

RS-2022
-IP12203
7

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

발간등록번호

11-1543000-004743-01

반려동물
유래
포스트바이오틱스(사균체)를
활용한
반려동물
기능성
펫푸드
개발

2024

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

반려동물 유래 포스트바이오틱스(사균체) 를 활용한 반려동물 기능성 펫푸드 개발

2024.07.29.

주관연구기관 / 우진비앤지 주식회사
공동연구기관 / (재)농축산용미생물산업육성지원센터

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “반려동물 유래 포스트바이오틱스(사균체)를 활용한 반려동물 기능성 펫푸드 개발”(개발기간 : 2022. 04. 01 ~ 2023. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 07. 29.

주관연구기관명 : 우진비앤지(주) 강재권 (인)

공동연구기관명 : (재)농축산용미생물산업육성지원센터 김대현 (인)

주관연구책임자 : 이성호

공동연구책임자 : 김양선



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

| | | | | | | | |
|------------------------|---|--------|---|--------------------------|------------------------------|-----------|-----|
| 사업명 | 기술사업화지원사업 | | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | | |
| 내역사업명 (해당 시 작성) | 민간 중심 R&D 사업화 지원 | | | 연구개발과제번호 | | 122037-02 | |
| 기술분류 | 국가과학기술 표준분류 | LA0908 | 50% | LA0904 | 30% | LB0606 | 20% |
| | 농림식품 과학기술분류 | CA0105 | 70% | AB0299 | 20% | CA0302 | 10% |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | 반려동물 유래 포스트바이오틱스(사균체)를 활용한 반려동물 기능성 펫푸드 개발 | | | | | | |
| 전체 연구개발기간 | 2022.04.01. ~ 2023.12.30. (1년 9개월) | | | | | | |
| 총 연구개발비 | 총 544,590 천원 (정부지원연구개발비: 464,000 천원, 기관부담연구개발비 : 80,590 천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원) | | | | | | |
| 연구개발단계 | 기초[] 응용[] 개발[○] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[] | | 기술성숙도 (해당 시 기재) | | 착수시점 기준(4) 종료시점 목표(8) | | |
| 연구개발과제 유형 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제 특성 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발 목표 및 내용 | 최종 목표 | | <input type="checkbox"/> 본 연구팀은 포스트게놈 다부처 유전체사업 과제(반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발)을 통해 4종의 반려견(2종), 반려묘(2종) 유래 효능·효과가 우수한 프로바이오틱스 균주를 선별하였고, 이 균주를 활용하여 반려동물 정장제(멍멍정장 정, 멍멍정장 파우더 냥냥정장) 3종의 제품을 출시하였음. <input type="checkbox"/> 상기 개발된 제품들의 제한적인 판매성과와 한정적인 원료 적용 범위에 대한 벽을 넘기 위해 생균원료의 기능에 못지 않은 사균으로서의 우수한 안전성·유효성을 검증하고 자원화하여 원료 적용 범위의 확대와 본 원료를 사용한 펫푸드(사료, 간식 등) 사업화를 확장하는 것을 목표로 함. | | | | |
| | 전체 내용 | | <input type="checkbox"/> 프로바이오틱스 균주 사균화 생산 공정 개발 및 원료화 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 사균화 조건(살균 조건, 농축 분말화 공정) 확립 ▶ 사균체 정량법 선정(직접계수법, PCR, 유세포분석기, 형광염색법, 지방산분석법 등) <input type="checkbox"/> 반려동물 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 시스템을 이용한 포스트바이오틱스(사균체) 효능 및 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 항균능, 세포활성 평가, 면역조절인자 발현을 평가 ▶ 사균화 공정에 따른 대사체 분석 및 생균제와의 대사체 비교 ▶ 가정 반려견, 반려묘 대상 임상 실시 : 급여 후 혈액검사, 면역 조절 반응 평가 <input type="checkbox"/> 반려동물 대상 포스트바이오틱스의 장내 마이크로바이옴 분석 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 포스트바이오틱스 급여 전·후 분변을 통한 장내 마이크로바이옴 변화 분석 <input type="checkbox"/> 기능성 포스트바이오틱스(사균체) 적용 반려동물 제품군 설정 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 경쟁 제품 및 시장 상황을 고려한 제품 라인업 선정 <input type="checkbox"/> 기능성 포스트바이오틱스(사균체) 활용 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 우진비앤지, 오에스피(우진비앤지 자회사, 유기농 사료 생산), 바우와우 코리아(반려동물 식품제조업체)를 통한 생산라인 확보 ▶ 소재의 효능, 안전성 시험 결과에 따른 제품별 보증 성분 | | | | |

| | | |
|--|--|----------|
| | 및 함량 설정 <input type="checkbox"/> 기능성 포스트바이오틱스(사균체)를 이용한 반려동물 기능성 펫푸드(사료, 간식 등) 라인업 구축 및 제품 등록 ▶ 오에스피, 바우와우코리아 등 반려동물 유기농 사료 및 간식 생산 개파 확보 ▶ 기능성 포스트바이오틱스를 포함한 펫푸드 라인업 구축 ▶ 제품 허가 및 등록 <input type="checkbox"/> 제품의 마케팅, 판매 전략 수립 ▶ 제품 런칭 및 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 시험, 마이크로바이옴 분석 기반 홍보자료 제작 ▶ 경쟁 브랜드 제품과 비교하여 국내 최초 반려동물 유래 미생물 사용, 포스트바이오틱스 효능 및 안전성에 대한 부분을 강조한 마케팅 전략 구축 ▶ 국내 및 해외 박람회 참석 ▶ 국내 영업망과 글로벌 네트워크를 통한 제품 홍보 | |
| | 1단계 (해당 시 작성) | 목표 내용 |
| | n단계 (해당 시 작성) | 목표 내용 |
| | | |

| | |
|---------------------|--|
| 연구개발성과 | |
| 연구개발성과 활용계획 및 기대 효과 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 향후 반려동물 기능성 소재를 이용한 펫푸드 사업 활성화를 위해 본 연구에서 도출된 데이터베이스를 기초 자료로 활용 가능 ▶ 일반 유용미생물 첨가 제품과는 차별된 미생물 사균체를 첨가한 제품 출시를 통해 새로운 기능성 펫푸드로서의 연구개발 방향 제시 ▶ 사균체 급여를 통한 장내미생물 환경 변화 및 개선효과 검증을 통한 새로운 기능성 사료첨가 유산균 연구관련 유전자원 정보 제공 ▶ 선진국 및 다국적 기업 위주의 펫푸드 및 기술에 대응하는 한국형 펫푸드 및 원천기술의 확보와 기술 파급력 강화 ▶ 국내형 반려동물 기능성 펫푸드 개발을 위한 소재 확보 및 기능성 제품 개발 활성화 및 산업화 견인 ▶ 본 과제를 통해 도출된 기능성 소재 효능 검증 기술 및 메타지놈 응용 연구는 반려동물 강건성 증대 연구 등의 관련 국가 기술 위상 제고에 기여 ▶ 포스트바이오틱스 소재를 기반으로 하는 반려동물 사료 첨가제 제품 개발 시 수출 확대 및 일자리 창출 효과를 기대 |

| | |
|--------------------|--|
| 연구개발성과의 비공개여부 및 사유 | |
|--------------------|--|

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|------------------|----------|---------------------------------|----------|---------------------|-----------|------------|-----------|-------------|-----|-----|----|
| 연구개발성과의 등록·기탁 건수 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구 시설·장비 | 기술 요약 정보 | 소프트 웨어 | 표준 | 생명자원 | | 화합물 | 신품종 | |
| | 3 | 2 | | | | | | 생명 정보 | 생물 자원 | | 정보 | 실물 |
| 연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황 | 구입 기관 | 연구시설·장비명 | 규격 (모델명) | 수량 | 구입 연월일 | 구입가격 (천원) | 구입처 (전화) | 비고 (설치장소) | ZEUS 등록번호 | | | |
| 국문핵심어 (5개 이내) | 반려동물 | | 사균체 | | 기능성 펫푸드 | | 마이크로바이옴 | | 포스트바이오틱스 | | | |
| 영문핵심어 (5개 이내) | Companion Animal | | Tyndallized latic acid bacteria | | Functional pet food | | Microbiome | | Postbiotics | | | |

〈 목 차 〉

| | |
|-----------------------------------|----|
| 1. 연구개발과제의 개요 | 6 |
| 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 | 11 |
| 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 | 13 |
| 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) | 74 |
| 5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도 | 74 |
| 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 | 75 |

최종보고서

보안등급

일반[], 보안[]

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----------------|------------------------|---|------------------------------------|---------------|----------------|-------------------|---------|--------|---------|
| 중앙행정기관명 | 농림축산식품부 | | | 사업명 | | 기술사업화지원사업 | | | | |
| 전문기관명 (해당 시 작성) | 농림식품기술기획평가원 | | | 내역사업명 (해당 시 작성) | | 민간중심R&D 사업화 지원 | | | | |
| 광고번호 | 융복합사업실-900 | | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | 122037-02 | | | | |
| | | | | 연구개발과제번호 | | | | | | |
| 기술분류 | 국가과학기술 표준분류 | LA0908 | 50% | LA0904 | 30% | LB0606 | 20% | | | |
| | 농림식품과학기술분류 | CA0105 | 70% | AB0299 | 20% | CA0302 | 10% | | | |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | 국문 | | | | | | | | |
| | | 영문 | | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | | 국문 | 반려동물 유래 포스트바이오틱스(사균체)를 활용한 반려동물 기능성 펫푸드 개발 | | | | | | | |
| | | 영문 | Development of the functional pet food taps into postbiotics(tyndallized lactic acid bacteria) to derive from pet | | | | | | | |
| 주관연구개발기관 | | 기관명 | 우진비앤지(주) | | 사업자등록번호 | 124-81-14283 | | | | |
| | | 주소 | (우)18628 경기도 화성시 양감면 정문송산로 230 | | 법인등록번호 | 124311-0014409 | | | | |
| 연구책임자 | | 성명 | 이성호 | | 직위 | 이사 | | | | |
| | | 연락처 | 직장전화 | | | 휴대전화 | | | | |
| | | | 전자우편 | | | 국가연구자번호 | | | | |
| 연구개발기간 | | 전체 | 2022. 04. 01 - 2023. 12. 31(1 년 9 개월) | | | | | | | |
| | | 단계 (해당 시 작성) | 1단계 | YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월) | | | | | | |
| | | | n단계 | YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월) | | | | | | |
| 연구개발비 (단위: 천원) | | 정부지원 연구개발비 | 기관부담 연구개발비 | | 그 외 기관 등의 지원금 | | 연구개발비 외 지원금 | | | |
| | | 현금 | 현금 | 현물 | 현금 | 현물 | | 현금 | 현물 | 합계 |
| 총계 | | 464,000 | 5,340 | 75,250 | 80,590 | | | 469,340 | 75,250 | 544,590 |
| 1단계 | 1년차 | 199,000 | | 27,250 | | | | 199,000 | 27,250 | 226,250 |
| | 2년차 | 265,000 | 5,340 | 48,000 | | | | 270,340 | 48,000 | 318,340 |
| n단계 | 1년차 | | | | | | | | | |
| | n년차 | | | | | | | | | |
| 공동연구개발기관 등 (해당 시 작성) | | 기관명 | 책임자 | 직위 | 휴대전화 | 전자우편 | 비고 | | | |
| | | (재)농축산용미생물 산업육성지원센터 | 김양선 | | | | 공동 | 기타 | | |
| 위탁연구개발기관 | | | | | | | | | | |
| 연구개발기관 외 기관 | | | | | | | | | | |
| 연구개발담당자 실무담당자 | | 성명 | 박영빈 | | 직위 | 과장 | | | | |
| | | 연락처 | 직장전화 | | | 휴대전화 | | | | |
| | | | 전자우편 | | | 국가연구자번호 | | | | |

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

2024 년 02 월 29 일

연구책임자: 이 성 호

주관연구개발기관의 장: 강 재 구

공동연구개발기관의 장: 김 대 혁

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



1. 연구개발과제의 개요

- 본 연구팀은 포스트게놈다부처유전체사업(과제명 : 반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발)을 통해 4종의 반려견(2종), 반려묘(2종) 유래 효능·효과가 우수한 프로바이오틱스 균주를 선별하였고, 이 균주를 활용하여 반려동물 정장제(멍멍정장 정, 멍멍정장 파우더, 냥냥정장) 3종의 제품을 출시하였음.
- 상기 개발된 제품들의 제한적인 판매성과와 한정적인 원료 적용 범위에 대한 벽을 넘기 위해 생균원료의 기능에 못지않은 사균으로서의 우수한 안전성·유효성을 검증하고 자원화하여 원료 적용 범위의 확대와 본 원료를 사용한 펫푸드(사료, 간식 등) 사업화를 확장하는 것을 목표로 함.

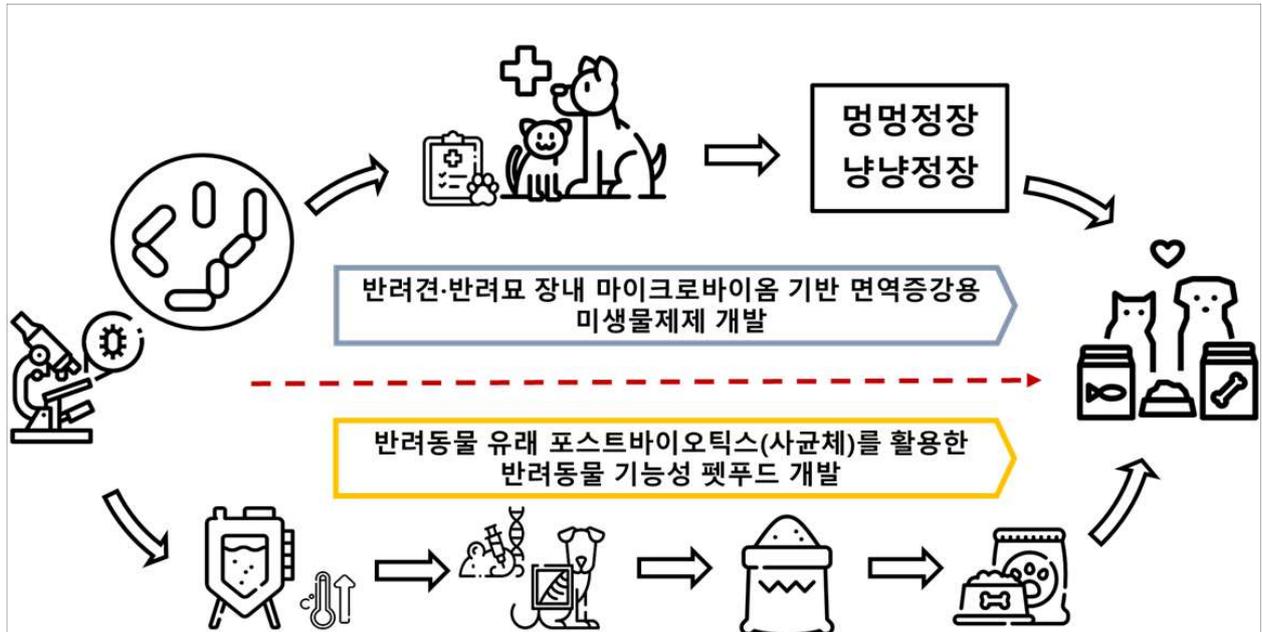


그림 1. 연구개발목표

- 프로바이오틱스 제품 '멍멍정장'은 현재 소비자에게 우수한 효능과 기호성을 인정받아 지속적인 판매와 꾸준한 매출을 기록하고 있지만, 반려동물 프로바이오틱스 영양제 시장에서 특이적인 제품으로 인정받거나 매출 급상승을 기대하기 어려운 것으로 보여짐.
- 또한 생균제 특성상 제조, 유통 과정 및 제품 보관 환경에 따른 안정성 확보가 어려움.
- 반려동물용 사료, 간식 등의 제조 시 제형화 과정에서 고온, 고압의 공정이 필수적으로 사용되는 이유로 생균 사용이 제한적임.
- 이러한 문제점 해결과 다양한 반려동물 제품 라인업 확보를 위한 방안이 필요.
- 포스트바이오틱스(사균체)는 안정성의 문제가 해결되어 제조 및 유통 안정성 확보되는 장점이 있어 고농도의 기능성 사균체 원료 확보 및 이를 이용한 반려동물 영양제뿐만 아니라 사료, 간식 등 다양한 펫푸드 라인업 확보 가능함.
- 우수한 기호성과 반려동물에 기능적 효과를 기대할 수 있는 우수한 제품 라인업을 갖추고 안전성과 유효성 그리고 가심비를 충족시키는 마케팅으로 국내 시장뿐만 아니라 동남아시아를 필두로 세계적으로 수출할 수 있는 우수한 제품을 개발하고자 크게 다음과 같은 연구 방향을 설정함.
 - ▶ 발굴한 반려동물 유래 프로바이오틱스 균주의 사균화 생산 공정 개발 및 원료화
 - ▶ 포스트바이오틱스(유산균 사균체)의 체내 활성 성분 규명
 - ▶ 반려동물 *in vivo* 시스템을 이용한 포스트바이오틱스(사균체) 안전성, 유효성 평가
 - ▶ 장내 마이크로바이옴 및 오믹스 데이터를 이용한 장 건강 상태 검증
 - ▶ 발굴한 반려동물 유래 프로바이오틱스 균주의 포스트바이오틱스(사균체)로서의 가치 평가
 - ▶ 포스트바이오틱스(사균체)를 이용한 반려동물 펫푸드(사료, 간식 등)를 개발 및 제품 등록

- ▶ 포스트바이오틱스(사균체) 실증 연구를 수행. 그리고 본 연구에 의해 도출된 결과를 바탕으로 제품 마케팅 전략을 수립하고, 기능성 사균체 원료와 이를 활용한 반려동물 펫푸드(사료, 간식 등)를 생산·판매하여 국내뿐만 아니라 수출을 통해 국산 제품의 세계화를 목표로 함.
- 본 연구팀은 포스트게놈다부처유전체사업 과제를 통해 확보한 효능이 검증된 반려동물 유래 기능성 프로바이오틱스 균주를 활용하여 포스트바이오틱스(사균체)로서의 효능을 검증하고 기호성, 안전성, 유효성이 확보된 기능성 사균체 원료와 이를 활용한 반려동물 펫푸드(사료, 간식 등)를 개발하여 이를 바탕으로 국내 업계를 넘어서 글로벌 기업과 경쟁 할 수 있는 역량을 갖추고자 함.
- 현재 국내 식약처 가이드는 고시형 원료로서의 프로바이오틱스의 기능성을 ‘유산균 증식 및 유해균 억제, 배변활동 원활, 장 건강에 도움을 줄 수 있음’으로 고시하고 있음. 한편, 최근 5년 내 개별인정형으로 등록된 프로바이오틱스 원료를 살펴보면 면역과민반응 조절, 여성 질 건강 증진, 갱년기 여성 건강 증진, 체지방 감소와 관련된 기능들임. 프로바이오틱스의 기능성이 장 건강을 물론 다양한 질환 개선 효능으로 확대되고 있음 (식품안전나라, 2021).
- 건강기능식품분야도 크게 성장하면서 유익미생물 생균제인 프로바이오틱스(probiotics), 미생물들의 성장 원료가 되는 프리바이오틱스(prebiotics), 프로바이오틱스와 프리바이오틱스를 합친 신바이오틱스(synbiotics), 그리고 유익미생물 사균체를 포함하는 포스트바이오틱스(postbiotics)에 대해서도 많은 관심이 있음.
- 한편, 최근 주목받고 있는 포스트바이오틱스(postbiotics)는 프로바이오틱스가 생산하는 유용한 대사산물과 미생물의 구성성분을 포함하는 소재임(그림 2). 국제 프로바이오틱스·프리바이오틱스 협회(ISAPP)는 최근 Nature Portfolio 논문에서 포스트바이오틱스를 ‘숙주의 건강에 유익한 미생물의 살아있는 형태 또는 그 미생물의 성분이 포함된 제형’으로 명확하게 정의 하였음(Salminen *et al.*, 2021).

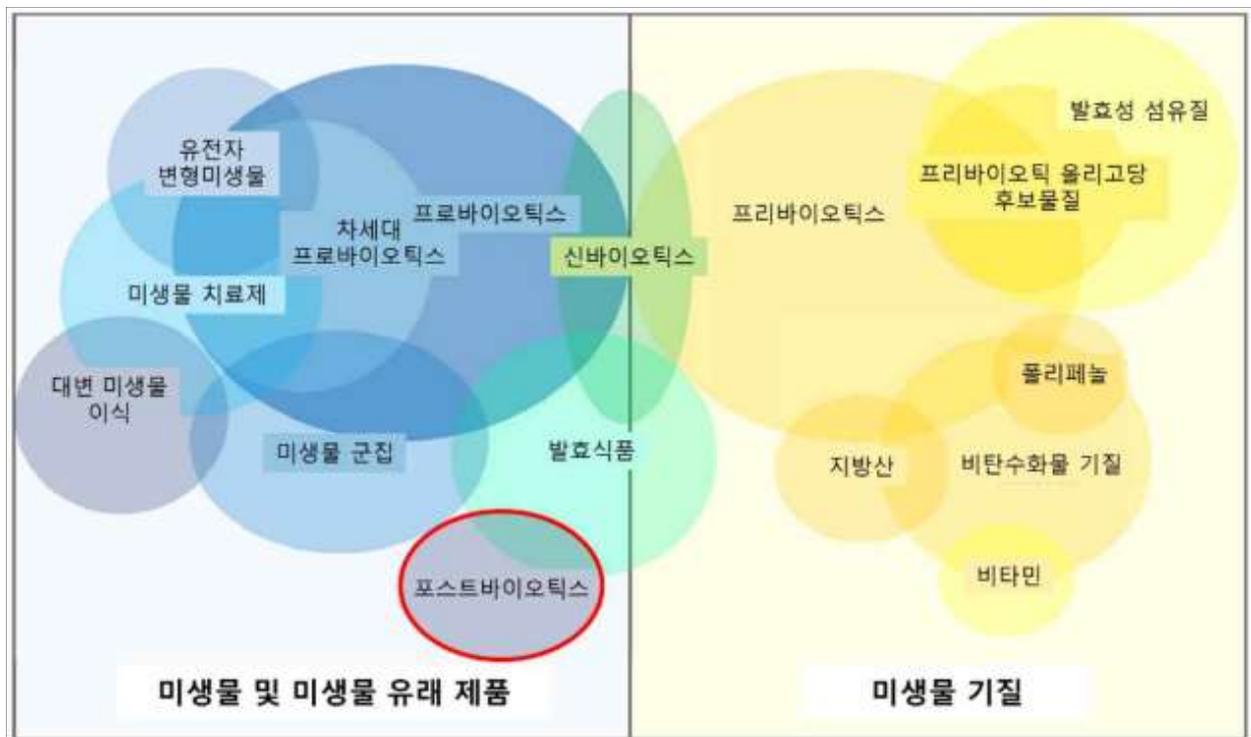


그림 2. 마이크로바이옴 분야에서 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 포스트바이오틱스 영역

Cunningham *et al.*, 2021

- 포스트바이오틱스는 기존 프로바이오틱스 소재가 갖는 안전성(safety), 기능성(function), 안정성(stability)의 한계를 극복할 수 있는 새로운 대안 소재로 주목받고 있음.
- 생균의 프로바이오틱스를 사균화 처리하여, 특정 대사물질의 복합물 형태로 제조되고

있기에 기존 생균제보다 가공, 포장, 유통, 섭취가 용이해지는 장점이 있음(Ouwehand *et al.*, 2000). 따라서 생산과 보관 과정에서 발생하는 어려움을 해결할 수 있음.

- 프로바이오틱스가 갖는 부작용(설사, 복통, 구토, 피부 발진, 가려움 등)이 우려되는 면역력 저하 환자나 영유아, 노인층이 좀 더 안전하게 섭취할 수 있다는 장점이 있음(Deshpande *et al.*, 2018).
- 한편, 기존 프로바이오틱스가 갖는 다양한 질환 개선 효능도 동등하게 유지되는 것으로 여러 연구 결과들이 보여주고 있음(Kataria *et al.*, 2009). 이런 장점들로 포스트바이오틱스를 활용한 건강기능식품들이 향후 다양한 형태로 출시될 것으로 예상됨.
- 포스트바이오틱스는 프로바이오틱스에 의해서 생성되는 다양한 대사물질들을 포함하는데, 특히 단쇄지방산(short-chain fatty acids), 항균펩타이드(antimicrobial peptide), 비타민, 효소, 세포외다당류, 세포벽성분 등이 대표적임(그림 3).

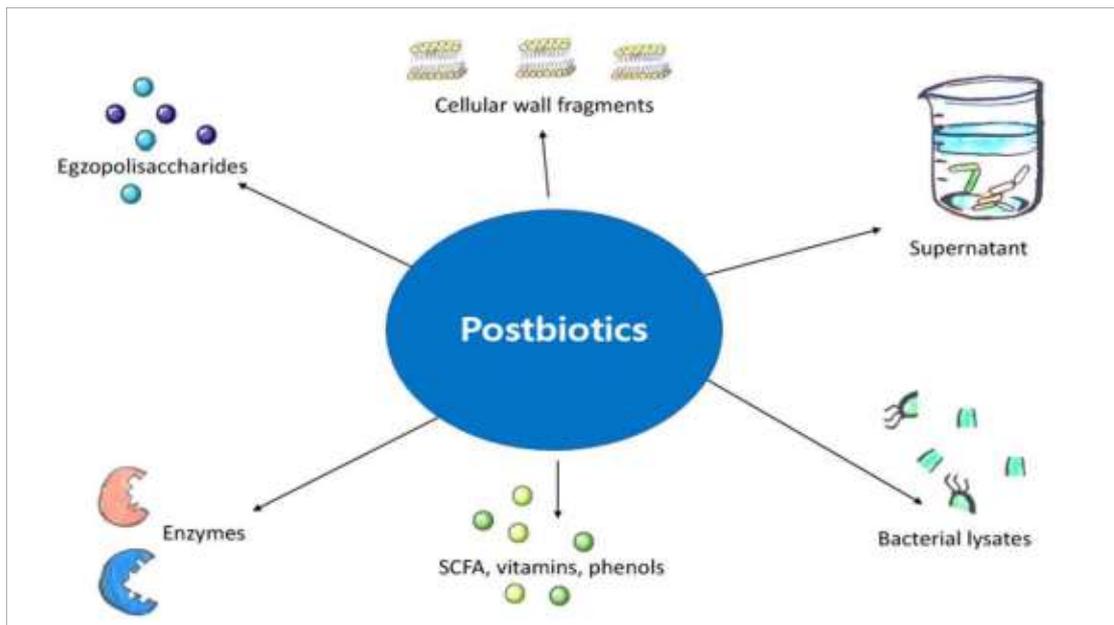


그림 3. 포스트바이오틱스의 다양한 종류

Zolkiewicz *et al.*, 2020

- 단쇄지방산 : 장 상피세포의 주요 에너지원, 장내 환경 개선
 - 항균펩타이드 : 병원균이나 부패균 억제
 - 효소 : 식물 유래 탄수화물 분해
 - 세포벽성분 : 면역조절작용, 항염 작용
- 포스트바이오틱스는 유해세균 억제, 면역기능 조절, 장관 내 질환 개선, 체지방 감소, 콜레스테롤 개선 등 다양한 생체 내 기능이 알려져 있으며, 대사산물과 사균체는 유전물질 전달, 숙주세포와의 신호전달 등으로 장내 투과성과 면역반응을 유발하여 장내 마이크로바이옴에 영향을 미침(그림4).

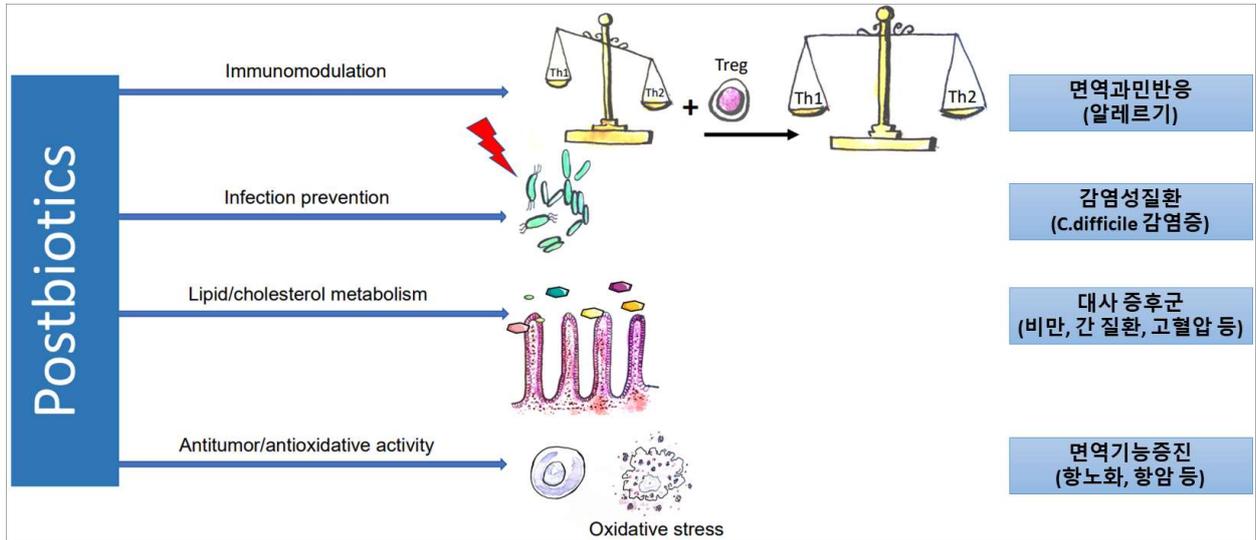


그림 4. 포스트바이오틱스의 생체내 기능과 질환 개선 효능

Zolkiewicz *et al.*, 2020

- 포스트바이오틱스가 가지는 또 하나의 장점이자 특징은 사균화 방식에 따라 프로바이오틱스의 장점을 더 강화시킬 수 있음. 대표적인 예로 차세대 프로바이오틱스로 주목받고 있는 *Akkermansia muciniphila*는 인슐린 저항성을 개선시키거나 콜레스테롤을 낮추는 대사질환 개선 기능을 나타내는데, 이 과정에 세포외막 단백질인 Amuc_1100이 중요한 역할을 함. 단백질의 효과를 증명했던 2016년 동물실험에서 생균과 대조균으로 Autoclave 하여 만든 사균을 비교했을 때 사균체가 효과적임을 확인함(Anhe *et al.*, 2019)(그림5).

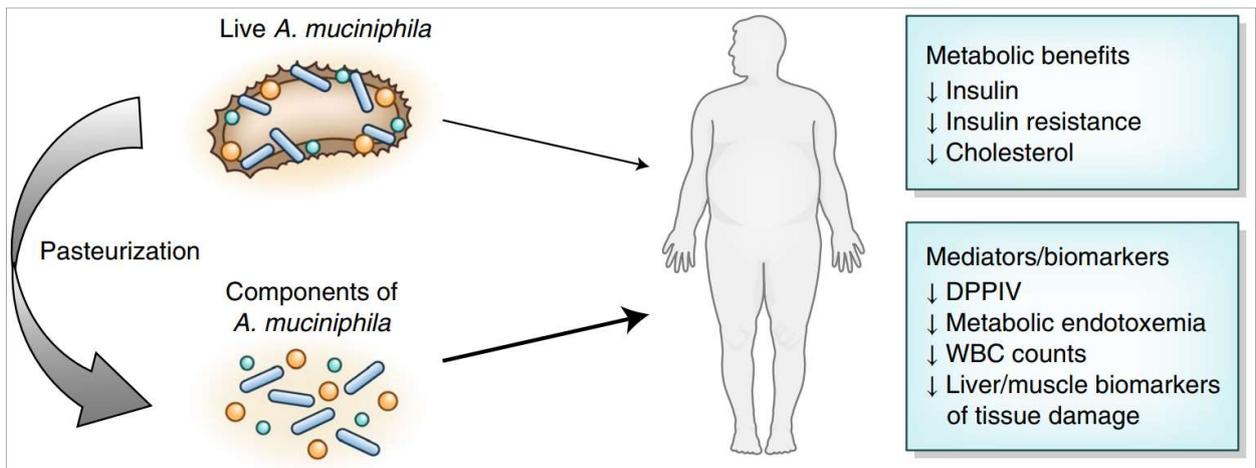


그림 5. *Akkermansia muciniphila* 생균과 사균의 효과 차이

Anhe *et al.*, 2019

- 기존 프로바이오틱스도 단쇄지방산 생산이나 대사 기능, 호르몬 분비, 위장관 상피세포벽 기능 강화, 면역반응 조절 등이 기전으로 제시됨. 포스트바이오틱스에서는 세포벽의 peptidoglycan 이나 특정 단백질 또는 효소와 같이 좀 더 구체적인 작용기전 물질이 강조됨. 이러한 기전적인 측면보다는 살아있는 균인 프로바이오틱스가 가지는 제한점을 살아있지 않다는 특성으로 극복할 수 있는 것이 포스트바이오틱스가 주목받는 이유임 (Salminen *et al.*, 2021)(그림6).

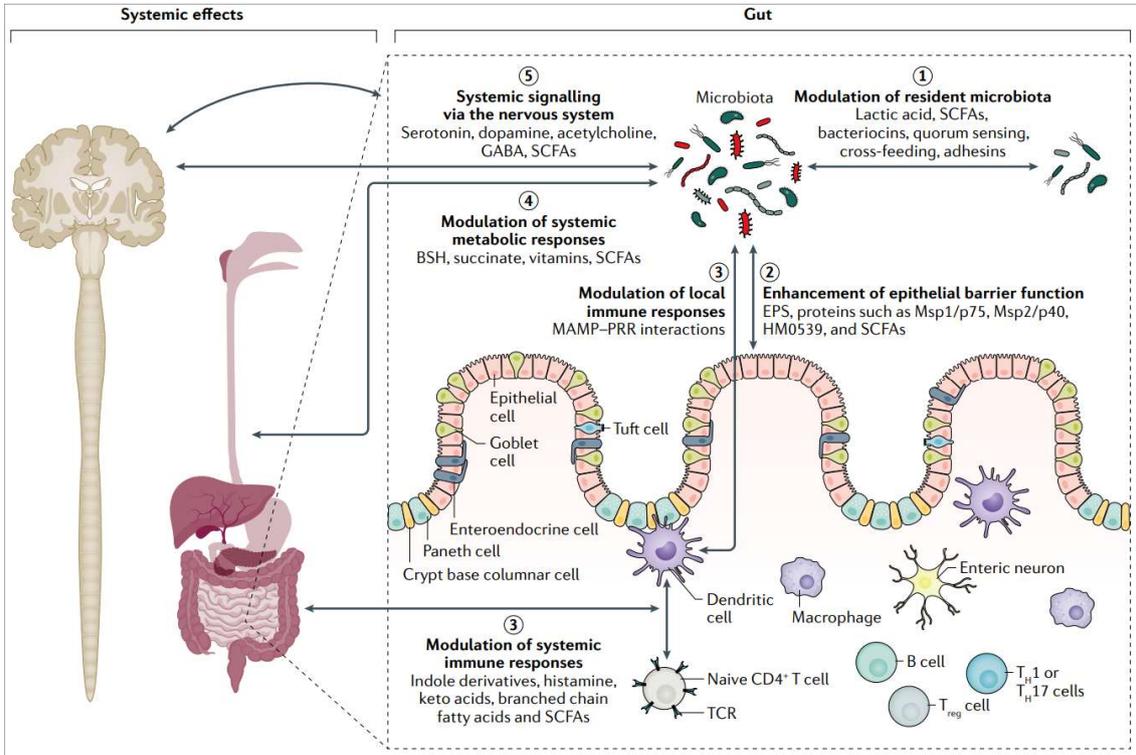


그림 6. 포스트바이오틱스의 건강 기전

Salminen *et al.*. 2021

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

| 구분 (연도) | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 |
|----------------|---|--|
| 1차년도 (2022) | 사균화 공정 확립 | <ul style="list-style-type: none"> - 고농도 균체 사균화 방법 선정 : 처리 온도(60℃ ~ 120℃), 시간(10분 ~ 60분)에 따른 살균효과 확인 : 사균체 공정에 따른 갈변 확인 - 사균체 정량법 선정(직접계수법) : 고압균질기를 이용한 균질화 조건 설정 : Hemocytometer 측정법 : 외부 분석기관을 통한 시험법 검증 |
| | 후공정 선정 | <ul style="list-style-type: none"> - 분말화 고정 선택 : 건조방법(spray dry, freeze-dry) 성상 및 공정 단가 비교 |
| | 사균체 원료화 | <ul style="list-style-type: none"> - 원료(사균) 최종 수율 확인 - 3 batch 반복 시생산을 통한 안정적 수율 확인 - 원료 최종 Spec 설정 |
| | 경쟁 제품 및 시장상황 조사 | <ul style="list-style-type: none"> - 사료, 간식, 영양제 등 시장에 유통되는 제품군 조사 - 경쟁 제품의 보증 성분 및 함량 조사 |
| | 생산라인 확보 및 시제품 제작 | <ul style="list-style-type: none"> - 생산라인 확보 : 영양제(우진비앤지 주식회사) - 자사 생산라인 : 사료(쥬오에스피) - 우진비앤지 자회사 : 간식(바우와우 코리아) - 쥬오에스피와 MOU 체결 - 시제품 제작 : 반려견 유래 프로바이오틱스 2종 사균화 원료를 포함한 사료첨가제(영양제), 사료, 간식 시제품 제작 |
| | 포스트바이오틱스(사균체)의 효능 검증 | <ul style="list-style-type: none"> - 반려견 유래 프로/포스트바이오틱스 2종에 대한 면역 및 항염증 효능 검증 |
| | 포스트바이오틱스(사균체)의 대사체 분석 | <ul style="list-style-type: none"> - 반려견 유래 포스트바이오틱스 2종의 사균화 공정에 따른 대사체 분석 및 생균제와의 대사체 비교 |
| | 가정 반려견 대상 포스트바이오틱스 임상 실시 | <ul style="list-style-type: none"> - 반려견 유래 기능성 미생물의 포스트바이오틱스를 반려견에 급여 후 혈액 검사를 통한 안정성 평가와 면역 조절 반응 평가 |
| 2차년도 (2023) | 포스트바이오틱스(사균체)의 효능 검증 | <ul style="list-style-type: none"> - 반려묘 유래 프로/포스트바이오틱스 2종에 대한 면역 및 항염증 효능 검증 |
| | 포스트바이오틱스(사균체)의 대사체 분석 | <ul style="list-style-type: none"> - 반려묘 유래 포스트바이오틱스 2종의 사균화 공정에 따른 대사체 분석 및 생균제와의 대사체 비교 |
| | 반려견, 반려묘 영양제 시제품 제작 | <ul style="list-style-type: none"> - 선정된 부형제와 향료, 사균체 원료를 섞어 시제품 제작 - 시제품 제형은 현재 시장에서 가장 많이 유통되고 있는 분말 제형을 선택 |
| | 반려동물 in vivo 시스템을 이용한 포스트바이오틱스(사균체) 안정성, 유효성 평가 | <ul style="list-style-type: none"> - 반려동물 유래 LBR_C1, LBA_C5, CACC612, CACC789 사균체의 혈액 임상 연구 |
| | 마이크로바이옴 분석 | <ul style="list-style-type: none"> - 임상 반려견 마이크로바이옴 분석 |
| | 포스트바이오틱스(사균체)를 | <ul style="list-style-type: none"> - 제품 생산 라인 확보 |

| | | |
|--|---------------------------------|---|
| | 이용한 반려동물 기능성 펫푸드 라인업 구축 및 제품 등록 | <ul style="list-style-type: none"> : 주관연구개발기관 우진비앤지 주식회사에서는 2022년 소용량 스틱포장 생산 라인 구축 완료 - 사료첨가제(영양제) 제품화 : 포스트바이오틱스(사균체) 원료가 포함된 반려동물 사료첨가제(영양제) 3종 제품화 완료 : 반려동물 영양제 제품 등록 완료 |
| | 제품 홍보 및 마케팅 | <ul style="list-style-type: none"> - 특허 출원 : 개 유래 유산균 사균체 2종, 고양이 유래 유산균 사균체 2종에 대한 효능, 효과를 확인하며 이를 포함하는 사료 조형물에 대한 2건의 특허 출원 완료 - 오산대학교 MOU 축산신문 홍보 - 국내 반려동물 사료 대리점 대상 제품 설명회 개최 - 국내, 국제 박람회 홍보 부스 운영 |
| | 제품 판매 | <ul style="list-style-type: none"> - 제품 등록과 동시에 국내 및 해외 수출에 따른 매출 발생 |

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

<반려동물 유래 프로바이오틱스 균주 4 종의 사균화 생산 공정 개발>

□ 반려동물 유래 프로바이오틱스 균주 4 종의 사균화 공정 확립

- ▶ 연구소 15 L, 30 L 발효기를 사용하여 반려견 유래 프로바이오틱스 균주 2 종 (*Lactobacillus reuteri* LBR_C1, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5)과 반려묘 유래 프로바이오틱스 균주 2 종(*Lactobacillus rhamnosus* CACC 612, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC 789) 균주를 배양함(그림 7).



그림 7. 반려동물 유래 프로바이오틱스 균주 4 종의 Lab scale 배양을 위한 발효기
15 L, 30 L 발효기

- 선행 과제(반려견, 반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발)을 통해 반려동물 유래 프로바이오틱스 균주 4 종을 확보하였고, 산업 배지 및 배양 공정 개발을 완료하였음.
- 연구소 15 L, 30 L 발효기를 사용하여 기개발된 산업 배지 및 공정을 통해 4 종의 프로바이오틱스 균주를 배양 하였으며, 원심분리기(8,000 rpm, 4℃, 10 min)를 사용하여 10 배 농축하였음(그림 8, 9).

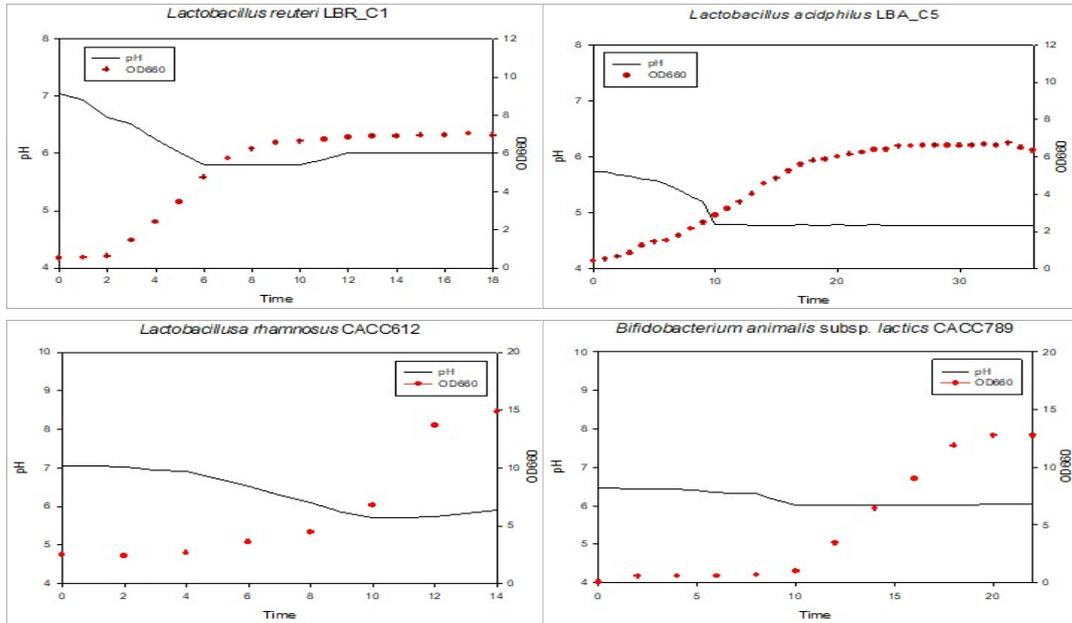


그림 8. 프로바이오틱스 균주 4 종 배양 차트

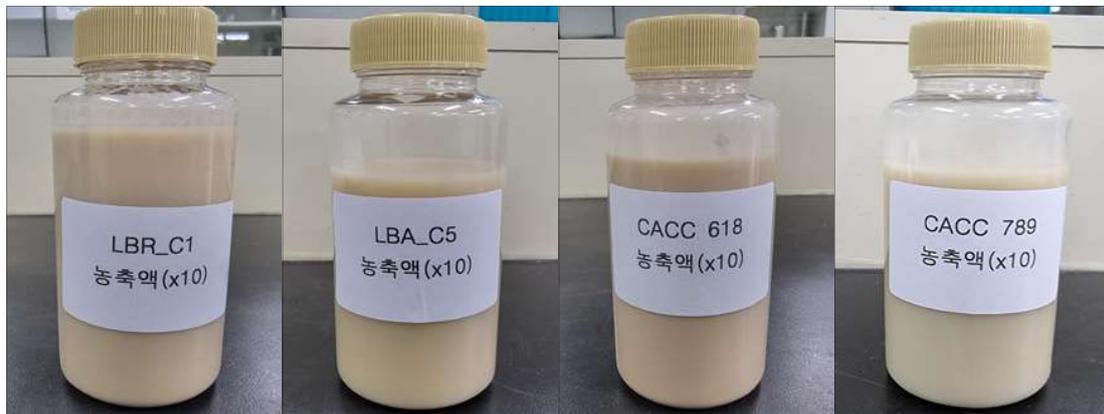


그림 9. 반려동물 유래 프로바이오틱스 균주 4 종의 배양 농축액

▶ 프로바이오틱스 균주 4 종 사균화(Tyndallization) 방법 설정

- 프로바이오틱스 균체의 사균화 방법 설정을 위해 온도를 60 ~ 120°C, 처리시간을 10 ~ 60 분의 범위로 세분화하여 틴달화 조건을 설정하였음. 냉각 조건은 수냉식으로 자사 생산 기기(발효기) 조건에 맞춰 진행함.
- 생균의 틴달화 진행 시 균체나 생성 단백질 등의 엉킴현상으로 층분리, 배양기내 고착 나아가 케이킹 현상이 발생하는 것이 일반적이기 때문에 이에대한 대책이 필요함.
- 본 연구에서 역시, 4 종의 균주 배양 농축액 모두 80°C 이상에서 열처리했을 때 멍침, 층분리가 발생했음. 이러한 멍침현상을 방지하고자 생산공정 중 가열 및 냉각 공정에서 적절한 교반(RPM) 필요함. 따라서 가열, 냉각, 교반등의 시스템을 사용할 수 있는 배양기 안에서 틴달화 공정을 진행하는 것으로 설정함.
- 프로바이오틱스 균주 4 종의 농축액을 위와 같은 사균화 조건 처리 후 Lactobacilli MRS agar (Difco) 배지에 도말하여 생균수를 확인하여 100 cfu/ml 이하의 사균화 조건을 선택하였음. 그 결과 *Lactobacillus reuteri* LBR_C1 는 80°C, 40 분 조건, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5는 80°C, 30 분 조건, *Lactobacillus rhamnosus* CACC 612는 80°C, 30 분 조건, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC 789 는 80°C, 20 분 조건에서 살균을 확인함(표 1).

표 1. *Lactobacillus reuteri* LBR_C1 틴달화 조건 따른 생균수 확인

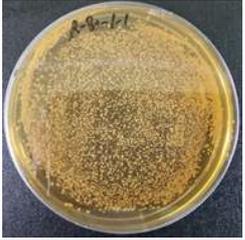
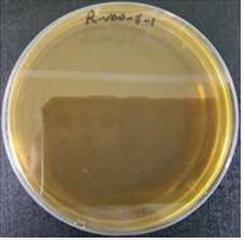
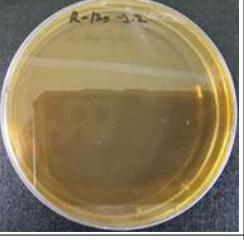
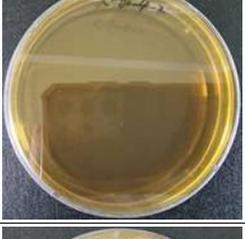
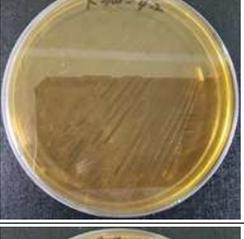
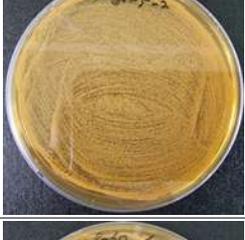
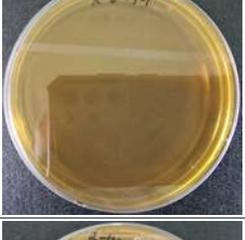
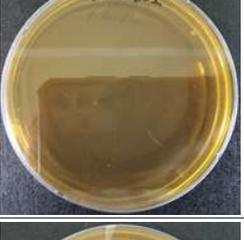
| 구분 | | 틴달화 온도 | | | |
|-----------|-----|---|---|--|---|
| | | 60℃ | 80℃ | 100℃ | 120℃ |
| 틴달화 시간 | 10분 |  |  |  |  |
| | 20분 |  |  |  |  |
| | 30분 |  |  |  | |
| | 40분 |  |  |  | |
| | 50분 |  |  |  | |
| | 60분 |  |  |  | |

표 2. *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5 틴달화 조건 따른 생균수 확인

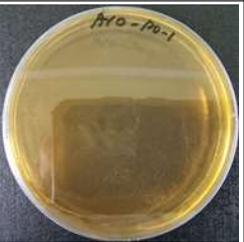
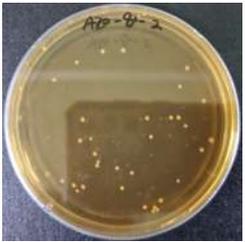
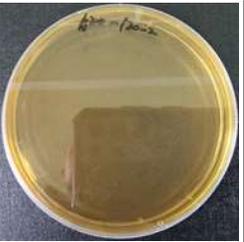
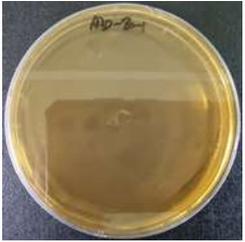
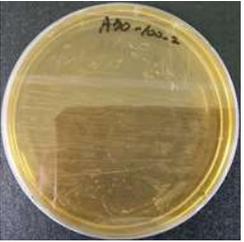
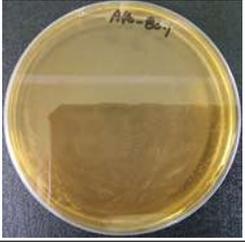
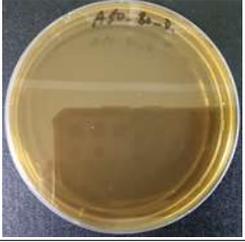
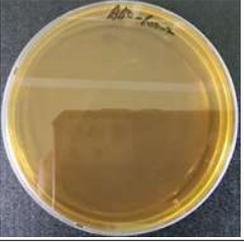
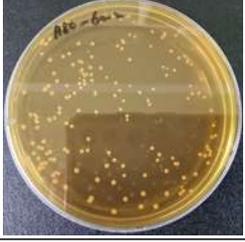
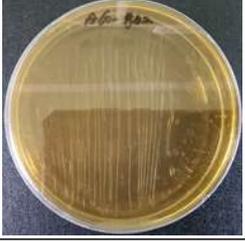
| 구분 | | 틴달화 온도 | | | |
|-----------|-----|---|---|--|---|
| | | 60℃ | 80℃ | 100℃ | 120℃ |
| 틴달화 시간 | 10분 |  |  |  |  |
| | 20분 |  |  |  |  |
| | 30분 |  |  |  | |
| | 40분 |  |  |  | |
| | 50분 |  |  |  | |
| | 60분 |  |  |  | |

표 3. *Lactobacillus rhamnosus* CACC 612 틴달화 조건 따른 생균수 확인

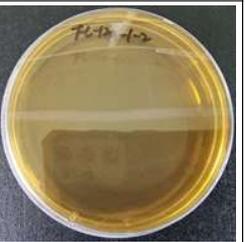
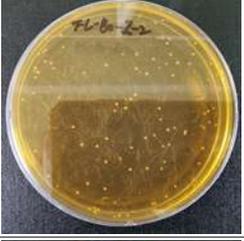
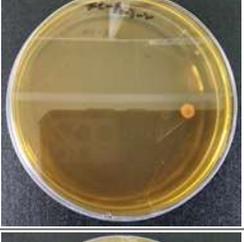
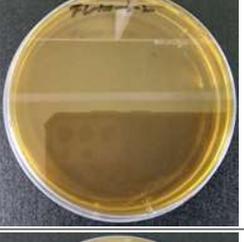
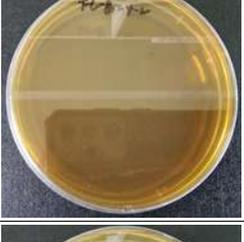
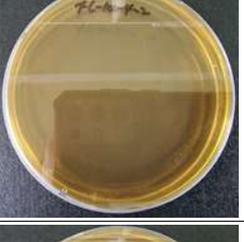
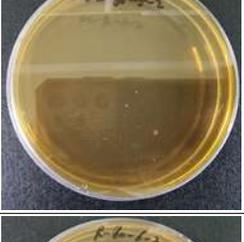
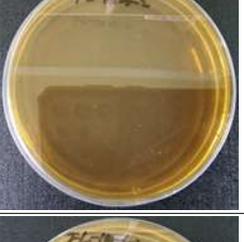
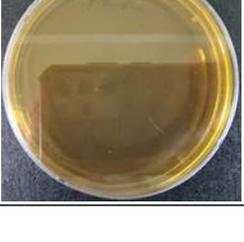
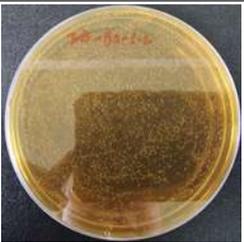
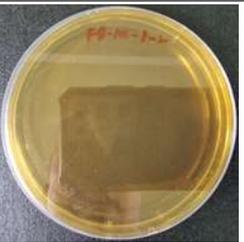
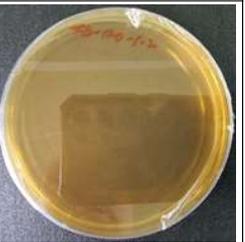
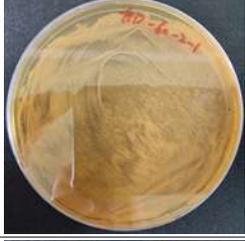
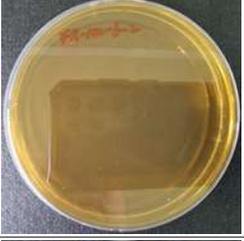
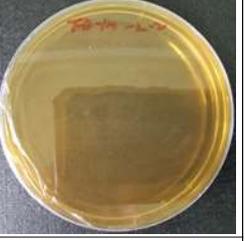
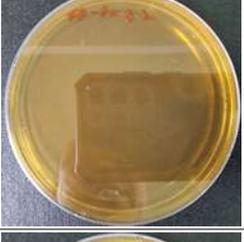
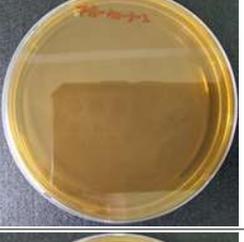
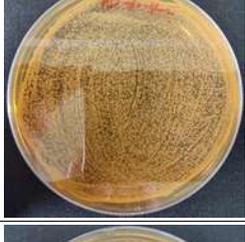
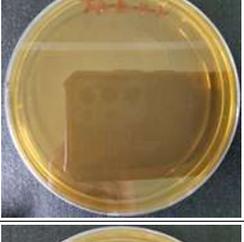
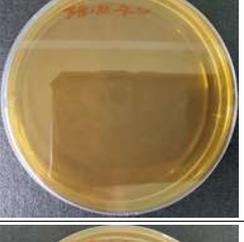
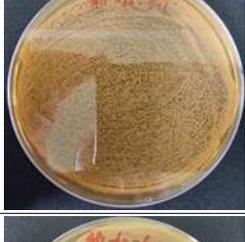
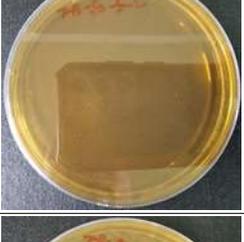
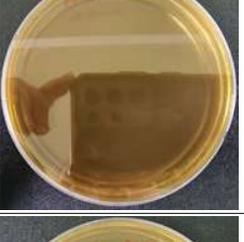
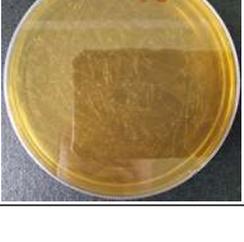
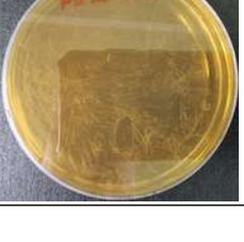
| 구분 | | 틴달화 온도 | | | |
|-----------|-----|---|---|--|---|
| | | 60℃ | 80℃ | 100℃ | 120℃ |
| 틴달화 시간 | 10분 |  |  |  |  |
| | 20분 |  |  |  |  |
| | 30분 |  |  |  | |
| | 40분 |  |  |  | |
| | 50분 |  |  |  | |
| | 60분 |  |  |  | |

표 4. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC 789 틴달화 조건 따른 생균수 확인

| 구분 | | 틴달화 온도 | | | |
|-----------|-----|---|---|--|---|
| | | 60℃ | 80℃ | 100℃ | 120℃ |
| 틴달화 시간 | 10분 |  |  |  |  |
| | 20분 |  |  |  |  |
| | 30분 |  |  |  | |
| | 40분 |  |  |  | |
| | 50분 |  |  |  | |
| | 60분 |  |  |  | |

- 틔달화 조건에 따른 사균체의 변색적도 판별은 틔달화 공정에서 프로바이오틱스 균주 4 종의 농축액 시료가 완전히 살균 된 후 변색의 정도를 PANTONE 수치로 판별함(그림 10).

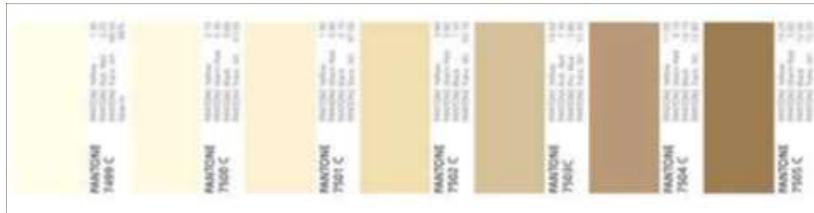


그림 10. 사균체 갈변화 정도 판단을 위한 색상표

- 그 결과 *Lactobacillus reuteri* LBR_C1, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5, *Lactobacillus rhamnosus* CACC 612, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC 789 모두 120°C, 10 분 이상 열처리 조건에서만 사균체 농축액 갈변을 확인함(표 5, 6).

표 5. *Lactobacillus reuteri* LBR_C1, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5 틔달화 조건 따른 갈변 확인

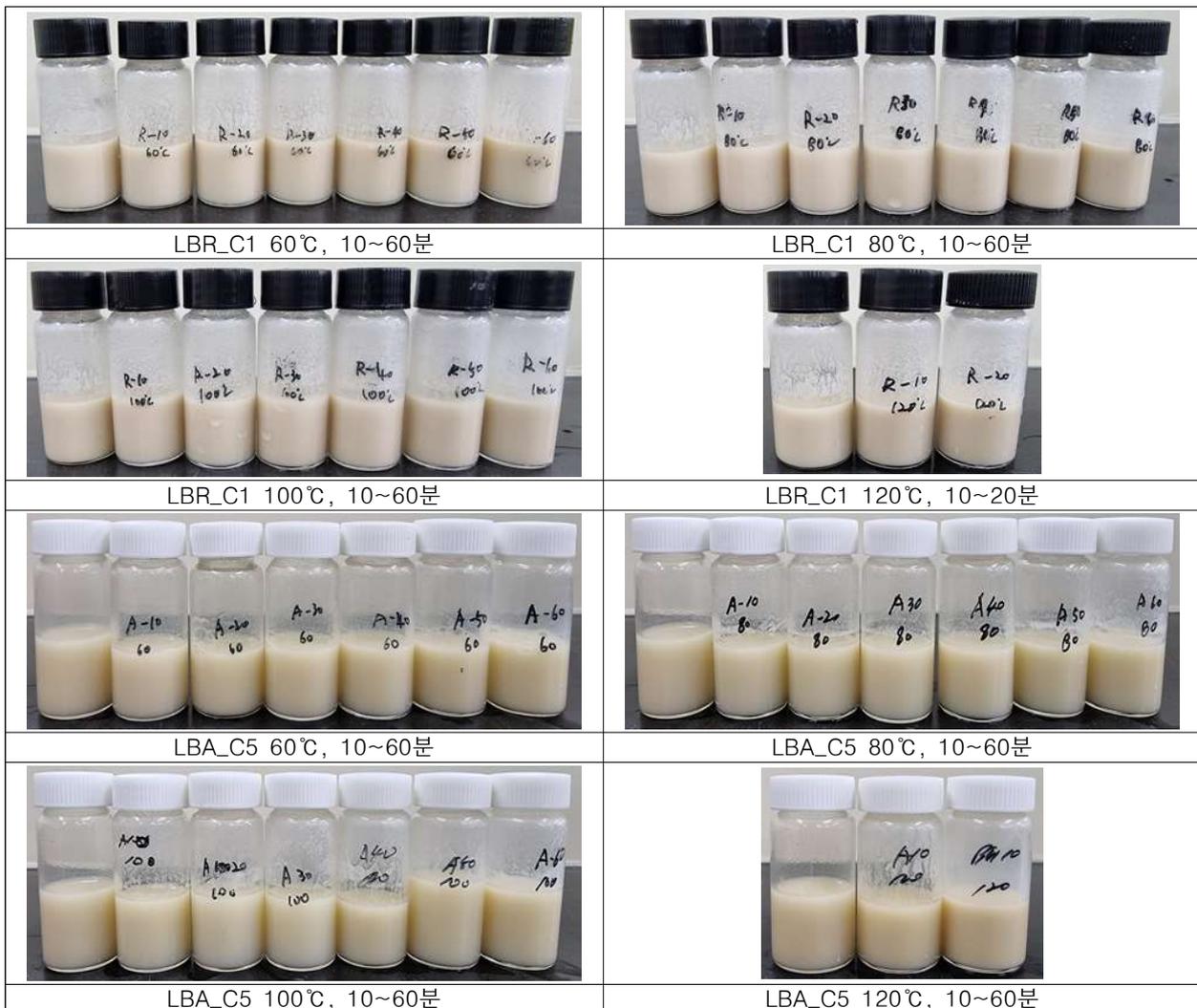
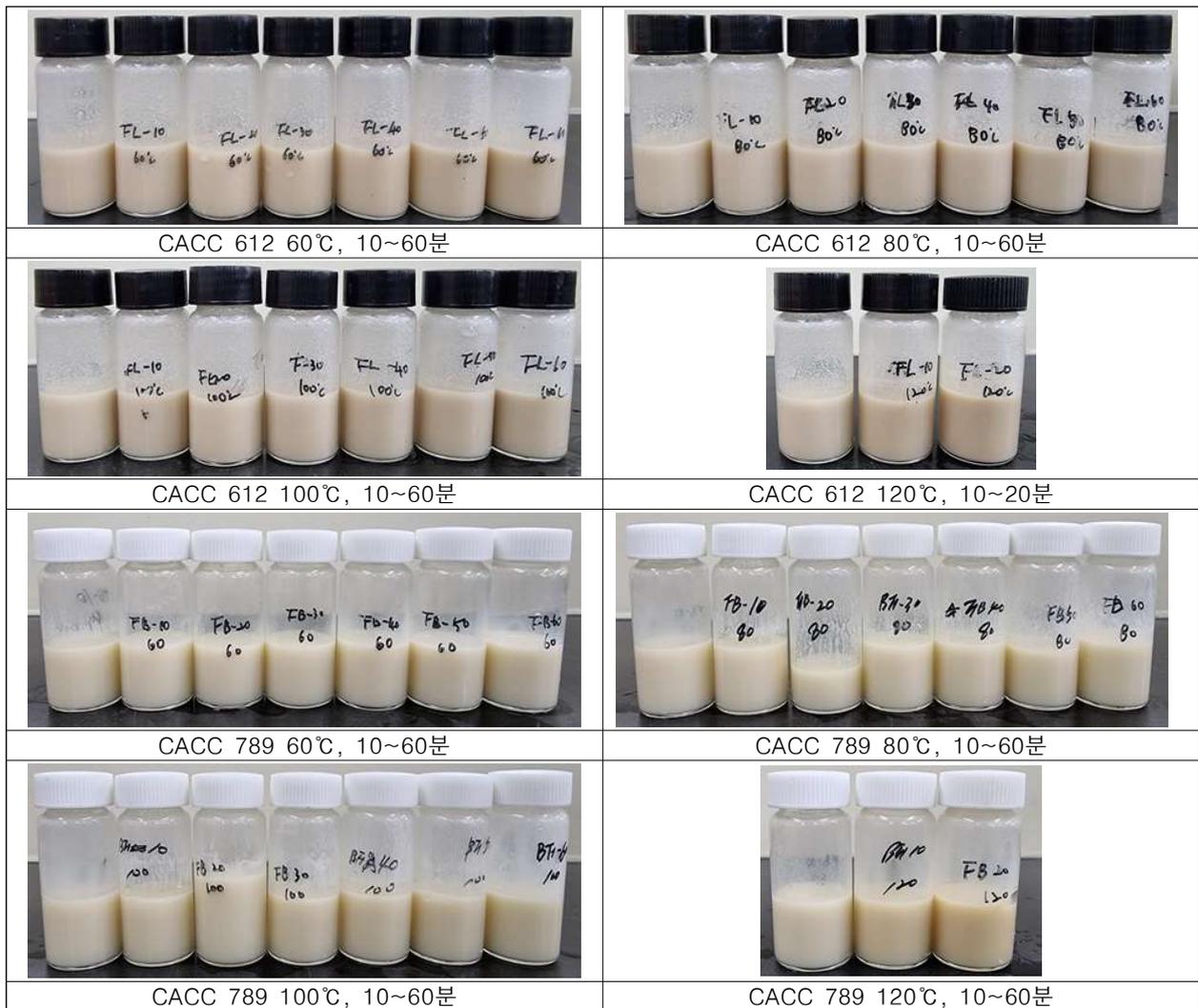


표 6. *Lactobacillus rhamnosus* CACC 612, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC 789 틴달화 조건 따른 갈변 확인



- 위의 틴달화 공정 실험을 통해 프로바이오틱스 균주 4종의 최적 틴달화 온도 및 시간 범위를 확인하였으며, 가열 시간, 온도, 냉각 시간, 생산 공정 및 단가 등을 고려하여 원료(사균체) 생산에 가장 적합한 조건으로 최종 선정하였음(표 7).

표 7. 반려건 유래 프로바이오틱스 균주 4 종의 사균화 조건 최종 설정

| 구분 | <i>L. reuteri</i> LBR_C1 | <i>L. acidophilus</i> LBA_C5 | <i>L. rhamnosus</i> CACC 612 | <i>B. animalis</i> CACC 789 |
|--------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 틴달화 온도 | 80°C | 80°C | 80°C | 80°C |
| 틴달화 시간 | 40분 | 30분 | 30분 | 20분 |

▶ 원료 제형화 공정 개발: 건조 방법 설정

- 동일한 시료를 사용한 분무건조, 동결건조 분말의 성상 및 생산 단가를 고려한 건조 방법 설정함.
- 동결건조: *Lactobacillus reuteri* LBR_C1 배양 농축액(사균체)을 사용하였음. 배양 농축액(사균체)에 보존제(10% trehalose, 5% corn starch)를 첨가하여 균일하게 혼합한 다음 -80°C에서 완전히 동결한 후 소형 동결건조기(우진비앤지㈜, 중앙연구소)를 사용하여 5일간 동결건조 하였음.

- 분무건조: *Lactobacillus reuteri* LBR_C1 배양 농축액(사균체)을 사용하였음. 배양 농축액(사균체)에 보존제(10% trehalose, 5% corn starch)를 첨가하여 균일하게 혼합한 다음 소형 분무건조기(춘천바이오산업진흥원, INLET℃ 180, PUMP% 15)를 사용하여 분무건조 하였음.

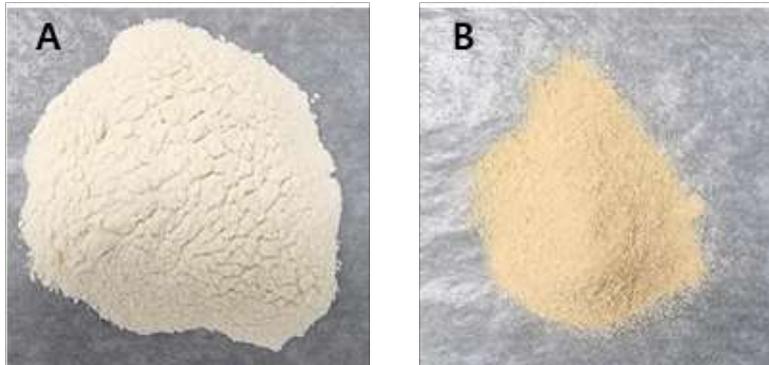


그림 11. *Lactobacillus reuteri* LBR_C1 배양 농축액(사균체) 건조 분말(A. 동결건조, B. 분무건조)

- *Lactobacillus reuteri* LBR_C1 동결건조 및 분무건조 분말의 성상 비교 결과 고온에서 건조하는 분무건조 분말에서 갈변이 확인됨. 그 외의 성상에는 차이를 보이지 않음. 하지만 동결건조 공정은 저온상태에서 건조 되므로 시간이 오래 걸리고 보유 시설의 한계로 대량생산에 어려움이 있음. 따라서 사균체 건조 공정은 생산 시간과 단가를 절감할 수 있는 분무건조방법으로 최종 선정하였음.

▶ 프로바이오틱스 사균체 균질화 및 정량법 선정

- 프로바이오틱스 사균체의 균질화 조건 설정
 - ✓ 열처리 사균체의 경우, 생균에 비해 균체의 뭉침 현상이 심함.
 - ✓ 사균체 분말 샘플 1.0 g을 칭량하여 50 ml conical tube에 넣고 멸균수를 총 10 ml로 맞추어 넣고 vortex로 잘 혼합 후 Ultra-sonicator의 Tip에 위의 시료를 넣고 750 W, 20 kHz 조건에서 10 ~ 60 분 설정 중 하나를 선택하여 균질화를 진행하였음. 그 결과 20 분 처리 샘플부터 뭉침이 없이 균질화가 잘 되었고, 그 이상 처리에서 큰 차이를 보이지 않음. 따라서 균질화 조건은 750 W, 20 kHz, 20 분으로 설정함 (표 8, 그림 12).

표 8. Ultra-sonicator 처리 시간에 따른 균질화 결과

| 조건 | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min | 40 min | 50 min | 60 min |
|----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 750W, 20kHz | 뭉침이 많이 보임 | 일부 뭉침이 보임 | 뭉침이 보이지 않음 |

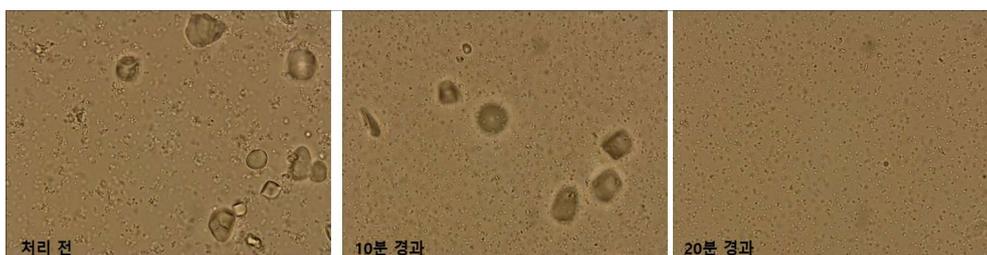


그림 12. Ultra-sonicator 처리 시간에 따른 균질화 결과(위상차현미경, x1,000)

- 사균체 정량법 설정(계수법)
 - ✓ 현재 국내에서는 대한약전(락토바실러스아시도필루스균 틴달화동결건조물 정량법)에 서술된 Hemocytometer를 이용한 현미경 관찰 측정법이 기준이 되어있음.
 - ✓ 위의 정량법으로 프로바이오틱스 균주 4 종의 사균체 분말 균체수를 측정하였고, *Lactobacillus reuteri* LBR_C1는 2.2×10^{11} cell/g, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5는 1.1×10^{10} cell/g, *Lactobacillus rhamnosus* CACC는 $612 \ 4.8 \times 10^{11}$ cell/g, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC 789는 9.4×10^{11} cell/g 의 사균체 수율을 확인함(표 9).

표 9. 반려동물 유래 프로바이오틱스 균주 4 종의 사균체 건조 분말의 사균체 계수 결과

| 구분 | <i>L. reuteri</i> LBR_C1 | <i>L. acidophilus</i> LBA_C5 | <i>L. rhamnosus</i> CACC 612 | <i>B. animalis</i> CACC 789 |
|-------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 우진비앤지 | 2.2×10^{11} cell/g | 1.1×10^{10} cell/g | 4.8×10^{11} cell/g | 9.4×10^{11} cell/g |

□ 대량생산공정 확립: 사균체 원료화

▶ Scale-up 적용 시험: 3 회 반복 시생산을 통한 안정적 수율 확인

- Lab scale 조건을 바탕으로 commercial scale 적용 시험을 진행함. 15 ton 발효기를 사용하여 배양하였으며, 연속원심분리기를 사용하여 배양액을 약 10 배 농축하여 2 ton 발효기에서 각 균주의 틴달화 공정에 따라 사균화 진행 후 분무건조 함. 위의 공정의 3 회 반복 시생산을 통해 안정적인 수율 확보 여부를 판단함. 그 결과 *Lactobacillus reuteri* LBR_C1, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5, *Lactobacillus rhamnosus* CACC 612, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC 789 모두 큰 편차없는 안정적인 사균체 수율을 확인하였으며, 위의 결과를 바탕으로 대량생산공정을 확립함(그림 13).

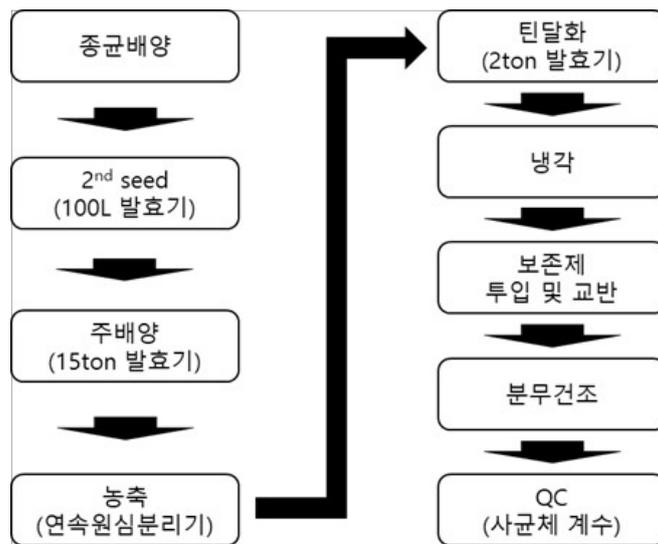


그림 13. 사균체 대량생산공정도

▶ 사균체 최종 수율 확인 및 원료 Spec 설정

- Commercial scale에서 3 회 반복 시생산을 통해 사균체 4 종의 평균 수율을 확인하였으며, 이를 바탕으로 사균체 원료 최종 spec을 *Lactobacillus reuteri* LBR_C1는

1.0 * 10¹¹ cell/g 이상, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5는 1.0 * 10¹⁰ cell/g 이상, *Lactobacillus rhamnosus* CACC 612는 1.0 * 10¹¹ cell/g 이상, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC 789는 1.0 * 10¹² cell/g 이상으로 설정함(표 10).

표 10. 반려동물 유래 프로바이오틱스 균주 4종의 사균체 원료 시생산 결과 및 최종 spec 설정

| 구분 | <i>L. reuteri</i> LBR_C1 | <i>L. acidophilus</i> LBA_C5 | <i>L. rhamnosus</i> CACC 612 | <i>B. animalis</i> CACC 789 |
|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1차 | 1.5 * 10 ¹¹ cell/g | 1.5 * 10 ¹⁰ cell/g | 5.2 * 10 ¹¹ cell/g | 1.2 * 10 ¹² cell/g |
| 2차 | 2.4 * 10 ¹¹ cell/g | 9.4 * 10 ⁹ cell/g | 4.2 * 10 ¹¹ cell/g | 9.7 * 10 ¹¹ cell/g |
| 3차 | 2.1 * 10 ¹¹ cell/g | 2.1 * 10 ¹⁰ cell/g | 3.9 * 10 ¹¹ cell/g | 1.0 * 10 ¹² cell/g |
| 평균 | 2.0 * 10 ¹¹ cell/g | 1.5 * 10 ¹⁰ cell/g | 4.4 * 10 ¹¹ cell/g | 1.3 * 10 ¹² cell/g |
| 사균체 원료 Spec | 1.0 * 10 ¹¹ cell/g 이상 | 1.0 * 10 ¹⁰ cell/g 이상 | 1.0 * 10 ¹¹ cell/g 이상 | 1.0 * 10 ¹² cell/g 이상 |



그림 14. 반려동물 유래 프로바이오틱스 균주 4종의 사균체 원료 시제품

▶ 원료 시제품 안전성 평가

- 유해미생물(대장균, 살모넬라), 중금속(납, 카드뮴, 크롬, 수은) 오염에 대한 안전성 확인을 위해 (재)농축산용미생물산업육성지원센터(공동연구기관, 사료검정인증기관)에 시험 의뢰함. 그 결과 유해미생물, 중금속 모두 검출되지 않음(그림 15).

그림 15. 원료 시제품 안전성 시험 결과(유해미생물, 중금속)

▶ 사균체 원료의 기준 및 규격 표준화

- 자체적인 사균체 함량 시험법 검증을 위해 미생물 연구분야에 권위있는 연구기관인 한국의과학연구원(마이크로바이옴센터, 대전)에 의뢰하여 Hemocytometer를 사용한 사균체 원료 4 종의 균체수 측정을 의뢰함(그림 16).
- 한국의과학연구원 의뢰 결과 LBR_C1, LBA_C5, CACC612 시료에서는 자사에서 수행한 사균수 측정(대한약전 정량법) 결과(LBR_C1: 2.2×10^{11} cell/g, LBA_C5: 1.1×10^{10} cell/g, CACC612: 4.8×10^{11} cell/g) 와 비슷한 수준의 사균수(LBR_C1: 1.4×10^{11} cell/g, LBA_C5: 1.6×10^{10} cell/g, CACC612: 1.8×10^{11} cell/g) 를 확인함.
- CACC 789는 6.2×10^{10} cell/g으로 자사에서 수행한 사균수(CACC789: 9.4×10^{11} cell/g)보자 적게 확인되었으나, 이는 사균수 측정을 위한 분산 과정에서 균이 파쇄된 것으로 판단됨.
- 위의 결과를 바탕으로 자사에서 수행한 hemocytometer를 사용한 직접계수법을 사균체 정량법으로 선정함.



그림 16. 사균체 원료 4종의 균체수 측정 결과(한국의과학연구원)

<반려견 유래 프로바이오틱스 균주 2 종 사균체 효능 평가>

□ 반려견 유래 프로바이오틱스 생균, 사균을 FACS 분석을 통해 사멸을 확인

- ▶ 사균체 확인을 위해 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit의 SYTO 9을 이용하여 생균을 Green으로 염색후 FACS(유세포 분석, Fluorescence Activated Cell Sorting)를 이용하여 분석하였고, 임상에 사용될 LBR_C1, LBA_C5 우진비앤지 샘플(C1C5_WG)에서 94.73%의 사균체를 확보함으로써 안정적인 사균체 급여(포스트바이오틱스 급여)가 가능함을 확인 함.
- ▶ *Lactobacillus reuteri* LBR_C1 생균체에 대해 양성 대조군 실험을 진행하여 92.78%의 생균체(사균체 7.22%)를 확인 함(그림 17).

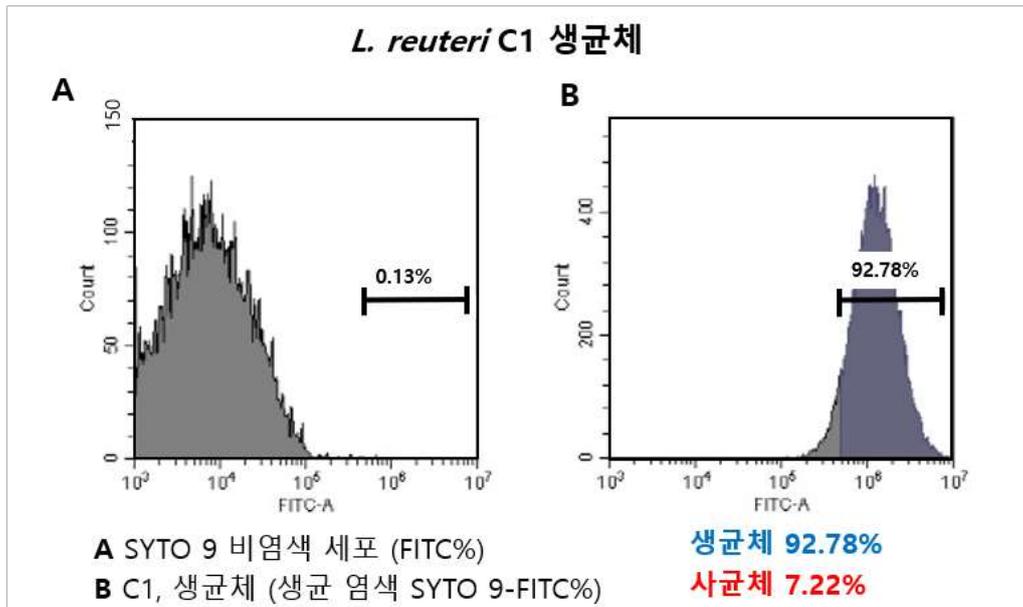


그림 17. FACS (SYTO 9)를 통한 *L. reuteri* C1 생균체의 생균 분포도 확인

- ▶ 우진비앤지는 영양소 파괴를 최소화한 사균화 방법(틸달화법/Tyndallization, 간헐멸균법)을 사용하였으며, 임상실험에 사용된 C1C5_WG 샘플(9:1 mixture)에서는 94.73% (생균체 5.27%), 연구실에서 Autoclave를 이용한 사균화 방식 (C1_D)에서는 97.96% (생균체 2.04%) 사균체가 확인됨(그림 18).

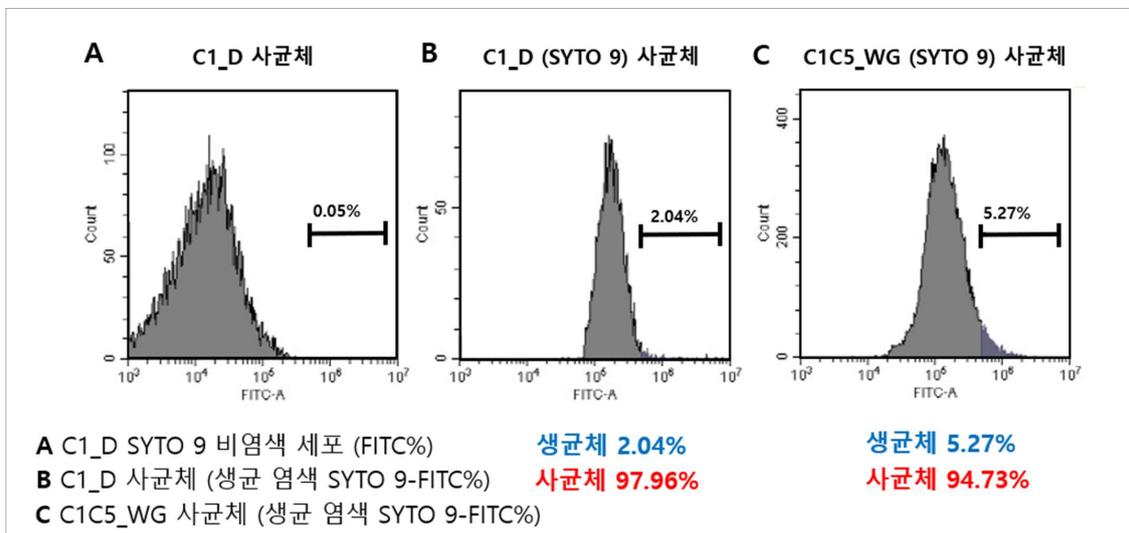


그림 18. FACS (SYTO 9)를 통한 사균체 확인

□ 반려견 유래 LBR_C1, LBA_C5 사균체의 면역 및 항염증 효능 검증 및 생균과의 비교 분석

- ▶ LBR_C1와 LBA_C5 생균제와 사균체의 면역작용을 통한 항염증 조사를 위해 Raw264.7 Macrophage 세포에 LPS(Lipopolysaccharide)를 처리하여 염증반응을 유도함과 동시에 LBR_C1와 LBA_C5 생균제(C1, C5로 표기)와 사균제(C1D, C5D로 표기)를 4 시간동안 처리후 Pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 와 Anti-inflammatory cytokine인 IL-10을 RT-qPCR을 통하여 각각의 mRNA 발현량을 조사하였음.
- ▶ mRNA 발현량 조사 결과, Pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 의 발현량은 음성대조군 대비 LPS 처리시 늘어났던 발현량이 C1와 C5 생균제와 사균제 및 LPS 동시 처리군에서 유의미하게 감소되는 것을 확인 할 수 있었음(그림 19).

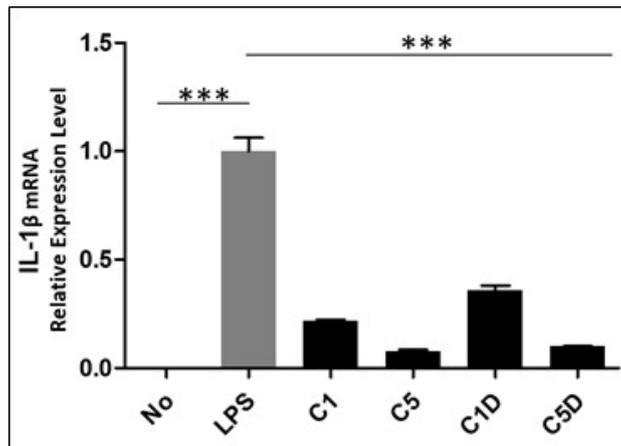


그림 19. 반려견 유래 C1과 C5 생균제와 사균체에 의한 IL-1 β 의 발현량 조사
C1(C1 생균제), C5(C5 생균제), C1D(C1 사균제), C5D(C5 사균제) *** P <0.001

- ▶ 또한, Anti-inflammatory cytokine인 IL-10의 발현량이 음성대조군과 LPS 단독처리 대조군과 비교하였을 때, C1와 C5 생균제와 사균제 및 LPS 동시 처리군에서 유의미하게 증가되는 것을 확인 할 수 있었음(그림 20).

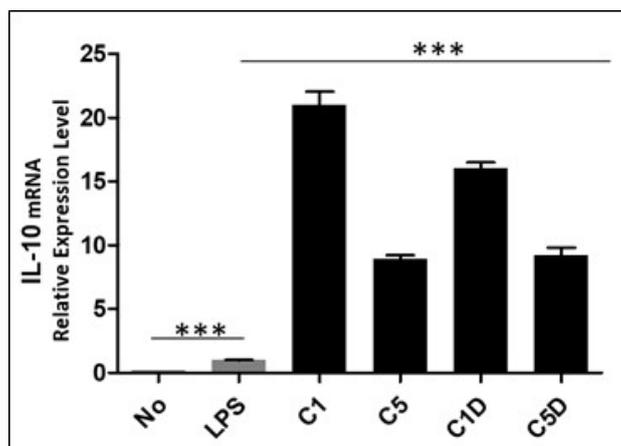


그림 20. 반려견 유래 C1과 C5 생균제와 사균체에 의한 IL-10의 발현량 조사
C1(C1 생균제), C5(C5 생균제), C1D(C1 사균제), C5D(C5 사균제) *** P <0.001

- ▶ 따라서 C1와 C5 생균제와 사균제 모두 염증 사이토카인의 분비는 억제하고, 항염증 사이토카인의 분비를 촉진함으로써 면역 사이토카인의 조절을 통해 항염증 반응을 유도할 수 있음을 확인 할 수 있음.

□ 반려견 유래 CACC612, CACC789 사균체의 면역 및 항염증 효능 검증 및 생균과의 비교 분석

- ▶ CACC612와 CACC789 생균제와 사균체의 면역작용을 통한 항염증 조사를 위해 Raw264.7 Macrophage 세포에 LPS(Lipopolysaccharide)를 처리하여 염증반응을 유도함과 동시에 CACC612와 CACC789 생균제(CACC612, CACC789로 표기)와 사균체(CACC612D, CACC789D로 표기)를 4 시간동안 처리후 Pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 와 Anti-inflammatory cytokine인 IL-10을 RT-qPCR을 통하여 각각의 mRNA 발현량을 조사하였음.
- ▶ mRNA 발현량 조사 결과, Pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 의 발현량은 음성대조군 대비 LPS 처리시 늘어났던 발현량이 CACC612와 CACC789 생균제와 사균체 및 LPS 동시 처리군에서 유의미하게 감소되는 것을 확인 할 수 있었음(그림 21).

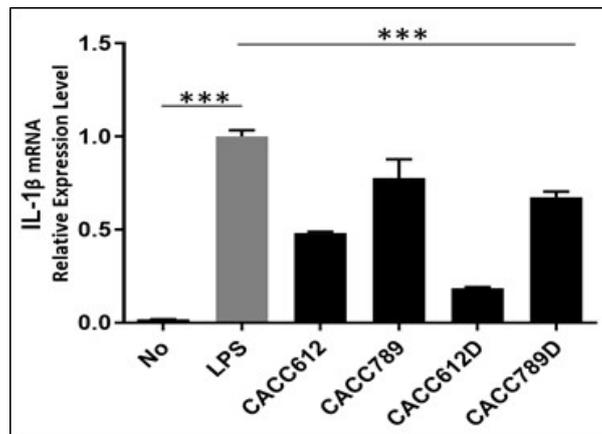


그림 21. 반려묘 유래 CACC612와 CACC789 생균제와 사균체에 의한 IL-1 β 의 발현량 조사

CACC612(CACC612 생균제), CACC789(CACC789 생균제), CACC612D(CACC612 사균체), CACC789D(CACC789 사균체) *** P <0.001

- ▶ 또한, Anti-inflammatory cytokine인 IL-10의 발현량이 음성대조군과 LPS 단독처리 대조군과 비교하였을 때, CACC612와 CACC789 생균제와 사균체 및 LPS 동시 처리군에서 유의미하게 증가되는 것을 확인 할 수 있었음(그림 22).

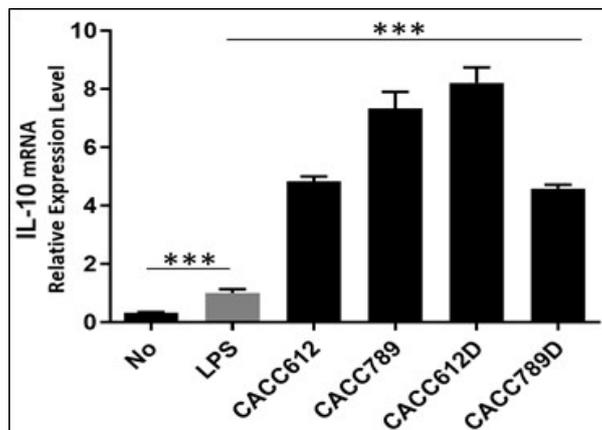


그림 22. 반려묘 유래 CACC612와 CACC789 생균제와 사균체에 의한 IL-10의 발현량 조사

CACC612(CACC612 생균제), CACC789(CACC789 생균제), CACC612D(CACC612 사균체), CACC789D(CACC789 사균체) *** P <0.001

- ▶ 따라서 CACC612와 CACC789 생균제와 사균체 모두 염증 사이토카인의 분비는 억제하고, 항염증 사이토카인의 분비를 촉진함으로써 면역 사이토카인의 조절을 통해 항염증 반응을 유도할 수 있음을 확인 할 수 있음.

□ 포스트바이오텍스의 대사체 분석

- ▶ 반려견 유래 포스트바이오텍스 2 종의 사균화 공정에 따른 대사체 분석 및 생균제와의 대사체 비교
- 반려견 유래 C1, C5 생균제와 사균체 내의 대사체를 LC-QTOF(Quadrupole Time-of-Flight) 방법을 사용하여 분석함(그림 23).

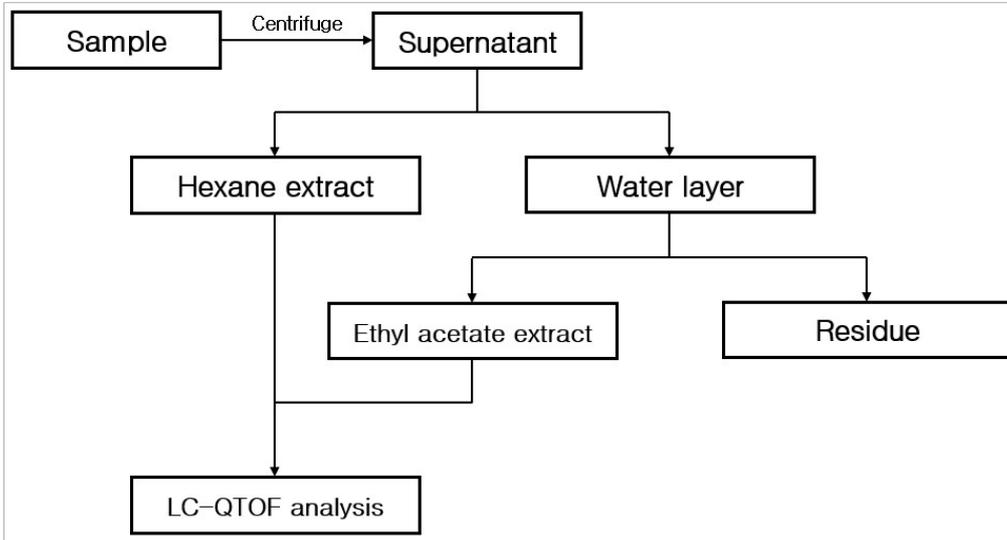


그림 23. Strategy of LC-QTOF analysis

- 배양액 시료를 원심분리하여 상등액을 취한 후 유기용매 (Hexane, EtOAc)를 이용하여 추출하였고, 각각의 추출물을 농축한 후 MeOH로 희석(2,500 ppm)하여 LC-QTOF (negative mode)로 분석함.
- 그 결과 C1, C5, C1_D 및 C5_D의 Hexane 추출물 모두 비슷한 양상의 chromatogram을 보였으며, 확인된 화합물은 n-Hexadecanal과 같은 지방족 화합물이었으며, 생리활성 기능을 보이는 화합물은 확인되지 않음(그림 24).

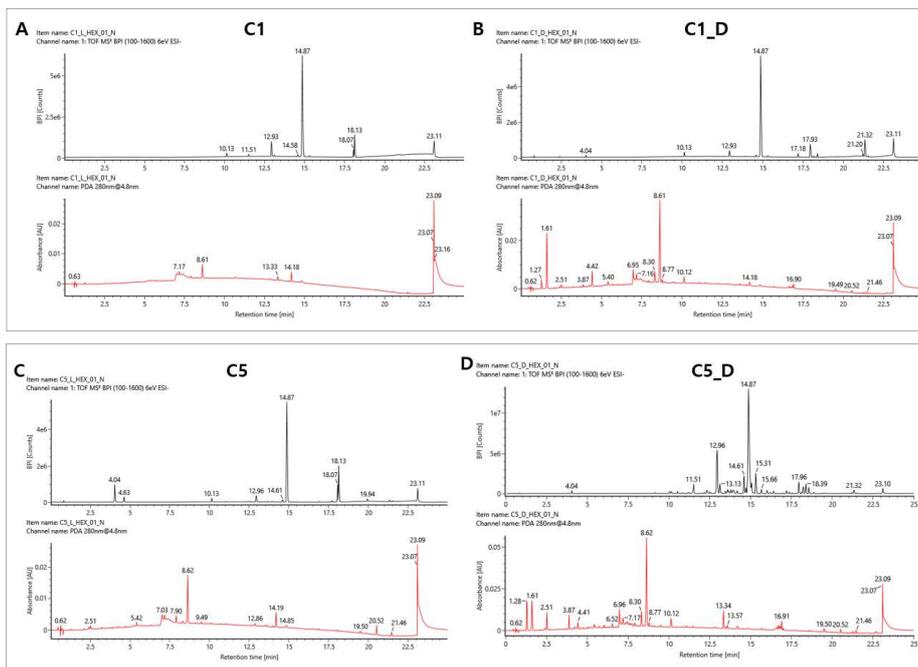


그림 24. Chromatogram of hexane extract

A, C1 생균제; B, C1_D 사균체; C, C5 생균제, D, C5_D 사균체

- Ethyl acetate extract의 경우 C1, C5, C1_D 및 C5_D간의 chromatogram 양상이 유사하였으며, 생균제와 사균체 시료에서 유기산 계열의 물질이 다수 확인됨(그림 25).
- 두 시료에서 공통적으로 확인된 물질의 mass count를 비교한 결과 사균체 시료에서 확인된 물질의 수치가 2 ~ 5 배 정도 낮게 측정되었음(표 11).

표 11. Components table of EtOAc extract

| No | Compound name | Neutral mass (Da) | Formula | Observed RT (min) | Detector counts | | | |
|----|--|-------------------|---|-------------------|-----------------|--------|--------|--------|
| | | | | | C1 | C1_D | C5 | C5_D |
| 1 | 2,4-Dihydroxyphenylacetic acid methylester | 182.0579 | C ₉ H ₁₀ O ₄ | 2.66 | 74063 | N.D | 96606 | N.D |
| 2 | Cyclo (Pro-Val) | 196.1212 | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 3.51, 4.05 | 90870 | N.D | 283017 | N.D |
| 3 | Pentalen | 86.07316 | C ₅ H ₁₀ O | 4.05 | 252375 | 86160 | N.D | 22399 |
| 4 | p-Hydroxy-phenylpropionic acid | 166.063 | C ₉ H ₁₀ O ₃ | 4.63 | 468041 | 155212 | 333397 | 56218 |
| 5 | 2-o-β-D-Glucopyranosyl ractyligenin | 482.2516 | C ₂₅ H ₃₈ O ₉ | 7.53 | 152443 | N.D | 461552 | N.D |
| 6 | Sanleng acid | 330.2406 | C ₁₈ H ₃₄ O ₅ | 8.35 | 357095 | 131509 | 928078 | 182001 |
| 7 | cholic acid | 408.2876 | C ₂₄ H ₄₀ O ₅ | 9.37 | 86815 | 31534 | 226032 | 44892 |
| 8 | Deoxycholic acid | 392.2927 | C ₂₄ H ₄₀ O ₄ | 10.05 | 107932 | N.D | 292563 | N.D |
| 9 | n-Heptadecanal | 254.261 | C ₁₇ H ₃₄ O | 14.87 | 427429 | 116768 | 216210 | 95109 |

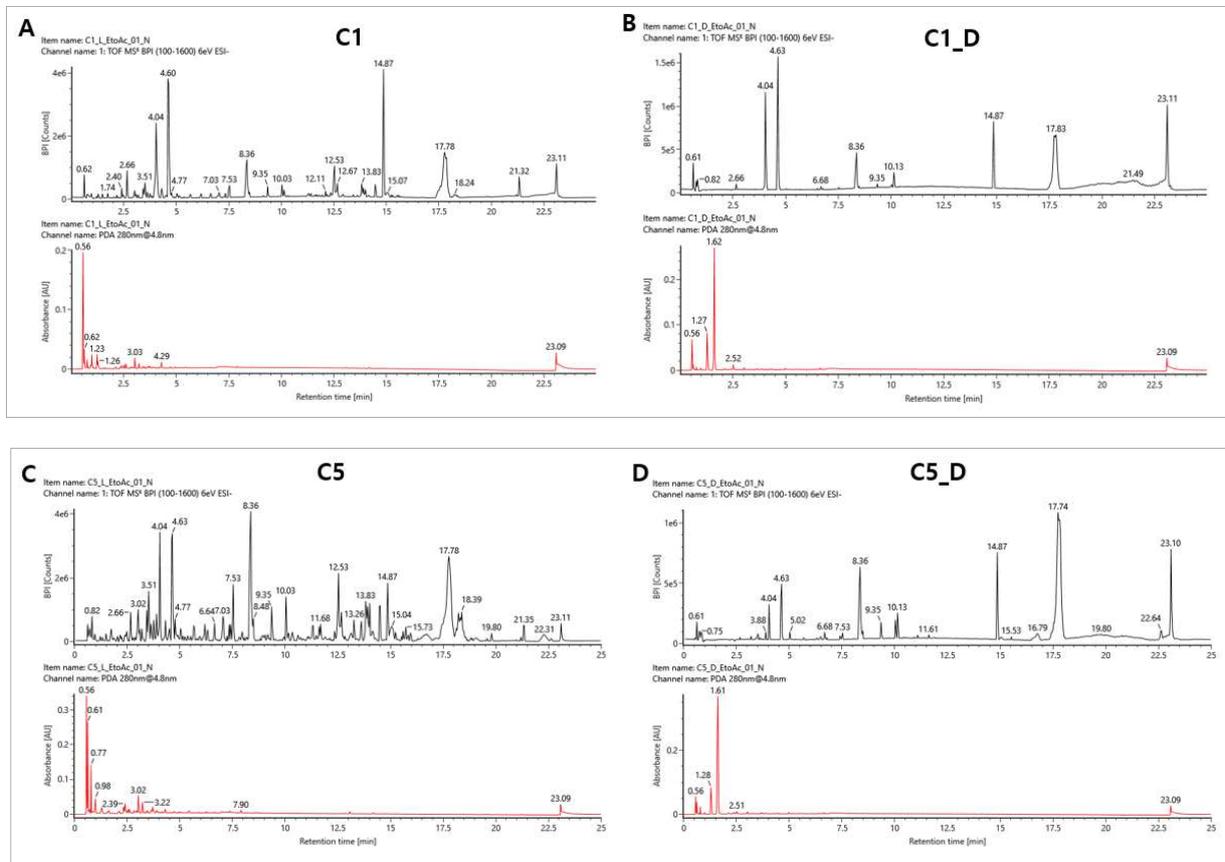


그림 25. Chromatogram of ethyl acetate extract
A, C1 생균제; B, C1_D 사균체; C, C5 생균제, D, C5_D 사균체

- ▶ 반려묘 유래 포스트바이오틱스 2종의 사균화 공정에 따른 대사체 분석 및 생균제와의 대사체 비교
 - 반려묘 유래 CACC 612, CACC 789 생균제(L)와 사균체(D) 내의 대사체를 두가지 전처리 방법으로 추출 후 LC-QTOF(Quadrupole Time-of-Flight) 분석함(그림 26).

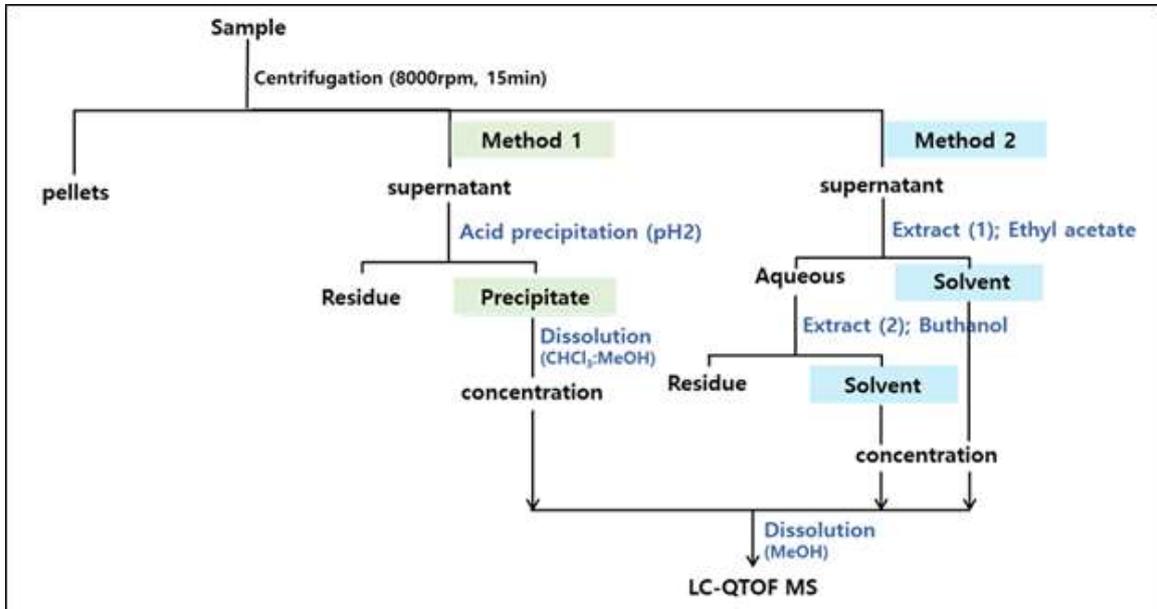


그림 26. Strategy of LC-QTOF analysis

- 대사체 분석을 위한 대사체 추출 방법 1은 시료를 원심분리하여 상등액을 취한 후 6N HCl을 가하여 pH2로 보정함. 이를 4°C에서 24 시간 방치한 후 형성된 침전물을 원심분리하여 회수함. Chloroform(CHCl₃)와 methanol(MeOH)이 2:1 비율로 조성된 용매로 재용해함. 방법 2는 시료를 원심분리하여 상등액을 취한 후 동일부피의 ethyl acetate(EtOAc)와 butanol(BuOH)을 이용하여 각각 분배 추출함.
- 방법 1과 방법 2에서 얻어진 각각의 추출물은 농축한 후 MeOH로 희석(5,000 ppm)하여 LC-QTOF(negative, positive mode)로 분석함. 분석한 데이터는 Progenesis Q1 소프트웨어를 이용하여 상관분석함.
- CACC612의 추출물을 분석 모드 별(ES-/+)로 상관분석한 결과 다양한 화합물이 식별되었음(표 12). 생균제와 사균체 시료에서 유기산 계열 및 지방족 화합물이 다수 확인되었으며 추출물 별 상이한 결과를 갖지만 atrolactic acid, indolelactic acid, aspergillusone A, saponin 계열 등 생리활성 기능을 보이는 물질이 확인됨. 사균체 시료에서 식별된 물질이 대부분 낮은 수준으로 검출되었으나 saponin 계열은 높은 수준으로 검출됨(표 12, 13).
- CACC789의 추출물을 분석 모드 별(ES-/+)로 상관분석한 결과 다양한 화합물이 식별되었음(표). 생균제와 사균체 시료에서 유기산 계열 및 지방족 화합물이 다수 확인되었으며 추출물 별 상이한 결과를 갖지만 asplicin, quinestron, saponin 계열, isoflavone 계열 등 생리활성 기능을 보이는 물질이 확인됨. 사균체 시료에서 식별된 물질이 대부분 낮은 수준으로 검출됨(표 14, 15).
- 반려견 유래 대사체 분석에서는 분배차이를 이용한 LLE(liquid-liquid extraction)법으로 유기용매의 극성도에 따라 target compound를 추출하였음. 이 때 hexane 추출물의 경우 지방족 화합물만 검출되었고 ethyl acetate 추출물의 경우 유기산 계열의 물질이 검출되었음. 반려묘 유래 대사체 분석에서는 반려견 유래 대사체 분석 결과를

바탕으로 다양한 대사체를 분석하기 위하여 추가적인 전처리 방법을 수행함. 반려묘 유래 대사체 분석의 방법 1은 산침전법으로 pH를 저하시켜 단백질을 정제하는데 주로 쓰이는 방법을 응용하였으며 반려묘 유래 대사체 분석 방법 2는 LLE 방법으로 반려견 유래 대사체 분석과 동일하나 더 많은 대사산물을 분석하기 위해 ethyl acetate와 butanol로 유기용매를 변경하여 추출하였음. 반려묘 유래 대사체 분석에 사용한 butanol의 경우 비극성용매이나 수용성 대사체들의 일부를 추출할 수 있음.

- 반려견 유래 대사체 분석은 UNIFI software를 사용하였으며 이는 각각의 샘플에서 분리된 peak의 MS 값을 이용하여 화학 구조를 식별하는데 유용한 software로 ID 되는 화합물이 극소수임. 반려묘 유래 대사체 분석은 Progenesis Q1 software를 사용하였으며 이는 다양한 변수에 대하여 통계적으로 유효한 농도 변화를 가지는 화합물을 식별하는데 유용한 software로 처리구별 변수에 대한 다변량 통계처리를 한 데이터를 얻을 수 있었으며 반려견 유래 대사체 분석 결과 값과 유사한 유기산 및 지방족 화합물 뿐 아니라 다양한 생리활성 기능을 보이는 물질을 확인할 수 있었음(표 12, 13, 14, 15).
- 본 연구결과는 생균제 및 사균체 대사체 LC-QTOF분석을 위하여 다양한 전처리 방법과 소프트웨어를 사용하여 분석을 진행하였으며, 반려견 유래 대사체 분석에 비해 반려묘 유래 대사체 분석에서 수용성 대사체를 포함한 더 다양한 대사체 물질의 측정을 위한 전처리 방법과 소프트웨어를 이용하여 생균제와 사균체의 동등한 비교를 하고자 다양한 분석을 시도하였음. 향후 비극성 용매를 이용한 추출법으로 일부 수용성 대사체를 포함하기는 하지만 지용성 대사체 분석에 치우친 분석법을 수용성 대사체를 추출할 수 있는 전처리 기법의 개발을 통해 보완해 나간다면 더 많은 대사물질을 포함한 분석이 가능할 것으로 사료됨.

Figure 12. Profiling of the chemical components of extracted fractions of CACC612 obtained from the LC-QTOF-MS(negative ionization mode) analysis.

| No | Compound name | Formula | Retention time (min) | Mass Error (ppm) | Normalised abundance | | | | | |
|----|--|--------------|----------------------|------------------|----------------------|---------|----------|----------|---------|---------|
| | | | | | Acid_L | Acid_D | EtoAC_L | EtoAC_D | BuOH_L | BuOH_D |
| 1 | (2E)-3-(2-Methyl-5-tetrazolidinyl)acrylaldehyde | C5H10N4O | 0.78 | 1.4 | | | | | 1700.7 | 2083.7 |
| 2 | 3-{2-[4-(2-Amino-3-hydrazino-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethoxy}propanoic acid (non-preferred name) | C10H18N6O4 | 0.89 | 0.6 | | | 5234.0 | 2795.7 | 261.0 | 109.3 |
| 3 | 3-Aminopropyl 6-deoxy-alpha-L-galactopyranoside | C9H19NO5 | 0.92 | -2.8 | | | 793.4 | 393.8 | 4609.9 | 4535.0 |
| 4 | {[5-(Methoxycarbonyl)-4-methyl-2-furyl]ethynyl}sodium | C9H7NaO3 | 0.95 | -3.2 | 1922.1 | 545.8 | 98.5 | 29.9 | | |
| 5 | Atrolactic acid | C9H10O3 | 1.11 | -3.8 | | | 14170.7 | 8516.7 | 3832.3 | 4228.9 |
| 6 | N-{3-[(5-Chloro-2-methoxy-4-pyrimidinyl)amino]-2-hydroxypropyl}-2-(2-furyl)propanamide | C15H19ClN4O4 | 1.11 | -4.8 | | | 12844.2 | 7970.0 | 838.0 | 587.2 |
| 7 | 3-({3-[5-(2-Aminoethyl)-2-furyl]-2-propyn-1-yl}oxy)propanoic acid | C12H15NO4 | 1.14 | -3.4 | | | 1265.1 | 797.0 | 2284.8 | 3168.8 |
| 8 | (2R)-2-Amino-6-(5-sulfo-3-pyridinyl)-5-hexynoic acid | C11H12N2O5S | 1.24 | -1.1 | | | | | 2429.4 | 1084.7 |
| 9 | (5E)-3-(3-Ethoxypropyl)-5-[(2-methyl-1H-indol-3-yl)methylene]-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one | C18H20N2O2S2 | 1.24 | -1.0 | 536.0 | | | | 6297.7 | 2395.5 |
| 10 | Indolelactic acid | C11H11NO3 | 1.35 | -3.5 | | | 1650.1 | 681.8 | | |
| 11 | 3-O-METHYLDOPA-4-SULFATE | C10H13NO7S | 1.67 | -0.2 | | | | | 34374.9 | 22966.7 |
| 12 | 3-(2,3-Dihydro-1-benzofuran-7-yl)ethynyl)-2-furoic acid | C15H10O4 | 2.69 | -0.1 | 16373.3 | 19211.8 | 128101.9 | 118544.3 | 1889.7 | 2796.7 |
| 13 | aspergillusone A | C16H14O6 | 3.02 | 0.4 | | 393.6 | 4949.3 | 4409.9 | | |
| 14 | 5-[[2-(Carboxymethyl)phenyl]ethynyl]-2-furoic acid | C15H10O5 | 3.12 | -0.3 | 141.3 | 2794.1 | 123325.8 | 112714.5 | 12717.3 | 8415.8 |
| 15 | Decyl 2,3-dideoxy-alpha-D-erythro-hex-2-enopyranoside | C16H30O4 | 3.32 | -1.6 | | | 2104.3 | 2292.7 | | |
| 16 | 3-oxo-tetradecanoic acid | C14H26O3 | 3.39 | -1.2 | | | 16517.5 | 17256.7 | | |
| 17 | 2-Hydroxymyristic Acid | C14H28O3 | 3.42 | -2.6 | | | 5303.1 | 5557.1 | | |
| 18 | 3,7-DIHYDROXYFLAVONE | C15H10O4 | 3.58 | 1.2 | 39115.3 | 39577.5 | 620.8 | 711.4 | | |
| 19 | Methyl 2-(1-hydroxy-3,3,5-trimethylcyclohexyl)hexanoate | C16H30O3 | 4.07 | -0.5 | | | 12322.5 | 12854.8 | 399.6 | 315.5 |
| 20 | 3R-hydroxypalmitic acid | C16H32O3 | 4.14 | -0.9 | | | 4481.1 | 3933.6 | 183.4 | 115.9 |
| 21 | Ethyl 2-[1-hydroxy-4-(2-methyl-2-butanyl)cyclohexyl]-3-methylbutanoate | C18H34O3 | 4.44 | -0.6 | | | 3429.6 | 2662.4 | 321.0 | 198.2 |
| 22 | Soyasaponin I | C48H78O18 | 4.67 | 0.9 | | | | | 17166.7 | 23242.3 |
| 23 | Soyasaponin Ba | C48H78O19 | 4.67 | 0.7 | | | | | 2444.6 | 3098.3 |
| 24 | clethroidoside B | C49H80O20 | 4.67 | 1.1 | | | | | 16129.8 | 21397.8 |
| 25 | Pisumsaponin I | C51H80O21 | 4.67 | -1.6 | | | | | 4031.6 | 5266.2 |
| 26 | salinixanthin | C61H92O9 | 4.70 | 0.7 | 173.6 | 1267.1 | | | | |

图 13. Profiling of the chemical components of extracted fractions of CACC612 obtained from the LC-QTOF-MS(positive ionization mode) analysis.

| No | Compound name | Formula | Retention time (min) | Mass Error (ppm) | Normalised abundance | | | | | |
|----|--|-------------|----------------------|------------------|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | | | | Acid_L | Acid_D | EtoAC_L | EtoAC_D | BuOH_L | BuOH_D |
| 1 | (5E)-5,16-Heptadecadiene-1,2,4-triol | C17H32O3 | 4.73 | 1.7 | 79760.2 | 72266.0 | 2593.0 | 1960.2 | | 977.0 |
| 2 | [1-({[1,3-Dimethyl-5-(4-morpholinyl)-1H-pyrazol-4-yl]methyl}amino)-3-ethoxy-2,2-dimethylcyclobutyl]methanol | C19H34N4O3 | 6.05 | -3.5 | 8205.4 | 6489.1 | | | 7443.8 | 8193.0 |
| 3 | 1-((12S,13S,14S)-13,14-Dihydroxy-12-methoxy-6-[(5-methyl-1-propyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-1-oxa-6,10-diazacyclopentadecan-10-yl)ethanone | C23H42N4O5 | 6.51 | 0.7 | 6213.0 | 7785.9 | | | | |
| 4 | 5-(1-Methyl-4-pyrazolidinyl)-N-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-4-piperidinyl]tetrahydro-2-furancarboxamide | C19H34N4O3 | 6.64 | -3.5 | | | | | 7896.4 | 6002.7 |
| 5 | 3-(5,6-Dimethyl-1H-benzimidazol-2-yl)-N-[[1R,3R,5R)-5-hydroxy-1-methyl-3-phenylcyclooctyl]methyl}propanamide | C28H37N3O2 | 6.64 | 0.7 | | | | | 6339.3 | 4016.5 |
| 6 | 1-[(11R,12R,13R)-6-[(1,3-Dimethyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-12,13-dihydroxy-11-(3-methylbutoxy)-1-oxa-6,9-diazacyclotetradecan-9-yl]ethanone | C24H44N4O5 | 6.81 | -3.1 | | | | | 8548.8 | 5318.4 |
| 7 | N-[(4S,5R)-5-Hydroxy-9-[[3-(methoxymethyl)-1,2,4-oxadiazolidin-5-yl]methyl]-4-methyl-1-oxa-9-azaspiro[5.5]undec-4-yl]-2-methoxyacetamide | C18H34N4O6 | 7.00 | -3.0 | | | | | 12678.7 | 18918.2 |
| 8 | N-(4-Methyl-2-pyridinyl)-N-nonanoyl leucine | C21H34N2O3 | 7.03 | 2.8 | 43658.2 | 52012.8 | | | 4362.5 | 3656.9 |
| 9 | 1-[(11R,12R,13R)-6-[(1-Ethyl-3-methyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-12,13-dihydroxy-11-(3-methylbutoxy)-1-oxa-6,9-diazacyclotetradecan-9-yl]ethanone | C25H46N4O5 | 7.03 | -3.8 | 11703.0 | 14038.6 | | | 33954.7 | 18040.5 |
| 10 | (5R)-4-Hydroxy-7-methyl-5-[[N-(3-methylbutanoyl)-D-valyl]amino]-N-[(2S)-1-[(4-methylpentanoyl)amino]-1-oxo-2-propanyl]octanamide | C28H52N4O6 | 7.27 | -3.7 | 15897.7 | 19635.7 | | | 53640.5 | 27776.2 |
| 11 | N~2~-Decanoyl-L-arginyl-L-valyl-N-(4-carbamimidoylbenzyl)-L-lysine amide | C35H62N10O4 | 7.70 | 3.8 | 109360.6 | 90115.7 | 130022.7 | 139891.1 | 219824.9 | 188091.2 |
| 12 | (3S,6E,9R,10E,12S,13S,14E,16S,17R)-3-Benzyl-9,13-dihydroxy-6,8,10,12,14,16-hexamethyl-17-[(2S,4S)-4-methyl-2-hexanyl]-1-oxa-4-azacycloheptadeca-6,10,14-triene-2,5-dione | C35H53NO5 | 12.07 | 2.2 | 67029.3 | 74774.0 | 57531.2 | 64090.3 | 51946.9 | 33932.2 |
| 13 | 1-(3-O-sulfo-beta-D-galactosyl)-N-[(2R)-2-hydroxybehenoyl]sphingosine | C46H89NO12S | 12.77 | 0.6 | 157963.1 | 162158.4 | 121647.7 | 135369.8 | 132477.1 | 98728.5 |

表 14. Profiling of the chemical components of extracted fractions of CACC789 obtained from the LC-QTOF-MS(negative ionization mode) analysis.

| No | Compound name | Formula | Retention time (min) | Mass Error (ppm) | Normalised abundance | | | | | |
|----|--|------------|----------------------|------------------|----------------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | | | | Acid_L | Acid_D | EtoAC_L | EtoAC_D | BuOH_L | BuOH_D |
| 1 | 4-Amino-5-[2-(hydroxymethyl)-5-methyl-4-morpholinyl]-5-oxopentanoic acid | C11H20N2O5 | 0.65 | 0.0 | 59369.1 | | | | 822.0 | 948.5 |
| 2 | {1-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl]-3-oxo-2-piperazinyl}acetic acid | C10H18N2O5 | 0.68 | -1.0 | 44156.6 | | | | 1309.7 | 1001.3 |
| 3 | [4-(2-Amino-4-pentenyl)-3-morpholinyl]acetic acid | C11H18N2O4 | 0.92 | -2.4 | 59129.7 | 18429.0 | | | | |
| 4 | (2S)-2-Amino-7-(5-formyl-2-methoxy-3-pyridinyl)-6-heptynoic acid | C14H16N2O4 | 1.21 | -1.7 | 42863.0 | 7082.1 | 13640.4 | 7648.9 | 81366.3 | 64086.9 |
| 5 | Daidzin | C21H20O9 | 1.41 | -1.6 | 280.2 | 718.9 | 1127.0 | 27251.7 | | |
| 6 | 7-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl beta-D-glucopyranoside | C22H22O11 | 1.41 | -1.5 | 340.6 | 4559.6 | 7280.1 | 158819.6 | | |
| 7 | 1-[[6-(2-Furyl)-2-methyl-3-pyridinyl]carbonyl]-4-methyl-2-piperidinecarboxylic acid | C18H20N2O4 | 1.57 | -0.2 | 325.4 | 34914.5 | 74706.4 | 80073.2 | | |
| 8 | Emodin 8-glucoside | C21H20O10 | 1.77 | -1.3 | 161.6 | 5713.3 | | | | |
| 9 | 4-Cyano-N-[(1R,2S,3R,4R)-2,3-dihydro-4-[[6-methyl-2-pyridinyl]oxy]methyl]cyclopentyl]benzamide | C20H21N3O4 | 1.94 | -0.8 | | 33639.2 | | | | |
| 10 | (+)-Aspicilin | C18H32O5 | 2.40 | -1.1 | 2416.4 | 3807.3 | | | | |
| 11 | N-Cyclohexyl-2-[(5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-7-yl)oxy]acetamide | C23H23NO5 | 2.83 | -0.4 | | | | | 56553.5 | 81523.8 |
| 12 | 3-Acetyl-6-[(3-hydroxy-3-oxetanyl)ethynyl]-2H-chromen-2-one | C16H12O5 | 3.02 | -1.3 | 39663.8 | | 85902.7 | 64220.2 | | |
| 13 | 4-(1,4-Dioxo-1,4-dihydro-2-naphthalenyl)-3-butyne-1-yl carbonochloridate | C15H9ClO4 | 3.35 | -1.0 | 111361.1 | | | | | |
| 14 | alpha-9,10-DiHODE | C18H32O4 | 3.51 | -0.8 | 3481.7 | 1778.9 | 261513.0 | 369999.7 | 771.2 | 36.3 |
| 15 | Dimethyl 2-[5-(chlorocarbonyl)-2-furyl]terephthalate | C15H11ClO6 | 3.61 | -0.1 | 964956.5 | | | | | |
| 16 | (±)12,13-DiHOME | C18H34O4 | 3.64 | -0.7 | 2725.4 | | 749949.3 | 204260.1 | 6417.6 | 989.0 |
| 17 | 1-[(11R,12R,13R)-9-Acetyl-12,13-dihydroxy-11-(3-methylbutoxy)-1-oxa-6,9-diazacyclotetradecan-6-yl]-3-methoxy-1-propanone | C22H42N2O7 | 3.88 | -2.7 | 59.1 | 46741.2 | 62647.0 | 70485.4 | | |
| 18 | Soyasaponin I | C48H78O18 | 4.70 | 1.9 | 188288.1 | 462.9 | | | 482604.4 | 387422.1 |
| 19 | Pisumsaponin I | C51H80O21 | 4.70 | -1.7 | 24598.7 | | | | 110941.8 | 75410.1 |
| 20 | Soyasaponin Ba | C48H78O19 | 4.73 | 1.9 | 31199.2 | 206.2 | 2325.7 | 842.4 | 95443.9 | 88196.5 |
| 21 | clethroidoside B | C49H80O20 | 4.73 | 2.1 | 149448.7 | 1386.5 | 3541.4 | 4611.6 | 457266.8 | 346729.5 |
| 22 | Saponin E | C42H68O14 | 4.80 | 0.3 | 514233.6 | 1367.4 | 10901.7 | 6033.4 | 36434.3 | 43140.6 |
| 23 | Soyasaponin IV | C41H66O13 | 4.84 | -0.4 | 94354.7 | | 4525.0 | 1268.1 | 4104.5 | 5720.5 |
| 24 | samholide D | C90H152O28 | 4.94 | 2.8 | 456.0 | 10616.7 | | | | |

표 15. Profiling of the chemical components of extracted fractions of CACC789 obtained from the LC-QTOF-MS(positive ionization mode) analysis.

| No | Compound name | Formula | Retention time (min) | Mass Error (ppm) | Normalised abundance | | | | | |
|----|--|-------------|----------------------|------------------|----------------------|----------|----------|----------|---------|---------|
| | | | | | Acid_L | Acid_D | EtoAC_L | EtoAC_D | BuOH_L | BuOH_D |
| 1 | 6-(Methylsulfanyl)-9-[(3xi)-beta-D-threo-pentofuranosyl]-9H-purin-2-amine | C11H15N5O4S | 0.68 | 0.6 | 3498.0 | 4083.9 | | | | |
| 2 | 2-[[5-(1,3-Dimethyl-4-pyrazolidinyl)-1,2-oxazolidin-3-yl]carbonyl]hydrazinecarboxamide | C10H20N6O3 | 0.72 | 0.4 | | | 178054.3 | 198154.2 | 73663.5 | 34685.9 |
| 3 | Indoleacrylic acid | C11H9NO2 | 0.92 | 3.4 | 2099.5 | 1938.3 | | | 70986.9 | 12216.2 |
| 4 | 3-[2-(Cyclopentyl oxy)ethyl]-5-fluoro-6-hydroxydihydro-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione | C11H17FN2O4 | 1.04 | 0.7 | 16211.8 | 58393.6 | | | | |
| 5 | 5-[(4-Aminobutyl)amino]-2-(hydroxymethyl)phenol | C11H18N2O2 | 1.14 | -0.5 | 25341.4 | 333382.3 | | | | |
| 6 | Istamycin A2 | C18H36N6O6 | 1.14 | -1.9 | 9555.4 | 53936.9 | 71161.7 | 84465.4 | 19680.3 | 20232.7 |
| 7 | N-(2-benzyl-N-(2-furylmethyl)glycinamide) | C14H16N2O2 | 1.53 | -1.0 | 21071.1 | 135866.8 | | | | |
| 8 | Quinestrol | C25H32O2 | 1.67 | -2.5 | 46059.1 | 88831.3 | 109882.1 | 126444.1 | 41335.0 | 46961.6 |
| 9 | Genistin | C21H20O10 | 1.70 | 0.2 | | | | | 5601.2 | 16737.8 |
| 10 | Glycerol 1-(5-hydroxydodecanoate) | C15H30O5 | 1.91 | -1.3 | 13309.6 | 71092.1 | 90864.7 | 102506.4 | | |
| 11 | Istamycin A2 | C18H36N6O6 | 1.94 | -1.8 | 11146.3 | 51946.6 | 62036.8 | 71811.0 | 23930.7 | 12860.5 |
| 12 | Daidzein | C15H10O4 | 2.66 | 0.3 | | | 346165.1 | 371232.8 | 30510.6 | 5993.5 |
| 13 | Genistein | C15H10O5 | 3.08 | 0.2 | 128245.5 | 2101.6 | 242659.1 | 315054.8 | 63357.2 | 14888.1 |
| 14 | 2-[5-(10-Hydroxy-1-decyn-1-yl)-2-pyridinyl]acetamide | C17H24N2O2 | 3.35 | -3.5 | 53972.1 | 85109.5 | 119046.9 | 123462.5 | 48960.1 | 94836.1 |
| 15 | 9-(Hydroxymethyl)-5-(4-phenylbutanoyl)-1,5-diazacycloundecan-2-one | C20H30N2O3 | 3.54 | -1.8 | 54261.5 | 132389.5 | 181571.7 | 182375.6 | | |
| 16 | 2-Methyl-2-propyl-4-[(3-[(1-ethoxy-2-methyl-1-oxo-2-propanyl)oxy]-2-pyridinyl)carbamoyl]-1-piperazinecarboxylate | C21H32N4O6 | 4.10 | -0.6 | | | 11501.6 | 12285.6 | | |
| 17 | 1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecan-2-ylmethyl 5-cyclohexylpentanoate | C24H44O8 | 5.26 | 1.7 | 11928.1 | 84977.6 | | | | |
| 18 | Sclareol | C20H36O2 | 5.30 | -1.6 | 2472.8 | | | | | |
| 19 | Benzyl(7-butyl-2,2-dimethyl-13-[(2-methyl-2-propanyl)oxy]carbonyl)-4-oxo-3-oxa-5,9,13-triazaheptadecan-17-yl)carbamate | C32H56N4O6 | 11.12 | -3.2 | 23799.4 | 50738.8 | | | | |

<기능성 포스트바이오틱스(사균체) 적용 반려동물 제품군 선정 및 시제품 제작>

□ 경쟁 제품 및 시장상황 조사

- 현재 반려동물 영양제를 포함한 펫푸드 시장에서 프로바이오틱스(유산균을 포함한 유용미생물), 프리바이오틱스, 포스트바이오틱스 성분이 소비자에게 많이 선호되고 있음.
- 그러나 이러한 제품들에 포함되어 있는 프로바이오틱스 균주들은 기원이 불분명하거나 외부(식물, 인체 등) 유래 균주들이 주를 이루고 있음.

- 반려동물의 장내세균총은 품종, 사육환경, 사료등 다양한 요인에 따라 변화하고 종특이성을 포함하므로 종 유래 균주를 사용하는 것이 이상적임.
- 본 연구에서는 반려견, 반려묘 유래 프로바이오틱스 균주를 사용함으로써 경쟁 제품과의 차별화와 마케팅 효과가 기대됨.

▶ 사료첨가제(영양제)

- 반려견을 대상으로 면역 증강, 정상 효과, 피부 개선 등의 효능 효과로 다양한 유산균, 프로바이오틱스, 포스트바이오틱스 사료첨가제(영양제)가 출시되고 있으며, 제품의 제형은 분말 형태가 주를 이루고 일부 필름, 츠르 형태의 제형도 판매되고 있음.
- 현재 시장에 유통되는 사균체를 함유하는 제품들은 *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* 등 다양한 유산균 사균체를 함유하고 있으며, 함량 표기 없이 첨가로 표기된 제품이 유통되고 있음(표 16).

표 16. 현재 유통되고 있는 제품의 함량 및 제형(영양제)

| 제품 | 주성분 | 함량 | 제형 |
|---|----------------------------------|------------------------------|----|
|  | <i>Enterococcus faecalis</i> | 3×10^{11} cell/1.2g | 분말 |
|  | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 첨가 | 분말 |
|  | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 첨가 | 필름 |
|  | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 3×10^{11} cell/14g | 츠르 |

▶ 간식

- 반려동물 제품의 유산균 및 프로바이오틱스 생균제 사용량이 늘어나면서 사료, 사료첨가제 뿐만아니라 프로바이오틱스 생균제가 포함된 다양한 제형의 간식이 출시되고 있음. 사균체의 경우 프로바이오틱스가 갖는 안전성, 안정성의 문제를 해결할 수 있어 사용 빈도가 늘어날 것으로 전망됨.
- 현재 시장에 유통되는 제품들은 *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* 등 다양한 유산균 사균체를 함유하고 있으며, 함량 표기 없

이 첨가로 표기된 제품이 유통되고 있음(표 17).

표 17. 현재 유통되고 있는 제품의 함량 및 제형(간식)

| 제품 | 주성분 | 함량 | 제형 |
|---|--|-----------------------------|---------|
|  | <i>Clostridium butyricum</i> | 첨가 | 츄르 |
|  | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 첨가 | 액상 |
|  | <i>Lactobacillus sp.</i> | 2.0×10^8 cell/100g | 분말 |
|  | <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 첨가 | 동결건조 트릿 |

▶ 사료

- 현재 사료 시장에 유산균 및 프로바이오틱스 생균제를 첨가하는 트렌드 임. 실제로 우리와 ANF, 풀무원 아미오, 사조동아원 오러브잇. 동원 F&B 뉴트리플랜 등의 유기농 프리미엄 사료에는 유산균, 낙산균, 바실러스 등의 생균제가 함량 표기 없이 첨가로 표기하여 유통되고 있음. 건식사료의 경우 생균을 투입해 배합하더라도 사료생산 공정 중 고온, 고압을 요구하는 고온압축성형(extrusion) 공정에 의해 균수 보증이 어려운 것으로 사료됨.
- 사균체를 첨가함 제품으로 *Lactobacillus plantarum* 사균체를 포함하는 하이독 CARE-V 처방식 사료가 있으며, 위의 사료와 동일하게 함량 표기 없이 첨가로 표기되어 있음.

▶ 영양제(사료첨가제)

- 현재 자사(우진비앤지 주식회사)에서는 앞선 포스트게놈다부처유전체사업 과제(과제명 : 반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발)를 통해 반려견 영양제(생균제) 2종 개발을 완료 하였고, 생산 및 판매를 하고 있음(그림 27).



그림 27. 멍멍정장(반려견 영양제), 캣바이오(반려묘 영양제)

- ‘멍멍정장’, ‘캣바이오’ 제품 개발에 사용했던 완제품 부형제 및 향신료 데이터베이스 바탕으로 샘플 제작 후 참여연구원들의 의견을 기준으로 한 관능적 평가 및 우진비앤지 주변 반려견, 반려묘를 대상으로 간이 선호도 시험을 통해 선호도가 가장 높은 부형제 및 향신료를 선정하였음.

표 18. 반려견용 포스트바이오틱스 시제품 기호성 테스트 결과

| 향신료 종류 | 관능적 평가 순위 | 반려견 선호도 | 종합 점수 |
|--------|-----------|---------|-------|
| 무첨가 | 5 | 5 | 5 |
| 소고기향 | 4 | 3 | 3.5 |
| 닭고기향 | 3 | 2 | 2.5 |
| 우유향 | 1 | 4 | 2.5 |
| 치즈향 | 2 | 1 | 1.5 |

* 숫자가 낮을수록 선호도 높음

표 19. 반려묘용 포스트바이오틱스 시제품 기호성 테스트 결과

| 향신료 종류 | 관능적 평가 순위 | 반려묘 선호도 | 종합 점수 |
|---------|-----------|---------|-------|
| 무첨가 | 2 | 4 | 3 |
| 생선향 | 5 | 3 | 4 |
| 해물향 | 4 | 2 | 3 |
| 바나나향 | 1 | 5 | 3 |
| 닭+소고기 향 | 3 | 1 | 2 |

* 숫자가 낮을수록 선호도 높음

- 반려견, 반려묘 영양제 시제품 제작
 - ✓ 선정된 부형제와 향료, 사균체 원료를 섞어 시제품을 제작했으며, 시제품 제형은 현재 시장에서 가장 많이 유통되고 있는 분말 제형을 선택했음. 타정형태의 경우에도 소화기관 내부에서 완전히 용해되는 형태로 만들어지기 때문에 분말제형의 시험만으로 충분하다고 판단하였음. 소형 약포장기를 사용하여 2 g 소포장 시제품을 생산했으며, 장기 안정성(caking, 갈변), 안전성 시험을 진행함(그림 28).



그림 28. 포스트바이오텍스(사균체) 반려견, 반려묘 영양제 시제품

<반려동물 in vivo 시스템을 이용한 포스트바이오텍스(사균체) 안전성, 유효성 평가>

□ 반려동물 유래 C1, C5, CACC612, CACC789 사균체의 혈액 임상 연구

▶ 반려견 유래 C1와 C5 사균체의 임상 연구와 임상 반려견 정보

- 본 임상 시험의 진행을 위해 반려견 임상 시험에 대해 실험동물윤리위원회 승인을 완료 하였음(승인번호: CIALM 2023-01, 그림 29).
- 본 임상 시험에 참여한 반려견들은 반려견 견주들로부터 피험자 동의서를 받아 시험 하였음(그림 30).
- 본 시험에 참여한 모든 반려견들은 부형제분말(P), 생균혼합제제(T), 사균혼합제제(D) 샘플을 가리지 않고 모두 잘 섭취하였으며, 샘플의 기호성이 충분하여 섭취 거부로 인해 시험이 불가능한 개체는 없었음(표 20).
- 반려견 16 마리의 임상 실험을 통하여서 포스트바이오텍스(사균체) 및 시제품 효능/안전성 평가를 진행함(표). 임상 시험은 정읍에 위치한 쿨핏 동물 병원에서 진행되었으며, 반려견의 급여, 전/후의 혈액 검사를 통해 포스트바이오텍스 시제품의 효능 및 안전성을 확인할 수 있음(표 20).
- T는 타블렛 타입의 생균제 제품으로 임상실험의 양성대조군으로, P는 부형제 분말로 임상 실험의 음성 대조군으로 사용하였으며, D는 분말 타입의 사균체 시제품임. 반려견 급여를 위해 C1, C5가 (9:1)로 섞인 사균체 시제품을 사용함.

▶ 임상 시험건 혈액검사 결과

- 본 시험에 참여한 반려견의 임상 증상, 혈액검사 등을 평가 하였을 때 뚜렷한 부작용이나 특이적인 임상증상이 관찰되지 않았기에 본 시험에 적용된 시제품은 반려견의 임상 적용에서 안전성이 확보되었음을 확인함.
- 총 17 가지 항목에 대하여 혈액 분석을 진행하여 혈액 내 임상 인자들의 수치를 확인하고 데이터베이스화 하였음(표 21).
- 임상시험은 정읍에 소재한 쿨핏 동물병원을 통해 진행되었으며, 지역 동물병원을 통해 자원적으로 모집되어 진행된 임상 시험의 한계로 시제품 급여 전 혈액 검사 결과가 정상 범위를 벗어나는 개체군들이 관찰되었음. 혈액 검사 결과 반려견 전체적으로 시제품 급여 전 혈액 지표 51건의 이상 수치가 발견 되었으며, 시제품 급여 후에도 시제품 급여 전과 동일한 51건의 이상 수치가 확인됨. 시제품 급여 전 51건의 이상 수치는 자원 모집된 반려견들의 기저질환에 기인한 것으로 판단되어 향후 임상실험결과와 신뢰도 측면에서 건강개체를 모집하는 노력을 기울여 임상실험을 진행하는 것이 좋을 것으로 사료됨.
- 생균제와 사균체를 급여 후 얻은 혈액 분석 결과를 통합한 임상데이터를 이용하여 주 성분분석을 수행한 결과 제품화되어 판매되고 있는 생균혼합제제(dog7, 11, 13, 14, 15 및 T)와 사균체 시제품(dog5, 6, 8, 10, 12 및 D)에서 비슷한 양상의 클러스터를 형성함을 확인함으로써 사균체의 임상 안전성을 다시 한 번 확인할 수 있었음(그림 31).

표 21. 임상 반려견 포스트바이오틱스 급여 전/후 임상 데이터(혈액검사 결과)

| ID | Sample | Clinical Trial | type | ALP | BUN | AMYL | vLIP | Ca | Na | K | Cl | Na/K | WBC | RBC | Hb | Hct | MCV | MCH | MCHC | Platelet |
|--------------|--------|----------------|------|--------|----------|----------|--------|----------|---------|---------|---------|-----------|------|---------|-------|-------|-------|-----------|-------|----------|
| Normal range | | | | 47-254 | 9.2-29.2 | 200-1400 | 10-160 | 9.3-12.1 | 141-152 | 3.8-5.0 | 102-117 | 29.9-39.2 | 6-17 | 5.5-8.5 | 12-18 | 37-55 | 60-77 | 19.5-24.5 | 32-36 | 200-500 |
| Dog1 | Plasma | before | P | 283 | 12.5 | 537 | 32 | 11.3 | 144 | 4.7 | 99 | 30.6 | 10.3 | 5.65 | 14.7 | 38.1 | 67.4 | 26 | 38.6 | 422 |
| Dog1 | Plasma | after | P | 323 | 10.5 | 630 | 28 | 11.8 | 145 | 4.7 | 101 | 30.9 | 10.5 | 5.97 | 15.9 | 40.8 | 68.3 | 26.6 | 39 | 453 |
| Dog2 | Plasma | before | P | 493 | 29.2 | 1543 | 79 | 10.9 | 148 | 5.1 | 104 | 29 | 8.6 | 5.54 | 15.8 | 39.4 | 71.1 | 28.5 | 40.1 | 311 |
| Dog2 | Plasma | after | P | 526 | 28.7 | 1475 | 82 | 11.2 | 146 | 4.3 | 101 | 34 | 16.4 | 6.28 | 17.2 | 45.2 | 72 | 27.4 | 38.1 | 319 |
| Dog3 | Plasma | before | P | 101 | 19.7 | 787 | 20 | 10.5 | 148 | 4.6 | 114 | 32.2 | 14 | 7.03 | 18.5 | 47.8 | 68 | 26.3 | 38.7 | 243 |
| Dog3 | Plasma | after | P | 129 | 18.7 | 708 | 34 | 10.9 | 150 | 4.6 | 112 | 32.6 | 13.1 | 6.82 | 18.7 | 48 | 70.4 | 27.4 | 39 | 244 |
| Dog4 | Plasma | before | P | 316 | 22.3 | 795 | 27 | 11 | 150 | 4.1 | 113 | 36.6 | 18.9 | 6.02 | 14.4 | 42.1 | 69.9 | 23.4 | 33.5 | 333 |
| Dog4 | Plasma | after | P | 293 | 26.6 | 731 | 26 | 11.1 | 124 | 3.3 | 75 | 37.6 | 18.1 | 6.03 | 14.5 | 42.5 | 70.5 | 24 | 34.1 | 222 |
| Dog5 | Plasma | before | D | 146 | 111.3 | 2182 | 222 | 11.3 | 146 | 0.1 | 109 | 35.6 | 9 | 5.15 | 13.3 | 36.1 | 70.1 | 25.8 | 36.8 | 368 |
| Dog5 | Plasma | after | D | 117 | 90.4 | 2134 | 192 | 12 | 145 | 4.3 | 107 | 33.7 | 10.6 | 6 | 16.2 | 42.3 | 70.5 | 27 | 38.3 | 382 |
| Dog6 | Plasma | before | D | 2710 | 23.7 | 770 | 56 | 12.6 | 146 | 4.2 | 102 | 34.8 | 8.6 | 5.93 | 16.4 | 39.6 | 66.8 | 27.7 | 41.4 | 477 |
| Dog6 | Plasma | after | D | 3500 | 24 | 907 | 60 | 11.5 | 139 | 4.3 | 91 | 32.3 | 7.6 | 5.93 | 15 | 39.6 | 66.8 | 25.3 | 37.9 | 442 |
| Dog7 | Plasma | before | T | 109 | 24.1 | 759 | 23 | 8 | 146 | 6.1 | 107 | 23.9 | 20.1 | 6.25 | 15.6 | 41.2 | 65.9 | 25 | 37.9 | 337 |
| Dog7 | Plasma | after | T | 141 | 20.3 | 845 | 27 | 12 | 146 | 4.6 | 104 | 31.7 | 18.9 | 6.57 | 16.9 | 43.9 | 66.8 | 25.7 | 38.5 | 333 |
| Dog8 | Plasma | before | D | 548 | 13.2 | 1055 | 280 | 11.6 | 149 | 4.3 | 108 | 34.7 | 11.6 | 6.84 | 17.6 | 46.9 | 68.6 | 25.7 | 37.5 | 287 |
| Dog8 | Plasma | after | D | 375 | 18.6 | 740 | 78 | 11.5 | 143 | 3.9 | 100 | 36.7 | 34.3 | 6.82 | 19.2 | 46.7 | 68.5 | 28.2 | 41.1 | 285 |
| Dog9 | Plasma | before | T | 129 | 17.5 | 600 | 26 | 9 | 148 | 5.1 | 109 | 29 | 9 | 7.65 | 18.7 | 50.3 | 65.8 | 24.4 | 37.2 | 67 |
| Dog9 | Plasma | after | T | 138 | 19.9 | 591 | 29 | 11.3 | 147 | 4.2 | 103 | 35 | 28 | 7.49 | 19.6 | 50.1 | 66.9 | 26.2 | 39.1 | 87 |
| Dog10 | Plasma | before | D | 155 | 19.6 | 822 | 36 | 11.2 | 151 | 4.5 | 115 | 33.6 | 13.6 | 5.97 | 16.3 | 42.6 | 71.4 | 27.3 | 38.3 | 167 |
| Dog10 | Plasma | after | D | 154 | 13.4 | 658 | 32 | 11 | 151 | 5.1 | 115 | 29.6 | 8.8 | 6.13 | 17.1 | 43.5 | 71 | 27.9 | 39.3 | 159 |
| Dog11 | Plasma | before | T | 724 | 19.6 | 587 | 36 | 11.2 | 148 | 4.6 | 105 | 32.2 | 12.4 | 6.62 | 17.3 | 44.1 | 66.6 | 26.1 | 39.2 | 542 |
| Dog11 | Plasma | after | T | 582 | 18.6 | 514 | 36 | 13.4 | 150 | 4.2 | 110 | 35.7 | 12.2 | 6.45 | 16.6 | 43.3 | 67.1 | 25.7 | 38.3 | 516 |
| Dog12 | Plasma | before | D | 563 | 28.1 | 814 | 30 | 11.6 | 150 | 4.7 | 113 | 31.9 | 13.6 | 6.08 | 15.6 | 42.3 | 69.6 | 25.7 | 36.9 | 424 |
| Dog12 | Plasma | after | D | 746 | 30.2 | 729 | 31 | 11.7 | 152 | 4.9 | 113 | 31 | 15.4 | 5.77 | 16.1 | 40.7 | 70.4 | 27.9 | 39.7 | 271 |
| Dog13 | Plasma | before | T | 138 | 23 | 552 | 29 | 9.8 | 151 | 4.2 | 113 | 36 | 10.6 | 5.69 | 15 | 41.2 | 72.4 | 26.4 | 36.4 | 113 |
| Dog13 | Plasma | after | T | 121 | 23 | 506 | 26 | 10.3 | 147 | 4.7 | 116 | 31.3 | 10.3 | 6.19 | 17.4 | 44.6 | 72.1 | 28.1 | 39 | 191 |
| Dog14 | Plasma | before | T | 109 | 12.9 | 793 | 30 | 10.2 | 148 | 4.2 | 107 | 35.2 | 16.1 | 5.9 | 14.8 | 39.7 | 67.3 | 25.1 | 37.3 | 207 |
| Dog14 | Plasma | after | T | 69 | 25.3 | 694 | 26 | 10.9 | 148 | 4.4 | 108 | 33.6 | 12.2 | 7 | 18.1 | 47.5 | 67.9 | 25.9 | 38.1 | 211 |
| Dog15 | Plasma | before | T | 352 | 14.6 | 939 | 66 | 10.7 | 148 | 4 | 109 | 37 | 10.3 | 6.57 | 17.7 | 46.6 | 70.9 | 26.9 | 38 | 351 |
| Dog15 | Plasma | after | T | 196 | 15.2 | 593 | 27 | 10.4 | 147 | 3.7 | 104 | 39.7 | 15.1 | 6.07 | 17.1 | 43.8 | 72.2 | 28.2 | 39 | 252 |
| Dog16 | Plasma | before | P | 105 | 18.1 | 1145 | 25 | 11.4 | 142 | 4.8 | 106 | 29.6 | 13.7 | 6.56 | 16.8 | 43.6 | 66.5 | 25.6 | 38.5 | 461 |
| Dog16 | Plasma | after | P | 135 | 29.1 | 1082 | 29 | 11.5 | 144 | 4.4 | 103 | 32.7 | 25.1 | 6.58 | 17.1 | 45 | 68.4 | 26 | 38 | 165 |

* 부형제분말(P), 생균혼합제제(T), 사균혼합제제(D)

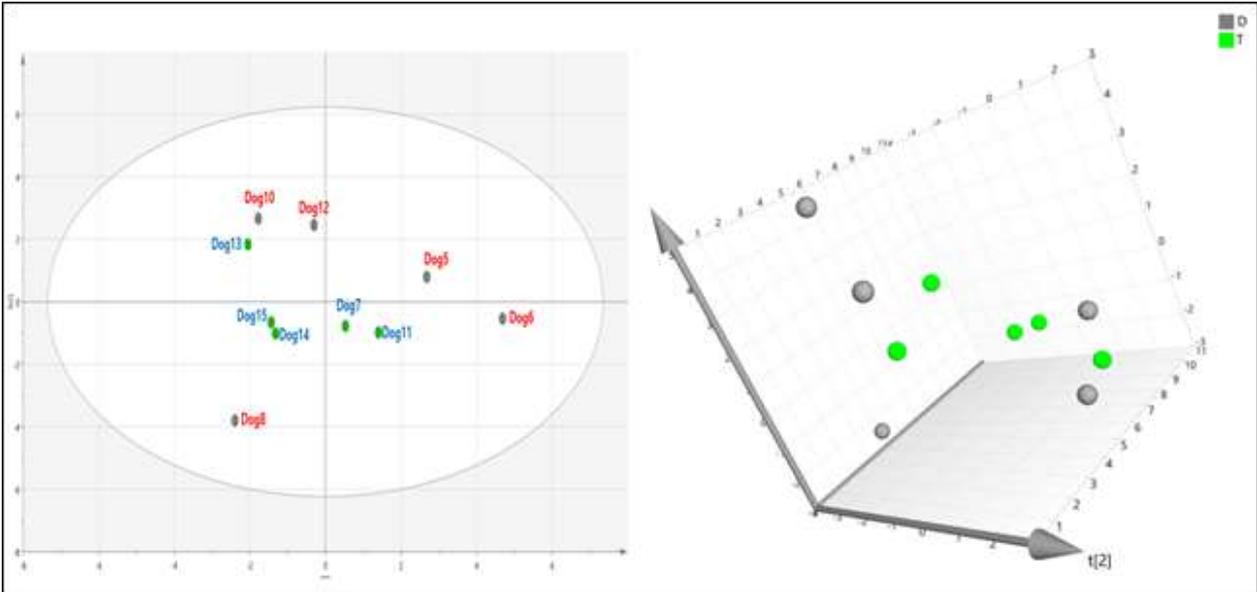


그림 31. 임상 반려견 급여후 혈액 검사 결과(PCA 분석)

생균혼합제제(T), 사균혼합제제(D), 2D PCA model과 3D PCA model
 생균혼합제제(dog7, 11, 13, 14, 15), 사균혼합제제(dog5, 6, 8, 10, 12)

▶ 반려묘 유래 CACC612와 CACC789 사균체의 임상 연구와 임상 반려묘 정보

- 본 임상 시험의 진행을 위해 반려묘 임상 시험에 대해 실험동물윤리위원회 승인을 완료 하였음(승인번호: CIALM 2023-01, 그림 29)
- 본 임상 시험에 참여한 반려묘들은 반려묘 묘주들로부터 피험자 동의서 획득을 완료 하였음(그림 32).
- 본 시험에 참여한 모든 반려묘들은 생균혼합제제(T), 사균혼합제제(D) 샘플을 가리지 않고 모두 잘 섭취하였으며, 샘플의 기호성이 충분하여 섭취 거부로 인해 시험이 불가능한 개체는 없었음(표 22).
- 반려묘 20 마리의 임상 연구를 통하여 포스트바이오틱스(사균체) 시제품의 효능 및 안전성 평가를 진행 하였음(표 23).
- 임상 시험은 정읍에 위치한 쿨핏 동물 병원에서 진행되었으며, 반려묘의 포스트바이오틱스 시제품 급여 전후의 혈액 검사를 통해 포스트바이오틱스 시제품의 효능 및 안전성을 확인할 수 있었음(표 23).
- CACC612와 CACC789 생균제와 사균체의 임상 결과를 통해 생균제와 사균체의 차이를 확인하기 위해 CACC612와 CACC789 생균제 및 사균체 혼합 시제품을 제조하여, 반려묘 20 마리 중 각 10 마리씩 생균혼합제제 급여(T로 표기)와 사균혼합제제 급여(D로 표기)를 하였음.

표 22. 임상 반려묘 정보 및 기호성 결과

| ID | Name | Type | Breed | Sex | Age (year) | 선호도 |
|----|------|------|------------------|--------|------------|--------------------------------|
| 1 | 호두 | T | Korean shorthair | male | 3 | 가루 상태로 그릇에 덜어 줌/잘 먹음 |
| 2 | 우유 | T | Scottich fold | female | 2 | 사료 위에 뿌려서 먹임/잘 먹음 |
| 3 | 레이 | T | Mixed | Male | 2 | 잘 먹음 |
| 4 | 가을 | D | Korean shorthair | male | 3 | 잘 먹음 |
| 5 | 루루 | T | Korean shorthair | female | 3 | 잘 먹음 |
| 6 | 보리 | D | Persian | male | 5 | 잘 먹음 |
| 7 | 까망 | D | Korean shorthair | male | 5 | 잘 먹음 |
| 8 | 마디 | T | Turkish angora | female | 6 | 잘 먹음 |
| 9 | 두선 | D | Korean shorthair | | 1 | 잘 먹음 |
| 10 | 해리 | T | Ragdoll | female | 6 | 사료 위에 뿌려서/잘 먹음 |
| 11 | 미카 | T | Russian blue | female | 5 | 잘 먹음 |
| 12 | 달래 | T | Russian blue | female | 4 | 잘 먹음 |
| 13 | 국일 | D | Korean shorthair | male | 9 | 잘 먹음 |
| 14 | 밍 | D | Korean shorthair | male | 4 | 사료 위에 뿌려서/잘 먹음 |
| 15 | 모다 | T | Korean shorthair | male | 4 | 잘 먹음 |
| 16 | 아옹 | T | Korean shorthair | male | 4 | 잘 먹음 |
| 17 | 딩 | D | Korean shorthair | male | 4 | 잘 먹음 |
| 18 | 광복 | D | Korean shorthair | male | 4 | 사료 위에 뿌려서/잘 먹음 |
| 19 | 모리 | D | Korean shorthair | female | 2 | 배고플 때 잘 먹음 배부를 때는 잘 안 먹으려 함 |
| 20 | 대범 | D | Korean shorthair | male | 7 | 사료 위에 뿌려서/잘 먹음 |

* 생균혼합제제(T), 사균혼합제제(D)

▶ 임상 시험묘 혈액검사 결과

- 생균혼합제제 급여(T)와 사균혼합제제 급여(D)후 생균제와 사균체의 차이 확인을 위해 급여전 후, 혈액 샘플을 채취하여 17 가지 혈액 지표를 분석하였음(표 21).
- 지역 동물병원을 통해 자원적으로 모집되어 진행된 임상 시험의 한계로 시제품 급여 전 혈액 검사 결과가 정상 범위를 벗어나는 반려묘 개체군들이 관찰 되었음. 혈액 검사 결과 반려묘 전체적으로 시제품 급여 전 86건의 이상 수치가 발견 되었으며, 시제품 급여 후 79건의 이상 수치의 확인으로 7건의 이상 수치가 시제품 급여 후 정상 수치로 돌아온 것을 확인할 수 있었음. MCHC(평균 적혈구 헤모글로빈 농도) 지표에서 18건의 이상 수치가 13건으로 줄어듦으로 5건의 이상 수치가 시제품 급여 후 정상 수치로 돌아 온 것을 확인함. 시제품 급여 전 86건의 이상 수치는 자원 모집된 반려묘들의 기저질환에 기인한 것으로 판단되어 향후 임상실험결과의 신뢰도 측면에서 건강개체를 모집하는 노력을 기울여 임상실험을 진행하는 것이 좋을 것으로 사료됨.

- 본 시험에 참여한 반려묘의 임상 증상, 혈액검사 등을 평가 하였을 때 뚜렷한 부작용이나 특이적인 임상증상이 관찰되지 않았기에 본 시험에 적용된 시제품은 반려묘의 임상 적용에서 안전성이 확보되었음을 확인 함.
- 급여 전후의 차이 확인을 PCA 데이터를 통해 확인하였음(그림 33).
- 생균혼합제제 급여(T)와 사균혼합제제 급여(D)후 생균제와 사균체의 차이 확인을 PCA 데이터를 통해 확인 하였음(그림 34).
- 급여 전후의 차이를 확인한 PCA 데이터와 생균혼합제제와 사균혼합제제 급여 전후를 비교한 PCA 데이터를 통해 생균제, 사균제 모두 급여 전후 유의미한 차이를 보이는 것을 확인 할 수 있음으로 생균제를 대체할 수 있는 사균제로서의 생리 활성 효과를 확인 할 수 있었음.

표 23. 임상 반려묘 포스트바이오틱스 급여 전/후 임상 데이터(혈액검사 결과)

| ID | Name | Type | Clinical Trial | ALP | BUN | vAMY | vLIP | Ca | Na | K | Cl | Na/K | WBC | RBC | Hb | Hct | MCV | MCH | MCHC | Platelet |
|--------------|------|------|----------------|--------|-----------|----------|------|----------|---------|---------|---------|-----------|----------|------|-------|-------|-------|-----------|-------|----------|
| Normal range | | | | 38-165 | 17.6-32.8 | 200-1900 | 0-30 | 8.8-11.9 | 147-156 | 3.4-4.6 | 107-120 | 33.6-44.2 | 5.5-19.5 | 5-10 | 8-15 | 24-45 | 39-55 | 12.5-17.5 | 30-36 | 300-800 |
| 1 | 호두 | T | BF | 91 | 28.3 | 1027 | 23 | 10.7 | 156 | 4.6 | 112 | 33.9 | 18.4 | 11.2 | 18.8 | 48.3 | 43 | 16.7 | 38.9 | 439 |
| | | | AF | 247 | 28.6 | 492 | 11 | 9 | 176 | 5.3 | 116 | 33.2 | 8.4 | 10.8 | 17.2 | 46.3 | 42.9 | 15.9 | 37.1 | 101 |
| 2 | 우유 | T | BF | 90 | 29.7 | 1355 | 15 | 11.3 | 154 | 4.1 | 112 | 37.6 | 10.5 | 9.69 | 17.1 | 46.4 | 47.9 | 17.6 | 36.9 | 299 |
| | | | AF | 80 | 29.1 | 1326 | 20 | 10.6 | 154 | 4.1 | 113 | 37.6 | 10.8 | 9.55 | 16.6 | 44.7 | 46.8 | 17.4 | 37.1 | 105 |
| 3 | 레이 | T | BF | 130 | 24 | 1358 | 23 | 11.1 | 159 | 4.6 | 114 | 34.6 | 11.1 | 8.67 | 14.6 | 38.9 | 44.9 | 16.8 | 37.5 | 262 |
| | | | AF | 117 | 28.5 | 1719 | 23 | 10.7 | 154 | 4.3 | 109 | 35.8 | 15.6 | 8.82 | 14.1 | 37.6 | 42.6 | 16 | 37.5 | 359 |
| 4 | 가을 | D | BF | 116 | 22.6 | 984 | 14 | 11 | 152 | 4.1 | 114 | 37.1 | 14.5 | 8.93 | 15.8 | 42 | 47 | 17.7 | 37.6 | 207 |
| | | | AF | 99 | 24.5 | 1133 | 15 | 10.9 | 154 | 4.5 | 112 | 34.2 | 15.1 | 8.24 | 14.1 | 38 | 46.1 | 17.1 | 37.1 | 108 |
| 5 | 루루 | T | BF | 169 | 23.7 | 965 | 16 | 10.7 | 153 | 4.6 | 110 | 33.3 | 9.2 | 9.07 | 16.9 | 45.2 | 49.8 | 18.6 | 37.4 | 367 |
| | | | AF | 136 | 24.8 | 1045 | 14 | 10.9 | 153 | 3.9 | 109 | 39.2 | 15.9 | 8.44 | 15.4 | 41.8 | 49.5 | 18.2 | 36.8 | 950 |
| 6 | 보리 | D | BF | 99 | 18.5 | 1255 | 23 | 9.8 | 156 | 4.2 | 114 | 37.1 | 9.6 | 8.96 | 13.2 | 35.7 | 39.8 | 14.7 | 37 | 122 |
| | | | AF | 104 | 19.3 | 1437 | 9 | 9.7 | 155 | 4 | 111 | 38.8 | 7 | 9.77 | 13.3 | 37.1 | 38 | 13.6 | 35.8 | 740 |
| 7 | 까망 | D | BF | 145 | 19.8 | 1091 | 13 | 10.9 | 157 | 5.5 | 117 | 28.5 | 9.5 | 9.98 | 14.8 | 39 | 39.1 | 14.8 | 37.9 | 222 |
| | | | AF | 136 | 19.3 | 1203 | 7 | 10.4 | 154 | 3.6 | 115 | 42.8 | 18.9 | 11.2 | 16.5 | 44.4 | 39.5 | 14.7 | 37.2 | 188 |
| 8 | 마디 | T | BF | 97 | 23.7 | 1192 | 15 | 10.9 | 155 | 3.9 | 118 | 39.7 | 13.4 | 8.74 | 16 | 43.2 | 49.4 | 18.3 | 37 | 235 |
| | | | AF | 82 | 26.9 | 1395 | 22 | 10.6 | 157 | 4.1 | 117 | 38.3 | 10.3 | 8.01 | 14.7 | 38.9 | 48.6 | 18.4 | 37.8 | 123 |
| 9 | 두선 | D | BF | 209 | 26.4 | 1724 | 26 | 10.8 | 152 | 4.3 | 109 | 35.3 | 16.2 | 10.8 | 14.8 | 40.7 | 37.5 | 13.7 | 36.4 | 312 |
| | | | AF | 221 | 29 | 1293 | 15 | 10.4 | 149 | 3.9 | 108 | 38.2 | 21.1 | 10.3 | 14.3 | 40.2 | 38.8 | 13.8 | 35.6 | 346 |
| 10 | 해리 | T | BF | 66 | 21.6 | 1127 | 15 | 10.7 | 156 | 3.6 | 116 | 43.3 | 7.7 | 9.18 | 14.8 | 40.2 | 43.8 | 16.41 | 36.8 | 162 |
| | | | AF | 81 | 24.4 | 1117 | 17 | 10.8 | 155 | 4 | 114 | 38.8 | 6.4 | 10.1 | 15.7 | 42.1 | 41.4 | 15.4 | 37.3 | 198 |
| 11 | 미카 | T | BF | 52 | 22.3 | 719 | 20 | 10 | 158 | 4.6 | 111 | 34.3 | 65.6 | 10.4 | 16.1 | 42 | 40.4 | 15.5 | 38.3 | 210 |
| | | | AF | 59 | 23.7 | 946 | 21 | 10.2 | 157 | 4.5 | 109 | 34.9 | 11 | 10.1 | 14.9 | 41.4 | 41 | 14.8 | 36 | 216 |
| 12 | 달래 | T | BF | 101 | 25.1 | 1062 | 22 | 10.4 | 154 | 3.7 | 112 | 41.6 | 12.8 | 5.54 | 15.7 | 42.4 | 76.5 | 28.3 | 37 | 304 |
| | | | AF | 87 | 26.9 | 1030 | 21 | 10 | 155 | 3.9 | 110 | 39.7 | 13.3 | 9.96 | 16 | 44.5 | 44.7 | 16.1 | 36 | 195 |
| 13 | 국일 | D | BF | 116 | 21.1 | 1628 | 26 | 10.5 | 148 | 4.6 | 101 | 32.2 | 38.1 | 7.68 | 13.6 | 37.9 | 49.3 | 17.7 | 35.9 | 235 |
| | | | AF | 125 | 20.6 | 1741 | 26 | 10.1 | 156 | 5 | 109 | 31.2 | 31.2 | 7.68 | 14.63 | 37.8 | 49.2 | 18.6 | 37.8 | 197 |
| 14 | 밍 | D | BF | 111 | 26.6 | 1020 | 28 | 10.4 | 151 | 4.3 | 109 | 35.1 | 8.3 | 8.9 | 14.4 | 39.8 | 44.7 | 16.2 | 36.2 | 101 |
| | | | AF | 87 | 27 | 936 | 25 | 11 | 152 | 5.8 | 112 | 26.2 | 15.1 | 7.49 | 11.7 | 35.5 | 47.4 | 15.6 | 33 | 560 |
| 15 | 모다 | T | BF | 111 | 23.1 | 1259 | 20 | 12 | 162 | 6.3 | 124 | 25.7 | 11 | 10.7 | 17 | 45.9 | 42.7 | 15.8 | 37 | 231 |
| | | | AF | 101 | 24.6 | 1249 | 14 | 11.9 | 158 | 5.4 | 119 | 29.3 | 22.2 | 10.9 | 16.6 | 45.5 | 41.6 | 15.2 | 36.5 | 270 |
| 16 | 아웅 | T | BF | 116 | 24.4 | 1891 | 21 | 10.4 | 155 | 4.3 | 115 | 36 | 13.3 | 10 | 15.5 | 41.9 | 41.8 | 15.5 | 37 | 265 |
| | | | AF | 125 | 32.5 | 1779 | 18 | 10.5 | 153 | 4.4 | 116 | 34.8 | 15.4 | 10.5 | 15.6 | 42.6 | 40.6 | 14.9 | 36.6 | 381 |
| 17 | 딩 | D | BF | 148 | 27.7 | 1759 | 27 | 12 | 156 | 5 | 112 | 31.2 | 18.1 | 9.63 | 15.7 | 44.3 | 46 | 16.3 | 35.4 | 162 |
| | | | AF | 130 | 27.2 | 1645 | 21 | 12 | 158 | 5.2 | 114 | 30.4 | 77.4 | 10.1 | 15.4 | 46.5 | 45.9 | 15.2 | 33.1 | 112 |
| 18 | 광복 | D | BF | 97 | 33.2 | 808 | 26 | 10.4 | 155 | 4.2 | 114 | 36.9 | 12.8 | 9.19 | 16.7 | 43.4 | 47.2 | 18.2 | 38.5 | 141 |
| | | | AF | 100 | 32.5 | 850 | 26 | 10.5 | 158 | 4 | 119 | 39.5 | 19.3 | 9.5 | 16.1 | 44.2 | 46.5 | 16.9 | 36.4 | 120 |
| 19 | 모리 | D | BF | 99 | 26.2 | 963 | 16 | 10.5 | 155 | 3.9 | 112 | 39.7 | 10.9 | 9.52 | 16.9 | 45.3 | 47.6 | 17.8 | 37.3 | 247 |
| | | | AF | 115 | 30.9 | 838 | 16 | 10.2 | 153 | 4 | 108 | 38.3 | 9.7 | 8.87 | 15.5 | 42.3 | 57.7 | 17.5 | 36.6 | 169 |
| 20 | 대범 | D | BF | 132 | 28.2 | 743 | 24 | 10.1 | 154 | 4.1 | 111 | 37.6 | 9.2 | 9.09 | 15.3 | 41.4 | 45.5 | 16.8 | 37 | 222 |
| | | | AF | 138 | 26.2 | 778 | 22 | 10.3 | 155 | 3.9 | 112 | 39.7 | 15.6 | 8.98 | 14.8 | 41.6 | 46.3 | 16.5 | 35.6 | 160 |

* 급여전(BF), 급여후(AF), 생균 혼합제제(T), 사균 혼합제제(D)

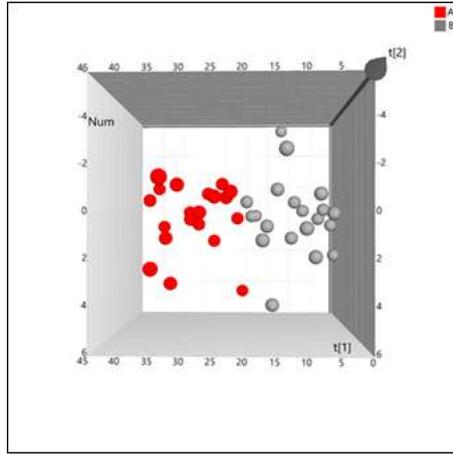


그림 33. 반려묘 급여 전후의 혈액지표 분석 차이를 확인하는 PCA 검사
BF(급여 전), AF(급여 후)

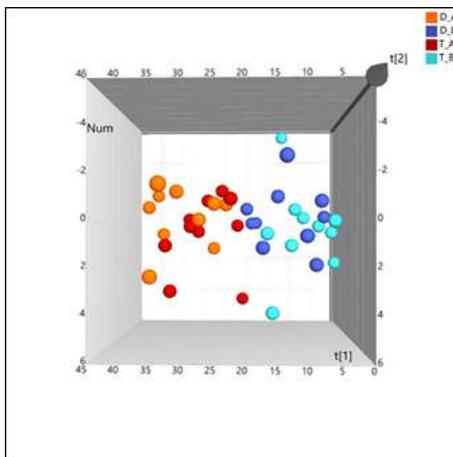


그림 34. 생균혼합제제와 사균혼합제제의 반려묘 급여 전후 혈액지표 분석 차이 PCA 검사
T_BF(생균혼합제제 급여 전), D_BF(사균혼합제제 급여 전), T_AF(생균혼합제제 급여 후), D_AF(사균혼합제제 급여 후)

<마이크로바이옴 분석>

□ 임상 반려견 마이크로바이옴 분석

- ▶ 임상 반려견 마이크로바이옴을 Phylum level과 Family level로 분석하였을 때 우선 각 개체간의 마이크로바이옴 차이를 확인 할 수 있었으며, 또한 사균혼합제제의 급여 전후의 마이크로바이옴 차이를 확인할 수 있었음(그림 35).

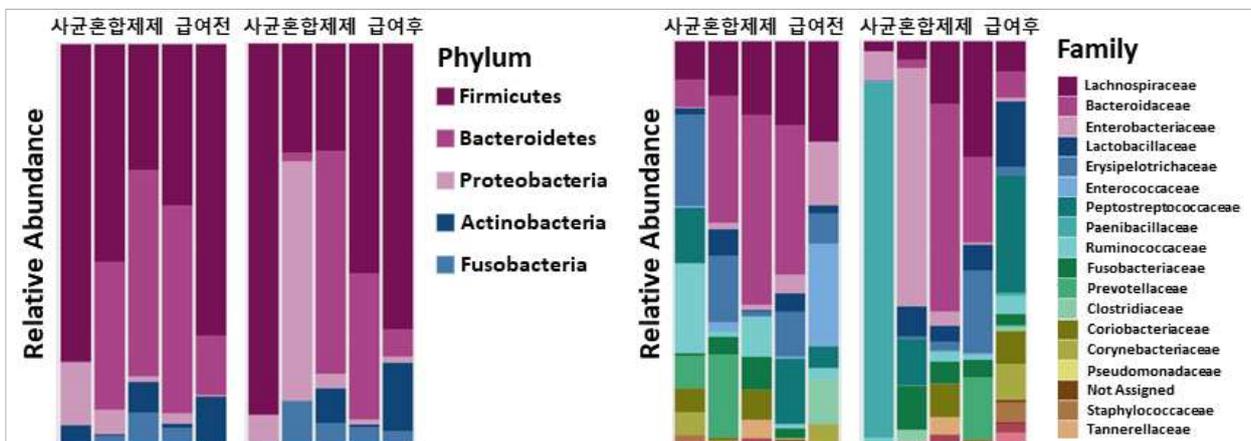


그림 35. 사균혼합제제의 임상 반려견 급여 전후의 마이크로바이옴 분석
Phylum level과 Family level 분석

- ▶ 반려견 유래 *Lactobacillus reuteri* LBR_C1, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5의 사균 혼합제제를 임상 반려견에 급여한후 Lactobacillaceae와의 연관성을 분석하였을 때, Bifidobacteriaceae, Moraxellaceae가 Lactobacillaceae와 유의미한 positive correlation을 보였으며, 두 미생물 모두 급여후 abundance가 증가하는 양상을 보였음(그림 36).
- ▶ 사균혼합제제의 임상 반려견 급여후 Lactobacillaceae와 장내 미생물과의 연관성 분석에서 대표적 유산균 중 하나인 Bifidobacteriaceae 증가와 함께 Lactobacillaceae와 Bifidobacteriaceae가 positive correlation을 보인 점은 *Lactobacillus* 사균혼합제제의 급여가 장내 유용미생물들의 증가에 영향을 미칠 수 있다는 점과 이로 인해 반려동물 장건강에 긍정적 역할을 할 수 있음을 시사한다고 볼 수 있음.

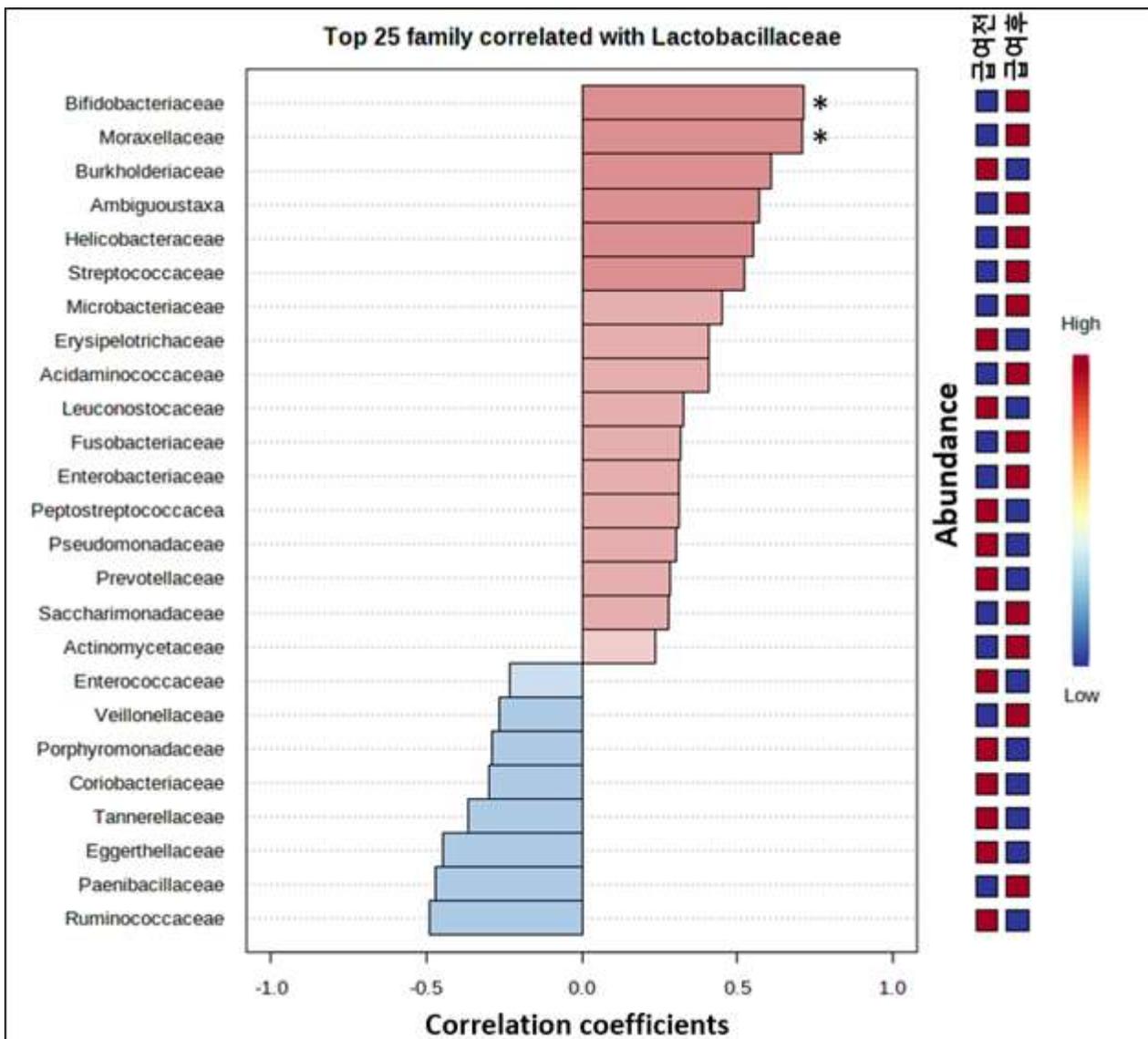


그림 36. 사균혼합제제의 임상 반려견 급여 후 Lactobacillaceae와 장내 미생물과의 연관성 분석
* $P < 0.05$

□ 임상 반려묘 마이크로바이옴 분석

- ▶ 임상 반려묘 마이크로바이옴을 Phylum level로 분석하였을 때 우선 각 개체간의 마이크로바이옴 차이를 확인 할 수 있었으며, 또한 사균혼합제제 급여전은 Firmicutes가 장내 우점하다가 사균혼합제제 급여후 Proteobacteria가 장내 우점하는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 사균혼합제제의 급여 전후의 마이크로바이옴 차이를 확인할 수 있었음(그림 37).

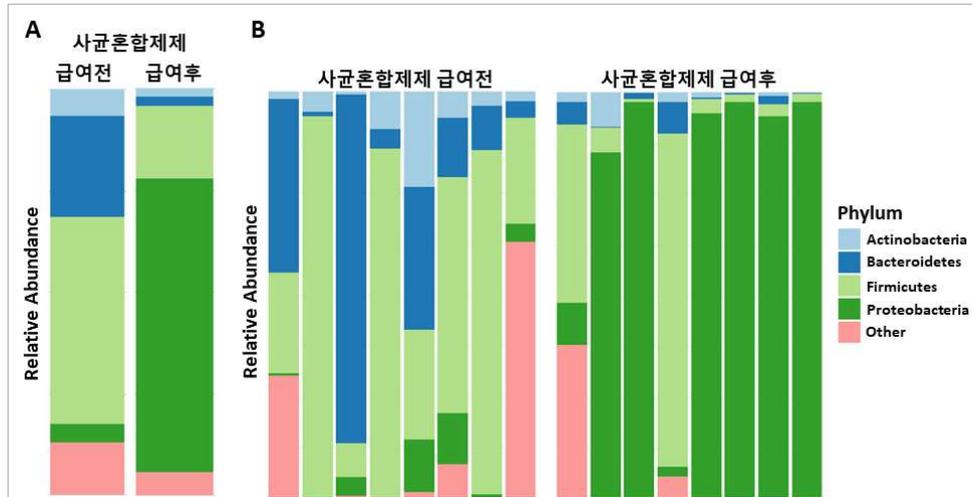


그림 37. 사균혼합제제의 임상 반려묘 급여 전후의 마이크로바이옴 분석
Phylum level 분석

- A. 급여 전후 전체 샘플들의 평균 abundance 값 분석
- B. 급여 전후 각각의 샘플들의 abundance 값 분석

- ▶ 임상 반려묘 분변 마이크로바이옴의 PCoA 분석을 통해 사균혼합제제 급여 전후의 차이를 분석(그림 38).
- ▶ 사균혼합제제 급여 전후를 비교한 임상 반려묘 분변 마이크로바이옴의 PCoA 데이터를 통해 사균체 급여 전후 유의미한 차이를 보이는 것을 확인 할 수 있음으로 생균제를 대체할 수 있는 사균체로서의 장내 생리 활성 효과를 기대 할 수 있음.

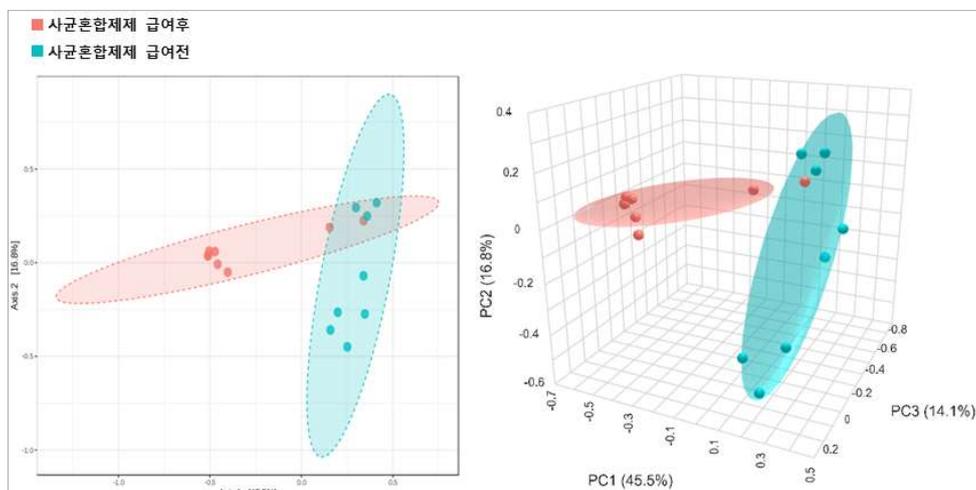


그림 38. 사균혼합제제의 반려묘 급여 전후의 분변 마이크로바이옴 차이를 확인하는 PCoA 분석
2D PCoA model과 3D PCoA model

□ 국제 미생물 학회 ASM Microbe 2023 포스터 발표

- ▶ 본 과제 수행 결과로 확보된 반려견 유래 *Lactobacillus reuteri* LBR_C1, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5의 기능성 평가 및 임상 마이크로바이옴 결과를 미국에서 개최된 국제적인 미생물 학술회인 ASM Microbe 2023에서 포스터 발표 수행(그림 39).

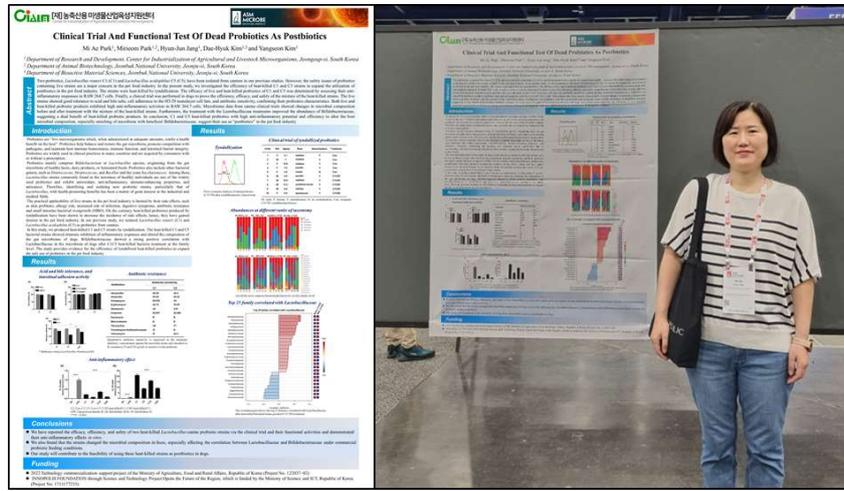


그림 39. 국제 미생물 학회 발표 ASM Microbe 2023
(American Society for Microbiology Conference 2023)

<포스트바이오틱스를 이용한 반려동물 기능성 펫푸드 라인업 구축 및 제품 등록>

□ 제품 생산라인 확보

- ▶ 주관연구개발기관 우진비앤지주식회사 에서는 2022년 소용량 스틱포장 생산라인 구축을 완료 했으며, 추가 시제품 제작 및 제품 생산라인을 확보함(그림 40).



그림 40. 우진비앤지 소용량 스틱포장 생산라인 구축

▶ 사료첨가제(영양제) 제품화

- 사균체는 생균제와는 달리 제조 환경, 보관 환경 등의 조건에 안정하며, 제형화 조건에 따른 손실이 없음. 따라서 다양한 펫푸드 제조에 첨가하여 제형화 하기 유리함.
- 본 연구과제의 기반이 되는 이전 연구과제 포스트게놈다부처유전체사업(과제명 : 반려견·반려묘 장내 마이크로바이옴 기반 면역증강용 미생물제제 개발)에서 진행했던 프로바이오틱스 제형 조성을 활용하여 관능적 시험 및 임상시험에서 객관적인 기호도가 확보된 조성을 기반으로 아래 표와 같이 다양한 원료들을 검토하였음(표 24).

표 24. 반려동물용 사료첨가제 사용 원료 조사

| 부형제 | | |
|-------------------|----------------------|----------------------------|
| Calcium carbonate | Maltitol | Starch, Corn |
| Cellulose | Magnesium carbonate | Starch, Potato |
| Dextrin | Maltodextrin | Starch, Pregelatinized |
| Dextrose | Maltose | Sucrose |
| Fructose | Mannitol | Talc |
| Lactose | Sodium chloride | Trehalose |
| Lactitol | Sorbitol | Xylitol |
| 감미제, 향료 | | |
| Fructose | Leucine | Sodium acetate |
| Lactitol | Monosodium glutamate | Tartaric acid |
| 고결방지제 | | |
| Calcium silicate | Magnesium oxide | Silicon dioxide, Colloidal |
| 활택제 | | |
| Calcium stearate | Magnesium stearate | |

- 기존에 보유중인 대량 포장공정과는 다르게 스틱포장 공정에서는 샘플 조성의 유동성, 안식각 등 다양한 조건이 포장에 큰 영향을 미치는 것으로 확인됨.
- 이에 다양한 조성을 프리포물레이션 하여 가장 우수한 흐름도를 보이는 조성을 선별하여 대량 생산 시 흐름성에 의한 문제가 발생하지 않도록 예비 테스트 진행(표 25, 27).
- 반려동물용 사료첨가제의 프리포물레이션을 진행한 결과 반려견용 조성에서는 case 3, 반려묘용 조성에서는 case 4가 스틱포장에 가장 적절한 조성으로 확인됨(표 26, 28).

표 25. 반려견용 사균체를 활용한 사료첨가제 프리포물레이션

| 원료명 | Case1 | Case2 | Case3 | Case4 | Case5 | Case6 | Case7 | Case8 | Case9 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| LBR_C1 사균체 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| LBA_C5 사균체 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 아미노산 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 부형제1 | 20 | 20 | - | 20 | 10 | 10 | - | 10 | 20 |
| 부형제2 | 20 | 20 | 20 | - | 10 | - | - | 20 | 25.8 |
| 부형제3 | - | - | 20 | 20 | 45.5 | 55.5 | 55.5 | - | - |
| 부형제4 | 10 | 35.5 | 35.5 | 35.5 | 10 | 10 | 20 | 35.8 | 20 |
| 부형제5 | 25.8 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 향료 | 0.2 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.2 | 0.2 |
| 활택제 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 고결방지제1 | 10 | - | - | - | - | - | - | 10 | 10 |
| 고결방지제2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 합계 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

표 26. 반려견용 사균체 프리포물레이션 흐름도 결과

| 시험 항목 | Case1 | Case2 | Case3 | Case4 | Case5 | Case6 | Case7 | Case8 | Case9 |
|---------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| 흐름성(초) | NA | 86.5±3.4 | 52.6±1.5 | 84.3±3.2 | 62.1±2.1 | 60.1±1.5 | 57.2±3.2 | 92.1±4.3 | NA |
| 안식각 (°) | NA | 34.4 | 30.57 | 34.36 | 32.19 | 33.13 | 30.57 | 40.44 | NA |
| 고결 확인 | - | + | - | + | + | ++ | ++ | + | - |

* NA : 측정 불가, - : 케이킹 없음, + ~ ++ : 케이킹 발생 정도

표 27. 반려묘용 사균체를 활용한 사료첨가제 프리포물레이션

| 원료명 | Case1 | Case2 | Case3 | Case4 | Case5 | Case6 | Case7 | Case8 | Case9 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CACC612 사균체 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| CACC789 사균체 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 아미노산1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 아미노산2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 아미노산3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 부형제1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 부형제2 | 42 | 30 | 15 | 15 | 30 | 30 | 30 | 20 | 20 |
| 부형제3 | 20 | 22 | 10 | 10 | 20 | 20 | 20 | 20 | 15 |
| 부형제4 | | | 47 | | 22 | | 10 | | 20 |
| 부형제5 | | | | | | 22 | | 10 | |
| 부형제6 | | 20 | | 46 | | | 10 | 10 | 15 |
| 향료1 | | 6 | | 4 | | | 4 | | 4 |
| 향료2 | 6 | | 3 | | 5 | 2 | | 6 | |
| 향료3 | | | 1.8 | 1.8 | | 2.7 | 3.6 | 1.8 | 3.6 |
| 향료4 | | | 0.2 | 0.2 | | 0.3 | 0.4 | 0.2 | 0.4 |
| 활택제 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 고결방지제1 | 10 | - | - | - | - | - | - | 10 | |
| 고결방지제2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 합계 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

표 28. 반려묘용 사균체 프리포물레이션 흐름도 결과

| 시험 항목 | Case1 | Case2 | Case3 | Case4 | Case5 | Case6 | Case7 | Case8 | Case9 |
|---------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|----------|
| 흐름성(초) | NA | 64.1±2.7 | 64.2±4.5 | 54.6±2.4 | 62.1±2.1 | 60.1±1.5 | 57.2±3.2 | NA | 58.7±3.1 |
| 안식각 (°) | NA | 34.14 | 35.64 | 30.36 | 32.19 | 33.13 | 30.57 | NA | 32.45 |
| 고결 확인 | - | + | - | - | + | - | ++ | - | + |

* NA : 측정불가, - : 케이킹 없음, + ~ ++ : 케이킹 발생 정도

- 상기 조성을 바탕으로 스틱포장기 혼합 순서, 시간 및 포장기 공정 값 등 생산 조건을 검토하였음.
- 원료 조성표 내 함량이 적은 순, 많은 순 2 가지의 원료 별 혼합 순서 조건을 결정하여 원료 혼합 샘플을 제조하였고 이 샘플들을 혼합 시간 별로 평가하여 생산조건을 결정함.
- 사균체 특성 상 부형제와 섞이면 계수가 불가능하여 당사에서 보유하고 있는 생균제 원료 *Bacillus subtilis*를 1.0*10⁸ cfu/g 이상 첨가하여 혼합도 지표로 활용하였음.
- 상기 혼합도 결과를 기반으로 혼합 시 투입량이 적은 원료부터 프리믹스 형태로 혼합을 실시하고 최적의 혼합시간을 20 분으로 결정하여 투입 시간 대비 생산 효율이 우수한 반려동물용 사료첨가제의 스틱포장기 생산 조건을 확립하였음(표 29).

표 29. 반려동물용 사균체 조성의 혼합조건 별 혼합도 결과

| 샘플 채취 장소 / 혼합시간 | <i>Bacillus subtilis</i> 균수 측정 결과 (cfu/g) | | | | | |
|--------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 10 분 | | 20 분 | | 30 분 | |
| | 적은 순 | 많은 순 | 적은 순 | 많은 순 | 적은 순 | 많은 순 |
| 상층부 | 7.7×10^7 | 9.4×10^6 | 2.4×10^8 | 6.2×10^7 | 1.6×10^8 | 2.6×10^8 |
| 중층부 | 1.4×10^8 | 9.5×10^7 | 2.1×10^8 | 2.2×10^7 | 2.7×10^8 | 1.7×10^8 |
| 하층부 | 6.7×10^6 | 5.1×10^8 | 2.7×10^8 | 3.6×10^8 | 2.5×10^8 | 1.8×10^8 |

- 포장지는 다양한 재질이 존재하며, 1 차년도에 샘플 제공하였던 LDPE 형태와 일반적인 스틱포장에 사용되는 알루미늄 호일 필름(alu-bag), PET/PE/AL/PE/LLDPE 복합재질 필름이 가장 널리 사용됨.
- 제품의 변질 없는 유통을 위해서 3 개월 간 항온항습기 (25 °C, RH 60%) 조건에서 보관하였으며, 보관 후 안정성 지표 측정을 통해 가장 적합한 포장재질을 검토함.
- 사균체의 단순 계수로 균체의 변질 여부를 확인 할 수 없어 종전 실험과 마찬가지로 *Bacillus subtilis* 원료를 1.0×10^8 cfu/g 이상 투입하여 변질 지표로 활용하였음.
- 포장 재질 별 안정성 확인 결과 LDPE 단일층으로 이뤄진 포장지에서는 정상변화 및 균음, 균수의 변화가 확인되었으며, 데이터로는 표기하지 않았지만 불쾌한 냄새도 발생하였음.
- 그에 비해 알루미늄 호일 필름, PET/PE/AL/PE/LLDPE 복합재질은 안정성 지표가 모두 우수하였으며, ALU-bag 단일 재질에서는 포장지 겉면 인쇄가 불가능한 단점이 있어 PET/PE/AL/PE/LLDPE 복합재질로 포장재를 선정함(표 30).

표 30. 반려동물용 사균체 조성의 포장 재질 별 안정성 결과

| 항목 | 기준 | 결과 | | |
|------------|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | | LDPE | ALU-bag | PET/PE/AL/PE/LLDPE |
| 성상 (색) | 미황색 | 진한 황색 | 미황색 | 미황색 |
| 건조감량 (%) | <10 | 11.24 ± 1.23 | 4.12 ± 0.05 | 3.95 ± 0.04 |
| 고결 확인 | - | ++ | - | - |
| 균수 (cfu/g) | 1.0×10^8 이상 | 6.3×10^7 | 1.4×10^8 | 1.5×10^8 |

* NA : 측정불가, - : 케이킹 없음, + ~ ++ : 케이킹 발생 정도

- 이전 포스트게놈다부처유전사업에서 확보한 개 유산균 프로바이오틱스 정제 생산 기술을 기반으로 본 연구에서도 개 유산균 사균체를 활용한 정제 생산을 위한 프리포물 레이션을 진행하였음(표 31).
- 프리포물레이션 조성들을 대상으로 타정기에서 직접 타정 테스트를 실시하여 최적의 타정 조성을 확립하였음.
- 원료의 혼합도 평가를 위해 스틱포장 산제와 동일하게 *Bacillus subtilis* 원료를 1.0×10^8 cfu/g 이상 투입하여 혼합도 지표로 활용하였음.
- 혼합도는 모든 샘플에서 우수하게 유지되었으며, 흐름성, 안식각, 경도, 마손도 등 정제의 생산 및 품질평가에 기준이 되는 항목들을 비교한 결과 case4 조성이 가장 우수한 성능을 나타내는 것을 확인함(표 32).

표 31. 반려견용 사균체를 활용한 사료첨가제 타정제 프리포물레이션

| 원료명 | Case1 | Case2 | Case3 | Case4 |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| LBR_C1 사균체 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| LBA_C5 사균체 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 부형제1 | 46.5 | 46.5 | 46.5 | 46.5 |
| 부형제2 | 26 | 26 | | |
| 부형제3 | | | 26 | 26 |
| 부형제4 | 15 | 15 | | |
| 부형제5 | | | 15 | 15 |
| 향료 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 활택제 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 고결방지제1 | 1 | | 1 | |
| 고결방지제2 | | 1 | | 1 |
| 합계 | 100 | 100 | 100 | 100 |

표 32. 반려견용 사균체 타정제 프리포물레이션 타정 결과

| 시험 항목 | Case1 | Case2 | Case3 | Case4 |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 흐름성(초) | 66.1±2.7 | 60.1±2.7 | 64.2±4.5 | 54.6±2.4 |
| 안식각 (°) | 35.64 | 33.14 | 35.64 | 30.36 |
| 경도 (kp) | 15.36 | 18.24 | 17.24 | 20.16 |
| 마손도 (%) | 99.12 | 99.47 | 99.29 | 99.82 |
| 혼합도 (cfu/g) | 2.1*10 ⁸ | 1.9*10 ⁸ | 1.9*10 ⁸ | 1.8*10 ⁸ |

- 반려견 유래 사균체의 균주 개발, 제형화, 시제품 제작 성과에 대해 국제학술대회 AAAP 2022(Asian-Australasian Association of Animal Production)에 참석하여 포스터 발표를 진행하였으며, 다양한 분야의 연구자들과 성과를 교류함(그림 41).



그림 41. 반려견 연구성과에 대한 국제학술대회 AAAP 2022 포스터 발표

- 위 실험 결과로 확립된 포مول레이션 및 생산 조건을 기반으로 반려견, 반려묘 사군체를 활용한 산제 스틱포장 시제품 2 종, 반려견 사군체를 활용한 정제 시제품 1 종을 생산함(그림 42).



그림 42. 사군체 원료를 활용한 시제품

(왼쪽 : 닥터터미 강아지 산, 중간 : 닥터터미 고양이 산, 오른쪽 : 닥터터미 강아지 정)

- 주관연구개발기관 우진비엔지에서 제품 등록을 위해 여러 법령을 조사한 결과 현재까지 보조사료로서 사군체 성분을 보증 할 수 없고 보조사료 사군체 또는 포스트바이오틱스 항목으로 등록도 불가하지만, 유익균 배양물로서 보조사료 첨가가 가능하다는 것을 확인함.
- 현행 법령에서 원활한 제품 등록과 판매를 위해 제형화 개발 시 지표로 활용된 *Bacillus subtilis* 균주를 활용하여 보조사료 생균제로 등록 하고 사용한 원료의 명칭에 본 연구과제에서 개발된 사군체를 기재하는 것으로 제품화를 진행함.
- 상기 장점과 기능성을 확보한 개 유래 유산균 사군체 2종(*Lactobacillus reuteri* LBR_C1, *Lactobacillus acidophilus* LBA_C5)과 고양이 유래 유산균 사군체 2종(*Lactobacillus rhamnosus* CACC612, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC789)를 포함하는 Dr.Tummy (for dog) 정제, 산제, Dr.Tummy (for cat) 산제 제형으로 포스트바이오틱스 보조사료 제품화를 완료함(그림 43).



그림 43. 포스트바이오틱스를 함유하는 반려동물 영양제 제품 등록증

- 이전 연구개발과제와 본 연구개발과제를 통해 생균, 사균 균주 개발과정에서 얻은 결과를 바탕으로 브로셔를 제작하여 제품 마케팅 자료로 활용(그림 44).



그림 44. 닥터터미 시리즈 브로셔

▶ 사료

- 우진비앤지 주식회사 자회사인 반려동물 유기농 사료 제조 회사 (주)오에스피 는 자체 브랜드 유기농 사료 ‘네추럴 시그니처’를 제조 판매하고 있음.



그림 45. (주)오에스피 자체 브랜드 유기농 사료 ‘네추럴 시그니처’

- 우진비앤지 주식회사 중앙연구소(본 연구진)는 (주)오에스피 연구소와 협업으로 업그레йд 제품 개발 및 런칭을 진행하고 있으며, 반려동물 유래 균주(사균체)를 포함한 사료 개발을 진행 중임.
- 사료 제형은 반려인에게 가장 편리한 사료 형태라고 볼수 있는 견식 제형을 선택하였고, (주)오에스피 생산라인을 통한 사균체(트리플락토 for dog)를 포함한 유기농 프리미엄 사료 ‘INDIGO’ 3종의 시생산을 완료함(그림 46).



그림 46. 포스트바이오틱스 사균체를 포함한 반려견 사료 시제품(INDIGO 3종)

▶ 간식

- 우진비앤지 자회사인 (주)오에스피는 반려동물 간식제조업체 바우와우코리아와 업무협약(MOU)을 맺음으로서 반려동물 간식 생산라인을 확보함.



그림 47. (주)오에스피(우진비앤지 자회사), 바우와우코리아 업무협약(MOU) 체결

- 바우와우코리아에서 생산하고 있는 다양한 제형의 반려동물 간식 제조에 사균체 첨가가 가능하며, 주요 제형에 사균체를 첨가하여 시제품 생산을 완료하였음(그림 48).



그림 48. 포스트바이오틱스 사균체를 포함한 반려견 간식 시제품

□ 특허 출원

- ▶ 본 과제를 통해 개 유래 유산균 사균체 2 종, 고양이 유래 유산균 사균체 2 종에 대한 효능·효과를 확인 하였으며 이를 포함하는 사료 조성물에 대한 2 건(출원번호: 10-2023-0185801, 10-2023-0194998)의 특허 출원을 완료하였음(그림 49).

| 【특허사양】 | | 2023-10-08 | 【특허사양】 | | 2023-10-18 |
|----------|---|------------|----------|---|------------|
| 【발명명】 | 박지송홍서 | | 【발명명】 | 박지송홍서 | |
| 【출원번호】 | PH230236 | | 【출원번호】 | PH230160 | |
| 【출원구분】 | 특허출원 | | 【출원구분】 | 특허출원 | |
| 【출원지】 | | | 【출원지】 | | |
| 【연장】 | 우진비앤지 주식회사 | | 【연장】 | 우진비앤지 주식회사 | |
| 【특허고려범위】 | 1-1998-105607-3 | | 【특허고려범위】 | 1-1998-105607-3 | |
| 【출원인】 | (주)우진비앤지 | | 【출원인】 | 우진비앤지 | |
| 【특허고려범위】 | 1-2019-038009-1 | | 【출원지】 | 대전광역시 동구상대동삼양로15길100-1 | |
| 【대리인】 | | | 【특허고려범위】 | 1-2019-084822-7 | |
| 【공표일】 | 박지송홍서출원 | | 【대리인】 | 이준호 | |
| 【대리인번호】 | 9-2022-100101-7 | | 【출원인】 | 박지송홍서출원 | |
| 【발명발견자】 | 홍대영 | | 【발명발견자】 | 홍대영 | |
| 【공표발견자】 | 2022-085808-9 | | 【공표발견자】 | 2022-085808-9 | |
| 【발명지】 | 한국특허출원, 특허청, LBLCT1 균주 및 락토발리우스, LBLCT5 균주의 사균체 및 이와 제조 방법 | | 【발명지】 | 한국특허출원, 특허청, CAC 612 균주 및 락토발리우스, CAC 612 균주 및 락토발리우스, CAC 789 균주의 사균체 및 이와 제조 방법 | |
| 【발명지】 | Dead cells of Lactobacillus reuteri LBLCT1 strain and Lactobacillus acidophilus LBLCT5 strain having antibacterial activity and method for producing the same | | 【발명지】 | Combinet animal's feed composition comprising dead cells of Lactobacillus reuterus CAC 612 strain and Bifidobacterium animalis CAC 789 strain | |
| 【발명지】 | 30-1 | | 【발명지】 | 이준호 | |
| | | | 【출원지】 | 대전 | |

그림 49. 개, 고양이 유래 유산균 사균체를 포함한 사료 조성물 특허 출원서

<제품 홍보 및 마케팅>

□ 반려동물 교육기관과의 산학협력(MOU) 체결(오산대학교 반려동물관리과)

- ▶ 반려동물관리과 특성 상 학생과 교수진이 반려동물 산업에 종사하는 경우가 많고, 임상시험에 대한 사전 지식을 어느 정도 갖춘 고학력의 인재풀을 활용하기에 적합하여, 실험 동의서를 얻을 수 있는 최적의 조건으로 판단됨.
- ▶ 오산대학교는 공동연구기관인 우진비앤지와 소재지가 화성·오산 지역으로 공통점을 가지고 있으며, 이에 지역 반려동물산업 발전과 오산대학교 고등직업교육거점지구 사업의 목적이 일치하여, 서로 협력을 통해 충분한 시너지 효과를 발휘 할 수 있을 것으로 예상됨(그림 50).



그림 50. 우진비앤지 주식회사, 오산대학교 반려동물관리과 산학협력(MOU) 체결

□ 오산대학교 MOU 축산신문 홍보

- ▶ 오산대학교 HIVE 사업단과의 반려동물 산업 관련 교육 협력 MOU 홍보를 위해 주간지(축산신문, 2022.10.21.)에 지면 기사를 게재하여 관련 사실을 홍보함(그림 51).

우진비앤지, 오산대와 반려동물 산업 ‘산학협력’

맞춤형 인재 양성, 교육·연구 활동 MOU

우진비앤지(대표 강석진)는 지난 9월 28일 오산대와 반려동물산업 관련 산학협력을 위한 업무 협약(MOU)을 체결했다.

이를 통해 두 기관은 반려동물 산업에 필요한 현장 맞춤형 인재를 양성할 교육·연구 활동 등에서 협력하게 된다.

협약 주요 내용은 스고등직업교육거점지구(HiVE) 사업 성과 제고를

를 위한 상호 협력 △반려동물관리 산업 분야 전문인력 양성, 실습·진로(취업, 창업) 등을 위한 상호협력 △교육과정 공동 개발·주문식 교육 상호지원 협력 등이다.

이성호 우진비앤지 이사는 “이번 협력을 대학과 산업체가 더불어 발전하는 기회로 삼겠다. 회사 경쟁력 제고는 물론, 지역 경제와 반려동물 산업 성장에도 기여할 것이



왼쪽 이성호 이사, 오른쪽 노재준 오산대 사업단장.

다”고 말했다.

김영길 kimy2908@naver.com

그림 51. 우진비앤지 주식회사, 오산대학교 반려동물관리과 산학협력(MOU) 기사

□ 국내 반려동물 사료 대리점 대상 제품 설명회 개최(2023.06.07.)

- ▶ 주관연구기관인 우진비앤지 주식회사는 제품 런칭에 앞서 전국의 사료 대리점 대표자를 초청하여 신규로 출시하는 개, 고양이 유래 유산균 사균체를 포함한 반려동물 영양제 Dr. Tummy (for dog, for cat) 제품 설명회를 개최함(그림 52).



그림 52. 국내 반려동물 사료 대리점 대상 제품 설명회 개최(2023.06.07.)

□ 국내 박람회 홍보 부스 설치(제품 홍보)

- ▶ 국내 최대 펫산업 박람회인 메가주(대한민국 일산, 2023.05.19. ~ 21)는 사료, 용품, 헬스케어, 의류, 여행, 펫테크 등 모든 펫 산업 트렌드를 한자리에서 진행하는 박람회로 자회사 오에스피의 홍보 부스를 통한 반려동물 영양제 ‘닥터터미(Dr.Tummy)’, 오에스피(우진비앤지 주식회사 자회사)의 유기농 프리미엄사료 ‘INDIGO’ 제품의 홍보를 진행함(그림 53).
- ▶ 자회사의 부스에서 공동으로 홍보 진행하여, 이전 포스트게놈다부처유전체사업의 성과이고 INDIGO사료에 첨가중인 ‘트리플락토’, 이번 과제 성과로 개발된 닥터터미(Dr.Tummy)의 홍보를 진행하였고, 관람객들이 많은 관심을 보임.



그림 53. 메가주 (대한민국 일산, 2023.05.19. ~ 21) 홍보 부스 운영

□ 국제 박람회 홍보 부스 설치(제품 홍보)

- ▶ 2022년 처음으로 개최된 Pet Fair Southeast Asia (태국 방콕, 2022.10.26. ~ 28) 전시회는 ASEAN 지역 13개국의 반려동물 관련 박람회 연합으로 개최되었으며, 홍보 부스를 통해 반려동물 영양제 ‘닥터터미(Dr.Tummy)’, B2B 제품 ‘트리플락토’, (주)오에스피(우진비앤지(주) 자회사)의 유기농 프리미엄사료 ‘INDIGO’ 제품의 홍보를 진행함(그림 54).
- ▶ 태국, 홍콩, 말레이시아, 일본, 필리핀, 대만, 베트남 등 다양한 동남아 국가의 바이어들은 프로바이오틱스, 포스트바이오틱스가 첨가된 펫푸드에 대한 관심이 높았으며, 포스트바이오틱스(사균체)가 포함된 자사 및 (주)오에스피 제품 또한 많은 관심을 보임.



그림 54. Pet Fair Southeast Asia 2022(태국 방콕, 2022.10.26. ~ 28) 홍보 부스 운영

- ▶ 세계 최대 축산분야 박람회로 알려진 EuroTier 2022 (독일 하노버 2022.11.15. ~ 18) 박람회 홍보 부스를 통해 우진비앤지의 축종별 항생제, 철분주사제, 대사촉진제, 플루메타손, 각종 생균제, 비타민제 등 다양한 제품을 홍보했으며, 신규 런칭을 준비하는 반려동물 영양제 ‘닥터터미(Dr.Tummy)’ 에 대한 홍보를 진행함(그림 55).
- ▶ 선진국의 반려동물 제품 트렌드를 경험하였으며, 닥터터미 시제품 중 특히 타정 제품에 대한 관심이 매우 높았음.



그림 55. EuroTier 2022 (독일 하노버, 2022.11.15. ~ 18) 홍보 부스 운영

- ▶ 2년마다 개최되는 아시아에서 가장 큰 축산관련 박람회인 VIV Asia 2023(태국 방콕 2023.03.08. ~ 10)은 코로나19로 인해 2019년 이후 4년 만에 개최된 박람회로서 이번 2023년 박람회에서는 기존 대비 전시면적을 2배 가까이 늘림(그림 56).
- ▶ 본 박람회의 홍보 부스를 통해 우진비앤지의 축종별 항생제, 철분주사제, 대사촉진제, 각종 생균제, 비타민제 등 다양한 제품을 전시하였으며, 자회사 오에스피의 인디고 사료도 반려동물 라인업으로서 같이 홍보 진행하였으며, Pet Fair Southeast Asia 2022 전시회에 이어 많은 관람객들이 닥터터미(Dr. tummy)제품에 많은 관심을 보임.



그림 56. VIV asia 2023(태국 방콕, 2023.03.08. ~ 10) 홍보 부스 운영

- ▶ 한국농수산식품유통공사가 주최한 K-PET Food fair (베트남 하노이 2023.05.26. ~ 27) 자회사 오에스피의 홍보 부스에서 오에스피 인디고 사료에 첨가된 반려동물 유래 유산균과, 우진비앤지의 반려동물 라인업 닥터터미(Dr. tummy)를 홍보함(그림 57).



그림 57. K-PET Food fair (베트남 하노이 2023.05.26. ~ 27) 홍보 부스 운영

- ▶ 유럽과 아시아의 교두보인 터키 지역에서 가장 큰 축산 박람회로 알려진 VIV TURKEY (터키 이스탄불, 2023.07.06. ~ 08)에 참석하여 우진비앤지의 축산용 주사제, 사료첨가제 등 동물용의약품 제품들을 홍보하였고, 성장하고 있는 동유럽, 서아시아 지역의 반려동물 산업 트렌드에 맞춰 새로 개발된 반려동물 사료첨가제 닥터터미를 집중적으로 홍보함(그림 58).



그림 58. VIV TURKEY (터키 이스탄불, 2023.07.06. ~ 08) 홍보 부스 운영

- ▶ 북미지역에서 가장 큰 반려동물 B2B 산업 박람회로 알려진 SUPERZOO 2023(미국 라스베이거스, 2023.08.16. ~ 18)에 자회사 오에스피, 손자회사 바우와우 부스에 공동 참석하여 반려동물용 사료첨가제, 사료, 간식 등 우진비앤지 그룹의 모든 반려동물 관련 제품을 전시하여 자사 반려동물 라인업에 대한 전체적인 홍보 시너지 효과를 창출하여 고객사의 많은 관심을 받음(그림 59).



그림 59. SUPERZOO 2023(미국 라스베이거스, 2023.08.16. ~ 18) 홍보 부스 운영

- ▶ Pet Fair South East Asia (태국 방콕, 2023.10.25. ~ 27)는 2022년 1회차에 이어 이번 2023년 2회차 박람회에서 꾸준히 참석하였으며, 2022년 1회 부스 대비 규모를 대폭 확대하여 참석하였으며, 자회사 오에스피와 손자회사 바우와우의 공동 홍보 부스에서 오에스피 인디고 사료에 첨가된 반려동물 유래 유산균을 홍보하고 우진비앤지, 오에스피, 바우와우의 사료첨가제 닥터터미(Dr. tummy), 사료(인디고), 간식(무마진) 반려동물 라인업에 대한 홍보 진행함(그림 60).



그림 60. Pet Fair South East Asia (태국 방콕, 2023.10.25. ~ 27) 홍보 부스 운영

- ▶ 중동 아프리카 지역의 가장 크고 유명한 박람회 중 하나인 VIV MEA 2023(UAE 아부다비, 2023.11.20. ~ 22)박람회에 참석하여 우진비앤지의 축종별 항생제, 주사제, 생균제, 비타민제 등 동물용의약품 및 보조사료를 홍보하였으며, 반려동물 라인업으로 닥터터미(Dr. tummy) 홍보를 진행함(그림 61).
- ▶ 반려동물 산업이 시작되고 있는 중동, 아프리카 지역인 만큼 신규 반려동물 라인업에 관한 문의가 축산용품과 비등한 수준으로 높아졌으며, 반려동물용 사료첨가제에 대한 많은 관심이 있었음.

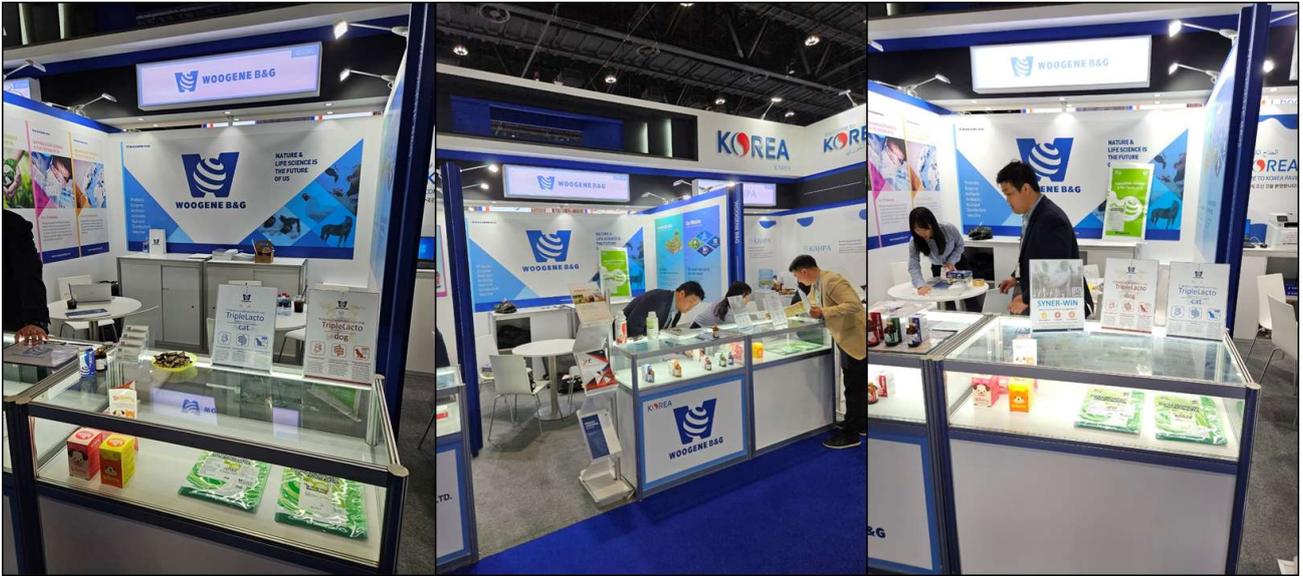


그림 61. VIV MEA 2023(UAE 아부다비, 2023.11.20. ~ 22) 홍보 부스 운영

- ▶ 동남아시아에서 가장 유명한 축산 박람회 중 하나인 Livestock Malaysia 2023(말레이시아 쿠알라룸푸르, 2023.11.29. ~ 12.01)박람회 홍보 부스에서 우진비앤지의 축산용 축종별 동물용의약품 및 보조사료, 반려동물용 닥터터미(Dr. tummy) 및 자회사 오에스피의 네추럴시그니처 사료를 홍보하였음(그림 62).



그림 62. Livestock Malaysia 2023(말레이시아 쿠알라룸푸르, 2023.11.29. ~ 12.01) 홍보 부스 운영

- ▶ 북미에서 가장 크게 열리는 축산관련 박람회 IPPE 2024(미국 애틀랜타, 2024.01.30. ~ 02.01)에 참가하여 홍보 부스에서 우진비앤지의 축종별 항생제, 주사제 등 동물용 의약품 및 생균제, 비타민제 등 보조사료를 홍보하였으며, 반려동물 라인업으로 반려동물 유래 포스트바이오틱스 닥터터미(Dr. tummy)를 홍보하였으며, 선진국에서도 드

르, 뉴질랜드 3건, 14,865,540 원으로 총 19,415,000 원을 기록하였음.

- ▶ 대부분의 매출은 원료 매출로서 원료 시장은 제품 시장 대비 규모가 1/10 수준으로 작은 것을 고려하였을 때 실질적인 펫푸드 시장 규모 및 제품 매출 대비 환산 매출은 10배 이상으로 예상됨.
- ▶ 과제 종료 후에도 지속적으로 국내외 많은 바이어, 회사에서 포스트바이오텍스 원료 및 제품 관련 문의가 들어오고 있으며, 이를 기반으로 사료첨가제(영양제)외 사료, 간식 등 다양한 펫푸드 제품에 대한 직접적인 제품 매출까지 발생 예정으로 종료 후 매출 성과 달성에 무리가 없을 것으로 예상됨.

| 전자세금계산서 | | | | 수출신고필증(수출이행, 감지) | | | | 수출신고필증(수출이행, 감지) | | | | 수출신고필증(수출이행, 감지) | | | | | |
|----------------------|-------------------|-----------------------------|----------------|----------------------|-------------------|----------------|-----------|----------------------|-------------------|----------------|--------------------|----------------------|-------------------|----------------|-----------|-----------|--------------|
| 등록번호 124-81-14283 | 주식회사 홈택스 | 주소 경기도 화성시 양감면 철문순산로 230 | 대표 김석진, 장재구 | 등록번호 502-26-74750 | 주식회사 홈택스 | 주소 충청남도 당진시 | 대표 안수현 | 등록번호 502-26-74750 | 주식회사 홈택스 | 주소 충청남도 당진시 | 대표 안수현 | 등록번호 502-26-74750 | 주식회사 홈택스 | 주소 충청남도 당진시 | 대표 안수현 | | |
| 발행일자 2023-06-21 | 공급가액 4,550,000 | 세액 455,000 | 대당없음 | 발행일자 2023-06-21 | 공급가액 4,550,000 | 세액 455,000 | 대당없음 | 발행일자 2023-06-21 | 공급가액 4,550,000 | 세액 455,000 | 대당없음 | 발행일자 2023-06-21 | 공급가액 4,550,000 | 세액 455,000 | 대당없음 | | |
| 월 | 일 | 품목 | 규격 | 수량 | 단가 | 공급가액 | 세액 | 비고 | 월 | 일 | 품목 | 규격 | 수량 | 단가 | 공급가액 | 세액 | 비고 |
| 06 | 21 | 닥터타이 강아지 프로바이오틱스 산 | 2g*30개 | 500 | 9,100 | 4,550,000 | 455,000 | | 06 | 21 | 닥터타이 강아지 프로바이오틱스 산 | 2g*30개 | 500 | 9,100 | 4,550,000 | 455,000 | |
| 합계금액 | | | | 한금 | 수표 | 어음 | 외상미수금 | 이 과반율 (해구) 환 | 합계금액 | | | | 한금 | 수표 | 어음 | 외상미수금 | 이 과반율 (해구) 환 |
| | | | | | | | 5,005,000 | | | | | | | | | 5,005,000 | |

그림 65. 제품 매출 증빙 (국내 1건, 수출 3건)

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

- SCI 논문 게재 3건((재)농축산용미생물산업육성지원센터)
- 국내 학술대회 발표 5건(우진비앤지(주) 1건, (재)농축산용미생물산업육성지원센터 4건)
- 특허 출원 2건
- 고용창출 17명(우진비앤지(주) 8명, (재)농축산용미생물산업육성지원센터 9명)
- 인력양성 2명((재)농축산용미생물산업육성지원센터)
- 박람회 홍보 부스 운영 11건, 제품 설명회 개최 1건, 월간잡지 기사 1건
- 기술실시(이전) : 직접실시 3건
- 제품등록 3건
- 국내 매출 : 4,550 (천원), 해외 수출 : 11,325(달러)

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

| 성과지표명 | 연도 | 1단계 (2022~2023) | | 계 | 가중치 (%) | |
|-------------------------------|----------|-----------------|--------|--------|---------|-----|
| | | 목표(단계별) | 실적(누적) | | | |
| 전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾ | 논문 | 목표(단계별) | 2 | 2 | | |
| | | 실적(누적) | 3 | 3 | | |
| | 논문평균IF | 목표(단계별) | 2 | 2 | 2 | 10 |
| | | 실적(누적) | 2.875 | 2.875 | 2.875 | 10 |
| | 특허 | 목표(단계별) | 2 | 2 | 2 | 10 |
| | | 실적(누적) | 2 | 2 | 2 | 10 |
| 연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾ | 기술실시(이전) | 목표(단계별) | 0 | 0 | 0 | |
| | | 실적(누적) | 3 | 3 | 3 | |
| | 제품화 | 목표(단계별) | 2 | 2 | 2 | 20 |
| | | 실적(누적) | 3 | 3 | 3 | 20 |
| | 매출액 | 목표(단계별) | 10,000 | 10,000 | 10,000 | 20 |
| | | 실적(누적) | 19,415 | 19,415 | 19,415 | 20 |
| | 고용창출 | 목표(단계별) | 2 | 2 | 2 | 10 |
| | | 실적(누적) | 17 | 17 | 17 | 10 |
| | 인력양성 | 목표(단계별) | 1 | 1 | 1 | 10 |
| | | 실적(누적) | 2 | 2 | 2 | 10 |
| | 학술발표 | 목표(단계별) | 2 | 2 | 2 | 10 |
| | | 실적(누적) | 5 | 5 | 5 | 10 |
| | 홍보전시 | 목표(단계별) | 2 | 2 | 2 | 10 |
| | | 실적(누적) | 13 | 13 | 13 | 10 |
| | 계 | 목표(단계별) | | | | 100 |
| 실적(누적) | | | | | 100 | |

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도, 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표 >

| 평가 항목 (주요성능 ¹⁾) | 단위 | 전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%) | 세계 최고 | | 연구개발 전 국내 성능수준 | 연구개발 목표치 | 목표설정 근거 | |
|-----------------------------|-----|-----------------------------------|----------|--------------|------------------------|------------------------|---------------------------|---|
| | | | 보유국/보유기관 | 성능수준 | 성능수준 | 1단계 (2022~2023) | | |
| 1 | 사균체 | cell/g | 100 | 미국 / alltech | 10 ⁸ cell/g | 10 ⁶ cell/g | 10 ⁹ cell/g 이상 | 현재 공정 기술로 균주에 따라 10 ¹⁰ ~ 10 ¹¹ cell/g 사균체 원료 생산 가능 (한국의과학연구원) |

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

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

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

| 번호 | 논문명 | 학술지명 | 주저자명 | 호 | 국명 | 발행기관 | SCIE 여부 (SCIE/비SCIE) | 게재일 | 등록번호 (ISSN) | 기여율 |
|----|--|-------------------------|------|-------|------|---------------------|----------------------|-------------|-------------|-----|
| 1 | Complete genome sequence of <i>Pediococcus acidilactici</i> CACC 537 isolated from canine | JAST | 김정애 | 65(5) | 대한민국 | 한국축산 학회지 | SCIE | 2023.09.30. | 2055-0391 | 100 |
| 2 | Anti-inflammatory potential via the MAPK signaling pathway of <i>Lactobacillus</i> spp. isolated from canine feces | PLOS ONE | 박미애 | | 미국 | PLOS | SCIE | 2024.03.27. | 1932-6203 | 100 |
| 3 | Characterization of feline-originated probiotics <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CACC612 and <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CACC789 and evaluation of their host response | BMC veterinary research | 장현준 | 20(1) | 영국 | BioMed Central, BMC | SCIE | 2024.04.01. | 1746-6148 | 100 |

국내 및 국제 학술회의 발표

| 번호 | 회의 명칭 | 발표자 | 발표 일시 | 장소 | 국명 |
|----|--|----------|------------|--------|-------|
| 1 | The 19 th AAAP (Asian-Australasian Association of Animal Production) Animal Science Congress | 이성호 외 7인 | 2022.08.23 | 제주도 | 대한민국 |
| 2 | The 19 th AAAP (Asian-Australasian Association of Animal Production) Animal Science Congress | 김양선 외 4인 | 2022.08.23 | 제주도 | 대한민국 |
| 3 | American Society for Microbiology Conference 2023 (ASM Microbe 2023) | 박미애 외 4인 | 2023.06.17 | 휴스턴 | 미국 |
| 4 | 16 th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut microbiota and Health (IPC 2023) | 김양선 외 4인 | 2023.06.20 | 브라티슬라바 | 슬로바키아 |
| 5 | 2023 International Meeting of the Microbiological Society of Korea (2023 MSK) | 박미애 외 5인 | 2023.10.26 | 여수 | 대한민국 |

기술 요약 정보

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

보고서 원문

| 연도 | 보고서 구분 | 발간일 | 등록 번호 |
|----|--------|-----|-------|
| | | | |

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

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

[기술적 성과]

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

| 번호 | 지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재) | 국명 | 출원 | | | | 등록 | | | 기여율 | 활용 여부 |
|----|--|------|--|------------|-----------------|----------|-----|-----|----------|-----|----------|
| | | | 출원인 | 출원일 | 출원 번호 | 등록 번호 | 등록인 | 등록일 | 등록 번호 | | |
| 1 | 락토바실러스 람노시스 CACC 612 균주 및 비티도박테리움 애니멀리스 CACC 789 균주의 사균체를 포함하는 반려동물 사료 조성물 | 대한민국 | 이성호, 황영민, 김동욱, 박영빈, 강재구, 김양선, 박미애, 장현준 | 2023.12.19 | 10-2023-0185801 | | | | | 100 | 활용 |
| 2 | 항균활성을 갖는 락토바실러스 루테리 LBR_C1 균주 및 락토바실러스 아시도필루스 LBA_C5 균주의 사균체 및 이의 제조방법 | 대한민국 | 이성호, 황영민, 김동욱, 박영빈, 강재구 | 2023.12.28 | 10-2023-0194998 | | | | | 100 | 활용 |

○ 지식재산권 활용 유형

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

| 번호 | 제품화 | 방어 | 전용실시 | 통상실시 | 무상실시 | 매매/양도 | 상호실시 | 담보대출 | 투자 | 기타 |
|----|-----|----|------|------|------|-------|------|------|----|----|
| 1 | √ | | | | | | | | | |
| 2 | √ | | | | | | | | | |

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

| 번호 | 저작권명 | 창작일 | 저작자명 | 등록일 | 등록 번호 | 저작권자명 | 기여율 |
|----|------|-----|------|-----|-------|-------|-----|
| | | | | | | | |

□ 신기술 지정

| 번호 | 명칭 | 출원일 | 고시일 | 보호 기간 | 지정 번호 |
|----|----|-----|-----|-------|-------|
| | | | | | |

□ 기술 및 제품 인증

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

□ 표준화

○ 국내 표준

| 번호 | 인증구분 ¹⁾ | 인증여부 ²⁾ | 표준명 | 표준인증기구명 | 제안주체 | 표준종류 ³⁾ | 제안/인증일자 |
|----|--------------------|--------------------|-----|---------|------|--------------------|---------|
| | | | | | | | |

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

| 번호 | 표준화단계구분 ¹⁾ | 표준명 | 표준기구명 ²⁾ | 표준분과명 | 의장단 활동여부 | 표준특허 추진여부 | 표준개발 방식 ³⁾ | 제안자 | 표준화 번호 | 제안일자 |
|----|-----------------------|-----|---------------------|-------|-------------|--------------|--------------------------|-----|-----------|------|
| | | | | | | | | | | |

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

| 번호 | 시제품명 | 출시/제작일 | 제작 업체명 | 설치 장소 | 이용 분야 | 사업화 소요 기간 | 인증기관 (해당 시) | 인증일 (해당 시) |
|----|-------------------|-------------|------------|-------|-----------------|-----------|-------------|------------|
| 1 | Dr.Tummy | 2022.08.25. | 우진비앤지 주식회사 | - | 반려견 사료첨가제 (영양제) | 1년 | - | - |
| 2 | 트리플락토 for dog | 2022.09.15. | 우진비앤지 주식회사 | - | 반려견 펫푸드 첨가제 | 1년 | - | - |
| 3 | 반려견 간식 4종(제품명 미정) | 2022.10.21. | 바우와우 코리아 | - | 반려견 간식 | 2년 | - | - |

□ 기술 실시(이전)

| 번호 | 기술 이전 유형 | 기술 실시 계약명 | 기술 실시 대상 기관 | 기술 실시 발생일 | 기술료 (해당 연도 발생액) | 누적 징수 현황 |
|----|----------|--|-------------|-------------|-----------------|----------|
| 1 | 직접실시 | 닥터터미 강아지 프로바이오틱스 산(Dr. Tummy Probiotics for dogs (powder)) | 우진비앤지(주) | 2023.08.25. | 0 | 0 |
| 2 | 직접실시 | 닥터터미 고양이 프로바이오틱스 산(Dr. Tummy Probiotics for cats (powder)) | 우진비앤지(주) | 2023.08.25. | 0 | 0 |
| 3 | 직접실시 | 닥터터미 강아지 프로바이오틱스 정, Dr. Tummy Probiotics for dogs (tablet) | 우진비앤지(주) | 2023.11.30. | 0 | 0 |

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

| 번호 | 사업화 방식 ¹⁾ | 사업화 형태 ²⁾ | 지역 ³⁾ | 사업화명 | 내용 | 업체명 | 매출액 | | 매출 발생 연도 | 기술 수명 |
|----|----------------------|----------------------|------------------|--|---------|------------|-----------|---------|----------|-------|
| | | | | | | | 국내 (천원) | 국외 (달러) | | |
| 1 | 자기실시 | 신제품개발 | 국내, 국외 | 닥터터미 강아지 프로바이오틱스 산(Dr. Tummy Probiotics for dogs (powder)) | 보조사료 등록 | 우진비앤지 주식회사 | 4,550,000 | 1,640 | 2023 | 10년 |
| 3 | 자기실시 | 신제품개발 | 국내, 국외 | 닥터터미 고양이 프로바이오틱스 산(Dr. Tummy Probiotics for cats (powder)) | 보조사료 등록 | 우진비앤지 주식회사 | | 5,330 | 2023 | 10년 |
| 3 | 자기실시 | 신제품개발 | 국내, 국외 | 닥터터미 강아지 프로바이오틱스 정, Dr. Tummy Probiotics for dogs(tablet) | 보조사료 등록 | 우진비앤지 주식회사 | | 4,355 | 2023 | 10년 |

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

| 사업화명 | 발생 연도 | 매출액 | | 합계 | 산정 방법 |
|--|-------|-----------|--------|------------|-------------|
| | | 국내(천원) | 국외(달러) | | |
| 닥터터미 강아지 프로바이오틱스 산(Dr. Tummy Probiotics for dogs (powder)) | 2023 | 4,550,000 | 1,640 | 6,775,644 | 매출원장, 세금계산서 |
| 닥터터미 고양이 프로바이오틱스 산(Dr. Tummy Probiotics for cats (powder)) | 2023 | | 5,330 | 7,001,980 | 매출원장, 세금계산서 |
| 닥터터미 강아지 프로바이오틱스 정, Dr. Tummy Probiotics for dogs(tablet) | 2023 | | 4,355 | 5,637,916 | 매출원장, 세금계산서 |
| 합계 | | 4,550,000 | 11,325 | 19,415,540 | |

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

| 성과 | | 반려동물 유래 유산균 사균체를 활용한 포스트바이오틱스 소재 개발 | | | |
|--------------------------------|-------------|--|---------|---------|--------|
| 사업화 계획 | 사업화 소요기간(년) | 2년 | | | |
| | 소요예산(천원) | | | | |
| | 예상 매출규모(천원) | 현재까지 | 3년 후 | 5년 후 | |
| | | 19,415 | 100,000 | 500,000 | |
| | 시장 점유율 | 단위(%) | 현재까지 | 3년 후 | 5년 후 |
| | | 국내 | 0.0001 | 0.0002 | 0.0002 |
| 국외 | | - | - | - | |
| 향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획 | | 반려동물용 영양제 외 본 과제를 통해 개발한 포스트바이오틱스 소재를 활용한 반려동물용 사료, 간식 등의 다양한 반려동물용 펫푸드 개발 및 판매 예정 | | | |
| 무역 수치 개선 효과(천원) | 수입대체(내수) | 현재 | 3년 후 | 5년 후 | |
| | | - | 50,000 | 100,000 | |
| | 수출 | | 30,000 | 50,000 | |

□ 고용 창출

| 순번 | 사업화명 | 사업화 업체 | 고용창출 인원(명) | | 합계 |
|----|-------------|---------------------|------------|-------|----|
| | | | 2022년 | 2023년 | |
| 1 | 닥터터미 시리즈 3건 | 우진비앤지 주식회사 | 1 | 7 | 8 |
| 2 | 닥터터미 시리즈 3건 | (재)농축산용미생물 산업육성지원센터 | 7 | 2 | 9 |
| 합계 | | | 8 | 9 | 17 |

□ 고용 효과

| 구분 | | | 고용 효과(명) |
|-------|------|------|----------|
| 고용 효과 | 개발 전 | 연구인력 | 13 |
| | | 생산인력 | 14 |
| | 개발 후 | 연구인력 | 14 |
| | | 생산인력 | 17 |

□ 비용 절감(누적)

| 순번 | 사업화명 | 발생연도 | 산정 방법 | 비용 절감액(천원) |
|----|------|------|-------|------------|
| | | | | |
| 합계 | | | | |

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

산업 지원(기술지도)

| 순번 | 내용 | 기간 | 참석 대상 | 장소 | 인원 |
|----|----|----|-------|----|----|
| | | | | | |

기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

법령 반영

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

정책활용 내용

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

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

전문 연구 인력 양성

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

산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

| 번호 | 중앙행정기관명 | 사업명 | 연구개발과제명 | 연구책임자 | 연구개발비 |
|----|---------|-----|---------|-------|-------|
| | | | | | |

□ 국제화 협력성과

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

□ 홍보 실적

| 번호 | 홍보 유형 | 매체명 | 제목 | 홍보일 |
|----|----------|------------------------------|---|----------------------|
| 1 | 월간잡지 | 축산신문 | 우진비앤지, 오산대와 반려동물 산업 '산학협력' | 2022.10.21. |
| 2 | 전시회 참석 | Pet Fair south east Asia | 부스설치 | 2022.10.26. ~ 28 |
| 3 | 전시회 참석 | EuroTier 2022 | 부스설치 | 2022.11.15. ~ 18 |
| 4 | 전시회 참석 | Viv Asia 2023 | 부스설치 | 2023.03.08. ~ 10 |
| 5 | 전시회 참석 | 메가주 2023 | 부스설치 | 2023.05.19. ~ 21 |
| 6 | 전시회 참석 | Asean K-Pet Food Fair | 부스설치 | 2023.05.26. ~ 27 |
| 7 | 제품설명회 개최 | 제품설명회 | 개, 고양이 유래 유산균 사균체를 포함한 반려동물 영양제 Dr. Tummy (for dog, for cat) 제품 설명회 | 2023.06.07. |
| 8 | 전시회 참석 | VIV TURKEY 2023 | 부스설치 | 2023.07.06. ~ 08 |
| 9 | 전시회 참석 | SUPERZOO 2023 | 부스설치 | 2023.08.16. ~ 18 |
| 10 | 전시회 참석 | Pet Fair southeast Asia 2023 | 부스설치 | 2023.10.25. ~ 27 |
| 11 | 전시회 참석 | VIV MEA 2023 | 부스설치 | 2023.11.20. ~ 22 |
| 12 | 전시회 참석 | Livestock Malaysia 2023 | 부스설치 | 2023.11.29. ~ 12.01. |
| 13 | 전시회 참석 | IPPE 2024 | 부스설치 | 2024.01.30. ~ 02.01. |

□ 포상 및 수상 실적

| 번호 | 종류 | 포상명 | 포상 내용 | 포상 대상 | 포상일 | 포상 기관 |
|----|----|-----|-------|-------|-----|-------|
| | | | | | | |

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

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

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

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

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

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

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

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

2) 목표 달성 수준

| 추진 목표 | 달성 내용 | 달성도(%) |
|--------------------------|--|--------|
| ○ 사균체 원료화 2건 이상 | ○ 사균체 원료화 4건 달성 | ○ 100% |
| ○ 반려견 20마리 임상 결과 | ○ 반려견 임상 시험 완료 | ○ 100% |
| ○ 반려견 20마리 혈액 지표 결과 | ○ 반려견 혈액 지표 결과 | ○ 100% |
| ○ 반려견 20마리 분변 마이크로바이옴 결과 | ○ 반려견 분변 마이크로바이옴 분석 결과 | ○ 100% |
| ○ 반려견 제품군 리스트 선정 | ○ 반려견 제품군 리스트 선정 | ○ 100% |
| ○ 반려견 시제품 2건 이상 | ○ 시제품 제작 2건 달성 | ○ 100% |
| ○ 반려묘 20마리 임상 결과 | ○ 반려묘 20마리 임상 결과 | ○ 100% |
| ○ 반려묘 20마리 혈액 지표 결과 | ○ 반려묘 20마리 혈액 지표 결과 | ○ 100% |
| ○ 반려묘 20마리 분변 마이크로바이옴 결과 | ○ 반려묘 분변 마이크로바이옴 분석 결과 | ○ 100% |
| ○ 반려묘 제품군 리스트 선정 | ○ 반려묘 제품군 리스트 선정 | ○ 100% |
| ○ 반려묘 시제품 2건 이상 | ○ 시제품 제작 2건 달성 | ○ 100% |
| ○ 제품 허가 및 등록증 | ○ 제품 3건 등록 | ○ 100% |
| ○ 제품등록, 마케팅 홍보자료, 박람회 참석 | ○ 국내외 박람회 홍보 부스 운영(11건) ○ 홍보기사 작성 (1건) ○ 대리점 연구 성과 홍보 설명회 (1건) | ○ 100% |

4. 목표 미달 시 원인분석(해당사항없음)

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 본 연구를 통해 반려동물에서 분리한 프로바이오틱스 균주의 사균화를 통해 포스트바이오틱스로서의 가능성을 확인 할 수 있었으며 이는 향후 관련 분야에 적용 가능한 신규 미생물 자원을 확보하는 중요한 연구가 됨. 사균화(틴달화) 균주에 대해 유전체 기술을 활용하여 반려견, 반려묘에 급여 시 장내 마이크로바이옴 및 관련 대사체의 발현 변화를 확인하였으며, 이를 통해 사균체(포스트바이오틱스)의 체내 작용 및 장 건강 개선에 대한 기초원천 기술을 확보하였음.
 - 본 연구 결과를 통해 프로바이오틱스로서 우수한 효능을 보인 LBR_C1, LBA_C5, CACC612, CACC789 등 균주의 사균화 공정 및 대량생산공정을 개발하여 포스트바이오틱스의 생산성 향상 및 제작 단가, 안정성 등 신규 분리 균주의 사업화에 있어 기술 개발 사례와 기준 제시로 사용 될 수 있고, 이를 통해 경제·산업적 측면으로도 많은 효과를 기여함
 - 그동안 반려동물, 특히 반려묘에 대한 효능평가는 실험묘 품종 및 고양이의 생리적 특성에 맞는 사육 시스템 가이드라인의 부재로 거의 실험이 이루어지지 못했으나, 지역 거점 동물병원을 이용한 임상 후보군 모집, 소유주와의 실험 동의서 작성 등 반려동물 임상시험의 사례 및 기준으로 활용 될 수 있음.
 - 사균체를 활용한 포스트바이오틱스 제품은 기존 프로바이오틱스 제품이 갖는 안정성 문제가 해결되어 제조 및 유통 안전성이 확보되어 반려동물 영양제 뿐만 아니라 다양한 펫푸드 제품에 활용 될 수 있음.
 - 고농도의 사균화 원료 확보 기술 확보로 경제동물의 응용에 의한 기술이전 및 원료 판매로 경제적 이익을 거둘 수 있을 것으로 판단되며, 본 연구팀은 이전 포스트게놈다부처유전체사업 연구과제를 통해서 획득한 관련 등록특허 2건 이상을 보유하고 있으며 향후 관련 사업에 응용할 수 있는 기초를 확립함.
 - 향후 관련 기반기술개발 사업을 계획할 시에 본 연구를 통해 발굴된 미생물을 활용하는 방안 등의 검토가 이루어질 수 있으며, 반려동물의 미생물 유전체, 장내 대사체, 마이크로바이옴 연구를 하는 분야에 있어서도 핵심적인 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대됨.
 - 본 연구를 통해서 국내 반려동물업계에 선진 기술개념을 적용함으로써 향후 항생제 다제내성균 및 항생제 대체제, 장내 미생물 기반 소화계 질병 예방 및 치료와 같은 관련기술 개발과 데이터베이스 구축에 유용하게 활용될 수 있음.
 - 본 연구를 통해 양성된 인력들에게는 관련 학문의 상호 발전과 사균화(틴달화) 기술 확보, 미생물 안정성 향상기술과 같은 미생물 분야의 고급인력 창출 및 NGS기반 유전체학, 장내 미생물 생태계 균형 분야의 고급인력창출로 관련 산업 발전 및 고용창출효과 등 경제적 파급효과에도 큰 도움이 될 것으로 사료됨.
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 본 연구과제를 통해 특허 2건 출원되어 있으며, 등록 심사를 통해 특허 등록하여 본 연구과제 성과의 진보성, 독창성을 인정 받을 예정임.
- 본 연구 성과는 포스트바이오틱스 영역을 반려동물로 확장시킨 사례로 국내를 비롯한 선진국에서도 좋은 반응을 이끌어 내고 있으며, 과제 종료 후에도 지속적인 해외 박람회 참석 및 신규 거래처 발굴을 진행 중에 있음.
- 세계적으로 나날이 커져가고 있는 반려동물 산업에 대응하기 위해 본 연구기관에서는 원료 및 사료첨가제를 지속적으로 개발 및 개선 중에 있으며, 연구개발 성과인 포스트바이오틱스 공정을 더욱 최적화 하여, 자회사 오에스피의 유기농 사료 라인, 손자회사 바우와 우크리아의 사료 및 간식 라인에도 포스트바이오틱스를 활용한 제품군을 지속적으로 개발 중에 있음.
- 본 연구성과인 포스트바이오틱스는 원료 소재로서 직접적인 매출액은 크지 않으나 연관 산업에서의 매출액은 원료 매출 대비 10배 이상 계산 될 수 있으며, 자회사와 손자회사의 사료 및 간식 라인업 사업화 이후 매출액이 폭발적으로 성장할 것으로 예상됨.
- 본 과제의 과제 종료 후 매출 목표는 최소한의 매출액 수준을 기재한 것으로 현재까지 성과에 대한 마케팅 결과 실질적인 집계 후에는 이보다 더 높은 수준의 성과를 달성 할 수 있을 것으로 예상됨.
- 해외를 중심으로 동물용 프로바이오틱스에 대해 인체용 수준으로 관리기준을 상향 시키는 움직임이 있으며, 프로바이오틱스 계열인 포스트바이오틱스 또한 마찬가지로 예상됨. 이에 본 연구성과에 대해 인체 수준의 안전성 시험 및 자료들을 확보하고 있으며, 상향되어가는 기준에 맞게 보완할 예정임.

< 연구개발성과 활용계획표 >

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

주 의

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