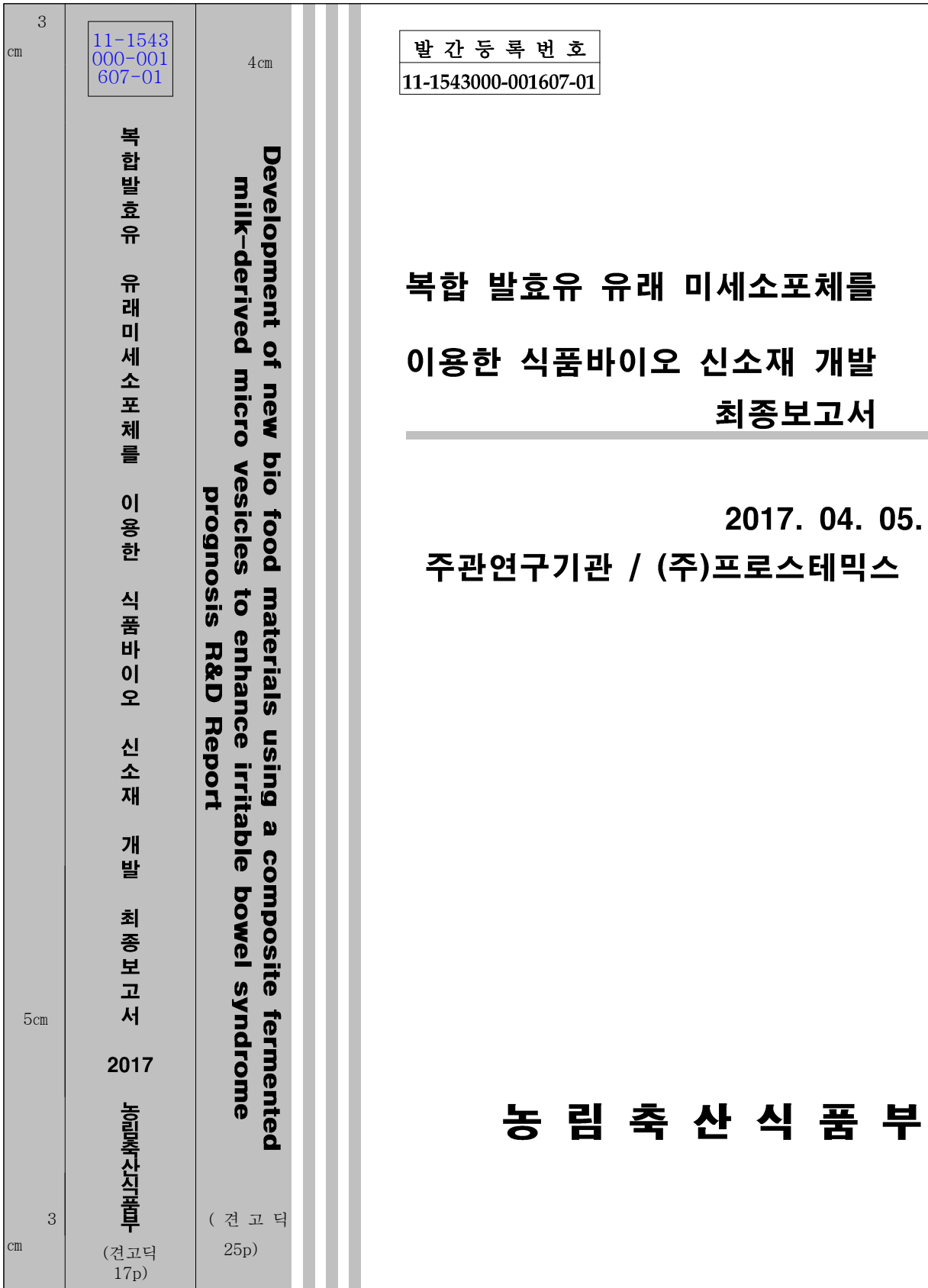


1-2. 표지(최종보고서 최종본) : 발간등록번호 필수(최종제출시 표지)
 (뒷면) (옆면) (앞면)



※ 최종보고서 표지 작성 시 과제명이 길 경우 글씨 크기 변경 가능

2. 제출문

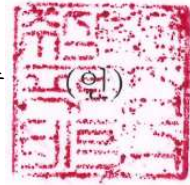
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “복합 발효유 유래 미세소포체를 이용한 식품바이오 신소재 개발”(개발기간 : 2015. 10. ~ 2016. 10.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 04. 05.

주관연구기관명 : (주)프로스테믹스 (대표자) 이 원 중



주관연구책임자 : 최 은 욱

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	115028-1	해당 단계 연구 기간	1년	단계 구분	(1단계)/ (1단계)
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	복합 발효유 유래 미세소포체를 이용한 식품바이오 신소재 개발			
연구책임자	해당단계 참여 연구원 수	총: 4명 내부: 4명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 16,700천원 계: 66,700천원	
	총연구기간 참여 연구원 수	총: 4명 내부: 4명 외부: 0명	총연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 16,700천원 계: 66,700천원	
연구기관명 및 소속부서명	프로스테믹스 부설연구소			참여기업명: 프로스테믹스	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수: 80	

4. 국문 요약문

			코드번호	D-01	
연구의 목적 및 내용	<p>○ 연구목적</p> <p>발효유 내 존재하는 케피어 유래 미세소포체를 이용하여 기능성 식품원료로써 이용 가능성을 탐색하고, 정장효과, 내독소 저감효과를 증명하여 과민성대장증후군 개선 효과가 있는 미세소포체를 활용한 식품바이오 신소재를 개발하고자 함</p> <p>○ 연구 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 복합 발효유 내 존재하는 케피어 유래 미세소포체 분리방법 최적화 - 발효유 내 존재하는 케피어가 생산하는 미세소포체의 과민성대장증후군 개선 효과 확인 - 새로운 바이오식품 소재로서의 타당성 확인 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 케피어 균주 유래 미세소포체 배양 조건 및 분리방법을 최적화 : 다양한 조건에서의 연구를 통해 케피어 유래 미세소포체의 수득률을 극대화 할 수 있는 분리방법 최적화 및 배양 프로토콜을 확립함. - In vitro 시험계를 통한 케피어 균주 유래 미세소포체의 면역 조절 기능에 대한 유효성 자료 확보 : 대장세포주인 Caco-2 세포에서 케피어 균주 유래 미세소포체 에 의한 염증성 사이토카인의 유전자 발현 감소 효과와 단백질의 분비 억제 효과 확인. - 과민성 대장증후군 동물모델을 통한 효능 검증 자료 확보 : TNBS (Trinitrobenzene sulfonate) 유도 과민성 대장증후군 마우스모델에서 시험물질의 효력을 평가하여 직장 출혈 및 붉은변의 정도가 완화됨을 확인함. - 케피어 유래 미세소포체의 안정성 자료 확보 : 6개월 장기 보존 시험, 미생물 오염 검사를 통해 케피어 균주 유래 미세소포체의 장기간 안정성이 유지됨을 확인함. - 과민성 대장 증후군 조성물 특허출원 1건 - 기술이전 1건 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 미세소포체를 이용한 새로운 식품바이오 신소재 개발에 의한 식품개발의 새로운 패러다임을 제시하여 과민성대장증후군에 기능성 식품으로 응용될 수 있는 근거를 마련하였고 이를 활용하여 건강기능식품 사업화에 활용할 것임. - 기존 복합 발효유와 차별화를 두기 위해 복합 발효유에서 분리된 미세소포체만 포함된 기능성 식품 소재를 제품화하기 위해 미생물 유래 미세소포체 대량 공정 시스템을 최적화할 계획임. - 연구 기간 중 실용화와 출원된 특허에 관한 권리를 확보하기 위해 특허 등록을 실시하고 미생물 유래 미세소포체 원료의 위탁생산자를 탐색하여 시작품 제작을 진행할 예정임. 				
중심어 (5개 이내)	미세소포체	발효유	과민성대장증 후군	미생물	기능성 식품

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

			코드번호	D-02	
Purpose& Contents	<p>○ Research Objective</p> <ul style="list-style-type: none"> - To develop a new bio food material utilizing extracellular vesicles with improvement effectiveness on irritable bowel syndrome (IBD) by exploring the usage possibility of kefir-derived extracellular vesicles existing within fermented milk as a functional food material and proving its ability to reduce endotoxin <p>○ Research Process</p> <ul style="list-style-type: none"> - Optimize the separation method of kefir-derived extracellular vesicles existing within fermented milk - Study the improvement effectiveness extracellular vesicles produced by the kefir existing within fermented milk have on IBD - Check the validity as a new bio food material 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> - Optimization of the separation method to obtain a kefir-derived extracellular vesicles existing within fermented milk: We established the optimized separation method and culturing protocol with maximum yield of kefir-derived extracellular vesicles through researches under diverse conditions. - Efficacy data on immunomodulatory function of kefir-derived extracellular vesicles through in vitro test : We observed the reduction of gene expression and protein secretion of inflammatory cytokines by treatment of kefir-derived extracellular vesicles in the Caco-2 (colon epithelial cell). - Efficacy data on IBD via experiment of animal model: kefir-derived extracellular vesicles showed positive effects on rectum bleeding and watery feces in the TNBS (Trinitrobenzene sulfonate)-induced IBD mouse model. - Stability data of kefir-derived extracellular vesicles: We evaluated stability of kefir-derived extracellular vesicles by 6-month long-term stability test and microbial contamination examination. - Technology Transfer: 1 case 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> - Grounds for new bio food material utilizing extracellular vesicles to be applied to functional foods with effectiveness in IBD were proposed, as well as setting a new paradigm in food development based on new materials. It can be further applied and utilized to commercialization of health functional foods. - In order to differentiate from the conventional complex fermented milk and to make functional food materials only containing the separated extracellular vesicles from complex fermented milk, a massive process system for microorganism-originated extracellular vesicles will be optimized. - Patent will be registered in order to secure the patent-related rights for commercialization purposes during the research period and production of the prototype will take place after searching for the OEM for microorganism-originated extracellular vesicles materials. 				
Keywords	Microvesicles	Fermented milk	Irritable bowel syndrome	Microorganism	Functional food

6. 영문목차

1. Introduction	1
2. The status of domestic and foreign technical development	10
3. Contents and results of study	15
4. Purpose achievement and contribution degree on field of the study	69
5. Achievement of the study and application plan of the results	71
6. The obtained informations during the project progress	74
7. Security grade of the research achievements	76
8. Laboratory safety management implementation performance	77
9. Representative research achievements	78
10. Reference	79

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	10
3. 연구수행 내용 및 결과	15
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	69
5. 연구결과의 활용계획 등	71
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	74
7. 연구개발성과의 보안등급	76
8. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	77
9. 연구개발과제의 대표적 연구실적	78
10. 참고문헌	79

8. 뒷면지

주 의

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

제 1장 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제 1절 연구개발 목적

○ 본 과제에서는 발효유 내 존재하는 커피어 유래 미세소포체를 이용하여 기능성 식품원료로써 이용 가능성을 탐색하고, 정상효과, 내독소 저감효과를 증명하여 과민성대장증후군 개선 효과가 있는 미세소포체를 활용한 식품바이오 신소재 개발 및 시제품 제작



제 2절 연구개발의 필요성

- 과민성 대장 증후군은 알 수 없는 원인에 의해 소화기 기능의 장애가 생기는 것을 말하며, 만성 질환으로 심각한 삶의 질 저하를 초래함
- 소화기내과를 찾은 환자의 절반 정도가 해당 질환에 속하지만, 현재 대증적 치료에 국한 되어 있음
- 본 연구로 최근 신소재물질로 부각되고 있는 미세소포체를 이용한 식품바이오 신소재로써의 개발 유효성 자료를 확보
- 최종적으로 과민성 대장 증후군 개선 효과가 있는 커피어 유래 미세소포체를 활용한 식품바이오 신소재 개발 가능성을 확인하고자 함

1. 과민성 대장 증후군

- 과민성 대장 증후군(Irritable Bowel Syndrome: IBS)은 기능성 소화불량의 한 분류이며 복통, 복부 팽만감과 같은 불쾌한 소화기 증상과 설사 혹은 변비 등 배변장애 증상을 반복적으로 느끼는 만성적인 질환임. CT나 내시경 등의 검사상 원인 질환을 찾을 수 없는 것이 특징임. 증후군의 원인으로서는 장운동의 비정상적인 변화, 내장 감각의 증가, 그리고 복잡한 사회화에 따른 스트레스와 같은 정신사회적 요인들이 복합적으로 작용하는 것으로 사료됨.
- 과민성 대장 증후군의 주요원인은 여러 복합적인 요소가 있음. 주로 스트레스, 예민한 성격, 불규칙한 식습관, 만성피로 및 자극적이고 기름진 음식이 주요 원인으로 알려져 있지만 특정화 된 명확한 원인을 찾을 수 없기에 현재까지 제시되고 있는 치료의 효과는 많지 않음.



<과민성 대장 증후군의 주요 원인>

- 아직까지 본 질환에 대한 근본적 치료법은 알려지지 않았으며, 진정제, 지사제, 완화제 등의 약제를 이용하여 비정상적인 장의 운동 기능이나 감각기능을 회복시켜 변비와 설사, 복통 등의 증상을 완화에 초점을 둔 대증적인 치료방법에 의존하고 있음. 이외에도 자극성 대장 증후군을 악화시키는 스트레스나 심리적 불안을 제거하기 위해 정신요법, 신경 안정제 등의 약물요법, 술, 카페인, 기름진 음식과 같이 대장에 자극을 줄 수 있는 음식을 피하는 식이요법과 걷기나 달리기 등의 유산소 운동을 통해 장 기능을 활성화하고, 스트레스를 줄여 증상을 호전시키는 운동요법 등이 알려져 있음.
- 과민성 대장 증후군의 발병률은 최근 5년간(2008-2012년)의 심사결정자료를 이용하여 ‘과민성 대장 증후군(자극성 대장 증후군)’을 분석한 결과, 지난 2008년 149만명이던 진

료인원이 2012년 162만명으로 5년세 약 8.7%(13만명) 증가한 것으로 나타남. 연평균 1.7%씩 증가하였음. 총 진료비 역시 2008년 약 584억원에서 2012년 약 763억원으로 30.8%(179억원)의 증가율을 보임.



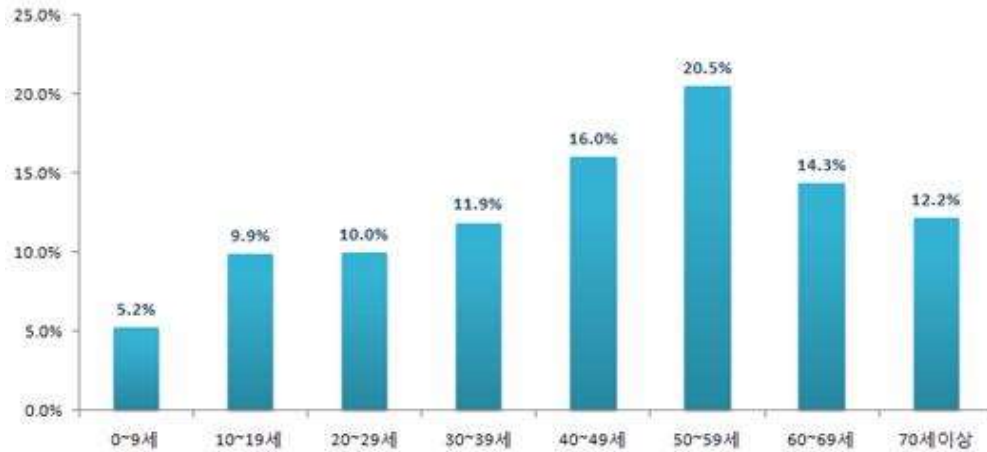
<과민성 대장 증후군 진료인원 및 총 진료비 추이, 자료출처: 건강보험심사평가원>

- 과민성 대장 증후군 진료인원을 성별로 분석해 본 결과 2012년을 기준으로 남성이 약 47%, 여성은 약 53%로 성별에 의한 큰 차이는 없는 것으로 나타남. 2008-2012년 진료인원의 연평균 증가율은 남성이 2.1%, 여성이 1.3%로 남성이 0.8% 더 높게 조사 됨.



<과민성 대장 증후군 성별 진료인원 추이, 자료출처: 건강보험심사평가원>

- 과민성 대장 증후군 진료인원의 10세 구간 연령별 점유율은 2012년을 기준으로 50대 20.5%, 40대 16.0%, 60대 14.3%의 순으로 나타남. 특히 40-60대의 점유율이 50.8%로, 자극성 장 증후군 진료인원의 2명 중 1명은 40-60대의 중·장년층인 것으로 나타남.

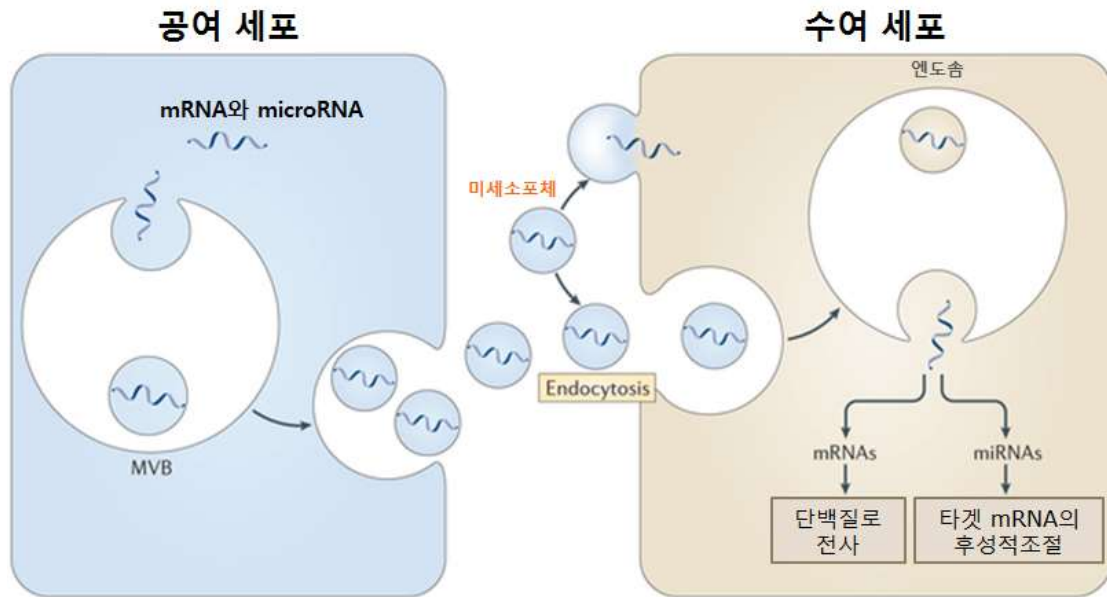


<과민성 대장 증후군 10세 구간 연령별 진료인원 점유율, 자료출처: 건강보험심사평가원>

- 2012년 기준 과민성 대장 증후군 외래 진료인원은 약 161만명, 입원 진료인원은 약 1만 명으로 대부분의 진료인원은 외래 방문하여(전체환자의 99.4%) 대증적인 요법으로 치료하는 것으로 나타남. 따라서 대증적인 치료법 외에 장내 유해균을 억제시키고 케피어를 증가시켜 장기능을 활성화 시킬 수 있는 식품바이오 신소재의 개발이 시급한 실정임.

2. 미세소포체를 이용한 식품바이오 신소재 개발 가능성

- 미세소포체는 지름이 30-100nm 크기인 미세소체를 말하여 대부분의 세포에 존재하고 혈액, 혈장, 타액(침), 점액 등 대부분의 체액(body fluid)에 존재한다고 알려짐.
- 표지인자로는 C63, CD9, CD81등이 알려져 있으며 주변 혹은 멀리 떨어진 세포에 흡수되어 유전적 변화를 유도 한다고 알려짐. 따라서 미세소포체를 이용한 질병의 진단이나 치료제 개발연구가 현재 많은 관심을 받고 있음.
- 미세소포체는 모세포에 존재하는 단백질, RNA, microRNA 등 다양한 분자를 포함하고 있어 이를 이용하여 치료제, 약물전달, 질병의 진단마커로 활용이 가능함. 따라서 미세소포체를 이용한 치료제 개발을 위한 연구가 국·내외적으로 활발하게 진행되고 있음.



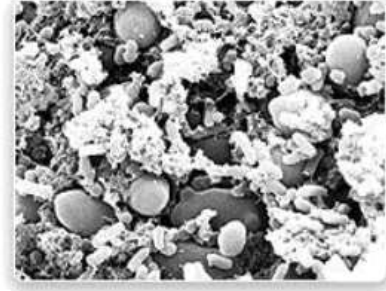
Nature Reviews | Immunology

<미세소포체의 세포간 흡수 및 유전정보 전달, 자료출처: Nat Rev Immunol. 2014.>

- 미세소포체는 위산, 타액, 소화효소 등에 의해서도 분해되지 않는 구조적으로 매우 안정한 상태로 존재하며 주사제 외에서 경구 투여가 가능한 점, 생적합성 (biocompatible)을 가지고 독성이 매우 적으며 면역반응을 회피 할 수 있음 점, 기존에 사용되던 전달체의 낮은 전달 효율을 극복할 수 있는 점, 기존의 전달체로는 전달이 어려운 생물학적장벽(biological barriers)을 쉽게 통과할 수 있는 점 등의 치료용 소재로서 장점을 가지고 있어 현재 대부분의 미세소포체 소재 개발은 질환의 치료에 목적을 두는 신약개발에 초점을 맞추고 있음.

3. 케피어를 이용한 정장용 미세소포체 식품신소재 개발 필요성

- 최근 프로바이오틱스 이외에도 장내 세균총을 개선하여 면역력을 활성화 시켜준다고 알려진 케피어(kefir)에 대한 관심이 높아지고 있음. 케피어는 코카사스 지방에서 Saccharomyces kefir 등의 젖당발효성효모 및 젖산균을 포함하는 케피아종을 종균 (starter)을 이용하여 소, 양, 염소 등의 젖을 발효시켜 만든 유익균 군집임. 케피어(티벳버섯)는 버섯이 아니지만 종균으로 사용되는 Kefir grain의 모양이 몽글몽글 덩어리져 있기 때문에 일반인들은 티벳버섯, 하얀버섯, 혹은 요구르트 버섯이라고도 알려짐.



<Structure of kefir grain>

Electron microscope of kefir grain

<케피어의 형태와 전자현미경 사진>

- Kefir grain에 존재하는 유산균에 의해 생산되는 케피란(kefiran)은 면역증강 및 항암효과가 있는 수용성 다당복합체로 알려졌고 케피어 종균은 염증성 대장염이나 항생제로 인한 설사, 클로스트리듐 디피실리균 독성에 의한 대장염, 염증성 설사, 간성 뇌병증, 과민성 대장 증후군, 알레르기 등과 같은 몇 가지 위장관계 질환에 도움을 준다고 알려짐.
- 하지만 케피어는 대부분 가정에서 직접 발효시켜 섭취하기 때문에 다른 미생물의 오염이나 발효조건이 일정하지 않은 환경에 의한 균주의 변질 가능성을 지니는 문제점을 가지고 있어 가공기술의 위생적이고 과학적인 접근과 제조방법의 표준화와 규격화가 필요함.
- 케피어가 장 건강에 도움이 된다고 잘 알려져 있기는 하지만, 사람에 따라 프로바이오틱스나 케피어에 의해 복부팽창감을 유발하거나 장내 가스가 지나치게 차는 등의 부작용도 보고되고 있고 프로바이오틱스 제품에 들어있는 특정 성분에 알레르기가 있는 사람은 프로바이오틱스를 섭취하거나 사용해서는 안 된다는 단점이 있으며, 유당민감성인 사람의 경우 프로바이오틱스가 들어있는 유제품을 섭취하고 난 후 복부 불편감이나 설사를 유발시킬 수 있음.
- 또한 유제품 형태의 프로바이오틱스나 케피어 제품은 보존기간이 보통 3주 안팎으로 짧아 판매와 보관에 어려움을 가지고 있고 건조 형태의 파우더 제품은 장기간 보존이 가능하지만 이들은 생물학적 제제로 보존기간 경과에 따른 생리활성이 감소되는 문제점을 가지고 있어 보관과 유통이 용이하고 보존기간과 상관없이 일정한 생리활성을 가지는 새로운 형태의 케피어 유래 식품소재 개발이 필요함.

- 따라서 기존 유익균이 가지는 부작용을 최소화하고 장건강 개선 효과를 극대화시킨 균주 유래 식품바이오 신소재 개발이 필요한 상황이며 미세소포체는 제조과정에서 유당을 제거할 수 있고, 장내에서 증식되지 않고 유효성분만 장내에 효과적으로 흡수되어 생리활성을 가지기 때문에 식품신소재 개발에 최적화된 후보 물질임.

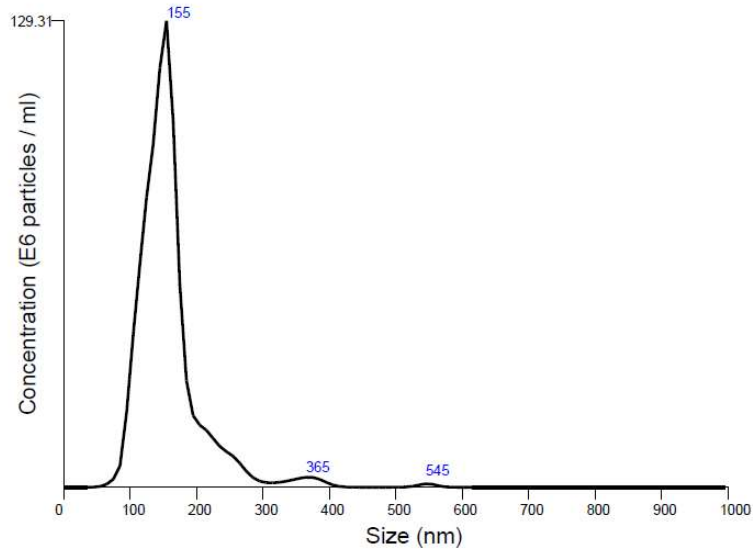
4. 자사의 선행연구 결과

가. 천연물 유래의 미세소낭 분리 방법 모색

- 최근 다양한 세포에서 분비되는 세포외 소낭(extracellular vesicle)에 대한 구체적인 연구가 여러 분야에서 시작되었고, 그 중 치료 및 진단에 응용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있음. 세포외 소낭에는 다양한 크기와 성분을 가지고 있으며, 분비되는 기원 또는 소낭의 크기 형태에 따라 응용 범위가 다양함. 세포외 소낭은 그 크기와 구성에서 이질성이 있고, 여러 가지 다른 종류의 막 소낭(membrane vesicle)들로 자멸소체(apoptotic body), 미세소낭 (Microvesicles)으로 구분됨. 미세소낭의 존재에 대한 연구는 오래전에 진행되었으나 그 특성, 기능, 적용 가능성 그리고 분리에 대한 연구는 최근 2~3년 사이에 활발하게 진행되고 있음. 하지만 대부분이 동물 및 인체 유래 세포 및 체액에서 분비되는 미세소낭 연구이며, 미생물 내에 존재하거나 미생물이 분비하는 미세소낭 연구는 매우 미비한 실정임. 미생물 유래의 식품 소재를 발굴하기 위하여 미생물 유래 미세소포체를 다양한 미세소포체 분리법을 이용하여 미생물 유래 미세소포체를 준비하였음.

나. 분리된 미생물 유래의 미세소포체 형태적, 분자적 특성 분석

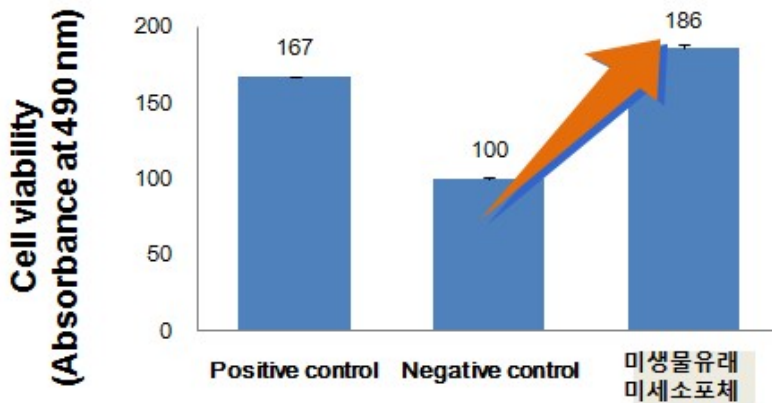
- 분리된 미세소포체는 Nanoparticle Tracking Analysis(NTA, 나노 입자 추적 분석)기기를 사용하여 나노 입자의 특성을 분석하였음. 미세소포체를 분리 한 후 nano-particles의 경향을 확인한 결과 평균 크기는 153.2nm 이고, 미세소포체 입자의 수는 평균 $2.49 \times 10^8 \sim 6.91 \times 10^8$ particles/ml 임을 확인하였음. 따라서 자사가 개발한 분리 방법에 따른 미생물 유래 미세소포체는 그 크기가 100-200 nm의 범위에 존재하는 nano size로 분리된 것을 확인하였음.



<나노입자추적분석기를 통해 미세소포체의 크기 및 수 분석>

다. 미생물 유래 미세소포체의 인간 모유두 세포 증식능 확인

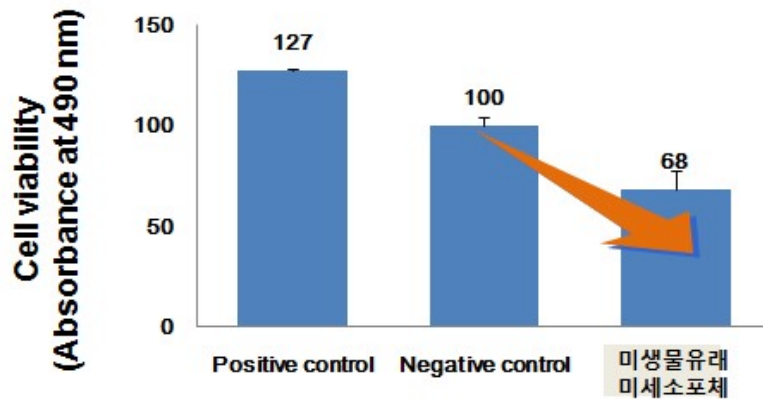
- 인간 모유두 세포(dermal papilla cells)는 모낭 주위를 둘러싼 피부세포로서 모발이 자라는데 중요한 역할을 함. 우리는 생물학적 in vitro system에서 미생물유래 미세소포체가 모유두 세포에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행함.
- 인간 모유두 세포에 미생물유래 미세소포체를 처리하였음. 48시간 후에 MTS assay(cell viability)를 통하여 측정함. 그 결과 미생물 유래 미세소포체 처리군에서 인간 모유두 세포의 증식률이 약 86%가 증식한 것을 확인함으로써, 모발생성을 돕는 식품보조제 소재로의 가능성을 확인함.



< 미생물 유래 미세소포체 처리 후 인간 모유두 세포의 증식능 비교>

라. 미생물 유래 미세소포체의 피부암세포 증식 억제능 확인

- 우리는 생물학적 in vitro system에서 미생물유래 미세소포체가 피부암세포에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행함.
- 피부암세포에 미생물유래 미세소포체를 처리하였음. 48시간 후에 MTS assay(cell viability)를 통하여 측정함. 그 결과 미생물 유래 미세소포체 처리군에서 피부암세포의 증식이 약 32%가 감소된 것을 확인함으로써, 암 억제를 돕는 식품 보조제 소재로의 가능성을 확인함.



<미생물 유래 미세소포체 처리 후 피부암세포 억제능 비교>

제 3절 연구개발 범위

<p>주요 연구 1</p>	<p>복합 발효유 내 존재하는 케피어 유래 미세소포체 분리 방법 최적화</p>	<p>연구방법 1.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 다양한 배양 조건에서 미세소포체 분리 효율 확인 • 표지인자 확인을 통한 분리된 미세소포체를 검증
<p>주요 연구 2</p>	<p>발효유 내 존재하는 케피어가 생산하는 미세소포체의 과민성 대장증후군 개선 효과 확인</p>	<p>연구방법 2.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 항염증 활성 평가를 위한 세포모델 확립 • 미세소포체의 생물학적 안전성 확인 • 동물모델에서 케피어 유래 미세소포체에 항염증 활성 평가
<p>주요 연구 3</p>	<p>새로운 바이오식품 소재로서의 타당성 확인</p>	<p>연구방법 3.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 케피어 유래 미세소포체의 보존성 확인 • 식품바이오 신소재로써 지적재산권 획득방향 모색

제 2장 국내외 기술개발 현황

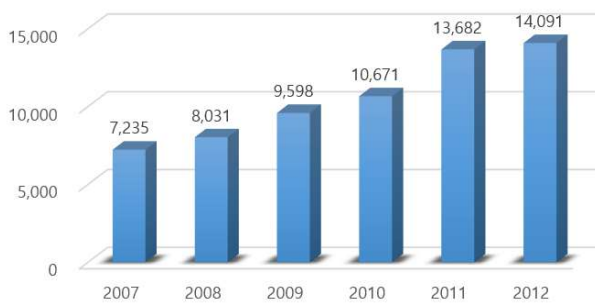
코드번호

D-04

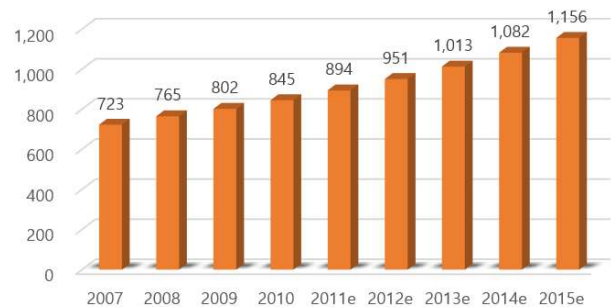
제 1절 과민성 대장 증후군 관련 기능성 식품 현황

- 현재 국내 일반 식품시장은 거의 포화된 상태로 연간 1%도 안되는 성장률을 보이고 있음. 하지만 기능식품 시장은 매년 고성장세를 보이고 있고 이미 건강 기능식품 시장은 2012년 1조 4천억원의 시장 규모로 성장해 있으며 식품에 대한 소비자들의 인식 수준이 높아져 지속적인 성장세를 보일 것으로 예측됨.
- Nutrition Business Journal(2012)의 자료에 따르면 2010년 건강 기능식품 세계시장 규모는 약 845억 달러로 5.4%의 성장률을 보이고 있음. 특히 여러 국가들이 선진국가로 들어서면서 소아비만 및 성인병에 대한 경각심이 부각되어 식품 소비경향이 변화됨에 따라 세계의 기능성식품 시장은 꾸준한 성장세를 보일 것으로 보임.

국내 건강기능식품 총 생산액



건강기능식품 세계 시장 규모



<건강기능식품 시장 규모, 자료출처: 식약처, Nutrition Business journal(2012)>

- 우리나라 건강기능식품 시장은 신제품 개발에 의한 국내 생산품 판매 향상 보다는 수입 관제품 증가로 인한 수입의존도가 높은 특징을 가진. 하지만 환율 변동에 시장의 성장 이 영향을 받아 최근 자체 연구개발을 통해 신제품 개발 등 집중 투자를 통해 이러한 현상이 두드러지고 있고 앞으로도 업계의 연구개발비 비율을 높일 필요가 있음.
- 하지만 국내 건강기능식품을 생산하는 기업은 대부분 영세한 중소기업체로 수입품 등의 저가 공세, 환율 상승에 따른 수입 원료의 원가 부담 등으로 운영에 어려움 많아 연구개발에 투자할 여력이 충분하지 않기 때문에 국가적 차원의 지원이 절실한 상황임.
- 2014년 식품의약품안전처 자료에 따르면 장 건강과 관련해 인증된 원료는 19종으로 대부분 울리고당에 국한되어 있으며, 이와 관련된 기능성 건강식품으로 식물과 프로바이오틱스가 혼합된 형태로 시판되고 있음. 하지만 과민성 대장 증후군 관련 정장용 건강기능

식품은 요구 수요에 비해 시판되는 제품은 많지 않기 때문에 이미 포화상태에 있는 체지방감소, 간건강, 기억력·혈행개선과 같은 기능성 원료에 비해 투자가치가 높은 개발 소재임.

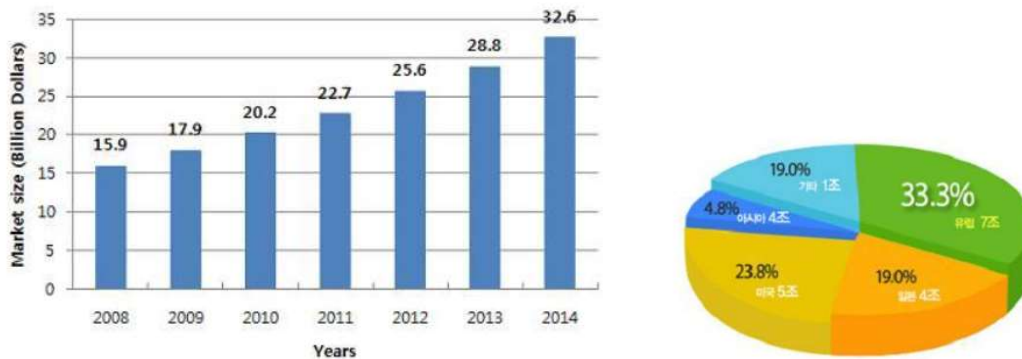
제품명	제조사	주요성분	가격(원)	효능
오만디환	선경 바이오	오만둥이, 강황, 영경귀, 솔잎, 민들레	60,000	과민성 대장, 복부팽만감, 가스 참 등의 증상에 호전을 보임.
류코바C	㈜다이아 텍코리아	IgG, IgA, IgM, IGF-1, IGF-2, 락토펜린	48,000	면역인자로 인해 장내세균의 증식억제 및 독소물질 전이 억제
홍삼유산균	㈜한국 인삼공사	사포닌(Rb1, Rd, Rg1, Rg3, Rh1), 프로바이오틱스	70,000	면역력 증진, 피로개선, 혈소판 응집 억제 및 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원활에 도움
청인발효유산균	㈜힐링 바이오	곡류혼합분말, 미강, 현미, 팥쌀 등 식물성혼합 추출물 함유	129,000	17종 곡류를 발효시켜 얻은 슈퍼유산균(SJP)이 1-10억마리가 생존하여 장내생태계를 복원함
식물성유산균 페디락	제이나인 바이오	현미, 대두, 보리, 흑미, 수수 등 식물성유산균 배양액 분말	66,000	장 건강에 좋은 식물성 유산균이 대장을 건강하게 함

<과민성 대장 증후군 관련 식품 현황>

제 2절 프로바이오틱스 관련 시장현황

- 프로바이오틱스(Probiotics: ‘적당량을 섭취했을 때 인체에 이로움을 주는 살아있는 미생물’을 총칭)는 건강에 유익한 박테리아로서 ‘친절한 미생물’이라고도 불리며, 소장의 정상 세균총을 균집시키고 병을 유발할 수 있는 미생물은 제거하는 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 이러한 역할 덕분에 장내 세균총이 적절한 균형 상태를 유지하게 됨. 또한 해로운 미생물과 경쟁하며 장내 해로운 미생물의 성장을 억제하는 물질을 생산함.
- 국내 프로바이오틱스 원료시장은 유산균산업 모두를 합칠 경우 약 500억 원 규모로, 쉐바이오텍, 씨티바이오, 메디오젠, 프로바이오틱, 뉴팜, 비피도, 에이엠바이오 등이 주도하고 있으며, 이외에도 피엘바이오, 바이오리듬, 일동제약 등이 있음.

- 세계 프로바이오틱스 시장은 연평균 12.6%의 성장률로 2014년에는 326억 달러에 이를 것으로 예상되고 있으며 미국의 프로바이오틱스 시장은 치료약에서 예방약으로 빠르게 전환하면서 의약품 개발성향까지 변화를 유도하고 있으며, 중국은 유산균 제조공장을 건설하면서 세계 프로바이오틱스 공급기지로 변모하고 있음.



<세계 프로바이오틱스 시장 규모. 자료출처: Markets and Markets, <http://www.cellbiotech.com>>

제 3절 미세소포체를 이용한 식품바이오 신소재 개발 현황

- 최근 바이오분야에서 주목하고 있는 미세소포체 소재는 미래성장동력산업 중에 하나로 미국국립보건원(NIH)에서 한해에만 미세소포체 연구에 1천 7백만달러 규모의 연구 사업을 지원(출처:미국국립보건원 소식지, 2013)하고 있고 최근 우리정부에서도 미래유망분야의 차세대바이오 물질로 미세소포체를 선정하고 국책연구사업으로 적극적인 투자를 하고 있는 상황임.

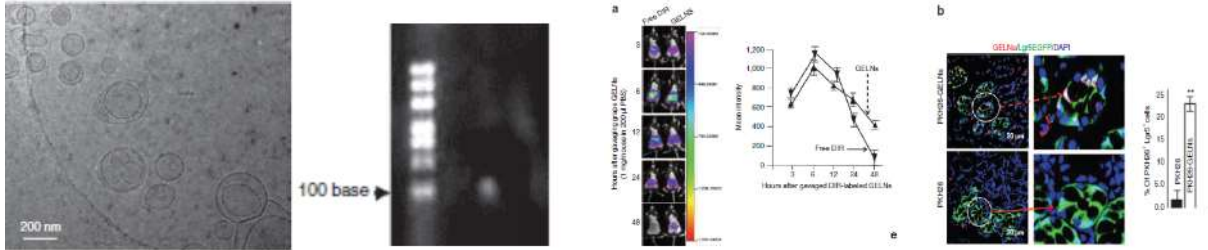
신약 · 차세대바이오 중점기술분야

분야	중점 기술분야
G:차세대 바이오	G-1. Protein Metabolism and Disease
	G-2. New Frontiers in Aging Science
	G-3. Receptors and Disease
	G-4. Synthetic Biology
	G-5. Emerging Cytokine Networks
	G-6. Mitochondrial Dynamics and Physiology
	G-7. Lipid Pathways in Biology and Disease
	G-8. Fibrosis : From Bench to Bedside
	G-9. Autophagy : Fundamentals to Disease
	G-10. New Frontiers in Cardiovascular disease
	G-11. Tumor Metabolism
	G-12. Precision Genome Engineering and Synthetic Biology: Designing Genomes and Pathways
	G-13. Advances in the Knowledge and Treatment of Autoimmunity
	G-14. Sensory System: From Genes to Behavior
	G-15. Ion Channels : Channel Structure, Function, Disease and Drugs
	G-16. Oxygen and Diseases
	G-17. Exosome(미세소포체): Emerging Biology and Pathophysiology
	G-18. Inflammatory Diseases : Recent Advances in Basic and Translational Research and Therapeutic Treatments

<차세대바이오 중점기술 분야에 포함된 미세소포체, 자료출처: 한국과학재단>

- 하지만 특정 치료성분만을 포함하는 미세소포체의 분리 기술이 아직까지 확보되지 않았고 이러한 기술을 개발하더라도 미세소포체를 이용한 신약개발은 특정 질병에 대한 약효를 가질 수 있는 표적 후보들을 확인하는 데서부터 이들 추출 방법의 개발, 임상 전 시험을 통한 약리학적 특성과 독성 등을 확인하고 최종적으로 사람을 상대로 3단계 임상시험을 거쳐야하기 때문에 천문학적인 비용이 소요되는 문제점을 가진.
- 미세소포체는 피부재생, 노화, 항산화 개선, 면역력 증강에 도움을 주는 다양한 호르몬과 성장인자를 포함하고 있기 때문에 의약품 이외에 식품개발에도 매력적인 소재이나 대부분의 미세소포체 소재 연구가 동물 유래 미세소포체에 국한되어 있어 새로운 소재를 발굴한다 하더라도 동물 자원의 경우 혈액, 혈장, 타액(침), 점액 등의 체액 (body fluid) 혹은 동물세포 배양액에서 다량의 미세소포체를 얻기 어렵기 때문에 대량생산이 어려워 산업화가 쉽지 않은 문제점을 가지고 있음.
- 따라서 향후 미세소포체 소재 개발은 위에서 언급한 문제점을 해결하기 위한 방향으로 진행될 것으로 보이며 현재의 개발 동향으로 유추해 볼 때 2~3년 내에 산업화로 진입하여 새로운 소재 시장을 형성할 것으로 예측됨.

- 아직 많은 연구결과는 아니지만 최근에 동물세포 이외에 식물과 유산균에서도 미세소포체의 존재가 확인되고 동물세포에 높은 장내 흡수율을 보이는 것이 확인됨. 미세소포체를 이용한 소재 개발에 가장 큰 걸림돌인 대량생산 문제를 식물 혹은 유산균 유래 미세소포체를 이용하여 회피할 수 있는 가능성이 확인되고 있음.



<식품 유래 미세소포체의 장내 흡수 효과 확인, 자료출처: Ju S et al. Mol Ther. 2013>

- 그러므로 유산균과 같은 균주에서의 고효율의 미세소포체를 분리, 생산하는 기술을 확보한다면 미세소포체 소재의 산업기술적 패러다임 발전과 관련 기술을 선도적으로 이끌어 나갈 수 있으며 새롭게 형성될 미세소포체 식품소재 시장에서 경쟁적 우위를 확보할 수 있을 것임.

제 3장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제 1절 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

1. 추진전략

- 미세소포체 시료 취급의 전문성 체계화

- 다년간 미세소포체 기술 연구와 추출 수득의 효율을 높이기 위한 다양한 동·식물 유래 미세소포체 연구를 수행한 노하우를 최대한 활용.
- 특히, 미세소포체를 이용한 화장품 개발 경험을 적극 활용하여 시료를 취급하는 단계에서부터 일관성 있고 전문성을 극대화하는 방안을 모색하고 체계적인 방법을 도입함.

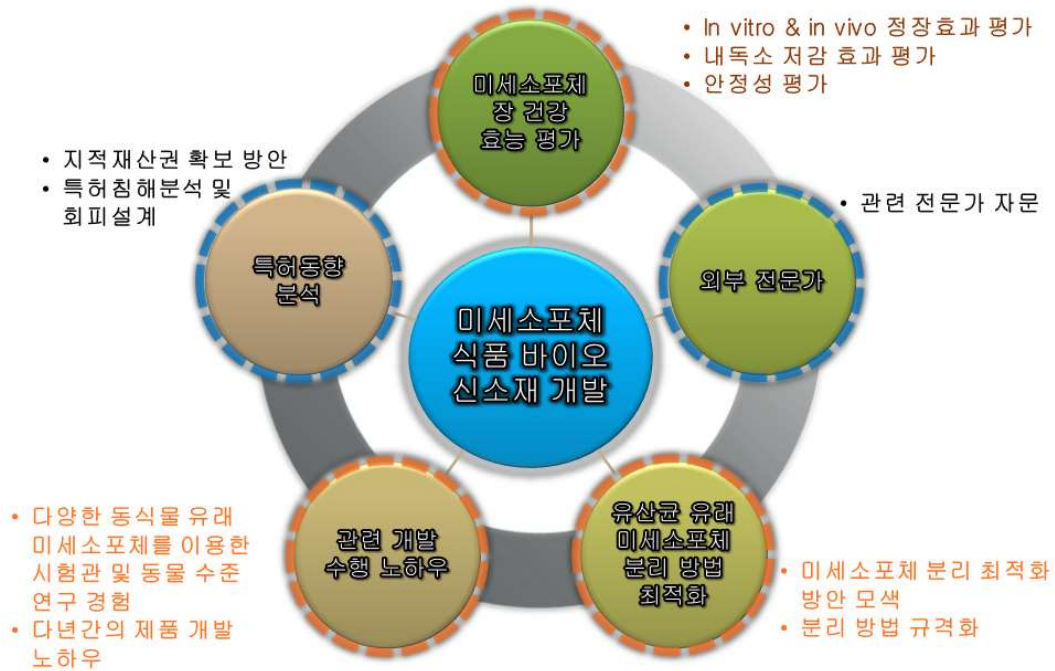
- 식품바이오 신소재의 지적재산권 확보

- 유산균 유래 미세소포체의 양뿐만 아니라 질적인 평가를 동시 진행할 수 있고, 기존에 개발된 기능성식품의 단점을 보완하고 과민성 대장 증후군 완화 효과를 극대화한 식품바이오 신소재를 개발하여 지적재산권을 확보함.

- 외부 전문가 활용 방안

- 본 연구에서 개발할 식품바이오 신소재에 대한 기술·산업적 가치를 분석하고 기술 개발 수행 시 사업화 가능성 및 경제성 등을 평가하기 위해 전문기관을 적극 활용할 것임.
- 특허분석 전문기관인 본 기업 담당 특허법인은 특허, 상표, 디자인과 같은 지적 권 출원 및 등록과 기술 이전 및 기술사업화에 강점을 가진 전문 로펌임. 현재 25여명의 변리사, 4명의 박사, 4명의 기술가치평가사, 5명의 기술거래사 및 30여명 특허 전문 스템으로 구성되어 있음.

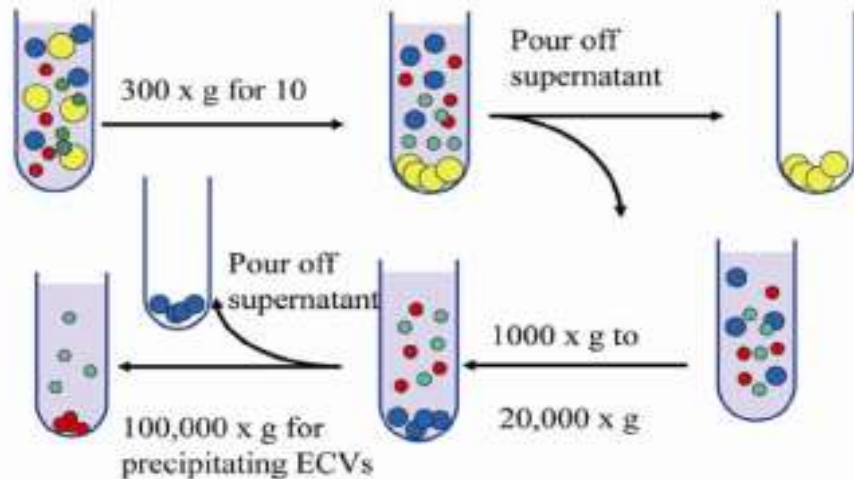
2. 추진체계



제 2절 연구내용

1. 케피어 유래 미세소포체 추출법 최적화

- 케피어 배양 조건(배양일, 배양액조성, 배양환경변화)을 성립하여 미세소포체를 추출하는 최적의 방법을 개발할 것임.
- 미세소포체 추출은 필터여과법(Filtration), 초고속원심분리법(Ultra-centrifugation), 상용화된 분리 키트(Exoquick) 방법 중에서 현 분야에서 가장 정확한 미세소포체 분리 방법으로 알려진 초고속원심분리법을 이용함.



〈고속원심분리법을 이용한 미세소포체 분리과정〉

- 각 조건별로 추출한 미세소포체에 대한 검증은 나노 입자의 시각화 및 분석을 위해 사용되는 장비인 나노입자분석기(Nanoparticle Tracking Analysis)를 이용한 나노입자 크기와 개수를 분석하고 Western blot과 실시간중합연쇄반응(Real-time PCR)을 이용한 미세소포체 표지인자를 확인함.
- 미세소포체가 세포막을 투과하여 세포 안으로 잘 흡수 되는지를 확인하기 위하여, 미세소포체를 형광 표지인자로 염색할 수 있는 PKH26 시약으로 염색한 후 사람 대장 상피를 구성하고 있는 인간 상피세포인 Caco-2 세포에 처리하여 일정시간 배양한 후 세포 내로 흡수 되는 것을 관찰.

2. 항염증 활성 평가를 위한 세포모델 확립

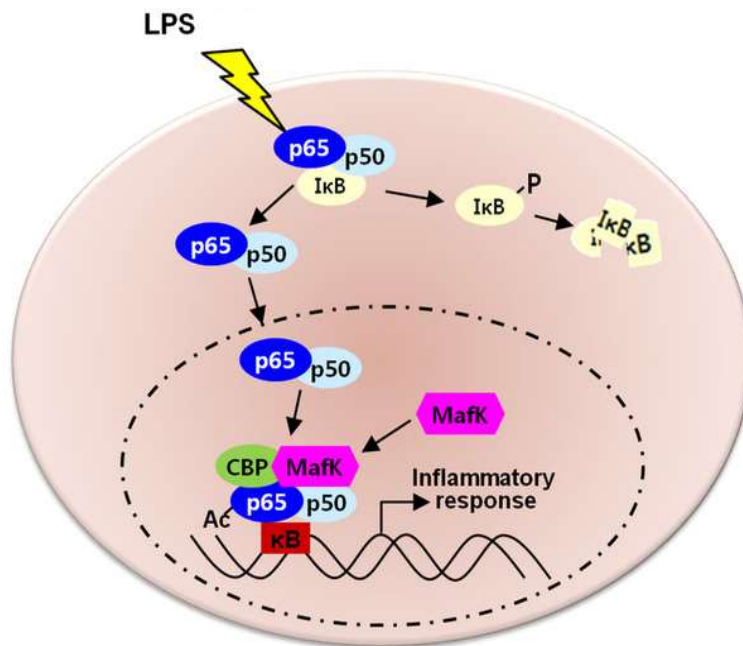
- 장 염증 완화활성을 평가하기 위해서는 후보 물질을 처리하기 위한 In vitro 모델이 필요함. 따라서 염증을 유발한 세포모델을 확립하여 후보 물질의 탐색에 이용할 예정임.
- 염증유발 세포주로 일반 장 상피 세포주인 Caco-2 세포를 한국세포주 은행에서 분양 받아 사용하고 Positive control로서 염증유발 물질인 염증 유발 물질로 LPS(lipopolysaccharides:염증유도물질)를 사용하여 LPS처리 농도에 따른 염증활성의 정도를 측정함.
- 염증 반응의 활성 정도는 pro-inflammatory cytokine인 Interleukin 8을 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정하고 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction을 시행하여 mRNA 발현 정도를 분석함.

3. 케피어 유래 미세소포체의 생물학적 안전성 및 증식 확인

- 세포수준에서 검증할 수 있는 분석체계를 구축하고 이를 조절하는 케피어 유래 미세소포체를 확보 한 후 그 활성을 분자생물학적으로 검증함으로써 생명기능연구를 수행하려 함. 우선적으로 인간 상피세포인 Caco-2 세포에 LPS를 주입한 뒤 케피어 유래 미세소포체를 처리해 세포 증식능을 MTS assay로 측정하고 세포 증식능을 억제하는 미세소포체를 확보함.

4. 케피어 유래 미세소포체에 대한 항염증 효과 검증

- 장염 후에 발생한 과민성 장 증후군은 추적 기간에 따라 다소 차이가 있으나 염증으로 인한 운동 변화에 기인됨. 염증 반응에는 다양한 사이토카인이 관여하며 친염증성 사이토카인인 TNF- α or IL-8의 발현이 특이적임. 따라서, LPS로 염증 유발된 Caco-2 세포에 케피어 유래 미세소포체를 처리하여 상등액을 채취한 후 TNF- α 와 IL-8의 발현의 감소를 통하여 케피어 유래 미세소포체의 장 질환 염증을 완화 및 억제함을 확인함.
- NF- κ B 는 DNA의 전사를 조절하는 단백질로 LPS 자극에 의해 I κ B를 활성화시켜 핵으로 들어가 염증반응을 유도함. 이 중 NF- κ B 의 subunit 인 p65(RelA)는 전사 활성 도메인을 가지고 있어 염증반응에 중요한 매개자로 알려짐. LPS로 염증 유발된 Caco-2 세포에 케피어 유래 미세소포체를 처리한 군과 대조군에서 활성화된 P65의 발현 정도를 Western blotting을 통해 단백질 발현이 저하정도를 측정하여 케피어 유래 미세소포체에 의한 장 질환 억제효과를 확인함.



<NF- κ B에 의한 염증반응 유발 기전>

- 또한 TNF-alpha와 INF-gamma와 같은 염증 유발 사이토카인 mRNA 억제 효과를 확인하기 위해 LPS로 염증 유발된 Caco-2 세포에 동정된 케피어 유래 미세소포체를 24 h 처리한 후 RNA를 추출하여 mRNA level에서 염증성 사이토카인 유전자의 발현 정도를 측정함.



<염증 유발 사이토카인 mRNA 억제 효과 확인 방법>

5. 항염증 활성 평가를 위한 동물모델 확립

- 장 염증 완화활성을 평가하기 위해서는 후보 물질을 처리하기 위한 동물 모델이 필요함. 따라서 염증을 유발한 동물모델을 확립하여 후보 물질의 탐색에 이용할 예정이다. 동물모델은 Specific-pathogen free (SPF) 상태의 6주령 SD rat을 중앙실험동물에서 구입하여 1주일 동안 순화 사육한 후 실험에 사용함.
- 대장염 유도 물질로는 점촉성 감작 알레르겐인 Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)를 에탄올과 함께 대장에 관장 투여하여 대장염을 유발할 것임. 에탄올은 점막장벽 (mucosal barrier)을 깨서 TNBS를 장벽으로 들어가게 하는 역할을 해줌.

종류	방법	병변	장점	단점
TNBS (Trinitrobenzene sulfonic acid)	·TNBS를 에탄올과 함께 대장에 관장 투여	수일 내에 급성 괴사와 염증. 그 후로는 단핵구 침윤 등과 함께 만성 염증	·값싼 쥐를 이용, 반복성, 전복성 궤양. ·사람의 염증성 장질환에 근접하다는 점	·TNBS와 에탄올 양을 쥐와 연구자에 따라 조절해야 함. ·병변이 국소적
DSS (Dextran sulfate sodium)	·5% DSS를 경구 섭취	초기 좌측대장에 발생하며 혈변, 체중 감소, 대장의 축소 및 점막 궤양 나중에는 만성 염증 유발됨.	·쉽게 재연할 수 있고 만성 염증 소견을 얻을 수 있음.	
IL-10 deficiency	·IL-10 유전자를 knockout	십이지장, 상부 공장, 상부 대장이 심함. 분절성인 경우 많음	·장의 점막 상피에 MHI II 항원이 높게 발현	·Th 1 반응에 치우쳐 있다.

<동물모델에서 대장염 유도 물질 종류>

- 50% 에탄올에 40 mg/mL로 녹인 TNBS를 100 μ l씩 항문을 통해 투여하여 장염을 유발하고 케피어 균주의 미세소포체를 대장염이 유발된 모델에 1주일에 2번씩 3주간 구강투여 한 후 대장염 유발 대조군과 실험군 간의 차이를 육안 및 염증인자 억제효과로 평가함.

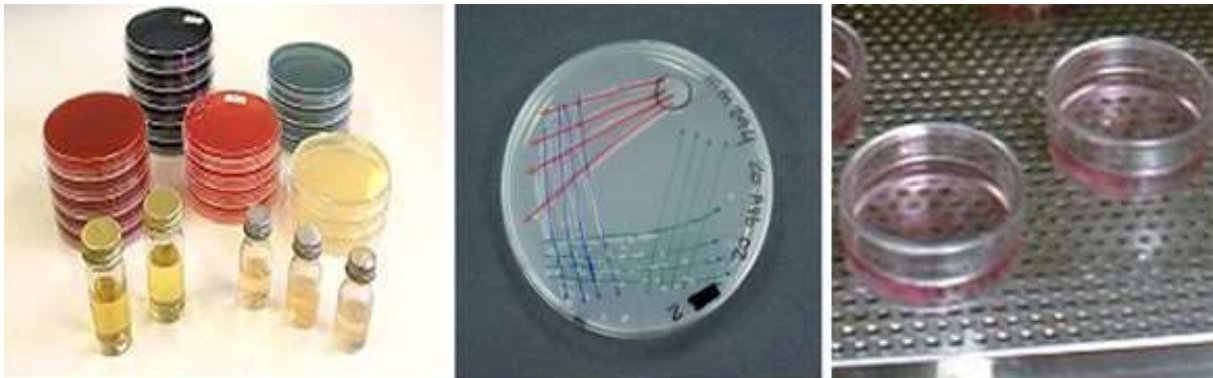
6. 동물모델에서 케피어 유래 미세소포체에 항염증 활성 평가

- Macroscopic assessment (육안으로 평가)
 - 절제한 대장을 종축으로 열고 생리식염수로 씻은 후, 직장에서부터 맹장까지 궤양과 미란 등의 병변이 있는지 관찰하여 케피어 균주의 미세소포체가 장 질환 염증을 완화 및 억제함을 확인함.
- Microscopic assessment (현미경으로 관찰)
 - 희생한 동물의 대장 말단 부분의 조직을 sampling하여 종축으로 열고, 10% formaldehyde (in PBS buffer) 용액에 고정시킴. 고농도의 에탄올에 탈수시키고, paraffin block을 제작함. Deparaffinized 시켜서 section하고 자른 section을 슬라이드 글라스 위에 놓고 hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하여 케피어 균주의 미세소포체가 장 질환 염증을 완화하는지 확인함.
- MPO (Myeloperoxidase) activity
 - Myeloperoxidase(MPO)는 중성구의 neutrophilic granule에 풍부하게 존재하는 효소로서 염증이 발생하여 중성구가 활성화되면 분비가 증가되므로 조직의 염증 정도를

나타내는 양적 지표로 사용됨. 점막을 50 mg을 취하여 0.5% hexadecyl-trimethylammonium bromide (HETAB) 와 10 mM EDTA가 포함된 10 mM PBS, pH 7.0, 1 mL을 넣어 vortexing함. -70°C로 얼렸다 녹이기를 3번 반복하고 원심분리 후 상층액을 취하여 1.6 mM tetramethyl benzidine (TMB)를 넣고 발색 후 catalase (20 μ g/mL)와 0.2 M sodium acetate를 첨가하여 반응을 종결시킴. 655 nm에서 흡광도를 측정함. 염증 발현인자의 감소를 통하여 케피어 균주의 미세소포체가 장 질환염증을 완화 및 억제하는지 확인함.

7. 케피어 유래 미세소포체의 안정성 평가

- 복합 발효유에서 분리된 미세소포체의 생물학적 안정성을 확보하기 위해 관리해야 할 중요한 요소로 미생물 오염이 있음. 오염된 미생물을 포함한 미세소포체가 피부에 닿거나 인체 내로 섭취되었을 경우, 미생물 감염에 의한 심각한 질환을 야기시킬 수 있기 때문임.
- **육안 검사:** 미세소포체의 적정량을 시료에 혼합 후 다양한 시간 및 온도에 따른 부유물의 유무를 검사함. 혼탁한 정도, 부유물의 발생 등을 육안으로 확인할 수 있음.
- **미생물 검사:** 시료를 무균적으로 영양분이 함유된 적합한 배지(미생물 디스크)에 접종 후 호기성, 혐기성, 박테리아를 분별 할 수 있게 37°C에서 배양함. 배양 후 육안으로 관찰을 통하여 균의 유무를 판별할 수 있음.



<미생물배양검사, 자료출처: 삼육서울병원>

제 3절 연구개발성과

1. 연구성과

성과목표		사업화지표									연구기반지표						
		지식 재산권		기술실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	기타 (타 연구 활용 등)	
		특허 출원	특허 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문					학술 발표
											SC I	비 SC I					
1차 년도	목표	1		1				1				1					
	달성	1		1				1				1					
계		1		1				1				1					

2. 성과 내용

가. 특허출원

	특허명	출원번호
1	케피어 그래인을 포함하는 과민성 대장 증후군의 예방 또는 치료용 조성물	10-2016-0158710

관인생략


출원번호통지서


출원 일자 2016.11.25
특기 사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(DPB163602)
출원 번호 10-2016-0158710 (접수번호 1-1-2016-1158526-98)
출원인 명칭 (주)프로스테믹스(1-2015-065649-2)
대리인 성명 특허법인 정안(9-2012-100022-4)
발명자 성명 박은주 서민구 고성렬 최은욱 이원종
발명의 명칭 커피어 그레인을 포함하는 과민성 대장 증후군의 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.


【주소】 


【국적】 


【발명자】


【성명】 이원종

【성명의 영문표기】 Lee, Won Jong

【주민등록번호】 

【우편번호】 

【주소】 

【국적】 

【출원언어】 국어

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 115028-1

【부처명】 농림축산식품부

【연구관리 전문기관】 농림수산식품기술기획평가원

【연구사업명】 고부가가치식품기술개발사업

【연구과제명】 복합 발효유 유래 미세소포체를 이용한 식품바이오 신소재 개발

【기여율】 1/1

【주관기관】 (주)프로스테믹스

【연구기간】 2015. 10. 23 ~ 2016. 10. 22

<연구성과: 특허출원통지서>

나. SCI급 1건(심사중)

개제 연도	논문명	저자			학술지명	Vol (No.)	구 분
		주저자	교신 저자	공동저자			
1 2017	Effect of kefir-derived extracellular vesicles on inflammatory bowel disease in mice.	서민구, 박은주	김수	고성렬, 최은욱	PLOS ONE	(심사중)	SCI

메일

답장
전체 답장
전달
전체 전달
삭제
휴지통
인쇄
스팸 처리
폴더...
eml
닫기

제목	PLOS ONE: Notification of co-authorship on manuscript - [EMID:1553ce07feeb6116]
발신	em.pone.0.4fabb7.8cb1a4dc <em.pone.0.4fabb7.8cb1a4dc@editorialmanager.com> (2016-12-05 오후 09:12) 주소록 등록
수신	"Minkoo Seo" <minkoo@prostemics.com>

PONE-D-16-48001
Effect of kefir-derived extracellular vesicles on inflammatory bowel disease in mice.
Mrs. Sue Kim

Dear Minkoo Seo,

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to PLOS ONE and entitled "Effect of kefir-derived extracellular vesicles on inflammatory bowel disease in mice."

The corresponding author for the submission process is: Mrs. Sue Kim
The full author list for the submission is: Minkoo Seo; Eunjoo Park; Seongyeol Ko; Eunwook Choi; Sue Kim

If you are not aware of this submission, or if you should not be listed as a co-author, then please contact the journal office at plosone@plos.org.

Kind regards,

Order of Authors:	Minkoo Seo
	Eunjoo Park
	Seongyeol Ko
	Eunwook Choi
	Sue Kim
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure Please describe all sources of funding that have supported your work. This information is required for submission and will be published with your article, should it be accepted. A complete funding statement should do the following: Include grant numbers and the URLs of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding. Describe the role of any sponsors or funders in the study design, data	This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries(IPET) through High Value-added Food Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA)(115028-1)

<SCI 저널 submission 자료>

다. 기술이전(자체기술실시)

핵심기술명	커피어 그레인을 포함하는 과민성 대장 증후군의 예방 또는 치료용 식품 조성물		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	5,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체사업화)		
이전소요기간	2016. 11. 25.	실용화예상시기 ³⁾	3년
기술이전시 선행조건	-		

기술료 감면 신청서

(단위 : 원)

연구개발과제 현황	사업명	고부가가치식품개발 사업	연구과제번호	115028-1			
	연구과제명	복합 발효유 유래 미세소포체를 이용한 식품바이오 신소재 개발					
	연구기관명	프로스테믹스	연구책임자	최은옥	참여기업명	프로스테믹스	
	연구협약일	2015년 10월 23일	연구기간	2015. 10. 23. ~ 2016. 10. 22.			
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 ()	계		
50,000,000		16,700,000	-	66,700,000			
기술실시내용	성과활용명	커피어 그레인을 포함하는 과민성 대장 증후군의 예방 또는 치료용 식품 조성물		실시(활용)기간	프로스테믹스		
	지재산 종류	특허 출원		실시권 유형	직접 실시		
	* 지재산이 출원(특허)인 경우	명칭	커피어 그레인을 포함하는 과민성 대장 증후군의 예방 또는 치료용 식품 조성물			일자	2016.11.25
		번호	10-2016-0158710			일자	2016.11.25
	실시기관	기관명	프로스테믹스			기관유형	중소기업
		주소	서울시 강남구 언주로 708 3층			대표자	이원중
		사업자번호	114-87-18509			전화번호	02-2284-0220
부서(담당자)		기업부설연구소 (안지나 사원)			e-mail	dlwml@dsl11@pro-stemix.com	
기술료 감면	감면근거	-농림축산식품부 소관 농림수산물과학기술 육성법 시행령 제14조 제1항 3호 -농림축산식품부 소관 농림수산물과학기술 육성법 시행령 제14조 제2항		기술료 납부예정일	2016년 12월 30일		
	감면사유 및 내용	농림축산식품부 소관 농림수산물과학기술 육성법 시행령 제14조 제1항 3호와 농림축산식품부 소관 농림수산물과학기술 육성법 시행령 제14조 제2항에 의거하여 기술료를 감면하고자 신청함.					
	감면금액 산출내역	기술료 산정비율: 정부출연금 × 10%(중소기업) 50,000,000×0.1=5,000,000 감면금액산출내역: 중소기업 80% 감면, 기술료 일시납부 30% 감면 5,000,000×(1-0.8)×(1-0.3)=700,000 총 감면금액: 4,300,000 / 총 기술료 납부금액: 700,000					
<p>농림축산식품부 소관 연구개발사업 운영규정 제35조 제9항에 따라 위와 같이 기술료 감면신청서를 제출합니다.</p> <p>붙임 1. 연구개발과제 개요 1부. 2. 연구계획서 또는 연구결과보고서 등 1부. 3. 지식재산권을 포함하는 기술실시인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부.</p> <p style="text-align: center;">2016년 11월 25일</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관 프로스테믹스의 대표 이원중 [직인] 농림수산물기술기획평가원장 귀하</p>							



농림수산물기술기획평가원



수신자 (주)프로스테믹스 대표

(경유)

제목 기술료 감면 승인 알람((주)프로스테믹스)

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 기술료 감면 신청의 건(관리161128-01)과 관련됩니다.
3. 귀 기관에서 요청한 기술료 감면 건에 대해 아래와 같이 승인하오니 불임의 후속 조치 사항을 참조하시어 기술실시보고서 제출 및 기술료 납부에 차질이 없도록 진행해 주시기 바랍니다.

- 아 래 -

가. 승인내역

사업명	과제명	주관연구기관/실시기업	정부출연금	당초기술료*	최종 기술료**
고부가가치 식품기술 개발사업	복합 발효유 유래 미세소포체를 이용한 과민성대장증후군 개선 식품바이오 신소재 개발	(주)프로스테믹스/ (주)프로스테믹스	50,000천원	5,000천원 (정부출연금의 10%)	700천원 (참여 중소기업이 기술실시하는 경우 80% 감면, 일시납 추가감면 30%)

* 주관연구기관(영리)이 기술실시계약을 체결함에 따라 정부출연금의 10~40% 수준에서 정액으로 책정되는 정부납부기술료로 감면되기 이전의 금액

** 주관연구기관(영리)이 실시기업으로부터 징수하여 전문기관에 납부해야 하는 기술료(실시기업의 유형, 납부방식에 따라 기술료 감면을 적용한 금액)

나. 계좌내역

- 은행명 및 계좌번호 : 신한은행, 56210798938108
- 예금주 : 농림수산물기술기획평가원

다. 기술실시 이후 제출 서류 및 기한

- 기술실시보고서(감면승인 통보 후 3개월 이내), 전문기관에 납부한 기술료 입금증
- * 영리법인이 전문기관에 일시납 한 경우, 기술료 징수 및 사용현황 보고서를 별도 작성할 필요 없음

불 임. 농식품 R&D 과제 기술실시 계약 체결 후 조치사항 1부. 끝.

<연구성과: 기술이전(자체실시)>

라. 고용창출

- 박사급 연구원 1명 (커피어 유래 미세소포체 기능성 식품 소재 개발을 기획 및 개발하는 단계에서 관련 분야 박사급 연구원을 신규 채용함.)

제 4절 연구결과

1. 케피어 유래 미세소포체 추출법 최적화 방법 선별

Kefir 유래 미세소포체를 분리방법을 최적화하기 위하여 배양조건 설정 및 여러 분리 방법을 통해 최적화 하였다.

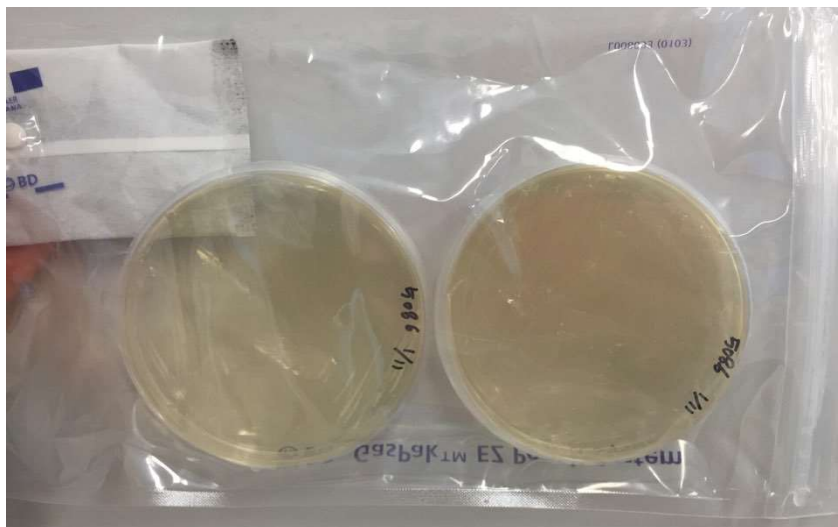
가. Lactobacillus 배양

(1) 균주 분양

균주번호	균주명	배양온도	산소요구성
5075	Lactobacillus kefirnofaciens subsp. kefirnofaciens	30	Anaerobic
5086	Lactobacillus kefirnofaciens subsp. kefirgranum	28	Anaerobic
3611	Lactobacillus kefir	30	Facultative Anaerobic

(2) 균주 배양

- 1) MRS broth를 구입하여 media를 PH 7.0 , PH5.2로 만든다.
- 2) 고체 배지에 ampoule로 구입한 균을 streaking 한다.
- 3) 30℃ incubator에서 배양한다. (혐기성 균이므로 anaerobic jar를 이용하여 배양)
- 4) colony를 따서 액체 배양한다. (혐기성을 유지하기 위해 배지를 가득 채워 배양)



<혐기성 균 배양>

나. 배양 기간별 kefir 유래 미세소포체

- 1) kefir 유래 대표 균주 ①Lactobacillus kefirifaciens subsp. Kefirifaciens ② Lactobacillus kefirifaciens subsp. Kefirgranum ③Lactobacillus kefirii 를 MRS 고체 배지에 Streaking 하여 37°C 배양 한다
- 2) 24hr 배양 후 colony를 small scale로 액체 배양 한다.
- 3) 24hr 배양 후 OD_{600} 값을 0.5로 맞춰서 large scale에서 기간 별로 액체 배양한다.
- 4) 1일차, 2일차, 3일차, 4일차, 7일차 배양한 배양액을 수거 한다.
- 5) Ultracentrifuge 를 이용하여 배양액에서 exosome 을 분리한다.
- 6) 분리된 exosome의 Protein과 NTA를 이용하여 Particle number를 측정한다.

다. 배양 기간에 따른 케피어 미세소포체 획득률 최적화 결과

(1) Bradford assay

산성 조건에서 Coomassie Brilliant Blue G-250이 단백질과 결합하여 푸른색으로 변하고 최대 흡수 파장이 595nm로 옮겨지는 것을 이용하여 단백질의 농도를 정량하는 방법이다. UV-Visible spectrophotometer를 이용, 흡광도를 측정하여 standard물질인 BSA(Bovine Serum Albumin)를 기준으로 sample의 단백질이 얼마만큼 들어있는지 측정한다.

- 1) 5X protein assay dye를 증류수를 이용하여 1X로 dilution한다.
- 2) 2mg/ml 농도의 Albumin 용액을 준비한다.
- 3) 2)의 용액을 이용하여 standard를 만든다
- 4) 3)에서 준비한 albumin 용액 20ul에 준비한 1X dye를 1ml 넣는다.
- 5) sample도 4)와 같은 방법으로 준비한다.
- 6) vortexing하여 잘 혼합한다.
- 7) spectrophotometer를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정한다.

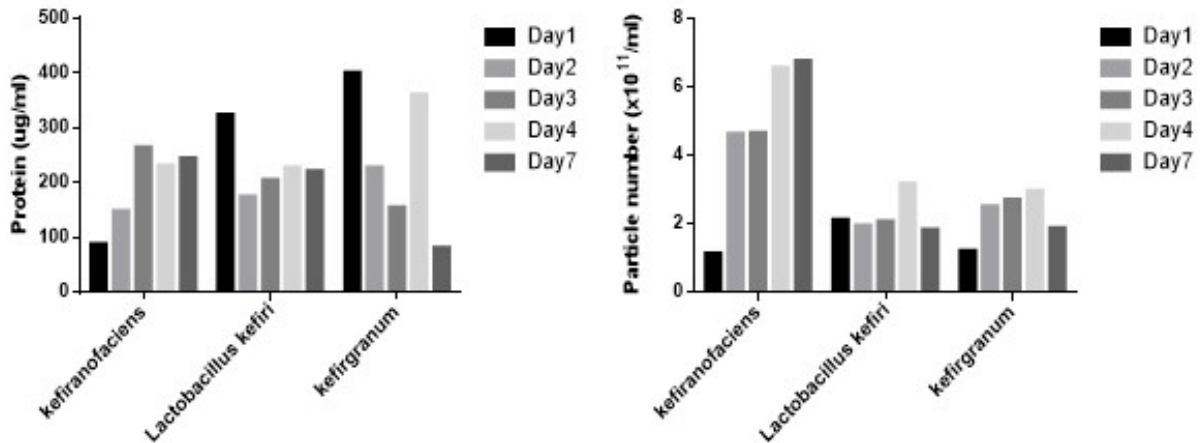
(2) Nanoparticle tracking analysis

나노 입자 추적 분석은 현탁액에서 시료의 입자 크기 분포를 얻기 위해 광 산란과 브라운 운동의 특성을 이용한다.

chamber에 레이저 광선을 통과시키면 현탁액에서 이 광선의 경로에 있는 입자가 빛을 산란시켜 카메라로 시각화 할 수 있다. 입자 크기, 농도를 측정할 수 있고, 입자의 양의 변화를 실시간으로 모니터링 가능하다.

kefir 유래 미세소포체 분리를 최적화하기 위하여 세 가지 균주의 배양기간을 설정하였

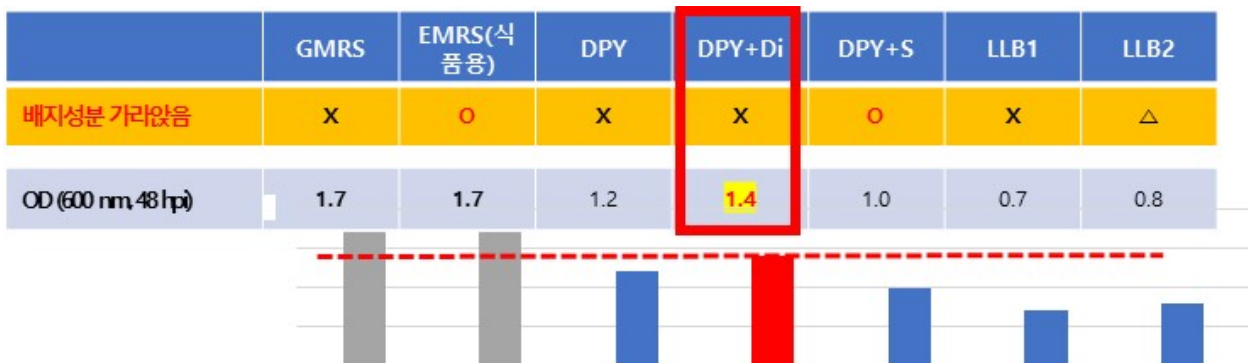
다. 균주의 액체배양 1, 2, 3, 4, 7일간 배양하여 배양액을 수거 하였다. 수거한 배양액을 Ultracentrifuge로 미세소포체를 분리하였다. 배양기간 별 미세소포체의 particle number를 측정하였다. 미세소포체의 protein 결과에서는 배양기간별 의존적인 결과는 얻지 못하였다. 균주마다는 다르지만 particle number는 4일 배양한 미세소포체의 수가 가장 최적화된 배양기간을 확인하였다.



<배양 날짜 별 protein 및 particle number>

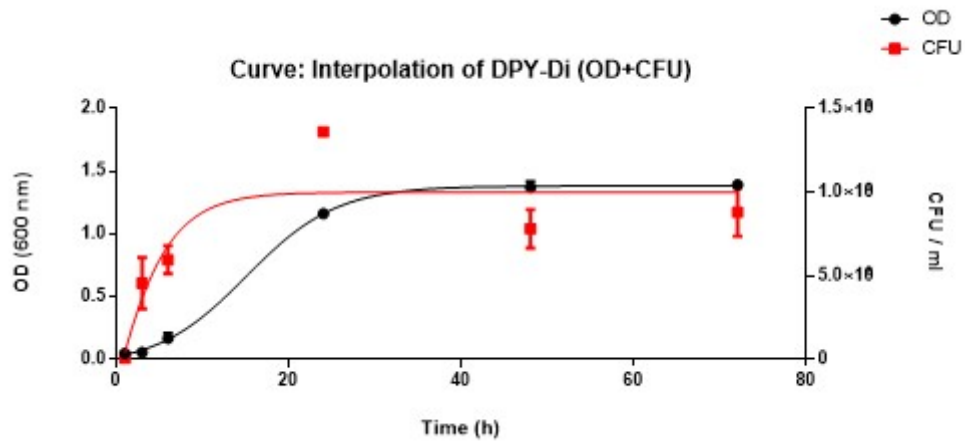
라. 배양 배지에 따른 케피어 미세소포체 획득률 최적화 결과

기존 kefir 배양 배지 조건을 modify하여 kefir의 배양 및 미세소포체 분비를 촉진 할 수 있는 배지 조건을 확인하였다. 배지 성분은 식품첨가물로 모두 변경하여 진행하였으며, 배지를 간소화하였다. 먼저 기존 배지로 균 성장 곡선 및 미세소포체의 분비 확인하였고, modify한 배지에서 불순물이 생기지 않는 배지의 조건을 찾았다.



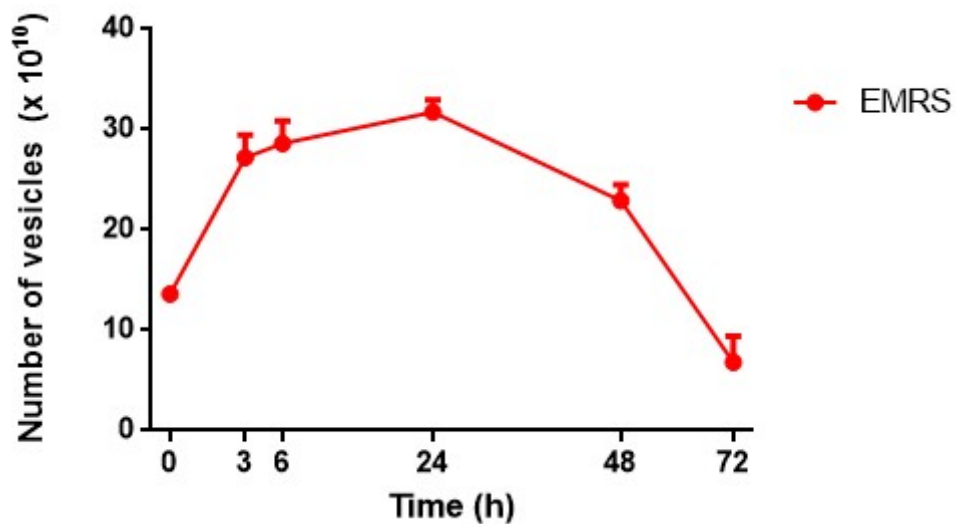
<배양 배지 별 OD값>

불순물이 생기지 않는 배지 조건을 확인하였고, OD값 측정으로 kefir 균의 배양에도 문제가 없음을 확인하였다. 간소화된 식품첨가물 배지에서 배양된 kefir의 OD값 확인 외에 생균수를 확인하기 위하여 성장곡선을 확인하였다.



<Growth curve>

최적화된 배지에서 kefir 성장에 문제가 없음을 확인하였고, 미세세포체의 분비를 확인하기 위하여 particle number를 확인하였다.

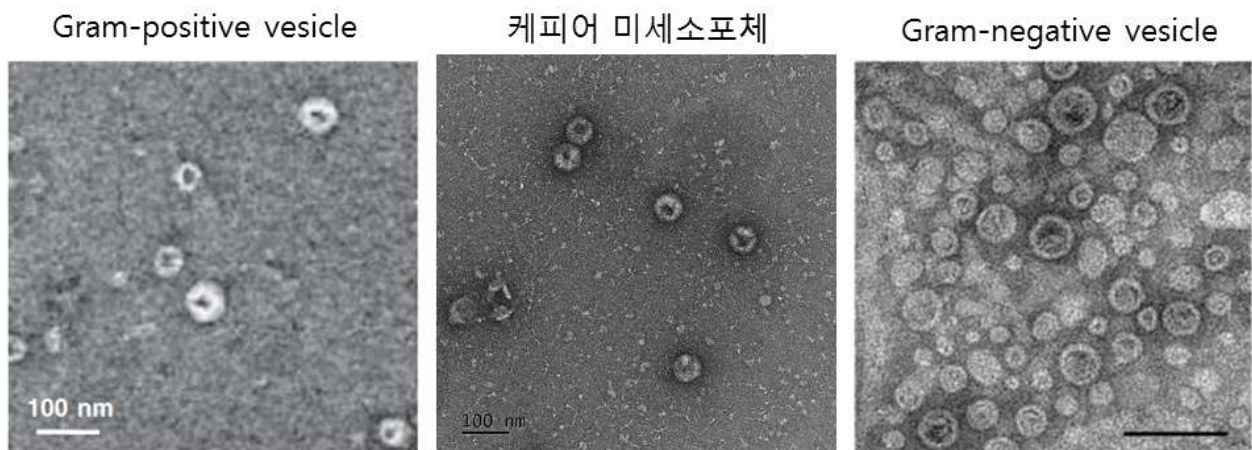


<최적화된 배지에서 분비된 미세세포체>

미세세포체의 수율이 높은 배양 시간을 알 수 있었고, modify된 배지에서 kefir 성장은 생균수를 통해 확인하여 최적화된 배지를 확립하였다.

마. 미세소포체 분리 방법에 따른 전자현미경(TEM) 분석

최적화된 kefir 유래 미세소포체를 TEM (Transmission Electron Microscope)으로 분석하여 기존의 알려진 미생물 유래 미세소포체와 비교하여 보았다. kefir 유래 미세소포체는 전자현미경상에서 60~100 nm 크기로 관찰되며 형태학적인 특성이 대장균과 같은 그람음성균에서 분리되는 미세소포체 보다 유산균과 같은 그람양성균에서 분리되는 미세소포체와 구조적으로 유사함을 확인하였다.



<케피어 유래 미세소포체 전자현미경 분석>

2. 분리 방법별 kefir 유래 미세소포체 획득률 확인

아래와 같이 3가지 방법을 이용하여 미세소포체를 분리하였고, 분리된 exosome은 NTA로 측정하여 나노입자수를 비교 하였다..

가. 미세소포체 분리 방법

(1) Ultracentrifuge를 이용한 미세소포체 분리

- 1) kefir 배양액을 300g , 4°C 10 min 원심 분리한다.
- 2) 상층액을 취하여 1200g, 4°C 20min 원심 분리한다.
- 3) 상층액을 취하여 10000g, 4°C 30min 원심 분리한다.
- 4) 상층액을 취하여 Ultracentrifuge를 이용하여 110000g 4°C 1hr 10min 원심 분리한다.
- 5) 상층액을 제거 후 침전물 (pellet)을 PBS 로 현탁 한다.

(2) ExoQuick-TCTM Exosome Precipitation Solution을 이용한 미세소포체 분리

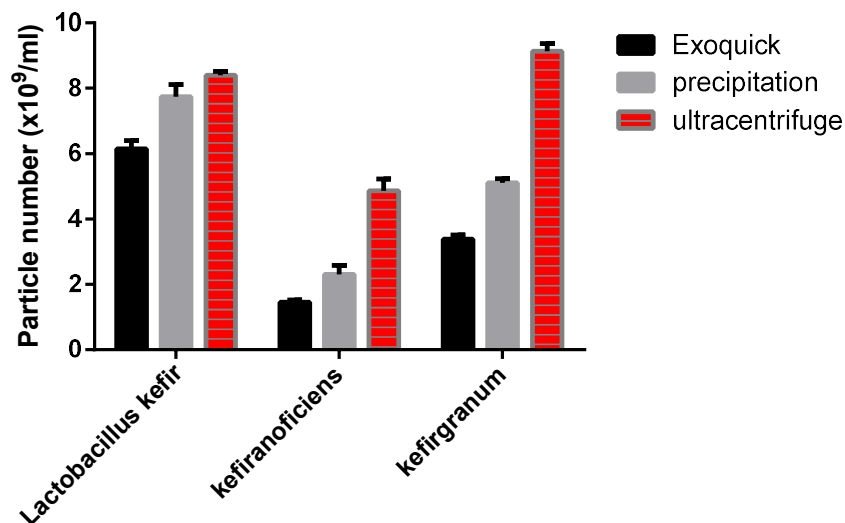
- 1) kefir 배양액을 3000g 15min 원심 분리함
- 2) Precipitation solution을 10ml당 2ml의 비율로 넣고 4°C overnight 배양.
- 3) 배양 후 1500g 30min 원심 분리함.
- 4) 상층액을 제거 후 1500g 30min 원심 분리함.
- 5) 상층액을 제거 후 침전물 (pellet)을 PBS 로 현탁 함

(3) Precipitation을 이용한 미세소포체 분리

- 1) kefir 배양액을 5000g 10min 원심 분리함
- 2) 1N Sodium acetate 10ml당 1ml의 비율로 넣고 ice에 45min 배양.
- 3) 5000g 10min 원심 분리함.
- 4) 상층액을 제거 후 침전물(pellet)을 0.1N Sodium acetate로 washing
- 5) 5000g 10min 원심 분리함.
- 6) 상층액을 제거 후 침전물 (pellet)을 PBS 로 현탁 함

나. 미세소포체 분리 방법에 따른 나노입자 획득을 비교 분석

kefir 유래 미세소포체의 분리방법을 최적화하기 위한 방법으로 여러 가지 추출법을 이용하여 분리하였다. 세 가지 분리 방법은 상기에 기술된 방법대로 수행하였다. 각 각 균주마다 분리 방법별 particle number의 차이는 보였지만, Ultracentrifuge 방법에서 미세소포체의 수율이 가장 높았다.



<분리 방법 별 나노입자수>

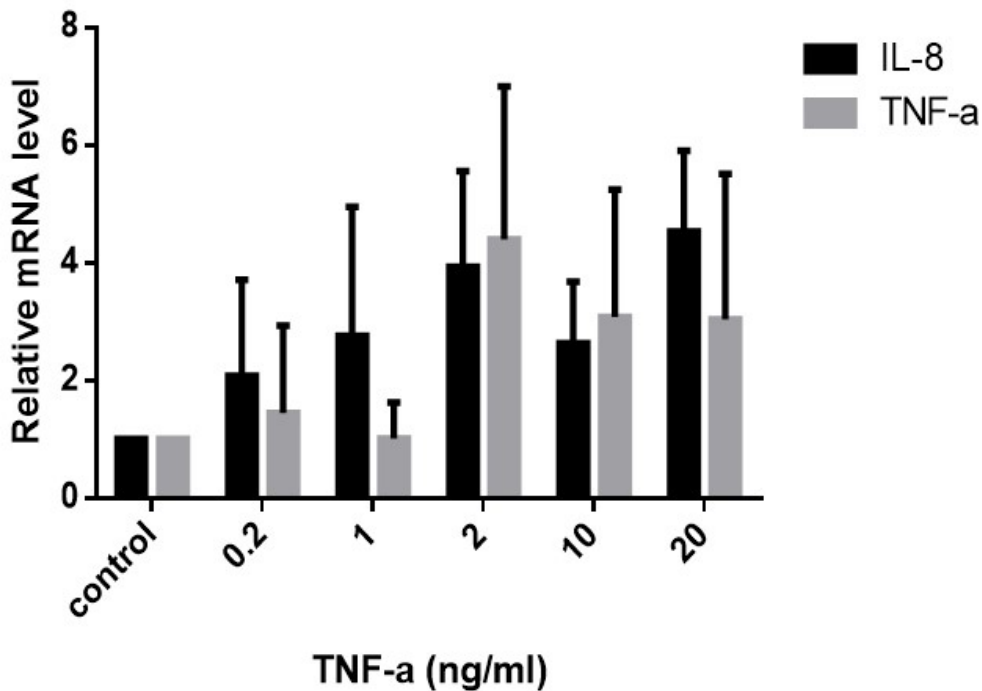
3. 항염증 활성 평가를 위한 세포모델 확립

장 염증 완화활성을 평가하기 위해서는 후보 물질을 처리하기 위한 염증 유발한 세포모델을 확립하였다. 염증유발 세포주로 일반 장 상피 세포주인 Caco-2 를 한국세포주 은행에서 분양받아 사용하고 Positive control로서 염증유발 물질인 염증 유발 물질로 TNF-a를 사용하여 농도에 따른 염증활성의 정도를 측정하였다.

가. Caco-2 세포에서 염증 유도조건 확립

- 1) Caco-2 세포를 1×10^5 cells 로 24well에 seeding 하였다.
- 2) 24시간 후, serum free media로 media change 하였다.
- 3) 24시간 후, 염증을 유도하기 위하여 TNF-a 0.2/1/2/10/20 ng/ml 를 처리하였다.
- 4) 6시간 후, RNA isolation 및 cDNA 합성하였다.
- 5) 염증인자 IL-8, TNF-a의 발현을 확인하였다.

대장 상피 세포주에서 염증 유도조건을 확립하기 위하여 염증유도 물질인 TNF-a를 농도별로 처리하여 염증 유도조건을 확인하였다. TNF-a 20ng에서 control 대비 염증인자의 발현이 약 4배 정도 증가하는 것을 확인하였다.



<염증 유도 조건 확립>

4. 케피어 유래 미세소포체의 생물학적 안전성 평가

Kefir exosome의 안전성 확인을 위하여 세포 내 수준에서 독성 test를 진행하였다.

가. 실험 방법

(1) kefir exosome의 안전성 확인 (3T3-L1)

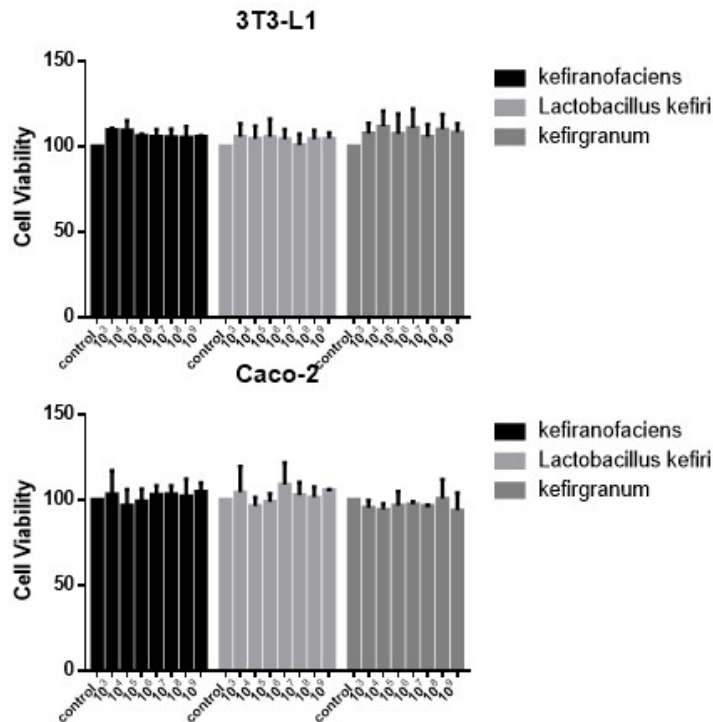
- 1) 3T3-L1을 1×10^4 cells/well 로 96well에 seeding.
- 2) 24시간 후, 각 균주의 particle number ($10^3 \sim 10^9$) 처리.
- 3) 24시간 후, MTS를 이용하여 측정.

(2) kefir exosome의 안전성 확인 (Caco-2)

- 1) Caco-2를 2.5×10^4 cells/well 로 96well에 seeding.
- 2) 24시간 후, 각 균주의 particle number ($10^3 \sim 10^9$) 처리.
- 3) 24시간 후, MTS를 이용하여 측정.

나. 연구 결과

kefir 유래 미세소포체의 생물학적 안전성 평가를 확인하기 위해 3T3-L1, Caco-2 세포를 사용하였다. 각 균주의 particle number를 $10^3 \sim 10^9$ 를 처리하여 결과를 확인하였을 때, 세 가지 균주의 모든 농도에서 독성이 없는 것을 확인하였다.



<세포독성 확인>

5. 케피어 유래 미세소포체에 대한 항염증 효과 검증

장염 후에 발생한 과민성 장 증후군은 추적 기간에 따라 다소 차이가 있으나 염증으로 인한 운동 변화에 기인된다. 염증 반응에는 다양한 사이토카인이 관여하며 친염증성 사이토카인인 TNF- α or IL-8의 발현이 특이적이다. 따라서 TNF- α 로 염증 유발된 Caco-2 세포에 케피어 유래 미세소포체를 처리하여 TNF- α 와 IL-8의 발현의 감소를 통하여 케피어 유래 미세소포체의 장 질환 염증을 완화 및 억제함을 확인하였다.

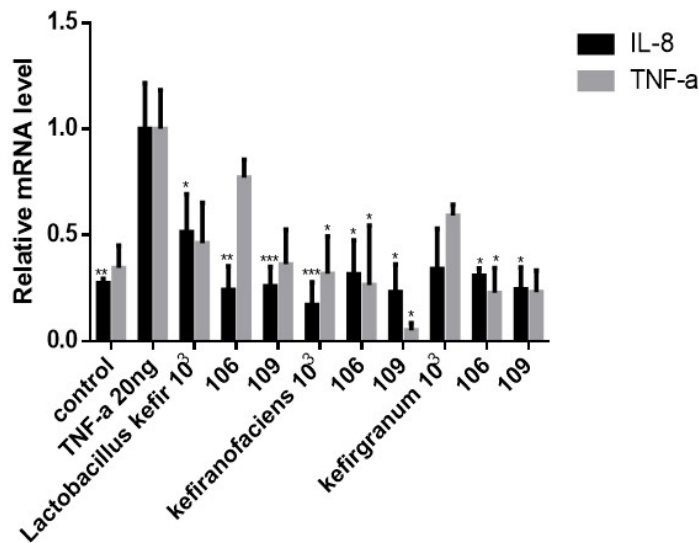
가. 연구 방법

(1) kefir exosome의 항염 효과 확인 (mRNA level)

- 1) Caco-2 세포를 1×10^6 cells 로 12well에 seeding.
- 2) 24시간 후, serum free media로 media change.
- 3) 24시간 후, 염증을 유도하기 위하여 TNF- α 20 ng/ml 처리.
- 4) 6시간 후, 각 균주의 particle number ($10^3/10^6/10^9$) 처리.
- 5) 24시간 후, RNA isolation.
- 6) 염증인자 IL-8, TNF- α 의 발현을 확인.

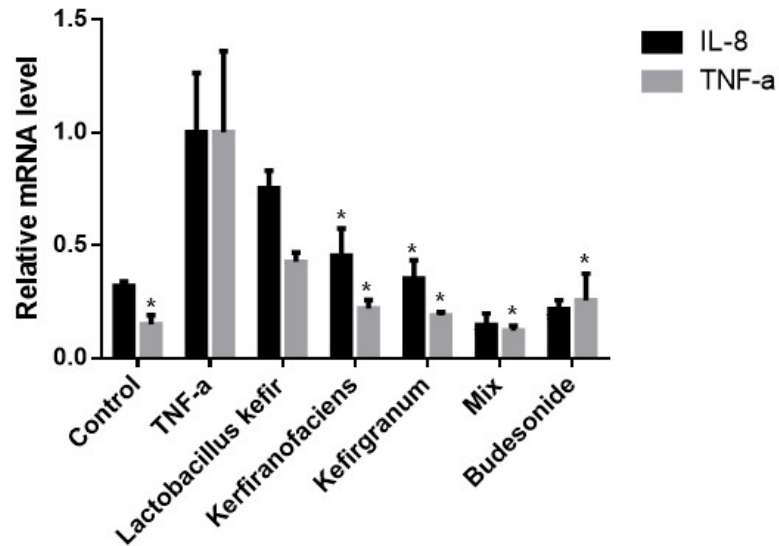
나. 연구 결과

케피어 유래 미세소포체의 과민성대장증후군 개선 효과 확인을 위하여 kefir exosome이 염증인자 감소에 영향을 미치는지 qPCR 을 통해 확인하였다. Kefir exosome을 particle number $10^3, 10^6, 10^9$ 로 처리하였을 때 처리하지 않고 염증을 유도한 조건에 비해 염증인자인 IL-8, TNF- α 의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 균주마다 조금씩 다른 결과를 보였지만 kefir exosome 의 항염증 효과를 확인할 수 있었다.



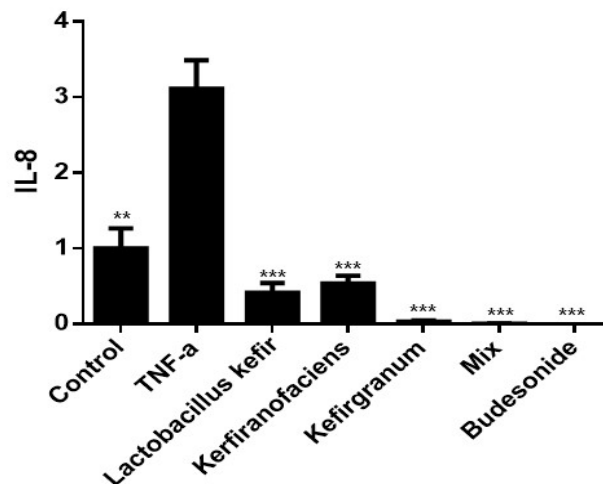
<미세소포체 항염증 효과 확인>

항염증 효과에서 세 가지 균주의 혼합으로 인한 시너지효과를 확인하기 위하여 각 균주의 처리와 혼합된 exosome을 처리하여 염증 인자를 확인하였다. 세 가지 균주를 각각 처리한 그룹에서 염증인자가 감소한 것을 확인하였고, mix한 그룹에서 시너지효과를 확인하였다.



<혼합 미세소포체의 항염증 효과 확인>

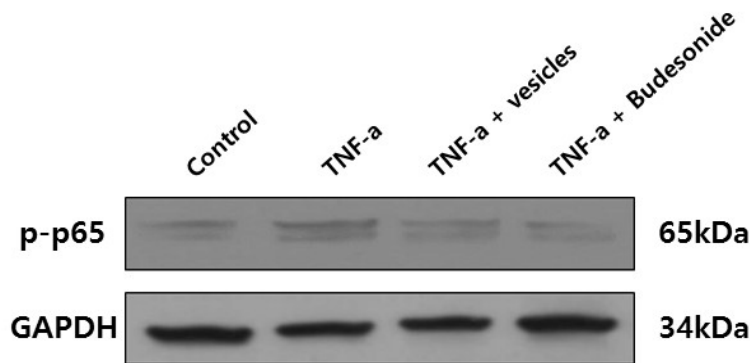
Caco-2 세포에 케피어 유래 미세소포체를 처리하여 상등액을 채취한 후 IL-8의 발현의 감소를 통하여 케피어 유래 미세소포체의 장 질환 염증을 완화 및 억제함을 확인하였다.



<IL-8 cytokine 발현 확인>

6. NF- κ B에 의한 염증반응 유발 기전 확인

NF- κ B 는 DNA의 전사를 조절하는 단백질로 LPS 자극에 의해 I κ B를 활성화시켜 핵으로 들어가 염증반응을 유도한다. TNF- α 로 염증 유발된 Caco-2 세포에 케피어 유래 미세소포체를 처리한 군과 대조군에서 활성화된 P65의 발현 정도를 Western blotting을 통해 단백질 발현이 저하정도를 측정하여 케피어 유래 미세소포체에 의한 장 질환 억제효과를 확인하였다.



<인산화된 p65 단백질 발현 확인>

7. 항염증 활성 평가를 위한 동물모델에서의 항염증 활성 평가

가. 시험계

(1) 종 및 계통: 특정병원체 부재 (SPF) 마우스, Balb/cAnNCrljOri

생산자 및 공급원: 오리엔트바이오 (경기도 가평군 북면 목동리)

(2) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용하는 마우스는 각종 약효 및 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 있으며, 이러한 자료를 이용하여 시험결과의 해석 및 평가가 용이하기 때문에 선택하였다.

(3) 입수일: 2016 년 07 월 21 일

(4) 입수시 성별, 주령 및 동물수: 수컷 8 주령, 40 마리

(5) 입수시 체중범위: 약 20 g \pm 20 % 이내

(6) 검역 및 순화기간

입수 후 7 일 (순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강상태를 확인하였고 건강한 동물을 시험에 사용하였다.)

(7) 투여개시시 체중범위: 평균체중 (g) \pm 20 % 이내

(8) 사용 동물수: 수컷 25 마리

(9) 식별

동물은 순화기간 (청색), 투여 및 관찰기간 (붉은색) 동안 미부표식법을 사용하여 식별하였다.

(10) 동물실험윤리위원회 승인 사항

KNOTUS IACUC IACUC 16-KE-154

다음과 같이 동물사용계획서를 준수하여 시험을 실시하고자 신청합니다.
2016 년 07 월 18 일

시험책임자 김명진

동물입수	2016 년 07 월 21 일	시험계획서 번호	동물종/동물수	투여경로	입수형태
사육종류	2016 년 08 월 07 일	16-KE-154	Mouse/40	경구	신규(0) 재사용()
동물사용 목적	TNBS (Trinitrobenzene sulfonate) 유도 inflammatory bowel disease balb/c 모델에서의 효력시험				
사용의 근거	기존에 수행한 시험 및 논문에 근거함				
대체시험법이 있음에도 동물을 사용하는 사유	해당사항 없음				
사용 동물 수의 타당성	기존에 수행한 시험 및 논문에 근거함				
동물종 선택의 타당성	기존에 수행한 시험 및 논문에 근거함				
시험자의 훈련 및 경험	충분함				
특별한 주거 및 사육조건	해당없음(0) 필요함() 필요하다면 이유:				
동물에 예상치 못한 고통과 스트레스가 생길 경우의 조치	담당 수의사의 의견에 따라 조치할 예정임				
해당란에 표시					
1. 외과적 처치 ()	5. 보정기 사용()	9. 동물실의 음향기기()			
2. 사료/음수 제한()	6. 중복시험 가능성()	10. 복수의 대규모 수술 여부()			
3. Adjuvant 사용()	7. 감염시험()	11. 진정, 진통, 마취제 사용(0)			
4. 재혈방법(배대정맥)	8. SOP 없는 시험()	12. 기타()			
위 해당사항이 불가피한 이유:					
고통의 정도에 따른 GRADE: A() B() C() D(0) E()					
동물실험윤리위원회의 서명 및 의견					
위 원 신서호		2016 년 7 월 18 일	의견: 승인(0) 조건부승인() 부적합()		
위 원 차승범		2016 년 7 월 18 일	의견: 승인(0) 조건부승인() 부적합()		
위 원 이승환		2016 년 7 월 19 일	의견: 승인(0) 조건부승인() 부적합()		
위 원		년 월 일	의견: 승인() 조건부승인() 부적합()		
위 원		년 월 일	의견: 승인() 조건부승인() 부적합()		
위원장 김도형		2016 년 07 월 19 일	의견: 승인(0) 조건부승인() 부적합()		
비고					

주식회사 노터스 동물실험윤리위원회 [KNOTUS IACUC]

나. 시험군의 구성 및 투여량 설정

(1) 시험군의 구성

케피어 미세소포체 투여 물질은 *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *Kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *Kefirgranum*, *Lactobacillus kefir*에서 분리한 미세소포체를 미세입자수 대비 동량 혼합(1:1:1)한 것을 시험물질로 사용하였다.

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	IBD 유발여부	투여물질	투여량	투여액량
G1	M	5	1-5	N			10
G2	M	5	6-10	Y			10
G3	M	5	11-15	Y	Prednisolone	2 mg/kg/day	10
G4	M	5	16-20	Y	TA 저용량	0.2 mL/head	10
G5	M	5	21-25	Y	TA 고용량	0.2 mL/head	10

G1: 정상대조군, G2: 유발대조군

다. 염증성 장 질환 유발

장 질환 유발일에 해당 동물을 Zoletil 50 (VIRBAC, France, 5 mg/kg) 및 xylazine (Rompun®, Bayer AG, Germany, 2.5 mg/kg)을 이용하여 마취를 실시한 후, 50 % 에탄올로 희석한 2.5 % TNBS 용액 0.1 mL을 항문을 통해 직장 내로 투여하였다. TNBS가 항문으로 새어나오지 않도록 동물은 투여 후 1 분간 수직 자세를 유지하도록 하였다.

라. 물질 투여

(1) 투여경로 : 경구 투여

(2) 투여횟수 및 투여기간: 질환 유발일부터 1 회/일, 10 일간 투여하였다.

(3) 투여액량 산출

최근 체중측정일에 측정된 체중을 기준으로 10 mL/kg/day로 산출하여 투여하였다.

(4) 투여방법 : 동물을 경배부 피부 고정법으로 고정하고, 경구 투여용 존데를 이용하여 위 내에 직접 투여 하였다.

마. 관찰 및 검사 항목

(1) 체중

시험물질 투여 전, 그 이후에는 1 회/2 일 측정하였다.

(2) 일반 증상 관찰 및 육안 관찰

투여 및 관찰기간 동안 사망을 포함한 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 1 일 1회 관찰하였고 개체별로 기록하였으며, 항문 및 직장부의 출혈, 대변의 성상을 1 일 1

회 관찰하고 scoring하였다.

Stool blood - 0: negative, 2: fecal occult blood test positive, 4: gross bleeding

Stool consistency - 0: Negative, 2: loose stool, 4: diarrhea

(3) 채혈 및 부검

시험물질 투여개시 후 10 일 후에 해당 동물을 마취하고 배대정맥에서 채혈을 실시하였다. 채혈 후 동물을 안락사 시킨 뒤 결장 및 직장을 적출하여 장의 길이 및 무게를 측정 한 뒤, 10 % 중성완충포르말린용액에 고정하였다. 혈액은 clot activator가 들어 있는 vacutainer tube에 주입하고 약 15 분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 3,000 rpm으로 10 분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 분석 전까지 -70°C 이하로 설정되어 있는 Deep freezer에 보관하였으며, ELISA 분석에 사용하였다.

(5) 조직병리학적 검사

고정된 조직은 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 조직병리학적 검사를 위한 검체를 제작한 뒤, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였고, 광학 현미경(Olympus BX53, Japan)을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였으며, 평가 기준은 다음과 같다.

0: No evidence of inflammation

1: Low level of inflammation with scattered infiltrating mononuclear cells (1 - 2 foci)

2: Moderate inflammation with multiple foci

3: High level of inflammation with increased vascular density and marked wall thickening

4: Maximal severity of inflammation with transmural leukocyte infiltration and loss of goblet cells

(6) ELISA 분석

상용화된 Mouse MPO ELISA Kit (EIAab Science Co., Ltd., Wuhan, China)를 이용하여 혈청내 MPO 수준을 분석하였으며, 생산자가 제공하는 프로토콜에 따라 분석을 진행하였다.

마. 통계학적 분석

본 시험의 결과에 대하여 모수적인 다중비교 (parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교 (non-parametric multiple comparison procedures)를 사용하였다. 모수적인 다중비교의 경우, 자료의 정규성을 가정하였고, 모수적 일원분산분석 (One-way ANOVA)으로 검정하였으며, 그 결과가 유의할 경우, Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 사후검정을 실시하여 시험군간 유의한 차이를 분석하였다. 비모수적인 다중비교의 경우, Kruskal-Wallis'H-test로 검정하여, 그 결과가 유의할 경우 사후분석인 Mann Whitney U-test를 이용하여 시험군간 유의한 차

이를 분석하였다. 통계학적 분석은 Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 및 SPSS Statistics 18.0K를 이용하여 실시하였으며, p값이 0.05 미만일 경우, 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

사. 결과

(1) 일반증상

전 실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.

시험물질 투여 개시일 부터 시험물질 투여 후 4 일째까지 모든 IBD 유발군 개체가 쇠약 (weakening)을 보였으며, 유발대조군은 점차 빈사 (moribund) 상태를 보이는 개체가 늘어나 시험 종료일에는 전 개체가 빈사 상태로 관찰되었다. 양성대조군 및 시험물질 투여군의 경우, 시험물질 투여 후 4 일째부터 점차 회복되는 경향을 나타내어, 시험 종료일에 양성대조군 1 수, 시험물질 저용량 투여군 2 수를 제외한 나머지 개체는 활동성에 이상이 없는 정상 상태로 관찰되었다.

CLINICAL SIGNS						
DAYS	SIGNS	GROUPS				
		G1	G2	G3	G4	G5
0	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
1-4	Weakening	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
5	Weakening	0 / 5	4 / 5	5 / 5	4 / 5	4 / 5
	Moribund	0 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
6	Weakening	0 / 5	4 / 5	5 / 5	3 / 5	2 / 5
	Moribund	0 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
7	Weakening	0 / 5	1 / 5	3 / 5	3 / 5	1 / 5
	Moribund	0 / 5	4 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
8	Weakening	0 / 5	1 / 5	1 / 5	2 / 5	0 / 5
	Moribund	0 / 5	4 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
9-10	Weakening	0 / 5	0 / 5	1 / 5	2 / 5	0 / 5
	Moribund	0 / 5	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
10	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the sign / Number of animals examined.

(2) 체중

시험물질 투여 후 2 일째에 모든 IBD 유발군 (G2-G5)의 체중 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났다 ($p < 0.001$). 시험물질 투여 후 4 및 6 일째에 모든 IBD 유발군 (G2-G5)의 체중 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 낮은 것으로 관찰되었으며 ($p < 0.001$), G3 (prednisolone 2 mg/kg/day 투여군) 및 G5 (케피어 미세소포체 고용량 투여군)의 체중 수준은 G2 (유발대조군)에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다

($p < 0.05$). 시험물질 투여 후 8 및 10 일째에 모든 IBD 유발군 (G2-G5)의 체중 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났으며 ($p < 0.001$), G3 (prednisolone 2 mg/kg/day 투여군), G4 (케피어 미세소포체 저용량 투여군) 및 G5 (케피어 미세소포체 고용량 투여군)의 체중 수준은 G2에 비하여 유의하게 높은 것으로 관찰되었다 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$).

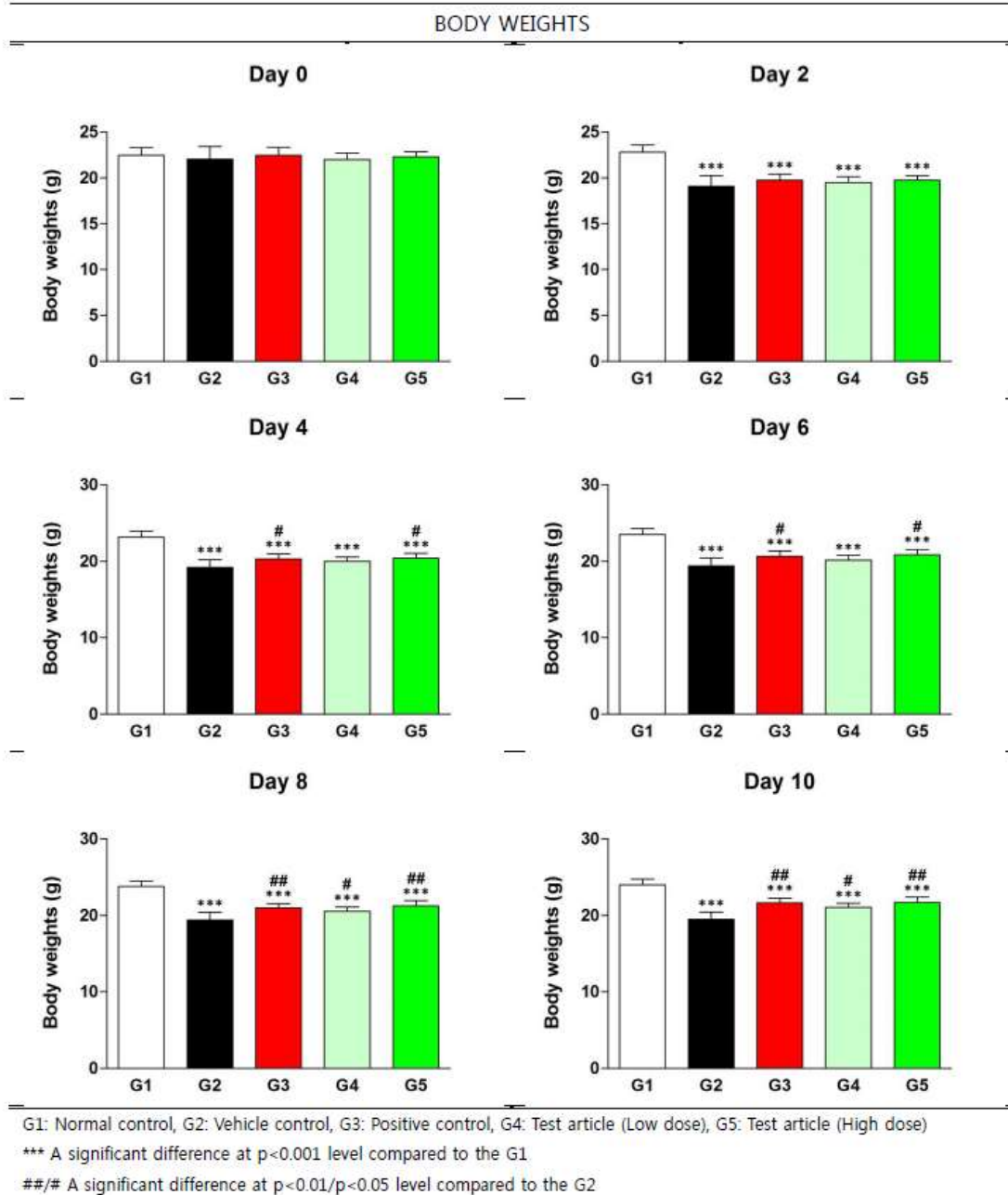
BODY WEIGHTS (g)					
DAYS	GROUPS				
	G1	G2	G3	G4	G5
0	22.474±0.810	22.030±1.375	22.448±0.874	21.988±0.739	22.282±0.561
2	22.794±0.775	19.104±1.145 ^{***}	19.754±0.658 ^{***}	19.504±0.632 ^{***}	19.732±0.518 ^{***}
4	23.170±0.780	19.258±0.998 ^{***}	20.310±0.660 ^{***#}	19.976±0.574 ^{***}	20.412±0.620 ^{***#}
6	23.518±0.785	19.422±1.013 ^{***}	20.654±0.685 ^{***#}	20.172±0.641 ^{***}	20.828±0.679 ^{***#}
8	23.796±0.728	19.408±1.001 ^{***}	21.004±0.522 ^{***#}	20.544±0.564 ^{***#}	21.238±0.730 ^{***#}
10	24.016±0.728	19.490±0.946 ^{***}	21.646±0.611 ^{***#}	21.032±0.575 ^{***#}	21.680±0.708 ^{***#}
N	5	5	5	5	5

Data were expressed as Mean±S.D.

G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

^{***} A significant difference at $p < 0.001$ level compared to the G1

^{#/#} A significant difference at $p < 0.01/p < 0.05$ level compared to the G2



(3) Gross rectal bleeding

통계학적 분석 결과, 시험물질 투여 후 5 일째까지 모든 IBD 유발군 (G2-G5)의 직장 출혈 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났으며 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$), 시험물질 투여 후 5 일째에 G3 (prednisolone 2 mg/kg/day 투여군) 및 G4 (케피어 미세소포체 저용량 투여군) 의 직장 출혈 수준은 G2 (유발 대조군) 에 비하여 유의하게 낮은 것으로 관찰되었다 ($p < 0.05$). 시험물질 투여 후 6 일째에 G2, G3 (prednisolone 2 mg/kg/day 투여군) 및 G4 (케피어 미세소포체 저용량 투여군) 의 직장 출혈 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높았으며 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$), G5 (케피어 미세소포체 고

용량 투여군) 의 직장 출혈 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났다 (p<0.05).

시험물질 투여 후 7 일째에 G2 및 G4 (케피어 미세소포체 저용량 투여군) 의 직장 출혈 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높았으며 (p<0.01 및 p<0.05), G4 (케피어 미세소포체 저용량 투여군) 및 G5(케피어 미세소포체 고용량 투여군) 의 직장 출혈 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났다 (p<0.05 및 p<0.01). 시험물질 투여 후 8, 9 및 10 일째에 G2의 직장 출혈 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높았으며 (p<0.01), G4 (케피어 미세소포체 저용량 투여군) 및 G5 (케피어 미세소포체 고용량 투여군) 의 직장 출혈 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮았고 (p<0.01 또는 p<0.05), 시험물질 투여 후 8 및 9 일째에 G3 (prednisolone 2 mg/kg/day 투여군) 의 직장 출혈 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났다 (p<0.05).

GROSS RECTAL BLEEDING					
DAY	GROUPS				
	G1	G2	G3	G4	G5
1	0.0±0.0	3.6±0.9**	3.6±0.9**	2.8±1.1**	2.8±1.1**
2	0.0±0.0	2.8±1.1**	3.6±0.9**	2.4±0.9**	3.2±1.1**
3	0.0±0.0	3.2±1.1**	3.6±0.9**	2.8±1.1**	2.8±1.1**
4	0.0±0.0	3.6±0.9**	2.4±0.9**	2.0±1.4*	2.0±1.4*
5	0.0±0.0	3.2±1.1**	1.6±0.9*#	1.6±0.9*#	2.0±1.4*
6	0.0±0.0	3.2±1.1**	2.0±0.0*	2.4±0.9**	0.8±1.1#
7	0.0±0.0	4.0±0.0**	2.0±2.0	2.0±1.4*#	1.2±1.1##
8	0.0±0.0	4.0±0.0**	1.2±1.8#	0.8±1.8#	0.4±0.9##
9	0.0±0.0	3.6±0.9**	1.2±1.8#	1.2±1.8#	0.4±0.9##
10	0.0±0.0	3.2±1.1**	1.2±1.8	0.8±1.1#	0.4±0.9#
N	5	5	5	5	5

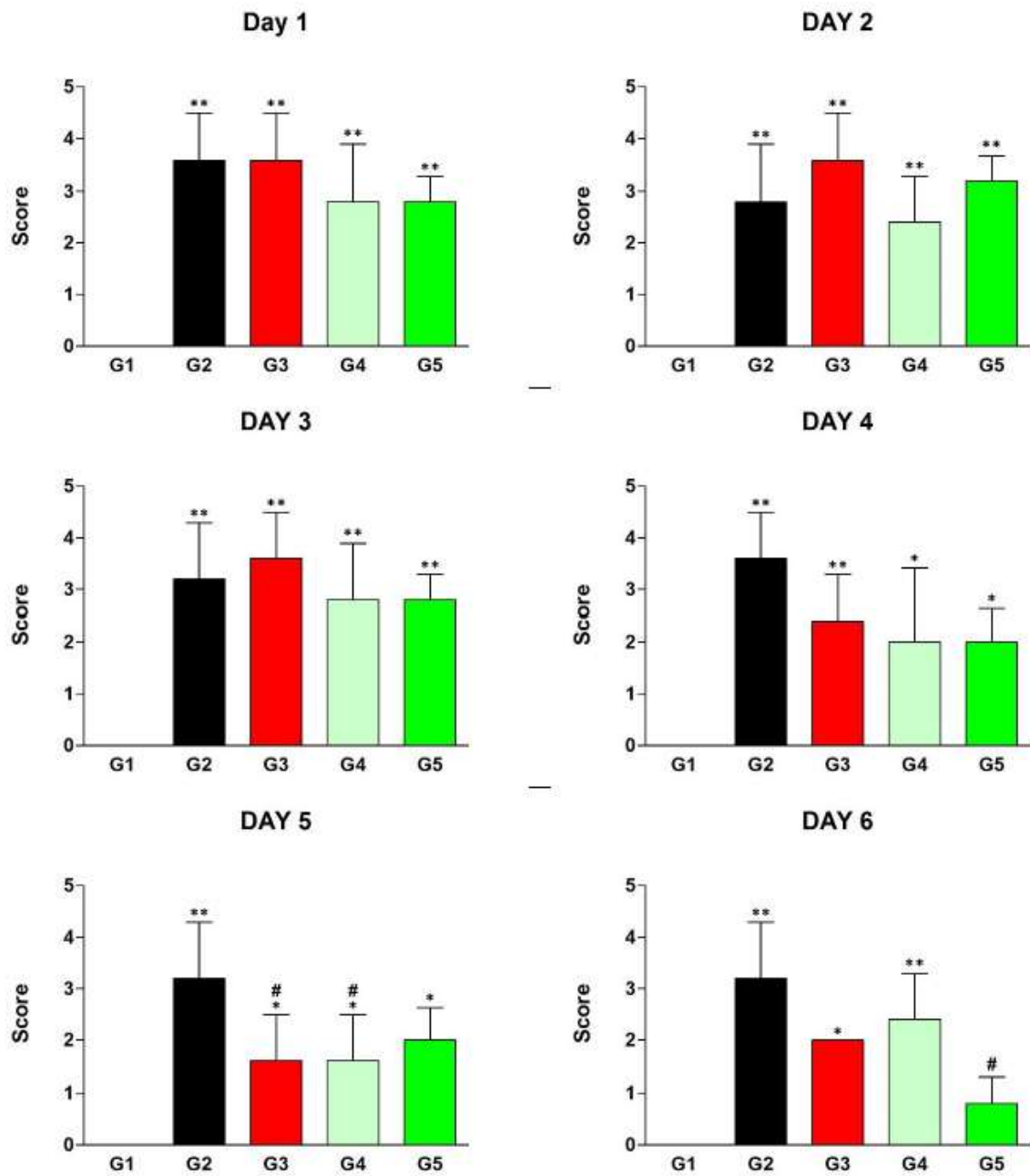
Data were expressed as Mean±S.D.

G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

**/* A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G1.

##/# A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G2

GROSS RECTAL BLEEDING

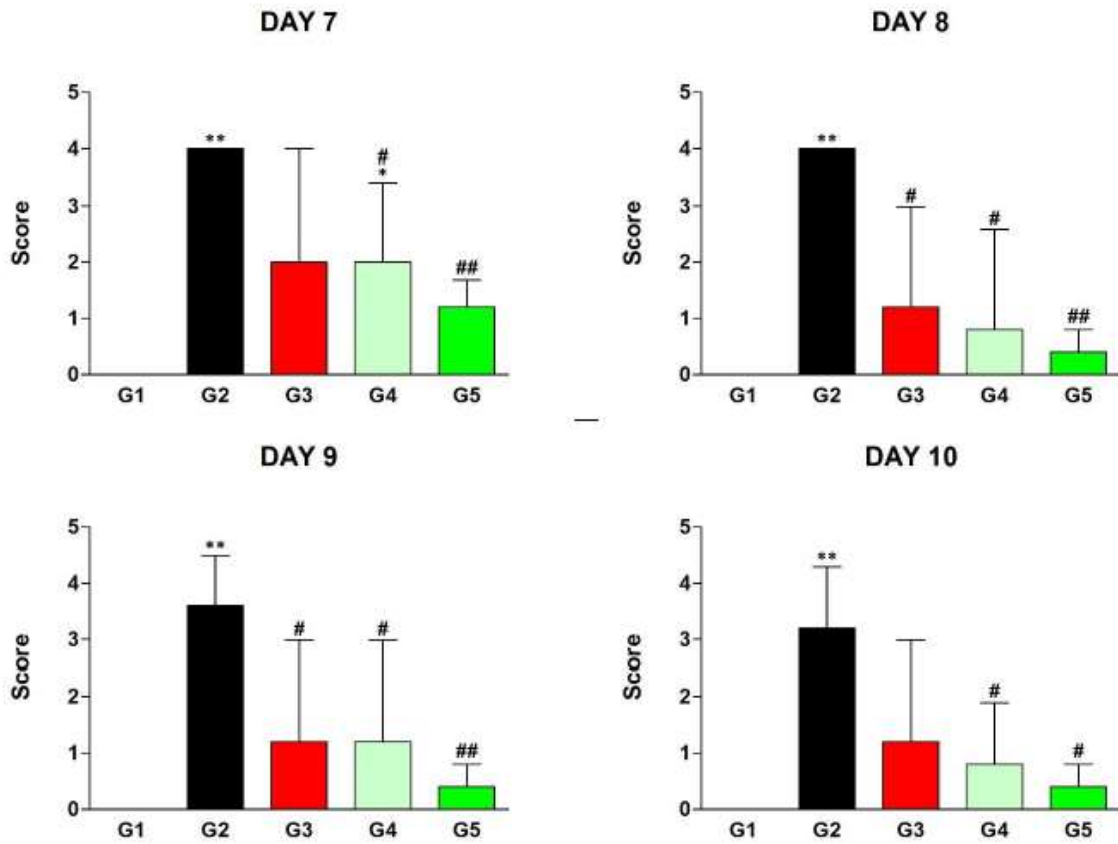


G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

**/* A significant difference at $p < 0.01/0.05$ level compared to the G1

A significant difference at $p < 0.05$ level compared to the G2

GROSS RECTAL BLEEDING



G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

**/* A significant difference at $p < 0.01/p < 0.05$ level compared to the G1

##/# A significant difference at $p < 0.01/p < 0.05$ level compared to the G2

(4) Stool consistency

시험물질 투여 후 3 일째까지 모든 IBD 유발군 (G2-G5)의 Stool consistency 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났으며 ($p < 0.01$), 시험물질 투여 후 4 일째에 G2 (유발대조군), G3 (prednisolone 2 mg/kg/day 투여군) 및 G5 (케피어 미세소포체 고용량 투여군)의 Stool consistency 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 관찰되었다 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$). 시험물질 투여 후 5 일째에 G2, G3 (prednisolone 2 mg/kg/day 투여군) 및 G4 (케피어 미세소포체 저용량 투여군)의 Stool consistency 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 관찰되었으며 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$), G5 (케피어 미세소포체 고용량 투여군)의 Stool consistency 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 시험물질 투여 후 6 일째에 G2 및 G3 (prednisolone 2 mg/kg/day 투여군)의 Stool consistency 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 관찰되었으며 ($p < 0.01$ 및 $p < 0.05$), G4 (케피어 미세소포체 저용량 투여군) 및 G5

(케피어 미세소포체 고용량 투여군)의 Stool consistency 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났다 ($p<0.05$). 시험물질 투여 후 7 및 8 일째에 G2의 Stool consistency 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 관찰되었으며 ($p<0.01$), G5의 Stool consistency 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났다 ($p<0.05$). 시험물질 투여 후 9 및 10 일째에 G2의 Stool consistency 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 관찰되었으며 ($p<0.01$), G3 (prednisolone 2 mg/kg/day 투여군), G4 (케피어 미세소포체 저용량 투여군) 및 G5 (케피어 미세소포체 고용량 투여군)의 Stool consistency 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났다 ($p<0.01$ 또는 $p<0.05$).

STOOL CONSISTENCY					
DAY	GROUPS				
	G1	G2	G3	G4	G5
1	0.0±0.0	2.4±0.9**	2.8±1.1**	3.2±1.1**	2.8±1.1**
2	0.0±0.0	2.4±0.9**	3.2±1.1**	2.8±1.1**	2.8±1.1**
3	0.0±0.0	3.2±1.1**	2.8±1.1**	2.0±0.0**	2.0±0.0**
4	0.0±0.0	2.8±1.1**	2.8±1.1**	1.6±1.7	1.6±0.9*
5	0.0±0.0	2.4±0.9**	2.0±1.4*	2.0±1.4*	0.8±1.1#
6	0.0±0.0	2.4±0.9**	1.6±0.9*	0.8±1.1#	0.8±1.1#
7	0.0±0.0	2.4±0.9**	1.6±1.7	1.2±1.8	0.8±1.1#
8	0.0±0.0	2.8±1.1**	1.2±1.8	1.2±1.8	0.4±0.9#
9	0.0±0.0	3.6±0.9**	1.2±1.8#	1.2±1.8#	0.4±0.9##
10	0.0±0.0	3.6±0.9**	1.2±1.8#	1.2±1.8#	0.4±0.9##
N	5	5	5	5	5

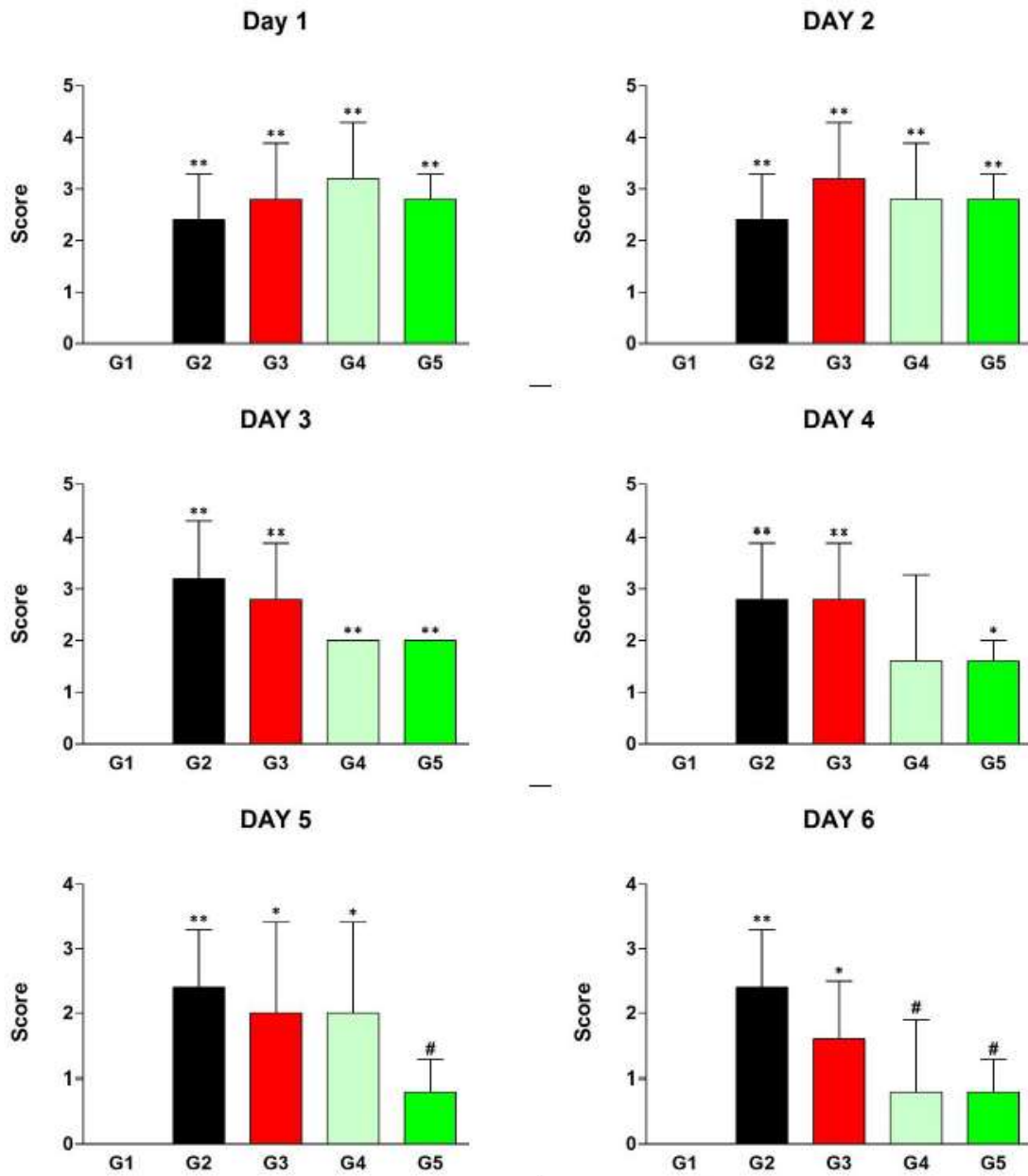
Data were expressed as Mean±S.D.

G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

**/* A significant difference at $p<0.01/p<0.05$ level compared to the G1

##/# A significant difference at $p<0.01/p<0.05$ level compared to the G2

STOOL CONSISTENCY

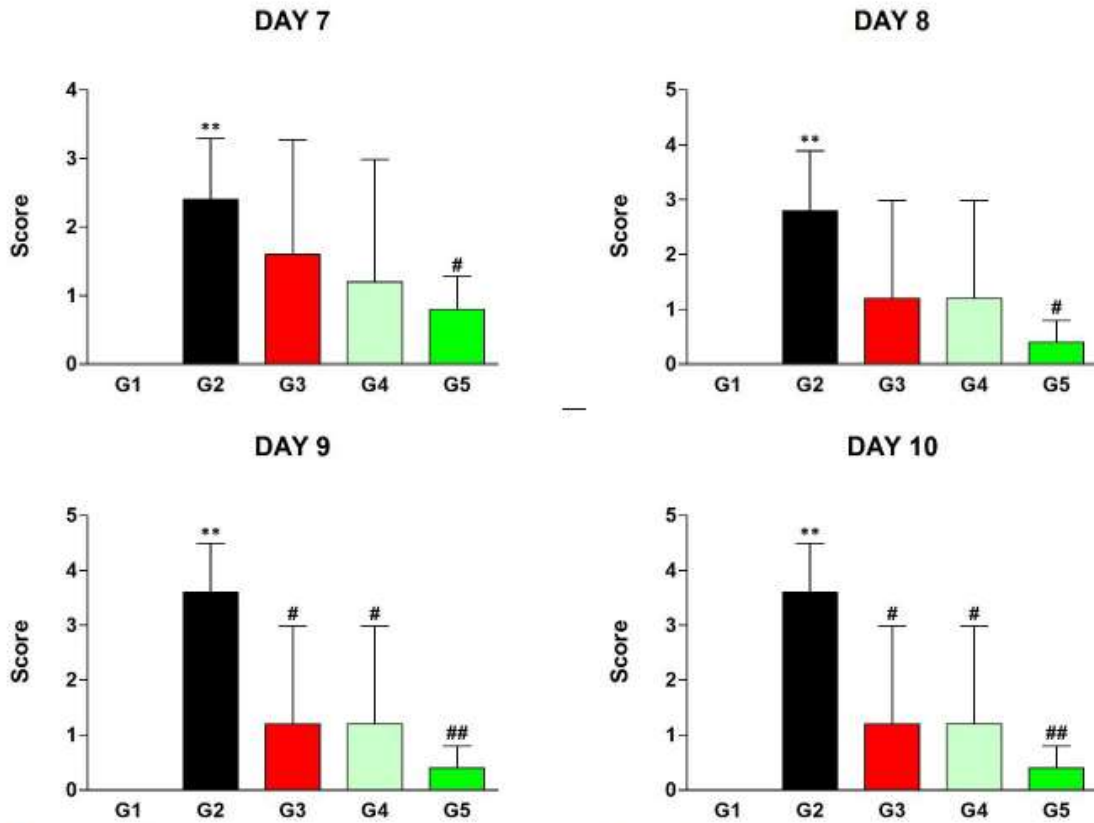


G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

**/* A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G1

A significant difference at p<0.05 level compared to the G2

STOOL CONSISTENCY



G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

** A significant difference at $p < 0.01$ level compared to the G1

##/# A significant difference at $p < 0.01/p < 0.05$ level compared to the G2

(5) 조직병리학적 검사

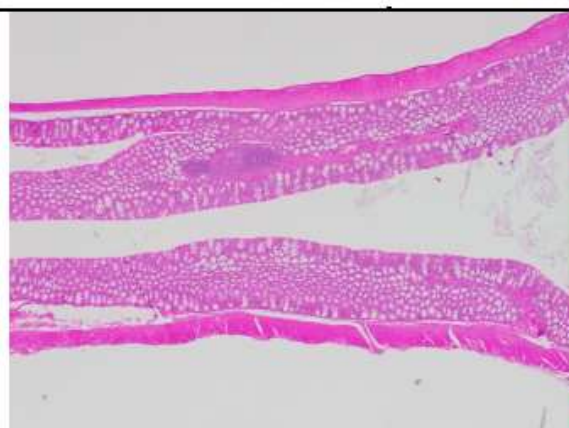
조직병리학적 검사 결과, 정상대조군은 정상적인 대장의 조직학적 구조를 잘 유지하고 있었으나, 유발대조군의 경우, 심한 상피괴사, 출혈, 염증세포의 침윤, 부종 및 궤양 등이 관찰되었다. Prednisolone 투여군 및 시험물질 투여군에서는 일부 개체의 병변 수준은 높았으나, 대부분 정상 조직에 가까운 것으로 나타나 시간이 경과함에 따라 손상된 조직이 회복되는 경향을 나타내었다. 조직병리학적 검사 결과를 점수화하여 통계학적으로 분석한 결과, G2의 병변 수준은 G1에 비하여 유의하게 높았으며 ($p < 0.01$), G3, G4 및 G5의 병변 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났다 ($p < 0.01$).

HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION

G1

H&E STAIN

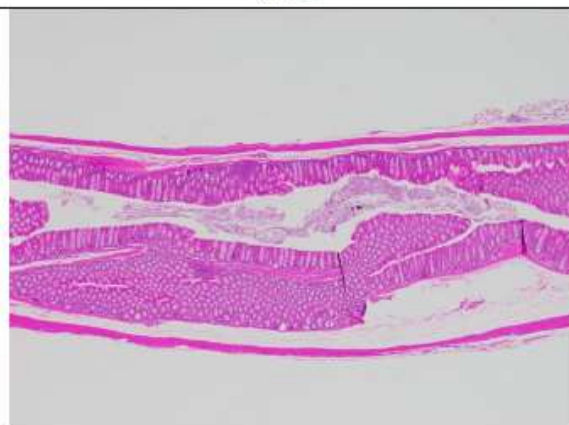
X40



G1-1



G1-2



G1-3



G1-4



G1-3

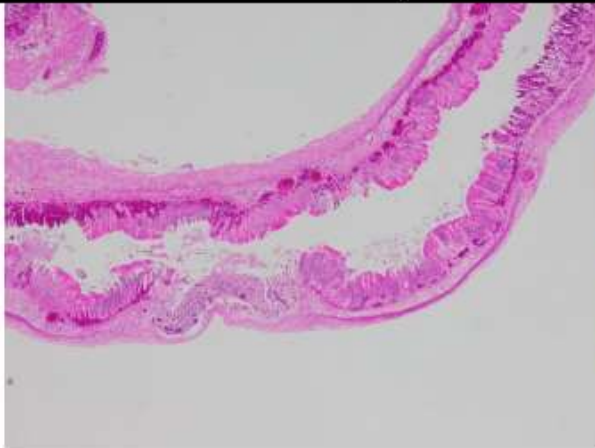
G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION

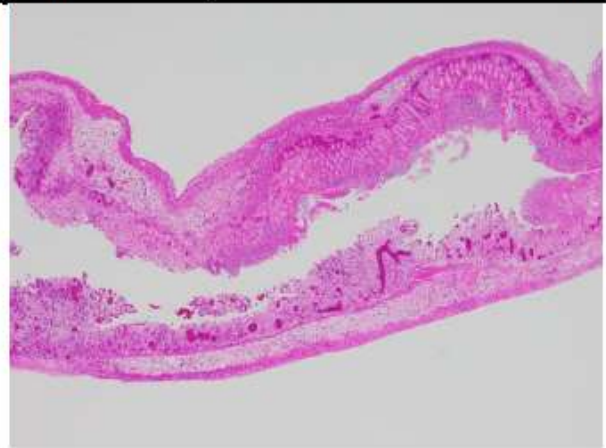
G2

H&E STAIN

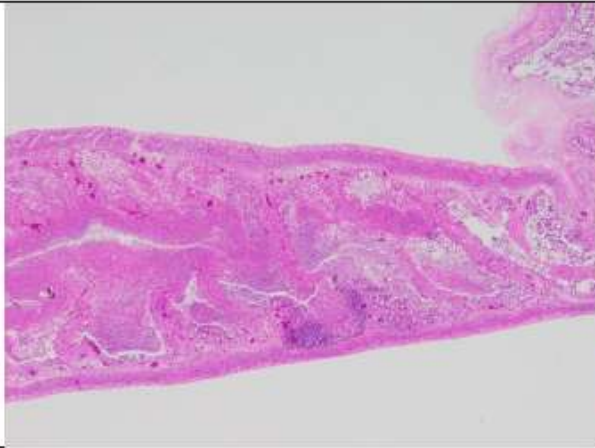
X40



G2-6



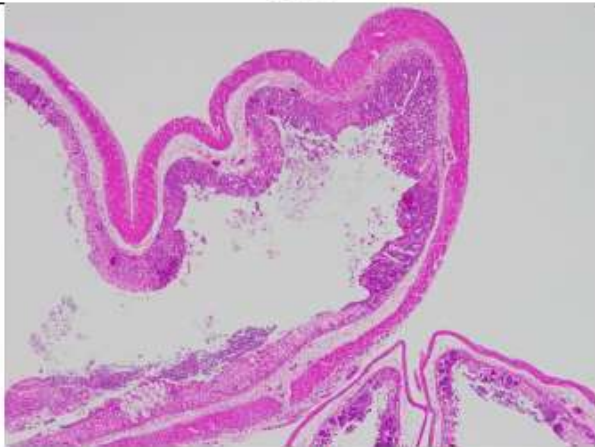
G2-7



G2-8



G2-9



G2-10

G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION

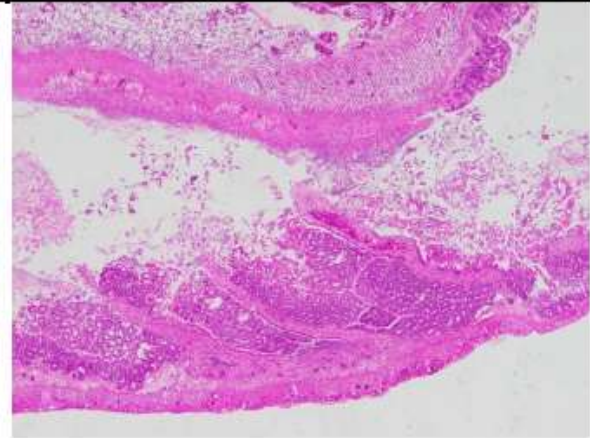
G3

H&E STAIN

X40



G3-11



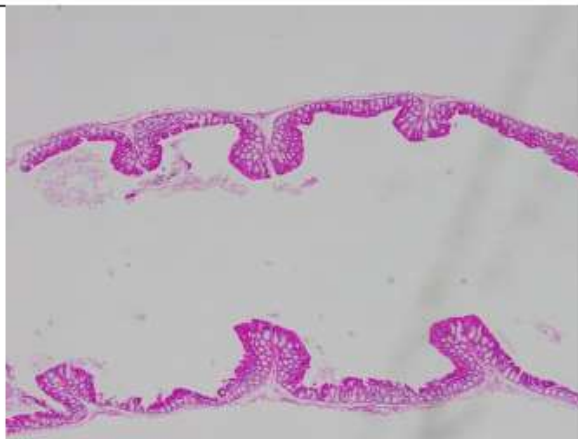
G3-12



G3-13



G3-14



G3-15

G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION

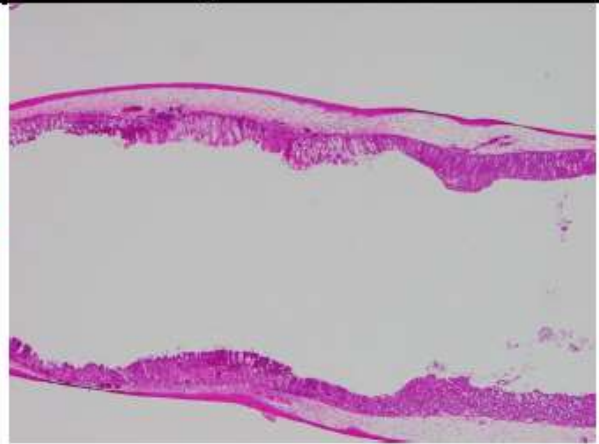
G4

H&E STAIN

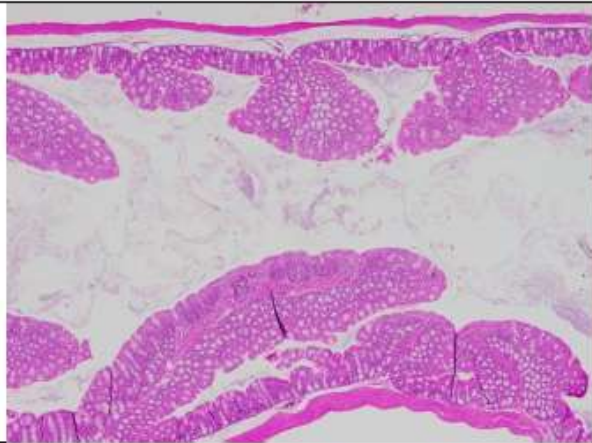
X40



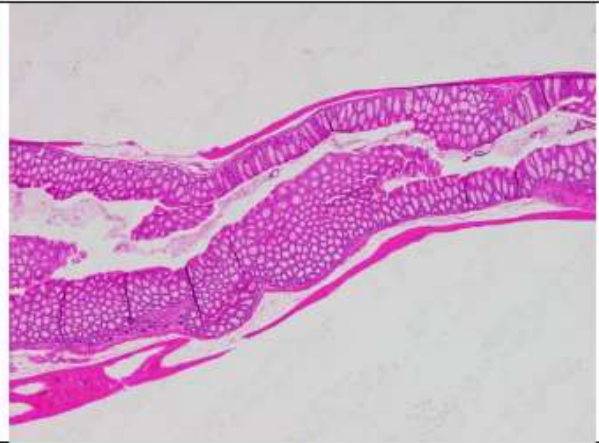
G4-16



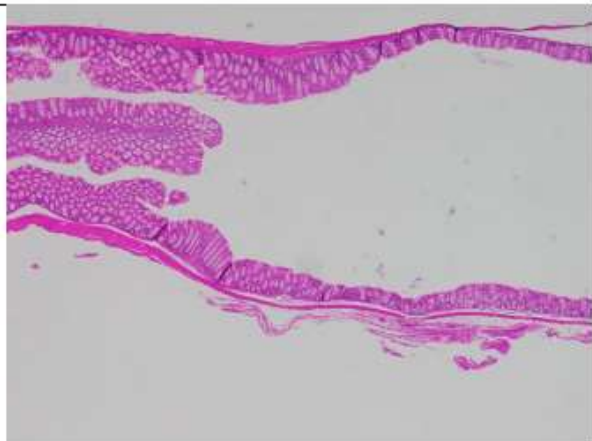
G4-17



G4-18



G4-19



G4-20

G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION

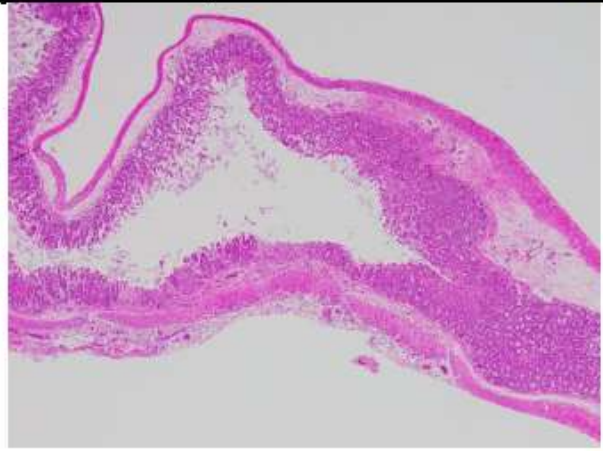
G5

H&E STAIN

X40



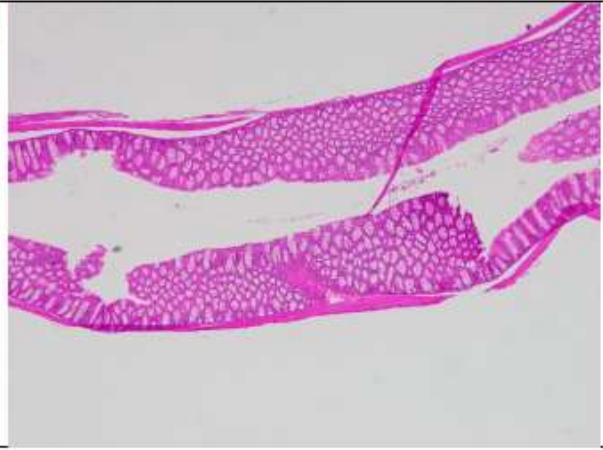
G5-21



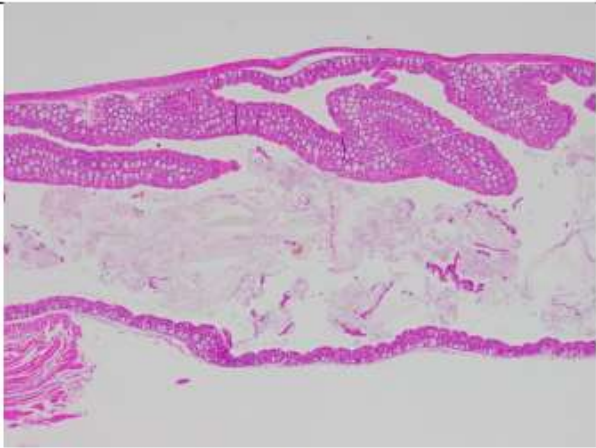
G5-22



G5-23



G5-24

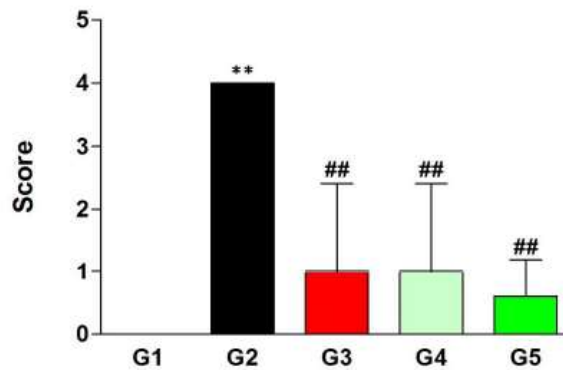


G5-25

G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION

Histopathological examination



G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

** A significant difference at $p < 0.01$ level compared to the G1

A significant difference at $p < 0.01$ level compared to the G2

(6) ELISA 분석

혈청을 이용한 MPO ELISA 분석 결과, G2, G3 및 G4의 혈청 내 MPO 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높았으며 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$), G3, G4 및 G5의 혈청 내 MPO 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮았으므로 나타났다 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$).

산화적 스트레스 (oxidative stress) 및 산화 환원 신호전달은 염증성 사이토카인의 증가 및 염증성 장 질환의 많은 신호 전달 경로를 통한 염증 세포의 동원과 연관되어 있다. 반대로, 염증 세포의 활성화는 장 손상을 초래하는 활성산소 (reactive oxygen species)의 증가를 통하여 산화적 스트레스를 야기한다. 산화적 스트레스와 그 결과로 나타나는 지질 과산화 (lipid peroxidation)는 자유 라디칼 연쇄 반응 (free radical chain reaction)을 악화시키고 호중구와 같은 염증성 매개 물질의 방출을 활성화시킴으로써 장 조직 내에서의 MPO 활성 순환으로의 혈관의 유출 (extravasation)에 의하여 혈청내 MPO 수준 또한 증가시킨다. 이러한 이유로 MPO 활성은 IBD 질환에 항염증성 약물의 평가뿐만 아니라 질환 상태의 파악을 위하여 널리 사용되어왔다. ELISA 분석을 통한 혈청 내 MPO 검사 결과에서 케피어 미세소포체 저용량 및 고용량 투여군 모두 유발대조군에 비하여 유의하게 낮은 수준을 나타내었고, 타 검사항목 분석 결과와 유사한 변화 경향을 보였다.

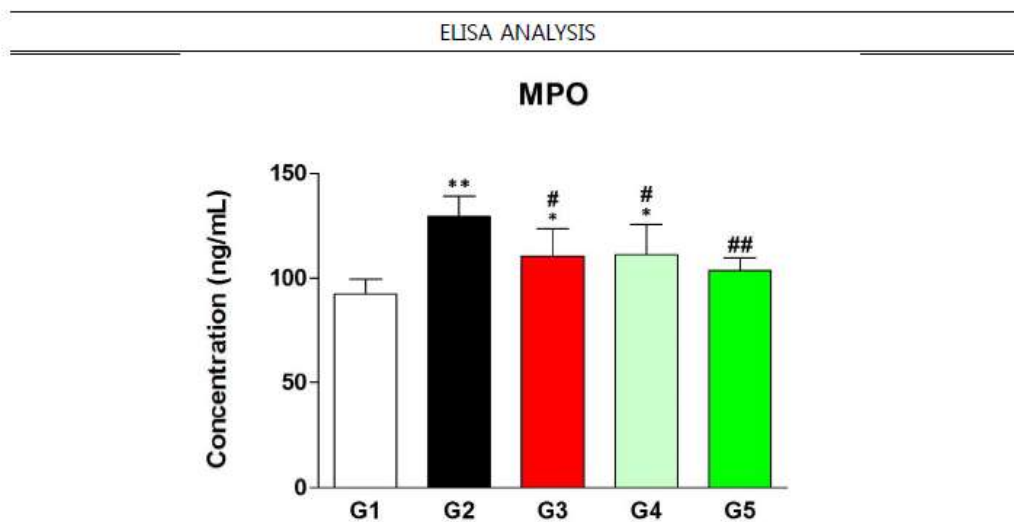
ELISA ANALYSIS	
MPO	
UNIT: ng/mL	
GROUPS	TESTS
G1	92.27 ± 7.32
G2	129.14 ± 9.93**
G3	110.19 ± 13.25*#
G4	111.16 ± 14.24*#
G5	103.52 ± 13.33##

Data were expressed as Mean±S.D.

G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

**/* A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G1

##/# A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G2



G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: Positive control, G4: Test article (Low dose), G5: Test article (High dose)

**/* A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G1

##/# A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G2

8. 커피어 유래 미세소포체의 안정성 평가

가. 커피어 유래 미세소포체의 주요 품질기준

시험항목		기준 및 규격	시험방법	
규격 항목	성상	이미, 이취가 없는 투명 ~ 미황색의 액체로 층 분리나 부유물이 없어야 한다.	한국표준색을 따른다.	
	Particle number, Particle size (nm)		4.58x10 ⁹ /mL ~ 5.6x10 ⁹ /mL, 120 ~ 190nm	아래 Particle number 및 size 시험방법에 따른다.
	미생물 한도	일반세균	음성	식품의 일반시험법 3.미생물 시험법 중 일반세균수에 따른다.
		대장균	음성	식품의 일반시험법 3.미생물 시험법 중 대장균시험법을 따른다.
		황색포도상구균	음성	식품의 일반시험법 3.미생물 시험법 중 황색포도상구균시험법을 따른다.
		효모곰팡이	음성	식품의 일반시험법 3.미생물 시험법 중 대장균시험법을 따른다.
환경리스테리아		음성	식품의 일반시험법 3.미생물 시험법 중 리스테리아 시험법을 따른다.	

나. 케피어 유래 미세소포체의 안정성 시험 (장기보존) 결과

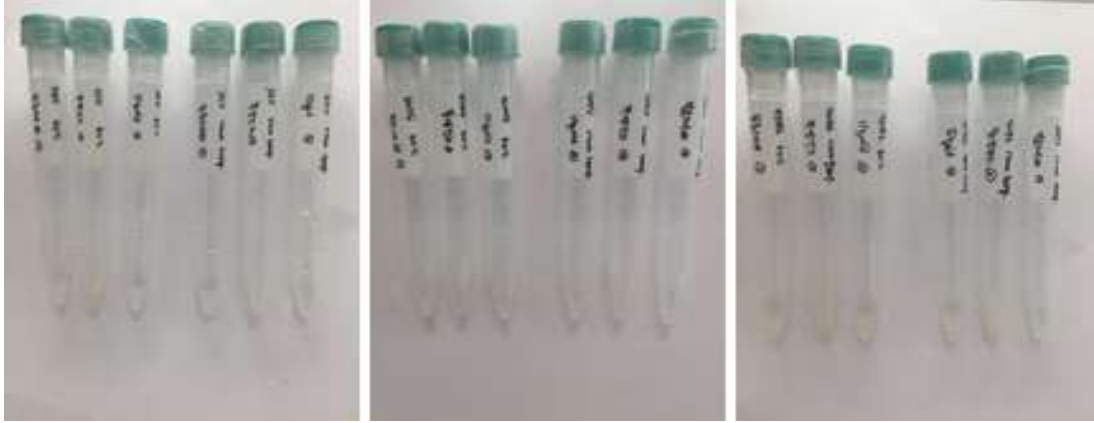
	시험항목	기준 및 규격	시험결과 (장기보존)			
			1개월	3개월	6개월	
규격 항목	성상	이미, 이취가 없는 투명 ~ 미황색의 액체로 층 분리나 부유물이 없어야 한다.	이미, 이취 없는 투명한 액체, 층 분리, 부유물 없음	이미, 이취 없는 투명한 액체, 층 분리, 부유물 없음	이미, 이취 없는 투명한 액체, 층 분리, 부유물 없음	
	Particle number	4.58X10 ⁹ /mL	5.59X10 ⁹ /mL,	4.94X10 ⁹ /mL,	4.75X10 ⁹ /mL,	
	Particle size (nm)	~ 5.6X10 ⁹ /mL, 120~190nm	120~190nm	120~190nm	120~190nm	
	미생물 한도	일반세균	음성	음성	음성	음성
		대장균	음성	음성	음성	음성
		황색포도상구균	음성	음성	음성	음성
		효모곰팡이	음성	음성	음성	음성
환경리스테리아		음성	음성	음성	음성	

다. 안정성 시험 세부내용

분리된 kefir exosome의 안정성 확인을 위해 다음과 같은 시험 항목을 측정하여 안정성을 test 하였다.

(1) 성상

아래와 같은 방법으로 이미, 이취 및 색깔(투명 ~ 미황색) 등을 관찰하고 층 분리나 부유물의 존재여부를 육안으로 확인하였다.

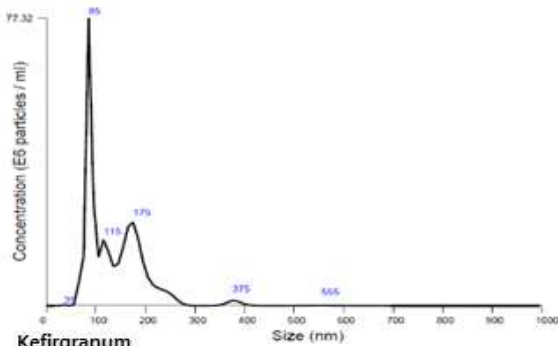


<kefir exosome 안정성 시험 (성상)>

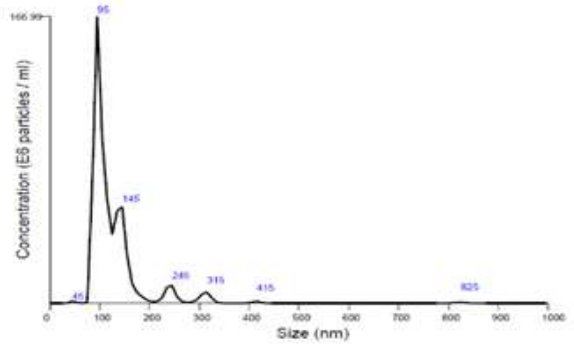
(2) Particle number

Kefir exosome의 particle number를 측정하기 위해 분리된 kefir 3가지 균주의 exosome 을 NTA (Nanosight NS300)을 이용하여 측정하였고, 평균 size는 120 - 190nm 결과 값을 확인하였다. 안정성 시험을 위해 6개월 동안 보존한 kefir exosome 의 particle 수를 1개월, 3개월, 6개월 25°C 보관 후 NTA를 이용하여 측정하였다.

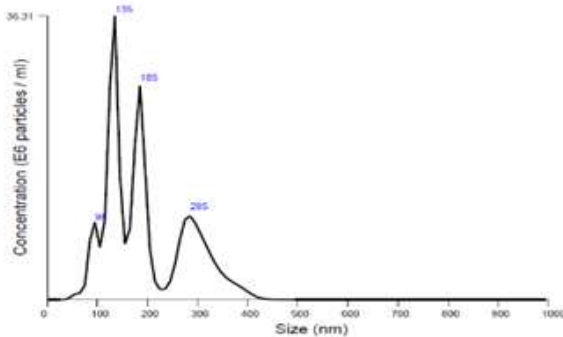
Lactobacillus kefir



Kefirnofaciens



Kefirgranum



<kefir exosome 안정성 시험 (Particle number & size)>

(3) 미생물 시험

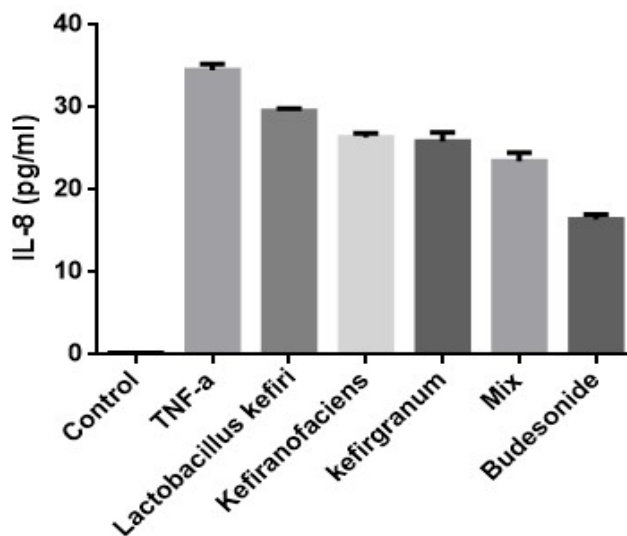
Kefir exosome의 미생물에 대한 안정성을 확인하기 일반세균, 효모 및 곰팡이균, 대장균균, 환경리스테리아, 황색포도상구균 검출 시험을 실시하였다.



<kefir exosome 안정성 시험 (미생물 시험)>

(4) 장기보존 후 kefir exosome 유효성 확인

6개월 장기 보존한 kefir exosome의 유효성 확인을 위해 Caco-2 세포에 처리하여 상등액을 채취해 염증인자인 IL-8 의 발현을 측정하였다. 기존 kefir exosome의 항염증 효과와 같이 IL-8의 발현의 감소를 통하여 6개월 후에도 케피어 유래 미세소포체가 장 질환 염증을 완화 및 억제함을 확인하였다.



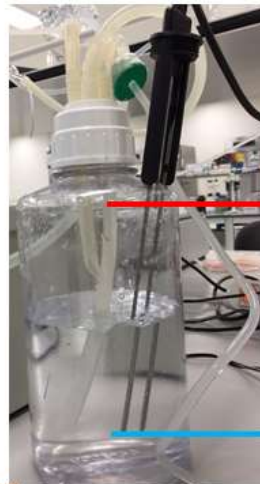
<장기보존 후 kefir exosome 유효성 결과>

9. 대량생산 공정 확립

- 기존의 초고속원심분리기를 이용한 분리방법의 경우 최대 분리 가능한 배양액 양이 0.54L로 제한되기 때문에 사업화를 위해 대량생산하는데 한계가 있음.
- 따라서 이를 개선하기 위해 Tangential Flow Filtration system을 이용한 초미세여과 기술을 이용하여 케피어 배양액에서 미세소포체 분리 공정을 test 함.
- 수차례 시행착오 끝에 초고속원심분리기를 이용한 분리방법에 비해 10배 정도(5L)의 배양액에서 케피어 유래 미세소포체 분리에 성공함.



[커피어 EVs 분리 장치 전체 구성] 구동 제어

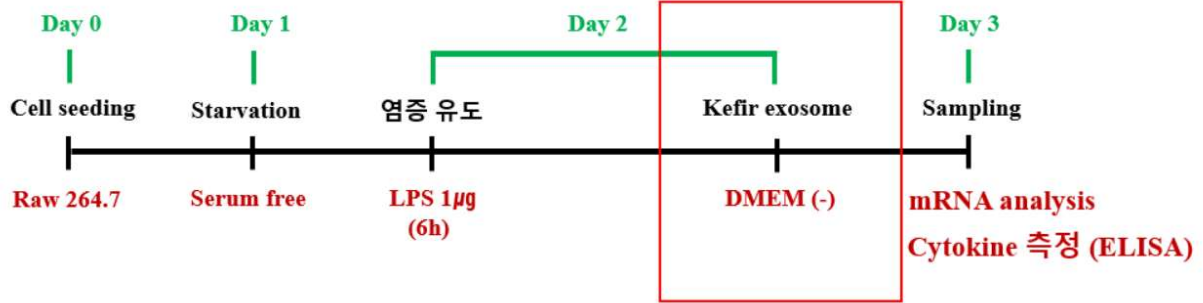


[압력 및 구동 제어 장치]



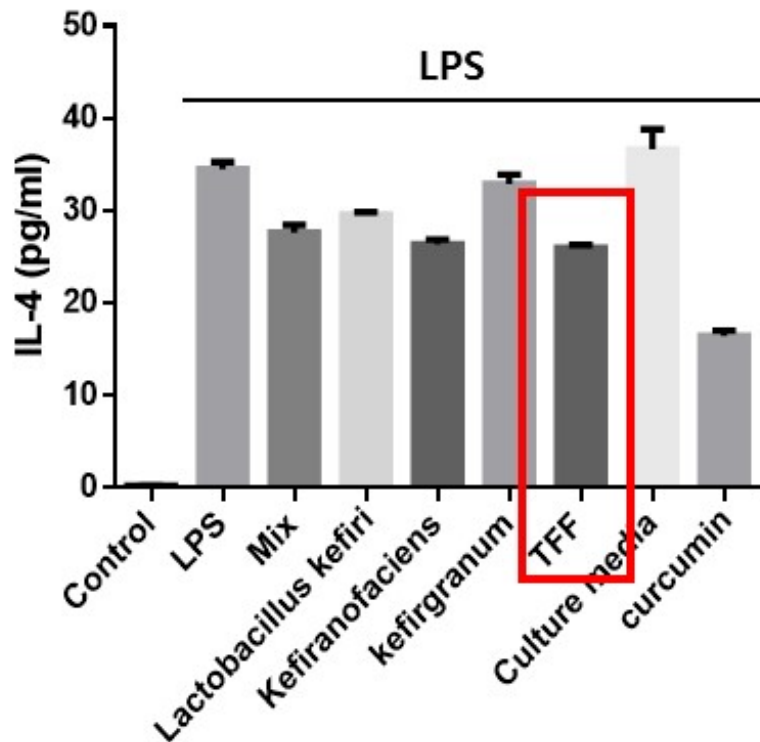
<커피어 유래 미세소포체 대량 분리 장치>

- 새로운 공정으로 분리된 미세소포체의 유효성을 확인하기 위하여 LPS로 염증을 유도한 염증세포 모델에서 기존의 초고속원심분리 방법으로 추출한 케피어 유래 미세소포체와 항염 효과 비교 평가를 진행함. 기존 방법으로 분리한 케피어 유래 미세소포체의 항염증 효과와 같이 초미세여과 방법으로 분리한 미세소포체에서도 IL-4의 발현의 감소를 통하여 염증을 완화 및 억제하는 효과를 보임을 확인하였다.



- Kefir exosome (Ultracentrifuge)
- Kefir 배양액 (균 제거)
- TFF 농축액

<새로운 공정에 따른 항염증 유효성 검증 개요도>



<대량 생산 공정 방법으로 분리한 미세소포체 유효성 평가>

10. 선행 기술 조사

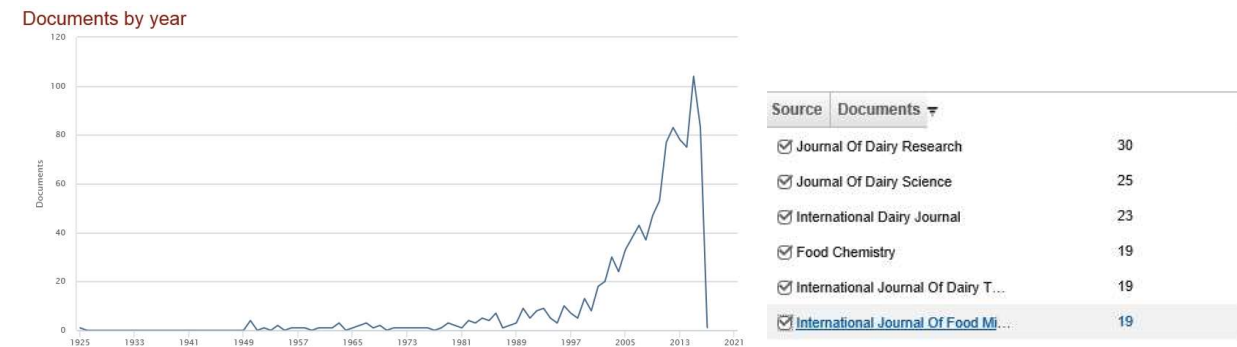
Kefir exosome을 활용한 과민대장성 증후군의 완화 및 억제 효과를 기대 할 수 있는 식품소재의 개발을 진행하고 추후 상용화를 위한 기존의 기술 조사와 산업적 권리 획득을 위한 특허 분석 및 특허 출원 후 특허등록 가능성을 확보하기 위한 목적으로 선행 기술 조사가 진행 되었다.

가. 논문 분석

Scopus를 이용하여 논문을 검색하였으며, “kefir”라는 키워드, “kefir&exosome”, “kefir&vesicle” 등의 키워드를 이용하여 검색을 진행하였다. “kefir&exosome”에서는 검색결과가 없었으며, “kefir&vesicle”의 키워드에서는 총 8개의 검색결과가 도출되었지만, 유의미하지 않았다. Kefir라는 키워드로는 총 964개의 논문이 검색되었다.

The screenshot shows the Scopus search results page for the query 'kefir'. The page displays 994 document results. On the left side, there are filters for Year (2013-2017), Author Name (Abraham, A.G., Koutinas, A.A., etc.), Subject Area (Agricultural and Biological Sciences, Biochemistry, etc.), and Document Type (Article, 875). The main results list includes titles such as 'Assessment of free and immobilized kefir culture in simultaneous alcoholic and malolactic cider fermentations', 'Bioprocess development for kefir production by Lactobacillus kefirifaciens in semi industrial scale bioreactor', and 'The Antimetastatic and Antiangiogenesis Effects of Kefir Water on Murine Breast Cancer Cells'. Each result shows the title, authors, year, journal name, and citation count.

약 1000편의 논문 게재시기를 분석한 결과 2010년 이후부터 연간 게재건수가 50건을 초과하여 증가 추세에 있었으며, 2015년 104편으로 가장 연구가 활발하였다. 또한 게재된 저널의 종류들은 유제품관련 저널과 식품에 관한 저널에 집중되어 있다. 이는 식품으로서 활용 가능한 소재이며, 활용도가 높다는 것을 의미한다. 특히 발효유 등의 유제품에 관한 연구가 가장 활발함을 확인 할 수 있다.



996편의 검색결과를 분석한 결과 다양한 균주를 이용한 i)제조방법, ii)대량생산 방법, iii)배양 및 발효를 위한 발효원물, iv)배양기, v)그리고 kefir를 이용한 장질환, 당뇨, 항암, 알러지

등의 억제 등 다양한 질환에 유효한 효과를 보인다는 보고들이 존재 하였다. 하지만 본 과제에서 수행하는 배양을 통한 미세소낭에 관한 직접적인 보고는 확인 할 수 없었다. 현재 진행 중인 소재의 신규성 및 질환에서의 치료 및 유효 효과에 대한 in vitro, in vivo 검증을 통하여 신규 기능성을 확보한 신규 식품 소재로서 건강기능식품 등의 활용 방안이 가능하다고 판단하였다.

나. 특허 분석

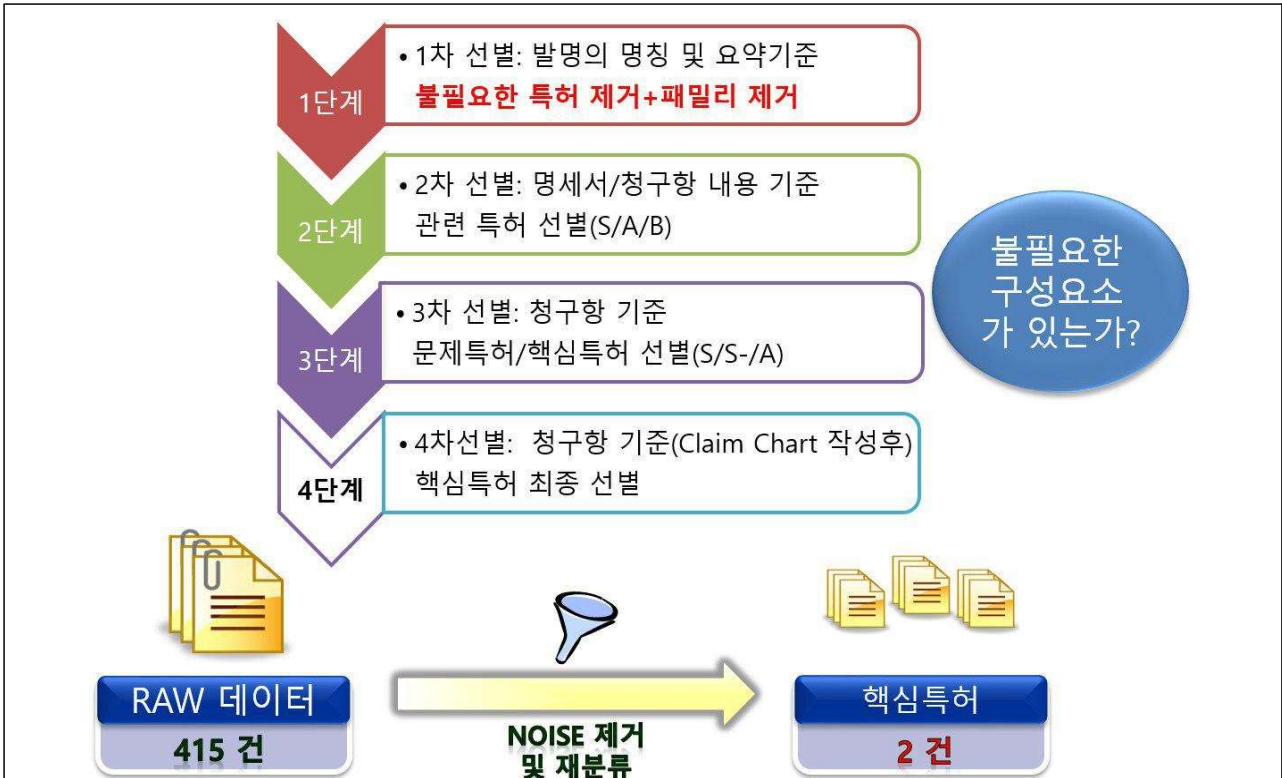
1) 검색범위

검색 기준	~ 현재 (공개일 기준)
검색 대상	US, KR, EP, CN, JP, WO

2) 검색식 및 검색 결과

FOCUST DB							
검색식	US	EP	PCT	CN	JP	KR	Total
((유산균* 케피어* 티벳버섯*) near3 (발효유* 배양* 엑소좀* 미세소낭*)) ((lactoba* kefir* tibet*) near3 ferment*) ((dairy* culture* food* exosome* vesicle) and (장* 대장* 과민성* near4 (* 장질환*)) (gut adj immune) intestine* ((gast* cure*) near4 (food* drug*)))	65	136	86	72	32	24	415

케피어 미세소낭의 장질환 관련 검색식을 이용하여 약 400여편의 특허가 검색되었다. 이 중 불필요한 구성요소를 제거하기 위한 방법으로 총 4단계의 선별 작업을 진행 하였다. 1차 적으로 발명의 명칭 및 요약을 기준으로 불필요한 특허 및 패밀리 특허들을 제거 하였으며, 2차~3차 선별은 명세서 및 청구항을 기준으로 관련 특허 및 문제 특허를 선별하는 방식을 활용하여 최종 핵심 특허를 선별 후 청구항 분석 등의 작업을 진행하였다. 총 문제 및 핵심 특허로 2건의 특허를 선별 하였다. 이 특허들은 PCT를 통해 각국에 진입된 특허 들이다.



문제 특허 (1)

등록/출원 번호	10-2016-0029069	출원인	(주) 엠디헬스케어
법적상태	거절	출원일자	2016. 3. 10
발명의 명칭	유산균 유래 세포막 소포체를 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 치료용 조성물		

주요 청구항	설계안	비고
1. 유산균 유래 세포막 소포체를 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	유산균 미세소낭, 염증질환 관련 용도	○
2. 상기 세포막 소포체는 평균 직경이 10~300 nm인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물	미세소낭의 직경으로 특징 한정	○
검토	<ul style="list-style-type: none"> - 유산균의 포괄적인 균주를 청구하고 있으며, 미세소낭을 종속항으로 청구 하고 있다. 또한 그 용도가 염증질환 관련 내용을 주요 청구항의 구성요소가 상응한다. - 포괄적 청구항 및 균주의 차별성, 질환의 구체화 등의 차별성 보임 - 거절 의견이 나온 특허로서 추가 진행 상황을 주시 할 필요성 있음 	

문제 특허 (2)

등록/출원 번호	10-2016-0029638	출원인	(주) 엠디헬스케어
법적상태	분할 출원 (심사 중)	출원일자	2016. 3. 11
발명의 명칭	발효식품에서 유래된 세포막 소포체를 포함하는 조성물 및 이의 용도		

주요청구항	설계안	비고
1. 세균 또는 곰팡이에 의해 발효된 발효식품에서 유래된 세포막 소포체를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 암은 인터루킨 6(IL-6) 과발현을 특징으로 하며, 폐암, 위암, 또는 대장암인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.	발효식품 유래 세포막 소포체 암예방 약학 조성물	○
2. 제1항에 있어서, 상기 세포막 소포체는 그 평균 직경이 20 nm 내지 200 nm인 것을 특징으로 하는, 조성물	미세소낭의 직경으로 특징 한정	○
검토	- 발효식품 또는 유산균 음료로 포괄적인 청구항 이며, 미세소낭을 종속항으로 청구하고 있다. 또한 그 용도가 암 예방 관련 내용을 주요 청구항 하고 있으며, 그 구성요소 중 일부가 상응한다. - 포괄적 청구항 및 균주의 차별성, 질환의 구체화 등의 차별성 보임 - 분할 출원 특허로서 추가 진행 상황을 주시 할 필요성 있음	

다. 특허 등록 전략

(1) 침해분석

기존 케피어 또는 유산균 관련 미세소낭을 청구하는 특허가 등록되지는 않았다. 하지만 확대대상 발명 1, 2는 이미 PCT를 통해 각국에 진입을 해 놓은 상태이며, 국내에서도 심사진행 중에 있으므로, 등록 여부 및 최종 등록 공고된 청구항에 대해 추적관찰이 필요하다. 포괄적인 청구항을 받을 경우 침해 가능성은 존재하게 된다.

(2) 특허 등록 가능성 분석 및 전략

전략 특허의 발굴이 필수적이며, 포괄적인 청구항에 대한 부분은 기존 특허 뿐 아니라 다양한 논문 및 민간에 공표된 용도 등이 잘 알려져 있으므로 신규성 확보는 어렵다.

따라서, 진보성을 확보하기 위한 전략으로 본 과제에서 활용된 i) 다른 균주와 비교하여 균주의 특이적 특이성 발굴, ii) 구체적 용도의 한정 iii) 제조 방법에 의한 유효성 극대화 iv) 유효성분의 규명을 통한 물질의 특성 청구 등의 후속 연구를 통한 구체적인 전략 특허를 발굴하여 상용화 하여야 한다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
제 1절 목표달성도			
연구개발 목표	연구개발의 내용	가중치	달성률
커피어 유래 미세소포체 분리 방법 최적화	다양한 조건에서의 연구를 통해 커피어 유래 미세소포체의 수득률을 극대화 할 수 있는 분리방법 최적화 및 배양 프로토콜을 확립함.	10%	100%
발효유 내 존재하는 커피어가 생산하는 미세소포체의 과민성 대장증후군 개선 효과 확인	<ul style="list-style-type: none"> - In vitro 시험계를 통한 커피어 균주 유래 미세소포체의 면역 조절 기능에 대한 유효성 자료 확보: 대장세포주인 Caco-2 세포에서 커피어 균주 유래 미세소포체 에 의한 염증성 사이토카인의 유전자 발현 감소 효과와 단백질의 분비 억제 효과 확인. - 과민성 대장증후군 동물모델을 통한 효능 검증 자료 확보: TNBS (Trinitrobenzene sulfonate) 유도 과민성 대장증후군 마우스모델에서 시험물질의 효력을 평가하여 직장 출혈 및 묽은변의 정도가 완화 효과를 확인함. 	30%	100%
새로운 바이오식품 소재로서의 타당성 확인	- 커피어 유래 미세소포체의 안정성 자료 확보: 6개월 장기 보존 시험, 미생물 오염 검사를 통해 커피어 균주 유래 미세소포체의 장기간 안정성을 유지함을 확인함.	10%	100%
커피어 유래 미세소포체의 지적재산권 확보	특허명: 커피어 그레인을 포함하는 과민성 대장증후군의 예방 또는 치료용 조성물, 출원번호: 10-2016-018710	20%	100%
커피어 유래 미세소포체의 효과에 대한 학회 발표	저널명: Plos one, 논문명: Effect of kefir-derived exosome-like vesicles on inflammatory bowel disease in mice.(심사중)	10%	100%
기술이전	자체실시 1건	20%	100%

제 2절 관련분야 기여도

- 기능성 식품원료로 널리 알려진 유산균과 같은 미생물에서 새로운 유효 성분인 미세소포체를 분리하는 기술을 확립하여 미세소포체를 이용한 기능성 식품 신소재 개발에 기여함.
- 케피어 균주 유래 미세소포체의 대장세포에서 확인된 염증성 사이토카인을 억제하는 항염효과 및 동물모델을 이용한 과민성대장증후군 증상완화 효과에 확인에 대한 과학적 접근으로 관련분야의 기초자료를 제공
- 면역 관련 다양한 기능장애를 개선할 수 있는 가능성 자료를 확보하여 위장관기능 이외에 면역기능 증진, 면역기능 저하(알레르기) 같은 면역기능 조절 건강기능식품 원료로 개발하는 참고자료로 제공되어 관련 분야의 새로운 소재 개발에 기여함.

제 5장 연구결과의 활용계획

		코드번호	D-07
--	--	------	------

○ 기존 복합 발효유와 차별화를 두기 위해 복합 발효유에서 분리된 미세소포체만 포함된 기능성 식품 소재를 제품화하기 위해 과제 종료 후 미생물 유래 미세소포체 대량 공정 시스템을 최적화 할 것이며, 연구 기간 중 실용화를 위해 출원된 특허에 관한 권리를 확보하기 위해 특허 등록을 실시할 예정임, 또한 미생물 유래 미세소포체 시작품 제작을 진행할 예정임. 본 연구를 통해 개발된 미세소포체 기능성 원료를 신청할 것이며, 원료 위탁생산자를 탐색할 것임.

1. 사업화 추진계획

가. 기술 개발

- 동물 및 인체유효성 평가 결과(개별인정 획득)를 기초자료로 식의약 분야 제품개발에 적극 활용
- 물리적, 화학적 성상 분석과 생리 활성 지표를 확립하여 기준규격 설정

나. 건강기능식품 원료 인정

- 본 연구결과를 기반으로 장 기능 개선 효능을 가지는 케피어 유래 균주의 개별인정형 원료로 승인 받아 건강기능식품 기능성 원료로 제품화할 계획임. 현재 참여기업인 (주)프로스테믹스에서 건강기능식품 형태로 상품화를 진행하고자 비임상 유효성 평가를 진행 중임
- 케피어 유래 미세소포체의 개별인정형 건강기능식품 소재 개발을 위하여 유효성 및 작용기전의 과학적 입증, 유효(지표)성분의 설정 및 분석법 확립 예정
- 단회, 반복 유전 독성 시험을 통한 안전성 자료 확보
- 생산공정의 표준화를 구축하며, 전문의료기관에서 인체적용시험을 수행할 예정임



<케피어 균주 및 미세소포체 복합체 동결 건조물>

❖ 건강기능식품 개발의 제형 형태

- 미세소포체 단독으로는 인허가상 안전성 이슈가 존재: 상용화의 걸림돌
- 기존 유산균 제형과 유사한 형태와 제조공정으로 제형화 개발 연구 필요
- 균사체에 미세소포체가 포함된 형태의 제형화 (Lab Scale Test)
→ 인허가 안전성 이슈 문제 해결과 동시에 빠른 제품화 전략



<케피어 유래 미세소포체 사업화 추진 방향>

다. 대량생산

- 초고속 원심분리법을 탈피한 100 L 이상의 배양액에서 미세소포체 분리 공정 개발 중임
- 100 L 급 bioreactor 2 대 설비 신설 중에 있으며, 위탁생산 Operation 및 계약 추진 예정

라. 경제성 검토

- 현재 연구용 생산단가는 100회분 10만원으로 1회분 단가는 1000원으로 제품화시 가격경쟁력이 떨어지지만 제품용 생산단가는 1회분 생산 단가를 60원 정도로 17배 정도 단가를 절감하여 사업화의 경제성을 확보함. 그리고 현재 진행중인 대량생산 공정 개발과 배지 최적화를 통해 생산단가가 추가적으로 절감 시킬 계획임.

마. 마케팅 및 판로 확보 방안

1) 제품

- 장 기능 개선 개별인정형 원료로서 승인을 진행하여 건강기능식품으로 출시할 때 주원료로 케피어 유래 균주를 강조하여 판매 성과를 올릴 계획임. 이를 위해 케피어가 시장에서 주목받을 수 있는 포인트에 대해 연구할 예정임.

2) 가격

- 제품의 단가를 낮추기 위하여 경제성과 상품성을 고려한 최적의 배양배지의 배합 조건을 연구하고 현재 1회 0.5 L 의 분획 기술을 100 L 이상 분획 하는 기술을 확보하여 제품의 원가를 낮추어 가격 경쟁력을 확보할 것임.

3) 유통채널 다양화

- 자사몰과 유명포털 유통망을 통한 온라인 쇼핑몰 확충
- 최근 변화하는 다양한 형태의 소비자 유형인 자기만족형 소비 트렌드에 맞추어 연령대 별로 차별화된 패키지를 개발하여 각 세대별 접근이 용이한 유통채널을 통해 세분화된 타겟 연령층을 공략

사. 활용방안

(1) 장건강 기능성 식품군(개별인증 확보)별 제품화

- 예 1) 배변활동 개선관련 건기식품
- 예 2) 면역기능 조절을 통한 장 건강 개선관련 건기식품

(2) 관련 산업 연계 용도용법별 차별화 후 상품화

- 케피어 유래 미세소포체의 고부가가치 산업 응용성과 용도 확대 및 신규 제품화



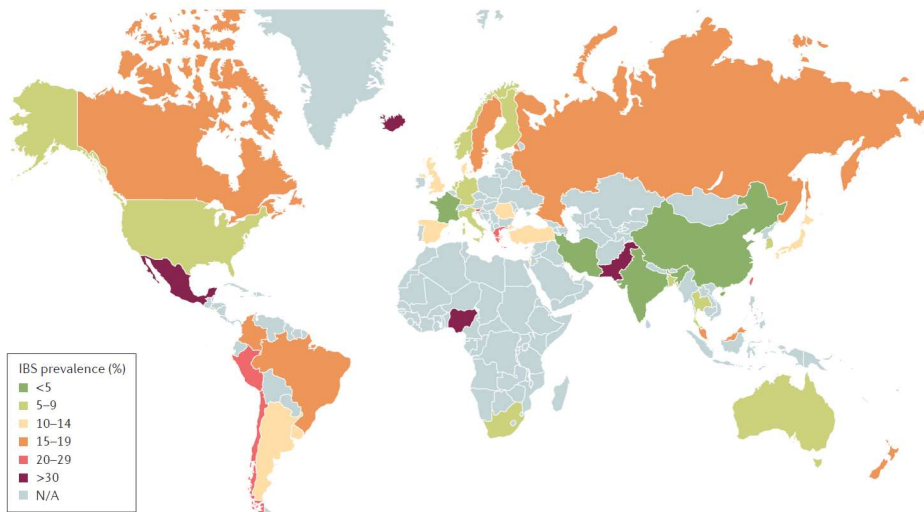
제 6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

제 1절 기 추진한 연구 관련 해외과학기술정보 기술

1. 세계적인 과민성대장증후군 발생 현황 조사



(출처, *Nature reviews Immunology*, 2016)

<국가별 인구 대비 과민성대장증후군의 발생 빈도>

2. 해외 'Kefir(케피어)' 관련 특허 현황 조사

기본적으로 'Kefir(케피어)'란 키워드로 해외 특허를 검색할 경우 미국은 약 985건, 유럽은 약 433건, 일본은 약 700건, 중국은 약 99건으로 확인되며, 케피어와 관련하여 해외 특허의 경우 미국, 일본, 유럽, 중국 순으로 많았음. '케피어 를 포함한 치료용 조성물'과 관계된 특허는 미국은 약 402건, 유럽은 약 119건, 일본은 약 75건, 중국은 약 65 건이 확인되었고, 치료 조성물로서 케피어의 기능을 보여주는 특허의 경우 미국, 유럽, 일본, 중국 순으로 많았음. 본 과제의 목표 및 특허 확보를 고려하였을 때, 케피어의 면역 개선 및 과민성대장증후군과 관계된 특허를 조사한 결과 미국은 약 33건, 유럽은 약 7건, 일본은 약 7건, 중국은 0건으로 확인되었으나 케피어 Exosome(미세소낭)관련 특허는 확인할 수 없었음. 종합적으로, 특허를 기반 하여 고려해볼 때, '면역 개선 및 과민성대장증후군'에 관계하는 케피어 연구는 세계적으로 미비한 실정이며, 현재 케피어를 활용한 연구개발은 여러 국가들 중 미국에서 가장 많이 시도되고 있는 것으로 파악됨.

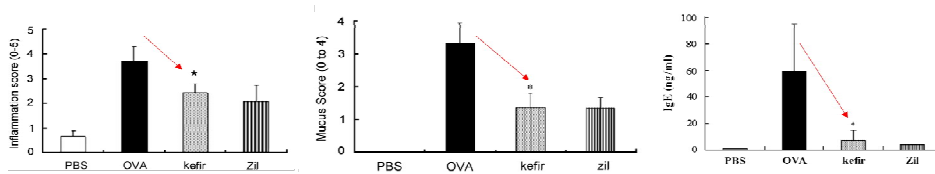
3. 케피어의 면역 개선 효과 관련 문헌(해외 저널) 조사



Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Immunobiology 212 (2007) 647–654

Immunobiology
www.elsevier.de/imbio

Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model



(출처, *Immunobiology*, 2007)

OVA를 이용해 알러지가 유도된 마우스 모델에 케피어 처리시 염증 억제 효과를 확인한 논문으로 왼쪽으로부터 면역세포의 유입(infiltration) 정도, 점액 발생 정도 및 알러지 반응에 핵심 역할을 하는 IgE 발생 정도를 측정하여 케피어가 염증 억제 및 면역 질환인 알러지 반응 개선에 관계하고 있음을 밝혔으나, 해당 기전 혹은 메커니즘에 대해서는 아직 밝혀진 바가 명확하지 않음. 추가적으로 케피어 미세소낭을 활용한 연구결과는 미비한 상태이며 그에 따른 효과를 확인한 연구결과는 확인할 수 없었음.

4. 결론

유산균 및 Kefir관련 Exosome 관련 식품 및 의약품으로써의 이용 혹은 판매 등의 해외 사례는 아직까지 찾아볼 수 없었음.

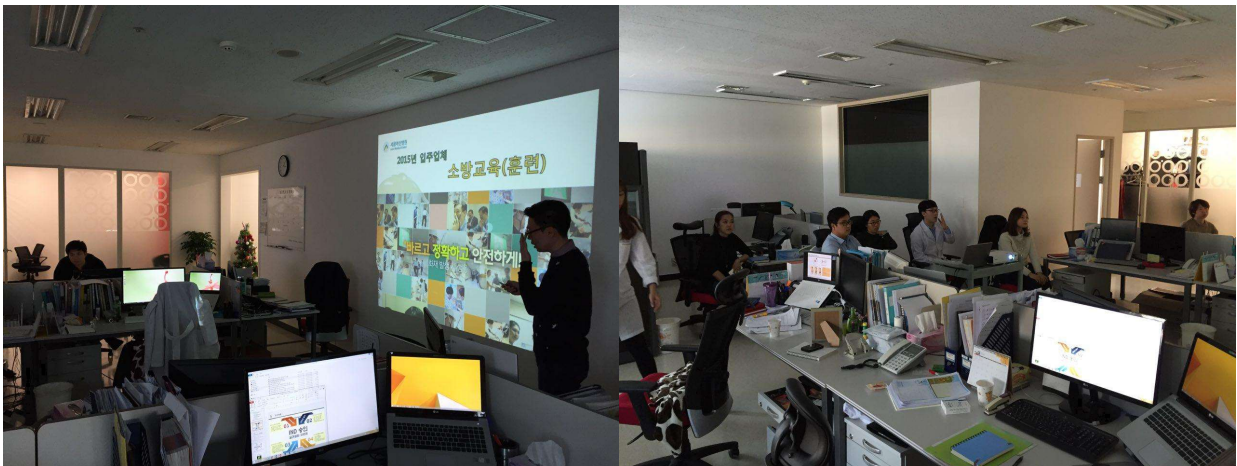
제 7장 연구개발성과의 보안등급

		코드번호	D-09
보안등급분류	일반과제		
결정사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음		

제 8장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

코드번호	D-11
------	------

- 연구실 내에서 사용하고 있는 기계, 기구, 전기,약품, 병원체 등의 위험, 유해요소의 이상 유무 및 관리 실태를 교육 및 점검 실시
- 실험실 안전관리에 대한 종합적인 자체계획을 수립하여 운영하고 있는지 월간안전관리 점검표를 만들어 안전관리계획/ 안전 교육/ 시설 안전관리 / 시약 관리로 세분화하여 점검 실시.
- 오염폐기물을 보관할 별도의 공간에 폐기물 용기 뚜껑을 설치하여 에어로졸 발생 최소화를 통한 청결관리 실시. 안전캐비넷 1개소 설치하여 화기나 화공약품을 별도로 보관, 연구원들의 정기적인 건강검진(년 1회)을 실시함.



<실험실 안전교육 및 소방안전교육 실시>

제 9장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	케피어 그레인을 포함하는 과민성 대장 증후군의 예방 또는 치료용 조성물	(주)프로스 테믹스		한국		2016.11.25	단독사사	출원
2	논문	Effect of kefir-derived extracellular vesicles on inflammatory bowel disease in mice.		제1저자, 참여저자, 교신저자	Plos one		2017.mm.dd (심사중)	단독사사	SCI 논문 (심사중)

제 10장 참고문헌

코드번호	D-14
1. Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of japanese encephalitis. <i>Antimicrob. Agents. Ch.</i> 51: 3367-3370 (2007)	
2. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. <i>Nature</i> 454: 428-435 (2008)	
3. Gismera CS, Aladrén BS. Inflammatory bowel diseases: a disease(s) of modern times? Is incidence still increasing?. <i>World J. Gastroenterol.</i> 14: 5491-5498 (2008)	
4. Yang SK, Yun S, Kim JH, Park JY, Kim HY, Kim YH, Chang DK, Kim JS, Song IS, Park JB, Park ER, Kim KJ, Moon G, Yang SH. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the songpa-kangdong district. Seoul, Korea, 1986-2005: A KASID study. <i>Inflamm. Bowel Dis.</i> 14: 542-549 (2008)	
5. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. <i>Gastroenterology</i> 140: 1785-1794 (2011)	
6. Cabré E, Domènech E. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. <i>World J. Gastroenterol.</i> 18: 3814-3822 (2012)	
7. Kawada M, Arihiro A, Mizoguchi E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. <i>World J. Gastroenterol.</i> 13: 5581- 5593 (2007)	
8. Cho EJ, Shin JS, Noh YS, Cho YW, Hong SJ, Park JH, Lee JY, Lee JY, Lee KT. Anti-inflammatory effects of methanol extract of <i>patrinia scabiosaefolia</i> in mice with ulcerative colitis. <i>J. Ethnopharmacol.</i> 136: 428-435 (2010)	
9. Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy <i>Lactobacillus</i> strains to Caco-2 cell cultures. <i>Int. J. Food Microbiol.</i> 41: 45-51 (1998)	
10, Lehto EM, Salminen SJ. Inhibition of <i>Salmonella typhimurium</i> adhesion to Caco-2	

cell cultures by Lactobacillus strain GG spent culture supernate: Only a pH effect?
FEMS Immunol Med. Mic. 18: 125-132 (1997)

11. Lehto EM, Salminen SJ. Inhibition of Salmonella typhimurium adhesion to Caco-2 cell cultures by Lactobacillus strain GG spent culture supernate: Only a pH effect?
FEMS Immunol Med. Mic. 18: 125-132 (1997)

12. Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197-215 (2000)

13. Tuomola EM, Ouwehand AC. Adhesion of some probiotic and diary Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. Int. J. Food Microbiol. 41: 45-51 (1998)

14. 식품의약품안전처 고시 제 2013-40호 (2013 년 04 월 05 일) '비임상시험관리기준'

15. OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997).

16. Isaacs KL, Lewis JD, Sandborn WJ, Sands BE, Targan SR. State of the art: IBD therapy and clinical trials in IBD. Inflamm Bowel Dis 2005;11:3S-12S

17. Miquel S, Leclerc M, Martin R, Chain F, Lenoir M, Raguideau S, Hudault S, Bridonneau C, Northen T, Bowen B, Bermúdez-Humarán LG, Sokol H, Thomas M, Langella P. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of Faecalibacterium prausnitzii. mBio 2015;6:e00300-15.

18. Li XL, Cai YQ, Qin H, Wu YJ. Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. Can J Physiol Pharmacol. 2008;86:841-9.

19. Zarzecki MS, Bortolotto VC, Poetini MR, Araujo SM, de Paula MT, Roman SS, Spiazzi C, Cibin FW, Rodrigues OE, Jesse CR, Prigol M. Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of p-Chloro-Phenyl-Selenoesterol on TNBS-Induced Inflammatory Bowel Disease in Mice. J Cell Biochem. 2016 Aug 6.

20. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. Nat Protoc. 2007;2(3):541-6.