

발간등록번호

11-1543000-002466-01

장내 미생물총 개선을
통한 인체면역 기능개선
소재 및 발효유제품 개발
최종보고서

2018. 10. 11.

주관연구기관 / 서울대학교

협동연구기관 / 한국과학기술연구원

(주)고바이오랩

(주)한국야쿠르트

농림축산식품부

보고서 요약서

과제고유번호	315067-3	해당단계 연구기간	2015.10.12. - 2018.10.11. (36개월)	단계구분	총단계
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	장내 미생물총 개선을 통한 인체면역 기능개선 소재 및 발효 유제품 개발			
연구책임자	고광표, 강경수, 박성준, 최일동	해당단계 참여연구원 수	총: 40명 내부: 40명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 1,000,000 천원 민간: 667,000 천원 계: 1,667,000 천원
		총연구기간 참여연구원 수	총: 40명 내부: 40명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 1,000,000 천원 민간: 667,000 천원 계: 1,667,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 산학협력단, 한국과학기술연구원,			참여기업명 (주)고바이오랩, (주)한국야쿠르트	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	10	10							1		

- | | |
|--|-----------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - 본 과제의 목적은 연령 및 건강상태별 한국인 장내 미생물총 특성 분석을 통한 장내 미생물총 밸런스 및 면역 기능 개선 소재 발굴 및 발효 유제품의 개발임 - 연령 및 건강상태별로 수집한 인체 대변시료를 기반으로 차세대염기서열 분석 및 생물정보학적 분석을 통해 한국인 장내 미생물총 라이브러 | 보고서 면수
: 178 |
|--|-----------------|

<p>리를 구축함</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대변 시료들로부터 한국인 유래 장내 미생물 균주 라이브러리를 구축하고, 관련 미생물 유전체 정보를 확보함. - 확보한 한국인 유래 장내 미생물 균주들을 대상으로, 안정성 및 면역기능 기능성을 <i>in vitro</i> 모델에서 평가하여 핵심 기능성 미생물 소재인 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> SNUG50430을 발굴하였으며, 이의 대량 생산 조건 최적화를 꾀함 - 천연물 라이브러리로부터 유망 소재를 선정, 장내 균총 개선능을 검증한 천연 프리바이오틱스 소재 발굴을 완료함 - 시제품의 면역기능 및 장내 균총 개선능을 <i>in vivo</i> 마우스 모델에서 입증하였으며, 제품 맞춤형 대량 생산 공정을 구축함 	
---	--

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><연구 목적> 연령 및 건강상태별 한국인 장내 미생물총 특성 분석을 통한 장내 미생물총 밸런스 및 면역 기능 개선 소재 발굴 및 발효 유제품의 개발</p> <p><연구 내용></p> <ul style="list-style-type: none"> • 연령 및 건강상태에 따른 한국인 장내 미생물총 분석 및 소재 라이브러리 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 연령별, 건강상태별 인체 대변시료 확보 및 차세대염기서열분석 (16S rRNA)을 통한 장내 미생물 군집 메타게놈 분석 - 단변량, 다변량 분석을 통한 연령별 및 면역 관련 건강 상태에 따른 한국인 장내 미생물총 특징 분석 - 연령별, 건강상태별 표준 장내 미생물 및 유해균, 유익균 대량 분리 동정 - 장내 미생물총 분석을 위한 인체 대장모사시스템 구축 - 천연물 라이브러리를 활용한 천연 프리바이오틱스 소재 발굴 - <i>in vitro</i> 장내 미생물-동물세포 혼합 배양을 통한 면역기능 개선 효능 평가 - 장상피세포 tight junction 측정, 장 점막 두께 및 발현량 측정, 면역세포 유래 사이토카인 분비능 측정 • 분리, 상용 균주를 활용한 장내 미생물총 밸런스 개선 균주의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 프로바이오틱스 소재안정성, 기능성에 따른 균주 발굴 / 배합비 최적화 - 우유 발효능 및 배양조건 확립을 위한 기초특성 파악 - 장관 모사시스템을 활용한 혼합소재의 장내 미생물 개선 효능 검증 - CCD을 이용한 프리·프로바이오틱스 배합비 최적화 - 단일/혼합 기능성 균주 별 최적배지 및 배양조건을 확립 - 단일/혼합 기능성 균주 대량생산 공정 구축 및 최적화 • 개발 소재를 활용한 발효 유제품의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 농축, 동결, 건조 등의 가공공정에서 상용화 생산 적합성 시스템 구축 및 보호제 적용 연구 - 코팅 및 분말화 기술 적용을 통해 저장 안정성이 높은 기능성 중균 개발 - Non-specific chemical profiling을 통한 장내 미생물총과 대사체와의 상관관계 연구 - 천연 프리바이오틱스의 화학성분 규명 및 원료 표준화 - 기능성 균주의 발효유 제품 적용 가능성 검토 및 제품 대량생산 공정 구축 - 면역결핍 마우스, Pseudo-germ free 마우스 모델을 이용한 장내 미생물 개선이 면역기능 개선에 미치는 효과 검증 - 연령별, 건강상태별 맞춤형 시제품 개발
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 기술적 성과 <ul style="list-style-type: none"> - 연령별, 건강상태별 한국인 마이크로비옴 빅데이터 확보

	<ul style="list-style-type: none"> - 순수 분리한 신규 장내 미생물 중 인체 면역 기능 개선 효과를 가진 기능성 미생물 분리균주 확보, 소재화 - 확보한 소재들의 균학적 특성 파악 및 장내전달체계 확인 - 핵심 미생물 소재인 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> SNUG50430의 대량 생산 조건 최적화 - 유제품 적용용 고기능성 천연물 소재 확보 - 맞춤형 <i>in vivo</i> 마우스 모델을 통한 소재 및 시제품들의 기능 검증법 구축 - 제품 맞춤형 대량 생산 공정 완비 - 향후 의료용 마이크로비옴 신약 개발을 위한 다양한 실험적 검증 모델 확보 <ul style="list-style-type: none"> • 경제·산업적 성과 <ul style="list-style-type: none"> - 차별화된 면역 조절 기능성을 갖춘, 고기능성 미생물 및 천연물 소재 발굴 - 연령 및 건강상태별로 표준화된 맞춤형 제품을 개발, 제공함으로써, 신사업 영역 확보 및 충분한 수준의 시장 경쟁력 기대 - 천연물 유래 소재 및 유산균 프로바이오틱스를 혼배한 고기능성 프리미엄 발효유 개발로 전반적 발효유 시장의 확장 기대 - 마이크로비옴 분석기술을 기반으로 한 소재 발굴 - 소재 평가, 개량 및 최적화 - 대량 생산화 등의 신제품 파이프라인 구축 				
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 장내 미생물총 밸런스 개선 및 장관면역 증진 기능성을 갖춘 기능성 소재 (미생물 및 천연물 등) 개발 파이프라인 확보 - 개발 파이프라인을 통하여 확보한 면역증진 기능성 소재들의 혼입을 통한 시너지 효과를 가지는 제품 개발 - 연령별 균총 표준화 및 기능성 소재 발굴을 통해 각 연령대에 요구되는 기능성 제품 개발에 활용 (예: 영유아의 경우 면역개선을 통한 아토피 질환 예방 및 개선, 청소년의 경우 여드름 등 피부질환 개선, 성인 노년층의 경우 항노화 제품) - 분석 기술 파이프라인 및 기능성 소재들을 활용하여 향후 고급 프리미엄 산업이 더욱 활성화될 것으로 예측되는 현대 사회 소비자의 트렌드를 반영한 개인 맞춤형 제품으로 응용 발전 - 유가공 산업 성장 유도 및 낙농가 소득 창출 가능 - 소재 및 기술 수출을 통한 부가가치 창출 (B2B, C&D) - 과학적 자료 제공을 통한 발효유 효능에 대한 소비자의 신뢰도 향상 - 기능성이 검증된 원료를 이용한 국민건강증진 및 국가경쟁력 증대 도모 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	장내 미생물	면역 기능 조절	발효유제품	천연 프리바이오틱스	장관면역
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Gut microbiota	Immuno- modulation	Fermented milk	Natural prebiotics	Intestinal immune system

< 목 차 >

1장. 연구개발과제의 개요	7
2장. 연구수행 내용 및 결과	34
3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	144
4장. 연구결과의 활용 계획 등	174
붙임. 참고 문헌	176

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

연령별, 건강상태별 면역 기능 개선 한국인 장내 미생물총 특성 분석을 통한 장내 미생물총 밸런스 개선 소재 발굴 및 발효 유제품의 개발

2절. 연구개발의 필요성

1. 장관면역의 중요성

- 장관은 음식물의 소화, 흡수, 배설이 일어나는 곳이며 동시에 장관 내 미생물과 이들의 부산물, 항원, 독소 등의 혈류 유입이 차단되고 있는 방어벽으로서 우리 몸의 최전방에서 중요한 면역학적 기능을 수행함.
- 소장, 대장을 포함하는 장관면역기관은 인체 전체 면역의 60% 이상을 차지하고 있는 중요한 면역기관이라고 할 수 있음. 특히, 소장의 점막세포는 인체 피부면적의 약 200배에 달하는 표면적 (400 m²)을 가지는 것으로 추산되는데 매일 섭취하는 음식물을 비롯한 각종 물질의 소화, 흡수 과정에서 점막세포의 기능에 이상이 생기는 경우 잦은 감기, 장염, 질염이나 바이러스 감염 증상을 보이는 등 심각한 문제를 초래할 수 있음.
- 최근 연구결과에 의하면 장관점막세포의 점막 기능 소실과 장관세포 간 치밀 결합 (tight junction)의 약화가 여러 고분자 물질들의 장관세포 투과성을 증가시켜 leaky gut syndrome (장누수증후군)을 유발하고, 이러한 장누수증후군이 장내세균전위, 장관내독소혈증 등을 통해 각종 면역 반응, 염증 반응을 초래하여 만성질환의 원인 및 악화에 기여하는 것으로 나타나고 있음.
- 실제로 장관 투과성이 증가되어 있는 것으로 보고되는 질환이나 임상적 상태는 비만, 당뇨, 노화, 천식, 류마티스성 관절염, 염증성 대장질환, 과민성 대장증후군 등으로 매우 광범위하여 만성질환에 있어 장관면역이 미치는 영향이 매우 중요함을 보여줌.

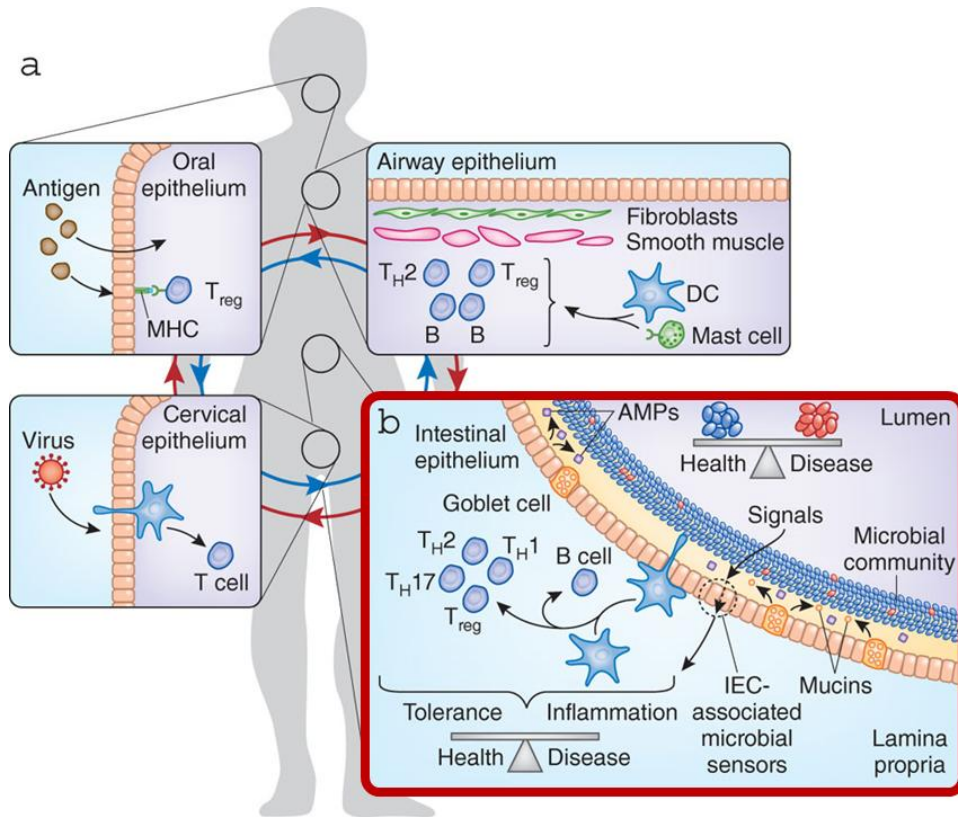


그림 1. 인체 부위별 점막면역 (a) 및 장관면역 (b)의 작용 모식도

2. 장내 미생물과 장관면역, 질환과의 관계

- 인체는 인간세포보다 10배 많은 약 100조개의 미생물과 함께 살고 있으며 미생물의 유전자 수는 인간 유전자 수의 100배가 넘는 것으로 알려지고 있음. 특히 이들 중 대부분이 인체의 장내에서 장관 점막 주위에 서식하면서 병원성 세균의 침입 억제, 장 표피세포의 손상 방지, 지방 축적 조절, 비타민K 생산, 철분 흡수, 장 점막의 면역 증강, 담즙산 대사 등 인체의 전반적인 대사 과정과 생리작용에 관여하는 것으로 밝혀짐.
- 이러한 장내 미생물의 20-40%만이 기존의 방법으로 배양이 가능하기 때문에 배양법 대신 개인 미생물총을 총체적으로 분석하는 metagenomics 연구가 도입되었으며 차세대염기서열분석법의 발달과 함께 저렴한 가격으로 대량의 시료에 대한 metagenomics 연구가 가능해짐.
- 2000년도 중반 이후 미국과 유럽에서 각각 Human Microbiome Project (HMP)와 Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT)의 거대 프로젝트가 진행되면서 장내 미생물에 대한 연구가 전 세계적으로 수행되기 시작함. 이를 통해 인체부위별 (피부, 비강, 구강, 장, 비노생식기) 미생물 구성에 관한 정보가 분석되고 있음. 지금까지 발견된 장내 미생물 species는 총 1000 여 개 정도이며, 각 개인은 최소한 100-300 개의 species를 가지고 있음이 밝혀짐.
- 또한 장내 미생물총의 구성에 따라서 세 종류의 장 유형 (enterotype)으로 구분될 수 있음.

대표적인 genus에 따라서 *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*로 분류되어 각 미생물의 대사 능력에 따라 체질이 결정될 수 있음이 보고됨.

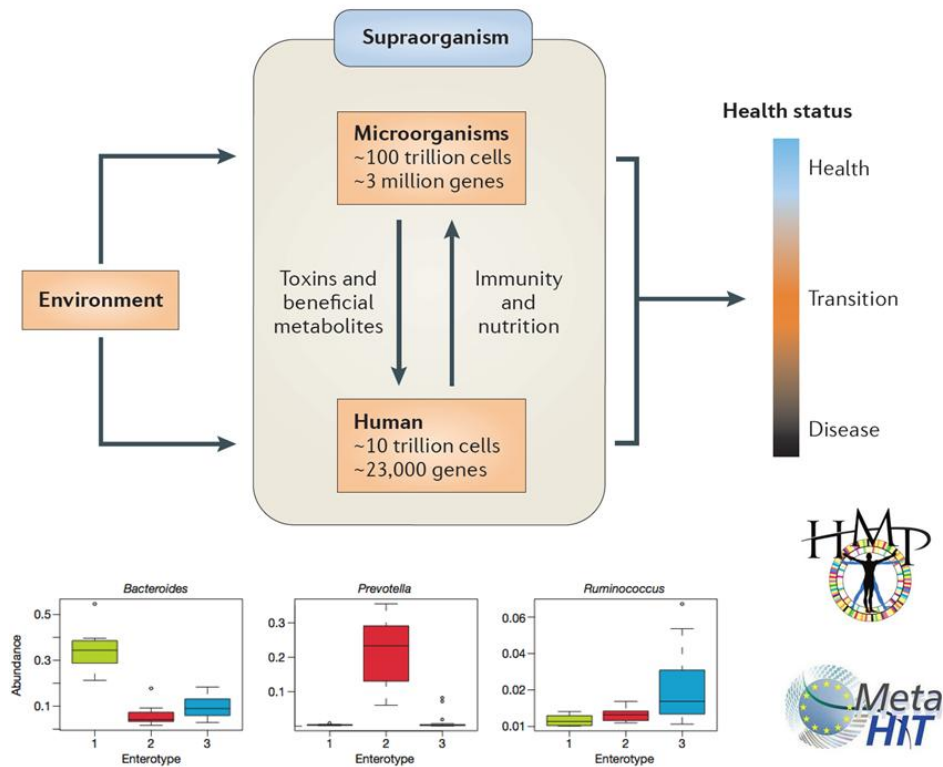


그림 2. HMP, MetaHIT을 통한 인체 장내 미생물 연구 및 3가지 장 유형

- 특히, 장내 미생물총의 구성이 인간의 건강과 질병 상태와 유의적인 상관관계가 있음이 밝혀지고 있음. 그림 3에 의하면 항생제 사용에 의한 장내 미생물 불균형이 대사성 질환에 미치는 영향을 간접적으로 알 수 있음.

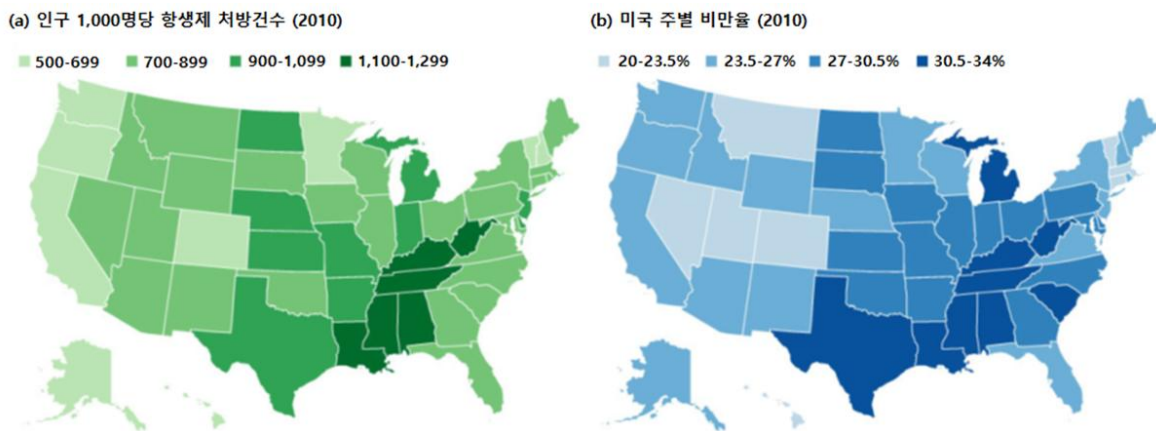


그림 3. 미국의 각 주별 항생제 사용률과 비만 유병률 사이의 관계

- **비만, 당뇨 환자**에서 *Clostridium leptum*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides intestinalis*, *Clostridium hathewayi*, *Eggerthella lenta*, *Bifidobacterium spp.* 등 장내 미생물의 증가/감소 여부가 질병 상태와 깊은 관련이 있음이 보고되었으며, **아토피염, 자가면역질환**이 있는 어린이의 경우 미생물총 다양성의 감소와 함께 *Bacteroidetes/Firmicutes*의 비가 증가하고 *Proteobacteria*의 다양성이 감소하는 것이 밝혀짐.
- 또한 **과민성 장증후군**에서 *Hemophilus parainfluenza*, *Alistipes*의 증가와 **염증성 장질환**에서 *Faecalibacterium*, *Roseburia*의 감소 및 *Enterobacteriaceae*, *Ruminococcus gnavus*의 증가가 보고된 바 있음. 이외에도 만삭아에 비해 **미숙아**의 경우 생후 72시간에 *Clostridium difficile*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Citrobacter* 종을 포함한 병원균이 많이 발견되며 *Bifidobacterium* 종과 *Lactobacillus* 종은 적게 발견되는 등 장내 미생물총이 인체 질병 및 건강상태와 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있음.

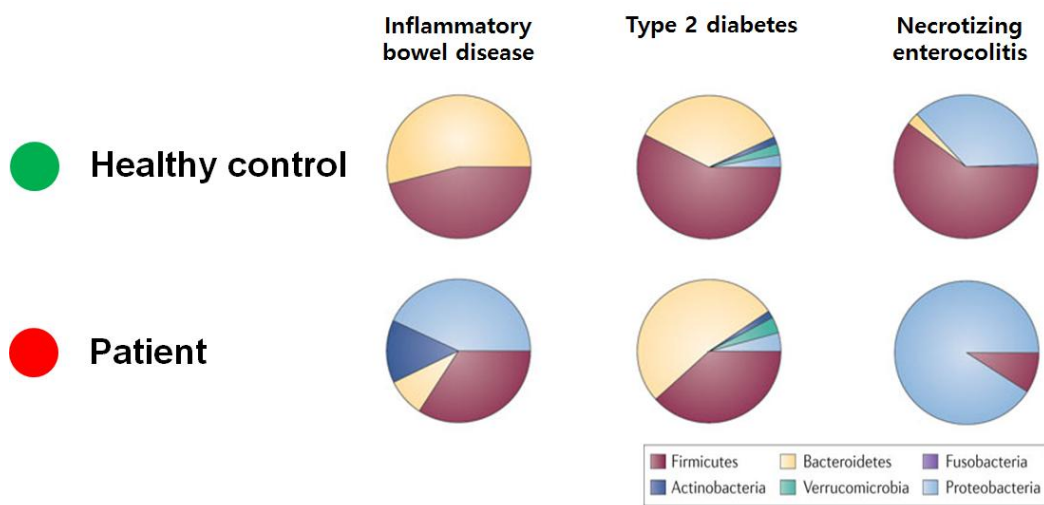


그림 4. 질환별로 다르게 나타나는 인체 장내 미생물총의 차이점

- 최근에는 장내 미생물과 질병과의 상관관계를 밝히는 수준을 넘어서 미생물에 의한 각종 만성 질환 발병의 기전을 밝히는 연구들이 수행되고 있으며, 무균 상태에서 자란 마우스, 돼지 등에 사람의 장내 균총을 주입시켜 인간의 대장과 유사한 상태로 만든 동물모델이 개발됨.
- 이러한 연구들에 의하면 장내 미생물총의 구성비율과 점막내 분포가 장점막의 정상적인 기능 유지와 장관세포 간 긴밀한 결합에 중요한 역할을 함. TLR과 같은 pattern recognition receptors의 장내 미생물총 인식이 MyD88, TRAM, TRIF 등을 경유하여 면역세포의 cytokines 생산을 결정함으로써 선천적, 후천적 면역 체계를 조절할 수 있고 만약 이러한 조절 시스템에 이상이 생길 경우 만성 질환으로 이어질 수 있음이 입증되고 있음.

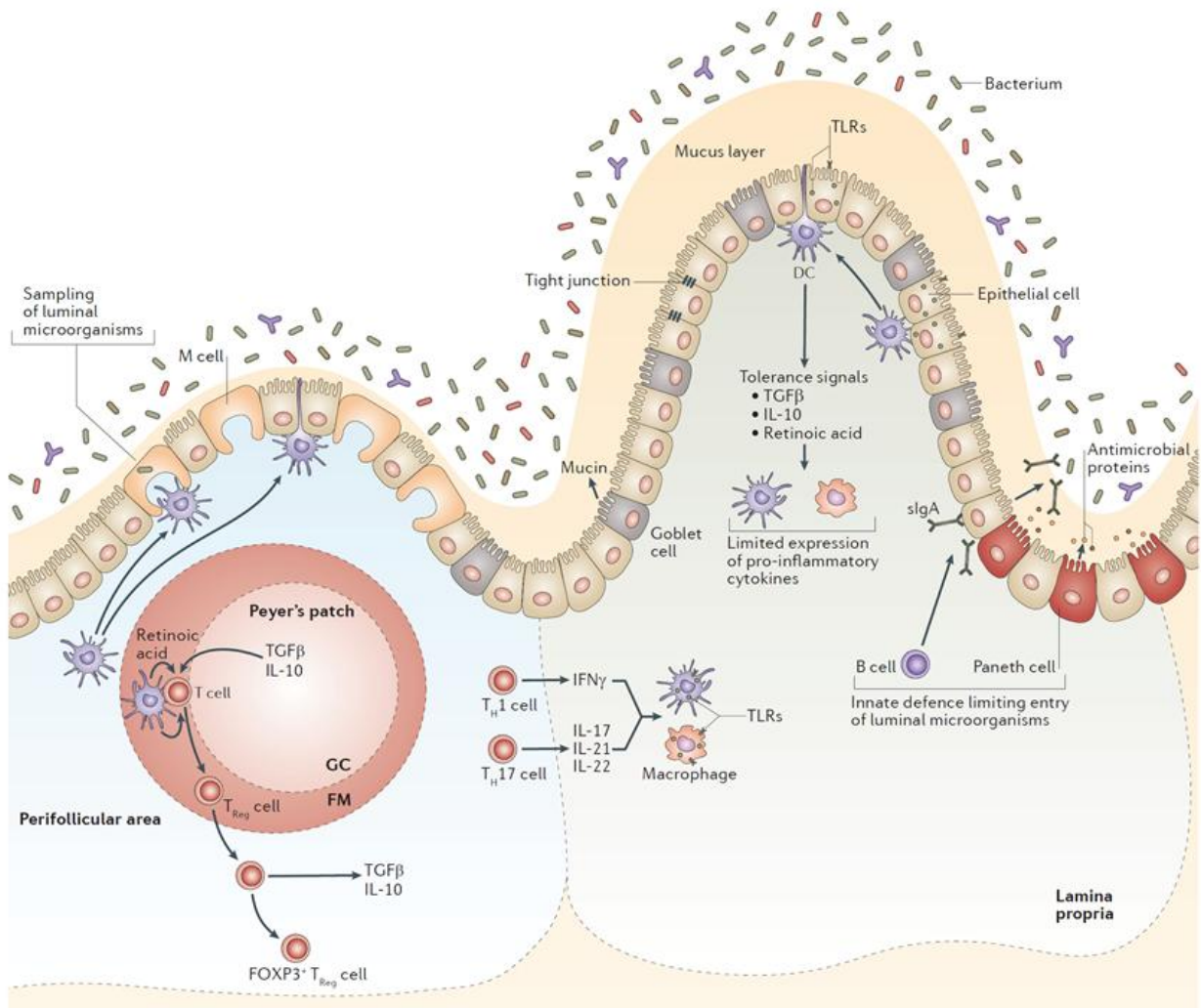


그림 5. 장내 미생물에 의한 장관면역 작용기전 모식도

- 한편, 국내에서는 2010년부터 본 연구진 주도하에 한국인 쌍둥이 코호트를 이용하여 미생물 유전체의 다양성과 질환과의 연관성을 규명하는 연구가 시행되고 있으며 마이크로비옴 국제심포지엄 참가를 통한 국제 협력 연구가 활발히 수행 중에 있음. 향후 마이크로비옴 타겟 소재 발굴 및 제품화를 위한 추가적인 대규모 연구 지원이 요구된다고 할 수 있음.

3. 장내 미생물 기반 응용연구 및 제품화 동향

- 장내 미생물 연구를 통해 얻은 정보를 건강 증진 및 질병치료에 활용하기 위해 마이크로비옴 유래 생물학적 표지자 개발을 통한 질병 조기진단, 대변 이식, 새로운 프로바이오틱스 개발 등의 응용연구가 진행 중에 있음.
- 특히 마이크로비옴 조절을 통한 치료제 개발 기술은 2011년 Science 저널에 의해 10대 breakthrough 기술에 선정되었으며, 2014년 “Human microbiome therapeutics”가 미래를 바꿀 10대 emerging technology 중 대표 바이오 기술의 하나로 선정된바 있음 (WEF, 세계경제포럼).



그림 6. 미래 선도 기술로 기대되고 있는 인체 마이크로비옴 조절 기술

- 전 세계적으로 인체 마이크로비옴 전문가들이 주요 자문위원으로 구성된 마이크로비옴 관련 사업체들이 형성되고 있으며, Enterome, GT Biologics, Second Genome, Seres Health, Vithera Pharmaceutica 등이 사업을 선도하고 있음. 그러나 아직 장내 미생물 타겟 의약품은 신규 장내 미생물 소재의 안전성 검증, 질환개선 효과의 원인성 규명과 같은 후속 연구가 추가적으로 필요한 상황이므로 제품화, 산업화를 위한 장벽이 높을 것으로 여겨짐.

표 1. 마이크로비옴 사업체 글로벌 현황

Company (location)	Focus/main products	Company (location)	Focus/main products
Enterome (France)	Biomarkers for IBD and NAFLD based on microbiome signatures / MET220, MET230, IBD120	Second Genome (USA)	Application of microbiome science for discovery of new Therapies / Metagenomics sequencing service
GT Biologics (UK)	Development of Live Biotherapeutics (LBPs) for the treatment of autoimmune diseases / Thetanix	Seres Health (USA)	Therapeutics to catalyze restoration of a healthy microbiome (Ecobiotics) / SER-109 (phase 3), SER-262, SER-155
Metabogen (USA)	Biomarker discovery for metabolic diseases	Vedanta Biosciences (USA)	Immunomodulating therapies
MicroBiome therapeutics (USA)	Development of microbiome modulator / NM504 (reformulation of metformin)	Vithera Pharmaceutica (USA)	Engineered Lactococcus lactis / VT301

- 따라서 단기적으로 마이크로비옴 시장은 기존 유산균, 발효유제품 등을 활용한 장내 미생물총 개선 기능성 식품을 중심으로 성장할 것으로 여겨짐.

4. 면역기능 개선 관련 건강기능식품, 유제품 국내 시장 및 연구 현황

- 식약처가 면역기능 개선효과로 허가한 건강기능식품 (건기식) 소재로는 홍삼, 인삼을 포함한 4종의 고시형 소재와 16종의 개별인정형 소재가 있음 (2014년 기준). 그러나 전체 건기식 시장의 46% 이상이 홍삼 제품 (2012년 기준 6,484억 원의 시장규모)일 정도로 단일 소재로의 쏠림 현상이 심하며 홍삼 소재의 장내 미생물총을 경유한 장관면역 개선 효과는 아직 과학적인 검증이 이루어지지 않은 상황임.

- 국내 유산균 제품 시장은 1조 4000억 원 규모로, 대부분 발효유가 차지하고 있음 (2012년 기준). 식약처에 따르면, 2013년 프로바이오틱스 품목의 성장률은 55%로 건강기능식품의 평균성장률 (5%)을 뛰어넘는 수치를 나타냄.
- 또한, 개별인정형 중 프로바이오틱스의 등록 현황은 2010년 전 1건에서 2015년 현재 12건으로 꾸준히 증가하고 있으며, 기능성의 종류도 ‘장 건강’과 ‘면역력 강화’ 등 전통적 의미의 기능성뿐만 아니라 면역 과민반응 억제, 여성 질 건강, 알레르기 질환 억제, 고혈압 개선, 혈행 개선, 체지방 감소, 피부과민반응, 항노화 등 다양한 기능성을 가지는 제품으로 확장되어 판매되고 있음.

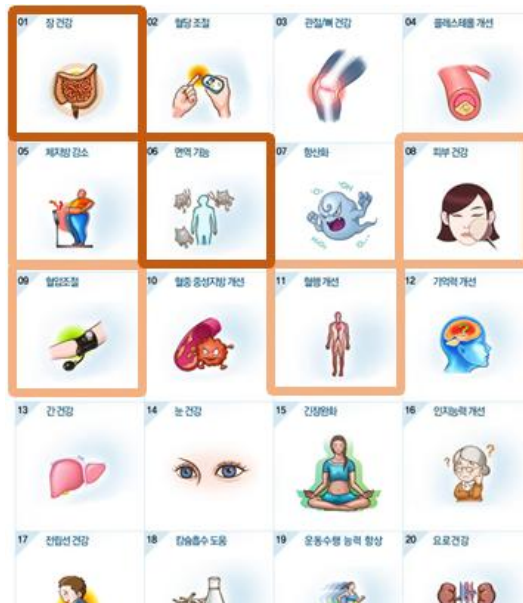


그림 7. 개별인정형 프로바이오틱스의 기능성

- 현재 식약처가 장 건강과 관련되어 허가한 고시형 및 개별인정형 건기식 원료로는 프리바이오틱스 역할을 수행하는 각종올리고당과 프로바이오틱스 균주가 있으며, 특히 면역을 조절하여 장건강에 도움을 주는 것으로 개별인정형 건기식 허가를 받은 ‘VSL#3 프로바이오틱스’ 소재 등이 있음. 하지만 현재 시판중인 발효유제품은 장내 균총을 개선하여 배변활동 등에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 기대되고 있지만, 각 제품들에 대한 metagenomics 기반 총체적 장내 미생물총 분석 연구는 미흡한 실정임. 한국인 마이크로비옴 분석 데이터를 기반으로 한 장 환경 개선에 대한 검증 연구가 반드시 필요함.
- 또한 현재 시장에 유통되고 있는 대부분의 프로바이오틱스 제품은 고시형 제품으로, 주로 유제품이나 건강한 신생아의 분변에서 분리한 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* 계열의 미생물이 이용되고 있으며, 관련 특허도 상기 균주에 국한되어 2000여 건 (2002년 이후) 이상 등록되어 있음. 따라서 시장경쟁력 확보를 위해서 신규성 있는 균주 발굴 및 권리 확보가 필요한 상황임. 이를 위해서는 기능성 입증과 함께 장내 균총 개선 효능 검증이 동시에 이루어져야 함.

표 2. 식약처 인정 19개의 프로바이오틱스 균주

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

5. 맞춤형 발효유제품 개발의 중요성

- HMP, MetaHIT 등을 통한 전 세계 지역 별 최근 인체 마이크로비옴 연구는 인체 부위별, 인종별로 미생물총에 유의적인 차이가 있음이 밝혀짐. 또한 생애주기와 건강상태 (모유 수유, 영양상태, 항생제 처리, 비만 등)에 따라 장내 미생물총이 서로 다르게 분포하는 것으로 나타남. 이러한 결과는 한국인 고유의 장내 미생물총 특징 규명의 중요성과 연령별 그룹화, 표준화의 필요성을 보여줌.

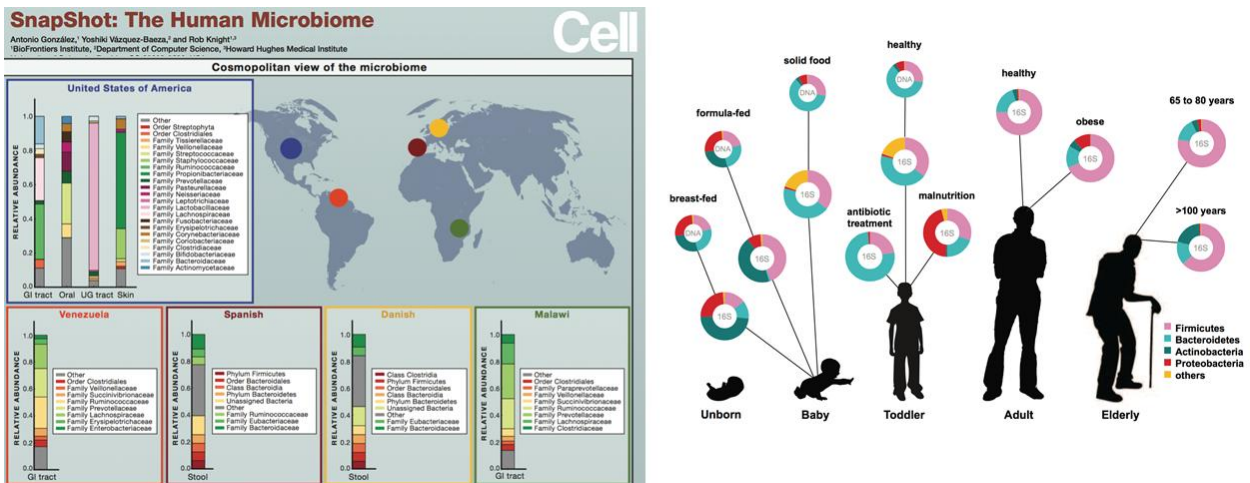


그림 8. 지역, 인종, 연령, 건강상태에 따른 인체 장내 미생물총 차이

- 그림 9에 따르면 서로 다른 네 가지 유산균종 (*L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* Lafti-L10, *L. casei* CRL-431, *L. plantarum* WCFS1)을 건강한 사람에게 섭취 시켰을 때, 34가지 인체 점막 유전자의 발현 수준은 프로바이오틱스에 의한 차이보다 사람 개개인 간의 차이에 의해 더 큰 영향 (10-100배)을 받음. 즉, 숙주의 유전자형, 생활습관, 섭식습관 등과 같은 여러 가지 생물학적, 환경적 인자들을 고려한 맞춤형 프로바이오틱스 설계의 중요성을 알 수 있음.

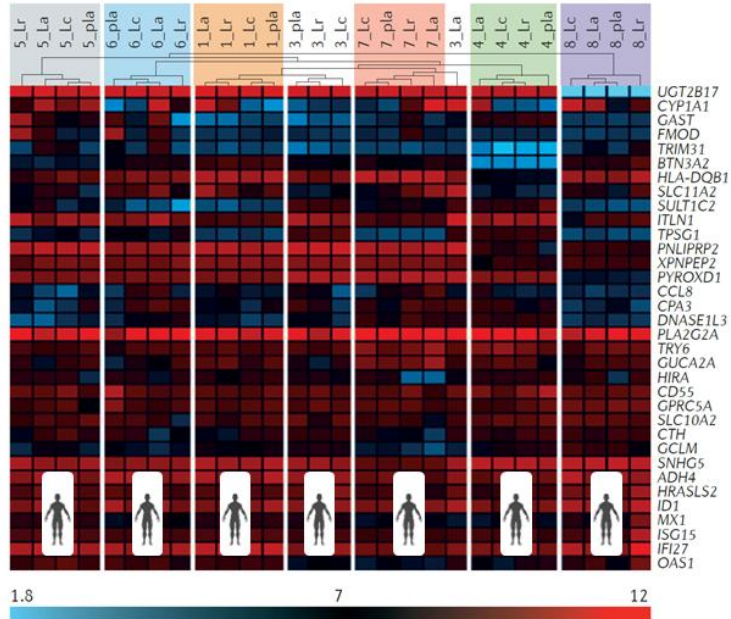


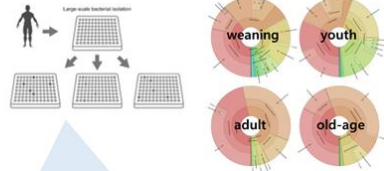
그림 9. 숙주와 프로바이오틱스 종류에 따른 점막면역 관련 유전자 발현 수준의 클러스터링 분석 비교

3절. 연구개발 범위

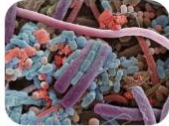
1. 주요연구내용

- 연령(세대별) 및 건강상태 별 마이크로비옴 특징 규명
- 장내미생물 라이브러리 (library) 구축

연령 및 건강상태별
한국인 장내미생물총 분석 /
소재 라이브러리 구축



분리, 상용 균주 활용
장내미생물총 밸런스 개선
혼합균주의 개발



- 혼합모델: 건강상태별 맞춤 균주 + 천연 프리바이오틱스
- 장내 미생물총 개선 혼합균주 / 표준 배합비 연구



장내미생물총 밸런스 개선
발효 유제품 개발



- 혼합균주 기능 유지·보존 기술 연구 / 대량생산 공정
- 제품 라인별 공정 최적화 / 품질 관리 표준화 설정
- 발효 유제품의 장관면역 기능개선 검증
- 카테고리 별 신제품 출시

그림 10. 본 연구과제 연구개발 모식도

- **연령 및 건강상태에 따른 한국인 장내 미생물총 (gut microbiota) 분석 및 상업화를 위한 라이브러리 (library) 구축**
 - 연령 (세대별) 및 건강상태 별 표준 장내 미생물총 규명
 - 장내 미생물총 개선용 천연 프리바이오틱스 발굴 연구
 - 장내 미생물 분리 및 상업화를 위한 소재 라이브러리 구축
 - 라이브러리 (library)를 활용한 연령 및 건강상태에 따른 면역기능 조절 모델 개발

- **분리, 상용 균주를 활용한 장내 미생물총 밸런스 개선 혼합균주의 개발**
 - 장내 미생물총 밸런스 개선용 혼합균주 발굴 및 표준 배합비 연구
 - 맞춤형 균주와 천연 프리바이오틱스를 활용한 혼합모델 개발
 - 신규 장내 미생물총 개선 소재 생산 공정 구축

- **개발 소재를 활용한 발효 유제품의 개발**
 - 혼합균주 기능 유지·보존 기술 연구
 - 장내 미생물 개선 소재의 규격화
 - 제품 대량생산 공정 구축 및 품질 관리 표준화 설정 연구
 - 개발된 발효 유제품의 장관면역 기능개선 검증
 - 제품 카테고리 구축 전략을 통한 시제품 개발

2. 연구개발 세부일정

연구내용	추진 일정 (분기별: 3년 12분기)												비고
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
● 연령 및 건강상태별 한국인 장내 미생물총 분석 / 소재 라이브러리 구축													
✓ 연령 및 건강상태에 따른 한국인 표준 장내 미생물총 규명													
✓ 연령별, 건강상태별 표준 장내 미생물 분리 및 상업화를 위한 소재 라이브러리 구축													
✓ 장내 미생물총 개선용 천연 프리바이오틱스 발굴 연구													
● 분리, 상용 균주 활용 장내 미생물총 밸런스 개선 혼합균주의 개발													
✓ 장내 미생물총 기반 면역기능 조절 모델 개발													
✓ 장내 미생물총 개선용 혼합균주 발굴 및 표준 배합비 연구													
✓ 맞춤형 균주와 천연 프리바이오틱스를 활용한 혼합모델 개발													
✓ 신규 장내 미생물총 개선 소재 생산 공정 구축													
● 장내 미생물총 밸런스 개선 발효 유제품 개발													
✓ 혼합균주 기능 유지·보존 기술 연구													
✓ 장내 미생물 개선 소재의 규격화													
✓ 제품 대량생산 공정 구축 및 품질 관리 표준화 설정 연구													
✓ 개발된 발효 유제품의 장관면역 기능개선 검증													
✓ 제품 카테고리 구축 전략을 통한 시제품 개발													
사업진도(%)	40%			30%			30%			100%			

3. 과제별(세부·협동) 연구개발내용

가. 1세부 - 서울대학교

(1) 연령 및 건강상태에 따른 한국인 표준 장내 미생물총 규명

- 인체 대변시료 확보
 - 본 연구진은 5년간의 한국인 쌍둥이 코호트를 대상으로 한 선행연구에서 이미 2000개 이상의 연령별 인체시료를 확보함. 해당 시료는 건강한 정상인을 대상으로 확보된 것이므로 면역 기능 개선에 중요한 장내 미생물총을 밝히기 위해서는 면역 기능에 이상이 있는 사람을 대상으로 대변 시료를 추가 확보하여 정상인과 비교분석 연구가 필요함.
 - 영유아, 청소년, 중년층, 노인층을 대상으로 추가적으로 대변 시료를 확보하여 기존 선행연구 결과를 검증함. 이때 생명윤리위원회로부터 승인을 받고 대변 시료 외에 혈액, 소변 시료, 신체계측지표, 생활습관, 식습관 등의 메타데이터를 확보하여 식이/환경 요인이 장내 미생물총에 미치는 간접효과를 보정함.
 - 새롭게 확보한 분변시료는 즉시 냉동 보관되어 이동되었으며 균주 분리 및 분석을 위해 해동 후 10분 이내로 혐기성 배양기에 옮겨짐. 또한 식이정보 (food frequency table), 음주 여부, 각종 비만 지표 및 비만과 관련된 중성지방, 혈중 콜레스테롤, 혈당, hs-CRP, GTP, 혈압 등 기초적인 생체 지표 자료를 확보하여 건강상태를 확인함.
- 차세대염기서열분석 (16S rRNA)을 통한 장내 미생물 군집 메타게놈 분석 / 통계학적 비교 분석을 통한 연령별, 건강상태별 한국인 표준 장내 미생물총 선정
 - 분석 대상자의 분변 시료로부터 total DNA를 추출하고 이를 template로 사용함. 16S rRNA gene (V4 region)에 대한 프라이머 (515F-806R)를 이용하여 16S rRNA gene을 증폭하고 두 프라이머에는 Illumina adaptor와 프라이머 pad, linker 서열, barcode (reverse 프라이머) 서열이 존재하여 PCR 수행 시 sequencing에 필요한 construct가 함께 생성되도록 함. 증폭된 DNA를 정제한 후, 각 샘플 당 동량의 DNA를 Illumina Miseq을 이용하여 sequencing을 실시함.
 - 생산된 염기서열은 QIIME, Solar, MaAsLin 등의 생물 정보 분석기술을 활용하여 단변량/다변량 분석 (나이, 성별, 쌍둥이 보정)을 수행하고 연령별 (영유아, 청소년, 성인 중년층, 노인층), 면역 관련 건강 상태에 따른 (영유아: 아토피 증상, 청소년: 호흡기 감염/비만, 성인 중년층: 과민성 대장증후군/만성 비염, 노인층: 감염증) 한국인 장내 미생물총의 특징을 분석함.

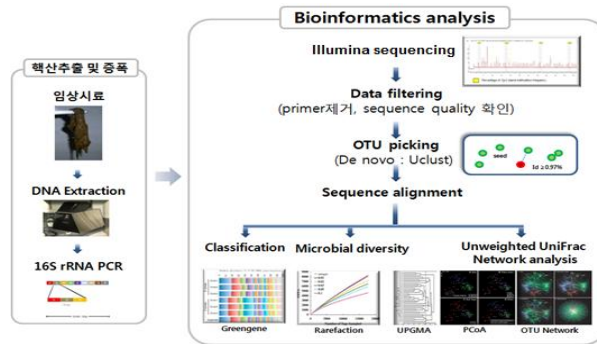


그림 11. 차세대 염기서열 분석법을 이용한 장내 미생물 분석 파이프라인

• 면역기능 개선 유용 장내 미생물 선별

- 기존 1,000명 이상의 한국인 쌍둥이 코호트 장내 마이크로비옴 정보와 메타데이터를 이용하여 hs-CRP와 같은 면역인자를 기준으로 유의한 차이를 나타내는 장내 미생물을 선별함.
- 쌍둥이 모델을 통해 유전적 감수성 분석 (GWA)을 수행하고 유전-마이크로비옴 상호작용 평가를 수행함으로써 면역기능 개선 관련 유용 장내 미생물을 발굴함.
- 통계학적 비교 분석을 통한 연령별 (영유아, 청소년, 성인, 중년층, 노인층), 면역 관련 건강 상태에 따른 (아토피, 호흡기 감염, 비만, 과민성 대장증후군, 만성비염 등) 장내 미생물총 네트워크 분석을 수행함.

단계	Microbiome의 건강 영향 평가	유전적 감수성 분석 (GWA)	유전-마이크로비옴 상호작용 평가
설명	쌍둥이간에 차이 나는 omics 결과 확인 (causative phenotypes)	trait-causative 및 strong reactive로 screen된 분석대상의 family-based GWA	유전형-microbiome의 상호작용 분석
개념			
비고	Microbiome과 건강영향의 관련성에 대한 1차 결과 산출	Microbiome, immunome, metabolome등의 유전적 감수성결과 산출	건강영향의 변이에 영향 주는 유전형- microbiome의 상호 작용 평가

그림 12. 장내 미생물 metagenomic 융합 분석 흐름

(2) 연령별, 건강상태별 표준장내 미생물 분리 및 상업화를 위한 소재 라이브러리 구축

- 전체 미생물의 약 97%는 비배양성지만 장내 미생물의 경우 30-40%까지 배양이 가능한 것으로 전망됨. 그러나 까다로운 혐기적 배양 조건과 장내 미생물의 특이적 성장요인에 관한 정보 부족으로 인해 장내 미생물 배양 기술은 지속적으로 발전하는 유전자 염기서열 분석기술에 비하여 아직 초보 단계 수준에 머무르고 있음.

- 신규 장내 미생물 분리를 통해 소수 개체군 (minority population)을 발견할 가능성이 높아지고, 새로운 종에 대한 기능적 특성 파악 (characterization)이 가능하게 되며, 장내 생태계에 존재하는 다양한 strain 사이의 상호 작용 (interaction)을 연구할 수 있다는 특징이 있음. 다양한 배양조건 (탄소원, 산소농도, rumen fluid, mucin type, sterile stool 등)에서 특이적 enrichment 기술을 이용한 장내 미생물 분리를 통해 면역기능개선과 관련된 유익균, 유해균을 동시에 확보할 예정임. 이는 신규 장내 미생물의 생물학적, 대사적 특성을 과학적으로 검증하는데 활용되어 기존 장 개선 미생물 연구와 차별화될 수 있음.



그림 13. 장내 미생물 순수분리를 위한 혐기적 미생물 특이적 enrichment 기술 도입

- 인종별, 연령별, 성별 장내 미생물의 strain은 서로 유의적인 기능적 차이가 있으며 장 정착 능력에도 상이한 결과를 나타냄. 카테고리별로 생산되는 발효 유제품의 기능성을 극대화하기 위해서는 각 그룹에 효과적으로 작용할 수 있도록 같은 그룹으로부터 분리된 유용 장내 미생물의 특징을 파악하고 이러한 정보를 활용하여 소재화 할 필요가 있음.
- 이에 연령별, 건강상태별로 선정된 표준 장내 미생물을 직접 분리하여 유익균, 유해균을 비롯한 대량의 장내 미생물 소재를 확보함으로써 한국인 마이크로비옴 라이브러리 및 장내 미생물 बैं크를 구축함. 이렇게 확보된 신규 장내 미생물 소재는 면역 기능 개선 효능 탐색과 장내 미생물총 개선능 탐색에 동시에 활용될 수 있으며 향후 실용화 소재로서 이용될 수 있음.

나. 1협동 - 한국과학기술연구원 천연물연구소

(1) 장내 미생물총 개선용 천연 프리바이오틱스 발굴 연구

- 장내 미생물 맞춤형 분석을 위한 인체 대장모사시스템 구축
 - 산소에 취약한 혐기성 장내 미생물의 배양을 위해 연속식 혐기 배양 시스템을 이용함. 건강한 사람의 분변으로부터 얻은 장내 미생물을 혐기 배양기 내에서 키우며 장 환경을 재현할 수 있는 배지 성분을 일정하게 주입해줌으로써 안정한 상태의 장내 미생물총 형성을 유도함.
 - 이후 장내 미생물총 개선 후보 소재의 처리를 통해 미생물 유래 대사산물의 함량 변화와 균총 커뮤니티의 변이 양상을 모니터링 함.
 - 대장 통합 모사 공정 개발: 대장 3 part (ascending - transverse - descending colon) 모사를 동시에 수행하도록 함.
 - 이러한 시스템을 통해 프리 및 프로바이오틱스의 장내 미생물총 밸런스 개선 효능을

평가할 수 있을 뿐 아니라, 이때 배지성분을 달리함으로써 비건강인의 장내환경을 모사할 수 있으며, 정상적인 장내환경과 서로 다른 조건에서 기능성 소재의 활성을 탐색가능.

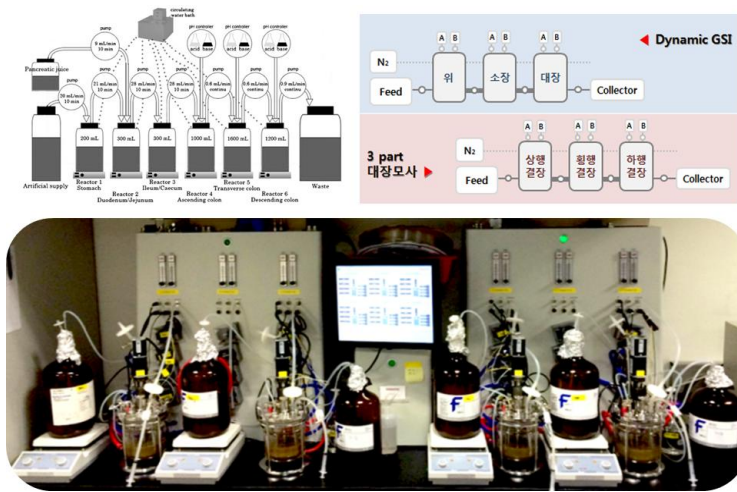


그림 14. 장내 미생물 연구 맞춤형 대장모사시스템 활용

- 천연물 라이브러리를 활용한 천연 프리바이오틱스 소재 발굴
 - 대장모사시스템에 KIST가 보유한 천연물 라이브러리를 적용하여 유해균/유익균 변동 양상을 통해 천연 프리바이오틱스 소재를 발굴함. 특히, 면역기능개선효능으로 기보고된 식품소재를 우선적으로 스크리닝함.
 - 장내 균총의 변화 검증 혹은 특정 대사체 변화 정도를 지표로 하여 활성 스크리닝을 시도함.
 - 이때 시장 needs, 마케팅 가능성, 식품공전 등재여부, 특허성, 건강기능식품 원료 등재 여부 등을 사전에 검토함으로써 기능소재 발굴가능성을 극대화 할 수 있음.

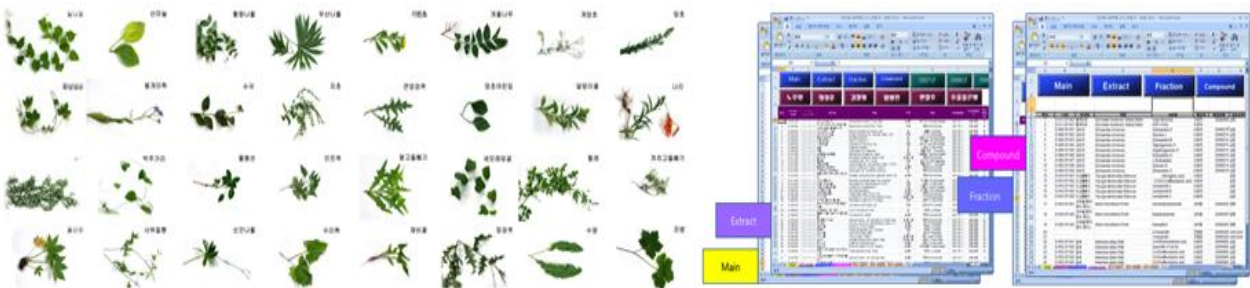


그림 15. KIST 천연물 라이브러리를 활용한 천연 프리바이오틱스 소재 발굴

(2) 장내 미생물총 기반 면역기능 조절 모델 개발

- 유용 장내 미생물의 면역기능 개선 효능 평가를 위한 예쁜 꼬마선충 모델 적용 연구
 - 장내 미생물총 라이브러리 연구를 통해 결정된 유익균 및 유해균을 모델동물인 예쁜

꼬마선충에 투여 후 수명에 미치는 영향을 탐색함. 이를 통해서 생물통계학적으로 예측된 유익균 및 유해균의 기능성을 검증 가능함. 가령 유익균의 경우 예쁜 꼬마선충의 수명을 연장시킬 수 있는지, 유해균의 경우 수명을 단축시키는지를 검증함.

- 또한 유해균과 함께 천연 프리바이오틱스를 예쁜 꼬마선충에 투여한 다음, 유해균만 투여한 경우와 비교하여 수명을 관찰함. 이를 통해 유해균의 수명단축 효과가 천연 프리바이오틱스에 의해 얼마나 개선되는지를 관찰함으로써 천연 프리바이오틱스의 *in vivo* 기능성 검증에 이용할 수 있음.
- Bacterial pathogens이 포함된 배양조건에서 발굴된 프로바이오틱스 혹은 천연 프리바이오틱스가 수명에 미치는 영향을 조사함으로써, 면역기능개선 효능을 검증함.

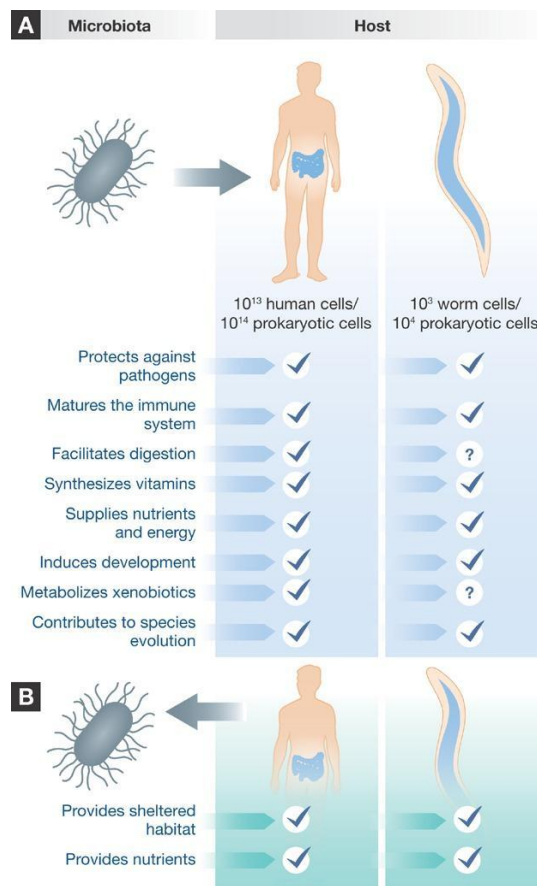


그림 16. 예쁜 꼬마선충 모델을 이용한 *in vivo* 장내 미생물 맞춤형 연구 모델 개발

(3) 맞춤형 균주와 천연 프리바이오틱스를 활용한 혼합모델 개발

- 선정된 프로바이오틱스, 천연 프리바이오틱스, 그리고 프리·프로바이오틱스 혼합균주를 각각 처리 후 장내 미생물총 개선 정도를 비교함.
- Response surface methodology를 이용 (ex. central composite design)하여 프리바이오틱스 종류, 천연물 조성비를 달리하면서 표준 배합비를 결정함.
- 이러한 연구결과를 바탕으로 프로바이오틱스와 천연 프리바이오틱스 혼합물을 이용한 장내 미생물총 개선소재로 특허화함.

(4) 장내 미생물 개선 소재의 규격화

- 천연 프리바이오틱스의 화학성분 규명 및 원료 표준화
 - 선정된 천연 프리바이오틱스에서 천연물화학 분석을 통해 화학성분을 규명함. 즉, 식물추출물 내 기능/지표 성분을 설정함으로써 천연 프리바이오틱스 원료 표준화가능.
- 장내 미생물총과 대사체와의 상관관계 연구
 - 발효유제품을 대장모사 시스템에 적용 후 장내미생물 총 및 대사체 변화와 상관관계를 연구함.
 - 대장모사시스템에서 발효유제품은 장내균총에 유의적인 영향을 미침을 규명함.
 - 발효유제품 처리시 장내미생물총과 대사체 변화는 밀접한 연관성을 나타냄을 규명함.

다. 2협동 - (주)고바이오랩

(1) 장내 미생물총 기반 면역기능 조절 모델 개발

- 후보 혼합소재의 인체세포와의 상호작용 연구를 위해서 장내 미생물을 인체 장상피세포와 면역세포에 동시에 배양하여 *in vitro* 장내 미생물-동물세포 혼합배양을 통한 면역기능 개선 효능을 평가함. 후보 균주를 살아있는 형태와 UV로 사멸시킨 형태로 동시에 처리하여 장내 미생물 유래 대사물질의 효능을 간접적으로 평가함.
- 장상피세포 tight junction을 측정하기 위해 TEER (trans-epithelial electrical resistance)의 변화를 측정하고, ZO-1, claudin1과 같은 마커 유전자의 발현 레벨을 확인함. 또한 장 점막의 두께, mucin 발현량을 분석하고 면역세포에 대한 IL-6, TNF- α , IL-10, IL-8 등의 사이토카인 분비능을 측정.

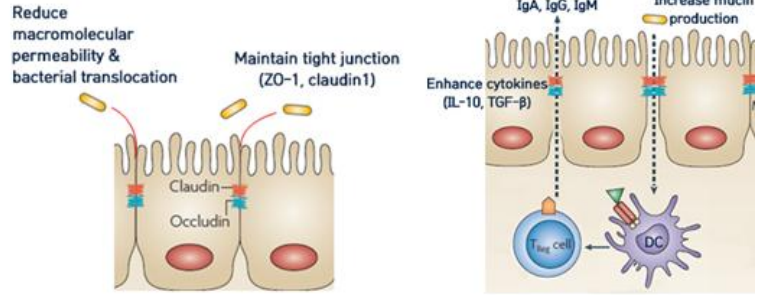


그림 17. *in vitro* 장 세포, 면역세포 배양을 통한 장관면역 분석 모델 개발

(2) 개발된 발효유제품의 장관면역 기능개선 검증

- 면역 결핍 knock-out 마우스 ($IL-10^{-/-}$)와 항생제 cocktail (cefadroxil, oxytetracycline, erythromycin, neomycin sulphate, streptomycin, ampicillin, vancomycin, metronidazole 등)을 투여한 *in vivo* pseudo-germ-free 마우스 모델을 이용하여 후보 소재의 장내 미생물총 개선을 통한 면역기능 개선 효능을 검증함.

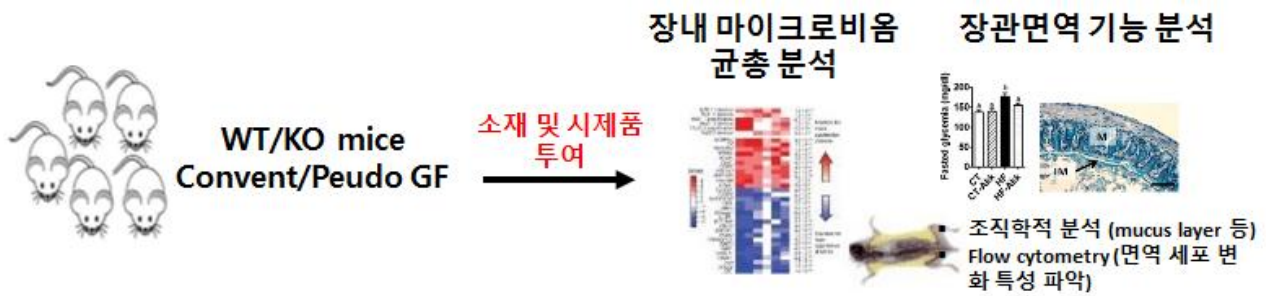
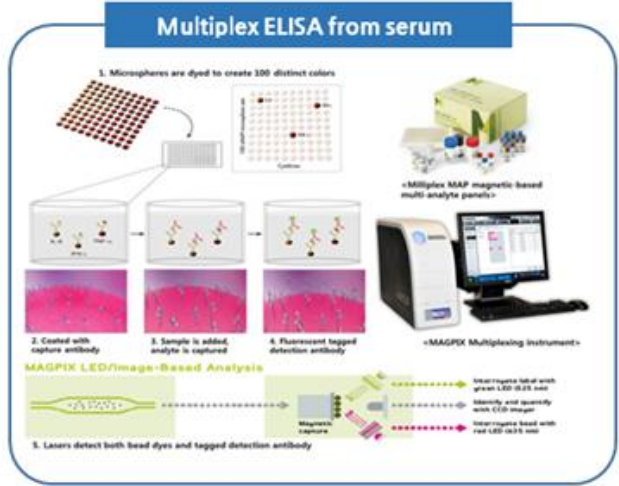
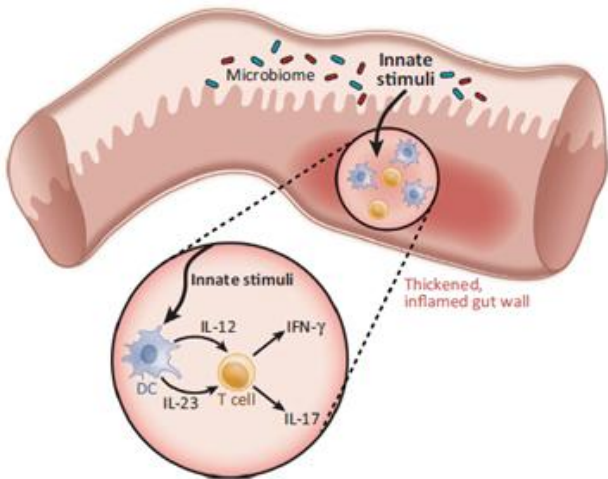


그림 18. 장내 미생물 맞춤형 *in vivo* 동물 모델을 통한 발효유제품의 장관면역 기능개선 효능 확인

- 면역세포의 cytokine을 lineage를 고려하여 면역기능 개선 관련 바이오마커로 선정함 ($TNF\alpha$, IL-6, $IFN-\gamma$, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-10 등). 발효 유제품을 투여한 쥐의 혈액으로부터 Multiplex ELISA를 통해 각 cytokine의 레벨을 동시 측정함으로써 장내 미생물총 개선 발효유제품의 면역기능 개선 효능을 검증하도록 함. 이때 사용한 각 소재에 대한 투여도 동시에 수행하여 핵심 기능성 소재를 발굴하도록 함.



Innate & Inflammatory	Th1 계열	Th2 계열	Th17 계열	Treg 계열	not confirmed
TNF- α	IFN- γ	IL-4	IL-17A	IL-10	IL-27
IL-6	IL-2	IL-5	IL-21		IL-28a
IN-1 β	IL-12 (p70)	IL-13	IL-22		IL-31
TNF- β			IL-23		IL-33
CCL20/MIP3a					

면역세포의 lineage를 고려한, 20개의 cytokine 선정

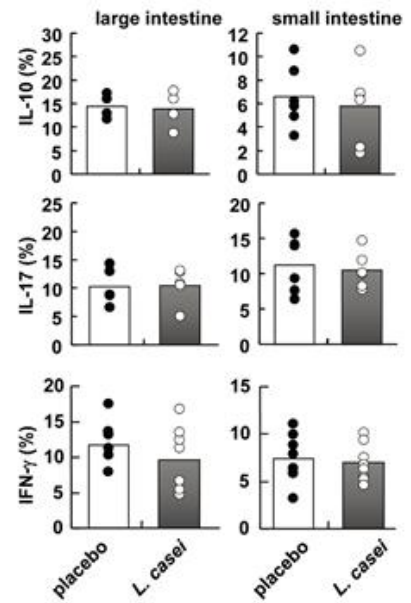


그림 19. *In vivo* 동물 모델에서 검증될 면역기능 개선 관련 바이오마커

라. 3협동 - (주)한국야쿠르트

(1) 장내 미생물총 개선용 혼합균주 발굴 및 표준 배합비 연구

- 장내 미생물총 개선 균주의 특성검사
 - 발효유 제조에 필수적인 우유 발효능 및 배양조건 확립을 위한 기초특성 파악.

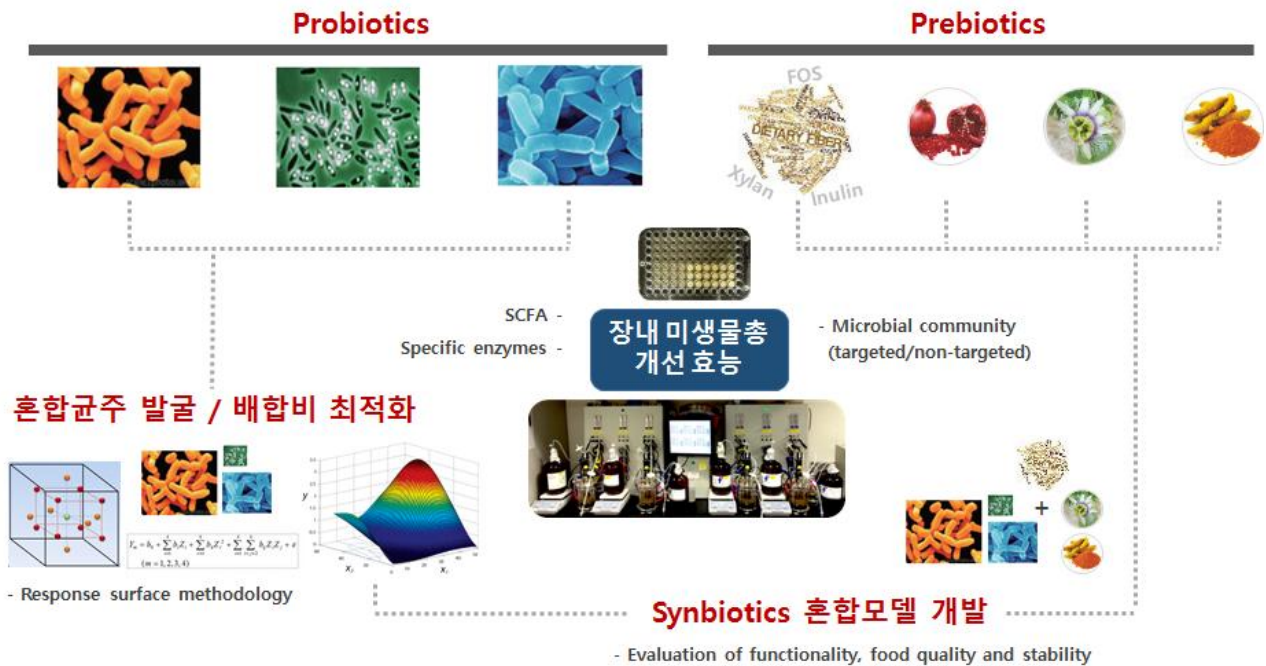


그림 20. 혼합균주 발굴 및 배합비 최적화 연구 모식도

(2) 신규 장내 미생물총 개선 소재 생산 공정 구축

- 단일/혼합 기능성 균주 별 최적배지 및 배양조건을 확립
 - 선별 균주의 종·속에 따른 표준 식용배지 개발.
 - DOE (Design of Experiment)를 이용한 성장필수인자 및 성장촉진인자 선별.
 - 배지성분 및 농도를 조절하여 최대 생균수를 생산하는 배지최적화 연구.
 - 최대 생산성을 보이는 배양시간, 배양온도, pH 및 교반속도를 확인하여 배양조건 최적화.
 - 유통안정성 개선에 적합한 배지 및 배양 조건 최적화를 통한 고밀도배양 연구.
- 단일/혼합 기능성 균주 대량생산 공적 구축 및 최적화
 - Lab scale 연구를 기반으로 plant scale 적용 연구.
 - Pilot 및 시생산을 통한 공정 적합성 확인 및 산업화 가능균주 선별.
 - 당사 프로바이오틱스 공정에 선발균주 생산적용.
 - 공정 최적화를 통한 생산량 증대.

(3) 혼합균주 기능 유지·보존 기술 연구



그림 21. 균주 대량생산 공정 구축을 위한 모식도

- 당사보유 종균 안정화기술 적용 선별균주의 기능성을 유지할 수 있는 안정화기술 개발
 - 농축, 동결, 건조 등의 가공공정에서 상용화 생산 적합 판단.
 - 제품적용을 위한 농축종균 개발시 최적 농축 비 및 공적압력을 조절하여 균체영향 최소화.
 - 농축종균의 저장 안정성을 극대화 할 수 있는 균주별 최적 액상 보호제 선별 및 개발.
 - 분말종균 개발 시 균체사멸 최소화를 위한 균주별 최적 동결건조 조건 탐색.
 - 분말종균의 저장안정성을 높일 수 있는 최적 동결보호제 및 코팅물질의 선정 및 개발.
 - 미생물 신속검사법을 통한 기능성균주의 저장안정성 및 오염 모니터링 기술 구축.

(4) 제품 대량생산 공정 구축 및 품질 관리 표준화 설정 연구

- 기능성 균주의 발효유 제품 적용 가능성 검토
 - 기능성 균주의 향미, 산미, 효소 및 물성 등 발효유 적용 적합성 평가.
 - 우유의 발효 및 물성변화에 따른 발효균종으로의 적합성 검토.
 - 기능성균주 첨가 시 우유 발효액의 저장성, 우유 발효액의 후숙성 연구.
 - 발효유 저장온도별 관능 특성 파악.

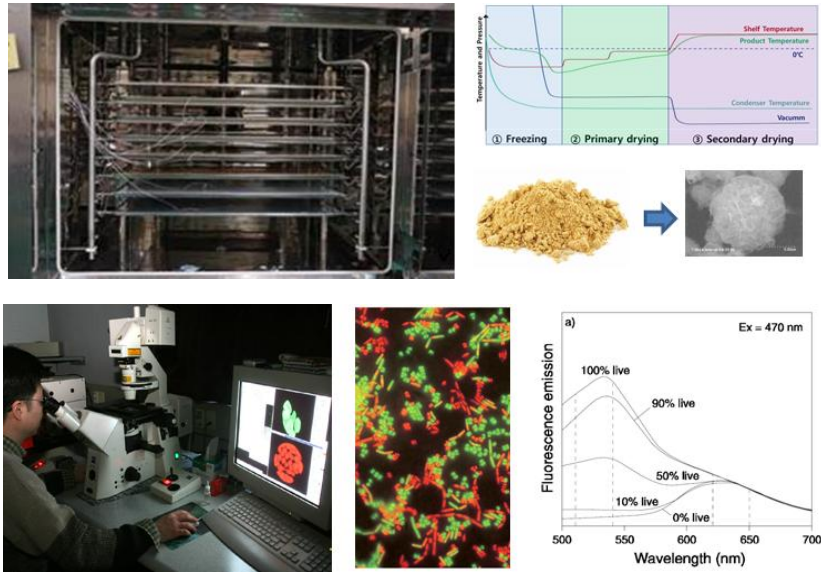


그림 22. 유산균 농축, 동결건조, 코팅 및 분말화 기술 적용

- 기능성 균주 및 기능성소재 적용 제품 대량생산 공정 구축
 - 적용소재 특성에 따른 적용제품 선정 (액상발효유, D.Y, 호상발효유).
 - 액상발효유, 농후발효유 (드링크, 호상) 제품에 대한 기존 대량생산 공정 활용.
 - 주요 공정
 - : 배양액 전처리 → 배양 → 시럽 제조 및 조합 → 제품 충전 및 포장 → 출하
 - 조합 단계에서 기능성 원료 투입.
 - 발효유 제품 생산을 위한 생산 plot 설정.
 - 시제품 생산 및 관능검사.
 - 저장 안정성 검증.

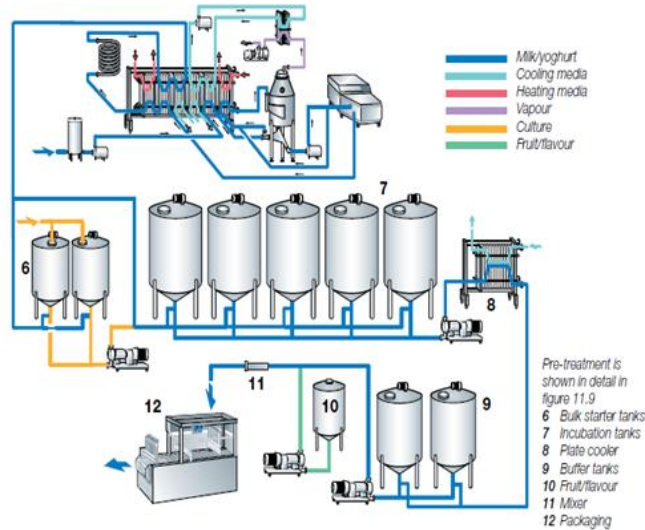


그림 23. 발효 유제품 대량생산 공정 구축

- 관리 표준화를 위한 기능성분 설정 및 시험법
 - 건강기능식품 법률 및 가이드라인에 따른 기능성분 (지표성분) 설정.
 - 혼합균주: 발효유 내 스타터 균주와 구분지을 수 있는 선발 배지 확보.
 - 프리바이오틱스: 발효유내에서 검출이 용이한 기능성분 (지표성분) 설정.
 - 축산물 가공기준 및 성분규격에 따른 기준 및 규격 설정.
 - 1) 법적규격: 성상, 이물, 무지유고형분, 유산균 수, 대장균 균.
 - 2) 품질관리규격: pH, 산도, 당도, 비중, 점도, 진균수 등.
 - 최종 상품화 제품 선정



그림 24. 제품 관능 평가 및 향미, 산미, 물성 등 품질 표준화 연구

(5) 제품 카테고리 구축 전략을 통한 시제품 개발

- 시장성 및 소비자 선호도 분석을 통한 대표 효능 카테고리 선정.
- 아토피, 항노화, 면역증진, 피부미용, 활력증진 등 시장성 분석 및 전문가 조언 활용.
- 연령별, 성별 및 건강상태별 제품형태 소비자 선호도 조사.
- 액상, 호상, DY 및 발효유 캡슐 복합소재 (LOOK, 쿠퍼스) 등 소비자 선호도에 따른 제품 타입 선정.
- 시장성 높은 카테고리 맞춤형 제품 개발.
- ‘내 몸 속의 또 다른 나, 균을 변화시켜 나를 변화시키자!’ 는 컨셉으로 제품 홍보.
- 연구력뿐만 아니라 제품개발력까지 가지고 있다는 기업이미지 활용 홍보 (과학성 연구).
- 소비자 평가단 및 체험단 선정을 통한 제품 모니터링.
- 제품 장기섭취 시 고객의 기존 장내 균총에서 카테고리 별 표준화된 균총으로 개선을 유도.

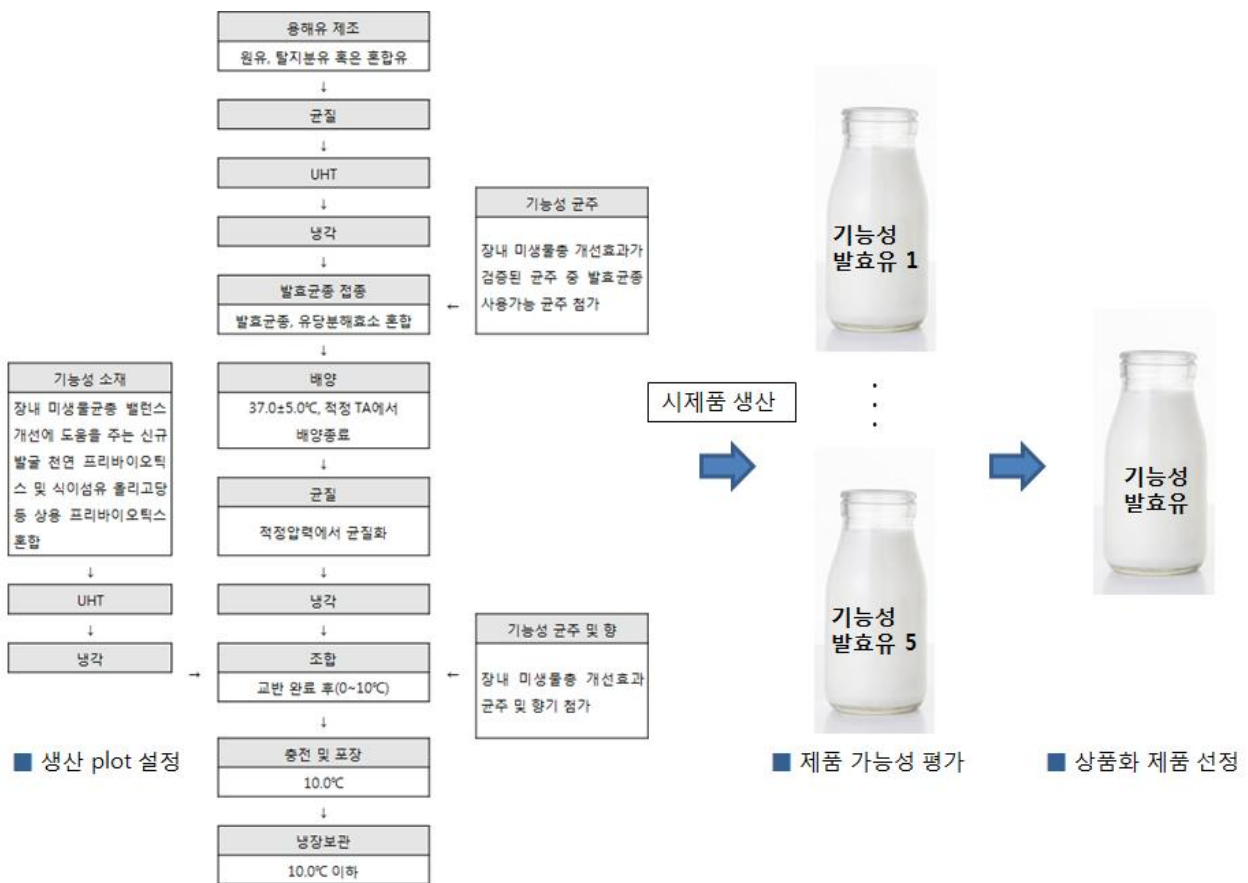


그림 25. 시제품 개발 및 상품화를 위한 모식도



그림 26. 시제품 개발을 위한 파이프라인 구축 및 최적화

4. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	○ 연령 및 건강상태에 따른 한국인 표준 장내 미생물총 규명 (1세부)	- 연령별, 건강상태별 인체 대변시료 확보 - 차세대염기서열분석 (16S rRNA)을 통한 장내 미생물 군집 메타게놈 분석 - 통계학적 비교 분석을 통한 연령별 (영유아, 청소년, 성인, 중년층, 노인층), 면역 관련 건강 상태에 따른 (아토피, 호흡기 감염, 비만, 과민성 대장증후군, 만성비염 등) 한국인 장내 미생물총 특징 분석 - 장내 미생물총 개선 및 면역기능 개선 관련 유용 장내 미생물 소재 발굴 (2건 이상)
		○ 연령별, 건강상태별 표준 장내 미생물 분리 및 상업화를 위한 소재 라이브러리 구축 (1세부)	- 한국인 마이크로비옴 라이브러리 구축
		○ 장내 미생물총 개선용 천연 프리바이오틱스 발굴 연구 (1협동)	- 장내 미생물총 분석을 위한 인체 대장모사시스템 구축 - 천연물 라이브러리를 활용한 천연 프리바이오틱스 소재 발굴
2차년도	2016	○ 장내 미생물총 개선용 혼합균주 발굴 및 표준 배합비 연구 (1세부)	- 프로바이오틱스 소재안정성, 기능성에 따른 혼합균주 발굴 / 배합비 최적화
		○ 맞춤형 균주와 천연 프리바이오틱스를 활용한 혼합모델 개발 (1세부)	- 생물정보학 기반 혼합소재의 미생물총 개선 효능 검증
		○ 맞춤형 균주와 천연 프리바이오틱스를 활용한 혼합모델 개발 (1협동)	- 생체 장관 모사시스템을 활용한 혼합소재 적용 - Central composite design을 이용한 프리·프로바이오틱스 배합비 최적화
		○ 장내 미생물총 기반 면역기능 조절 모델 개발 (1협동)	- 장내미생물-동물 혼합배양을 통한 발굴소재의 기능성 검증
		○ 장내 미생물총 기반 면역기능 조절 모델 개발 (2협동)	- <i>in vitro</i> 장내 미생물-동물세포 혼합 배양을 통한 면역기능 개선 효능 평가 - 장상피세포 tight junction 측정, 장 점막 두께 및 발현량 측정, 면역세포 유래 사이토카인 분비능 측정
○ 장내 미생물총 개선용 혼합균주 발굴 및 표준 배합비 연구 (3협동)	- 우유 발효능 및 배양조건 확립을 위한 기초특성 파악		
○ 신규 장내 미생물총 개선 소재 생산 공정 구축 (3협동)	- 단일/혼합 기능성 균주 별 최적배지 및 배양조건을 확립 - 단일/혼합 기능성 균주 대량생산 공정 구축 및 최적화		

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	2017	○ 개발된 발효 유제품의 장관면역 기능개선 검증 (1세부)	- 면역결핍 마우스 모델을 이용한 시제품의 면역기능개선 효과 검증 - 발효유제품에 의한 장관조직 사이토카인 분비능 측정
		○ 장내 미생물 개선 소재의 규격화 (1협동)	- 장내 미생물총과 대사체와의 상관관계 연구 - 천연 프리바이오틱스의 화학성분 규명 및 원료 표준화
		○ 개발된 발효 유제품의 장관면역 기능개선 검증 (2협동)	- Pseudo-germ free 마우스 모델을 이용한 장내 미생물 개선이 면역기능 개선에 미치는 효과 검증
		○ 혼합균주 기능 유지·보존 기술 연구 (3협동)	- 농축, 동결, 건조 등의 가공공정에서 상용화 생산 적합성 시스템 구축 - 제품 적용 시 기능성균주의 안정성을 높일 수 있는 공정 및 보호제 적용 연구 - 코팅 및 분말화 기술을 적용 저장 안정성이 높은 기능성 종균 개발
		○ 제품 대량생산 공정 구축 및 품질 관리 표준화 설정 연구 (3협동)	- 기능성 균주의 발효유 제품 적용 가능성 검토 - 기능성 균주 및 기능성소재 적용 제품 대량생산 공정 구축
○ 제품 카테고리 구축 전략을 통한 시제품 개발 (3협동)	- 카테고리 별 제품 생산을 위한 공정 최적화 - 연령별, 건강상태별 맞춤형 제품 개발		

2장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 인체 대변시료 확보

- 인체 대변시료 확보를 통해 연령별, 건강상태별 한국인 장내 미생물 특징을 확인하고자 함. 우선 연령 그룹을 총 4그룹 (영유아, 20-30대, 40-50대, 60-70대)로 구분하였음. 20-30대는 건강한 대학생으로부터 시료를 확보하여 즉시 혐기 챔버로 옮겨진 후 유산균 소재 순수분리 및 유익 장내 미생물 분리에 활용함. 다른 연령대는 병원 (서울대병원, 서울삼성병원, 서울삼성수가정의학과, 부산 백병원)과의 연계를 통해 병원으로부터 냉동 보관된 대변 시료와 함께 환자의 건강상태와 관련된 정보를 제공받음. 이 모든 절차는 서울대학교 생명윤리위원회의 승인 (IRB No. 1602/001-001)을 받은 후 진행하였음.
- 시료 제공자의 건강상태는 병원에서 제공한 건강검사 기록과 설문, 혈액 중 염증 수치, uric acid 함량, BMI, 공복시 혈당 치 등을 기준으로 고위험군과 정상군으로 구분함.
- 대변시료 회수 시 시료 제공자에게 상세한 설명과 함께 전용 용기를 제공하여 시료가 회수되도록 안내하였으며 대변시료 이외에도 시료 제공자의 건강 상태를 검증할 수 있도록 혈액, 타액 시료를 함께 회수하였음. 20-30대 시료 제공자는 연구실에 직접 방문하여 대변 시료를 제공한 후 서울대학교 보건소를 방문하여 혈액을 채취하였음.

심의결과 통보서

수신

책임연구자	이름: 고광표	소속: 보건대학원	직위: 교수
지원기관	기타정부기관(농림축산식품부)		

과제정보

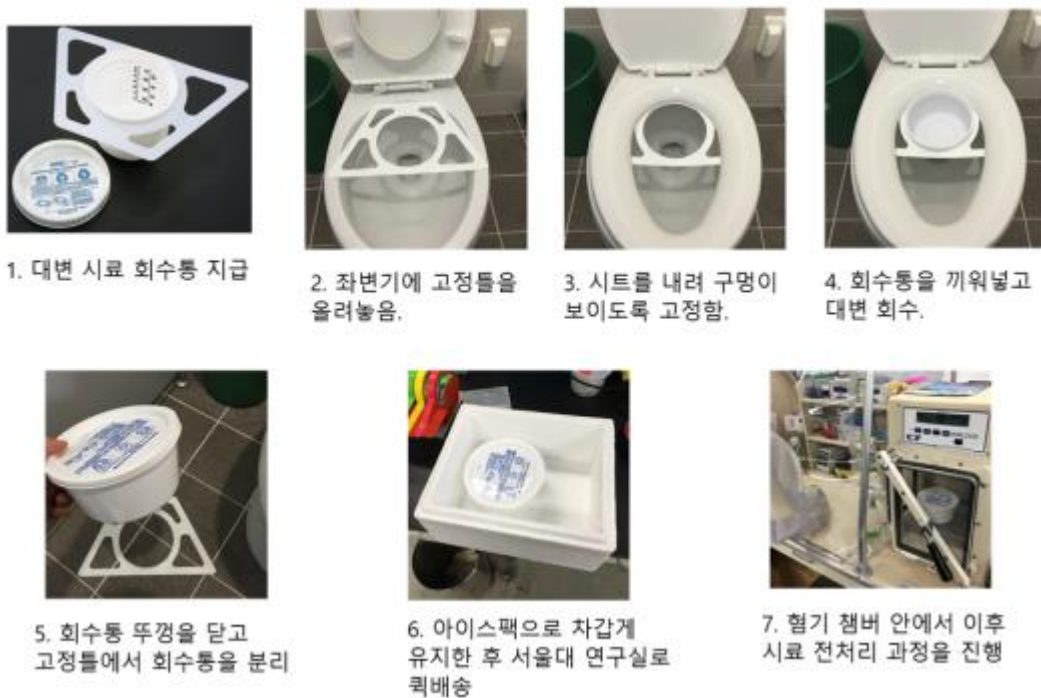
승인번호	IRB No. 1602/001-001		
연구과제명	장내 미생물총 개선을 통한 인체면역 기능개선 소재 및 발효 유제품 개발		
연구종류	학술 연구, 설문조사, 조직 및 검체연구(혈액, 체액 등)		
심의종류	신속심의		
심의일자	2016-01-22		
심의대상	연구계획서(재심의), 연구참여자용 동의서 또는 동의서 면제 사유서, 재심의 답변서		
심의결과	승인		
승인일자	2016-01-22	승인유효기간	2017-01-21
정기보고주기	12개월		
심의의견	1. 심의결과 제출하신 연구계획에 대해 승인합니다. 2. 연구자께서는 승인된 문서를 사용하여 연구를 진행하시기 바라며, 만일 연구진행 과정에서 계획상에 변경사항(연구자 변경, 연구내용 변경 등)이 발생할 경우 본 위원회에 변경 신청을 하여 승인 받은 후 연구를 진행하여 주십시오. 3. 유효기간 내 연구가 끝났을 경우 종료 보고서를 제출하여야 하며, 승인유효기간 이후에도 연구를 계속하고자 할 경우, 2016-12-22까지 지속심의를 받도록 하여 주십시오.		

2016년 01월 22일

서울대학교 생명윤리위원회 위원장



그림 27. 서울대학교 생명윤리위원회 승인 통보서



1. 대변 시료 회수통 지급
2. 좌변기에 고정틀을 올려놓음.
3. 시트를 내려 구멍이 보이도록 고정함.
4. 회수통을 끼워넣고 대변 회수.
5. 회수통 뚜껑을 닫고 고정틀에서 회수통을 분리
6. 아이스팩으로 차갑게 유지한 후 서울대 연구실로 퀵배송
7. 혐기 챔버 안에서 이후 시료 전처리 과정을 진행

그림 28. 본 연구에서 사용한 대변시료 회수 방법

- 각 인체 시료와 관련된 메타데이터는 인체 유래물 관리 장부에 기록하여 보안 유지하였음.

ID	대면 (h)	타액(ml)	혈액(ml)	1g x 2	DNA	RNA	경도	색	비중	사진	1차 streaking (2/03)
161001	30	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		3
161002	15	y	1.5	3	1	1	탄산	갈색	갈색		3
161003	45	y	1.5	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		2
161004	27	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161005	25	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		3
161006	25	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161007	0	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161008	24	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		3
161009	16	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161010	24	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		3
161011	23	y	1	3	1	1	탄산	갈색	갈색		
161012	24	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		1
161013	27	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161014	30	y	1	3	1	1	탄산	갈색	갈색		1
161017	22	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		1
161018	0	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		1
161019	30	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		1
161020	19	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161015	22	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161016	38	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161021	28		1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161022	10	y	1	3	1	1	탄산	갈색	갈색		2
161023	6	y	1	3	1	1	탄산	갈색	갈색		2
161024	28	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		1
161025	31	y	1	3	1	1	탄산	갈색	갈색		2
161026	26	y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		
161027	32	y	1	3	1	1	탄산	갈색	갈색		1
161028		y	1	3	1	1	복합 인산염	갈색	갈색		

그림 29. 인체 유래물 관리 장부 기록 모습

2. 메타게놈 확보

- 메타게놈 분석을 위한 DNA 추출과 전처리는 미국의 Human Microbiome Project의 프로토콜을 기초로하여 수행함. 그람양성 미생물의 효율적인 DNA 추출을 위해 QIAGEN Fast Stool DNA Collection Kit에 Bead beating을 추가하는 방법을 사용하였으며, Illumina Miseq 장비를 이용하여 메타게놈 분석을 수행하였음.
- 이후 국제 마이크로비옴 연구를 선도하고 있는 Rob Knight 연구팀에서 개발한 QIIME (Quantitative insights into microbial ecology) 소프트웨어 패키지를 이용하여 대량의 마이크로비옴 데이터로부터 수백만 개의 염기서열을 비교하고, Greengene 데이터베이스를 이용하여 생물종에 따른 분류를 수행한 후 기초적인 데이터 시각화 연구를 수행함.

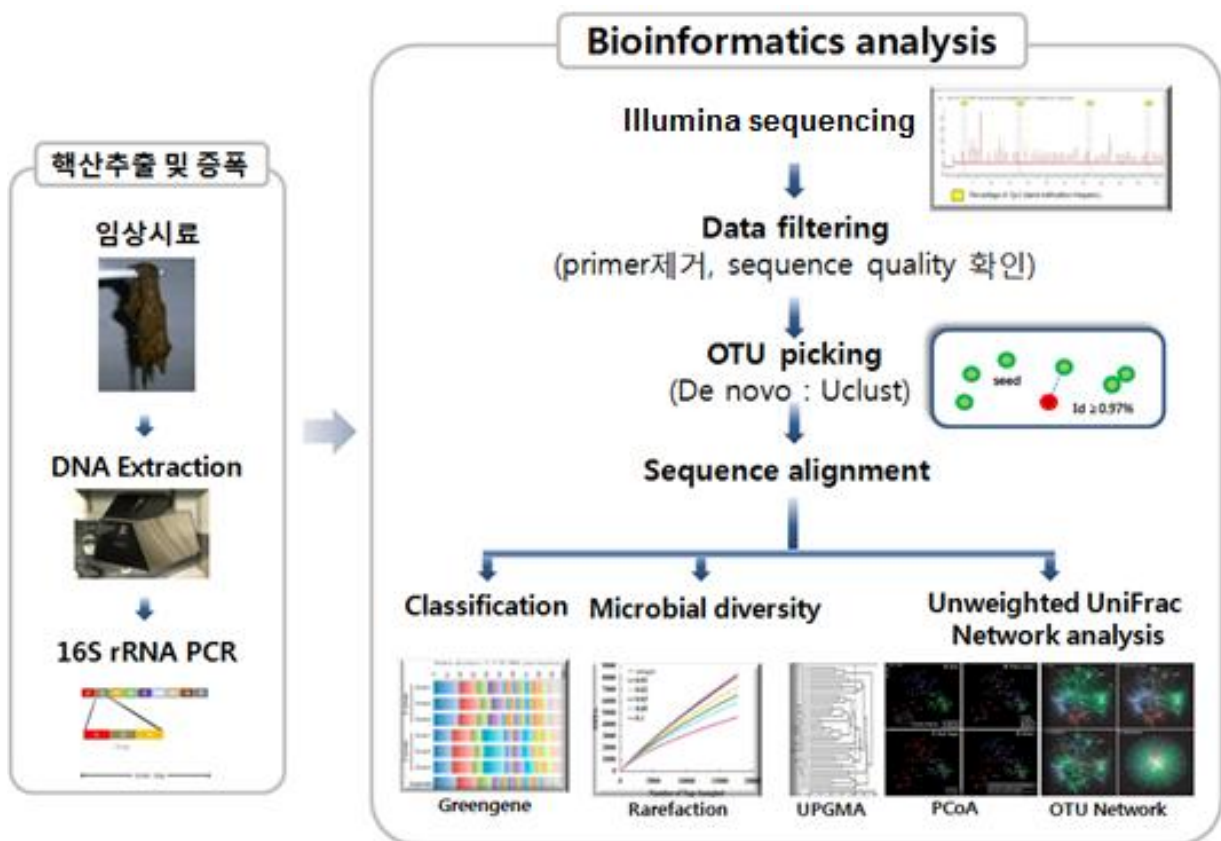


그림 30. 메타게놈 확보 수행 방법 모식도

- 총 240개의 메타게놈을 확보하였으며 시료제공자별 장내 미생물의 relative abundance를 나타내는 OTU 테이블을 구함. 이때 생물종 분류기준에 따라 크게 Order-Family-Genus-Species 레벨로 구분하여 생물통계학적 분석을 수행할 수 있도록 함.

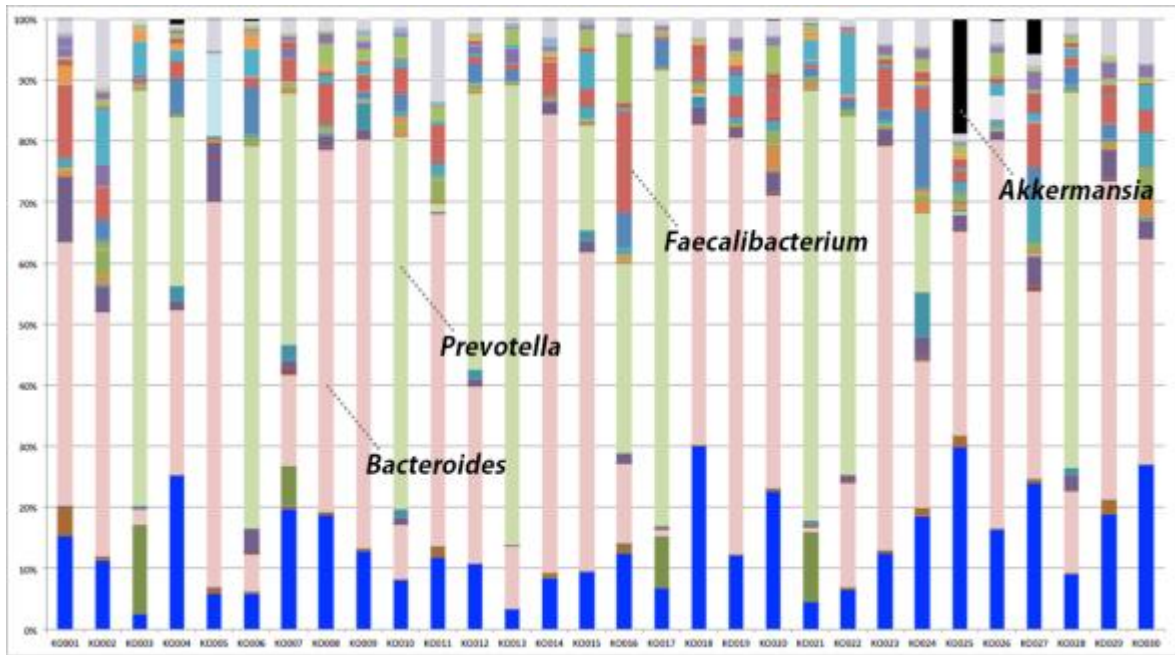


그림 31. 시료 제공자별 장내 미생물 군집 분포 확인

- 특정 시료 제공자의 경우 유의 장내 미생물로 알려진 *Akkermansia*와 *Faecalibacterium* 등을 유의적으로 높게 함유하고 있음을 확인할 수 있었고 해당 제공자의 대변을 이용하여 유의 장내 미생물 순수 분리 연구를 수행하였음.

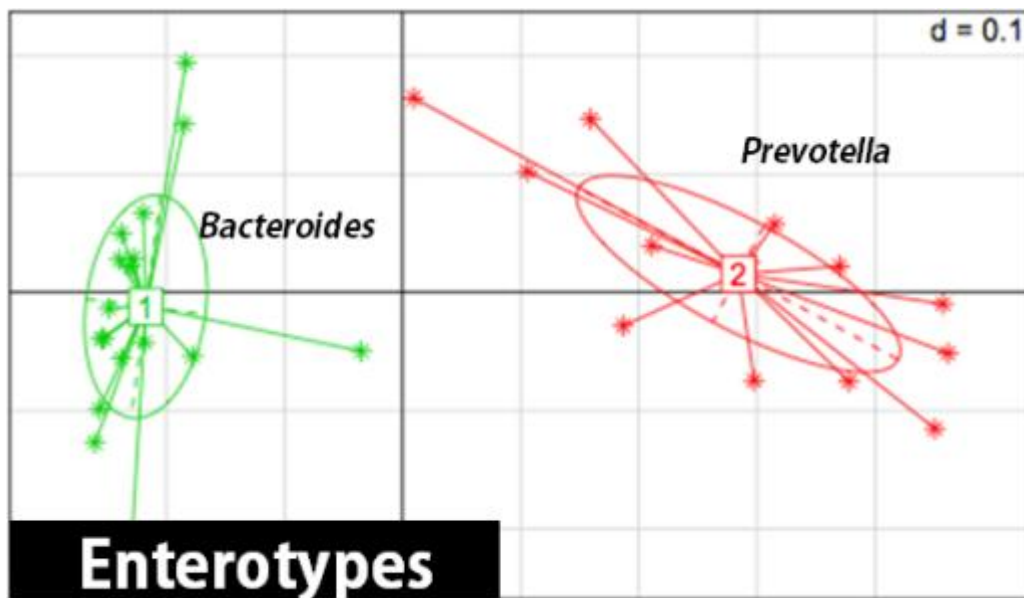


그림 32. 본 연구 시료 제공자들의 장 유형 분석

- 시료 제공자들로부터 주요 장 유형 (enterotypes)을 분석하였을 때 *Prevotella*와 *Bacteroides*의 2가지 장 유형으로 구분됨.

3. 생물통계학적 분석

- 하버드대 생물정보학자 Curtis Huttenhower 연구그룹에서 개발한 LEfSe, MetaPhlAn, MaAsLin, PICRUST 등의 분석기술을 이용하여 단변량/다변량 분석을 수행함. 해당 툴은 웹 기반 (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) 혹은 서버 기반으로 분석함.
- 연령 간 생물다양성 비교를 위해서는 Shannon diversity (적은 양으로 존재하는 장내 미생물의 기여도를 고려), Simpson diversity 2가지 방법을 병행함.

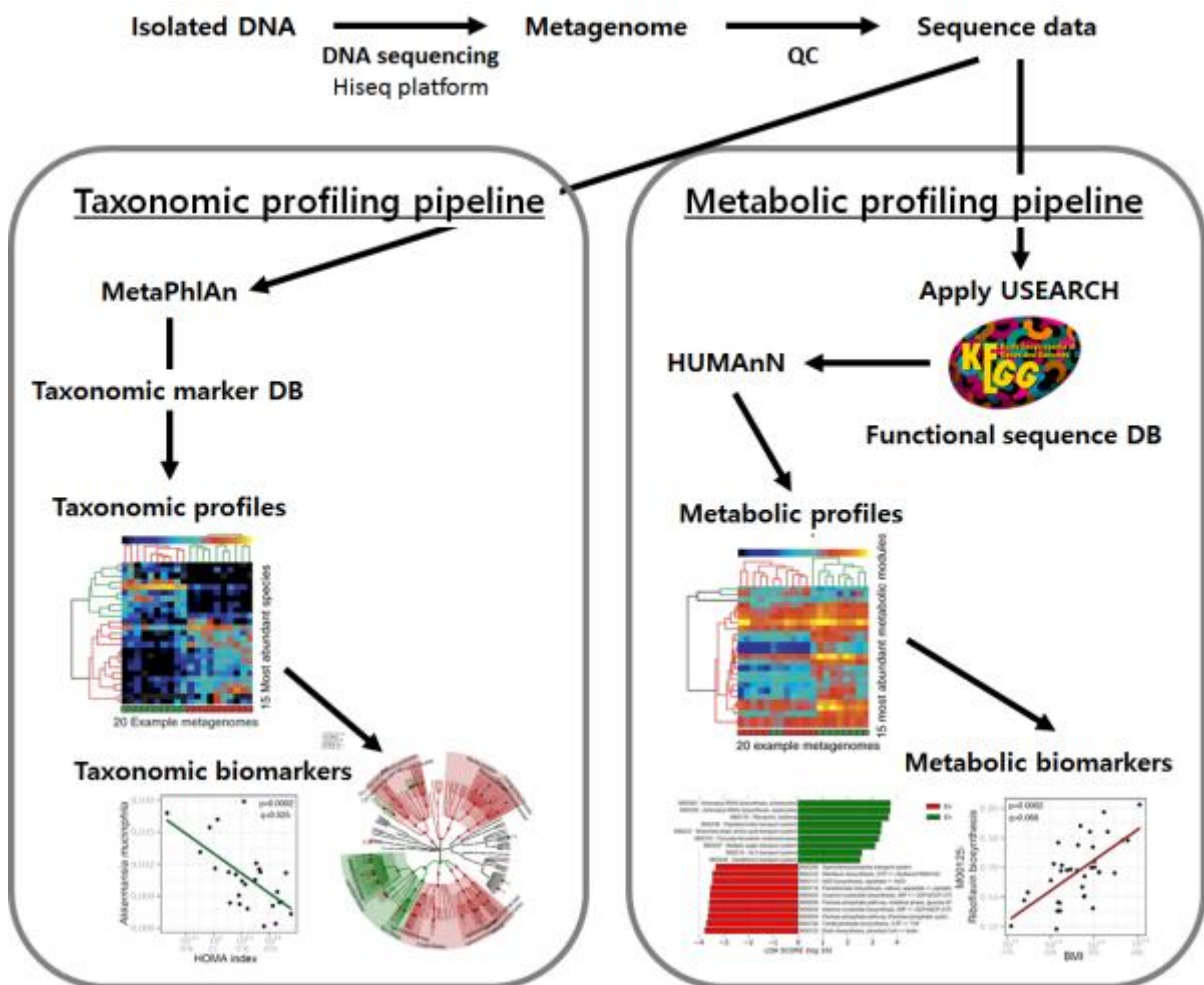


그림 33. 본 연구팀에서 적용한 마이크로비움 생물통계학적 분석 모식도

- 영유아, 20, 30, 40, 50, 60, 70대 그룹 (각각 30명 이상)을 대상으로 연령별 균총 다양성 특징을 규명하였을 때, 샘플 내 장내 균총 수는 연령이 증가하면서 늘어나기 시작하다가 30대부터 안정화되는 경향을 나타냄. 이러한 결과는 30-70대에 이르기까지 비슷한 장내 미생물 군집 특성을 보이고 전 연령대에 적용 가능한 발효 유제품 생산의 가능성을 보여준다는 점에서 의의가 있음.

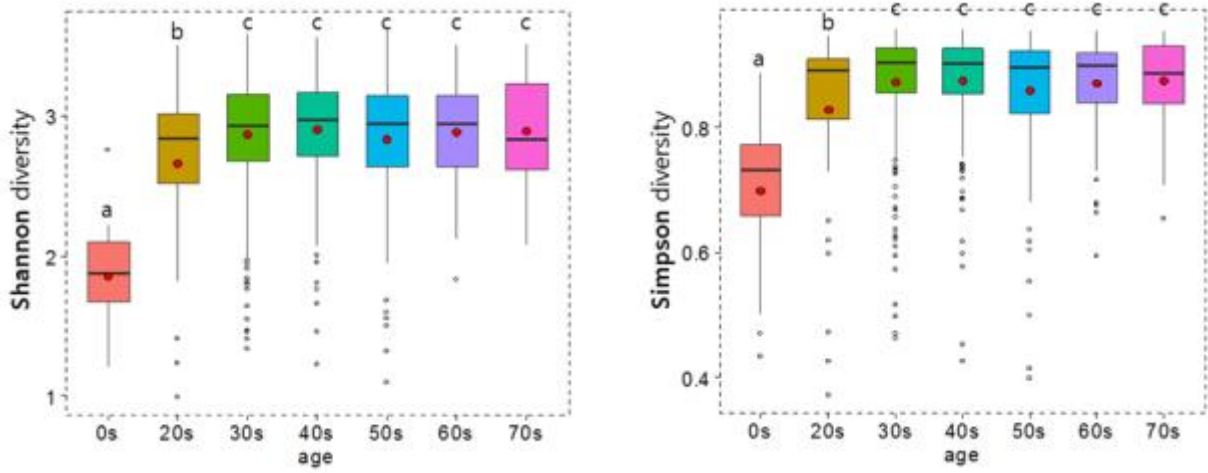


그림 34. 연령별 균총 다양성 특징 분석

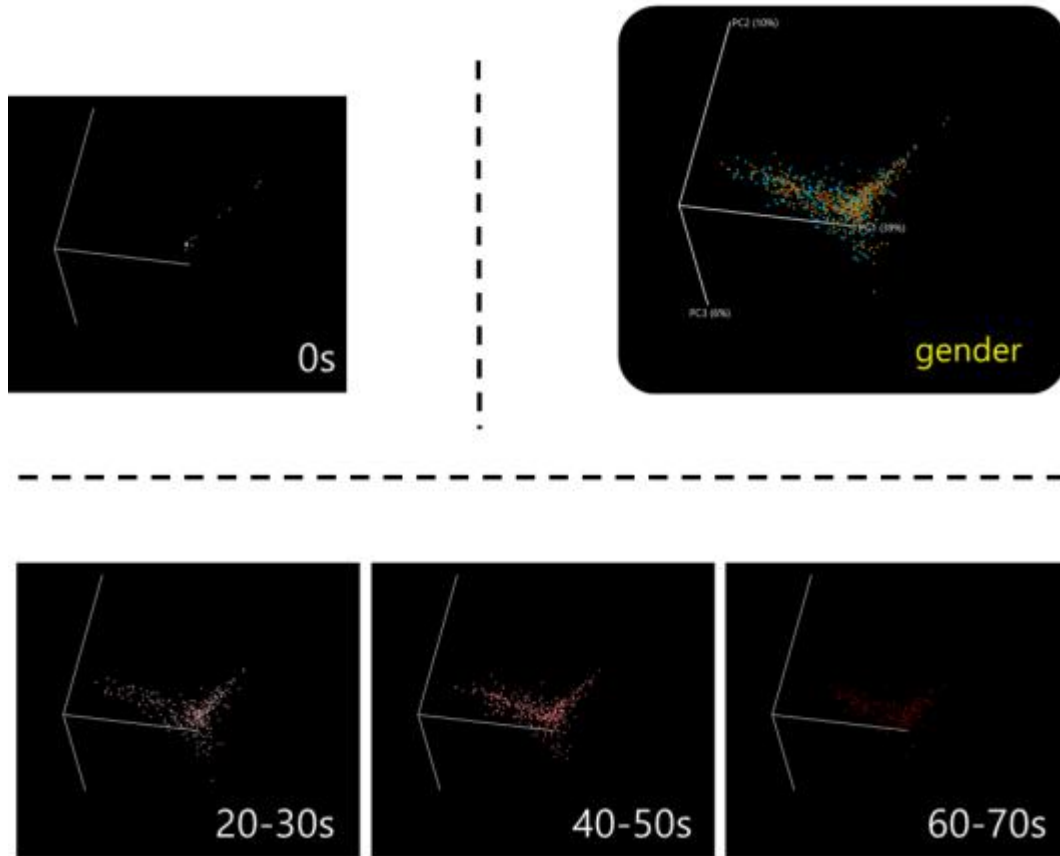


그림 35. 연령별, 성별 β -diversity 분석

- β -diversity 분석 시 마찬가지로 20-70대에서는 그룹별로 비슷한 분포도를 보였음. 성별로 분석 시에는 그룹 간에 유의적인 차이가 나타나지 않음.
- 영유아, 청소년의 경우 장내 균집의 특수성을 가지고 있으므로 연령 특이적인 맞춤형 발효 유제품이 필요함을 보여주었음. 이러한 결과는 향후 연령별 분석 시료를 늘려 지속적인 분석을 수행함으로써 검증할 필요가 있음.
- 염증 수치 (hsCRP)를 기반으로 한 건강상태별 장내 미생물총 비교 분석 및 마이크로비움 바이오마커를 탐색한 결과, 유의적인 상관관계를 보인 1개 이상의 장내미생물 family를 발굴함. 이때, 혈중 면역 관련 바이오마커인 hsCRP 함량을 기준으로 총 59명의 대조군 그룹 (hsCRP: 1.5-2.5 mg/L)과 총 55명의 면역질환 고위험 그룹 (hsCRP: 3.5 mg/L 이상)으로 구분함.

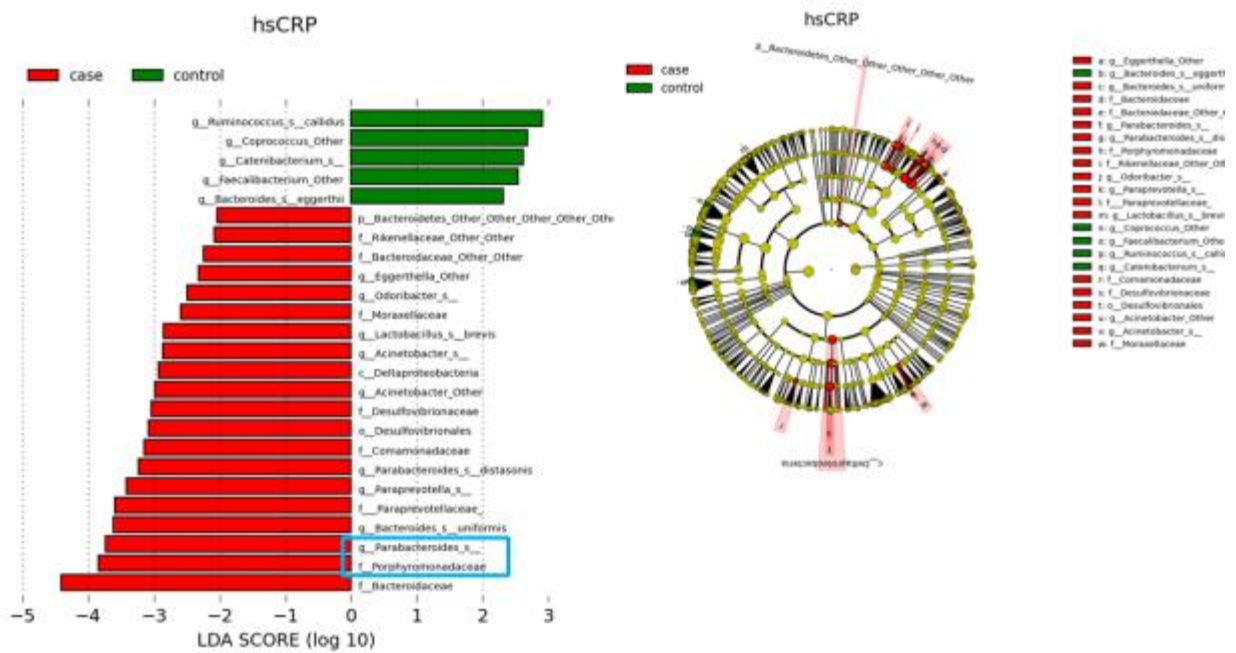


그림 36. 면역질환 관련 마이크로비움 마커 규명 - hsCRP 그룹별 Linear discriminant analysis 분석

- Linear discriminant analysis를 수행한 결과, hsCRP 고위험 그룹에서 *Porphyromonadaceae* (family level) 科에 속하는 *Parabacteroides* (genus level) 속이 유의적으로 증가되어있어 해당 장내 미생물이 면역 질환의 바이오마커로 이용될 수 있음을 밝힘. 이외에도 *Paraprevotella*, *Actinobacteria*, *Odoribacter*, *Eggerthella* 등의 장내 미생물 속이 면역 질환과 관련이 있을 가능성이 있으므로 이에 대한 검증 실험이 요구됨.

4. 장내 미생물 순수분리

- 장내 미생물 분리를 위해 대학생으로부터 직접 회수한 신선한 인체 대변 시료 중 대변의 색, 단단함, 공기 노출 시간 등을 고려하여 총 19개의 대변 시료 (16I005, 16I008, 16I010, 16I012, 16I014, 16I017, 16I018, 16I019, 16I022, 16I023, 16I024, 16I025, 16I027, 16I029, 16I030, 16I031)를 선정하여 미생물 분리를 수행함.
- 유산균 enrichment를 위해 상업용 BL agar 플레이트에 1차 streaking 후 단일 콜로니를 분리함. 특히 유산균 중에서도 장 점막에 붙어서 서식하는 것으로 알려진 *Bifidobacterium*을 선택적으로 분리하기 위해 주 탄소원으로 mucin만 첨가되어있는 mucin agar 플레이트를 사용함. 해당 미생물은 절대 혐기 미생물이므로 모든 작업을 혐기 챔버 안에서 산소가 엄격하게 제거된 상태에서 수행함.

- streaking 과정을 반복하여 단일 콜로니를 얻은 후 human serum이 추가된 BHI 배지에서 액체 배양을 수행함. 배양액으로부터 스탁을 제조하고 펠렛 PCR을 통해 16S rRNA gene을 증폭함. 미생물 동정은 Ezbiocloud 데이터베이스를 사용함.



그림 37. 장내 미생물 분리동정 및 미생물 라이브러리 구축 모식도

- 10개의 유산균 species에 대해 총 153개 strain을 새롭게 확보함.

표 3. 신규 확보한 유산균 species 별 strain 수

유산균	New isolation (153)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	35
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	27
<i>Bifidobacterium faecale</i>	5
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	4
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	26
<i>Bifidobacterium longum subsp. suis</i>	3
<i>Bifidobacterium steroris</i>	24
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	23
<i>Lactobacillus ruminis</i>	4
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1

- 기존 2000개 이상의 자체 장내 미생물 라이브러리에 포함되어있지 않던 신규 장내 미생물 species 13 종을 확보함. (*Anaerostipes hadrus*, *Anaerotruncus colihominis*, *Blautia hansenii*, *Butyricimonas virosa*, *Mitsuokella jalaludini*, *Paenibacillus timonensis*, *Ruminococcus gnavus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, *Bacillus circulans*, *Bacillus spiralis*, *Streptococcus salivarius subsp. salivarius*, *Coprobacillus cateniformis*) → 신규 분리 중에 대해 SCI 논문 게재.

Correspondence
GwangPyo Ko
gko@snu.ac.kr

Sellimonas intestinalis gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces

Boram Seo,^{1,2} Ju Eun Yoo,¹ Yung Mi Lee³ and GwangPyo Ko^{1,4}

¹Center for Human and Environmental Microbiome, Graduate School of Public Health, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea
²School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea
³Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, 26 Songdomirae-ro, Yeosu-gu, Incheon 406-840, Republic of Korea
⁴N-Bio, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

A Gram-stain positive and obligately anaerobic bacterial strain, BR72^T, forming ivory yellow colonies was isolated from a faecal sample of a healthy Korean woman. 16S rRNA gene sequence analysis indicated that strain BR72^T belongs to *Clostridium* cluster XIVa and

그림 38. KO-018 대변시료로부터 신종 미생물 분리 관련 논문 출간

5. 장내 미생물총 개선용 천연물 발굴을 위한 인체 대장모사시스템 구축

- 다양한 배지 조건 내에서 연속식 혐기 배양을 수행하기 위해 기존에 구축되어있는 3-stage 기반 6채널 멀티퍼멘터를 1-stage continuous colonic fermentation 시스템으로 개조하여 실험을 수행함 (그림 39).

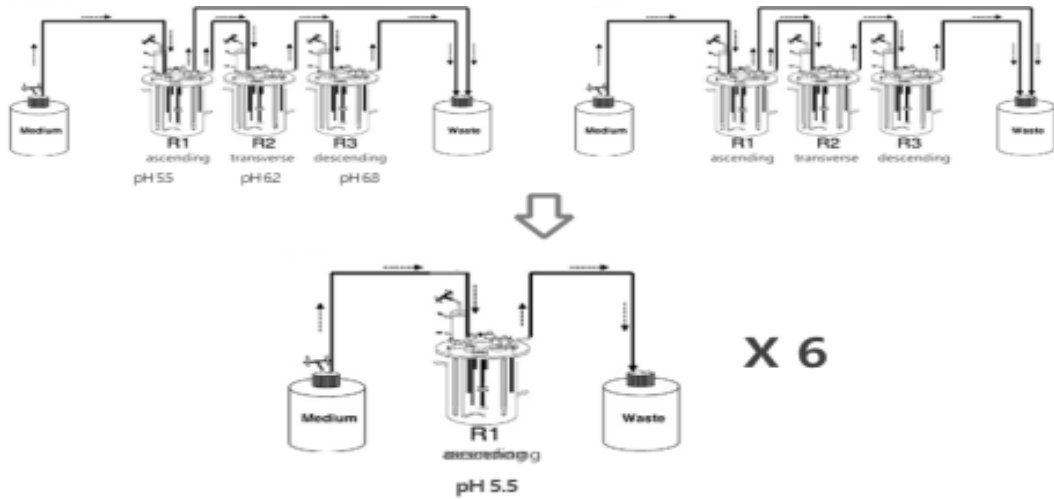


그림 39. 장내균총 개선 천연물 탐색을 위한 연속식 혐기 배양시스템 구축

- 천연물 처리에 의한 장내 미생물총 개선 효과를 확인하기 위해 장내 미생물총 불균형 상태를 유도할 수 있는 배지조건을 탐색함. 혐기성 연속 배양 시스템에서 BCM (basal culture medium) 기반 배양을 수행하면서 mucin, 당 (arabinogalactan, starch, pectin, xylan, inulin, sucrose), 단백질 함량을 다르게 하여 2주 이상 배양을 수행함. 장내 미생물총 불균형 유도 여부는 SCFA (short chain fatty acid) 함량을 측정하여 인체 대변시료의 특징과 비교함으로써 결정함 (그림 40).

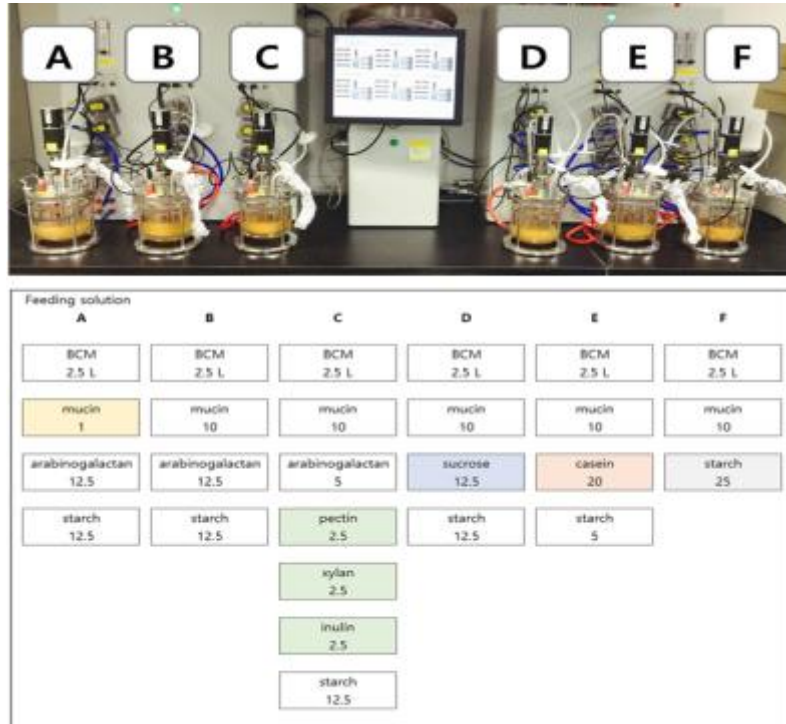


그림 40. 장내 미생물총 탐색용 배양 조건 연구

- SCFA 분석을 위해 샘플링된 배양액 시료를 sulfuric acid로 산성화시켰으며 diethyl ether 층으로 분획하여 GC-FID 실험을 수행하였음. 이때 volatile acid 분석 전용 Nukol 컬럼 (Supelco)을 사용하였으며 acetate, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid, valeric acid를 표적 물질로 분석하였음 (내부표준물질: 2-methylpentanoic acid).
- 활성 소재의 고속 탐색을 위해 장내 미생물총 불균형을 유도하는 배지조건에 대해 96-deep well plate 기반 배양을 수행함. 동일 배지조건에서 생물반응기로부터 샘플링된 배양액 1%를 접종하여 이틀간 배양하였고 이때 천연물 소재를 함께 처리하여 최종적으로 장내 미생물 유래 유해효소 활성, SCFA 함량, qPCR을 통한 유산균 증식 여부 등을 분석함. 장내 미생물 유래 유해효소는 간에서 유독성 물질의 무독화 기능을 방해하는 미생물 β -glucuronidase와 장내에서 트립토판을 분해하여 인돌류의 유해물질 생성에 관여하는 tryptophanase, 또 aromatic amine을 생성하여 DNA 변이를 초래하는 nitroreductase 활성을 측정하였음. 유산균 증식 여부를 위해서는 *Lactobacillus* (F: GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC, R: GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC), *Bifidobacterium* (F: CTCCTGGAAACGGGTGG, R: GGTGTTCTTCCCGATATCTACA) primer를 사용함.
- 장내미생물 개선효능 검증용 맞춤형 대장모사시스템 구축 완료하였으며, 정상배지 및 고단백질 섭취조건 (육식위주 식이습관 모사목적)에서 인체유래 장내미생물 배양에

성공하였음.

표 4. 장내 미생물 불균형 유도 고단백 배양배지 조성

Component	g/L
Peptone	1.3
Yeast extract	2
NaHCO ₃	2
L-Cystein-HCl	0.5
Bile salts	0.5
Hemin	0.005
Vitamin K	10 µL
NaCl	0.8
KH ₂ PO ₄	0.04
K ₂ HPO ₄	0.04
MgSO ₄	0.01
CaCl ₂	0.01
Resazurin	0.0025
Mucin	2
Casein	5
Sucrose	1

- 대장모사시스템을 이용하여 약 2달간 장내미생물을 배양유지 하였으며, 장내미생물 성장, 유해균 효소활성, SCFA (Short chain fatty acid) 함량 측정에 성공하였음.
- 이를 96웰 플레이트에서 배양 및 모니터링 함으로써 장내미생물총 개선 효능 고속검증 시스템을 구축 완료하였음. 스크리닝 플랫폼의 모식도는 아래와 같음 (그림 41).

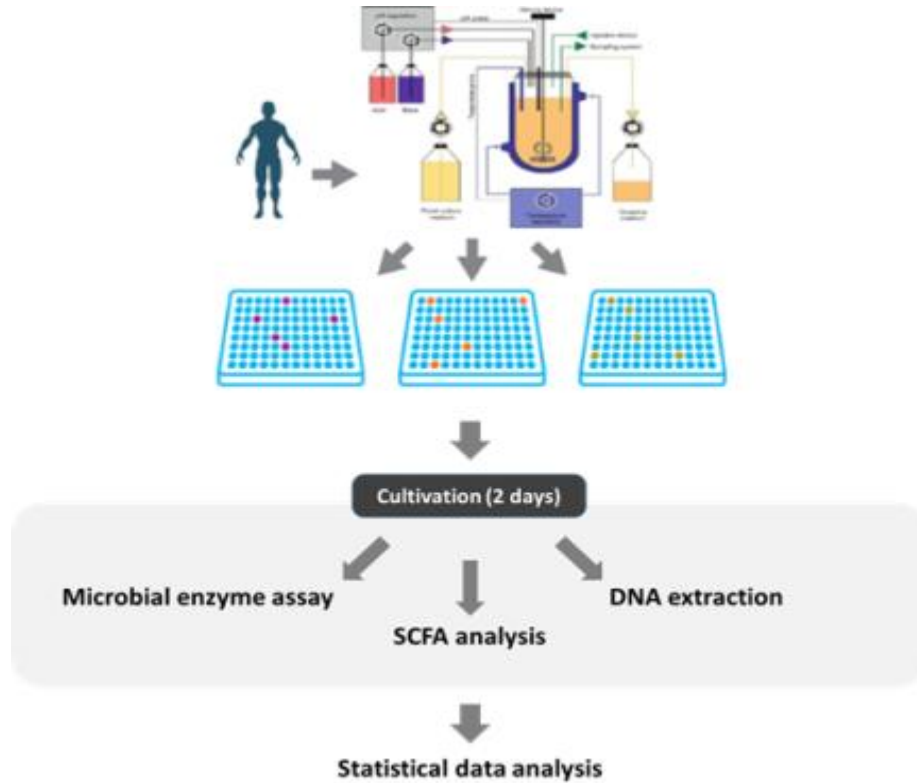


그림 41. 인체 장내 미생물총 개선 효능 고속검증 시스템 모식도

6. 천연물 라이브러리를 활용한 천연 프리바이오틱스 소재 발굴

- 천연물 라이브러리 중 장내 미생물 군집 개선에 효과가 있는 것으로 알려진 다당체와 phytochemicals을 다량 함유하고 있는 소재 및 항균 활성이 있는 것으로 알려진 소재 등을 중심으로 약 30여종의 천연물을 대상으로 장내균총 개선능을 검증함 (그림 42).
- 구축된 천연물 맞춤형 인체 장내 미생물총 개선 효능 고속검증 시스템을 이용하여 천연물 후보 소재의 균총 개선 효능을 탐색하였음. 천연물 처리 농도는 100 ppm으로 통일하였으며 양성 대조군으로 Fructooligosaccharide (1 mg/mL), 음성대조군으로 항생제인 chloramphenicol (10, 40 ppm)을 사용하였음.

samples		OD600						β-glucuronidase						β-glucuronidase (normalization)							
		w1	w2	w3	average	vs. control	ttest	w1	w2	w3	average	vs. control	ttest	w1	w2	w3	average	vs. control	ttest		
media only		0.001	0.000	0.000	0.000	0.00	0.024	0.003	-0.001	-0.001	0.000	0.00									
no DMSO		0.071	0.189	0.112	0.100	81.79	0.416	0.054	0.062	0.065	0.060	123.29	0.035	0.759	0.520	0.576	0.619	146.08	0.156		
0.1% DMSO		0.096	0.138	0.132	0.120	97.55	0.909	0.053	0.058	0.059	115.07	0.032	0.587	0.419	0.438	0.481	113.53	0.600			
0.2% DMSO		0.094	0.140	0.145	0.123	100.00	1.000	0.050	0.051	0.049	100.00	1.000	0.594	0.363	0.316	0.424	100.00	1.000			
0.2% DMSO 13배지		0.095	0.152	0.149	0.132	107.34	0.752	0.050	0.052	0.057	119.18	0.100	0.699	0.341	0.385	0.472	110.91	0.755			
FOS	1 mg/mL	0.225	0.278	0.253	0.230	205.16	0.007	0.020	0.017	0.016	35.62	0.000	0.098	0.060	0.065	0.070	16.47	0.015			
chl/or amphenicol	10 ppm	0.065	0.006	0.115	0.062	50.27	0.175	0.100	0.002	0.036	0.044	89.73	0.872	1.541	0.294	0.250	0.694	164.62	0.559		
chl/or amphenicol	40 ppm	0.005	0.010	0.006	0.007	5.43	0.004	0.003	0.004	0.001	0.002	4.79	0.000	0.571	0.379	0.118	0.356	83.99	0.688		
RNP01	100 ppm	0.134	0.164	0.189	0.162	132.07	0.194	0.065	0.056	0.069	0.063	129.45	0.026	0.484	0.340	0.363	0.396	93.38	0.786		
RNP02	100 ppm	0.133	0.133	0.205	0.157	127.72	0.334	0.043	0.048	0.049	95.21	0.387	0.322	0.359	0.238	0.306	72.22	0.274			
RNP03	100 ppm	0.154	0.142	0.209	0.168	136.96	0.189	0.081	0.071	0.091	165.75	0.006	0.525	0.499	0.435	0.486	114.64	0.528			
RNP04	100 ppm	0.168	0.136	0.183	0.153	124.73	0.284	0.048	0.049	0.058	105.48	0.429	0.348	0.351	0.316	0.338	79.63	0.375			
RNP05	100 ppm	0.129	0.021	0.167	0.105	85.97	0.738	0.041	0.047	0.049	91.10	0.146	0.316	0.258	0.276	0.294	69.58	0.471			
RNP06	100 ppm	0.169	0.163	0.243	0.177	144.29	0.082	0.075	0.027	0.077	121.92	0.551	0.443	0.167	0.378	0.329	77.67	0.473			
RNP07	100 ppm	0.132	0.130	0.170	0.147	119.57	0.351	0.020	0.018	0.038	47.05	0.000	0.149	0.127	0.192	0.156	36.83	0.038			
RNP08	100 ppm	0.172	0.168	0.170	0.170	138.32	0.074	0.078	0.071	0.081	155.48	0.001	0.441	0.421	0.475	0.444	105.16	0.815			
RNP09	100 ppm	0.251	0.254	0.279	0.231	212.77	0.003	0.108	0.116	0.123	236.99	0.000	0.430	0.456	0.440	0.400	104.22	0.846			
RNP10	100 ppm	0.196	0.219	0.226	0.213	173.91	0.014	0.058	0.075	0.057	129.45	0.076	0.295	0.341	0.251	0.296	69.75	0.226			
RNP11	100 ppm	0.188	0.218	0.238	0.214	174.18	0.020	0.051	0.058	0.059	114.38	0.076	0.270	0.267	0.247	0.261	61.15	0.132			
RNP12	100 ppm	0.175	0.220	0.222	0.210	170.92	0.030	0.045	0.057	0.053	105.48	0.526	0.256	0.244	0.238	0.246	57.93	0.107			
RNP13	100 ppm	0.169	0.206	0.207	0.193	166.86	0.029	0.051	0.054	0.050	108.85	0.132	0.288	0.258	0.226	0.251	69.51	0.123			
RNP14	100 ppm	0.182	0.209	0.203	0.198	161.14	0.024	0.048	0.053	0.052	104.11	0.407	0.262	0.255	0.251	0.257	69.51	0.123			
RNP15	100 ppm	0.180	0.212	0.215	0.202	164.67	0.024	0.121	0.086	0.126	0.111	227.40	0.038	0.672	0.405	0.585	0.554	130.63	0.307		
RNP16	100 ppm	0.186	0.208	0.218	0.204	166.03	0.020	0.063	0.072	0.081	147.26	0.013	0.338	0.345	0.371	0.351	82.80	0.446			
RNP17	100 ppm	0.220	0.192	0.167	0.193	157.07	0.048	0.061	0.071	0.075	141.10	0.011	0.276	0.369	0.448	0.364	85.91	0.921			
RNP18	100 ppm	0.223	0.195	0.172	0.196	160.05	0.040	0.061	0.056	0.068	126.03	0.029	0.272	0.288	0.395	0.318	74.89	0.321			
RNP19	100 ppm	0.203	0.148	0.169	0.173	141.03	0.117	0.059	0.053	0.064	119.86	0.052	0.289	0.357	0.377	0.341	80.47	0.409			
RNP20	100 ppm	0.120	0.183	0.189	0.164	133.42	0.237	0.066	0.043	0.056	112.33	0.429	0.549	0.234	0.235	0.359	84.70	0.642			
RNP21	100 uM	0.279	0.229	0.263	0.259	208.42	0.025	0.299	0.271	0.322	607.53	0.000	1.057	1.184	1.238	1.079	273.54	0.029			
RNP22	100 uM	0.238	0.195	0.143	0.208	237.77	0.039	0.072	0.066	0.189	226.71	0.214	0.302	0.337	0.435	0.354	84.62	0.530			
RNP23	100 uM	0.185	0.199	0.194	0.192	156.52	0.025	0.043	0.051	0.069	107.53	0.522	0.231	0.256	0.325	0.272	64.16	0.169			
RNP24	100 uM	0.120	0.117	0.123	0.120	97.55	0.886	0.121	0.128	0.144	268.40	0.000	1.008	1.094	1.171	1.093	257.38	0.002			
media only		0.002	0.000	0.002	0.000	0.00	0.007	0.003	-0.002	-0.002	0.000	0.00									
no DMSO		0.122	0.112	0.136	0.123	102.78	0.897	0.036	0.013	0.029	0.026	141.07	0.388	0.208	0.119	0.216	0.211	132.01	0.451		
0.1% DMSO		0.162	0.113	0.105	0.127	105.56	0.831	0.026	0.013	0.020	107.14	0.821	0.163	0.118	0.190	0.158	96.97	0.969			
0.2% DMSO		0.165	0.107	0.088	0.120	100.00	1.000	0.025	0.011	0.019	100.00	1.000	0.154	0.108	0.225	0.160	100.00	1.000			
0.2% DMSO 13배지		0.145	0.070	0.072	0.099	82.22	0.551	0.023	0.013	0.011	85.71	0.653	0.161	0.169	0.157	0.162	101.66	0.940			
FOS	1 mg/mL	0.388	0.318	0.300	0.388	277.50	0.023	0.096	0.034	0.088	380.96	0.053	0.254	0.108	0.270	0.218	132.65	0.448			
chl/or amphenicol	10 ppm	0.137	0.119	0.180	0.143	119.44	0.485	0.027	0.031	0.021	142.86	0.184	0.200	0.115	0.198	0.198	124.24	0.531			
chl/or amphenicol	40 ppm	0.003	-0.004	-0.005	-0.002	-1.67	0.008	0.005	0.004	0.002	23.21	0.027	2.111	-1.093	-0.462	0.187	117.11	0.979			
RNP01	100 ppm	0.198	0.214	0.209	0.206	171.94	0.022	0.030	0.030	0.029	160.71	0.050	0.155	0.142	0.140	0.144	91.17	0.684			
RNP02	100 ppm	0.192	0.196	0.194	0.194	161.67	0.033	0.027	0.029	0.027	150.00	0.086	0.142	0.150	0.141	0.140	90.35	0.686			
RNP03	100 ppm	0.184	0.129	0.188	0.167	139.17	0.192	0.061	0.059	0.047	300.00	0.003	0.333	0.460	0.252	0.348	218.11	0.052			
RNP04	100 ppm	0.167	0.123	0.179	0.156	130.28	0.275	0.031	0.029	0.032	166.07	0.041	0.188	0.238	0.181	0.202	126.63	0.322			
RNP05	100 ppm	0.134	0.118	0.109	0.119	99.44	0.980	0.023	0.023	0.025	128.57	0.284	0.174	0.198	0.239	0.204	127.49	0.313			
RNP06	100 ppm	0.122	0.114	0.155	0.130	105.61	0.715	0.029	0.020	0.027	137.50	0.225	0.240	0.178	0.170	0.196	124.21	0.379			
RNP07	100 ppm	0.168	0.170	0.189	0.175	146.11	0.083	0.023	0.024	0.025	130.36	0.229	0.139	0.143	0.135	0.138	86.98	0.554			
RNP08	100 ppm	0.171	0.161	0.182	0.181	151.11	0.093	0.054	0.048	0.038	255.36	0.018	0.318	0.273	0.205	0.282	165.95	0.096			
RNP09	100 ppm	0.228	0.252	0.218	0.230	193.33	0.011	0.049	0.061	0.053	292.86	0.003	0.218	0.243	0.243	0.234	147.41	0.000			
RNP10	100 ppm	0.198	0.215	0.226	0.213	177.50	0.019	0.037	0.045	0.043	225.00	0.008	0.109	0.211	0.192	0.197	123.37	0.330			
RNP11	100 ppm	0.176	0.221	0.195	0.197	164.44	0.044	0.012	0.026	0.022	108.93	0.789	0.070	0.119	0.115	0.101	63.40	0.185			
RNP12	100 ppm	0.175	0.220	0.186	0.194	161.39	0.052	0.026	0.027	0.026	142.86	0.121	0.150	0.124	0.142	0.138	86.88	0.570			
RNP13	100 ppm	0.174	0.181	0.183	0.179	149.44	0.064	0.024	0.028	0.023	135.71	0.199	0.140	0.157	0.126	0.141	88.47	0.617			
RNP14	100 ppm	0.170	0.209	0.188	0.182	151.94	0.080	0.026	0.031	0.027	151.79	0.090	0.								

마커의 활성을 낮추는 반면, 장내균총을 망가뜨리는 것으로 알려진 항생제는 장내균의 성장을 억제하며 유해균 마커의 활성을 높였음.

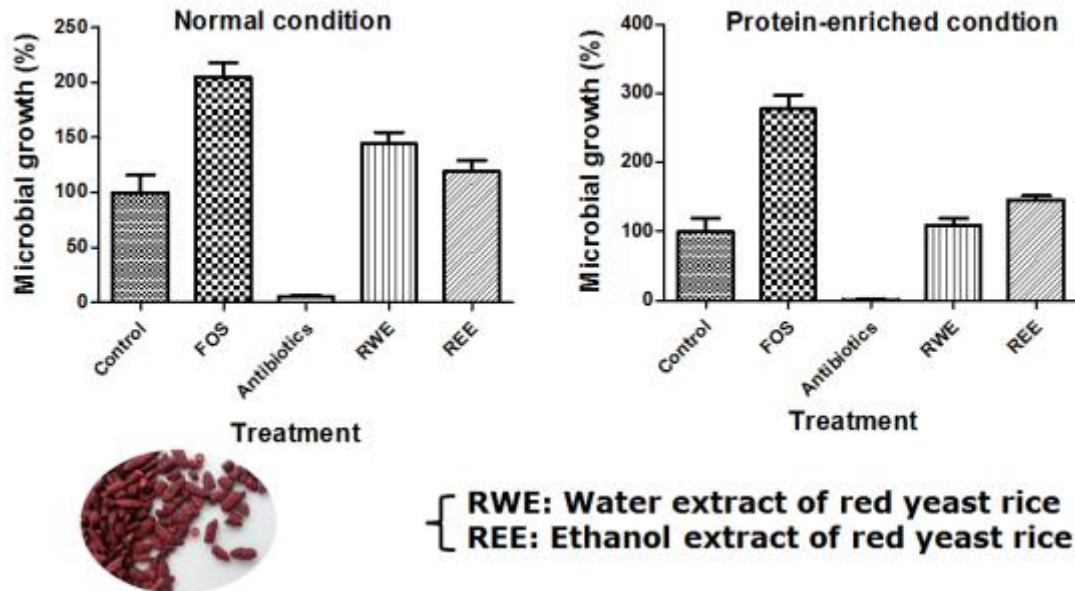


그림 43. 천연프리바이오틱스 소재인 홍국추출물의 장내미생물 성장촉진효과

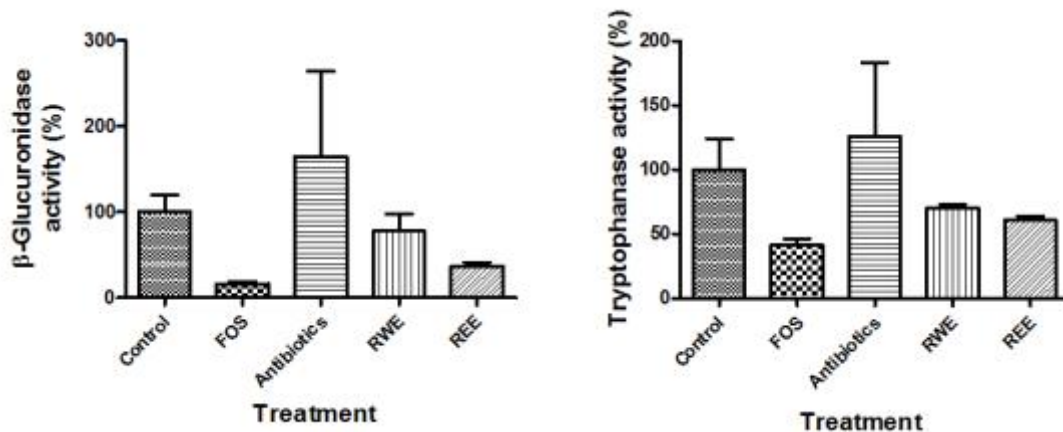


그림 44. 홍국추출물의 유해균 바이오마커인 효소활성 억제 효능

- 또한 유익미생물이 생성하는 것으로 알려져 있는 단쇄지방산 (short chain fatty acid; SCFA) 함량을 측정된 결과, 프락토올리고당 (FOS) 처리 시에는 SCFA 함량이 증가하고, 항생제 처리 시에는 SCFA 함량이 감소하는 반면, 홍국 물추출물, 에탄올추출물 처리 시에는 SCFA 함량이 늘어남으로써, 유익균 활성이 늘어남을 유추할 수 있었음 (그림 45).

	Short Chain Fatty Acid (%)						Content (mM)
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	
Control	46.25±4.32	15.36±0.10	4.35±0.55	25.06±1.76	8.28±0.44	0.71±0.04	18.60±1.21
FOS	46.44±1.79	23.54±0.33	2.97±0.54	21.57±1.37	5.48±0.25	N.D.	25.41±0.55
Antibiotics	54.36±3.23	25.40±0.89	N.D.	20.24±0.64	N.D.	N.D.	2.03±0.06
RWE	45.68±1.20	18.71±1.56	4.11±0.83	23.13±1.65	7.62±0.62	0.75±0.12	20.56±0.99
REE	48.40±0.31	16.86±0.92	3.63±0.72	23.41±1.44	7.09±0.44	0.62±0.01	20.11±0.75

그림 45. 홍국추출물이 대장모사시스템에서 단쇄지방산 생성에 미치는 영향

- 발굴된 유망소재인 홍국, 더덕, 실리마린 소재를 지적재산권화 하였으며, 현재 (2018.11.4.)까지 총 9건의 국내외 특허출원 및 등록 실적을 도출하였음 (국내출원 4건, 미국출원 1건, 국내등록 4건).
- 특히 ‘더덕 추출물을 함유하는 장건강 개선용 조성물’에 관한 특허는 한국과학기술연구원의 특허심의회 평가 결과, 신규성과 산업적 파급력이 큰 우수특허 (A등급)로 선정된 바 있으며, 한국과학기술연구원으로부터 해외 특허출원 비용 (1300만원)을 지원 받아 미국특허로 출원되었으며, 현재 심사 중에 있음.

2절. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 장내 미생물총 개선용 혼합 균주 발굴

가. Direct plating을 이용한 장내 미생물 순수 분리

- 본 연구진은 1차년도 연령별, 건강상태별 한국인 장내 미생물 패턴을 분석하기 위해, 확보한 연령 그룹별 (영유아, 20-30대, 40-50대, 60-70대) 분변 시료를 이용하여 장내 미생물총 개선용 혼합 미생물 균주 분리를 시도하였음. 혐기 조건에서, non selective agar에 direct plating을 하여 2000 종 이상의 다양한 장내 미생물을 순수 분리하였으며, 이를 통하여 현재 식품의약품 안전처 (식약처) 에서 허가하고 있는 고시형, 개별 인정형 프로바이오틱스 균주 (표 5) 에 속하는 *Lactobacillus* 112종, *Lactococcus* 2종, *Bifidobacterium* 464종의 균주를 분리하였음.

표 5. 식약처 고시형 균주 리스트

구분	종류
Lactobacillus	L.acidophilus, L.casei, L.gasseri, L.delbrueckii spp bulgaricus, L.helveticus, L.fermentum, L.paracasei, L.plantarum, L.reuteri, L.rhamnosus, L.salivarius
Bifidobacterium	B.bifidum, B.breve, B.longum, B.animalis ssp. lactis
Lactococcus	Lc.lactis
Enterococcus	E.faecium, E.faecalis
Streptococcus	S.thermophilus

나. *In vitro* 장내 미생물-동물세포 혼합 배양을 통한 면역기능 개선 효능 평가

- 전체 분리 균주들을 대상으로 한 내산성 및 내담즙성 평가를 통해, *Lactobacillus* 19종, *Lactococcus* 2종, *Bifidobacterium* 34종을 선별함. 이 후, 단핵구 세포주 THP1과 인간 말초혈액단핵구 (human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 이용하여, 인간 분변 유래 순수 분리된 장내 균총의 다양한 사이토카인 분비능을 확인함.
- THP-1 세포주는 100 mM의 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)를 처리하여 대식세포 (macrophage) 로 분화하였으며, 이는 초기 선천성 면역에 관여하는 세포 중 하나로 장내 점막에서 다양한 사이토카인을 유도 할 수 있는 능력을 가짐.. PBMC는, 백혈구 농축액으로써, 선천면역에 관여하고 항원을 인지하는대식세포 및 수지상세포 뿐만 아니라 B 세포, T 세포 및 natural killer T (NKT) 세포 등 후천면역에 관여하는 다양한 림프구 에 의한 사이토카인 반응을 확인할 수 있음.
- 본 실험에서는 인간 세포 (THP1 또는 PBMC) 대 생균 비율 (cell: live bacteria) 을 1:20 또는 1:100으로 혼합 배양한 후, 24 시간 뒤 상층액을 획득하여 cytometric bead assay (CBA) 또는

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 다양한 사이토카인 (TNF, IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-17A) 발현량을 확인하였음. 흥미롭게도 THP1 세포주에서는 염증성 사이토카인 중 IL-8이 유의하게 증가하였으며, 또한 항염증 사이토카인인 IL-10을 유의하게 증가시키는 *Lactobacillus*, *Lactococcus* 종과 *Bifidobacterium* 종을 확인하였음. 또한 IL-6, TNF, IFN- γ 대비 IL-10 발현을 역시 확인하여 염증성 사이토카인이 항염증성 사이토카인에 비해 높은 수준으로 발현되는 분리 균주를 확인하였음 (그림 46).

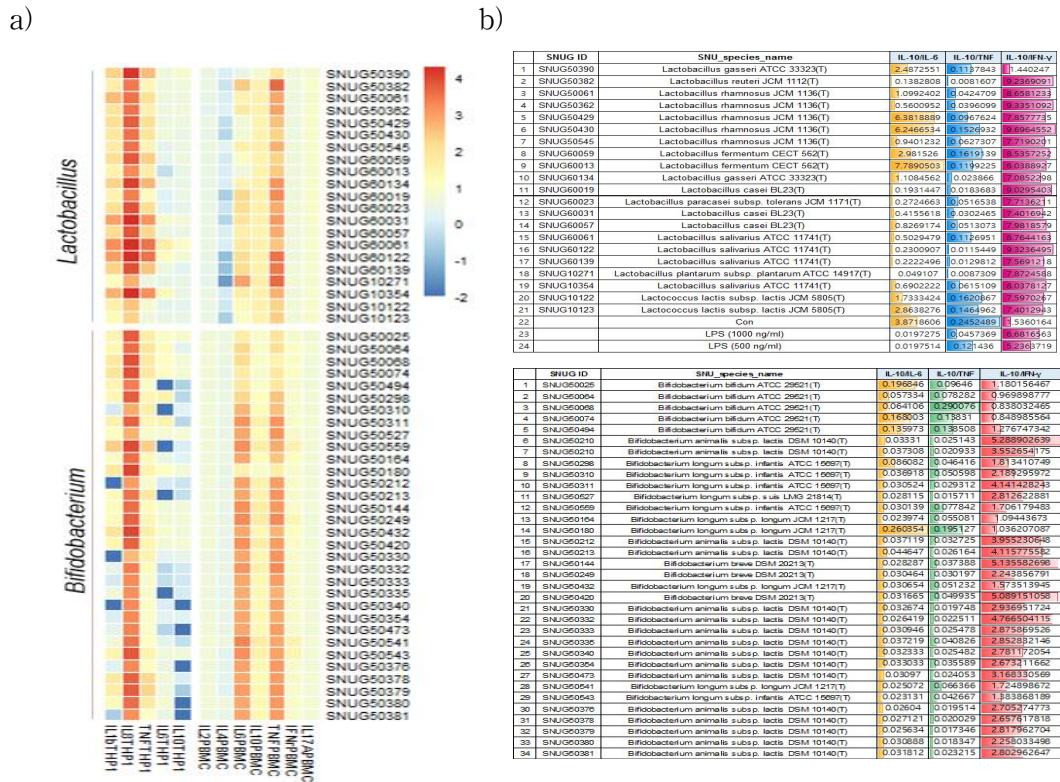


그림 46. 후보 균주들에 의한 THP1과 PBMC 상의 사이토카인 발현률 결과 (a) 및 PBMC와의 항염증성 사이토카인 상대적 발현을 비교 (b)

다. 소재 안정성·기능성 평가를 통한 혼합 균주 발굴

- 후보 분리균주들을 대상으로 인간 유래 면역 세포의 장내 미생물에 대한 면역반응 및 장관세포의 tight junction 조절 능력을 확인하였음 (그림 47). 이를 통해 항염증성 기능과 장관세포의 tight junction을 증가시킬 수 있는 균주 3종을 확보하였으며, 이들의 생육 특성 규명 및 최적화 및 내산성·내담즙성 평가를 통해 기능성 및 안전성을 확보하였음.

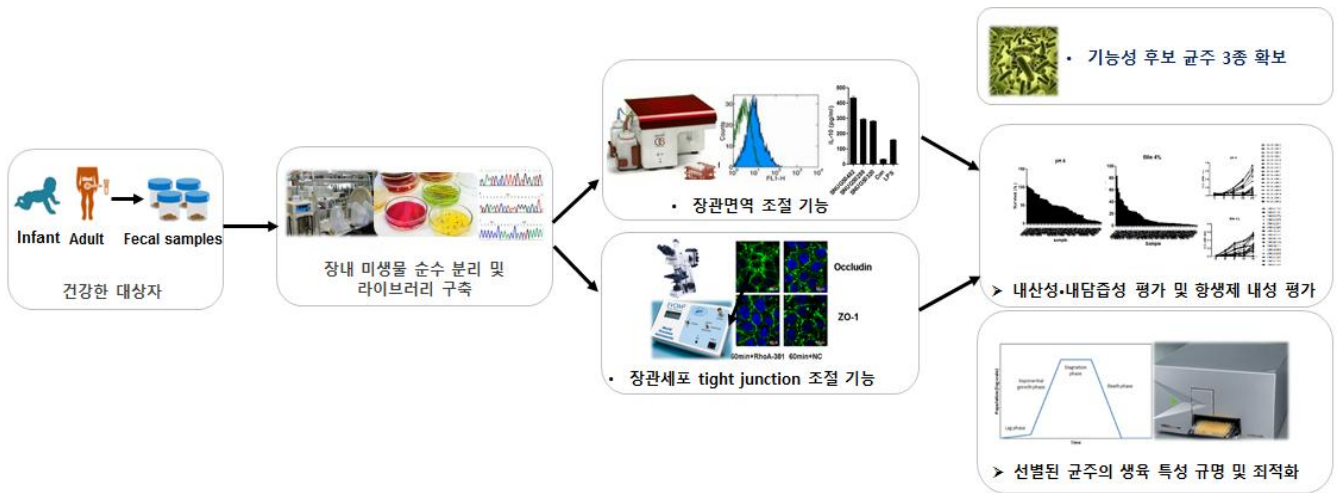


그림 47. 면역기능 개선 혼합 균주 발굴 모식도

라. 소재 안정성·생육 특성 규명 및 최적화

- 최종적으로 선별한 균주 3종 중 SNUG50430 과 SNUG50559 는 3개월 미만의 신선한 영아 분변 샘플에서 분리하였음. SNUG10122 는 성인 분변 샘플의 분변에서 분리함 (표 6). 각 균주는 16s rRNA gene resequence 분석을 통해, 99% 이상 identity 가 상등한 균으로 동정함.

표 6. 최종 선별 균주 3종의 정보

SNUG ID	Bacteria name	개별ID	source	Isolator
SNUG50430	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BL16c	Infant	HS,NY
SNUG10122	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	O-6 Bif1	Adult	SH,HO
SNUG50559	<i>Bifidobacterium longum subsp. Infantis</i>	S20BS1	Infant	HS,NY

- 각 균주의 생육 특성 규명 및 최적화를 위해 선별된 균의 성장도를 시간별로 확인한 결과, SNUG50430의 경우, 배양 후 11시간 경에 휴지기 (stationary phase) 에 도달하였으며, 생균수는 3.26×10^9 CFU/mL를 나타냈음. SNUG10122는 배양 후 5시간경 (생균수 2.36×10^9 CFU/mL), SNUG50559의 경우 17시간 경 (생균수 4.48×10^9 CFU/mL)에 각각 정지기에 도달하는 것을 확인하였음 (그림 48).

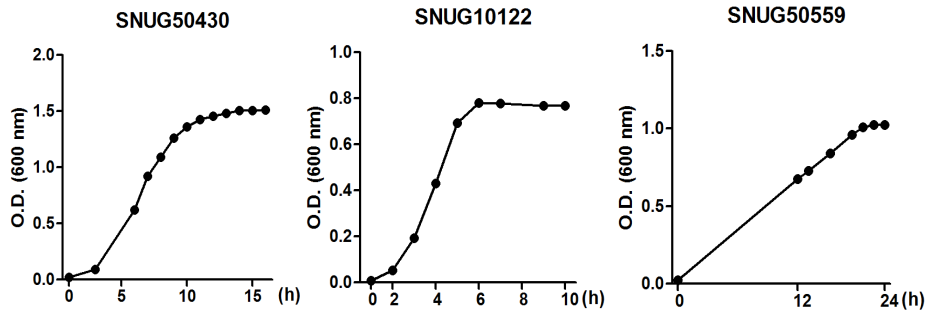


그림 48. 선별된 균주의 성장곡선

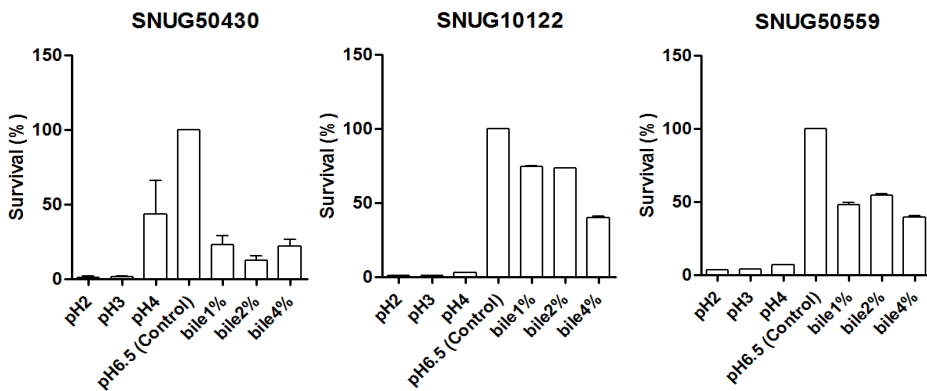
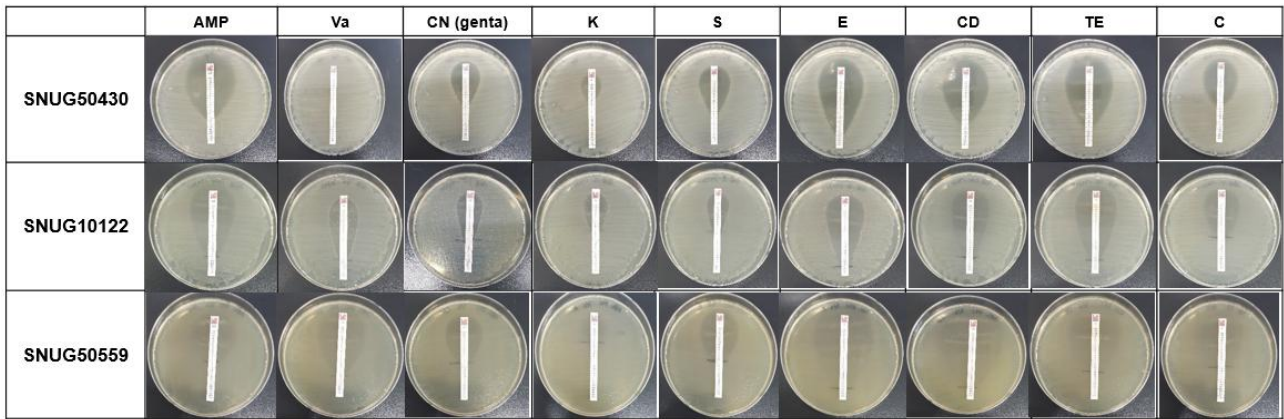


그림 49. 선별된 균주의 내산성·내담즙성 평가

- 또한 각 균주의 생존율 및 안정성을 평가하기 위해 pH 2, 3, 4 조건과 담즙 (oxgall, sigma) 1%, 2%, 4%의 농도로 조절한 MRS broth에 각 균을 접종하고, 24시간 동안 배양한 뒤, 그 성장 정도를 pH 6.5 조건의 대조군과 비교하여 생존율 $[(\text{실험균의 OD값}/\text{대조군의 OD값}) \times 100]$ 을 산출하였음 (그림 49). SNUG50430의 경우, pH 4에서 53%, SNUG10122와 SNUG50559의 경우 담즙 1%, 2%에서 50% 이상의 생존율을 보이는 등, 상당한 내산 및 담즙성을 보였음. 장내 위장의 낮은 pH 와 소장의 담즙 등에 대한 강한 내성이 필요한 점을 고려하였을 때, 본 균주들은 바람직한 수준의 내성을 보유하고 있음.
- 선별 균주의 항생제 내성 평가를 위해 ISO-sensitest agar에 각 균주를 접종한 다음 항생제 MIC test strip (Liofilchem, Italy)를 올려놓고, 18-24시간 동안 배양하여 생육 억제 (clear zone)가 나타나는 농도를 확인하였음. AMP (Ampicillin), Va (Vancomycin), CN (Clindamycin), K (Kanamycin), S (Streptomycin), E (Erythromycin), CD (Clindamycin), TE (Tetracycline) 및 C (Chloramphenicol) 등 총 9가지 항생제들 대한 내성을 평가하였으며 . 결과를 미생물의 저항성에 관한 국제기준인 European Food Safety Authority (EFSA) 기준을 적용하여 점검함. 3종의 선별균주들은 전반적으로 항생제들에 대한 내성이 기준치보다 낮아 요건을 충족하였음 (그림 50).



Strains	Antibiotics (µg/mL)								
	AMP	VA	CN	K	S	E	CD	TE	C
SNUG50430	0.5	-	3	24	6	0.064	0.38	0.19	3
EFSA <i>L. rhamnosus</i> breakpoint	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4
SNUG10122	0.19	0.19	1	8	16	0.47	0.125	0.064	2
EFSA <i>Lactococcus lactis</i> Breakpoint	2	4	32	64	64	2	4	4	8
SNUG50559	3	0.38	3	96	6	0.094	0.064	0.75	2
EFSA <i>Bifidobacterium</i> breakpoint	2	2	64	n.r.	128	0.5	0.25	8	4

그림 50. 선별 균주의 항생제 내성 능력 평가

- SNUG50430 (*L. rhamnosus*)과 SNUG50559 (*B. longum*)에 대한 형태 (morphology)를 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 확인하였음 (그림 51).

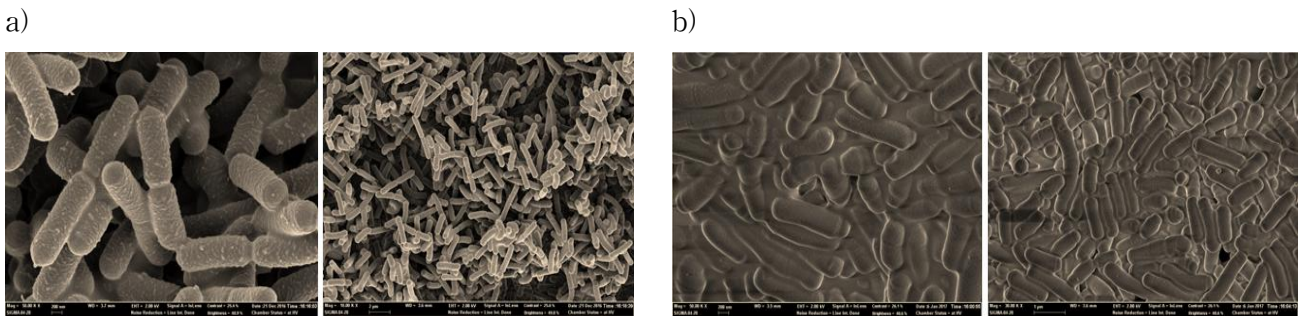


그림 51. (a) SNUG50430 (b) SNUG50559 주사전자현미경 사진

마. 장관 세포 밀착결합 (Tight junction) 조절 기능 평가

- 3종의 기능성 균주 (SNUG50430, SNUG10122, SNUG50559)의 배양조건 확립 및 미생물 변형을 최소화하기 위한 스탁화 (stock) 등을 수행하였으며, 각 균주를 적절한 규모로 배양한 후, 배양법 및 유세포 분석기를 활용하여 각 균주의 접종량을 일정화하는 단계를 거침.

- 균주들에 의한 tight-junction 효과를 확인하기 위하여 대표적인 장상피세포인 Caco-2 세포를 배양하였으며, 기능성 균주의 성장조건을 고려하여 기능성 균주-Caco-2 세포 간 혼합 배양조건을 확립하였음.
- Neutral red uptake법으로 확인한 바와 같이 기능성 균주와의 혼합 배양이 Caco-2 세포의 cell viability에 영향을 미치지 않았으며, 이에 균주들의 기능성을 점검하기 위한 혼합 배양 조건이 적절히 갖추어졌음을 알 수 있음 (그림 52).

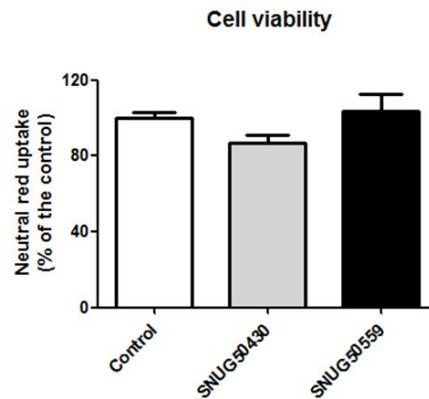


그림 52. Neutral red uptake
법으로 검증한
혼합 배양 조건 확립

바. 기능성 균주가 장상피세포 tight junction 및 장 점막 관련 단백질 발현에 미치는 영향 확인

- 기능성 균주와 혼합배양한 후의 Caco-2 세포를 대상으로 Transepithelial/transendothelial electrical resistance (TEER) assay을 수행하여 기능성 균주가 장상피세포의 tight junction에 주는 영향을 확인함 (그림 53).

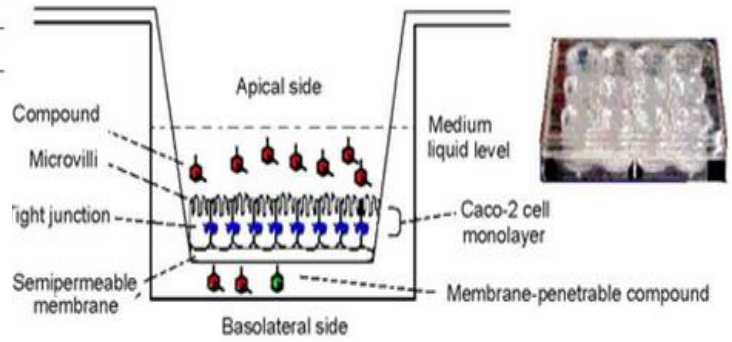
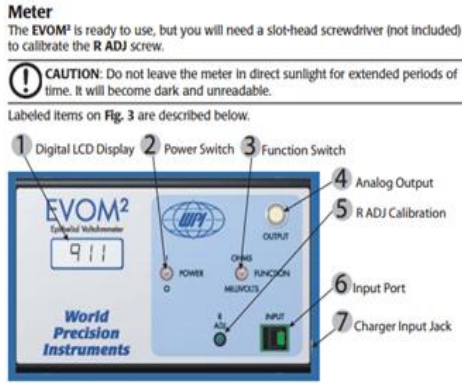


그림 53. TEER 측정용 장비 (EVOM2) 및 Caco-2 세포의 tight junction 변화 검증 과정

- 대조군에 비해 3종의 대상 균주를 처리한 Caco-2 세포 상의 TEER값이 유의하게 상승하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 12시간 처리에 비해 24시간 처리 후 3~5배 정도의 높은 TEER값 상승이 있었음 (그림 54).

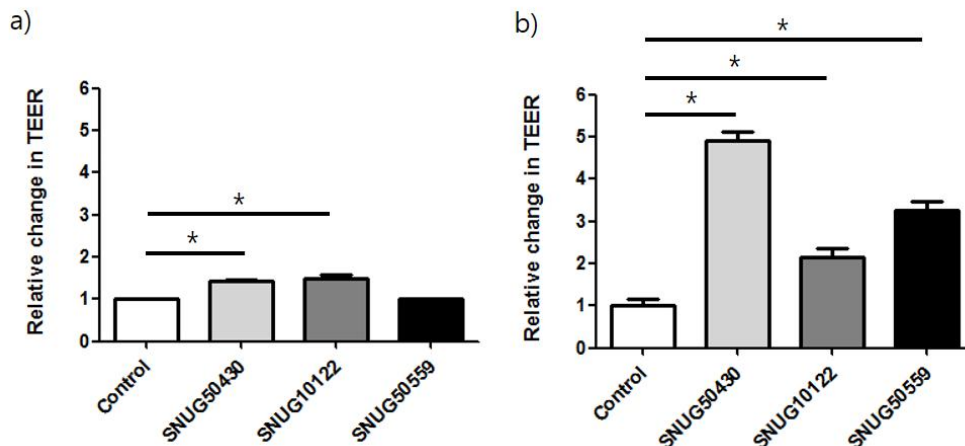


그림 54. 기능성 균주 처리 후의 Caco-2 세포 상 TEER값 변화
(a) 12시간 처리; (b) 24시간 처리

- 또한 열처리를 하여 사멸화한 균주 및 균주 배양 상층액을 Caco-2 세포에 24시간 처리한 다음 2배 내외의 TEER값이 상승하는 것을 확인함. 본 결과는 기능성 균주로부터 유래하는 대사체 (metabolites)들이 장 상피세포의 tight junction를 유의하게 강화시킬 수 있음을 보여줌 (그림 55).

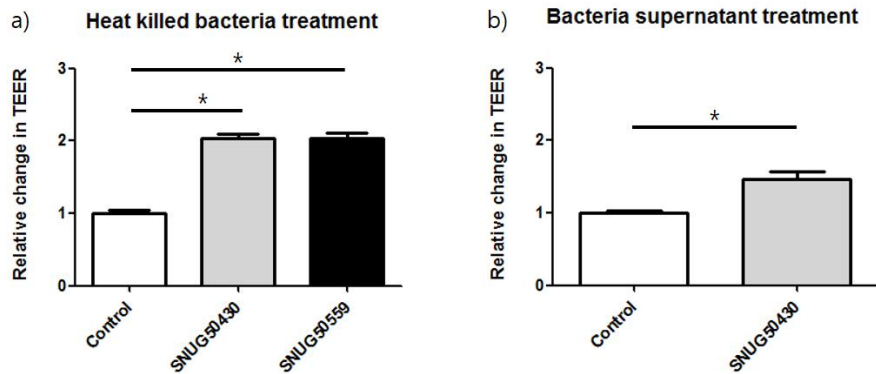


그림 55. (a) 열처리를 통하여 사멸화한 균주 및 (b) 균주배양 상층액을 처리한 후 Caco-2 세포 상 TEER값 변화

- 기능성 균주를 24시간 처리한 후의 핵심 막단백질인 ZO-1 및 Occludin의 발현량을 western blot을 통하여 조사한 결과, 대조군에 비하여 ZO-1은 약 1.6배, Occludin은 약 2배 남짓 과발현되는 것을 확인하였다. 이는 즉 기능성 균주의 처리가 막단백질의 발현에 영향을 미침으로써 장 상피세포의 tight junction을 강화할 수 있음을 보여줌 (그림 56 및 그림 57).

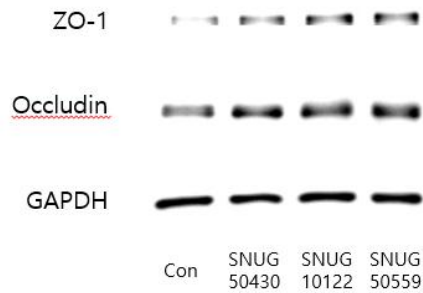


그림 56. Western blot을 통한 기능성 균주 처리 후 단백질 발현량 비교

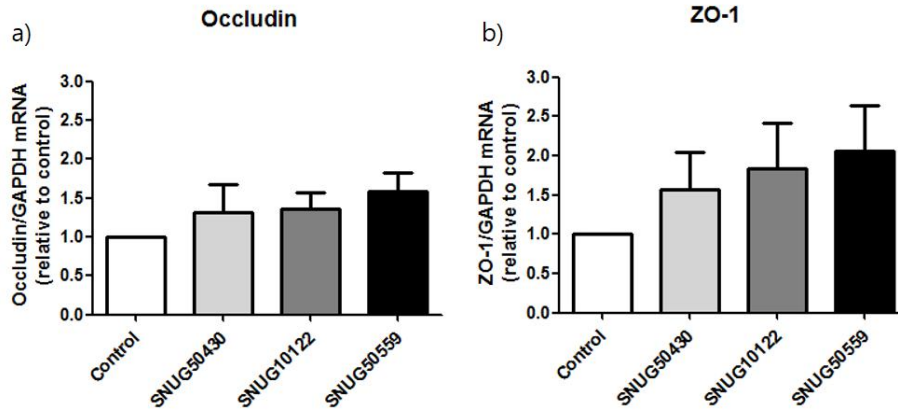


그림 57. 24시간의 기능성 균주 처리가 Caco-2 세포의 막단백질 (a) ZO-1 및 (b) Occludin의 발현에 미치는 영향 확인

- 기능성 균주를 24시간 처리한 후의 핵심 막단백질인 ZO-1 및 Occludin의 발현을 면역형광염색법으로 확인한 결과, 대조군에 비해 확실한 발현 증가를 육안으로 살펴볼 수 있었음. 이에 기능성 균주가 충분한 장 상피세포의 tight junction 강화를 유도해 낼 수 있음을 재차 확인하였음 (그림 58).

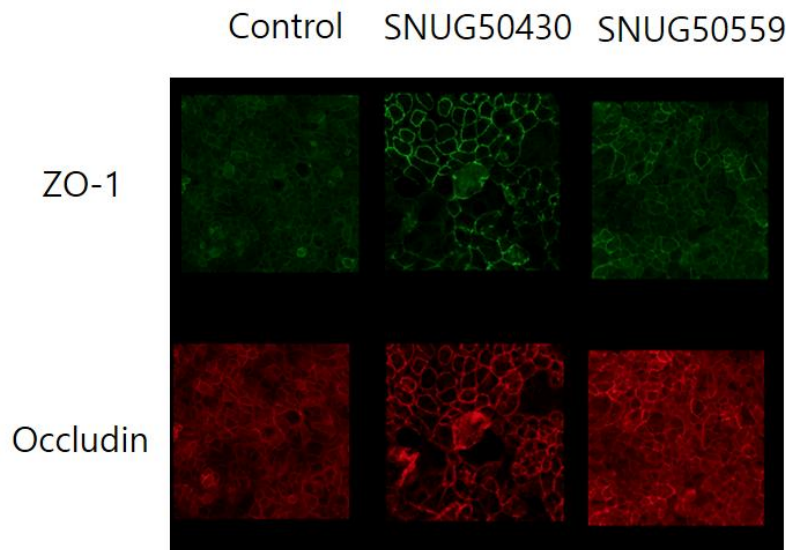


그림 58. 균주 처리가 유도한 Caco-2 세포 상 주요 막단백질의 과발현 확인 (면역형광염색법)

2. 맛춤 균주와 천연 프리바이오틱스를 활용한 혼합모델 개발

- 1차년도 연구개발을 통해 발굴된 맛춤형 균주 및 천연프리바이오틱스를 혼합시의 최적 비율을 결정하기 위해, 중심합성계획법 (Central composite design, CCD) 기반의 혼합모델 개발 연구를 수행함 (그림 59).



그림 59. 맛춤 균주와 천연프리바이오틱스 최적 혼합비율 결정을 위한 연구개발 개념도

- 대장모사기반 고속 장내균총 개선능 평가시스템을 활용하여 혼합소재 적용 연구를 수행함. 대장 환경을 모사하기 위해 회분식 장내미생물 배양법에 기반하여 high throughput *in vitro* 혐기배양법을 개발함 (Long, 2015). 건강한 인체 시료로부터 10% fecal slurry를 만들고 이를 1%가 되도록 접종하여 1차 배양 (50 mL)을 24시간 동안 수행함. 2차 배양은 96 deep-well plate (1.6 mL)에서 24-48시간 동안 진행하였으며 이때 프로바이오틱스 및 프리바이오틱스를 동시에 처리하였음. 배양배지는 프로바이오틱스와 프리바이오틱스에 의한 균총 개선 효과를 확인하기 위해 장내미생물 dysbiosis를 유도할 수 있는 고단백질 배양조건 (C-source: 6.7 g/L, N-source: 10.5 g/L)을 이용하였으며 (Marzorati, 2017), 기본 조성은 아래와 같음 (표 7).

표 7. 대장환경 불균형 모사를 위해 사용된 고단백 배양배지 조성

성분명	함량 (g/L)	비고
Starch	1.0	C-source
Arabinogalactan	0.5	C-source
Pectin	0.5	C-source
Xylan	0.5	C-source
Glucose	0.2	C-source
Yeast extract	3.0	N-source
Peptone	2.5	N-source
Bacto tryptone	2.5	N-source
Casein	2.5	N-source
Mucin	4.0	natural C-source
Cysteine	0.5	산소제거용

- 혼합모델 개발을 위해 사용된 유산균 균주는 주관연구기관인 서울대학교에서 후보균주로 선별한 SNUG50430, SNUG50559, SNUG10122 3종의 균주를 사용함 (표 8). 각 균주에 대해 (주)한국야쿠르트에서 대량배양 후 제조한 분말시료를 제공받아 연구를 수행하였으며 균주별 생균수 정보는 아래와 같음. 시료 처리 시 $10^4 \sim 10^5$ CFU의 유산균 시료를 처리함.

표 8. 혼합모델 개발에 사용된 유산균 시료별 생균수

유산균 시료 ID	생균수 (CFU/g)
SNUG50430	4.9×10^{11}
SNUG50559	5.5×10^{11}
SNUG10122	2.8×10^{11}

- 유산균 소재와의 혼합연구를 위한 천연 프리바이오틱스로는 장내균총 개선능 스크리닝을 통해 발굴되어 특허출원된 홍국 물 추출물, 홍국 에탄올 추출물, 더덕 에탄올 추출물을 대상으로 하였음. 각 추출물은 물 또는 DMSO에 50 mg/mL로 녹여졌으며 시료 처리 시 10-200 ppm의 농도가 사용됨.
- 장내균총 개선을 위한 지표로 bacterial growth, tryptophanase 활성, β -glucuronidase 활성 등을 측정하였으며, GC-FID를 이용한 SCFA (short chain fatty acid) 분석법 (David,

2014)을 통해 total SCFA와 3개의 major SCFA인 acetate, propionate, butyrate 함량을 측정함.

- 중심합성계획법 (Central composite design)을 이용한 프리·프로바이오틱스 배합비 최적화 연구를 수행함. 반응표면 분석을 위해서는 Minitab 18 버전이 사용되었으며 프로바이오틱스 (SNUG50430), 프리바이오틱스 (더덕 에탄올 추출물)를 2개의 연속요인으로 사용하였음. 중심합성계획법을 이용한 최적화를 위해 bacterial growth, tryptophanase 활성, beta-glucuronidase 활성, butyrate 및 총 단쇄지방산 (total short chain fatty acid) 함량 등을 response로 설정함 (표 9).

표 9. SNUG50430, 더덕 에탄올추출물에 대한 중심합성 실험 계획

런 순서	점 유형	블럭	A	B	SNUG50430 (log10 CFU)	더덕 에탄올추출물 (ppm)
1	0	1	0	0	4.5	110
2	1	1	1	1	5	180
3	-1	1	1.414	0	5.21	110
4	0	1	0	0	4.5	110
5	1	1	1	-1	5	40
6	-1	1	0	-1.414	4.5	11.01
7	1	1	-1	1	4	180
8	0	1	0	0	4.5	110
9	0	1	0	0	4.5	110
10	-1	1	0	1.414	4.5	208.99
11	1	1	-1	-1	4	40
12	-1	1	-1.414	0	3.79	110
13	0	1	0	0	4.5	110

- 선별된 3종의 유산균 시료와 3종의 천연 프리바이오틱스 소재에 대해 대장모사 환경에서 단독 처리 실험을 수행하였을 때, 1차년도 연구결과와 동일하게 유해 효소활성인 tryptophanase, β -glucuronidase 활성이 천연프리바이오틱스 처리 시 감소되는 것을 확인할 수 있었음 (특히 홍국 에탄올 추출물의 tryptophanase 활성 감소가 두드러짐). 유산균 시료의 경우 세포 실험을 통한 면역 증강 및 염증 억제 활성이 있는 소재가 선정되었음에도 SNUG50559, SNUG10122 시료의 경우 β -glucuronidase 억제활성을 가짐을 확인하였음 (그림 60).

	GROW	TRYP	GLUC
배양액	0.159	0.548	2.498
배양액 + SNUG50430 (10 ⁴)	0.160	0.556	2.644
배양액 + SNUG50430 (10 ⁵)	0.159	0.560	2.648
배양액 + SNUG50559 (10 ⁴)	0.158	0.556	2.244
배양액 + SNUG50559 (10 ⁵)	0.160	0.556	2.244
배양액 + SNUG10122 (10 ⁴)	0.159	0.560	2.264
배양액 + SNUG10122 (10 ⁵)	0.160	0.556	2.256
배양액 + 홍국 물추출물 30 ppm	0.160	0.536	2.380
배양액 + 홍국 에탄올추출물 30 ppm	0.169	0.516	2.569
배양액 + 더덕 에탄올추출물 30 ppm	0.160	0.536	2.380

GROW; Bacterial growth, **TRYP**; Tryptophanase activity, **GLUC**; β-glucuronidase activity

그림 60. 유산균, 천연 프리바이오틱스 단독 처리 시 장내균총 개선효과

- SNUG50430에 대해 천연 프리바이오틱스 (30, 100 ppm) 혼합 배양 실험을 수행함. SNUG50430 10⁵ 처리 시 홍국, 더덕 에탄올 추출물 30 ppm 병용처리 효과가 있었음 (tryptophanase 활성 억제). 단, 홍국 에탄올 추출물의 경우 β-glucuronidase 활성은 증가시키는 문제점이 있음을 확인함. 100 ppm 이상에서는 이러한 활성 억제 효능이 보이지 않기 때문에 각 시료 혼합 배양 시 프리·프로바이오틱스의 혼합비를 최적화할 필요가 있음을 유추할 수 있었음 (그림 61).

	GROW	TRYP	GLUC
배양액	0.159	0.548	2.498
배양액 + SNUG50430 (10 ⁵)	0.160	0.560	2.648
배양액 + SNUG50430 (10 ⁵) + 홍국 물추출물 30 ppm	0.162	0.548	2.635
배양액 + SNUG50430 (10 ⁵) + 홍국 에탄올추출물 30 ppm	0.166	0.532	3.028
배양액 + SNUG50430 (10 ⁵) + 더덕 에탄올추출물 30 ppm	0.160	0.500	2.801
배양액 + SNUG50430 (10 ⁵) + 홍국 물추출물 100 ppm	0.155	0.577	2.695
배양액 + SNUG50430 (10 ⁵) + 홍국 에탄올추출물 100 ppm	0.167	0.548	3.066
배양액 + SNUG50430 (10 ⁵) + 더덕 에탄올추출물 100 ppm	0.160	0.562	2.757

그림 61. SNUG50430에 대한 천연 프리바이오틱스 혼합 처리 시 장내균총 개선 효과

- SNUG50559에 대해 천연 프리바이오틱스 (30, 100 ppm) 혼합 배양 실험을 수행함. SNUG50559 10⁴ 처리 시 홍국 물 추출물 30 ppm에서 β-glucuronidase 활성 억제 효능이 있었고, 더덕 에탄올 추출물 30 ppm에서 tryptophanase 활성 억제 효능이 있었음 (그림 62).

	GROW	TRYP	GLUC
배양액	0.153	0.52	2.498
배양액 + SNUG50559 (10 ⁴)	0.157	0.53	2.505
배양액 + SNUG50559 (10 ⁴) + 홍국 물추출물 30 ppm	0.163	0.52	2.188
배양액 + SNUG50559 (10 ⁴) + 홍국 에탄올추출물 30 ppm	0.163	0.52	2.609
배양액 + SNUG50559 (10 ⁴) + 더덕 에탄올추출물 30 ppm	0.163	0.52	2.498
배양액 + SNUG50559 (10 ⁴) + 홍국 물추출물 100 ppm	0.163	0.587	2.505
배양액 + SNUG50559 (10 ⁴) + 홍국 에탄올추출물 100 ppm	0.168	0.53	2.834
배양액 + SNUG50559 (10 ⁴) + 더덕 에탄올추출물 100 ppm	0.157	0.589	2.665

그림 62. SNUG50559에 대한 천연 프리바이오틱스 혼합 처리 시 장내균총 개선 효과

- SNUG10122에 대해 천연 프리바이오틱스 (30, 100 ppm) 혼합 배양 실험을 수행함. SNUG10122 10⁵ 처리 시 홍국 물 추출물 100 ppm에서 β-glucuronidase 활성 억제 효능이 있었고, 홍국 에탄올 추출물 100 ppm에서 tryptophanase 활성 억제 효능이 있었음 (그림 63).

	GROW	TRYP	GLUC
배양액	0.153	0.52	2.498
배양액 + SNUG10122 (10 ⁵)	0.157	0.53	2.505
배양액 + SNUG10122 (10 ⁵) + 홍국 물추출물 30 ppm	0.163	0.575	2.505
배양액 + SNUG10122 (10 ⁵) + 홍국 에탄올추출물 30 ppm	0.163	0.52	2.754
배양액 + SNUG10122 (10 ⁵) + 더덕 에탄올추출물 30 ppm	0.154	0.589	2.669
배양액 + SNUG10122 (10 ⁵) + 홍국 물추출물 100 ppm	0.163	0.53	2.131
배양액 + SNUG10122 (10 ⁵) + 홍국 에탄올추출물 100 ppm	0.172	0.533	2.508
배양액 + SNUG10122 (10 ⁵) + 더덕 에탄올추출물 100 ppm	0.157	0.583	2.545

그림 63. SNUG10122에 대한 천연 프리바이오틱스 혼합 처리 시 장내 균총 개선 효과

- 균주와 천연 프리바이오틱스의 혼합 모델 연구 결과, 균주별로 병용처리 효능을 갖는 천연 프리바이오틱스가 달랐고, 농도별로 상이한 균총개선 효과가 나타남을 확인할 수 있었음. 이에 장내균총 개선 효능이 우수했던 더덕 에탄올 추출물과 SNUG50430에 대해 중심합성계획법을 이용한 배합비 최적화 연구를 수행함. 유산균은 10⁴, 10⁵ CFU를 기본 처리 생균수로 첨가하였고, 더덕 추출물의 경우 40, 180 ppm을 기본 처리 농도로 사용하였음.
- 장내 미생물 growth의 경우 더덕 에탄올 추출물 농도가 증가할수록 늘어나는 추세를 보임. 그러나 유해효소 활성 억제의 경우, 유산균 처리 농도가 적을 때에는 천연 프리바이오틱스와 유해 효소 활성이 양의 상관관계를 보인 반면, 유산균 처리 농도가 높을

때에는 음의 상관관계를 나타냄 (그림 64).

a)

$$\text{Growth} = 0.0103 + 0.0630 \text{ probiotics} - 0.000019 \text{ prebiotics} - 0.00660 \text{ probiotics*probiotics} + 0.000000 \text{ prebiotics*prebiotics} + 0.000007 \text{ probiotics*prebiotics}$$

$$\text{TRYP} = -0.032 + 0.0524 \text{ probiotics} + 0.000429 \text{ prebiotics} - 0.00538 \text{ probiotics*probiotics} - 0.000000 \text{ prebiotics*prebiotics} - 0.000098 \text{ probiotics*prebiotics}$$

$$\text{GLUC} = -0.417 + 0.318 \text{ probiotics} + 0.00163 \text{ prebiotics} - 0.0308 \text{ probiotics*probiotics} - 0.000000 \text{ prebiotics*prebiotics} - 0.000340 \text{ probiotics*prebiotics}$$

b)

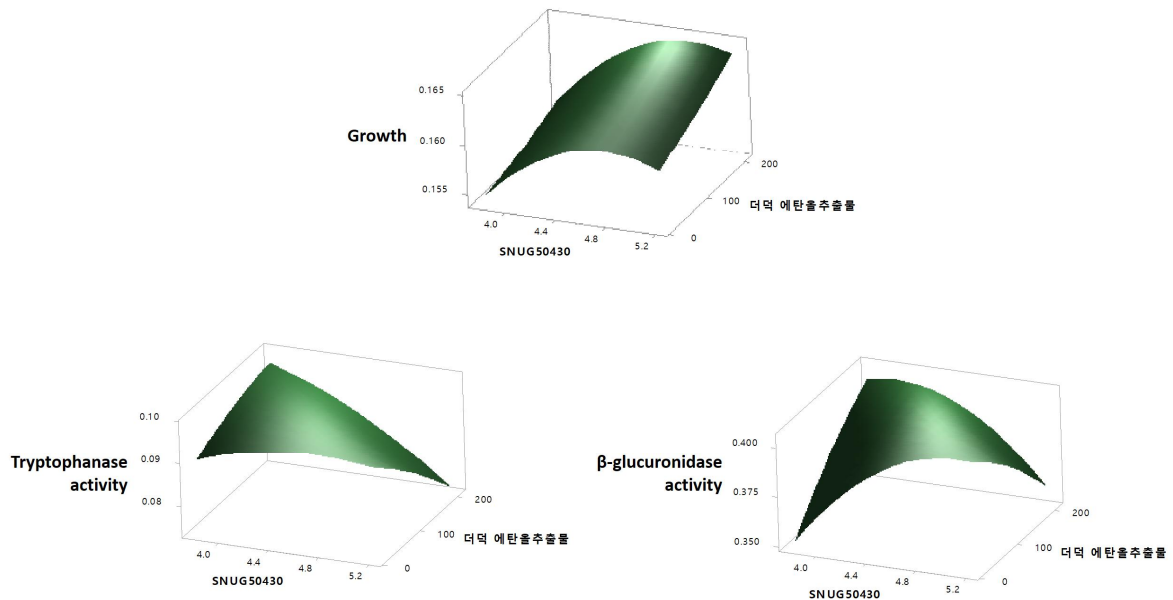


그림 64. Growth, tryptophanase 활성 및 beta-glucuronidase 활성에 대한
(a) CCD 기반 배합비 최적화 반응식 및 (b) 3D 반응표면도

- 단쇄지방산 함량에 대한 반응표면 설계 적용 결과 실험에서 사용한 농도범위 안에서 최대값을 나타내어 적정농도로 실험이 되었음을 확인할 수 있었고, 장세포의 에너지원으로 사용되어 면역증강에 도움을 주는 것으로 알려진 butyrate의 생산이 최적화되는 배합비를 확인함 (그림 65).

a)

$$\begin{aligned} \text{total SCFA} = & -0.1434 + 0.1102 \text{ probiotics} + 0.000179 \text{ prebiotics} \\ & - 0.01196 \text{ probiotics} * \text{probiotics} - 0.000000 \text{ prebiotics} * \text{prebiotics} \\ & - 0.000037 \text{ probiotics} * \text{prebiotics} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{butyrate} = & -0.00689 + 0.00728 \text{ probiotics} - 0.000002 \text{ prebiotics} \\ & - 0.000823 \text{ probiotics} * \text{probiotics} - 0.000000 \text{ prebiotics} * \text{prebiotics} \\ & + 0.000001 \text{ probiotics} * \text{prebiotics} \end{aligned}$$

b)

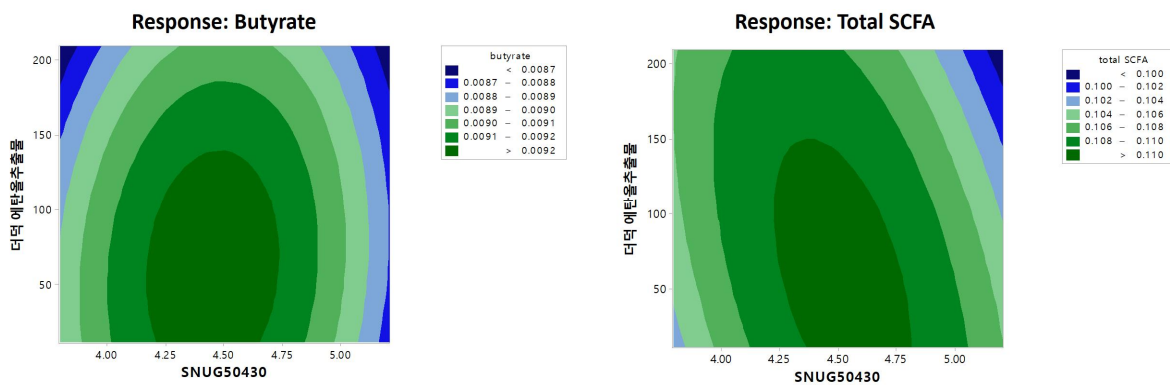


그림 65. Butyrate, total SCFA 함량에 대한
(a) CCD 기반 배합비 최적화 반응식 및 (b) 반응표면 등고선도

- tryptophanase, β -glucuronidase와 같은 유해 효소의 활성을 최소화하면서 총 단쇄지방산 함량과 butyrate 함량을 최대화할 수 있는 배합비를 찾기 위해 반응최적화를 수행하였을 때, 최적화 조건은 SNUG50430이 $10^{4.30}$ CFU, 더덕 에탄올 추출물이 23.00 ppm으로 분석되었음. 이러한 연구결과를 토대로 향후 혼합소재 제조 시 최적 배합비로 활용될 수 있음 (그림 66).

반응 최적화: total SCFA, butyrate, TRYP, GLUC

파라미터

반응	목적	하한	목표값	상한	가중치	중요도
total SCFA	최대값	0.102392	0.113614		1	1
butyrate	최대값	0.008771	0.009583		1	1
TRYP	최소값		0.083000	0.107000	1	1
GLUC	최소값		0.366333	0.428667	1	1

솔루션

솔루션	SNUG50430	더덕 에탄올추출물	total SCFA 적합치	butyrate 적합치	TRYP 적합치	GLUC 적합치	종합 만족도
1	4.29287	23.0044	0.109763	0.0092346	0.0942309	0.385634	0.609283

다중 반응 예측

변수	설정
SNUG50430	4.29287
더덕 에탄올추출물	23.0044

반응	적합치	SE 적합치	95% CI	95% PI
total SCFA	0.10976	0.00200	(0.10504, 0.11448)	(0.10156, 0.11797)
butyrate	0.009235	0.000138	(0.008907, 0.009562)	(0.008666, 0.009804)
TRYP	0.09423	0.00454	(0.08349, 0.10497)	(0.07556, 0.11290)
GLUC	0.3856	0.0151	(0.3500, 0.4213)	(0.3237, 0.4476)

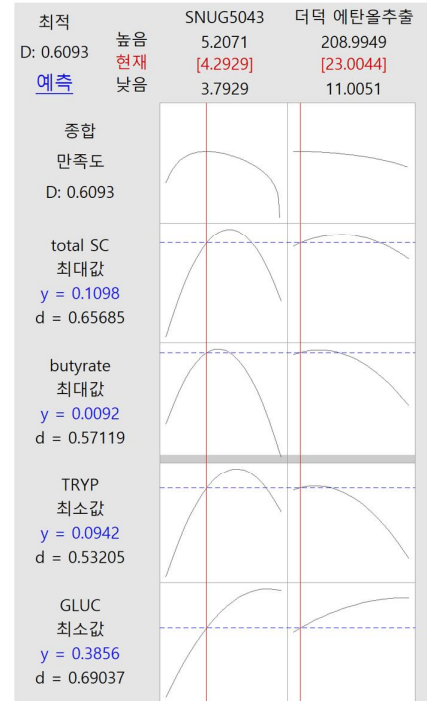


그림 66. SNUG50430, 더덕 에탄올 추출물에 대한 반응 최적화 및 예측값

3. 장내미생물-동물 혼합배양을 통한 장건강 기능성 검증

- 천연프리바이오틱스 등 발굴된 소재의 기능성 검증을 위하여, 장내균총 배양시스템과 모델동물인 예쁜꼬마선충 (*Caenorhabditis elegans*) 모델에서 기능성 및 독성 검증 플랫폼을 구축하였음. 모델동물인 예쁜꼬마선충은 인간과 유사하게 장내미생물을 보유하고 있으며 (Cabreiro, 2013), 세대기간이 짧고 유전자 변형기법 적용이 용이해서 최근 장내미생물 연구에 활발히 이용되고 있음 (그림 67).

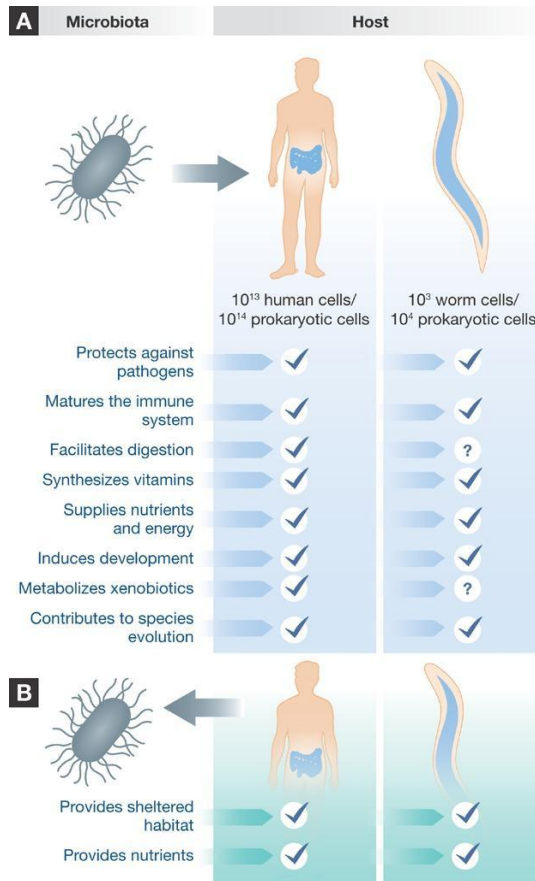


그림 67. 장내미생물 연구를 위한 인간 및 예쁜 꼬마선충 모델 비교

- 장내미생물 중 병원성 세균으로 알려진 pathogens (*Staphylococcus aureus* KCTC3881, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Enterococcus faecalis* KCTC3206 등)이 포함된 배양조건에서 예쁜꼬마선충의 수명에 미치는 영향을 조사함으로써 발굴소재의 기능을 검증하였음. 이때 대조군 미생물로는 예쁜꼬마선충의 일반적인 배양에 이용되는 대장균 (*Escherichia coli*) strain OP50을 이용하였음.
- 또한 배양된 단일 세균뿐만 아니라, 실제 대장모사시스템에서 배양된 인간 장내미생물총이 예쁜꼬마선충의 수명에 미치는 영향을 탐색하였음. 이를 위한 정상조건 대장미생물총 배양액과 유해한 장 조건을 모사한 미생물총 배양액을 예쁜꼬마선충 먹이로 투여 후 수명에 미치는 영향을 탐색하였음.
- 이때 실험에 이용된 예쁜꼬마선충 strain은 야생형인 N2뿐만 아니라, 수명연구에 유리한 CF512 strain을 대상으로 테스트를 수행하였음.

- 이와 함께 발굴된 천연프리바이오틱스의 독성평가 플랫폼을 구축하였으며, 이는 예쁜꼬마선충에 케미컬을 투여 후, 형태관찰, 성장속도, 생식능력, 생식선 세포의 관찰 등을 통해 독성 정도를 비교평가 하고자 하였음. 이때 대표독성평가 물질로는 임상항암제인 에토포사이드 (etoposide)를 이용하였는데, 이 항암제는 장막 표피세포를 손상시켜 장 건강을 악화시킬 수 있는 독성물질로써 향후 장건강 평가에 활용 가능하기 때문이었음.
- 유해균인 *S. aureus* KCTC3881, *P. aeruginosa* PA01, *E. fecalis* KCTC3206를 *C. elegans* CF512 strain에 투여하여 수명에 미치는 영향을 확인한 결과, *P. aeruginosa*는 예쁜꼬마선충의 수명을 현저히 감소시켰음 ($P < 0.0001$, Log-rank test). 대조미생물 투여군의 mean lifespan은 11.53일 이었으며, *S. aureus* 투여군은 11.24일 *E. fecalis* 투여군은 12.74일로 나타나, 대조군 미생물과 비교하여 유사하거나 약간 늘어난 수명을 나타냈음. 이와는 대조적으로 *P. aeruginosa* 투여군은 수명이 6.79일 정도로 현저히 감소하였음 (그림 68). 이러한 연구결과는 유해미생물-모델동물 혼합배양 모델로 활용할 수 있을 것으로 기대됨.

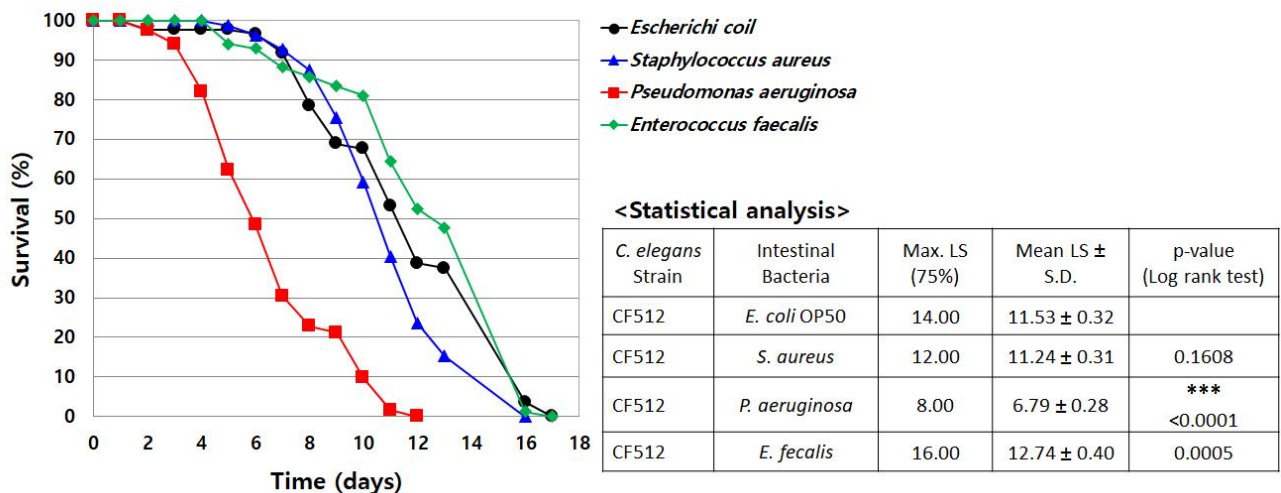


그림 68. 유해한 장내미생물이 모델동물인 예쁜꼬마선충의 수명에 미치는 영향

- 실제 대장모사시스템에서 배양된 인간 장내균총이 모델동물에 미치는 영향도 평가하였음. 정상적인 장조건을 모사한 장내균총과 고단백질 섭취조건을 모사한 장내균총을 야생형 예쁜꼬마선충 N2 strain에 투여한 결과, 대조미생물로 이용된 대장균 OP50 균주 (mean lifespan 19.22일)에 비해 예쁜꼬마선충의 수명은 현저히 줄어들었음. 정상 장내균총 (mean lifespan = 15.8일)과 고단백질 섭취모사 장내균총 투여 시에는 비슷하거나 고단백질섭취모사 장내균총 (mean lifespan = 15.01일) 이 좀 더 수명을 감소 시켰음 (그림 69). 대장균 OP50 균주는 예쁜꼬마선충 생육에 최적화된 먹이미생물임. 반면, 혐기성조건에서 배양된 인간 장내균총 배양액을 먹이로 공급하는 경우, 일반적으로 예쁜꼬마선충이 섭취하던 먹이가 아니기 때문에 대장균 OP50 균주 투여군보다는 수명이 짧아진 것으로 추측됨. 이러한

예쁜꼬마선충의 생물학적 특성과 함께, 서로 다른 배양환경에서 배양된 미생물 (호기조건에서 배양된 단일미생물 vs. 혐기조건에서 배양된 복잡한 미생물군총)을 투여하였기 때문에, 이러한 실험결과는 매우 자연스러운 현상으로 생각됨. 이러한 연구 결과는 향후 장내균총 개선소재의 기능성검증을 위한 장내균총-모델동물 혼합배양 모델로 활용할 수 있음.

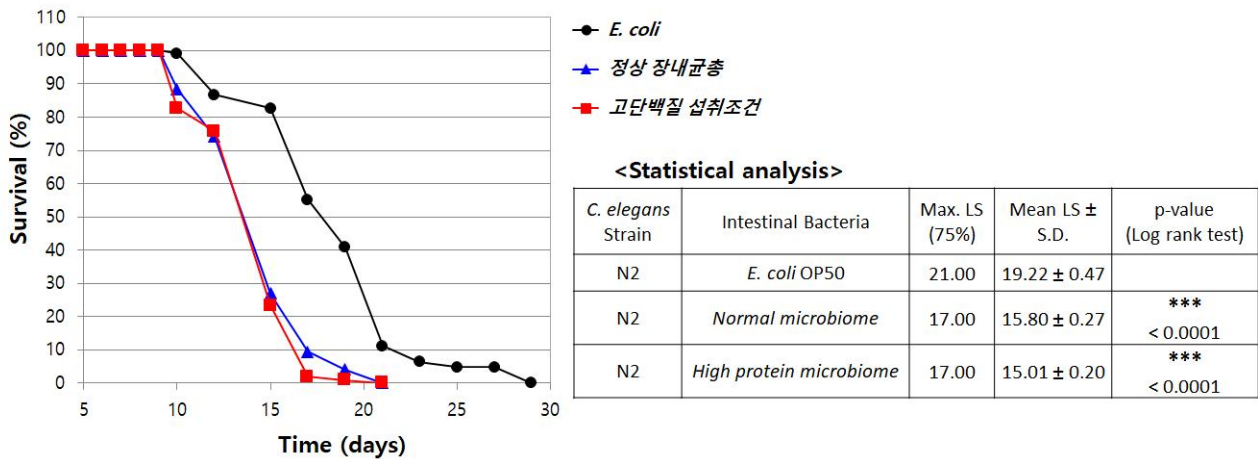


그림 69. 인간 장내균총이 모델동물인 예쁜꼬마선충의 수명에 미치는 영향

- 아울러 예쁜꼬마선충을 이용하여 장건강 효능과 함께 독성평가 플랫폼을 구축 완료하였음. 독성평가를 위해 장막세포를 손상하는 것으로 알려진 독성 케미컬을 투여 후, 예쁜꼬마선충의 형태관찰, 성장속도, 생식능력, 생식선 세포의 관찰 등을 통해 독성 정도를 평가하였음. 독성화합물을 예쁜꼬마선충에 투여 시 모델동물의 생장이 현저히 저해하였음. 또한 케미칼이 투여된 예쁜꼬마선충이 산란하는 알 갯수는 현저히 감소하였음 (그림 70). 뿐만 아니라, 케미칼 농도가 높아질수록 알의 부화속도도 현저히 감소하였음. 이와 함께 독성 케미칼 투여 후 예쁜꼬마선충의 생식선 세포 (gonad germ cells)의 형태를 관찰한 결과, 독성 케미칼에 의해 생식선 세포의 숫자가 현저히 감소하였으며, 동시에 생식선 세포의 핵이 비정상적으로 커짐을 확인함 (그림 71).

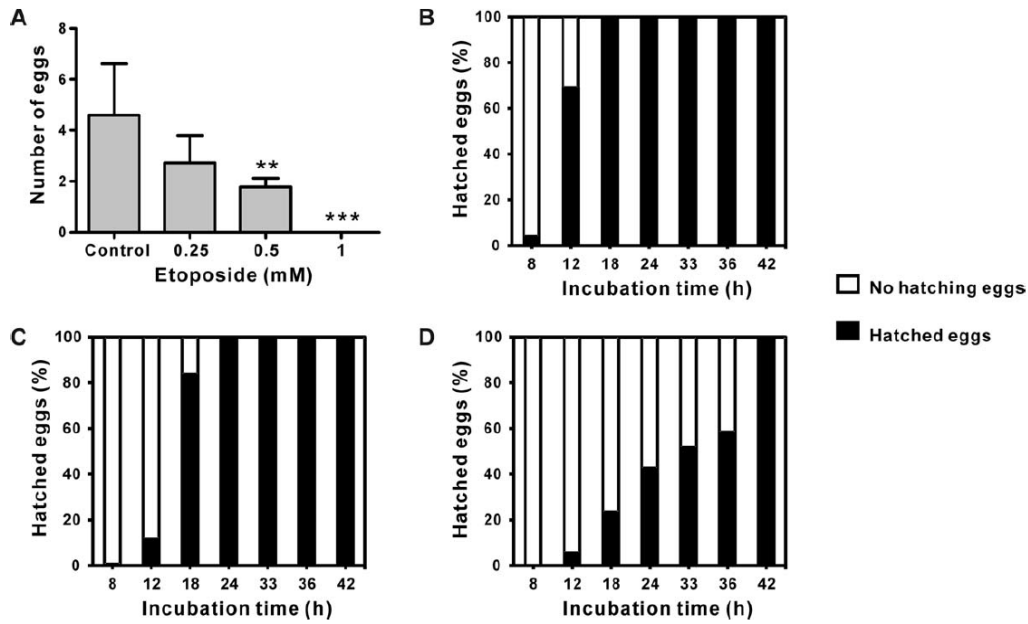


그림 70. 독성 케미칼이 예쁜꼬마선충의 생식 및 발달에 미치는 영향평가 (A) 산란한 알의 개수 (B-D) 알의 부화속도 측정; (B) 대조군 (C) 0.25 mM투여군 (D) 0.5 mM 투여군

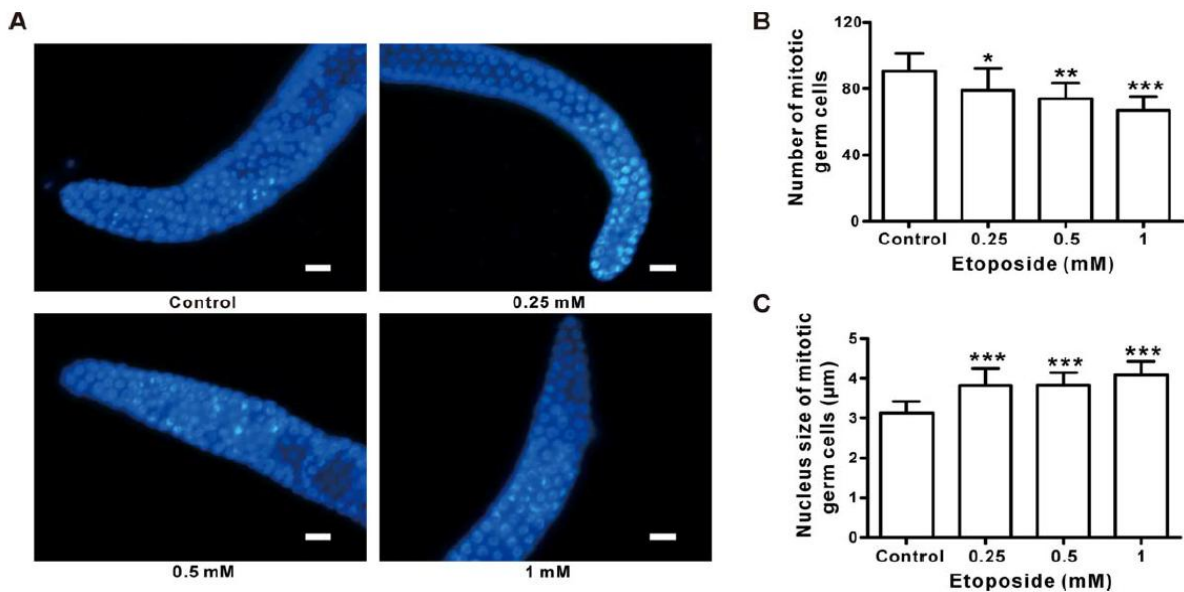


그림 71. 독성 케미칼이 예쁜꼬마선충의 생식선 세포에 미치는 영향 (A) 생식선 세포 (gonad germ cell)의 핵형태 관찰 (B) 생식선세포 숫자 (C) 생식선 세포의 핵 크기

- 예쁜꼬마선충기반 독성평가 플랫폼 구축에 관한 연구결과는 2017년도 Environmental Toxicology지 6월호의 표지논문으로 게재되었으며 (그림 72), 관련 실험법은 비디오 저널로 출간되어 전 세계적으로 표준 프로토콜로 활용되고 있음 (Lee, 2017). 관련 연구내용은 매일경제, 조선일보, 동아일보, 전자신문 지면 등 주요일간지와 YTN사이언스 방송보도 및 과학동아 7월호에 소개되는 등 높은 홍보전시 효과를 보임 (그림 73).



그림 72. 모델동물을 이용한 장건강 독성평가 플랫폼 구축과 관련된 학술지 표지 사진

전자신문 2017년 06월 15일 19면 (과학/기술)

항암제 독성 평가 '쥐' 아닌 '벌레'가 한다

KIST 연구팀 '에쁜꼬마선충' 기술 개발
윤리 준수...비용 절감·기간 단축 효과

국내 연구진이 포유동물 대신 흙 속 벌레로 항암제 독성을 평가하는 기술을 개발했다. 한국과학기술연구원(KIST-원장 이병권)은 강경수 강릉분원 전연물연구소 박사팀이 '에쁜꼬마선충(Caenorhabditis elegans)'을 이용한 항암제 독성 평가 기술을 개발했다고 12일 밝혔다.

에쁜꼬마선충은 흙에 서식하는 1mm 크기의 투명한 벌레다. 900여개 체세포와 300여개 신경세포, 2만여개 유전자로 구성됐다. 유전자 40%가 인간에게 보존돼 세포 사멸, 노화 등 생물학적 기작이 인간에게도 적용될 수 있는 것으로 알려졌다.

연구진은 항암제 독성을 평가하는 실험 동물로 쥐 같은 포유류 대신 에쁜꼬마선충을 선택했다. 꼬마선충에 항암제를 투여한 후 행동이나 성장, 생식에 문제가 없는지 관찰했다.

트로이소머라이제 저해제이자 임상항암제인 '에트로사이드' 독성을 시험했다. 기존 쥐 실험과 연관된 결과를 얻었다.

에쁜꼬마선충은 수명이 3주 정도로 짧고, 1마리가 약 300개 알을 낳는다. 독성물질의 생애 전체, 세대에 걸친 영향을 평가한다. 실험 개체도 쉽게 확보한다. 포유동물 실험 없이 1주일이면 결과를 얻는다.

기존에는 항암제 독성 평가시 한 달 이상 쥐 100여 마리 정도를 희생시켜야 했다. 쥐의 체중변화, 조직병리검사, 혈액검사를 바탕으로 평가했다. 벌

레 이용 시에는 벌레 크기 변화, 알의 개수, 알의 부화 속도, 생식세포 관찰로 독성을 가늠한다.

연구팀은 포유동물 희생을 최소화, 동물연구 윤리 준수를 도울 것으로 기대했다. 연구비용 절감, 기간 단축도 가능하다. 연구팀은 항암제 후보물질 외에 건강기능식품, 화장품 개발 시 독성 평가에도 이 벌레를 활용할 계획이다.

강경수 KIST 박사는 "에쁜꼬마선충은 비록 벌레지만 사람과 유사한 소화기관, 신경기관 유전자를 갖고 있어 여러 식의약품 효능, 약물 작용원리를 밝히는 데 요긴하다"고 설명했다.

연구 결과는 국제학술지 '환경독성학회지(Environmental Toxicology)' 6월 표지논문으로 채택됐다. KIST 기관고유사업, 동립축산식품부 고부가가치식품기술개발사업으로 수행됐다.

송준영기자 songjy@etnews.com (14.0~16.3)cm

그림 73. 본 사업의 연구 성과가 소개된 전자신문 지면

4. 장내 미생물총 개선 균주의 우유배지 배양 기초 특성 검사

- 발효유 개발 시 스타터 균주로서 활용가능성을 평가하기 위해, 장내 미생물총 개선 균주 3종 (SNUG50430, SNUG10122, SNUG50559)에 대한 10% (w/v) 탈지분유 배지 및 우유 배지에서의 생육 특성을 분석하여 우유 배지 배양특성을 확인함.
- 탈지분유 배지의 경우, 식수에 탈지분유를 10% (w/v)로 녹인 후 멸균 유리병에 담고 98~100℃에서 30분간 증탕가열 살균을 수행하고, 상온에서 식힌 후 배양특성 평가 배지로 사용함. 우유 배지의 경우, UHT 고압살균을 실시하고 균질하여 멸균 유리병에 담아, 상온에서 식힌 후 배양특성 평가 배지로 사용함.
- 1차적으로 3종의 균주를 10% (w/v) 탈지분유 배지에 0.5% (v/v) 또는 20% (v/v)로 접종량을 달리해 15시간 배양하여 탈지분유 배지 발효능을 평가함
- 최종적으로 3종의 균주를 각 우유 배지에 1×10^6 cfu/mL 수준으로 접종한 후 자사의 우유 배지 배양조건에서 48시간동안 배양하면서 배양 20시간, 40시간, 48시간에서의 커드 생성여부, 산 생성능, 배양액의 pH, 배양액 생균수를 검사하여 우유 배지 내 생육 기초 특성 및 발효유 제조를 위한 스타터 균주로서의 활용 가능성을 평가함.
- 1차적으로 탈지분유 배지 발효능을 평가한 결과, 0.5% (v/v) 접종한 실험군에서는 배양 15시간까지 3종 균주 모두 배양액에서 커드가 생성되지 않은 반면, 20%를 접종한 실험군에서는 3종 모두 탈지분유 배지에서 커드가 생성되어 유당 발효가 진행될 수 있음을 확인 (그림 74).

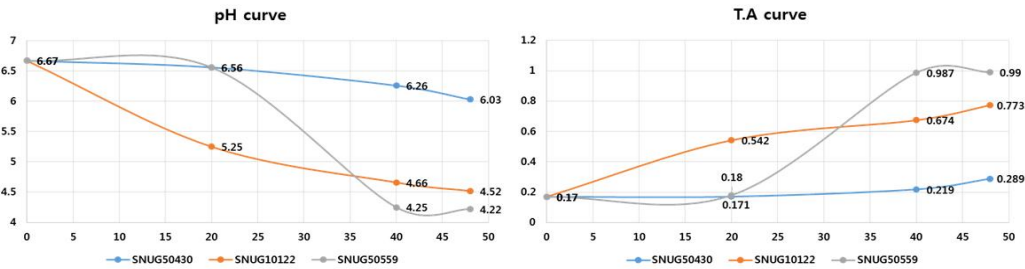


그림 74. 장내 미생물총 개선 균주의 우유 배양 특성 검사

- 최종적으로 실제 발효유 스타터의 접종량 수준인 1×10^6 cfu/mL로 우유 배지 배양실험을 진행함. SNUG50430 균주의 경우 배양 48시간 까지도 우유 배지 배양액에서 커드가 생성되지 않았고, 최종 배양액 산도 0.289%, pH는 6.03, 생균수 2.6×10^8 cfu/mL로 분석됨. SNUG10122 균주의 경우 배양 24시간 이후부터 우유 배지 배양액에서 커드가 생성되었으며, 최종 배양액 산도 0.773%, pH 4.52, 생균수 8.4×10^8 cfu/mL로 분석됨. SNUG50559 균주는 최종 배양액 산도 0.99%, pH 4.22, 생균수 1.4×10^9 cfu/mL로 분석됨. 산 생성능은 SNUG50559>SNUG10122>SNUG50430 순으로 높았음 (그림 75).
- 산업에 적용되는 발효유 스타터의 경우, 1×10^6 cfu/mL 수준이 되도록 접종하였을 때, 최종적으로 실제 발효유 스타터의 접종량 수준인 1×10^6 cfu/mL로 우유 배지 배양실험을 진행함. SNUG50430 균주의 경우 배양 48시간 까지도 우유 배지 배양액에서 커드가 생성되지 않았고, 최종 배양액 산도 0.289%, pH는 6.03, 생균수 으로 분석됨. SNUG10122 균주의 경우 배양 24시간 이후부터 우유 배지 배양액에서 커드가 생성되었으며, 최종 배양액 산도 0.773%, pH 4.52, 생균수 로 분석됨. SNUG50559 균주는 최종 배양액 산도 0.99%, pH 4.22, 생균수 로 분석됨. 산 생성능은 SNUG50559>SNUG10122>SNUG50430 순으로 높았음 (그림 75).
- 산업에 적용되는 발효유 스타터의 경우, 단일균주 혹은 복합균주로 사용되며 1×10^6 cfu/mL 수준이 되도록 소량 접종하였을 때, 37~42°C에서 4시간 이내에 배양이 완료되는 단기배양이 방법이 대량생산 주로 사용되며 이 때 산도는 대략 0.90~0.95%로 나타남. 3종의

후보균주 중 산생성능이 가장 우수한 SNUG50559의 경우도 최종 산도는 0.99%로 분석되었으나 배양시간이 느린 단점이 있음. 본 실험에 사용된 균주 3종 모두 우유 발효는 가능하나 그 속도가 매우 느려, 단일 발효유 스타터로서는 산업적, 경제적 측면에서 활용이 매우 어려울 것으로 사료됨. 한편, 기존의 발효유 스타터 균주와 더불어 조합 스타터로 활용하고자 한다면 단일 균주의 배양 특성 뿐 아니라 조합 스타터 발효 시 발효유의 맛, 풍미, 생균수 유지기한 등 발효유 품질에 미치는 영향 등의 관련 연구가 선행되어야 함. 이에 본 장내 미생물총 개선 균주 3종의 경우 스타터가 아니라 독립적으로 생산 후 발효유에 기능성 첨가 균주로서 활용될 수 있도록 연구하는 것이 바람직할 것으로 사료됨 (그림 75).

5. 기능성 균주의 최적 배양 조건 연구 - 최적 배양 온도 및 pH 연구

- SNUG50430, SNUG10122, SNUG50559의 최적 배양 온도를 확인하기 위해, 상업용 배지에서 참고문헌을 통해 일반적인 배양 온도 범위를 확인 후 해당 온도 주변으로 배양온도 별 배양 20시간 후 생균수를 비교하여 각 균주의 최적 배양 온도를 결정함. SNUG50430, SNUG10122 균주는 상업용 MRS 배지에서 30℃, 32℃, 35℃, 37℃의 온도로 배양평가를 수행함. SNUG50559 균주는 상업용 BL 배지에서 30℃, 32℃, 35℃, 37℃의 온도로 배양평가 수행함.
- SNUG50430, SNUG10122, SNUG50559의 최적 배양 pH를 확인하기 위해, 각 균주의 최적 배양 온도에서 배양액의 pH 조절을 달리하여 상업용 배지에서 20시간동안 배양함. 최종 배양 생균수 비교를 통해 각 균주의 최적 배양 pH를 결정함. SNUG5043 균주는 상업용 MRS 배지에서 pH 5.0 pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5로 배양평가를 수행하였고, SNUG10122 균주는 상업용 MRS 배지에서 pH 5.0 pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5로 배양평가를 수행하였으며, SNUG50559 균주는 상업용 BL 배지에서 pH 5.0 pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5로 배양평가 수행함.
- SNUG50430 균주의 최적 배양 온도는 37℃, SNUG10122 균주의 최적 배양 온도는 32℃, SNUG50559의 최적 배양 온도는 37℃로 분석됨 (그림 75).
- SNUG50430 균주의 최적 배양 pH는 pH 5.5, SNUG10122 균주의 최적 배양 pH는 pH 6.0, SNUG50559의 경우 pH 6.0이 최적 배양 pH로 분석됨 (그림 75).

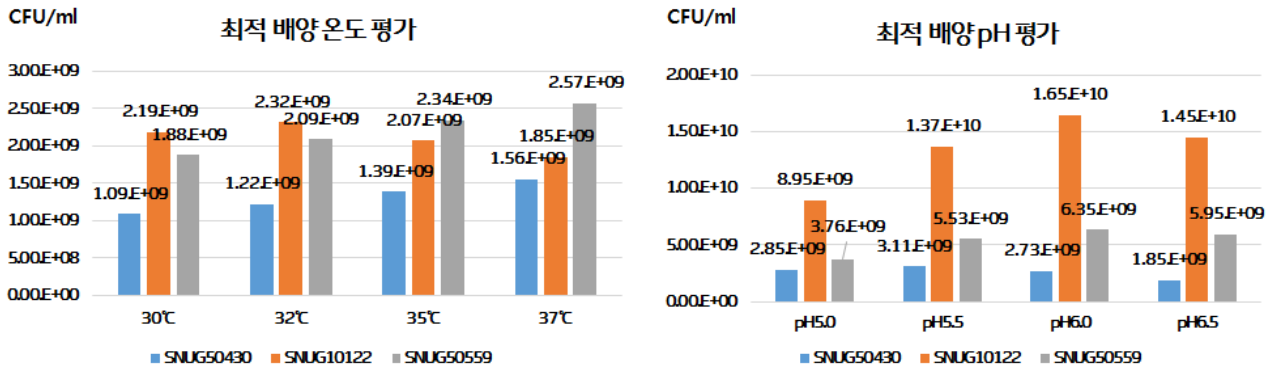


그림 75. 장내 미생물총 개선 균주의 최적 배양 온도 및 pH 평가

6. 장내 미생물총 개선 균주 생육곡선 확인

- SNUG50430, SNUG10122, SNUG50559 균주 중 산업화 적합 균주를 선발하기에 앞서 상업용 배지에서의 생육곡선을 확인함.
- SNUG50430, SNUG10122, SNUG50559의 최적 배양 pH 및 온도조건에서 MRS 또는 BL배지에서의 배양시간 별 생균수를 측정하여 최대 생균수를 나타내는 배양시간을 확인함.
- SNUG50430 균주는 배양 18시간에 3.49×10^9 CFU/mL로 최대 생균수를 나타내고 이후 생균수가 감소하는 경향을 보임. SNUG10122 균주는 배양 18시간에 1.72×10^{10} CFU/mL로 최대 생균수를 나타내고 이후 생균수가 감소하는 경향을 보임. SNUG50559 균주는 배양 20시간에 7.45×10^9 CFU/mL로 최대 생균수를 나타내고 이후 생균수가 감소하는 경향을 보임 (그림 76).

상업용 배지 배양 생장곡선

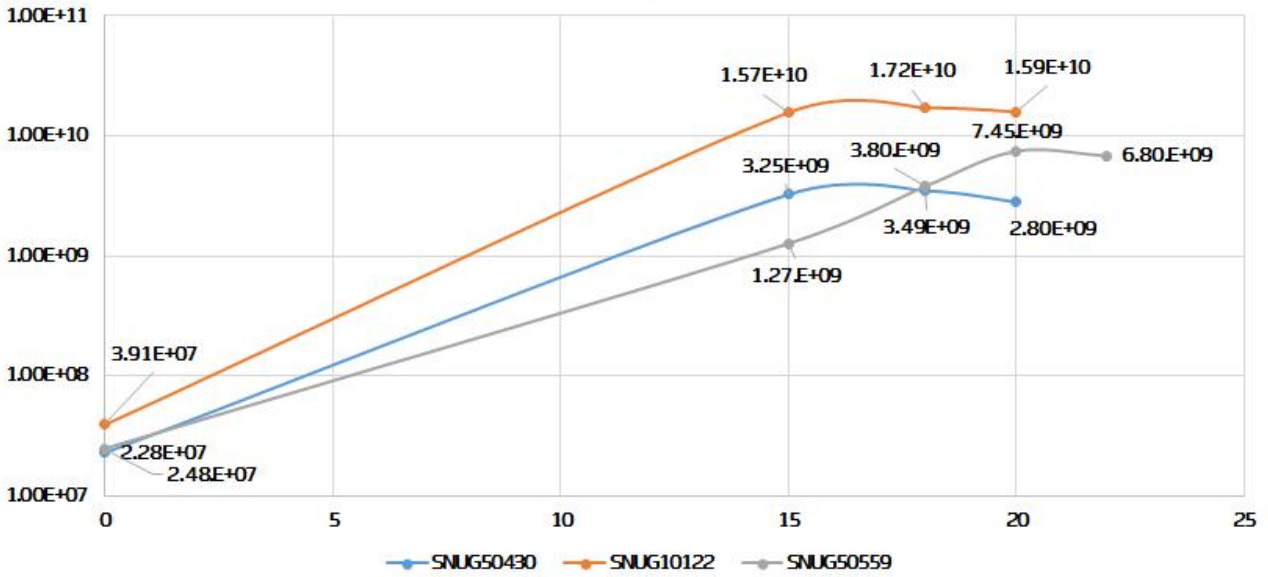


그림 76. 장내 미생물총 개선 균주의 상업용 배지에서의 생육곡선

7. 산업화 적합 균주 선별

- SNUG50430, SNUG10122, SNUG50559 균주 중 산업화 적합 균주를 선별하기 위해 seed 용이성, 배양 생균수, 공정 단계별 생산 수율, 균주 분말화 시 동결건조 후 생존률 등을 고려함.
- SNUG50430 균주는 seed 제조에 있어 매우 용이하였으며, 배양액 대비 농축 수율은 약 100% 수준으로 농축공정에 문제가 없었음. 배양액 대비 동결건조 시 수율은 약 80~90% 이상, 동결보호제 혼합 농축액의 동결건조 후 생존률은 약 80% 수준으로 동결건조 시 생존률이 우수함. 종합적으로 산업화 적합성이 매우 높았음. 또한 우유 내 발효가 매우 느리게 일어나는 특성으로 발효 후 첨가균으로 활용 시 발효유의 맛과 풍미를 변질시키지 않을 가능성이 높음.
- SNUG10122 균주는 seed 제조에 있어 용이하였으며, 배양액 대비 농축 수율은 약 80~100% 수준으로 농축공정에 큰 문제는 없었음. 하지만 배양액 대비 동결건조 시 수율은 약 40~60% 수준이며, 동결건조 생존률은 약 40~80% 수준으로 SNUG10122와 비교하여 산업화 적합도가 낮았음. 동결 건조까지의 수율 및 생존률이 높지는 않지만 최종 생균수가 후보 균주 3종 중 가장 높기 때문에 생균수 측면에서 산업 적용성에 대해 긍정적으로 고려함.
- SNUG50559 균주는 SNUG50430, SNUG10122 균주와 비교하여 산소에 대한 감수성이 매우 높아 seed 제조에 있어 어려움이 있었으며, 이는 산업화에 불리하게 작용함. 배양액 대비 농축 수율은 약 70~90% 수준으로 나타남. 하지만 배양액 대비 동결건조 시 수율은 약 45%

수준이며, 동결건조 생존률은 약 60% 수준으로 균주 안정성이 상대적으로 낮았음. 산업화를 위해서는 균주의 안정성을 증진시킬 수 있는 다양한 방법이 추후 고려되어야 할 것임. 종합적으로 고려할 때 후보 균주 3종 중 산업화 적합성이 가장 낮음.

- 생산성 및 우유 내 발효특성에 따라 SNUG50430 균주를 산업화 후보 균주로 선정함.

8. 장내 미생물총 개선 균주의 최적 배지 개발 - 질소원 선별실험

- 발효유에 첨가할 기능성 균주로서 SNUG50430를 선정하고 배지 최적화를 진행함. 먼저 bottle test를 통해 배지 질소원으로 최적 효소추출물 및 최적 펩톤류 조성을 선별함. 배양 배지조성에서 6종의 효소추출물을 변경 배양하면서 최대 생균수를 나타내는 최적 효소추출물 선별을 우선 실시하고, 선정된 최적 효소추출물을 고정한 배지 조성에 6종의 펩톤을 달리 조합하여 최대 생균수를 나타내는 질소원 조합을 선별함. 이 때, 기본 배지 조성은 자사의 *Lactobacillus* 식용배지 조성을 기반으로 배지성분 및 농도를 변형하여 사용하였음.
- 6종의 효모추출물 A, B, C, D, E, F을 변경하여 bottle 배양 실험을 실시한 결과, 배양 18시간 후 최대 생균수 (1.44×10^9 CFU/mL)를 나타낸 효모추출물 E를 최적 효모추출물로 선정함. 효모추출물 E를 기반으로 다양한 source의 펩톤류 A, B, C, D, E, F를 달리 조합하여 배양 실험을 실시한 결과, 배양 18시간 후 최대 생균수 (2.29×10^9 CFU/mL)를 나타낸 펩톤 C를 최적 펩톤으로 선정함. 이후 질소원은 효모추출물 E와 펩톤 C를 조합한 기본배지를 제조하여 사용함 (그림 77).

배양시간 (h)	Yeast extract 류					
	A	B	C	D	E	F
0	9.80.E+06	9.80.E+06	9.80.E+06	9.80.E+06	9.80.E+06	9.80.E+06
15	6.20.E+08	7.85.E+08	6.85.E+08	1.26.E+09	1.22.E+09	6.20.E+08
18	9.05.E+08	9.55.E+08	7.60.E+08	1.30.E+09	1.44.E+09	8.50.E+08
배양시간 (h)	Peptone 류					
	A	B	C	D	E	F
0	2.24.E+07	2.24.E+07	2.24.E+07	2.24.E+07	2.24.E+07	2.24.E+07
15	1.68.E+09	1.56.E+09	2.17.E+09	1.60.E+09	1.83.E+09	1.98.E+09
18	2.16.E+09	1.77.E+09	2.29.E+09	1.85.E+09	1.76.E+09	2.19.E+09

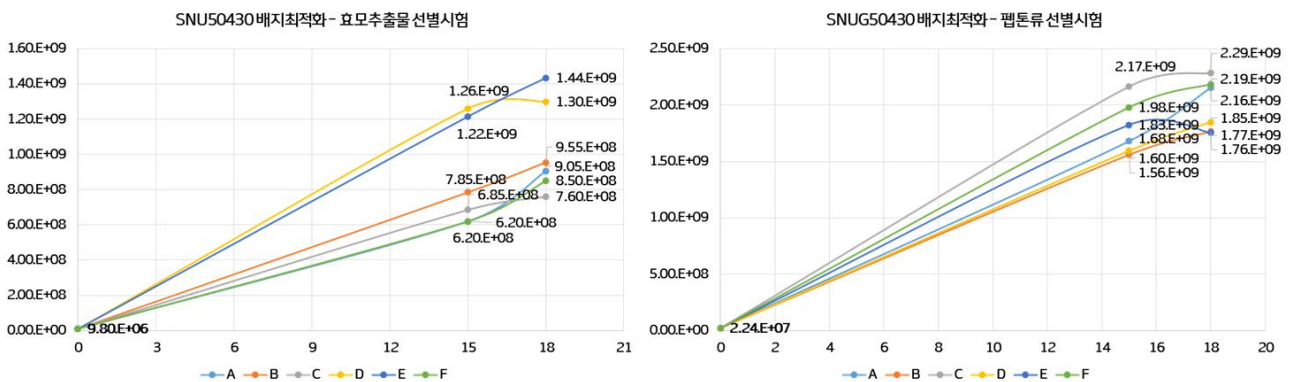


그림 77. SNUG50430의 배지 성분 최적화 - 질소원 선별 실험

9. Plackett-Burman design (PBD)를 통한 SNUG50430 균주의 생균수 증진 요소 확인

- 통계학적 배지 최적화 기법 중 Plackett-Burman Design (PBD)를 활용하여 SNUG50430의 생육을 증진시킬 수 있는 중요인자를 결정함. 기본 배지 성분배합 비율을 기준점으로 탄소원 및 질소원과 같은 큰 비중을 차지하는 성분을 각 $\pm 20\%$ 씩 조정하고, 미네랄 등 미량원소들은 $\pm 50\%$ 씩 조정함. 이와 같은 방식으로 12가지 조합의 배지조성을 설계하고 각 실험배지를 제조 후 600 nm에서 흡광도를 측정한 후 통계학적 방법을 통해 흡광도 변화에 영향을 미치는 중요 배지 성분을 선별함 (표 10 및 11).
- Plackett-Burman Design (PBD)를 활용하여 SNUG50430의 생육 증진 인자로 통계적으로 유의성 ($P < 0.05$)을 나타낸 인자는 함수결정포도당으로 나타남. 그 다음으로는 통계적 유의성은 없었지만 2. 효모추출물 E, 3. $MgSO_4$ 순으로 생균수에 영향을 미치는 요소로 분석됨 (그림 78).

표 10. 기본 식용배양 배지 조성

배지성분	함량(%)
효모추출물 E	4
렙톤 C	1
K ₂ HPO ₄	0.15
Vitamin C	0.002
Tween 80	0.1
MgSO ₄	0.0014
FeSO ₄	0.0014
MnSO ₄	0.0014
Glucose	2
정제수	92.74

표 11. Plackett-Burman Design (PBD)을 통한
생육 중요인자 결정

표준 순서	런 순서	점 유형	블럭	YE_E	PE_C	K ₂ HPO ₄	Vit C	Tween 80	MgSO ₄	FeSO ₄	MnSO ₄	포도당
1	7	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
2	11	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
3	3	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
4	9	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	6	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
6	8	1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
7	2	1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
9	4	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
10	13	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
11	12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
12	14	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

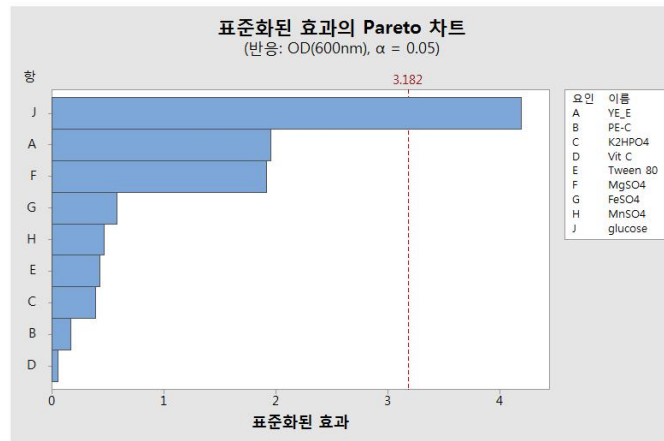


그림 78. Plackett-Burman Design (PBD)을 통한 생육 중요인자 결정

10. 반응표면분석을 통한 SNUG50430 균주의 배지 최적화

- Plackett-Burman Design (PBD)를 통해 결정된 SNUG50430의 생육 증진인자 상위 3개 요소인 함수결정포도당, 효모추출물 E, MgSO₄를 인자로 반응표면분석 (Response surface method, RSM)을 시행하여 각 성분의 최적배양 농도를 산출하는 실험을 진행함. 통계프로그램을 통해 결정된 20가지 실험 조합을 대상으로 SNUG50430를 배양하여 600 nm에서 흡광도를 측정함. 흡광도 기준 표면분석 결과를 바탕으로 반응 최적 지점, 즉 최대 흡광도가 기대되는 함수결정포도당, 효모추출물 E 및 MgSO₄의 농도를 도출함.
- RSM을 통해 최적 함수결정포도당 농도는 18.43 g/L, 최적 효모추출물 E의 농도는 42.42 g/L, 최적 MgSO₄ 농도는 0.152 g/L로 결정됨 (그림 79 및 그림 80). 최적화 배지에서 기존 상업용 배지 대비 생균수가 약 34% 증진됨 (표 12).

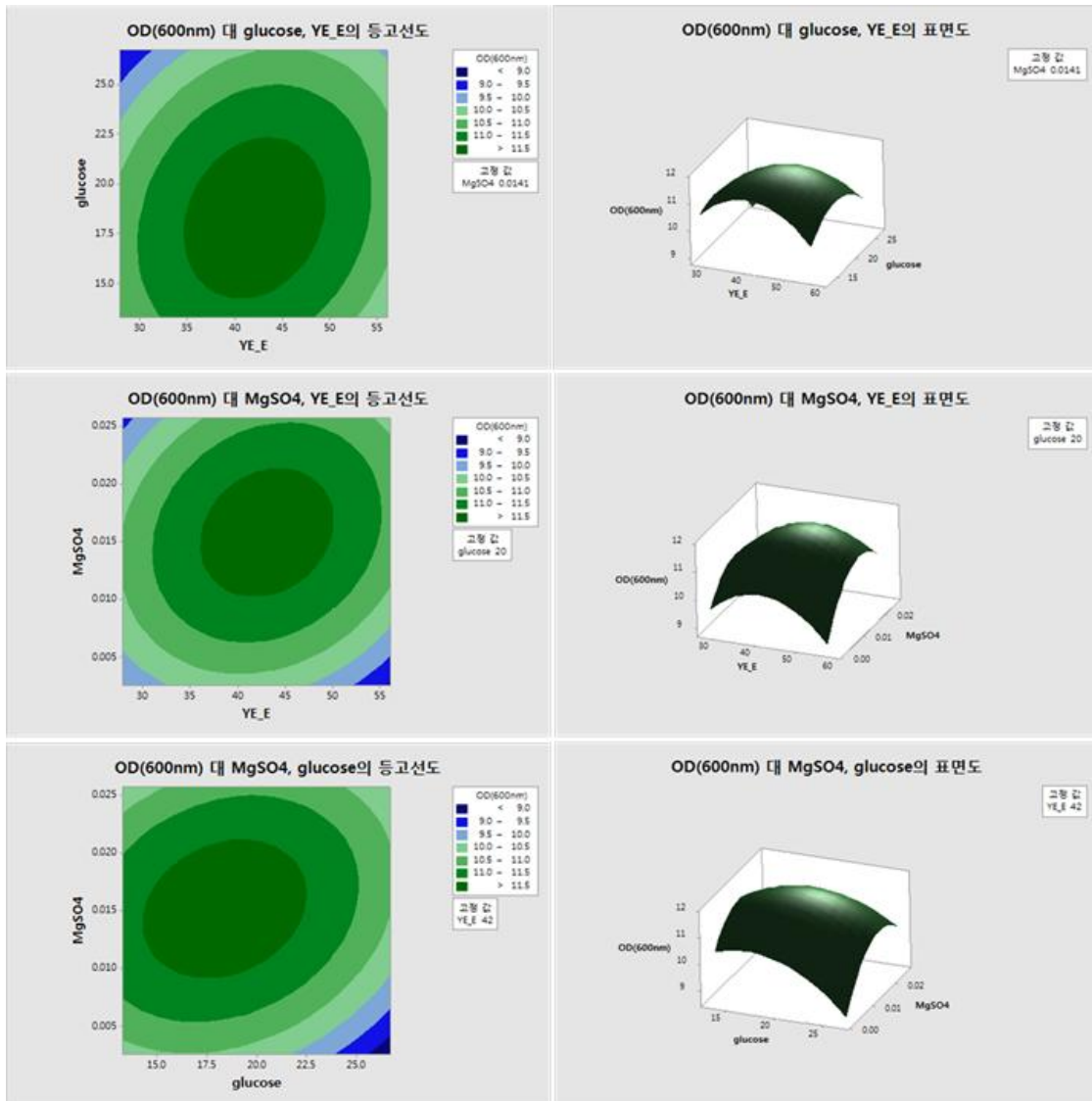


그림 79. Response surface method (RSM)를 통한 함수결정포도당, 효모추출물 E, MgSO₄ 농도별 배양 흡광도 결과

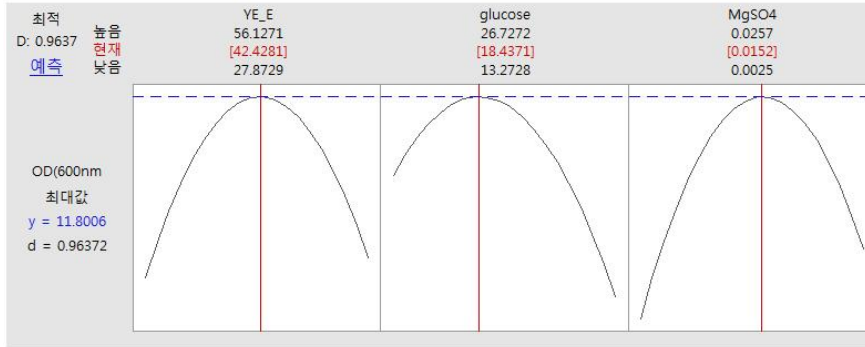


그림 80. Response surface method (RSM)를 통한
함수결정포도당, 효모추출물 E, MgSO₄ 최적 반응 농도

표 12. SNUG50430 최적화 배지와 기존 식용 배지의 생균수 비교

배지성분	최적화 함량(%)	최적화 배지 생균수	기존 식용배지 생균수	비교
효모추출물 E	4.24	3.07 × 10 ⁹ CFU/mL	2.29 × 10 ⁹ CFU/mL	배양 생균수 대비 약 34% 증가
펩톤 C	1			
K ₂ HPO ₄	0.15			
Vitamin C	0.002			
Tween 80	0.1			
MgSO ₄	0.00152			
FeSO ₄	0.0014			
MnSO ₄	0.0014			
Glucose	1.84			
정제수	92.66			

11. 대량생산 공정 구축 및 최적화

- 대량 생산 공정 구축 및 최적화를 위해 SNUG50430의 최적화 배지를 기반으로 5L 배양기를 이용하여 3L 배양 실험을 진행함. 이때, 최적 배양 온도 및 최적 배양 pH 조건인 37°C, pH 5.5로 조절하며 총 18시간 동안 배양을 진행함.
- 초기 접종은 2차례 계대를 통해 활성화한 SNUG50430을 배지 부피의 1.5% (v/v)로 실시하였고, 18시간 배양완료액은 모두 7000 rpm에서 15 분간 20배수로 농축함. 농축액은 10% 동결보호제를 1:1 비율로 혼합하고, 이후 -80°C에서 농축액 및 보호제 혼합액의 동결을 진행함. 동결된 균주는 동결건조기를 통해 약 50시간 이상 동결건조를 수행하여 분말화 균주를 확보함.

- SNUG50430 균주의 배양 완료 생균수는 5.6×10^9 CFU/mL로 분석됨. 농축액 및 보호제 혼합액의 생균수는 5.8×10^{10} CFU/mL로 배양균수 대비 공정수율은 104%로 분석됨. 최종 분말은 33.52g이 회수되었으며 생균수는 4.2×10^{11} CFU/g로 배양균수 대비 공정수율은 83%로 분석됨. 동결건조 후 생존률은 80%로 분석됨 (표 13). 농축 수율은 약 100%로 나타나 균주 농축이 잘 수행되었고, 동결건조 분말은 연갈색의 부드러운 성상을 나타냄 (그림 81 및 82).

표 13. 5L jar 배양기 배양 연구 결과

공정단계	생균수	무게 (g)	총 생균수	수율 (%)	동결건조 후 생존률 (%)
	CFU/mL or g				
배양 18시간	5.6×10^9	3020	1.69×10^{13}	100%	-
농축액 + 보호제 혼합액	5.75×10^{10}	305	1.75×10^{13}	104%	-
분말	4.20×10^{11}	33.52	1.41×10^{13}	83%	80%

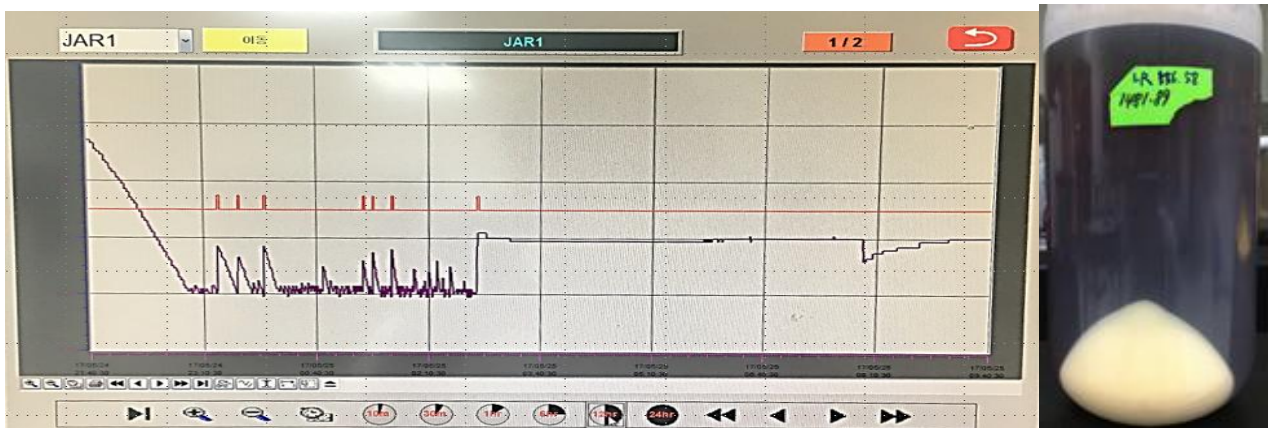


그림 81. 5L jar 배양기 배양 pH/온도 조절 결과 그래프 및 농축 SNUG50430 pellet 형태

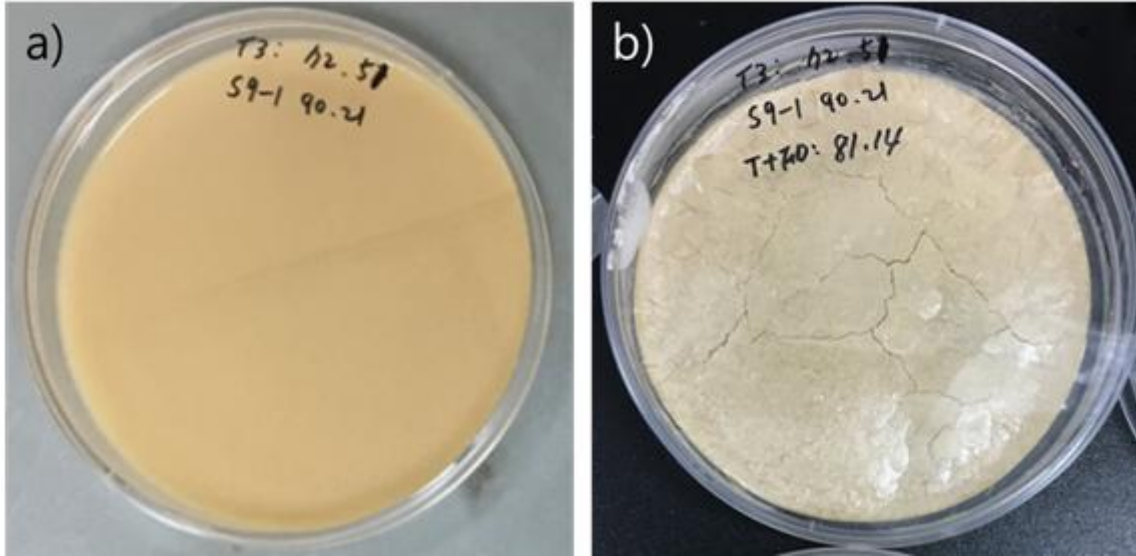


그림 82. SNUG50430 농축액 동결보호제 혼합액 및 동결건조 분말 성장 확인

12. 대량생산 공정 구축 및 최적화 - SNUG05430 시생산

- 대량 생산 공정 구축 및 최적화를 위해 SNUG50430의 최적화 배지를 기반으로 lab scale에서 결정된 실험조건을 참고하여 총 배양용량 300L, 초기 접종 1% (v/v), 배양온도 37°C, pH 5.5 control, 총 배양시간 21시간, 교반속도 30 rpm으로 시생산 진행함. 대량생산 시 최적 배양시간을 확인하기 위해 배양시간을 충분히 늘려주었음. 배양 3시간 단위로 배양액을 샘플링하여 생균수 측정하여 대량생산 시 배양양상을 확인함.
- 배양 종료 후 농축을 진행하되 농축액 온도가 20°C 이하를 유지하도록 냉각한 후 약 6500 rpm으로 20배 농축을 진행함. 농축완료액에 차갑게 온도를 유지한 10% 동결보호제를 1:1로 교반혼합하여 동결보호제 최종농도 5%인 농축액 보호제 혼합액 제조함. 농축액 보호제 혼합액 동결 후 동결건조를 실시함.
- 생균수를 토대로 SNUG50430의 배양양상을 확인한 결과, 배양 3시간부터 12시간까지 균수가 급격하게 늘어나는 대수기를 보였고, 12시간부터 15시간까지는 균수변화가 점차 완만해지고 이후 18시간 정지기에 도달하는 양상이 관찰됨. 시간별 생균수를 확인한 결과, 배양 15시간에 최대 생균수 (5.2×10^9 CFU/mL)를 나타내었으며, 배양18시간에도 생균수 (5.0×10^9 CFU/mL)에 큰 차이는 없었음. Lab scale의 최대 생균수 (배양 18시간, 5.6×10^9 CFU/mL)와 비교해 유사한 생균수를 나타냄. 배양 21시간 (4.8×10^9 CFU/mL)에는 생균수가 감소하여 최적배양 시간은 15~18시간이 적당할 것으로 사료됨. 해당 조건으로 대량 생산 연구를 추가수행 중에 있음 (표 14, 그림 83).
- 동결건조 종료 후 분말성장 확인 결과, 황갈색의 부드러운 분말 성상을 보여 동결건조가 잘 이루어졌음을 확인함. 최종 분말 생균수는 3.9×10^{11} CFU/g으로 대량생산 시에도 공정별

생산 수율 및 동결건조 후 생존률이 lab scale 조건에서와 유사하게 재현됨을 확인하여 향후 대량 생산에 큰 문제는 없을 것으로 사료됨. 다만 향후 동결보호제 개선 연구 등 동결건조 과정에서 생산수율 및 동결건조 후 생존률을 더욱 높일 수 있는 방안을 마련해야 할 것으로 사료됨.

표 14. 300 L 대량배양 연구 결과

공정단계	생균수	무게 (g)	총 생균수	수율 (%)	동결건조 후 생존률 (%)
	CFU/mL or g				
배양완료액	4.8×10^9	~ 300,000	1.44×10^{15}	100%	-
농축액 + 보호제 혼합액	4.72×10^{10}	~ 30,000	1.42×10^{15}	98%	-
분말	3.90×10^{11}	3,051	1.19×10^{15}	83%	84%

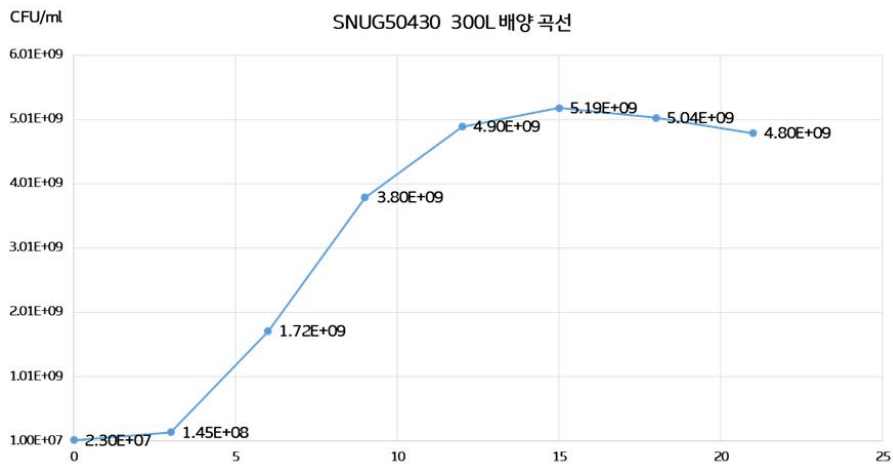


그림 83. SNUG50430의 300 L 대량생산 생육 곡선

3절. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

1. *In vivo* 마우스 모델을 통한 기능성소재 및 발효유의 장관면역 기능 및 장내 균총 개선 검증

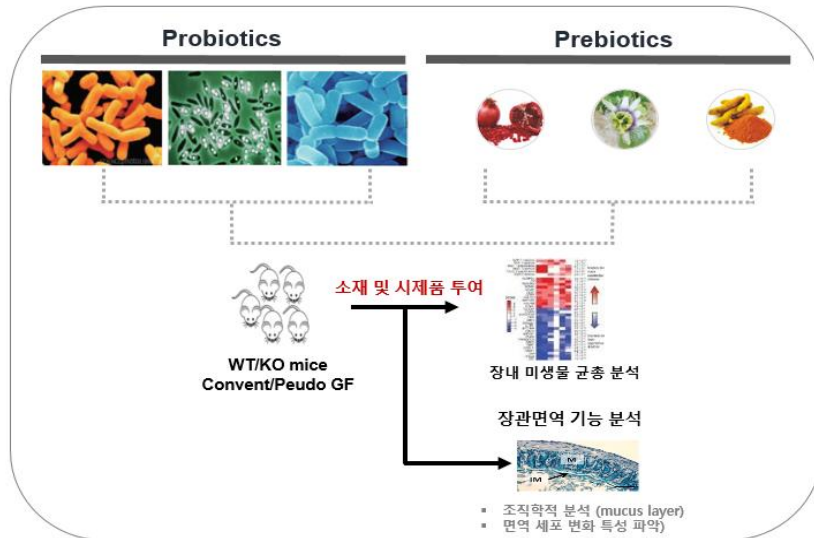


그림 84. 기능성 프리바이오틱스 균주들로 인한 장관면역 기능 개선 검증 모식도 (*in vivo* 실험)

- 본 연구를 위하여 다양한 기능성 미생물 소재들 중 최종적으로 선정된 *Lactobacillus rhamnosus* SNUG50430 (이하 SNUG50430) 및 이를 포함한 발효유 시제품을 확보하였으며, 3종의 *in vivo* 마우스 모델을 통해 기능성 소재와 시제품의 장관 면역 및 장내 균총 개선능을 검증함.
- Dextran Sulfate Sodium (DSS)를 이용한 일반 C57BL/6 마우스 상의 염증성 장 질환 모델을 이용하여 SNUG50430 균주의 장관면역기능 개선 효능을 평가함. 마우스의 급성 장염을 유도하기 위하여 2% DSS를 1주간 식수로 투여하였음. 이후 SNUG50430균주는 1×10^9 CFU/mL의 농도로 phosphate buffered saline (PBS)에 희석 후, 일반 C57BL/6 마우스 모델에는 1주간, DSS 유도 염증성 장질환 모델에는 유도시작일부터 10일간 경구로 투여하였음.
- SNUG50430 포함 발효유 시제품의 면역기능 및 균총 개선 검증을 위하여 pseudo-germ free 마우스 모델과 면역 결핍 마우스 모델인 IL-10^{-/-} 마우스 모델을 구축하였음. 여기서 pseudo-germ free 마우스 모델은 항생제를 일정 기간 투여하여 장내 균총을 제거하는 방식을 통해 인위적인 germ free 상태를 구축하는 방법으로, 특정 균주의 효능을 확인하기에 적합함. 대표적인 항생제인 ampicillin, vancomycin, neomycin, 및 metronidazole을 혼합하여, 대상 마우스가 음용하는 식수를 통해 투여하였음. 특히 기존 마우스에 존재하고 있는 장내 균총의 제거를 확인할 필요성이 있어, 항생제 투여기간을 1일, 4일, 7일로 나누어 균총분석을 실시함 (그림 85). 결과, 항생제 투여 4일째부터 균집 내 다양성이 감소하기 시작하여, 7일째는 극명하게

감소함을 확인하였음. 따라서 본 연구에서는 보다 보수적으로, 10일간 항생제 투여를 실시한 마우스들을 활용하여 후속 실험을 진행함.

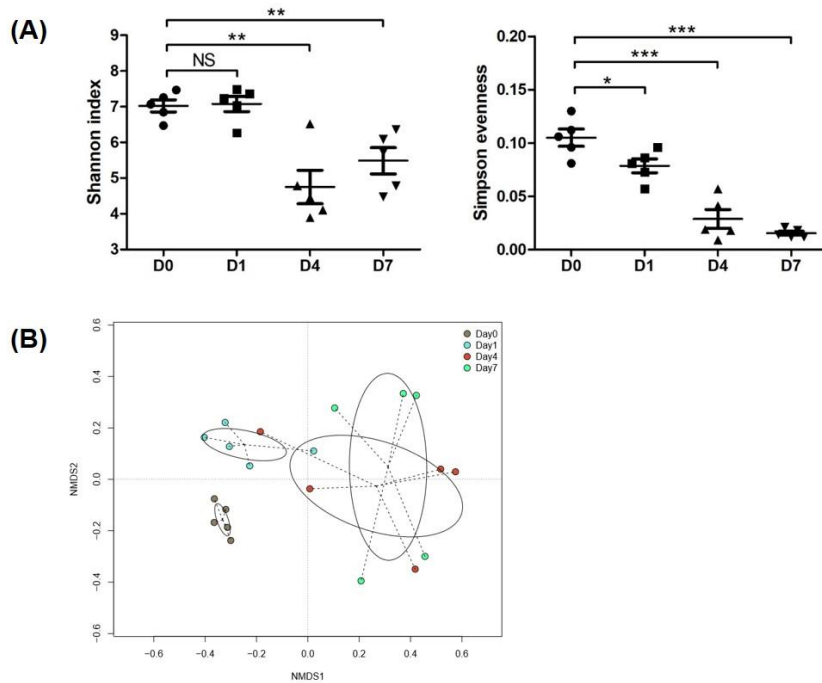


그림 85. 항생제 투여 기간에 따른 미생물 다양성분석 (A) Alpha diversity (B) Beta diversity

- 발효유 시제품의 경우 starter균주 (*Streptococcus thermophilus*)를 추가적으로 포함하였음. 발효유는 경구로 투여하였으며 Pseudo-germ free 마우스 모델은 1주간, IL-10^{-/-} 마우스 모델은 2주간 투여함 (Starter 균주: 7.45×10^8 CFU/mL, SNUG50430은 2.05×10^{11} CFU/mL).
- 대장 조직 및 혈청 시료를 이용하여 면역기능 개선 효능 평가를 수행하였으며, 이때 면역세포의 lineage를 고려한 다수의 염증관련 마커들을 선정하였다. 이때 염증관련 마커의 RNA 발현 정도는 qPCR을 통하여 측정하였고, multiplex ELISA를 통하여 cytokine 단백질 발현 양 역시 정량하였음.
- 기능성 균주 SNUG50430의 장내 균총 개선 효능 평가를 위해 각 그룹 별 마우스의 맹장 (cecum)을 분리하였음. 맹장 조직 내용물의 DNA추출 후 515F/806R primer를 이용하여 16S rRNA gene V4 영역을 증폭함. 이후 Illumina MiSeq 장비를 이용하여 16S amplicon sequencing을 수행하였으며 QIIME 플랫폼 기반으로 균총 분석을 실시함.

가. 면역기능 개선 효능 평가 결과

- 일반 C57BL/6 마우스에 기능성 소재인 SNUG50430 균주를 개체당 1×10^9 CFU/mL로 2주간 투여한 결과, 대장 조직 내 염증관련 마커 유전자 발현 정도가 크게 변하는 것을 확인함 (그림 86). 특히 염증성 cytokine인 *Tnfa*의 유전자 발현량 대비 항염증 마커인 *Il10*과 *Foxp3*의 유전자 발현량이 대조군 대비 SNUG50430 투여 군에서 유의하게 증가하였음.

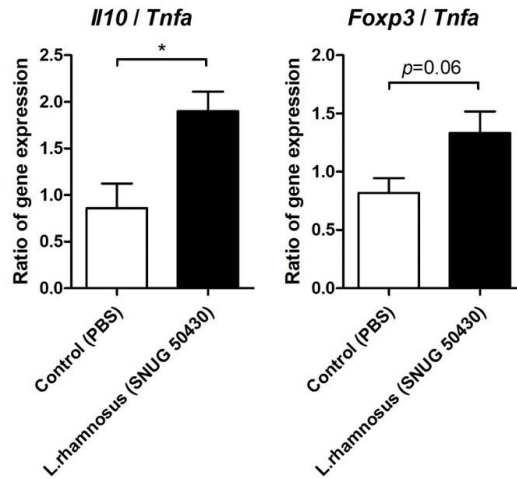


그림 86. 일반 C57BL/6 모델에서 대장에서의 염증 관련 유전자 발현량 분석

- DSS 유도 염증성 장염 마우스 모델에 기능성 소재인 SNUG50430 균주를 개체당 1×10^9 CFU/mL로 10일 간 투여한 결과, 대장 조직에서의 항염증 cytokine인 *Il10*과 *Tgfb1*의 유전자 발현량이 증가하였으며, 장관벽 밀착연접 (tight junction) 연관 마커인 *Zo1*과 *Occludin*의 유전자 발현량이 증가함 (그림87). 이에 SNUG50430은 유의미한 장내 염증 완화 및 장관벽 강화효과를 갖추고 있음을 확인함.

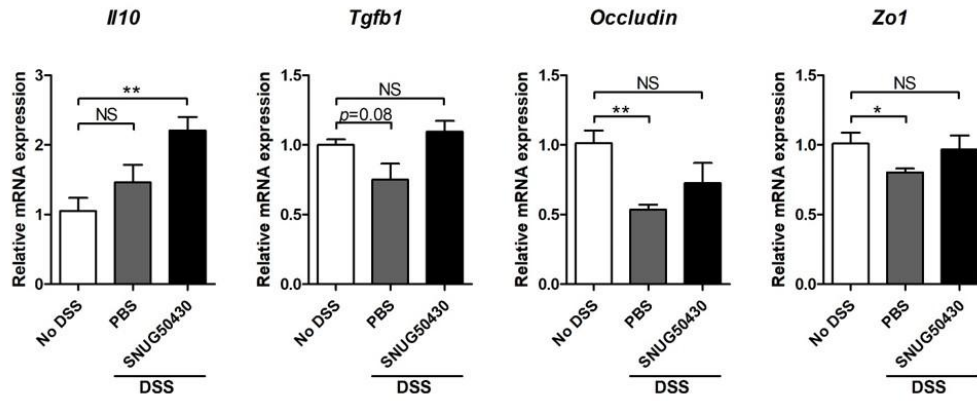


그림 87. DSS유도 염증성 장질환 모델에서 대장 조직에서의 항염증 및 밀착연접 (tight junction) 관련 유전자 발현량 분석

- Pseudo-germ free 마우스 모델을 유도하기 위해 항생제를 처리한 마우스 그룹의 경우, 대조군 (PBS 처리)에 비해 대장 조직 상 대표적인 염증성 cytokine인 IFN γ 와 TNF α 가 유의하게 증가하였으며, SNUG50430를 포함한 발효유의 투여가 이들을 유의하게 감소시킨다는 것을 확인하였다 (그림 88). 또한 SNUG50430가 항염증 cytokine인 IL-10를 증가시키는 것 역시 확인함. 이는 즉 SNUG50430를 이용해 만든 발효유 역시 항생제 투여로 인하여 유도된 염증 반응을 억제할 수 있음을 의미함.

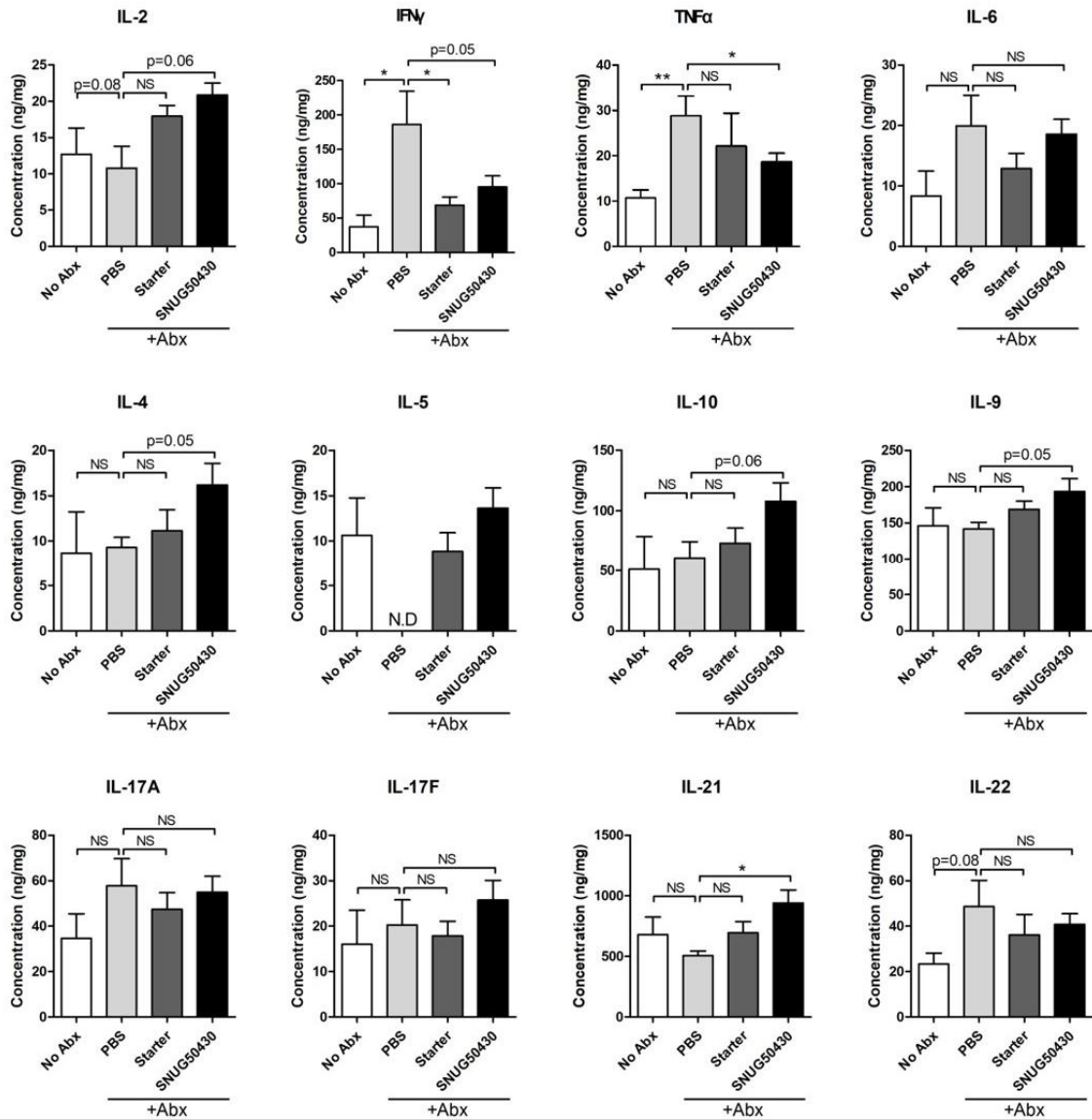


그림 88. Pseudo-germ free 마우스 모델에서 확보한 대장 조직에서의 cytokine 분석 결과

- Pseudo-germ free 마우스 모델에서 확보한 혈청 시료 중 염증 관련 cytokine 발현 정도를 정량한 결과는 그림 89과 같음. 항생제 비처리 군에 비해, 항생제 처리군에서 확보한 혈청 시료들에서 다양한 염증성 cytokine들 (IFN γ , TNF α , IL-6, IL-4, IL-5, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22)이 증가하는 양상을 보였으며, 이는 항생제 처리로 인한 대장 조직에서의 cytokine 변화 양상과 유사함. 반면, SNUG50430를 투여한 실험군에서 확보한 혈액 시료에서 염증성 cytokine들이 극명하게 낮아지는 것을 확인하였으며, 자가면역질환과 관련된 T Helper 17 cell 관련 cytokine들의 유의한 감소 역시 관찰됨. 본 결과로 미루어볼 때, SNUG50430의 투여는 투여대상의 전방위적 염증반응 억제에 충분한 기여를 할 수 있을 것으로 보이며, 균주 자체 또는 유제품 병행 투여 등 전달 매체의 다양화를 꾀할 수 있다는 장점이 있음.

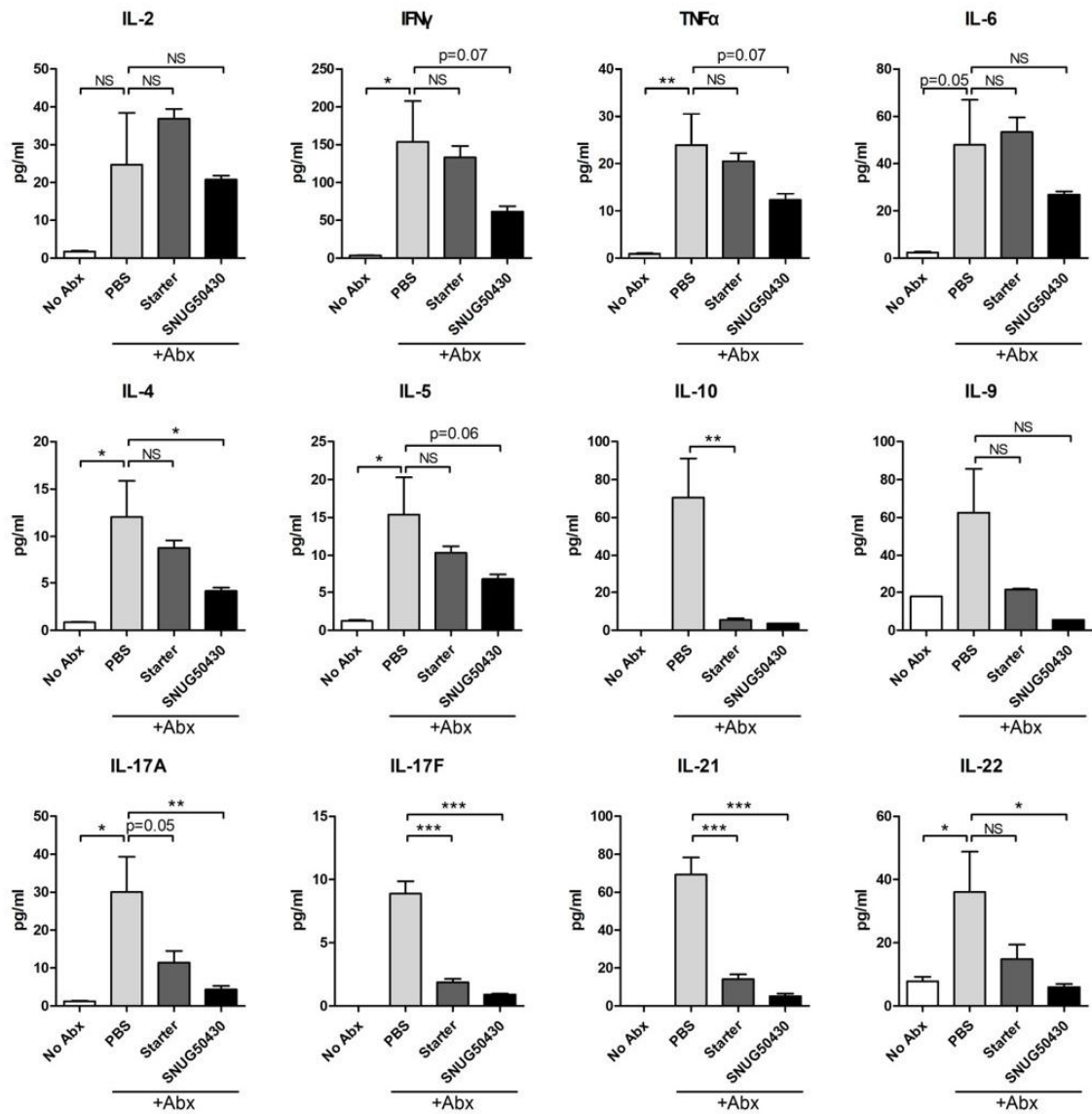


그림 89. Pseudo-germ free 마우스 모델에서 확보한 혈청 시료에서의 cytokine 분석 결과

- 면역 결핍 마우스 모델인 IL-10^{-/-} 마우스에 SNUG50430를 2주간 투여한 결과, 특히 혈청 샘플에서 염증성 cytokine들인 IFN γ 와 IL-5가 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었음 (그림 90, 91). 이는 즉 대표적인 항 염증성 cytokine인 IL-10의 분비능이 없는 마우스에서도 SNUG50430이 충분한 염증 억제 효과를 보일 수 있음을 시사함.

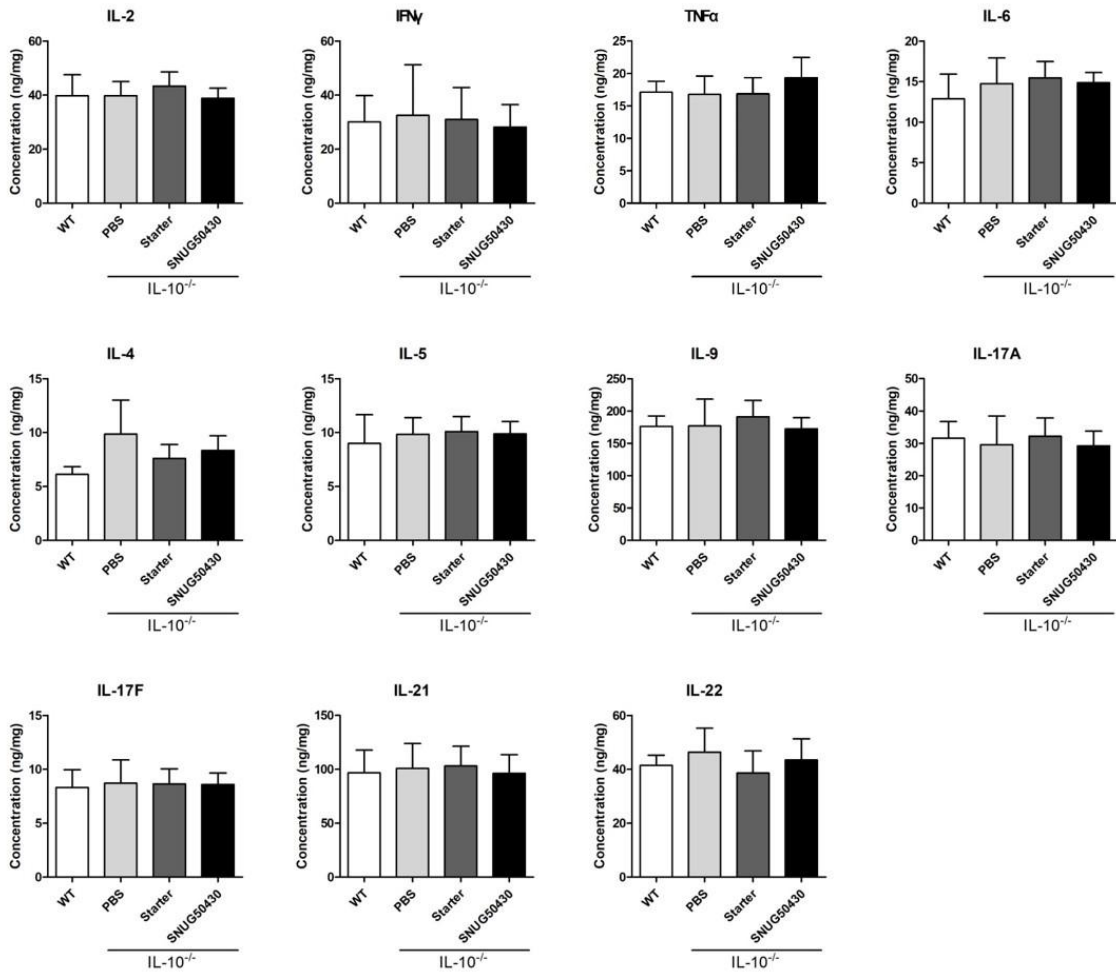


그림 90. IL-10^{-/-} 모델에서 대장조직에서의 cytokine 분석 결과

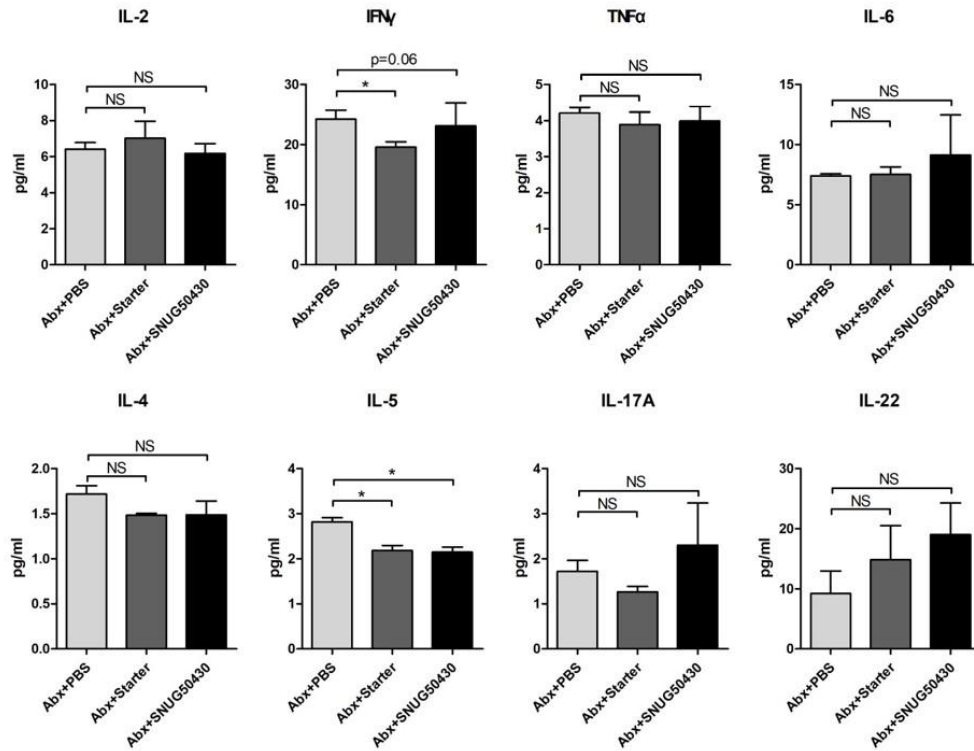


그림 91. IL-10^{-/-} 모델에서 혈청에서의 cytokine 분석 결과

나. 장내 균총 개선 효능 평가 결과

- SNUG50430 포함 발효유 시제품을 섭취한 마우스의 맹장을 분리하여 내용물을 활용한 균총 분석을 실시함. 이때 균집내 다양성을 나타내는 Alpha diversity를 확인하기 위하여 Simpson evenness, Observed species, Shannon index 등 3가지 지표를 활용함 (그림 92). Pseudo-germ free 마우스 모델에서는 세 가지 index에서 모두 대조군에 비해 SNUG50430 포함 발효유 실험군에서 균총의 다양성이 유의하게 증가함. 유전자 결핍 마우스 모델인 IL-10^{-/-} 마우스 모델에서는 Simpson evenness index 상에서 SNUG50430이 포함된 발효유를 투여한 그룹이 다른 두 대조군에 비해 다양성이 높게 유지됨을 확인함.

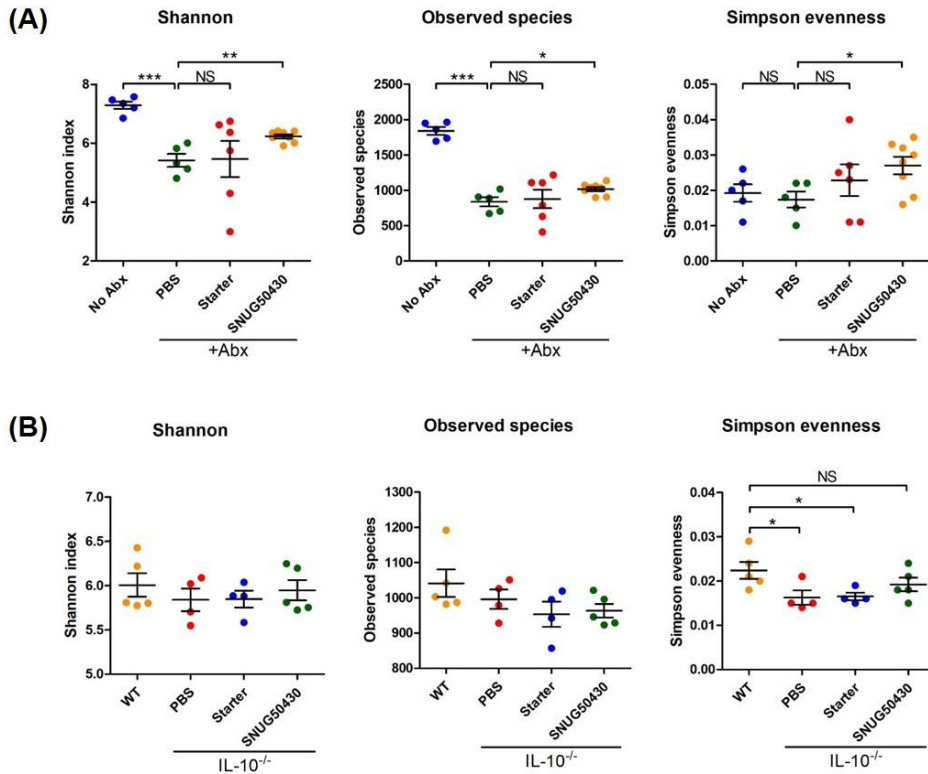


그림 92. 군집 내 장내 미생물 다양성 (Alpha diversity) 비교
 (A) Pseudo-germ free 모델 (B) IL-10^{-/-} 모델

- 그룹간 균총 군집의 다양성 (Beta diversity)를 확인하고자, Bray-Curtis distance 및 Weighted unifracs distance 지표를 확인함 (그림 93). 그 결과 pseudo-germ free 및 IL-10^{-/-} 모델 등 양 마우스 모델 모두에서, 다른 그룹들에 비해 SNUG50430을 투여한 그룹이 대조군 그룹과 보다 가깝게 clustering 되는 것으로 보아, SNUG50430 섭취가 마우스 모델의 균총 회복에 기여할 수 있음을 확인함.

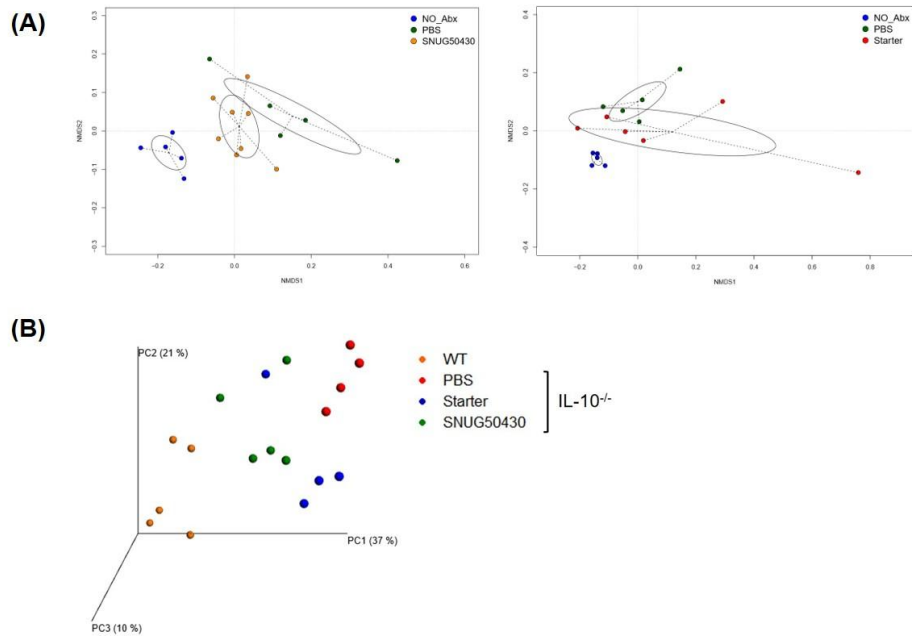


그림 93. 군집간 장내 미생물 다양성 (Beta diversity) 비교
 (A) Pseudo-germ free 모델 (B) IL-10^{-/-} 모델

- 특히 SNUG50430을 포함한 시제품 투여 마우스 그룹에서 유익균 박테리아들이 대조군 수준으로 회복되는 것을 확인함 (그림 94). Pseudo-germ free 마우스 모델에서는 대표적인 유익균인 *Lactobacillus* spp.의 증가를 비롯해 비만예방에 도움이 된다고 알려져 있는 *Oscillospira* spp., 일반적으로 풍부도 측면에서 염증성 장질환 환자 중 음의 상관관계를 가지는 *Coprococcus* spp. 와 *Ruminococcus* spp. 등이 증가하는 반면, 주된 기회감염균으로 알려진 *Proteus* spp. 는 감소함. 아울러, IL-10^{-/-} 마우스 모델에서도 *Lactobacillus* spp.와 *Ruminococcus* spp.의 증가가 관찰되었으며, 이는 즉 SNUG50430의 투여가 장내 기타 유익균 증가를 피할 수 있음을 보여주고 있음.

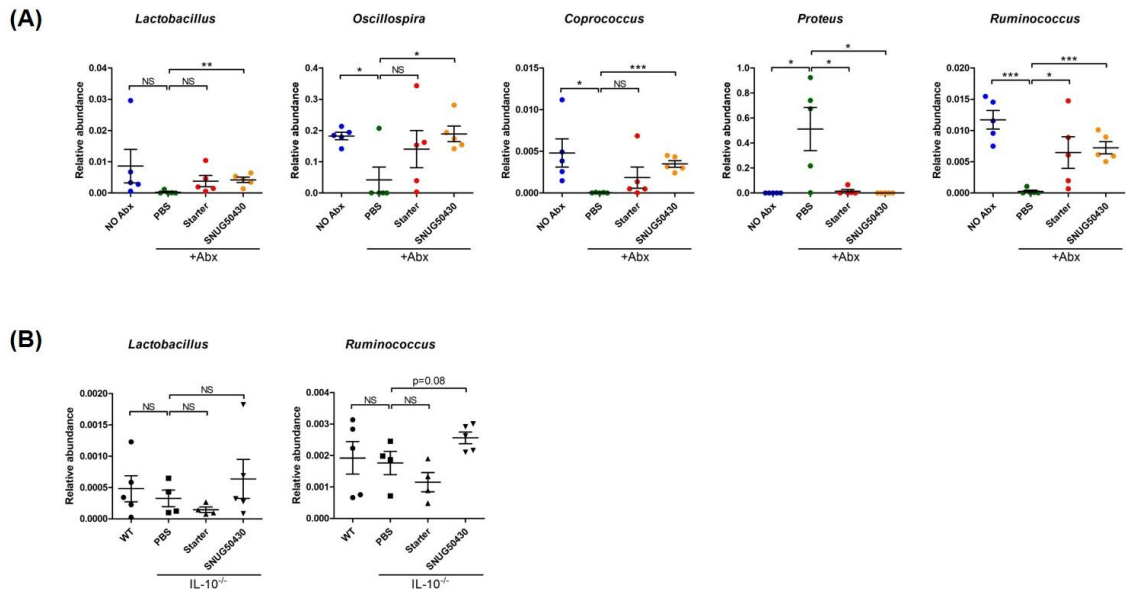


그림 94. SNUG50430 포함 발효유 투여 이후 유의한 상대적 풍부도를 보이는 미생물군 (A) Pseudo-germ free 모델 (B) IL-10^{-/-} 모델

- 마우스 모델에서 획득한 맹장 시료에서, 주로 미생물 대사에 의거하여 생성되며, 장내 건강에 중요한 역할을 하는 short chain fatty acid (SCFA)인 butyrate를 분석한 결과는 그림 95과 같음. SNUG50430 투여 그룹에서 모두 butyrate가 증가함을 알 수 있으며, 특히 butyrate는 대장 세포의 에너지원으로 사용되는 등 매우 중요한 SCFA로 알려져 있음. 즉 SNUG50430의 투여는 장내 유익균 증가를 피하여, 결과적으로 장내 건강 유지에 크게 이로운 역할을 한다고 사료됨.

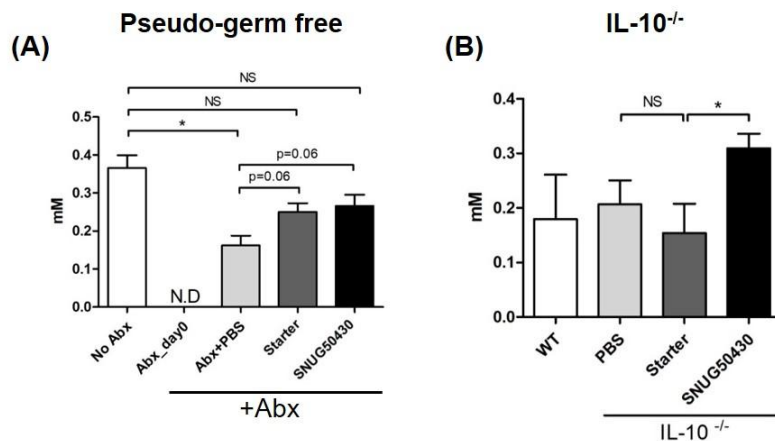


그림 95. 맹장내 Butyrate 분석 결과 비교 (A) Pseudo-germ free 모델 (B) IL-10^{-/-} 모델

2. 장내 미생물총과 대사체와의 상관관계 연구

- 장내미생물총과 대사체와의 상관관계를 연구하기 위해, 발효유제품을 3-stage 연속식 혐기배양 시스템 적용 후 장내균총과 대사체 변화를 관찰하였음.
- 대장 내 3개 부위 (상행, 횡행, 하행 결장)의 환경을 재현할 수 있도록 3-stage 연속식 배양을 수행함 (Macfarlane, 1998). 건강한 24세 성인 남성의 대변 시료로부터 배양 접종액을 준비함. 회분식 배양 24시간 후 연속식 배양을 시작하면서 3개의 생물반응기의 배양액 머무름 시간을 300, 400, 325 mL로 각각 다르게 조정해줌. 각 반응기는 질소 유입 (20 mL/min)을 통해 혐기상태가 유지되도록 함. 2주 동안 안정화시킨 후 발효유제품 1 mL을 ascending 모사 생물반응기에 접종해줌. 정기적으로 회수된 배양액 샘플은 초저온냉동고에 보관하였고 장내 미생물총, 대사체 분석에 이용하였음.
- 장내 미생물총 분석을 위해 Illumina MiSeq 장비를 이용하여 16S amplicon sequencing을 수행함. 515F/806R primer를 이용하여 미생물 16S rRNA gene 부분의 V4 영역을 증폭함. Miseq reagent kit V3를 이용하여 얻은 염기서열 정보로부터 QIIME 플랫폼 기반 마이크로비옴 분석을 수행함. 그룹 간 미생물 차이를 통계적으로 분석하기 위해 linear discordant analysis인 LEfSe 분석툴을 사용함.
- 장내 대사체 분석을 위해 NMR 기반 장내 대사체 분석을 수행함 (Lamichhane, 2015). 배양액 샘플 상정액에 대해 500 MHz NMR system을 이용하여 ¹H NMR spectroscopy 데이터를 확보함. 정량, 정성 분석을 위해 Chenomx NMR Suite 분석툴과 Human Metabolome Database를 활용하였으며 총 43개의 주요 대사체 (acetate, acetoin, alanine, 4-aminobutyrate, arginine, betaine, bile acids, butyrate, cadaverine, choline, p-cresol, ethanol, formate, fumarate, glycerol, glycine, histamine, histidine, hypoxanthine, isobutyrate, isoleucine, isovalerate, lactate, leucine, malonate, methanol, phenylacetate, phenylalanine, 2-phenylpropionate, propionate, putrescine, pyruvate, sarcosine, thymine, tryptophan, tyrosine, uracil, uridine, urocanate, valerate, valine, xanthine)에 대해 분석을 수행함. 각 대사체 함량 정보는 Metaboanalyst 분석툴을 이용하여 그룹간 비교와 통계적 유의성을 평가함.
- 3-stage 연속식 배양 시스템을 이용한 발효유제품의 장내미생물총, 대사체 변이 효과를 분석한 결과, 연속식 배양 시스템에 접종한 인체 대변 시료는 *Prevotella*, *Dialister*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* 등이 주요 미생물 균집원이었으며 상행 (ascending, AC), 횡행 (transverse, TC), 하행결장 (descending colon, DC) 모사 생물반응기의 균집 특성을 분석하였을 때 횡행, 하행결장에서 인체 대변과

비슷한 상태를 유지하는 반면 상행 결장은 *Clostridium*, *Lachnospira*, *Bifidobacterium* 등이 우점하게 됨을 확인함.

- Shannon diversity index를 이용한 그룹 내 미생물 다양성 분석 시 3가지 대장 부위별로 서로 유의적으로 다른 미생물 다양성을 나타냄. 상행에서 하행결장으로 갈수록 diversity가 증가하는 경향성을 보임. 그리고 PCoA 분석을 통한 그룹 간 비교 시 대장 부위별로 클러스터링을 통해 명확한 분리가 이루어짐을 확인함 (그림 96).
- 발효유제품 처리 시 미생물 다양성에는 유의적인 변화가 일어나지 않음. 그러나 PCoA를 통한 베타 diversity 분석에서 발효유제품 처리 시 장내미생물 군집 변화가 나타남을 확인함. 발효유제품 처리를 중단하였을 때 (washout group) 미생물다양성 감소가 유발되었지만 장내미생물 군집의 특징은 발효유제품 처리 그룹과 여전히 비슷한 클러스터에 속하는 결과를 보임 (그림 96).

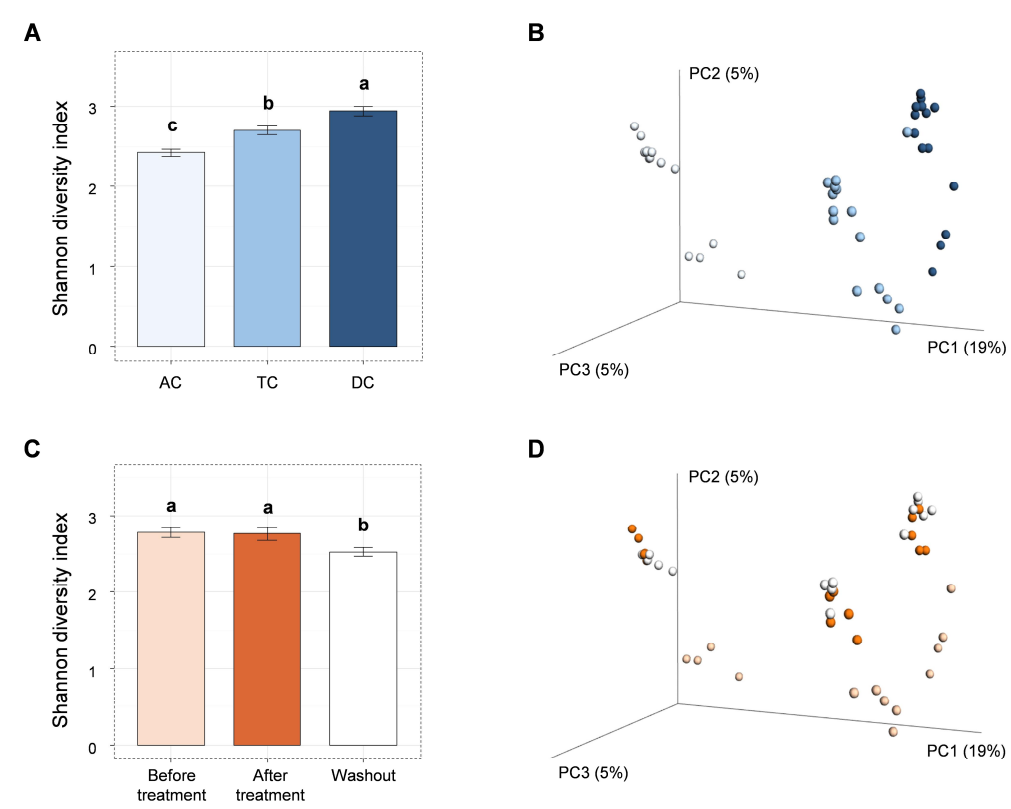


그림 96. 대장부위, 발효유제품 처리여부에 따른 미생물 다양성 분석

- 발효유제품 처리 후 유의적으로 증가되는 미생물은 각 대장 부위를 모사하는 생물반응기에 따라 서로 다르게 나타남. LEfSe 분석 결과, 상행결장에서는 발효유제품 처리 후 *Veillonella*, *Atopobium*, *Streptococcus* 등이 증가함. 한편, 횡행, 하행결장에서는 *Roseburia*, *Parabacteroides*, *Coprococcus* 등의 미생물이 유의적으로 증가함 (그림 97).

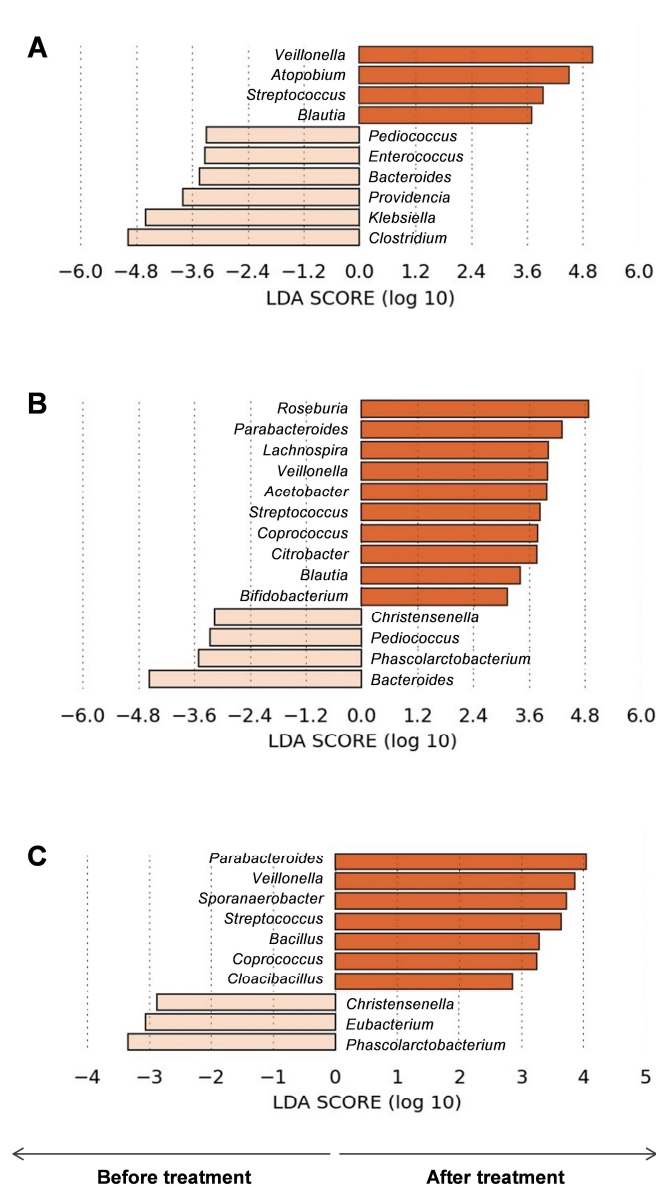


그림 97. 발효유제품 처리 여부에 따른 각 그룹별 고연관성 미생물 (genus).
 (A) 상행결장 (B) 횡행결장 (C) 하행결장

- 상행결장과 횡행-하행결장의 미생물 분포 차이는 대사체 분석 결과에서도 비슷하게 나옴. NMR을 이용한 대사체 분석 시 횡행-하행결장의 대사체 특징이 상행결장과 비교하였을 때 서로 더 비슷하였음 (그림 98).

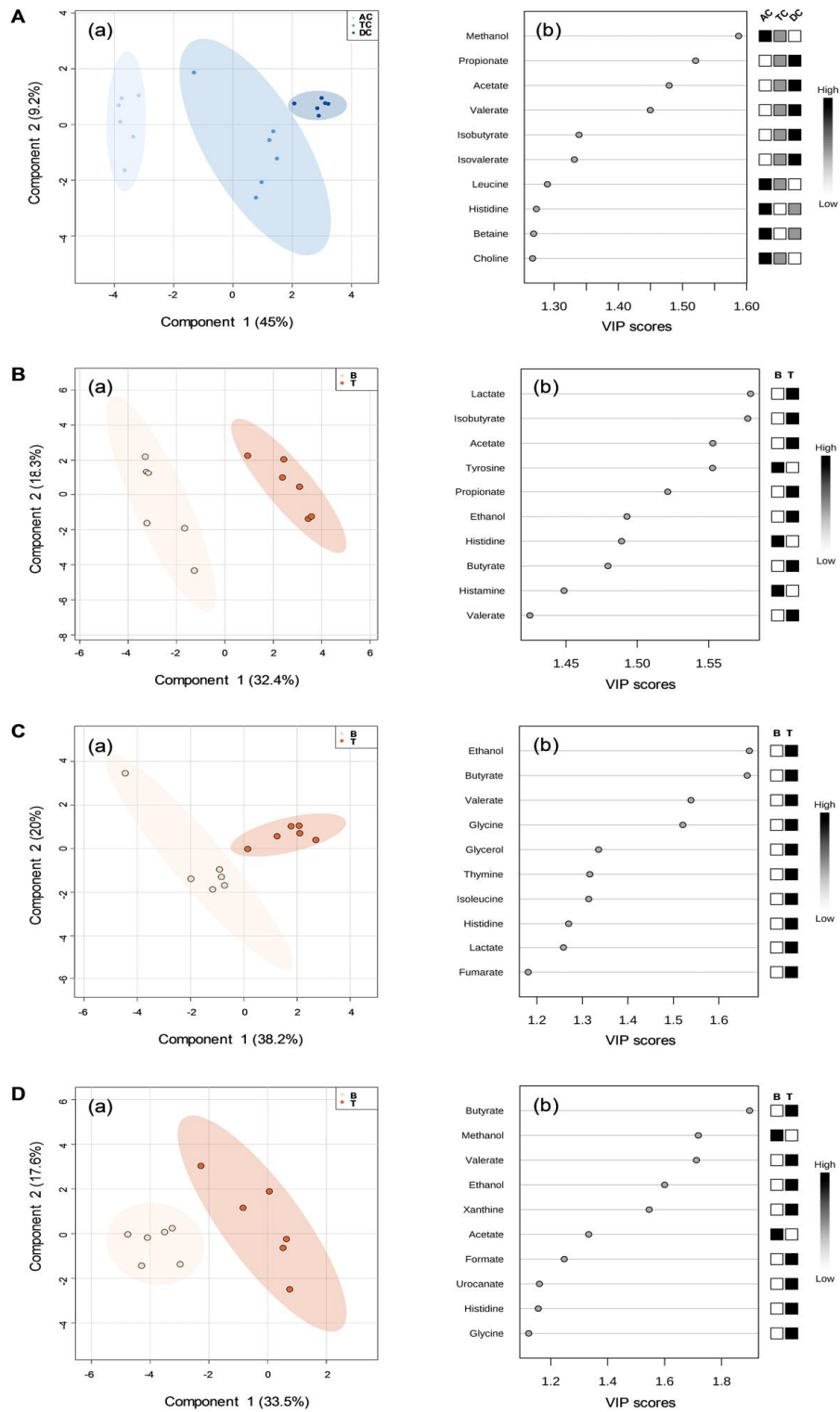


그림 98. NMR을 이용한 대사체 분석 결과 (PLS-DA score plot). (A) 대장부위별, (B) 발효유제품 처리 여부에 따른 상행결장, (C) 횡행결장, (D) 하행결장의 대사체 특징

- 특히, 횡행, 하행결장에서는 acetate, propionate, butyrate와 같은 미생물 유래 단쇄지방산 중에서 특히 butyrate 함량이 유의적으로 증가되었는데 이는 같은 부위에서 증가되었던 *Roseburia*, *Coprococcus*가 대표적인 butyrate 생산균주라는 점에서 서로 일치하는

결과였음.

- 마이크로비움 데이터와 장내 대사체 분석 결과를 통합하여 연관성 분석을 수행하였을 때, 각 대장부위별 주요 대사체와 이에 영향을 주는 장내 미생물과의 관계를 연구할 수 있었음. 상행결장에서는 ethanol과 acetate의 증가가 두드러졌으며 여기에 가장 영향을 끼치는 장내 미생물은 *Streptococcus*였음. 실제로 *Streptococcus*의 경우 발효유제품의 주요 미생물 중 하나였음. 이러한 결과는 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*에 비해 *Streptococcus*는 대장의 처음 시작 부분에 정착하여 장내 환경을 변화시킬 가능성이 높음을 보여주므로 의의가 있음 (그림 99).
- 횡행, 하행결장에서는 *Bifidobacterium*의 영향이 두드러지게 나타났으며, *Acetobacter*, *Roseburia*, *Coprococcus* 등과 같은 butyrate 생산균주의 증가가 두드러짐. 하행결장에서는 *Streptococcus*의 영향력이 상행결장과 비교하였을 때 감소되었고, 특정 균주에 의한 영향 (세로)보다 대사체에 의한 영향 (가로)이 더 강해지는 양상을 보임 (그림 99).

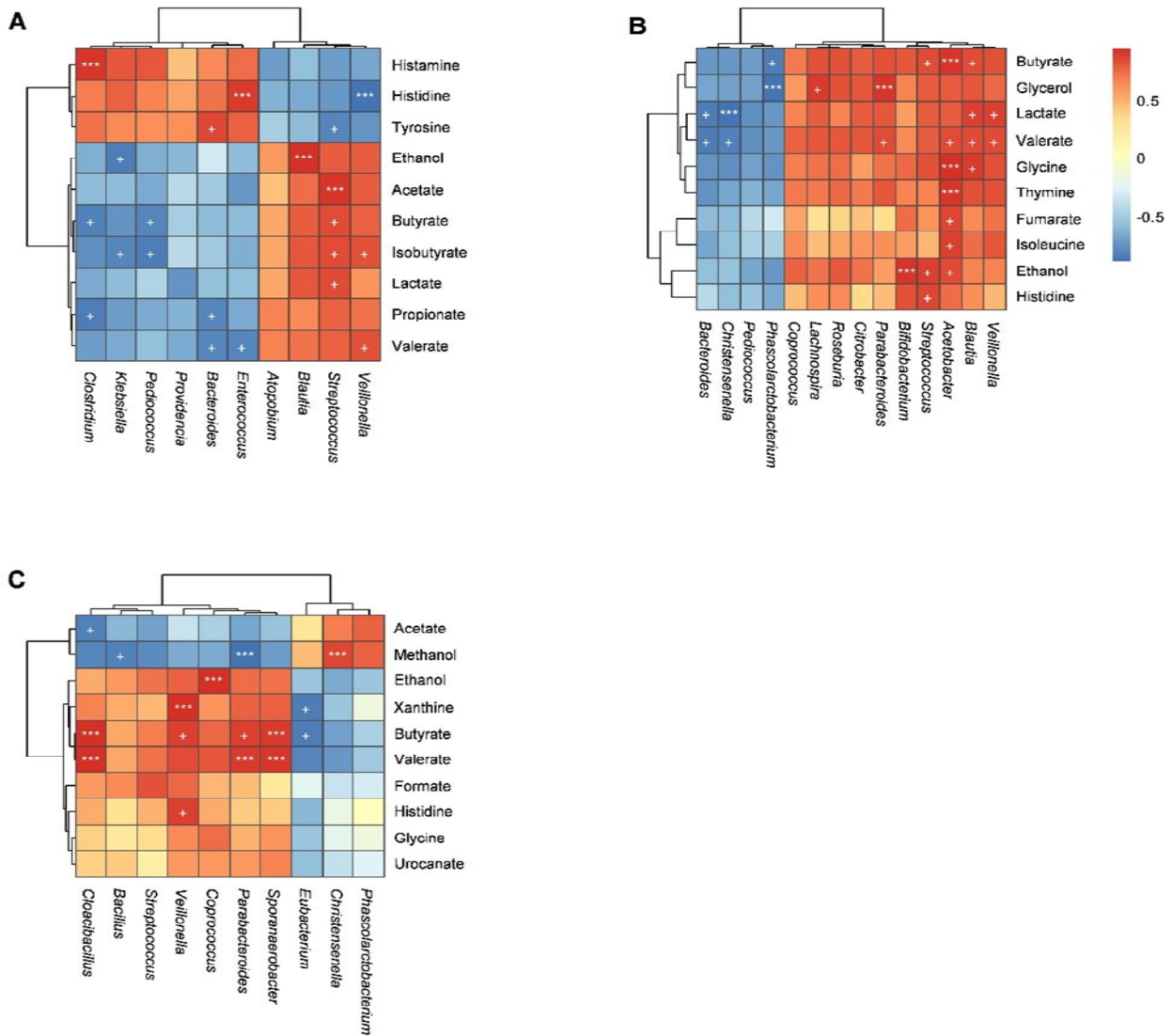


그림 99. metagenomics와 metabolomics 데이터를 이용한 연관성 분석 연구. (A) 상행결장 (B) 횡행결장 (C) 하행결장

- 본 연구 결과는 식품 분야 저명지인 Food Chemistry에 2018년 10월 호에 발표되었음 (Cha, 2018). 이러한 연구결과로 부터 발효유제품의 처리가 장내 미생물 군집 및 장내 대사체 생성능에 유의적인 영향력을 줄 수 있음이 확인됨. 또한 장건강 소재 개발에 있어서 *in vitro* 시스템을 통한 대장모사 연구가 중요성을 보여줌. 아울러 발효유제품의 구성 미생물이 대장 부위별로 미치는 영향이 달랐기 때문에 각 유산균별로 대장 부위에 따라 정착효율을 최적화할 수 있는 전달 기술의 개발이 필요함을 시사함.

3. 천연 프리바이오틱스의 화학성분 규명 및 원료 표준화

- 지재권에 활용된 유망소재인 더덕과 홍국을 대상으로 화학성분을 분석하여 향후 원료표준화를 위한 기초자료를 확보하였음. 이를 위해 HPLC 크로마토그램 분석을 이용한 화학성분 프로파일링 (chemical profiling) 및 고전 분석화학실험을 이용한 총페놀성분 함량 및 총플라보노이드 함량을 측정하였음.
- 더덕 및 홍국 추출물 제조를 위해, 생더덕을 세절 후 95% 에탄올을 가하여 3일 동안 상온 추출하였음. 추출용액을 filter 후 감압 농축하여 더덕 추출물을 제조하였음. 홍국의 경우 환류냉각 추출법을 이용하여 95% 에탄올 추출 용액을 얻었으며, 추출용액을 filter 후 감압 농축하여 홍국 추출물을 제조하였음.
- 더덕 및 홍국 분획물 제조방법하기 위해 각 추출물들을 증류수에 현탁한 후 노르말헥산, 에틸아세테이트, 수포화부탄올의 순서로 극성에 따른 분획물을 제조하였음.
- 더덕 및 홍국 추출/분획물의 HPLC 크로마토그램을 얻기 위해 Agilent1260 HPLC system에 Shiseido Capcell pak (4.6Φ × 150 mm, 5 μm)컬럼을 사용하여 1.0 mL/min의 유속으로 분석하였음. 각 추출 또는 분획물 10 mg을 메탄올 1 mL에 잘 녹여 filter 후 10 μL를 injection하여 245 nm에서 분석하였으며, 사용된 용매 조건은 아래와 같음 (표 15).

표 15. HPLC 화학성분 프로파일링을 위한 용매조건

Time (min)	0.1% FA in water (%)	0.1% FA in ACN (%)
0	90	10
5	90	10
55	10	90
60	10	90

- 더덕 및 홍국 추출/분획물의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 측정하였음. 총폴리페놀 함량 측정을 위해 Folin-Denis법을 사용하였음. DMSO에 녹인 추출물 시료 20 μL와 증류수 60 μL, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 20 μL를 잘 섞어 상온에서 5분간 반응시킴. 그 후 20% Na₂CO₃ 용액 100 μL를 첨가하여 상온에서 30분간 더 반응 시킨 후 730 nm에서 흡광도를 측정하였음. 이때 galic acid를 표준품으로 사용하였으며, 0-500 μg/mL 농도로 작성한 표준곡선을 이용하여 총폴리페놀 함량을 구하였음.
- 총플라보노이드 함량 측정을 위해서는 염화알루미늄법을 사용하였음. 추출물 시료 20 μL와 에탄올 80 μL, 2% AlCl₃·6H₂O 용액 100 μL을 잘 혼합하였음. 상온에서 5분간 반응 후 430 nm에서 흡광도를 측정하였음. quercetin을 표준품으로 사용하였으며, 0-500 μg/mL 농도로 작성한 표준곡선을 이용하여 총플라보노이드 함량을 구하였음.

- 더덕 및 홍국의 추출물과 분획물 제조결과는 다음과 같음 (표 16)

표 16. 더덕 및 홍국 추출물 및 분획물 제조 중량

시료명		중량 (g)
더덕	에탄올 추출물	146.56
	노르말렉산 분획물	1.31
	에틸아세테이트 분획물	1.70
	부탄올 분획물	8.64
홍국	물 분획물	96.10
	에탄올 추출물	9.80
	노르말렉산 분획물	1.39
	에틸아세테이트 분획물	0.91
	부탄올 분획물	1.52
	물 분획물	1.25

- 더덕 시료의 HPLC 화학성분 프로파일링 결과, 극성에 따라 분획이 잘 이루어진 것을 확인하였음. 15분 정도에 검출된 더덕 에탄올추출물의 주성분은 수포화 부탄올 분획으로 이동한 것으로 보아 주성분은 극성이 높은 화합물로 예측할 수 있었음 (그림 100).

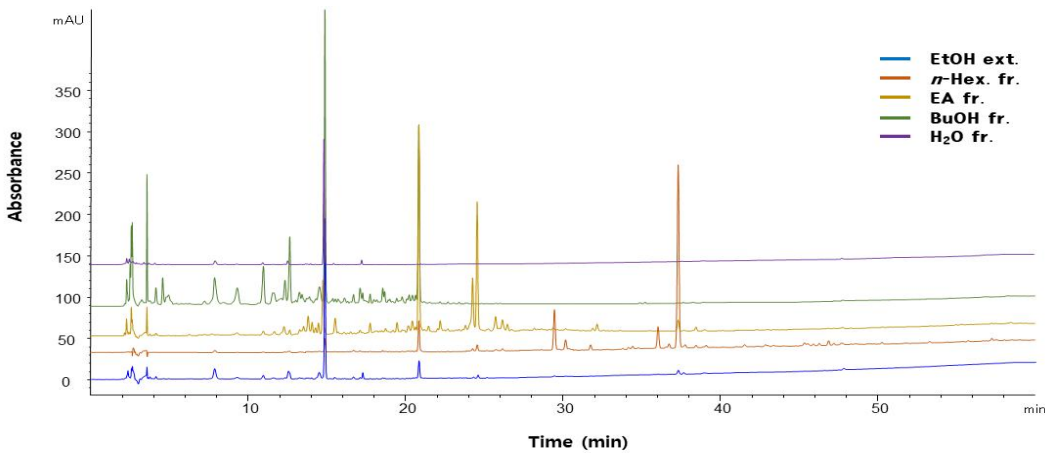


그림 100. 더덕 시료의 HPLC Chromatogram

- 홍국 시료의 HPLC 크로마토그램 분석결과, 극성에 따라 분획이 잘 이루어진 것을 확인하였음. 전반적인 흡광도가 낮아 주성분을 설정하기에 어려움이 있음. 더덕 시료에 비해 비극성 화합물들의 함량이 높을 것으로 판단됨 (그림 101).

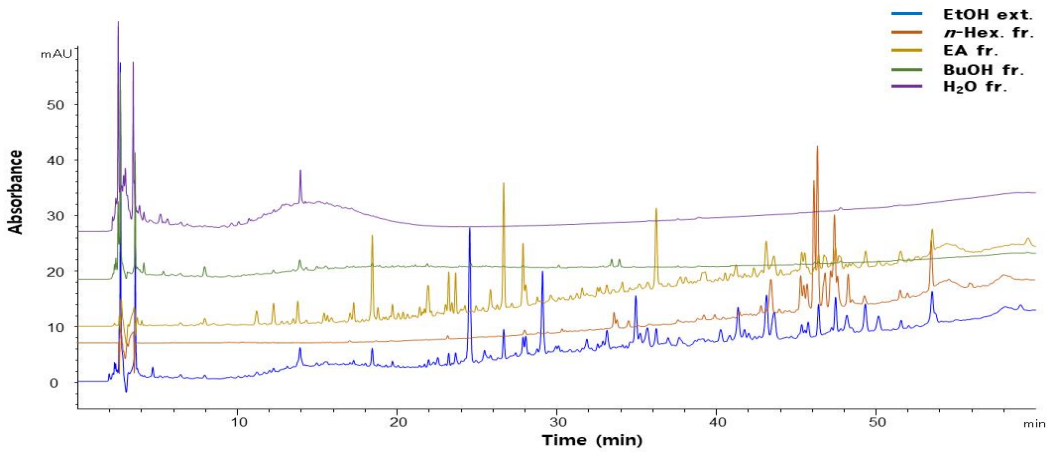


그림 101. 홍국 시료의 HPLC Chromatogram

- 더덕 및 홍국 시료의 총폴리페놀 함량 측정결과를 표 17에 나타내었음. galic acid를 표준품으로 사용하여 각 시료 1 g 내의 총폴리페놀 함량으로 표시하였음. 더덕 에탄올 추출물에서는 총폴리페놀 함량이 비교적 낮게 나타났지만, 이를 분획할 경우 노르말렉산 및 에틸아세테이트, 부탄올 분획물에서 높은 총폴리페놀 함량을 보였으며, 특히 에틸아세테이드 분획물에서 총폴리페놀 함량이 가장 높게 나타났음.

표 17. 더덕 및 홍국 시료의 총폴리페놀 함량

시료명		함량 (mg/g)
더덕	에탄올 추출물	3.05 ± 0.35
	노르말렉산 분획물	10.51 ± 0.17
	에틸아세테이트 분획물	17.95 ± 0.92
	부탄올 분획물	8.63 ± 0.20
	물 분획물	1.79 ± 0.33
홍국	에탄올 추출물	13.55 ± 1.76
	노르말렉산 분획물	7.97 ± 0.54
	에틸아세테이트 분획물	14.00 ± 0.47
	부탄올 분획물	14.92 ± 0.15
	물 분획물	11.50 ± 0.41

- 더덕 및 홍국 시료의 총플라보노이드 함량 측정결과를 표 18에 나타내었음. quercetin을 표준품으로 사용하여 각 시료 1g내의 총플라보노이드 함량으로 표시하였음. 더덕 시료의 경우 에탄올추출물에서 비교적 낮은 총플라보노이드 함량을 보였지만, 이를 분획물을 제조 시 특히 노르말렉산 및 에틸아세테이트 분획물에서 높은 총플라보노이드 함량이 나타났음 (표 18).

표 18. 더덕 및 홍국 시료의 총플라보노이드 함량

시료명		함량 (mg/g)
더덕	에탄올 추출물	0.72 ± 0.23
	노르말렉산 분획물	19.43 ± 0.88
	에틸아세테이트 분획물	22.78 ± 1.23
	부탄올 분획물	1.21 ± 0.13
	물 분획물	0.92± 0.20
홍국	에탄올 추출물	15.63 ± 0.75
	노르말렉산 분획물	12.88 ± 1.19
	에틸아세테이트 분획물	16.78 ± 0.24
	부탄올 분획물	2.77 ± 0.46
	물 분획물	0.59 ± 0.17

4. 혼합균주 기능 유지·보존 기술 연구

- 산업화의 적합성을 판단하기 SNUG50430의 최적화 배지를 기반으로 lab scale에서 결정된 실험조건을 참고하여 총 배양용량 5 L × 2, 초기 접종 1% (v/v), 배양온도 37℃, pH 5.5 control, 총 배양시간 18시간, 교반속도 30 rpm으로 생산을 진행함. 최종 배양액으로 생균수를 측정함.
- 배양 완료된 5 L 배양액을 이용하여 최적 액상보호제를 선발/개발하기 위해 농축을 진행하되 농축액 온도가 20℃이하를 유지 하도록 냉각한 후 약 6500 rpm으로 20배 농축을 진행함. 농축완료액에 차갑게 온도를 유지한 10% 액상보호제를 1:1로 교반 혼합하여 액상 보호제 최종농도 5%인 농축액, 보호제 혼합액을 제조함.
- 배양 완료된 5 L 배양액을 이용하여 최적 분말종균 보호제를 선발/개발 하기 위해 농축을 진행하되 농축액 온도가 20℃이하를 유지 하도록 냉각한 후 약 6500 rpm으로 20배 농축을

진행함. 농축완료액에 차갑게 온도를 유지한 12% 동결보호제를 1:1로 교반 혼합하여 동결보호제 최종농도 6%인 농축액 보호제 혼합액을 제조함. 농축액 보호제 혼합액 급속동결 후 동결건조를 실시함.

- 배양 완료된 5 L 배양액 및 농축액의 생균수를 측정된 결과 1.30×10^{10} cfu/mL, 1.32×10^{10} cfu/mL 및 7.9×10^{11} cfu/mL, 9.8×10^{11} cfu/mL로 확인 되었다. 농축 수율은 약 101% 수준으로 농축공정에 문제가 없었음. 각각의 농축액을 액상농축용 10% 동결보호제 와 12% 분말 동결보호제와 혼합한 결과 3.9×10^{11} cfu/mL, 5.6×10^{11} cfu/mL로 확인됨 (표 19).

표 19. 배양액 및 농축액의 검사 결과

시료명	대장균군(ND)		진균(균)(ND)		유산간구균수 (cfu/mL)	
	액상	분말	액상	분말	액상	분말
3차 Seed	ND	ND	ND	ND	1.20×10^9	1.50×10^9
10시간 배양액					6.3×10^9	7.2×10^9
최종 배양액					1.30×10^{10}	1.32×10^{10}
농축액					7.9×10^{11}	9.8×10^{11}
농축액 + 동결보호제					3.9×10^{11}	5.6×10^{11}
분말						1.29×10^{12}

- 선발된 액상/분말 보호제를 사용하여 제작된 액상농축 및 분말종균의 유통안정성(기준치: 액상: 1×10^{10} cfu/mL, 분말 1.0×10^{11} cfu/mL)을 확인한 결과 냉장에서 액상농축종균 12주, 분말 종균은 냉장 12개월로 확인됨. 액상농축종균은 냉장 (10℃ 이하)으로 유통에 기준하여 「식품, 식품첨가물, 축산물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준」 고시 전문(식약처 고시 제2017-89호, 2017.11.14)에 근거하여 유통기한을 10주로 설정함 (표 20). 분말 종균 상온 유통 기준하여 상온 10개월로 설정함 (표 21). 일반적인 발효유의 유통기한은 10 ~ 15 일 설정하여 판매되고 있음. SNUG50430는 생균수가 최소 10주 이상 유지됨에 따라 2가지 타입의 모두 첨가 균주로 사용시 산업화가 가능하다고 판단됨.

표 20. 액상농축종균의 유통안정성 실험결과

구분	기준	3주 후	6주 후	9주 후	12주 후
유산균수	1×10^{10} cfu/mL 이상	9.2×10^{10}	7.3×10^{10}	4.1×10^{10}	1.0×10^{10}
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성
성상	고유의 색택과 향미를 가지며, 이미·이취가 없어야 한다.	적합	적합	적합	적합
이물	없어야 한다.	적합	적합	적합	적합

표 21. 분말중균의 유통안정성 실험결과

구분	기준	0개월	1개월	3개월	6개월	9개월	12개월	13개월
유산균수	1×10^{11} cfu/mL 이상	1.29×10^{12}	7.70×10^{11}	6.49×10^{11}	3.85×10^{11}	2.00×10^{11}	1.18×10^{11}	9.87×10^{11}
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
성상	고유의 색택과 향미를 가지며, 이미·이취가 없어야 한다.	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
이물	없어야 한다.	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

5. 기능성 균주의 발효유 제품 적용 가능성 검토

- 기존 당사의 Stater로 사용중인 *Streptococcus thermophilus*의 배양을 위해 당사의 우유 배지 배양조건으로 배양 후 「식품의 기준 및 규격」 18. 유가공품 18-4 발효유류, (2) 농후 발효유 규격에 근거하여 품질검사를 진행함.
- 우유배양액에 78%에 시럽 20%를 첨가한 제품액에 기능성균주 2%의 혼합 후 30일동안 「식품의 기준 및 규격」 18. 유가공품 18-4 발효유류, (2) 농후발효유 규격에 근거하여 품질검사를 진행함.
- 기존 당사의 Stater로 사용중인 *Streptococcus thermophilus*의 배양을 위해 당사의 우유 배지 배양조건에서 배양 후 품질 검사를 진행한 결과, 품질지표에는 특이사항이 발생하지 않았음. 제품화의 적합한 배양액이라고 판단됨 (표 22).

표 22. 배양액 배양 연구 결과

공정단계	생균수	무게 (g)	총 생균수	비고
	CFU/mL or g			
배양 9시간	5.30×10^8	4,000	2.12×10^{12}	

- 당사의 배양액과 액상 농축 중균 및 분말 중균을 혼합 후 「식품의 기준 및 규격」 18. 유가공품 18-4 발효유류, (2) 농후발효유의 규격 (표 23)에 따라 30일차 까지 검사를 진행함. 기능성 유산균수 규격이상 유지됨을 확인함. 관능 및 성상에서도 차이식별 불가함. 액상농축 및 분말 제품을 혼합 후에도 제품화가 가능할 것으로 판단됨 (표 24, 25).

표 23. 혼합액의 품질지표 검사 기준

번호	항 목	기 준	시험 방법	비고
1	성상	고유의 색택과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없어야 한다.	제7. 일반시험법 1.1 성상	법적규격
2	이물	이물을 함유하여서는 아니된다. 금속성 이물로서 10.0 mg/kg 이상 검출 되어서는 아니 되며, 또한 금속 이물은 2 mm 이상 검출되면 아니 된다.	제7. 일반시험법 1.2 이물	법적규격
3	대장균	음성	제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.8 대장균	법적규격
4	기능성 유산균	1.0×10^8 (cfu/mL) 이상	제7. 일반시험법	법적규격

표 24. 액상종균 혼합 후 품질지표 검사 결과

	관능	성상	이물	대장균	SNUG50430
1일차	적합	적합	적합	ND	7.50×10^8
7일차					5.96×10^8
13일차					5.17×10^8
19일차					4.86×10^8
25일차					3.11×10^8
30일차					2.15×10^8

표 25. 분말종균 혼합 후 품질지표 검사 결과

	관능	성상	이물	대장균	SNUG50430
1일차	적합	적합	적합	ND	1.25×10^{10}
7일차					9.27×10^9
13일차					6.52×10^9
19일차					5.14×10^9
25일차					3.24×10^9
30일차					1.75×10^9

6. 기능성 균주 및 기능성 소재 적용 제품 대량생산 공정 구축

- 당사의 현재 생산하고 있는 다양한 발효유 제품 중 소비자의 선호도가 가장 높은 농후발효유 타입에 소재 및 기능성 유산균의 적용이 적합하다고 판단됨.
- 시제품 제작은 제작된 공정도를 기본으로 연구소 내 파일럿 설비를 이용하여 진행하였으며 단맛 신맛 깔끔한 맛 3가지 기준으로 진행하였음. 3가지 제품에 대해서 비교 관능도 진행하였다. 총 7점 척도로 진행 하였음.
- 당사의 현재 생산하고 있는 다양한 발효유 제품 중 소비자의 선호도가 가장 높은 농후발효유 타입의 발효유에 소재 및 기능성 유산균의 적용이 적합하다고 판단되어 당사 공정도에 적용할 수 있는 공정도를 작성함 (그림 102, 103, 104)

○ 성인용 발효유

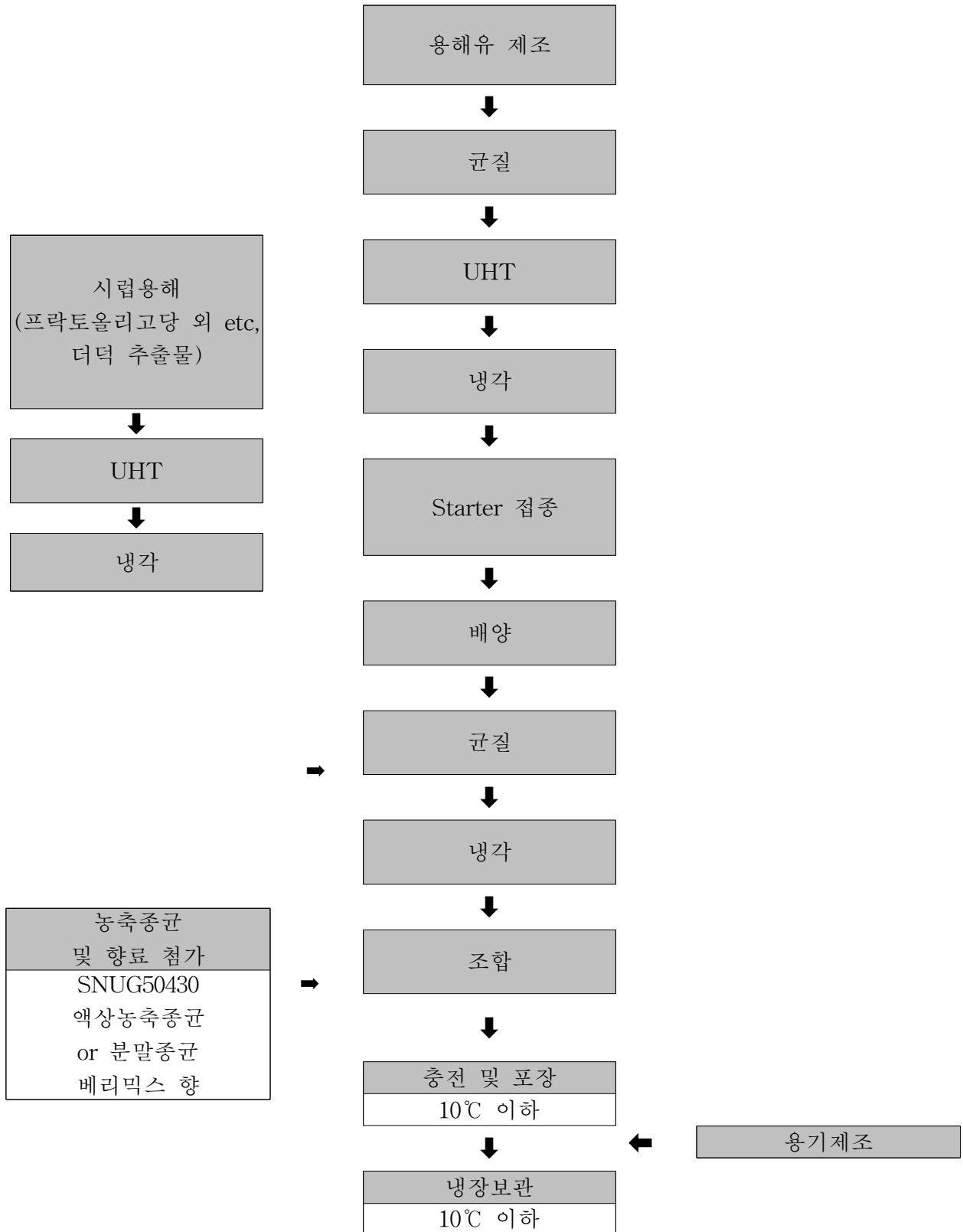


그림 102. 성인용 농후발효유 타입 발효유 제조 공정도

○ 여성용 발효유

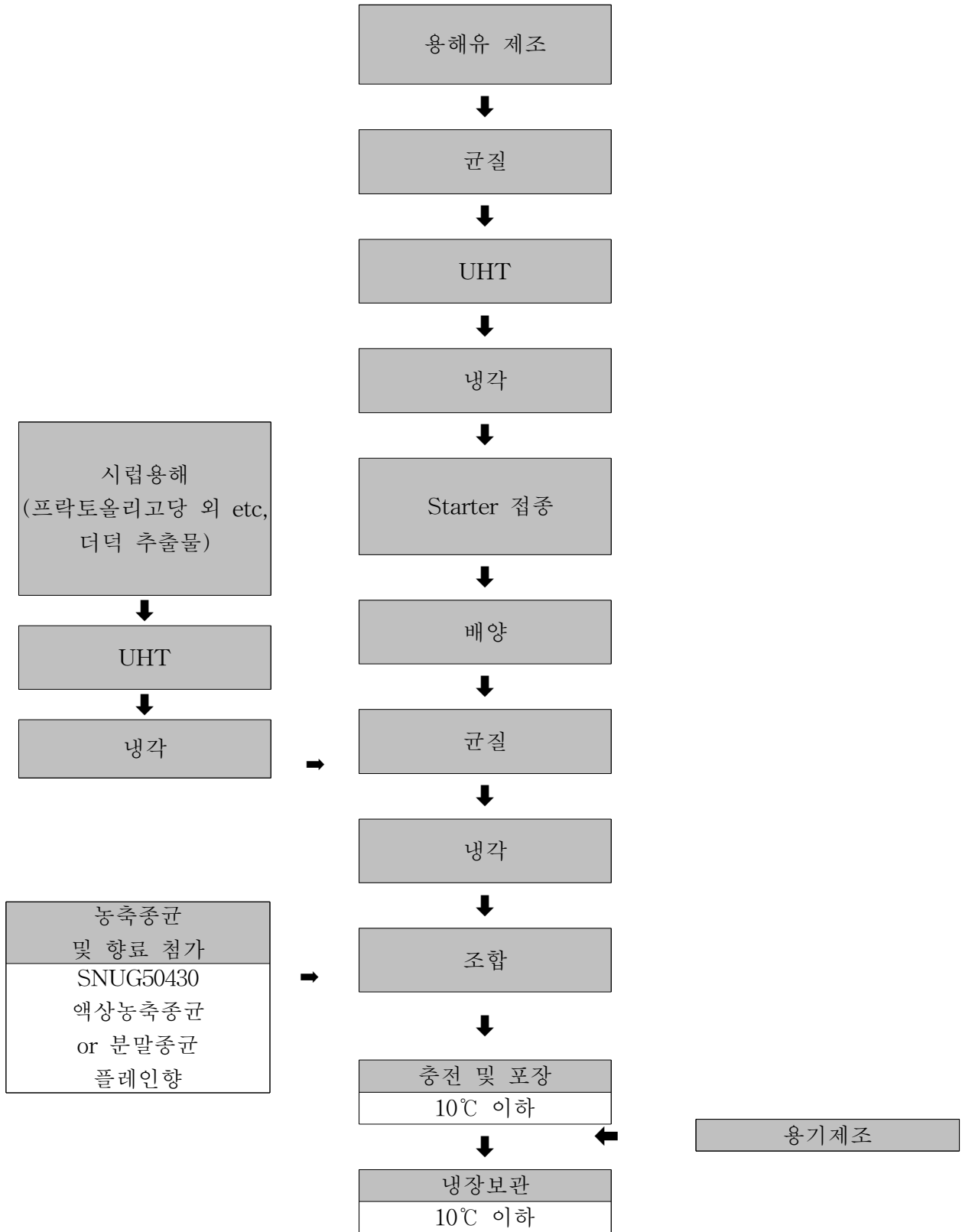


그림 103. 여성용 농후발효유 타입 발효유 제조 공정도

○ 어린이용 발효유

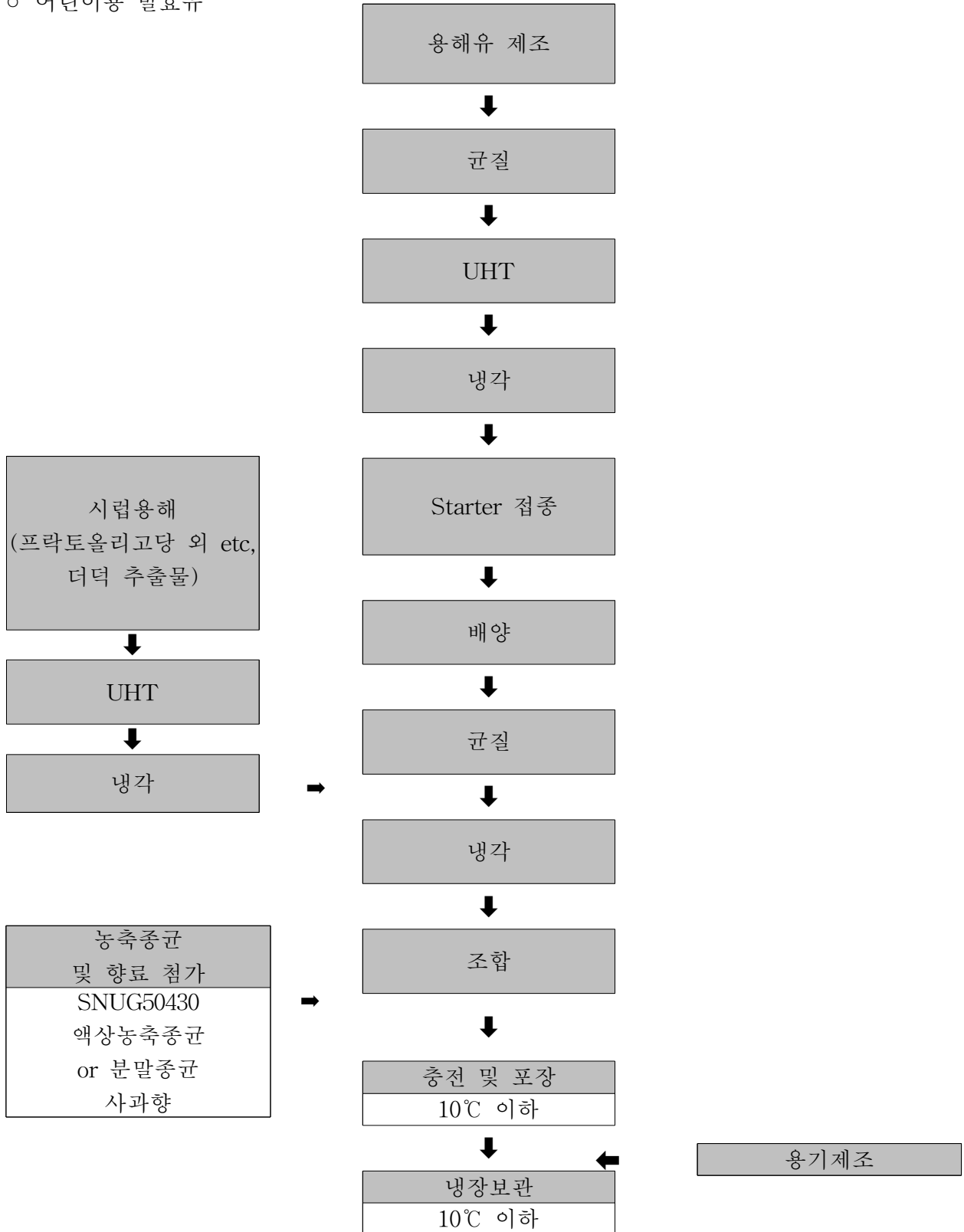


그림 104. 어린이용 농후발효유 타입 발효유 제조 공정도

- 파일럿 설비를 이용하여 시제품을 제작함 (그림 105, 106, 107)



그림 106. 성인용
농후발효유 시제품



그림 107. 여성용
농후발효유 시제품



그림 108. 어린이용
농후발효유 시제품

- 총 50명으로 대상으로 진행을 하였으며 7점 척도 중 성인용 5.24, 여성용 5.24, 어린이용 5.39로 모두 기준인 5.0 이상으로 관능점인 점수는 우수한 것으로 판단됨(그림 108).

성별, 연령에 따른 관능 평가				
전반적 만족도	(Base)	액상 음용시		
		성인용	여성용	어린이용
전체	(50)	5.42	5.34	5.29
성인	(15)	5.13	5.27	5.13
여성	(25)	5.72	5.56	5.84
어린이	(10)	5.42	5.20	4.90

근거: 관능 조사(n=50)

그림 108. 성별, 연령에 따른 관능 평가

- 총 50명으로 대상으로 진행을 하였으며 제품에 따른 연령대별 선호도를 확인한 결과 성인용과 여성용 제품이 우세한 것으로 확인됨. 추가적으로 2제품에 대해서 선호도 검사를

진행 한 결과 성인용 제품이 높음을 확인 하였다. 본 조사를 바탕으로 제품을 출시 시 성인용 제품의 선호도가 높음으로 제품 생산계획에 반영 예정임.(그림 109).

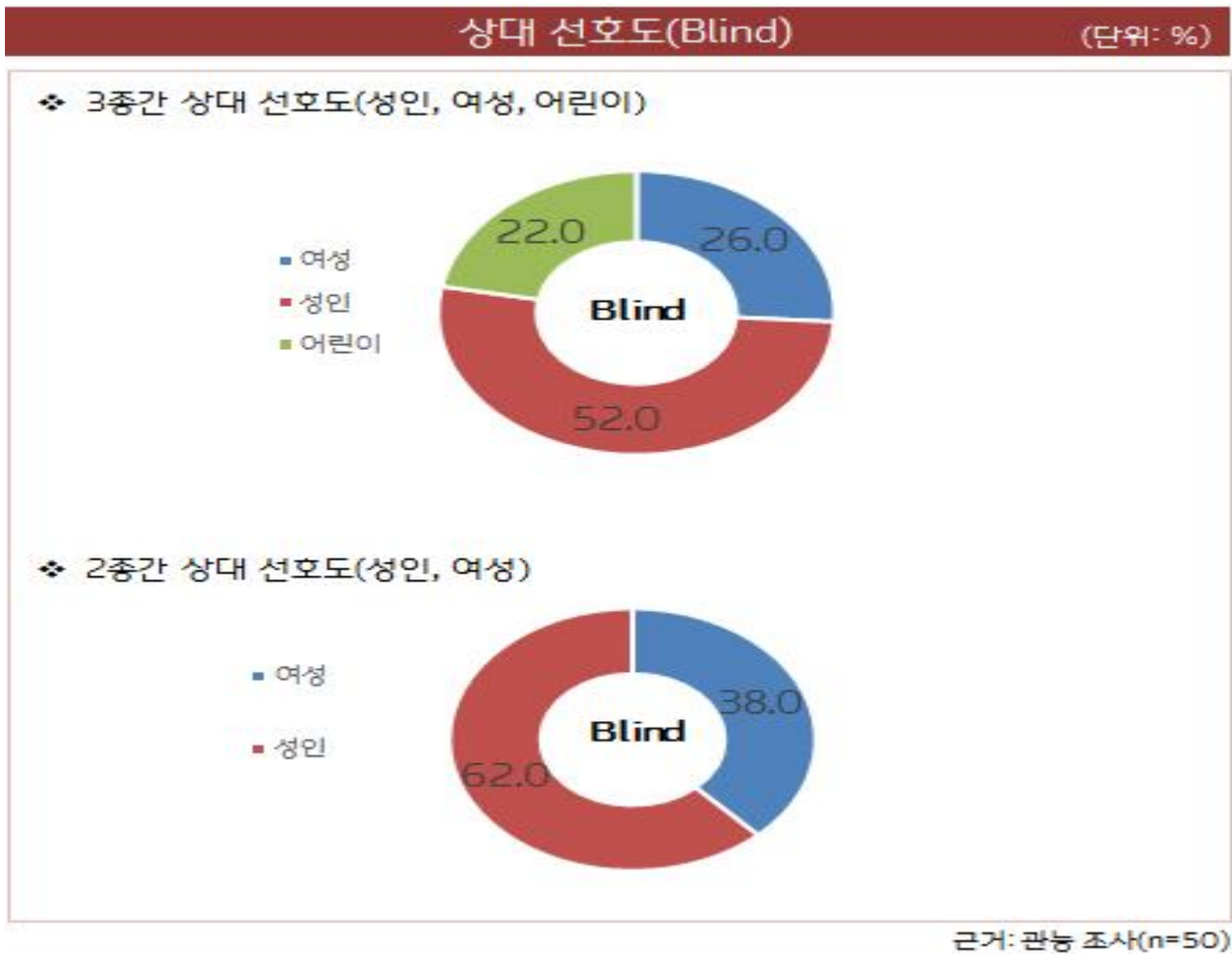


그림 109. 제품에 따른 상대 선호도 검사

7. 관리 표준화를 위한 기능성분 설정 및 시험법 확보

- 「식품의 기준 및 규격」 18. 유가공품 18-4 발효유류에 따른 규격 설정을 진행함.
- 소비자의 연령대에 맞추어 제작한 시제품을 근거로 품질규격서를 작성함 (표 26).
- 농후발효유의 발효유 규격서를 작성하였으며, 「식품의 기준 및 규격」 18.유가공품 18-4 발효유류, (2) 농후발효유 규격에 따라 작성하였으며, 제품의 기본적인 향과 맛에 관여하는 기준은 당사 관리기준으로 설정하여 관리함.

표 26. 농후발효유 type 발효유 규격서

번호	항 목	기준			시험 방법	비 고
		성인용	여성용	어린이		
1	성상	고유의색택과 향미를 가진 액상으로서 이미 · 이취가 없어야 한다.	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	법적규격*
2	이물	이물을 함유하여서는 아니 된다. 금속성 이물로서 10.0mg/kg 이상 검출되어서는 아니 되며, 금속이물은 2mm 이상 검출되면 아니 된다.	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	법적규격**
3	pH	4.50 ± 0.1	좌동	좌동	자사 시험법 5019	참고규격
4	적정산도(%)	0.76 ± 0.02	좌동	좌동	자사 시험법 5014 자사 시험법 5024	관리규격
5	당도(Brix°)	16.68 ± 0.20 (0.45 μ m filtered)	좌동	좌동	자사 시험법 5003	관리규격
6	비중	1.0720 ± 0.003	좌동	좌동	자사 시험법 5023	관리규격
7	총유산균수 (기능성 유산균) 써모필러스 (cfu/ml)	5.0 × 10 ⁸ 이상 (1.0 × 10 ⁸ 이상) 5.0 × 10 ⁸ 이상	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	관리규격 (법적규격*) 참고규격 참고규격 참고규격
9	대장균군(cfu/ml)	음성 (n=5,c=2,m=<3,M=10)	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	관리규격 (법적규격*)
10	진균수(cfu/ml)	음성	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	관리규격
11	살모넬라	n=5, c=0, m=0/25g	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	법적규격*
12	리스테리아모노 사이토제네스	n=5, c=0, m=0/25g	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	법적규격*
13	황색포도상구균	n=5, c=0, m=0/25g	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	법적규격*
14	방사능 기준 (Bq/kg, L)	131I (100이하), 134Cs + 137Cs (370이하)	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	법적규격****
15	멜라민(mg/kg)	2.5 이하	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	법적규격*****
16	내용량(ml)	150.0 ± 2.0 (143.25 이상)	좌동	좌동	시험법 5712	관리규격 (법적규격***)

번호	항 목	기준			시험 방법	비 고
		성인용	여성용	어린이		
17	잔류농약(ppm)	허용치 이하 (유가공품 기준)	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	법적규격*****
18	동물용의약품 (mg/kg)	허용치 이하	좌동	좌동	식품의 기준 및 규격	법적규격*****

* 식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처 고시) 제4. 식품별 기준 및 규격, 18. 유가공품, 18-4 발효유류

** 식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처 고시) 제2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격, 3. 식품일반의 기준 및 규격, 2) 이물

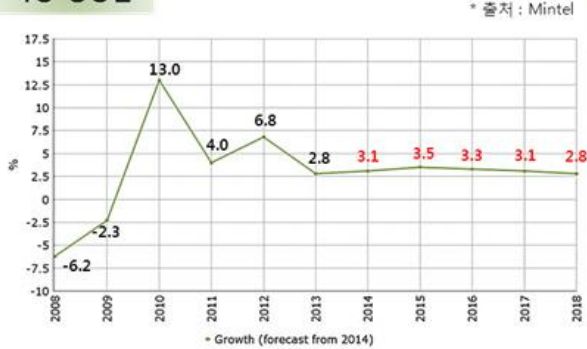
*** 축산물의 표시기준(식품의약품안전처 고시), 제10조 중량 등의 허용오차, [별표2] 표시된 양과 실제 량과의 부족량의 허용오차(제10조관련)

4절. 제품 및 시장 분석

1. 생산 및 시장현황

국내 발효유 시장 현황

시장 성장률



발효유 생산 및 소비량

(단위: 톤)

	2010	2011	2012	2013	2014	
생산	액상발효유	373,322	393,214	444,753	456,571	463,911
	호상발효유	129,282	126,791	112,886	117,101	108,507
	수입(액상)	79	108	120	198	282
	수입(호상)	3	27	4	2	35
계	502,686	522,140	557,763	573,872	572,735	
소매	액상발효유	367,454	389,703	438,740	449,737	458,911
	호상발효유	129,252	126,984	112,855	117,173	108,158
	수출(액상)	5,369	5,349	6,100	6,395	6,208
	수출(호상)	2	0	20	38	147
계	502,077	522,036	557,715	573,343	573,424	

[자료: 농림축산식품부]

시장 점유율



- 발효유 시장은 2009년 이후 급성장 (건강/웰빙 지향적인 소비 트렌드 보편화)
- 시장 성장률은 향후 약 3% 수준에서 유지 될 것으로 전망
- 2014년까지 발효유 소비량은 꾸준히 증가, 증가율은 점차 감소
- 2013년까지 발효유 생산량은 증가 후 2014년 발효유 생산량 감소
- 액상발효유 생산/소비 증가 추세, 2014년도 호상발효유 생산/소비 감소
- 국내 발효유 시장 점유율은 '한국아쿠르트'가 업계 1위
- 그 외 기업이 15% 내외의 점유율 기록
- 2013년 분말 프로바이옥스의 급성장이 발효유 시장 성장률에 영향 미침

가. 국내 제품생산 및 시장 현황

국내 발효유 제품

발효유 제품 트렌드

- 기능성 probiotics + 기능성 소재 발효유 다양화
 - 액상 (1970년대): 장 건강
 - 호상 (1980년대): 장 건강
 - 드링크 (1990년대): 장 건강
 - 기능성 (2000년대 ~): 장 건강, 위 건강, 간 건강, 혈중 콜레스테롤 저하 등
- Low sugar
 - 저당 함유 제품 선호 (당줄이기 캠페인 - 한국아쿠르트)
- 기존 액상, 드링크, 호상 타입 외 아이스크림처럼 얼러먹는 타입의 제품 인기
- 유기농/무첨가 발효유 등 프리미엄 제품 성장
- 대용량 발효유, 그리스타일 발효유



- 국내 발효유 제품은 (주)한국야쿠르트 ‘월’ 출시 이후 기능성 발효유 제품 개발이 다양화되고 있음.
- 대부분 전통적인 발효유의 기능성인 장 건강을 기반으로 프리바이오틱스 첨가를 통해 더욱 기능성을 강화하고, 기능성 프로바이오틱스 및 기능성 소재의 첨가를 통해 위, 간 건강을 클레임한 제품이 출시되고 있는 실정.
- 파스퇴르의 경우, 핀란드의 콜레스테롤 조절 대표 브랜드인 베네콜을 국내도입.
- 다양한 종류의 과일 flavor 발효유, 무첨가 발효유, 그릭 스타일 발효유 등 제품 다양화.
- 연령 및 건강상태별 장내 균총 분석을 기반으로 한 제품은 없음.

국내 기능별 주요 발효유 제품

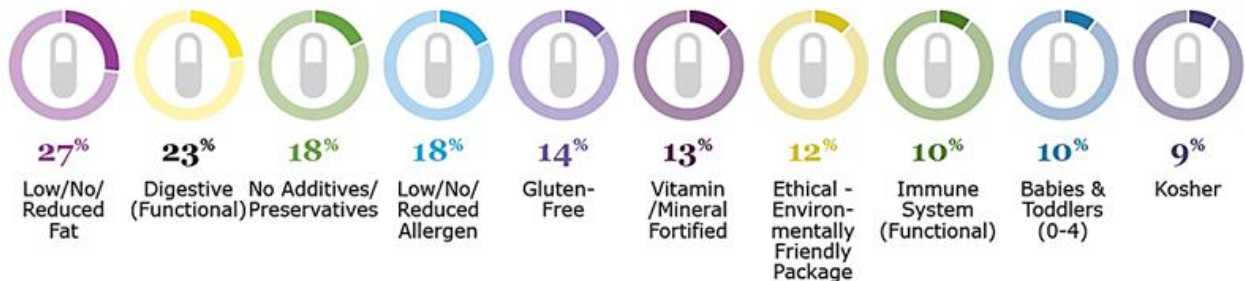
* 출처 : 각 사 홈페이지

 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 월 - 한국야쿠르트 - 클레임 : 위장 건강, 항 헬리코박터 <i>H. pylori</i> 억제 효능 특허유산균 2종 함유 자조기 추출물, 면역난황, 강화약속 등 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 프리미엄 쿠퍼스 - 한국야쿠르트 - 클레임 : 간 건강 건강기능식품 엿기나우 과병추출분말, 밀크씨슬 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 세븐 - 한국야쿠르트 - 클레임 : 장 건강 7종 프로바이오틱스 유산균 1000억 마리
 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 메치니코프 - 한국야쿠르트 - 클레임 : 장 건강 식이섬유 3종 (지커리식, 아카시아, 풀리엑스트로스), 자일로올리고당, 락투로스, 유당분해효소, 코카서스 유산균 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 간편안 구트 - 매일유업 - 클레임 : 간 건강 알코올 분해 효소 활성 우수 유산균 2종 함유 아세트알데하이드 분해 효소 활성 우수 유산균 	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 위편안 구트 - 매일유업 - 클레임 : 위 건강, 항 헬리코박터 항 헬리코박터 효능 유산균 3종 함유
 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 퓨어 - 매일유업 - 클레임 : 장 건강 LGG, BB-12 유산균 함유 타가토즈, 갈락토올리고당 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 자연의 시작 불가리스 - 남양유업 - 클레임 : 장 건강 복합 프로바이오틱스 유산균 프리바이오틱스 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 위력 - 남양유업 - 클레임 : 위 건강, 항 헬리코박터 <i>H. pylori</i> 억제 효능 특허유산균 1종 함유 L-glutamine (위벽 재생 도움) 함유
 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 베네콜 - 파스퇴르 - 클레임 : 혈중 콜레스테롤 개선 식물 스타놀 에스테르 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ Run - 신양초식품 - 클레임 : 장 건강 프로바이오틱스 유산균 LAFTI 함유 녹차카테킨, 유당분해효소 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 케어3 - 일동우디스 - 클레임 : 위, 장, 활력 위, 장, 활력 특허 유산균 2종 초유단백, 베타글루칸

Global 프로바이오틱스 함유 제품 동향

Top 10 claims associated in food and drink with probiotics, % of introductions, global, 2010-13

Note: 2013 includes January to September
Source: Mintel GNPD



나. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 국외 기능성 발효유 제품은 기능성 프로바이오틱스 및 프리바이오틱스 함유를 통해 장 건강 뿐 아니라 항 노화, 혈중 콜레스테롤 개선, 면역 증강, 단백질 강화 등 국내보다 다양한 카테고리 제품 출시.

국의 발효유 시장 현황

시장 성장률

* 출처 : Mintel (2014년 이후 예측치)

Region	Units	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Australia	%	0.6	7.4	2.9	4.6	1.5	1.5	2	2.1	2.2	2.2
China	%	11.2	13.7	24	21.1	16.5	14.6	11.3	10.5	9.8	8.5
India	%	7.7	6.6	7	5.5	6.7	6.3	6.2	6	5.6	6
Indonesia	%	8.2	6.6	9.7	10	9.5	8.2	10.5	9.9	10.4	10.3
Japan	%	0.3	4.9	-0.4	15.2	4.8	2.4	3.7	3.8	3.7	3.5
Malaysia	%	11.1	10	10	13.6	11	12.5	13	12.4	12.5	12.5
South Korea	%	-2.3	13	4	6.8	2.8	3.1	3.5	3.3	3.1	2.8
Vietnam	%	1.7	2	5	7	13	11.6	10.3	9.4	8.6	7.7
US	%	7.4	9	2.2	3.4	6.9	0.8	3.6	2.9	2.9	2.8
Canada	%		-1.6	1.6	3	2.9	3.7	3.2	3.7	3.4	3.9
Mexico	%		3.4	4.4	1.3	-1.5	4	2	1.9	2.6	1.1
Belgium	%	2.9	-0.5	-3.7	-1.2	-2.1	0.8	1.5	0.5	0.5	0.2
Denmark	%	4.6	-7.8	3.4	-2.9	0.6	1.7	2	2.7	2.8	2.8
Finland	%	1.1	4.1	2.7	-0.7	-2.4	-1	-0.6	-0.2	0.5	1.1
France	%	-1.4	5	0.3	-0.3	-2.6	1.1	-0.1	-0.1	-0.2	-0.2
Germany	%	-1.5	2	-0.3	-1.3	-2.1	-0.1	-0.6	-0.8	-0.8	-0.9
Italy	%		-0.8	2.5	1.7	-5.5	-2.1	-1.5	2.3	2	-0.5
Netherlands	%	-2.4	3	1	-3.8	-2.9	0.4	0.4	-0.1	-0.5	-0.5
Norway	%	9.3	5.5	0.8	2.1	7.1	2.6	5	5	4.9	4.8
Portugal	%	1.2	-0.4	-0.4	-1	-0.2	0.1	0	0.1	0.1	0.2
Spain	%	2.8	2.3	5.4	0.2	-0.2	0	1.9	1.9	1.8	3.4
Sweden	%	7	2.9	5.6	4.2	1.6	2.2	2.5	2.5	3	1.7
Switzerland	%	1.7	-0.8	1.5	-1.4	-1	0.8	0.2	1.3	1	1.5
Turkey	%	3.7	0.9	10.2	4.9	4	3.5	6.5	3.6	3.2	3.9
UK	%	1.2	1.8	-1.5	-1.7	0.7	0	-0.7	-0.3	-0.7	-0.6

- [아시아 시장]
- 말레이시아, 인도네시아를 중심으로 높은 성장을 지속할 것으로 전망 (약 10% 이상)
 - 일본과 호주, 한국의 경우 북중미 시장과 비슷한 성장률 나타냄
 - 북미, 서유럽과 비교할 때 발효유 시장 발전가능성 높음
- [북중미시장]
- 미국, 캐나다의 경우 약 3% 수준에서 성장률이 유지될 것으로 전망
 - 아시아와 비교할 때 발효유 시장 성장률이 낮음
- [서유럽시장]
- 덴마크와 노르웨이, 터키를 제외하면 아시아, 북중미 시장과 비교하여 그 성장률이 낮음
 - 프랑스, 독일, 이탈리아, 네덜란드의 경우 시장이 감소할 것이라 전망
- 1인당 발효유 소비량이 상대적으로 큰 서유럽 시장은 그 크기를 유지하거나 약간 감소할 전망이지만 아시아, 북중미의 경우 발효유 소비가 꾸준히 늘어 시장이 점차 성장할 것으로 전망

Figure 1: Launches of global food and drink products using both a prebiotic and a probiotic ingredient, by category, 2010-14*

Category	%
Dairy	67
Baby Food	21
Other Beverages	3
Snacks	3
Desserts & Ice Cream	3

*Note: 2014 includes January to October

Source: Mintel GNPD

Figure 2: Top five categories using probiotics in global product launches, 2010-14

Category	%
Dairy	71
Baby Food	10
Healthcare	5
Pet Food	4
Desserts & Ice Cream	2

Note: 2014 includes January to April













Source: Mintel

- Probiotics 함유 제품은 장 건강과 관련한 클레임이 23%를 차지하였으며, 면역 시스템 관련 클레임은 약 10%를 차지하였음
- 발효유 등 유제품 (71%)과 영유아 식품 (10%)이 probiotics 함유 제품 중 가장 높은 비율 차지
- Probiotics와 prebiotics 동시 함유 제품은 유제품이 67%, 영유아 식품이 21% 차지
- 발효유 외에도 프로바이오틱스 및 기능성 소재를 활용한 면역 기능 개선 제품이 출시되고 있음

- 연령별로는 유아용 발효유 제품, 심혈관질환 개선 및 항노화에 도움을 주는 성인 중년층 및 노년층을 타겟으로 한 제품이 출시.
- 연령 및 건강상태별 장내 균총 분석을 기반으로 한 제품은 없음.

프로바이오틱스 함유 발효유

* 출처: 각 사 홈페이지

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vaalia My First Yoghurt (Parmalat Vaalia, 호주) - 클레임 : 소화, 면역 - <i>L. acidophilus</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>Lactobacillus</i> GG 함유 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 불가리아 요거트 액티브 플러스 LB81 (메이지, 일본) - 클레임 : 양 노화 - 노화로 인한 대장 기능 약화 개선 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 베네콜 (핀란드) - 클레임 : 열중 콜레스테롤 개선 - Plant sterol 함유
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oatly (스웨덴) - 클레임 : 열중 콜레스테롤 개선 - 천연 귀리 요거트 - 칼슘 비타민 베타글루칸 함유 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pro-active (Flora) - 클레임 : 열중 콜레스테롤 개선 - Plant sterol 함유 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vaalia Sugar-Free Low Fat Probiotic Yogurt (Parmalat Vaalia, 호주) - 클레임 : 소화, 면역
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Abbott Pediasure Vanilla Delight Flavored Nutritional Powder (Abbott Laboratories, 싱가포르) - 클레임 : 소화, 면역, 프리바이오틱 - 프락토올리고당 함유 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nestlé Orange and Mango Flavor (Nestlé, 베트남) - 클레임 : 소화, 면역 - 유아용 씨리얼+요거트 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sütas baby mix plain spoonable yogurt for babies (Sütas, 터키) - 클레임 : 소화, 면역, 프리바이오틱 (이눌린)
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LB-21 Cultured Milk Drink (Junlebao Dairy, 중국) - 클레임 : 소화, 프리바이오틱 - <i>S. thermophilus</i>, <i>L. bulgaricus</i>, <i>L. acidophilus</i>, <i>Bifidobacterium</i> LB-21 프리바이오틱 (자일로올리고당 함유) 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Powerful Yogurt (Powerful men, 미국) - 클레임 : 단백질 강화, Natural - 7종 유산균 함유, 글루텐 free 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Premium Vanilla Bean Frozen Yogurt (Twin Cups Proyo, 미국) - 클레임 : 프리바이오틱, 단백질 강화 - 프리바이오틱 (이눌린) 함유

2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

가. 산업화 방향 (제품의 특징, 대상 등)

- 개발 대상 소재 및 이를 기반한 제품은 ‘연령별, 건강상태별 장내 균총 미생물총 밸런스 개선 및 장관면역 증진’ 기능성을 특징으로 함. 또한 인공적 합성 원료가 아닌 천연물 유래 또는 인체 및 식품 유래 소재이기 때문에 소재에 대한 거부감이 매우 낮을 것으로 기대됨.
- 위와 같은 특징을 기초로 하여 다음과 같은 산업화의 방향을 생각해 볼 수 있음. 먼저 소재의 가장 중요한 특징인 장내 미생물총 밸런스 개선 및 장관면역 증진 기능성 활용에 있어서 다양한 기능성 발효유, 우유 및 건강 기능성 식품의 개발을 목표로 함. 또한 기존 유사 면역증진 기능성 소재들과의 복합을 통한 시너지 효과를 나타내는 제품 개발, 장내 미생물총의 불균형에서 발생하는 다양한 질환의 예방 및 개선에 활용 가능할 것임. 나아가서는 연령별 균총 표준화 및 기능성 소재 발굴을 통해 각 연령대에 요구되는 기능성 제품 개발에 활용할 수 있음. 예를 들어, 영유아의 경우 면역개선을 통한 아토피 질환 예방 및 개선, 청소년의 경우 여드름 등 피부질환 개선, 성인 노년층의 경우 항노화 제품에 이르기까지 그 활용범위는 실로 광범위하리라 기대됨.
- 개발 제품의 특징 및 대상 요약

타겟층	영유아	청소년	성인 중년	노년
제품 특징	건강한 한국인 영유아의 표준 장내 균총 개선 및 면역증진을 유도할 수 있는 소재 함유	건강한 한국인 청소년 또는 영유아의 표준 장내 균총 개선 및 면역증진을 유도할 수 있는 소재 함유	건강한 한국인 성인 중년층 또는 청소년 또는 영유아의 표준 장내 균총 개선 및 면역증진을 유도할 수 있는 소재 함유	건강한 한국인 노년층 또는 성인 중년층 또는 청소년 또는 영유아의 표준 장내 균총 개선 및 면역증진을 유도할 수 있는 소재 함유
응용	- 면역력 증진 - 장질환 개선 - 아토피/알러지 완화	- 면역력 증진 - 장질환 개선 - 여드름 완화 등 뷰티 제품	- 면역력 증진 - 장질환 개선 - 항노화(혈행개선 등) - 활력	- 면역력 증진 - 장질환 개선 - 항노화(뇌질환예방) - 활력

- 본 연구개발 성과물인 연령 및 건강상태별 맞춤형 발효유 제품 및 맞춤형 소재는 우유 소비 및 발효유 소비가 둔화되고 있는 현시점에서 낙농가의 소득 창출 및 유가공 산업의 신성장동력으로서 중요한 역할을 수행할 수 있을 것임.
- 고급 프리미엄 산업이 더욱 활성화될 것으로 예측되는 머지않은 미래에 개인 맞춤형

제품으로 응용발전이 가능하며 프리미엄 제품을 선호하는 소비계층을 위한 차별화된 제품군을 제공할 것으로 여겨짐. 이는 개인 장내 균총 검사 서비스 산업 발전 등 중장기적으로 다양한 부가가치가 창출되어 유가공 산업 뿐 아니라 식품산업 전반, 영유아산업, 항노화산업, 고령친화산업 등 미래산업 발전에 큰 영향을 미칠 것으로 기대함. 또한 소재 자체의 개발과 수출뿐만 아니라 기술 수출 등 다양한 시도가 가능하며 이를 통한 국가경제발전에 이바지할 것임.

- 이상과 같은 산업화는 식품 전반에 대한 이해와 해당 소재 개발 노하우 및 이를 활용한 시장 마케팅 역량 등 다양한 기업 역량을 요구함. 당사 및 당사의 중앙연구소는 이와 같은 분야에 대한 기반 역량을 지니고 있으며, 이의 확대 적용을 위한 네트워크를 보유하고 있어 이 같은 산업화에 매우 유리한 위치를 점하고 있음.

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	3,000	4,000	5,000	5,000	5,000	22,000
경제적 파급효과	5,000	6,000	7,000	7,000	7,000	32,000
부가가치 창출액	10,000	12,000	14,000	15,000	15,000	66,000
합 계	18,000	22,000	26,000	27,000	27,000	120,000

- 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

3. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

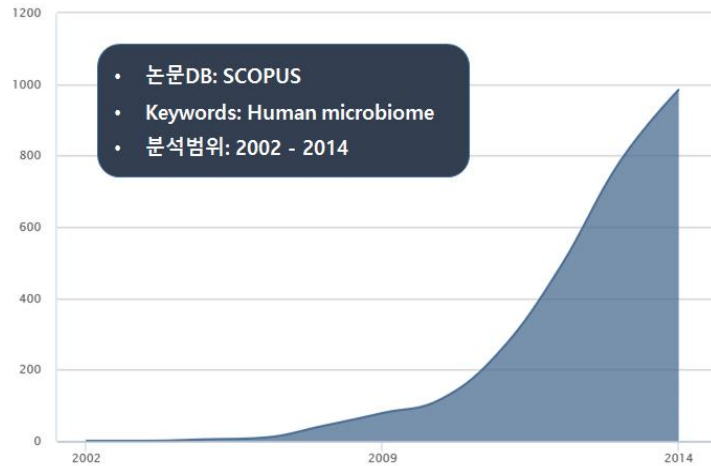
가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

(1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 장내 균총 변화와 인체 면역질환과의 상관관계를 바탕으로 특정 질병을 진단하거나, 프로바이오틱스 혹은 프리바이오틱스를 개별로 이용하여 이를 개선하는 방법에 치중되어 있거나, 혹은 천연물 등으로부터 유래하여 장내 균총변화를 유도하는 방법 등이 아주 드물게 출원되고 있음.
- 특정 연령별 장내 균총 라이브러리를 기반한 제품개발에 대한 방법이나, 프로바이오틱스 및 프리바이오틱스 제품을 동시에 적용하여 장내 균총의 변화를 유도하는 방법에 대한 특허는 거의 없음.
- 따라서 본 연구과제의 프로바이오틱스 및 천연 프리바이오틱스 혼합모델을 바탕으로 연령별, 건강상태별 장내 균총 개선하는 기능성 식품조성물 특허를 국내외에 출원할 계획임.

(2) 논문분석 측면

- 인체 마이크로비옴과 관련한 논문은 metagenomics 분석이 활성화되기 시작하면서 최근 10년간 급속도로 늘어나고 있음.
- 기존 논문은 Rob Knight, Curtis Huttenhower, 등의 과학자를 중심으로 주로 인체 장내 미생물총의 유의적 변화를 생물정보학적으로 해석하기 위한 metagenomics 분석 분야에 치중되어 있거나, 혹은 장내 미생물총의 불균형이 각 질환에 미치는 연관성을 찾아내고 무균 동물모델 등을 이용하여 이를 입증하는 것에 국한되어 있음.



- 장내 미생물 연구분야에 있어서 화학자들의 참여는 아직 활성화되지 않은 상황이며 향후 장내 미생물 관련 대사체를 연구하는 microbiome-related metabolomics 연구와 장내 미생물 유래 기능성 단백질에 초점을 맞추는 metaproteomics 분야의 중요성이 부각될 것으로 여겨짐.
- 장내 미생물총 개선 효과가 있는 기능성 소재에 대한 제품화 연구가 부족한 상황이며 이에 대한 임상시험이 요구되고 있음. 따라서 본 연구과제를 수행함에 있어 생화학 기반 마이크로비옴 연구, 장내 미생물 맞춤형 제품화 연구와 관련하여 논문을 발표할 계획임.

(3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과, 국외 발효유 시장은 아시아를 중심으로 발전하고 있으며, 북미지역에서도 꾸준히 성장하고 있음. 발효유의 기본적인 효능인 장 환경 개선에 더해 프로바이오틱스 및 기능성 소재를 첨가함으로써 혈중 콜레스테롤 조절, 면역력 개선, 항노화, 단백질 강화 등 다양한 클레임의 제품이 출시되고 있음. 국내시장의 경우 전반적으로 성장 정체기를 맞고 있는 시점에서 (주)한국야쿠르트의 ‘윌’의 성공을 시작으로 다양한 기능성 발효유가 생산 판매되고 있지만 대부분 위 건강, 간 건강 클레임에 편중되어 있고 일부 해외 스타균주 첨가를 통해 장내면역 증진 효능을 부여하고 있음.
- 최근 인간 장내 미생물총과 건강상태에 관련한 국내외 연구가 활발히 진행되고 있으며, 실제로 밀접한 연관성이 규명되고 있음. 따라서 본 연구과제에서는 장내 미생물총 분석 연구를 기반으로 한 발효유 제품 개발을 목적으로 제품의 타겟을 과학적으로 세분화하여 연령 및 건강상태별로 한국인의 장내 미생물총을 분석하고 한국인에 적합한 장내 미생물총을 그룹별로 표준화함으로써 각 연령대에 적합한 이상적인 장내 미생물총 밸런스 개선 및 장관 면역을 증진시킬 수 있는 균주와 천연 프리바이오틱스 소재를 개발하고, 해당 소재를 함유한 맞춤형 발효유 제품을 생산하여 제품 및 소재를 국내 및 국외에 판매할 계획임.

5절. 향후 사업화 계획 및 예상 매출 실적

1. 생산 계획

가. ㈜고바이오랩

구분		(2020 년) 개발 종료 후 1년	(2021 년) 개발 종료 후 2년	(2022 년) 개발 종료 후 3년
국 내	시장점유율 (%)	1	3	5
	판매량 (단위: 60 capsules/bottle)	50,000	150,000	250,000
	판매단가 (원)	50,000	50,000	50,000
	국내매출액 (백만원)	2,500	7,500	12,500
해 외	시장점유율 (%)	-	-	0.001
	판매량 (단위: 60 capsules/bottle)	-	-	50,000
	판매단가 (\$, \$=1,200원 기준)	-	-	42
	해외매출액 (백만\$)	-	-	2.1
당사 생산능력 (단위: bottle)		100,000	300,000	600,000

나. ㈜한국야쿠르트

구분		(2020 년) 개발 종료 후 1년	(2021 년) 개발 종료 후 2년	(2022 년) 개발 종료 후 3년
국 내	시장점유율 (%)	0.3	0.4	0.5
	판매량 (단위: 만개)	200	266	333
	판매단가 (원)	1500	1500	1500
	국내매출액 (백만원)	3,000	4,000	5,000
당사 생산능력		전체 발효유 약 500톤/일	전체 발효유 약 500톤/일	전체 발효유 약 500톤/일

2. 투자 계획

가. ㈜고바이오랩

(단위 : 백만원)

항목		(2020 년) 개발 종료 후 1년	(2021 년) 개발 종료 후 2년	(2022 년) 개발 종료 후 3년
매출원가		500	1,500	3,004
판매관리비2)		750	2,250	4,506
자본적 지출	토지	2,000	-	-
	건물/건축물	2,000	2,000	-
	기계장치등	2,000	2,000	2,000
자본적지출 합계		7,250	7,750	9,510

- 매출원가 (총 매출액의 20% 상정)
- 판매관리비 (총 매출액의 30% 상정)
- 토지 (시외권으로 GMP 시설 구축 가정시, 최초 공장부지 확보 형태로 20억)
- 건물/건축물 (건물 신축 등, 20억/년, 2년 내 완공 형태로 총 40억)
- 기계장치 등 (GMP 생산 능력이 확충되는 2021년 이후, 대용량 배양 시설 및 제품생산라인 확충 등에 20억원/년 수준 유지)

3. 사업화 전략

가. ㈜고바이오랩

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> o 상용화 형태 : 기능성 프로바이오틱스 (또는 조합) 원말 또는 기능성 및 생착성을 고려하여 특수히 설계, 조제한 경구형 캡슐 제품 : 필요시 추가적으로 면역 기반 기능성 소재들의 혼합을 통한 시너지 효과를 꾀하는 제품 제시 o 수요처 : : 약국 및 백화점을 포함한 건강기능식품 소매점, 인터넷 쇼핑몰 등 o 예상 단가 : 50,000원/병 (60 캡슐) o 개발 투입인력 및 기간 : ~ 2022년 (개발 완료 후 3년) 내 시장 정착 완료 : 박사급 인력 3명, 학/석사급 인력 5명 이상 투입 예정

<p>상용화 능력 및 자원보유</p>	<p>o 국제적 수준의 마이크로비옴 분석 파이프라인 보유 : (주)고바이오랩은 다년간 축적해 온 연구 노하우를 기반으로 “임상시료 → 실험실 내 시료 처리 → 데이터 생산 → 대용량 유전체 분석 → 생물학적 기능성 마커 발굴”에 이르는 국제적 수준의 마이크로비옴 분석 파이프라인을 하드웨어 및 소프트웨어 측면에서 모두 보유하고 있으며, 이는 즉 프로바이오틱스, 마이크로비옴 치료제 및 진단에서 필요한 마커 확보 및 효과 평가를 in-house에서 고효율로 수행할 수 있다는 것을 의미함.</p> <p>o 마이크로비옴 기능성 평가 및 최적화 파이프라인 확보 : 난배양성 미생물들을 대상으로 한 최적화된 배양 방법 및 생리학적 특성 확인 방안을 확립한 바 있으며, 균주 염기서열 분석 및 기능성 평가를 위한 효율적인 시스템 구축을 완료하여 보다 빠르고 효율적인 균주 분리/동정/생산 시스템을 갖추고 있음.</p> <p>o 국제적 수준의 연구 시설 및 기자재를 활용한 신속·정확한 미생물 기원 기능성 소재 확보 : (주)고바이오랩은 서울대학교 생명공학공동연구원을 주요 기반으로 하여 충분한 오픈랩 시설을 확보하고 있으며, QTOF, LC-MS/MS, ICP-OES 및 single-cell isolation system 등의 최신식 분석 장비들과 anaerobic chamber 및 대용량 발효기 등의 난배양성 미생물 분리-배양 시스템을 갖추고 있음. 이러한 국제적인 수준의 시설 및 기자재들을 기반으로, 본사는 마이크로비옴 및 미생물 기반 메타볼롬 (metabolome), 이뮤노믹스 (immunome) 등의 오믹스 연구들을 통한 신속·정확한 미생물 기원 기능성 소재 확보가 가능함.</p> <p>o 제품 상용화를 위한 다양한 산학기반 확립 : 제품의 공인 인증 및 임상 실험, 대량 생산, QA/QC, 유통 등의 상용화 진행과 관련한 협력기관 및 업체들을 확보하여, 필요시 아웃소싱 등을 적절히 선택/진행할 수 있는 기반을 확립함. 아울러 제품 연구 개발 등에 대한 전반적인 자문을 수행할 산학 내 전문가들을 다수 확보한 바 있음.</p>
<p>상용화 계획 및 일정</p>	<p>o (주)고바이오랩의 사업화 추진 전략은 크게 2가지로, 기능성 원료의 L/O 및 완제품 생산/판매 등이 있음.</p> <p>o Plan A> L/O 모델 : 현재 시중에 유통되는 대부분의 프로바이오틱스 제품이 정장기능만을 타깃으로 하는 한계점이 있다는 것을 고려하였을 때, 장내 미생물총 밸런스 개선 미생물 소재는 시장 내 충분한 경쟁력이 있을 것으로 사료됨. : 이에 본 과제를 통하여 확보한 미생물 기능성 소재를 안정화하는 작업을 걸쳐, 그 균주 (또는 조합)을 다양한 회사로 L/O하는 전략을 고려하고 있음.</p> <p>o Plan B> 완제품 생산/판매 : 아울러 국내 기업과의 전략적 제휴를 통해 자체적으로 제품을 출시하는 전략 역시 고려하고 있음.</p>

	<p>: (주)고바이오랩은 프로바이오틱스 균주 GMO 시설을 보유하고 있는 종근당바이오와 인체 마이크로비옴 공동 연구를 위한 양해각서 (MOU)를 체결하는 등 보다 적극적인 사업파트너로서의 관계를 지속하고 있으며, 종근당 내 수개 핵심 계열사들과 기능성 프로바이오틱스 균주의 생산/판매에 대한 활발한 논의를 진행하고 있음.</p> <p>: 이에 기능성 원료 균주의 자체 생산/판매전략을 추진할 경우 제품의 제조-포장-판매에 이르는 핵심 생산/유통 루트 확보가 용이함.</p> <p>o (주)고바이오랩은 상단의 사업회 추진 전략을 적극적으로 고려하여, 과제 종료 이후 수년 이내에 시장내 일정 점유율을 확보함을 목표로 삼고 있음.</p>
--	---

나. ㈜한국야쿠르트

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> o 상용화 형태 : 일반 발효유류 등 B2C형태 유가공품 o 수요처 : 편의점, 대형마트, 백화점 및 방문판매 o 예상 단가 : 1500원선 o 개발 투입인력 및 기간 : 과제투입인원 약 20명/연간, 3년
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> o 발효유 등 유제품 전문 개발팀 및 다경험의 전문 연구원 보유 o 평택, 천안, 논산, 양산공장까지 4개의 발효유 생산 공장 보유
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> o 제품화 종료 후 소비자 검증 : 2019년 o 소비자 검증 및 과학성 자료 바탕으로 한 마케팅, 제품 출시 예정 : 2020년 o 판매 추이 검토하여 생산량 확대 등 결정 : 2021년 이후

4. 사업화를 위한 비즈니스 모델

가. (주)고바이오랩

(1) BM 수립 배경 및 핵심 경쟁 요인

- (주) 고바이오랩은 다년간 축적해 온 연구 노하우를 기반으로 “임상시료 → 실험실 내 시료 처리 → 데이터 생산 → 대용량 유전체 분석 → 생물학적 기능성 마커 발굴”에 이르는 국제적 수준의 마이크로비옴 분석 파이프라인을 보유하고 있으며, 이는 즉 프로바이오틱스, 마이크로비옴 치료제 및 진단에서 필요한 마커 확보 및 효과 평가를 in-house에서 고효율로 수행할 수 있다는 것을 의미함.
- 또한 난배양성 미생물들을 대상으로 한 최적화된 배양 방법 및 생리학적 특성 확인 방안을 확립한 바 있으며 이러한 연구를 위해 필요한 QTOF, LC-MS/MS, ICP-OES 및 single-cell isolation system 등의 최신식 분석 장비들과 anaerobic chamber 및 대용량 발효기 등의 난배양성 미생물 분리-배양 시스템을 갖추었음.

- 이에 본사는 마이크로비옴 및 미생물 기반 메타볼롬 (metabolome), 이뮤놈 (immunome) 등의 오믹스 연구들을 통한 신속 · 정확한 미생물 기원 기능성 소재 확보가 가능하며, 보다 빠르고 효율적인 균주 분리/동정/생산 시스템을 통해 충분한 기능성 제품 생산이 가능함.
- 인체의 건강에 있어 장내 미생물총 균형이 매우 중요하다는 것은 익히 알려져 있으며, 이에 본사는 발전된 마이크로비옴 분석 시스템을 바탕으로 기능성 소재 발굴 및 제품화에 박차를 기하고자 함.
- 본 과제를 통해 확보한 제품은 향후 충분한 시장성을 확보할 수 있을 것으로 기대하며, 바이오/식품 산업 발전에 충분한 기여를 할 수 있을 것이라 기대됨.

(2) BM 목표

- 장내 균총 분성에 기반한 연령별 균총 표준화 및 기능 개선 미생물 소재 발굴
- 각 미생물 소재들에 대한 충분한 과학적 기반 확보
- 확보한 미생물 소재에 대한 확고한 L/O 모델 구축
- 기능적인 측면에서의 차별화된 제품을 통한 시장 점유율/고객충성도 확보



(주)고바이오랩 SWOT



그림 110. (주) 고바이오랩의 기업 SWOT 분석

(3) 사업화 추진 전략

- **<PLAN A>** 기능성 원료로 개별인정 취득 후 L/O 추진
 - 현재 시중에 유통되는 대부분의 프로바이오틱스 제품은 고시형 균주들의 혼합을 통해 일반적인 기능성 (정장제)만을 타깃으로 하는 제품이라는 한계가 있음.
 - 본 과제에서 선별된 균주들의 경우 장내 마이크로비옴 균형 회복 및 면역기능과 관련한 차별화된 기능성을 확보한 후, 주요 업체들에 대한 균주 자체의 licensing out을 시도하고자 함.
 - 관련한 기능성을 주장할 수 있는 주요 프로바이오틱스 소재들이 부재한 현 시장 상황에서, 본 소재에 대한 수요는 향후 제품의 고급화, 기능성화의 경향과 맞물려 크게 증가할 것으로 예상되며, 이에 충분한 L/O모델 구현이 가능할 것으로 사료됨.

- <PLAN B> 국내 기업과의 전략적 제휴를 통한 자체 제품 생산/판매
 - 서울대학교에서 발굴하고, 그 가능성을 입증한 프로바이오틱스 소재의 시장적 측면에서의 가능성은 상당하다고 판단됨.
 - (주)고바이오랩은 프로바이오틱스 균주의 생산시설을 보유하고 있는 종근당바이오와 인체 마이크로비옴 공동 연구를 위한 양해각서 (MOU) 체결하였으며, 종근당 내 수개의 핵심 계열사들과 향후 기능성 프로바이오틱스 균주의 생산 및 판매에 관한 활발한 논의를 진행하고 있음.
 - 따라서, 기능성 원료 균주의 자체 판매 전략을 추진할 경우 역시 제품의 제조 - 포장 - 판매에 이르는, 핵심 생산/유통 루트 확보가 상당히 용이한 상황임.

(4) 수익확보 전략

- 산업화 생산 공정 시스템 확보
 - 최적 동선의 제조시설을 구축하는 동시에, 전 공정간 오염방지시설을 확보하여 안전성을 확보한 생산시설을 구비할 예정임.
 - 동결 건조 또는 캡슐화를 마친 미생물 균주들을 안전하게 구분/보관이 가능한 보관시설을 구비할 예정임.
 - 생산 및 보관 등 전 공정에 대한 검증시스템의 확립 역시 수행할 예정임.
- 기능성 균주의 기능성 및 CMC 자료 확보
 - 균주의 표준화 및 기능성 관련 데이터들을 공인시험기관을 통하여 확보함.
 - 비임상시험 관리기준에 의거한 안전성 및 안정성, 유효성 평가를 수행할 예정임.
 - 장기보존시험 등의 안정성 평가 및 유효성 평가 역시 실시하여, 균주의 신뢰성을 확보함.
- 지식재산권 확보 전략
 - 본 과제에서 개발된 기능성 전략 균주들은 균주 특허 및 용도 특허 출원이 가능할 것으로 보이며, 이에 균주 발굴 및 최적화 후 동시 확보를 목표로 함.
 - (주) 고바이오랩은 본 연구 과제 기획 전 프로바이오틱스 관련 특허정보 분석 및 특허맵 확보 등을 선수행함으로써, 가치 있는 특허의 확보를 위한 기반을 다짐. 이러한 기반 정보는 향후 R&D 기획에서 상품화에 이르는 기술사업화 전주기 과정상에서 발생하는 주요한 의사결정들에 있어 참조할 수 있는 가이드로 활용할 예정임.
 - 확보 지식재산권을 위한 기능성 규명을 최소 비임상 수준까지 진행할 계획이며, 청구항의 기재에는 다실시에 광범위의 원칙을 적용함으로써 향후 확보할 기술들에 대해 전략적으로 충분히 활용 가능한 배타적인 권리를 구축 할 예정임.
 - 균주들에 대한 최적화 배양 및 캡슐화 기술 등을 단계적으로 추가 확보함으로써 관련 기술에 대한 카테고리형 특허를 마련하는 것을 목표로 삼고 있음.
 - 아울러 사업화 전략 및 시장환경을 고려하여 맞춤형 지식재산권 그룹을 확보하고자 함.

(5) BM의 수익창출 방안

- 매출 창출 계획은 본사의 사업화 전략에 따라 차이를 보일 수 있으며, 이에 사업화 과정 중 매출의 극대화를 위한 최적 방향으로 추진하고자 함.
- 국내 프로바이오틱스 시장은 2014년 기준으로 1,500억원 정도로 추정하고 있으며 2011년에서 2014년 사이 연평균 성장률은 32.9%로 매우 급격하게 성장하고 있음.
- 국내 프로바이오틱스 시장의 90% 이상을 발효유 제품이 차지하고 있으며 연평균 약 3% 수준의 안정적인 성장률을 보이고 있기에, 향후 프리미엄 발효유 시장 역시 크게 확대될 것으로 예상됨.
- 프로바이오틱스 건강기능식품 시장의 경우 현재는 고시형 균주 위주의 정장제 제품이 주를 이루고 있으나 시장 포화 및 프로바이오틱스의 추가 기능성 제시 등으로 인하여 향후 개별 인정형 기능성 유산균 제품 등의 프리미엄 시장으로 급격하게 변동할 것으로 예상됨.
- <PLAN A> 기능성 원료로 개별인정 취득 후 L/O 추진
 - PLAN A를 따를 시, 개별인정형 기능성 원료 인정은 과제 종료 후 약 10개월 이내에 가능할 것으로 판단되며, 이 시점 licensing out하는 것으로 가정할 경우, up-front에 의한 매출이 2018년 발생 가능할 것으로 판단됨.
 - Up-front는 약 5억원 정도로 책정하였음. 이후 제품화는 2020년 이후 가능할 것으로 판단되며, 제품 출시는 2019년 내로 예상 가능함. 이후 시장점유율을 15% 정도 차지할 것으로 가정하고 매출에 따른 royalty (4%)를 계산하여 매출 계획을 작성하였음.
 - 아래의 예상 매출액은 하나의 균주 (혹은 혼합균주)를 licensing out한 경우를 가정하여 작성하였음.

표 27. 예상 매출액 - PLAN

년도	매출 창출 계획 (백만원)		
	2020	2021	2022
추정 매출	500	1,320	1,452

* 산출근거 : Licensing out upfront로 5억원 가정, 제품 출시 후 royalty로 매출의 4% 책정, 제품의 시장점유율은 출시 후 15% 정도로 일괄 계산 적용함, 최초 프로바이오틱스 시장규모는 2,000억원으로 설정하였으며, 이후 10%의 연평균 시장성장률을 가정함.

- <PLAN B> 국내 기업과의 전략적 제휴를 통한 자체 제품 생산/판매
 - PLAN B를 따를 시 2020년 경 첫 제품 출시를 계획하고 있으며, 이후 7-1 및 7-2항에 기술한 바와 같은 생산 및 투자 계획 하에 적절한 제품 판매를 계획함.
 - 연령대 등 적절한 수요 고객층 설정 및 기확보한 전략적 제휴-유통 파이프라인을 최대한 활용하여 초기에 확고한 시장 진출 및 고객충성도 확보를 목표로 하고 있음.

- 특히 기존 화학물질과는 달리 부작용은 최소화하면서도 충분한 기능을 발휘할 수 있는 제품이며, 다양한 실험들을 통하여 검증된 제품임을 마케팅적 측면에서 강조하여 구매를 강화하는 방향으로 제품을 기획하고자 함.

나. ㈜한국야쿠르트

(1) BM 수립 배경

- **첨단 마이크로비움 분석 기술을 응용한, 한국인의 연령별/건강상태별 발효유제품 제품 강조**
 - 인체는 약 100조개의 미생물과 함께 살고 있으며 이들 중 대부분이 인체의 전반적인 개사 과정과 생리작용에 관여하는 것으로 밝혀짐.
 - 특히, 장내 미생물총의 구성이 인간의 건강 및 질병 상태와 유의적인 상관관계가 있음.
 - 마이크로비움 조절을 통한 치료제 개발 기술이 2010년 이후 꾸준히 연구 되고 있고, 이러한 전문가들을 통해 관련 사업체들이 형성 되고 있음.
 - 따라서 연령별/건강상태별 장내 균총 분석 연구 결과를 바탕으로 기능성 발효유제품을 개발하여 각 소비자층의 니즈에 적합한 제품이라는 강점을 내세우고자 함.
 - 또한 중장기적으로 다양한 부가가치가 창출되어 식품산업뿐만 아니라 영유아 산업에서 고령친화산업까지 미래 산업 발전에 큰 영향을 미칠 것으로 기대.

(2) BM 목표 및 핵심경쟁요인

(가) BM 목표

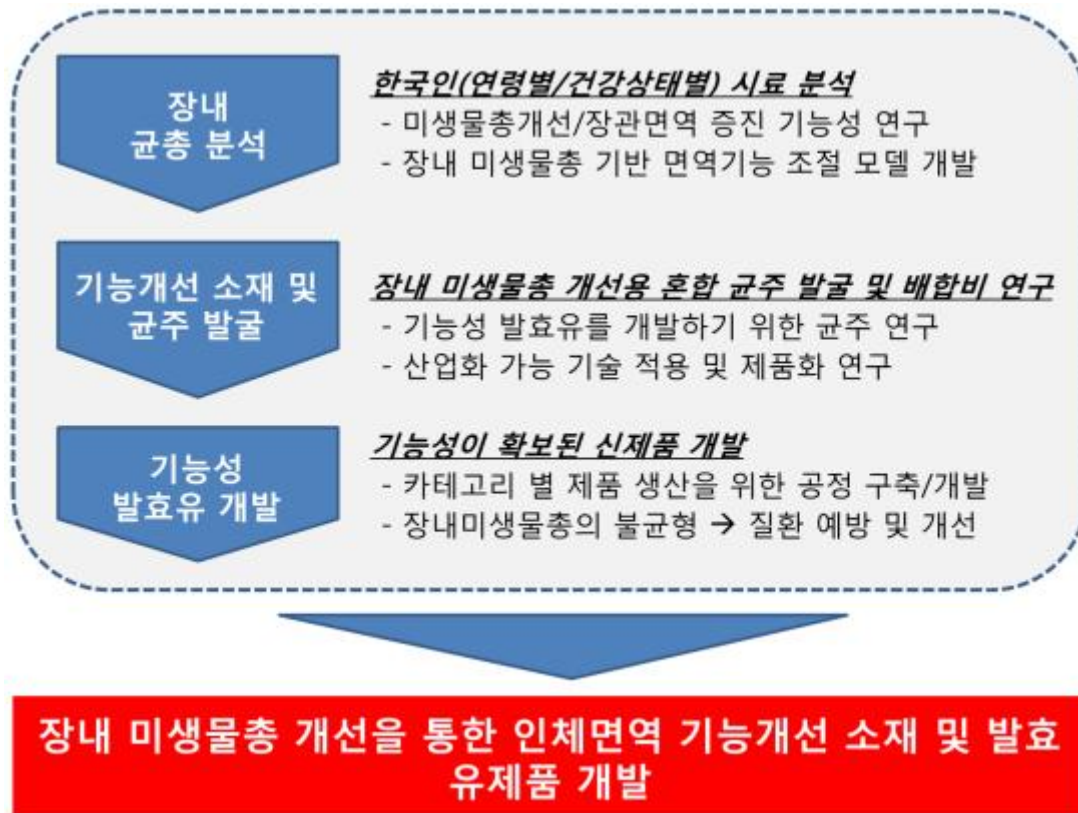


그림 111. 한국야쿠르트의 BM 목표

(나) 핵심경쟁요인

- 한국야쿠르트의 발효유 제품화 능력
 - 47년 전통의 프로바이오틱스 전문 기업이자 국내 발효유 제품 시장 점유율 1위 기업인 한국야쿠르트의 발효유 제품개발 노하우 활용.
- 한국야쿠르트의 프로바이오틱스 기술력
 - 일반적인 유산균 연구 뿐 아니라 피부보습, 혈중지질개선, 염증개선 등 기능성 균주의 발굴, 개발 노하우 및 제품 대량 생산 기술에 이르기까지 프로바이오틱스 개발 관련 토탈 솔루션 보유하고 있음.
- 고객만족
 - 한국야쿠르트는 NCSI(국가고객만족도) 지수 우유/발효유 부문에서 19년 연속 1위로 선정되어 제품의 품질에 대한 고객의 신뢰를 꾸준히 받고 있으며, 제품 경쟁력을 시장에서 인정받고 있음.

(3) 목표 시장 구조

(가) 경쟁기업 현황

① 국내 발효유 시장 현황

- 2016년 기준, 전체 발효유 소매시장 규모는 약 1조원 규모로 일정수준을 유지하는 추세임
- 한국인의 1인당 발효유 연간 소비량은 세계 24위 차지함.
- 2016년 국내 발효유 시장은 저당 제품과 얼려먹는 발효유가 인기를 끌었음.

한국야쿠르트 '얼려먹는 발효유'	빙그레 저당 '요플레 라이트'	한국야쿠르트 '메치니코프'
		

그림 112. 주요 제품 사례 (국내)

- 한국야쿠르트는 얼려먹는 야쿠르트 출시, 세븐일레븐은 파스퇴르와 아이스크림 요구르트 출시.
- 한국야쿠르트는 저당 캠페인을 함께 저당 발효유를 출시하여 업계 트렌드를 주도하였음.
- 빙그레는 저당 발효유 제품인 요플레 라이트 2종을 출시.
- 국내 판매채널은 과거 대형할인마트 이용객의 소비가 근거리 체인 슈퍼 소비로 변화하였음.
- 2016년 드링크와 호상이 비슷한 비율 (약 40%)로 비슷한 비중으로 소비됨.

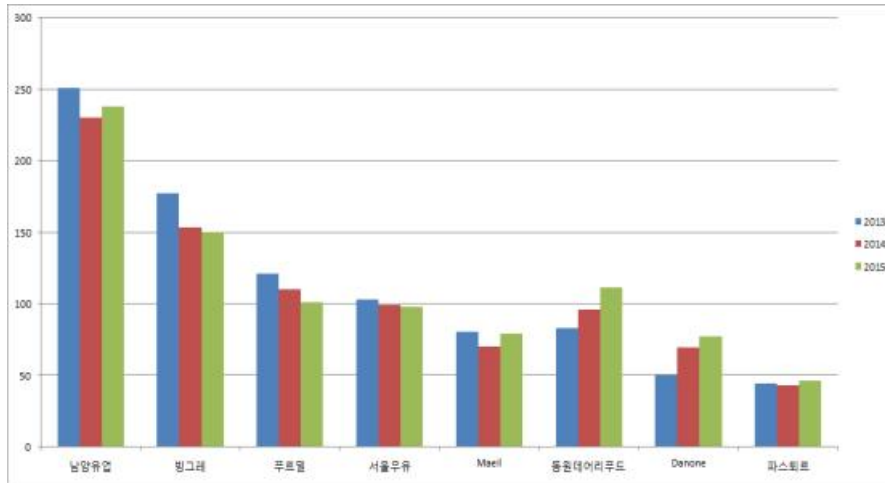


그림 113. 주요 경쟁사 매출액 변화 추이

② 국외 제품생산 및 시장 현황

- 세계 발효유 시장 규모는 약 570억 달러 정도로 추정되며, 우리나라는 세계에서 약 1.4%를 차지하는 것으로 추정됨.
- 세계적으로 1인당 발효유를 가장 많이 소비하는 국가는 네덜란드로 1인당 22.2 kg을 소비.
- 스웨덴이 2위 (19.7 kg), 일본은 1인당 6.0 kg을 소비, 중국은 1인당 2.6 kg 소비.
- 국외 기능성 발효유 제품은 기능성 프로바이오틱스 및 프리바이오틱스 함유를 통해 장 건강 뿐 아니라 항 노화, 혈중 콜레스테롤 개선, 면역 증강, 단백질 강화 등 국내보다 다양한 카테고리 제품 출시.
- 연령별로는 유아용 발효유 제품, 심혈관질환 개선 및 항노화에 도움을 주는 성인 중년층 및 노년층을 타겟으로 한 제품이 출시.

국의 발효유 시장 현황

시장 성장률

* 출처 : Mintel (2014년 이후 예측치)

Region	Units	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Australia	%	0.6	7.4	2.9	4.6	1.5	1.5	2	2.1	2.2	2.2
China	%	11.2	13.7	24	21.1	16.5	14.6	11.3	10.5	9.8	8.5
India	%	7.7	6.6	7	5.5	6.7	6.3	6.2	6	5.6	6
Indonesia	%	8.2	6.6	9.7	10	9.5	8.2	10.5	9.9	10.4	10.3
Japan	%	0.3	4.9	-0.4	15.2	4.8	2.4	3.7	3.8	3.7	3.5
Malaysia	%	11.1	10	10	13.6	11	12.5	13	12.4	12.5	12.5
South Korea	%	-2.3	13	4	6.8	2.8	3.1	3.5	3.3	3.1	2.8
Vietnam	%	1.7	2	5	7	13	11.6	10.3	9.4	8.6	7.7
US	%	7.4	9	2.2	3.4	6.9	0.8	3.6	2.9	2.9	2.8
Canada	%		-1.6	1.6	3	2.9	3.7	3.2	3.7	3.4	3.6
Mexico	%		3.4	4.4	1.3	-1.5	4	2	1.9	2.6	1.1
Belgium	%	2.9	-0.5	-3.7	-1.2	-2.1	0.8	1.5	0.5	0.5	0.2
Denmark	%	4.6	-7.8	3.4	-2.9	0.6	1.7	2	2.7	2.8	2.8
Finland	%	1.1	4.1	2.7	-0.7	-2.4	-1	-0.6	-0.2	0.5	1.1
France	%	-1.4	5	0.3	-0.3	-2.6	1.1	-0.1	-0.1	-0.2	-0.2
Germany	%	-1.5	2	-0.3	-1.3	-2.1	-0.1	-0.8	-0.8	-0.8	-0.9
Italy	%		-0.8	2.5	1.7	-5.5	-2.1	-1.5	2.3	2	-0.5
Netherlands	%	-2.4	3	1	-3.8	-2.9	0.4	0.4	-0.1	-0.5	-0.5
Norway	%	9.3	5.5	0.8	2.1	7.1	2.6	5	5	4.9	4.8
Portugal	%	1.2	-0.4	-0.4	-1	-0.2	0.1	0	0.1	0.1	0.2
Spain	%	2.8	2.3	5.4	0.2	-0.2	0	1.9	1.9	1.8	3.4
Sweden	%	7	2.9	5.6	4.2	1.6	2.2	2.5	2.5	3	1.7
Switzerland	%	1.7	-0.8	1.5	-1.4	-1	0.8	0.2	1.3	1	1.5
Turkey	%	3.7	0.9	10.2	4.9	4	3.5	6.5	3.6	3.2	3.9
UK	%	1.2	1.8	-1.5	-1.7	0.7	0	-0.7	-0.3	-0.7	-0.6

[아시아 시장]

- 말레이시아, 인도네시아를 중심으로 높은 성장을 지속할 것으로 전망 (약 10% 이상)
- 일본과 호주, 한국의 경우 북중미 시장과 비슷한 성장을 나타냄
- 북미, 서유럽과 비교할 때 발효유 시장 발전가능성 높음

[북중미시장]

- 미국, 캐나다의 경우 약 3% 수준에서 성장률이 유지될 것으로 전망
- 아시아와 비교할 때 발효유 시장 성장률이 낮음

[서유럽시장]

- 덴마크와 노르웨이, 터키를 제외하면 아시아, 북중미 시장과 비교하여 그 성장률이 낮음
- 프랑스, 독일, 이탈리아, 네덜란드의 경우 시장이 감소할 것이라 전망

→ 1인당 발효유 소비량이 상대적으로 큰 서유럽 시장은 그 크기를 유지하거나 약간 감소할 전망이지만 아시아, 북중미의 경우 발효유 소비가 꾸준히 늘어 시장이 점차 성장할 것으로 전망

프로바이오틱스 함유 발효유

* 출처 : 각 사 홈페이지













 <ul style="list-style-type: none"> • Vaalia My First Yoghurt (Parmalat Vaalia, 호주) - 클레임 : 소화, 면역 - <i>L. acidophilus</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>Lactobacillus GG</i> 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> • 불가리아 요거트 액티브 플러스 LB81 (에이지, 일본) - 클레임 : 양 노화 - 노화로 인한 대장 기능 약화 개선 	 <ul style="list-style-type: none"> • 베네콜 (핀란드) - 클레임 : 열중 콜레스테롤 개선 - Plant sterol 함유
 <ul style="list-style-type: none"> • Oatly (스웨덴) - 클레임 : 열중 콜레스테롤 개선 - 천연 귀리 요거트 - 칼슘 비타민 베타글루칸 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> • Pro-active (Flora) - 클레임 : 열중 콜레스테롤 개선 - Plant sterol 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> • Vaalia Sugar-Free Low Fat Probiotic Yogurt (Parmalat Vaalia, 호주) - 클레임 : 소화, 면역
 <ul style="list-style-type: none"> • Abbott Pediasure Vanilla Delight Flavored Nutritional Powder (Abbott Laboratories, 싱가포르) - 클레임 : 소화, 면역, 프리바이오틱 - 프락토올리고당 함유 	 <ul style="list-style-type: none"> • Nestlé Orange and Mango Flavor (Nestlé, 베트남) - 클레임 : 소화, 면역 - 유아용 찌리얼+요거트 	 <ul style="list-style-type: none"> • Sütas baby mix plain spoonable yogurt for babies (Sütas, 터키) - 클레임 : 소화, 면역, 프리바이오틱 (이눌린)
 <ul style="list-style-type: none"> • LB-21 Cultured Milk Drink (Junlebao Dairy, 중국) - 클레임 : 소화, 프리바이오틱 - <i>S. thermophilus</i>, <i>L. bulgaricus</i>, <i>L. acidophilus</i>, <i>Bifidobacterium</i> LB-21 프리바이오틱 (차일드프리요거트 함유) 	 <ul style="list-style-type: none"> • Powerful Yogurt (Powerful men, 미국) - 클레임 : 단백질 강화, Natural - 7종 유산균 함유, 글루텐 free 	 <ul style="list-style-type: none"> • Premium Vanilla Bean Frozen Yogurt (Twin Cups Proyo, 미국) - 클레임 : 프리바이오틱, 단백질 강화 - 프리바이오틱 (이눌린) 함유

그림 114. 해외시장 분석

③ 경쟁구조

- 국내 발효유 시장은 한국야쿠르트, 서울우유협동조합, 남양유업, 빙그레, 롯데푸드, 동원에 프렌비, 푸르밀 등이 진출해있음.
- 발효유 사업은 건강식품으로서 성장지속성과 안정성을 내포하고 있는 만큼, 모든 유가공업체에서 발효유 사업에 참여하여 시판시장 기준 약 30개 업체가 치열하게 경쟁함.
- 장내균총을 고려한 과학적이고 기능성이 명확한 제품은 거의 전무한 실정으로 경쟁 구조가 심하지 않다고 판단됨.
- 따라서 장내 미생물총 개선을 통한 인체면역 기능개선을 타깃으로 둔 제품을 개발 하면 새

로운 발효유 시장 개방으로 자사 발효유시장점유율 상승 예상.

④ 시장진입 장벽

- **가격 경쟁력/소비자의 니즈 충족**

- 현재 판매되는 발효유보다 다양한 기능성 확보가 된 제품으로 출시 될 경우 가격이 상승될 수 있어 프리미엄을 강조한 제품으로 접근해 발효유를 판매해야할 필요성이 있음.
- 각각의 연령별 소비자층에서 장내 균총이 인체의 건강과 관계가 있다는 사실을 인지하게 해야함.
- 소비자의 균총 변화와 건강의 연관성에 대한 인식의 함양을 위한 마케팅적인 전략이 필요함.

(4) 수익 확보 전략

(가) 주요 고객군

- 소비환경 트렌드

경제	사회
<ul style="list-style-type: none"> - 과잉되지 않은 합리적 소비 - 가치지향적 소비 	<ul style="list-style-type: none"> - 1인 미디어의 활성화/ 개인 레시피의 공유 - 웰빙 및 스트레스 완화 제품 인기 - 편의성을 갖춘 제품 인기
인구	환경
<ul style="list-style-type: none"> - 노년층의 지속 증가에 따른 시니어 시장 성장 - 저출산에 따른 키즈 시장 고급화 (골드키즈) - 아이 건강 중요성 강조 	<ul style="list-style-type: none"> - 미세먼지, 황사 등 대기오염 이슈 증가에 따른 오염을 차단/정화하는 제품 인기 증가 (안티폴루션) - 면역력 강화 제품 인기 증가

- 식품시장 트렌드

유제품	건강기능식품	과채주스
<ul style="list-style-type: none"> - 맛 - 무첨가 - 기능성 등 새로운 가치 추가 	<ul style="list-style-type: none"> - 맛 - 섭취 편의성 - Natural - 기존 기능성 강화 	<ul style="list-style-type: none"> - 유기농, 무첨가 컨셉 - 건강지향적 - 제형 다양화

- 주요 고객군 선정 및 고객군에 따른 제품 컨셉 개발

- 소비 환경 트렌드 및 식품시장 트렌드를 반영한 주요 고객군 및 해당 제품 컨셉의 개발.

- 현 트렌드를 반영한 제품 개발을 통해 합리적/지속적 소비 유도를 통한 수익의 확보.
- **주요고객군** : 영유아 (2~7세), 어린이 (2~13세)군, 30~50세 군, 60대 이상 군.
 - 골드키즈 현상에 따른 어린이 타겟 제품 강화 (2~7세, 2~13세)
 - 웰빙한 삶 및 건강한 노년을 준비하기 위한 중장년 타겟 제품 개발 (30~50세)
 - 건강한 노년을 유지하기 위한 노년 타겟 제품 개발 (60세 이상)

(나) BM의 수익창출 방안

- **수익유형**
 - B2C : 대부분의 수익은 발효유 제품의 직접 판매에 따른 직접 수익을 통해 확보 예상
장내 균총 균형의 중요성에 대한 소비자의 인식 확대에 따른 시장 규모 확대
 - B2B : 개발 균주 혼합 모델 분말 소재의 B2B 판매를 통해 2차 수익으로 확대 가능

• 수요고객층 확보 계획

<연령별 타겟 확보>

구분	영유아용 제품		어린이용 제품
타겟	연령(세대별)	2~7세	2~13세
	건강상태별	면역밸런스 붕괴로 아토피 증상이 심한 영유아 	면역기능감소로 호흡기 감염이 잦은 어린이 
제품컨셉	우리 아이 피부지킴이 이뮤밸런스 순(純)	자연 면역 증가로 환절기를 건강하게...	
제품차별성 (USP)	<ul style="list-style-type: none"> - 면역 조절 기능이 있는 신바이오틱스(프로바이오틱스+프리바이오틱스) 함유로 면역 과민 반응(아토피)에 도움을 줄 수 있음 - 식물성 발효유(Rice milk)로 최대한 알레르기 유발 원료 사용을 줄임 - 무합성착향료, 무합성착색료, 무합성감미료 - 영유아가 음용하기 편리한 패키지(스파우트파우치)를 사용한 짜먹는 발효유 	<ul style="list-style-type: none"> - 면역 증진 기능이 있는 신바이오틱스(프로바이오틱스+프리바이오틱스) 함유로 어린이 호흡기 건강에 도움을 줄 수 있음 - 무합성착향료, 무합성감미료, 무합성착색료 	
제품이미지/제형&용량	 액상발효유 /100ml	 액상발효유 /80ml	
원재료	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 원료 : 혼합균주 + 프리바이오틱스 - 부원료 : 라이스밀크파우더, 배과즙농축액, 유기농아가베시럽, 유산균 스타터 	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 원료 : 혼합균주+프리바이오틱스 - 부원료 : 원유, 배과즙농축액, 유기농아가베시럽, 천연착향료, 유산균 스타터 	

구분	중장년 제품		심비용 제품
타겟	연령(세대별)	30~50 중장년층	60세 이후 노년층
	건강상태별	장내 면역밸런스 붕괴로 IBS(Irritable bowel syndrome)나 IBD(Inflammatory bowel disease)로 고생하는 중장년층 	전반적인 면역 약화로 각종 감염증, 무기력감, 피로 등을 호소하는 노년 계층 
제품컨셉	장편한 하루! 밸런스 업(UP)	새로 태어난 듯 한 건강함으로 일상 및 여가 생활에 활력을 주는 발효유	
제품차별성 (USP)	<ul style="list-style-type: none"> - 장내 면역 조절 기능이 있는 신바이오틱스(프로바이오틱스+프리바이오틱스) 함유로 과민성대장질환(IBS, IBD)에 도움을 줄 수 있음 - 유당분해효소, 대장 건강에 효과적인 천연물을 부소재로 사용하여 대장 건강에 도움을 줌 	<ul style="list-style-type: none"> - 면역 증진 기능이 있는 신바이오틱스(프로바이오틱스+프리바이오틱스) 함유로 면역 약화로 인한 증상들을 개선함 - 노년층에게 부족한 단백질, 칼슘 등을 보충해주는 그리(Greek) 타입의 기능성 발효유 	
제품이미지/제형&용량	 농후발효유 / 140ml	 농후발효유(Greek) / 120g	
원재료	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 원료 : 혼합균주+프리바이오틱스 - 부원료 : 원유, 과립농축액, 유기농아가베시럽, 유당분해효소, 천연물혼합소재, 천연착향료, 유산균 스타터 	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 원료 : 혼합균주+프리바이오틱스 - 부원료 : 원유, 마누카 꿀, 유기농아가베시럽, 밀크칼슘파우더, 천연착향료, 유산균 스타터 	

그림 115. 연령별 타겟 제품 설계 사례

- 실질적인 구매 고객 중심 영업
 - 영유아, 청소년 고객 : 실질적 구매자인 부모세대 (30-50세)까지 맞춤형 홍보 주력
 - 중장년, 노년층 고객 : 중장년, 노년층에 직접 홍보 및 부모의 건강을 염려하는 자식 세대 까지 고려하여 고객 유치 주력

<영업계획>

- 방판영업 : 기본적인 발효유 소비 고정 고객층에 신규 제품 특성/장점을 홍보하여 제품 구매 유도.
- 직판영업 : 백화점, 대형마켓 제품 영업을 통한 대량 구매 유도.
- 마케팅/홍보 : 본 연구개발물의 과학적 우수성에 대해 TV광고, 지면광고를 통해 지속 홍보 하고, 마케팅 수단으로 활용함으로써 마이크로비움 관련 신규 제품 시장 형성 및 시장 확대에 기여.

• 구매욕구 적정성, 구체화

- 고객으로 하여금 기본적인 디저트로서의 발효유 섭취가 아닌 프리미엄 발효유를 섭취한다는 개념으로 기존 가치의 진화 가능.
- 화학합성 의약품과 달리 제품 섭취를 통해 인체에 나타날 수 있는 부작용을 최소화할 수 있는 점 건강한 장내 미생물총 유지를 통한 인체 면역력 개선 효과를 부각하여 제품 구매 욕구 촉진.

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 구 활 용 등)
	특허 출원	특허 등록	품 종 등 록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
최종목표	4	4	-	1	미 정	1	-	-	-	-	-	5	-	-	4	-	-	6	-	
1 차 년 도	목 표	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	
	실 적	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-	2	-	
2 차 년 도	목 표	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	2	-	-	2	-	
	실 적	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	9	-	-	6	-	
3 차 년 도	목 표	-	4	-	1	-	1	-	-	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	
	실 적	2	4	-	1	-	1	-	-	-	-	3	1	-	4	-	-	2	-	
소 계	목 표	4	4	-	1	-	1	-	-	-	-	5	-	-	4	-	-	6	-	
	실 적	6	4	-	1	-	1	-	-	-	-	7	3	-	14	-	-	10	-	
종료 1차년도	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-	2	-	
종료 2차년도	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	9	-	-	6	-	
종료 3차년도	2	4	-	1	-	1	-	-	-	-	-	3	1	-	4	-	-	2	-	
소 계	6	4	-	1	-	1	-	-	-	-	-	7	3	-	15	-	-	10	-	
합 계	6	4	-	1	-	1	-	-	-	-	-	7	3	-	15	-	-	10	-	

2절. 목표 달성여부

1. 연구개발목표의 달성도 및 자체평가

가. 연구개발 성과 및 평가방법

- 연령별, 건강상태별 장내 미생물총 분석을 위해 인체 대변 시료 유래 차세대염기서열 분석 마이크로비옴 정보 통합 확보 (총 850개 이상 인체 대변 시료 사용).
- 연령별 β -diversity 특징 규명 (영유아, 20, 30, 40, 50, 60, 70대 그룹으로 구분하여 분석).
- 염증 수치 (hsCRP)를 기반으로 한 건강상태별 장내 미생물총 비교 분석 및 마이크로비옴 바이오마커 발굴 (유의적인 상관관계를 보인 1개 이상의 장내미생물 family 발굴).
- 장내 미생물 분리를 통하여 150종 이상의 유산균 확보 및 장내 미생물 소재 라이브러리 구축 (유산균 포함 총 2000 strains).
- 면역기능 개선 유산균 탐색을 통한 기능성 유산균 소재 발굴.
- 96웰 기반 천연물 맞춤형 장내 미생물총 개선 검증 시스템 구축 (시스템 구축 및 활용 여부).
- 장내 미생물총 개선 효능 천연프리바이오틱스 소재 발굴 (SCFA, 유해균 유래 효소활성 측정).
- 고시형 균주에 해당하는 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*에 대한 내산성·내담즙성 평가를 통해 안정성이 우수한 균주를 선별하였으며, 장관 면역 조절 기반 *in vitro* 모델을 구축함 (장내 미생물-인간세포 혼합배양 모델 구축).
- 장관 면역 증진 및 장 상피세포 강화능을 보유한 균주를 3종 확보함 (기능성 미생물 소재 3종 확보).
- 대장모사시스템을 통해 배양한 인간유래 장내균총을 모델동물인 예쁜꼬마선충에 투여한 후 수명에 미치는 영향을 평가 완료함 (장내미생물-동물 혼합배양을 통한 발굴소재의 기능성 플랫폼 구축).
- 장내 미생물총 개선 소재 균주 3종 (SNUG50430, SNUG50559, SNUG10122) 우유 배지 배양 기초 특성 평가를 완료함.
- 소재 균주 3종의 기본 생산 특성 및 산업화 적합 소재 평가를 완료함.
- 소재 균주 1종 (SNUG50430)의 최적 배지 개발 및 배양 최적화 연구를 완료하였으며, 대량생산 공정 구축 및 최적화 완료.
- 소재 균주 1종 (SNUG50430)를 이용한 발효 유제품의 *in vivo* 모델에서의 장관 면역 기능 및 장내 균총 회복능 검증.
- 인간대장모사시스템을 통해 발효유제품의 장내균총 개선여부와 이에 따른 대사체와의 상관관계평가 완료 (장건강 소재의 균총 개선능 및 대사체 생성능 *in vitro* 평가 시스템 구축).
- 발효 유제품의 균총 변화 및 대사체 변화의 대장 부위별 기초자료 확보.
- 천연 프리바이오틱스 소재 2종 (더덕, 홍국)의 화학성분 분석 완료 및 원료표준화를 위한 기초자료 확보.

- 농축, 동결, 건조 등의 주요 가공공정에서의 소재 균주 1종 (SNUG50430)의 유지·보존인증 (SNUG50430의 산업화 적합성 검증 및 최적 액상보호제 / 최적 동결보호제 선발).
- 소재 균주 (SNUG50430)을 이용해 제작된 시제품의 단맛 신맛 깔끔한 맛 3가지 기준 관능평가결과를 바탕으로 제품 대량생산 공정 구축 및 연령/성별에 따른 시제품 제작.
- 관리 표준화를 위한 품질규격서를 작성함.
- 특허 출원 6건, 특허 등록 4건으로 지식재산권 총 10건으로 목표 초과달성함.
- ‘한국인 인체 시료에서 확보한 유익균 미생물 군집 정보에 대한 노하우’ 에 대한 기술이전 1건 실시함.
- ‘더덕 추출물을 함유하는 장건강 개선용 조성물’을 미국특허로 출원함 (해외특허 출원 1건).
- SCI 논문 10건 및 학술발표 15건으로 기존 목표 초과 달성함. 특히, 2016년 한국응용생명화학회 국제학술대회에서 우수포스터발표상 2건을 수상함.
- 본 사업의 수행결과로 도출된 연구 성과를 언론에 홍보하였음. 한국인 마이크로비옴을 이용한 면역 질환 관련 연구에 대해 KBS, EBS 다큐멘터리에 인터뷰 2건, 사사 표기된 중앙일간지 3건 (전자신문, 서울경제, 연합뉴스), 매체 특성상 사사표기가 어려우나 본 사업의 연구 성과와 직접 연관된 방송보도 (YTN사이언스 보도 1건) 및 주요 월간지 (과학동아, 1건), 우리나라에서 가장 유력한 일간지 (조선일보, 동아일보, 매일경제) 지면 보도건 (1건) 그 외 언론지 2건 (베리타스알파, 의료정보)등을 확보함 (홍보 보도 10건으로 목표 초과달성함).

나. 성과목표에 대한 자체평가

성과목표	자 체 평 가
<p>지식재산권 10건 (특허출원6건 및 특허등록4건)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 장내 미생물 균총 개선 및 장관 면역 기능 개선에 관한 미생물 소재 특허출원 1건, 또한 프리바이오틱스 소재의 장내 건강 개선능과 관련하여 특허출원 5건, 특허등록 4건을 달성함. 이 중 ‘더덕 추출물을 함유하는 장건강 개선용 조성물’에 관한 특허는 한국과학기술연구원의 특허심의회 평가 결과 신규성과 산업적 파급력이 큰 우수특허 (A등급)로 선정된 바 있으며, 한국과학기술연구원으로부터 해외 특허출원 비용 (1300만원)을 지원 받음 (미국특허 출원 1건).
<p>기술이전 1건</p>	<ul style="list-style-type: none"> 본 과제 연구 성과에 해당하는 연령 및 건강 상태별 한국인 인체 대변시로 관련 임상 라이브러리와 미생물 유전체 균집 라이브러리 정보에 대한 기술이전 실시.
<p>논문 10건 (SCI 논문 7건 및 비SCI논문 3건)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 신규 장내 미생물 동정 분석을 통해 논문 2건과, 꼬마선충을 이용한 장내 미생물 활성 탐색 관련 논문 1건, nanoparticle을 통해 유해한 박테리아 저해능을 확인하는 논문 3건, 대장모사시스템을 이용한 장관 부위별 균총과 대사체 분석 및 균총과 대사체간의 연관성에 관한 논문 1건, 총 SCI 7건을 발표하였으며 추가적으로 특정 대사체의 장내 균총 조절능과 그에 따른 바이러스 억제에 관한 리뷰 논문 1건과 질 분리 <i>Lactobacillus</i> 균총의 유전체 분석 1건, 꼬마선충을 이용한 독성평가 방법론에 관한 논문 1건, 총 비SCI 논문 2건을 발표함.
<p>학술발표 15건</p>	<ul style="list-style-type: none"> 국내 미생물 관련 학술대회에서 구두발표 5건, 포스터 발표 9건, 총 14건과 마이크로비옴 분야 해외 저명 학술대회인 International Human Microbiome Consortium Meeting (IHMC)에서 구두발표 1건, 총 15건으로 목표 초과 달성함.
<p>홍보전시 10건</p>	<ul style="list-style-type: none"> 한국인 마이크로비옴을 이용한 면역 질환 관련 연구에 대해 KBS, EBS 다큐멘터리에 인터뷰함으로써 본 연구과제 연구성과에 대해 홍보하였으며, 모델동물을 이용한 장건강 효능 및 독성평가 플랫폼 구축 관련 논문은 매일경제, 동아일보, 조선일보 등 주요일간지 뿐만 아니라 YTN사이언스 등에 방송보도 되었음. 또한 우리나라에서 가장 잘 알려진 과학 분야 유명 월간지인 과학동아 7월호에 관련연구 성과가 홍보되었음.

2. 연구성과

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	<i>Sellimonas intestinalis</i> gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	서보람	66	영국	Microbiology Society	SCI	2016.02.01	1466-5026
2	<i>Merdimonas faecis</i> gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces	International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology	서보람	67	영국	Microbiology Society	SCI	2017.07.26	1466-5026
3	Disinfection of various bacterial pathogens using novel silver nanoparticle-decorated magnetic hybrid colloids	Science of the Total Environment	박성준	609	네덜란드	Elsevier BV	SCI	2017.07.08	0048-9697
4	Toxicological evaluation of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in the model animal <i>Caenorhabditis elegans</i> and 3T3-L1 normal murine cells	Environmental Toxicology	이소영	32(6)	미국	John Wiley & Sons	SCI	2017.02.16	1522-7278
5	New perspectives regarding the antiviral effect of vitamin A on norovirus using modulation of gut microbiota	Gut Microbes	이희태	9	미국	Landes Bioscience	비SCI	2017.11.02	1949-0976
6	Complete genome sequence of the plasmid-bearing <i>Lactobacillus fermentum</i> strain SNUV175, a probiotic for women's health isolated from the vagina of a healthy South Korean woman	Genome Announcements	이성희	5(12)	미국	American Society for Microbiology	비SCI	2017.03.23	2169-8287

7	Measuring the effect of chemicals on the Growth and reproduction of <i>Caenorhabditis elegans</i>	Journal of Visualized Experiments : JoVE	이소영	128	미국	MYJoVE Corporation	비SCI	2017.10.05	1940-087X
8	Effects of fermented milk treatment on microbial population and metabolomic outcomes in a three-stage semi-continuous culture system	Food Chemistry	차광현	263	영국	Applied Science Publishers	SCI	2018.10.15	0308-8146
9	Disinfection of waterborne viruses using silver nanoparticle-decorated silica hybrid composites in water environments	Science of The Total Environment	박성준	625	네덜란드	Elsevier BV	SCI	2018.06.01	0048-9697
10	Inactivation of influenza A virus via exposure to silver nanoparticle-decorated silica hybrid composites	Environmental Science and Pollution Research International	박성준	25	독일	Ecomed	SCI	2018.09	0944-1344

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016년도 한국응용생명화학학회 국제학술대회	이소영, 김주연, 정유진, 강경수	2016.06.16	제주도	대한민국
2	2016년도 한국응용생명화학학회 국제학술대회	차광현, 김상민, 이은하, 강경수, 판철호	2016.06.16	제주도	대한민국
3	2017년 대한면역학회 춘계학술대회	고광표	2017.04.13	서울	대한민국
4	International Meeting of the Microbiological Society of Korea	고광표	2017.04.27	부산	대한민국
5	KSBMB International Conference	고광표	2017.05.19	부산	대한민국
6	The Korean Society for Microbiology & Biotechnology	유현주	2017.06.29	부산	대한민국
7	The Korean Society for Microbiology & Biotechnology	이길재	2017.06.29	부산	대한민국
8	The Korean Society for Microbiology & Biotechnology	윤성현	2017.06.29	부산	대한민국
9	2017 한국분자세포생물학회 예쁜꼬마선충분과 심포지엄,	이소영, 김주연, 정유진, 강경수	2017.01.17	용평	대한민국
10	2017 한국독성학회 한국환경성돌연변이발암원 학회 국제심포지엄, 초청	이소영, 김주연, 정유진, 강경수	2017.05.19	부산	대한민국
11	2017 한국응용생명화학학회 국제학술대회	이소영, 김주연, 강경수	2017.06.15	부산	대한민국
12	International Human Microbiome Consortium Meeting (IHMC 2018)	고광표	2018.06.28	Killarney	아일랜드
13	2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	윤소연	2018.04.25	평창	대한민국
14	2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	윤성현	2018.04.25	평창	대한민국
15	2018 한국식품과학회 국제학술대회 구두발표	강경수	2018.06.29	부산	대한민국

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

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	더덕 추출물을 함유하는 장 건강 개선용 조성물	대한민국	한국과학기술연구원	2016.05.31.	10-2016-0067553	-	-	-	90
2	실리마린을 포함하는 장 건강 개선용 조성물	대한민국	한국과학기술연구원	2016.08.02.	10-2016-0098465	-	-	-	90
3	홍국 추출물을 포함하는 장 건강 개선용 조성물	대한민국	한국과학기술연구원	2016.08.08	10-2016-0100833	-	-	-	90
4	Method for improving intestinal health using extracts of Codonopsis lanceolata	미국	한국과학기술연구원	2017.05.16	15/596404	-	-	-	90
5	홍국 추출물을 포함하는 장 건강 개선용 조성물(분할출원)	대한민국	한국과학기술연구원	2018.04.12	10-2018-0042763	-	-	-	90
6	장내 항염증 및 균총 개선 활성을 갖는 락토바실러스 람노시스 균주	대한민국	서울대학교 산학협력단	2018.09.05	10-2018-0106181	-	-	-	90
7	더덕 추출물을 함유하는 장 건강 개선용 조성물	대한민국				한국과학기술연구원	2018.02.01	10-1826673	90
8	홍국 추출물을 포함하는 장 건강 개선용 조성물	대한민국				한국과학기술연구원	2018.04.13	10-1850308	90
9	홍국 추출물을 포함하는 장 건강 개선용 조성물(분할출원)	대한민국				한국과학기술연구원	2018.05.23	10-1862132	90
10	실리마린을 포함하는 장 건강 개선용 조성물	대한민국				한국과학기술연구원	2018.10.11	10-1909083	90

라. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	노하우	한국인 인체 시료에서 확보한 유익균 미생물 군집 정보에 대한 노하우	(주)고바이오랩	2018.11.15	10,000,000원	

마. 기타: 홍보실적

No	제목	매체명	일시	홍보유형
1	장영실쇼: 인간의 6번째 장기, 박테리아를 다시 보다	KBS	2016.06.16	중앙TV방송
2	당신의 대변은 건강하십니까?	EBS	2016.06.16	중앙TV방송
3	포유동물 대신 예쁜꼬마선충으로 항암제 독성 평가한다	서울경제	2017.04.13	중앙일간지
4	항암제 독성 '예쁜꼬마선충'으로 평가하는 기술 개발	YTN 사이언스	2017.04.27	중앙TV방송
5	항암제 독성, '예쁜꼬마선충'으로 가능	연합뉴스	2017.05.19	중앙일간지
6	쥐 대신 벌레로 항암제 독성 평가...연구 효율, 윤리 증대	전자신문	2017.06.29	중앙일간지
7	물고기로 뇌기능 연구, 기생충으로 독성 검사	조선일보	2017.06.29	중앙일간지
8	예쁜꼬마선충으로 항암제 독성 평가한다	과학동아	2017.06.29	월간잡지
9	서울대 보건대학원 국제심포지움 개최	베리타스알파	2017.01.17	중앙일간지
10	'미생물 분야, 100년 만에 황금기 왔다'	의료정보	2017.05.19	중앙일간지

3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 해당사항 없음

연번	증빙자료
1	<p style="text-align: center;">International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2016), 66, 951–956 DOI 10.1099/ijsem.0.000817</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 25%; background-color: #f0f0f0; padding: 5px;"> <p>Correspondence GwangPyo Ko gko@snu.ac.kr</p> </div> <div style="width: 75%;"> <h3 style="text-align: center;">Sellimonas intestinalis gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces</h3> <p style="text-align: center;">Boram Seo,^{1,2} Ju Eun Yoo,¹ Yung Mi Lee³ and GwangPyo Ko^{1,4}</p> <p>¹Center for Human and Environmental Microbiome, Graduate School of Public Health, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea ²School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea ³Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, 26 Songdomirae-ro, Yeosu-gu, Incheon 406-840, Republic of Korea ⁴N-Bio, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea</p> <hr/> <p>A Gram-stain-positive and obligately anaerobic bacterial strain, BR72^T, forming ivory yellow colonies was isolated from a faecal sample of a healthy Korean woman. 16S rRNA gene sequence analysis indicated that strain BR72^T belongs to <i>Clostridium</i> cluster XIVa and represents a distinct phyletic line within the family <i>Lachnospiraceae</i>. The most closely related strains were <i>Clostridium nexile</i> DSM 1787^T (94.1 % 16S rRNA gene sequence similarity), <i>Coprococcus comes</i> ATCC 27758^T (93.5 %), <i>Ruminococcus torques</i> ATCC 27756^T (93.5 %), <i>Ruminococcus lactaris</i> ATCC 29176^T (93.5 %), <i>Clostridium aerotolerans</i> DSM 5434^T (93.1 %) and <i>Eubacterium fissicatena</i> DSM 3598^T (92.9 %). The DNA G+C content of strain BR72^T based on its genome sequence was 45.3 mol%. The major cellular fatty acids were C_{16:0}, C_{14:0}, and iso-C_{17:1} I and/or anteiso-C_{17:1} B. Acetic acid was produced from glucose fermentation. Other physiological and biochemical comparisons allowed the phenotypic differentiation of strain BR72^T from the members of the family <i>Lachnospiraceae</i>. Based on the phylogenetic and phenotypic findings, this strain is considered to represent a novel species of a new genus belonging to the family <i>Lachnospiraceae</i> and the name <i>Sellimonas intestinalis</i> gen. nov., sp. nov. is proposed. The type strain of <i>Sellimonas intestinalis</i> is BR72^T (=KCTC 15479^T=JCM 30749^T).</p> <hr/> <p>The human gut contains a highly diverse bacterial community (Eckburg <i>et al.</i>, 2005; Human Microbiome Project Consortium, 2012). Recently, gut microbiota and its functions in maintaining host health have attracted great interest and have been investigated using culture-independent molecular techniques (Human Microbiome Project Consortium, 2012). The gut microbiota is estimated to exceed over 1000 species of mostly anaerobic bacteria and is dominated by the phyla <i>Firmicutes</i> and <i>Bacteroidetes</i> (Bäckhed <i>et al.</i>, 2005). Commensal gut bacteria in healthy humans maintain a balance and produce microbial metabolites such as short-chain fatty acids during glucose fermentation. Their products are considered to perform important functions for the host metabolism and the immune system (Brestoff & Artis, 2013). The major bacterial species producing short-chain fatty acids are included in <i>Clostridium</i> cluster IV and cluster XIVa. In this study, we describe the taxonomic characterization of a novel bacterial strain, BR72^T, belonging to <i>Clostridium</i> cluster XIVa (Collins <i>et al.</i>, 1994).</p> <p>Strain BR72^T was isolated from a faecal sample of a healthy Korean woman, subject KO-018, who had not taken antibiotics in the previous 6 months. The fresh faecal sample was immediately brought into the anaerobic workstation (Coy Laboratory Products) containing 5 % H₂, 5 % CO₂ and balance nitrogen. For isolation, the faecal sample was directly plated onto YCFAG medium containing 1.5 % (w/v) agar (Duncan <i>et al.</i>, 2002). After 18–24 h of incubation at 37 °C, single colonies were selected based on their morphology and streaked on new modified Gifu anaerobic medium (GAM; Kisan Bio) agar plates at 37 °C under anaerobic conditions to obtain a pure culture. The isolate, designated BR72^T, was stored at –81 °C in modified GAM medium supplemented with 25 % (v/v) glycerol for preservation.</p> <hr/> <p>Abbreviation: ANI, average nucleotide identity.</p> <p>The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain BR72^T is KP966092. The GenBank Bioproject ID numbers for the draft genome sequences of strain BR72^T and <i>Eubacterium fissicatena</i> KCTC 15010^T are PRJNA283562 and PRJNA283563, respectively.</p> <p>One supplementary table and one supplementary figure are available with the online Supplementary Material.</p> <p style="font-size: small;">000817 © 2015 IUMS Printed in Great Britain IP: 147.47.67.161 On: Thu, 22 Nov 2016 04:48:33</p> </div> </div>

Merdimonas faecis gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces

Boram Seo,^{1,2} Ju Eun Yoo,¹ Yung Mi Lee³ and GwangPyo Ko^{1,4,5,6,*}

Abstract

A strictly anaerobic Gram-stain-positive, non-motile and non-spore-forming bacterial strain, BR31^T, was isolated from a faecal sample of a healthy human. Bacterial colonies were ivory-coloured on GAM agar and composed of rod-shaped cells with rounded ends approximately 1.4–2.1×0.5–0.6 µm in size. According to comparative analysis based on 16S rRNA gene sequences, strain BR31^T formed a distinct phylogenetic lineage that reflects a new genus within *Clostridium* cluster XIVa in the family *Lachnospiraceae*, with highest similarity to *Eubacterium contortum* DSM 3982^T (94.6%). The DNA G+C content was calculated to be 47.0 mol% from whole genome sequencing. Predicted genes associated with synthesis of teichuronic acid, polyamines, polar lipids and diaminopimelic acid were detected. The peptidoglycan contained *meso*-diaminopimelic acid and the main polar lipid detected was phosphatidylglycerol. The major metabolic end product of glucose was acetic acid, which was in agreement with those of most members of the family. However, the profile of major cellular fatty acids (C_{16:0}, C_{14:0}, summed feature 4 and C_{13:0}) and overall enzyme activity demonstrated phenotypic differentiation of strain BR31^T from other closely related genera. Thus, based on distinct phenotypic, phylogenetic, genotypic and chemotaxonomic characteristics, strain BR31^T is considered to represent a novel species of a new genus, for which the name *Merdimonas faecis* gen. nov., sp. nov. is proposed. The type strain of *Merdimonas faecis* is BR31^T (=KCTC 15482^T=JCM 30748^T).

2

The human large intestine harbours highly diverse anaerobic bacteria colonized at concentrations greater than 10¹² cells ml⁻¹ [1]. *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the two most dominant phyla, which play commensal roles by aiding the digestion of non-digestible fibres during fermentation [2]. Recent human gut microbiome studies have focused on *in silico* whole genome and metagenomic analysis as well as on investigating distinct features of anaerobic bacteria and their interactions based on culturing techniques. Browne *et al.* revealed that spore-forming ability ensures host-to-host microbiota transmission and suggested a novel workflow for obtaining and phenotyping uncultivated commensal gut bacteria [3]. Spore formation is a key feature of strains within the class *Clostridia*, but is no longer used to determine a taxonomic affiliation [4]. In particular, *Clostridium* cluster XIVa in the phylum *Firmicutes* has attracted a great deal of attention as producing beneficial small-molecule metabolites from carbohydrates [5]. These microbial-derived metabolites interact closely with host immune systems, such as inducing immunomodulatory

effects by promoting regulatory T cells [6]. *Clostridium* cluster XIVa encompasses diverse genera such as *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Roseburia* and *Ruminococcus* [4]. Here, we describe the taxonomic characterization of a novel bacterial strain, BR31^T, belonging to *Clostridium* cluster XIVa.

Strain BR31^T was isolated from a faecal sample obtained from a healthy Korean female (30 years old) who had not taken antibiotics in the previous 6 months. After collection, the faecal sample was immediately brought into an anaerobic workstation (Coy Laboratory Products) containing 5% H₂, 5% CO₂ and balanced nitrogen. To isolate obligate anaerobic bacteria, all materials were brought into the workstation and prepared anaerobically. The faecal sample was directly plated onto YCFAG medium [7], with 1.5% (w/v) agar added. After 18 or 24 h of incubation at 37 °C under anaerobic conditions, single colonies less than 1 mm in diameter were selected and sub-cultured on fresh modified Gifu anaerobic medium (MB-G0825, modified GAM; Kisan

Author affiliations: ¹Department of Environmental Health Sciences, Graduate School of Public Health, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; ²School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; ³Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon, Republic of Korea; ⁴Center for Human and Environmental Microbiome, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; ⁵N-Bio, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; ⁶KoBioLabs, Inc., Seoul, Republic of Korea.

*Correspondence: GwangPyo Ko, gko@snu.ac.kr

Keywords: New taxa; *Clostridium* cluster XIVa; human gut microbiota.

Abbreviations: ANI, average nucleotide identity; DAP, diaminopimelic acid.

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain BR31^T is KP966093. The GenBank Bioproject ID number for the draft genome sequence of strain BR31^T is PRJNA283565.

Two supplementary figures and one supplementary table are available with the online Supplementary Material.

001977 © 2017 IJMS

Downloaded from www.microbiologyresearch.org by

IP: 147.243.07.161

On: Thu, 22 Nov 2018 08:18:08



Disinfection of various bacterial pathogens using novel silver nanoparticle-decorated magnetic hybrid colloids



Sungjun Park ^{a,b}, Hye Hun Park ^c, Young-Seon Ko ^c, Su Jin Lee ^a, The Son Le ^c, Kyoungja Woo ^c, GwangPyo Ko ^{a,b,*}

^a Department of Environmental Health Sciences, Graduate School of Public Health, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea

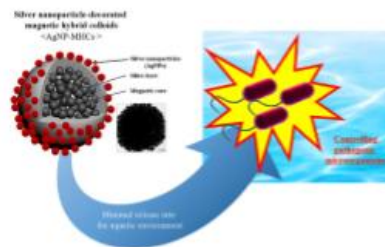
^b N-Bio, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea

^c Nanophotonics Research Center, Korea Institute of Science and Technology, 39-1 Hawolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul, Republic of Korea

HIGHLIGHTS

- The use of AgNPs for controlling pathogens is hindered by several major obstacles.
- AgNP-MHCs can prevent the aggregation of AgNPs and be re-collected easily after use.
- AgNP-MHCs showed great antibacterial capabilities in various environmental conditions.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 March 2017
Received in revised form 7 July 2017
Accepted 8 July 2017
Available online 25 July 2017

Editor: Simon Pollard

Keywords:
Silver nanoparticle
Magnetic hybrid colloid
Disinfection
Antibacterial agents
Aerobic
Anaerobic

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) have long been considered a powerful disinfectant for controlling pathogenic microorganisms. However, AgNPs might have adverse effects on both human health and our ecosystems due to their potential cytotoxicity and the difficulty in recovering them after their release into the environment. In this study, we characterized the antimicrobial efficacy caused by a novel micrometer-sized magnetic hybrid colloid (MHC) containing 7, 15, or 30 nm sized monodispersed AgNPs (AgNP-MHCs), which can be re-collected from the environment using simple procedures, such as a magnet or centrifugation. We evaluated the antibacterial capabilities of AgNP-MHCs against target bacteria (*Legionella pneumophila*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Clostridium perfringens*) and compared them with the inactivation efficacy of AgNPs ~30 nm in diameter (nAg30s). Among the different AgNP-MHCs composites evaluated, Ag30-MHCs had the greatest antibacterial effect. After 1 h of exposure, more than a 4- \log_{10} reduction of *L. pneumophila* and 6- \log_{10} reduction of *B. subtilis* was achieved by 4.6×10^9 particles/mL of Ag30-MHCs and Ag30-MHC-1s. In addition, Ag30-MHC-1s maintained their strong antibacterial capabilities under anaerobic conditions. Our results indicate that AgNP-MHCs can be considered excellent tools for controlling waterborne bacterial pathogens, with a minimal risk of release into the environment.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Environmental Health Sciences, Graduate School of Public Health, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea.

E-mail address: gko@snu.ac.kr (G. Ko).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.071>
0048-9697/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Toxicological evaluation of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in the model animal *Caenorhabditis elegans* and 3T3-L1 normal murine cells

So Young Lee¹ | Joo Yeon Kim¹ | Yu-Jin Jung¹ | Kyungsu Kang^{1,2} 

¹Systems Biotechnology Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Gangneung, 25451, Korea

²Department of Biological Chemistry, University of Science and Technology (UST), Dajon, 34113, Korea

Correspondence

Kyungsu Kang, Systems Biotechnology Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Gangneung, 25451, Korea.
Email: kskang@kist.re.kr

Funding information

High Value-added Food Technology Development Program, Grant/Award Number: 315067-03; Intramural Program, Grant/Award number: 2Z04690.

Abstract

Etoposide, a topoisomerase II inhibitor, has been widely used as a clinical anticancer drug to treat diverse cancer patients. Since not only rapidly dividing cancer cells but also the cells of normal human tissues and every living organism in environmental ecosystems have topoisomerases, it is crucial to study the toxicity of etoposide in other organisms in addition to cancer cells. In this study, we evaluated the toxicity of etoposide in both a soil nematode, *Caenorhabditis elegans*, and 3T3-L1 normal murine cells. Etoposide significantly retarded the growth, egg laying, and hatching in *C. elegans*. Etoposide also affected the reproductive gonad tissue, decreased the number of germ cells and induced abnormally enlarged nuclei in *C. elegans*. In addition, etoposide inhibited 3T3-L1 cell proliferation, with IC₅₀ values of 37.8 ± 7.3 and 9.8 ± 1.8 μM after 24 and 48 hours of treatment, respectively, via the induction of cell cycle arrest at the G2/M phase and apoptotic cell death. Etoposide also induced nuclear enlargement in 3T3-L1 normal murine cells. The reproductive toxicity and abnormal nuclear morphological changes seemed to correlate with the adverse effects of etoposide. We suggest that these experimental platforms, i.e., the toxicological evaluation of both nematodes and 3T3-L1 cells, may be useful to study the mechanisms underlying the side effects of chemicals, including topoisomerase inhibitors.

KEYWORDS

abnormal nuclei, *C. elegans*, cellular toxicity, etoposide, germ cell toxicity, reproductive toxicity, topoisomerase inhibitor, 3T3-L1 cells

1 | INTRODUCTION

Topoisomerase inhibitors are one of the major classes of anticancer agents because rapidly dividing cancer cells need to replicate DNA continuously, and topoisomerases are essential enzymes for DNA replication. There are two classes of topoisomerases, topoisomerase I and II. Topoisomerase I inhibitors (camptothecin, irinotecan) and topoisomerase II inhibitors (etoposide, doxorubicin) have broad spectrum anticancer activity, i.e., they can kill a broad range of cancer cells, compared to targeted anticancer agents, such as imatinib.^{1–3} However, topoisomerase inhibitors damage rapidly dividing normal cells and cause various side effects, such as myelosuppression, hair loss, gastrointestinal injury, cardiac toxicity, infertility, and the development of secondary leukemia. Therefore, continuous efforts are needed to overcome the side effects of the anticancer drugs targeting topoisomerases.^{1,4,5}

As every living organism has topoisomerases, topoisomerase inhibitors possibly affect all living organisms. Topoisomerase inhibitors have been widely used for the treatment of various cancers for decades. Environmental concerns relating to the use of topoisomerase inhibitors have increased. Topoisomerase inhibitors exert detrimental effects to diverse wild life, including bacteria, aquatic organisms (planktons and primary consumers), and plants.^{6–9} However, in these reports, the toxicological evaluation is limited to growth inhibition; the detailed cellular and molecular mechanisms underlying the toxicity of topoisomerase inhibitors have not yet been fully elucidated.

Etoposide is a poison-type topoisomerase II inhibitor, which is a clinical anticancer agent for the treatment of various human tumors, including small cell lung, testicular, and ovarian cancers.^{5,10} Similar to other topoisomerase inhibitors, etoposide has been reported to have side effects, such as immunosuppression and an increased incidence of secondary leukemia.^{4,5} Recently, our group suggested that the

ADDENDUM



New perspectives regarding the antiviral effect of vitamin A on norovirus using modulation of gut microbiota

Heetae Lee^a and GwangPyo Ko^b

^aCollege of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul, Korea; ^bCenter for Human and Environmental Microbiome, Institute of Health and Environment, School of Public Health, Seoul National University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Gut microbiota has been revealed to play an important role in various health conditions, and recent studies have suggested the modulation of gut microbiota as a therapeutic strategy. There is no effective treatment of norovirus infection, though vitamin A has been suggested to have an antiviral effect in an epidemiological study. We demonstrated that vitamin A significantly inhibited murine norovirus replication. Vitamin A supplementation significantly increased the abundance of *Lactobacillus* sp. during norovirus infection, which played a crucial role in antiviral efficacy, inhibiting murine norovirus. Therefore, we elaborated the antiviral effect of vitamin A via modulation of gut microbiota. Furthermore, we suggest a novel strategy, using potential probiotics, as having a protective and therapeutic effect on norovirus infection.

ARTICLE HISTORY

Received 22 November 2016
Revised 31 March 2017
Accepted 29 June 2017

KEYWORDS

gut microbiome; IFN- β ;
Lactobacillus; norovirus;
vitamin A

Introduction

The gut microbiota plays an important role in energy and immune homeostasis of the gastrointestinal tract.¹⁻³ Recent studies have revealed that the modulation of gut microbiota significantly impacts various diseases including infectious diseases.^{4,5} For example, fecal microbial transplantation (FMT), as a gut microbiota-targeted therapy, for the treatment of *Clostridium difficile*, could be a good example of the application of gut microbiota modulation for preventing infectious diseases.⁶ In our previous study and other recent studies, metabolic improvement by commonly used drugs such as metformin, accompanied by modulation of the abundance of bacterial taxa (e.g. *Akkermansia muciniphila*), had a beneficial effect on obesity and type 2 diabetes.^{7,8} In addition, gut microbiota influences healthy immunity from viral infections such as influenza virus and hepatitis virus.^{9,10}

Norovirus is the most common cause of acute gastroenteritis, with clinical symptoms that include diarrhea, vomiting, nausea, abdominal pain, and fever lasting one to 3 d.¹¹ Unfortunately, there is no current treatment or vaccine effective against norovirus infection. A recent study reported that norovirus infection

did not significantly alter the gut microbiota, the composition of gut microbiota was not considered in norovirus pathogenesis.¹²

In previous epidemiological studies, the norovirus infection rate and clinical symptoms decreased significantly with sufficient vitamin A supplementation.¹³ Retinoic acid, the metabolite of dietary vitamin A, plays an essential role in innate immune response against viral infection. A recent study reported that sufficient vitamin A supplementation reduced both mortality and morbidity related to infectious gastrointestinal diseases.¹⁴ Moreover, retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) signaling contribute to antiviral responses by activating type I interferons (IFNs).¹⁵ Previous studies have revealed that MDA5- and STAT-1-deficient mice had a defect in their immune response to murine norovirus.^{16,17}

In the current study, we investigated the possibility that gut microbiota, modulated by vitamin A during norovirus infection, could have a potential role in the treatment of, and preventive measures against, norovirus. Our findings provide new perspectives on how vitamin A exerts an antiviral effect against norovirus,



Complete Genome Sequence of the Plasmid-Bearing *Lactobacillus fermentum* Strain SNUV175, a Probiotic for Women's Health Isolated from the Vagina of a Healthy South Korean Woman

Sunghee Lee,^{a,b} Hyun Ju You,^{c,d,e} Boml Kwon,^c GwangPyo Ko^{a,b,c,e}

Center for Microbiome Therapeutics, KoBioLabs, Inc., Seoul, Republic of Korea; N-Bio, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; Department of Environmental Health Sciences, Graduate School of Public Health, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; Institute of Health and Environment, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; Center for Human and Environmental Microbiome, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

ABSTRACT *Lactobacillus fermentum* SNUV175 has been identified as a probiotic strain that inhibits pathogenic microorganisms related to women's health. We present the complete genomic sequence of the strain *L. fermentum* SNUV175 isolated from the vagina of a South Korean woman. This genomic information may provide insight into the functional activity of this strain.

The composition of the vaginal microbiota is influenced by host genetics and plays a key role in host defense against bacterial vaginosis and pathogenic viral infections, such as human papillomavirus (HPV) and human immunodeficiency virus (HIV) (1–3). Among the microorganisms present in the vagina, *Lactobacillus* spp. help maintain an acidic environment and produce bacteriocins that inhibit potentially pathogenic microorganisms (4).

In this study, the strain *Lactobacillus fermentum* SNUV175, isolated from the vagina of a healthy South Korean woman, showed functional properties in the treatment of vaginal infection caused by lactobacilli deficiency. Here, we present the complete genome sequence of this functional probiotic strain.

In order to perform the complete genome sequencing of the strain *L. fermentum* SNUV175, massive sequencing technology was implemented using the PacBio platform (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA). A 20-kb library was constructed with purified DNA on a single-molecule real-time (SMRT) cell and was sequenced using P6-C4 chemistry with a data collection time of 4 h. The sequencing run provided a total of 125,532 reads with quality scores \geq Q20. The number of bases was 805,055,752 bp. *De novo* assembly employed the default parameters of the Hierarchical Genome Assembly Process approach version 3 (HGAP3) (5). The single circular chromosome was 2,176,678 bp in size, with an estimated G+C content of 51.5% and around 276 \times coverage. The three plasmids ranged between 29 and 33 kb in size: pSNU175-2 (33,413 bp; G+C content, 40.0%), pSNU175-3 (33,071 bp; G+C content, 39.6%), and pSNU175-3 (29,166 bp; G+C content, 43.8%).

The assembled genome sequences were annotated using the Prokka annotation pipeline, version 1.11 (6), which predicted tRNA, rRNA, and mRNA genes. Putative gene products were then assigned to protein-coding genes (CDSs) based on their similarity to sequences in the respective database. Curated virulence factors and antibiotic resistance genes were estimated using IslandViewer3 (7) against the Virulence Factor Database (VFDB) (8) and the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (9).

Received 24 January 2017 Accepted 25 January 2017 Published 23 March 2017
Citation Lee S, You HJ, Kwon B, Ko G. 2017. Complete genome sequence of the plasmid-bearing *Lactobacillus fermentum* strain SNUV175, a probiotic for women's health isolated from the vagina of a healthy South Korean woman. Genome Announc. 5:e00045-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00045-17>.

Copyright © 2017 Lee et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to GwangPyo Ko, gko@snu.ac.kr.

Video Article

Measuring the Effect of Chemicals on the Growth and Reproduction of *Caenorhabditis elegans*

So Young Lee¹, Kyungsu Kang¹

¹Systems Biotechnology Research Center, Korea Institute of Science and Technology

Correspondence to: Kyungsu Kang at kskang@kist.re.kr

URL: <https://www.jove.com/video/56437>

DOI: [doi:10.3791/56437](https://doi.org/10.3791/56437)

Keywords: Medicine, Issue 128, Anticancer drug, *Caenorhabditis elegans*, chemical toxicology, ecotoxicology, egg laying, etoposide, natural product science, phytochemical, reproductive toxicity, topoisomerase inhibitor

Date Published: 10/5/2017

Citation: Lee, S.Y., Kang, K. Measuring the Effect of Chemicals on the Growth and Reproduction of *Caenorhabditis elegans*. *J. Vis. Exp.* (128), e56437, [doi:10.3791/56437](https://doi.org/10.3791/56437) (2017).

Abstract

Toxicological evaluation is crucial for understanding the effects of chemicals on living organisms in basic and applied biological science fields. A non-mammalian soil round worm, *Caenorhabditis elegans*, is a valuable model organism for toxicology studies due to its convenience and lack of animal ethics issues compared with mammalian animal systems. In this protocol, a detailed procedure of toxicological evaluation of chemicals in *C. elegans* is described. A clinical anticancer drug, etoposide, which targets human topoisomerase II and inhibits DNA replication of human cancer cells, was selected as a model testing chemical. Age-synchronized *C. elegans* eggs were exposed to either dimethyl sulfoxide (DMSO) or etoposide, and then the growth of *C. elegans* was monitored every day for 4 days by the stereo microscope observation. The total number of eggs laid from *C. elegans* treated with DMSO or etoposide was also counted by using the stereo microscope. Etoposide treatment significantly affected the growth and reproduction of *C. elegans*. By comparison of the total number of eggs laid from worms with different treatment periods of chemicals, it can be decided that the reproductive toxicity of chemicals on *C. elegans* reproduction is reversible or irreversible. These protocols may be helpful for both the development of various drugs and risk assessment of environmental toxicants.

Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/56437/>

Introduction

Toxicological evaluation is essential for the development of pharmaceuticals, nutraceuticals, and cosmeceuticals, as well as the risk assessment of various environmental toxins. The rodent model is one of the most popular *in vivo* experimental systems for this toxicology study; alternatively, non-mammalian organisms such as *C. elegans* are also widely used. Non-mammalian toxicological evaluation models are beneficial because of not only animal ethical issues but also their convenience and usefulness considering cost-effectiveness, maintainability, speed, and reproducibility^{1,2,3,4}.

C. elegans, a soil round worm, has been exploited as a model animal in various basic and applied biology and chemistry research. It is a 1 mm long, transparent nematode, which is simply maintained in solid or liquid Nematode Growth Media (NGM) fed with the bacterial strain *Escherichia coli* OP50. *C. elegans* has a short life cycle, and wild-type N2 *C. elegans* lays approximately 300 eggs. Therefore, it is easily propagated to be used as experimental materials^{3,4,5}. *C. elegans* has also been widely used in the toxicological studies of many drugs and environmental pollutants^{6,7,8,9}.

Because many anticancer drugs target rapidly dividing cancer cells, they can also damage rapidly dividing normal cells such as bone marrow, intestinal epithelium, and hair follicle cells. For example, topoisomerase inhibitory anticancer drugs target the DNA replication process of cancer cells; therefore, they also inhibit rapidly dividing normal cells. Every living organism has topoisomerases, and these topoisomerase inhibitors most likely impact environmental ecosystems^{8,10,11}. Thus, a drug toxicological evaluation platform using a model animal is valuable for both the development of pharmaceuticals and environmental risk assessment.

In this article, we describe the detailed protocols to test the toxicity of etoposide, which is a clinical anticancer agent that targets topoisomerase II, as a model toxic chemical in *C. elegans*. For this purpose, we will describe the measurement method of body size and the total number of eggs laid in *C. elegans* treated with etoposide.

Protocol

NOTE: The entire experiment must be performed in a clean isolated laboratory maintained at 20 °C with low dust and with minimization of contamination during worm and bacterial handling. For this purpose, experiments must be performed under the flame of an alcohol lamp or using a clean bench.



Effects of fermented milk treatment on microbial population and metabolomic outcomes in a three-stage semi-continuous culture system



Kwang Hyun Cha^{a,c}, Eun Ha Lee^a, Hyo Shin Yoon^c, Jae Ho Lee^d, Joo Yun Kim^d, Kyungsu Kang^a, Jin-Soo Park^b, Jong Beom Jin^a, GwangPyo Ko^{c,e,f,g,h,i}, Cheol-Ho Pan^{a,e,*}

^a Systems Biotechnology Research Center, KIST Gangneung Institute of Natural Products, Gangneung 25451, Republic of Korea

^b Natural Constituents Research Center, KIST Gangneung Institute of Natural Products, Gangneung 25451, Republic of Korea

^c Department of Environmental Health Sciences, School of Public Health, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

^d R&BD Center, Korea Yakult Co. Ltd., Yongin 17086, Republic of Korea

^e Center for Human and Environmental Microbiome, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

^f KollidLab, Inc., 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:

Fermented milk
Gut microbiota
In vitro colon simulation
MS/MS
NMR-based metabolomics

ABSTRACT

We investigated the impact of a fermented milk product on gut microbiota and their metabolism in 3 different conditions of the colon with a systemic viewpoint. An *in vitro* semi-continuous anaerobic cultivation was used to assess the colon compartment-specific influence of fermented milk, followed by a multiomics approach combining 16S rDNA amplicon sequencing and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The microbiome profiling and metabolomic features were significantly different across three colon compartments and after fermented milk treatment. Integrative correlation analysis indicated that the alteration of butyrate-producing microbiota (*Veillonella*, *Roseburia*, *Lachnospira*, and *Coprococcus*) and some primary metabolites (butyrate, ethanol, lactate, and isobutyrate) in the treatment group had a strong association with the fermented milk microorganisms. Our findings suggested that fermented milk treatment significantly affected microbial population in an *in vitro* cultivation system as well as the colonic metabolome in different ways in each of colon compartment.

1. Introduction

Probiotic fermented milk is consumed worldwide and is known to have health benefits related to the improvement of intestinal conditions, including the amelioration of inflammatory bowel disease and prevention of infectious pathogens (Ceapa et al., 2013; Sanchez et al., 2017). Although the health-promoting effects of fermented milk have generally long been acknowledged, the probiotic metabolism underlying the modulation of the gut environment is far from being understood due to the complicated crosstalk among gut microbiota.

With the outstanding advancements in high-throughput DNA sequencing technology, numerous studies have recently demonstrated that the microbial community and their metabolic function in the human intestine play a pivotal role in modulating many aspects of host physiology (Belizario & Napolitano, 2015; Cani & Everard, 2016; Cani et al., 2016; Spanoglannopoulos, Bess, Carmody, & Turnbaugh, 2016). There have been some reports that utilized next-generation sequencing

to show that the ingestion of fermented milk clearly modified the gut microbial community in human subjects (McNulty et al., 2011; Unno et al., 2015; Veiga et al., 2014). Although these studies elucidated the impact of fermented milk on the gut microbial community and intestinal metabolism using a well-designed metagenomic approach, some issues have remained unresolved. The biggest issue is the lack of information about microbial changes in the proximal colon because most microbiome studies have involved just human stool analyses, although the live lactic acid bacteria in fermented milk are more likely to colonize and function in upper colonic sites, which have relatively lower pH conditions as compared to other colonic sites.

The application of *in vitro* simulations of the human intestine has advantages such as precise control of experimental parameters, more accessible colonic sampling, and colon compartment-specific separation. It has been already reported that the addition of fermented milk or lactic acid bacteria can modulate gut microbial metabolism when using several *in vitro* colon mimicking systems, including the TNO

* Corresponding authors at: Department of Environmental Health Sciences, School of Public Health, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea (G. Ko).

E-mail addresses: chkh79@kist.re.kr (K.H. Cha), ehlee@kist.re.kr (E.H. Lee), hyoon86@snu.ac.kr (H.S. Yoon), jlee@se.yakult.co.kr (J.H. Lee), monera@se.yakult.co.kr (J.Y. Kim), kukang@kist.re.kr (K. Kang), jinsopark@kist.re.kr (J.-S. Park), jongbeom17@kist.re.kr (J.B. Jin), gko@snu.ac.kr (G. Ko), panse@kist.re.kr (C.-H. Pan).

[†] G.P. Ko and C.H. Pan contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.095>

Received 17 November 2017; Received in revised form 18 April 2018; Accepted 22 April 2018

Available online 23 April 2018

0308-8146/© 2018 Published by Elsevier Ltd.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Disinfection of waterborne viruses using silver nanoparticle-decorated silica hybrid composites in water environments



Sungjun Park ^{a,b}, Young-Seon Ko ^c, Haeyong Jung ^a, Cheonghoon Lee ^{a,d}, Kyoungja Woo ^c, GwangPyo Ko ^{a,b,*}

^a Department of Environmental Health Sciences, Graduate School of Public Health, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea

^b N-Bio, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea

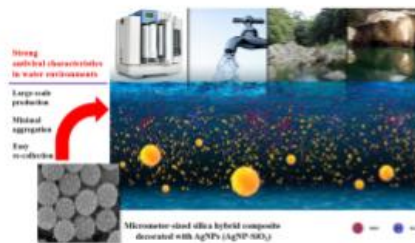
^c Nanophotonics Research Center, Korea Institute of Science and Technology, 39-1 Hawolguk-dong, Seongbuk-gu, Seoul, Republic of Korea

^d Institute of Health and Environment, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea

HIGHLIGHTS

- AgNP-SiO₂ can be synthesized using a high-yield, large-scale process.
- AgNP-SiO₂ maintained strong antiviral characteristics in different types of water.
- Modified Hom was the best model for murine norovirus disinfection using AgNP-SiO₂.
- AgNP-SiO₂ can be used without significant risk to human health and the environment.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2017

Received in revised form 27 December 2017

Accepted 27 December 2017

Available online 29 December 2017

Editor: Solo-Gabriele

Keywords:

Silver nanoparticle
Silica hybrid composite
Water disinfection
Antiviral agents
Murine norovirus

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) have been reported as an effective alternative for controlling a broad-spectrum of pathogenic viruses. We developed a micrometer-sized silica hybrid composite decorated with AgNPs (AgNP-SiO₂) to prevent the inherent aggregation of AgNPs, and facilitated their recovery from environmental media after use. The production process had a high-yield, and fabrication was cost-effective. We evaluated the antiviral capabilities of AgNP-SiO₂ particles against two model viruses, bacteriophage MS2 and murine norovirus (MNV), in four different types of water (deionized, tap, surface, and ground). MNV was more susceptible to AgNP-SiO₂ particles in all four types of water compared to MS2. Furthermore, several water-related factors, including temperature and organic matter content, were shown to affect the antimicrobial capabilities of AgNP-SiO₂ particles. The modified Hom model was the best-fit disinfection model for MNV disinfection in the different types of water. Additionally, this study demonstrated that the effects of a certain level of physical obstacles in water were negligible in regards to the use of AgNP-SiO₂ particles. Thus, effective use of AgNPs in water disinfection processes can be achieved using our novel hybrid composites to inactivate various waterborne viruses.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The capabilities of silver nanoparticles (AgNPs) to control various pathogenic microorganisms have been examined (Lara et al., 2011; Maramba-Jones and Hoek, 2010; Zhang et al., 2016). As previous

* Corresponding author at: Department of Environmental Health Sciences, Graduate School of Public Health, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea.

E-mail address: gko@smu.ac.kr (G. Ko).



Inactivation of influenza A virus via exposure to silver nanoparticle-decorated silica hybrid composites

SungJun Park^{1,2} · Young-Seon Ko³ · Su Jin Lee¹ · Cheonghoon Lee^{1,4} · Kyoungja Woo³ · GwangPyo Ko^{1,2,4}

Received: 1 November 2017 / Accepted: 19 June 2018 / Published online: 16 July 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Influenza A virus (IFV-A) is one of the main cause of seasonal flu and can infect various of host species via the reassortment of segmented RNA genomes. Silver nanoparticles (AgNPs) have been known as excellent antiviral agent against IFV. However, the use of free AgNPs has several major drawbacks, including the inherent aggregation among AgNPs and unwanted cytotoxic or genotoxic damages for human body via inhalation or ingestion. In this study, we assessed the efficacy of our novel ~30-nm-diameter AgNP-decorated silica hybrid composite (Ag30-SiO₂; ~400 nm in diameter) for IFV-A inactivation. Ag30-SiO₂ particles can inhibit IFV-A effectively in a clear dose-dependent manner. However, when real-time RT-PCR assay was used, merely 0.5-log₁₀ reduction of IFV-A was observed at both 5 and 20 °C. Moreover, even after 1 h of exposure to Ag30-SiO₂ particles, more than 80% of hemagglutinin (HA) damage and 20% of neuraminidase (NA) activities had occurred, and the infection of Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells by IFV-A was reduced. The results suggested that the major antiviral mechanism of Ag30-SiO₂ particles is the interaction with viral components located at the membrane. Therefore, Ag30-SiO₂ particles can cause nonspecific damage to various IFV-A components and be used as an effective method for inactivating IFV-A.

Keywords Silver nanoparticle · Silica hybrid composite · Influenza A virus · Antiviral agent · Disinfection · Virus inactivation

Introduction

Influenza viruses (IFVs) are single-stranded, negative-sense ribonucleic acid (RNA) viruses, included within the family *Orthomyxoviridae* (Nelson and Holmes 2007). Historically, IFVs have caused seasonal epidemics or global pandemics of flu, one of the common infectious human diseases. The

annual morbidity, mortality, and economic burden by flu worldwide are tremendous (Aigbogun et al. 2015). Globally, IFVs have an annual attack rate of 5–10% in adults and 20–30% in children (WHO 2017), and annual epidemics cause approximately 3–5 million cases of severe illness and 290,000–650,000 deaths (WHO 2018). Moreover, influenza A viruses (IFV-As) have become genetically diverse via the reassortment of segmented RNA genomes and thus can infect various host species, including humans and livestock (Harder and Vahlenkamp 2010; Neumann et al. 2009; Yamamoto et al. 2008). IFV-A transmissions could occur in individuals and even between species via various routes including contact, air, and IFV-contaminated fomites (Herfst et al. 2012; Kandun et al. 2010; Swayne 2006; Zepeda and Salman 2007). Therefore, various novel materials have been developed to control IFV-As effectively (Aydin et al. 2013; Hayashi et al. 2000).

With the remarkable advances in technology, the applying of various metallic nanoparticles including silver nanoparticles (AgNPs), copper oxide and zinc oxide in the disinfection of pathogens has been highlighted (Alswat et al. 2017a, b; Khan et al. 2018). Especially, AgNPs have been reported as strong antiviral agents against various pathogenic viruses,

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ GwangPyo Ko
gko@snu.ac.kr

¹ Department of Environmental Health Sciences, Graduate School of Public Health, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea

² N-Bio, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea

³ Nanophotonics Research Center, Korea Institute of Science and Technology, 39-1 Hawolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul, Republic of Korea

⁴ Institute of Health and Environment, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea

○ 특허 출원·등록실적

연번	증빙자료
1	<p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p style="text-align: center;">관인생략 출원번호통지서</p> <p>출원일자 2016.05.31 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2016-0067553 (접수번호 1-1-2016-0525514-25) 출원인명칭 한국과학기술연구원(3-1998-007751-8) 대리인성명 김영철(9-1998-000040-3) 발명자성명 판철호 강경수 차광현 이은하 이희주 구송이 최용수 발명의명칭 더덕 추출물을 함유하는 장 건강 개선용 조성물</p> <p style="text-align: center;">특 허 청 장</p> <p style="text-align: center;"><< 안내 >></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px;"> <ol style="list-style-type: none"> 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 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]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. </div>

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2016.08.02
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2016-0098465 (접수번호 1-1-2016-0751691-88)
출원인명칭 한국과학기술연구원(3-1998-007751-8)
대리인성명 김영철(9-1998-000040-3)
발명자성명 강경수 판철호 차광현 이은하 이희주 구송이 최용수 김상민
발명의명칭 실리마린을 포함하는 장 건강 개선용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

2

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 [출원인코드 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 등록 이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

연번	증빙자료
3	<p style="text-align: right;">출원번호통지서 페이지 1 / 3</p> <p style="text-align: center;">관인생략 출원번호통지서</p> <p>출원일자 2016.08.08 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2016-0100833 (접수번호 1-1-2016-0768687-92) 출원인명칭 한국과학기술연구원(3-1998-007751-8) 대리인성명 김영철(9-1998-000040-3) 발명자성명 강경수 판철호 차광현 이은하 이희주 구승이 최용수 양종석 김상민 발명의명칭 홍국 추출물을 포함하는 장 건강 개선용 조성물</p> <p style="text-align: center;">특 허 청 장</p> <p style="text-align: center;"><< 안내 >></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ol style="list-style-type: none"> 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 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 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. </div>

4

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	29220379
Application Number:	15596404
International Application Number:	
Confirmation Number:	7637
Title of Invention:	METHOD FOR IMPROVING INTESTINAL HEALTH USING EXTRACTS OF CODONOPSIS LANCEOLATA
First Named Inventor/Applicant Name:	Cheol-Ho PAN
Customer Number:	2292
Filer:	Craig Andrew McRobbie/Kleithon Sayson/Ana Stepina
Filer Authorized By:	Craig Andrew McRobbie
Attorney Docket Number:	5398-0103PUS1
Receipt Date:	16-MAY-2017
Filing Date:	
Time Stamp:	14:25:22
Application Type:	Utility under 35 USC 111(a)

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	CARD
Payment was successfully received in RAM	\$ 730
RAM confirmation Number	051717INTEFSW14255400
Deposit Account	022448
Authorized User	Kleithon Sayson
The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows: 37 CFR 1.16 (National application filing, search, and examination fees) 37 CFR 1.17 (Patent application and reexamination processing fees)	

연번	증빙자료
-----------	-------------

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2018.04.12
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2018-0042763 (접수번호 1-1-2018-0365782-15)
 출원인명칭 한국과학기술연구원(3-1998-007751-8)
 대리인성명 김영철(9-1998-000040-3)
 발명자성명 강경수 판철호 차광현 이은하 이희주 구송이 최홍수 양중석 김상민
 발명의명칭 중국 추출물을 포함하는 장 건강 개선용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

5

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), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 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 등록 이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

연번	증빙자료
6	<p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p style="text-align: right;">1의 3페이지</p> <p style="text-align: center;">관인생략 출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.09.05 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(2954) 출원번호 10-2018-0106181 (접수번호 1-1-2018-0884733-62) 출원인명칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2) 대리인성명 유미특허법인(9-2001-100003-6) 발명자성명 고광표 윤효신 윤성현 박효인 윤소연 발명의명칭 장내 항염증 및 균총 개선 활성을 갖는 락토바실러스 람노시스 균주</p> <p style="text-align: center;">특 허 청 장</p> <p style="text-align: center;"><< 안내 >></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.</p> <p>2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호</p> <p>3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식</p> <p>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.</p> <p>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.</p> <p>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</p> <p>7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법</p> </div>

7

	
<h1>특허증</h1> <p>CERTIFICATE OF PATENT</p>	
특허 Patent Number	제 10-1826673 호
출원번호 Application Number	제 10-2016-0067553 호
출원일 Filing Date	2016년 05월 31일
등록일 Registration Date	2018년 02월 01일
<p>발명의 명칭 Title of the Invention 더덕 추출물을 함유하는 장 건강 개선용 조성물</p>	
<p>특허권자 Patentee 한국과학기술연구원(114422-*****) 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)</p>	
<p>발명자 Inventor 등록사항란에 기재</p>	
<p>위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다. This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.</p>	
 특허청 Korean Intellectual Property Office	<p>2018년 02월 01일</p> <hr/> 특허청장 COMMISSIONER, KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE 

8

특허증

CERTIFICATE OF PATENT



특허 제 10-1850308 호
Patent Number

출원번호 제 10-2016-0100833 호
Application Number

출원일 2016년 08월 08일
Filing Date

등록일 2018년 04월 13일
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention
홍국 추출물을 포함하는 장 건강 개선용 조성물

특허권자 Patentee
한국과학기술연구원(114422-*****)
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2018년 04월 13일



QR코드로 현재기준
등록사항을 확인하세요

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

성근모

9

특허증

CERTIFICATE OF PATENT



특허 제 10-1862132 호
Patent Number

출원번호 제 10-2018-0042763 호
Application Number

출원일 2018년 04월 12일
Filing Date

등록일 2018년 05월 23일
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention
홍국 추출물을 포함하는 장 건강 개선용 조성물

특허권자 Patentee
한국과학기술연구원(114422-*****)
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2018년 05월 23일



QR코드로 현재기준
등록사항을 확인하세요

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

성근모

10

특허증

CERTIFICATE OF PATENT



특허 제 10-1909083 호
Patent Number

출원번호 제 10-2016-0098465 호
Application Number

출원일 2016년 08월 02일
Filing Date

등록일 2018년 10월 11일
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention
실리마린을 포함하는 장 건강 개선용 조성물

특허권자 Patentee
한국과학기술연구원(114422-***)**
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



특허청
 Korean Intellectual Property Office

2018년 10월 11일





QR코드로 현재기준
 등록사항을 확인하세요

특허청장
 COMMISSIONER,
 KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

박원주

○ 기술이전

연번	증빙자료
1	<p style="text-align: center;">기술이전(통상) 계약서</p> <p>서울대학교 산학협력단 (이하 '甲'이라 한다)과 주식회사 고바이오랩 (이하 '乙'이라 한다)은 '甲'이 보유하고 있는 '계약기술'을 기술도입 희망자 '乙'에게 제공하고 실시권을 허여함에 있어 다음과 같이 합의하고 계약을 체결한다.</p> <p>제1조(용어의 정의) 본 계약의 적용을 위한 용어는 다른 특별한 언급이 없는 한 다음 각 호의 의미로 사용된다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 본 계약에서 '계약기술'이라 함은 하기에 명시한, '甲'이 보유하고 있는 노하우를 말한다. <ul style="list-style-type: none"> □ 노하우명: 한국인 인체 시료에서 확보한 유익균 미생물 균집 정보에 대한 노하우 <ul style="list-style-type: none"> - 연령 및 건강 상태별 한국인 인체 대변시료 관련 임상 라이브러리 와 미생물 유전체 균집 라이브러리 정보 2. 본 계약에서 '실시'라 함은 대한민국 특허법 제2조 제3호 각 목의 1에 해당하는 것을 말한다. 3. 본 계약에서 '계약제품'이라 함은 '계약기술'을 적용하여 제조한 제품 및 생산장치 또는 '계약기술'을 적용하여 제공하는 서비스를 말하고, 중간체 또는 원료를 생산 판매하는 경우 그 중간체 또는 원료를 포함한다. 4. 본 계약에서 '개량기술'이라 함은 '계약기술'을 개량, 대체, 확장 또는 추가한 기술을 의미한다. 5. 본 계약에서 '선행기술'이라 함은 '계약기술'을 개발하기 위해서 '甲'이 이전에 개발한 기술을 의미한다. 6. 본 계약에서 '파생기술'이라 함은 '계약기술'에서 갈려 나왔고 '甲'이 개발한 기술을 의미한다. 7. 본 계약에서 '관련기술'이라 함은 '계약기술'과 관련되었지만 계약에 포함되지 않는 '甲'이 개발한 기술을 의미한다. 8. 본 계약에서 '상업화'라 함은 '계약제품'을 판매하여 매출을 올린 것을 의미한다. 9. 본 계약에서 '매출액'이라 함은 본 계약 '계약제품'의 국내외 총 매출액 으로부터 매출 환입, 매출 예누리 및 매출 할인은 공제한 금액으로서 부가가치세를 제외한 판매금액을 말한다. <p style="text-align: center;">   </p>

4장. 연구결과의 활용 계획 등

1절. 활용방안

- 본 과제에서 구축될 한국인 마이크로비움 라이브러리는 향후 지속적인 데이터 추가와 업데이트를 통해 보다 많은 시료 분석을 바탕으로 통계적 신뢰성을 확보할 것으로 여겨지며, 건강상태와 관련된 한국인 마이크로비움의 특징을 활용함으로써 건강한 장내 미생물총의 균형을 통한 면역기능 개선을 넘어서 각종 만성 질환의 예방을 위해 이용될 수 있을 것으로 보임.
- 본 연구가 성공적으로 진행된다면, 기존 유산균의 직접적인 기능성을 바탕으로 한 유산균 건강기능식품의 실제적인 장내미생물총 밸런스 개선 효능을 유전자 수준에서 과학적으로 검증할 수 있게 되면 유산균과 다른 질병 관련 핵심 마이크로비움과의 상호작용을 이해할 수 있는 계기를 마련할 수 있음.
- 기능성에 기반을 둔 맞춤형 식품 컨셉은 이미 몇 해 전부터 강조되고 있지만 사람 개개인마다 유전적, 환경적, 식이적 요인이 달라 실제적으로 적용된 바가 없음. 본 과제를 통해 얻게 될 마이크로비움 빅데이터는 유전적, 환경적, 식이적 요인에 대한 보정이 보다 용이하므로 향후 마이크로비움 기반 맞춤형 식품의 활성화에 널리 활용될 수 있을 것으로 여겨짐.
- 본 연구 수행 과정에서 확립될 장내 미생물 맞춤형 분석 플랫폼은 향후 장내 미생물 기반 다양한 기능성 검증 및 유용 기능성 물질 발굴에 유용하게 이용될 수 있으며 장내 미생물을 이용한 소재 산업화에 선도적인 역할을 담당할 수 있음.

2절. 기술적 측면

- 다음의 기술들에 대해 전문성을 갖출 수 있을 것으로 기대됨.
 - 연령별, 건강상태별 한국인 마이크로비움 빅데이터 확보 및 분석 기술
 - 인체 마이크로비움 진단 기술
 - 장내 미생물 순수분리·소재화 기술
 - 마이크로비움 맞춤형 대량배양 기술
 - 프로·프리바이오틱스 맞춤형 소재 안정화/식품 제형화 기술
 - 장내 미생물 개선 소재 맞춤형 *in vitro/in vivo* 기능성 검증 기술
 - 의료용 마이크로비움 신약 개발을 위한 생물학적 기반기술

3절. 경제·산업적 측면

- Scottish Enterprise의 2013년 보고서에 따르면 인체 마이크로비움을 이용한 산업은 크게 인체 건강, 가축 건강, biotechnology 분야를 중심으로 성장하며 관련 제품 시장은 향후 5년간 연 10-20%의 성장률을 나타낼 것으로 예상됨.
- “Human Microbiome Market by Disease, Application & by Product - Global Forecast to 2023” 보고서에 따르면, 2019년 인체 마이크로비움 치료제 관련 시장은 294백만 USD를 형성하고 이후 꾸준히 성장하여 2023년 까지 총 658백만 USD의 시장을 형성할 것으로 여겨짐.

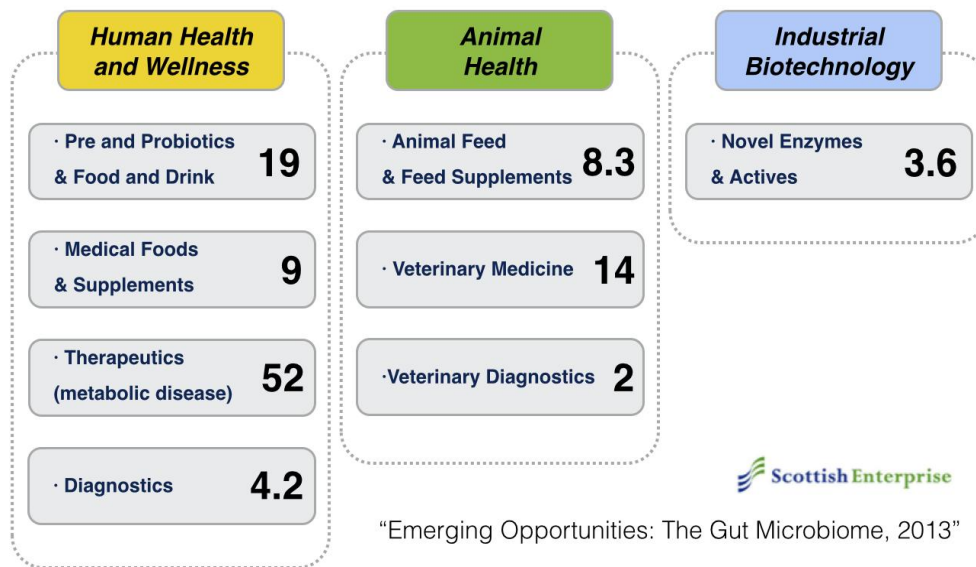


그림 116. 마이크로비움 관련 주요 산업 분야 및 세계 시장 규모 현황 (2010년, billion USD)

- 본 연구진의 한국인 맞춤형 연구는 동양인들을 대상으로 특화된 마이크로비움 치료제 시장을 형성할 수 있을 것으로 기대되며, 개발된 기술은 1차적으로 프리바이오틱스 및 프로바이오틱스 제품과 건강기능식품 개발에 적용될 수 있고, 향후 마이크로비움을 이용한 치료제 혹은 진단제 개발에 응용되어 최소 수천억 원의 시장을 형성할 것으로 보임 (그림 116).
- 그 외 다음과 같은 경제산업적 효과가 기대됨.
 - 해당 제품을 다양한 연령층을 대상으로 판매함으로써 해당 제품 매출 및 전반적인 발효유 매출 증대
 - 유가공 산업 성장 유도 및 낙농가 소득 창출 가능
 - 균주 배양 최적화 및 공정 최적화를 통한 유틸리티 비용 등 생산 원가 절감 및 생산성 향상
 - 연령별, 건강상태별로 표준화된 맞춤형 발효유 제공이라는 신사업 영역 확보

- 향후 제품군 다각화를 통한 고객에 차별화된 제품 제공
- 과학적 자료 제공을 통한 발효유 효능에 대한 신뢰도 향상
- 기능성이 검증된 원료를 이용한 국민건강증진 및 국가경쟁력 증대 도모
- 소재 및 기술 수출을 통한 부가가치 창출 (B2B, C&D)

붙임. 참고 문헌

- Analyses of intestinal microbiota: culture versus sequencing.** Hiergeist A, Gläsner J, Reischl U, Gessner A. *ILAR J.* 2015 Aug 31;56(2):228-40.
- Conducting a microbiome study.** Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, Knight R, Ley RE. *Cell.* 2014 Jul 17;158(2):250-62
- Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome.** David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. *Nature.* 2014 Jan;505:559-563
- Differential responses of gut microbiota to the same prebiotic formula in oligotrophic and eutrophic batch fermentation systems.** Long W, Xue Z, Zhang Q, Feng Z, Bridgewater L, Wang L, Zhao L, Pang X. *Sci Rep.* 2015 Aug;13469
- Effect of environmental pH on chain length of *Lactobacillus bulgaricus*.** Rhee SK, Pack MY. *J Bacteriol.* 1980 Dec;144(3):865-8.
- Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota.** Lee H, Ko G. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Oct;80(19):5935-43.
- Effects of fermented milk treatment on microbial population and metabolomic outcomes in a three-stage semi-continuous culture system.** Cha KH, Lee EH, Yoon HS, Lee JH, Kim JY, Kang K, Park JS, Jin JB, Ko G, Pan CH. *Food Chem.* 2018 Oct;263:216-224
- Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa.** Bron PA, van Baarlen P, Kleerebezem M. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Nov 21;10(1):66-78.
- Enhancement of bile resistance in *Lactobacillus plantarum* strains by soy lecithin.** Hu B, Tian F, Wang G, Zhang Q, Zhao J, Zhang H, Chen W. *Lett Appl Microbiol.* 2015 Jul;61(1):13-9.
- Enterotypes of the human gut microbiome.** Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín

M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. *Nature*. 2011 May 12;473(7346):174-80.

Experimental models of the gut microbiome. Venema K, van den Abbeele P. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013 Feb;27(1):115-26.

Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human β -defensin-2: dependence on inflammatory cytokines. Habil N, Abate W, Beal J, Foey AD. *Benef Microbes*. 2014 Dec;5(4):483-95

High-fiber and high-protein diets shape different gut microbial communities, which ecologically behave similarly under stress conditions, as shown in a gastrointestinal simulator. Marzorati M, Vilchez-Vargas R, Bussche JV, Truchado P, Jauregui R, El Hage RA, Pieper DH, Vanhaecke L, Van de Wiele T. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Jan;61(1)

Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. Hartstra AV, Bouter KE, Bäckhed F, Nieuwdorp M. *Diabetes Care*. 2015 Jan;38(1):159-65.

***Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 and the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice.** Laval L, Martin R, Natividad JN, Chain F, Miquel S, Desclée de Maredsous C, Capronnier S, Sokol H, Verdu EF, van Hylckama Vlieg JE, Bermúdez-Humarán LG, Smokvina T, Langella P. *Gut Microbes*. 2015;6(1):1-9.

Measuring the effect of chemicals on the growth and reproduction of *Caenorhabditis elegans*. Lee SY, Kang K. *J Vis Exp*. 2017 Oct;(128)

Metabonomic understanding of probiotic effects in humans with irritable bowel syndrome. Hong YS, Hong KS, Park MH, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Lee J, Kim IK, Hwang GS, Kim JS. *J Clin Gastroenterol*. 2011 May-Jun;45(5):415-25

Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. Chen K, Chen M, Liu J, Lin C, Chiu H. *J Food Sci*. 2005 June;70(5):260-266

Probiotics, prebiotics, and the host microbiome: the science of translation. Petschow B, Doré J, Hibberd P, Dinan T, Reid G, Blaser M, Cani PD, Degnan FH, Foster J, Gibson G, Hutton J, Klaenhammer TR, Ley R, Nieuwdorp M, Pot B, Relman D, Serazin A, Sanders ME. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Dec;1306:1-17.

SnapShot: the human microbiome. Gonzalez A, Vazquez-Baeza Y, Knight R. *Cell*. 2014 Jul 31;158(3):690.

Stability of gut enterotypes in Korean monozygotic twins and their association with

- biomarkers and diet.** Lim MY, Rho M, Song YM, Lee K, Sung J, Ko G. *Sci Rep.* 2014 Dec 8;4:7348
- Strategy for nuclear-magnetic-resonance-based metabolomics of human feces.** Lamichhane S, Yde CC, Schmedes MS, Jensen HM, Meier S, Bertram HC. *Anal Chem.* 2015 Jun;87(12):5930-7
- The function of our microbiota: who is out there and what do they do?** Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Aug 9;2:104.
- The integrative human microbiome project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease.** Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. *Cell Host Microbe.* 2014 Sep 10;16(3):276-89.
- The microbiome and regulation of mucosal immunity.** McDermott AJ, Huffnagle GB. *Immunology.* 2014 May;142(1):24-31.
- The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead.** Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. *Gastroenterology.* 2014 May;146(6):1489-99.
- Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon.** Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. & Gibson, G. R. *Microb Ecol.* 1998 Mar;35(2):180-7
- Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*.** Cabreiro F, Gems D. *EMBO Mol Med.* 2013 Sep;5(9):1300-10