

RS-
2021-IP
821025

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

발간등록번호

11-1543000-004690-01

전통 발효식품 유래 유산균을 활용한 숙취 및 간 보호효능에 도움이 되는 기능성 식품 개발

2024.07.09.

주관연구기관 / (주)팜스빌
공동연구기관 / 세계김치연구소

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

전통 발효식품 유래 유산균을 활용한 숙취 및 간 보호
효능에 도움이 되는 기능성 식품 개발

2024
농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “전통 발효식품 유래 유산균을 활용한 숙취 및 간 보호효능에 도움이 되는 기능성 식품 개발” (개발기간 : 2021. 04. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 07. 09.

주관연구기관명 : (주)팜스빌 (대표자) 이 병 옥
공동연구기관명 : 세계김치연구소 (대표자) 장 해 춘



주관연구책임자 : 박상민
공동연구책임자 : 최학종



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

사업명	기술사업화지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	-		
내역사업명 (해당 시 작성)	[공공기술 사업화 촉진] 지원분야 식품			연구개발과제번 호	821025-03		
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LA0904	50%	2순위 LA1906	30%	3순위 LA1801	20%
	농림식품 과학기술분류	1순위 PA0201	40%	2순위 PA0102	30%	3순위 CA0105	30%
총괄연구개발명	-						
연구개발과제명	전통 발효 식품 유래 유산균을 활용한 숙취 및 간 보호효능에 도움 이 되는 기능성 식품 개발						
전체 연구개발기 간	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(33개월)						
총 연구개발비	총 1,045,720천원 (정부지원연구개발비:732,000천원, 기관부담연구개발비 : 313,720 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[○] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도	착수시점기준(3단계) 종료시점목표(8단계)		
연구개발과제 유형	-						
연구개발과제 특성	-						
연구 개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ● 전통 발효 식품인 막걸리와 묵은지 유래 유산균을 활용하여, 숙취 해소 와 간 보호 효능을 가지는 기능성 식품 개발 					
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효 식품 유래 숙취 개선 유산균 발굴 ○ 발굴된 숙취 해소 유산균의 최적 대량생산 기술 확보 -배양조건 확립, 동결건조보호제 개발, 열 안정성 확보 ○ 숙취 해소 유산균의 대량공정 표준화를 통한 제조공정 확립 ○ 숙취 해소 유산균의 in vitro, in vivo 숙취 개선 효능 및 간 기능 개선 효능 확인 - in vitro:알코올 분해능, 알코올 대사 분해효소 활성, 간세포 손상 억제 - in vivo: 알코올 저감 효능, 알코올 간 기능 개선 효능, 알코올 대사 분해효소 활성, 알코올 유도 운동 능력 손상 개선 효능, 알코올에 의한 수면 유도 증상 개선 효능 확인 ○ 숙취 해소 유산균의 특성, 안전성, 장내 안정성 검증 -항생제 내성, 용혈반응, 젤라틴 액화 반응 및 urea 분해 반응 분석 내산성/내담즙성/장 부착능 확인 -Whole genome 분석 기반 항생제 내성 확인 ○ GLP 기관의 독성시험 등을 통한 섭취 안전성 확보 - 단회투여독성시험, 유전독성시험 3종 ○ 인체적용시험 IRB 신청 서류 개발 완료 및 IRB 승인 -Protocol(시험계획서), CRF(증례기록서), 동의서 등 ○ 인체적용시험 수행 완료 					

		<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형 개발(젤리, 캡슐, 건과류, 음료용 분말, 필름) 및 제품 디자인 개발 ○ 기능성 표시식품으로서의 과학적 증빙자료 확보 완료 ○ 개발된 복합유산균 “와이락 엘 복합유산균” 을 적용한 제품개발 완료 및 사업화 ○ 특허출원 및 논문 게재 완료 ○ 기술이전 완료
	목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효식품 유래 숙취 개선 유산균 발굴 ○ 숙취 해소 유산균의 in vitro, in vivo 숙취 개선 효능 및 간기능 개선 효능 확인 ○ 숙취 해소 유산균의 장내 안정성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 내산성/내담즙성/장 부착능 확인 ○ 숙취 해소 유산균의 최적 대량생산 배양조건 확보 <ul style="list-style-type: none"> -배양조건 확립, 동결건조보호제 개발, 열 안정성 확보 ○ GLP 기관 독성시험을 통한 섭취 안전성 확보 ○ 숙취 해소 유산균의 복합 조합에 따른 세포 및 동물시험에서 유효성 확인 ○ 인체적용시험 IRB 신청서류 개발 및 IRB 승인 ○ 특허출원 및 균주 기탁
1 단계	내용	<p>[1차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> ● (주)팜스빌 (주관기관) <ul style="list-style-type: none"> · 최종 선발된 유산균의 대량 배양조건 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 유산균 대량 배지 조성과 보호제 개발을 통한 원말 생산 <ul style="list-style-type: none"> : 균주의 생장에 따른 배양 온도, pH, 배양 시간, 배지 조성 확립 · 선발된 유산균의 열 안정성 확보 · 동결 건조 보호제 개발 ● 세계김치연구소 (공동 연구 개발 기관) <ul style="list-style-type: none"> · 발효 식품 유래 숙취 개선 유산균 발굴 · 유산균 처리에 따른 in vitro 알코올 분해능, 알코올 대사 분해효소 활성, 간세포 손상 억제 효능 확인 · 실험 동물을 이용한 유산균의 알코올 분해 효능, 알코올성 간질환 개선 효능 검증 · 숙취 해소 유산균의 장내 안정성 확인 <p>[2차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> ● (주)팜스빌 (주관기관) <ul style="list-style-type: none"> · 대량공정 표준화 및 유통 기한 설정 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 4주 가혹 시험 및 8주 25, 35, 40° C 경시 안정성 평가 · 안전성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 단회투여독성시험, 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험) ● 세계김치연구소 (공동 연구 개발 기관) <ul style="list-style-type: none"> · 실험 동물 기전 확립 및 대량 배양 시료를 이용한 동등성 효능 검증 · 알코올 유도 운동 능력 손상 개선효능 확인

		<ul style="list-style-type: none"> 알코올에 의한 수면 유도 증상 개선효능 확인 특허출원 및 균주 기탁 <p>● 네오뉴트라㈜ (위탁연구 개발 기관)</p> <ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발 프로토콜 및 시험문서(증례기록서, 동의서 등) 개발 프로토콜 IRB 심의 신청 및 승인
2 단계	목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 유산균의 생리학 및 분자 생물학적 안전성 평가 ○ 특허 확보를 통한 기술 이전 및 논문 제출 ○ 숙취 해소 유산균의 특성, 안전성 검증 <ul style="list-style-type: none"> -항생제 내성, 용혈반응, 젤라틴 액화 반응 및 urea 분해 반응 분석 -Whole genome 분석 기반 항생제 내성 확인 ○ 숙취 해소 유산균의 제형개발과 인체적용시험 완료를 통한 제품화
	내용	<p>● ㈜팜스빌 (주관기관)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 표시 식품으로서의 과학적 증빙자료 확보 완료 · 제형(젤리, 캡슐, 건과류, 음료용 분말, 필름) 및 제품 디자인 개발 ○ 개발된 복합 유산균 “와이락 엘 복합 유산균” 을 적용한 제품개발 완료 및 사업화 <p>● 세계김치연구소 (공동 연구 개발 기관)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 알코올 내성 김치 유산균의 생리학 및 분자생물학적 안전성 평가 - 섭취 근거에 따른 안전성 확보를 위한 데이터수집, 항생제 내성 확인 및 Whole genome 분석 · 장내 안정성 확인 알코올 내성 선발 유산균의 생화학적 특성 및 분자생물학적 특성 평가 · 숙취 해소 기능성 선발 유산균 특허등록 및 기술 이전 · 학술 논문 발표 및 논문 게재 <p>● 네오뉴트라㈜ (위탁연구 개발 기관)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 인체적용시험 수행 - 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 교차설계 인체적용시험 모니터링 · 인체적용시험 결과보고서 작성 - DM(Data Management) 및 통계분석 - 인체적용시험 종료

연구개발성과	<p>1. 기술적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 숙취 해소 유산균 4종의 특허권 확보 ○ 알코올 내성 유래 숙취 해소 유산균 균주 기탁 5건 ○ in vitro 및 in vivo 효능실험을 통한 숙취 개선 관련 기전 규명 및 유효성 자료 확보 ○ 식약처 “숙취 해소 표시·광고 실증을 위한 인체적용시험 가이드라인” 에 따른 숙취 해소 인체적용시험을 통해 유산균의 숙취 해소 효능을 입증 ○ GLP 안전성 평가자료 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 단회투여독성시험, 유전독성시험(소핵시험, 염색체이상시험, 복귀돌연변이시험) ○ 균주 대량생산 공정 표준화 및 규격화 완료 ○ 열 안정성 개선 공정을 통한 온도안정성 확보
--------	--

- 대량생산 원말의 공인시험 분석을 통한 기능 성분 및 기준규격 설정 완료
- 인체적용시험 완료
- 기능성 표시 식품 신청을 위한 과학적 증빙자료 확보
- 알코올성 간 손상에 대한 보호 효능 검증

2. 경제적 성과

- 숙취 해소 인체적용시험을 통해 효능이 확인된 복합 유산균을 적용하여, 숙취 해소제의 주요 소비자층인 2030세대를 공략할 수 있는 신규 제형(필름 제형, 프레스 샷 등의 이중 제형)의 개발과 숙취 해소제 제형의 틀을 벗어나 건과류의 시즈닝으로 사용하는 등 숙취 해소용 안주와 같은 새로운 형태의 개발을 통해 사업화하여 매출 증대에 기여
- 과음으로 인한 숙취는 개인적으로는 의료비 지출, 업무나 학업에 집중하지 못하는 생산성 손실을 발생시키고, 사회적으로는 근로자들의 생산성을 감소시키거나 업무효율을 떨어뜨려 교통사고나 건강보험 지출 증가 등의 사회적 손실을 발생시킴. “와이락 엘 복합 유산균” 이 적용된 숙취 해소제의 개발로 인해 이러한 개인적, 사회적 손실을 예방할 수 있어 사회적 비용이 감소됨

3. 사회적 성과

구 분	(2024)년	(2025)년	(2026)년
신규고용(명)	9	16	-
상시고용(명)	21	30	22

연구개발성과
활용계획 및
기대 효과

○ 연구 개발 성과 활용계획

- 기능성 표시 식품 관련 제도 강화 및 개편에 따라 향후 개발될 제품을 위한 기초 자료로 활용가능. 나아가 본 연구과제의 인체적용시험 결과를 바탕으로 향후 숙취 해소 기능성 유산균의 개별인정형 인·허가를 위한 활용 가능
- 알코올로 손상된 간 보호 효과 확인을 통해 간 건강 기능성 소재로 확대하여 개별 인정 등을 진행 가능
- 숙취 해소 기능성 유산균의 추가 기능성 탐색을 통해 다기능성 생물 자원의 활용 가능
- 음료, 환, 젤리 제형의 제품들로 구성된 숙취 해소제 시장에 숙취 해소 기능성 유산균을 이용한 안주 형태의 일반식품이라는 신규 분야 개척 가능
- 해외 진출을 위한 캡슐 제형으로 hangover 표시 식품으로 베트남 B2C 공략
- 국내 숙취 해소제 시장에 차별화 제품 출시뿐 아니라 동남아, 베트남, 중국, 미국, 러시아 등 숙취 해소 음료에 대한 수요 증가가 기대되는 국외 시장에 대한 수출 산업화

○ 기대 효과

- 세계김치연구소에서 기술이전받은 알코올에 내성을 가지며 알코올 및 아세트알데하이드 분해 활성을 갖는 숙취 개선 유산균 소재를 이용해 기능성 표시 식품을 개발할 뿐 아니라 인체적용시험 결과까지 확보함으로써 ‘숙취 해소’ 기능성 표시 식품 시장에서의 경쟁적 우위를 확보하고 매출 증가에 기여할 수 있을 것으로 기대
- 전통 막걸리와 묵은김치로부터 분리 동정 된 토종 균주의 숙취 해소 제품의

글로벌시장 진출 및 토종 균주의 세계화												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	해당사항 없음											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허 (등록)	보고서 원문	연구시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	1	2	5	-	1	-	-	-	5	-	-	-
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
국문핵심어 (5개 이내)	숙취 해소제		간보호		유산균		알코올대사		아세트알데하이드			
영문핵심어 (5개 이내)	hangover food		liver protection		lactic acid bacteria		alcohol metabolism		acetaldehyde			

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요	
제 1 절. 연구 배경 및 목적	10
제 2 절. 연구 개발의 필요성	
1. 연구 개발의 필요성	12
2. 연구 개발의 차별성 및 독창성	15
제 2 장 연구 개발 수행 방법 및 내용	
제 1 절. 연구 개발 수행 목표	
1. 연구 개발 수행 목표	17
2. 연구 개발 추진체계	19
3. 연구 개발 내용 및 범위	20
제 2 절. 연구 개발 방법	
1. 숙취 해소유산균의 발굴 및 효능 검증	22
2. 숙취 해소 유산균의 대량 공정 원료 표준화	23
3. 균주의 특성 및 안정성 평가	25
4. 최종선발 된 숙취 해소 2종의 안전성 검증	26
5. 인체적용시험 및 통계분석	26
6. 제형 개발 및 시제품	31
7. 제품화	31
제 3 절. 연구 개발 내용	
1. 숙취 해소 개선 기능성 유산균 선발	32
2. 숙취 해소 유산균의 in vitro 효능 검증	35
3. 숙취 해소 유산균의 in vivo 효능 검증	40
4. 대량 표준화 원료를 적용한 효능 재현성 검증	48
5. 균주 생산 최적화 및 대량 공정 표준화	62
6. 숙취 해소 유산균 5종의 특징 및 안전성 검증	77
7. 숙취 개선 유산균의 안정성 검증	81
8. 복합 유산균의 안전성 평가	84
9. 인체 적용 시험	88
10. 제형 개발 및 제품화	108
제 3.장 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	
제 1 절. 연구 개발 과제의 대표적 연구 실적	
1. 연구 개발 실적 요약	109
제 2 절. 연구 수행 결과	
1. 정성적 연구개발 성과	112
2. 정량적 연구개발 성과	136
제 4 장. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	
제 1 절. 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용	
제 2 절. 자체 보완활동	150

제 3 절. 연구개발 과정의 성실성

제 5 장. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

제 1 절. 목표 달성도	-----	151
제 2 절. 관련 분야 기여도	-----	154

제 6 장. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

제 1 절. 연구 개발 성과의 관리 계획	-----	155
제 2 절. 연구 개발 성과의 활용 계획	-----	157

기타 1. 별첨 자료 (공통 요구자료)

기타 2. 별첨 자료 (기타추가자료)

최종보고서										보안등급 일반[○], 보안[]				
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명			기술사업화지원사업				
전문기관명		농림식품기술기획평가원			내역사업명		[공공기술 사업화 촉진] 지원분야 식품							
공고번호		농축 2021-418			총괄연구개발 식별번호		-							
					연구개발과제번호		821025-03							
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LA0904	50%	2순위 LA1906	30%	3순위 LA1801	20%							
	농림식품과학기술분류	1순위 PA0201	40%	2순위 PA0102	30%	3순위 CA0105	30%							
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문	-									영문	-	
연구개발과제명		국문	전통 발효 식품 유래 유산균을 활용한 숙취 및 간보호효능에 도움이 되는 기능성 식품 개발									영문	Development of functional foods that help with hangover and liver protection by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods	
주관연구개발기관		기관명	(주)팜스빌			사업자등록번호		[Redacted]						
		주소	(우)077906 서울시 강서구 마곡중앙8로 3길 37			법인등록번호		[Redacted]						
연구책임자		성명	박상민			직위		[Redacted]						
		연락처	직장전화	[Redacted]			휴대전화		[Redacted]					
			전자우편	[Redacted]			국가연구자번호		[Redacted]					
연구개발기간		전체	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)											
		단계 (해당 시 작성)	1단계	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)										
			2단계	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1년 0개월)										
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금		
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계			
총계		732,000	94,120	219,600	-	-	-	-	826,120	219,600	1,045,720	-		
1단계	1년차	200,000	25,720	60,000	-	-	-	-	225,720	60,000	285,720	-		
	2년차	266,000	34,200	79,800	-	-	-	-	300,200	79,800	380,000	-		
2단계	3년차	266,000	34,200	79,800	-	-	-	-	300,200	79,800	380,000	-		
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고							
							역할	기관유형						
공동연구개발기관		세계김치연구소	최학중	본부장	[Redacted]	[Redacted]	책임자	국립연출연(연)						
위탁연구개발기관		네오뉴트라(주)	서은정	차장	[Redacted]	[Redacted]	책임자	중소기업						
연구개발기관 외 기관		-	-	-	-	-	-	-						
연구개발담당자 실무담당자		성명	목지예			직위		팀장						
		연락처	직장전화	[Redacted]			휴대전화		[Redacted]					
			전자우편	[Redacted]			국가연구자번호		[Redacted]					

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

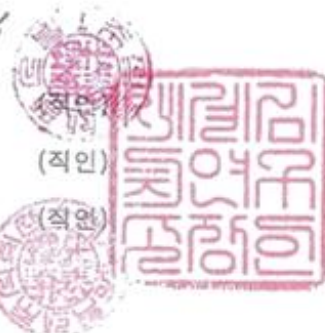
2024년 02월 29일

연구책임자: 박 상 민

주관연구개발기관의 장: 이병욱

공동연구개발기관의 장: 장해춘

위탁연구개발기관의 장: 강제학



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 배경 및 목적

1. 연구개발의 배경 및 목적

- 숙취는 술을 마신 후에 나타나는 두통, 설사, 식욕부진, 오심, 구토, 오한, 식은땀 등의 증상을 뜻하며, 객관적인 증상으로는 인식, 운동능력 저하, 혈액학적 변화 및 호르몬의 변화를 일컫음. 숙취의 원인은 탈수, 알코올 및 알코올 대사물(아세트알데하이드, 포름알데하이드, 아세트 등)의 독성, 흡수 장애에 의한 영양소 결핍(혈당, 비타민, 무기질 결핍) 등인 것으로 알려져 있다. 숙취 정도는 유전에 따른 개인의 편차, 환경 상태(영양 상태, 운동 상태, 탈수 정도, 건강 상태)에 따라 정도의 차이가 매우 심함.
- 음주 후 알코올은 3가지 경로를 통해 대사되는데, 에탄올의 농도가 낮을 때는 위장관 또는 간에 존재하는 알코올 탈수소효소(Alcohol dehydrogenase)와 아세트알데하이드탈수소효소(Acetaldehyde dehydrogenase)의 작용에 의해, 에탄올의 농도가 높을 때는 소포체에 존재하는 마이크로솜 에탄올 산화체계(MEOS: Microsomal ethanol oxidizing system)에 의해 아세트알데하이드와 아세트산으로 대사되며 이후 퍼옥시솜(peroxisome)에 존재하는 카탈라제(catalase)의 작용 등을 거쳐 이산화탄소(CO₂)와 물(H₂O)로 최종 분해됨. 적당량의 알코올이 유입되면 상기 기술한 대사 체계가 원활하게 작용하여 알코올 때문에 일어나는 제반 증상이 일어나지 않지만, 다량의 알코올 유입 시 대사 체계의 균형이 파괴되어 생체 항상성을 유지하지 못하게 되어 단기적으로는 두통 또는 두중감, 집중력 감퇴, 속쓰림 및 소화불량 등이 초래되고 장기적으로는 간 기능 장애가 발생할 수 있음.
- 2023년 대한민국의 국민 1인당 연간 알코올 소비량은 9.3 L로 OECD 회원국 중에서도 상위권에 속하며, 2021년보다 총소비량이 1.6 L가 늘어 약 20.8% 상승하였음. 알코올 소비량 증가에 따라 소비자들의 숙취 해소제에 대한 니즈도 함께 커지고 있어 기존에 숙취 해소제를 판매하고 있던 회사들도 최근 주류 소비의 큰손으로 떠오른 MZ세대(1980년대 초~2000년대 초 출생자)를 대상으로 새로운 숙취 해소제를 출시하고 있음.
- 시장조사업체 닐슨코리아에 따르면 국내 숙취 해소제 시장 규모는 2019년 2,678억 원에서 2022년 3,127억 원으로 커졌으며, 20~40대의 숙취 해소제 수요는 50대 이상의 연령군보다 3배 이상 높은 것으로 조사되었으며, 닐슨코리아의 조사 결과에 따르면 국내 숙취 해소제 시장은 전년 대비 약 40%가 증가하여 시장 규모가 약 3,127억 원을 기록함.
- 기존 숙취 개선을 위한 소재 관련 주성분으로는 식물성 생약제가 가장 많았으며, 주원료로 많이 첨가되는 재료로는 헛개나무(지구자, 지구목)가 가장 많았고, 갈근, 인삼, 오리나무, 진피, 가시오가피 순이었음(황지홍 외 1, 2020)¹⁾.
- 최근 장내 유익균 증진 및 유해균 억제로 각광을 받고 있는 프로바이오틱스(Probiotics)는

1) 황지홍, 김미연, 천연소재복합물의 알코올 및 아세트알데하이드 분해활성 및 호기중 알코올 농도 감소, 문화기술의 융합, 2020

그 가능성을 인정받아 다양한 분야에 적용되고 있음. 이러한 프로바이오틱스 중에 알코올로부터 간을 보호하고 간의 특이 기능을 향상해 준다는 결과가 보고되어 있음.

- 알코올 및 아세트알데하이드 분해 활성을 갖는 유산균 소재를 함유한 숙취 해소제는 소장으로 흡수되는 알코올과 아세트알데하이드를 간으로 이동하기 전에 분해함으로써 간 부담을 최소화할 수 있고 이에 따라 숙취를 감소시킬 수 있음.
- 기존의 숙취 해소 제품들은 광고 심의를 거쳐 숙취라는 단어를 사용하였으나, 2021년 기능성표시 제도의 개정으로 2025년부터는 인체적용시험 또는 그 결과에 대한 정성적 문헌 고찰을 갖추어야 숙취 해소' 라는 표현을 사용할 수 있도록 관련 법규가 개정되었고, 식약처에서 “숙취 해소 표시·광고 실증을 위한 인체적용시험 가이드라인” 이 2023년 6월 발표되었음.
- 이에 따라 본 연구에서는 숙취 해소에 대한 과학적인 근거와 인체적용시험을 통한 숙취 해소 유산균을 개발하게 되었음
- 숙취 해소제의 주요 소비층을 타겟으로한 새로운 숙취 해소 소재의 개발을 위하여 세계 김치연구소와 공동 연구를 통하여 전통 발효식품인 막걸리와 묵은지로부터 알코올에 내성을 가지는 유산균을 분리하여 숙취의 원인이 되는 아세트알데하이드와 알코올 분해능이 있는 균주를 발굴하였음
- 본 기술은 묵은지와 막걸리로부터 분리된 5종의 유산균의 알코올 분해효소 활성, 혈중 알코올 저감 및 간 손상 개선, 알코올 섭취 후 수면 각성 효과와 운동능력 등에 대한 효과를 검증하였으며, 인체적용시험을 통하여 효과가 우수함을 확인하였으며, 다양한 제형의 개발과 제품화를 통해 2025년 기능성 표시 식품의 인증을 위한 기반을 마련하였음.
- 베트남 등 동남아 및 글로벌 숙취 해소 시장에 진출하기 위한 차별화 된 한국 전통 식품 유래 소재를 개발하게 되었으며, 이를 통한 숙취 해소제의 해외 시장 수출의 교두보가 마련됨
- 기존의 숙취 해소제와 달리 원료 및 제품의 과학적 근거 마련을 위한 인체적용시험을 통해 객관적인 효능을 검증한 제품의 글로벌 시장 진출은 K-Food의 우위성을 알리는 계기가 됨.

제 2 절 연구 개발의 필요성

1. 연구 개발의 필요성

1) 음주 문화 변화에 따른 숙취 해소제 시장의 변화

- 식약처에서 발표한 자료에 의하면 2020년 코로나19로 인한 팬데믹이 선언되면서 국내에서도 5인 이상의 단체 모임이 금지, 외출 시 마스크 착용 의무화 등으로 인하여 국내 알코올 소비량은 2020년부터 지속적으로 감소하는 추세를 보였으나, 2023년에 코로나19 엔데믹을 선언하게 되면서 그해 국민 1인당 알코올 소비량은 9.3 L로 전년 대비 7.3% 증가하였음. 2023년에 코로나19 엔데믹을 본격화로 주류업계의 지각변동이 예상됨. MZ세대를 주축으로 즐거움을 주는 술, 새롭고 독특한 맛을 찾는 소비자가 늘어나며 고급 위스키, 하이볼, 칵테일 등이 주목받는 추세임, 관세청 수출입 무역통계에 따르면 2022년 와인 수입액은 전년동기대비 5.5% 상승, 위스키 수입액은 전년동기대비 61.8% 상승함.

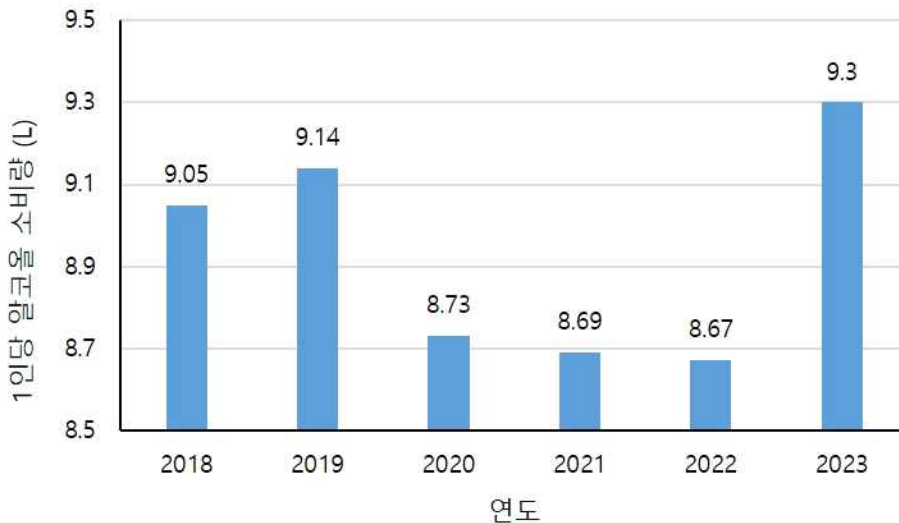


그림 1. 국민 1인당 연간 순 알코올 소비량(L)

- 또한 모임이 제한되면서 ‘회식 문화’, ‘억지 술 문화’가 줄어들고 ‘홈술(집에서 마시는술)’, ‘혼술(혼자 마시는 술)’, ‘간술(간단하게 술 마시자)’, ‘간맥(간단하게 맥주 마시자)’ 등 가게가 아닌 집에서, 혼자 술을 마시거나 소수가 모여 가벼운 음주를 즐기는 문화가 자리 잡게 됨.
- 음주 문화의 변화가 퍼져 나가면서 가벼운 음주에도 숙취 해소제를 챙겨 먹는 트렌드가 확대되고 숙취 해소제의 주요 소비자층이 ‘과거 사오십 대 남성 직장인’에서 ‘현 2030(MZ세대)’으로 이동하여, MZ세대의 숙취 해소제 수요가 50대 이상의 연령층보다 3배 높은 것으로 조사되었음. 따라서, 변화하는 음주 문화 및 주요 소비자층에 맞는 새로운 숙취 해소제 개발의 필요성이 대두됨.

2) 숙취 해소 유산균 소재 개발 필요성

- 기존의 천연 원료 소재와 밀크씨슬 등을 함유한 간 보호 기능을 가진 제품은 소재의 쓴 맛과 특유의 향을 없애기 위한 당분이 첨가되어 있으며, 혈중 당류 부족은 숙취를 야기

하는 것으로 알려져 숙취 해소음료의 설탕 함량이 다소 높게 되어있음.

- 동아제약(주)의 ‘모닝케어 강황’은 17g, 광동제약(주)의 ‘헛개파워’는 18g의 당을 함유하고 있으며, 누적 판매량이 가장 높은 HK이노엔(주)의 헛개 컨디션 또한 당 함량이 11g임. 이는 고혈압·당뇨·비만 등 대사성 질환을 앓고 있는 소비자의 선택 시 주의가 필요한 사항이며, 건강한 사람이라 하더라도 숙취 해소제를 짧은 시간 내에 많이 복용하게 되면 과도한 당은 장운동이 활성화시켜 설사나 복통을 유발할 수 있어 주의가 필요함.
- 본 연구과제를 통해 개발 예정인 유산균 소재의 숙취 해소 제품은 설탕 대신 유산균의 먹이가 되는 올리고당으로 대체가 가능하므로 기존 숙취 해소 음료들에 비해 당 함량을 낮출 수 있음. 따라서, 본 연구과제에서는 공동 연구개발기관인 세계김치연구소로부터 발굴된 알코올 및 아세트알데하이드 분해능이 우수하며 알코올 내성을 가지는 균주를 이용하여 기존 제품 대비, 당 함량을 낮춘 숙취 해소제를 개발하여 경쟁력을 확보하고자 함.

회사명	제품명	당 함량(g)	회사명	제품명	당 함량(g)
동아제약	모닝케어	9	하이트진로	술 깨는 비밀	7.6
	모닝케어 강황	17	케이디	88h	18
	모닝케어 레이디	8	참다한	디데이	10
	모닝케어 엑스	5	블루텍	기적소리	0.12
광동제약	헛개파워	18	자연채	후엔	8
해태음료	이태백의 숙취비책	22	우리집농장	애간장	2
KGC인삼공사	정관장369	11	금호제약	모닝세븐	11
CJ헬스케어	헛개 컨디션	11	영진약품	헛개 콜샷	13
	컨디션 레이디	11	태영F&I	콜싸인 후레쉬	11
라운그린푸드	깁데이	0.2	유한양행	내일엔	10
하이텍21	굿타임	9	아이센스	위하여 골드	8
보령수앤수	헛개 스마일어게인	17	진산웰니스	진산 아우라	1
S&J푸드	천지개벽	13	푸드사이언스	닥터박 모닝파워	14
한독	레디큐	15	이마트	울금500	10

표 1 숙취 해소 음료별 당분 함량

<출처: 글로벌이코노믹, [설탕과의 전쟁-숙취 해소음료] 천차만별 당 함량, 술 깨려다 비만 온다?, 2016.06.28.>

3) 소비자층 변화에 따른 신소재 개발 필요성

- 1992년 CJ의 ‘컨디션’ 출시로부터 시작된 국내 숙취 해소제 시장의 초기 단계 1세대 제품은 마시는 숙취해소음료가 주를 이루었음. 2013년 삼양사의 ‘상쾌환’ 제품이 출시된 이후 환, 젤, 젤리, 분말 타입 등 차별화된 컨셉의 신제품이 잇따라 출시되고 있으며, 기존 병 제품에서 휴대성과 편리성을 높인 다양한 제형으로 시장의 성장을 끌어내고 있음.
- 하지만 액상뿐 아니라 환, 타블렛과 같이 천연물을 주원료로 사용한 제품들은 맛과 향에 대한 거부감이 있음. 이에 소비자들의 니즈에 따라 섭취 순응도가 높으며, 휴대하기 간편하고 섭취가 편리한 숙취 해소제의 개발이 필요함.
- 현재 숙취 해소제의 주요 소비자층인 MZ세대는 미닝아웃(Meaning out), 팬시(Fancy), 가치 소비, 비건(Vegan), 레트로(Retro) 등 자신의 신념이나 가치관, 친환경, 윤리적 소비,

합하고 멋이 있는 질 높은 제품이나 서비스의 소비, 자신이 가치가 있다고 생각하는 것에 대하여 소비를 아끼지 않는 소비경향이 드러나며, 이러한 소비 경향은 현재 식품 시장에도 큰 영향을 줌. 이를 바탕으로 기존의 소재와 제형의 지루함에서 벗어난 새로운 제품과 제형에 대한 니즈가 커지고 있음.

- 음료 제형 숙취 해소제 시장 점유율이 2023년 상반기에 40%를 넘어서는 등 숙취 해소제를 가장 많이 소비하는 2030 연령대는 기존의 음료 제형보다 새롭고 재미있으면서도 저렴하고 휴대가 간편한 특징을 가지는 신제품에 소비가 증가하는 추세임.
- 한독이 2023년 09월 경희대학교 축제에서 대학생 1,300여 명을 대상으로 진행한 음주 문화 조사에서 응답자 중 56%가 스틱형 젤리 제형의 숙취 해소제를 선호하는 것으로 나타난 바 있는데, 최근 주요 제약기업들은 2030 젊은 세대들을 잡기 위해 기존의 소환부터 음료 등 제형에 국한하지 않고, 신규 제형을 적용한 제품을 앞다투어 출시하고 있음.
- MZ세대를 타겟으로 하는 신규 제형으로 기존 숙취 해소제에 단순하게 맛을 변형하기보다는 새로운 제형, 새로운 섭취 방법을 고려하여 안주를 대체할 수 있는 건과류, 좀 더 빠른 흡수를 도울 수 있는 필름형, 최근 제일 주목받고 있는 젤리 스틱형 등 다양한 제품의 적용이 가능한 소재가 필요함

4) 산업 및 과학·기술적 필요성

- 2023년에 식품의약품안전처는 ‘숙취 해소 표시·광고 실증을 위한 인체적용시험 가이드라인’을 제정하였음. 해당 내용에 따라 2024년 12월 31일까지 ‘숙취 해소’라는 표현은 객관적·과학적인 근거가 있는 경우 표시·광고 내용을 사용할 수 있도록 하고 2025년 1월 1일부터 인체적용시험 또는 인체적용시험 결과에 대한 정성적 문헌 고찰(체계적 고찰, SR: Systematic Review)을 통해 객관적이고 과학적인 자료를 갖춘 경우에 한하여 ‘숙취 해소’ 표현을 표시 또는 광고할 수 있도록 함.
- 이에 따라 기존에 생산되어 유통 중인 제품들도 2025년부터는 인체적용시험 또는 시험 결과에 대한 문헌 고찰이 없어 과학적인 자료를 통해 효능을 입증하지 못하면 제품의 표시·광고에 ‘숙취 해소’라는 표현을 사용할 수 없음.
- 이러한 산업의 규제에 따라 기존의 숙취 해소제에 사용되던 원료뿐만 아니라 새롭게 개발하는 원료들의 인체적용시험을 통한 객관적이고 과학적인 검증이 필수 요건으로 자리 잡게 됨.
- 본 연구 개발 과제를 통해 한국의 전통 발효 식품인 막걸리와 묵은지에서 유래한 유산균의 숙취 해소 효능 검증과 인체적용시험 결과를 확보함으로써 기능성 표시 식품 인증을 위한 자료를 확보 함으로써 기업경쟁력 확보 및 시장 선점을 기대할 수 있음.
- 김치 유래 유산균 연구를 통한 균주와 유전체 정보를 밝혀냄으로써 농생명 자원·정보를 확보할 수 있고, IT 혁명 이후 세계 경제를 선도할 핵심 산업으로 주목받고 있는 바이오 산업에 근본이 되는 핵심적 역할을 할 것임. 유전체 정보를 바탕으로 한 실용화 및 산업화를 통해 농축산식품 분야의 산업 경쟁력을 갖출 수 있음.

2. 연구 개발의 차별성 및 독창성

1) 차별성

- 김치와 막걸리는 수천 년 동안 한국에서 소비되어 온 전통 발효 식품임. 이러한 식품에서 유래한 균주를 활용하는 것은 식품의 전통적 가치와 현대 과학의 결합을 의미하며, 이는 기존의 천연물이나 한방 원료를 사용하는 숙취 해소 제품들과는 다른 차별화된 접근 방식임
- 과거에는 술을 마신 후 동치미 국물이 숙취 해소에 좋다고 알려져 섭취하였음. 이는 숙취로 인해 발생하는 수분을 보충하며, 탈수 상태를 방지하고 몸의 수분 균형을 회복하는데 도움을 줌
- 전통 발효 과정에서 생성된 효소가 소화를 도우며, 이러한 효소들은 알코올과 음식물의 대사를 촉진하여 숙취 증상을 완화 시킬 수 있음
- 발효 과정에서 발생한 유산균 중 알코올 내성을 가지며, 장내에서 알코올을 분해하는 효소의 활성을 촉진하여 알코올 탈수소효소(ADH)와 아세트알데하이드 탈수소효소(ALDH)는 알코올의 분해를 촉진하고 아세트알데하이드의 축적을 줄일 수 있음
- 유산균 섭취는 장내 유익균의 비율을 증가시키고 유해균의 성장을 억제하여 장내 환경의 균형이 유지되며, 장내에서 알코올과 아세트알데하이드의 대사가 더 효율적으로 이루어질 수 있도록 도움을 줄 수 있음.
- 알코올 섭취는 장 내 염증을 유발할 수 있으며, 이는 장의 투과성 증가와 유해 물질의 혈류로의 유입을 초래할 수 있음. 반면, 유산균은 항염증 효과를 통해 장의 투과성을 감소시키고, 장 내 염증 반응을 완화하여 알코올과 그 대사 산물로 인해 발생하는 증상의 영향을 줄여 줄 수 있음.
- 본 연구에서 개발한 유산균은 알코올 및 아세트알데하이드 분해 능력을 가지며, 장내에서의 대사 활성 촉진, 장내 환경의 개선, 직접적인 대사 작용, 그리고 항염증 효과를 통해 숙취 해소 기능이 있음을 검증하였음. 특히 숙취로 인한 수면의 질에 대한 검증과 운동 실조 능력의 회복 검증을 통해 효과를 입증함

2) 독창성

- 기존 천연물들이 직접 알코올과 아세트알데하이드를 분해 촉진 시키는 반면, 유산균은 장내 미생물의 환경 변화를 통하여 생기는 대사 물질에 의하여 알코올이 분해 및 제거를 촉진함
- 유산균 중 알코올 내성을 가지는 유산균을 발견하였으며, 특히 25 % 알코올 농도에서도 안정적인 성장을 하는 유산균 발굴을 통해 알코올 내성 유산균을 확인하였음
- 간보호 효과 및 운동 수행 능력 향상과 수면 시 입면 시간 등을 통해 숙취로 인해 수면

장애에 대한 효능까지 검증하여 숙취로 나타날 수 있는 모든 장애적인 요소에 대한 검증을 통해 효과가 있음을 확인함

- 특히 대부분의 숙취 해소 유산균은 술에서 분리했지만, 한국 전통 발효 식품인 묵은지를 통해서 분리된 숙취 해소 유산균 제품은 없으며, 기존의 제품과는 다른 다양한 제형을 개발하였음. 특히 필름형 제형 개발과 스낵류에 씨즈닝으로 토핑하는 제품개발을 통해 다양한 유통 라인과 제품군의 확장이 가능함

제 2 장 . 연구개발과제의 수행 방법 및 내용

제 1 절 연구 개발 수행 목표

1. 연구 개발 수행 목표

- 전통 발효 식품인 막걸리와 묵은지 유래 유산균을 활용하여, 숙취 해소와 간보호 효능을 가지는 기능성 식품 개발

기술개발목표	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효식품(김치 및 전통 주류) 유래 숙취 개선 유산균 후보 5종 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 알코올 내성 유산균 발굴과 알코올 분해 효소 활성 유산균 5종 확보 ○ 유산균의 생화학적/분자생물학적 안전성 및 균주 특성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 숙취 개선 효능 유산균 5종에 대해 생화학적·분자생물학적, 용혈반응 검사를 통해 안전성 확인(항생제 내성, 염기서열 분석을 통한 항생제 내성 평가, 용혈능 검사, 젤라틴 액화 반응 및 urea 분해반응 분석) - 내산성, 내담즙성 장내 안정성 확인 ○ 간세포 손상 억제 효능 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 간세포와 알코올 내성 유산균(후보 유산균 5종) 간의 공배양을 통해 간세포 생존율을 측정하여 간세포 손상 억제 효능 검증 ○ 실험동물의 후보 유산균 5종 투여 후 간 기능 개선 지표 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 단기 투여 후 실험동물의 간 조직 내 AST와 ALT 감소 효능 검증 - 장기 투여(8주)에 따른 실험동물의 혈액 AST와 ALT의 감소 효능 검증 ○ 알코올 투여 동물모델을 이용한 알코올 분해능 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 5종의 유산균 및 “와이락 엘 복합 유산균” 을 알코올과 함께 투여하여 시간대별로 혈중 알코올 저감 효능 검증 ○ ” 와이락 엘 복합유산균” 투여에 따른 행동 약리 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 알코올로 유도된 운동능력 저하 개선 효능 확인 - 알코올에 의한 수면 유도 증상의 각성 효능 확인 ○ 균주의 대량공정 표준화 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 후보 유산균 5종의 최적 배양 배지 선정 - 균주 생산 수율 확립을 위한 배양 조건 개발 - 균주 온도안정성 확보를 위한 최적 동결보호제 개발 - 생산공정 최적화를 통해 확보된 배양 기술을 Scale up 하여 800L까지 대량생산 하여 대량생산 공정 확립 및 수율 재현 안정성 확인 	

○ 원료(균주)의 기준규격 설정- 보장 균 수, 정상, 유해 물질, 잔류 농약, 유통 기한 등

- 대량공정을 통해 생산된 균주의 규격화
- 공인 시험기관 분석을 통해 원료 특성 및 안전성(유해 물질 등) 확보

○ 섭취 안전성 확보

: GLP 독성시험기관을 통해 “와이락 엘 복합유산균”의 단회투여독성시험, 유전독성 3종 시험을 완료하여 섭취 안전성 입증

○ 인체적용시험을 통한 통계적 유효성 확보와 인체 안전성 평가

- 식약처 “숙취 해소 표시·광고 실증을 위한 인체적용시험 가이드라인”에 따른 숙취 해소 인체적용시험을 통해 유산균의 숙취 해소 효능을 입증
- 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발 및 IRB 승인
- 인체적용시험 개시 및 수행
- 인체적용시험 Data Management 및 통계분석(예정)
- 인체적용시험 결과보고서 작성 및 결과 보고 IRB 승인(예정)

○ 기능성표시식품의 과학적 근거자료 확보

: 동물실험 논문, 인체적용시험 결과보고서를 기반으로 정성적 문헌 고찰을 통해 과학적 자료를 확보하여 2025년 시행될 숙취 해소 기능성 표시 식품 광고 표시 심의 (상세 페이지, 패키지 등) 및 심사 준비

○ 숙취 해소 제품 및 제형 개발

- 타겟층 분석을 통한 제형 개발(젤리, 분말형, 건과류, 필름형, 소환)
- “와이락 엘 복합유산균”의 특성과 효능을 살릴 수 있는 제품개발
- MZ세대 공략을 위한 직관적이고 접근성이 쉬운 패키지 디자인 적용

○ 학술 발표 및 논문 게재

: 전통 발효 식품 유래 “와이락 엘 복합유산균”의 알코올 및 아세트알데하이드 저감효과와 간 손상 보호 효능에 대한 연구 결과를 발표

○ 숙취 개선 유산균 5종 균주 기탁 5건

- 본 연구를 통해 개발된 전통 식품 유래 유산균 5종의 균주 기탁

○ 숙취 및 간 기능 개선 유산균 4종 특허 출원 4건

- 본 연구를 통해 개발된 유산균의 특허 출원 4건 중 2건은 등록 결정됨. 2024년 3월중 최종 등록 예정.

○ 숙취 개선 유산균 기술이전 2건

- 본 연구를 통해 개발된 유산균 5종의 기술 이전을 완료함
- *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus acidilactici*, *Lac. brevis*, *Lac. curvatus*, *Leuconostoc mesenteroide*

○ 품목신고

- 후보균주 5종 및 “와이락 엘 복합유산균” 원료 품목신고
- 개발제품 품목신고 2건 완료

2. 연구 개발 추진 체계

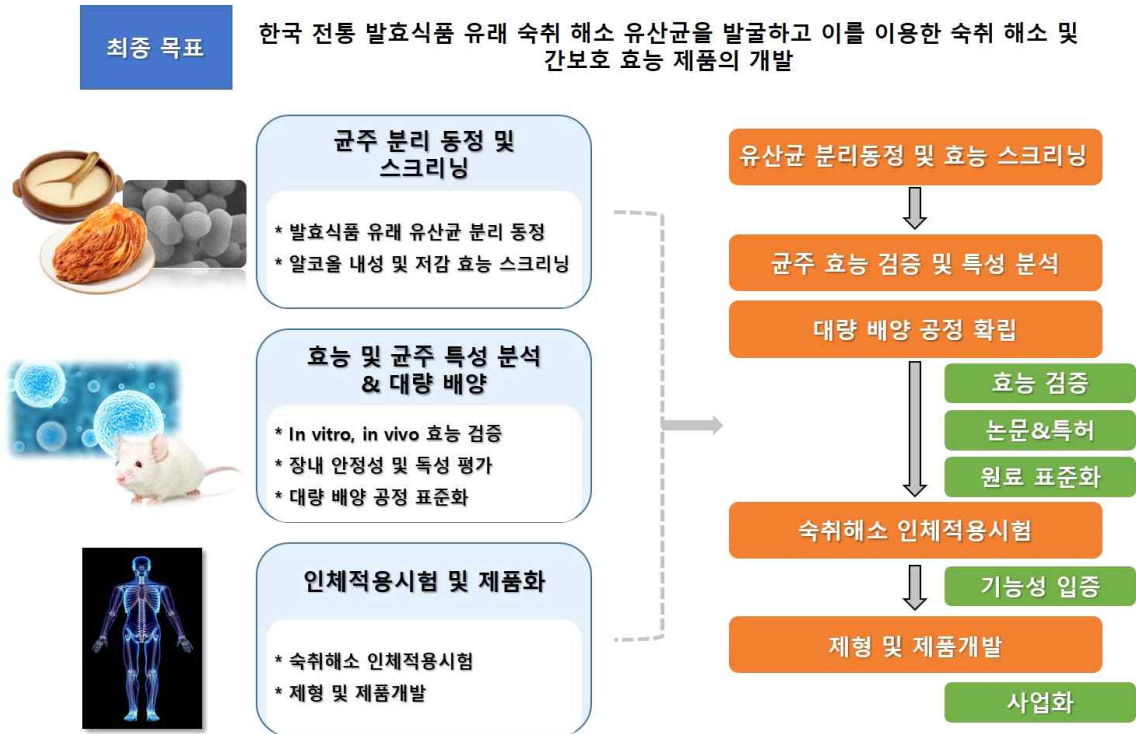


그림 2. 연구 개발 추진 체계도

기관명	추진 연계 현황
세계 김치 연구소	발효 식품에서 알코올 내성을 가지는 유산균을 발굴하여 소재의 효능 및 특성 분석을 진행. 발굴된 유산균의 균주를 (주)팜스빌에 전달함
팜스빌	세계 김치 연구소에서 분리한 균주의 스톡을 이용하여 균주의 대량 배양 표준화를 실시함 세계 김치 연구소에서 검증한 효능 자료를 바탕으로 섭취량을 설정하며, 안전성 검증 실시. 안전성을 확보 후 인체적용시험을 실시하며 통계적 유의성을 확인 제형 개발 및 시제품개발을 통한 제품개발 사업화를 통한 매출 증대
네오뉴트라	숙취 개선 인체적용시험 프로토콜 개발 및 통계 처리 인체 적용 시험 모니터링 및 통계 보고서 등 검토

표 2. 기관별 추진연계 현황

3. 연구 개발 내용 및 범위

연구 개발 내용 및 범위

- 1) 숙취 해소 효능을 가지는 유산균의 발굴
 - 알코올 내성을 가지는 발효 식품 유래 유산균 5종 발굴
- 2) 숙취 해소 유산균의 In vitro 효능 검증
 - 알코올 대사 분해 효소 활성 검증
 - 알코올 분해 효소(ADH) 및 아세트알데하이드 분해효소(ALDH) 활성 측정
 - 간세포 손상 억제 효능 확인
- 3) 숙취 해소 유산균의 in vivo 효능 검증
 - 알코올 분해 효능 검증
 - 알코올 유도 운동 능력 손상 개선 효능 확인
 - 알코올에 의한 수면 유도 증상 개선 효능 확인
 - 김치 유산균 투여 후 혈중/간 조직 내 간 기능 개선 지표 평가
 - 알코올성 간질환 개선 효능 검증 및 메커니즘 규명
- 4) 숙취 해소 유산균의 배합 비율에 따른 효능 증대 및 배합 비율 확정
 - 복합균 조성에 따른 알코올 대사 분해효소 활성 측정
 - 실험 동물 기전 확립 및 대량 배양 시료를 이용한 동등성 효능 검증
 - 알코올 유도 운동 능력 손상 개선 효능 확인
 - 알코올에 의한 수면 유도 증상 개선 효능 확인
- 5) 숙취 해소 유산균의 작용 기전 검증
- 6) 숙취 해소 유산균의 특성 및 안정성
 - 장내 안정성, 내산성, 내담즙성, 장 부착능 검증
 - 전장 유전체 검증
 - 용혈반응 검사, 항생제 내성 검증
- 7) 숙취 해소 유산균의 배양조건 확립 및 대량공정 표준화
 - 배양 온도, 시간, 배지조성 확립
 - 대량공정 표준화 및 가혹 시험
 - 열 안정성 검증
- 8) 숙취 해소 유산균의 안전성 검증
 - 단회 투여 독성
 - 유전독성시험(복귀돌연변이 시험, 염색체이상시험, 소핵시험)
- 9) 인체적용시험

- 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조, 제품군 교차설계 인체적용시험
- 숙취 해소 유산균 섭취군, 대조군, 숙취 해소 유산균 함유 제품군
- 통계분석

10) 숙취 해소 유산균의 제형 개발 및 시제품 개발

- 음료, 젤리, 환, 분말, 안주류, 필름 제형 개발
- 시제품 개발

11) 숙취 해소 유산균 제품화

- 제품의 포뮬레이션 개발 및 품목 신고
- 디자인 개발 및 제품화 2건

12) 숙취 해소 유산균의 상용화

- 마케팅 전략을 통해 국내외 판매 타겟 설정에 따른 다양한 제품의 상용화

13) 숙취 해소 유산균의 특허등록 및 기술 이전

- 본 연구를 통해 개발된 유산균 5종을 2건으로 기술 이전을 완료함

- *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus acidilactici* , *Lac. brevis*, *Lac. curvatus*,

Leuconostoc mesenteroide

- 특허출원 4건, 특허등록 2건

- 기술 이전 완료 2건 (5종 균주), 선급금 및 경상 기술료 지불

14) 논문 등록

- 논문 등록 1건

제 2 절 연구 개발 방법

1. 숙취 해소 유산균의 발굴 및 효능 검증

1) 숙취 해소 유산균 5종 발굴

- 전통 발효식품인 묵은지와 전통 방식으로 만든 수제 막걸리에서 고효율의 알코올 내성 신규 유산균 발굴을 위하여 알코올 내성 유산균 스크리닝 방법을 활용한 추가 기능성 유산균 후보 5종을 선정함.
- 숙취 해소 기능성 유산균을 분리하고, 이를 16s rRNA gene sequencing을 수행하여 동정함.
- 후보 유산균을 0%, 7.5%, 12.5%, 15%, 25% 에탄올이 함유된 MRS 배지에 접종하여, 알코올 내성 생존능 관찰을 위하여 48, 72, 120시간 별로 흡광도 600nm로 측정함

2) 숙취 해소 유산균의 in Vitro 효능 검증

(1) 알코올 분해 효소 활성 측정

- 유산균의 알코올 분해효소(ADH) 및 아세트 알데하이드 분해효소(ALDH) 활성을 측정함
- ADH와 ALDH 활성 측정을 위해 선별 유산균을 생균 및 sonication 한 분획물의 상층액을 Alcohol dehydrogenase activity assay kit와 Acetaldehyde dehydrogenase activity assay kit를 이용하여 활성을 측정함

(2) 간세포 손상 억제 효능 확인

- 혈중 알코올 저감 및 간 기능 개선 유산균 개발을 위한 5종의 후보 유산균의 간세포 사멸 여부를 확인함
- 간암 세포 (HepG2)를 24 well plate에 1×10^4 cell/well로 배양한 후, 유산균을 함께 처리하여 24시간 후 간세포 생존율을 평가

3) 숙취 해소 유산균 5종의 in vivo 숙취 개선 효능 확인

(1) 혈중 알코올 농도 감소 효능 평가

- 선별된 유산균의 숙취 개선 효능을 평가하기 위하여 실험 동물모델에서 혈중 알코올 농도를 측정하여 알코올 저감 효능을 검증하였음
- 8시간 동안 절식한 Sprague Dawley Rat에 에탄올과 함께 유산균을 경구투여하고, 30분, 60분, 180분 그리고 300분 후에 꼬리에서 혈액을 채취하여 원심분리 후 혈청을 분리하고 에탄올 농도 측정 kit를 이용하여 측정함

(2) 알코올성 간 기능 개선 효능 검증

- 유산균의 알코올성 간질환 개선 효능을 검증하기 위하여 6주간 알코올성 식이로 지방간을 유도하면서 유산균을 투여함
- 유산균 경구투여 후 혈액을 채취하여 혈중 간 기능 및 지방대사 개선 수치를 확인함 (ALT, AST, ALP, 중성지방, 총콜레스테롤, HDL)

- 알코올 섭취로 인한 간 손상(염증세포의 침윤)에 따른 염증성 사이토카인 매개 활성을 관찰함

(3) 알코올에 의한 수면 유도 증상의 각성 효능 평가

- 알코올에 의해 유도된 수면 상태가 유산균 원말 시료의 알코올 분해 활성에 따른 수면 각성 효능을 관찰하기 위해 수면 각성 효능 평가(LORR test; Loss of righting reflex test)를 수행함
- 각 원말 시료를 경구 투여한 후, 알코올 투여로 유도된 수면을 각성시키는 효능을 확인함
- C57BL/6 마우스에 알코올을 투여하고, 원말시료를 투여하여 수면 상태 유도함. 이후 사지를 위로 향하게 눕힌 후, 수면에서 각성하여 깨어나는데 걸린 시간을 측정하여 기록함 (1분 내 3회 이상 사지를 바로 하도록 돌아서는 시점 기준)
- 입면 시간과 총 수면 시간을 계산하여 유산균 원말 시료의 수면 각성 효능을 평가함
- LORR test와 숙취 기능 해소 연관성 검증
 - LORR test 수행 후 실험동물로부터 간 조직을 적출하여 파쇄 후 간 기능 수치(AST, ALT) 측정

(4) 알코올 유도 운동 능력 저하 개선 효능 확인

- 원말 생산된 선발 유산균의 운동능력 저하 개선 효능을 평가하기 위해 로타로드 운동능력 검사(Rota rod performance test)를 수행함
- 실험 전 로타로드에서 1회 적응 훈련된 C57BL/6 마우스를 대상으로 각 제품을 효능 용량별 경구 투여한 후, 알코올 투여 후 로타로드 운동능력 검사를 수행함
- 알코올 주사 후 로타로드에서 최대 3분까지 바닥 면으로 떨어질 때까지의 시간을 알코올 주사 후 5, 30, 60, 120, 180 그리고 300분 경과까지 시간대 별로 측정함

2. 숙취 해소 유산균의 대량공정 원료 표준화

1) 대량 배양조건 확립

(1) 후보 균주 5종의 배양조건 개발

- 스크리닝을 통해 선정된 균주 5종: *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus acidilactici*, *Lac. brevis*, *Lac. curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*의 배지 조성 및 동결 건조 보호제 개발을 통한 최적화 진행
- 선별 균주 5종의 균 특성을 변화시키지 않는 여러 배지 조성 개발과 동결 건조 보호제 개발을 통해 대량공정을 위한 최적의 조건 확립
 - 배지 종류와 배양 온도, 시간에 따른 생존율 확인을 통한 생균 수 확인
 - Flask, 4L 배양기를 이용한 대량 증식공정 최적화 진행 중(배지 조성 변화에 따른 생균 수 확인)
 - 제조 단계별 기능 성분의 함량 및 수율 변화에 대한 검증(배지 조성에 따른 균의 생존율 확인)
 - 동결 건조 보호제의 종류와 배합 비율, 동결 조건, 건조 시간에 따른 생존율 확인
 - ▶ 생존율(%) = 동결 건조 후 시료의 CFU 값 / 동결 건조 전 시료의 CFU 값 * 100

- 동결 건조 보호제 종류에 따른 균의 안정성 확보 기술개발

(2) 열 안정성 향상 기술개발

- 선발 균주의 동결 건조 보호제 처리 등 기술 접목을 통해 열 안정성 확보 기술 확립
- 보장균 수 안정화를 위해 조건별 생존율을 확인하여 최적의 배지 선정
- 배지 조성 및 동결 건조 보호제 등의 조건에 따른 온도별·기간별 생존률 측정
 - 가혹 조건 생존율 검증(40°C에서 기간별 생존률 측정)

2) 최종 선정된 유산균 2종의 대량생산 표준화

(1) 대량 배양 조건 표준화

- 최종 효능 및 생산성을 고려하여 선정된 균주 2종(*Levilactobacillus brevis* Wilac L003, *Leuocostoc mesenteroides* Wilac L005)을 800L 발효 탱크로 대량 배양하여, 시생산 원말의 생균 수 및 생산량을 확인하여 대량생산 최적화 진행
- 원료의 기준규격 설정
 - 원말의 생산 배지 조건 확립과 생존율 확인을 통한 지표 기능성 균 수에 대한 확립
 - 유산균 대량 배양조건 확립(배양 온도, 배양 시간에 따른 성장곡선 OD값과 생균수 측정)
- 대량 생산공정 확립 및 최적 공정도 완료에 따른 원료 품목 제조 보고 완료

(2) 경시 안정성 평가 및 유통 기한 설정 시험

- 최종 선발 균주 2종(*L. brevis* Wilac L003, *L. mesenteroides* Wilac L005) 800L 대량생산 원말을 이용하여 25° C, 35° C, 40° C 조건에서 8주간 보관하며 2주마다 원말의 생존 균 수 측정을 통해 경시 안정성 평가
- 유통 기한 설정을 위하여 매달 1회씩 원말의 생균수를 분석

(3) 기준 규격 설정 및 유해 물질 분석

○ 기준 규격 설정

시험 기준 및 방법은 건강기능식품 공전 분석법에 준하여 설정하였다. 대량 생산 표준화 조건에 따라 생산된 원료의 원료에 대한 기능 성분에 대한 규격 및 시험 방법은 프로바이오틱스 수: 「건강기능식품 기준 및 규격(제2022-48호)」 4. 건강기능식품 시험법, 3. 개별 성분별 시험법, 3-57 유산균 수”에 의하여 설정하였다. 대량 생산된 원말의 생균수에 대한 섭취 기준 등을 고려하여, 원료의 기준규격을 설정하였음

○ 섭취용량 설정

- 세계김치연구소의 in vivo 효능실험 결과를 바탕으로 동물 기준 효능 용량을 사람 기준 섭취용량으로 환산하여 계산함으로써 최종 인체적용시험 섭취 용량 결정
- 최종 결정된 섭취용량을 기준으로 인체적용시험 시험식품 생산 및 안전성 시험 수행

3. 균주 특성 및 안정성 평가

1) 숙취 개선 유산균의 분자생물학적 안정성 평가

- 숙취 개선 효능을 보이는 유산균 5종에 대해 항생제 내성을 평가함
- Whole genome 염기서열 분석을 통한 항생제 내성 유전자 확인

2) 알코올 내성 유산균의 생화학적 특성 평가

- 숙취 해소 유산균의 생리적 특성을 파악하기 위해 API 20 Kit를 이용하여 urease 및 gelatin 액화력 생성 유무를 관찰함. 장내 미생물이 생성하는 유해 대사 산물로 알려진 암모니아 생성 여부는 선별된 유산균의 생화학적 특성을 평가하는데 중요한 지표임

3) 용혈반응 관찰 안전성 시험

- 5% Sheep blood를 포함한 blood agar plate에 유산균을 접종하여 배양한 후 α , β , γ 형의 용혈반응을 보이는 비교 균주를 통해 용혈반응을 확인하고, 유산균이 β -용혈 현상을 보이는지 여부를 판단함

4) 장내 안정성 측정

(1) 내산성 검사

- 각각의 유산균을 37°C MRS 액체배지에서 24시간 배양 후 O.D. 1수준으로 하여 3,000rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 버리고 균을 회수하여 산성과 담즙 염에 대한 내성 실험에 사용함
- 내산성 검사를 위해 1N HCl로 pH 2.5로 조정하여 멸균한 MRS 액체 배지에 선발된 균주를 1% 양으로 접종하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 균주 접종 직후와 3시간 배양 후의 시료를 회수하여 MRS 평판 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 평판 배지 위의 집락 수를 계수하여 세포수를 측정함

(2) 내담즙성 검사

- 내담즙성 검사를 위해 0.3%의 담즙산염이 함유된 MRS 액체 배지에 선발된 균주를 1% 양으로 접종하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 균주 접종 직후와 2시간 배양 후의 시료를 회수하여 MRS 평판 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 평판 배지 위의 집락 수를 계수하여 세포수를 측정함

(3) 장세포 부착능 검사

- 96 well plate에 배양된 HT-29 세포에 유산균을 접종한 후 37°C에서 2시간 동안 배양. PBS로 5회 세척하여 부착되지 않은 유산균을 제거한 후 MRS 평판 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 평판 배지 위의 집락 수를 계수하여 세포수를 측정함

4. 최종 선발된 숙취 해소 2종의 안전성 검증

1) 단회투여독성시험

- 시험 물질을 설치류(랫드)에 단회투여하고 그 후 시험계의 일반상태와 변화를 주된 지표로 하여 개략적인 치사량 확인
 - 암수 5마리/군에 시험물질 경구투여 후 14일 관찰

2) 유전독성시험

(1) 복귀돌연변이시험

- *n-vitro*에서 형질전환 균주를 이용하여 시험물질의 유전자 돌연변이의 가능성을 검토
 - TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2uvrA 균주를 이용하여 음성대조군, 시험 물질군(5용량), 양성대조군(용량당 3 plates)로 하여 시험물질 투여 후 48시간 배양하여 복귀변이 콜로니 수 관찰

(2) 염색체이상시험

- *in-vitro*에서 포유류 균주를 이용하여 수적 이상과 구조적 이상에 대한 시험물질의 염색체 이상 유발의 가능성을 검토
 - CHL/IU cell을 이용하여 음성대조군, 시험 물질군(3용량), 양성대조군(용량당 2plates)로 하여 시험물질 투여 후 24시간 후 세포를 수거해서 슬라이드를 검체 제작하고, 염색체 이상 유무를 판독

(3) 소핵시험

- 시험물질의 마우스(또는 랫드) 골수세포에 대한 소핵유발성 유무를 평가
 - 음성대조군, 시험물질군(저·중·고용량군), 양성대조군의 마우스(또는 랫드)에 시험물질을 투여 후 예비시험(소핵유발빈도시험)에서 결정된 시간에 골수를 채취하여 슬라이드 검체를 제작하여 소핵 형성 유무 판독

5. 인체적용시험 및 통계분석

1) 인체적용시험

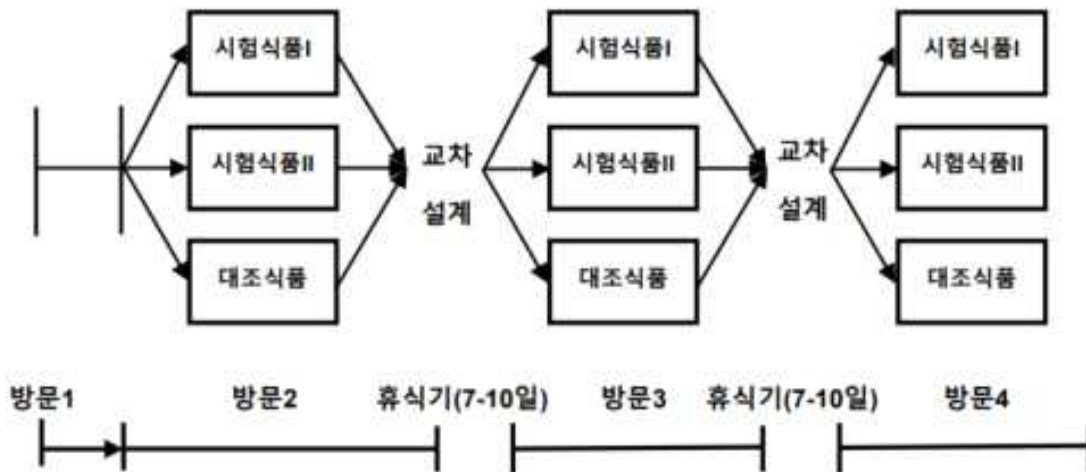
(1) 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발

- ① 프로토콜 개발
 - 인체적용시험 실시기관 선정
 - 인체적용시험 문서 개발
- ② IRB 초기심의 신청 및 승인
 - 연구계획서 및 연구계획서 요약

- 대상자 설명문 및 동의서
- 대상자 모집 문건
- 증례기록서(Case Report Form)
- 피해 보상에 관한 규약
- 인체적용시험자 자료집(IB)
- 시험책임자의 최근 이력 또는 기타경력에 관한 문서
- 연구비 내역서
- 이해상충 서약서

(2) 인체적용시험 방법 및 계획서

① 인체적용시험 방법



- 숙취개선에 미치는 “와이락 엘 복합유산균 및 와이락 엘 복합유산균을 함유한 제품”의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 교차설계, 위약 대조 인체적용시험으로 디자인 하였다. 자발적으로 인체적용시험 동의서에 서명한 대상자의 인구학적, 생활 습관, 병력 및 약물투여력 조사, 활력징후(혈압, 맥박) 신체검진, 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성 해당), 심전도 검사, 신체 계측, 체질량지수, 알코올분해 유전자 검사 등의 측정을 실시하여 선정/제외기준에 적합하면 무작위배정을 통한 등록을 실시함.

② 인체적용시험 계획서

인체적용시험 제목	숙취개선에 미치는 와이락 열 복합유산균 및 와이락 숙취 L35의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 교차설계, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 의뢰자	㈜팜스빌 서울특별시 강서구 마곡중앙8로 3길 37
인체적용시험 책임자	백채민 연구책임자 ㈜글로벌의학연구센터
인체적용시험 실시기관	㈜글로벌의학연구센터 서울특별시 서대문구 충정로 7, 4층
인체적용시험 기간	기관생명윤리위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월 (단, 시험대상자 등록속도에 따라 변경될 수 있음)
인체적용시험 대상	음주 후 숙취경험이 있는 자
인체적용시험 목적	본 인체적용시험은 음주 후 숙취경험이 있는 자를 대상으로 와이락 열 복합유산균과 와이락 숙취 L35를 섭취시켰을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 숙취개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.
인체적용시험 시험 단계 및 디자인	단 계: 기타(기능성표시식품) 디자인: 무작위배정, 이중눈가림, 교차설계, 위약대조
인체적용시험용 식품	시험식품1: 와이락 열 복합유산균 시험식품2: 와이락 숙취 L35 대조식품: Placebo
인체적용시험용 식품 섭취 방법	시험식품1(와이락 열 복합유산균): 1회 7캡슐을 물과 함께 섭취 시험식품2(와이락 숙취 L35): 1회 7캡슐을 물과 함께 섭취 대조식품(Placebo): 시험식품과 동일한 방법으로 섭취
인체적용시험용 식품 섭취 기간	단회 섭취

그림3 . 인체적용시험 계획서 요약

③ 인체적용시험 대상자

	ABC군	ACB군	BAC군	BCA군	CAB군	CBA군	총 시험 대상자 수
최종 평가 례수 (PP Set)	4	4	4	4	4	4	24
Drop- out(20 %) 고려 려수	5	5	5	5	5	5	30

- 선정기준

- 만 19세 이상, 만 40세 이하인 자
- 방문 1에 측정된 체질량지수가 18.5kg/m² 이상, 25kg/m² 미만인 자
- 주량이 소주 1~3병 사이이며, 음주 후 숙취경험이 있는 자

- 인체적용시험이 시작되기 전 본 인체적용시험 참여에 동의하고, 서면 동의서(Informed Consent Form)에 서명한 자

- 제외기준

- 알코올 대사장애, 통풍, 위장관 질환, 간질환(B형, C형 간염 보균자, 알코올성 간질환이 있는 경우 등), 심혈관계(고혈압 등), 면역계, 호흡기계, 내분비계(당뇨 등), 간 및 담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경계, 근골격계, 정신성, 감염성 질환 및 악성종양 등으로 현재 치료 중인 자
- 알코올 분해 유전자 검사 결과, ALDH2 유전자가 Homo Type인 자
- 방문1 기준 소화성궤양 및 역류성 식도염 환자
- 인체적용시험용 식품 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계질환(예: 크론병) 이나 위장관계 수술(단, 단순 충수돌기 절제술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자
- 방문1 기준 알코올 사용 장애 또는 알코올 중독자
- 방문1 기준 1주 이내에 음주를 한 자
- 알코올 대사에 영향을 미칠 것으로 판단되는 약물(Antabuse계 약물 등) 또는 식이보충제, 위장관 출혈의 위험이 있는 약물[와파린(Warfarin), 클로피도그렐(Clopidogrel), 아스피린(Aspirin), NSAIDs, 기타 해열진통제 및 소염진통제 등]을 지속적으로 복용하고 있는 자
- 방문1 기준 2주 이내에 간기능 개선과 관련된 의약품 및 건강기능식품을 복용한 자
- 방문1 기준 1개월(30일) 이내에 약물 대사 효소 유도 및 억제약물(Barbiturates, Griseofulvin, Rifampin, Erythromycin, Isoniazid, Cimetidine, Omeprazole 등)을 복용한 자
- 방문1 기준 1개월 이내에 항생제, 성장제를 투여한 자
- 방문1 기준 1개월 이내에 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 지속적으로(주 4회 이상) 유산균 제품을 섭취한 자
- Creatinine이 실시기관 정상 상한치의 2배 이상인 자
- AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 실시기관 정상 상한치의 3배 이상인 자
- 갑상선 질환자
- 임신 중이거나 수유부 또는 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 자
- 방문1 기준 1개월 이내에 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자
- 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자
- 기타 사유로 시험자가 부적합하다고 판단하는 자

④ 유효성 평가변수

- 혈중 알코올, 아세트알데하이드 농도(시간별 농도, Cmax, Tmax, AUC)
- AHS
- 숙취 증상 설문
- 혈중 알코올 농도 0.03 % 이하 도달까지의 소요시간

⑤ 안전성 평가변수

- 이상 반응
- 임상병리검사(혈액학적/혈액 화학적 검사, 뇨 검사)
- 활력징후(혈압, 맥박)

(3) 인체적용시험 수행

- ① 인체적용시험 개시
- ② 대상자 등록 및 검사 진행(실시기관)
- ③ 인체적용시험 실시기관 관리
 - 인체적용시험용 식품 관리/수불사항 관리
 - SDV(Source Documents Verification) 실시
 - 연구 상황 보고서(Monthly Report) 작성
- ④ 인체적용시험 모니터링
 - 대상자 등록 상황에 따른 인체적용시험 모니터링 실시
 - KGCP규정에 의거한 모니터링 보고서 작성

(4) 인체적용시험 Data Management

- ① DMP(Data Management Plan) 작성
- ② Annotated eCRF 개발
- ③ DVS(Data Validation Specification)
- ④ Query Management

2) 인체적용시험 통계분석

(1) 유효성 평가 변수

- 시험식품 1 또는 시험식품 2 또는 대조식품의 섭취 시점을 기저 시점으로 정의한다. 유효성 평가변수인 혈중 알코올, 아세트알데하이드 농도(시간별 농도, Cmax Tmax, AUC) AHS, 숙취증상 설문, 혈중 알코올 농도 0.03% 이하 도달까지의 소요시간의 시험식품 1과 대조식품 또는 시험식품 2와 대조식품 간의 변화 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고 여기에 추가로 잔류효과가 없다는 가정하에 두 식품 (시험식품 1과 대조식품, 시험식품 2와 대조식품) 간의 섭취 효과에 대한 차이점을 알아보는 분석을 ANOVA를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가함.

(2) 안전성 평가변수

- ① 이상반응
 - 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 구간 이상반응이 발생한 인체적용시험 대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정 또는 피셔의 정확검정을 이용하여 비교 분석함
- ② 임상병리검사(혈액학적/혈액 화학적 검사, 뇨 검사)
 - 시험식품 1과 대조식품 또는 시험식품 2와 대조식품 간 혈액학적 및 혈액화학적 검사치에 대하여 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지를 평가한다. 정상과 비정상에 대한 빈도와 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 혹은 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)(셀 기대도수가 5 미만인 셀이 20%가 넘을 경우)를 이용하여 유의확률 값을 제시함
- ③ 활력징후(혈압, 맥박), 신체 계측(체중)
 - 활력징후(혈압, 맥박), 신체 계측(체중) 검사치에 대하여 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 시험식품 1과 대조식품 또는 시험식품 2와 대조식품

품 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가함

6. 제형 개발 및 시제품 개발

1) 제형 개발

- MZ세대인 20-30대의 니즈를 반영한 젤리형, 분말형 및 섭취흡수율이 높은 필름 제형, 숙취 해소 안주인 견과류 시즈닝 등 기존의 숙취 해소제와 다른 차별성이 있는 제형 개발 완료
- 안정성과 생존률을 높이는 sp복합 코팅 공법을 개발하였다. 온도와 수분 압력의 영향을 받지 않고 안전하게 장까지 도달 가능한 식물성 캡슐 정제를 개발하였음

2) 시제품 개발

- 인체적용시험 시제품 개발
 - 인체적용시험에 사용한 시험군은 2군으로 유산균만을 넣은 캡슐 제형과 부스터 역할이 가능한 원료를 사용
- 필름형, 전해질이 함유된 분말로 물에 타 먹을 수 있는 분말과 젤리를 개발함
젤리 등은 숙취 해소 분해에 효과가 있는 과일 맛을 사용하여 개발함
- 숙취 해소 안주류 적용
 - 숙취 해소에 효과가 있는 아몬드를 이용하여 씨즈닝한 아몬드 안주 개발 , 20-30대 소비자의 니즈에 맞추어 와사비 맛, 불닭 맛 등 개발 완료함
- 이중 제형 개발
분말과 액상의 이중 제형 개발을 완료함

7. 제품화

1) 디자인 개발 및 브랜드 개발

- “살리도”는 스페인어로 벗어나다 라는 의미로 “숙취에서 벗어 나다”라는 의미로 “숙취 살리도”의 개발로 살리도 시리즈 라인업
- MZ세대의 직관적이고 감각적인 제품 디자인 완료 “숙취 뽀개기”, “확개유”

2) 제품개발

- MZ세대를 타겟으로 한 직관적인 디자인 개발 및 제품명 선정
- 제품개발 : 소환 제품과 분말형 제품개발, 이중 제형 개발 및 필름형 제품 개발

제 3 절 연구 개발의 내용

1. 숙취 해소 개선 기능성 유산균 선발

1) 숙취 해소 유산균 최종 후보균 5종 선정

(1) 숙취 해소 유산균 선정

- 묵은지와 수제 막걸리로부터 알코올 내성을 가지는 유산균을 분리하여 5종을 선별하여 알코올 내성을 가지는 숙취 해소 유산균 5종 선정
- 16S RNA 분석을 통해 균종 확인 및 코드명 부여

NO	분리원	균종	코드명
1	김치	<i>Levilactobacillus brevis</i> wikim0168	와이락 L 003
2	김치	<i>Latilactobacillus curvatus</i> wikim 0169	와이락 L 004
3	막걸리	<i>Pediococcus acidilactici</i> wikim 0170	와이락 L 002
4	막걸리	<i>Lactobacillus paracasei</i> wikim 0171	와이락 L 001
5	김치	<i>Leuconostoc mesenteroide</i> wikim 0172	와이락 L 005

표 3. 최종 선별된 숙취 해소 유산균 5종의 균주명 및 코드명

(2) 알코올 분해능 검증

- 5종의 유산균을 0%, 7.5%, 12.5%, 15% 그리고 25% 에탄올이 함유된 MRS 배지에 접종하여 배양함. 알코올 내성 생존능 관찰을 위하여 배양 후 48, 72, 120시간 별로 흡광도 600nm 로 균 성장을 관찰함

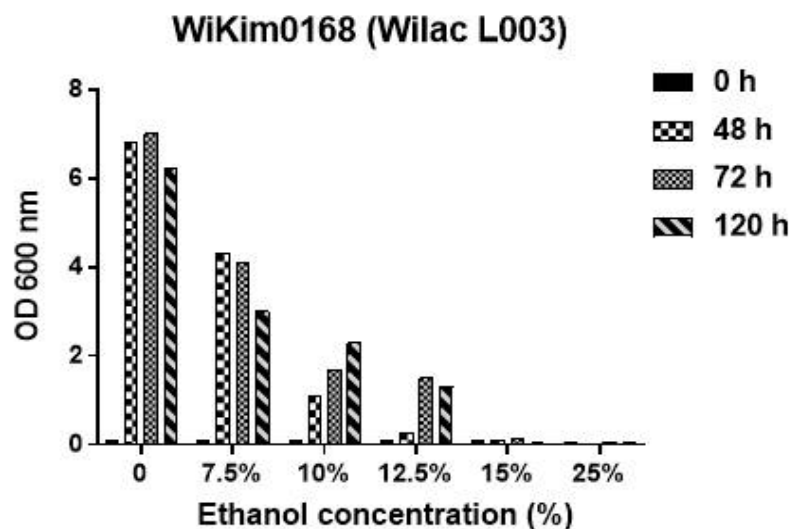


그림.4 유산균 WiKim0168의 알코올 내성 효능

- WiKim0168(와이락 L003)은 12.5%의 알코올 함량에도 안정적으로 성장하며, 15%의 알코올 함량에서도 균 성장이 관찰되는 알코올 내성을 갖는 유산균으로 확인함 (그림4)

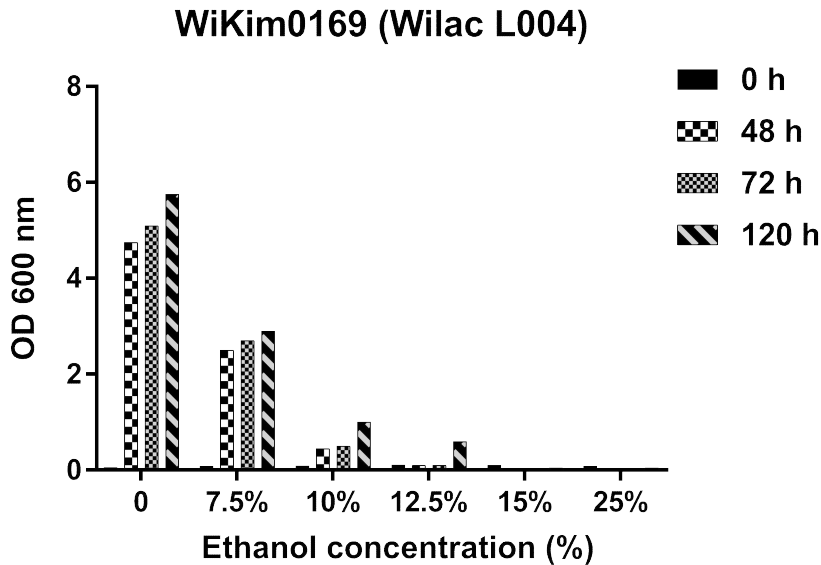


그림 5. 유산균 WiKim0169의 알코올 내성 효능

- WiKim0169(와이락 L004)는 10.0%의 알코올 함량에도 안정적으로 성장하며, 12.5%의 알코올 함량에는 120시간 이후에 균 성장이 느린 것으로 관찰되었으며 알코올 내성을 가지는 유산균으로 확인(그림5)

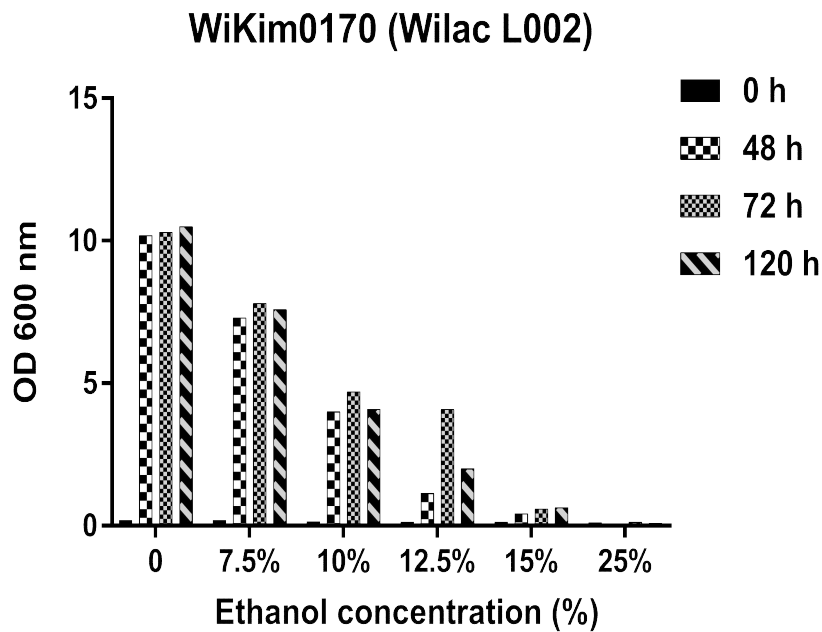


그림 6 숙취 개선 유산균 WiKim0170의 알코올 내성 효능

- WiKim0170은 15%의 알코올 함량에도 OD 600nm에서 0.6 이상의 성장이 관찰되었으며, 15%의 알코올 함량에서도 균 성장이 관찰되는, 알코올 내성을 가지는 유산균으로 확인하였음 (그림6)

WiKim0171 (Wilac L001)

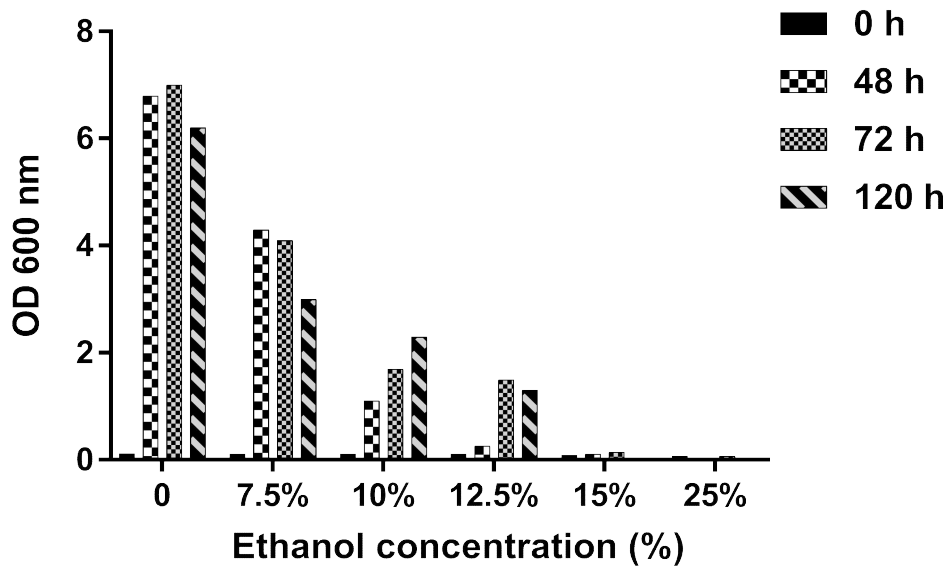


그림 7. 숙취 개선 유산균 WiKim0171의 알코올 내성 효능

- WiKim0171은 12.5%의 알코올이 포함된 배지에서 안정적인 성장이 관찰되는 알코올 내성을 가지는 유산균으로 확인함 (그림7)

WiKim0172 (Wilac L005)

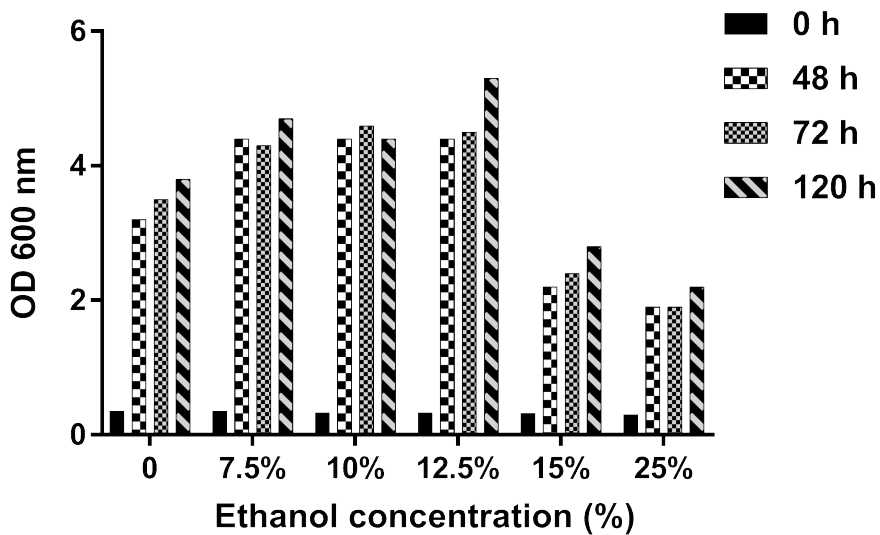


그림 8. 숙취 개선 유산균 WiKim0172의 알코올 내성 효능

- WiKim0172는 25%의 알코올 함량에도 안정적으로 성장하며, 유산균 생존이 어려운 고농도의 알코올 함량에서도 균 성장이 관찰되는 알코올 내성을 가지는 유산균으로 확인함(그림8)

2. 숙취 해소 유산균의 in vitro 효능 검증

1) 알코올 대사 분해효소 활성 측정

- 알코올은 주로 간에 존재하는 알코올 분해효소(Alcohol dehydrogenase, ADH)와 아세트알데히드분해효소(Acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)의 작용에 의해 분해됨. 분해가 되지 않을 경우, 간에 축적되어 여러형태의 숙취가 나타날 수 있음. 알코올 저장 활성을 확인하기 위해서 유산균은 30℃에서 48시간 배양한 후 알코올 분해 효소 ADH와 아세트알데하이드 분해효소 ALDH 활성을 관찰함
- ADH와 ALDH 활성 측정을 위해 선별 유산균 배양액을 Alcohol dehydrogenase activity assay kit와 Acetaldehyde dehydrogenase activity assay kit를 이용하여 활성을 측정
- WiKim0168의 알코올 분해효소 ADH 활성은 대조군 대비 190% 이상 높게 측정되었고, 아세트알데하이드 ALDH 활성은 대조군 대비 600% 이상 높게 측정되었음. 이를 통해 알코올 저장 및 숙취 개선에 활용될 수 있는 WiKim0168의 분해효능이 확인되었음(그림 9)

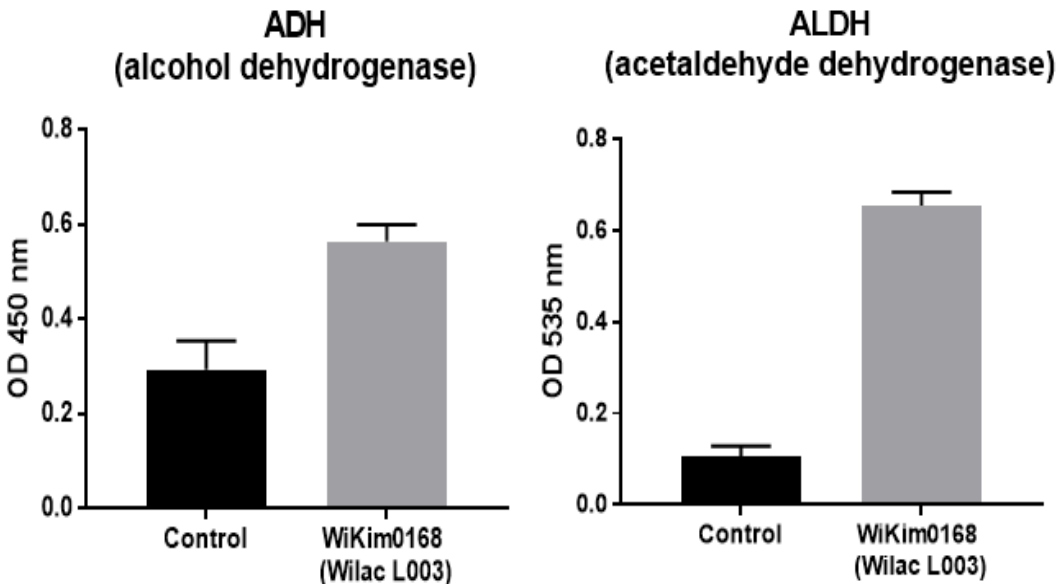


그림 9. 유산균 WiKim0168의 알코올 분해효소 ADH와 ALDH 활성

- WiKim0169의 알코올 분해효소 ADH 활성은 대조군 대비 10% 이상 높게 측정되었고, 아세트알데하이드 ALDH 활성은 대조군 대비 160% 이상 높게 측정되었음. 이를 통해 알코올 저장 및 숙취 개선에 활용될 수 있는 WiKim0169의 분해효능이 확인되었음(그림10)

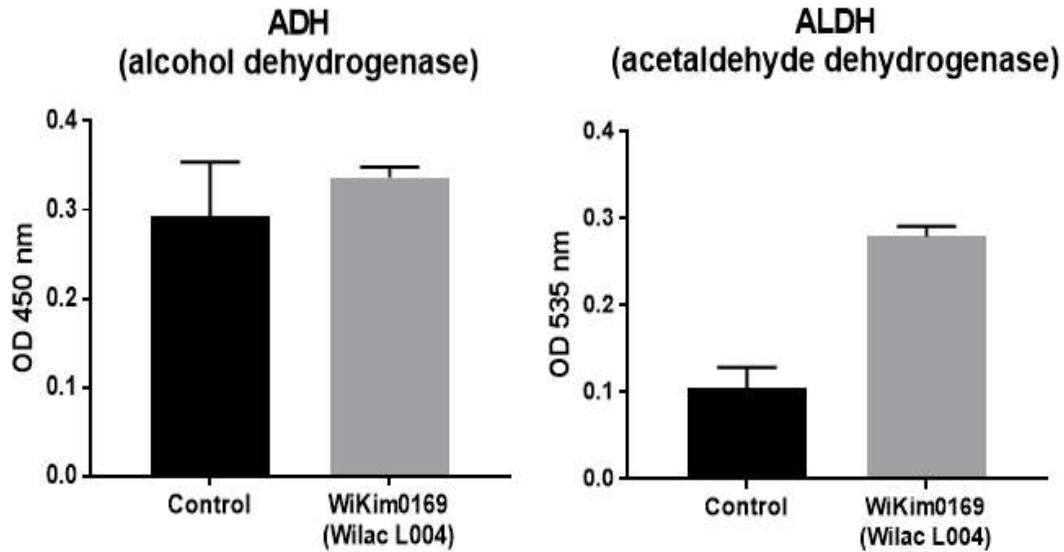


그림 10 유산균 WiKim0169의 알코올 분해효소 ADH와 ALDH 활성

- WiKim0170의 알코올 분해효소 ADH 활성은 대조군 대비 130% 이상 높게 측정되었고, 아세트알데하이드 ALDH 활성은 대조군 대비 220% 이상 높게 측정되었음. 이를 통해 알코올 저감 및 숙취 개선에 활용될 수 있는 WiKim0170의 분해효능이 확인되었음(그림11)

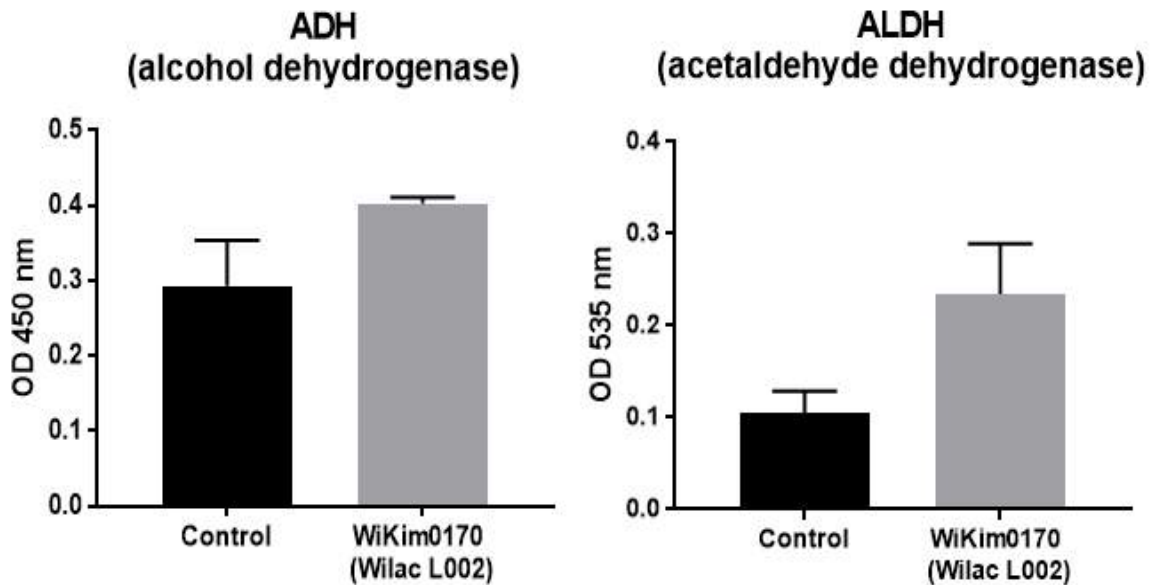


그림 11 유산균 WiKim0170의 알코올 분해효소 ADH와 ALDH 활성

- WiKim0171의 알코올 분해효소 ADH 활성은 대조군 대비 170% 이상 높게 측정되었고, 아세트알데하이드 ALDH 활성은 대조군 대비 290% 이상 높게 측정되었음. 이를 통해 알코올 저감 및 숙취 개선에 활용될 수 있는 WiKim0171의 분해효능이 확인되었음(그림12)

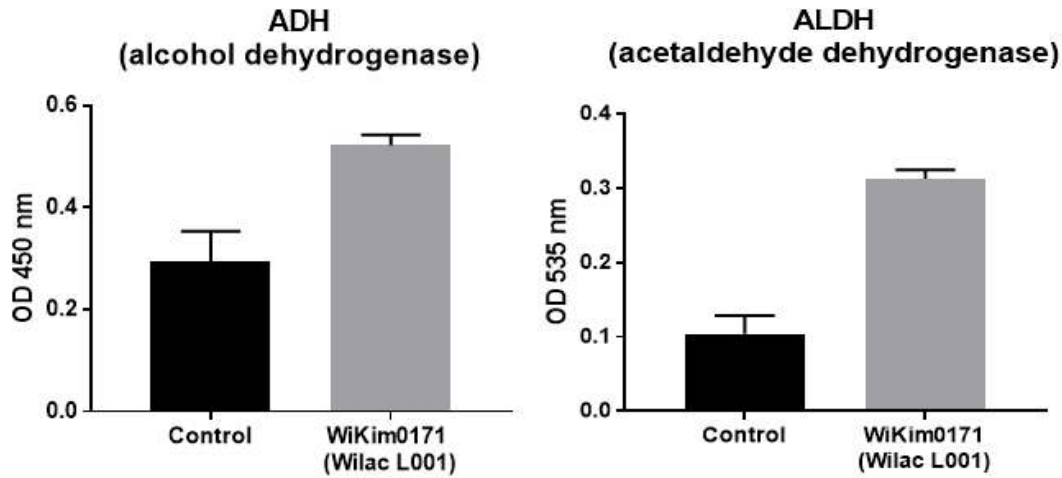


그림12 유산균 WiKim0171의 알코올 분해효소 ADH와 ALDH 활성

- WiKim0172의 알코올 분해효소 ADH 활성은 대조군 대비 140% 이상 높게 측정되었고, 아세트알데하이드 ALDH 활성은 대조군 대비 210% 이상 높게 측정되었음. 이를 통해 알코올 저감 및 숙취 개선에 활용될 수 있는 WiKim0172의 분해효능이 확인되었음(그림13)

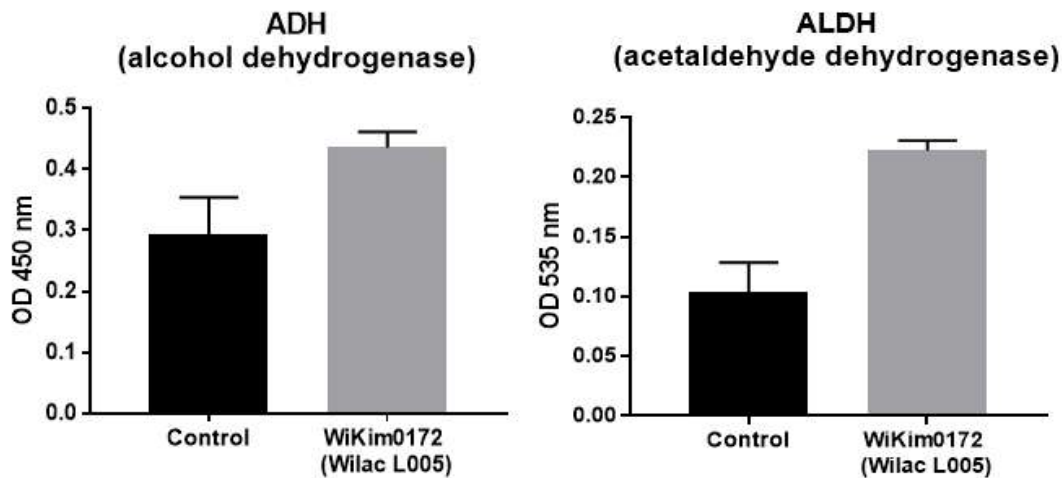


그림 13. 유산균 WiKim0172의 알코올 분해효소 ADH와 ALDH 활성

2) 간세포 손상 억제 효능 확인

- 숙취 개선 기능성 유산균의 간세포 내 손상 유발 정도를 평가하기 위하여 간세포와 유산균의 공배양을 통하여, 간세포 생존율을 측정하여 확인하였음
- 간암세포(HepG2)를 배양하고, 유산균을 함께 처리하여 24시간 후 세포가 손상되어 사멸하면서 분비하는 LDH 효소를 측정하고 대조군 대비 비교하여 생존율을 평가함

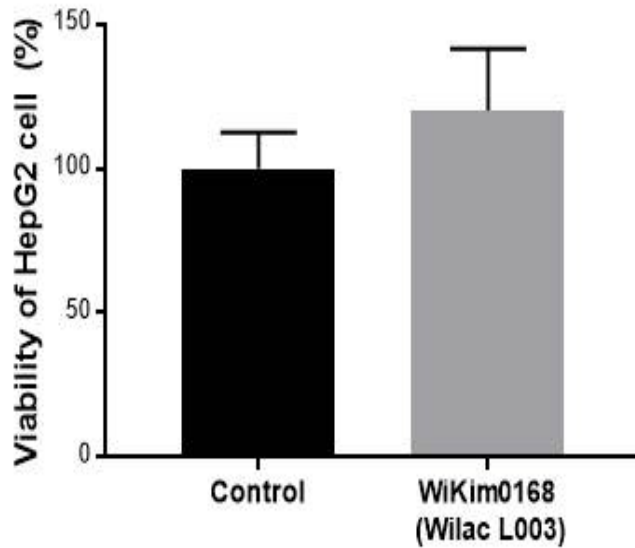


그림 14. 숙취 개선 유산균 WiKim0168 처리에 따른 간세포 생존률

- 간세포와 유산균 WiKim0168 동시배양 후 세포가 손상시 분비하는 LDH 효소 측정을 통해 생존율을 관찰한 결과, WiKim0168이 처리된 실험군이 대조군 대비 약 20% 세포 성장이 높게 관찰되었음(그림14)

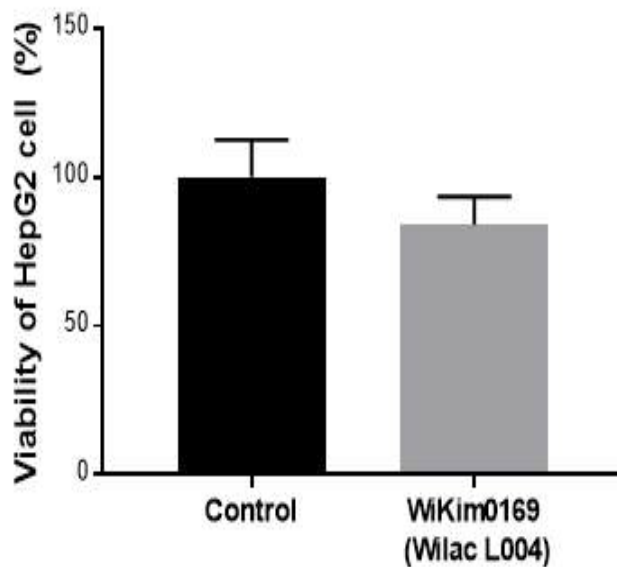


그림 15. 숙취 개선 유산균 WiKim0169 처리에 따른 간세포 생존률

- 간세포와 유산균 WiKim0169 동시배양 후 세포가 손상시 분비하는 LDH 효소 측정을 통해 생존율을 관찰한 결과, WiKim0169이 처리된 실험군이 대조군 대비 약 88%의 간세포 성장이 확인되었음(그림15)

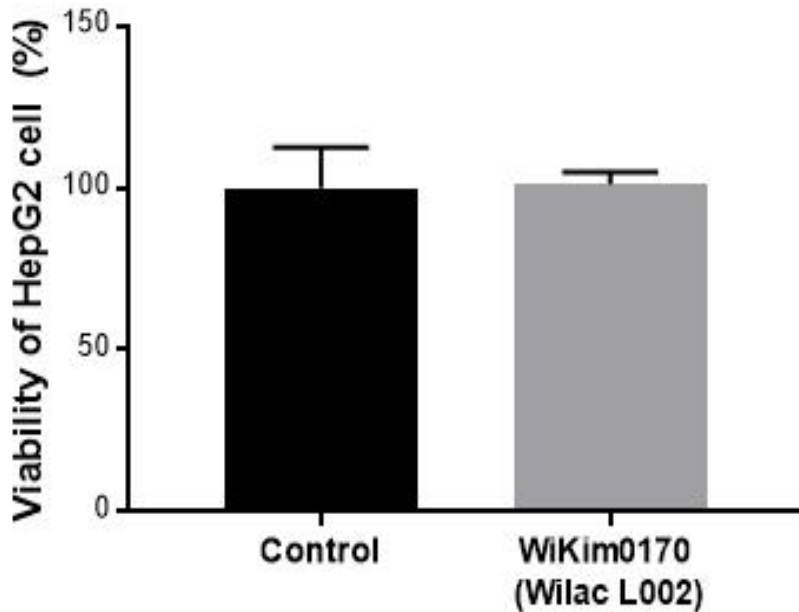


그림 16. 숙취 개선 유산균 WiKim0170 처리에 따른 간세포 생존률

- 간암세포와 유산균 WiKim0170를 동시배양 후 세포가 손상시 분비하는 LDH 효소 측정을 통해 생존율을 관찰한 결과, WiKim0170이 처리 된 실험군이 대조군 대비 101.3%로 대조군과 유사한 간세포 성장 관찰되었음(그림16)

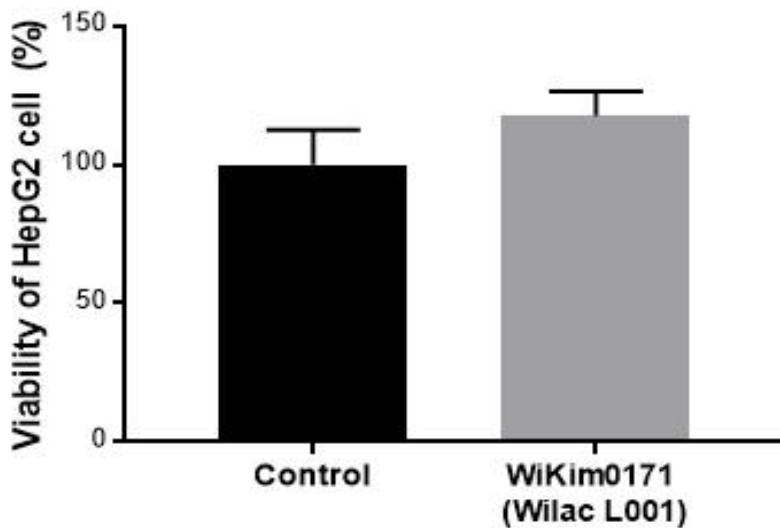


그림 17. 숙취 개선 유산균 WiKim0171 처리에 따른 간세포 생존률

- 간세포와 유산균 WiKim0171 동시배양 후 세포가 손상시 분비하는 ALDH 효소 측정을 통해 생존율을 관찰한 결과, WiKim0171이 처리 된 실험군이 대조군 대비 약 17% 세포 성장이 높게 관찰되었음(그림17)

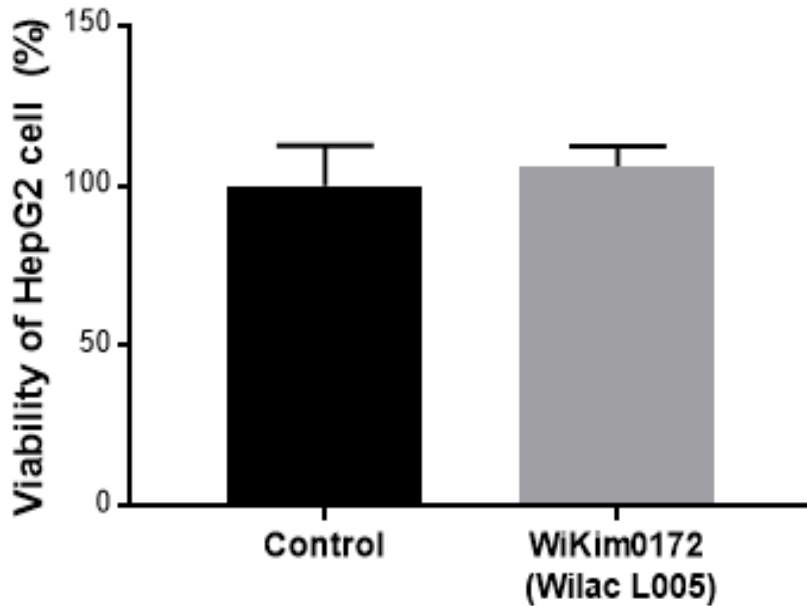


그림 18. 숙취 개선 유산균 WiKim0172 처리에 따른 간세포 생존률

- 간세포와 유산균 WiKim0172 동시배양 후 세포가 손상시 분비하는 LDH 효소 측정을 통해 생존율을 관찰한 결과, WiKim0172가 처리된 실험군이 대조군 대비 106.3%로 대조군과 유사한 간세포 성장 관찰되었음(그림18)

3. 숙취 해소 유산균의 in vivo 효능 검증

1) 알코올 저감 효능

- 5종의 숙취 개선 유산균의 혈중 알코올 저감 효능을 평가하기 위하여 실험동물에 에탄올과 유산균을 동시 투여하고 혈중 알코올 농도를 측정하여 알코올 저감 효능을 검증하고자 함
- 8시간 동안 절식한 Sprague Dawley Rat에 에탄올과 함께 유산균을 경구투여하고, 30분, 60분, 180분 그리고 300분 후에 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈청 분리 후 에탄올 농도를 측정함
- WiKim0168이 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 180분 후 30% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었으며, 이를 통해 알코올 저감 효능이 관찰되었음(그림19)

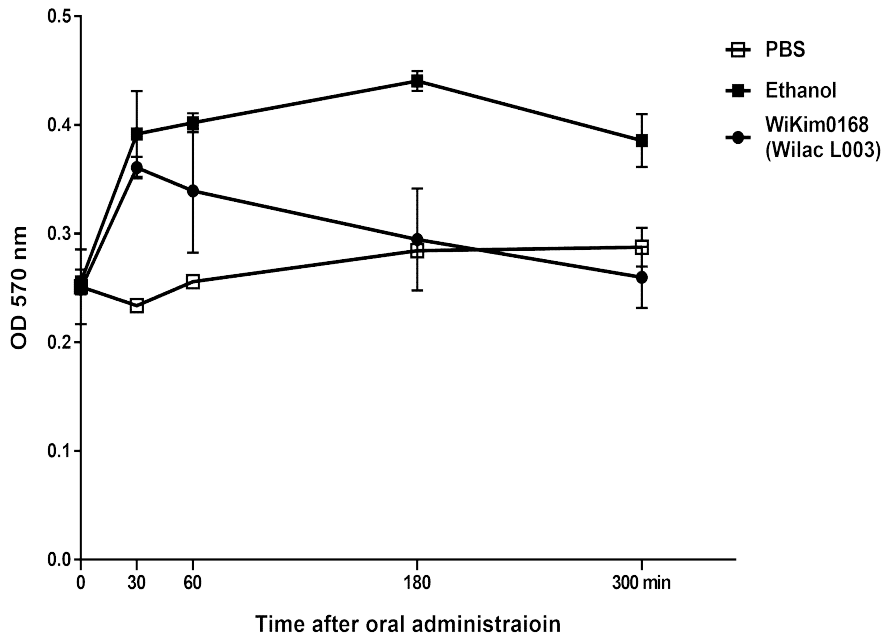


그림 19. WiKim0168의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

-WiKim0169이 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 180분 후 25% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었으며, 이를 통해 알코올 저감 효능이 관찰되었음(그림20)

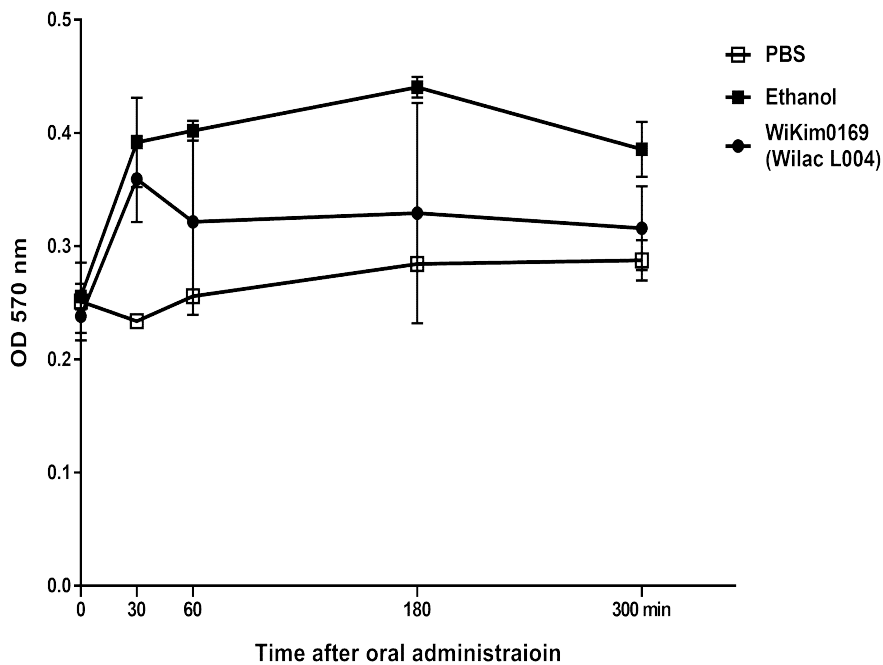


그림 20. WiKim0169의 실험동물 혈중 알코올 저감 효능

- WiKim0170이 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 180분 후 30% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었으며, 이를 통해 알코올 저감 효능이 관찰되었음(그림21)

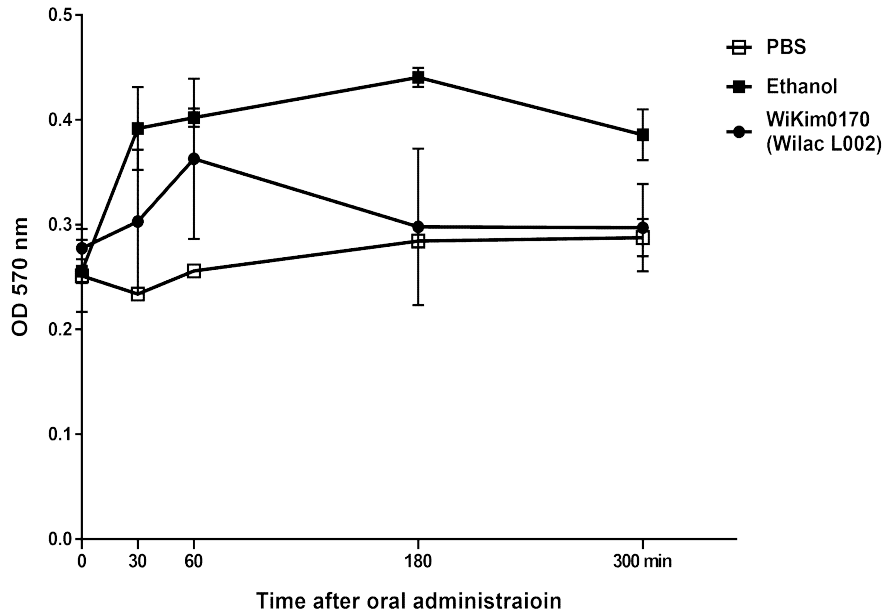


그림 21. WiKim0170의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

-WiKim0171이 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 180분 후 20% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었으며, 이를 통해 알코올 저감 효능이 관찰되었음(그림22)

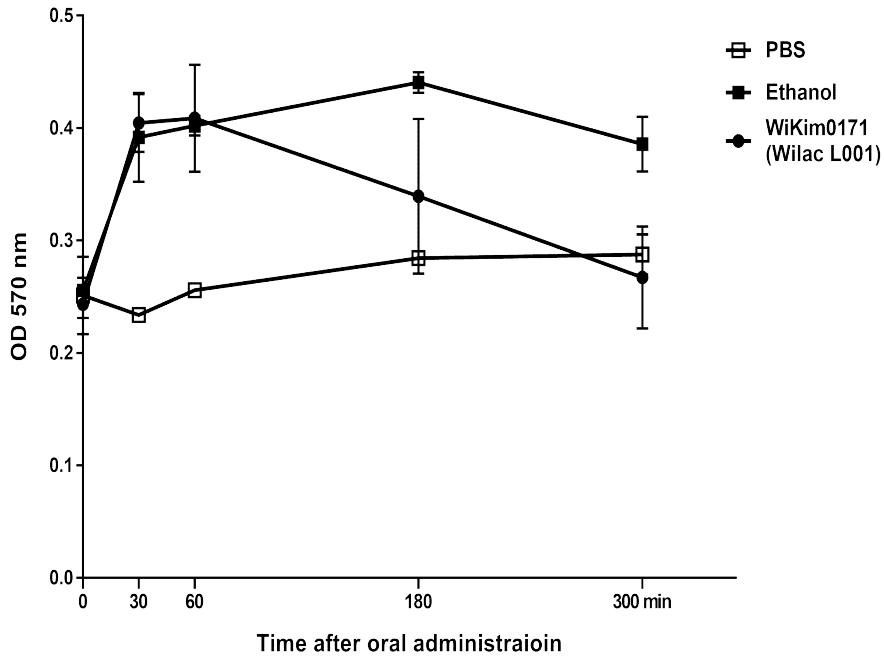


그림22 WiKim0171의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

- WiKim0172가 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 180분 후 20% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었으며, 이를 통해 알코올 저감 효능이 관찰되었음(그림23)

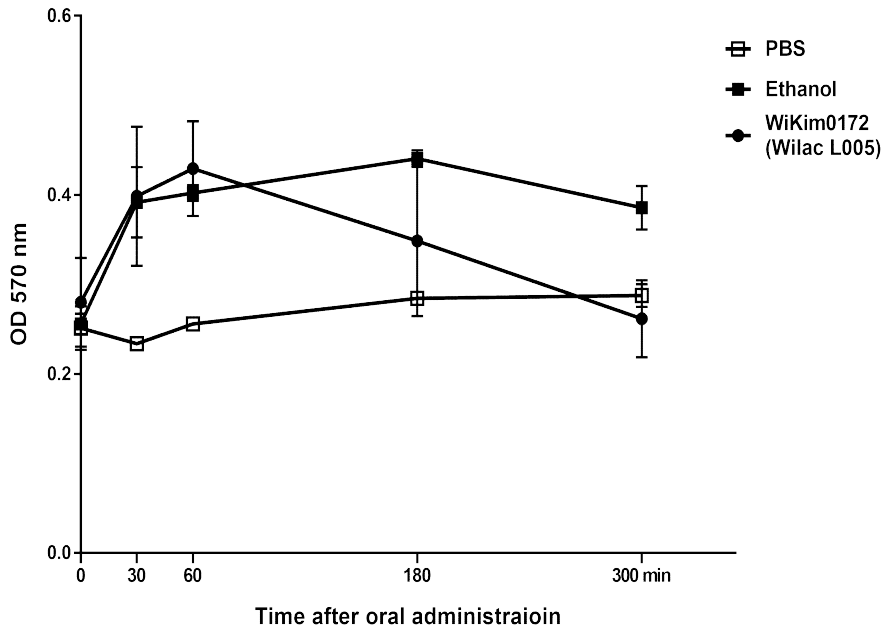


그림 23. WiKim0172의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

- 위의 결과를 통해, 알코올 내성을 갖는 5종의 유산균은 숙취의 원인이 되는 아세트알데하이드와 알코올 분해능이 있으며 알코올 저감 효능 프로바이오틱스의 가능성을 검증하였음

2) 알코올성 간 기능 개선효능 검증

- 실험 동물의 혈액 및 간 조직을 채취하여 혈청을 분리한 후 선발된 5종의 유산균 투여 후 혈중 간 기능 및 지방 대사 개선 수치를 확인함(AST, ALT, 중성지방, 총콜레스테롤, HDL)

(1) 혈중 AST 농도 측정

- 선발된 유산균 5종을 투여 후 혈중 AST 농도 측정 결과 WiKim0168 와 WiKim0170이 투여된 실험 동물의 혈중 AST 감소가 관찰되었음. AST의 효소 활성치의 증가는 간 세포 장애 정도와 비교적 상관성이 높은 것으로 알려져 있음

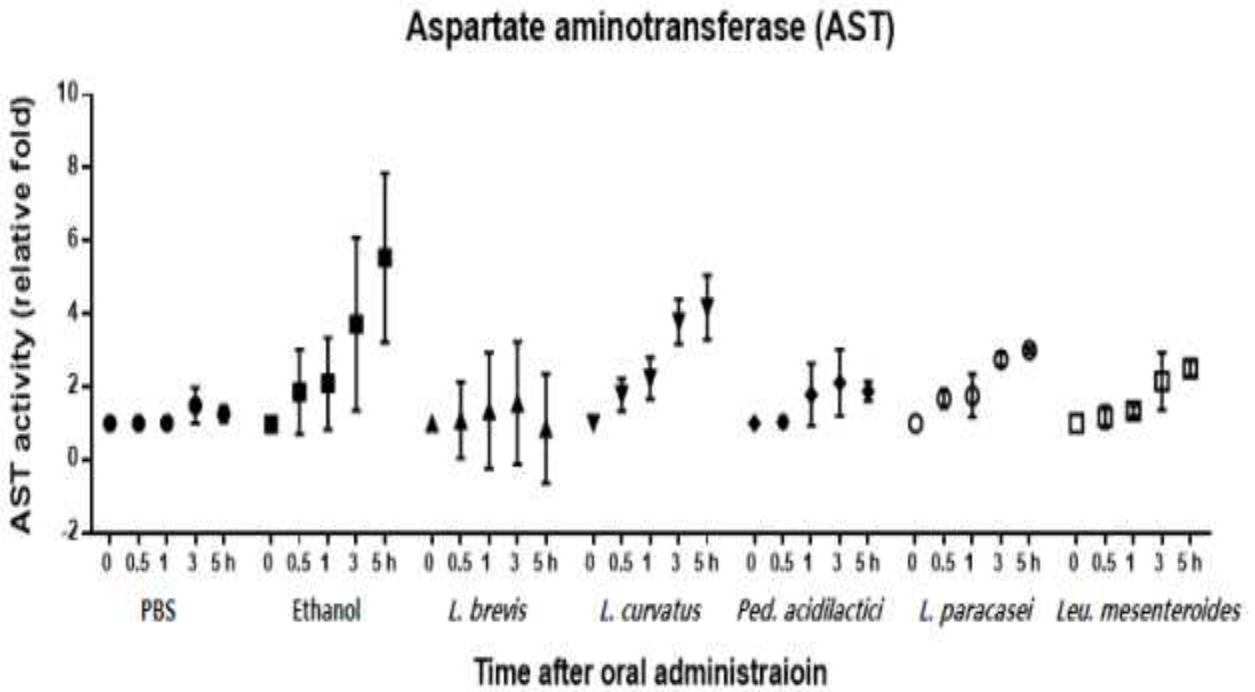


그림 24. 알코올 저감 효능 기능성 유산균 투여 후 혈중 AST 농도

(2) 혈중 ALT 농도 측정

- 알코올 저감 효능 유산균 투여 후 혈중 ALT 농도 측정 결과 WiKim0168 와 WiKim0170이 투여된 실험 동물의 혈중 ALT 감소가 관찰되었음. ALT의 효소 활성치의 증가는 간 세포 장애 정도와 비교적 상관성이 높은 것으로 알려져 있음

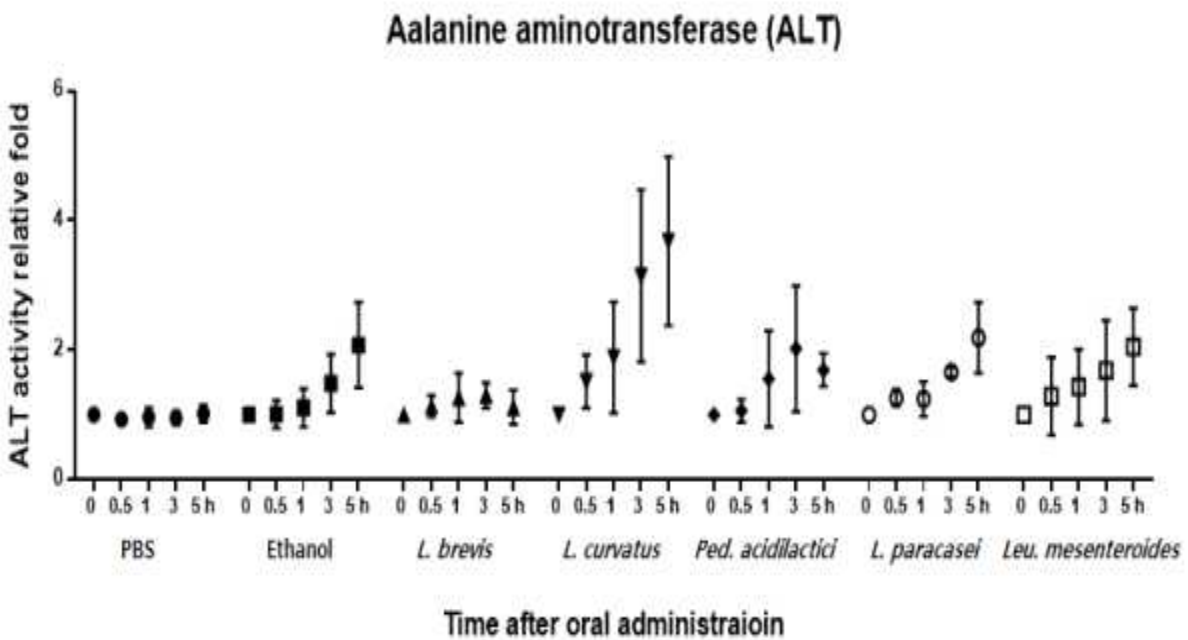


그림25. 알코올 저감 효능 기능성 유산균 투여 후 혈중 ALT 농도

(3) 총콜레스테롤 함량

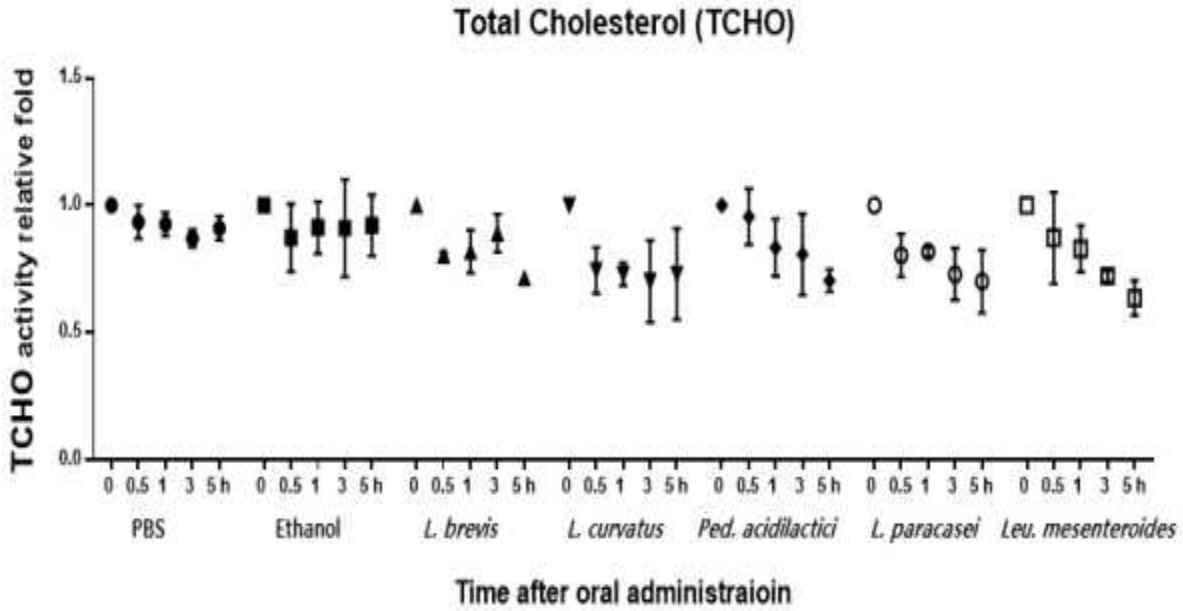


그림 26. 알코올 저감 효능 기능성 유산균 투여 후 혈중 총콜레스테롤 농도

- 알코올 저감 효능 유산균 투여 후 혈중 총콜레스테롤 농도 측정 결과 5종의 유산균 투여된 실험 동물의 혈중 총콜레스테롤 수치 감소가 관찰되었음

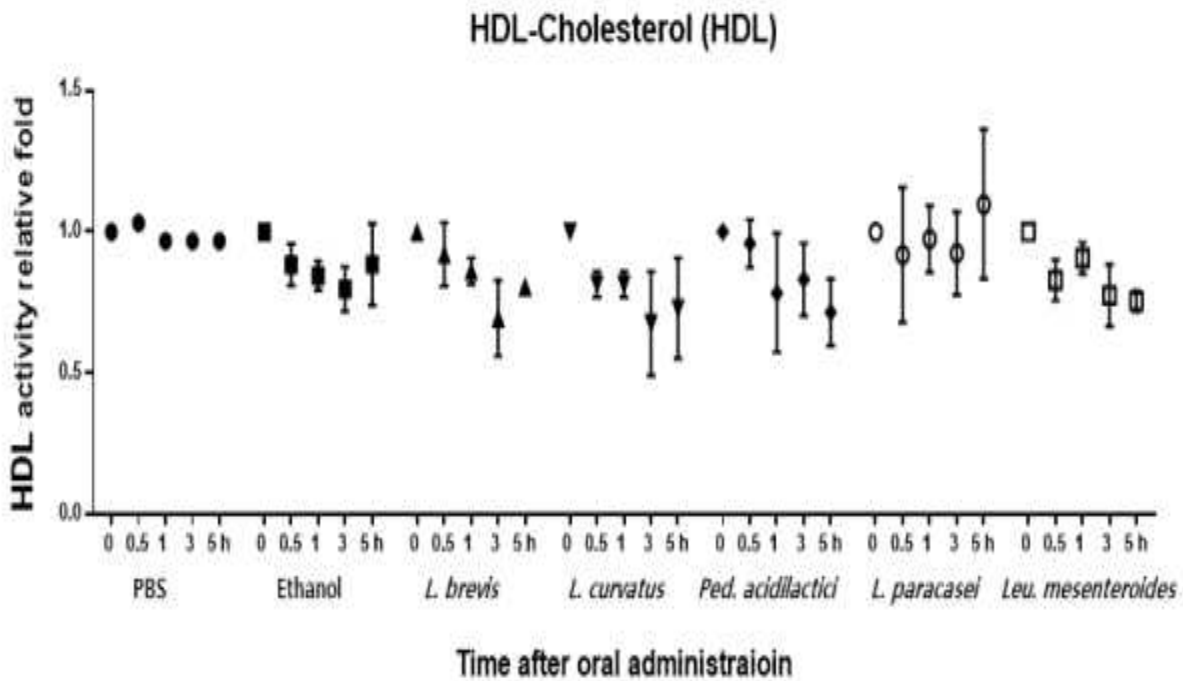


그림 27. 알코올 저감 효능 기능성 유산균 투여 후 혈중 HDL 농도

- 알코올 저감 효능 유산균 투여 후 혈중 총콜레스테롤 농도 측정 결과 5종의 유산균이 투여된 실험동물의 혈중 총콜레스테롤 수치 감소가 관찰되었음

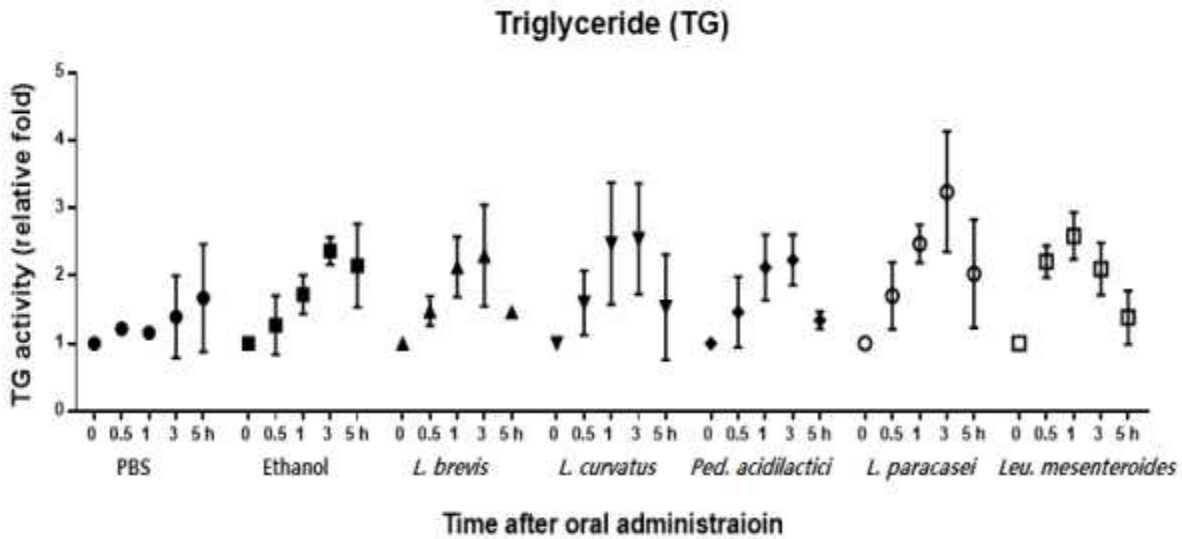


그림 28. 알코올 저감 효능 기능성 유산균 투여 후 혈중 중성지방 농도

- 알코올 저감 효능 유산균 투여 후 혈중 중성지방 농도 측정 결과 5종의 유산균이 투여된 실험 동물의 혈중 중성지방 수치가 알코올을 투여한 실험 동물그룹보다 낮게 관찰되었음

(4) 복합균 조성에 따른 알코올 대사 분해효소 활성 측정

- 유산균 복합조성으로 균을 배합하여 알코올 분해효소(ADH) 및 아세트알데하이드 분해효소(ALDH) 활성 측정

1	WiKim0168	WiKim0169	WiKim0170	WiKim0171	WiKim0172
2	WiKim0168	WiKim0169	WiKim0170	WiKim0171	
3	WiKim0168	WiKim0169	WiKim0171	WiKim0172	
4	WiKim0168	WiKim0169	WiKim0170	WiKim0172	
5	WiKim0168	WiKim0169	WiKim0171		
6	WiKim0168	WiKim0169	WiKim0172		
7	WiKim0168	WiKim0169	WiKim0170		
8	WiKim0168	WiKim0169			
9	WiKim0168	WiKim0172	WiKim0170	WiKim0171	
10	WiKim0168	WiKim0172	WiKim0170		
11	WiKim0168	WiKim0172	WiKim0171		
12	WiKim0168	WiKim0172			

표 4. 단일 균주의 12가지 복합 조합

- ADH와 ALDH 활성 측정을 위해 위의 표와 같이 조합하여 alcohol dehydrogenase activity assay kit와 acetaldehyde dehydrogenase activity assay kit를 이용하여 활성을 측정함

ADH (alcohol dehydrogenase)

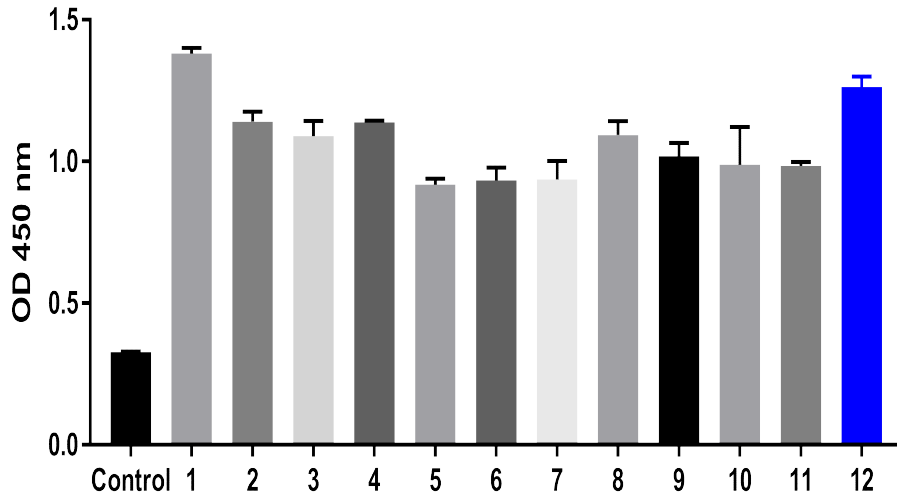


그림 29. 알코올 저감 효능 유산균의 복합조성에 따른 ADH 활성

-알코올 분해효소(ADH) 활성은 ① *L. brevis* + *L. curvatus* + *Ped. acidilactici* + *L. paracasei* + *Leu. mesenteroides* 균이 조합된 복합균에서 가장 높은 활성이 측정되었으며, ⑫ *L. brevis* + *Leu. mesenteroides* 균이 조합된 복합균에서 두 번째로 높은 활성이 관찰됨

ALDH (acetaldehyde dehydrogenase)

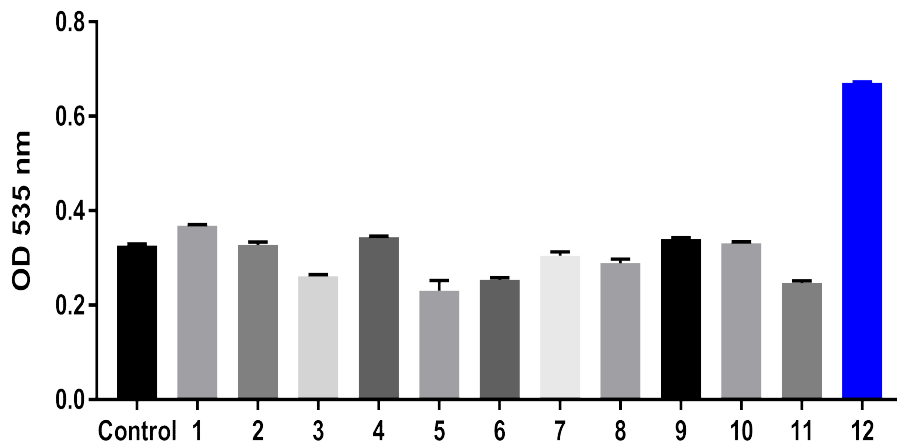


그림30. 알코올 저감 효능 유산균의 복합조성에 따른 ALDH 활성

-아세트 알데하이드 분해효소(ALDH)의 활성은 12. *L. brevis* + *Leu. mesenteroides* 균이 조합된 복합균에서 가장 높게 측정되었음

3) 알코올 섭취로 인한 간 손상(염증세포의 침윤)에 따른 염증성 사이토카인 매개 활성화 관찰

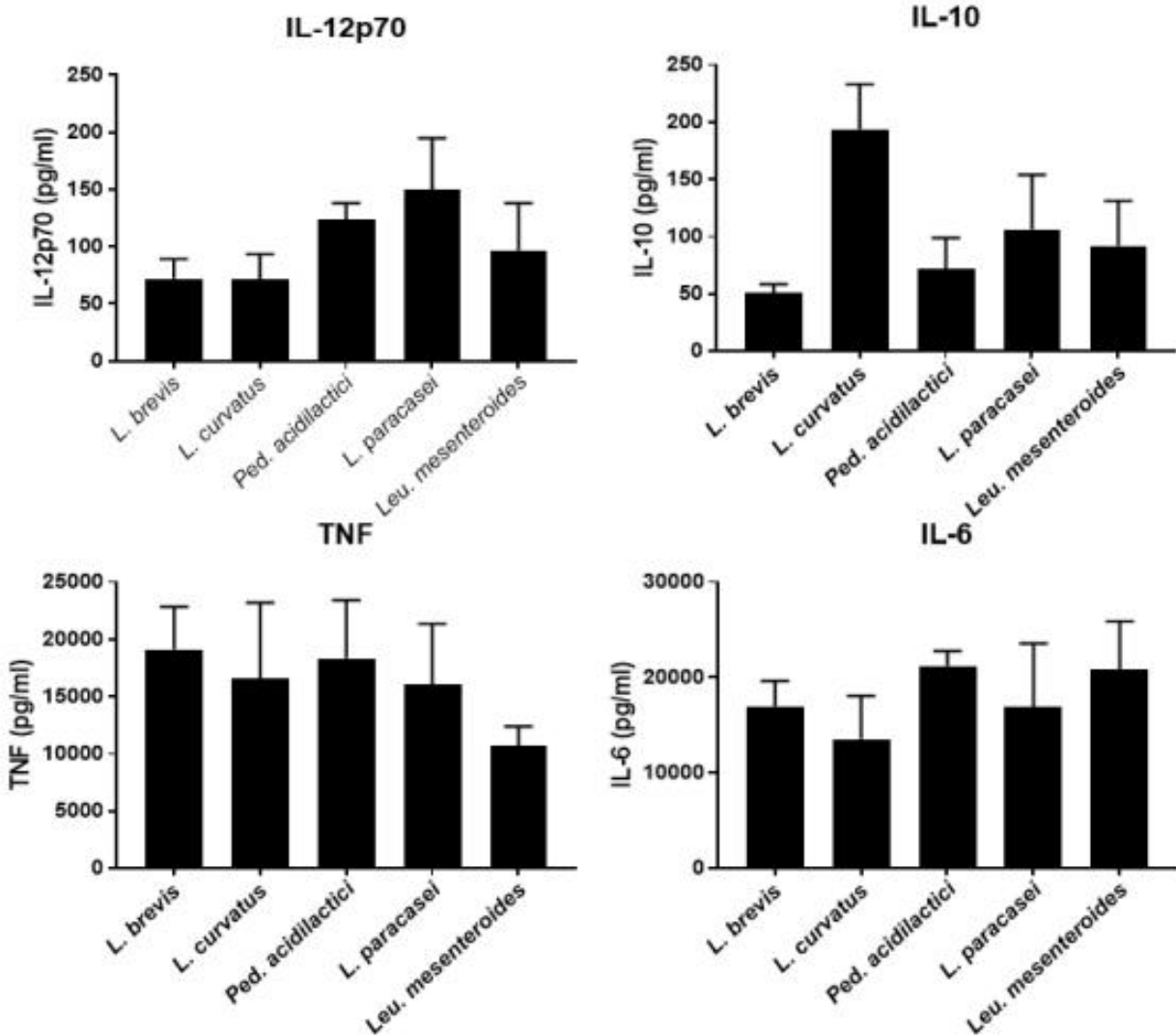


그림31 알코올 저감 효능 유산균의 염증성 사이토카인 매개 활성화

- 알코올 저감 효능 5종의 유산균의 염증성 사이토카인 매개 활성을 관찰함. 면역반응을 활성화 시키는 IL-12, TNF, IL-6는 염증 촉진되었을 때 활성화되는 사이토카인이며, 전염증성 사이토카인이 분비되고, 염증 증상을 유발하는 염증전달물질들이 분비됨. IL-10는 항염증에 작용하는 사이토카인으로, 항염증 매개물질은 전신 염증을 미리 차단하는 역할을 함

4. 대량 표준화 원료를 사용한 효능 재현성 검증

1) 혈중 알코올 저감 효능 검증

(1) 최종 선별된 단일 균주 5종에 대한 검증

- 선별된 유산균 원말시료의 숙취 개선 효능을 평가하기 위하여 수행했던 rat 실험 동물의 혈중 알코올 농도 측정 실험 방법과 동일하게 원말시료의 효능 동등성 실험을 수행함
- 5종의 숙취 개선 유산균 원말 시료의 혈중 알코올 저감 효능을 평가하기 위하여 실험 동물에 25% 에탄올과 원말 시료 (5×10^{10} CFU/kg)를 동시 투여하고 시간별로 혈액을 채취하고 혈중 알코올 농도를 측정하여 알코올 저감 효능을 검증하고자 함
- 8시간 동안 절식한 Sprague Dawley Rat에 에탄올과 함께 유산균을 경구투여하고, 30분, 60분, 180분 그리고 300분 후에 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈청 분리 후 에탄올 농도를 측정함

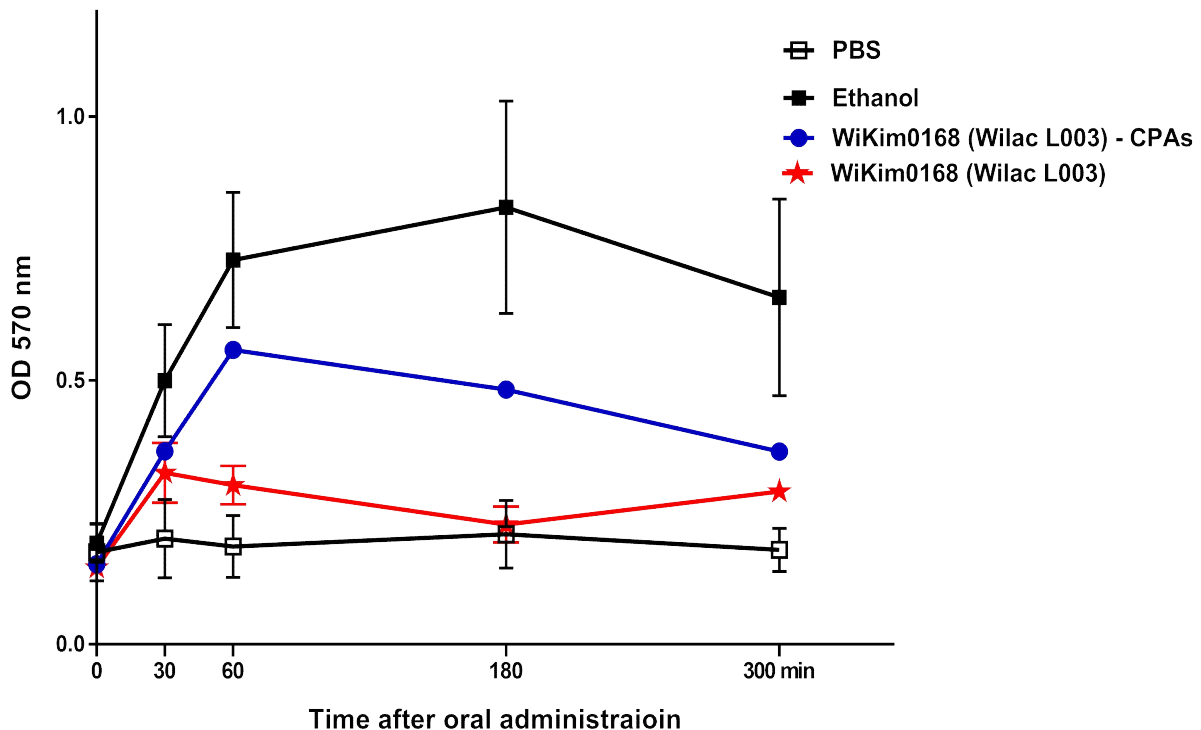


그림 32. WiKim0168(Wilac L003) 원말시료의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

- WiKim0168(Wilac L003) 원말시료가 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 60분 후 50% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었음

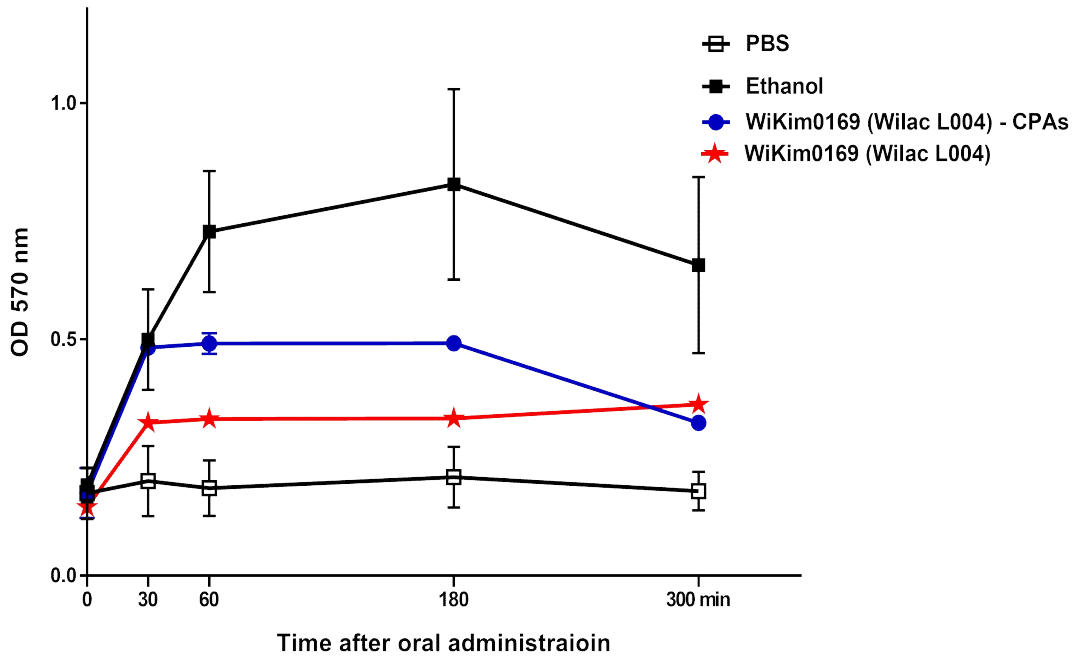


그림 33. WiKim0169(Wilac L004) 원말시료의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

- WiKim0169(Wilac L004) 원말시료가 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 60분 후 50% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었음

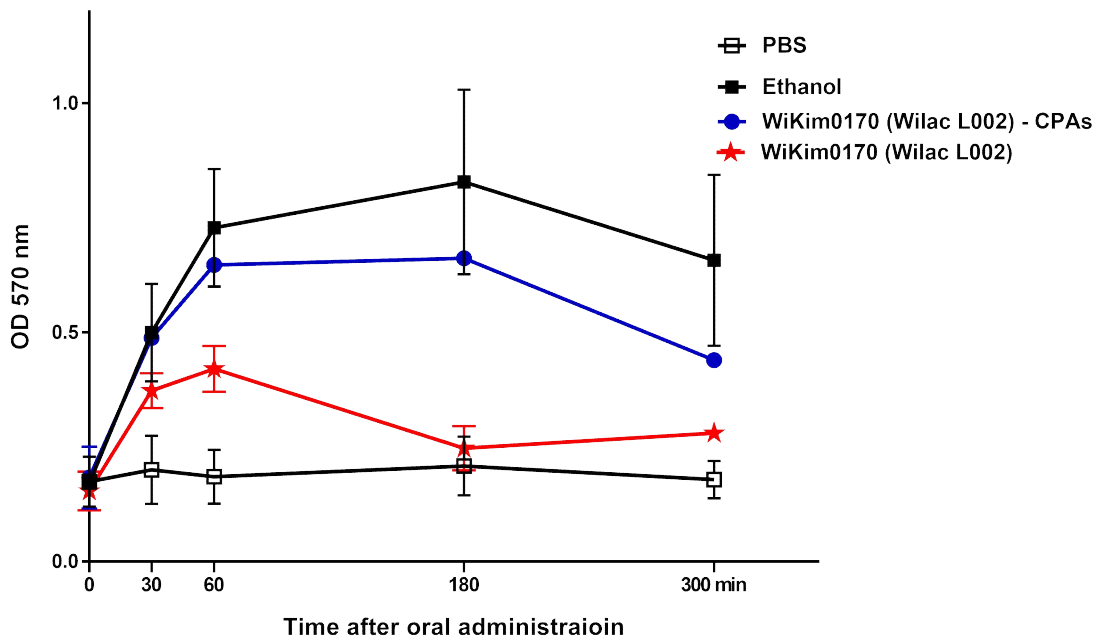


그림 34. WiKim0170(Wilac L002) 원말시료의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

- WiKim0170(Wilac L002) 원말시료가 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 60분 후 40% 그리고 180분 후에는 60% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었음

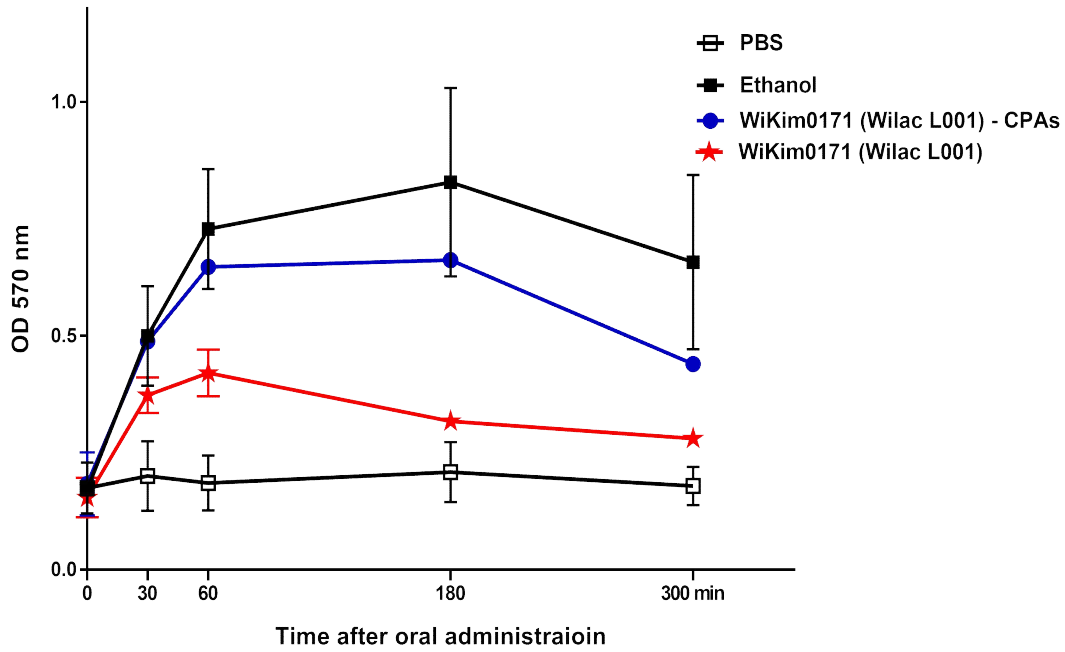


그림 35. WiKim0171(Wilac L001) 원말시료의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

- WiKim0171(Wilac L001) 원말시료가 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능도 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 60분 후 40% 그리고 180분 후에는 65% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었음

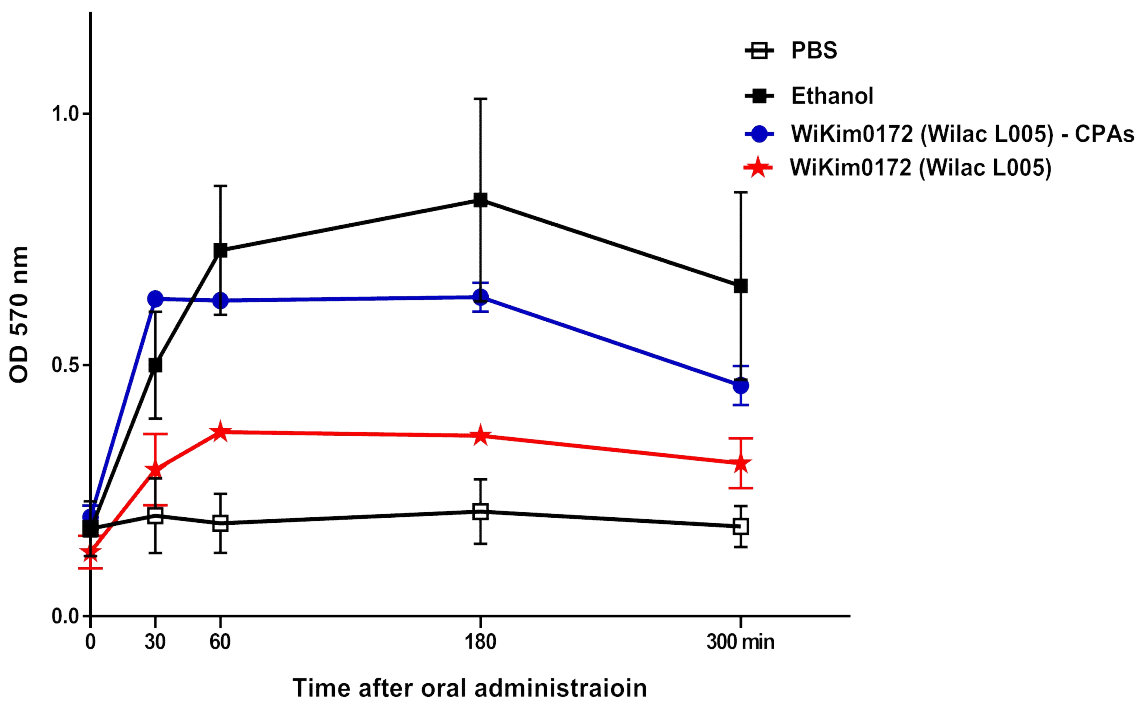


그림 36. WiKim0172(Wilac L005) 원말시료의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

- WiKim0172(Wilac L005) 원말시료가 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물 그룹에 비해 60분 후 45% 그리고 180분 후에는 55% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었음

(2) 복합 균주 2종에 대한 알코올 저감 효능 검증

- WiKim0168(Wilac L003)과 WiKim0172(Wilac L005) 복합원말시료가 투여된 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능은 에탄올만 투여된 실험 동물그룹에 비해 60분 후 60%, 180분 후에는 약 69% 그리고 300분 후에도 60% 이상의 혈중 알코올 저감이 확인되었음

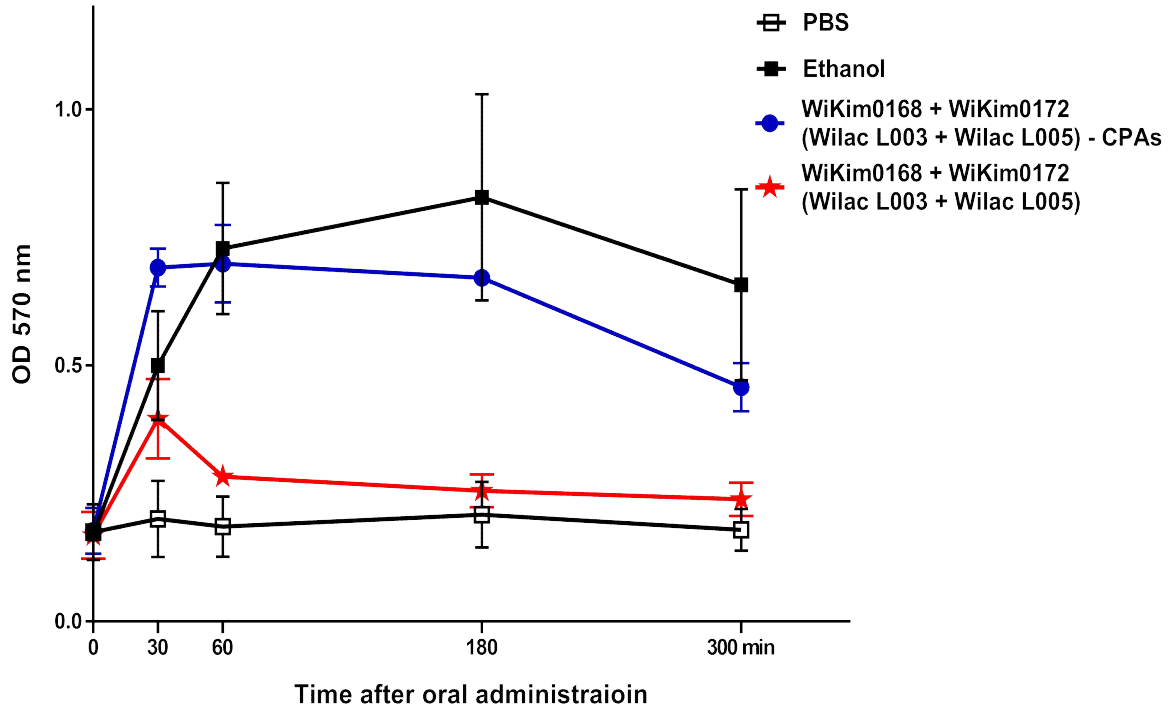


그림 37. WiKim0168(Wilac L003)과 WiKim0172(Wilac L005) 복합 원말시료의 실험 동물 혈중 알코올 저감 효능

- 위의 원말시료의 실험 결과를 통해 유산균 투여에 따른 알코올 저감 효능이 원말시료 투여를 통해서도 관찰되었으며, 그 효능은 유산균 투여보다 원말시료를 투여한 실험 동물의 혈중 알코올 저감 효능이 더 높은 것으로 확인되었음

2) 알코올에 의한 수면 유도 증상의 각성 효능 평가

- 알코올에 의해 유도된 수면 상태가 유산균 원말 시료의 알코올 분해 활성에 따른 수면 각성 효능을 관찰하기 위해 수면 각성 효능 평가(LORR test; Loss of righting reflex test)를 수행함

- 각 원말 시료를 경구 투여한 후, 알코올 투여로 유도된 수면을 각성시키는 효능을 확인함

- C57BL/6 마우스에 알코올(4g/kg)을 투여하고, 원말시료(5 X 10¹⁰ CFU/kg)를 투여하여 수면 상태 유도함. 입면 시간과 총 수면 시간을 계산하여 유산균 원말 시료의 수면 각성 효능을 평가함

(1) 단일 균주 5종의 수면 각성 효능 검증

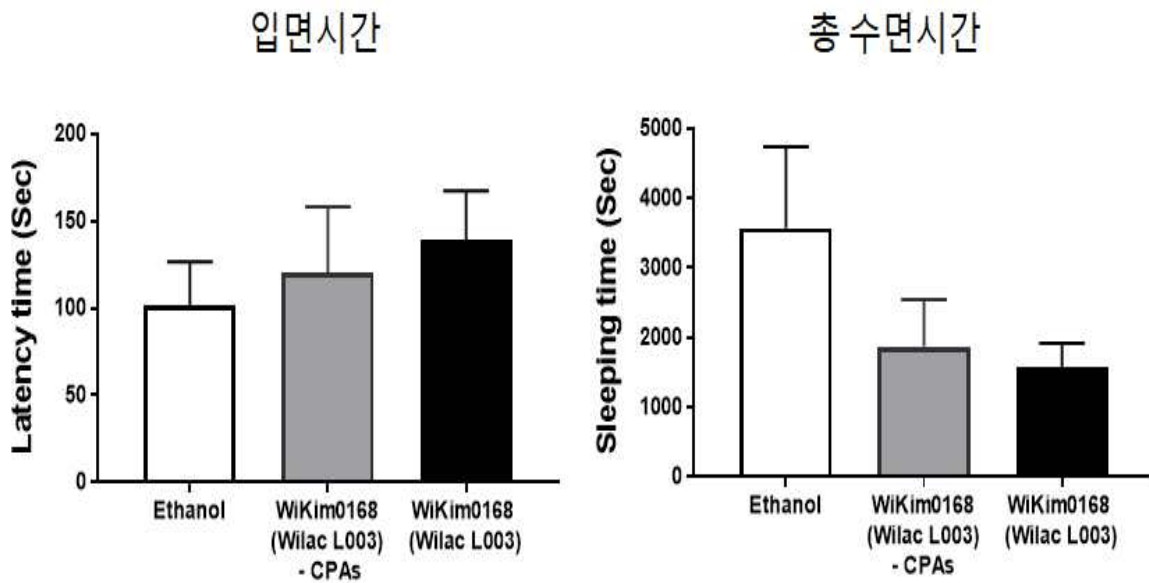


그림 38. WiKim0168 원말시료 투여에 따른 알코올에 의해 유도된 수면 각성 효능 평가

- WiKim0168 원말시료를 에탄올과 함께 투여하고 수면에 이르는 시간과 수면에서 각성 되는 시간을 측정하여 총 수면 시간을 계산한 결과 에탄올만 투여한 실험 동물그룹에 비해 입면 시간은 약 25% 늦었으며, 수면은 약 45% 이상 빨리 각성 되었음

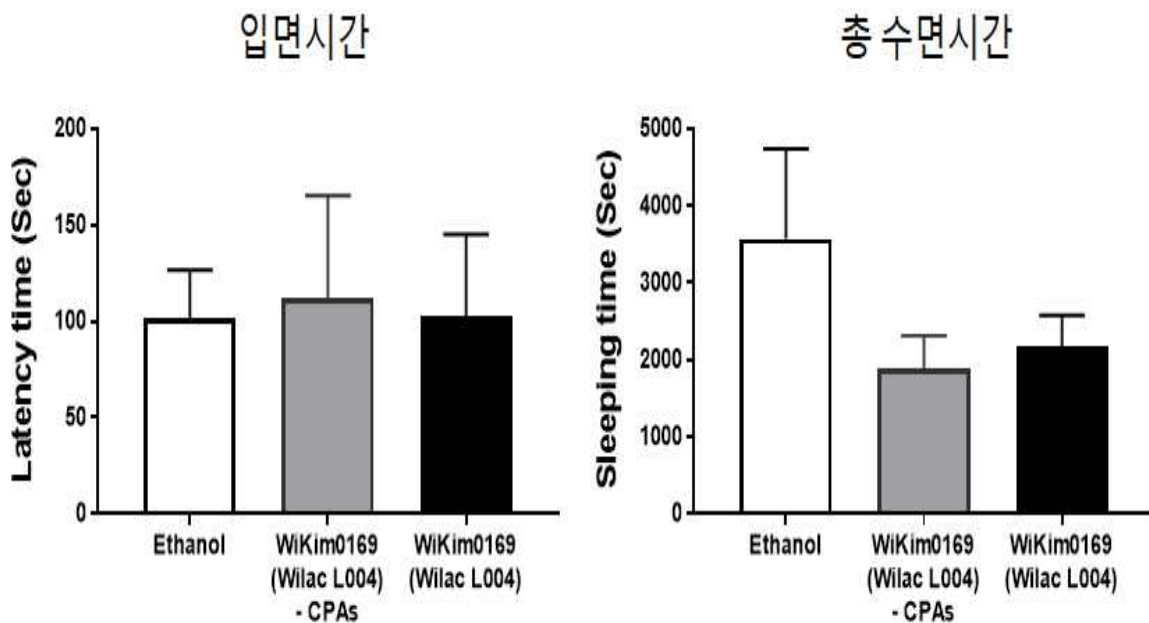


그림 39. WiKim0169 원말시료 투여에 따른 알코올에 의해 유도된 수면 각성 효능 평가

- WiKim0169 원말시료를 에탄올과 함께 투여하고 수면에 이르는 시간과 수면에서 각성 되는 시간을 측정하여 총 수면 시간을 계산한 결과 에탄올만 투여한 실험 동물그룹에 비해 입면 시간이 비슷하였으며, 수면은 약 25% 이상 빨리 각성 되었음

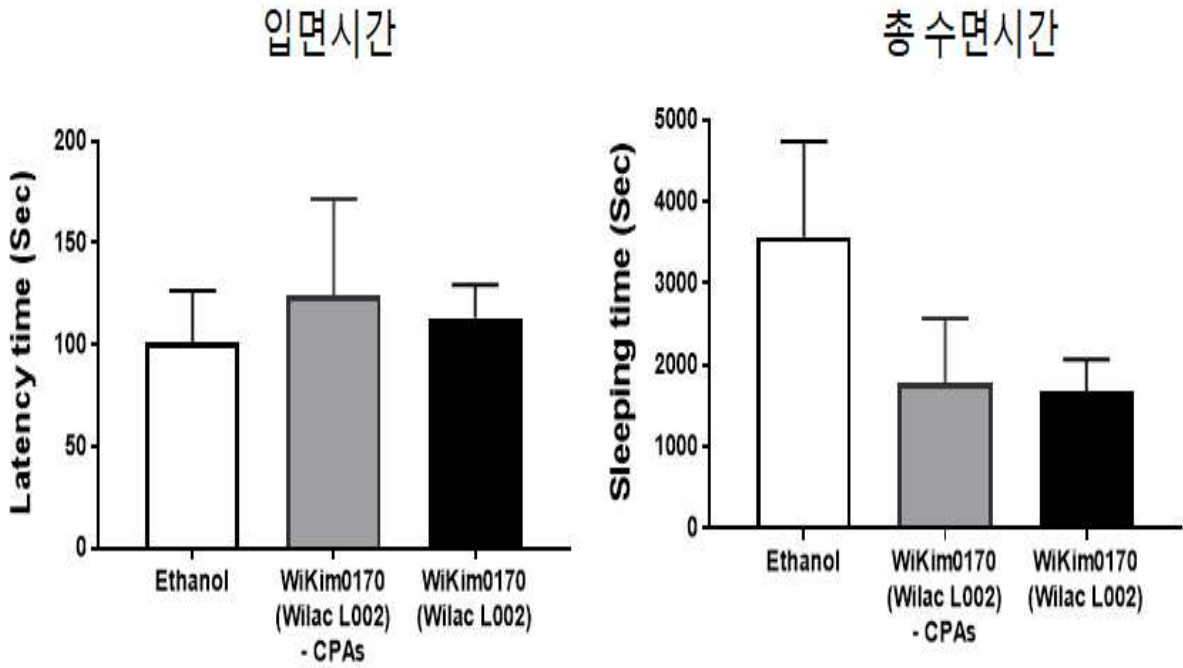


그림 40. WiKim0170 원말시료 투여에 따른 알코올에 의해 유도된 수면 각성 효능 평가

- WiKim0170 원말시료를 에탄올과 함께 투여하고 수면에 이르는 시간과 수면에서 각성 되는 시간을 측정하여 총 수면 시간을 계산한 결과 에탄올만 투여한 실험 동물그룹에 비해 입면시간이 비슷하였으며, 수면은 약 40% 이상 빨리 각성 되었음

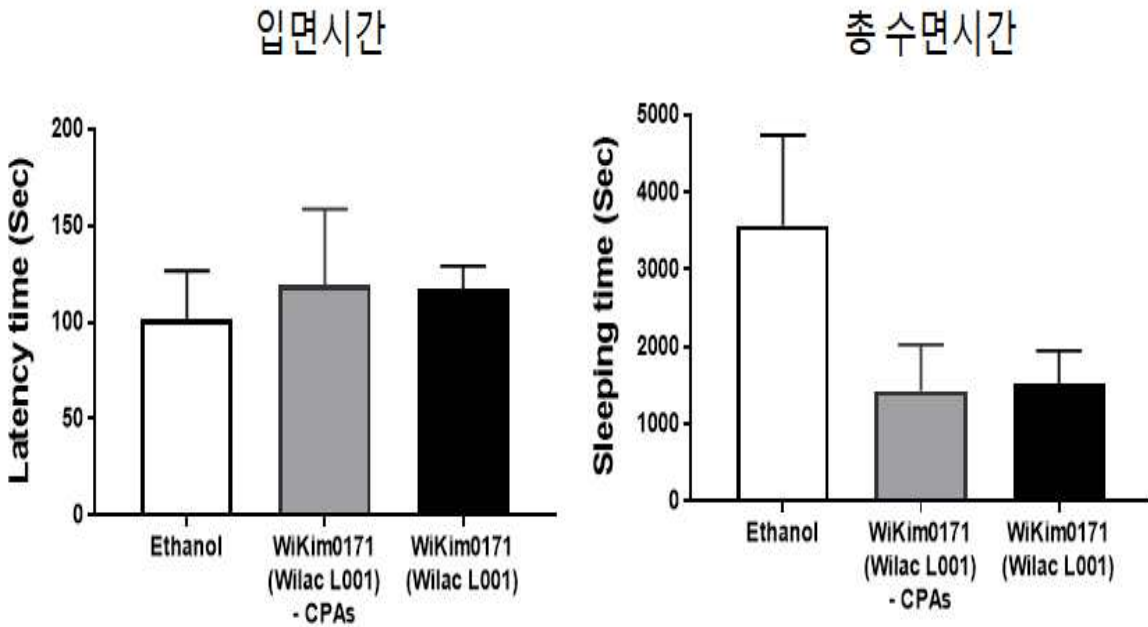


그림 41. WiKim0171 원말시료 투여에 따른 알코올에 의해 유도된 수면 각성 효능 평가

- WiKim0171 원말 시료를 에탄올과 함께 투여하고 수면에 이르는 시간과 수면에서 각성 되는 시간을 측정하여 총 수면 시간을 계산한 결과 에탄올만 투여한 실험 동물 그룹에 비해 입면 시간 비슷하였으며, 수면은 약 45% 이상 빨리 각성 되었음

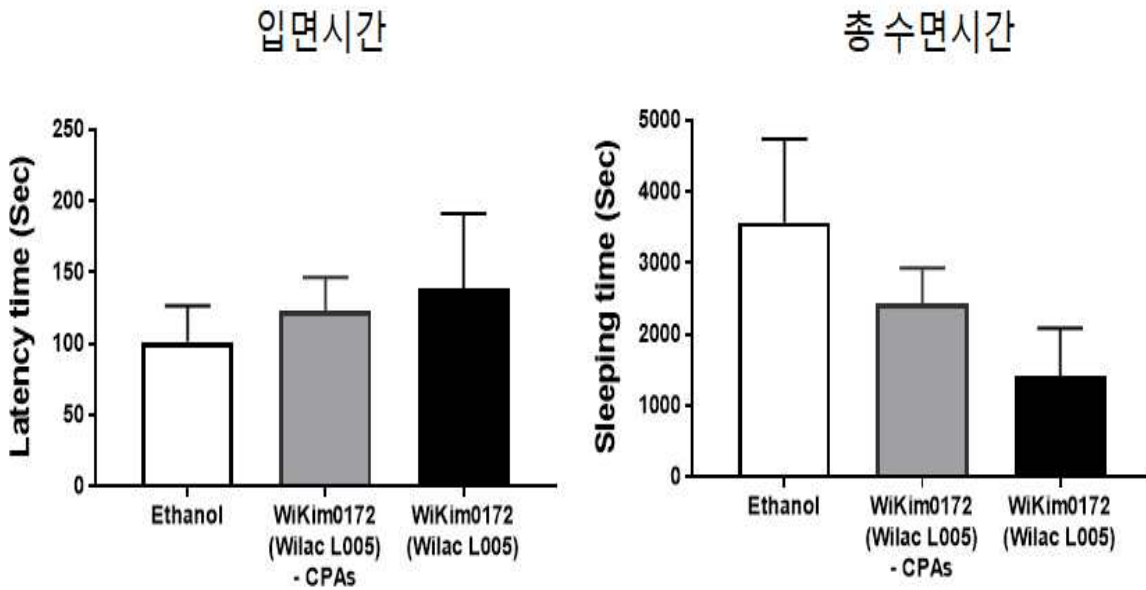


그림 42. WiKim0172 원말 시료 투여에 따른 알코올에 의해 유도된 수면 각성 효능 평가

- WiKim0172 원말 시료를 에탄올과 함께 투여하고 수면에 이르는 시간과 수면에서 각성 되는 시간을 측정하여 총 수면 시간을 계산한 결과 에탄올만 투여한 실험 동물그룹에 비해 입면 시간은 약 18% 늦었으며, 수면은 약 50% 이상 빨리 각성되었음

(2) 최종 선정된 복합균 2종의 수면 각성 효과

- 복합원말시료를 에탄올과 함께 투여하고 수면에 이르는 시간과 수면에서 각성 되는 시간을 측정하여 총 수면 시간을 계산한 결과 에탄올만 투여한 실험 동물그룹에 비해 입면 시간은 약 6% 늦었으며, 수면은 약 45% 이상 빨리 각성 되었음

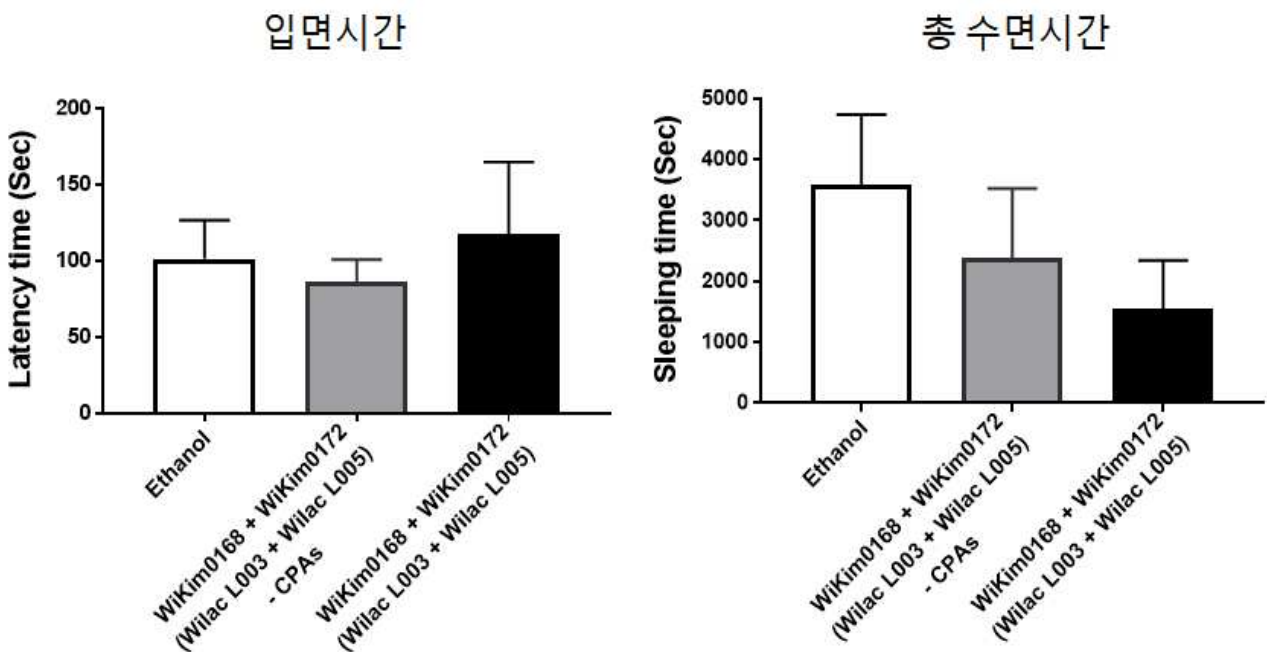


그림 43. WiKim0168과 WiKim0172 복합원말시료의 알코올에 의해 유도된 수면 각성 효능 평가

(3) 수면 각성 효과와 간 기능 개선의 상관관계 검증

- LORR 수면각성평가 결과와 숙취 개선 기능성과의 연관성을 확인하기 위하여 행동 분석 후 2시간 이후에 실험 동물로부터 간 조직을 적출 하여 파쇄 후 간 손상 수치(AST, ALT)를 측정하였음

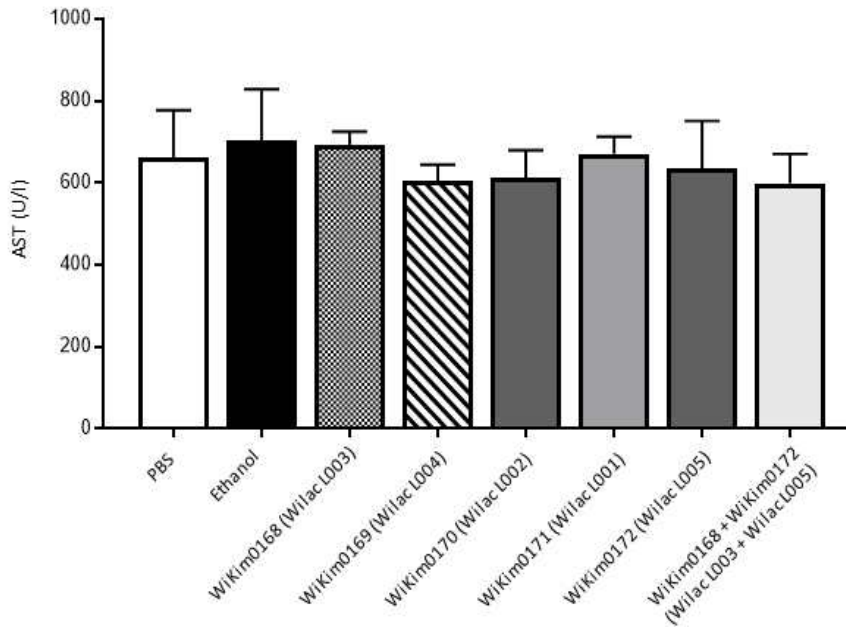


그림44. 수면 각성 평가 실험 동물의 간 조직 내 AST 농도

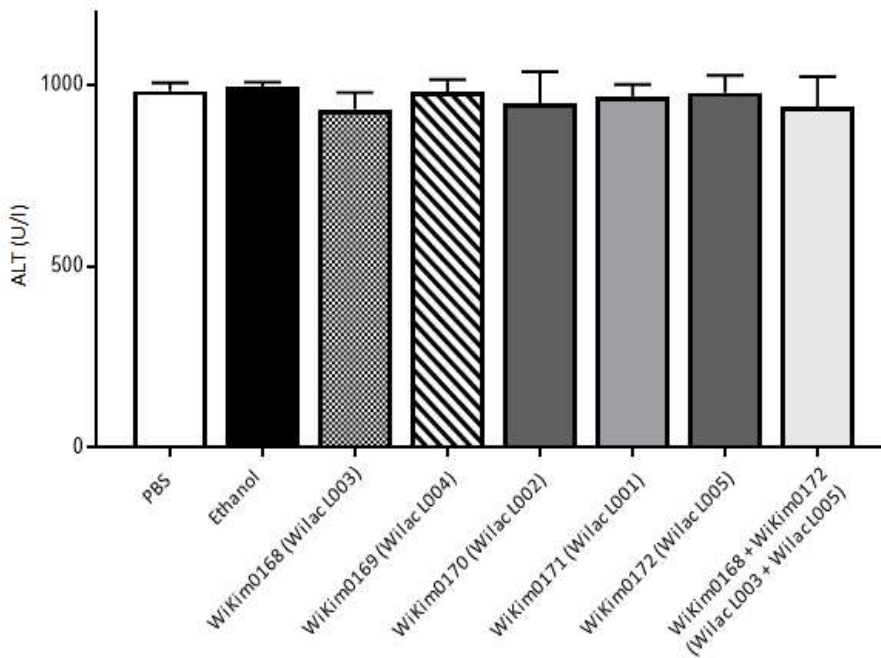


그림 45. 수면 각성 평가 실험 동물의 간 조직 내 ALT 농도

- 수면 각성 평가를 수행한 실험 동물의 간 조직 내 AST와 ALT농도를 측정한 결과 원말 시료를 투여한 실험 동물 그룹의 AST 농도가 에탄올만 투여한 실험 동물그룹에 비해 적게는 1.3%에서 많게는 10.7% 감소 되었으며, ALT는 적게는 1.4% 많게는 6.2% 감소되는 것을 확인함

3) 알코올에 의해 유도된 운동실조 증상 개선 효능 분석

(1) 단일 군주 5종의 단기투여에 따른 운동실조 증상 효능

- 유산균 원말 섭취에 따른 알코올 유도 운동실조증상의 개선효능을 분석하기 위하여 에탄올을 투여(4g/kg) 한 후, 5분, 30분, 60분, 120분, 180분, 300분에 로타로드분석을 실시함
- 로타로드 분석은 베이스 플랫폼과 표면이 미끄럽지 않은 회전막대로 구성된 로타로드 (Ugo Basile) 위에서 동물이 회전 드럼 상에 균형을 유지하는 기간을 측정함. 평가는 4 rpm의 속도에서 시작하여 최고 40rpm의 속도까지 8초당 1rpm씩 가속 패러다임을 적용하였고, 그 후의 회전 속력은 최대 300초 동안 40rpm으로 일정하게 유지함
- 실험 동물들은 실험 전날 위 장치에서 3분간 1회 이상 적응시키는 과정을 거쳤으며, 실험 당일에는 동물이 회전 드럼에서 떨어질 때의 드럼 속도(rpm) 및 동물이 균형을 잃고 바닥에 떨어질 때까지의 시간(초)을 표시하여 운동실조증상의 개선효능을 분석함

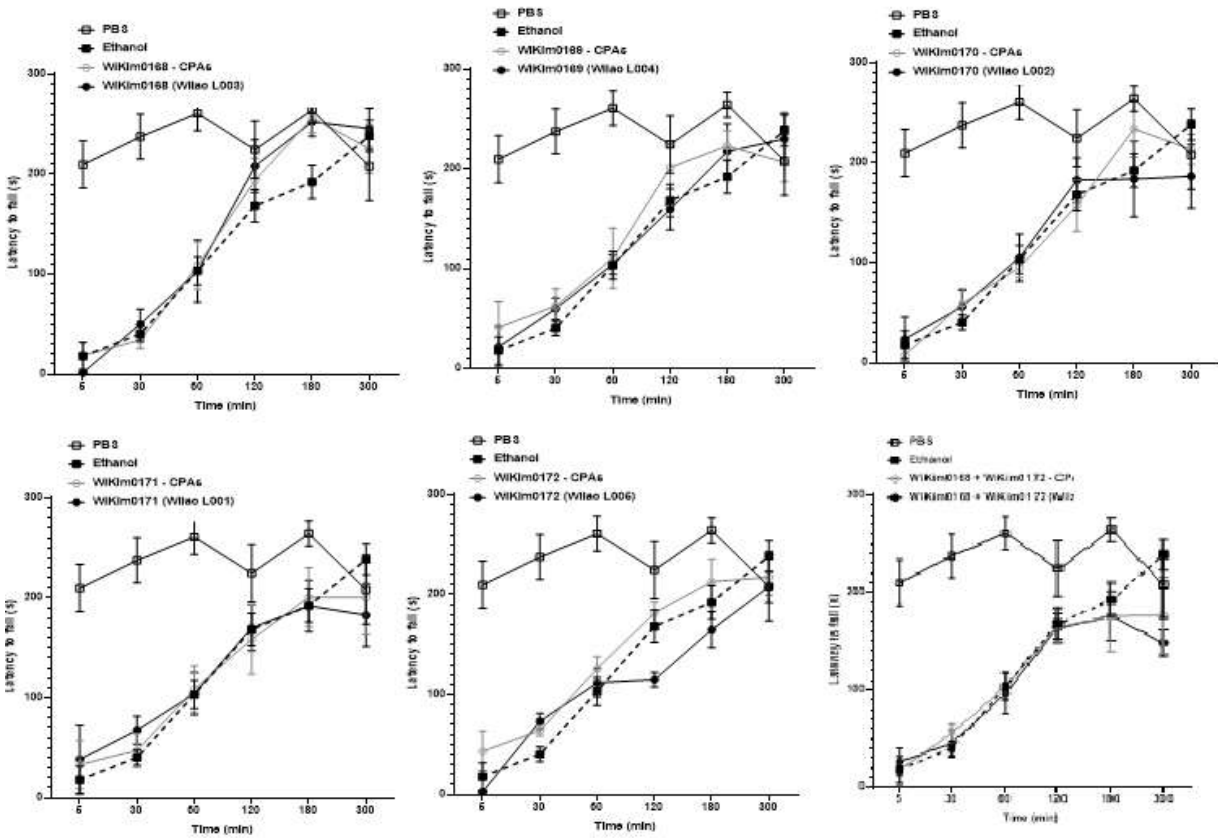


그림46. 유산균 원말시료의 단기 투여 로타로드 운동 평가

- 알코올 저감 효능 유산균 원말의 알코올로 유도된 운동실조증상의 개선 효과를 로타로드를 통한 운동평가로 확인한 결과 WiKim0168 원말 시료를 투여한 실험그룹에서 에탄올만 투여한 실험그룹보다 후 120분 후에는 1.23배, 180분 후에는 1.31배 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음
- 알콜 저감 유산균의 원말 시료를 통한 동등성 실험에서도 실험 동물 혈중알코올농도 저감이 확인되었으며, 실험 동물 행동분석을 통해 LORR 수면각성평가 결과에서도 유산균 투여 그룹의 유의미한 개선 효과가 관찰됨

(2) 단일 군주 5종의 장기투여에 따른 운동실조 증상 개선효능

- 4주간의 유산균 원말 및 알코올 섭취에 따른 장기투여에 따른 운동실조 증상 개선효능을 분석하기 위해 5종의 균주와 알코올을 4주간 경구투여 후 로타로드 운동 평가를 실시 하였으며, 실험 종료 후 각 실험그룹의 실험 동물 체중 변화를 관찰하였음.

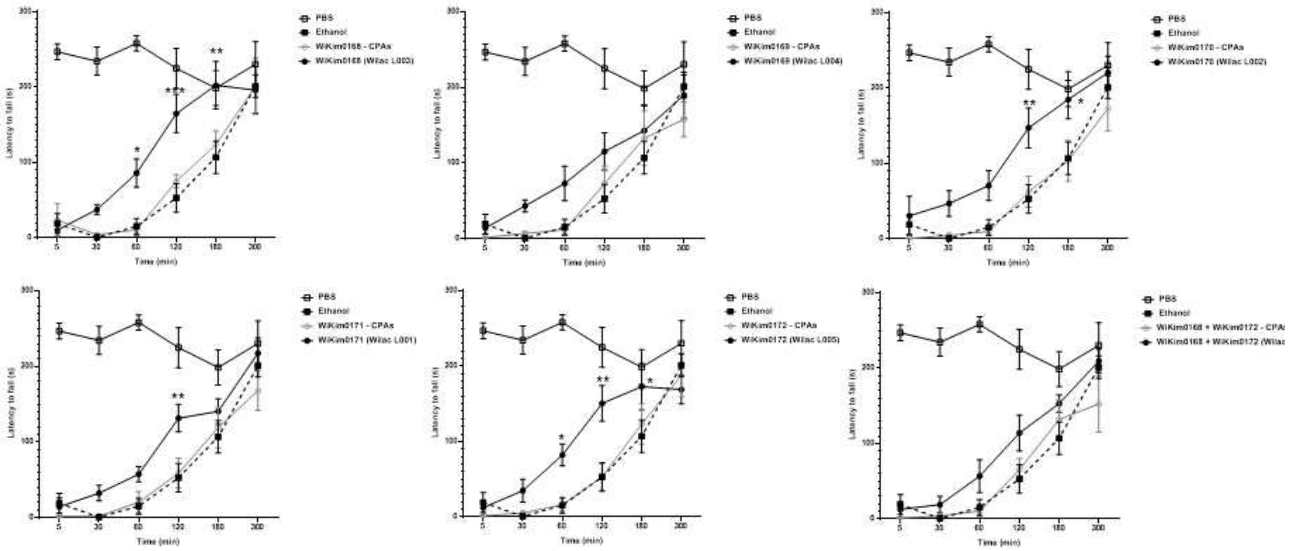


그림47. 유산균 원말시료의 장기 투여 로타로드 운동 평가

- 알코올 저감 효능 유산균 원말과 알코올을 4주간 장기투여하여 알코올로 유도된 운동실조 증상의 개선 효과를 로타로드 운동평가로 확인한 결과 WiKim0168 원말 시료를 투여한 실험 그룹에서 에탄올만 투여한 실험그룹 대비 30분 후 4.7배, 60분 후 5.5배, 120분 후에는 3.1배 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음. WiKim0169 원말 시료를 투여한 실험그룹에서 에탄올만 투여한 실험그룹 대비 30분 후 5.4배, 60분 후 4.7배, 120분 후에는 2.1배 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음. WiKim0170 원말 시료를 투여한 실험그룹에서 에탄올만 투여한 실험그룹 대비 30분 후 5.8배, 60분 후 4.5배, 120분 후에는 2.7배 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음. WiKim0171 원말 시료를 투여한 실험그룹에서 에탄올만 투여한 실험그룹 대비 30분 후 4.0배, 60분 후 3.7배, 120분 후에는 2.4배 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음. WiKim0172 원말 시료를 투여한 실험그룹에서 에탄올만 투여한 실험그룹 대비 30분 후 4.3배, 60분 후 5.3배, 120분 후에는 2.8배 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음. WiKim0168과 WiKim0172 원말 혼합시료를 투여한 실험그룹에서 에탄올만 투여한 실험 그룹 대비 30분 후 2.3배, 60분 후 3.6배, 120분 후에는 2.1배 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음. 단기 투여 후 운동실조 증상 개선효능보다 4주간 장기투여에 따른 운동실조 개선효능이 유의적으로 증가함을 검증하였음.

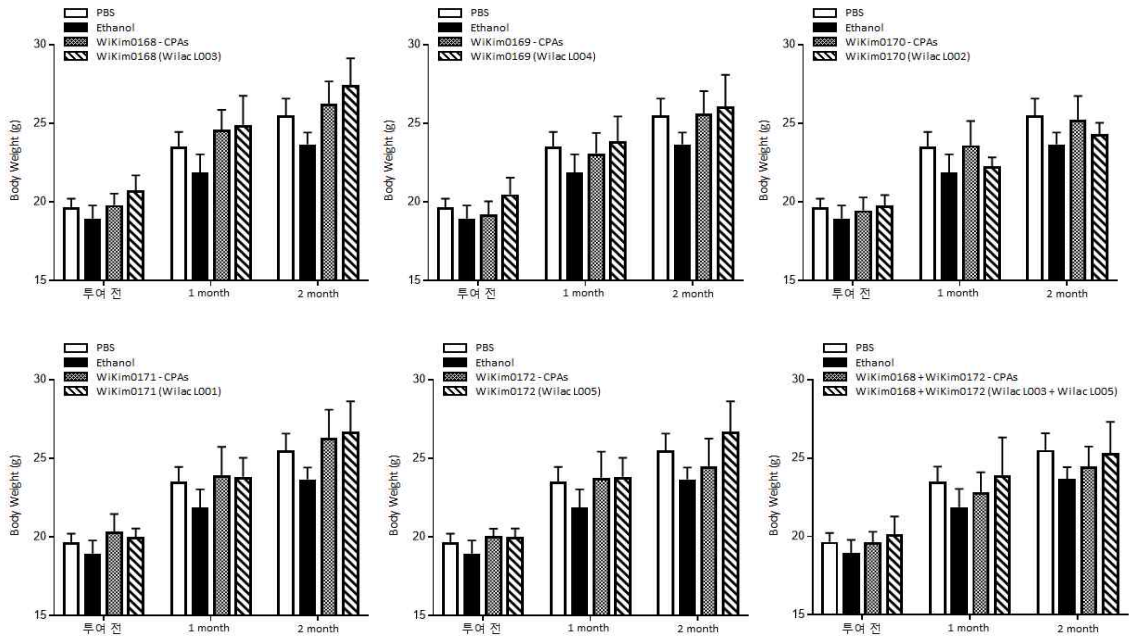


그림48. 유산균 원말시료의 장기투여 실험그룹 체중 관찰

- 알코올 저감 효능 유산균 원말과 알코올을 장기투여하여 알코올로 유도된 운동실조증상의 개선효능이 검증된 실험 동물의 체중을 관찰한 결과, 5종의 단일 투여그룹과 복합 투여그룹 모두 알코올만 투여된 실험 동물에서 나타나는 급성설사나 체중감소 증상은 관찰되지 않았음. 유산균이 투여됨으로서 다량의 알코올 섭취나 장기간의 음주에 따른 급성 복통이나 체중감소 증상이 보호되는 결과를 확인할 수 있음.

4) 알코올에 의해 유도된 간세포 손상 개선효능 분석

- 8주간의 유산균 원말 및 알코올 섭취에 따른 알코올성 간세포 손상 개선효능을 분석하기 위해 5종의 균주와 알코올을 8주간 경구투여하고, 실험 종료 후 실험동물의 혈액을 수집하여 혈중 간 기능 개선 수치를 분석하였음.

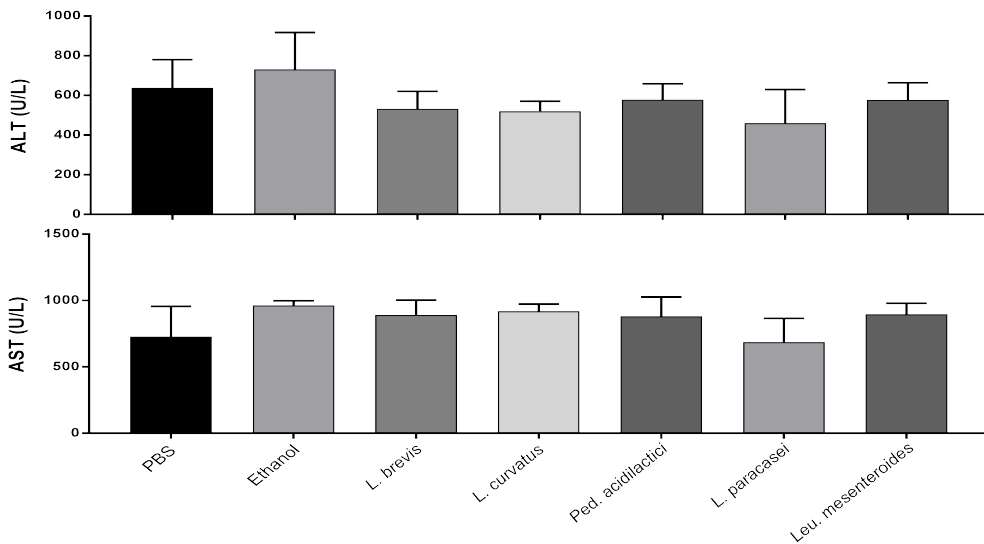


그림 47 알코올에 의해 유도된 간세포의 ALT, AST 농도

- 혈액 중 AST 및 ALT 수치 측정을 통해 알코올 섭취에 의한 간손상을 경감시킴을 확인할 수 있으며, 알코올 섭취 마우스 대비 감소 효능을 확인하였음

5) 유산균 투여 후 장내미생물 다양성 변화 관찰

(1) WiKim0169 투여에 따른 장내 미생물 군집 변화 분석

- 8주간 알코올과 WiKim0169 균을 각각 투여하고, 실험동물 분변을 이용하여 16S rRNA gene 시퀀싱을 통한 장내 미생물 군집 분석을 수행하였음

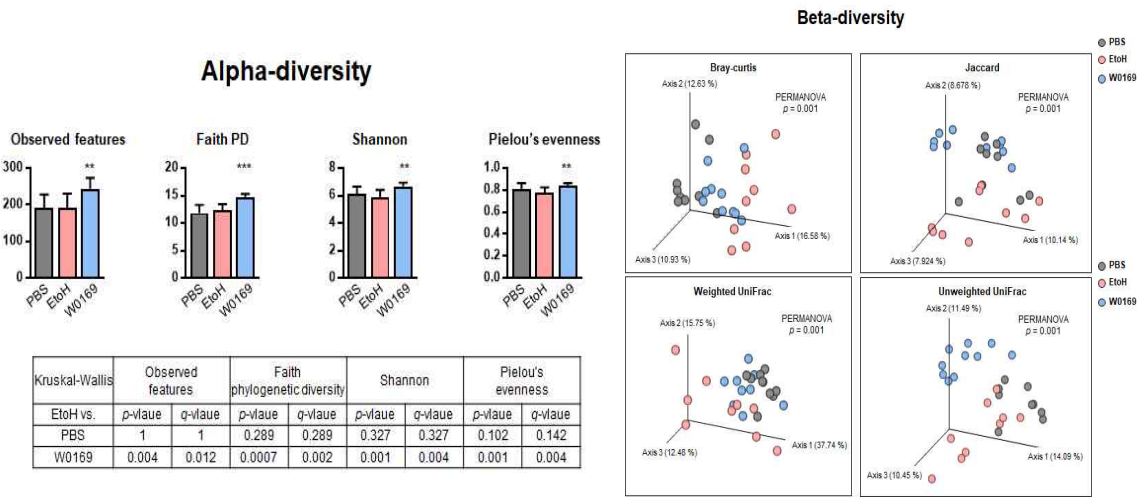


그림 50. 장내 미생물 군집의 Alpha-diversity 및 Beta-diversity 분석

- Alpha diversity는 미생물 군집의 개체 다양성과 균등성을 나타내주는 지표로 WiKim0169가 투여된 실험그룹에서 다양성이 유의하게 증가됨을 확인함
- Beta diversity는 미생물 군집 간에 종의 다양성 비교 분석을 통해 생태계 관계를 유추해 보는 분석으로 알코올만 투여된 실험그룹과 유산균 투여군 간의 생태계적 차이를 보임

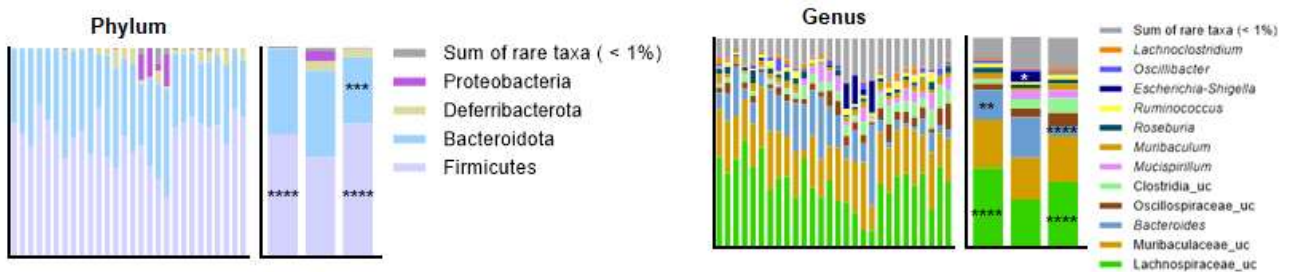


그림 51. 장내 미생물 군집의 Phylum 및 Genus 수준에서의 군집 분석

- Phylum 및 genus 수준에서의 장내 미생물 군집 분석을 통해 알코올 투여그룹과 유산균 투여군 간의 미생물 군집 차이를 보임

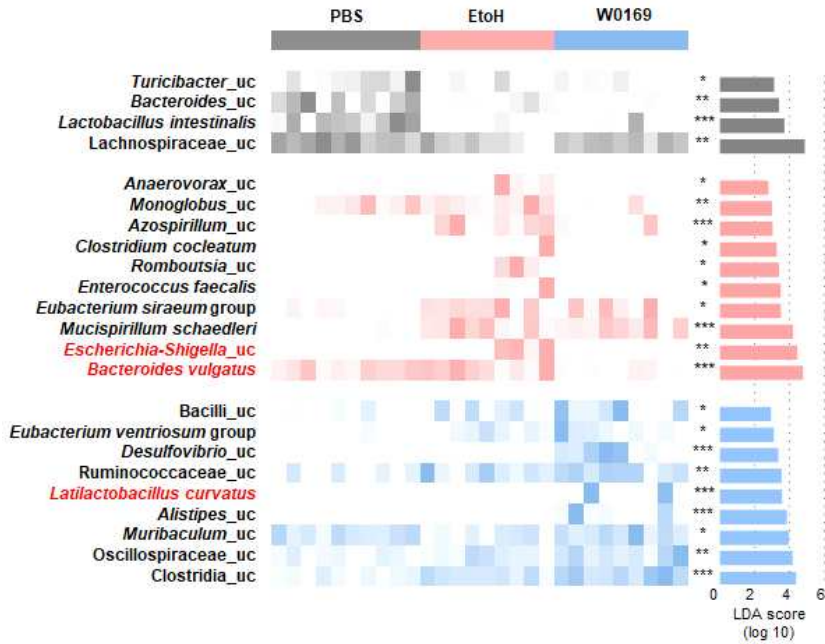


그림 52. WiKim0169 유산균 섭취군의 LefSe 분석

- 장내 미생물 군집 분석 결과를 이용하여 알코올 투여그룹과 WiKim0169 유산균 투여그룹 간의 LefSe 분석을 수행하여 Genus 및 Species 수준의 변화를 관찰한 결과, 알코올 장기투여 후에는 *Escherichia*, *Shigella*와 같은 유해 장내 미생물이 유의적으로 증가되었음. 위의 유해 장내 미생물은 WiKim0169 투여에 따라 유의적으로 감소됨을 확인하였으며, WiKim0169 투여그룹에서는 투여 균인 *Latilactobacillus curvatus*도 안정적으로 장내 부착 및 장내 증식 효능을 검증하였음.

6) 알코올과 혼합 유산균 2주, 4주 투여 후 숙취 개선 및 간 손상 개선 지표 관찰 혈중 알코올 저감 및 알코올 분해효소 활성화

(1) 알코올과 혼합 유산균 2주 투여에 따른 혈중 알코올 저감 및 알코올 분해효소 활성화 분석

- 2주와 4주간 알코올과 WiKim0168+Wikim0172 혼합 유산균을 함께 투여하고, 실험 알코올과 혼합 유산균을 동시에 투여하고 30분, 60분, 180분, 300분 후 각각 실험그룹의 혈액을 채취하여 혈중 알코올과 혈중 ADH, 혈중 ALDH 활성을 비교 분석하였음.

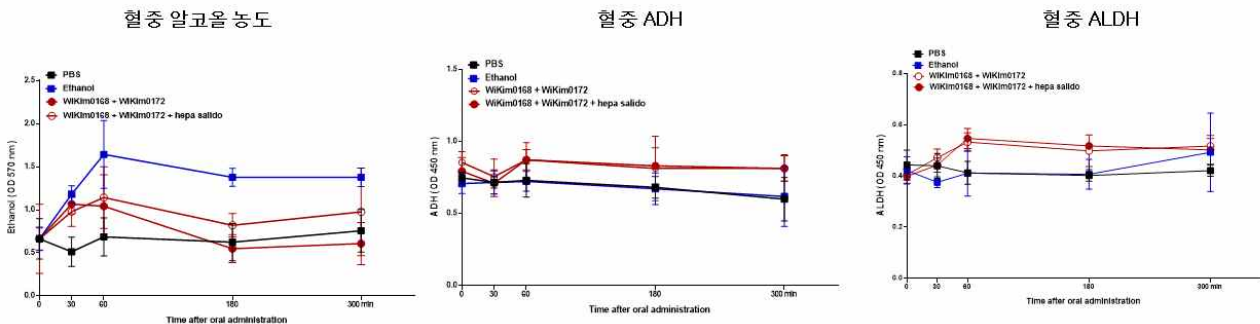


그림 53. 혼합 유산균 2주 투여 후 혈중 숙취 개선 효능

- 2주간 알코올과 혼합 유산균을 함께 장기투여 한 실험그룹은 알코올만 투여한 실험 그룹대비 혈중 알코올은 60분 후 30.4%, 180분 후 40.4%, 300분 후 29.1% 감소가 관찰되었으며, 혈중 ADH 효소 활성은 60분 후 20.7%, 180분 후 23.6%, 300분 후 31.5% 증가, 혈중 ALDH 효소 활성은 60분 후 33.0%, 180분 후 27.3% 증가됨이 관찰되었음

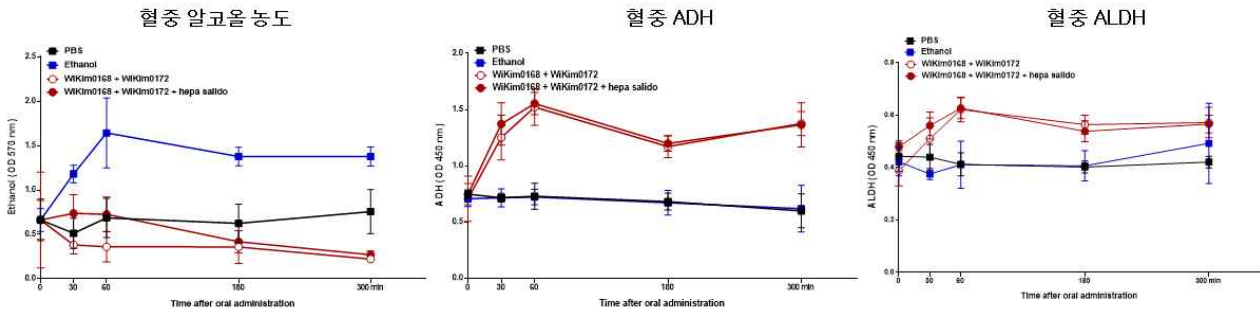


그림 54. 혼합 유산균 4주 투여 후 혈중 숙취 개선효능

- 4주간 알코올과 혼합 유산균을 함께 장기 투여한 실험그룹은 알코올만 투여한 실험 그룹대비 혈중 알코올은 30분 후 67.7%, 60분 후 78.0%, 180분 후 74.0%, 300분 후 83.9% 감소가 관찰되었으며, 혈중 ADH 효소 활성은 30분 후 91.8%, 60분 후 114.8%, 180분 후 78.4%, 300분 후 120.7% 증가, 혈중 ALDH 효소 활성은 30분 후 49.4%, 60분 후 52.4%, 180분 후 32.5% 증가됨이 관찰되었음

2주 투여 후 ALT

4주 투여 후 ALT

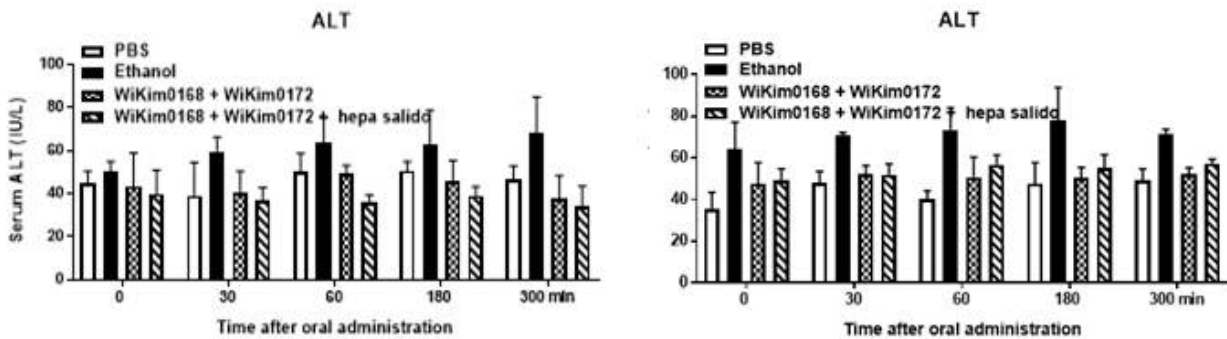


그림 55. 혼합 유산균 2주, 4주 투여 후 간손상 지표 개선 효능

- 2주와 4주간 투여된 알코올과 혼합 균주 실험 동물의 혈중 간손상 지표 ALT를 관찰한 결과 에탄올만 투여된 실험그룹은 간 손상이 진행되어 혈중 ALT가 높게 측정되었으며, 혼합유산균이 투여된 실험그룹은 혈중 ALT가 유의적으로 감소됨이 확인됨
- 이와 같이 2주와 4주간 혼합 균주의 장기투여에 따른 혈중 알코올 농도 감소와 함께 혈중 알코올 분해효소 활성이 함께 증가함이 검증되었으며, 이와 함께 간 손상 개선효능도 확인됨에 따라 단회투여와 장기투여 조건에 효능을 가진 숙취개선 유산균임을 평가할 수 있음

5. 균주 생산 최적화 및 대량 공정 표준화

1) 숙취 개선 기능성 후보 유산균 5종의 배양조건 개발

(1) 후보 유산균 5종의 최적 배양배지 선정 및 동결건조 보호제 개발

① *Lactobacillus paracasei* WiKim0171 (Wilac L001)

- 최적의 배양 배지 조건 확립

- 6종의 배지 조성에 따른 생균수를 바탕으로 4L급 scale up을 통한 최적화를 진행하여, 기존의 C배지 대비 F배지의 경우 9억에서 35억 CFU/ml로 약 4배 증가 되어 최적 배지로 F를 선정하였음.




배양배지	C	F	F 최적화
배양액 생균수 (CFU/ml)	21억	35억	45억
현미경 사진			
OD	8.5	9.8	9.5
pH	6.03	5.99	6.11

표 5. C와 F 배지를 이용하여 scale up 결과 비교

- 동결건조보호제 선정 및 생산 수율 확인
 - F 배지를 이용하여 동결 건조 보호제 5종의 원말의 생균수와 원말 생산량을 비교 분석하였으며, 최적의 동결 건조 보호제는 C, D로 확인되었으며 생산 수율에 따라 최적 동결건조 보호제는 C로 확인되었음.

동결건조 보호제	C	D
원말 생균수 (CFU/g)	3,500억	2,700억
원말생산량	45g	37g

표 6. F배지에 2종의 동결건조 보호제 재현성 실험

② *Pediococcus acidilactici* WiKim0170 (Wilac L002)

- 최적의 배양 배지 조건 확립
 - 기본 조성 배지에서도 생산성이 높은 것으로 나타남.


배양액 생균수 (CFU/ml)	65억
현미경 사진	
OD	10.5
pH	5.34

표 7. 배양 생균수 (65억 CFU/ml)

- 동결 건조 보호제 선정 및 생산 수율 확인
 - 총 6종의 동결 건조 보호제를 사용하여 원말 생균수를 측정였고, 동결건조 보호제 D를 이용하여 배양 및 동결 건조를 진행하였을 때 7,000억 CFU/g으로 다른 보호제 대비 50% 이상 원말의 생균수가 높게 측정되었음.
- 시생산 결과 (최적화 조건 적용)
 - 선정된 동결 건조 보호제 D를 이용하여 대량 생산을 위한 최적화 조건을 통해 배양한 결과는 원말 생균수는 7,200억 CFU/g로 나타남.

배양배지	D
배양액 생균수 (CFU/ml)	60억
현미경 사진	
OD	10.7
pH	5.53
원말 생산량	19g
원말 생균수 (CFU/g)	7200억

표 8. 동결건조 보호제 D를 이용한 최적화 결과

③ *Lactobacillus brevis* WiKim0168 (Wilac L003)

- 최적의 배양 배지 조건 확립
 - 배양배지 변경 실험
 - : 각 배지별 원말의 총 생산량은 동일하나 g 당 생산 균 수는 월등히 증가되어, B배지로 최종 선정함.



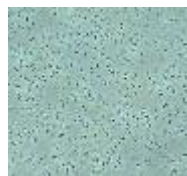
배양배지	A	B	C
배양액 생균수 (CFU/ml)	33억	43억	32억
현미경 사진			
OD	3.1	5.4	3.1
pH	5.57	5.57	5.65
원말 생산량	15g	15g	11g
원말 생균수 (CFU/g)	5000억	6200억	5500억

표 9. 배지 조성에 따른 원말 생산량과 생균수

- 동결 건조 보호제 선정 및 생산 수율 확인
 - 기본 동결건조보호제를 이용한 최적화 결과는 원말 생균수는 6,000억 CFU/g로 나타남

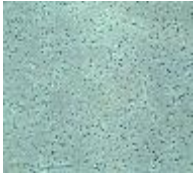

배양배지	B	B 최적화
배양액 생균수 (CFU/ml)	40억	45억
현미경 사진		
OD	4.2	5.9
pH	5.48	5.40
원말 생산량	15g	17g
원말 생균수 (CFU/g)	5800억	6000억

표 10. 동결건조보호제를 이용한 최적화

④ *Lactobacillus curvatus* WiKim0169 (Wilac L004)

- *Lac. curvatus*는 생산성이 떨어지는 균주로 9종의 배지와 10종의 동결건조 보호제를 이용하여 생산 최적화 진행
- 최적의 배양 배지 조건 확립
 - : A' 배지의 경우 2,500억 CFU/g, B'의 경우 2,000억 CFU/g으로 최종 경시 테스트를 통해 최적의 배지를 A' 로 선정함.



배양배지	A'	B'
배양액 생균수 (CFU/ml)	28억	20억
현미경 사진		
OD	8.5	7.9
pH	5.39	5.49
원말 생산량	42g	20g
원말 생균수 (CFU/g)	2500억	2000억

표 11. 배지 조성에 따른 원말 생산량과 생균수

- 동결 건조 보호제 선정 및 생산 수율 확인
 - 동결 건조 보호제 선정을 위하여 A~J, 10종의 서로 다른 동결 건조 보호제를 이용하여 원말 생산 생균수를 확인하였음.

동결건조 보호제	A	B	C	D	E
원말 생균수 (CFU/g)	450억	900억	1100억	1700억	1500억
동결건조 보호제	F	G	H	I	J
원말 생균수 (CFU/g)	1100억	600억	250억	290억	540억

표 12. 동결 건조 보호제 10종에 따른 원말 생균수

- 동결 건조 보호제 D와 E에서 높은 원말 생균수가 측정되었으며, 특히 동결 건조 보호제를 이용한 결과 1,700억 CFU/g 으로 원말 생균수가 가장 높았음. 최종적으로 D 동결 건조 보호제에 A' 와 B'배지로 배양된 샘플을 이용하여 경시 테스트를 진행 후 최종적으로 배양 조건을 확정하였음.

⑤ *Leuconostoc mesenteroides* WiKim0172 (Wilac L005)

- 6종의 배지, 6종의 동결건조보호제 이용하여 배양 최적화 진행
- 최적의 배양 배지 조건 확립
- B 와 F 배지를 이용하여 scale up 생산을 진행하였음. 그 결과 아래와 같이 B 배지에서 35억 CFU/ml, F 배지에서 60억 CFU/ml로 나타남. 총 원말 생균수는 B 배지에서 1,500억 CFU/g, F 배지에서 3,000억 CFU/g임. 이에 최종 F 배지를 선정하였음.



배양배지	B	F
배양액 생균수 (CFU/ml)	35억	60억
현미경 사진		
OD	4.9	5.4
pH	5.52	5.49
원말 생산량	35g	40g
원말 생균수 (CFU/g)	1500억	3000억

표 13. B 배지와 F 배지에 따른 생산 수율과 원말 생균수

- 동결 건조 보호제 선정 및 생산 수율 확인
- C의 경우 4,000억 CFU/g, F의 경우 4,500억 CFU/g으로 원말의 생균수가 높게 나타났으며, 최종 동결 건조보호제는 F로 선정하였음.

동결건조 보호제	A	B	C	D	E	F
원말 생균수 (CFU/g)	3000억	3200억	4000억	3500억	3700억	4500억

표 14. 동결 건조 보호제별 생산된 원말 생균수

(2) 후보 유산균 5종의 열안정성 향상 기술 확보

○ 최적의 열 안정성 확보를 위한 온도별 균주의 안정성을 확인하기 위해 40℃ 가혹조건에서 한 달간 경시안정성 테스트를 진행하여, 최적의 대량 배양을 위한 조건을 확립함.

① *Lactobacillus paracasei* WiKim0171 (Wilac L001)

- F 배지와 C, D 동결 건조 보호제를 이용하여 생산한 원말 생균수가 동일하여 열 안정성 경시 테스트를 진행한 후 안정성이 더 확보된 동결 건조 보호제를 최종 대량 배양조건으로 확립하고자 실험을 실시 하였음.
- 3 주차까지의 생균수확인하여 최종적으로 생존율이 큰 D 보호제로 설정함.

동결 건조 보호제		C		D	
경시온도		40℃			
생존 원말 생균수 (CFU/g)	0 주차	2,000억		2,000억	
	1 주차	700억	35.0%	550억	27.5%
	2 주차	120억	6.0%	500억	25 %
	3 주차	10억	0.5%	9억	0.5%

표 15. 40℃ 가혹 조건에서 동결 건조 보호제에 따른 생존 원말 생균수

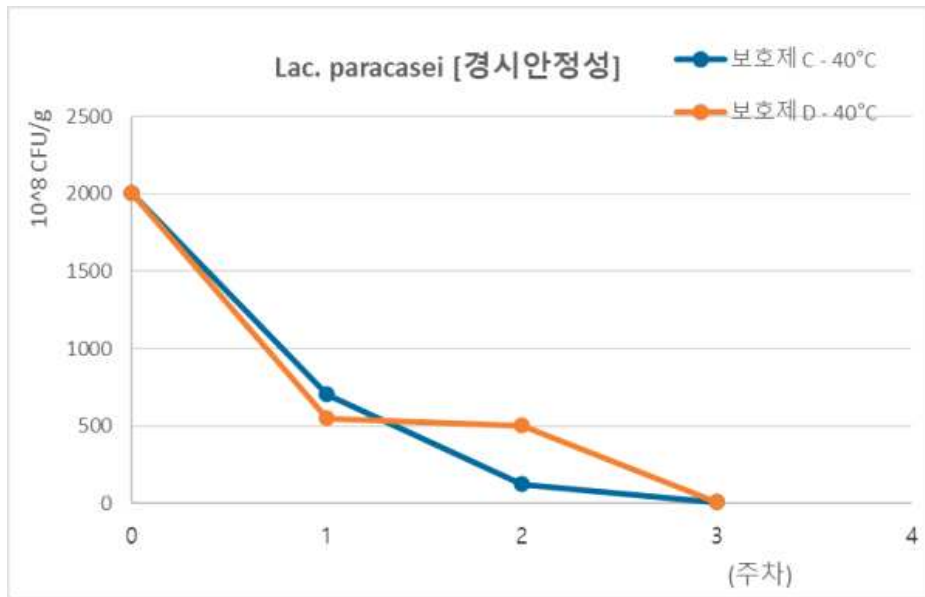


그림 56. 40°C 가혹 조건에서 경시 안정성 테스트 결과

② *Pediococcus acidilactici* WiKim0170 (Wilac L002)

- 1 주차에서 27.9%, 4 주차에서 8.8%의 생존율을 나타냄.

경시온도		40°C	
원말 생균수 (CFU/g)	0 주차	3,400억	
	1 주차	950억	27.9%
	2 주차	450억	13.2%
	3 주차	350억	10.3%
	4 주차	300억	8.8%

표 16 40°C 가혹 조건에서 생존 원말 생균수

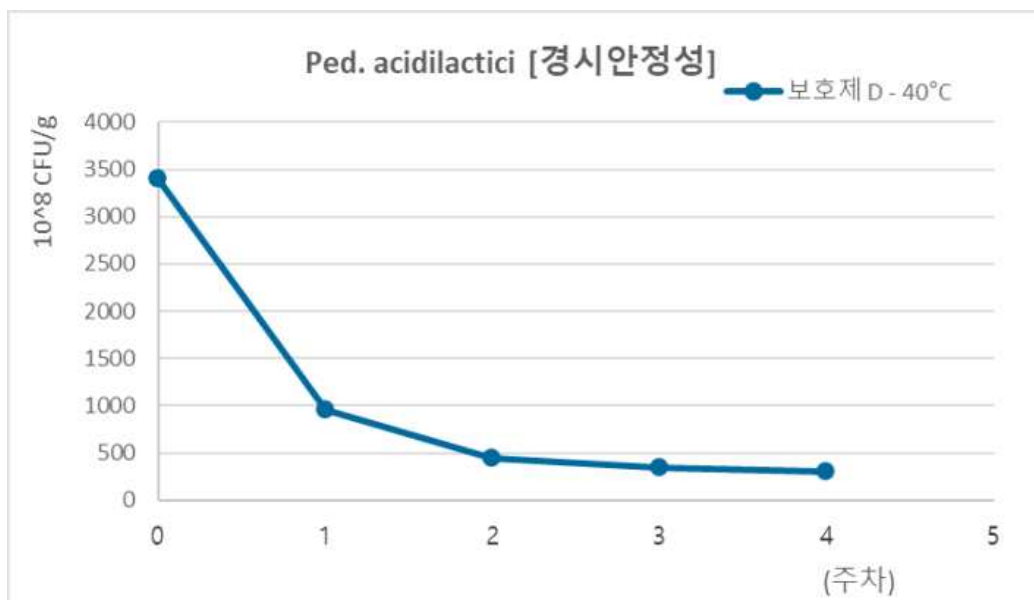


그림 57. 40°C 가혹 조건에서 경시 안정성 테스트 결과

③ *Lactobacillus brevis* WiKim0168 (Wilac L003)

- 다른 균주에 비해 열 안정성이 우수하며, 가혹 조건에서 4 주차까지 23.3%의 생존율이 유지되는 양상을 보였음.

경시온도		40℃	
원말 생균수 (CFU/g)	0 주차	3,000억	
	1 주차	2,200억	73.3%
	2 주차	1,500억	50.0%
	3 주차	1,050억	35.0%
	4 주차	700억	23.3%

표 17. 40℃ 가혹 조건에서 원말 생균수



그림 58. 40℃ 가혹 조건에서 경시 안정성 테스트 결과

④ *Lactobacillus curvatus* WiKim0169 (Wilac L004)

- 동결 건조 보호제는 D로 동일하게 적용하였으며, 2차로 확인한 배양 배지 A'와 B'를 이용하여 열 안정성 경시 테스트 결과를 Lac. curvatus의 최적의 대량배양 조건은 A'배지와 D 동결 건조 보호제가 가장 적합한 것으로 나타남.

배양 배지		A`		B`	
경시온도		40° C			
원말 생균수 (CFU/g)	0 주차	2000억		2000억	
	1 주차	1200억	60.0%	950억	47.5%
	2 주차	920억	46.0%	400억	20.0%
	3 주차	500억	25.0%	270억	13.5%
	4 주차	350억	17.5%	50억	2.5%

표 18. 40°C 가혹 조건에서 생존 원말 생균수(배지 조성별 비교)

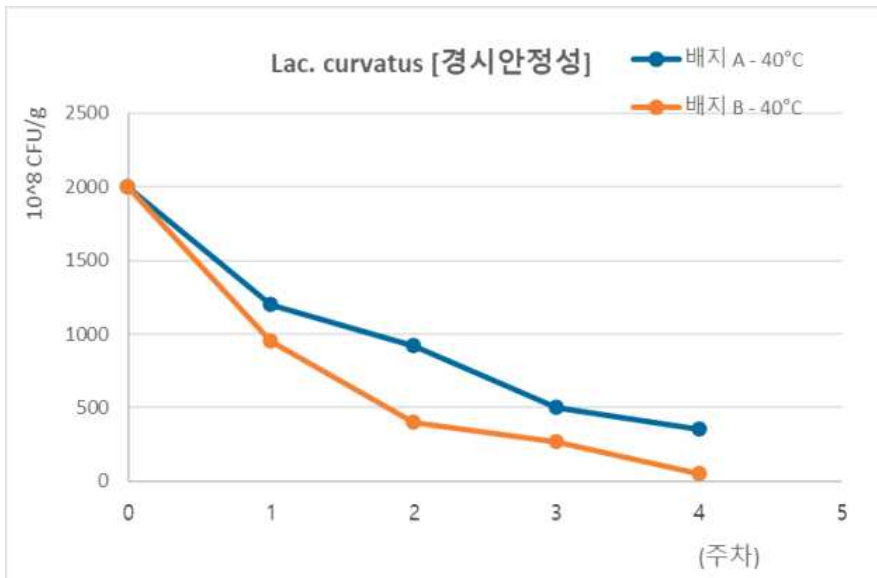


그림 59. 40°C 가혹 조건에서 A`와 B` 배지의 경시 안정성 테스트 결과

⑤ *Leuconostoc mesenteroides* WiKim0172 (Wilac L005)

- 1 주차 생존율 62.5%, 2 주차 51%, 4 주차에 13%로 열안정성을 확인하였음. 다른 균주와 비교 시 열안정성이 있는 것으로 확인되었음.

경시온도		40°C	
원말 생균수 (CFU/g)	0 주차	2,000억	
	1 주차	1,250억	62.5%
	2 주차	1,020억	51.0%
	3 주차	500억	25.0%
	4 주차	260억	13.0%

표 19. 40°C 가혹 조건에서 생존 원말 생균수

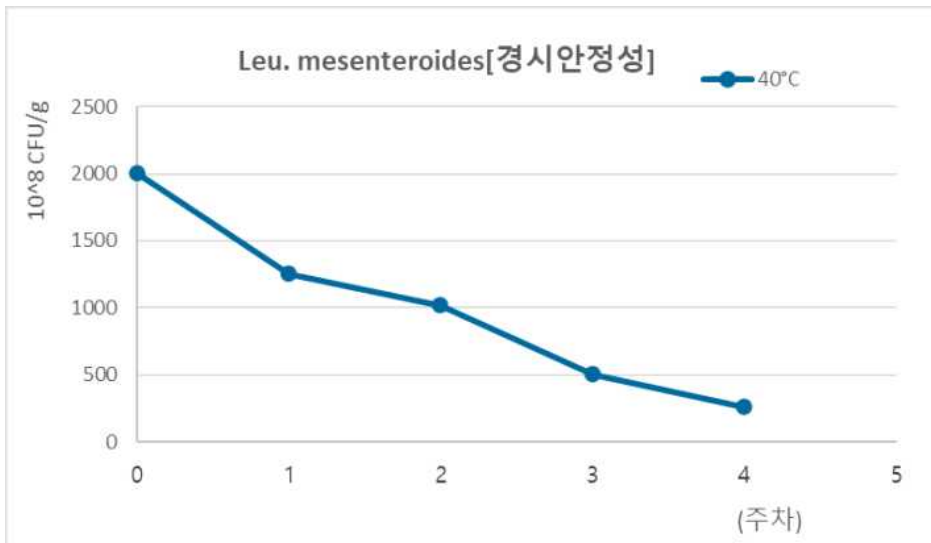


그림 60. 40°C 가혹 조건에서 *Leu. mesenteroides*의 경시 안정성 테스트 결과

(3) 후보 균주 5종의 최적 생산 조건 확립

- 후보 균주의 최적 배지 및 동결건조보호제 확립
배지와 동결 건조 보호제에 따른 경시 안정성과 열 안정성 검증을 통해 최적의 배지와 동결 건조 보호제 선정

균주명	최종 선정 최적배지	최종 선정 동결보호제
<i>L. paracasei</i> WiKim0171(Wilac L001)	F`	C
<i>L. paracasei</i> WiKim0171(Wilac L001)	A	D
<i>L. brevis</i> WiKim0168(Wilac L003)	B	B`
<i>L. curvatus</i> WiKim0169(Wilac L004)	A`	D
<i>Leu. mesenteroides</i> WiKim0172(Wilac L005)	F	F

표 20. 후보균주 5종 최적 생산 조건 확립

2) 대량생산 공정 표준화

(1) 후보 균주 5종의 400L 대량 시생산을 통한 수율 및 생균수 확인

- 400L 시생산 결과와 세계김치연구소의 효능 스크리닝 결과를 복합적으로 고려하였을 때 생산성과 효능이 모두 우수한 *L. brevis* WiKim0168(Wilac L003) 및 *Leu. mesenteroides* WiKim0172(Wilac L005) 균주를 최종 선별하였음.

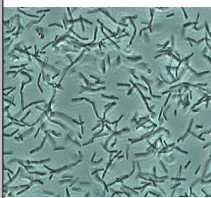
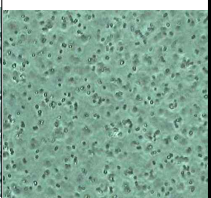
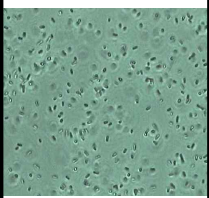
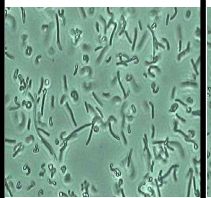
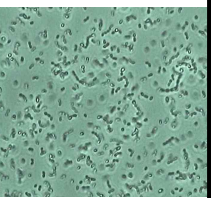
균주	<i>L. paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>L. paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>L. brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>L. curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	<i>Leu. mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
배양액 생균수 (CFU/ml)	20억	60억	20억	20억	22억
현미경 사진					
OD	9.5	8.0	4.0	8.2	3.5
pH	6.04	5.58	5.52	5.52	5.50
원말 생산량(g)	5500g	1100g	700g	3000g	750g
원말 생균수(CFU/g)	1700억	7500억	5500억	1000억	4000억

표 21. 후보 균주 5종 400L 대량 시생산 결과

(2) 최종 선별 균주 2종 800L 대량생산을 통한 최적화 공정 확립

- 최종 선별 균주 2종(*L. brevis* WiKim0168(Wilac L003) 및 *Leu. mesenteroides* WiKim0172 (Wilac L005)의 800L 배양 탱크를 이용하여 생산 수율 및 재현성 확인 결과, 400L 시생산 결과와 동일한 수준의 원말 생균수가 유지됨을 확인하였음.
- 특히 400L에서 800L 규모로 용량을 2배 증가시켜 배양하였을 때, 원말생산량은 *L. brevis* WiKim0168(Wilac L003)이 400L, 700g에서 800L, 2000g으로, *Leu. mesenteroides* WiKim0172(Wilac L005)는 400L, 750g에서 800L, 2000g으로 수율이 크게 향상되었음.
- 최종 선별 균주 2종은 1.0×10^{10} (100억)CFU/g 이상 대량 배양 표준화 목표를 충족하였으며, 이를 바탕으로 원말의 생산 spec을 설정함(1.0×10^{10} CFU/g 이상).

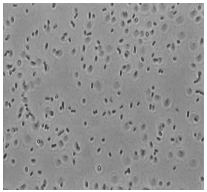
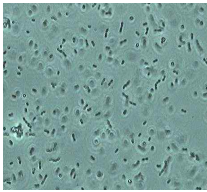
균주	<i>L. brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Leu. mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
배양액 생균수 (CFU/ml)	30억	30억
현미경 사진		
OD	4.6	4.0
pH	5.45	5.60
원말 생산량(g)	2000g	2000g
원말 생균수(CFU/g)	5500억	4000억

표 22. 최종 선별 균주 2종 800L 대량 시생산 결과

(3) 최종 선별 균주 2종의 경시안정성 평가

- 원말 유통 온도 조건 설정 및 최종 제품의 투입균수 결정 시, 본 경시안정성 평가 결과를 기반 자료로 활용할 계획임.

① *Lactobacillus brevis* WiKim0168 (Wilac L003)

- 800L 대량 시생산 원말을 25℃, 35℃, 40℃에서 각각 8주간 보관하며 1주마다 원말 생균수를 측정한 결과는, 8주 보관 후 원말의 생존율은 25℃에서 58.36%, 35℃에서 28.55%, 40℃에서 2.59%로 확인되었음.

Batch No.		22F0818					
경시온도		25℃		35℃		40℃	
원말 생균수 (CFU/g)	0주차	5,500 억					
	1주차	4,554억	82.80%	3,616억	65.75%	3,509억	63.80%
	2주차	4,301억	78.20%	3,198억	58.15%	3,153억	57.32%
	3주차	4,070억	74.00%	2,887억	52.49%	2,493억	45.33%
	4주차	3,995억	72.63%	2,590억	47.09%	1,521억	27.65%
	5주차	3,777억	68.67%	2,276억	41.38%	600억	10.90%
	6주차	3,451억	62.74%	2,033억	36.96%	483억	8.77%
	7주차	3,370억	61.28%	1,793억	32.60%	210억	3.81%
	8주차	3,210억	58.36%	1,570억	28.55%	143억	2.59%

표 23. *L. brevis* WiKim0168 (Wilac L003) 경시안정성 결과



그림 61. *L. brevis* WiKim0168 (Wilac L003) 경시안정성 그래프

② *Leuconostoc mesenteroides* WiKim0172 (Wilac L005)

- 800L 대량 시생산 원말을 25℃, 35℃, 40℃에서 각각 8주간 보관하며 1주마다 원말 생균수를 측정된 결과는 8주 보관 후 원말의 생존율은 25℃에서 16.20%, 35℃에서 8.23%, 40℃ 4주에서 0.80%로 확인되었음.

Batch No.		22F0818					
경시온도		25℃		35℃		40℃	
원말 생균수 (CFU/g)	0주차	4000 억					
	1주차	2495 억	62.40%	1420 억	35.50%	584.0 억	14.60%
	2주차	2012 억	50.30%	908 억	22.70%	60.0 억	1.50%
	3주차	1712 억	42.80%	744 억	18.60%	36.0 억	0.90%
	4주차	1476 억	36.90%	568 억	14.20%	32.0 억	0.80%
	5주차	1264 억	31.60%	524 억	13.10%	-	
	6주차	1004 억	25.10%	476 억	11.90%		
	7주차	804 억	20.10%	388 억	9.70%		
	8주차	648 억	16.20%	329 억	8.23%		

표 24. *Leu. mesenteroides* WiKim0172 (Wilac L005) 경시안정성 결과

Leu. Mesenteroides Wilac L005

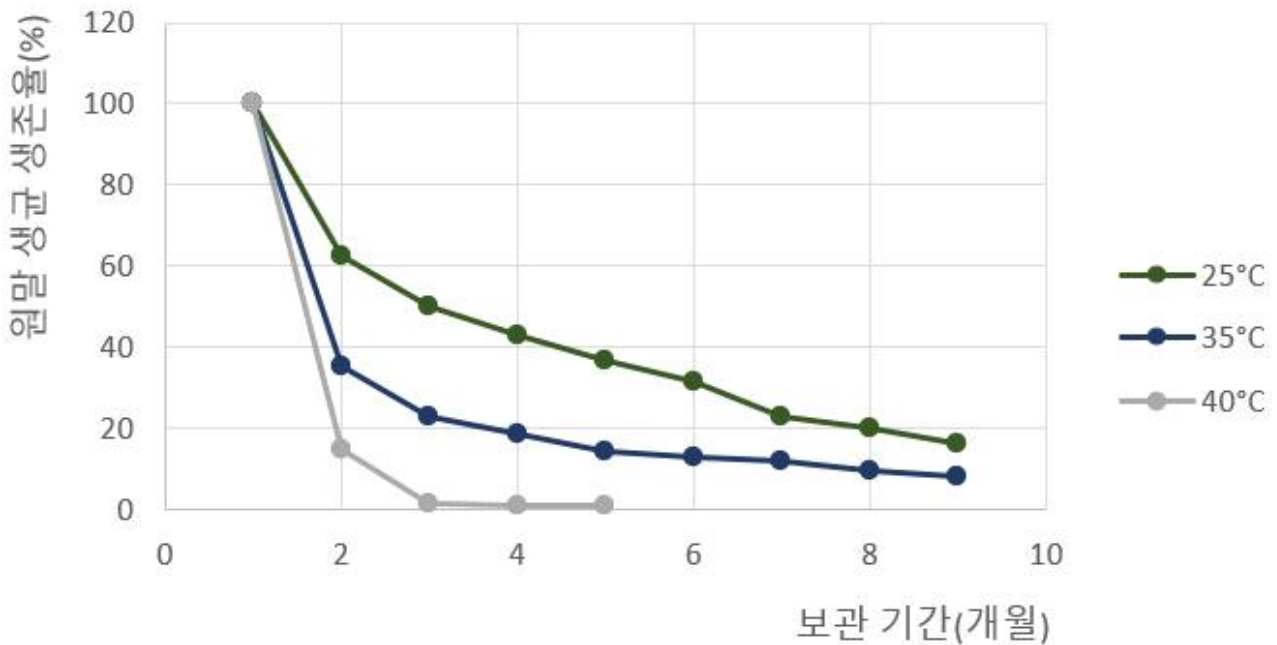


그림 62. *Leu. mesenteroides* WiKim0172(Wilac L005) 경시안정성 그래프

(4) 원료 품목제조보고

- 표준화된 대량 생산 조건 확립에 따른 제조 공정도 확립 및 원료 품목 신고 완료
- 각 표준화된 대량 배양 조건에 따라 최종 후보 균주에 대하여 scale up 생산을 진행하여 재현성 확인 함

<p>식품·식품첨가물 품목제조보고서</p> <p>제 20040020968 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 품명(학명(번역)): 20040020968 호</p> <p>○ 품 소 명: (주)비타이노</p> <p>○ 품 조 기: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>○ 품 조 명: 건강기능식품제조신고증</p> <p>○ 품 조 명: (주)비타이노(서울특별시 강남구 테헤란로 100)</p> <p>제조업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>판매업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>2023년 11월 15일</p> <p>대한지방식품(주)식품안전장</p>	<p>식품·식품첨가물 품목제조보고서</p> <p>제 20040020969 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 품명(학명(번역)): 20040020969 호</p> <p>○ 품 소 명: (주)비타이노</p> <p>○ 품 조 기: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>○ 품 조 명: 건강기능식품제조신고증</p> <p>○ 품 조 명: (주)비타이노(서울특별시 강남구 테헤란로 100)</p> <p>제조업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>판매업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>2023년 11월 15일</p> <p>대한지방식품(주)식품안전장</p>	<p>식품·식품첨가물 품목제조보고서</p> <p>제 20040020970 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 품명(학명(번역)): 20040020970 호</p> <p>○ 품 소 명: (주)비타이노</p> <p>○ 품 조 기: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>○ 품 조 명: 건강기능식품제조신고증</p> <p>○ 품 조 명: (주)비타이노(서울특별시 강남구 테헤란로 100)</p> <p>제조업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>판매업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>2023년 11월 15일</p> <p>대한지방식품(주)식품안전장</p>
<p>락티카제이바실러스 파라카제이 Wikim0171(Wilac L001)</p>	<p><i>Pediococcus acidilactici</i> Wikim0170(Wilac L002)</p>	<p><i>Lactobacillus brevis</i> Wikim0168(Wilac L003)</p>
<p>식품·식품첨가물 품목제조보고서</p> <p>제 20040020971 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 품명(학명(번역)): 20040020971 호</p> <p>○ 품 소 명: (주)비타이노</p> <p>○ 품 조 기: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>○ 품 조 명: 건강기능식품제조신고증</p> <p>○ 품 조 명: (주)비타이노(서울특별시 강남구 테헤란로 100)</p> <p>제조업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>판매업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>2023년 11월 15일</p> <p>대한지방식품(주)식품안전장</p>	<p>식품·식품첨가물 품목제조보고서</p> <p>제 20040020972 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 품명(학명(번역)): 20040020972 호</p> <p>○ 품 소 명: (주)비타이노</p> <p>○ 품 조 기: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>○ 품 조 명: 건강기능식품제조신고증</p> <p>○ 품 조 명: (주)비타이노(서울특별시 강남구 테헤란로 100)</p> <p>제조업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>판매업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>2023년 11월 15일</p> <p>대한지방식품(주)식품안전장</p>	<p>식품·식품첨가물 품목제조보고서</p> <p>제 20040020973 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 품명(학명(번역)): 20040020973 호</p> <p>○ 품 소 명: (주)비타이노</p> <p>○ 품 조 기: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>○ 품 조 명: 건강기능식품제조신고증</p> <p>○ 품 조 명: (주)비타이노(서울특별시 강남구 테헤란로 100)</p> <p>제조업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>판매업자: 동양식품 제1차 배아(2004년 10월 10일)</p> <p>2023년 11월 15일</p> <p>대한지방식품(주)식품안전장</p>
<p><i>Lactobacillus curvatus</i> Wikim0169(Wilac L004)</p>	<p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> Wikim0172(Wilac L005)</p>	<p>와이락 엘 복합유산균 (L003+L005)</p>

표 25 , 숙취 해소 유산균 5종의 품목제조 보고서와 actobalciillus brevis Wikim0168와 Leuconostoc mesenteroides Wikim0172 복합 유산균 (와이락 엘복합 유산균)의 품목 제조 보고

(5) 섭취용량 설정

- 와이락 엘 복합 유산균의 동물실험과 안전성 검증 자료를 바탕으로 일일 섭취량은 프로바이오틱스 수로써 1.0×10^{10} CFU/day 으로 설정함

(6) 기준 규격 설정

- 최종 선정된 와이락 엘 복합 유산균의 생산성을 고려하여 2.0×10^{11} CFU 을 기준규격으로 설정함

6. 숙취 해소 유산균 5종의 특징 및 안전성 검증

1) 분자생물학적 안전성 평가

(1) 항생제 내성

- 숙취 개선효능을 보이는 유산균 5종에 대해 항생제 내성을 평가함



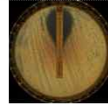





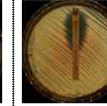

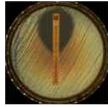
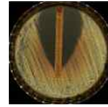
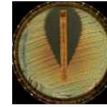
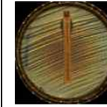
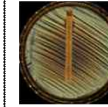
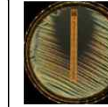
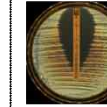
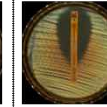

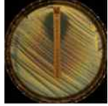
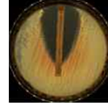
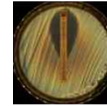
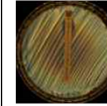

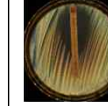
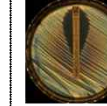
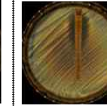



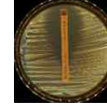
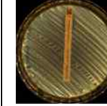
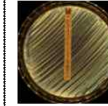
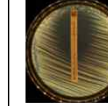
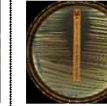
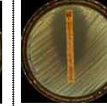
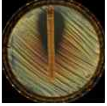

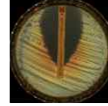
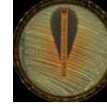

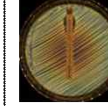
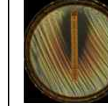

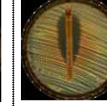
	Ampicillin	Chloramphenicol	Clindamycin	Erythromycin	Gentamicin	Kanamycin	Penicillin	Rifampin	Tetracycline
W0168									
W0169									
W0170									
W0171									
W0172									

그림 63. 숙취 개선 유산균 5종의 antibiotic susceptibility test

- 9종 항생제(Ampicillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Gentamicin, Kanamycin, Penicillin, Rifampin, Tetracycline)에 대한 김치유산균 3종의 항생제 내성을 평가하여 안전성을 검증함
- Whole genome 염기서열 분석을 통한 항생제 내성 유전자 확인

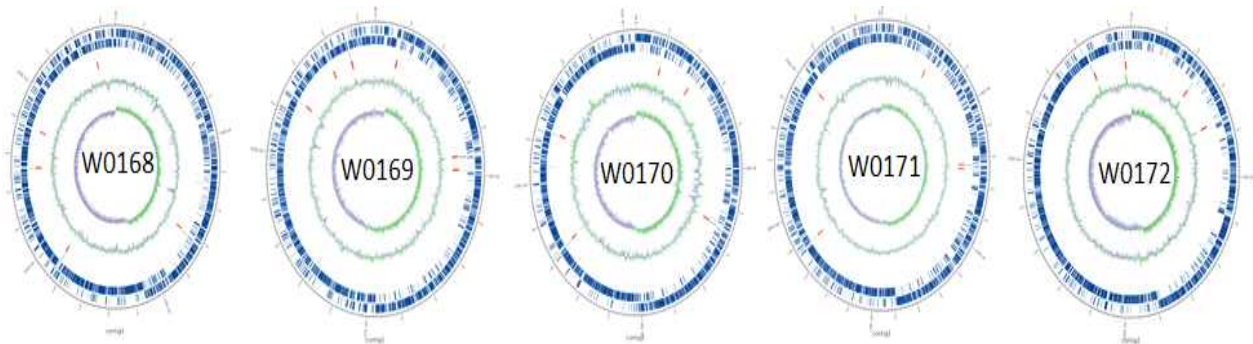


그림 64. 숙취 개선 유산균 5종의 전장유전체 분석

- 식약처에서 권고한 “plasmidFinder-2.0 Server” 를 이용한 전장유전체 항생제 내성 유전자 annotation 결과 특정 항생제와 연관성 있는 결과는 도출되지 않았음

(2) 용혈반응 검사

- 용혈능 검사를 통한 안전성 분석을 실시하였음



그림 65. 숙취 개선 유산균 5종의 용혈능 검사

- Sheep blood를 포함하는 배지에 유산균 5종을 도말하여 균주에 의한 용혈 현상을 관찰함
양성대조균으로 사용된 Bacillus cereus 균주와 비교해보았을 때, 유산균 5종에 의한 용혈 현상은 관찰되지 않았음

2) 생화학적 안전성 평가

- 숙취 개선효능 유산균 5종에 대해 생화학적 특성 분석을 통한 젤라틴 액화 반응 및 유해 대사 산물인 urea 분해 반응 분석을 통한 안전성을 검증함

Tests	Active ingredients	Reactions/Enzymes	Results	
			Negative	Positive
ONPG	2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	-	yellow
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	-	red
LDC	L-lysine	Lysine DeCarboxylase	yellow	-
ODC	L-ornithine	Ornithine DeCarboxylase	-	red
CIT	Trisodium citrate	Citrate utilization	yellow	-
H2S	Sodium thiosulfate	H2S production	colorless	-
URE	Urea	UREase	yellow	-
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DeAminase	yellow	-
IND	L-tryptophane	INDole production	colorless	-
VP	Sodium pyruvate	Acetoin production	-	red
GEL	Gelatin	GELatinase	no diffusion	-
GLU	D-glucose	fermentation/oxidation (GLUcose)	-	yellow
MAN	D-mannitol	fermentation/oxidation (MANnitol)	-	yellow
INO	Inositol	fermentation/oxidation (INOsitol)	blue	-
SOR	D-sorbitol	fermentation/oxidation (SORbitol)	blue	-
RHA	L-rhamnose	fermentation/oxidation (RHAgnose)	blue	-
SAC	D-sucrose	fermentation/oxidation (SACcharose)	-	yellow
MEL	D-melibiose	fermentation/oxidation (MELibiose)	-	yellow
AMY	Amygdalin	fermentation/oxidation (AMYgdalin)	-	yellow
ARA	L-arabnose	fermentation/oxidation (ARABinose)	-	yellow



그림 66. WiKim0168의 API 20 생화학 특성

Tests	Active ingredients	Reactions/Enzymes	Results	
			Negative	Positive
ONPG	2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	colorless	-
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	yellow	-
LDC	L-lysine	Lysine DeCarboxylase	yellow	-
ODC	L-ornithine	Ornithine DeCarboxylase	yellow	-
CIT	Trisodium citrate	Citrate utilization	yellow	-
H2S	Sodium thiosulfate	H2S production	colorless	-
URE	Urea	UREase	yellow	-
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DeAminase	yellow	-
IND	L-tryptophane	INDole production	colorless	-
VP	Sodium pyruvate	Acetoin production	-	pink
GEL	Gelatin	GELatinase	no diffusion	-
GLU	D-glucose	fermentation/oxidation (GLUcose)	-	yellow
MAN	D-mannitol	fermentation/oxidation (MANnitol)	blue	-
INO	Inositol	fermentation/oxidation (INOsitol)	blue	-
SOR	D-sorbitol	fermentation/oxidation (SORbitol)	blue	-
RHA	L-rhamnose	fermentation/oxidation (RHAMnose)	blue	-
SAC	D-sucrose	fermentation/oxidation (SACcharose)	blue	-
MEL	D-melibiose	fermentation/oxidation (MELibiose)	blue	-
AMY	Amygdalin	fermentation/oxidation (AMYgdalin)	blue	-
ARA	L-arabnose	fermentation/oxidation (ARAbinose)	blue-green	-



그림 67. WiKim0169의 API 20 생화학 특성

Tests	Active ingredients	Reactions/Enzymes	Results	
			Negative	Positive
ONPG	2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	colorless	-
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	-	red
LDC	L-lysine	Lysine DeCarboxylase	yellow	-
ODC	L-ornithine	Ornithine DeCarboxylase	yellow	-
CIT	Trisodium citrate	Citrate utilization	yellow	-
H2S	Sodium thiosulfate	H2S production	colorless	-
URE	Urea	UREase	yellow	-
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DeAminase	yellow	-
IND	L-tryptophane	INDole production	colorless	-
VP	Sodium pyruvate	Acetoin production	-	red
GEL	Gelatin	GELatinase	no diffusion	-
GLU	D-glucose	fermentation/oxidation (GLUcose)	-	yellow
MAN	D-mannitol	fermentation/oxidation (MANnitol)	blue	-
INO	Inositol	fermentation/oxidation (INOsitol)	blue	-
SOR	D-sorbitol	fermentation/oxidation (SORbitol)	blue	-
RHA	L-rhamnose	fermentation/oxidation (RHAMnose)	blue	-
SAC	D-sucrose	fermentation/oxidation (SACcharose)	blue	-
MEL	D-melibiose	fermentation/oxidation (MELibiose)	blue	-
AMY	Amygdalin	fermentation/oxidation (AMYgdalin)	-	yellow
ARA	L-arabnose	fermentation/oxidation (ARAbinose)	-	yellow



그림 68. WiKim0170의 API 20 생화학 특성

Tests	Active ingredients	Reactions/Enzymes	Results	
			Negative	Positive
ONPG	2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	colorless	-
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	yellow	-
LDC	L-lysine	Lysine DeCarboxylase	yellow	-
ODC	L-ornithine	Ornithine DeCarboxylase	yellow	-
CIT	Trisodium citrate	Citrate utilization	yellow	-
H2S	Sodium thiosulfate	H2S production	colorless	-
URE	Urea	UREase	yellow	-
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DeAminase	yellow	-
IND	L-tryptophane	INDole production	colorless	-
VP	Sodium pyruvate	Acetoin production	-	red
GEL	Gelatin	GELatinase	no diffusion	-
GLU	D-glucose	fermentation/oxidation (GLUcose)	-	yellow
MAN	D-mannitol	fermentation/oxidation (MANnitrol)	-	yellow
INO	Inositol	fermentation/oxidation (INOsitol)	blue	-
SOR	D-sorbitol	fermentation/oxidation (SORbitol)	blue	-
RHA	L-rhamnose	fermentation/oxidation (RHAmnose)	blue	-
SAC	D-sucrose	fermentation/oxidation (SACcharose)	-	yellow
MEL	D-melibiose	fermentation/oxidation (MELibiose)	blue	-
AMY	Amygdalin	fermentation/oxidation (AMYgdalin)	blue	-
ARA	L-arabnose	fermentation/oxidation (ARAbinose)	blue	-



그림 69. WikiM0171의 API 20 생화학 특성

Tests	Active ingredients	Reactions/Enzymes	Results	
			Negative	Positive
ONPG	2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	-	yellow
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	yellow	-
LDC	L-lysine	Lysine DeCarboxylase	yellow	-
ODC	L-ornithine	Ornithine DeCarboxylase	yellow	-
CIT	Trisodium citrate	Citrate utilization	yellow	-
H2S	Sodium thiosulfate	H2S production	colorless	-
URE	Urea	UREase	yellow	-
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DeAminase	yellow	-
IND	L-tryptophane	INDole production	colorless	-
VP	Sodium pyruvate	Acetoin production	-	red
GEL	Gelatin	GELatinase	no diffusion	-
GLU	D-glucose	fermentation/oxidation (GLUcose)	-	yellow
MAN	D-mannitol	fermentation/oxidation (MANnitrol)	-	yellow
INO	Inositol	fermentation/oxidation (INOsitol)	blue	-
SOR	D-sorbitol	fermentation/oxidation (SORbitol)	blue	-
RHA	L-rhamnose	fermentation/oxidation (RHAmnose)	blue	-
SAC	D-sucrose	fermentation/oxidation (SACcharose)	-	yellow
MEL	D-melibiose	fermentation/oxidation (MELibiose)	-	yellow
AMY	Amygdalin	fermentation/oxidation (AMYgdalin)	-	yellow
ARA	L-arabnose	fermentation/oxidation (ARAbinose)	-	yellow



그림 70. WikiM0172의 API 20 생화학 특성

- 숙취 개선효능 유산균 5종에서 젤라틴 액화 반응 및 유해 대사산물인 urea 분해 반응은 관찰되지 않았음

7. 숙취개선 유산균의 안정성 검증

1) 내산성, 내담즙성, 장 부착능 검증

○ 유산균 5종의 안정성 확인을 위하여 내산성, 내담즙성 그리고 장내 안정성 확인

- 5종의 유산균을 산성과 담즙염에 대한 내성과 장세포부착능 실험을 수행하여 내산성, 내담즙성 및 장내 안정성을 확인하였음
- 내산성 실험은 1N HCl 용액으로 pH 2.5 MRS 액체 배지를 만들고, 30°C 에서 48시간 동안 배양한 균을 접종하고 3시간 이후 MRS agar 배지에 도말하였다. MRS 평판 배지에 도말하여 30°C 에서 24시간 동안 배양한 후 평판 배지 위의 집락 수를 계수하여 생균수를 CFU/ml로 나타내고 내산성이 있는 균주로 판단함
- 내담즙성 실험은 1%의 담즙산염이 함유된 MRS 액체 배지에 유산균을 접종하고 30°C 에서 6시간 동안 배양한 후 MRS 평판 배지에 도말하여 30°C 에서 24시간 동안 배양한 후 평판 배지 위의 집락 수를 계수하여 생균수를 측정하여 내담즙성이 있는 균주로 판단함
- 장세포부착능 실험은 6 well plate에 배양된 HT-29 세포에 유산균을 접종한 후 30°C 에서 2시간동안 공배양함. PBS로 5회 세척하여 부착되지 않은 유산균을 제거한 후 세포를 회수하여 MRS 평판 배지에 도말하여 30°C 에서 24시간 동안 배양한 후 평판 배지 위의 집락 수를 계수하여 세포수를 측정하여 장세포부착능을 관찰하였고, 장내안정성이 있는 균주로 판단함

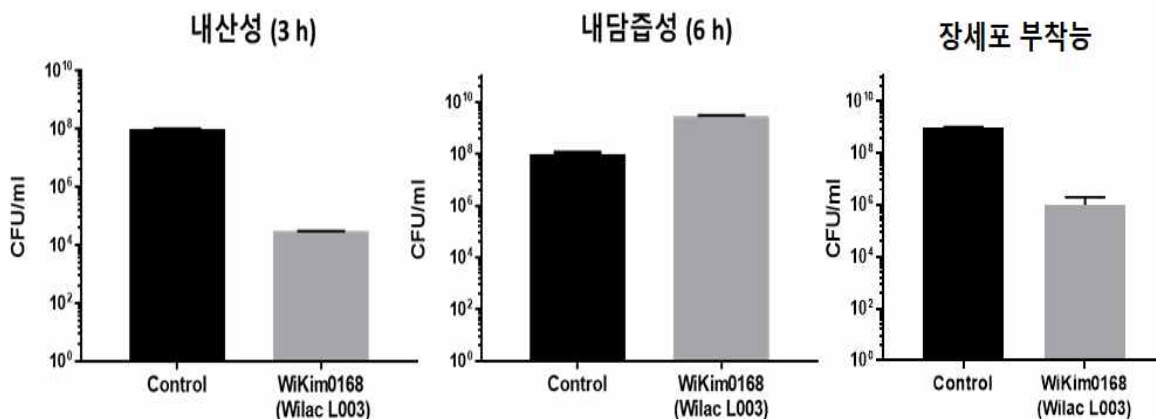


그림 71. WiKim0168의 내산성, 내담즙성 및 장내안정성

- WiKim0168의 내산성 확인 결과, pH 2.5로 보정된 MRS 액체 배지에 1 x 10⁸cfu/ml로 접종한 WiKim0168은 3시간 후 1 x 10⁴cfu/ml로 회수되었으며, 내산성이 확인되었음

- WiKim0168의 내담즙성은 Oxgall(difco) 1%로 MRS 액체 배지에 1×10^8 cfu/ml의 수로 접종한 WiKim0168은 6시간 후 3×10^9 cfu/ml으로 우수한 내담즙성이 확인되었음
- WiKim0168의 장내안정성은 HT29 대장암세포와 공배양된 1×10^9 cfu/ml의 WiKim0168은 2시간 후 1×10^6 cfu/ml으로 회수되었으며, 안정적인 장세포 부착능을 통한 장내안정성이 확인되었음

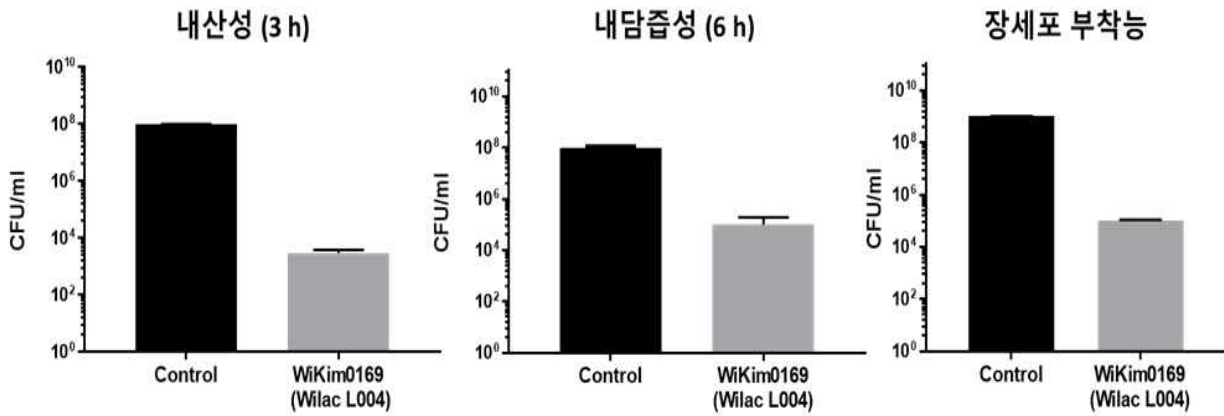


그림 72. WiKim0169의 내산성, 내담즙성 및 장내안정성

- WiKim0169의 내산성 확인 결과, pH 2.5로 보정된 MRS 액체 배지에 1×10^8 cfu/ml로 접종한 WiKim0169는 3시간 후 3×10^3 cfu/ml로 회수되었으며, 내산성이 확인되었음
- WiKim0169의 내담즙성은 Oxgall(difco) 1%로 MRS 액체 배지에 1×10^8 cfu/ml의 수로 접종한 WiKim0169는 6시간 후 1×10^5 cfu/ml로 내담즙성이 확인되었음
- WiKim0169의 장내안정성은 HT29 대장암세포와 공배양된 1×10^9 cfu/ml의 WiKim0169는 2시간 후 1×10^5 cfu/ml로 회수되었으며, 안정적인 장세포 부착능을 통한 장내안정성이 확인되었음

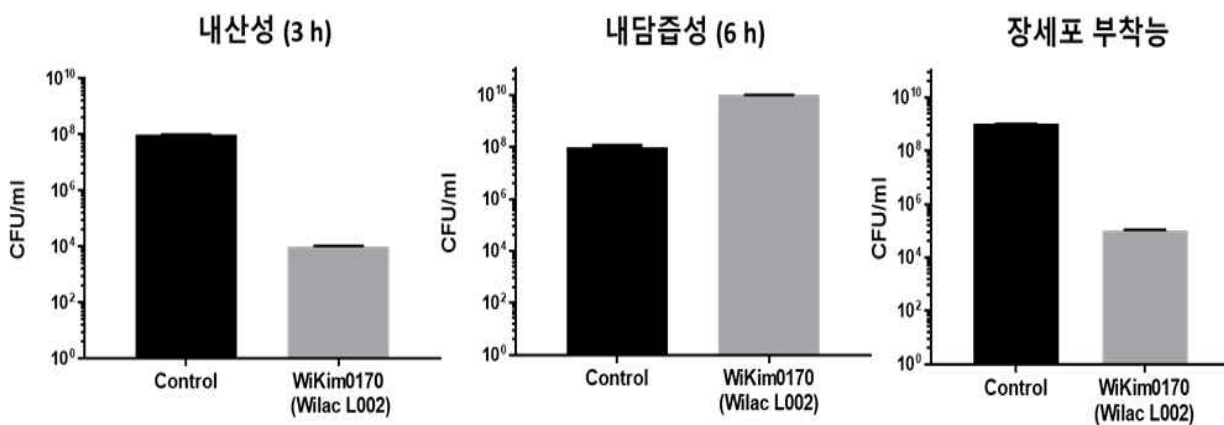


그림 73. WiKim0170의 내산성, 내담즙성 및 장내안정성

- WiKim0170의 내산성 확인 결과, pH 2.5 로 보정된 MRS 액체 배지에 1×10^8 cfu/ml로 접종한 WiKim0170는 3시간 후 1×10^4 cfu/ml로 회수되었으며, 내산성이 확인되었음

- WiKim0170의 내담즙성은 Oxgall(difco) 1%로 MRS 액체 배지에 1×10^8 cfu/ml의 수로 접종한 WiKim0170는 6시간 후 1×10^{10} cfu/ml로 우수한 내담즙성이 확인되었음
- WiKim0170의 장내안정성은 HT29 대장암세포와 공배양된 1×10^9 cfu/ml의 WiKim0170는 2시간 후 1×10^5 cfu/ml로 회수되었으며, 안정적인 장세포 부착능을 통한 장내안정성이 확인되었음

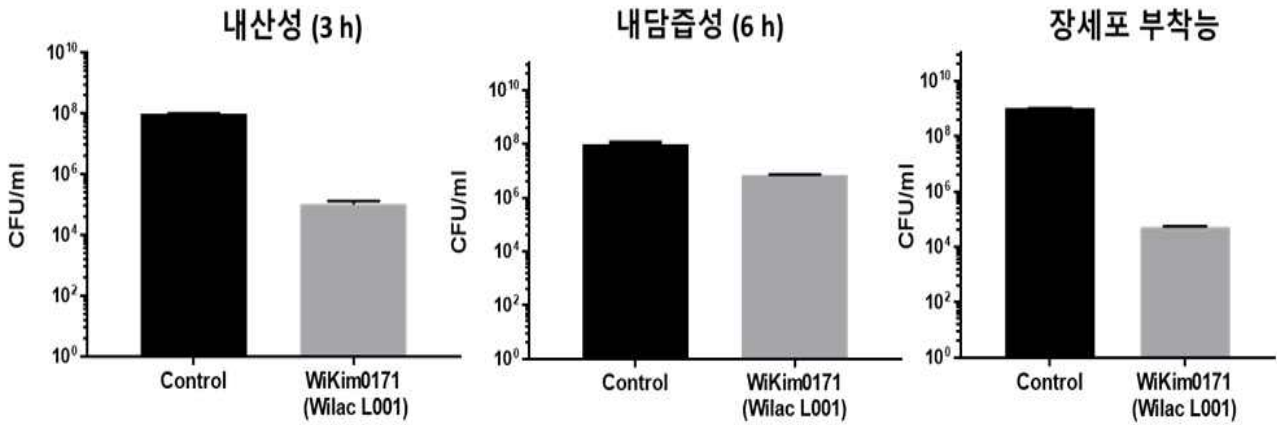


그림 74. WiKim0171의 내산성, 내담즙성 및 장내안정성

- WiKim0171의 내산성 확인 결과, pH 2.5로 보정된 MRS 액체 배지에 1×10^8 cfu/ml로 접종한 WiKim0171는 3시간 후 1×10^5 cfu/ml로 회수되었으며, 내산성이 확인되었음
- WiKim0171의 내담즙성은 Oxgall(difco) 1%로 MRS 액체 배지에 1×10^8 cfu/ml의 수로 접종한 WiKim0171는 6시간 후 7×10^6 cfu/ml로 우수한 내담즙성이 확인되었음
- WiKim0171의 장내안정성은 HT29 대장암세포와 공배양된 1×10^9 cfu/ml의 WiKim0171는 2시간 후 5×10^4 cfu/ml로 회수되었으며, 안정적인 장세포 부착능을 통한 장내안정성이 확인되었음

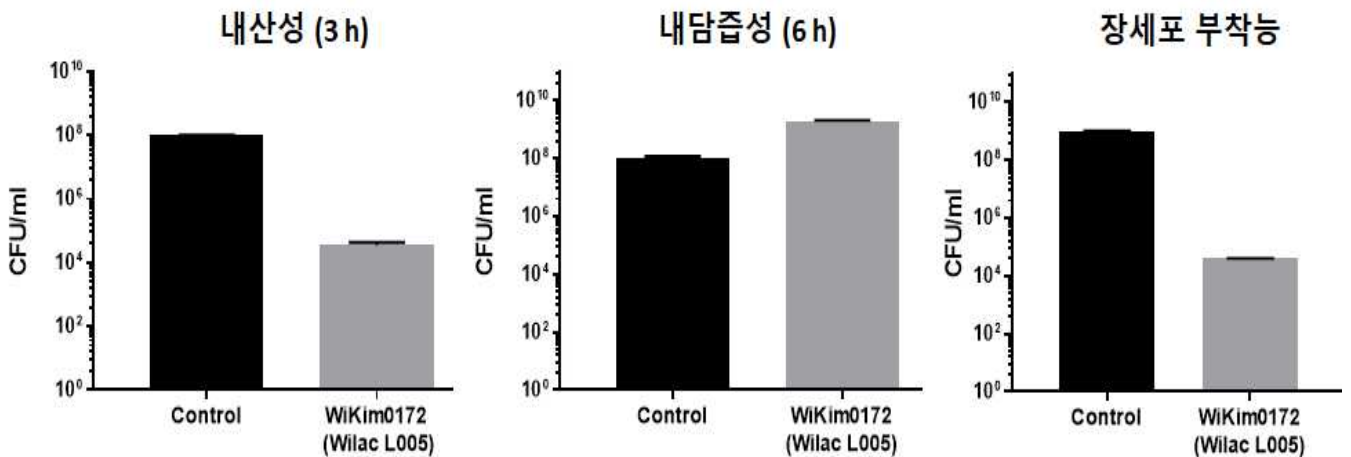


그림 75. WiKim0172의 내산성, 내담즙성 및 장내안정성

- WiKim0172의 내산성 확인 결과, pH 2.5로 보정된 MRS 액체 배지에 1×10^8 cfu/ml로 접종한 WiKim0172는 3시간 후 4×10^4 cfu/ml로 회수되었으며, 내산성이 확인되었음

- WiKim0172의 내담즙성은 Oxgall(difco) 1%로 MRS 액체 배지에 1×10^8 cfu/ml의 수로 접종한 WiKim0172는 6시간 후 2×10^9 cfu/ml로 우수한 내담즙성이 확인되었음
- WiKim0172의 장내안정성은 HT29 대장암세포와 공배양된 1×10^9 cfu/ml의 WiKim0172는 2시간 후 4×10^4 cfu/ml로 회수되었으며, 안정적인 장세포 부착능을 통한 장내안정성이 확인되었음

8. 최종 선정된 복합 유산균의 안전성 평가

- 효능실험 결과를 통해 최종 선정된 *Lactobacillus brevis* WiKim0168(Wilac L003)와 *Leuconostoc mesenteroides* WiKim0172 (Wilac L005)의 복합 유산균의 안전성을 평가하기 위하여 독성시험을 수행함.

1) 단회투여 독성시험

- 시험 기간 중 복합유산균 단회투여에 따른 사망례는 관찰되지 않았으며, 0 ~ 6,600mg/kg 모든 용량 투여군에서 이상 증상, 체중 변화, 부검에 따른 육안 소견 이상 등 관찰되지 않았음. 시험 결과에 따라 복합 유산균의 치사량은 암수 모두 6,600mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.

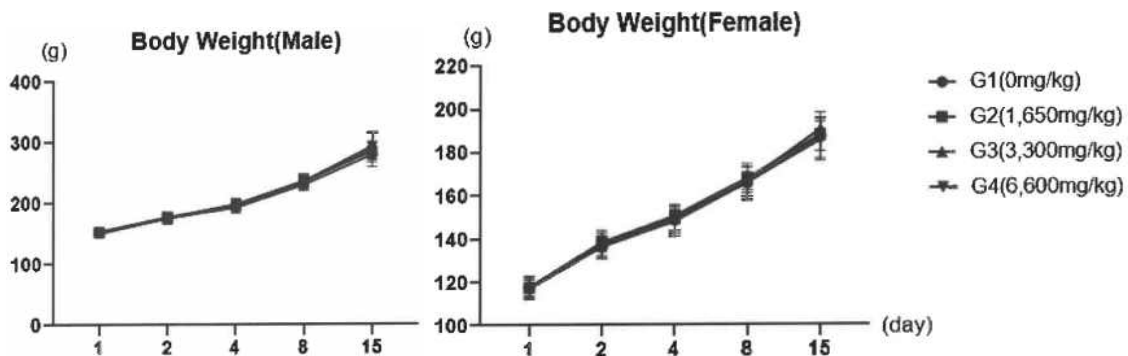


그림 76. 투여 일수 별 체중 변화 결과

Sex : Male

Group Dose (mg/kg)	No. of animal	Days after dosing															Mortality (dead/total)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
G1 (0)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 / 5
G2 (1,650)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 / 5
G3 (3,300)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 / 5
G4 (6,600)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 / 5

Sex : Female

Group Dose (mg/kg)	No. of animal	Days after dosing															Mortality (dead/total)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
G1 (0)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 / 5
G2 (1,650)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 / 5
G3 (3,300)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 / 5
G4 (6,600)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 / 5

표 25. 투여 일수 별 사망례 결과

Sex : Male

Group Dose (mg/kg)	No. of animal	Clinical sign	Days after dosing															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
G1 (0)	5	No observable abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (1,650)	5	No observable abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 (3,300)	5	No observable abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 (6,600)	5	No observable abnormality	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Alopecia	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Group Dose (mg/kg)	No. of animal	Clinical sign	Days after dosing														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
G1 (0)	5	No observable abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (1,650)	5	No observable abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 (3,300)	5	No observable abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 (6,600)	5	No observable abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

표 26. 투여 일수 별 이상 반응 결과

2) 유전 독성 시험

(1) 복귀 돌연변이

- 모든 시험 농도 (1.22 ~ 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$)에서 시험물질에 의한 복귀돌연변이 콜로니 수의 용량 의존적인 증가가 관찰되지 않아 시험물질인 복합 유산균은 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단됨.

Strain	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies (대사활성계 존재)	Strain	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies (대사활성계 부재)
TA98	0	18 ± 2	TA98	0	19 ± 1
	9.77	19 ± 2		156.3	18 ± 2
	19.5	21 ± 3		312.5	17 ± 2
	39.1	18 ± 0		625	19 ± 1
	78.1	20 ± 2		1250	18 ± 2
	156.3	17 ± 1		2550	15 ± 1
	312.5	3 ± 1		5000	6 ± 1
	2-AA(0.5)	252 ± 14		2-NF(1.0)	222 ± 14
TA100	0	91 ± 8	TA100	0	81 ± 10
	39.1	86 ± 1		156.3	82 ± 9
	78.1	86 ± 2		312.5	86 ± 7
	156.3	85 ± 2		625	79 ± 5
	312.5	85 ± 4		1250	83 ± 5
	625	50 ± 9		2500	71 ± 3
	1250	39 ± 5		5000	39 ± 1
	B[a]P(2.0)	766 ± 83		SA(1.0)	540 ± 62
TA1535	0	16 ± 1	TA1535	0	14 ± 2
	156.3	15 ± 3		312.5	14 ± 1
	312.5	13 ± 2		625	16 ± 1
	625	13 ± 2		1250	14 ± 1

	1250	13±1		2500	14±1
	2500	6±2		5000	13±1
	5000	3±2			
	2-AA(2.0)	340±28		9-AA(80.0)	
TA1537	0	7±1	TA1537	0	7±2
	39.1	7±1		156.3	8±1
	78.1	6±1		312.5	6±
	156.3	6±0		625	7±1
	312.5	7±2		1250	7±1
	625	6±2		2500	7±1
	1250	5±1		5000	3±1
	2500	5±1			
	5000	2±1			
	2-AA(2.0)	233±17		9-AA(80.0)	717±46
WP2uvrA (pKM101)	0	178±8	WP2uvrA (pKM101)	0	90±6
	39.1	121±11		156.3	84±5
	78.1	113±6		312.5	81±9
	156.3	115±6		625	85±
	312.5	100±		1250	61±9
	625	48±7		2500	33±8
	1250	32±8		5000	19±6
	2-AA(20.0)	1754±156		AF-2(0.005)	855±70

표 27. 시험군주별 복귀돌연변이 시험 결과

(2) 염색체이상시험

- 대사활성계 존재하 및 부재 하의 단시간 처리 군과 연속 처리 군에서 모든 시험물질의 구조 이상은 음성대조군과 비교하여 용량 의존적인 유의적인 증가가 관찰되지 않았음. 따라서 시험물질인 복합 유산균은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단됨.

처리군	대사활성계 유무	음성대조군	시험물질군(μg/ml)		
			188	375	750
단시간 처리군	유	0.3%	0.7%	0.3%	1.0%
	무	음성대조군	시험물질군(μg/ml)		
			500	1,000	2,000
		0.3%	0.0%	0.0%	0.3%
연속 처리군	무	음성대조군	시험물질군(μg/ml)		
			300	600	1,200
			0.3%	0.7%	0.7%

표 28. 염색체 구조적 이상 빈도 실험 결과

(3) 소핵시험

- 시험물질은 모든 용량 (2.5×10^{11} , 5.0×10^{11} , 10.0×10^{11} CFU/kg)에서 음성대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았음. 따라서 시험물질인 복합 유산균은 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단됨.

Substance	Dose	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/4,000PCE
PBS	0 mg/kg	0.498±0.013	0.2±0.45
Lactobacillus brevis (Wilac L003) + Leuconostoc mesenteroides (Wilac L005) 복합 유산균	2.5 × 10 ¹¹ CFU/kg	0.524±0.015	0.4±0.55
	5.0 × 10 ¹¹ CFU/kg	0.513±0.022	0.6±0.89
	10.0 × 10 ¹¹ CFU/kg	0.498±0.029	0.2±0.45
CPA	70 mg/kg	0.499±0.016	88.6±7.86

표 29. 마우스 골수세포 소핵시험 결과

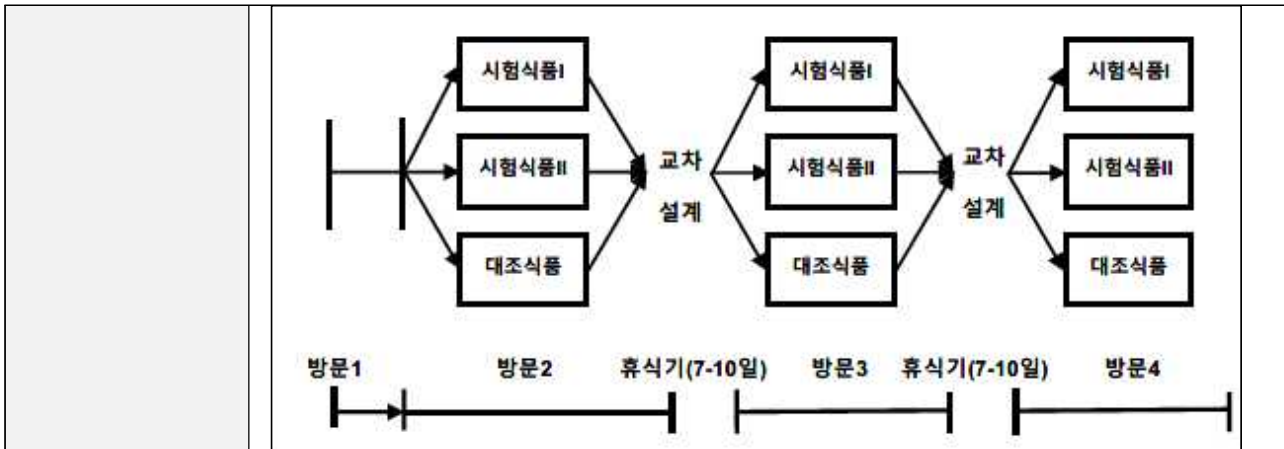
* PBS: Phosphate buffered saline, CPA: Cyclophosphamide, PCE: Polychromatic erythrocyte, MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

9. 인체적용시험

1) 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발

(1) 프로토콜 개발

인체적용시험 제목	숙취개선에 미치는 와이락 엘 복합유산균 및 와이락 숙취 L35의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 교차설계, 위약대조 인체 적용시험
인체적용시험 의뢰자	(주)팜스빌
인체적용시험 책임자	서울특별시 강서구 마곡중앙8로 3길 37 백채민 연구책임자
인체적용시험 실시기관	(주)글로벌의학연구센터 (주)글로벌의학연구센터
인체적용시험 기간	서울특별시 서대문구 충정로 7, 4층 기관생명윤리위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월 (단, 시험대상자 등록속도에 따라 변경될 수 있음)
인체적용시험 대상	음주 후 숙취경험이 있는 자
인체적용시험 목적	본 인체적용시험은 음주 후 숙취경험이 있는 자를 대상으로 와이락 엘 복합유산균과 와이락 숙취 L35를 섭취시켰을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 숙취개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.
인체적용시험 시험 단계 및 디자인	단 계: 기타(기능성표시식품) 디자인: 무작위배정, 이중눈가림, 교차설계, 위약대조
인체적용시험용 식품	시험식품1: 와이락 엘 복합유산균 시험식품2: 와이락 숙취 L35 대조식품: Placebo
인체적용시험용 식품 섭취 방법	시험식품1(와이락 엘 복합유산균): 1회 7캡슐을 물과 함께 섭취 시험식품2(와이락 숙취 L35): 1회 7캡슐을 물과 함께 섭취 대조식품(Placebo): 시험식품과 동일한 방법으로 섭취
인체적용시험용 식품 섭취 기간	단회 섭취



인체적용시험
방법

인체적용시험 동의서에 자의로 서명한 인체적용시험 대상자를 대상으로, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험 대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 ABC군(방문2: 와이락 엘 복합유산균, 방문3: 와이락 숙취 L35, 방문4: Placebo), ACB군(방문2: 와이락 엘 복합유산균, 방문3: Placebo, 방문4: 와이락 숙취 L35), BAC군(방문2: 와이락 숙취 L35, 방문3: 와이락 엘 복합유산균, 방문4: Placebo), BCA군(방문2: 와이락 숙취 L35, 방문3: Placebo, 방문4: 와이락 엘 복합유산균), CAB군(방문2: Placebo, 방문3: 와이락 엘 복합유산균, 방문4: 와이락 숙취 L35), CBA군(방문2: Placebo, 방문3: 와이락 숙취 L35, 방문4: 와이락 엘 복합유산균) 중 한 군으로 무작위배정 한다. 방문2 이후 방문3은 7일 이상, 10일 이하의 wash-out 후 실시하며, 방문3 이후 방문4는 7일 이상, 10일 이하의 wash-out 후 실시한다. 배정된 인체적용시험 대상자는 방문 2, 3, 4에 인체적용시험용 식품(시험식품 1 또는 시험식품 2 또는 Placebo)을 단회 섭취한다.

인체적용시험
대상자 수

	ABC군	ACB군	BAC군	BCA군	CAB군	CBA군	총 시험 대상자 수
최종 평가 례수 (PP Set)	4	4	4	4	4	4	24
Drop-out(2 0%) 고려 려수	5	5	5	5	5	5	30

선정기준

- 1) 만 19세 이상, 만 40세 이하인 자
- 2) 방문1에 측정된 체질량지수(BMI)가 18.5 kg/m² 이상, 25 kg/m² 미만인 자
- 3) 주량이 소주 1~3병 사이이며, 음주 후 숙취경험이 있는 자
- 4) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험 참여에 동의하고, 서면 동의서(Informed Consent Form)에 서명한 자

제외기준

- 1) 알코올 대사장애, 통풍, 위장관 질환, 간 질환(B형, C형 간염 보균자, 알코올성 간질환이 있는 경우 등), 심혈관계(고혈압 등), 면역계, 호흡기계, 내분비계(당뇨 등), 간 및 담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경계, 근골격계, 정신성, 감염성 질환 및 악성종양 등으로 현재 치료 중인 자
- 2) 알코올 분해 유전자검사 결과, ALDH2 유전자가 Homo Type인 자
- 3) 방문1 기준 소화성 궤양 및 역류성 식도염 환자
- 4) 인체적용시험용 식품 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계질환(예: 크론병)이나 위장관계 수술(단, 단순 충수돌기 절제술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자

	<p>5) 방문1 기준 알코올 사용 장애 또는 알코올 중독자</p> <p>6) 방문1 기준 1주 이내에 음주를 한 자</p> <p>7) 알코올 대사에 영향을 미칠 것으로 판단되는 약물(Antabuse계 약물 등) 또는 식이보충제, 위장관 출혈의 위험이 있는 약물[와파린(Warfarin), 클로피도그렐(Clopidogrel), 아스피린(Aspirin), NSAIDs, 기타 해열진통제 및 소염진통제 등]을 지속적으로 복용하고 있는 자</p> <p>8) 방문1 기준 2주 이내에 간기능 개선과 관련된 의약품 및 건강기능식품을 복용한 자</p> <p>9) 방문1 기준 1개월(30일) 이내에 약물 대사 효소 유도 및 억제 약물(Barbiturates, Griseofulvin, Rifampin, Erythromycin, Isoniazid, Cimetidine, Omeprazole 등)을 복용한 자</p> <p>10) 방문1 기준 1개월 이내에 항생제, 성장제를 투여한 자</p> <p>11) 방문1 기준 1개월 이내에 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 지속적으로(주 4회 이상) 유산균 제품을 섭취한 자</p> <p>12) Creatinine이 실시기관 정상 상한치의 2배 이상인 자</p> <p>13) AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 실시기관 정상 상한치의 3배 이상인 자</p> <p>14) 갑상선 질환자</p> <p>15) 임신 중이거나 수유부 또는 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 자</p> <p>16) 방문1 기준 1개월 이내에 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자</p> <p>17) 본 인체적용시험용 식품 성분에 민감하거나 알레르기가 있는 자</p> <p>18) 기타 사유로 시험자가 부적합하다고 판단하는 자</p>
<p>유효성 평가 변수</p>	<p>1) 혈중 알코올, 아세트알데하이드 농도(시간별 농도, C_{max}, T_{max}, AUC)</p> <p>2) AHS</p> <p>3) 숙취 증상 설문</p> <p>4) 혈중 알코올 농도 0.03 % 이하 도달까지의 소요시간</p>
<p>안전성 평가 변수</p>	<p>1) 이상반응</p> <p>2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적 검사, 뇨검사)</p> <p>3) 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(체중)</p>
<p>통계분석</p>	<p>1. 유효성 평가 변수</p> <ul style="list-style-type: none"> • 시험식품1 또는 시험식품2 또는 대조식품의 섭취 시점을 기저 시점으로 정의한다. 유효성 평가 변수인 혈중 알코올, 아세트알데하이드 농도(시간별 농도, C_{max}, T_{max}, AUC), 혈중 알코올 농도 0.03 % 이하 도달까지의 소요시간의 시험식품1과 대조식품 또는 시험식품2와 대조식품 간의 변화 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 여기에 추가로 잔류효과가 없다는 가정 하에 두 식품(시험식품 1과 대조식품, 시험식품 2와 대조식품) 간의 섭취 효과에 대한 차이점을 알아보는 분석을 ANOVA를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. • AHS, 숙취 증상 설문의 각 시점에서의 시험식품 1과 대조식품 또는 시험식품 2와 대조식품 간의 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

	<p>2. 안전성 평가 변수</p> <p>1) 이상반응</p> <ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 구간 이상반응이 발생한 인체적용시험 대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다. <p>2) 임상병리검사(혈액학적/혈액 화학적 검사, 뇨 검사)</p> <ul style="list-style-type: none"> 시험식품 1과 대조식품 또는 시험식품 2와 대조식품 간 혈액학적 및 혈액 화학적 검사치에 대하여 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 정상과 비정상에 대한 빈도와 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 혹은 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)(셀 기대도수가 5 미만인 셀이 20% 넘을 경우)를 이용하여 유의확률을 값을 제시한다. <p>3) 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(체중)</p> <ul style="list-style-type: none"> 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(체중) 검사치에 대하여 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 시험식품1과 대조식품 또는 시험식품2와 대조식품 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.
--	---

○ 프로토콜

<p>인체적용시험계획서</p> <p>숙위개선에 미치는 외아락 열 복합유산균 및 외아락 속취 L35의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 교차설계, 위약대조 인체적용시험</p> <p>Protocol No. : HO_WWIL003H-005 Version No. : 2.2 Version Date : 2024년 01월 09일</p> <p>비밀스레 소유</p> <p>Confidential</p>	<p>시험스레 Clinical Study Protocol Protocol No. HO_WWIL003H-005 Version No. 2.2 2024.01.09</p> <p>182</p> <p>시험스레 Clinical Study Protocol Protocol No. HO_WWIL003H-005 Version No. 2.2 2024.01.09</p> <p>182</p> <p>시험스레 Clinical Study Protocol Protocol No. HO_WWIL003H-005 Version No. 2.2 2024.01.09</p> <p>182</p>	<p>시험스레 Clinical Study Protocol Protocol No. HO_WWIL003H-005 Version No. 2.2 2024.01.09</p> <p>182</p> <p>시험스레 Clinical Study Protocol Protocol No. HO_WWIL003H-005 Version No. 2.2 2024.01.09</p> <p>182</p> <p>시험스레 Clinical Study Protocol Protocol No. HO_WWIL003H-005 Version No. 2.2 2024.01.09</p> <p>182</p>	<p>시험스레 Clinical Study Protocol Protocol No. HO_WWIL003H-005 Version No. 2.2 2024.01.09</p> <p>182</p> <p>시험스레 Clinical Study Protocol Protocol No. HO_WWIL003H-005 Version No. 2.2 2024.01.09</p> <p>182</p> <p>시험스레 Clinical Study Protocol Protocol No. HO_WWIL003H-005 Version No. 2.2 2024.01.09</p> <p>182</p>
--	--	--	--

○ 인체적용시험 실시기관 선정

- 시험(연구)자가 인체적용시험에 관한 규정을 준수하고, 과학적·윤리적인 기준을 가지고 인체적용시험 계획서에 따라 연구를 수행할 수 있는지를 평가하며, 시험기관의 인체적용시험 진행에 필요한 세부 항목들을 확인 및 점검
- 선정기관/시험책임자: (주)글로벨의학연구센터(백채민 연구책임자)

○ 인체적용시험 문서 개발

<p>증례기록서 (Case Report Form)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 각각의 대상자별로 인체적용시험 계획서에서 요구한 정보를 기록하여 인체적용시험 의뢰자에게 전달할 목적으로 개발된 문서
-------------------------------------	--

	<ul style="list-style-type: none"> 본 인체적용시험에는 데이터의 실시간 입력 및 수정, Audit Trail 관리, 사용자 정의 DV(S(Data Validation Specification) 기능 등을 갖춘 EDC(Electronic Data Capture) System 및 e-CRF(electronic-Case Report Form;전자증례기록서)를 도입, 구축하였음.
<p>인체적용시험 대상자 동의서(Informed Consent Form)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 대상자가 인체적용시험 참여 유·무를 결정하기 전에 대상자 설명서를 통하여 인체적용시험과 관련된 모든 정보를 제공받고, 대상자 본인이 자발적으로 인체적용시험에 참여함을 확인하는 서명 및 서명일자가 포함된 문서
<p>인체적용시험 대상자 모집 공고문</p>	<ul style="list-style-type: none"> 대상자가 합리적인 참여 결정을 위해 필요한 정보(인체적용시험의 명칭, 목적, 방법, 대상자 자격 및 선정기준, 의뢰자와 책임자의 성명·주소·연락처 및 예측 가능한 부작용에 관한 사항 등)를 이해하기 쉽고 정확하게 전달하도록 작성된 문서
<p>인체적용시험 피해 보상 규약</p>	<ul style="list-style-type: none"> 대상자가 인체적용시험 참여로 인한 손상(인체적용시험 계획서에 따라 섭취한 인체적용시험용 식품 또는 인체적용시험 계획서에 따라 행해진 의학적 치료 과정 또는 개입으로 인한 손상)이 발생하였을 경우, 그 보상에 대한 사항을 규정하는 문서

The screenshot displays the 'Electronic Case Report Form' interface. At the top, it shows the data hash: 'Data hash : 2356c3f986d6baa34498781605710522-12-29 11:15:56 (UTC+9)'. Below this, there are sections for 'PROTOCOL' (HO_Wilac1003+005) and 'STUDY TITLE' (숙취해산에 미치는 HO_Wilac1003+005의 효용성 및 안전성 평가하기 위한 부작용시험, 이중눈가림, 교차블라인드, 위약대조 인체적용시험). The main part of the form is a table with columns for 'Protocol', 'Site', 'Baseline (21Day)', '35Day (+1)', '47Day (+7)', '63Day (+14)', and '추가방문 (+)' and rows for various adverse events like '시력 변화', '시력 감소', '시력 증가', '시력 불명', '시력 측정 불가', '시력 측정 중단', '시력 측정 지연', '시력 측정 오류', '시력 측정 누락', '시력 측정 과다', '시력 측정 부족', '시력 측정 불일치', '시력 측정 불확실', '시력 측정 불충분', '시력 측정 불완전', '시력 측정 불적절', '시력 측정 불합당', '시력 측정 불공정', '시력 측정 불투명', '시력 측정 불확정', '시력 측정 불신뢰', '시력 측정 불확실', '시력 측정 불충분', '시력 측정 불완전', '시력 측정 불적절', '시력 측정 불합당', '시력 측정 불공정', '시력 측정 불투명', '시력 측정 불확정', '시력 측정 불신뢰'.

The screenshot shows the 'Informed Consent Form' document. It includes sections such as '연구목적' (Study Purpose), '연구대상자 대상' (Study Population), '연구대상자 제외' (Exclusion Criteria), and '연구대상자 선정' (Participant Selection). The document is written in Korean and provides detailed information about the study's objectives, who is eligible to participate, who is not eligible, and how participants are selected.

The screenshot displays the '증례기록서' (Adverse Event Record) form. It includes sections for '연구목적' (Study Purpose), '연구대상자 대상' (Study Population), '연구대상자 제외' (Exclusion Criteria), and '연구대상자 선정' (Participant Selection). The form is used to document and track adverse events during the study.

The screenshot shows the '대상자 동의의 설명서' (Subject Description) form. It includes sections for '연구목적' (Study Purpose), '연구대상자 대상' (Study Population), '연구대상자 제외' (Exclusion Criteria), and '연구대상자 선정' (Participant Selection). The form provides a detailed description of the study and the subjects involved.

The screenshot displays the '대상자 모집 공고안' (Subject Recruitment Notice) form. It includes sections for '연구목적' (Study Purpose), '연구대상자 대상' (Study Population), '연구대상자 제외' (Exclusion Criteria), and '연구대상자 선정' (Participant Selection). The form is used to recruit subjects for the study.


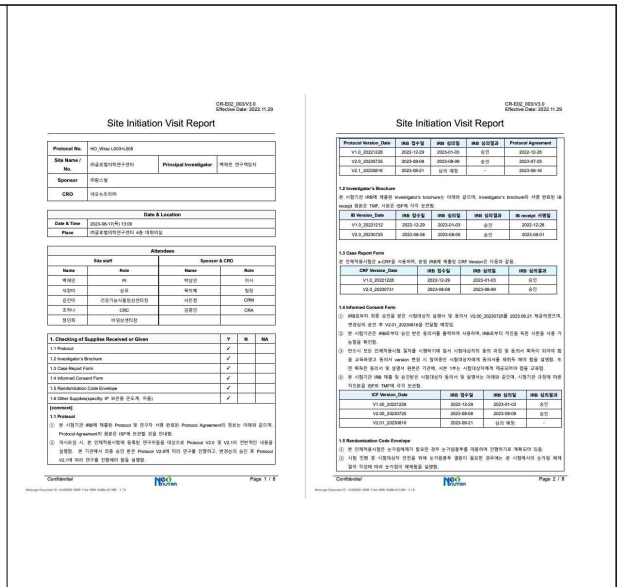
The screenshot shows the '피해 보상 규약' (Compensation Agreement) form. It includes sections for '연구목적' (Study Purpose), '연구대상자 대상' (Study Population), '연구대상자 제외' (Exclusion Criteria), and '연구대상자 선정' (Participant Selection). The form outlines the compensation agreement for participants.

(1) 인체적용시험 개시

- 인체적용시험 착수를 위한 개시모임 실시
- 일자: 2023.08.17(목) / 장소: (주)글로벌의학연구센터 4층 대회의실
- 참석자: 백채민 (주)글로벌의학연구센터 연구책임자 등 5명, (주)팜스빌 박상민 이사 등 2명, 네오뉴트라(주) 서은정 차장 등 2명)
- 개시모임 주요 수행 업무

- ① 인체적용시험 계획서의 전반적 검토(선정/제외기준, 시험진행 절차, 시험식품 섭취, 무작위 배정 및 맹검법, 1차 유효성 평가변수 및 기타 자세한 사항들) 및 설명, 논의, 준수사항(GCP 설명)
- ② 시험 관련 문서 및 물품 등 필요한 자료 제공
- ③ 영상진단의학실 검사(임상병리실) 및 특수 컴퓨터 프로그램과 같은 전문적인 절차에 대한 지침 검토
- ④ Protocol, ICF, CRF, 복용일지 등에 대한 모든 질문사항 및 의문점들에 대한 논의
- ⑤ IRB승인 및 변경 사항 문서화
- ⑥ 시험 담당자의 역할과 책임
- ⑦ 향후 모니터링 SDV업무계획 소개 및 근거문서(Source Document)정의(모니터링 방문 간격, 모니터링 방문 시 CRC준비사항 등)
- ⑧ 이상반응 및 중대한 이상반응 등에 대한 보고 및 보고 절차
- ⑨ 의뢰자에게 관련 연구에 관한 최신 정보를 제공
- ⑩ 시험기관 내에서의 절차 및 이슈사항
- ⑪ 연구문서의 종류, 보관 및 사용방법 등에 대한 소개(동의서, 시험대상자 로그, 워크시트, 증례기록서, 수불대장, 처방전, 온도기록지 등의 작성법)
- ⑫ 시험에 사용되는 식품의 수불 일지 확인
- ⑬ 모든 연구 관련 교육 후의 교육기록 문서화
- ⑭ 시험 실시 전 확보되어야 할 기본 문서들 확인, Investigator Site File(ISF) 검토(기록의 보관) 및 ISF보관 기본문서 설명
- ⑮ 연구자파일 및 약국파일 업데이트(추후 발송되는 뉴스레터 와 IRB 관련 변경 및 승인사항, Material 인수증 등)

○ 개시모임 발표자료 및 보고서

 <p>AGENDA</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 참석자 소개 2. 진행 현황 3. Timeline for Clinical Trial 4. 인체적용시험계획서 (V2.1) 5. 시험일차 <ul style="list-style-type: none"> 1) 논거, 용도, 목적, 대상자 관리, 연구윤리위원회 2) 인체적용시험용 식용, 이상반응보고 등 3) 모니터링 6. 인체적용시험자의 책임 (KCCPC) <p>진행현황</p> <p>1. IIRB 초기심사</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>심사종류</th> <th>심사일</th> <th>결과</th> <th>PRF</th> <th>CRF</th> <th>ICF</th> <th>IB</th> <th>승인 완료기간</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>초기심사</td> <td>2023.12.28</td> <td>승인</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> <td>-2024.01.02</td> </tr> </tbody> </table> <p>2. IIRB 변경심사</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>일차</th> <th>심사일</th> <th>승인일</th> <th>내용</th> <th>PRF</th> <th>CRF</th> <th>ICF</th> <th>IB</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1차</td> <td>2023.08.08</td> <td>2023.08.09</td> <td>시험 디자인 변경 (연구 종료 후 추가)</td> <td>2.0</td> <td>2.0</td> <td>2.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>2차</td> <td>2023.08.18</td> <td>휴등</td> <td>관계 부가조건 및 최종심사 자료 보충</td> <td>2.1</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>3. 기타 사항: 2022.12.28 (1차 연구비 입금 완료) 4. 비상책임부담: 2023.07.01~2024.06.30 5. 시험용 식용: 2023.08.21 일고 미동 01-R001-V2 - 01-R030-V2, 01-R001-V3 - 01-R030-V3, 01-R001-V4 - 01-R030-V4</p>	심사종류	심사일	결과	PRF	CRF	ICF	IB	승인 완료기간	초기심사	2023.12.28	승인	1.0	1.0	1.0	1.0	-2024.01.02	일차	심사일	승인일	내용	PRF	CRF	ICF	IB	1차	2023.08.08	2023.08.09	시험 디자인 변경 (연구 종료 후 추가)	2.0	2.0	2.0	2.0	2차	2023.08.18	휴등	관계 부가조건 및 최종심사 자료 보충	2.1	-	-	-	 <p>Site Initiation Visit Report</p> <p>CRDC 2023.12.28 Protocol No. 2023-11-20</p> <p>Investigator's Name: Dr. Min Young Lee Site Name: 서울대학교병원 연구실 Principal Investigator: 박민영 연구원 Sponsor: NCS CRO: NCS</p> <p>Date & Time: 2023.12.28 13:00 Place: 서울대학교병원 연구실 4층 연구실</p> <p>Attendees: Site Visit, Sponsor S (CRO)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Role</th> <th>Name</th> <th>Role</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>박민영</td> <td>PI</td> <td>박민영</td> <td>PI</td> </tr> <tr> <td>김민서</td> <td>연구실</td> <td>김민서</td> <td>연구실</td> </tr> <tr> <td>김민서</td> <td>연구실/생물안전관리팀</td> <td>김민서</td> <td>CRO</td> </tr> <tr> <td>조희원</td> <td>CRO</td> <td>정영준</td> <td>CRO</td> </tr> <tr> <td>조희원</td> <td>생물안전관리팀</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>1. Checklist of Supplies Received or Given</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Item</th> <th>Y</th> <th>N</th> <th>NA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.1 Protocol</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.2 Investigator's Signature</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.3 Clinical Report Form</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.4 Informed Consent Form</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.5 Medication Code Document</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.6 Other Attachments (if any) as per protocol</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>1.7 Checklist</p> <p>1.8 Other Attachments (if any) as per protocol</p> <p>1.9 Checklist</p> <p>1.10 Checklist</p> <p>1.11 Checklist</p> <p>1.12 Checklist</p> <p>1.13 Checklist</p> <p>1.14 Checklist</p> <p>1.15 Checklist</p> <p>1.16 Checklist</p> <p>1.17 Checklist</p> <p>1.18 Checklist</p> <p>1.19 Checklist</p> <p>1.20 Checklist</p> <p>1.21 Checklist</p> <p>1.22 Checklist</p> <p>1.23 Checklist</p> <p>1.24 Checklist</p> <p>1.25 Checklist</p> <p>1.26 Checklist</p> <p>1.27 Checklist</p> <p>1.28 Checklist</p> <p>1.29 Checklist</p> <p>1.30 Checklist</p> <p>1.31 Checklist</p> <p>1.32 Checklist</p> <p>1.33 Checklist</p> <p>1.34 Checklist</p> <p>1.35 Checklist</p> <p>1.36 Checklist</p> <p>1.37 Checklist</p> <p>1.38 Checklist</p> <p>1.39 Checklist</p> <p>1.40 Checklist</p> <p>1.41 Checklist</p> <p>1.42 Checklist</p> <p>1.43 Checklist</p> <p>1.44 Checklist</p> <p>1.45 Checklist</p> <p>1.46 Checklist</p> <p>1.47 Checklist</p> <p>1.48 Checklist</p> <p>1.49 Checklist</p> <p>1.50 Checklist</p> <p>1.51 Checklist</p> <p>1.52 Checklist</p> <p>1.53 Checklist</p> <p>1.54 Checklist</p> <p>1.55 Checklist</p> <p>1.56 Checklist</p> <p>1.57 Checklist</p> <p>1.58 Checklist</p> <p>1.59 Checklist</p> <p>1.60 Checklist</p> <p>1.61 Checklist</p> <p>1.62 Checklist</p> <p>1.63 Checklist</p> <p>1.64 Checklist</p> <p>1.65 Checklist</p> <p>1.66 Checklist</p> <p>1.67 Checklist</p> <p>1.68 Checklist</p> <p>1.69 Checklist</p> <p>1.70 Checklist</p> <p>1.71 Checklist</p> <p>1.72 Checklist</p> <p>1.73 Checklist</p> <p>1.74 Checklist</p> <p>1.75 Checklist</p> <p>1.76 Checklist</p> <p>1.77 Checklist</p> <p>1.78 Checklist</p> <p>1.79 Checklist</p> <p>1.80 Checklist</p> <p>1.81 Checklist</p> <p>1.82 Checklist</p> <p>1.83 Checklist</p> <p>1.84 Checklist</p> <p>1.85 Checklist</p> <p>1.86 Checklist</p> <p>1.87 Checklist</p> <p>1.88 Checklist</p> <p>1.89 Checklist</p> <p>1.90 Checklist</p> <p>1.91 Checklist</p> <p>1.92 Checklist</p> <p>1.93 Checklist</p> <p>1.94 Checklist</p> <p>1.95 Checklist</p> <p>1.96 Checklist</p> <p>1.97 Checklist</p> <p>1.98 Checklist</p> <p>1.99 Checklist</p> <p>1.100 Checklist</p>	Name	Role	Name	Role	박민영	PI	박민영	PI	김민서	연구실	김민서	연구실	김민서	연구실/생물안전관리팀	김민서	CRO	조희원	CRO	정영준	CRO	조희원	생물안전관리팀			Item	Y	N	NA	1.1 Protocol	✓			1.2 Investigator's Signature	✓			1.3 Clinical Report Form	✓			1.4 Informed Consent Form	✓			1.5 Medication Code Document	✓			1.6 Other Attachments (if any) as per protocol	✓		
심사종류	심사일	결과	PRF	CRF	ICF	IB	승인 완료기간																																																																																						
초기심사	2023.12.28	승인	1.0	1.0	1.0	1.0	-2024.01.02																																																																																						
일차	심사일	승인일	내용	PRF	CRF	ICF	IB																																																																																						
1차	2023.08.08	2023.08.09	시험 디자인 변경 (연구 종료 후 추가)	2.0	2.0	2.0	2.0																																																																																						
2차	2023.08.18	휴등	관계 부가조건 및 최종심사 자료 보충	2.1	-	-	-																																																																																						
Name	Role	Name	Role																																																																																										
박민영	PI	박민영	PI																																																																																										
김민서	연구실	김민서	연구실																																																																																										
김민서	연구실/생물안전관리팀	김민서	CRO																																																																																										
조희원	CRO	정영준	CRO																																																																																										
조희원	생물안전관리팀																																																																																												
Item	Y	N	NA																																																																																										
1.1 Protocol	✓																																																																																												
1.2 Investigator's Signature	✓																																																																																												
1.3 Clinical Report Form	✓																																																																																												
1.4 Informed Consent Form	✓																																																																																												
1.5 Medication Code Document	✓																																																																																												
1.6 Other Attachments (if any) as per protocol	✓																																																																																												
<p>개시모임 발표자료</p>	<p>개시모임 보고서</p>																																																																																												

(2) 대상자 등록 및 검사 진행(실시기관)

- 프로토콜 일정에 따라 실시기관 대상자 등록 및 검사 진행
- 인체적용시험 진행 일정표

Period	Screening ¹⁾		Active Treatment ²⁾			
	1	2	3	4	5	6
Visit	1	2	3	4		
day	-14	0	+7	+8	+14	+15
Window period(day) ³⁾			+3		+3	
서면 동의서	P					
인구학적 조사 ⁴⁾	P					
생활습관 조사 ⁵⁾	P					
병력 및 약물투여력, 비약물치료력 조사 ⁶⁾	P	P				
신체검진	P	P	P	P	P	P
활력징후(혈압, 맥박) 측정 ⁷⁾	P	P	P	P	P	P
신체계측 ⁸⁾	신장	P				
	BMI	P	P		P	P
	체중	P	P	P	P	P
임상병리검사 ⁹⁾	P	P		P		P
임신반응검사 ⁹⁾	P					
알코올 분해 유전자검사 ¹⁰⁾	P					
음주 습관 설문	P	P		P		P
호기 알코올 검사 ¹¹⁾		P		P		P
유 효성	혈중 알코올, 아세트알데하이드	P	P	P	P	P

평가	¹²⁾							
	AHS ¹³⁾			P		P		P
	숙취 증상 설문 ¹³⁾			P		P		P
피부 수분량 및 홍반지수 ¹⁴⁾		P	P	P	P	P	P	P
인체적용시험 대상자 적합성 평가	P	P						
무작위배정		P						
인체적용시험용 식품/알코올 섭취 ¹⁵⁾		P		P		P		
이상반응 확인		P	P	P	P	P	P	P
시험대상자 교육 ¹⁶⁾	P		P			P		
병용약물 및 병용요법 확인		P	P	P	P	P	P	P

1) 방문1 이후 14일 이내 방문2가 시행되어야 한다. 방문1의 일부 검사가 누락된 경우에는 방문2 무작위배정 전까지 실시할 수 있다.

2) 방문2, 3, 4는 실시기관에서 1박2일 동안 진행하며, 모든 인체적용시험 대상자에게 시험 시작 2시간 전에 동일한 식단을 제공받는다.

3) 방문3, 4의 방문일은 지정된 날짜 기준 +3일을 허용한다. 방문2에 인체적용시험용 식품을 섭취하고 7일 이상, 10일 이하의 Wash-Out 기간을 거친 후 방문3을 실시하며, 방문3에 인체적용시험용 식품을 섭취하고 7일 이상, 10일 이하의 Wash-Out 기간을 거친 후 방문4를 실시한다.

4) 방문1에 성별, 생년월일, 연령을 조사한다.

5) 방문1에 운동여부, 흡연여부, 수면 시간, 수분 섭취량, 이온 음료나 탄산 음료의 섭취량, 평소 아침식사 패턴을 조사한다.

6) 방문1 기준 3개월 이내의 외과적 수술력을 포함한 병력과 1개월(30일) 이내의 약물투여력 및 비약물치료력을 조사한다(단, 인체적용시험용 식품 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(크론병 등)이나 위장관계 수술(단순 충수돌기 절제술, 탈장 수술 제외)의 경우 전체 이력을 조사).

7) 방문2, 3, 4에 혈압, 맥박을 인체적용시험용 식품 섭취 전(-2시간) 및 음주 15시간 후에 측정한다.

8) 신장은 0.1 cm, 체중은 0.1 kg, BMI는 0.1 kg/m² 단위까지 반올림하여 측정한다.

9) 인체적용시험 대상자는 채혈하기 전 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사하며 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대하여 재검사를 실시할 수 있다. 방문2(Day +1) 및 방문3(Day +8) 및 방문4(Day +15)에 임상병리검사를 음주 15시간 후 실시하며, 검체는 외부분석기관에서 분석 후 2차 목적으로 이용되지 않고 즉시 폐기한다.

- 혈액학적검사: WBC, RBC, Hb, Hct, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil
- 혈액화학적검사: AST(GOT), ALT(GPT), Total Cholesterol, Glucose, Total Protein, BUN, Creatinine, Uric Acid, Ca
- 뇨검사: S.G, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, RBC(Erythrocyte), Urobilinogen, Nitrite, WBC(Leukocyte)
- 임신반응검사: Urine HCG(※ 가임기 여성만 해당)

10) 알코올 분해 유전자검사는 혈액 8 mL를 채취하여 상온보관 후, 외부분석기관에서 분석

하며, 분석 완료 후 검체는 2차 목적으로 이용되지 않고 즉시 폐기한다.

- 알코올 분해 유전자검사: ADH1B, ALDH2

- 11) 호기 알코올 검사는 방문2(Day 0)에 무작위배정 전과 방문3(Day +7) 및 방문4(Day +14)에 실시하여 음주여부를 확인한다.
- 12) 음주 전, 음주 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 15시간 후 혈중 알코올 및 아세트알데하이드 농도를 측정한다. 매시간마다 혈액 5 mL를 채취하여 아세트알데하이드 농도는 즉시 외부분석기관에서 분석하고, 알코올 농도 분석을 위한 검체는 냉동보관 후 외부분석기관에서 분석한다. 분석 완료 후 검체는 2차 목적으로 이용되지 않고 즉시 폐기한다.
- 13) 음주 3, 6, 15시간 후 AHS, 숙취 증상 설문을 실시한다.
- 14) 음주 전, 음주 1, 6, 15시간 후 피부 수분량 및 홍반지수를 측정한다.
- 15) 방문2(Day 0), 3(Day +7), 4(Day +14)에 인체적용시험용 식품 섭취 30분 후 알코올(0.9 g/kg b.w.)을 30분 이내에 섭취한다. 알코올 섭취하는 동안 최소한의 안주(새우깡 20개 수준)는 허용하며, 섭취 후 금식한다. 물은 채혈 2, 4시간 후 각각 동일한 양(100 mL 일괄 섭취)으로 섭취 가능하다.
- 16) 방문1, 2(Day +1), 3(Day +8)에 방문 72시간 이내 금주하고, 24시간 이내 카페인 섭취를 자제하도록 인체적용시험 대상자를 교육한다.

○ 인체적용시험 관찰 항목 및 임상검사 항목

인체적용시험 대상자 동의 및 인구학적 조사	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험에 들어가기 전, 본 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 인체적용시험 대상자에게 상세히 설명하고, 인체적용시험 대상자에게 서면 동의를 받으며, 서면 동의는 인체적용시험 대상자가 자의로 서명받음. 서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호를 부여한 후 인구학적 정보 조사 • 방문1에 인체적용시험 대상자 성별, 생년월일, 연령 조사 실시
생활습관 조사	<ul style="list-style-type: none"> • 방문1에 운동여부, 흡연여부, 수면 시간, 수분 섭취량, 이온 음료나 탄산 음료의 섭취량, 평소 아침식사 패턴을 조사
병력 및 약물투여력, 비약물 치료력, 병용약물 및 병용요법 변화 확인	<ul style="list-style-type: none"> • 방문1, 2(Day 0)에 문진과 과거 진료 기록 점검 및 면담 등을 통하여 조사함. 외과적 수술력을 포함한 병력은 방문1을 기준으로 3개월 이내의 병력을 상세히 조사하며, 과거력 및 현병력에 대하여 방문일 기준 유병 여부, 질환명/수술명, 시작일, 방문 당시 지속여부를 기재 • 약물투여력 및 비약물치료력은 방문1 기준으로 1개월(30일) 이내의 선행약물 및 치료력을 모두 확인 • 방문2(Day 0)의 인체적용시험용 식품 섭취 이후, 방문2(Day +1), 방문3(Day +7, +8), 방문4(Day +14, 15)에서 병용약물 및 병용요법을 확인
신체검진	<ul style="list-style-type: none"> • 매 방문마다 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 인체적용시험 대상자의 임상적 상태를 근거로 신체검진을 실시
활력징후(혈압, 맥박)	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험 대상자를 10분 이상 안정시킨 후 혈압, 맥박을 방문1, 2(Day 0, +1), 3(Day +7, +8), 4(Day +14, +15)에 측정 • 방문2, 3, 4의 혈압, 맥박은 방문 당일(Day 0, Day +7, Day +14)의 인체적용시험용 식품 섭취 전(-2시간) 및 음주 15시간 후에 측정
신체계측(신장, BMI, 체중)	<ul style="list-style-type: none"> • 신장, 체질량지수(BMI, kg/m²)는 방문1에 측정하며, 체중은 방문1, 2(Day 0, +1), 3(Day +8), 4(Day +15)에 측정

	<ul style="list-style-type: none"> • 반올림하여 0.1 cm, 0.1 kg, 0.1 kg/m² 단위까지 측정
임상병리검사/임신 반응검사	<ul style="list-style-type: none"> • 방문1, 2(Day +1), 3(Day +8), 4(Day +15)에 임상병리검사를 실시하여 인체적용시험 대상자의 전신적인 건강상태를 평가함. • 인체적용시험 대상자는 채혈하기 전 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사하며 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대하여 재검사를 실시 • 방문2(Day +1), 3(Day +8), 4(Day +15)에 임상병리검사를 음주 15시간 후 실시하며, 검체는 외부분석기관에서 분석 후 2차 목적으로 이용되지 않고 즉시 폐기 <ul style="list-style-type: none"> - 혈액학적검사: WBC, RBC, Hb, Hct, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil - 혈액화학적검사: AST(GOT), ALT(GPT), Total Cholesterol, Glucose, Total Protein, BUN, Creatinine, Uric Acid, Ca - 뇨검사: S.G, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, RBC(Erythrocyte), Urobilinogen, Nitrite, WBC(Leukocyte) - 임신반응검사: Urine HCG(※ 가임기 여성만 해당) • 가임 여성의 경우 무작위배정을 받기 전에 소변 임신반응검사 결과 음성 판정을 받아야하며, 검사 결과 음성 판정이 나오지 않을 경우(임신을 의미) 본 인체적용시험에서 배제됨. 단, 비가임 여성*은 임신반응검사를 시행하지 않음(*비가임 여성: 불임시술(기록된 자궁절제술, 양난소절제술 혹은 수정란이 난관을 통과하지 못하게 하는 수술)을 받은 여성 혹은 폐경 여성(최소 2년 동안 생리가 없는 경우)). • 임상적으로 의미가 있는 비정상 임상병리검사 결과는 시험자가 인체적용시험 대상자의 증례기록서(CRF)에 소견을 기재하고, 시험자가 필요하다고 판단하는 경우 추가 평가를 실시 • 비정상적 임상병리검사 결과로 인하여 임상적 징후/증상이 야기되거나 치료 중재술이 필요한 경우 인체적용시험 대상자의 근거문서, 증례기록서(CRF)에 진단 또는 의학적 상태를 기록함.
알코올 분해 유전자검사	<ul style="list-style-type: none"> • 방문1에 알코올 분해 유전자검사(ADH1B, ALDH2)를 실시 • 혈액 8 mL를 채취하여 상온보관 후, 외부분석기관에서 분석하며, 분석 완료 후 검체는 2차 목적으로 이용되지 않고 즉시 폐기함. • 검사 결과, ALDH2 유전자가 Homo Type인 자는 본 인체적용시험에서 제외
음주 습관 설문	<ul style="list-style-type: none"> • 방문1, 2(Day 0), 3(Day +7), 4(Day +14)의 인체적용시험용 식품 섭취 전에 음주 습관 설문지를 통해 평균 음주량 및 방문 72시간 이내 금주여부 등을 조사함. • 방문1에 방문1 기준 지난 1개월 이내의 1주일 평균 음주량을 조사하며, 방문2(Day 0), 3(Day +7), 4(Day + 14)에 지난 방문 이후 1주일 평균 음주량 및 방문 72시간 이내 금주여부 등을 조사 • 알코올량(g)= {(음주량(잔)*1잔 용량(mL) x 도수(%) x 0.7947}/100⁵)으로 계산함.
호기 알코올 검사	<ul style="list-style-type: none"> • 호기 알코올 검사는 방문2(Day 0)에 무작위배정 전 및 방문3(Day +7), 4(Day +14)에 실시하여, 음주여부를 확인 • 호기 알코올 검사 결과 0.00 %가 아닌 자는 중도탈락 처리

<p>혈중 알코올, 아세트알데하이드 농도</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 숙취의 대표적인 원인물질로는 알코올대사 산물인 아세트알데하이드가 있는데, 이는 활성산소 생성과 간조직 손상 등을 유도한다고 알려져 있음. 체내의 알코올은 알코올가수분해효소(Alcohol Dehydrogenase, ADH)와 알데하이드가수분해효소(Aldehyde Dehydrogenase, ALDH)에 의해서 아세테이트로 전환되고 소변이나 CO₂로 배설되는 대사과정을 거치는데, 효소 활성이 낮은 경우 체내 축적된 알코올과 아세트알데하이드가 산화되지 못하고 혈액 중에 축적되면 메스꺼움, 구토, 두통, 무기력함 등의 숙취 증상이 발생함. • 방문2(Day 0), 3(Day +7), 4(Day +14)에 음주 전, 음주 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 15시간 후 혈중 알코올 및 아세트알데하이드 농도를 측정 • 매시간마다 혈액 5 mL를 채취하여 아세트알데하이드 농도는 즉시 외부분석기관에서 분석하고, 알코올 농도 분석을 위한 검체는 냉동보관 후 외부분석기관에서 분석함. 분석 완료 후 검체는 2차 목적으로 이용되지 않고 즉시 폐기
<p>AHS</p>	<ul style="list-style-type: none"> • AHS(Acute Hangover Scale, 급성 숙취 정도)는 현재의 숙취 상태에 대해 평가가 가능한데, 각 문항은 0~7점 척도로 되어있으며 그 기준은 0=증상없음(None), 1=약함(Mild), 4=보통(Moderate), 7=기능상실(무능력/Incapacitating)으로 나눌 수 있음. • AHS는 방문2(Day +1), 3(Day +8), 4(Day +15)에 음주 3, 6, 15시간 후 실시
<p>숙취 증상 설문</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 9개 숙취 증상(집중력 저하, 무력감, 평소보다 땀이 많이 나는 정도, 수면곤란, 졸음, 기억단절, 근육통, 설사, 평소보다 자극에 민감)에 대해 0~7점 척도로 평가 • 숙취 증상 설문은 방문2(Day +1), 3(Day +8), 4(Day +15)에 음주 3, 6, 15시간 후 실시
<p>피부 수분량 및 홍반지수</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 피부 수분량은 Corneometer[®] CM 825(Courage & Khazaka, Germany)로 측정 • Corneometer[®] CM 825는 전기용량(Capacitance)을 측정하는 원리로 화장품, 약물의 도포에 크게 영향을 받지 않는 상태에서 피부 각질층 아래 30~40 μm의 수분량을 측정할 수 으며, Probe에서 전류를 보내면 피부의 수분 함유량에 따른 피부의 전기 전도도에 따라 Probe head에 남아 있는 절연이온 값이 수치화(AU: Arbitrary Unit)되어 나타남. 따라서 피부에 수분량이 많을수록 측정값은 높아짐. • Mexameter[®] MX 18(Courage & Khazaka, Germany)는 피부색을 결정하는 주요 요인인 멜라닌과 헤모글로빈의 양을 흡광 원리를 이용하여 측정하는 장치로서 각 과장 영역의 피부 흡수율을 디지털화하여 멜라닌지수(Melanin Index)와 홍반지수(Erythema Index)로 표시 • 방문2, 3, 4에 세안 후 항온·항습 조건(20~24 $^{\circ}$C, 40~60 %)에서 30분간 안정을 취한 후 피부 수분량 및 홍반지수를 측정하며, 음주 전, 음주 1, 6, 15시간 후에 측정함. 좌측 눈꼬리와 코끝의 직각교차부위를 3회 이상 측정하여 안정화된 3개 측정값의 평균값을 사용
<p>선정/제외기준 확인(인체적용시험)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 방문1, 2(Day 0)에 이루어진 인체적용시험 대상자 동의여부와 인구학적 조사, 생활습관 조사, 병력 및 약물투여력, 비약물치료력 조사, 신

대상자 적합성 평가)	체검진, 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(신장, BMI, 체중), 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당), 알코올 분해 유전자검사, 음주습관 설문 결과를 종합하여 선정/제외기준에 적합한 인체적용시험 대상자인지를 평가
무작위배정 및 섭취	<ul style="list-style-type: none"> • 방문2(Day 0)에 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 인체적용시험 대상자를 ABC군, ACB군, BAC군, BCA군, CAB군, CBA군으로 무작위배정 하고, 무작위배정번호에 따라 인체적용시험용 식품을 배부하여 섭취하도록 함. • 방문2(Day 0), 3(Day +7), 4(Day +14)에 인체적용시험용 식품 섭취 30분 후 알코올(0.9 g/kg b.w.)을 30분 안에 섭취하도록 함. • 알코올 섭취하는 동안 최소한의 안주(새우깡 20개 수준)는 허용하며, 섭취 후 금식함. 물은 채혈 2, 4시간 후 각각 동일한 양(100 mL 일괄 섭취)으로 섭취 가능
시험대상자 교육	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험 대상자에게 방문1, 방문2(Day +1), 3(Day +8)의 방문 72시간 이내 금주하고, 24시간 이내 카페인 섭취를 자제하도록 인체적용시험 대상자를 교육
이상반응 확인	<ul style="list-style-type: none"> • 이상반응에 대한 정보는 인체적용시험 기간동안의 인체적용시험 대상자에게 우회적으로 질문(Non-directive questioning)하여 탐색해야 함. 또한 인체적용시험 기간 내에 인체적용시험 대상자가 자발적으로 보고하거나 신체검진, 임상병리검사 또는 기타 평가를 통하여 확인할 수 있음. • 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 인체적용시험용 식품과 관련하여 취해진 조치 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함됨. • 자·타각적 증상에 대한 확인: 인체적용시험 시험자의 진료를 통하여 이상반응 발현 여부를 조사하고, 평가 기준에 따라 발현 정도를 기록하며, 약제 투여 및 시험/대조식품과의 인과관계도 평가 • 임상병리검사에 대한 확인: 임상병리검사에서 어떤 비정상적인 변화는 증상호전 때까지 추적 검사를 실시하도록 하며, 발현 증상에 대한 예상 원인을 기록한다. 또한 임상병리검사 시 검사내용에 지장을 줄 수 있는 요인(심각한 피로 등)이 있었는지 면담을 통하여 기록함.

○ 대상자 방문별 관찰 검사 방법

1차 방문 (Screening visit, Day-14)	<p>본 인체적용시험에 참가하는 인체적용시험 대상자는 1차 방문 시 인체적용시험에 대한 설명을 듣도록 하고, 다음과 같이 평가를 실시</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ol style="list-style-type: none"> ① 서면 동의서 ② 스크리닝 번호 부여 ③ 인구학적 조사 ④ 생활습관 조사 ⑤ 병력 및 약물투여력, 비약물치료력 조사 </div>
---------------------------------------	--

	<ul style="list-style-type: none"> ⑥ 신체검진 ⑦ 활력징후(혈압, 맥박) ⑧ 신체계측(신장, BMI, 체중) ⑨ 임상병리검사 ⑩ 임신반응검사(가임기 여성만 실시) ⑪ 알코올 분해 유전자검사 ⑫ 음주 습관 설문 ⑬ 1차 적합성 평가 ⑭ 시험대상자 교육 ⑮ 다음 방문일 지정
<p style="text-align: center;">2차 방문 (Randomization, Interim visit, Day 0)</p>	<p>2차 방문은 최초 방문일 이후 14일 이내에 이루어졌고, 다음과 같이 평가를 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> ① (인체적용시험용 식품 섭취 전)병력 및 약물투여력, 비약물치료력 조사 ② (인체적용시험용 식품 섭취 후)이상반응 확인 ③ (인체적용시험용 식품 섭취 후)병용약물 및 병용요법 확인 ④ 신체검진 ⑤ 활력징후(혈압, 맥박) ⑥ 신체계측(체중) ⑦ 음주 습관 설문 ⑧ 호기 알코올 검사 ⑨ 피부 수분량, 피부 홍반지수 ⑩ 혈중 알코올, 아세트알데하이드 ⑪ 최종 적합성 평가 ⑫ 무작위배정 ⑬ 식사 및 인체적용시험용 식품/알코올 섭취
<p style="text-align: center;">2차 방문 (Interim visit, Day+1)</p>	<p>다음과 같이 평가 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 이상반응 확인 ② 병용약물 및 병용요법 변화 확인 ③ 신체검진 ④ 활력징후(혈압, 맥박) ⑤ 신체계측(체중) ⑥ 임상병리검사 ⑦ 혈중 알코올, 아세트알데하이드 ⑧ AHS ⑨ 숙취 증상 설문 ⑩ 피부 수분량, 피부 홍반지수 ⑪ 시험대상자 교육 ⑫ 다음 방문일 지정
<p style="text-align: center;">3차 방문 (Interim visit, Day+7)</p>	<p>3차 방문은 2차 방문일 이후 7일(±3)에 이루어졌고, 다음과 같이 평가를 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 이상반응 확인

	<ul style="list-style-type: none"> ② 병용약물 및 병용요법 변화 확인 ③ 신체검진 ④ 활력징후(혈압, 맥박) ⑤ 음주 습관 설문 ⑥ 호기 알코올 검사 ⑦ 피부 수분량, 피부 홍반지수 ⑧ 혈중 알코올, 아세트알데하이드 ⑨ 식사 및 인체적용시험용 식품/알코올 섭취
<p style="text-align: center;">3차 방문 (Interim visit, Day+8)</p>	<p>다음과 같이 평가 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 이상반응 확인 ② 병용약물 및 병용요법 변화 확인 ③ 신체검진 ④ 활력징후(혈압, 맥박) ⑤ 신체계측(체중) ⑥ 임상병리검사 ⑦ 혈중 알코올, 아세트알데하이드 ⑧ AHS ⑨ 숙취 증상 설문 ⑩ 피부 수분량, 피부 홍반지수 ⑪ 시험대상자 교육 ⑫ 다음 방문일 지정
<p style="text-align: center;">4차 방문 (Interim visit, Day+14)</p>	<p>4차 방문은 2차 방문일 이후 14일(±3)에 이루어졌고, 다음과 같이 평가를 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 이상반응 확인 ② 병용약물 및 병용요법 변화 확인 ③ 신체검진 ④ 활력징후(혈압, 맥박) ⑤ 음주 습관 설문 ⑥ 호기 알코올 검사 ⑦ 피부 수분량, 피부 홍반지수 ⑧ 혈중 알코올, 아세트알데하이드 ⑨ 식사 및 인체적용시험용 식품/알코올 섭취
<p style="text-align: center;">4차 방문 (Closing visit, Day+15)</p>	<p>다음과 같이 평가 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 이상반응 확인 ② 병용약물 및 병용요법 변화 확인 ③ 신체검진 ④ 활력징후(혈압, 맥박) ⑤ 신체계측(체중) ⑥ 임상병리검사 ⑦ 혈중 알코올, 아세트알데하이드 ⑧ AHS ⑨ 숙취 증상 설문

(3) 인체적용시험 실시기관 관리

○ 인체적용시험용 식품 관리/수불사항 관리

인체적용시험용 식품 관리	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 계획서 및 무작위배정 순서를 준수하여 인체적용시험용 식품이 처방되고 있는지 확인하고, 이에 대한 기록이 적절히 되고 있는지 점검
배송관리	<ul style="list-style-type: none"> 필요한 인체적용시험용 식품을 필요시에 따라 관리약사 또는 시험 담당자의 요청에 따라서 수량에 맞게 의뢰자로부터 배송을 받아야 하며, 배송에 대한 인수증은 시험책임자의 위임을 받은 관리약사 또는 시험 담당자의 서명을 받아 기본 문서 파일에 보관
취급/보관방법 관리	<ul style="list-style-type: none"> 관리약국에서 인체적용시험 계획서 및 관리기준에 준하도록 취급/보관이 이루어지는지 점검
반납/폐기 관리	<ul style="list-style-type: none"> 시험대상자는 인체적용시험용 식품을 관리약사 또는 시험 담당자에게 반납해야 하며, 모니터링요원은 회수된 인체적용시험용 식품 및 미사용된 인체적용시험용 식품을 의뢰자에게 반납하도록 함. 반납된 인체적용시험용 식품은 의뢰자 측에서 관련기록을 남기고 폐기
수불기록 관리	<ul style="list-style-type: none"> 관리약사 또는 시험 담당자는 수불대장에 시험대상자의 무작위배정번호, 처방일, 불출 수량, 재고량 등을 기록하도록 함. 인체적용시험용 식품의 입고가 필요한 경우 모니터링요원에게 이를 알리고, 모니터링요원은 의뢰자에게 이를 요청함. 모니터링요원은 정기적으로 인체적용시험용 식품의 관리, 기록된 수불대장의 작성이 완전하고 정확한지 확인

○ SDV(Source Documents Verification) 실시

○ 연구 상황 보고서(Monthly Report) 작성

시험계획서 준수 여부 확인	<ul style="list-style-type: none"> 기존 임상병리검사 등의 검사일 허용기준 준수 여부 Visit window 준수 여부 시험계획서 미준수 내용은 Protocol Deviation/Violation Log지에 기록하여 별도로 관리하며, 실시기관 IRB 보고기한에 맞게 보고
시험대상자 동의서 점검	<ul style="list-style-type: none"> 매 방문 시 지난 방문 이후 등록된 새로운 시험대상자의 동의서를 확인 동의서에는 시험대상자와 시험자의 서명 날짜가 모두 동일한 날짜로 기재되었는지 확인 서명이 완료된 동의서 원본은 ICF binder에 보관되어 있으며, 사본은 시험대상자에게 제공하였는지 확인
증례기록서	<ul style="list-style-type: none"> 각각의 페이지는 모든 항목이 완결되고 빈칸이 없는지 확인 Randomization date로부터 계산하여, 방문과 방문 간에 Visit window가 정확한지 계산 모든 증례기록서 상의 데이터가 근거문서와 일치하는지 확인

	<ul style="list-style-type: none"> 증례기록서에 기재된 자료가 근거문서와 일치하지 않는 내용은 시험자의 설명이 첨부되었는지 확인 중도탈락 된 시험대상자는 시험종결 page 기록이 완료되었는지 확인 증례기록서 작성은 시험대상자 방문 후, 가능한 working day 3일 이내 완결할 수 있도록 독려
Subject Log(Screening and Enrollment Log)	<ul style="list-style-type: none"> 스크리닝 및 등록된 모든 시험대상자는 Screening and Enrollment Log지에 기록되어야 하며, 매 방문 시 CRA가 확인
인체적용시험용 식품	<ul style="list-style-type: none"> 계획서에 기술된 순응도 확인 방법에 따라 매 방문 시 인체적용시험용 식품의 순응도를 확인 매 방문 시 온도기록지, 수불대장, 시험대상자별 처방기록지 작성, 처방전 보관 등을 확인 미사용 인체적용시험용 식품 및 반납된 인체적용시험용 식품은 의뢰자에게 반납하여 폐기하도록 하며, 반납증을 보존
시험대상자 현황	<ul style="list-style-type: none"> 시험대상자 스크리닝 및 등록 현황은 매달 1회 이상 업데이트 하여 의뢰자에게 전달
스크리닝 탈락된 시험대상자의 근거문서 검토	<ul style="list-style-type: none"> 동의서 스크리닝 탈락 사유

○ 인체적용시험 관련자(의뢰기관, 실시기관 시험책임자 등)들의 상호 정보 공유를 위한 연구 상황 보고서 작성

(4)인체적용시험 모니터링

- 대상자 등록 상황에 따른 인체적용시험 모니터링 실시
- 모니터링 주요 내용

- ① 시험책임자가 시험기간 동안 안전하고 적절하게 인체적용시험을 수행할 자격이 있고 자원을 확보하고 있는지 여부 확인
- ② 인체적용시험에 사용되는 시험식품에 대한 다음 사항의 확인
 - 저장조건의 적절성, 섭취기간의 준수 여부 및 이들 시험식품이 인체적용시험을 실시하기에 충분한지의 여부
 - 선정기준을 만족하는 대상자에게만 시험계획서에 명시된 섭취기간, 섭취방법대로 사용되고

있는지의 여부

- 대상자가 인체적용시험에 사용되는 시험식품의 적절한 섭취·보관·반납에 관한 정보를 제공받는지의 여부
 - 실시기관에서 인체적용시험에 사용되는 시험식품의 인수 또는 섭취, 의뢰자로의 회수 등이 적절히 관리되고 문서화되는지의 여부
- ③ 시험자가 승인된 시험계획서 또는 시험변경계획서를 준수하고 있는지 여부 확인
- ④ 대상자가 인체적용시험에 참여하기 이전에 동의서가 얻어졌는지의 여부 확인
- ⑤ 시험자가 인체적용시험을 적절히 실시하고 이 기준에서 정한 사항을 준수하기 위하여 필요한 최신의 인체적용시험자 자료집 및 문서, 인체적용시험에 사용되는 시험식품을 포함한 그 밖의 공급품을 수령하였는지의 여부 확인
- ⑥ 시험자가 인체적용시험의 제반 사항을 충분히 숙지하고 있는지의 여부 확인
- ⑦ 시험자가 특정한 인체적용시험 관련 기능을 시험계획서 및 의뢰자와 실시기관의 장 또는 시험책임자와 합의한 문서에 따라 수행하고 있으며, 권한이 없는 자에게 이러한 기능이 위임되지 않았다는 사실의 확인
- ⑧ 시험책임자가 선정기준에 적합한 대상자만을 인체적용시험에 참여시키고 있는지의 여부 확인
- ⑨ 대상자 모집 현황에 대한 보고
- ⑩ 근거문서 및 그 밖의 인체적용시험 관련 기록이 정확하고 완전하며 최신 사항이 반영되도록 유지되고 있는지의 여부 확인
- ⑪ 시험책임자가 인체적용시험에 필요한 모든 보고서, 통지서, 신청서 등을 적절히 제공하고 있으며, 이러한 문서들을 통해 해당 인체적용시험을 확인할 수 있고 또한 그 기록이 정확하고 적절하며, 읽기 쉽고, 날짜가 기재되어 있는지 여부 확인
- ⑫ 증례기록서상의 기재 내용, 근거문서 및 그 밖의 인체적용시험 관련 문서의 정확성과 완전성에 대한 검토와 이들의 상호대조로부터 서로 일치하는지의 여부 및 다음 각 사항에 대한 확인
- 인체적용시험 계획서에서 요구한 자료가 증례기록서에 정확히 기재되었거나 보고되고 있으며, 근거문서와 일치하는지 여부
 - 섭취기간이나 섭취방법 등의 변동사항이 각 대상자별로 적절히 문서화되고 있는지의 여부
 - 대상자가 지키지 못한 방문검사, 실시하지 않은 실험실 검사 또는 임상 검사 등에 대하여 증례기록서상에 사실대로 명확하게 기재되었거나 보고되고 있는지의 여부
 - 인체적용시험으로부터 대상자가 탈락하거나 탈퇴한 모든 사실이 증례기록서 상에 기재되었거나 보고되고 그 이유가 설명되었는지의 여부
 - 증례기록서의 기재오류, 누락사항과 판독하기 어려운 부분에 대하여 시험책임자에게 알리고, 이러한 사항에 대한 정정·첨가·삭제 등이 적절하게 이루어졌는지, 날짜와 그 사유(필요한 경우)가 기재되어 있는지, 시험책임자 또는 시험책임자를 대신하여 증례기록서상의 기재사항에 대한 변경권한을 가진 시험담당자가 서명을 하였는지 등의 확인
 - 모든 이상반응이 인체적용시험 계획서, 심사위원회, 의뢰자 및 관련규정에 명시된 기간 내에 적절하게 보고되었는지의 여부 확인
 - 시험책임자가 기본문서를 보존하고 있는지의 여부 확인
 - 인체적용시험 계획서, 표준작업지침서에서 정한 사항을 준수하지 않은 것에 대해 시험책임자에게 알리고, 이러한 미 준수 사항이 재발되지 않도록 하는 적절한 조치

○ 모니터링 실시내역

실시기관	회차	모니터링일자
글로벌의학연구센터	1	2023.09.20
	2,3	2023.10.26,27

○ Final version CRF를 바탕으로 Data Dictionary에서 명시하는 변수에 대한 정의를 기술한 Blank CRF

③ DVS(Data Validation Specification)

- 쿼리(Query;질의)항목: CRF로 수집해야 하는 자료 중 계획서·CRF 작성 지침에 위반되거나 수집되어야 할 자료의 누락 또는 수집된 자료 간의 일치하지 않는 항목 등
- DVS란 쿼리항목을 사전정의 및 목록화하는 과정으로서, Data의 무결성을 최대화하고, 높은 수준의 Data Quality를 이끌어내기 위하여 실시
- Missing Values, Range Checks, Logical Inconsistencies, Protocol Violations 및 적절하지 못한 데이터의 확인 작업들을 포함
- DVS Test: 작성된 DVS의 정확성을 확인하기 위해 DVS Test를 수행하며, Dummy Data(질의가 각 항목별에 해당하는 자료가 입력되었을 때는 검출되고, 그렇지 않은 자료가 입력되었을 때는 검출되지 않음을 확인하기 위하여 임의로 만드는 자료)를 작성 및 DVS에 적용하여 제대로 실행되는지 검증함. Dummy Data와 출력된 결과와의 불일치를 발견할경우 이를 해결하여 Retest를 시행하고, Discrepancy가 없을 때까지 반복
- UAT(User Acceptance Test): EDC real site를 개시하기 전 EDC System의 기능 및 Data Validation 조건들의 오류가 발생하지 않는지 확인하기 위하여 실시하며, UAT과정에서 의뢰사 검토 의견에 따른 쿼리 조건 추가 및 삭제 등을 진행
- DVS Report

④ Query Management

발생된 System Query, Manual Query에 대한 해결 및 관리

10. 제형 개발 및 제품화

1) 제형개발 및 시제품 개발

- ① 유통 채널별 제형 차별화하여 개발
- ② 젤리, 캡슐, 건과류, 음료용 분말 및 필름 제형 등 다양한 제형을 적용
 - 대형 유통 채널 (편의점, 다이소)등을 타겟으로 필름제형 개발
 - 유사균의 특성상 온도 조절을 통한 생존력 증대 및 안정성 확보를 위한 제형 개발
 - MZ세대 및 여성을 타겟으로 한 젤리형, 음료형, 환 제품 등 다양한 제형 개발 완료

2) 제품 패키지 디자인 개발

- MZ세대를 타겟으로 한 직관적 디자인 개발
 - 20-30세대를 타겟으로 직관적인 디자인 개발
 - SNS를 즐기고, 재미있는 경험을 중시하는 MZ세대의, 즐겁게 건강을 관리하려는 경향성 파악. 키워드는 '먹기 편하고' '맛도 좋은' MZ세대 공략.
 - 건강이 '치료' 보다 '예방' 의 의미로 인식되기 시작하며 삶의 만족도와 연관되는 트렌드 적용
- 이중 제형 디자인 및 RRP 디자인 개발
- 제형 맞춤형 디자인 패키지 개발

제 3 장 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

제 1 절 연구 개발 과제의 대표적 연구 실적

1. 연구 개발 실적 요약

성과명	숙취 해소 기능성 표시 식품 개발 및 산업화				
성과 요약	○ 대표적 연구 실적 요약				
	숙취 해소 기능성 표시 식품 개발	1. 원료의 특징 2. 및 표준화 - 전통 발효식품 유래 알코올 내성 균주 - 800L 대량배양 표준화 완료 - 경시안정성 우수	2. 원료 안정성 및 안전성 - 장내 안정성 우수 (내산, 내담즙, 장세포 부착능) - 단회투여 및 유전독성 안전성 확인	3. 원료의 기능성 평가 - in vitro 효능 검증 완료 - in vivo 혈중 알코올, 아세트알데하이드 저감 효능 확인 - 간 세포 보호능 확인	4. 임상 시험 - 유산균 균과 유산균 함유 제품군 모두 대조군에 비해 아세트알데하이드에서 통계적으로 유의하게 감소 하였음 (P<0.005)
	연구 성과	* SCI(E)급 논문 1건 게재 완료 * 특허출원 4건 완료 * 특허등록 2건 완료 * 기술이전 2건 (5종 균주 기술 이전, 선급료, 경상기술료 있음) * 균주기탁 5건			
○ 기술적 성과					
- 최초 숙취 해소 유산균 5종 발굴					
: 현재 인체적용시험까지 완료되어 숙취 해소 기능성을 입증한 숙취 해소 유산균은 개발되어 있지 않았으며, 본 연구를 통해 인체적용시험에서도 숙취 해소 기능성을 입증하여 ‘국내 최초 숙취 해소 유산균’ 기능성 표시 식품으로 등록 가능					
- 알코올 내성균 확인 및 검증					
: 발굴해낸 유산균 5종 모두 알코올 농도 12.5%의 MRS배지에서도 성장할 수 있을 만큼 알코올에 내성이 뛰어나며, 특히 선정된 균주 중 Leu. mesenteroides WiKim0172(Wilac L005)는 알코올 농도 25% MRS배지에서 성장할 수 있음을 확인함.					
- 전통 발효 식품 유래 균주의 특성 및 우수성 확보					
: 효능을 검토한 후보 유산균 5종은 모두 한국의 전통 발효 식품인 막걸리와 묵은지에서 유래한 균주이며, 본 연구를 통하여 해당 균주들의 기능성을 입증하는 것으로 기업의 성장과 함께 국내 전통 발효 식품의 우수성을 알릴 수 있을 것으로 사료됨					

<p>성과 요약</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 숙취 해소 효능 검증 숙취 해소 유산균 5종의 in vitro, in vivo 효능 검증을 통해 숙취 해소능이 우수함을 검증함, 최적의 효능 증대를 위하여 복합 유산균 조성을 확보 하였으며, - 안정/안전성 : 후보균주 5종에 대한 장내 안정성(내산성, 내담즙성, 장세포 부착능)을 확인하였으며, 용혈반응 및 GLP기관의 단회투여독성, 유전독성시험의 수행으로 유산균 복합물의 안전성을 입증함. - 인체적용시험 : 식약처의 숙취 해소 기능성 가이드라인에 적합한 인체적용시험 프로토콜을 개발하고 이에 입각하여 3-Arms 디자인(유산균복합물, 유산균복합물+식물성추출물, 대조군)을 이용한 인체적용시험 IRB를 승인받아 성인남녀 30명을 대상으로 인체적용시험을 수행함. 인체적용시험 결과 숙취 해소 유산균 섭취 시 아세트알데하이드의 농도가 감소함. - SCI 급 논문 등록 1건 - 기술 이전 2건, 5종의 균주 - 특허 출원 4건, 특허 등록 2건 ○ 사업화 성과 - 신 제형 개발 : 필름 제형, 이중 제형 개발, 견과류에 씨즈닝으로 하여 숙취 해소 안주류 개발 소환 및 분말 류 개발 - 제품화 : 디자인 패키지 개발 4건, 레트로풍과 2030을 겨냥한 직관적인 디자인 개발 : 제품화 및 품목 신고 (숙취 뽀개기, 확깨유, 이중 제형 숙취 뽀개기, 숙취 살리도)
--------------	--

제 2 절 연구 수행 결과

1. 정성적 연구개발성과

1) 숙취 해소 유산균의 효능 검증

(1) 숙취 개선 유산균의 In vitro 효능 검증 결과

① 알코올 내성 및 숙취 개선 유산균 5종 개발

-고효율의 알코올 내성 유산균 발굴과 숙취 개선 기능성 유산균 후보 5종을 선정함

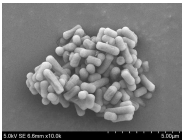
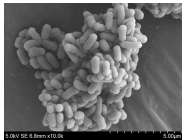
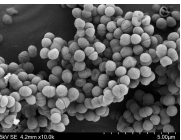
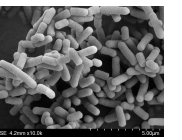

균주	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
알코올 함량	15%까지 성장	12.5%까지 성장	15%까지 성장	12.5%까지 성장	25%까지 성장
전자현미경 사진					
알코올 분해효소 ADH 활성 (대조군 흡광도 대비)	190%	10%	130%	170%	140%
알코올 분해효소 ALDH 활성 (대조군 흡광도 대비)	600%	160%	220%	290%	210%
간세포 생존율 (control 대비)	120%	88%	101%	117%	106%

표 28. 후보 균주 5종 in vitro 효능 결과

- 5종의 유산균의 배지 내 에탄올 함량에 따른 성장 가능 농도를 확인하였고, 알코올 분해효소(ADH, ALDH) 활성에 따른 숙취 개선 가능성, 그리고 간세포와 공배양을 통해 세포 손상 저해 효능을 확인함

(2) 숙취개선 유산균의 in vivo 효능 검증 결과

① 알코올 저감 효능 검증 결과

- 숙취 개선 기능성 유산균 후보 5종의 혈중 알코올 저감 효능을 실험동물모델에서 검증함

군주	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
투여 후 30분 (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	7.9%	8.2%	22.6%	-	-
투여 후 60분 (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	15.5%	20.0%	9.7%	-	1.5%
투여 후 180분 (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	33.1%	25.2%	32.3%	22.9%	20.8%
투여 후 300분 (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	32.6%	18.0%	22.9%	30.7%	32.1%

표 29. 후보 균주 5종의 in vivo 혈중 알코올 저감 효능

- 위의 결과를 통해, 알코올 내성을 갖는 5종의 유산균은 숙취의 원인이 되는 아세트알데하이드와 알코올 분해능이 있으며 알코올 저감 효능 프로바이오틱스의 가능성을 검증하였음

② 숙취 개선 기능성 유산균 5종의 원말 시료를 통한 혈중 알코올 저감 효능 검증

- 선발된 유산균 원말시료의 숙취 개선효능을 평가하기 위하여 유산균으로 수행했던 rat 실험동물의 혈중알코올농도 측정 실험 방법과 동일하게 원말시료의 효능 동등성 실험을 수행함

원말	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
투여 후 30분 (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	-	35.2%	25.3%	25.3%	41.5%
투여 후 60분 (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	39.6%	54.4%	42.2%	42.2%	49.7%
투여 후 180분 (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	68.8%	59.8%	61.7%	65.8%	56.6%
투여 후 300분 (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	65.0%	44.8%	57.3%	57.3%	53.6%

표 30. 숙취 개선 유산균 5종 원말시료의 in vivo 혈중 알코올 저감 효능

- 위의 원말시료의 실험 결과를 통해 유산균 투여에 따른 알코올 저감 효능이 원말시료 투여를 통해서도 관찰되었으며, 그 효능은 유산균 투여보다 원말시료를 투여한 실험동물의 혈중 알코올 저감 효능이 더 높은 것으로 확인되었음

③ 숙취 개선 기능성 유산균의 알코올에 의한 수면 유도 증상의 각성 효능 평가

- 알코올에 의해 유도된 수면 상태가 유산균 원말 시료의 알코올 분해활성에 따른 수면각성 효능을 관찰하기 위해 수면 각성 효능 평가(LORR test; Loss of righting reflex test)를 수행함

원말	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
입면 시간 (알코올 투여 그룹 대비 증가 %)	25%	-	-	-	18%
총수면시간 (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	45%	25%	40%	45%	50%

표 31. 후보 균주 5종 원말시료의 in vivo 수면 각성 효능 결과

- 각 원말 시료를 경구 투여한 후, 알코올 투여로 유도된 수면을 각성시키는 효능을 확인함
- LORR 수면 각성평가 결과와 숙취 개선 기능성과의 연관성을 확인하기 위하여 행동분석 후 2시간 이후에 실험 동물의 간 조직을 적출하여 파쇄 후 간 손상 수치(AST, ALT)를 측정하였음

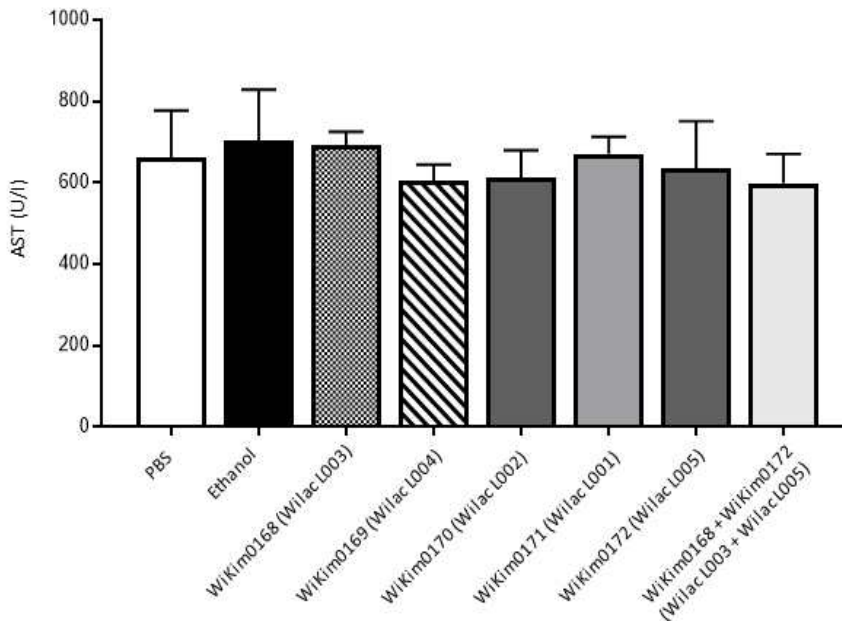


그림 77. 수면 각성 평가 실험동물의 간 조직 내 AST 농도

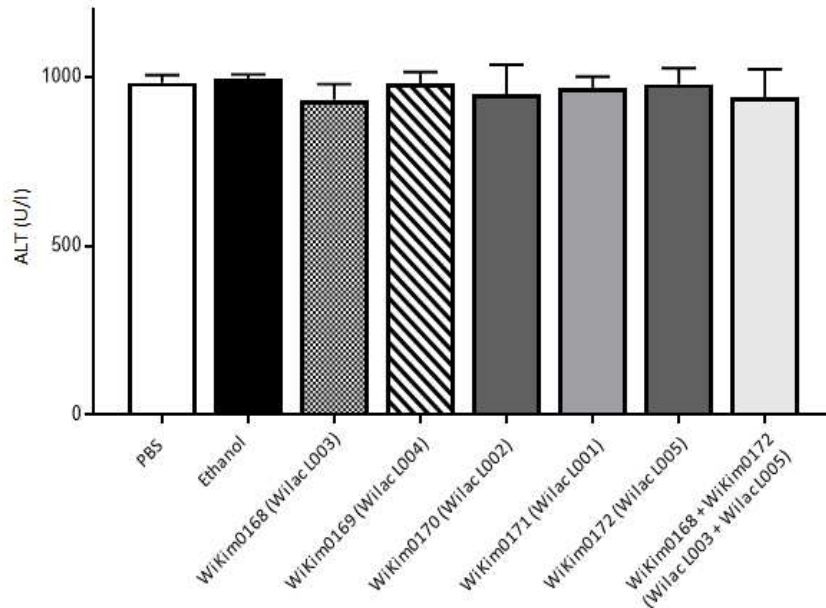


그림 78. 수면 각성 평가 실험 동물의 간 조직 내 ALT 농도

- 수면 각성 평가를 수행한 실험 동물의 간 조직 내 AST와 ALT 농도를 측정된 결과 원말 시료를 투여한 실험 동물그룹의 AST 농도가 에탄올만 투여한 실험 동물그룹에 비해 적게는 1.3%에서 많게는 10.7% 감소 되었으며, ALT는 적게는 1.4% 많게는 6.2% 감소 되는 것을 확인함

④ 알코올에 의해 유도된 간세포 손상 개선효능 평가

- 8주간의 유산균 원말 및 알코올 섭취에 따른 알코올성 간세포 손상 개선효능을 분석하기 위해 5종의 균주와 알코올을 8주간 경구투여하고, 실험 종료 후 실험 동물의 혈액을 수집하여 혈중 간 기능 개선 수치를 분석하였음.

원말	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
AST (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	27.2%	28.8%	20.9%	21.1%	37.0%
ALT (알코올 투여 그룹 대비 감소 %)	7.5%	4.5%	8.5%	6.9%	28.8%

표 32. 후보 균주 5종 원말시료의 혈중 간세포 손상 개선효능 결과

- 혈액 중 AST 및 ALT 수치 측정을 통해 알코올 섭취에 의한 간 손상을 경감시킴을 확인할 수 있으며, 알코올 섭취 마우스 대비 감소 효능을 확인하였음

2) 숙취개선 유산균 5종의 안정성 및 특성 평가

균주	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
항생제 내성 유전자	없음	없음	없음	없음	없음
용혈성	없음	없음	없음	없음	없음
Gelatin 액화반응	음성	음성	음성	음성	음성
Urea 분해반응	음성	음성	음성	음성	음성
내산성 (1x10 ⁸ cfu/ml 로 접종)	1 x 10 ⁴ cfu/ml	3 x 10 ³ cfu/ml	1 x 10 ⁴ cfu/ml	1 x 10 ⁵ cfu/ml	4 x 10 ⁴ cfu/ml
내담즙성 (1x10 ⁸ cfu/ml 로 접종)	3 x 10 ⁹ cfu/ml	1 x 10 ⁵ cfu/ml	1 x 10 ¹⁰ cfu/ml	7 x 10 ⁶ cfu/ml	2 x 10 ⁹ cfu/ml
장세포 부착능 (1x10 ⁹ cfu/ml 공배양)	1 x 10 ⁶ cfu/ml	1 x 10 ⁵ cfu/ml	1 x 10 ⁵ cfu/ml	5 x 10 ⁴ cfu/ml	4 x 10 ⁴ cfu/ml

표 33. 후보 균주 5종의 안전성 평가 실험 결과

- 식약처에서 권고한 “plasmidFinder-2.0 Server” 를 이용한 전장 유전체 항생제 내성 유전자 annotation 결과 특정 항생제와 연관성 있는 결과는 도출되지 않았음
- Sheep blood를 포함하는 배지에 유산균 5종을 도말하여 균주에 의한 용혈 현상을 관찰함. 양성대조균으로 사용된 *Bacillus cereus* 균주와 비교해보았을 때, 유산균 5종에 의한 용혈 현상은 관찰되지 않았음
- 숙취 개선효능 유산균 5종에 대해 생화학적 특성 분석을 통한 젤라틴 액화 반응 및 유해 대사 산물인 urea 분해 반응 분석을 통한 안전성을 검증함
- 5종의 유산균을 산성과 담즙염에 대한 내성과 장 세포 부착능 실험을 수행하여 내산성, 내담즙성 및 장내 안정성을 확보하고 있는지 확인하였음

3) 대량 생산 표준화

(1) 대량 배양조건 확립 결과

① 최적의 배지 조성, 동결건조보호제 개발

- 후보 유산균 5종에 대한 배양 최적화를 위하여 각 유산균 배양에 최적화된 배지의 조성 과 동결 건조 보호제를 개발.

균주	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
배지	F ‘	기본배지	B	A’	F
동결건조보호제	C	D	B’	D	F
원말 생균수 (CFU/g)	2,700억	7,200억	6,000억	2,500억	4,500억

표 34. 최적의 배지 조성 및 동결 건조 보호제

- *Lactobacillus brevis* WiKim0168 은 B 조성 배지와 B’ 동결 건조 보호제가 우수하여 대량 배양 조건으로 확정 함,
- *Leuconostoc mesenteroides* WiKim0172 은 F 조성 배지와 F 동결 건조 보호제가 우수하여 배양배양 조건으로 확정 함,

② 후보 균주의 열안정성 확인

- 후보 유산균 5종에 대한 대량 배양 공정 최적화를 위하여 균주의 열안정성을 검토함. 최적의 배지와 동결건조보호제를 선정하고 5종의 후보 균주의 열 안정성이 우수함을 확인함.

균주	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)		<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)		<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)		<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)		
경시온도	40℃										
투입 생균수 (CFU/g)	2,000억		3,400억		3,000억		2,000억		2,000억		
생존 원말 생균수 (CFU/g)	1주	700억	35.0%	950억	27.9%	2,200억	73.3%	1,200억	60.0%	1,250억	62.5%
	2주	120억	6.0%	450억	13.2%	1,500억	50.0%	920억	46.0%	1,020억	51.0%
	3주	10억	0.5%	350억	10.3%	1,050억	35.0%	500억	25.0%	500억	25.0%
	4주	-	-	300억	8.8%	700억	23.3%	350억	17.5%	260억	13.0%

표 35. 최적 배양조건으로 생산된 균주 5종의 40℃ 경시안정성 결과

(2) 대량 배양 공정 표준화

- 선정된 배지와 동결 건조 보호제를 토대로 400L급 대량생산 공정을 수행하여 공정을 표준화하였으며, 대량 배양 결과 및 세계김치연구소의 효능 연구 결과를 종합하여 선정된 균주 2종에 대한 800L 대량 배양 공정 표준화를 완료함.

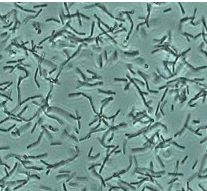
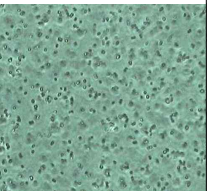
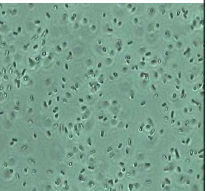
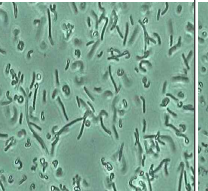
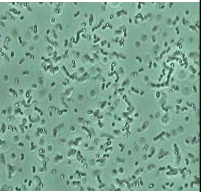
균주	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
배양액 생균수 (CFU/ml)	20억	60억	20억	20억	22억
현미경 사진					
OD	9.5	8.0	4.0	8.2	3.5
pH	6.04	5.58	5.52	5.52	5.50
원말 생산량(g)	5500g	1100g	700g	3000g	750g
원말 생균수(CFU/g)	1700억	7500억	5500억	1000억	4000억

표 36. 후보 균주 5종 400L 대량 시생산 결과

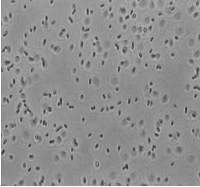
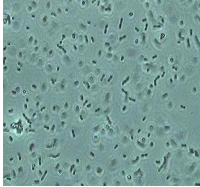
균주	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)
배양액 생균수 (CFU/ml)	30억	30억
현미경 사진		
OD	4.6	4.0
pH	5.45	5.60
원말 생산량(g)	2000g	2000g
원말 생균수(CFU/g)	5500억	4000억

표 37. 최종 선별 균주 2종 800L 대량 시생산 결과

(3) 경시안정성 시험

① 열안정성 확인을 위한 가혹시험

- 최적화 공정을 통해 Pilot 생산된 균주들을 40° C 가혹조건에서 1주일 간격으로 총 4주간 열 안정성 확인

	Lac. paracasei WiKim0171 (Wilac L001)	Ped. acidilactici WiKim0170 (Wilac L002)	Lac. brevis WiKim0168 (Wilac L003)	Lac. curvatus WiKim0169 (Wilac L005)	Leu. mesenteroides WiKim0172 (Wilac L005)
	40° C				
0	2000	3000	3000	1000	3000
1	920	1000	1650	750	1900
2	450	790	1300	580	1200
3	140	320	1000	350	900
4	-	65	750	270	470

표 38 후보 균주 5종 4주 가혹경시 안정성 시험 결과

(단위: 10⁸ CFU/g)

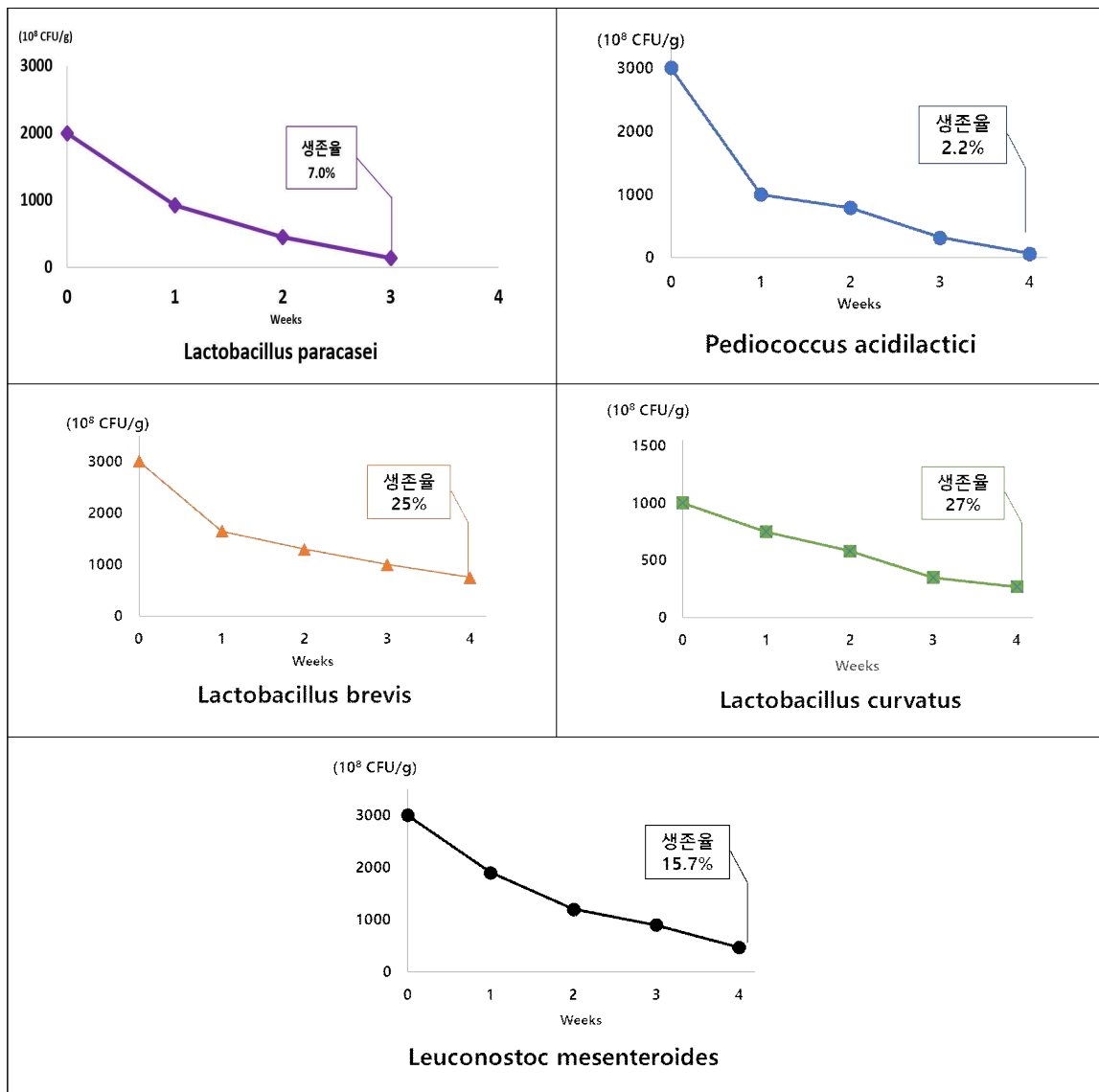


그림 79. 후보 균주 5종 4주 가혹경시 안정성 시험 결과(그래프)

② 최종 선정된 균주 2종에 대한 25° C, 35° C, 40° C 경시안정성 시험

○ *Lactobacillus brevis* WiKim0168(Wilac L003)

- 최적화 공정을 통해 Pilot 생산된 균주들을 25° C, 35° C, 40° C 온도 조건에서 1주일 간격으로 총 8주간 안정성 확인

	Lactobacillus brevis WiKim0168(Wilac L003)		
경시온도	25° C	35° C	40° C
0 주차	5500		
1 주차	4554	3616	3509
2 주차	4301	3198	3153
3 주차	4070	2887	2493
4 주차	3995	2590	1521
5 주차	3777	2276	600
6 주차	3451	2033	483
7 주차	3370	1793	210
8 주차	3210	1570	143

표 39. *Lac. brevis* WiKim0168(Wilac L003) 8주 상온 및 가혹경시 안정성 시험 결과
(단위: 10⁸ CFU/g)

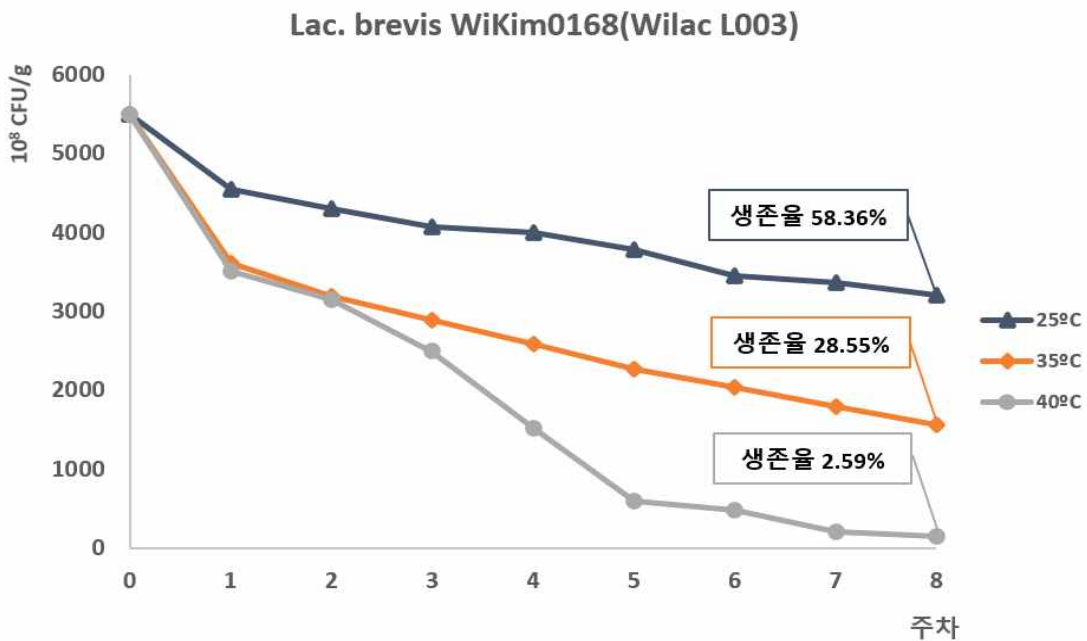


그림 80. *Lac. brevis* WiKim0168(Wilac L003) 8주 상온 및 가혹경시 안정성 시험 결과(그래프)

○ *Leuconostoc mesenteroides* WiKim0172(Wilac L005)

- 최적화 공정을 통해 Pilot 생산된 균주들을 25° C, 35° C, 40° C 온도 조건에서 1주일 간격으로 총 8주간 안정성 확인

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172(Wilac L005)		
경시온도	25° C	35° C	40° C
0 주차	4000		
1 주차	2496	1420	584
2 주차	2012	908	60
3 주차	1712	744	36
4 주차	1476	568	32
5 주차	1264	524	
6 주차	1004	476	
7 주차	804	388	
8 주차	648	329	

표 40. *Leu. mesenteroides* WiKim0172(Wilac L005) 8주 상온 및 가혹경시 안정성 시험 결과 (단위: 10⁸ CFU/g)

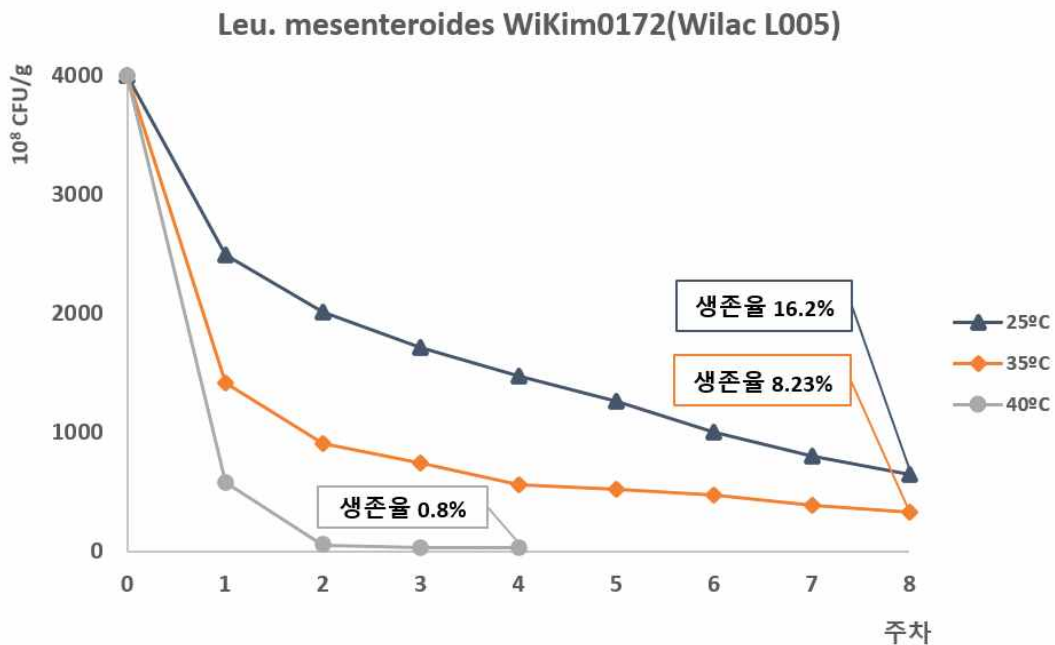


그림 81. *Leu. mesenteroides* WiKim0172(Wilac L005) 8주 상온 및 가혹경시 안정성 시험 결과(그래프)

(4) 원료 제조과정 확립

① 표준화된 공정으로 제조 방법 확립 및 제조공정도 확보 완료

제조 방법 확립

- 1) 원료 : 정해진 배합비의 원료를 건강기능식품공전, 식품공전 및 식품첨가물공전에 적합하게 사용한다.
- 2) 칭량 : 원료를 전자저울(0.001 g - 150 kg)로 각각 칭량한다.
- 3) 멸균 : 121°C에서 15분 이상, 1.2 kg/cm² 이상 스팀압으로 배지를 멸균한다.
- 4) 배양 : 멸균된 배지에 각 종균을 접종하고, 37°C에서 12시간 이상 배양한다.
- 5) 원심분리 : 배양액을 15,000rpm 이상으로 원심분리하여 균체만을 분리, 회수한다.
- 6) 동결건조 : 혼합탈지분유(탈지분유, 유청분말), 유당혼합제제(유당, 텍스트린), 트레할로스, 백설탕, 유청분말, D-솔비톨, 텍스트린, β-시클로덱스트린, 알긴산나트륨, 레시틴, 호박가루, 시수를 함유한 멸균된 혼합액과 회수된 균체가 잘 코팅될 수 있도록 혼합한 후에 동결건조 한다.
- 7) 분쇄 : 동결건조된 균원말을 분쇄기를 이용하여 균질하게 분쇄한다.
- 8) 혼합 : 동결건조된 균원말 40.0%, 혼합탈지분유(탈지분유, 유청분말), 유당혼합제제(유당, 텍스트린), 트레할로스, 백설탕, 유청분말, D-솔비톨, β-시클로덱스트린, 알긴산나트륨, 레시틴, 호박가루)와 텍스트린 30.0%, 분말결정포도당 30.0%를 투입한 후 15 rpm으로 10분 이상 교반, 혼합한다.
- 9) 검사 : 건강기능식품규격에 의한 검사를 실시한다.
- 10) 포장 : 포장용량(10 g ~ 20 kg)별로 파우치 포장 후 외(박스)포장(5 kg, 10 kg, 20 kg)하여 유통기간을 표시한다.
- 11) 보관, 출고: 규격에 적합한 제품만을 보관, 출고한다.

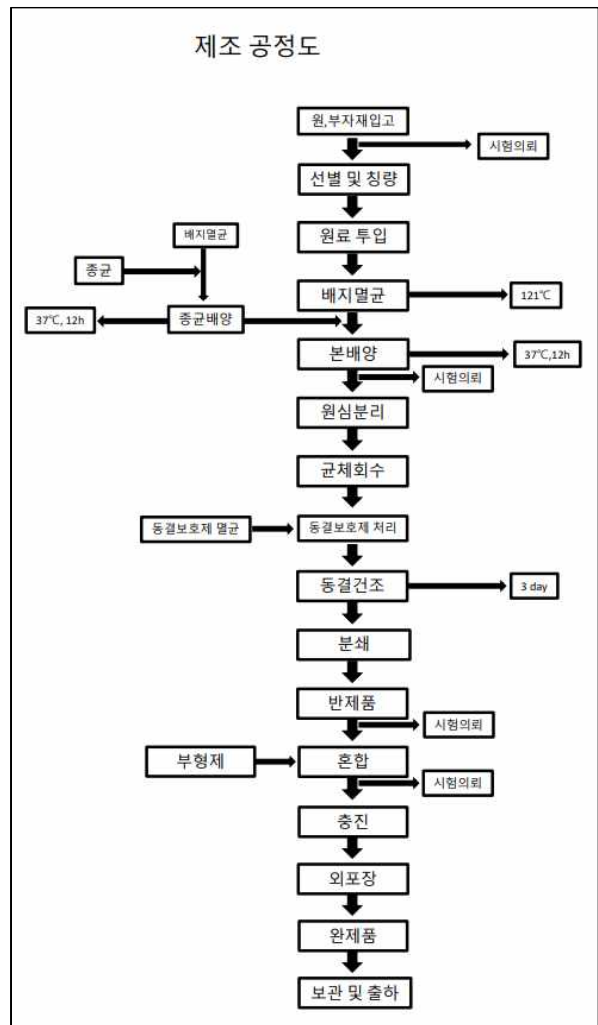


그림 82. 제조공정도

(5) 품목제조보고서 및 기준 규격 설정

① 단일 균주 5종(L001~L005) 및 최종 선별 소재인 와이락 엘 복합유산균(L003+L005 1:1 복합물) 품목제조보고서 완료

<p>락티카제이바실러스 파라카제이 Wikim0171(Wilac L001)</p>	<p><i>Pediococcus acidilactici</i> Wikim0170(Wilac L002)</p>	<p><i>Lactobacillus brevis</i> Wikim0168(Wilac L003)</p>
<p><i>Lactobacillus curvatus</i> Wikim0169(Wilac L004)</p>	<p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> Wikim0172(Wilac L005)</p>	<p>와이락 엘 복합유산균 (L003+L005)</p>

② 2종 복합 유산균 (와이락 엘 복합유산균:L003+L005 복합물)의 기준규격 설정

- 기준 규격(Specification) 설정
- 프로바이오틱스 수: 2.0×10^{11} CFU/g 이상
- 성상: 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 노랑색의 분말
- 이물: 불검출
- 대장균군: 음성
- 황색포도상구균: 음성
- 리스테리아: 음성
- 살모넬라: 음성




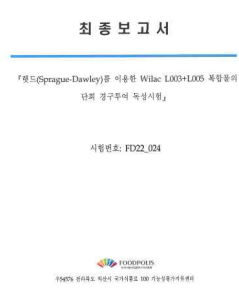



시험성적서 (Certificate of Analysis)		
제품명 : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> L005 + <i>Levilactobacillus brevis</i> L003 혼합물		생산 Lot : 22F0720(L005) 22F0818(L003)
		제조일 : 2022. 12. 14
ITEM	SPECIFICATION	RESULT
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 노랑색의 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 노랑색의 분말
이물질	불량물	불량물
프로바이오틱스수	2.0 x 10 ¹¹ CFU/g 이상	4.0 x 10 ¹¹ CFU/g
대장균군	음성	음성
황색모도상구균	음성	음성
리스테리아	음성	음성
살모넬라	음성	음성
시험기준 및 방법은 건강기능식품 공전의 분석법에 준합니다.		
		2022. 12. 14.
		승인자 : 
메디오젠 제품은 우수한 제조기술과 최적인 품질을 유지하는 유산균입니다.		
 http://www.mediojen.co.kr 본사/공장 충북 제천시 바이오밸리1로 120 (우)290-250 TEL. 043-644-4216-7 / FAX. 043-644-4215		 제2012-대전경-0002호 BANGJIB 제6065-1096호

그림 83. 와이락 엘 복합 유산균의 COA

4) GLP안전성 시험 자료 확보

- GLP 독성시험기관을 통해 최종 선정 소재인 와이락 엘 복합유산균(L003+L005)에 대한 유전독성 3종 시험 및 단회투여독성시험 안전성 검증 완료

 <p>최종보고서</p> <p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> W00m0168 + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> W00m0172 복합물 * Leuconostoc mesenteroides W00m0172 복합물 * Chinese Hamster Lung(CH2) 세포를 이용한 염색체이상시험</p> <p>C22V0-0460</p> <p>경기도 수원시 영통구 영교로 107 실험연구동 3층</p>	 <p>최종보고서</p> <p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> W00m0168 + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> W00m0172 복합물 * Leuconostoc mesenteroides W00m0172 복합물 * Chinese Hamster Lung(CH2) 세포를 이용한 염색체이상시험</p> <p>C22V0-0460</p> <p>경기도 수원시 영통구 영교로 107 실험연구동 3층</p>	 <p>최종보고서</p> <p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> W00m0168 + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> W00m0172 복합물 * Leuconostoc mesenteroides W00m0172 복합물 * Chinese Hamster Lung(CH2) 세포를 이용한 염색체이상시험</p> <p>C22V0-0470</p> <p>경기도 수원시 영통구 영교로 107 실험연구동 3층</p>	 <p>최종보고서</p> <p><i>Leuconostoc mesenteroides</i> W00m0168 + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> W00m0172 복합물 * Leuconostoc mesenteroides W00m0172 복합물 * CRJ 마우스를 이용한 스펙시험</p> <p>C22M0-0460</p> <p>경기도 수원시 영통구 영교로 107 실험연구동 3층</p>
단회투여독성 시험	복귀돌연변이 시험	염색체이상 시험	소핵시험(마우스)

(1) 단회투여독성시험

- 시험 결과, 시험물질의 모든 투여용량에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 이상증상, 체중변화 및 부검 소견은 관찰되지 않았음
- 이상의 결과로부터, 와이락 엘 복합유산균(L003+L005)을 단회 경구 투여한 결과, 개략의 치사량은 암·수 모두 6,600 mg/kg(6.6x10¹⁰ CFU/kg)을 상회하는 것으로 판단됨.

(2) 유전독성시험

① 복귀돌연변이

- 시험 결과, 대사활성계 존재 하 및 부재 하의 모든 균주의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 시험물질(와이락 엘 복합유산균)에 의한 복귀돌연변이 콜로니수의 용량의존적인 증가가 관찰되지 않았음
- 한편, 양성대조군의 복귀돌연변이 콜로니수는 음성대조군에 비해 현저하게 증가하여 뚜

몇한 복귀돌연변이 양성반응을 나타내었음.

- 이상의 결과로부터, 와이락 엘 복합유산균(L003+L005)은 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 최종 판단됨

②소핵시험

- 시험 결과, 시험물질군(와이락 엘 복합유산균)에서 다염성 적혈구 중 소핵 다염성적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 증가가 관찰되지 않았음. 또한, 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도는 모든 투여 용량군에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았음
- 반면, 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵 다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의하게 증가하였음
- 이상의 결과로부터, 시험물질 와이락 엘 복합유산균(L003+L005)은 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 최종 판단됨

③ 염색체이상시험

- 대사활성계 존재 하 및 부재 하의 시험 물질(와이락 엘 복합유산균) 처리군 모두 염색체이상 세포가 음성 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가되지 않았음
- 또한 양성 대조군의 구조적 이상세포는 음성 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하여 시험이 적절하게 수행되었음을 확인하였음
- 이상의 결과로부터, 시험물질(와이락 엘 복합유산균(L003+L005)은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 최종 판단됨

5) 인체적용시험 수행 결과

(1) 인체적용시험 숙취 개선 유효성 평가지표 및 결과 요약

표 41. 인체적용시험 결과 요약

시험물질	대상자	섭취량 /기간	평가지표	결과
1.와이락 엘 복합유산균 2.와이락 숙취 L35	<p>[선정기준]</p> <p>1.만 19세 이상, 만 40세 이하인 자</p> <p>2.방문에 측정된 체질량지수(BMI)가 18.5 kg/m² 이상, 25 kg/m² 미만인 자</p> <p>3.주량이 소주 1~3병 사이이며, 음주 후 숙취경험이 있는 자</p> <p>4.인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험 참여에 동의하고, 서면 동의서(Informed Consent Form)에 서명한 자</p> <p>[제외대상]</p> <p>1.알코올 대사장애, 통풍, 위장관 질환, 간 질환(B형, C형 간염 보균자, 알코올성 간질환이 있는 경우 등), 심혈관계(고혈압 등), 면역계, 호흡기계, 내분비계(당뇨 등), 간 및 담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경계, 근골격계, 정신성, 감염성 질환 및 악성종양 등으로 현재 치료 중인 자</p> <p>2.알코올 분해 유전자검사 결과, ALDH2 유전자가 Homo</p>	<p>[섭취량 /섭취기간]</p> <p>1회 7캡슐을 물과 함께 섭취 /단회 섭취</p>	<p>1.혈중알코올, 아세트알데하이드 농도</p> <p>2.AHS</p> <p>3.숙취 증상 설문</p> <p>4.혈중 알코올 농도0.03% 이하 도달까지의 소요시간</p>	<p>[유효성 평가변수]</p> <p>1. 혈중 알콜 농도: 감소</p> <p>2. 혈중 아세트알데하이드 농도: 유의 감소 (vs. 대조군, p<0.05)</p> <p>3. AHS 증상: 감소</p>

	<p>Type인 자</p> <p>3.방문1 기준 소화성 궤양 및 역류성 식도염 환자</p> <p>4.인체적용시험용 식품 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계질환(예: 크론병)이나 위장관계 수술(단, 단순 충수돌기 절제술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자</p> <p>5.방문1 기준 알코올 사용 장애 또는 알코올 중독자</p> <p>6.방문1 기준 1주 이내에 음주를 한 자</p> <p>7.알코올 대사에 영향을 미칠 것으로 판단되는 약물 (Antabuse계 약물 등) 또는 식이보충제, 위장관 출혈의 위험이 있는 약물[와파린(Warfarin), 클로피도그렐(Clopidogrel), 아스피린(Aspirin), NSAIDs, 기타 해열진통제 및 소염진통제 등]을 지속적으로 복용하고 있는 자</p> <p>8.방문1 기준 2주 이내에 간기능 개선과 관련된 의약품 및 건강기능식품을 복용한 자</p> <p>9.방문1 기준 1개월(30일) 이내에 약물 대사 효소 유도 및 억제 약물(Barbiturates, Griseofulvin, Rifampin, Erythromycin, Isoniazid, Cimetidine, Omeprazole 등)을 복용한 자</p> <p>10.방문1 기준 1개월 이내에 항생제, 정장제를 투여한 자</p> <p>11.방문1 기준 1개월 이내에 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 지속적으로(주 4회이상) 유산균 제품을 섭취한 자</p> <p>12.Creatinine이 실시기관 정상 상한치의 2배 이상인 자</p> <p>13.AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 실시기관 정상상한치의 3배 이상인 자</p> <p>14.갑상선 질환자</p> <p>15.임신 중이거나 수유부 또는 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 자</p> <p>16.방문1 기준 1개월 이내에 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자</p> <p>17.본 인체적용시험용 식품 성분에 민감하거나 알레르기가 있는 자</p> <p>18.기타 사유로 시험자가 부적합하다고 판단하는 자</p>			
--	--	--	--	--

① 혈중 아세트알데하이드 농도

- 음주 전, 후 혈중 아세트알데하이드 농도를 측정하여 ‘와이락 엘 복합유산균’, ‘와이락 속취 L35’ 과 대조식품을 비교한 결과 ‘와이락 엘 복합유산균’ 그룹은 혈중 아세트알데하이드 농도가 음주 후 15분에 26.7%, 30분에 25.2%, 1시간에 26.4% 감소하였으며 통계적으로 유의한 차이를 보임.
- 또한 ‘와이락 속취 L35’ 그룹의 혈중 아세트알데하이드 농도는 음주 후 15분에 16.4%, 30분에 15.8%, 1시간에 16.5%, 2시간에 18.7%, 6시간에 30.1% 감소하였으며 통계적으로 유의한 차이를 보임.
- 혈중 아세트알데하이드 농도에 대한 AUC 또한 ‘와이락 속취 L35’ 섭취 그룹에서 22.7% 감소하여 통계적으로 유의한 차이를 나타냄.
- 본 결과를 통해 ‘와이락 엘 복합유산균’ 과 ‘와이락 속취 L35’ 는 음주로 인해 발생하는 아세트알데하이드를 제거하여 속취 해소 도움을 줄 수 있음을 확인하였음.

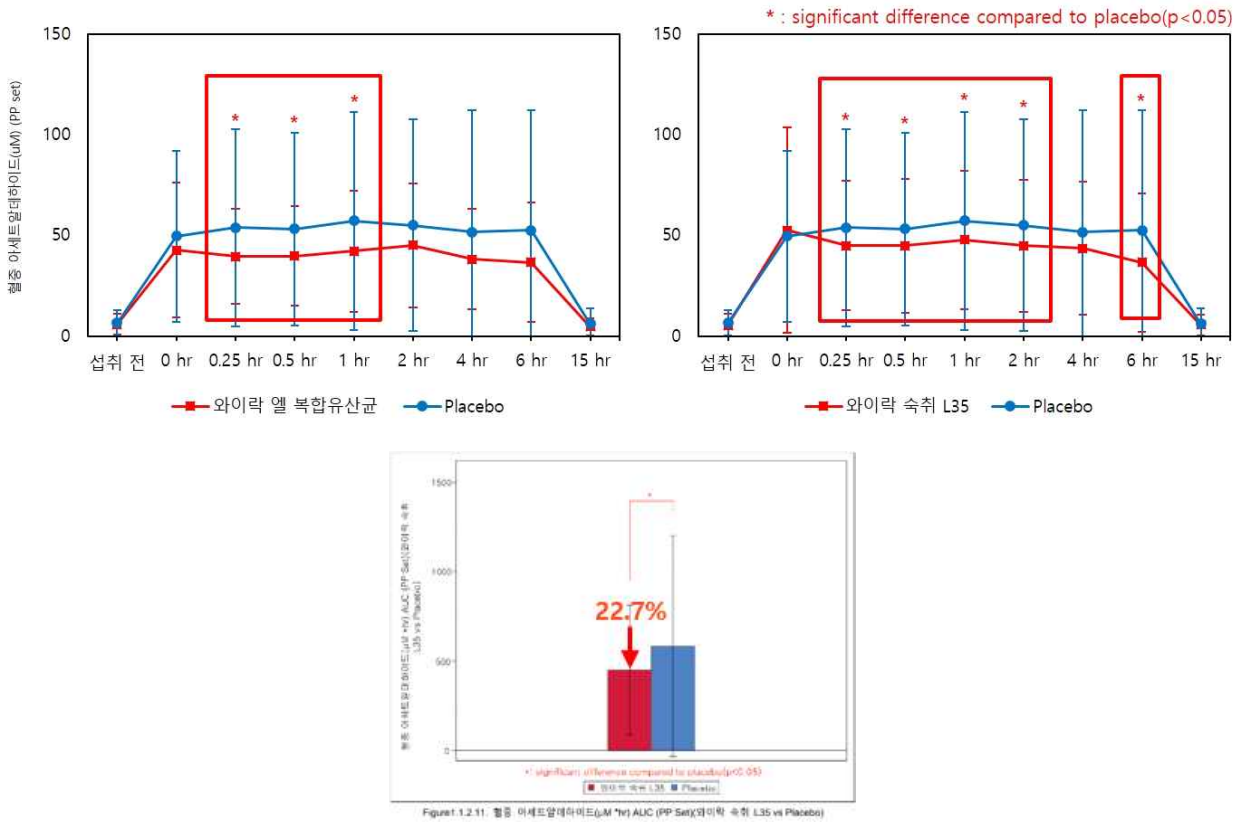


그림 84. 혈중 아세트알데하이드 농도 감소 효과

② 혈중 알코올 농도

- 30분간 음주를 진행한 직후 채혈한 혈액의 혈중알코올농도는 대조군에서 0.077%까지 증가하였고, ‘와이락 엘 복합유산균’ 그룹은 0.065%로 확인되어 음주 직후(0hr)에 대한 혈중 알코올 농도는 ‘와이락 엘 복합유산균’ 그룹이 15.6% 낮은 경향을 보임.
- ‘와이락 숙취 L35’ 는 음주 30분후까지 대조군대비 혈중 알코올 농도가 최대 6.5% 낮은 경향을 보임.

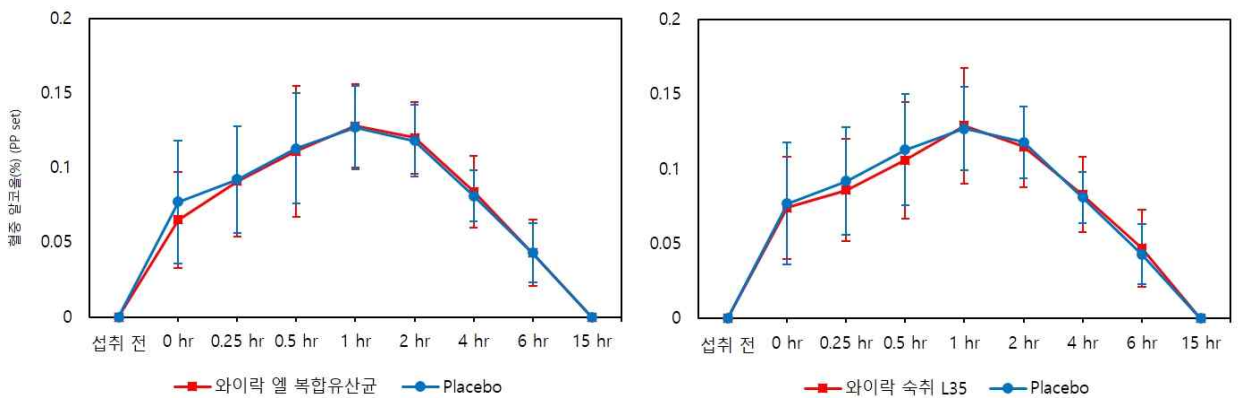


그림 85. 혈중 알코올 농도 감소 효과

③ 숙취 증상 설문조사 (AHS, HS)

- 음주 후 경과 시간에 따라 대조군은 3hr에 AHS 총점이 12.80, 6hr에 11.68으로 조사된 반면, ‘와이락 엘 복합유산균’ 그룹은 3hr에 11.32, 6hr에 10.16으로 나타남. 이는 실험참가자들이 유산균을 섭취한 뒤 느끼는 주관적인 숙취증상이 대조군보다 감소하는 하였음을 의미함.

- AHS 중 갈증 항목에서 음주 15시간 후 ‘와이락 숙취 L35’ 그룹의 갈증을 느끼는 정도가 대조군 대비 13.5% 감소함이 통계 유의적인 차이를 나타내었음.
- HS 중 수면곤란 항목에서 음주 6시간 후 ‘와이락 숙취 L35’ 그룹의 수면곤란 수준이 38.5% 개선되어 통계 유의차를 나타내었음.
- 본 연구과제를 통해 개발한 숙취 해소 유산균인 ‘와이락 엘 복합유산균’은 음주 후 발생하는 숙취 증상인 갈증과 수면곤란을 개선하는 것으로 확인됨.

음주 후 경과시간	그룹	숙취 불쾌감	갈증	피로	두통	현기증	식욕부진	위장장애	구역질	두근거림	총 점
3hr	대조군	2.24	3.80	2.96	1.20	0.84	0.52	0.28	0.36	0.60	12.80
	와이락 엘 복합유산균	1.48	3.60	2.80	1.24	0.72	0.44	0.32	0.44	0.28	11.32
	와이락 숙취 L35	1.68	3.40	2.72	0.88	0.56	0.72	0.44	0.36	0.44	11.20
6hr	대조군	2.00	3.64	2.60	1.72	0.40	0.68	0.12	0.40	0.12	11.68
	와이락 엘 복합유산균	1.44	3.40	2.56	1.72	0.44	0.48	0.08	0.00	0.04	10.16
	와이락 숙취 L35	1.80	3.28*	2.80	1.28	0.36	0.36	0.32	0.28	0.24	10.72
15hr	대조군	1.04	3.84	2.08	0.32	0.08	0.12	0.04	0.08	0.04	7.64
	와이락 엘 복합유산균	0.64	3.36	1.76	0.84	0.28	0.44	0.20	0.20	0.00	7.72
	와이락 숙취 L35	0.80	3.32	2.04	0.40	0.00	0.48	0.16	0.04	0.00	7.24

음주 후 경과시간	그룹	집중력 저하	기운 없음	땀나는 정도	수면 곤란	졸음	기억단절	근육통	설사	자극에 민감	총 점
3hr	대조군	1.88	1.44	0.20	0.52	3.12	0.40	0.16	0.00	0.16	7.88
	와이락 엘 복합유산균	1.84	1.28	0.28	0.68	2.80	0.32	0.00	0.00	0.28	7.48
	와이락 숙취 L35	1.88	1.24	0.16	0.64	2.80	0.44	0.00	0.00	0.40	7.56
6hr	대조군	1.28	1.20	0.04	0.52	3.04	0.12	0.00	0.00	0.16	6.36
	와이락 엘 복합유산균	1.48	1.48	0.12	0.40	2.72	0.28	0.04	0.16	0.12	6.80
	와이락 숙취 L35	1.52	1.76	0.04	0.32*	2.92	0.40	0.32	0.00	0.16	7.44
15hr	대조군	0.68	0.96	0.12	1.00	0.40	0.20	0.08	0.16	0.00	4.68
	와이락 엘 복합유산균	0.76	1.12	0.04	0.60	0.32	0.04	0.08	0.28	0.24	4.64
	와이락 숙취 L35	0.96	1.04	0.08	1.24	0.44	0.08	0.08	0.16	0.20	5.24

표 42. 숙취 증상 설문조사 결과

④ 피부 수분량

- 음주 1시간 후 대조군은 피부 수분량은 56.7 A.U이었으나 ‘와이락 엘 복합유산균’ 그룹은 57.1 A.U, ‘와이락 숙취 L35’는 57.35 A.U로 대조군보다 증가하는 경향을 보였으며, ‘와이락 엘 복합유산균’ 그룹은 음주 후 15시간에도 대조군 대비 피부 수분량이 0.5% 증가하여 피부 수분의 손실이 적은 경향이 확인됨.

⑤ 피부 홍반 지수

- 음주 1시간 후 대조군은 홍반수치는 387.96 E.I이었으나 ‘와이락 숙취 L35’ 그룹은 374.84 E.I로 대조군보다 13.12 E.I 낮은 경향을 보였으며, 음주 15시간 후에도 홍반수치는 337.07 E.I로 대조군보다 1.8% 낮은 경향이 확인됨.

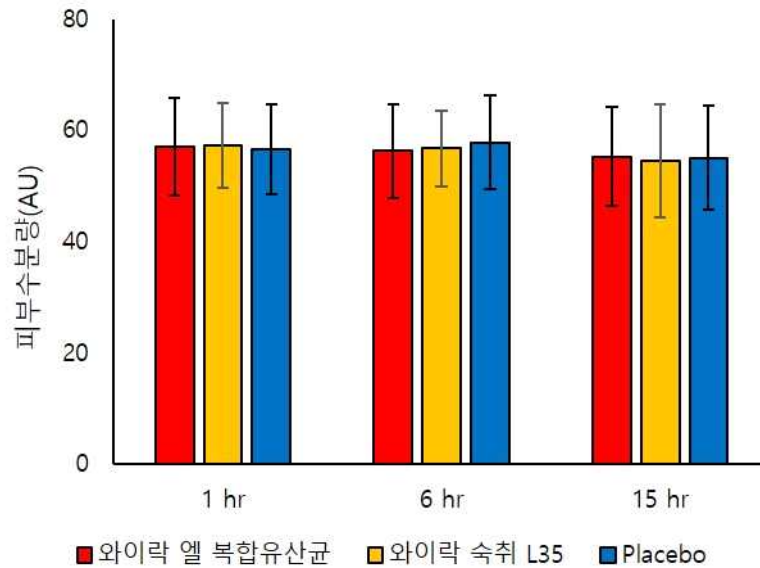


그림 86. 알코올 섭취 후 시간에 따른 대조군과 유산균 군의 피부 수분량 감소 비교

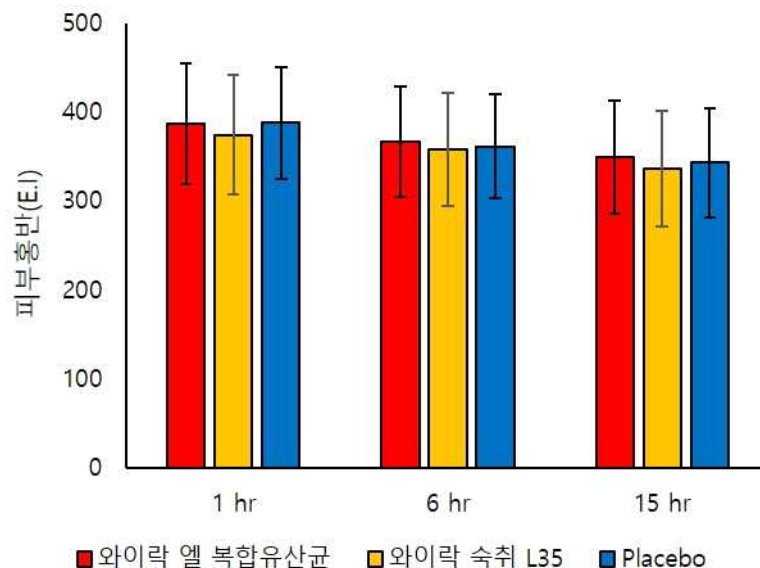


그림 87. 알코올 섭취 후 시간에 따른 대조군과 유산균 군의 피부 홍반 지수 비교

(2) 인체적용시험 안전성 평가지표 및 결과 요약

① 이상반응

- 총 4명의 인체적용시험 대상자에서 4건의 이상반응이 있었으나 해당 시험과 관련이 없다고 판단되었으며 모두 중도 탈락 되었음. 중대한 이상반응은 발생하지 않았음

② 임상병리검사(혈액학적/혈액 화학적, 뇨검사)

- 혈액학적검사: 모든 항목에서 유의적 차이가 없었다.
- 혈액화학적검사: 모든 항목 구간 유의 차이 없음. 시험자에 의해 임상적으로 의미가 있다고 판단된 대상자는 없었다.
- 뇨검사: 모든 항목에서 유의적 차이가 없었다.
- 활력징후(혈압, 맥박): ‘와이락 숙취 L35’ 섭취 그룹의 이완기 혈압이 섭취 15시간 후 69.36 mmHg으로 섭취 전 대비 4.64 mmHg만큼 증가하였으나, 정상혈압 범위이기 때

문에 안전성에 문제는 없는 것으로 판단됨. 그 외 활력징후에서는 유의적 차이가 나타나지 않음.

6) 제품화

(1) 제형개발

① 젤리, 캡슐, 견과류, 음료용 분말 및 필름 제형 등 다양한 제형을 적용

<p>• 젤리형</p>	<p>숙취 해소에 효과가 있는 과일을 기본 베이스 맛으로 선정하여 젤리형 시제품 개발</p>
<div style="text-align: center;">  <p style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> 사과맛 박카스맛 매실맛 </p> <p style="margin-top: 20px;">그림81. 숙취 해소 시제품 - 젤리형</p> </div>	
<p>• 캡슐형</p>	<p>와이락 엘 복합유산균(L003+L005)를 기반으로 한 캡슐 제형으로 섭취가 용이한 제형. 이러한 제형은 해외수출 전용으로 해외 소비자들을 겨냥한 제형 개발임</p>
<div style="text-align: center;">  <p style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> 곡물맛 분유맛 </p> <p style="margin-top: 20px;">그림82. 숙취 해소 시제품 - 캡슐형</p> </div>	
<p>• 견과류</p>	<p>숙취 해소 안주류 개발, 기존 안주로 많이 섭취하는 다양한 맛의 씨즈닝 아몬드에 와이락 엘 복합유산균(L003+L005) 분말을 첨가한 아몬드 안주 개발</p>



그림 83 숙취 해소 시제품 - 아몬드

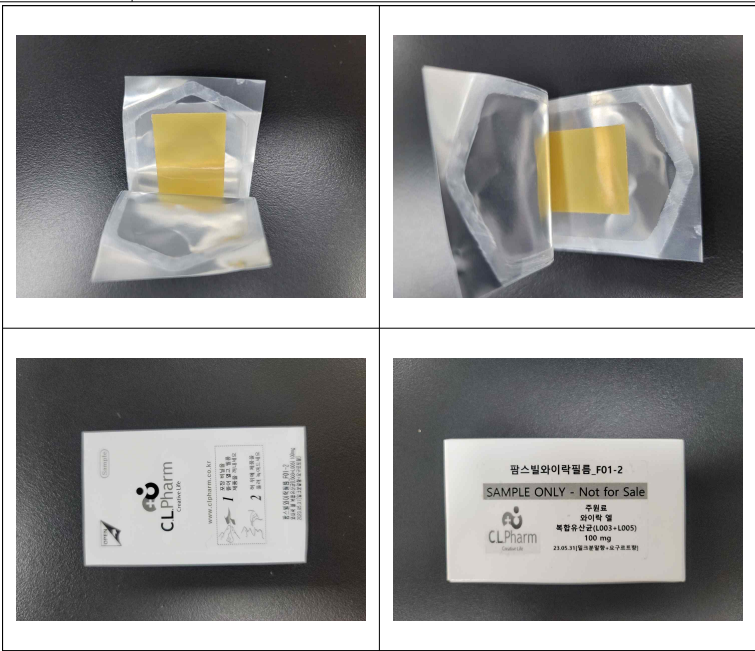
• 음료용 분말 | 숙취로 인한 갈증에 도움을 줄 수 있는 전해질과 과일류 플레이버, 와이락 엘 복합유산균(L003+L005)을 함유한 음료형 분말 제형으로 물에 타서 마시는 분말 제형 개발



5가지의 electrolytes
 숙취 해소 도움이 되는 과일 맛
 숙취 해소 유산균
 음주 후 탈수로 인한 피부 수분
 섭취 기능성 원료 함유

그림 84 숙취 해소 시제품 - 음료용 분말

• 필름형 | 숙취 해소에 도움을 줄수있도록 점막을 통해 빠른 흡수를 시킬 수 있는 와이락 엘 복합유산균(L003+L005)을 함유한 필름 제형 개발



• 이중 제형 | 서로 다른 제형의 제품을 한번에 섭취할수 있도록 제품을 개발하여 숙취 해소 효능의 시너지 효능 기대



② 인체적용시험식품 개발

인체적용시험식품 개발	인체적용시험용 시험식품(시험군 IP 및 Placebo IP) 개발

(2) 제품 패키지 디자인 개발

① MZ세대 타겟 직관적 디자인 개발





- 활깨유는 작관적인 속취 해소 느낌과 “유”는 유산균의 의미임
- 속취 살리도의 “살리도(Slidp)”는 스페인어로 “벗어나다, 빠져나오다”의 의미로 속취에서 빠져 나오다의 의미로 브랜드 및 스토리텔링 완료
- 제품화를 위한 디자인 베리에이션 작업실시
- 속취 해소 안주류의 경우 씨즈닝을 한 제품과 견과류에 취향에 따라 뿌려 먹을 수 있는 패키지로 디자인을 구성함



(3) 제품 품목신고

<p>발급번호: MAMK-AMMW-KGKD-RPQH-WHDD</p> <p>식품·식품첨가물 품목제조보고서</p> <p>※ 목적의 유무사항을 보고 작성하기 위하여, []에는 해당되는 곳에 √ 표를 합니다.</p> <p>보고인: 이병욱</p> <p>주소: _____</p> <p>영입소: 영입(상호) (주)맘스빌 영입등록번호 20200076937 소재지 서울특별시 강서구 마곡중앙8로3길 37(3층, 4층, 마곡동)</p> <p>식품의 유형 기타가공품 요청하는 품목제조보고번호 2020007693775</p> <p>제품명 숙취뽀개기</p> <p>소비기한 제조일로부터 24개월</p> <p>품질유지기한 _____</p> <p>원재료명 또는 성분명 및 배합비율 * 위력에 적용됩니다.</p> <p>용도·용법 맛장애 기재</p> <p>포장방법 및 포장재질 포장에 기재</p> <p>표장방법 및 표장단위 포장에 기재</p> <p>상상 크유의 향미가 있고 이며, 이취가 없으며 특색의 당근 소분</p> <p>위약성상 여부 []예 [√]아니오</p> <p>제품정보 · 수탁 영입소의 명칭 및 소재지: · 수탁 영입소의 영입의 종류: · 위약제조공장:</p> <p>품목의 특성 · 고열량·저열량 식품에 해당되는지 여부 []예 []아니오 · 영유아용으로 표시해 판매하는 식품에 해당되는지 여부 []예 [√]아니오 · 고영양원식품으로 표시해 판매하는 식품에 해당되는지 여부 []예 [√]아니오 · []영양성분 조절제품 []경도 조절제품 []색상 없음 · 기능성표시식품에 해당되는지 여부 []예 [√]아니오 · 살균·멸균 제품에 해당되는지 여부 [√]비살균 []살균 []멸균 · 영양성분 표시의무 식품에 해당되는지 여부 []예 [√]아니오</p> <p>기타 「식품위생법」 제37조제8항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.</p> <p>2024년 02월 26일 보고인 이병욱 (서명 또는 인)</p> <p>서울특별시 강서구청장 귀하</p> <p>품목제조보고번호: 2020007693775</p> <p>처리부서 보건소 위생관리과 처리자성명 김민아 처리일자 2024년 02월 29일</p>	<p>발급번호: MAMK-AMMW-UR2M-GHLZ-SEUT</p> <p>식품·식품첨가물 품목제조보고서</p> <p>※ 목적의 유무사항을 보고 작성하기 위하여, []에는 해당되는 곳에 √ 표를 합니다.</p> <p>보고인: _____</p> <p>주소: _____</p> <p>영입소: 영입(상호) (주)맘스빌 영입등록번호 20200076937 소재지 서울특별시 강서구 마곡중앙8로3길 37(3층, 4층, 마곡동)</p> <p>식품의 유형 기타가공품 요청하는 품목제조보고번호 2020007693776</p> <p>제품명 확깨유</p> <p>소비기한 제조일로부터 24개월</p> <p>품질유지기한 _____</p> <p>원재료명 또는 성분명 및 배합비율 * 위력에 적용됩니다.</p> <p>용도·용법 맛장애 기재</p> <p>포장방법 및 포장재질 포장에 기재</p> <p>표장방법 및 표장단위 포장에 기재</p> <p>상상 크유의 향미가 있고 이며, 이취가 없는 옅은 노란의 분말</p> <p>위약성상 여부 []예 [√]아니오</p> <p>제품정보 · 수탁 영입소의 명칭 및 소재지: · 수탁 영입소의 영입의 종류: · 위약제조공장:</p> <p>품목의 특성 · 고열량·저열량 식품에 해당되는지 여부 []예 []아니오 · 영유아용으로 표시해 판매하는 식품에 해당되는지 여부 []예 [√]아니오 · 고영양원식품으로 표시해 판매하는 식품에 해당되는지 여부 []예 [√]아니오 · []영양성분 조절제품 []경도 조절제품 []색상 없음 · 기능성표시식품에 해당되는지 여부 []예 [√]아니오 · 살균·멸균 제품에 해당되는지 여부 [√]비살균 []살균 []멸균 · 영양성분 표시의무 식품에 해당되는지 여부 []예 [√]아니오</p> <p>기타 「식품위생법」 제37조제8항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.</p> <p>2024년 02월 26일 보고인 이병욱 (서명 또는 인)</p> <p>서울특별시 강서구청장 귀하</p> <p>품목제조보고번호: 2020007693776</p> <p>처리부서 보건소 위생관리과 처리자성명 김민아 처리일자 2024년 02월 29일</p>
<p>품목신고증 “숙취뽀개기”</p>	<p>품목신고증 “확깨유”</p>

- 제품 생산을 위한 품목 신고 완료
- 소환제품과 분말 제품의 출시를 위한 품목 신고 완료

(4) 최종 제품화

① 필름형 - 열에 대한 안정성 확보 기술을 접목한 필름형 제품 개발



② 샷 & 이중 제형 - 음료형 샷과 2개의 제형이 합쳐진 제형



2. 정량적 연구개발성과

1) 단계별 성과 지표 및 목표치

성과지표명		단계	1단계(21~22)	2단계(23)	계	가중치(%)
전담기관 등록·기탁지 표	[등록]특허 출원	목표(단계별)	1	1	2	5
		실적(누적)	2	2	4	
	[등록]특허 등록	목표(단계별)	-	1	1	10
		실적(누적)	-	2	2	
	[기탁]기술이전	목표(단계별)	-	1	1	10
		실적(누적)	-	2	2	
	[등록]고용창출	목표(단계별)	1	-	1	10
		실적(누적)	1	-	1	
	[등록]제품화	목표(단계별)	-	1	1	10
		실적(누적)	-	2	2	
	[기탁]균주기탁	목표(단계별)	2	-	2	10
		실적(누적)	5	-	5	
	[논문]SCI	목표(단계별)	-	1	1	-
		실적(누적)	-	1	1	
[논문]IF	목표(단계별)	-	3	3	-	
	실적(누적)	-	2.8	2.8		
연구개발과제 특성 반영 지표	학술발표	목표(단계별)	1	-	1	5
		실적(누적)	1	1	2	
	홍보 전시	목표(단계별)	-	2	2	10
		실적(누적)	3	2	5	
	인체 적용시험	목표(단계별)	-	1	1	5
		실적(누적)	-	1	1	
	사업화 매출액	목표(단계별)	-	2백만원	2백만원	5
		실적(누적)	-	2.64 백만원	2.64 백만원	
	계	목표(단계별)	5	11	16	100
		실적(누적)	12	15.8	27.8	170

* 1] 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균 Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 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, 설계 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).

2) 연구개발 성과 성능지표

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고수준 보유국/보유기 관	연구개발 전 국내 수준	연구개발 목표치		목표 설정 근거	목표달성도 (%)
			성능수준	성능수준	1단계(21년-22년)	2단계(23년)		
알코올에 대한 내성 검사	%	5	국내/10%	10%	10%	-	별첨 성능지표 1	100%
알코올 소비량 (알코올 대사 활성 분석)	%	5	미국/78.8%	78.8%	80%	-	별첨 성능지표 2	100%
혈중 알코올	%	10	미국/58%	50%	60%	-	별첨	100%

분해능 확인							성능지표 3	
혈중 간기능 개선 수치 분석	%	10	미국/ ALT 25% 이상 감소	ALT 25% 감소	ALT 25% 감소	-	별첨 성능지표 4	100%
행동 약리 실험	%	5	-	-	대조군 대비 감소	-	별첨 성능지표5	100%
유산균의 대량 공정개발 및 표준화	L	5	국내/10톤	-	800L	-	별첨 성능지표6	100%
안전성 검증	건	10	WHO/FAO	-	식품의약품안전처 고시 및 OECD기준 안전성 문제 없음	WHO/FAO기준 독성 없음	별첨 성능지표7	100%
안정성	CFU/ml	5	국내/10 ⁴ CFU/ml	-	10 ⁴ CFU/ml 이상	10 ⁴ CFU/ml 이상	별첨 성능지표8	100%
인체적용시험	건	10	-	-	IRB 승인	20-50명 완료	별첨 성능지표9	100%
제형 개발	건	3	간편 제형	스낵, 필름, 캔디류, 젤리 등	-	2건	별첨 성능지표10	100%
특허 출원 및 등록	건	10	-	-	2건	-	별첨 성능지표11	100%
제품화	건	6	-	숙취 해소제 기능성 표시 식품 없음	-	1건	별첨 성능지표12	100%
균주 기탁	건	6	-	-	2건	-	별첨 성능지표13	100%
기술이전	건	10	-	-	-	1건	기술이전	100%

*** 별첨**

◦ (성능지표 1)에 에탄올 농도에 따른 내성검사

- 멸균한 MRS 액체배지에 멤브레인 필터(membrane filter)로 제공한 7.5%, 10%, 15%, 20% 에탄올을 첨가한 후, MRS 액체배지에서 활성화시킨 유산균을 소정량 첨가하여 37 °C의 온도에서 24시간 동안 정치배양하고, 유산균의 균체량을 흡광도로 측정함
- 국내 유산균 함유 숙취 해소제 ‘칸의 아침’의 경우 락토바실러스 퍼멘텀과 락토바실러스 브레비스는 10% 알코올 환경에서는 100% 생장을 보였고, 20% 알코올을 포함하는 MRS 액체 배지에서도 80% 정도의 생장을 보였음

◦ (성능지표 2) 예) 알코올 소비량 분석 : ADH

- 알코올 대사 분해 효소인 알코올 분해효소(ADH) 활성 및 알데하이드 분해효소(ALDH) 활성이 우수한 균주를 선발하고 이에 따른 알코올 분해효소 활성을 측정함
- 체내 에탄올(ethanol) 섭취시 알코올 분해효소(alcohol dehydrogenase, ADH)에 의해 아세트알데하이드(acetaldehyde)로 분해되고, 아세트 알데하이드 분해효소(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)에 의해 최종적으로 아세테이트(acetate)로 분해됨
- 기술개발전 수준은 해외특허(미국)인 “COMPOSITION FOR ALCOHOL OR ACETALDEHYDE DEGRADATION COMPRISING PROBIOTICS(Pub. No.: US2018/0333441 A1, United States)”를 참고하여 설정함. *Lactobacillus gasseri* (LGA), *Lactobacillus casei* (LC5), *Bifidobacterium breve* (BR3), *Bifidobacterium lactis* (BL3) 4종을 혼합한 CBT4에 관한 알코올 저해 효과를 측정하였으며, 알코올 잔존량(%)는 21.2%, 아세트 알데하이드 잔존량 (%)로 4.7%로 기재됨. 이는 알코올 섭취 대사 과정에서 효소 활성이 활발해짐으로써 최종 산물인 acetate로 전환된 것으로 보임
- MRS 액체배지에 배양하여 유산균 균체만을 회수하고, phosphate buffer solution(pH 7.5)에 재현탁한 후, 얼음배스(Ice bath)에서 3분간 초음파 분쇄기로 균체를 파쇄함. 파쇄된 균체액을 4 °C의 온도에서 10000rpm의 조건으로 60분간 원심분리하여 유산균체의 세포질을 수확함. 알코올 분해 효소의 측정은 알코올을 기질로 하여 NAD 환원정도를 측정하였으며, 알데하이드 분해효소의 측정은 아세트 알데하이드를 기질로 하여 NAD 환원정도를 측정함. NADH 소비량을 확인하고, 이를 에탄올 소비량으로 환산하였다. 에탄올 소비량은 다음 계산식에 따라 계산함.
- 국내 유산균 함유 숙취 해소제 ‘칸의 아침’의 경우 락토바실러스 브레비스는 97.9% 정도의 알코올 소비량이 관찰됨

◦ (성능지표 3) 혈중 알코올 분해능 (숙취 해소효능): 혈중 alcohol 농도

- 실험동물에 알코올과 함께 선발된 균주를 경구 투여하고, 혈중 알코올 및 아세트알데하이드 농도를 확인함
- 기술개발전 수준은 해외특허(미국)인 “COMPOSITION FOR ALCOHOL OR ACETALDEHYDE DEGRADATION COMPRISING PROBIOTICS(Pub. No.: US2018/0333441 A1, United States)”를 참고하여 설정함. CBT4는 알코올 섭취군 대비 5시간 후 혈중 알코올이 58% 감소, 혈중 아세트알데하이드가 60% 감소함
- 혈중 알코올 농도 감소 효과를 측정하기 위해 실험동물에 유산균과 25%의 알코올을 같은 양으로 경구투여 하고 5시간 경과

- 후, 혈액을 채취하여 혈청 분리 후 에탄올측정키트(Sigma aldrich, USA)를 이용하여 에탄올의 농도를 측정함. 대조군과 비교하여 알코올 잔존량을 계산하고, 알코올 분해 효능을 환산함
- 최종 개발목표는 알코올 섭취 후 혈중 알코올 농도가 60% 이상 감소하는 유산균을 선발하고자 함
 - (성능지표 4) 혈중 간기능 개선 수치 분석
 - 실험동물에 알코올과 함께 선발된 균주를 경구 투여하고, 혈중 간기능 개선효과의 유효성 검사항목을 분석함
 - 혈액 중 Aspartate aminotransferase (AST) 및 Alkaline phosphatase (ALP) 수치 측정을 통해 급성 알코올 섭취에 의한 간 손상을 경감시킴으로써 간 보호 효능을 확인할 수 있음
 - 전 세계적으로 널리 사용되고 있는 *Lactobacillus rhamnosus* GG의 경우 알코올성 간질환 개선에 효과적이라고 보고됨. 에탄올 함유 식이를 통해 알코올성 지방간 유발 마우스 모델에 *Lactobacillus rhamnosus* GG를 8주 동안 섭취시에는 ALT 수치가 알코올 섭취 마우스 대비 25% 감소하였다고 보고된 “*Lactobacillus rhamnosus* GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury, The American Journal of Pathology, 2011 “을 참조하여 설정함
 - 혈중 ALT(GPT), AST(GOT), 중성지방, 총콜레스테롤, HDL, LDL,를 분석하고 간기능 효과에 대한 종합적인 해석
 - (성능지표5) 행동 약리 실험
 - 실험동물에 유산균과 대조군(PBS), 비교군(국내시판제품)을 투여하고 알코올을 복강 투여한 후 각각 5, 30, 60, 120, 180 및 300 분 뒤 운동 능력을 측정할수 있는 Rota-rod 기기 (2 ~ 16 rpm, 3분간 등가속 조건)에 운동 능력을 상실하여 하단의 발판으로 떨어지는데 걸리는 시간을 측정함
 - 실험동물에 유산균과 대조군(PBS), 비교군(국내시판제품)을 투여하고 알코올을 복강 투여함. 알코올 투여로 인해 수면에 돌입한 실험동물의 수면 각성을 판정하기 위해 LORR 실험법 (Loss of righting reflex test)을 사용함. 수면 상태에 돌입한 실험동물의 사지가 위를 향하도록 깔짚이 깔린 사육 케이지 안에 돌려 눕히고 이들이 수면에서 깨어나 사지를 아래로 하여 정자세로 돌아오는데 (60초 이내에 3회 이상 정자세로 돌아오는지 여부로 판정)까지 걸린 시간을 측정함
 - (성능지표6) 대량 공정
 - 유산균의 대량 배양을 위한 배지 조성과 배양 온도, 시간에 따른 생존율의 확인을 통한 대량 공정 개발
4L → 200 L → 400 L → 800L의 스케일 업을 통한 최종 스케일에서는 동결 건조 보호제를 개발
 - 동결 건조 보호제의 종류와 배합 비율, 동결 조건, 건조 시간에 따른 생존율 확인.
(생존율 (%))= 동결 건조 후 시료의 CFU값 / 동결 건조 전 시료의 CFU값 X 100)
 - (성능지표7) 안전성
 - 용혈반응 검사 : α형 (대조군인 β형 균주 *Bacillus cereus* 및 α형 균주 *Streptococcus mutans*와 비교)
 - 항생제 감수성 검사 : 10종(Ampicillin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Erythromycin, Gentamicin, Kanamycin, Penicillin, Rifampin, Tetracycline, Vancomycin)
 - 단회투여 독성, 유전자 변이 검사를 통한 음성 및 독성 없음
 - (성능지표8) 안정성

장내 안정성 : 내산성/내담즙성 검사

 - 내산성 검사는 pH 2에서 3시간 이상 생존수를 유지하며, 일반적으로 프로바이오틱스 균주는 pH 2에서 일반적으로 10⁴ CFU/ml 이하의 생존수를 보고되었으며, 내담즙산 검사에서는 0.3% 담즙삼염에서 유산균의 생존수가 10⁴ CFU/ml 이하로 담즙삼염에 민감하다고 보고됨.
 - 참고문헌: “전통발효식품에서 분리한 유산균의 항균활성 및 프로바이오틱스 기능성 연구, Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, 2017 “
 - 최종 개발목표는 10⁴ CFU/ml 이상 생존이 가능한 유산균을 발굴하고자 함.
 - (성능지표9) 인체적용시험
 - 개발한 유산균숙취 해소를 성인 남·여 24-50명을 대상으로 위약과 진약을 투여 후 체혈을 통한 혈중 에탄올 농도 검사 혈중 아세트알데하이드 등을 측정하기 위한 혈액 채취 시간 설정, 활력징후(혈압, 맥박) 등 신체 변화 항목 설정 등 성능지표 검사
 - (성능지표10) 제형 개발 2건
 - 스낵류 : 일반 식품 기준 규격 설정 및 관능 검사를 통한 최종 조건 확립
 - 필름형 제형 : 필름의 두께, 크기, 효능 함량과 안정성 확보 (40도, 습도 80% 에도 안정한 제형 기술개발)
 - 젤형 : 겔보다 진한 젤형으로 맛, 향기 관능평가 기준 확보
 - (성능지표11) 특허출원
 - 국내특허 출원 2건(상표 출원 포함)
 - (성능지표12) 제품화
 - 최종 제품 출시를 통한 품목 신고 등록
 - (성능지표13) 균주기탁
 - KCTC 특허 기탁
 - 특허균주 기탁 2건
 - (성능지표13) 기술이전 1건
 - 세계 김치연구소에서 개발한 숙취 해소 유산균에 대한 기술 이전 실시

3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Oral administration of Alcohol-Tolerant Lactic Acid Bacteria Alleviates Blood Alcohol Levels and Ethanol-Induced Liver Damage in Rodents	Journal of Microbiology and Biotechnology	Misun Yun	34(4)	대한민국	Korean Society for Microbiology and Biotechnology	SCIE	2024.01.18	1017-7825	80%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	(사단)한국산업식품공학회	윤미선	2022.11.09	제주도 해비치호텔&리조트, 그랜드볼룸 강릉, 라카이샌드파인리조트 컨벤션센터 라카이볼룸	대한민국
2	(사단)한국산업식품공학회	윤미선	2023.04.27	라카이샌드파인리조트 컨벤션센터 라카이볼룸	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용 방식																																																																																																		
2023	레비락토바실러스 브레비스 WiKim0168을 포함하는 숙취 해소 및 개선용 조성물	개발 제품과 핵심 원료에 대한 인체적용시험을 통해 기능성 표시식품 형태의 숙취 해소제 상용화, 건강기능식품 분야 원료 사용성 확대 등을 계획하고 있어 경쟁제품과의 비교하여 우수성을 검증시 고부가가치의 사업화 가능성이 있음.	<p>기술가치 산정:288 백만원</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>2023년</th> <th>2024년</th> <th>2025년</th> <th>2026년</th> <th>2027년</th> <th>2028년</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>매출액</td> <td>342</td> <td>719</td> <td>2,170</td> <td>4,170</td> <td>5,941</td> <td>5,257</td> </tr> <tr> <td>로열티율</td> <td colspan="6">2.2%</td> </tr> <tr> <td>제천로열티 수입</td> <td>8</td> <td>16</td> <td>48</td> <td>92</td> <td>131</td> <td>116</td> </tr> <tr> <td>법인세</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>5</td> <td>10</td> <td>14</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>제후로열티 수입</td> <td>7</td> <td>14</td> <td>42</td> <td>82</td> <td>116</td> <td>103</td> </tr> <tr> <td>할인율</td> <td colspan="6">15.4%</td> </tr> <tr> <td>현재가치</td> <td>0.88</td> <td>0.76</td> <td>0.66</td> <td>0.57</td> <td>0.49</td> <td>0.43</td> </tr> <tr> <td>현재가치</td> <td>6</td> <td>11</td> <td>28</td> <td>47</td> <td>58</td> <td>44</td> </tr> </tbody> </table> <p>(단위 : 백만 원)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>2029년</th> <th>2030년</th> <th>2031년</th> <th>2032년</th> <th>합계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4,651</td> <td>4,116</td> <td>3,642</td> <td>3,222</td> <td>34,230</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>102</td> <td>91</td> <td>80</td> <td>71</td> <td>753</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>10</td> <td>9</td> <td>8</td> <td>83</td> </tr> <tr> <td>91</td> <td>81</td> <td>71</td> <td>63</td> <td>670</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>0.37</td> <td>0.32</td> <td>0.28</td> <td>0.24</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>34</td> <td>26</td> <td>20</td> <td>15</td> <td>288</td> </tr> </tbody> </table>	구분	2023년	2024년	2025년	2026년	2027년	2028년	매출액	342	719	2,170	4,170	5,941	5,257	로열티율	2.2%						제천로열티 수입	8	16	48	92	131	116	법인세	1	2	5	10	14	13	제후로열티 수입	7	14	42	82	116	103	할인율	15.4%						현재가치	0.88	0.76	0.66	0.57	0.49	0.43	현재가치	6	11	28	47	58	44	2029년	2030년	2031년	2032년	합계	4,651	4,116	3,642	3,222	34,230	102	91	80	71	753	11	10	9	8	83	91	81	71	63	670	0.37	0.32	0.28	0.24	-	34	26	20	15	288	PA-2022-11-003	해당 사항 없음	농림식품기술기획평가원의 “기술성과활용”을 위한 기술가치평가서로 평가용도 외 사용금지됨	-	-
구분	2023년	2024년	2025년	2026년	2027년	2028년																																																																																																				
매출액	342	719	2,170	4,170	5,941	5,257																																																																																																				
로열티율	2.2%																																																																																																									
제천로열티 수입	8	16	48	92	131	116																																																																																																				
법인세	1	2	5	10	14	13																																																																																																				
제후로열티 수입	7	14	42	82	116	103																																																																																																				
할인율	15.4%																																																																																																									
현재가치	0.88	0.76	0.66	0.57	0.49	0.43																																																																																																				
현재가치	6	11	28	47	58	44																																																																																																				
2029년	2030년	2031년	2032년	합계																																																																																																						
4,651	4,116	3,642	3,222	34,230																																																																																																						
102	91	80	71	753																																																																																																						
11	10	9	8	83																																																																																																						
91	81	71	63	670																																																																																																						
0.37	0.32	0.28	0.24	-																																																																																																						
34	26	20	15	288																																																																																																						

□ 보고서 원문 - 외부기관 보고서 (안전성, 안정성, 통계보고서)

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
2023	단회 경구투여 독성시험		FD22-024
2023	복귀돌연변이시험	2023.04.04	C22VG-246G
2023	염색체 이상시험	2023.04.04	C22VG-247G
2023	소핵시험	2023.04.27	C22VG-248G
2024	인체적용시험 통계보고서	2024.04.30	-

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Levilactobacillus brevis</i> WiKim0168	KCCM13111P	한국미생물보존센터	2022
2	<i>Latilactobacillus curvatus</i> WiKim0169	KCCM13112P	한국미생물보존센터	2022
3	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170	KCCM13113P	한국미생물보존센터	2022
4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> WiKim0171	KCCM13114P	한국미생물보존센터	2022
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172	KCCM13115P	한국미생물보존센터	2022

[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	레비락토바실러스 브레비스 WiKim0168을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물	대한민국	한국식품연구원	2022.11.11	10-2022-0150934	-	한국식품연구원	2024.02.26	10-264257	90%	√
2	페디오코커스 에시디 락 티 시 WiKim0170을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물	대한민국	한국식품연구원	2022.11.11	10-2022-0150935	-	한국식품연구원-	2024.02.26	10-2642548	90%	√
3	락티카제이바실러스 파 라 카 제 이 WiKim0171을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물	대한민국	한국식품연구원	2023.01.30	10-2023-0011588	-	-	-	-	90%	√
4	류코노스톡 메센테로이데스 WiKim0172을 포함하는 숙취	대한민국	한국식품연구원	2023.01.30	10-2023-0011589	-	-	-	-	90%	√

해소 및 간 기능 개선용 조성물										
-------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

○ 지식재산권 활용 유형 (기술 이전한 지식 재산권 활용 표시 할 것)

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

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

□ 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

○ 국내표준 (해당없음)

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	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.

○ 국제표준 (해당없음)

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	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	신제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> WiKim0171 (Wilac L001)	2021	팜스빌 (메디오젠)	-	건강기능식품 품목신고	3년	대전지방식품의약품안전청장	2023.01.18
2	<i>Pediococcus acidilactici</i> WiKim0170 (Wilac L002)	2021	팜스빌 (메디오젠)	-	식품원료 품목신고	3년	충청북도 제천시청	2023.01.12
3	<i>Lactobacillus brevis</i> WiKim0168 (Wilac L003)	2021	팜스빌 (메디오젠)	-	식품원료 품목신고	3년	충청북도 제천시청	2023.01.12
4	<i>Lactobacillus curvatus</i> WiKim0169 (Wilac L004)	2021	팜스빌 (메디오젠)	-	식품원료 품목신고	3년	충청북도 제천시청	2023.01.12
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim0172 (Wilac L005)	2021	팜스빌 (메디오젠)	-	식품원료 품목신고	3년	충청북도 제천시청	2023.01.12
6	와이락 엘 복합유산균	2022	팜스빌 (메디오젠)	-	식품원료 품목신고	3년	충청북도 제천시청	2023.05.10
7	확개유	2024	팜스빌	-	기타가공품 품목신고	1년	서울특별시 강서구청장	2024.02.26
8	숙취뽀개기	2021	팜스빌	-	기타가공품 품목신고	1년	서울특별시 강서구청장	2024.02.26

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시	숙취 해소 기능성 유산균 2종(WiKim0168, WiKim0172)	(주)팜스빌			
2	통상실시	알콜 저감 효능 기능성 유산균 3종(WiKim0169, WiKim0170, WiKim0171)	(주)팜스빌			

*내부 자금

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
1					

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품개발	국내	제품화	확개유	(주)팜스빌	0	0	2024	10
2	자기실시	자기실시	국내	제품화	숙취뽀개기	(주)팜스빌	0	0	2024	10

* 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)		
숙취 해소 유산균 와이락 엘 복합 유산균 원료 판매 사업화	2024년 2월				
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과		숙취 해소 유산균 런칭 (편의점, 대형마트, 오프라인 특수채널, 온라인, 해외 수출 B2B & B2C)			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3-5개월 (2024년)			
	소요예산(천원)	500,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지(2024.2월기준)	3년 후	5년 후	
		2,640	2,800,000	4,400,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내	0	5
국외			0	0.1	5
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		간기능 개선에 효과적인 유산균제품 개발			
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재까지(2024.2월기준)	3년 후	5년 후	
	수출	-	400,000	650,000	

*원료 사업화 및 완제품 사업화 전략

유통 전략 : 채널별 제형 차별화 전략을 통한 입점

홍소핑 : 이중 제형 [규제샌드박스 시범사업 융복합 건강기능식품 과 일반식품의 일체형] 편의성을 높인제품으로 차별화 전략

편의점 및 올리브영 & 온라인 : MZ 세대 타겟 분말형 (과일맛 등), 구미 & 젤리

다xx : 필름형

특수 채널 x : 분말 또는 필름형

면세점 : 젤리형 구미



* 해외 사업화 전략

자사 B2C 와 해외플랫폼 활용한 일본과동남아 및 베트남 시장 공략

Cloud Funding - B2C
제품의 희소성, 차별성을 강조한 마케팅 목적
미국의 Kickstarter, GoFundMe, 일본의 마쿠아케
진출 국가별



제품 소개 및 B2B 유통 벤더사 네트워크를 위한
약국 재인점, 드럭스토어를 위한
미국, 유럽, 아시아의
국제 식품, 건강식품, 관련 행사 및 부티 박람회 참가



Amazon US, UK, JP - B2C
Amazon US 입점
Amazon UK, AU, SG 확장
Amazon Japan 확장



동남아시아, 중동 오프라인 드럭스토어 공급계약
Guardian, Watsons, Chemist, O!Gud, Watsons, Costco, O!Gud



i- Herb 입점 - B2C
아이허브 입점을 통한 건강기능식품 전문몰 확장



제품군 확장 및 카테고리 확장
숙취 해소 유산균
간보호 유산균



일본 Q0010



Shopee 몰



□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년~2022년	2023년	
1	고용창출	(주)팜스빌	1	1	2
합계			1	1	2

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	1
		생산인력	1
	개발 후	연구인력	2
		마케팅 및 영업인력	7
		생산 인력	2

□ 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
2024	숙취 해소제품화	-	50,000	100,000	-	-	-
기대 목표	숙취 해소제품화	-	650,000	3,800,000	-	-	-

□ 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
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

□ 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
1	세계김치연구소	기술사업화지원사업	숙취 개선 유산균과 해파살리도의 장기간 복용에 따른 숙취 개선 효과 연구	윤미선	40,000천원

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용
-	-	-	-	-	-	-

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	기사	파이낸셜뉴스	팜스빌, "숙취 해소 유산균 및 간보호 효능을 가지는 기능성 식품 개발" 농림부 국책과제 선정	2021.04.05
2	기사	약업신문	팜스빌, 10억원 규모 농림부 국책과제 선정 발효식품 유래 숙취 해소 유산균·간보호 기능성 식품개발	2021.04.05
3	기사	아이뉴스 24	팜스빌, 10억 규모 농림부 국책과제 선정	2021.04.05
4	기사	머니투데이	팜스빌, 간 보호 효과 및 숙취 개선 기능성 유산균 기술 이전받아	2023.12.29
5	해외박람회	-	제21차 세계한인비즈니스대회(세계한상대회) 참석	2023.10.11.~14
6	기술이전 체결식	-	"2023년 농식품 우수·유망기술발표회 in 농림축산식품 과학기술대전" 에서 세계김치연구소로부터 간 보호 효과 및 숙취 개선 효능을 가진 기능성 유산균 기술이전 체결식 진행함	2023.11.29

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	기술장려상	미생물 생명공학 분야 기술개발과 산업화	최학종	2021.06.24	한국미생물 생명공학회
2	수상	기술진보상	김치 식품 산업 분야의 기술발전 기여	최학종	2021.07.08	한국식품과학회
3	수상	JM 우수논문상	우수한 논문 발표로 학술지의 발전과 국제성 제고에 공헌	최학종	2021.08.26	한국미생물학회
4	수상	FSBH건강기능식품 국제학술지 우수논문상	우수한 논문 발표로 학술지의 발전과 마이크로바이옴을 이용한 건강기능 식품의 발전에 기여	박상민	2021.07.15	건강기능식품 미래포럼

[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)

1. 기술가치 평가보고서 수령 완료

- 본 연구개발 성과로 출원되었고 기술이전 받은 특허 “레비락토바실러스 브레비스 WiKim0168”을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물(10-2022-0150934 / 2022.11.11.)를 농림기술기획평가원의 “기술성과활용”을 위해 기술가치평가를 받았으며, 기술가치 288백만원으로 평가받음.
- 간 보호 확장 가능성을 보여줌과 동시에 제품화를 위한 기술 이전 및 기능성표시식품 식약처 허가까지 진행할 수 있는 가능성을 보여주었음.

2. 제품 효능 확인을 위한 인체적용시험 추가 수행

- 기존 원료 소재에 대한 숙취 해소효능 확인을 목표로 하였으나, 제품의 확실한 효능 확인을 최종 검증하기 위해 실험군을 추가하여 과학적인 정량적 자료 확보함.
- 인체적용시험 구성: 3-Arms 디자인(유산균복합물, 유산균복합물+식물성 추출물, 대조군)

3. 소재에 대한 장복 시너지 효능 자료 확보

- 숙취 해소 유산균으로 선정된 5종의 유산균을 이용한 복합물(Wilac L001+L002, Wilac L003+L005, Wilac L004) 및 간 건강에 도움을 주는 “헤파살리도” 제품의 장기복용 후 숙취 개선 효능 자료 확보

결과: 각 균주복합물에서 효능이 확인되었으며, 유산균을 먹인 균에서는 “와이락 엘 복합유산균(Wilac L003+L005)”의 효능이 우수하였으며, 특히 헤파살리도와 동시 섭취했을 때의 효능은 유산균 단독섭취 하였을 때보다 더 높은 효능이 확인되었음

3) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

1. 숙취 해소 유산균 5종을 이용하여 기능성 확장 실험을 통해 면역 증강 효과 검증
을 통해 다른 기능성 유산균의 발굴이 발생함
2. 청년 DT R & D 직무 체험 프로젝트 참여를 통한 기업 홍보



4) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도 (%)
○ 선발 유산균 최종 후보 선발	○ 알코올 내성(최대 25%까지 성장) 유산균 발굴과 알코올 분해 효소 활성(최대 ADH 190% 증가) 유산균 5종 개발	100
○ 선발 유산균 처리에 따른 간세포 손상억제 효능 확인	○ 간세포와 알코올 내성 유산균간의 공배양을 통해 간세포 생존율(최대 120%)을 측정하여 간세포 손상억제 효능을 확인하였음	100
○ 실험동물모델을 이용한 숙취 개선 유산균의 알코올 분해능 검증	○ 5종의 유산균 시료를 알코올과 함께 투여하여 시간대별로 혈액을 채취하여 혈중 알코올 저감 효능(최대 32.6% 감소)을 검증하였음	100
	○ 5종의 원말 시료를 알코올과 함께 투여하여 시간대별로 혈액을 채취하여 혈중 알코올 저감 효능(최대 68.8% 감소)을 검증하였음	100
○ 유산균 투여에 따른 운동능력 저하 개선효능 확인	○ 알코올로 유도된 운동실조 증상의 개선 효과를 로타로드를 통한 운동평가로 확인하였음. 유산균 원말 시료를 투여한 실험그룹에서 에탄올만 투여한 실험 그룹보다 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음	100
○ 유산균 투여에 따른 알	○ 알코올로 유도된 수면각성 효능을 LORR 수면 각성평	100

코올에 의한 수면 유도 증상 개선효능 확인	가를 통해 분석하였음. 유산균 원말시료를 투여한 실험그룹에서 알코올만 투여한 실험그룹 대비 입면 시간이 증가되거나 총 수면 시간이 감소하여 알코올로 유도된 수면을 각성시키는 효능을 확인하였음	
○ 실험동물의 선발유산균 투여의 간 기능 개선 지표 평가	○ 수면각성효능 분석 후 실험동물의 간조직을 파쇄하여 조직 내 AST와 ALT를 측정된 결과 원말시료를 투여한 실험그룹에서 알코올만 투여한 실험그룹 대비 최대 10.7% 감소되었으며, ALT는 최대 6.2% 감소 되는 것을 확인하였음	100
	○ 8주간의 장기투여에 따른 알코올에 의한 간세포 손상 개선효능을 평가하기 위해 실험 동물의 혈액을 채취하여 AST와 ALT를 측정하였음. 알코올 섭취에 의한 간 손상을 경감시킴을 확인할 수 있으며, 알코올 섭취 마우스 그룹 대비 최대 AST 37% 감소, ALT 28.8% 감소 효능을 확인하였음	100
○ 유산균의 생화학적/분자 생물학적 안전성 평가	○ 숙취 개선효능 유산균 5종에 대해 생화학적 특성 분석을 통한 젤라틴 액화 반응 음성 및 유해 대사 산물인 urea 분해 반응 음성 확인을 통한 안전성을 검증함	100
	○ 전장유전체 항생제 내성 유전자 annotation 결과 특정 항생제와 연관성 있는 결과는 도출되지 않았음	100
○ 유산균의 용혈반응 검사를 통한 안전성 확인	○ Sheep blood를 포함하는 배지에 유산균 5종을 도말하여 균주에 의한 용혈현상을 관찰함. 양성 대조군으로 사용된 Bacillus cereus 균주와 비교해보았을 때, 유산균 5종에 의한 용혈현상은 관찰되지 않았음	100
○ 숙취 해소 기능성 유산균의 균주기탁 · 특허출원 · 기술이전 · 논문 게재	○ 숙취 해소 기능성 유산균 균주 기탁 5종	100
	○ 숙취 해소 및 간 기능 개선 유산균 특허출원 4건	100
	○ 숙취 해소 기능성 유산균 기술이전 2건	100
	○ “Oral administration of Alcohol-Tolerant Lactic Acid Bacteria Alleviates Blood Alcohol Levels and Ethanol-Induced Liver Damage in Rodents” 논문 게재 1건	100
○ 유산균 대량배양 공정개발 및 표준화	○ Scale-up 생산을 통한 유산균 대량배양 최적화 완료 - 최적 배양배지 및 최적 동결건조보호제 선정 완료 - Flask, 4L, 400L, 800L 단계별 시생산을 통한 optimization 완료 ○ 원료 품목제조보고 완료(6건)	100
○ 대량생산 원료 안정성 검증	○ 4주 가혹 경시안정성 평가 완료 ○ 8주 경시안정성 평가 완료	100
○ GLP 독성시험을 통한 안전성 검증	○ GLP 독성시험기관 “크로엔” - 유전독성시험(복귀돌연변이, 염색체이상시험, 소핵시험) 완료를 통해 안전성 확보	100

	<ul style="list-style-type: none"> ○ GLP 독성시험기관 “한국식품산업클러스터진흥원” <ul style="list-style-type: none"> - 단회투여독성시험 완료를 통해 안전성 확보 ○ 안전성 시험 수행위한 원말 생산 완료(800L) 	
○ 인체적용시험 수행 및 결과보고서 확보	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험 Protocol synopsis 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Cross-over 교차설계 인체적용시험(30명) ○ 인체적용시험 수행기관(글로벌의학연구센터) 선정 및 시험 완료 	100
○ 제형개발 완료	○ 제형 5종 개발 (젤리형, 건과류, 필름형, 분말형, 소환)	100
○ 제품개발 완료	○ 제품 품목제조보고 완료(2건) 디자인 개발 4건 이상	200
○ 기술 이전	○ 기술 이전 2건	200
○ 특허 등록	○ 특허출원 4건. 등록 2건 완료	200
○ 균주 기탁	○ 균주 5종 기탁	200
○ 논문	○ SCIE 논문 등록 1건	100

제 4장 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 기능성 표시 식품 등록
 - 식약처의 법 제정으로 인한 숙취 해소 “기능성 표시 식품”에 대한 평가 유예 기간이 2024년까지 연장되어 2025년에 등록 및 접수 가능
 - 식약처 가이드라인 및 심사 방향 공지 시 바로 접수 예정임
-

2) 자체 보완활동

- 제품의 런칭을 위해 마케팅 및 해외수출 마케팅 수립 중
-

3) 연구개발 과정의 성실성

- 기능성 표시 식품 등록을 위한 가이드라인에 맞추어 효능 검증과 인체적용시험을 완료하였으며, 기능성 표시 식품 등록을 유예 기간 동안 가능한지에 대한 질의를 관계 기관에 하였으나, 정확한 평가 기준이 나오지 않아 2025년부터 접수 및 승인이 가능하다고 함
- 2024년 상반기 매출을 목표로 각 영업 채널별 전략 수립 및 영업팀의 보강을 통하여 대형마트, 올리브영, 편의점, 온라인으로 전략을 세분화하여 진행하고 있음
- 대형 프랜차이즈 입점 제안을 받아 제형 및 스펙을 개발진행 중이며, 상반기 입점 예정임

제 5 장. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

제 1 절 목표 달성도

구분	목표	달성내용	달성도
1	알코올 농도에 따른 유산균의 내성검사- 10%	- 알코올 내성(최대 25%까지 성장) 유산균 발굴	100
2	알코올 대사 활성 분석 (ADH 알코올 분해효소 활성)- 80%	- 알코올 분해 효소 활성(최대 ADH 190% 증가) 유산균 선정	100
3	혈중 알코올 분해능 (숙취 해소효능) 혈중 알코올 농도 - 60%	- 5종의 원말 시료를 알코올과 함께 투여하여 시간대별로 혈액을 채취하여 혈중 알코올 저감 효능(최대 68.8% 감소)을 검증	100
4	혈중 간 기능 개선 수치 분석 - ALT 25% 감소	- 8주간의 장기투여에 따른 알코올에 의한 간세포 손상 개선효능은 알코올 섭취 마우스 그룹 대비 혈중 간 기능 개선 수치 최대 AST 37% 감소, ALT 28.8% 감소 효능을 확인함	100
5	행동 약리 실험 - 대조군 대비 감소	- 알코올로 유도된 운동실조 증상의 개선 효과는 유산균 원말시료를 투여한 실험그룹에서 에탄올만 투여한 실험그룹보다 로타로드 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음 - 알코올로 유도된 수면각성 효능은 LORR 수면 각성 평가를 통하여 알코올만 투여한 실험그룹 대비 입면 시간이 증가되거나 총 수면 시간이 감소하여 알코올로 유도된 수면을 각성시키는 효능을 확인하였음	100
6	안전성 검증	- 식약처 고시 기준 젤라틴 액화 반응 음성, Urea 분해 반응 음성, 전장유전체 내 항생제 내성 연관 유전자 없음, 용혈반응 음성	100
7	안정성 검증	- 후보균주 5종에 대한 내산성, 내담증성 검증 완료	100
8	특허 출원 - 2건	- 특허출원 4건	200
9	특허 등록 - 1건	- 특허 등록 2건	200
10	균주 기탁 - 2건	- 균주 기탁 5건	250
11	기술 이전 - 1건	- 기술 이전 2건 (균주 5건 이전완료)	200
12	고용 창출 -1건	- 고용 창출 2명	100

13	제품화 -1건	- 제품화 2건 완료 - 제품 제조 품목 신고 2건 완료	100
14	제형 개발 - 2건	- 제형 개발 - 5건	250
15	홍보 전시-2건	- 홍보 전시 3건	150
16	인체적용시험-1건	- 인체적용시험-1건	100
17	사업화 매출액 -200만원	- 매출액 264 만원	100
18	식약처 접수 -1건	- 기능성표시식품 원료광고심의 2025년 접수 진행 예정 * 2024년 유예기간으로 식약처 심의 가이드라인이 25년 발표로 연기됨에 따라 접수를 25년 식약처 가이드 일정에 맞추어 접수 예정 임	-
19	대량 공정 개발 및 표준화	- 대량 공정 개발 및 표준화 완료 - 원료 품목 신고 5건 완료	100
20	제형 개발	- 제형 개발 6건 완료 - 필름형, 젤리형,분말, 이중제형, 환제 품, 견과류 시즈닝	100

○ 선발 유산균의 알코올 내성 및 알코올 대사 활성 분석

- 알코올 내성(최대 25%까지 성장) 유산균 발굴과 알코올 분해 효소 활성(최대 ADH 190% 증가) 유산균 5종 개발

○ 혈중 알코올 분해능 확인

- 5종의 유산균 시료를 알코올과 함께 투여하여 시간대별로 혈액을 채취하여 혈중 알코올 저감 효능(최대 32.6% 감소)을 검증하였음
- 5종의 원말 시료를 알코올과 함께 투여하여 시간대별로 혈액을 채취하여 혈중 알코올 저감 효능(최대 68.8% 감소)을 검증하였음

○ 혈중 간기능 개선 수치 분석

- 수면각성효능 분석 후 실험동물의 간 조직을 파쇄하여 조직 내 AST와 ALT를 측정하고 결과 원말시료를 투여한 실험그룹에서 알코올만 투여한 실험그룹대비 최대 10.7% 감소 되었으며, ALT는 최대 6.2% 감소 되는 것을 확인하였음
- 8주간의 장기투여에 따른 알코올에 의한 간세포 손상 개선효능을 평가하기 위해 실험동물의 혈액을 채취하여 AST와 ALT를 측정하였음. 알코올 섭취에 의한 간 손상을 경감 시킴을 확인할 수 있으며, 알코올 섭취 마우스 그룹 대비 최대 AST 37% 감소, ALT 28.8% 감소 효능을 확인하였음

○ 행동 약리 실험

- 알코올로 유도된 운동실조 증상의 개선 효과를 로타로드를 통한 운동 평가로 확인하였음. 유산균 원말시료를 투여한 실험그룹에서 에탄올만 투여한 실험그룹보다 운동 시간이 더 유지되는 것을 확인하였음
- 알코올로 유도된 수면 각성 효능을 LORR 수면 각성평가를 통해 분석하였음. 유산균 원말시료를 투여한 실험그룹에서 알코올만 투여한 실험그룹 대비 입면시간이 증가되거나 총 수면시간이 감소하여 알코올로 유도된 수면을 각성시키는 효능을 확인하였음

○ 안전성 검증

- 숙취 개선효능 유산균 5종에 대해 생화학적 특성 분석을 통한 젤라틴 액화 반응 음성 및 유해 대사 산물인 urea 분해 반응 음성 확인을 통한 안전성을 검증함
- 전장유전체 항생제 내성 유전자 annotation 결과 특정 항생제와 연관성 있는 결과는 도출되지 않았음
- Sheep blood를 포함하는 배지에 유산균 5종을 도말하여 균주에 의한 용혈 현상을 관찰함. 양성대조균으로 사용된 Bacillus cereus 균주와 비교해보았을 때, 유산균 5종에 의한 용혈 현상은 관찰되지 않았음

○ 특허출원 4건, 등록 2건

- 레비락토바실러스 브레비스 WiKim0168을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물
- 페디오코커스 에시디락티시 WiKim0170을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물
- 락티카제이바실러스 파라카제이 WiKim0171을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물
- 류코노스톡 메센테로이데스 WiKim0172을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물

○ 특허 등록 2건

번호	지식재산권 등 명칭 (건별각각 기재)	등록		
		등록인	등록일	등록 번호
1	레비락토바실러스브레비스WiKim0168을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물	한국식품연구원	2024.02.26	10-264257
2	페디오코커스에시디락티시WiKim0170을 포함하는 숙취 해소 및 간 기능 개선용 조성물	한국식품연구원-	2024.02.26	10-2642548

○ 균주 기탁 5종

- *Levilactobacillus brevis* WiKim0168
- *Latilactobacillus curvatus* WiKim0169
- *Pediococcus acidilactici* WiKim0170
- *Lacticaseibacillus paracasei* WiKim0171
- *Leuconostoc mesenteroides* WiKim0172

○ 기술 이전 2건

- 숙취 해소 기능성 유산균 2종(WiKim0168, WiKim0172)
- 알콜 저감 효능 기능성 유산균 3종(WiKim0169, WiKim0170, WiKim0171)

○ 제형개발 6건

○ 제품개발 2건(제품 품목 신고 2건)

○ 원료 품목신고 6건 (프로바이오틱스 1건, 일반 식품 원료 5건)

○ 인체적용시험 1건

○ 유산균 대량공정 개발 및 표준화 5건

제 2 절 관련 분야 기여도

○ 숙취 개선 및 간세포 손상 개선 유산균 개발

- 5종의 알코올 내성 유산균 발균을 통한 숙취 개선 및 간세포 손상 개선효능 검증을 통해 신규 유산균의 기능성을 구명하였고, 숙취 해소 관련 기능성 표시 식품 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대됨
- 유산균의 실험 동물을 통한 효능 검증을 통해 숙취 개선 및 간세포 손상 개선 4종의 특허를 출원하였음
- (주)팜스빌에 5종의 숙취 개선 기능성 유산균의 기술을 이전하여, 논문 게재를 통한 객관적·과학적 근거에 따라 인체적용시험 결과까지 확보함으로써 ‘숙취 해소’ 기능성 표시식품 시장에서 경쟁적으로 우위를 확보하여, 개발의 선두가 되도록 사업화에 발돋움하고 있음
- 세계적인 수준의 성능지표 목표를 달성하고, 숙취 개선 기능성과 간 기능 개선효능이 확인된 유산균을 이용한 건강기능성 미생물 연구 기술은 국내 독자적인 기술력 및 노하우 확보에 획기적인 시점이 될 것임

○ K - FOOD, 숙취 해소제의 글로벌 수출 가능

- 베트남, 미국의 아마존 등에 입점을 준비 중으로 해외수출 판로 확대 및 수출에 기여

제 6장 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

제 1절 연구 개발 성과의 관리계획

○ 기술이전

- 본 연구 소재 5종에 대한 세계김치연구소와 팜스빌 간의 기술이전을 통해 균주 5종에 대한 권리를 보유하고, 해당 기술이전을 통한 사업화 계획을 수립하여 필요한 자금, 인력 등을 확보하고 기술이전을 관리할 계획임.

○ 숙취 해소 유산균 제품 개발을 통한 사업화

- 숙취 해소 인체적용시험을 통해 효능이 확인된 복합유산균을 적용하여, 숙취 해소제의 주요 소비자층인 2030세대를 공략할 수 있는 신규 제형(필름제형, 프레스샷 등의 이중제형)의 개발과 숙취 해소제 제형의 틀을 벗어나 견과류의 시즈닝으로 사용하는 등 숙취 해소용 안주와 같은 새로운 형태의 개발을 통해 사업화를 지속적으로 수행할 예정임.
- 또한 기존의 천연물로 이루어진 숙취 해소제 시장을 유산균이라는 새로운 소재를 활용함으로써 틈새시장을 공략할 수 있는 전략적인 마케팅 방안을 계획하여 동남아 등으로의 해외수출, 오프라인 마케팅, 코스트코 등 대형마트와 올리브영 등의 다방면 채널을 활용하여 사업화를 진행 및 매출향상

○ 건강기능식품 복합 기능성 소재로의 확장

- 개발 소재 균주 5종은 알코올로 인한 간 손상을 보호할 수 있는 효능을 확인하였으며, 해당 효능에 대한 작용 기전을 밝히기 위하여 추가적인 전임상시험과 간 보호에 대한 인체적용시험을 수행함으로써 알코올성 손상으로부터 간을 보호하는 데 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 개별인정형 원료 등록을 추진하여 개발 소재 균주에 대한 기능성을 확장해나갈 계획임.
- 본 연구를 통해 개발된 *L. paracasei* WiKim0171 (Wilac L001) 균주는 식약처에서 허가한 장 건강 기능성을 갖는 프로바이오틱스 고시형 원료로 사용가능 함. 이를 활용하여 팜스빌의 독자적인 장 건강 프로바이오틱스 제품개발을 수행하고, 추가 연구를 통하여 개발 소재들 중 간 건강 기능성을 추가로 인정받아 장과 간을 동시에 케어 할 수 있는 이중기능성 원료로의 확장을 수행할 수 있어, 이에 대한 기술개발을 수행할 예정임.

○ 논문 등록 완료 및 확장

- 본 소재의 효능에 대한 객관적, 과학적 타당성을 확보하기 위하여 숙취 해소 인체적용 시험 결과를 논문으로 등록 함으로써 기술의 원천을 알리고 보호하며 사내 데이터베이스를 구축하여 관리할 계획임.
-

○ 숙취 해소 유산균의 생산망 구축 및 해외시장 진출

- 숙취 해소에 효능이 확인된 복합유산균의 안정적인 원료 확보를 위하여 자체적인 생산 시설을 구축하여 원료 생산, 공급의 안정성을 확보하고 이를 위한 설비 및 인력개발에 투자할 계획임.
- 국내뿐만 아니라 개발 소재의 해외시장 진출을 위하여 미 FDA의 GRAS, NDI 승인을 추진하고 이에 본 연구 결과를 활용할 계획이며, Vitafood, supplyside west(east)등 해외 박람회 참가하여 개발 소재와 제품에 대한 해외 시장 진출을 도모할 계획임.

○ 상표 등록 및 특허등록 관리

- 개발된 제품의 상표에 대한 국내외 등록을 통하여 유사 및 기술 도용을 방지하고자 함
- 특허등록을 통해 용도 확장 시 활용할 계획임
- 복합유산균의 숙취 해소 인체적용시험 결과를 특허로 출원하고 개별 균주의 숙취 및 간 기능 개선 특허와 함께 개발 소재의 기술을 보호하기 위하여, 특허료 납부를 통해 특허권 소멸을 방지하고, 특허 침해가 발생 할 경우 법적인 조치를 취할 수 있도록 지속적인 모니터링을 수행할 계획임.
- 숙취 해소 유산균 소재를 활용하여 개발할 제품들은 상표를 등록하여, 팜스빌의 제품임을 공시함과 동시에 등록 상표에 대한 권리행사를 위하여 특허법인과 함께 등록유지를 꾸준히 관리할 예정임.

○ 논문 등록 완료 및 확장

- 본 소재의 효능에 대한 객관적, 과학적 타당성을 확보하기 위하여 숙취 해소 인체적용 시험 결과를 논문으로 등록 함으로써 기술의 원천을 알리고 보호하며 사내 데이터베이스를 구축하여 관리할 계획임.

제 2 절 연구 개발 성과의 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE	-	
	계	-	
국내논문	SCIE	1	
	비SCIE	-	
	계	1	
특허출원	국내	-	
	국외	1	
	계	1	
특허등록	국내	2	
	국외	1	
	계	3	
인력양성	학사	-	
	석사	-	
	박사	-	
	계	-	
사업화	상품출시	3	
	기술이전	-	
	공정개발	1	
제품개발	제품 개발 사업화 매출 (천원)	3,800,000	
비임상시험 실시		-	
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	-
		2상	-
		3상	-
	의료기기	-	
기능성 표시 식품 원료 등록		1	
해외 수출 사업화 매출 (천원)		650,000	
성과홍보		5	
포상 및 수상실적		1	
정성적 성과 주요 내용		간건강 개선 개별인정형 원료 추가 등록	

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서
2. 추가 제출 자료	1) 논문
	2) 학술발표 자료
	3) 특허 출원서 4건, 결성서 2건
	4) 안전성 시험 최종보고서 4건
	5) 원료 기준 규격 시험 성적서
	6) 균주기탁증 5건
	7) 16s RNA Standard ID Report
	8) 기술가치평가서 1건
	9) 원료 및 제품 품목제조보고서(신고증)
	10) 인체적용시험 프로토콜
	11) 인체적용시험 IRB 개시승인서

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업 “전통 발효식품 유래 유산균을 활용한 숙취 및 간보호 효능에 도움이 되는 기능성 식품 개발” 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.

주 의

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