

1. 표지

발간등록번호

11-1543000-001736-01

고부가가치식품개발사업 R&D Report

**비만 예방 및 치료용 국내산
농산물과 지방산제거 유산균
복합분말제 개발 및 식품소재화
최종보고서**

2017 . 04 . 04 .

주관연구기관 / (주)지니스

협동연구기관 / 전북대학교 산학협력단

(재)임실치즈&식품연구소

농 립 축 산 식 품 부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고부가가치식품개발사업”(개발기간 : 2013 . 12. 13 ~ 2016 . 12 .12)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017 . 01 . 26 .

주관연구기관명 : (주)지니스 (대표자) 김현진(인)
협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 이철로(인)
참여기관명 : (재)임실치즈과학연구소 (대표자) 심민(인)
(상호 변경 후 : (재)임실치즈&식품연구소)



주관연구책임자 : 김현진
협동연구책임자 : 홍성출
참여기관책임자 : 이상천

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	313040-3	해 당 단 계 연구 기 간	2013.12.13. ~2016.12.12	단 계 구 분	3년 차/ 3차 년도
연구사업명	중 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과제명	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물과 지방산제거 유산균 복합분말제 개발 및 식품소재화			
	세부 과제명	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물과 지방산제거 유산균 복합분말제 개발 및 식품소재화			
연구책임자	김현진	해당단계 참여 연구원 수	총: 19명 내부: 7명 외부: 12명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:100,000천원 계:400,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 25명 내부: 11명 외부: 14명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:300,000천원 계:1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)지니스 전북대학교 산학협력단 (재)임실치즈과학연구소(임실치즈&식품연구소)			참여기업명: (주)지니스	
위탁연구	연구기관명: 해당없음			연구책임자: 김현진	
<p style="text-align: center;">요약</p> <p>항비만 농산물소재의 지방축적 억제능을 초고속 탐색하는 HTS-지방축적억제능 스크리닝으로 국내산 농산물 추출물로부터 우수한 항비만 활성을 가지는 추출물 PE와 추출물 CA를 발굴하였다. 항비만 미생물소재의 지방 제거능을 초고속 탐색하는 HTS-지방산제거능 스크리닝에 의해 장 마이크로비오타 유래 미생물 library로부터 우수한 항비만 활성을 가지는 균주를 발굴하였다. 국내산농산물소재와 지방산제거유산균 복합물의 항비만 효능을 in vitro, in vivo 효능평가로 검증하였고 발효 유제품에 적용하였다. 국내산농산물소재와 장 마이크로비오타 유래 지방산제거유산균을 성공적으로 제품화하였다</p>				<p>보고서 면수</p>	

4. 국문 요약문

		코드번호		D-01	
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재를 발굴 ◦ 지방산 제거 항비만 유산균주와 항비만 국내산 농산물 복합 분말제 개발 ◦ 지방산 제거 항비만 유산균주와 항비만 국내산 농산물 복합 분말제 제품화 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재를 탐색 및 발굴하였음 ◦ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재의 항비만 효능 확인하였음 ◦ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재의 확인 및 분석방법 확립하였음 ◦ 지방산제거능 유산균의 항비만 효능 확인하였음 ◦ 지방산제거능 유산균의 제품화 연구 수행하였음 ◦ 지방산제거능 유산균의 유제품 적용연구 수행하였음 ◦ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거능 유산균의 복합분말제 개발하였음 ◦ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거능 유산균의 복합분말제 시제품화하였음 ◦ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거능 유산균의 유제품 적용연구 수행하였음 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거능 유산균의 복합분말제 제품화 ◦ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거능 유산균의 복합분말제를 적용한 발효유제품 제품화 				
중심어 (5개 이내)	농산물	지방산제거	장내 미생물	유산균	식품

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호		D-02	
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ◦ The screening and identification of domestic agricultural products for anti-obesity. ◦ Development of anti-obesity complex of FFA-removal microbes and domestic agricultural products ◦ Commercialization of anti-obesity complex of FFA-removal microbes and domestic agricultural products 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ◦ High-throughput screening of domestic agricultural products and identification of active compounds for prevention and treatment of obesity and related metabolic disorder ◦ Identification, purification and analysis of active compounds derived from domestic agricultural products for prevention and treatment of obesity and related metabolic disorder ◦ High-throughput screening of gut microbiota to identify functional microbes for prevention and treatment of obesity and related metabolic disorder ◦ Development of fat-removal microbes derived from gut microbiota for the production of functional food ◦ Development of anti-obesity complex of FFA-removal microbes and domestic agricultural products ◦ Production of anti-obesity complex of FFA-removal microbes and domestic agricultural products 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Commercialization of anti-obesity complex of FFA-removal microbes and domestic agricultural products for active ingredients in processed foods ◦ Commercialization of anti-obesity complex of FFA-removal microbes and domestic agricultural products for fermented dairy foods 				
Keywords	agricultural	FFA-removal	gut microbes	obesity	food

6. 영문목차

CONTENTS

Chapter 1. Overview of research and development	7
Chapter 2. Current status of technological developments	18
Chapter 3. Contents and results	28
Chapter 4. Achievement of objects and contribution to the related fields	130
Chapter 5. Future application of results	135
Chapter 6. Information for science and technology abroad obtained during research and development	136
Chapter 7. Confidentiality of research results	140
Chapter 8. Status of research facilities and equipments registered in National Science Technology Information System	140
Chapter 9. Performance of safety measures	140
Chapter 10. Representative research results	141
Chapter 11. 기타사항	142
Chapter 12. References	143

<Appendix> Self assessment

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	18
3. 연구수행 내용 및 결과	28
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	130
5. 연구결과의 활용계획 등	135
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	136
7. 연구개발성과의 보안등급	140
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	140
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	140
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	141
11. 기타사항	142
12. 참고문헌	143

<별첨> 자체평가의견서

주 의

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

제 1 장. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제 1 절. 연구개발의 목적

본 연구팀에서는 지방산제거 작용기전을 통해 비만 치료 및 예방에 탁월한 효능이 있는 항비만 장내 미생물 유산균주를 발굴하여 확보하고 있다. 본 연구팀에서는 지방산제거 유산균의 비만 치료 및 예방 효과를 실험동물 실험으로 입증했고, 여기에 더 나아가 이미 임상시험에서도 그 효능을 확인하였다.

이러한 지방산제거 유산균 락토바실러스의 작용기전 특성에 기초하여 본 연구팀에서는 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재를 발굴하고 발굴된 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균 락토바실러스로 복합분말제를 개발하고 이의 식품학적 적용 연구를 진행하여 기능성식품 생산용 복합분말제 및 이를 이용하여 항비만 기능성 발효 식품으로 개발하는 연구를 수행하고자 한다.

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 비만 및 관련 질환의 심각성

- 세계 인구의 60% 이상에서 나타나는 과체중 또는 비만은 인류의 건강을 위협하는 수준으로, 사전 예방 및 적절한 치료가 매우 중요하며, 현재 70 billion USD 규모의 anti-obesity 시장이 형성되어 있고 경제에 미치는 영향은 2 trillion USD 규모임



그림 2. 비만으로 인한 경제 효과 및 비만인 수 (WHO, 2015)



그림 3. 비만으로 인해 유발되는 각종 성인 만성 질환

- 기존 항비만 의약품으로는 식욕억제제, 에너지 사용 촉진제, 지방분해 저해제들이 다수 있었으나, 심각한 독성 부작용으로 인해 대다수가 퇴출(판매중지)되었음
- 상대적으로 안전하다고 알려진 기능성 소재들의 경우 역시 효능이 크지 않은데 비해 상대적으로 간독성이나 장 부작용등으로 인해 안전성 문제가 있음

Claim	Efficacy	Safety	
Alli & Xenical (orlistat)	Inhibition of fat digestion (지방분해 저해제)	Possibly effective (식이요법과 병행시 1년에 2kg 감소)	Liver toxicity GI side effect
Chitosan	Blocks fat absorption	Insufficient reliable evidence	Possibly safe
CLA	Reduces fat and builds muscle	Insufficient reliable evidence	Possibly safe
Green tea extract	Increases metabolism and decreases appetite	Insufficient reliable evidence	Possibly safe
Bitter orange	Increases calories burned	Insufficient reliable evidence	Possibly unsafe
Chromium	Increases calories burned, decreases appetite	Insufficient reliable evidence	Likely safe
Country mallow (heartleaf)	Decreases appetite and increases calories burned	Insufficient reliable evidence	Unsafe (banned by FDA)
Guar gum	Blocks fat absorption of dietary fat	Ineffective	Likely safe
Hoodia	Decreases appetite	Insufficient reliable evidence	Insufficient info
Ephedra	Decreases appetite	Possibly effective	Unsafe (banned by FDA)

그림 4. 기존 항비만 소재들의 낮은 효능 및 장기간 복용시 부작용 등 안전성 문제 (US FDA)

2. 항비만 장내 미생물 소재 발굴의 중요성

- 비만은 식품 섭취량과 에너지 소모량의 불균형에 의해 나타나지만, 인간의 장내 미생물들의 상호 대사활동 역시 비만의 주요 원인이 된다는 사실이 새롭게 규명됨 (Nature 444:1027-31, Nature 474:327-36, Nature Rev. Drug Disc. 2008, 7:123-128)

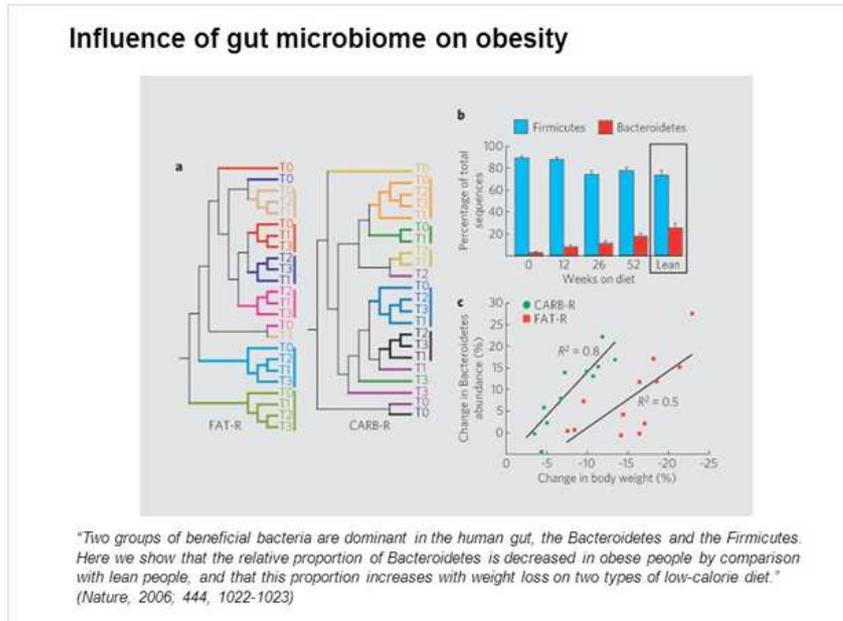


그림 5. 정상인과 비만인의 장내 미생물 연구를 통해, 비만을 결정하는 요인으로 새롭게 밝혀진 장내 미생물 (gut microbiota)

- 사람의 장에는 10^{11} - 10^{12} 개/ml의 엄청난 수의 장내 미생물들이 상호공존하는 집합체로 존재하는데, 이러한 장내 미생물 집합체를 장 마이크로비오타(microbiota)라고 함

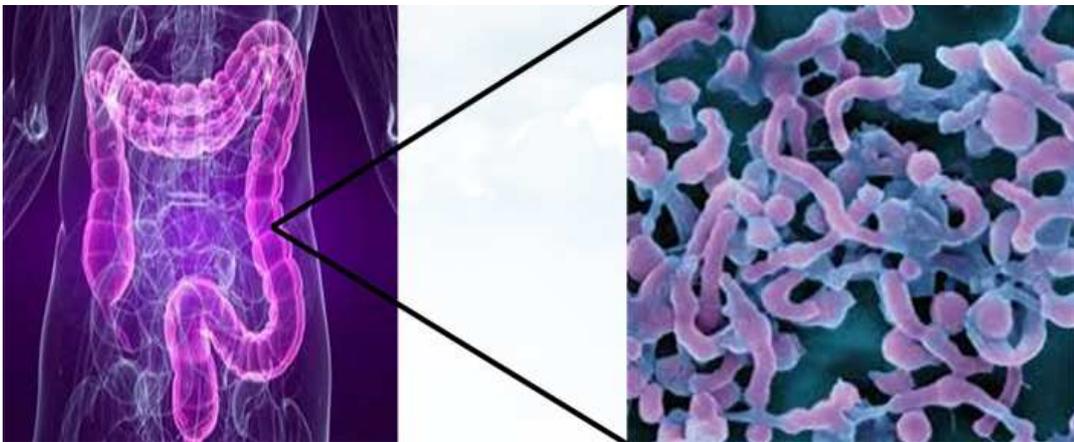


그림 6. 인체 세포 수의 10배 이상 규모인 1014개의 장내 미생물로 구성된 장 마이크로비오타 (Gut Microbiota)

- 장 마이크로비오타의 미생물들은 소화기관에서 식이에너지 흡수량을 늘리거나 줄임으로써 비만에 영향을 미치는데, 식이에너지 흡수량을 줄여주는 장 마이크로비오타 미생물의 경우 항비만 효과를 가지므로, 장 마이크로비오타 미생물을 새로운 작용기전의 항비만 치료제로 개발하려는 연구가 매우 활발히 진행되고 있는 중임 (Current Pharmaceutical Design, 2009, 15:1546-1558)
- 장내미생물에 의한 체중 조절 및 비만 치료 연구가 세계 관련업계의 가장 핫 이슈이었음 (Gut micro in Obesity & Metabolic Disease - A novel therapeutic target, Nat. Rev. Drug Dis. 2008,7:123-128, Nut. Therapy & Met. 2009, 27:113-133)

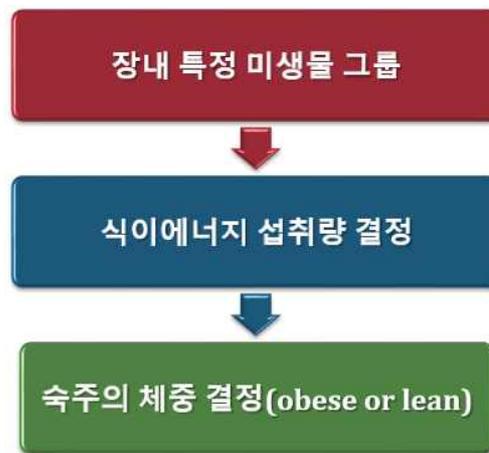


그림 7. 장내 미생물에 의한 비만 결정

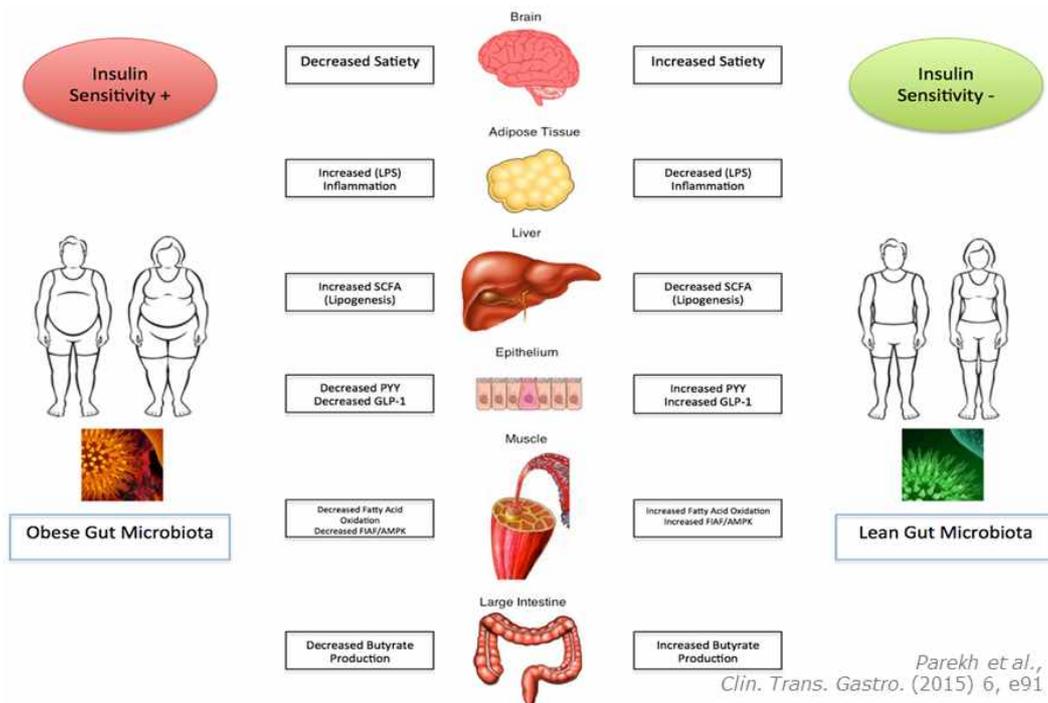


그림 8. 장내 Obese 미생물과 Lean 미생물에 의한 비만 발생 기전

- 특히 장내 유산균 중 일부는 장내에서 식이 에너지의 추출 (extraction)을 줄여주는 기능이 있으며, 이런 유산균을 섭취하면 부작용 없는 항비만 효과가 가능함
- 항비만 제품의 경우 남용과 오용의 문제점이 항상 있기 때문에 장기간 복용시의 안전성이 가장 중요한데, 장 마이크로비오타 미생물의 경우 독성과 부작용 우려가 없으므로, 안전성 측면에서 사업성이 가장 우수하고 탁월한 항비만 소재임
- 이러한 이유 때문에 세계 주요 선진국에서는 항비만 효능을 가진 장내 미생물을 발굴하여 항비만 제품으로 사업화하려는 수요가 매우 높음

3. 지방산제거 유산균

- 항비만 효능을 가진 장내 미생물을 발굴하여 제품화하기 위해 가장 핵심적인 기술은 수백조 이상 미생물로 이루어진 장 마이크로비오타에서 항비만 효능을 가지는 미생물 균주를 찾아내는 과정으로 가장 고난도의 진입장벽이나 일단 발굴에 성공하면 원천특허균주로 인한 독점권을 보장받을 수 있음
- 본 연구팀은 세계 최초로 지방산제거 유산균 락토바실러스를 발굴하여 전세계 특허권을 확보하였음 (2013 한국 특허 등록, 전세계 특허 출원 PCT)

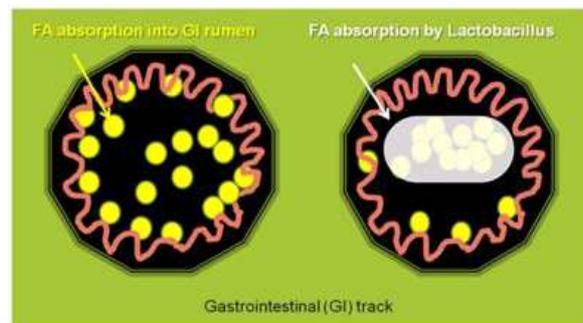


그림 9. 지방산제거 유산균의 작용기전 (MOA)

- 지방산제거 유산균은 장내에서 지방의 분해산물인 지방산(FFA)이 체내로 흡수되기 전에 흡수하여 장내에서의 지방산(FFA)을 제거해주는 작용기전으로 인해 식이에너지 섭취량을 줄여줌
- 이는 기존의 지방분해효소 저해제(Orlistat)이나 식욕저해제(sibutramine)과는 다른 신규한 작용기전의 항비만 미생물 소재를 세계 최초로 발굴한 것임
- 지방산제거 락토바실러스에 대한 동물실험을 수행한 결과 Orlistat보다 훨씬 우수한 수준의 항비만 효능(efficacy)과 최고 수준의 안전성(safety)을 확인하였음
- 지방산제거 락토바실러스의 항비만 효능을 보기 위해서는 고지방 사료로 비만을 유도한 쥐 (DIO, diet-induced obesity) 동물모델을 이용하여 대조군(고지방사료에 일반 유산균 요구르트 섭취군)과 실험군(고지방사료에 지방산제거 락토바실러스

요구르트 섭취군)으로 나누어 각자 해당하는 식이를 자유롭게 섭취 후 매주 실험 동물의 체중변화를 측정하였음

- 예상한 바와 같이 일반 유산균을 섭취시킨 쥐와 비교해서 지방산제거 락토바실러스를 섭취시킨 쥐는 몸무게 증가가 억제되는 효과를 나타내었음

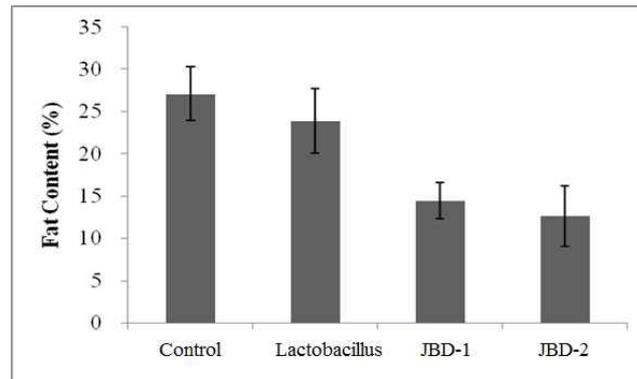


그림 10. 지방산제거 유산균의 체지방 감소 효과

- 체중 이외에도 지방산제거 락토바실러스를 섭취시킨 쥐는 일반 유산균을 섭취시킨 쥐와 비교해서 체지방 감소, 혈당 수치 저하 등 비만 및 대사성질환에 대한 효과가 뛰어났음
- 또한 지방산제거 락토바실러스에 대한 동물실험을 수행한 결과 최고 수준의 안전성(safety)을 확인하였음
- in vivo 독성평가를 위해서는 설치류를 이용하여 지방산제거 락토바실러스를 경구투여 후 일반상태의 추이와 사망에 이르는 경과를 관찰하여 독성평가를 수행하였으며, 투여용량은 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 산출하였으며 유산균이 식품으로 사용되는 소재인 점을 감안하여 단회 경구투여 한계용량인 2,000mg/kg 을 최고용량으로 정하여 투여한 후 일반상태의 추이와 사망여부를 1일 1회 이상 2주간 관찰하였음
- 일반상태의 관찰에서는 체중변동이 없었으며, 호흡이상, 경련 등 이상증상이 관찰되지 않았고 또한 관찰기간 중에 사망한 동물은 없었음. 대조군과 비교관찰시 시험군의 모든 동물에서 단회경구투여 이후 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며 폐사 또는 빈사 동물들도 관찰되지 않았음
- 동물모델계에서 검증된 효능을 바탕으로 인체적용 임상시험을 수행한 결과 orlistat보다 훨씬 우수한 수준의 항비만 효능(efficacy)과 최고 수준의 안전성(safety)을 확인하였음 (Jeonbuk National University Clinical Trial Center, Samsung Medical Center)
- 따라서 본 연구에서는 뛰어난 안전성과 혁신적인 항비만 효능이 이미 동물실험과 임상시험을 통해 입증된 항비만 효능이 입증된 지방산제거 미생물을 세계 최초로 항비만 발효 스타터로 개발하여, 비만의 예방 및 치료용 발효식품 등으로 사업화

하여, 경제가치 창출 및 국내 농축산물 파급효과를 가져오하고자 함

- 지방산제거 유산균 락토바실러스 JBD은 다음과 같은 특성이 있음
- GI tract에서 지방산제거라는 독창적인 작용기전에 기초하여 항비만 효능을 가지는 최초 원천 소재 (First in the class)
- 기존에 개발된 어떠한 식품소재보다 항비만 효능이 뛰어남 (Preclinical 동물실험과 임상시험에서 항비만 효능 입증)
- 유산균이므로 원천적으로 무독성임
- 거의 모든 종류의 식품에 접목 가능함
- 본 연구팀에서는 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재를 발굴하고 발굴된 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 미생물 락토바실러스 유산균으로 복합분말제를 개발하고자 함

제 3 절. 연구개발 범위

1. 연구개발 목표 및 내용

가) 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 작용기전의 항비만 기능성 유산균 복합분말제 개발 및 제품화 연구 (지니스)

- 지방산제거 유산균 최적 배양을 위한 영양 요구 조건, 배양 온도 및 pH 조건 확립
- 지방산제거 유산균 최적 배양을 위한 aeration, 교반 등과 같은 물리적 조건 확립
- Bioreactor 배양 최적화 및 분말 최적화로 양산 공정 조건 확립
- 지방산제거 유산균의 임상시험 통계처리 및 기능성 자료 준비
- 지방산제거 유산균의 건강기능식품 소재화 자료 준비
- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 탐색
- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 제품화 연구
- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 개발 완료 및 제품화
- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 마케팅 전략 수립

나) 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구(전북대)

- 지방산제거 작용기전에 기초한 생체모델을 이용하여 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 탐색 및 발굴

- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 활성성분의 구조 확인 및 분석방법 확립
- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 활성성분의 안정성 평가, 생체이용률 제고 방법 개발
- 비만 예방 및 치료용 건강기능식품 지표물질의 선정 및 분석법 확립

다) 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균 복합 분말제를 이용한 기능성 식품 연구(임실치즈과학연구소)

- 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말의 발효공정 적용 test
- 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말로 발효된 제품 품질검사
- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균 복합분말제를 이용한 발효식품 제품화 적용 연구
- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균 복합분말제로 발효된 제품

	연구개발 목표	연구개발 내용
1차 년도	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 screening 및 지방산제거 유산균 기능성식품 소재화 연구 (지니스)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 탐색 ○ 지방산제거 작용기전에 기초한 생체모델을 이용하여 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 탐색 ○ 지방산제거 유산균 최적 배양을 위한 영양 요구 조건 확립 ○ 지방산제거 유산균 최적 배양을 위한 배양 온도 및 pH 조건 확립 ○ 지방산제거 유산균 최적 배양을 위한 aeration, 교반 등과 같은 물리적 조건 확립 ○ Bioreactor에서 growth media, 유성분 첨가, inoculum ratio, pH, neutralizing agent, reducing agent, temperature, duration 및 agitation 조건 확립 ○ 지방산제거 유산균의 항비만 기능성 자료 ○ 지방산제거 유산균의 data 통계처리 ○ 지방산제거 유산균의 식품 소재화 연구
	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구(전북대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방산제거 작용기전에 기초한 생체모델을 이용하여 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 탐색 ○ 지방산제거 작용기전에 기초한 생체모델을 이용하여 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴

	연구개발 목표	연구개발 내용
2차 년도	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 생산용 복합분말제 개발 (지니스)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 스타터 분말 대량생산 공정 개발 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 스타터 분말 시제품 생산 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 복합 분말제 제품화 연구 (제형 개발, 포장단위, spec 등) ○ 지방산제거 유산균의 항비만 기능성 자료 ○ 지방산제거 유산균의 항비만 기능성 검증 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말 개발을 위해 growth characteristics (optimum pH, temp, agitation 등), sugar utilization ability, acid production ability, proteolytic activity 특성 연구 ○ 지방산제거 유산균을 비만 예방 및 치료용 발효식품 스타터 분말 소재로 개발
	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구 (전북대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재의 효능 관련 성분의 구조 확인 및 분석방법 확립 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 활성성분의 안정성 평가 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 활성성분의 생체이용률 제고 방법 개발
	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균 복합 분말제를 이용한 기능성 식품 연구 (임실치즈과학연 구소)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말의 발효공정 적용 test ○ 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말로 발효된 제품 품질검사 (lactic acid, pH, Acetaldehyde, Diacetyl 등) ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 개발

	연구개발 목표	연구개발 내용
3차 년도	<p>비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 생산용 복합분말제 개발완료 및 비만 예방 및 치료용 기능성식품 제품화 (지니스)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 항비만 식품 마케팅 파트너 확보 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성식품 제품화 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성식품 마케팅 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 시제품 생산 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 개발 완료 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 제품화 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 마케팅 전략 수립
	<p>비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구 (전북대)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 예방 및 치료용 건강기능식품 지표물질의 선정 ○ 비만 예방 및 치료용 건강기능식품 지표물질의 건강기능식품 소재화를 위한 지표물질의 분석법 ○ 비만 예방 및 치료용 건강기능식품 지표물질의 건강기능식품 소재화 연구
	<p>비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균 복합 분말제를 이용한 기능성 식품 연구 (임실치즈과학연구소)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산 제거 유산균 복합분말제를 이용한 발효식품 제품화 적용 연구 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산 제거 유산균 복합분말제로 발효된 제품 품질검사 (lactic acid, pH, Acetaldehyde, Diacetyl 등)

2. 평가 기준

가) 평가의 착안점

- 비만의 예방 및 치료용 기능성 식품 소재 사업화 가능성 여부

나) 평가의 기준

		정성적 항목	정량적 항목	개발목표
1차 년도	2014	지방산제거 유산균 및 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴	○ 유산균의 지방산제거능	2 fold 이상
			○ 지방산제거 유산균 배양	> 10[9]CFU/ml
			○ 국내산 농산물 발굴	1 ea 이상
			○ 항비만 활성 검색	5% 이상
2차 년도	2015	비만 예방 및 치료용 복합분말제 개발 및 식품소재화	○ 유산균 소재의 항비만 효능	10% 이상
			○ 국내산 농산물 소재의 항비만 효능	10% 이상
			○ 비만 예방 및 치료용 복 합분말제의 생균수	> 10[10]CFU/g
			○ 비만 예방 및 치료용 복 합분말제의 유해균수	불검출
			○ 비만 예방 및 치료용 복 합분말제 시제품	1건
			○ 지방산제거 유산균 발효능	pH 4.2~4.7
3차 년도	2016	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재를 이용한 항비만 기능성 복합분말제 개발 및 항비만 기능성 식품화	○ 항비만 기능성 발효식품 생균수	> 10[11]CFU/ea
			○ 비만 예방 및 치료용 복합분말제의 기능성	1건
			○ 비만 예방 및 치료용 기능성 식품 지표물질 함량	> 50 µg
			○ 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 발효 식품	1건
			○ 비만 예방 및 치료용 복합분말제 제품화	1건

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제 1 절. 국내외 기술개발 현황

1. 관련 기술개발 현황

- 비만, 고콜레스테롤증, 고지혈증, 당뇨, 동맥경화 등과 같은 대사성증후군 (Metabolic syndrome) 및 관련질환은 인체의 에너지 대사 이상으로 인한 질환을 말하며 에너지 흡수 과다가 주 원인임
- 대사성증후군 및 관련질환은 체내 에너지 흡수가 과다하게 이루어지는 것이 질환 발병의 주원인이어, 기존에는 대사성증후군 및 관련질환의 원인을 음식물 과다 섭취에서 찾고 있었음
- 최근 장 마이크로비오타가 인체의 에너지 흡수에 결정적인 역할을 한다는 사실이 규명되어, 장 마이크로비오타가 대사성증후군 및 관련질환의 주요 원인 중 하나로 등장하였음 (Ley et al., 2006. Nature 444, 1022; Turnbaugh et al., 2006. Nature 444, 1027)
- 이에 세계 주요 선진국 연구팀들에서는 장 마이크로비오타를 연구하여, 장 마이크로비오타 소재들을 대사성증후군 및 관련질환 치료 예방을 위한 식의약소재로 개발하려는 연구에 몰두하기 시작했음 (Nature Rev. Drug Discovery 2008, 7:123-128, Nut. Therapy & Met. 2009, 27:113-133, Current Pharmaceutical Design, 2009, 15:1546-1558)
- 하지만 장 마이크로비오타 구성 미생물들을 초고속으로 탐색하고 분석하여, 각 주요 산업동물과 사람의 건강한 형질을 결정하는 ‘건강 형질 결정 장 마이크로비오타 지표’ 결정에 관한 기술과 노하우가 아직은 미완성이어, 대사성증후군 및 관련질환 치료 예방을 위한 장 마이크로비오타 소재 개발이 아직 완성되고 있지 못하고 있는 실정임

2. 관련 특허 현황

- Dupont의 미국등록특허 제8257695호는 포만감 조절능이 있는 *Lactobacillus acidophilus* PTA_4797, *Bacillus lactis* 420, *Bacillus lactis* HN019 및 *Lactobacillus salivarius* Ls-33를 항비만 제제로 공지하였음
- Nestec의 미국등록특허 제8454949호 및 국제공개특허 제200601922호는 t10c12-octadecadienoic acid를 과다생산하는 *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4046를, 미국등록특허 제8440178호 및 제8318151호는 *Lactobacillus rhamnosus*

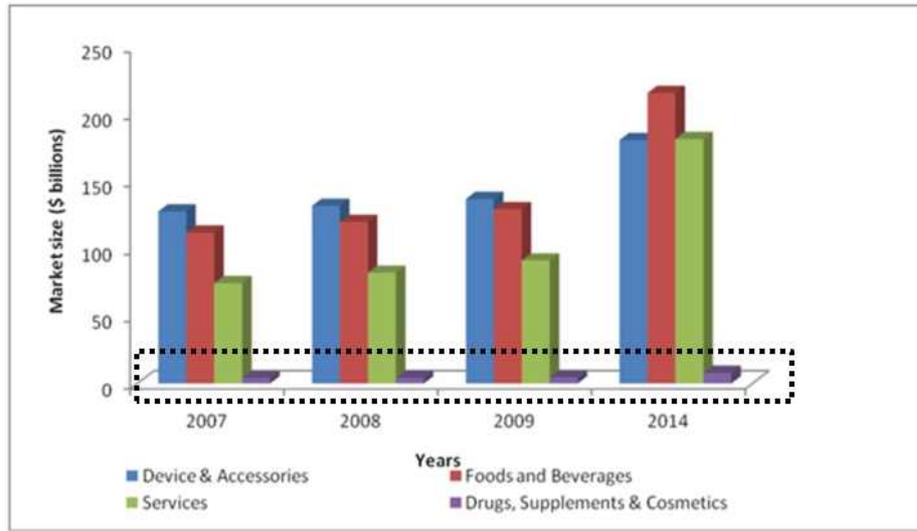
NCC4007를, 미국등록특허 제8318150호는 *Lactobacillus helveticus* CNCM I-4095를, 미국등록특허 제8637000호는 *Lactobacillus rhamnosus* 균주(ATCC53103)를, 유럽특허 제2123168호는 *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116을 각각 항비만 제제로 공지하였음

- Megmilk Snow Brand의 미국등록특허 제8440179호는 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 및 *Lactobacillus helveticus* SBT2171를 지방 감소용 제제로 공지하였음
- Genmont Niotech의 미국등록특허 제7001756호는 *Lactobacillus rhamnosus* GM-020을 항비만 제제로 공지하였음
- Yakult의 미국공개특허 제2009-0181437호는 linoleic acid를 conjugated linoleic acid (CLA)로 전환시키는 방법 및 균주들을 공지하였음
- CJ의 국제공개특허 제2006-019222호, 유럽특허 제1789531호 및 미국공개특허 제2008-0267932호는 linoleic acid를 conjugated linoleic acid (CLA)로 전환시키는 *Lactobacillus rhamnosus* PL60(KCCM-10654P)를, 미국공개특허 제2008-0057044호는 *Lactobacillus plantarum* PL62(KCCM-10655P)를 각각 항비만 제제로 공지하였음
- 한국야쿠르트의 한국등록특허 제0543114호는 α -glucosidase를 억제하는 대사산물을 생성하는 것을 특징으로 하는 *Bacillus subtilis* KY912(KACC-91056)를 항비만 균주로 공지하였음
- 바이오니아의 한국등록특허 제0404236호는 장내의 저당류 물질을 다당류 물질로 전환시키는 것을 특징으로 하는 *Acetobacter* sp. BC-Y058 및 *Lactobacillus* sp. BC-Y009를 당뇨병 및 비만증 예방치료용 제제로 공지하였고, 한국등록특허 제0794701호는 다당류 물질 생성 균주 *Lactobacillus reuteri* (KCTC-10301BP)를, 한국등록특허 제0794702호는 다당류 물질 생성 균주 *Lactobacillus fermentum* NM316(KCTC-10458BP)를, 한국등록특허 제1108428호는 다당류 물질 생성 균주 *Lactobacillus gasseri* BNR17(KCTC 10902BP)를 공지하였음
- (주)지니스의 한국등록특허 제1292714호에서 자유지방산 흡수능이 있는 *Lactobacillus* 및 자유지방산 흡수능이 있고 장내 지방산을 감소시키는 효능이 있는 항비만 균주를 공지한 바 있음
- (주)일동제약은 한국특허 10-2002-0040450에서 콜레스테롤 저하능을 갖는 스트렙토코커스 폐시움 균주 (*Streptococcus faecium* having activity of reducing cholesterol)를 공지한 바 있음
- 매일유업은 한국특허 10-2007-0006240에서 콜레스테롤 저하 기능성 발효유의 제조 방법 (Preparing method for fermented milk with cholesterol lowering activities)를 공지한 바 있음

제 2 절. 국내외 관련 시장 동향

1. 항비만 시장 동향

- 세계보건기구 (WHO)에 의하면 전 세계적으로 과체중 또는 비만인 성인이 19조 명을 넘었으며, 6억 명 이상이 비만 상태로 조사되었고, 이 수치는 점점 증가할 것으로 추정되며 (WHO, 2014), 현재 230 billion USD 규모의 항비만 식품 시장이 형성되어 있음



Source: MarketsandMarkets

그림 11. 전 세계 체중 조절 시장 규모 (WHO, 2015)

- 비만은 전 세계 당뇨 환자의 80%, 심장질환의 20% 이상의 직접적인 원인이며, 제2형 당뇨와 심혈관질환 이외에도 비만은 고혈압, 뇌졸중, 자궁암, 지방간, 위암 등을 일으키므로, 비만의 예방 및 치료는 건강유지에 절대적으로 중요함
- 비만 치료제로는 식욕억제제, 음식의 소화흡수억제제, 열 생성 촉진제, 에너지 사용 촉진제들이 다수 개발되었으나, 장기간 사용시 우울증, 심장혈관 문제, 자살 등의 심각한 부작용으로 인해 대다수가 퇴출되거나 판매가 중지되는 실패사례들이 반복되고 있음
- 다른 비만 치료제에 비해 상대적으로 독성이 적은 지방분해저해제 오리스탯 (orlistat)은 비만 치료 의약품으로 가장 오랫동안 팔리고 있으며 처방용 의약품보다 적은 함량의 저용량 제품이 OTC 제품(브랜드명 Alli®)으로도 판매되고 있음
- 하지만 오리스탯(orlistat)은 기본적으로 지방 분해/소화 저해제이다 보니 분해되지 않은 지방으로 인해 복통 및 급변 등의 부작용 문제가 있고 특히 장기간 복용시의 간독성 문제로 인해 미국 FDA에서 재검토 단계임
- 체중조절을 위한 항비만 건강기능식품소재로는 HydroxyCA(HCA, 가르시니아 캄

보지아 추출물), 공액리놀레산(conjugatic linoleic acid, CLA), 키토산(chitosan), 녹차 추출(green leaf/tea extract), 폴리페놀(polyphenol) 및 식이섬유(dietary fiber) 등이 다양하게 제품화되어 왔음



그림 12. 미국의 체중 조절 관련 식이보조제 제품들

- 이들은 대부분 효과가 미미하거나, 간 독성 등 장기 복용시의 부작용 등 안전성 문제들이 보고되고 있음

	Claim
Orlistat	Inhibition of fat digestion
Bitter orange (synephrine)	Increases calories burned
Caffeine	Increases calories burned and breakdown of fat
Chromium	Increases calories burned and decreases appetite
Fucoxanthin	Increases calories burned and decreases fat
Garcinia cambogia	Decreases appetite
Chitosan	Blocks digestion of fat
Conjugated Linoleic Acid	Reduces fat and builds muscle
Green tea extract	Increases metabolism and decreases appetite
Glucomannan	Lower total cholesterol, LDL cholesterol, triglyceride
Green coffee bean extract	Reduces weight
Country mallow	Increases calories burned and decreases appetite
White kidney bean	Suppress appetite and decreases fat

표 1. 미국 NIH의 체중 조절 관련 식이보조제 성분 (2015)

2. 대사증후군 시장 동향

- 대사증후군(metabolic syndrome)은 당뇨, 복부비만, 고지혈증 (high TG or low LDL-cholesterol), 고혈압 중 3가지 이상 증상을 가지는 것을 말함
- 당뇨, 비만, 고지혈증은 의학적으로 서로 다른 질병이나, 에너지 과잉 섭취가 질환 발병의 주 원인이라는 공통점이 있어 이들을 포괄적으로 대사성질환이라고 부름

- 과잉 섭취된 칼로리가 체내에서 매우 다양한 대사 경로를 거쳐 인슐린 저항성을 일으키게 되고, 이로 인해 혈당이 높아지거나, 복부 지방이 증가되거나, 혈중 지질을 높아진 경우에 대사증후군이 발병함
- 대사증후군의 심각성은 세계 성인인구의 60 - 70%에서 찾아볼 수 있을 정도로 인류에게 가장 흔한 만성질환군으로 자리잡고 있으나 효과적인 예방 및 치료가 어렵다는 점임
- 현재 대사증후군의 발병시 복부 부위의 비만 즉 내장지방과 이로 인한 인슐린 저항성을 원인치료하기보다는 대사증후군 관련 질환의 증상에 대한 치료를 주로 하고 있음
- 대사증후군 관련 질환인 당뇨, 고지혈증, 고혈압에 대해서는 기존에 다양한 당뇨 치료제, 고혈압 치료제, 콜레스테롤 저하제들이 개발되어 세계 의약품 시장에서 가장 큰 규모를 차지하고 있음
- 대사성질환 세계시장은 2014년 현재 1,800억불 규모로 의약품 시장에서 가장 큰 규모이며, 2020년에는 3,500억불 이상 성장할 것으로 예상됨
- 국내의 경우 2010년에 대사성질환 진료비만 3조 7천 억원 규모이나 이는 지속적으로 확대되어 불과 4년만인 2014년에는 1조원이 증가한 4조 7천 억원에 육박할 정도로 큰 시장이 형성되어 있음

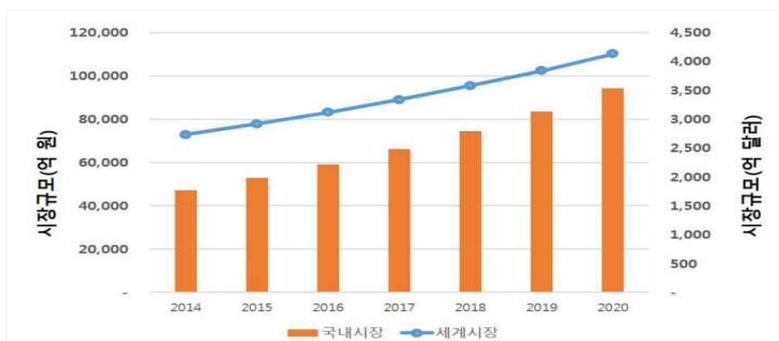


그림 13. 2014~2020년 대사성 질환 치료제의 국내의 시장 전망 (Datamonitor, 2015)

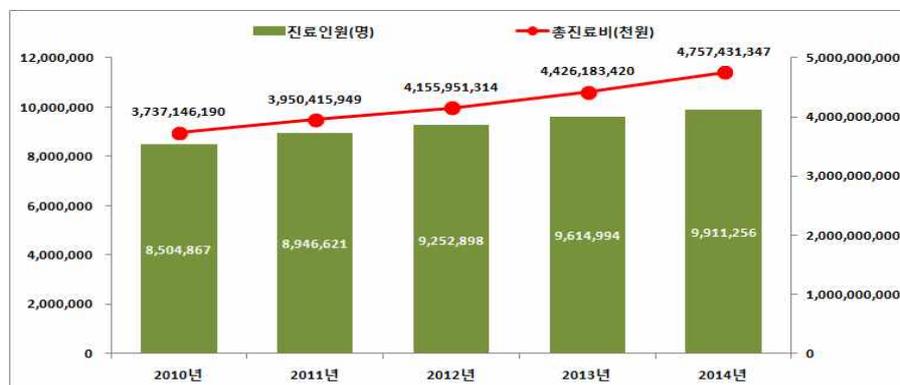


그림 14. 2010년~2014년 대사증후군 관련 진료인원 및 총 진료비 추이 (출처-건강보험심사평가원, 2015)

제 3 절. 본 연구관련 기능성 소재 산업 동향

1. 국내 현황

- 2012년 국내 건강기능식품 총 생산액은 1조4,091억원에 달하며 이 중 체지방 감소에 효능이 있다고 알려진 가르시니아카모비아 추출물 제품이 440억원, 그린마떼추출물 제품이 147억원, 대두배아열수추출물등 복합물 제품이 61억원의 시장을 차지하고 있음 (식약처)
- “2009년 국내 다이어트 식품 시장은 1조2000억원 규모로 세계시장의 1.0% 수준이나, 2014년에는 2.0% 정도를 차지할 것으로 예상됨 (2011 한국식품안전연구원 미디어 워크숍)
- 성인 비만 유병률은 1998년 26.0%에서 2005년 31.3%로 5.3%p 증가한 후 최근 5년간 31% 수준을 유지하고 있으며 2011년 비만 유병률은 전체 31.9%, 남자 35.2%, 여자 28.6%로 나타남
- 비만인 사람 중 최근 1년간 체중감소 시도율은 전체 60.3%, 남자 57.4%, 여자 64.0%로 여성이 더 높았으며, 특히 20-40대 여성에서 높은 시도율 보임 (2011 국민건강통계)
- 건강기능식품 소비자 요구도 조사에서 비만관련 제품이 38%로 우위로 나타남 (한국건강기능식품협회, 건강기능식품 요구도 우선순위 조사결과)
- 바이오뉴트리젠(Bionutrigen), 케이비피(KBP), 태평양, 풀무원(Pulmuone), 유니베라(Univera), CJ, 한국야쿠르트 등 다양한 기업에 의해 시장 점유
- 바이오텍(CLA), 바이오뉴트리젠 (식물 추출물, 폴리페놀), KBP (Polymannuronate), LGCI (식욕저하 물질), 현대약품 (지방 분해 물질), 동아제약 (지방 축적억제), 한미약품 (체지방감소 레몬밤 추출물), 지니스 (JBD 유산균), 바이오니아 (BNR17 유산균) 등이 천연 소재를 이용하여 항비만소재 발굴 연구를 수행하고 있음
- 건강기능식품 체지방감소 기능성 개별인정형으로 인정받은 소재는 대두배아추출물, MCFA유지, 식물성유지, 깻잎추출물, 레몬밤추출물, 키토올리고당, 마태추출물, 돌외잎추출물, 핑거루트추출물, 미역추출물, 보이차추출물, 발효식초, 망고종자추출물, 그린커피빈추출물들이 있으며 이를 기능성 소재로 한 제품들이 판매되고 있음

2. 국외 현황

- 장 마이크로비오타에 의한 건강식품 및 의약품의 개발은 기존에 주로 장건강과 소화흡수를 개선하는 프로바이오틱스 소재 위주로 이루어졌음
- 장 마이크로비오타와 대사증후군, 면역, 성장이나 뇌건강 관련하여 이제 막 기능성 균주들의 발굴 및 제품화가 활발히 이루어지고 있음
- 특히 대사증후군의 핵심인 비만 또는 체지방 조절 효능 제품으로는 GNC사의 Ultra 25 Probiotic Complex-Weight Management Support 제품이 최근 출시되어 판매되기 시작했음

제 4 절. 본 연구관련 선행연구 내용

가. 항비만 유산균 발굴

- 지방산흡수 유산균에 의한 칼로리 섭취 감소가 비만에 미치는 효과를 알아보기 위해 먼저 지방산 흡수능이 현저히 개선된 지방산흡수 유산균 *L. acidophilus* mut1과 mut2 균주를 발굴하여 in vitro fatty acid uptake 능을 확인하였으며, 실제로 체내로 지방의 흡수량을 감소시켜준다는 사실을 확인하였음

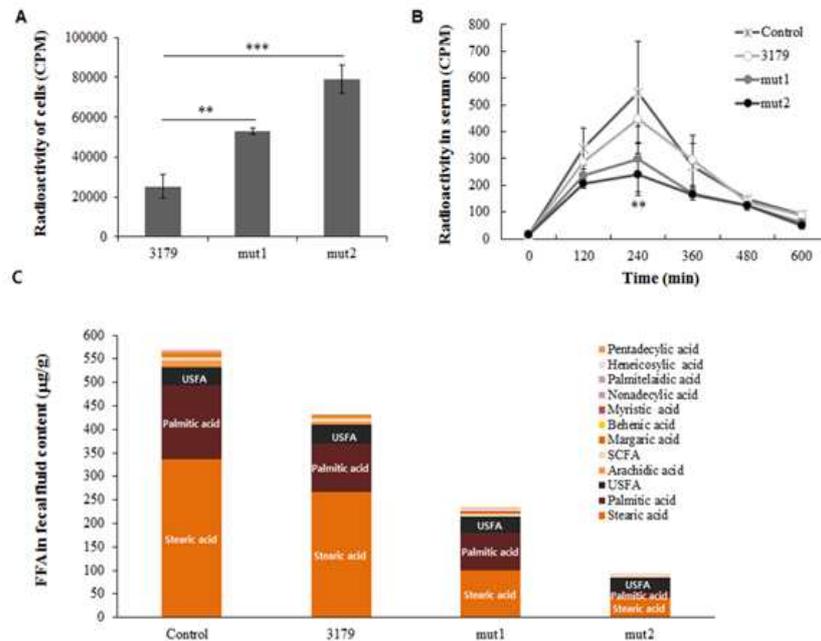


그림 15. 지방흡수 *L. acidophilus* 유산균의 지방흡수능(A), 지방 체내 흡수량 감소(B), 및 지방 대사체 감소 효과(C)

Fig. 1. Administration of the FFA-absorbing *Lactobacillus* mutants significantly reduced the absorption of FFAs by the host. (A) The FFA absorption by *Lactobacilli* (*L. acidophilus* 3179, mut1, or mut2) was determined by measuring the radioactivity in *Lactobacilli* after incubation with ^{14}C -labeled palmitic acid for 30 min. Values are mean \pm SD (n = 4). (B) Three-month-old male SD rats were randomized and fed a standard diet only (control) or a diet supplemented daily with 10^7 CFU of tested *Lactobacilli* (*L. acidophilus* 3179, mut1, or mut2). After 8 weeks, rat feed containing radiolabelled fat, ^{14}C -triolein, was administered. Blood samples were collected at the indicated times and radioactivity was analyzed to quantify the amount of FFAs from absorbed dietary fat in the blood of hosts. Values are mean \pm SD (n = 9). (C) FFAs in the fecal fluid contents from the hosts were analyzed by GC/MS.

- 지방흡수 유산균에 의한 칼로리 섭취 감소가 비만에 미치는 효과를 알아보기 위해 동물실험을 수행하였음
- 비만 유도 쥐 (DIO, diet-induced obesity)에 대조군(고지방 사료), 지방산흡수 유산균 그룹(고지방사료에 *L. acidophilus* mut1, 2)으로 나누어 각자 해당하는 식이

를 자유롭게 섭취 후 매주 실험동물의 체중변화를 측정하였음

- 예상한 바와 같이 정상유산균을 섭취시킨 쥐와 비교해서 지방흡수 유산균을 섭취시킨 쥐는 몸무게 증가가 15-20% 줄어드는 효과를 나타내었음

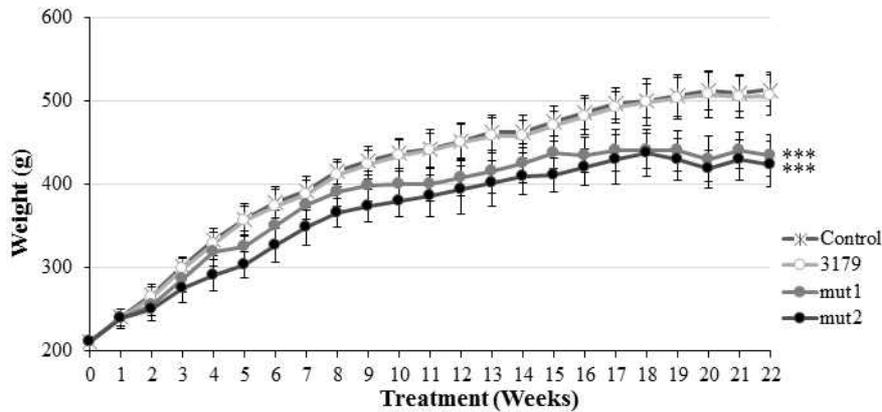


그림 16. 지방흡수 *L. acidophilus mut*유산균 섭취시 체중 증가 억제 효과

FFAs-absorbing *Lactobacillus* mutants effectively inhibited weight gain under diet-induced obesity condition. Three-month-old male SD rats were randomized and fed a HFD only (control) or a HFD diet supplemented daily for 22 weeks with 10^7 CFU of tested *Lactobacilli* (*L. acidophilus* 3179, mut1, or mut2). Body weights were monitored weekly.

나. 항비만 유산균 효능평가

- 포유동물에서 칼로리 과다섭취는 내장지방으로 대부분 축적되기 때문에 몸무게 증가는 내장지방 증가량과 비례하므로 지방흡수 유산균 섭취군에서 복부피하지방과 내장지방을 측정하였음

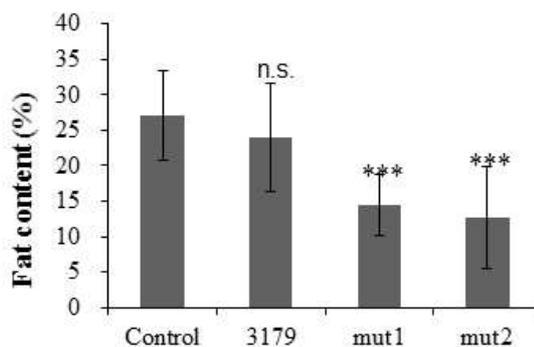


그림 17. 지방흡수 *L. acidophilus mut*유산균 섭취시 체지방 감소 효과

FFAs-absorbing *Lactobacillus* mutants effectively inhibited body fat accumulation under diet-induced obesity condition. Three-month-old male SD rats were randomized and fed a HFD only (control) or a HFD diet supplemented daily for 22 weeks with 10^7 CFU of tested *Lactobacilli* (*L. acidophilus* 3179, mut1, or mut2). The change in visceral fat areas of the rats. The representative MRI images of visceral fat accumulation were shown.

- 지방흡수 항비만 유산균은 체중을 감소시키는 효과가 있었고, 특히 이 쥐의 MRI 촬영 결과 복부 비만의 축적을 막는 효과가 뛰어난을 알 수 있었음

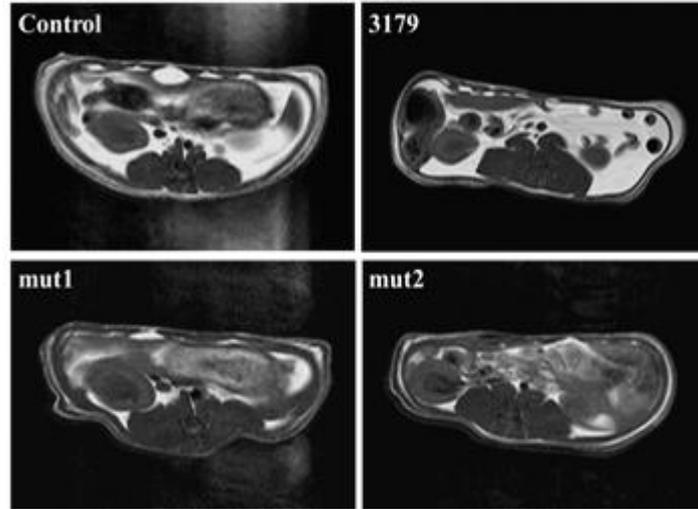


그림 18. 지방흡수 *L. acidophilus mut* 유산균 섭취시 내장지방 감소 효과

FFAs-absorbing *Lactobacillus* mutants effectively inhibited visceral fat accumulation under diet-induced obesity condition. Three-month-old male SD rats were randomized and fed a HFD only (control) or a HFD diet supplemented daily for 22 weeks with 10^7 CFU of tested *Lactobacilli* (*L. acidophilus* 3179, mut1, or mut2). The change in visceral fat areas of the rats. The representative MRI images of visceral fat accumulation were shown.

- 대조군과 실험군의 내장지방을 자기공명영상장치(MRI)로 측정하여 얻어진 이미지들을 영상분석프로그램(Image J, USA)으로 분석한 결과, 비처리 대조군, 일반 유산균을 섭취시킨 쥐 실험군, mut-1을 섭취시킨 쥐 실험군, mut-2를 섭취시킨 쥐 실험군의 내장지방량은 각각 27%, 24%, 14%, 그리고 13%였음
- 체지방을 및 비만과 관련되어 있는 혈중 지질 개선 효과를 보기 위해 대조군, 일반 유산균 발효 요구르트 섭취군과 지방흡수 항비만 유산균 발효 요구르트 섭취군의 혈청 내 생화학 분석을 수행하였음
- 유산균을 전혀 섭취시키지 않은 대조군과 일반 유산균을 섭취시킨 쥐에서의 TG, TC 및 LDL-콜레스테롤량은 지방흡수 항비만 유산균을 섭취시킨 쥐에서 보다 높았으며, 예상한 바와 같이 HDL 콜레스테롤 수치는 대조군에서는 낮았으나 지방흡수 항비만 유산균 그룹에서는 높았음
- 유산균을 전혀 섭취시키지 않은 대조군과 일반 유산균을 섭취시킨 쥐에서의 혈당 지표들 역시 지방흡수 항비만 유산균을 섭취시킨 쥐에서 개선되었으며, 예상한 바와 같이 지방흡수 항비만 유산균 그룹에서 혈당 수치, insulin, leptin의 수치들은 정상 수준으로 돌아갔음

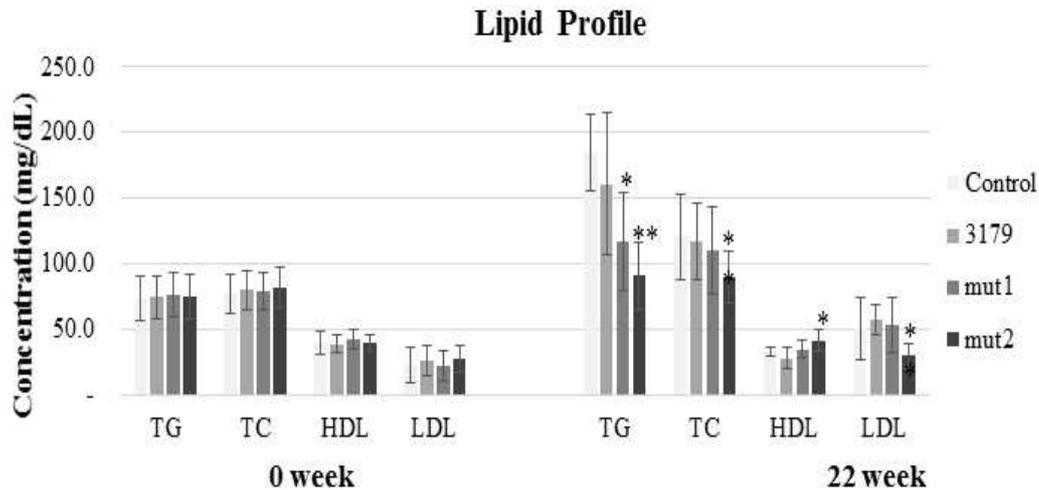


그림 19. 지방흡수 *L. acidophilus* mut유산균 섭취시 혈중 지질 프로파일 개선 효과

FFAs-absorbing *Lactobacillus* mutants effectively ameliorated blood profiles under diet-induced obesity condition. Three-month-old male SD rats were randomized and fed a HFD only (control) or a HFD diet supplemented daily for 22 weeks with 10^7 CFU of tested *Lactobacilli* (*L. acidophilus* 3179, mut1, or mut2).

다. 항비만 유산균 안전성 평가

- in vivo 독성평가를 위해서는 설치류를 이용하여 지방흡수 항비만 유산균을 경구 투여 후 일반상태의 추이와 사망에 이르는 경과를 관찰하여 독성평가를 수행함
- 투여용량은 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 산출하였으며 유산균이 식품으로 사용되는 소재인 점을 감안하여 단회 경구투여 한계용량인 2,000 mg/kg을 최고용량으로 정하여 투여한 후 일반상태의 추이와 사망여부를 1일 1회 이상 2주간 관찰하였음
- 일반상태의 관찰에서는 체중변동이 없었으며, 호흡이상, 경련 등 이상증상이 관찰되지 않았고 또한 관찰기간 중에 사망한 동물은 없었음.
- 지방흡수 항비만 유산균 섭취군을 대조군과 비교관찰시 시험군의 모든 동물에서 단회경구투여 이후 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며 폐사 또는 빈사 동물들도 관찰되지 않았음

제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

제 1 절. 연구개발 추진전략 및 방법

가) 국내산 농산물 소재의 HTS-지방 축적 억제능 스크리닝

- 지방산제거 작용기전에 기초한 생체모델을 이용하여 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재를 초고속으로 탐색하기 위해 cell line으로 3T3-L1 preadipocytes를 선정하였으며, 분화를 유도한 adipocytes 상태에서 식물소재를 처리하고, Nile red staining으로 lipid droplet을 측정하는 방법을 통해서 in vitro high throughput screening system 개발을 완료하였음
- High throughput screening에 이용할 식물기반 국내산 농산물 소재를 준비하기 위해서 감, 굴, 매실, 복분자, 당근, 무, 복숭아, 연, 잣, 녹차, 인진쑥, 벼, 보리, 밀, 수수, 조, 강낭콩, 검은콩, 울무, 대두 등을 포함하는 100종의 식물소재를 준비하였음
- 준비된 100종의 식물소재는 조직별로 (잎, 껍질, 씨앗, 과육, 뿌리, 줄기 등) 분리하였고, 분리된 부위를 각각 ethanol, methanol, ethyl acetate, hexane, water에서 micro 단위 추출을 진행하여 3,000개의 식물유래 농산물 소재의 항비만 탐색을 진행하였음
- Gelatin coating된 96-well plate에 3T3-L1 preadipocytes를 well 당 5,000개씩 seeding 한 후 CO2 incubator에서 confluent한 상태에 도달할 때까지 2-3일 정도 배양시켜주며, 앞서 개발한 high throughput screening의 방법을 이용하여 adipocytes로의 분화를 유도해주었음
- Plate내에 cell이 지방세포로 잘 분화되었는지 현미경을 통해 확인한 뒤, plate에 준비된 식물유래 농산물 소재를 6일 동안 처리하였음
- 6일 후 Nile red staining을 통해서 지방세포 내에 lipid droplet을 fluorescence 측정을 통해 확인하였음
- 무처리 대조군을 100%로 놓고 비교하였을 때, 최대 60% 이상 lipid droplet이 감소된 결과를 확인하였음
- High throughput screening을 통해서 선별한 후보군의 항비만 효능을 Nile red staining을 통해서 비교한 결과, 우수한 항비만 효능을 가지는 식물유래 농산물 소재를 확보하였음
- 지방 축적 억제능이 우수한 crude extract에서 물질 추출을 진행하여 LC/MS 분석을 수행한 후 효능평가를 통해 활성성분을 발굴하였음

나) 항비만 미생물 소재의 HTS-지방산 제거능 스크리닝

- 지방산 제거능을 가진 미생물 소재를 screening을 위한 방법으로 Fatty acid uptake assay와 free fatty acid assay를 탐색하였음
- 스크리닝에는 지니스에서 보유하고 있는 유산균 라이브러리 (Lactobacillus library)를 이용하였음
- Fatty acid uptake assay에는 masking dye가 부착된 fluorescent fatty acid analog가 들어있어 형광을 내지 못하는 상태이지만, Fatty acid transport protein (FATP)을 통해서 cell 내로 들어가면서 masking dye가 제거되며 형광을 내게 되어 fluorescence를 측정하여 지방산 흡수정도를 확인함
- Free fatty acid assay의 경우는 샘플에 들어있는 fatty acid를 측정하는 방법으로, fatty acid가 반응하여 최종적으로 분홍색을 띄는 물질을 생성하며, 570 nm에서 흡광도를 측정하여 비교함
- 두 분석법의 비교 평가를 통해 항비만 미생물소재 초고속 탐색을 위해 free fatty acid assay를 이용하여 high throughput screening을 진행하기로 결정함
- 항비만 미생물소재 초고속 탐색을 위한 in vitro high throughput screening system을 이용하여 유산균 라이브러리 (Lactobacillus library) 약 8,000종의 screening을 진행함
- 스크리닝 진행을 위해 deep 96-well plate에 자동분주기를 이용하여 MRS broth에 palmitate가 첨가된 배지를 분주하였음
- 스크리닝에 이용하는 미생물 유래 국내산 농산물 소재를 각각의 well에 inoculation하였으며, 15 - 18 시간동안 culture한 뒤 우선, cell OD 값(600 nm)을 측정하였고, 배지 내에 남아있는 free fatty acid 양을 free fatty acid assay를 이용하여 OD값 (570 nm)을 측정하였음
- 측정된 cell OD 값과 free fatty acid OD 값을 각 plate 별로 x, y로 하여 각각의 plot을 작성하였음
- 1차로 선별된 항비만 선도소재 후보 미생물의 in vitro 지방산 제거능을 확인한 결과, 대조군에 비해 현저히 향상된 지방산 제거능을 보이는 항비만 선도소재 균을 선별하였음

다) 항비만 소재의 in vivo 효능평가

- 6주령의 암컷 C57BL6 mouse를 구입하여 동물사육실 mouse Cage에 5마리 이하로 넣고 실험동물용 쥐 사료와 음용수를 자유 섭취 시키고 약 5-6일간 순화시켜 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 군 분리를 실시했음

- 1 주일 동안 환경에 적응을 시킨 후, 20% 이상의 돼지기름이 함유된 고지방 사료를 2주 이상 급이 하여 비만을 유도함
- 각 그룹별 마우스를 각 cage당 5마리씩 넣고 그룹별로 실험할 소재들이 첨가된 사료를 급이했음
- 각 mouse group은 정기적으로 체중을 측정하고, 꼬리 동맥에서 혈액을 채혈하여, 채취 후 신선한 상태에서 즉시 혈당, 혈중 중성지방, 혈중 총 콜레스테롤, 혈중 LDL 콜레스테롤, 그리고 혈중 HDL 콜레스테롤 수치들을 측정하는데 이용함
- 혈당분석은 각 mouse의 혈액 (whole blood) 10 ml를 혈당측정기에 삽입된 혈당 시험지에 떨어트린 후, 이 혈당 시험지를 읽는 방법으로 각 mouse의 혈당을 측정하였으며 각 mouse 혈당 값은 mouse group별로 모아 통계적 분석에 활용되었음
- 각 mouse의 혈중 지방 수치들을 측정하기 위해서는 분리된 혈장을 측정용 kit로 반응시킨 후, ELISA를 이용하여 흡광도를 측정하였음
- 각 mouse 혈장의 흡광도 값은 표준 sample의 흡광도 값을 기준으로 하여 수학적 보간법으로 각 mouse의 혈중 지방 수치를 계산하여 통계적 분석에 활용되었음
- 혈중 ALP(plasma alkaline phosphatase) 수치 역시 혈장 1 μ l를 Enzymatic colorimetric kit (Asan Pharm., Yongin, Korea)로 반응시킨 후 500nm에서 흡광도를 측정하여 정량분석을 수행하였음.
- 각 mouse의 체지방 분석은 micro-CT를 이용하여 Skyscan micro-CT의 CCD/phosphor screen detector로 촬영하고, 촬영된 영상은 Skyscan의 CTan Ver.1.10 프로그램으로 분석하여 총지방량, 피하지방량, 그리고 복부지방량을 측정하였음
- 조직학적 실험을 위해서는 먼저 각 실험군의 마우스를 마취한 후, 근조직과 피부조직을 적출하여 10% 포르말린 용액에 넣어 고정하고 parafilm block으로 만든 다음 microtome으로 얇게 자름
- Masson's trichrome stain 방법으로 염색한 다음 현미경으로 관찰하여 근육과 피부조직에 미치는 영향을 평가하였음
- 운동신경 상호작용 및 신체 능력 실험을 위해서는 수조 실험(수영, 자발성, 협응)과 rotarod 실험(협동능력, 균형, 신경근육 강화)을 수행하여 운동신경 상호작용과 신체 능력을 확인하였음
- 수영능력과 능률을 관찰하기 위해서 쥐는 물이 차있는 유리 수조 끝 지점에서 시작하여 반대쪽에 있는 플랫폼으로 이동하도록 하는 훈련을 진행하였음
- rotarod 실험에서는 rotarod 장치 (ROTAROD, Haryana, India)를 이용하여 30, 60rpm에서 떨어지기 전까지의 평균 유지시간을 분석하여 운동, 신체, 균형 능력을 확인하였음

라) 지방산제거 항비만 유산균의 characterization

- 물리적, 생물학적 요구조건의 확립을 위한 실험으로서 본 연구진은 배양 기간 중 pH의 변화를 토대로 각 조건에서의 균주의 산 생성 정도를 확인하고 유산균의 성장과 밀접한 연관이 있는 아세트산과 젖산의 농도를 일정 시간 배양 후 측정하였음
- 또한 각 배양 조건에서, 매 시간 OD 600nm를 기반으로 총 균수를 측정하여 성장 곡선을 도식화하였고 이를 토대로 고 영양원 환경에서 지방산 제거 유산균이 어떠한 물리적, 생물학적 특성을 가지는지 확인하였음
- 지방산 제거 유산균의 16s rDNA 분석을 위해 genomic DNA를 추출하여 얻은 뒤, 16s rDNA gene을 증폭하기 위한 PCR을 수행하였고, 증폭된 JBD 항비만 유산균의 16s rDNA는 automated DNA sequencer를 이용하여 sequencing하였으며, 얻어진 sequence는 CodonCode Aligner를 이용하여 Sequence Alignment를 진행하여 DNA sequence 분석을 완료하였음
- NCBU BLAST+, EMBL Nucleotide Sequence Database and DDBJ (DNA Data Bank of Japan)에서 비교분석하여 phylogenic characterization을 완료하였음

마) 지방산제거 항비만 유산균 배양 및 분말 생산공정 연구

- 대량 생산 공정을 개발하기 위해 본 연구진은 5,000L 대형 발효조를 사용했으며 발효기의 가동 조건으로서 중요한 요소인 pH, 온도, 임펠러의 속도 등을 중심으로 최적화 된 가동 조건을 찾기 위한 연구를 수행하였음
- 지방산제거 유산균은 생물학적 특성 상 성장에 따른 부산물로 산성물질을 배출하기 때문에 일정한 pH를 유지시켜주는 것은 유산균의 배양과정에 있어서 매우 중요한 요소임
- 지방산제거 유산균 Bioreactor 양산조건 최적화를 위해서, pH 3 내지 pH 7 범위를 설정하여 각 조건에서 배양한 뒤 배양액을 채취하여 600nm에서의 흡광도를 측정하였음
- 지방산제거 유산균 Bioreactor 양산조건 최적화를 위해서, 유산균의 성장 온도 조건인 30~40℃을 설정하여 각 온도에서 유산균의 성장 정도를 확인하였음
- 지방산제거 유산균 Bioreactor 양산조건 최적화를 위해서, bioreactor impeller rpm을 30~200 사이 다양하게 설정하여 각 온도에서 유산균의 성장 정도를 확인하였음
- 이와 더불어 유화제 및 소포제를 첨가하는데 있어서 유산균의 성장에 미치는 소포제 자체의 영향을 알아보기 위해 단독으로 소포제 넣은 균과 유화제와 함께 넣은 실험균을 각각 설정하였음
- 배양 이후 동결건조 과정에서 가장 결정적인 동결보호제 조합을 바탕으로 하여 대량 생산 공정으로 생산한 지방산제거 유산균 배양액도 비슷한 경향성을 따르는지 확인하고 scale-up 및 첨가물로 인한 성분의 변화, 탁도의 차이, 균질화의 어려움 등을 고려하여 다시 최적화를 진행하였음

- 이를 위해 탈지분유, 자당, 만니톨, 말토오스, 폴리비닐피로리돈, 아스코르빈산 및 자당/아스코르빈산등의 조합에 의한 유산균 분말에 대해 평가를 실시하였음

바) 지방산제거 항비만 유산균 분말 시제품 생산

- 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 스타터 분말의 시제품 생산을 위해 앞서 실험 과정을 통해 최적화된 배지 조성과 대형 발효조 가동 조건, 동결보호제 조성 등을 적용하여 시제품의 대량 생산을 진행하였음
- 지방산제거 유산균의 시제품 생산을 위해 200L 발효조에서 약 5시간 내지 8시간 정도 종배양을 진행하였음 (Agitation: 100rpm, Temperature: 37°C, anaerobic)
- 일부를 5,000L 대형 발효조에 접종하여 10시간 내지 15시간의 본배양을 진행하였음. (Agitation: 30rpm, Temperature: 37°C, Pressure: 1.0kgf/cm², anaerobic)
- 모든 배양액은 사전에 121°C에서 15분간 멸균이 진행되었음
- 배지 성분 중 무수결정포도당의 경우 멸균과정에서의 반응을 최소화하기 위해 따로 멸균을 진행한 뒤 냉각되었을 때 배양 발효조에 투입되었음
- 배양액은 이후 대용량 원심분리기와 여과장치를 거쳐 농축되어지고, 해당 과정을 통해 얻은 균체 농축액은 앞서 최적화된 동결보호제 조성 및 농도에 의거하여 고르게 혼합되었음
- 혼합된 농축액은 일정량씩 동결건조용 트레이에 부어진 후 미리 -45°C이하로 냉각된 동결건조기에서 약 2일 내지 3일 동안 충분히 동결건조 되었음
- 동결건조물은 이후 회수되어 100mesh 내지 300mesh의 분쇄기에서 분쇄되었으며 분말은 정량씩 밀봉 흡습 포장되어 -20°C 이하에서 냉동보관 되었음
- 포장 완료된 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 스타터 분말 시제품은 유산균 생균수 측정 및 대장균군 검사, 중금속 함량 검사 등의 정밀 검사를 거쳐 분말의 품질이 확인되었음
- 밀폐된 알루미늄 파우치에 생산된 분말을 소량씩 나눠 담은 뒤 냉장 보관 상태(4°C)와 일반 보관 상태(25°C, room temperature) 이상 두 가지 경우를 가정하여 본 실험을 진행하였음

사) 국내산 농산물 소재의 HTS-지방 분해 억제능 스크리닝

- 시료를 전 처리한 뒤 spectrophotometer를 활용하여 정량분석하였음
- 1차 실험을 통해서 lipase 비활성화율을 분석하여 상위 소재를 결정함
- 추가적으로 반복 실험을 통하여 lipase 비활성화율이 높은 상위 소재를 결정한 후 대량으로 추출, 분리정제 및 분석을 수행함

- 이 추출물을 이용하여 다양한 조건에서 가장 우수한 pancreatic lipase 억제율을 보이는 소재를 최종 발굴하였음
- 분획물의 물질을 분리하기 위해 HPLC를 수행하고 이를 토대로 물질분리를 수행하기 위해서 rotary evaporator를 이용하여 농축과정을 진행하고, prep-LC 장비를 이용하여 물질 분리를 실시하였음
- 시간대 별로 나누어 물질을 분리해 lipase assay를 진행한 후 효과가 있는 시간대의 물질을 확인함

아) 지방산제거 항비만 유산균 분말의 유제품 발효 적용

- 원유는 홀스타인 프리지안(Holstein-Friesian)종에서 생산된 산도가 0.14~ 0.15% 이고, pH가 6.6~6.8 범위인 신선한 원유를 사용함
- 원유는 90℃에서 10분간 살균하고 43℃까지 냉각함
- 지방산제거 항비만 유산균 분말 균체를 접종하여 42℃에서 pH가 4.7에 도달할 때까지 발효시켰으며, 이때까지의 시간을 측정하여 상업적 스타터와 비교함
- 상업적 스타터는 ABT-4(Chr. Hansen, Denmark)를 똑같은 방법으로 배양하여 대조군으로 함
- 지방산 제거 유산균 분말의 원유에 대한 유산 생성능 측정하기 위해 지방산 제거 유산균 분말 첨가량에 따른 유산 생성을 대조군과 비교함
- 지방산 제거 유산균 분말이 포함되어 있지 않고 소비자의 선호도가 높은 YF-L812을 상업적 스타터로 선정하여 지방산제거 유산균 분말과 혼합하여 발효유 적용 특성을 측정함
- 배양 종료 후 배양시간별로 스타터 균주별로 제조된 발효유에 대해 일반검사를 통해 당도(Brix), 산도(%), 지방(%), pH 등을 검사하여 발효 적성 평가를 수행함
- 미생물 검사를 통해 ml당 대장균군, 효모/곰팡이, 유산균의 CFU를 측정하고 품질 검사 (lactic acid, pH, Acetaldehyde, Diacetyl 등)를 수행함
- 제조된 발효유를 색, 향, 맛, 전반적인 기호도를 5점 척도법을 이용하여 관능평가 실시함
- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 함유한 식품 첨가물용 복합분말제의 경우 역시 같은 방식으로 유제품 발효 공정을 적용한 후 발효유 적용 특성, 미생물 검사, 품질평가등을 수행함

제 2 절. 연구개발 추진체계

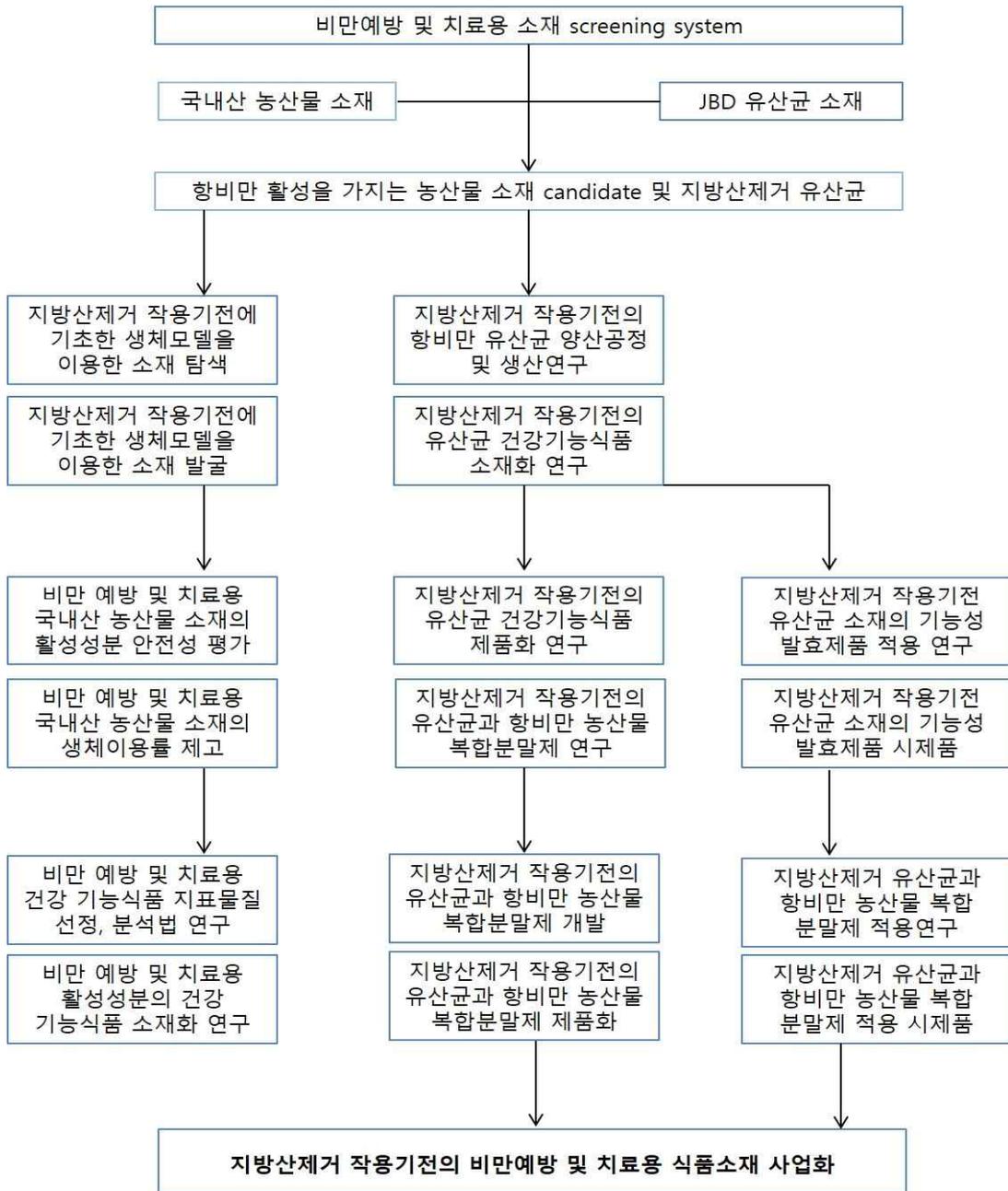


그림 20. 연구개발 추진체계

제 3 절. 연구개발 추진일정

1. 1차 년도 연구개발 추진일정

세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진일정											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 screening 및 지방산제거 유산균 기능성식품 소재화 연구 (지니스)	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 탐색												
	○ 비만 예방 및 치료용 미생물 기반 소재 탐색 및 생체모델을 이용하여 항비만 기능성 소재 발굴												
	○ 지방산제거 유산균 최적 배양을 위한 영양 요구 조건, 배양 온도 및 pH 조건, aeration, 교반 등과 같은 물리적 조건 확립												
	○ 지방산제거 유산균의 기능성 자료 준비												
	○ 지방산제거 유산균의 data 통계처리												
	○ 지방산제거 유산균의 건강기능식품 소재화 연구												
비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구 (전복대)	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 탐색 및 생체 모델을 이용하여 항비만 기능성 소재 발굴												
	○ 지방산제거 작용기전에 기초한 생체 모델을 이용하여 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴												

2. 2차 년도 연구개발 추진일정

세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진일정											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 생산용 복합분말제 개발 (지니스)	○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성 분말 대량생산 공정 개발												
	○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성 분말 시제품 생산												
	○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 복합 분말제 제품화 연구 (제형 개발-캡슐형, 액체형, 포장단위, spec 등)												
	○ 지방산제거 유산균과 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 복합 항비만 효능 평가												
	○ 지방산제거 유산균의 항비만 기능성 자료												
	○ 지방산제거 유산균의 항비만 기능성 검증												
	○ 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말 개발을 위해 growth characteristics, sugar utilization ability, acid production ability, proteolytic activity 특성 연구												
○ 지방산제거 유산균을 비만 예방 및 치료용 발효식품 스타터 분말 소재로 개발													
비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구 (전북대)	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 유산균 발효 전후 활성성분 함량 변화 연구												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재의 효능 관련 성분의 구조 확인 및 분석방법 확립												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 활성성분의 안정성 평가												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 활성성분의 생체이용률 제고 방법 개발												
비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균 복합 분말제를 이용한 기능성 식품 연구 (임실치즈연구소)	○ 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말의 발효공정 적용 test												
	○ 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말로 발효된 제품 품질검사 (lactic acid, pH, Acetaldehyde, Diacetyl 등)												
	○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 개발												

3. 3차 년도 연구개발 추진일정

세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진일정											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 생산용 복합분말제 개발완료 및 비만 예방 및 치료용 기능성식품 제품화 (지니스)	○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 항비만 기능성식품 마케팅 파트너 확보												
	○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성식품 제품화												
	○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성식품 마케팅												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 함유한 식품 첨가물용 복합분말제 개발 연구												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 함유한 식품 첨가물용 복합분말제 시제품 생산												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 제품화												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 마케팅 전략 수립												
비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구 (전북대)	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 함유한 복합분말제 지표물질 선정 및 분석												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균을 함유한 복합분말제의 synergistic 효능평가												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균을 함유한 복합분말제 시제품 품질 평가												
비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균 복합 분말제를 이용한 기능성 식품 연구 (임실치즈과학연구소)	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균을 함유한 복합분말제를 이용하여 발효식품 제품화 적용 연구												
	○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균을 함유한 복합분말제로 발효된 제품 품질검사												

1. 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 screening

가) 항비만 농산물소재 초고속 탐색을 위한 in vitro HTS

- 항비만 식물소재 초고속 탐색을 위한 in vitro high throughput screening system 개발을 위해 3T3-L1 preadipocytes cell line을 선정하였음
- 3T3-L1 cell line은 mouse origin의 embryo fibroblast이며, 분화 유도물질 처리 조건에 의해서 triglyceride가 축적되어 adipocyte 형태를 띠므로 in vitro에서 지방세포 분화와 항비만을 연구하는데 잘 알려진 cell line임

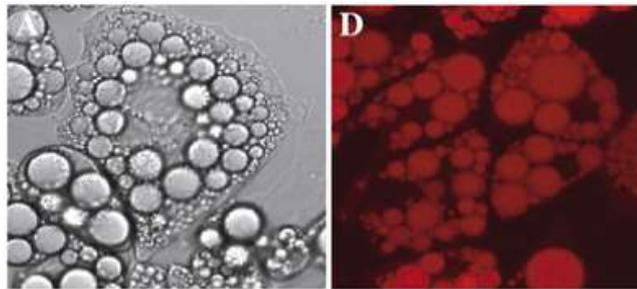


그림 21. 지방세포의 Lipid droplet(중성지방)에 염색된 Nile red

- 항비만 식물소재 초고속 탐색을 위해 cell line으로 3T3-L1 preadipocytes를 선정하였으며, 분화를 유도한 adipocytes 상태에서 식물소재를 처리하고, Nile red staining으로 lipid droplet을 측정하여, in vitro HTS를 수행하였음

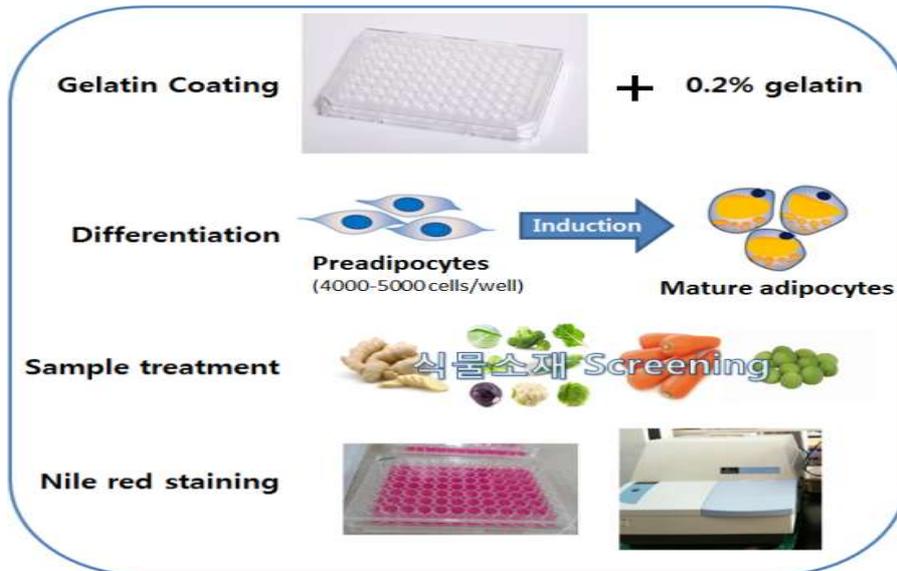


그림 22. 항비만 농산물소재 초고속 탐색을 위한 in vitro HTS

- HTS에 이용할 식물기반 국내산 농산물 소재를 준비하기 위해서 감, 굴, 매실, 복분자, 당근, 무, 복숭아, 연, 잣, 녹차, 인진쑥, 벼, 보리, 밀, 수수, 조, 강낭콩, 검은

콩, 울무, 대두 등을 포함하는 100종의 식물소재를 조직별로 (잎, 껍질, 씨앗, 과육, 뿌리, 줄기 등) 분리하였고, 분리된 부위를 각각 ethanol, methanol, ethyl acetate, hexane, water에서 micro 단위 추출을 진행하여 3,000개의 식물유래 농산물 소재의 항비만 탐색을 진행하였음

- 96-well plate에서 3T3-L1 preadipocytes를 adipocytes로 분화시킨 뒤 준비된 식물유래 농산물 소재를 6일 동안 처리 후 Nile red staining을 통해서 지방세포 내에 lipid droplet을 fluorescence 측정을 통해 확인하였음
- 그 결과, 무처리 대조군 (100%, red) 대비, 최대 60% lipid droplet이 감소하였음

96.71	101	52.2	76.6	95.1	60.9	99.4	98.7	97.1	101	60.5	83.6	101	98.4	79.1	99.8	97.9	84.1	99	95.8	96.3	101		
40.31	58.3	98.4	71	43.8	46.3	98	53.1	33.7	39.8	83.3	99.8	99.2	66.7	88.8	99.4	93.3	99.8	76.4	95.2	84.7	99.9	93.8	101
108.6	46.3	95.3	95.3	68.5	99	98.4	92.4	94.2	57.4	44.4	96	92.2	92.9	90.8	93.8	96.4	97.7	80.9	95.8	82.2	97	98.7	
57	81.8	48.4	52.7	42.1	43.8	42.9	83.8	89.8	84.8	43.8	44.4	94	48.9	52.6	71.3	94.3	77.3	95.4	85.6	68	46	92	73.1
42.8	53	99.8	99.4	99.4	73.8	42.2	81	41.8	97.8	98.8	98.1	62.3	97.3	92.3	99.3	97	94.3	97	92.7	43.8	93.8	95.6	49.8
85.5	97.8	54.1	71.3	88	63.4	76.1	83.3	81.1	73	62.4	83.9	88.8	66.4	84.4	84.8	71.5	84.4	46.8	76.1	84.8	90.8	81.8	81.8
69.9	86.3	98	79.8	67.8	88.3	93.7	41.8	95.8	58.3	101	72.7	39.8	101	101	84	84	90	93.7	74.4	87.4	84.2	79.8	99
82.4	57.2	97.8	88.8	88	74.4	98.3	98.8	81.1	78.3	63.3	88.8	74.8	94.4	98.8	99.3	96	94.2	92.7	84	77.6	84.3	93.1	88.1
89.2	106	81.7	101	84.7	108	97.8	97.8	72.9	99.1	106	68.4	72.9	104	85.5	70.3	98	101	99.2	48.3	52.2	94.2	101	49.8
98.8	48.2	62.2	101	98.8	97.8	96.3	96.3	115	65.3	68.3	68.3	68.3	118	101	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
81.1	52	50.3	84.1	61.5	99.8	59.4	87.8	51.8	98.3	83.2	98.1	83.1	101	101	98.2	58.9	87.4	68.7	85.3	98.8	98.4	95	95
91.3	94.8	99.2	93.8	81.7	98.3	97.8	97.8	97.8	101	82.3	84.4	94	91.1	97.8	55.6	87.9	98	99.4	94.8	84.6	63.3	97.3	79.3
88.8	84.3	83	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8
66.3	88.8	92.1	84.1	86.7	79.4	82	84	77.8	85.4	93.8	86.9	101	101	101	89.3	98	89.4	71.5	82.7	90.4	94.8	106	106
106.2	81.8	84.1	92.6	91.1	58.8	68.2	91.8	95.1	81.9	93.3	88.8	98.1	98.1	98.1	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4
88.8	84.3	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8
97.2	101	65.1	83.7	101	84.5	97.3	101	81.8	90.9	104	96	53.8	92.8	83.1	20.8	98	89.7	98.8	98.8	85	85	85	85
84.5	92.8	45.7	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8
95.7	81.8	88.4	88.4	78	52.4	86.3	87.1	95.8	76.8	88.7	100	80.3	56.7	73.1	88	78.4	97	95.8	68	68	68	68	68
48.9	98	57.2	89	67.8	93.1	98.8	88.4	84.1	81.1	85.4	71.5	88.8	52	73.2	48.8	58.8	78.8	88.1	98.8	88	63.3	59.4	
63.8	98.1	57.2	98	88.8	85.8	48	45.8	52.8	68	43.8	68.8	92.4	98	78	97.8	98.8	57.8	93.8	98.8	88.8	88.8	88.8	88.8
79.2	93.2	98.4	98	48.8	88.4	42.4	62.7	94	42.4	90.1	74.7	88.8	84.5	97.1	80.4	84	88.3	87.5	87.4	98.8	88.8	88.8	88.8
88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8
63.4	95.5	93.5	87.1	83.4	89.8	91	72.7	82.2	77.3	45.3	38.4	81.4	78	94.2	91	84.4	82.8	88.8	93.8	95	87.4	92.4	101
48.2	106	76.7	44.5	89.2	101	100	100	44.4	82.8	90.1	47.4	97.8	101	98	101	98.8	100	98.8	101	90.7	108	110	89.8
133.6	98	101	88.8	77.8	96.8	98.8	98.8	79.8	58.4	98.3	98.4	97.4	73.4	44	101	98.2	104	88.8	94.5	101	101	101	101
87.2	88.1	101	99.3	84	58.9	69.3	46	95	88.8	108	87.4	92.4	88.3	93.8	96.3	98.8	108	79.3	98.1	71.8	101	84.3	98.8
84.3	88.8	98	83.3	108	94.8	89.3	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88
97.2	97.8	88	91.7	86.3	95.8	68.3	88	84.8	83.8	96.8	88.8	93.8	60.7	84	92.7	87.3	83.8	88.8	93.8	95	97.1	97	99.2
82.3	100	93.5	88.8	87.8	92.5	53.5	82.8	83.1	88.8	108	100	90.8	87.7	97.2	100	100	83.2	95.1	98.4	97	97.8	101	101
108	88.8	88	95.8	108	97.4	101	100	100	101	91.1	86.1	84	91.2	85.4	96.1	99.4	98.8	71	95.1	91.8	93.8	96.4	91.5
92.1	99.8	84.4	101	82.4	101	95.1	100	99.8	94.8	72.3	101	95.4	95.2	98	97.4	88.8	97.8	90	92.8	87.1	83.8	99.1	88.8

그림 23. Nile red staining HTS-1

98.8	95	69	97.8	88.2	91	97.4	100	99.9	100	100	87.1	98.8	101	52.9	82.2	96.6	99.4	84.4	98.8	97.8	101	60.3	
79.3	92.8	94.7	94.8	63.8	83.1	96.4	85.2	94.2	98.8	98.7	101	40.3	58.9	88.8	78	43.8	48.3	87.4	55.1	83.7	92.8	81.8	88.8
108.6	46.3	95.3	95.3	68.5	99	98.4	92.4	94.2	57.4	44.4	96	92.2	92.9	90.8	93.8	96.4	97.7	80.9	95.8	82.2	97	98.7	
89.2	106	81.7	101	84.7	108	97.8	97.8	72.9	99.1	106	68.4	72.9	104	85.5	70.3	98	101	99.2	48.3	52.2	94.2	101	49.8
98.8	48.2	62.2	101	98.8	97.8	96.3	96.3	115	65.3	68.3	68.3	68.3	118	101	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
81.1	52	50.3	84.1	61.5	99.8	59.4	87.8	51.8	98.3	83.2	98.1	83.1	101	101	98.2	58.9	87.4	68.7	85.3	98.8	98.4	95	95
91.3	94.8	99.2	93.8	81.7	98.3	97.8	97.8	97.8	101	82.3	84.4	94	91.1	97.8	55.6	87.9	98	99.4	94.8	84.6	63.3	97.3	79.3
88.8	84.3	83	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8
66.3	88.8	92.1	84.1	86.7	79.4	82	84	77.8	85.4	93.8	86.9	101	101	101	89.3	98	89.4	71.5	82.7	90.4	94.8	106	106
106.2	81.8	84.1	92.6	91.1	58.8	68.2	91.8	95.1	81.9	93.3	88.8	98.1	98.1	98.1	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4
88.8	84.3	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8
97.2	101	65.1	83.7	101	84.5	97.3	101	81.8	90.9	104	96	53.8	92.8	83.1	20.8	98	89.7	98.8	98.8	85	85	85	85
84.5	92.8	45.7	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8
95.7	81.8	88.4	88.4	78	52.4	86.3	87.1	95.8	76.8	88.7	100	80.3	56.7	73.1	88	78.4	97	95.8	68	68	68	68	68
48.9	98	57.2	89	67.8	93.1	98.8	88.4	84.1	81.1	85.4	71.5	88.8	52	73.2	48.8	58.8	78.8	88.1	98.8	88	63.3	59.4	
63.8	98.1	57.2	98	88.8	85.8	48	45.8	52.8	68	43.8	68.8	92.4	98	78	97.8	98.8	57.8	93.8	98.8	88.8	88.8	88.8	88.8
79.2	93.2	98.4	98	48.8	88.4	42.4	62.7	94	42.4	90.1	74.7	88.8	84.5	97.1	80.4	84	88.3	87.5	87.4	98.8	88.8	88.8	88.8
88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8	88.8
63.4	95.5	93.5	87.1	83.4	89.8	91	72.7	82.2	77.3	45.3	38.4	81.4	78	94.2	91	84.4	82.8	88.8	93.8	95	87.4	92.4	101
48.2	106	76.7	44.5	89.2	101	100	100	44.4	82.8	90.1	47.4	97.8	101	98	101	98.8	100	98.8	101	90.7	108	110	89.8
133.6	98	101	88.8	77.8	96.8	98.8	98.8	79.8	58.4	98.3	98.4	97.4	73.4	44	101	98.2	104	88.8	94.5	101	101	101	101
87.2	88.1	101	99.3	84	58.9	69.3	46	95	88.8	108	87.4	92.4	88.3	93.8	96.3	98.8	108	79.3	98.1	71.8	101	84.3	98.8
84.3	88.8	98	83.3	108	94.8	89.3	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88
97.2	97.8	88	91.7	86.3	95.8	68.3	88	84.8	83.8	96.8	88.8	93.8	60.7	84	92.7	87.3	83.8	88.8	93.8	95	97.1	97	99.2
82.3	100	93.5	88.8	87.8	92.5	53.5	82.8	83.1	88.8	108	100	90.8	87.7	97.2	100								

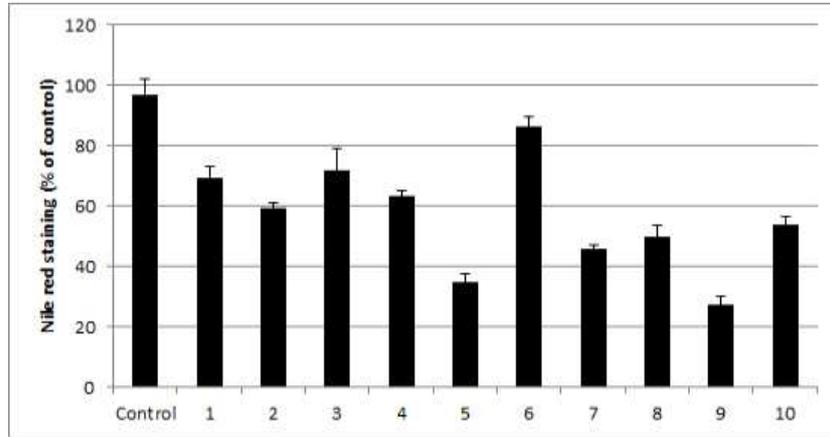


그림 26. 항비만 효능 식물유래 농산물 소재 후보군

나) 항비만 미생물소재 초고속 탐색을 위한 in vitro HTS

- 항비만 미생물소재 초고속 탐색을 위해, 지니스 유산균 라이브러리 (Lactobacillus library)를 FFA assay로 탐색하여 지방산 제거 미생물을 screening하였음

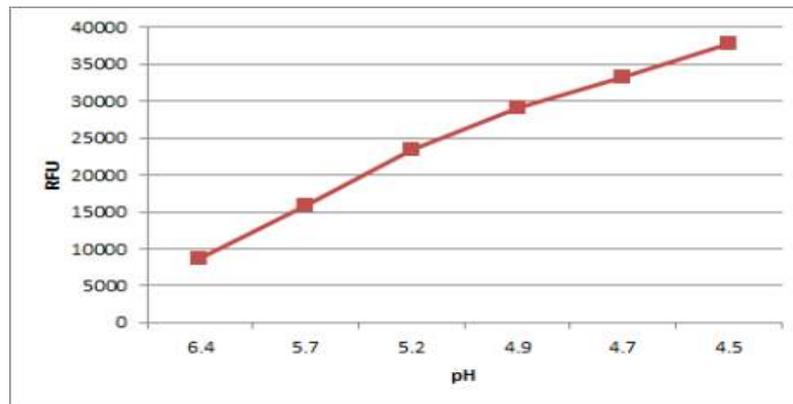


그림 27. pH에 따른 FA uptake assay 값

- 다양한 최적화 시도를 거쳐, round-bottom deep 96 well plate를 선정하였으며, automation으로 screening의 효율을 높였고, 미생물을 culture media의 FFA 양을 측정하여, 미생물소재의 지방산 제거능을 정량분석하는 방법으로 in vitro HTS 개발을 완료하였음

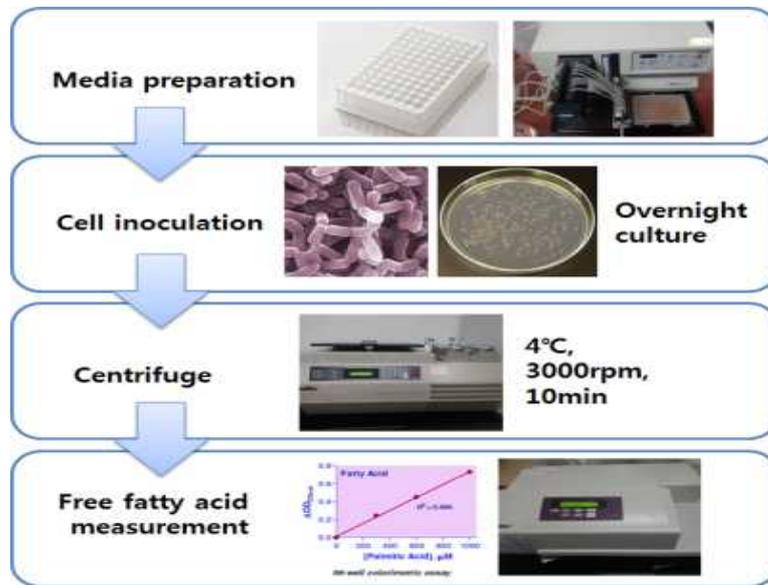


그림 28. 항비만 미생물소재 초고속 탐색 HTS

- 유산균 라이브러리 (Lactobacillus library)를 HTS하기 위해 deep 96-well plate에 자동분주기를 이용하여 palmitate가 첨가된 MRS를 분주하고, 스크리닝할 미생물을 inoculation하여 culture한 뒤 우선, free fatty acid assay를 이용하여 측정된 free fatty acid OD 값과 cell OD 값을 각 plate 별로 y, x로 하여 plot을 작성하였음

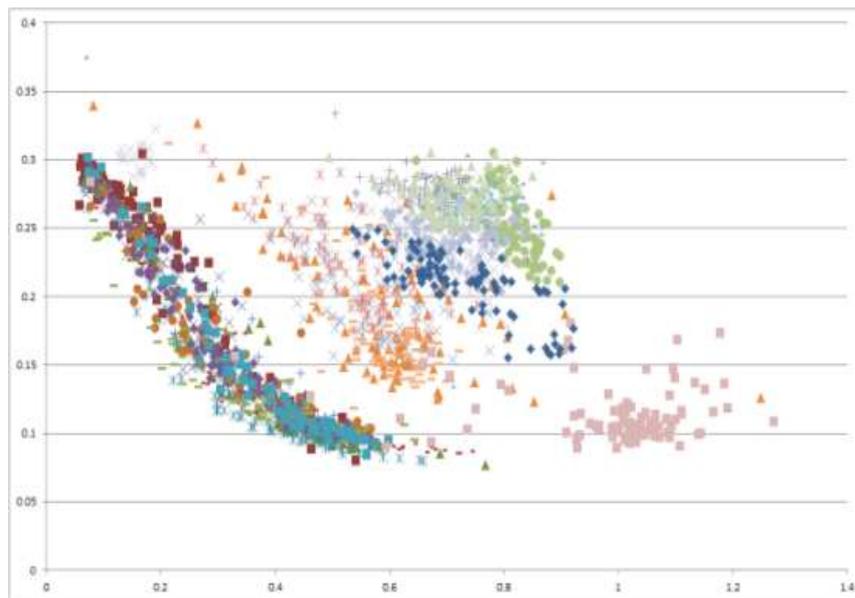


그림 29. 미생물 in vitro 지방산 제거능 스크리닝 (x축: cell, y축:FFA)

- 균주 스크리닝 data와 plot을 토대로, 빠른 성장속도를 보이면서 FA 제거 능력이 좋은 균주를 선별하여 1차 후보균 41개를 선정된 후 재 assay하였음

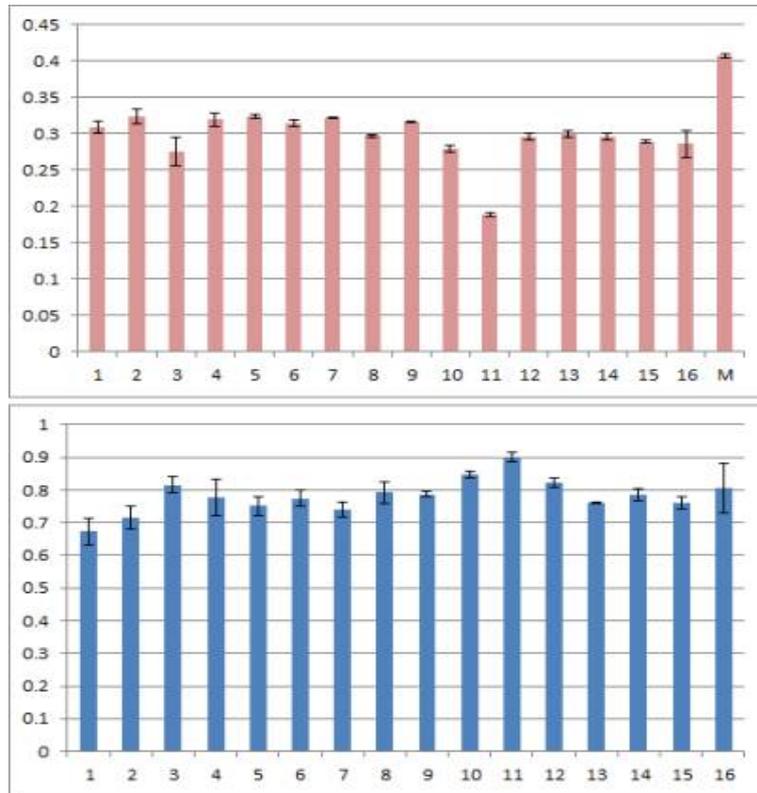


그림 30. 2차 선별 미생물후보군의 FFA능(위)와 cell OD(아래)

- 2차 선별 실험에서 11번 균주가 가장 좋은 지방산 제거능을 가짐을 확인하여, 기존에 확보한 지니스 항비만 유산균과 지방산 제거능을 비교 확인하였음
- 항비만 유산균의 In vitro FFA uptake 능을 평가하기 위해서 유산균주들을 방사능 표지된 14C 팔미트산(palmitic acid)과 함께 배양한 후 방사능 정도를 측정하였음
- 그 결과, 11번 균주는 지니스 항비만 유산균보다 좋은 흡수능을 보이는 것을 확인하였음

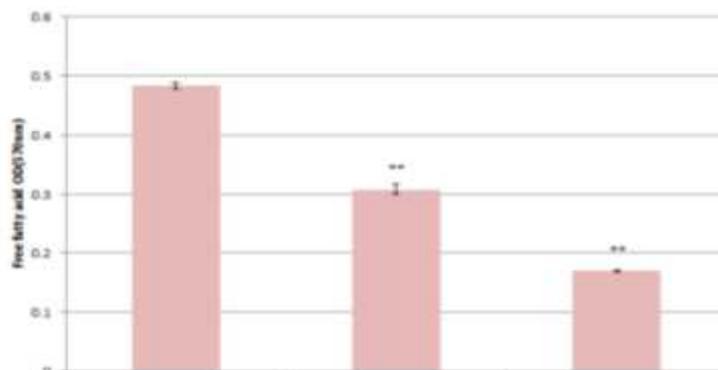


그림 31. 최종 미생물의 지방산 제거능 비교 그래프 (Cont, 301, 11)

다) 국내산 농산물 소재의 항비만 효능 평가

- 본 연구에서는 in vitro high throughput screening에서 도출된 식물체 유래 항비만 국내산 농산물소재 51건에 대한 항비만 효능평가 시험결과 특히 4건의 시료 (JBD1125, JBD2314, JBD2543, JBD3107)의 항비만 효능이 뛰어난을 확인할 수 있었음

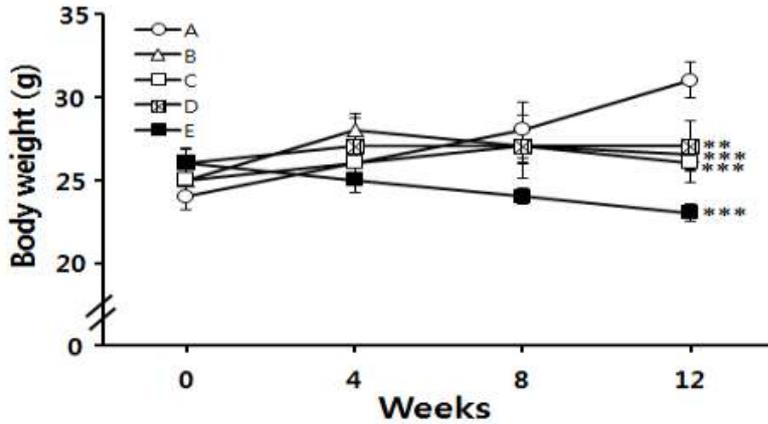


그림 32. 국내산 농산물 항비만소재가 체중에 미치는 영향

본 그림에서 A는 고지방/고칼로리 사료를 12 주 섭취한 마우스 대조군 그룹; B는 고지방/고칼로리 사료에 JBD1125 시료 1%가 함유된 사료를 섭취한 마우스 그룹; C는 고지방/고칼로리 사료에 JBD2314 시료 1%가 함유된 사료를 섭취한 마우스 그룹; D는 고지방/고칼로리 사료에 JBD2543 시료 1%가 함유된 사료를 섭취한 마우스 그룹; E는 고지방/고칼로리 사료에 JBD3107 시료 1%가 함유된 사료를 섭취한 마우스 그룹(n=16); * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001은 대조군과 비교한 통계분석 결과임.

- “식물체 유래 국내산 농산물 항비만소재”가 함유된 사료를 섭취한 마우스는 체중 감소와 더불어 micro-CT 분석 결과 체지방 수치 또한 탁월하게 개선됨을 알 수 있었음

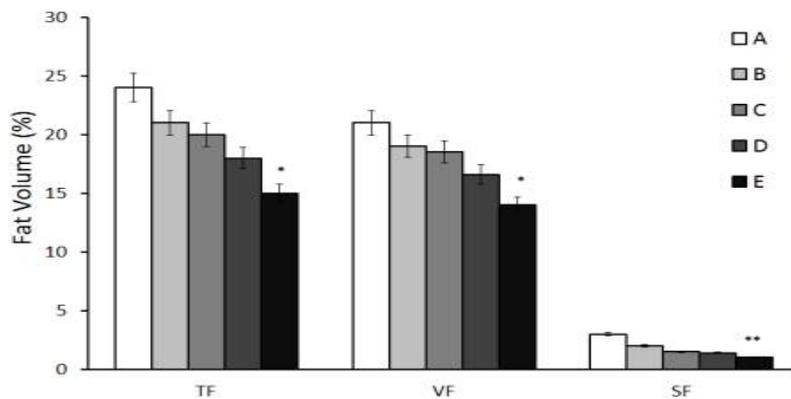


그림 33. “국내산 농산물 항비만소재”에 의한 체지방량

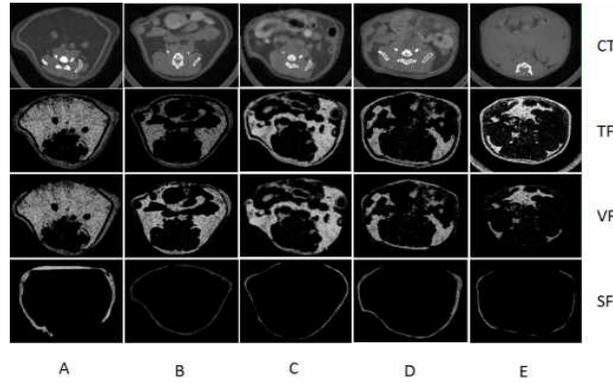


그림 34. 국내산 농산물 항비만소재”에 의한 체지방량(좌) 및 대표 이미지(우)

본 그림에서 A는 고지방/고칼로리 사료를 섭취한 마우스 대조군 그룹; B는 고지방/고칼로리 사료에 JBD1125 시료 1%가 함유된 사료를 섭취한 마우스 그룹; C는 고지방/고칼로리 사료에 JBD2314 시료 1%가 함유된 사료를 섭취한 마우스 그룹; D는 고지방/고칼로리 사료에 JBD2543 시료 1%가 함유된 사료를 섭취한 마우스 그룹; E는 고지방/고칼로리 사료에 JBD3107 시료 1%가 함유된 사료를 섭취한 마우스 그룹. 본 실험은 “식물체 유래 국내산 농산물 항비만소재”를 12주 동안 섭취한 생쥐의 체지방 변화를 in vivo micro CT 영상 분석법으로 관찰한 결과의 평균값 \pm SEM (n=16) 및 micro-CT 이미지 각 생쥐 실험군과 대조군은 unpaired Student's t test 통계 분석 방법으로 분석하였음

- Micro-CT 분석 결과에 의하면 “식물체 유래 국내산 농산물 항비만소재”를 섭취한 마우스는 전반적으로 체중이 감소하고 체지방도 줄었지만, 특히 JBD3107 시료를 섭취한 마우스의 경우 총 체지방은 21.55%, 복부 지방은 16.33%, 그리고 피하지방은 3.10%이었고 반면에 대조군의 총 체지방은 25.43%, 복부 지방은 20.02%, 그리고 피하지방은 3.83%이었음
- 결론적으로 “식물체 유래 국내산 농산물 항비만소재 (JBD1125, JBD2314, JBD2543, JBD3107)”는 체중과 체지방을 감소시켜 비만에 탁월한 효능이 있음을 확인하였음
- JBD1125, JBD2314, JBD2543, JBD3107를 섭취한 마우스는 체중과 체지방이 감소하면서 전반적으로 혈액 내 LDL 콜레스테롤, 총 콜레스테롤, 혈당, 중성지방 수치가 감소되어 혈청학적 profile이 개선되어짐을 알 수 있었음
- 특히 JBD3107 시료를 섭취한 마우스 그룹의 경우 혈당이 22.0%, 총 중성지방 수치는 37.4%, 총 콜레스테롤 수치는 27.0%, 그리고 LDL 콜레스테롤 수치는 59.6% 감소하였고, HDL 콜레스테롤 수치는 14.8%나 증가시킴을 알 수 있었음
- in vitro 및 in vivo 항비만 효능평가 실험에서 항비만 효능이 검증된 농산물소재들은 어떠한 화학물이 항비만 효능을 나타내는지를 밝히는 지표물질 확인을 위해 농산물소재를 homogenizer로 분쇄하여 LC-MS/MS 분석 또는 GC-MS 분석하였음
- LC-MS/MS 분석시 사용된 column은 C18 column이었고, C18 column에서 분리된 물질은 retention time과 MS/MS molecular weight defragmentation pattern을 LC-MS/MS library 들과 비교하여 지표 물질을 확인하였음

- GC-MS 분석시 사용된 column은 Rtx-WAX column (inner diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 μ m, length: 30 m)이었고, RT와 MS molecular weight defragmentation pattern을 GC-MS library 들과 비교하여 지표 물질을 확인하였음

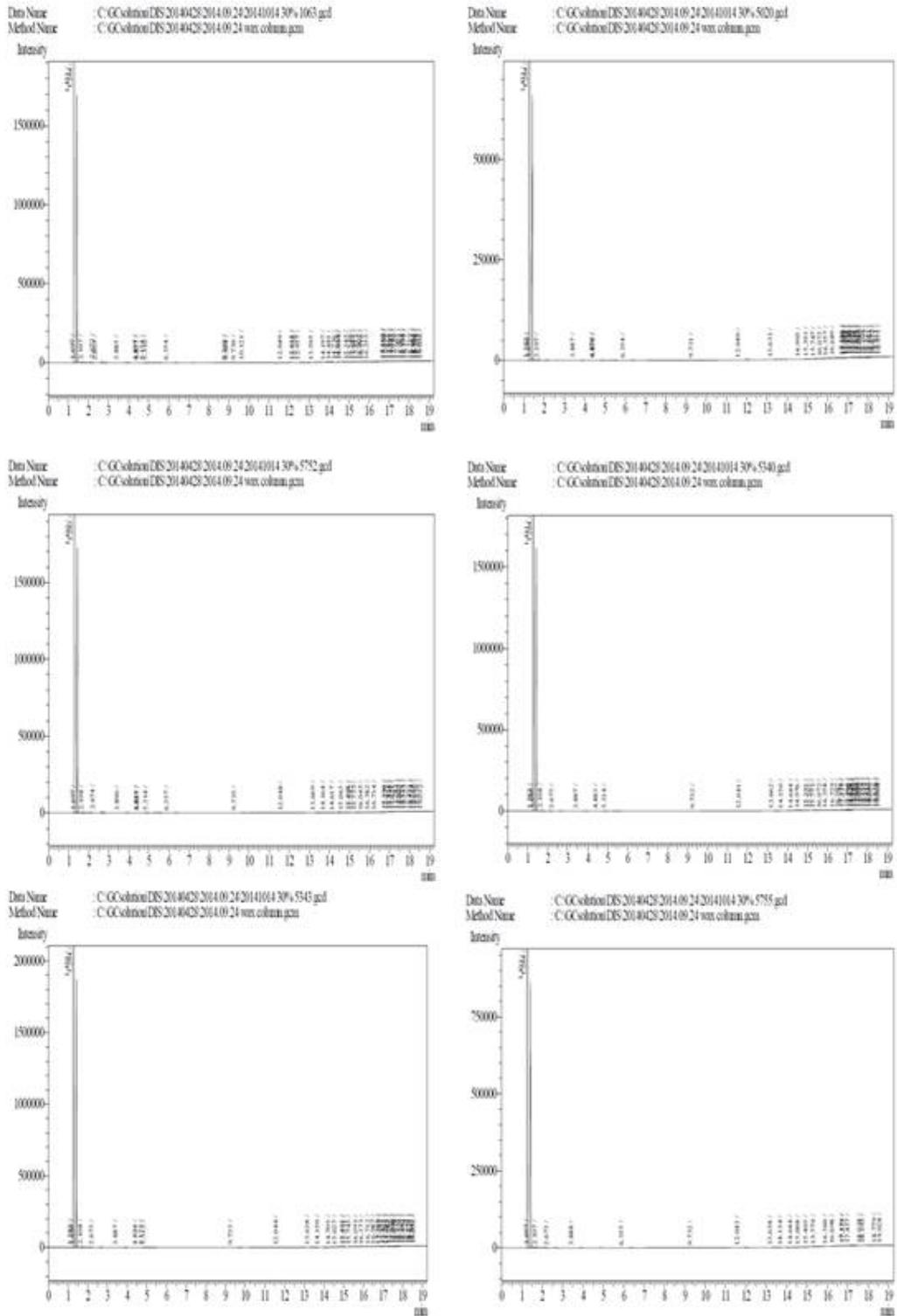


그림 34. 국내산 향비만 농산물소재 추출물들의 GC

- “식물체 유래 국내산 항비만 농산물소재” 추출물에서 항비만 기능을 부여하는 지표물질은 acetate, propionate, butyrate, lactate으로 확인되었고, 특히 propionate을 함유한 농산물소재가 가장 강력한 항비만 효능이 있었음
- “식물체 유래 국내산 항비만 농산물소재” 추출물에서 항비만 기능을 부여하는 지표물질로 propionate acid를 확인하였음

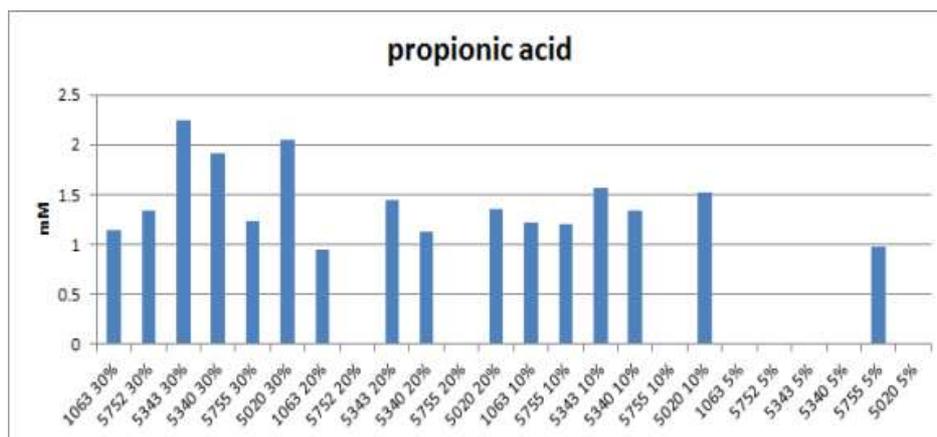


그림 35. 국내산 항비만 농산물소재”의 propionic acid 분석

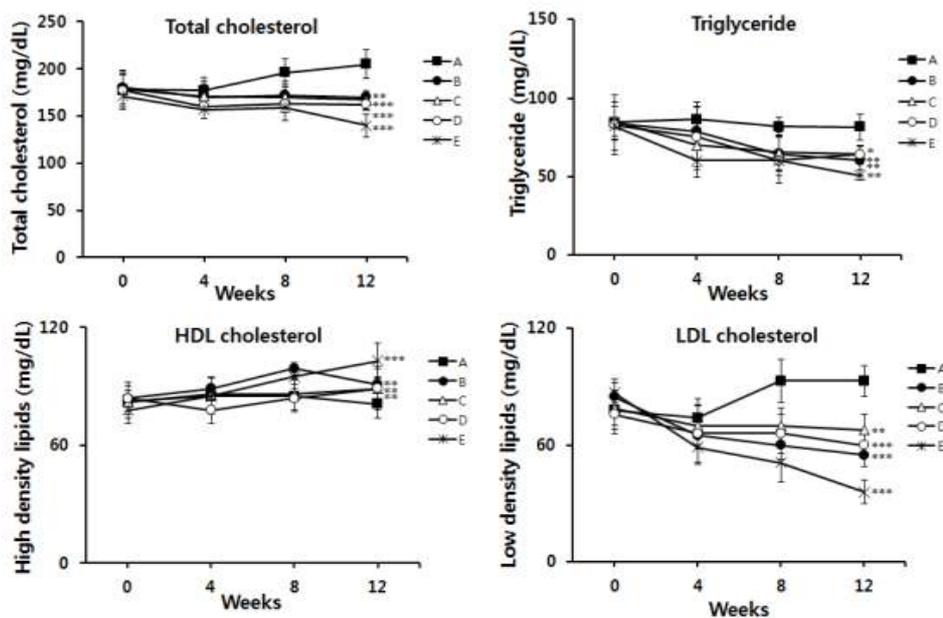


그림 36. 국내산 농산물 항비만소재가 혈중 지질대사에 미치는 영향

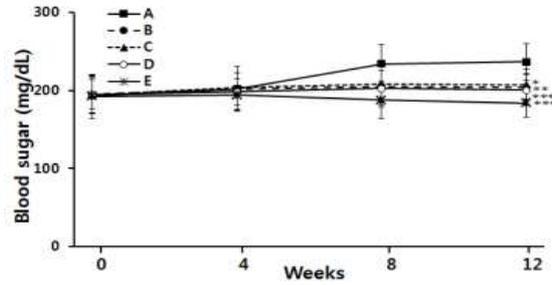


그림 37. 국내산 농산물 항비만소재가 혈당에 미치는 영향

- 마우스의 피부와 근조직의 조직학적 검사를 시행한 결과 “식물체 유래 국내산 농산물 항비만 소재”를 섭취한 마우스는 피부와 근육조직을 더 젊고 건강하게 유지되는 것을 관찰할 수 있었음

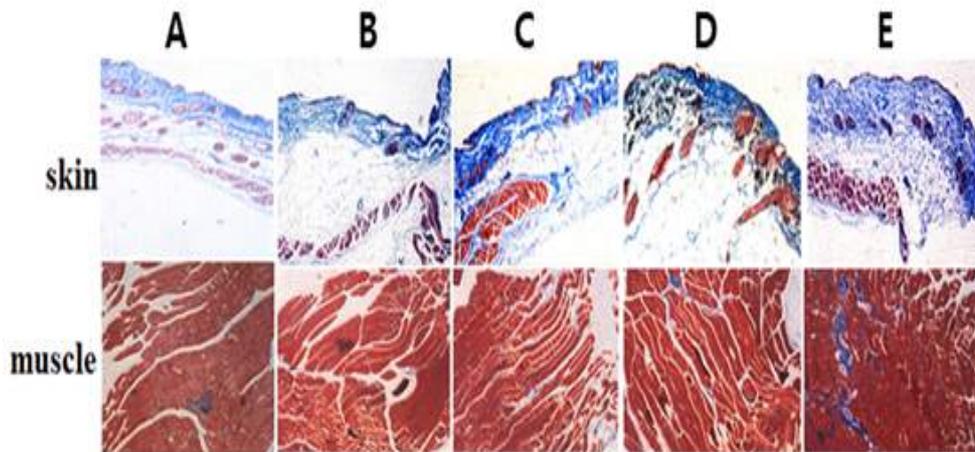


그림 38. 국내산 농산물 항비만 소재가 피부와 근조직 건강에 미치는 영향

A는 고지방/고칼로리 사료 only 대조군 그룹; B는 JBD1125 시료 1%; C는 JBD2314 시료 1%; D는 JBD2543 시료 1%; E는 JBD3107 시료 1%가 함유된 사료를 섭취한 마우스 그룹 (n=16)

라) 국내산 미생물 소재의 항비만 효능 평가

- in vitro HTS를 이용하여 JBD Lactobacillus library의 1차 스크리닝을 통해 41건, 2차 스크리닝을 통해 16건의 균주를 선별하였고, 이들 중 가장 우수한 지방산 제거능을 보이는 3번, 10번, 11번, 15번 미생물을 항비만 선도소재로 발굴하였음
- in vivo 효능평가 실험을 위해 먼저 유산균을 배양한 후 동결건조시켜 freeze-dried 된 지방산 제거 유산균 분말을 고지방/고칼로리 조합 사료 1g에 10⁹/g cfu freeze-dried 미생물소재 0.1 g 비율로 첨가한 후 마우스에 자유 급이 하면서 마우스의 체중을 주기적으로 측정하는 방법으로 각 지방산 제거 유산균의

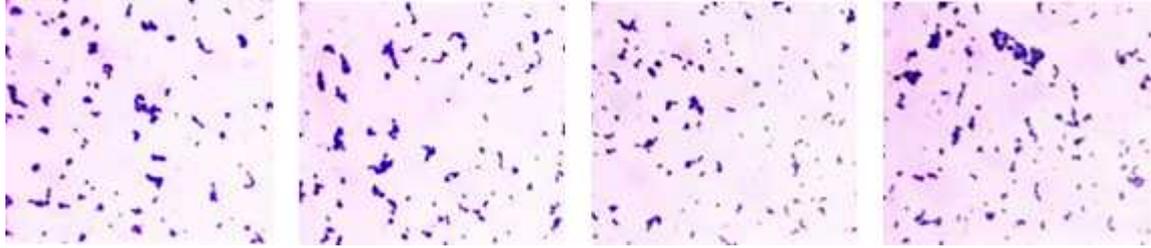


그림 39. 항비만 미생물 선도소재 3, 10, 11, 15의 gram staining morphology

항비만 효능을 평가한 결과 11번과 301, 15번, 10번, 3번 순으로 우수하였음

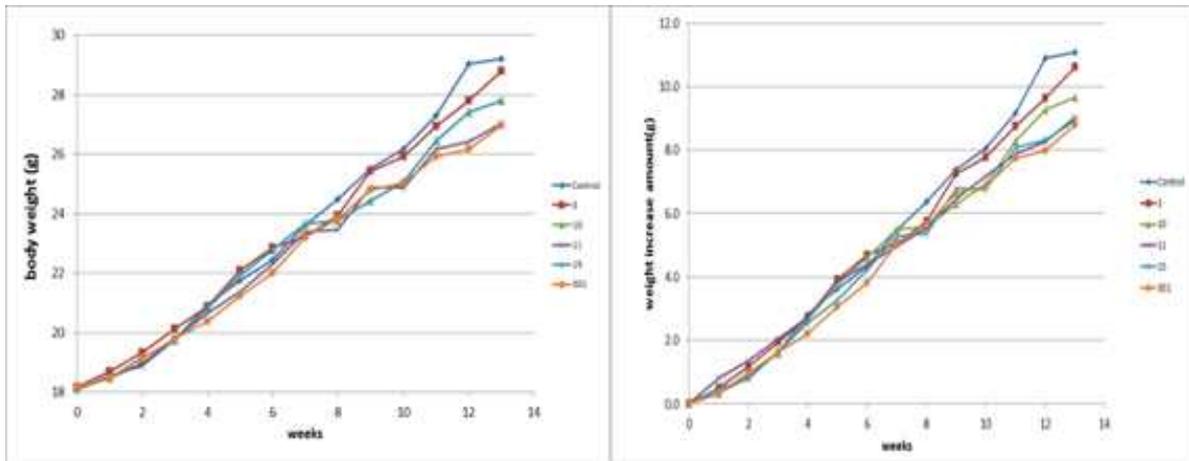


그림 40. Body weight and bode weight changes after administration of the indicated FFA-removing Lactobacillus strains.

Three-month-old C57BL/6 female mice were randomized and fed a HFD only (control) or this diet supplemented with each Lactobacilli #3, #10, #11, #15 or 301.

마) 국내산 미생물 소재 항비만균주 분석

- 비만 예방 및 치료용 국내산 미생물 기반 농산물 소재인 Lactobacillus JBD 항비만 유산균의 Gram staining, Nile Red 염색 및 전자현미경 관찰 결과, 막대모양의 bacillus 형태이었으며 분명하게 outer membrane, inner membrane, periplasmic space를 확인할 수 있었고 Cytoplasm과 osmiumphilic layer가 관찰되었음
- Lactobacillus JBD 항비만 유산균의 16s rDNA 분석을 위해 genomic DNA를 추출하여 얻은 뒤, 16s rDNA gene을 증폭하기 위한 PCR을 수행하였고, 증폭된 JBD 항비만 유산균의 16s rDNA는 automated DNA sequencer를 이용하여 sequencing하였으며, 얻어진 sequence는 CodonCode Aligner를 이용하여 Sequence Alignment를 진행하여 DNA sequence 분석을 완료하였음

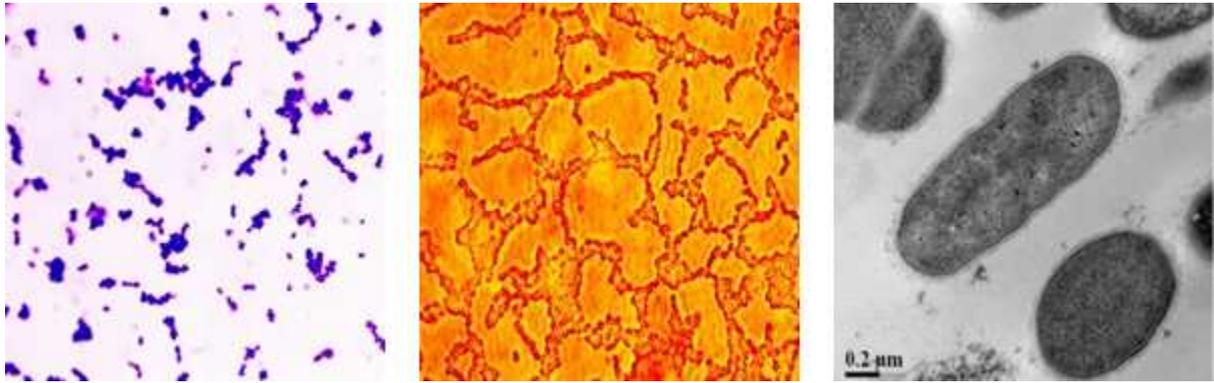


그림 41. JBD301 Lactobacillus의 Gram staining, Nile Red staining, TEM images

- NCBU BLAST+, EMBL Nucleotide Sequence Database and DDBJ (DNA Data Bank of Japan)에서 비교분석한 결과, Lactobacillus reuteri과 99%의 유사도를 확인하여, Lactobacillus reuteri JBD301로 분류됨
- Lactobacillus JBD 항비만 유산균의 Biochemical Analysis는 다음과 같음

No.	Biochemical Test	Result	No.	Biochemical Test	Result
1	D-GALACTOSE	+ve	19	BETA-GALACTOSIDASE	+ve
2	Leucine ARYLAMIDASE	-ve	20	ALPHA-ARABINOSIDASE	+ve
3	ELLMAN	+ve	21	ALPHA-GALACTOSIDASE	-ve
4	Phenylalanine ARYLAMIDASE	-ve	22	BETA-MANNOSIDASE	-ve
5	Proline ARYLAMIDASE	+ve	23	ARGININE GP	-ve
6	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-ve	24	PYRUVATE	-ve
7	D-CELLOBIOSE	-ve	25	MALTOTRIOSE	+ve
8	Tyrosine ARYLAMIDASE	-ve	26	ESCULIN-hydrolysis	-ve
9	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+ve	27	BETA-D-FUCOPYRANOSIDE	+ve
10	D-GLUCOSE	+ve	28	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+ve
11	D-MANNOSE	+ve	29	ALPHA-MANNOSIDASE	-ve
12	D-MALTOSE	+ve	30	ALPHA-I-FUCOPYRANOSIDE	+ve
13	SACCHAROSE/SUCROSE	+ve	31	PHOSPHATASE	+ve
14	ARBUTIN	-ve	32	L-ARABINOSE	+ve
15	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+ve	33	D-RIBOSE-2	+ve
16	BETA-GLUCOSIDASE	-ve	34	OPS	-ve
17	UREASE	-ve	35	ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDE	+ve
18	BETA-GLUCORONIDASE	-ve	36	D-XYLOSE	+ve

- Lactobacillus JBD 항비만 유산균의 배양시 basal media에 추가적으로 첨가할 탄소원 스크리닝을 glucose, fructose, galactose, lactose, sucrose를 사용하여 확인한 결과, Lactobacillus reuteri JBD301 media의 supplemental carbon source로는 lactose가 가장 적합함을 확인하였음
- 질소원 스크리닝은 bacto peptone, soy peptone, tryptone, yeast extract (EX), malt EX를 사용하여 확인해본 결과, 질소원으로는 yeast EX가 적합함을 확인하였음
- 무기물 첨가물 스크리닝은 다양한 mineral 등을 사용하여 확인해본 결과, mineral mixture (sodium acetate, potassium phosphate dibasic, magnesium sulphate, manganese sulfate)가 Trace element solution을 추가해주는 것보다도 CFU 향상

효과가 가장 극대화됨을 확인하였음

- Lactobacillus JBD 항비만 유산균의 배양 최적온도를 탐색하기 위해서 MRS 배지를 적용하여 온도별 CFU를 측정한 결과, 33℃에서 증식률이 가장 좋았으며 Lactobacillus reuteri JBD301의 최적온도는 32℃ ~ 34℃을 확인하였음
- Lactobacillus JBD 항비만 유산균의 배양 최적 pH를 탐색하기 위해서 MRS 배지를 적용하여 33℃에서 12시간 배양 후 각 pH별 CFU를 측정한 결과 pH5.6에서 증식률이 가장 좋았으며, Lactobacillus reuteri JBD301의 최적 pH는 5.4 ~ 5.8 범위임
- Lactobacillus JBD 항비만 유산균의 배양 최적 rpm을 탐색하기 위해서 MRS 배지, 33℃에서 12시간 배양하면서 agitation rpm별 CFU를 측정한 결과 rpm 150에서 증식률이 가장 좋아, Lactobacillus reuteri JBD301의 최적 rpm은 150 rpm임
- Lactobacillus JBD 항비만 유산균의 분말공정에서는 Skim milk와 sucrose, ascorbic acid를 혼합한 부형제를 처리하였을 때 가장 높은 CFU를 보였고, 각 부형제의 비율에 따른 CFU를 확인한 결과 skim milk 10%, sucrose 10%, ascorbic acid 2%일 때 가장 효과적인 survival CFU를 가짐을 확인하였음

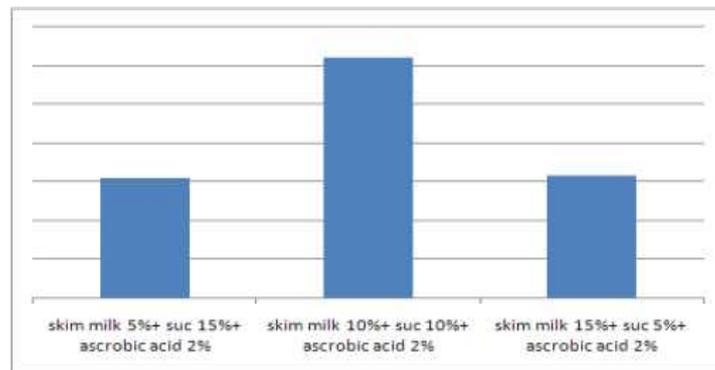


그림 42. JBD301 Lactobacillus의 부형제 평가

- Lactobacillus JBD 항비만 유산균의 in vitro FFA uptake 실험을 위해 Lactobacillus JBD 항비만 유산균을 섭취시킨 후 [14C]로 방사능 표지한 triolein을 의 체내 흡수와 체외 배출을 확인하였음

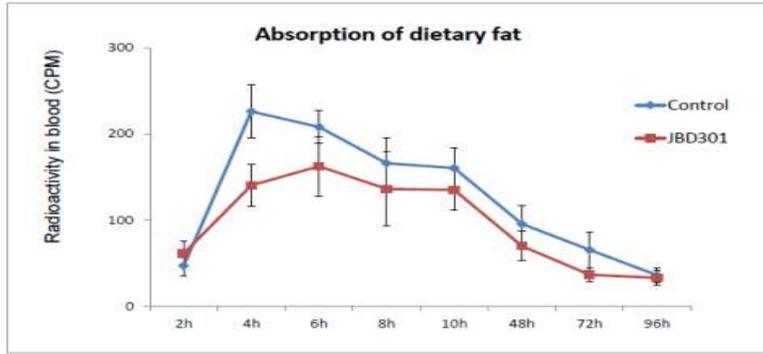


그림 43. Lactobacillus JBD 항비만 유산균에 의한 지방흡수량 감소

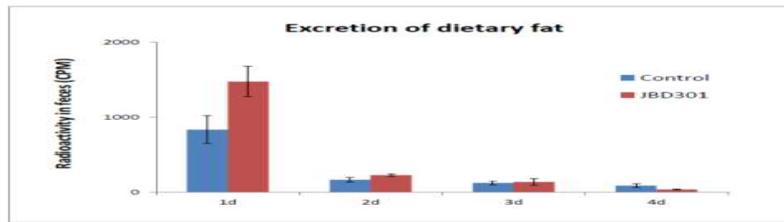


그림 44. Lactobacillus JBD 항비만 유산균에 의한 지방배출량 증가

바) 국내산 미생물 소재 항비만 유산균 양산공정 최적화 및 포플러

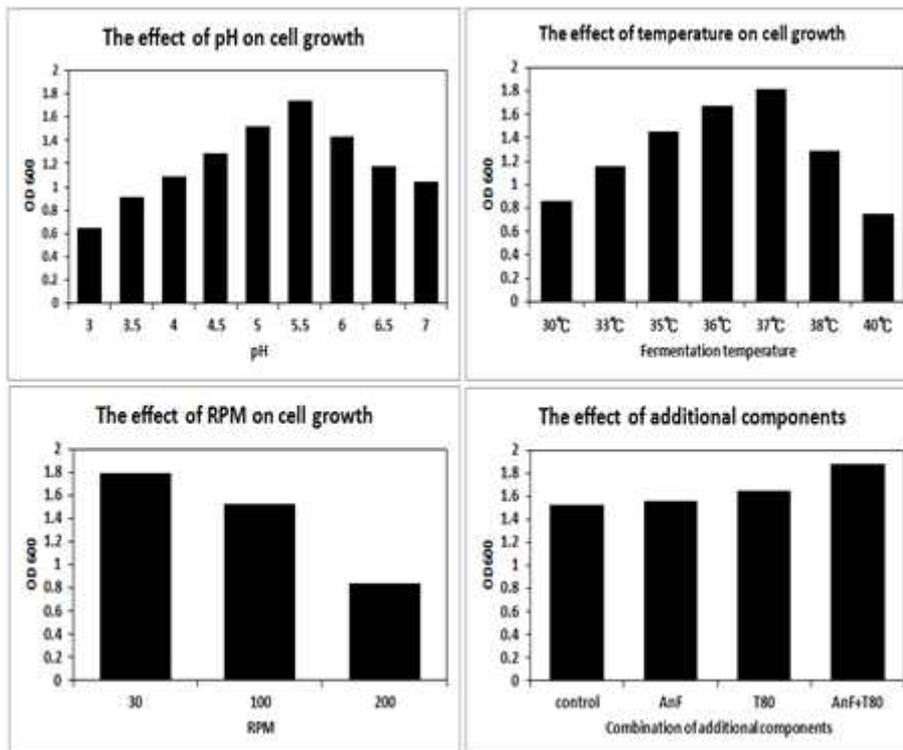


그림 45. Lactobacillus JBD 항비만 유산균 배양 최적화

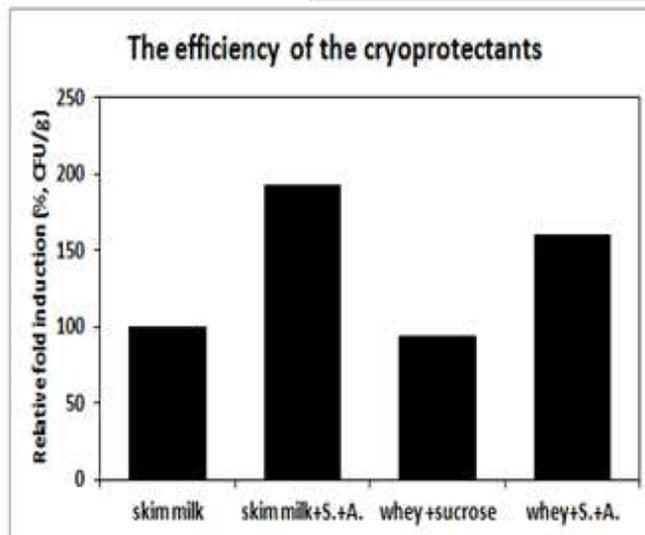
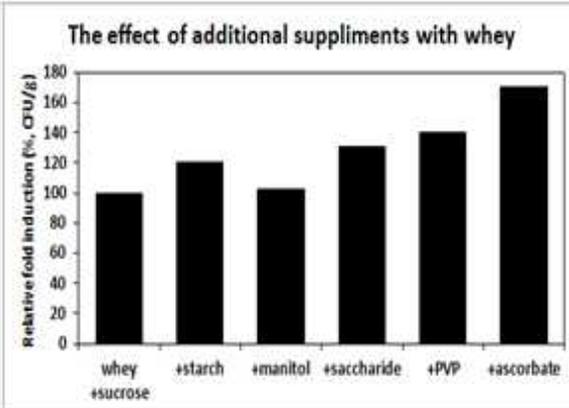
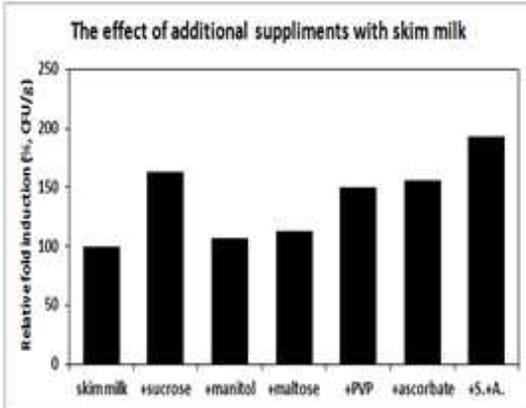
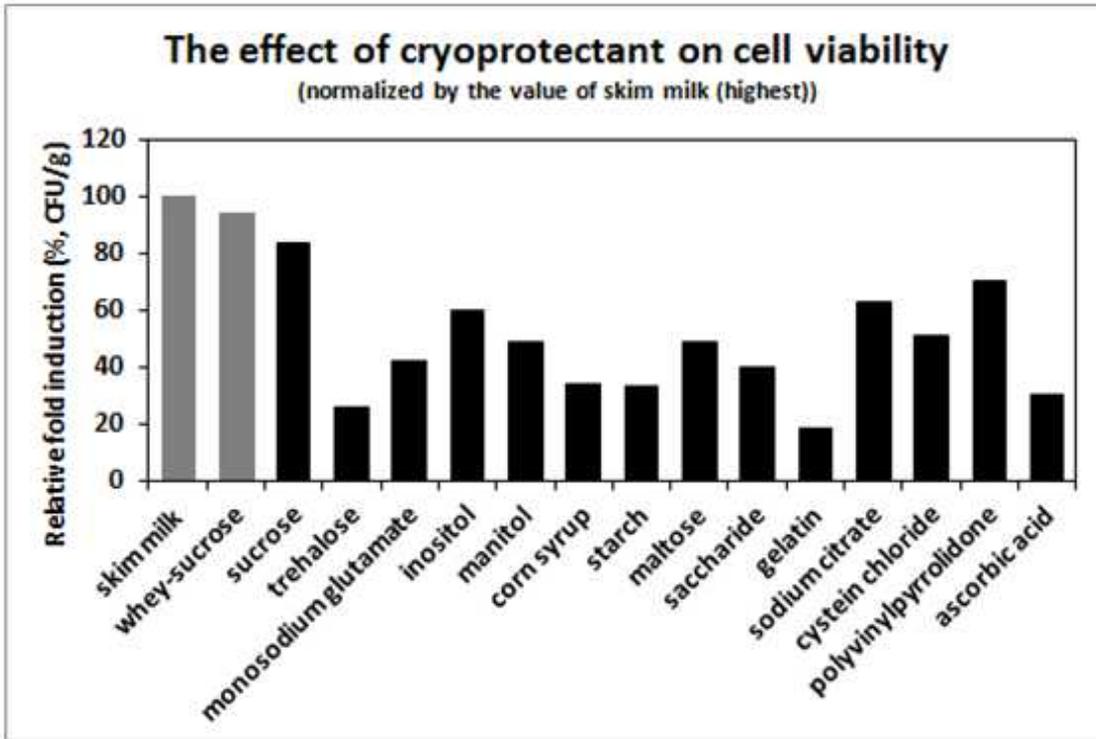


그림 46. JBD 항비만 유산균의 부형제 최적화

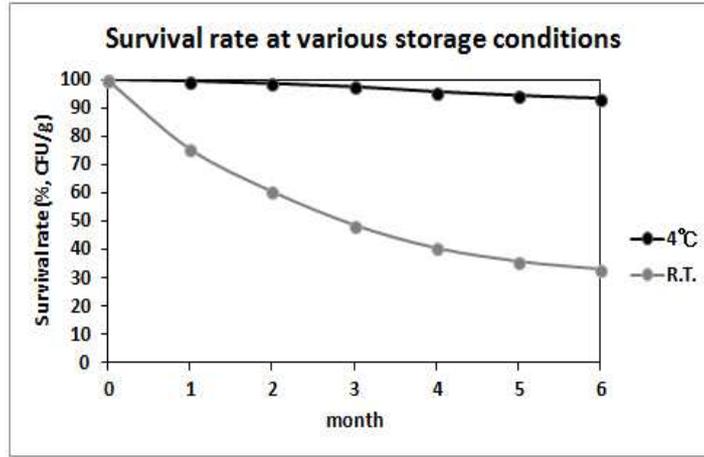


그림 47. JBD 항비만 유산균의 저장조건

감미료	강화제	비타민	식품 원료	유화제	기타 첨가물
D-소르비톨	니코틴산아미드	비타민A	경화유	글리세린 지방산에스테르	이산화규소 (고결방지제)
말티톨	비오틴	비타민B1	식물성경화유지	레시틴	구연산 (산도조절제)
맥아당	산화아연	비타민B12	식물성크림분말	말토덱스트린	제삼인산칼륨 (산도조절제)
무수결정포도당	엽산	비타민B2	유청칼슘	메타인산나트륨	제이인산칼륨 (산도조절제)
물엿	철	나이아신	전분	스테아린산마그네슘	아스코르빈산칼슘 (산화방지제)
수크랄로스	판토텐산칼슘	비타민B6	전분당	폴리인산칼륨	아티초크
알토오스		비타민C	정제염	피로인산나트륨	알로에베라겔분말
자일리톨		비타민D		카제인나트륨	아자경화유
정제포도당		비타민E			요구르트맛분말
트레할로스		비타민K			요구르트향분말
프락토올리고당					적포도농축분말
글루콘산아연					적포도분말
					포도향분말

표 2. 유산균 분말화시 함유 첨가 성분

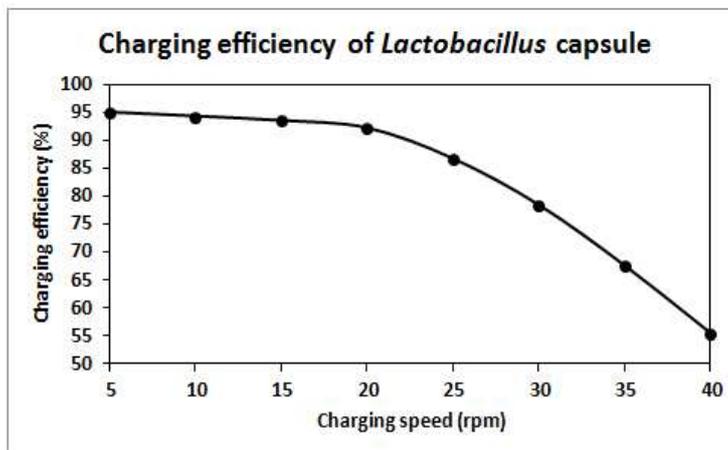


그림 48. Charging efficiency of Lactobacillus capsule

사) 국내산 농산물 소재 Lipase Inactivation Screening

- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 복합 항비만 효능 평가를 수행하기 위해 본 연구진은 다양한 국내산 농산물 400여종을 선정하고 crude extract를 추출하여 Pancreatic lipase inactivation을 분석하였음



그림 49. pancreatic lipase 비활성화 실험 사진

Test of lipase inactivation #1 (OD405)

0.2714	0.2275	0.8848	0.2606	0.3172	0.4141	0.2318	0.2352	0.2779	0.2079	0.465	0.2776	
0.478	0.3016	0.2997	0.2555	0.4026	1.0428	0.5146	0.3401	0.2844	0.3266	0.269	0.2492	
0.3855	0.2964	0.2983	0.4348	0.3818	0.3483	0.4319	0.4069	0.5744	0.5059	0.3015	0.3803	
0.2183	0.2846	0.5054	0.1998	0.5492	0.3081	0.2563	0.4915	0.2328	0.254	0.2074	0.2323	
0.2359	0.245	0.3135	0.2294	0.4072	0.2564	0.4742	0.2532	0.26	0.4401	0.4393	0.7224	
0.2353	0.3419	0.4156	0.2054	0.6231	0.4396	0.2801	0.2361	0.3857	0.3113	0.242	0.3304	
0.3652	0.2471	0.3805	0.6339	0.4722	0.3392	0.2101	0.3357	0.5184	0.3428	0.1869	0.4426	
0.3023	0.3613	0.4181	0.4725	0.7361	0.2559	0.3547	0.1852	0.2216	0.2578	0.3522	0.2526	
0.1892	0.204	0.2045	0.2378					0.2041	0.2026	0.2018	0.20283	
% of Lipase inactivation							A		B		C	
							7.855382		8.693509		6.721446	

Test of lipase inactivation #2 (OD405)

0.387	0.4346	0.3888	0.3946	0.4431	0.4279	0.3615	0.3718	0.4425	0.4902	0.3296	0.4061	
0.4605	0.4171	0.4237	0.3996	0.4007	0.6566	0.6093	0.4872	0.4177	0.6317	0.3927	0.4109	
0.461	0.4382	0.4268	0.4518	0.5158	0.4314	0.4796	0.4691	0.4344	0.5058	0.4058	0.501	
0.3794	0.472	0.4141	0.3726	0.6403	0.3944	0.4238	0.5549	0.4465	0.399	0.3504	0.3949	
0.3953	0.4134	0.4307	0.3961	0.4891	0.367	0.5375	0.3856	0.3722	0.4284	0.406	0.4948	
0.5671	0.4544	0.4347	0.4079	0.4276	0.5135	0.3901	0.3813	0.4897	0.4266	0.4154	0.3414	
0.3789	0.3831	0.4094	0.4951	0.3572	0.3699	0.3961	0.4074	0.4448	0.402	0.3296	0.4247	
0.4154	0.4532	0.4219	0.454	0.4736	0.3998	0.3769	0.3215	0.3246	0.41	0.3614	0.3667	
0.4197	0.4649	0.3843	0.3929									
% of Lipase inactivation							A		B		D	
							14.41925		16.52242		15.7175	

Test of lipase inactivation #3 (OD405)

0.8999	0.3826	0.892	0.3319	0.3533	0.3427	0.3413	0.3148	0.3758	0.3489	0.3046	0.3199	
0.4295	0.3085	0.3293	0.3434	0.3416	0.5952	0.3371	0.385	0.3384	0.3408	0.3882	0.3826	
0.3799	0.3927	0.3779	0.4011	0.4495	0.3715	0.423	0.3951	0.3863	0.4244	0.4235	0.3544	
0.2938	0.3246	0.3398	0.3128	0.4255	0.3466	0.3571	0.3764	0.3471	0.3572	0.3079	0.3263	
0.3071	0.3213	0.3015	0.3126	0.3658	0.296	0.3429	0.3102	0.3221	0.3277	0.3219	0.399	
0.5853	0.44	0.6925	0.5378	0.7968	0.4522	0.6883	0.4657	0.4178	0.4023	0.6915	0.4348	
0.2894	0.3229	0.3229	0.387	0.2853	0.3085	0.3339	0.3695	0.4228	0.3475	0.2729	0.3531	
0.3438	0.3762	0.3459	0.3626	0.3984	0.3346	0.5518	0.274	0.3779	0.2809	0.4214	0.3621	
0.3261	0.3353	0.3237	0.3937									
% of Lipase inactivation							A		B		E	
							19.47477		19.15019		17.1142	

Test of lipase inactivation #4 (OD405)

0.3972	0.3793	0.3555	0.3601	0.3873	0.3951	0.3352	0.3489	0.4198	0.3772	0.3750	0.3605	
0.6822	0.6813	0.7501	0.4063	0.8895	0.8827	0.5349	0.9412	0.5063	0.3782	0.6975	0.7142	
0.4075	0.402	0.3679	0.4133	0.5445	0.3978	0.4547	0.4473	0.404	0.4581	0.376	0.4419	
0.3258	0.3943	0.4151	0.3137	0.466	0.3846	0.4091	0.4366	0.3857	0.3924	0.3461	0.3628	
0.3809	0.3647	0.3635	0.3748	0.4187	0.3461	0.4441	0.6084	0.3585	0.5068	0.3739	0.6043	
0.3709	0.4198	0.3904	0.3478	0.4509	0.4367	0.5286	0.3341	0.5105	0.4182	0.441	0.3487	
0.3433	0.4015	0.3899	0.4773	0.3504	0.3568	0.372	0.4186	0.4388	0.4065	0.3208	0.3657	
0.3646	0.3852	0.3877	0.4004	0.4459	0.3959	0.3619	0.3122	0.3218	0.3733	0.3467	0.3338	
0.3577	0.3595	0.3476	0.3811									
% of Lipase inactivation							A		B		F	
							7.77192141		10.24437		9.813129	

표 3. Pancreatic lipase 비활성화 실험 data

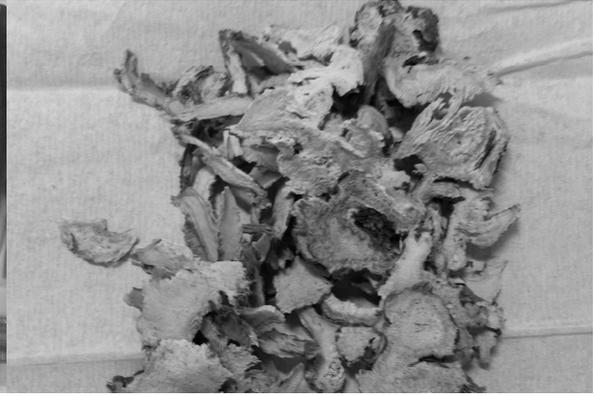


그림 50. lipase inactivation 분석(A) 그림 51. lipase inactivation 분석(B)

- lipase의 비활성화 정도를 다양한 조건에서 반복실험한 결과 B 추출물의 기능이 가장 우수하여 Ethanol로 추출된 B 추출물에서 최종 효능 compound를 분리하기 위해서 추출물을 4가지 용매, hexane, chloroform, ethyl acetate, water를 이용하여 hydrophobic한 물질부터 hydrophilic한 물질까지 순차적으로 획득하였고, 각각의 분획물에서의 lipase inhibition을 확인하였음

Fraction	0min	30min	60min	90min	120min	150min	210min
blank	0.0882667	0.229	0.3587	0.4736333	0.573533	0.659567	0.7338
Hexane	0.1825667	0.303333	0.4087	0.5010667	0.586933	0.6644	0.7298
Chloroform	0.151	0.2544	0.3575	0.4502	0.5389	0.614567	0.687067
Ethyl acetate	0.0811333	0.200733	0.314133	0.4145333	0.508367	0.590633	0.664133
Ethanol	0.1131667	0.246533	0.360333	0.4586	0.5494	0.6319	0.701133
D.W.	0.08895	0.2254	0.3518	0.46475	0.5642	0.6518	0.7244

표 4. 용매별 분획에 의한 B 추출물의 lipase inhibition (OD450)

- EtOH 추출물에서 물로 녹인 후 그 이후에 hexane, chloroform, ethyl acetate의 순서로 분획한 분획물의 lipase 비활성화율이 다양하게 나타났음.
- 초기의 흡광도 값은 다양하게 나타났고 180min이 지난 후의 흡광도 값은 강할 hexane 분획물, DW 분획물, ethanol 분획물, chloroform 분획물, ethyl acetate 분획물 순서로 나타났음
- 초기의 흡광도 값을 동일하게 맞춰주고 실험에 대한 흡광도($\Delta OD_{405} = A_t - A_i$: A_t 는 측정 당시 시간대의 흡광도값. A_i 는 0min에 측정한 흡광도값.)를 보면 DW 분획물, ethanol 분획물, ethyl acetate 분획물, hexane 분획물, chloroform 분획물 순서로 나타났음
- 다양한 분획물에서의 lipase 비활성화를 측정했을 때 Chloroform 분획물 >

Hexane 분획물 > Ethyl acetate 분획물 > 강할 D.W 순서로 비활성화율이 나타남. 이는 lipase 비활성화율(%)=100-(B-b/A-a×100). A는 저해물질이 들어가지 않은 lipase assay의 OD값.(a는 0min의 흡광도값) B는 저해물질(농산물 추출물)이 들어간 lipase assya의 OD값.(b는 0min의 흡광도값) 의 계산식을 통해서 확인하였음

- 최종적으로 chloroform 분획에서 가장 높은 lipase inhibition 정도를 확인하여 본 분획물을 이용하여 물질분석을 수행하였음

Column		C18 5µm 4.6×250mm column or C18 Prep LC용 column	
Mobile phase	A sol.	9:1 = MeOH:Dichloromethane: 97:3 = D.W : acetic acid = 9:1	
	B sol.	266 :1 = water : acetic acid	
Flow rate		0.7 ml/min (total time = 40min/ sample)	
Detector		photodiode array detector (waters 996)	
Solvent/mi n	A sol.	0~10m	60% → 80%
		10~20m	80% → 100%
		20~40m	100% → 60%
	B Sol.	0~10m	40% → 20%
		10~20m	20% → 0%
		20~40m	0% → 40%

표 5. 추출물의 분석을 위한 HPLC 가동 조건

- HPLC 분석을 통해서 chloroform 분획에서 30분동안 약 27개의 peak가 분리됨을 확인하였고, 이 결과를 토대로 물질분리를 수행하기 위해서 prep-LC 장비를 이용하여 물질 분리를 실시하였음
- prep-LC를 진행하는 동안 0-10min, 10-20min, 20-30min에서 fraction을 회수하였으며, 회수한 용액은 각각 rotary evaporator를 이용하여 농축과정을 진행하여, 최종적으로 얻어진 물질은 DMSO에 녹여 lipase inhibition 정도를 확인하였음

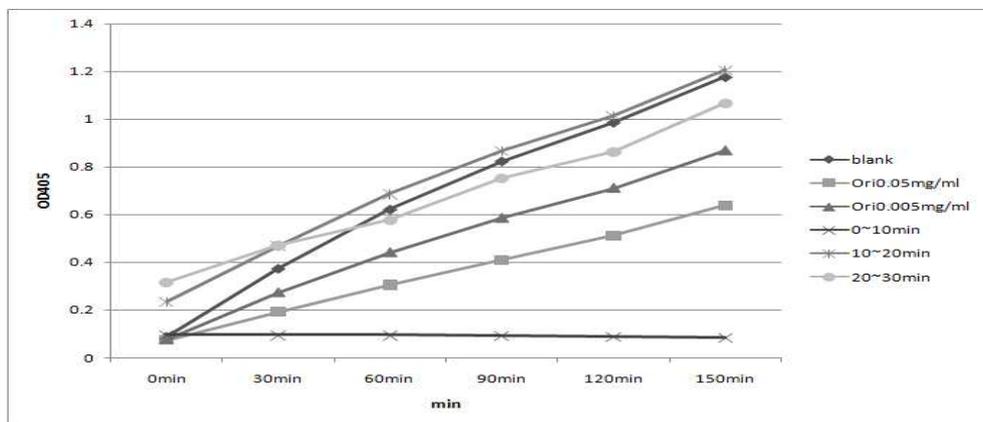


그림 52. Prep-LC에 의해 시간별로 분리된 chloroform fraction의 lipase assay.

- Prep-LC로 분리한 물질군들 중 0~10min, 20~30min 두 구간의 물질의 lipase 비활성화 효과가 높게 나타나는 것으로 확인되었음
- blank, positive control(Oristat 0.05mg/ml, Oristat 0.005mg/ml), 0~10min sample, 10~20min sample, 20~30min sample을 실험을 진행하여 얻은 결과 값을 보면 control(blank) 값보다 Prep-LC로 분리하여 얻은 값들의 lipase 활성도가 좋았고 그 중에서 0~10min에서의 lipase 비활성화도가 우수하게 나타났음

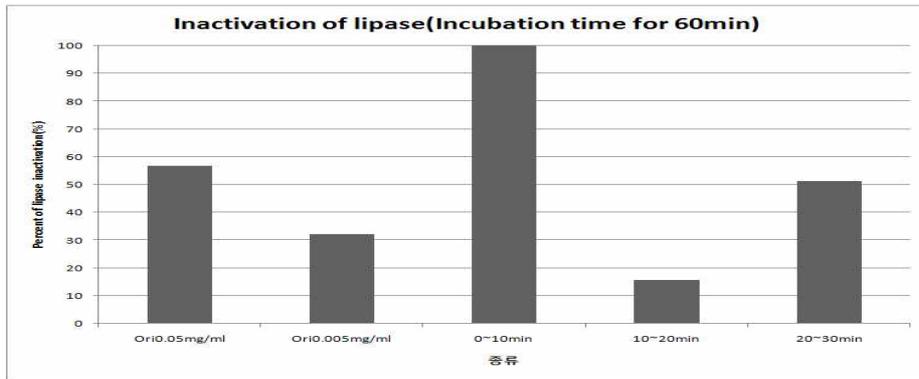


그림 53. Prep LC를 통한 시간별 분획물의 lipase 비활성화율.

- 최종적으로 시간대별 lipase 비활성화율을 확인한 결과, 60min 처리하였을 때 값이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 전체 시간대에서 0-10min 회수 샘플이 가장 높은 억제효능을 보임
- 최종적으로 0-10min 시간대 물질들에서 lipase inhibition에 효과적인 물질을 분리 정제하여, 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재를 선정할 것임

아) 국내산 농산물 소재 항비만 활성성분

- 1차년도 연구를 통해 국내산 농산물 소재를 이용하여 항비만 효능 스크리닝을 진행하였으며, 그 결과 중에 좋은 효능을 보였던 과일류(포도, 감, 귤, 무화과, 복분자, 자두, 모과, 매실, 복숭아, 배) 10가지를 선별하였음
- 10가지 과일 각각 100g에 phosphoric acid (pH 2.8) solution을 200ml 처리를 한 후 믹서기로 분쇄, 그 이후 3시간 동안 교반하여 물질 추출을 진행하였으며, 진행한 이후 centrifuge로 3000rpm으로 15분정도 돌려준 후 상층액을 회수하여 LC/MS 분석을 수행하였음
- 각각의 LC/MS 분석을 통해서 공통적으로 많은 성분을 list up 하였음
- 항비만 스크리닝을 통해서 선별된 10가지 종류의 농산물 소재에 들어있는 주요 2가지 기능성 물질에 대해 자세한 정량 분석을 수행하였음

국내산 농산물(굴,매실) CA와 PE의 정량 및 분석법

- 농산물 소재의 원료를 확인하여 기능성 원료의 표준화 작업을 진행하기 위해 HPLC로 지표성분을 측정, 기준 시험 분석법을 확립하였음
- HPLC를 이용하여 2가지의 지표성분을 농도별로 측정하여 굴과 매실 추출물 내의 지표성분을 확인하고 정량함

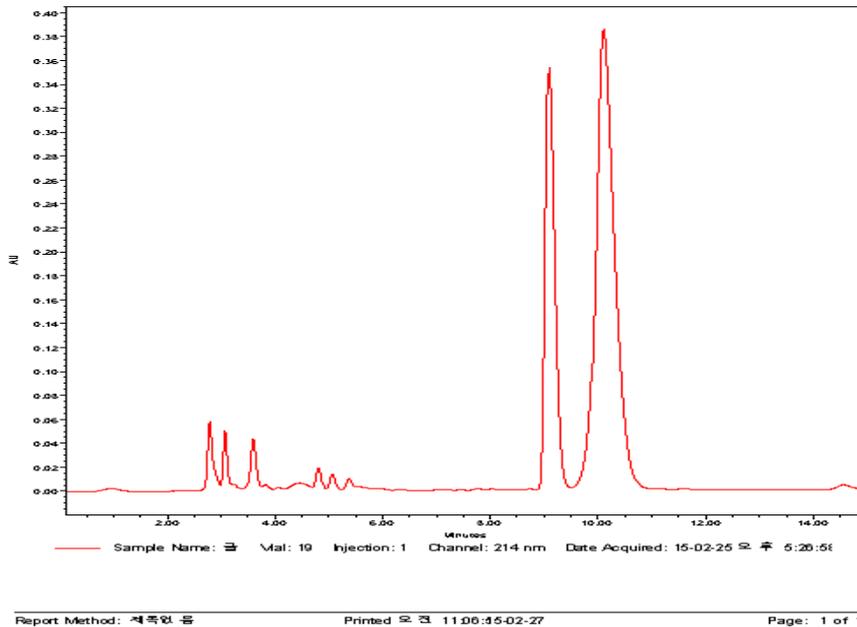


그림 54. 굴 추출물의 HPLC 분석 이미지

- HPLC를 이용하여 retention time으로 PE와 CA(지표물질)의 확인시험을 진행하고 정량하여 국내산 농산물인 굴에서의 지표성분의 농도를 확인함
- 굴 추출물에서의 PE와 CA를 분석하기 위한 확인시험은 250mm × 4.6mm, 5um C18 column이 사용됨
- mobile phase의 경우 50mM phosphate solution (pH 2.8)을 사용하였으며 mobile phase의 flow rate는 0.7 mL/min으로 분석법을 정함
- 214nm의 파장값을 이용함
- CA의 경우 굴 추출물에 32.182 mg/ml로 가장 많이 함유되어 있었으며, 매실 추출물에 13.14 mg/ml, 복분자 추출물에서 9.0 mg/ml이 검출되었음

Channel 214 nm C 0.000000e+000 Time 4.793
 Fit Type Linear (1st Order) D 0.000000e+000 Processing Method test_total standard
 R² 0.999978

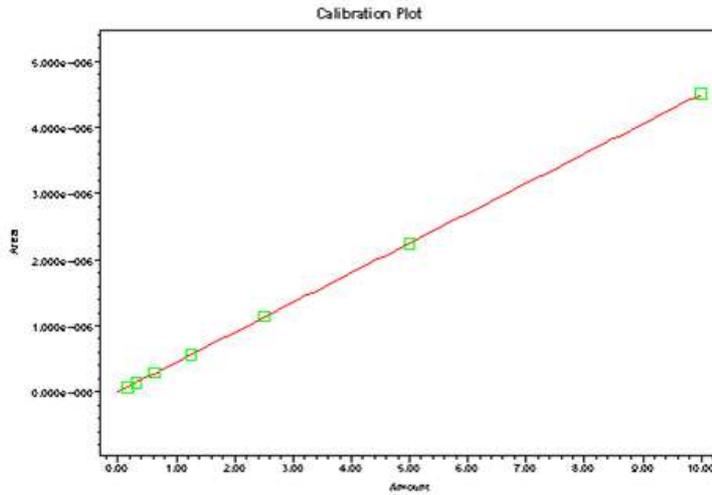
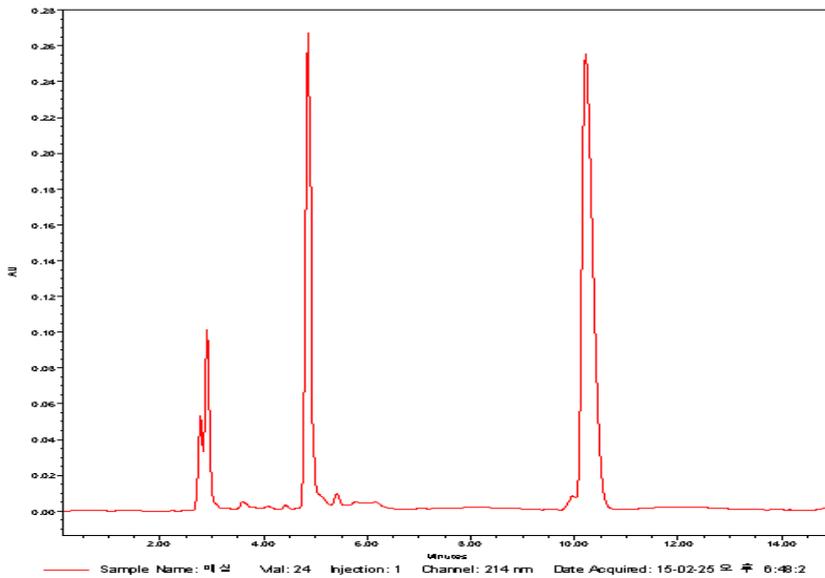


그림 55. 정량분석을 진행하기 위해 HPLC로 확인한 CA standard curve



Report Method: 색측정법

Printed on 11:13:05-02-27

Page: 1 of 1

그림 56. 매실 추출물의 HPLC 분석 이미지

- HPLC를 이용하여 retention time으로 PE와 CA지표물질의 확인시험을 진행하고 정량하여 국내산 농산물인 매실에서의 지표성분의 농도를 확인함
- 매실 추출물에서의 PE와 CA를 분석하기 위한 확인시험은 250mm × 4.6mm, 5um C18 column이 사용됨
- mobile phase의 경우 50mM phosphate solution (pH 2.8)을 사용하였으며 mobile phase의 flow rate는 0.7 mL/min으로 분석법을 정함

- 214nm 파장 이용함
- PE의 경우 매실 추출물에 8.722 mg/ml, 자두 추출물에 5.166 mg/ml, 포도 추출물에 3.526 mg/ml이 존재하는 것을 확인하였음

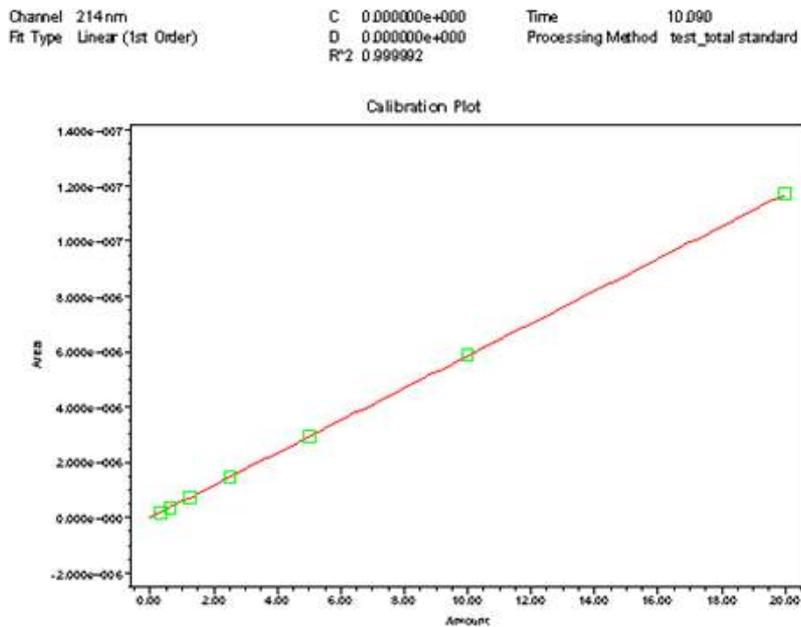


그림 57. 정량분석을 진행하기 위해 HPLC로 확인한 PE standard curve

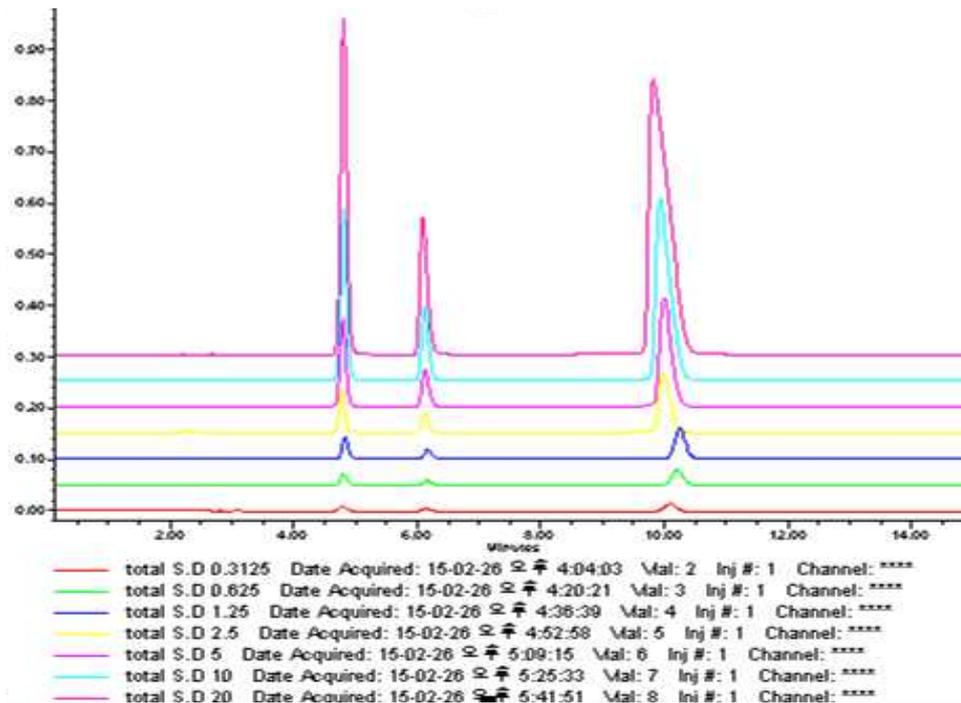


그림 58. 2가지 지표성분의 HPLC peak 이미지

- 꺾과 매실 추출물의 PE와 CA의 분석에 사용된 standard peak로 얻은 standard curve를 이용하여 정량을 진행
- PE의 분석을 위한 standard curve의 경우 retention time이 10.09 min이며 R²값은 0.999992로 확인되었으며 CA의 분석을 위한 standard curve의 경우 retention time이 4.793 min 이며 R² 값은 0.999978로 확인되었음

CA와 PE의 생체이용률과 안정성 실험

- 꺾과 매실의 추출물에서 활성 성분으로 확인된 CA와 PE의 생체이용률과 안정성을 확인하기 위해서 동물실험에서 방법을 고안하였음
- 6주령의 C57BL/6 mice 암컷을 구입하여 (Joongang Experimental Animal Co., Seoul, Korea) 3 마리씩 우리(cage)에 넣고, 처음 1주일 동안 적응기간을 주며 사료와 물을 자유 급이하였음
- 섭취 전과 섭취 후 1, 4, 8 시간에서 혈액을 채취하고 혈청을 회수하여 혈청에서의 꺾 추출물 유효성분과 매실 추출물 유효성분을 측정하여 생체이용률을 확인하였음

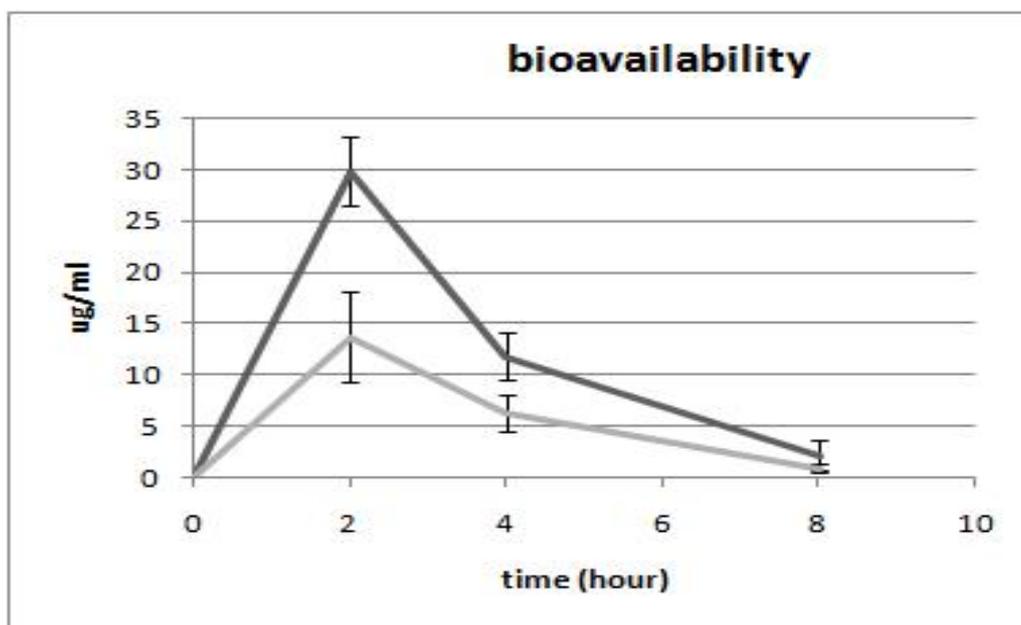


그림 59. 씨트러스 성분의 생체이용률

매실 추출물 유효성분의 체중 감소 효과

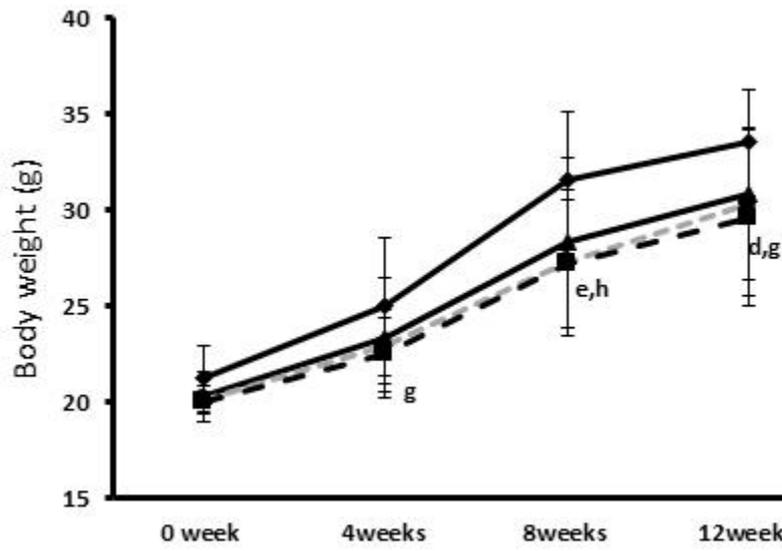


그림 60. 매실 추출물 유효성분에 의한 체중 증가 억제 효과

매실추출물 유효성분의 체적 감소 효과



그림 61. 매실 추출물 유효성분에 의한 체적 감소 효과

매실추출물 유효성분의 total body fat 감소 효과

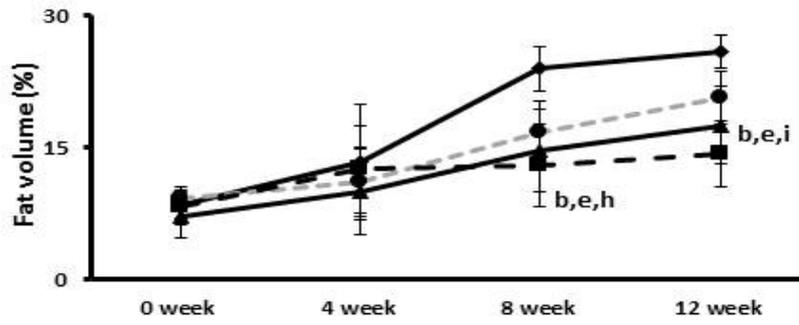


그림 62. The effects of the plum extract on changes in fat volume measured by in vivo micro-CT image analysis.

매실추출물 유효성분의 visceral fat 감소 효과

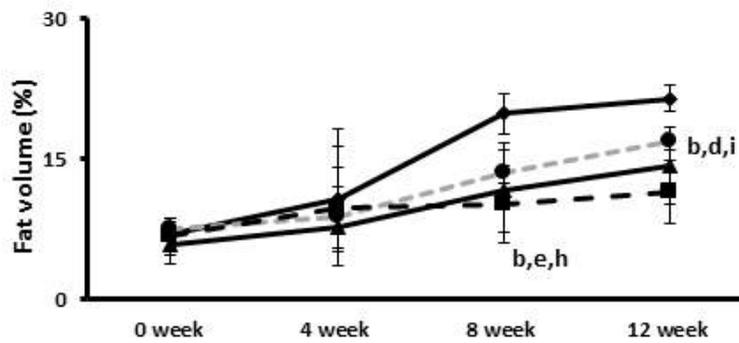


그림 63. The effects of the plum extract on changes in visceral fat volume measured by in vivo micro-CT image analysis.

매실추출물 유효성분의 subcutaneous fat 감소 효과

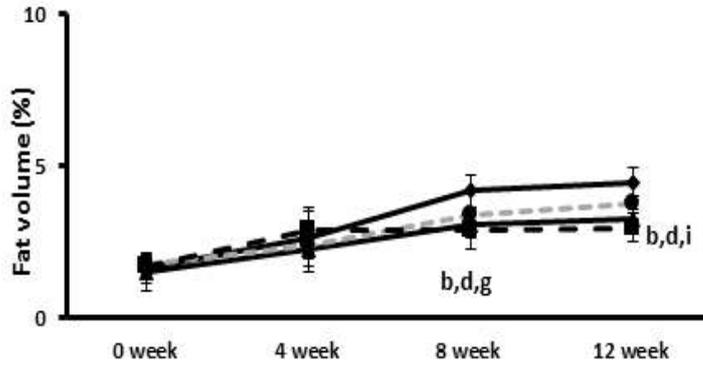


그림 64. The effects of the plum extract on changes in subcutaneous fat volume measured by in vivo micro-CT

매실추출물 유효성분의 지방 감소 효과

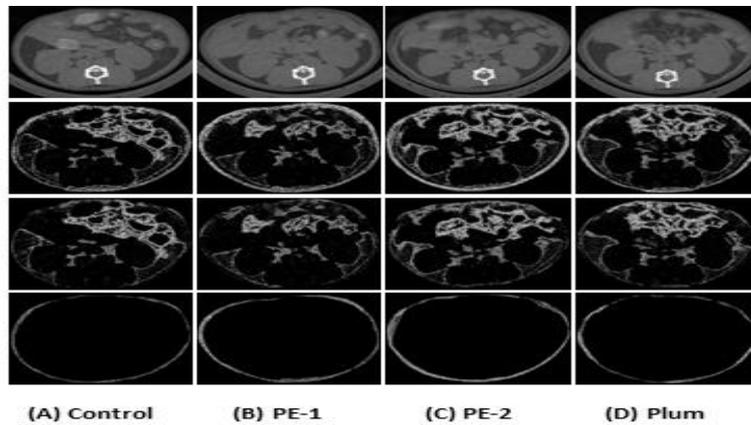


그림 65. The representative in vivo micro-CT image at 0 wk.

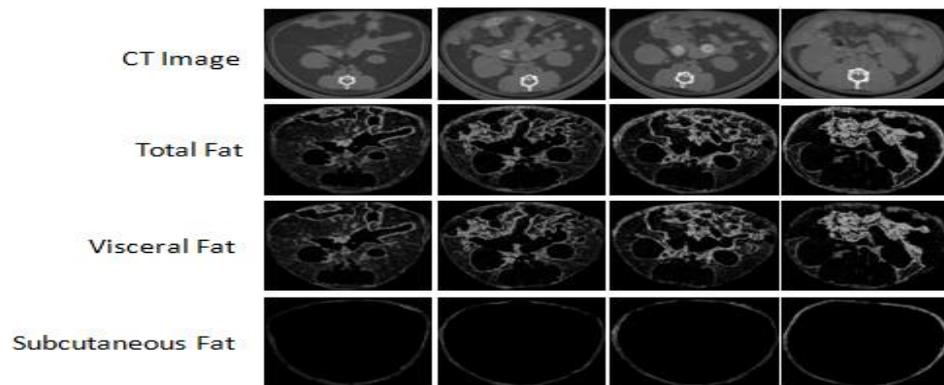


그림 66. The representative in vivo micro-CT image at 12 week.

매실추출물 유효성분 섭취 쥐의 체내 total 콜레스테롤 평가

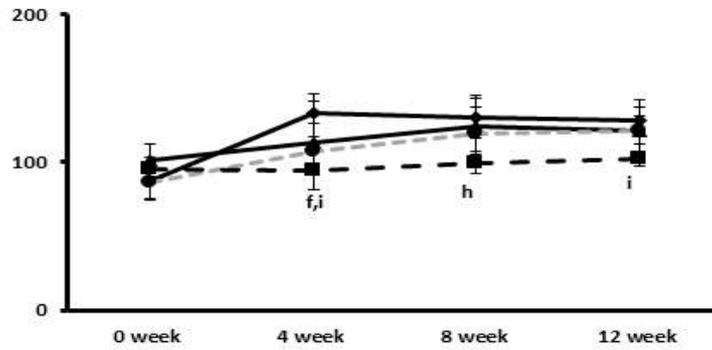


그림 67. The effects of the plum extract on changes in the concentration of plasma total cholesterol.

매실추출물 유래 유효성분 섭취 쥐의 체내 중성지방 평가

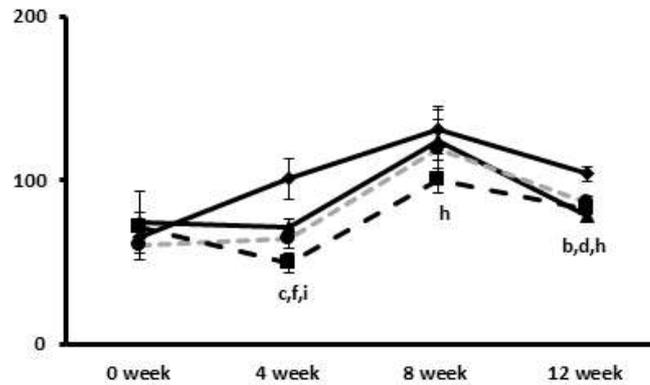


그림 68. The effects of the plum extract on changes in the concentration of plasma triacylglycerol

매실추출물 유�효성분 섭취 쥐의 체내 HDL 콜레스테롤 평가

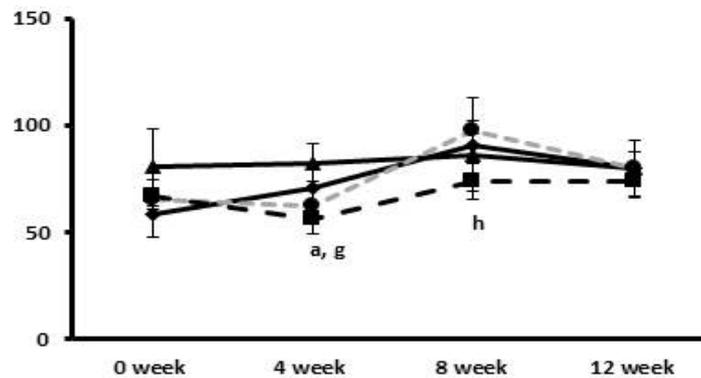


그림 69. The effects of the plum extract on changes in the concentration of plasma HDL-cholesterol

매실추출물 유효성분 섭취 쥐의 체내 LDL 콜레스테롤 평가

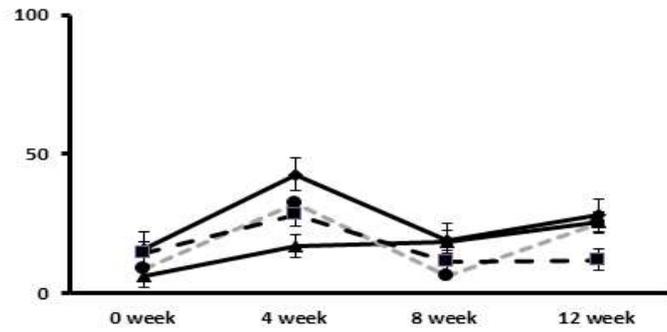


그림 70. The effects of the plum extract on changes in the concentration of plasma LDL-cholesterol

매실추출물 유효성분 섭취 쥐의 체내 ALP(plasma alkaline phosphatase)

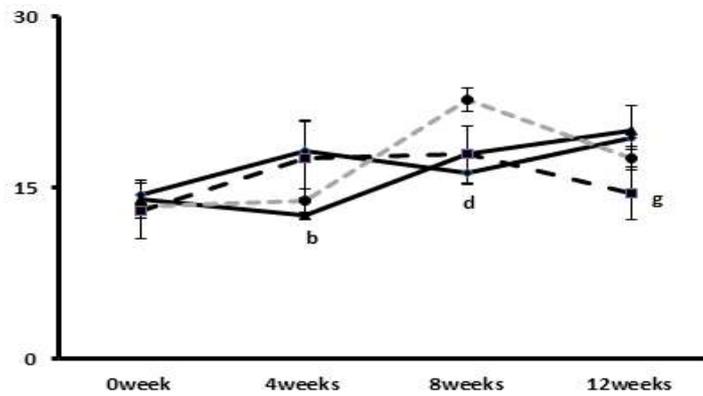


그림 71. The effects of the plum extract on changes in the activity of plasma Alkaline phosphatase of blood

매실추출물 유효성분 섭취 쥐의 혈당

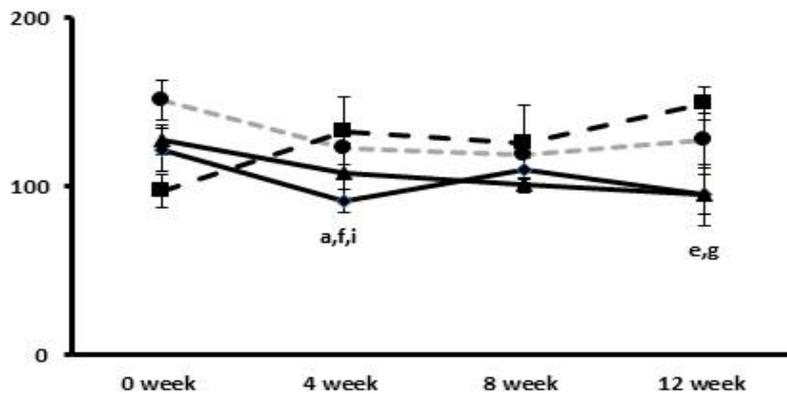


그림 72. The effects of the plum extract on changes in the activity of plasma glucose

매실추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 motor test

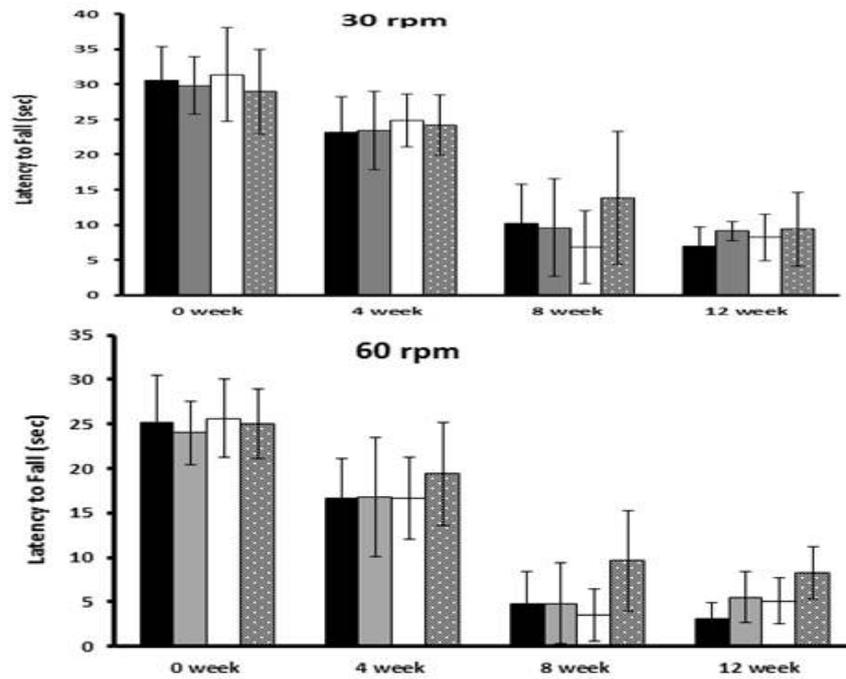


그림 73. The effects of the plum extract on changes on motor activity measured by rotarod test at 30 rpm and 60 rpm

- 효율적인 동작 패턴을 측정을 위해 개별 운동 시스템을 통합하는 능력을 확인하는 motor coordination(운동 능력 test법)를 수행한 결과 주(week)수가 증가할수록 매실추출물 군들의 버티는 시간이 control 보다 증가함.

매실추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 수영 운동능력 test

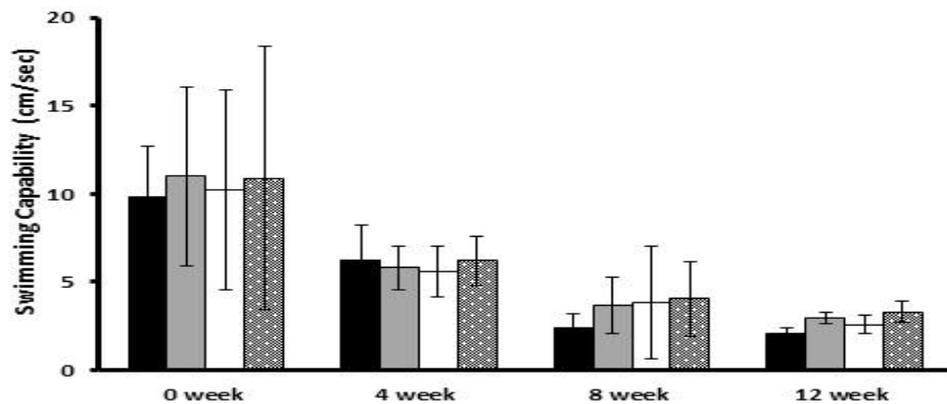


그림 74. The effects of the plum extract on changes on motor activity measured by swimming test

- 위의 실험을 통해서 매실추출물의 운동능력이 가장 좋은 것으로 확인되었음

귤추출물 유효성분의 체중 감소 효과

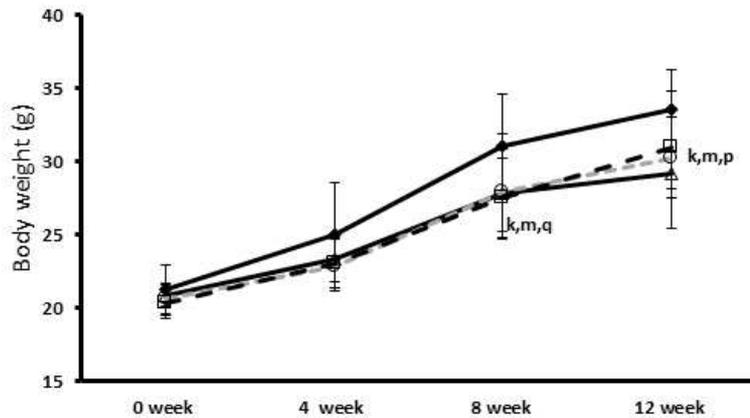


그림 75. The effects of the citrus extract and tangerine on changes in the body weight.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)“harlan”), citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD; Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student’s t-test; (k) $0.01 \geq P^{**}$, (m) $0.5 \geq P^{*}$, (p) $0.5 \geq P^{*}$.

귤추출물 유효성분의 total body fat 감소효과

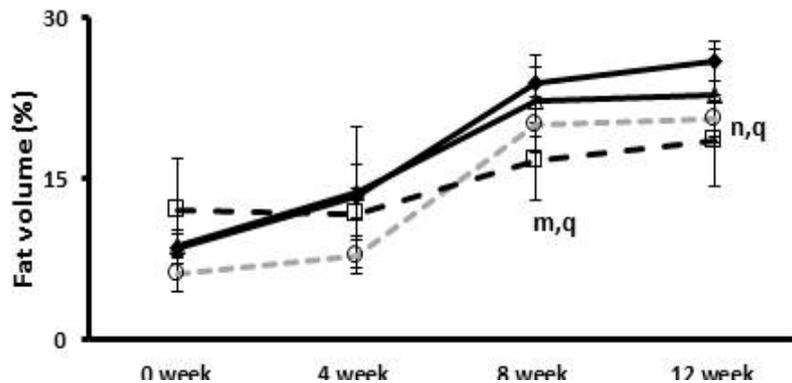


그림 76. The effects of the Tangerine and CA on changes in abdominal fat content measured by in vivo micro-CT image analysis.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)“harlan”); citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD. The values represent the mean± s.d. (n = 15). Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student’s t-test; (m) $0.5 \geq P^{*}$ 1% CA compared to the control, (n) $0.01 \geq P^{**}$ 1% CA compared to the control, (q) $0.01 \geq P^{**}$ 0.7 % Tangerine compared to the control.

귤추출물 유효성분의 visceral fat 감소 효과

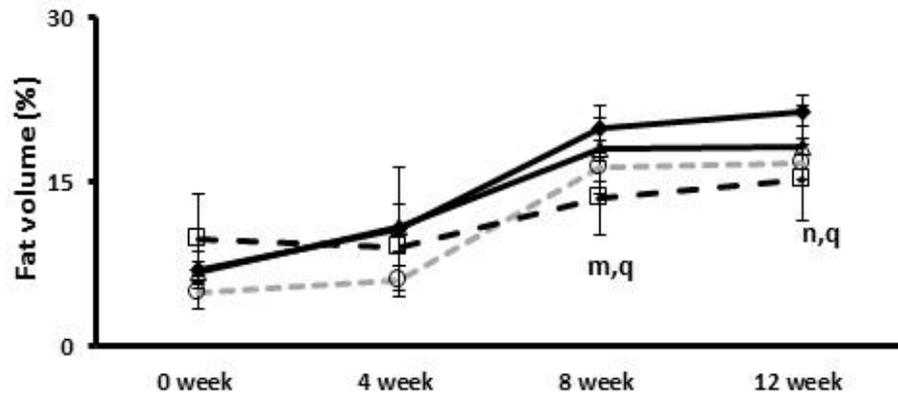


그림 77. The effects of the Tangerine and CA on changes in abdominal fat content measured by in vivo micro-CT image analysis.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan"); citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD. The values represent the mean± s.d. (n = 15). Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student's t-test; (m) $0.5 \geq P^*$, (n) $0.01 \geq P^{**}$, (q) $0.01 \geq P^{**}$.

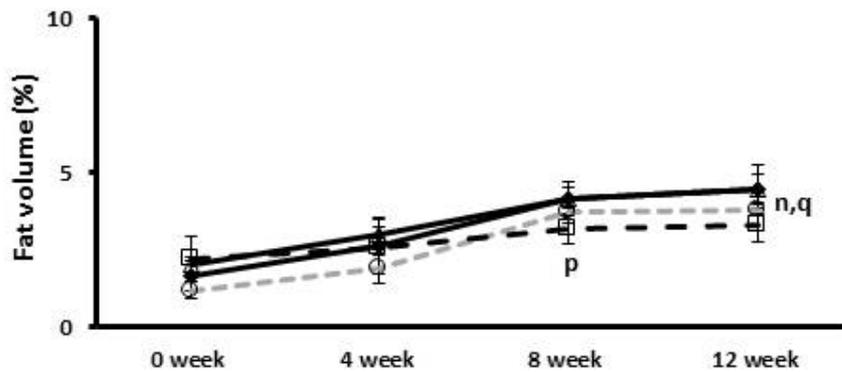


그림 78. The effects of the Tangerine and CA on changes in abdominal fat content over the period of 12 weeks showing comparative analysis of the mice total subcutaneous fat volume measured by in vivo micro-CT image analysis at 0,4,8 and 12 weeks.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan"); citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD. The values represent the mean± s.d. (n = 15). Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student's t-test; (n) $0.01 \geq P^{**}$ 1% CA compared to the control, (p) $0.5 \geq P^*$ 0.7 % Tangerine compared to the control, (q) $0.01 \geq P^{**}$ 0.7 % Tangerine compared to the control.

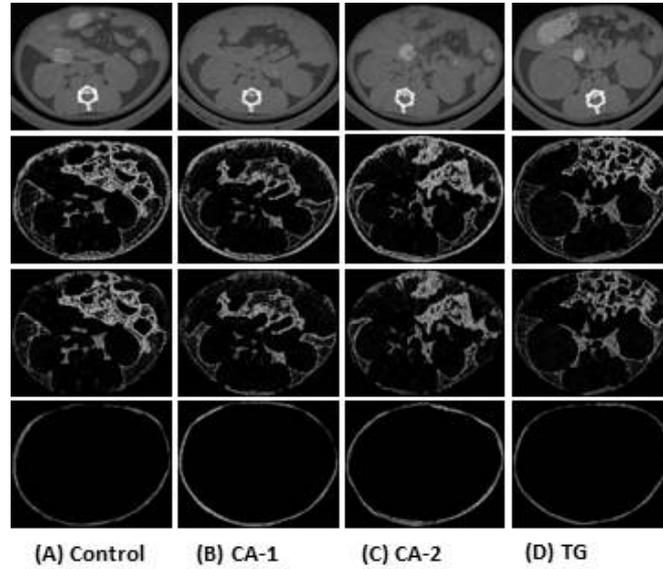


그림 79. The representative micro-CT image used for comparative analysis of the mice treated with the Tangerine and CA at 0 week.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan"); citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD.

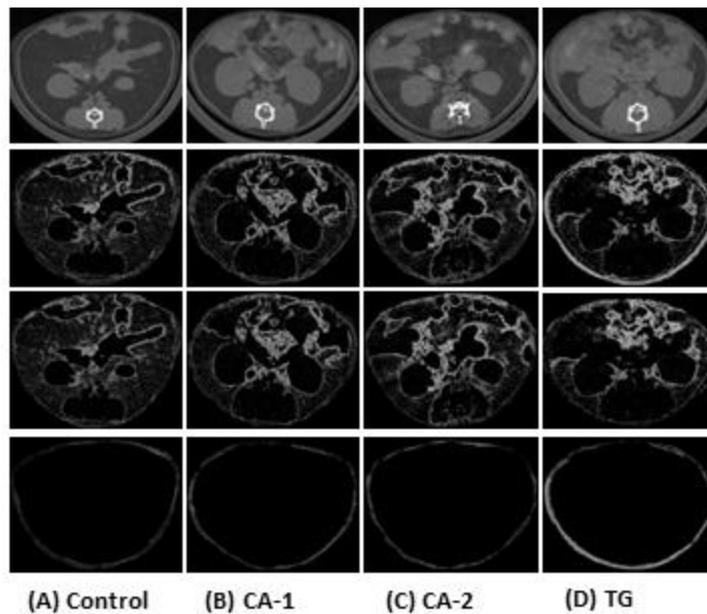


그림 80. The representative in vivo micro-CT image used for comparative analysis of the mice treated with the Tangerine and CA at 12 week.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan"); citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD.

귤추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 체내 total 콜레스테롤 평가

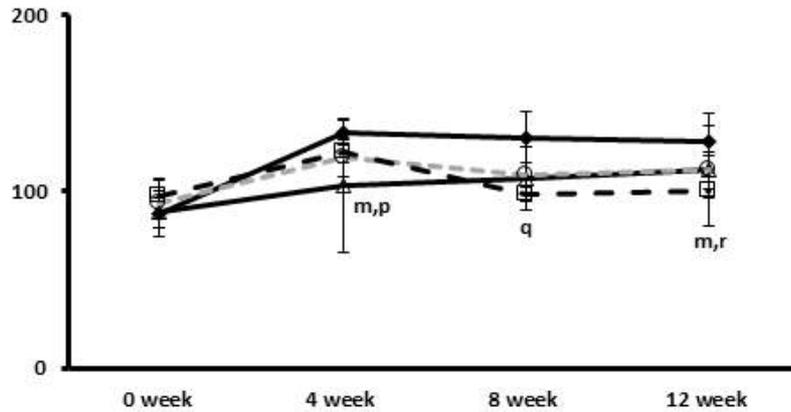


그림 81. The effects of the Tangerine and CA on changes in the concentration of total cholesterol of blood over the period of 12 weeks showing comparative analysis of the mice blood profile.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan") ; citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD; Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student's t-test; (m) $0.5 \geq P < 1\%$ CA compared to control, (p) $0.5 \geq P < 0.7\%$ Tangerine compared to the control, (q) $0.01 \geq P < 0.05$ 0.7% Tangerine compared to the control, (r) $0.001 \geq P < 0.005$ 0.7% Tangerine compared to the control.

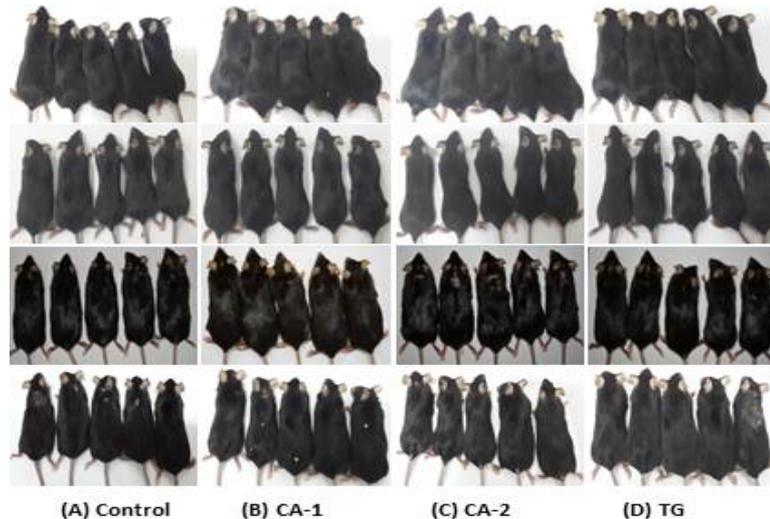


그림 82. Images representing the change of physical status experimental mice groups by adding the Tangerine and citric acid in HFD at 0,4,8 and 12 weeks.

The values represent the mean \pm s.d. (n = 15). Eight weeks old female mice were purchased and acclimatized for 4 weeks and then the animals were fed with their respective HFD diets. The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan") ; In Group D and E CA were added in the 2% and 1% concentration to the HFD respectively and in F group 0.7% Tangerine were added in HFD.

귤추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 체내 중성지방 평가

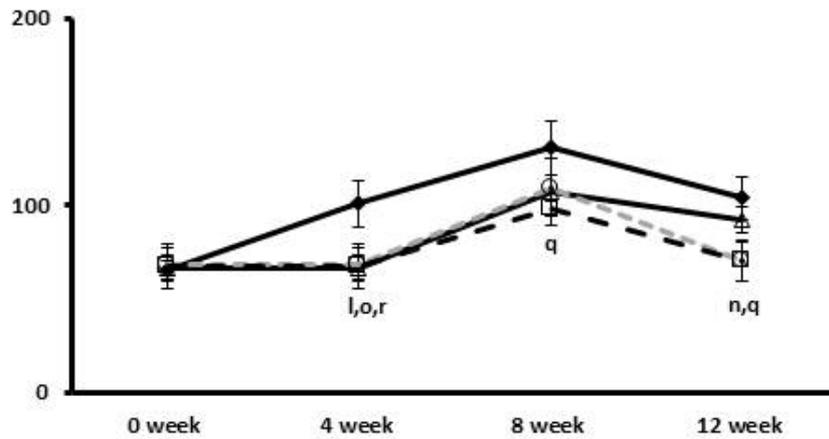


그림 83. The effects of the Tangerine and CA on changes in the concentration of plasma triacylglycerol of blood over the period of 12 weeks showing Comparative analysis of the mice blood profile at 0,4,8 and 12 weeks.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan") ; citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD; Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student's t-test; (i) $0.001 \geq P$ *** 1.91% Plum compared to the control, (n) $0.01 \geq P$ ** 1% CA compared to the control, (o) $0.001 \geq P$ *** 1% CA compared to the control, (q) $0.01 \geq P$ ** 0.7 % Tangerine compared to the control, (r) $0.001 \geq P$ *** 0.7 % Tangerine compared to the control.

귤추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 체내 HDL 콜레스테롤 평가

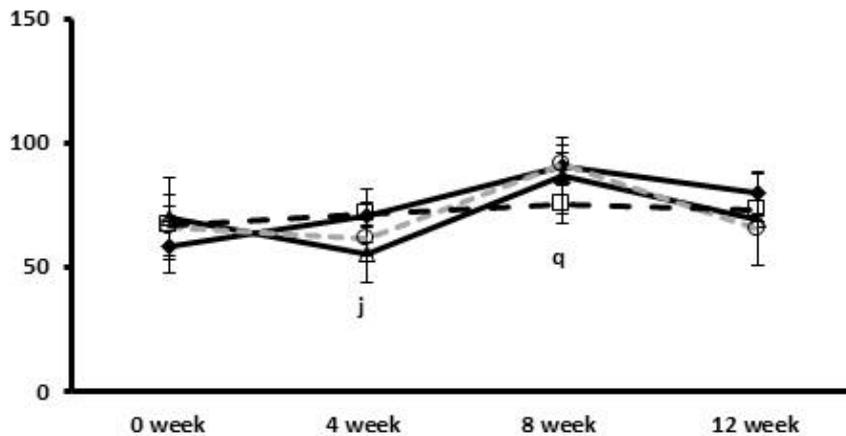


그림 84. The effects of the Tangerine and CA on changes in the concentration of HDL-cholesterol of blood.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan") ; citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD; Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student's t-test; (j) $0.5 \geq P$ * 2% CA compared to the control, (q) $0.01 \geq P$ ** 0.7 % Tangerine compared to the control.

귤추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 체내 LDL 콜레스테롤 평가

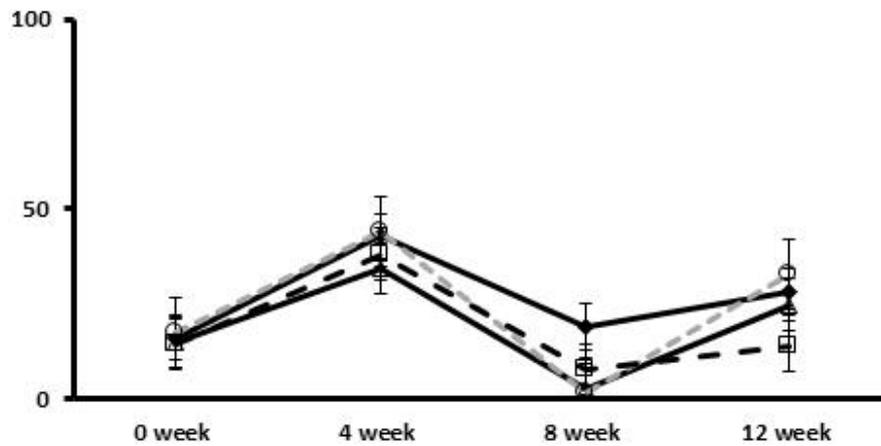


그림 85. The effects of the Tangerine and CA on changes in the concentration of LDL-cholesterol of blood..

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan") ; citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD.

귤추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 체내 ALP(plasma alkaline phosphate) 평가

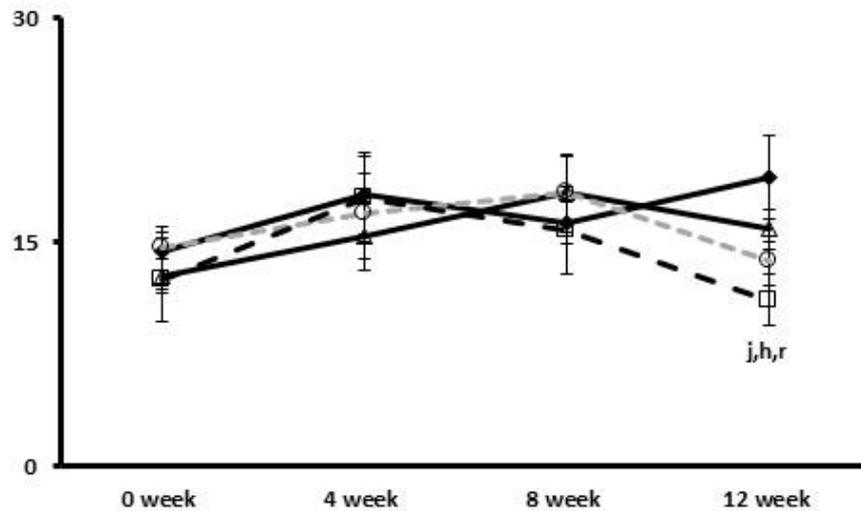


그림 86. The effects of the Tangerine and CA on changes in the activity of plasma Alkaline phosphatase of blood.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan"); citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD; Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student's t-test; (h) $0.01 \geq P < 0.05$ Plum compared to the control, (j) $0.05 \geq P < 0.1$ CA compared to the control, (r) $0.001 \geq P < 0.005$ 0.7 % Tangerine compared to the control.

귤추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 혈당 측정

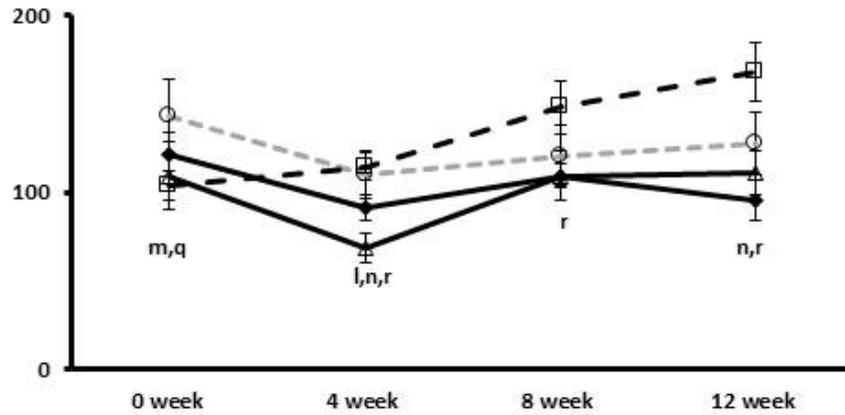


그림 87. The effects of the Tangerine and CA on changes in the concentration of glucose of blood over the period of 12 weeks (A,D,E,F) showing Comparative analysis of the mice blood profile at 0,4,8 and 12 weeks.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan") ; citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD; Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student's t-test; (l) $0.001 \geq P$ *** 2% CA compared to the control, (m) $0.05 \geq P$ * 1% CA compared to the control, (n) $0.01 \geq P$ ** 1% CA compared to the control, (q) $0.01 \geq P$ ** 0.7 % Tangerine compared to the control, (r) $0.001 \geq P$ *** 0.7 % Tangerine compared to the control.

귤추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 motor test

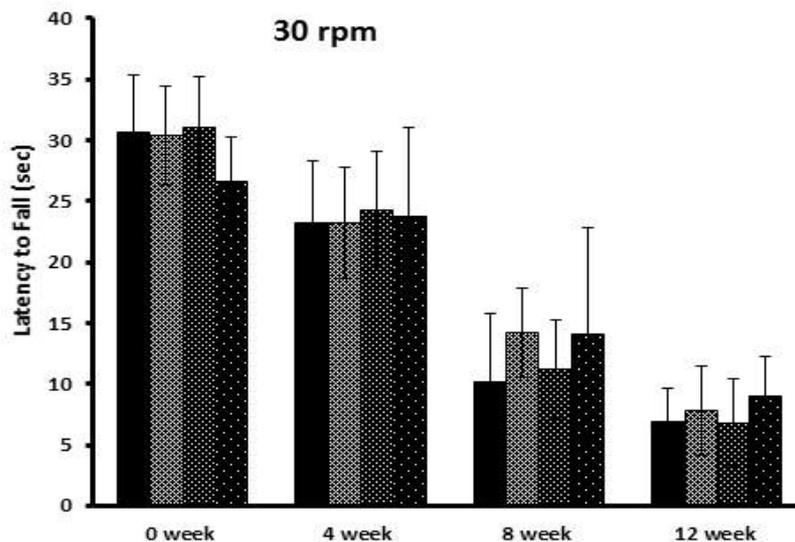


그림 88. The effects of the Tangerine and CA on motor coordination over the period of 12 weeks showing results of the rotarod test results of mice on 30rpm.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)"harlan"); citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD.

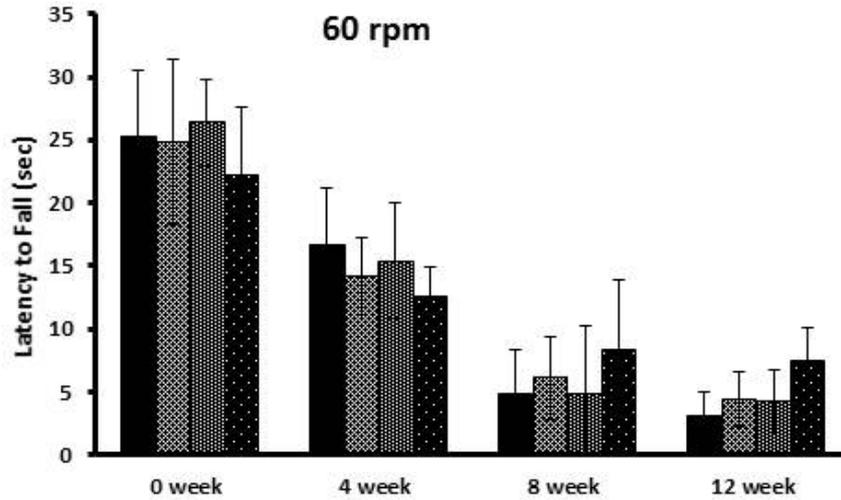


그림 89. The effects of the Tangerine and CA on motor coordination over the period of 12 weeks showing results of the rotarod test results of mice on 60rpm.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)“harlan”); citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD. Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student’s t-test; ***p < 0.001 compared with Ctrl.

귤추출물 유래 유효성분의 섭취 쥐의 수영 운동능력 test

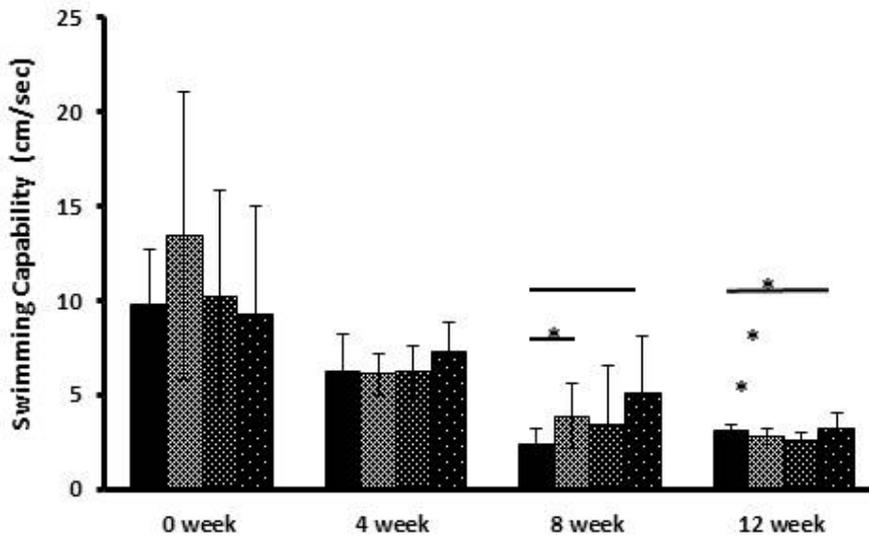


그림 90. The effects of Tangerine and CA on physical strength over the period of 12 weeks showing the performance of mice in the swimming test.

The control (Ctrl) mice fed a HFD containing 45% calories as lard fat (TD.06415 adjusted Calories Diet(45/Fat)“harlan”); citrus extract CA-1, citrus extract CA-2 and Tangerine were added in HFD; Values in the figure with a superscripted letter indicate statistical significance as analyzed by an unpaired Student’s t-test; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared with Ctrl.

자) 지방산제거 항비만 유산균을 이용한 스타터 연구

- 지방산 제거 유산균 분말의 상업적 이용을 위하여 원유에 대한 발효 특성을 우선적으로 분석 하였다.

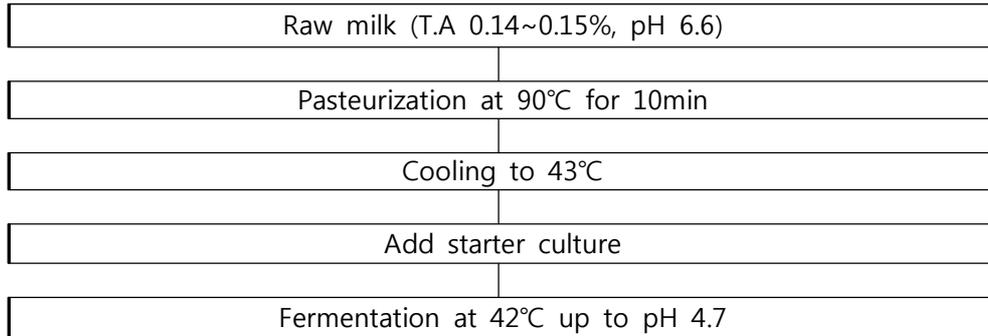


그림 91. 지방산제거 유산균 분말의 원유 적용 특성 분석을 위한 시료 제조

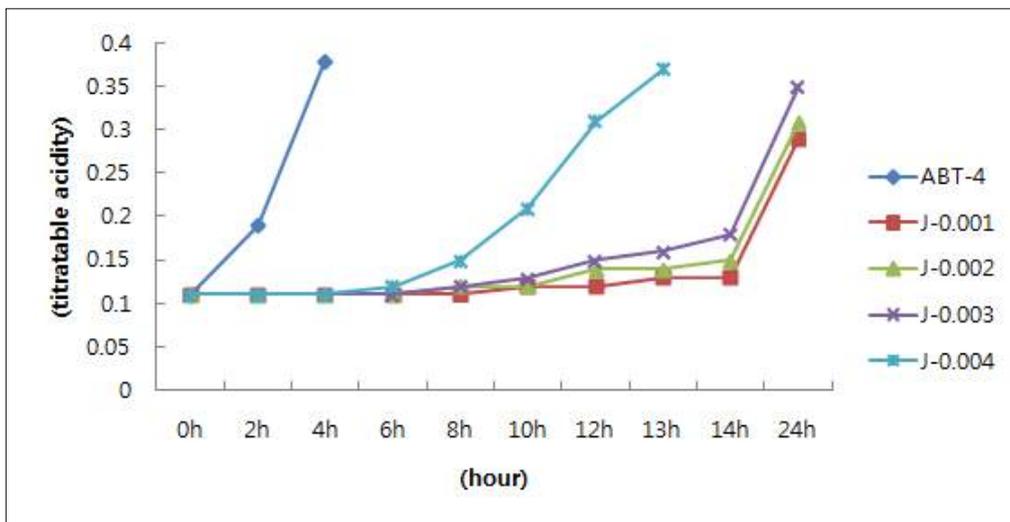


그림 92. 지방산 제거 유산균 분말 첨가량에 따른 유산 생성능의 변화

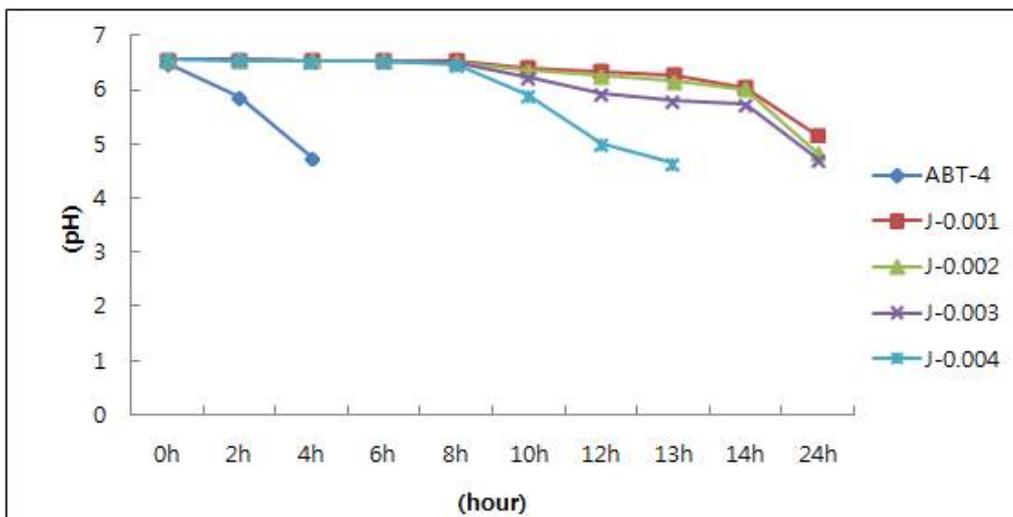


그림 93. 지방산 제거 유산균 분말 첨가량에 따른 pH의 변화

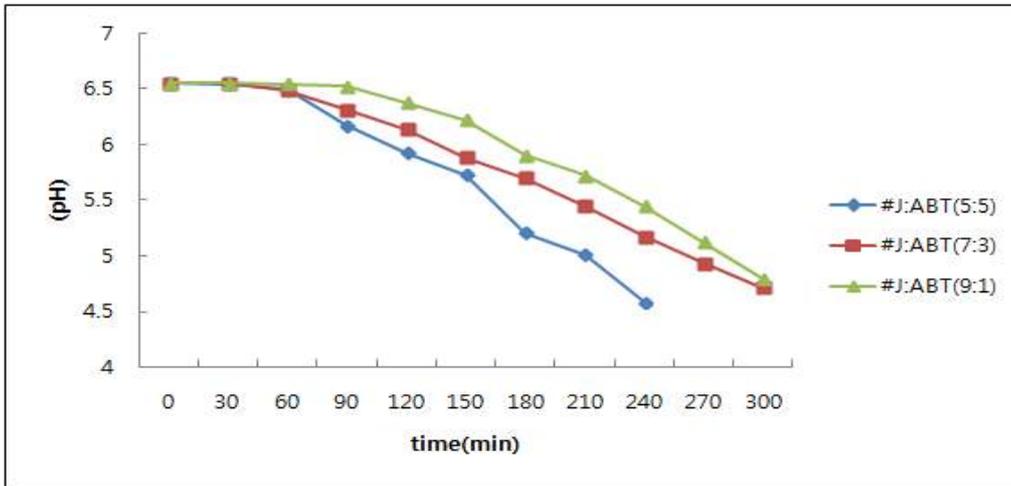


그림 94. 지방산제거유산균 및 ABT-4 스타터 이용한 발효 적성 연구

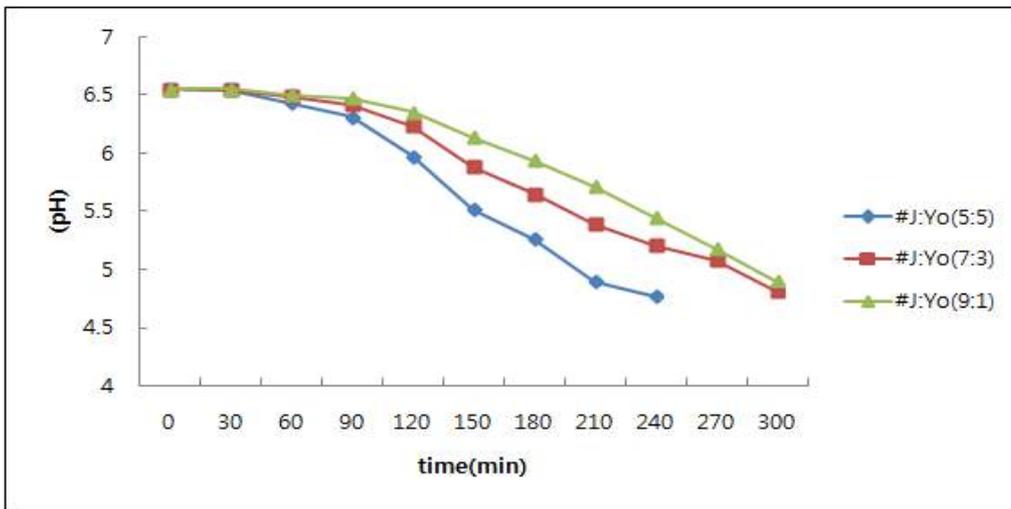


그림 95. 지방산제거 유산균 및 YoFlex Express 1.0 스타터를 이용한 발효 적성 연구

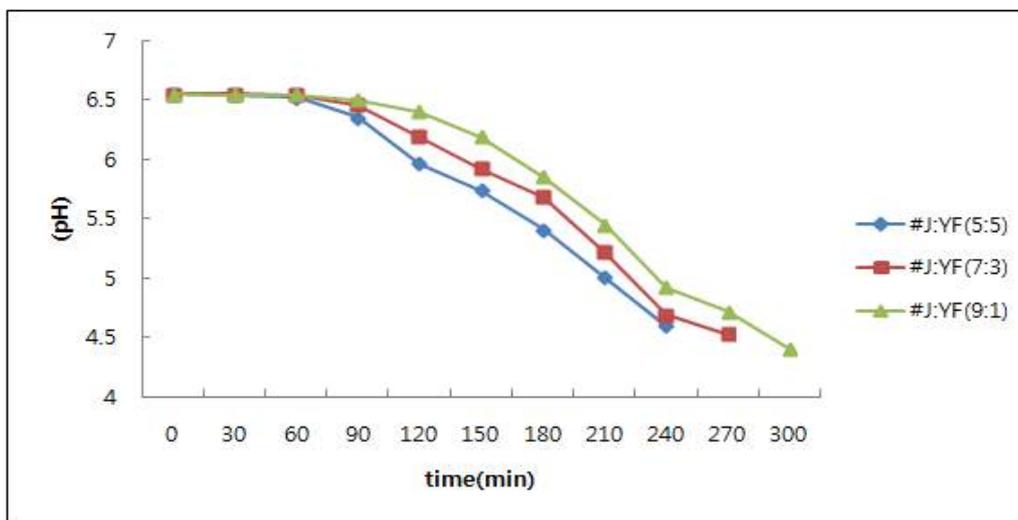


그림 96. 지방산제거 유산균 및 YF_L812 혼합 스타터를 이용한 발효 적성 연구

구 분	유산균수(CFU/mL)	혼합비율
ABT-4	3.60×10^8	5:5
YoFlex Express 1.0	2.31×10^8	5:5
YF-L812	3.11×10^8	5:5

표 6. 지방산 제거 유산균 분말 및 상업적 유산균의 혼합 처리에 따른 유산균수

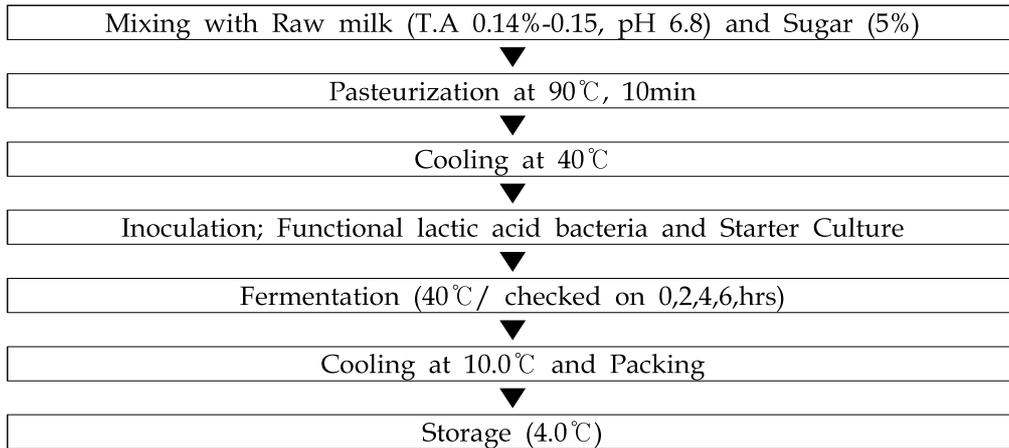
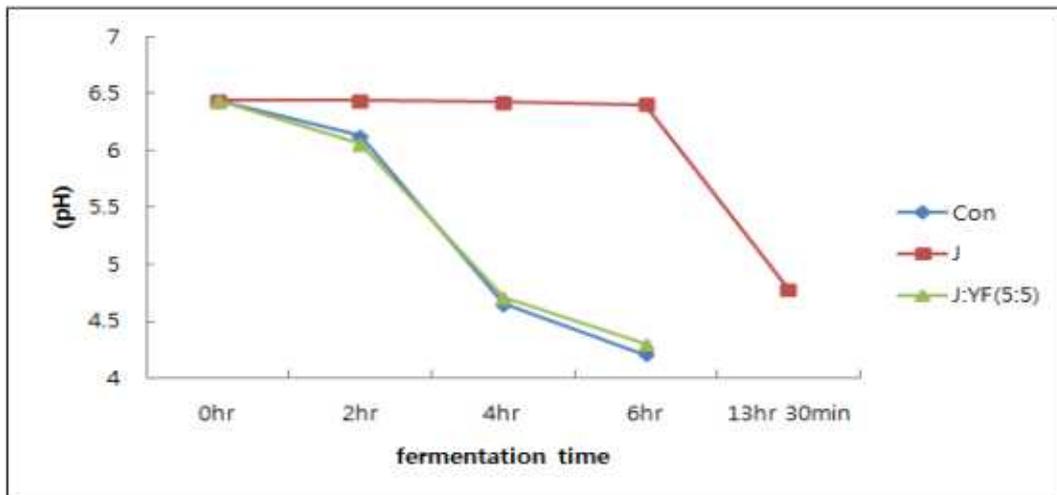
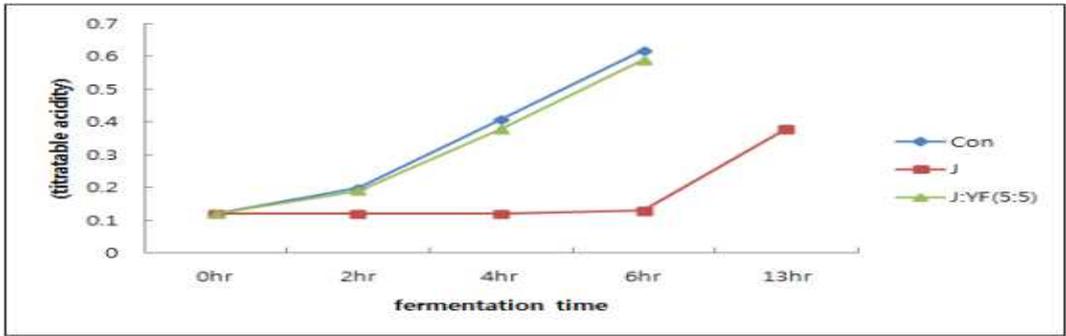


그림 97. 발효유 제조공정



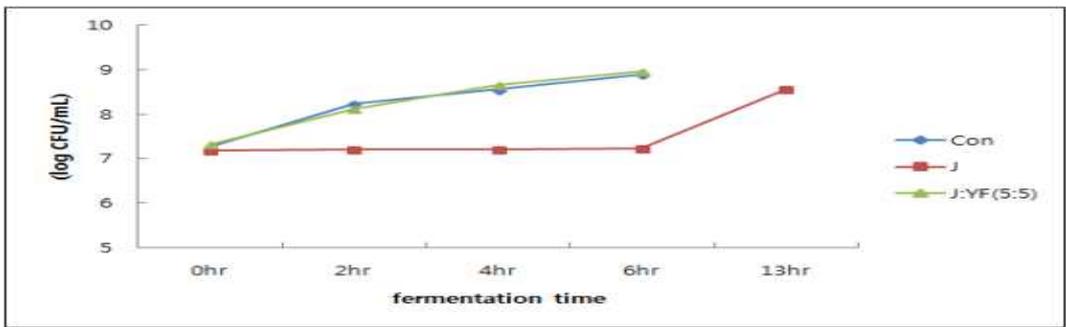
- ※ Con : 상업적 스타터(YF-L812)
- J : 지방산제거 유산균 분말
- J:YF(5:5) : 지방산제거 유산균 분말 및 상업적 스타터 혼합 분말(5:5)

그림 98. 발효시간에 따른 pH 변화



※ Con : 상업적 스타터(YF-L812)
 J : 지방산제거 유산균 분말
 J:YF(5:5) : 지방산제거 유산균 분말 및 상업적 스타터 혼합 분말(5:5)

그림 99. 발효시간에 따른 산도 변화



※ Con : 상업적 스타터(YF-L812)
 J : 지방산제거 유산균 분말
 J:YF(5:5) : 지방산제거 유산균 분말 및 상업적 스타터 혼합 분말(5:5)

그림 100. 발효시간에 따른 생균수 변화

구분	색	향	맛	전반적인 기호도
Con	4.7 ± 0.5	4.3 ± 0.8	4.2 ± 0.7	4.5 ± 0.7
J	4.7 ± 0.5	3.8 ± 0.8	3.7 ± 0.7	3.9 ± 0.5
J:YF(5:5)	4.8 ± 0.4	4.2 ± 0.7	4.1 ± 0.9	4.5 ± 0.5

표 7. 지방산제거 유산균 분말을 이용하여 제조한 발효유의 관능검사



그림 101. 지방산 제거 유산균주 첨가 발효유 시제품

차) 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 항비만 활성성분 검증

(1) 국내산 농산물 추출물 유효성분의 체중 및 체지방 감소 효과

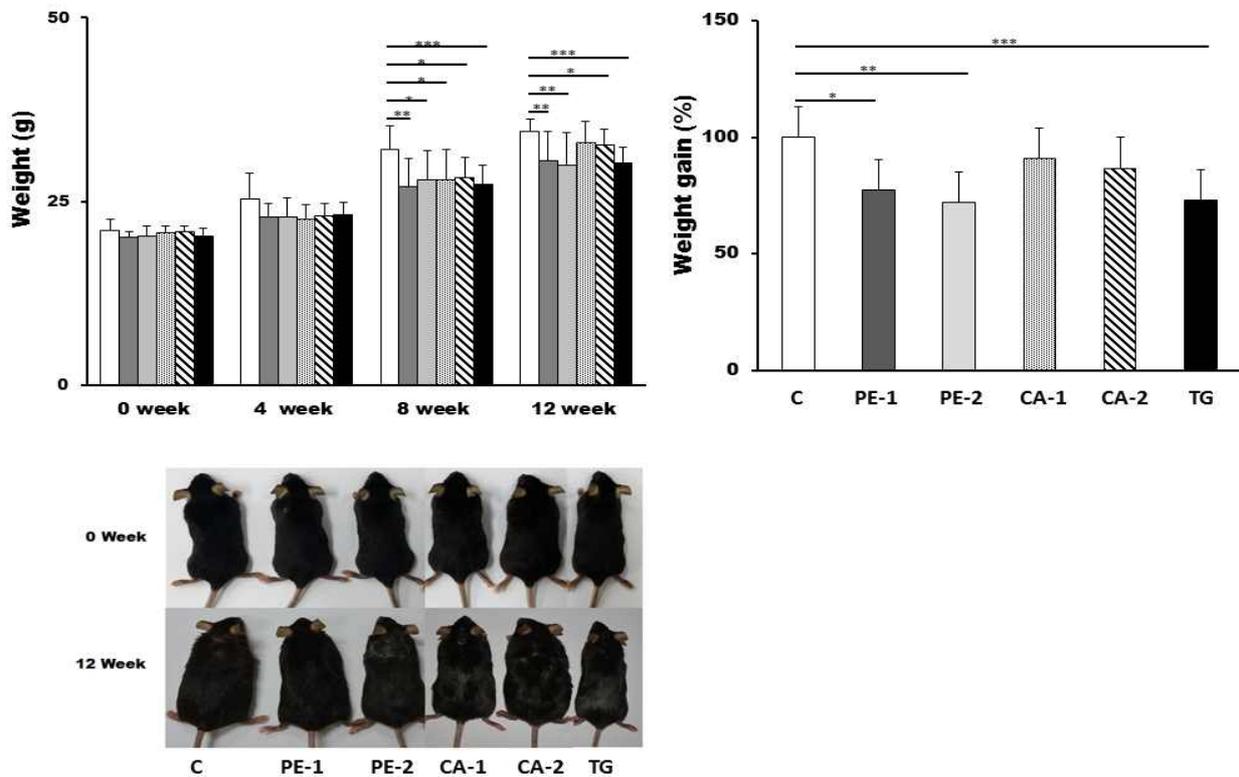


그림 102. 매실 추출물 Plum extract PE-1, Plum extract PE-2, 귤 추출물 CA-1, CA-2, Tangerine 섭취에 따른 체중 및 체지방 감소 효과

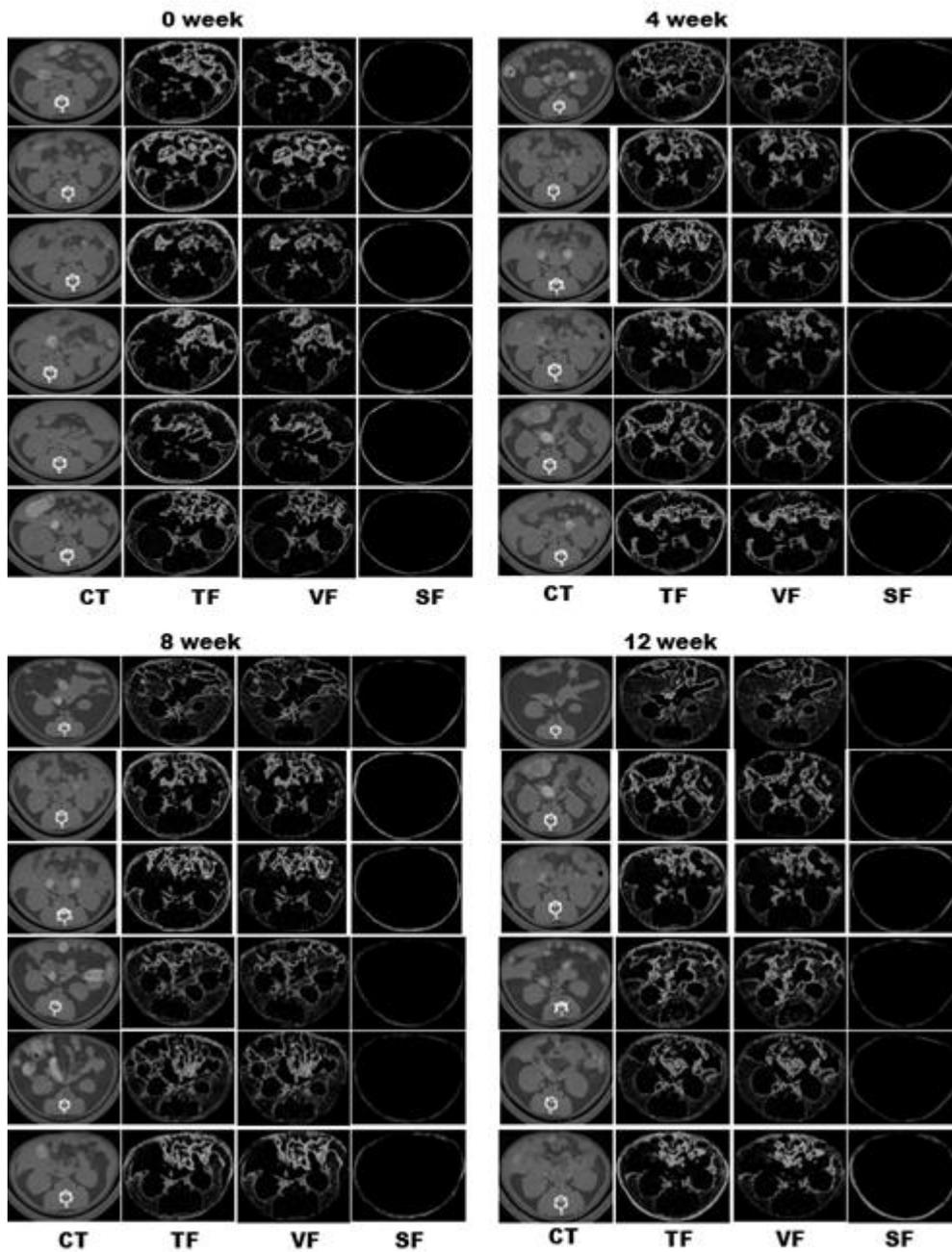


그림 103. Representative images of CT, total fat, visceral fat and subcutaneous fat in control, plum extract PE-1, PE-2, citrus extract CA-1, citrus extract CA-2, Tangerine extracts (from top to bottom)

(2) 국내산 농산물 추출물 유효성분의 혈중 지질 개선 효과

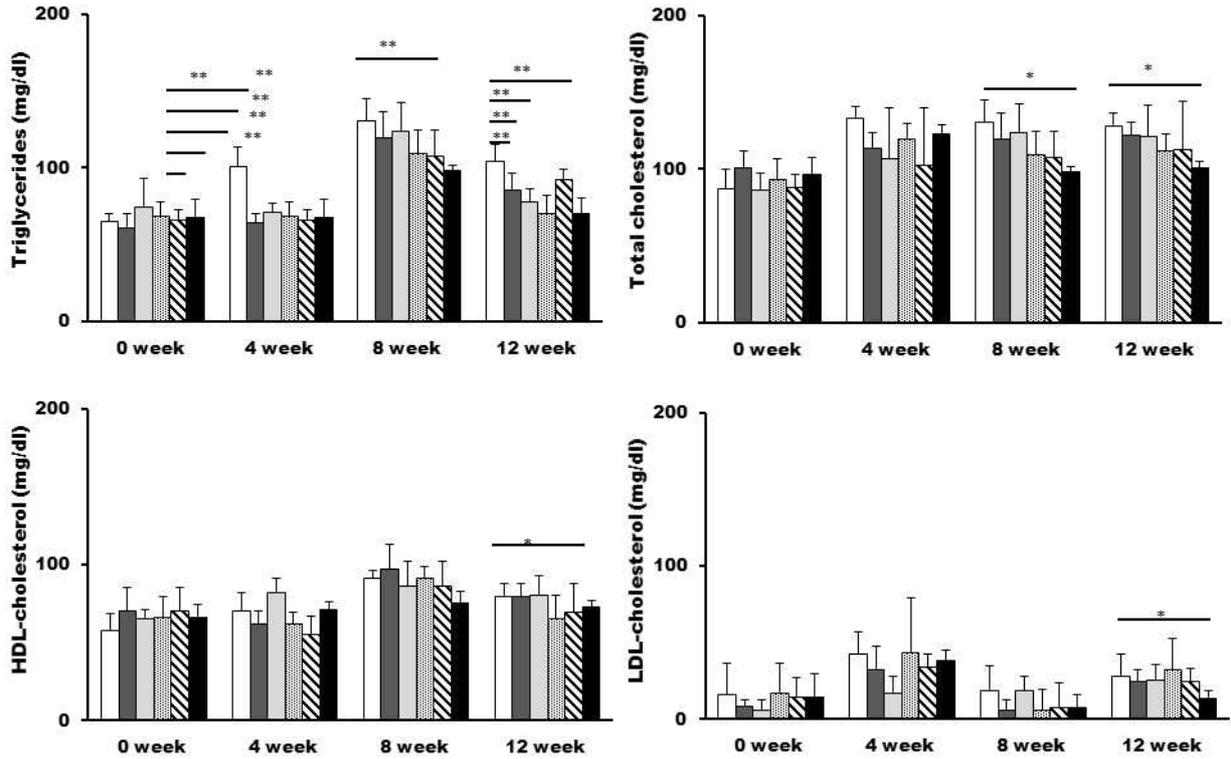


그림 104. Blood lipid profile in mice fed ontrol, PE-1, PE-2, CA-1, CA-2, or Tangerine extracts

(3) 국내산 농산물 추출물 유효성분의 항당뇨 효과

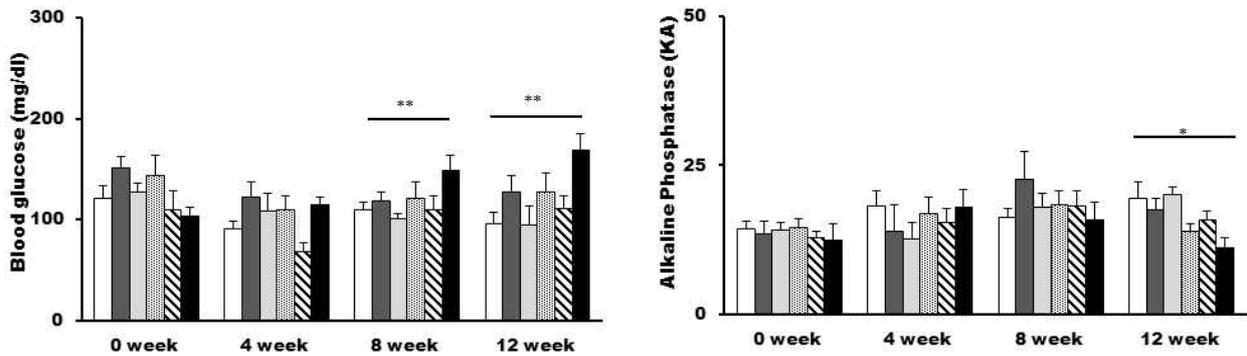


그림 105. Blood glucose and alkaline phosphatase in mice fed control, PE-1, PE-2, CA-1, CA-2, or Tangerine extracts

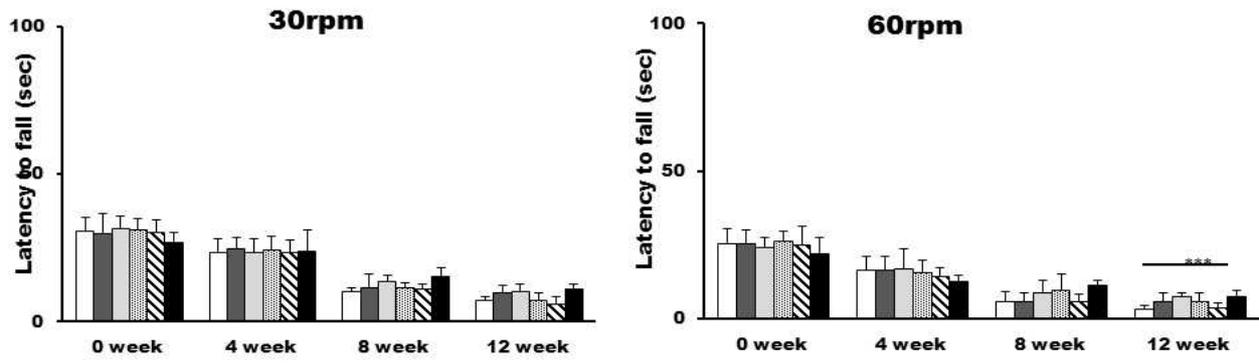


그림 106. Motor coordination in rotarod test at 30 rpm and 60 rpm

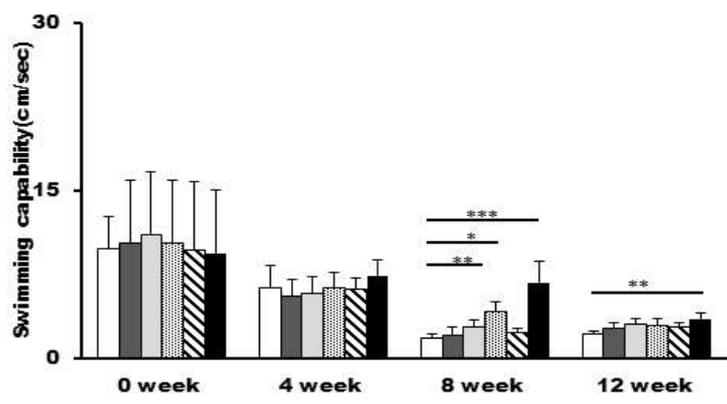


그림 107. Swimming test in mice fed control, PE-1, PE-2, CA-1, CA-2, or Tangerine extracts

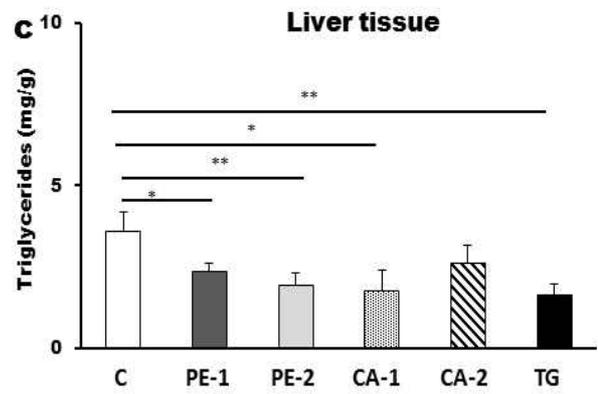
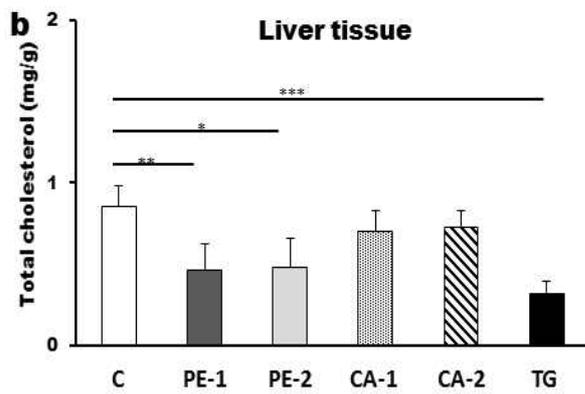
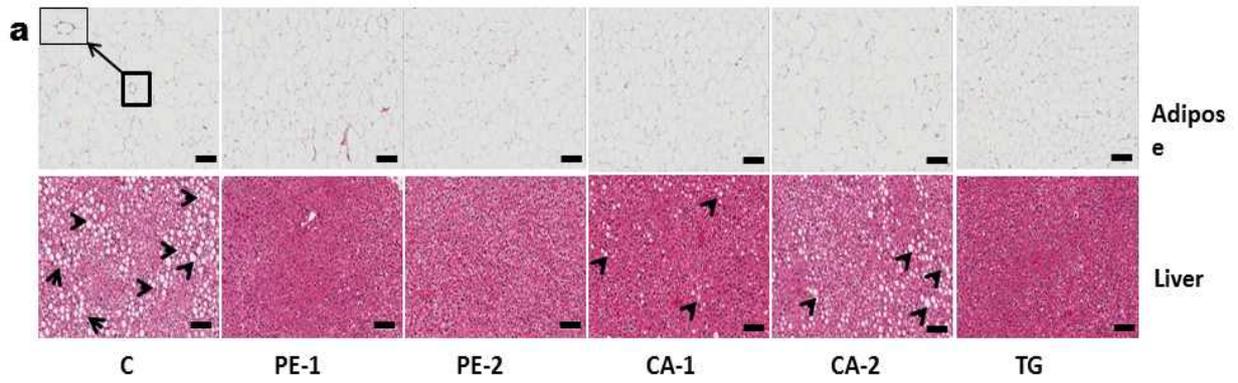


그림 108. Effects on tissue health in mice fed control, PE-1, PE-2, CA-1, CA-2, or Tangerine extracts in H&E staining (a), total cholesterol(b) and triglycerides(c) in liver.

카) 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 항비만 활성성분에 의한 gene expression study

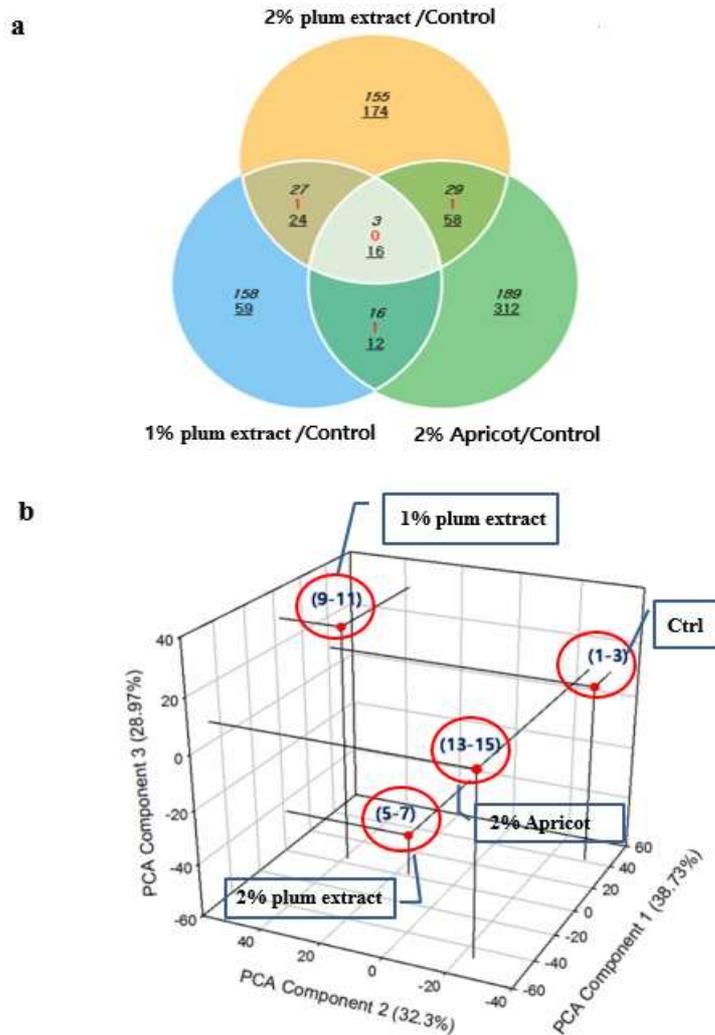
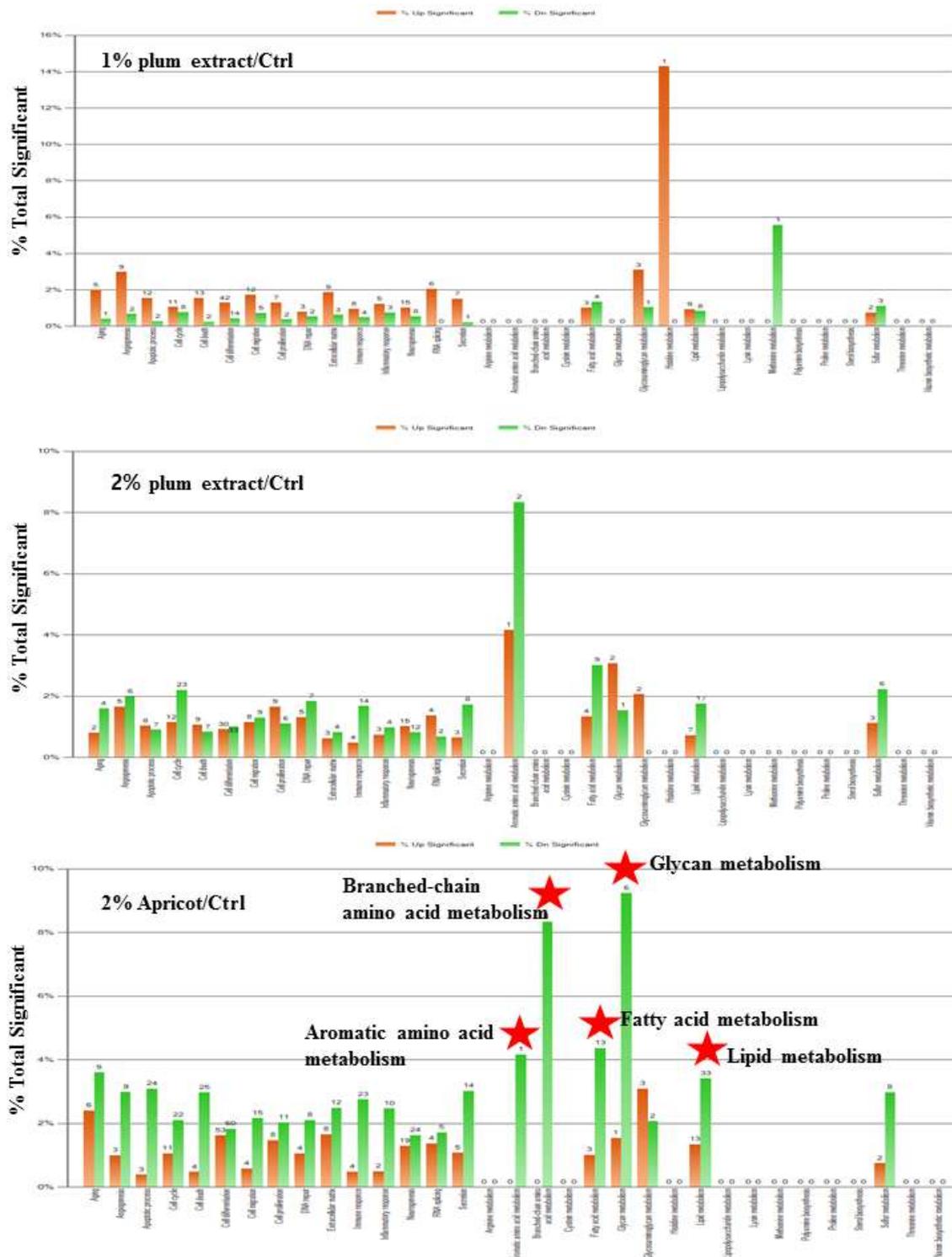


그림 109. The gene expression patterns of the mice on 2% plum extract, 1% plum extract, 2% Apricot, or Control diet.

(a) Overlaps of differential expression signatures at the end of 3 month feeding experiments. A total of 811 probe sets (< 3.3%) were induced by 2% Apricot/Ctrl, 318 probe sets (< 1.3%) were induced by 2% PE and 311 probe sets (< 1.3%) were induced by 1% PE. The Venn diagram shows the overlap between these groups, where up (0), down (0), and contra (0) indicate the number of probe sets up, down and contra-regulated, respectively. Genes were filtered using a cutoff fold change > 1.5, average normalized RC (log2) > 2, and p-value of < 0.05. (b) Principal component analysis of the microarray data at the end of the 3 month feeding experiments. The first principal component (PC1) is dominant with 38.7% variability, and shows that 2% Apricot is different from plum extract, or Ctrl, respectively.



	2%
Up	<p>gene_sets.gmt#HUMMERICH_BENIGN_SKIN_TUMOR_DN gene_sets.gmt#FRICKMAN_HEAD_AND_NECK_CANCER_F gene_sets.gmt#WEBER_METHYLATED_ICP_IN_FIBROBLAST gene_sets.gmt#REACTOME_AMINE_DERIVED_HORMONES gene_sets.gmt#CHEMELLO_SOLEUS_VS_EDL_MYOFIBERS_DN gene_sets.gmt#HUMMERICH_MALIGNANT_SKIN_TUMOR_DN gene_sets.gmt#CHEMELLO_SOLEUS_VS_EDL_MYOFIBERS_UP gene_sets.gmt#REACTOME_STRIATED_MUSCLE_CONTRACTION gene_sets.gmt#REACTOME_CGMP_EFFECTS</p>
Down	<p>gene_sets.gmt#WONG_ENDOMETRIUM_CANCER_UP gene_sets.gmt#REACTOME_IRON_UPTAKE_AND_TRANSPORT gene_sets.gmt#KEGG_PRIMARY_BILE_ACID_BIOSYNTHESIS gene_sets.gmt#COLLER_MYC_TARGETS_UP gene_sets.gmt#REACTOME_TRANSFERRIN_ENDOCYTOSIS_AND_RECYCLING gene_sets.gmt#CAFFARELL_RESPONSE_TO_TBC_DN gene_sets.gmt#REACTOME_CITRIC_ACID_CYCLE_TCA_CYCLE gene_sets.gmt#REACTOME_BRANCHED_CHAIN_AMINO_ACID_CATABOLISM gene_sets.gmt#IZUKA_LIVER_CANCER_PROGRESSION_G2_G3_UP gene_sets.gmt#SCIAN_CELL_CYCLE_TARGETS_OF_TP53_AND_TP73_DN gene_sets.gmt#KASLER_HDAC7_TARGETS_1_DN</p>
	1%
Up	<p>gene_sets.gmt#TSUNODA_CISPLATIN_RESISTANCE_DN gene_sets.gmt#GEISS_RESPONSE_TO_DSRNA_UP gene_sets.gmt#MARTORIATI_MDM4_TARGETS_FETAL_LIVER_DN gene_sets.gmt#WARTERS_RESPONSE_TO_IR_SKIN gene_sets.gmt#HASLINGER_B_CELL_WITH_CHROMOSOME_12_TRISOMY gene_sets.gmt#LI_WILMS_TUMOR_ANAPLASTIC_UP gene_sets.gmt#DORN_ADENOVIRUS_INFECTION_24HR_DN gene_sets.gmt#LUI_TARGETS_OF_PAX8_PPARG_FUSION gene_sets.gmt#PID_HIF1_PATHWAY gene_sets.gmt#DOUGLAS_BMI1_TARGETS_DN</p>
Down	<p>gene_sets.gmt#MARIADASON_REGULATED_BY_HISTONE_ACETYLATION_UP gene_sets.gmt#REACTOME_REGULATION_OF_GLUCKINASE_BY_GLUCKINASE_REGULATORY_PROTEIN gene_sets.gmt#LU_AGING_BRAIN_UP gene_sets.gmt#REACTOME_VIF_MEDIATED_DEGRADATION_OF_APOBEC3G gene_sets.gmt#CHIARADONNA_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION_KRAS_DN gene_sets.gmt#KEGG_MATURITY_ONSET_DIABETES_OF_THE_YOUNG gene_sets.gmt#REACTOME_DOWNSTREAM_TCR_SIGNALING gene_sets.gmt#TAMBOLSKY_RESPONSE_TO_VITAMIN_D3_DN gene_sets.gmt#AKEDA_TARGETS_OF_NIP95_HOXA9_FUSION_1D_DN gene_sets.gmt#YAGI_AML_WITH_INV_16_TRANSLOCATION</p>
	2% Apricot/Cerl
Up	<p>gene_sets.gmt#BIOCARTA_ARE_PATHWAY gene_sets.gmt#REACTOME_IL_3_5_AND_GM-CSF_SIGNALING gene_sets.gmt#ROSS_EK3_TARGETS_UP gene_sets.gmt#MCCABE_BOUND_BY_HOXC6 gene_sets.gmt#RASHI_NFKB1_TARGETS gene_sets.gmt#KEGG_TYPE_II_DIABETES_MELLITUS gene_sets.gmt#BROWNE_HCMV_INFECTION_20HR_DN gene_sets.gmt#REALT_B_CELL_WITH_VH_REARRANGEMENTS_UP gene_sets.gmt#SPENG_GLUCOSE_DEPRIVATION_DN gene_sets.gmt#FARMER_BREAST_CANCER_CLUSTER_1</p>
Down	<p>gene_sets.gmt#REACTOME_APC_C_CDC20_MEDIATED_DEGRADATION_OF_CYCLIN_B gene_sets.gmt#LIU_IL13_MEMORY_MODEL_UP gene_sets.gmt#PID_AK_NONGENOMIC_PATHWAY gene_sets.gmt#KEGG_MELANOMA gene_sets.gmt#REACTOME_RAS_ACTIVATION_UOPN_CA2_INFUX_THROUGH_NMDA_RECEPTOR gene_sets.gmt#HEIDENBLAD_AMPLICON_12P11_12_DN gene_sets.gmt#KEGG_BASAL_CELL_CARCINOMA gene_sets.gmt#REACTOME_TRANSPORT_OF_GLUCOSE_AND_OTHER_SUGARS_BILE_SALTS_AND_ORGANIC_ACIDS_METAL_IONS_AND_AMINE_COMPOUNDS gene_sets.gmt#REACTOME_CHONDROITIN_SULFATE_DERMATAN_SULFATE_METABOLISM gene_sets.gmt#SHIN_B_CELL_LYMPHOMA_CLUSTER_9</p>

그림 111. The most highly significant up-regulated and down-regulated pathways in the livers of mice

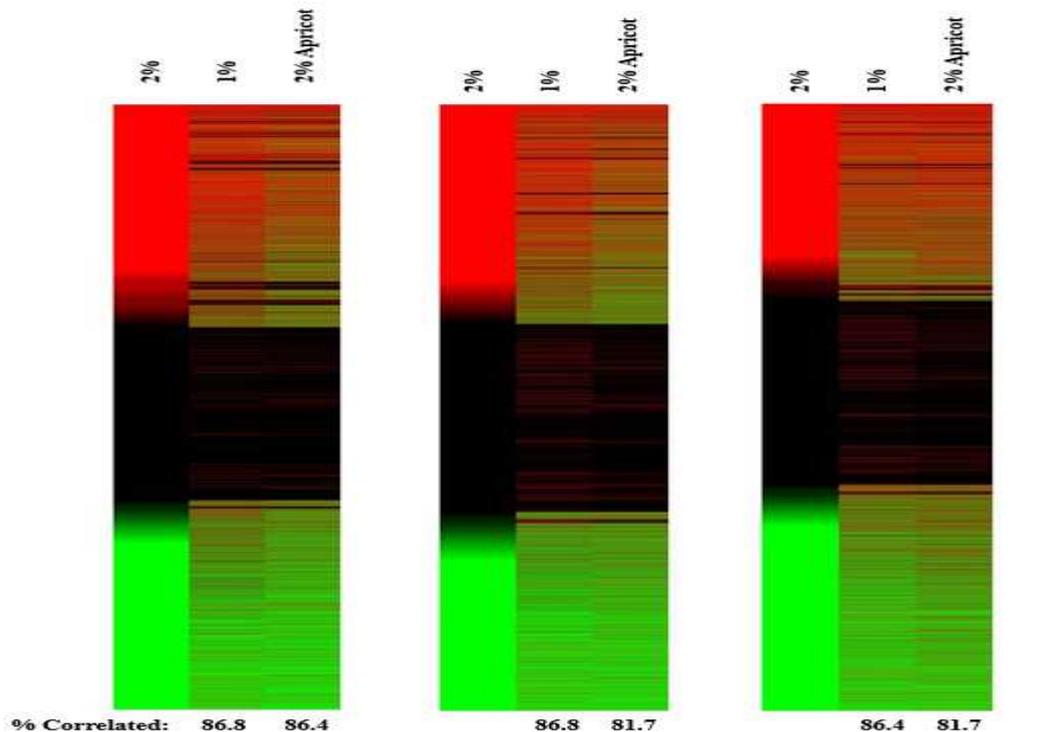
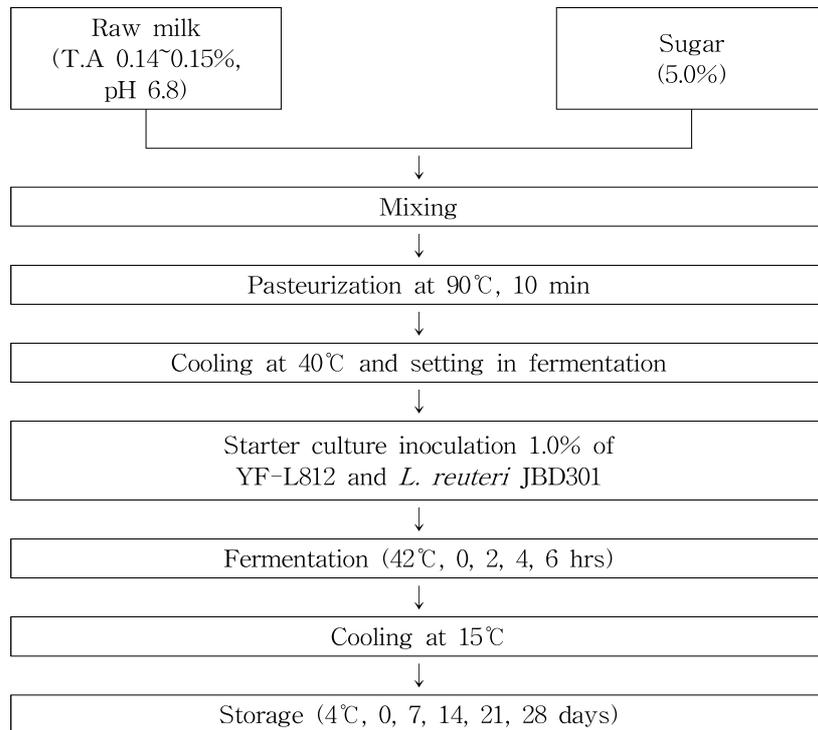


그림 112. The gene set enrichment analysis of the microarray data

타) **비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산 제거 항비만 유산균 복합분말제의 발효식품 제품화 적용 연구**

(1) 국내산 농산물 소재와 항비만 유산균 첨가 발효유 제조용 스타터 첨가량 결정

- 국내산 농산물 소재를 발효유에 적용하기 전 지방산 제거 항비만 유산균의 최소 첨가량을 확인하기 위하여 상업균주(YF-L812)와 지방산 제거 항비만 유산균 (*Lactobacillus reuteri* JBD301)의 첨가량에 따른 발효유를 제조한 후 발효시간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화를 측정함



상업균주와 지방산 제거 유산균첨가량에 따른 발효유 제조

- pH 측정은 pH meter(UB-10, Denver, USA)를 이용하였으며, 적정산도는 시료 10 mL에 증류수 10 mL를 혼합하여 현탁액을 만든 후 이 현탁액을 NaOH를 첨가하여 pH 8.3까지 적정하고 NaOH의 소비량에 유산의 환산계수인 0.9를 곱한 후 검체의 무게(g)를 나누어 나타낸 값을 적정산도(%)로 함.
- 유산균수의 변화는 시료 1 mL를 채취하여 멸균식염수에 십진 희석법으로 희석한 뒤 BCP 한천배지를 이용하여 평판배양법으로 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 나타난 노랑색 콜로니 수를 측정하여 CFU/mL로 표시함.
- 결과 상업균주와 지방산 제거 항비만 유산균 JBD301을 각각 0.8:0.2, 0.6:0.4, 0.4:0.6, 0.2:0.8의 비율로 혼합하여 제조한 발효유의 경우는 상업균주 발효유와 유사하게 발효 4시간에 발효 종말점인 pH 4.6에 도달하였고, 적정산도 값은 0.75%를 유지하였으며, 유산균수는 6×10^9 CFU/mL을 유지함

		(CFU/mL)				
Ingredients	Ratio	Fermentation time (h)				
		0	2	4	6	
pH	YF+JBD301	1.0:0.0	6.46±0.02	5.15±0.03	4.57±0.04	4.36±0.02
		0.8:0.2	6.47±0.01	5.17±0.02	4.58±0.03	4.38±0.03
		0.6:0.4	6.47±0.03	5.19±0.03	4.59±0.02	4.40±0.02
		0.4:0.6	6.46±0.02	5.20±0.02	4.60±0.03	4.42±0.03
		0.2:0.8	6.46±0.02	5.24±0.03	4.62±0.03	4.44±0.04
		0.0:1.0	6.47±0.01	6.32±0.02	5.82±0.04	5.26±0.02
Titratable acidity (%)	YF+JBD301	1.0:0.0	0.14±0.05	0.59±0.03	0.77±0.08	0.87±0.12
		0.8:0.2	0.14±0.07	0.58±0.06	0.76±0.09	0.86±0.13
		0.6:0.4	0.14±0.04	0.58±0.06	0.76±0.09	0.86±0.10
		0.4:0.6	0.14±0.05	0.57±0.05	0.75±0.08	0.85±0.10
		0.2:0.8	0.14±0.04	0.55±0.06	0.73±0.07	0.84±0.09
		0.0:1.0	0.14±0.05	0.19±0.02	0.42±0.03	0.53±0.06
Viable cell counts (CFU/mL)	YF+JBD301	1.0:0.0	7.2×10 ⁶	5.4×10 ⁸	6.4×10 ⁹	3.5×10 ¹⁰
		0.8:0.2	7.1×10 ⁶	5.3×10 ⁸	6.3×10 ⁹	3.3×10 ¹⁰
		0.6:0.4	7.1×10 ⁶	5.2×10 ⁸	6.2×10 ⁹	3.4×10 ¹⁰
		0.4:0.6	7.1×10 ⁶	5.3×10 ⁸	6.2×10 ⁹	3.3×10 ¹⁰
		0.2:0.8	7.0×10 ⁶	5.1×10 ⁸	6.1×10 ⁹	3.2×10 ¹⁰
		0.0:1.0	7.0×10 ⁶	9.6×10 ⁶	7.2×10 ⁷	4.2×10 ⁸

YF : YF-L812 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*)
 JBD301 : *Lactobacillus reuteri* JBD301

표 8. 상업균주와 지방산 제거 항비만 유산균 첨가량에 따른 pH, 산도 및 유산균수

- 이와 더불어 상업균주와 항비만 유산균의 첨가량을 달리하여 제조한 발효유를 9점 척도법을 이용하여 관능검사를 실시한 결과 색 항목에서 크게 차이를 나타내지 않았지만, 향, 맛, 전체적인 기호도 항목에서 상업균주와 지방산 제거 항비만 유산균 0.8:0.2 첨가구가 가장 우수함

Ingredients	Ratio	Sensory evaluation				
		Color	Flavor	Taste	Texture	Overall acceptability
YF+JBD301	1.0:0.0	7.5±0.45	7.2±0.44	7.1±0.35	7.3±0.35	7.0±0.32
	0.8:0.2	7.5±0.48	7.6±0.47	7.6±0.32	7.1±0.37	7.7±0.38
	0.6:0.4	7.4±0.42	7.5±0.41	7.4±0.34	7.0±0.42	7.4±0.39
	0.4:0.6	7.5±0.45	7.4±0.46	7.3±0.37	6.9±0.45	7.4±0.41
	0.2:0.8	7.5±0.42	7.5±0.42	7.2±0.36	7.0±0.46	7.2±0.32
	0.0:1.0	7.4±0.48	6.6±0.48	6.5±0.43	6.7±0.32	6.5±0.27

YF : YF-L812 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*)
 JBD301 : *Lactobacillus reuteri* JBD301
 All values are mean ± SD (n=10).

표 9. 상업균주와 지방산 제거 항비만 유산균 첨가량에 따른 발효유의 관능평가

- 특히 발효가 완료된 각각의 발효유를 4°C에서 냉장보관하면서 7일 간격으로 28일 동안 저장기간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화를 측정된 결과 상업균주와 지방산 제거 항비만 기능성 유산균 0.8:0.2 첨가구는 상업균주 단독 및 지방산 제거 항비만 기능성 유산균 단독 첨가구와 유사하게 저장기간 동안 후산발효가 지속적으로 일어나 pH는 28일 저장 후 4.58에서 4.29으로 0.29 감소됨
- 적정산도는 0.78에서 0.95로 0.17% 증가하였다. 또한 유산균수는 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/mL을 유지하여 적정치 범위 이상인 10^8 CFU/mL 이상을 유지하고 있으므로 품질의 안정성이 확인됨

(CFU/mL)

	Ingredients	Ratio	Storage period (days)				
			0	7	14	21	28
pH	YF+JBD301	1.0:0.0	4.58±0.02	4.42±0.03	4.34±0.03	4.29±0.02	4.24±0.02
		0.8:0.2	4.58±0.03	4.46±0.02	4.39±0.02	4.35±0.01	4.29±0.02
		0.0:1.0	4.59±0.02	4.50±0.02	4.45±0.02	4.39±0.02	4.35±0.01
Titratable acidity (%)	YF+JBD301	1.0:0.0	0.78±0.08	0.85±0.09	0.88±0.11	0.94±0.13	1.07±0.13
		0.8:0.2	0.78±0.08	0.85±0.11	0.87±0.12	0.89±0.14	0.95±0.14
		0.0:1.0	0.77±0.07	0.84±0.09	0.85±0.09	0.87±0.13	0.89±0.12
Viable cell counts (CFU/mL)	YF+JBD301	1.0:0.0	6.4×10^9	8.7×10^9	2.5×10^{10}	7.5×10^{10}	9.5×10^{10}
		0.8:0.2	6.3×10^9	8.5×10^9	2.2×10^{10}	6.5×10^{10}	8.4×10^{10}
		0.0:1.0	6.3×10^9	8.2×10^9	1.9×10^{10}	5.5×10^{10}	6.5×10^{10}

YF : YF-L812 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*)

JBD301 : *Lactobacillus reuteri* JBD301

표 10. 상업균주와 지방산 제거 항비만 유산균 첨가 발효유의 저장기간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화

(2) 지방산 제거 항비만 유산균 첨가 발효유 에탄올 추출물의 지방축적 억제효과

- 상업균주와 지방산 제거 항비만 유산균 0.8:0.2 첨가구의 항비만 효과를 확인하기 위하여 발효유를 에탄올 추출 및 농축 후 동결건조한 후 3T3-L1 지방세포 내 지방축적에 미치는 영향을 평가하기 위해 ORO 염색을 시행하여 세포 내 지방의 양을 정량함(그림 2).
- 3T3-L1 세포는 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였고, 10% bovine serum (BS), 1% penicillin-streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였으며, 37°C, 8%의 CO₂ incubator에서 4~5일마다 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ cells/mL로 계대배양하며 실험에 사용함.
- ORO 염색시약은 중성지질, 콜레스테롤 등과 결합하며, 지방분화로 인해 축적된 대부분의 지질은 중성지방으로 염색된 세포의 붉은색 정도를 통해 지방세포 내

중성지방 축적 정도를 확인할 수 있음.

- 지방세포 내 염색된 중성지방의 양을 DMSO로 녹여 정량한 결과, 분화군과 비교하여 지방산 제거 항비만 유산균 첨가 발효유 에탄올 추출물을 처리한 실험군에서는 농도의존적으로 지방의 양이 감소된 것을 알 수 있었음.
- 0.125 mg/mL 실험군은 10%, 0.25 mg/mL 실험군은 20%, 0.5 mg/mL 실험군은 40% 감소하는 것으로 나타남.
- 결론적으로 지방산 제거 항비만 유산균 첨가 발효유 에탄올 추출물이 3T3-L1 지방세포 분화유도과정에 작용하여 농도 의존적으로 지방축적을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었음

(CFU/mL)

	Ingredients	Ratio	Storage period (days)				
			0	7	14	21	28
pH	YF+JBD301	1.0:0.0	4.58±0.02	4.42±0.03	4.34±0.03	4.29±0.02	4.24±0.02
		0.8:0.2	4.58±0.03	4.46±0.02	4.39±0.02	4.35±0.01	4.29±0.02
		0.0:1.0	4.59±0.02	4.50±0.02	4.45±0.02	4.39±0.02	4.35±0.01
Titratable acidity (%)	YF+JBD301	1.0:0.0	0.78±0.08	0.85±0.09	0.88±0.11	0.94±0.13	1.07±0.13
		0.8:0.2	0.78±0.08	0.85±0.11	0.87±0.12	0.89±0.14	0.95±0.14
		0.0:1.0	0.77±0.07	0.84±0.09	0.85±0.09	0.87±0.13	0.89±0.12
Viable cell counts (CFU/mL)	YF+JBD301	1.0:0.0	6.4×10 ⁹	8.7×10 ⁹	2.5×10 ¹⁰	7.5×10 ¹⁰	9.5×10 ¹⁰
		0.8:0.2	6.3×10 ⁹	8.5×10 ⁹	2.2×10 ¹⁰	6.5×10 ¹⁰	8.4×10 ¹⁰
		0.0:1.0	6.3×10 ⁹	8.2×10 ⁹	1.9×10 ¹⁰	5.5×10 ¹⁰	6.5×10 ¹⁰

YF : YF-L812 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*)
 JBD301 : *Lactobacillus reuteri* JBD301

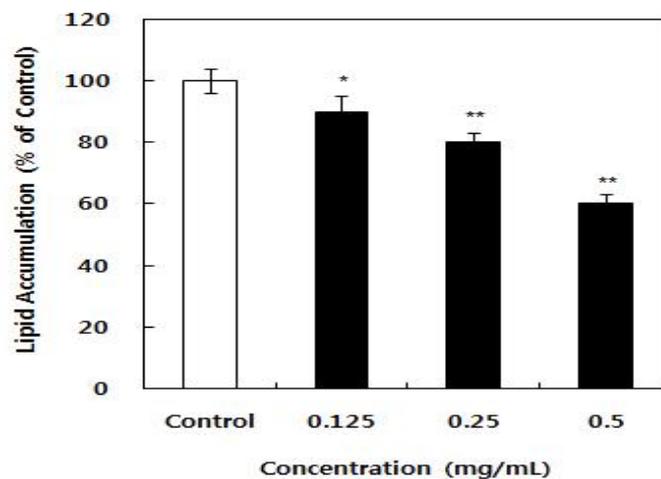


그림 113. 항비만 유산균 첨가 발효유 에탄올 추출물의 지방축적 억제효과

(3) 지방산 제거 항비만 유산균 첨가 발효유 에탄올 추출물의 지방세포 내 지방분해에 미치는 영향

- 지방산 제거 항비만 유산균 0.8:0.2 첨가 발효유의 지방축적 억제효과가 지방분해와도 관련하는지를 확인하기 위하여 mouse LPL ELISA kit를 이용하여 LPL의 활성을 측정함.
- LPL은 세포막, 세포외부 및 혈관 내피세포로 분비되어 중성지방을 지방산과 글리세롤로 분해하는 주요 효소임.
- 그 결과, 대조군과 비교하여 항비만 기능성 유산균 첨가 발효유 에탄올 추출물을 처리한 실험군에서 LPL의 활성이 0.25 mg/mL 실험군은 8%, 0.5 mg/mL 실험군은 20% 증가하는 것으로 나타남

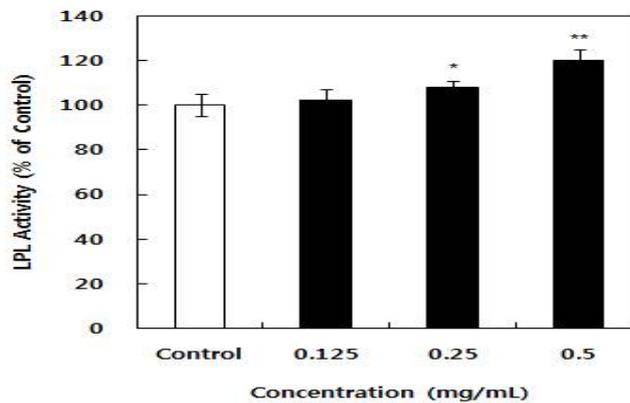


그림 114. 항비만 유산균 첨가 발효유 에탄올 추출물의 지방분해효과 (1)

- 배양액 내 지방 분해산물인 글리세롤의 농도를 free glycerol assay kit (Abcam)를 이용하여 측정한 결과, 0.25 mg/mL 실험군에서 5%, 0.5 mg/mL 실험군에서 15% 증가하는 것으로 나타남
- 지방산 제거 항비만 유산균 첨가 발효유 에탄올 추출물이 지방의 축적을 억제할 뿐 아니라 생성된 지방의 분해에도 관여함을 확인할 수 있었음.

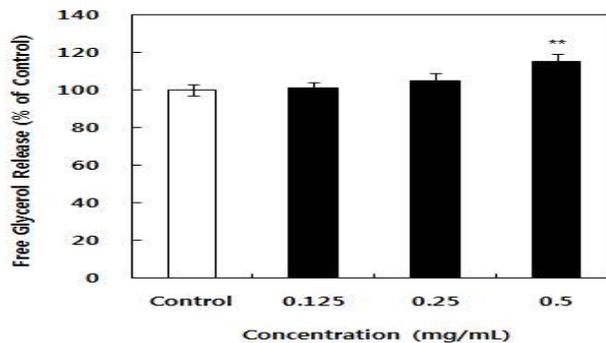


그림 115. 항비만 유산균 첨가 발효유 에탄올 추출물의 지방분해효과 (2)

(4) 발효유 제조를 위한 국내산 농산물 소재 적용 가능성

- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재를 발효유에 적용하고자 상업균주와 항비만 기능성 유산균이 0.8:0.2 비율로 첨가된 발효유 제조과정 중 국내산 농산물 소재를 0%에서 0.5% 첨가하여 발효시간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화를 확인함 (표 4).
- 결과 다량의 유기산이 함유된 국내산 농산물 소재 첨가구 모두 정상적인 발효가 진행되지 않아서 부드러운 커드를 형성하지 못함.
- 대조구인 상업균주와 항비만 유산균 0.8:0.2 첨가구에서만 발효 4시간에 발효 종말점인 pH 4.6에 도달하였으며, 적정산도 값은 0.78%를 유지하였고, 유산균수는 7×10^9 CFU/mL을 유지함.
- 이러한 실험을 통해 유기산을 다량 함유한 국내산 농산물 소재를 유산균 발효과정 중에 첨가하여 발효제품에 적용하는 것은 부적합한 것으로 판단되며, 발효가 종료된 후 첨가하는 방식으로 제조방법을 변경해야 할 것으로 확인이 되었음.

		(CFU/mL)			
Ingredients	Ratio	Fermentation time (h)			
		0	2	4	
pH	agricultural products	0%	6.48±0.03	5.18±0.04	4.60±0.02
		0.1%	5.78±0.02	5.75±0.03	5.76±0.03
		0.2%	5.32±0.04	5.30±0.02	5.33±0.04
		0.3%	5.05±0.02	5.06±0.04	5.07±0.02
		0.4%	4.71±0.03	4.73±0.02	4.72±0.03
		0.5%	4.43±0.04	4.41±0.03	4.44±0.05
Titratable acidity (%)	agricultural products	0%	0.16±0.04	0.53±0.04	0.78±0.07
		0.1%	0.45±0.09	0.45±0.03	0.45±0.07
		0.2%	0.50±0.06	0.50±0.05	0.50±0.07
		0.3%	0.61±0.11	0.61±0.08	0.61±0.05
		0.4%	0.72±0.08	0.72±0.05	0.72±0.07
		0.5%	0.85±0.06	0.85±0.04	0.85±0.07
Viable cell counts (CFU/mL)	agricultural products	0%	7.5×10^6	5.8×10^8	7.0×10^9
		0.1%	7.4×10^6	6.4×10^6	3.5×10^4
		0.2%	7.5×10^6	6.3×10^6	3.5×10^4
		0.3%	7.5×10^6	6.3×10^6	3.5×10^4
		0.4%	7.4×10^6	6.4×10^6	3.5×10^4
		0.5%	7.3×10^6	6.1×10^6	3.5×10^4

표 11. 국내산 농산물 소재 첨가 발효유의 발효과정 중 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화

(5) 국내산 농산물 소재와 항비만 유산균을 함유한 발효유 제품 품질검사

- 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재를 발효유에 적용하기 위하여 상업균주와 항비만 유산균이 0.8:0.2 비율로 첨가된 발효유를 제조한 후 4°C에서 저장하기 전에 국내산 농산물 소재를 0%에서 0.5% 첨가하여 혼합한 후 저장기간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화를 확인함
- 그 결과 대조구인 상업균주와 항비만 기능성 유산균 0.8:0.2 첨가구는 저장기간 동안 후산발효가 지속적으로 일어나 pH는 28일 저장 후 4.59에서 4.28으로 0.31 저하됨.
- 적정산도는 0.78에서 0.94로 0.16% 증가하였으며, 유산균수는 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/mL을 유지함.

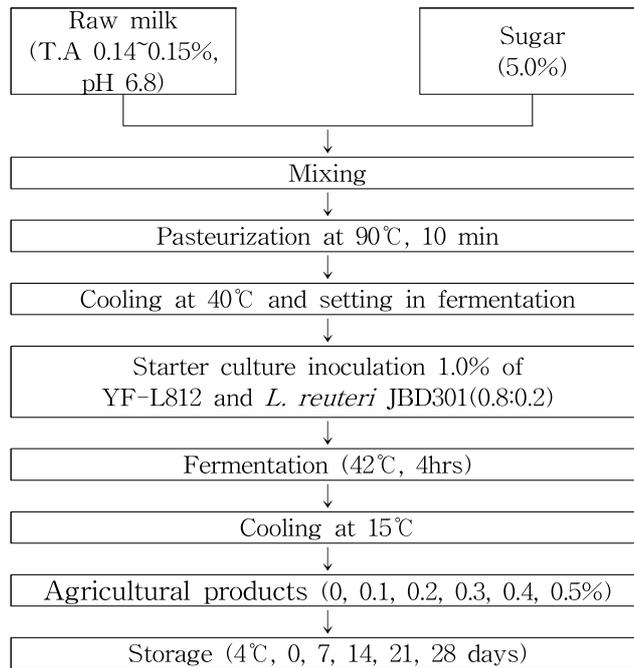


표 12. 국내산 농산물 소재와 항비만 유산균을 함유한 발효유 제조과정



그림 116. 국내산 농산물 소재와 항비만 유산균을 함유한 발효유 시제품

- 그러나 국내산 농산물 소재 첨가구 모두 다량의 유기산으로 인하여 후산발효가 지속적으로 억제됨에 따라 저장기간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화는 관찰되지 않았고, 유산균수는 10^9 CFU/mL 이상을 유지하였다 (표 5).
- 또한 국내산 농산물 소재와 항비만 유산균을 함유한 발효유를 9점 척도법을 이용하여 관능검사를 실시한 결과 국내산 농산물 소재의 첨가량이 증가함에 따라 신맛이 강하게 나타났지만 맛과 전체적인 기호도 항목에서 국내산 농산물 소재 0.1% 첨가구가 가장 우수하였다 (표 6).

(CFU/mL)

Ingredients	Ratio	Storage period (days)					
		0	7	14	21	28	
pH	agricultural products	0%	4.59±0.04	4.44±0.01	4.38±0.03	4.36±0.02	4.28±0.02
		0.1%	4.40±0.06	4.39±0.05	4.40±0.04	4.38±0.07	4.37±0.07
		0.2%	4.24±0.03	4.26±0.04	4.23±0.02	4.23±0.04	4.22±0.05
		0.3%	4.13±0.02	4.14±0.03	4.12±0.04	4.13±0.04	4.10±0.08
		0.4%	4.06±0.02	4.04±0.03	4.03±0.04	4.02±0.07	4.02±0.05
		0.5%	3.95±0.07	3.92±0.05	3.93±0.06	3.91±0.09	3.89±0.04
Titratable acidity (%)	agricultural products	0%	0.78±0.08	0.84±0.10	0.86±0.09	0.87±0.11	0.94±0.12
		0.1%	0.85±0.06	0.86±0.08	0.85±0.011	0.85±0.12	0.86±0.09
		0.2%	0.92±0.11	0.91±0.13	0.92±0.17	0.93±0.14	0.94±0.12
		0.3%	1.12±0.13	1.13±0.12	1.13±0.15	1.12±0.12	1.12±0.11
		0.4%	1.24±0.09	1.24±0.11	1.25±0.08	1.24±0.11	1.26±0.08
		0.5%	1.38±0.14	1.39±0.13	1.38±0.15	1.38±0.112	1.40±0.12
Viable cell counts (CFU/mL)	agricultural products	0%	6.8×10^9	8.8×10^9	2.4×10^{10}	6.9×10^{10}	8.5×10^{10}
		0.1%	6.8×10^9	7.4×10^9	7.5×10^9	7.3×10^9	7.1×10^9
		0.2%	6.8×10^9	7.2×10^9	7.3×10^9	7.1×10^9	7.0×10^9
		0.3%	6.7×10^9	7.1×10^9	7.1×10^9	7.0×10^9	6.9×10^9
		0.4%	6.8×10^9	7.0×10^9	7.1×10^9	7.1×10^9	6.9×10^9
		0.5%	6.7×10^9	6.8×10^9	6.8×10^9	6.6×10^9	6.6×10^9

표 13. 국내산 농산물 소재와 항비만 유산균을 함유한 발효유의 저장기간에 따른 pH, 적정산도 및 유산균수의 변화

Ingredients	Ratio	Sensory evaluation				
		Color	Flavor	Taste	Texture	Overall acceptability
agricultural products	0%	7.8±0.37	7.4±0.42	7.2±0.40	7.3±0.39	7.2±0.37
	0.1%	7.7±0.43	7.6±0.48	8.0±0.33	7.3±0.38	8.2±0.32
	0.2%	7.6±0.48	7.6±0.44	7.4±0.37	7.2±0.40	7.5±0.37
	0.3%	7.6±0.38	7.7±0.42	6.7±0.39	7.3±0.39	6.6±0.42
	0.4%	7.7±0.47	7.7±0.48	6.2±0.41	7.2±0.48	6.1±0.43
	0.5%	7.8±0.43	7.6±0.39	5.5±0.44	7.1±0.38	5.3±0.29

All values are mean ± SD (n=10).

표 14. 국내산 농산물 소재와 항비만 유산균을 함유한 발효유의 관능평가

파) 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 유산균을 함유한 복합 분말제 연구

(1) 복합 분말제 개발을 위한 유효성분의 *in vitro* 항비만 효능

- 자사의 항비만 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 생산용 분말의 대량 생산 공정을 개발한 본 연구진은 제품 생산에 앞서 복합 분말제에 첨가될 물질이 유해성이 적으면서 비만 예방 및 치료에 긍정적인 역할을 할 수 있는 식품 첨가물을 확인하기 위한 작업을 진행함.
- 이전의 실험을 통해 유산균 발효 시 유효물질을 넣는 것이 아닌 유산균 발효가 끝나고 분말화된 이 후에 유효물질들을 넣어야 하는 것을 확인하였고 그 이후 어떠한 유효물질이 분말에 들어갔을 때 항비만 효과를 알아보는 실험을 진행함.
- 기존 1, 2차 년도 실험을 바탕으로 물질(Compound 1, 2, 3, Xylitol, Erythritol, Myo-Inositol, Benzenedicarboxylic acid, Octadecanoic acid, Indole-3-carbino, Decanedioic acid, Butanedioic acid, Octadecanoic acid, Cyclopropanetetradecanoic acid, Turanose, Phthalic acid, Linoleic acid, Glycerol, Hexadecanoic acid, Squalene1H-indole-1-acetic acid)을 선정하여 그 물질들 중에서 복합분말제의 식품첨가물로 안정성이 있으며 지방산 제거 항비만 유산균의 항비만 효과를 극대화 할 수 있는 물질을 확인하기 위한 실험을 진행함.
- 지방산제거 항비만 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 생산용 분말의 대량 생산 공정을 개발한 본 연구진은 제품 생산에 앞서 복합 분말제에 첨가될 물질이 유해성이 적으면서 비만 예방 및 치료에 긍정적인 역할을 할 수 있는 식품 첨가물을 확인하기 위한 작업을 진행함.

(2) 복합 분말제 첨가성분의 lipase inhibition 효과

- 지방산 제거 항비만 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 생산에 앞서 복합 분말제에 첨가될 물질이 기존에 비만 억제제로 사용되고 있는 Orlistat에 비해 lipase inhibition에 어떠한 영향을 주는지를 확인하기 위한 실험 진행.
- 표 11에 해당 하는 물질들을 *in-vitro* 실험을 통해 Orlistat과 비교분석 하는 실험을 진행하여 복합 분말제의 첨가물로서 (주)지니스에서 연구해서 얻은 지방산 제거 항비만 유산균의 비만 예방 및 치료 효과를 증폭시키는 역할을 할 것으로 예상하고 이를 위해 실험을 진행함.
- 표 11에 해당하는 물질들의 Pancreatic lipase inactivation 측정을 수행하기 위해 본 연구진은 시료(#1~#20)를 DMSO solution에 0.05mg/mL로 처리 한 뒤 spectrophotometer를 활용하여 정량분석 하였음.
- 1mM EDTA이 들어있는 10mM MOPS(morpholinepropanesulphonic acid)의 pH를 6.8로 맞춘 용액에 2.5mg/ml이 되도록 pancreatic lipase를 녹임. 그 2.5mg/ml

lipase solution을 169ul Tris buffer(100mM Tris-HCl and 5mM CaCl₂, pH7.0)에 녹인다. 그 이후 blank 20ul와 추출물들 20ul를 처리하여 15분간 37°C incubation을 실시한 후 5ul의 substrate solution(10mM p-NPB : p-nitrophenyl butyrate)를 처리한 후 37°C incubation 처리하였음

- lipase의 activity는 p-nitrophenyl butyrate가 가수분해 되면서 p-nitrophenol이 되어 405nm 흡광도를 plate reader로 측정하여 실험을 진행하였음.
- lipase의 activation은 p-nitrophenyl butyrate 가수분해 되면서 p-nitrophenol이 되어 405nm의 빛을 흡수가 증가된 것을 보고 확인할 수 있는데 그의 반대로 lipase의 활성이 줄어 p-nitrophenol이 되지 않아서 405nm의 빛을 흡수하는 양이 적어지면 이를 통해 lipase inhibition을 확인할 수 있음.
- 유효물질(#1~#20)의 수가 많기 때문에 군을 나누어서 실험을 진행하도록 함.
- 실제 실험에서 총 3가지의 군(1군 : #1~#6 , 2군 : #7~#14, 3군 : #15~#20)으로 나누어서 실험을 진행함. 각 군의 sample을 넣을 때는 Orlistat과 동일한 농도 (0.05mg/ml)을 넣어 진행하였음.

① 유효물질(#1~#20)의 Lipase assay 흡광도 분석

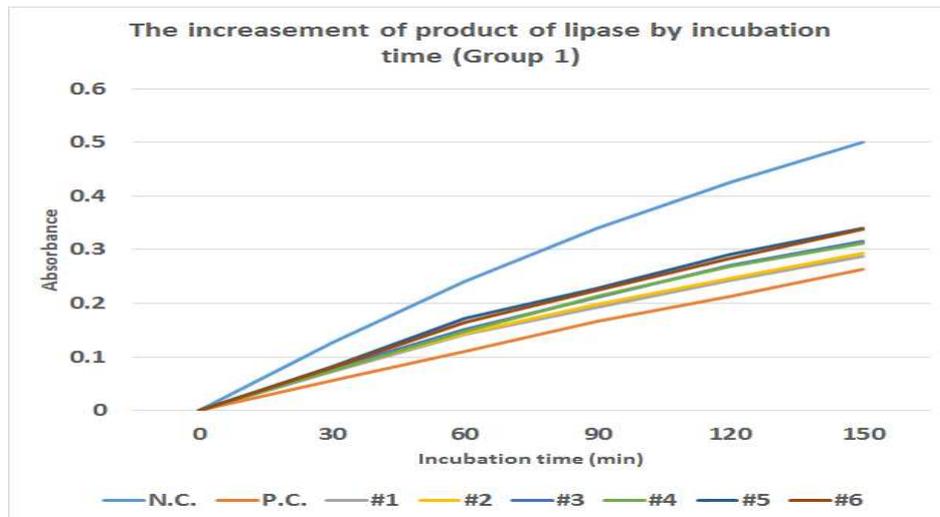


그림 117. 시간(0~150min)에 따른 #1~#6 물질의 lipase inhibition

- 1 군의 실험을 진행한 결과 Orlistat의 lipase inhibition 효과가 가장 큰 것으로 나타났고 그 이후 #1,#2,#4,#3,#6,#5로 흡광도가 낮게 나타났다. 이를 토대로 Orlistat을 제외한 #1,#2의 lipase inhibition 효과가 좋은 것으로 확인되었음.

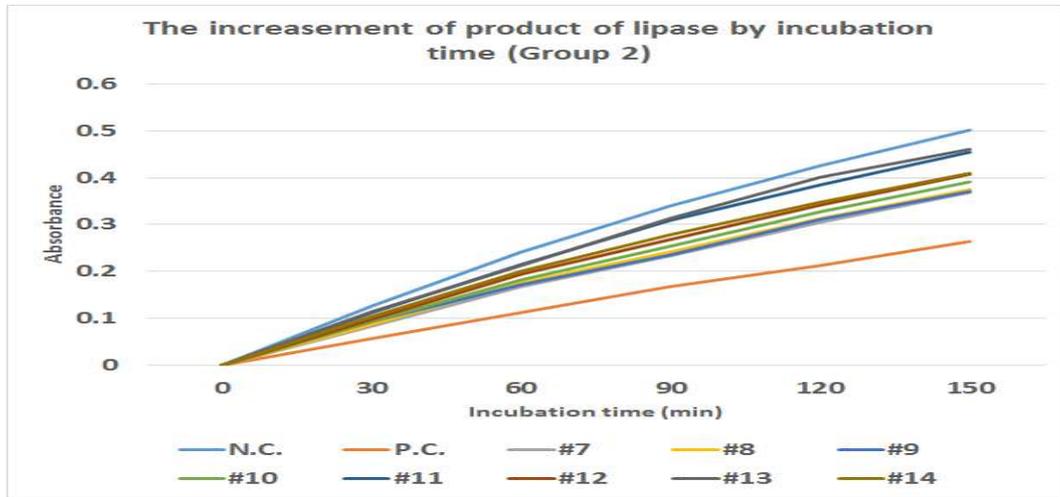


그림 118. 시간(0~150min)에 따른 #7~#14 물질의 lipase inhibition

- 2 군의 실험을 진행한 결과 또한 Orlistat의 lipase inhibition 효과가 가장 큰 것으로 나타났고 2번째 군에서는 Orlistat을 제외하고 #7 #8 #9의 sample의 lipase inhibition이 높은 것으로 확인이 되었음. 그렇지만 정성적으로 살펴보면 1군이 2 군에 비해 lipase inhibition 효과가 큰 것으로 나타남.

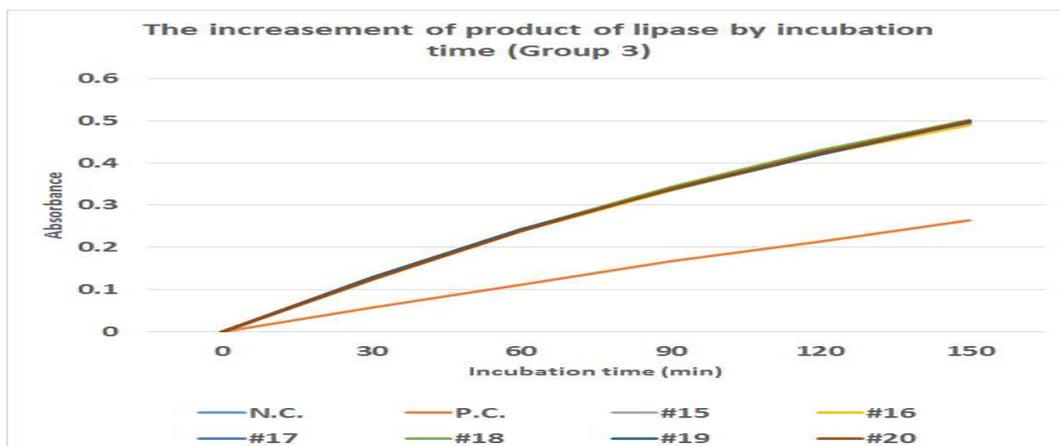


그림 119. 시간(0~150min)에 따른 #15~#20 물질의 lipase inhibition

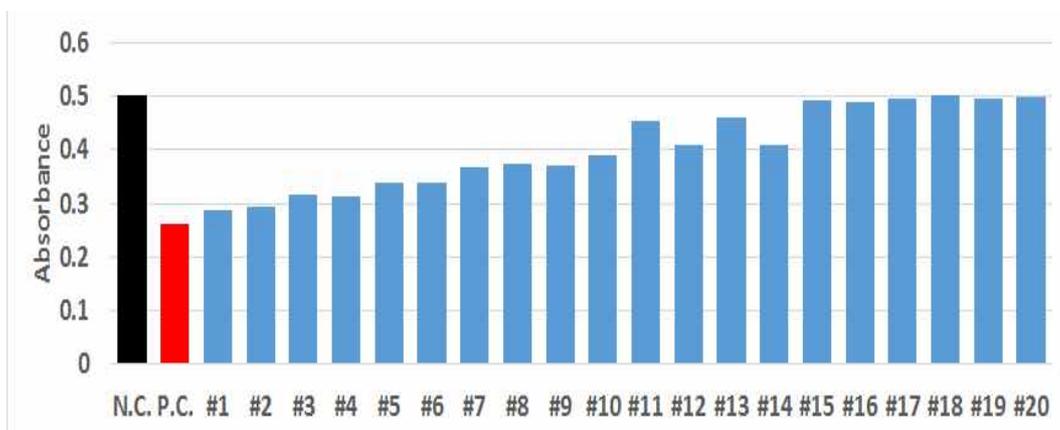


그림 120. 물질들의 lipase inhibition

② 유효물질(#1~#20)의 Lipase assay 흡광도 차이

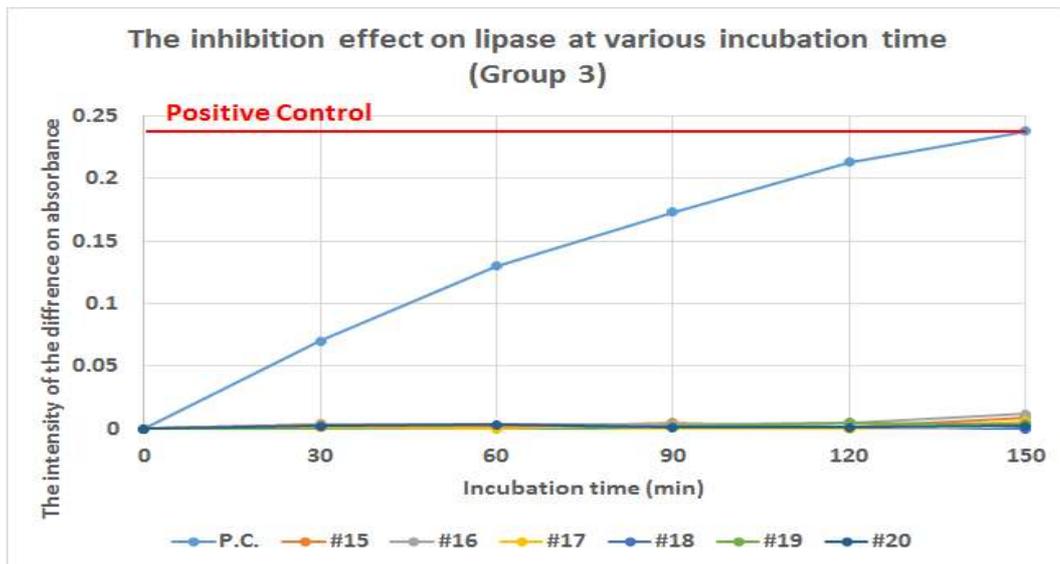
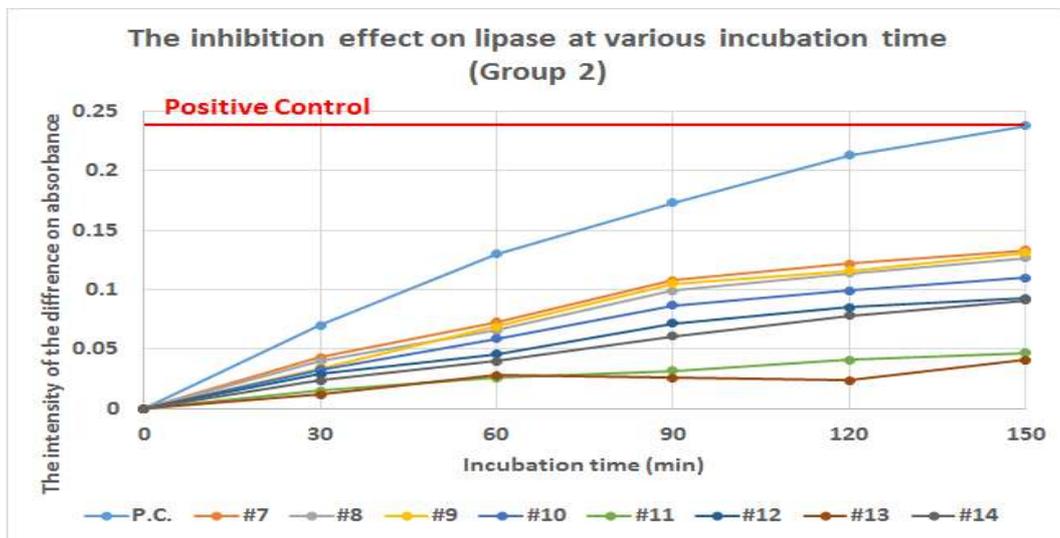
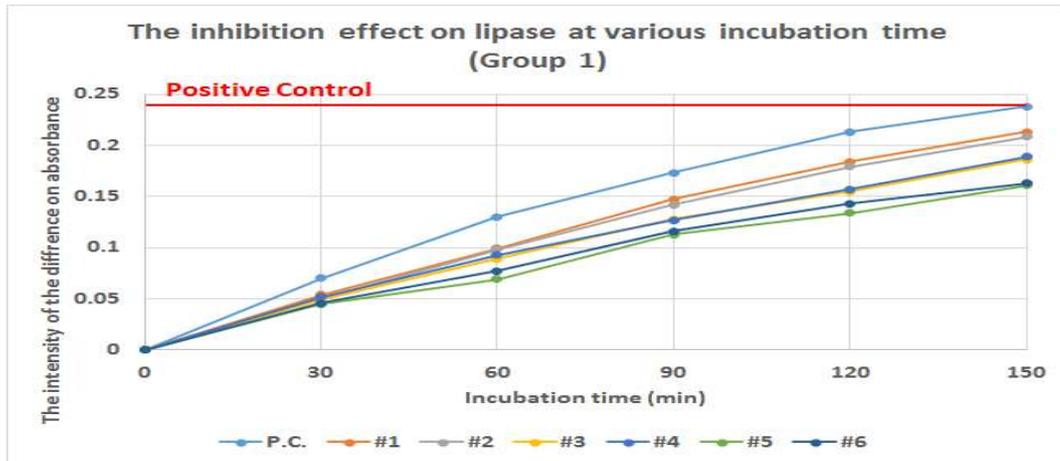
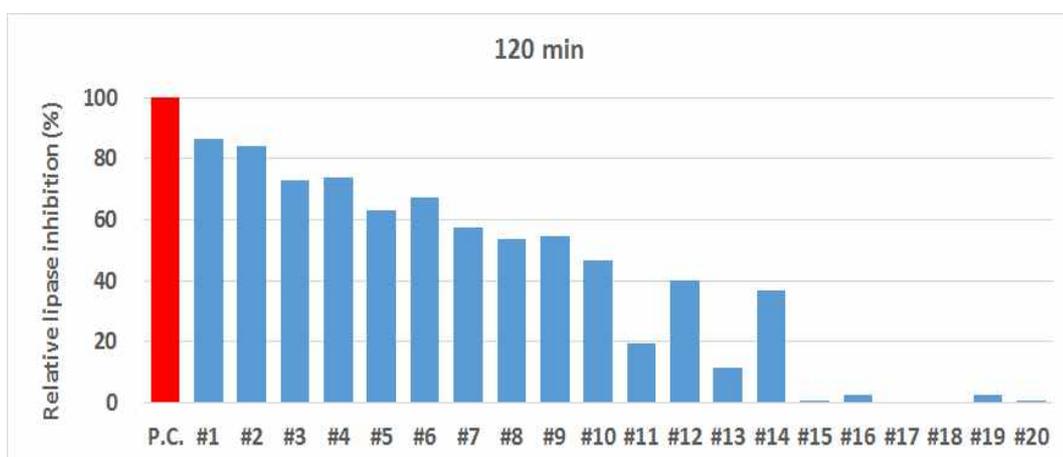
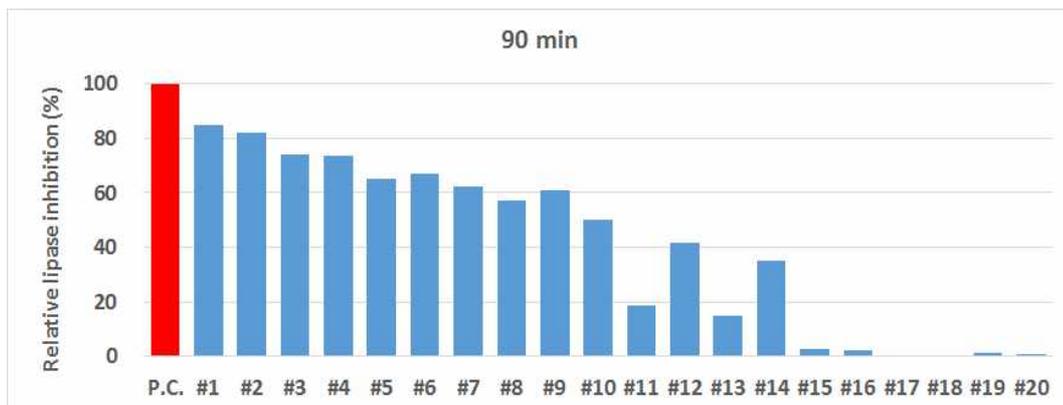
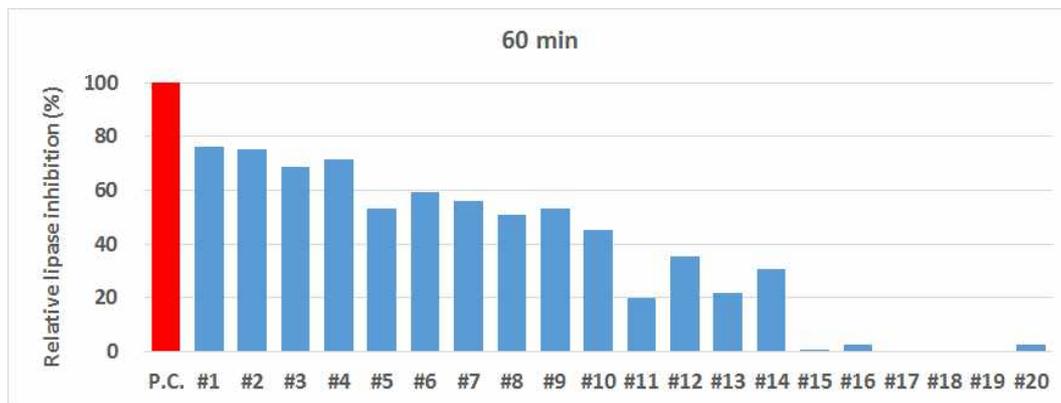
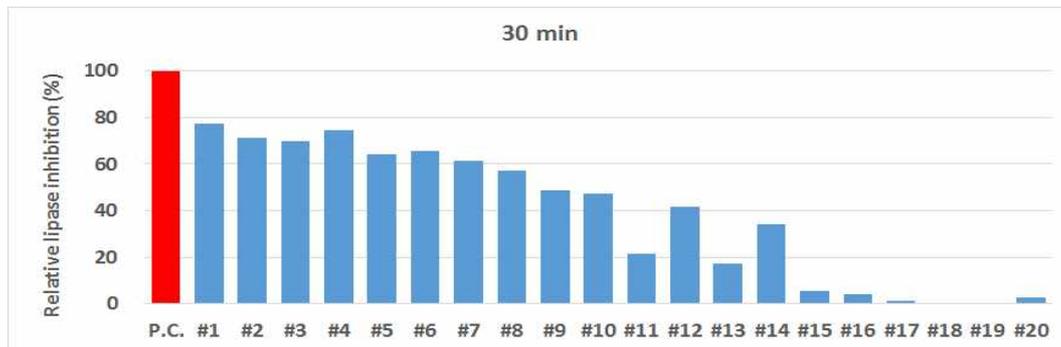


그림 121. 물질들의 lipase inhibition

③ 유효물질(#1~#20)의 lipase inhibition %



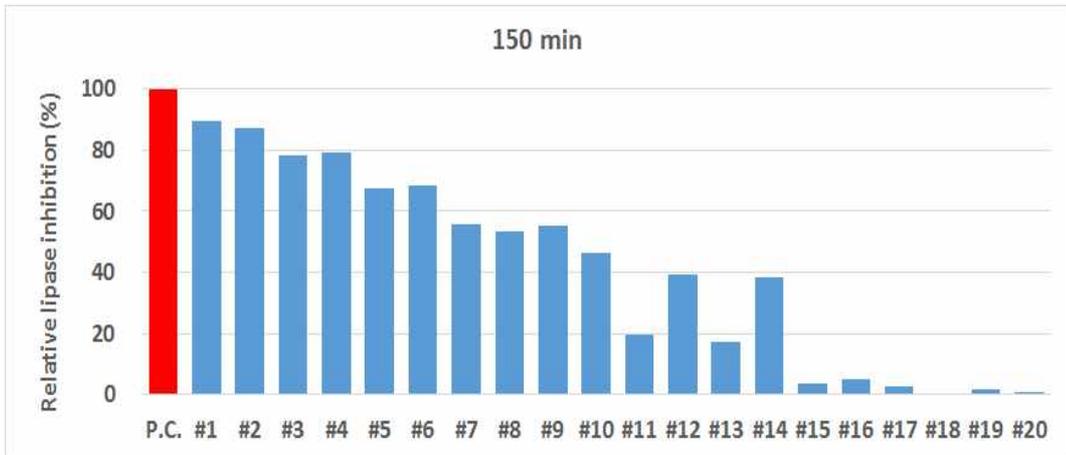


그림 123. 각 시간별 relative lipase inhibition(%)

- 30~150min의 유효물질 (#1~#20)들의 lipase 억제 효과를 확인하는 실험을 통해 #1~#4에서 다른 #5~#20에서보다 좋은 효과가 있는 것을 확인함.
 - 이러한 결과를 바탕으로 lipase inhibition 효과가 실제 in-vivo 동물실험에 나타나 는지를 확인하는 실험을 진행하려함.
- (3) 복합 분말제 첨가성분의 in vivo 항비만 효능

- 식이군의 설정은 일반 사료에 5%의 JBD301 유산균을 넣은 후 (Control, #1~#20) 0.5% 첨가성분(#1~#20)을 군 별로 각각 넣은 사료를 만든 후 8주령의 암컷 in bred mouse C57BL/6에 상기의 사료 21군을 식이하여 총 9주간 체중, 외형적 변화, 섭취한 사료의 양 및 항비만 효능 확인에 관련한 실험을 수행하였음

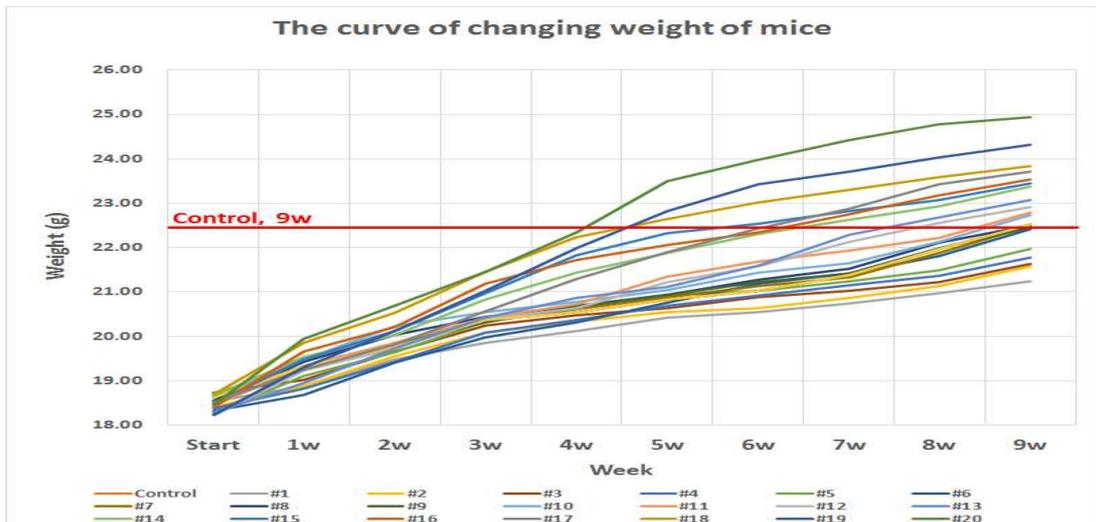


그림 124 실험군(#1~#20)과 Control의 9주간의 body weight 변화 그래프

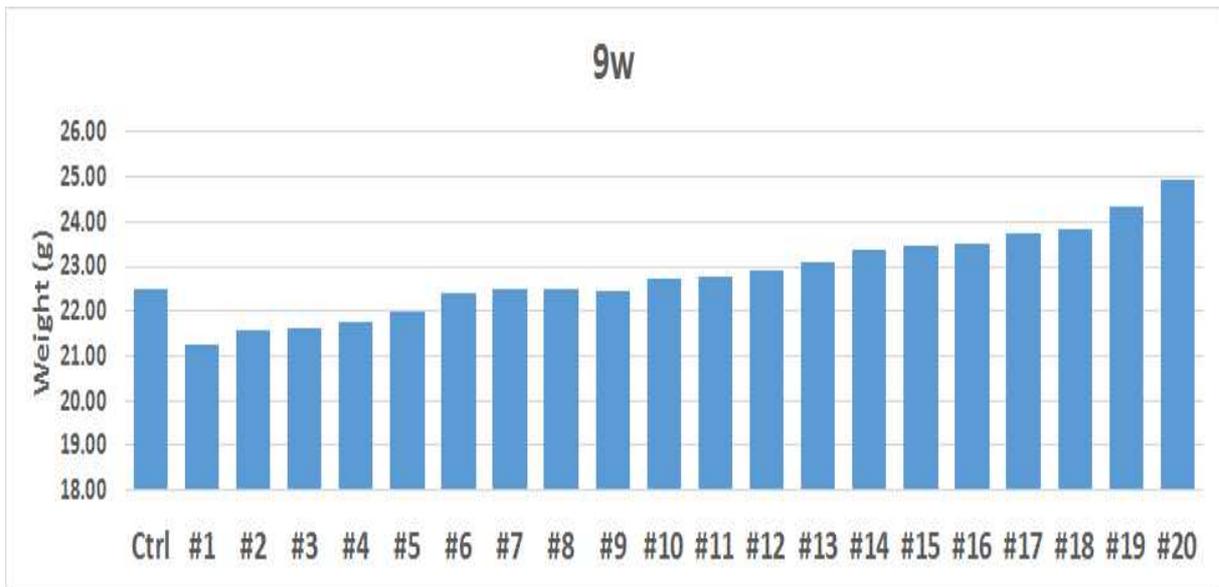


그림 125. 9주차 body weight (g)

	0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	9w
Ctrl	18.62	19.33	19.76	20.36	20.54	20.83	21.03	21.38	21.97	22.52
#1	18.54	18.87	19.48	19.85	20.12	20.42	20.55	20.74	20.98	21.24
#2	18.42	18.88	19.55	20.08	20.34	20.54	20.63	20.87	21.14	21.57
#3	18.73	19.01	19.66	20.24	20.47	20.63	20.88	21.03	21.22	21.63
#4	18.37	18.82	19.42	20.08	20.37	20.68	20.92	21.15	21.37	21.78
#5	18.27	19.11	19.64	20.34	20.62	20.94	21.02	21.24	21.49	21.97
#6	18.32	18.68	19.4	19.97	20.32	20.76	21.18	21.42	21.8	22.42
Ctrl	18.62	19.33	19.76	20.36	20.54	20.83	21.03	21.38	21.97	22.52
#7	18.46	19.28	19.82	20.38	20.62	20.88	21.13	21.32	21.88	22.48
#8	18.55	19.42	20.03	20.44	20.68	20.94	21.27	21.53	22.11	22.5
#9	18.72	19.32	19.83	20.32	20.67	20.93	21.22	21.42	21.99	22.45
#10	18.63	19.48	20.22	20.54	20.77	21.04	21.44	21.64	22.13	22.73
#11	18.45	19.34	19.85	20.42	20.72	21.35	21.68	21.93	22.21	22.78
#12	18.21	19.23	19.73	20.38	20.64	21.23	21.58	22.13	22.55	22.92
#13	18.28	18.95	19.73	20.42	20.87	21.12	21.59	22.29	22.68	23.08
#14	18.66	19.53	20.03	20.83	21.43	21.88	22.3	22.62	22.93	23.38
Ctrl	18.62	19.33	19.76	20.36	20.54	20.83	21.03	21.38	21.97	22.52
#15	18.51	19.48	20.12	20.98	21.83	22.32	22.54	22.82	23.08	23.45
#16	18.42	19.65	20.2	21.18	21.72	22.05	22.34	22.76	23.18	23.53
#17	18.52	19.24	19.82	20.56	21.3	21.89	22.43	22.87	23.42	23.72
#18	18.69	19.85	20.53	21.46	22.23	22.64	23.01	23.3	23.58	23.83
#19	18.24	19.3	20.12	21.03	21.98	22.83	23.43	23.72	24.03	24.32
#20	18.47	19.94	20.68	21.45	22.34	23.5	23.98	24.42	24.78	24.93

표 15. (#1~#20) 실험군 쥐들의 몸무게 측정표

%	0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	9w
Ctrl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
#1	99.58	97.64	98.57	97.50	97.96	98.01	97.72	97.01	95.51	94.32
#2	98.94	97.69	98.93	98.62	99.03	98.59	98.10	97.61	96.24	95.79
#3	100.60	98.36	99.48	99.41	99.66	99.02	99.29	98.36	96.60	96.06
#4	98.67	97.38	98.27	98.62	99.17	99.26	99.48	98.92	97.29	96.72
#5	98.13	98.88	99.38	99.90	100.39	100.51	99.95	99.35	97.83	97.57
#6	98.40	96.66	98.17	98.08	98.93	99.64	100.71	100.19	99.24	99.56
Ctrl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
#7	99.15	99.76	100.29	100.10	100.39	100.22	100.48	99.72	99.61	99.83
#8	99.63	100.49	101.36	100.39	100.68	100.51	101.14	100.70	100.66	99.92
#9	100.55	99.97	100.34	99.80	100.63	100.46	100.90	100.19	100.11	99.70
#10	100.06	100.80	102.32	100.88	101.12	100.99	101.95	101.22	100.75	100.94
#11	99.10	100.07	100.45	100.29	100.88	102.48	103.09	102.57	101.11	101.16
#12	97.81	99.50	99.84	100.10	100.49	101.90	102.62	103.51	102.66	101.79
#13	98.18	98.05	99.84	100.29	101.61	101.37	102.66	104.26	103.25	102.50
#14	100.23	101.06	101.36	102.31	104.33	105.02	106.04	105.80	104.39	103.83
Ctrl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
#15	99.42	100.80	101.81	103.05	106.28	107.13	107.18	106.74	105.07	104.14
#16	98.94	101.68	102.22	104.03	105.74	105.84	106.23	106.45	105.53	104.49
#17	99.47	99.56	100.29	100.98	103.70	105.07	106.66	106.97	106.62	105.34
#18	100.39	102.71	103.89	105.40	108.23	108.67	109.42	108.98	107.35	105.83
#19	97.97	99.87	101.81	103.29	107.01	109.58	111.41	110.94	109.40	108.00
#20	99.21	103.18	104.65	105.35	108.76	112.80	114.03	114.22	112.81	110.71

표 16. Control(일반 사료)기준 normalize weight % 몸무게 측정표

(4) 복합 분말제 첨가성분에 의한 항비만 유산균 FFA uptake 효능 영향

- 앞서 개발된 국내산 농산물 소재가 복합분말제로 첨가됨에 따라서 기존 연구진들이 보유한 지방산 제거 항비만 유산균의 free fatty acid uptake에 어떠한 영향을 주는 지 확인하기 위해 각각의 유효물질 (#1,#2,#3)과 기능성 유산균을 배합한 분말(#1+지방산 제거 항비만 유산균, #2+지방산 제거 항비만 유산균, #3+지방산 제거 항비만 유산균, #1+#2+#3+지방산 제거 항비만 유산균)을 이용, in vitro 실험을 진행하였음.
- 50ml falcon tube에 MRS broth에 Palmitate가 첨가된 배지를 분주하였음.
- #1+지방산 제거 항비만 유산균, #2+지방산 제거 항비만 유산균, #3+지방산 제거 항비만 유산균, #1+#2+#3+지방산 제거 항비만 유산균 각각 4가지의 균들의 동량의 가루를 50mL tube 에 넣어 15 - 18 시간동안 culture한 뒤 우선, cell OD 값(600 nm)을 측정하였고, 배지 내에 남아있는 free fatty acid 양을 측정하기 위해 free fatty acid assay를 이용하여 OD값 (570 nm)을 측정하였음
- Palmitic acid가 첨가된 MRS 배지에서 배양하였으며, 15-18 h 배양 후의 cell density와 free fatty acid 양을 측정하여 plot을 작성하였음
- 유효물질 #1,#2,#3이 지방산 제거 항비만 유산균의 fatty acid uptake에 어떠한 영향을 주는지를 확인하였음.

- 15~18 h 동안 각 군당 3개로 배양한 5가지 군(control, 유산균+#1, 유산균+#2, 유산균+#3, 유산균+#1+#2+#3)을 이용하여 OD 값(600 nm)을 측정하여 나타냄
- 4가지 군(유산균+#1, 유산균+#2, 유산균+#3, 유산균+#1+#2+#3)을 비교 분석해보았을 때 cell OD 값은 차이가 많지 않았고 유효물질(#1,#2,#3)이 유산균 cell에 큰 영향을 주지 않는 것으로 확인됨.
- 이를 기초로 유효물질(#1,#2,#3)이 지방산 제거 항비만 유산균에 성장에 영향을 주지 않는 것을 확인하였으며 이 물질들이 유산균의 free fatty acid의 흡수능에 어떠한 영향을 주는 지를 알아보기 위해서 fatty acid uptake kit를 이용하여 실험을 진행함.
- 5가지 군(control, 유산균+#1, 유산균+#2, 유산균+#3, 유산균+#1+#2+#3)의 fatty acid uptake 실험을 진행한 결과 유산균+#1, 유산균+#2, 유산균+#3, 유산균+#1+#2+#3 군의 배지에 남아있는 fatty acid 양은 크게 차이가 나지 않지만 이 군들 중에서 유산균+#1+#2+#3 군이 다른 군들에 비해서 fatty acid 잔존량이 상대적으로 적은 것으로 나타남(표17, 그림 52). 이를 통해서 유효물질 (#1,#2,#3)이 지방산 제거 항비만 유산균의 fatty acid uptake를 다소 증가시키는 것으로 확인하였음.

	n=1	n=2	n=3
Control(유산균)	0.478	0.485	0.467
(유산균+#1)	0.496	0.457	0.466
(유산균+#2)	0.455	0.448	0.435
(유산균+#3)	0.464	0.453	0.464
(유산균+#1+#2+#3)	0.403	0.41	0.402

표 17. Free fatty acid OD570nm 값.

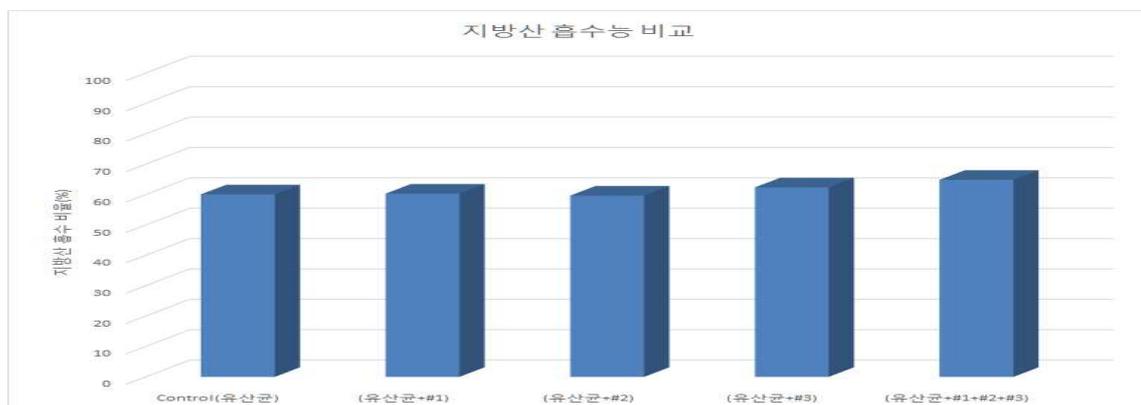


그림 126. 유효물질 복합체에 따른 지방산 흡수능 비교

(6) 복합 분말제 첨가물 제품화 연구

① 마우스 항비만 효능 평가

- 우리 농산물에서 얻은 항비만 효과가 있는 유효성분들을 확인하였고 이러한 물질들을 지방산 제거 항비만 유산균과 함께 첨가한 복합분말제의 효능평가를 수행함

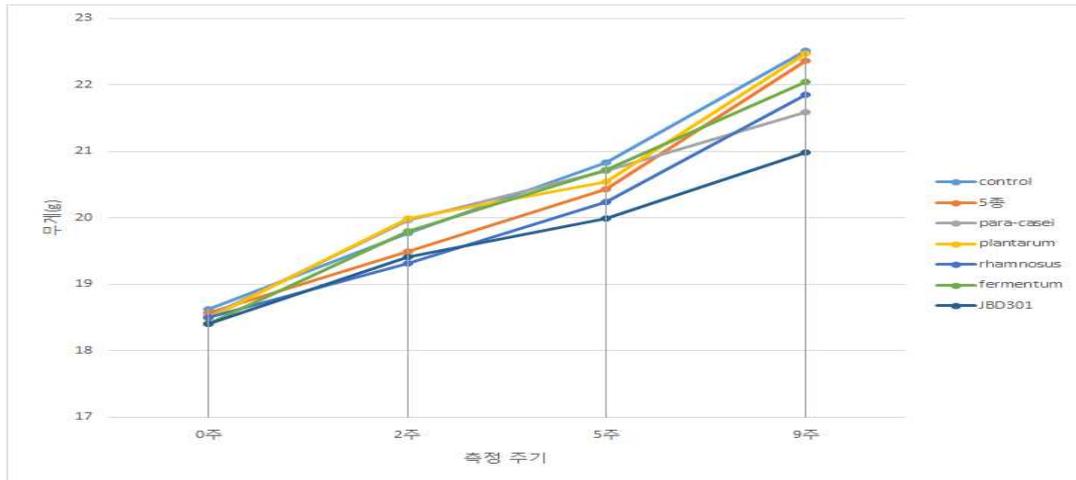


그림 127. 유효물질 복합체에 따른 몸무게 비교

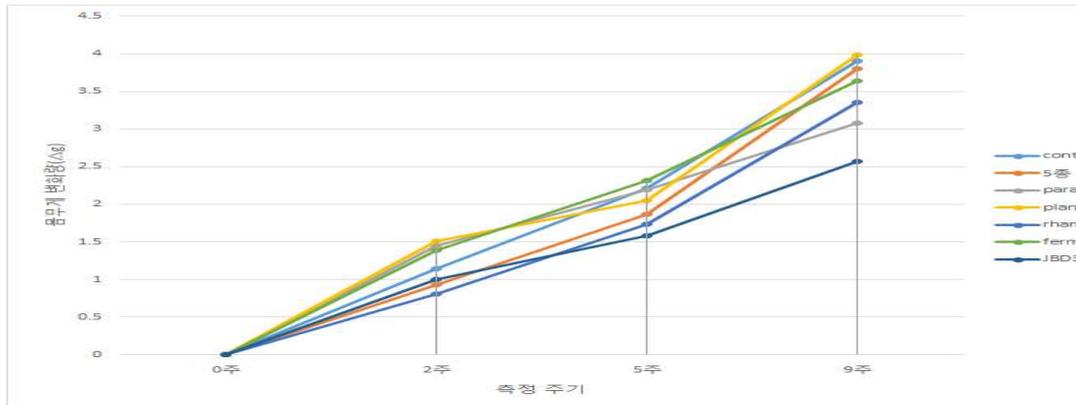


그림 128. 유효물질 복합체에 따른 몸무게 변화량 비교

	0주(g)	2주(g)	5주(g)	9주(g)
Control	18.618	19.762	20.834	22.518
5종*+(#1,#2,#3)	18.566	19.496	20.434	22.364
L.para-casei+(#1,#2,#3)	18.508	19.954	20.7	21.584
L.plantarum+(#1,#2,#3)	18.486	19.994	20.538	22.468
L.rhamnosus+(#1,#2,#3)	18.504	19.314	20.242	21.856
L.fermentum+(#1,#2,#3)	18.402	19.79	20.72	22.042
JBD301+(#1,#2,#3)	18.406	19.41	19.992	20.978

표 18. Control(일반사료)과 물질 #1,#2,#3을 첨가한 L.paracasei, L.plantarum, L.rhamnosus, L.fermentum, JBD301군의 몸무게 측정표

② 안정성 평가

- 매실과 귤 1g 당 2mL의 증류수의 비율로 지표성분을 용출시키기 위해 처리를 진행하고 나머지 분석에 방해되는 이물질들을 제거하기 위해 centrifuge 과정을 거친다. 이 후 paper filter를 이용하여 불순물들을 제거하는 작업을 진행
- 국내산 농산물(매실, 귤)에서 추출한 지표물질을 12개월 동안 정량하여 농도의 변화가 있는지 확인함

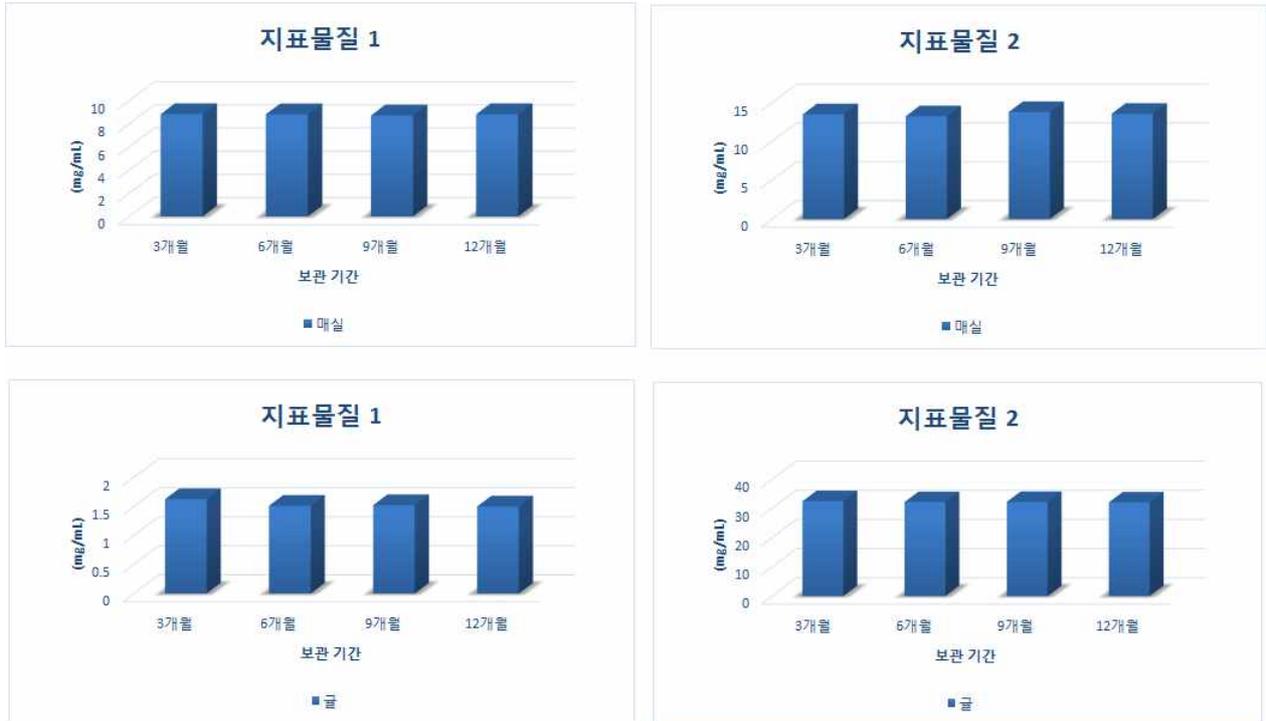


그림 129.매실과 귤에서 추출한 지표물질1(PE), 지표물질2(CA)의 안정성 평가

- HPLC 분석 결과를 토대로 확인한 결과 국내산 농산물(매실, 귤)에서 추출한 지표물질들이 시간에 지남에 따라 물리 화학적으로 변화하지 않고 12개월 동안 안정한 것으로 확인이 되었음

	냉장보관(CFU/g)	냉장보관 생존률(%)	상온보관(CFU/g)	상온보관 생존률(%)
1개월	1.97×10^{11}	100	1.97×10^{11}	100
2개월	1.89×10^{11}	95.94	1.69×10^{11}	85.79
3개월	1.81×10^{11}	91.88	1.17×10^{11}	59.39
4개월	1.8×10^{11}	91.37	1.10×10^{11}	55.83
5개월	1.7×10^{11}	86.29	9.20×10^{10}	46.70
6개월	1.69×10^{11}	85.79	8.30×10^{10}	42.13
7개월	1.43×10^{11}	72.59	7.90×10^{10}	40.10
8개월	1.42×10^{11}	72.08	7.40×10^{10}	37.56
9개월	1.37×10^{11}	69.54	7.70×10^{10}	39.09
10개월	1.34×10^{11}	68.02	7.30×10^{10}	37.06
11개월	1.28×10^{11}	64.97	6.90×10^{10}	35.03
12개월	1.24×10^{11}	62.94	6.80×10^{10}	34.52

표 19. 항비만 유산균의 보관 상태에 따른 CFU/g와 생존률(%)

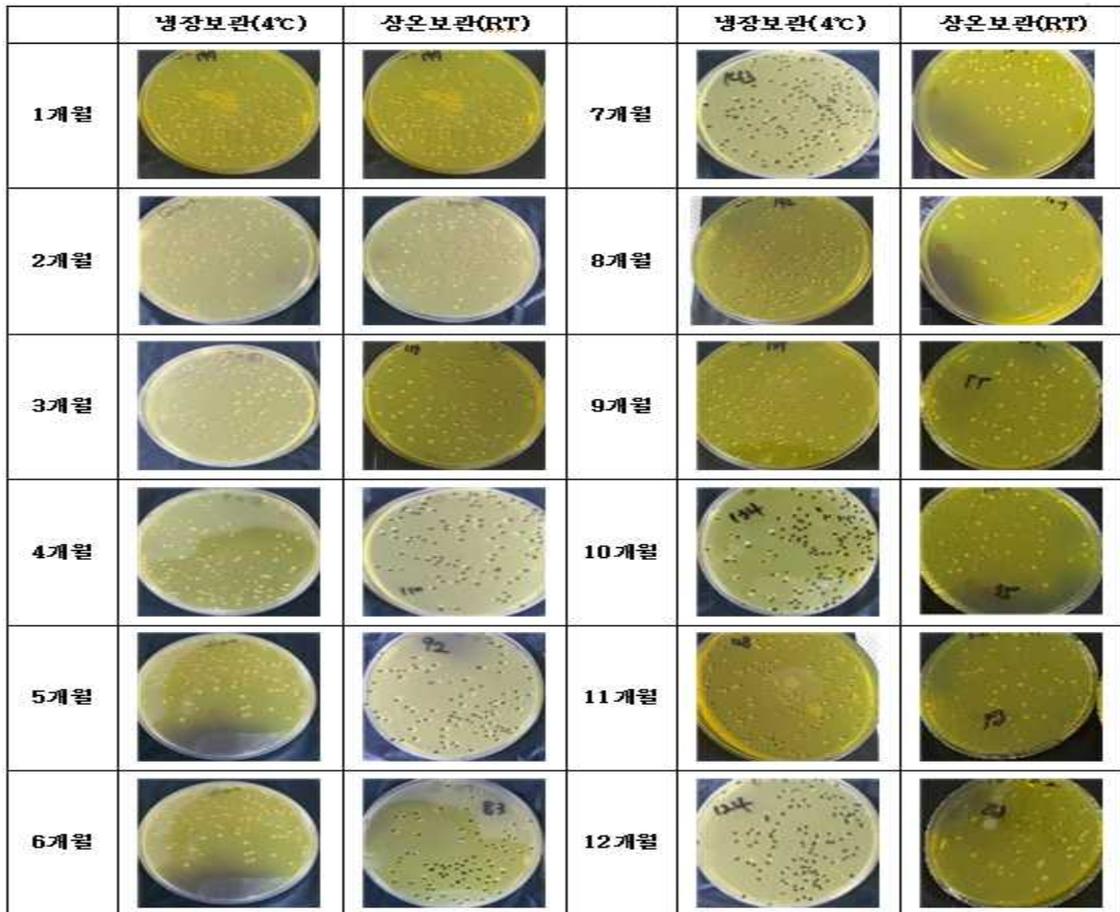


그림 130. 항비만 유산균의 냉장보관 또는 상온보관 후 CFU 측정

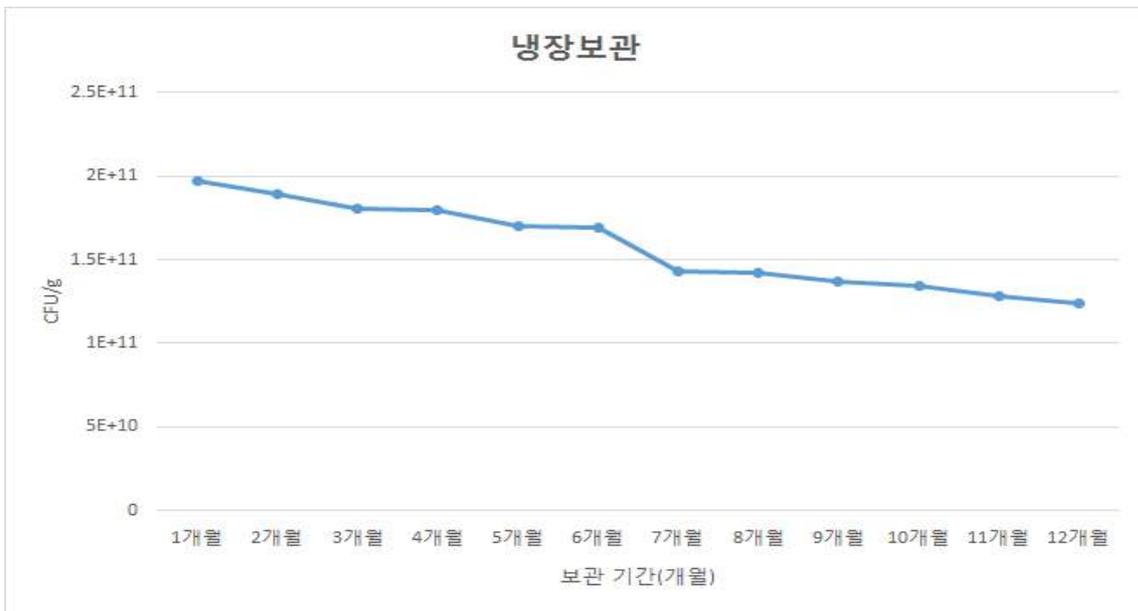


그림 131. 항비만 유산균의 냉장보관시 CFU

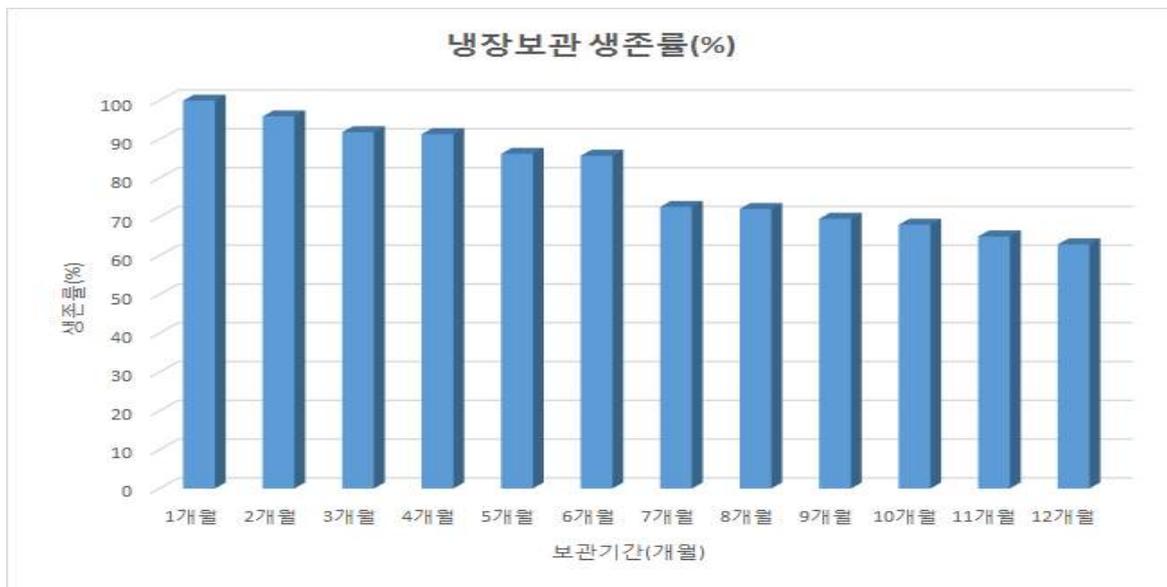


그림 132. 항비만 유산균의 냉장보관시 생존률(%)



그림 133. 항비만 유산균의 상온보관시 CFU



그림 134. 항비만 유산균의 상온보관시 생존률(%)

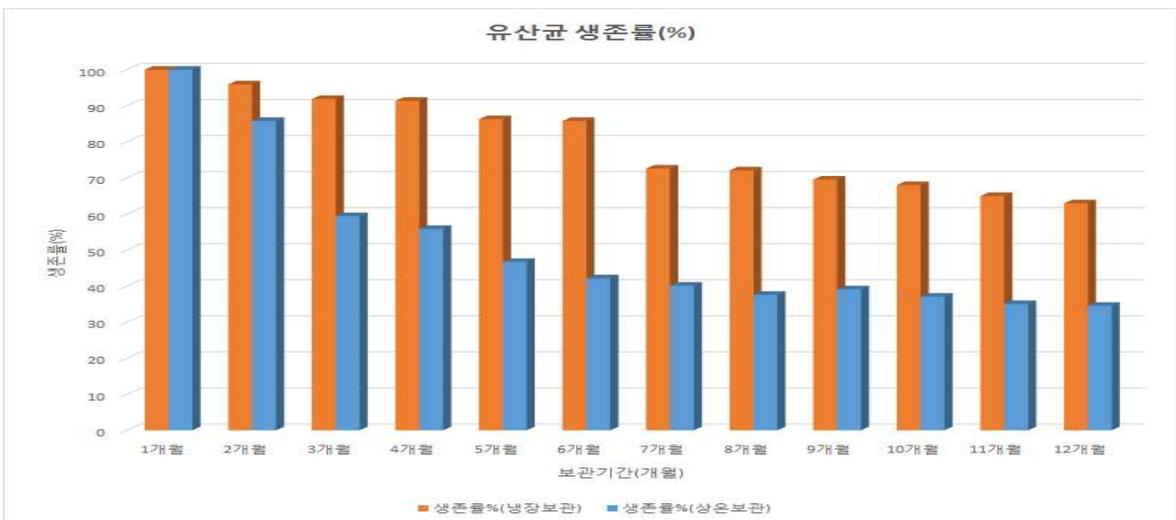


그림 135. 항비만 유산균의 보관 조건별 생존률(%)

하) 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 유산균을 함유한 복합 분말제 제품화

(1) 생산공정

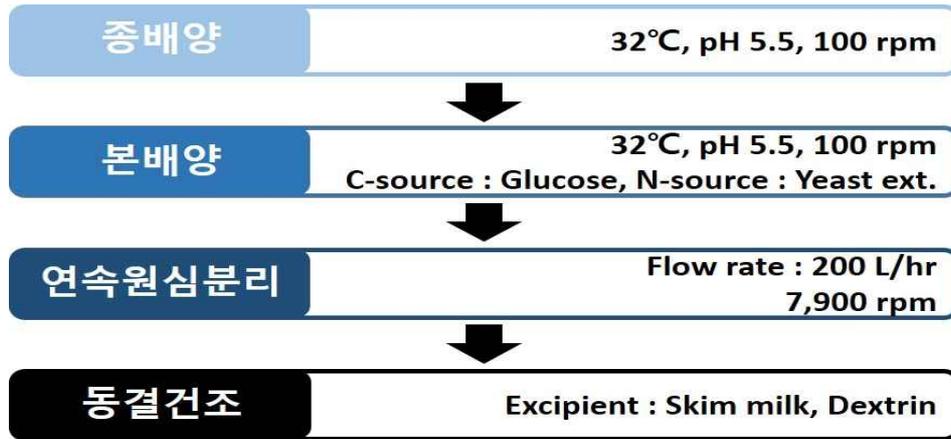


그림 136. 항비만 유산균의 생산공정도



그림 137. 항비만 유산균의 생산공정

(2) 제품화

① 지방제거 유산균 Lactobacillus JBD301 powder 분말



그림 138. JBD 항비만 유산균 동결건조물

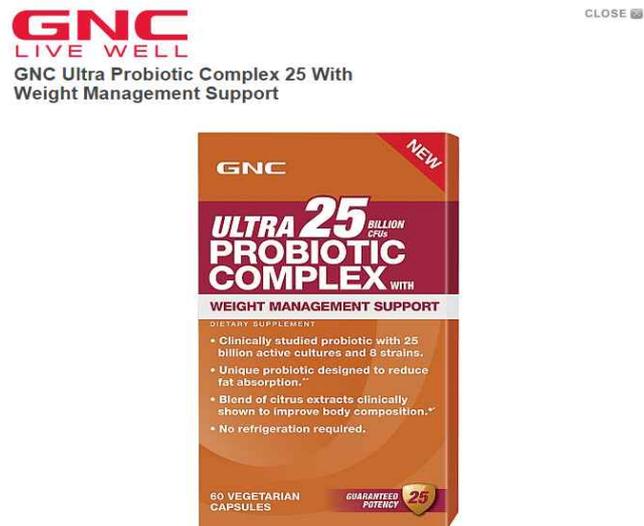


그림 139. JBD301 함유 GNC Weight Management Support

③ 항비만 기능성 꿀 추출물 및 Lactobacillus 복합 유산균 건강기능식품



그림 140. 항비만 기능성 꿀 추출물 및 Lactobacillus 복합 유산균 건강기능식품

④ 최종 JBD301에 대한 건강기능식품 소재의 개별인정 진행

건강기능식품 소재에 관한 자료 요약

1. 물질, 제품에 대한 정보

- 지방흡수 유산균 JBD301은 건강한 인체에서 분리한 유산균들의 지방산 흡수능을 스크리닝하여 발굴된 천연 지방흡수 *Lactobacillus reuteri* 균으로 JBD301을 섭취하면, 장에 정착하여 지방산을 흡수함으로써, 체내로의 지방 흡수를 감소시켜, 식이에너지 섭취량을 감소시키므로 체지방/체중 조절 효과를 가지게 됨

2. 안전성에 관한 정보

- '*Lactobacillus reuteri*' 는 식품의 원료로 사용 가능한 유산균 균주이며(식품공전), 또한 국내건강기능식품 고시형 기능성제품 (51호) 프로바이오틱스에 속하는 균주임(건강기능식품공전)
- '*Lactobacillus reuteri*' 균주는 국내에서 현재 식품 및 건강기능식품 프로바이오틱스 제품의 원료로 사용중임

3. 알려진 기능 정보

- in vitro에서 자유지방산 흡수능(FFA-uptake)이 유의증가하였음
- in vivo 동물시험에서 지방산의 양을 대조군 대비 유의감소하였음
- 또한 지방의 체내 흡수량을 유의감소시키고, 체외 배출은 유의증가시켰으며, 이로 인해 체중을 유의감소시켰음
- 인체적용시험에서는 Placebo 위약군 대비 체중과 BMI가 유의감소하였고, 체지방량이 감소 경향을 보였음

4. 역사적/전통적/지리적 우수성에 관한 정보

- Lactobacillus* Genus는 유산균(Lactic Acid Bacteria)의 일종으로 가장 대표적인 장내 미생물

5. 기타 특이 사항

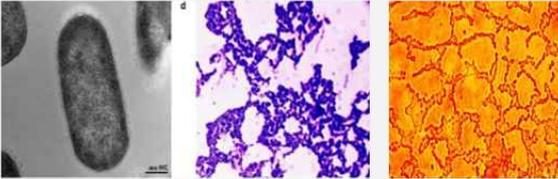
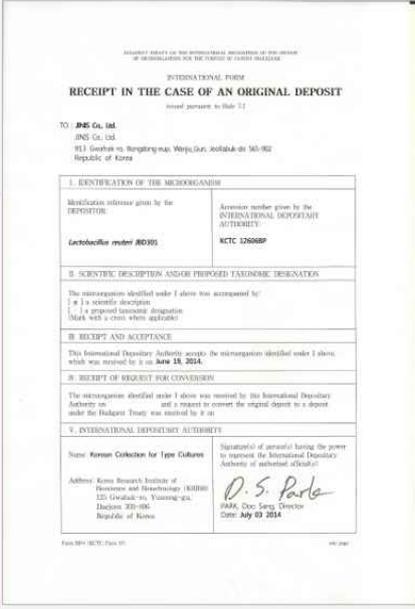
- 지방흡수 유산균 JBD301은 미국 GNC로부터 제품화를 요청받아 3년간의 철저한 기술검증을 거쳐, 2015년 제품화되어 WEIGHT MANAGEMENT SUPPORT (항비만) Health claim이 붙은 제품으로 판매중임

건강기능식품 소재의 기능성 자료 요약

Biomarker	시험관시험	동물시험	인체적용시험
자유지방산 흡수능 (Free fatty acid uptake)	유의증가 (p<0.05)		
장용액내 자유지방산 농도 (Free fatty acid concentration in the gut fluid)		유의감소 (p<0.05)	
장용액내 자유지방산 량 (Free fatty acid amount in the gut fluid)		유의감소 (p<0.05)	
혈중 흡수 지방량 (Free fatty acid absorption from dietary fat)		유의감소 (p<0.05)	
체외 배출 지방량 (Fecal excretion of free fatty acid)		유의증가 (p<0.05)	
체중		유의감소 (p<0.05)	유의감소 (p<0.05)
BMI			유의감소 (p<0.05)
체지방			유의감소경향 (p≤0.05)

건강기능식품 소재의 지표물질 자료

항 목	관련사항	분석방법
제품명	JBD301	JBD301 <u>생균수</u> >1X10 ⁹ CFU/일 섭취량
제품형태	미백색 분말	성상 확인 또는 원료 확인
안정성(QC) 관련 지표	<u>생균수</u>	유산균 <u>생균수</u> (CFU counting) 측정
기능성 관련 지표	JBD301 유산균	KCTC12606 BP(NCBI <u>GenBank</u> KJ957189)에 공지된 16s <u>rRNA</u> gene sequence를 PCR 시험방법
지표물질 선정 안	JBD301 유산균	KCTC12606 BP(NCBI <u>GenBank</u> KJ957189)에 공지된 16s <u>rRNA</u> gene sequence를 PCR 시험방법
프라세보 제조관련사항	일반 유산균	유산균 <u>생균수</u> (CFU counting) 측정

건강기능식품 소재 개별인정 신청

🏠 전자민원
📄 종합상담센터
📞 부정물량식품 소비자신고
📄 건강기능식품 이상사례 신고
👤 이용안내

전자민원

- 전자 민원 신청
- 나의 민원**
- 원재료코드 신청
- 원재료코드 신청 조회
- 관할구역 안내

▶ 홈 / 전자민원 / 나의 민원

나의 민원

건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)

접수번호: 20160047421

접수증출력
자진취하

민원신청 진행현황

신청


접수


담당자배정


검토

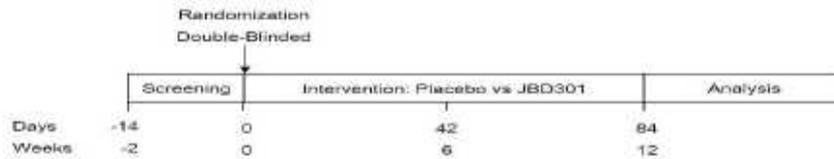

처리완료


번호	처리내용	처리일시	부서	담당	연락처
1	신청	2016.02.24	식품의약품안전평가원 영양기능연구팀		
2	접수	2016.03.07	식품의약품안전평가원 영양기능연구팀	라옥조	
3	담당자배정	2016.03.07	식품의약품안전평가원 영양기능연구팀	오재명	

⑤ 최종 JBD301 항비만 유산균의 임상시험

© Clinical Trial 개요

<Study protocol for randomized controlled trial of JBD301 on obesity>



Title	A phase 2, double-blind, placebo-controlled, human study to determine the safety and efficacy of <i>JBD301</i> for the reduction of body fat and/or weight in obese adults
Sponsor	JINIS Biopharmaceuticals Co. 948-9 Dunsan, Bongdong, Wanju, 565-902, South Korea
Investigation Site	Clinical Trial Center, Samsung Medical Center 50, Irwon-dong, Gangnam-gu, Seoul, 135-710, South Korea
Time frame	Total 12 months after approval for 12 weeks intervention,
Condition	Obesity/excessive body fat
Objective	The purpose of this study is to evaluate the safety and tolerability of JBD301 and to evaluate the preliminary efficacy of JBD301 compared to placebo for reduction of body fat or weight in obese adults
Design	Allocation: Randomized Control: Placebo Control Endpoint Classification: Safety/Efficacy Study Intervention Model: Parallel Assignment Masking: Double-Blind (Subject, Investigator), Primary Purpose: Treatment
Investigational product	<i>Lactobacillus JBD301</i>
Placebo Control	450 mg of Vegetable cream
Investigational Dose	1 capsule (450 mg) per day
Control Dose	1 capsule (450 mg) per day
Treatment plan	
Subject number	Placebo Control: 44, Intervention: 44
Inclusion Criteria	To be eligible for enrollment into this study, subjects must meet all of the following criteria: 1) Written informed consent 2) Men and women between 25-65 years of age 3) Body mass index between 25 ~ 35kg/m ²
Safety measures	1) Abnormal reaction 2) Vital signs (blood pressure, Pulse) 3) Laboratory tests (complete blood and urine tests)

METHODS

Definitions of study endpoints

The primary endpoint for this study was the reduction in total abdominal fat at 12 weeks post treatment.

Statistical Methods

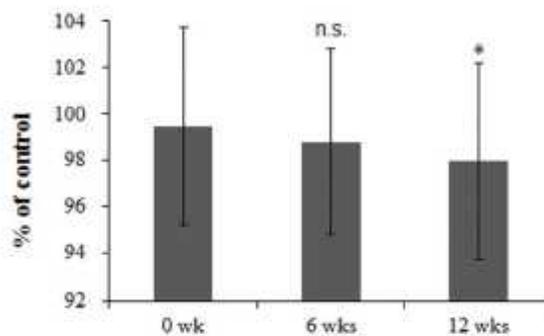
The Mann-Whitney U test was used to compare outcome variables for each assessment time (0 and 12 weeks) and percentage changes in outcome variables in the two treatment groups (JBD301 vs. Placebo). %change in outcome variable was calculated by following formula:

$$\% \text{change at 12 weeks}(\%) = \left(\frac{\text{value at 12 weeks} - \text{value at 0 week}}{\text{value at 0 weeks}} \right) \times 100.$$

For all comparisons, a significant level of 0.05 (not adjusted for multiple comparisons) was used. Unless otherwise stated, a range reported with a mean refers to the standard error of the mean (\pm SEM). All analyses were conducted using procedures in SAS (Version 9.2) and MedCalc (Version 11.6.0).

© Clinical Trial Result

< Comparison of % control in body weight between 0 and 12th week >



	0 week	12 week	(Unit: %) P value
% control in body weight	99.45 ± 4.26	97.94 ± 4.21	0.028*

NOTE. * P values were derived from the Wilcoxon signed rank test and considered significant if $p < 0.05$. Values are mean \pm SEM.

© Clinical Trial Conclusion

Study participants' baseline characteristics

There was no statistically significant difference in study participants' baseline characteristics.

%Change in weight at 12 weeks

It was found that there was statistically significant difference in the percentage change in weight from 0-week assessment to 12-week assessment between JBD301 and placebo group (Mann-Whitney U test p value=0.026).

%Change in BMI at 12 weeks

It was found that there was statistically significant difference in the percentage change in BMI from 0-week assessment to 12-week assessment between JBD301 and placebo group (Mann-Whitney U test p value=0.036).

Side effects

No side effects were observed in JBD301 treatment group.

	Restriction	Daily	Between Group Difference	Side effect
JINIS	none	1 time	1.24 kg (weight) 0.41 (BMI) 1,411 g (body fat) 0.16% (HbA1c)	None (0 case)
Xenical (ref.)	<1200kcal, exercise	3 times	0.76 kg (weight)	Severe, Multiple (fatty stool, ache, GI discomfort, etc)

그림 141. JBD 301 항비만 유산균과 Xenical(ref) 비교표

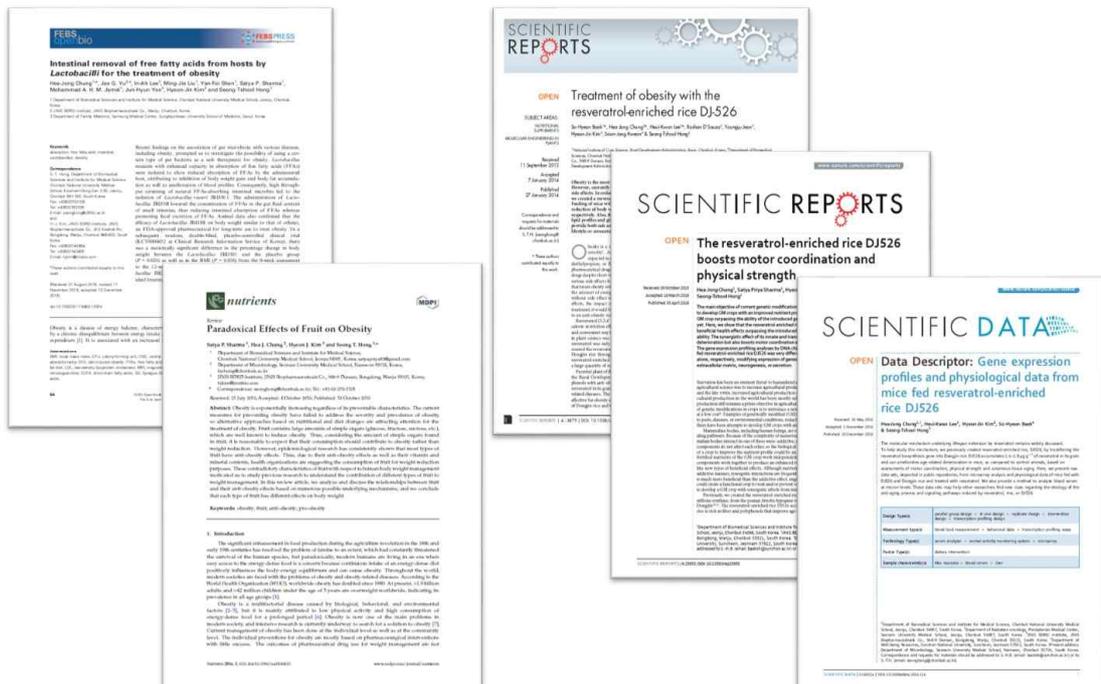
JBD 301 항비만 유산균의 임상자료 통계처리 결과 항비만제 Xenical(Orlistat) 보다 좋은 효능을 확인하였고 또한 부작용이 없는 것을 확인하였음.

⑥ 항비만 유산균과 농산물 소재를 이용한 복합분말제 마케팅 전략 수립

마케팅 전략 1: 지식재산권(특허) 확보를 통한 차별성 확보



마케팅 전략 2: 국제 SCI 논문 발표를 통한 기술 우수성 입증



마케팅 전략 3: 지방산제거유산균 JBD301의 Review citation으로 기술 차별화

FEBS Open Bio 2016, Jan 6(1): 64-76. PMID: PMC4794792
 Published online 2016 Jan 16; doi: 10.1002/2211-5463.12024

Intestinal removal of free fatty acids from hosts by *Lactobacilli* for the treatment of obesity

Chae-Jong Lim¹, J. Jae H. Yoo¹, Y. In-Chul Lee¹, Ming-Jie Liu¹, Yan-Fai Shen¹, Satiya P. Sharma¹, Mohammad A. H. M. Jamal¹, Jun-Hyun Yoo², Hyeon-Jin Kim^{1,2} and Seong-Tshool Hong^{1,3}

Abstract

Recent findings on the association of gut microbiota with various diseases, including obesity, prompted us to investigate the possibility of using a certain type of gut bacteria as a safe therapeutic for obesity. *Lactobacillus* mutants with enhanced capacity in absorption of free fatty acids (FFAs) were isolated to show reduced absorption of FFAs by the administered host, attributing to inhibition of body weight gain and body fat accumulation as well as amelioration of blood profiles. Consequently, high throughput screening of natural FFAs-absorbing intestinal microbes led to the isolation of *Lactobacillus reuteri* JBD301. The administration of *Lactobacillus* JBD301 lowered the concentration of FFAs in the gut fluid content of small intestine, thus reducing intestinal absorption of FFAs whereas promoting fecal excretion of FFAs. Animal data also confirmed that the efficacy of *Lactobacillus* JBD301 on body weight similar to that of orlistat, an FDA-approved pharmaceutical for long-term use to treat obesity. In a subsequent random, double-blind, placebo-controlled clinical trial (KCT0000452 at Clinical Research Information Service of Korea), there was a statistically significant difference in the percentage change in body weight between the *Lactobacillus* JBD301 and the placebo group ($P = 0.026$) as well as in the BMI ($P = 0.036$) from the 0-week assessment to the 12-week assessment. Our results show that FFA-absorbing *Lactobacillus* JBD301 effectively reduces dietary fat absorption, providing an ideal treatment for obesity with inherent safety.

frontiers in Genetics

REVIEW published: 10 January 2017
 doi: 10.3389/fgen.2017.00074

Advances in Gut Microbiome Research, Opening New Strategies to Cope with a Western Lifestyle

PROBIOTICS

<i>L. curvatus</i> HY7601 and <i>L. plantarum</i> KY1032	These strains prevent weight gain, and lower plasma glucose, insulin, triglycerides, oxidative stress levels, liver mass, and liver cholesterol (Park et al., 2013a,b).
<i>A. muciniphila</i>	This strain reduces plasmatic LPS, adiposity, insulin resistance, body weight, and hyperglycemia. It increases adipocyte differentiation and lipid oxidation, and prevents the thinning of the mucus layer (Everard et al., 2013).
<i>B. uniformis</i> CECT 7771	This strain reduces total body weight gain, intestinal lipid absorption, liver fat, levels of cholesterol and triglycerides. It improves glucose metabolism, insulin and leptin sensitivity, and immune function. A Bacteroides-rich microbiota has been associated with reduced production of pro-atherosclerotic TMAO (Gauvain Cano et al., 2012).
<i>L. reuteri</i> JBD301	This strain absorbs FFAs and increases fecal fat excretion (Chung et al., 2016).

마케팅 전략 4: 지방산제거 유산균 JBD301의 전문 SNS marketing

GUT MICROBIOTA RESEARCH & PRACTICE

HOME NEWS WATCH RESEARCH & PRACTICE ABOUT GUT MICROBIOTA EVENTS

GUT MICROBIOTA METABOLIC CONDITIONS DIGESTIVE HEALTH GUT BRAIN AXIS IMMUNE HEALTH NUTRITION PR

Free fatty acid-absorbing bacteria as a potential new treatment for obesity

25 MAY 2016 | Andreu Predos
 Obesity, Research & Practice

A new study, led by Dr. Seong-Tshool Hong from the Department of Biomedical Sciences and Institute for Medical Science, at Chonbuk National University Medical School in Jeonju (South Korea), showed that a **free fatty acid-absorbing *Lactobacillus* strain reduced dietary fat absorption both in mice and humans, suggesting a potential treatment for obesity.**

Recent research suggests that manipulating gut microbiota represents a novel approach to treating obesity, although long-term effects have not yet been studied in humans. Chung et al. studied whether the inhibition of free fatty acid (FFA) absorption in the human body by using a *Lactobacillus* mutant with enhanced capacity in absorption of FFAs would lead to the development of a safe therapeutic for obesity. ***Lactobacillus* strains were isolated from faeces of healthy lean adult volunteers and those strains that absorb FFAs strongly were selected.** Screening of natural FFA-absorbing intestinal bacteria led to the isolation and characterization of intestinal FFA-absorbing *Lactobacillus reuteri* JBD301, named *Lactobacillus* JBD301. After confirming the ability of the mutants to remove FFAs in the gastrointestinal tract, the anti-obesity effects were demonstrated in rats by inhibition of body weight gain and body fat accumulation as well as amelioration of plasma lipid profiles under a diet-induced obesity condition

Nova Probiotics

6월 9일 · 🇰🇷

A new study showed that a free fatty acid-absorbing *Lactobacillus* strain reduced dietary fat absorption both in mice and humans, suggesting a potential treatment for obesity.

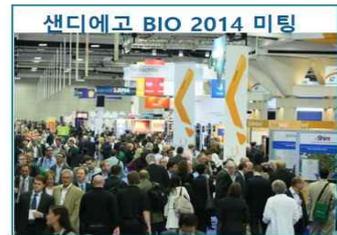
#microbiome #bacteria #probiotics

Free fatty acid-absorbing bacteria as a potential new treatment for obesity - Gut Microbiota for...

마케팅 전략 5: 국제 파트너링 및 Keynote 발표 등 홍보



마케팅 전략 6: 미국 GNC에 의한 철저한 기술검증 및 성공적 제품화



GNC
LIVE WELL
GNC Ultra Probiotic Complex 25 With
Weight Management Support

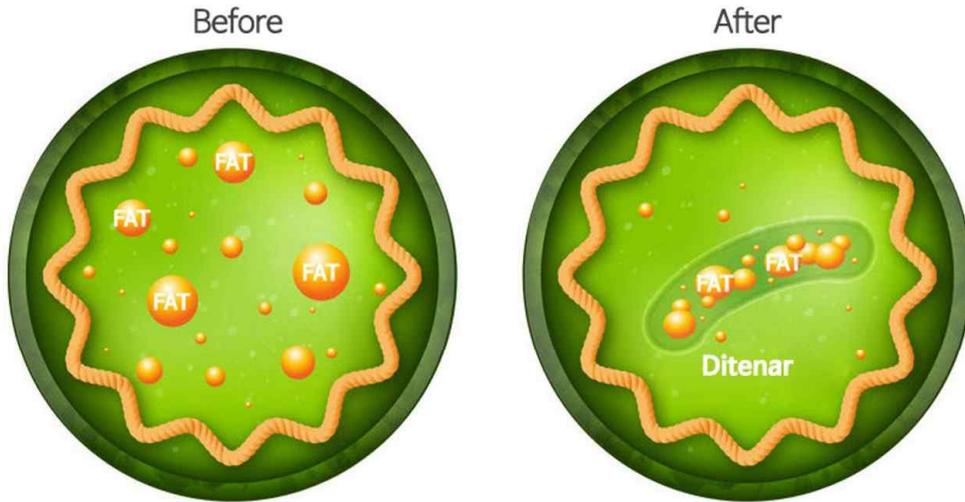


#1 FASTEST GROWING PROBIOTIC BRAND*

WEIGHT MANAGEMENT SUPPORT
*JBD301, Unique probiotic designed to reduce fat absorption

Launching 6개월만에 Top Seller 10%
Launching 1년만에 Top Seller 5% 이내
(16년 12월 28일 GNC online site 기준)

마케팅 전략 7: 국내 제품화



음식물로 섭취한 지방이
장에서 모두 흡수됨

디테나 유산균이 장에서 지방을 줄여줘,
체내로 지방 흡수량이 감소하게 됨

영양분(지방)의 흡수량을 줄여주는 다이어트 유산균

로그인 | 회원가입

JINISMART

회사소개 | 스토어 | 디테나이야기 | 건강정보 | 고객센터

내 페이지 | 장바구니 / 0

하루한번,
내 몸이 가벼워지는 시간
Probiotics Ditenar JBD301

국제특허를 획득한
1st-in class
지방흡수 유산균
장내 지방의 체내흡수 감소를
도와드립니다.

<http://jinimart.com>

제 5 절. 연구개발 성과

1. 논문게재 성과

가) SCI 국제논문 실적; 9건

- (1) Chung HJ et al., The gene expression profile and physiological data of mice feeding the resveratrol-enriched DJ526, Scientific Data, 3:1-9, 2016. Dec, DOI: 10.1038/sdata.2016.114 (SCI 2017)
- (2) Sharma SP et al., Paradoxical Effects of Fruit on Obesity, Nutrients (ISSN 2072-6643), 2016, 8(633):1-16, DOI:10.3390/nu8100633 (SCI IF 4.064)
- (3) Yang HS et al., Effects of Allium hookeri Root Water Extracts on inhibition of Adipogenesis and GLUT-4 Expression in 3T3-L1 Adipocytes, Food Sci. Biotech h., 2016, , 25(2):615-621 DOI 10.1007/s10068-016-0086-7 (SCI-E IF 0.699)
- (4) Chung HJ et al., The resveratrol-enriched rice DJ-526 boosts motor coordination and physical strength, Scientific Reports (ISSN 2045-2322), 2016, 6:1-12, DOI:10.1038/srep23958 (SCI IF 5.578)
- (5) Chung HJ et al., Intestinal removal of free fatty acids from hosts by Lactobacilli for the treatment of obesity, FEBS Open Bio, 2016, 6:64 - 76 DOI:10.1002/2211-5463.12024 (SCI IF 2.0)
- (6) Chung HJ et al., Manipulation of a Quasi-Natural Cell Block for High Efficiency Transplantation of Adherent Somatic Cells, Br. J. Medical and Biological Research(ISSN 1414-431X), 2015, 48(5):392-400 (SCI IF 1.15)
- (7) Baek SH et al. Treatment of obesity with the resveratrol-enriched rice DJ-526. Scientific Reports (ISSN 2045-2322), 2014, 4:3879 (SCI IF 5.578)
- (8) Chung HJ et al., Improved production of phleochrome from the phytopathogenic fungus *C. phlei* using synthetic inducers and photodynamic ROS production. J. of Bioscience & Bioengineering, 2014, 119 (SCI IF 2.21)
- (9) Baek SH et al. Creation of resveratrol-enriched rice for the treatment of metabolic syndrome and related diseases, PlosOne 2013, 8(3):1-10 (SCI IF 4.1)

(10) Kim et al., Anti-obesity effect of natural plant extracts from citrus fruit by inhibition of dietary fat absorption (In preparation)

나) 비SCI 국제논문 실적: 5건

1	Lactobacillus rhamnosus pl을 이용한 절단형 고다치즈 제조방법 및 숙성중 품질특성	한국유가공기술과학회	(재)임실치즈&식품연구소	32	국내	한국유가공기술과학회	비SCI
2	유청과 표고버섯 추출물의 혼합 발효를 통한 기능성 음료 제조	한국유가공기술과학회	(재)임실치즈&식품연구소	32	국내	한국유가공기술과학회	비SCI
3	유청과 콩가루를 활용한 단백질 강화 발효유의 품질특성	한국유가공기술과학회	(재)임실치즈&식품연구소	32	국내	한국유가공기술과학회	비SCI
4	김치로부터 분리한 Lactobacillus acidophilus C로 발효한 홍삼 및 북분자 발효물의 비만예방 효과	한국유가공기술과학회	(재)임실치즈&식품연구소	33	국내	한국유가공기술과학회	비SCI
5	Antiamnesic effects of fermented Ganoderma lucidum water extracts by lactic acid bacteria on scopolamine-induced memory impairment in rats	Preventive Nutrition and Food science	(재)임실치즈&식품연구소	20	국제	KOFST	비SCI

다) 국제 발표 및 파트너링 실적: 5건

국제 발표					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016 MedLife	김현진(기조연설)	2016	Shanghai	China
2	2016 Hypertension	전북대학교	2016	Seoul	Korea
3	BIO2016	김현진	2016	San Francisco	USA
4	BIO2015	김현진	2015	Pensylvania	USA
5	BIO2014	김현진	2014	San Diego	USA

라) 홍보 실적: 5건

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	SNS	Gut Microbiota Twitter	Free fatty acid-absorbing bacteria as a potential new treatment for obesity	2016.06.09
2	Online Report	Gut Microbiota-Research & Practice	Free fatty acid-absorbing bacteria as a potential new treatment for obesity	2016.05.25
3	홍보	KSBMB 학회지	항비만유산균 Ditenar	2016.05.18.-20
4	보고서	농식품 R&D 동향	마이크로비오타 관련 산업 및 기술개발동향	2016.03.30
5	보고서	농림수산식품기술기획평가원 (IPET) 보고서	농생명소재산업화기술기획보고서-중점소재: 건강기능성	2015.12.30

2. 특허 성과: 13건 (등록 6건, 출원 6건, 균주 기탁 1건, 상표등록 2건)

가) 특허 출원

- (1) 2015년도, 비만억제능을 갖는 균주 및 이를 함유하는 약학조성물, (주)지니스, 대한민국, 출원번호 KR10-2015-0020316
- (2) 2015년도, 비만억제능을 갖는 균주 및 이를 함유하는 약학조성물, (주)지니스, 대한민국, 출원번호 KR10-2015-0156733
- (3) 2015년도, Unhulled rice of biosynthesizing resveratrol and use thereof, Chonbuk National Univ. EU, 출원번호 EPO 13865132.8
- (4) 2016년도, Anti-obesity microorganisms and pharmaceuticals therefrom, PCT, 출원번호 PCT/KR2016/012791
- (5) 2016년도, Ditenar 상표출원
- (6) 2016년도, JBD301 상표출원

나) 특허 등록

- (1) 2013년도, 미생물을 이용한 비만의 예방 및 치료, 대한민국, 등록번호 10-1292714
- (2) 2013년도, Composition and method for the prevention and the treatment of obesity and metabolic syndrome, 중국, 등록번호 CN1321982
- (3) 2014년도, Composition and method for the prevention and the treatment of obesity and metabolic syndrome, 멕시코, 등록번호 MX318415
- (4) 2014년도, Composition and method for the prevention and the treatment of obesity and metabolic syndrome, 일본, 등록번호 JP5665196
- (5) 2015년도, Composition and method for the prevention and the treatment of obesity and metabolic syndrome, 유럽, 등록번호 2407170
- (6) 2015년도, Composition and method for the prevention and the treatment of obesity and metabolic syndrome, 미국, 등록번호 8986675

다) 상표 등록

- (1) 2016년도, Ditenar
- (2) 2016년도, JBD301

라) 특허균주 기탁

- 생물자원; *Lactobacillus reuteri* JBD301
- 수탁기관; 한국생명공학연구원 생명자원센터
- 등록·기탁 번호; KCTC10301BP

3. 기술요약정보

- 기술명:항비만 식품 기술
- 요약내용; 항비만 농산물과 항비만 유산균 복합물을 이용한 항비만 식품 기술
- 기술완성도; 기술개발완료 및 실용화단계
- 등록·기탁번호:KCTC11513BP, KCTC11514BP, KCTC11515BP, KCTC-10301BP

4. 생명정보

- 생물자원; *Lactobacillus reuteri* JBD301
- 기탁일; 2014.07.03
- 수탁기관; 한국생명공학연구원 생명자원센터
- 등록·기탁 번호; KCTC10301BP

5. 연구결과

(1) 기술적 성과

- 항비만 농산물과 항비만 유산균 복합물을 이용한 항비만 식품 기술은 기존의 다이어트 관련 제품들이 공통적으로 가지고 있는 안전성 문제에서 근본적으로 자유로운 “무독성 다이어트 제품”임
- 국내산 농산물 추출물의 HTS 스크리닝을 통해 지방축적 저해능과 지방제거능이 우수한 천연 항비만 과실 추출물을 유효성분으로 개발하였음
- 또한 장 마이크로비오타 유래 미생물 library의 HTS 스크리닝을 통해 지방산 제거능이 우수한 항비만 미생물들을 발굴하였음
- 항비만 유산균은 체내로 흡수되기 직전의 free fatty acid를 흡수하여 장 내에서 지방산량을 감소시키므로 부작용 없이 지방감소효과를 가지는 유산균으로, 기존 식욕억제제와 지방흡수억제제의 문제점을 혁신적으로 개선하였음
- 천연 항비만 과실 추출물과 항비만 유산균 복합체를 기능성 소재화하여 미국

GNC에 수출하였고 국내에서는 건강기능식품으로 완제품을 출시하였음

- 선진국 대비 기술수준; 세계 최초 특허권 보유 및 미국 시장 최초 제품화 기술
- 국산화율;100%

(2) 경제적 성과

① 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	3억원	
			향후 3년간 매출	20억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	30억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : 0.1 %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

② 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2		
	소요예산(백만원)		1000		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
				20	100
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내		3	10
국외		0.1	0.5	3	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		핵심 항비만 농산물 소재와 미생물 소재를 함유한 기능성 식품			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

제 1 절. 목표 달성도

	연구개발목표	세부연구내용	달성도
1차 년도	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 screening 및 지방산제거 유산균 기능성식품 소재화 연구 (지니스)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 탐색 ○ 비만 예방 및 치료용 미생물 기반 소재 탐색 및 생체모델을 이용하여 항비만 기능성 소재 발굴 ○ 지방산제거 유산균 최적 배양을 위한 영양 요구 조건, 배양 온도 및 pH 조건, aeration, 교반 등과 같은 물리적 조건 확립 ○ 지방산제거 유산균의 항비만 기능성 개별인정 기능성 자료 ○ 지방산제거 유산균의 data 통계처리 ○ 지방산제거 유산균의 건강기능식품 소재화를 위한 인허가 자료 준비 	100%
	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구 (전북대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 탐색 및 생체 모델을 이용하여 항비만 기능성 소재 발굴 ○ 지방산제거 작용기전에 기초한 생체 모델을 이용하여 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 	100%

	연구개발목표	세부연구내용	달성도
2차 년도	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 생산용 복합분말제 개발 (지니스)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성 분말 대량생산 공정 개발 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성 분말 시제품 생산 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 복합 분말제 제품화 연구 (제형 개발-캡슐형, 액체형, 포장단위, spec 등) ○ 지방산제거 유산균과 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 복합 항비만 효능 평가 ○ 지방산제거 유산균의 항비만 기능성 자료 ○ 지방산제거 유산균의 항비만 기능성 검증 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말 개발을 위해 growth characteristics, sugar utilization ability, acid production ability, proteolytic activity 특성 연구 ○ 지방산제거 유산균을 비만 예방 및 치료용 발효식품 스타터 분말 소재로 개발 	100%
	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구 (전북대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 유산균 발효 전후 활성성분 함량 변화 연구 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재의 효능 관련 성분의 구조 확인 및 분석방법 확립 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 활성성분의 안정성 평가 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 활성성분의 생체이용률 제고 방법 개발 	100%
	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균 복합 분말제를 이용한 기능성 식품 연구 (임실치즈과학연구소)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말의 발효공정 적용 test ○ 지방산제거 유산균을 이용한 스타터 분말로 발효된 제품 품질검사 (lactic acid, pH, Acetaldehyde, Diacetyl 등) ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 발효식품 개발 	100%

	연구개발목표	세부연구내용	달성도
3차 년도	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 생산용 복합분말제 개발완료 및 비만 예방 및 치료용 기능성식품 제품화 (지니스)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 항비만 기능성식품 마케팅 파트너 확보 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성식품 제품화 ○ 지방산제거 유산균을 이용한 비만 예방 및 치료용 기능성식품 마케팅 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 함유한 식품 첨가물용 복합분말제 개발 연구 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 함유한 식품 첨가물용 복합분말제 시제품 생산 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 제품화 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 이용한 식품 첨가물용 복합분말제 마케팅 전략 수립 	100%
	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재 발굴 및 식품 소재화 연구 (전북대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균을 함유한 복합분말제 지표물질 선정 및 분석 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균을 함유한 복합분말제의 synergistic 효능평가 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균을 함유한 복합분말제 시제품 품질 평가 	100%
	비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 항비만 기능성 유산균 복합 분말제를 이용한 기능성 식품 연구 (임실치즈과학연구소)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균을 함유한 복합분말제를 이용하여 발효식품 제품화 적용 연구 ○ 비만 예방 및 치료용 국내산 농산물 소재와 지방산제거 유산균을 함유한 복합분말제로 발효된 제품 품질검사 	100%

제 2 절. 관련 분야 기여도

1. 원천 기술 개발로 우리나라 바이오산업 경쟁력 강화에 기여

- 현재 우리나라 농업 및 바이오산업 분야는 대부분 선진국에서 이미 기 개발한 제품들과 같은 개념의 제품을 복제해 생산하거나, 개량하여 비슷한 종류의 제품을 개발하는 선진국 추격형 연구에 머무르고 있는 실정임
- probiotics와 prebiotics에 기반한 식품소재들이나 기능성소재들이 선진국 추격형 제품의 대표적인 예임
- probiotics나 prebiotics의 경우 특허권이 이미 소멸되었거나, 나머지는 크리스찬 한센, 다농, 다니스코/듀풍 등과 같은 다국적 회사 등에서 소유하고 있어 고부가가치 제품을 독자적으로 개발하기 힘들
- 장 마이크로비오타에 기반 기능성 미생물 및 농산물 소재들은 그 기능성이 probiotics나 prebiotics에 비해 비교할 수 없을 정도로 확실하고, 또한 동시에 매우 다양한 제품들을 개발할 수 있음
- 장 마이크로비오타에 기반 기능성 미생물 및 농산물 소재들은 현재 농업 및 바이오산업계에서 큰 관심을 가지고 집중적으로 투자하고 있으나 아직까지 시장에 성공적으로 진출한 예는 없음
- 장 마이크로비오타에 기반 기능성 미생물 및 농산물 소재들은 향후 20년 이내에 수 백조 규모의 시장을 선도할 수 있을 것으로 예측되고, 비슷한 개념의 제품이 없는 혁신형 소재들이어서, 장 마이크로비오타에 기반한 기능성 농산물 소재들을 개발하면 막대한 부가가치를 창출할 수 있음
- 따라서 농림축산식품부에서 지원받아 수행된 본 과제로 장 마이크로비오타에 기반한 기능성 농산물 소재들이 본격적으로 제품화되면 우리나라 농업 및 바이오산업 분야 발전에 크게 기여할 것으로 기대되어짐

2. 기능성 농산물 소재 발굴로 우리나라 경제 발전에 기여

- 선진국 추격형 연구에 의한 농업 및 바이오 소재들은 특허에 의해 생산자가 보호 받을 수 없거나, 보호 받는 범위가 매우 제한적이어 부가가치 창출에 뚜렷한 한계가 있음
- 장 마이크로비오타에 기반 기능성 미생물 및 농산물 소재 연구는 대표적인 First-In-Class (혁신형) 연구이어서 개발자가 최소 17년 경우에 따라서 34년간 전 세계적으로 배타적인 독점권을 행사할 수 있어 우리나라에 막대한 부가가치를 창출할 수 있음
- 장 마이크로비오타에 기반 기능성 미생물 및 농산물 소재들은 향후 20년 이내에 최소 연 수 백조원 규모의 시장을 형성할 수 있으리라 예측되기 때문에, 향후에

도 농림축산식품부에서 지속적으로 장 마이크로비오타 제품화에 투자하게 되면 우리나라 경제 발전에 엄청난 기여를 하게 됨

3. 국민 보건에 기여

- 인구 고령화는 65세 이상 인구의 증가뿐 아니라 출산율 하락으로 급속하게 진행되고 있으며, 2045년 경 전 세계적으로 65세 이상의 노인인구가 전체인구의 15% 이상을 차지하고 반면에 5세 이하의 유아인구는 7% 이하로 심각한 인구 고령화 현상이 나타날 것으로 예상됨
- 우리나라 뿐 만 아니라 세계적인 인구 고령화 및 아동비만 증가 추세에 따라 당뇨, 비만, 고지혈증/고콜레스테롤혈증 등의 대사성 질환 및 만성 우울증, 파킨슨병, 치매 등의 퇴행성뇌신경질환에 대한 치료 수요가 빠르게 증가하고 있음
- 비만의 원인으로는 유전적 요인, 식습관, 생활습관, 에너지 대사의 불균형 등이 있고 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심장질환, 관절염, 호흡기질환, 성기능 장애, 암발생 등에 중요한 위험인자로 알려지고 있어 비만의 치료와 예방에 관한 관심이 증가되고 있음
- 장 마이크로비오타에 기반 항비만 미생물 및 항비만 농산물 소재들은 이들 질병의 발병을 예방할 수 있고, 어느 정도 치료할 수 있어서, 본 농림축산식품부에서 기획과제로 장 마이크로비오타 기반 소재 개발에 투자하게 되면 우리나라 보건의료에 큰 기여를 하게 됨

제 5 장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

제 1 절. 활용 계획

1. 연구개발 관련 활용 계획

- 세계적으로 비만 시장은 잠재적 시장 규모에 비해 아직도 상업화 초기 단계에 머무르고 있으나, 기존 비만 소재가 가지고 있는 부작용은 없으면서도 효과적으로 비만을 치료할 수 있는 항비만 유산균은 본 연구팀이 최초임
- 특히 본 사업을 통해 국내산 항비만 농산물 소재를 신규 발굴하였으므로 국내산 항비만 농산물 소재의 작용기전 및 임상효능 연구에 활용하고자 함

2. 연구개발 관련 추가 연구 필요성

- 효과적이고 안전한 차세대 항비만 치료제로 개발하려는 연구가 전 세계적으로 활발하게 진행되고 있는 현 상황에서 지방흡수 항비만 유산균과 지방흡수 감소 농산물 자원을 새로운 항비만 건강기능식품으로 개발완료시, 세계 최고 수준의 항비만 식의약 소재가 국내에서 탄생할 수 있을 것으로 기대되며 건강기능식품 뿐 아니라 의약품 소재로도 개발 가능할 것임
- 현재 부작용으로 수십조 이상 규모의 세계 항비만 시장에서 많은 제품들이 퇴출된 상황에서 무독성의 유산균이 제품화시 시장을 선점하여 리드할 것이 예상되며, 이로 인한 매출 창출 및 수입대체효과가 기대되는 바임

제 2 절. 기업화 추진 계획

1. 국내 시장 완제품 판매

- 현재 지방흡수 항비만 유산균과 지방흡수 감소 농산물 자원을 함유한 건강기능식품으로 제품화를 추진하고 있으며 이를 통한 매출 창출이 기대됨

2. 해외 시장 완제품 수출

- 중국 시장을 타깃으로 국내산 농산물 및 항비만 유산균을 이용한 제품화 및 수출을 추진할 예정임

제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

Ingredient	Proposed Mechanism of Action	Evidence of Efficacy	Evidence of Safety+
Bitter orange (synephrine)	Increases energy expenditure and lipolysis, acts as a mild appetite suppressant	<p>Small clinical trials of poor methodological quality</p> <p><u>Research findings:</u> Possible effect on resting metabolic rate and energy expenditure; inconclusive effects on weight loss</p>	<p>Some safety concerns reported</p> <p><u>Reported adverse effects:</u> Chest pain, anxiety, and increased blood pressure and heart rate</p>
Caffeine (as added caffeine or from guarana, kola nut, yerba mate, or other herbs)	Stimulates central nervous system, increases thermogenesis and fat oxidation	<p>Short-term clinical trials of combination products</p> <p><u>Research findings:</u> Possible modest effect on body weight or decreased weight gain over time</p>	<p>Safety concerns not usually reported at doses less than 400 mg/day for adults, significant safety concerns at higher doses</p> <p><u>Reported adverse effects:</u> Nervousness, jitteriness, vomiting, and tachycardia</p>
Calcium	Increases lipolysis and fat accumulation, decreases fat absorption	<p>Several large clinical trials</p> <p><u>Research findings:</u> No effect on body weight, weight loss, or prevention of weight gain based on clinical trials</p>	<p>No safety concerns reported at recommended intakes (1,000-1,200 mg/day for adults)</p> <p><u>Reported adverse effects:</u> Constipation, kidney stones, and interference with zinc and iron absorption at intakes above 2,000-2,500 mg for adults</p>
Chitosan	Binds dietary fat in the digestive tract	<p>Small clinical trials, mostly of poor methodological quality</p> <p><u>Research findings:</u> Minimal effect on body weight</p>	<p>Few safety concerns reported, could cause allergic reactions</p> <p><u>Reported adverse effects:</u> Flatulence, bloating, constipation, indigestion, nausea, and heartburn</p>

<u>Chromium</u>	Increases lean muscle mass; promotes fat loss; and reduces food intake, hunger levels, and fat cravings	Several clinical trials of varying methodological quality <u>Research findings:</u> Minimal effect on body weight and body fat	No safety concerns reported at recommended intakes (25-45 mcg/day for adults) <u>Reported adverse effects:</u> Headache, watery stools, constipation, weakness, vertigo, nausea, vomiting, and urticaria (hives)
<u>Coleus forskohlii (forskolin)</u>	Enhances lipolysis and reduces appetite	Few short-term clinical trials <u>Research findings:</u> No effect on body weight	No safety concerns reported <u>Reported adverse effects:</u> None known
<u>Conjugated linoleic acid</u>	Promotes apoptosis in adipose tissue	Several clinical trials <u>Research findings:</u> Minimal effect on body weight and body fat	Few safety concerns reported <u>Reported adverse effects:</u> Abdominal discomfort and pain, constipation, diarrhea, loose stools, dyspepsia, and (possibly) adverse effects on blood lipid profiles
<u>Ephedra (ma huang, ephedrine)</u>	Stimulates central nervous system, increases thermogenesis, reduces appetite	Several short-term clinical trials of good methodological quality, many of ephedra combined with caffeine <u>Research findings:</u> Modest effect on short-term weight loss	Significant safety concerns reported; banned as a dietary supplement ingredient <u>Reported adverse effects:</u> Anxiety, mood changes, nausea, vomiting, hypertension, palpitation, stroke, seizures, heart attack, and death
<u>Fucoxanthin</u>	Increases energy expenditure and fatty acid oxidation, suppresses adipocyte differentiation and lipid accumulation	Studied only in combination with pomegranate-seed oil in one trial in humans <u>Research findings:</u> Insufficient research to draw firm conclusions	No safety concerns reported but not rigorously studied <u>Reported adverse effects:</u> None known
<u>Garcinia cambogia (hydroxycitric acid)</u>	Inhibits lipogenesis, suppresses food intake	Several short-term clinical trials of varying methodological quality <u>Research findings:</u> Little to no effect on body weight	Few safety concerns reported <u>Reported adverse effects:</u> Headache, nausea, upper respiratory tract symptoms, and gastrointestinal symptoms

Glucomannan	Increases feelings of satiety and fullness, prolongs gastric emptying time	Several clinical trials of varying methodological quality, mostly focused on effects on lipid and blood glucose levels	Significant safety concerns reported with tablet forms, which might cause esophageal obstructions, but few safety concerns with other forms
		<u>Research findings:</u> Little to no effect on body weight	<u>Reported adverse effects:</u> Loose stools, flatulence, diarrhea, constipation, and abdominal discomfort
Green coffee bean extract (Coffea arabica , Coffea canephora , Coffea robusta)	Inhibits fat accumulation, modulates glucose metabolism	Few clinical trials, all of poor methodological quality	Few safety concerns reported but not rigorously studied; contains caffeine
		<u>Research findings:</u> Possible modest effect on body weight	<u>Reported adverse effects:</u> Headache and urinary tract infections
Green tea (Camellia sinensis) and green tea extract	Increases energy expenditure and fat oxidation, reduces lipogenesis and fat absorption	Several clinical trials of good methodological quality on green tea catechins with and without caffeine	No safety concerns reported when used as a beverage, contains caffeine; some safety concerns reported for green tea extract
		<u>Research findings:</u> Possible modest effect on body weight	<u>Reported adverse effects (for green tea extract):</u> Constipation, abdominal discomfort, nausea, increased blood pressure, liver damage
Guar gum	Acts as bulking agent in gut, delays gastric emptying, increases feelings of satiety	Several clinical trials of good methodological quality	Few safety concerns reported with currently available formulations
		<u>Research findings:</u> No effect on body weight	<u>Reported adverse effects:</u> Abdominal pain, flatulence, diarrhea, nausea, and cramps
Hoodia (Hoodia gordonii)	Suppresses appetite, reduces food intake	Very little published research in humans	Some safety concerns reported, increases heart rate and blood pressure
		<u>Research findings:</u> No effect on energy intake or body weight based on results from one study	<u>Reported adverse effects:</u> Headache, dizziness, nausea, and vomiting

Pyruvate	Increases lipolysis and energy expenditure	Few clinical trials of weak methodological quality <u>Research findings:</u> Possible minimal effect on body weight and body fat	Few safety concerns reported <u>Reported adverse effects:</u> Diarrhea, gas, bloating, and (possibly) decreased high-density lipoprotein levels
Raspberry ketone	Alters lipid metabolism	Studied only in combination with other ingredients <u>Research findings:</u> Insufficient research to draw firm conclusions	No safety concerns reported but not rigorously studied <u>Reported adverse effects:</u> None known
White kidney bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Interferes with breakdown and absorption of carbohydrates by acting as a "starch blocker"	Several clinical trials of varying methodological quality <u>Research findings:</u> Possible modest effect on body weight and body fat	Few safety concerns reported <u>Reported adverse effects:</u> Headache, soft stools, flatulence, and constipation
Yohimbe (<i>Pausinystalia yohimbe</i>, yohimbine)	Has hyperadrenergic effects	Very little research on yohimbe for weight-loss <u>Research findings:</u> No effect on body weight; insufficient research to draw firm conclusions	Significant safety concerns reported <u>Reported adverse effects:</u> Headache, anxiety, agitation, hypertension, and tachycardia

* References to support statements in Table 1 are provided in subsequent text.

+Listed in order of severity, with the most severe reported side effects listed last.

제 7 장. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 국내산 농산물 유래 항비만 소재에 대한 원천특허출원이 진행중이오니 사업 완료 이후 3년 동안 외부 공개 없이 보안을 유지하여 주시기 바랍니다.	

제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
<p>가. 연구실 안전조치 이행실적</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 위험 요소 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 화학 분야 : 사용 시약의 특성별 위험요소 확인하였음 - 생물 분야 : 병원균 미생물 및 바이러스 등 인체 유해물질 확인하였음 - 기타 분야 : 전기, 기계, 환기, 폐기물 등 연구실내 위험, 유해인자 확인하였음 ○ 안전 관리 대책 <ol style="list-style-type: none"> 1. 안전 교육 <ul style="list-style-type: none"> - 자체교육 : 반기 1 회 이상 연구실 자체 안전교육 실시(위험물질 취급요령, 보호구 착용 등) 2. 안전점검 <ul style="list-style-type: none"> - 정기점검 : 연구실 안전팀에서 년 2회 측정 장비 등을 이용하여 연구실내 불안전사항 점검 실시 - 특별점검 : 연구실 안전사고 발생 시 점검을 실시하여 문제점 개선 및 재발방지 계획 수립 	

제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수등)
1	대표 논문	Intestinal removal of free fatty acids from hosts by Lactobacilli for the treatment of obesity	(주)지니스 전북대	교신 저 자	FEBS OpenBio	2.09	2016	단독사사	SCI
2	논문	Treatment of obesity with the resveratrol-enriched rice DJ-526	(주)지니스 전북대	교신 저 자	Scientific Reports	5.578	2016	사사	SCI
3	논문	Paradoxical Effects of Fruit on Obesity	(주)지니스 전북대	교신 저 자	Nutrients	4.06	2016	단독사사	SCI
4	논문	The resveratrol-enriched rice DJ-526 boosts motor coordination and physical strength	(주)지니스 전북대	교신 저 자	Scientific Reports	5.578	2014	사사	SCI
5	특허	미생물을 이용한 비만의 예방 및 치료	(주)지니스	발명자	대한민국	등록 특허	2013072 5		
6	대표 특허	Composition and method for the prevention and the treatment of obesity and metabolic syndrome	(주)지니스	발명자	EU	국제 특허 등록	2015022 6		국제특허
7	대표 특허	Composition and method for the prevention and the treatment of obesity and metabolic syndrome	(주)지니스	발명자	US	국제 특허 등록	2015032 4		국제특허
8	대표 특허	비만억제능을 갖는 균주 및 이를 함유하는 약학조성물	(주)지니스	발명자	대한민국		2015110 9		
9	대표 특허	Anti-obesity microorganisms and pharmaceuticals therefrom	(주)지니스	발명자	PCT		2016110 8		국제특허
10	학회	2016 MedLife	(주)지니스	기조연 설	Shanghai	국제	2016		Keynote
11	학회	BIO2016	(주)지니스	발표	San Francisco	국제	2016		
12	학회	BIO2015	(주)지니스	발표	Pensylvania	국제	2015		
13	학회	BIO2014	(주)지니스	발표	San Diego	국제	2014		

제 11 장. 기타사항

코드번호	D-13
○	

제 12 장. 참고문헌

코드번호	D-14
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bäckhed, et al. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. <i>Cell Host Microbe</i> 12, 611-620. 2. Baek, S. H. et al. (2014). Treatment of obesity with the resveratrol-enriched rice DJ-526. <i>Sci. Rep.</i> 4, 3879. 3. Bays, H. E. (2011) Lorcaserin: drug profile and illustrative model of the regulatory challenges of weight-loss drug development. <i>Expert Rev. Cardiovasc. Ther.</i> 9, 265-277. 4. Clemente, J. C., et al. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. <i>Cell</i> 148, 1258-1270. 5. Colman, E., et al. (2012). The FDA's assessment of two drugs for chronic weight management. N. 6. Collins, et al. (2009) The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. <i>Gastroenterology</i> 136, 2003-2014. 7. Davidson, M. H., et al. (1999). Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. <i>JAMA</i>, 281, 235 - 242. 8. Delzenne, et al. (2011) Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. <i>Nat. Rev. Endocrinol.</i> 7, 639-646. 9. Dereeper, A., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. <i>Nucleic Acids Res.</i> 36, W465-469. 10. Després, J. P. and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. <i>Nature</i>, 444, 881-887. 11. DiBaise, J. K., et al. (2012) Impact of the gut microbiota on the development of obesity: current concepts. <i>Am. J. Gastroenterol. Suppl.</i> 1, 22 - 27. 12. Dietrich, M. O. and Horvath, T. L. (2012) Limitations in anti-obesity drug development: the critical role of hunger-promoting neurons. <i>Nat. Rev. Drug Discov.</i> 11, 675-691. 13. Drent, M. L., et al. (1995). Orlistat (RO 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. <i>Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.</i> 19, 221-226 14. <i>Engl. J. Med.</i> 367, 1577-1579. 15. Fak, F. and Backhed, F. (2012) <i>Lactobacillus reuteri</i> prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe^{-/-} mice. <i>PLoS One</i> doi: 10.1371/journal.pone.0046837. 16. Gadde, K. M., et al. (2011). Effects of low-dose, controlled-release, phentermine plus topiramate combination on weight and associated comorbidities in overweight and obese adults (CONQUER): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. <i>Lancet</i> 377, 1341-1352. 17. Guercolini, R. (1997) Mode of action of orlistat. <i>Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.</i> 21, S12-S23. 	

18. Halford, J. C., et al. (2010) Pharmacological management of appetite expression in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 255–269.
19. Hauptman, et al. (1992) Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin). *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 309S–313S.
20. Hill, J., et al. (1999). Orlistat, a lipase inhibitor, for weight maintenance after conventional dieting: a 1-y study. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1108–1116.
21. Hill, J. O. (2006) Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr. Rev.* 27, 750–761.
22. Holes-Lewis, et al. (2013) Pharmacotherapy of obesity: clinical treatments and considerations. *Am. J. Med. Sci.* 345, 284 - 288.
23. Jain, R., et al. (2011). Implications of obesity for drug therapy: limitations and challenges. *Clin. Pharmacol. Ther.* 90, 77–89.
24. James, W. P. et al. (2010) Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *N. Engl. J. Med.* 363, 905–917.
25. Kang, J. G. and Park, C. Y. (2012) Anti-obesity drugs: A review about their effects and safety. *Diabetes Metab. J.* 36, 13–25.
26. Keno, Y., et al. (1991). High sucrose diet increases visceral fat accumulation in VMH-lesioned obese rats. *Int. J. Obes.* 15, 205–211
27. Leenen, R., et al. (1992) Visceral fat accumulation in obese subjects: relation to energy expenditure and response to weight loss. *Am. J. Physiol.* 263, E913–919.
28. Ley, R. E., et al. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
29. Lin, W. H., et al. (2006) Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.* 23, 74–81.
30. Million, M., et al. (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int. J. Obes.* 36, 817–825.
31. Million, M., et al. (2012). Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb. Pathog.* 53, 100–108.
32. Million, M., et al. (2013). Correlation between body mass index and gut concentrations of *L. reuteri*, *B. animalis*, *M. smithii* and *E. coli*. *Int. J. Obes.* 37, 1460–1466.
33. Molavi, B., et al. (2006) The prevention and treatment of metabolic syndrome and high-risk obesity. *Curr. Opin. Cardiol.* 21, 479–485.
34. Musso, G., et al. (2011) Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Ann. Rev. Med.* 62, 361–380.
35. Ogawa, A., et al. (2014) *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces postprandial and fasting serum non-esterified fatty acid levels in Japanese hypertriglycerolemic subjects. *Lipids Health Dis.* doi:10.1186/1476-511X-13-36.
36. Oliverio, A. M. and Katz, L. A. (2014) The dynamic nature of genomes across the tree of life. *Genome Biol. Evol.* 6, 482–488.
37. Poirier, P. (2011) Weight loss drugs and cardiovascular risks. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.* 5, 138–144.
38. Qin, J., et al. (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60.

39. Rand, C. S. (1987) Obesity and caloric intake. *J. Chronic. Dis.* 40, 911–912.
40. Ridaura, V. K., et al. (2013) Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341, 1241214.
41. Rueda-Clausen, et al. (2013) New pharmacological approaches for obesity management. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 467–478.
42. Santhana, R. L. et al. (2007). Rapid method for transmission electron microscope study of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Ann Microscope* 7, 102–108.
43. Sekirov, I., et al. (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904.
44. Tilg, H. and Kaser, A. (2011) Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J. Clin. Invest.* 121, 2126–2132.
45. Turnbaugh, P. J. et al. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027–1031.
46. Turnbaugh, P. J., et al. (2007). The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*, 449, 804–810.
47. Turnbaugh, P. J., et al. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223.
48. Wells, J. C. and Siervo, M. (2011) Obesity and energy balance: is the tail wagging the dog? *Eur. J. Clin. Nutr.* 65, 1173–1189.
49. Wright, S. M. and Aronne, L. J. (2011) Obesity in 2010: the future of obesity medicine: where do we go from here? *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 69–70.
50. Yanovski, S. Z. and Yanovski, J. A. (2014) Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review. *JAMA* 311, 74–86. (2001) 22, 355–375.