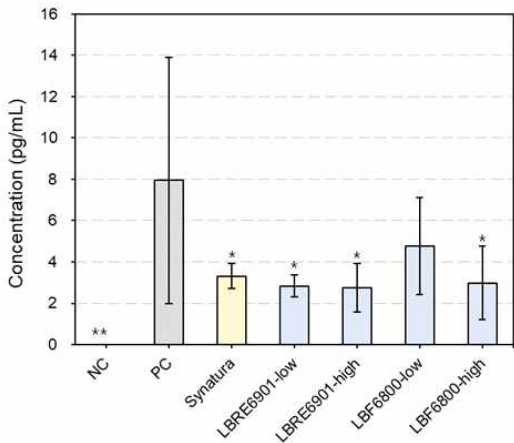
(B) IL-5



(C) IL-13



(D) OVA-specific IgE



<Figure 27> Effects of LAB strains on Th2-type cytokines and OVA-specific IgE in BALF and serum. The levels of IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C) and OVA-specific IgE (D) in bronchoalveolar lavage fluid and serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901; LBF6800, *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800; low,  $1 \times 10^8$  CFU/mouse; high,  $1 \times 10^9$  CFU/mouse; IL, interleukin; IgE, immunoglobulin E. All data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 compared with positive control (PC).

○ 폐 조직 내, T 세포의 분화에 관여하는 전사인자 측정

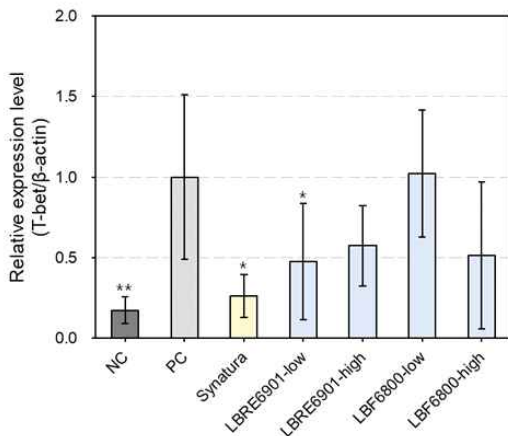
- 폐 조직 내 T 세포의 분화에 관여하는 전사인자인 T-bet (T helper 1, Th1), GATA3 (Th2), ROR- $\gamma$ t (Th17) 그리고 Foxp3 (regulatory T cell, Treg)를 분석하기 위해 폐 조직에서 mRNA를 추출하고 RT-qPCR을 수행하였음.  $\beta$ -actin, GATA3, Foxp3 유전자는 표 3의 프라이머 쌍을 사용하여 증폭하였으며, PCR 조건은 다음과 같음; 95°C에서 5분, 95°C에서 15초, 60°C에서 30초, 60°C에서 30초를 40사이클

<Table 21> Specific PCR primer sequences

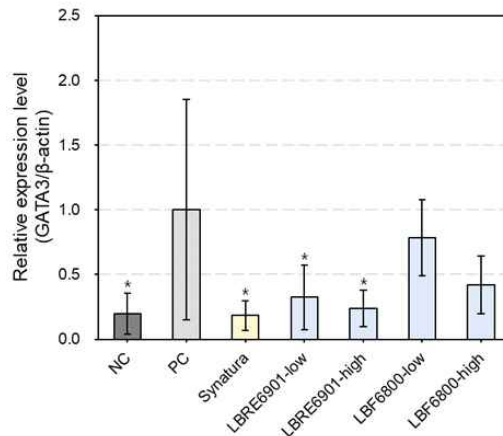
Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
$\beta$ -actin	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
T-bet	GCCAGGGAACCGCTTATATG	GACGATCATCTGGGTACATT GT
GATA3	TTTACCCTCCGGCTTCATCCTCCT	TGCACCTGATACTTGAGGCACTCT
ROR- $\gamma$ t	TCTACACGGCCCTGGTTCT	ATGTTCCACTCTCCTCTTCTCTTG
Foxp3	TCATCCGCTGGGCCATCCTG	GTGGAAACCTCACTTCTTGGT C

- 그 결과, 천식이 유도됨에 따라 Th2형 분화에 관여하는 전사인자인 GATA3의 mRNA 발현양이 유의적으로 증가하였으며, LBRE6901을 처리하였을 때 감소하였음(Figure 25)
- 또한, Treg의 분화에 관여하는 전사인자의 Foxp3의 mRNA 발현 수준이 LBRE6901을 투여하였을 때 농도 의존적으로 증가하였음

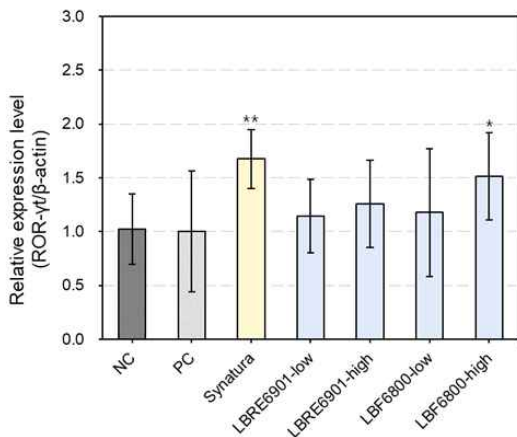
(A) T-bet (Th1)



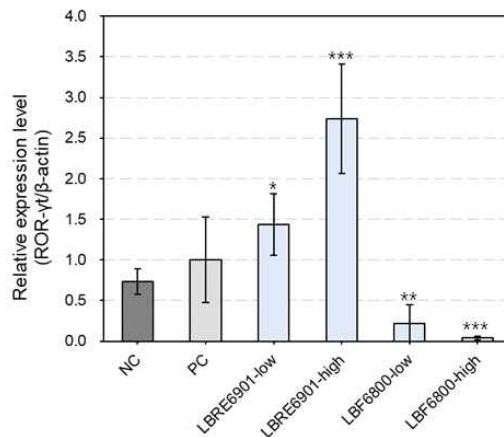
(B) GATA3 (Th2)



(C) ROR- $\gamma$ t (Th17)



(D) Foxp3 (Treg)



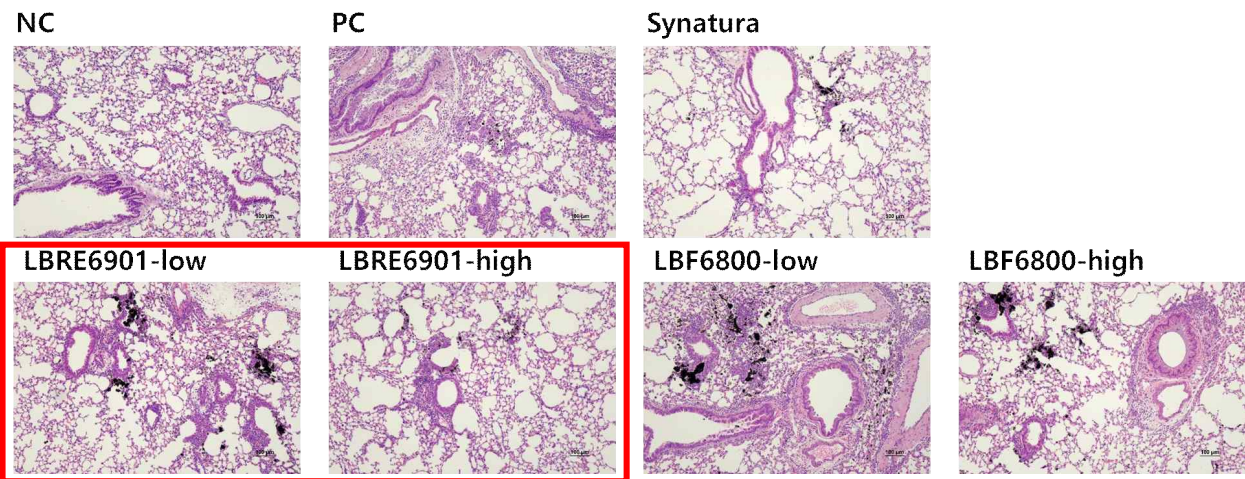
<Figure 28> The mRNA expression levels of T-bet (A), GATA-3 (B), ROR $\gamma$ t (C), and Foxp3 (D) in lung quantified using real-time PCR. Relative quantitation of the gene transcripts was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901; LBF6800, *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800; low,  $1 \times 10^8$  CFU/mouse; high,  $1 \times 10^9$  CFU/mouse. All data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 compared with positive



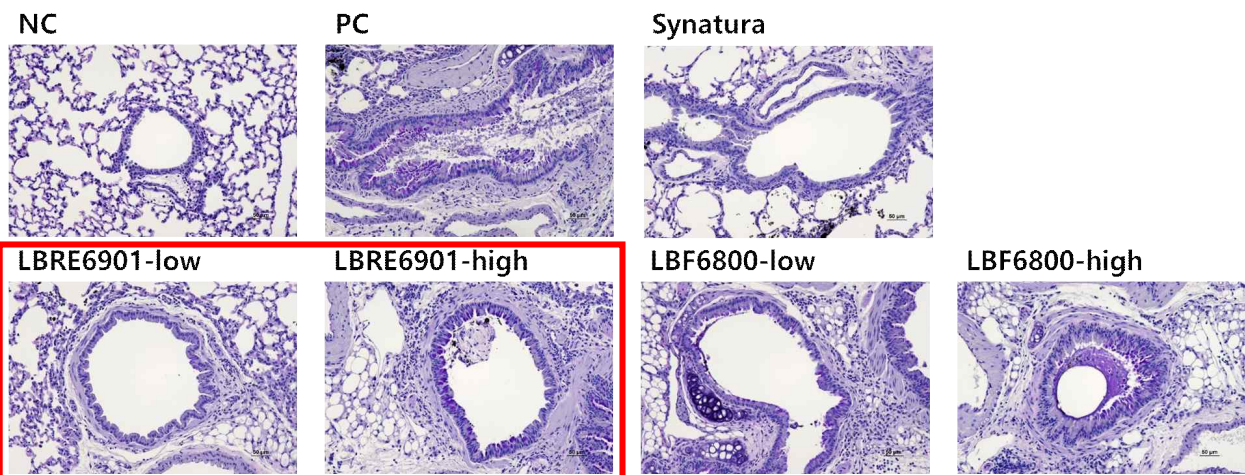
control (PC).

○ 폐의 조직 병리학적 검사

- 조직학적 변화 관찰을 위해, 좌폐 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정하고 흐르는 물에 세수한 후, 탈수(에탄올 70%, 80%, 95%, 100%), xylene으로 투명, 파라핀 침투 과정을 거쳐 포매하고 microtome을 이용하여 4 μm 두께의 박절편을 제작함. 이후, 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)(H&E) 및 페리오딕 산(periodic acid schiff) 염색하여 광학 현미경을 통해 기관지 주변 염증세포 침윤도, 세기관지 조직 변화를 관찰함
- H&E 염색 결과, 천식이 유도됨에 따라 NC 그룹에 비해 PC 그룹에서 기관지 주변 염증 세포(호산구, 호중구, 폐 대식세포, 림프구 등) 침윤 정도가 크게 증가하였으며, LBRE6901을 경구투여했을 때 완화됨(Figure 26)
- PAS 염색 결과, PC 그룹에서 기관지 주변 배상세포의 과증식 및 점액 생성이 증가하였으며, LBRE6901을 투여했을 때 완화됨(Figure 27)
- 하지만, LBF6800은 조직병리지표에서 염증세포 침윤 또는 점액 과증식을 완화하지 못하였음



<Figure 26> Effects of LAB strains on histopathological changes in BALB/c mice induced with asthma. Lung tissues were stained with hematoxylin and eosin. NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901; LBF6800, *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800.



<Figure 29> Effects of LAB strains on mucosal hyperplasia in BALB/c mice induced with asthma. The lung tissues were stained with periodic acid-Schiff (PAS). NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901; LBF6800, *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800; low,  $1 \times 10^8$  CFU/mouse; high,  $1 \times 10^9$  CFU/mouse.

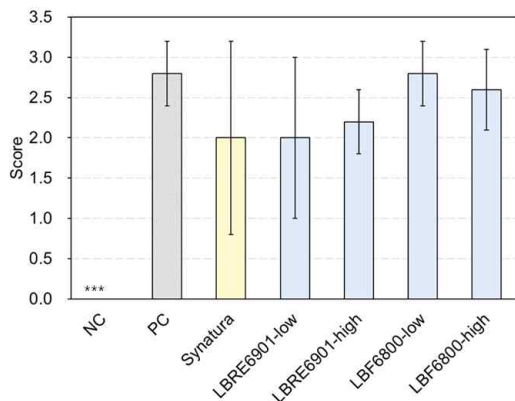
○ 폐의 조직 병리지표에 따른 점수화

- 조직학적 변화에 따라 염증 표 22의 점수화를 기반으로 염증 세포 침윤도와 세기관지 변화도를 점수화함
- 그 결과, 비록 유의적인 차이를 보이지는 않았지만, LBRE6901을 경구 투여 했을 때, PC 그룹에 비해 염증 세포 침윤도와 세기관지 변화도가 감소함(Figure 28)

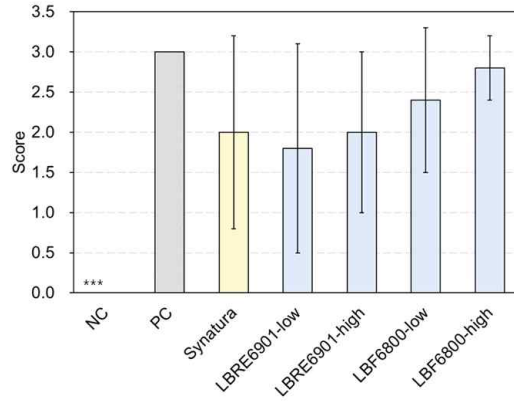
<Table 22> Scoring criteria for pulmonary histopathological examination

Inflammatory changes		Bronchiolar changes	
Grade	Criteria	Grade	Criteria
0	Normal	0	Normal
1	Mild infiltration of inflammatory cells, including interstitial lymphocytes, alveolar macrophages, and occasional eosinophils	1	Mild changes in bronchiolar epithelium, including mucosal hyperplasia, epithelial detachment, and bronchiolar smooth muscle hypertrophy
2	Moderate infiltration of inflammatory cells	2	Moderate bronchiolar changes
3	Severe infiltrations of inflammatory cells	3	Severe bronchiolar changes

(A) Inflammation cell infiltration score



(B) Bronchial tissue changes score



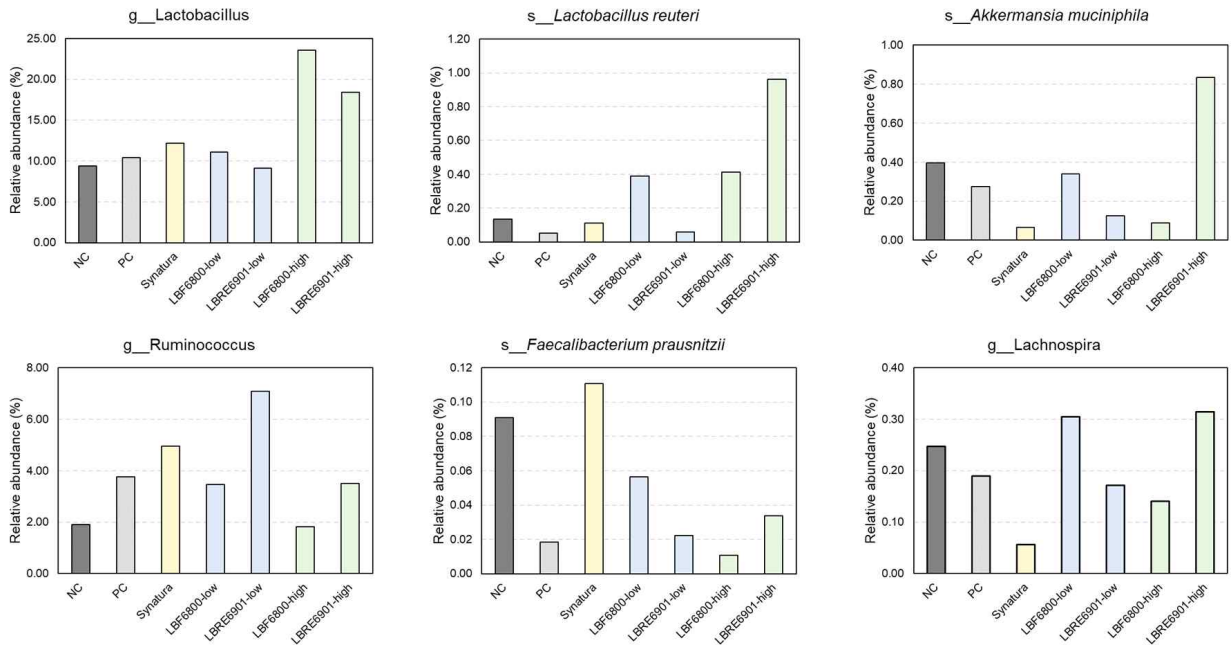
<Figure 30> Effects of LAB strains on inflammatory cell infiltrations (A) and bronchoalveolar changes (B) in BALB/c mice model of asthma induced by ovalbumin (OVA) and diesel exhaust particulate matter (DEPM). NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901; LBF6800, *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800; low,  $1 \times 10^8$  CFU/mouse; high,  $1 \times 10^9$  CFU/mouse. All data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 compared with positive control (PC).

○ 장내 마이크로바이옴 분석

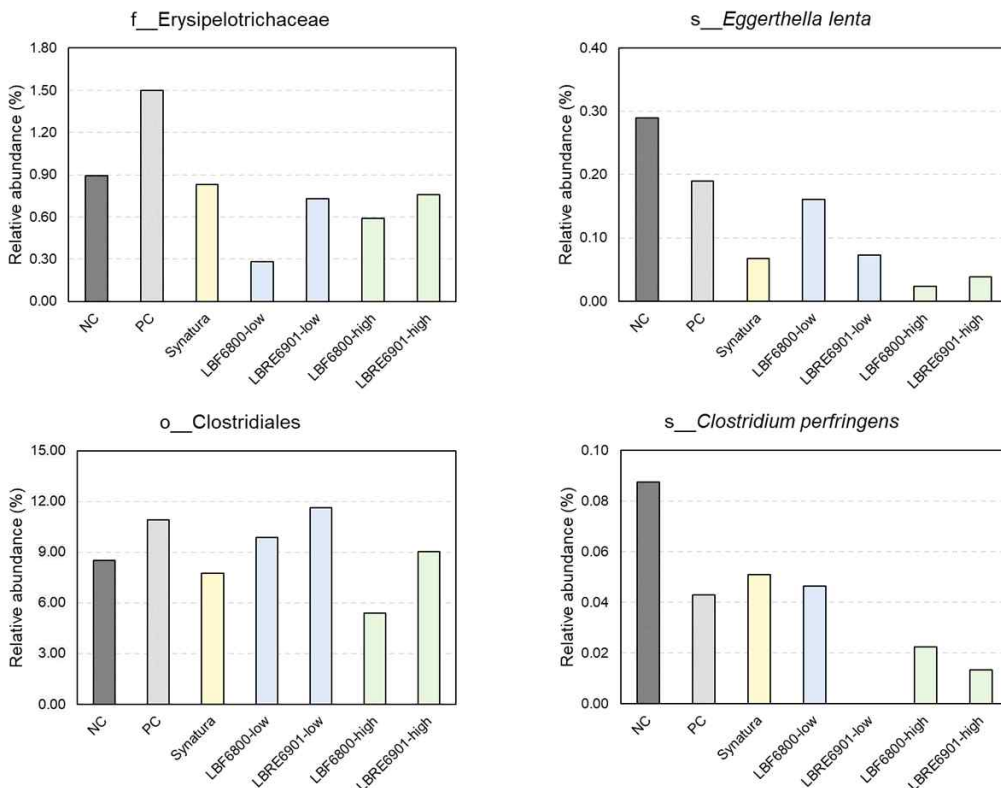
- 천식 발병과 유산균의 경구 투여에 따른 마이크로바이옴 분석을 위해, 동물 모델의 맹장에서 분변을 수집하고 DNA를 추출함. 이후, 16S rRNA 유전자의 V3-V4 영역을 341-F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 및 785-R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')의 프라이머 세트를 사용하여 증폭함. 16S rRNA 유전자 라이브러리는 Nextera Index Kit(Illumina, San Diego, CA, United States)를 사용하여 준비함. 최종 PCR 앰플리콘은 MiSeq 시퀀서(Illumina)를 사용하여 Macrogen (Seoul, Korea)에서 시퀀싱되었고 raw FASTQ 파일은 고유한 바코드를 기반으로 QIIME2를 사용하여 Deblur 파이프라인을 사용하여 분석함
- 그 결과, 균주를 고농도로 투여했을 때, *Lactobacillus* spp., *Akkermensia muciniphila*, *Ruminococcus* spp., 등의 유익균이 증가하였으며, 특히, LBRE6901을 고농도로 투여했을 때, *Limosilactobacillus reuteri*가 크게 증가함(Figure 31). 반면, 유해균으로 알려진 *Eggerthella lenta*, *Clostridium perfringens*, *Clostridiales* 등을 감소시킴(Figure 32)
- 이는 LBRE6901이 장내 미생물 중 유익균을 증가시키고, 유해균을 감소시켜 대장 환경을 개선할

수 있음을 보여줌

- 또한, 평균 종의 다양성을 나타내는 alpha-diversity를 분석한 결과, 유산균 고농도 투여군에서 alpha-diversity가 감소하는 경향을 보였으며, 이는 앞서 유산균 투여에 의해 *Lactobacillus* spp.가 장내에 우점함에 따라 감소한 것으로 간주 됨(Figure 33)

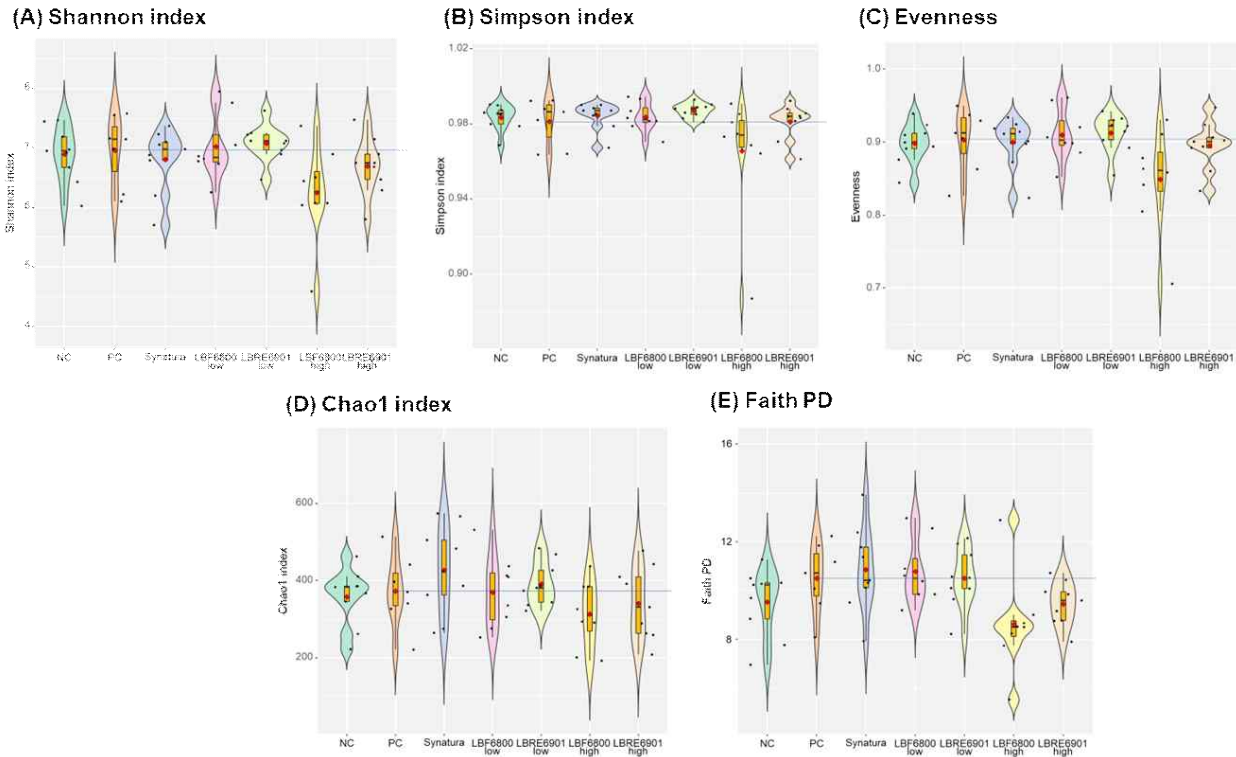


<Figure 31> Different taxa at genus and species among different groups of the gut microbiota in mice. n = 5. *Lactobacillus* genus (A), *Ruminococcus* genus (B), *Lachnospira* genus (C), *Lactobacillus reuteri* (D), *Akkermansia muciniphila* (E), *Faecalibacterium prausnitzii* (F). NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, *L. reuteri* EFEL6901; LBF6800, *L. fermentum* EFEL6800; low,  $1 \times 10^8$  CFU/mouse; high,  $1 \times 10^9$  CFU/mouse. Results are expressed as means  $\pm$  standard error the mean (SEM) (n=5).





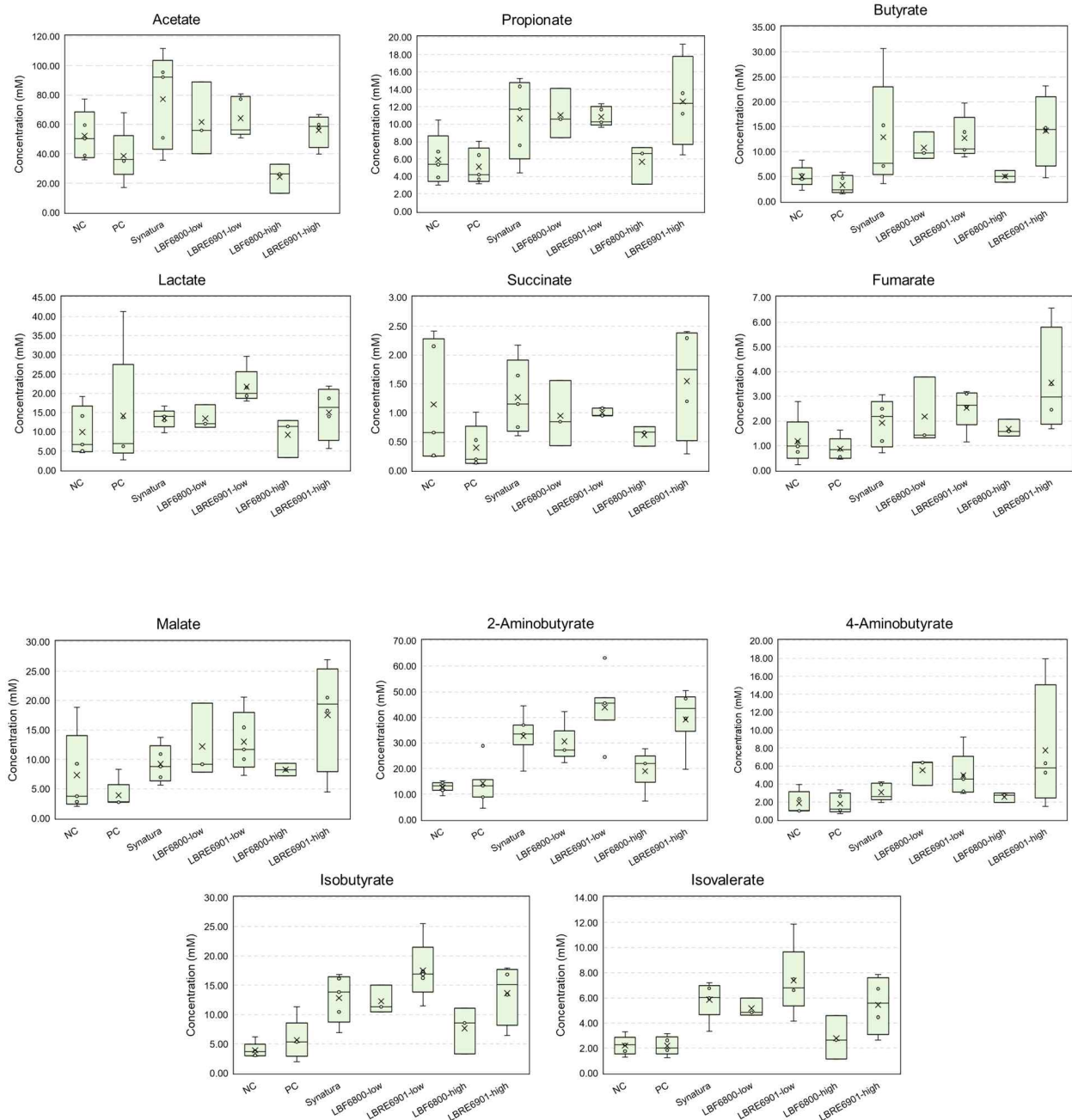
<Figure 32> Different taxa at genus and species among different groups. n = 5. Clostridiales order (A), Erysipelotrichaceae family (B), Clostridium perfringens (C), Eggerthella lenta (D). NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, L. reuteri EFEL6901; LBF6800, L. fermentum EFEL6800; low,  $1 \times 10^8$  CFU/mouse; high,  $1 \times 10^9$  CFU/mouse. Results are expressed as means  $\pm$  standard error the mean (SEM) (n=5).



<Figure 33> Alpha-diversity of gut microbiota. Alpha-diversity was calculated with Shannon index (A), Simpson index (B) and Chao1 index (C). n = 5. Violin plot showed comparison of  $\alpha$ -diversity between each samples. Parameters of inspection behavior for the different treatments presented as boxplots, indicating the median and quartiles with whiskers reaching up to 1.5 times the interquartile range. The average was plotted concentration of  $\alpha$ -diversity (red squares) in the same diagram. NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, L. reuteri EFEL6901; LBF6800, L. fermentum EFEL6800; low,  $1 \times 10^8$  CFU/mouse; high,  $1 \times 10^9$  CFU/mouse.

### ○ 알레르기 천식 유도 동물 모델의 분변 내 대사체 분석

- 천식을 유도한 동물 모델의 맹장에서 분변의 대사체 분석을 위해  $^1\text{H-NMR}$ 을 수행함
- 그 결과, EFEL6901 투여 실험군에서 단쇄지방산 중 acetate, propionate, butyrate의 농도가 증가하였으며, succinate, fumarate, malate, isobutyrate, isovalate, 2-aminobutyrate, 4-aminobutyrate 등 건강에 유익한 유기산이 증가함(Figure 34). 이 결과는 LBRE6901 투여가 장내 유익균의 증가와 함께 단쇄지방산 및 유기산의 증가를 유도함을 나타냄



<Figure 34> Effects of LAB strains on short chain fatty acids (SCFAs) levels in the cecum. Acetate (A), propionate (B), butyrate (C), lactate (D), succinate (E), fumarate (F), malate (G), 2-aminobutyrate (H), 4-aminobutyrate (I), isobutyrate (J), isovalerate (K). Parameters of inspection behavior for the different treatments presented as boxplots, indicating the median and quartiles with whiskers reaching up to 1.5 times the interquartile range. The average was plotted concentration of SCFAs (x mark) in the same diagram. NC, negative control; PC, positive control; LBRE6901, *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901; LBF6800, *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800; low,  $1 \times 10^8$  CFU/mouse; high,  $1 \times 10^9$  CFU/mouse. Results are expressed as means  $\pm$  standard error the mean (SEM) (n=5)

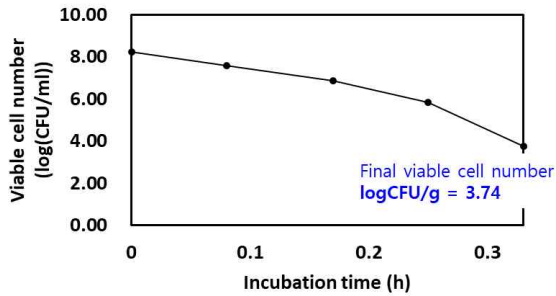
## 2. 가속 실험을 통한 균주의 유통기한 설정

### ○ 세 가지 온도에서 저장 시 생균 수의 변화

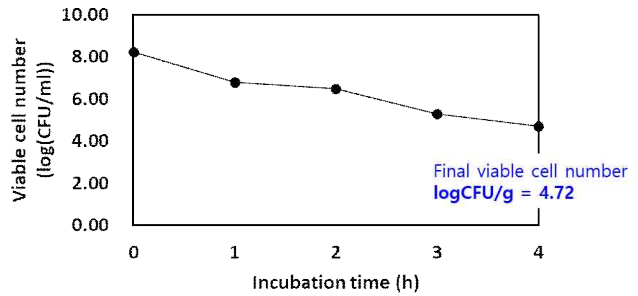
- 가속 실험을 통해 *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901 (LBRE6901)와 *Limosilactobacillus fermentum* EFEL6800 (LBF6800)의 유통기한을 설정함. 균주 분말을 준비하기 위해 LBRE6901과 LBF6800 동결건조 분말을 말토덱스트린과 혼합함. 균주 분말 일정량을 취하여 초기 생균수를 측정하고 70°C, 60°C, 50°C에서 각각 20분, 4시간, 24시간 동안 저장하면서 생균수의 변화를 측정하였으며, 유통기한은 균수가 10배 감소하는 값인 D-value를 아레니우스 방정식과 활성화 에너지를 통해 산출하여 계산함

- LBRE6901은 각각 70°C, 60°C, 50°C에서 log 3.74 CFU/g, log 4.72 CFU/g 및 log 6.13 CFU/g 이 생존하였으며(Figure 29), LBF6800은 각각 log 4.00 CFU/g, log 5.73 CFU/g 및 log 6.83 CFU/g 생존하였음(Figure 33)
- 가속 실험을 통해 LBRE6901과 LBF6800 분말의 생균수가 10배 감소하는 기간을 계산 한 결과, 상온에서 각각 2년과 4.5년 보관이 가능할 것으로 예측됨

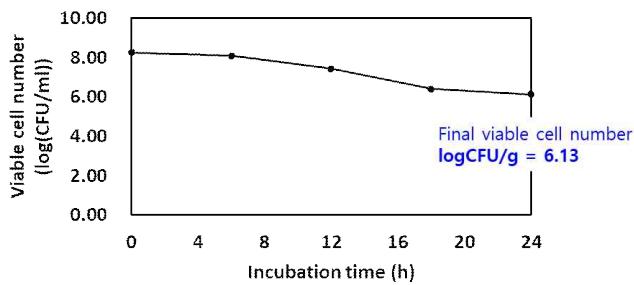
(A) 70°C, 0.33 h



(B) 60°C, 4 h

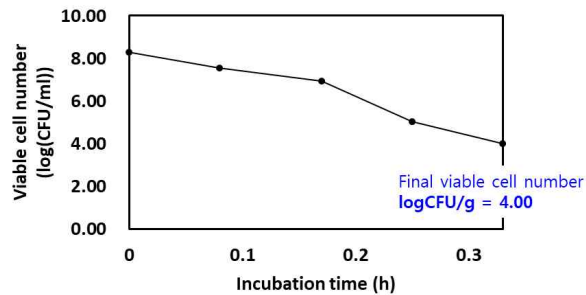


(C) : 50°C, 24 h

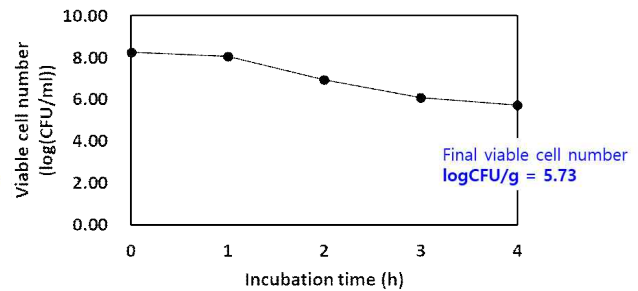


<Figure 35> The bacterial count of surviving *Limosilactobacillus reuteri* EFEL6901 (LBRE6901) in the acceleration experiment.

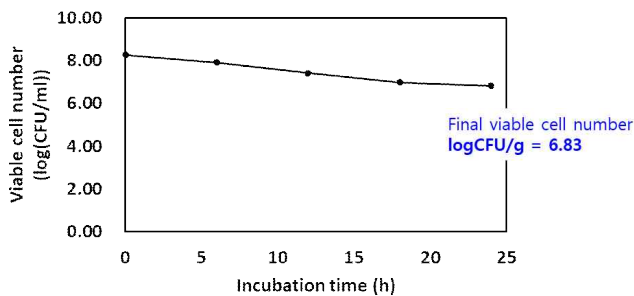
(A) 70°C, 0.33 h



(B) 60°C, 4 h



(C) : 50°C, 24 h



<Figure 36> The bacterial count of surviving *Limosilactobacillus fermentum* (LBF6800) in the acceleration experiment.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

---

###### 정성적 목표 :

- 프로바이오틱스 우수 후보 발굴
  - 비알코올성 간 건강 및 구강 건강
- 비알코올성 간건강을 위한 in vivo 질환 마우스 모델 기반 간조직에서의 지방 감소 효과 검증
- 구강건강 개선 평가를 위한 pilot study을 통한 프로바이오틱스 기능성 검증
- 개발중인 건강기능별 국내 건강기능식품의 시장성 평가, 사업성 분석 수행, 개별인정 추진 기능성 선정
- 프로바이오틱스 우수 후보 발굴
  - 호흡기 건강 및 체지방 감소
- 호흡기 건강 개선 효과를 갖는 균주 확보 및 검증
- 호흡기 염증 개선 in vivo mouse 모델 확보

###### 연구 개발 성과:

- 프로바이오틱스 우수 후보 확보
    - 시험관 실험을 통한 구강건강 후보소재 선정 : L. rhamnosus DM65, L.plantarum DSR920 (1:3 비율)
    - 시험관 실험을 통한 비알코올성 간건강 후보소재 선정 : L.plantarum DSR330
  - 비알코올성 간건강을 위한 질환 마우스 모델 기반 효과 검증
    - 동물 실험을 통한 효능 확인 : L.plantarum DSR330
  - 구강건강 개선 평가를 위한 pilot study을 통한 프로바이오틱스 기능성 검증
    - 구강건강 후보소재 시생산 및 임상시험식품 제조 완료
    - 구강건강 pilot study 대상자 모집 완료
  - 개발중인 건강기능별 국내 건강기능식품의 시장성 평가, 사업성 분석 수행, 개별인정 추진 기능성 선정
    - 자체 시장성 평가 및 사업성 분석 완료. 개별인정 추진 기능성 동물실험 완료
  - 프로바이오틱스 우수 후보 발굴(체지방, 호흡기)
    - 우수 프로바이오틱스 균주 확보
      - 체지방 감소(L. reuteri EFEL6901)
      - 호흡기 건강(L. reuteri EFEL6901)
  - 호흡기 건강 개선 효과를 위한 프로바이오틱스 균주 확보
    - 균주의 항염증 효과 분석
    - 온도와 시간에 따른 저장성 가속화 실험을 통한 균주의 안정성 평가
  - 호흡기 염증 개선 in vivo mouse 모델 확보
    - 염증 세포 침윤도 및 세기관지 변화도, 염증 바이오마커를 개선하는 천식 마우스 모델 생체 내 질환 바이오 마커 측정
  - 전장 유전체 분석을 통한 프로바이오틱스 건강기능식품 원료 안전성 확인
    - 장 내 유익균 및 유해균의 상대적 풍부도를 조절하고 유익한 대사산물을 생성하는 천식 마우스 모델의 장내 마이크로바이옴 분석
-

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1년차 (2022)	2년차 (2023)	계	가중치 (%)
	전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	논문	목표(단계별)	0	2	2
실적(누적)			0	3	3	
특허출원		목표(단계별)	0	2	2	20
		실적(누적)	0	2	2	20
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	기술이전	목표(단계별)	0	1	1	20
		실적(누적)	0	0	0	0
	인력양성	목표(단계별)	0	1	1	10
		실적(누적)	0	7	7	10
계	목표	0	6	6	50	
	실적	0	12	12	30	

- \* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.
- \* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 실제 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다  
(연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Strain-specific barcode PCR and quantitative PCR assay for identification and enumeration of kimchi starter, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> DRC1506	LWT	Seul-Ah Kim, Dong Hyeon Lee, Byung Hee Ryu, Nam Soo Han	174	England	ELSEVIER	SCIE	2023.01.15	0023-6438	100
2	Synergistic Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Kale Juice Fermented with <i>Limosilactobacillus reuteri</i> EFEL6901 or <i>Limosilactobacillus fermentum</i> EFEL6800	Antioxidants	Ga Yun Kim, Seul-Ah Kim, Sun Young Kong, Hyunbin Seong, Jae-Han Bae, Nam Soo Han	10	Switzerland	MDPI	SCIE	2023.10.12	2076-3921	100
3	Hepatoprotective Effect of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSR330 in Mice with High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease	J. Microbiol. Biotechnol	Na-Kyoung Lee, Yunjung Lee, Da-Soul Shin, Jehyeon Ra, Yong-Min Choi, Byung Hee Ryu, Jinhyeuk Lee, Eunju Park, and Hyun-Dong Paik	34	Korea	KMB	SCIE	2023.12.8	1738-8872	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	KMB2022, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	공선영, 한남수	2022.2.16	디오션리조트, 여수	대한민국
2	KMB2022, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	곽민정, 공선영, 양소희, 김민정, 한남수	2022.6.22	HICO, 경주	대한민국
3	KMB2022, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	공선영, 서희, 김가연, 한남수	2022.6.22	HICO, 경주	대한민국
4	IUFoST International Union of Food Science & Technology	공선영	2022.10.31	Marina Bay Sands Expo & Convention Centre	Singapore
5	KMB2023, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	곽민정, 공선영, 한남수	2023.1.16	용평리조트	대한민국
6	IPC 2023. INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE ON PROBIOTICS, PREBIOTICS, GUT MICROBIOTA AND HEALTH	곽민정, 공선영, 한남수	2023.06.20	Carlton Hotel, Bratislava	Slovakia
7	2023 KoSFoST international Symposium and Annual Meeting	곽민정, 공선영	2023.06.28	ICC, 제주	대한민국
8	2023 KFN International Symposium and Annual Meeting	곽민정	2023.10.18	BEXCO, 부산	대한민국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[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	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허	대한민국	대상(주)	2023.12 .22	10-2023- 0189187					100	
2	특허	대한민국	충북대	2024.03. 11	10-2024-0 034060					100	

○ 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
			√	√						

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

\* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

\* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등



□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- \* 1) 기술이전 또는 자기실시
- \* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- \* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과			대상웰라이프(주)와 공동연구개발 계약 예정(5월 말)		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		인체적용시험 2년 개별인정형 소재 신청 1년 (총 3년)		
	소요예산(천원)		1개의 기능성 개발에 5억 예상		
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
			0원	0원	5,500,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내	0	0
국외			0	0	0
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		순차적인 기능성(구강 건강, 호흡기 건강, 비알콜성 간건강, 체지방 감소) 소재 개발 외에 기능성 소재를 이용하여 기능성 표시 식품을 개발하여 관련 매출을 향상시킬 예정임.			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
			0	0	0
	수출		0	0	0

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1		대상(주)		7	7
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	졸업	2022		2				2		2			
2	졸업	2023		2				2		2			

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

---



---

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

---



---

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함), <b>품종인 경우 품종보호권 등록증 또는 생산·판매 신고증명서</b>
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 - 비알코올성 간 건강 및 구강 건강	○ 시험관 실험을 통한 구강건강 후보소재 선정 : L. rhamnosus DM65, L.plantarum DSR920 (1:3 비율) ○ 시험관 실험을 통한 비알콜성 간건강 후보소재 선정 : L.plantarum DSR330	○ 100
○ 비알콜성 간건강을 위한 in vivo 질환 마우스 모델 기반 간조직에서의 지방 감소 효과 검증	○ 동물 실험을 통한 효능 확인 : L.plantarum DSR330	○ 100
○ 구강건강 개선 평가를 위한 pilot study을 통한 프로바이오틱스 기능성 검증	○ 구강건강 후보소재 시생산 및 임상시험식품 제조 완료 ○ 구강건강 pilot study 대상자 모집 완료	추가 진행
○ 개발중인 건강기능별 국내 건강기능식품의 시장성 평가, 사업성 분석 수행, 개별인정 추진 기능성 선정	○ 자체 시장성 평가 및 사업성 분석 완료. 개별인정 추진 기능성 동물실험 완료	○ 100
○ 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 - 호흡기 건강 및 체지방 감소	○ 우수 프로바이오틱스 균주 확보 체지방 감소(L. reuteri EFEL6901) 호흡기 건강(L. reuteri EFEL6901)	○ 100
○ 호흡기 염증 개선 in vivo mouse 모델 확보	○ 염증 세포 침윤도 및 세기관지 변화도, 염증 바이오마커를 개선하는 천식 마우스 모델 생체 내 질환 바이오마커 측정	○ 100
○ 전장 유전체 분석을 통한 프로바이오틱스 건강기능식품 원료 안전성 확인	○ 장 내 유익균 및 유해균의 상대적 풍부도를 조절하고 유익한 대사산물을 생성하는 천식 마우스 모델의 장내 마이크로바이옴 분석	○ 100

#### 4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

#### 5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	2건	
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	1건	
	기술이전	1건	
	공정개발		
제품개발	시제품개발	1건	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

	과제번호			122040-02	
사업구분	기술사업화지원사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	민간중심 R&D 사업화				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	김치 종균 프로바이오틱스 유산균의 맞춤형 기능성 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	대상(주)			연구책임자	류병희
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	22.4~22.12	198,000	89,000	287,000
	2차년도	23.1~23.12	264,000	114,000	378,000
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
계					
참여기업					
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024.02.26

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
대상(주)	수석 연구원	류병희

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.

확약

류병희

[별첨 1]

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

[우수] 동물실험 유효성 평가는 식약처에서 발행한 가이드라인을 참고하여, 필요한 바이오마커를 측정하였으며 기전을 설명할 수 있도록 필요 마커를 측정하였음

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

[우수] 기능성이 입증된 프로바이오틱스를 활용하여 국제 연구 경쟁력을 확보할 수 있으며, 개별 인정형 원료로 개발할 수 있음. 이를 통해, 기능성표시식품 또는 건강기능식품으로 개발된 소재의 제품화를 통해 전문인력 고용창출 및 연간 5억원 이상의 매출 창출이 기대됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

[우수] 구강건강과 호흡기 건강에 대해 기술이전 및 인체적용시험 진행을 통해 개별인정형 원료 개발 및 건강기능식품 제품화 예정임

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

[우수] 구강건강, 비알콜성 간건강, 체지방감소, 호흡기 건강 4가지 기능성으로 세포실험 유효성 평가 진행 후, 비알콜성 간건강과 호흡기 기능성 동물실험 효능 평가 수행 완료. 추가적으로 구강건강은 사과나무치과병원에서 간이임상시험을 통해 인체에서의 효능을 빠르게 확인하려고 함

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

[우수] 논문 3건 게재, 지적소유권 특허 출원 2건, 학술발표 8건으로 목표 이상 성과 달성



## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 - 비알콜성 간 건강 및 구강 건강	10	100	세포실험을 통해 우수한 동물실험 후보 균주 선발함
○ 건강기능성 평가모델 확보	5	100	유효성 평가를 위한 동물실험 모델 확립 완료
○ 비알콜성 간건강을 위한 in vivo 질환 마우스 모델 기반 간조직에서의 지방 감소 효과 검증	25	100	동물실험을 통한 DSR330 소재의 비알콜성 간건강 기능 유효성 확보
○ 구강건강 개선 평가를 위한 pilot study를 통한 프로바이오틱스 기능성 검증	-	-	(추가진행)동물실험 평가 완료 건 외, 간이임상 추가 수행함
○ 개발중인 건강기능별 국내 건강기능식품의 시장성 평가, 사업성 분석 수행, 개별인정 추진 기능성 선정	10	100	자체 시장성 평가 및 사업성 분석 완료. 개별인정 추진 기능성 동물실험 완료
○ 프로바이오틱스 우수 후보 발굴 - 호흡기 건강 및 체지방 감소	10	100	세포실험을 통해 우수한 동물실험 후보 균주 선발함
○ In vivo 건강기능성 평가모델 확보	5	100	In vivo 평가 모델 확보 (호흡기 건강, 체지방 감소)
○ 호흡기 또는 체지방 건강을 위한 in vivo 질환 마우스 모델 기반 효능, 효과 검증	25	100	염증 세포 침윤도 및 세기관지 변화도, 염증 바이오마커를 개선하는 천식 마우스 모델 생체 내 바이오마커 측정
○ 전장 유전체 분석을 통한 프로바이오틱스 건강기능식품 원료 안전성 확인	10	100	장 내 유익균 및 유해균의 상대적 풍부도를 조절하고 유익한 대사산물을 생성하는 천식 마우스 모델의 장내 마이크로바이옴 분석 완료
<b>합계</b>	<b>100점</b>	<b>100</b>	

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

목표에 맞추어 연구개발성과를 잘 도출하였을 뿐만 아니라 시제품 생산 및 간이임상시험을 진행하여 사업화를 위한 연구도 수행하였음

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 없음

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

확보된 기능성을 바탕으로 추후 인체적용시험을 통해 개별인정형 소재로 개발하면서 동시에 안정성 확보를 통해 사업화를 준비할 예정임

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	김치 종균 프로바이오틱스 유산균의 맞춤형 기능성 개발			
주관연구개발기관	대상(주)		주관연구책임자	류병희
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	462,000,000	203,000,000	-	665,000,000
연구개발기간	2022.04.04. ~ 2023.12.31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(    ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:    )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①프로바이오틱스 우수 후보 발굴 -비알코올성 간, 구강, 체지방감소, 호흡기 건강	세포실험을 통해 동물실험 우수 균주 선발함
②질환 마우스모델 기반 효능, 효과 검증	동물실험으로 DSR330 소재의 비알콜성 간건강 및 EFEL6901 소재의 호흡기 건강 유효성 확보
③개발중인 기능별 건강기능식품의 시장성 평가, 사업성 분석수행, 개별인정추진 기능성 선정	자체 시장성 평가 및 사업성 분석 완료. 개별인정 추진 기능성 동물실험 완료
④전장 유전체 분석을 통한 프로바이오틱스 건강기능식품 원료 안전성 확인	장 내 유익균 및 유해균의 상대적 풍부도를 조절하고 유익한 대사산물을 생성하는 천식 마우스 모델의 장내 마이크로바이옴 분석 완료

### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타연구활용예외) (명)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문 S C I	비 S C I			학 술 발 표	정 책 활 용	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	20				20	20				10				10	10		10		
최종 목표	2	2			1	50	1	550		1		2		3.5	8	4			
당해 년도	목표	2			1	50				1		2		3.5	8	4			
	실적	2			1	20				1		3		5.3	8	4			
달성률 (%)	100				100	40				100		150		150	100	100			





## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업 민간중심 R&D 사업화과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 기술사업화지원사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.